

基于 16S rRNA 和 16S-23S rRNA 基因间隔区序列探讨陆生和 水生螺原体菌株的系统发生关系

毕可然¹, 顾伟², 王文², 阎斌伦¹, 张晓君¹

(1. 淮海工学院海洋学院, 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005)

(2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏省生物资源技术和水生甲壳动物病害重点实验室, 江苏 南京 210046)

[摘要] 采集江苏省养殖池塘内发病的中华绒螯蟹、克氏原螯虾和南美白对虾, 利用已有螺原体 16S rRNA 和 23S rRNA 基因序列保守引物扩增并测序 16S rRNA 和 16S-23S rRNA 基因间隔区序列 (ISRs)。基于已获得的序列和 GenBank 中下载的螺原体序列分别进行同源性比对, 比对的结果分别利用 PAUP 软件和 MrBayes 软件提供的最大似然法和贝叶斯法进行系统发生关系分析。分析结果是: 所有淡水甲壳动物螺原体菌株 *Spiroplasma eriocheiris* (中华绒螯蟹)、*Spiroplasma* sp. CRAYFISH (克氏原螯虾)、*Spiroplasma* sp. SHRMP (南美白对虾) 严格聚为一支, 并且与陆生兔扁虱螺原体 (非凡螺原体) *Spiroplasma mirum* 关系最近, 而与中国报道的陆生植物螺原体菌株 *Spiroplasma* sp. CR-1 (油菜)、*Spiroplasma* sp. CNR-1 (油菜)、*Spiroplasma* sp. CNR-2 (油菜)、*Spiroplasma* sp. CAN-1 (杜鹃花)、*Spiroplasma* sp. CRW-1 (红花酢浆草) 及昆虫螺原体菌株 *Spiroplasma* sp. CH-1 (蜜蜂)、*Spiroplasma* sp. M10 (蜜蜂) 关系较远, 此外, 3 个淡水甲壳动物螺原体菌株与现今唯一报道的海水南美白对虾螺原体 *Spiroplasma penaei* 系统发生关系也很远。因此, 在螺原体属中, 我国发现的淡水甲壳动物螺原体近缘种是非凡螺原体而不是我国陆生昆虫或植物螺原体及美洲的南美白对虾螺原体。

[关键词] 螺原体, 16S rRNA 基因, 16S-23S rRNA 基因间隔区序列, 系统发生关系

[中图分类号] Q939.1 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2011)01-0096-06

Phylogenetic Relationship of Terrestrial and Aquatic Spiroplasmas Inferred From Their 16S rRNA and 16S-23S rRNA Intergenic Spacer Region Sequences

BiKeran¹, GuWei², Wang Wen², Yan Binlun¹, Zhang Xiaojun¹

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, College of Ocean Engineering, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory for Bioresource and Technology and Jiangsu Key Laboratory for Aquatic Crustacean Diseases
School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract The diseased *Eriocheir sinensis*, *Procambarus clarkii* and *Penaeus vannamei* were collected from far ponds in Jiangsu province. The 16S rRNA and intergenic spacer region sequences were amplified and sequenced using the conserved primers of 16S and 23S rRNA gene sequence for *Spiroplasma*. The obtained sequences were aligned combined with the homologous sequences of almost all species in the genus *Spiroplasma*. The alignment results were analyzed by maximum likelihood and Bayesian methods. The results were as follows: all *Spiroplasma* strains from freshwater crustaceans *Spiroplasma eriocheiris* (*Eriocheir sinensis*), *Spiroplasma* sp. CRAYFISH (*Procambarus clarkii*), *Spiroplasma* sp. SHRMP (*Penaeus vannamei*), were strictly clustered as a phylogenetic clade and showed a more closely phylogenetic relationship with *Spiroplasma mirum* than *Spiroplasma* sp. CR-1 (*Brassica campestris*), *Spiroplasma* sp. CNR-1 (*Brassica campestris*), *Spiroplasma* sp. CNR-2 (*Brassica campestris*), *Spiroplasma* sp. CAN-1 (*Rhododendron simsii*), *Spiro-*

收稿日期: 2010-10-22

基金项目: 生物多样性与生物技术江苏省重点实验室开放基金 (164070302104)、淮海工学院校内课题 (KX08046)。

通讯联系人: 王文, 教授, 研究方向: 水生生物病原微生物学。E-mail: njwuwang@263.net

plasma sp. CRW-1 (*Oxalis corymbosa*) and *Spiroplasma* sp. CH-1 (*Apis mellifera*), *Spiroplasma* sp. M10 (*Apis mellifera*), as well as *Spiroplasma penaei*. The closely related species of the *spiroplasma* strains from freshwater crustaceans was not the *spiroplasma* from terrestrial plant, insect or marine *Penaeus vannamei* but *Spiroplasma minus*.

Key words *spiroplasma*, 16S rRNA gene, 16S-23S rRNA intergenic spacer region sequences, phylogenetic relationship

螺原体是 20 世纪 70 年代发现的一类寄生于陆生植物和昆虫的微生物^[1,2], 它们非常独特, 具螺旋结构和运动性, 体积很小, 可以滤过 220 nm 孔径滤膜, 是目前世界上已发现的原核生物中基因组最小却具有自我复制能力的一类微生物. 它们大多数来源于陆生植物和昆虫, 少数种类能引起陆生经济植物和昆虫的病害^[3,4], 长期以来它们的寄主被认为只有陆生植物和昆虫这 2 大类. 在我国, 陈永萱等 1988 年首次报道了从江苏扬州患“爬蜂病”蜜蜂体内分离到的螺原体 *Spiroplasma* sp. CH-1^[5], 1989 年又报道了从江苏南京油菜花表面分离到螺原体 *Spiroplasma* sp. CR-1^[6], 之后他们在国家自然科学基金资助下开展了有关螺原体的免疫学特性、抗生素敏感性和致病性的研究. 2007 年, 阮康勤等在江苏南京患“爬蜂病”的蜜蜂体内也分离到一株蜜蜂螺原体 *Spiroplasma* sp. M10^[7], 之后, 于汉寿^[8]、刘淑园^[9]等分别从江苏南京油菜 (*Brassica napus*)、杜鹃花 (*Rhododendron sinense*)、红花酢浆草 (*Oxalis corymbosa*) 3 种植物花表和黄道蚜蝇昆虫体内分离到 5 株螺原体 CNR-1、CNR-2、CAN-1、CRW-1 和 YY0801, 并对其形态和基本生物学特性进行了初步研究. 另外, 除了国外和国内大量报道的植物和昆虫螺原体外, 2003 年, 王文等在患颤抖病的中华绒螯蟹体内发现了螺原体类微生物^[10], 这是首次在水生环境中发现和分离到螺原体类微生物, 并正式命名为螺原体的新种 *Spiroplasma eriocheiris*^[11]. 继中华绒螯蟹螺原体发现以后, 在曾经患病的中华绒螯蟹养殖池塘内的克氏原螯虾和南美白对虾体内也发现了螺原体类微生物的存在^[12,13], 而且, 柯赫氏法则 (Koch's Rule) 验证、形态学观察和分子生物学分析都证实 3 种不同类甲壳动物来源的螺原体可能是同一个种. 除了我国发现的淡水甲壳动物螺原体外, 国外学者 Nunan 等也在海水养殖的南美白对虾中发现并分离到了螺原体微生物^[14]. 但有关我国陆生动植物螺原体和水生动物螺原体之间关系一直没有报道. 本研究首次基于水生甲壳动物螺原体、我国陆生昆虫和植物螺原体以及 NCBI 上已报道的其他螺原体菌株 16S rRNA 基因和 16S-23S rRNA 基因间隔区序列 (intergenic spacer region sequences, ISRs), 分析探讨了水生动物螺原体和陆生植物或昆虫螺原体的系统发生关系.

1 材料和方法

1.1 实验样本的采集

实验中发病的中华绒螯蟹、克氏原螯虾和南美白对虾分别采集于江苏扬州、高淳、金湖、昆山、宜兴、宝应、溧阳、兴化、山阳、中港、天平和一场等养殖池塘, 采集后的所有样本通过放有冰袋的泡沫盒运回实验室. 按照 Wang 等所描述的螺原体体外分离和培养的方法^[15], 随机从每个池塘濒死甲壳动物体内分离螺原体菌株.

1.2 螺原体菌株基因组 DNA 的提取和 16S rDNA、ISRs 序列的扩增及测序

发病的中华绒螯蟹、克氏原螯虾和南美白对虾样本直接用 Qiagen 公司提供的 DNeasy Tissue Kit 提取基因组 DNA. 分离培养的螺原体菌株经过 CCU 法^[16]获得单克隆菌株, 取 100 μ L 单克隆菌液分别接种到 5 mL 螺原体经典培养基 R2 中 30℃ 恒温扩大培养. 待其生长到对数生长期时, 以 13 000 r/min 4℃ 离心 30 min, 沉淀物用灭菌双蒸水重悬洗涤 2 次, 然后按照 Qiagen 公司提供的 DNeasy Tissue Kit 提取每种螺原体菌株的基因组 DNA. 提取后的基因组 DNA 部分保存在 -20℃ 冰箱内供近期实验使用, 部分保存在 -70℃ 超低温冰箱内供以后实验使用. 16S rRNA 基因和 ISRs 序列扩增引物对为: 16F1 (5'-CTAATACATG-CAAGTCAACG-3') 和 16R1 (5'-TTGCTGATTTCGCGATTACTAG-3'); 16F2 (5'-GGTGCATGGTTGTCGTCAG-3') 和 23R1 (5'-TTCGCTCGCCGCTACTAAG-3')^[13]. PCR 反应体系 30 μ L (1.5 mmol/L Mg^{2+} ; 0.6 mmol/L dNTPs; 引物各 0.5 mmol/L; 1U Taq 酶和模板 DNA 约 100 ng). PCR 反应条件: 95℃ 预变性 5 min, 然后 94℃ 变性 30 s, 65℃ (16F1/16R1) 及 56℃ (16F2/23R1) 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环后, 72℃ 延伸 10 min 补齐. 所有扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 明亮单一的条带用胶纯化试剂盒纯化后送上海 Invitrogen 公司完成双向测序.

1.3 16S rDNA 和 ISRs 序列系统发生分析

测序后获得的螺原体 16S rDNA 和 ISRs 序列分别与 NCBI 数据库中方便下载的螺原体菌株同源序列利用 ClustalX 1.8 软件进行多序列比对^[17], 比对后的序列一方面利用 Mega3.0 软件进行序列同源性分析, 另一方面分别利用 PAUP 4.0b10 软件中的最大似然法 (maximum likelihood ML)^[18] 和 MrBayes 3.0b4 软件中的贝叶斯法 (Bayesian inference BI)^[19] 构建系统发生树。

在系统发生树构建之前, 所有序列分别使用 Modeltest 3.06 软件^[20] 估算其进化最适模型, 估算过程中使用的最大似然参数 (形状参数 α 非变异位点所占比例 pinvar 碱基频率等) 通过 “Akaike Information Criterion (AIC)” 算法完成。原因是 Akaike Information Criterion (AIC) 算法比 hierarchical likelihood ratio tests 算法有更多优点^[21]。ML 法分析所选择的参数是: 启发式搜索 (heuristic search), 100 次重复随机加入序列, TBR branch swapping Bootstrap (100 replicates) 检验各节点的支持率。BI 方法所选择的参数是: 马尔科夫链的蒙特卡洛方法 (Markov chain Monte Carlo process) 设置 4 条链 (3 条热链 1 条冷链) 同时运行。以随机树起始 (start from random trees), 运行 10^6 代 (generations), 每 100 代取样并保存树 1 次。在舍弃老化样本 (burn-in samples) 后, 根据剩余的样本构建严格合意树。BI 树上每个节点的支持率由该节点在这些取样树中出现的百分率表示, 是该节点的后验概率 (posterior probabilities) 的近似值。

2 结果

2.1 16S rDNA 和 ISRs 序列特征

从 12 个不同地理位置随机选择的 56 个样本 (47 个中华绒螯蟹、8 个克氏原螯虾和 1 个南美白对虾) 分别测序拼接整理后 16S rRNA 基因部分序列 1 430 bp ISRs 全部序列 310 bp 23S rRNA 基因部分序列 213 bp 校对中 56 株螺原体 1953bp 序列没有一个碱基差异, 并且与 Bi 等 2008 年已报道的中华绒螯蟹螺原体、克氏原螯蟹螺原体和南美白对虾螺原体同源序列有 100% 相似性。在 40 个螺原体菌株 16S rRNA 基因序列同源性分析中, 中华绒螯蟹、克氏原螯蟹和南美白对虾螺原体与非凡螺原体同源性最高 (99.8%), 第 V III 族 (*S. syphidicola*, *S. chrysopicola*, *S. sp. TAAS*) 次之 (96.4%), 与我国分离到的陆生植物和昆虫螺原体为 96.1% 和 90.3% (*S. sp. CRW-1*), 其他介于 96.0% 和 88.6% 之间。在 37 个螺原体菌株 ISRs 序列同源性分析中, 我国淡水甲壳动物螺原体菌株同样与非凡螺原体同源性最高 (99.0%), 与其他螺原体同源性系数均等于或小于 90%。

2.2 16S rDNA 和 ISRs 序列系统发生分析结果

鉴于随机选择 56 个样本 16S rRNA 基因序列和 ISRs 序列与 Bi 等^[13] 已报道的中华绒螯蟹螺原体、克氏原螯蟹螺原体和南美白对虾螺原体同源序列完全相同, 在基于 16S rDNA 和 ISRs 序列构建系统发生树时, 我们只选择了 Bi 等^[13] 已经上传到 NCBI 数据库中的中华绒螯蟹螺原体、克氏原螯蟹螺原体和南美白对虾螺原体同源序列。

利用 16S rRNA 基因序列构建系统发生树时, Modeltest 3.06 所选择的序列最适模型是: GTR + I + G; Lset Base = (0.283 8 0.195 5 0.281 7); Nst = 6 Rmat = (1.138 5 5.530 6 2.471 4 0.913 4 8.961 4); Rates = gamma Shape = 0.530 3 Pinvar = 0.360 6 基于该模型分别构建了 ML 和 BI 树 (图 1)。从图 1 可知, 3 个淡水甲壳动物螺原体菌株与美洲发现的兔扁虱螺原体 *Spiroplasma mirum* 严格聚为一类, 而与中国报道的所有陆生螺原体菌株关系较远; 在已报道的中国陆生生物螺原体中, 植物螺原体菌株 *Spiroplasma sp. CR-1* (油菜)、*Spiroplasma sp. CNR-1* (油菜)、*Spiroplasma sp. CNR-2* (油菜)、*Spiroplasma sp. CAN-1* (杜鹃花) 及昆虫螺原体菌株 *Spiroplasma sp. CH-1* (蜜蜂)、*Spiroplasma sp. M10* (蜜蜂) 与美国分离鉴定的蜜蜂螺原体 *Spiroplasma melliferum* 严格聚为一类; 而红花酢浆草螺原体菌株 *Spiroplasma sp. CRW-1* 与目前中国报道的昆虫、植物和水生螺原体关系都很远。

利用 ISRs 序列构建系统发生树时, Modeltest 3.06 所选择的序列最适模型是: TM + G; Lset Base = (0.372 7 0.107 9 0.154 8); Nst = 6 Rmat = (1.000 0 3.279 2 1.656 6 1.656 6 4.714 6); Rates = gamma Shape = 1.753 9; Pinvar = 0 基于该模型分别构建了 ML 和 BI 树 (图 2)。该分析进一步表明: 淡水甲壳动物螺原体菌株严格聚类后与美洲兔扁虱螺原体 *Spiroplasma mirum* 聚为一簇。

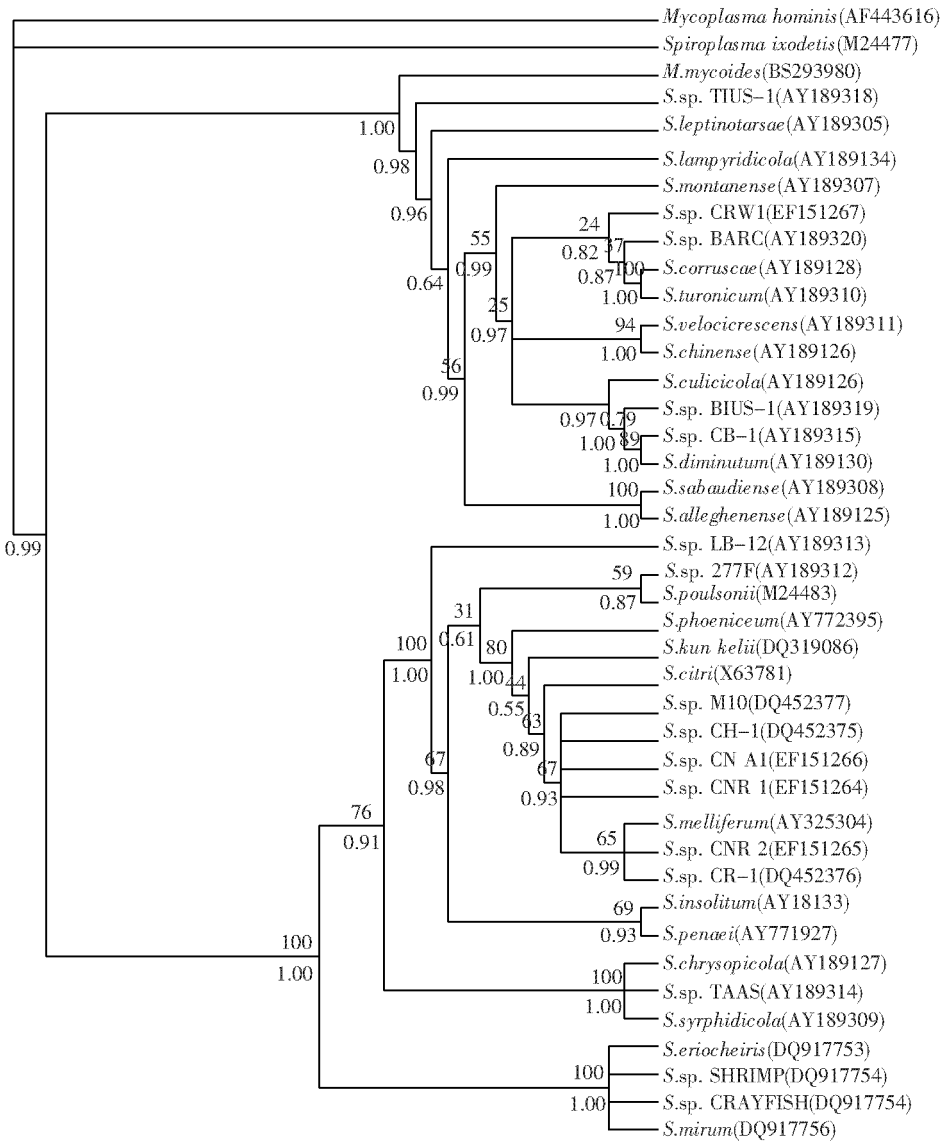


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的最大似然树 (ML) 和贝叶斯树 (BI)

Fig.1 The maximum likelihood (ML) and Bayesian (BI) tree based on the 16S rRNA datasets. *Mycoplasma hominis* was used as outgroup. Numbers above branches are bootstrap values and the numbers below branches represent the posterior probability values of the Bayesian analysis

3 讨论

螺原体是一类营共生、互生和寄生生活的无细胞壁的原核微生物, 通过吮吸植物花粉和筛管液的昆虫, 一些螺原体种可以从一种陆生植物传播到另外一种陆生植物, 在陆生植物以及昆虫寄主间建立完整的循环. 这一结果已被以下的研究所证实: (1) *Spiroplasma citri* 不仅是美国柑橘顽固病的主要病原, 而且也是辣根脆根病和长春花未命名疾病的主要病原, 同时还是最新报道的加利福尼亚胡萝卜紫叶病的主要病原^[22]; (2) 杂食性的甜菜叶蝉 *Circulifer tenellus* 是 *S. citri* 传播到柑橘、辣根、长春花和胡萝卜寄主的主要载体, 在干燥的夏季, 一些被 *S. citri* 感染的甜菜叶蝉会从杂草中转移到经济作物的表面, 使得甜菜叶蝉在经济作物中出现的时间与经济作物螺原体病害发生的时间呈现一致性^[23]; (3) *S. citri* 的螺旋蛋白 *spiralin* 在实现病原粘附到 *Circulifer haematoceps* 的肠和唾液腺上皮细胞上起着关键性的作用^[24]. (4) 基于螺原体属大量物种 16S rRNA 基因构建的系统发生树强烈支持柑橘、油菜花和长春花等螺原体与叶蝉和蜜蜂等螺原体严格聚为一支^[25]. 本研究中的蜜蜂螺原体 *S. sp. CH-1*, *S. sp. M10* 和油菜花螺原体 *S. sp. CR-1*, *S. sp. CNR-1*, *S. sp. CNR-2* 也能在同一时间内使它们的寄主患病, 并且在基于 16S rRNA 和 ISRs 序列构

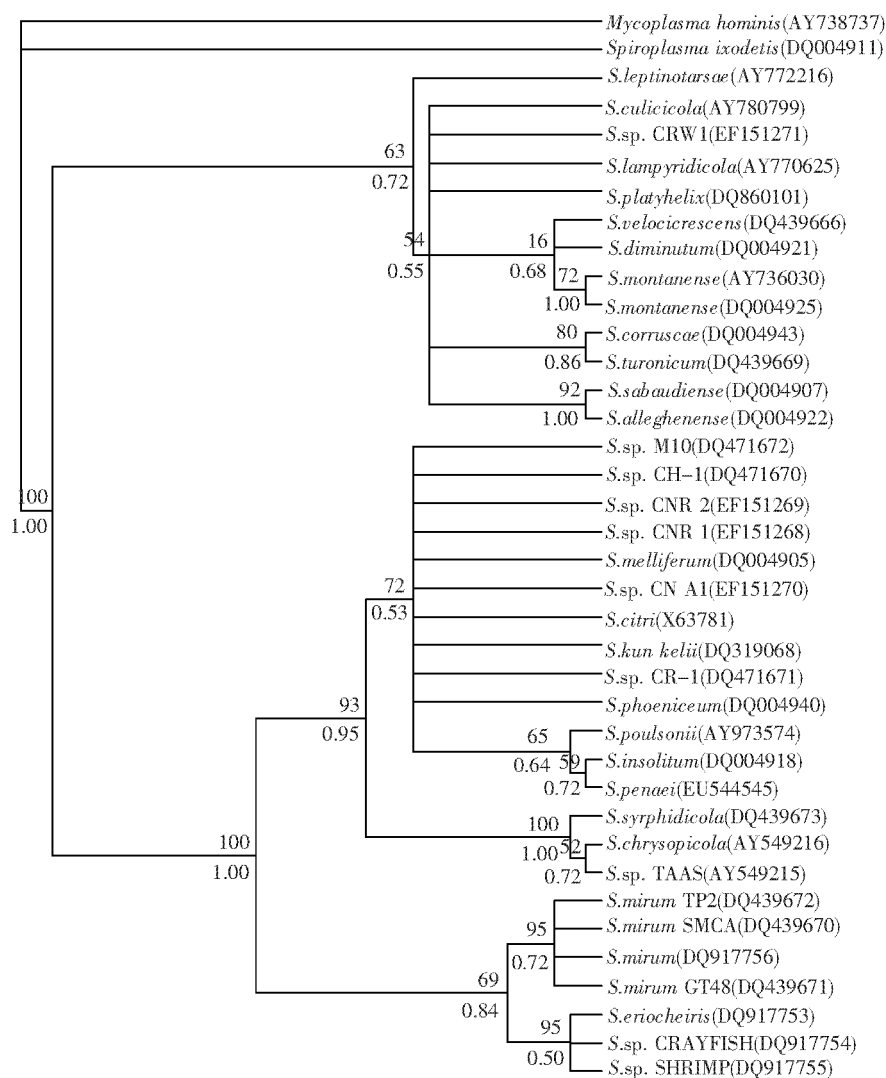


图2 基于16S-23S rRNA 基因间隔区序列构建的最大似然树(ML)和贝叶斯树(BI)

Fig.2 The maximum likelihood (ML) and Bayesian (BI) tree based on the ISRs datasets. *Mycoplasma hominis* was used as outgroup.

Numbers above branches are bootstrap values and the numbers below branches represent the posterior probability values of the Bayesian analysis

建的系统发生树中, 它们也聚为一支, 所以, 在我国江苏发现的蜜蜂和油菜花螺原体也能在陆生寄主间建立完整的循环, 然而蜜蜂螺原体和油菜花螺原体是否是同一个种还需要进一步的研究.

我国自上世纪 90 年代起,随着水产养殖业的迅猛发展,江浙一带的许多农户开始改造庄稼地为水产养殖池塘,大量养殖中华绒螯蟹、南美白对虾和克氏原螯虾等底栖水产甲壳动物,其中有些发病蟹塘就是早期患螺原体病油菜花的种植基地,因此,我们推测水生甲壳动物螺原体可能来自留存在泥土中的植物或昆虫螺原体.然而,我们的研究发现 12 个不同地理来源的 56 株螺原体 (47 个中华绒螯蟹、8 个克氏原螯虾和 1 个南美白对虾的螺原体菌株)不仅与土壤中可能留存的陆生植物和昆虫螺原体关系都很远,而且与南美洲报道的海水南美白对虾螺原体关系也较远.从 16S rRNA 基因和 ISRs 序列构建的系统发生树中可以看出,我国发现的中华绒螯蟹、南美白对虾和克氏原螯虾螺原体都与先前报道的唯一一个可以感染幼年哺乳动物的兔扁虱螺原体 *S. mirum* 严格聚为一支,且与中国发现的所有陆生植物和昆虫螺原体的关系都较远.红花酢浆草螺原体菌株 *Spiroplasma* sp. CRW-1 聚类在 apis 支系,其他陆生植物和昆虫螺原体以及美洲发现的海水南美白对虾螺原体都严格聚在 citri 支系内,而我国发现的中华绒螯蟹、南美白对虾和克氏原螯虾螺原体聚在 minum 支系. *S. minum* 是 Tully 等从美洲兔扁虱体内分离和纯化的病原微生物^[26],那么,我国发现的淡水甲壳动物螺原体为何与兔扁虱螺原体 *S. mirum* 呈现最近的系统发生关系?这些淡水甲壳动物究竟如何被螺原体病原感染的以及螺原体病原如何在淡水甲壳动物间传递等等这些问题还有待进一步的深入研究.

[参考文献]

- [1] Williamson D L, Whitcomb R E. Plant Mycoplasmas: A cultivable Spiroplasma causes corn stunt disease [J]. Science, 1975, 188: 1018-1020.
- [2] Tully J G, Whitcomb R E, Clark H E, et al. Pathogenic mycoplasmas: cultivation and vertebrate pathogenicity of a new Spiroplasma [J]. Science, 1977, 195: 892-894.
- [3] Regassa L B, Gasparich G E. Spiroplasma: evolutionary relationships and biodiversity [J]. Frontiers in Bioscience, 2006, 11: 2983-3002.
- [4] Gasparich G E. Spiroplasma: evolution, adaptation and diversity [J]. Frontiers in Bioscience, 2002, 7: 619-640.
- [5] 陈永萱, 薛宝娣, 郭永红. 蜜蜂螺原体基本性状的研究 [J]. 中国科学 (B 辑), 1988, 2: 149-154.
- [6] 郭永红, 叶旭东, 陈永萱, 等. 一种新的植物花螺原体 (Spiroplasma) 的研究 [J]. 中国科学 (B 辑), 1989, 8: 815-820.
- [7] 阮康勤, 周秀文, 张晶, 等. 蜜蜂螺原体的分离鉴定及致病性研究 [J]. 微生物学通报, 2007, 34(4): 695-699.
- [8] 于汉寿, 阮康勤, 纪燕玲, 等. 3 种植物花螺原体的分离及其基本特性 [J]. 微生物学报, 2008, 48(9): 1141-1146.
- [9] 刘淑园, 于汉寿, 苏萌, 等. 黄道蚜螺螺原体的分离及其基本生物学特性 [J]. 微生物学报, 2009, 49(6): 786-791.
- [10] Wang W, Rong L, Du K, et al. Study on experimental infections of TDA from the Chinese mitten crab in crayfish, mice and embryonated chickens [J]. Research in Microbiology, 2003, 154(10): 677-680.
- [11] Wang W, Gu W, Gasparich G E, et al. *Spiroplasma eriocheiris* sp. nov., a novel species associated with mortalities in *Eriocheir sinensis* Chinese mitten crab [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, doi: 10.1099/ijs.0.020529-0.
- [12] Wang W, Gu W, Ding Z, et al. A novel Spiroplasma pathogen causing systemic infection in the crayfish *Procambarus clarkii* (Crustacea: Decapoda) in China [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 249: 131-137.
- [13] Bi K, Huang H, Gu W, et al. Phylogenetic analysis of Spiroplasma from three freshwater crustaceans (*Eriocheir sinensis*, *Procambarus clarkii* and *Penaeus vannamei*) in China [J]. Journal of Invertebrate Pathology, 2008, 99: 57-65.
- [14] Nunan L, Pantoja C, Salazar M, et al. Characterization and molecular methods for detection of a novel Spiroplasma pathogenic to *Penaeus vannamei* [J]. Diseases of Aquatic Organisms, 2004, 62: 255-264.
- [15] Wang W, Wen B H, Gasparich G E, et al. A Spiroplasma associated with tremor disease in the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) [J]. Microbiology, 2004, 150: 3035-3040.
- [16] 顾伟. 中华绒螯蟹颤抖病病原体的生物学特性 [D]. 南京: 南京师范大学生命科学学院, 2006.
- [17] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 24: 4876-4882.
- [18] Swofford D L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods) [M]. Version 4.0b10. Sunderland: Sinauer Associates, 2002.
- [19] Huelsenbeck J P, Ronquist F M. Bayes: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. Bioinformatics, 2001, 17: 754-755.
- [20] Posada D, Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. Bioinformatics, 1998, 14: 817-818.
- [21] Posada D, Buckley T R. Model selection and model averaging in phylogenetics: advantages of Akaike information criterion and Bayesian approaches over likelihood ratio tests [J]. Systems Biology, 2004, 53: 793-808.
- [22] Melb A F, Wiyadande A C, Yokomi R K, et al. Transmission of different isolates of *Spiroplasma citri* to carrot and citrus by *Circulifer tenellus* (Hemiptera: Cicadellidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 2009, 102(4): 1417-1422.
- [23] Calavan E C, Bove J M. Ecology of *Spiroplasma citri* [M]. New York: Academic Press, 1989: 425-485.
- [24] Duret S, Bertho N, Danet J L, et al. Spinalin is not essential for the helicity, motility or pathogenicity but is required for efficient transmission of *Spiroplasma citri* by its leafhopper vector *Circulifer haematodes* [J]. Applied Environmental Microbiology, 2003, 69: 6225-6234.
- [25] Gasparich G E, Whitcomb R E, Dodge D, et al. The genus *Spiroplasma* and its non-helical descendants: phylogenetic classification, correlation with phenotype and roots of the Mycoplasma mycoides clade [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54: 893-918.
- [26] Tully J G, Whitcomb R E, Williamson D L, et al. Suckling mouse cataract agent is a helical wall-free prokaryote (Spiroplasma) pathogenic for vertebrates [J]. Nature, 1976, 259: 117-120.

[责任编辑: 顾晓天]