林业科学研究 2011,24(5):549～553
Forest Research

文章编号:1001-1498(2011)05-0549-05

灰叶丛枝病病原的分子鉴定及系统发育分析

李 永[1], 田国忠[1], 朴春根[1*], 郭民伟[1], 林乐民[2]

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所,国家林业局森林保护学重点实验室,北京 100091;
2. 中国林业科学研究院林业研究所,北京 100091)

摘要:实验应用 PCR 扩增、*i*PhyClassifer 分析、序列同源性及系统发育分析等方法对海南省灰叶丛枝病病害进行了分子检测及其病原的鉴定、系统进化研究。*i*PhyClassifer 结果显示:灰叶丛枝病植原体为花生丛枝组(16SrⅡ组)16SrⅡ-A 成员。序列同源性分析结果表明:灰叶丛枝病植原体与 16SrⅡ、16SrⅡ-A 成员同源性最高,如与花生丛枝病植原体 16S rDNA 的序列同源性为 99.9%,rp 基因为 99.9%。基于 16S rRNA 和 rp 两基因构建的系统发育树显示:灰叶丛枝病植原体与花生丛枝病植原体、甘薯丛枝病植原体起源相同,且关系相当接近。根据以上结果,灰叶丛枝病植原体归为花生丛枝组(16SrII 组)16SrⅡ-A 亚组,与 *Candidatus* Phytoplasma australasiae 候选种相关。

关键词:灰叶丛枝病;植原体;分子鉴定;系统发育

中图分类号:S763 **文献标识码**: A

The Molecular Identification and Phylogeny of Tephrosia Witches'-broom Phytoplasma

LI Yong[1], *TIAN Guo-zhong*[1], *PIAO Chun-gen*[1], *GUO Min-wei*[1], *LIN Le-min*[2]

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: The tephrosia witches'-broom phytoplasma collected from Hainan province was classified and identified by sequencing techniques and *i*PhyClassifer. The results of sequencing and homologuous comparison with other phytoplasmas showed that tephrosia witches'-broom phytoplasma shared 99.9% similarity with peanut witches'-broom phytoplasma in 16S rRNA gene and 99.9% in rp gene. Tephrosia witches'-broom phytoplasma are sorted into Peanut witches'-broom group (16SrⅡ), 16SrⅡ-A, according to the results of *i*PhyClassifer of 16S rDNA, phylogenetic analysis of 16S rRNA and rp gene, which is related to *Ca.* Phytoplasma australasiae.

Key words: Tephrosia witches'-broom; phytoplasma; molecular identification; phylogeny

植原体(Phytoplasma)为无细胞壁原核微生物,专性寄生于植物和昆虫。迄今,世界各地已统计有 1 000 多种植物自然感染植原体病害[1-2],我国也报道了 100 多种植物植原体病害[2-3]。因为植原体尚不能在人工培养基上离体培养,因此,无法使用传统的微生物分类鉴定方法进行鉴定。植原体的生物多样性和基因多样性研究主要依靠血清学、核酸检测和遗传进化保守的基因分析等方法[4]。植原体也像其他原核生物一样,其核糖体 16S rRNA 基因高度保守,1993 年,Lee 等[5]初步建立了以 16S rRNA 基因序列限制性内切酶片段长度多态性分析(RFLP)为基础的稳定的植原体分类鉴定体系。2000 年,Lee 等[6]利用 16S rRNA 基因的 RFLP 分析将植原体属分成 14 个 16Sr 组和一个未确定组,包括 5 个候选

收稿日期: 2010-12-06
基金项目: 中国林业科学研究院森环森保所院所长基金项目(CAFRIFEEP201008);国家科技基础条件平台建设项目(2005DKA21207)
作者简介: 李 永(1978—),男,山东新泰市人,在职博士生,主要从事菌种保藏和林木细菌分子生物学研究.
*通讯作者:Email:cfcc@ caf. ac. cn

种。2004 年,植原体候选种鉴定标准的发表为植原体的分类鉴定提供直接依据[7],如序列同源性方面规定“16S rDNA 序列与已发表候选种的同源性小于 97.5%,可以发表新的候选种”。

近年来,计算机程序模拟 RFLP 分析也得到了利用和发展,Wei 等[8]利用计算机程序模拟 RFLP 分析,将植原体属分成了 28 个 16Sr 组。随后,Zhao 等[4]建立了名为 *i*PhyClassifier 的植原体网络在线分类工具,可以快速查询未知植原体所属的 16Sr 组、亚组和候选种信息。另外,其它保守基因也常用于植原体亚组分类研究,如核糖体蛋白基因(rp)、延伸因子(EF-Tu)*tuf* 基因、SR 间区等,这些基因的保守性较 16S rRNA 基因差,可用于植原体属近缘株系的系统进化和鉴别[6,9]。植原体病害病原菌的快速准确鉴定,对病害防治和病害发生、发展和流行传播机制等相关研究意义非凡。灰叶丛枝病是一种新发现的豆科植物丛枝病害,在海南省发生较为普遍。灰叶(*Tephrosia purpurea*(L.)Pers.)别名灰毛豆、野蓝靛、野青树、假靛青,是豆科灰叶属药用植物,分布于越南、老挝、柬埔寨、缅甸及我国的台湾、福建、广东、广西、云南等地。本实验首先对灰叶丛枝病病原菌的 16S rRNA 和 rp 基因进行了 PCR 扩增和序列测定,并利用 *i*PhyClassifier 网络工具确定了其在植原体属的 16Sr 组和亚组的分类地位,基于 16S rRNA 基因和 rp 基因构建的系统发育树,可为灰叶丛枝病防治和流行规律等相关基础研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 植原体样品

灰叶丛枝样品为 2004 年从海南省三亚市鹿回头公园采集(图 1);阴性对照为健康灰叶枝叶样品,采自海南省三亚市(图 2);阳性对照为泡桐丛枝病样品。

图 1 灰叶丛枝病症状

图 2 健康灰叶植株

1.2 DNA 提取与 PCR 扩增

1.2.1 DNA 提取 常规的 CTAB 法提取 DNA。

1.2.2 PCR 反应 两对植原体的引物分别为 P1/P7 和 rppwbF1/rppwbR1,16S rDNA 的引物对为 P1/P7(详见文献[10]),rp 引物是根据 Genbank 中花生丛枝组 rp 基因序列设计获得,引物对为 ppwbF1/rppwbR1(5'-ATGGTAGGTTATAAATTAGG/GTTCTTTTTGGCATTAACAT-3');两对引物的 PCR 反应条件为 94 ℃变性 6 min,然后 94 ℃,30';52 ℃,45';72 ℃,1 min,35 个循环,最后 72 ℃延伸 8 min。

1.2.3 电泳检测 1%琼脂糖凝胶电泳检测(SYBR Green Ⅰ染色),美国 Sygene 公司的凝胶成像系统观察结果。

1.3 16S rDNA 和 rp 基因序列测定

16S rDNA 和 rp 基因的 PCR 产物送华大基因有限公司直接测序。

1.4 16S rDNA 序列的 *i*PhyClassifer 分析

利用 *i*PhyClassifer 网络鉴定工具对灰叶丛枝病植原体进行鉴定。该网络鉴定工具是利用植原体 16S rDNA 序列虚拟 RFLP 分析进行植原体的分类与鉴定,即根据待查序列和已知植原体各组及亚组的代表株系的序列酶切片段多态性相似度比较结果,获得待查植原体的分类地位,该工具可以鉴定到亚组。登陆该网络工具的首页,按该工具的要求输入灰叶丛枝病植原体 16S rDNA 序列,点击“*Candidatus* Phytoplasma species assignment”和“16Sr group/subgroup classification based on similarity coefficient”选项框,并提交查询内容,参照文献[4]。

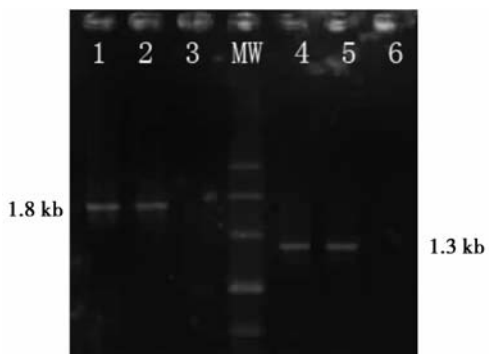
1.5　序列同源性及系统发育分析

从 Genbank 数据库中下载植原体属 28 个组中的 39 个的 16S rDNA 序列和 25 个 rp 基因序列,以及 *Acholeplasma palmae* 的 16S rDNA 序列和 rp 基因序列。应用 DNAman6.0.40 分别对所选植原体株系的 16S rDNA 序列和 rp 基因序列进行同源性比较。然后利用 MEGA4 分别构建基于 16Sr DNA 序列(41 个)和 rp 基因序列(27 个)的系统发育树。首先,对 16Sr DNA 序列和 rp 基因序列进行对位排列(CLUSTAL W),然后构建分子系统发育树有根树(邻接法,NJ,Bootstrap 检验 1 000 次重复检验),*Acholeplasma palmae* J233^{T}(L33734)为组外对照。

2　结果与分析

2.1　PCR 扩增与序列测定

引物对 P1/P7 成功的从染病灰叶扩增出 1 806 bp 特异性 DNA 片段(GenBank acc No.:JF441271),而健康灰叶总 DNA 未扩增出特异性 DNA 片段;引物对 rppwbF1/rppwbR 成功的从染病灰叶扩增出 1 294 bp 特异性 DNA 片段(GenBank acc No.:JF441272),而健康灰叶总 DNA 均未扩增出特异性 DNA 片段(图 3)。此两对引物均为植原体特异性引物,扩增 DNA 片段大小与设计片段大小一致,排除污染的因素(设阴性对照),可以断定该灰叶丛枝病病害的病原菌为植原体。



1－3:16S rDNA;MW;4－6:rp;1,4:阴性对照;
2,5:灰叶丛枝病;3,6:健康对照
图 3　PCR 产物电泳结果

2.2　*i*PhyClassifer 分析和同源性比较

*i*PhyClassifer 分析显示:灰叶丛枝病植原体与 16Sr Ⅱ-A 亚组的参考株(花生丛枝病植原体,GenBank acc No.:L33765)一致,相似系数为 1.00,即灰叶丛枝病植原体是 16SrⅡ-A 亚组株系。

16S rDNA 的分析结果显示:与灰叶丛枝病植原体同源性最高的是 16Sr Ⅱ组的花生丛枝病植原体(GenBank acc No.:L33765)、甘薯丛枝病植原体(GenBank acc No.:DQ777762)、印度麻丛枝病植原体(GenBank acc No.:EF193358)和 *Ca.* P. australasia(GenBank acc No.:Y10097),同源性分别为 100%、99.8%、99.9% 和 99.9%,与其他组候选种同源性低于 97%。因此,灰叶丛枝病植原体与花生丛枝病植原体遗传关系最近,与候选种 *Ca.* P. australasiae 相关。

rp 基因的分析结果表明:灰叶丛枝病植原体 rp 基因序列与本研究所选 16Sr Ⅱ组株系间同源性均在 85% 以上,而且与花生丛枝病植原体(GenBank acc No.:EF193375)、印度麻丛枝病植原体(GenBank acc No.:EF193374)、甘薯丛枝病植原体(GenBank acc No.:DQ777762)和 *Ca.* P. australasia(GenBank acc No.:EF193373)株系间的同源性分别为 99.9%、99.8%、99.6% 和 99.7%,与其他组所选序列同源性在 60%～70%。灰叶丛枝病植原体与花生丛枝病植原体、印度麻丛枝病植原体和 *Ca.* P. australasia 间关系最近。

2.3　系统发育分析

基于 16S rDNA 序列构建的系统发育树(图 4)显示:系统发育树各主要分支的自展值大于 50,说明所构建的拓扑结构置信度较高。进化树中 16Sr Ⅱ组的 12 个植原体聚在一起,形成一个大的分支。在 16Sr Ⅱ组分支下又分成了 5 个小的分支(自展值都大于 50),分别对应该组的 5 个亚组,即 16Sr Ⅱ-A 的 Peanut witches'-broom、Tephrosia witches'-broom、Sweet potato witches'-broom、Sunn hemp witches'-broom;16Sr Ⅱ-B 的 *Ca.* P. aurantifolia;16Sr Ⅱ-C 的 Crotalaria phyllody;16Sr Ⅱ-D 的 *Ca.* P. australasia 和 16Sr Ⅱ-E 的 Picrise echiodes phyllody。在此进化枝上,Tephrosia witches'-broom 与 Peanut witches'-broom 等 3 个植原体株系的遗传进化关系最近,与 *Ca.* P. australasiae 关系较近。

基于 27 个 rp 基因序列构建系统发育树(图 5)显示:rp 基因的遗传进化图与 16S rDNA 的遗传进化图各分支的顺序基本一致,16SrⅡ组的 12 个植原体聚成一个分支;不同的是,在这个分支中又形成 6 个小分支(自展值都大于 50),16SrⅡ-C 亚组的 3 个株系分成了 2 个分支,Cotton phyllody 单独一个分支,Crotalaria phyllody 和 Fababean phyllody 一个分

支。Tephrosia witches'-broom 与 16SrⅡ-A 亚组 Peanut witches'-broom 等 3 个植原体遗传进化关系最近,其次为 16SrⅡ-D 亚组的 *Ca.* P. australasia 和 Alfalfa witches'-broom。

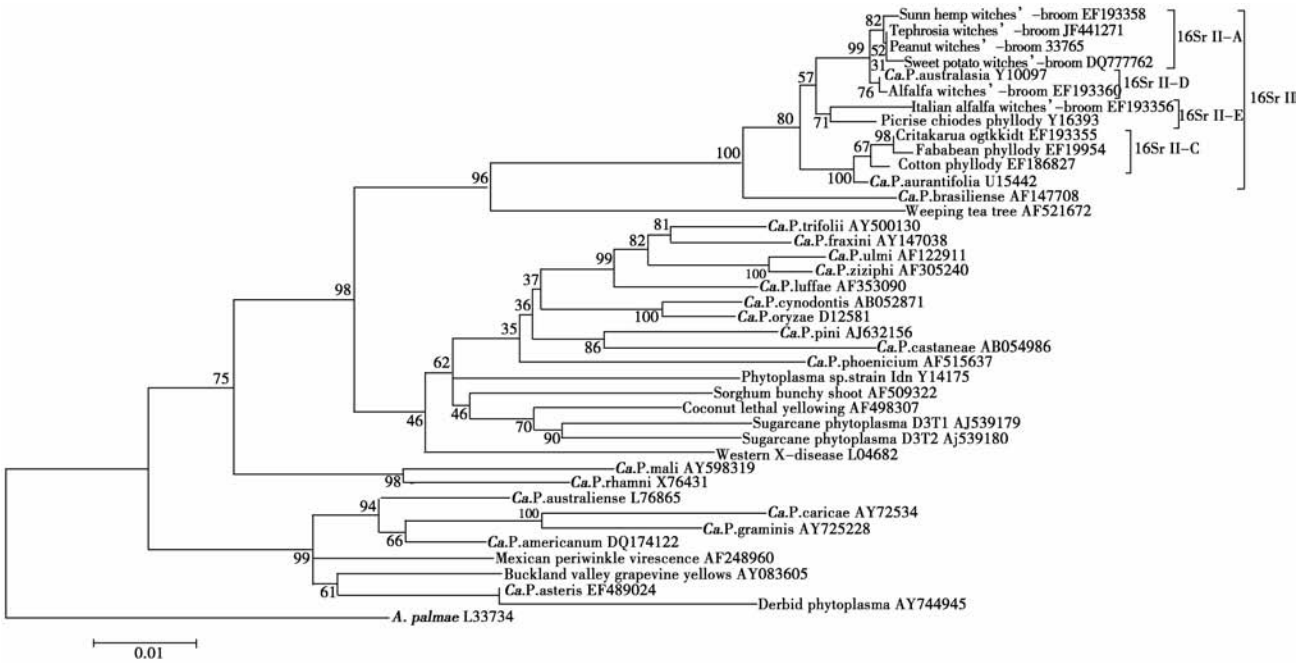


图 4 基于 16S rDNA 序列构建的系统 NJ 树

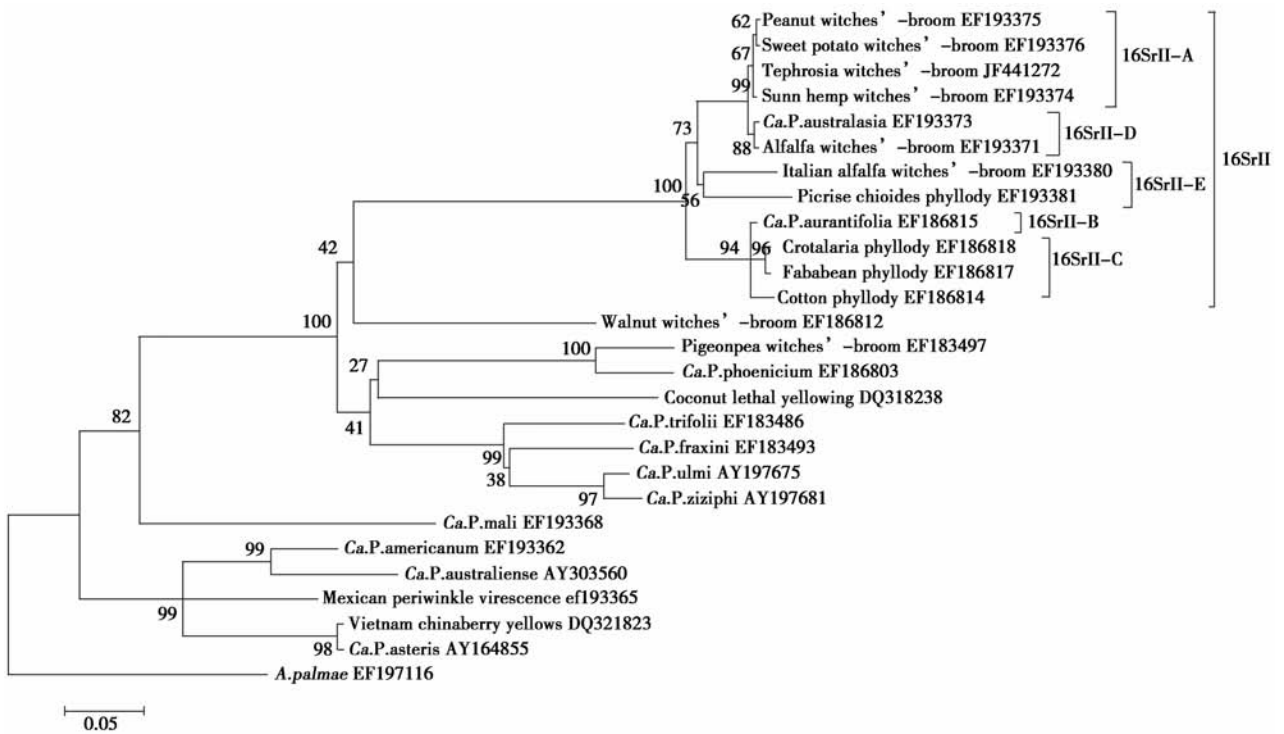


图 5 基于 rp 基因序列构建的系统发育 NJ 树

3　结论与讨论

16S rDNA 和 rp 基因的同源性比较、16S rDNA 序列的 *i*PhyClassifer 分析以及系统发育树结果显示:灰叶丛枝病植原体为 16SrⅡ-A 亚组的株系,与该亚组的 Peanut witches'-broom phytoplasma 的系统发育关系最近,与 *Ca.* P. australasiae 相关。

16S rRNA 基因和 rp 基因是细菌进化演变研究中的 2 个重要基因,为系统发育的研究提供非常重要的信号[2]。本研究构建的两基因系统发育树主要分支的顺序基本一致,但详细的分支也不是完全平行。从基于两基因构建的系统发育树中发现,16SrⅡ组分支的 5 个小的分支基本上是平行的,棉花变叶病植原体除外,其单独形成了一个分支,2 个系统树中都揭示灰叶丛枝病植原体与花生丛枝病植原体、甘薯丛枝病植原体起源相同,且关系相当接近。

像其它细菌一样,植原体也有一定的寄主范围,但由于植原体尚未成功获得离体培养物,因此无法按照柯赫氏法则验证植原体病原,只能通过分子生物学数据和生物学实验来研究植原体的寄主范围。温秀军等[11]通过嫁接传染病菌的方法验证了枣疯病植原体可以寄生酸枣。王海妮等[12]根据 16S rDNA 序列和 *tuf* 序列分析结果推测枣疯病和酸枣丛枝病为同一个种的不同寄主生物学型。本研究 16S rRNA 和 rp 2 个基因序列同源性和系统发育分析的结果显示:16SrⅡ-A 亚组的灰叶丛枝病植原体、花生丛枝病植原体、甘薯丛枝病植原体和印度麻丛枝植原体在本研究构建的系统发育树上遗传关系最近,在同一小分支上,灰叶丛枝病植原体与其它 3 个植原体间的 16Sr DNA 序列的遗传距离分别为 0.001、0.001 和 0.002,rp 基因的分别为 0.00、0.002 和 0.002,因此认为这 4 种植原体病害有可能是由同一种植原体侵染引起。

本研究为灰叶丛枝病病害流行规律的揭示和病害的防治奠定基础,而且还为花生等豆科植物植原体病害的病原菌的传播和转主寄主研究提供了分子依据,今后有必要开展病原生物学实验研究,如病害传播、嫁接传毒等研究,进一步证明灰叶是否为花生丛枝病植原体的转主寄主,揭示花生丛枝病植原体病害流行规律。

参考文献:

[1] Seemüller 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] 李　永, 徐启聪, 田国忠,等. 猪屎豆丛枝病植原体的分子检测与鉴定[J]. 林业科学,2010, 46(1):163 – 168

[3] 赖　帆,李　永,徐启聪,等. 植原体的最新分类研究动态[J]. 微生物学通报, 2008, 35(2):291 – 295

[4] Zhao Y, Wei W, Lee I M, *et al*. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, *i*PhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII)[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59: 2582 – 2593

[5] Lee I M, 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, 1993b, 83: 834 – 842

[6] Lee I M, Davis R E, Dawn E, *et al*. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes[J]. Annu Rev Microbiol, 2000, 54 :221 – 253

[7] The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team-Phytoplasma taxonomy group. 'Candidatus Phytoplasma' a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54: 1243 – 1255

[8] Wei W, Davis R E, Lee I M, *et al*. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57:1855 – 1867

[9] Martini M, Lee I M, Bottner D, *et al*. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57: 2037 – 2051

[10] Deng S, Hiruki C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes[J]. J Microbiol Methods, 1991, 14:53 – 61

[11] 温秀军,郭晓军,田国忠,等. 几个枣树品种和婆枣单株对枣疯病抗性的鉴定[J]. 林业科学,2005, 41(3):88 – 96

[12] 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