

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
49(11): 1510 – 1519; 4 November 2009  
ISSN 0001 – 6209; CN 11 – 1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

# 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

徐启聪<sup>1</sup>, 田国忠<sup>1\*</sup>, 王振亮<sup>2</sup>, 孔繁华<sup>3</sup>, 李永<sup>1</sup>, 王合<sup>4</sup>

(<sup>1</sup>中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091)

(<sup>2</sup>河北林业科学院森林保护研究所, 石家庄 050061)

(<sup>3</sup>山东泰安市农业科学研究院, 泰安 271000)

(<sup>4</sup>北京市林业保护站, 北京 100029)

**摘要:**【目的】检测不同地区枣树品种上的枣疯植原体侵染及保守基因序列的变异。【方法】利用植原体 16S rDNA 的通用引物 R16mF2/R16mR1、16S-23S 间区序列(SR)的通用引物 SR1/SR 及 *secY* 基因引物 FD9f/r, 通过 PCR 检测采自国内 7 个地区 14 个枣树品种上的 32 个枣疯病和 4 个酸枣丛枝病样品。将 PCR 产物进行直接或克隆测序, 结合已报导的测序数据, 进行序列同源性和系统进化分析。【结果】所有枣疯病样品中均检测到植原体; 皆属于榆树黄化 16S rV-B 亚组, 与我国重阳木丛枝和樱桃致死黄化遗传关系更近, 而与国外的其他植原体亲缘关系较远。不同地区和不同抗性品种上的植原体在 16S rDNA、SR 和 *secY* 基因上都存在程度不同的序列差异。直接测序法检出的优势株系分布范围很广。不同株系间的 *secY* 基因变异比 16S rDNA 和 SR 更明显, 某些碱基替换并不影响编码氨基酸种类, 但有的株系的碱基缺失使编码框中断。【结论】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, 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。

**关键词:** 枣疯病; 植原体; 16S rDNA; 16S-23S 间区; *secY* 基因; 分子变异

**中图分类号:** X172    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0001-6209 (2009) 11-1510-10

枣疯病是我国枣树 (*Zizyphus jujuba* Mill.) 上的毁灭性病害, 几乎遍布我国所有的枣树栽培区<sup>[1]</sup>, 呈现典型的黄化丛枝型病症, 病原是枣疯植原体 (*Ca. Phytoplasma ziziphi*)。通过分子生物学研究, 已确定其属植原体属榆树黄化组 16SrV 组 B 亚组 (16SrV-B)<sup>[2]</sup>, 并且采用 PCR 对部分地区的枣疯病样品进行了分子检测<sup>[1,3]</sup>。但迄今针对我国不同地区、侵染不同抗性枣树品种的植原体则缺乏系统的鉴定和全面的了解, 不同分离物间是否存在遗传变异及

与其他种类植原体的混合感染都不明确, 这将影响抗病品种的合理利用、有效的检疫措施的制定和综合管理水平的提高。

16S rDNA 已成为植原体分子检测和分类鉴定的主要依据。Lee 等<sup>[2]</sup>根据植原体 16S rRNA 基因的 RFLP 分析, 将植原体 34 个典型的株系划分为 14 个组及 41 个亚组。国际比较菌原体学研究计划 (IRPCM) 参考 16SrDNA 序列, 将植原体划分为 17 个组, 24 个候选种, 至少 40 个亚组, 并制订了相应的

**基金项目:** 科技部“十一五”林业科技支撑计划项目“商品林重大生物灾害防控技术研究”项目(2006BAD08A113-2); 国家质量监督检验检疫总局公益性行业科研专项“重要果树黄化病原鉴定技术标准研制”(200810517-3)

\* 通信作者。Tel: +86-10-62889525; Fax: +86-10-62884972; E-mail: [tiangz@caf.ac.cn](mailto:tiangz@caf.ac.cn)

**作者简介:** 徐启聪(1982-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向为分子病理。E-mail: [qicongx@163.com](mailto:qicongx@163.com)

**收稿日期:** 2009-04-26; **修回日期:** 2009-06-01

分类标准<sup>[4]</sup>。Wei 等根据目前已经发表的植原体 16SrDNA, 将植原体分为 28 个组<sup>[5]</sup>。

16S-23S rDNA 间区序列 (16S-23S rDNA space region, SR) 由于不加入成熟核糖体, 在进化过程中承受的自然选择压力非常小, 比 16SrDNA 能容忍更多的变异<sup>[6]</sup>, 其丰富的变异可在较低的分类阶元上解决原核生物系统发育问题, 为类群内部的系统重建提供较好的支持<sup>[7]</sup>。

跨膜蛋白质 *secY* 是原核生物的分泌蛋白转运系统最主要的组成部分, *secY* 基因同 16SrRNA 基因一样具有保守性, 但核苷酸序列变异较 16SrDNA 相对较大, 基于 *secY* 基因序列表现出来的植原体多样性比基于 16SrDNA 序列的多样性要丰富<sup>[8]</sup>, 更适合比较亲缘关系近的植原体亚组及株系。Lee 等<sup>[9]</sup> 曾将 *secY* 基因用于榆树黄化组 (16SrV) 的系统分类。

本研究采集了全国 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, 利用 16SrDNA、SR 和 *secY* 引物检测其中的植原体, 对 PCR 产物进行测序, 鉴定植原体的种类, 比较其序列同源关系, 以期了解不同地区不同植原体样品之间分子变异和遗传多样性, 为植原体群体分子系统发育与进化、病原致病机制、病害流行预测、抗病品种利用及综合防治提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试样品:** 2006 年采集了河南濮阳枣疯 (JWBPY), 濮阳酸枣丛枝 (WJWBPY), 北京林科院枣疯 (JWBCAF) 及香山酸枣丛枝 (WJWBXS)。

2007 年 ~ 2008 年 6 月份至 11 月份, 采集了发病严重的枣树嫩枝叶, 表 1 所示。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** 质粒 pMD18-T simple vector 购自 Takara 公司, DNA 提取试剂盒、DL2000、PCR 反应体系、*E. coli* DH5 $\alpha$  购自北京天根生化科技有限公司。Sigma 3-18 K 台式高速冷冻离心机, Ependorf Mastereyler Gradient PCR 仪。

### 1.2 植物总 DNA 提取

用 DNA 提取试剂盒 (北京天根生化科技有限公司) 提取枣疯病组织总 DNA, 取样量为 0.1g 鲜叶片, DNA 用 100 $\mu$ TE 溶解。

### 1.3 PCR 扩增

16SrDNA 引物采用 Lee 等<sup>[10]</sup> 报导的引物对 Rl6mF2/Rl6mRl, SR 引物采用 Chang 等<sup>[11]</sup> 使用的引物对 SR1/SR2, 5 号、6 号、7 号、10 号、25 号、27 号、

31 号先采用引物 P1/P7 进行第一次 PCR, 再用 SR1/SR2 进行巢式 PCR, *secY* 引物采用 Darire 等<sup>[12]</sup> 使用的引物对 FD9f/r。

PCR 反应体系: 50  $\mu$ L 体系中含有 5  $\mu$ L 10 $\times$  PCR buffer, 上下游引物各 0.2 mmol/L, dNTPs 0.2 mmol/L, Taq DNA 聚合酶 2 U, DNA 模板 40 ng。

PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 30s, 52 $^{\circ}$ C (16SrDNA)/56 $^{\circ}$ C (SR)/51 $^{\circ}$ C (*secY*) 30s, 72 $^{\circ}$ C, 1min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, SR 的巢式 PCR 的反应条件同直接 PCR。

PCR 产物用 1% 琼脂糖电泳检测 (SYBR green 染色), 紫外透射仪下观察, Vilber 凝胶成像仪中照相。

### 1.4 PCR 产物的序列测定与分析

16SrDNA、SR 和 *secY* 基因的扩增产物经纯化试剂盒纯化或克隆后, 送上海生工生物技术有限公司测序。部分样品的 PCR 产物经纯化后, 直接作为模板进行测序, 部分样品的 PCR 产物连接到质粒载体 pMD18T 中, 克隆到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中, 筛选阳性克隆进行测序。所得序列用 DNASTAR、DNAMAN 6.0 及 MEGA 3.1 软件进行拼接、比对和分子进化遗传分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 不同地区采集样品 PCR 检测

所有样品均分别扩增出约 1400bp 的 16SrDNA 特异性产物, 29 个样品通过直接 PCR, 7 个样品 (均在 11 月下旬采集) 通过巢式 PCR 扩增出约 400 bp 的 SR 特异性引物, 而健康枣树和双蒸水对照未扩增出 (图 1、图 2) 产物, 表明所有枣疯样品中均有植原体的存在。15 种样品扩增出了约 1400 bp 的 *secY* 基因特异性产物 (图 3), 这部分样品都是在 7 月到 10 月之间采集的, 而 11 月份采集的样品均未扩增出 *secY* 的特异性产物, 可能是患病枣树在这段时间体内植原体的含量有所下降以及 PCR 反应的抑制物质含量增多造成的。

### 2.2 16S rDNA 的序列分析

测得 26 个菌株的 28 条 16SrDNA 序列 (表 1 中序号为: 1、2、3、4、9、11、12、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、25、29、30、31、32、33、34、35、36)。26 个菌株均进行过 1 次 PCR 产物直接测序, 吉安大枣和北京龙爪枣植原体除 PCR 产物直接测序外, 还各进行过 1 次克隆测序, 2006 年已测定 5 个林科院枣疯、3 个香山酸枣丛枝、2 个河南濮阳枣疯、3 个河南濮阳酸枣菌株 16SrDNA 的克隆序列, 共计 15 个克隆测序。其中 26 个株系直接测序序列同源性为 100%,

表 1 枣疯病材料概况

Table 1 The information about the JWB samples in this paper

Province	No.	Cultivar*	Resistance <sup>†</sup>	Symptoms <sup>‡</sup>	Sampling site	Sampling date
Hebei (河北)	1	TXDO(唐县冬枣)	S	WB	Tang county(唐县)	May 2008
	2	TXCH(唐县长红枣)	R	WB	Shijiagou, Tang county(唐县史家沟村)	Aug 2008
	3	XYPZ(行营沟婆枣)	S	WB	Xingyinggou, Tan county(唐县行营沟村)	Aug 2008
	4	TXPZ(唐县婆枣)	S	WB	Shijiagou, Tang county(唐县史家沟村)	Aug 2008
	5	ZHDA(赞皇大枣)	S	WB	Xuting, Zanhuang county(赞皇县许亭镇)	Nov 2008
	6	PSHP(平山壶瓶枣)	R	WB	Wangjiagou, Pingshan county(平山县王家沟村)	Nov 2008
	7	XTLZ(行唐梨枣)	S	WB	Wuzhuang, Xingtang county(行唐县武庄镇)	Nov 2008
	8	FPHP(阜平壶瓶枣)	R	WB	Fuziyu, Fuping county(阜平县父子峪)村	Nov 2008
	9	XTPZ(行唐婆枣)	S	WB	Wuzhuang, Xingtang county(行唐县武庄镇)	Nov 2008
	10	ZHSZ(赞皇酸枣)	S	WB	Xuting, Zanhuang county(赞皇县许亭镇)	Nov 2008
	11	TXSZ(唐县酸枣)	S	WB	Shijiagou, Tang county(唐县史家沟村)	Nov 2008
Beijing (北京)	12	XFXZ(西峰山小枣)	U	WB	Xifengshan, Changping district(昌平西峰山)	Aug 2008
	13	XFDO(西峰山冬枣)	S	WB	Xifengshan, Changping district(昌平西峰山)	Aug 2008
	14	CPLZ(昌平梨枣)	S	WB	Changling, Changping district(昌平区长陵镇)	Aug 2008
	15	CPMY(昌平马牙枣)	U	WB	Qiyuan, Changping district(昌平区漆园村)	Aug 2008
	16	HDDO(海淀冬枣)	S	WB	Sujiaduo, Haidian district(海淀区苏家坨镇)	Jul 2008
	17	HDDM(海淀冬枣)	S	M	Sujiaduo, Haidian district(海淀区苏家坨镇)	Jul 2008
	18	PGDO(平谷冬枣)	S	WB	Jinhaihu, Pinggu district(平谷区金海湖镇)	Otc 2008
	19	PGLZ(平谷梨枣)	S	WB	Jinhaihu, Pinggu district(平谷区金海湖镇)	Otc 2008
	20	BJLZ(北京龙枣)	S	WB	Xuanwu district(宣武区)	Aug 2007
	21	BSDA(北师大附中大枣)	U	WB	Xuanwu district(宣武区)	Aug 2007
Shanxi (山西)	22	YCXZ(运城相枣)	S	WB	Yanhu, Yuncheng city(运城盐湖区)	Nov 2008
	23	YCLZ(运城梨枣)	S	WB	Yanhu, Yuncheng city(运城盐湖区)	Nov 2008
	24	JSBZ(稷山板枣)	R	WB	Yaocun, Jishan county(稷山县姚村)	Nov 2008
	25	LBDA(灵宝大枣)	R	WB	Yuecun, Pinglu county(平陆县岳村)	Nov 2008
	26	YJLZ(永济梨枣)	S	WB	Taining, Yongji county(永济县太宁村)	Nov 2008
	27	YJLZ(永济梨枣)	S	WB	Zhaofang, Yongji county(永济县赵坊村)	Nov 2008
	28	JSSZ(稷山酸枣)	S	WB	Yaocun, Jishan county(稷山县姚村)	Nov 2008
	29	YJHM(永济蛤蟆枣)	R	WB	Taining, Yongji county(永济县太宁村)	Nov 2008
Henan (河南)	30	PBHS(扁核酸枣)	S	WB	Puyang city(濮阳市濮上园)	Sep 2007
	31	TBDA(桐柏大枣)	S	WB	Liaohe, Nanyang city(南阳市潦河镇)	Nov 2008
	32	ZSSZ(周山酸枣)	S	WB	Luoyang city(洛阳周山公园)	Nov 2008
Shandong (山东)	33	NYCH(宁阳长红枣)	R	WB	Geshi, Ningyang county(宁阳县葛石镇)	Jul 2008
	34	NYYH(宁阳园红枣)	S	WB	Geshi, Ningyang county(宁阳县葛石镇)	Jul 2008
Jiangxi (江西)	35	JADA(吉安大枣)	U	WB	Ji an city(吉安市)	Jul 2007
Tianjin (天津)	36	TJDO(天津冬枣)	S	WB	Machangdao(天津市场马道)	Jul 2008

†S, Susceptible; †R, Resistance; †U, Unknow; ‡WB, Witches'-broom; ‡M, Mosaic.

有 4 个克隆序列与 26 个直接测序序列的同源性也为 100%，约占总克隆序列的三分之一，推断为优势菌株序列；而另外 11 个克隆序列两两之间存在 1-5 个碱基差异，同源性为 99.8%。

26 个同源性为 100% 的 PCR 产物直接测序序列与前人测过的 9 个枣疯病、2 个酸枣丛枝病和 5 个其它植物(韩国枳椇 AB442218、日本枳椇 AB361249、日本女贞 AB293422、大麻 EF029092、纸桑 AY576685)

丛枝病植原体 16S rDNA 序列同源性也为 100%，而本研究 11 个克隆测序及前人所测 16 个枣疯 16S rDNA 序列之间存在 1-6 个碱基差异，共计 57 处碱基多态位点，包括 54 个单一变异位点，3 个简约信息位点。多态位点从 5' 到 3' 的范围内分布不均匀，从 5' 端至 800 位碱基之间，有 40 个多态位点，从 800 到 1100 位碱基之间，有 5 个多态位点，从第 1100 位碱基到 3' 端末尾，有 12 个多态位点。

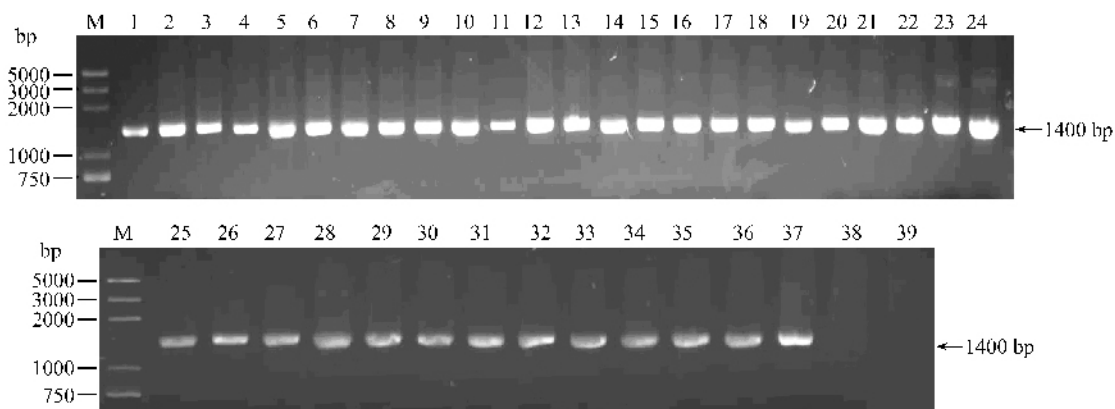


图 1 枣疯病植原体 16S rDNA 扩增结果

Fig.1 PCR amplification of 16S rDNA from jujube witches'-broom phytoplasma. M. DL plus2000 Marker; 1-36 Jujube witches'-broom (Table 1); 37. Paulownia witches'-broom as positive control; 38. Healthy jujube as negative control; 39. Double distilled water as blank control.

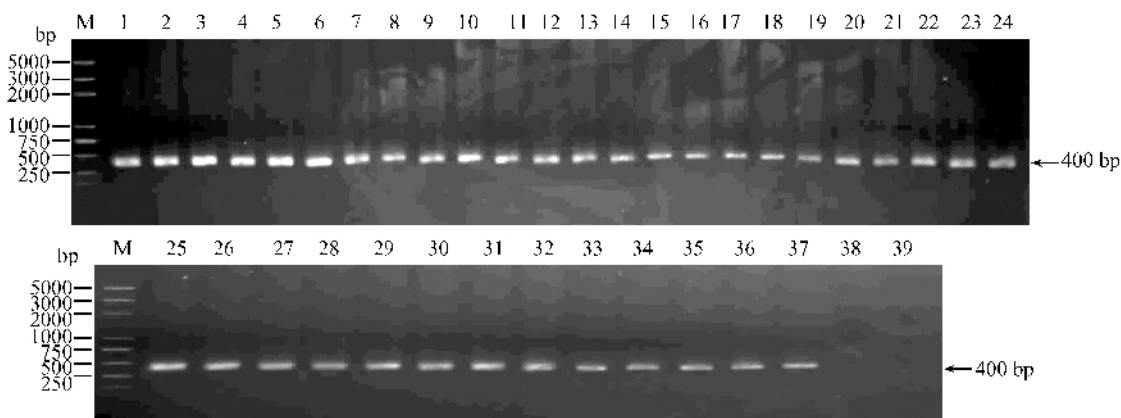


图 2 枣疯病植原体 SR 扩增结果

Fig.2 PCR amplification of SR from jujube witches'-broom phytoplasma. M. DL plus2000 Marker; 1-36: Jujube witches'-broom (Table 1); 37. Paulownia witches'-broom as positive control; 38. Healthy jujube as negative control; 39. Double distilled water as blank control.

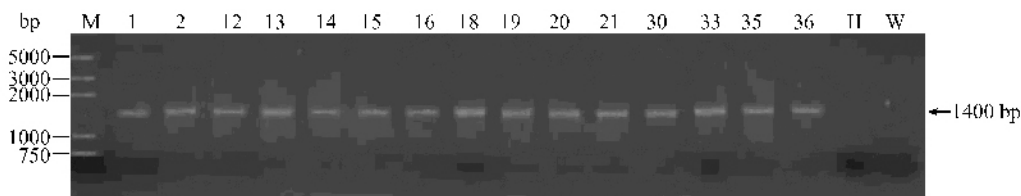


图 3 枣疯病植原体 *secY* 基因扩增结果

Fig.3 PCR amplification of *secY* gene from jujube witches'-broom phytoplasma. M. DL plus2000 Marker; 1-36: Jujube witches'-broom (Table 1); H. Healthy jujube as negative control; W. Double distilled water as blank control.

韩国枣疯 (AB052879)、陕西枣疯 (DQ919060, EU651839) 和章丘枣疯 (FJ154847) 植原体序列中变异位点较多, 为 4-5 个, 其它的菌株为 1-3 个。

系统发育关系分析结果显示, 虽然不同国家和地区间的枣疯植原体 16S rDNA 序列遗传距离很小, 但测序菌株大致聚为 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, 序列一致的 30 个优势菌株属于第 I 类群。但这种地理划分类群并不严格, 北京香山酸枣枣疯的几

个克隆, 山东不同地区的一些菌株分别分布在不同的类群中(图 4)。

### 2.3 SR 序列分析

共测得 24 个菌株的 30 个 SR 序列(表 1 中的序号为: 1、2、3、4、6、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、20、23、24、25、30、33、34、35、36), 20 次 PCR 产物直接测序, 10 次克隆测序, 2006 年已测定 2 个濮阳枣疯克隆和 3 个濮阳酸枣丛枝克隆的 SR 序列, 共 15 个克隆测序, 20 个直接测序, 长度均为 268bp。其中 20

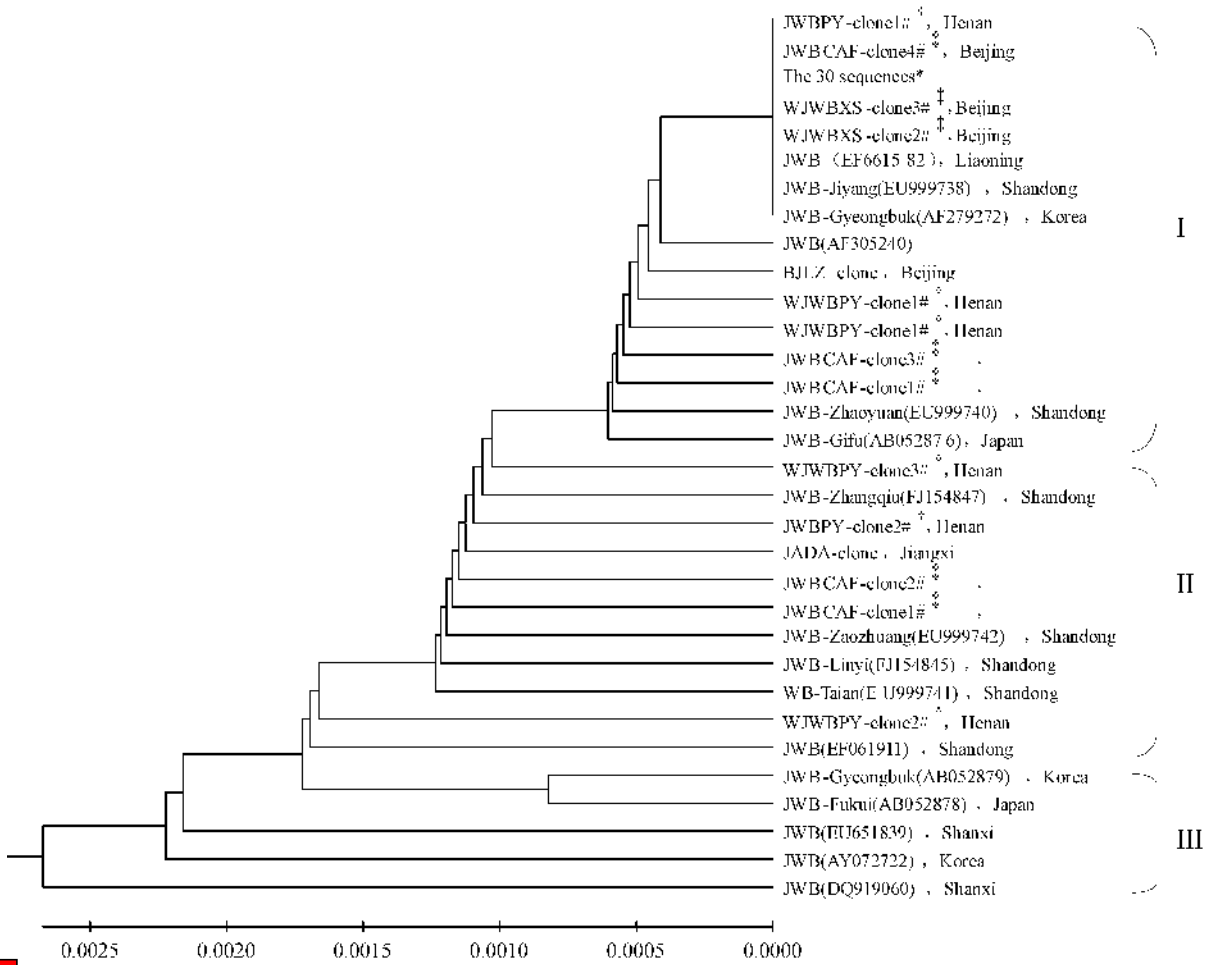


图4 基于枣疯病植原体 16S rDNA 序列构建的系统进化树(MEGA 3.1)

Fig.4 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of JWB related phytoplasmas constructed with the MEGA 3.1. \*, The 30 sequences that share 100% similarity, contain 26 sequences obtained by direct sequencing of PCR products and 4 sequences obtained by sequencing cloned PCR products (JWBXS-clone4 #, WJWBXS-clone2 #, WJWBXS-clone3 #, JWBPY-clone1 #). †, Sequence obtained by sequencing cloned PCR products from Puyang(濮阳), Henan(河南); ‡, Sequence obtained by sequencing cloned PCR products from Xiangshan(香山)and Chinese Academy of Forestry(中国林科院), Beijing(北京).

个 PCR 产物直接测序序列完全相同,15 个克隆序列中,10 个克隆序列与 20 个 PCR 产物直接测序结果的同源性为 100%;另外 5 个克隆序列之间存在 2~5 个碱基差异,10 个单一变异的多态位点,序列同源性平均为 99.4%。本研究完全一致的 30 条序列与前人测定的 3 个枣疯病 (AY072722、EF661582、AF305240)和 3 种其它植物丛枝病(日本枳椇子丛枝 AB442218、日本女贞丛枝 AB293422、纸桑丛枝 AY576685)的 SR 序列也无差异。

枣疯植原体诸菌株 SR 与 16SrV 组中榆树黄化 (AF189214)、葡萄金黄化植原体 (AF176319)、重阳木丛枝病 (EF432569)、悬钩子矮化 (Y16395)植原体 SR 序列的碱基差异为 3~8 个,序列同源性为 97.0~98.5%(表 2)。系统进化分析出现了 2 个类群,枣疯植原体的 SR 与中国发生的重阳木丛枝的 SR 关系

最近,聚为一枝,而国外报导的榆树黄化、葡萄金黄化和悬钩子矮化植原体的 SR 聚在另一枝(图 5)。

#### 2.4 secY 基因的序列分析

测得 15 个菌株的 18 条 secY 基因序列(表 1 中的序号为:1、2、12、13、14、15、16、18、19、20、21、30、33、35、36),11 个克隆测序,7 个 PCR 产物直接测序,长度均为 1211 bp,编码 403 个氨基酸。5 个 PCR 产物直接测序的菌株与 3 个克隆序列的同源性为 100%,一致序列约占总测定序列的 44.4%,推断为优势菌株序列;而其余 10 条序列之间则有不同程度的碱基差异,序列之间的碱基差异为 1~5 个,平均序列同源性为 99.8%,存在 14 个单一变异位的多态位点,宁阳长红第 38 个碱基 T 缺失,平谷冬枣第 888 个碱基 T 缺失;多态位点在序列的中部分布较多,两端部分较少。

表 2 通过直接和克隆测序获得的枣疯 SR 序列与 16SrV 组其它植原体 SR 序列的比较

Table 2 Comparison between SR sequence of JWB by direct sequencing of PCR products and sequencing by cloned PCR products as well as some phytoplasmas in 16 SrV

Sequences	Position																									
	23	37	69	75	76	79	82	83	107	163	167	169	177	197	203	212	213	214	216	235	248	249	250	268	269	
JWB-The 30 SR sequences*	C	T	T	C	A	A	A	A	A	G	G	G	A	A	T	/	/	/	C	A	G	A	T	A	G	
JWBXFZ-clone1 # <sup>†</sup>	C	T	T	C	A	A	A	A	<b>G</b>	G	G	G	A	A	T	/	/	/	C	<b>G</b>	G	A	T	A	G	
JWBXFDO-clone1 #	C	T	T	C	A	<b>G</b>	A	A	A	<b>A</b>	G	G	A	A	T	/	/	/	C	A	G	A	T	A	G	
JWBCPLZ-clone2 #	C	<b>C</b>	T	C	<b>G</b>	A	A	A	A	G	G	G	A	<b>G</b>	T	/	/	/	C	A	G	A	T	A	G	
WJWBPY-clone1 #	C	T	<b>C</b>	C	A	A	A	A	A	G	G	G	A	A	T	/	/	/	C	A	G	A	T	A	G	
WJWBPY-clone2 #	C	T	T	C	A	A	<b>G</b>	A	A	G	G	G	<b>G</b>	A	T	/	/	/	C	A	G	A	T	A	G	
EY-AF189214	<b>T</b>	T	T	C	A	A	A	A	A	G	<b>A</b>	G	A	A	<b>A</b>	A	C	T	<b>T</b>	A	G	A	T	A	<b>A</b>	
FD-AF176319	C	T	T	<b>T</b>	A	A	A	A	A	G	<b>A</b>	G	A	A	<b>A</b>	/	/	/	C	A	G	A	T	<b>T</b>	<b>T</b>	
BiWB-EF432569	C	T	T	C	A	A	A	/	A	G	G	<b>A</b>	A	A	T	/	/	/	C	A	<b>A</b>	<b>G</b>	T	A	G	
RS-Y16395	C	T	T	<b>T</b>	A	A	A	/	A	G	<b>A</b>	G	A	A	<b>A</b>	/	/	/	C	A	G	A	<b>C</b>	A	<b>T</b>	

\* , The 30 SR sequences that share 100% similarity, contain 20 sequences of direct sequencing of PCR products and 10 sequences of cloned PCR products (BJLZ-clone, NYCH-clone, TXDO-clone, TJDO-clone, CPLZ-clone1 # , XFDO-clone2 # , XFXZ-clone2 # , WJWBPY-clone3 # , JWBPY-clone1 # , JWBPY-clone2 # )EY, Elm yellows; FD, Flavescence doree; BiWB, *Bischofia polycarpa* witches'-broom; RS, Rubus stunt;

<sup>†</sup>, Sequence obtained by sequencing cloned PCR products;

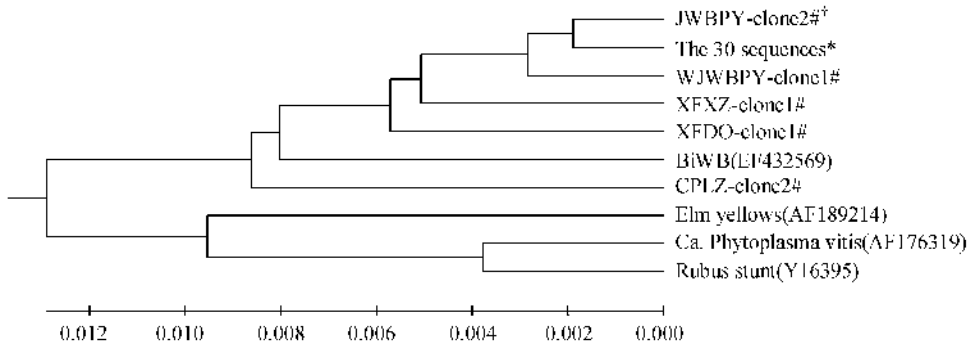


图 5 基于 10 条枣疯病植原体 SR 序列构建的系统进化树

Fig. 5 Phylogenetic tree based on 10 SR sequences of JWB related phytoplasmas constructed with the MEGA 3.1

\* , The 30 SR sequences that share 100% similarity, include 20 sequences of direct sequencing of PCR products and 10 sequences of cloned PCR products (BJLZ-clone, NYCH-clone, TXDO-clone, TJDO-clone, CPLZ-clone1 # , XFDO-clone2 # , XFXZ-clone2 # , WJWBPY-clone3 # , JWBPY-clone1 # , JWBPY-clone2 # ). <sup>†</sup>, Sequence obtained by sequencing cloned PCR products; BiWB, *Bischofia polycarpa* witches'-broom.

枣疯诸菌株 *secY* 基因与桃黄化(Peach yellows, AY197694) *secY* 基因碱基差异为 11-14 个, 同源率为 98.9-99.2%, 与印度樱桃致死黄化(Cherry lethal yellows, AY197693) *secY* 的碱基差异为 5-8 个, 序列同源率为 99.4-99.7%, 与枣疯 *secY* (AY197695) 的碱基差异为 1-4 个, 序列同源率为 99.7-99.9%。系统进化分析发现, 枣疯植原体间 *secY* 基因的遗传距离较小, 序列完全一致的 8 个菌株的 *secY* 基因序列(图 6 中的 the 8 sequences)代表了枣疯植原体中占绝对优势的 *secY* 的碱基序列状态, 其中北京各个县区的菌株在进化枝中分布比较分散, 昌平区和海淀区菌株与河北唐县、山东、天津及江西的菌株距离较近, 平谷区和宣武区的菌株与河南菌株距离较近。

对 *secY* 氨基酸序列分析发现, 本研究的 11 个枣疯植原体菌株及王海妮<sup>[3]</sup> 报道的陕西枣疯病

EU651837 和 Lee 等<sup>[9]</sup> 报道的 AY197695 的氨基酸序列同源率为 100%, 而它们的核苷酸序列之间则存在 3 处差异, 密码子的简并性在一定程度上维持了氨基酸的保守性; 5 个菌株的氨基酸序列之间存在 2~4 个氨基酸差异, 同源率 99.6%; 枣疯植原体诸菌株 *secY* 氨基酸序列与桃黄化 *secY* 之间存在 10~11 个氨基酸差异, 平均同源率 99.2%, 与樱桃致死黄化存在 4~6 个氨基酸差异, 平均同源率 99.5% (表 3)。宁阳长红菌株克隆第 38 个碱基 T 的缺失, 使得终止密码子在第 15 个碱基处提前出现。平谷冬枣菌株克隆第 888 个碱基 T 缺失, 导致终止密码子在第 901 个碱基处提前出现。基于 *secY* 氨基酸序列的系统进化树与依据 *secY* 基因核苷酸序列做出的进化树基本一致(图 7)。

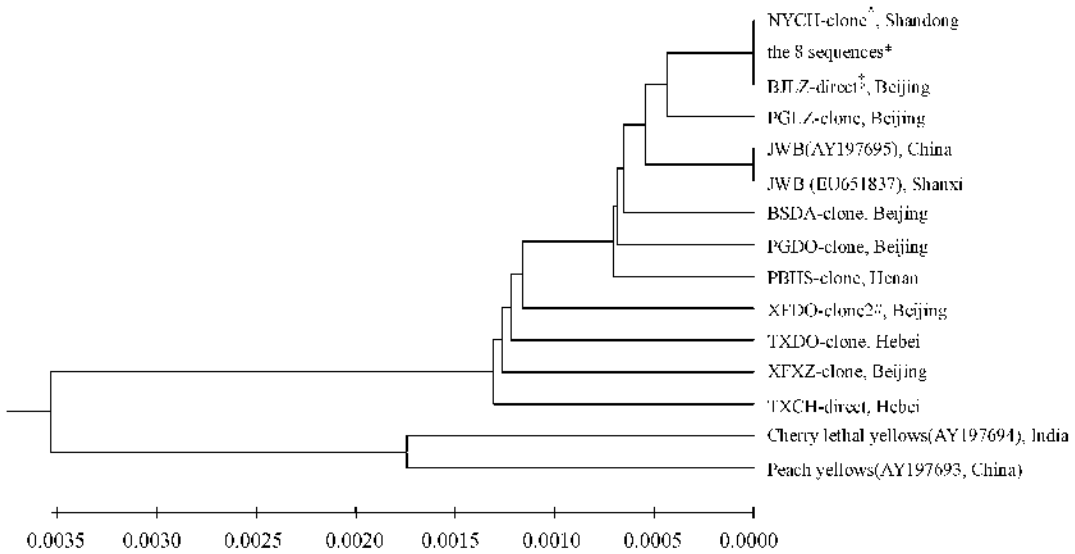


图 6 基于 15 条枣疯病植原体 *secY* 基因序列构建的系统进化树

Fig.6 Phylogenetic tree based on 15 *secY* gene sequences of phytoplasmas constructed with the MEGA 3.1. \*, The 8 Sequences that share the 100% similarity in the *secY* gene: CPLZ-direct sequencing of PCR products, HDDO-direct sequencing of PCR products, JADA-direct sequencing of PCR products, TXDO-direct sequencing of PCR products, XFXZ-direct sequencing of PCR products, CPMY-clone, TJDO-clone, XFDO-clone. †, Sequence obtained by sequencing cloned PCR products; ‡, Sequence obtained by direct sequencing PCR products.

表 3 *secY* 基因的氨基酸序列比较

Table 3 Differences of deduced amino acid sequences between *secY* gene from this research and 16SrV group

Sequences	Position															
	49	55	134	139	169	187	192	206	215	231	262	281	374	375	379	383
JWB EU651837	V	S	F	S	N	F	S	I	T	I	N	I	S	T	N	G
JWB AY197695	V	S	F	S	N	F	S	I	T	I	N	I	S	T	N	G
The 8 sequences*	V	S	F	S	N	F	S	I	T	I	N	I	S	T	N	G
PGLZ-clone†	V	S	F	S	N	F	S	I	T	I	N	I	S	T	N	G
BSDA-clone	V	S	F	S	N	F	S	I	T	I	N	I	S	T	N	G
BJLZ-direct‡	V	S	F	S	N	F	S	I	T	I	N	I	S	T	N	G
XFDO-clone2 # †	V	S	F	S	N	F	S	T	T	I	N	T	S	T	N	G
XFXZ-clone†	V	S	F	S	D	F	S	I	T	I	N	I	S	T	S	G
TXDO-clone†	V	S	F	S	N	F	S	I	A	I	N	I	S	T	N	G
PBHS-clone†	V	S	F	S	N	F	S	I	T	I	I	I	S	T	N	G
TXCH-direct‡	V	S	F	S	N	I	C	I	T	I	N	I	S	T	N	G
PY-AY197694	L	P	L	Y	N	F	S	V	T	X	N	I	I	K	N	S
CLY-AY197693	L	P	F	Y	N	F	S	I	T	I	N	I	S	K	N	G

\*, 8 sequences that share the 100% similarity in the *secY* gene: CPLZ-direct sequencing of PCR products, HDDO-direct sequencing of PCR products, JADA-direct sequencing of PCR products, TXDO-direct sequencing of PCR products, XFXZ-direct sequencing of PCR products, CPMY-clone, TJDO-clone, XFDO-clone; †, Sequence obtained by sequencing cloned PCR products; ‡, Sequence obtained by direct sequencing PCR products

### 3 结论和讨论

经 PCR 检测确认, 采自国内 7 个地区 14 个品种 32 个栽培枣样品和 4 个野生酸枣样品均感染了植原体。对植原体的 16SrDNA 的扩增效率未受季节变化的影响, 而 SR 和 *secY* 基因的扩增则不同程度的受到了样品采集时间的影响。

Lee 等<sup>[13]</sup> 在韩国的庆北省(Chonbuk)地区的枣疯病株上检测到两种植原体, 其中一种的 16SrDNA

与枣疯病 AY072722 的同源性为 99.8%, 另一种与 16SrI 组的桑树丛枝植原体 AY075038 同源性为 100%。而本研究中未发现枣疯病中存在此类混合感染现象, 各枣疯病发生区的主要病原与日本、韩国枣疯植原体同属于 16SV-B 亚组植原体, 与我国发生的重阳木丛枝和樱桃致死黄化遗传关系更近, 而与同组内的国外报道的榆树和葡萄黄化等植原体关系更远<sup>[9]</sup>。至于中国的枣疯病究竟有没有混合感染现象, 还需要进一步取样调查研究。

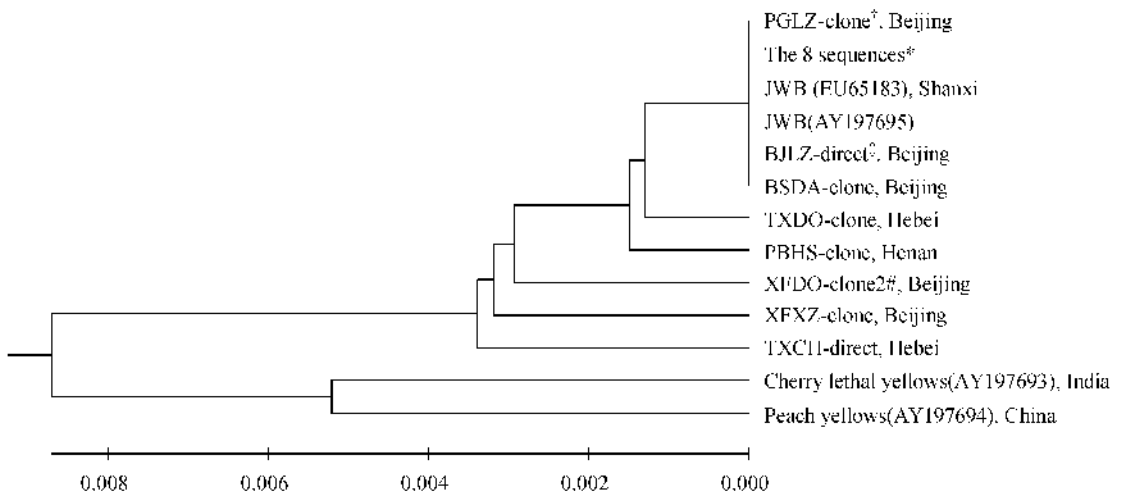


图 7 基于 13 个 *secY* 基因的氨基酸序列的系统进化树(MEGA 3.1)

Fig.7 Phylogenetic tree based on 13 amino acid of *secY* gene of phytoplasmas constructed with MEGA 3.1. \*, 8 sequences that share the 100% similarity in the *secY* gene: CPLZ-direct sequencing of PCR products, HDDO-direct sequencing of PCR products, JADA-direct sequencing of PCR products, TXDO-direct sequencing of PCR products, XFXZ-direct sequencing of PCR products, CPMY-clone, TJDO-clone, XFDO-clone. †, Sequence obtained by sequencing cloned PCR products; ‡, Sequence obtained by direct sequencing PCR products.

PCR 产物直接测序和克隆测序是常用的两种测序方式。PCR 产物直接测序的目的片段不用经过传代增殖,克隆测序需将待测片段插入质粒载体中,并转化到细菌细胞中增殖,提取 DNA 测序。如果重复单位间序列差异较大,突变体数量较多,对 PCR 产物直接测序就无法准确读出某个 DNA 分子的序列。本研究采用 PCR 产物直接测序法测得的 16SrDNA 和 SR 序列高度一致,而克隆法测得的序列之间则存在差异。在植物基因测序中,出现这种差异的原因可能与基因的重复序列间的纯合程度及杂合序列的比率有关<sup>[14]</sup>。已知植原体的 16SrDNA 和 SR 在染色体上有两个拷贝,如果在植原体基因重复序列间存在差异的话,则克隆测序出现差异就可以理解为基因的杂合现象<sup>[15]</sup>。但与植物基因分析方法不同的是,我们所测定的同一样品中也有可能不存在不同变异程度的植原体群体。如果变异植原体菌株数量极少,PCR 产物直接测序时,测得将是数量占绝对优势的那部分 DNA 的共同序列,少量模板 DNA 上发生的变异则被忽略。而采用克隆测序时,则可能检测到 PCR 产物直接测序法不能检测到的变异。

从对枣疯植原体 3 个保守序列的系统进化分析结果来看,本实验测定的和其他研究者测定的优势或代表性菌株群体具有一定的地理分布特征。这种从同一样品或同一地区菌株检测到的 16SrDNA 或 SR 保守基因的序列碱基差异,及不同国家和地区之间存在的序列差异,可能暗示着在枣疯病植原体中,存在着比预想更丰富的遗传多样性菌群;而

16SrDNA 或 SR 的序列的微小变化可能预示着其它相关基因更大的变异,或致病性与寄主适应性的改变<sup>[16]</sup>。与采用 PCR 产物直接测序法测得的 16SrDNA 和 SR 序列高度一致结果不同的是,*secY* 基因的 7 个菌株 PCR 直接测序结果中只有 5 个菌株的序列完全一致,其它测序结果各不相同,进一步说明 *secY* 基因的突变体的数量要比 16SrDNA 和 SR 的多,变异性大。

本研究测得的多数菌株 16SrDNA 和 SR 保守基因序列与其他研究这报道的一些菌株序列一致,推断它们为同一个株系,或者说是导致枣疯病流行的优势株系。它们之所以广泛分布在不同的地区,寄生在不同抗病或感病品种的枣树或野生酸枣树上,可能与该株系在枣树上的广泛的适应性、以及该菌株随种苗或其他繁殖材料广泛传播蔓延有关。而同一地区、甚至同一样品中会出现不同的分子变异群体,应该与植原体在适应和进化过程中所受到的各种选择压力有关,比如,品种的抗性差异、传毒昆虫介体种类及与其他微生物菌群作用等,从而导致植原体遗传物质上发生细微的差异,形成由不同进化程度株系构成的遗传多样性群体<sup>[17]</sup>。原来起源单一的菌株受地理隔离作用会形成不同遗传背景的菌株,但不同病区间的种苗交流会导致不同遗传背景菌株间的杂合,产生新的变异菌株群体。北京地区采集的菌株间更丰富的遗传多样性,很可能与近年来红枣产业的大发展、大量从全国各地引种导致多种遗传背景的菌株随种苗传入有关。所以,对植



原体遗传多样性和分子进化的研究不仅为植原体株系划分、基因变异研究奠定了良好的基础,而且也有助于植原体监测动态、病害流行预测和抗病品系合理利用,以及病菌传播和扩散渠道和方式的揭示。

韩国和日本的枳椇、泰安的纸桑和大麻上的植原体的 16SrDNA 序列与本实验的枣疯 16SrDNA 的 PCR 产物直接测序的序列同源性为 100%,它们可能是枣疯植原体的另类寄主,而且 Zhao 等<sup>[18]</sup>报导的大麻丛枝病和 Liu 等<sup>[19]</sup>报导的纸桑丛枝病都是在泰安发现的,泰安的枣疯病非常普遍,Liu 的纸桑丛枝样品是在枣疯病株周围采集到的,纸桑丛枝植原体、枳椇丛枝植原体、大麻丛枝植原体和枣疯植原体是否具有相同的昆虫传播介体有待进一步研究。

需要注意的是,对通过克隆 PCR 产物测序法测定的序列尚不能完全排除在 PCR 扩增、克隆及序列测定过程中产生的测序误差<sup>[20]</sup>,这需要在对序列信息评估和诠释植原体分子变异时特别谨慎和多方求证。由于直接 PCR 测序方法未能检测到不同抗性 or 感病品种上的植原体变异,而克隆测序的样本尚不足以揭示其与菌株序列变异之间的关系,所以需要开展进一步的研究,以明确我国枣疯病植原体不同株系的分子特征、分子变异与致病性及寄主抗病性的关系、多样性产生机制与分子生态学意义,比如对更多地区和品种上的植原体进行测序比较、增加同一样品的克隆测序数目、通过专化 PCR 或 RFLP 等手段对已知的多态性位点加以验证和检测等。

## 参考文献

- [ 1 ] 田国忠,张志善,李志清,等. 我国不同地区枣疯病发生动态和主导因子分析,林业科学(*Scientia Silvae Sinicae*), 2002, 38(2): 83-91.
- [ 2 ] Lee IM, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, 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.
- [ 3 ] 王海妮,吴云锋,安凤秋,等. 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.
- [ 4 ] IRCMPPhytoplasma/Spiroplasma working Team 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, nonhelical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 1243-1255.
- [ 5 ] Wei W, Davis RE, Lee IM, et al. 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.
- [ 6 ] 郑雪松,杨虹,李道棠,等. 基因间隔序列(ITS)在细菌分类鉴定和种群分析中的应用. 应用与环境生物学报(*Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*), 2003, 9(6), 678-684.
- [ 7 ] 田欣,李德株. DNA 序列在植物系统学研究中的应用. 云南植物研究(*Acta Botanica Yunnanica*), 2002, 24(2): 170-184.
- [ 8 ] Kakizawa S, Oshima K, Kuboyama T, et al. Cloning and expression analysis of Phytoplasma protein translocation genes. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001, 14(9): 1043-1050.
- [ 9 ] Lee IM, Martini M, Marcone C, et al. 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.
- [ 10 ] Lee IM, Hammond RW, Davis R E, et al. Universal amplification and an alysis of mycoplasma like organ isms. *Phytopathology*, 1993, 83, 834-842.
- [ 11 ] Chang KF, Hwang SF, Khadhair, AH, et al. Detection and molecular characterization of an aster yellows phytoplasma in poker statice and Queen Anne's lace in Alberta, Canada. *Microbiological Research*, 2004, 159, (1): 43-50.
- [ 12 ] Daire X, Clair D, Reinert W, et al. Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 1997, 103, 507-514.
- [ 13 ] Lee S, Han S, Cha B. Mixed infection of 16S rDNA V and I groups of phytoplasma in a single jujube. *The Plant Pathology Journal*, 2009, 25(1): 1-4 .
- [ 14 ] 李春香,杨群. PCR 产物直接测序还是克隆测序——密叶杉属 rDNA ITS 序列的测定方法. 植物学通报(*Chinese Bulletin of Botany*), 2002, 19(6): 698-704.
- [ 15 ] 曾建,张利,凡星,等. 伸彬草属植物 ITS 序列 PCR 产物直接测序与克隆测序比较分析. 四川农业大学学报(*Journal of Sichuan Agricultural University*), 2006, 4(4): 369-374.
- [ 16 ] Harrison NA, Myrie W, Jones P, et al. 16SrRNA interoperon sequence heterogeneity distinguishes strains populations of palm lethal yellowing phytoplasma in the Caribbean region. *Annals of Applied Biology*, 2002, 141: 183-193.

- [17] Melcher U, Fletcher J. Genetic variation in *Spiroplasma citri*. *European Journal of Plant Pathology*, 1999, 105: 519–533.
- [18] Zhao Y, Sun Q, Davis RE, et al. First report of witches'-broom disease in a *Cannabis* spp. in China and its association with a phytoplasma of elm yellows group (16SrV). *Plant disease*, 2007, 91(2): 227.
- [19] Liu Q, Wu T, Davis RE, et al. First report of witches'-broom disease of *Broussonetia papyrifera* and its association with a phytoplasma of elm yellows group (16SrV). *Plant Disease*, 2004, 88(7):770.
- [20] Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second edition, volume two. New York, Springer Science and Business Media Inc, 2005.

## Molecular detection and variability of jujube witches'-broom phytoplasmas from different cultivars in various regions of China

Qicong Xu<sup>1</sup>, Guozhong Tian<sup>1</sup>, Zhengliang Wang<sup>2</sup>, Fanhua Kong<sup>3</sup>, Yong Li<sup>1</sup>, He Wang<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

(<sup>2</sup> Institute of Forestry Protection, Hebei Academy of Forestry Science, Shijiazhuang 050061, China)

(<sup>3</sup> Taian Academy of Agriculture, Tai'an 271000, China)

(<sup>4</sup> Beijing Forest Protection Station, Beijing 100029, China)

**Abstract:** [Objective] Jujube witches'-broom is an important disease in jujube cultivation areas, which causes serious losses in jujube fruit production. To understand the genetic variability and diversity of jujube witches'-broom phytoplasma population from the different cultivars and various regions of China. [Method] We collected 32 samples from 14 cultivars or wild sour jujubes in 7 regions of China and detected them with PCR with the primers R16mF2/R16mR1 for phytoplasma 16S rDNA, SR1/SR for 16S-23SrRNA space region (SR) and FD9f/r for secretion proteins (*secY*). The direct sequencing of PCR products and sequencing by cloned PCR products were used for sequence polymorphism and phylogenetic analyses by comparison to the databases of known conserved gene sequences. [Results] We detected phytoplasmas by PCR amplification of 16SrDNA from all the diseased jujube samples. All the phytoplasma isolates infected various jujube cultivars belonged to subgroup 16SrV-B of elm yellows group and had closer homology with *Bischofia polycarpa* witches'-broom and cherry lethal yellows phytoplasmas occurred in China than other 16SrV phytoplasmas in other countries. The sequence polymorphism at different extent in 16SrDNA, SR and *secY* gene and genetic diversity were revealed in phytoplasma strain population related to different habitats, among which the dominant strains were always detected by the direct sequencing of PCR products in all the diseased areas of China. The degree of variability on *secY* gene of collected phytoplasma strains was greater than that of 16SrDNA and SR sequences, and some base substitutions could not alter encoded amino acid, however certain single base deletions detected in a Shandong and a Beijing strains may have impact on the gene structure or function. [Conclusion] Phytoplasma strains from different cultivars and regions show dramatic genetic diversity. Compared with direct sequencing of PCR products, the sequencing by cloning PCR products was more useful for the displaying of variants and phylogeny in phytoplasma strain population.

**Keywords:** Jujube witches'-broom (JWB) phytoplasma; 16S rDNA; 16S-23S rRNA space region (SR); secretion protein gene (*secY*); molecular variability; phylogenetic analysis

( 本文责编:王晋芳 )

Supported by the 11th-five Scientific and Technology Project of the Science and Technology Ministry of China "Research about prevention and control of biological disaster in commercial forest" (2006BAD08A113-2) and the National Department Public Benefit Research Foundation (200810517-3)

\* Corresponding author. Tel: +86-10-62889525; Fax: +86-10-62884972; E-mail: tiangz@caf.ac.cn

Received: 26 April 2009/ Revised: 1 June 2009