

# 南繁基地番茄青枯菌的分离与 16S rDNA 鉴定

任海龙<sup>1</sup>, 李文慧<sup>2</sup>, 徐麟<sup>1</sup>, 杨涛<sup>1</sup>, 符小发<sup>1</sup>, 王琪<sup>1</sup>

(1. 新疆农业科学院 海南三亚农作物育种试验中心, 海南 三亚 572014; 2. 新疆农业科学院 轮台国家果树资源圃, 新疆 轮台 841600)

**摘 要:** 对新疆农业科学院南繁试验基地的得青枯病的番茄植株进行病原菌分离, 采用细菌 16S rDNA 测序方法进行鉴定。结果表明: 鉴定出致病菌为番茄青枯菌(*Ralstonia solanacearum*), 并探讨了南繁番茄青枯病的防治策略。

**关键词:** 南繁; 番茄; 青枯菌; 16S rDNA

**中图分类号:** Q 949.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2013)02-0080-03

番茄是世界重要的蔬菜作物之一, 在我国的蔬菜栽培中均占有相当的比例<sup>[1]</sup>。据联合国粮农组织统计, 2010 年全世界番茄栽培面积为 441 万  $\text{hm}^2$ , 其中我国番茄栽培面积 2010 年达到约 92 万  $\text{hm}^2$ , 且还在不断增加。为了加快培育高产优质番茄新品种, 国内各育种单位都特别注意南繁育种这一环节<sup>[2]</sup>, 南繁不仅可以成倍加快番茄新品种育种进程, 还可直接促进海南当地农业的发展。番茄青枯病(病原菌为 *Ralstonia solanacearum*, 以前命名为 *Pseudomonas solanacearum*) 是番茄生产上的严重病害之一<sup>[3-4]</sup>。由于青枯病菌的生化型和生理小种多样性高, 且寄主范围广泛, 造成青枯病的难以防治<sup>[5]</sup>。此病在我国长江以南各地尤其是华南地区发生较为普遍, 造成作物的巨大损失<sup>[6]</sup>。近年来, 新疆农业科学院海南三亚南繁试验基地发现部分番茄叶片发生萎焉, 并很快枯死, 对番茄的南繁工作造成了严重影响。该试验对新疆农业科学院南繁基地的番茄病株进行了病原菌的分离与鉴定, 为海南南繁番茄青枯病的研究提供了物质基础和理论依据。



图 1 受青枯病危害的番茄

**第一作者简介:** 任海龙(1985-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为作物抗病遗传育种。E-mail: renhailong\_2006@163.com.

**责任作者:** 徐麟(1968-), 男, 本科, 高级农艺师, 研究方向为果树资源收集评价与利用。

**基金项目:** 海南省自然科学基金资助项目(311059)。

**收稿日期:** 2012-10-18

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

新疆农业科学院园艺作物研究所加工番茄课题组培育的南繁番茄材料, 于 2011 年 10 月 12 日采用穴盘育苗, 11 月 11 日定植到大田, 水肥管理采用覆膜滴灌。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 培养基制备** LB 固体培养基: 配制 1 000 mL LB 培养基需加入琼脂粉 15 g, 胰蛋白胨(Tryptone) 10 g, 酵母提取物(Yeast extract) 5 g, 氯化钠(NaCl) 10 g, 121℃ 灭菌锅灭菌 20 min, 最后在超净工作台中倒入直径为 9 cm 的培养皿, 用封口胶封边, 并倒置放于 4℃ 保存, 1 个月内使用。

**1.2.2 病原菌的分离** 取新鲜发病植株的茎基部组织, 用清水将表皮冲洗干净, 取内部维管束组织切成 0.5  $\text{cm}^2$  左右的小块, 用 70% 的酒精清洗 5~10 s, 再用无菌水洗净酒精, 放在无菌吸水纸上吹干, 在 LB 固体培养基上培养, 3 d 后挑取淡黄色的细菌落再划线培养, 直到菌落单一, 分离过程在超净工作台中进行。

**1.2.3 病原菌基因组的提取** 按北京康为世纪生物科技有限公司的 CW0552 细菌基因组提取试剂盒说明书进行提取。

**1.2.4 病原菌 16S rDNA 序列的扩增** 由于 16S rDNA 在细菌种内相当保守, 且种间某些区域在一级结构水平上有显著差异<sup>[7]</sup>, 对细菌的 16S rDNA 进行 PCR 扩增、测序及序列分析, 已越来越多的用于细菌的鉴定与分类等研究<sup>[8-10]</sup>。该试验选用细菌通用引物 27f 和 1492r, 通过对分离物的 16S rDNA 序列进行同源性比较, 鉴定病原菌的种类。PCR 引物: 27f (5'-AGAGTTTGATCTG-GCTCAG-3'); 1492r (5'-ACGGATACCTTGTTCAGACTT-3') 反应体系(50  $\mu\text{L}$ ): 10×PCR Buffer 5  $\mu\text{L}$ , dNTPs(10 Mm each) 1  $\mu\text{L}$ , Taq (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , 27f (10  $\mu\text{M}$ ) 和 1492r (10  $\mu\text{M}$ ) each 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 39.6  $\mu\text{L}$ 。将

各种成分混匀后进行 PCR 反应程序,94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 下退火 35 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环,最后延伸 8 min PCR 扩增产物的电泳切割回收及纯化参见北京康为世纪生物科技有限公司 CW2302 快速琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒的操作手册。

1.2.5 细菌 16S rDNA 序列的分析方法 测序工作由海口龙华华科为技术服务中心完成,将测序结果输入 NCBI 数据库进行比对,搜索同源 DNA 序列并比较分析。从数据库中选取与目的片段一致性最高的序列,导入 DNAMAN 软件中进行同源性比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 病原菌 16S rDNA 的测序结果

PCR 产物由海口龙华华科为技术服务中心,采用 3730 自动测序仪进行序列测定,结果见图 2。

### 2.2 病原菌 16S rDNA 的测序比对

测序的结果为 1 440 bp,将上述序列与 NCBI 数据库(美国国立生物技术信息中心)进行同源比较,BLAST

得到 79 个 E 值为 0.0 的主要同源序列的分类报告(表 1),全部属于青枯菌属(*Ralstonia*),77 个属于青枯菌种 *Ralstonia solanacearum*,2 个属于 *Ralstonia syzygii*,且排名前 20 位的都是 *Ralstonia solanacearum*,如登录号为 JF523189.1, FJ184057.1, JQ359665.1, JQ320374.1 等。把测序得到的序列与同源关系最近的登录号为 JF523189.1 的序列通过 DNAMAN 软件进行序列比对发现,该分离物的 16S rDNA 序列与 JF523189.1(*Ralstonia solanacearum* strain CaRs-Mep)的核心序列同源性达 99.24%(图 3),因此确认其致病菌为番茄青枯菌(*Ralstonia solanacearum*)。

表 1 79 个主要同源序列的分类报告

菌种	个体数目	种类数目
<i>Ralstonia</i>	79 hits	4 orgs
<i>Ralstonia solanacearum</i>	77 hits	3 orgs
<i>Ralstonia solanacearum</i> GMI1000	4 hits	1 orgs
<i>Ralstonia solanacearum</i> PSI07	1 hits	1 orgs
<i>Ralstonia syzygii</i> R24	2 hits	1 orgs

```
GGTTGGACCTCTGTGGTATCGCCCTCCTTGCGGTTAGGCTAACTACTTC
TGGTAAAGCCCACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCG
GGAACGTATTACCGCGGCATGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCA
GCTTACGTAAGTCGAGTTGCAGACTACGATCCGGACTACGATGCATTTT
CTGGGATTAGTCCACCTCGCGGCTTGGAACCCCTCTGTATGCACCAAT
GTATGACGTGTGAAGCCCTACCCATAAGGGCCATGAGGACTTGACGTC
ATCCCCACCTTCTCCGGTTTGTACCGGCAGTCTCTCTAGAGTGCCCT
TTCGTAGCAACTAGAGACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC
AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTGTCCA
CTTCTCTTTCGAGCACCTAATGCATCTCTGCTTCGTTAGTGGCATGTC
AAGGGTAGTAAGGTTTTTCGCGTTGCATCGAATTAATCCACATCATC
CACCGCTTGTGCGGGTCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTTAATCTTGCGA
CCGTACTCCCCAGGCGGTCAACTTCACGCGTTAGCTACGTTACTAAGG
AAATGAATCCCCAACAAGTAGTTGACATCGTTTAGGGCGTGGACTACC
AGGGTATCTAATCCTGTTTGTCTCCCCACGCTTTCGTGCATGAGCGTCAG
TGTTATCCCAGGAGGCTGCCTTCGCCATCGGTAATCCTCCACATCTCTA
CGCATTTCACTGCTACACGTGGAATTCTACCTCCCTCTGACACACTCTA
GCCGTGCAGTCACCAATGCAATTCCAGGTTAAGCCCGGGGATTTCAC
ATCGGTCTTGACAACCGCCTGCGCACGCTTTACGCCAGTAATTCGG
ATTAACGCTTGACCCCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTA
GCCGTCTTATCTTCCGGTACCGTCATCCACACAGGTATTAACCAAG
TGCATTCTTTCGACAAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCCTTCTTC
ACACACGCGGCATTGCTGATCAGGGTTGCCCCATTGTCCAAAATTC
CCCACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGT
GGCTGATCGTCTCTCAGACCAGCTACTGATCGTCGCTTGGTGGGCCT
TTACCCACCAACTAGCTAATCAGACATCGGCCGCTCTATAGCATGA
GGCCTTGCGGTCCCCACTTTACCCCTCAGGTCGTATGCGGTATTAGCT
AGTCTTTCGACTAGTTATCCCCACTACAGGGCACGTTCCGATGTATTA
CTCACCCGTTTCGCCACTCGCCGCGAGGTAGCAAGCTACCCCGCTGCC
GTCGACTTGATGTGTAATGCAGTCCCCATTAT
```

图 2 病原菌 16S rDNA 的测序结果

目标序列	TGCACTT...CTGTGGTA	TGCGCCTCCTTGCGGTTAGGCTAACTACTTCTGGTAAAGCCC	57
JF523189.1	TGCACTT...CTGTGGTA	TGCGCCTCCTTGCGGTTAGGCTAACTACTTCTGGTAAAGCCC	60
Consensus	tg acc c gtggtg	tgccctccttgcggttaggctaactacttctggttaaagccc	
目标序列	ACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCGGGAACTATTACCGCGGCATGC		117
JF523189.1	ACTCCCATGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCGGGAACTATTACCGCGGCATGC		120
Consensus	actcccatggtgtgacggcggtgtgtacaagacccgggaacgtattaccgcgcatgc		
目标序列	TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGTAGTCGAGTTGCAGACTACGATCCGGA		177
JF523189.1	TGATCCGCGATTACTAGCGATTCCAGCTTCACGTAGTCGAGTTGCAGACTACGATCCGGA		180
目标序列	CCTTGGTGGGCTTTACCCCACTAGCTAATCAGACATCGGCCCTCCTATAGCATG		1257
JF523189.1	CCTTGGTGGGCTTTACCCCACTAGCTAATCAGACATCGGCCCTCCTATAGCATG		1260
Consensus	ccttgggtggcctttaccccaactagctaatcagacatcgccgctcctatagcatg		
目标序列	AGGCCTTGCGGTCCCGCACTTTCACCTCAGGTGATGCGGTATTAGCTAGTCTTTGGA		1317
JF523189.1	AGGCCTTGCGGTCCCGCACTTTCACCTCAGGTGATGCGGTATTAGCTAGTCTTTGGA		1320
Consensus	aggccttgcggtcccccactttcacctcagggtgtagtcggtatttagctagctcttgcga		
目标序列	CTAGTTATCCCCACTACAGGGCAGTTCGGATGATTACTACCCGTTGCGCACTCGCC		1377
JF523189.1	CTAGTTATCCCCACTACAGGGCAGTTCGGATGATTACTACCCGTTGCGCACTCGCC		1380
Consensus	ctagtattccccactacagggcaggttcgatgtattactacccggttcgcaactcgcc		
目标序列	GGCAGGTAGCAAGCTACCCCGCTGCGGT	CGACTTGCATGTGTAATCGACTCCCGA	1433
JF523189.1	GGCAGGTAGCAAGCTACCCCGCTGCGGT	CGACTTGCATGTGTAATCGACTCCCGC	1437
Consensus	ggcaggtagcaagctaccccgctgcggt	cgacttgcattgtgtaa gcag cccc	

图3 目标序列与 JF523189.1 的核心序列比对

注:JF523189.1;番茄青枯菌的序列;Consensus:一致的序列。

### 3 讨论

该研究表明,番茄青枯病在我国南方地区,尤其是华南地区发生普遍<sup>[1]</sup>。对番茄、茄子、辣椒、马铃薯等茄科蔬菜作物危害极大,且大豆、花生等也能受害<sup>[12]</sup>。由于番茄青枯病没有有效的防治方法,因此建议南繁番茄青枯病的防治应采取综合防治策略:首先,控制住发病源头,种植前对土壤和种子进行全面消毒。第二,实行与禾本科或十字花科作物的轮作,切断番茄青枯菌的循环途径。第三,及时清除发病株并灌药处理,防治青枯病的扩散。最后,对南繁输出的种子进行植物检疫,杜绝其向外传播。

#### 参考文献

- [1] 张春奇,查素娥,李红波. 番茄育种研究概况及展望[J]. 农业科技通讯,2011(3):29-33.
- [2] 肖雷,余庆辉. 南繁基地加工番茄的栽培技术[J]. 农村科技,2006(2):30-31.
- [3] 林明宝,汪国平,卢婷,等. 番茄抗青枯病材料及抗病基因 SSR 标记的初步筛选[J]. 安徽农业科学,2008,36(9):3538-3539.

- [4] 刘达凤,陈须文,汪金莲. 番茄不同品种抗青枯病研究[J]. 江西农业大学学报,1996,18(3):360-362.
- [5] Hauward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*[J]. Annu Rev Phytopathol,1991,29:65-87.
- [6] 汪国平,袁四清,熊正葵,等. 广东省番茄青枯病相关研究概况[J]. 广东农业科学,2003(3):32-34.
- [7] 余小漫,何自福,李华平,等. 广东茄科雷尔氏菌菌株生化变种的测定[A]. 中国植物病理学会 2008 年学术年会论文集[C]. 2008:337-339.
- [8] Chen D, Zhang Q, Q Ian K C, et al. Sequence analysis of 16S rRNA gene from 3 microcystis flos-aquae aeruginosa in Guangdong Reservoirs[J]. Ecology Science,2006,25(1):41-42.
- [9] 杨雪颖,张执欣,杨亚珍,等. 甘草根瘤菌的 16S rDNA 全序列测定及系统进化分析[J]. 西北植物学报,2006,26(4):707-711.
- [10] 余小漫,何自福,虞皓,等. 广东茄科雷尔氏菌 16S rDNA 序列分析[J]. 华南农业大学学报,2009,30(4):24-28.
- [11] 邹庆道,朱华,张子君,等. 番茄抗青枯病材料的筛选[J]. 北方园艺,2011(2):28-29.
- [12] 寿森炎,冯壮志,苗立祥,等. 番茄抗青枯病基因的 AFLP 分子标记[J]. 遗传,2006,28(2):195-199.

## The Separation and Bacteria 16S rDNA Identification of Tomato *Ralstonia solanacearum* in Off-season Breed Area

REN Hai-long<sup>1</sup>, LI Wen-hui<sup>2</sup>, XU Lin<sup>1</sup>, YANG Tao<sup>1</sup>, FU Xiao-fa<sup>1</sup>, WANG Qi<sup>1</sup>

(1. Crops Selection Experiment Center, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Sanya, Hainan 572014; 2. National Fruit Tree Resource Garden of Luntai, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Luntai, Xinjiang 841600)

**Abstract:** Pathogens was separated from the disease tomato plants, which came from off-season bread area of Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, and it was identified by the method of bacteria 16S rDNA. The results showed that the pathogen was *Ralstonia solanacearum*, and the strategies of prevention and treatment for tomato bacterial wilt in off-season bread area were discussed.

**Key words:** off-season bread area; tomato; *Ralstonia solanacearum*; 16S rDNA