

漆艳香,张贺,蒲金基,等. 芒果细菌性黑斑病菌 rep-PCR 遗传多样性[J]. 江苏农业科学,2017,45(6):88-91.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.06.022

芒果细菌性黑斑病菌 rep-PCR 遗传多样性

漆艳香,张贺,蒲金基,张欣,谢艺贤,陆英,喻群芳,张辉强

(中国热带农业科学院环境与植物保护研究所,海南海口 571101)

摘要:采用 REP、ERIC 和 BOX 引物对 22 株从海南、四川、广西芒果产区采集的芒果细菌性黑斑病菌菌株和 1 株源自美国菌种保藏中心(ATCC)的标准菌株进行 rep-PCR 分析,并根据 DNA 指纹特征,用 NTSYS 软件进行聚类分析。结果表明,3 组引物共扩增出 463 条带,其中有 302 条多态性条带,多态检测率为 65.23%。综合分析 3 组引物组合的指纹图谱数据,以相似系数 0.65 为阈值时,供试的 23 株菌株可以分为 A 和 B 2 个遗传相似组,其中来自四川米易县的 2 株菌株与标准菌株 ATCC11637 聚在 A 组,而来自海南省、广西省的所有菌株均聚在 B 组。取相似系数为 0.87 时,A 组群又可分为 2 个亚组,而 B 组群则进一步分为 6 个亚组。研究结果表明,芒果细菌性黑斑病菌菌株有丰富的遗传多态性和较大的遗传变异,但各遗传聚类组群菌株来源广泛,与地理来源及芒果品种均无明显相关性。

关键词:芒果细菌性黑斑病菌;遗传多样性;REP;ERIC;BOX

中图分类号:S436.67+9 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)06-0088-04

由野油菜黄单胞杆菌芒果致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *mangiferae* indicae, *Xcm*)引起的芒果细菌性黑斑病是芒果上一种常发性重要病害,该病严重影响芒果产量和果品商品价值,是芒果外销产业的重要限制因子^[1-2]。选育抗病品种是防治此病害最经济和有效的措施,而品种抗性是寄主与病原物相互作用的结果,因此,了解与掌握芒果细菌性黑斑病原菌的群体分化,可为芒果抗病品种选育提供依据和参考。

重复序列 PCR(rep-PCR)主要是基于细菌基因组中重复序列元件(REP、ERIC 和 BOX 等)的保守区域设计引物,通过 PCR 选择性扩增不同的基因组区域,揭示病原菌不同种或种下的不同菌株的遗传变异情况^[3-4]。该技术具有分辨率高、快速简单、重复性好的特点,在国内外已广泛应用于黄单胞菌属植物病原细菌的群体遗传多样性分析,如柑橘溃疡病菌(*X. citri* subsp. *citri*)^[5-7]、水稻白叶枯病菌(*X. oryzae* pv. *oryzae*)^[8-9]、水稻条斑病病菌(*X. oryzae* pv. *oryzicola*)^[10-11]、红掌细菌性疫病病菌(*X. axonopodis* pv. *dieffenbachiae*)^[12-13]和十字花科黑腐病病菌(*X. campestris* pv. *campestris*)^[14-15]等。

目前,国内对于芒果细菌性黑斑病的研究多集中于检测鉴定^[16-17]与防控^[18-20],有关 *Xcm* 遗传分化等方面的研究报道甚少^[21]。本试验首次对 22 株从海南省、四川省、广西省芒果产区分离的 *Xcm* 菌株和 1 株源自美国菌种保藏中心(ATCC)的 *Xcm* 标准菌株进行 rep-PCR 分析,以期揭示我国 3 省(区) *Xcm* 的遗传多样性,为芒果品种合理布局、黑斑病的流行监测及防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

Xcm 标准菌株 ATCC11637 由国家质检总局动植物检疫检验研究所赵文军博士馈赠;其余 22 株 *Xcm* 菌株由笔者从海南省、四川省、广西省芒果产区的病组织中分离所得,单菌落经不断纯化、回接及鉴定保存。菌株相关信息如表 1 所示。

1.2 菌株的培养和基因组 DNA 的制备

将供试菌株接种到 NA 固体平板培养基上划线培养,28 ℃ 恒温培养 3 d 后,挑取单个菌落于 NA 液体培养液中,在 28 ℃ 恒温摇床上培养 24 h,直接用于 DNA 提取或 4 ℃ 保存备用。细菌基因组 DNA 的提取参考 Biomiga 公司的试剂盒(Bacterial gDNA kit)说明书进行,-20 ℃ 保存备用。

1.3 rep-PCR

rep-PCR 采用 REP、ERIC 和 BOX 寡核苷酸引物^[3],REP

cytokines upon the biomechanics and remodeling of isolated amnion membrane *in vitro* [J]. Placenta,2011,32(3):206-213.

[11] Mei C, Flinn B S. The use of beneficial microbial endophytes for plant biomass and stress tolerance improvement[J]. Recent Patents Biotechnol,2010,4(1):81-95.

[12] 马敏芝,南志标. 黑麦草内生真菌对植物病原真菌生长的影响[J]. 草业科学,2011,28(6):962-968.

[13] 王莉莉,戴志聪,祁珊珊,等. 植物内生细菌及其对入侵生态学的启示[J]. 江苏农业科学,2013,41(3):9-12.

收稿日期:2016-01-15

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(编号:2014hzz1J007-2)。

作者简介:漆艳香(1975—),女,湖南城步人,博士,副研究员,主要从事热带果树病害病原学研究。Tel:(0898)66969240;E-mail:qianxiang@126.com。

[6] 刘翔. 中药重楼皂苷的分离、结构鉴定及生物转化的研究[D]. 天津:天津科技大学,2009.

[7] 任安芝,高玉葆. 植物内生真菌一类应用前景广阔的资源微生物[J]. 微生物学通报,2001,28(6):90-93.

[8] 王丽萍,赵学伟. 云南重楼野生驯化及栽培技术研究初探[J]. 中国野生植物资源,2002,21(1):62.

[9] 牛燕芬,李扬苹,罗富成,等. 植物内生真菌对寄主生长及抗逆性的增效机理研究进展[J]. 草原与草坪,2015,35(2):91-96.

[10] Kumar D, Schatz F, Moore R M, et al. The effects of thrombin and

表 1 供试菌株及其 rep-PCR 指纹图谱分组

编号	菌株	芒果品种	组织	地理来源	rep-PCR	
					0.65 相似	0.87 相似
1	ATCC11637	芒果			A	A-I
2	XCM15	贵妃	叶	海南省东方市	B	B-I
3	XCM16	贵妃	叶	海南省东方市	B	B-I
4	XCM17	贵妃	叶	海南省东方市	B	B-I
5	XCM18	贵妃	叶	海南省东方市	B	B-I
6	XCM19	贵妃	叶	海南省东方市	B	B-I
7	XCM20	贵妃	叶	海南省东方市	B	B-III
8	XCM21	贵妃	叶	海南省东方市	B	B-I
9	DFL1	贵妃	叶	海南省东方市	B	B-V
10	DF4	贵妃	果	海南省东方市	B	B-II
11	X6	贵妃	叶	海南省东方市	B	B-VI
12	X16	贵妃	叶	海南省东方市	B	B-IV
13	SYI4	贵妃	叶	海南省三亚市	B	B-I
14	SYF5	贵妃	果	海南省三亚市	B	B-I
15	SYI9	贵妃	叶	海南省三亚市	B	B-I
16	MYL2	凯特	叶	四川省米易县	B	B-VI
17	MYF2	凯特	果	四川省米易县	B	B-IV
18	MYF5	凯特	果	四川省米易县	A	A-I
19	MYL7	凯特	叶	四川省米易县	A	A-II
20	MYF8	凯特	果	四川省米易县	B	B-IV
21	SC1	凯特	叶	四川省攀枝花仁和区	B	B-I
22	SC4	凯特	叶	四川省攀枝花仁和区	B	B-III
23	GX3	桂热 82	叶	广西省田东县	B	B-I

引物序列: REP1R-I(5'-IIHCIGCIGCATCIGGC-3')和 REP2-I(5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3');ERIC 引物序列: ERIC1R(5'-ATGTAAGCTCTCGGGATTAC-3')和 ERIC2(5'-AAGTAAGTGA CTGGGCTGAGCG-3');BOX 引物序列: BOXA1R(5'-CTACGCCAAGGCGACGCTGACG-3')。引物均由上海英骏生物技术有限公司合成。

按照文献[3]中的方法对 PCR 扩增反应体系和条件进行适当调整,所有扩增反应均在 PTC200 PCR 仪(MJ RE-SEARCH)上进行。优化后的反应体系如下:2.5 μL 10×PCR 缓冲液(Mg²⁺ Plus),2 μL dNTP 混合物(2.5 mmol/L),各 0.5 μL 上、下游引物(20 μmol/L),0.2 μL Taq 酶(5 U/μL),100 ng 模板 DNA,无菌超纯水补足至 25 μL。rep-PCR 扩增条件:95℃预变性 7 min,30 个循环(94℃1 min,40℃退火 1 min,65℃延伸 8 min),最后 65℃延伸 15 min。ERIC-PCR 和 BOX-PCR 扩增条件中,除退火温度分别为 52、53℃外,其余扩增步骤均同 rep-PCR。扩增结束后,取 6 μL 反应产物在 1.5% 琼脂糖胶上进行电泳检测。

1.4 数据分析

参照 rep-PCR 扩增结果的琼脂糖凝胶电泳图谱,每 1 条 DNA 条带均为 1 个分子标记,代表 1 个引物结合位点。根据各分子标记的迁移率及其有无统计所得位点的二源数据,即有带记为“1”,无带记为“0”,制成 Excel 文件用于聚类分析。使用 NTSYS-pc 2.10e 软件按 UPGMA 绘制聚类图,并进行菌株的分组分析。

2 结果与分析

2.1 Xcm 基因组 DNA 的 rep-PCR 指纹图谱分析

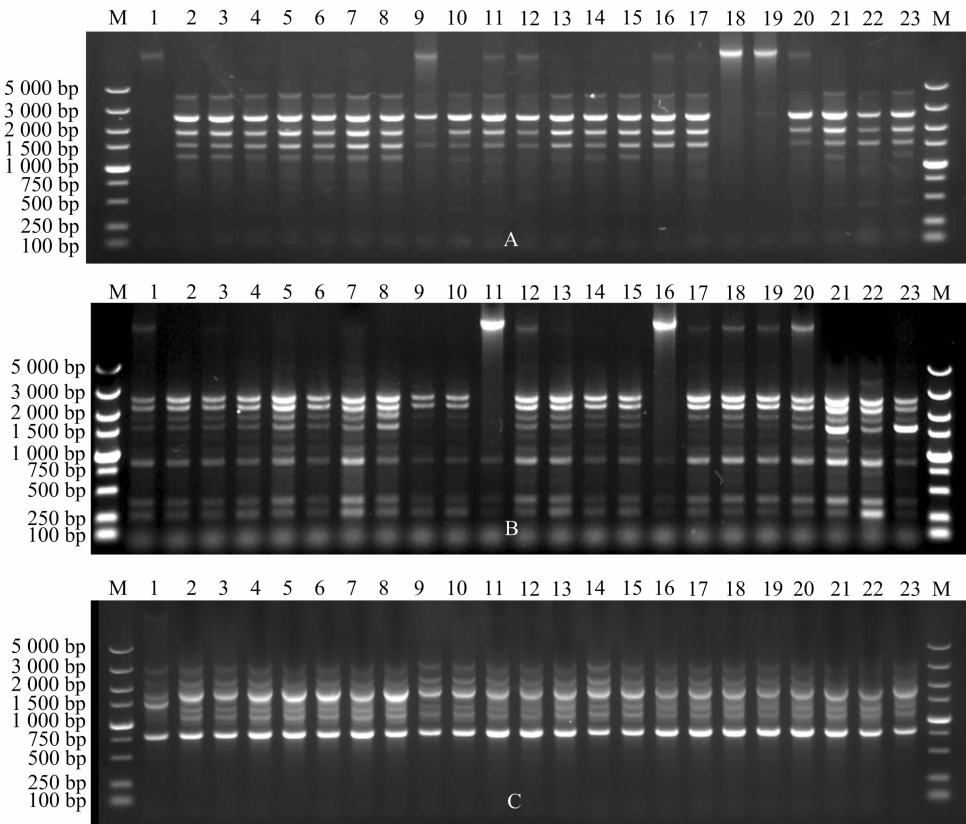
采用 3 组引物(REP、ERIC 和 BOX)对 23 株 Xcm 的基因

组 DNA 分别进行 PCR 扩增,均获得较清晰的电泳图谱,分别扩增出 1~7、4~12、5~7 条分子量不等的 DNA 条带,多态性比率分别为 100.00%、75.00%、42.86%,片段大小主要集中在 100~5 000 bp 之间。3 组引物对所有供试菌株的基因组 DNA 共扩增出 463 条带,其中多态性条带 302 条,多态检测率为 65.23%,初步表明供试病菌种群在 DNA 水平上变异较大,存在丰富的多态性,且各芒果产区 Xcm 种群的 DNA 指纹谱型也表现出明显差异。如图 1 所示,同一地点相同品种相同组织分离出的部分菌株指纹图谱差异明显,如 DFL1、X6、X16 与 XCM15~XCM21,MYL2 与 MYL7,MYF2 与 MYF5,但也有例外,如 XCM15~XCM21;不同地点不同品种不同组织分离出的部分菌株指纹图谱有较大差异,如 MYF5、MYL7 与海南省分离株及广西省分离株。

2.2 Xcm 基因组 DNA 的 rep-PCR 聚类分析

本试验采用 NTSYS-pc 2.1 聚类分析软件 SHAN 程序估算 DNA 相似系数,综合分析了 3 组引物组合的指纹图谱数据,用 UPGMA 方法绘制了 23 株供试菌株的系统聚类树状图。结果(图 2)表明,以相似系数 0.65 为阈值时,供试的 23 株菌株可以分为 A 和 B 2 个遗传相似组,其中 B 含 20 个菌株,为主要遗传组。以相似系数为 0.87 为阈值时,A 组群可分为 2 个亚组,B 组群则可分为 6 个遗传亚组,其中 B-I 含 11 个菌株,为主要遗传亚组。

如图 2 所示,聚类分析结果表明,23 株供试菌株在相似系数为 0.65 时,可以分为 A、B 2 组,其中 A 组与 B 组又各自进一步分为 2 个和 6 个亚组。A 组由 2 株来自四川省米易县的菌株与标准菌株 ATCC11637 组成,其中 ATCC11637 与 1 株来自米易县的菌株进一步聚成 A-I 亚组,A-II 亚组只有 1 株来自米易县的菌株。B 组则由 14 株来自海南省、5 株



M—DL5000; 1~23—与表1中菌株号相对应
图1 *Xcm* 菌株的 rep-PCR(A)、ERIC-PCR(B) 和 BOX-PCR(C)DNA 指纹图谱

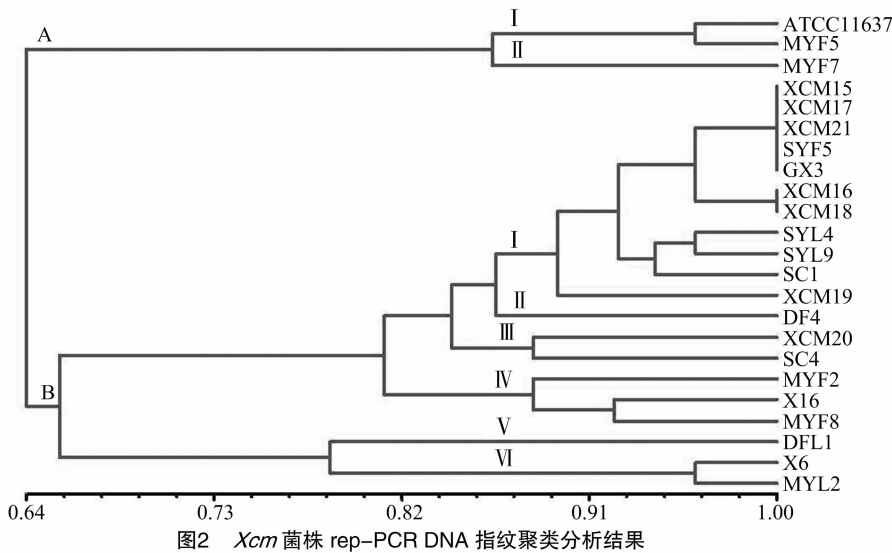


图2 *Xcm* 菌株 rep-PCR DNA 指纹聚类分析结果

来自四川省及 1 株来自广西省的菌株组成。B - I 亚组以 6 株来自海南省东方市和 3 株来自海南省三亚市的菌株为主, 另外 2 株菌株则分别来自广西省田东县和四川省攀枝花仁和区; B - II 亚组只有 1 株来自四川省米易县的菌株; B - III 包括来自四川省攀枝花仁和区及海南省东方市的菌株各 1 株。B - IV 亚组包括 2 株来自四川省米易县及 1 株来自海南省东方市的菌株; B - V 亚组仅有 1 株来自海南省东方市的菌株; B - VI 亚组包括 2 株分别来自四川省米易县及海南省东方市

的菌株。

3 讨论

应用分子生物学技术分析 *Xcm* 群体遗传结构研究, 国外已有相关研究与报道^[22-24]。Gagnevin 等采用 *hrp* 探针, 对 127 株 *Xcm* 进行了 RFLP 分析, 结果表明供试菌遗传多样性丰富, 可分为 4 个组群, 且遗传分化与菌株的寄主及地理来源有明显的相关性^[22]。Kishun 等对 6 株印度 *Xcm* 进行 RAPD 分析,

结果证明供试菌株遗传多样性较丰富,可划分为 2 个族群,族群与供试菌株地理来源没有相关性^[23]。Pruvost 等对 299 株 *Xcm* 进行 MLVA、IS1595-LM PCR 及 AFLP 分析,结果证明供试菌株具有丰富的遗传多样性,可分别划分为 231、29、125 种单倍型,但单倍型的划分与菌株的地理来源没有相关性^[24]。迄今为止,国内尚未见应用分子生物学技术进行 *Xcm* 遗传分化的研究报道。

本试验采用 REP、ERIC 和 BOX 引物对 23 株来源于海南省、四川省、广西省及美国菌种保存中心的 *Xcm* 进行了遗传多样性的分子指纹分析,结果表明,REP 和 ERIC 引物能扩增出多种条带,并显示出多态性丰富的特点,而 BOX-PCR 虽可扩增出条带,但用于分析 *Xcm* 群体内的遗传变异的效果不理想。

为了准确反映供试菌株间基因组之间的差异,本试验综合分析了 3 组引物的 DNA 指纹图谱,结果表明,供试菌株群体具有丰富的遗传多样性,不同地区的部分 *Xcm* 菌株 DNA 指纹谱型具有较明显的差异,另外,来源于同一县市的 *Xcm*,其部分菌株的 DNA 指纹谱型也表现出一定差异。进一步分析发现,来自不同产区与不同芒果品种的 *Xcm* 可以聚成一组,由此说明芒果细菌性黑斑病病原菌的遗传组与地理来源及芒果品种均无明显相关性,这一研究结果与文献报道^[23-24]一致,这也从侧面说明了该病是带菌苗木、接穗调运引起的。

4 结论

本试验采用 rep-PCR 指纹分析初步揭示了 *Xcm* 基因组间的遗传多样性,结果表明,*Xcm* 群体有丰富的遗传多态性和较大的遗传变异,且各遗传聚类群菌株来源广泛,与地理来源及芒果品种均无明显相关性。由于所用的菌株数量有限,其代表程度有一定局限性。在以后的研究中,应该大范围地收集菌株以研究我国 *Xcm* 的群体结构和遗传多样性。

参考文献:

- [1] 文衍堂,黄圣明. 芒果细菌性黑斑病症状与病原菌鉴定[J]. 热带作物学报,1994,15(1):79-85.
- [2] 漆艳香,蒲金基,张欣,等. 芒果细菌性黑斑病菌 *XcmR* 基因的克隆与序列分析[J]. 热带作物学报,2011,32(4):663-667.
- [3] Versalovic J, Schneider M, De Bruijn F J, et al. Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction[J]. Methods in Molecular and Cellular Biology, 1994, 5(1):25-40.
- [4] Louws E J, Fulbright D W, Stephens C T, et al. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1994, 60(7):2286-2295.
- [5] 姚廷山,胡军华,唐科志,等. 利用 rep-PCR 技术研究我国 9 省柑橘溃疡病菌遗传多样性[J]. 果树学报,2010,27(5):819-822.
- [6] Arshadi F, Sijam K, Awang Y B. Genetic diversity of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* causal agent of citrus canker[J]. Journal of Plant Protection Research, 2013, 53(4):312-316.
- [7] 魏楚丹,丁钊,叶淦,等. 广东和江西省柑橘溃疡病菌的遗传多样性分析[J]. 华南农业大学学报,2014,35(4):71-76.
- [8] 高玲玲,黄琼,陈小龙. 中国西南水稻白叶枯病菌遗传多样性垂直分布格局[J]. 中国生态学报,2014,22(9):1086-1092.
- [9] Cruz C M V, Leach J E, Ardales E Y, et al. Measurement of haplotypic variation in *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* within a single field by rep-PCR and RFLP analyses[J]. Phytopathology, 1996, 86(12):1352-1359.
- [10] 张立新,何涛,于建红,等. 安徽省水稻条斑病菌群体遗传结构分析[J]. 植物病理学报,2014,44(5):521-526.
- [11] Gonzalez C, Szurek B, Manceau C, et al. Molecular and pathotypic characterization of new *Xanthomonas oryzae* strains from West Africa[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2007, 20(5):534-546.
- [12] 付贝,周晓云,罗建军,等. 广东红掌细菌性疫病病原菌的遗传多样性分析[J]. 华中农业大学学报,2014,33(2):40-45.
- [13] Donahoo R S, Jones J B, Lacy G H, et al. Genetic analyses of *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* strains reveal distinct phylogenetic groups[J]. Bacteriology, 2013, 103(3):237-244.
- [14] Singh D, Dhar S, Yadava D K. Genetic and pathogenic variability of Indian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* causing black rot disease in crucifers[J]. Current Microbiology, 2011, 63(6):551-560.
- [15] 朱平川,卢洁,张昭颖,等. 广西十字花科黑腐病菌致病性分化及遗传多样性分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(3):541-547.
- [16] 芒果细菌性黑斑病菌检疫鉴定方法:GB/T 28094—2011[S]. 北京:中国标准出版社,2011.
- [17] 芒果细菌性黑斑病原菌分子检测技术规范:NY/T 2257—2012[S]. 北京:中国农业出版社,2012.
- [18] 张贺,漆艳香,谢艺贤,等. 芒果细菌性黑斑病原菌室内药剂筛选[J]. 中国农学通报,2010,26(12):344-347.
- [19] 刘晓妹,刘文波,范秀利. 芒果细菌性黑斑病原菌的筛选及防效测定[J]. 中国生物防治,2006,22(增刊1):94-97.
- [20] 刘晓妹,刘文波,蒲金基,等. 芒果对细菌性黑斑病抗病性测定[J]. 果树学报,2009,26(3):349-352.
- [21] 漆艳香,谢艺贤,张贺,等. 海南省芒果细菌性黑斑病原菌生理生化特性初步研究[J]. 中国农学通报,2014,30(28):301-305.
- [22] Gagnevin L, Leach J E, Pruvost O. Genomic variability of the *Xanthomonas* pathovar *mangiferaeindicae*, agent of mango bacterial black spot[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(1):246-253.
- [23] Kishun R, Gupta V K. Detection of genetic diversity among Indian strains of *Xanthomonas campestris* pv. *mangiferaeindicae* using PCR-RAPD[J]. Nature Precedings, 2008:1-19.
- [24] Pruvost O, Vernière C, Vital K, et al. Insertion sequence- and tandem repeat-based genotyping techniques for *Xanthomonas citri* pv. *mangiferaeindicae*[J]. Phytopathology, 2011, 101(7):887-893.