

## 狗牙根白化病植原体 16S rDNA 序列

谭卫军, 陈勇\*, 张武, 韩承畴, 谭志远, 张巨明

(华南农业大学农学院, 广州 510642)

**摘要:**【目的】狗牙根(草坪草的一种)白化病是狗牙根的一种重要病害,在全世界均有分布。为了确定中国大陆狗牙根白化病病原,进一步与世界其他地区的病原相比有无特异性。【方法】采用植原体 16S rDNA PCR 扩增、序列分析、Southern 分子杂交等技术对狗牙根健康植株及白化病患病植株进行研究。【结果】仅白化病植株扩增获得 1.3 kb 的特异片段,序列分析表明特异片段与 *Candidatus Phytoplasma Cynodontis* 有 99% 同源性。Southern 杂交有特异条带,大小在预期范围之内。证实了在中国大陆发生的狗牙根健株型白化病病原含有植原体。【结论】大陆狗牙根白化病病原中含有植原体,为该病原的进一步鉴定与防治奠定了基础。

**关键词:** PCR; 狗牙根; 白化病; 植原体; 同源性; Southern 杂交

**中图分类号:** Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2008) 10-1393-05

狗牙根被认为是暖季型草坪草中最重要的草种之一<sup>[1]</sup>。该草种以其适应性强、形成的草坪色泽美丽、耐践踏、耐瘠薄和恢复能力强等优良性状,而被广泛应用于公共绿地、护坡及各类运动场。20 世纪 70 年代初,台湾首次报道了狗牙根丛枝白化病<sup>[2]</sup>,该病害主要表现为全株叶片白化和变小。随后,美洲、欧洲和亚洲其他地区也相继报道了该病<sup>[3]</sup>。但截至目前,中国大陆对狗牙根白化病的研究仍然停留在病状及病原特征上。王团老等 1993 年在南京农业大学校内发现了狗牙根丛枝白化病,并对其病原进行了电镜观察,发现在病株筛管中含有大量的类菌体物质<sup>[4]</sup>。翁启勇等 1997 年在福建厦门等地发现了狗牙根成簇白化的丛枝白化病和病叶变软稍变宽变长的健株型白化病等两种类型。白化病成为当时在福建草坪病害调查中发现的最为严重的病害<sup>[5]</sup>。笔者 2006 年在华南农业大学校园内、深圳和东莞等高尔夫球场内发现了大量健株型白化病,该病害严重影响了景区的美观效果,并于 2007 年从洛阳、开封和西安等中原地区采

集了丰富的健株型白化病病株材料。鉴于目前从分子生物学的角度来鉴定狗牙根白化病病原的研究尚未见报道,本试验以开封和洛阳狗牙根白化病病株为材料,从分子生物学角度对大陆狗牙根健株型白化病病原进行研究,力图为大陆的狗牙根白化病的防治工作提供理论基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 材料来源:** 狗牙根白化病病株及健康株材料采自河南省开封清明上河园、洛阳牡丹公园和洛阳洛浦公园,材料在华南农业大学杂草试验室进行培养保存。

**1.1.2 主要试剂和仪器:** TaqDNA 聚合酶、dNTP 和 DNA Marker 购于北京普博生物技术有限公司,尼龙膜和地高辛高效标记检测试剂盒购于 Roche 公司,核酸内切酶 *Hind* III 购于上海生工工程有限公司,显影粉、定影粉和 X-光胶片购自威佳生物有限公司。

**1.1.3 引物及序列测定:** 研究中应用的 PCR 引物由

基金项目: 广东省攻关基金(2006B20301045; 2007A020300009-5); 国家自然科学基金(30671381)

\*通讯作者。Tel: +86-20-38294907; Fax: +86-20-38294907; E-mail: chenrong@scau.edu.cn

作者简介: 谭卫军(1984-), 女, 河南周口人, 硕士研究生, 主要从事草坪病害防治。E-mail: weijunworld@126.com

收稿日期: 2008-01-21; 修回日期: 2008-06-25

上海生工工程有限公司合成, 序列测定由上海英俊生物技术有限公司完成。

### 1.2 狗牙根白化病原的 PCR 分析

提取狗牙根白化病病株及健康株总 DNA, 步骤主要参考 Nakad 等的方法<sup>[6]</sup>。

分别以狗牙根白化病病株及健康株 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应采用 50.0  $\mu$ L 体系。引物为植原体 16S rDNA 通用引物: R16mF2((5'-CATGCAAGTCGAACGGA-3')和 R16mR 2(5'-CTTAACCCCAA-TCATCGAC-3')<sup>[7]</sup>。反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 10 min。用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 紫外灯下观察并拍照。

### 1.3 序列分析

采用低熔点琼脂糖电泳并回收样品扩增产物, 经 PCR 产物纯化试剂盒纯化后, 交由生物公司测序。将测定的核苷酸序列提交到 GenBank 中进行同源性比较, 得到相关植原体序列, 与试验所测得的序列一起采用软件 CLUSTALX 进行比对 (alignment) 后, 再用软件 GeneDoc 进行人工比对和格式转换。最后用 TREECONW 进行邻近法 (neighbor-joining method) 聚类分析并构建系统发育树。

### 1.4 Southern 杂交

Southern 杂交操作方法参照文献<sup>[8]</sup>和 Roche 公司试剂盒使用说明书进行。

## 2 结果分析

### 2.1 狗牙根白化病 16S rDNA 的 PCR 检测

0.8% 琼脂糖电泳结果显示, 狗牙根白化病病株组织的总 DNA 可以扩增出大小为 1.3 kb 左右的片段, 而狗牙根健康组织总 DNA 中未能扩增出特异条带 (图 1)。

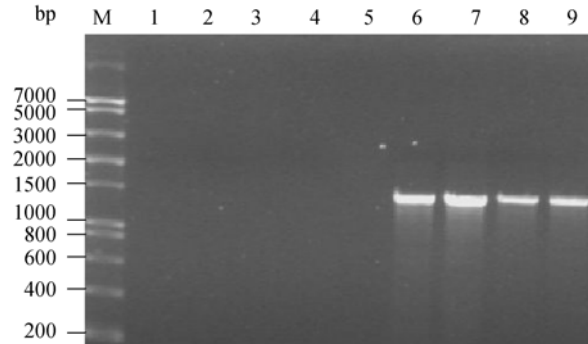


图 1 狗牙根白化病植原体 16S rDNA 序列 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of PCR products amplified from ill Bermuda grass phytoplasma 16S rDNA. M. DNA maker; 1,2. Healthy wheat leaves (Luoyang); 3,4,5. Healthy wheat leaves (Kaifeng); 6,7. ill Bermuda grass (Luoyang); 8,9. ill Bermuda grass (Kaifeng).

### 2.2 狗牙根白化病植原体与相关植原体核苷酸序列比较

将采于开封和洛阳两地的狗牙根白化病植株扩增产物的测序结果提交到 GenBank 数据库中获得其序列登录号分别为 EU377477 和 EU409293, 并将其在 GeneBank 中进行 BLAST 分析, 结果如表 1。可以看出, 狗牙根

表 1 狗牙根白化病植原体 LuoYang-C1 16S rDNA 序列同源性比较结果  
Table 1 The similarity of 16S rDNA sequences compared with known species

Phytoplasma	Strain	Geographical Origin	GenBank Accession no.	Similarity/%
<i>Candidatus</i> Phytoplasma cynodontis	Kaifeng-C1	China	EU377477	99
Bermuda grass white leaf	BGWL-CA	Italy	AJ550986	99
Bermuda grass white leaf	BGWL-C1	Italy	AJ550984	99
Bermuda grass white leaf	BGWL-C2	Italy	AJ550985	99
Bermuda grass white leaf	BGWL- Juyom	Iran	EF444486	99
Bermuda grass white leaf	BraWL-KK	Thailand	AB052872	99
Bermuda grass white leaf	BGWL-Firoozabad	Iran	EF444485	99
Bermuda grass white leaf	BGWL-T	Thailand	AF248961	99
<i>Candidatus</i> Phytoplasma cynodontis	BGWL-KK	Thailand	AB052871	99
Cynodon white leaf	CWL	Australia	AF509321	98
Bermuda grass white leaf	BGWL-I	Italy	Y16388	97
unidentified mollicute	SCWL	Thailand	X76432	97
Sugarcane white leaf	SCWL-Ud	Thailand	AB052874	97
<i>Candidatus</i> Phytoplasma oryzae	RYD-Th	Thailand	AB052873	97
<i>Candidatus</i> Phytoplasma vitis	FD57	Serbia	EF581166	94
<i>Candidatus</i> Phytoplasma trifolii	CaPT	Korea	AB279597	94
<i>Candidatus</i> Phytoplasma pini	Pin190S	Spain	AJ632156	94

白化病植原体 LuoYang-C1、Kaifeng- C116S rDNA 序列与 Carmine M 等报道的狗牙根白化病植原体同源性高达 99%。

2.3 系统发育分析

将狗牙根白化病病原 16S rDNA 的序列与国外狗牙根白化病病原不同株系及目前已经被国际比较菌原体学研究计划署(International research programme

on comparative mycoplasmaology, IRPCM) 植原体/螺原体工作组接受的植原体种的核苷酸序列进行比较, 构建了系统演化的比较树(图 2)。可以看出, 中国狗牙根白化病植原体与国外狗牙根白化病不同株系明显聚为一个类群, 表明大陆狗牙根白化病植原体应归属于狗牙根植原体组 BGWL(16S rXIV-A)。

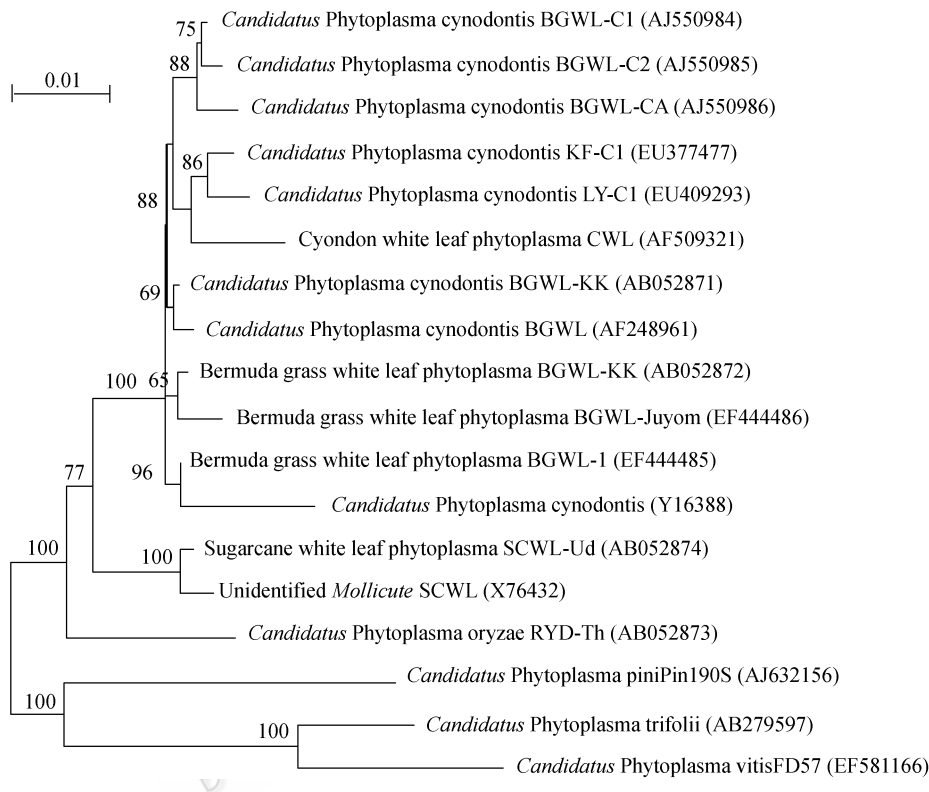


图 2 LuoYang-C1、Kaifeng-C1 相关序列系统发育进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on LuoYang-C1 and Kaifeng-C1 16S rDNA sequences from Bermuda grass white leaf phytoplasma and related phytoplasma strains. Bootstrap confidence levels greater than 50% are indicated at the internodes. GenBank accession numbers are shown in the paranthese. Bar=1% nucleotide divergence.

2.4 Southern 杂交结果分析

分析得到 *Hind* III 酶在目的片段中无酶切位点。采用 *Hind* III 对健康和发病植株叶片组织 DNA 分别进行酶切(图 3), 以狗牙根白化病植株 DNA 扩增所得 16Sr DNA 序列为探针, 利用地高辛高效标记检测试剂盒对探针进行标记, 将白化病植株 DNA 植原体通用引物 PCR 扩增产物设为阳性对照。从 X-光片曝光照片可以看出, 在白化病泳道上有特异性条带(图 4)。

3 结论和讨论

狗牙根白化病属于狗牙根的一种重要病害, 分布范围较广。20 世纪 70 年代初, 中国台湾地区首次报道了此病害, 但由于当时试验技术条件有限和植原体自身难以分离纯化等原因, 对其研究也仅限于病状的描述

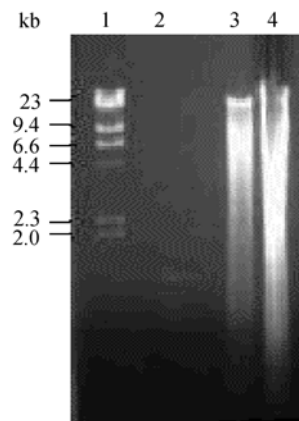


图 3 狗牙根健康及白化病植株 DNA *Hind* III 酶切及白化病植株 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 3 Electrophoresis of gDNA digested by *Hind* III and PCR products amplified from white leaf. 1. DNA maker; 2. PCR product; 3. Healthy Bermuda grass; 4. ill Bermuda grass.

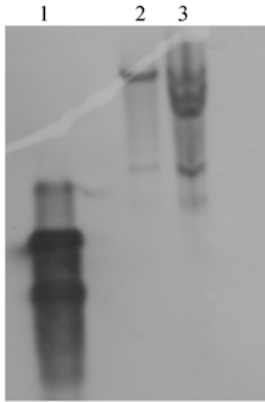


图 4 Southern 杂交分析

Fig. 4 Southern hybridization analysis. 1. PCR product; 2. Healthy Bermuda grass; 3. Ill Bermuda grass.

及电子显微技术下的物理性状。直到 20 世纪 90 年代中后期,随着生物技术的发展,国外才相继报道了该病在分子水平上的一些研究,而中国大陆在相应方面的研究较少。

本试验利用植原体 16S rDNA 序列通用引物对中国开封和洛阳两地狗牙根白化病病株进行了 PCR 扩增,均能获得 1.3 kb 的特异性片段, Southern 杂交分析结果从分子水平证实了中国大陆狗牙根白化病病原含有植原体。对其进行核苷酸序列分析结果表明,引起开封和洛阳两地狗牙根白化病的植原体序列同源性达 99%,可视为同一植原体。与国外报道的一些狗牙根白化病植原体序列也有 99% 的同源性。对 LuoYang-C1、Kaifeng-C1 进行系统发育分析结果证明了 Carmine M 等人的观点<sup>[9]</sup>,狗牙根白化病病原同属一族植原体 BGWL(16S rXIV-A)组。

Southern 杂交检测中,将狗牙根白化植株 DNA 通过植原体通用引物扩增所得 PCR 产物与探针杂交,出现了多条杂交带,笔者认为这是在扩增过程中出现了电泳结果肉眼不能看到的非特异性条带。在健康植株酶切泳道上也同样出现了条带,笔者认为这是在探针标记的过程中出现了与狗牙根总 DNA 片段中有着高同源性的非特异性扩增,发病与健康植株同时出现可以说明这一点。

由于植原体为无细胞壁原核微生物,难以在人工培养基上离体培养,目前还没找到可普遍利用的有效分离纯化方法<sup>[10]</sup>,因此本试验针对狗牙根白化病病原的鉴定只是从利用植原体通用引物进行特异性扩增、

测序比对分析和 Southern 检测等方面做了初步研究。就白化病病原是否为唯一性,还有待于下一步的试验证实。

**致谢** 本工作得到了广州医学院第二附属医院陶爱林老师、华南师范大学李洪清老师的热情帮助,在此表示诚挚的感谢。

## 参 考 文 献

- [1] 刘建秀,贺善安.暖季型草坪草种质资源的研究与改良,国外畜牧学—草原与牧草(*Grassland and Turf*), 1996, 74(3): 12–20.
- [2] Chen TC, Lee CS, Chen M. Mycoplasma-like organisms in *Cynodon dactylon* and *Brachiaria distachya* affected by white leaf disease. *Rep Taiwan Sugar Exp Stn*, 1972, 56, 49–55.
- [3] Arocha Y, Horta D, Pinol B. First report of a phytoplasma associated with Bermuda-grass white leaf disease in Cuba. *Plant Pathology*, 2005, 54: 233.
- [4] 王团老,陈永萱.狗牙根丛枝病的电镜诊断,南京农业大学学报(*Journal of Nanjing Agricultural University*), 1993, 16(2): 117.
- [5] 翁启勇,王青松,何玉仙,等.福建草坪草病害初报,草业学报(*Acta Prataculturae Sinica*), 1997, 6(2): 70–73.
- [6] Nakada M, Tanaka C, Tsunewaki K, et al. RFLP analysis for species separation in the genera *Bipolaris* and *Curvularia*. *Mycoscience*, 1994, 35 (3): 271–278.
- [7] Lee IM, Hammond RW, Davis RE, et al. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 1993, 83(8): 834–842.
- [8] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup>, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [9] Carmine M, Bernd S, Erich S. 'Candidatus *Phytoplasma cynodontis*', the phytoplasma associated with Bermuda grass white leaf disease. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54, 1077–1082.
- [10] 李永,田国忠,朴春根,等.我国几种植物病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.

## Association of phytoplasma with Bermuda grass white-leaf disease

Weijun Tan, Yong Chen\*, Wu Zhang, Chengchou Han, Zhiyuan Tan, Juming Zhang

(College of Agronomy, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** [Objective] Bermuda grass white leaf is an important disease on Bermuda grass all over the world. The aim of this research is to identify the pathogen which leads to Bermuda grass white leaf occurring on the Chinese mainland. [Methods] PCR amplification technique, sequence analysis and Southern hybridization were used. [Results] A 1.3 kb fragment was amplified by PCR phytoplasma universal primers and total DNA sample extracted from ill Bermuda grass as the amplified template. Sequence analysis of the amplified fragment indicated it clustered into *Candidatus* Phytoplasma Cynodontis. Southern hybridization analysis showed differential cingulums. [Conclusion] The pathogen of Bermuda grass white leaf on the Chinese mainland contains phytoplasma, which provides a scientific basis for further identification, prevention and control of the disease.

**Keywords:** PCR; Bermuda grass; white leaf; phytoplasma; similarity; Southern hybridization

Supported by the Department of Science and Technology, Guangdong Province of China (2006B20301045; 2007A020300009-5) and the National Natural Science Foundation of China (30671381)

\*Corresponding author. Tel: +86-20-38294907; Fax: +86-20-38294907; E-mail: chen Yong@scau.edu.cn

Received: 21 January 2008/ Revised: 25 June 2008

### 科学出版社生物分社新书推介(2008-07)

生物化学——基础理论与临床 (原书第6版) (译, 配彩图光盘)

【美】德夫林 著 王红阳 等译

978-7-03-021323-5 ¥138.00 2008年7月30日 出版

内容简介

Textbook of Biochemistry with Clinical Correlation 一书由美国 John Wiley & Sons 出版社于 1982 年首次发行, 该书一面世就受到了医学院校广大师生和生物化学领域众多研究人员的青睐, 并且在美国长期持续畅销, 2006 年已经发行到了第六版。该书被翻译成各种语言, 在许多欧美国家用作生物化学课本或辅助教材, 受到了很多知名教授和众多学生的好评。本书深入浅出的讲述了生命体细胞中的生物化学反应过程, 从分子水平揭示了许多生命现象的本质, 阐明了在机体内生理过程中细胞层面的生化反应。在讲述理论的过程中还引入了大量的临床病例分析作为生化课本的延伸, 进一步解释了与人类疾病密切相关的生物化学过程, 既可以帮助读者理解书本的内容, 又能加深对理论知识的记忆, 成为本书有别于同类专业书籍的一大特色。全书内容安排紧凑连贯、由浅入深, 并用大量生动直观的插图对相关概念和生化反应加以清晰的描述, 为本书增色不少。该书主要适用于生物学和医学专业的大学本科生和研究生, 当然, 对基础医学和临床生物化学领域的研究人而言, 也是一本不可多得的好书。

