

西南地区水稻细菌性条斑病菌 的遗传多样性分析

林琳^{1,2}, 姬广海^{2*}, 马改转², 王永吉², 张丽辉²

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学 教育部农业生物多样性与病虫害控制重点实验室, 云南 昆明 650201)

摘要: 选取云南、贵州、四川不同省市地区的水稻条斑病菌菌株 141 株, 利用 Rep-PCR 技术筛选出多态性较好的引物对其 DNA 进行多态性分析。引物 J3、ERIC、JELIR 的扩增多态性较好, 不同毒性菌株间的 Rep-PCR 指纹图谱差异很大。通过聚类分析显示, 我国西南地区的水稻细菌性条斑病菌群体遗传分化明显, 菌株的遗传族群与其致病性具有一定的相关性, 强、中、弱毒性菌株大致归为不同的类群。因此, Rep-PCR 技术可用于检测水稻细菌性条斑病菌的遗传变异与鉴定研究。

关键词: 水稻细菌性条斑病菌; 小种; 遗传多样性; Rep-PCR

中图分类号: S435.111.4⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)02-0264-06

Genotypic Diversity Analysis of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in Southwest China by Rep-PCR

LIN Lin^{1,2}, JI Guang-hai^{2*}, MA Gai-zhuan², WANG Yong-ji², ZHANG Li-hui²

(1. College of Agronomy and Biotechnology, YAU, Kunming 650201, China 2. Key Laboratory of Agricultural Biodiversity and Pests Control, Ministry of Education, YAU, Kunming 650201, China)

Abstract: The genetic diversity of 141 strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* from Yunnan, Guizhou and Sichuan provinces was analyzed polymorphously by Rep-PCR. Primer J3, ERIC and JELIR had better amplified polymorphism, different toxicity strains of the Rep-PCR fingerprints varied widely. Cluster analysis showed that significant genetic diversity exists within the population of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* in Southwest China. There was a high degree of correlation between the genetic strains populations of and their pathogenicity. Strains of strong, middle or weak toxicity were roughly classified into different genetic populations. The result suggests that Rep-PCR technique can be used for detecting genetic variation among strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* and identification of strains.

Key words: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*; race; genetic diversity; Rep-PCR

水稻细菌性条斑病由水稻黄单胞菌稻生致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *oryzicola*)引起, 对水稻生产造成严重损失, 特别是对我国华南稻区的籼稻危害较重^[1-3]。制定病害的长期治理策略需要了解病原体的群体遗传结构及变化机制。Rep-PCR 技术已广泛应用于植物病原细菌分析、检测及群体

收稿日期: 2010-11-08 修回日期: 2011-02-15

基金项目: 国家自然科学基金项目(30760139)和农业部公益性行业科研专项(3-23)

作者简介: 林琳(1982-), 女, 硕士生, 主要从事植物病原细菌检测研究, E-mail: linlin649@sohu.com; * 通讯作者: 姬广海, 教授, 博士, E-mail: jghai001@yahoo.com.cn。

遗传多样性分析。通过 PCR 扩增,比较菌株间的指纹图谱,可快速区分病原细菌种、亚种(致病变种)以及相同致病变种内菌株间的差异,揭示病原物群体的遗传多样性,为病菌的分子监测和诊断提供科学依据^[4-8]。

目前,已报道的短重复序列有 REP 序列、ERIC 序列、BOX 序列等^[9-11]。这类短重复序列广泛分布在原核生物,特别是细菌基因组内基因间区域,在维持基因组的 DNA 结构和进化变异方面起着重要的作用。利用与其序列同源的 REP、BOX、ERIC、J3 等引物,结合 PCR 技术,选择性扩增不同的基因组区域并根据 DNA 指纹,能在种、亚种、小种(致病型)和菌株水平上进行细菌的鉴定,了解其遗传多样性,明确病原细菌致病型间的系统发育关系。姬广海等^[5]利用 Rep-PCR 技术采用 ERIC 和 BOX 两引物对水稻细条斑病菌、李氏禾条斑病菌等代表菌株进行了分析,但不能代表当前西南地区的水稻细菌性条斑病菌的遗传分化情况。

本文采用 Rep-PCR DNA 指纹技术,利用 JELIE、BOX、ERIC、J3、TX 等引物,对来自西南地区的云南、贵州、四川不同省市的有代表性的 141 株水稻细菌性条斑病菌进行多态性分析,比较主要生理小种菌株间的遗传差异,以期探索利用分子标记方法在生产上进行水稻细菌性条斑病菌小种鉴定和遗传分化的可行性。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

选取云南、贵州、四川不同省市地区的代表性水稻条斑病菌菌株 141 株。所有菌株经单菌落纯化,液体保存在 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的低温冰箱中。接种时,活化菌株,于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 2 d,用无菌水洗下菌苔,接种菌液浓度为 $3 \times 10^8\text{ CFU/mL}$ 。

1.2 菌株基因组 DNA 的提取

采用李德葆^[12]报道的细菌基因组 DNA 提取方法,对 141 株水稻细菌性条斑病菌进行细菌总 DNA 的提取。

1.3 Rep-PCR

1.3.1 引物序列 所用的 5 对引物序列详见表 1。

表 1 引物序列及退火温度
Tab.1 Primers sequence and annealing temperature

引物名称 Primer	引物序列(5'→3') Primers sequence	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
BOX	CTA CGG CAA GGC GAC GCT GAC G	51
J3	GCT CAG GTC AGG TCG CCT GG	36
ERIC	ERIC1R: ATG TAA GCT CCT GGG GAT TCA C ERIC2: AAG TAA GTG ACT GGG GTG AGG G	49
TX	TX1: TGT AGT GGA CCT TCG AA TX2: ACG AGG GAT TGA TCA TG	38
JELIR	JELIR1: CGA GTC CAG TCC AGC GGA GG JELIR2: GCG GGG AGC TTC AGA AGA GG	36

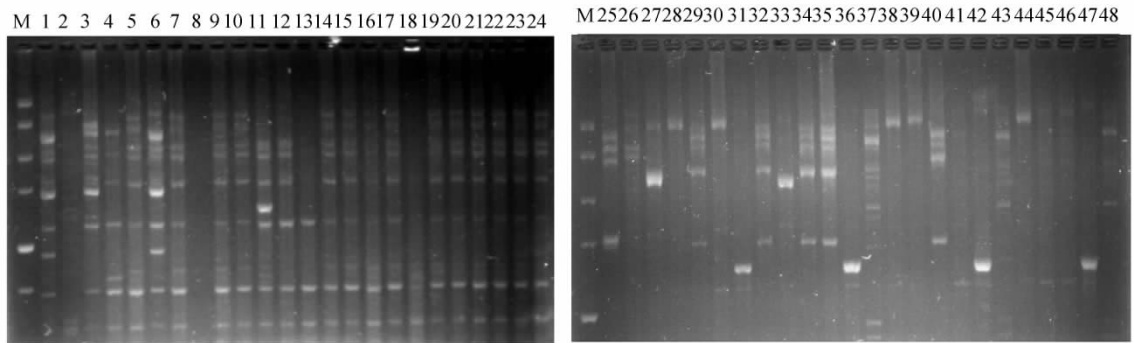
1.3.2 PCR 扩增条件 总反应体积为 $25\text{ }\mu\text{L}$,其中 $10 \times\text{ PCR buffer}$ (Tris - HCl 100 mmol/L , pH 8.3; KCl 500 mmol/L ; MgCl_2 15 mmol/L) $2.5\text{ }\mu\text{L}$, $2.5\text{ mmol/L dNTP Mixture}$ $2\text{ }\mu\text{L}$, Taq 酶 2.5 U ,每个引物 10 pmol ,模板 DNA $20 \sim 50\text{ ng}$ 。PCR 扩增程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min , $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min , $36 \sim 51\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min , $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 8 min , 30 个循环,最后 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 15 min 。扩增产物于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.3.3 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物每个样品取 $5\text{ }\mu\text{L}$,于 17 g/L 琼脂糖凝胶(含核酸染料)在 TBE 缓冲液中稳压 80 V 3 h 左右进行检测,置于 Image Master 紫外成像系统(Pharmacia Biotech)成像。

1.3.4 电泳结果记录及聚类方法 依照琼脂糖凝胶电泳图谱,根据电泳条带的有无,分别记为“1”和“0”,并将结果制成 0/1 Excel 表。用统计软件 Statistic 聚类分析方法中的 UPGMA(非加权平均法)及 Percent disagreement 方法,得到样本的相似性聚类图。

1.4 致病性测定

选取已知抗病基因的水稻 6 个近等基因系材料: IRBB5、IR24、IRBB14、IRBB4、IRBB21、IRBB18 作为鉴别品种。在水稻的孕穗期,以菌悬液浓度为 3×10^8 CFU/mL,采用针刺法接种平展的剑叶中部叶脉两侧,每一处理至少接种 10 片叶。接种 21 d 后测量病斑的长度,取平均值作为衡量菌株致病力的尺度,病斑小于或等于 1 cm 的划分为抗病反应(R),病斑大于 1 cm 的划分为感病反应(S)。根据各菌株在 6 个鉴别品种上的致病性反应,分析 141 个水稻条斑病菌菌株的致病型。



M: DL5000 DNA Maker; 1: YJ4; 2: YJ18; 3: YJ13; 4: AB2; 5: YM4; 6: YJ5; 7: 细 72; 8: YM9; 9: YM12; 10: YM26; 11: 细 59; 12: 细 14; 13: 细 7; 14: YM13; 15: YM7; 16: YM8; 17: YM3; 18: 细 75; 19: YM2; 20: YM14; 21: YM15; 22: YM24; 23: YM25; 24: YM27; 25: AB4; 26: EF6; 27: LF3; 28: YM5; 29: CD4; 30: YM22; 31: EF2; 32: YJ8; 33: EF10; 34: YJ16; 35: YJ4; 36: CD2; 37: YJ1; 38: YM28; 39: YM1; 40: YJ3; 41: 细 50; 42: 细 73; 43: YJ17; 44: YM11; 45: 细 64; 46: 细 66; 47: 细 56; 48: EF1。

图1 引物 J3 的 PCR 指纹图谱
Fig. 1 The genomic fingerprinting form in J3 - PCR

2 结果与分析

2.1 Rep - PCR 指纹图谱和聚类分析

用 5 对引物对 141 株水稻细菌性条斑病菌的 DNA 进行扩增,引物 J3、ERIC、JELIR 的扩增多态性非常好,扩增条带从 1 至 12 条不等。代表性引物 J3、ERIC、JELIR 扩增的部分条带见图 1、图 2、图 3。引物 J3 的图谱中,所测试的菌株共有 37 种不同谱型,来自同一地区菌株的指纹图谱相似程度高,也有部分差异;引物 ERIC 的扩增图谱包含 12 种不同谱型,来自同一地区的菌株的指纹图谱有较高的相似性;引物 JELIR 的扩增指纹有 28 种谱型,对于不同地区的菌株的谱型有相似也有差别。

对所有的扩增图谱数据进行对比,选出比较有代表性的菌株谱型进行综合聚类分析,结果见图 4。从图 4 可看出,按不同遗传距离可划分为不同的遗传相似组,在遗传距离为 0.12 时,可以将 43 个有代表性的细菌性条斑病菌株分为 10 个遗传相似组,其中



M: DL5000 DNA Maker; 1: YJ15; 2: 细 54; 3: YJ10; 4: YJ11; 5: YJ12; 6: YJ14; 7: YM14; 8: YM15; 9: YM19; 10: YM21; 11: YM23; 12: YM24; 13: YM25; 14: YM27; 15: YM29; 16: YM30; 17: AB6; 18: CD1; 19: EF1; 20: EF2; 21: EF5; 22: EF6; 23: EF9; 24: EF10。

图2 引物 ERIC 的 PCR 指纹图谱
Fig. 2 The genomic fingerprinting form in ERIC - PCR

第 4、7、9、10 组为主要族群; 第 9 组由 14 个菌株组成; 第 10 组有 8 个菌株; 第 4 组包括 8 个菌株; 第 7 组由 6 个菌株组成。

2.2 水稻细菌性条斑病菌的致病型多样性

依据水稻细菌性条斑病菌在 6 个鉴别品种上的反应, 进行致病性分化研究。结果表明, 141 个菌株有 21 个小种互作模式(表 2)。依据抗感病反应情况和发病程度, 可以将菌株大致划分为三大类: 强毒性菌株、中毒性菌株和弱毒性菌株。病斑长度在 3 cm 以上, 有 5 个及 5 个以上鉴别品种都发病的菌株称为强度性菌株; 病斑长度在 1.5 ~ 3 cm, 有 3 个及 3 个以上的鉴别品种都发病的菌株称为中度性菌株; 病斑长度在 1.5 cm 以下, 有 2 个及 2 个以下的鉴别品种发病的菌株称为弱毒性菌株。

2.3 遗传族群与小种相关性

从 Rep-PCR 扩增图谱上可以看出, 不同小种的部分代表菌株在图谱上存在明显的差异: 小种 19 的代表菌株 LF3(27 泳道)、EF10(33 泳道) 与小种 18 的代表菌株 EF6(26 泳道) 有明显差异(图 1, 引物 J3); 小种 4 的代表菌株 YJ10(3 泳道) 与小种 11 的代表菌株 CD1(18 泳道)、EF2(20 泳道) 有明显差异(图 2, 引物 ERIC); 小种 1 的代表菌株 YM14(11 泳道)、YM15(12 泳道) 与小种 14 的代表菌株 LF2(4 泳道) 有明显差异(图 3, 引物 JELIR)。

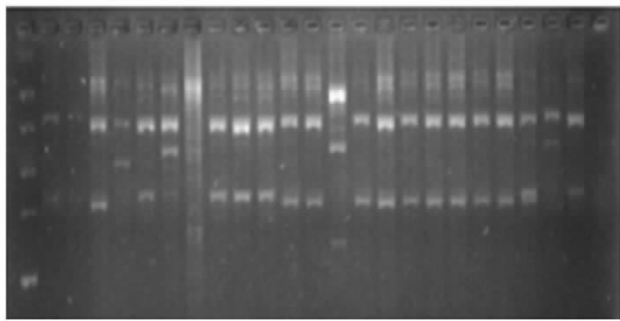
当遗传距离为 0.12 时, 所分族群与菌株所属小种有一定的相关性: 第 4 组包括 8 个菌株, 主要为 1 号、2 号和 3 号小种, 都属于强毒性菌株; 第 2、3 组也属于强度性菌株; 第 5、6、8 组共有 3 个菌株, 这些菌株都属于弱毒性菌株; 第 7 组和第

10 组分别由 6 个和 8 个菌株组成, 包含强毒、中毒、弱毒性菌株组; 第 1 组和第 9 组总有 16 个菌株, 则为强毒和中毒性菌株群(表 3)。

3 讨 论

生理小种的鉴定和预测其毒性的演变规律, 有助于更好地应用抗病品种来控制病害和提高产量^[13]。传统的致病性测定主要通过毒力试验来进行, 但此方法受环境、鉴别寄主等多种因素影响。Rep-PCR 技术在研究测定病原细菌致病性分化上具有独特优势。何培新等^[14]利用 Rep-PCR 技术对侧耳属种及菌株进行了初步鉴定。张建丽等^[15]利用 Rep-PCR 对链霉菌的基因指纹进行了分析, 证明该

0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



M: DL5000 DNA Maker; 1: 细 75; 2: YM2; 3: YM10; 4: LF2; 5: YJ15; 6: 细 54; 7: YJ10; 8: YJ11; 9: YJ12; 10: YJ14; 11: YM14; 12: YM15; 13: YM19; 14: YM21; 15: YM23; 16: YM24; 17: YM25; 18: YM27; 19: YM29; 20: YM30; 21: AB6; 22: CD1; 23: EF1; 24: EF2。

图 3 引物 JELIR 的 PCR 指纹图谱

Fig. 3 The genomic fingerprinting form in JELIR-PCR

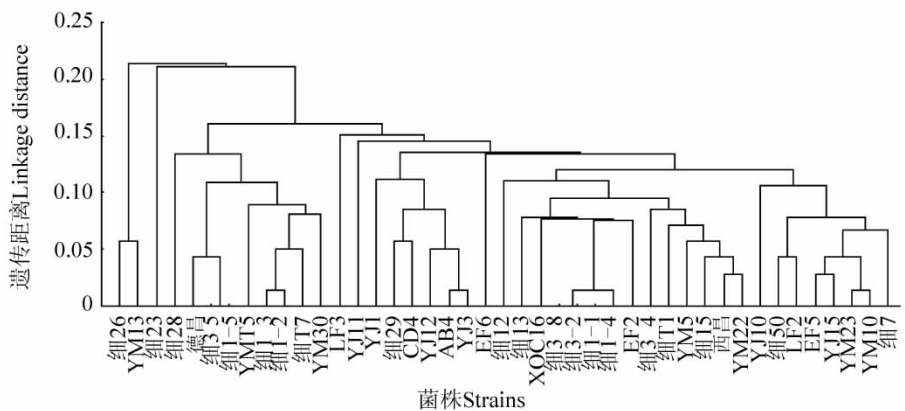


图 4 水稻细菌性条斑病菌的 DNA 指纹图谱的树状聚类分析

Fig. 4 Cluster analysis of strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* base on DNA fingerprints data generated using J3 and JELIR-PCR primers

表2 水稻细菌性条斑病菌小种在6个鉴别品种上的反应模式

Tab.2 The response patterns between 21 races on 6 differentials

小种 Race	鉴别品种 Differentials						代表菌株 Representative stains
	IRBB5	IR24	IRBB14	IRBB4	IRBB21	IRBB18	
1	S	S	S	S	S	S	细 1-3, 细 1-9, 细 1-10, 细 3-1, 细 3-6, YM15
2	R	S	S	S	S	S	细 1-2, 细 1-5, 细 3-5, 细 17, CD4, YM13
3	S	R	S	S	S	S	细 1-7, 细 1-8
4	S	S	R	S	S	S	细 11, YJ10, YJ12
5	S	S	S	R	S	S	细 28, 细 29
6	S	S	R	R	S	S	EF5
7	S	R	S	R	S	S	YJ1, YM26
8	R	S	S	R	S	S	细 26
9	R	S	R	S	S	S	细 15, YM30
10	R	R	S	S	S	S	细 3-4, 细 13
11	S	R	S	R	R	S	EF2, 细 50, CD1
12	S	R	R	S	S	R	AB4
13	R	S	S	R	S	R	YM5
14	R	R	S	S	S	R	LF2
15	R	R	S	R	S	S	细 3-2, 细 6, 西昌, YJ15
16	R	R	R	S	S	S	YM10
17	R	R	R	S	R	S	细 3-7, YJ3
18	R	R	R	S	R	R	EF6
19	R	R	R	R	S	R	LF3, EF10
20	R	R	R	R	R	S	YJ11
21	R	R	R	R	R	R	细 4, 细 9

表3 具有代表性的水稻细菌性条斑病菌的来源、遗传组群与优势小种相关性分析

Tab.3 The relationship between genetic group and sources, predominant race of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*

遗传族群 Genetic group	代表菌株及来源地区 Representative stains (sources)	优势小种及毒性 Predominant race (toxicity)
1	细 26(云南元江); YM13(云南蒙自)	2,8(强毒, 中毒)
2	细 23(云南元江)	2(强毒)
3	细 28(云南元江)	5(强毒)
4	细 1-2、细 1-3、细 1-5、细 1-7、细 1-8、细 1-9、细 1-10、细 3-1、细 3-5、细 3-6(云南禄丰); 细 17、、YM15、YM30(云南元谋); 德昌(四川凉山)	1,2,3(强毒)
5	LF3(云南禄丰)	19(弱毒)
6	YJ11(云南元江)	20(弱毒)
7	YJ1、YJ3、YJ12、细 29(云南元江); AB4(云南双江); CD4(湖南益阳)	2,4,5,7,12,17 (强毒, 中毒, 弱毒)
8	EF6(四川西昌)	18(弱毒)
9	细 1-1、细 1-4、细 3-2、细 3-4、细 3-8(云南禄丰); 细 11、西昌、EF2(四川西昌); 细 12、细 13(云南瑞丽); 细 15(云南元江)、Xoc16(云南腾冲); YM5、YM22(云南元谋)	1,2,4,9,10,11,13,15 (强毒, 中毒)
10	细 7(云南汶山)、YJ10、YJ15(云南元江); YM10、YM23(云南元谋); LF2(云南禄丰); EF5、细 50(四川西昌)	1,4,6,11,14,15,16 (弱毒)(强毒, 中毒, 弱毒)

技术可应用于种及以下水平的分类和快速鉴定。陈功友等采用探针 *avrBS3* 对水稻细菌性条斑病菌进行杂交,发现西南地区的云南、四川等地菌株的指纹图谱不同于其他省份,说明西南地区水稻细菌性条斑病菌有丰富的多态性(内部资料)。

应用分子技术分析水稻细菌性条斑病菌群体遗传结构的研究比较少,国外仅 Raymundo 等^[16] 采用限制性内切酶 *Pst* I 和 *pR41* 探针针对菲律宾的水稻细菌性条斑病菌进行了分析,证明了菌株群体具有丰富的遗传多样性,且遗传分化与地理来源和致病性间无明显的相关性。本研究对来自西南地区特别是云南省的 141 株水稻细菌性条斑病菌进行遗传多样性分析,通过比较筛选出多态性和分辨率较高的 3 个引物: J3、ERIC、JELIR,其中 J3 引物的多态性最好。并系统和广泛地研究了来自云南、四川等省份的水稻细菌性条斑病菌遗传组群和生理小种的相关性,在遗传距离为 0.12 时,所分组群与菌株所属小种有明显的对应关系,而水稻细菌性条斑病菌生理小种与来源地区之间的关系并不明显,为今后在生产上利用 Rep-PCR 技术快速检测条斑病菌生理小种和掌握菌株的遗传分化程度提供了依据。

参考文献:

- [1] 农秀美,廖恒登,刘志明,等. 广西水稻细菌性条斑病致病力分化研究初报[J]. 西南农业科学,1991,4(4): 94-98.
- [2] 郭亚辉,许志刚. 水稻条斑病菌致病力分化研究进展[J]. 安徽农业科学,2006,34(23): 6247-6248.
- [3] 林兴祖,冯健敏,梁正,等. 南繁水稻细菌性条斑病发生特点及综合防控对策[J]. 杂交水稻,2007,22(3): 41-42.
- [4] Louws F, Fulbright D W, Stephens C T, et al. Specific genomic fingerprints of pathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars strains generated with repetitive sequences and PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 1994, 60(7): 2286-2295.
- [5] De Bruijn F. Use of repetitive (repetitive extragenic palindromic and enterobacterial repetitive intergeneric consensus) sequences and the polymerase chain reaction to fingerprint the genomes of *Rhizobium meliloti* isolates and other soil bacteria[J]. Appl Environ Microbiol, 1992, 58(7): 2180-2187.
- [6] 姬广海,许志刚,张世光. Rep-PCR 技术对中国水稻条斑病菌的遗传多样性初析[J]. 植物病理学报,2002,32(1): 26-32.
- [7] 王春连,章琦,周永力,等. 我国长江以南地区水稻白叶枯病原菌遗传多样性分析[J]. 中国水稻科学,2001,15(2): 131-136.
- [8] 李洁,熊智. 用 Rep-PCR 方法研究细菌遗传多样性的探讨[J]. 西南林学院学报,2006,26(6): 1-3.
- [9] Higgins C F, Ame G F, Barns M W, et al. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons[J]. Nature, 1982, 298: 760-762.
- [10] Sharples G J, Lloyd R G. A novel repeated DNA sequence located in the intergenic regions of bacterial chromosomes[J]. Nucleic Acid Res, 1990, 18(22): 6503-6508.
- [11] Martin B, Humber O, Camra M. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosome of *Streptococcus pneumoniae*[J]. Nucleic Acid Res, 1992, 20(13): 3479-3485.
- [12] 李德葆,徐平. 重组 DNA 的原理和方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社,1996: 130-132.
- [13] 王绍雪,马改转,魏兰芳,等. 西南地区水稻细菌性条斑病菌致病力的分化[J]. 湖南农业大学学报,2010,36(2): 187-191.
- [14] 何培新,刘伟,郭恒,等. Rep-PCR 技术在平菇栽培菌株鉴定中的应用[J]. 河南农业科学,2008(2): 78-81.
- [15] 张建立,刘志恒. 链霉菌的 Rep-PCR 基因指纹分析[J]. 微生物学报,2004,44(3): 281-285.
- [16] Raymundo A K, Briones A M Jr, Ardles E Y, et al. Analysis of DNA polymorphism and virulence in Philippine strains of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*[J]. Plant Dis, 1999, 83: 434-440.