

水稻橙叶病植原体 16S rDNA 基因的序列分析

张松柏^{1,2}, 张德咏², 罗香文², 张曙光¹, 李华平¹

(1 华南农业大学 植物病毒研究室, 广东 广州 510642; 2 湖南省农业科学院 植物保护研究所, 湖南 长沙 410125)

摘要:利用植原体 16S rDNA 通用引物对水稻橙叶病发病植株的 DNA 进行了 PCR 扩增和基因克隆. 序列测定表明, PCR 扩增的片段全长为 1 853 bp, 包括 1 527 bp 的水稻橙叶病植原体(RYL)的 16S rDNA 基因全序列、234 bp 的邻近间隔区的序列及部分(92 bp)23S rDNA 基因序列. 序列比较结果表明, RYL 的 16S rDNA 全序列与其他植原体的相似性在 88% ~ 95%, 其中与 America aster yellows(AAY, GenBank 登录号 X68373)最高相似性为 95%. 利用最大简约法构建的 16S rDNA 系统演化树结果表明: RYL 与 AAY 亲缘关系最近, 同被聚类为翠菊黄化组(16Sr I).

关键词:水稻橙叶病; 植原体; 16S rDNA; 序列分析

中图分类号: S432.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)02-0037-03

Sequence Analysis of 16S Ribosomal DNA of Phytoplasma Associated with Rice Orange Leaf

ZHANG Song-bai^{1,2}, ZHANG De-yong², LUO Xiang-wen², ZHANG Shu-guang¹, LI Hua-ping¹

(1 Laboratory of Plant Virology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agricultural Science, Changsha 410125, China)

Abstract: One set of the conserved primers was designed to amplify a 1 853 bp fragment which included 16S rDNA (1 527 bp), adjacent spacer sequence (234 bp) and partial sequence of 23S rDNA (92 bp) by PCR from total DNA sample extracted from diseased rice as the amplified template. Nucleotide sequencing of the amplified fragment indicated that rice orange leaf phytoplasma shared nucleotide similarity about 88% to 95% with other phytoplasmas from data of GenBank, and a maximum similarity at 95% with America aster yellow phytoplasma. A phylogenetic tree based on 16S ribosomal DNA sequences was constructed and showed that rice orange leaf phytoplasma was clustered into the *Candidatus* phytoplasma asteris, group 16Sr I.

Key words: rice orange leaf disease; phytoplasma; 16S rDNA; sequence

植原体(Phytoplasma), 原称类菌原体(Mycoplasma-like organism, MLO), 能引起许多重要的粮食、蔬菜和果树以及观赏作物、林木的严重病害, 并造成巨大损失. 目前世界各地先后报道的植原体病害达 300 多种, 我国也报道了 70 余种, 且有不断增加的趋势. 20 世纪 70 至 80 年代, 我国河北玉田和北京密云等县金丝小枣发生枣疯病, 绝产绝收, 造成巨大的经济损失^[1]; 20 世纪 90 年代, 广东、云南等省部分地

区发生水稻橙叶病, 造成部分地区水稻绝产绝收, 给当地水稻生产带来严重损失^[2-3]. 核苷酸序列分析, 特别是 16S rDNA 的序列分析在植原体系统发育研究中广泛应用^[4], 植原体 16S rRNA 基因序列同源性分析是目前国际上植原体分类和鉴定的最重要的方法. 本研究采用 PCR 技术扩增到水稻橙叶病病原的 16S rDNA 片段, 并进行序列测定, 并将与已知的植原体序列共同构建系统发育树, 试图明确其与已知

收稿日期: 2008-07-02

作者简介: 张松柏(1980—), 男, 助理研究员, 硕士; 通讯作者: 李华平(1961—) 男, 教授, 博士, E-mail: huaping@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30370929, 30771407)

植原体种类的关系.

1 材料与方法

1.1 材料

水稻疑似病株,分别采集于广东省信宜的水稻品种博优 3550 和从化、高州的水稻品种博优 3550、博优 903. 采集的标样种植于防虫网室或直接保存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用.

Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA marker 和提取试剂(Tris-苯酚、EDTA、SDS 等)等购自北京鼎国生物技术有限公司;pGEM-T 载体、UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程技术有限公司.

1.2 方法

1.2.1 16S rDNA 序列的 PCR 扩增和克隆 DNA 的提取方法主要参考宋敏等^[5]的水稻 DNA 提取法,并进行修改. 取水稻病株和健株叶片中脉组织各 1 g 进行 DNA 提取;用含 100 g/L SDS 的提取缓冲液(150 mmol/L NaCl、100 g/L SDS、250 mmol/L Tris-HCl、50 mmol/L EDTA、 $\phi=0.1\%$ 巯基乙醇, pH 8.0) 替换 20 g/L CTAB 的提取缓冲液. 提取的 DNA 用 $\phi=70\%$ 的乙醇洗涤 2~3 次,干燥后,溶解于 50 μL 的 TE 中.

根据 Smart 等^[6]报道的植原体保守序列设计特异引物,扩增片段包括 16S rDNA 序列和 16S rDNA 与 23S rDNA 序列之间的间隔序列. 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成,其引物序列为:

P1(5'-AAGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATT-3'),

P7(5'-CGTCCTTCATC GGCTCTT-3').

PCR 反应体积为 25 μL ,其中 10 $\times$ PCR 缓冲液 2.5 μL 、DNA 模板 10 ng、200 $\mu\text{mol/L}$ 的 dNTP 0.5 μL 、25 pmol/L 引物各 1 μL 、2 U 的 *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μL . 反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,50 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min. 取 5 μL PCR 产物进行 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,检测 PCR 产物的大小和特异性. 通过 PCR 产物回收试剂盒纯化扩增的 DNA 片段,通过常规法克隆入 pGEM-T 载体,转化大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109,构建重组质粒.

1.2.2 序列同源性比较 序列测定由大连宝生物(华运)工程公司完成. 将测定的核苷酸序列登录到 GenBank,登录号为 EU093079. DNA 序列同源性比较通过国际互联网在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)

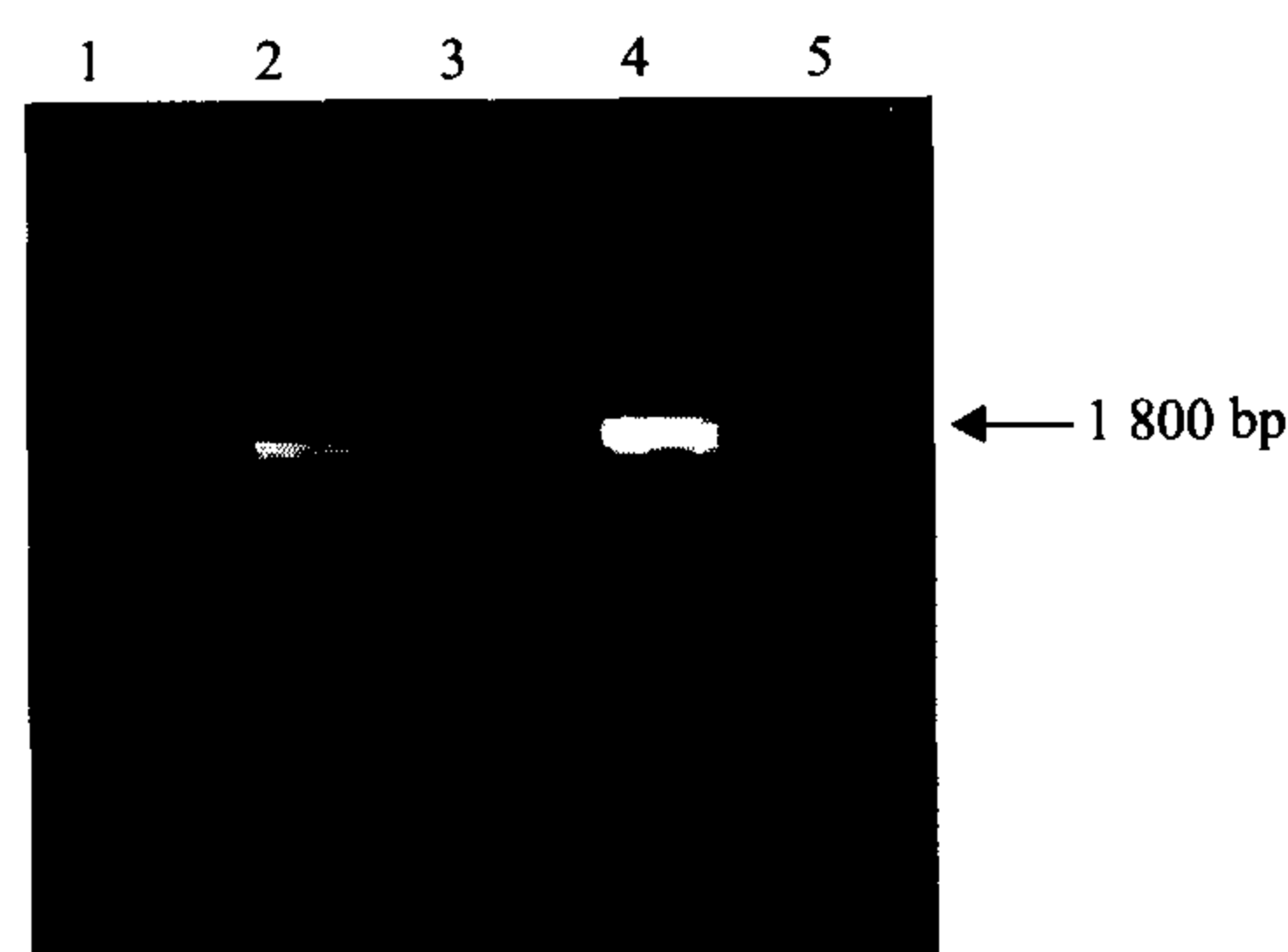
网站进行,利用此网站中的分析软件 Blastn 比较水稻橙叶病原 16S rDNA 序列与其他植原体 16S rDNA 序列同源性.

通过 Mega 3.1 软件将测定的水稻橙叶病植原体 16S rDNA 基因片段序列与已知植原体各组代表的相关序列进行同源性比较,并构建系统发育树,以 *Acholeplasma laidlawii* (M23932) 作为外群.

2 结果与分析

2.1 16S rDNA 序列扩增

水稻橙叶病病株总 DNA 经 PCR 扩增后产物经 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳,EB 染色,结果见图 1. 电泳结果显示,扩增片段大小约为 2 kb,与预计相符,而健康水稻与清水对照均未扩增出特异片段.



1: DNA Marker DL2000; 2、4: 发病水稻标样; 3: 健康水稻标样; 5: 清水对照

图 1 水稻橙叶病植原体 16S rDNA 片段 PCR 扩增产物凝胶电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis analysis of PCR products from rice orange leaf phytoplasma 16S rDNA

2.2 16S rDNA 序列同源性比较

测定的序列全长为 1 853 bp,包括 1 527 bp 的 16S rDNA 基因全序列、234 bp 的邻近间隔区的序列及部分(92 bp)23S rDNA 基因序列. 16S rDNA 基因 G + C 质量分数为 56.73%,在其基因 3'末端含有植原体 3'末端保守序列 GATCACCTCCTTTCT. 用 blastn 在 GenBank 中搜索同源序列,结果发现,水稻橙叶病植原体(RYL)的 16S rDNA 全序列与其他植原体的相似性在 88%~95%,其中与 America aster yellow(AAY, GenBank 登录号 X68373)最高相似性为 95%.

2.3 16S rDNA 序列系统发育树构建与分析

通过 16S rDNA 片段序列的比较,利用 Mega 3.1 软件得出 RYL 和其他 12 个不同组的植原体的系统进化树状图(图 2). 由图 2 可见,水稻橙叶病植原体与 AAY 亲缘关系很近,二者聚为一个分枝,同属于 16Sr I 组植原体.

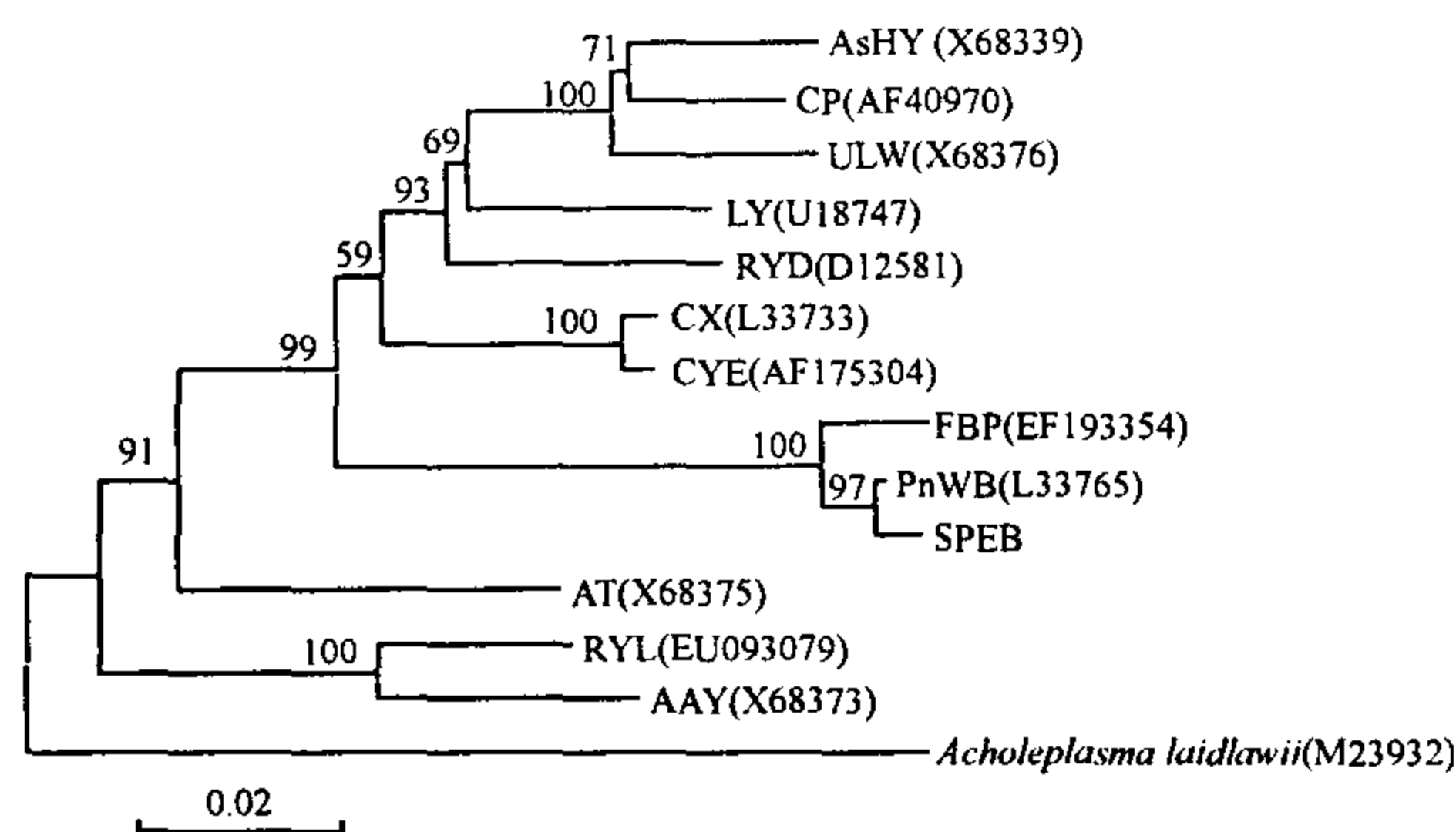


图2 基于水稻橙叶病植原体 16S rDNA 序列和其他相关植原体序列构建的进化树

Fig.2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence from rice orange leaf and other related phytoplasma groups, *Acholeplasma lailawii* (M23932) as the outgroup to boot the tree

3 讨论与结论

水稻橙叶病 1960 年在泰国报道零星发生,当时认为病原物可能是病毒,在未提取到病毒的情况下认为可能是生理病害^[7]。其后,在菲律宾、印度、马来西亚、印尼和斯里兰卡都有报道零星发生^[8-9]。当时仅仅是利用电镜和组织化学技术对病原菌进行了形态上的观察。我国对在华南地区发现水稻橙叶病的电镜和组织化学技术研究都认为该病害病原物是植原体^[2-3]。近年来,随着分子生物学的发展,采用 PCR 技术和测序手段比较不同植原体株系或分离物 16S rDNA 片段的遗传差异和同源性的研究方法已得到众多研究工作者的一致认可。本试验根据 Smart 等^[6]的报道设计的引物,利用 PCR 技术对水稻橙叶病植原体 16S rDNA 进行基因克隆和序列分析,从而进行系统分类研究,这在国内外鲜见报道。

本研究通过对 16S rDNA 基因片段的序列测定和同源性比较分析,发现水稻橙叶病植原体 (RYL) 与其他植原体的相似性在 88% ~ 95%,其中与 America aster yellows (GenBank 登录号 X68373) 最高相似性为 95%;聚类分析显示 RYL 与 America aster yellows 的亲缘关系很近而聚为同一分枝。根据 1996 年国际菌原学组织 (Internationalization for Mycoplas-

mology, IOM) 会议确认的分类系统,可以认为,水稻橙叶病植原体和翠菊黄化组 (16Sr I) 的 America aster yellows 植原体应同属于植原体 16Sr I 组。

到目前为止,翠菊黄化组 (16Sr I) 共有 9 个亚组^[4],水稻橙叶病病原的亚组分类地位,还需要进行该病原核糖体蛋白基因 (rp) 序列进行分析后才能最终确定。

参考文献:

- [1] 车海彦,罗大全. 植原体病害的检测方法研究进展[J]. 华南热带农业大学学报, 2006, 12(3): 69-72.
- [2] 沈菊英,陈作义,彭加木. 水稻橙叶病在云南的发生——病原的电子显微镜研究[J]. 植物病理学报, 1989, 19(3): 55-56.
- [3] 张曙光,范怀忠,肖火根,等. 广东新发生流行的水稻橙叶病的鉴定[J]. 植物病理学报, 1995, 25(3): 233-237.
- [4] The IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working-team phytoplasma taxonomy group. 'Candidatus phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects [J]. International Journal of Systemic Evolutional Microbiology, 2004, 54(4): 1243-1255.
- [5] 宋敏,张云孙,胡卫红. 4 种提取水稻基因组 DNA 方法的比较[J]. 云南大学学报, 2001, 23(1): 74-76.
- [6] SMART C D, SCHNEIDE B R, BLOMOUIST L, et al. Phytoplasma-specific PCR primers based on sequences of the 16S-23S rRNA spacer region[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1996, 18: 2988-2993.
- [7] LING N S, HSU Y H, HSU H T. Immunological detection of plant viruses and a mycoplasma-like organism by direct tissue blotting on nitrocellulose membranes[J]. Phytopathology, 1972, 80: 824-828.
- [8] 吴自强. 类菌原体研究现状与发展趋势[J]. 微生物学报, 1980, 21(1): 37-40.
- [9] SAITO Y, LING K C. MLO associated with rice orange leaf disease[J]. Plant Disease Reports, 1976, 60(8): 649-651.

【责任编辑 周志红】