

高爽,陈武,戴良英. 湖南省柑橘溃疡病菌 *gyrB* 和 16S rRNA 的扩增和序列分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(5):76-78.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.020

湖南省柑橘溃疡病菌 *gyrB* 和 16S rRNA 的扩增和序列分析

高爽,陈武,戴良英

(湖南农业大学植物保护学院/湖南农业大学植物疾病控制与利用中心,湖南长沙 410128)

摘要:为了解湖南省不同地区柑橘溃疡病菌遗传多样性,从湖南省黔阳、祁阳、衡山、道县、茶陵、永兴、沅江、零陵 8 个柑橘主产区采集样本,分离病原菌,PCR 扩增其 *gyrB* 基因和 16S rRNA 序列,阳性样品送样测序。利用生物信息学软件,将测序结果与 GenBank 中柑橘溃疡病菌相近的黄单胞杆菌构建系统发生树,对比 2 个不同序列扩增的分辨率。结果表明,*gyrB* 基因比 16S rRNA 序列分辨率高;利用 *gyrB* 基因除了能分析亲缘较近的外源菌株,还能对同属但是生长地区有异的菌株进行更深入的区分。

关键词:柑橘溃疡病;遗传多样性;*gyrB* 基因;16S rRNA

中图分类号: S436.661.1⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0076-03

柑橘溃疡病(citrus canker)1912 年首次在美国发现^[1],中国相关最早的报道出现在 1918 年^[2]。至今全球已有 30 多个国家和地区报道发现了该病害,占世界柑橘种植国家和地区的 50% 以上^[3-4]。柑橘溃疡病对我国柑橘产业有较大影响,不仅降低了全国柑橘产量和品质,还制约了我国柑橘产业的发展^[5];其中发病严重的地区包括湖南、福建、广东、广西等。柑橘溃疡病是一种细菌性病害,病原菌为地毯草黄单胞柑橘致病变种(*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*),病菌主要通过自然孔口和伤口感染健康植株。该病菌在叶、枝梢及果实的病斑中越冬,翌年春条件适宜时从病部溢出,借风雨、昆虫传播,经寄主的气孔、皮孔和伤口侵入,使叶片、嫩梢和果实发病^[6]。叶片受害,开始在叶背产生针头大小的黄色、油渍状小点,后逐渐扩大。同时,在叶片正反两面逐渐隆起成圆形病斑,病部表皮破裂,病斑木栓化如海绵状,表面粗糙,灰褐色。其后中央凹陷并有细微轮纹,周围有黄色晕圈,在晕圈的内侧常有褐色釉光边缘,后期病斑中心开裂并且凹陷,呈火山口状。柑橘溃疡病自然条件下传播距离较近,主要途径是风雨、虫害和农作时造成的伤口以及植株间摩擦等^[7]。

rRNA 是细菌系统分类学研究中最常用的“分子钟”,其种类少,含量大,可占到细菌 RNA 总量的 80%^[8]。由于其大小适中且保守性很好,所以广泛应用于物种间的遗传分化距离和亲缘关系的研究中。16S rRNA 是一种常用核糖体 RNA,其高度的保守性^[9]使之成为分子生物学研究的一个热点。

促旋酶(*gyrase*) B 亚单位基因简称为 *gyrB*,是一种细菌共有的蛋白质编码基因^[10]。随着分子生物学的发展,*gyrB* 基因序列扩增技术在细菌亲缘关系及系统发育研究中的作用越

来越明显^[11],可以用其作为分子标记来研究细菌的系统发育水平,还可区分近源种和菌株。已知的 *gyrB* 序列,包括其相关产物的 *gyrB* 数据被存放于由日本建立的 ICB^[12] 数据库中,用于细菌分类鉴定方面的研究和细菌亲缘种的鉴定。Dauga 等研究表明,比较肠杆菌科(Enterobacteriaceae)不同属的系统进化关系时,*gyrB* 基因比 16S rRNA 更加适用于种属内或种属间的精确遗传距离分析和发育关系比较^[13]。

中国柑橘溃疡病研究表明,部分地区的菌种中仍然存在更细致的分化^[14],本研究采集湖南省主要柑橘产区的柑橘溃疡病样本,分离致病菌进行纯化培养及致病性检测,提取病原菌 DNA 选取多种引物进行 PCR 扩增,最终选出自行设计的 *gyrB* 基因片段的特异性引物^[15] 和 16S rRNA 引物^[16] 来分析湖南柑橘溃疡病的遗传多样性。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料取自于湖南省黔阳、祁阳、衡山、道县、茶陵、永兴、沅江、零陵等地的柑橘主要种植区,大部分为叶片,少部分为发病果实。采用的致病菌标准菌由湖南农业大学国家柑橘改良中心长沙分中心提供。

表 1 供试柑橘溃疡病菌采样信息

| 编号 | 采集地点 | 地理位置 | 采集品种 | 样品标记 |
|----|------|------|---------------|------|
| 1 | 黔阳 | 湖南西部 | 大红橙、甜橙 | QY1 |
| 2 | 祁阳 | 湖南中部 | 甜橙、蜜橘、 | QY2 |
| 3 | 衡山 | 湖南中部 | 大红橙、脐橙、冰糖橙、甜橙 | HS |
| 4 | 道县 | 湖南南部 | 大红橙、蜜橘、冰糖橙、 | DX |
| 5 | 茶陵 | 湖南东部 | 甜橙、大红橙、纽荷尔 | CL |
| 6 | 永兴 | 湖南南部 | 赣南脐橙、蜜橘、冰糖橙 | YX |
| 7 | 沅江 | 湖南北部 | 朱红桔、冰糖橙 | YJ |
| 8 | 零陵 | 湖南南部 | 甜橙、大红橙 | LL |

1.2 方法

1.2.1 柑橘溃疡病菌分离、鉴定 按稀释分离法对采集的柑

收稿日期:2016-01-07

作者简介:高爽(1991—),女,湖南岳阳人,硕士研究生,主要研究方向为植物病理学。E-mail:gaoshuangsun@foxmail.com。

通信作者:戴良英,教授,博士生导师,主要研究方向为植物病理学。E-mail:daily@hunau.net。

橘溃疡病样本进行病原菌分离^[17],得到的病原物经 JYF5/JYR5 引物进行 PCR 扩增、验证。JYF5/JYR5 引物序列为: JYF5:5′-TTCGGCGTCAACAACCTG-3′,JYR5:5′-AACTC-CAGCACATACGGGTC-3′,目标片段长度在 410 左右,基本都扩增到了目标条带,从 8 个地区的样品中经过分离和鉴定共获得了 22 个病原菌的菌株。

1.2.2 *gyrB* 引物 *gyrB* 序列引物是通过 Primer Premier 5.0 软件^[18]设计的引物 GGS1F/GGS2R,其序列为 GGS1F:5′-CCCTGCTGCTGACCTTCTTCT-3′和 GGS2R:5′-GGTTGAC-CGTGG TTTCCATA-3′。反应参数:预变性 95 ℃ 4 min;变性 95 ℃ 30 s,退火 62 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 30 s,35 个循环;延伸 72 ℃ 7 min,4 ℃ 保存。

1.2.3 16S rRNA 序列 16S rRNA 序列的引物为 27F:5′-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3′和 1492R:5′-TACGGHTAC-CTT ACGACTT-3′。反应参数:预变性 95 ℃ 4 min;变性 95 ℃ 30 s,退火 58 ℃ 30 s,延伸 72 ℃ 30 s,40 个循环;延伸 72 ℃ 7 min,4 ℃ 保存。

1.2.4 序列分析和系统发育树的构建 *gyrB* 及 16S rRNA 序列引物 PCR 扩增产物送至上海生工测序,测序结果用软件 MEGA 4.0 的非加权平均数聚类法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean,UPGMA) 构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 *gyrB* 引物的 PCR 扩增结果

通过 GGS1F/GGS2R 引物对 22 个已经鉴定的柑橘溃疡病病原菌进行 PCR 扩增,目标片段的大小约为 760 bp,扩增产物进行凝胶电泳,结果见图 1。

2.2 16S rRNA 序列 PCR 扩增结果

16S rRNA 序列引物 PCR 扩增 22 个经过鉴定的菌株,目标片段的大小约为 1.5 ku,PCR 扩增产物进行凝胶电泳,结果见图 2。

2.3 构建 *gyrB* 和 16SrRNA 序列的系统发育树

2.3.1 *gyrB* 序列系统发育树 *gyrB* 序列引物扩增产物序列建树结果(图 3)表明,不同地区的病原菌样品间的遗传距离比较明显。在遗传距离大于 0.18 时 22 个供试菌株为同一

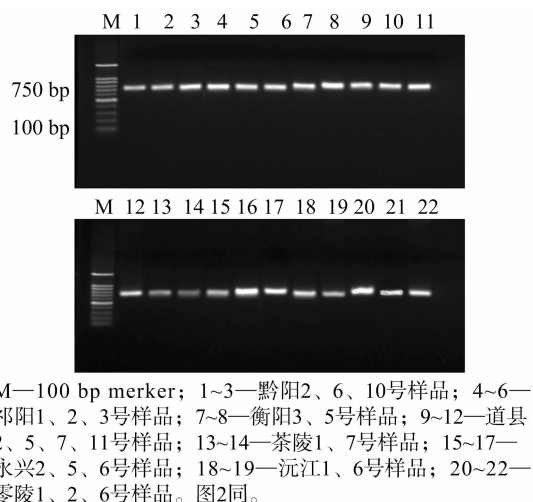


图1 GGS1F/GGS2R引物扩增22个样品的结果

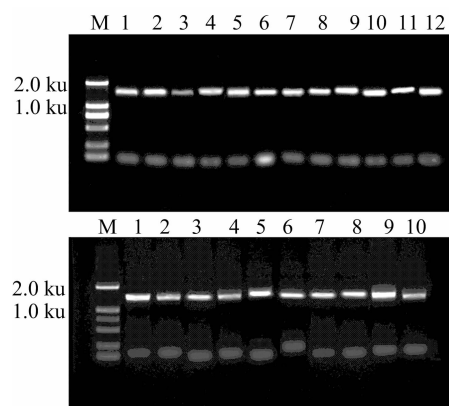


图2 16S rRNA引物扩增22个样品的扩增结果

簇,当遗传距离为 0.055 时,所有的菌株可以分成 7 个不同的簇,其分布情况基本与菌株采样地点在湖南省的地理位置相关。

2.3.2 16S rRNA 序列系统发育树 16S rRNA 引物扩增产物序列建树结果(图 4)表明,所采用的菌株样品之间的遗传距离非常小。遗传距离为 0.004 6 左右时,所有的菌株一共

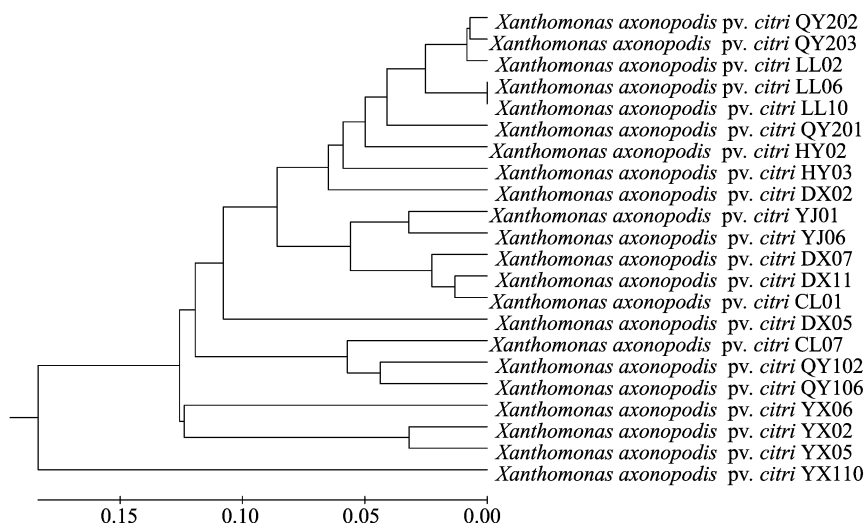


图3 GGS1F/GGS2R引物聚类分析树

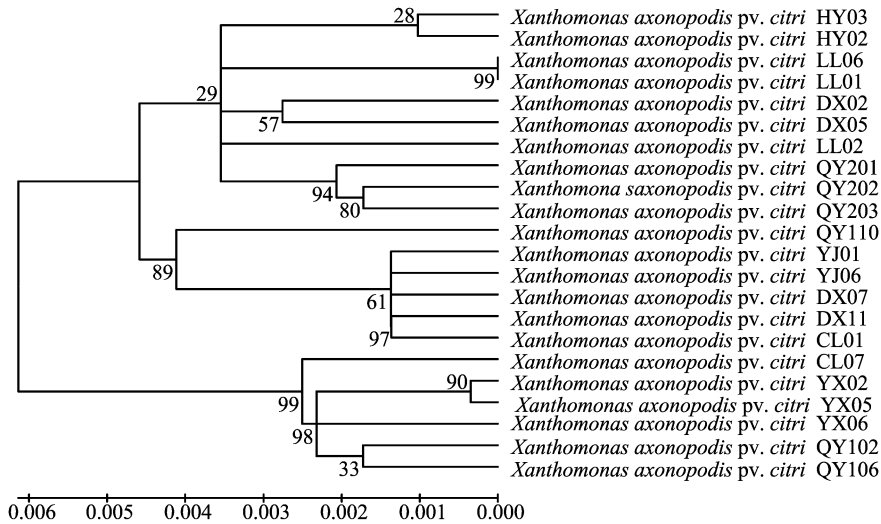


图4 16S rRNA引物聚类分析树

可以分为3个不同的簇,其分布规律基本与地域的差距有很大关系。

3 讨论

通过16S rRNA及*gyrB*序列引物PCR扩增结果建树可以明显看到湖南省中部、东部及北部部分样品,西部和部分北部样品,南部、部分西部样品分成了3个遗传距离相对大一点的3部分。其分布与病原菌来源地的位置有着较大联系,而且寄主植物差异也是造成遗传差距的主要因素之一,且*gyrB*基因序列分辨率要明显高于16S rRNA序列。16S rRNA序列分析仅能在属的水平区分这些菌株,*gyrB*序列分析还可将区分程度扩展到属内小种。

16S rRNA序列在目前使用比较广泛,但其不足之处也逐渐显露。16S rRNA基因序列相比*gyrB*基因序列所携带的信息量多,长度适中,但其分辨率较低。*gyrB*引物扩增序列在菌株分类程度上有了进一步的提高,在湖南省柑橘溃疡病的小种分析中*gyrB*基因序列的分辨率较前者高,效果比较好;但是由于*gyrB*基因的序列较短,鉴定细菌的准确度依然不够。目前,*gyrB*基因序列在分子生物学中应用不多,还需要进一步开发利用。

参考文献:

- [1] Dopson R N. The eradication of citrus canker[J]. Plant Dis Rept, 1964, 48: 30-31.
- [2] Lee H A. Further data on the susceptibility of rutaceous plants to citrus canker[J]. Agr Res, 1918, 15: 661-665.
- [3] Gottwald T R, Graham J H, Schubert S T. Citrus canker: the pathogen and its impact [R/OL]. [2015-12-20]. <http://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/review/citruscanker/>.
- [4] Schubert T S, Rizvi X, Sun T R. Meeting the challenge of eradicating citrus in Florida - Again[J]. Plant Disease, 2001, 85: 340-356.
- [5] 杨枫. 多胺在提高柑橘溃疡病抗性中的作用及其机理研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014.
- [6] 陈小帆, 莫瑾, 左静, 等. 利用双重PCR技术检测柑橘溃疡病菌[J]. 华南农业大学学报, 2010, 31(3): 32-35.

- [7] Gottwald T R, Timmer L W. The efficacy of windbreaks in reducing the spread of citrus canker caused by *Xanthomonas campestris* pv. *citri* [J]. Tropical Agriculture, 1995, 72(3): 194-201.
- [8] Hou W G, Wang S, Dong H L, et al. A comprehensive census of microbial diversity in hot springs of Tengchong, Yunnan Province, China using 16S rRNA gene pyrosequencing[J]. PLoS One, 2013: e81.
- [9] Hiroshi M, Maruyama F, Kato H, et al. Design and experimental application of a novel non-degenerate universal primer set that amplifies prokaryotic 16S rRNA genes with a low possibility to amplify eukaryotic rRNA genes[J]. DNA Research, 2014, 21: 217-227.
- [10] Kirby B M, Everest G J, Meyers P R. Phylogenetic analysis of the genus *Kribbella* based on the *gyrB* gene: proposal of a *gyrB*-sequence threshold for species delineation in the genus *Kribbella*[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2010, 97(2): 131-142.
- [11] Carrasco G, Valdezate S, Garrido N, et al. Identification, typing, and phylogenetic relationships of the main clinical nocardia species in Spain according to their *gyrB* and *rpoB* genes[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013, 51(11): 3602-3608.
- [12] Teng L J, Hsueh P R, Huang Y H, et al. Identification of bacteroides thetaiotaomicron on the basis of an unexpected specific amplicon of universal 16S ribosomal DNA PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2004, 42(4): 1727-1730.
- [13] Dauga C. Evolution of the *gyrB* gene and the molecular phylogeny of Enterobacteriaceae: a model molecule for molecular systematic studies [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52(2): 531-547.
- [14] 彭耀武. 中国柑橘溃疡病病原菌多态性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
- [15] 安然, 易图永, 肖启明, 等. *gyrB*基因在细菌分类和检测中的应用[J]. 江西农业学报, 2010, 22(4): 18-20, 24.
- [16] 李霞, 高谦. 16S rRNA基因序列分析在临床微生物学中的应用[J]. 微生物与感染, 2006, 1(3): 184-186.
- [17] 董玉兰. 湖南省柑橘溃疡病菌系分化及拮抗菌筛选[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012.
- [18] 张新宇, 高燕宁. PCR引物设计及软件使用技巧[J]. 生物信息学, 2004, 2(4): 15-18, 46.