

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.01.003

重庆北碚桑树萎缩病植原体分子鉴定^①

赵雪君, 张宁, 李婷婷, 赵城钢, 孙现超

西南大学植物保护学院/植物病害生物学重庆市高校级重点实验室, 重庆 400716

摘要: 运用 16S rDNA 基因分子检测技术, 使用 16mF2/R16mR1, R16F2n/R16R2 引物对扩增采集于重庆北碚地区表现萎缩病症的桑叶样品的总 DNA, 结果发现在编号为 C, I, S 的样品中扩增出了约 1.2 kb 的特异条带. 经克隆测序并通过 NCBI 比对分析后, 确定所得序列为植原体的特定序列 16S rDNA, 将测序结果与已报道的桑树萎缩病植原体序列进行同源性比对, 结果表明重庆北碚地区桑树萎缩病植原体均属于 16S r I 亚组, 其中 C 样品中萎缩病植原体鉴定为 B 亚组. 研究结果为明确北碚地区桑树萎缩病病原及该病害的有效防治提供了基础依据.

关键词: 桑树萎缩病; 植原体; 16S rDNA 基因; 多样性

中图分类号: S432

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)01-0016-05

桑树萎缩病 Mulberry dwarf disease 是桑树中的重要病害之一, 在我国各大养殖蚕区均有发生, 且发病率较高, 对蚕桑生产造成严重的经济损失, 并且对其防治也越发困难. 近年来, 随着传统蚕桑地区产业结构的调整, 我国蚕桑生产基地也发生了转移, 桑树萎缩病在新的种植区也再度爆发. 同时, 在其他林木果树(如泡桐、枣树、木豆等)中也相继有新的植原体病害报道, 这些病害也可能与桑树萎缩病病原有关^[1].

已经证实引起桑树萎缩病的病原有病毒和植原体. 病毒在桑树上主要引发花叶型萎缩, 而植原体则主要引发萎缩型和黄化型萎缩^[2]. 桑黄化型萎缩病是桑树上的主要病害类型, 属国内植物中重要检疫性病害之一, 也是国际上首先被确定为由植原体引起的病害之一. 因植原体在全世界广泛存在, 危害着数百种植物, 又因其发生后对作物产量影响严重, 受到国内外学者的高度重视. 迄今为止, 世界各地已统计有 700 多种植物自然感染植原体病害, 而我国早在 1976 年就将桑树萎缩病确定为植原体病害, 同时报道了 70 多种植物植原体病害. 根据 16S rDNA 序列的相似性分析, 桑树植原体归为翠菊黄花组, 即 16S r I 组. 其病害症状表现为植株矮化、丛枝、叶片变黄或变红及花变叶等, 而病毒也可以引起叶片黄化、节间缩短、叶缘卷曲、花叶等类似的症状. 因此, 单从症状上区分桑树萎缩是由病毒还是植原体引起的仍是一个难题^[3].

目前, 国内一些地区使用分子生物学技术对当地桑萎缩病的病原进行分析鉴定, 从而初步解决了之前研究上的困难. 早在 1998 年, 邱并生等^[4]首先对江苏镇江的桑黄化型和萎缩型萎缩病植原体的 16S rDNA 进行分析比较, 推断这两种植原体属于 16S r I 组. 之后, 夏志松等^[5]和刘清神等^[6]更多学者先后报道了镇江和广州桑树萎缩病植原体 16S rDNA 的序列. 目前重庆地区未见桑树萎缩病植原体病害的相关报道, 为了研究鉴定重庆桑树萎缩病的植原体种类, 本实验采用 nested-PCR 技术对重庆北碚发生的萎缩病进行分子检测. 对检测到的植原体 16S rDNA 进行序列测定和分析, 通过序列同源性分析确定了其分类地位, 为进一步研究、诊断、控制桑树萎缩病提供了一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

表现萎缩症状的病叶样品和健康桑叶采自重庆北碚区. DNA 凝胶回收试剂盒购自天根科技有限公司,

① 收稿日期: 2015-10-15

基金项目: 重庆市自然科学基金项目(CSTC2010BB1122); 中央高校基本科研业务费资助项目(XDJK2016A009, 2362015xk04).

作者简介: 赵雪君(1990-), 女, 山西临汾人, 硕士研究生, 主要从事植物病害诊断与防治研究.

通信作者: 孙现超, 博士, 研究员.

载体 pGEM-T Easy Vector 购自 Promaga 公司, 感受态细胞 Trans1-T1 Phage Resistant 购自北京全式金生物技术有限公司, 其他生物学试剂均购自 TaKaRa 公司.

1.2 样品总 DNA 提取

采用改良的 CTAB 法分别提取病叶和健康桑叶的总 DNA, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存.

1.3 引物的设计与合成

PCR 引物根据植原体 16S-23S rDNA 区段序列按文献[4]设计, 采用引物对 R16F2/R16R1 及 R16F2n/R16R2(表 1), 引物合成由华大基因公司完成.

表 1 本研究用到的引物

名称	引物序列 5'-3'	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	名称	引物序列 5'-3'	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$
R16F2	CATGCAAGTCGAACGGA	57.7	R16F2n	ACGACTGCTAAGACTGG	48.8
R16R1	CTTAACCCCAATCATCGAC	54.4	R16R2	GCGGTGTGTACAAACCCCG	64.6

1.4 目的基因的 PCR 扩增

以桑树叶脉组织总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 反应体系为 $25\text{ }\mu\text{L}$, 含有 $10\times$ Reaction buffer $2.5\text{ }\mu\text{L}$, 10 mmol/L dNTPs $0.5\text{ }\mu\text{L}$, rTaq DNA 聚合酶 $0.3\text{ }\mu\text{L}$ (1U), 上、下游引物各 $0.5\text{ }\mu\text{L}$, 模板 DNA $1.0\text{ }\mu\text{L}$, 剩余以灭菌 ddH₂O 补足. 先用引物对 R16F2/R16R1 进行第一轮 PCR, 扩增条件为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min , $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s , $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 50 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 110 s , 进行 30 个循环, 最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸时间为 10 min . 用上一轮扩增产物为模板, 以 R16F2n/R16R2 为引物对进行新一轮 PCR, 将退火温度改为 $53\text{ }^{\circ}\text{C}$, 其余条件与第一轮相同. 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 在 110 V 下电泳 25 min , 经 Goldview 染色后观察电泳结果并拍照.

1.5 PCR 产物回收、克隆及测序分析

采用 DNA 纯化试剂盒纯化回收凝胶电泳后的 PCR 目的片段, 连接回收的片段至 pGEM-T Easy Vector, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 16 h . 热激法将连接产物转入大肠杆菌感受态细胞 Trans1-T1 Phage Resistant, 经筛选培养基筛选后, 挑白色菌落进行 PCR 检测, 随机挑选 3 个阳性克隆送到华大基因科技股份有限公司测序.

1.6 目的基因的序列分析

测序所得序列在 GenBank 中 BLAST 比对, 根据序列的同一性判断所获序列是否为目的序列. 再运用 DNASTar 中的 MegAlign 软件, 以 16S rDNA 序列为基础, 对比分析北碚桑树植原体与已报道的植原体若干代表株系的亲缘关系^[7-8], 并用 MAGA 5 构建系统进化树^[9].

2 结果与分析

2.1 桑树叶片中的植原体检测

以样品提取的 DNA 为模板, 利用植原体 16S rDNA 通用引物进行 PCR 扩增. 扩增产物电泳结果显示, 有 3 个样品(编号分别为 C, I, S)扩增出长度约 1.2 kb 的片段, 与预期目标片段大小一致^[9]. 而从健康桑树叶片和双蒸水中均未扩增出特异条带(图 1).

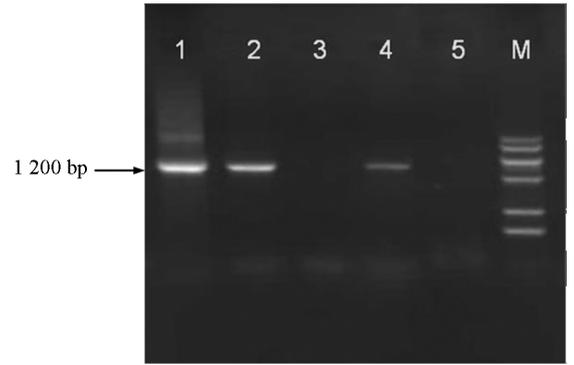


图 1 感染植原体的桑树样品及健康对照

2.2 16S rDNA 序列分析

2.2.1 对 16S rDNA 基因序列分析

样品 C, I, S 的测序结果表明, 其 16S rDNA 片段的核苷酸长度均为 1 237 bp(图 2), 上传至 GenBank, 分别获得登录号 KF289966, KF289967, KF289968. 将这 3 条序列与已登录的其他植原体 16S rDNA 序列进行同源性分析, 结果如表 2 所示. 这 3 条序列与 16S r I 组同源性最高, 均在 98.3% 以上, 最高达 99.8%, 与其他各组的同源性在 90% 以下. 3 个样品序列均与植原体 16S r I 的 B 亚组同源性最高, 分别为 C: 99.2%, I: 99.8%, S: 99.6%. 利用网络在线分析软件 iPhyClassifier (<http://plant-pathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) 中模拟 RFLP 分析表明, C 与 16S r I-B 亚组典型成员洋葱黄化植原体(Onion yellows phytoplasma OY-M, NC_005303)的 RFLP 图谱一致性为 100%, 属于 16S r I-B 亚组. 而 I 和 S 的模拟 RFLP 图谱不同于与 16S r I 组的任何亚组, 相似性最高的是洋葱黄化植原体的 RFLP 图谱, 一致性为 97.0%.



1: 桑树样品 C; 2: 桑树样品 I; 3: 健康样品; 4: 桑树样品 S; 5: 清水对照; M: Bio Marker V.

图 2 PCR 产物电泳结果

表 2 16S r 各组的代表性植原体 16S rDNA 基因片段的核苷酸同源性比较

16S rDNA 组	相关植原体病害	登录号	核苷酸同源性/%		
			C	I	S
16 Sr I-A	Plantago virescence(PV)	AY265216	98.3	98.7	98.7
16 Sr I-B	Rose Balsam phyllody(RBLPh)	HQ646367	99.2	99.8	99.6
16 Sr I-C	Clover Phyllody (CPh)	AF222066	98.7	99.1	99.1
16 Sr I-D	Paulownia Witches'-Broom (PaWB)	DQ851169	99.1	99.4	99.4
16 Sr I-E	Blueberry stunt (BS)	AY265220	99.0	99.4	99.4
16 Sr I-F	Aster yellows (AY)	AY265212	98.6	99.0	99.0
16 Sr II	Peanut witches'-broom (PnWB)	L33765	89.4	89.5	89.7
16 Sr III	Peach X-disease (PX)	HQ589204	90.1	90.2	90.2
16 Sr IV	Lethal yellows (LY)	EF186822	90.2	90.5	90.6
16 Sr V	Jujube witches'-broom (JWB)	AY197661	90.4	90.5	90.7
16 Sr VI	Iranian cabbage yellows (ICY)	EF592606	88.6	88.7	88.9
16 Sr VI	Clover Phyllody (CPh)	HQ589189	90.5	90.7	90.9
16 Sr VII	Ash yellows(AshY)	HQ589190	90.1	90.4	90.5
16 Sr VIII	Loofah witches'-broom (LfWB)	L33764	87.3	87.5	87.5
16 Sr IX	Pigeon pea witches'-broom(PPWB)	EF186826	88.6	88.7	88.9
16 Sr X	Apple proliferation(AP)	AJ430067	90.7	91.0	91.1
16 Sr XI	Rice yellow dwarf (RYD)	D12581	89.7	89.8	90.0
16 Sr XII	Stolbur (STOL)	AY725230	95.4	95.9	95.8
16 Sr XIII	Mexican periwinkle vire (MPV)	AF248960	95.6	96.0	96.0
16 Sr XIV	Beimuda grass white leaf (BGWL)	AF248961	90.1	90.3	90.5

2.2.2 16S rDNA 基因同源性比较分析

利用 MEGA5, 将 C, I, S 与已报道的 16S r 植原体的若干代表株系一起构建系统进化树(图 3). 从图 3 中可以看出, C, I, S 的 16S rDNA 序列划分在 16S r I 组, 与上面的同源性比较结果一致.

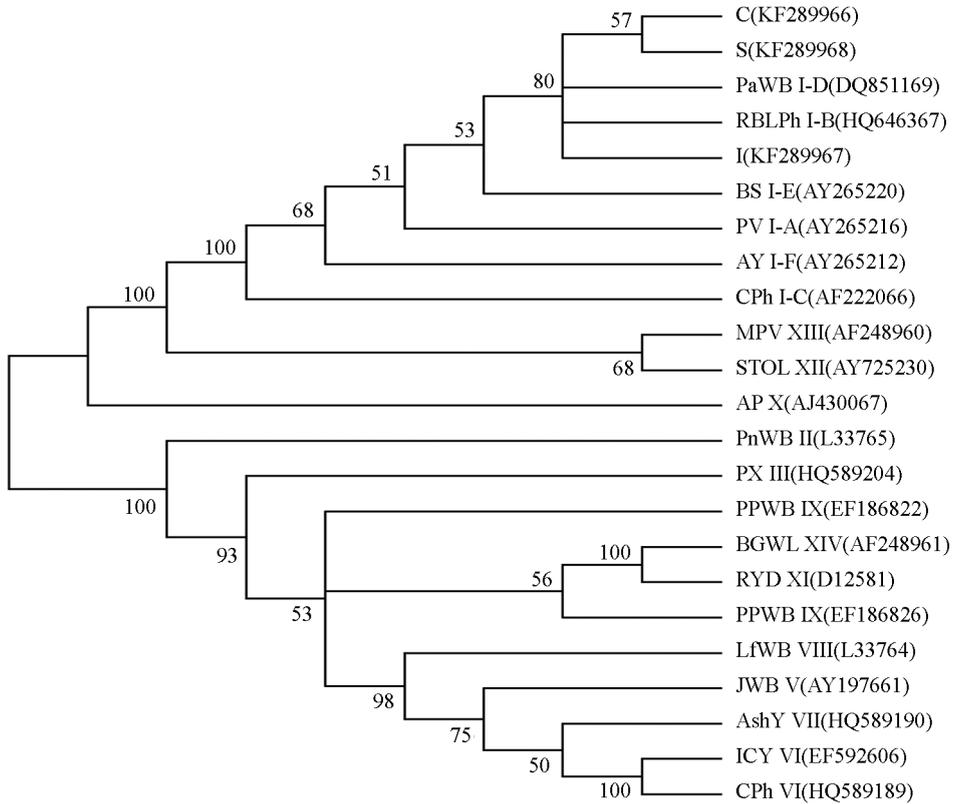


图 3 基于 16S rDNA 序列构建的系统进化树

3 讨 论

桑树萎缩病有黄化型、萎缩型和花叶型 3 种类型, 前二者的病原为植原体, 后者的病原为病毒^[10]. 三者在田间症状比较相似, 因此单从症状上很难区分具体病害种类. 桑树萎缩病在我国江苏、安徽、山西、山东、广东等省蚕区都发生危害. 发病初期桑叶变小变薄, 叶缘稍向背面卷曲, 叶逐渐黄化; 发病后期病桑枝短叶小, 2~3 年后桑树死亡^[11-13]. 由于植原体在植物体内的含量较少, 并且难以人工培养, 使得传统的生物学方法在其分类和鉴定中不能很好地发挥作用. 但是近些年由于分子生物学的发展, 使得植原体的分类和鉴定也有了较大的进展. 目前, 植原体分类已经以 16S rDNA 基因的限制性片段长度多态性分析(RFLP)和核糖体蛋白基因(rp)序列分析为基本框架, 将植原体分为 14 个组(候选种)和 41 个亚组. 本研究采用 nested-PCR 方法, 是由于该技术具有特异性强、准确度和灵敏度高等优点, 能快速准确地检测到寄主组织中含量极低的病原. 在所采集的表现萎缩症状的桑叶样品中, 仅有 3 份样品检出为阳性, 说明其他病叶可能是由于病毒感染或者是其他因素所引起的, 还有待进一步验证. 本研究 3 份样品中扩增出的 16S rDNA 序列之间的相似性在 99.2%~99.6% 之间, 并且都属于翠菊黄化 16S r I 组, 其中 C 进一步归属于 16S r I-B 亚组, 与国内广州^[4]和山东^[10]报道的桑树萎缩病植原体一致, 而 I 和 S 与 16S r I-B 亚组亲缘关系最近, 但由于模拟 RFLP 图谱不完全一致, 还不能确定其亚组归属. 研究表明, 重庆北碚桑树中的植原体属于 16S r I 组, 因 16S rDNA 基因存在多样性, 这对于植原体分类的深入研究具有一定的参考价值.

参考文献:

- [1] 张和禹, 汪泰初, 鲍先巡. 桑树萎缩病的研究进展 [J]. 中国蚕业, 2010, 31(1): 9-12.
- [2] 李 永, 田国忠, 朴春根, 等. 我国几种植物植原体的快速分子鉴别与鉴定的研究 [J]. 植物病理学报, 2005, 35(4): 293-299.

- [3] 苏州蚕桑专科学校. 桑树病虫害防治学 [M]. 北京: 农业出版社, 1992.
- [4] 邱并生, 李横虹, 史春霖, 等. 从我国 20 种感病植物中扩增植原体 16S rDNA 片段及其 RFLP 分析 [J]. 林业科学, 1998, 34(6): 67—74.
- [5] 夏志松, 难波成任. 桑黄化型萎缩病病原体 16S rDNA 基因的序列分析 [J]. 蚕业科学, 2004, 30(2): 204—206.
- [6] 刘清神, 许东林, 林盘芳, 等. 广州桑树植原体分子检测及多样性初探 [J]. 蚕业科学, 2006, 32(1): 1—5.
- [7] 顾沛雯, 吴云锋, 安凤秋. 小麦蓝矮植原体寄主范围的鉴定及 RFLP 分析 [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2007, 37(4): 390—397.
- [8] SAITOU N, NEI M. The Neighbor-Joining Method: a New Method for Reconstructing Phylogenetic Trees [J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406—425.
- [9] KOICHIRO T, JOEL D, MASATOSHI N, et al. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(8): 1596—1599.
- [10] 邱长玉, 朱方容, 林 强. 桑树花叶病的研究进展 [J]. 广西蚕业, 2011, 48(2): 32—37.
- [11] 张 林, 陈俊百, 黄 勇, 等. 山西省桑树地方品种遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(2): 24—27.
- [12] 刘永光, 田国忠, 王 洁, 等. 山东蚕区桑黄化型萎缩病病原物的分子鉴定 [J]. 蚕业科学, 2009, 35(3): 463—471.
- [13] 卢全有. 安徽桑黄化型萎缩病植原体 16S rDNA 序列分析及分子检测 [J]. 植物病理学报, 2010, 40(6): 642—646.

Molecular Detection of Phytoplasma Associated with Mulberry Dwarf Disease in Beibei of Chongqing

ZHAO Xue-jun, ZHANG Ning, LI Ting-ting,
ZHAO Cheng-gang, SUN Xian-chao

*Chongqing Key Laboratory of Plant Disease Biology / School of Plant Protection,
Southwest University, Chongqing 400716, China*

Abstract: In order to provide basic reference for the identification of the pathogen of mulberry dwarf disease and for its control, mulberry leaves showing dwarf symptoms were collected from Beibei, Chongqing, and the universal phytoplasma primer pairs R16mF2/R16mR1 and R16F2n/R16R2 were used to amplify 16S rDNA of phytoplasma from each leaf sample. In the samples of No. C, I and S, specific fragments of about 1.2 kb were obtained. After cloning and sequencing, the obtained sequences were identified as the specific fragments of phytoplasma 16S rDNA. Results of Blast in NCBI showed that the pathogen of mulberry dwarf disease in Beibei belonged to the 16S r I group of phytoplasma. Phytoplasma in the C sample belonged to subgroup B of 16S r I.

Key words: mulberry dwarf disease; phytoplasma; 16S rDNA gene; diversity

责任编辑 夏 娟

