

许昌泡桐丛枝病植原体的分子鉴定

李婷婷¹, 史梦蝶¹, 张 宁¹, 赵文军², 孙现超^{1*}

(1. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400716; 2. 中国检验检疫科学研究院 动植物检疫研究所, 北京 100029)

摘要: 对采自河南许昌的表现丛枝症状的泡桐样品进行了病原鉴定, 并通过序列同源性分析确定了其分类地位。采用 16S rDNA 基因的通用引物 R16mF2/R16mR1、R16F2n/R16R2 和延伸因子 (EF-Tu) *tuf* 基因的通用引物 fTufu/rTufu, 对样品总 DNA 进行 PCR 扩增, 分别得到了约 1.2 kb 和 840 bp 的特异条带。经克隆测序, 并在 NCBI 网站比对分析, 确定所得序列分别为植原体特定的 16S rDNA 和 *tuf* 基因序列。将测得序列与已报道的翠菊黄化组植原体序列进行同源性比对, 并构建系统进化树, 显示河南许昌的泡桐丛枝病植原体属于 16Sr I -D 亚组。

关键词: 泡桐丛枝病; 植原体; 16S rDNA 基因; 延伸因子 *tuf* 基因; 系统进化分析

中图分类号: S763.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)02-0078-05

Molecular Detection of Phytoplasma Associated with Paulownia Witches' Broom in Xuchang

LI Ting-ting¹, SHI Meng-die¹, ZHANG Ning¹, ZHAO Wen-jun², SUN Xian-chao^{1*}

(1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China)

Abstract: In this study, the pathogenic agent in paulownia leaves showing witches' broom symptoms collected from Xuchang, Henan province was identified. Universal phytoplasma primer pairs, R16mF2/R16mR1, R16F2n/R16R2 and fTufu/rTufu were used to amplify 16S rDNA and elongation factor (EF-Tu) *tuf* gene by PCR, respectively. Specific fragments about 1.2 kb and 840 bp were yielded in the end. After cloning, sequencing and analysis, the obtained fragments were separately identified as the specific 16S rDNA and *tuf* fragments of phytoplasma. BLAST in NCBI and phylogenetic analysis showed that the phytoplasma causing paulownia witches' broom in Xuchang (PaWB-Xuchang) belonged to 16Sr I -D group.

Key words: paulownia witches' broom; phytoplasma; 16S rDNA gene; elongation factor *tuf* gene; phylogenetic analysis

植原体影响着世界上数百种植物, 其引起的丛枝病由昆虫载体传播, 发生后对作物产量影响严重^[1]。泡桐是原产我国的重要速生用材树种, 不仅在观赏、工业等方面有重要的应用价值, 而且通过我国医药研究证明, 其还具有重要的药用价值。泡桐广泛分布于我国 20 多个省区, 在我国林业产业中具有特殊的重要地位^[2]。泡桐丛枝病最早是 1877 年

在日本记载, 其发病严重, 并已扩散蔓延至广大泡桐种植区。泡桐丛枝病在韩国也有严重发生^[3]。在我国, 除少数泡桐产区外, 普遍都遭受泡桐丛枝病的危害。据调查资料记载, 仅河南省泡桐丛枝病的发病面积就达 33.62 万 hm^2 , 每年造成泡桐木材产量减产 23 万 m^3 , 折合人民币损失约 4 500 万元^[4]。近年来, 泡桐丛枝病的发病率未见降低, 并已经出现发病

收稿日期: 2012-07-12

基金项目: 质检公益性行业科研专项 (200810517); 重庆市自然科学基金项目 (CSTC. 2007BB1349); 农业部公益性行业科研专项 (201203076)

作者简介: 李婷婷 (1988-), 女, 山东肥城人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。E-mail: ffzyltt@163.com

* 通讯作者: 孙现超 (1977-), 男, 河南许昌人, 副教授, 博士, 主要从事分子植物病理学研究。

E-mail: sunxianchao@163.com

树龄降低的趋势^[5]。幼苗发病会造成比成树发病更为严重的损失^[6-7]。

泡桐丛枝病的病原——植原体,由于不能人工培养,使形态学鉴定无法进行。随着分子生物学技术的发展,自20世纪80年代初,分子生物学手段广泛应用于植原体的检测与鉴定,极大地推动了丛枝病的研究。PCR技术在植原体检测的应用始于Deng等对翠菊黄化病植原体的检测^[8],该技术为广泛检测植物和昆虫植原体提供了可能^[9]。基于保守序列16S rDNA的分析,植原体已经被划分为至少15个组和超过38个亚组^[10]。而延伸因子(EF-Tu)*tuf*基因的保守但相对增强的可变性,更适合于研究亲缘关系比较近的亚组及株系的划分^[11]。

本研究采集了河南省许昌市表现丛枝症状的泡桐病叶,用植原体的16S rDNA通用引物和*tuf*基因通用引物对病叶基因组进行PCR扩增,目的片段克隆后测定序列并进行同源性分析,以期明确造成许昌泡桐丛枝病的病原,为泡桐丛枝病植原体致病分子机制和遗传本质的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

泡桐健康和丛枝病叶样品采自河南省许昌市。凝胶回收试剂盒Universal DNA Purification Kit购自天根科技有限公司;载体pGEM-T Easy Vector购自Promega公司;感受态细胞Trans1-T1 Phage Resistant购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 样品总DNA提取

参照改进的CTAB法^[12]提取健康和丛枝病泡桐样品的总DNA。

1.3 PCR扩增

扩增16S rDNA:以总DNA为模板,利用植原体16S rDNA通用引物^[13] R16mF2 (5'-CATG-CAAGTCGAACGGA-3')/R16mR1 (5'-CTTAAC-CCCAATCATCGAC-3')扩增第1轮,然后以第1轮扩增产物为模板,利用通用引物 R16F2n (5'-AG-GACTGCTAAGACTGG-3')/R16R2 (5'-GCGGT-GTGTACAAACCCCG-3'),扩增第2轮。第1轮的扩增条件为:95℃ 3 min;95℃ 30 s,58℃ 50 s,72℃ 110 s,进行30个循环;最后72℃延伸10 min。第2轮的扩增条件为:95℃ 3 min;95℃ 30 s,53℃ 50 s,72℃ 110 s,进行30个循环;最后72℃延伸10 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,Goldview染色,在紫外灯下成像。

扩增*tuf*基因:利用植原体延伸因子(EF-Tu)*tuf*基因引物 fTufu (5'-CCTGAAGAAAGAGAACGTGG-3')/rTufu (5'-CGGAAATAGAATTGAGGACG-3')为引物^[14],以提取的总DNA及空白对照双蒸水为模板进行扩增。扩增条件为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 1 min,进行35个循环;最后72℃延伸10 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物,Goldview染色,在紫外灯下成像。

1.4 PCR产物回收、克隆以及测序

将PCR扩增产物割胶回收,回收到的片段连接到pGEM-T Easy Vector,4℃过夜。将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1 Phage Resistant,挑选筛选板上的白色菌落培养,经PCR检测,筛选含有目的基因片段的重组克隆,任选1个送到华大基因科技股份有限公司测序。

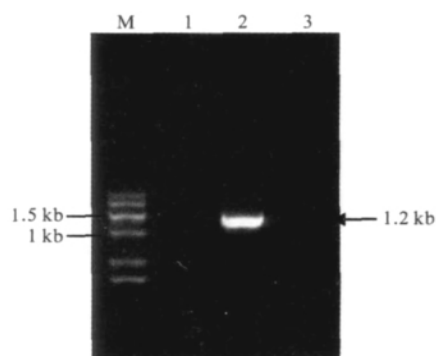
1.5 序列分析

将测得的16S rDNA基因和*tuf*基因序列在NCBI数据库中进行BLAST分析,并用MAGA5与已报道的序列进行同源性比对,构建系统NJ树^[15-16]。

2 结果与分析

2.1 泡桐样品16S rDNA PCR扩增结果

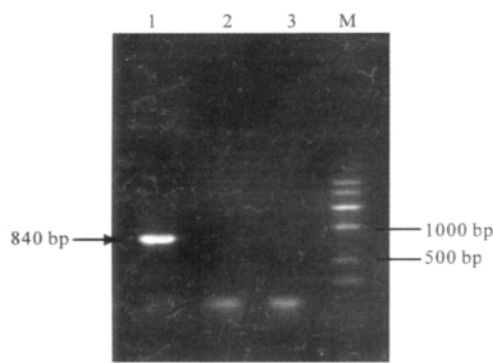
如图1所示,利用16S rDNA通用引物从表现丛枝症状的泡桐样品中扩增出长度约1.2 kb的片段,与预期目标片段大小相符^[17],而从健康泡桐总DNA和双蒸水中均未扩增出特异条带。说明表现丛枝症状的泡桐是被植原体感染。



M. Bio Marker V; 1. 空白对照; 2. 丛枝样品; 3. 健康样品

图1 泡桐样品16S rDNA PCR产物电泳结果

如图2所示,利用*tuf*通用引物从表现丛枝症状的泡桐样品中扩增出长度约840 bp的片段,与预期目标片段大小相符^[14]。而从健康泡桐总DNA和双蒸水中均未扩增出特异条带。



1. 丛枝样品; 2. 健康样品; 3. 空白对照; M. Bio Marker V

图 2 泡桐样品 *tuf* 基因 PCR 产物电泳结果

2.2 泡桐样品 16S rDNA 和 *tuf* 序列分析

2.2.1 16S rDNA 基因序列分析 测序结果表明,泡桐丛枝病植原体 16S rDNA 片段的核苷酸序列长度为 1 246 bp,在 GenBank 上登录此序列(登录号 JX036539),并将其与已登录的其他植原体 16S rDNA 序列进行同源性分析。如表 1 所示,该序列与所报道的翠菊黄化组植原体 16S rDNA I 组 B、C、D 3 个亚组的核苷酸序列同源性较高,均在 99.1% 以上,与其他各组的同源性在 96.2% 以下。因此,可初步判定该组序列属于翠菊黄化 16Sr I 组。

表 1 16Sr 各组代表性植原体 16S rDNA 基因片段的核苷酸同源性比较

16S rDNA 组	植原体病害	GenBank 登录号	核苷酸序列同源性/%
16Sr I -B	Rose Balsam phyllody(RBLPh)	HQ646367	99.6
16Sr I -C	Clover phyllody(CPh)	AF222066	99.1
16Sr I -D	Paulownia witches' broom(PaWB)	DQ851169	99.4
16Sr II	Peanut witches' broom(PnWB)	L33765	89.7
16Sr III	Peach X-disease(PX)	HQ589204	90.1
16Sr IV	Lethal yellows(LY)	EF186822	90.5
16Sr V	Jujube witches' broom(JWB)	AY197661	90.6
16Sr VI	Iranian cabbage yellows(ICY)	EF592606	90.6
16Sr VI	Clover phyllody(CPh)	HQ589189	90.6
16Sr VII	Ash yellows(AshY)	HQ589190	90.4
16Sr VIII	Loofah witches' broom(LfWB)	L33764	87.4
16Sr IX	Pigeon pea witches' broom(PPWB)	EF186826	88.7
16Sr X	Apple proliferation(AP)	AJ430067	91.5
16Sr XI	Rice yellow dwarf(RYD)	D12581	90.0
16Sr XII	Stolbur(STOL)	AY725230	95.9
16Sr XIII	Mexican periwinkle vire(MPV)	AF248960	96.2
16Sr XIV	Beimuda grass white leaf(BGWL)	AF248961	90.3
16Sr XIV	Beimuda grass white leaf(BGWL)	Y16388	88.3

利用 MAGA5 对泡桐丛枝病植原体的 16S rDNA 基因核苷酸序列进行分析,得到该植原体序列与 16Sr 各组代表性序列的系统 NJ 树

(图 3)。从图 3 可以看出,该植原体的 16S rDNA 序列被划分在 16Sr I 组,此结果与同源性比较结果一致。

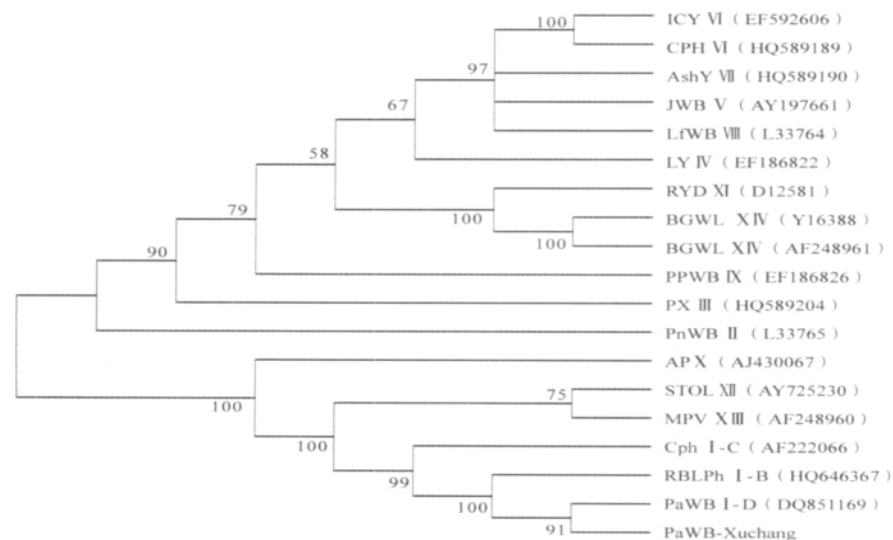


图 3 基于 16S rDNA 序列构建的系统 NJ 树

2.2.2 *tuf* 基因及其编码氨基酸序列的分析 对 *tuf* 基因片段的测序确定了其核苷酸序列长度为 842 bp。通过 DNAMAN 对序列翻译,得到 280 个氨基酸。将氨基酸序列登录 GenBank 进行比对,结果显示,该 *tuf* 基因的扩增产物是延伸因子 EF-Tu。将核苷酸序列登录 GenBank(JX069976),并与已登录的翠菊黄化组各个亚组植原体的 *tuf* 基因进行同源性比较,结果如

表 2 所示,该序列与已报道的 PaWB-NY 株系的 *tuf* 基因核苷酸序列(GQ375569)同源性最高,为 99.9%。对氨基酸序列的同源性比较结果(表 2)显示,其氨基酸序列与 PaWB-NY 株系 *tuf* 编码的氨基酸序列同源性达 100%。因此可以确定,采集的泡桐丛枝病材料的植原体分离物与 PaWB-NY 株系属于同一个亚组,从而确定了该植原体属于 16SrI-D 亚组。

表 2 16Sr I 组中代表性植原体 *tuf* 基因核苷酸及氨基酸序列分析同源矩阵

16Sr I 组	PaWB-Xuchang	A 亚组		SAY (B 亚组)	KVF (C 亚组)	PaWB-NY (D 亚组)	AYA (E 亚组)	Straw2 (F 亚组)	IOWB (G 亚组)
		AYWB	BB						
PaWB-Xuchang	100	98.6	97.9	98.9	98.2	100	97.9	98.6	97.5
AYWB	97.0	100	99.4	98.0	98.0	98.0	97.8	98.6	97.8
BB	96.7	99.1	100	97.8	97.5	97.5	97.2	98.0	97.2
SAY	99.6	96.2	96.6	100	98.3	98.6	98.0	98.6	97.8
KVF	97.0	96.7	97.0	97.0	100	98.0	97.8	98.0	97.5
PaWB-NY	99.9	96.9	95.7	99.3	96.1	100	97.8	98.3	97.5
AYA	96.8	96.6	97.0	97.0	97.4	95.9	100	97.8	97.2
Straw2	97.1	96.6	97.0	97.2	97.3	96.3	97.0	100	98.0
IOWB	98.9	96.1	96.5	99.0	96.8	98.1	96.6	97.1	100

注:对角线右上角为氨基酸序列同源性,左下角为核苷酸序列同源性。

利用 MAGA5 对泡桐丛枝病植原体的 *tuf* 基因核苷酸序列进行分析,得出该植原体序列与 16Sr I 组各亚组的代表性序列的系统 NJ 树(图 4)。从

图 4 可以看出,该植原体的 *tuf* 序列与 PaWB-NY 株系序列为同一亚组,即 16Sr I-D 亚组。此结果与同源矩阵的分析结果一致。

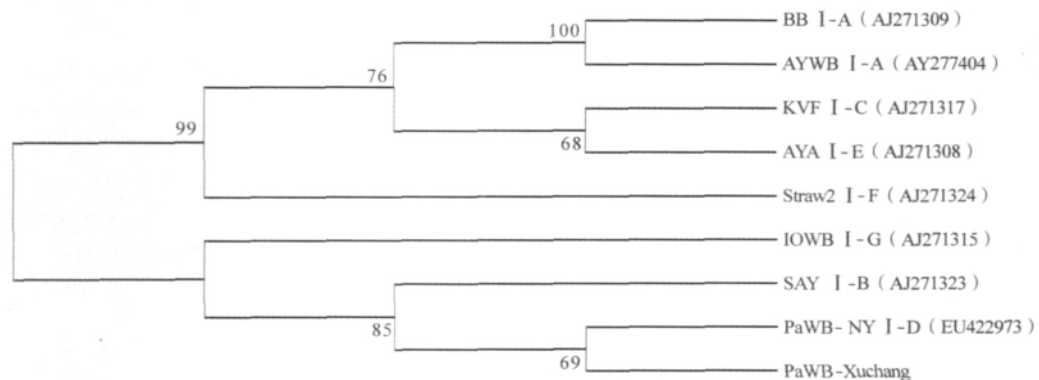


图 4 基于 *tuf* 序列构建的系统 NJ 树

3 结论与讨论

本研究采用植原体 16S rDNA 基因的通用引物,通过巢式 PCR 扩增得到 1 246 bp 的 16S rDNA 片段,并采用植原体 *tuf* 通用引物扩增到了 842 bp 的 *tuf* 基因,说明所采集的表现丛枝症状的泡桐样品是由植原体侵染引起的。该样品的 16S rDNA 核苷酸序列与 16Sr I 组的核苷酸一致性均在 99.1% 以上,*tuf* 核苷酸序列及氨基酸序列与 16Sr I-D 亚组的 PaWB-NY 株系同源性最高,表明采自许昌的

泡桐丛枝病植原体属于 16Sr I-D 亚组。

本研究结果与史英姿等^[18]报道的对河南新乡泡桐丛枝病植原体及 Wang 等^[19]报道的对南阳泡桐丛枝病植原体的研究结果一致,分类上同属于 16Sr I-D 亚组。并且,国内其他省报道的泡桐丛枝病植原体大多都被划分为 16Sr I-D 亚组。但是,和志娇等^[20]报道的云南泡桐丛枝病植原体株系(PaWB-QJ)属于 16Sr I-B 亚组。推测我国泡桐丛枝病植原体存在株系分化。然而,由于采样地域限制及植原体分类的复杂性,我国泡桐丛枝病植原体

是否存在株系分化尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Ruth W. Diseases caused by phytoplasmas[J]. Plant Pathology, 1999, 25(1): 17-22.
- [2] 蒋建平. 泡桐栽培学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1990.
- [3] 田国忠. 泡桐丛枝病植原体与泡桐的生化和分子相互作用[D]. 北京: 中国农业大学, 1999.
- [4] 王洁. 泡桐丛枝病植原体延伸因子 *tuf* 基因分析及其他寄主植物的检测[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.
- [5] Tian G Z, Raychaudhuri S P. Paulownia witches' broom disease in China: Present status[M]//Raychaudhuri S P, Maramorosch K. Forest trees and palms: Diseases and control. New Dehli: Oxford and IBH, 1996: 227-251.
- [6] 李永. 我国几种木本植物植原体的分子检测与鉴定[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2004.
- [7] 卓玛措. 泡桐丛枝病的发病规律及防治措施[J]. 现代农业科技, 2008(11): 156.
- [8] Deng S J, Hiruki C. Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction[J]. Phytopathology, 1991, 81(12): 1475-1479.
- [9] Lee I M, Gundersen D E, Hammond R W, et al. Use of mycoplasma-like organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant[J]. Phytopathology, 1994, 84(6): 559-566.
- [10] Montano H G, Davis R E, Dally E L, et al. "Candidatus phytoplasma brasiliense", a new phytoplasma taxon associated hibiscus witches' broom disease[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51(3): 1109-1118.
- [11] Streten C, Gibb K S. Genetic variation in *Candidatus phytoplasma australiense*[J]. Plant Pathology, 2005, 54(1): 8-14.
- [12] Angelini E, Clair D, Borgo M, et al. Flavescence doree in France and Italy-occurrence of closely related phytoplasma isolates and their near relationships to *Palatinata grapevine* yellows and an alder yellows phytoplasma[J]. Vitis, 2001, 40(2): 79-86.
- [13] 顾沛雯, 吴云峰, 安凤秋. 小麦蓝矮植原体寄主范围的鉴定及 RFLP 分析[J]. 植物病理学报, 2007, 37(4): 390-397.
- [14] Schneider B, Gibb K S, Seemueller E. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas[J]. Microbiology, 1997, 143(10): 3381-3389.
- [15] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.
- [16] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [17] Lee I M, Davis R E, Asu H T. Differentiation of strains in the aster yellows mycoplasma-like organism strain cluster by serological assay with monoclonal antibodies[J]. Plant Disease, 1993, 77(8): 815-817.
- [18] 史英姿, 吴云峰, 顾沛雯, 等. 泡桐丛枝植原体 16S rDNA 和延伸因子基因序列分析[J]. 微生物学通报, 2007, 34(2): 291-295.
- [19] Wang J, Zhu X P, Gao R, et al. Genetic and serological analyses of elongation factor EF-Tu of paulownia witches'-broom phytoplasma (16Sr I -D) [J]. Plant Pathology, 2010, 59(5): 972-981.
- [20] 和志娇, 蔡红, 陈海如, 等. 云南泡桐丛枝病植原体核糖体蛋白基因片段序列分析[J]. 植物病理学报, 2005, 36(5): 18-21.