

利用等电聚焦电泳研究黄单胞菌分类

徐宝梁* 张志雍 葛起新** 陈红燕

(农业部植物检疫实验所,北京 100026)

对黄单胞菌的 4 个种及 29 个致病变种的代表菌株进行了等电聚焦电泳研究,发现所测定的黄单胞菌种间、致病变种间蛋白质图谱差别很大。电泳结果经聚类分析表明,某些致病变种间的差别并不一定比种间的差别小,说明某些致病变种可以上升到种这一分类地位。引起细菌性黑颖病的黄单胞菌禾谷致病变种、小麦致病变种、大麦致病变种间差别很小,仅有 6 条蛋白质谱带的差别。因此这 3 个致病变种的分类地位需重新考虑,同时说明等电聚焦电泳对黄单胞菌种下分类具有一定指导意义。

关键词 黄单胞菌分类;等电聚焦电泳

在《伯杰细菌鉴定手册》第八版^[1]中,黄单胞菌属 (*Xanthomonas*) 下 112 个命名种不具有显著的生理生化性状差异而被列入补遗 1 中,从而黄单胞菌属减少到只有五个种。

据 Young 等^[2]的建议,《伯杰系统细菌学手册》^[3]将这些命名种称为致病变种,其数目增加到 125 个,并将这 125 个致病变种归入野油菜黄单胞菌 (*X. campestris*) 种下。《伯杰系统细菌学手册》还将曾归属于半透明黄单胞菌 (*X. translucens*) 命名种下的禾谷专化型 (*X. translucens* f. sp. *cerealis*)、小麦专化型 (*X. translucens* f. sp. *undulosa*)、大麦专化型 (*X. translucens* f. sp. *hordei*) 提升到致病变种的地位。

Starr^[4]认为将黄单胞菌减少到几个种是不恰当的,因为这些致病变种间还存在着遗传、生理、生化和血清学上的差别。作者试图利用等电聚焦电泳这一高灵敏度的分析技术,在黄单胞菌的分类方面作一些探讨。

材料和方 法

(一) 菌株

白纹黄单胞菌 (*X. albilineans*) XAL-1; 地毯草黄单胞菌 (*X. axonopodis*) XAX-1; 野油菜黄单胞菌 (*X. campestris*) XCA-1; 草莓黄单胞菌 (*X. fragariae*) XFR-1; 野油菜黄单胞菌苜蓿致病变种 (*X. campestris* pv. *alfalfae*) AL-1, 秋海棠致病变种 (*X. campestris* pv. *begoniae*) BEG-1, 莙菜致病变种 (*X. campestris* pv. *betlicola*) BE-12, 土豆致病变种 (*X. campestris* pv. *cajani*) CAJ-1, 胡萝卜致病变种 (*X. campestris* pv. *carotae*) CAR-1, 榛致病变种 (*X. campestris* pv. *corylina*) CO-1, 黄瓜

本文于 1992 年 1 月 21 日收到。

* 现工作单位:北京市食品研究所。

** 浙江农业大学植保系。

荷兰农业部 J. P. Jancs 博士、美国 Idaho 大学 N. W. Schaad 教授、中国农业科学院孙福在同志提供大部分菌株;中国科学院微生物研究所马俊才等同志协助聚类分析,特此一并致谢。

致病变种 (*X. campestris* pv. *cucurbitae*) CU-1, 花叶万年青致病变种 (*X. campestris* pv. *dieffenbachiae*) DI-1, 大豆致病变种 (*X. campestris* pv. *glycines*) PS-113, 绒毛草致病变种 (*X. campestris* pv. *holcicola*) HO-1, 紫罗兰致病变种 (*X. campestris* pv. *incanae*) IN-1, 胡桃致病变种 (*X. campestris* pv. *juglandis*) JU-1, 李氏禾致病变种 (*X. campestris* pv. *leersiae*) LE-6, 锦葵致病变种 (*X. campestris* pv. *malvacearum*) MAL-1, 芒果致病变种 (*X. campestris* pv. *mangiferae-indicae*) MAU-1, 木薯致病变种 (*X. campestris* pv. *manihotis*) MAN-2, 黑斑致病变种 (*X. campestris* pv. *nigromaculans*) NI-1, 水稻致病变种 (*X. campestris* pv. *oryzae*) Js97-2, 水稻条斑致病变种 (*X. campestris* pv. *oryzicola*) RLS-15, 天竹葵致病变种 (*X. campestris* pv. *pelargonii*) PE-1, 菜豆致病变种 (*X. campestris* pv. *phaseoli*) PH-0, 菜豆棕色致病变种 (*X. campestris* pv. *phaseolifuscans*) PF-0, 桃李致病变种 (*X. campestris* pv. *pruni*) PR-1, 豇豆致病变种 (*X. campestris* pv. *vignicola*) VI-1, 葡萄蔓致病变种 (*X. campestris* pv. *vitians*) VIT-1, 禾谷致病变种 (*X. campestris* pv. *cerealis*) Xt-6、Xt-7、Xt-8、Xt-9、Xt-16, 小麦致病变种 (*X. campestris* pv. *undulosa*) Xt-1、Xt-3、Xt-19, 大麦致病变种 (*X. campestris* pv. *hordei*) Xt-4、Xt-15。

(二) 菌种培养

将菌种接种于改良 523 平皿上, 28℃ 下培养 56 小时。

(三) 菌体蛋白制备

用冷震扰法^[5]制备菌体蛋白质溶液, 20[#] 透析袋浓缩, 根据 144 (OD215-OD225)^[6] 调节蛋白质溶液浓度至 10mg/ml。

(四) 等电聚焦电泳

参照何忠效等^[7]的方法进行等电聚焦电泳。在制胶过程中加 pH3.0—9.5 和 pH5—7 两种两性电解质各 1ml。在 LKB Multiphor 2117 电泳仪上电泳, 电泳条件为 1500V、50mA、25W。加样量 15 μ l。用 PHS-301 表面电极测胶板 pH 值。电泳约 2 小时。

(五) 聚类分析

根据菌株间蛋白质图谱质的差别, 用相似系数 $S = (a + b) / (a + b + c + d)$ 结合平均连锁法进行系统聚类, 画出聚类树状谱。

结 果

(一) 等电聚焦电泳

黄单胞菌种及致病变种各代表菌株间电泳图谱差异很大 (图 1)。聚类分析结果 (图 2) 表明: 某些致病变种间的差异并不一定比种间的小。 *X. campestris* pv. *begoniae*、*X. campestris* pv. *vitians*、*X. campestris* pv. *mangiferae-indicae* 和其他种或致病变种在相似系数为 83% 水平上相遇, 而 *X. campestris* 与其它三个种 *X. albilineans*、*X. axonopodis*、*X. fragariae* 在 84% 水平上相遇, 因而 *X. campestris* pv. *begoniae*、*X. campestris* pv. *vitians*、*X. campestris* pv. *mangiferae-indicae* 间及其与其他所测种或致病变种间的差别比上述任何两种间的差别都大。 *X. campestris* pv. *pelargonii*、*X. campestris* pv. *besticola* 在 84% 水平上和 *X. fragariae*、*X. axonopodis*、*X.*

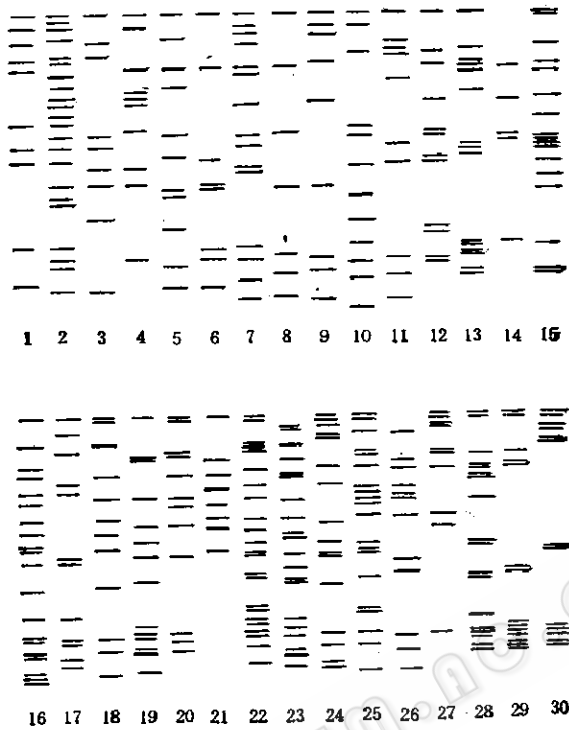


图1 黄单胞菌种及致病变种代表菌株电泳图谱

Fig. 1 Isoelectric focusing patterns of strains of *Xanthomonas* species and pathovars

1. Xt-9; 2. MAU-1; 3. Js97-2; 4. CU-1; 5. LE-6; 6. RLS-18; 7. PS-113; 8. MAN-2; 9. PH-0; 10. BE-12; 11. MAL-1; 12. XFR-1; 13. XCA-1; 14. XAL-1; 15. CAJ-1; 16. PE-1; 17. XAX-1; 18. PF-0; 19. VI-1; 20. NI-1; 21. IN-1; 22. VIT-1; 23. JU-1; 24. HO-1; 25. CO-1; 26. PR-1; 27. AL-1; 28. CAR-1; 29. BEG-1; 30. DI-1

albilineans 相遇,而 *X. fragariae* 和 *X. axonopodis*、*X. albilineans* 在 86% 水平上相遇。*X. campestris* pv. *holcicola*、*X. campestris* pv. *vignicola*、*X. campestris* pv. *carotae*、*X. campestris* pv. *corylina*、*X. campestris* pv. *juglandis* 与 *X. axonopodis*、*X. albilineans* 在 87% 水平上相遇,而 *X. axonopodis* 与 *X. albilineans* 在 88% 水平上相遇。这些致病变种间及其与其他测试种间或致病变种间的差别大于 *X. fragariae*、*X. axonopodis*、*X. albilineans* 中某两者之间的差别。但 *X. campestris* pv. *oryzae*、*X. campestris* pv. *phaseoli-fuscans*、*X. campestris* pv. *phaseoli*、*X. campestris* pv. *cucurbitae*、*X. campestris* pv. *cerealis*、*X. campestris* pv. *incanae*、*X. campestris* pv. *nigromaculans*、*X. campestris* pv. *manihotis*、*X. campestris* pv. *alfalfae*、*X. campestris* pv. *oryzicola*、*X. campestris* pv. *leersiae*、*X. campestris* pv. *malvacearum*、*X. campestris* pv. *glycines*、*X. campestris* pv. *pruni*、*X. campestris* pv. *dieffenbachiae*、*X. campestris* pv. *cajani* 间的差别比任何两个种间的差别都小。

(二) 引起细菌性黑颖病的黄单胞菌等电聚焦电泳

黄单胞菌禾谷致病变种、小麦致病变种、大麦致病变种的代表菌株等电聚焦电泳结果

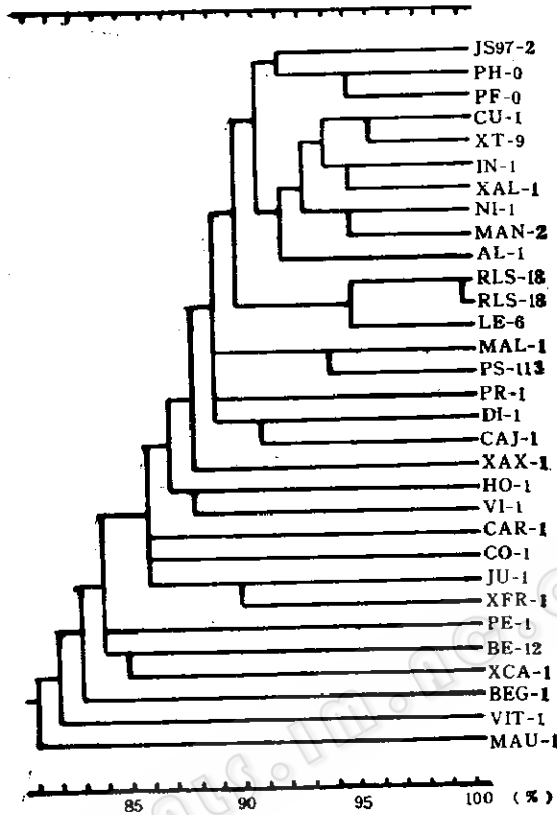


图2 黄单胞菌种及致病变种代表菌株电泳图谱聚类分析结果
 Fig. 2 Cluster analysis result of IEF date of strains of *Xanthomonas* species and pathovars

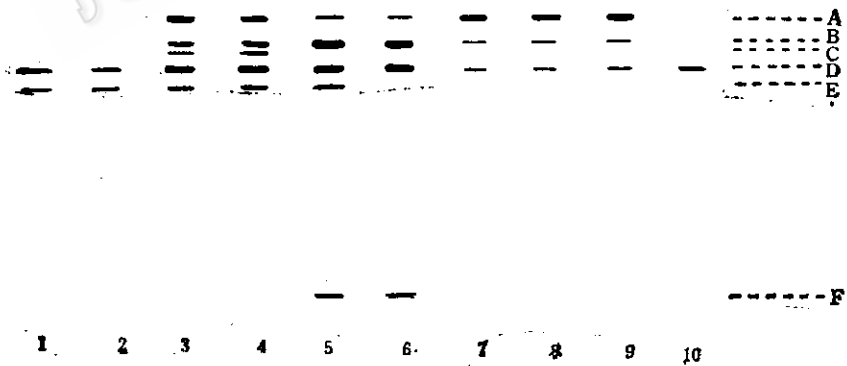


图3 引起细菌性黑颖病的3个黄单胞菌致病变种代表菌株等电聚焦电泳图谱
 Fig. 3 Isoelectric focusing patterns of three *Xanthomonas* pathovars strains causing bacterial black cheff

- 1. Xt-15; 2. Xt-4; 3. Xt-3; 4. Xt-1; 5. Xt-19; 6. Xt-9; 7. Xt-8;
- 8. Xt-7; 9. Xt-6; 10. Xt-16.

(图3)表明:三个致病变种间的差别不大,只有6条蛋白谱带的差异。根据这6条蛋白谱带的差异,可将测试菌株分为四个类群(表1)。第一类群代表禾谷致病变种,包括 Xt-

6、Xt-7、Xt-8 三个菌株,有 A、B、D 谱带。第二类群包括有禾谷致病变种的一个菌株 Xt-9 和小麦致病变种的一个菌株 Xt-19,有 A、B、D、F 谱带,且 Xt-19 菌株具有 E 谱带。第三类群含有小麦致病变种的 2 个菌株 Xt-1、Xt-3,有 A、B、C、D、E 谱带。这两类群非常相似,代表了小麦致病变种。第四类群代表了大麦致病变种,包括大麦致病变种的 2 个菌株 Xt-4、Xt-15,但禾谷致病变种的 Xt-16 菌株也被归入此类群中,有 D、E 谱带。各类群内菌株间的蛋白质图谱基本一致。

表 1 引起细菌性黑颖病的黄单胞菌 3 个致病变种代表菌株电泳结果

Table 1 The result of isoelectric focusing of three *Xanthomonas* pathovars strains causing bacterial black chaff

电泳群 IEF groups	菌株号 No. of strains	谱带及其强弱*					
		A	B	C	D	E	F
1	Xt-6	+++	++		+		
	Xt-7	+++	++		+		
	Xt-8	+++	++		+		
2	Xt-9	++	+++		+++		++
	Xt-19	++	+++		+++	++	++
3	Xt-1	+++	+++	++	+++	++	
	Xt-3	+++	+++	++	+++	++	
4	Xt-4				++	+	
	Xt-15				++	+	
	Xt-16				++	+	

* +++ 最强; ++ 较强; + 强; + 弱。

+++ Strongest; ++ Stronger; + Strong; + Weak.

讨 论

Murata 等^[6]对部分黄单胞菌种与命名种进行了脱氧核糖核酸同源性分析,发现种间同源性并不一定比命名种间同源性小。El-Sharkaey 等^[9]对 21 个黄单胞菌种和命名种进行了酯酶、磷酸酶等多种可溶性蛋白的凝胶电泳分析,发现种及命名种间差别很大。Van Den Mooter 等^[10]认为黄单胞菌属内应该含有 8 个种,将 *X. maltiphilia*、*X. graminas*、*X. oryzae* 提升到种的位置。本试验对黄单胞菌 4 个种 29 个致病变种代表菌株进行了等电聚焦电泳分析,发现各菌株间电泳图谱差异很大,因而借助计算机聚类分析,得出了相似性树状图。从树状图可以看出,某些致病变种间的差异并不一定比种间的差别小,因而认为某些致病变种可以上升到种这一分类地位。

《伯杰系统细菌学手册》将曾归属于半透明黄单胞菌命名种下的几个专化型提升到致病变种的地位,即 *X. campestris* pv. *cerealis*、*X. campestris* pv. *undulosa*、*X. campestris* pv. *hordei* 等。从等电聚焦电泳结果看,此三者间差别很小,仅有 6 条蛋白质谱带的差别,不宜上升为致病变种,和其他致病变种一起并列于 *X. campestris* 下。Schaad^[11]认为此三者和 *X. campestris* 间在血清学,膜蛋白图谱及部分生理生化性状上

是有差别的,因此它们应成为 *X. translucens* 下的致病变种。

菌体蛋白等电聚焦电泳对黄单胞菌种下分类具有一定指导意义。从引起细菌性黑颖病的黄单胞菌等电聚焦电泳结果看,等电聚焦电泳能较客观地反映生物学测定规律。来自禾谷致病变种的 Xt-9 菌株被归入代表小麦致病变种的类群中,根据生物学测定结果,Xt-9 的致病性和发病程度均处于禾谷致病变种和小麦致病变种之间,是两者的中间类型,因而电泳测定结果将其归入了代表小麦致病变种的群中。而 Xt-16 归入第四电泳群的原因有待进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Dye, D. W. et al.: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Buchanan, R. E. et al. ed., 8th ed, pp. 234—249, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1974.
- [2] Young, J. M. et al.: *N. Z. Agric. Res.*, 21: 157—177, 1978.
- [3] Young, J. M. et al.: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Krieg, N. R. et al. ed., 9th ed, Vol. 1, pp. 199—210, The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1984.
- [4] Starr, M. P.: *The Prokaryotes*, Starr, M. P. ed., pp. 742—763, Springer Verlag, New York, 1981.
- [5] 微生物研究法讨论会: 微生物实验法, (程光胜等译)第 206 页, 科学出版社, 北京, 1983。
- [6] 陶慰孙等: 蛋白质分子基础, 第 92—93 页, 高等教育出版社, 北京, 1986。
- [7] 何忠效等: 等电聚焦电泳, 科学出版社, 北京, 1985。
- [8] Murata, N. et al.: *Physopathol. Z.*, 77: 285—322, 1973.
- [9] El-Sharkawy, T. A. et al.: *Gen. Microbiol.*, 68: 155—165, 1971.
- [10] Van Den Mooter, M. et al.: *Plant Pathogenic Bacteria*, Civerolo, E. L. et al. ed., pp. 795—798, Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht, 1978.
- [11] Schaad, N. W.: *Plant Pathogenic Bacteria*, Civerolo, E. L. et al. ed., pp. 783—785, Martinus Nijhoff Publisher, Dordrecht, 1978.

A STUDY ON CLASSIFICATION OF XANTHOMONAS BY ISOELECTRIC FOCUSING

Xu Baoliang* Zhang Zhiyong Ge Qixing** Chen Hongyan

(Plant Quarantine Institute of Agricultural Minister, Beijing 100026)

Studying *Xanthomonas* strains of 4 species and 29 pathovars by isoelectric focusing, it was shown that the protein patterns were very different among the species and pathovars. Through cluster analysis of IEF data, it was found that the protein pattern differences among certain pathovars were no fewer than that among the species. It revealed that some pathovars could become to be species. There were few differences of 6 protein bands among *X. campestris* pv. *cerealis*, *X. campestris* pv. *undulosa* and *X. campestris* pv. *hordei* which cause bacterial black sheff, so the classification of the three pathovars need to be re-considered. It also showed that isoelectric focusing could be used to classify *Xanthomonas* below species.

Key words Classification of *Xanthomonas*; Isoelectric Focusing

* The Beijing Food Research Institute, Beijing.

** Department of Plant Protection, Zhejiang Agricultural University, Hangzhou.