



卢慧林, 陈大嵩, 陈逢浩, 叶静文, 欧阳革成. 基于纳米孔测序技术的柑橘黄龙病检测方法建立 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (6): 1596 – 1600.

基于纳米孔测序技术的柑橘黄龙病检测方法建立

卢慧林^{1*}, 陈大嵩^{1*}, 陈逢浩^{1,2}, 叶静文¹, 欧阳革成^{1**}

(1. 广东省科学院动物研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室, 广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广州 510260;

2. 华南农业大学植物保护学院, 广州 510642)

摘要: 柑橘黄龙病 (Huanglongbing) 是柑橘生产上最具毁灭性的病害, 及时快速地进行早期检测和诊断是防控黄龙病的关键措施之一。本文利用掌上纳米孔测序仪 MinION 对携带黄龙病菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* 的 DNA 样品进行测序, 并利用 Blast、GraphMap、minimap2 以及两种 bwa 的比对方法将测序结果比对到黄龙病菌基因组上, 比对结果均匀的比对到黄龙病菌基因组上, 并未发现严重的偏倚现象, 验证了其测序结果的可靠性。本技术可弥补因柑橘木虱 *Diaphorina citri* (Kuwayama) 虫体过小或损坏难以进行光学识别的不足, 并可同时检测虫体是否携带有黄龙病菌, 对有黄龙病发生风险但尚未有黄龙病实际发生的柑橘种植区提供实时实地的监控与预警。

关键词: 柑橘黄龙病; MinION; 测序; 快速诊断

中图分类号: Q968.1; S433

文献标识码: A

文章编号: 1674-0858 (2021) 06-1596-05

Establishment of detection method of Huanglongbing based on nanopore sequencing technology

LU Hui-Lin^{1*}, CHEN Da-Song^{1*}, CHEN Feng-Hao^{1,2}, YE Jing-Wen¹, OUYANG Ge-Cheng^{1**}

(1. Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Institute of Zoology, Guangdong Academy of Sciences, Guangzhou 510260, China; 2. College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Huanglongbing is the most devastating disease in citrus production, early detection and diagnosis in a timely and rapid manner is one of the key measures to prevent and control huanglongbing. In this paper, the DNA sample carrying *Candidatus Liberibacter asiaticus* (CLas) was sequenced by MinION, and the sequencing results were compared to the genome of CLas by blast, graphmap, minimap2 and two BWA comparison methods. The comparison results were evenly compared to the genome of CLas, and no serious bias was found, which verified the reliability of the sequencing results. This sequencing technology could make up for the difficulty of optical identification due to the small or damaged *Diaphorina citri* (Kuwayama), and it could also detect whether the psyllids carry CLas at the same time, and provided real-time monitoring and early warning for citrus planting areas where there was a potential risk of huanglongbing.

Key words: Huanglongbing; MinION; sequence; rapid diagnosis

基金项目: 广东省农业科技创新及推广项目 (2020KJ113; 2021KJ113)

* 共同第一作者: 卢慧林, 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为柑橘病虫害综合防治, E-mail: 41170955@qq.com; 陈大嵩, 男, 博士, 助理研究员, 研究方向为昆虫基因组与昆虫化学生态学, E-mail: Chends@giabr.gd.cn

** 通讯作者 Author for correspondence: 欧阳革成, 男, 博士, 研究员, 研究方向为果树病虫害综合防治, E-mail: 18922369378@189.cn

收稿日期 Received: 2021-08-05; 接受日期 Accepted: 2021-10-10

柑橘黄龙病 (Huanglongbing) 是最具毁灭性的柑橘病害 (Hall and McCollum, 2011; Wang, 2019), 在全球的分布超过 50 多个国家和地区 (Bové, 2006; 黄爱军, 2014; European Food Safety Authority (EFSA), *et al.*, 2019), 是全球柑橘产业健康发展的瓶颈。由于目前无法选育出抗病树种, 除了防治其媒介昆虫—柑橘木虱以外, 及时移除病树, 避免感染扩散, 是防控黄龙病的关键措施之一, 其中最重要的就是要及时快速地对柑橘黄龙病进行早期检测和诊断 (郑正, 2017)。近年来, 分子生物学检测、高光谱检测等技术, 越来越普遍地用于柑橘黄龙病的识别与监测 (许美容等, 2015), 但仍然达不到生产要求。多聚酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 是目前应用于柑橘黄龙病识别的一种较为可靠且普遍的技术, 但该方法存在的问题是难以实现实时在线检测 (陆健强等, 2021)。高光谱检测可实现实时实地快速识别, 但只对有明显症状的染病树有用, 难以做到早期诊断。

随着高通量测序方法的快速发展, 测序成本的不断降低, 高通量测序被广泛应用于各种病原的测序或检测中 (陈大嵩等, 2021)。牛津纳米孔技术公司 (Oxford Nanopore Technologies, ONT) 的掌上纳米孔测序仪 MinION 是一款新研发的便携式测序仪, 它能够直接进行 DNA 和 RNA 测序, 拥有超长的读长、实时测序、随时终止等特性, 被广泛应用于多种病原体的检测 (Wongsurawat *et al.*, 2019; Warwick *et al.*, 2019; 陈大嵩等, 2021)。本文尝试利用 MinION 测序仪对感染黄龙病的柑橘 DNA 样品进行测序, 对比不同软件的比对结果, 优化分析手段, 从而实现利用高通量测序技术对黄龙病菌进行有效监控和高效测定。

1 材料与方法

1.1 DNA 提取

4 个柑橘叶片 (砂糖桔 *Citrus triculata*, 典型黄龙病斑驳叶片) 标本均取自广东省科学院动物研究所环境昆虫研究中心养虫室, 叶片总 DNA 提取方法: 采用 Biospin 植物基因组试剂盒, 实验步骤参照说明书进行调整: 称取 0.1 g 植物叶片叶脉, 用灭菌剪刀剪碎, 置于 2.0 mL 离心管中, 加入 100 μ L LP Buffer, 并放入研磨珠, 将离心管放入研磨机内研磨, 研磨后在加入 350 μ L LP Buffer,

并混合均匀; 于 65 $^{\circ}$ C 下温浴 15 min, 每 5 min 颠倒混匀; 加入 150 μ L DA 缓冲液, 混合均匀, 放置冰浴中 5 min; 将管中混合物全部转移至 Shredder spin column, 于 14 000 $\times$ g 离心 3 min; 将上述滤液转移到一个灭菌后的 1.5 mL 离心管; 加 750 μ L 或上述滤液体积 1.5 倍的 P Binding 缓冲液, 并混合均匀; 将上述混合液体转移至 Spin column, 然后 6 000 $\times$ g 离心 60 s, 并弃去接液管中液体; 加入 500 μ L G Binding 缓冲液至 Spin column, 于 10 000 $\times$ g 离心 30 s, 并弃去接液管中液体; 加入 600 μ L Wash 缓冲液, 于 10 000 $\times$ g 离心 30 s, 并弃去接液管中液体; 空管离心 Spin column, 10 000 $\times$ g 离心 1 min, 并将 Spin column 转移至一个新灭菌的 1.5 mL 离心管; 加入 100 ~ 200 μ L Elution 缓冲液, 室温温育 1 min; 12 000 $\times$ g 离心 1 min, 并弃去 Spin column, 1.5 mL 离心管中液体含有 DNA。

1.2 黄龙病病原菌检测

参照许美容等 (2016) 检测方法, 用基于柑橘黄龙病菌 16S rDNA 基因的 OH1/OI2c (5'-GCGCGTATCCAA-TACGAGCGGCA-3'/5'-GCCTCGC GACTTCGCAAC-CCAT-3') 引物扩增目的 DNA 样品, 以健康柑橘材料提取的 DNA 分别作为阴性对照, 以感染黄龙病的柑橘 DNA 为阳性对照。PCR 扩增反应完成后, 取 6 μ L PCR 产物和 6 $\times$ Loading Buffer 相混合, 于室温下进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电压为 120 V, 时间为 30 min, 在凝胶成像系统下观察结果, 如在 1 167 bp 处出现条带, 则为阳性样品。

1.3 纳米孔测序文库构建

参考纳米孔测序连接测序试剂盒说明书进行纳米孔测序文库构建。首先, 利用微量分光光度计测量溶液中 DNA 含量, 并保证 1 μ g 以上的 DNA 用于下一步实验; 其次利用试剂盒 NEBNext End repair / dA-tailing Module (NEB: E7546) 对打断的 DNA 进行末端修复; 第三步, 利用磁珠 AMPure XP beads (Agencourt) 对 DNA 文库进行回收; 第四步, 利用末端连接试剂盒 NEB Blunt / TA Ligase Master Mix (NEBZ: M0367) 与连接测序试剂盒 1 D Genomic DNA by ligation (Oxford Nanopore Technologies: SQK-LSK108) 进行 DNA 末端测序接头的连接, 完成 DNA 测序文库的构建; 最后, 参照试剂盒说明书的方法进行对测序芯片进行质检 (陈大嵩等, 2021)。

1.3 纳米孔测序与分析

测序获得的 fastq 文件利用长序列比对软件 GraphMap、minimap2、bwa 在 mem 模式下参数 -x 选择 ont2d 以及 bwa 在 mem 模式下参数 -A 选择 2、参数 -B 选择 3 比对到柑橘黄龙病亚洲种基因组序列 (GenBank: NZ_CP010804.1)。测序获得的 fastq 文件转换成 fasta 文件后, 利用 blastn 比对到柑橘黄龙病亚洲种基因组序列 (GenBank: NZ_CP010804.1)。比较不同比对软件与比对方案之间的差异。

2 结果与分析

2.1 病原菌检测结果

采集的 4 个样品中, 经常规 PCR 检测显示, 样品编号 4 的柑橘 DNA 扩增到 1 条大小约 1 167 bp 的条带, 确定为黄龙病菌 (图 1), 以此 DNA 样品进行下一步的测序和分析。

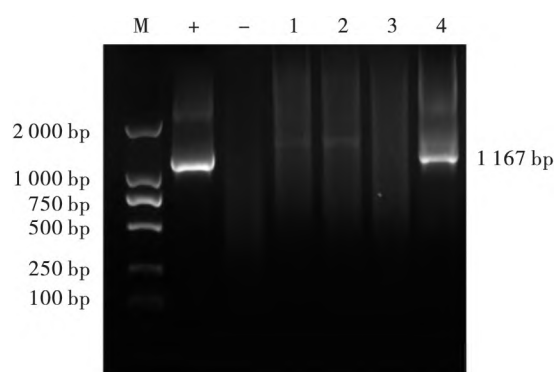


图 1 柑橘样品中黄龙病菌的 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 PCR amplification electrophoretogram of *Candidatus*

Liberibacter asiaticus in citrus samples

注: M, DL2000 DNA marker; +, 阳性对照 (感染黄龙病的柑橘 DNA 样品); -, 阴性对照 (健康柑橘 DNA 样品); 1~4, 采自广东省科学院动物研究所实验室的柑橘样品。Note: M, DL2000 DNA marker; +, Positive control (DNA sample of citrus infected CLAs); -, Negative control (DNA sample of citrus un-infected CLAs); 1~4, Citrus samples taken from the laboratory of Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization.

2.2 纳米孔测序与分析

利用 MinION 测序仪对确诊黄龙病菌感染的柑橘叶片总 DNA 进行测序, 获得约 25 M 条序列共 3.75 G 个碱基 (图 2)。序列最长 27 147 bp, 序列长度的中位数为 1 239 bp, 平均长 1 492 bp。利用 Blast、GraphMap、minimap2 以及两种 bwa 的比对

方法将测序结果比对到黄龙病基因组上, 其中 Blast、GraphMap、minimap2、bwa AB 与 bwa x 分别比对上 5 702、42 557、6 200、7 269 与 56 712 条序列 (图 3), 其中 Blast、minimap2 与 bwa AB 分析方法获得的结果比较接近。将比对算法的软件 GraphMap、minimap2 以及 bwa 得到的结果利用比对到黄龙病菌基因组的位置展示成圈图 (图 4), 可见比对结果均匀地比对到黄龙病菌基因组上, 并未发现严重的偏倚现象。

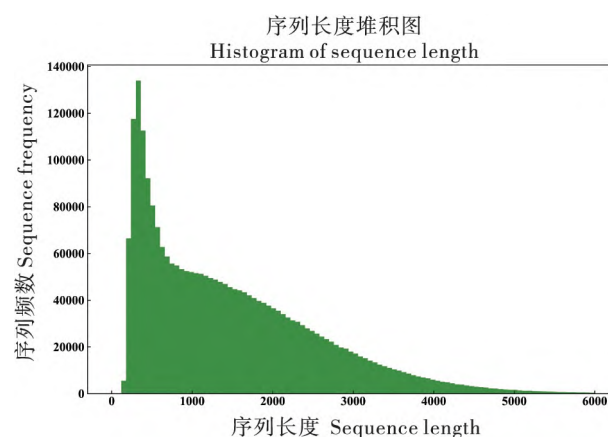


图 2 MinION 测序原始序列长度堆积图

Fig. 2 Histogram of the raw sequences by MinION sequencer
注: 横坐标, 序列长度; 纵坐标, 序列长度的频数, 即每个序列长度区间内有多少个序列。Note: X-axis, Sequence length; Y-axis, Sequence frequency, namely the sum of the sequences within each sequence length interval.

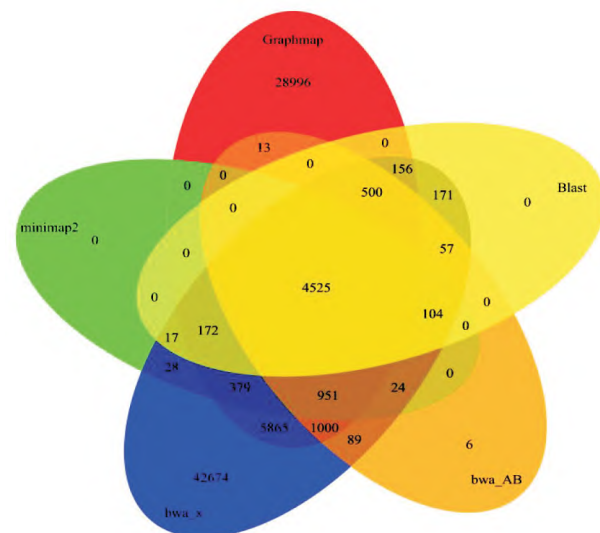


图 3 比对结果的韦恩图

Fig. 3 Venn diagram of comparison results

注: bwa_x, bwa 在 mem 模式下参数 -x 选择 ont2d; bwa_AB, bwa 在 mem 模式下参数 -A 选择 2、参数 -B 选择 3。Note: bwa_x, bwa mem mapping mode with -x ont2d; bwa_AB, bwa mem mapping mode with -A 2 -B 3.

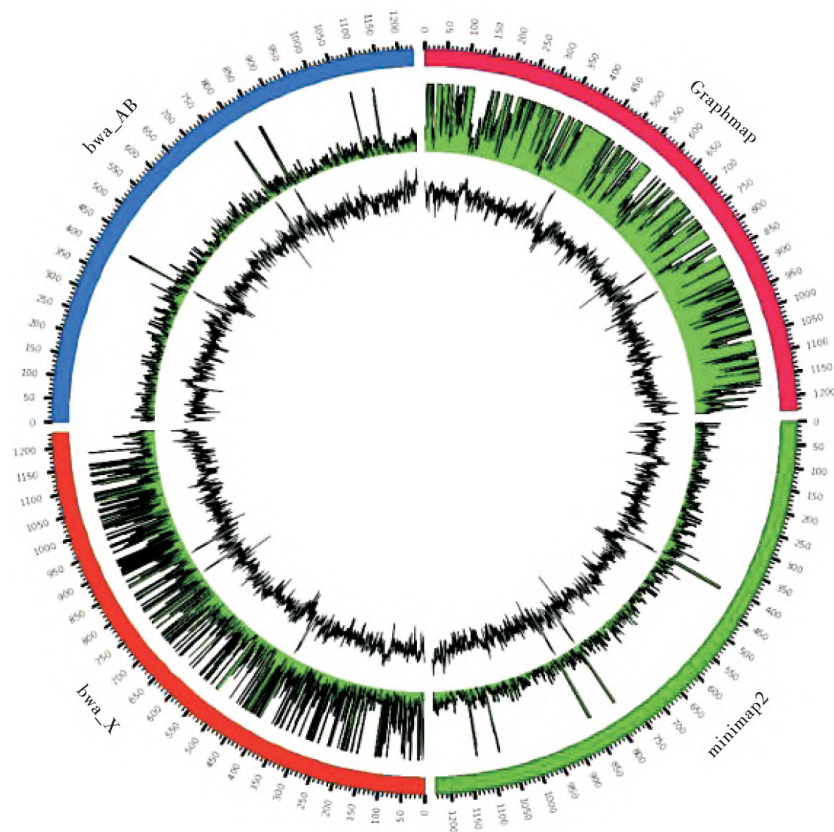


图4 分析软件比对到基因组的位置

Fig. 4 The location of the genome mapped by each software

注：外环，黄龙病菌基因组长度的示意图；中环，各软件比对到黄龙病菌基因组位堆积图，高度表示比对到该基因组位置的碱基数量；内环，黄龙病菌基因组的 GC 含量。Note: Outer, Diagram of genome length of Huanglongbing; Central, Histogram of each software mapping to Huanglongbing genomic, and the height indicates the sum of bases mapped to the genome; Inner, GC content of Huanglongbing genome.

3 结论与讨论

纳米孔测序技术 Nanopore sequencing 为近几年兴起的第三代测序技术，由牛津纳米孔技术公司 (Oxford Nanopore Technologies, ONT) 开发，与以往的测序方法不同，该技术基于电信号的测序技术，通过电流信号的特征性改变，来确定正在通过该孔的 DNA 或 RNA 的碱基序列，进行实时单分子测序 (Senol Cali *et al.*, 2019; 陈大嵩等, 2021; 张皓博等, 2021)。该技术能够边解链边测序，无需 PCR 扩增和化学样品标记，极大简化了测序试验流程，有效降低了假阳性，而且不需要模板设计引物，甚至可以鉴定新病原等的特性，可以与 PCR 鉴定方法形成互补 (Feng *et al.*, 2015; 陈大嵩等, 2021)，该技术具有高通量、实时、长片段读长、易集成、时效性强、体积较小便于携带等优势，可应用于动植物和微生物基因组测序、宏

基因组测序、RNA 直接测序、微生物检测、DNA 与 RNA 甲基化检测、mRNA 的 polyA 长度定量等研究 (Senol Cali *et al.*, 2019; 曹影等, 2020; 陈大嵩等, 2021)。杜宇等 (2021) 利用纳米孔技术构建和注释了蜜蜂球囊菌的首个高质量全长转录组，为探究球囊菌转录组的复杂性、完善参考基因组的序列和功能注释信息以及深入开展球囊菌可变剪接体的功能研究提供了关键依据。在人类疾病检测中，纳米孔测序也显示出明显的优势，该技术有着先前基因测序技术没有的优势，其能够提供动态、实时的测序，可在数小时或更短的时间内获取和分析 DNA 或 RNA 序列，且文库制备简单，不受环境限制，便于携带，使现场基因测序成为可能，从而进一步加快了检测时间，有助于迅速诊断疾病并及时进行针对性治疗 (Euskirchen *et al.*, 2017; 张皓博等, 2021)。

柑橘黄龙病的实时实地早期检测和快速诊断技术是防控黄龙病的关键措施之一，目前尚无满

足生产实际要求的技术和产品。本文利用纳米孔测序技术对携带黄龙病菌叶片样品的 DNA 进行测序, 并利用 Blast、GraphMap、minimap2 以及两种 bwa 的比对方法将测序结果比对到黄龙病基因组上, 比对结果均匀的比对到黄龙病菌基因组上, 并未发现严重的偏倚现象, 验证了其测序结果的可靠性。随着技术发展和产品成本的降低, 可以为柑橘黄龙病的检测诊断提供一种新的技术方案。由于本技术能够一次性地对同一样品中混和存在的不同物种基因信息进行灵敏准确的检测识别, 在未来的病虫智能监控系统中整合这一技术, 对收集 (如灯光诱集、机械吸取或扫网采集等) 到的害虫样本进行自动化检测, 以弥补因柑橘木虱虫体过小或损坏难以进行光学识别的不足, 并可同时检测虫体是否携带有黄龙病菌, 对有黄龙病发生风险但尚未有黄龙病实际发生的柑橘种植区提供实时实地的监控与预警, 同样也可用于对其它危险性入侵害虫的监控。

参考文献 (References)

- Bové JM. Huanglongbing: A destructive, newly – emerging, century – old disease of citrus [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2006, 88 (1): 7 – 37.
- Chen CZ, Zeng JW, Zhong Y, *et al.* Research progress on citrus huanglongbing disease [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2013, 40 (9): 1656 – 1668. [程春振, 曾继吾, 钟云, 等. 柑橘黄龙病研究进展 [J]. 园艺学报, 2013, 40 (9): 1656 – 1668]
- Chen DS, Huang H, Wu H, *et al.* Identifying of *Samia ricini* diseases by nanopore sequencing [J]. *Journal of Environmental Entomology*, 2021, 43 (1): 260 – 264. [陈大嵩, 黄鸿, 吴华, 等. 利用纳米孔测序鉴定蓖麻蚕病害 [J]. 环境昆虫学报, 2021, 43 (1): 260 – 264]
- Cao Y, Li W, Chu X, *et al.* Research progress and application of nanopore sequencing technology [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2020, 36 (5): 811 – 819. [曹影, 李伟, 褚鑫, 等. 单分子纳米孔测序技术及其应用研究进展 [J]. 生物工程学报, 2020, 36 (5): 811 – 819]
- Du Y, Zhu ZW, Wang J, *et al.* Construction and annotation of *Ascosphaera apis* full-length transcriptome utilizing nanopore third-generation long-read sequencing technology [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2021, 54 (4): 864 – 876. [杜宇, 祝智威, 王杰, 等. 利用第三代纳米孔长读段测序技术构建和注释蜜蜂球囊菌的全长转录组 [J]. 中国农业科学, 2021, 54 (4): 864 – 876]
- Euskirchen P, Bielle F, Labreche K, *et al.* Same – day genomic and epigenomic diagnosis of brain tumors using real – time nanopore sequencing [J]. *Acta Neuropathol.*, 2017, 134 (5): 691 – 703.
- European Food Safety Authority (EFSA), Parnell S, Camilleri M, *et al.* Pest survey card on huanglongbing and its vectors [J]. *European Food Safety Authority Supporting Publications*, 2019, 16 (4): 1574E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2019>.
- Feng Y, Zhang Y, Ying C, *et al.* Nanoporebased fourth – generation DNA sequencing technology [J]. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 2015, 13 (1): 4 – 16.
- Hall DG, McCollum G. Survival of adult Asian citrus psyllid on harvested citrus fruit and leaves [J]. *Florida Entomologist*, 2011, 94: 1094 – 1096
- Huang AJ. Population Structure of ‘*Candidatus Liberibacter Asiaticus*’ in China Revealed by SSR Markers and Transcriptome Profiling of Sweet Orange Infected with HLB [D]. Chongqing: Southwest University Doctor Thesis, 2014. [黄爱军. 韧皮部杆菌亚洲种简单重复序列 (SSR) 多态性及其侵染甜橙后转录组学研究 [D]. 重庆: 西南大学博士学位论文, 2014]
- Lu JQ, Lim JH, Huang ZQ, *et al.* Identification of citrus fruit infected with huanglongbing based on mixup algorithm and convolutional neural network [J]. *Journal of South China Agricultural University*, 2021, 42 (3): 94 – 101. [陆健强, 林佳翰, 黄仲强, 等. 基于 Mixup 算法和卷积神经网络的柑橘黄龙病果实识别研究 [J]. 华南农业大学学报, 2021, 42 (3): 94 – 101]
- Reinking OA. Diseases of economic plants in South China [J]. *Philippine Agriculture*, 1919, 8: 109 – 135.
- Senol Cali D, Kim JS, Ghose S, *et al.* Nanopore sequencing technology and tools for genome assembly: Computational analysis of the current state, bottlenecks and future directions [J]. *Brief Bioinform*, 2019, 20 (4): 1542 – 1559.
- Warwick DJ, Solonenko N, Moore K, *et al.* Long-read viral metagenomics captures abundant and microdiverse viral populations and their niche-defining genomic islands [J]. *PeerJ*, 2019, 7: e6800.
- Wongsurawat T, Jenjaroenpun P, Taylor MK, *et al.* Rapid sequencing of multiple RNA viruses in their native form [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 260.
- Wang N, The citrushuanglongbing crisis and potential solutions [J]. *Molecular Plant*, 2019, 12: 607 – 609.
- Xu MR, Dai ZH, Kong WW, *et al.* Citrus huanglongbing research based on molecular biology techniques [J]. *Journal of Fruit Science*, 2015, 32 (2): 322 – 334. [许美容, 戴泽翰, 孔维文, 等. 基于分子技术的柑橘黄龙病研究进展 [J]. 果树学报, 2015, 32 (2): 322 – 334]
- Xu MR, Chen YL, Deng XL. Correlations between symptoms of citrus huanglongbing and PCR detection of ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*’ [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2016, 46 (1): 367 – 373. [许美容, 陈燕玲, 邓晓玲. 柑橘黄龙病症状与 “*Candidatus Liberibacter asiaticus*” PCR 检测结果的相关性分析 [J]. 植物病理学报, 2016, 46 (1): 367 – 373]
- Zhang HB, Fan XX, Liu MD, *et al.* Research progress on nanopore sequencing technology in disease detection [J]. *China Animal Health Inspection*, 2021, 38 (6): 82 – 89. [张皓博, 樊晓旭, 刘蒙达, 等. 纳米孔测序技术在疾病检测中的研究进展 [J]. 中国动物检疫, 2021, 38 (6): 82 – 89]
- Zheng Z. Whole Genome Sequencing and Analysis of “*Candidatus Liberibacter Asiaticus*”, the Associated Pathogen of Citrus Huanglongbing [D]. Guangzhou: South China Agricultural University Doctor Thesis, 2017. [郑正. 柑橘黄龙病菌的全基因组测序及分析 [D]. 广州: 华南农业大学博士论文, 2017]