

南方5省区柑橘黄龙病病原 16S rDNA 片段的克隆与序列分析

单振菊^{1,2}, 冯震¹, 周根¹, 邓晓玲¹

(1 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642; 2 广州市天河出入境检验检疫局, 广东 广州 510620)

摘要:采集了广东、广西、贵州、福建、云南5省区的8个柑橘黄龙病样品,利用黄龙病病原的特异引物对其16S rDNA片段进行PCR扩增,将其扩增产物纯化、回收,并与pMD18-T Vector连接,转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α ,筛选含有黄龙病病原16S rDNA片段的阳性克隆,进行序列测定.利用生物信息学软件对所克隆的序列进行同源性分析和聚类分析.结果表明:来自我国南方5省区的柑橘黄龙病病原16S rDNA的序列与亚洲种(L22532)的同源性为96.9%~98.6%,与非洲种(L22533)的同源性为94.5%~97.1%,与美洲种(AY742824)的同源性为92.5%~94.2%.表明我国南方5省区柑橘黄龙病均属于亚洲种,但在亚洲种内部不同地区的黄龙病病原也发生了微小的变异,其中福建厦门和云南个旧的2个菌株变异较大.

关键词:柑橘黄龙病; 16S rDNA; 基因克隆; 序列分析

中图分类号:S432.41

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2008)02-0025-05

Cloning and Sequence Analysis of 16S rDNA of Citrus Huanglongbing Agents Collected from Five Provinces in South China

SHAN Zhen-ju^{1,2}, FENG Zhen¹, ZHOU Gen¹, DENG Xiao-ling¹

(1 College of Resources and Environment, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Tianhe Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau of Guangzhou, Guangzhou 510620, China)

Abstract: In the study, eight samples of Citrus Huanglongbing (HLB) trees showing typical mottle symptoms were collected from Provinces of Guangdong, Guangxi, Guizhou, Fujian, and Yunnan in China. The HLB agent specific primer sets, OI_1/OI_{2c} was used to amplify DNA from the loci of 16S rDNA. Amplicons were collected, purified, ligated to pMD18-T and transformed into *Escherichia coli* DH5 α . The cloned DNAs were sequenced and compared to all published DNA sequences in GenBank through BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) for phylogenetic analyses. The single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified by using BioEdit software. The cluster analyses were performed by MEGA software. It were concluded that eight of 16S rDNA sequences from these provinces were phylogenetically most closely related to those of the published HLB agents. The similarities between the eight sequences to that of *Candidatus Liberibacter asiaticus* were 98.6% to 98.9%, to that of *Ca. L. africanus* were 95.4% to 97.4%, and to that of *Ca. L. americanus* were 92.5% to 94.5%. The results indicated that the HLB agents collected from these provinces in southern China were *Ca. L. asiaticus*.

Key words: Citrus Huanglongbing; 16S rDNA; clone; sequence analysis

收稿日期:2007-05-16

作者简介:单振菊(1977—),女,硕士,现在广州市天河出入境检验检疫局工作; 通讯作者:邓晓玲(1966—),女,哈尼族,副教授, E-mail: xldeng@sacu.edu.cn

基金项目:广东省自然科学基金(06025850);广东省科技计划项目(2004B20901010)

柑橘黄龙病(Citrus Huanglongbing)是世界性的毁灭性病害,对柑橘生产造成严重的为害^[1-3]. 该病害是由一种限制于韧皮部筛管细胞内的革兰氏阴性细菌所引起的,由于其病原目前尚未能进行人工培养,分类地位不能正式确定,暂定为原核生物薄壁菌门变型菌纲 Proteobacteria α -亚纲中的韧皮部杆菌属 *Candidatus Liberibacter* ssp.,一旦病原人工培养获得成功,才能把(*Candidatus*)去掉^[2,4]. 该病害最早在我国广东省汕头地区开始发生^[5],在2004年以前,黄龙病仅在亚洲东南部、非洲南部的国家和地区发生^[6]. 2004年5月在巴西圣保罗地区发现黄龙病^[7-8],次年9月在美国佛罗里达州也发现了黄龙病^[9],目前黄龙病的研究工作受到了这2个国家的高度重视. 我国在20世纪60年代以后,随着柑橘生产的发展,该病害逐渐严重起来,在广东、广西、福建、海南及台湾等省区的柑橘产区广泛蔓延,摧毁了大量的柑橘树^[10]. 80年代以后,又在江西、浙江、四川、云南、贵州和湖南等省的部分柑橘产区陆续发现黄龙病,目前还有不断扩展蔓延的趋势^[11]. 在柑橘黄龙病病原的多样性方面,最初一些学者根据柑橘黄龙病发生的地域条件、气候条件和传播介体,认为柑橘黄龙病病原存在亚洲种(*Candidatus Liberibacter asiaticus*, Las)和非洲种(*Candidatus Liberibacter africanus*, Laf)^[2]. 后来, Garnier等^[12]利用血清学方法,认为黄龙病存在不同的血清型,可能存在亚洲或非洲2个株系或种. 随着分子生物学的发展,通过对16S rDNA核苷酸序列进行分析已成为原核生物分类的一个重要依据. 1996年, Jagoueix等^[13]通过对柑橘黄龙病病原16S rDNA部分序列的分析,进一步证实柑橘黄龙病存在亚洲种和非洲种. 2005年, Teixeira等^[6]又利用同样的方法在巴西圣保罗发现了美洲种(*Candidatus Liberibacter americanus*). Garnier等^[14]通过对非洲1种感染了黄龙病的 *Calodendrum capense* 的16S rDNA进行克隆与序列分析,发现非洲种的1个新亚种. 在我国,廖晓兰等^[11]曾报道福建可能存在柑橘黄龙病亚洲种下的1个新的亚种.

近年来,随着全球气候持续变暖,木虱活动的范围不断扩大,加上带病的柑橘苗木、接穗的调运,使黄龙病呈现逐渐扩大蔓延的趋势,而且为害越来越严重^[15]. 我国各地气候条件不同,地形多样,各地柑橘黄龙病病原是否完全相同,是否存在新的亚种等问题,迄今鲜见报道. 本研究从我国南方5省区采集了8个表现柑橘黄龙病样品,并对这些样品的16S rDNA序列进行克隆和测序,利用生物信息学的手段进行序列分析,对于我国柑橘黄龙病病原的分类研

究具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 黄龙病病原标本来源

黄龙病病原标本分别采自广东(中山、连山、廉江)、广西(北海)、贵州(从江)、云南(建水、个旧)、福建(厦门)等表现典型黄龙病症状的甜橙叶片,检测有黄龙病病原后,备用.

1.2 柑橘叶脉总DNA的提取

分别选取以上8个表现黄龙病典型斑驳症状的叶脉0.5 g,采用CTAB法^[16]提取叶脉总DNA,在10 g/L的琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下观察DNA的纯度,其余置-20℃保存备用.

1.3 柑橘叶脉总DNA的PCR扩增

采用 Jagoueix等^[17]报道的柑橘黄龙病病原16S rDNA的引物OI₁/OI_{2c},由上海英俊生物工程公司合成,引物序列如下:

OI₁: 5'-GCGCGTATGCAATACGAGCGGCA-3';

OI_{2c}: 5'-GCCTCGCGACTTCGCAACCCA T-3'.

PCR的反应体系:10×PCR缓冲液2.5 μL, dNTP 2 μL, OI₁ 1 μL, OI_{2c} 1 μL, 模板DNA 1 μL, TaqDNA聚合酶0.2 μL,加双蒸灭菌水17.3 μL使总体积为25 μL,放到PCR仪(GeneAmp PCR System 9700)上扩增,设置反应条件,94℃变性5 min后,35个循环(94℃变性30 s, 56℃退火1 min, 72℃延伸1 min),最后72℃再延伸5 min. PCR反应结束后,用10 g/L的琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增结果.

1.4 柑橘黄龙病病原16S rDNA基因的克隆

采用Omega公司的胶回收试剂盒,对柑橘黄龙病病原16S rDNA的PCR产物进行纯化、回收,将纯化的片段连接到pMD18-T Vector,并转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞,通过PCR扩增和酶切筛选,获得含有柑橘黄龙病病原16S rDNA片段的阳性克隆.

1.5 柑橘黄龙病病原16S rDNA基因的序列分析

柑橘黄龙病病原16S rDNA的阳性克隆菌液测序在英俊工程技术有限公司3730测序仪上进行. 测得序列利用DNASTAR软件进行同源性分析. 利用MEGA3.0软件和BioEdit5.0软件进行系统发育分析.

2 结果与分析

2.1 柑橘黄龙病病原DNA的PCR扩增

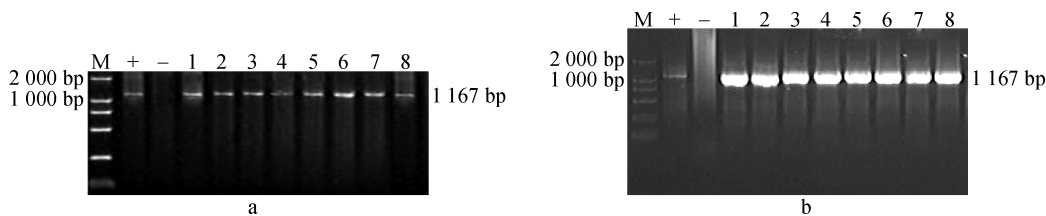
以8个地区表现典型黄龙病症状叶片的DNA为模板,用OI₁/OI_{2c}引物进行PCR扩增反应. 如图

1a 所示,可见有长 1 167 bp 的特异带被扩增出,说明所采集的样品均感染了黄龙病.

2.2 柑橘黄龙病病原 16S rDNA 片段的克隆

对黄龙病病原 16S rDNA 的 PCR 产物进行克隆,利用柑橘黄龙病特异引物 OL_1/OI_{2c} ,通过常规 PCR 方法对克隆菌液进行阳性克隆的筛选,所挑选的单

菌落均能扩增到相应条带,通过 *Bam* I 和 *Hind* III 进行双酶切,每个克隆的质粒均切出了预期的目的条带,证明已经成功克隆了 16S rDNA 片段,PCR 扩增结果见图 1b. 各选取 3 个阳性重组克隆送往上海博亚生物有限公司进行测序.



M: DNA marker DL2000; + :阳性对照 (感病植株); - :阴性对照 (健康植株); 1~8:依次为广东中山、广东连山、广东廉江、广西北海、贵州从江、云南建水、云南个旧、福建厦门的样品
M: DNA marker DL2000; + :positive control (infected tree); - :negative control (healthy tree); 1~8: DNA samples from Guangdong Zhongshan, Guangdong Lianshan, Guangdong Lianjiang, Guangxi Beihai, Guizhou Congjiang, Yunnan Jianshui, Yunnan Gejiu, Fujian Xiamen

图 1 柑橘黄龙病病原 16S rDNA 片段(a)及重组质粒(b)PCR 扩增电泳图

Fig. 1 PCR amplification products of 16S rDNA genes from *Candidatus Liberibacter* and cloned productions

2.3 柑橘黄龙病病原 16S rDNA 序列的同源性分析

利用 DNASTar 软件将本研究所克隆的南方 5 省区 8 个柑橘黄龙病病原 16S rDNA 的序列与基因库中的亚洲种 L22532、非洲种 L22533 和美洲种 AY742824 进行同源性分析(表 1). 由表 1 可见,所

克隆的 8 个地区的柑橘黄龙病病原与亚洲种的同源性很高,而与非洲种和美洲种的同源性相对较低,并且所克隆的 8 个地区的柑橘黄龙病病原中福建厦门和云南个旧病原的变异稍大.

表 1 克隆 16S rDNA 的同源性比对

Tab. 1 The identical ratio of 16S rDNA gene sequences among 8 samples from five provinces

序号 no.	菌株编号 no. of isolate	来源 source	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	L. as-JS	云南建水	...	99.9	99.7	99.9	100.0	100.0	99.9	99.6	98.8	97.3	94.5
2	L. as-ZS	广东中山	0.1	...	99.7	100.0	99.9	99.9	100.0	99.7	98.9	97.4	94.6
3	L. as-XM	福建厦门	0.3	0.3	...	99.7	99.7	99.7	99.7	99.4	98.6	97.1	94.4
4	L. as-BH	广西北海	0.1	0.0	0.3	...	99.9	99.9	100.0	99.7	98.9	97.4	94.6
5	L. as-CJ	贵州从江	0.0	0.1	0.3	0.1	...	100.0	99.9	99.6	98.8	97.3	94.5
6	L. as-LJ	广东廉江	0.0	0.1	0.3	0.1	0.0	...	99.9	99.6	98.8	97.3	94.5
7	L. as-LS	广东连山	0.1	0.0	0.3	0.0	0.1	0.1	...	99.7	98.9	97.4	94.6
8	L. as-GJ	云南个旧	0.3	0.3	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3	...	96.9	95.4	92.5
9	L. as(L22532)	亚洲种	0.4	0.3	0.6	0.3	0.4	0.4	0.3	2.4	...	97.0	93.8
10	L. af(L22533)	非洲种	1.9	1.9	2.1	1.9	1.9	1.9	1.9	3.9	1.8	...	93.7
11	L. am(AY742824)	美洲种	4.0	3.9	4.2	3.9	4.0	4.0	3.9	6.0	4.3	4.5	...

2.4 柑橘黄龙病病原 16S rDNA 片段的 SNPs 分析

将所获得的 8 个地区柑橘黄龙病病原的 16S rDNA 的序列进行 SNPs (single nucleotide polymorphisms) 分析,由分析结果(表 2)可见,云南个旧和福建厦门黄龙病病原的变异位点稍多.

2.5 柑橘黄龙病病原 16S rDNA 序列的聚类分析

利用 MEGA 软件采用邻近法对所克隆的序列和

基因库中登录的序列进行系统发育分析,所得的进化树如图 2. 图 2 中 *Phyllobacterium myrsinacearum*、*Sinorhizobium* sp.、*Aminobacter* sp.、*Ensifer adhaerens*、*Agrobacterium tumefaciens*、*Mesorhizobium* sp.、*Rhizobium* sp.、*Escherichia coli* 为从 GenBank 中下载的 8 个 alpha-Proteobacteria 菌株的 16S rDNA 序列(作为比較的参照菌株). 研究表明,置信度小于 50% 时,进

表 2 克隆 8 个序列的变异位点¹⁾

Tab. 2 The location of differentiation of 8 gene sequences from five provinces		2	3	6	7	8	9	10	11	244	261	657	827	839	844	1166
样品 samples	来源 source															
CL. XM	福建厦门	C	G	T	A	T	C	C	A				A	T	G	G
CL. LJ	广东廉江	C	G	T	A	T	C	C	A	T	G	G	A		G	G
CL. CJ	贵州从江	C	G	T	A	T	C	C	A	T	G	G	A		G	G
CL. JS	云南建水	C	G	T	A	T	C	C	A	T	G	G	A		G	G
CL. LS	广东连山	C	G	T	A	T	C	C	A	T	G	G	A	T	G	G
CL. BH	广西北海	C	G	T	A	T	C	C	A	T	G	G	A	T	G	G
CL. GJ	云南个旧									T	G	G		T		
CL. ZS	广东中山	C	G	T	A	T	C	C	A	T	G	G	A	T	G	G

1) 加阴影的碱基为变异碱基

化树可靠性需慎重对待,只有置信度大于 70% 时,进化树才是可靠的^[18]. 从图 2 可见,这些菌株被分成 3 个类群,所克隆的 8 个柑橘黄龙病病原的菌株和基因库中的柑橘黄龙病病原的菌株组成 1 个单系类群(monophyletic group),其靴带支持率为 100%. 而其他的一些菌株(除 *E. coli*)则属于 alpha-Proteobacteria,为另一平行枝,其靴带支持率为 99%. *E. coli* 作为外类群引入,以生成整个系统发育树的树根. 本研究

研究所克隆的 8 个序列与柑橘黄龙病病原的亚洲种在同一个分枝上,而与非洲种和美洲种在不同的分枝上,其靴带支持率都在 95% 以上. 在亚洲种分枝里,LJ、CJ、XM、JS 和 BH 的样品归于一类,而 ZS、GJ、和 LS 的样品归于一类,其靴带支持率分别为 63% 和 83%.

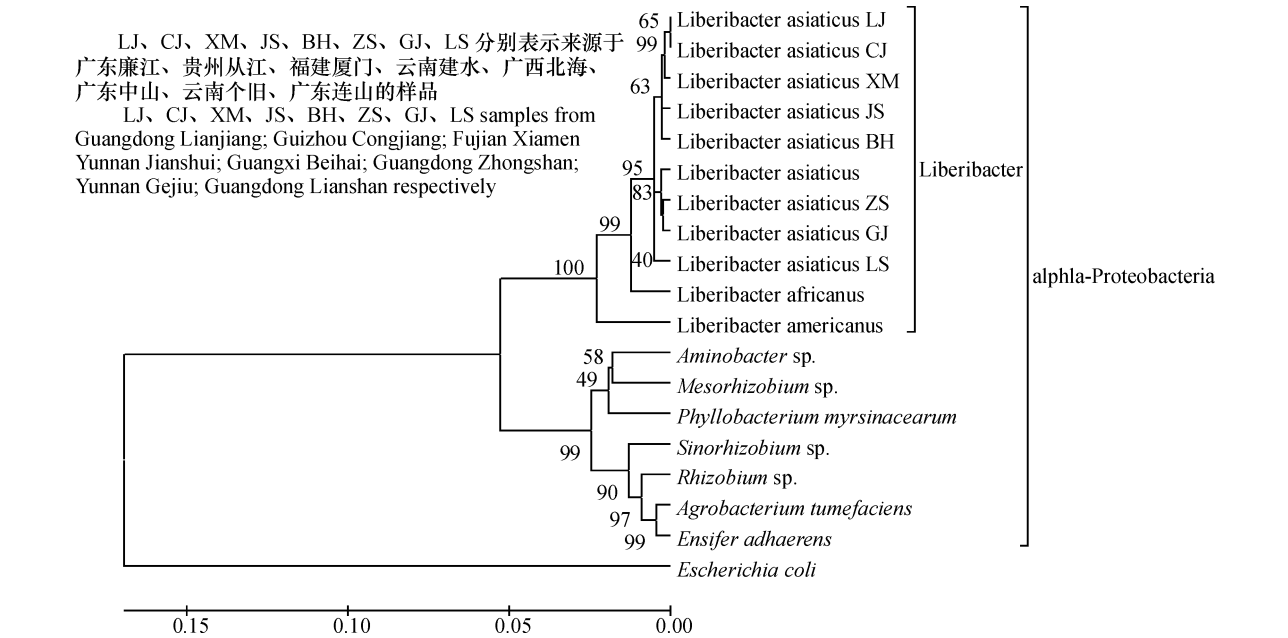


图 2 基于 16S rDNA 基因序列构建的柑橘黄龙病病原的 NJ 系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree generated from alignment of 16S rDNA gene sequences from *Candidatus Liberibacter*

3 讨论

16S rDNA 存在于所有原核生物的细胞中,它是研究细菌分类、进化和亲缘关系的重要指标,可用于进化程度不同的生物系统发育研究^[19]. 特别对于不能进行人工培养的细菌,利用其进行分类是一个有力的工具. 目前已知细菌和植原体 16S rDNA 基因只要相差 3% 以上则可定为不同的种^[20]. 将本研究所克隆的我国南方 5 省区 8 个地区的柑橘黄龙病病原

16S rDNA 基因序列与基因库中已登录的序列经同源性比对,结果表明所获得的这 8 个地区的柑橘黄龙病病原属于同一个种,为亚洲种. 但在亚洲种内部,云南个旧和福建厦门柑橘黄龙病病原在 16S rDNA 部分与亚洲种(L22532)的同源性为 96.9% ~ 98.6%,与非洲种(L22533)的同源性为 94.5% ~ 97.1%,与美洲种(AY742824)的同源性为 92.5% ~ 94.2%,同源性相对较低. 因此,本研究所获得的云南个旧和福建厦门地区的柑橘黄龙病病原可能属于

亚洲种中的一个新亚种. 真实情形是否如此,需要分析更多的基因数据才能作出正确判断.

从柑橘黄龙病病原16S rDNA基因系统发育进化树中可见,我国南方5省区8个地区的柑橘黄龙病病原明显地被划分为亚洲种,与亲缘关系稍远的非洲种和美洲种为姐妹群. 但在亚洲种内部,LJ、CJ、XM、JS和BH的16S rDNA序列归于一起,而ZS、GJ、和LS的归于另一类,由此推断在我国同一个亚种内可能存在着新的亚种. 这需要一个比较大的群体分析,即在大范围内收集感染黄龙病病原的柑橘样品,分析其中病原物的变异情形.

以上结果说明所获得的8个地区的柑橘黄龙病病原可能是由柑橘黄龙病发源地广东传播而来的,但是有些地区的病原发生了微小变异,其原因是由于测序的误差还是确实发生了变异还有待于进一步研究.

参考文献:

- [1] AUBERT B. Citrus greening disease, a serious limiting factor for citriculture in Asia and Africa [C] // BUANGSU-WON D. Proceedings of the 4th Conference of the International Society of Citrus Nurserymen [S. l.]: Rehabilitation of Citrus Industry in Asian Pacific Region, 1993: 134-142.
- [2] BOVE J M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus [J]. Journal of Plant Pathology, 2006, 88(1): 7-37.
- [3] 邓晓玲, 梁志慧, 唐伟文. 快速检测柑橘黄龙病病原的研究 [J]. 华南农业大学学报, 1999, 20(1): 1-4.
- [4] GARNIER M, BOVE J M. Citrus greening disease and greening bacterium [C] // MORENO P, DA GRAC J V, JIMMER L W. Proceedings of the 12th Conference of the International Organization of Citrus Virus. Calif.: International Organization Citrus Virologists, 1993: 212-219.
- [5] GARNIER M, BOVE J M. Distribution of the Huanglongbing (Greening) Liberibacter species in fifteen African and Asian countries [C] // DA GRAC J V, MORENO P, YOKOMI R K. Proceedings of the 13th Conference of the International Organization of Citrus Virus. Calif.: International Organization Citrus Virologists, 1996: 388-391.
- [6] TEIXEIRA D C, DANET J L, EVEILLARD S, et al. Citrus Huanglongbing in Sao Paulo Atate, Brazil: PCR detection of the *Candidatus Liberibacter* species associated with the disease [J]. Molecular and Cellular Probes, 2005, 19: 173-179.
- [7] COLETTA-FILHO H D, TAKITA M L, TARGON P N, et al. Analysis of 16S rDNA sequences from Citrus Huanglongbing bacteria reveal a different "*Candidatus Liberibacter*" strain associated with citrus disease in Sao Paulo [J]. Plant Disease, 2005, 89 (8): 848-852.
- [8] HALBERT S E. The discovery of huanglongbing in Florida [C] // GOTTFWALD T R. Proceedings of 2nd International Citrus Canker and Huanglongbing Research Workshop, Florida: Orlando, 2005: 1-3.
- [9] 林孔湘. 柑橘黄梢(黄龙)病研究 [J]. 植物病理学报, 1956, 2(1): 1-42.
- [10] 林孔湘. 柑橘黄梢(黄龙)病的进一步研究 [J]. 植物保护学报, 1963, 2(3): 243-250.
- [11] 廖晓兰, 朱水芳, 赵文军, 等. 柑橘黄龙病病原16S rDNA克隆、测序及实时荧光PCR检测方法的建立 [J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(1): 80-85.
- [12] GARNIER M, MARTIN-GROS G, BOVÉ J M. Monoclonal antibodies against the bacterial-like organism associated with citrus greening disease [J]. Annales Microbiol, 1987, 13(8): 639-650.
- [13] JAGOUEIX S, BOVE J M, GARNIER M. PCR detection of two '*Candidatus Liberibacter*' species associated with greening disease of citrus [J]. Molecular and Cellular Probes, 1996, 10: 43-50.
- [14] GARNIER M. Genomic characterization of a *Liberibacter* present in an ornamental rutaceous tree, *Calodendrum capense*, in the western Cape Province South Africa: Proposal of "*Candidatus Liberibacter africanus* subsp. Capensis" [J]. International Journal of Systematic Evolution Microbiol, 2000, 50(6): 2119-2125.
- [15] 冯震, 单振菊, 周根, 等. 沙田柚黄龙病病原16S rDNA片段的克隆与序列分析 [J]. 广西农业生物科学, 2006, 25(1): 61-65.
- [16] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8: 4321-4325.
- [17] JAGOUEIX S M, BOVE J M, GARNIER M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the proteobacteria [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44: 397-386.
- [18] 张会敏, 冯友军. 一株野生细菌的16S rDNA序列分析与系统发育树的构建 [J]. 生物信息学报, 2004, 8(3): 2-4.
- [19] EREIK L, CARLE P, BOVÉ J M, et al. Characterization of the mycoplasma-like organism association with witches broom disease of line and proposition of a *Candidatus* taxon for the organism "*Candidatus phytoplasma aurantifolia*" [J]. International Journal of Systematic Bacteriol, 1995, 45(2): 449-453.

【责任编辑 周志红】