新疆田旋花丛簇病植原体的分子鉴定

石宝萍，李成亮，都业娟，向本春

（石河子大学，绿洲农作物病害防控重点实验室，新疆 石河子 832000）

摘　要：为明确新疆田旋花丛簇病植原体的分类地位，现利用植原体16S rRNA基因通用引物P1/P7和R16F2n/R16R2对新疆石河子地区表现丛簇症状的田旋花植株总DNA进行巢式PCR扩增，并对扩增片段进行克隆和测序。结果表明：田旋花丛簇病植原体16S rRNA基因片段长1 229 bp(Genbank No.:KC414725)，该分离物在系统发育树中与植原体16SrII组花生丛枝组(*Peanut witches'* broom)成员聚集在一起，与该组成员中的茄子巨芽Eggplant big bud(JX083377)植原体同源性最高，达到98%。因此确定田旋花丛簇病植原体是16SrII组成员。

关键词：田旋花；丛簇病；植原体；分子鉴定

中图分类号：Q 813.1　**文献标识码**：A　**文章编号**：1001－0009(2013)19－0114－04

植原体属于柔膜菌纲，是一类缺少细胞壁的原核生物，多发现于植物韧皮部筛管细胞内，与植物的衰退、叶片黄化或畸形等症状有关[1]。到目前为止，世界上报道的植原体病害已有1 000多种，早期对植原体的鉴定主要是通过生物学特性，如感染植原体植株表现的症状、与昆虫介体的相互关系等。但这些方法费时费力，结果也不是很可靠[2]。随着PCR技术等分子生物学方法在植原体研究中的应用，才使得对植原体的研究出现了新的突破[3]。16S rDNA是原核生物染色体基因组中的一种编码区序列，在进化中高度保守，因此常被用作原核生物系统发育及分类研究的标准方法[4]。

田旋花(*Convolvulus arvensis* L.)为田间有害杂草，以药用为主，全草可入药，能调经活血，滋阴补虚，止痒，祛风，主治神经性皮炎，牙痛，风湿性关节痛。另外，由于田旋花蛋白质含量较高，粗纤维低，氨基酸含量也较全面，有时也作为牛羊等的低等植物饲料[5]。为探究采集到的表现丛簇症状的田旋花植株所感染的植原体的种类，该研究采用分子生物学技术对田旋花总DNA提取后进行植原体16S rRNA基因片段PCR扩增[6]，并对扩增片段克隆、测序，将此序列与已知的植原体16S r各组中的代表性植原体构建系统发育进化树和核酸序列同源性比对从而鉴定该植原体，明确了其分类地位。

第一作者简介：石宝萍(1985-)，女，硕士研究生，研究方向为植物病毒与病害防治。

责任作者：向本春(1958-)，男，博士，教授，博士生导师，现主要从事植物病理学研究等工作。

基金项目：国家科技支撑计划资助项目(2011BAD48B00)；石河子大学自然科学创新团队资助项目(2011ZRKXTD-0205)。

收稿日期：2013－05－14

1　材料与方法

1.1　试验材料

供试材料为表现丛簇症状的田旋花植株，编号为TXH-3、TXH-4、TXH-5，采自新疆石河子地区大学试验站。莴苣黄花植原体阳性克隆由实验室保存，感受态细胞菌株大肠杆菌DH5α由实验室提供，克隆载体PMD18-T等购自大连TaKaRa宝生物工程有限公司。质粒小量制备试剂盒、胶回收试剂盒采用天根生化科技公司产品；PCR引物由华大基因科技股份有限公司合成；其余试剂为进口或国产分析纯化[7]。

1.2　试验方法

1.2.1　田旋花丛簇植株总DNA提取　总DNA提取材料为所采植株的叶片和细弱的丛生枝节，方法采用CTAB法。主要参照Ahrens等[8]的方法，并稍作改动，提取的总DNA于－20℃冰箱中保存备用。

1.2.2　田旋花丛簇植原体引物设计及PCR反应条件　用植原体16S rRNA基因通用引物进行PCR扩增，参照李正男等[9]的植原体16Sr RNA基因通用引物P1/P7，然后以此扩增产物为模板用R16F2n/R16R2进行巢氏PCR。引物序列如下：P1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGA-3')，P7(5'-CGTCCTCATCGGCTCTT-3')；R16F2n(5'-GAAACGACTGCTAAGACTGG-3')，R16R2(5'-TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG-3')。PCR反应体系为25 μL，直接PCR以植株总DNA为模板，P1/P7为引物。反应循环为94℃预处理4 min，94℃ 45 s，51℃ 1 min，72℃ 2 min，共35个循环，最后72℃延伸10 min。巢式PCR以直接PCR扩增产物为反应模板，以R16F2n/R16R2为引物，退火温度升高至57℃，其余反应条件同直接PCR。Marker为DNA Ladder marker

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

2 000(大连 TaKaRa 宝生物工程有限公司)。PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶中电泳,经溴化乙锭染色后,在紫外透射台上观察。

1.2.3 PCR 产物的纯化、克隆和测序 回收 PCR 目标条带,具体操作过程参照试剂盒说明书。感受态细胞制备采用 Costa[10] 氯化钙法,连接到载体 PMD18-T 并转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,在麦康凯培养基上涂板筛选挑取白色菌落摇菌培养,经 PCR 鉴定为阳性的重组质粒送北京华大基因科技发展有限公司测序[11]。

1.2.4 构建系统发育树和序列同源性比较 将所得 DNA 序列提交 GenBank 并进行 BLAST 比对,与 NCBI 中已知序列进行同源性比较,采用 DNAMAN(Version 4.0)软件,分析所测序列的 G+C 含量。根据 Lee 等[12] 1998 年重新修订的植原体新的分类体系,将获得的序列与植原体 16S r 组中各个代表性植原体的 16S rRNA 基因核苷酸序列进行比较[13],用软件 MEGA 5.1 构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 感病植株的症状表现

田间采集丛簇病的田旋花症状如下:植株部分枝节簇状着生,簇生枝节细弱,叶片浅绿色或黄色,带有斑驳或条纹,叶片变小、卷曲。

2.2 田旋花丛簇病植原体 16S rRNA 基因 PCR 片段扩增

从图 1 可以看出,电泳检测后植株 TXH-5 扩增得到约 1 300 bp 的目标片段,而其它植株未扩增得到所需目标条带,以健康田旋花叶片总 DNA 为模板的阴性对照未扩出特异片段。这表明表现丛簇症状的田旋花植株 TXH-5 中存在植原体。将这个植原体株系命名为田旋花丛簇植原体(*Convolvulus arvensis* cluster,CAC)。

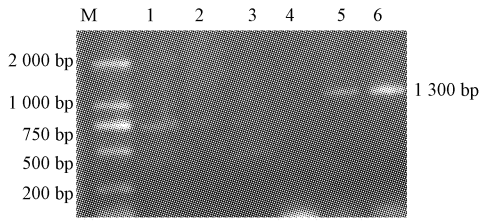

图 1 田旋花丛簇病植原体 16S rDNA 片段的巢式 PCR 扩增

注:M:DNA 分子标记 DL 2 000;1:ddH_2O 空白对照;2:健康田旋花植株阴性对照;3、4、5:田旋花植株 TXH-3、TXH-4、TXH-5;6:莴苣黄花植原体阳性对照。

Fig. 1 Nested-PCR amplification of *Convolvulus arvensis* cluster phytoplasma's 16S rDNA

Note: M: DL 2 000 marker; 1: Double distilled water; 2: Healthy *Convolvulus arvensis* as negative control; 3, 4, 5: collected *Convolvulus arvensis* cluster phytoplasma's plants TXH-3, TXH-4, TXH-5; 6: *Lactuca sativa* yellows phytoplasmas as positive control.

2.3 田旋花丛簇病植原体 16S rRNA 基因的序列分析和同源性比较

将扩增到的特异片断克隆并测序。结果表明,16S rDNA 基因扩增片段含有 1 229 个核苷酸(GenBank 登录号:KC414725),G+C 的含量为 47.6%,符合植原体 16S rRNA 基因 G+C 含量(47%～48%)[14]。将测序所得序列在 NCBI 中进行 BLAST 序列比对,发现该基因片段与植原体的 16S rRNA 基因序列一致率很高,与其它组植原体代表植株 16S rDNA 序列的相似性为 84.5%～98%;16SrII 组植原体利用 MEGA 软件分析 16S rDNA 的一致率,可以看出,田旋花丛簇病株系 CAA 植原体与 16SrII 组植原体成员 16S rRNA 基因序列相似性最高,达 97%～98%,与 16SrII 组 Eggplant big bud (Genbank No.:JX083377)的序列同源性最高达到 98%。将它与 GenBank 中已登录的其它相关植原体的 16S rRNA 基因序列构建成系统发育进化树(图 2),结果表明,该植原体与花生丛枝组(PnWB,16SrII)植原体聚为一簇,并与 EBB-A(JX083377)处于同一个分支,亲缘关系最近,与其它植原体有着较远的进化距离,综合 16S rRNA 基因序列核苷酸序列一致率和系统进化树分析的结果,初步推断该植原体属于 PnWB(16SrII)组。

3 结论与讨论

该试验对疑似感染植原体的田旋花显症植株进行了分子鉴定。通过巢式 PCR 技术,利用植原体 16S rRNA 基因的通用引物,完成 16S rDNA 特异性片段的克隆和序列分析,明确了田旋花丛簇病是植原体病害,且初步证实了感染田旋花的该种植原体种类是 16SrII 组[15]。廖晓兰等[3]指出,欧洲有发现 16S X 组旋花属植物黄化植原体,意大利有发现旋花属植物僵顶植原体[16],但国内尚无田旋花上植原体病害报道。对表现疑似植原体感染但从中没有扩增得到目标片段的田旋花植株,有可能是其它病原感染所引起的症状。我国对植原体病害的研究主要集中在 16SrI 组、16SrV 组,还有 16SrII 组,这和已知的地理位置对植原体分布的影响是统一的。

田旋花是一种十分常见的田间杂草,与农作物争夺养料、生存空间,以往对田间杂草的去除方法是发现后及时铲除或是喷洒农药,可是喷洒农药往往会产生抗药性,铲除它们,它们的生命力十分顽强,和农作物缠绕在一起,很难清除。生物防止是一种比较好的防止方法,它安全、经济、有效,已经成为防除杂草的重要措施之一,杂草生物防治的基本技术是利用昆虫、细菌、真菌、病毒、线虫、食草动物等来控制杂草的发生、生长、蔓延[1]。植原体病害使田旋花不能正常生长,在一定程度上也起到了防治的效果,该病害对田旋花的影响还有待

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

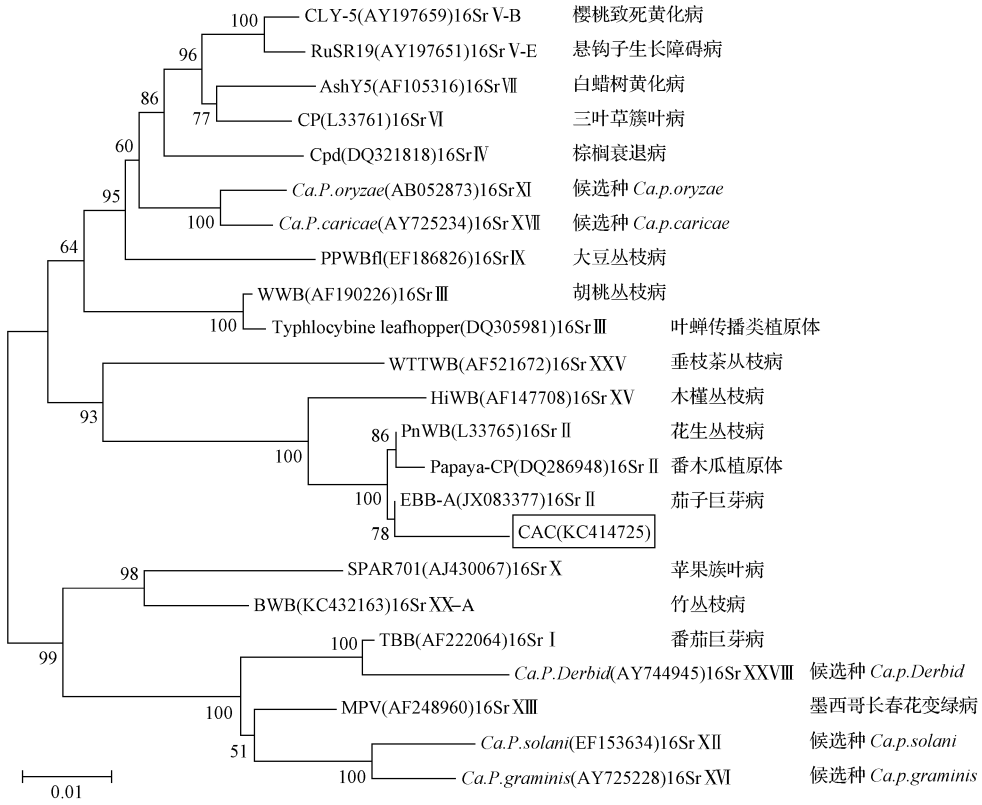

图 2　利用 MEGA 5.0 邻接法构建的有关田旋花丛簇植原体基于 16S rDNA 基因序列序列的系统发育树

Fig. 2　Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene of *Convolvulus arvensis* cluste and related phytoplasmas constructed with the Neighbour-Joining method by MEGA 5.0

于进一步研究观察。另外，植原体病害不能通过机械传播来传染，可是它可以通过介体昆虫和菟丝子来进行传播，那么在田间杂草田旋花上发生的该病害会不会通过介体昆虫等途径传播到田间经济作物上，也需要进一步对它进行研究。该试验研究结果对杂草田旋花的生物防止和植原体病害的传播有一定的理论指导意义。

参考文献

[1]　王真辉，陈秋波，郭志立，等. 假臭草丛枝病植原体 16S rDNA 检测与 PCR-RFLP 分析[J]. 热带作物学报，2007，28(4)：52-56.

[2]　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]. 微生物报，2003，43(1)：116-119.

[3]　廖晓兰，朱水芳，罗宽. 植原体的分类及分子生物学研究进展[J]. 植物检疫，2002，16(3)：167-172.

[4]　Lim P O，Sears B B. 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas[J]. Journal of Bacteriology，1989，171：5901-5906.

[5]　石峰，杨伟俊，于睿. 田旋花药材质量标准的研究[J]. 时珍国医国药，2009，20(10)：2542-2543.

[6]　罗燕娜，杜娟，李俊华. 棉苗立枯病拮抗菌的筛选及鉴定[J]. 石河子大学学报(自然科学版)，2010，28(5)：556-560.

[7]　秦荣，张伟，刘炜炜. dsRNA 介导的双价抗病毒沉默载体的构建[J]. 石河子大学学报(自然科学版)，2012，30(4)：430-433.

[8]　Ahrens U，Seeüller E. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16SrRNA gene[J]. Phytopathology，1992，82：828-832.

[9]　李正男，张磊，吴云锋. 丁香卷叶病植原体的分子鉴定[J]. 植物病理学报，2012，42(2)：131-138.

[10]　Costa A S. Duas novas molesti as devirus do tomate iroem Sao Paulo[J]. Biological，1949，15：79-81.

[11]　任娟，孙佰平，杜娟. 枯草芽孢杆菌 S44 菌株 ituD 基因的克隆及原核表达[J]. 石河子大学学报(自然科学版)，2012，30(5)：578-581.

[12]　Lee I M，Gundersen Rindal D E，Davis R E，et al. Revised classification scheme of phytoplasma based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences[J]. International Journal of Systematic Bacteriology，1998，48：1153-1169.

[13]　秦国夫，赵俊，刘小勇. 植原体分子分类的现状与存在的问题[J]. 林业科学，2002，38(6)：125-136.

[14]　Zhao Y，Sun Q R，Wei W，et al. '*Candidatus* Phytoplasma tamaricis'，a novel taxon discovered in witches' broom diseased salt cedar (*Tamarix chinensis* Lour.)[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology，2009，59：2496-2504.

[15]　顾沛雯，安凤秋，吴云峰，等. 小麦蓝矮病植原体 16S rDNA 基因片段的比较分析[J]. 植物病理学报，2005，3(5)：403-411.

[16]　Lee I M，Davis R E，Gundersen D E. Phytoplasma：phytopathogenic mollicutes[J]. Annual Review of Microbiology，2000，54：221-255.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

不同苦瓜材料农艺性状调查及白粉病抗性分析

刘子记,刘昭华,牛　玉,杨　衍

(中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所,农业部华南作物基因资源与种质创制重点开放实验室,海南 儋州 571737)

摘　要:以18份苦瓜自交系为试材,调查了其农艺性状,并对其白粉病抗性进行评价。结果表明:不同苦瓜材料农艺性状及抗病性差异显著,筛选出抗病材料8份,极早熟材料6份,为苦瓜优良品种选育和推广提供了依据。

关键词:苦瓜;种质资源;白粉病;农艺性状

中图分类号:S 642.5　**文献标识码**:A　**文章编号**:1001－0009(2013)19－0117－03

苦瓜(*Momordica charantia* L.)属葫芦科(Cucurbitaceae)苦瓜属(*Momordica* L.)1 a生草本植物。苦瓜营养价值很高,富含维生素C、维生素E、氨基酸及矿物质。此外,苦瓜所含的药理活性成分具有抗突变[1]、降血糖[2-3]、抗肿瘤[4-6]、降低胆固醇含量[7]等功效。随着大众对苦瓜营养价值和药用价值的充分认识,我国苦瓜生产迅速发展,栽培面积逐年扩大,大大促进了经济的发展。但近年来,由于连作现象比较严重,加之高温高湿的气候条件容易造成苦瓜病虫害的发生与蔓延。

苦瓜白粉病主要是由二孢白粉菌(*Golovinomyces cichoracearum*)及瓜类单囊壳菌(*Podosphaera xanthii*)引起的危害苦瓜生产的一种常见病害。该病原菌寄主范围广泛,可寄生在多种葫芦科作物上,具有生理小种多、变异速度快的特点,对温度和湿度的适应范围较广[8]。主要危害叶片、叶柄和茎,苗期至收获期均可染病,田间发病率可高达100%,造成植株叶片褪绿、变黄,光合作用降低,影响果实发育,植株早衰,缩短采收期,导致减产40%以上[9]。白粉病已成为制约苦瓜无公害生产的关键性因素。

对苦瓜白粉病的防治主要采取加强栽培管理、化学防治和种植抗病品种等措施。与加强栽培管理和化学防治相比,培育和推广抗病品种是防御瓜类白粉病最为经济、有效和环保的措施,对于提高苦瓜产量、增加经济效益具有重要意义。筛选优良种质资源是苦瓜遗传育种的基础,该研究通过对苦瓜种质资源进行苗期白粉病

第一作者简介:刘子记(1982-),男,博士,助理研究员,研究方向为蔬菜分子生物学及遗传育种。E-mail:liuziji1982@gmail.com.

责任作者:杨衍(1971-),男,博士,副研究员,研究方向为苦瓜遗传育种。E-mail:catasvegetable@gmail.com.

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所)资助项目(1630032012007);海南省自然科学基金资助项目(312025;311072)。

收稿日期:2013－05－16

Molecular Identification of Phytoplasma Strain Associated with *Convolvulus arvensis* Cluster Disease in Xinjiang

SHI Bao-ping, LI Cheng-liang, DU Ye-juan, XIANG Ben-chun

(Key Laboratory for the Prevention and Control of Oasis Crop Disease, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000)

Abstract: In order to identify the taxonomic status of phytoplasma of *Convolvulus arvensis* cluster disease in Xinjiang, using phytoplasma universal primers P1/P7 and R16F2n/R16R2 for 16S rRNA gene to detect phytoplasma in *Convolvulus arvensis* showing symptoms of cluster disease in Xinjiang Shihezi area. The target fragment was amplified from the total DNA by nested-PCR, then it was cloned and sequenced. The results showed that the 16S rRNA gene of *Convolvulus arvensis* cluster phytoplasma consists of 1 229 bp (Genbank No.: KC414725), it clustered together with the members of phytoplasma *Peanut witches'* broom (16SrII) group, and shared a high similarity(98%) with the phytoplasma EBB-A (Eggplant big bud) belongs to 16SrII. So it was confirmed that the phytoplasma strain *Convulus arvensis* cluster disease was the member of phytoplasma 16SrII group.

Key words: *Convolvulus arvensis*; cluster disease; phytoplasma; molecular identification

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn