

黄洪霞, 郑正, 邓晓玲, 等. 基于不同位点的广东省柑橘黄龙病菌种群分子多样性分析 [J]. 华南农业大学学报, 2020, 41(2): 66-75.
HUANG Hongxia, ZHENG Zheng, DENG Xiaoling, et al. Population diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in Guangdong Province based on different gene loci[J]. Journal of South China Agricultural University, 2020, 41(2): 66-75.

基于不同位点的广东省柑橘黄龙病菌种群分子多样性分析

黄洪霞, 郑 正, 邓晓玲, 许美容

(华南农业大学 农学院/广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】探究广东省不同地区柑橘黄龙病菌 “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLas) 的种内遗传结构及遗传多样性情况; 评价用多基因位点分析柑橘黄龙病菌遗传多样性的科学性。【方法】基于原噬菌体区域 (SC1、SC2 和 PJXGC)、转座子位点 (*CLIBASIA_05620~CLIBASIA_05625*) 和短串联重复序列 STR1(*CLIBASIA_03080*)、STR12(*CLIBASIA_01215*) 6 个基因位点的多态性, 对来自广东省 10 个市 (县) 的 176 个黄龙病样品进行病原菌遗传多样性分析。【结果】基于噬菌体类型鉴定出 6 组菌株, 其中携带 Type II 类型原噬菌体的菌株为优势种群 (85.23%); 基于转座子位点鉴定出 4 种类型菌株, 含有缺失 MCLas-A 类型转座子的 B350 片段的菌株为优势种群 (76.70%); 基于短串联重复序列 STR1 和 STR12 分别鉴定出 9 和 10 类菌株, 且 STR1 位点上含有 3 个 “CAGT” 串联重复的菌株为优势种群 (56.82%); STR12 位点上多态性条带分布不集中, 没有优势条带类型。聚类分析结果表明湛江、茂名和深圳的种群与其他地区种群的差异较大, 而清远和梅州的黄龙病菌种群关系较近。【结论】基于不同位点和基于所有位点所得的聚类结果不尽相同, 说明利用单个或单种基因位点对黄龙病菌进行种群遗传结构分析具有较大的局限性。

关键词: 柑橘黄龙病; 韧皮部杆菌; 种内遗传结构; 遗传多样性; 多态基因位点
中图分类号: S436.661 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2020)02-0066-10

Population diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” in Guangdong Province based on different gene loci

HUANG Hongxia, ZHENG Zheng, DENG Xiaoling, XU Meirong
(College of Agriculture, South China Agricultural University/Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】To explore the intraspecific genetic structure and genetic diversity of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” (CLas) in different regions of Guangdong Province, and evaluate the feasibility of using multiple loci in studying genetic diversity of CLas. 【Method】Six polymorphic gene loci, including three phage regions (SC1, SC2 and PJXGC), transposon region (*CLIBASIA_05620 – CLIBASIA_05625*) and short tandem repeat (STR) genes, STR1 (*CLIBASIA_03080*) and STR12 (*CLIBASIA_01215*), were used to evaluate genetic diversity of 176 CLas samples from 10 cities in Guangdong Province. 【Result】Based on the prophage types, the CLas isolates were classified into six groups, among which the strains with Type II prophage were predominate, accounting for 85.23% of the population. Four types of isolates were identified based on transposon sites, and the

Clas strains containing the B350 fragment (non-MCLas-A type) were the dominant group, accounting for 76.70% of the population. Based on the two STR loci, nine and ten band types were identified respectively, and the isolates with three CAGT tandem repeats at the STR1 locus were predominate accounting for 56.82% of the population. The distribution of polymorphic bands at the STR12 locus was scattered, and no predominate band type was identified. Cluster analysis showed that CLas populations from Zhanjiang, Maoming and Shenzhen were different from populations of other regions, while the CLas populations collected from Qingyuan and Meizhou were similar. 【Conclusion】 Cluster results based on individual locus and based on all six loci are different, indicating the limitation of using single gene locus to analyze the genetic structure of CLas population.

Key words: Citrus Huanglongbing; “*Candidatus Liberibacter asiaticus*”; intraspecific genetic structure; genetic diversity; polymorphic gene loci

柑橘黄龙病是柑橘生产上的重要病害, 严重制约着我国柑橘产业的发展。根据文献记载, 19 世纪末在我国广东潮汕地区就已经有黄龙病的发生报道^[1]。至今黄龙病已在亚洲、非洲、南美洲、北美洲和大洋洲的近 50 个国家和地区传播和蔓延^[2]。目前已知黄龙病菌属于 α -变形菌纲 Alphaproteobacterial 候选韧皮部杆菌属 *Candidatus Liberibacter* 的革兰阴性细菌。与黄龙病相关的 *Candidatus Liberibacter* 有 3 个种: 亚洲种 (“*Ca. L. asiaticus*”, CLas)、非洲种 (“*Ca. L. africanus*”, CLaf) 和美洲种 (“*Ca. L. americanus*”, CLam)^[3], 我国仅有 CLas 分布^[4-5]。柑橘黄龙病在广东地区已有近百年流行历史, 分析广东省内不同地理区域的 CLas 分子遗传多样性对其余国家及地区的 CLas 多样性研究具有一定的参考意义。

Jagoueix 等^[3] 从分子水平上确定了黄龙病菌属于细菌, 之后对黄龙病菌遗传多样性的研究主要集中在保守基因的单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphisms, SNPs) 分析, 包括 16S rDNA 序列、16S/23S rRNA 基因间隔区^[6-10]、 β 操纵子^[9] 以及外膜蛋白 (Outer membrane protein, OMP) 基因, 但基于这些相对保守位点的 CLas 遗传多样性程度很低。自 2009 年 Duan 等^[11] 公布了 CLas 全基因组序列及 2011 年 Zhang 等^[12] 公布了其中的 2 个噬菌体 SC1 和 SC2 之后, 许多高变异的位点被发掘以供黄龙病菌种群多样性研究, 这些变异位点包括原噬菌体区域位点、短串联重复序列和转座子等。在 CLas 基因组中噬菌体多样性研究方面, Liu 等^[13] 通过研究 CLas 上 1 个原噬菌体位点 (*CLIBASIA_05610*), 发现该基因在广东和云南黄龙病菌群体中的出现频率存在显著差异, 在云南群体出现的频率比广东群体更高。Zhou 等^[14] 基于 Psy62 菌株基因

组的原噬菌体区域的串联重复序列鉴定出黄龙病菌亚洲种 CLas 2 个相关联的高变异基因 (*hyv I* 和 *hyv II*), 揭示了黄龙病菌在不同国家和地区的种群多样性, 首次报道不同 CLas 种群共存于同一样品中。Zheng 等^[15] 基于 2 种原噬菌体对我国柑橘黄龙病菌群体进行原噬菌体鉴定, 发现我国的黄龙病群体主要携带单一类型的原噬菌体, 广东省及周边省份以携带 Type II 类型原噬菌体的菌株为主, 而云南则以含有 Type I 类型的菌株为主。2018 年, Zheng 等^[16] 报道了第 3 种类型的原噬菌体。在此基础上, 李嘉慧等^[17] 基于原噬菌体类型对我国 CLas 遗传多样性进行分析, 指出我国南方地区的 CLas 种群分为 3 个组, 且只携带 Type II 类型原噬菌体的菌株为华南地区的优势种群。在基因组的短串联重复序列多态性方面, Chen 等^[18] 在 CLas 的 *CLIBASIA_01645* 位点上发现广东和美国佛罗里达种群在串联重复序列数目 (Tandem repeat number, TRN) 存在变化并具有显著差异: 佛罗里达的 TRN=5(84.4%) 的种群占主导地位, 而广东种群的 TRN 值更加多样化, 表现为 TRN=7(47.6%)。Ma 等^[19] 根据 *CLIBASIA_01645* 位点分析我国南方 8 个省份的 CLas 种群遗传结构, 发现来自广东的 CLas 种群与其他省份存在明显差异。Katoh 等^[20] 通过分析柑橘黄龙病菌 CLas Psy62 菌株的全基因组, 选择了 4 个高度多态性的简单重复基因位点 (Simple single repeat, SSR), 结果表明, 使用多个可变数目串联重复序列 (Variable number tandem repeat, VNTR) 基因位点比仅使用单个 VNTR 基因位点的分析能更准确地揭示遗传多样性。Islam 等^[21] 开发了 7 个微卫星 DNA(串联重复序列) 位点对亚洲、美洲的几个国家(地区) 的 CLas 进行遗传多样性分析, 结果发现, 亚洲的 CLas 遗传多样性比美洲丰富。许美容等^[22]

基于 CLas 基因组中全套短串联重复序列 (Short tandem repeat, STR), 通过 PCR 和聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE) 试验分析我国南方 6 个省份的 CLas 菌株, 结果表明各省的菌株均表现出较高的遗传多样性, 且广东省的黄龙病菌株具有一定的遗传特异性。在基于微型反向重复转座元件 (Miniature inverted-repeat transposable element, MITE) 的多样性方面, Wang 等^[23] 在 CLas 原噬菌体区域发现了 2 个具有类似 MITE 序列特征的微型转座子 MCLas-A 和 MCLas-B, 并在佛罗里达州的 CLas 种群中检测出 MCLas-A(B720) 和 MCLas-B(B630) 共存的状态, 而在我国的 CLas 种群中, 只含有其中一种转座子。

综上所述, 相对于 16S rRNA 基因、16S/23S rRNA 基因间隔区、 β 操纵子以及 *omp* 等保守基因, 基于噬菌体区域、STR(或 SSR、VNTR) 及 MITE 等高变异位点的 CLas 种群遗传多样性更为丰富, 且广东省的 CLas 种群多特异于其他省份。但至今鲜见基于高变异位点单独对广东省的 CLas 种群进行分析的报道。本试验在上述研究基础上, 利用 3 种类型的高变异位点: 原噬菌体区域、MITE^[23] 和 STR 位点^[22], 对广东省的 176 个不同地理来源的 CLas 菌株进行遗传多样性分析。较系统地分析黄龙病发生历史最为悠久的广东省各地市的 CLas 基因水平的

多样性, 以明确黄龙病菌在历史病区的遗传分化情况, 以期为 CLas 种群进化提供理论支持。同时, 进一步分析与探讨基于柑橘黄龙病菌多种基因位点遗传多样性分析方法的科学性。

1 材料与方法

1.1 病原材料

黄龙病菌株样品来源于广东省清远、韶关、肇庆、梅州、惠州、深圳、江门、茂名、湛江和广州市, 采集自带有典型斑驳或者黄化症状的感染黄龙病的柑橘叶片样品, 总计 176 个。每份样品为取自同一株病树同一枝条上的 3 片具有典型黄龙病症状的叶片。

1.2 DNA 提取

剪取柑橘叶中脉 100 mg, 参照 OMEGA 植物 DNA 提取试剂盒 (OMEGA bio-tek) 说明书提取总 DNA。取 1~2 μ L 提取的 DNA 溶液, 用 Thermo NanoDrop One 超微量紫外分光光度计进行 DNA 质量的检测, 合格的 DNA 样品稀释至约 100 ng/ μ L, 保存于-20 $^{\circ}$ C 冰箱用于下一步试验。

1.3 PCR 及检测

所用引物的特异性已进行多重验证, 引物的信息见表 1。用 Real-time PCR 验证所采样品中是否含有 CLas 及 CLas 阳性的样品中的噬菌体类型; 用

表 1 特异性引物信息
Table 1 Information of specific primers

基因类型 ¹⁾	引物	引物序列	产物大小/bp	短串联重复序列	基因位点	引物来源
Gene type	Primer	Primer sequence	Product length	Short tandem repeat	Gene locus	Primer origin
原噬菌体 Prophage	SC1-045F	CCGTTCGTCTTTTGCCCAT	87		SC1_gp045	本研究
	SC1-045R	GCATTCTTCGCATCATCGGA				This study
	SC2-035F	AGGTCACAAGGATTAGCCCA	86		SC2_gp040	本研究
	SC2-035R	CTCCTAATCCCGCACCGATA				This study
	PJXGC-8F	CGGCGCTGAACTCTTGTTAT	85		PJXGC_08	本研究
	PJXGC-8R	AAGGGCGTTGTTCTTGTCAC				This study
MITE	LapPF1-f	GCCACTTTGGGGTAGCAGTA	350~		CLIBASIA_05620~	文献[23]
	LapPF1-r	AAAACCTTCGTACGGCTTT	731		CLIBASIA_05625	Reference [23]
STR	STR1F	TCGCTTGAAAGTTATTATTGGG	181	CAGT	CLIBASIA_03080	文献[22]
	STR1R	GCATAAGAATAGAAGAACCTA				Reference [22]
	STR12F	GTTGCTTCGTTTATCC	239	TACAGAA	CLIBASIA_01215	文献[22]
	STR12R	GCATTCTGTGCCTCTT				Reference [22]

1) MITE为微型反向重复转座元件; STR为短串联重复序列
1)MITE: Miniature inverted-repeat transposable element; STR: Short tandem repeat

常规 PCR 扩增转座子位点 *CLIBASIA_05620* 的基因片段及 2 个具有 STR 的基因位点 (*CLIBASIA_03080* 和 *CLIBASIA_01215*)。

1.3.1 Real-time PCR CLas 的检测采用基于 Li 等^[24]设计的特异性引物和探针 HLBas/HLBp/HLBr 的 Real-time PCR 法, 对 Real-time PCR 检测得到的 Ct 值<30 的阳性样品进行后续试验。Real-time PCR 扩增使用 Bio-Rad CFX Connect 系统。反应体系共 20 μL, 包括 10 μL Bestar qPCR Master Mix (DBI Bioscience), 1 μL DNA 模板 (100 ng), 0.2 μL PCR 探针 (10 μmol/L), 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μL, 8 μL ddH₂O。扩增程序为: 95 °C 2 min; 95 °C 10 s, 58 °C 30 s, 40 个循环, 在每个 58 °C 步骤结束时捕获荧光信号。使用 Bio-Rad CFX Manager 2.1 软件进行数据分析, 基线和阈值设置为软件默认。

1.3.2 常规 PCR 转座子位点的 PCR 反应体系为 25 μL, 包括 17.6 μL 的 ddH₂O, 2.5 μL 的 10×DNA 聚合酶缓冲液, 2.5 μL 的 2.5 mmol/L 的 dNTPs, 0.4 μL 的 2.5 U/μL Taq DNA 聚合酶 (Tiangen Biotech Co.), 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.5 μL 和 1 μL DNA 模板 (50~100 ng)。扩增程序为: 在 94 °C 下初始变性 2 min, 扩增 35 个循环 (94 °C 30 s, 55 °C 30 s 和 72 °C 30 s), 最后 72 °C 延伸 7 min。将 PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳 (0.5×TBE 缓冲液), 然后在凝胶成像系统下观察结果, 拍照并保存。STR 的常规 PCR 反应体系为 15 μL, 反应液体系和扩增程序参照以上扩增 MITEs 的体系设置, PCR 退火温度为 57 °C。PCR 产物经 10%(w) PAGE 电泳 (1×TBE 缓冲液) 后, 用硝酸银染色, 在白瓷板上拍照并保存。

1.3.3 电泳带型读取及校准 根据琼脂糖凝胶电

泳结果, 对 *CLIBASIA_05620*~*CLIBASIA_05625* 扩增的部分 PCR 产物进行胶回收然后克隆测序, 根据测序结果分成以下 2 种带型: B720 和 B350。参考 Wang 等^[23]的分型方法, 将 719 和 731 bp 的条带归为 B720(约 720 bp, 含有 MCLas-B 类型转座子的片段); 将 303、291 和 292 bp 归为 B350(约 350 bp, 缺失 MCLas-A 类型转座子的片段)。PAGE 电泳的 DNA 条带读取根据条带相对分子质量由小到大依次读取, 并编号。根据电泳图片以及读取的结果, 将部分相同相对分子质量的样品重新在同一块胶中进行 PAGE 电泳, 以对数据进一步校准。

1.4 聚类分析

根据 Real-time PCR 和常规 PCR 结果计算含有不同类型原噬菌体的 CLas 菌株在不同地区样本中所占的比例以及转座子位点、短串联重复序列所扩增出来的条带类型。使用 Popgene v1.32(<https://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.html>) 软件, 基于 Nei’ s(1972)genetic distance 的分析方法, 对广东省 10 个不同地区的 CLas 种群进行聚类分析, 用 MEGA 6.0 制图, 方法参照文献 [25]。

2 结果与分析

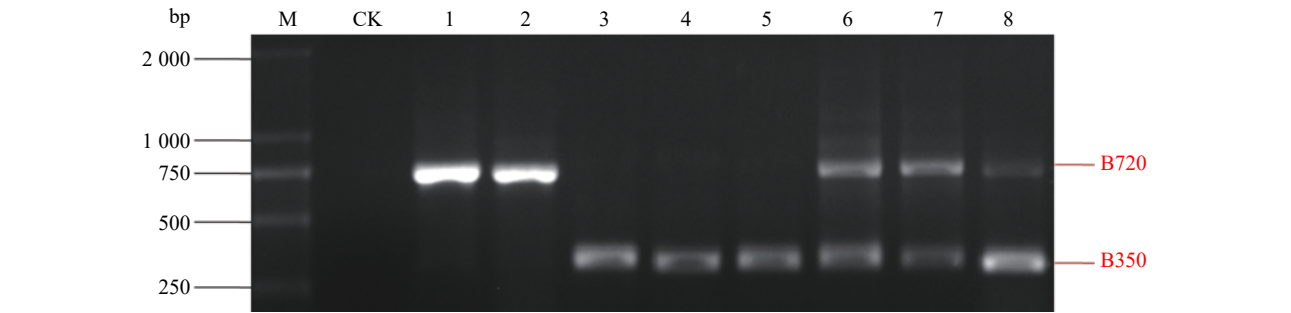
2.1 基于噬菌体类型的广东地区柑橘黄龙病菌的种群多样性

通过对 176 个黄龙病样品进行噬菌体特异性引物 Real-time PCR, 共鉴定出 6 种类型的 CLas 菌株 (表 2)。85.8% 的黄龙病菌株样品中仅能扩增出 1 种噬菌体, 其余样品中含有 2 种或 2 种以上的噬菌体。仅含有其中 1 种噬菌体的 151 个样品中, 有 150 个菌株 (99.3%) 只携带 Type II 类型噬菌体, 该类型 CLas 菌株为广东省优势菌株。同时携带 2 种不同类型噬菌体的菌株为 23 个 (13.1%), 主要为

表 2 广东省柑橘黄龙病菌株携带噬菌体类型的情况

类型 Type	来源及数目 Origin and number										
	清远	韶关	肇庆	梅州	惠州	深圳	江门	茂名	湛江	广州	总计
	Qingyuan	Shaoguan	Zhaoqing	Meizhou	Huizhou	Shenzhen	Jiangmen	Maoming	Zhanjiang	Guangzhou	Total
Type II	22	12	34	12	21	3	5	17	21	3	150
Type III					1						1
Type I+ Type II + Type III			1				1				2
Type I + Type III								14		1	15
Type I + Type II						1			6		7
Type II+ Type III			1								1
总计 Total	22	12	36	12	22	4	6	31	27	4	176

Type I + Type III 类型 (15 个, 8.5%), 其次是 Type I + Type II; 同时携带 3 种类型噬菌体 (Type I + Type II + Type III) 的菌株数较少。其中携带 Type I + Type III 噬菌体的样品主要来自茂名, Type I + Type II 类型则主要来自湛江。本研究未检测到只携带 Type I 类型噬菌体的菌株和均不含有上述 3 种类型噬菌体的菌株。Type I 和 Type III 噬菌体更倾向于与别的噬菌体复合存在 (Type I 噬菌体单独存在与复合存在的比率是 0:24; Type III 噬菌体单独存在与复合存在的比率是 1:18), 而 Type II 噬菌体则倾向于单独存在 (单独存在与复合存在的比率是 150:10)。另外, 结合采集的柑橘品种进行研究, 结果发现菌株所携带噬菌体的类型与柑橘品种没有相关性。



M: DL2000 DNA marker; CK: 健康样品; 1~8 为不同的柑橘黄龙病菌株; 719、731 bp 的条带为 B720; 303、291、292 bp 的条带为 B350
M: DL2000 DNA marker; CK: DNA from healthy citrus; 1-8 indicate different “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strains; Bands of 719 or 731 bp are defined as B720; Bands of 303, 291 or 292 bp are defined as B350

图 1 LapPF1-f/LapPF1-r 引物对广东部分柑橘黄龙病菌株的 PCR 扩增条带
Fig. 1 PCR amplification bands of partial “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strains in Guangdong Province with primers of LapPF1-f/LapPF1-r

表 3 基于转座子 CLIBASIA_05620~CLIBASIA_05625 位点对广东省柑橘黄龙病菌株的扩增条带分析
Table 3 Analysis of amplified bands of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strains in Guangdong Province based on transposon sites in CLIBASIA_05620-CLIBASIA_05625 gene

带型 Amplicon type ¹⁾	来源与数目 Origin and number										总计 Total
	清远 Qingyuan	韶关 Shaoguan	肇庆 Zhaoqing	梅州 Meizhou	惠州 Huizhou	深圳 Shenzhen	江门 Jiangmen	茂名 Maoming	湛江 Zhanjiang	广州 Guangzhou	
B350	22	12	34	11	21	2	5	14	11	3	135
B720					1				11		12
B720+B350			1	1		2	1	17		1	23
无条带 No amplicon			1						5		6
总计 Total	22	12	36	12	22	4	6	31	27	4	176

1)B720是指测序结果为719或731 bp的条带;B350是指测序结果为303、291或292 bp的其中一种条带
1)B720 are sequenced bands of 719 or 731 bp; B350 are sequenced bands of 303, 291 or 731 bp

2.3 基于短串联重复序列的广东地区柑橘黄龙病菌的种群多样性

根据许美容等^[22]开发的 33 个获得有效扩增的 STR 位点, 从中选取 2 个多态性的位点 STR1 和 STR12。如图 2 所示, 基于 STR 序列 2 个不同位点对广东省柑橘黄龙病菌株扩增出来的条带类型均较为多样; 如表 4 所示, STR1 位点扩增出 9 种条

2.2 基于转座子位点的广东地区柑橘黄龙病菌的种群多样性

使用 LapPF1-f/LapPF1-r 引物对广东省 176 个 CLAs 菌株的常规 PCR 所产生的条带类型有 4 种: B720、B350、B720+B350 和没有条带 (图 1)。具有这 4 种条带的 CLAs 菌株在不同地区样品中的分布见表 3。转座子 CLIBASIA_05620~CLIBASIA_05625 位点扩增结果显示, 广东省 B350 类型条带最多 (占 76.7%); 清远和韶关的 CLAs 样品中只扩增出 B350 类型的条带, 说明其种群结构可能比较单一; 而茂名样品扩增出 B720+B350 的比例较高, 占到 54.8%, 说明其种群变异相对较大; 湛江样品扩增出 B350 和 B720 的比例相当, 均为 40.7%(表 3)。

带, 分别为含有大小不一的单一一条带、2 种条带组合或没有条带的情况。STR1 位点扩增产物为单一一条带、不含条带和复合条带的比例分别为 133:4:39。扩增产物为 150~160 bp 条带的菌株在广东省内大部分地区的比例都比较高, 占 56.8%, 为优势菌株。其中湛江的菌株多扩增到 150~180 bp 条带, 而茂名菌株则多同时扩增出 140~150 和 150~160 bp 条带。

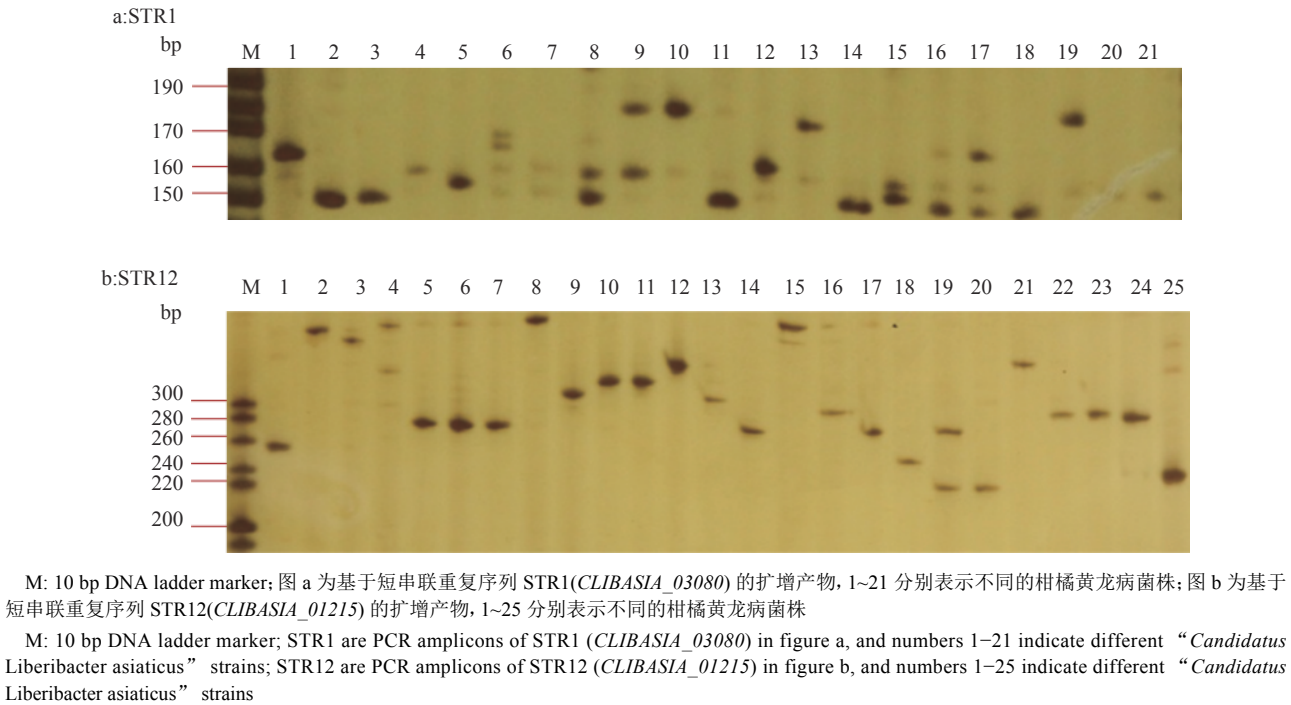


图 2 STR1/STR12 引物对广东部分柑橘黄龙病菌株的 PCR 扩增条带 PAGE 电泳结果

Fig. 2 PAGE electrophoresis of PCR amplified bands of partial “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strains in Guangdong Province with primers of STR1/STR12

表 4 基于短串联重复序列 *CLIBASIA_03080* 位点对广东省柑橘黄龙病菌株的扩增条带分析

Table 4 Analysis of amplified bands of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strains in Guangdong Province based on short tandem repeats in *CLIBASIA_03080* gene

条带大小/bp	清远	韶关	肇庆	梅州	惠州	深圳	江门	茂名	湛江	广州	总计
Sequence length	Qingyuan	Shaoguan	Zhaoqing	Meizhou	Huizhou	Shenzhen	Jiangmen	Maoming	Zhanjiang	Guangzhou	Total
140~150			3								3
150~160	17	12	22	10	21	1	3	6	6	2	100
160~170			5		1	1	1	1	10		19
170~180									10	1	11
150~160、200~220	2										2
140~150、150~160	1		2	2		2	1	18	1	1	28
150~160、160~170								1			1
150~160、170~180	2		2				1	3			8
无条带 No amplicon			2					2			4
总计 Total	22	12	36	12	22	4	6	31	27	4	176

如表 5 所示, STR12 位点扩增出 10 种条带。STR12 位点比 STR1 位点多样性更丰富。STR12 引物扩增产物单一条带、不含条带和复合条带的比例分别为 141:19:16。240~360 bp 的单一扩增条带占多数, 而复合有 2 种类型条带的菌株为少数。其中湛江的样品多为 240~280 bp 的条带, 茂名的菌株则多扩增出 280~300 bp 的条带。韶关地区的较为单一, 使用 STR1F/STR1R 引物只扩增出 150~160 bp 这一种条带, 使用 STR12F/STR12R 引物扩增出的

条带集中在 280~360 bp。另外, 结合噬菌体类型和 STR 2 种位点的结果显示, 含有 2 个及 2 个以上噬菌体的 25 个菌株中 STR1 扩增具有 2 个条带的样品数目为 15 个; 而单个噬菌体的 151 个菌株中 STR1 扩增出多条带的样品数为 24 个。

2.4 基于 3 类多态位点的黄龙病菌株聚类

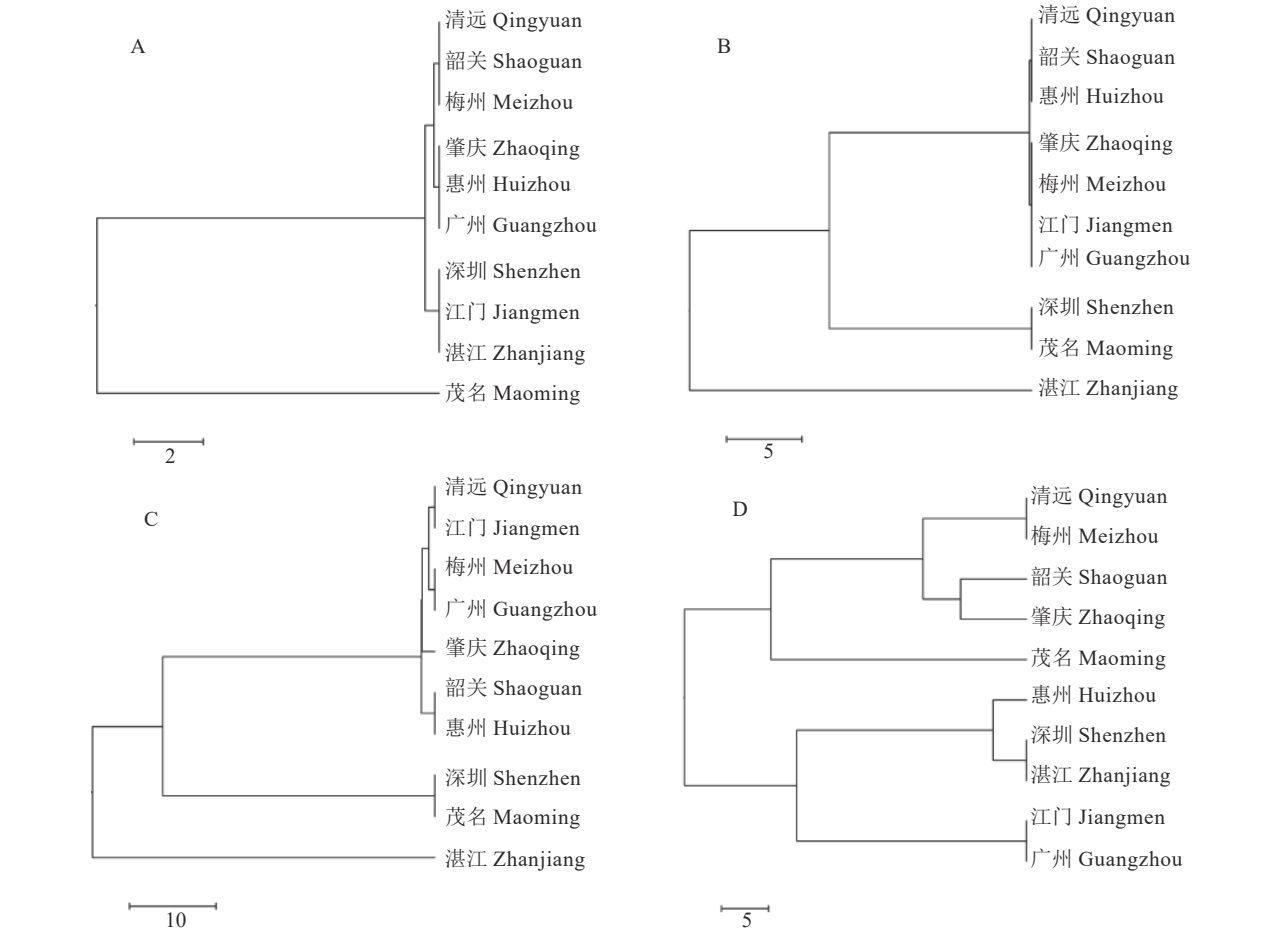
分别基于原噬菌体区域、转座子位点和短串联重复序列 3 种多态性位点对 176 个 CLas 菌株作出 4 个聚类图 (图 3) 可见, 基于不同位点的 CLas 种群

可分为 2 大组, 但不同位点的具体情况又有所不同。从 4 个聚类图上看, 湛江、茂名和深圳的菌株与其余地区的菌株遗传距离较远; 对 MITEs 和 STR1 位点, 湛江的菌株异于其余地区的菌株。

表 5 基于短串联重复序列 *CLIBASIA_01215* 位点对广东省柑橘黄龙病菌株的扩增条带分析

Table 5 Analysis of amplified bands of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” strains in Guangdong Province based on short tandem repeats in *CLIBASIA_01215* gene

条带大小/bp Sequence length	清远 Qingyuan	韶关 Shaoguan	肇庆 Zhaoqing	梅州 Meizhou	惠州 Huizhou	深圳 Shenzhen	江门 Jiangmen	茂名 Maoming	湛江 Zhanjiang	广州 Guangzhou	总计 Total
200~240			1				1				2
240~260	2		2	2	5	1		4	6	2	24
260~280	2		2		6	1	1	3	12		27
280~300	1	3	4	1	2		1	12	1		25
300~320	2	1	2	1	1	1		2	1	1	12
320~340	5	4	6	4	3		1		1		24
340~360	2	3	3	1	3		1	2			15
>360		1	7			1		1	2		12
双条带 Double amplicons	4		5				1	1	4	1	16
无条带 No amplicon	4		4	3	2			6			19
总计 Total	22	12	36	12	22	4	6	31	27	4	176



A 是基于柑橘黄龙病种群的噬菌体类型 (SC1、SC2 和 PJXGC); B 是基于转座子位点 (*CLIBASIA_05620-CLIBASIA_05625*); C 是基于短串联重复序列 STR1(*CLIBASIA_03080*); D 是基于短串联重复序列 STR12(*CLIBASIA_01215*)

A is generated according to phage types (SC1, SC2 and PJXGC) in “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” populations; B is generated according to transposon loci of *CLIBASIA_05620-CLIBASIA_05625*; C is generated according to short tandem repeat STR1 (*CLIBASIA_03080*); D is generated according to short tandem repeat STR12 (*CLIBASIA_01215*)

图 3 基于不同位点的广东地区黄龙病菌种群的聚类分析

Fig. 3 The dendrogram analysis of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” populations in Guangdong Province based on different gene loci

综合所有 4 个位点的数据对这 176 个样品作聚类分析 (图 4)。总的聚类图与每个位点做的聚类图均不完全一致, 可见基因水平的遗传多样性是复

杂的。只有清远和梅州的样品在 4 个聚类图以及 3 种位点总的聚类图中, 都聚为一组, 说明这 2 个地方的菌株的遗传距离较近。

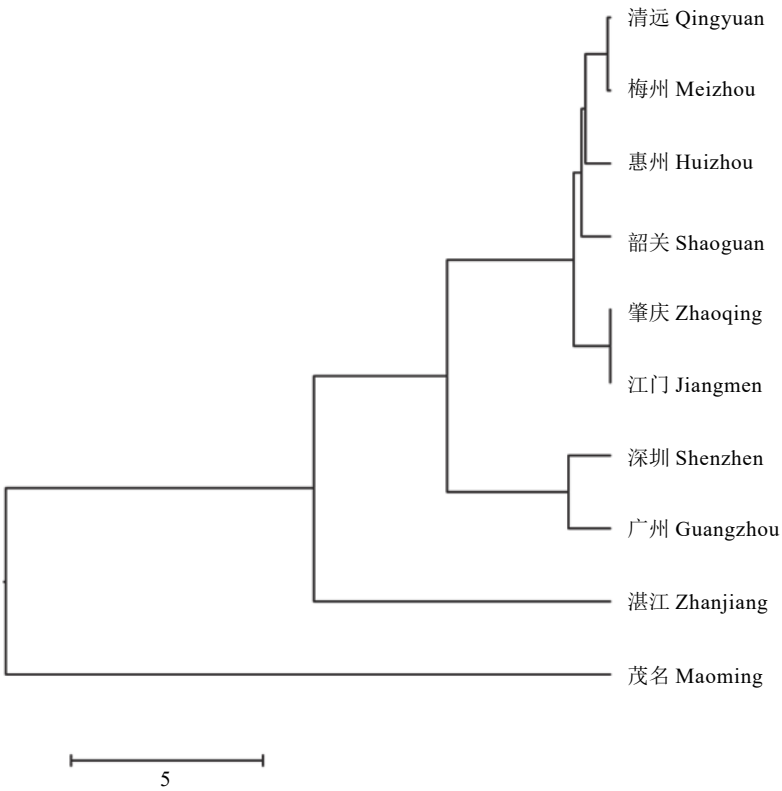


图 4 基于 6 个位点的广东省柑橘黄龙病种群的聚类

Fig. 4 The dendrogram of “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” populations in Guangdong Province based on six gene loci

根据这 3 种不同位点在广东省不同地区黄龙病菌基因组中的 Nei’ s (1973) 基因多态性 (H 值), 对多态性进行排序, 基于 STR12 位点的多态性 ($0.880\ 5$)>基于 STR1 位点的多态性 ($0.633\ 3$)>基于转座子位点的多态性 ($0.388\ 8$)>基于原噬菌体区域位点的多态性 ($0.197\ 8$)。从聚类图也可看出基于 STR12 位点的 CLas 种群遗传结构较复杂, 说明该位点为高度变异位点。

3 讨论与结论

黄永辉等^[26] 基于 *omp* 基因单个位点分析了广东省柑橘产区 7 个城市黄龙病菌的遗传多样性, 发现广东地区的 CLas 具有很高的同源性, 同时也存在一定的遗传变异。Kenta 等^[10] 通过 16S rDNA、16S/23S rRNA 基因间隔区、*omp* 基因区、*trmU-tufB-secE-nusG-rplKAJL-rpoB* 区域 (基因簇区域) 和噬菌体型 DNA 聚合酶 (Bacteriophage-type DNA polymerase) 区域的 DNA 片段序列研究东南亚不同寄主和不同地理区域的 CLas 分离株的遗传多样性和亲缘关系, 发现噬菌体型 DNA 聚合酶区域序列

多样性最为丰富, 该位点可用于东南亚地区 CLas 分离株的分子鉴定。全基因组序列分析也证明 CLas 的噬菌体区域的碱基变异最大。本研究的 176 个菌株基于噬菌体类型、MITE 及 2 个 STR 位点的多样性都较为丰富, 一方面说明保守的基因位点不适用于分析 CLas 种内的多样性, 而种间差异分析时则可参考保守的基因序列; 另一方面也表明要全面地探清某一物种的基因多样性, 应尽可能地用多基因位点综合分析, 甚至用全基因组序列。类似地, Katoh 等^[20] 认为单一的串联重复位点无法真实地反映 CLas 的遗传多样性。本研究结果证明分别基于 2 个 STR 位点的序列多态性聚类结果差异较大; 基于不同类型位点 (噬菌体类型、MITE 和 STR) 的多样性分析结果也各有异同。广东省不同地区的 CLas 菌株在不同的基因位点的变异程度有一定差异, 这可能是不同类型的位点在进化过程中选择压力不同造成的。根据不同多态性位点的基因型对 CLas 菌株的遗传分析具有一定的差异, 进一步说明基于单个位点对 CLas 的遗传结构进行分析具有较大的局限性。

目前在黄龙病菌基因组中检测到 3 种原噬菌体类型, 即 Type I(SC1, NC_019549.1)、Type II(SC2, NC_019550.1) 和 Type III(P-JXGC-3, KY661963.1)^[16, 27]。李嘉慧等^[17]根据这 3 种噬菌体分析了我国 8 个省份 548 个 CLas 菌株的多样性, 该研究与本研究的噬菌体类型部分结果是一致的: 仅携带 Type II 噬菌体的菌株占多数 (分别占 76.7% 和 85.2%), 其次为同时携带 Type I 和 Type III (分别占 8.59% 和 8.52%) 及同时携带 Type I 和 Type II (6.13% 和 3.98%) 噬菌体组合的菌株, 仅个别菌株携带其余类型的噬菌体或组合。2 个研究均发现 Type I 噬菌体偏向于和 Type II 和/或 Type III 类型的噬菌体组合存在于广东省的 CLas 菌株中。da Silva 等^[28]分析了巴西来源于 São Paulo 州的 573 个 CLas 菌株的 3 个 STR 位点和噬菌体类型, 发现这些 CLas 菌株的 STR 复杂, 主要含 Type I 噬菌体, 指出基因重组现象可能是导致巴西 CLas 群体同源性差异的原因。此外, 150 个含 Type II 噬菌体的菌株中有 88.67% 在目的转座子位点为缺失 MCLas-A 型, STR1 位点扩增出 150~160 bp 条带的概率为 64%; 26 个非 Type II 噬菌体菌株中, 以上比例相应为 7.69% 和 15%, 3 种位点的优势菌株的相关性分析表明含 Type II 类型噬菌体的菌株更可能携带无 MCLas-A 型 MITE 及 150~160 bp 条带 STR1 位点。本研究的广东省内各地区的菌株携带噬菌体类型的多样性低于之前研究中我国不同省份间的菌株多样性, 这也证明了与苗木调运相关的柑橘区域化种植对该病害的蔓延传播具有关键影响。结合噬菌体位点和 2 个 STR 位点的结果分析发现, 含有 2 个及以上噬菌体菌株中 STR1 扩增条带数为 2 个以上的比例高达 60%, 推测含有 2 种以上噬菌体的样品可能混有 2 个以上 CLas 菌株。在 MITE 位点上, 与 Wang 等^[23]之前报道的 MITE 类型多样性相比, 本研究的菌株中未扩增出 B630 的条带 (含有 MCLas-A 类型转座子的片段), 该类型样品缺失的原因有待进一步研究。

本研究在各地采集的样品数目不同; 不同地区的样本有的来源单一 (同一果园), 有的则来源较为复杂 (多个果园); 样本也并非来自相同背景 (柑橘的品种、树龄、地理条件、栽培管理水平等) 的果园; 未收集材料的原始来源 (引种) 信息; 聚类分析中每个类型的多态位点未附以不同的分值; 以上几点差异可解释部分试验误差。分析地理特异性柑橘品种上的 CLas 菌株多样性更具有代表性和针对性; 对同一地区不同年代的样品进行分析也是研究菌株

分子变异的一个思路。

参考文献:

- [1] 林孔湘. 柑桔黄梢 (黄龙) 病研究 I: 病情调查[J]. 植物病理学报, 1956, 2(1): 13-42.
- [2] BOVÉ J M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus[J]. J Plant Pathol, 2006, 88: 7-37.
- [3] JAGOUEIX S, BOVÉ J M, GARNIER M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the Proteobacteria[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 1994, 44(3): 379-386.
- [4] 田亚南, 柯穗, 柯冲. 应用多聚酶链式反应 (PCR) 技术检测和定量分析柑桔黄龙病病原[J]. 植物病理学报, 1996, 26(3): 243-250.
- [5] 孔维文, 邓晓玲, 梁志慧, 等. 柑桔黄龙病病原 DNA 片段的克隆及序列分析[J]. 植物病理学报, 2000, 30(1): 71-75.
- [6] DING F, DENG X, HONG N, et al. Phylogenetic analysis of the citrus Huanglongbing (HLB) bacterium based on the sequences of 16S rDNA and 16S/23S rDNA intergenic regions among isolates in China[J]. Eur J Plant Pathol, 2009, 124(3): 495-503.
- [7] SUBANDIYAH S, IWANAMI T, TSUYUMU S, et al. Comparison of 16S rDNA and 16S/23S intergenic region sequences among citrus greening organisms in Asia[J]. Plant Dis, 2000, 84(1): 15-18.
- [8] 丁芳, 洪霓, 钟云, 等. 中国柑橘黄龙病病原 16S rDNA 序列研究[J]. 园艺学报, 2008, 35(5): 649-654.
- [9] ADKAR-PURUSHOTHAMA C R, QUAGLINO F, CASATI P, et al. Genetic diversity among 'Candidatus Liberibacter asiaticus' isolates based on single nucleotide polymorphisms in 16S rRNA and ribosomal protein genes[J]. Ann Microbiol, 2009, 59(4): 681-688.
- [10] KENTA T, SHIN-ICHI M, NORIKO F, et al. Evaluation of genetic diversity among 'Candidatus Liberibacter asiaticus' isolates collected in Southeast Asia[J]. Phytopathology, 2009, 99(9): 1062.
- [11] DUAN Y, ZHOU L, HALL D G, et al. Complete genome sequence of citrus Huanglongbing bacterium 'Candidatus Liberibacter asiaticus' obtained through metagenomics[J]. Mol Plant Microbe In, 2009, 22(8): 1011-1020.
- [12] ZHANG S, FLORESCRUZ Z, ZHOU L, et al. 'Candidatus Liberibacter asiaticus' carries an excision plasmid prophage and a chromosomally integrated prophage that becomes lytic in plant infections[J]. Mol Plant Microbe In, 2011, 24(4): 458-468.
- [13] LIU R, ZHANG P, PU X, et al. Analysis of a prophage gene frequency revealed population variation of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' from two citrus-growing provinces in China[J]. Plant Dis, 2011, 95(4): 431-435.
- [14] ZHOU L, POWELL C A, HOFFMAN M T, et al. Diversity and plasticity of the intracellular plant pathogen

and insect symbiont ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ as revealed by hypervariable prophage genes with intragenic tandem repeats[J]. *J Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(18): 6663-6673.

[15] ZHENG Z, BAO M, WU F, et al. Predominance of single prophage carrying a CRISPR/cas system in ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ strains in Southern China[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146422.

[16] ZHENG Z, BAO M, WU F, et al. A type III prophage of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ carrying a restriction-modification system[J]. *Phytopathology*, 2018, 108(4): 454-461.

[17] 李嘉慧, 郑正, 邓晓玲. 基于原噬菌体类型的我国柑橘黄龙病菌种群遗传结构分析[J]. 植物病理学报, 2019, 49(3): 334-342.

[18] CHEN J, DENG X, SUN X, et al. Guangdong and Florida populations of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ distinguished by a genomic locus with short tandem repeats[J]. *Phytopathology*, 2010, 100(6): 567-572.

[19] MA W, LIANG M, GUAN L, et al. Population structures of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ in Southern China[J]. *Phytopathology*, 2014, 104(2): 158.

[20] KATOH H, SUBANDIYAH S, TOMIMURA K, et al. Differentiation of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ isolates by variable-number tandem-repeat analysis[J]. *J Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(5): 1910-1917.

[21] ISLAM M S, GLYNN J M, BAI Y, et al. Multilocus microsatellite analysis of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ associated with citrus Huanglongbing worldwide[J]. *BMC Microbiol*, 2012, 12(1): 39.

[22] 许美容, 郑正, 李昕昱, 等. 基于短串联重复和 PAGE 的柑橘黄龙病菌 ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ 种间遗传多样性分析 (英文)[J]. 植物病理学报, 2014, 44(6): 609-619.

[23] WANG X F, TAN J, BAI Z Q, et al. Detection and characterization of miniature inverted-repeat transposable elements in ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ [J]. *J bacteriol*, 2013, 195(17): 3979-3986.

[24] LI W, HARTUNG J S, LEVY L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of ‘*Candidatus Liberibacter species*’ associate with citrus Huanglongbing[J]. *J Microbiol Meth*, 2006, 66(1): 104-115.

[25] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D, et al. MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2013, 30: 2725-2729.

[26] 黄永辉, 程保平, 彭埃天, 等. 广东不同地区柑橘黄龙病菌的遗传多样性分析[J]. 植物保护, 2014, 40(1): 60-64.

[27] ZHENG Z, WU F, KUMAGAI L B, et al. Two ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ strains recently found in California harbor different prophages[J]. *Phytopathology*, 2017, 107(6): 662-668.

[28] da SILVA P A, FASSINI C G, SAMPAIO L S, et al. Genetic diversity of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ revealed by short tandem repeats and prophage typing indicates population homogeneity in Brazil[J]. *Phytopathology*, 2019, 109(6): 960-971.

【责任编辑 霍 欢】