

新疆小叶白蜡丛枝病植原体的鉴定及 16S rRNA 基因序列分析

李成亮 都业娟 石宝萍 刘娟娟 向本春*

(石河子大学 新疆 石河子 832003)

摘要:【目的】对新疆小叶白蜡丛枝病植原体进行检测,通过其 16S rRNA 基因分析确定其分类地位。【方法】利用苯胺蓝和 4',6-二脒基-2-苯基咪唑(DAPI)染色,在荧光显微镜下观察新疆小叶白蜡嫩茎横切片;采用植原体 16S rRNA 基因的通用引物对 P1/P7 和 R16F2n/R16R2 进行直接和巢式 PCR 扩增,对得到的 16S rRNA 基因的序列进行 RFLP 和构建系统进化树分析。【结果】表现丛枝病症状的新疆小叶白蜡中存在植原体,暂命名为 *Fraxinus sogdiana*Bunge witches' broom phytoplasma (*Fraxinus sogdiana*Bunge WB);其 16S rRNA 基因的序列 GenBank 登录号为 KF061042, RFLP 图谱与 16Sr V-B 亚组的枣疯病植原体相同,系统进化地位与枣疯病菌株 AB052876 相同。【结论】新疆小叶白蜡丛枝病植原体为 16Sr V-B 亚组成员。

关键词: 新疆小叶白蜡, 植原体, 苯胺蓝, DAPI, 16S rRNA, RFLP, 系统进化分析

The identification and sequence analysis of 16S rRNA gene of *Fraxinus sogdiana*Bunge witches' broom phytoplasma

LI Cheng-Liang DU Ye-Juan SHI Bao-Ping LIU Juan-Juan XIANG Ben-Chun*

(Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

Abstract: [Objective] To identify and classify the *Fraxinus sogdiana*Bunge witches' broom phytoplasma. [Methods] Horizontal slices of tender stem from *Fraxinus sogdiana*Bunge were stained with aniline blue and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), and then observed under fluorescence microscopy. 16S rRNA gene sequences were amplified using direct-PCR and nested-PCR with universal primers P1/P7 and R16F2n/R16R2 for phytoplasmal 16S rRNA gene sequence. Amplicons were analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) and a phylogenetic tree was constructed based on the sequences of 16S rRNA gene. [Results] A phytoplasma was identified from *Fraxinus sogdiana*Bunge which with symptoms of witches' broom and was tentatively named as *Fraxinus sogdiana*Bunge witches' broom phytoplasma (*Fraxinus sogdiana*Bunge WB). The 16S rRNA gene sequence was deposited in GenBank with the accession number of KF061042. Its RFLP patterns of 16S rRNA gene were the same as jujube witches' broom phytoplasma which belong to 16Sr V-B subgroup, and it had the same phylogenetic position with jujube witches' broom phytoplasma strain AB052876. [Conclusion] *Fraxinus sogdiana*Bunge witches' broom phytoplasma was identified as the member of 16Sr V-B subgroup.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(No. 2011BAD48B00); 石河子大学自然科学创新团队项目(No. 2011ZRKXTD-0205)

*通讯作者: Tel: 86-993-2058009; Fax: 86-993-2058009; ✉: diyilcl@126.com

收稿日期: 2013-05-22; 接受日期: 2013-07-19; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-08-20

Keywords: *Fraxinus sogdiana*Bunge, Phytoplasma, Aniline blue, DAPI, 16S rRNA, RFLP, Phylogenetic analysis

植原体(Phytoplasma)原称类菌原体(MLO),属于柔膜菌纲,在植物和昆虫中广泛分布,是重要的病原微生物。主要由取食植物韧皮部的叶蝉、飞虱等昆虫传播,可侵染粮食、蔬菜、花卉、林木、药材、杂草等各类植物。导致感病植株黄化、顶枯、丛枝、簇生、花变叶、矮化、小叶等症状^[1-2]。目前世界已报道的植原体病害有1 000多种,我国迄今已报道的植原体病害有100余种^[3],尚未见新疆小叶白蜡感染植原体的报道。

新疆小叶白蜡(拉丁名:*Fraxinus sogdiana*Bunge),又名新疆白蜡、天山白腊、天山桤,属木犀科白蜡属,为新疆特有树种,被作为新疆园林及城市绿化首选树种之一。因其树形优美,材质好,且生长快等优点,目前各地均有引种。

2012年9月在石河子大学校园内及市区道路两旁发现部分新疆小叶白蜡表现出类似植原体感染的症状。本试验采用苯胺蓝及4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)对采集的新疆小叶白蜡嫩茎横切片染色后,通过荧光显微镜观察新疆小叶白蜡植原体病原的分布特征;利用PCR扩增方法对表现症状的新疆小叶白蜡进行植原体检测,确定其为植原体感染;克隆得到的16S rRNA基因的序列进行RFLP(限制性内切酶片段长度多态性)及系统进化分析,明确其分类地位,为该病害的防治提供技术支持与理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

表现丛枝病症状的新疆小叶白蜡及其健康植株样品均采自石河子市;克隆载体 pMD18-T

simple vector 购自 TaKaRa 公司,2×Es Taq Master Mix、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及质粒回收试剂盒购自北京康为世纪公司,核酸限制性内切酶购自 Thermo 公司;大肠杆菌 DH5α 菌株、枣疯病及番茄巨芽植原体 DNA 均为本实验室保存。

1.2 新疆小叶白蜡丛枝病嫩茎中植原体观察

1.2.1 苯胺蓝染色观察:取健康及患病新疆小叶白蜡新鲜幼小嫩茎,徒手切片,厚度为20–30 μm,蒸馏水煮沸 5 min 固定,0.01%苯胺蓝溶液[1/15 mol/L K₂HPO₄ (pH 8.0)溶液配制]染色 25 min,LEICA DM4000B 正置智能荧光显微镜观察。

1.2.2 DAPI 染色观察:取健康及患病新疆小叶白蜡嫩茎切成3–5 mm小段,70% FAA 固定液(35%甲醛水溶液 50 mL+冰乙酸 50 mL+无水乙醇 630 mL+蒸馏水 270 mL)固定24–30 h,石蜡切片法切成10 μm的切片,1 mg/L DAPI 染色 20 min;LEICA DM4000B 正置智能荧光显微镜观察。

1.3 感病及健康新疆小叶白蜡总 DNA 提取及 PCR 扩增

参照漆艳香等^[4]的方法,分别提取感病及健康新疆小叶白蜡总DNA,并于–20℃冰箱中保存备用。

利用植原体16S rRNA基因的序列通用引物对P1/P7^[5]和R16F2n/R16R2^[6]对采集的样品进行PCR扩增(表1)。先用引物对P1/P7和R16F2n/R16R2对枣疯病及新疆小叶白蜡总DNA分别进行直接PCR扩增。然后取P1/P7的PCR扩增产物1 μL作为模板,用引物对R16F2n/R16R2进行巢式PCR扩增。

表1 用于植原体 16S rRNA 基因扩增的引物序列 Table 1 Primers used in this research to amplify 16S rRNA gene		
引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	参考文献 Reference
P1	AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT	[5]
P7	CGTCCTCATCGGCTCTT	[5]
R16F2n	GAAACGACTGCTAAGACTGG	[6]
R16R2	TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG	[6]

1.4 16S rRNA 基因核苷酸序列的测定与分析

PCR 扩增产物回收后连接载体并转化至大肠杆菌 DH5α 菌株，取白色菌落培养并提取质粒 DNA。通过 PCR 扩增筛选鉴定阳性克隆，送北京华大基因公司进行测序。利用 5 种限制性内切酶 (*Taq* I、*Eco*R I、*Bfa* I、*Hpa* I 和 *Hha* I)对 16S rRNA 基因序列进行 RFLP 分析；MEGA 5.0 邻接法 (Neighbor-Joining , NJ)构建基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树。

2 结果与分析

2.1 感病植株的症状表现

第一年 ,感病新疆小叶白蜡表现为枝条下部羽状复叶脱落，顶端羽状复叶丛生(图 1A)，次年，感病严重者表现为树冠干枯和植株枯死(图 1B)。

2.2 新疆小叶白蜡丛枝病嫩茎中植原体观察

2.2.1 苯胺蓝染色观察：徒手切片经苯胺蓝溶液染色后 ,在荧光显微镜下观察表现丛枝病症状的新疆小叶白蜡幼小嫩茎横切片韧皮部有不规则分布的金黄色云状荧光带(图 2A)；而健康新疆小叶白蜡幼小嫩茎横切片韧皮部无此特异性荧光带(图 2B)。

2.2.2 DAPI 染色观察：经 DAPI 染色后，用荧光显微镜在表现丛枝病症状的新疆小叶白蜡嫩茎横切片中观察到韧皮部有金黄色云状荧光带 ,皮层和

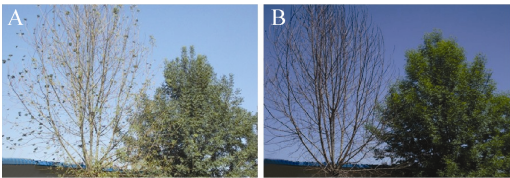


图 1 新疆小叶白蜡丛枝病症状
Figure 1 Symptoms of *Fraxinus sogdiana*Bunge witches' broom
注：A：第一年表现丛枝病症状的感病新疆小叶白蜡(左)及健康植株(右)；B：次年感病新疆小叶白蜡表现为树冠干枯和植株枯死(左)及健康植株(右)。
Note: A: Plants of *Fraxinus sogdiana*Bunge affected by phytoplasma showing symptoms of witches' broom (left) and healthy plants (right) in the first year; B: Plants of *Fraxinus sogdiana*Bunge affected by phytoplasma died and its crown was withered (left) and healthy plants (right) in the second year.

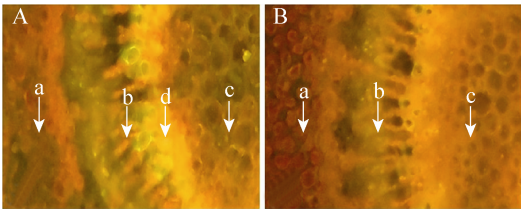


图 2 经苯胺蓝染色患病植株嫩茎横向切片荧光带及健康对照(200×)
Figure 2 Fluorescence zone in the phloem of infected plants by horizontal slices staining with aniline blue and healthy control (200×)
注：A：患病植株；B：健康植株。a：皮层；b：韧皮部；c：髓；d：荧光带。
Note: A: Infected plants; B: Healthy plants. a: Cortex; b: Phloem; c: Pith; d: Fluorescence zone.

髓部薄壁细胞有大量荧光点(图 3A)，而健康新疆小叶白蜡嫩茎横切片韧皮部无此特异性荧光带 ,韧皮部、皮层和髓部薄壁细胞有极少荧光点(图 3B)。

2.3 新疆小叶白蜡丛枝病植原体 16S rRNA 基因的序列 PCR 扩增结果

以 P1/P7 和 R16F2n/R16R2 为引物分别进行直接 PCR 扩增，仅枣疯病总 DNA 扩增出大小为 1 800 bp 和 1 200 bp 左右的特异产物 ,健康及感病新疆小叶白蜡均未扩增出此特异产物 ,再以引物 P1/P7

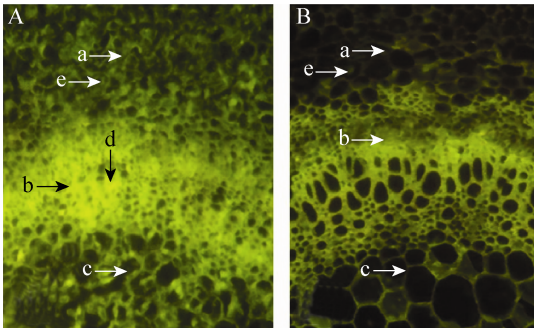


图 3 经 DAPI 染色患病植株嫩茎横向切片荧光带及健康对照(200×)
Figure 3 Fluorescence zone in the phloem of infected plants by horizontal slices staining with DAPI and healthy control (200×)
注：A：患病植株；B：健康植株。a：皮层；b：韧皮部；c：髓；d：荧光带；e：荧光点。
Note: A: Infected plants; B: Healthy plants. a: Cortex; b: Phloem; c: Pith; d: Fluorescence zone; e: Fluorescence dots.

的 PCR 扩增产物为模板 ,R16F2n/R16R2 为引物进行巢式 PCR 扩增,枣疯病及感病新疆小叶白蜡总 DNA 均得到 1 200 bp 左右的特异产物,而健康新疆小叶白蜡植株未扩增出相应产物(图 4)。说明表现感病症状的新疆小叶白蜡植株中存在植原体,暂命名为 *Fraxinus sogdiana*Bunge witches' broom phytoplasma (*Fraxinus sogdiana*Bunge WB)。

2.4 新疆小叶白蜡丛枝病植原体 16S rRNA 基因的序列测定与分析

2.4.1 核苷酸序列测定: 通过测定 *Fraxinus sogdiana*Bunge WB 的 3 个克隆确定其 16S rRNA 基因的序列,大小为 1 249 bp (GenBank 登录号: KF061042), G+C 含量为 46.0%。

2.4.2 RFLP 分析: 利用 5 种限制性内切酶对枣疯病(JWB)、*Fraxinus sogdiana*Bunge WB 及番茄巨芽植原体(TBB)的 16S rRNA 基因的序列进行 RFLP 分析。2.5% 琼脂糖凝胶电泳显示: *Fraxinus sogdiana*Bunge WB 和 16Sr V-B 亚组 JWB 的 RFLP 图谱完全一致,而二者与 16Sr VI 组 TBB 的 RFLP 图谱均不一致(图 5)。

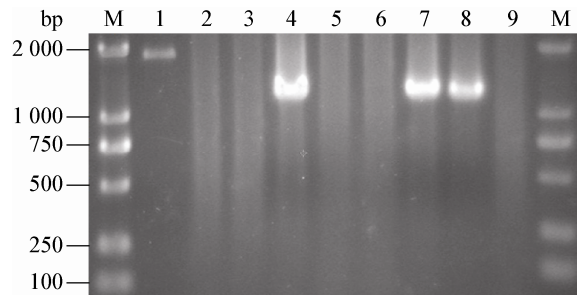


图 4 PCR 扩增产物电泳图

Figure 4 Electrophoresis of PCR products

注: M: Marker 2000; 1-6: 直接 PCR, 1-3 引物为 P1/P7, 4-6 引物为 R16F2n/R16R2; 7-9: 巢式 PCR, 引物为 R16F2n/R16R2; 1, 4, 7: 枣疯病植原体(阳性对照); 2, 5 和 8: *Fraxinus sogdiana*Bunge WB; 3, 6 和 9: 健康新疆小叶白蜡。

Note: M: Marker 2000; 1-6: Direct-PCR, 1-3 were amplified with primers P1/P7 and 4-6 were amplified with primers R16F2n/R16R2; 7-9: Nested-PCR, the primers were R16F2n/R16R2; 1, 4, 7: Jujube witches' broom phytoplasma (positive control); 2, 5, 8: *Fraxinus sogdiana*Bunge WB; 3, 6, 9: Healthy *Fraxinus sogdiana*Bunge plants.

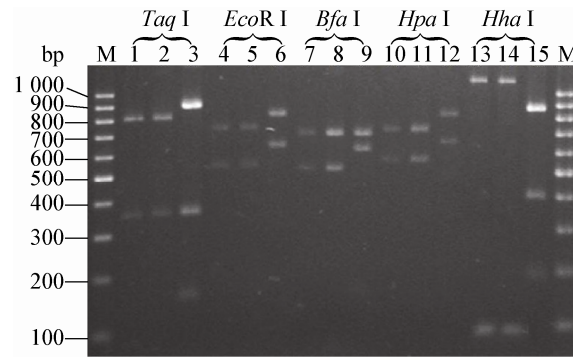


图 5 JWB, *Fraxinus sogdiana*Bunge WB 和 TBB 16S rRNA 基因的 RFLP 图

Figure 5 RFLP patterns of 16S rRNA gene from JWB, *Fraxinus sogdiana*Bunge WB and TBB

注: M: 100 bp marker (部分); 1, 4, 7, 10 和 13: JWB 16S rRNA 基因分别由限制性内切酶 *Taq* I, *Eco*R I, *Bfa* I, *Hpa* I, *Hha* I 进行酶切; 2, 5, 8, 11 和 14: *Fraxinus sogdiana*Bunge WB 16S rRNA 基因分别由限制性内切酶 *Taq* I, *Eco*R I, *Bfa* I, *Hpa* I, *Hha* I 进行酶切; 3, 6, 9, 12 和 15: TBB 16S rRNA 基因分别由限制性内切酶 *Taq* I, *Eco*R I, *Bfa* I, *Hpa* I, *Hha* I 进行酶切。

Note: M: 100 bp marker (partial); 1, 4, 7, 10 and 13: JWB 16S rRNA gene digested with *Taq* I, *Eco*R I, *Bfa* I, *Hpa* I, *Hha* I, respectively; 2, 5, 8, 11 and 14: *Fraxinus sogdiana*Bunge WB 16S rRNA gene digested with *Taq* I, *Eco*R I, *Bfa* I, *Hpa* I, *Hha* I, respectively; 3, 6, 9, 12 and 15: TBB 16S rRNA gene digested with *Taq* I, *Eco*R I, *Bfa* I, *Hpa* I, *Hha* I, respectively.

2.4.3 系统进化树构建及分析: 利用 MEGA 5.0 中 NJ 法构建基于植原体 16S rRNA 基因的序列系统进化树, *Fraxinus sogdiana*Bunge WB 与 16Sr V-A、16Sr V-B、16Sr V-C、16Sr V-D、16Sr V-E 亚组聚集为同一进化分支,并与 16Sr V-B 亚组的枣疯病菌株 AB052876 聚为一簇(图 6)。

3 讨论

3.1 新疆小叶白蜡丛枝病嫩茎中植原体观察

苯胺蓝染色检测植原体是利用植原体侵染植物后对韧皮部组织筛管细胞产生损害,造成胼胝质的积累,胼胝质与苯胺蓝特异性结合后在荧光显微镜蓝色激发光下产生金黄色荧光的原理,所以苯胺蓝染色只是检测植原体侵染的间接证据。国内曾用本方法成功检测出泡桐丛枝病^[7]及枣疯病^[8]。但是植物在正常的生长条件下,随着季节的变化,筛管

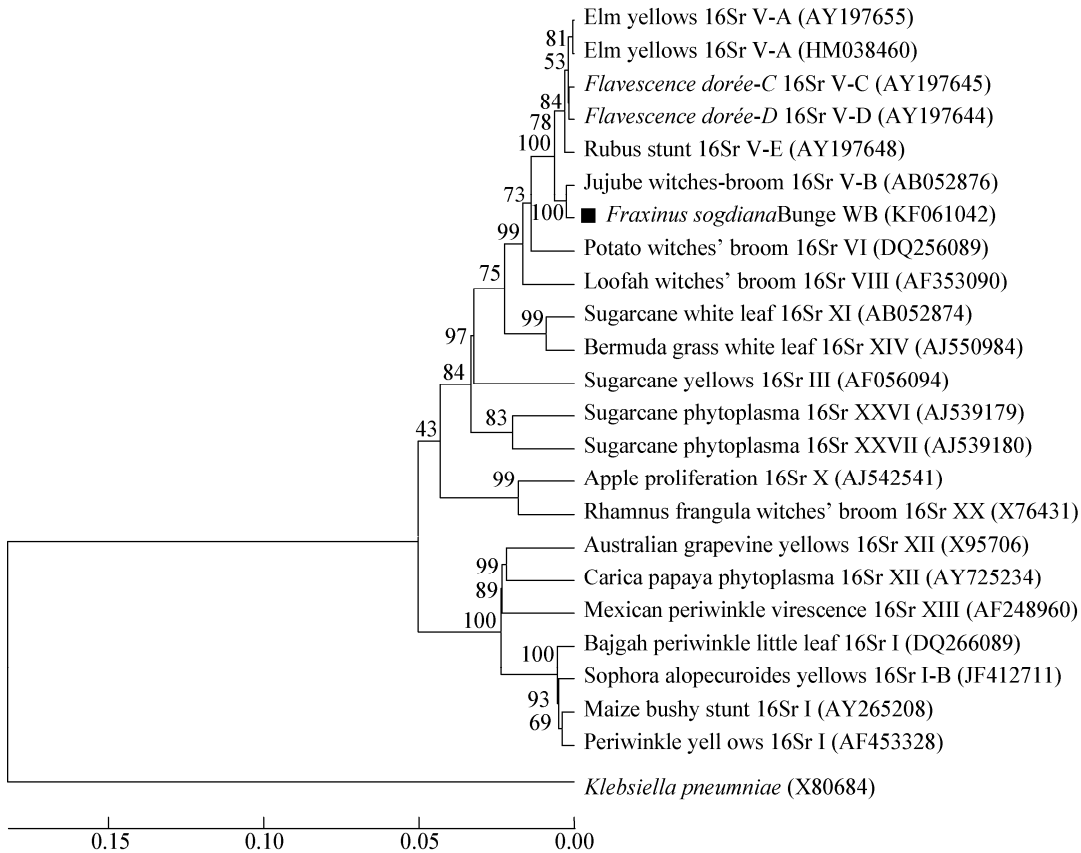


图 6 基于植原体 16S rRNA 基因序列分析构建的系统进化树

Figure 6 Phylogenetic tree constructed by parsimony analysis of 16S rRNA sequences of phytoplasmas

注：分支上的数值为自展值。Klebsiella pneumoniae 为外群，使进化树为有根树。

Note: Bootstrap values are shown on branches. Klebsiella pneumoniae was used as the out group to root the tree.

的老化或其他逆境也会导致胼胝质的积累,影响检测的准确性。本试验为了提高检测的可靠性,选择胼胝质积累少的幼小嫩茎切片染色观察,感病植株较健株在韧皮部有特异性荧光带,该结果与金开璇等^[7]关于泡桐丛枝病植原体的报道一致,说明苯胺蓝染色可用于新疆小叶白蜡植原体的检测。

DAPI 本身的荧光极其微弱,但与 DNA 结合后复合物的荧光强度骤然上升,是检测 DNA 的高效荧光染料。在国内,DAPI 染色法已经应用于泡桐丛枝病^[7,9]、枣疯病^[8]和桃黄化病^[10]植原体的检测。本试验用该法观察新疆小叶白蜡丛枝病植株嫩茎横切片发现韧皮部有大量的荧光带,而健康对照有极少的荧光点(植物本身细胞 DNA 被染色导

致),说明植原体主要寄生于病株韧皮部,这与前人^[7-10]研究结果一致。该结果说明 DAPI 染色法可用于新疆小叶白蜡丛枝病的初步检测。但本试验发现病株较健株嫩茎皮层和髓部薄壁细胞中存在更多的荧光点,说明病株嫩茎皮层和髓部薄壁细胞存在植原体,该结果与黄云等^[10]报道的仅在桃黄化病叶韧皮部薄壁细胞、筛管细胞及伴胞中发现植原体不一致,这可能是由观察器官、植物种类、采样时期、发病程度等因素不同导致。

3.2 新疆小叶白蜡丛枝病植原体 16S rRNA 基因的 PCR 扩增与分析

本试验利用直接 PCR 未能在患病新疆小叶白蜡总 DNA 中扩增出特异性产物:以第一轮 PCR

产物为模板, P1/P7 的嵌套引物 R16F2n/R16R2 为引物进行巢式 PCR 扩增, 得到植原体 16S rRNA 基因的特异产物, 说明巢式 PCR 较直接 PCR 适用于检测新疆小叶白蜡丛枝病植原体, 对该病原的检测具有重要的应用价值。

目前国际上普遍采用的植原体分类系统是根据其 16S rRNA 基因进行 PCR-RFLP 分析建立的。本试验选用 5 种限制性内切酶对 JWB、*Fraxinus sogdiana*Bunge WB 和 TBB 的 16S rRNA 基因进行 PCR-RFLP 分析, 发现 *Fraxinus sogdiana*Bunge WB 和 16Sr V-B 亚组 JWB 的 RFLP 图谱完全一致, 而二者与 16Sr VI 组 TBB 图谱均不一致。能否利用其它限制性内切酶对 *Fraxinus sogdiana*Bunge WB 的 16S rRNA 基因进行 RFLP 分析, 确定其为 16Sr V-B 亚组成员尚需进一步试验证实。16S rRNA 构建系统进化树结果显示, *Fraxinus sogdiana*Bunge WB 与 16Sr V-B 亚组参照菌株(AB052876)聚为一簇, 进化地位相同, 说明 16S rRNA 构建系统进化树与 PCR-RFLP 分析结果一致。所以, 根据 16S rRNA 基因的分析确定新疆小叶白蜡丛枝病植原体为 16Sr V-B 亚组成员, 与 Lee 等^[11]报道的 16Sr V-B 主要分布在亚洲相符, 该结果是否与 *Fraxinus sogdiana*Bunge WB 的核糖体蛋白基因 PCR-RFLP 分析一致还有待进一步试验证实。

参 考 文 献

- [1] Bai X, Zhang J, Ewing A, et al. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts[J]. Journal of Bacteriology, 2006, 188(10): 3682-3696.
- [2] Hogenhout SA, Oshima K, Ammar D, et al. Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects[J]. Molecular Plant Pathology, 2008, 9(4): 403-423.
- [3] 常文程, 李向东, 邵云华, 等. 椴棠丛枝病相关植原体的分子鉴定[J]. 植物病理学报, 2012, 42(5): 541-545.
- [4] 漆艳香, 谢艺贤, 张辉强, 等. 植原体 DNA 提取方法的改良[J]. 生物技术通报, 2004(4): 44-46.
- [5] Deng S, Hiruki C. Amplification of 16S rDNA genes from culturable and nonculturable mollicutes[J]. Journal of Microbiology Methods, 1991, 14(1): 53-61.
- [6] Lee I M, Gundersen-Rindal DE, Davis RE, et al. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1998, 48(4): 1153-1169.
- [7] 金开璇, 田国忠, 汪跃. 组织化学技术快速检测泡桐丛枝病研究[J]. 植物病理学报, 1989, 19(3): 185-187.
- [8] 王秀伶, 刘孟军, 刘丽娟, 等. 荧光显微技术在枣疯病病原鉴定中的应用[J]. 河北农业大学学报, 1999, 22(4): 46-49.
- [9] 袁巧平, 田国忠, 黄饮才. 泡桐丛枝病病原 MLO 在寄主离体培养组织中的保存与增殖[J]. 植物病理学报, 1994, 24(2): 115-120.
- [10] 黄云, 王靖, 赵艳琴, 等. 桃黄化病病原植原体的鉴定及 16S rDNA 序列分析[J]. 园艺学报, 2009, 36(3): 341-346.
- [11] Lee IM, Davis RE, Gundersen-Rindal DE, et al. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes[J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54: 221-255.