

樱桃带化病组织中植物菌原体 16 S rDNA PCR 扩增及其产物 RFLP 分析*

李横虹 邱并生 史春霖 金开璇 周琦 黄习军

摘要 樱桃带化病是从以色列引种樱桃园中发现的新病害。本文报道了按照检测植物菌原体(phytoplasma)的方法提取 DNA, 扩增患病植株中植物菌原体的 16 S rDNA 片段, 证明樱桃带化病中有植物菌原体存在, 并对此扩增片段进行限制性酶切片段长度多态性(RFLP)分析。根据 RFLP 分析结果, 参照 Lee, I. M. 等的文献资料, 对本次樱桃带化病病原进行鉴定与分类, 初步定为 类。

关键词 樱桃带化病 植物菌原体 巢式 PCR RFLP

樱桃带化病发生在北京市中以示范农场。1995 年春, 该场从以色列引进 1 年生嫁接的欧洲甜樱桃(*Prunus avium* L.) 系统的 6 个品系苗木 3 500 余株, 当年夏、秋调查发现有的樱桃苗在生长期苗木罹带化病, 其病状(见图 1)为新梢顶端变扁呈弯曲状, 尖端卷曲或扭曲生长, 有的形成齐头铲状, 宽度可达 4~5 cm, 在带化枝顶部着生簇状小枝和小叶^[1], 此病影响苗木正常生长及樱桃结实。据 1995~1996 年三次调查, 樱桃带化病株率约为 3%, 其分布特点是在一株发病苗的周围常有几株樱桃同时感病。樱桃带化病有进一步发展的趋势。国内外尚未见到樱桃带化及其病原研究的报道。



图 1 樱桃带化病植株

1 材料和方法

1.1 植物材料

用于鉴定的樱桃带化病株和健康对照材料采自北京市中以示范农场樱桃园。

1.2 DNA 提取

参照 Harrison N. A. 等^[2]所介绍的 CTAB, 巯基乙醇提取法取韧皮部或叶脉组织, 提取

1996—12—30 收稿。

李横虹(研究生), 邱并生, 史春霖(中国科学院微生物研究所 北京 100080); 金开璇(中国林业科学研究院森林保护研究所); 周琦, 黄习军(中华人民共和国首都机场动植物检疫局)。

* 1996~1998 年国家自然科学基金资助项目。本研究得到首都机场动植物检疫局陶玲珠、张炜、张建英、杨洁磊同志, 中以示范农场吴玉红同志的帮助, 特此致谢。

DNA, -20℃ 冰冻保存。具体方法如下: 配制提取液: 称取 2.05 g NaCl, 0.05 g 巯基乙醇, 0.5 g CTAB, 溶于 20 mL 蒸馏水中, 加入 1 mL 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0), 2.5 mL 1 mol/L Tris Cl (pH 8.0), 定容至 25 mL。取韧皮部, 叶脉组织 0.3 g, 加入 0.9 mL 提取液, 研磨。于 60℃ 水浴 30 min, 5 000 rpm 离心 5 min, 取上清液, 沉淀弃去。用氯仿异丙醇 (24:1) 抽提一次, 10 000 rpm 离心 90 s, 取上层水相。以 2/3 体积异丙醇于 -20℃ 沉淀 30 min, 10 000 rpm 离心 5 min, 用 1 mL 70% 乙醇清洗沉淀物, 干燥后溶于 100 μL TE, 使用 Shimadzu UV 2201 型紫外分光光度计测 OD₂₆₀ 吸收值, 确定 DNA 含量。

1.3 PCR 反应条件及所用引物对

参照 Lee, I. M. 等¹⁾, 根据植物菌原体 16 S rDNA 序列设计的引物对, 选择 R16mF2/R16mR1 作为第一引物对, R16F2/R16R2 作为第二引物对, 进行巢式 PCR (nested-PCR) 扩增。

引物对序列如下:

R16mF2= 5'-CATGCAAAGTCGAACGGA-3' R16F2= 5'-ACGACTGCTAAGACTGG-3'

R16mR1= 5'-CTTAACCCCAATCATCGAC-3' R16R2= 5'-GCGGTGTGTACAAACCCCG-3'

PCR 反应条件: 50 μL PCR 反应体系中加入引物对 500 nmol/L, dNTP 100 mol/L, DNA 提取液 20 ng (巢式 PCR 时取第一引物对扩增产物 1 μL), 5 μL 10×PCR 缓冲液 (上海生工), Taq DNA 聚合酶 1.25U (上海生工)。变性温度 94℃, 复性温度 56℃, 延伸温度 72℃, 共 30 次循环。前 5 个循环变性 1 min, 复性 1 min, 延伸 2 min; 后 25 个循环变性 30 s, 复性 1 min, 延伸 2 min, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物 1% 琼脂糖 (0.5 μg/mL EB) 电泳, 1×TAE 缓冲系统, 每孔加样 5 μL, 于紫外灯下观察并摄影记录。

1.4 玻璃粉法纯化 PCR 产物及克隆

使用发玛西亚 DNA 纯化试剂盒 (Pharmacia Sephaglas Kit) 从琼脂糖凝胶上回收扩增片段, 与 PCR2.1 T Vector (Invitrogen) 进行连接反应, 转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) TG1 中。用单菌落电泳法筛选出含重组质粒的克隆。同时从筛选出的克隆做菌落直接 PCR, 扩增产物的大小如果与巢式 PCR 产物一致, 则证明存在目的片段 (16 S rDNA 片段)。然后通过碱裂解法制备质粒, -20℃ 冰冻保存。

1.5 限制性酶切片段长度多态性 (RFLP) 分析

以提取的质粒为模板, 进行 PCR 扩增, PCR 反应条件如前所述, 50 μL 反应体系中加入模板 10 ng, 引物对选用 R16F2/R16R2。使用 Promega WizardTM PCR preps DNA purification system 快速纯化扩增所得产物, 然后进行酶切反应, 37℃ 水浴 24 h 使充分酶解。所选用的酶有: Alu I, Hinf I, Hha I, Hpa I, Rsa I, Sau 3A, Tru 9I。酶切产物进行 5% 聚丙烯酰胺电泳 (PAGE), 使用 1×TBE 配制的 0.5 μg/mL EB 室温染色 40 min, 紫外灯观察并摄影记录。

2 结果与分析

2.1 PCR 结果

1) Lee I.M. A new outlook in detection, identification and classification of phytoplasmas. 见: 中国林科院编. 第五届国际植物菌原体研讨会论文摘要集. 北京, 1996.

以图2中左侧的分子量标记为对照可见,扩增片段大小约1.2 kb,健康对照没有出现特异扩增带,说明病株中有植物菌原体(Phytoplasma)存在。

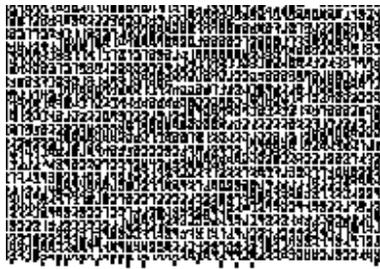


图2 樱桃带化病巢式PCR产物
1%琼脂糖
(0.5 μg/mL EB)电泳

(从左至右依次为:1. SPP1 分子量标记,2. 樱桃带化巢式PCR产物,3. 樱桃健康样品巢式PCR产物, SPP1 分子量标记的片段 bp 数大小从上到下依次为:8 000, 7 100, 6 000, 4 800, 3 500, 2 700, 1 900, 1 850, 1 500, 1 400, 1 150, 1 000, 680, 490, 370)

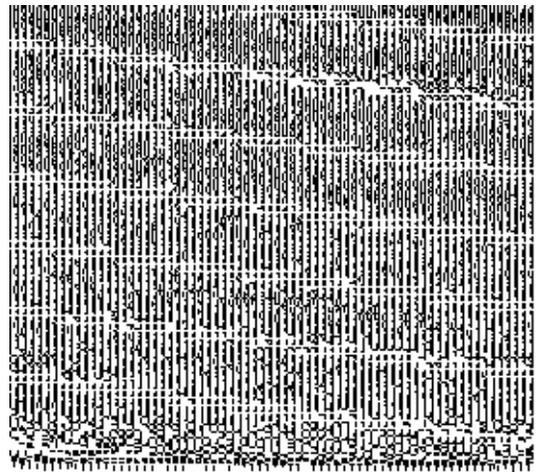


图3 樱桃带化PCR扩增产物RFLP分析,5%聚丙烯酰胺电泳

(右侧分子量标记从上到下各片段 bp 数大小依次为:2 642, 1 500, 1 400, 1 300, 1 200, 1 100, 1 000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 100)

2.2 RFLP 分析结果

将樱桃带化病组织PCR扩增产物RFLP图谱(图3)与Lee, I. M. 等^[3]文献中所列的酶切图谱进行比较。对照分子量标记,读出每个酶切片段的大小(bp数),列于下表进行比较。Lee, I. M. 文献中以Ash, Y. 的酶切图谱与本文所测得的酶切谱型最为近似。因而此处列Ash, Y. 的酶切图谱作比较。

表1 樱桃带化病组织PCR扩增产物的限制性内切酶酶切图谱
与Lee, I. M. 等^[3]文献中所列分类别及图谱比较

限制性内切酶	本次樱桃带化		Ash, Y. ^① (Lee, I. M. 等)		限制性内切酶	本次樱桃带化		Ash, Y. ^① (Lee, I. M. 等)			
	酶切片段数	片段大小 (bp)	酶切片段数	片段大小 (bp)		酶切片段数	片段大小 (bp)	酶切片段数	片段大小 (bp)		
Alu	4	700	4	700	Rsa	2	690	2	690		
		240		480			480				
		140		770			3		770		
		80							270		
Hinf	2	770	2	770	Tru 91	4	380	4	380		
		380		400			260		260		
Hha	2	1150	2	1050			150		150	260	260
		90		170						260	140
Hpa	3	700	2	750							
		350		350							
		90									

①国际上现将Ash, Y. (Ash Yellows)分为 -A 类。

根据上述结果可知,本次樱桃带化的酶切谱型与 A 类 Ash, Y. 基本类似。证实了扩增所得片段为植物菌原体 16 S rDNA。有的酶切片段大小有微小差异,如 Hha^I, Hpa^I 等,这可能是因亚型之间所存在的碱基变化而导致。PCR 结果显示樱桃带化样品确实感染植物菌原体,根据 RFLP 分析,初步分类定于 A 类。这为控制樱桃带化病的进一步蔓延和防治提供了理论依据。

参 考 文 献

- 1 Jin Kaixuan, Wang Yue. MLO and BLO associated with fasciated tree diseases in China. *Int. J. Tropical Plant Diseases*, 1992, 10: 209 ~ 213.
- 2 Harrison N A, Richardson P A, Tsai J H, et al. PCR assay for detection of the phytoplasma associated with maize bushy stunt disease. *Plant Disease*, 1996, (3): 263 ~ 269.
- 3 Lee I M, Hammond R W, Dawis R E, et al. Universal amplification and analysis of pathogen 16 S rDNA for classification and identification of mycoplasmalike organisms. *phytopathology*, 1993, 83(8): 834 ~ 842.

PCR Amplification of 16 S rDNA of Phytoplasma Associated with Cherry Fasciated Disease and RFLP Analysis

Li Henghong Qiu Bingsheng Shi Chunlin
Jin Kaixuan Zhou Qi Huang Xijun

Abstract Cherry fasciated disease is a disease which was found in the cherry sapling imported from Israel. DNA amplification by PCR was used to detect the phytoplasma associated with cherry fasciated disease. The 16 S rDNA sequence amplified was analyzed by restriction endonuclease digestion. The RFLP pattern (sum of results analyzed by 7 restriction enzymes) was compared with the results of other phytoplasma previously described by Lee, I. M. et al. We propose that cherry fasciated disease should belong to Group A.

Key words cherry fasciated disease phytoplasma nested-PCR RFLP

Li Henghong, Qiu Bingsheng, Shi Chunlin (Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science Beijing 100080); Jin Kaixuan (The Research Institute of Forest Protection, CAF); Zhou Qi, Huang Xijun (Capital Airport Animal & Plant Quarantine Bureau, PRC).