

魏楚丹, 丁 钿, 叶 淦, 等. 广东和江西省柑橘溃疡病菌的遗传多样性分析[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(4): 71-76.

# 广东和江西省柑橘溃疡病菌的遗传多样性分析

魏楚丹<sup>1</sup>, 丁 钿<sup>1</sup>, 叶 淦<sup>2</sup>, 刘琼光<sup>1</sup>

(1 华南农业大学 资源环境学院, 广东 广州 510642;

2 江西省赣州市果业局, 江西 赣州 341000)

**摘要:**【目的】明确来自广东和江西两省柑橘溃疡病菌菌株之间的分子水平差异。【方法】使用 ERIC 引物, 通过 REP-PCR 技术, 对来自我国广东和江西省 12 个市(县) 12 个柑橘品种的 71 个柑橘溃疡病菌株进行遗传多样性研究。根据 DNA 指纹特征, 并用 NTSYS 软件聚类分析。【结果和结论】71 个菌株在相似值为 0.64 时, 可以分为 A、B 两簇, 其中来自江西赣州 6 个市县的所有溃疡病菌株全部聚在 A 簇, 而来自广东有 50% 的菌株聚在 B 簇。取相似值为 0.88 时, A、B 簇又各自分为 6 个遗传组。广东和江西两省柑橘溃疡病菌存在明显的遗传多样性, 不同地理来源和不同柑橘品种之间的溃疡病菌多样性差异明显。

**关键词:**柑橘溃疡病; 柑橘黄单胞柑橘亚种; 遗传多样性; REP-PCR; ERIC-PCR

中图分类号: S666

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2014)04-0071-06

## Genetic diversities of *Xanthomonas citri* subsp. *citri* in Guangdong and Jiangxi Provinces

WEI Chudan<sup>1</sup>, DING Tian<sup>1</sup>, YE Gan<sup>2</sup>, LIU Qiongguang<sup>1</sup>

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

2 Ganzhou Fruits Crop Bureau in Jiangxi Province, Ganzhou 341000, China)

**Abstract:**【Objective】Citrus canker caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcci*) is one of the most important plant diseases. The aim of the experiment was to study the genetic diversities of *Xac* in Guangdong and Jiangxi Provinces. 【Method】The bacterial strains which were collected from 12 cities (counties) of Guangdong and Jiangxi Provinces on 12 varieties were investigated with ERIC-PCR. Dendrograms were generated by NTSYS software according to fingerprint features. 【Result and conclusion】The results indicated that 71 *Xac* strains could be clustered division A and B. All the strains from Jiangxi Province were distributed on division A, while half of the strains from Guangdong Province were distributed on division B. Both division A and B could be separated into 6 groups at a level of 88% similarity respectively. There were significant genetic diversities of *Xac* strains from Guangdong and Jiangxi Provinces. It showed that the diversity differences of strains from different geographical origins or different varieties were significant.

**Key words:** citrus canker; *Xanthomonas citri* subsp. *citri*; genetic diversity; RER-PCR; ERIC-PCR

柑橘溃疡病(Citrus canker)是由柑橘黄单胞柑橘亚种 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (*Xcci*) 引起的细菌性病害, 对柑橘生产造成毁灭性的危害, 世界上许多国家将其列为重要检疫性病害<sup>[1-2]</sup>。该病最早发现

收稿日期: 2013-10-20 优先出版时间: 2014-05-30

优先出版网址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7671/j.issn.1001-411X.2014.04.014.html>

作者简介: 魏楚丹(1987—), 女, 硕士, E-mail: 137291965@qq.com; 通信作者: 刘琼光(1964—), 男, 副教授, E-mail: qgliu@scau.edu.cn

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目子课题(201003067-01-7)

于1912年,目前在亚洲、非洲及南美洲等30多个国家均有分布,危害面积占世界柑橘生产面积的1/3,其中亚洲地区发生最为普遍.柑橘溃疡病在我国广东、广西、海南、福建、浙江、江西、湖南、湖北、云南及四川等地为害较重,造成柑橘落叶、枯梢、树势弱,严重时引起落果,影响柑橘的产量和果品的质量<sup>[3-6]</sup>.

20世纪90年代初,根据柑橘溃疡病菌的地理分布和不同柑橘品种的相对致病性不同,柑橘溃疡病菌被分为5个菌系:A、B、C、D和E菌系,其中A菌系的侵染力最强、毒力较强、分布较广<sup>[7]</sup>.我国南方柑橘产区溃疡病菌菌系基本都属于A型,但部分地区的研究发现其存在生理生化差异和致病力分化<sup>[8]</sup>.Vauterin等<sup>[9]</sup>根据柑橘溃疡病菌的致病性和寄主专化性将其分成3个致病型,分别为*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*致病型I,即A菌系;*Xanthomonas axonopodis* pv. *aurantifolia*致病型II,即B、C、D菌系和*Xanthomonas axonopodis* pv. *citrumelo*致病型III,即E菌系.2006年,Schaad等<sup>[10]</sup>将这3个致病型重新命名,分别为*X. citri* subsp. *citri*、*X. fuscans* subsp. *aurantifolii*和*X. alfalfae* subsp. *citrumelo*.2000年在美国佛罗里达州发现另一新菌系,被暂定名为Aw菌系<sup>[11]</sup>.

目前,国内外关于柑橘溃疡病菌的遗传多样性分析已有相关研究和报道.Swings等<sup>[12]</sup>采用AFLP指纹识别技术,对来自伊朗和韩国的43个柑橘溃疡病菌进行研究,发现供试菌株可分为6个遗传组.姚廷山等<sup>[13]</sup>采用引物BOXA1R的REP-PCR技术,对来自我国9省(区)共18个柑橘溃疡病菌株进行了遗传多样性分析,取遗传相似距离为0.5时,供试菌株可划分为4个簇,其中有15个菌株与标准A菌株的遗传相似距离较近;来自同一省份的少数溃疡病菌株的遗传相似性也较低.由于研究者所收集的溃疡病菌株数量、标本采集的时间、柑橘品种及地理来源的差异,还有研究方法的不同,导致研究结果的差异.此外,在长期的柑橘生产过程中,由于柑橘品种的更换和环境的改变,病菌也会产生变异,由此,笔者认为柑橘溃疡病菌菌系多样性的研究需要不断深入和完善.

研究发现 REP (Repetitive extragenic palindromic) 和 ERIC (Enterobacterial repetitive intergenic consensus) 序列在微生物中广泛存在,随机分布且在进化中呈高度保守状态.以 REP、ERIC 等序列为引物,以基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳得到不同带型,从而形成了被测菌基因组特异的指纹图谱的技术为 REP-PCR DNA 指纹技术.该技术方法简单、快速、敏感和分辨率高,现普

遍应用于流行病学中的致病菌株鉴定和确定细菌间的亲缘关系.

本研究利用 ERIC-PCR 的方法对主要来自广东和江西两省的12个市(县)的12个柑橘品种71个柑橘溃疡病菌株进行了遗传多样性分析.这将有助于揭示广东和江西两省柑橘溃疡病菌菌株的本质差异,为生产中柑橘溃疡病菌的流行监测,品种合理布局 and 溃疡病防治等提供重要参考.

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料及试剂

来自江西和广东不同县市的柑橘种植区的柑橘溃疡病病叶或病果.柑橘溃疡病细菌的分离采用 LB 培养基,其配方为:牛肉膏 3 g,酵母膏 3 g,蛋白胨 3 g,硫酸镁 0.25 g,磷酸氢二钾 2 g,磷酸二氢钾 0.5 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 L. *Taq* DNA 聚合酶、DL2000 DNA Marker、dNTPs、Loading Buffer 和细菌基因组 DNA 提取试剂盒均购于北京全式金生物技术有限公司.

### 1.2 柑橘溃疡病细菌的分离纯化和鉴定

1.2.1 标本采集和细菌分离纯化 2011—2012年先后从江西和广东不同县市的柑橘种植区采集溃疡病病叶或病果.病原细菌的分离采用平板划线法,挑取 *Xcc* 的特征性单菌落,纯化、PCR 鉴定.

1.2.2 *Xcc* 病菌的检测和鉴定 将分离纯化得到的细菌,用柑橘溃疡病细菌特异性引物<sup>[14]</sup> JYF5 (5'-TTCCGGCGTCAACAAAATG-3') 和 JYR5 (5'-AACTC-CAGCACATACGGGTC-3') 进行 PCR 检测和鉴定. 25  $\mu$ L 的 PCR 反应体系:模板 (10 ~ 50 ng) 1  $\mu$ L, 10  $\times$  Buffer 2.5  $\mu$ L, dNTP (2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 2.0  $\mu$ L, 引物 JYF5 (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 和 JYR5 (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 各 1  $\mu$ L, *Taq* 酶 (5 U  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>) 0.2  $\mu$ L, 补充 ddH<sub>2</sub>O 至 25  $\mu$ L. PCR 反应条件:94  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 54  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 32 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min, PCR 产物 4  $^{\circ}$ C 保存. PCR 产物在 10 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 琼脂糖凝胶上电泳检测.

### 1.3 *Xcc* 病菌的 REP-PCR 分析

1.3.1 *Xcc* 总 DNA 的提取 将供试的 71 个 *Xcc* 菌株接种在 LB (液体) 培养基中, 30  $^{\circ}$ C、180 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 振荡培养 12 h. 用 DNA 提取试剂盒, 提取病原细菌基因组总 DNA, 并将 DNA 质量浓度调至 50 ng  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>, 在 10 g  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的琼脂糖凝胶上电泳检测.

1.3.2 REP-PCR 扩增 采用以细菌基因组内广泛存在的短重复序列 ERIC 为基础设计的引物 ERIC1R (5'-ATGTAAGCTCCTGGGGATTAC-3')<sup>[15]</sup> 与 ERIC2 (5'-AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG-3')<sup>[16]</sup>, PCR 反

应体系为 25 μL:模板 (*Xcc* 总 DNA) 1 μL, 10 × Buffer 2.5 μL, dNTP (2.5 μmol · L<sup>-1</sup>) 2.0 μL, 引物 (10 μmol · L<sup>-1</sup>) 各 1 μL, *Taq* 酶 (5 U · μL<sup>-1</sup>) 0.4 μL, 补充 ddH<sub>2</sub>O 至 25 μL. 反应条件: 95 °C 7 min; 94 °C 1 min, 52 °C 1 min, 65 °C 8 min, 32 个循环, 65 °C 15 min, PCR 产物 4 °C 保存. 取 6 ~ 8 μL 扩增产物于 15 g · L<sup>-1</sup> 琼脂糖胶上电泳 (电压为 6 V · cm<sup>-1</sup>, 时间 2 ~ 3 h).

1.3.3 REP-PCR 图谱的聚类分析 利用 ERIC 引物扩增产物电泳图谱中各位点条带的有无对 REP-PCR 扩增产物的指纹图谱进行读带, 有带的记为“1”, 无带的记为“0”, 制成 Excel 文件用于聚类分析.

利用 NTSYS 软件, 对结果以非加权算术平均数配对法 (Unweighted pair-group method with arithmetic averages, UPGMA) 绘出聚类树状图, 构建系统树状图谱, 并进行菌株的聚类分析.

## 2 结果与分析

### 2.1 柑橘溃疡病菌菌株的分离

通过标本采集、病原细菌分离、纯化后得到的单菌落, 经过 *Xcc* 特异引物 JYF5/JYR5 的 PCR 扩增, 得到大小为 413 bp 的特异性目标条带, 确定都是 *Xcc*. 本研究共获得了来自江西和广东两省 12 个市 (县) 12 个柑橘品种的 71 个溃疡病细菌菌株 (表 1).

表 1 柑橘溃疡病菌菌株编号、地理来源和柑橘品种

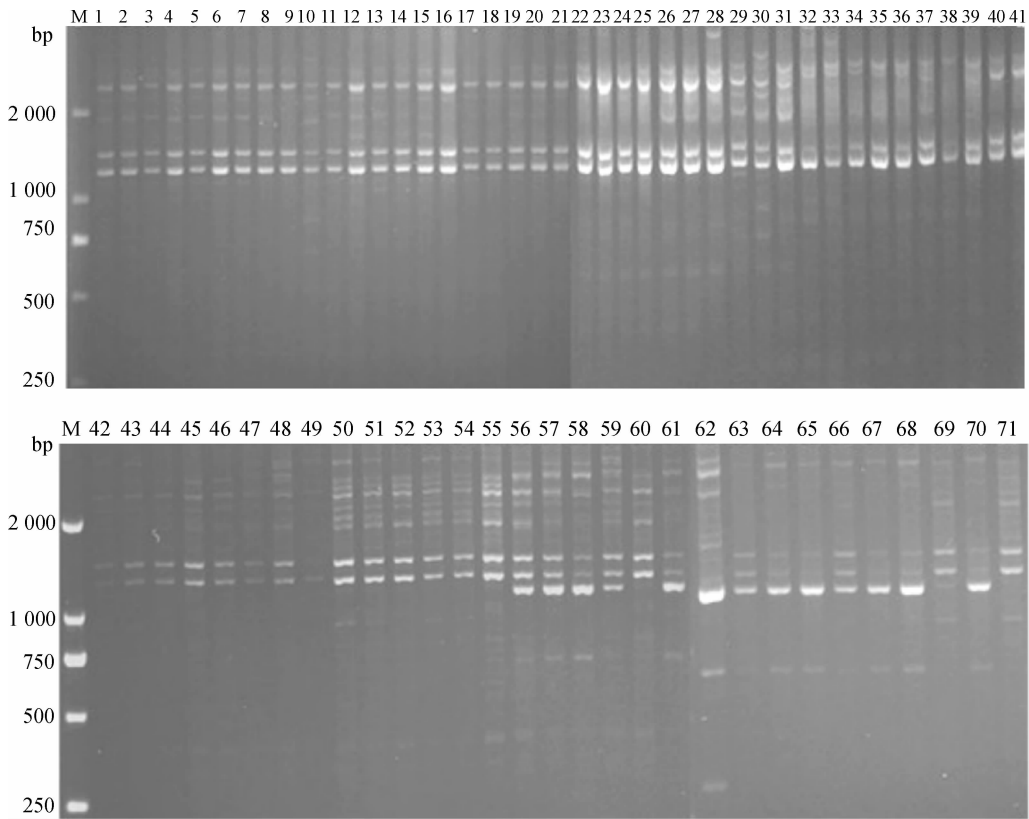
Tab.1 The number, geographical origin and citrus variety of *Xanthomonas citri* subsp. *citri*

菌株编号	地理来源	柑橘品种	菌株编号	地理来源	柑橘品种
<i>Xcc</i> 1	广东深圳	橘红	<i>Xcc</i> 37	广东顺德	朱砂橘
<i>Xcc</i> 2	广东深圳	橘红	<i>Xcc</i> 38	广东平远	脐橙
<i>Xcc</i> 3	广东深圳	橘红	<i>Xcc</i> 39	广东平远	脐橙
<i>Xcc</i> 4	广东深圳	橘红	<i>Xcc</i> 40	广东平远	脐橙
<i>Xcc</i> 5	江西安远	脐橙	<i>Xcc</i> 41	广东平远	脐橙
<i>Xcc</i> 6	江西安远	脐橙	<i>Xcc</i> 42	广东梅县	沙田柚
<i>Xcc</i> 7	江西安远	脐橙	<i>Xcc</i> 43	广东梅县	沙田柚
<i>Xcc</i> 8	江西安远	脐橙	<i>Xcc</i> 44	广东梅县	沙田柚
<i>Xcc</i> 9	江西大余	红江橙	<i>Xcc</i> 45	广东梅县	脐橙
<i>Xcc</i> 10	广东新会	砂糖橘	<i>Xcc</i> 46	广东梅县	脐橙
<i>Xcc</i> 11	广东新会	甜橘	<i>Xcc</i> 47	广东新会	红柠檬
<i>Xcc</i> 12	广东新会	新会柑	<i>Xcc</i> 48	广东新会	红柠檬
<i>Xcc</i> 13	广东新会	新会柑	<i>Xcc</i> 49	广东新会	红柠檬
<i>Xcc</i> 14	江西寻乌	脐橙	<i>Xcc</i> 50	广东新会	新会橘
<i>Xcc</i> 15	江西寻乌	脐橙	<i>Xcc</i> 51	广东新会	新会橘
<i>Xcc</i> 16	江西定南	脐橙	<i>Xcc</i> 52	广东新会	新会橘
<i>Xcc</i> 17	江西定南	脐橙	<i>Xcc</i> 53	广东新会	新会橘
<i>Xcc</i> 18	江西赣县	沙田柚	<i>Xcc</i> 54	广东新会	新会橘
<i>Xcc</i> 19	江西赣县	脐橙	<i>Xcc</i> 55	广东阳春	马水橘
<i>Xcc</i> 20	江西赣县	脐橙	<i>Xcc</i> 56	广东阳春	砂糖橘
<i>Xcc</i> 21	江西赣县	脐橙	<i>Xcc</i> 57	广东阳春	砂糖橘
<i>Xcc</i> 22	江西全南	脐橙	<i>Xcc</i> 58	广东阳春	马水橘
<i>Xcc</i> 23	江西全南	脐橙	<i>Xcc</i> 59	广东阳春	砂糖橘
<i>Xcc</i> 24	江西全南	脐橙	<i>Xcc</i> 60	广东阳春	马水橘
<i>Xcc</i> 25	江西全南	脐橙	<i>Xcc</i> 61	广东阳春	马水橘
<i>Xcc</i> 26	广东顺德	朱砂橘	<i>Xcc</i> 62	广东阳春	砂糖橘
<i>Xcc</i> 27	广东顺德	朱砂橘	<i>Xcc</i> 63	广东阳春	砂糖橘
<i>Xcc</i> 28	广东顺德	朱砂橘	<i>Xcc</i> 64	广东廉江	红橙
<i>Xcc</i> 29	广东顺德	朱砂橘	<i>Xcc</i> 65	广东廉江	红橙
<i>Xcc</i> 30	广东顺德	朱砂橘	<i>Xcc</i> 66	广东廉江	红橙
<i>Xcc</i> 31	广东顺德	朱砂橘	<i>Xcc</i> 67	广东廉江	红橙
<i>Xcc</i> 32	广东顺德	朱砂橘	<i>Xcc</i> 68	广东廉江	红橙
<i>Xcc</i> 33	广东顺德	朱砂橘	<i>Xcc</i> 69	广东廉江	红橙
<i>Xcc</i> 34	广东顺德	朱砂橘	<i>Xcc</i> 70	广东廉江	红橙
<i>Xcc</i> 35	广东顺德	朱砂橘	<i>Xcc</i> 71	广东廉江	红橙
<i>Xcc</i> 36	广东顺德	朱砂橘			

## 2.2 柑橘溃疡病菌 REP-PCR

采用试剂盒提取病原菌 *Xcc* 基因组 DNA, 琼脂糖凝胶电泳条带清晰, 可用于 REP-PCR 分析. 以 *Xcc* 细菌基因组 DNA 为模板, 用 ERIC1R 与 ERIC2 引物进行 ERIC-PCR 反应, 结果发现: 引物 ERIC 扩增的片段大小主要在 750 bp 以上, 有 5~12 条指纹主带, 共 10 种指纹谱型(图 1). 所有菌株之间的相似性高, 相似度达 0.55, 部分菌株差别较少, 如 *Xcc* 1 与 *Xcc* 2 等; *Xcc* 62 和 *Xcc* 63

等菌株与其他菌株差异较大. 来自不同地区的同一柑橘品种的溃疡病菌株的指纹图谱通常差异性较小, 如 *Xcc* 15 与 *Xcc* 20 菌株, 但也存在差异较大的情况, 如 *Xcc* 6 与 *Xcc* 40 菌株. 来自同一地区的不同柑橘品种分离得到的溃疡病菌株, 指纹图谱存在部分差异, 如 *Xcc* 10 与 *Xcc* 12 菌株, 有些差异不明显, 如 *Xcc* 11 与 *Xcc* 48 菌株. 来自不同地点不同柑橘品种上的溃疡病菌株间差异相对明显, 如 *Xcc* 1 与 *Xcc* 71 等菌株.



M:DL 2000 DNA Marker; 1~71 分别为 *Xcc* 1~*Xcc* 71.

图 1 不同地理来源的 71 个 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 菌株的 ERIC-PCR 扩增结果

Fig. 1 The ERIC-PCR electrophoretogram of 71 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains from different geographical origins

## 2.3 *Xcc* 菌株的聚类分析

根据 PCR 扩增 DNA 产物指纹带位的有无, 转换为数码 1 或 0, 采用 NTSYS 软件对 71 个柑橘溃疡病菌菌株进行 UPGMA 聚类分析. 结果表明, 在相似水平为 0.64 时, 供试的 71 个菌株大体可以聚为 A、B 两簇(图 2). 取相似水平为 0.88 时, A 簇又可分为 6 个遗传组, 其中 A1 是主要遗传组, 在相似水平为 0.88 时, B 簇可分为 6 个遗传组群(图 2). 各遗传组所含菌株见表 2.

如表 2 所示, 聚类分析结果表明, 71 个 *Xcc* 菌株在相似系数为 0.88 时, 可以分为 A、B 两簇, A 簇可以分为 6 个遗传组, A1 遗传组以 4 个来自广东深圳的橘红品种和 11 个来自江西脐橙品种的菌株为主;

A2 遗传组包括 2 个来自广东新会的红柠檬菌株; A3 遗传组主要包括来自广东顺德的 12 个朱砂橘的菌株; A4 遗传组只有 1 个来自广东新会的砂糖橘菌株; A5 遗传组包括 7 个广东廉江的红橙菌株; A6 遗传组只有 1 个来自广东廉江的红橙菌株. 在相似水平为 0.88 时, B 簇有 6 个遗传组, B1 遗传组有 7 个来自广东新会的新会橘和新会柑菌株; B2 遗传组主要包括 3 个来自广东梅县沙田柚品种的菌株; B3 遗传组有 2 个来自广东新会的甜橘和红柠檬菌株; B4 遗传组是来自广东的 6 个脐橙品种的菌株; B5 遗传组主要包括来自广东阳春 4 个马水橘品种的菌株和 3 个砂糖橘菌株; B6 是来自广东阳春的 2 个砂糖橘品种的菌株.

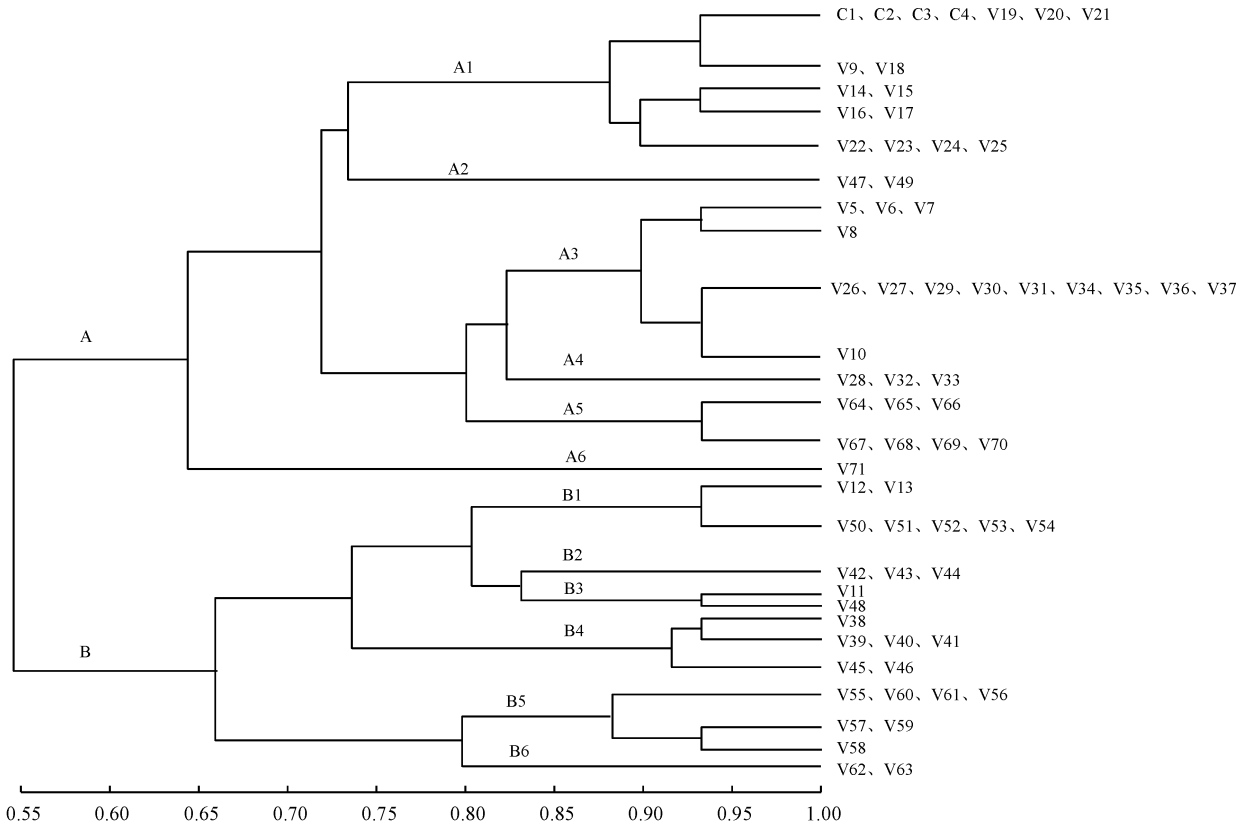


图 2 71 个 *Xcc* 菌株 ERIC-PCR 的 DNA 聚类分析树状图

Fig. 2 DNA dendrogram constructed by ERIC-PCR data of *Xcc*

表 2 71 个 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* 菌株 ERIC-PCR 遗传组

Tab. 2 The ERIC-PCR genetic groups of 71 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* strains

遗传组编号	对应菌株	地理来源	品种	遗传组
C1、C2、C3	<i>Xcc</i> i1、 <i>Xcc</i> i2、 <i>Xcc</i> i3	广东深圳	橘红	A1
C4	<i>Xcc</i> i4	广东深圳	橘红	A1
V9	<i>Xcc</i> i9	江西大余	红江橙	A1
V18	<i>Xcc</i> i18	江西赣州	沙田柚	A1
V14、V15	<i>Xcc</i> i14、 <i>Xcc</i> i15	江西寻乌	脐橙	A1
V16、V17	<i>Xcc</i> i16、 <i>Xcc</i> i17	江西定南	脐橙	A1
V19、V20、V21	<i>Xcc</i> i19、 <i>Xcc</i> i20、 <i>Xcc</i> i21	江西赣州	脐橙	A1
V22、V23、V24、V25	<i>Xcc</i> i22、 <i>Xcc</i> i23、 <i>Xcc</i> i24、 <i>Xcc</i> i25	江西全南	脐橙	A1
V47、V49	<i>Xcc</i> i47、 <i>Xcc</i> i49	广东新会	红柠檬	A2
V5、V6、V7、V8	<i>Xcc</i> i5、 <i>Xcc</i> i6、 <i>Xcc</i> i7、 <i>Xcc</i> i8	江西安远	脐橙	A3
V26、V27、V28、V29、V30、V31	<i>Xcc</i> i26、 <i>Xcc</i> i27、 <i>Xcc</i> i28、 <i>Xcc</i> i29、 <i>Xcc</i> i30、 <i>Xcc</i> i31	广东顺德	朱砂橘	A3
V32、V33、V34、V35、V36、V37	<i>Xcc</i> i32、 <i>Xcc</i> i33、 <i>Xcc</i> i34、 <i>Xcc</i> i35、 <i>Xcc</i> i36、 <i>Xcc</i> i37	广东顺德	朱砂橘	A3
V10	<i>Xcc</i> i10	广东新会	砂糖橘	A4
V64、V65、V66、V67、V68、V69、V70	<i>Xcc</i> i64、 <i>Xcc</i> i65、 <i>Xcc</i> i66、 <i>Xcc</i> i67、 <i>Xcc</i> i68、 <i>Xcc</i> i69、 <i>Xcc</i> i70	广东廉江	红橙	A5
V71	<i>Xcc</i> i71	广东廉江	红橙	A6
V12、V13	<i>Xcc</i> i12、 <i>Xcc</i> i13	广东新会	新会柑	B1
V50、V51、V52、V53、V54	<i>Xcc</i> i50、 <i>Xcc</i> i51、 <i>Xcc</i> i52、 <i>Xcc</i> i53、 <i>Xcc</i> i54	广东新会	新会橘	B1
V42、V43、V44	<i>Xcc</i> i42、 <i>Xcc</i> i43、 <i>Xcc</i> i44	广东梅县	沙田柚	B2
V11	<i>Xcc</i> i11	广东新会	甜橘	B3
V48	<i>Xcc</i> i48	广东新会	红柠檬	B3
V38、V39、V40、V41	<i>Xcc</i> i38、 <i>Xcc</i> i39、 <i>Xcc</i> i40、 <i>Xcc</i> i41	广东平远	脐橙	B4
V45、V46	<i>Xcc</i> i45、 <i>Xcc</i> i46	广东梅县	脐橙	B4
V55、V58、V60、V61	<i>Xcc</i> i55、 <i>Xcc</i> i58、 <i>Xcc</i> i60、 <i>Xcc</i> i61	广东阳春	马水橘	B5
V56、V57、V59	<i>Xcc</i> i56、 <i>Xcc</i> i57、 <i>Xcc</i> i59	广东阳春	砂糖橘	B5
V62、V63	<i>Xcc</i> i62、 <i>Xcc</i> i63	广东阳春	砂糖橘	B6

### 3 讨论与结论

有关柑橘溃疡病菌菌系的遗传多样性研究,国内报道较少.姚廷山等<sup>[13]</sup>曾用 BOXA1R 引物,将来自我国9省(区)的18株柑橘溃疡病菌株分为4~5个簇,其中江西和广东各1个脐橙菌株.本研究选择了包括脐橙、朱砂橘、柠檬和砂糖橘等12个不同品种上的71个菌株,采用ERIC引物扩增,将柑橘溃疡病菌分为2个簇群12个遗传组,进一步丰富了前人的结果.本研究收集的71个菌株54个来自广东、17个来自江西,聚类分析结果表明,71个*Xcc*菌株可以分为A、B两簇,A、B簇又分别可分为6个遗传组.

进一步分析发现,来自江西省主要柑橘产区的柑橘溃疡病菌株均聚在A簇,而来自广东省的菌株绝大部分聚在B簇,表明柑橘溃疡病菌的遗传组与地理来源有一定的相关性.新会的红柠檬品种和新会橘品种与其他菌株间差异较大.研究还发现,来自江西省的绝大多数脐橙品种的菌株聚在A1遗传组,而朱砂橘品种均分布在A3遗传组,新会橘品种分布在B1遗传组,马水橘品种分布在B5遗传组等,由此表明,柑橘品种与溃疡病细菌的遗传多样性之间具有一定的相关性.

聚类结果发现,柑橘溃疡病细菌在不同的地区及不同时间产生了分化,这是利用传统的形态标记技术很难检测到的,REP-PCR技术具有很高的灵敏度和准确性,能够用于遗传多样性和遗传分化研究.且REP分析所需要的仪器设备相对简单、检测速度快,能够处理大量菌株.随着引物数量的增加,更多数量和更多来源菌株的采集,*Xcc*菌株的遗传多样性分析将更趋于完善.

#### 参考文献:

- [1] 黄幼玲. 柑橘溃疡病检疫与防治[J]. 植物保护, 2007, 33(6):132-135.
- [2] CUBERO J, GRAHAM H J. Genetic relationship among worldwide strains of *Xanthomonas* causing canker in citrus species and design of new primers for their identification by PCR[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(3):1257-1264.
- [3] GOTTFWALD T R, HUGHES G, GRAHAM J H, et al. The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species[J]. Phytopathology, 2001, 91(1):30-34.
- [4] 何秀玲,袁红旭. 柑橘溃疡病发生与抗性研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(8):409-412.
- [5] 方毅敏,张宜绪. 柑橘溃疡病发病程度对落叶、落果、果实大小及品质的影响[J]. 植物病理学报, 1992, 22(4):75-78.
- [6] CHRISTIANO R S C, PRIA M D, JUNIR W C J, et al. Effect of citrus leaf-miner damage, mechanical damage and inoculum concentration on severity of symptoms of Asiatic citrus canker in Tahiti lime[J]. Crop Prot, 2007, 26(2):59-65.
- [7] 刘冰. 赣南脐橙溃疡病及其研究现状[J]. 生物灾难科学, 2012, 35(3):235-238.
- [8] 罗志萍. 柑橘溃疡病菌的分子鉴定及检测技术研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2006.
- [9] VAUTERIN L, HOSTE B, KERSTERS K, et al. Reclassification of *Xanthomonas*[J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 145:472-489.
- [10] SCHAAD N W, POSTNIKOVA E, LACY G et al. Emended classification of *Xanthomonas* pathogens on citrus[J]. Syst Appl Microbiol, 2006, 29(8):690-695.
- [11] SUN X A, ROBEN E S, CUBERO J, et al. Detection and characterization of a unique isolate of citrus canker bacterium from key lime in Wellington and Lake Worth[ R]. Florida: International Citrus Canker Research Workshop, 2000(6):20-22.
- [12] SWINGS J, KHODAKARAMIAN G. Genetic diversity and pathogenicity of *Xanthomonas axonopodis* strains inducing citrus canker disease in Iran and South Korea[J]. Springer, 2011, 51(2):194-199.
- [13] 姚廷山,胡军华,唐科志,等. 利用 rep-PCR 技术研究我国9省柑橘溃疡病菌遗传多样性[J]. 果树学报, 2010, 27(5):819-822.
- [14] DENG Z N, XU L, LI D Z, et al. Screening citrus genotypes for resistance to canker disease (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*) [J]. Plant Breeding, 2010, 129(3):341-345.
- [15] MOHAPATRA B R, MAZUMDER A. Comparative efficacy of five different rep-PCR methods to discriminate *Escherichia coli* populations in aquatic environments[J]. Water Sci Technol, 2008, 58(3):537-547.
- [16] LUKA F, MATEJA J, MAJA B, et al. The discriminative power in determining genetic diversity of *Escherichia coli* isolates: Comparing ERIC-PCR with AFLP[J]. Afr J Microbiol Res, 2013, 7(20):2416-2419.

【责任编辑 霍欢】