

烟草青枯菌遗传多样性分析

周训军^{1,2}, 杨玉文¹, 王静³, 赵廷昌¹, 高必达²

1 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193;

2 湖南农业大学生物安全科技学院, 长沙 410128;

3 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101

摘要: 为阐明中国主要产烟省区烟草青枯菌的种内遗传多样性, 揭示烟草青枯菌种内遗传多样性与烟草品种、地理来源等的关系, 采用多位点序列分型 (Multilocus Sequence Typing, MLST) 研究方法对采自我国 11 个主要产烟省区的 93 株烟草青枯菌进行种内遗传多样性分析。结果表明: 93 株供试菌株被分为 51 个序列型 (Sequence Type, ST), 运用 eBURST V3 软件共享 5/7 基因标准可将所有供试菌株划分为 4 个亚群 (group) 与 4 个单一群 (singleton)。我国烟草青枯菌地理分布广泛, 存在丰富的种内遗传多样性, 但烟草青枯菌的组群划分与菌株的地理区域和烟草品种没有明显的相关性。

关键词: 烟草青枯菌; MLST; 遗传多样性

doi: 10.3969/j.issn.1004-5708.2014.04.014

中图分类号: Q81 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-5708 (2014) 04-0069-06

Genetic diversity of *Ralstonia solanacearum* in tobacco

ZHOU Xunjun^{1,2}, YANG Yuwen¹, WANG Jing³, ZHAO Tingchang¹, GAO Bida²

1 Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China;

2 College of Bio-safety Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

3 Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China

Abstract: Genetic diversity was analyzed with data from 93 *R. solanacearum* strains collected from 11 main tobacco-growing areas by Multilocus Sequence Typing in order to reveal relationship between tobacco variety, geographical origin and genetic diversity of *R. solanacearum*. There were 51 sequence types (STs) out of 93 *R. solanacearum* strains, and all tested strains were classified into 4 groups and 4 singletons by using eBURST V3 software sharing 5/7 gene criterion. MLST analysis showed that *R. solanacearum* was widely spread in China with rich genetic diversity and no significant correlation was found between geographical area, variety and group classification of *R. solanacearum*.

Keywords: *Ralstonia solanacearum*; MLST; genetic diversity

烟草青枯病是由青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 引起的危害全球烟草产业的毁灭性病害之一, 印度尼西亚于 1864 年首先发现了青枯菌能对烟草造成毁灭性危害。现在, 植物青枯病已经成为

世界范围内广泛传播、危害严重的重大病害之一^[1]。由于青枯病菌具有丰富的种内遗传多样性, 使其寄主范围十分广泛, 能侵染 54 个科的 450 多种植物^[2]。烟草青枯病在我国分布广泛, 尤其是长江流域及其以南产烟省区普遍发生, 其中以福建、云南、四川、湖南和贵州烟区危害最为严重, 甚至在某些年份大范围暴发流行, 给当地烟农造成巨大损失。近年来, 由于全球气候变暖等方面的原因, 该病的危害范围在我国有由南向北扩展蔓延之势, 且危害时间也在延长, 对我国烟草的生产造成了巨大威胁^[3]。

至今仍没有特别有效的药剂能够防治烟草青枯

基金项目: 中国烟草总公司科技重点项目 (110201002025, 110200902065 和 110201202002)

作者简介: 周训军 (1986—), 硕士, 研究方向为烟草青枯菌遗传多样性, Email: zhouxj@isa.ac.cn

通讯作者: 赵廷昌 (1964—), 博士, 研究员, 研究方向为植物细菌病害及植物与病原细菌互作, Email: zhaotcg@163.com

收稿日期: 2013-07-25

病。因此, 培育出对烟草青枯病具有较强抗性和耐受性的烟草新品种是防治青枯病最理想也是最经济有效的方法。但由于青枯菌寄主范围的多样性和基因组的变异性, 其致病性和菌系的变化与寄主作物品种、耕作栽培方式及其外界环境温度等均存在较大关系。所以, 在实际生产中推广的抗病品种通常会由于种植年限的增长或种植地域的不同, 使品种抗性丧失^[4]。因此青枯菌的种内遗传多样性研究具有重要意义。

多位点序列分型 (Multilocus Sequence Typing, MLST) 是由多位点酶电泳技术发展出来的一种新的遗传多样性分析方法。该方法主要运用 PCR 技术和测序技术来揭示看家基因序列的碱基位点突变从而对菌株进行遗传多样性分析^[5]。看家基因 (Housekeeping gene) 是具有高度保守性质的与核心代谢功能相关的基因, 但是不同的种以及不同菌株之间的看家基因又存在一定的差异即变异性, 一个等位基因位点上可能存在一个或几个碱基的变异。目前该方法已广泛应用于动物细菌病害的分型研究和流行病学研究^[6-12], 在植物细菌病害的研究中仅见对瓜类果斑病菌的研究报道^[13-14]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株的采集、鉴定

2011 年度分别于四川、云南、贵州、重庆、湖南、湖北、广东、广西、江西和安徽等十个主要产烟省区田间采集了不同烟草品种疑似青枯病病样材料 167 份, 以 75% 酒精对病样材料进行表面消毒, 于无菌条件下取茎秆或叶片的病健交界处组织, 放入灭菌培养皿中, 倒入 75% 的酒精灭菌 4 min, 用镊子将材料夹入无菌水中清洗 5~10 min, 然后置于小研钵中研磨, 用移液器吸取 40 μ L 左右研磨汁液滴入含有 TTC 的 NA 培养基平板划线, 写上标签, 放入 28 $^{\circ}$ C 培养箱中培养 72 h, 挑取呈典型菌落形态 (菌落一般较大, 微凸起, 呈现不规则圆形, 中间粉红色, 外周乳白色, 对光观察能见轮纹, 菌落流动性较强^[15]) 的单菌落, 于 NA 培养基平板或斜面上划线, 28 $^{\circ}$ C 条件下培养 48 h 后挑菌, 室温条件下保存于装有灭菌去离子水的离心管中备用。经分离、纯化和鉴定共得到 67 株烟草青枯菌 (表 1); 另外, 对本实验室保存的 26 株已鉴定的烟草青枯菌进行活化 (表 2), 最终确定了采自我国 11 个烟草主产省区 12 个不同烟草品种上的共 93 株烟草青枯菌作为本研究的实验材料。

表 1 分离鉴定的 67 株烟草青枯菌

Tab. 1 67 tobacco plants with *R. solanacearum* tested separately

菌株编号	采样地点	烟草品种	采样时间
5Q1	江西省赣州市石城县	K326	2011-06-16
5Q2	江西省赣州市石城县	K326	2011-06-16
5Q7	江西省抚州市广昌县	K326	2011-06-16
7Q8	湖南省张家界市慈利县	K326	2011-06-27
7Q10	湖南省长沙市浏阳市	9511	2011-06-27
7Q11	湖南省长沙市浏阳市	9511	2011-06-27
7Q12	湖南省衡阳市衡南县	云烟 87	2011-06-29
7Q17	湖南省长沙市宁乡县	云烟 85	2011-07-25
7Q18	湖南省长沙市宁乡县	云烟 85	2011-07-25
7Q20	湖南省湘西州龙山县	云烟 87	2011-08-22
7Q21	湖南省湘西州龙山县	K326	2011-08-22
7Q22	湖南省湘西州龙山县	K326	2011-08-22
4Q6	广东省韶关市南雄市	云烟 85	2011-06-11
4Q7	广东省韶关市南雄市	云烟 85	2011-06-11
4Q10	广东省韶关市南雄市	云烟 85	2011-06-11
1Q7	四川省攀枝花市米易县	翠碧一号	2011-07-10
1Q23	四川省达州市	云烟 97	2011-08-18
3Q3	广西贺州市富川县	云烟 97	2011-07-07
3Q4	广西贺州市富川县	云烟 97	2011-07-07
3Q5	广西河池市罗城县	云烟 85	2011-07-08
3Q6	广西河池市南丹县	云烟 87	2011-07-20
3Q7	广西河池市南丹县	云烟 87	2011-07-20
3Q8	广西河池市罗城县	云烟 85	2011-07-23
RS429	湖北省恩施州巴东县	云烟 87	2011-04-29
9Q4	湖北省恩施州咸丰县	云烟 87	2011-08-03
9Q5	湖北省恩施州利川市	云烟 87	2011-08-15
9Q6	湖北省恩施州利川市	云烟 87	2011-08-15
9Q7	湖北省恩施州咸丰县	云烟 87	2011-08-17
9Q8	湖北省恩施州咸丰县	云烟 87	2011-08-17
9Q9	湖北省恩施州宣恩县	云烟 98	2011-08-16
9Q11	湖北省恩施州宣恩县	云烟 98	2011-08-16
9Q13	湖北省恩施州鹤峰县	云烟 87	2011-08-22
9Q14	湖北省恩施州建始县	鄂烟 1 号	2011-08-28

表 1 (续)

8Q1	安徽省黄山市歙县	云烟 97	2011-07-05
8Q5	安徽省宣城市宣州区	云烟 97	2011-07-30
8Q6	安徽省宣城市宣州区	云烟 97	2011-07-30
8Q7	安徽省宣城市宣州区	云烟 97	2011-07-31
8Q8	安徽省宣城市宣州区	云烟 97	2011-07-31
8Q9	安徽省芜湖市芜湖县	云烟 97	2011-07-31
8Q10	安徽省芜湖市芜湖县	云烟 97	2011-07-31
17Q25	云南省玉溪市新平县	KRK26	2011-08-09
17Q26	云南省玉溪市新平县	K326	2011-08-09
Py10	重庆市黔江区	南江 3 号	2011-06-10
11Q1	重庆市万州区	云烟 87	2011-07-19
11Q2	重庆市万州区	云烟 87	2011-07-19
11Q3	重庆市万州区	云烟 87	2011-07-19
11Q8	重庆市黔江区	南江 3 号	2011-08-12
11Q9	重庆市黔江区	南江 3 号	2011-08-12
11Q12	重庆市武隆县	云烟 97	2011-08-22
11Q13	重庆市武隆县	云烟 97	2011-08-22
11Q14	重庆市武隆县	云烟 97	2011-08-22
11Q15	重庆市武隆县	云烟 97	2011-08-22
11Q16	重庆市武隆县	云烟 97	2011-08-22
11Q17	重庆市万州区	南江 3 号	2011-08-30
11Q18	重庆市万州区	云烟 87	2011-09-09
2Q1	贵州省铜仁市思南县	K326	2011-08-16
2Q2	贵州省铜仁市思南县	K326	2011-08-16
2Q4	贵州省铜仁市思南县	K326	2011-08-16
2Q7	贵州省铜仁市松桃县	南江 3 号	2011-08-23
2Q8	贵州省铜仁市松桃县	毕纳 1 号	2011-08-23
2Q9	贵州省铜仁市松桃县	南江 3 号	2011-08-23
2Q12	贵州省铜仁市松桃县	南江 3 号	2011-08-25
2Q13	贵州省铜仁市石阡县	K326	2011-08-26
2Q15	贵州省铜仁市石阡县	南江 3 号	2011-08-26
2Q16	贵州省铜仁市石阡县	牛津 2 号	2011-08-26
2Q17	贵州省铜仁市石阡县	南江 3 号	2011-08-26
2Q21	贵州省铜仁市贞丰县	云烟 97	2011-08-29

表 2 本实验室保存的 26 株烟草青枯菌

Tab. 2 26 tobacco plants with *R. solanacearum* stored in the laboratory

菌株编号	采样地点	烟草品种	采样时间
Tb619	广东省韶关市南雄市	云烟 85	2009-06-19
Tb712	广东省韶关市南雄市	云烟 85	2009-07-12
E69	浙江省	云烟 87	2010-12-20
E406	浙江省	云烟 87	2010-12-20
M77	浙江省	云烟 87	2010-12-20
T91	浙江省	云烟 87	2010-12-20
T93	浙江省	云烟 85	2010-12-0
T94	浙江省	云烟 87	2010-12-20
G021	浙江省	云烟 85	201-12-20
NAND	广西河池市南丹县	云烟 87	2010-09-10
ssf4	广东省三水区	K326	2007-04-05
RS0712	广东省	云烟 85	2007-07-12
RS08121	广东省	K326	2008-01-21
RS0745	广东省	云烟 85	2007-04-05
YS	湖南省湘西州永顺县	K326	200-09-04
C3	湖南省长沙市	云烟 87	2011-06-12
C4	湖南省长沙市	云烟 87	2011-06-12
C5	湖南省长沙市	云烟 87	201-06-12
JL429	广东省	云烟 85	2009-04-29
JL57	广东省	云烟 85	2009-05-07
JM	重庆市	南江 3 号	2011-09-20
XC	云南省文山州西畴县	云烟 85	2010-09-28
MLP	云南省文山州麻栗坡县	云烟 85	2010-09-01
XW	四川省宜宾市兴文县	云烟 97	2010-08-2
Gy2	广东省高要市	云烟 85	2007-04-05
Tb23	广东省荔浦县	云烟 85	2002-04-29

1.1.2 主要仪器和试剂

超净工作台 (苏州净化设备有限公司, SW-CJ-1FD 型单人单面净化工作台), 恒温培养箱 (上海实验仪器厂有限公司, DHP120), 恒温水浴锅 (Julabo, TW8), PCR 仪 (TaKaRa PCR Thermal Cycler), 电泳仪 (北京六一仪器厂, DYY-8C), 凝胶成像分析系统 (BIO-RAD Gel Doc™ XR Imaging System); 细菌基因

组 DNA 提取试剂盒 (北京百灵克生物科技有限责任公司), 2×Taq PCR MasterMix (天根生化科技北京有限公司), 琼脂糖 (Invitrogen™ Agarose-Molecular Biology Grade), DNA MarkerII、λ DNA/HindIII (中科瑞泰 (北京) 生物技术有限公司) 等。

1.2 方法

1.2.1 菌株基因组 DNA 提取

将青枯菌在 TTC 培养基平板划线并于 28℃ 培养箱中培养 48h, 然后用灭菌枪头在无菌条件下挑取火柴头大小的菌落, 接种在装有高压灭菌的 NA 液体培养基的玻璃试管内。将试管放在 28℃ 恒温摇床内, 200 r/min 摇培 16 ~ 17 h, 将摇好的菌悬液按照细菌

基因组 DNA 提取试剂盒上面的步骤进行菌株基因组 DNA 的提取。

1.2.2 看家基因的筛选

参考相关文献并从中选出 12 个常用于革兰氏阴性细菌 MLST 分型且多态性好的看家基因^[6-14], 从 NCBI 网站下载青枯菌菌株 GMI1000 基因组全序列, 将初选的 12 个看家基因与 GMI1000 基因组全序列比对, 并利用引物设计专业软件 primer5.0 分别设计各看家基因的引物并对各看家基因进行 PCR 预扩增, 以筛选合适的看家基因和扩增条件, 最终确定了 7 个看家基因 (表 2) 为本实验的看家基因, PCR 扩增引物由上海生工生物工程有限公司合成。

表 3 7 个看家基因在青枯菌菌株 GMI1000 基因组中的功能、位置和引物序列
Tab. 3 Function, location and primer sequence of 7 house-keeping genes in the genome GMI1000

基因	功能	基因位置	引物序列	产物长度 /bp
<i>rfbD</i>	糖核苷酸合成转化蛋白	RSc_0683	rfbD1: GCTGGTCACGGGAAGCAACG rfbD2: GATCGCCCCGACAGCCAGAAG	608
<i>efp</i>	延伸因子	RSc_1069	efp1: CCCGATGGTCGTGCTC efp2: GACCTGGATCTCGAAGC	433
<i>pstS1</i>	磷酸盐转移蛋白	RSc_1529	pstS1: AAGGTGAACTATCAAGGCAT pstS2: TCAGGATCTGGTAGAACGAC	637
<i>dnaQ</i>	核酸外切酶	RSc_1872	dnaQ1: GAGCATCCCGAAGCCAGACC dnaQ2: GCACGGCATTACCAACGAGT	536
<i>ureG</i>	尿素酶相关蛋白	RSc_2029	ureG1: CCGTGGCCTGGTGTTCAT ureG2: GGAGTCAGGAAACGCTTGTG	608
<i>ppa</i>	无机焦磷酸酶	RSc_2349	ppa1: GCAAGGACATCCCCAACG ppa2: CGCCATCGACGATTTCTTTAT	483
<i>adk</i>	腺苷酸激酶	RSc_2533	adk1: ATGCGGTTGATTCTGTTGGG adk2: GGCGGTCTGGTTCTCGTA	529

1.2.3 扩增体系及反应程序

用筛选出的特异性高的引物对所有供试菌株的七个看家基因分别进行 PCR 扩增, PCR 扩增采用 50 μL 反应体系, 其中 2×Taq PCR MasterMix 20 μL, ddH₂O 24 μL, 上下游引物各 2 μL, DNA 模板 2 μL。反应程序为 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 30 s, 59℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。取 10 μL PCR 产物于 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳, 再通过 Bio-rad 凝胶成像系统观察结果, 然后将扩增产物送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序。

1.2.4 序列比对和分析

经过对看家基因的 PCR 扩增以及碱基测序, 每个菌株都能得到 7 个 400~600 bp 大小的看家基因扩

增产物的碱基序列, 运用 DNAMAN 软件对全部供试菌株的 7 个看家基因的扩增产物碱基序列分别进行多序列比对分析, 依照各个看家基因中不同等位基因的碱基差异将每个看家基因的各等位基因进行排列组合并进行数字编号, 然后所有菌株都能得到各个看家基因上的一个数字编号即等位基因号 (Allelic Profile), 最后每个菌株都能够用 7 个看家基因的等位基因号组成的数列表示, 称为菌株的序列型 (Sequence Type, ST)^[9]。

登录 <http://eburst.mlst.net/>, 采用 eBURST V3 程序共享 5/7 基因标准分析, 将全部供试菌株的由不同序列型及等位基因号组成的一个数字矩阵提交网络, 利用程序分析便能够获得全部菌株的种群遗传关系图谱。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

用细菌基因组提取试剂盒提取基因组 DNA 后电泳检测 DNA 提取效果, 然后进行看家基因的 PCR 扩增, 并电泳检测扩增效果, 将合格样品送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序, 获得菌株看家基因的碱基序列。图 1 与图 2 分别为 2011 年部分新分离菌株基因组 DNA 电泳和看家基因扩增产物电泳图。

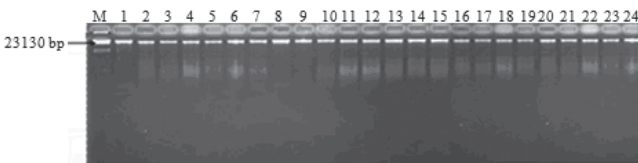


图 1 部分基因组 DNA 提取产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis map of extraction of some genome



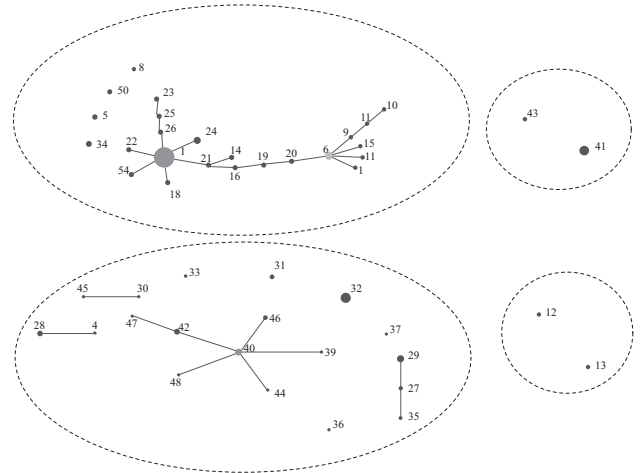
图 2 引物 pstS1/pstS2 扩增部分烟草青枯病菌的产物电泳图

Fig. 2 Electrophoresis map of *R. solanacearum* for the expanded part of pstS1/pstS2

2.2 序列比对和分析

将所有菌株的 7 个看家基因测序所得碱基序列用 DNAMAN 软件分别进行比对分析, 结合测序峰图, 峰图中开始的若干个波峰不明显的碱基不计入分析。将各个看家基因的不同等位基因位点上的不同碱基进行排列组合并进行数字编号, 形成每个看家基因的不同等位基因号, 分析结果表明: 所有供试菌株的七个看家基因 *rfbD*、*efp*、*pstS1*、*dnaQ*、*ureG*、*ppa*、*adk* 分别存在 5、7、14、10、8、9、4 个等位基因号。对各个看家基因的各等位基因位点上的不同碱基形成不同的组合进行数字编号, 即为每个看家基因的等位基因号 (Allelic Profile), 最后每个菌株都能够用 7 个看家基因的 7 个等位基因号组成的数列表示, 称为菌株的序列型 (Sequence Type, ST)。经过数据统计分析, 93 株供试菌株被划分为 51 个序列型 (Sequence Type, ST)。登陆 <http://eburst.mlst.net/>, 将所有供试菌株形成的序列型和等位基因号形成的数字矩阵提交网络, 选择共享 5/7 的基因标准, 运用 eBURST V3 程序分析, 结果表明, 所有菌株可分为 4 个亚群 (group) 和 4 个单一群 (singleton): 亚群 1 包含 24 个 ST 的 50 个菌株,

其核心型为 ST1, ST1 包含 19 个菌株, 来源包括了除江西以外的所有采样省区; 亚群 2 包含 19 个 ST 的 32 个菌株, 其核心型为 ST40, ST40 包含 2 个菌株, 都来自安徽; 亚群 3 包含 2 个 ST 的 2 个菌株, 都来自湖南; 亚群 4 包含 2 个 ST 的 5 个菌株, 其中 3 株来自重庆, 2 株来自贵州; 4 个单一群各包含 1 个菌株, 分别是浙江 2 个菌株, 云南和广西各 1 个菌株。



注: 其中每个圆点代表一个 ST, 蓝色圆点表明该 ST 为核心型 ST, 而黄色圆点则代表次级核心型 ST, 每个圆点的大小与其含有的菌株个数呈正比关系。

图 3 程序 eBURST V3 在选择共享 5/7 基因标准时获得的所有供试烟草青枯菌的种群遗传关系图

Fig. 3 Population genetic relationship diagram for eBURST V3 sharing 5/7 gene criterion

通过共享 5/7 基因标准分析, 主要亚群 (亚群 1, 亚群 2) 中都包含了所有采样省区的菌株, 且亚群 1 的核心型 ST1 包含了除江西省的所有采样地区菌株, 虽然亚群 2 的核心型 ST40 的两个菌株都来自安徽, 但亚群 2 中各菌株之间的联系比较松散, 并没有与核心型菌株紧密联系在一起。这一结果表明我国烟草青枯病的地理分布极为广泛, 且各省的烟草青枯病都是由同一 ST 的菌株发展蔓延的。

本研究采用的 93 株烟草青枯菌主要采自 K326、KRK26、9511、云烟 85、云烟 87、云烟 97、云烟 98、南江 3 号、翠碧一号、鄂烟 1 号、毕纳 1 号、牛津 2 号等 12 个烟草品种。根据共享 5/7 基因标准的组群划分, 亚群 1 的核心型 ST1 包含的菌株分别采自 7 个不同的烟草品种, 亚群 1 中所有菌株分别采自 10 个不同的烟草品种; 亚群 2 的核心型 ST40 的两个菌株都采自同一烟草品种 (云烟 97), 但亚群 2 中所有菌株来自 6 个不同的烟草品种。根据 ST 的划分可以看出, 不同烟草品种上分离的菌株可以被划分到

同一 ST, 而同一烟草品种上分离的不同菌株则可以被划分为不同的 ST, 且烟草品种与 ST 划分之间并没有规律。这一实验结果表明, 烟草青枯菌的组群划分与烟草品种无关。

3 结论与讨论

由于青枯菌寄主范围广泛, 危害严重, 且到目前为止还没有能有效防治青枯菌的药剂。所以, 各国学者一直在尝试了解青枯菌种内遗传变化规律, 为选育抗病品种和研制新型防治药剂提供理论依据。在第三届国际青枯病大会上, Fegan 和 Prior 首次提出了演化型分类框架用于描述青枯菌种内差异, 该分类框架将青枯菌划分为种、演化型、序列变种和克隆四个不同分类水平, 并分别建立了与之对应的鉴定方法。演化型分类框架与传统的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^[16]。

对于烟草青枯菌种内遗传多样性的研究, 国内外报道的比较少。1982年, Yi 等对 1980-1981 年间采自韩国烟草的 14 株青枯菌菌株进行分类研究, 通过对接种不同寄主的反应分为两个小种, 生化型测定分别属于生化变种 1 和生化变种 4^[17]。2007 年, 郑向华等采用 RAPD (随机扩增多态性 DNA) 对广东省的 38 株烟草青枯菌进行了遗传多样性分析, 表明烟草青枯菌组群划分与寄主来源有一定相关性, 但与地理区域、生物型和致病型没有明显的相关性^[4]。2010 年, 徐进等对 45 株福建烟草青枯菌进行演化型分类, 结果表明所有菌株均为演化型 I 型即亚洲分支菌株, 其中有 43 株属于生化变种 III, 1 株属于生化变种 IV, 1 株属于非标准型生化变种^[18]。

本研究首次运用了 MLST (多位点序列分型) 对采自全国 11 个主要产烟省区 12 个不同烟草品种的 93 株烟草青枯菌进行遗传多样性分析, 结果表明 93 株烟草青枯菌具有丰富的种内遗传多样性, 所有菌株可以分为 4 个亚群和 4 个单一群。但是烟草青枯菌组群划分与寄主的地理来源和品种没有明显相关性。

本研究采用的 MLST 法已广泛应用于细菌病害的分型研究^[6-12], 但是还未见用于烟草青枯菌遗传多样性分析的报道。该方法选择高度保守的看家基因为研究对象, 分辨率高, 更能反映菌株的遗传多样性, 且得到的实验数据可以提交到官方网站 <http://www.mlst.net/>, 为后续研究者提供参考和依据, 有利于研究者全面的了解病害在世界各地的发生和流行趋势, 为病害的防控提供理论依据。

参考文献

- [1] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas Solanacearum*[J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29(1): 65-87.
- [2] Wicker E, Grassart L, Coranson B R, et al. *Ralstonia solanacearum* strains from Martinique (French West Indies) exhibiting a new pathogenic potential[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 71(21): 6790-6801.
- [3] 孔凡玉. 烟草青枯病的综合防治 [J]. 烟草科技, 2003(4): 42-43.
- [4] 郑向华, 邓海滨, 刘琼光, 等. 广东省烟草青枯菌的菌系和遗传多样性 [J]. 华中农业大学学报, 2007,26(4): 463-468.
- [5] 姬小薇, 廖亚玲, 毛旭虎, 等. MLST 分析在病原微生物基因分型应用中的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2011,32(2):246-249.
- [6] Scally M, Schuenzel E L, Ctouthamer R, et al. Multilocus sequence type system for the plant pathogen *Xylella fastidiosa* and relative contributions of recombination and point mutation to clonal diversity[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(12): 8491-8499.
- [7] Homan W L, Tribe D, Poznanski S, et al. Multilocus sequence typing scheme for *Enterococcus faecium* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002, 40(6): 1963-1971.
- [8] Dingle K E, Colles F M, Wareing D R A, et al. Multilocus Sequence Typing System for *Campylobacter jejuni* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 37(1): 14-23.
- [9] McCombie R L, Finkelstein R A, Woods D E. Multilocus sequence typing of historical *Burkholderia pseudomallei* isolates collected in southeast Asia from 1964 to 1967 provides insight into the epidemiology of melioidosis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2006, 44(8): 2951-2962.
- [10] 邓小玲, 管大伟, 黎薇, 等. MLST 分型技术应用于脑膜奈瑟菌的分子流行病学研究 [J]. 华南预防医学, 2008, 34(3): 10-14.
- [11] 张少敏, 徐建国. 多位点序列分型及其应用 [J]. 疾病监测, 2008, 23(10): 648-650.
- [12] 王新, 周婷, 孟洪江. 禽肉空肠弯曲杆菌的多位点序列分型技术研究 [J]. 中国食品学报, 2010, 10(2): 180-186.
- [13] Feng J J, Schuenzel E L, Li J Q, et al. Multilocus sequence typing reveals two evolutionary lineages of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* [J]. Phytopathology, 2009, 99: 913-920.
- [14] 阎莎莎. 瓜类细菌性果斑病菌种内遗传多样性的研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [15] Lucas G B. Diseases of Tobacco[M]. Third edition Reteigy North Carolina, 1975, 365-382.
- [16] Fegan M, Prior P. How complex is the “*Ralstonia solanacearum* species complex” [M]. Allen C, Prior P, Hayward AC. Bacterial wilt disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. St. Paul: APS, 2005: 449-462.
- [17] Yi T K, Kim J H, Kang S K, et al. Classification of *Pseudomonas solanacearum* isolates from tobacco plants in Korea[J]. Korean Journal of Plant Protection, 1982, 21(3): 123-127.
- [18] 徐进, 顾刚, 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): 66-71.