

仙人掌丛枝病植原体 CWB1 株系 16S rRNA 基因克隆及序列分析*

蔡 红 李 凡 孔宝华 陈海如**

(云南农业大学 云南省植物病理重点实验室 昆明 650201)

摘 要:对表现丛枝症状的仙人掌植株总 DNA 进行植原体 16S rRNA 基因 PCR 扩增,得到一条约 1.5kb 的特异片段,表明植株中有植原体存在,将此植原体株系命名为 CWB1。把此特异片段与 pGEM-T Easy 载体连接并转化到大肠杆菌 JM109 感受态细胞中,通过 PCR 鉴定、限制性内切酶(*EcoRI*)酶切分析及核苷酸序列分析,均表明克隆成功。序列分析结果显示,此株系的 16S rRNA 基因全长 1489 个碱基,与属于植原体 16S rII-C 亚组的 Faba bean phyllody 植原体同源率最高,为 99.7%。通过 16S rRNA 基因核酸序列同源性比较,认为该株系属于 16S rII-C 亚组,基本确定了其分类地位。

关键词:仙人掌,丛枝,植原体,16S rRNA 基因,序列分析

中图分类号:S436.66 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 06-0693-06

仙人掌植物是一种耐旱性极强的园艺观赏植物,其种类丰富,大小差异大并且在形态上极易产生变异形成很密的株丛^[1]。

植原体(phytoplasma)(原称类菌原体 Mycoplasma-like Organism,简称 MLO)于 1967 年被日本学者土居养二首次发现后,迄今为止,世界上报道的植物植原体病害多达 300 余种^[2],其主要症状包括丛枝、黄化、花变叶、花器退化等,严重时引起植株提早衰老直至整个植株枯死。

一直沿用的 MLO 名称很容易使人们误认为植物上的 MLO 与动物菌原体(Mycoplasma)有更近的亲缘关系。九十年代以来,随着分子生物学研究手段的提高,通过对 16S rRNA 基因、核糖体蛋白基因等保守基因序列的分析,表明植物类菌原体(MLO)不同于动物菌原体,将这类微生物称为 MLO 是不合适的。因而在 1992 年召开的第九届国际菌原体组织大会上 Sears 和 Kirkpatrick^[3]提议在软球菌纲中设立 Phytoplasmas(裘维蕃先生提出将此名翻译为植原体)替代植物类菌原体。

在仙人掌植物上由植原体引起的丛枝病很容易使人们误以为是仙人掌在形态上发生的奇特变异,从而延误了其防治时期,因此对表现为丛枝(或株丛)的仙人掌植物进行植原体的检测是一项重要的预防措施。但由于植原体是一种严格寄生于寄主植物韧皮部,不能进行人工培养病原菌,因而对其检测及鉴定技术的发展有一定阻碍^[4]。近十年来,随

* 云南省自然科学基金(2000C0014Q)、云南省省院省校科技合作基金(98YQ009)资助项目

** 通讯作者

本文报道的基因序列在 GenBank 中登录号为 AF331973

作者简介:蔡红(1972-),女,云南昆明人,云南农业大学讲师,硕士,主要从事植物病毒及类似病害研究。

收稿日期:2001-01-08,修回日期:2001-06-11

着分子生物学技术的发展,PCR 检测技术使植原体的检测与分类取得了令人瞩目的进展^[4]。通过对植原体 16S rRNA 的分析使人们从遗传本质上认识到了植原体与其他原核微生物间的差异。植原体的分子检测及分类在国际上已十分普遍,而且已成为植原体研究领域的焦点。本研究采用植原体通用引物通过 PCR 技术对表现为丛枝(或株丛)的仙人掌植物进行植原体 16S rRNA 片段扩增,并对扩增片段进行克隆、测序,通过碱基序列同源性比较,从分子水平上对该植原体株系进行分类。

1 材料和方法

1.1 材料来源

仙人掌(*Opuntia salmiana* form)采自中国科学院昆明植物研究所扶荔宫多浆植物展馆内。质粒 pGEM-T Easy Vector、Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System 纯化试剂盒为 Promega 公司产品;泡桐丛枝病阳性对照、*E. coli* JM109 菌株为本室保存。限制性内切酶及其它酶类均为 TaKaRa 公司产品。

1.2 植株总 DNA 提取

以泡桐丛枝病为阳性对照。总 DNA 提取方法参照 Ahrens 和 Seemüller^[5]的方法进行,最后于 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.3 引物设计与合成

参照 Lee^[6,7]所报道的植原体 16S rRNA 基因通用引物对 R16mF2/R16mR1 序列合成引物(上海 Sangon 公司合成),引物序列如下:

R16mF2:5'-CATGCAAGTCGAACGGA-3'

R16mF1:5'-CTTAACCCCAATCATCGAC-3'

1.4 PCR 扩增

反应液为 50μL,含有 1× PCR Buffer,250μmol/L dNTP,2.0mmol/L Mg²⁺,0.6μmol/L 引物对,2.5U Taq 酶,50ng 模板 DNA,30μL 矿物油。反应循环为 95℃ 预处理 5min,95℃ 30s,60℃ 1min,72℃ 90s,共 35 个循环,最后于 72℃ 保温 10min。取 5μL PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳,经溴化乙锭染色后,在紫外透射台上观察。

1.5 PCR 产物纯化及克隆

PCR 产物纯化采用 Wizard[®] PCR Preps DNA Purification System 纯化试剂盒进行。纯化后的 PCR 产物与 pGEM-T Easy Vector 于 16℃ 连接过夜。按 Cohen^[8]等的氯化钙法制备感受态细胞。将连接产物加到 200μL *E. coli* JM109 感受态细胞中,水浴 30min,42℃ 水浴热击 90S;冰浴 2min,加入 700μL LB 液体培养基,37℃,220r/min,轻摇 30~40min,菌液 3 000r/min,离心 5min,留沉淀及少量上清,混匀,涂布于含 50mg/mL Amp 的 X-gal 筛选平板上,倒置培养皿于 37℃ 培养 12~16h。

1.6 重组子筛选

挑选筛选平板上的白色菌落,采用碱裂解法提取少量重组质粒 DNA,经 PCR 及酶切鉴定,筛选出含有外源片段的重组克隆。

1.7 核苷酸序列测定

经筛选鉴定后的重组质粒送大连 TaKaRa 公司进行序列测定。

1.8 序列同源性比较

根据 Lee 和 Gundersen 等^[9] 1998 年重新修订的植原体新的分类体系,通过软件(DNA-MAN, Version 4.0),将测定到的仙人掌丛枝病植原体 CWB1 株系 16S rRNA 基因碱基序列与植原体 16Sr 组中各个代表性植原体的 16S rRNA 基因碱基序列进行核酸同源性比较,得出同源关系树状图,判定此株系的分类地位。

2 结果和分析

2.1 PCR 扩增结果

仙人掌丛枝病植株总 DNA PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳,EB 染色后,结果见图 1。扩增片段约 1.5kb,与引物设计相符。以泡桐丛枝病为阳性对照的扩增中也出现相同的特异条带,以双蒸水为阴性对照的扩增中却没有出现特异条带。由于所用的引物对是植原体特异的,因此说明症状表现丛枝的仙人掌植株中有植原体存在。由于作者还从仙人掌另一品种(*O. linguiformis*)分离到一个仙人掌丛枝病植原体株系,故将此株系命名为 CWB1。

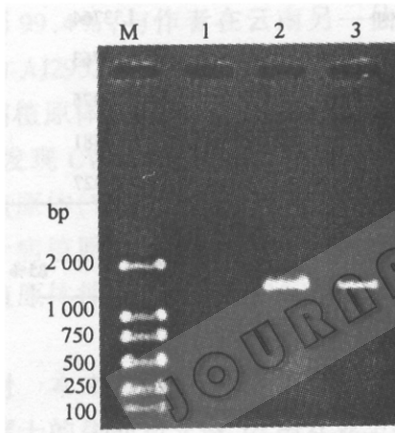


图 1 PCR 扩增结果

Fig.1 Results of PCR amplification

M: DNA marker; 1: CK;

2: *Paulownia witches' broom*;

3: CWB1 strain.

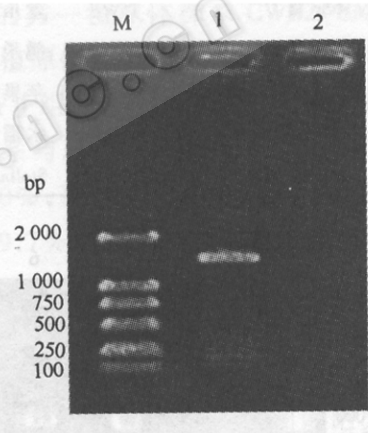


图 2 重组质粒 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of

recombinant plasmids by PCR

M: DNA marker; 1: Recombinant plasmid;

2: pGEM-T plasmid.

2.2 重组子 PCR 及酶切鉴定结果

重组质粒 DNA 经 PCR 扩增,电泳结果显示扩增产物大小为 1.5kb(图 2)。表明重组子中含有 PCR 产物目标外源片段。以 pGEM-T Easy Vector 多克隆位点中外源片段插入位点两侧的 *EcoR* I 酶切位点进行酶切鉴定(图 3),得到两条大小分别约为 650bp 和 850bp 的片段,与用 *EcoR* I 消化 PCR 产物所得到的两条酶切条带相同。进一步说明重组子含有 PCR 产物目标外源片段而且 PCR 扩增产物中含有一个 *EcoR* I 酶切位点。

2.3 序列测定及同源性比较结果

对经 PCR 及酶切鉴定的重组质粒进行碱基序列测定,表明仙人掌丛枝病植原体 CWB1 株系 16S rRNA 片段长为 1489 个核苷酸。G + C 含量为 47.5%。在序列的 627 ~ 632

位碱基位置上有一 *Eco*RI 酶切位点。同源性比较结果表明(表 1, 图 4), CWB1 与植原体 16S rII 组中的各植原体亲缘关系均达到 97.5% 以上, 其中又与属于 16S rII -C 亚组的 FBP 株系亲缘关系最近, 达到 99.7%, 而与植原体 16Sr 其它组的同源率均低于 90%。

表 1 各 16Sr 组及 16Sr II 亚组中的代表性植原体

Table 1 Typical phytoplasma of 16Sr groups and 16Sr II sub-group

16Sr group or rII sub-group	Strain	Phytoplasmas	GenBank accession No.
16Sr I	SAY	西方翠菊黄化 western aster yellows	M86340
16Sr II -A	PnWB	花生丛枝 Peanut witches'-broom	L33765
16Sr II -B	WBDL	酸橙丛枝 Witches'-broom of lime	U15442
16Sr II -C	FBP	蚕豆变叶 Faba bean phyllody	X83432
16Sr III	WX	桃西方 X X-disease	L04682
16Sr IV	LY	可可致死黄花 Coconut lethal yellowing	U18747
16Sr V	EY1	榆树黄花 Elm yellows	L33763
16Sr IV	CP	三叶草簇叶 Clover proliferation	L33761
16Sr VII	AshY	桉树黄花 Ash yellows	X68339
16Sr VII	LfWB	丝瓜丛枝 Loofah witches'-broom	L33764
16Sr IX	PPWB	鸽子豆丛枝 Pigeon pea witches'-broom	U18763
16Sr X	AT	苹果簇叶 Apple proliferation	X68375
16Sr XI	RYD	水稻黄萎 Rice yellow dwarf	D12581
16Sr XII	STOL	Stolbur 组 Stolbur	X76427

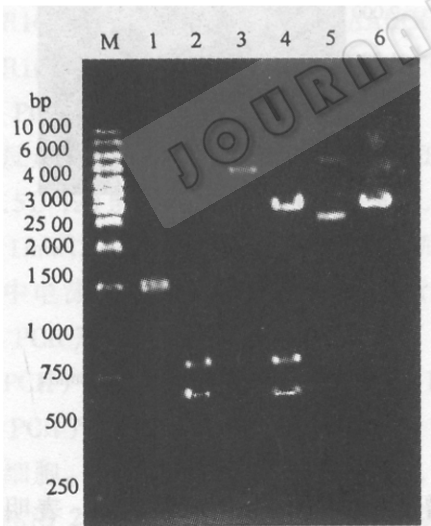


图 3 重组质粒酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid by *Eco*RI digestion

M: DNA marker; 1: Product of PCR amplification; 2: Product of PCR amplification digested by *Eco*RI; 3: Recombinant plasmid; 4: Recombinant plasmid digested by *Eco*RI; 5: pGEM-T plasmid; 6: pGEM-T plasmid digested by *Eco*RI.

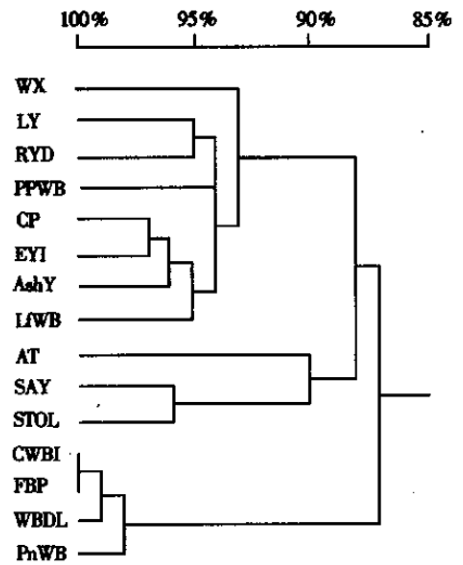


图 4 基于 15 种植原体株系 16S rRNA 基因核苷酸序列比较的同源性树状图

Fig. 4 Homologic tree constructed by analysis of 16S rRNA gene nucleotide sequences from 15 strains of phytoplasmas

3 讨论

3.1 云南首次在仙人掌植物上发现一植原体病害

本实验通过植原体 16S rRNA 通用引物 R16mF2/R16mR1 对表现丛枝症状的一仙人掌植株通过 PCR 扩增得到一条约 1.5kb 的特异片段,表明此仙人掌植株中含有植原体,是云南省首次报道的危害仙人掌植物的一种植原体病害。同时,该实验通过克隆、序列分析得到这一植原体株系 16S rRNA 基因近全长碱基序列,在国内也属首次报道。

3.2 为害仙人掌植物植原体株系的分类地位

依据植原体 16S rRNA 序列分析核酸同源性可对植原体进行分子水平上的分类,同时根据 1996 年国际菌原体学组织(International Organization for Mycoplasmaology, 简称 IOM)会议认为的植原体 16S rRNA 基因序列变异若超过 3%,就完全可以确认为是不同种。本实验通过对植原体 16S rRNA 片段碱基序列同源性的比较分析,发现该株系与属于 16S rII 组(花生丛枝病组)的花生丛枝病植原体(Peanut Witches'-Broom, PnWB)同源率达 98.2%;与 Aguilar-Rojas 等在墨西哥仙人掌上发现的植原体(Genbank 登录号为 AF200718)的同源率达到 99.4%,与作者在云南另一仙人掌品种上发现的另一植原体株系 CWB2(EMBL 登录号为 AJ293216)同源率达到 99.5%,而墨西哥仙人掌植原体和植原体株系 CWB2 与花生丛枝病植原体同源率均为 98.0%;通过进一步与 16S rII 组中各亚组的植原体株系进行比较,发现 CWB1、墨西哥仙人掌植原体、CWB2 三个株系与属于 16S rII-B 亚组的酸橙丛枝病植原体(WBDL)同源率分别为 99.1%、99.0%、99.0%;而与属于 16S rII-C 亚组的蚕豆变叶植原体(FBP)同源率分别高 99.7%、99.4%、99.7%,由此作者认为为害仙人掌植物的植原体株系都应属于 16S rII-C 亚组。

致谢 本文在标本采集和实验过程中曾得到中国农业大学 2000 级分子植物病理专业谢勇博士的帮助和支持,云南农业大学 98 级植保专业本科生陈蕙同学曾参加该论文部分实验工作,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] 徐民生. 仙人掌类花卉栽培. 北京:中国林业出版社,1984.8~11.
- [2] 邱人璋,叶莹. 植物病毒与似病毒病害研讨会专刊. 中国台北:行政院农业委员会,1993.29~42.
- [3] International Committee on Systematic Bacteriology, Sub-committee on the Taxonomy of Mollicutes. Minutes of the interim meetings, 1 and 2 August 1992. Ames, Iowa. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1993, 43:394~397.
- [4] Sinclair W A, Luli R J, Dyer A T, et al. *Plant Disease*, 1990, 74:604~607.
- [5] Ahrens U, Seemüller E. *Phytopathology*, 1992, 82:828~832.
- [6] Lee I M, Hammond R W, Davis R E, et al. *Phytopathology*, 1993, 83:834~842.
- [7] Lee I M, Davis R E, Sinclair W A. *Phytopathology*, 1993, 83:829~833.
- [8] Cohen S N, Chang A C Y, Hsu L. *Proc Natl Acad Sci*, 1972, 69:2110.
- [9] Lee I M, Gundersen-Rindal D E, Davis R E, et al. *Int J Syst Bacteriol*, 1998b, 48:1153~1169.

CLONING AND SEQUENCING OF 16S RRNA GENE OF PHYTOPLASMA CWB1 STRAIN ASSOCIATED WITH CACTUS WITCHES' BROOM

Cai Hong Li Fan Kong Baohua Chen Hairu

(The Key Laboratory of Plant Pathology of Yunnan province, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

Abstract: A 1.5kb DNA fragment was amplified in DNA samples extracted from *Opuntia salmiana* form showed witches'-broom symptom. The result indicates the existence of phytoplasma associated with this disease and this phytoplasma was designated as CWB1. The amplified fragment was ligated to pGEM-T easy vector and then transformed into JM109 strain of *E. coli*. Cloned DNA fragments were verified by PCR, restriction endonuclease (*EcoRI*) digestion and sequence analysis. The result revealed that the 16S rRNA gene of CWB1 consists of 1489bp and shared 99.7% homology with Fa-ba bean phyllody which belongs to phytoplasma 16S r II -C subgroup. So we can classify this strain into phytoplasma 16S r II -C subgroup.

Key words: *Opuntia salmiana* form, Witches'-broom, Phytoplasma, 16S rRNA gene, Sequence analysis