

专论与综述

PCR 技术在植物病原细菌研究中的应用*

姬广海¹ 魏兰芳² 张世光¹(云南农业大学云南省植物病理重点实验室 昆明 650201)¹(云南农业大学资源与环境学院 昆明 650201)²

摘要: 利用 rep-PCR、AFLP 和 RAPD 等多种基因组指纹分析方法, 指纹图谱结合计算机辅助分析, 用于研究植物病原细菌群体遗传多样性; 遗传多样性图谱有助于理解病原细菌的分类、群体结构, 还有利于设计特异、灵敏、快速检测策略用于植物病原检测和病害诊断。已有许多以 PCR 为基础的检测技术如 rDNA-PCR、ITS-PCR、ARDRA 等, 有很多特异性引物及检测程序, 已在植物病原检测和病害诊断中广泛应用。PCR 技术的应用和计算机的辅助分析, 为植物病原细菌群体动态和生态学知识提供了基本框架, 使植物病理学进入一个新时代。

关键词: 基因组指纹, 群体动态, PCR, 病原检测和病害诊断

中图分类号: S432.42 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 04-0077-05

生物技术的发展, 从根本上改变了快速识别和跟踪微生物的能力, 目前已完成 18 种微生物基因组 DNA 全序列, 56 种正在进行之中, 展示了微生物遗传、分类和鉴定已进入一个新时代。基因组策略相应产生了许多用于特异、灵敏检测病原菌和病害诊断的分子策略, 同时分子方法也已在微生物生态领域中广泛应用。许多土壤、植物叶围、根围及内生微生物群体结构已得到深入了解, 这对病原菌的检测和病害诊断提供了重要依据。

以 PCR 为基础的方法包括了一个以 DNA 为基础获得病菌种群多样性、病原检测及病害诊断的过程, 将 16S rDNA 和 DNA 序列分析等不同 PCR 方法, 与 rep-PCR 等总基因组指纹图谱分析相结合, 可形成植物病原细菌从科到菌株不同分类水平的遗传多样性指纹图谱; 由于生物技术的发展、信息化和其它计算机检测系统的使用, 再加上有关植物病原细菌生态和种群动态学方面的深入了解, 植物病原物遗传多样性、检测和病害诊断研究已进入了一个新领域^[1-2]。

1 基因组指纹技术及其在植物病原细菌群体多样性研究中的应用

1.1 RAPD 基因组指纹技术 RAPD 技术由 Williams 和 Welsh 首先提出 (Williams 等 1990), 是利用一个随机序列的寡核酸作引物, 通常为 10 个核苷酸, 以生物基因组 DNA 作模板进行 PCR 扩增反应, 经琼脂糖凝胶电泳来检测 DNA 序列多态性。利用 RAPD 通过对不同类群细菌及其种、致病变种群体的 PCR 扩增, 获得的多态性资料进行聚类分析, 可以了解它们彼此之间的同源程度, 从而确定它们之间的亲缘关系和进化地位^[3]。

* 国家自然科学基金资助项目 (No. 30160052)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 30160052)

云南省自然科学基金资助项目 (No. 2000C0016Q)

收稿日期: 2001-04-29, 修回日期: 2001-06-15

RAPD 已成功用于软腐欧文氏菌、荧光假单胞菌、草莓黄单胞菌、油菜黄单胞菌不同亚种、稻白叶枯病菌、短小杆菌等属内不同种、致病变种、小种鉴定和鉴别中。

1.2 扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP) AFLP 技术实际上是 RFLP 和 PCR 相结合的一种分子标记, 多态性很强, 非常适合遗传多样性分析、菌株鉴定、快速构建遗传图谱等研究。如 Bragard 等 (1997) 对 68 株透明黄单胞菌种下不同致病变种 AFLP 分析, 经聚类分析明确了各自的亲缘关系, 透明黄单胞菌禾谷致病变种 (*X. t. pv. cereals*)、透明致病变种 (*X. t. pv. translucens*) 及颖壳致病变种 (*X. t. pv. undulosa*) 为真正的分类单元, 属于不同的 AFLP 类群, 支持以前用多元分类法 (致病性研究、FAME 分析、蛋白质电泳分析等) 得出的结论^[4]。Restrepo 等 (2000) 利用 AFLP 方法测定了哥伦比亚地区黄单胞菌属 *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 遗传多样性, 确定了株系之间的表型关系和遗传分化系数。

1.3 rep-PCR 技术 研究发现, 许多细菌都存在与 REP、ERIC、BOX 序列同源的短重复序列, 且在不同的属、种和菌株间具有高度的保守性。因此, 利用 REP、ERIC、BOX 等引物, 结合 PCR 技术, 选择性扩增 REP、ERIC、BOX 因子之间不同基因组区域, 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳进行分离, 此项技术合称 rep-PCR DNA 指纹技术, 根据 rep-PCR DNA 指纹, 能在种、亚种和小种 (致病型) 和菌株水平上进行细菌分类和鉴定。该技术已成功应用于 *Xanthomonas*、*Pseudomonas*、*Acidovorax*、*Agrobacterium*、*Rhizobium*、*Clavibacter* 等属内不同种研究领域。

1.3.1 rep-PCR 指纹分析在细菌分类和鉴定中的应用: Louws 等 (1994) 对假单胞菌属和黄单胞菌属内不同种或致病变种 rep-PCR 指纹图谱可区分同种内不同致病变种, 如水稻白叶枯病和条斑病菌, 丁香假单胞菌的丁香和番茄致病变种等; 并且能明确同一致病变种菌株间的遗传变异情况。Rademaker 等 (1997) 对 59 种黄单胞菌不同种群的 rep-PCR 指纹分析, 经计算机辅助分析能在亚种水平上区分黄单胞菌属内的不同种或致病变种, rep-PCR 指纹分析及其种、致病变种的指纹数据库有助于黄单胞菌的分类与鉴定。胡方平和张小平等 (1997) 也采用该技术用于噬酸菌属 (*Acidovorax*) 的燕麦噬酸菌 (*A. avenae*) 不同亚种、布克氏菌属 (*Burkholderia*) 不同种群, 以及慢生根瘤菌种群的鉴定和鉴别。

1.3.2 指纹技术在评价寄主适应性病原菌群体多样性中的应用: 病原菌新小种的进化及群体动态的预测为病原控制提供了直接依据, 实验证明分子指纹技术是细菌群体动态和进化的有效工具。病原等群体结构是分析一种细菌群体内个体或群体间的遗传变异和亲缘关系程度。例如: 通过指纹分析发现引起番茄斑点病的病原由两种具有完全不同的 rep-PCR 指纹图谱的病原物构成。实际上两种病原物分别为 *X. axonopodis* pv. *vesicatoria* (Xav) 和 *X. vesicatoria*, 具有不同的生理生化和致病性特点。rep-PCR 指纹已用于构建加勒比海和中美洲的 Xav 菌株的遗传多样性图谱, 研究发现在许多国家和岛屿上 Xav 为优势菌株, 许多菌株具有岛屿特异性的遗传谱系; Xv 菌株的缺乏, 以及病原菌远距离迁移发生少, 对利用抗性品种布局控制 Xav 菌株的危害提供了可靠证据。目前还发现少数病原细菌如水稻白叶枯病菌中存在一类多拷贝的可移动重复单元 (IS1112, IS1113) 根据其序列设计引物, 经 PCR 扩增, 获得的 DNA 多态性图谱, 根据基因组指纹很容易区分白叶枯病菌的遗传谱系构成。病原菌遗传多样性结合致病型分析可以明确微生物在国家或地区水平上的遗传多样性特点。例如 George 等 (1995,

1997) 采用 IS1112 引物对白叶枯病原菌进行 PCR-RFLP 分析, 结果表明: 菲律宾和印度尼西亚两国的水稻白叶枯病菌菌系遗传多样性复杂, 表现地理性区域性分化, 但也存在一定的相关性^[5]。Walcott 等 (2000) 利用 DNA 指纹图谱分析西瓜斑点病菌 (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*), 将其分为 14 个单元型, 通过聚类分析分为两个亚群 (I 和 II)。玉春连等 (2001) 用 IS-PCR 和 rep-PCR 法结合传统病理学分析了我国长江以南的 128 个水稻白叶枯病菌的群体遗传多样性, 将 128 个病原菌在我国 5 个鉴别品种上测定, 结果显示参试菌系多数属于 IV 型、II 型和 0 型, 并出现了一群反应型不同于已有病原型的新类型^[6]。

2 检测与病害诊断

检测是判断一个样品内是否存在特定目标微生物; 病害诊断则是病害发生原因和性质的鉴定。植物病原物快速、简便、精确的检测, 是制定病害控制策略, 阻止病原物快速传播的有效方法。PCR 技术的问世, 使病原物的快速检测和病害诊断成为现实。植物病原物的检测和病害诊断策略要求具有较好的特异性和灵敏性, 以 PCR 为基础的检测技术中, 特异性取决于引物和扩增反应条件; 灵敏性则取决于每次分析样品中目标病原菌的最低剂量, 以及样品制备方法对 PCR 反应的影响。PCR 的快速检测, 引物尤其重要。

已发展许多策略为病原细菌特异检测和病害诊断设计引物。特异性引物的设计需要了解目标 DNA 序列。由下列几种途径可快速进行病原菌特异检测和病害诊断。

2.1 特异性基因或 DNA 序列用于检测和鉴定病原菌 以致病基因为目标, 设计特异性引物, 通过 PCR 扩增进行病原菌特异性检测已有许多报道。例如 Haes 等土壤杆菌 (*Agrobacterium*) *virD* 基因内切酶编码区相匹配的引物, 特异性检测 *Agrobacterium* 致病性菌株, 利用引物扩增 *ipf* 致瘤基因片段, 用于区分肿瘤诱导菌株和非肿瘤诱导菌株。Darrasse 等设计引物扩增由胡萝卜欧文氏菌 (*E. carotovora*) 菌株导致腐烂病相关的果胶裂解酶基因 (*Pel*), 产生 434bp 的特异性扩增片段, 该引物可用于特异性鉴定 *E. c. subsp. carotovora*、*atroseptica*、*odorifera* 和 *wasabiae* 等具有果胶裂解活性的亚种菌株。Stephane 等 (2000) 采用嵌套-PCR-RFLP (Nested-PCR-RFLP) 技术, 根据 *hrp* 基因区设计引物特异性检测 *Ralstonia solanacearum* 的生理变种, 结果显示此方法为病原菌的鉴定、检测及病害流行调查提供了一个广阔的应用前景^[7]。

另外, 根据无毒基因特性特异性检测毒性小种已成为快速鉴定群体内特定小种组成的有效策略, 例如在 *X. a. pv. vesicatoria* 菌株群体内可特异性检测 *avrBS2* 基因, 对高效区分致病性小种非常有用。随着多种植物病原细菌基因组 DNA 序列的完成, 控制病原菌致病性或适应性的致病基因或毒性基因保守 DNA 区域的不断了解, 直接针对致病基因设计引物, 建立可靠的 PCR 检测程序, 用于植物病原菌特异性检测和病害诊断已成为今后检测研究热点。

质粒 DNA 也可作为 PCR 检测目标, 进行病原菌的快速检测。例如 Verdier 等设计引物扩增与木薯枯萎病菌 (*X. a. pv. manihotis*) 致病性相关的一个质粒 DNA 片段, 107 致病性菌株均产生 897bp 的特异性 PCR 扩增片段, 其它 5 个 *X. a. pv. manihotis* 无毒性或相近的黄单胞菌株, 以及与木薯有关的腐生性细菌均无扩增产物^[8]; 来自梨火疫病菌 (*E. amylovora*) 的质粒 pEA29 DNA *Pst* I 酶切片段, 经测序后设计引物, 用于梨火

疫病菌的特异、灵敏检测。质粒 DNA 一些基因片段与病原菌致病性或适应性相关,但质粒稳定性问题一直是困扰这一策略的实用性,常造成漏检现象。利用质粒 DNA 为目标的 PCR 检测技术的可靠性和稳定性仍取决于对质粒 DNA 稳定性的充分认识。

2.2 核糖体 DNA 基础的 PCR 策略 (1) rDNA-PCR: rDNA 存在于所有细菌中, rDNA 基因由保守区和可变区组成,在细菌中高度保守。细菌 rDNA 由 5S、16S、23S 及其基因间隔区 (ITS) 构成。依据 rDNA 保守序列设计引物,PCR 扩增产物的电泳谱型及其 DNA 序列,可在属、种水平上鉴定和检测植物病原细菌。Maes 等利用 16S rDNA 通用引物和特异于 *Xanthomonas* 的一个反向引物,对小麦种子浸提液进行 PCR 扩增,产物为 480bp,可特异性检测小麦种子 *Xanthomonas* 菌株。Seal 等设计特异引物,利用 PCR 技术特异性扩增茄青枯病菌,片段大小为 287 ~ 288bp 16S rRNA 基因片段,对检测马铃薯青枯病等已知小种和生化型非常有用。特异于 *E. amylovora* 23S rDNA 基因的引物,PCR 扩增可用于特异性检测病组织中潜伏侵染的梨火疫病病菌。Takeuchi 等测定 6 个 *Burkholderia* 和其它两个相关细菌的 16S-23SrDNA 基因间隔区序列,经分析后设计 ITS 区特异性引物,检测引起水稻苗腐病菌 *B. plantarii* 和 *B. glumae* 病菌。

(2) ITS-PCR: 16S-23SrRNA ITS 区包括几个 tRNA 基因和非编码区,比 16S 和 23S rRNA 变异更大,根据 ITS-PCR 扩增产物的数目及片段长度,以及结合产物的 RFLP 和 DNA 序列分析,可大幅度地增强检测的特异性^[9]。例如:Li 和 Doer 等分析 5 个不同的 *Clavibacter* 亚种的 16S 和 23S rRNA 基因 ITS 间隔区的 DNA 序列,设计一对引物,经 PCR 扩增后产生 *C. m. pv. sepedonicus* 菌株 215bp 特异性扩增 ITS 片段。在检测马铃薯块茎病原菌潜伏侵染的灵敏度优于 ELISA 和免疫荧光检测方法;采用同样技术可特异性检测甘蔗组织中的 *C. xyli* subsp. *xyli*,并将其与相似的 *C. x. subsp. synodonis* 区分开。

(3) ARDRA 即扩增核糖体 DNA 限制性分析:主要采用通用引物用于扩增细菌 rDNA 序列,然后酶切扩增产物,电泳分离后,电泳谱型借助计算机辅助分析,可将菌株鉴定到属、种水平,比 16S rDNA 测序更快,ARDRA 产生的 16S rDNA 图谱还可与 rep-PCR 基因组指纹图谱相结合一起分析,使分辨率更高,达到亚种或菌株水平。该方法已广泛用于细菌的分类和鉴定。例如引物组合 (fD2 和 rp1) 已用于扩增梨火疫病病菌 (*E. amylovora*) 产生 1.5bp 的扩增片段,经 *Hae* III 酶切后,获得可用于诊断的 RFLP 图谱;嵌套 16S rDNA-PCR 程序对特异性鉴定 *C. michiganensis* 菌株相当有用,限制性酶切分析后,可用于区分不同的致病变种;嵌套 PCR 程序可用于检测马铃薯块茎中的 *C. m. subsp. sepedonicus*。这一技术可显著提高检测灵敏度。ARDRA 分析可用于区分 *Agrobacterium* 生化变种 1、2、3,但无法区分 *A. radiobacter* 和 *A. rubi*,以及种内菌株间的差异,相反,ITS-PCR 结合限制性酶切分析,可有效区分所有 *Agrobacterium* 种、变种,也可揭示种内菌株间的差异。

(4) rDNA 序列分析: rDNA 是研究细菌进化和亲缘关系的重要指标,它含量大 (约占细菌 RNA 总量的 80%),并存在于所有的细菌中。rDNA 基因由保守区和可变区组成,在细菌中高度保守,素有“细菌化石”之称,是细菌系统分类学研究中最有用和最常用的分子钟。原核生物 rDNA 分为 3 种,分别为 5S rDNA、16S rDNA 和 23S rDNA,并且它们位于同一操纵子 (rm) 上。由于 16S rDNA 序列在原核生物中的高度保守性,对于相近种或同一种内不同菌株之间的鉴别分辨力较差。23S rDNA 分子比较大 (约 3kb 左右),并且只有少数种的核酸序列被报道,尚未在细菌的分类和鉴定中得到广泛应用。

16S-23S rDNA 间区 (Intergenic Spacer Region) 由于没有特定功能和进化速率比 16S rDNA 大 10 多倍, 近几年来在细菌鉴定和分类方面倍受关注。通过对核酸序列库中 13 个种的 33 个 16S-23S rRNA ITS 序列进行比较发现, 它们没有高度保守区域, 同源性最高的是编码 rRNA 的基因。利用多拷贝的 rrm 的 16S-23S rRNA ITS 的长度和数目的差异可以鉴别不同属、种及型的细菌。PCR 技术和测序技术结合, 又发展了 PCR 直接测序方法, 更使 16S rRNA 序列分析在细菌系统发育应用更加深入。已有资料表明不同属、种之间生物体的亲缘关系越远, 16S rRNA 核苷酸序列差异越大, 例如 Hauben 等以 16S rDNA 序列分析黄单胞菌属内不同种之间的序列相似性达 98.2%, 经聚类分析将 Vauterin 划分的 20 个基因种分成 3 个簇, 其中簇 1 由 *X. albilineans*、*X. hyacinchi*、*X. theicola*、*X. translucens* 4 个种组成, 甘蔗黄单胞菌 (*X. sacchari*) 则形成独特的谱系类群, 簇 3 则以油菜黄单胞菌为核心, 其余的 15 个种组成^[10]。

参 考 文 献

- [1] Louws F J, Rademaker J L W, de bruijn F J. *Phytopathology*, 1999, **37**: 81 ~ 125.
- [2] 邱 芳, 伏建民, 金德敏, 等. 生物多样性, 1998, **6** (2): 143 ~ 150.
- [3] 吴少慧, 张成刚, 张忠泽. 微生物学杂志, 2000, **20** (2): 44 ~ 47.
- [4] Brajard C, Singer E, Alizadeh A, *et al.* *Phytopathology*, 1997, **87**: 1111 ~ 1117.
- [5] George M L C, Bustman M, Cruz W T, *et al.* *Phytopathology*, 1997, **87**: 302 ~ 309.
- [6] 王春连, 章 琦, 周永力, 等. 中国水稻科学, 2001, **15** (2): 131 ~ 136.
- [7] Stephane P, Jacques L. *European Journal of Plant Pathology*, 2000, **106**: 255 ~ 265.
- [8] Verdier V, Mosquera G, Assigbetse K. *Plant Dis*, 1998, **82**: 79 ~ 83.
- [9] 焦振泉, 刘秀梅. 微生物学通报, 2001, **28** (1): 85 ~ 89.
- [10] Hauben L, Vauterin L, Swing J M, *et al.* *JISB*, 1997, **47** (2): 328 ~ 335.