

研究简报

Research Notes

杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 16S rDNA 基因克隆与序列分析

艾克热木·买买提^{1,2#}, 韩剑^{1,2#}, 罗明^{1,2*}, 唐章虎³

(1. 新疆农业大学农学院, 乌鲁木齐 830052; 2. 新疆维吾尔自治区高校农林有害生物监测与安全防护重点实验室, 乌鲁木齐 830052; 3. 新疆农科院轮台国家果树资源圃, 轮台 841600)

摘要 利用植原体 16S rDNA 基因通用引物对新疆轮台县疑似杏褪绿卷叶病植株总 DNA 进行巢氏 PCR 检测, 扩增出大小约 1.2 kb 的特异性条带。对扩增产物克隆和测序, 确定特异片段大小为 1 248 bp。序列同源性比较和系统进化分析表明, 新疆杏褪绿卷叶植原体不同分离株 16S rDNA 基因序列同源性极高, 达到 99.8%~100%。与 16SrV 组成员的同源性达到 98.2% 以上, 其中与 16SrV-B 亚组的枣疯病植原体山东宝山分离株, 甜樱桃绿化植原体山东分离株同源性最高, 达到 99.4%~99.6%。进一步虚拟 RFLP 分析, 结果表明该植原体属于榆树黄化组 (16SrV) 的一个新的亚组, 与其相似性最高的是 16SrV-B 亚组, 相似系数为 0.94。本研究首次报道了新疆杏褪绿卷叶植原体 16S rDNA 的序列, 确定了其分类地位, 为杏褪绿卷叶病的早期诊断和检测提供了基础。

关键词 杏; 杏褪绿卷叶病; 植原体; 16S rDNA; 序列分析

中图分类号: S 436.6 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2019046

Cloning and sequencing of 16S rDNA gene of the phytoplasma of apricot chlorotic leaf roll in Xinjiang

AIKEREMU · Maimaiti^{1,2#}, HAN Jian^{1,2#}, LUO Ming^{1,2*}, TANG Zhanghu³

(1. Agronomy Faculty, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, China; 2. Key Laboratory of Harmful Biological Monitoring and Safety Prevention of Xinjiang Autonomous Region Forestry Universities, Urumqi 830052, China; 3. Luntai National Pomology Germplasm Garden, Academy of Agricultural Science of Xinjiang, Luntai 841600, China)

Abstract By using Nested-PCR, the 16S rDNA of phytoplasma of apricot chlorotic leaf roll (ACLR) in diseased sample from Luntai region in Xinjiang was amplified by the universal primer pairs, then a phytoplasma-specific 1.2 kb fragment were amplified by nested-PCR. The 16S rDNA gene was cloned by polymerase chain reaction from samples of ACLR, they were then sequenced. The result of sequencing showed that the ACLR strains from Xinjiang consists of 1 248 bp in 16S rDNA gene. The similarity and phylogenetic analysis showed that the six ACLR isolates sequenced from Luntai region are closely related to each other, displaying 99.8%–100% nucleotide sequence similarity, and the six isolates shared approximately 98.2% identity with 16SrV group, the results of blast showed that the genetic distance of six isolates was closely to the 16SrV-B subgroup, which shared the highest similarity (99.4%–99.6%) with the strains of prunus avium virescence phytoplasma (MF848965) from Shandong and jujube witches'-broom phytoplasma (EU999737) from Shandong. Furthermore, virtual RFLP analysis showed that the phytoplasma belonged to a new subgroup within the elm yellows group (16SrV), the most similar was the reference pattern of the 16Sr group V, subgroup B (GenBank accession: AB05287), with a similarity coefficient of 0.94. This study reports 16S rDNA sequences of ACLR phytoplasmas and classified phytoplasma of ACLR in Xinjiang for the first time, it provides the base for early diagnosis and detection.

Key words apricot; apricot chlorotic leafroll; phytoplasma; 16S rDNA; sequence analysis

收稿日期: 2019-01-26

修订日期: 2019-05-27

基金项目: 国家自然科学基金(31600011); 新疆维吾尔自治区研究生教育创新计划科研创新项目(XJGRI2017-072)

* 通信作者 E-mail: luomingxjau@sina.com

为并列第一作者

杏 *Armeniaca vulgaris* 为蔷薇科杏属植物,是中国栽培历史最悠久的果树之一。新疆作为杏的原生起源中心,拥有丰富的杏种质资源,其栽培面积和产量均居中国各省(区)之首。杏褪绿卷叶病(apricot chlorotic leaf roll disease)是危害杏树的一种高致死性植原体病害。该病害于 1973 年首次在法国杏树上发现,之后陆续在欧洲其他核果类树种如扁桃、欧洲李、樱桃、桃和油桃等多种果树上发现,成为影响欧洲核果类果树商业化栽培的主要病害。中国,欧洲和北美均将其列入进境植物检疫危险性病害名录^[1-2]。1993 年,赵京民对北京、河北、山西等地出现严重早期落叶的杏树植株的组织切片进行了电镜观察,初步判断可能是由类菌原体所致^[3]。2007 年李文慧等^[4]首次在新疆轮台县的杏园中发现了杏褪绿卷叶病疑似病株,症状主要表现为叶片褪绿斑驳、变红,树冠中、下部甚至全株叶片沿主脉向上翻卷成筒状,早衰落果,果小味差,轻者产量降低,重者 4~5 a 内整株死亡,通过电镜观察确定引起新疆杏褪绿卷叶病的病原为植原体。

本研究于 2016—2018 年连续 3 年对新疆轮台县、托克逊县杏褪绿卷叶病发生情况进行调查。发现该病害从零星、局部发生到范围逐渐扩大、发病程度逐年加重,部分杏园的发病率已超过 30%,严重的超过 60%,患病果园减产可达 20%~50%,严重影响杏果品质。该病害对近年来蓬勃发展的新疆经济支柱林果产业带来巨大隐患。本研究对新疆杏生产区杏褪绿卷叶病疑似病株进行植原体 16S rDNA PCR 扩增、克隆和序列测定,获取病原菌的分子信息,确定其分类地位和系统发育关系。

1 材料与方法

1.1 供试材料

2016 年 8 月至 2018 年 8 月在新疆轮台县国家果树资源圃采集表现为叶片上卷、叶肉有不规则褪绿斑的疑似杏褪绿卷叶病样品。将采集的叶片、枝条、叶柄等组织,保存于保鲜袋内,带回实验室后保存于 4℃ 和 -40℃ 冰箱中。同时采集健康植株枝叶作为对照。

试剂及仪器:新型植物基因组 DNA 提取试剂盒、PCR 产物回收试剂盒、标准分子量 Marker 购自天根生化科技(北京)有限公司。克隆载体 pMD 19T 以及其他酶类等分子生物学试剂购自大连宝生物工程有限公司(TaKaRa)。

1.2 样品总 DNA 提取

采用新型植物基因组 DNA 提取试剂盒和改良 CTAB 法^[5]提取杏树叶中脉及韧皮部总 DNA。

1.3 植原体 16S rDNA 的巢式 PCR 扩增

1.3.1 引物

参照 Lee 等^[6]根据植原体 16S rDNA 序列设计的通用引物对。R16mF2/R16mR2 为外侧引物对, R16F2n/R16R2 为内侧引物对。R16mF2: 5'-CATG-CAAGTCGAACGGA-3', R16mR2: 5'-CTTAACCCCAATCATCGA-3'; R16F2n: 5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3'; R16R2: 5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3'。引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.3.2 巢氏 PCR 扩增

以提取的供试样品总 DNA 为模板,用外侧引物 R16mF2/R16mR2 进行扩增。反应体系(25 μ L): DNA 模板 2.0 μ L, 引物(10 μ mol/L)各 1.0 μ L, dNTPs(10 mmol/L) 1.0 μ L, 10 $\times$ PCR buffer (含 2.5 mmol/L $MgCl_2$) 2.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ μ L) 0.3 μ L, 灭菌超纯水 17.2 μ L。反应条件:94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 45 s, 50℃ 复性 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

如外侧引物扩增出目的条带,则将 1 μ L PCR 产物稀释 30 倍后取 1 μ L 作为模板;如未扩增出目的条带,则直接取 1 μ L PCR 产物作为模板,以内侧引物 R16F2n/R16R2 进行第二轮扩增。PCR 反应体系和条件与第一轮 PCR 相同。

1.3.3 PCR 产物电泳分析

取 PCR 产物在添加 Goldview 染料的琼脂糖(浓度为 10 g/L)中进行电泳(1 $\times$ TAE 缓冲系统),使用凝胶成像系统观察并拍摄图片。

1.4 PCR 产物的回收与克隆

将巢式 PCR 产物中的特异性条带切下,采用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收,纯化。回收的 PCR 产物与载体 pMD19T 在 16℃ 下连接 2 h。将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞中,在含有 X-gal (20 g/L)、IPTG (50 g/L)、Amp (100 mg/L)的 LB 琼脂平板上 37℃ 培养 14~16 h,形成单菌落。将筛选出的阳性单菌落接种于含 Amp (100 mg/L) LB 液体培养基中,在 37℃ 培养过夜,提取质粒,用 R16F2n/R16R2 进行 PCR 扩增、酶切鉴定。

1.5 序列测定与分析

将筛选获得的含有目的片段的重组质粒送上海生工生物工程股份有限公司进行序列测定。所得序列在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih>).

gov/)中进行 BLAST 检索,通过 DNAMAN 5. 2. 2 将测得序列与植原体 16Sr 各组中的代表性植原体的 16S rDNA 序列进行核酸同源性比较,利用 MEGA 5. 0软件^[7]的邻接法(neighbor-joining)构建系统发育树。并利用植原体分类鉴定在线工具 iPhyClassifier^[8]和 pDRAW 32 软件对杏褪绿卷叶植原体新疆分离物及植原体 16Sr V 组各亚组参考株系 16Sr V-A (AY197655)^[9]、16Sr V-B (AB052876)^[10]、16Sr V-C (AY197642)^[11]、16Sr V-D (AY197644)^[11]、16Sr V-E (AY197650)^[12]、16Sr V-F (AB689678)^[13]、16Sr V-G (AB052879)^[10]、16Sr V-H (KJ452547)^[14]、16Sr V-I (KR233473)^[15]的 16S rDNA 序列(R16F2n/R16R2

扩增片段)进行 *Alu* I等 17 种限制性内切酶的虚拟酶切分析,根据限制性片段长度多态性分析结果鉴定出褪绿卷叶植原体新疆分离物所在组为 16Sr 组/亚组。

2 结果与分析

2.1 新疆杏褪绿卷叶病症状表现

与健康植株相比,感病植株树冠中、下部甚至全株叶片从叶柄到叶尖边缘沿主脉向上翻卷成筒状,叶片表面呈不规则褪绿斑驳,感病株果实的生长发育受到抑制,果实成熟期推迟,品质变劣,产量严重下降,随着感病年数的增加,病情逐渐加深,直至整株干枯、死亡(图 1)。



a-c: 杏褪绿卷叶植株; d: 健康杏树
a-c: Plant of apricot chlorotic leaf roll; d: Healthy apricot

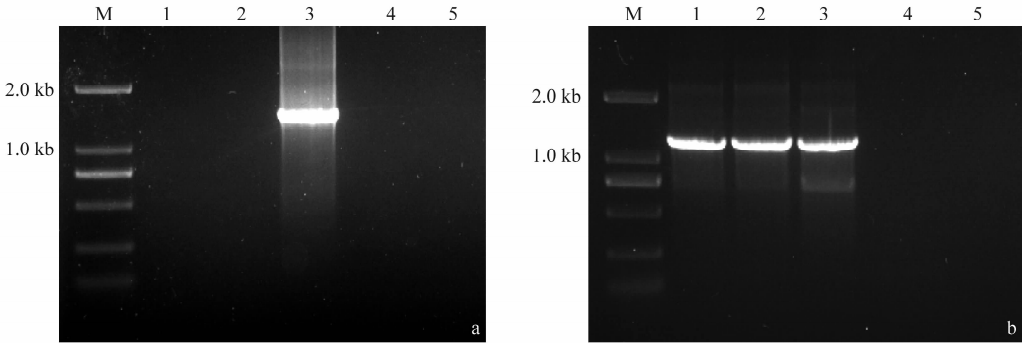
图 1 新疆杏褪绿卷叶病症状

Fig. 1 Symptom of apricot chlorotic leaf roll in Xinjiang

2.2 新疆杏褪绿卷叶植原体 16S rDNA 巢式 PCR 扩增结果

利用植原体通用引物对 R16mF2/R16mR2 对杏褪绿卷叶病、枣疯病病株和健康杏树植株总 DNA 进行 PCR 扩增,电泳结果显示,枣疯病病株总 DNA 可以扩增出 1 条约 1.5 kb 的特异性片段,而杏褪绿卷叶病病株、健康杏树植株和灭菌超纯水空白对照均未出现特异性条带(图 2a)。进一步以杏

褪绿卷叶病病株第一轮 PCR 产物为模板,利用内侧引物对 R16F2n/R16R2 进行第二轮 PCR 扩增,结果扩增出约 1.2 kb 的特异性片段,同时枣疯病植原体也扩增出相同的特异性条带,而健康植株和灭菌超纯水均未出现特异性条带(图 2b)。结果表明,所用引物对具有特异性,可从疑似病样中扩增到与目的基因片段大小相符的条带。疑似病样中存在植原体。



a: 第一轮PCR扩增; b: 第二轮PCR扩增; M: DL2000 Marker; 1~2: 疑似杏褪绿卷叶病样品; 3: 枣疯病样品; 4: 健康杏树; 5: 空白对照(灭菌超纯水)
a: First round PCR amplification; b: Second round PCR amplification; M: DL2000 Marker; 1~2: Samples of suspected ACLR; 3: Sample of jujube witches' broom; 4: Sample of healthy apricot; 5: Negative control (ddH₂O)

图 2 杏褪绿卷叶植原体 16S rDNA 巢式 PCR 扩增结果

Fig. 2 Nested PCR amplification of 16S rDNA from apricot chlorotic leaf roll phytoplasma

2.3 杏树褪绿卷叶植原体 16S rDNA 片段的序列分析

随机选取 6 个杏褪绿卷叶病病样的巢氏 PCR 扩增产物进行回收、纯化、克隆,提取质粒,经 PCR 和酶切鉴定后,选取阳性克隆进行测序。结果表明,从 6 个病样中获得的片段大小均为 1 248 bp,G+C 含量为 45.91%~45.99%,符合植原体 16S rDNA 基因 G+C 含量(45%~49%),命名为 ACLR-XJ01~ACLR-XJ06,登录号分别为(MH587702~MH587707)。

同源性比较结果表明,新疆杏褪绿卷叶植原体不同分离株 16S rDNA 基因片段核苷酸序列无明显

差异,相似性达到 99.8%~100%。与植原体 16Sr 各组代表性植原体比较结果表明,杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 ACLR-XJ01~ACLR-XJ06 与植原体 16Sr V 组成员的相似性达到 97.6%以上,与 16Sr V-B 亚组的枣疯病植原体山东宝山分离物 BS1 (EU999737),甜樱桃绿化植原体山东分离物 SCV-JN-2013(MF848965)相似性最高,均达到 99.4%~99.6%。其中 BS1 和 SCV-JN-2013 与 ACLR-XJ01~ACLR-XJ04 仅有 5 个碱基的差异,与 ACLR-XJ05 和 ACLR-XJ06 有 8 个碱基的差异。

表 1 与 16S r 各组代表性植原体 16S rDNA 基因片段的核苷酸同源性比较

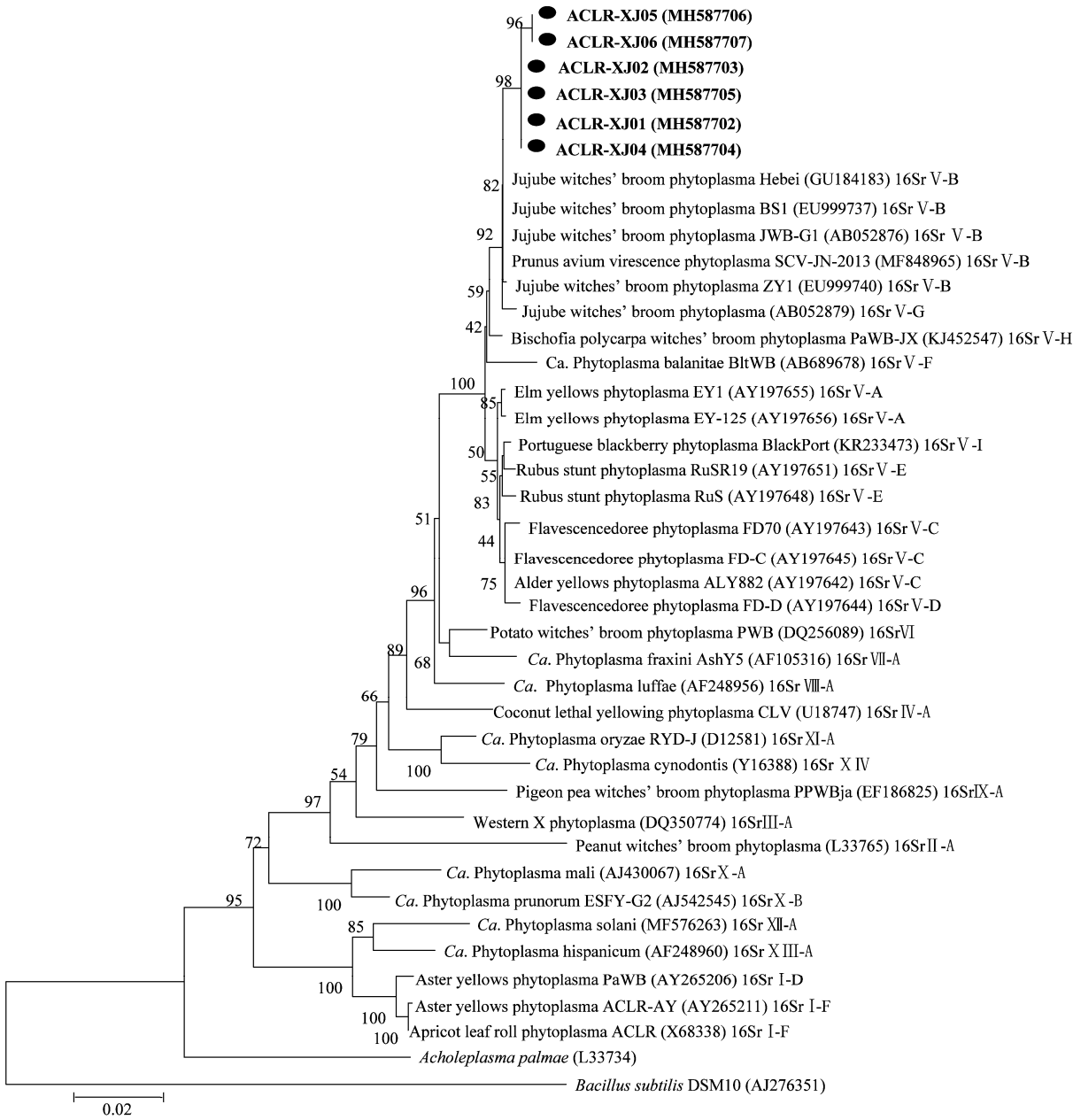
Table 1 Comparison of nucleotide of 16S rDNA fragment from typical phytoplasma of 16Sr groups

16Sr 组及亚组 16Sr group and subgroup	植原体病害及相关菌株 Phytoplasma disease and strain	登录号 GenBank accession no.	核苷酸相似性/% Nucleotide similarity
16Sr I-D	翠菊黄化 Aster yellows (PaWB)	AY265206	90.0~90.1
16Sr I-F	杏褪绿卷叶 Apricot chlorotic leaf roll (ACLR-AY)	AY265211	90.0~90.1
	杏褪绿卷叶 Apricot chlorotic leaf roll (ACLR)	X68338	90.2~90.4
16Sr II	花生丛枝 Peanut witches' broom (PnWB)	L33765	88.7~89.8
16Sr III	西方 X 病 Western X disease (WX)	DQ350774	93.3~94.4
16Sr IV	可可致死黄化 Coconut lethal yellowing (CLY)	U18747	94.8~95.0
16Sr V-A	榆树黄化 Elm yellows (EY1)	AY197655	98.5~98.7
	榆树黄化 Elm yellows (EY-125)	AY197656	98.5~98.7
16Sr V-B	枣疯病 Jujube witches' broom (JWB-G1)	AB052876	99.3~99.5
	枣疯病 Jujube witches' broom (BS1)	EU999737	99.4~99.6
	枣疯病 Jujube witches' broom (ZY1)	EU999740	99.3~99.5
	枣疯病 Jujube witches' broom (Hebei)	GU184183	99.2~99.4
	甜樱桃绿化 Prunus avium virescence (SCV-JN-2013)	MF848965	99.4~99.6
16Sr V-C	葡萄金黄化 Flavescence dorée (FD-C)	AY197645	98.5~98.7
	葡萄金黄化 Flavescence dorée (FD70)	AY197643	98.2~98.4
	桤木黄化 Alder yellows (ALY882)	AY197642	98.4~98.6
16Sr V-D	葡萄金黄化 Flavescence dorée (FD-D)	AY197644	98.2~98.4
16Sr V-E	悬钩子矮化 Rubus stunt (RuS)	AY197648	98.2~98.5
	悬钩子矮化 Rubus stunt (RuSR19)	AY197651	98.2~98.5
16Sr V-F	Balanites witches' broom (BltWB)	AB689678	97.8~98.1
16Sr V-G	枣疯病 Jujube witches' broom (JWB-Ko)	AB052879	97.6~97.8
16Sr V-H	重阳木丛枝 Bischofia polycarpa witches' broom (PaWB-JX)	KJ452547	98.8~99.0
16Sr V-I	黑莓丛枝 Blackberry witches' broom (BlackPort)	KR233473	98.3~98.6
16Sr VI-A	马铃薯丛枝病 Potato witches' broom (PWB)	DQ256089	96.6~96.7
16Sr VII-A	桉树黄化 Ash yellows (AshY)	L33759	96.2
16Sr VIII-A	丝瓜丛枝 Loofah witches' broom (LfWB)	L33764	95.6~95.8
16Sr IX-A	鸽子豆丛枝 Pigeon pea witches' broom (PPBW)	L33735	93.8~94.0
16Sr X-A	苹果丛枝 Apple proliferation (SPAR701)	AJ430067	89.1~89.3
16Sr X-A	欧洲核果类黄叶 European stone fruit yellows phytoplasma (ESFY-G2)	AJ542545	90.7~90.9
16Sr XI-A	水稻黄矮 Rice yellows dwarf (RYD-J)	D12581	94.5~94.7
16Sr XII-A	僵化植原体 Stolbur (Van D3)	MF576263	88.3~88.5
16Sr X III-A	墨西哥长春花绿变 Mexican periwinkle virescence (MPV)	AF248960	89.3~89.5
16Sr X IV-A	百慕大群岛草白叶 Berrnuda grass white leaf (BGWL)	Y16388	92.9~93.2

2.4 系统进化及虚拟 RFLP 分析

将本研究获得的 6 个杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 16S rDNA 序列与 GenBank 中已公布的部分 16Sr 组代表性植原体 16S rDNA 基因序列进行比较, 利用 MEGA 5.0 软件的邻接法 (neighbor-joining) 构建系统发育树。系统进化树显示 (图 3), 杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 ACLR-XJ01~ACLR-XJ06 与 16Sr V 组各亚组代表性植原体成员聚在同一进化分枝上, 属于 16Sr V 组成员。同时与 16Sr V-B 亚组各株系的亲缘关系最近, 聚在一个分枝上, 但又单独聚

为一簇。进一步利用植原体在线分类系统 iPhyClassifier 对 6 个杏褪绿卷叶植原体新疆分离物进行虚拟 RFLP 分析, 结果表明, 本研究获得的植原体 16S rDNA 基因片段的限制性片段长度多态性不同于已有的 16Sr 组/亚组。其中与 16Sr V-B 亚组分离物 (GenBank 登录号: AB052876) 的相似性最高, 相似系数为 0.94, 在限制性内切酶 *Bst*U I 和 *Rsa* I 的酶切位点上存在明显的差异, 因此系统推测本研究获得的杏褪绿卷叶植原体新疆分离物可能属于 16Sr V 组的一个新亚组。



括号内为GenBank登录号; 黑体为本研究检测的植原体株系; 标尺所示长度为2%核苷酸置换率
GenBank accession numbers are in the parentheses. The boldfaces are tested strains for 16S rDNA sequencing. Bar means 0.02 substitutions per nucleotide

图3 用邻接法构建的新疆杏褪绿卷叶植原体 16S rDNA 系统发育树

Fig. 3 Neighbor-joining dendrogram based on 16S rDNA sequences of the phytoplasma of apricot chlorotic leaf roll in Xinjiang

3 讨论

依托特殊生态地理环境所赋予的丰富光热资源,新疆杏有着优异的品质。近年来,新疆杏生产规模快速扩大和迅猛发展,形成了环塔克拉玛干沙漠独特的杏生态品种群和杏产业带,对于地处极端干旱荒漠区、生态环境极为脆弱的南疆地区防风固沙、环境保护和促进地区经济发展都有着重要的意义。杏褪绿卷叶病自 2007 年首次在新疆出现以来,已从零星发生转为成片发生,发生面积不断扩大,部分成年果园的发病率呈逐年升高的趋势,给新疆杏生产带来严重隐患。本研究利用巢式 PCR 扩增、序列分析、同源性比较等分子生物学方法对杏褪绿卷叶植原体新疆分离物进行分子检测鉴定,获得了其 16S rDNA 分子信息,从亚组水平上确定了其分类地位,为建立新疆杏褪绿卷叶植原体快速诊断和检测提供技术支持。

近年来国际上对 ACLR 的病原、流行病学、寄主范围、检验检疫等方面开展了不少研究,取得了一定进展^[16-17]。尽管不同国家所报道的杏褪绿卷叶病症状相似,但各国所报道的 ACLR 病原包括分类地位不同的多种植原体。如捷克、土耳其、比利时、白俄罗斯等国发生的 ACLR 病原被鉴定为 16Sr X-B 亚组^[18-21],黎巴嫩、德国发生的 ACLR 病原被鉴定为 16Sr I-F 亚组^[22-23],伊朗发生的 ACLR 病原被鉴定为 16Sr II-C 亚组^[24]。还有研究发现,ACLR 病原与苹果丛枝植原体(apple proliferation phytoplasma, 16Sr X-A)、梨衰退植原体(pear decline phytoplasma, 16Sr X-C)和翠菊黄化植原体(aster yellow phytoplasma, 16Sr I-A)具有相似的 DNA 序列,序列相似度为 98.6%~99.1%,差异部位在 16S rDNA 第 16~19 位点,但倾向于将杏褪绿卷叶植原体归于苹果丛枝植原体类群^[25]。而本研究发现,引起新疆杏褪绿卷叶病的植原体在系统分类上应归于 16Sr V 组。由此可见,杏树可被多种植原体侵染并引起相似的症状,而新疆杏褪绿卷叶病株中是否还有其他不同分类地位的植原体,是否存在混合侵染现象还有待进一步检测证实。

植原体分类鉴定在线工具 *iPhyClassifier* 在植原体亚组及株系的分类研究中已得到广泛应用。本研究利用该方法对患病杏树植株中植原体的 16S rDNA 序列进行 RFLP 分析,发现 16S rDNA 基因片段的限制性内切酶片段多态性不同于所有已建立的 16Sr 组/亚组的参考模型。其中与 16Sr V-B 亚

组分离物(GenBank 登录号:AB052876)的相似性最高,相似系数为 0.94(相似系数 ≤ 0.97 建议该植原体可代表新的植原体 16Sr 亚组^[8]),因此推测本研究获得的杏褪绿卷叶植原体新疆分离物属于 16Sr V 组的一个新亚组。通过对 16S rDNA 序列同源性及其系统发育分析,发现杏褪绿卷叶植原体新疆分离物与 16Sr V-B 亚组的枣疯病植原体山东分离株、甜樱桃绿化植原体山东分离株亲缘关系很近,序列相似性达到 99.4%~99.6%,最多有 8 个碱基存在差异,且在同一条进化小分支上,在分子水平上未体现出不同株系间的差异。随着植原体分类的深入研究,研究人员发现仅依靠 16S rDNA 序列对植原体进行分类鉴定存在严重的局限性,因此,有必要进一步测定核糖体蛋白基因(*rp*)、延伸因子基因(*tuf*)、运转蛋白基因(*SecY*)等较 16S rDNA 具有较大变异性的基因或区域以获取更加丰富的分子生物学信息,从而更加深入地了解杏褪绿卷叶植原体新疆分离物与其他植原体的系统进化关系和分子水平差异,为植原体致病机制研究与新疆杏褪绿卷叶病的防治奠定基础。

参考文献

- [1] BERTACCINI A, PALTRINIERI S, CAPARA L, et al. Improved molecular methods for detection of European stone yellows (ESFY) phytoplasmas from in vitro shoots of fruit trees [C]//Proceedings of the Xth International Symposium on Virus and Virus-like Diseases of Temperate Fruit Crops: Fruit Tree Disease, 2004, 657: 495–500.
- [2] NEČAS T, KRŠKA B. Detection of phytoplasma ESFY in apricot trees using phloem and petioles [J]. Plant Protection Science, 2005, 41(4): 132–140.
- [3] 赵京民. 杏树褪绿卷叶病病原研究[J]. 华北农学报, 1993, 8(2): 120.
- [4] 李文慧, 徐麟, 何天明, 等. 杏褪绿卷叶病研究初报[J]. 西北农业学报, 2007, 16(6): 207–209.
- [5] GREEN M J, THOMPSON D A, MACKENZIE D J. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction [J]. Plant Disease, 1999, 83(5): 482–485.
- [6] LEE I M, HAMMOND R W, DAVIS R E, et al. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms [J]. Phytopathology, 1993, 83(8): 834–842.
- [7] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA 5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. Molecular Biology & Evolution, 2011, 28(10): 2731–2739.

- [8] ZHAO Yan, WEI Wei, LEE I M, et al. Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifier, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII) [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2009, 59(Pt10): 2582–2593.
- [9] LEE I M, MARTINI M, MARCONE C, et al. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16Sr V) and proposal of ‘*Candidatus Phytoplasma ulmi*’ for the phytoplasma associated with elm yellows [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2004, 54: 337–347.
- [10] JUNG H Y, SAWAYANAGI T, KAKIZAWA S, et al. ‘*Candidatus Phytoplasma ziziphi*’, a novel phytoplasma taxon associated with jujube witches’-broom disease [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2003, 53(2): 1037–1041.
- [11] MARTINI M, MURAU E, MORI N, et al. Identification and epidemic distribution of two flavescence dorée-related phytoplasmas in Veneto (Italy) [J]. Plant Disease, 1999, 83(10): 925–930.
- [12] MALEMBIC-MAHER S, SALAR P, FILIPPIN L, et al. Genetic diversity of European phytoplasmas of the 16Sr V taxonomic group and proposal of ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’ [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2011, 61(9): 2129–2134.
- [13] WIN N K, LEE S Y, BERTACCINI A, et al. ‘*Candidatus Phytoplasma balanitae*’ associated with witches’ broom disease of *Balanites triflora* [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2013, 63(2): 636–640.
- [14] LAI Fan, SONG Chansheng, REN Zhengguang, et al. Molecular characterization of a new member of the 16Sr V group of phytoplasma associated with *Bischofia polycarpa* (Lavl.) Airy Shaw witches’ broom disease in China by a multiple gene-based analysis [J]. Australasian Plant Pathology, 2014, 43(5): 557–569.
- [15] FRANOVA J, DE SOUSA E, KOLONIUK I, et al. Multi-gene characterization of a new ‘*Candidatus Phytoplasma rubi*’-related strain associated with blackberry witches’ broom in Portugal [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2016, 66(3): 1438–1466.
- [16] JARAUSCH W, JARAUSCH B, FRITZ M, et al. Epidemiol-
- ogy of European stone fruit yellows in Germany: the role of wild *Prunus spinosa* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2019, 154(2): 463–476.
- [17] HODGETTS J. Rapid sample preparation and LAMP for phytoplasma detection [J]. Methods in Molecular Biology, 2019, 1875: 187–201.
- [18] NAVRÁTIL M, VÁLOVÁ P, FIALOVÁ R, et al. Survey for stone fruit phytoplasmas in the Czech Republic [J]. Acta Horticulturae, 2001, 550(2): 377–382.
- [19] SERTKAYA G, MARTINI M, ERMACORA P, et al. Detection and characterization of phytoplasmas in diseased stone fruits and pear by PCR-RFLP analysis in Turkey [J]. Phytoparasitica, 2005, 33(4): 380–390.
- [20] OLIVIER T, KUMMERT J, STEYER S, et al. First detection of European stone fruit yellows phytoplasma (ESFY) in Belgium [J]. Acta Horticulturae, 2004, 124(657): 519–521.
- [21] VALASEVICH N, SCHNEIDER B. Detection, identification and molecular diversity of ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’ in Belarus [J]. Journal of Plant Pathology, 2016, 98(3): 625–629.
- [22] ABOUJAWDAH Y, DAKHIL H, MOLINO LOVA M, et al. Preliminary survey of potential vectors of ‘*Candidatus Phytoplasma phoenicium*’ in Lebanon and probability of occurrence of apricot chlorotic leaf roll (ACLR) phytoplasma [J]. Bulletin of Insectology, 2011, 64(S): 123–124.
- [23] DICKINSON M B, BOONHAM N, HODGETTS J, et al. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of ‘*Candidatus Phytoplasma*’ [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2008, 58(8): 1826–1837.
- [24] RASOULPOUR R, SALEHI M, BERTACCINI A. Association of a ‘*Candidatus Phytoplasma aurantifolia*’-related strain with apricot showing European stone fruit yellows symptoms in Iran [J]. 3 Biotech, 2019, 9(3): 1–6.
- [25] SEEMÜLLER E, SCHNEIDER B. ‘*Candidatus phytoplasma mali*’, ‘*Candidatus Phytoplasma pyri*’ and ‘*Candidatus Phytoplasma prunorum*’, the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively [J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2004, 54(4): 1217–1226.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 185 页)

- [24] 陈艺欣, 田厚军, 魏辉, 等. 小菜蛾幼虫、蛹和成虫的雌雄形态识别 [J]. 福建农业学报, 2011, 26(4): 611–614.
- [25] 王丽平, 嵇保中, 刘曙雯, 等. 微红梢斑螟雌雄形态识别 [J]. 中国森林病虫, 2014, 33(5): 13–16.
- [26] 冯丽凯, 刘政, 李国富, 等. 苹果蠹蛾不同虫态体征及雌雄个体的快速鉴别方法 [J]. 应用昆虫学报, 2019, 56(2): 354–360.
- [27] 王政, 孟倩倩, 谭乐和, 等. 黄翅绢野螟蛹和成虫雌雄形态的快

速鉴定 [J]. 环境昆虫学报, 2017, 39(5): 1185–1190.

- [28] 张蒙, 马涛, 白雪姣, 等. 香梨优斑螟蛹和成虫的性别鉴定 [J]. 植物保护, 2014, 40(1): 119–121.
- [29] 田卉, 刘映红. 稻纵卷叶螟雌雄蛹的鉴别方法 [J]. 植物医生, 2012, 25(5): 10–11.
- [30] 张军, 杜茜, 王振营, 等. 一种快速鉴别亚洲玉米螟雌雄的方法 [J]. 应用昆虫学报, 2013, 50(5): 1484–1488.

(责任编辑: 杨明丽)