

广东花生丛枝病植原体的分子鉴定

汤亚飞^{1#}, 林祺^{1,2#}, 余小漫¹, 李正刚¹, 于琳¹, 蓝国兵¹, 何自福^{1*}

(1. 广东省农业科学院植物保护研究所, 广东省植物保护新技术重点实验室, 广州 510640;

2. 华南农业大学植物保护学院, 广州 510642)

摘要 2020年在广东省湛江市遂溪县田间发现表现明显丛枝、小叶, 类似植原体感染症状的花生病株。本研究利用分子生物学技术对其病原进行鉴定。以花生病叶的总DNA为模板, 利用植原体16S rRNA和SecY基因通用引物进行PCR扩增, 获得广东花生丛枝病植原体(PnWB-GDSX-2020)16S rRNA基因片段(1 430 bp, GenBank登录号为MZ427281)和SecY基因片段(1 709 bp, GenBank登录号为MZ437794)。序列一致性和系统进化分析显示, PnWB-GDSX-2020的16S rRNA序列与16Sr II -A、16Sr II -D和16Sr II -V亚组植原体一致性最高, 亲缘关系最近; 进一步利用*iPhyClassifier*对16S rRNA序列进行在线虚拟RFLP分析, 结果显示, PnWB-GDSX-2020的虚拟RFLP图谱与16Sr II -V亚组的参照株系‘*Praxelis clematidea*’ phyllody phytoplasma (GenBank登录号: KY568717) 酶切图谱一致, 相似系数为1.00。因此, PnWB-GDSX-2020属于16Sr II -V亚组成员。所获得的PnWB-GDSX-2020 SecY基因序列与花生丛枝病植原体的一致性最高, 亲缘关系最近。本文确定了广东花生丛枝病相关植原体的分类地位, 为当地病害诊断、检测以及防控提供科学依据。

关键词 花生丛枝病; 植原体; 分子鉴定; 16S rRNA; SecY基因; 序列分析

中图分类号: S432.41 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2021409

Molecular identification of peanut witches'-broom phytoplasma in Guangdong province

TANG Yafei^{1#}, LIN Qi^{1,2#}, SHE Xiaoman¹, LI Zhenggang¹, YU Lin¹, LAN Guobing¹, HE Zifu^{1*}

(1. Plant Protection Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangdong Provincial Key Laboratory of High Technology for Plant Protection, Guangzhou 510640, China;

2. College of Plant Protection, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract In 2020, peanut plants exhibiting symptoms of witches'-broom and fewer leaves like phytoplasma infection were found in fields in Suixi county, Zhanjiang city, Guangdong province. In this study, the pathogen was identified using molecular detection technology. The 16S rRNA fragment (1 430 bp, GenBank acc. no. MZ427281) and SecY gene fragment (1 709 bp, GenBank acc. no. MZ437794) of phytoplasma associated with peanut witches'-broom in Guangdong province (PnWB-GDSX-2020) were amplified from total DNA of diseased peanut leaves using phytoplasma universal primers of 16S rRNA and SecY gene. Sequence similarity and phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequence showed that PnWB-GDSX-2020 shared the highest similarity and closest relationship with phytoplasmas from 16Sr II -A, 16Sr II -D and 16Sr II -V subgroup. The *iPhyClassifier* online virtual RFLP analysis on the 16S rRNA sequence showed that the virtual RFLP map of PnWB-GDSX-2020 was consistent with that of ‘*Praxelis clematidea*’ phyllody phytoplasma (GenBank acc. no. KY568717), the reference strain from 16Sr II -V subgroup, with a similarity coefficient of 1.00. Based on the 16S rRNA sequence analysis results, PnWB-GDSX-2020 belonged to 16Sr II -V subgroup of phytoplasma. The SecY gene sequence of PnWB-GDSX-2020 also had the highest similarity and the closest relationship with peanut witches'-broom phytoplasma. This is the first study for determining the classification status of phytoplasma associated with peanut

收稿日期: 2021-07-26 修订日期: 2021-10-26

基金项目: 广东省重点研发计划(2019B020217003-05); 广东省现代农业产业共性关键技术研发创新团队建设项目(2020KJ134); 广东省农业科学院科技创新战略专项资金(高水平农科院建设)(R2019PY-JX005); 广东省农业科学院“十四五”学科团队建设项目(202105TD)

* 通信作者 E-mail: hezf@gdppri.com

为并列第一作者

witches'-broom disease in Guangdong province. The results provide the scientific basis for diagnosis, detection, prevention and control of this disease.

Key words peanut witches'-broom disease; phytoplasma; molecular identification; 16S rRNA; *SecY* gene; sequence analysis

植原体 phytoplasma 是一类专性寄生、不能人工培养的植物病原体,隶属于细菌界 Bacteria 软壁菌门 Tenericutes 柔膜菌纲 Mollicutes 无胆甾原体目 Acholeplasmatales 无胆甾原体科 Acholeplasmataceae 植原体暂定属 *Ca.* genus Phytoplasma^[1-2]。植原体主要通过具有刺吸式口器的昆虫传播,也可通过嫁接或菟丝子传播,寄主范围广泛,可侵染 1 000 多种植物,常引起丛枝、花变叶、黄化、小叶、衰退、矮化等典型症状,给农林业生产造成较大的损失^[3]。中国已报道了 100 多种植原体相关病害^[4],如枣疯病(jujube witches'-broom disease)^[5-6]、小麦蓝矮病(wheat blue dwarf disease)^[7-8]、马铃薯僵顶病(potato stolbur disease)^[9]、樱桃丛枝或花变叶病(cherry witches'-broom or phyllody disease)^[10-11]等。国际上,依据 16S rRNA 基因核苷酸序列一致性、限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)结果对植原体进行分类,目前植原体包括 52 个暂定种('Candidatus Phytoplasma'), 34 个组(group)和 100 多个亚组(subgroup)^[3]。

花生是我国重要的油料和经济作物之一,是广东省第二大农作物,全省种植面积常年保持在 30 万~35 万 hm^2 ,仅次于水稻^[12]。花生丛枝植原体(peanut witches'-broom phytoplasma, PnWB)引起花生丛枝病^[13],在我国南方花生产区发生较为普遍。花生丛枝病田间主要表现为植株节间缩短,产生大量腋芽,丛生枝条上叶片变小,大多数植株不接荚果,民间俗称“花生公”,严重影响花生的产量。

我国花生丛枝病于 1952 年首次在广州发现^[14]。该病害被发现以来,我国不少学者对其开展了相关研究,20 世纪 80 年代初,通过昆虫介体传病试验证明华南花生丛枝病是由小绿叶蝉 *Empoasca flavescens* Fab. 传播的类菌原体(现称植原体)病^[15];同年,通过电子显微镜从海南花生丛枝病病样中观察到类菌原体^[16]。1994 年,对华南花生丛枝病的发病规律及防治方法开展了相关研究^[14]。2000 年,开展了花生丛枝病病原的血清学研究^[17]。随着分子生物学技术的发展,不少学者已对引起海

南、云南、台湾等省花生丛枝病的相关植原体的 16S rRNA、*SecY*、*rp* 等多个基因进行克隆和序列分析^[13,18-21]。尚未见广东花生丛枝病的植原体分子特征及相关基因序列分析的报道。本研究采用分子生物学方法对广东采集的花生丛枝病进行了病原鉴定,明确了植原体株系分类地位,为进一步开展花生植原体病害防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品采集

2020 年 10 月,在广东省湛江市遂溪县花生种植地随机采集了 7 份花生丛枝病样,病株田间症状表现典型丛枝、小叶(图 1)。



图 1 广东省花生丛枝病田间症状

Fig. 1 Symptoms of peanut witches'-broom disease in fields in Guangdong province

1.1.2 主要试剂和仪器设备

植物基因组 DNA 抽提试剂盒(EasyPure Plant Genomic DNA Kit)和大肠杆菌 *Escherichia coli* T1 感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司; Premix TaqTM (Ex TaqTM Version 2.0 plus dye) 和载体 pMD 19-T 购自宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒(GeneJET Gel Extraction Kit)购自美国 Thermo(赛默飞)公司;氨苄青霉素、X-Gal、蔗糖、琼脂糖和胰蛋白胨购自生工生物工程(上海)股份有限公司;GoldView 核酸染料购自湖南艾科瑞生物工程有限公司;其他常规分析纯试剂购自广州市芊荃化玻仪器有限公司。T100TM Thermal cycler PCR 仪、Universal Hood II 凝胶成像

系统以及电泳仪均购自美国 BIO-RAD 公司;植物组织自动研磨仪 MM400 购自德国 Retsch(莱驰)公司。

1.2 试验方法

1.2.1 病样总 DNA 提取

取待测花生病株叶片 100 mg 置于装有钢珠的 2 mL 圆底离心管,将其装入植物组织自动研磨仪的适配器,然后浸入液氮中冷却 2 min 左右,取出后移至主机快速固定即可开始研磨,以频率 1 200 次/min,时间为 90 s,进行振荡破碎,结束后迅速取出粉末,按照植物 DNA 提取试剂盒(EasyPure Plant Genomic DNA Kit)说明书上的步骤进行总 DNA 提取,DNA 沉淀溶解于 50 μ L ddH₂O 中,于-20℃冰箱保存备用。

1.2.2 16S rRNA 基因的扩增

利用扩增植原体 16S rRNA 基因的通用引物 P1/P7^[22-23]、R16mF2/R16mR1^[24],对待测病样总 DNA 进行 PCR 检测,预期扩增目的片段大小分别为 1.8 kb 和 1.4 kb。反应体系 25 μ L:待测样品总 DNA 1 μ L(约 20 ng),*Ex Taq*TM Premix 12.5 μ L,上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,灭菌水 9.5 μ L。反应程序:95℃ 预变性 4 min;95℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 2 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.3 *SecY* 基因的扩增

利用扩增植原体 *SecY* 基因的通用引物 L15F1/MapR1 和 *SecYF2*(II)/*SecYR1*(II)^[19],对待测病样总 DNA 进行巢式 PCR 扩增,目的片段大小为 1.7 kb。PCR 反应体系 25 μ L:待测样品总 DNA 1 μ L(约 20 ng),*Ex Taq*TM Premix 12.5 μ L,引物 L15F1/MapR1 (10 μ mol/L) 各 1 μ L,灭菌水 9.5 μ L。反应程序:95℃ 预变性 4 min;95℃ 1 min,48℃ 1 min,72℃ 2 min,30 个循环;72℃ 延伸 10 min。巢式 PCR 反应体系 25 μ L:第一轮 PCR 产物 1 μ L,*Ex Taq*TM Premix 12.5 μ L,引物 *SecYF2*(II)/*SecYR1*(II) (10 μ mol/L) 各 1 μ L,灭菌水 9.5 μ L。反应程序:95℃ 预变性 4 min;95℃ 30 s,55℃ 1 min,72℃ 90 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.4 基因克隆与测序

采用琼脂糖凝胶回收试剂盒(Gene JET Gel

Extraction Kit)回收目的条带,将回收的 PCR 产物连接到 pMD-19T 载体上。具体操作:pMD-19T 1 μ L、2 \times solution I 连接反应缓冲液 5 μ L、回收 DNA 目的片段 4 μ L 混匀,在 16℃ 条件下反应过夜。采用热激法将连接产物转化到大肠杆菌 T1 感受态细胞,在含 100 μ g/mL Amp、40 μ L/mL X-Gal 的 LB 固体培养基上,37℃ 倒置培养过夜;从每个平板随机挑取 3 个阳性白色单菌落送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

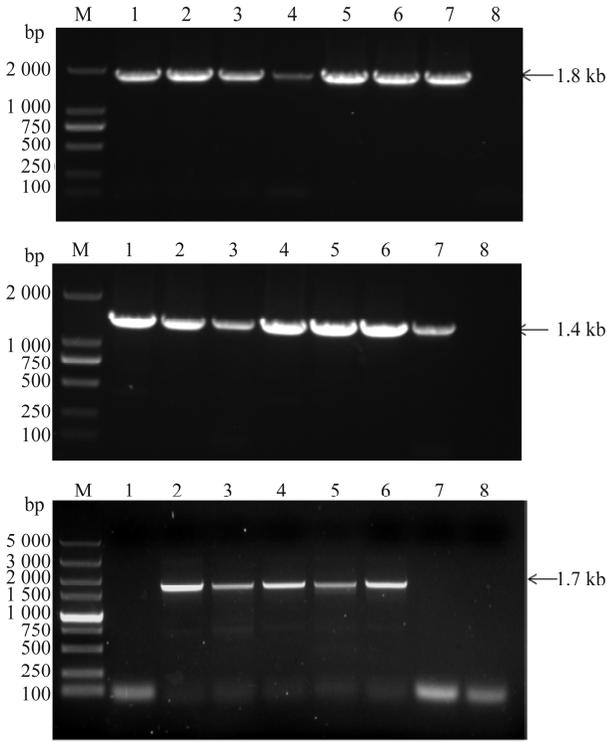
1.2.5 序列分析

利用 DNASTar 的 SeqMan 对测序获得的基因序列进行拼接,去掉载体序列,将所得 DNA 序列在 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中进行 BLASTn 搜索,确定是否为植原体基因序列;进一步将 16S rRNA 基因片段序列通过植原体在线分类软件 *iPhyClassifier* (<https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) 计算相似系数和虚拟 RFLP (Virtual RFLP) 分析,确定其植原体组和亚组^[25]。利用在线分析工具 MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>),将所获得的 16S rRNA 和 *SecY* 基因序列与已登录 GenBank 的相关序列进行一致性分析。采用 MEGA 6.06 的邻接法(neighbor joining,NJ)^[26]构建基于 16S rRNA 和 *SecY* 基因的系统进化树,bootstrap 值设置为 1 000。

2 结果与分析

2.1 植原体 PCR 检测结果

利用扩增植原体 16S rRNA 的通用引物 P1/P7、R16mF2/R16mR1 对采集的 7 份花生丛枝病样进行 PCR 检测,结果两对引物均能从 7 份病样的总 DNA 中扩增出与预期目的片段大小一致的条带,阴性对照中未扩增出任何片段(图 2a、b)。进一步利用扩增 *SecY* 基因的通用引物 L15F1/MapR1 和 *SecYF2*(II)/*SecYR1*(II) 对 7 份花生丛枝病样进行巢式 PCR 扩增,5 份病样总 DNA 中扩增出与预期目的片段大小一致的特异性条带,阴性对照中未扩增出任何片段(图 2c)。这些结果表明,采集于广东省湛江市遂溪县的花生丛枝病样中存在植原体。将该株系命名为广东花生丛枝植原体(PnWB-GDSX-2020)。



a: 引物P1/P7扩增16S rRNA; b: 引物R16mF2/R16mR1扩增16S rRNA; c: 巢式PCR扩增SecY基因。M: 2000/5000 bp DNA Marker (TaKaRa); 1~7: 花生植原体病样; 8: 健康样品(CK)
a: PCR products of 16S rRNA by P1/P7; b: PCR products of 16S rRNA by R16mF2/R16mR1; c: Nested PCR products of SecY. M: 2000/5000 bp DNA Marker (TaKaRa); 1-7: Peanut witches'-broom samples; 8: Healthy sample (CK)

图2 花生丛枝病样中植原体16S rRNA、SecY 基因PCR检测结果

Fig. 2 PCR detection result of 16S rRNA and SecY genes of phytoplasma in peanut witches'-broom samples

2.2 16S rRNA 基因序列分析

随机挑取1个病样的PCR产物进行克隆、测序、分析,结果表明,从广东遂溪花生病样中获得的

16S rRNA 片段大小为1 430 bp (GenBank 登录号为MZ427281),BLASTn 结果显示,与该片段有较高一致性的序列均为16Sr II组(Peanut WB group)成员的16S rRNA 序列。进一步利用在线分析工具MUSCLE(https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/)对广东花生丛枝植原体(PnWB-GDSX-2020)的16S rRNA 与GenBank 数据库(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)相关序列进行了核苷酸一致性分析(表1),结果显示,PnWB-GDSX-2020 与已报道的花生丛枝植原体组(16Sr II组)的16S rRNA 核苷酸序列一致性在97%以上,与来自中国广东、海南、台湾的16Sr II-A、16Sr II-D 和16Sr II-V 亚组的11个植原体的一致性为100%,与来自中国海南和云南花生丛枝植原体的一致性为99.93%;而与其他亚组植原体的一致性较低,其中与16Sr I 和16Sr IV 组植原体的一致性分别为89.47%和90.81%。

2.3 16S rRNA 基因序列的系统进化分析

采用MEGA 6.06 的邻接法构建了PnWB-GDSX-2020 16S rRNA 与GenBank 数据库中36个植原体的系统发育树,以柑橘黄龙病菌亚洲种广东株系(*Candidatus Liberibacter asiaticus* isolate Guangdong-HP)(GenBank 登录号: DQ432005)的16S rRNA 序列为外组。结果(图3)显示,PnWB-GDSX-2020 与16Sr II组的植原体株系聚集在一个大分支,与16Sr II-A、16Sr II-D、16Sr II-V 和16Sr II-X 亚组植原体株系形成一个小的分支,亲缘关系最近;而与16Sr I 和16Sr IV 组的植原体亲缘关系远。

表1 PnWB-GDSX-2020 与其他植原体的16S rRNA 基因序列一致性¹⁾

Table 1 Identities of 16S rRNA gene sequence between PnWB-GDSX-2020 and other phytoplasmas

植原体病害 Phytoplasma disease	株系 Strain	组/亚组 Group/ subgroup	地理来源 Geographical origin	登录号 GenBank accession no.	一致性/% Identity
假臭草花变叶 <i>Praxelis clematidea</i> phyllody	Chengmai1	16Sr II -V	中国海南	KY568717	100.00
豆角花变叶 Cowpea phyllody	GDHY	16Sr II -V	中国广东	MW426146	100.00
大豆丛枝 Soybean witches'-broom	s3	16Sr II -V	中国台湾	MW393690	100.00
马松子丛枝 <i>Melochia corchoriifolia</i> witches'-broom	McWB-hnda	16Sr II -V	中国海南	MZ353520	100.00
大豆丛枝 Soybean witches'-broom	CH20SL01-1	16Sr II -V	中国台湾	MW680828	100.00
猪屎豆丛枝 <i>Crotalaria</i> witches'-broom	—	16Sr II -A	中国海南	EF656454	100.00
青稍变叶丛枝 <i>Celosia argentea</i> phyllody and witches'-broom	Ca1	16Sr II -A	中国海南	KX426374	100.00
一点红丛枝 <i>Emilia sonchifolia</i> witches'-broom	T1	16Sr II -A	中国台湾	MT420682	100.00
茄子花变叶 Eggplant phyllody	HZQZ1	16Sr II -D	中国广东	MH667642	100.00
卵叶山蚂蝗丛枝 <i>Desmodium ovalifolium</i> witches'-broom	Hainan-Chengmai01	16Sr II -A	中国海南	MK956144	100.00
甘薯丛枝 Sweet potato witches'-broom	WPWB	16Sr II -A	中国台湾	DQ452417	100.00
蔓草虫豆丛枝 <i>Cajanus scarabaeoides</i> witches'-broom	CaSWB-YNym3	16Sr II -A	中国云南	MF193350	99.93
花生丛枝 Peanut witches'-broom	PnWB-YNym	16Sr II -A	中国云南	JX871467	99.93
花生丛枝 Peanut witches'-broom	PnWB-Hnsy2005	16Sr II -A	中国海南	JN681274	99.93

续表 1 Table 1(Continued)

植原体病害 Phytoplasma disease	株系 Strain	组/亚组 Group/ subgroup	地理来源 Geographical origin	登录号 GenBank accession no.	一致性/% Identity
花生丛枝 Peanut witches'-broom	PnWB-Hn1	16Sr II -A	中国海南	GU113148	99.93
花生丛枝 Peanut witches'-broom	—	16Sr II -A	中国台湾	L33765	99.86
鸟尾花植原体 <i>Crossandra infundibuliformis</i> phytoplasma	KL1	16Sr II -D	印度	MT707242	99.84
天竺葵小叶 <i>Geranium</i> little leaf	Ir-GrLL3	16Sr II -D	伊朗	MT187639	99.84
马铃薯紫顶 Potato purple top	PTT-SA	16Sr II -X	沙特阿拉伯	MH423498	99.77
番茄黄化 Tomato yellows	TP1-2	16Sr II -A	中国云南	JX162603	99.72
青柠丛枝 Acid lime witch'-s-broom	Oman-LW23	16Sr II -B	阿曼	KX602312	98.89
棉花花变叶 Cotton phyllody	CoP	16Sr II -F	布基纳法索	JQ868439	98.67
猪屎豆丛枝 <i>Crotalaria</i> witches'-broom	SQU-Se2	16Sr II -W	阿曼	KY872740	98.61
柑橘衰退 Citrus decline	CaPaur_MR6	16Sr II -B	伊朗	KY990817	98.56
柑橘衰退 Citrus decline	CaPaur_ML8	16Sr II -C	伊朗	KY990820	98.56
仙人掌丛枝 Cactus witches'-broom	YN23	16Sr II -G	中国云南	EU099568	98.39
毛连菜植原体 <i>Picris hieracioides</i> phytoplasma	56Avg-07	16Sr II -E	塞尔维亚	JF799094	98.35
仙人掌丛枝 Cactus witches'-broom	YN24	16Sr II -H	中国云南	EU099569	98.25
仙人掌丛枝 Cactus witches'-broom	YN07	16Sr II -J	中国云南	EU099552	98.11
仙人掌丛枝 Cactus witches'-broom	YN28	16Sr II -K	中国云南	EU099572	98.11
仙人掌丛枝 Cactus witches'-broom	YN01	16Sr II -L	中国云南	EU099546	97.97
梨果仙人掌植原体 <i>Opuntia ficus-indica</i> phytoplasma	CT3	16Sr II -I	意大利	JQ181545	97.91
致死黄化植原体 Lethal yellowing phytoplasma	Lyja	16Sr IV	牙买加	EF186822	90.81
翠菊黄化 Aster yellows	AY-WB	16Sr I	美国	AY389828	89.47

1) “—”表示没有具体株系名称。

“—” indicates no specific strain name.

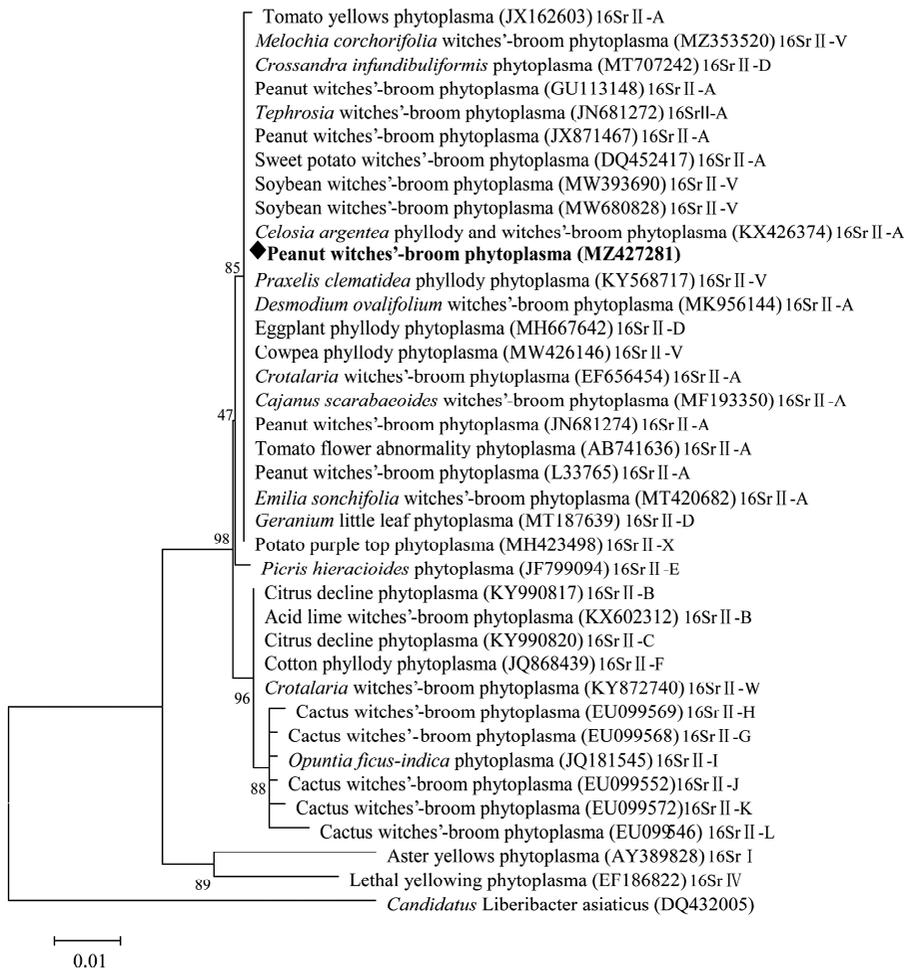


图 3 PnWB-GDSX-2020 与其他 36 个植原体代表株系基于 16S rRNA 基因序列的系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed based on 16S rRNA gene sequences of PnWB-GDSX-2020 and 36 other phytoplasmas

2.4 16S rRNA 基因序列的 *iPhyClassifier* 在线分析

将获得的 PnWB-GDSX-2020 16S rRNA 基因序列利用植原体在线分类软件 *iPhyClassifier* 进行分析。结果显示 PnWB-GDSX-2020 16S rRNA 序列与 ‘*Candidatus Phytoplasma australasiae*’ 菌株 (GenBank 登录号: U15442) 的一致性最高, 为 98.5%, 这说明 PnWB-GDSX-2020 是 ‘*Candidatus Phytoplasma australasiae*’ 的相关菌株; PnWB-GDSX-2020 16S rRNA 序列片段的 17 种限制性内切酶虚拟 RFLP 图谱与 16Sr II-V 亚组的参照株系 ‘*Praxelis clematidea*’ phyllody phytoplasma (GenBank 登录号: KY568717) 酶切图谱一致 (相似系数 1.00), 表明 PnWB-GDSX-2020 属于 16Sr II-V 亚组成员。

2.5 *SecY* 基因序列分析

利用扩增 *SecY* 基因的通用引物, 从广东遂溪花生病样总 DNA 中 PCR 扩增获得该基因片段, 其大小为 1 709 bp (GenBank 登录号为 MZ437794), 其中该片段序列 318—1580 nt 为完整 *SecY* 基因

序列, 编码 420 个氨基酸。BLASTn 结果显示, 与该片段有较高一致性的序列均为 16Sr II 组成员的 *Sec Y* 基因序列。进一步利用在线分析工具 MUSCLE 对 PnWB-GDSX-2020 的 *Sec Y* 基因与 GenBank 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 相关序列进行核苷酸一致性分析, 结果 (表 2) 表明, PnWB-GDSX-2020 与已报道的 16Sr II 组的 *Sec Y* 基因核苷酸序列一致性在 98% 以上, 其中与来自中国云南、中国台湾、印度的 15 个植原体的 *Sec Y* 基因核苷酸一致性为 98.83%~99.82%; 而与其他亚组植原体的 *Sec Y* 基因核苷酸序列一致性较低, 其中与 16Sr I 和 16Sr V 组植原体的一致性分别为 64.05% 和 69.74%。进一步采用 MEGA 6.06 的邻接法, 构建了 PnWB-GDSX-2020 *Sec Y* 与 GenBank 数据库中 17 个植原体的系统发育树, 结果 (图 4) 显示, PnWB-GDSX-2020 与 16Sr II 组的植原体株系聚集在一个大分支, 亲缘关系最近; 与 16Sr I 和 16Sr V 组的植原体亲缘关系远。

表 2 PnWB-GDSX-2020 与其他植原体的 *Sec Y* 基因序列一致性¹⁾

Table 2 Identities of *Sec Y* gene sequences between PnWB-GDSX-2020 and other phytoplasmas

植原体病害 Phytoplasma disease	株系 Strain	组 Group	地理来源 Geographical origin	登录号 GenBank accession no.	一致性/% Identity
花椰菜花变叶 Cauliflower phyllody	CauPh-YNym1	16Sr II	中国云南	KC953012	99.82
番茄巨芽 Tomato big bud	TBBP-YNym	16Sr II	中国云南	KC953016	99.77
豆角花变叶 Cowpea phyllody	CoVP-YNym	16Sr II	中国云南	KC953013	99.77
蔓草虫豆丛枝 <i>Cajanus scarabaeoides</i> witches'-broom	CaSWB-YNym2	16Sr II	中国云南	MF314449	99.71
银胶菊丛枝 <i>Parthenium weed</i> witches'-broom	ParWWB-YNym2	16Sr II	中国云南	KU958720	99.71
番茄巨芽 Tomato big bud	TBB-Mal	16Sr II	印度	KT970080	99.71
空心菜丛枝 <i>Ipomoea aquatica</i> witches'-broom	WSWB-YNym	16Sr II	中国云南	KJ735783	99.71
菊苣丛枝 <i>Cichorium intybus</i> witches'-broom	ChWB-YNym	16Sr II	中国云南	KJ735775	99.71
长春花植原体 <i>Catharanthus roseus</i> phytoplasma	CR-ND	16Sr II	印度	MT423388	99.65
芝麻花变叶 <i>Sesamum</i> phyllody	SP-AP	16Sr II	印度	MT423386	99.65
鹰嘴豆花变叶 Chickpea phyllody	CPP-M3	16Sr II	印度	MT423385	99.65
花生丛枝 Peanut witches'-broom	PnWB-YNym	16Sr II	中国云南	JX871468	99.65
金鸡菊植原体 <i>Coreopsis grandiflora</i> phytoplasma	PHP2	16Sr II	印度	MW071220	99.65
花生丛枝 Peanut witches'-broom	—	16Sr II	中国台湾	GU004331	99.65
番茄巨芽 Tomato big bud	TBB-PUN2	16Sr II	印度	KT970079	98.83
致死黄化植原体 Lethal yellowing phytoplasma	EY1	16Sr V	美国	GU004330	69.74
翠菊黄化 Aster yellows	BB	16Sr I	美国	AY803178	64.05

1) — 表示没有具体株系名称。

— indicates no specific strain name.

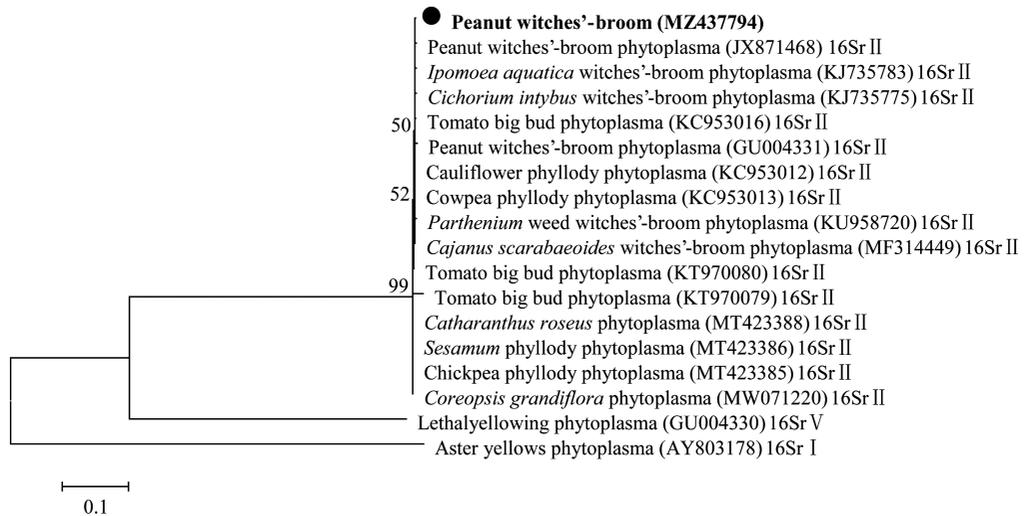


图 4 PnWB-GDSX-2020 与其他 17 个植原体代表株系基于 *SecY* 基因序列的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree constructed based on *SecY* gene sequences of PnWB-GDSX-2020 and 17 other phytoplasmas

3 结论与讨论

本研究通过 PCR 扩增、克隆、测序获得广东花生丛枝病相关植原体 (PnWB-GDSX-2020) 的 16S rRNA 和 *Sec Y* 基因序列,进一步通过对 16S rRNA 基因序列的 *iPhyClassifier* 在线分析、序列一致性和系统进化分析,明确广东花生丛枝病相关植原体为 16Sr II-V 亚组植原体。同时,*Sec Y* 基因序列分析结果也显示,PnWB-GDSX-2020 与花生丛枝植原体组的一致性最高,亲缘关系最近。广东花生丛枝病于 20 世纪 50 年代就有发生,至今仅见通过电子显微镜观察、介体和嫁接传病来鉴定其病原的报道,本文从分子水平明确了广东花生丛枝病相关植原体,并确定了其分类地位,这些结果为开展植原体 16S rRNA 和 *Sec Y* 基因序列变异与进化等研究提供了基础数据。

植原体是一类不能人工培养的植物病原细菌,分类鉴定主要依据 16S rRNA、*rp*、*SecY* 等保守基因序列分析。本文利用扩增 16S rRNA 基因的两对通用引物从 7 份花生病样中均扩增出条带,而经过多次试验通过 *SecY* 基因的通用引物进行巢式 PCR 仅能从 5 份病样中扩增出目的条带,其他 2 份病样未能扩增出条带。16S rRNA 基因是植原体高度保守基因,也是目前植原体分类的主要分子依据,而 *rp*、*SecY* 等其他基因遗传变异较大。本文扩增 *SecY* 基因序列采用的引物位于 *rpl15* 和 *map* 基因之间,扩增的目的片段包含部分 *rpl15* 基因、完整 *SecY* 基因

以及部分 *map* 基因,推测 2 份样品未能扩增出目的条带是由于引物结合位点的植原体基因序列发生变异导致。

植原体病害种类多,寄主范围广,已在农林领域造成严重危害。病原种类鉴定是指导相关病害防控的前提。而用于植原体检测与鉴定的技术主要有组织学观察、生物学方法、血清学检测、分子检测技术。广东省常年高温高湿,植物和介体昆虫都可以周年生长与繁殖,植原体等各类植物病害发生严重。不少学者采用不同鉴定技术对广东相关植原体病害进行鉴定。如 20 世纪 80 年代通过组织学观察和生物学方法明确广东地区的花生丛枝病、芝麻花变叶病是由植原体引起的^[14,27];1994 年,同样采用组织学观察和生物学方法明确水稻橙叶病是一种植原体引致的新病害^[28]。随着分子生物学技术的发展,2019 年通过分子检测技术明确广东枣疯病植原体属于 16Sr V-B 亚组^[29],广东茄子花变叶病植原体属于 16Sr II-D 亚组^[30]。本文通过分子生物学技术确定了广东花生丛枝病植原体属于 16Sr II-V 亚组,且与先前报道的茄子花变叶、豆角花变叶相关植原体 16S rRNA 基因序列 (GenBank 登录号:MH667642、MW426146) 一致性 100%,但茄子花变叶植原体病害发生在粤东惠州、豆角花变叶植原体病害发生在粤西湛江,由此初步推测,该植原体病害极有可能通过介体昆虫的传播在全省蔓延,这一研究结果为广东省植原体病害的防控提供了科学依据。

参考文献

- [1] FIRRAO G, ANDERSEN M, BERTACCINI A, et al. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(Pt 4): 1243 - 1255.
- [2] RAZIN S, YOGEV D, NAOT Y. Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 1998, 62(4): 1094 - 1156.
- [3] 杨毅, 姜蕾, 李世访. 植原体分类鉴定研究进展[J]. 植物检疫, 2020, 34(5): 13 - 20.
- [4] 李继东, 陈鹏, 倪静, 等. 植原体致病分子机理研究进展[J]. 园艺学报, 2019, 46(9): 1691 - 1700.
- [5] YE Xia, WANG Huiyu, CHEN Peng, et al. Combination of iTRAQ proteomics and RNA-seq transcriptomics reveals multiple levels of regulation in phytoplasma-infected *Ziziphus jujuba* Mill [J/OL]. Horticulture Research, 2017, 4: 17080. DOI: 10.1038/hortres.2017.80.
- [6] 陈妮, 刘永光, 仇平平, 等. 山东省枣疯病植原体的鉴定及分子变异分析[J]. 植物病理学报, 2015, 45(2): 113 - 120.
- [7] WANG Nan, LI Yan, CHEN Wang, et al. Identification of wheat blue dwarf phytoplasma effectors targeting plant proliferation and defence responses [J]. Plant Pathology, 2018, 67(3): 603 - 609.
- [8] 张荣, 孙广宇, 张雅梅, 等. 小麦蓝矮病植原体 16S rDNA 序列分析研究[J]. 植物病理学报, 2005, 35(5): 397 - 402.
- [9] 李正男, 马强, 张磊, 等. 宁夏马铃薯僵顶植原体的分子鉴定[J]. 植物保护, 2021, 47(2): 56 - 61.
- [10] 王甲威, 朱东姿, 魏海蓉, 等. 甜樱桃丛枝病的形态及分子鉴定[J]. 果树学报, 2014, 31(S1): 153 - 158.
- [11] 高瑞, 杨淑珂, 王洁, 等. 中国樱花花变叶病相关植原体的分子检测及鉴定[J]. 园艺学报, 2019, 46(7): 1249 - 1256.
- [12] 李少雄, 洪彦彬, 陈小平, 等. 广东花生生产、育种和种业现状与发展对策[J]. 广东农业科学, 2020, 47(11): 78 - 83.
- [13] 万琼莲, 杨子祥, 王连春, 等. 云南花生丛枝植原体 16S rRNA 和核糖体蛋白基因序列分析[J]. 植物病理学报, 2014, 44(4): 370 - 378.
- [14] 陈慕容, 张曙光, 郑冠标, 等. 华南花生丛枝病发病规律及防治研究[J]. 广东农业科学, 1994(2): 33 - 35.
- [15] 张曙光, 范怀忠. 华南花生丛枝病一由叶蝉传递的花生类菌原体性新病害的研究简报[J]. 华南农学院学报, 1981, 2(2): 104 - 105.
- [16] 陈作义, 沈菊英, 彭加木, 等. 花生丛枝病原的电子显微镜研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1981, 13(3): 317 - 318.
- [17] 杨健源, 梁志慧, 唐伟文. 花生丛枝病原的血清学研究[J]. 中国油料作物学报, 2000, 22(4): 58 - 61.
- [18] 万琼莲, 蔡红, 杨子祥, 等. 云南花生丛枝植原体 *secY* 基因序列分析及结构预测[J]. 云南农业大学学报, 2013, 28(2): 163 - 168.
- [19] LEE I M, BOTTFNER K D, ZHAO Yurong, et al. Phylogenetic analysis and delineation of phytoplasmas based on the *secY* gene [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(12): 2887 - 2897.
- [20] LEE I M, HAMMOND R W, DAVIS R E, et al. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rRNA for classification and identification of mycoplasma-like organism [J]. Phytopathology, 1993, 83(8): 834 - 842.
- [21] MARTINI M, LEE I M, BOTTFNER 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.
- [22] DENG Sujun, HIRUKI C. Genetic relatedness between two non-culturable micoplasmalike organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction [J]. Phytopathology, 1991, 81(12): 1475 - 1479.
- [23] SCHNEIDER B. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasma [J]. Molecular and Diagnostic Procedures in Mycoplasma, 1995(1): 369 - 380.
- [24] GUNDERSEN D E, LEE I M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs [J]. Phytopathologia Mediterranea, 1996, 35(3): 144 - 151.
- [25] 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 (16Sr III) [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2009, 59(10): 2582 - 2593.
- [26] TAMURA K, STECHER G, PETERSON D S, et al. MEGA 6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725 - 2729.
- [27] 陈作义, 沈菊英, 戴月明, 等. 广东芝麻变叶病病原的电子显微镜研究[J]. 生物化学与生物物理学报, 1982, 14(2): 199 - 200.
- [28] 张曙光, 谢双大, 蔡汉雄, 等. 广东水稻新病害“橙叶病”在茂名市发生流行[J]. 华南农业大学学报, 1994, 15(2): 156 - 157.
- [29] 李正刚, 余小漫, 汤亚飞, 等. 广东枣疯病植原体的鉴定[J]. 植物病理学报, 2019, 49(2): 281 - 282.
- [30] LI Zhenggang, TANG Yafei, SHE Xiaoman, et al. First report of 16Sr II -D phytoplasma associated with eggplant phyllody in China [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2019, 41(3): 339 - 344.

(责任编辑: 杨明丽)