

长春花黄化植原体(PY)株系的检测与鉴定*

蔡 红 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)

关键词: 长春花, 黄化, 植原体, 16S rRNA 基因, 核糖体蛋白基因

中图分类号: S436.66 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2003)01-0116-04

植原体(Phytoplasma)原称类菌原体(Mycoplasma-like Organism, 简称 MLO)是一类无细胞壁、存在于植物筛管细胞内的原核生物。植原体自 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, 早期对植原体的鉴定主要是通过生物学特性, 如症状特征、与昆虫介体的相互关系等进行的。这些方法费时费力, 结果往往也不是很可靠。80 年代, 随着血清学、分子探针以及 PCR 技术的发展应用, 为植原体的检测提供了一种相对简单、灵敏、可靠的方法。通过对 16S rRNA 基因或核糖体蛋白基因 PCR 扩增产物的直接测序或扩增产物的 RFLP 分析, 可对植原体进行鉴定和分类, 同时也建立了植原体的分类体系^[1]。

长春花(*Catharanthus roseus*)为夹竹桃科园艺观赏草本植物。由于植原体可通过具有迁飞性的韧皮部饲食的昆虫, 如叶蝉、飞虱等介体进行传播, 所以在自然条件下, 长春花很可能感染不同种类的植原体株系。

为搞清采集到的自然表现黄化症状的长春花植株所感染的植原体株系的种类, 本研究采用分子生物学方法对该植株总 DNA 进行植原体 16S rRNA 基因及核糖体蛋白基因片段扩增, 并对扩增片段进行克隆、测序, 通过核酸序列同源性比较对该株系进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

自然显症的长春花(*Catharanthus roseus*)采自云南农业大学校园内。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

植株总 DNA 提取方法参照 Ahrens 和 Seemüller^[2]的方法进行。

1.3 引物及 PCR 条件

参照 Lee^[3,4]所报道的植原体 16S rRNA 基因通用引物及 Lim & Sears^[5]报道的植原体核糖体蛋白基因引物合成下列引物:

R16F2 5'-ACGACTGCTGCTAAGACTGG-3'

R16R2 5'-TGACGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'

* 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

本文报道的核糖体蛋白基因序列及 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中登录号分别为 AF453327 及 AF453328
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 2002-04-01, 修回日期 2002-07-09

rpF1 5'-GGACATAAGTTAGGTGAATTT-3'

rpR1 5'-ACGATATTTAGTTCITTTTTGG-3'

反应体系为 50 μ L, 含有 1 \times PCR 缓冲液, 200 μ mol/L dNTP, 2.0mmol/L Mg²⁺, 0.6 μ mol/L 引物, 2.5U Taq 酶, 50ng 模板 DNA。反应循环为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 1min(扩增核糖体蛋白基因时, 退火温度为 57 $^{\circ}$ C 1min), 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s, 共 35 个循环, 最后于 72 $^{\circ}$ C 保温 10 min。分别取 10 μ L 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。

1.4 PCR 产物纯化、克隆及序列测定

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 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物加到 200 μ L *E. coli* JM109 感受态细胞中, 冰浴 30min, 42 $^{\circ}$ C 水浴热击 90s, 冰浴 2min, 加入 700 μ L LB 液体培养基, 37 $^{\circ}$ C, 220r/min, 轻摇 30~40min, 菌液 3000r/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 $^{\circ}$ C 培养 12~16h。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 鉴定筛选出含有正确插入片段的重组克隆后送大连 TaKaRa 公司进行序列测定。

1.5 序列同源性比较

根据 Lee 和 Gundersen 等^[1]1998 年重新修订的植原体新的分类体系, 通过软件(DNAMAN, Version 4.0)将测定到的序列分别与植原体 16Sr 组中各个代表性植原体的 16S rRNA 基因核酸序列和核糖体蛋白基因序列进行比较。

2 结果

2.1 PCR 扩增及重组质粒鉴定结果

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 分别得到约 1.2kb 和 1.3kb 的特异片段(图 1)大小与引物设计相符, 将此植原体株系命名为长春花黄化(Periwinkle yellows, PY)。重组质粒经 PCR 扩增后均得到与植株总 DNA 扩增片段大小相同的产物, 说明重组子中均含有目的外源片段。

2.2 序列测定及同源性比较结果

2.2.1 16S rDNA 序列及同源性比较 对 AY 株系的 16S rRNA 基因重组质粒进行序列测定, 结果表明, PY 株系 16S rDNA 长 1239 bp, G+C 含量为 47.5%, 同源性比较结果(表 1)表明, 该株系与植原体 16SrI 组中的各植原体同源率均达到 98.5% 以上, 其中又与 SAY(16SrI-B 亚组)的同源率最高, 达到 98.9%; 与 STOI(16SrXII 组)的同源率为 95.6%, 而与其它 16Sr 组的同源率却为 88.0%~89.9%。

2.2.2 核糖体蛋白基因序列及同源性比较 对 AY 株系的核糖体蛋白基因重组质粒进行序列测定, 结果表明, PY 株系核糖体蛋白基因片段长 1244 bp, 序列同源性比较结果显示(表 1)该株系 *rp* 基因片段核酸序列及所含 *rpl* 22 和 *rps* 3 基因编码的氨基酸序列与已在 GenBank 中登录的 16SrI 组中的植原体株系同源率均达到 97.0% 以上, 而与其它 16Sr 组的同源率均低于 80%。

3 讨论

由于长春花在自然条件下很容易通过菟丝子或韧皮部饲食的昆虫传播而感染植原体, 所以从表现典型植原体病害症状的植株中可能分离到不同分类地位的植原体株系。目前报道的自然感染长春花

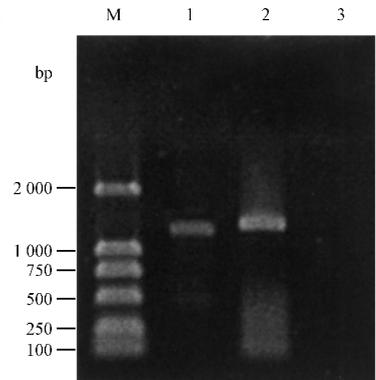


图 1 长春花黄化植株总 DNA 16S rRNA 基因及核糖体蛋白基因 PCR 扩增结果

M: DL-2000 分子量标准; 1. 16SrRNA 基因扩增产物; 2. 核糖体蛋白基因扩增产物; 3. CK.

的植原体株系主要有长春花小叶(Periwinkle little leaf, CN1)^[6,7]、马里兰翠菊黄化(Maryland aster yellows, AY1)^[7]、美洲翠菊黄化(American aster yellows, AAY)^[8]、长春花褪绿(Periwinkle virescence, VR BLTVA)^[9,10]及墨西哥长春花褪绿(Mexican periwinkle virescence, MPV)^[11]等,这些株系在目前的植原体分类体系中分别属于不同的 16SrI-A 组、16SrI-B 组、16SrVI 组和 16SrXIII 组^[1]。

表 1 PY 与部分植原体 16S rDNA 和核糖体蛋白基因片段序列及所含基因编码的氨基酸序列同源性比较

Phytoplasma strain	16Sr group-subgroup (rp-subgroup)	Homology/%					Gene accession No.
		16S rRNA gene nucleotide	Ribosomal protein gene				
			Nucleotide	<i>rps19</i>	<i>rpl22</i>		
Maryland aster yellows (AY1)	16SrI-B (rp-B)	98.8	/	/	/	/	L33767
Western aster yellows (SAY)	16SrI-B (rp-B)	98.9	/	/	/	/	M86340
Tomato big bud (TBB)	16SrI-A (rp-A)	98.5	99.8	100	97.8	/	L33760/L27004
STRAWB2	16SrI-K (rp-J)	98.6	97.8	100	98.4	97.2	U96616/U96617
X-disease (CX)	16SrIII-A (rp-A)	89.5	72.2	78.6	64.8	/	L33733/L27016
X-disease (WX)	16SrIII-A (rp-B)	89.5	71.9	78.6	65.9	/	L04682/L27047
Elm yellows (EY1)	16SrV-A (rp-A)	89.9	71.6	60.0	60.0	/	L33763/L27022
Clover proliferation (CP)	16SrVI	89.4	68.8	66.7	57.7	/	L33761/L27011
Ash yellows (AshY)	16SrVII	89.7	69.5	16.7	57.8	/	X68339/L26999
Loofah witches' broom (LWB)	16SrVIII	89.5	70.6	66.7	66.7	/	L33764/L27027
Pigeon pea witches' broom (PPWB)	16SrIX	88.1	70.6	41.7	66.7	/	U18763/L27036
Apple proliferation (AT)	16SrX	88.0	72.1	75.0	61.5	/	X68375/L27994
Stolbur (STOL)	16SrXII	95.6	/	/	/	/	X76427

通过对 PY 株系 16S rRNA 基因及核糖体蛋白基因扩增片段的序列比较分析,表明该株系与植原体 16SrI 组中各株系同源率均最高。从 16S rDNA 序列同源性比较结果, PY 株系又与 16SrI-B 亚组株系同源率最高。比较 PY 株系和已登录的两个植原体 16SrI 组的核糖体蛋白基因片段序列, PY 株系与 TBB (16SrI-A 组) STRAWB α 16SrI-K 组株系 *rp* 基因核酸序列同源关系分别为 99.8% 和 97.8%, 序列所含 *rp122* 基因编码的氨基酸序列同源性分别为 97.8% 和 98.4%。由于目前在 GenBank 中没有或还没有释放出 16SrI-B 亚组 *rp* 基因的序列, 所以在此无法根据序列同源性比较结果对 PY 株系进行亚组水平上的分类, 但是通过本实验可确定该株系为 16SrI 组(翠菊黄化组)的成员之一。

致谢 本文在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惠同学参加该论文实验工作, 在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Lee I M, Gundersen-Rindal D E, Davis R E, et al. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1998, **48**: 1153 ~ 1169.
- [2] 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. *Phytopathology*, 1992, **82**: 828 ~ 832.

- [3] Lee I M , Davis R E , Sinclair W A . Genetic relatedness of mycoplasma-like organisms detected in *Ulmus* spp. in the United States and Italy by means of DNA probes and polymerase chain reactions. *Phytopathology* , 1993 , **83** : 829 ~ 833 .
- [4] Lee I M , Hammond R W , Davis R E . *et al.* Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology* , 1993 , **83** : 834 ~ 842 .
- [5] 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 Bacteriology* , 1992 , **174** : 2606 ~ 2611 .
- [6] Davis R E , Lee I M , Douglas S M , *et al.* Molecular cloning and detection of chromosomal and extrachromosomal DNA of mycoplasma-like organism associated with little leaf disease in periwinkle(*Catharanthus roseus*) . *Phytopathology* , 1990 , **80** : 789 ~ 793 .
- [7] Lee I M , Davis R E , Chen T A , *et al.* A genotype-based system for identification and classification of mycoplasma-like organisms(MLOs) in the aster yellows MLO strain cluster. *Phytopathology* , 1992 , **82** : 977 ~ 986 .
- [8] Seemüller E , Schneider B , Maurer R , *et al.* Phylogenetic classification of phytopathogenic mollicutes by sequence analysis of 16S ribosomal DNA. *Int J Syst Bacteriology* , 1994 , **44** : 440 ~ 446 .
- [9] Lee I M , Davis R E , Hiruki C . Genetic relatedness among clover proliferation mycoplasma-like organisms(MLOs) and other MLOs investigated by nucleic acid hybridization and restriction fragment length polymorphism analyses. *Appl Environ Microbiology* , 1991 , **57** : 3565 ~ 3569 .
- [10] Shaw M E , Kirkpatrick B C , Golino D A . Causal agent of tomato big bud disease in California is the beet leafhopper-transmitted virescence agent. *Phytopathology* , 1991 , **81** : 1210 .
- [11] Gundersen D E , Lee I M , Chang C J , *et al.* RFLP analyses of ribosomal protein genes reveal strain diversity in MLO 16S rRNA groups I and III. *Phytopathology* , 1994 , **84** : 1128 .

Detection and Identification of Phytoplasma Strain Associated with Periwinkle Yellows

Cai Hong Kong Baohua Chen Hairu

(Key Laboratory for Plant Pathology of Yunnan Province , Yunnan Agricultural University , Kunming 650201 , China)

Abstract : A 1.2kb and 1.3kb DNA fragments were amplified in DNA samples extracted from periwinkle exhibiting yellows naturally. The amplified fragments were cloned , sequenced and compared with other phytoplasma strains. The results showed that the 16S rDNA and ribosomal protein gene of periwinkle yellows phytoplasma consist of 1239bp and 1244bp , respectively. They all shared high homology (higher than 97.5%) with phytoplasma strains of 16S rI group. Thus , the result made it clear that the phytoplasma strain of periwinkle yellows (PY) is one of the members of phytoplasma 16SrI group.

Key words : Periwinkle , Yellows phytoplasma , 16S rRNA gene , Ribosomal protein gene

双百期刊 核心期刊 欢迎投稿 欢迎订阅 诚征广告 !