

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
50(10):1313–1319; 4 October 2010  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 枣疯病植原体 *tuf* 和 *rp* 基因的克隆与序列分析

林文力<sup>1,2#</sup>, 牟海青<sup>1#</sup>, 赵文军<sup>1</sup>, 徐启聪<sup>3</sup>, 田国忠<sup>3</sup>, 廖晓兰<sup>2</sup>, 朱水芳<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所, 北京 100029)

(<sup>2</sup> 湖南农业大学生物安全科学技术学院, 长沙 410128)

(<sup>3</sup> 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091)

**摘要:**【目的】枣疯病是一种重要的植原体病害, 本研究旨在明确北京及河北地区枣疯病植原体的分类地位, 为枣疯病在亚组水平上分类提供一定的参考依据。【方法】利用植原体通用引物 fTufu/rTufu 和 rp(v) F1A/rp(v) R1A 对北京和河北地区枣疯病植原体延伸因子 *tuf* 基因和核糖体蛋白基因(*rp*)进行 PCR 扩增并进行核苷酸序列测定及相似性分析。【结果】获得北京地区 JWB-XFSZ 株系、JWB-XFDO 株系以及河北地区 JWB-TXSZ 株系的 *tuf* 基因片段均为 824 bp; 北京地区 JWB-XFSZ 株系的 *rp* 基因片段为 1196 bp。经序列相似性比较表明: *tuf* 基因与 16SrV 组的葡萄黄叶病(Flavescence dorée)相似性最高, 为 92.84%, 而与已经公布的其它地区(陕西杨凌)的枣疯病植原体 *tuf* 基因相似性较低, 为 57.29%; 关于 *rp* 基因, 北京地区枣疯病 JWB-XFSZ 株系与 16SrV 组的枣疯病泰山株系(JWB-Taishan)以及大麻丛枝病植原体(HFWB)相似性最高, 均为 99.83%, 与 16SrV 组的成员相似性均在 96% 以上。【结论】北京与河北地区枣疯病植原体具有较高的相似性, 而在 *tuf* 基因水平上, 与陕西地区枣疯病植原体具有较大的差异; 本研究中北京与河北两地区枣疯病植原体归属于 16SrV 组。

**关键词:** 枣疯病; 植原体; *tuf* 基因; *rp* 基因; 序列分析

**中图分类号:** R37      **文献标识码:** A      **文章编号:** 0001-6209 (2010) 10-1313-07

植原体(*Candidatus Phytoplasma*)是一类无细胞壁、存在于植物筛管内的专性寄生细菌, 主要依靠叶蝉等昆虫传播, 也可由菟丝子和人工嫁接传病, 常引起植物丛枝、黄化、花变叶、衰退、簇生、矮化、小叶等症状<sup>[1]</sup>。我国已报道 100 多种植物上发生的病害与植原体有关, 给经济作物造成了巨大的损失<sup>[2]</sup>。由于植原体尚不能进行体外培养, 对其生物学特性研究较少。近年来, 随着分子生物学的迅速发展, 核酸杂交、血清学和 PCR 等技术的广泛应用极大改善了研究者对植原体的鉴定和分类<sup>[3]</sup>。根据植原体的一些保守序列, 如: 16S rDNA 序列、核糖体蛋白

(*rp*) 基因、延伸因子(*tuf*) 基因、16S-23S rDNA 间区序列(16S-23S rDNA spacer region, SR)、转运蛋白(*SecY*) 基因以及外膜蛋白(OMP) 基因等, 利用植原体通用、特异性引物进行 PCR 扩增和 RFLP 分析, 已成为国内外植原体检测和鉴定的主要方法<sup>[4-6]</sup>。据此, Wei 等根据已经公布的植原体 16S rDNA 序列, 将植原体分为 28 个组, 50 个亚组<sup>[7]</sup>。

枣疯病(Jujube witches'-broom, JWB)是由植原体引起的一种毁灭性的侵染性病害, 几乎分布于国内外主要枣树栽培区。枣树一旦患病, 通常 2–3 年内丧失产量并很快导致植株死亡。枣疯病发病过程

**基金项目:** 质检公益性行业科研专项(200810517, 200810632)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-64896608; E-mail: zhushf@netchina.com.cn

**作者简介:** # 对本文有同等贡献。林文力(1983–), 男, 湖南邵阳人, 硕士研究生, 研究方向为植物细菌学, E-mail: linwenli123@163.com; 牟海青(1982–), 女, 山东潍坊人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物细菌学研究, E-mail: kellymou@yahoo.cn

**收稿日期:** 2010-03-09; **修回日期:** 2010-06-07

从外观上看可分为以下几个阶段:健康叶片→花叶→变态花蕾→花变叶→丛枝。自从 1981 年王祈楷等<sup>[8]</sup>首次确定了枣疯病的病原是植原体以来,国内外对枣疯病的发生和危害、PCR 病原检测等方面开展了许多研究。Jung 等对采自日本和韩国 4 个不同地区的枣疯病样品进行 PCR 扩增,通过与其它地区的枣疯病和已分离的植原体 16S rDNA 基因进行比较发现,枣疯病植原体序列、传播媒介的独特性以及寄主植物特殊的地理分布使它组成了一个具体的相关分类,可代表一个新的分类单元‘*Candidatus Phytoplasma ziziphi*’<sup>[9]</sup>。王海妮等对中国陕西的彬县、阎良、武功、佳县、杨凌,河北沧州,山东德州 7 个枣区的枣疯病样品和杨凌 4 个酸枣丛枝病样品植原体 16S rDNA 基因保守序列和延伸因子 *tuf* 基因进行克隆和测序,通过序列相似性比较,证实中国陕西、河北、山东的枣疯病的病原一致,归属于植原体 16Sr V-B 组<sup>[10]</sup>。徐启聪等采集了全国 7 个枣产区的 14 个枣树品种上的 31 个枣疯病和 5 个酸枣丛枝病样品,发现不同地区不同品种枣树上枣疯植原体间存在着较为丰富的遗传多样性,并分为 3 个类群:Ⅰ-河南与北京诸菌株、Ⅱ-山东诸菌株、Ⅲ-陕西与韩国诸菌株。此外,与 PCR 产物直接测序法相比,用克隆测序结果能检测到更多的碱基突变,对于鉴别不同植原体株系及研究其系统发育关系更为有用<sup>[11]</sup>。侯立华等对枣疯病植原体进行了实时荧光 PCR 检测方法的研究,可用于枣疯病植原体的定量

检测,为枣疯病植原体检测提供了技术支持<sup>[12]</sup>。

本研究对中国北京和河北地区的枣疯病植原体 *tuf* 基因以及核糖体蛋白基因(*rp*)进行 PCR,明确其分类地位,并与我国其它地区发生的枣疯病进行相似性比较,以期枣疯病植原体地区间遗传变异等研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试样品:**供试枣疯病病株及健康枣树样品采自北京昌平区西峰山村小枣(JWB-XFSZ)、昌平区西峰山村冬枣(JWB-XFDO)以及河北唐县军城实验园小枣发病枝条(JWB-TXSZ);阳性对照泡桐丛枝(PaWB)植原体由本实验室保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:**克隆载体 pMD18-T、PCR 产物回收试剂盒、限制性内切酶及其它酶类等分子生物学试剂均购自 TaKaRa 公司。

### 1.2 植物总 DNA 提取

参照顾沛雯等<sup>[13]</sup>的方法从病株及健康样品中提取基因组 DNA,于 -20℃ 保存备用。

### 1.3 PCR 扩增、克隆及序列测定

**1.3.1 引物:**根据 Schneider 等<sup>[14]</sup>报道的延伸因子 *tuf* 基因的引物对 fTufu/rTufu, Lee 等<sup>[15]</sup>报道的核糖体蛋白基因引物对 rp(v)F1A/rp(v)R1A 均由上海英俊生物技术有限公司合成。引物对序列见表 1。

表 1 本研究中 PCR 扩增所用到的引物对  
Table 1 Primers used in PCRs in this study

Primer	Nucleotide sequence (5'→3')	Size/bp	Specificity	Reference
fTufu-rTufu		20	Phytoplasmas (universal)	Schneider <i>et al.</i> (1997)
fTufu	CCTGAAGAAAGAGAACGTGG			
rTufu	CGGAAATAGAATTGAGGACG			
rp(v) F1A-rp(v) R1A		22	16SrV;EY group (specific)	Lee <i>et al.</i> (2004)
rp(v) F1A	AGGCGATAAAAAAGTTTCAAAA			
rp(v) R1A	GGCATTAACATAATATATTATG			

**1.3.2 PCR 扩增:**反应采用 25 μL 体系, *tuf* 基因 PCR 反应条件为:94℃ 5 min;94℃ 40 s,55℃ 1 min,72℃ 90 s,35 个循环;72℃ 10 min。rp 基因的 PCR 反应条件除了退火温度为 50℃ 外,其余反应条件均与 *tuf* 基因一致。

**1.3.3 克隆及序列测定:**PCR 扩增出的目标产物由 TaKaRa 公司生产 PCR 产物回收试剂盒纯化回收,克隆插入 pMD18-T Simple 载体中,利用 PCR 反应和酶切筛选阳性克隆,序列测定委托北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。

**1.4 序列分析及相似性比较**利用 GenBank 数据库中的 BLAST 程序对测序结果进行相似性检索 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),通过 DNAMAN5.2.2 及 MEGA4.1 软件进行相似性比较及系统发生树的构建。

## 2 结果和分析

### 2.1 *tuf* 基因序列扩增

利用植原体通用引物 fTufu/rTufu 对 JWB-

XFSZ、JWB-XFDO 以及 JWB-TXSZ 的总 DNA 进行 PCR 扩增,产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳。电泳结果显示,3 个地区的枣树病株样品与泡桐丛枝阳性对照中都扩增到了约为 0.8 kb 大小片段,而健康枣树阴性对照和双蒸水空白对照均未扩增出特异条带(电泳图略)。

克隆 *tuf* 基因后测序结果表明,3 个株系 *tuf* 基因片段长为 824 bp。北京地区 JWB-XFDO 株系(登录号 GU968759)与 JWB-XFSZ 株系(登录号 GU137287)的 *tuf* 序列完全一致,而河北地区 JWB-TXSZ(登录号 GU968760)株系在 3 端最后一个碱基由“G”变成“A”。应用软件(DNAMAN5.2)对测定

的核苷酸序列进行翻译并进行比对,结果表明 3 个株系氨基酸相似性 100%,均编码 274 个氨基酸,产物为延伸因子 EF-Tu。

利用 DNAMAN5.2.2 软件,将 JWB-XFSZ 株系、JWB-XFDO 株系的 *tuf* 基因序列与其它已报道的植原体 *tuf* 基因序列比对(表 2),结果表明与 16SrV 组葡萄黄叶病植原体(登录号 AM939565)的 *tuf* 核苷酸序列最近,相似性达 92.84%;其次为 16SrVII 组白蜡树黄化植原体 *Ca. phytoplasma fraxini*(登录号 AY685053)及 16SrVIII 组丝瓜丛枝植原体(登录号 AF086617);与 16SrI 组内的植原体相似性较低。

表 2 JWB-XFSZ 株系、JWB-XFDO 株系 *tuf* 基因与各组植原体 *tuf* 基因的核苷酸序列相似性比较

Table 2 Comparison of nucleotide of <i>tuf</i> gene between JWB-XFSZ、JWB-XFDO and other typical phytoplasma in different group			
16Sr group	Associated phytoplasma diseases	Accession No.	Identity/%
16Sr I	Wheat blue dwarf (WBD)	DQ507200	70.87
	Paulownia witches' -broom (PaWB)	AJ271319	70.16
	Mulberry dwarf phytoplasma (MD)	FJ844444	70.28
16Sr III	Peach western-X disease (WX)	AB095674	69.46
	Tsuwabuki witches' -broom (TWB)	AB095673	72.77
16Sr IV	Palm lethal yellowing phytoplasma (PLY)	EU413952	72.52
16Sr V	Flavescence dorée 'Ca. P. vitis' (FD)	AM939565	92.84
	Jujube witches' -broom strain Shaanxi (JWB)	EF088198	57.41
	Jujube witches' -broom strain WJWB (JWB)	DQ919061	57.29
	Jujube witches' -broom strain bj (JWB)	EU421731	70.40
	Jujube witches' -broom strain WJwb-Henan (JWB)	FJ445391	70.28
	Jujube witches' -broom strain Jwb-Henan (JWB)	FJ445388	70.28
16Sr VII	<i>Candidatus</i> Phytoplasma fraxini	AY685053	83.14
	Aster yellows witches' -broom phytoplasma (AYWB)	AY277404	70.75
16Sr VIII	Loofah witches' -broom (LfWB)	AF086617	77.56
16Sr X	Apple proliferation (AP)	AJ011104	70.55
	European stone fruit yellows 'Ca. P. prunorum'	EU103617	69.48
16Sr XII	Papaya dieback phytoplasma (PD)	Y18215	62.56
	<i>Candidatus</i> Phytoplasma australiense	DQ096804	70.64
	Red clover dwarf 'Ca. P. solani'	EU814646	70.40

将本研究中扩增到的枣疯病(JWB-XFSZ) *tuf* 序列与已登录 GenBank 的枣疯病 *tuf* 基因序列进行相似性比较,发现 JWB-XFSZ 株系与陕西杨凌地区酸枣丛枝病的 *tuf* 基因(登录号 DQ919061)相似性较低,仅为 57.29%。

利用 MEGA4.1 软件对植原体 *tuf* 基因核苷酸序列进行分析,获得 JWB-XFSZ 株系、JWB-XFDO 株系以及 JWB-TXSZ 株系和其它 18 种植原体 *tuf* 基因核苷酸序列的系统发生树(图 1)。由图中可知,JWB-XFSZ、JWB-XFDO 以及 JWB-TXSZ 被聚为单独

的一个分支,这 3 个株系与葡萄黄叶病植原体 *Candidatus* Phytoplasma vitis(FD)株系的亲缘关系最近,而与 AYWB 和 WBD 的最远。因此,这 3 个株系与 FD 一样,应同属于 16SrV 组。同时也可以看出,陕西地区枣疯病植原体(登录号 EF088198)和酸枣丛枝病植原体(登录号 DQ919061)的 *tuf* 基因与其它 19 种植原体未聚类到一起,说明这 2 个植原体株系与其它植原体亲缘关系较远。

2.2 核糖体基因(*rp*)序列扩增

分别提取北京昌平区漆园村发病、健康西峰山

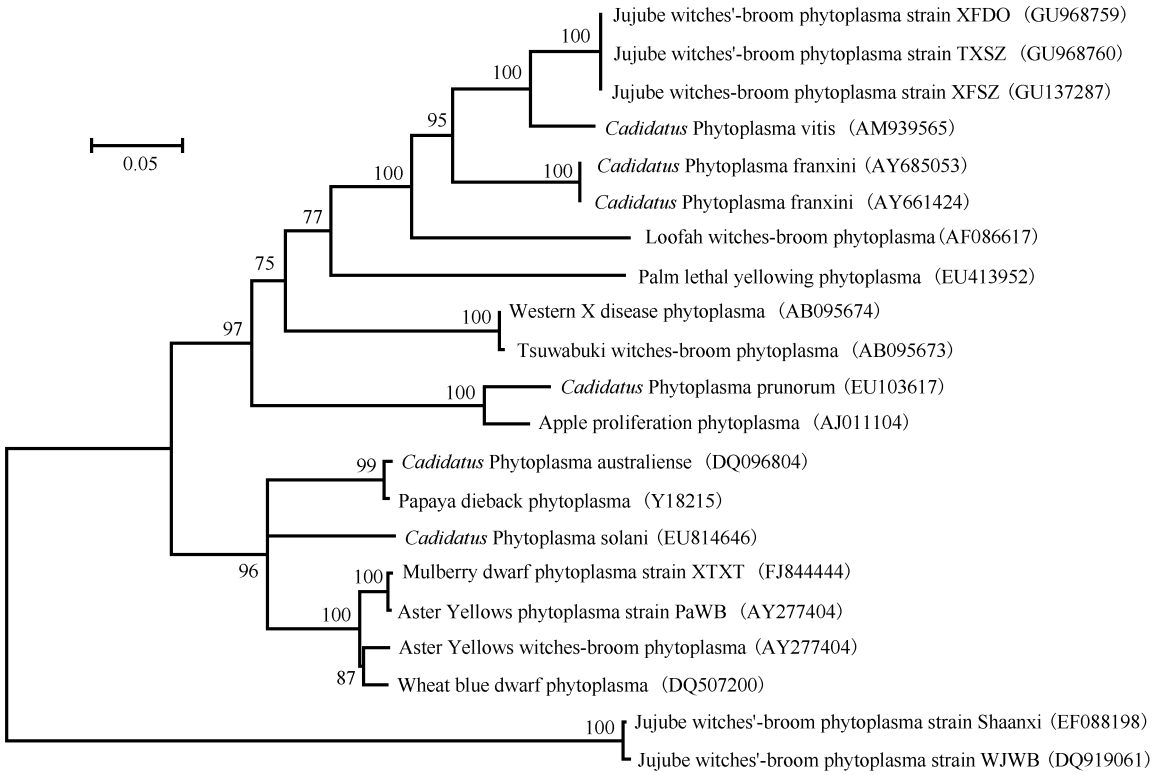


图 1 基于 21 种植原体 *tuf* 基因片段核苷酸序列系统发生树的构建

Fig. 1 Phylogenetic tree constructed by parsimony analysis of *tuf* gene nucleotide sequence from 21 phytoplasma strains. Bar, 5 substitutions in 100 nt; Accession numbers are shown in parentheses; Numbers on branches are confidence percentages obtained from 100 bootstrap replicates.

小枣 (JWB-XFSZ) 总 DNA, 经植原体 16SrV 组特异引物对 *rp*(v) F1A/*rp*(v) R1A 进行 PCR 扩增, 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳, 结果显示, 病株样品中扩增片段大小约 1.2 kb, 而健康枣树阴性对照和双蒸水空白对照均未扩增出特异性条带 (电泳图略)。

克隆 JWB-XFSZ 株系的 *rp* 基因并测序, 扩增到的 DNA 片段包含部分 *rp*S19 以及 *rp*L22 和 *rp*S3 基因的全部序列 (1196 bp): 392 A, 192 C, 134 G, 478 T; 百分比含量为: 32.8% A, 16.1% C, 11.2% G, 40.0% T。将 JWB-XFSZ 株系的 *rp* 基因登录 GenBank 进行相似性比对 (登录号 GU170400), 发现与已登录的 12 条枣疯病 *rp* 基因序列基本一致, 差别最大的有 4 个碱基, 相似性为 99.67%; 差别最少的为 2 个碱基, 相似性为 99.83%。将此序列与其他植原体 *rp* 基因比较并构建系统发生树, 结果如图 2 所示。从系统发生树可以看出, JWB-XFSZ 与全国各地 JWB 株系以及 HFWB 被聚到单独的一个小分支, 与 16Sr V 组植原体 *rp* 基因的相似性较高。

JWB-XFSZ 株系的 *rp* 基因与 GenBank 上已登录的不同地区 12 条枣疯病植原体 *rp* 基因只有 2-4

个碱基的差异, 说明不同地区枣疯病从 *rp* 基因来看未存在株系的变异; 而 JWB-XFSZ 株系的 *rp* 基因与 16SrV-B 亚组的樱桃致死黄化病植原体的 *rp* 基因有 99.08% 的相似性, 表明 JWB-XFSZ 株系可根据 *rp* 基因划分到 16SrV 组。

### 3 讨论

16S rDNA 是原核生物染色体基因组中的一种 rDNA 编码区序列, 在进化中高度保守, 常作为原核生物系统发育及分类研究的标准方法<sup>[16]</sup>。延伸因子 (EF-Tu) *tuf* 基因广泛存在于原核生物中, 主要生物功能是在蛋白质合成过程中负责肽链的延伸<sup>[17]</sup>。核糖体蛋白基因 (*rp*) 是植原体进化演变的一个重要基因, 在植原体株系关系和系统发育研究中, *rp* 基因揭示出更多有价值的信息和系统发育的标记, 能用于 rDNA 基因不易区分的近缘株系的研究<sup>[18]</sup>。*tuf* 基因和 *rp* 基因都具有保守性, 常作为植原体分类及系统发育研究的一个可靠标记, 但 *tuf* 基因和 *rp* 基因比 16S rDNA 基因的序列可变性强, 保守性低,

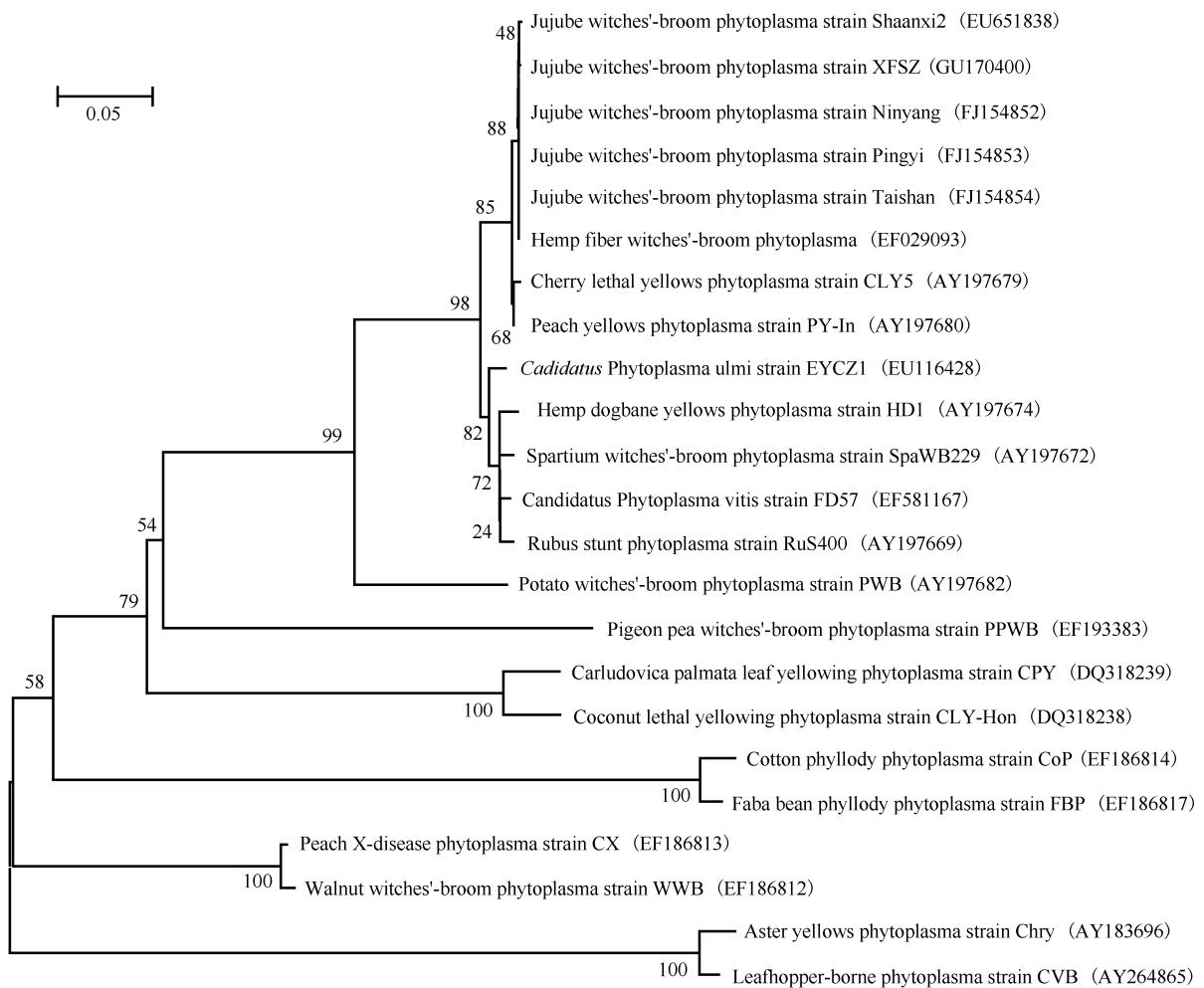


图 2 JWB-XFSZ 株系与其它植原体 *rp* 基因片段核苷酸序列系统发生树的构建

Fig. 2 The phylogenetic tree inferred from *rp* genes of JWB-XFSZ phytoplasma and other phytoplasmas. Bar, 5 substitutions in 100 nt; Accession numbers are shown in parentheses; Numbers on branches are confidence percentages obtained from 100 bootstrap replicates.

因此更适合研究亲缘关系比较近的植原体亚组及株系之间的分类。

目前 GenBank 上已公布的植原体 *tuf* 基因多属于 16SrI 组,而 16SrV 组的 *tuf* 基因序列相对较少,因此无法将 JWB 从 *tuf* 基因上进行亚组的分类。一般来说,用 *tuf* 基因分析各组及各亚组植原体之间的相似性均低于用 16S rDNA 基因分析的结果,不同组之间相似性差异为 17% 左右,而亚组之间为 3% 左右<sup>[19]</sup>。而本研究中枣疯病植原体 JWB-XFSZ、JWB-XFDO 以及 JWB-TXSZ 3 个株系的 *tuf* 基因与 GenBank 上已登录的中国各地区的枣疯病不同株系 *tuf* 基因序列相似性仅为 57.41% - 70.28%。不同地区枣疯病植原体的同一基因有这么大差异,分析并推测原因:1、不同地区的枣疯病植原体 *tuf* 基因本身差异较大;2、在 DNA 提取与 PCR 实验过程中存在人为误差。本研究测得的枣疯病 *tuf* 基因来自北京和河北两个不同地区的样品,每个扩增产物均送

样两个克隆并重复测序一次,其测序结果均一致,保证了实验数据的重复性;且本研究测得的枣疯病 *tuf* 序列与 16SrV 组的葡萄金黄化 (Flavescence dorée) 植原体 *tuf* 序列亲缘关系最近,相似性为 92.84%,合乎枣疯病植原体 *tuf* 基因序列特征。此 *tuf* 基因序列的获得也为枣疯病在亚组水平上的分类提供了新的参考依据。基于枣疯病植原体 *tuf* 基因存在较大差异,在今后的工作中有必要对更多地区和品种的枣疯病样品进行 *tuf* 基因的检测与鉴定。

由于植原体在寄主植物样品中含量较低,通常占提取总 DNA 的不到 1%,所以在检测中经常用到巢式 PCR 技术。巢式 PCR 虽然解决了植原体在植物体内浓度低、难以检测的问题,但是两次 PCR 扩增,增加了交叉污染的风险,因此巢式 PCR 极为灵敏但具有污染风险和假阳性结果的不足。本研究中为了避免因痕量植原体 DNA 污染而出现假阳性结果,PCR 扩增实验均采用普通 PCR,保证 PCR 扩

增的准确性。

## 参考文献

- [ 1 ] Bai X, Zhang J, Ewing A, Miller SA, Radek AJ, Shevchenko DV, Tsukerman K, Walunas T, Lapidus A, Campbell JW, Hogenhout SA. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188 : 3682-3696.
- [ 2 ] 李永, 田国忠, 朴春根, 朱水芳. 我国几种植物上植原体的快速分子鉴别与鉴定的研究. *植物病理学报* (*Acta Phytopathologica sinica*), 2005, 35 (4) : 293-299.
- [ 3 ] Firrao G, Garcia-chapa M, Marzachi C. Phytoplasmas: genetics, diagnosis and relationships with the plant and insect host. *Front Biosci*, 2007, 12 : 1353-1375.
- [ 4 ] Bertolini E, Tomes E, Olmos A. Co-operational PCR couple with dotblot hybridization for detection and 16SrX grouping of phytoplasmas. *Plant Pathology*, 2007, 1: 1-6.
- [ 5 ] 李永, 田国忠, 徐启聪, 朴春根, 汪来发, 郭民伟. 臭矢菜丛枝病植原体的分子鉴定研究. *植物病理学报* (*Acta Phytopathologica sinica*), 2009, 39 (4) : 377-384.
- [ 6 ] 朱天生, 潘一展, 崔廷涛, 高瑞, 李向东, 朱水芳. 榆树黄化病植原体的分子检测与鉴定. *植物病理学报* (*Acta Phytopathologica sinica*), 2008, 38 (4) : 401-406.
- [ 7 ] Wei W, Davis RE, Lee IM, Zhao Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57 : 1855-1867.
- [ 8 ] 王祈楷, 徐绍华, 陈子文, 张金岐. 枣疯病的研究. *植物病理学报* (*Acta Phytopathologica sinica*), 1981, 11 (1) : 15-18.
- [ 9 ] Jung HY, Sawayanag T, Kakizawa S, Nishigawa H, Wei W, Oshima K, Miyata S, Ugaki M, Hibi T, Namba S. ‘*Candidatus* Phytoplasma ziziphi’, a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches’-broom disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2003, 53 : 1037-1041.
- [ 10 ] 王海妮, 吴云锋, 安凤秋, 顾沛雯, 张昭亮. 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. *中国农业科学* (*Scientia Agricultura Sinica*), 2007, 40 (10) : 2200-2205.
- [ 11 ] 徐启聪, 田国忠, 王振亮, 孔繁华, 李永, 王合. 中国各地不同枣树品种上枣疯病植原体的 PCR 检测及分子变异分析. *微生物学报* (*Acta Microbiologica Sinica*), 2009, 49 (11) : 1510-1519.
- [ 12 ] 侯立华, 黄新, 朱水芳. 枣疯病植原体实时荧光定量 PCR 检测方法的研究. *生物技术通讯* (*Letters In Biotechnology*), 2010, 21 (1) : 70-72.
- [ 13 ] 顾沛雯, 安凤秋, 吴云锋, 杨栋, 罗朝鹏, 相建业, 杨英. 小麦蓝矮病植原体 16S rDNA 基因片段的比较分. *植物病理学报* (*Acta Phytopathologica Sinica*), 2005, 35 (5) : 403-411.
- [ 14 ] Schneider B, Gibb KS, Seemuüller E. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasma. *Microbiology*, 1997, 143 : 3381-3389.
- [ 15 ] Lee IM, Martini M, Marcon C, Zhu SF. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposal of ‘*Candidatus* Phytoplasma ulmi’ for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54 : 337-347.
- [ 16 ] Lim PO, Sears BB. 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *Journal of Bacteriology*, 1989, 171 : 5901-5906.
- [ 17 ] 安凤秋, 吴云锋, 孙秀芹, 顾沛雯, 杨英. 小麦蓝矮病植原体延伸因子 (EF-Tu) *tuf* 基因序列的同源性分析. *中国农业科学* (*Scientia Agricultura Sinica*), 2006, 39 (1) : 74-80.
- [ 18 ] Martini M, Lee IM, Bottner KD, Zhao Y, Botti S, Bertaccini A, Harrison NA, Carraro L, Marcone C, Khan AJ, Osler R. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57 : 2037-2051.
- [ 19 ] Kouji T, Natsuaki T, Okuda S. Phylogenetic analysis of elongation factor Tu gene of phytoplasmas from Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 2003, 69 : 316-319.

# Cloning and analysis of *tuf* and *rp* gene of the phytoplasma associated with Jujube Witches' -Broom

Wenli Lin<sup>1,2#</sup>, Haiqing Mou<sup>1#</sup>, Wenjun Zhao<sup>1</sup>, Qicong Xu<sup>3</sup>, Guozhong Tian<sup>3</sup>, Xiaolan Liao<sup>2</sup>, Shuifang Zhu<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China)

(<sup>2</sup>College of Bio-safety Science & Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

(<sup>3</sup>Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] Jujube witches' -broom (JWB) is an important plant disease caused by phytoplasma. The major objective of our research was to classify JWB in Beijing and Hebei districts and to provide reference for classification in subgroup level. [ **Methods** ] By use of PCR, the elongation factor Tu (*tuf* gene) and ribosomal protein (*rp*) gene of phytoplasma associated with JWB in Beijing and Hebei districts were amplified separately with universal primer pairs fTufu/rTufu and rp(v)F1A/rp(v)R1A. Partial *tuf* gene and *rp* gene were sequenced and similarity analysed with other phytoplasmas. [ **Results** ] We obtained partial *tuf* gene sequence (824bp) and complete *rp* gene (1196bp) from the diseased sample. In *tuf* gene, JWB in Beijing shared most similarity (92.84%) with Flavescence dorée (FD) phytoplasma (*Candidatus* Phytoplasma vitis), however, shared a low similarity (57.29%) with JWB in Shaanxi district which had been already reported. The similarity analysis for sequences of *rp* gene showed a high identity (> 96%) with members of the 16SrV group phytoplasmas. It shared most identity (99.83%) with JWB strain Taishan and Hemp fiber witches' -broom phytoplasma (HFWB) of the 16SrV group. [ **Conclusion** ] The JWB strains in Beijing and Hebei are members of 16Sr V; JWB in Beijing and Hebei share high similarity, and show a diversity with JWB in Shaanxi.

**Keywords:** Jujube witches' -broom; phytoplasma; elongation factor Tu; *rp* gene; sequence analysis

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Commonweal Project of Quality Control (200810517, 200810632)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-10-64896608; E-mail: zhushf@netchina.com.cn

#These authors contributed equally to this work.

Received: 9 March 2010 /Revised: 7 June 2010

## 《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效!此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。