

海南苦楝丛枝病植原体核糖体蛋白 基因片段序列分析

车海彦,刘先宝,符瑞益,叶莎冰,罗大全

(中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所,海南省热带农业有害生物检测监控重点实验室,海南 儋州 571737)

【摘要】【目的】利用分子生物学方法分析采自海南儋州的苦楝丛枝病植原体核糖体蛋白(rp)基因,从亚组水平上确定苦楝丛枝病植原体的分类地位。【方法】利用植原体核糖体蛋白基因通用引物对 rpF1/rpR1,应用 PCR 技术对苦楝丛枝病植原体的核糖体蛋白基因进行扩增,对其核苷酸序列进行测定并分析。【结果】通过 PCR 扩增得到约 1.2 kb 的特异片段,测序结果表明该片段长 1 240 bp,包括 *rps19* 基因的 3'区域, *rpl22* 和 *rps3* 基因的全部区域。进一步分析发现,该片段与苦楝丛枝病贵州株系(Chinaberry witches'-broom, CWB-GZh)的亲缘关系最近,核苷酸同源性达 99.9%。基于核糖体蛋白基因核苷酸序列,构建了海南苦楝丛枝病植原体与其他 18 个已知分类地位植原体的系统分类树状图,结果表明,引起海南苦楝丛枝病的植原体与 16Sr I-B 亚组植原体越南苦楝黄化、苦楝丛枝贵州株系和苦楝丛枝云南株系在同一条进化枝上。【结论】报道了海南苦楝丛枝病植原体的核糖体蛋白基因序列,海南苦楝丛枝病植原体属于 16Sr I-B。

【关键词】 苦楝丛枝病;植原体;核糖体蛋白基因;序列分析

【中图分类号】 S718.87

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2008)12-0083-05

Sequence analysis of ribosomal protein gene of phytoplasma associated with Chinaberry witches'-broom in Hainan Province

CHE Hai-yan, LIU Xian-bao, FU Rui-yi,
YE Sha-bing, LUO Da-quan

(Environment and Plant Protection Institute, CATAS; Key Laboratory for Boleful Biology Detection and Monitor of
Tropical Agriculture of Hainan Province, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: 【Objective】 The study analyzed the phytoplasma rp gene of Chinaberry witches'-broom (CWB) samples which were collected in Danzhou of Hainan Province. This study can differentiate and classify phytoplasma of CWB from subgroup. 【Method】 Universal primers(rpF1/rpR1) for phytoplasma ribosomal protein gene were used to amplify DNA samples extracted from infected Chinaberry tree, then the amplified fragment was sequenced and analysed. 【Result】 A 1.2 kb or so fragment was amplified in DNA samples extracted from diseased chinaberry tree samples, but not in those extracted from healthy plants. Sequence analysis of the amplified fragment indicated that the amplified ribosomal protein gene fragment consisted of 1 240 bp, containing part of *rps19*, *rpl22* and *rps3* genes. It had the highest sequence identity (99.9%) with chinaberry witches'-broom phytoplasma strain Guizhou. Homologic tree constructed by a-

* [收稿日期] 2008-01-04

[基金项目] 中国热带农业科学院科技基金项目(Rky0709)

[作者简介] 车海彦(1976—),女,吉林镇赉人,助理研究员,硕士,主要从事热带作物植原体病害研究。

E-mail: chehaiyan2002@yahoo.com.cn

[通讯作者] 罗大全(1968—),男,海南琼海人,副研究员,主要从事热带作物植原体病害研究。

analysis of ribosomal protein gene nucleotide sequences from 19 strains of phytoplasmas showed that Chinaberry witches'-broom strain CWB-Hn, Vietnam chinaberry yellows, Chinaberry witches'-broom strain CWB-GZh, Chinaberry witches'-broom strain CWB-WSh clustered in the same clade. 【Conclusion】 This article reported ribosomal protein gene nucleotide sequences of Chinaberry witches'-broom phytoplasmas strain CWB-Hn, Chinaberry witches' broom phytoplasmas strain CWB-Hn belonged to subgroup 16Sr I-B.

Key words: Chinaberry tree witches'-broom; phytoplasma; ribosomal protein gene; sequence analysis

苦楝(*Melia azedarach* L.)是我国南方优良的用材树种之一,也可作为绿化树种。苦楝丛枝病(Chinaberry witches'-broom, CWB)在我国 80 年代初就有相关的报道^[1-3],在广东、海南、福建、浙江、江西、安徽等省的苦楝种植区均有发生,严重林段发病率达 50% 以上,常造成苦楝大量死亡,已成为部分地区发展苦楝种植及成片造林的严重阻碍^[4]。

在国内,张景宁^[1]早在 1980 年就通过电镜观察及传毒试验证明,苦楝簇顶病是由类菌原体引起的,可通过叶蝉和嫁接传播,并不是病毒所致。邱并生等^[5]根据 16S rDNA RFLP 将采自广东的 CWB 植原体归入翠菊黄化组中;李永^[6]通过 16S rDNA 的异源双链迁移率分析(Heteroduplex mobility assay, HMA)和序列分析,认为江西苦楝丛枝病植原体株系应归属于翠菊黄化组 16Sr I-B 亚组;和志娇^[7]对采自云南和贵州两个省份的苦楝丛枝病样品进行研究,结果表明,这两种植原体株系均属于翠菊黄化组 B 亚组(16S rI-B, rp-B)。

关于苦楝感染植原体相关的研究国外也有报道。Galdeano 等^[8]和 Arneodo 等^[9]等分别对阿根廷的苦楝黄化和衰退病进行了研究,表明二者均属于 16Sr XIII 组;Harrison^[10-11]等的研究表明,南美洲玻利维亚的苦楝黄化衰退病和越南的苦楝黄化病植原体分别属于 16Sr XIII -C 亚组和 16Sr I-B 亚组。目前,有关从亚组水平确定苦楝丛枝病植原体分类地位的研究较少。

为进一步从亚组水平确定苦楝丛枝海南株系(Chinaberry witches'-broom strain Hainan, CWB-Hn)的分类地位,本研究采用 PCR 技术对 CWB-Hn 基因组中,用于亚组分类的核糖体蛋白(rp)基因片段进行扩增,并对扩增产物进行了克隆测序及分析,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 苦楝丛枝病植原体样品的来源

表现典型丛枝病症状(叶片变小、丛生)和健康

的苦楝样品,均采自海南省儋州地区。

1.2 苦楝丛枝病植原体总 DNA 的提取

参照顾沛雯等^[12]的方法提取植物样品总 DNA,于-20℃冰箱保存备用。

1.3 PCR 扩增、克隆及序列测定

根据 Lim 等^[13]报道的引物对 rpF1/rpR1 扩增,苦楝丛枝病植原体的核糖体蛋白基因,引物对序列如下, rpF1: 5'-GGACATAAGTTAGGTGAATTT-3'; rpR1: 5'-ACGATATTTAGTTCTTTTGG-3'。引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

PCR 反应体系为(25 μL): 10 × Buffer (含 Mg²⁺)2.5 μL, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L)2.0 μL, 引物 rpF1 (20 μmol/L)1 μL, 引物 rpR1 (20 μmol/L)1 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.125 μL, 无菌双蒸水 18.375 μL; PCR 反应条件如下: 94℃变性 1 min, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 1.5 min, 循环 35 次;最后 72℃延伸 10 min。以健康苦楝植株总 DNA 和无菌双蒸水为对照。

PCR 扩增出的目标产物均由 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 纯化回收,克隆入 pMD18-T Simple 载体中,利用 PCR 反应筛选阳性克隆,序列测定委托上海英骏生物技术有限公司完成。

1.4 苦楝丛枝病植原体核糖体蛋白基因的核苷酸序列分析

利用国际基因数据库 GenBank 中的 BLAST 程序,对测序结果进行同源性检索,通过 DNAMAN 6.0 软件进行同源性比较并构建进化树。

2 结果与分析

2.1 感丛枝病苦楝植株样品的 PCR 检测结果

从表现丛枝病症状的海南苦楝植株样品总 DNA 中扩增到大小约 1.2 kb 的特异片段,片段大小与 Lim 等^[13]报道的相符,而健康苦楝植株和双蒸水对照均未出现特异扩增带(图 1)。

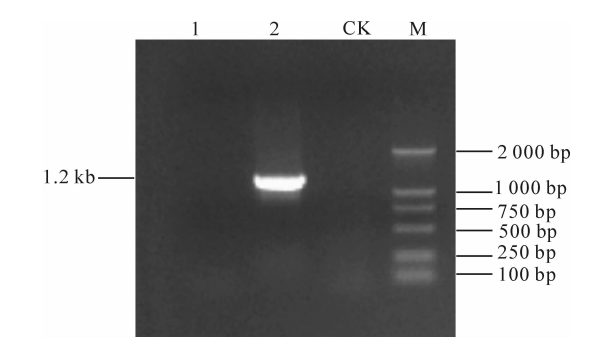


图 1 苦楝丛枝病株样品的 PCR 检测结果
1. 健康苦楝植株;2. 感丛枝病苦楝植株;
CK. 双蒸水空白对照;M. DL2000 分子标记

Fig. 1 PCR detection of the diseased *Melia azedarach* L.
1. Healthy *Melia azedarach* L. ;2. Diseased *Melia azedarach* L.
sample;3. Blank control;M. DL2000 Marker

2. 2 苦楝丛枝病植原体核糖体蛋白基因片段的序
列分析

对 2. 1 扩增到的特异片段经纯化、克隆、测序，

结果表明,苦楝丛枝病植原体核糖体蛋白基因扩增
片段含有 1 240 个核苷酸 (GenBank 登录号为
EU348781),G + C 含量为 47. 2 %。该序列包括
rps19 基因的 3' 区域 (1nt ~ 81nt),*rpl22* (102 nt ~
491 nt) 和 *rps3* 基因 (475 nt ~ 1 233 nt) 的全部区
域。*rpl22* 基因使用 AUG 作为起始密码子,编码
129 个氨基酸;*rps3* 基因使用 GUG 作为起始密码
子,编码 252 个氨基酸,且 *rpl22* 和 *rps3* 基因为重
叠基因,所含的 3 个基因均以 UAA 作为终止密码
子。这些特性均与其他植原体核糖体蛋白基因序列
相似。利用国际基因数据库 GenBank 中的 BLAST
程序,对测序结果进行同源性检索,结果表明,海南
苦楝丛枝病植原体与 rp I 组中的各植原体核苷酸
同源性均达到 97 % 以上,其中与和志娇^[7] 报道的
16Sr I-B 亚组的苦楝丛枝贵州株系 (Chinaberry
witches'-broom,CWB-GZh) 的亲缘关系最近,核苷
酸同源性达 99. 9 % (表 1)。

表 1 海南苦楝丛枝病植原体与 rp I 组中代表性植原体核糖体蛋白基因核苷酸序列同源性的比较

Table 1 Comparison of nucleotide sequence of ribosomal protein gene between CWB-Hn and typical phytoplasma of rp group			
rp I 组 rp I group	植原体 Associated phytoplasma disease	基因登录号 GenBank Accession No.	同源性 % Homology
A	翠菊黄化 BB 株系 (BB) Aster yellows strain BB	AY183686	97. 7
	绣球变叶 (HYDP) Hydrangea phyllody	AY264869	97. 5
	菊花黄化 (CHRYM) Chrysanthemum yellows	AY264868	97. 7
	毛车前绿变 (PVM) Plantago virescence	AY264867	97. 7
	翠菊黄化 Chry 株系 (Chry) Aster yellows strain Chry	AY183696	97. 7
	苦楝丛枝贵州株系 (CWB-GZh) Chinaberry witches'-broom strain CWB-GZh	DQ648461	99. 9
	苦楝丛枝云南株系 (CWB-WSh) Chinaberry witches'-broom strain CWB-WSh	DQ648460	99. 8
	越南苦楝黄化 (VCY) Vietnam chinaberry yellows	DQ321823	99. 8
C	小麦蓝矮 (WBD) Wheat blue dwarf	EF417591	97. 3
	三叶草变叶 KVG 株系 (KVG) Clover phyllody strain KVG	AY264860	97. 5
	三叶草变叶 CPh 株系 (CPh) Clover phyllody strain CPh	AY264862	97. 4
D	泡桐丛枝 (PaWB) Paulownia witches'-broom	AY264857	99. 7
E	蓝莓矮化 (BBS3) Blueberry stunt	AY264863	98. 3
F	叶蝉传 (CVB) Leafhopper-borne	AY264865	97. 2
	杏褪绿卷叶 (ACLR-AY) Apricot aster yellows	AY264866	97. 3
K	草莓衰退 (STRAWB2) Strawberry decline	U96617	98. 1
N	细花牵牛丛枝 (IoWB) Ipomoea obscura witches'-broom	AY26485	98. 6
M	灰狗木矮化 (GD1) Grey dogwood witches'-broom	AY264864	98. 3

2.3 苦楝丛枝病植原体系统发育树的构建与分析

基于核糖体蛋白基因核苷酸序列,采用 DNA-MAN6.0 软件构建了海南苦楝丛枝病植原体和其他 18 个已知分类地位植原体的系统分类树状图(图

2)。由图 2 可知,苦楝丛枝海南株系植原体与属于 16Sr I-B 组植原体的越南苦楝黄化、苦楝丛枝贵州株系和苦楝丛枝云南株系在同一条进化枝上。

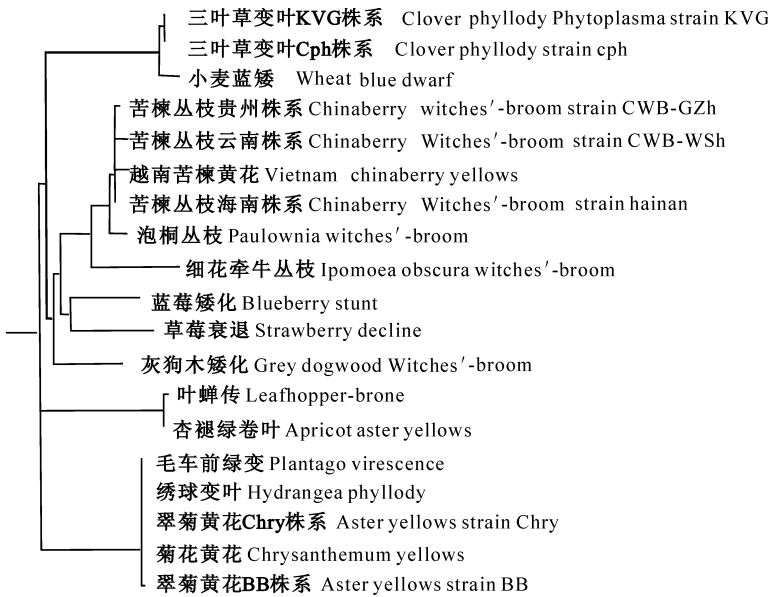


图 2 基于核糖体蛋白基因核苷酸序列构建的 19 种植原体系统分类树状图

Fig. 2 Homologic tree constructed by analysis of ribosomal protein gene nucleotide sequences from 19 strains of phytoplasmas

3 讨 论

由于植原体无法人工培养,传统生物学方法在该类病原物的分类和鉴定中不能很好地发挥作用,在很长的一段时间内限制了植原体病害的研究。随着分子生物学技术的发展,植原体的分子分类学得到了快速发展,16S rRNA 基因序列分析,对于植原体的分类具有重要意义,但随着植原体研究的不断深入,研究者发现 16S rRNA 基因序列过于保守,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行更进一步划分。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,是对亚组进行分类的有效手段。2000 年, Lee 等^[14]建立了以 16S rRNA 和核糖体蛋白基因为基础的植原体分类基本框架,这个分类体系在最近一段时间内仍发挥着重要的作用。由于植原体本身难以人工培养等特点,限制了人们对其生物学特性和基因组的研究,仅仅依靠 16S rRNA、rp 等少数基因序列对植原体进行分类,存在着一定的局限性。尽管目前只获得洋葱黄化植原体(Onion yellows phytoplasma, OY-M, 16SrI-B)^[15]和

翠菊黄化丛枝植原体(Aster yellow witches'-broom, AY-WB, 16SrI-A)^[16]两个株系的全基因组序列,但随着越来越多的植原体基因组序列的测定,植原体分类体系将会进一步完善。

本研究中,海南苦楝丛枝病植原体与和志娇^[7]报道的 16Sr I-B 亚组中的苦楝丛枝病贵州株系(Chinaberry witches'-broom, CWB-GZh)的亲缘关系最近, rp 基因的核苷酸同源性达 99.9%,与 16Sr I-B 组植原体 VCY、CWB-GZh 和 CWB-WSH 在同一条进化枝上,故可认为苦楝丛枝植原体海南株系应属于 16Sr I-B 亚组。本研究进一步确定了引起海南苦楝丛枝的植原体的亚组分类地位,为植原体病害防治提供了理论依据。

[参考文献]

[1] 张景宁. 苦楝簇顶病病原的研究 [J]. 林业科学, 1980, 16(增刊): 92-94.
Zhang J N. Pathogenic study on bunchy top of chinaberry (*Melia azedarach*) [J]. Scientia Silvae Sinicae, 1980, 16 (Supplement): 92-94. (in Chinese)
[2] 金开璇, 蔡希灼, 阿·丝·诺来斯. 苦楝丛枝病类细菌、类菌原体的电镜观察 [J]. 林业科学, 1982, 18(4): 422-424.
Jin K X, Cai X Z, Norris R C. Observatino of bacteriallike or-

- ganisms and mycoplasma-like organisms in melia azedarach with witches'-broom [J]. Scientia Silvae Sinicae, 1982, 18(4): 422-424. (in Chinese)
- [3] 陈作义, 沈菊英, 郑冠标, 等. 海南岛苦楝丛枝病的初步调查研究 [J]. 热带作物学报, 1984, 5(2): 121-123.
Chen Z Y, Shen J Y, Zheng G B, et al. A preliminary study of *Melia azedarach* L. rosette disease on Hainan island [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 1984, 5(2): 121-123. (in Chinese)
- [4] 刘仲健, 罗焕亮, 张景宁. 植原体病理学 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1999: 201-209.
Liu Z J, Luo H L, Zhang J N. Phytoplasma pathology [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1999: 201-209. (in Chinese)
- [5] 邱并生, 李横虹, 史春霖, 等. 从我国 20 种感病植物中扩增植原体 16S rDNA 片段及其 RFLP 分析 [J]. 林业科学, 1998, 34(6): 67-74.
Qiu B S, Li H H, Shi C L, et al. Amplification of phytoplasma 16S rDNA from 20 infected plants in China and their RFLP analysis [J]. Scientia Silvae Sinicae, 1998, 34(6): 67-74. (in Chinese)
- [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.
Li Y. Molecular detection and identification of several different phytoplasmas from woody plants in China [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2004. (in Chinese)
- [7] 和志娇. 两个苦楝丛枝病植原体株系的比较鉴定 [D]. 云南昆明: 云南农业大学, 2006.
He Z J. Comparative identification of two phytoplasma strains associated with chinaberry tree witches'-broom [D]. Kunming, Yunnan: Yunnan Agricultural University, 2006. (in Chinese)
- [8] Galdeano E, Torres L E, Meneguzzi N, et al. Molecular characterization of 16S Ribosomal DNA and phylogenetic analysis of two X-disease group phytoplasmas affecting China-tree (*Melia azedarach* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) in Argentina [J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152, (3): 174-181.
- [9] Arneodo J D, Marini D C, Galdeano E, et al. Diversity and geographical distribution of phytoplasmas infecting China-tree in Argentina [J]. Journal of Phytopathology, 2007, 155(6): 70-75.
- [10] Harrison N A, Boa E, Carpio M L. Characterization of phytoplasmas detected in chinaberry trees with symptoms of leaf yellowing and decline in Bolivia [J]. Plant Pathology, 2003, 52: 147-157.
- [11] Harrison N A, Carpio M L. First report of "Candidatus Phytoplasma Asteris"-related strains infecting chinaberry trees with leaf yellowing symptoms in Vietnam [J]. Plant Disease, 2006, 90: 527.
- [12] 顾沛雯, 安凤秋, 吴云锋, 等. 小麦蓝矮病植原体 16S rDNA 基因片段的比较分析 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 403-411.
Gu P W, An F Q, Wu Y F, et al. Comparison and analysis of 16S rDNA fragment of phytoplasma of wheat blue dwarf [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2005, 35(5): 403-411. (in Chinese)
- [13] Lim P O, Sears B B. Evolutionary relationships of a plant-pathogenic mycoplasma-like organism and *Acholeplasma laidlawii* deduced from two ribosomal protein gene sequences [J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174: 2606-2611.
- [14] Lee I M, Davis R E. Phytoplasma: Phytopathogenic mollicutes [J]. Annual Review Microbiology, 2000, 54: 221-255.
- [15] Oshima K, Miyata S, Sawayanagi T, et al. Minimal set of metabolic pathways suggested from the genome of onion yellows phytoplasma [J]. Journal of General Plant Pathology, 2002, 68: 225-236.
- [16] Bai X D, Zhang J H, Ewing A, et al. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts [J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188: 3682-3696.