

## 泡桐丛枝病病树周围几种植物上植原体的分子检测

王 洁<sup>1,2</sup>, 田国忠<sup>2</sup>, 徐启聪<sup>2</sup>, 刘永光<sup>1</sup>, 高 瑞<sup>1</sup>, 李向东<sup>1</sup>, 竺晓平<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>山东农业大学植物保护学院, 山东泰安 271018; <sup>2</sup>中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所/国家林业局森林生态保护重点实验室, 北京 100091)

**摘要:** 【目的】初步明确自然条件下可能感染泡桐丛枝病植原体的寄主植物。【方法】用植原体 16S rRNA 基因的通用引物, 对从泡桐丛枝病病树周围采集的表现黄化、小叶、皱叶、丛枝等症状或无症状的 16 种植物样品的 DNA 进行巢式 PCR 扩增, 对所扩增的片段进行序列测定和分析。并利用泡桐丛枝病植原体延伸因子的抗血清对部分样品进行间接免疫荧光观察。【结果】巢式 PCR 结果显示从牛筋草 (*Eleusine indica*)、辣椒 (*Capsicum annuum*)、狗尾草 (*Setaria viridis*)、山药 (*Dioscorea opposita*)、灯笼泡 (*Physalis angulata*)、花生 (*Arachis hypogaea*) 及南瓜 (*Cucurbita moschata*) 共 7 种植物样品和阳性对照 PaWB 菏泽分离物 (PaWB-HZ) 中均得到了约 1.2 kb 的特异性片段。序列分析表明这 7 种植原体分离物和 PaWB-HZ 属于翠菊黄化组的 16SrI-D 亚组。对所采集的植原体侵染的寄主植株辣椒、山药、花生、南瓜和泡桐进行间接免疫荧光观察结果显示, 仅在 PaWB-HZ 侵染的泡桐中发现翠绿色特异荧光, 在健康泡桐及其它 4 种分离物侵染的植物中均未检测到明显的植原体特异荧光。【结论】首次从泡桐丛枝病病树周围存在的 7 种其它植物中检测到植原体, 并且测定其植原体 16S rDNA 核苷酸序列与泡桐丛枝病植原体相关基因片段高度同源, 初步推测这 7 种植物可能是泡桐丛枝病植原体自然寄主或是通过昆虫偶尔被感染。

**关键词:** 泡桐丛枝病; 植原体; 16S rRNA 基因; PCR; 间接免疫荧光; 寄主植物

## Molecular Detection of Phytoplasma Strains From Several Plants Around Diseased *Paulownia* Infected with *Paulownia* Witches'-broom Phytoplasma

WANG Jie<sup>1,2</sup>, TIAN Guo-zhong<sup>2</sup>, XU Qi-cong<sup>2</sup>, LIU Yong-guang<sup>1</sup>, GAO Rui<sup>1</sup>, LI Xiang-dong<sup>1</sup>, ZHU Xiao-ping<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong; <sup>2</sup>Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry/The Key Laboratory of Forest Ecology and Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091)

**Abstract:** 【Objective】 The objective of this study is to investigate and identify the alternative host plants of paulownia witches'-broom phytoplasma (PaWB) in natural condition. 【Method】 Using universal primers for phytoplasmal 16S rRNA gene, nested PCR was conducted to detect phytoplasmas from 16 species of plants with/without symptoms of yellowing, little leaf, wrinkle leaf, witches'-broom and growing around paulownia plants infected with PaWB, and then sequencing and phylogenetic analyses of the amplified fragment were made. Indirect immunofluorescence was also used to analyze partial plant samples. 【Result】 A specific fragment of ca. 1.2 kb in length was amplified with nested PCR from 7 species of plants, Chinese yam (*Dioscorea opposita*), groundcherry (*Physalis angulata*), pepper (*Capsicum annuum*), peanut (*Arachis hypogaea*), goosegrass (*Eleusine indica*), bristle grass (*Setaria viridis*) and musdky guard (*Cucurbita moschata*) along with the positive control of PaWB. The sequencing and phylogenetic results showed that all the phytoplasmas detected in the 7 species of plants and the one from diseased paulownias

收稿日期: 2009-05-18; 接受日期: 2009-07-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471393)、国家级星火科技项目 (国科发计字[2004]140 号)、中国博士后科学基金 41 批 (20070411103)、山东省博士后创新项目专项基金 (200702015)

作者简介: 王 洁, 硕士。Tel: 0538-8247781 转 8308; E-mail: angel@sda.edu.cn。田国忠, 研究员, 博士。Tel: 010-62889525; E-mail: tiang@caf.ac.cn。王洁和田国忠具有同等贡献。通信作者竺晓平, 副教授, 博士。Tel: 0538-8242523, 0538-8247781 转 8308; E-mail: zhuxp@sda.edu.cn

belonged to 16Sr I-D subgroup of aster yellows phytoplasma group. Indirect immunofluorescence analysis using antibody to PaWB Tuf protein indicated that specific fluorescence was easily detected in paulownia plants infected with Beijing and Heze isolates of PaWB, but not either in healthy paulownia plants or in CaWL, DoY, AhY, CmA phytoplasma-infected plants. 【Conclusion】 Paulownia witches'-broom phytoplasma were detected from 7 species of plants, which were probable natural hosts of PaWB.

Key words: paulownia witches'-broom; phytoplasma; 16S rRNA gene; nested PCR; indirect immunofluorescence; host plant

## 0 引言

【研究意义】泡桐丛枝病 (Paulownia witches'-broom, PaWB), 是由植原体 (phytoplasma, 原称 mycoplasma-like organism, 简称 MLO) 引起的, 其病原属于翠菊黄化组 (Aster yellow group; 16SrI)。Marcone 等与 Lee 等<sup>[1-2]</sup>将翠菊黄化组划分为 8 个亚组, 分别是 16Sr I-A、-B、-C、-D、-E、-F、-K 和 -N 亚组, 泡桐丛枝病原属于 16Sr I-D 亚组, 2008 年 Wei 等<sup>[3]</sup>通过软件模拟 RFLP 分类系统也确定了此分类地位。泡桐丛枝病在林间自然条件下主要靠烟草盲蝽 (*Cyrtopeltis tenuis*)、茶翅蝽 (*Halyomorpha mista*)<sup>[4-5]</sup>和小绿叶蝉 (*Empoasca flavescens*)<sup>[6]</sup>等昆虫介体传播。中国泡桐丛枝病的发生和危害很严重<sup>[7]</sup>, 已知现有的泡桐种类及杂交组合都能感染泡桐丛枝病, 并表现出典型的丛枝症状, 泡桐似乎是泡桐丛枝病植原体唯一的自然寄主<sup>[8]</sup>。泡桐在中国分布广泛, 在主栽区河南、山东等地区, 农、桐间作是重要的种植方式, 间作作物有花生、豆类、芝麻和山药等多种植物, 因此明确泡桐丛枝植原体与这些植物的关系对泡桐丛枝病的防治有重要的指导意义。【前人研究进展】早在 20 世纪 90 年代, 人们通过症状观察和显微镜观察等方法研究发现了感染丛枝病的泡桐与其周围生长异常的植物之间的关系, 如 1993 年黄玉璋等<sup>[9]</sup>报道山东滕州泡桐丛枝病树周围发生花生丛枝病, 1988 年金开璇<sup>[10]</sup>将南方菟丝子在泡桐病株上缠绕吸毒后, 再接到长春花上, 可使长春花表现出典型的丛枝症状, 仵光俊等<sup>[11]</sup>的研究认为泡桐丛枝病原能够侵染辣椒, 并引起丛枝、皱缩和小叶等症状。随着分子生物学在植原体研究中的应用, 采用巢式 PCR 技术、RFLP 和序列测定分析等对某一寄主上的植原体侵染其它植物的研究变得更为可行和可靠。Salehi 等<sup>[12]</sup>通过在室内做介体传毒试验和 RFLP 分析, 发现引起莴苣和野莴苣花变叶病害的植原体还可以感染苦苣菜和长春花并引起不同的症状。2007 年, 顾沛雯等<sup>[13]</sup>用巢式 PCR 和 RFLP 的方法鉴定了小麦蓝矮植原体的 10 种田间自然寄主和 8 种温室传毒寄主。Gao 等<sup>[14]</sup>从山东平阴县靠近泡桐丛

枝病的玫瑰上检测到 16S rDNA 序列与 16Sr I-D 同源性很高的植原体。【本研究切入点】首次用分子生物学方法较为系统地检测了患丛枝病的泡桐林地间和其周围栽种的植物及野生杂草, 对克隆得到的序列进行了分析, 并使用中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所国家林业局森林生态保护学重点实验室制备的泡桐丛枝病植原体 tuf 蛋白的抗血清<sup>[15]</sup>进行了间接免疫荧光分析。【拟解决的关键问题】本研究利用巢式 PCR 的方法对患丛枝病的泡桐林地间及其周围的栽种植物及野生杂草进行了检测, 克隆测定了植原体 16S rRNA 基因核苷酸序列, 序列分析初步确定了它们的分类地位。并对检测呈阳性的重要经济作物进行间接免疫荧光分析, 以期明确从这些植物上所检测到的植原体与泡桐丛枝植原体之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

采集山东菏泽和河南濮阳的泡桐丛枝病树周围的植物, 包括生长异常及正常的草本及木本植物, 涉及种植作物、树木及林间杂草。采集时间分别为 2005 年 7 月 27 日、2006 年 9 月 2 日、2007 年 9 月 18—21 日和 2008 年 9 月 18 日, 均为泡桐丛枝病典型症状显现期。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  购自北京博大泰克生物基因技术有限公司; T 载体 pMD18-T、限制性内切酶等分子生物学试剂产品购自 TaKaRa 公司, 泡桐丛枝植原体延伸因子的兔抗血清由中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所国家林业局森林生态保护学重点实验室提供。

### 1.2 方法

1.2.1 16S rRNA 基因克隆 采用 SDS-CTAB 法<sup>[16]</sup>提取植物总 DNA, 以总 DNA 为模板, 利用植原体 16S rRNA 基因通用引物 R16mF2/R16mR1 进行 PCR 扩增, 然后以此扩增产物为模板并稀释数倍后用 R16F2/R16R2 进行巢式 PCR<sup>[17-18]</sup> (表 1)。

纯化回收的 PCR 产物与 T 载体连接后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 涂板后筛选重组子菌落进行培养并提取质粒, 对来自 2 个菌落的重组质粒进行 PCR 及酶切鉴

表 1 PCR 扩增 16S rRNA 基因所用引物的核苷酸序列

Table 1 Primers used in this research to amplify 16S rRNA gene

引物名称 Primers	引物序列 Primer sequence	退火温度 T <sub>m</sub> (°C)
R16mF2	5'-CAT GCA AGT CGA ACG GA-3'	52
R16mR1	5'-CTT AAC CCC AAT CAT CGA C-3'	52
R16F2	5'-ACG ACT GCT AAG ACT GG-3'	55
R16R2	5'-TGA CGG GCG GTG TGT ACA AAC CCC G-3'	55

定, 然后送上海英骏生物技术有限公司测序。

**1.2.2 序列分析** 将所得 DNA 序列输入 GenBank 进行 BLAST 检索, 采用 DNASTAR 和 MEGA3.1 软件对所得到的核苷酸序列进行比较和分析, 并构建系统进化树<sup>[19]</sup>。

表 2 田间采集样品的归属及症状表现

Table 2 Classification and symptoms of collected samples

样品名称 Samples	分类 Classification	症状 Symptom	缩写 Acronym
红小豆 <i>Phaseolus angularis</i>	豆科 Leguminosae	Y, LL	PeYL
大豆 <i>Glycine max</i>	豆科 Leguminosae	Y	GmY
花生 <i>Arachis hypogaea</i>	豆科 Leguminosae	Y	AhY
牛筋草 <i>Eleusine indica</i>	禾本科 Gramineae	WB	EiWB
狗尾草 <i>Setaria viridis</i>	禾本科 Gramineae	WB	SvWB
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	茄科 Solanaceae	WL, LL	CaWL
灯笼泡 <i>Physalis angulata</i>	茄科 Solanaceae	LL	PaL
瓜蒌 <i>Fructus trichosanthis</i>	葫芦科 Cucurbitaceae	LL, Y	FtLY
南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>	葫芦科 Cucurbitaceae	A	CmA
刺儿菜 <i>Cephalanoplos segetum</i>	菊科 Compositae	A	CsA
山药 <i>Dioscorea opposita</i>	薯蓣科 Dioscoreaceae	Y, LL	DoY
芝麻 <i>Sesamum indicum</i>	胡麻科 Pedaliaceae	A	SiA
国槐 <i>Sophora japonica</i>	蝶形花科 Papilionaceae	Y	SjY
猫眼草 <i>Euphorbia lunulata</i>	大戟科 Euphorbiaceae	Y, LL	EpYL
苦楝 <i>Melia azedaeach</i>	楝科 Meliaceae	Y	MaY
软枣 <i>Diospyros lotus</i>	柿树科 Diospyros kaki	A	DIA

Y: 黄化 Yellow; LL: 小叶 Little leaf; WB: 丛枝 Witches-broom; WL: 皱叶 Wrinkled leaf; A: 无症状 Asymptomatic

山东菏泽市胡集乡泡桐林地泡桐“中林 3 号”无性系示范林地, 株距 5 m, 行距 20 m(中间有缺株)。由于该品种对丛枝病高度感病, 病树丛枝症状典型。当地传统种植方式是在林下间种秋季作物, 比如花生、辣椒、豆类和山药等, 间种的作物种类常因年份和季节有所差异, 所以采集的不同样品的症状有所差异。

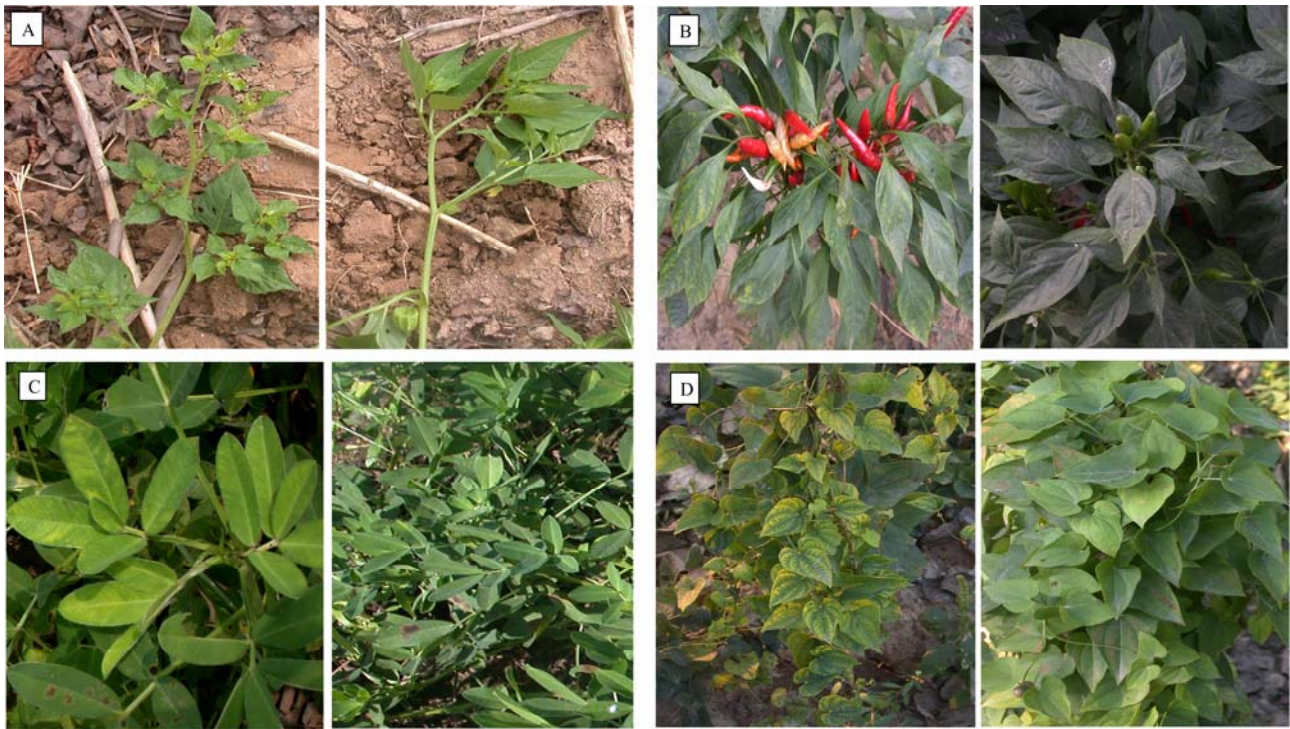
**1.2.3 间接免疫荧光显微分析** 专化抗体(一抗)为泡桐丛枝病植原体延伸因子兔抗血清, 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate FITC)标记的羊抗兔抗血清为二抗。在 490—495 nm 的蓝光激发下观察 FITC 的特异荧光<sup>[20]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 采集作物、杂草和树木症状表现及采集地生境

于泡桐丛枝病发病盛期, 采集山东菏泽和河南濮阳泡桐林的病树周围套种作物和杂草。共采集到植物 16 种, 分属于 11 个科(表 2)。采集的样品中南瓜、刺儿菜、芝麻和软枣 4 种植物的生长表现正常, 其余 12 种植物多表现为黄化和小叶症状, 多数植物未出现类似泡桐丛枝病的典型丛枝症状, 也不是典型的病毒侵染引起的症状, 图 1 是采集部分样品的症状表现。

河南濮阳采样地点之一市郊濮上园为一片泡桐纯林, 病株率在 90%以上, 丛枝症状严重, 林下有苦楝树苗生长。河南濮阳另外一处采样地点胡村乡为零星的泡桐丛枝病病树, 病树周围采集样品较为单一。每年 6 月份泡桐丛枝大量萌生之后, 病枝叶上出现大量的叶蝉和蜡蛾, 在林下的作物和杂草上也能发现这些昆虫。



A: 灯笼泡; B: 辣椒; C: 花生; D: 山药; 左侧是采集的样品, 右侧是健康对照  
A: *Physalis angulata*; B: *Capsicum annuum*; C: *Arachis hypogaea*; D: *Dioscorea opposita*. The left is collected sample, the right is healthy plant

图 1 采集部分样品的症状表现

Fig. 1 Symptom of partially collected samples

## 2.2 PCR 检测结果

采集不同植物上的样品共 36 份, 以总 DNA 为模板进行的普通直接 PCR 扩增, 除阳性对照泡桐病株外, 所有样品检测不到 1.5 kb 16S rRNA 基因目的条带, 但以直接 PCR 产物进行的巢式 PCR(Nested-PCR) 扩增, 电泳检测发现有 16 个样品能够扩增到 1.2 kb 16S rRNA 基因片段 (表 3)。

牛筋草 (*Eleusine indica*)、辣椒 (*Capsicum annuum*)、狗尾草 (*Setaria viridis*)、山药 (*Dioscorea opposita*)、灯笼泡 (*Physalis angulata*)、花生 (*Arachis hypogaea*) 和南瓜 (*Cucurbita moschata*) 7 种植物中经巢式 PCR 扩增得到约 1.2 kb 的片段 (图 2), 与阳性对照泡桐丛枝病植原体菏泽分离物 (PaWB-HZ) 和濮阳分离物 (PaWB-PY) 出现的条带大小相同, 也与设计引物对应序列相符, 健康的阴性对照及双蒸水空白对照中均未扩增到目标条带, 判断这些植物样品中可能存在植原体感染。其中山药黄化和灯笼泡小叶所有批次的样品中都被检出植原体, 其它植物则有部分批次样品未检测出植原体。而在刺儿菜、红小豆、大

豆、芝麻、瓜蒌、国槐、猫眼草、苦楝和软枣植物中均未检测到植原体。

## 2.3 16S rRNA 基因序列测定及分析

酶切及 PCR 筛选得到重组质粒, 通过测定 2 个片段的序列, 确定了检测到的 16S rRNA 基因均含有 1 246 个核苷酸, 共得到 8 个分离物的 16S rRNA 基因的核苷酸序列, 其中包括阳性对照泡桐丛枝植原体菏泽分离物 (PaWB-HZ, FJ263622), 另外包括 7 种在发病泡桐树 (阳性对照) 周围田间采集的植物, 分别进行了命名 (附 GenBank 登录号): 牛筋草丛枝植原体 (*Eleusine indica* witches'-broom, EiWB, FJ263620)、辣椒皱叶植原体 (*Capsicum annuum* winkle leaf, CaWL, FJ263617)、狗尾草丛枝植原体 (*Setaria viridis* witches'-broom, SvWB, FJ263625)、山药黄化小叶植原体 (*Dioscorea opposita* yellows, DoY, FJ263630)、灯笼泡小叶植原体 (*Physalis angulata* little leaf, PaL, FJ263624)、花生黄化植原体 (*Arachis hypogaea* yellows, AhY, FJ263623)、南瓜无症状植原体 *Cucurbita moschata* asymptomatic, CmA, FJ263619)。

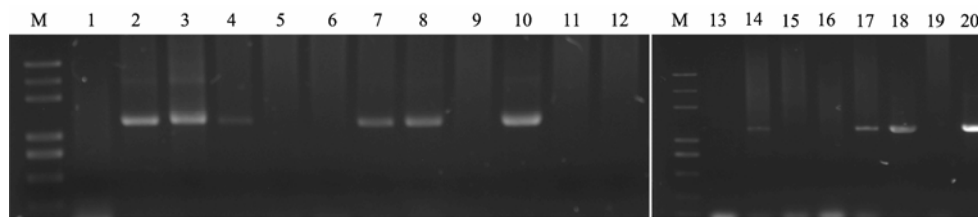
表 3 田间样品的检测结果

Table 3 Time and place of samples collection and nested PCR detection results

样品名称 Samples name	采集时间 Collection time				检测阳性比例 Positive /total	采集地点 Collection place
	2005-7-27	2006-9-22	2007-9-21	2008-9-18		
刺儿菜 <i>Cephalanoplos segetum</i>	—	—	—		0/3	山东菏泽胡集乡
牛筋草 <i>Eleusine indica</i>		+			1/1	Huji, Heze, Shandong
辣椒 <i>Capsicum annuum</i>		+	—	+	2/3	
红小豆 <i>Phaseolus angularis</i>		—	—	—	0/3	
大豆 <i>Glycine max</i>	—	—			0/2	
狗尾草 <i>Setaria viridis</i>		+			1/1	
山药 <i>Dioscorea opposita</i>		+	+	+	3/3	
芝麻 <i>Sesamum indicum</i>		—	—		0/2	
灯笼泡 <i>Physalis angulata</i>		+	+	+	3/3	
花生 <i>Arachis hypogaea</i>	+	—	+	+	3/4	
瓜蒌 <i>Fructus trichosanthis</i>		—	—		0/2	
国槐 <i>Sophora japonica</i>			—		0/1	
猫眼草 <i>Euphorbia lunulata</i>			—		0/1	
南瓜 <i>Cucurbita moschata</i>			+		1/1	
苦楝 <i>Melia azedaeach</i>			—		0/1	河南濮阳胡村乡
软枣 <i>Diospyros lotus</i>			—		0/1	Hucun, Puyang, Henan
						河南濮阳濮上园 Puyang, Henan

“+”表示 PCR 检测阳性结果；“—”表示 PCR 结果为阴性

“+” Represent the positive result of PCR detection; “—” Represent the negative result of PCR detection



M: DNA 分子量标准 DL 2000plus; 2: 泡桐丛枝病濮阳分离物; 3: 泡桐丛枝病菏泽分离物; 4: 辣椒皱叶病; 7: 花生黄化病; 8: 牛筋草丛枝病; 10: 狗尾草丛枝病; 14: 灯笼泡小叶病; 17: 南瓜无症枝; 18: 山药黄化小叶病; 1, 5, 6, 9, 11, 13, 15, 16: 分别为健康的泡桐、辣椒、花生、牛筋草、狗尾草、灯笼泡、南瓜和山药植物总 DNA 为阴性对照; 12: 双蒸水为空白对照

M: DNA marker DL 2000plus; 2: *Paulownia* witches'-broom PaWB-PY; 3: *Paulownia* witches'-broom PaWB-HZ; 4: *Capsicum annuum* winkle leaf; 7: *Arachis hypogaea* yellows; 8: *Eleusine indica* witches'-broom; 10: *Setaria viridis* witches'-broom; 14: *Physalis angulata* little leaf; 17: *Cucurbita moschata* asymptomatic; 18: *Dioscorea opposita* yellows; 1, 5, 6, 9, 11, 13, 15, 16: Total DNA from healthy paulownia, pepper, peanut, goosegrass, bristle grass, groundcherry, musky guard and yam plants as negative controls respectively; 12: Double distilled water as blank control

图 2 植原体 16S rDNA 巢式 PCR 检测结果

Fig. 2 Nested-PCR detection result of phytoplasma 16S rDNA

将得到的 8 个植原体分离物的 16S rDNA 核苷酸序列与 GenBank 中已登陆的 22 个植原体分离物的核苷酸序列进行序列比对和系统进化分析。应用 DNASTar 的 MegAlign 功能进行序列同源性比对, 结果表明所测的 7 种样品与其阳性对照的核苷酸序列同源性均要高于 GenBank 中已登陆的 22 个植原体分离物的 16S rDNA 核苷酸序列, 其中 DoY 与 PaWB-HZ 的 16S rDNA 序列同源性最低是 98.4%, AhY、EiWB、

PaL 3 种分离物与 PaWB-HZ 的核苷酸序列同源性最高为 99.4%, CaWL、SvWB、CmA 与 PaWB-HZ 阳性对照的核苷酸同源性也都在 99.0% 以上, 推测这些植物可能是泡桐丛枝植原体的自然寄主。根据 16S rDNA 序列构建系统进化树发现所测的 8 种分离物都聚集在 16SrI 组的分支上, 并和马里兰州翠菊黄化植原体 AF322644 (16SrI-B) 及泡桐丛枝植原体 AY265206 (16SrI-D) 在同一个独立分支上 (图 3), 而同源性比

对分析确定 7 种分离物与 AY265206 的同源性分别在 98.1%—99.4%之间，阳性对照与 AY265206 的同源性高达 99.8%，高于与马里兰翠菊黄化植原体的同源性，

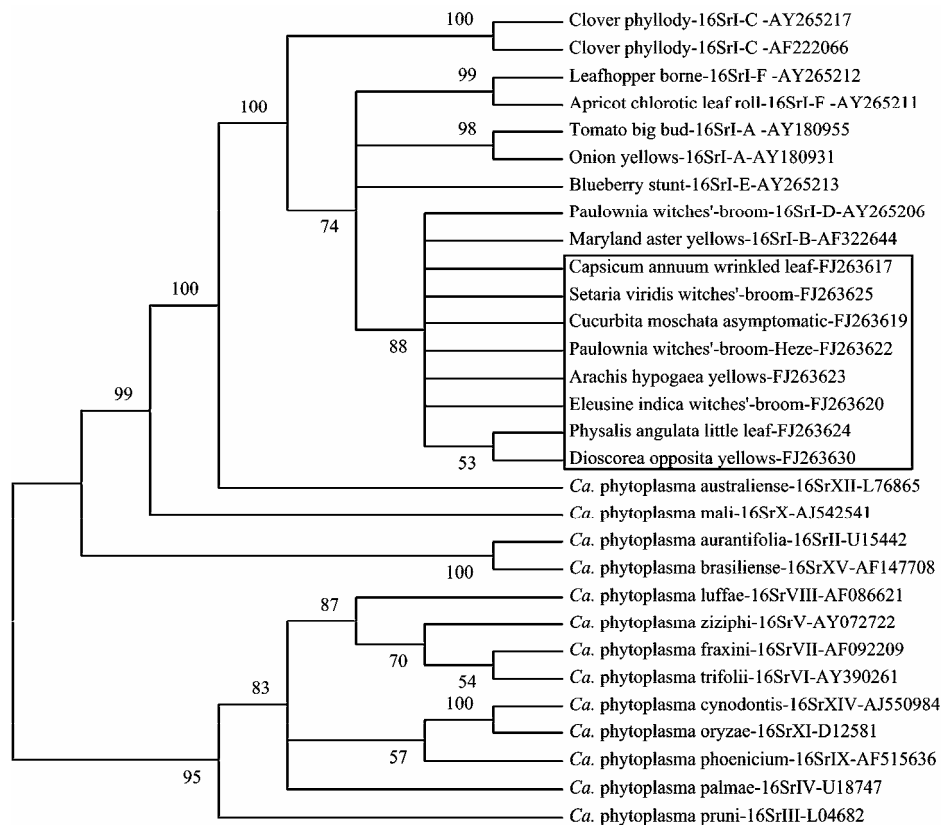
因而判断所测的 8 个植原体分离物均属于 16SrI-D 亚组（表 4）。

2.4 间接免疫荧光显微观察

表 4 采集的样品和 16Sr I -B 和 I -D 亚组代表植原体的 16S rRNA 基因核苷酸序列分析同源矩阵

Table 4 Homology matrix of phytoplasma 16S rRNA gene sequence of collected samples and typical phytoplasma of 16Sr I-D and 16Sr I-B subgroups

	PaWB-HZ	CmA	AhY	DoY	CaWL	EiWB	PaL	SvWB	AY265206-16SRI-D
PaWB-HZ	100								
CmA	99.2	100							
AhY	99.4	99.4	100						
DoY	98.4	98.1	98.1	100					
CaWL	99.3	99.5	99.6	98.1	100				
EiWB	99.4	99.5	99.6	98.2	99.7	100			
PaL	99.4	99.5	99.5	98.2	99.5	99.7	100		
SvWB	99.3	99.6	99.6	98.1	99.9	99.6	99.6	100	
AY265206-16SRI-D	99.8	99.2	99.2	98.2	99.4	99.3	99.2	99.4	100
AF322644-16SRI-B	99.6	99.0	99.0	98.0	99.2	99.0	99.0	99.2	99.7



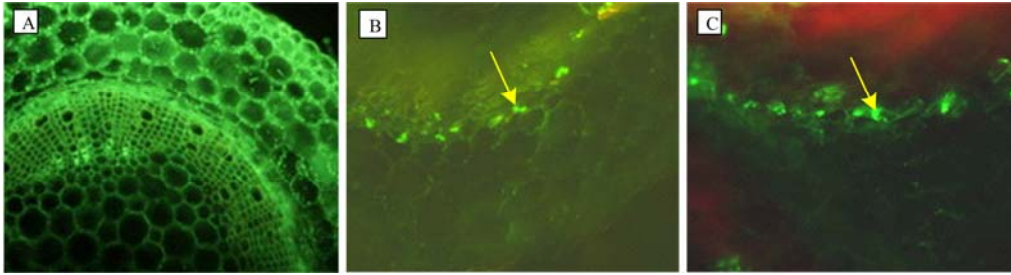
框里为测定的田间样品的植原体 16Sr RNA 基因序列 Inside of box are phytoplasma 16S rRNA gene sequences of collected samples

图 3 基于 16Sr RNA 基因序列分析用 MEGA3.1 建立的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree constructed by MEGA3.1 based on 16S rRNA gene sequences from representative phytoplasma strains

将采集的 4 种患病作物辣椒、山药、花生和南瓜的新鲜组织（叶柄、枝条和根）徒手切片后进行间接免疫荧光观察，结果显示，在患病组织横切片韧皮部筛管位置均未观察到植原体 *tuf* 蛋白特异性翠绿色

FITC 荧光（图未列出），阳性对照 PaWB-HZ 及 PaWB-PY 的组织中的相同位置则可以观察到大量的植原体翠绿色荧光，健康的泡桐中未观察到此特异荧光（图 4）。



A: 健康泡桐; B: 感染 PaWB-PY 的泡桐; C: 感染 PaWB-HZ 的泡桐; 箭头指的是特异荧光所在的位置

A: Healthy paulownia; B: Paulownia infected with PaWB-PY; C: paulownia infected with PaWB-HZ; Arrowhead indicates the localization of emitted fluorescence

图 4 PaWB-BJ 和 PaWB-HZ 间接免疫荧光观察结果

Fig. 4 Immunofluorescence detection by the EF-TU protein antibody in cross sections of PaWB-PY and PaWB-HZ infected plant

### 3 讨论

本研究结果显示，引起皱叶症状的辣椒和黄化、矮缩的花生样品检出的植原体均属于 16SrI-D 亚组，而已报道的辣椒僵顶病和花生丛枝病的病原分别由三叶草簇叶组 16SrVI<sup>[21]</sup>和属于 16SrII 组的花生丛枝植原体<sup>[22]</sup>引起，其它几种植物均没有植原体病害的相关报道，关于 16SrI-D 组植原体是否是引起这些植株异常的主要原因尚待进一步试验证实。

一些研究发现，在澳大利亚番木瓜植原体发生地块的作物和杂草上，能够通过 PCR-RFLP 检测到植原体的多达 6 种不同 RFLP 类型株系，但 2 个优势类型占检测总比例的 94%以上<sup>[23]</sup>。这种在一种植原体群体内的 16S rDNA 序列的多样性常常被检测到<sup>[24]</sup>。本研究不同植物上扩增产物存在的序列的个别碱基差异可能与植原体在不同寄主植物上可能出现的优势菌株变化或寄主适应性基因突变有关。

笔者田间的调查结果显示，山药黄化对植株的生长影响最为明显，其次是花生和辣椒等作物。由于山药通过营养繁殖，植原体对其生长和繁殖的影响可能比花生和辣椒等一年生种子繁殖作物要大得多。从植原体的检出几率来看，山药的检出率明显高于花生和辣椒等植物（表 3），这可能与后两者只会当年被感染发病，而山药可能一年前或更早早就已被感染，病原在植株体内不断积累有关。植原体能够引起植物丛枝、

黄化、簇生、矮化和顶枯等典型症状，而本研究检测结果发现，检测到植原体的植物症状表现多数为黄化、小叶和皱叶等不正常现象，少数为无明显症状。阴性的直接 PCR 结果和其它研究报道判断，植原体引起的单纯表现叶片黄化和生长衰退症状的病组织中，病菌的浓度低于表现典型丛枝症状的植原体病组织浓度，这可能是常遇到的现象<sup>[25]</sup>。过去许多不明病因的病害往往被认为是其它生理性病害或由病毒、缺素引起的，但是没有排除与植原体侵染的关系，而从表现黄化症状的植株中检测出低浓度的植原体一直是被中国植原体研究学者忽视的重要问题。由于植原体人工培养和分类鉴定手段的局限性，增加了明确一种植原体寄主范围的困难<sup>[26]</sup>。本研究结果显示，巢式 PCR 技术和序列分析手段是研究黄化类型植原体病害诊断、病原检测和鉴定的有效途径。而基于植原体 *tuf* 蛋白抗体进行的间接免疫荧光检测结果显示，仅在 2 个地区的泡桐丛枝病植株中检测到特异的翠绿色荧光，而不能从用巢式 PCR 检测阳性的、表现黄化、皱叶及小叶植物组织中检测到植原体特性抗原，这进一步表明植原体在这些患病植物组织中的浓度不高。

进一步明确泡桐丛枝病的自然寄主范围，对全面揭示泡桐丛枝病的病害循环、制订切实可行的病害防治策略具有十分重要的意义。在河南、山东等病区推广脱毒泡桐育苗过程中，也发现在周围不存在泡桐丛枝病树的育苗地中脱毒营养钵苗定植当年或次年仍出

现零星发病苗木, 这很可能与附近存在其它未被注意的带毒寄主植物或带毒昆虫有关(田国忠等 2008 年未发表资料)。本研究为解决 PaWB 的传播和流行学的疑难问题、提高病害的防治水平及未知疑难病害的诊断都具有重要的指导作用和提供新的研究思路。

## 4 结论

本试验运用分子生物学方法对泡桐丛枝植原体周围存在的其它植物之间的关系进行了调查。通过植原体 16S rRNA 基因通用引物 R16mF2/R16mR1 和巢式 PCR 通用引物 R16F2/R16R2 对泡桐丛枝病病树周围的自然植物进行了检测。首次从 7 种植物中扩增到植原体 1.2 kb 的 16S rRNA 基因, 并且克隆测定到了它们的核苷酸序列。通过和 GenBank 已登录的植原体的 16S rDNA 序列进行序列比对分析, 确定了它们均属于 16SrI-D 亚组的分类地位。根据序列比对和对病害发生自然环境的分析, 初步筛选出了除过去已知的自然感染泡桐属种类 (*Paulownia* spp.) 和人工接种发病的长春花植物之外的可能被 PaWB 自然感染的植物种类共 7 种, 均采自山东菏泽泡桐间作田地, 包括 4 种经济作物: 辣椒、花生、南瓜和山药, 3 种杂草: 灯笼泡、牛筋草和狗尾草。

## References

- [1] Marcone C, Lee I M, Davis R E, Seemuller E. Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and tuf gene sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50: 1703-1713.
- [2] Lee I M, Gundersen-Rindal D E, Davis R E, Bartoszyk I M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic and Bacteriology*, 1998, 48: 1153-1169.
- [3] Wei W, Davis R E, Lee I M, Zhao Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16S rRNA genes: identification of ten new phytoplasma groups. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007, 57: 1855-1867.
- [4] 金开璇, 梁成杰, 邓丹荔. 泡桐丛枝病传毒昆虫研究. 林业实用技术, 1981(12): 23-24.  
Jin K X, Liang C J, Deng D L. Research on the pathogen transmitted insect of paulownia witches'-broom. *Forest Science and Technology*, 1981(12): 23-24. (in Chinese)
- [5] 金开璇, 付仓生, 李振兰, 张为俊. 泡桐丛枝病病原及传毒途径的研究. 林业科学, 1978(4): 1-4.  
Jin K X, Fu C S, Li Z L, Zhang W J. Research on the pathogen and infection of witches-broom of paulownia. *Scientia Silvae Sinicae*, 1978(4): 1-4. (in Chinese)
- [6] 郑文锋, 宋晓斌, 任锁堂, 奥恒毅, 东子亭. 泡桐丛枝病病原及传毒途径的研究. 陕西林业科技, 1990(1): 23-25.  
Zheng W F, Song X B, Ren S T, Ao H Y, Dong Z T. Research on the pathogen and virus spread of witches-broom of paulownia. *Shaanxi Forest Science and Technology*, 1990(1): 23-25. (in Chinese)
- [7] Tian G Z, Raychaudhuri S P. Paulownia witches'broom disease in China: present status//Raychaudhuri S P, Maramorosch K, eds. *Forest Trees and Palms: Diseases and Control*. New Dehli: Oxford and IBH, 1996: 227-251.
- [8] Doi Y, Asuyama H. Paulownia witches' broom disease//*Mycoplasma Diseases of Trees and Shrubs*. New York: Academic Press, 1981: 135-145.
- [9] 黄玉璋, 陈子文, 朱忠堂. 山东花生丛枝病研究初报. 植物病理学报, 1993, 23(3): 229-230.  
Huang Y Z, Chen Z W, Zhu Z T. A preliminary study of peanut witch's broom in Shandong. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1993, 23(3): 229-230. (in Chinese)
- [10] 金开璇. 泡桐丛枝病类菌原体(MLO)病原传染长春花研究初报. 林业科学研究, 1988, 1(1): 106-109.  
Jin K X. A preliminary study on transmission of paulownia witches'-broom from paulownia to periwinkle dodder. *Forest Research*, 1988, 1(1): 106-109. (in Chinese)
- [11] 仵光俊, 陈志杰, 张美荣, 张淑莲, 吴云峰. 辣椒发生的一种类菌原体新病害. 植物病理学报, 1994, 24(1): 51-55.  
Wu G J, Chen Z J, Zhang M R, Zhang S L, Wu Y F. A new pepper disease caused by MycoplasmaLike Organism (MLO). *Acta Phytopathologica Sinica*, 1994, 24(1): 51-55. (in Chinese)
- [12] Salehi M, Izadpanah K, Nejat N, Siampour M. Partial characterization of phytoplasmas associated with lettuce and wild lettuce phyllodies in Iran. *Plant Pathology*, 2007, 56: 669-676.
- [13] 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. 植物病理学报, 2007, 37(4): 390-397.  
Gu P W, Wu Y F, An F Q. Host range testing and RFLP analysis of wheat blue dwarf phytoplasma. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007, 37(4): 390-397. (in Chinese)
- [14] Gao R, Zhang G M, Lan Y F, Zhu T S, Yu X Q, Zhu X P, Li X D. Molecular characterization of phytoplasma associated with rose witches'-broom in China. *Journal of Phytopathology*, 2008, 156: 93-98.
- [15] Wang J, Zhu X P, Li X D, Lin C L, Gao R, Li Y, Xu Q C, Piao C G, Li H F, Tian G Z. Cloning and expression of Paulownia



- witches'-broom phytoplasma (EF-Tu) tuf gene in *Escherichia coli* and antiserum preparation. (Paper presented at the 9<sup>th</sup> International Congress of Plant Pathology, Torino, Italy). *Journal of Plant Pathology*, 2008, 90 (Suppl. 2): 465.
- [16] 刘小勇, 田素忠, 秦国夫, 沈瑞祥. 提取植物和微生物 DNA 的 SDS-CTAB 改进法. 北京林业大学学报, 1997, 19(3): 100-103.  
Liu X Y, Tian S Z, Qin G F, Shen R X. An improved method for extracting DNA from plants and microorganisms using SDS-CTAB. *Journal of Beijing Forestry University*, 1997, 19(3): 100-103. (in Chinese)
- [17] Lee I M, Gundersen D E, Hammond R W, Davis R E. Use of mycoplasmaLike organism (MLO) group-specific oligonucleotide primers for nested-PCR assays to detect mixed-MLO infections in a single host plant. *Phytopathology*, 1993, 84(6): 559-566.
- [18] Gundersen D E, Lee I M, Schaff D A, Harrison N A, Chang C J, Davis R E, Kingsbury D T. Genomic diversity and differentiation among phytoplasma strains in 16S rRNA groups I (aster yellows and related phytoplasmas) and III (X-disease and related phytoplasmas). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 1996, 46(1): 64-75.
- [19] Lin C L, Zhou T, Li H F, Fan Z F, Li Y, Piao C G, Tian G Z. Molecular characterisation of two plasmids from paulownia witches'-broom phytoplasma and detection of a plasmid encoded protein in infected plants. *European Journal of Plant Pathology*, 2009, 123: 321-330.
- [20] 田国忠, 张锡津, 朱水方, 张成良, 罗 飞, 黄文胜. 间接免疫荧光技术检测泡桐丛枝病原 MLO 的研究. 林业科学研究, 1996, 9(1): 1-6.  
Tian G Z, Zhang X J, Zhu S F, Zhang C L, Luo F, Huang W S. Detection of mycoplasma-like organism in the infected paulownia by indirect immunofluorescence microscopy. *Forest Research*, 1996, 9(1): 1-6. (in Chinese)
- [21] Castro S, Romero J. The association of clover proliferation phytoplasma with stolbur disease of pepper in Spain. *Journal of Phytopathology*, 2002, 150(1): 25-29.
- [22] Gundersen D E, Lee I M, Rehner S A, Davis R E, Kingsbury D T. Phylogeny of mycoplasmaLike organisms (phytoplasmas): A basis for their classification. *Journal of Bacteriology*, 1994, 176(17): 5244-5254.
- [23] Padovan A C, Gibbs K S. Epidemiology of phytoplasma diseases in papaya in Northern Australia. *Journal of Phytopathology*, 2001, 149: 649-658.
- [24] Amaral Mello A P O, Bedendo I P, Camargo L E A. Sequence heterogeneity in the 16S rDNA of tomato big bud phytoplasma belonging to group 16SrIII. *Journal of Phytopathology*, 2006, 154: 245-249.
- [25] Berges R, Rott M, Seemuller E. Range of phytoplasma concentration in various plant hosts as determined by competitive polymerase chain reaction. *Bacteriology*, 2000, 90(10): 1145-1152.
- [26] McCoy R E, Caudwell A, Chang C J. Plant diseases associated with mycoplasmaLike organisms//Whitcomb R F, Tully J G, eds. *The Mycoplasmas*. New York: Academic Press, 1989: 545-560.

(责任编辑 毕京翠, 李 莉)