

水稻白叶枯病菌北方菌株遗传多样性 rep-PCR 分析

阙海勇^{1,2,3} 陈华民² 吴茂森² 何晨阳^{2*}

(1. 江西出入境检验检疫局 综合技术中心 江西 南昌 330002; 2. 中国农业科学院 植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室 北京 100193; 3. 江西农业大学 农学院 江西 南昌 330045)

摘要:为了揭示水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo) 北方菌株的遗传结构组成,利用 rep-PCR 技术对 103 个从辽宁、吉林、河北、山东稻区采集的 Xoo 菌株、9 个标准小种(R1-R9)代表菌株和 13 个水稻细菌性条斑病菌(*X. oryzae* pv. *oryzicola*, Xoc) 菌株进行了遗传多样性分析。结果表明,ERIC-PCR 和 BOX-PCR 分析均能较好地揭示出测试菌株的遗传多态性,分别获得了 84 种和 90 种分子谱型;在相似系数为 70% 时,ERIC-PCR 将所有测试菌株聚类为 17 个簇群,其中 1 个为优势簇群;BOX-PCR 将测试菌株聚类为 10 个簇群,其中 2 个为优势簇群。在相似系数为 50% 时,Xoo 与 Xoc 测试菌株分别聚类为 2 个不同的簇群。

关键词:水稻白叶枯病菌; rep-PCR; 分子谱型; 簇群

中图分类号:S435.111.4⁺7 文献标志码:A 文章编号:1000-2286(2011)03-0482-06

Rep-PCR Analysis of Genotypic Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* Strains from North China

QUE Hai-yong^{1,2,3}, CHEN Hua-min², WU Mao-sen², HE Chen-yang^{2*}

(1. The Comprehensive Technology Center of Jiangxi Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanchang 330002, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 3. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: To reveal the genetic structure of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo) strains in the north rice-growing regions of China, 103 strains isolated from the diseased rice leaves collected from Liaoning, Jilin, Hebei and Shandong Provinces, 9 representative strains of pathotypes/races (R1-R9) of Xoo and 13 strains of *X. oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc) were analyzed using rep-PCR technique. Dendrograms were generated from the combination data sets of primers ERIC and BOX by using UPGMA analysis. The results indicated that extensive genetic diversity existed within the population of Xoo strains tested, they showed 84 and 90 haplotypes respectively. All tested strains could be divided into 17 clusters at level of 70% similarity using primer ERIC, and there was one predominant cluster, but 10 clusters using primer BOX and two predominant clusters. All tested strains of Xoo and Xoc could be divided into two different clusters respectively at a level of 50% similarity.

Key words: *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*; rep-PCR; haplotype; cluster

收稿日期:2010-12-20 修回日期:2011-03-10

基金项目:国家农业行业科研专项经费项目(nyhyzx07-056)和国家科技支撑计划项目(2006BAD08A04)

作者简介:阙海勇(1984—)男,硕士,主要从事植物检验检疫研究, E-mail: quehaiyong1013@163.com; * 通讯作者:何晨阳,研究员,博士, E-mail: cyhe@caas.net.cn.

阐明水稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, Xoo) 遗传结构及其变异规律是选用抗病品种控制病害的科学基础之一^[1]。病原菌群体遗传变异通常导致品种抗性丧失,用传统手段很难发现群体遗传结构组成和发育规律及其毒性变异^[2]。因此,采用新的分子技术揭示 Xoo 种群遗传多样性尤显重要。Xoo 基因组中含有大量的短重复序列(如 ERIC、BOX)和插入片段(如 J3、IS1112、IS1113)^[3-8]。利用这些序列通用引物进行 PCR 扩增,称为 rep-PCR^[4,7]。该技术操作简单、重复性好,在国内外已被广泛用于 Xoo 群体遗传及其变异的分析。不同引物产生不同分子谱型(haplotype),反映了遗传多态性与环境、品种更换等之间的关系,揭示了 Xoo 的遗传分化规律^[5-13]。然而,有关我国北方菌株群体遗传结构及其分化、与南方菌株遗传差异等方面的研究报道不多。因此,本研究采用 rep-PCR 技术,对北方菌株进行了遗传多样性分析,旨在揭示我国北方稻区田间流行菌株群体遗传结构特点,为北方稻区水稻品种的合理布局 and 有效使用提供科学指导。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

103 个 Xoo 菌株为 2008 和 2009 年分别采集于辽宁(74 个)、吉林(12 个)、河北(12 个)和山东(5 个)4 省稻区病叶组织的田间分离菌株^[14];9 个 Xoo 标准小种(R1~R9)代表菌株(YN18、YN1、GD414、HEN11、ScYc-6、YN7、YN11、FuJ 和 YN24)^[15]由南京农业大学刘凤权博士提供;13 个水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, Xoc)菌株(RS63、YNb8-2、JSb1-39、Ory1-Ory10)和 Xoo 已测序菌株(PX099)为本室保存。所有菌株冻干保存于 -80 °C 中备用。

1.2 细菌基因组 DNA 制备及其 rep-PCR 分析

在 PSA(蛋白胨 10.0 g + 蔗糖 10.0 g + L-谷氨酸 1.0 g,加水至 1 000 mL,固体培养基加质量浓度为 1.5% 琼脂,调至 pH 7.0,121 °C 湿热灭菌 20 min)固体平板培养基上划单菌落进行活化,于 28 °C 培养箱中培养 72 h 后,用无菌水洗脱菌苔用于基因组 DNA 提取。参照《分子克隆实验指南》进行 DNA 提取。提取的 DNA 溶解于 TE 中。取 2 μL 于质量浓度为 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,

对提取样品进行浓度、纯度测定,稀释至 25 ng/μL。rep-PCR 引物序列 ERIC: ERIC1 5′-ATGTA-AGCTCCTGGGGATTAC-3′,ERIC2 5′-AAGTAAGTGACTGGGCTGAGCG-3′; BOX: 5′-CTACG-GCAAGGCGACGCTGACG-3′,由北京 Invitrogen 公司合成。rep-PCR 扩增体系和反应程序见表 1 和表 2。PCR 产物用混合胶(5.0 mg/L Agarose + 7.5 mg/L Syneigel)电泳(0.5X TBE、4 v/cm、4 °C) 2 h,溴化乙锭(EB)染色 10 min,在 BIO-RAD 紫外成像仪上进行 DNA 指纹图谱检测。

1.3 数据分析

将测试菌株 DNA 指纹图谱中每一条带作为一个分子标记,代表一个结合位点;根据 PCR 产物指纹带位的有无,分别转换成两个数码(1 或 0),获得测试菌株的原始数据矩阵;用统计软件 NTSYS-PC (Version 2.1, Exeter Biological Software, Sstauket, NY, USA) (SIMQUAL 程序)得到相似系数矩阵;然后用 NTSYS-PC (SHAN 程序)模块的类平均法(UPGMA)进行聚类分析,制作所有菌株具有相似性系数树状图(phenogram),以此来推断各菌株间的遗传关系。

以测试菌株 PCR 谱型标记指纹带位的相似性系数 70% 为界,进行聚类分簇,根据公式计算遗传多样性值: $H = [n/(n-1)](1 - \sum X_i^2)$ $i=1, X_i$ 为群体中第 i 个样品谱型出现频率 n 是测定菌株数。

表 1 本研究用 rep-PCR 扩增体系

Tab. 1 Rep-PCR conditions used in this study

扩增体系	ERIC 扩增	ERIC-PCR	BOX 扩增	BOX-PCR
10 × PCR buffer		2.5 μL		2.0 μL
25 mmol/L MgCl ₂		1 μL		0.8 μL
10 mmol/L dNTP		2 μL		1.5 μL
10 μmol/L/each primer		2 μL		2 μL
Template DNA		20 ~ 100 ng		20 ~ 100 ng
Taq DNA polymerase		1.25 U		1.25 U
Add ddH ₂ O		25 μL		25 μL

表 2 本研究用 rep-PCR 程序
Tab.2 Rep-PCR procedure used in this study

	PCR 反应程序 PCR procedure					
	预变性 Initial denaturation	PCR 循环 PCR cycles				延伸 Extension
		变性 Denaturation	复性 Annealing	延伸 Extension	循环数 Cycles	
ERIC-PCR	95 °C 3 min	94 °C 45 s	52 °C 45 s	72 °C 5 min	35	72 °C 12 min
BOX-PCR	95 °C 3 min	94 °C 45 s	53 °C 1 min	72 °C 3 min	30	72 °C 12 min

2 结果与分析

2.1 细菌基因组 DNA 制备

通过对所有测试菌株基因组 DNA 提取,获得质量较高的 DNA 模板, DNA 大小一致(图 1),高质量的 DNA 模板便于后续试验研究。

2.2 ERIC-PCR 分析

ERIC-PCR 片段为 5~15 条,大小为 100~4 000 bp,有 84 种分子谱型,遗传多样性值为 0.952 2 (图 2)。以相似性系数 70% 为界,可将 84 种分子谱型聚类分成 17 个簇群(图 3)。各个簇群的菌株数量不等,其中簇群 15 有 27 个菌株,占总数的 23.89%,为优势簇群;簇群 1、7、12 各有 3 个菌株,分别占

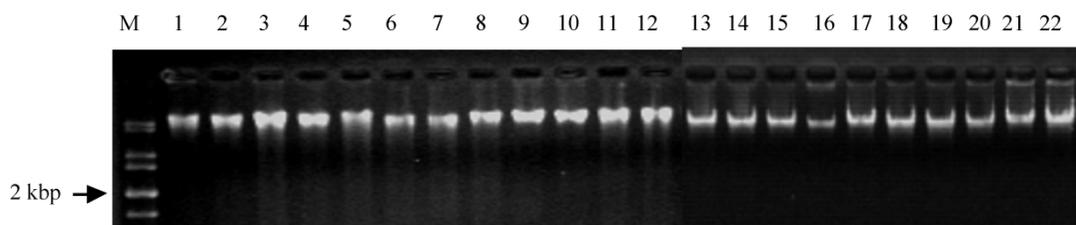


图 1 水稻白叶枯病菌(Xoo)与细菌性条斑病菌(Xoc)基因组 DNA 提取电泳图
Fig.1 Genomic DNA extract of *Xanthomonas oryzae* pvs. *oryzae* (Xoo) and *oryzicola* (Xoc).

图 1 水稻白叶枯病菌(Xoo)与细菌性条斑病菌(Xoc)基因组 DNA 提取电泳图

Fig.1 Genomic DNA extract of *Xanthomonas oryzae* pvs. *oryzae* (Xoo) and *oryzicola* (Xoc)

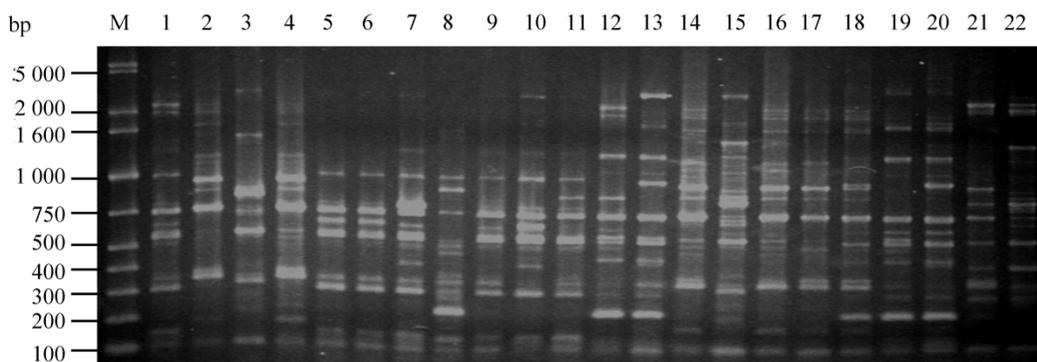


图 2 水稻白叶枯病菌(Xoo)与细菌性条斑病菌(Xoc)基因组 DNA 的 ERIC-PCR 指纹图谱

Fig.2 ERIC-PCR fingerprinting patterns from genomic DNA of *Xanthomonas oryzae* pvs. *oryzae* (Xoo) and *oryzicola* (Xoc) strains

图 2 水稻白叶枯病菌(Xoo)与细菌性条斑病菌(Xoc)基因组 DNA 的 ERIC-PCR 指纹图谱

Fig.2 ERIC-PCR fingerprinting patterns from genomic DNA of *Xanthomonas oryzae* pvs. *oryzae* (Xoo) and *oryzicola* (Xoc) strains

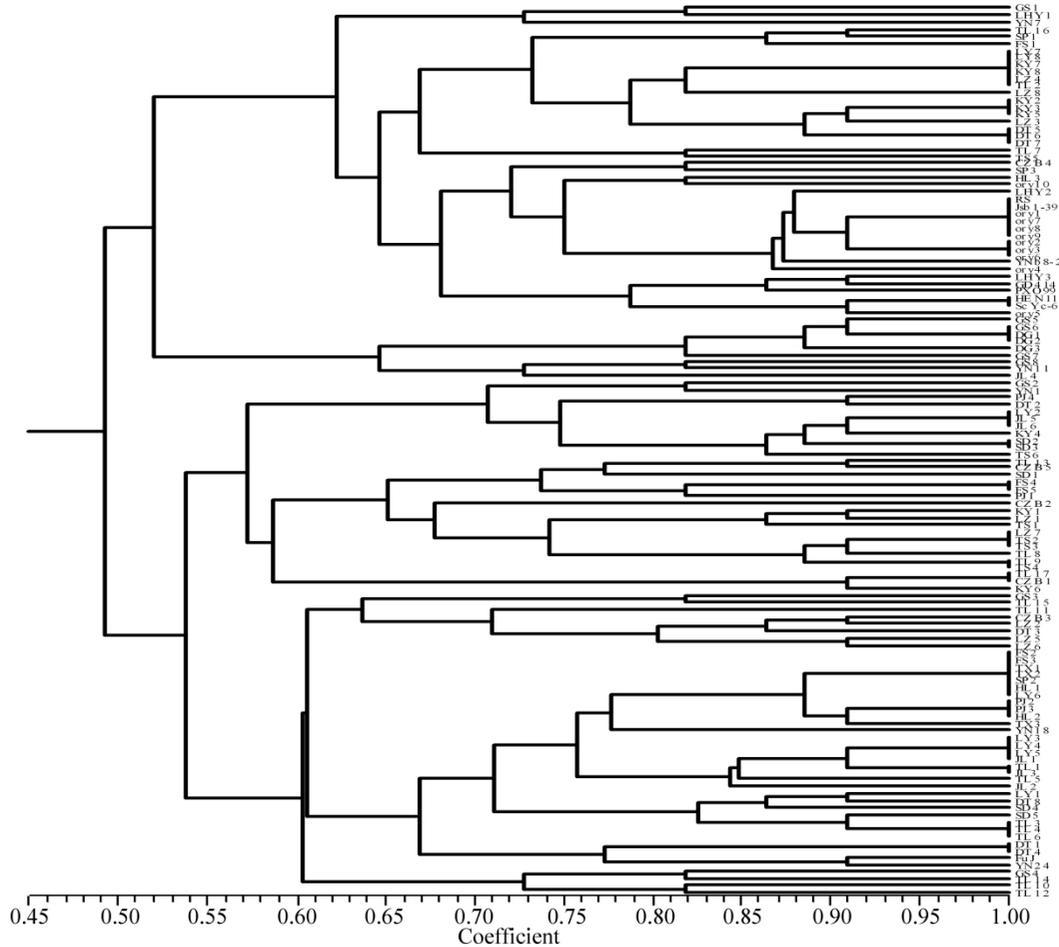


图 3 水稻白叶枯病菌(*Xoo*) 与细菌性条斑病菌(*Xoc*) ERIC-PCR 分子谱型的树型结构图

Fig. 3 Dendrogram constructed with UPGMA based on 84 haplotypes with ERIC-PCR of *Xanthomonas oryzae* pvs. *orycolae* and *oryzicola* strains

2.65%；簇群 2 有 17 个菌株，占 15.04%；簇群 3、13 各有 2 个菌株，分别占 1.77%；簇群 4、16、17 各有 4 个菌株分别占 3.54%；簇群 5 有 5 个菌株，占 4.42%；簇群 6、9、14 各有 6 个菌株，分别占 5.31%；簇群 8、10、11 分别有 11、1、9 个菌株，分别为 9.73%、0.88% 和 7.96%。各簇群菌株来源广泛，与地域无关；另外 9 个已鉴定小种的南方代表菌株分别与北方菌株聚类在不同簇群中。而 12 个 *Xoc* 菌株聚类在簇群 4；另有 1 个 *Xoc* 菌株 *Ory5* 聚类在簇群 5。

2.3 BOX-PCR 分析

BOX-PCR 片段为 2~13 条，大小为 100~3 000 bp，有 90 种分子谱型。以相似性系数 70% 为界，可将 90 种分子谱型聚类分成 10 个簇群，遗传多样性值为 0.960 1（图 4）。各个簇群的菌株数量不等，其中簇群 1 和 6 各有 28 和 24 个菌株，分别占总数的 24.78% 和 21.24%，为优势簇群；簇群 2 有 2 个菌株，占 1.77%；簇群 3、4 各有 17 个菌株，占 15.04%；簇群 5、8、9 各有 4 个菌株，占 3.54%；簇群 7 有 13 个菌株，占 11.50%；簇群 10 为 13 个 *Xoc* 菌株。各簇群菌株来源广泛，与地域无关。当相似性系数为 50% 时，*Xoo* 和 *Xoc* 菌株聚类为两大簇群。

3 讨 论

本研究发现 ERIC-PCR 和 BOX-PCR 分析 DNA 指纹条带丰富、分子谱型多、遗传多样性值相似，表明两者均能较好地揭示出测试菌株丰富的遗传多态性。UPGMA 聚类分析发现：（1）ERIC-PCR 和 BOX-PCR 分析揭示出的优势簇群的菌株组成相似，表明这些菌株可能为田间流行菌株、分布广泛，应予以重视；（2）国内 9 个已鉴定小种的代表菌株（主要为南方菌株）均与北方菌株分别聚在不同簇群中，表明南、北方菌株遗传背景相近；（3）ERIC-PCR 和 BOX-PCR 分析均揭示出 *Xoc* 菌株单独聚为

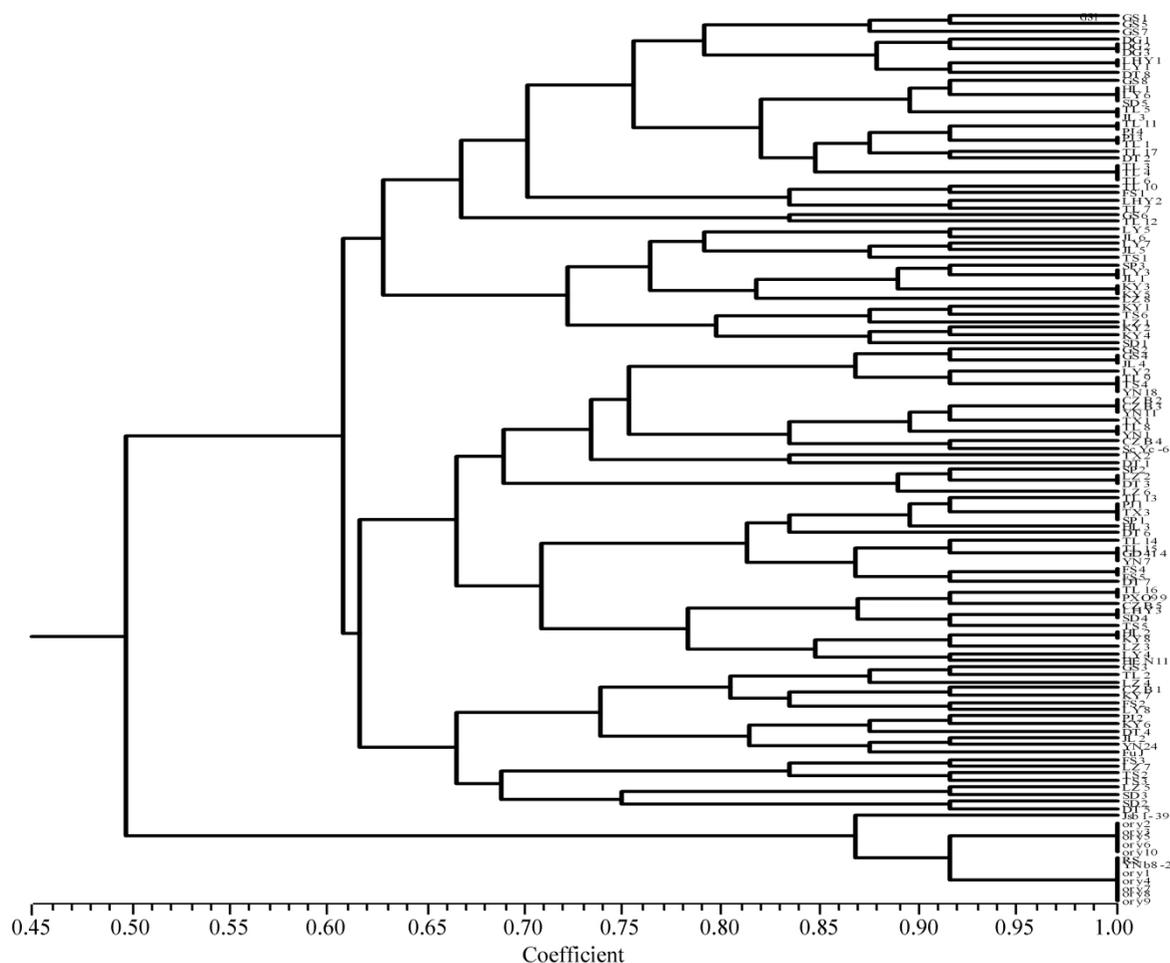


图 4 水稻白叶枯病菌(*Xoo*)与细菌性条斑病菌(*Xoc*) BOX - PCR 分子谱型的树型结构图

Fig. 4 Dendrogram constructed with UPGMA based on 90 haplotypes with BOX - PCR of *Xanthomonas oryzae* pvs. *oryzae* and *oryzicola* strains

一簇群,能与 *Xoo* 菌株相区分,但 BOX 引物对两种菌株的区分力更强;同时明确了 *Xoo* 与 *Xoc* 在遗传背景上存在一定的差异。本实验室前期工作已明确了我国北方菌株致病型和小种的组成^[14],但其遗传型与致病型之间的关系仍需深入探究。

参考文献:

[1] 姬广海,何月秋,张世光. 水稻白叶枯病原菌遗传和致病型多样性分析[J]. 华南农业大学学报,2005,26(2):26-30.
 [2] Vera Cruz C M, Ardales E Y, Skinner D Z, et al. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by Rep - PCR and RFLP analysis[J]. Phytopathology,1996 86(12):1352-1359.
 [3] Zhang Q, Jan E Leach, Nelson R J, et al. Genetic structure of rice bacterial blight pathogen population in China[J]. Acta Agronomica Sinica,1997 23(3):150-158.
 [4] Tika B Adhikari, Mew T W, Jan E Leach. et al. Genotypic and pathotypic diversity in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal[J]. Phytopathology,1999 89(7):687-694.
 [5] Tika B Adhikari, Vera Cruz C M, Zhang Q, et al. Genetic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Asia[J]. Appl Environ Microbiol,1995(5):966-977.
 [6] Tika B Adhikari, Shrestha S M. Distribution and severity of bacterial b of rice in nepal[J]. Inst Agric Anim,1989 10(6):31-38.
 [7] Tika B Adhikari, Vera Cruz C M, Mew T W, et al. Identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* by Insertion Sequence - based Polymerase Chain Reaction(IS - PCR) [J]. Int. Rice Res,1999 24(2):23-24.
 [8] Tika B Adhikari, Mew T W, Teng P S, et al. Phenotype Diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in Nepal[J]. Plant Dis,1994 78(1):68-72.
 [9] 王春连,章琦,周永力,等. 我国长江流域以南地区水稻白叶枯病菌遗传多样性分析[J]. 中国水稻科学,2001,15

- (2): 131-133.
- [10]梁斌,王敬文,明风,等. 云南滇西高原粳稻区水稻白叶枯病菌遗传多样性初探[J]. 上海交通大学学报,2003,21(2):38-425.
- [11]曾列先,陈深,张慧,等. 广东水稻白叶枯病菌遗传多样性和小种分化研究[J]. 植物病理学报,2009,39(3):231-237.
- [12]郑伟,刘晓辉,成国华,等. 中国、日本和菲律宾水稻白叶枯病菌遗传多样性比较分析[J]. 微生物学通报,2008,35(4):519-523.
- [13]Li G, Song C F, Pang X M et al. Analysis of pathotypic and genotypic diversity of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in China[J]. Phytopathology, 2009, 157(6): 208-218.
- [14]阙海勇,陈华明,王继春,等. 水稻白叶枯病菌北方菌株的分子鉴别和致病型分析[J]. 植物病理学报,2010,40(4):351-356.
- [15]Liu H X, Hu W, Hu B S, et al. Virulence analysis and race classification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* in China[J]. Journal of Phytopathology, 2007, 155(3): 129-135.

(上接第 481 页)

- [15]张志祥,徐汉虹,程东美. EXCEL 在毒力回归计算中的应用[J]. 昆虫知识,2002,39(1):67-70.
- [16]刘平怀,陈德力,汪春牛,等. 海滩植物厚藤(*Ipomoea pescaprae*) 抗氧化活性研究[J]. 精细化工,2010,27(9):866-869.
- [17]王清吉,王友绍,何磊,等. 厚藤(*Ipomoea pescaprae* (L.) Sweet) 的化学成分研究(I) [J]. 中国海洋药物杂志,2010,25(3):15-17.
- [18]王清吉,王友绍,何磊,等. 厚藤(*Ipomoea pescaprae* (L.) Sweet) 的化学成分研究(II) [J]. 中国海洋药物杂志,2010,29(1):41-44.
- [19]刘光华,曾玲,梁广文. 海芋的利用研究进展[J]. 广东农业科学,2008(8):61-62.
- [20]潘科,黄炳球,侯学文. 海芋凝集素的纯化及其对 4 种昆虫细胞的毒杀作用[J]. 安徽农业科学,2007,35(18):5484-5485,5495.
- [21]潘科,黄炳球,侯学文. 海芋凝集素对几种鳞翅目昆虫的毒杀活性[J]. 安徽农业科学,2007,35(11):3291-3293.
- [22]马密霞,胡文祥,刘接卿,等. 马钱子属植物的药理毒理作用及临床应用进展[J]. 中国医院药学杂志,2007,27(12):1725-1728.
- [23]程忠跃,黄四喜,杨燕,等. 麻风树素的灭螺效果研究[J]. 华中医学杂志,2000,24(3):123-124.
- [24]杨燕,程忠跃,高竹琴,等. 麻风树素浸杀钉螺卵效果观察[J]. 实用寄生虫病杂志,2000,8(2):59-60.
- [25]杨忠,殷关麟,范崇正,等. 麻风树籽提取物杀灭钉螺的实验研究[J]. 中国血吸虫病防治杂志,2003,15(5):364-366.
- [26]刘建兵,徐兴建,戴裕海,等. 植物杀螺剂麻风树籽杀螺筛选的报告[J]. 实用寄生虫病杂志,1999,7(4):153-155.
- [27]郭宝星. 水茄及其提取物在医学上的应用[J]. 四川中医,2003,21(3):19-21.
- [28]马瑞君,郭守军,朱慧,等. 水茄叶挥发油化学成分分析[J]. 热带亚热带植物学报,2006,14(6):526-529.
- [29]樊金拴. 从水茄果实中分得具抗病毒活性的异黄酮硫酸酯和街类糖苷[J]. 西北林学院学报,1998,13(3):45-49.