

网络出版时间:2014-06-21 18:02

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.07.007

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.07.007.html>

枣疯植原体 *rp* 基因和 *secY* 基因序列分析

张磊^a, 韩翔^b, 隋丹丹^a, 吴景龙^a, 吴云锋^c, 韩崇选^a

(西北农林科技大学 a 林学院, b 理学院, c 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘要】 **【目的】** 基于核糖体蛋白基因(*rp*)和运输蛋白基因(*secY*), 明确了陕西、山西及山东 3 省枣疯植原体的亚组分类地位。**【方法】** 采集陕西、山西及山东 3 省枣产区的枣疯病样品, 提取样品总 DNA; 设计引物对 *rpF1*、*rpF2*、*rpR1* 和 *secF1*、*secF2*, 对枣疯植原体的 *rp* 基因和 *secY* 基因进行 PCR 扩增及核苷酸序列测定与系统发育分析。**【结果】** 获得枣疯植原体的 *rp* 基因和 *secY* 基因, 大小分别为 1 196 和 1 421 bp。序列比对结果表明, 陕西、山西及山东 3 个省枣疯植原体的 *rp* 基因和 *secY* 基因序列均一致; 系统发育分析表明, 这 3 省的枣疯植原体与樱桃致死黄化植原体(CLY5)和桃树黄化植原体印度株系(PY-In)的亲缘关系最近。**【结论】** 以 *rp* 和 *secY* 基因作为植原体 16S rRNA 基因分类系统的辅助分子证据, 将陕西、山西、山东的枣疯植原体归属到 16SrV-B 亚组, 明确三省枣疯植原体的亲缘关系。

【关键词】 枣疯病; 植原体; *rp* 基因; *secY* 基因; 序列分析

【中图分类号】 S436.6

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2014)07-0102-05

Sequence analyses of *rp* and *secY* genes of phytoplasma of jujube witches broom

ZHANG Lei^a, HAN Xiang^b, SUI Dan-dan^a, WU Jing-long^a,
WU Yun-feng^c, HAN Chong-xuan^a

(a College of Forestry, b College of Science, c College of Plant Protection,
Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The subgroups of phytoplasmas of jujube witches broom (JWB) in Shaanxi, Shanxi and Shandong provinces were identified based on the *rp* and *secY* genes. **【Method】** Stem samples of jujube trees with witches broom were collected in Shaanxi, Shanxi and Shandong, and the total DNA of each sample was extracted by CTAB method. Primers of *rpF1*, *rpF2*, *rpR1* and *secF1*, *secF2* were designed to conduct the amplification of *rp* and *secY* genes, the sequences of nucleotides and the phylogenetic analysis. **【Result】** *rp* genes with 1 196 bp and *secY* genes with 1 421 bp of phytoplasmas were obtained. Sequences and phylogeny analyses indicated that the sequences of *rp* and *secY* genes of JWB phytoplasmas in Shaanxi, Shanxi and Shandong were identical. The JWB phytoplasmas in Shaanxi, Shanxi and Shandong were phylogenetically related to phytoplasmas of cherry lethal yellows (CLY5) and peach yellows (PY-In). **【Conclusion】** Based on *rp* and *secY* genes, JWB phytoplasmas in Shaanxi, Shanxi and Shandong were classified into subgroup 16SrV-B.

Key words: jujube witches' broom; phytoplasma; *rp* gene; *secY* gene; sequence analysis

【收稿日期】 2013-05-02

【基金项目】 林业公益性行业科研专项(201004003-4); 教育部长江学者和创新团队发展计划项目

【作者简介】 张磊(1987—), 男, 陕西韩城人, 在读硕士, 主要从事森林有害动物研究。E-mail: zhlcool1121@nwsuaf.edu.cn

【通信作者】 韩崇选(1962—), 男, 陕西西安人, 教授, 主要从事森林有害生物治理研究。E-mail: sendakingcat@nwsuaf.edu.cn

枣树(*Ziziphus jujuba* Mill.)是我国的特色和优势果树,在我国已有 8 000 余年的栽培历史。我国枣产量占世界总产量的 98%,国际贸易量的 100%^[1]。枣疯病(Jujube witches' broom,JWB)是由植原体引起的一种毁灭性检疫病害,一旦发生将引起枣产量下降 30%~80%^[2-4]。20 世纪 50 年代国内外开始对枣疯病进行研究,在病原鉴定、田间传播、病害流行及病害防治等方面取得了很大进展^[1-2,5-6]。近些年,许多学者用 16S rRNA 基因保守序列对植原体病害进行分类研究,将日本、韩国的枣疯植原体划分到 16Sr V 组^[4,7-8]。在我国,王海妮等^[9]用 16S rDNA 保守序列从基因水平上确定了我国陕西、山西和山东枣疯植原体的分类地位属于 16Sr V 组。Lee 等^[8]发现,若用 16S rRNA 基因、*rp* 基因与 *secY* 基因联合分析,能够确定 16Sr 各组中亚组间的系统发育关系。本研究基于 *rp* 基因和 *secY* 基因明确了陕西、山西、山东 3 省间枣疯植原体的关系,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材 料

发生枣疯病的枣树枝条样品采自陕西武功、山西运城和山东聊城。pMD18-T simple vector、H. Q. &. Q. 凝胶回收试剂盒为优品生物工程有限公司产品,*E. coli* JM109 菌株为西北农林科技大学植物保护学院分子病毒学实验室保存。Marker 为大连 TaKaRa 公司的 DL-2000 和 Marker 3。

1.2 枣疯植原体总 DNA 的提取

总 DNA 提取参照 Ahrens 和 Seemüller^[7] 的方法,提取的总 DNA 样品保存于-20 ℃冰箱中备用。

1.3 枣疯植原体 *rp* 和 *secY* 基因的 PCR 扩增

参照 16Sr V 组植原体的 *rp* 基因和 *secY* 基因序列设计合成 5 条特异性引物,由上海基康公司合成:rpF1,5'-TCGCGGTCATGCAAAAGGCG-3';rpF2,5'-TTGCCTCGTTTATTTCCGAGAG-3';rpR1,5'-ACGATATTTAGTTCTTTTTTGG-3';secF1,5'-GAATTAGAACTGTTTGAAGACG-3';secF2,5'-TTTGCTTTCATATCTTGTATCG-3'。*rp* 基因序列采用半巢式扩增,第 1 次扩增以植物总 DNA 为模板,以 rpF1/rpR1 为引物;第 2 次扩增以第 1 次扩增产物为模板,以 rpF2/rpR1 为引物。*secY* 基因采用直接 PCR 扩增,以植物总 DNA 为模板,以 secF1/secF2 为引物。PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳检测。以健康枣树枝条样品为阴性对照,樱

桃致死黄化病样品为阳性对照。

1.4 核苷酸序列测定及分析

纯化 PCR 产物采用优品生物工程有限公司的纯化试剂盒,将回收产物与克隆载体 pMD18-T simple vector 连接,转化 *E. coli* JM109 感受态细胞,经蓝白斑筛选出含有外源片段的重组克隆。含有目标片段的重组克隆由上海捷瑞生物技术有限公司进行序列测定。用在线工具 BLASTn 对 GenBank 数据库进行同源序列检索,DNAMAN5.2.2 推导其氨基酸序列,将枣疯植原体 *rp* 基因和 *secY* 基因序列与已知 16Sr V 组的基因序列进行同源性比较,并得出系统发育进化树。

2 结果与分析

2.1 枣疯植原体 *rp* 基因的序列分析

对陕西、山西、山东 3 个枣区的枣疯病样品总 DNA 进行半巢式 PCR 扩增,凝胶检测结果表明,从 3 个枣区的枣疯样品总 DNA 中均扩增到了 1.2 kb 左右的产物,而健康植株未扩增出特异性条带。从重组质粒 pMD18-T simple vector 中也扩增到与枣疯样品大小相同的产物,约 1.2 kb,说明重组子含有目标外源片段(图 1)。

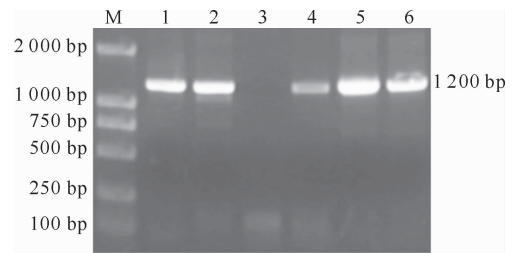


图 1 枣疯植原体 *rp* 基因的凝胶检测结果

1. 樱桃致死黄化病样品(阳性对照);2. 重组质粒;
3. 健康枣树枝条样品(阴性对照);4~6. 分别为陕西、山西、
山东的枣疯病样品;M. DL-2000 DNA Marker

Fig. 1 PCR amplification of *rp* genes of JWB phytoplasmas

1. Cherry lethal yellows disease (positive control);
2. Recombined plasmid;3. Healthy jujube branch
(negative control);4-6. JWB diseases from Shaanxi,Shanxi,and
Shandong,respectively;M. DL-2000 DNA Marker

序列测定结果表明,枣疯植原体 *rp* 基因的大小为 1 196 bp(GenBank 登录号:EU651838);DNAMAN5.2.2 软件分析结果表明,该序列包括部分 *rps19*、*rp122* 和 *rps3* 基因,这 3 个基因均以 UAA 作为终止密码子,其中 *rp122* 和 *rps3* 基因以 AUG 作为起始密码子,分别编码 129 和 252 个氨基酸,这些特性均与其他植原体相似。该核酸序列与 16Sr

V 组植原体的 *rp* 基因序列一致性均达到 96.0%以上,其中与 16Sr V-B 亚组的樱桃致死黄化(CLY5)和桃树黄化印度株系(PY-In)的一致性较大,分别达到 99.2%和 99.4%,而与其他 16Sr 组植原体 *rp* 基因序列的一致性小于 86%(表 1)。

表 1 枣疯植原体与其他植原体 *rp* 基因核酸序列及氨基酸序列同源性比较

Table 1 Comparison of *rp* genes and amino acid sequences of phytoplasmas of JWB and other plants

植原体 Phytoplasmas	16Sr 组-亚组(rp-亚组) 16Sr group-subgroup (rp-subgroup)	<i>rp</i> 基因同源率/% Homology of <i>rp</i> gene	GenBank 登录号 GenBank accession No.
EY1	16Sr V-A(rp-A)	96.2	AY197675
CLY5	16Sr V-B(rp-B)	99.2	AY197679
PY-In	16Sr V-B(rp-B)	99.4	AY197680
ALY	16Sr V-C(rp-C)	96.2	AY197666
RUS	16Sr V-C(rp-E)	96.1	AY197668
PWB	16Sr VI-A(rp-A)	86.6	AY197682
LfWB	16Sr VIII-A(rp-A)	85.6	L27027

注:ALY. 桤树黄化植原体 ALY 株系;CLY5. 樱桃致死黄化 CLY5 株系;EY1. ‘*Candidatus* Phytoplasmaulmi’EY1 株系;PY-In. 桃黄化植原体 PY-In 株系;RUS. 树莓矮缩植原体 RUS 株系;PWB. 马铃薯丛枝原体;LfWB. 丝瓜丛枝植原体。表 2 同。

Note:ALY. Alder yellows phytoplasma strain ALY;CLY5. Cherry lethal yellows phytoplasma strain CLY5;EY1. ‘*Candidatus* Phytoplasma ulmi’ strain EY1;PY-In. Peach yellows phytoplasma strain PY-In;RUS. Rubus stunt phytoplasma strain RUS;PWB. Potato witches’ broom phytoplasma;LfWB. Loofah witches’ broom phytoplasma. Table 2 is same.

2.2 枣疯植原体 *secY* 基因的序列分析

对陕西、山西和山东 3 个枣区的枣疯病样品总 DNA 进行 PCR 扩增,结果表明,陕西、山西和山东 3 个省的枣疯植原体 *secY* 基因的大小均约为 1 400 bp,健康样品未扩增出特异条带,重组质粒经 PCR 扩增后均得到大小相同的产物,约为 1 400 bp,说明重组子含有目标外源片段(图 2)。对含有目标片段的重组质粒测序,结果表明 3 个省的枣疯植原体 *se-*

cY 基因大小均为 1 421 bp (GenBank 登录号:EU651837);DNAMAN5. 2. 2 软件分析结果表明,该序列包括部分 *rp* 基因和 *secY* 基因,其中 *secY* 基因编码 413 个氨基酸。与 16SrV 组亚组株系比对后发现,枣疯植原体与 16SrV 组各株系的一致性达 97%以上,其中与樱桃致死黄化(CLY5)和桃树黄化印度株系(PY-In)的一致性较高,分别为 99.6%和 99.2%,而与其他各组的一致性都在 95%以下(表 2)。

表 2 枣疯植原体与 14 个植原体株系 *secY* 基因序列的同源矩阵

Table 2 Homology matrix of *secY* nucleotide sequences of phytoplasmas of JWB and other 14 strains

植原体 Phytoplasma	同源关系/%Homology relationship														
	JWB	CY	PaWB	ALY882	ALY	CLY5	EY1	EY-626	FD70	FD-C	FD-D	HD1	PY-In	RUS	Spa- WB_229
JWB	100.0														
CY	58.6	100.0													
PaWB	58.5	98.7	100.0												
ALY882	90.0	58.6	58.3	100.0											
ALY	90.4	59.4	59.2	96.7	100.0										
CLY5	99.6	58.7	58.6	90.3	90.6	100.0									
EY1	89.6	57.4	57.5	94.2	93.8	89.8	100.0								
EY-626	89.6	57.4	57.5	94.2	93.8	89.8	99.9	100.0							
FD70	90.6	59.2	59.0	96.7	99.4	90.7	93.8	93.8	100.0						
FD-C	90.1	59.0	58.8	96.8	98.4	90.2	93.8	93.8	98.4	100.0					
FD-D	90.3	59.2	59.0	96.4	99.6	90.5	93.5	93.5	99.3	98.1	100.0				
HD1	89.3	58.4	58.1	95.5	95.3	89.5	93.7	93.7	95.3	95.5	95.0	100.0			
PY-In	99.2	58.8	58.7	89.9	90.2	99.6	89.4	89.4	90.4	89.9	90.1	89.1	100.0		
RUS	89.8	58.6	58.3	97.0	96.0	89.9	93.9	93.9	96.0	96.2	95.5	94.5	89.6	100.0	
SpaWB_229	88.9	58.3	58.2	95.4	95.6	89.0	93.9	93.9	95.7	96.1	95.3	94.0	88.8	94.9	100.0

注:JWB. 枣疯植原体;CY. 菊花黄化;PaWB. 泡桐丛枝植原体;ALY882. 桤树黄化植原体 ALY882 株系;EY-626. 榆树黄化植原体 EY-626 株系;FD70. ‘*Candidatus* Phytoplasma vitis’株系 FD70;FD-C. ‘*Candidatus* Phytoplasma vitis’株系 FD-C;FD-D. ‘*Candidatus* Phytoplasma vitis’株系 FD-D;HD1. 红麻植原体 HD1 株系;SpaWB_229. 鹰爪豆丛枝植原体 SpaWB_229 株系。

Note:JWB. Jujube witches’ broom;CY. Chrysanthemum yellows;PaWB. Paulownia witches’ broom;ALY882. Alder yellows phytoplasma strain ALY882;EY-626. Elm yellows phytoplasma strain EY-626;FD70. ‘*Candidatus* Phytoplasma vitis’ strain FD70;FD-C. ‘*Candidatus* Phytoplasma vitis’ strain FD-C;FD-D. ‘*Candidatus* Phytoplasma vitis’ strain FD-D;HD1. Hemp dogbane phytoplasma strain HD1;SpaWB_229. Spartium witches’ broom phytoplasma strain SpaWB_229.

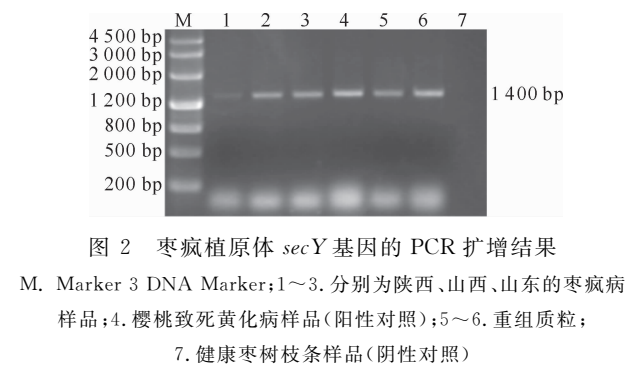


图 2 枣疯植原体 *secY* 基因的 PCR 扩增结果
M. Marker 3 DNA Marker;1~3. 分别为陕西、山西、山东的枣疯病样品;4. 樱桃致死黄化病样品(阳性对照);5~6. 重组质粒;
7. 健康枣树枝条样品(阴性对照)

Fig. 2 PCR amplification of *secY* genes of JWB phytoplasmas
M. Marker 3 DNA Marker;1~3. JWB diseases from Shaanxi, Shanxi, and Shandong, respectively;4. Cherry lethal yellows disease (positive control);5~6. Recombined plasmids;
7. Healthy jujube branch (negative control)

2.3 枣疯植原体同源进化树分析

序列分析发现,陕西、山西、山东 3 省枣疯植原体的 *rp* 和 *secY* 基因均彼此一致。因此以枣疯植原体陕西株系(JWB-Shaanxi)为代表,利用 DNA-MAN 软件进行系统发育分析,将 JWB-Shaanxi 的 *rp* 和 *secY* 基因序列分别与 16Sr V 组 13 个株系的序列进行比对并构建系统发育树状图,结果(图 3)表明,JWB-Shaanxi 株系与 CLY5 和 PY-In 的亲缘关系最近,聚集在同一枝。因此,陕西、山西、山东 3 省的枣疯植原体归到 16Sr V-B 组。

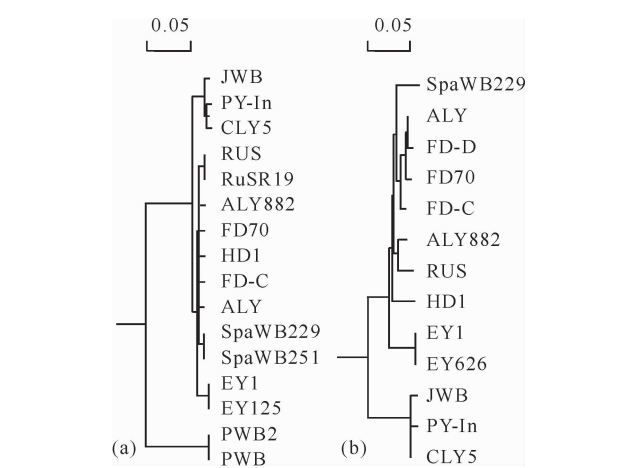


图 3 基于 16Sr V 植原体 *rp* 基因(a)和 *secY* 基因(b)序列构建的系统发育树状图

Fig. 3 Homology tree based on *rp* and *secY* sequences of phytoplasmas of 16Sr V phytoplasma strains

3 讨论与结论

对陕西、山西和山东 3 个省枣疯植原体的 *rp* 基因和 *secY* 基因的序列测定和一致性分析结果表明,3 个省枣疯植原体的 *rp* 基因和 *secY* 基因均彼此一

致,并且与 16Sr V 组的樱桃致死黄化(CLY5)和桃树黄化印度株系(PY-In)的亲缘关系最近。根据该结果,将 3 个省的枣疯植原体划分到 16Sr V-B 亚组,从亚组水平上确定了枣疯植原体的分类地位。该结果与王海妮等^[9]应用 16S rDNA 和 *tuf* 基因对陕西、山西和山东 3 个省枣疯植原体分类的结果一致。枣疯植原体 *secY* 基因与 *rp* 基因一样,也能作为植原体分类系统中的辅助分析,是对国内外用 16S rDNA 基因和核糖体蛋白基因进行分类的一个补充,也是一种可靠而又简便的方法。

20 世纪 90 年代后,国外开始探索植原体蛋白跨膜运输、营养信号物质代谢过程和植原体双层膜内外交换的机理,现在已有对植原体免疫膜蛋白基因(IMP)的报道,如翠菊黄化、甘薯丛枝、苹果丛枝、三叶草绿变和桃西方 X 病^[10-13]。而对于蛋白分泌系统中预测有功能的 *secA*、*secY* 基因报道很少。Economou^[14]认为,在细菌中,至少有 5 种独立的蛋白输出系统,所有这些系统中仅仅蛋白分泌系统对细胞的生存发育能力是必要的^[15]。在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中,蛋白分泌途径被认为是最重要的运输途径^[16]。由于植原体没有细胞壁,蛋白分泌系统可能分泌菌体蛋白直接到寄主细胞质中,这对 *secY* 基因的研究是十分必要的,将有助于对植原体蛋白分泌系统功能的深入研究。

本研究明确了陕西、山西、山东 3 省枣疯植原体 *rp* 基因和 *secY* 基因间的一致性,并依据 *rp* 基因和 *secY* 基因从亚组水平上确定了枣疯植原体的分类地位。

[参考文献]

[1] 温秀军,孙朝晖,田国忠,等. 抗枣疯病枣树品系选育及抗病机理初探 [J]. 林业科技开发,2006,20(5):12-18.
Wen X J, Sun C H, Tian G Z, et al. A preliminary study on the disease-resistant mechanism and selection of varieties in jujube witches' broom [J]. China Forestry Science and Technology, 2006, 20(5): 12-18. (in Chinese)

[2] 赵锦,刘孟军,代丽,等. 枣疯病病树中内源激素的变化研究 [J]. 中国农业科学,2006,39(11):2255-2260.
Zhao J, Liu M J, Dai L, et al. The variations of endogenous hormones in Chinese jujube infected with witches' broom disease [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(11): 2255-2260. (in Chinese)

[3] Yi J C, Lim T H, Cha B. Chang in phytoplasma densities in witches' broom-infected jujube trees over seasons [J]. The Plant Pathology Journal, 2001, 17(5): 295-299.

[4] Lee I M, Gundersen 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]. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, 48(4): 1153-1169.
- [5] 史英姿, 王海妮, 吴云锋, 等. 泡桐丛枝和枣疯病植原体相关基因分析 [C]//中国植物病理学会 2006 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2006: 143.
- Shi Y Z, Wang H N, Wu Y F, et al. Analysis of related genes of phytoplasma of Paulownia witches' broom and jujube witches' broom [C]//2006 Proceedings of the Annual Meeting of Chinese Society for Plant Pathology. Beijing: China Agriculture Sciencetech Press, 2006: 143. (in Chinese)
- [6] 蔡红, 杨根华, 孔宝华, 等. 应用分子生物学方法检测植原体研究进展 [J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(2): 188-191.
- Cai H, Yang G H, Kong B H, et al. Advances in detection of phytoplasmas with mollecular biological methods [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*, 2002, 17(2): 188-191. (in Chinese)
- [7] Ahrens U, Seemüller E. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene [J]. *Phytopathology*, 1992, 82(8): 828-832.
- [8] Lee I M, Martini M, Marcone C, et al. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of '*Candidatus Phytoplasma ulmi*' for the phytoplasma associated with elm yellows [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54(2): 337-347.
- [9] 王海妮, 吴云锋, 安凤秋, 等. 枣疯病和酸枣丛枝病植原体 16S rDNA 和 *tuf* 基因的序列同源性分析 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2200-2205.
- Wang H N, Wu Y F, An F Q, et al. The homology analysis for sequences of 16S rDNA and *tuf* gene of phytoplasma from jujube witches' broom and wild jujube witches' broom [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(10): 2200-2205. (in Chinese)
- [10] Barbara D J, Davies D L, Clark M F. Cloning and sequencing of a major membrane protein from chlorante (AY) phytoplasma [C]. In Proceedings of the 12th International Organisation of Mycoplasmaology, Sydney, Australia. Sydney: International Organisation of Mycoplasmaology, 1998: 183.
- [11] Yu Y L, Yeh K W, Lin C P. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches' broom [J]. *Microbiology*, 1998, 144(5): 1257-1262.
- [12] Berg M, Davies D L, Clark M F, et al. Isolation of the gene encoding an immunodominant membrane protein of the apple proliferation phytoplasma, and expression and characterization of the gene product [J]. *Microbiology*, 1999, 145(8): 1937-1943.
- [13] Blomquist C L, Barbara D J, Davies D L, et al. An immunodominant membrane protein gene from the Western X-disease phytoplasma is distinct from those of other phytoplasmas [J]. *Microbiology*, 2001, 147(3): 571-580.
- [14] Economou A. Following the leader: Bacterial protein export through the Sec pathway [J]. *Trends in Microbiology*, 1999, 7(8): 315-320.
- [15] Kakizawa S, Oshima K, Kuboyama T, et al. Cloning and expression analysis of phytoplasma protein translocation genes [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(9): 1043-1050.
- [16] Tjalsma H, Bolhuis A, Jongbloed J D, et al. Signal peptide-dependent protein transport in *Bacillus subtilis*: A genome-based survey of the secretome [J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2000, 64(3): 515-547.