

香蕉束顶病植原体 16S rDNA 片段的 RFLP 和序列分析*

李横虹 邱并生 李 铿 史春霖

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 香蕉束顶病(BBT)是一种发生在蕉类作物的严重病害。从带有典型香蕉束顶病症状的香蕉植株中按照检测植原体的方法提取 DNA, 扩增患病植株中植原体 16S rDNA 片段, 证明香蕉束顶病中有植原体存在。对此扩增片段进行限制性酶切片段长度多态性(RFLP)分析和核酸序列分析, 并与已知植原体的序列进行同源性比较, 构建进化树。结果显示该片段与 Gr1 的亲缘关系最近。

关键词 香蕉束顶病(BBT), 植原体, 16S rDNA, RFLP, 序列分析

分类号 S432 **文献标识码** A **文章编号** 0001-6209(1999)04-0315-20

香蕉束顶病(BBT)是一种严重影响香蕉产量的病害。澳大利亚、南太平洋、亚洲和非洲等世界各地都有发病, 在我国南方的蕉园也普遍存在这种病害。其典型症状为新长出的叶片渐小, 叶片直立成束, 叶质变硬, 病株束顶, 矮缩, 根系腐烂变紫色, 不发新根, 影响果树结实^[1]。长期以来这种病的病原始终不清。直到 80 年代末才认为引起上述病害的病原是一种小病毒, 即香蕉束顶病毒(BBTV)^[2~5]。Karan 等测定了 BBTV 的部分序列^[6~8]。并用 ELISA、DNA 杂交和 PCR 等鉴定方法进行诊断^[4, 9]。国内也有文献报道, 应用 BBTC 的单克隆抗体检测香蕉束顶病^[10]。尽管在 BBTC 的研究方面已取得较大的进展, 但是否 BBTC 就是香蕉束顶病的唯一的病原, 尚无定论。采用植原体特异引物通过 PCR 方法从患病植株 DNA 中扩增植原体 16S rDNA 片段, 并用 RFLP 和序列分析等方法进行分析, 此法可对植原体快速鉴定和分类。本文以带有香蕉束顶病症状的患病组织为材料进行了研究。

1 材料和方法

1.1 植物材料

用于鉴定的带有香蕉束顶病症状的患病材料和健株对照材料采自广东茂名。

1.2 DNA 提取

参照 Kollar 等^[11]介绍的方法取韧皮部组织提取 DNA, 提取样品 -20℃ 冰冻保存。

1.3 PCR 反应条件及所用引物对

参照 Lee 等^[12]根据植原体 16S 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:

* 国家自然科学基金资助项目(No. 39570004)

收稿日期: 1998-05-08, 修回日期: 1998-08-13

R16mF2: 5'-CATGCAAGTCGAACGGA-3'

R16mR1: 5'-CTTAACCCCAAT-
CATCGAC-3'

R16F2: 5'-ACGACTGCTAAGACTGG-3'

R16R2: 5'-GCGGTGTGTA-
CAAACCCCG-3'

PCR 反应条件: 50 μ L PCR 反应体系中含有 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 引物对 500 nmol/L, dNTP 100 μ mol/L, DNA 提取液 20 ng(巢式 PCR 时取第一引物对扩增产物 20 倍稀释液 1 μ L), Taq DNA 聚合酶 1.25 U(上海生工生物工程公司), 变性温度 94 $^{\circ}$ C, 复性 52 $^{\circ}$ C, 延伸 72 $^{\circ}$ C, 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 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在 1% 琼脂糖(0.5 μ g/mL EB) 1 \times TAE 缓冲系统电泳, 每孔加样 5 μ L, 电泳毕在紫外灯下观察并摄影记录。

1.4 限制性酶切片段长度多态性(RFLP)分析

使用 Promega Wizard PCR Preps DNA 纯化系统快速纯化扩增所得产物, 然后进行酶切反应, 37 $^{\circ}$ C 水浴 24 h 使充分酶解。选用的酶有: Alu I、Hinf I、Msp I、Kpn I、Rsa I、Mbo I、Tru91。酶切产物经 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE), 在 1 \times TBE 系统中电泳, 使用 1 \times TBE 配制的 0.5 μ g/mL EB 室温染色 40 min, 紫外灯下观察并摄影记录。

1.5 玻璃粉法纯化 PCR 产物及克隆

使用 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(*E. coli*) TG1 中。用单菌落电泳法筛选出含重组质粒的菌落。筛选出的重组克隆进行菌落 PCR 检定, 扩增产物的大小如果与巢式 PCR 产物一致, 证明存在目的片段(16S rDNA 片段)。

1.6 16S rDNA 片段序列测定

随机选取三个阳性克隆, 用 PEG 沉淀法制备质粒, 用作测序模板。使用 Pharmacia P-L Biochemicals 的 T7 Sequencing Kit, 以 α -³⁵SdATP 作为标记底物测序。第一轮测序使用 pUC/M13 正反向通用引物, 第二轮测序所用的引物 U5 和 1100R 如下:

U5: 5'-CCGCAATGGAGGAAACT-3' 1100R: 5'-AGGGTTGCGCTCGTTG-3'

1.7 酶切图谱的建立

将所测得的 16S rDNA 序列输入计算机, 用 DNAIS 软件分析 Alu I、Hinf I、Msp I、Kpn I、Rsa I、Mbo I 和 Tru91 酶切位点。

1.8 同源性比较

从 Genbank 中调出 6 种已知植原体的 16S rDNA 序列, 以及与植原体亲缘关系较近的 *A. laidlawii* (*Acholoplasma laidlawii*) 和 *An. varium* (*Anaeroplasma varium*) 的 16S rDNA 序列。用 Laser Gene 软件(DNASTAR 公司)排列 BBT 中植原体及 3 种已知植原体的序列(Gr1, Gr2, Gr3), 使用 Clustal 方法比较同源性, 然后加入 AAY, ACLR, *A. laidlawii*, *An. varium* 进行系统进化分析, 找到最佳进化树。

2 结果

2.1 PCR 结果

香蕉束顶病 DNA 巢式 PCR 产物的 1% 琼脂糖(0.5 μ g/mL EB)电泳结果见图 1。以

照片左侧的分子量标记为对照,扩增片段大小约 1.2kb,片段大小与 Lee 等^[12]报道的相符。而健康株对照没有出现特异扩增带。因此说明病株中有植原体存在。由于所用引物对都是植原体特异的,所以巢式 PCR 中的两次扩增也是两次特异性检测的过程。而且巢式 PCR 能提高检测敏感性,可以适当减少模板量,也间接提高了扩增的特异性。

2.2 RFLP 分析结果

目前对植原体的分类主要是在分子水平上进行。获得植原体 16S rDNA 序列分析数据后可依据核酸同源性指标分组,或者通过 RFLP 分组。Lee 等^[12]对 40 种植原体进行了 16S rDNA 扩增和 RFLP 分类,证实了 16S rDNA 扩增产物经 RFLP 进行分类与依据序列同源性分类结果一致,可以作为植原体分类的一种简化方法。文章中选用了 15 种限制性内切酶进行酶切,本文使用的 7 种酶就是从这 15 种酶中选出的。这 7 种酶对不同型的植原体 16S rDNA 片段的酶切图谱有较明显的差异,对分型较有意义。香蕉束顶病 DNA 巢式 PCR 产物经酶切后 5% 聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果见图 2。与 lee 等^[12]文献中所列的酶切图谱进行比较可知:BBT 中植原体与 I 型植原体的酶切图谱一致。

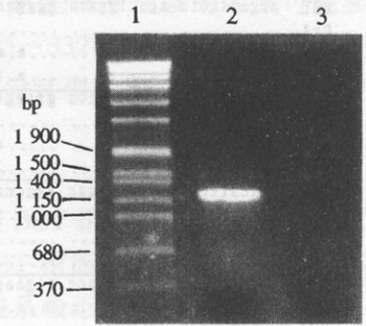


图 1 香蕉束顶病 DNA 巢式 PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 1 Nested PCR amplification of 16S rDNA of phytoplasma from banana bunchy top

1. SPP1/EcoRI marker; 2. Nested PCR product of banana bunchy top DNA; 3. Nested PCR product of health banana DNA.

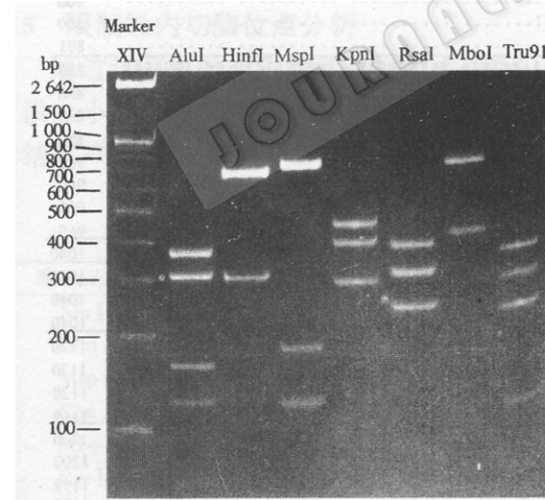


图 2 香蕉束顶病 DNA 巢式 PCR 产物 RFLP 的聚丙烯酰胺电泳

Fig. 2 RFLP analysis of 16S rDNA fragment amplified by nested PCR, separated by electrophoresis through a 5% polyacrylamide gel

2.3 序列测定结果及同源性比较

对 3 个克隆进行了 DNA 序列分析,测定了从 R16F2 到 R16R2 的 16S rDNA 片段的序列。长为 1243 个核苷酸(图 3)。G + C 含量为 47.2%。同源性比较结果,BBT 中植原体与 AAY 为 99.3%,ACLR 为 99.1% 和 Gr1 为 99.9%。与 I 型植原体 16S rDNA 的同源性达 99.1% ~ 99.9%,而与 Gr2、Gr3 的同源性分别为 90.2% 和 90.3%,碱基差异分别为 125 个和 122 个。与 AAY、ACLR 相比分别有 9 个和 11 个位点的差异,与 Gr1 仅有一个碱基存在差异,说明其与 Gr1 亲缘关系最近。Gr1 是 Namba S 等^[13]测定的 I 型植原体的 16S rDNA 序列,受侵染致病的植物为洋葱黄化。图 3 中列出了 BBT 中植原体 16S rDNA 片段与 I 型、II 型和 III 型植原体的序列比较,有些区域保守性极强,如 160bp ~ 269bp、572 ~

BBT	acgacigccta agacitggata ggagacaaga aggcacctic tigtillisa aagaccttagc a-ataggtatg cttagggagg	80
Gr1	80
Gr2	...agl..... a.agt..... t act..... tct ttaga..... a.....	80
Gr3	...agl..... a..... a.t.t.a..... f..... t..... t.cti ttaga..... a..... a.....	81
BBT	agcttgcgic acattagtia gtllgggtggg taaagccctt ccaagactat gatgtgtagc cgggctgaga ggtlgaacgg	160
Gr1	160
Gr2	g..... a..... ca..... l.a..... a.....	160
Gr3	g..... g..... a..... t..... t.a..... a.....	161
BBT	ccacatlggg acigagacac ggcccaaacct cctacggggg gcagcagtag ggaattttcg gcaatggagg aaactctgac	240
Gr1	240
Gr2	240
Gr3	241
BBT	cgagcaacgc cgcgtgaacg atgaagtatf tccgtacgta aagttctiti attagggag aataaatgat ggaabaatca	320
Gr1	320
Gr2 gg..... f..... a..... a..... gag..... ct	320
Gr3 t..... gaa..... a..... ag..... ct.	321
BBT	ttctgacggt acctaatgaa taagccccgg ctaactatgt gccagcagcc gcggtaaac atagggggca agcgttatcc	400
Gr1	400
Gr2	cct..... t..... t..... a..... g.....	400
Gr3	.ct..... c..... ttc..... a.....	401
BBT	ggaattatig ggcgtaaagg gtccgttagc ggttaaatca glltggctc taagtccaat gctcaacatt gigaigtcat	480
Gr1 a.....	480
Gr2 t..... .c.a.a..... t.t.gc..... t..... cgg t.tg.....	480
Gr3 t..... .c.a.a..... t.t.g..... t..... c..... cc.....	481
BBT	aaaaactgll tagctagagt aagatagagg caagtggaa tccatgtgta gtggtaaat gcgtaaat atggaggaa	560
Gr1	560
Gr2	.g..... ia..... g..... c..... c.....	560
Gr3	.g..... a.c aga..... g..... c..... c.....	561
BBT	accagtagcg aaggcggctt gcctggctclt tacigacgct gaggcacgaa agcgtgggga gcaaacgga ttagatacc	640
Gr1	640
Gr2	...ag... t.....	640
Gr3	...ag... t.....	641
BBT	tggtagtcca cgcglaaac gatgagtact aaactgtgg taaaaccagt gttgaagtia acacaitaag tactccgct	720
Gr1	720
Gr2 gt...c..... g...ac.....	720
Gr3 gt...c..... gg...ct.g...ac.....	721
BBT	gagttagtac tacgcaagta tgaaccttaa aggaattgac gggactccgc acasgcggig galcatgig titaaticga	800
Gr1	800
Gr2	800
Gr3	801
BBT	aggiaccoga aaaacctcac caggtctiga catgcttctg caaagctiga gaacacacagi ggggltatc agtgcacag	880
Gr1	880
Gr2	..a..a... ..f..... ..ll.ct... ..g...t.a... ..t.t.a... ..gaa... ..	880
Gr3	..a..a... ..f..... ..a.ct... ..a...c...t.t... ..ggat... ..	880
BBT	gtggtagcat gttgtcgta gctcgtctg tgagatgig ggttaagtc cgaacagagc gcaaccctta ttgtagtta	960
Gr1	960
Gr2 tcc...aga t..... taa..... ..g...c...a.g	960
Gr3 a..... taa..... ..g...c...g	960
BBT	ccagcacgta atgggtggga ctttagcaag acigccagtg ataatigga ggaaggggg gacgacgta satcatcatg	1040
Gr1	1040
Gr2	...t... ..a..... a.g..... a..... a..... tt.....	1040
Gr3	...t... ..a..... atg..... a.a..... a..... a..... tc.....	1040
BBT	ccccttatga cctgggctac aaacgigata caatggctgt tacaaggggt agctgaagcg caagllttig gcgaaltca	1120
Gr1	1120
Gr2	...t..... t..... l.a..... a..... a..... tg..... a..... c.....	1120
Gr3	...t..... t..... a..... a..... a..... t..... a..... a..... c.....	1119
BBT	aaaaaacagt ctacgttccg atlgaagtct gcaactcgac tcalgaagt tggatcgt agtaatcggc aatccagcat	1200
Gr1	1200
Gr2	t...t.a.....	1199
Gr3	1198
BBT	gtcgcggtag atacgttctc ggggtttgta cacaccgcc gtc	
Gr1	
Gr2	...a.....	
Gr3	

图3 BBT 植原体 16S rDNA 序列, 及其与三种已知植原体 16S rDNA 序列同源性比较(打点处表示碱基相同)

Fig.3 Comparison of 16S rDNA of phytoplasma from BBT and three known phytoplasmas

Note: Point-decoration means the same sequence.

673bp 和 694~803bp 等区段四种植原体的碱基完全相同。这些保守性强的区域可能参与 16S rDNA 的重要功能。而另一些区段,如 26~65bp, 295~337bp, 444~495bp, 810~878bp, 1078~1115bp 等碱基差异较大。可以参考这些区段设计型特异性的 PCR 引物进行诊断。

2.4 构建进化树

通过 16S rDNA 序列的比较,利用 Laser Gene 软件构建 BBT 植原体与 5 种已知植原体及 *A. laidlawii*, *An. varium* 的进化树(图 4)。可见 BBT 植原体与 Gr1、AAY 和 ACLR 同属于 I 型植原体,亲缘关系很近,其中与 Gr1 亲缘关系最近,可能属于一个亚型。进化树图中各分枝的长短表示了它们的进化距离,也就是说分枝越长者它所经过的进化阶段越长。可见植原体的进化距离长于 *A. laidlawii* 和 *An. varium*,植原体中 II 型、III 型的进化距离长于 I 型。

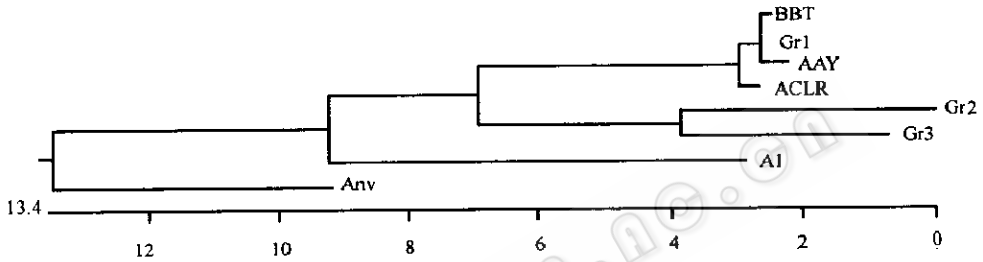


图 4 进化树(Laser Gene 软件构建)

Fig. 4 Phylogenetic tree(Laser Gene system)

2.5 限制性内切酶位点分析

通过计算机分析限制性酶切位点(表 1),将酶切位点数值两两相减就可得到酶切的片段大小。与图 2 中的 RFLP 图相比较可知:计算机分析结果与实际酶切片段 PGAE 电泳结果一致。

表 1 限制性酶切位点计算机分析结果(DNASIS 软件)

Table 1 Putative restriction sites by computer analysis(DNASIS)

酶 Enzyme	识别序列 Recognition sequence	酶切位点 Cutting position
Alu I	AG↓ CT	83, 495, 847, 903, 1094
Hinf I	G↓ ANTC	765, 1115, 1175, 1192
Msp I	C↓ CGG	141, 349, 401
Kpn I	GGTAC↓ C	334, 808
Mbo I	↓ GATC	782
Rsa I	CT↓ AC	276, 332, 669, 713, 729, 733, 806, 1231
Tru91	T↓ TAA	48, 435, 700, 708, 749, 794, 925

3 讨论

3.1 香蕉束顶病病原的鉴定

目前大量的文献报道都认为香蕉束顶病是由 BBTV 感染所致。本项研究中通过植原体 16S rDNA 特异的引物对 R16mF2/R16mR1 和 R16F2/R16R2 巢式 PCR 扩增可得到

1.2kb 的特异片段,并且此片段的 RFLP 图谱与目前已知的植原体 I 型的 RFLP 图谱相吻合^[12],表明香蕉束顶病病株中有植原体存在。这为全面了解香蕉束顶病的病原和致病机制以及开展预防提供了依据。

3.2 分类及进化关系研究

16S rDNA RFLP 图谱比较结果说明香蕉束顶病中的植原体属于植原体中的 I 型。16S rDNA 片段序列测定结果与已知的若干植原体 16S rDNA 片段序列同源性比较也说明,此序列与 I 型的同源性最高,达 99% 以上,进化树分析结果也支持这一结论。

参 考 文 献

- [1] 方中达. 中国农业植物病害. 北京:中国农业出版社出版,1996.454
- [2] Robert M H. *Journal of General Virology*, 1991, **72**:225~230.
- [3] Iskra M L, Garnier M, Bove J M. *Fruits*, 1989, **44**:63~66.
- [4] Thomas J E, Distzgen R G. *Journal of General Virology*, 1991, **72**:217~224.
- [5] Wu R Y, Su H J. *Journal of Phytopathology*, 1990, **128**:153~160.
- [6] Karan M, Harding R M *et al.* *Journal of General Virology*, 1994, **75**:3541~3546.
- [7] Xie W S, Hu J S. *Phytopathology*, 1995, **85**(3):339~347.
- [8] Wu R Y. *Journal of Phytopathology*, 1994, **142**:292~300.
- [9] Hafner G J, Harding R M *et al.* *Journal of General Virology*, 1995, **76**:2279~2285.
- [10] Zhang H B, Zhu X R. *Acta Phytophylacica Sinica*, 1995, **22**(1)75.
- [11] Kollar A, Seemuller E, Bonnet F *et al.* *Phytopathology*, 1990, **80**(3):233~237.
- [12] Lee I M, Hammond R W, Davis R E *et al.* *Phytopathology*, 1993, **83**(8):834~842.
- [13] Namba S, Oyaizu H *et al.* *Int J Syst Bacteriol*, 1993, **43**(3):461~467.

AMPLIFICATION OF PHYTOPLASMA 16S rDNA FROM BANANA BUNCHY TOP DISEASE, RFLP AND SEQUENCE ANALYSIS OF 16S rDNA FRAGMENT*

Li Henghong Qiu Bingsheng Li Li Shi Chunlin

(*Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)

Abstract Extract DNA from banana plants with banana bunchy top disease and amplify the phytoplasma 16S rDNA fragment by nested PCR. The classification of the phytoplasma established on the basis of 16S rDNA restriction patterns was examined by performing a sequence analysis of 16S rDNA fragment. The RFLP pattern, sequence data and phylogenetic tree showed that this phytoplasma should belong to Group I (*Phytoplasma asteri*).

Key words Banana bunchy top, Phytoplasma, 16S rDNA, RFLP, Sequence analysis

* Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39570004)