# 小麦蓝矮病植原体核糖体蛋白基因片段序列分析

张 荣, 崔晓艳, 孙广宇, 康振生
(西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用nested-PCR技术对小麦蓝矮病植原体核糖体蛋白基因片段进行扩增, 并对扩增片段进行了序列测定及分析。结果表明, nested-PCR扩增得到约1.2 kb的特异片段, 经核苷酸序列测定获得小麦蓝矮病植原体核糖体蛋白基因序列(1 136 bp); 小麦蓝矮病植原体(WBD)与16SrⅠ组中的各亚组代表植原体亲缘关系均达到96%以上, 其中与三叶草变叶病植原体(CPh株系)亲缘关系最近, 核苷酸同源性为99.7%, 归为翠菊植原体(*Candidatus* Phytoplasma asteris) 16SrⅠ-C亚组, 该结果与以前报道的利用16S rDNA的分组结果一致, 从亚组水平上进一步确定了小麦蓝矮病植原体的分类地位。

[关键词] nested-PCR; 系统发育; 小麦蓝矮病; 翠菊植原体
[中图分类号] S435.121 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2006)11-0194-05

植原体是一类无细胞壁、存在于植物筛管细胞中的原核生物。自从1967年Doi等报道第一个植原体以来, 全世界已报道1 000多种植物病害与植原体有关[1]。早期对植原体的分类和鉴定主要是通过生物学特性, 如致病性、症状特点、寄主范围与昆虫介体等进行的, 但由于植原体不能进行体外培养, 适用于其他原核生物的种群划分标准在植原体上无法进行。因此, 给不同地域、不同寄主上植原体的区分和命名等造成混乱。20世纪80年代末以来, 随着植原体分子生物学研究技术的突破, 植原体的系统分类研究取得了实质性进展。目前, 利用16S rRNA基因、16S/23S间隔区、核糖体蛋白基因、蛋白延伸因子(*tuf*)等一系列基因序列及RFLP图谱, 已对全世界近300种植原体病害进行了分子鉴定和分类, 并根据植原体16S rRNA基因核苷酸序列及RFLP, 建立了植原体分类体系的基本框架[2]。

16S rRNA基因序列分析对于植原体的分类具有重要意义, 但由于其序列过于保守, 难以对植原体不同亚组, 特别是包括众多成员的翠菊黄化组的进一步划分[1]。与16S rRNA基因相比, 核糖体蛋白(ribosomal protein, rp)基因序列的变异较大, 进化速率较快, 是对亚组分类的有效手段。Gundersen等[3]通过对16SrⅠ组和16SrⅢ组核糖体蛋白基因的RFLP分析表明, 该基因对不同亚组的区分能力较强。

小麦蓝矮病(Wheat Blue Dwarf, WBD)是我国西北地区冬小麦的一种重要病害, 也是我国最早研究的一种小麦"病毒病"[4]。安德荣等[5]、张秦风等[6]根据组织学和抗菌素试验证明, 小麦蓝矮病的病原为植原体。张荣等[7-8]首次从分子水平进一步证明小麦蓝矮病病原物是植原体, 并通过16S rRNA基因序列分析, 明确其病原归属于翠菊植原体(*Candidatus* Phytoplasma asteris, 即16SrⅠ组), 与三叶草变叶病植原体(CPh)关系密切, 为同一亚组(16SrⅠ-C)。

本研究采用nested-PCR技术对小麦蓝矮病植原体核糖体蛋白基因片段进行扩增, 并对扩增片段进行序列测定及分析, 以为进一步确定该植原体的分类地位提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材 料

1.1.1 毒 源 小麦蓝矮病病株采自陕西合阳县发病麦田, 以室内接种产生典型症状的发病病株为供试毒源。阳性对照材料泡桐丛枝病病株采自陕西杨凌。

1.1.2 试 剂 *Taq* DNA聚合酶、dNTP、DNA标准分子量、Tris-苯酚、乙二胺四乙酸(EDTA)、β-

[收稿日期] 2006-09-13
[基金项目] 国家自然科学基金项目(30670013); 教育部"长江学者和创新团队发展计划"创新团队项目(200558); 陕西省自然科学基金项目(99SM03)
[作者简介] 张 荣(1964- ), 女, 陕西榆林人, 副教授, 主要从事植物病理学研究。E-mail: rongzh@nwsuaf.edu.cn
[通讯作者] 孙广宇(1963- ), 男, 陕西洛川人, 教授, 主要从事分子系统学研究。E-mail: sgy@nwsuaf.edu.cn

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

巯基乙醇(βME)、十六烷基三乙基溴化铵(CTAB)等, 均购自北京鼎国生物技术有限责任公司; UNIQ-10柱式PCR产物纯化试剂盒, 由上海生工生物工程技术服务有限公司生产。

### 1.2 方　法

**1.2.1 小麦蓝矮病病株总DNA提取**　总DNA提取参照Lee等[9]的方法, 并略加修改。取小麦蓝矮病病株叶片中脉组织0.5 g, -80 ℃条件下冰冻后充分研磨, 加入1 mL 65 ℃预热的DNA提取液(100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 1.4 mol/L NaCl, 20 mmol/L EDTA, 体积分数2% CTAB, 体积分数0.1% βME), 在65 ℃水浴锅中保温1 h(间隔晃动)后, 加入等体积氯仿∶异戊醇(体积比24∶1), 混匀, 于4 ℃、10 000 *g* 离心10 min, 上清液中加入等体积异丙醇(-20 ℃预冷), -20 ℃静置30 min, 于4 ℃、12 000 *g* 离心10 min, 弃上清液, 沉淀用体积分数70%乙醇洗涤2～3次, 真空干燥后, 溶解于50 μL Tris/EDTA缓冲液(TE)中。泡桐丛枝病病株总DNA和小麦健康植株总DNA提取方法同上。

**1.2.2 核糖体蛋白基因的PCR及nested-PCR扩增**　根据Lee等[10]报道的用于检测16SrⅠ组核糖体蛋白基因的引物对rpF1/rpR1, rp(Ⅰ)F1/rp(Ⅰ)R1(均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成), 分别进行PCR扩增和nested-PCR扩增。引物对序列如下: rpF1(5′-GGA CAT AAG TTA GGT GAA TTT-3′)/rpR1(5′-ACG ATA TTT AGT TCT TTT TGG-3′); rp(Ⅰ)F1(5′-TTT TCC CCT ACA CGT ACT TA-3′)/rp(Ⅰ)R1(5′-GTT CTT TTT GGC ATT AAC AT-3′)。

PCR扩增以泡桐丛枝病病株总DNA为阳性对照, 小麦健康植株总DNA为阴性对照, 超纯水为空白对照。PCR反应体系总体积为25 μL, 其中10×PCR缓冲液2.5 μL, DNA模板10 ng, 200 μmol/L dNTP 0.5 μL, 5 μmol/L引物1 μL, 2 U/μL *Taq* DNA聚合酶0.5 μL。反应条件为94 ℃预变性10 min; 94 ℃ 1 min, 50 ℃ 2 min, 72 ℃ 3 min, 共38个循环; 最后72 ℃延伸7 min。将PCR扩增产物稀释30倍后分别作为DNA模板进行nested-PCR反应。反应条件同上。扩增产物于质量分数1%琼脂糖凝胶中电泳, 经溴化乙锭染色后, 在紫外透射灯下观察、拍照。

**1.2.3 核糖体蛋白基因核苷酸序列测定及分析**　PCR扩增产物经PCR产物纯化试剂盒纯化后, 利用ABI 3700 DNA测序仪进行序列测定(测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成)。

用CLUSTAL X1.8软件[11]对所测定的小麦蓝矮病植原体核糖体蛋白基因核苷酸序列与16SrⅠ组各亚组代表植原体核糖体蛋白基因序列进行比对(Alignment)后, 用系统发育推断软件包PHYLIP 3.5c[12]进行序列分析。采用邻位相连法[12](Neighbor-joining)构建系统发育树, 其中采用DNADIST程序计算进化距离, NEIGHBOR程序构建系统发育树, 合意树运用CONSENSE程序统计获得。对所构建的系统发育树进行自举分析[12](Bootstrap)(重复1 000次), 以估算其内分支的支持率。选择*Acholeplasma laidlawii* (M 74771)为外群。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦蓝矮病植原体核糖体蛋白基因的nested-PCR扩增结果

图1表明, 小麦蓝矮病植原体核糖体蛋白基因的PCR扩增产物稀释30倍后进行nested-PCR, 扩增出的条带最亮, 扩增片段约1.2 kb, 片段大小与Lee等[10]报道的相符, 而小麦健康植株总DNA未扩增出特异条带。进一步证明了小麦蓝矮病植原体归属于植原体16SrⅠ组。

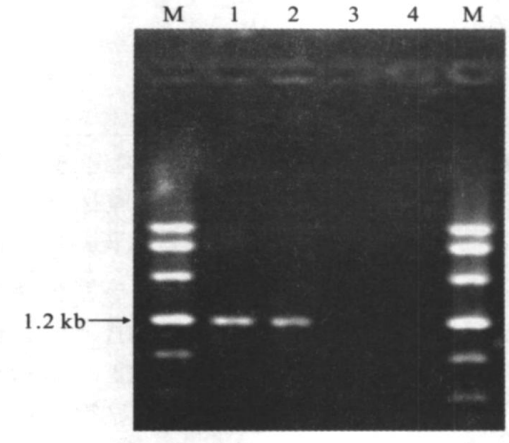


图1　小麦蓝矮病植原体核糖体蛋白基因的nested-PCR扩增结果

1. 小麦蓝矮病; 2. 泡桐丛枝病(阳性对照); 3. 小麦健康植株(阴性对照); 4. 超纯水(空白对照); M. 200 bp DNA标准分子量

Fig. 1　Electrophoresis of nested-PCR products amplified from wheat blue dwarf phytoplasma *rp* gene

1. Wheat blue dwarf; 2. Paulownia witches'-broom (positive control); 3. Healthy wheat leaves (negative control); 4. $ddH_2O$ (control); M. 200 bp DNA ladder marker

### 2.2 小麦蓝矮病植原体核糖体蛋白基因的核苷酸序列分析

经序列测定, 小麦蓝矮病植原体核糖体蛋白基因扩增片段长1 136 bp (GenBank接受号

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

DQ 489535)。用BLAST在GenBank中搜索同源序列,引用Genbank上的植原体的分组与接受号见表1。通过同源性比较可知,小麦蓝矮病植原体(WBD)与16SrⅠ组中的各亚组代表植原体核苷酸同源性均达到96%以上,其中与16SrⅠ-C亚组的三叶草变叶病植原体(CPh株系)序列亲缘关系最近,核苷酸同源性达99.7%(表1)。

表1 小麦蓝矮病植原体与16SrⅠ组相关植原体核糖体蛋白基因序列的同源性比较

Table 1 Homology comparisons of nucleotide sequences of ribosomal protein gene between WBD and related phytoplasmas in 16SrⅠ group

| 16SrⅠ组相关植原体株系 Associated phytoplasma strain | 亚组分类 Subgroup classification | | 同源性/% Homolgy | | 登录号 GenBank accession No. |
|---|---|---|---|---|---|
| | 16SrⅠ组 16SrⅠ gropu | rpⅠ组 rpⅠ group | 16SrⅠ组 16SrⅠ group | rpⅠ组 rpⅠ group | |
| 菊花黄化 *Chrysanthemum* yellows (CHRYM) | A | A | 98.7 | 96.9 | AY264869 |
| 菊花黄化 *Chrysanthemum* yellows (CHRY) | A | A | 99.3 | 96.8 | AY183696 |
| 灰狗木矮化 Grey dogwood stunt (GD1) | A | M | 99.1 | 97.3 | AY264864 |
| 绣球变叶 Hydrangea phyllody (HYDP) | A | A | 99.3 | 96.7 | AY264868 |
| 毛车前绿变 Plantago virescence (PVM) | A | A | 98.8 | 96.9 | AY264868 |
| 番茄巨芽 Tomato big bud (BB) | A | A | 99.2 | 96.9 | AY183686 |
| 甘蓝增生 Cabbage proliferation (CabD3) | B | B | 99.2 | 97.5 | AY183717 |
| 玉米丛矮 Maize bushy stunt (MBS) | B | L | 99.4 | 97.2 | AY264858 |
| 报春花绿变 Primrose virescence (PRIVC) | B | B | 99.2 | 97.4 | AY264854 |
| 三叶草变叶 Clover phyllody (CPh) | C | C | 99.9 | 99.7 | AY264862 |
| 三叶草变叶 Clover phyllody (KVG) | C | C | 99.8 | 99.7 | AY264860 |
| 三叶草变叶 Clover phyllody (KVE) | C | C | 99.9 | 99.7 | AY264861 |
| 泡桐丛枝 *Paulownia* witches'-broom (PaWB) | D | D | 99.1 | 97.4 | AY264857 |
| 蓝莓矮化 Blueberry stunt (BBS3) | E | E | 99.2 | 97.1 | AY264863 |
| 杏褪绿卷叶 Apricot chlorotic leaf roll (ACLR-AY) | F | N | 98.7 | 96.8 | AY264866 |
| 叶蝉传 Leafhopper borne (CVB) | F | N | 98.9 | 96.9 | AY264865 |
| 草莓衰退 Strawberry decline (STRAWB2) | K | J | 99.0 | 97.3 | U96617 |
| 翠菊黄化 Aster yellows (AV2192) | L | B | 99.3 | 97.4 | AY183708 |
| 翠菊黄化 Aster yellows (AV976) | L | B | | 97.4 | AY264856 |
| 翠菊黄化 Aster yellows (AVUT) | M | B | 99.4 | 97.4 | AY264855 |
| 细花牵牛丛枝 *Ipomoea obscura* witches'-broom (IOWB) | N | F | 99.2 | 96.8 | AY264859 |

### 2.3 小麦蓝矮病植原体系统发育树构建与分析

利用软件包PHYLIP 3.5c对植原体核糖体蛋白基因序列进行分析,构建小麦蓝矮病植原体(WBD)与其他21种相关植原体株系核糖体蛋白基因核苷酸序列的系统发育树(图2)。由图2可知,小麦蓝矮病植原体与16SRⅠ组三叶草变叶病植原体CPh株系、KVE株系和KVG株系明显聚为一个亚组,支持强度99%,表明小麦蓝矮病植原体应归为翠菊植原体16SrⅠ-C亚组。与小麦同为禾本科植物的玉米丛矮病植原体MBS株系与小麦蓝矮病植原体被归为不同的亚组,说明两者有明显差别。

## 3 讨 论

小麦蓝矮病在我国西北干旱、半干旱地区晚熟冬麦区间歇性发生危害,近年在麦草覆盖区呈逐渐上升趋势。因此,系统开展其病原学研究对于田间流行学及病害防治具有重要意义。安德荣等[5]、张秦凤等[6]和张荣等[7-8]先后通过形态学、生物学及核糖体16S rRNA基因片段研究证明,小麦蓝矮病的病原为植原体,并初步确定其归属于16SrⅠ-C亚组。本研究将核糖体蛋白基因作为分类标志,进一步对小麦蓝矮病植原体进行了系统分类,与张荣等[8]报道的利用16S rRNA基因分类结果一致,证实小麦蓝矮病属于16SrⅠ-C亚组,与三叶草变叶病植原体CPh株系亲缘关系最近,在亚组和种的水平上进一步确定了小麦蓝矮病植原体的分类地位。

在研究小麦蓝矮病植原体与16SrⅠ组各亚组代表植原体的亲缘关系中发现,核糖体蛋白基因与16S rRNA基因的分析结果一致,但用核糖体蛋白基因分析各亚组植原体之间的同源性均低于16S rRNA基因,说明植原体核糖体蛋白基因较16S rRNA基因具有更大的变异性,对于亚组划分能够提供更多的信息,这些差异也有可能被用于今后特异引物的设计。

目前国际上对植原体的分类命名采用贯以*Candidatus*(候选种)的暂时分类系统。迄今已正式

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

发表了 24 个植原体种。翠菊植原体(*Candidatus* Phytoplasma asteris)是在翠菊黄化植原体组即16Sr Ⅰ组基础上建立的[10]。翠菊黄化植原体组(16Sr Ⅰ组)是植原体中寄主范围最广, 多样性最大的一组。通过 16S rDNA 核糖体蛋白基因序列分析结果表明, 小麦蓝矮病植原体应该属于翠菊植原体*C.* P. asteris。因此, 建议规范小麦蓝矮病植原体的表述方法。具体表述如下。

病害名称: 小麦蓝矮病,

中文学名: 翠菊植原体小麦蓝矮株系,

拉丁学名: *Candidatus* Phytoplasma asteris wheat blue dwarf strain,

中英文俗名: 小麦蓝矮植原体(Wheat Blue Dwarf phytoplasma, WBD)。

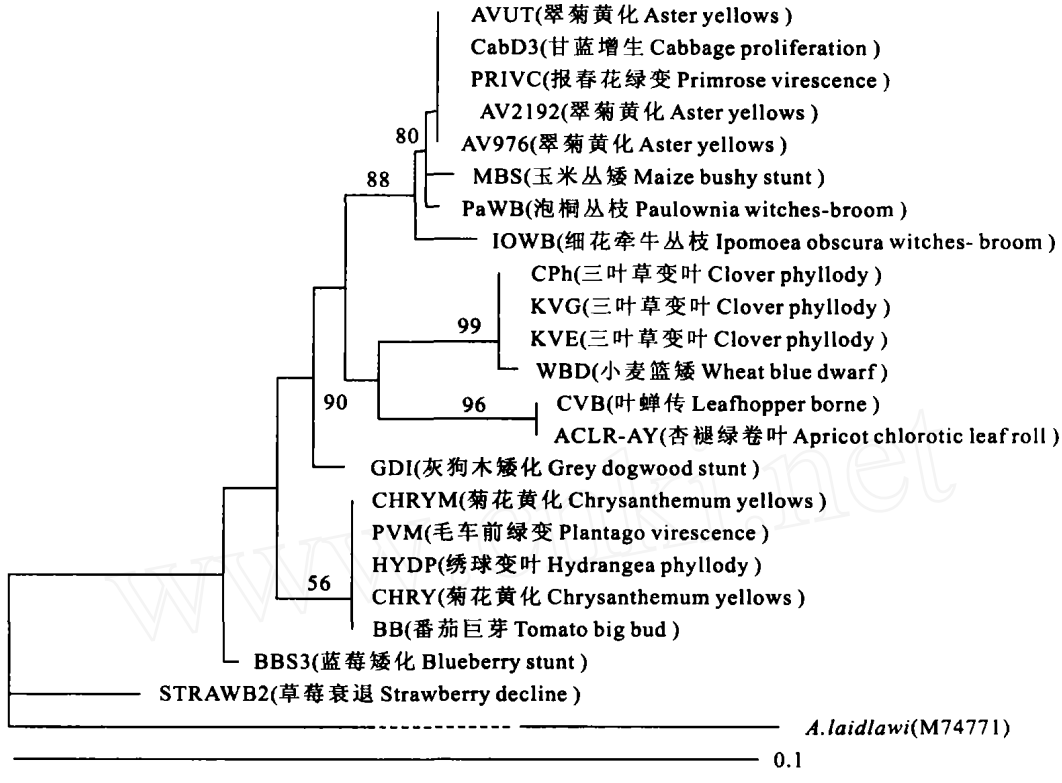


**图 2　小麦蓝矮病植原体及相关植原体株系核糖体蛋白基因核苷酸序列的系统发育树**

**分支处的数值为支持强度值(%), 显示支持强度大于 50% 的分支强度值,*Acholeplasma laidlawii* (M 74771)为外群**

Fig. 2　Phylogenetic tree based on ribosomal protein (rp) gene sequences from wheat blue dwarf phytoplasma and related phytoplasma strains

Bootstrap values > 50% are shown on branches. *Acholeplasma laidlawii* (M 74771) was employed as the outgroup to root the tree.

## [参考文献]


[1] Seemuller E, Marcone C, Lauer U, et al. Current status of molecular classification of the phytoplasmas[J]. Journal of Plant Pathology, 1998, 80: 3-26.

[2] Lee IM, Gundersen-Rindal D E, Davis R E, et al. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 1998, 48(4): 1153-1169.

[3] Gundersen D E, Lee IM, Schaff D A, et al. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in the 16S rRNA groups Ⅰ (aster yellows and related phytoplasmas) and Ⅲ (X-disease and related phytoplasma)[J]. Int J Syst Bacter, 1996, 46: 64-75.

[4] 裘维蕃. 植物病毒学[M]. 北京: 农业出版社, 1982.

[5] 安德荣, 魏宁生, 张秦凤, 等. 小麦蓝矮病病原物——类菌原体的初报[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 263-266.

[6] 张秦凤, 张　荣, 任之英, 等. 类菌原体引起的小麦蓝矮病[J]. 微生物学报, 1993, 33(5): 361-364.

[7] 张　荣, 孙广宇, 张雅梅, 等. 小麦蓝矮病植原体的分子生物学检测研究[J]. 中国农学通报, 2005, 21(8): 318-320.

[8] 张　荣, 孙广宇, 张雅梅, 等. 小麦蓝矮病植原体16Sr DNA 序列分析研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 397-402.


© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[9] Lee IM, Hammond R W, Davis R E, et al. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms[J]. Phytopathology, 1993, 83(8): 834-842.

[10] Lee IM, Gundersen D E, Davis R E, et al. *Candidatus* Phytoplasma asteris, a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54(4): 1037-1048.

[11] Thompson J D, Gibson T J, Higgins D G. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876-4882.

[12] Felsenstein J. Phylip: phylogeny inference package and manual, 3.5c[M]. Seattle: Department of Genetics, University of Washington, 1993.

# Sequence analysis of ribosomal protein gene of phytoplasma associated with wheat blue dwarf

**ZHANG Rong, CUI Xiao-yan, SUN Guang-yu, KANG Zhen-sheng**

(*College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

**Abstract**: Ribosomal protein gene shows higher sequence variability than the 16S rRNA gene and is more suitable for differentiation and classification of phytoplasma in subgroup level. A 1.2 kb or so fragment in ribosomal protein gene was amplified by nested PCR with primer pair rpF1/rpR1 followed by primer pair rp(Ⅰ)F1/rp(Ⅰ)R1 from the total DNA sample extracted from diseased wheat. Sequencing the PCR products, the near all length nucleotide sequence (1 136 bp) of the ribosomal protein gene was got. A Neighbor-joining tree based on ribosomal protein gene sequences was constructed and showed that wheat blue dwarf phytoplasma was clustered into the *Candidatus* Phytoplasma asteris, subgroup 16SrⅠ-C, and was of high homology with *Candidatus* Phytoplasma asteris CPh strain. This result confirmed classification status of wheat blue dwarf phytoplasma in subgroup level and provided theoretical foundation for future identification and detection.

**Key words**: nested-PCR; systematic development; wheat blue dwarf (WBD); *Candidatus* Phytoplasma asteris

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net