

生物技术

重庆烟区青枯雷尔氏菌生化变种及序列变种的特性研究

刘颖¹, 唐元满¹, 张淑婷¹, 郭兵¹, 谷纪涛¹, 丁伟^{1,2}

1 西南大学植物保护学院, 重庆市北碚区天生路2号 400715;

2 重庆烟草科学研究所, 重庆市北碚区天生路2号 400715

摘 要: 为进一步明确重庆烟区烟草青枯菌的遗传及生化特性, 采用生化变种分类标准及演化型复合 PCR、系统发育进化分析对重庆 10 个烟草青枯病发生区县青枯雷尔氏菌的种下分化情况进行了研究。结果表明: 46 株烟草青枯雷尔氏菌均属于生化变种 3 和亚洲分支菌株 (演化型 I)。内切葡聚糖酶基因 (*egl*) 和 DNA 修复蛋白基因 (*mutS*) 部分序列的系统发育学分析表明: 46 株供试菌株可聚类到青枯雷尔氏菌演化型 I 的 3 个序列变种, 分别为序列变种 15、17 和 44, 其中序列变种 17 和 44 为优势菌株。表明重庆烟草青枯雷尔氏菌具有一定的遗传分化和地理区域特性。

关键字: 烟草青枯菌; 生化变种; 演化型; 系统进化分析; 内切葡聚糖酶基因; DNA 修复蛋白基因

引用本文: 刘颖, 唐元满, 张淑婷, 等. 重庆烟区青枯雷尔氏菌生化变种及序列变种的特性研究 [J]. 中国烟草学报, 2016, 22 (4)

烟草青枯病是由青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*; 以下简称青枯菌) 引起的一种细菌性病害^[1]。青枯菌广泛分布于热带、亚热带及温带地区, 能侵染 54 个科 450 余种植物^[2]。烟草青枯病在我国许多烟区, 如福建、湖南、云南、贵州、四川、湖北、重庆等地普遍发生^[3-4]。近年来, 由于环境、气候、种植结构调整等方面的原因, 该病的危害范围有逐渐向北和冷凉地区扩展蔓延之势^[4]。

青枯菌因其寄主范围、地理分布、致病性以及生理特性的多样性和复杂性而被公认为是多变的复合种 (species complex)^[5]。根据传统的分类框架青枯菌可分为不同的生理小种 (race) 和生化变种 (biovar), 生理小种是依据不同菌株对不同植物种类的致病性差异来划分的, 而生化变种则是根据其利用 3 种双糖和 3 种己醇的能力差异来分类的^[6-9]。随着分子生物学技术的广泛应用, Fegan 和 Prior (2005 年) 共同提出了以演化型分类框架来描述青枯菌种以下的差异, 该分类框架依次将青枯菌划分为种 (Species)、演化型 (Phylotype)、序列变种 (Sequevar) 以及克隆 (Clone) 4 种不同水平的分类单元, 并分别建立了与之相对应的鉴定方法^[10]。

青枯菌的种水平鉴定采用以 *lpxC* 基因为靶标的

引物对 759/760; 演化型 (Phylotype) 为亚种水平, 分为演化型 I、II、III、IV, 可由基于 ITS 区域的演化型特异性复合 PCR (Phylotype specific multiplex PCR, Pmx-PCR) 鉴定; 每个演化型则又是由多个序列变种 (Sequevar) 组成的, 一个序列变种可作为一组在特定基因范围内序列高度保守的菌株集合体, 目前用于界定序列变种的基因包括内切葡聚糖酶基因 (Endoglucanase, *egl*)、III 型分泌系统调节基因 (*hrpB*) 和一个编码错配纠正蛋白的基因 (*mutS*) 等^[11]。演化型分类框架与传统的生理小种及生化变种分类方法相比可以更精确地反映青枯菌这一复合种的地理起源及种内的遗传多样性。

重庆是我国主要的植烟区, 烟草种植分布在武陵山区和大巴山区的黔江、石柱、彭水、酉阳、武隆、南川、涪陵、丰都、万州、巫溪、巫山、奉节等 12 个区县, 除巫山和奉节外, 其余 10 个区县均有青枯病发生。本研究分别采用生化变种和演化型分类框架对重庆烟草青枯菌群体进行种下分类研究, 旨在了解重庆烟区烟草青枯菌的遗传及生化特性, 解释该地区的青枯菌生态多样性, 揭示烟草青枯菌在地理环境、生态条件以及种植结构影响下的多样性分化情况, 为有针对性的控制病害提供参考依据。

基金项目: 中国烟草总公司重点项目 (110201202002); 中国烟草总公司重庆市公司重点项目 (NY20130501070005)

作者简介: 刘颖 (1991—), 硕士研究生, 研究方向: 天然产物农药及植物与病原菌互作, Email: lyying1201@163.com

通讯作者: 丁伟 (1966—), 博士, 教授, 研究方向: 天然产物农药和烟草有害生物系统控制, Email: dwing818@163.com

收稿日期: 2015-12-11

1 材料与方法

1.1 青枯菌株的分离及 DNA 的提取

供试烟草青枯病菌株由西南大学天然产物农药研究实验室 2013 年以及 2015 年在重庆地区采集分离, 分别采自黔江、石柱、彭水、酉阳、武隆、南川、涪陵、丰都、万州、巫溪, 共 46 株, 供试菌株信息见表 1。应用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN, DP302) 提取菌株 DNA, -20°C 保存备用。

1.2 生化变种鉴定

供试菌株生化变种测定参照 Hayward 的方法^[7]。基本培养基包括: $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; KCl , $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 蛋白胨, $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 溴百里酚蓝, $0.03\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$; 琼脂, $1.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ (最终用

1M NaOH 调节 pH 值到 7.1)。分别将 3 种双糖 (乳糖、麦芽糖和纤维二糖) 和 3 种己醇 (甘露醇、山梨醇和甜醇) 配成 10% 的溶液, 灭菌 (3 种双糖用过滤法灭菌, 3 种己醇经 121°C 蒸气灭菌) 后分别加入基本培养基中, 使其终浓度为 1%。按实验设计将含不同碳水化合物培养基垂直分布于 96 孔板上前 6 孔, 不含碳水化合物的培养基作为对照放于垂直的第 7、8 孔^[12]。取 $200\text{ }\mu\text{L}$ 培养基注入每个孔中, 每孔接种青枯菌悬液 $5\text{ }\mu\text{L}$ (菌悬液浓度约 $2\times 10^9\text{ CFU}\cdot\text{mL}^{-1}$), 第 8 孔作为对照不接种, 置 30°C 的恒温培养箱中培养 21 d。根据供试菌株对 3 种双糖和 3 种己醇的利用情况, 即培养基的颜色变化, 确定各菌株的生化变种分类归属。

表 1 供试烟草菌株相关信息

Tab.1 Tobacco *Ralstonia solanacearum* strains used in the study

菌株	采集地点	海拔 /m	寄主 / 品种	生化变种	演化型 / 序列变种 ^A	mutS-group ^B	egl	mutS
CQPS1	重庆彭水润溪	1203	烟草 / 云烟 87	3	I /17	2	KU194697	KU194740
CQPS2	重庆彭水润溪	1247	烟草 / 云烟 87	3	I /17	2	KU194698	KU194741
CQPS3	重庆彭水夏家	1275	烟草 / 云烟 87	3	I /17	2	KU194699	KU194742
CQPS4	重庆彭水樱桃井	1320	烟草 / 云烟 87	3	I /17	2	KU194700	KU194743
CQPS5	重庆彭水小厂	1237	烟草 / 云烟 87	3	I /44	1	KU194701	KU194744
CQPS6	重庆彭水小厂	1237	烟草 / 云烟 87	3	I /44	1	KU194702	KU194745
CQYY1	重庆酉阳龚滩	800	烟草 / 云烟 87	3	I /15	2	KU194703	KU194746
CQYY2	重庆酉阳龚滩	800	烟草 / 云烟 97	3	I /17	2	KU194704	KU194747
CQYY3	重庆酉阳板溪	730	烟草 / 云烟 97	3	I /44	1	KU194705	KU194748
CQYY4	重庆酉阳板溪	730	烟草 / 云烟 97	3	I /44	1	KU194706	KU194749
CQYY5	重庆酉阳黑水	1000	烟草 / 云烟 87	3	I /44	1	KU194707	KU194750
CQYY6	重庆酉阳黑水	1000	烟草 / 云烟 87	3	I /44	1	KU194708	KU194751
CQWL1	重庆武隆青木池	1114	烟草 / 云烟 97	3	I /44	1	KU194709	KU194752
CQWL2	重庆武隆江口	636	烟草 / 云烟 87	3	I /17	2	KU194710	KU194753
CQWL3	重庆武隆江口	756	烟草 / 云烟 87	3	I /17	2	KU194711	KU194754
CQWL4	重庆武隆江口	850	烟草 / 云烟 87	3	I /17	2	KU194712	KU194755
CQWL5	重庆武隆江口	1050	烟草 / 云烟 87	3	I /44	1	KU194713	KU194756
CQWL6	重庆武隆巷口	1273	烟草 / -	3	I /17	2	KU194714	KU194757
CQWL7	重庆武隆谭家	1250	烟草 / 云烟 87	3	I /44	1	KU194715	KU194758
CQNC1	重庆南川三泉	930	烟草 / 云烟 97	3	I /44	1	KU194716	KU194759

续表 1

CQNC2	重庆南川三泉	930	烟草 / 云烟 97	3	I /44	1	KU194717	KU194760
CQFL1	重庆涪陵罗云	590	烟草 / 云烟 87	3	I /44	1	KU194718	KU194761
CQFL2	重庆涪陵罗云	612	烟草 / 云烟 87	3	I /44	1	KU194719	KU194762
CQFD1	重庆丰都回龙	1059	烟草 / 云烟 87	3	I /17	2	KU194720	KU194763
CQFD2	重庆丰都武平	1156	烟草 / 云烟 87	3	I /17	2	KU194721	KU194764
CQQJ1	重庆黔江堰塘	1000	烟草 / 云烟 97	3	I /44	1	KU194722	KU194765
CQQJ2	重庆黔江水市	1100	烟草 / 云烟 97	3	I /44	1	KU194723	KU194766
CQQJ3	重庆黔江浦花	800	烟草 / 云烟 97	3	I /44	1	KU194724	KU194767
CQQJ4	重庆黔江水田	883	烟草 /-	3	I /17	2	KU194725	KU194768
CQQJ5	重庆黔江濯水	967	烟草 /-	3	I /44	1	KU194726	KU194769
CQQJ6	重庆黔江濯水	630	烟草 /-	3	I /44	1	KU194727	KU194770
CQQJ7	重庆黔江濯水蒲花	894	烟草 /K326	3	I /44	1	KU194728	KU194771
CQQJ8	重庆黔江濯水蒲花	912	烟草 /-	3	I /44	1	KU194729	KU194772
CQQJ9	重庆黔江濯水	1020	烟草 /-	3	I /17	2	KU194730	KU194773
CQQJ10	重庆黔江水市	1200	烟草 /-	3	I /17	2	KU194731	KU194774
CQQJ11	重庆黔江水市	1229	烟草 /-	3	I /17	2	KU194732	KU194775
CQQJ12	重庆黔江水市	1300	烟草 /-	3	I /44	1	KU194733	KU194776
CQQJ13	重庆黔江新华	787	烟草 /K326	3	I /44	1	KU194734	KU194777
CQQJ14	重庆黔江新华	787	烟草 /K326	3	I /44	1	KU194735	KU194778
CQSZ-1	重庆石柱龙潭	1000	烟草 / 云烟 87	3	I /44	1	KT961491	KT961588
CQSZ-2	重庆石柱龙潭	1000	烟草 / 云烟 87	3	I /44	1	KT961492	KT961589
CQSZ-3	重庆石柱金铃	1089	烟草 /K326	3	I /17	2	KU194736	KU194779
CQSZ-4	重庆石柱金铃	1055	烟草 /K326	3	I /17	2	KU194737	KU194780
CQWZ1	重庆万州孙家	815	烟草 / 云烟 87	3	I /17	2	KU194738	KU194781
CQWZ2	重庆万州恒合	1141	烟草 / 云烟 87	3	I /15	2	KU194739	KU194782
CQWX-1	重庆巫溪文峰	1200	烟草 /-	3	I /44	1	KT961514	KT961611

注: ^A 基于内切葡聚糖酶基因 (*egl*) 部分序列的系统进化树分析; ^B 基于 DNA 修复蛋白基因 (*mutS*) 部分序列的系统进化树分析。

1.3 演化型鉴定

根据演化型分类框架所设计的复合 PCR 引物对青枯菌菌株进行了演化型鉴定^[9]。PCR 扩增采用 25 μ L 反应体系: 2 $\times$ Taq PCR MasterMix (TIANGEN, KT201)、引物 Nmult:21:1F, Nmult:21:2F 和 Nmult:22:InF 各 6 pmoles, Nmult:23:AF 和 Nmult:22:RR 各 18 pmoles, 759/760 各 4 pmoles, 青

枯菌 DNA, ddH₂O。反应程序为 96 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 59 $^{\circ}$ C 退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。取 5 μ L PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶中电泳, 电压 4 V/cm, 通过 Biorad 凝胶成像仪观察结果。实验所用引物均由华大基因科技股份有限公司合成, 引物序列见表 2。

表 2 用于遗传多样性分析的引物序列
Tab.2 The primers used for genetic diversity analysis

引物	序列 Sequence (5'to3')	扩增片段分类归属	片段大小 /bp	来源
Nmult21:1F	CGTTGATGAGGCGCGCAATTT	演化型 I	144	[10]
Nmult21:2F	AAGTTATGGACGGTGAAGTC	演化型 II	372	[10]
Nmult23:AF	ATTACSAGAGCAATCGAAAGATT	演化型 III	91	[10]
Nmult22:InF	ATTGCCAAGACGAGAGAAGTA	演化型 IV	213	[10]
Nmult22:RR	TCGCTTGACCCTATAACGAGTA	All phylotypes	—	[10]
759	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC	种特异性	281	[10]
760	GTCGCCGTCAAGCAATGCGGAATCG			
Endo-F	ATGCATGCCGCTGGTCGCCGC	<i>egl</i>	750	[13]
Endo-R	GCGTTGCCCCGGCACGAACACC			
mutS-RsF.1570	ACAGCGCCTTGAGCCGGTACA	<i>mutS</i>	758	[11]
mutS-RsR.1926	GCTGATCACCGGCCCGAACAT			

1.4 部分 *egl* 基因扩增

用引物 Endo-F 和 Endo-R (表 2) 扩增内源葡聚糖酶基因 (*egl*) 内部的 750 bp 片段。*egl* 基因扩增 PCR 反应体系 (25 μ l): 2 $\times$ Taq PCR MasterMix (TIANGEN, KT201), 青枯菌 DNA 50 ng, 引物 Endo-F 和 Endo-R 各 10 pmoles, ddH₂O 补足。*egl* 扩增的 PCR 反应程序为 96 $^{\circ}$ C 预变性 9 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 64 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 产物送华大基因科技股份有限公司测序。

1.5 部分 *mutS* 基因扩增

用引物 mutS-RsF.1570 和 mutS-RsR.1926 (表 2) 扩增 DNA 蛋白修复基因 *mutS*, 其扩增 PCR 反应体系 (25 μ L): 2 $\times$ Taq PCR MasterMix (TIANGEN, KT201), 青枯菌 DNA 50 ng, 引物 mutS-RsF.1570

和 mutS-RsR.1926 各 10 pmoles, ddH₂O 补足。PCR 反应程序为 96 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 66 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 产物送华大基因科技股份有限公司测序。

1.6 序列分析

将所测得的供试青枯菌株 *egl* 和 *mutS* 基因序列与 GenBank 上已登录的青枯菌核酸序列进行比对 (参考序列信息见表 3), 构建系统发育树。698 bp 的 *egl* 基因和 682 bp 的 *mutS* 基因的测序结果用 Clustal x 软件比对后, 再用 MEGA 5 软件进行系统发育分析, 采用 Jukes and Cantor 模型邻接法 (neighbor-joining, NJ) 构建系统发育树, 1000 次重复取样作出 Bootstrap 树状图。序列之间的遗传距离用 Kimura-2-parameter 方法计算。并将所有的序列提交到 GenBank 数据库中。

表 3 参考序列信息
Tab.3 Reference strains used for sequence analysis

菌株	寄主	来源	演化型	序列变种	<i>egl</i> 登录号	<i>mutS</i> 登录号
R288	桑树	中国	I	12	GQ907153	AY756797
JT523	马铃薯	留尼汪岛	I	13	AF295252	-
PSS81	番茄	中国	I	14	FJ561066	JF702701
PSS358	番茄	中国	I	15	EU407298	JF702699

续表 3

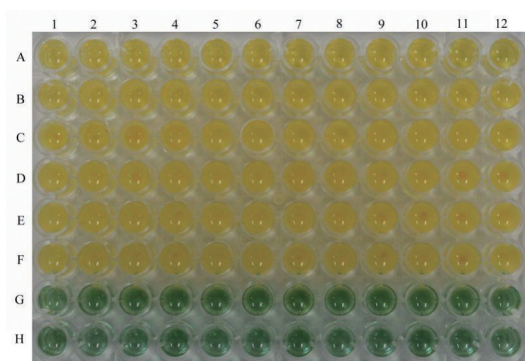
UW151	姜	澳大利亚	I	16	AF295254	-
P11	花生	中国	I	17	FJ561068	JF702705
GMI1000	番茄	法国	I	18	AF295251	AY756804
JT519	天竺葵	留尼汪岛	I	31	GU295032	JF702713
PSS219	番茄	中国	I	34	FJ561167	JF702700
O3	橄榄树	中国	I	44	FJ561069	JF702706
Tb28	烟草	中国	I	44	FJ561127	-
Tb43	烟草	中国	I	44	FJ561129	-
Bd11	木槿	中国	I	44	FJ561098	-
CIP365	马铃薯	菲律宾	I	45	GQ907151	AY756787
MAD17	辣椒	马达加斯加	I	46	GU295040	-
GMI8254	番茄	印度尼西亚	I	47	GU295014	JF702719
M2	桑树	中国	I	48	FJ561067	JF702707
CMR87	番茄	喀麦隆	II	35	EF439727	EF439805
CMR121	番茄	喀麦隆	II	52	EF439725	EF439800
CMR39	番茄	喀麦隆	II	41	EF439726	EF439803
CFBP2972	马铃薯	马提尼克	II	35	EF371809	EF371847
UW551	天竺葵	肯尼亚	II	1	DQ657596	JF702736
ICMP7963	马铃薯	肯尼亚	II	7	AF295263	AY756776
UW162	香蕉	秘鲁	II	4	AF295256	AY756795
MOLK2	香蕉	菲律宾	II	3	EF371841	AY756813
CMR66	木龙葵	喀麦隆	III	49	EF439729	EF439783
JT525	天竺葵	留尼汪岛	III	19	AF295272	AY756786
CFBP3059	茄子	布基纳法索	III	23	AF295270	AY756766
NCPPB332	马铃薯	津巴布韦	III	22	DQ657649	AY756760
MAFF301558	马铃薯	日本	IV	8	AY465002	AY756812
Psi7	番茄	印度尼西亚	IV	10	EF371804	AY756752
ACH732	番茄	澳大利亚	IV	11	GQ907150	AY756743

2 结果与分析

2.1 生化变种鉴定结果

测定了 46 株供试菌株对乳糖、麦芽糖、纤维二糖和甘露醇、山梨醇、甜醇的利用能力（图 1）。结

果表明，所有的供试菌株均能利用 3 种双糖和 3 种己醇，参照生化变种划分标准，重庆地区的烟草青枯菌均属于生化变种 3（表 1）。



注: A: 乳糖, B: 麦芽糖, C: 纤维二糖, D: 甜醇, E: 甘露醇, F: 山梨醇, G: 未加碳源的对照, H: 未加碳源且未接种青枯菌的对照。
1-3: CQPS1, 4-6: CQPS2, 7-9: CQPS3, 10-12: CQPS4

图 1 部分菌株生化变种结果展示

Fig.1 Results of biovar test of *R. solanacearum*

2.2 Pmx-PCR 的演化型鉴定结果

供试菌株演化型特异性复合 PCR 结果表明, 所有菌株均可同时扩增得到 144 bp 和 281 bp 的 2 条特异性片段, 其中 281 bp 的片段为青枯菌种特异性扩增条带, 144 bp 的片段为演化型 I 的特异性扩增条带。从而在种和演化型分类单元水平上, 揭示出供试菌株属于青枯菌演化型 I 型, 即亚洲分支菌株。

2.3 *egl* 基因分析

对供试菌株的 *egl* 基因部分序列 (698 bp) 进行系统发育分析, 并从 GenBank 上选取 32 个菌株的 *egl* 基因的序列 (表 3) 来确定供试菌株在系统发育结构中的位置。由系统发育分析知, 青枯菌被分为 4 个分支, 即 4 个演化型分支, 而我国烟草青枯菌均被聚类到演化型 I 型分支中 (图 2), 这与 Pmx-PCR 的鉴定结果一致。

供试 46 株菌株被聚类在演化型 I 型之下的 3 个分支中, 它们分别与序列变种 15、17 和 44 对应 (图 2)。其中, 序列变种 15 的参考菌株为中国番茄菌株 PSS358, 仅包含了 2 株菌, 分别是酉阳的 CQYY1 和万州的 CQWZ2。序列变种 17 以分离自中国花生的 P11 为参考菌株, 包含 18 株供试菌, 分别为彭水的 CQPS1、CQPS2、CQPS3、CQPS4, 酉阳的 CQYY2, 武隆的 CQWL2、CQWL3、CQWL4、CQWL6, 丰都的 CQFD1、CQFD2, 黔江的 CQQJ4、CQQJ9、CQQJ10、CQQJ11, 石柱的 CQSZ-3、CQSZ-4, 以及万州的 CQWZ1。而序列变种 44 包含了 2 个小分支, 1 个分支以中国烟草青枯菌 Tb28 和 Tb43 为参考菌株, 共 9 株菌, 其中酉阳 2 株 (CQYY5、CQYY6)、黔江 7 株 (CQQJ1、CQQJ2、CQQJ3、CQQJ6、CQQJ7、CQQJ8、CQQJ12); 1 个分支以

中国木槿菌株 Bd11 为参考菌株, 共有 17 株, 其中彭水 2 株 (CQPS5、CQPS6)、酉阳 2 株 (CQYY3、CQYY4)、武隆 3 株 (CQWL1、CQWL5、CQWL7)、南川 2 株 (CQNC2、CQNC2)、涪陵 2 株 (CQFL1、CQFL2)、黔江 3 株 (CQQJ5、CQQJ13、CQQJ14)、石柱 2 株 (CQSZ-1、CQSZ-2) 以及巫溪 1 株 (CQWX-1)。

2.4 *mutS* 基因分析

对供试菌株的 *mutS* 基因部分序列 (682 bp) 进行系统发育分析, 并从 GenBank 上选取 27 个菌株的 *mutS* 基因的序列 (表 2) 作为参考序列进行比较。由系统发育分析可知, 所有的供试菌株可聚到 2 个分支中, 如图 3 所示, 第一分支与 *egl* 基因的系统发育图中的序列变种 44 分支对应。第二分支则与 *egl* 基因的系统发育图的序列变种 15 和 17 对应。

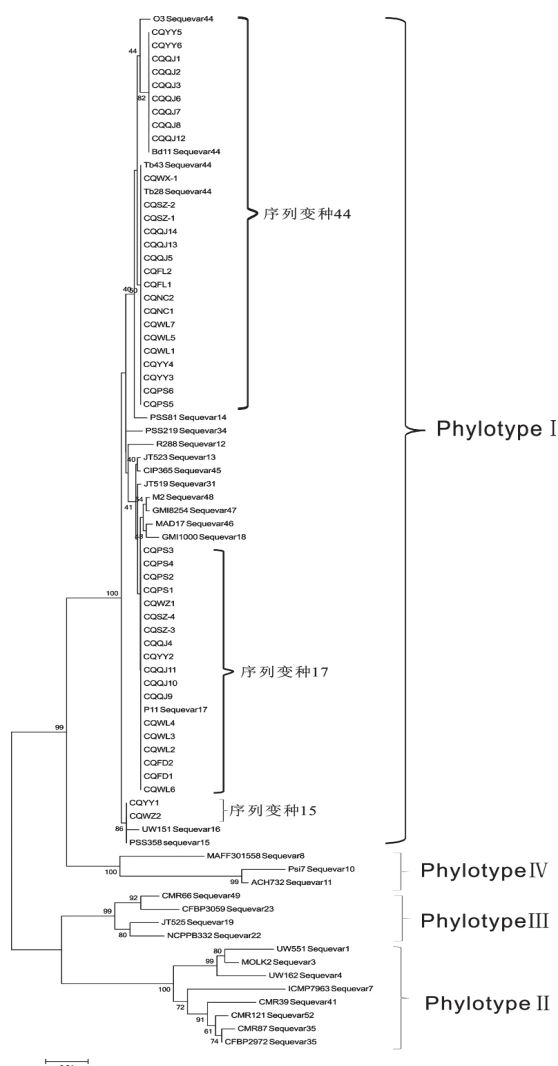
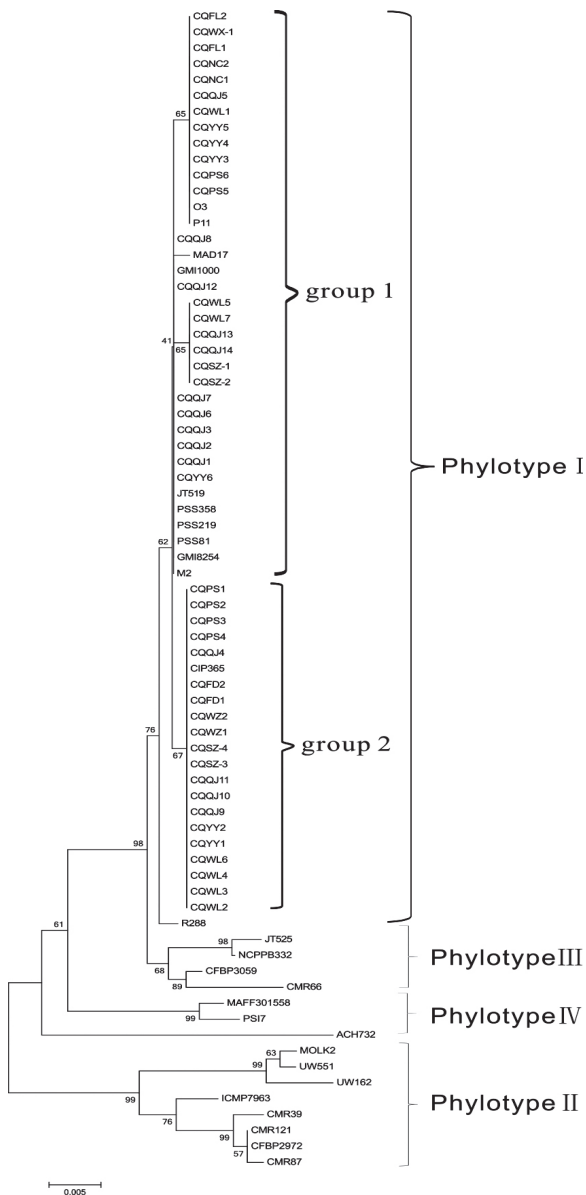


图 2 基于 *egl* 基因部分序列的系统发育分析

Fig.2 Phylogenetic neighbor-joining tree based on partial sequences of the *egl* gene

图3 基于 *mutS* 基因部分序列的系统发育分析Fig.3 Phylogenetic neighbor-joining tree based on partial sequences of the *mutS* gene

3 结论与讨论

青枯菌受不同的环境、寄主植物和各种农艺操作的影响,自身不断进化,形成了一个复合种^[14]。Fegan 和 Prior 所提出的演化型分类框架表明青枯菌的种下分化与地理起源密切相关^[10]。在分析美国东南部的青枯菌多样性时,分离自北卡罗来纳州和佐治亚州的烟草青枯菌均属于生化变种 1 和演化型 II (美洲分支)^[15]。Wang 等在研究中指出中国烟草青枯菌属于生化变种 3^[16]。对我国青枯菌遗传多样性分析中 9 株分离自烟草的菌属于演化型 I^[17]。福建烟草青枯菌被鉴定出均属于演化型 I^[18]。总体来看,我国的

烟草青枯菌属于演化型 I (亚洲分支),与美国的烟草青枯菌(演化型 II 即美洲分支)属于不同的地理起源。Wicker 等利用多位点序列分析(multilocus sequence analysis, MLSA)追溯了世界范围内的青枯菌的进化历史,发现该世系中存在 21 个重组事件,而演化型 I 是多态性持续发展的分支之一^[19]。重庆地区种下分化情况也属于生化变种 3 及演化型 I,并在序列变种上存在分化。

重庆 12 个烟草种植区县中,除巫溪、巫山和奉节地处大巴山区外,其余 9 个区县均处于武陵山区。其中,巫山、奉节目前尚未发现青枯病,巫溪县有零星发生,而另外的 9 个区县均发生青枯病,且较严重。巫山和奉节所种植的烟草品种与重庆其他植烟地并无差异。同时,本研究的结果未发现青枯菌序列变种分化与烟草品种有直接关系,由此推测,烟草品种可能不是青枯菌种下分化的直接原因。而武陵山区与大巴山区的气候、土壤条件等地理区域因子存在明显差异。鄂西烟区也大多属于武陵山区。刘海龙等对湖北地区烟草青枯菌系统发育分析的结果表明,湖北烟草青枯菌菌株属于青枯菌亚洲分支(演化型 I)的 3 个序列变种,分别为序列变种 15、17 和 44,其优势菌株也为序列变种 17 和 44^[20]。本研究结果与这个结果基本一致。福建和贵州的烟草青枯菌系统发育分析结果证实,福建的烟草青枯菌菌株包含序列变种 15、17、34 和 44,而贵州的供试菌株仅被聚到序列变种 17 分支中^[21]。比起重庆、湖北及靠近武陵山区的贵州,距离较远的福建省所分离的烟草青枯菌菌株除序列变种 15、17 和 44 外还存在序列变种 34。而其他地区是否存在异同还需进一步验证,因此,对于全国烟草青枯菌分化情况的全面评估是很有必要的。青枯菌与寄主协同进化过程中,地域分布是否是其种内遗传分化的主要驱动力,尚有待于大尺度范围内进一步深入研究。

掌握各地烟草青枯菌的具体分化情况,对今后进一步深入研究青枯菌的系统演化及防治措施具有重要意义。本研究分析了重庆地区的烟草青枯菌生化变种、演化型及系统发育情况,证实重庆地区 46 株供试菌株均属于生化变种 3 和演化型 I;系统发育进化分析结果表明重庆烟草青枯菌可聚类到 3 个序列变种(序列变种 15、17 和 44)中。为进一步研究影响青枯菌分化的关键因子及其遗传多样性机制提供了相应的依据。

参考文献

- [1] Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, et al. Transfer of two *Burkholderia* and an *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen. nov.:

- proposal of *Ralstonia pickettii* (Ralston, Palleroni and Doudoroff 1973) comb. nov., *Ralstonia solanacearum* (Smith 1896) comb. nov. and *Ralstonia eutropha* (Davis 1969) comb. nov.[J]. Microbiology Immunology, 1995, 39(11): 897-904.
- [2] Wicker E, Grassart L, Coranson-Beaudou R, et al. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French west indies) exhibiting a new pathogenic potential[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(21): 6790-6801.
- [3] 朱朝贤, 王彦亭, 王智发. 中国烟草病害 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 152-153.
ZHU Caixian, WANG Yanting, WANG Zhifa. Tobacco Diseases of China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2002: 152-153.
- [4] 孔凡玉. 烟草青枯病的综合防治 [J]. 烟草科技, 2003(4): 42-43.
KONG Fanyu. Integrated Control of Tobacco Bacterial Wilt Disease[J]. Tobacco science & Technology, 2003(4): 42-43.
- [5] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas Solanacearum*[J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29(1): 65-87.
- [6] Buddenhagen I W, Sequeira L, Kelman A. Designation of races in *Pseudomonas Solanacearum*[J]. Phytopathology, 1962, 52(8): 726.
- [7] Hayward A C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum*[J]. Journal of Applied Microbiology, 1964, 27(2): 265-277.
- [8] He L Y, Sequeira L, Kelman A. Characteristics of strains of *Pseudomonas Solanacearum* from China[J]. Plant Disease, 1983, 67(12): 1357-1361.
- [9] Pegg K G, Moffett M L. Host range of the ginger strain of *Pseudomonas solanacearum* in Queensland[J]. Animal Production Science, 1971, 11(53): 696-698.
- [10] Fegan M, Prior P. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex” ?[M] // Allen C, Prior P, Hayward A C. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St. Paul, MN: American Phytopathological Society Press, 2005: 449-461.
- [11] Prior P, Fegan M. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum*[J]. Acta horticulturae, 2005, 695, 127-136.
- [12] Sagar V, Jeevalatha A, Mian S, et al. Potato bacterial wilt in India caused by strains of phylotype I, II and IV of *Ralstonia solanacearum*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2014, 138(1): 51-65.
- [13] Poussier S, Prior P, Luisetti J, et al. Partial sequencing of the hrpB and endoglucanase genes confirms and expands the known diversity within the *Ralstonia solanacearum* species complex[J]. Systematic and applied microbiology, 2000, 23(4): 479-486.
- [14] Genin S, Denny T P. Pathogenomics of the *Ralstonia solanacearum* species complex[J]. Annual Review of Phytopathology, 2012, 50: 67-89.
- [15] Hong, J C, Norman, D J, Reed, D L, et al. Diversity among *Ralstonia solanacearum* strains isolated from the southeastern United States[J]. Phytopathology, 2012, 102(10): 924-936.
- [16] Wang Han-cheng, Huang Yan-fei, Wang Jin, et al. Phenotypic Fingerprints of *Ralstonia solanacearum* Biovar 3 Strains from Tobacco and Tomato in China Assessed by Phenotype MicroArray Analysis[J]. Plant Pathology Journal, 2015, 14(1): 38.
- [17] Xu J, Pan Z C, Prior P, et al. Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* strains from China[J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 125(4): 641-653.
- [18] 徐进, 顾钢, 潘哲超, 等. 福建烟草青枯菌演化型及生化变种鉴定研究 [J]. 中国烟草学报, 2010, 16(6): 66.
XU Jin, GU Gang, PAN Zhechao, et al. Phylotype identification and biovar determination of *Ralstonia solanacearum* strains isolated from Fujian province[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2010, 16(6): 66.
- [19] Wicker E, Lefeuvre P, de Cambiaire J C, et al. Contrasting recombination patterns and demographic histories of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum* inferred from MLSA[J]. The ISME journal, 2012, 6(5): 961-974.
- [20] 刘海龙, 黎妍妍, 郑露, 李锡宏, 黄俊斌. 湖北地区烟草青枯菌系统发育分析 [J]. 中国烟草科学, 2015, 36(2): 81-86.
LIU Hailong, LI Yanyan, ZHENG Lu, LI Xihong, HUANG Junbin. Phylogenetic Analysis of Tobacco *Ralstonia solanacearum* strains from Hubei Province[J]. Chinese Tobacco Science, 2015, 36(2): 6.
- [21] 潘哲超, 徐进, 顾钢, 等. 福建及贵州等地烟草青枯菌系统发育分析 [J]. 植物保护, 2012, 38(1): 18-23.
PAN Zhechao, XU Jin, GU Gang, et al. Phylogeny of tobacco *Ralstonia solanacearum* strains from Fujian and Guizhou provinces[J]. Plant Protection, 2012, 38(1): 18-23.

Biovar and sequevar of *Ralstonia solanacearum* in tobacco growing areas in Chongqing

LIU Ying¹, TANG Yuanman¹, ZHANG Shuting¹, GUO Bing¹, GU Jitao¹, DING Wei^{1,2}

¹ College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;

² Chongqing Tobacco Research Institute, Chongqing 400715, China

Abstract: 46 isolates were assessed to explore the diversity of tobacco *Ralstonia solanacearum* in Chongqing by using biovar, phylotype specific multiplex PCR, and phylogenetic relationships (*egl* and *mutS*). Results showed that all tested isolates belonged to biovar 3 and phylotype I. The phylogenetic neighbor-joining tree based on partial sequences of *egl* and *mutS* genes indicated that the tested isolates were clustered into phylotype I, and were further divided into 3 sequevars, namely sequevars 15, 17, and 44. Sequevar 17 and 44 were predominant. *R. solanacearum* strains on tobacco showed genetic differentiation to some extent, which provided basis for studying relationship between classification and geographic areas.

Keywords: tobacco; *Ralstonia solanacearum*; biovar; phylogenetic analysis; *egl*; *mutS*

Citation: LIU Ying, TANG Yuanman, ZHANG Shuting, et al. Biovar and sequevar of *Ralstonia solanacearum* in tobacco growing areas in Chongqing [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2016, 22(4)