

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.2021.01.006

杏褪绿卷叶植原体新疆分离物核糖体蛋白基因的克隆与序列分析

韩 剑^{1,2+*}, 陈 杭^{1,2+}, 艾克热木·买买提^{1,2}, 罗 明^{1,2}, 唐章虎³

¹新疆农业大学农学院, 新疆 乌鲁木齐 830052; ²新疆自治区高校农林有害生物监测与安全防护重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052; ³新疆农业科学院轮台国家果树资源圃, 新疆 轮台 841600

摘要:【目的】了解杏褪绿卷叶植原体新疆分离物的系统发育关系及遗传分化, 确定其分类地位。【方法】利用植原体核糖体蛋白(*rp*)基因的特异性引物 *rpF1*/*rpR1* 对新疆轮台县托克逊县杏褪绿卷叶病植株总 DNA 进行 PCR 扩增, 并对部分扩增片段克隆、测序及序列分析。【结果】获得杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 *rp* 基因片段大小为 1196 bp, 该片段包含部分 *rpS19* 以及 *rpL22* 和 *rpS3* 基因的全部序列。序列相似性和系统进化分析表明, 杏褪绿卷叶植原体新疆分离物与 16SrV-*rp* 亚组中的各代表性植原体的 *rp* 基因核苷酸序列相似性达到 95.7%~99.3%, 其中与 *rpV-C* 亚组的甜樱桃绿化植原体和枣疯病植原体的相似性最高, 核苷酸及氨基酸相似性分别达到 99.2%~99.3% 和 98.3%~98.4%。进一步虚拟 RFLP 分析, 发现杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 *rp* 基因的酶切图谱与 *rpV-C* 亚组成员相似性最高, 但在 *Mse* I、*Ssp* I 和 *Taq* I 的酶切位点上存在差异。综上初步判断其可能属于 16SrV 组(榆树黄化组)中的一个新 *rp* 亚组。【结论】本研究首次报道了杏褪绿卷叶植原体新疆分离物的 *rp* 基因序列, 确定了其分类地位, 为杏褪绿卷叶病的早期诊断和检测提供了基础。

关键词: 杏; 杏褪绿卷叶病; 植原体; 核糖体蛋白基因; 序列分析



Cloning and sequencing of the ribosomal protein gene of the phytoplasma of apricot chlorotic leaf roll in Xinjiang

HAN Jian^{1,2+*}, CHEN Hang^{1,2+}, AIKEREMU · Maimaiti^{1,2}, LUO Ming^{1,2}, TANG Zhanghu³

¹Agronomy Faculty, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China; ²Key Laboratory of Harmful Biological Monitoring and Safety Prevention of Xinjiang Autonomous Region Forestry Universities, Urumqi, Xinjiang 830052, China; ³Luntai National Pomology Germplasm Garden, Academy of Agricultural Science of Xinjiang, Luntai, Xinjiang 841600, China

Abstract: 【Aim】To examine the molecular phylogenetic relationship, genetic differentiation and taxonomic status of apricot chlorotic leaf roll (ACLR) phytoplasmas from Xinjiang isolates. 【Method】The ribosomal protein gene (*rp*) of the phytoplasma of apricot chlorotic leaf roll was amplified by PCR with the specific primer pairs *rpF1*/*rpR1* in the diseased apricot sample from Luntai County and Tuokexun County in Xinjiang Autonomous Regions, then the partial *rp* gene was cloned, sequenced and analyzed with other phytoplasmas. 【Result】The results showed that a 1196 bp DNA fragment was amplified from the infected apricot. The fragment included partial *rpS19* gene, complete *rpL22* and *rpS3* genes. The similarity and phylogenetic analyses showed that the sequence shared 95.7%–99.3% similarity with those of representative phytoplasmas in the 16SrV-*rp* subgroup. The NCBI blast results showed that the genetic distance of ACLR-Xinjiang isolates was closely related to the *rpV-C* subgroup, which shared the highest homology of nucleotide and amino acid sequences of 99.2%–99.3% and 98.3%–98.4% with the strains of prunus avium virescence phytoplasma and jujube witches'-broom phytoplasma. Furthermore, virtual RFLP analysis showed that the phytoplasma might belonged to a new subgroup within the elm yellows group (16SrV). The most similar was the reference pattern of the *rpV-C* subgroup (AB052876), but showed significant differences in the profile with *Mse* I, *Ssp* I and *Taq* I. 【Conclusion】This study reported the

收稿日期(Received): 2020-01-17 接受日期(Accepted): 2020-12-20
基金项目: 国家自然科学基金(31600011); 新疆维吾尔自治区研究生教育创新计划科研创新项目(XJGRI2017-072)
作者简介: 韩剑, 男, 副教授。研究方向: 农业微生物生物技术; 陈杭, 女, 硕士研究生。研究方向: 植原体病害
+ 同等贡献作者(The two authors contributed equally to this work)
* 通信作者(Author for correspondence), E-mail: hjwjemail@163.com

rp gene sequences of ACLR phytoplasmas and classified phytoplasma of ACLR in Xinjiang for the first time. It provides the basis for early diagnosis and detection.

Key words: apricot; apricot chlorotic leaf roll; phytoplasma; ribosomal protein gene; sequence analysis

杏褪绿卷叶病 (apricot chlorotic leaf roll, ACLR) 是危害杏树 *Armeniaca vulgaris* Lam. 的一种高致死性植原体病害。中国、欧洲和北美均将其列入进境植物检疫危险性病害名录 (Bertaccini *et al.*, 2004; Nečas *et al.*, 2005)。其寄主范围广泛, 可侵染杏、李 *Prunus salicina* Lindl.、桃 *Amygdalus persica* L.、樱桃 *Cerasus* spp.、扁桃 *Amygdalus communis* L. 和油桃 *Prunus persica* var. *nectarina* 等多种果树 (Trandafirescu *et al.*, 2011)。研究证明, 该病害传染性极强, 病原通过嫁接传染, 随无症状带菌苗木远距离传播, 介体昆虫 (木虱、叶蝉) 在感病树上取食后终生带菌保持感染力, 还可经卵传播 (Turk *et al.*, 2011)。赵京民 (1993) 对北京、河北、山西等地出现严重早期落叶的杏树植株的组织切片进行电镜观察, 初步判断可能是由类菌原体所致, 但未对病原进行鉴定和分类。李文慧等 (2007) 首次在新疆轮台县的杏园中发现了杏褪绿卷叶病疑似病株, 并通过电镜观察确定引起新疆杏褪绿卷叶病的病原为植原体。韩冰 (2012) 利用植原体 16S rDNA 基因通用引物对新疆杏褪绿卷叶病病株进行检测, 从分子水平证明新疆杏褪绿卷叶病的病原是植原体。

由于植原体至今无法分离培养, 难以采用纯培养的表型特征分类鉴定, 主要依据其基因组核酸序列和分子特征进行系统发育关系分析。16S rDNA 基因是植原体分类体系中的首选分子标记, 但大量研究表明, 16S rDNA 序列过于保守, 不足以对于亲缘关系较近的植原体作进一步划分 (Duduk *et al.*, 2008)。核糖体蛋白 (ribosomal protein, *rp*) 基因是植原体进化演变过程中一个重要的基因, 其在植原体株系间关系以及系统发育的研究中能够揭示更多有价值信息以及系统发育的标记, 能用于 16S rDNA 基因不易被区分的近缘株系的分类研究。Lee *et al.* (2000) 通过 16S rDNA 和 *rp* 基因相结合的 RFLP 分析, 将当时的植原体株系详尽地划分为 19 个组 46 个亚组。Martini *et al.* (2002) 基于 *rp* 基因进行系统发育研究, 将榆树黄化组 (16SrV) 划分为 12 个 *rp*V 亚组, 表明 *rp* 基因在划分亲缘关系更近的植原体株系中是一个有效的分子标记。在我

国, 蔡红等 (2003) 首次报道了长春花黄化植原体的 *rp* 基因, 并将其用于植原体系统分类研究。随后, 利用 *rp* 基因序列对枣疯病植原体 (王利平等, 2014)、泡桐丛枝病植原体 (和志娇等, 2014)、花生丛枝植原体 (万琼莲等, 2014) 等进行系统分类的研究也陆续被报道。目前, 国内尚未见关于杏褪绿卷叶植原体 *rp* 基因的研究报道。本研究对杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 *rp* 基因进行克隆和序列分析, 以期获取其分子特征信息, 分析其分子变异, 在亚组水平上确定其分类地位。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试样品: 2018—2019 年在新疆轮台县和托克逊县采集表现为叶片上卷、叶肉有不规则褪绿的疑似杏褪绿卷叶病样品 112 份, 将采集的叶片、枝条组织保存于保鲜袋内, 带回实验室后保存于 4 和 -20 °C 冰箱中。经植原体 16S rDNA 检测, 有 54 份样品确定为感病样品。普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、标准分子量 Marker 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。克隆载体 pMDTM19T 以及其他酶类等分子生物学试剂均购自大连宝生物工程有限公司 (TaKaRa)。

1.2 方法

1.2.1 杏树枝条韧皮部总 DNA 的提取 采用 CTAB 法 (Green *et al.*, 1999), 提取杏树多年生枝条韧皮部总 DNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量后, 置于 -40 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 *rp* 基因的 PCR 扩增 参照 Lee *et al.* (1998) 报道的植原体 *rp* 基因引物对序列进行 PCR 扩增: *rp*F1 (5'-GGAGTAAGGTGAATTT-3'), *rp*R1 (5'-ACG-TATTTACTTTTTGG-3')。PCR 扩增反应体系 (25 μ L): DNA 模板 2.0 μ L, 10 μ mol $\cdot$ L⁻¹ *rp*F1/*rp*F2 各 1.0 μ L, 10 mmol $\cdot$ L⁻¹ dNTPs 1.5 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer (2.5 mmol $\cdot$ L⁻¹ MgCl₂) 2.5 μ L, 2.5 U $\cdot$ μ L⁻¹ TaqDNA 聚合酶 0.5 μ L, 补足灭菌超纯水至 25 μ L。反应程序: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 1 min, 51 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 10 min。反应结束后取 PCR 扩增产物在添加 Goldview

染料的琼脂糖(浓度为 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)中进行电泳($1 \times \text{TAE}$ 缓冲系统),使用凝胶成像系统观察并保存拍摄图片。

1.2.3 PCR 产物的回收及克隆 将 PCR 产物中的特异性条带切下,采用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收,纯化。回收的 PCR 产物与载体 $\text{pMD}^{\text{TM}} 19\text{T}$ 在 $16 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下连接 2 h。将连接产物转化至 $\text{DH5}\alpha$ 感受态细胞中,在含有 X-gal ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、 IPTG ($50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)、 Amp ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 的 LB 琼脂平板上 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 14~16 h,形成单菌落。将筛选出的阳性单菌落接种于含 Amp ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) LB 液体培养基中,在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养过夜,提取质粒,用 rpF1/rpR1 进行 PCR 扩增、酶切鉴定。

1.2.4 序列测定与分析 随机选取 4 个含有目的片段的重组质粒送上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定。将所得序列在 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中进行 BLAST 检索,通过 DNASTar 软件将所得 rp 基因序列进行相似性比较,利用 MEGA 5.0 软件分析,邻接法构建系统进化发育树,同时利用 pDWAR 32 软件模拟实验室的 7 种限制性内切酶 (Alu I 、 Dra I 、 Hae III 、 Hha I 、 Mse I 、 Ssp I 、 Taq I) 对本研究获得的杏褪绿卷叶植原体和已报道的 16SrV-rp 亚组参考株系 (Martini *et al.*, 2007) 的 rp 基因序列 (rpF1/rpR1 扩增片段) 片段进行 RFLP 虚拟酶切分析。

2 结果与分析

2.1 新疆杏褪绿卷叶病危害现状及症状特点

本研究于 2017—2019 年连续 3 年对新疆轮台县、托克逊县等杏树生产区杏褪绿卷叶病发生情况进行调查。发现该病害有范围扩大、加重的趋势,目前在新疆轮台县、托克逊县、乌鲁木齐市周边均发现疑似病株,通过分子检测和嫁接传病试验确定为植原体病原。部分杏园的发病率已超过 30%,患病果园减产可达 20%~50%,严重影响杏果品质。调查发现,不同地区、不同品种的杏树中表现的症状基本相似,表现为叶片边缘沿叶脉向上卷。发病初期,感病植株的部分叶片会呈现卷叶症状,严重的整株叶片卷成筒状呈失水状,叶片表面呈现不规则的褪绿现象。发病植株果实的生长发育受到抑制,果实成熟期推迟,品质变劣,产量严重下降,并伴有落叶落果现象。发病植株随着发病年数的增长,病情逐渐加深,直至整株干枯、死亡(图 1)。

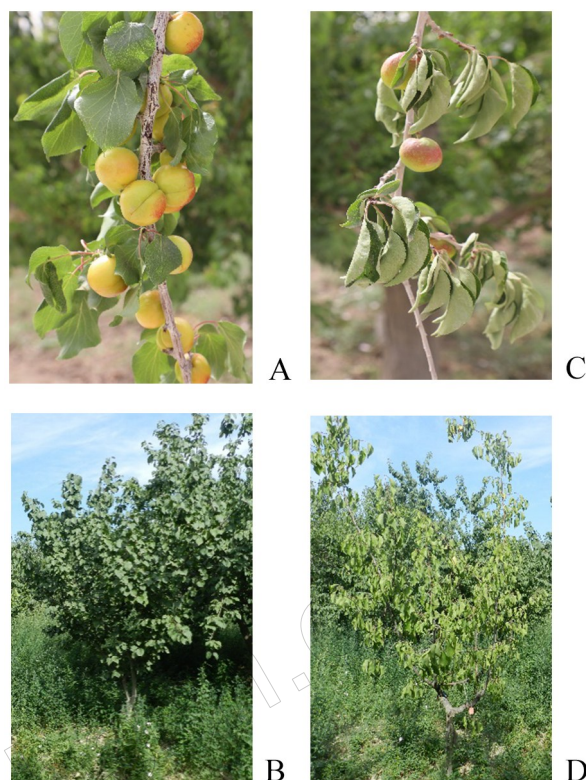


图 1 新疆杏褪绿卷叶病症状图

Fig.1 Apricot chlorotic leaf roll in Xinjiang

A, B: 健康杏树; C, D: 杏褪绿卷叶病植株。

A, B: Healthy apricot; C, D: Apricot exhibiting chlorotic leaf roll.

2.2 杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 rp 基因 PCR 扩增结果

以 54 份杏褪绿卷叶病阳性样品总 DNA 为模板,利用引物 rpF1/rpR1 对植原体 rp 基因进行 PCR 扩增,电泳结果表明,部分样品获得了约 1.2 kb 的特异性条带,同时,枣疯病植原体也扩增出相同的特异性条带,而健康植株和灭菌超纯水均未出现特异性条带(图 2)。结果表明,所用引物对具有特异性,可从病样中扩增到与目的基因片段大小相符的条带。

2.3 新疆杏褪绿卷叶植原体 rp 基因的克隆及序列分析

随机选取 4 个杏褪绿卷叶病病样(轮台县和托克逊县病样各 2 个)的 PCR 扩增产物进行回收、纯化、克隆,提取质粒、酶切鉴定,选取阳性克隆进行测序。测序结果表明,新疆杏褪绿卷叶植原体核糖体蛋白基因片段长 1196 bp, G+C 含量为 27.26%,包含部分 rpS19 基因以及完整的 rpL22 基因和 rpS3 基因。其中, rpL22 基因以 ATG 为起始密码子,由 354 个核苷酸组成的开放阅读框编码 117 个氨基

酸;*rpS3* 基因以 ATG 为起始密码子,由 753 个核苷酸组成的开放阅读框编码 250 个氨基酸,在所含的 3 个基因中均以 TAA 作为终止密码子,这些特性均与其他植原体核糖体蛋白基因序列相似。分别命名为 ACLR-XJ01 ~ ACLR-XJ04, 登录号分别为 (MW366827~MW366830)。

将杏褪绿卷叶植原体新疆分离物的 *rp* 基因核苷酸序列在 GenBank 中经 BLAST 比对检索,并利用 DNASTar 软件对核苷酸及氨基酸序列进行相似性比较。结果表明,杏褪绿卷叶植原体新疆分离物

ACLR-XJ01 ~ ACLR-XJ04 *rp* 基因片段核苷酸序列无差异,相似性达到 100%。杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 ACLR-XJ01 ~ ACLR-XJ04 与 16Sr V -*rp* 亚组各代表性植原体的 *rp* 基因核苷酸序列相似性达到 95.7%~99.3%,其中与 16Sr V 组 *rp* V -C 亚组的甜樱桃绿化植原体 SCV-JN-2013 (MF848954) 和枣疯病植原体分离物 JWB (AY197681)、JWB-Zhangqiu (FJ154856) 的亲缘关系最近,序列相似性分别达到 99.3%和 99.2%,*rpL22* 和 *rpS3* 基因编码的氨基酸相似性分别达到 98.3%和 98.4%(表 1)。

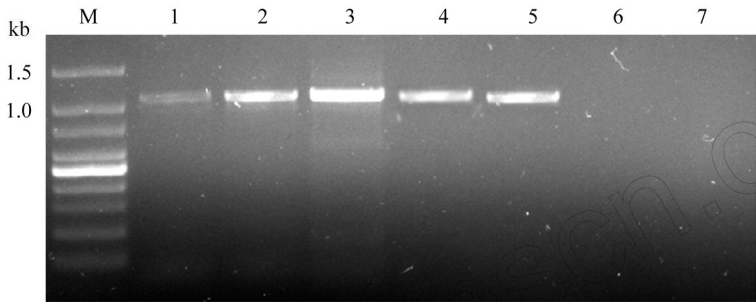


图 2 杏褪绿卷叶植原体 *rp* 基因 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR amplification of the *rp* gene from apricot chlorotic leaf roll phytoplasma

M: 100 bp DNA Ladder; 1~4: 杏褪绿卷叶病样品; 5: 枣疯病样品; 6: 健康杏树; 7: 双蒸水空白对照。
M: 100 bp DNA Ladder; 1~4: Samples of ACLR; 5: Sample of jujube witches'-broom;
6: Sample of healthy apricot; 7: Negative control (ddH₂O)。

表 1 杏褪绿卷叶植原体新疆分离物与其他植原体 *rp* 基因核苷酸和氨基酸同源性比较

Table 1 Homology comparison of the nucleotide and deduced amino acid sequence identity of the *rp* gene fragments from ACLR-Xinjiang isolates with other phytoplasma strains

16S r 组-亚组(<i>rp</i> 亚组) 16Sr group-subgroup (<i>rp</i> -subgroup)	植原体病害及相关菌株 Phytoplasma disease and strain	登录号 GenBank accession no.	核苷酸相似性 Nucleotide homology/%	氨基酸相似性 Amino acids homology/%	
				<i>rpL22</i>	<i>rpS3</i>
16Sr I -A (<i>rp</i> I -A)	番茄巨芽 Tomato big bud (BB)	AY183686	61.0	51.7	54.6
16Sr III -A (<i>rp</i> III -A)	桃 X 病 Peach X-disease (CX)	EF186813	69.2	61.9	49.4
16Sr V -C (<i>rp</i> V -L)	鹰爪豆丛枝 <i>Spartium</i> witches'-broom (SpaWB229)	AY197672	95.7	91.5	97.2
16Sr V VE (<i>rp</i> V -I)	悬钩子矮化 <i>Rubus</i> stunt (RUS)	AY197668	95.8	91.5	97.2
16Sr V -A (<i>rp</i> V -A)	榆树黄化 Elm yellows (EY1)	AY197675	95.9	93.2	94.8
16Sr V -C (<i>rp</i> V VH)	桤树黄化 Alder yellows (ALY)	AY197666	95.9	91.5	96.8
16Sr V -C (<i>rp</i> V -F)	葡萄金黄化 Flavescence dorée (FD70)	AY197663	96.0	90.7	96.8
16Sr V -C (<i>rp</i> V -D)	葡萄金黄化 Flavescence dorée (FD-C)	AY197665	96.1	90.7	97.2
16Sr V -C (<i>rp</i> V -J)	红麻黄化 Hemp dogbane yellows (HD1)	AY197674	96.2	90.7	96.8
16Sr V -C (<i>rp</i> V -K)	桤树黄化 Alder yellows (ALY882)	AY197662	96.2	90.7	96.8
16Sr V -D (<i>rp</i> V -E)	葡萄金黄化 Flavescence dorée (FD-D)	AY197664	96.2	90.7	97.6
16Sr V -B (<i>rp</i> V -B)	樱桃致死黄化 Cherry lethal yellows (CLY5)	AY197679	98.6	97.4	98.0
16Sr V -B (<i>rp</i> V -M)	桃树黄化 Peach yellows (PY-In)	AY197679	98.8	97.4	98.0
16Sr V -B (<i>rp</i> V -C)	枣疯病 Jujube witches'-broom (JWB)	AY197681	99.2	98.3	98.4
16Sr V -B (<i>rp</i> V -C)	枣疯病 Jujube witches'-broom (Zhangqiu)	FJ154856	99.2	98.3	98.4
16Sr V -B (<i>rp</i> V -C)	樱桃绿化 ' <i>Prunus avium</i> ' virescence (SCV-JN-2013)	MF848954	99.3	98.3	98.4

2.4 系统进化及 RFLP 虚拟分析

将获得的杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 *rp* 基因序列与 16SrV 组及其他组代表性植原体 *rp* 基因

序列进行比较,共同构建系统进化树。结果表明,杏褪绿卷叶植原体新疆分离物与 16SrV-*rp* 亚组各株系聚在同一个大分支上,其中与 *rp*V -C 亚组的甜

樱桃绿化植原体 SCV-JN-2013 (MF848954) 和枣疯病植原体分离物 JWB (AY197681)、JWB-Zhangqiu (FJ154856) 的亲缘关系最近,聚为单独的一个分支 (图 3)。进一步利用 pDRAW 32 软件对杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 ACLR-XJ01 和 16SrV 组中 12 个 rpV 亚组代表性分离物的 *rp* 基因序列 (rpF1/rpR1 扩增片段) 进行 *Alu* I 等 7 种限制性内切酶的

虚拟 RFLP 分析,结果显示,杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 *rp* 基因的虚拟酶切图谱不同于所有已建立的 *rp* V 亚组参考模型,其中与 *rp*V-C 亚组 (AY197681) 相似性最高,但在 *Mse* I、*Ssp* I 和 *Taq* I 的酶切位点存在差异 (图 4),因此,推测杏褪绿卷叶植原体新疆分离物可能是 16SrV 组中的一个新的 *rp* 亚组。

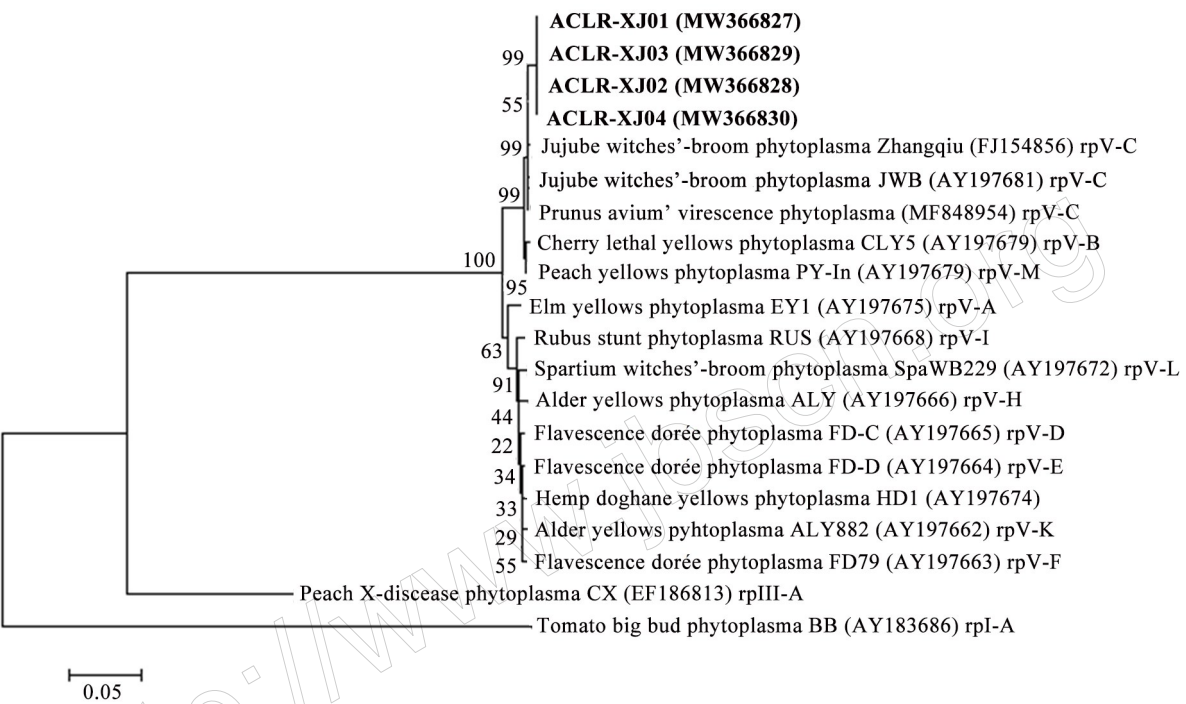


图 3 用邻接法构建的杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 *rp* 基因系统发育树

Fig.3 Neighbor-joining dendrogram based on the *rp* gene sequences of the phytoplasma of apricot chlorotic leaf roll in Xinjiang
括号内为 GenBank 登录号;黑体为本文所获得的 *rp* 基因测序株系;标尺所示长度为 5%核苷酸置换率。
GenBank accession numbers are in the parentheses; the boldface is the strain for *rp* gene sequencing in this study;
Bar means 0.05 substitutions per nucleotide.

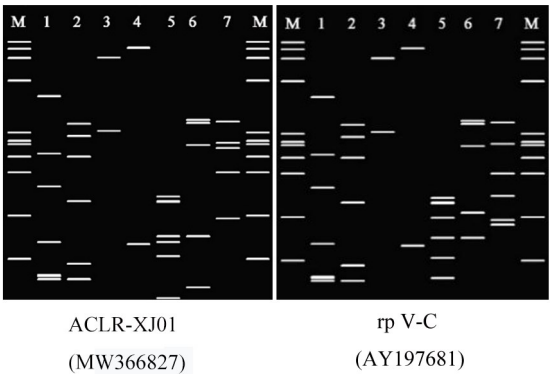


图 4 杏褪绿卷叶植原体新疆分离物与 *rp* V-C 亚组代表性植原体 *rp* 基因虚拟 RFLP 酶切图谱
Fig.4 Virtual RFLP maps of the *rp* gene of representative phytoplasma of *rp* V-C subgroup and apricot chlorotic leaf roll phytoplasma isolates in Xinjiang

M: ΦX174DNA-Hae II 酶切分子质量; 1~7: 在虚拟酶切中所用的 7 种限制性内切酶: *Alu* I、*Dra* I、*Hae* III、*Hha* I、*Mse* I、*Ssp* I 和 *Taq* I。
M: ΦX174 DNA digested with Hae II; 1~7: Recognition sites for the following 7 restriction enzymes were used in the simulated digestions: *Alu* I, *Dra* I, *Hae* III, *Hha* I, *Mse* I, *Ssp* I, *Taq* I.

3 讨论

新疆作为杏的原生起源中心,拥有丰富的杏种质资源,栽培面积和产量均居全国各省(区)之首,形成了环塔克拉玛干大沙漠独特的杏生态种群和杏产业带。发展杏产业对于地处极端干旱荒漠区、生态环境极为脆弱的南疆地区的防风固沙、生态环境保护和地区经济发展都有着重要的意义。笔者于 2016—2019 年连续 4 年对新疆轮台县、托克逊县杏褪绿卷叶病发生情况进行调查,发现该病害从零星、局部发生到范围迅速扩大、加重,表明新疆的地理气候环境适宜该病害的发生,目前该病原极有可能已成功定殖并逐渐进入流行期,给近年来蓬勃发展的新疆经济支柱林果产业带来巨大隐患。本研究首次获取了杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 *rp* 基因分子信息,从亚组水平上确定了其分类地位和遗传变异,为研究杏褪绿卷叶植原体新疆分离物的来源、进化关系,建立杏褪绿卷叶植原体快速诊断和检测技术奠定了基础。

韩冰(2012)首次对新疆轮台县杏褪绿卷病植原体 16S rDNA 进行 PCR 扩增、测序和序列分析,结果显示,杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 16S rDNA 基因与 16SrV-B 亚组枣疯病植原体的同源性最高达到 99.8% 以上,仅有 1~2 个碱基的差异。艾克热木·买买提等(2020)验证了杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 16S rDNA 基因序列的同源性,发现与韩冰已报道的杏褪绿卷叶植原体新疆分离物亲缘关系很近,同源性达到 99.6%,与 16SrV-B 亚组的枣疯病植原体山东分离株、甜樱桃绿化植原体山东分离株同源性最高,达到 99.4%~99.6%,同样未能在分子水平上体现出不同株系间的差异。这说明植原体在长期的进化过程中 16S rDNA 基因十分保守,并不适合亲缘关系较近的植原体株系的分类。在植原体株系关系和系统发育研究中发现 *rp* 基因能够揭示出更多有价值的信息和系统发育的标记。Martini *et al.* (2007)对植原体各代表株系进行系统进化分析,结果显示翠菊黄化组(16SrI 组)和榆树黄化组(16SrV 组)不同亚组间 16S rDNA 的序列相似性为 98.4%~99.2% 和 98.6%~99.5%,*rp* 基因的相似性为 96.8%~98.2% 和 96.5%~98.1%,说明植原体 *rp* 基因较 16S rDNA 基因具有更大的变异性,更适合用于同一组内亲缘关系更近的株系间的分类。本研究通过对杏褪绿卷叶植原体新疆分离物

rp 基因的同源性分析发现,杏褪绿卷叶植原体新疆分离物与 16SrV 组(*rp*V-C)亚组的樱桃绿化植原体和枣疯病植原体亲缘关系最近,核苷酸相似性达到 99.2%~99.3%,在系统发育树上聚为一簇,并未表现出明显的遗传分化。但进一步利用 RFLP 虚拟酶切分析发现,杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 *rp* 基因的酶切图谱与已报到的 12 个 *rp*V 亚组代表性分离物之间均存在一定的差异,尽管与 *rp*V-C 亚组代表性植原体的酶切图谱最为相似,但在限制性内切酶 *Mse* I、*Ssp* I 和 *Taq* I 的酶切位点上也存在明显差异,因此推测杏褪绿卷叶植原体新疆分离物属于榆树黄化组(16SrV)的一个新 *rp*V 亚组。该结果不但证明了 *rp* 基因更适合亲缘关系较近的植原体株系的分类,同时也表明 RFLP 分析更能有效地揭示植原体 DNA 水平上的遗传多样性。

杏褪绿卷叶病于 1973 年首次在法国杏树上被发现,之后陆续在欧洲多国相继发生,在亚洲国家土耳其、伊朗、黎巴嫩也有报道。研究发现,尽管不同国家所报道的杏褪绿卷叶病症状相似,但所鉴定的 ACLR 病原在分类地位上差异显著。如捷克、比利时、土耳其、白俄罗斯等国发生的 ACLR 病原被鉴定为 16SrX-B 亚组植原体(Navratil *et al.*, 2001; Olivier *et al.*, 2003; Sertkaya *et al.*, 2005; Valasevich *et al.*, 2016);德国、黎巴嫩发生的 ACLR 病原被鉴定为 16SrI-F 亚组植原体(Abou-jawda *et al.*, 2011; Hodgett *et al.*, 2008);伊朗发生的 ACLR 病原被鉴定为 16Sr II-C 亚组植原体(Rasoulpour *et al.*, 2019);而本研究发现引起新疆杏褪绿卷叶病的植原体在系统分类上应归于 16SrV 组。由此可见,杏树可被多种植原体侵染并引起相似的症状,不同分类地位的植原体在杏树上为何能够引起相似的症状,其致病机制如何,还有待深入的研究。

参考文献

- 艾克热木·买买提,韩剑,罗明,唐章虎,2020. 杏褪绿卷叶植原体新疆分离物 16S rDNA 基因克隆与序列分析. 植物保护, 46(2): 186-192.
- 蔡红,陈惠,李凡,陈海如,2003. 长春花黄化植原体核糖体蛋白基因片段序列分析. 微生物学通报, 30(1): 34-37.
- 韩冰,2012. 新疆杏褪绿卷叶植原体的检测与鉴定. 硕士学位论文. 乌鲁木齐: 新疆农业大学.
- 和志娇,蔡红,陈海如,和根强,吴华英,2005. 云南泡桐

- 丛枝病植原体核糖体蛋白基因片段序列分析. 植物病理学报, 35(6): 18-21.
- 李文慧, 徐麟, 何天明, 张大海, 唐章虎, 2007. 杏褪绿卷叶病研究初报. 西北农业学报, 16(6): 207-209.
- 王利平, 洪霓, 王国平, 2014. 来源于湖北省枣疯病植原体分离物 16S rDNA 和 *rp* 基因的序列分析. 植物病理学报, 44(1): 1-7.
- 万琼莲, 杨子祥, 王连春, 蔡红, 陈海如, 2014. 云南花生丛枝植原体 16S rRNA 和核糖体蛋白基因序列分析. 植物病理学报, 44(4): 370-378.
- 赵京民, 1993. 杏树褪绿卷叶病病原研究. 华北农学报, 8(2): 120.
- ABOU-JAWDA Y, DAKHIL H, LOVA M M, SOBH H, NEHME M, 2011. Preliminary survey of potential vectors of '*Candidatus* Phytoplasma phoenicium' in Lebanon and probability of occurrence of apricot chlorotic leaf roll (ACLR) phytoplasma. *Bulletin of Insectology*, 64(S): 123-124.
- BERTACCINI A, PALTRINIERI S, CAPARA L, LAIMER M, HANZER V, BALLA I, 2004. Improved molecular methods for detection of European stone yellows (ESFY) phytoplasmas from in vitro shoots of fruit trees. *Proceedings of the XIXth International Symposium on Fruit Tree Virus Disease*, 657: 495-500.
- DUDUK B, BERTACCINI A, 2011. Phytoplasma classification: taxonomy based on 16S ribosomal gene, is it enough? *Phytopathogenic Mollicutes*, 1(1): 3-13.
- GREEN M J, THOMPSON D A, MACKENZIE D J, 1999. Easy and efficient DNA extraction from woody plants for the detection of phytoplasmas by polymerase chain reaction. *Plant Disease*, 83(5): 482-485.
- HODGETTS J, BOONHAM N, MUMFORD R, HARRISON N, MATTHEW DICKINSON M, 2008. Phytoplasma phylogenetics based on analysis of *secA* and 23S rRNA gene sequences for improved resolution of candidate species of '*Candidatus* Phytoplasma'. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 58(8): 1826-1837.
- LEE I M, DAVIS R E, GUNDERSEN-RINDAL D E, 2000. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annual Review of Microbiology*, 54(1): 221-255.
- LEE I M, GUNDERSEN-RINDAL D E, DAVIS R E, 1998. Revised Classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16S rRNA and ribosomal protein gene sequences. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48(4): 1153-1169.
- MARTINI M, BOTTI S, MARCONE C, MARZACHI C, CASATI P, BIANCO P A, BENEDETTI R, BERTACCINI A, 2002. Genetic variability among flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France. *Molecular and Cellular Probes*, 16(3): 197-208.
- MARTINI M, LEE I M, BOTTNER K D, ZHAO Y, BOTTI S, BERTACCINI A, HARRISON N A, CARRARO L, MARCONE C, KHAN A J, OSLER R, 2007. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 57: 2037-2051.
- NAVRATIL M, VALOVA P, FIALOVA R, PETROVA K, FRANOVA J, NEBESAROVA J, PONCAROVA-VORACKOVA Z, KARESOVA R, 2001. Survey for stone fruit phytoplasma in the Czech Republic. *Acta Horticulturae*, 550(2): 377-382.
- NEČAS T, KRŠKA B, 2005. Detection of phytoplasma ESFY in apricot trees using phloem and petioles. *Plant Protection Science*, 41(4): 132-140.
- OLIVIER T, KUMMERT J, STEYER S, 2003. First detection of European stone fruit yellows phytoplasma (ESFY) in Belgium. *Acta Horticulturae*, 124: 519-521.
- RASOULPOUR R, SALEHI M, BERTACCINI A, 2019. Association of a '*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia'-related strain with apricot showing European stone fruit yellows symptoms in Iran. *3 Biotech*, 9(3): 1-6.
- SERTKAYA G, MARTINI M, ERMACORA P, MUSETTI R, 2005. Detection and characterization of phytoplasmas in diseased stone fruits and pear by PCR-RFLP analysis in Turkey. *Phytoparasitica*, 33(4): 380-390.
- TRANDAFIRESCU M, PLOPA C, TRANDAFIRESCU I, 2011. Symptomatological detection and biochemical changes of the trees infected by phytoplasma. *Bulletin of Insectology*, 64(1): 165-166.
- TURK A, FAJT N, SELJAK G, VEBERIC N, MEHLE J, BOBEN J, DREO T, RAVNIKAR M, 2011. Occurrence of European stone fruit yellows (ESFY) in Slovenia: possibilities for healthy mother plant cultivation in insect-proof net-houses. *Acta Horticulturae*, 917: 259-264.
- VALASEVICH N, SCHNEIDER B, 2016. Detection, identification and molecular diversity of '*Candidatus* Phytoplasma prunorum'. *Journal of Plant Pathology*, 98(3): 625-629.