

宁夏马铃薯僵顶植原体的分子鉴定

李正男¹, 马强¹, 张磊¹, 孙平平¹, 赵文军², 周洪友^{1*}

(1. 内蒙古农业大学园艺与植物保护学院, 呼和浩特 010018; 2. 中国检验检疫科学研究院, 北京 100176)

摘要 通过透射电子显微镜, 在从宁夏回族自治区固原市彭阳县红河镇采集的表现叶片上卷、红叶、气生薯症状的马铃薯样品叶脉韧皮部筛管细胞内观察到大量直径为 500~700 nm 的球形植原体粒子。以提取的感病和健康马铃薯叶片总 DNA 为模板, 应用植原体 16S rRNA 基因和 *rp* 基因通用引物进行 PCR 扩增, 从感病样品中扩增得到了长度均约为 1.2 kb 的片段。对获得基因核酸一致性比较分析表明, 马铃薯僵顶植原体宁夏株系 16S rRNA 基因与 '*Candidatus* Phytoplasma fragariae' 槭树株系 (MK501642) 16S rRNA 基因核酸一致性最高, 为 99.7%, *rp* 基因与 '*Ca. P. fragariae*' 云南马铃薯 YN-2G 株系 (KJ144889) *rp* 基因核酸一致性最高, 为 100%; 基于 16S rRNA 基因和 *rp* 基因构建系统进化树发现, 马铃薯僵顶植原体宁夏株系与 16Sr XIII-E 亚组成员聚在一起。基于透射电镜观察和基因序列比较分析, 证明宁夏发生的马铃薯僵顶病与植原体侵染相关, 该植原体在分类地位上属于植原体 16Sr XIII-E 亚组。

关键词 马铃薯僵顶植原体; 16S rRNA 基因; *rp* 基因

中图分类号: S 435.32 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019679

Detection and identification of potato stolbur-associated phytoplasmas in Ningxia

LI Zhengnan¹, MA Qiang¹, ZHANG Lei¹, SUN Pingping¹, ZHAO Wenjun², ZHOU Hongyou^{1*}

(1. College of Horticulture and Plant Protection, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot 010018, China;
2. Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100176, China)

Abstract Potato plants showing the symptoms of leaf rolling, reddening and air tuber were collected in Honghe town, Pengyang county, Guyuan city, Ningxia Hui autonomous region, China. The phytoplasma-like particles of 500–700 nm in diameter were observed in the phloem sieve elements of the leaves of the collected samples under a transmission electron microscope (TEM). Total DNAs were extracted from the symptomatic and healthy samples, respectively, as templates, and PCR products of around 1.2 kb were amplified from the symptomatic samples using phytoplasma universal primers for 16S rRNA and *rp* genes. Analyses of the nucleotide sequences indicated that the 16S rRNA of potato stolbur phytoplasma shared the highest identity of 99.7% with that of '*Candidatus* Phytoplasma fragariae' strain *Acer* sp. (MK501642); the *rp* gene of potato stolbur phytoplasma had the highest identity of 100% with that of *Ca. P. fragariae*-related strain YN-2G (KJ144889). On the phylogenetic trees constructed based on 16S rRNA and *rp* gene sequences, the potato stolbur phytoplasma from Ningxia clustered with the members of 16Sr XIII-E subgroup. The results of TEM examination and molecular detection suggested that the potato stolbur in Ningxia is associated with the phytoplasma of the subgroup 16Sr XIII-E.

Key words potato stolbur phytoplasmas; 16S rRNA gene; *rp* gene

马铃薯 *Solanum tuberosum* L. 是我国主要粮食作物之一, 是世界上仅次于水稻、玉米、小麦之后的第四大粮食作物, 对我国粮食安全具有重要战略意义^[1]。我国马铃薯种植区主要划分为西北、西南、内蒙古和

收稿日期: 2019-12-09 修订日期: 2020-03-08

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201101); 国家自然科学基金(31670128); 内蒙古自治区科技攻关项目(2019GG180); 内蒙古自然科学基金(2019MS03021)

* 通信作者 E-mail: hongyouzhou2002@aliyun.com

东北四大优势产区。宁夏属于西北马铃薯优势产区,2016 年,我国马铃薯种植面积为 554.52 万 hm^2 ,宁夏马铃薯种植面积为 16.88 万 hm^2 ^[2],马铃薯种植业已经发展成为当地农民脱贫致富的主导产业。随着马铃薯种植面积的扩大,病害的发生已经发展成为制约我国马铃薯高产、优产的主要因素,除传统的晚疫病 *Phytophthora infestans*、黑胫病 *Pectobacterium* spp.、环腐病 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* 和病毒病外,由植原体引起的马铃薯僵顶病 (potato stolbur) 日益发展成为主要病害^[3]。

马铃薯僵顶病是一种植原体病害,发生普遍、传播迅速、危害严重。其症状主要表现为叶片上卷、红叶或紫叶、节间膨大、节间缩短、芽增殖、气生薯和早衰,部分发病轻的植株地下薯块虽然无肉眼可见症状,但质地蓬松(海绵薯),在加工过程中品相变差,如制作炸薯片时,会出现薯片褐变,丧失食用和经济价值^[3-4]。马铃薯僵顶病的流行主要有以下两方面原因,第一,由介体昆虫甜菜叶蝉 *Circulifer tenellus* 传播^[5],散布迅速;第二,通过薯块营养繁殖传播^[6]。据报道,该病害在北美^[5,7]、南美^[8]、欧洲^[4,9]、新西兰^[10]、俄罗斯^[11]和伊朗^[12]均有发生,并且引起严重的马铃薯减产。已经确认马铃薯僵顶病可由 16Sr I、16Sr II、16Sr III、16Sr VI、16Sr X、16Sr XII、16Sr X III 和 16Sr X VIII 组植原体引起^[9,13-14]。在我国云南和内蒙古个别马铃薯种植区内,马铃薯僵顶病的发生率达 80%~100%,由 16Sr I 和 16Sr XII 组植原体引起^[3]。

宁夏作为我国马铃薯的主产区之一,是否有马铃薯僵顶病发生,其病原的分类地位等尚不清楚。为此,我们开展了宁夏马铃薯僵顶病调查和病原鉴定,以期对马铃薯僵顶病的预测及病原菌研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2018 年 9 月 10 日—17 日自宁夏回族自治区固原市彭阳县红河镇采集表现叶片上卷、红叶、节间缩短、气生薯、根系坏死等症状的马铃薯样品,马铃薯品种为‘费乌瑞它’。用于分子检测的样品采样方法

如下:每株取 5~8 片新叶,以锡箔纸包裹后迅速液氮冷冻,通过干冰运回实验室,保存于超低温冰箱(-86℃)备用,其中有症状样品 10 个,无症状样品 3 个。用于透射电镜观察的样品采样方法如下:取 10~15 cm 有症状植株茎尖,用打湿的报纸迅速包起来,保存在泡沫塑料盒中,带回实验室。在分类上属于 16Sr I-B 亚组的苦楝丛枝样品为本实验室保存。

Ex Taq® DNA Polymerase、dNTPs (2.5 mmol/L)、克隆载体 PMD19-T simple vector、DH5 α 感受态细胞均购自宝生物工程(大连)有限公司。琼脂糖凝胶回收试剂盒、高纯度质粒小量快速提取试剂盒购自艾德莱生物技术有限公司。1 kb DNA Ladder 购自北京天根生化科技有限公司。

1.2 透射电子显微镜观察

从显症马铃薯叶脉取 2 mm×2 mm 大小的韧皮部组织,将样品先用 3%的戊二醛和 4%的多聚甲醛混合物固定 4 h,然后用 1%锇酸再次固定 2 h,10%~70%的乙醇和 0~100%的丙酮逐级脱水,用 812 环氧树脂包埋,在烘箱内烘干 72 h 后取出修块,修块完成后切半薄切片,定位到韧皮部组织后进行超薄切片,将超薄切片以醋酸铀酰及柠檬酸铅进行双重染色,用 JEM-1200X 透射电镜观察并拍照^[15-16]。

1.3 总 DNA 提取

采用 CTAB 法提取冻存的 13 个马铃薯叶片样品总 DNA^[17-18],溶解于 50 μL 灭菌双蒸水中,采用 Eppendorf BioPhotometer D30 核酸蛋白测定仪测定 DNA 浓度,通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的完整性后将总 DNA 保存于超低温冰箱(-86℃)中备用。苦楝丛枝样品 DNA 提取方法同上。

1.4 马铃薯僵顶病的 PCR 检测

16S rRNA 基因的 PCR 扩增:以提取的总 DNA 为模板,用植原体 16S rRNA 基因通用引物 P1 (5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3') 和 P7 (5'-CGTCCCTTCATCGGCTCTT-3')^[19-20] 进行扩增。扩增程序为:98℃ 预变性 3 min;98℃ 1 min,50℃ 2 min,72℃ 3 min,35 个循环;72℃ 10 min。将第一轮 PCR 产物稀释 30 倍作为模板,用引物 R16F2n (5'-GAAACGCTGCTAAGACTGG-3') 和 R16R2 (5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3')^[21] 进行

第二轮 PCR, 扩增程序为: 98℃ 预变性 3 min; 98℃ 1 min, 52℃ 1 min, 72℃ 1 min, 先进行 5 个循环, 然后以 94℃ 30 s, 50℃ 1 min, 72℃ 2 min, 进行 25 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

rp 基因的 PCR 扩增: 使用植原体 *rp* 基因通用引物 rpF1C (5'-ATGGTDGGDCAYAAARTTAGG-3') 和 rp (D) R1A (5'-GTTCTTTTTTGGCATTAACAT-3')^[22] 进行扩增。扩增程序为: 98℃ 预变性 11 min; 98℃ 1 min, 50℃ 2 min, 72℃ 3 min, 38 个循环; 72℃ 延伸 7 min。

上述 PCR 反应体系均为 25 μ L: 灭菌双蒸水 14.5 μ L, 上下游引物分别 0.5 μ L (10 μ mol/L), 10 $\times$ PCR buffer 2.5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 4.0 μ L, *Taq* DNA polymerase (5 U/ μ L) 0.5 μ L, DNA (20 ng/ μ L) 1 μ L。

取 5 μ L PCR 产物, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, EB 染色后在凝胶成像系统下成像。PCR 反应以健康马铃薯总 DNA 为阴性对照, 采集自陕西省杨凌区西北农林科技大学校园的苦楝丛枝样品 DNA 为阳性对照。

1.5 PCR 产物的纯化、克隆及序列测定

采用快捷型琼脂糖 DNA 回收试剂盒纯化 PCR 产物, 纯化产物与 PMD19-T simple vector 16℃ 连

接 1 h, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经过蓝白斑筛选后, 挑取筛选平板上的白色菌落, 在 3 mL Amp 抗性的 LB 液体培养基中培养过夜, 经过 PCR 鉴定为阳性的菌液提取质粒, 重组质粒送上海生工生物技术有限公司进行测序。

1.6 序列一致性比较分析

采用 Vector NTI Advance11 (Invitrogen Corp.) 软件对测序结果进行校正和拼接; 将获得的 16S rRNA 和 *rp* 基因序列进行 BLASTn 比对检索同源序列并提交 GenBank; 通过 DNAMAN 软件将测定的 16S rRNA 基因和 *rp* 基因序列与同组植原体代表株系进行核酸一致性比较; 通过 MEGA 6.0 软件分别构建 16S rRNA 基因和 *rp* 基因系统发育进化树^[23]。

2 结果与分析

2.1 马铃薯僵顶病症状

2018 年 9 月 10 日—17 日, 对宁夏回族自治区固原市彭阳县红河镇马铃薯僵顶病进行了调查, 调查标准主要是看马铃薯田里是否存在叶片上卷、红叶、节间缩短、气生薯和根系坏死症状的植株。结果发现, 表现上述症状的马铃薯植株在薯田内零星发生, 共采集了 10 株有症状的马铃薯叶片样品, 3 株无症状马铃薯叶片样品 (图 1)。



a: 感病马铃薯表现为叶片上卷、红叶; b: 图a中表现红叶症状叶片的放大; c: 感病植株根系坏死、茎秆上着生气生薯, 丧失商品性
a: Symptoms of leaf rolling and reddening; b: Magnification of the symptomatic leaf shown in figure a; c: Symptoms of root death and air tubers, loss of commerciality

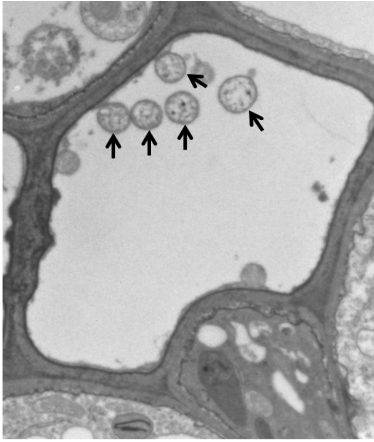
图 1 马铃薯僵顶病病株症状

Fig. 1 A symptomatic potato plant with potato stolbur disease

2.2 电镜结果

通过透射电子显微镜在感病马铃薯韧皮部筛管

细胞内观察到大量球形的植原体粒子, 大小在 500 ~ 700 nm (图 2)。



黑色箭头所示为球形植原体粒子, 大小在500~700 nm, 比例尺为2 μm
The black arrows indicate spherical phytoplasma particles with diameters from 500 to 700 nm. The scale bar is 2 μm

图 2 感病马铃薯叶脉韧皮部组织透射
电子显微镜观察结果
Fig. 2 The TEM observation of the phloem
tissue of an infected potato

2.3 PCR 鉴定结果

利用植原体 16S rRNA 基因和 *rp* 基因通用引物从有症状的 10 个马铃薯样品和阳性对照中均扩增出长度约 1.2 kb 的 16S rRNA 基因和 *rp* 基因, 而 3 个无症状马铃薯样品中未扩增出特异性条带。证明了表现叶片内卷、红叶、节间短缩、气生薯和根系坏死症状的马铃薯中有植原体存在。

2.4 一致性分析和系统发育分析

从 10 个 PCR 鉴定为植原体阳性的马铃薯样品中随机选择 2、4、7、9 号样品进行 16S rRNA 基因和 *rp* 基因克隆, 16S rRNA 基因和 *rp* 基因均选择 3 个阳性克隆进行测序, 4 个样品彼此间 16S rRNA 基因和 *rp* 基因的一致性为 100.0%, 我们将该植原体命名为马铃薯僵顶植原体宁夏株系 (potato stolbur phytoplasma strain Ningxia, PSp-Nx), 16S rRNA 片段长度为 1 246 bp, G+C 含量为 46.79%, 登录号为 MK696087; *rp* 基因长度为 1 182 bp, 登录号为 MK695939。通过 BLASTn 程序, 将获得的马铃薯僵顶植原体宁夏株系 16S rRNA 基因序列和 *rp* 基因序列在 GenBank 中进行同源序列搜索, 分别搜索到 99 条同源序列, 99 条序列均属于僵顶组 (16SrⅫ组) 成员, 其 16S rRNA 基因与 ‘*Ca. P. fragariae*’ 槭

树株系 (MK501642) 16S rRNA 基因一致性最高, 为 99.70%, *rp* 基因与 ‘*Ca. P. fragariae*’ 云南马铃薯 YN-2G 株系 (KJ144889) *rp* 基因一致性最高, 达到 100.0%。

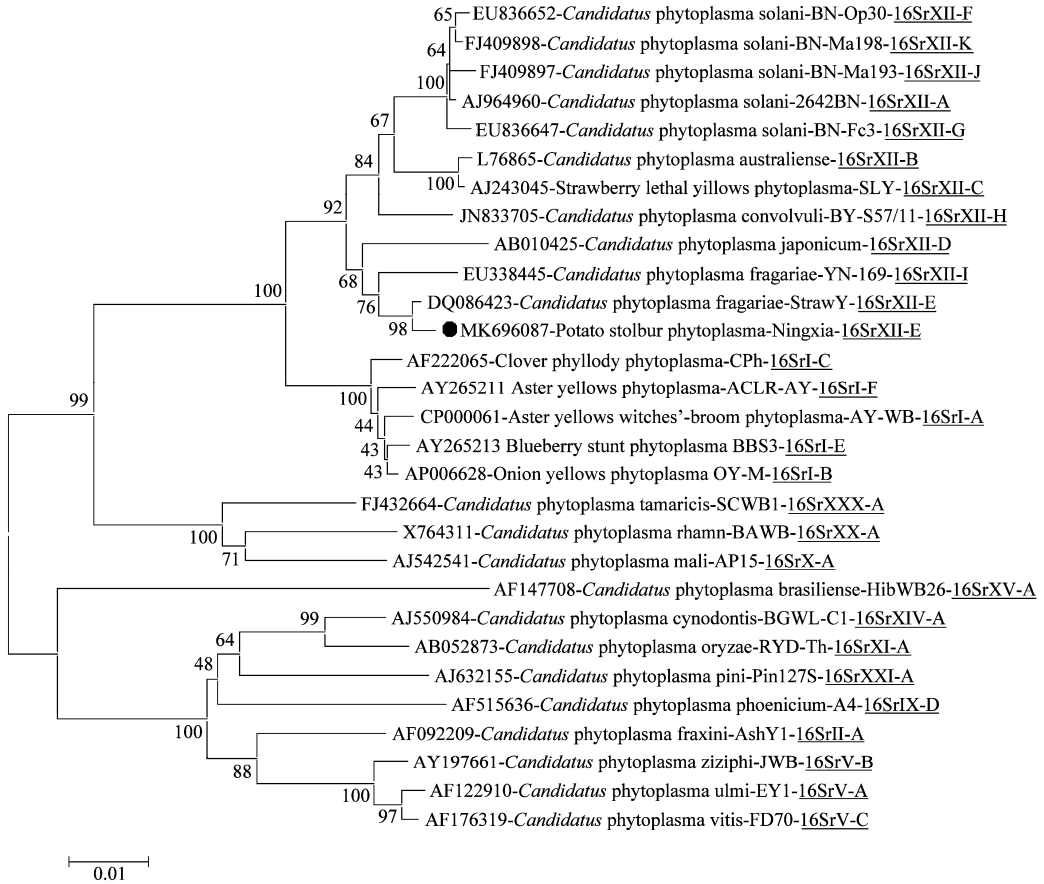
利用 MEGA 6.0 软件将马铃薯僵顶植原体宁夏株系 16S rRNA 基因序列与僵顶组植原体 11 个亚组 (A-K) 代表及其他各植原体组代表的 16S rRNA 基因序列进行比较, 构建系统发育进化树 (图 3)。从图中可以看出马铃薯僵顶植原体宁夏株系与僵顶组植原体 11 个亚组代表株系聚集在一起形成一个大的分支, 其中又与 16SrⅫ-E 亚组的代表株系 ‘*Ca. P. fragariae*’ 草莓株系 (DQ086423) 聚集在一起形成独立分支。马铃薯僵顶植原体宁夏株系 *rp* 基因序列与僵顶组植原体 5 个代表及其他各植原体组代表的 *rp* 基因序列进行比较, 构建系统发育进化树 (图 4)。从图中可以看出马铃薯僵顶植原体宁夏株系与僵顶组植原体 5 个代表株系聚集在一起形成一个大的分支, 其中又与分类属于 16SrⅫ-E 亚组的 ‘*Ca. P. fragariae*’ 云南马铃薯 YN-2G 株系 (KJ144889) 聚集在一起。

基于对 16S rRNA 基因和 *rp* 基因的核酸一致性分析和系统发育分析, 均证明马铃薯僵顶植原体宁夏株系属于 16SrⅫ组, 并且该分离物与 16SrⅫ-E 亚组亲缘关系最近。

3 讨论

在本研究中透射电镜和分子检测结果均证明在宁夏发生的马铃薯僵顶病与植原体有关; 其 16S rRNA 基因和 *rp* 基因的一致性分析和系统发育分析证明该植原体属于 16SrⅫ组, 并且与 16SrⅫ-E 亚组亲缘关系最近。

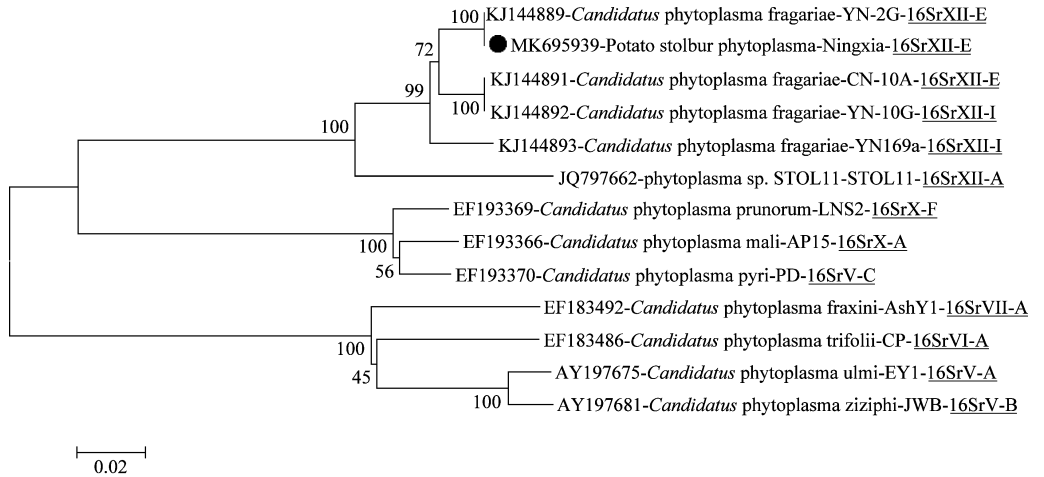
之前的研究表明在我国北方地区 16Sr I 组和 16Sr V 组植原体发生最为普遍, 南方地区 16Sr I 组和 16Sr II 组植原体发生最为普遍^[24], 但近年来越来越多的研究报道僵顶组 (16SrⅫ组) 植原体在我国的发生, 其中 Gao 等^[25]报道了 16SrⅫ组一个新的亚组在山东牡丹上的发生, Yang 等^[26]报道了 16SrⅫ-A 亚组在陕西丹参上的发生, Wu 等^[27]报道了 16SrⅫ-C 亚组在云南黄槐树上的发生, Cheng 等^[3]报道了 16SrⅫ-E、16SrⅫ-I 亚组在我国云南和内蒙古马铃



各标注依次为: 登录号+植原体名称+分离株系+分组, 其中“L76865”与“AB010425”的分离株系名称未知
Each strain in the phylogenetic tree is labeled as GenBank accession number + species name + strain name + group; among them, the strain names of “L76865” and “AB010425” are unknown

图 3 基于 16S rRNA 基因序列构建的马铃薯僵顶植原体宁夏株系 (P_{Sp}-N_x) 和 16SrⅫ 组 A-K 亚组代表及其他各植原体组代表的系统发育进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on the 16S rRNA gene sequences of the potato stolbur phytoplasma strain Ningxia (P_{Sp}-N_x), the representatives of 16SrⅫ-A to-K subgroups and members of other 16Sr groups



各标注依次为: 登录号+植原体名称+分离株系+分组
Each strain in the phylogenetic tree is labeled as GenBank accession number + species name + strain name + group

图 4 基于 *rp* 基因序列构建的马铃薯僵顶植原体宁夏株系 (P_{Sp}-N_x) 和 16SrⅫ 组植原体 5 个代表及其他各植原体组代表的系统发育进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed based on the *rp* gene sequences of the potato stolbur phytoplasma strain Ningxia (P_{Sp}-N_x), five representatives of 16SrⅫ groups and members of other 16Sr groups

薯上的发生,由此,我们可以看到 16SrⅫ组植原体在我国不同地区正在广泛发生。由 16SrⅫ组植原体引起的病害已经发展成为北欧最严重的植原体病害^[28],因此 16SrⅫ组植原体在我国的发生值得引起重视。

在我国西北马铃薯产区的陕西、西南马铃薯产区的云南、内蒙古马铃薯产区分别有 16SrⅠ-B、16SrⅥ-A、16SrⅫ-E、16SrⅫ-I 亚组植原体侵染马铃薯引起僵顶病的报道^[3,29-31],但在宁夏和黑龙江等马铃薯产区还没有马铃薯僵顶病发生的报道,本研究对宁夏马铃薯产区进行了调查,并证明在宁夏有 16SrⅫ-E 亚组植原体引起的马铃薯僵顶病。结合上面研究结果证明与植原体相关的马铃薯僵顶病在我国马铃薯产区普遍发生。虽然在本研究中鉴定到的马铃薯僵顶植原体宁夏株系与在云南和内蒙古鉴定到的马铃薯僵顶植原体均属于 16SrⅫ-E 亚组,但马铃薯僵顶植原体宁夏株系 16S rRNA 基因却与在比利时发生的‘*Ca. P. fragariae*’槭树株系(MK501642)一致性最高,为 99.70%,说明马铃薯僵顶植原体宁夏株系与云南和内蒙古株系存在一定变异。在世界范围内已经有 16SrⅠ、16SrⅡ、16SrⅢ、16SrⅥ、16SrⅩ、16SrⅫ、16SrⅫⅢ和 16SrⅫⅢ组^[10,14-15]在马铃薯上引起僵顶病的报道,结合我国的研究结果可以看出引起马铃薯僵顶病的植原体病原多样,植原体由刺吸式口器昆虫传播,这类昆虫食性广泛,它们可能会在感染了不同组植原体或者同组不同亚组植原体的植株上取食,这可能是导致马铃薯僵顶病植原体病原多样性的原因,在油菜、葡萄、长春花等植物上也存在分类上属于不同组的多个植原体组植原体侵染的报道。我国不同马铃薯产区僵顶病的发生情况、病原多样性和效应因子鉴定将是我们后续工作的重点。

参考文献

- [1] 谢从华. 马铃薯产业的现状与发展[J]. 华中农业大学学报(社科), 2012(1): 1-4.
- [2] 李晓瑞, 郭文辉, 陈学君. 宁夏马铃薯产业发展现状、存在问题及建议[J]. 宁夏农林科技, 2018, 59(9): 39-41.
- [3] CHENG Mingyuan, DONG Jiahong, LEE I M, et al. Group 16SrⅫ phytoplasma strains, including subgroup 16SrⅫ-E (‘*Candidatus* Phytoplasma fragariae’) and a new subgroup, 16SrⅫ-I, are associated with diseased potatoes (*Solanum tuberosum*) in the Yunnan and Inner Mongolia regions of China [J]. European Journal of Plant Pathology, 2015, 142(2): 305-318.
- [4] EMBER I, ACS Z, MUNYANEZA J E, et al. Survey and mo-

lecular detection of phytoplasmas associated with potato in Romania and southern Russia [J]. European Journal of Plant Pathology, 2011, 130(3): 367-377.

- [5] MUNYANEZA J E, JENSEN A S, HAMM P B, et al. Seasonal occurrence and abundance of beet leafhopper in the potato growing region of Washington and Oregon Columbia Basin and Yakima Valley [J]. American Journal of Potato Research, 2008, 85(1): 77-84.
- [6] CROSSLIN J M, HAMLIN L L, BUCHMAN J L, et al. Transmission of potato purple top phytoplasma to potato tubers and daughter plants [J]. American Journal of Potato research, 2011, 88(4): 339-345.
- [7] LEYVA-LÓPEZ N E, OCHOA-SÁNCHEZ J C, LEAL-KLEVEZAS D S, et al. Multiple phytoplasmas associated with potato diseases in Mexico [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2002, 48(12): 1062-1068.
- [8] JONES P, AROCHA Y, ANTESANA O, et al. ‘Brotes grandes’ (big bud) of potato: a new disease associated with a 16SrⅠ-B subgroup phytoplasma in Bolivia [J]. Plant Pathology, 2005, 54(2): 234.
- [9] PALTRINIERI S, BERTACCINI A. Detection of phytoplasmas in plantlets grown from different batches of seed-potatoes [J]. Bulletin of Insectology, 2007, 60(2): 379-380.
- [10] LIEFTING L W, PEREZ-EGUSQUIZA Z C, CLOVER G R G, et al. A new ‘*Candidatus* Liberibacter’ species in *Solanum tuberosum* in New Zealand [J]. Plant Disease, 2008, 92(10): 1474.
- [11] GIRSOVA N V, BOTTNER-PARKER K D, BOGOUTDI-NOV D Z, et al. Diverse phytoplasmas associated with potato stolbur and other related potato diseases in Russia [J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 145(1): 139-153.
- [12] HOSSEINI P, BAHAR M, MADANI G, et al. Molecular characterization of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Iran [J]. Journal of Phytopathology, 2011, 159(4): 241-246.
- [13] LEE I M, BOTTNER K D, MUNYANEZA J E, et al. Clover proliferation group (16SrⅥ) subgroup A (16SrⅥ-A) phytoplasma is a probable causal agent of potato purple top disease in Washington and Oregon [J]. Plant Disease, 2004, 88(4): 429.
- [14] SANTOS-CERVANTES M E, CHÁVEZ-MEDINA J A, ACOSTA-PARDINI J, et al. Genetic diversity and geographical distribution of phytoplasmas associated with potato purple top disease in Mexico [J]. Plant Disease, 2010, 94(4): 388-395.
- [15] LI Zhengnan, ZHANG Lei, ZHAO Lei, et al. A new phytoplasma associated with witches’-broom on Japanese maple in China [J]. Forest Pathology, 2012, 42(5): 371-376.
- [16] LI Zhengnan, ZHANG Lei, SONG Jiagui, et al. Molecular detection and identification of phytoplasma associated with pepper witches’ broom in China [J]. Phytoparasitica, 2013, 41(4): 429-434.

- vector of ‘*Candidatus Phytoplasma Trifolii*’ [J/OL]. *Australasian Plant Disease Notes*, 2018, 13(1): 13. DOI: 10.1007/s13314-018-0298-1.
- [14] MARTINI M, LEE I M, BOTTNER K D, et al. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(9): 2037–2051.
- [15] TRAN-NGUYEN L T T, KUBE M, SCHNEIDER B, et al. Comparative genome analysis of ‘*Candidatus Phytoplasma Australiense*’ (subgroup Tuf-Australia I; Rp-A) and ‘*Ca. Phytoplasma Asteris*’ strains OY-M and AY-WB [J]. *Journal of Bacteriology*, 2008, 190(11): 3979–3991.
- [16] LEE I M, ZHAO Y, BOTTNER K D. *SecY* gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the Aster yellows phytoplasma group [J]. *Molecular and Cellular Probes*, 2006, 20(2): 87–91.
- [17] 蔡红, 孔宝华, 陈海如. 长春花黄化植原体(PY)株系的检测与鉴定[J]. *微生物学报*, 2003, 43(1): 116–119.
- [18] 蔡红, 张华明, 陈海如, 等. 竹丛枝植原体 16SrDNA 片段克隆与序列分析[J]. *植物保护*, 2005, 31(2): 38–40.
- [19] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from metazoan invertebrates [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294–299.
- [20] WALSH K B, GUTHRIE J N, WHITE D. Control of phytoplasma diseases of papaya in Australia using netting [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2006, 35(1): 49–54.
- [21] MAYER C J, VILCINSKAS A, GROSS J. Pathogen-induced release of plant allomone manipulates vector insect behavior [J]. *Journal of Chemical Ecology*, 2008, 34(12): 1518–1522.
- [22] EBEN A, GROSS J. Innovative control of psyllid vectors of European fruit tree phytoplasmas [J]. *Phytopathogenic Mollicutes*, 2013, 3(1): 37–39.
- (责任编辑: 田 喆)
-
- (上接 61 页)
- [17] LI Zhengnan, ZHANG Lei, BAI Yaobo, et al. Detection and identification of the elm yellows group phytoplasma associated with Puna chicory flat stem in China [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2012, 34(1): 34–41.
- [18] LI Zhengnan, SONG Shuang, ZHANG Lei, et al. Identification of the phytoplasma associated with peach yellows disease in northwest China [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2014, 36(2): 151–160.
- [19] DENG Sujun, HIRUKI C. Amplification of 16S rRNA genes from culturable and nonculturable Mollicutes [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1991, 14(1): 53–61.
- [20] SCHNEIDER B, SEEMÜLLER E, SMART C, et al. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas [M]//RAZIN S, TULLY J. *Molecular and diagnostic procedures in Mycoplasma*. New York: Academic Press, 1995: 369–380.
- [21] LORENZ K H, SCHNEIDER B, AHRENS U, et al. Detection of the apple proliferation and pear decline phytoplasmas by PCR amplification of ribosomal and nonribosomal DNA [J]. *Phytopathology*, 1995, 85(7): 771–776.
- [22] MARTINI M, LEE I M, BOTTNER K D, et al. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2007, 57(9): 2037–2051.
- [23] CUMMINGS M P. MEGA. Dictionary of bioinformatics and computational biology [M]. Colchester: John Wiley & Sons Incorporation Press, 2004.
- [24] LI Zhengnan, ZHANG Lei, LIU Ping, et al. Detection and molecular characterization of cactus witches’ broom disease associated with a group 16SrII phytoplasma in northern areas of China [J]. *Tropical Plant Pathology*, 2012, 37(3): 210–214.
- [25] GAO Ying, QIU Pingping, LIU Wenhao, et al. Identification of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ associated with tree peony yellows disease in China [J]. *Journal of Phytopathology*, 2013, 161(3): 197–200.
- [26] YANG Ruihuan, WANG Guiwei, WANG Sai, et al. Molecular identification and diversity of ‘*Candidatus Phytoplasma solani*’ associated with red-leaf disease of *Salvia miltiorrhiza* in China [J]. *Journal of Phytopathology*, 2016, 164(11/12): 882–889.
- [27] WU Wei, CAI Hong, WEI Wei, et al. Identification of two new phylogenetically distant phytoplasmas from *Senna surattensis* plants exhibiting stem fasciation and shoot proliferation symptoms [J]. *Annals of Applied Biology*, 2012, 160(1): 25–34.
- [28] ZWOLIŃSKA A, KRAWCZYK K, POSPIESZNY H. Molecular characterization of stolbur phytoplasma associated with pea plants in Poland [J]. *Journal of Phytopathology*, 2012, 160(7/8): 317–323.
- [29] CHENG Mingyuan, DONG Jiahong, LASKI P J, et al. Molecular characterization of ‘*Candidatus Phytoplasma asteris*’ associated with aster yellows-diseased potatoes in China [J]. *Plant Disease*, 2011, 95(6): 777.
- [30] CHENG Mingyuan, DONG Jiahong, LASKI P J, et al. First report of clover proliferation group phytoplasmas (16SrVI-A) associated with purple top diseased potatoes (*Solanum tuberosum*) in China [J]. *Plant Disease*, 2011, 95(7): 871.
- [31] 李正男. 西北地区常见植物植原体病害分子鉴定及株系多样性研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- (责任编辑: 田 喆)