

植物病原棒形细菌的 RAPD 分析

尹燕妮 陈永芳 李师默 郭坚华*

(南京农业大学植物病理学系 南京 210095)

摘 要 采用 RAPD 分析技术对萎蔫短小杆菌落葵致病变种(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *basellae* pv. nov.)和萎蔫短小杆菌糖甜菜致病变种(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola* pv. nov.)及植物病原棒形细菌 4 个属的 15 个菌株进行分类研究。从 50 条随机引物中筛选出 20 条,共产生 225 条带,多态性条带占 80.4%。遗传相似矩阵及 UPGMA 聚类分析表明这两个新致病变种与萎蔫短小杆菌属亲缘关系近,最小相似系数为 0.6511;与其他属细菌亲缘关系较远。结合前人研究结果对植物病原棒形细菌新近提出的分类地位的改变进行了探讨。

关键词 RAPD, 分类, 萎蔫短小杆菌, 植物病原棒形细菌

中图分类号:Q432.4 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2005)06-0837-05

随机引物 PCR DNA 多态性分析(Randomly Amplified Polymorphic DNA, RAPD)是由 Williams 等^[1]建立的一种分子标记技术。该方法不要求了解 DNA 序列信息、灵敏度高、样品用量少而且可用于 RNA 指纹分析,广泛应用于病原微生物的分型鉴定、物种亲源关系分析、遗传育种研究和特异表达基因的克隆与鉴定等方面。RAPD 已成功地用于软腐欧文氏菌(*Erwinia*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、草莓黄单胞菌(*Xanthomonas fragariae*)、稻白叶枯病菌(*Xanthomonas oryzae*)等属内不同种、致病变种、小种鉴定和鉴别中^[2]。在革兰氏阴性细菌中,RAPD 对密执安棒形杆菌(*Clavibacter michiganensis*)种的不同亚种进行鉴定^[3],尚未见到用 RAPD 技术研究棒形细菌分类地位的报道。

一般将原先属于棒杆菌属(*Corynebacterium*)的植物病原细菌称为植物病原棒形细菌,现今分别属于节杆菌属(*Arthrobacter*)、棍状杆菌属(*Clavibacter*)、短小杆菌属(*Curtobacterium*)、拉氏杆菌属(*Rathayibacter*)、红球菌属(*Rhodococcus*)^[4,5]。红球菌属细菌本不属于“棒形细菌”的概念范畴,但由于该属中唯一一对植物致病的成束红球菌(*Rhodococcus fascians*)最初属于棒杆菌属,所以一般所称植物病原棒形细菌也包括该细菌在内^[6]。1983 年,Collins 和 Jones 强调 DNA 同源值的测定结果,并为实用和检测的目的,将萎蔫短小杆菌萎蔫致病变种(*Cur.*

flaccumfaciens pv. *flaccumfaciens*)、一品红致病变种(*Cur. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae*)、甜菜致病变种(*Cur. flaccumfaciens* pv. *betae*)和奥氏致病变种(*Cur. flaccumfaciens* pv. *oortii*)作为萎蔫短小杆菌种(*Cur. flaccumfaciens*)的不同致病变种^[7]。陈永芳等^[8,9]对落葵和糖甜菜细菌性叶斑病的病原用传统方法进行鉴定,认为它们是萎蔫短小杆菌种的两个新的致病变种。关于这两个病菌分类地位分子方面的研究国内外尚未见报道。本研究通过 RAPD 分析,以期更好地证明这两个致病变种的分类地位,并结合植物病原棒形细菌目前的分类研究进展,对另外 4 个属的分类地位进行初步分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和培养条件 供试的落葵叶斑病菌(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *basellae* pv. nov.)和甜菜叶斑病菌(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola* pv. nov.)及其相关细菌菌株的来源见表 1。所有菌株均在 D₂ 培养基^[10]上 28℃ 培养 24~48h。

1.1.2 引物和试剂 RAPD 随机引物(10bp 的寡聚核苷酸随机引物见表 2)、dNTP、*Taq* DNA 聚合酶、琼脂糖(Spanish 进口,分装)均购自大连 TaKaRa 公司;100bp DNA Ladder Plus 购自 MBI 公司。

基金项目:国家自然科学基金(39970481)、国家“863 计划”(2003AA249020)

* 通讯作者。E-mail: jhguo@njau.edu.cn

作者简介:尹燕妮(1980-),女,山西晋城人,博士研究生,研究方向为植物病原细菌学。E-mail: yinyin2003@yahoo.com.cn

收稿日期:2005-03-22,修回日期:2005-08-22

表 1 供试菌株

Strains tested	Number of strains	Resource
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i> pv. <i>basella</i> pv. nov.	BR10	Malabar spinach ; Nanjing
<i>Cur. flaccumfaciens</i> pv. <i>basella</i> pv. nov.	BR1003	Malabar spinach ; Nanjing
<i>Cur. flaccumfaciens</i> pv. <i>basella</i> pv. nov.	BR1002	Malabar spinach ; Nanjing
<i>Cur. flaccumfaciens</i> pv. <i>beticola</i> pv. nov.	BV30	Sugar beet ; Neimeng
<i>Cur. flaccumfaciens</i> pv. <i>beticola</i> pv. nov.	BV3001	Sugar beet ; Neimeng
<i>Cur. flaccumfaciens</i> pv. <i>beticola</i> pv. nov.	BV3011	Sugar beet ; Neimeng
<i>Cur. flaccumfaciens</i> pv. <i>flaccumfaciens</i>	2584	ICMP
<i>Cur. flaccumfaciens</i> pv. <i>poinsettiae</i>	2632	ICMP
<i>Cur. flaccumfaciens</i> pv. <i>betae</i>	2594	ICMP
<i>Cur. flaccumfaciens</i> pv. <i>oortii</i>	2566	ICMP
<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	2550	ICMP
<i>Cl. michiganensis</i> subsp. <i>insidiosum</i>	2621	ICMP
<i>Cl. m.</i> subsp. <i>tesselarius</i>	7221	ICMP
<i>Cl. michiganensis</i> subsp. <i>sepedonicus</i>	MH	Tomato ; Nanjing
<i>Rathayibacter rathayi</i>	2574	ICMP
<i>Rathayibacter iranicum</i>	3496	ICMP
<i>Rathayibacter tritici</i>	2626	ICMP
<i>Cl. fangii</i> ^[11]	Ta-19	Wheat ; Yangzhou
<i>Rhodococcus fascians</i>	5833	ICMP
<i>Rhodococcus fascians</i>	2604	ICMP
<i>Arthrobacter ilicis</i>	2607	ICMP

ICMP : International collection of micro-organism from plant(New Zealand) ;Other bacteria were isolated and identified in this lab.

表 2 随机引物碱基序列及编号

Primer	Sequence(5'→3')	Primer	Sequence(5'→3')	Primer	Sequence(5'→3')
S301	CTGGGCACGA	S318	GACTAGGTGG	S375	CTCCTGCCAA
S302	TTCCGCCACC	S319	TGGCAAGGCA	S376	GAGCGTCGAA
S303	TGGCGCAGTG	S320	CCCAGCTAGA	S377	CCCAGCTGTG
S304	CCGCTACCGA	S361	CATTGAGGCC	S378	CCTAGTCGAG
S305	CCTTTCCTC	S362	GTCTCCGCAA	S379	CACAGGCGGA
S306	ACGCCAGAGG	S363	CCAGCTTAGG	S380	GTGTCGCCAG
S307	GAGCGAGGCT	S364	CCGCCCAAAC	S381	GGCATGACCT
S308	CAGGGGTGGA	S365	TCTGTCGAGG	S382	TGGCGTCAA
S309	GGTCTGGTTG	S366	CACCTTTCCC	S383	CCAGCAGTT
S310	CCCTAGACTG	S367	AGCGAGCAAG	S384	GACTGCACAC
S311	GGAGCCTCAG	S368	GAACACTGGG	S385	ACGAGGCAC
S312	TCGCCAGCCA	S369	CCCTACCGAC	S386	GAGGGAAGAG
S313	ACGGGAGCAA	S370	GTGCAACGTG	S387	AGGCGGGAAC
S314	ACAGGTGCTG	S371	AATGCCCCAG	S388	AGCAGGTGGA
S315	CAGACAAGCC	S372	TGGCCCTCAC	S389	TGCGAGAGTC
S316	CTCTGTTCGG	S373	GGTTGTACCC	S390	TGGGAGATGG
S317	GACACGGACC	S374	CCCGCTACAC		

1.2 DNA 提取和 RAPD 扩增反应

利用 CTAB 法提取细菌基因组 DNA^[12]。PCR 扩增采用 25μL 反应体系^[13] 2mmol/L MgCl₂ ,10 × buffer 2.5μL ,0.2mmol/L dNTP ,0.64mmol/L 引物 ,1U Taq 酶 模板 DNA 20ng ,ddH₂O。PCR 仪为 PTC-100。反应条件 :94℃ 1min ,94℃ 30s ,37℃ 90s ,72℃ 90s ,30 个循环 ,72℃ 5min。取扩增产物 8μL ,在加有 EB 的 1.4% 琼脂糖凝胶上电泳分离 ,电压 3V/cm ,用 100bp

DNA Ladder Plus 作为对照。电泳完毕后于紫外灯下观察并拍照。

1.3 数值分析

对扩增条带(带型清楚 ,多态性好的引物)进行分析 ,根据每个位点上谱带的有无 ,分别用“1”和“0”代表 ,采用 Nei 和 Li 的公式 [Sxy = 2Nxy/(Nx + Ny)] 计算两两菌株间的相似系数 ,用 UPGMA 法进行聚类分析 ,绘出树状图^[14]。

2 结果

2.1 RAPD 扩增结果

以 BR10、BR1003、BV30、BV3001、2584、2632、2574、5833、2607 等 9 个菌株为对象 ,用 50 个 10bp 的寡核苷酸随机引物扩增 ,从中筛选出 20 条带型清楚、多态性好的引物(S304、S307、S309、S311、S312、S314、S315、S316、S317、S362、S367、S370、S371、S372、S373、S375、S376、S377、S380、S381) ,对 21 个供试菌株 RAPD 扩增(图 1)。21 个菌株共产生 225 条扩增带 ,多态性带为 181 条 ,多态性达 80.4% ,20 条引物中 ,S371 扩增出的条带最多(15 条) ,S309 的最少(6

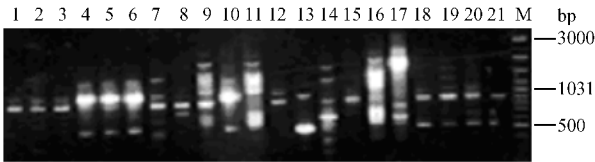


图 1 21 个菌株经引物 S315 扩增得到的 RAPD 图谱

Fig.1 RAPD patterns of 21 strains amplified with the primer S315 representatively

1 ~ 21 : BR10 ,BR1003 ,BR1002 ,BV30 ,BV3001 ,BV3011 ,2584 ,2632 , 2594 ,2566 ,2550 ,2621 ,7221 ,MH ,2574 ,3496 ,2626 ,Ta-19 ,5833 ,2604 , 2607 ; M.100bp DNA ladder plus.

条) ,平均每条引物扩出 11.25 条带。S312 对 21 个菌株扩出一条共有谱带 ,S316、S370、S371 和 S377 对所有短小杆菌属菌株都可扩出两条以上的共有谱带 ,未发现棒形杆菌属所有菌株的共有扩增产物。S315 对短小杆菌属同一致病变种不同菌株扩增出一致的谱型 ,而对不同致病变种则表现多态性。

2.2 遗传相似性分析

萎蔫短小杆菌落葵致病变种和糖甜菜致病变种与短小杆菌属亲缘关系近 :落葵叶斑病菌与短小杆菌平均相似性系数为 0.6817 ,与萎蔫短小杆菌萎蔫致病变种(*Cur. flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*)相似性系数最大(0.7678) ,与甜菜致病变种(*Cur. flaccumfaciens* pv. *betae*)相似性系数最小(0.5872) ,在与其他棒形细菌的亲缘相似性系数中 ,最大为 0.5325 糖甜菜叶斑病菌与短小杆菌平均相似性系数为 0.7133 ,与一品红致病变种(*Cur. flaccumfaciens* pv. *poinsettiae*)相似性系数最大(0.7822) ,与甜菜致病变种相似性系数最小(0.6180) 。在与其他棒形细菌相似性系数中 ,最大为 0.5595。其他棒形细菌间相似性系数的差异较大 ,且同一属下菌株间相似性系数较大。

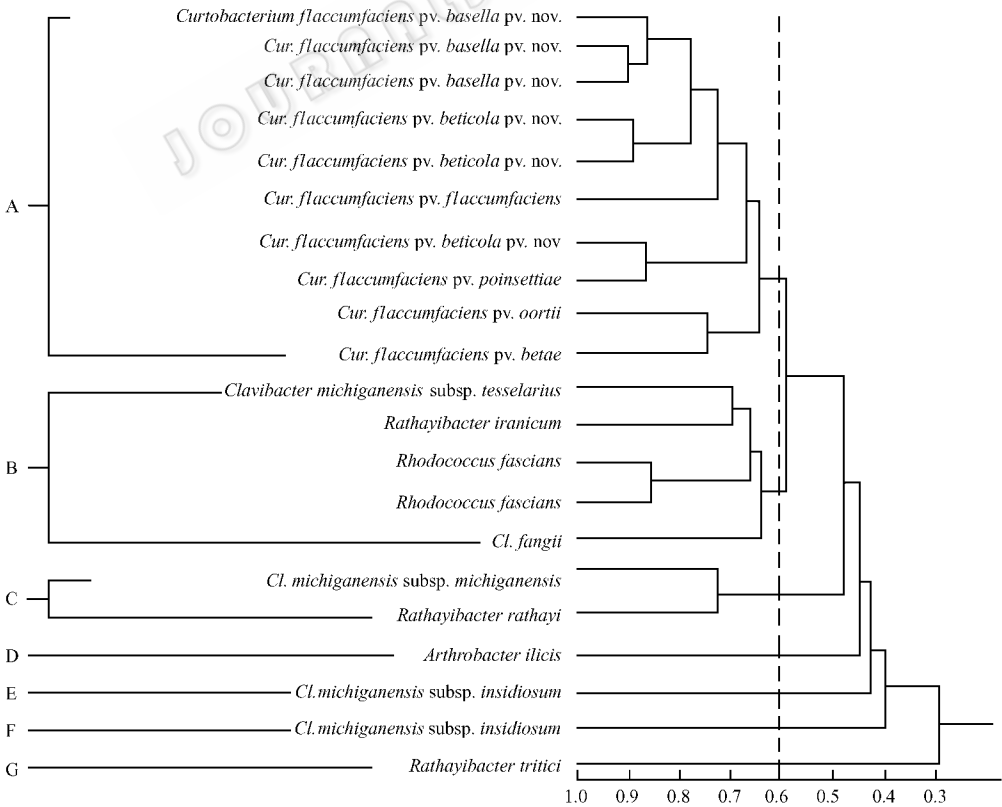


图 2 21 个植物病原棒形细菌的 RAPD 聚类分析树状图

Fig.2 The cluster dendrogram of RAPD in 21 strains

2.3 聚类结果分析

通过聚类分析(图2),在相似性达60%时,21个菌株被分为7组:A组包括短小杆菌属的所有菌株,最小相似系数为0.6511,可证明它们属同一个属;B组包括两个成束红球菌(*Rhodococcus fascians*)、伊朗拉氏杆菌(*Rathayibacter iranicum*)、方氏棍状杆菌(*Cl. Fangii*)和密执安棍状杆菌花叶亚种(*Cl. michiganensis* subsp. *tesselarius*);C组包括密执安棍状杆菌密执安亚种(*Cl. michiganensis* subsp. *michiganensis*)和拉氏拉氏杆菌(*Rathayibacter rathayi*)。其他的组均由单独的棒形细菌构成。棍状杆菌属菌株间差异较大,分布在4个组中。

3 讨论

采用RAPD聚类分析,落葵和糖甜菜叶斑病菌与短小杆菌属亲缘关系近,适合作为萎蔫短小杆菌种下的落葵致病变种和糖甜菜致病变种,与陈永芳等^[8,9]的报道一致。1972年,Schleifer等^[15]根据细胞壁聚糖结构将甜菜致病变种归到萎蔫短小杆菌种。糖甜菜致病变种与此变种在病害传统鉴定方面差异较大^[3]。本研究中,糖甜菜致病变种与一品红致病变种相似性系数最大(0.7822),而与甜菜致病变种相似性系数最小(0.6180),证明了成立糖甜菜致病变种的必要性。引物S315对短小杆菌属不同致病变种扩增并表现出多态性,有望获得区分各个变种的特异性引物,尤其是属于国家一类检疫对象的萎蔫致病变种。

Zgurskaya等^[16]将棒形杆菌属中的拉氏拉氏杆菌(*Rathayibacter rathayi*)、伊朗拉氏杆菌(*Rathayibacter iranicum*)和小麦拉氏杆菌(*Rathayibacter tritici*)3个种放到了新成立的拉氏杆菌属中。本文RAPD分析仅表明小麦拉氏杆菌与棍状杆菌属的菌株差异较大,未能得到这3个种相近的结果。本研究结果支持伯杰氏细菌鉴定手册第九版仍将此3种放入*Clavibacter*属的结论^[4]。密执安棍状杆菌诡谲亚种(*Cl. michiganensis* subsp. *insidiosum*) 在树状图中单独成一组,与密执安棍状杆菌(*Cl. michiganensis*)的其他菌株差异较大,可另立新种为*Clavibacter insidiosum*,符合美国一些科学家的提议^[17]。冬青节杆菌(*Arthrobacter ilici*)与所有参试菌株的相似度都较低(最大0.5381),不支持Young等^[18]将该菌重新定名为*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *ilicis*的提议。两个成束红球菌株间相似性系数达0.8383,与其他属菌株亲缘关系较

远,与早期报道相吻合^[19]。

本研究通过RAPD分析证实了两个新致病变种的分类地位。可采用rep-PCR和ITS等方法对它们展开更深入研究。通过收集更多实验材料,对新提出的棒形细菌分类地位的变动,采用多种方法进行探讨。

参 考 文 献

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(22): 6531–6535.
- [2] Louws F J, Rademaker J K W, de Bruijn F J. The three Ds of PCR-based genomic analysis of phytopathogens: Diversity, detection, and disease diagnosis. *Annual Review of Phytopathology*, 1999, **37**: 81–125.
- [3] Pastrick K H, Rainey F A. Identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies by polymerase chain reaction-based techniques. *Phytopathology*, 1999, **147**: 687–693.
- [4] Holt J G, Krieg N R, Sneath P H A, et al. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.
- [5] Zgurskaya H I, Eutushenko L I, Akimov V N, et al. *Rathayibacter* gen. nov., including the species *Rathayibacter rathayi* comb. nov., *Rathayibacter tritici* comb. nov., *Rathayibacter iranicus* comb. nov., and six strains from annual grasses. *Int J Syst Bacteriol*, 1993, **43**: 143–149.
- [6] 任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定. 北京: 农业出版社, 1994, 191–211.
- [7] Collins M D, Jones D. Reclassification of *Corynebacterium flaccumfaciens*, *Corynebacterium betae*, *Corynebacterium oortii* and *Corynebacterium poinsettiae* in the genus *Curtobacterium*, as *Curtobacterium flaccumfaciens* comb. nov. *J Gen Microbiology*, 1983, **129**: 3545–3548.
- [8] 陈永芳, 郭坚华, 方中达. 落葵上发现短小杆菌属(*Curtobacterium*)一个新的致病变种. 植物病理学报, 2000, **30**(2): 171–175.
- [9] 陈永芳, 郭坚华, 方中达. 引起糖甜菜细菌性叶斑病的萎蔫短小杆菌新致病变种. 植物病理学报, 2003, **33**(5): 396–400.
- [10] Kado C I, Heskete M G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 1970, **60**: 969–976.
- [11] 刘庆都, 郭坚华, 任欣正. 小麦上一种新的植物病原棒形细菌的初步鉴定. 南京农业大学学报, 1996, **19**(1): 111–114.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 分子克隆实验指南. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 第二版. 北京: 科学出版社, 1996, 102–109.
- [13] Parent J G, Lacroir M, Page S, et al. Identification of *Erwinia carotovora* from soft rot diseased plants by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Plant Dis*, 1996, **80**: 494–499.
- [14] 姬广海, 孔繁明, 沈秀萍. 水稻上三种条斑病细菌DNA的多态性初析. 植物病理学报, 1999, **29**(2): 120–125.
- [15] Schleifer K H, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev*, 1972, **36**(4): 407–477.

- [16] Zgurskaya H I , Evtushenko L I , Akimov V N , *et al.* *Rathayibacter* gen.nov. including the species *Rathayibacter rathayi* comb.nov. , *Rathayibacter iranicus* comb. nov. , and *Rathayibacter* sp. *Int J Syst Bacteriol* , 1993 , **43** : 143 – 149.
- [17] Stuteville D L , Erwin D C. Compendium of alfalfa diseases. 2nd ed. St. Paul : American Phytopathological Society , 1990 , 84.
- [18] Young J M , Watson D R W , Dye D W. Reconsideration of *Arthrobacter ilicis* (Mandel *et al.* 1961) Collins *et al.* 1982 as a plant-pathogenic species. Proposal to emend the authority and description of the species. Request for an Opinion. *Int J Syst Evol Microbiol* , 2004 , **54** : 303 – 305.
- [19] Goodfellow M. Reclassification of *Corynebacterium fascians* (Tilford) Dowson in the genus *Rhodococcus* , as *Rhodococcus fascians* comb. nov. . *Syst Appl Microbiol* , 1984 , **5** : 225 – 229.

RAPD analysis of plant pathogenic coryneform bacteria

YIN Yan-ni CHEN Yong-fang LI Shi-mo GUO Jian-hua *

(Department of Plant Pathology , College of Plant Protection , Nanjing Agriculture University , Nanjing 210095 , China)

Abstract : RAPD analysis was used for the taxonomy of plant pathogenic coryneform bacteria , especially for the classification of two new pathogens (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *basellae* pv. nov. and *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *beticola* pv. nov.). 20 random primers were screened from 50 ones to detect polymorphism among the total strains used. 80.4% were polymorphic bands among the 225 ones produced. The results of pairwise similarity and UPGMA cluster analysis suggest that the two new pathovars of sugar beet (*Beta vulgaris* var. *saccharifera*) and malabar spinach (*Basella rubra*) are genetically close related with *Curtobacterium flaccumfaciens* , and the minimal similarity coefficient is 0.6511. According to the RAPD analysis and previous research , some newly made taxonomic changes of the plant pathogenic coryneform bacteria are discussed.

Key words : RAPD , Taxonomy , *Curtobacterium flaccumfaciens* , Plant pathogenic coryneform bacteria

Foundation item : Chinese National Natural Science Fund(39970481) ; Chinese National Programs for High Technology Research and Development (2003AA249020)

* Corresponding author. E-mail : jhguo@njau.edu.cn

Received date 03-22-2005