

甘薯茎腐病菌的遗传多样性及致病力差异分析

黄立飞 陈景益 房伯平* 罗忠霞 张雄坚 王章英

(广东省农业科学院作物研究所, 广东省农作物遗传改良重点实验室, 广州 510640)

摘要: 为了解不同地区甘薯茎腐病菌 *Dickeya dadantii* 种群遗传多样性水平及致病力差异, 采用重复序列 PCR 基因指纹 (repetitive element palindromic PCR, REP-PCR) 技术和薯片接种方法, 对采自广东省、广西壮族自治区和重庆市的 6 个市区县的 59 株菌株进行分析。结果表明, 5 对引物对 59 株菌株扩增出 41 个清晰的条带, 其中 36 个为多态性条带, 每对引物的扩增条带数在 4~10 之间, 平均为 7.2。在物种水平上, 有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数和 Shannon 信息指数分别为 1.4768、0.2801 和 0.4186, 其中湛江种群多样性最高, 南宁种群多样性最低; 当遗传相似系数为 0.79 时, 59 株菌株可被划分为 5 个类群, 类群划分与菌株来源地间有一定的相关性。此外, 不同地区病菌种群间存在明显的致病力差异, 其中合浦种群与湛江种群致病力最强, 万州种群致病力较弱。表明甘薯茎腐病菌种群具有丰富的遗传多样性, 不同地区的病菌种群存在明显的遗传多样性与致病力差异。
关键词: 甘薯茎腐病; 达旦提狄克氏菌; 遗传多样性; 重复序列 PCR 基因指纹; 致病力差异

Pathogenic differentiation and genetic diversity of *Dickeya dadantii* causing bacterial stem and root rot of sweetpotato

Huang Lifei Chen Jingyi Fang Boping* Luo Zhongxia Zhang Xiongjian Wang Zhangying

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Crops Genetics and Improvement, Crop Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, Guangdong Province, China)

Abstract: To understand the pathogenic differentiation and genetic diversity of *Dickeya dadantii* causing bacterial stem and root rot of sweetpotato, 59 isolates collected from six different regions in Guangdong Province, Guangxi Zhuang Autonomous Region, and Chongqing City were analyzed by using repetitive-element PCR genomic fingerprinting (REP-PCR) techniques and chip inoculation methods. The results showed that 41 obvious bands were amplified, in which 36 bands were polymorphic. For each primer pair, four–ten alleles were detected with an average of 7.2. At the level of species, effective number of alleles, diversity index of Nei's genes, and Shannon information index were 1.4768, 0.2801 and 0.4186, respectively. Genetic diversity of Zhanjiang population was the maximal, and the minimal genetic diversity was found in Nanning population. The genetic similarity coefficient (GSC) was 0.79, and the 59 strains of bacterial stem and root rot of sweetpotato collected from six different regions were divided into five major groups using unweighted pair-group method with arithmetic averages (UPGMA) method according to genetic distance and GSC. The clustering groups based on GSC were associated with geographic origins to some degree. The pathogenic populations collected from different regions were different in infection ability, in which Hepu population and Zhanjiang population had the highest capacity to cause bacterial stem and root rot of sweetpotato, while Wanzhou population had the relative-

基金项目: 国家现代农业(甘薯)产业技术体系(CARS-10-C-17, CARS-10-B-4), 广东省自然科学基金(2015A030313564)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: fangboping@gdaas.cn

收稿日期: 2017-05-24

ly weak pathogenicity. The results suggested that *D. dadantii* populations had a rich genetic diversity, while there were significant differences between pathogenic populations in different regions. *D. dadantii* causing bacterial stem and root rot of sweetpotato had wide pathogenic differentiation in different regions.

Key words: bacterial stem and root rot of sweetpotato; *Dickeya dadantii*; genetic diversity; repetitive element palindromic PCR; pathogenic differentiation

甘薯茎腐病又称细菌性茎根腐烂病,由达旦提狄克氏菌 *Dickeya dadantii* 引起的一种毁灭性病害。该病害于 1974 年在美国首次被发现 (Schaad & Brenner, 1977), 2006 年该病害在我国广东省被发现 (Huang et al., 2010; 黄立飞等, 2011), 目前在我国福建、江西、广西、海南、河南、江苏、河北、重庆和浙江等省(市、区)均有发生,且呈不断蔓延和加重的趋势,造成严重的产量和经济损失(秦素研等, 2013; 黄立飞等, 2014; 高波等, 2015)。利用抗病品种防治该病害是最经济、绿色有效的措施,由于病原菌与寄主植物的协同进化,演化出明显的生理及致病力分化等表型特征差异,因此了解病原菌种群遗传结构及致病力对培育抗病品种以及有效控制病害具有重要意义。

学者多采用寄主范围、病原菌生理生化和分子生物学等方法对植物病原菌种群的遗传多样性及致病力分化进行研究,其中基于 DNA 水平的分子生物学技术方法因多态性丰富以及不受环境和人们主观因素影响的特点,已成为病原菌种内种群遗传结构研究的必选方法(司二静等, 2017)。Laurila et al. (2008) 和陈康等(2014)应用限制性酶切片长度多态性分析(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、16S rDNA 测序和重复序列 PCR 基因指纹(repetitive element palindromic PCR, REP-PCR)等技术对狄克氏菌属的分类鉴定及多样性进行研究。REP-PCR 技术操作简便、重复性高,已广泛应用于植物病原细菌和真菌的分类、检测以及病原细菌种群遗传多样性研究,能够分析同种、致病专化型菌株间的遗传变异关系(Louws et al., 1994; Dankevych et al., 2014)。由于植物病原细菌基因组中广泛分布着基因外重复回文序列(repetitive extragenic palindromic, REP)、肠杆菌基因间重复一致序列(enterobacterial repetitive intergenic consensus, ERIC)及反转录重复因子(mosaic repetitive element, BOX)等短重复序列,其不同属、种和菌株间具有高度的保守性,在细菌遗传进化上起着重要的作用(Louws et al., 1994)。因此,采用 PCR 技术以短重复序列为引

物,以重复序列间不同基因组区域为靶序列进行扩增,建立了 REP-PCR 技术,该技术通过比较不同菌株间 PCR 扩增产物指纹图谱的变化,能高效地揭示病原菌种群的遗传多样性变化以及不同菌株间的进化关系(Debrujin et al., 1996)。

Martin-Sanz et al. (2012) 采用 REP-PCR 技术将 91 株豌豆细菌性叶斑病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *Pisi* 划分为 2 个类群,类群划分与菌株的地域来源无显著相关性。Rusenova et al. (2013) 采用 REP-PCR 技术将 96 株来自保加利亚的幼虫芽胞杆菌 *Paenibacillus larvae* 划分为 ab 和 AB 两个基因型,其检出率分别为 78.1% 和 21.9%。潘俊鹏等(2011)对来自全国的 33 株番茄细菌性溃疡病菌菌株进行 REP-PCR 分析,将其划分为 7 个遗传相似组群,菌株具有丰富的遗传多态性和较大的遗传变异,遗传分群与菌株的地理来源关系密切。陈康等(2014)利用 REP-PCR 分析了香蕉狄克氏菌 *D. paradisiaca*,证实了侵染广东省香蕉的香蕉狄克氏菌遗传多样性丰富,且其与病原菌的致病性和地理来源有一定关系。目前关于甘薯茎腐病菌——达旦提狄克氏菌遗传多样性及致病力差异的研究未见报道。本研究利用 REP-PCR 技术和薯片接种方法,对采自广东省、广西壮族自治区、重庆市的 6 个市区县的 59 株甘薯茎腐病菌菌株进行遗传多样性和致病力差异分析,以期安全、有效地控制该病害提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及植物:于 2011—2014 年共采集了 59 株达旦提狄克氏菌菌株,其中广东省的广州市采集 10 株菌株,命名为广州种群,菌株编号分别为 E36~E45,寄主品种为广薯 87;广东省湛江市采集 9 株菌株,命名为湛江种群,菌株编号分别为 E47~E55,寄主品种为育种品系;广西壮族自治区南宁市采集 10 株菌株,命名为南宁种群,菌株编号分别为 E56~E65,寄主品种为育种品系;广西壮族自治区合浦县采集 10 株菌株,命名为合浦种群,菌株编号分别为 E80~E89,

寄主品种为育种品系;广西壮族自治区东兴市采集10株菌株,命名为东兴种群,菌株编号分别为E113~E122,寄主品种为红姑娘;重庆市万州区采集10株菌株,命名为万州种群,菌株编号分别为E161~E165、E167~E169、E173和E175,寄主品种为广薯87。所有菌株冻干于-80℃保存备用。致病鉴定品种为广薯72、广紫薯2号、广紫薯8号、广薯98、广薯87、广薯205、广薯128、广薯95-1和广薯79共9株甘薯品种/品系,均为广东省农业科学院作物研究所选育。

培养基:营养琼脂(nutrient agar, NA)固体培养基:蛋白胨5 g、牛肉膏3 g、琼脂15 g,加蒸馏水定容至1 L, pH调为7.0~7.2。NA液体培养基:NA固体培养基中不添加琼脂。

试剂及仪器:细菌基因组DNA提取试剂盒,广州美基生物科技有限公司;Easy Taq DNA聚合酶,北京全式金生物技术有限公司;6×Loading Buffer、分子量标记DL2000,宝生物工程(大连)有限公司;琼脂粉、蛋白胨、蔗糖,北京奥博星生物技术有限公司;牛肉浸膏、酵母浸膏,广东环凯微生物科技有限公司;其它试剂均为国产分析纯。DU800型紫外/可见分光光度计,美国Beckman公司;MDF-382E超低温冰箱,日本三洋公司;5332小型PCR仪,德国Eppendorf公司;Box-EF凝胶成像系统,英国Syn-gene公司;DYCP-32A型琼脂糖水平电泳仪,北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 菌株REP-PCR扩增

从NA平板上挑取单菌落于NA液体培养基中,于30℃以160 r/min振荡培养12 h。取1 mL菌液按照细菌基因组DNA提取试剂盒步骤提取59株菌株的基因组DNA。以59株菌株的基因组DNA为模板,PCR反应体系参照Guo et al.(2012)方法。REP-PCR引物(Versalovic et al., 1991)为REP1(5'-IIIC-GICGICATCIGGC-3')和REP2(5'-ICGICTTATCIGGCCTAC-3')。ERIC-PCR引物(Versalovic et al., 1991)为ERIC1R(5'-ATGTAAGCTCCTGGGGA-TTCAC-3')和ERIC2(5'-AAGTAAGTGACTGGG-GTGAGCG-3')。ISR-PCR引物(Ateba et al., 2013)为G1(5'-GAAGTCGTAACAAGG-3')和L1(5'-CAAGGCATCCACCGT-3')。BOX-PCR引物(Oda et al., 2002)为BOX A1R(5'-CTACGGCAAGGCG-ACGCTGACG-3')。MBO-PCR引物(Rusenova et al., 2013)为MBO EP1(5'-CCGCCGTTGCCGCC-

GTTGCCGCCG-3'),均委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR扩增程序:95℃预变性2 min;94℃变性40 s;REP、ISR、BOX、ERIC和MBO退火温度分别为40、40、50、52和59℃,均退火1 min;REP、ISR、BOX和ERIC四个PCR:65℃延伸8 min;MBO-PCR:72℃延伸1.5 min,35个循环;MBO:72℃延伸10 min;其它4个PCR:65℃延伸8 min。PCR扩增产物与4 μL 6×Loading Buffer混匀后,用移液器吸取6 μL在1%琼脂糖凝胶80 V电泳1 h,利用凝胶成像系统对电泳琼脂糖凝胶进行检测并拍照,将照片以JPEG文件保存。

1.2.2 甘薯茎腐病菌种群遗传多样性分析

利用POPGENE32 1.32软件(Yeh et al., 1997)对59株菌株的甘薯茎腐病菌种群进行遗传多样性、遗传分化以及遗传距离分析。首先对PCR扩增产物的凝胶图进行读带,有带记作1,无带记作0,然后将其数据输入到POPGENE32 1.32软件中分析甘薯茎腐病菌种群遗传多样性水平的相关指数,包括等位基因数、有效等位基因数、Nei's基因多样性指数、Shannon信息指数、多态性位点数、多态位点百分率、遗传分化系数 G_{st} ;为分析不同地区种群的遗传分化程度,按照Nei(1987)基因多度法计算遗传分化系数 G_{st} ;参考Nei(1972)方法计算遗传一致度和遗传距离,利用 F_{st} 法计算基因流 N_m (Wright, 1951)。

1.2.3 甘薯茎腐病菌种群聚类分析

为了进一步分析59株菌株不同地区种群及个体间的遗传关系,利用NTSYS 2.10软件采用非加权算术平均数配对(unweighted pair-group method with arithmetic averages, UPGMA)法对59株菌株进行聚类。对5个PCR扩增产物的凝胶图进行读带,有带记作1,无带记作0,利用NTSYS-pc 2.10e软件包自动生成相似性系数和树状图,分析不同菌株之间的遗传多样性及遗传关系。

1.2.4 甘薯茎腐病菌种群致病力分析

将保存在-80℃的59株菌株接种到营养琼脂培养基平板上,置于30℃恒温培养箱活化,48 h后用接种环将活化的菌株重新在NA平板上划线,置于30℃恒温培养箱培养24 h,用无菌水将NA平板上的细菌菌落冲洗下来,然后利用分光光度计于620 nm波长处测定菌液浓度,调制OD值为0.15,即菌悬液的浓度配成 1×10^8 CFU/mL。

对9个甘薯品种广薯72、广紫薯2号、广紫薯8号、广薯98、广薯87、广薯205、广薯128、广薯95-1和广薯79进行致病鉴定,每个品种选取5块200 g的薯

块,清洗晾干后用 75% 酒精消毒。从每个薯块中部切取厚度为 8 mm 的薯片作为接种体,然后把薯片置于放有灭菌湿润滤纸的灭菌铁盘中,用移液枪在每个薯片中央接种浓度 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液 20 μ L,放入 30℃ 恒温培养箱培养 24 h,十字交叉法量取薯片发病病斑直径。

1.3 数据分析

采用 DPS 7.05 软件对试验数据进行统计分析,应用 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 菌株 REP-PCR 扩增结果

在 59 株菌株中 5 对引物共扩增出 41 个清晰的条带即位点,其中 36 个为多态性位点。每对引物扩增的多态性位点数为 4~10 个,平均为 7.2 个。总体水平上,有效等位基因数、Nei's 基因多样性指数和 Shannon 信息指数分别为 1.8556、0.4593 和 0.6515。所有引物中,引物 MBO REP1 扩增的有效等位基因

数、Nei's 基因多样性指数和 Shannon 信息指数最高,分别为 1.9096、0.4746 和 0.6671(表 1)。

2.2 甘薯茎腐病菌种群遗传多样性

5 对引物在不同地区甘薯茎腐病菌种群中扩增出的多态位点数和多态性位点百分率存在一定的差异,各个种群的多态位点数和多态性位点百分率分别低于物种的多态位点数 32 个和多态性位点百分率 78.05%,其中南宁、合浦和万州 3 个种群的多态位点数和多态性位点百分率相同,分别为 9 个和 21.95%,低于种群的平均水平 12 个和 29.27%,最高值是湛江种群分别为 17 个和 41.46%。在物种水平上,等位基因观测数为 1.7805,有效等位基因数目为 1.4768,Nei's 基因多样性指数为 0.2801,Shannon 信息指数为 0.4186。在种群平均水平上,等位基因观测数为 1.2927,有效等位基因数为 1.1733,基因多样性指数为 0.1031,Shannon 信息指数平均为 0.1550。在种群之间,湛江种群多样性相对较高,其次为东兴种群,南宁种群最低(表 2)。

表 1 59 株甘薯茎腐病菌菌株的 REP-PCR 扩增结果

Table 1 The result of REP-PCR for 59 isolates of *Dickeya dadantii*

引物 Primer	有效等位基因数 Effective number of alleles	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index	Shannon 信息指数 Shannon information index	位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci
L1-G1	1.7166	0.3917	0.5619	6.0	4.0
REP1-REP2	1.7482	0.4073	0.5836	8.0	8.0
ERIC1R-ERIC2	1.7242	0.4096	0.5969	12.0	10.0
MBO REP1	1.9096	0.4746	0.6671	7.0	6.0
BOX A1R	1.6560	0.3877	0.5736	8.0	8.0
平均 Average	1.7509	0.4142	0.5966	8.2	7.2
总体 Total	1.8556	0.4593	0.6515	41.0	36.0

表 2 甘薯茎腐病菌种群遗传多样性水平

Table 2 Genetic diversity parameters of *Dickeya dadantii* in six populations

地理种群 Geographical population	样本数 No. of Samples	等位基因 观测数 Observed number of alleles	有效等位 基因数 Effective number of alleles	Nei's 基因 多样性指数 Nei's gene diversity index	Shannon 信息指数 Shannon information index	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点 百分率 Percentage of polymorphic loci (%)
广州种群 Guangzhou population	10	1.3171	1.1419	0.0941	0.1485	13	31.71
湛江种群 Zhanjiang population	9	1.4146	1.3003	0.1710	0.2489	17	41.46
南宁种群 Nanning population	10	1.2195	1.1287	0.0776	0.1168	9	21.95
合浦种群 Hepu population	10	1.2195	1.1457	0.0810	0.1195	9	21.95
东兴种群 Dongxing population	10	1.3659	1.1724	0.1073	0.1679	15	36.59
万州种群 Wanzhou population	10	1.2195	1.1507	0.0873	0.1284	9	21.95
平均 Average	9.83	1.2927	1.1733	0.1031	0.1550	12	29.27
物种水平 Species level	59	1.7805	1.4768	0.2801	0.4186	32	78.05

2.3 甘薯茎腐病菌种群遗传分化

甘薯茎腐病菌种群存在一定的遗传分化,总遗传多样性为 0.2808,种群内遗传多样性为 0.1823,种

群间遗传多样性为 0.0985,种群内和种群间的遗传多样性分别占总遗传多样性的 64.92% 和 35.08%,种群内遗传多样性明显大于种群间遗传多样性。不

同地区的种群遗传分化存在显著差异,其中广西种群遗传分化较大,遗传分化系数为0.5333,广东种群次之,遗传分化系数为0.3931,均都高于种群遗传分化系数0.3507,表明遗传变异主要存在于种群内部,而重庆种群仅包含一个采集点的种群,不能计算种群遗传分化系数(表3)。甘薯茎腐病菌种群基因流为0.9259,表明6个种群之间存在基因流,各地区种群

间基因流存在显著差异,其中广东种群基因流($N_m=0.7720$)较强,菌源交流较为广泛,而广西种群基因流($N_m=0.4376$)相对较小,菌源交流受到一定程度的限制,这些差异可能与各地区菌源的地理阻隔水平有关。然而,广东和广西2个种群的基因流明显低于种群基因流,表明甘薯茎腐病菌的基因交流在受到地理阻隔的同时可能存在其它交流方式。

表3 甘薯茎腐病菌种群遗传分化及基因流
Table 3 Genetic differentiation and gene flow of *Dickeya dadantii* within and among different regions

地理种群 Geographical population	样本数 No. of samples	总遗传多样性 Denote gene diversity in the species	种群内的遗传多样性 Gene diversity within population	种群间遗传多样性 Gene diversity among population	遗传分化系数 Population genetic differentiation	基因流 Gene flow
广州种群 Guangzhou population	9	0.0941	0.0941	0.0000	0.0000	—
湛江种群 Zhanjiang population	9	0.1710	0.1710	0.0000	0.0000	—
南宁种群 Nanning population	10	0.0776	0.0776	0.0000	0.0000	—
合浦种群 Hepu population	10	0.0810	0.0810	0.0000	0.0000	—
东兴种群 Dongxing population	10	0.1073	0.1073	0.0000	0.0000	—
万州种群 Wanzhou population	10	0.0873	0.0873	0.0000	0.0000	—
广东种群 Guangdong population	19	0.2185	0.1326	0.0859	0.3931	0.7720
广西种群 Guangxi population	30	0.1899	0.0886	0.1013	0.5333	0.4376
总计 Total	58	0.2808	0.1823	0.0985	0.3507	0.9259

2.4 甘薯茎腐病菌种群遗传距离

甘薯茎腐病菌南宁种群和合浦种群之间的遗传一致度最大,为0.9918,湛江种群与合浦种群之间的遗传一致度次之,为0.8104,广州种群和南宁种群之间的遗传一致度最小,为0.6847。各种群之间的遗传距离在0.0082~0.3788之间,南宁种群和合浦种群之间的遗传距离最小,为0.0082,广州种群和南宁种群之间的遗传距离最大,为0.3788,表明遗传距离与遗传一致度相对应,种群之间的遗传距离越小遗传一致度越高(表4)。

传距离在0.0082~0.3788之间,南宁种群和合浦种群之间的遗传距离最小,为0.0082,广州种群和南宁种群之间的遗传距离最大,为0.3788,表明遗传距离与遗传一致度相对应,种群之间的遗传距离越小遗传一致度越高(表4)。

表4 甘薯茎腐病菌6个种群的遗传一致度和遗传距离
Table 4 Genetic identity and genetic distance among six populations of *Dickeya dadantii*

地理种群 Geographical population	广州种群 Guangzhou population	湛江种群 Zhanjiang population	南宁种群 Nanning population	合浦种群 Hepu population	东兴种群 Dongxing population	万州种群 Wanzhou population
广州种群 Guangzhou population		0.8028	0.6847	0.6886	0.7160	0.7634
湛江种群 Zhanjiang population	0.2197		0.7986	0.8104	0.7195	0.7499
南宁种群 Nanning population	0.3788	0.2248		0.9918	0.7537	0.7464
合浦种群 Hepu population	0.3731	0.2103	0.0082		0.7524	0.7558
东兴种群 Dongxing population	0.3340	0.3291	0.2828	0.2845		0.7036
万州种群 Wanzhou population	0.2700	0.2878	0.2925	0.2800	0.3515	

对角线以上是遗传一致度,对角线以下是遗传距离。The numbers above the diagonal are coefficients of genetic similarity; the values under the diagonal are genetic distances.

2.5 甘薯茎腐病菌种群聚类分析

当相似系数为0.79时,59株菌株被划分为5个类群(图1),即I~V。类群I包含13株菌株,其中10株菌株来自广州种群,3株菌株来自湛江种群;类群II包含6株菌株,全部来自湛江种群;类群III包含20株菌株,分别来自南宁种群和合浦种群,类群IV包含10株菌株,全部来自万州种群;类群V包含10株菌

株,全部来自东兴种群。
2.6 甘薯茎腐病菌种群致病力分析

6个地理种群中,合浦和湛江种群平均病斑直径最大,分别为4.2333、4.1548 cm,2个种群间差异不显著($P=0.1286$),但与其它4个种群差异显著($P<0.05$),表明合浦和湛江2个种群的致病力较强;其次为广州种群和南宁种群,平均病斑直径分别为

3.9681、3.9244 cm, 2个种群之间差异不显著, 其致病力次之; 万州种群的平均病斑直径最小, 为3.1500 cm, 与其它种群之间存在差异显著 ($P<0.05$), 表明万州种群的致病力较差(表5)。

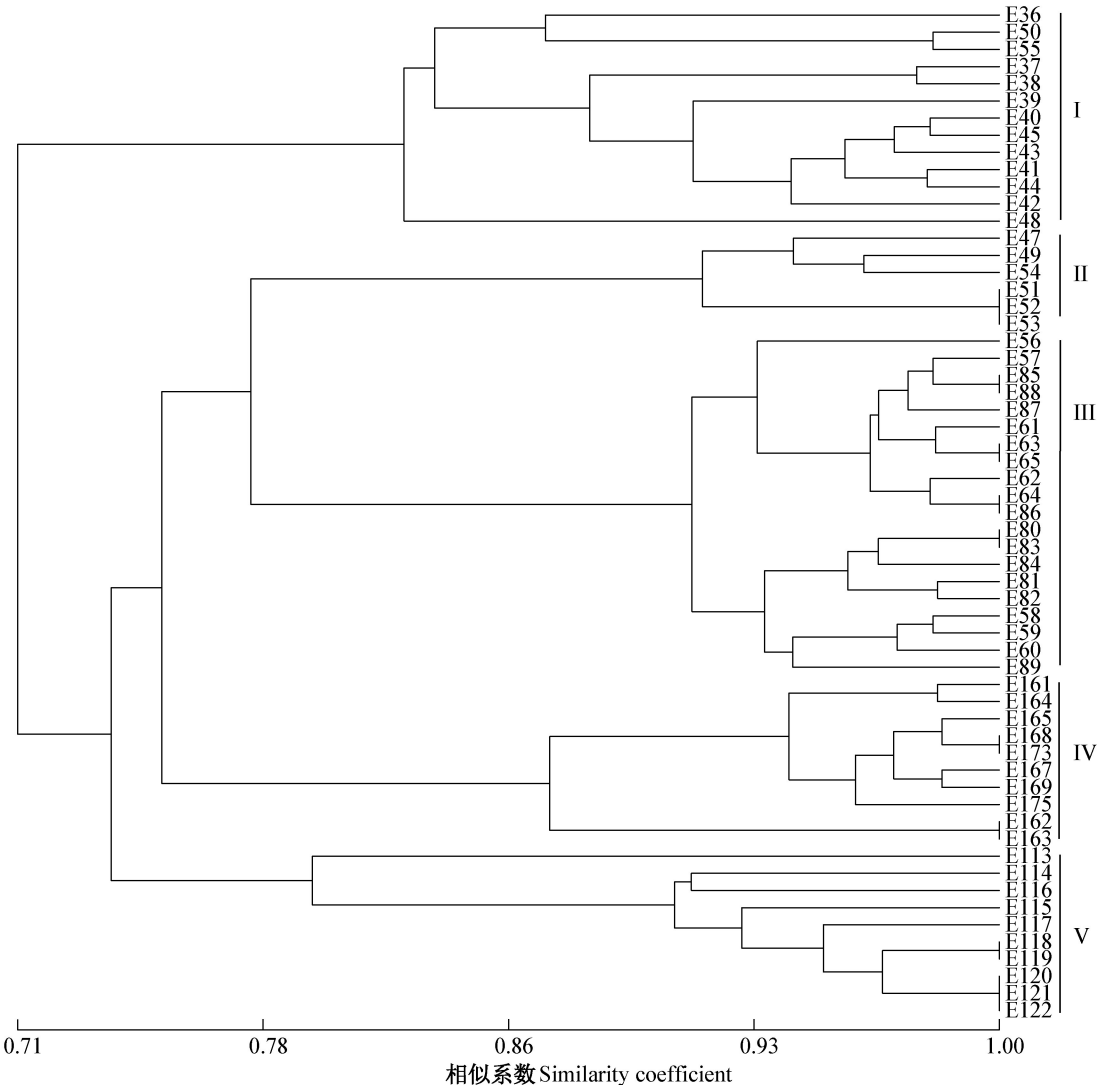


图1 基于5对引物扩增位点利用非加权算术平均数配对法构建59株甘薯茎腐病菌菌株的聚类图
Fig. 1 Dendrogram of 59 isolates of *Dickeya dadantii* based on the amplification sites using five primer pairs by unweighted pair-group method with arithmetic averages

表5 甘薯茎腐病菌6个不同地理种群所致发病病斑直径的多重比较

Table 5 Multiple comparison of pathogenic diameter of six different populations of *Dickeya dadantii*

地理种群 Geographical population	病斑直径 (cm) Lesion diameter	合浦种群 Hepu population	湛江种群 Zhanjiang population	广州种群 Guangzhou population	南宁种群 Nanning population	东兴种群 Dongxing population	万州种群 Wanzhou population
合浦种群 Hepu population	4.2333±0.8256 a		0.1286	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
湛江种群 Zhanjiang population	4.1548±0.5748 a	0.0785		0.0004	<0.001	<0.001	<0.001
广州种群 Guangzhou population	3.9681±1.1615 b	0.2652	0.1867		0.3961	<0.001	<0.001
南宁种群 Nanning population	3.9244±0.8773 b	0.3089	0.2304	0.0437		0.0002	<0.001
东兴种群 Dongxing population	3.7267±0.8317 c	0.5067	0.4281	0.2415	0.1978		<0.001
万州种群 Wanzhou population	3.1500±1.1013 d	1.0833	1.0048	0.8181	0.7744	0.5767	

表中数据为平均数±标准差。不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。下三角为均值差, 上三角为显著水平。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test. The lower triangle is the mean difference, and the upper triangle is the significant level.

3 讨论

狄克氏菌属为2005年设立的新属,包括6个种和1个亚种(Samson et al., 2005; Slawiak et al., 2009; van der Wolf et al., 2014), RFLP、DNA 扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、16S rDNA 测序和看家基因 *gapA* 和 *mdh* 测序等分子生物学技术被广泛用于狄克氏菌属的分类鉴定及多样性研究(Avrova et al., 2002; Laurila et al., 2008)。Slawiak et al. (2009)利用引物 REP 对自马铃薯分离的狄克氏菌属菌株进行鉴定和分类,结果表明采用 REP-PCR 技术与应用 *dnaX* 和 16S rDNA 序列分析结果完全一致,能够将来自荷兰、波兰、芬兰和以色列等国家的22株菌株鉴定为生理小种3。本研究采用 REP-PCR 技术对来自6个不同地区的59株甘薯茎腐病菌菌株进行遗传多样性分析,结果表明甘薯茎腐病菌遗传多样性比较丰富,6个甘薯茎腐病菌种群存在明显的差异。同时聚类分析将6个地区的59株菌株分为5个类群,即 I~V,其中类群 I 包括10株广州菌株和3株湛江菌株,这可能是广州市与湛江市之间甘薯茎腐病菌传播的分子证据;南宁市和合浦县的菌株聚为类群 III,表明两地菌株具有相同的 DNA 指纹。由于合浦县发生茎腐病的甘薯材料从南宁市引进,聚类分析从分子水平上证实了合浦县甘薯茎腐病是由南宁市传播而来的。因此,采用 REP-PCR 技术能够高效地揭示狄克氏菌不同地理种群的遗传多样性变化及其不同菌株在遗传上的系统进化关系(陈康等, 2014)。

采用薯片接种方法,利用甘薯茎腐病菌6个地理种群的59株菌株对广薯72、广紫薯8号和广薯98等9个甘薯品种进行接种,6个地理种群之间存在明显的致病力差异,不同菌株间也存在明显的致病力分化,其中致病力最强的是合浦种群和湛江种群,致病力较弱的为万州种群。这是首次报道自甘薯分离的达旦提狄克氏菌存在致病力差异。与其它一些重要的作物细菌性病害病原菌,如青枯雷尔氏菌 *Ralstonia Solanacearum*、黄单胞杆菌水稻致病变种 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 等一样都存在遗传分化及致病力差异(方中达等, 1990; 徐进和冯洁, 2013)。

总之,本研究通过病原菌 REP-PCR 技术和致病力鉴定初步证实了侵染甘薯的达旦提狄克氏菌存在丰富的遗传多样性和明显的致病力差异,且病原菌的遗传多样性与其地理来源有一定关系。然而,在

本研究中所用的菌株数量和致病鉴定甘薯品数量不够多,代表性不够广,不能全面地反映我国甘薯茎腐病菌整体情况。因此,下一步将加大分析病菌的数量,对采自全国不同地区的菌株进行 REP-PCR 技术和致病力分析,以进一步研究甘薯茎腐病菌的种群结构和遗传多样性,明确是否存在不同的致病型或生理小种,为抗茎腐病育种或抗病品种布局提供参考。

参 考 文 献 (References)

- Ateba CN, Mbeweb M. 2013. Determination of the genetic similarities of fingerprints from *Escherichia coli* O157: H7 isolated from different sources in the North West Province, South Africa using ISR, BOXAIR and REP-PCR analysis. *Microbiological Research*, 168(7): 438–446
- Avrova AO, Hyman LJ, Toth RL, Toth IK. 2002. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1499–1508
- Chen K, Qing L, Yuan Y, Dou YY, Li HP. 2014. On pathogenicity variation and genetic diversity of *Dickeya paradisiaca* isolates causing banana bacterial soft rot. *Journal of Southwest China Normal University (Natural Science Edition)*, 39(4): 69–75 (in Chinese) [陈康, 青玲, 袁月, 豆亚亚, 李华平. 2014. 香蕉细菌性软腐病菌致病性分化和遗传多样性分析. *西南师范大学学报(自然科学版)*, 39(4): 69–75]
- Dankevych LA, Zakharova OM, Mel'nychuk MD, Votselko SK, Patyaka VP. 2014. REP-PCR analysis of rapa's bacterial diseases agents. *Mikrobiologichnyi Zhurnal*, 76(4): 17–25
- Debruijn EJ, Rademakwe LW, Schneider M, Rossbach U, Louws FJ. 1996. Rep-PCR genomic finger printing of plant-associated bacteria and computer-assisted phylogenetic analyses. *Biology of Plant-Microbe Interaction*, 8: 497–502
- Fang ZD, Xu ZG, Guo CJ, Yin SZ, Wu SZ, Xu XM, Zhang Q. 1990. Studies on pathotypes of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae* in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 20(2): 81–87 (in Chinese) [方中达, 许志刚, 过崇俭, 殷尚智, 伍尚忠, 徐美明, 章琦. 1990. 中国水稻白叶枯病菌致病型的研究. *植物病理学报*, 20(2): 81–87]
- Gao B, Wang RY, Ma J, Li XH, Chen SL. 2015. A preliminary study on bacterial stem and root rot disease of sweet potato in Hebei Province. *Plant Protection*, 41(3): 119–122 (in Chinese) [高波, 王容燕, 马娟, 李秀花, 陈书龙. 2015. 河北省甘薯茎腐病研究初报. *植物保护*, 41(3): 119–122]
- Guo XJ, Rao Q, Zhang F, Luo C, Zhang HY, Gao XW. 2012. Diversity and genetic differentiation of the whitefly *Bemisia tabaci* species complex in China based on mtCOI and cDNA-AFLP analysis. *Journal of Integrative Agriculture*, 11(2): 206–214
- Huang LF, Fang BP, Luo ZX, Chen JY, Zhang XJ, Wang ZY. 2010. First report of bacterial stem and root rot of sweetpotato caused

- by a *Dickeya* sp. (*Erwinia chrysanthemi*) in China. Plant Disease, 94(12): 1503
- Huang LF, Luo ZX, Fang BP, Chen JY, Zhang XJ, Wang ZY. 2011. A new bacterial stem and root rot disease of sweetpotato in Guangdong, China. Acta Phytopathologica Sinica, 41(1): 18–23 (in Chinese) [黄立飞, 罗忠霞, 房伯平, 陈景益, 张雄坚, 王章英. 2011. 我国甘薯新病害茎腐病的研究初报. 植物病理学报, 41(1): 18–23]
- Huang LF, Luo ZX, Fang BP, Li KM, Chen JY, Huang SH. 2014. Advances in researches on bacterial stem and root rot of sweet potato caused by *Dickeya dadantii*. Journal of Plant Protection, 41(1): 118–122 (in Chinese) [黄立飞, 罗忠霞, 房伯平, 李开绵, 陈景益, 黄实辉. 2014. 甘薯茎腐病的研究进展. 植物保护学报, 41(1): 118–122]
- Laurila J, Ahola V, Lehtinen A, Joutsjoki T, Hannukkala A, Rahkonen A, Pirhonen M. 2008. Characterization of *Dickeya* strains isolated from potato and river water samples in Finland. European Journal of Plant Pathology, 122(2): 213–225
- Louws FJ, Fulbright DW, Stephens CT, de Bruijn FJ. 1994. Specific genomic fingerprints of phytopathogenic *Xanthomonas* and *Pseudomonas* pathovars and strains generated with repetitive sequences and PCR. Applied and Environmental Microbiology, 60(7): 2286–2295
- Martín-Sanz A, Pérez de la Vega M, Murillo J, Caminero C. 2012. Genetic, biochemical and pathogenic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *pisi* strains. Plant Pathology, 61: 1063–1072
- Nei M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist, 106(949): 283–292
- Nei M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York: Plenum Press, pp. 176–187
- Oda Y, Wanders W, Huisman LA, Meijer WG, Gottschal JC, Fomey LJ. 2002. Genotypic and phenotypic diversity within species of purple nonsulfur bacteria isolated from aquatic sediments. Applied and Environmental Microbiology, 68(7): 3467–3477
- Pan JP, Cui R, Ha XF, Wang C, Dai PH, Zhang XL. 2011. Rep-PCR genetic fingerprints of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in North China. Plant Quarantine, 25(4): 26–31 (in Chinese) [潘俊鹏, 崔荣, 哈小菲, 王翀, 代培红, 张祥林. 2011. 中国北方番茄细菌性溃疡病菌的Rep-PCR基因指纹图谱分析. 植物检疫, 25(4): 26–31]
- Qin SY, Huang LF, Ge CB, Liu ZJ, Zhang YY, Li JG, Fang BP. 2013. Molecular identification of a new bacterial stem rot disease of sweetpotato in Henan. Crops, (6): 52–55 (in Chinese) [秦素研, 黄立飞, 葛昌斌, 刘志坚, 张勇跃, 李建国, 房伯平. 2013. 河南省甘薯茎腐病的分离与鉴定. 作物杂志, (6): 52–55]
- Rusenova N, Parvanov P, Stanilova S. 2013. Molecular typing of *Pae-nibacillus larvae* strains isolated from Bulgarian apiaries based on repetitive element polymerase chain reaction (Rep-PCR). Current Microbiology, 66(6): 573–577
- Samson R, Legender JB, Christen R, Fischer-Le Saux M, Achouak W, Gardan L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 55(4): 1415–1427
- Schaad NW, Brenner D. 1977. A bacterial wilt and root rot of sweetpotato caused by *Erwinia chrysanthemi*. Phytopathology, 67(3): 302–308
- Si EJ, Yang SL, Li BC, Ma XL, Wang SR, Wang HJ. 2017. Pathogenic analysis, rDNA-ITS and genetic diversity of *Pyrenophora garminae* in Gansu Province. Journal of Plant Protection, 44(1): 84–92 (in Chinese) [司二静, 杨淑莲, 李葆春, 马小乐, 王生荣, 王化俊. 2017. 甘肃省大麦条纹病病原菌致病力分化、rDNA-ITS及遗传多样性分析. 植物保护学报, 44(1): 84–92]
- Slawiak M, van Bechoven JRCM, Speksnijder AGCL, Czajkowschi R, Grabe G, van der Wolf JM. 2009. Biochemical and genetical analysis reveal a new clade of biovar 3 *Dickeya* spp. strains isolated from potato in Europe. European Journal of Plant Pathology, 125(2): 245–261
- van der Wolf JM, Nijhuis EH, Kowalewska MJ, Saddler GS, Parkinson N, Elphinstone JG, Pritchard L, Toth IK, Lojkowska E, Potrykus M, et al. 2014. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant-pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 64(3): 768–774
- Versalovic J, Koeuth T, Lupski JR. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research, 19(24): 6823–6831
- Wright S. 1951. The genetical structure of population. Annals of Eugenics, 15: 323–354
- Xu J, Feng J. 2013. Advances in research of genetic diversity and pathogenome of *Ralstonia solanacearum* species complex. Scientia Agricultura Sinica, 46(14): 2902–2909 (in Chinese) [徐进, 冯洁. 2013. 植物青枯菌遗传多样性及致病基因组学研究进展. 中国农业科学, 46(14): 2902–2909]
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX. 1997. Popgene, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Edmonton, Canada

(责任编辑:张俊芳)