

福建省马铃薯黑胫病病原菌的鉴定及其遗传多样性分析

李华伟 林志坚 罗文彬* 许国春 许泳清 纪荣昌 邱思鑫 汤浩*

(福建省农业科学院作物研究所, 农业农村部南方薯类科学观测实验站,
福建省特色旱作品种选育工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要: 为明确福建省马铃薯黑胫病病原菌的种类、分布情况及群体遗传特性, 通过 16S rDNA 序列分析法对分离自福建省各马铃薯产区的 90 株黑胫病病原菌进行鉴定, 并利用细菌基因组重复序列 PCR (repetitive sequence-PCR, Rep-PCR) 方法分析福建省不同地区的马铃薯黑胫病病原菌群体的遗传变异情况。结果表明, 经 16S rDNA 序列分析鉴定, 引起福建省马铃薯黑胫病的病原菌包括黑腐果胶杆菌 *Pectobacterium atrosepticum*、胡萝卜果胶杆菌巴西亚种 *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*、胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*、帕曼蒂氏果胶杆菌 *P. parmentieri*、*P. polaris* 和达旦提狄基氏菌 *Dickeya dadantii*。对 90 株菌株的 Rep-PCR 检测得到 47 多态性条带条, 多态性比率为 100.00%。按采集地区将菌株划分为 8 个群体, 其等位基因数平均为 1.48, 有效等位基数平均为 1.30, Nei's 基因多样性指数平均为 0.17, Shannon 信息指数平均为 0.26, 多态性位点数平均为 22.75, 多态性位点百分率平均为 48.40%。供试 90 株菌株之间的相似系数为 0.584~1.000, 遗传距离为 0.149~0.602, 群体遗传距离和地理距离之间无显著相关性。聚类分析结果表明当相似系数为 0.605 时, 可将 90 株菌株分为 4 个类群, 其中 93.33% 的菌株分布在 I 和 II 类群中, 当相似系数为 0.646 时, 第 I 类群可分为 2 个亚群, 第 II 类群可分为 3 个亚群。表明福建省马铃薯黑胫病病原菌群体存在丰富的遗传多样性, Rep-PCR 技术可用于其遗传多样性分析。

关键词: 马铃薯; 黑胫病; Rep-PCR; 遗传多样性; 聚类分析

Identification and analysis of genetic diversity of the pathogen causing potato blackleg disease in Fujian Province

Li Huawei Lin Zhijian Luo Wenbin* Xu Guochun Xu Yongqing Ji Rongchang Qiu Sixin Tang Hao*

(Technical Research Center of Specialty Dry Crop Variety Breeding of Fujian; Scientific Observing and Experimental Station of Tuber and Root Crops in South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Crop Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, Fujian Province, China)

Abstract: In order to characterize the distribution and population genetics of the pathogens causing potato blackleg disease in Fujian Province, 90 isolates were obtained from diseased samples collected from potato producing areas in Fujian, and identified based on 16S rDNA sequence analysis, and the genetic diversity was analyzed using the Rep-PCR molecular markers. The results showed that the pathogens causing potato blackleg disease included *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum*, *P. parmentieri*, *P. polaris* and *Dickeya dadantii*. The results from the analysis of Rep-PCR molecular markers showed that 47 polymorphic loci were detected in 90 strains, and polymorphism ratio was 100.00%. According to the collection areas, the tested strains were divided into eight groups, which the number of alleles was 1.48, the effective number of alleles

基金项目: 福建省公益类科研专项(2018R1026-9), 国家现代农业(马铃薯)产业技术体系(CARS-10-ES11)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: luowenbing@faas.cn, tanghao@faas.cn

收稿日期: 2020-10-29

was 1.30, the Nei's diversity index was 0.17, Shannon information index was 0.26, the number of polymorphic sites was 22.75, and the percentage of polymorphic loci was 48.40%. The Nei's genetic similarity was 0.584–1.000 among the 90 strains, and the genetic distance was 0.149–0.602. There was no significant correlation between genetic distance and geographic distance. The dendrogram analysis showed that at a genetic similarity coefficient of 0.605, 90 strains could be divided into four groups with more than 93.33% of the strains were distributed in groups I and II. At a genetic similarity coefficient of 0.646, group I could be further divided into two subgroups, and group II could be divided into three subgroups. This study suggested that there was a rich genetic diversity in the potato blackleg pathogen population in Fujian Province of China, and the Rep-PCR can provide an effective tool for the study of genetic diversity in potato blackleg pathogen populations.

Key words: potato; blackleg disease; Rep-PCR; genetic diversity; cluster analysis

在福建省马铃薯是仅次于水稻和甘薯的第三大粮食作物,种植面积在6.3万 hm^2 以上(汤浩,2010)。病虫害是制约马铃薯产量的重要因子,其中马铃薯黑胫病的危害日趋严重,该病又称为黑脚病,是由果胶杆菌属 *Pectobacterium* spp. 和狄基氏菌属 *Dickeya* spp. 细菌引起的病害(Pérombelon, 1974; Mattinen et al., 2008)。马铃薯黑胫病以带菌种薯为初侵染源(Pérombelon, 1974),一般苗期开始发病且程度最严重,发病后植株矮小,茎基部变黑,节间缩短,长势较弱,同时上部叶片出现萎蔫状,随着侵染时间的延长,植株叶片出现褪绿、黄化现象,最后枯萎死亡(Ali et al., 2012; Kumvinit & Akarapisan, 2019)。在我国,随着各地种薯的调运和试种,近年来该病在全国各马铃薯产区相继被报道,且呈现逐年上升的趋势(余小漫等,2015;王信等,2018;徐进等,2019)。马铃薯黑胫病一般造成的产量损失为2%~5%,严重时可达30%~50%,对马铃薯产业的发展影响巨大(Toth et al. 2011;高玉林等,2019),已成为福建省马铃薯生产中的重要病害。

早期,果胶杆菌属 *Pectobacterium* spp. 和狄基氏菌属 *Dickeya* spp. 被划分入欧文氏软腐菌属 *Erwinia* spp.,但随着研究深入,这2个属独立成属(Ma et al., 2007)。目前,能引起马铃薯黑胫病的果胶杆菌属细菌有黑腐果胶杆菌 *P. atroseptica*、胡萝卜果胶杆菌 *P. carotovora* 及其2个亚种胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 和胡萝卜果胶杆菌巴西亚种 *P. carotovorum* subsp. *brasiliense* (Pérombelon, 1992; van der Merwe et al., 2010)、山葵果胶杆菌 *P. wasabiae* (Pitman et al., 2010)、*P. polaris* (Dees et al., 2017)和 *P. parmentieri*;狄基氏菌属细菌主要包括菊狄基氏菌 *D. chrysanthemi* (Czajkowski et al., 2010; Huang et al., 2010)、香石竹狄基氏菌 *D. di-*

anthicola、达旦提狄基氏菌 *D. dadantii*、玉米狄基氏菌 *D. zaeae*、香蕉狄基氏菌 *D. paradisiaca* 和茄狄基氏菌 *D. solani* (Toth et al., 2011)。在能侵染马铃薯的所有果胶杆菌中,胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种分布范围最广(de Haan et al., 2008);而黑腐果胶杆菌主要分布在温带地区(Czajkowski et al., 2015);胡萝卜果胶杆菌巴西亚种最早在巴西被发现,之后蔓延至世界各地(Duarte et al., 2004; van der Merwe et al., 2010;田艳丽等,2018);山葵果胶杆菌最早在日本山葵上分离得到,随后在马铃薯上也被分离到,Khayi et al. (2016)根据其基因组及表型数据分析,建议将马铃薯上分离的山葵果胶杆菌定义为一个新种,即 *P. parmentieri*。马铃薯黑胫病的病原菌较为复杂,且分布广泛,这给该病害的防控带来一定困难,因此对病原菌的准确鉴定及其群体遗传地理分布和类型的深入分析是有效防治马铃薯黑胫病的前提。

目前,常用于遗传多样性的分子标记方法主要包括限制性片段长度多样性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)、随机扩增多样性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、扩增片段长度多样性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、细菌基因组重复序列PCR(repetitive sequence-PCR, Rep-PCR)等。其中,Rep-PCR技术重复性好且通过简单的方法就能将相似菌株鉴别开来,广泛用于细菌和真菌的多样性分析(林海云等,2011;Nakayama et al., 2021; Pramunadipa et al., 2021)。目前应用Rep-PCR技术对马铃薯黑胫病病原菌遗传多样性的分析国内还未见报道。为揭示福建省马铃薯黑胫病病原菌的遗传多样性,本研究通过16S rDNA序列分析对其进行鉴定,并采用Rep-PCR技术从DNA水平分析其群体遗传

变异情况,明确福建省不同地区马铃薯黑胫病原菌的遗传结构和不同地域种群间的遗传关系,以期福建省马铃薯黑胫病的有效防治提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:90株马铃薯黑胫病原菌菌株于2018—2020年分离自福建省宁德市的福鼎市(4株)、周宁县(10株)、霞浦县(22株),福州市的闽侯县(10株)、长乐区(11株)、平潭县(8株)以及漳州市龙海市(11株)和龙岩市武平县(14株)。均由本实验室分离、鉴定并在-75℃下保存。

试剂及培养基:营养琼脂(nutrient agar, NA)培养基成分为蛋白胨5 g、牛肉浸膏3 g、葡萄糖2.5 g、琼脂16 g,调节pH至7.2,加蒸馏水定容至1 L;Luria-Bertani(LB)液体培养基成分为胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、氯化钠10 g,加蒸馏水定容至1 L,调节pH至7.2。2×Es Taq MasterMix,北京天根生化科技有限公司;细菌DNA提取试剂盒,北京全式金生物技术有限公司;30%丙烯酰胺溶液(丙烯酰胺29 g、N,N-二甲基丙烯酰胺1 g,加蒸馏水溶解并定容至100 mL)、5×Tris-硼酸缓冲液(Tris碱54 g、硼酸27.5 g、0.5 mol/L EDTA 20 mL,加蒸馏水定容至1 L)以及其他试剂均为国产分析纯。

仪器:Veriti 96孔PCR仪,美国Applied Biosystems公司;GXZ-280C型培养箱,宁波江南仪器厂;Centrifuge 5425 R型离心机,德国Eppendorf公司;法国Vilber凝胶成像系统,北京五洲东方有限公司;DYCZ-24B型电泳仪,北京六一生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 马铃薯黑胫病原菌16S rDNA序列分析

取超低温保存的90株供试菌株,解冻后分别用无菌接种环蘸取菌液在NA平板上划线。28℃倒置暗培养24~48 h,挑取单菌落接种于LB液体培养基中,28℃、180 r/min条件下摇培扩繁,于4℃保存备用。参照细菌DNA提取试剂盒说明书分别提取90株菌株的DNA,并用超纯水溶解,于-20℃保存备用。利用细菌通用引物27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCA-3')和1492R(5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3')(Lane, 1991)扩增待测菌株的16S rDNA序列,所有引物均由上海尚亚生物科技有限公司合成。20 μL扩增体系:2×Es Taq MasterMix 10 μL、10 μmol/L上下游引物各1 μL、50 μg/μL DNA模版1 μL、双蒸水7 μL。扩增程序:94℃预变性3 min;

94℃变性1 min,53℃退火45 s,72℃延伸90 s,30个循环;72℃再延伸10 min。PCR扩增产物送上海尚亚生物科技有限公司进行测序。将测序所得序列在NCBI数据库进行BLASTN检索比对并下载相关序列。使用MAFFT 7.427软件对测序所得序列和下载的相关序列进行多重比对,经PhyloSuite软件中的ModelFinder子程序计算,以K80+R4为最佳模型,以菊狄基氏菌为外群,采用最大似然(maximum likelihood, ML)法构建系统发育树,Bootstrap抽样1 000次(Katoh et al., 2002; Nguyen et al., 2015; Zhang et al., 2020)。

1.2.2 马铃薯黑胫病原菌Rep-PCR多样性扩增

采用引物ERIC1(5'-ATGTAAGCTCCTGGG-GATTCAC-3')和ERIC2(5'-AAGTAAGTGACTGG-GGTGAGCG-3')、BOXAIR(5'-CTACGGCAAGGC-GACGCTGACG-3')(Versalovic et al., 1994)对病原菌基因组DNA进行Rep-PCR扩增。20 μL扩增体系:2×Es Taq MasterMix 10 μL、10 μmol/L引物ERIC1/ERIC2各1 μL(BOXAIR 2 μL)、50 μg/μL DNA模版1 μL、双蒸水7 μL。扩增程序:95℃预变性2 min;94℃变性40 s;52℃(ERIC1/ERIC2)/50℃(BOXAIR)退火1 min;72℃延伸90 s,35个循环;72℃再延伸10 min。在80 mL的8%聚丙烯酰胺胶液(30%丙烯酰胺溶液21.3 mL、蒸馏水42.6 mL、5×Tris-硼酸缓冲液16 mL、10%过硫酸铵900 μL、四甲基乙二胺50 μL)中对PCR产物进行电泳检测,上样量4 μL,电压80 V,电泳120 min;电泳结束后采用银染法(固定→脱色→银染→显色)进行染色,最后观察并拍照。

1.2.3 马铃薯黑胫病原菌遗传多样性分析方法

根据1.2.2获得的电泳图谱,按凝胶同一个位置上DNA条带的有无进行统计,当某一扩增条带出现时赋值为1,不存在时赋值为0,将指纹图谱由图形资料转换成数据资料。采用Popgen 1.32软件进行马铃薯黑胫病原菌群体的遗传参数分析,分别计算等位基因数、有效等位基因数、多态性位点数、多态性位点百分率、Nei's基因多样性指数、Shannon信息指数、群体间的遗传距离和遗传相似性(Nei & Li, 1979; Yeh et al., 1998)。使用Google Map获得采样点的地理距离。利用NTSYSpc 2.10e软件中的Mxcomp模块分析比较遗传距离与地理距离的相关性并进行Mantel检测,用SAHN Clustering模块以非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic mean, UPGMA)对供试菌株进行聚类分析,明确福建省马铃薯黑胫病原菌群体的遗传关系。

2 结果与分析

2.1 马铃薯黑胫病原菌的鉴定

采用细菌通用引物 27F/1492R 对供试菌株 16S rDNA 序列进行扩增,均能获得 1 条约 1 400 bp 的产物,测序结果表明,供试菌株的 16S rDNA 序列长度在 1 404~1 444 bp 之间。BLAST 比对结果显示,有 7 株菌株与黑腐果胶杆菌的相似度达 100.00%,34 株菌株与胡萝卜果胶杆菌巴西亚种的相似度为 99.79%~100.00%,16 株菌株与胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种的相似度为 99.65%~100.00%,22 株菌株与帕曼蒂氏果胶杆菌 *P. parmentieri* 的相似度为 99.86%~100.00%,7 株菌株与 *P. polaris* 的相似度为 99.79%~

99.86%,1 株菌株与达旦提狄基氏菌的相似度为 99.93%;另外,有 3 株菌株 WP3、WP4 和 WP8 未鉴定到种,但与果胶杆菌属的相似度为 99.72%~99.79%。16S rDNA 比对结果初步表明所分离获得的 90 株菌株与 GenBank 中登录的马铃薯黑胫病各病原菌的相似度最高,且福建省的优势马铃薯黑胫病病原菌为胡萝卜果胶杆菌巴西亚种、帕曼蒂氏果胶杆菌和胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种,并首次鉴定到 1 株达旦提狄基氏菌。系统发育树显示,90 株菌株可分为 6 个类群,所有菌株按照其分类地位均能与已公布的黑腐果胶杆菌、胡萝卜果胶杆菌巴西亚种、胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种、帕曼蒂氏果胶杆菌、*P. polaris* 和达旦提狄基氏菌分别聚为一支(图 1)。

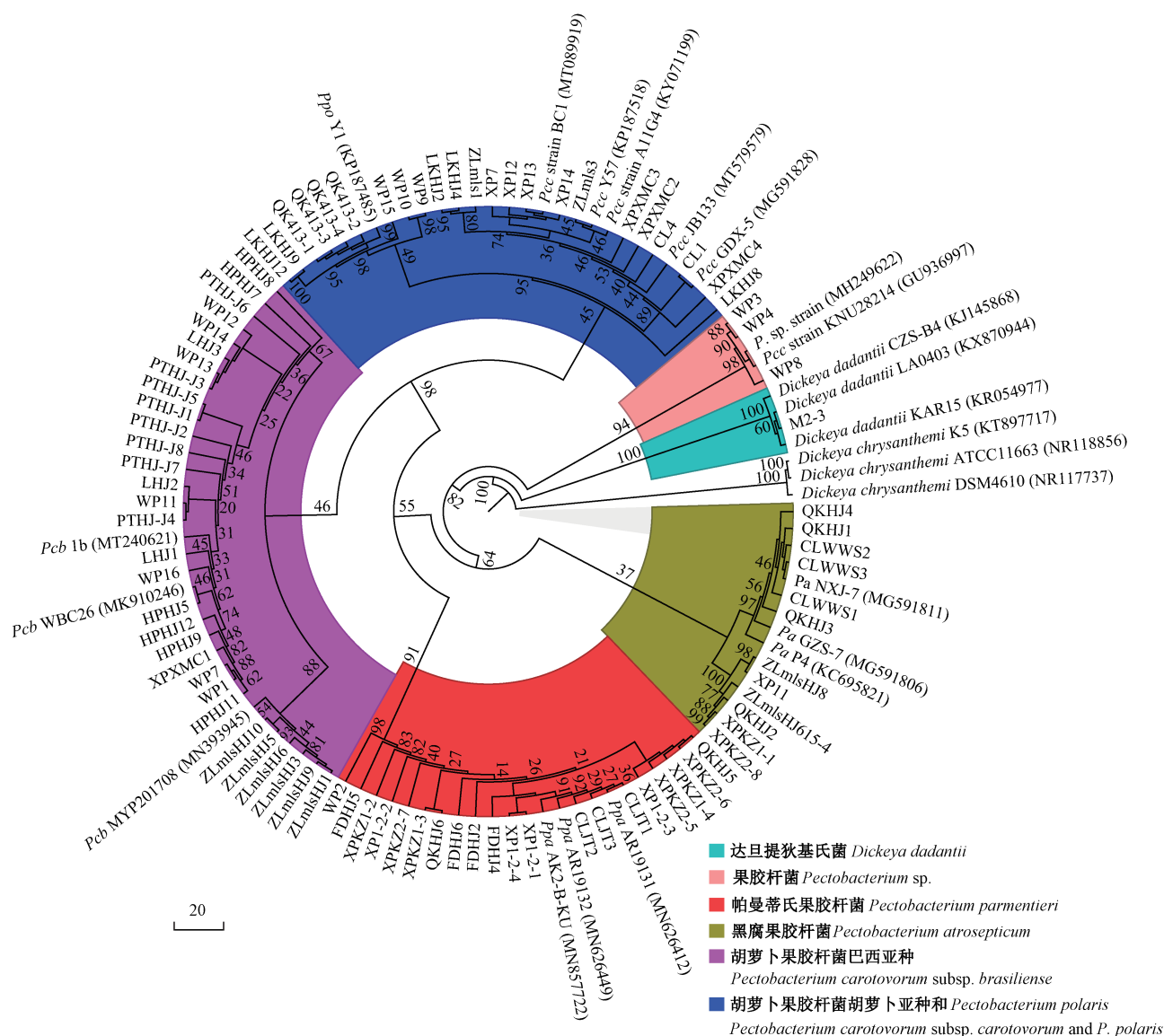


图 1 基于 16S rDNA 序列采用最大似然法构建福建省马铃薯黑胫病原菌的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of the pathogen causing potato blackleg disease in Fujian Province constructed based on 16S rDNA sequence using the maximum likelihood method

2.2 马铃薯黑胫病原菌 Rep-PCR 多样性分析

2.2.1 Rep-PCR 扩增结果

采用ERIC1/ERIC2和BOXAIR引物分别对供试90株菌株的基因组DNA进行扩增,ERIC1/ERIC2引物扩增获得22条目的条带,BOXAIR引物扩增获得25条目的条带,47条扩增条带的大小在100~1 000 bp之间,且均为多态性条带,多态性比率达100.00%。同一地区分离的菌株,扩增条带存在一定的相似性,但在不同地区间差异较大,说明ERIC和BOXAIR引物在不同种群中的扩增有一定差异,可以用于马铃薯黑胫病原菌群体的遗传多样性分析。

2.2.2 不同地理种群的遗传多样性分析

根据菌株地理来源将供试菌株分为8个种群,不同地理种群遗传多样性分析结果表明,马铃薯黑胫病原菌8个地理种群的等位基因数平均为1.48,有效等位基因数平均为1.30,Nei's基因多样性指数平均为0.17,Shannon信息指数平均为0.26,多态性位点数平均为22.75,多态性位点百分率平均

为48.40%(表1)。其中武平种群的等位基因数、有效等位基因数、Nei's基因多样性指数、Shannon信息指数、多态性位点数和多态性位点百分率均为最高,分别为1.82、1.52、0.29、0.44、39和82.98%,而福鼎种群的各遗传变异参数值均最低。

2.2.3 不同地理种群间的遗传相似度和遗传距离

马铃薯黑胫病原菌各种群间的遗传相似系数为0.548~0.861,遗传距离为0.149~0.602,表明各地区间种群遗传分化程度不同。其中,平潭种群和周宁种群间的遗传相似系数最高,为0.861,遗传距离最近,为0.149。霞浦种群与平潭种群间、周宁种群与福鼎种群间的遗传距离较大,分别为0.411和0.404,遗传相似系数较低,分别为0.663和0.668,而平潭种群和福鼎种群间的遗传相似系数最低,为0.548,遗传距离最大,为0.602。另外,霞浦、长乐、闽侯、龙海和武平种群间的遗传距离均较小(表2),表明这个几个地区马铃薯黑胫病原菌的群体遗传分化程度较低,关系较密切。

表1 福建省8个马铃薯黑胫病原菌地理种群的遗传变异参数						
Table 1 Genetic diversity among eight geographical populations of the pathogen causing potato blackleg disease in Fujian Province						
种群 Population	等位基因数 No. of alleles	有效等位基因数 Effective no. of alleles	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index	Shannon信息指数 Shannon's information index	多态性位点数 No. of polymorphic loci	多态性位点百分率 Polymorphism percent/%
霞浦 Xiapu	1.76	1.36	0.22	0.34	36	76.60
青口 Qingkou	1.57	1.43	0.24	0.34	27	57.45
周宁 Zhouning	1.42	1.23	0.14	0.22	20	42.55
平潭 Pingtan	1.06	1.05	0.03	0.04	3	6.38
龙海 Longhai	1.57	1.36	0.21	0.32	27	57.45
福鼎 Fuding	1.02	1.01	0.08	0.01	1	2.13
长乐 Changle	1.61	1.46	0.25	0.37	29	61.70
武平 Wuping	1.82	1.52	0.29	0.44	39	82.98
平均数 Mean	1.48	1.30	0.17	0.26	22.75	48.40

表2 福建省马铃薯黑胫病原菌不同地区种群间的遗传相似系数和遗传距离								
Table 2 Genetic similarity coefficients and genetic distances among different geographical populations of the pathogen causing potato blackleg disease in Fujian Province								
种群 Population	霞浦 Xiapu	青口 Qingkou	周宁 Zhouning	平潭 Pingtan	龙海 Longhai	福鼎 Fuding	长乐 Changle	武平 Wuping
霞浦 Xiapu		0.830	0.737	0.663	0.791	0.802	0.832	0.834
青口 Qingkou	0.187		0.775	0.687	0.796	0.735	0.828	0.858
周宁 Zhouning	0.306	0.255		0.861	0.752	0.668	0.813	0.791
平潭 Pingtan	0.411	0.375	0.149		0.691	0.548	0.725	0.746
龙海 Longhai	0.234	0.228	0.285	0.370		0.693	0.837	0.853
福鼎 Fuding	0.220	0.308	0.404	0.602	0.366		0.853	0.717
长乐 Changle	0.184	0.189	0.207	0.322	0.178	0.160		0.843
武平 Wuping	0.181	0.153	0.235	0.293	0.159	0.332	0.170	

对角线上方为遗传相似系数,对角线下方为遗传距离。The values above the diagonal were genetic similarity coefficients, and the numbers under the diagonal were genetic distances.

2.2.4 不同地理群体间的遗传相关性

马铃薯黑胫病原菌群体间的遗传距离与地理距离的相关性分析结果显示,数据点比较分散,无明显规律性。Mantel 检测结果表明,马铃薯黑胫病原菌群体间的遗传距离和地理距离无显著相关性 ($P=0.372$),相关系数为 -0.082 (图2),表明马铃薯黑胫病原菌群体的遗传分化不符合地理隔离模式。

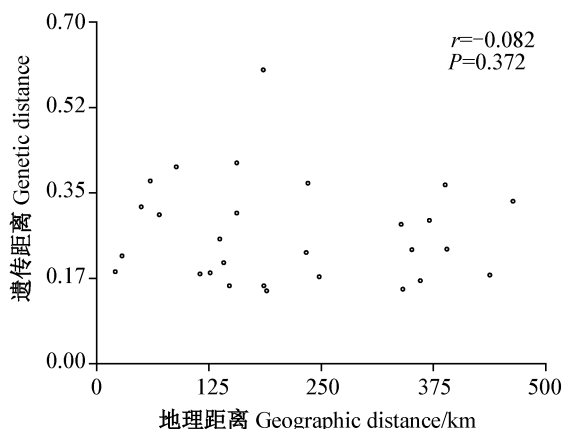


图2 马铃薯黑胫病原菌不同地理种群遗传距离和地理距离的相关性

Fig. 2 Correlation between genetic distance and geographic distance among different geographic pathogen populations causing potato blackleg disease

2.2.5 不同种群菌株的聚类分析

基于Rep-PCR扩增结果生成的系统聚类图显示,90株马铃薯黑胫病原菌之间的相似系数为0.584~1.000。以相似系数0.605为阈值可将供试菌株划分为4个类群,自上而下分别标记为I、II、III和IV类群,其中有93.33%的菌株分布在I类群和II类群(图3)。第I类群包含38株菌株,占总数的42.22%,其中来自福鼎市的4株菌株均在此类群中,其他34株菌株分别来自霞浦县(21株)、长乐区(3株)、闽侯县青口镇(6株)和武平县(4株);第II类群包含46株菌株,占总数的51.11%,其中周宁县(10株)、平潭县(8株)和龙海市(11株)的菌株均在此类群中,其他17株分别来自闽侯县青口镇(4株)、武平县(7株)和长乐区(6株);第III类群仅含1株菌株,来自霞浦县;第IV类群包含5株菌株,分别来自长乐区(2株)和武平县(3株)。以相似系数0.646为阈值,第I类群又可分为2个亚类I-1和I-2,其中第I-1亚类包含来自霞浦县(21株)、福鼎市(4株)、长乐区(3株)和闽侯县青口镇(2株)的30株菌株,是最大亚类,占第I类群的78.95%,第I-2类群包含来自闽侯县青口镇(4株)和武平县(4株)的8株菌株;第II类群可分为3个亚类II-1、II-2和II-3,其中第II-1类群包含17个菌株,来自

闽侯县青口镇(4个)、长乐区(3株)、龙海市(8株)和武平县(2株),第II-2类群包含来自周宁县(10株)、平潭县(8株)、武平县(5株)和龙海市(3株)的26株菌株,第II-3类群仅含3株菌株,均来自长乐区。

3 讨论

明确病原菌的种类及其分布对于植物病害防治策略的制订具有重要意义,本研究于2018—2020年采集了福建省马铃薯主栽地区的马铃薯黑胫病样,通过分离、纯化获得90株菌株,采用16S rDNA序列分析结果可将其中的87株菌株鉴定为黑腐果胶杆菌、胡萝卜果胶杆菌巴西亚种、胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种、帕曼蒂氏果胶杆菌、*P. polaris*及达旦提狄基氏菌,有3株菌株可鉴定到果胶杆菌属,但未鉴定到种;且胡萝卜果胶杆菌巴西亚种、胡萝卜果胶杆菌胡萝卜亚种和帕曼蒂氏果胶杆菌为优势菌种,同时鉴定到1株达旦提狄基氏菌,该菌隶属狄基氏菌属,寄主范围广,多分布于欧洲等国家,危害严重,我国以前报道的该属病原菌未鉴定到种,也未见达旦提狄基氏菌引起我国马铃薯黑胫病的报道。本研究首次报道了达旦提狄基氏菌可引起马铃薯黑胫病,但后续还需进行柯赫氏法则验证及生理生化特性分析。

Rep-PCR技术是Versalovic et al.(1994)描述的一种细菌基因组指纹分析方法。在细菌基因组中存在如基因外重复回文因子、肠杆菌基因间重复一致序列和BOX插入因子等重复序列,这些序列高度保守,存在菌株和种属水平上的差异,扩增该序列所获得的图谱可用于多态性分析(赵燕梅等,2014;高小宁等,2016)。高小宁等(2016)利用Rep-PCR技术研究了陕西省猕猴桃细菌性溃疡病菌*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*的遗传多样性;张敏等(2009)利用ERIC-PCR技术分析发现四川省不同地区、不同水稻品种上的稻曲病菌*Ustilaginoidea virens*存在遗传变异;Faquih et al.(2015)利用ERIC-PCR技术对摩洛哥不同地区的30株马铃薯软腐病菌*P. carotovorum* subsp. *carotovorum*进行了多样性评价,系统发育分析表明摩洛哥马铃薯软腐病菌具有较大的遗传多样性;Nakayama et al.(2021)利用Rep-PCR技术分析日本马铃薯黑胫病原菌指纹图谱,表明山葵果胶杆菌、胡萝卜果胶杆菌巴西亚种和香石竹狄基氏菌可分别被划分为29、21和11个指纹基因型,并认为黑胫病菌是通过种薯传播。目前国内还未见利用该技术研究马铃薯黑胫病原菌遗传多样性的报道,本研究利用Rep-PCR技术进行遗传多样性分析,发现福建省不同区域的马铃薯黑胫病原

菌存在丰富的多态性,构建的DNA指纹图谱可将供试菌株分为4个类群,遗传相似性和遗传距离分析表明福建省马铃薯黑胫病原菌存在一定的遗传变异,不同地理来源的菌株遗传相似性和遗传距离差异较大,说明各地马铃薯种薯来源混杂是导致福建省马铃薯黑胫病复杂多样的主要原因。马铃薯黑胫

病原菌种群间的遗传距离和地理距离无显著相关性,这进一步验证了上述结论。另外,本研究还测试了90株马铃薯黑胫病原菌对马铃薯薯块的致病力(未发表数据),发现来自不同地区的菌株致病力强弱不同,进一步说明了福建省各地区的马铃薯黑胫病原菌存在丰富的遗传多样性。

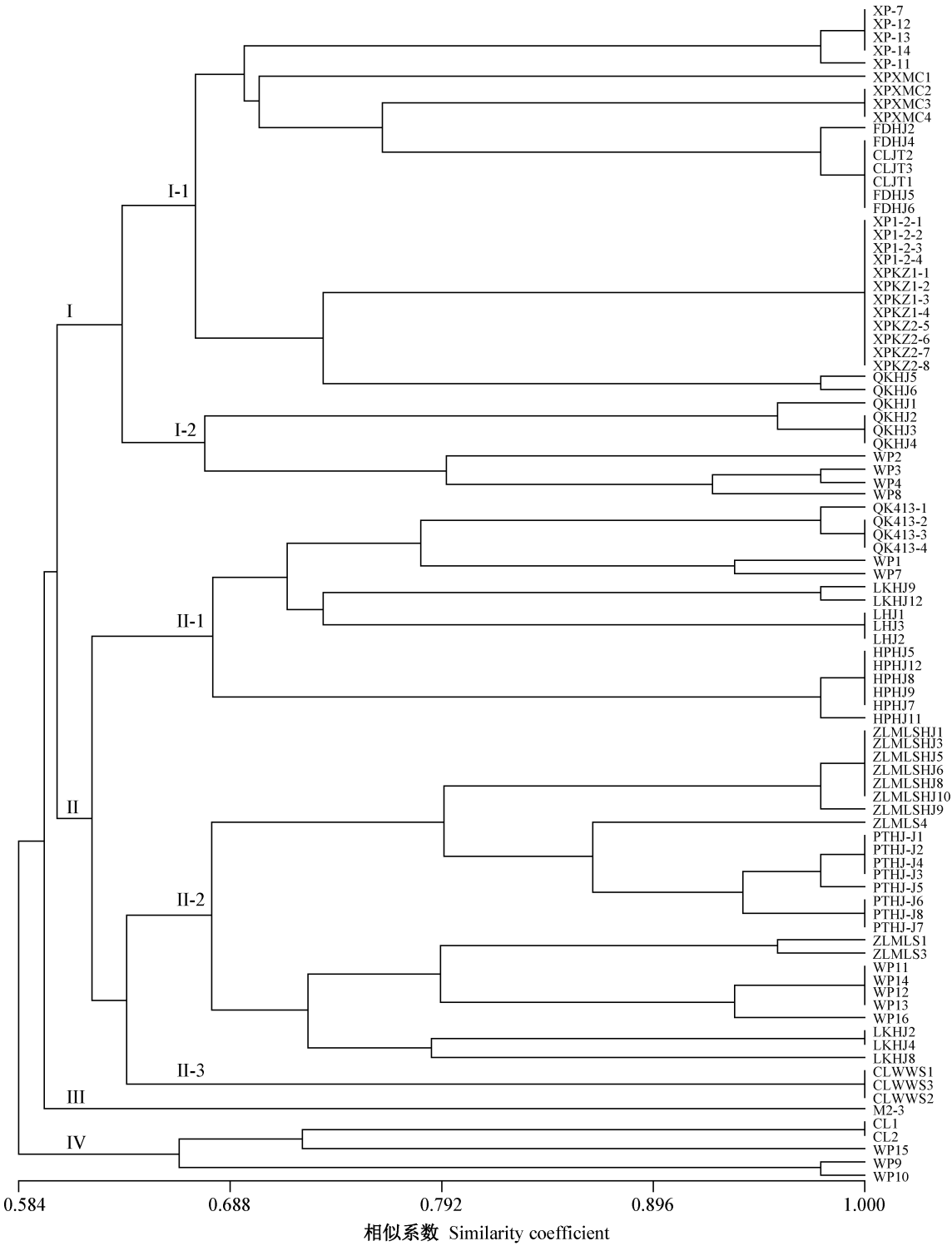


图3 基于REP-PCR检测结果的马铃薯黑胫病原菌聚类分析
Fig. 3 Dendrogram analysis of the pathogens causing potato blackleg disease based on REP-PCR results

本研究明确了引起福建省马铃薯黑胫病的病原菌,并利用Rep-PCR技术分析了马铃薯黑胫病病原菌的遗传多样性。引起福建省马铃薯黑胫病的重要传播途径可能是种薯带菌传播,因此今后要加强种薯质量检测,从源头切断传播途径,同时本研究首次分离到1个新种达旦提狄基氏菌,该属细菌能够感染蔬菜等多种作物引起软腐病,但仍需进行柯赫氏法则验证其是否为马铃薯黑胫病的致病菌,同时要加强对马铃薯黑胫病的监测和检测技术,预防马铃薯黑胫病的发生。

参 考 文 献 (References)

- Ali HF, Ahmad M, Junaid M, Bibi A, Ali A, Sharif M, Ali B, Nawab K, Sadozai A. 2012. Inoculum sources, disease incidence and severity of bacterial blackleg and soft rot of potato. *Pakistan Journal of Botany*, 44(2): 825–830
- Czajkowski R, de Boer WJ, Velvis H, van der Wolf JM. 2010. Systemic colonization of potato plants by a soilborne, green fluorescent protein-tagged strain of *Dickeya* sp. biovar 3. *Phytopathology*, 100(2): 134–142
- Czajkowski R, Pérombelon MCM, Jafra S, Lojowska E, Potrykus M, van der Wolf JM, Sledz W. 2015. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review. *Annals of Applied Biology*, 166(1): 18–38
- de Haan EG, Dekker-Nooren TCEM, van der Bovenkamp GW, Speksnijder AGCL, van der Zouwen PS, van der Wolf JM. 2008. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* can cause potato blackleg in temperate climates. *European Journal of Plant Pathology*, 122(4): 561
- Dees MW, Lysøe E, Rossmann S, Perminow J, Brurberg MB. 2017. *Pectobacterium polaris* sp. nov., isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(12): 5222–5229
- Duarte V, de Boer SH, Ward LJ, de Oliveira AMR. 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology*, 96(3): 535–545
- Faquihi H, Terta M, Amdan M, Achbani EH, Ennaji MM, Mhand RA. 2015. Phenotypic and genotypic diversity of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot disease of potatoes in Morocco. *European Journal of Plant Pathology*, 143(4): 801–811
- Gao XN, Zheng Z, Zhao ZB, Qin HQ, Huang LL. 2016. Rep-PCR analysis of genotypic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* strains from Shaanxi Province of China. *Journal of Fruit Science*, 33(3): 340–349 (in Chinese) [高小宁, 郑州, 赵志博, 秦虎强, 黄丽丽. 2016. 陕西省猕猴桃细菌性溃疡病菌(*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*)Rep-PCR的遗传多样性分析. 果树学报, 33(3): 340–349]
- Gao YL, Xu J, Liu N, Zhou Q, Ding XH, Zhan JS, Cheng XY, Huang J, Lu YW, Yang YH. 2019. Current status and management strategies for potato insect pests and diseases in China. *Plant Protection*, 45(5): 106–111 (in Chinese) [高玉林, 徐进, 刘宁, 周倩, 丁新华, 詹家绥, 成新跃, 黄剑, 鲁宇文, 杨宇红. 2019. 我国马铃薯病虫害发生现状与防控策略. 植物保护, 45(5): 106–111]
- 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
- Katoh K, Misawa K, Kuma KI, Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research*, 30(14): 3059–3066
- Khayti S, Cigna J, Chong TM, Quétu-Laurent A, Chan KG, Hélias V, Faure D. 2016. Transfer of the potato plant isolates of *Pectobacterium wasabiae* to *Pectobacterium parmentieri* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(12): 5379–5383
- Kumvinit A, Akarapisan A. 2019. Characterization of blackleg and soft rot from potato in northern Thailand. *Journal of Phytopathology*, 167(11/12): 655–666
- Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. //Stackebrandt E, Goodfellow M. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. New York: John Wiley and Sons, pp. 115–148
- Lin HY, Che JM, Liu B, Zheng XF, Xiao RF. 2011. Genetic diversity analysis of *Ralstonia solanacearum* based on BOX-PCR and REP-PCR. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 19(6): 1099–1109 (in Chinese) [林海云, 车建美, 刘波, 郑雪芳, 肖荣凤. 2011. 基于BOX-PCR和REP-PCR技术青枯雷尔氏菌遗传多样性分析. 农业生物技术学报, 19(6): 1099–1109]
- Ma B, Hibbing ME, Kim HS, Reedy RM, Yedidia I, Breuer J, Breuer J, Glasner JD, Perna NT, Kelman A, et al. 2007. Host range and molecular phylogenies of the soft rot enterobacterial genera *Pectobacterium* and *Dickeya*. *Phytopathology*, 97(9): 1150–1163
- Mattinen L, Somervuo P, Nykyri J, Nissinen R, Kouvonen P, Corthals G, Auvinen P, Aittamaa M, Valkonen JPT, Pirhonen M. 2008. Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type VI secretion cluster in the potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbiology*, 154(8): 2387–2396
- Nakayama T, Yasuoka S, Ozawa T, Aono Y, Ushio Y, Fujimoto T, Ohki T, Maoka T. 2021. Genetic diversity of potato blackleg pathogens, *Pectobacterium wasabiae*, *P. carotovorum* subsp. *brasilense* and *Dickeya dianthicola* in Japan by Rep-PCR fingerprinting. *European Journal of Plant Pathology*, 159: 917–939
- Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of the America*, 76(10): 5269–5273
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*,

- 32(1): 268–274
- Pérombelon MCM. 1974. The role of the seed tuber in the contamination by *Erwinia carotovora* of potato crops in Scotland. *Potato Research*, 17(2): 187–199
- Pérombelon MCM. 1992. Potato blackleg: epidemiology, host-pathogen interaction and control. *European Journal of Plant Pathology*, 98(2): 135–146
- Pitman AR, Harrow SA, Visnovsky SB. 2010. Genetic characterisation of *Pectobacterium wasabiae* causing soft rot disease of potato in New Zealand. *European Journal of Plant Pathology*, 126(3): 423–435
- Pramunadipita S, Widiastuti A, Wibowo A, Priyatmojo A. 2021. Genetic diversity of the pathogenic fungus *Sarocladium oryzae* causing sheath rot on rice using Rep-PCR. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 667: 012057
- She XM, Lan GB, He ZF, Tang YF, Du ZG, Luo FF. 2015. Identification of the pathogen of potato blackleg disease in Guangdong. *Acta Phytopathologica Sinica*, 45(5): 449–454 (in Chinese) [余小漫, 蓝国兵, 何自福, 汤亚飞, 杜振国, 罗方芳. 2015. 广东马铃薯黑胫病的病原鉴定. *植物病理学报*, 45(5): 449–454]
- Tang H. 2010. Potato industrial actuality and development countermeasures in Fujian Province. *Chinese Potato Journal*, 24(6): 376–378 (in Chinese) [汤浩. 2010. 福建省马铃薯产业优势及发展对策. *中国马铃薯*, 24(6): 376–378]
- Tian YL, Hu XD, Zhao YQ, Sun T, Zhou JJ, Fan JQ, Hu BS. 2018. Isolation and identification of the pathogen causing potato blackleg in Inner Mongolia. *Acta Phytopathologica Sinica*, 48(6): 721–727 (in Chinese) [田艳丽, 胡旭东, 赵玉强, 孙婷, 周家菊, 范加勤, 胡白石. 2018. 内蒙古马铃薯黑胫病原菌的分离和鉴定. *植物病理学报*, 48(6): 721–727]
- Toth IK, van der Wolf JM, Saddler G, Lojkowska E, Hélias V, Pirhonen M, Tsrer L, Elphinstone JG. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology*, 60(3): 385–399
- van der Merwe JJ, Coutinho TA, Korsten L, van der Waals JE. 2010. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*, 126(2): 175–185
- Versalovic J, Schneider M, Bruijn F, Lupski JR. 1994. Genomic fingerprint of bacteria using repetitive sequence based polymerase chain reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, 5: 25–40
- Wang X, Cheng L, Wang YY, Gao XS, Li SL. 2018. Identification of blackleg pathogen on potato (*Solanum tuberosum* L.) in Qinghai. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 30(8): 1369–1375 (in Chinese) [王信, 程亮, 王亚艺, 高旭升, 李松龄. 2018. 青海省马铃薯黑胫病原菌的鉴定. *浙江农业学报*, 30(8): 1369–1375]
- Xu J, Zhu JH, Yang YL, Tang H, Lü HP, Fan MS, Shi Y, Dong DF, Wang GJ, Wang WX, et al. 2019. Status of major diseases and insect pests of potato and pesticide usage in China. *Scientia Agricultura Sinica*, 52(16): 2800–2808 (in Chinese) [徐进, 朱杰华, 杨艳丽, 汤浩, 吕和平, 樊明寿, 石瑛, 董道峰, 王贵江, 王万兴, 等. 2019. 中国马铃薯病虫害发生情况与农药使用现状. *中国农业科学*, 52(16): 2800–2808]
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T. 1998. POPGENE Version 1.31: microsoft windows-based freeware for population genetic analysis. Alberta, Canada: University of Alberta, Centre for International Forestry Research, pp. 11–23
- Zhang D, Gao FL, Jakovlić I, Zou H, Zhang J, Li WX, Wang GT. 2020. PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies. *Molecular Ecology Resources*, 20(1): 348–355
- Zhang M, Li JS, Liu J, Song W, Dai HX. 2009. Preliminary analysis of genetic diversity of *Ustilaginoida virens* strains of indica rice from Sichuan Province. *Journal of Plant Protection*, 36(2): 113–118 (in Chinese) [张敏, 李竞生, 刘坚, 宋伟, 代海霞. 2009. 四川省籼稻区水稻稻曲病菌遗传多样性分析. *植物保护学报*, 36(2): 113–118]
- Zhao YM, Zhang JM, Xu QF. 2014. Rep-PCR technology and its application. *Shanghai Animal Husbandry and Veterinary Communications*, (3): 24–26 (in Chinese) [赵燕梅, 张吉明, 许庆方. 2014. Rep-PCR技术及其应用现状. *上海畜牧兽医通讯*, (3): 24–26]

(责任编辑:李美娟)