

苦楝丛枝植原体质粒的测定与分子特征

宋传生¹, 林彩丽¹, 田国忠^{1*}, 赵文军², 朱水芳², 牟海青², 胡佳续¹,
王曦茁¹, 郭民伟¹

¹ 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 国家林业局森林保护学重点实验室, 北京 100091

² 中国检验检疫科学研究院动植物检疫研究所, 北京 100029

摘要:【目的】测定苦楝丛枝植原体(CWB 植原体)质粒并分析其分子特征。【方法】扩增苦楝丛枝植原体质粒片段并进行系统进化分析, 预测质粒编码蛋白的跨膜区、亚细胞定位; 以质粒 pCWBf_q *repA* 为模板制备探针, 利用 Southern blot 方法检测苦楝丛枝植原体及其他几种植原体的质粒。【结果】测定了苦楝丛枝植原体福清株系的一个质粒 pCWBf_q, 该质粒全长 4446 bp, A + T 含量为 73.5%, 编码 6 个蛋白, 其中 pCWBf_q P2-P5 五个编码蛋白分别含有 3、2、1 和 2 个跨膜区, 其信号肽(Signal Peptide, SP)信号值分别为 0.989、0.505、0.918 和 0.914。氨基酸序列相似性比较表明: pCWBf_q RepA 蛋白与其他植原体质粒 RepA 的同源性在 9.6%–85.6% 之间, 而 pCWBf_q SSB 蛋白与其他植原体质粒 SSB 的同源性在 74.0%–89.4% 之间。用 pCWBf_q *repA* 探针检测到苦楝丛枝植原体中质粒的存在, 同时也能够检测到 16SrI 组的泡桐丛枝植原体(PaWBNy), 海南长春花绿变植原体(PeVHn), 苦楝丛枝植原体福州株系(CWBFz)和桑树萎缩植原体濮阳株系(MDPy)中的质粒, 但 16SrV 组的枣疯植原体北京株系(JWBBj)、樱桃致死黄化西昌株系(CLYXc)和重阳木丛枝南昌株系(BiWBNC)中未能检测到任何杂交信号。【结论】苦楝丛枝植原体质粒 pCWBf_q 编码的 6 个蛋白中, 除与质粒复制有关的 RepA 和 SSB 外, 另外 4 个均为含有疏水结构的分泌蛋白或膜蛋白。植原体质粒的同源基因间存在程度不同的变异, 其中 *repA* 基因在所有植原体质粒上均存在, 但变异性相对较大, 而 *ssb* 基因仅存在于 16SrI 组植原体质粒中, 且变异相对较小。16SrI 组的 CWBF_q、PaWBNy、PeVHn、CWBFz 和 MDPy 中均存在数量和大小不同的质粒, 而 16SrV 组的 JWBBj、CLYXc 和 BiWBNC 中或含有的质粒因与 pCWBf_q *repA* 探针的同源性较低而不能被检测到。

关键词: 苦楝丛枝植原体, 质粒, 序列分析, 系统进化, DNA 杂交

中图分类号: Q939 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2011)09-1158-10

苦楝(*Melia azedarach* L)为落叶乔木, 分布范围北起华北、秦岭南部, 南至海南, 东迄台湾, 西达西南, 是我国重要的用材、药用和环境绿化美化树种^[1]。苦楝丛枝病在我国江苏、湖北、湖南、广东、

广西、海南、福建、浙江、江西、安徽等省的苦楝种植区均有发生, 病树病症表现为枝条缩节丛生、叶变小、黄化, 重病树顶枯, 长势衰弱, 常造成苦楝大量死亡, 给林业的发展造成了一定的阻碍^[2]。

基金项目: 质检公益性行业科研专项“重要果树黄化病原鉴定技术标准研制”(200810517); 国家自然科学基金(30872025)

* 通信作者。Tel: +86-10-62889525; Fax: +86-10-62884972; E-mail: tiangz@caf.ac.cn

作者简介: 宋传生(1984–), 男, 山东滕州人, 硕士研究生, 研究方向为分子植物病理。E-mail: scssy@163.com

收稿日期: 2011-03-11; **修回日期:** 2011-05-03

苦楝丛枝病是由植原体引起的^[3-4],植原体是一类不具有细胞壁的重要植物病原原核生物,属于柔膜菌纲,寄生于植物韧皮部的筛管内,主要通过叶蝉、蜡蛾、飞虱等刺吸式昆虫传播。根据 16S rRNA 基因和核糖体蛋白基因(*rp*)序列分析结果将我国苦楝丛枝(chinaberry witches'-broom, CWB)植原体划分于 16SrI 组(Aster yellows groups, 翠菊黄化组)B 亚组^[5-7],然而阿根廷苦楝黄化丛枝植原体则属于 16SrIII 组 B 亚组(X-disease group, X 病组),另外还发现 16SrXIII 组 C 亚组植原体侵染苦楝以及 16SrXIII 组 B、C 亚组的混合侵染现象^[8-9]。

质粒是细菌中染色质外的遗传物质,质粒作为能够移动的复制子广泛存在于细菌和真核生物细胞中^[10-11],质粒编码的基因对寄主菌来说并非所必需但通常对寄主菌的生长有很大影响,最为常见的是质粒编码抗生素抗性基因,而植物病原菌的质粒常编码与病原致病性及病原菌介体昆虫的传播相关的基因^[12]。质粒容易通过功能基因的获得或丢失适应环境的变化,因此比染色体 DNA 的进化更为迅速^[13-14]。目前,已有 24 个植原体质粒被测序并发表,大部分为环状的,少数几个为线状质粒。这些质粒中,基因 *rep*、*dnaG*、*ssb* 参与了质粒的自我复制,*cop* 控制着质粒的拷贝数,在某些植原体中质粒的拷贝数可能影响植原体的致病能力^[15]。除了和质粒的复制有关的基因外,植原体质粒编码的绝大部分蛋白质是膜蛋白和分泌蛋白,它们可能在植原体和寄主的互作及介体昆虫传播中发挥重要的作用^[16]。迄今关于 CWB 植原体质粒的研究仍为空白。

本研究测定了福建福清苦楝丛枝植原体的一个完整质粒 pCWBfQ 序列并对其编码蛋白结构与功能进行了预测,通过杂交也验证了其他几种植原体中质粒的存在。该研究为进一步明确质粒与植原体分类的关系、质粒基因的结构和功能、植原体快速检测与鉴定以及深入研究植原体致病机制奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料:苦楝丛枝病鲜材料采自福建福清

和福州,编号分别为:CWBfQ 和 CWBFz;泡桐丛枝植原体南阳株系、长春花绿变海南株系及枣疯病北京株系保存在本实验室组培发病苗上,编号分别为 PaWBNy、PeVHn 和 JWBB^[17];桑树萎缩病 MDPy 材料采自河南濮阳市;樱桃致死黄化病 CLYXc 材料采自四川西昌冕宁县复兴镇;重阳木丛枝病 BiWBNe 材料采自江西南昌市。

1.1.2 主要试剂:2xTaq MIX、DNA 凝胶回收试剂盒、植物基因组 DNA 提取试剂盒、DNA Marker(天根公司);PMD18-T 载体(大连宝生物);地高辛标记和检测试剂盒 DIG High Primer Labeling and Detection Starter Kit I(Roche);化学试剂为国产分析纯。

1.2 总 DNA 的提取

参照天根公司植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书(DP305-02)。

1.3 质粒扩增和序列测定

根据已发表的洋葱黄化植原体质粒 EcOYNIM(AB097150)、泡桐丛枝植原体质粒 pPaWBNy-1(EF426472)、翠菊黄化植原体质粒 pAYWB-IV(CP000065)的序列同源性比对结果设计两对引物 pCWBfQF1Fwd/pCWBfQF1Rev 和 pCWBfQF2Fwd/pCWBfQF2Rev(表 1)。以 CWBFq 侵染的苦楝总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,获得了 CWBFq 质粒片段 pCWBfQ F1 和 pCWBfQ F2,然后根据 pCWBfQ F1 和 pCWBfQ F2 片段的序列设计引物对 pCWBfQF3Fwd/pCWBfQF3Rev 和 pCWBfQF4Fwd/pCWBfQF4Rev,分别扩增到 CWBFq 质粒的另外两个片段 pCWBfQ F3 和 pCWBfQ F4。

25 μ L 反应体系:2xTaq MIX 12.5 μ L, DNA 1 μ L, 10 mmol/L 正反向引物各 0.5 μ L, ddH₂O 1 μ L。扩增条件为:94℃变性 4 min;94℃变性 30 s,退火和延伸条件见表 1,共 35 次循环;最后 72℃延伸 10 min。PCR 产物送北京华大基因公司测序。

1.4 序列比对和蛋白特征预测

序列装配利用 DNAMAN6.0 分析软件;序列同源性比较分析采用 BLAST(Basic Local Alignment Search Tools)工具(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/balst/>);可读框预测采用标准遗传密码的 NCBI ORF

表 1 本研究所用的引物
Table 1 Primers used in this study

Name	Prime sequence(5'→3')	Product	Product size/bp	Annealing	Extension
pCWBfQF1Fwd pCWBfQF1Rev	TAAC TACCATGAAAGGATGC AGGTCATGAGTGATATTACC	pCWBfQ F1	1706	53℃ 30 s	72℃ 90 s
pCWBfQF2Fwd pCWBfQF2Rev	TCAAAAGTATATGTAGAAGG GACCCTACATATACGCAC	pCWBfQ F2	2403	53℃ 30 s	72℃ 120 s
pCWBfQF3Fwd pCWBfQF3Rev	CAACCAAATCAACAACCC TCACAATAGATTTAGGGCG	pCWBfQ F3	1539	53℃ 30 s	72℃ 90 s
pCWBfQF4Fwd pCWBfQF4Rev	GGATTGTTTCCTGGCATT TGCTCGTAGATGGAGTCG	pCWBfQ F4	1235	54℃ 30 s	72℃ 90 s
pCWBfQrepFwd pCWBfQrepRev	CTTTGACATTGAAGGTTTCC CTTATGACCGTTATCCTCAG	rep of pCWBfQ	814	54℃ 30 s	72℃ 80 s

寻找器 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>);序列多重比对采用 DNAMAN;进化树分析采用 MEGA4.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 4.1);基因功能预测元件 <http://www.Cbs.dtu.dk/service> SignalP V3.0 预测 N 端有无信号肽; TargetP V1.01 预测蛋白输送目的地、TMHMM V2.0 预测跨膜区; <http://mendel.imp.univie.ac.at> 提供的 Big. PI Predictor 预测 GPI 锚定位点;跨膜区预测用 TMHMM server v. 2.0 程序 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>;亚细胞定位预测用 TargetP 程序 <http://www.cbs.dtu.dk/services/targetP>。

1.5 Southern blot 检测

方法参照试剂盒说明书步骤。首先根据 CWBFq 质粒序列测定结果,在复制相关蛋白基因内部设计引物 pCWBfQrepFwd/pCWBfQrepRev 制备特异性的 DIG 标记的 DNA 探针;用 1% 琼脂糖凝胶电

泳分离质粒 DNA,加样量为 3 μg 总 DNA;将凝胶中的 DNA 转移到尼龙膜上,转膜持续 12 – 16 h;在 120℃ 烤箱中烤膜 30 min;将尼龙膜置于杂交管中,加入 5 mL 50℃ 预热的预杂交液 DIG Easy Hyb,50℃ 预杂交 3 h;取 5 μL 变性处理过的 DNA 探针加入到 50℃ 预热的 5 mL DIG Easy Hyb 溶液中,50℃ 杂交过夜;在 68℃ 杂交管中用 2 × SSC 和 0.5 × SSC 溶液洗膜 2 次,每次 15 min;加入 10 mL 封闭液,37℃ 温育 1 h;加入 Anti-DIG-AP (1 : 5000 用封闭液稀释),37℃ 温育 1 h;用冲洗缓冲液冲洗 3 次,每次 15 min;加入 BCIP/NBT 溶液,避光显色至清晰的条带出现;蒸馏水冲洗终止显色,干燥后扫描保存图像。

2 结果和分析

2.1 质粒片段的 PCR 扩增

以取自福建省福清市感病苦楝总 DNA 做模板,

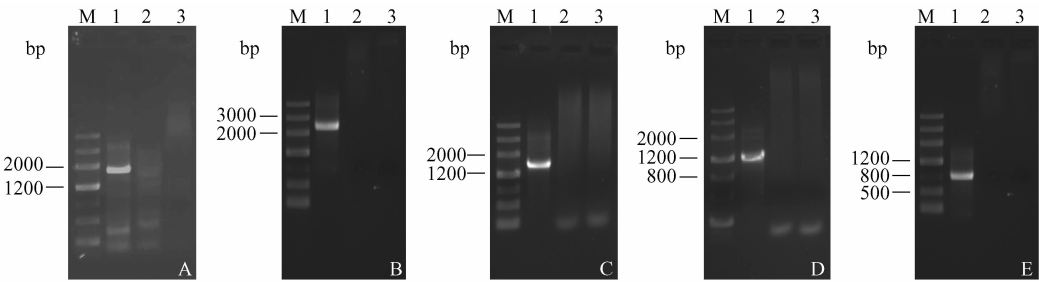


图 1 质粒 pCWBfQ 各片段的 PCR 扩增结果

Fig.1 PCR amplification of fragments from the plasmid pCWBfQ. A. M: marker III, lane1: pCWBfQ F1 fragment, lane2: Healthy control, lane3: none template control; B. M: marker III, lane1: pCWBfQ F2 fragment, lane2: Healthy control, lane3: none template control; C. M: marker III, lane1: pCWBfQ F3 fragment, lane2: Healthy control, lane3: none template control; D. M: marker III, lane1: pCWBfQ F4 fragment, lane2: Healthy control, lane3: none template control; E. M: marker III, lane1: pCWBfQ repA fragment, lane2: Healthy control, lane3: none template control.

引物 pCWBfQF1Fwd/pCWBfQF1Rev、pCWBfQF2-Fwd/pCWBfQF2Rev、pCWBfQF3Fwd/pCWBfQF3Rev、pCWBfQF4Fwd/pCWBfQF4Rev 和 pCWBfQrepFwd/pCWBfQrepRev 分别扩增到长度为 1706 bp 的片段 pCWBfQ F1、2403bp 的片段 pCWBfQ F2、1539bp 的片段 pCWBfQ F3、1235bp 的片段 pCWBfQ F4 和 814 bp 的片段 pCWBfQ *repA* (图 1)。健康植物总 DNA 中均没有扩增到特异性片段。用引物对 pCWBfQF1Fwd/pCWBfQF1Rev 扩增 PeVHn 侵染的长春花总 DNA 获得长度为 1588bp 的片段 pPeVHn F1。

2.2 植原体质粒 pCWBfQ 和 pPeVHn 的序列分析

利用 DNAMAN 软件对片段 pCWBfQ F1、pCWBfQ F2、pCWBfQ F3 和 pCWBfQ F4 进行拼接装配,得到长度为 4446bp 的环状质粒,命名为 pCWBfQ,GenBank 序列号为:JF827298(图 2)。序列分析表明,质粒 pCWBfQ 的 A+T 含量为 73.5%,与植原体染色体 DNA 高 AT 含量特征一致。用标准遗传密码的 NCBI ORF 寻找器预测 pCWBfQ 上有 6 个编码产物大于 10 个氨基酸的可读框,且都在同一条链的同一方向。将 ORF1 的第一个核苷酸的位置定为 1,其中 ORF1 编码复制相关蛋白(replication associated protein, RepA),ORF6 编码单链结合蛋白(single-stranded DNA binding protein, SSB)。海南长春花绿变植原体质粒 pPeVHn 仅测定了部分序

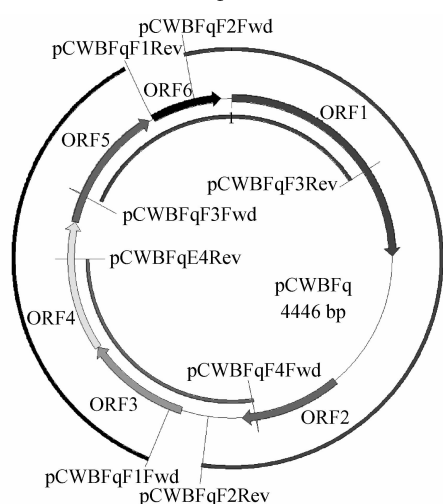


图 2 质粒 pCWBfQ 示意图

Fig. 2 Map of the plasmid pCWBfQ.

列,包括 3 个完整的 ORFs,分别对应于 pCWBfQ 的 ORF3、ORF4 和 ORF5。

2.3 质粒序列相似性及蛋白同源性比较

对已测定的 25 个植原体质粒的 DNA 序列进行相似性比对,结果表明,pCWBfQ 和 pPaWBny-1 的同源性最高,相似性为 71.02%。对质粒编码的蛋白进行同源性比对,6 个蛋白与来自不同植原体质粒编码的相应蛋白均具有较高的同源性(表 2)。其 RepA 蛋白与其他植原体质粒 RepA 蛋白的同源性在 9.6% - 85.6% 之间,和 pPaWBny-2 同源性最高,为 85.6%,其次为 pAYWB-III 83.9%,pASb11 77.7%,pAYWB-I 72.5%,pPAPh2 69.7%,pPaWBny-1 67.3%,最低的同源性仅为 9.6% - 10.7% (pTBBcap/pTBBperi/pCPa)。不同植原体的 SSB 蛋白的氨基酸序列同源性也较高,在 74.0% - 89.4% 之间;而且与其他多数序列相比,pCWBfQ SSB 存在明显的氨基酸变异位点包括 18 - 19 位(KS)、38 位(H)、42 - 43 位(VN)、52 - 53 位(GL)和 94 位(K)(图略)。pCWBfQ P2 和 EcOYW P7 的同源性最高,达 98.0%;与 pCWBfQ P2 同源性较高的蛋白质并非都是由植原体染色体外 DNA 编码的,如:AYWB 404 是由翠菊黄化丛枝植原体染色质 DNA 编码的,和 pCWBfQ P2 同源性也达 91.9%。与 pCWBfQ P3 同源性最高的为 pOYNIM P2 58.7%,最低为 pPAPh2 P2 45.6%;pCWBfQ P3 与 pPeVHn P1、pPaWBny-1 P3 和 pPaWBny-2 P2 的同源性分别为 50.4%、58.4% 和 55.2%,并且在 108 - 112 位缺失 4 个氨基酸,含 QPV 3 个保守氨基酸。pCWBfQ P4 与 ECOY-M P3 的同源性最高为 49.4%,与 pPaWBny-1 为 33.7%,与 pPaWBny-2 最低为 32.4%;与其他植原体相比此蛋白在 90 - 98 位多出 9 个氨基酸的插入序列(PKEDKKEET)。在苦楝丛枝植原体质粒的 6 个编码蛋白中,pCWBfQ P5 蛋白的保守性最小,同源性最高的仅为 47.2% (pPaWBny-1 P5),pPaWBny-2 P5 次之 47%,与 pPeVHn P1 P3 最低 37.6%。

2.4 植原体质粒 pCWBfQ 编码的蛋白质特征

2.4.1 质粒编码的蛋白跨膜区预测:登录 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>,对蛋白质跨膜

表 2 质粒 pCWBFq 编码的蛋白质

Table 2 Predicted proteins from ORFs in pCWBFq

Predicted ORF	Position	Number of AA	Homologous proteins	Matched plasmid proteins	Maxium similarity
ORF1(pCWBFq RepA)	1 – 1104	367	ABR08382	pPaWB _{Ny} -2 RepA	85.6
ORF2(pCWBFq P2)	1731 – 2177	148	BAH22128	EcOYW P7	98.0
ORF3(pCWBFq P3)	2248 – 2915	155	BAH22377	pOYNIM P2	58.7
ORF4(pCWBFq P4)	2919 – 3494	191	AB076263	ECOY-M P3	49.4
ORF5(pCWBFq P5)	3497 – 4066	189	ABR08380	pPaWB _{Ny} -1 P5	47.2
ORF6(pCWBFq SSB)	4085 – 4399	104	ABR08386	pPaWB _{Ny} -2 SSB	89.4

区进行预测。pCWBFq 编码的 6 个蛋白中除了 RepA 和 SSB 之外,其余 4 个均为含有跨膜结构的蛋白。pCBWFq P2 含有的 3 个疏水跨膜区域分别在多肽链的 N 端 AA7-29、内部 AA82-104 和 C 端 AA117-139,pCWBFq P3 在多肽链中含有 2 个跨膜区 AA19-41 和 AA51-73,pCWBFq P4 在 N 端有一个跨膜区 AA12-34,pCWBFq P5 在 N 端和 C 端各有一个跨膜区 AA10-32 和 AA165-187。

2.4.2 质粒编码的蛋白亚细胞定位预测:登录 <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>, 预测蛋白质的亚细胞定位。pCWBFq 编码的蛋白质都不含有叶绿体定位信号肽序列。RepA 和 SSB 蛋白不含有线粒体定位信号肽序列,推测应分布在植原体细胞质内。pCWBFq P2、pCWBFq P4 和 pCWBFq P5 有很强的信号肽定位信号,因此他们

可能参与了细胞的蛋白质分泌途径,定位在细胞膜上或分泌到细胞外,而 pCWBFq P3 信号肽定位信号较弱,所以该蛋白质可能为细胞质蛋白或分泌蛋白。

2.5 质粒 DNA 全序列和单基因的系统进化分析

基于质粒 DNA 全序列构建系统发育树(图 3),除 EcOYW1(野生型洋葱黄化植原体染色质外 DNA)偏离 16Sr-I 组较远以外,pCWBFq 与其它 16S rI 组的质粒聚为一个大的分支,结果与根据 16S rDNA 序列构建的系统发育树基本一致(图略)。但在亚组水平上,根据 16S rDNA 序列已把 CWB 划为 16SrI 组 B 亚组,但质粒的进化分析趋于 B 和 D 亚组之间,且更接近 D 亚组的 PaWB。进一步分别对 6 个 ORF 的核酸及编码蛋白氨基酸序列进行系统进化分析,结果显示 *repA* 的系统进化分析结果与基于

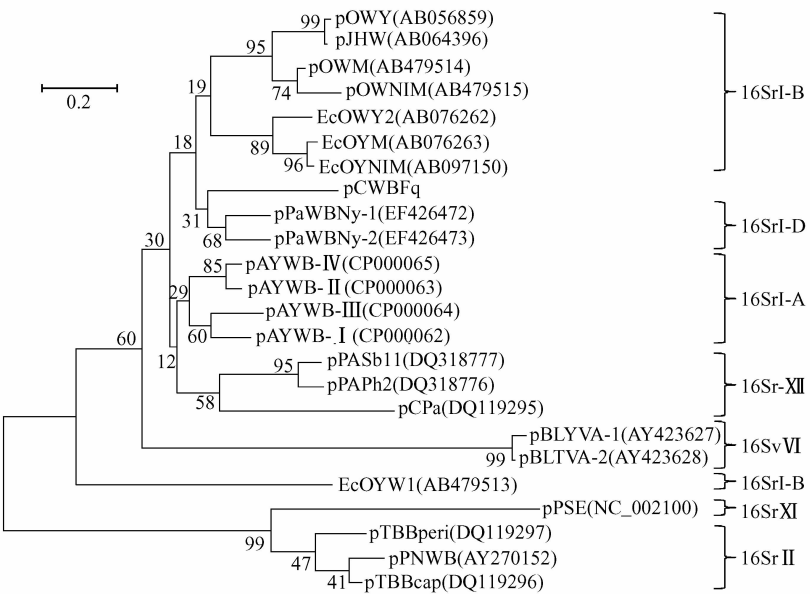


图 3 基于质粒全长序列构建的系统进化树 (MEGA4.1)

Fig. 3 Phylogenetic tree for phytoplasmal plasmids based on the full-length sequences of all given plasmids constructed with MEGA4.1 using the Minimum Evolution method.

16SrDNA 序列和质粒 DNA 全序列的系统进化分析结果不一致,即不能很好地区分现有的 16S 组。而 ORF2-ORF6 的系统进化分析结果与 16SrDNA 序列

的系统进化分析结果基本吻合,其中基于 ORF3 的系统进化分析结果与基于质粒完整序列的系统进化分析结果的一致性较好(图 4)。

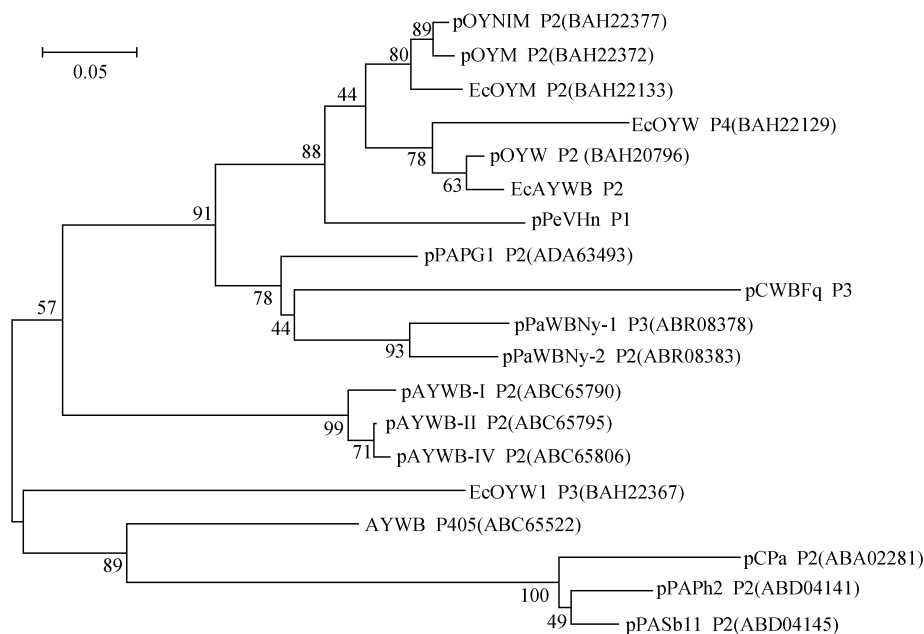


图 4 基于 pCWBfQ ORF3 和其他植原体相似序列构建的系统进化树 (MEGA4.1)

Fig. 4 Phylogenetic tree for pCWBfQ ORF3 and homologous sequences of other phytoplasmal plasmids constructed with MEGA4.1 using the Minimum Evolution method.

2.6 Southern blot 检测质粒

用 pCWBfQ *repA* 基因序列为模板制备的探针进行 Southern blot 检测感病苦楝及 16SrI 组和 16SrV 组植原体质粒,在 CWBFq 植原体株系中显出信号很强且大小不同的 6 条带,验证了苦楝丛枝植原体质粒 pCWBfQ 的存在,并推测除测定的此 4446 bp 质粒外,还有其它 1-2 个大小不同的质粒存在于 CWBFq 植原体中。在不同的 DNA 提取条件下,在 CWBFq 中也曾检测到 4 条质粒带(图略),推测与质粒提取效率和浓度低有关。在 CWBFz 株系中也仅检测到信号弱的 4 条带。有时检测到的杂交带的信号很弱或模糊,推测这与该样品的症状较轻、植原体浓度低有关。

用该探针从 PaWBfNy 中检测到 4 条杂交带,这和 Lin 从 PaWBfNy 鉴定出 2 个质粒的研究结果相一致^[10],PeVHn 和 MDPy 中分别检测到 8 和 3 条带,由此可见,PaWBfNy、PeVHn、MDPy 和 CWBFz 中都存在与 CWBFq *RepA* 基因序列相似性高的但大小不同的质粒,因此可以用此探针检测和鉴定 16SrI 组

植原体的质粒大小和数目;而 16SrV 组的 JWBBj、CLYXc 和 BiWBfNc 中均未有杂交信号出现,表明 JWBBj、CLYXc 和 BiWBfNc 中不含相似的质粒或 JWBBj、CLYXc 和 BiWBfNc 中的质粒 *repA* 序列与 pCWBfQ *repA* 基因序列相似性较低(图 5)。

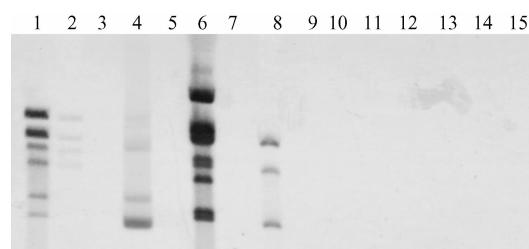


图 5 pCWBfQ *repA* 探针和不同植原体质粒的 DNA 杂交结果

Fig. 5 Southern blot analysis of plasmids from different phytoplasmas with the pCWBfQ *repA* probe. 1: CWBFq; 2: CWBFz 3: healthy chinaberry; 4: PaWBfNy; 5: healthy paulownia; 6: PeVHn; 7: healthy periwinkle; 8: MDPy 9: healthy mulberry; 10: JWBBj; 11: healthy jujube; 12: CLYXc; 13: healthy cherry; 14: BiWBfNc; 15: healthy Bischofia polycarpa.

3 讨论

本研究首次测定了我国苦楝丛枝植原体中的一个质粒 pCWBFq 的完整 DNA 序列,生物信息学软件预测 pCWBFq 编码 6 个蛋白,除与质粒复制有关的 RepA 和 SSB 外,另外 4 个均为含有疏水结构的分泌蛋白或膜蛋白。根据对质粒的系统进化分析判断, CWBFq 与我国之前报道的江西和海南分离物均应属于 16SrI 组成员,未发现阿根廷报道的属于 16SrIII 组和 16SrXIII 组植原体^[8-9]。

用 pCWBFq *repA* 基因序列为模板制备探针进行 Southern blot 能检测感病苦楝及 16SrI 组植原体中的质粒,但不能检测 16SrV 组植原体质粒, pCWBFq *repA* 基因探针能够检测不同植物和不同地区来源的 16SrI 组 CWBFz、PeVHn 和 MDPy 等植原体中不同数目和强弱的质粒条带,这是由于不同寄主来源的植原体甚至同一植原体不同株系的质粒数目和大小存在差异的缘故^[19-20],也表明该组植原体成员的质粒与染色体 DNA 系统发育关系有一致性。

目前已获得的 24 个植原体质粒中(表 3)共有的特点是均含有复制相关蛋白 *repA* 基因,但基因的大小和序列变异非常明显,大小在 567 - 1305 bp 之间,编码蛋白的氨基酸序列相似性在 9.6% - 85.6% 之间,推测这种巨大的变异与植原体质粒对不同植原体及其寄主植物、介体昆虫及地理生态环境的选择和适应性有关^[20-21]。虽然 JWBBj、CLYXc 和 BiWBnc 的寄主和分布范围差异很大,但皆属于 16SrV-B 亚组,迄今用 16SrI 组质粒检测和测序方法皆不成功;而用 pCWBFq *repA* 基因探针也不能检测 16SrI 组以外这三种植原体质粒的主要原因很可能不是这些组植原体内无质粒或质粒上无此基因,而是 *repA* 基因的序列同源性太低^[22-23]。据此推断,虽然 pCPa、pBLTVA-1、pPNWB 等质粒都有此基因,但可能用该探针并不能检测到这些质粒的存在。当然,以 pCWBFq *repA* 基因为探针进行杂交,在 68℃ 严格洗膜条件下,同源性较低的物种杂交的会较浅,甚至有可能杂交不上。今后需进一步摸索杂交条件,并尝试用不同的 ORF 做探针,分别杂交各植原体 DNA,不仅可能得到更多的条带,还可能确认某

一个株系中是否存在多个质粒。

在已知的植原体质粒中仅有 13 个质粒含有 *ssb* 编码基因,这些植原体都属于 16SrI 组成员,16SrI 组的 EcOYW1、pOYNIM 以及其他组的植原体质粒均不编码 SSB 蛋白。SSB 蛋白比 RepA 蛋白相对更保守,13 个植原体质粒的 SSB 蛋白中,9 个为 104AA,仅有 pAYWB-III 和 pAYWB-IV 的 SSB 蛋白为 124AA 和 113AA(表 3)。此外,16SrII 组和 16SrV 组的植原体质粒 pPNWB、pTBBcap、pTBBperi 和 pBLTVA-1 编码 DNA 引物酶基因,而其它各组植原体质粒均没有。

虽然质粒被认为是不稳定、可转移、易突变和丢失的染色体外 DNA 分子,但越来越多的证据显示,在低筛选压力的情况下,能以低的拷贝数在宿主内稳定存在^[11]。营养繁殖的材料(如:泡桐组培苗)体内的植原体,可能因寄主和环境的选择压力不大,虽经反复继代培养 10 余年也并未发现质粒的丢失或明显突变^[18,24]。已知 CWB 江西分离物和 MD 植原体同属于翠菊黄化组 16SrI-B^[7],所以用 pCWBFq *repA* 基因探针能够检测 MD 植原体这一事实验证了基于植原体 16SrDNA 的分类鉴定和系统进化分析结果与基于质粒基因的系统进化分析结果之间在一定范围内的一致性。因而依据本研究结果,可以设想质粒的 *repA*、*ssb* 及其他基因探针,不仅可以用于检测和鉴定不同植原体中质粒的存在和数目,而且也可以根据 Southern blot 结果对该植原体组的归属进行初步的判断。所以该技术可以用于从植原体大量样品、大量株系中鉴定目标质粒、寻找突变菌株,从而更好地研究植原体的致病机制、寄主专化性和质粒基因转移规律;同时也可能会为植原体的多基因、多指标基础的分类鉴定系统提供新的分子标记^[25-26]。

与 16SrI 组其他植原体相同,苦楝丛枝植原体质粒 pCWBFq 除了具有与复制有关的蛋白 RepA 和 SSB 外,其余 4 个蛋白质均为膜蛋白或分泌蛋白,它们可能参与了植原体存活、致病以及与寄主的互动,值得深入研究^[27]。

致谢 河南濮阳林业科学研究所李志清、福建福清市植保站王开山、四川凉山州植物检疫站肖连康及四川冕宁县植保站朱国翔协助植原体样品的采集工作。

表 3 已报道的植原体质粒一览表

Table 3 All reported plasmids of phytoplasmas											
Strains	Disease caused and/ or natural host	Classification	Name of plasmid	Accession No.	Size of plasmid/bp	Type of plasmid	ORF number	rep	Size of Rep/bp	Size of ssb	Note and reference
JHW	Japanese honewort witches'-broom	16SrI	pJHW	AB064396	4278	circle	6	+	1125	+	315 [22]
Rehmannia glutinosa' phytoplasma	<i>Rehmannia glutinosa</i>	16SrI	pPARG1	FJ905104	4371	circle	7	+	1128	+	315
AYWB	Aster yellows witches'-broom	16SrI-A	PAYWB-I	CP000062	3972	circle	5	+	1119	+	315 [28]
			PAYWB-II	CP000063	4009	circle	4	+	1149	+	315
			PAYWB-III	CP000064	5014	circle	7	+	1107	+	375
			PAYWB-IV	CP000065	4316	circle	6	+	1128	+	336
OYW	Onion yellows wild	16SrI-B	EcOYW1	AB479513	7005	circle	7	+	1044	-	ORF4 is copy number control protein
			EcOYW2	AB076262	5560	linear	7	+	1305	+	315
OYM	Onion yellows mild	16SrI-B	pOYW	AB056859	3933	linear	5	+	1134	+	315
			EcOYM	AB076263	5025	linear	6	+	1305	+	315
			pOYM	AB479514	3932	circle	5	+	1134	+	315
OYNIM	Onion yellows non-insect-transmissible	16SrI-B	EcOYNIM	AB097150	5054	circle	6	+	1305	+	315
			pOYNIM	AB479515	3062	circle	3	+	1134	-	
CWB	Chinaberry witches'-broom	16SrI	pCWBFFq	JF827298	4446	circle	6	+	1104	+	315
PaWB	Paulownia witches'-broom	16SrI-D	pPaWBNy-1	EF426472	4485	circle	6	+	1104	+	315 [18]
			pPaWBNy-2	EF426473	3837	circle	5	+	1104	+	315
PNWB	Peanut witches'-broom	16SrII-A	pPNWB	AY270152	4226	circle	4	+	1194	-	ORF2 is DNA Primase
TBB	Tomato big bud	16SrII-E	pTBBcap	DQ119296	4092	linear	3	+	570	-	ORF3 is Primase, ORF2 is putative threonine synthase
			pTBBperi	DQ119297	3319	circle	4	+	567	-	ORF4 is DNA Primase
BLTVA	Beet leafhopper-transmitted virescence agent	16SrVI-A	pBLTVA-1	AY423627	10785	circle	10	+	1242	-	ORF6 is DNA Primase DnaG, ORF8 is rep
			pBLTVA-2	AY423628	2587	circle	1	+	1251	-	
SCWL	Sugarcane white leaf	16SrXI-B	pPSE	NC_002100	2645	circle	2	+	1050	-	
Ca P. australiense	<i>Gomphocarpus physocarpus</i>	16SrXII	pCPa	DQ119295	3773	circle	4	+	1128	-	
Ca P. australiense	Strawberry lethal yellows	16SrXII	pPASb11	DQ318777	3635	circle	4	+	1134	-	
Ca P. australiense	<i>Phormium</i> yellow leaf	16SrXII	pPAPh2	DQ318776	3607	circle	4	+	1131	-	

The plus (+) indicates presence of the gene, minus (-) indicates absence of the gene.

参考文献

- [1] 南方本编写委员会. 树木学. 北京: 中国林业出版社, 2003: 563.
- [2] 徐梅卿, 何平勋. 中国木本植物病原总汇. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2008: 816-817.
- [3] 金开璇, 蔡希灼, 阿斯诺来. 苦楝丛枝病类细菌、类菌原体的电镜观察. *林业科学 (Scientia Silvae Sinicae)*, 1982, 22(3): 422-424.
- [4] 陈作义, 沈菊英, 郑冠标. 海南岛苦楝丛枝病的初步调查研究. *热带作物学报 (Chinese Journal of Tropical Crops)*, 1984, 5: 121-123.
- [5] 罗大全, 车海彦, 刘先宝, 符瑞益, 叶莎冰. 海南苦楝丛枝病植原体的分子鉴定. *热带作物学报 (Chinese Journal of Tropical Crops)*, 2008, 29(4): 522-524.
- [6] 车海彦, 刘先宝, 符瑞益, 叶莎冰, 罗大全. 海南苦楝丛枝病植原体核糖体蛋白基因片段序列分析. *西北农林科技大学学报 (Journal of Northwest A & F University)*, 2008, 36(12): 83-87.
- [7] 李永, 田国忠, 朴春根, 朱水芳. 我国几种植物病原体的快速分子鉴别与鉴定的研究. *植物病理学报 (Acta Phytopathologica Sinica)*, 2005, 35(4): 293-299.
- [8] Galdeano E, Torres LE, Meneguzzi N, Guzman F, Gomez GG, Docampo DM, Conci LR. Molecular characterization of 16S ribosomal DNA and phylogenetic analysis of two X-disease group phytoplasmas affecting China-tree (*Melia azedarach* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) in Argentina. *Journal of phytopathology*, 2004, 152: 174-181.
- [9] Arneodo JD, Marini DC, Galdeano E, Meneguzzi N, Bacci JR, Domecq C, Nome SF, Conci LR. Diversity and geographical distribution of phytoplasmas infecting China-tree in Argentina. *Journal of Phytopathology*, 2007, 155: 70-75.
- [10] Wegrzyn G. What does "plasmid biology" currently mean? : summary of the plasmid biology 2004 meeting. *Plasmid*, 2005, 53(1): 14-22.
- [11] Barbara E, Funnell, Gregory J, Phillips. 质粒生物学. 陈惠鹏, 张惟材等译. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [12] Vivian A, Murillo J, Jackson RW. The roles of plasmids in phytopathogenic bacteria: mobile arsenals? *Microbiology*, 2001, 147: 763-780.
- [13] Eberhard WG. Evolution in bacterial plasmids and levels of selection. *The Quarterly Review of Biology*, 1990, 65(1): 3-22.
- [14] Sundin, GW. Genomic insights into the contribution of phytopathogenic bacterial plasmids to the evolutionary history of their hosts. *Annual Review of Phytopathology*, 2007, 45: 129-151.
- [15] Nishigawa H, Miyata SI, Oshima K, Sawayanagi T, Komoto A, Kuboyama T, Matsuda I, Tsuchizaki T, Namba S. In planta expression of a protein encoded by the extrachromosomal DNA of a phytoplasma and related to geminivirus replication proteins. *Microbiology*, 2001, 147: 507-513.
- [16] Ishii Y, Kakizawa S, Hoshi A, Maejima K, Kagiwada S, Yamaji Y, Oshima K, Namba S. In the non-insect-transmissible line of onion yellows phytoplasma (OY-NIM), the plasmid-encoded transmembrane protein ORF3 lacks the major promoter region. *Microbiology*, 2009, 155: 2058-2067.
- [17] 田国忠, 温秀军, 李永, 孙朝辉, 赵玉芬, 郭晓军, 黄钦才, 李志清, 赵俊芳. 枣疯病和泡桐丛枝病植原体不同分离物组织培养保藏和嫁接传病试验比较. *林业科学研究 (Forest Research)*, 2005, 18(1): 1-9.
- [18] Lin CL, Zhou T, Li HF, Fan ZF, Li Y, Piao CG, Tian GZ. Molecular characterization 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.
- [19] Schaper U, Seemueller E. Recolonization of the stem of apple proliferation and pear decline-diseased trees by the causal organisms in spring. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 1984, 91: 608-613.
- [20] Novichkov PS, Omelchenko MV, Gelfand MS. Genome-wide molecular clock and horizontal gene transfer in bacterial evolution. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186: 6575-6585.
- [21] 徐启聪, 田国忠, 王振亮, 孔繁华, 李永, 王合. 中国各地不同枣树品种上枣疯病植原体的 PCR 检测及分子变异分析. *微生物学报 (Acta Microbiologica Sinica)*, 2009, 49(11): 1510-1519.
- [22] Lee IM, Martini MP, Marcone C, Shifang F, Zhu. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group(16SrV) and proposal of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2004, 54: 337-347.
- [23] Lai F, Li Y, Piao CG, Xu QC, Tian GZ. Molecular characterization of Bishopwood witches'-broom phytoplasma in China. *Proceedings of the Third Asian Conference on Plant Pathology*, Yogyakarta, Indonesia, 2007: 157-158.
- [24] 赖帆, 田国忠, 林彩丽, 徐启聪, 李永, 朴春根. 我国四个地区泡桐丛枝病植原体株系 23SrDNA、质粒 DNA 和与叶酸合成相关的基因 *folP* 分析. *中国植物病理学学会 2009 年学术年会论文集*. 北京: 中国农业出版社, 2009: 266-270.
- [25] Lee IM, Zhao Y, Davis RE. Prospects of multiple gene-based systems for differentiation and classification of phytoplasmas. In *Phytoplasmas: Genomes, Plant Hosts and Vectors*. Eds PG Weintraub and P Jones, CAB International, 2010: 51-63.
- [26] Wang J, Zhu XP, Gao R, Lin CL, Xu QC, Li Y, Piao CG, Li XD, Li HF, Tian GZ. Genetic and serological analyses of elongation factor EF-Tu of paulownia witches'-broom phytoplasma (16SrI-D). *Plant Pathology*, 2010, 59: 972-981.
- [27] Lin CL, Piao CG, Li Y, Song CS, Li HF, Zhou T, Tian GZ. Characterization of P33 protein encoded by plasmid from paulownia witches'-broom phytoplasma. The 18th IOM Congress. Chiancciano Terme, Italy, July, 2010, 146.
- [28] Bai XD, Zhang JH, Adam E, Sally AM, Agnes JR, Dmitry VS, Kiryl T, Theresa W, Alla L, John WC, and Saskia AH. Living with genome instability: the adaptation of phytoplasmas to diverse environments of their insect and plant hosts. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188: 3682-3696.

Complete sequence of a full-length DNA and molecular characterization of one plasmid from chinaberry (*Melia azedarach* Z) witches'-broom phytoplasma

Chuansheng Song¹, Caili Lin¹, Guozhong Tian^{1*}, Wenjun Zhao², Shuifang Zhu², Haiqing Mou², Jiaxu Hu¹, Xizhuo Wang¹, Minwei Guo¹

¹Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry/The Key Laboratory of Forest Protection, State Forestry Administration, Beijing 100091, China

²Institute of Animal and Plant Quarantine, Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029, China

Abstract: [**Objective**] To clone plasmid from chinaberry witches'-broom phytoplasma and analyse its molecular characterization. [**Methods**] Fragments of one plasmid (pCWBFq) in chinaberry witches'-broom phytoplasma-Fuqing strain (CWBFq) were amplified with primer pairs which were designed according to plasmid sequences published on NCBI. Transmembrane domain and subcellular localization predictions of proteins encoded by the plasmid pCWBFq as well as phylogenetic analysis among the plasmid sequences were completed by using bioinformatic softwares. Southern blot analysis was performed to detect the plasmids existed in CWBFq and several other phytoplasmas with the pCWBFq *repA* probe. [**Results**] One complete plasmid was sequenced from CWBFq. pCWBFq comprised 4446 bp and had a nucleotide content of 73.5% A + T and encoded six proteins. Protein P2, P3, P4 and P5 of pCWBFq contained 3, 2, 1 and 2 transmembrane domains respectively, and their predicted signal peptide values were 0.989, 0.505, 0.918 and 0.914 respectively. Homologous comparison showed that RepA homology between pCWBFq and other phytoplasmas was between 9.6% - 85.6%, however, the homology of different SSB proteins was between 74.0% - 89.4%. Southern blotting with pCWBFq *repA* probe confirmed the existence of the plasmids in CWBFq. In addition, The hybridizations occurred with paulownia witches'-broom phytoplasma-Nanyang strain (PaWBny), periwinkle virescence phytoplasma-Hainan strain (PeVHn), chinaberry witches'-broom phytoplasma-Fuzhou strain (CWBFz) and mulberry dwarf phytoplasma -Puyang strain (MDPy), whereas, no hybridizations occurred with jujube witches'-broom phytoplasma-Beijing strain (JWBBj), cherry lethal yellows phytoplasma-Xichang strain (CLYXc) and *Bischofia polycarpa* witches'-broom phytoplasma-Nanchang strain (BiWBnc). [**Conclusion**] The plasmid encoded a replication associated protein (RepA) and a single-stranded DNA binding protein (SSB), which were for the replication of plasmid. Four putative proteins encoded by the plasmid were predicted to contain one or more hydrophobic transmembrane domains, respectively, and presumably to be localized to the membrane. The alignment and homology analysis as well as phylogenetic analysis to the DNA and encoded protein amino acid sequences of the whole plasmids and single ORFs on the known phytoplasmal plasmids showed that the different homologous sequences have distinct variation, among which the *repA* gene with the largest diversity appeared in all the known plasmids while *ssb* with less variation were only found in 16SrI plasmids. CWBFq, PaWBny, PeVHn, CWBFz and MDPy possessed distinct plasmids in terms of number and size, whereas there was no plasmid detected in JWBBj, CLYXc and BiWBnc, perhaps as a result of low homology among *repA* genes in plasmids of JWBBj, CLYXc and BiWBnc.

Keywords: chinaberry witches'-broom phytoplasma, plasmid, sequence analysis, phylogenesis, Southern blot

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Department Public Benefit Research Foundation (200810517-3) and by the National Natural Science Foundation of China (30872025)

* Corresponding author. Tel: +86-10-62889525; Fax: +86-10-62884972; E-mail: tiangz@caf.ac.cn

Received: 11 March 2011/Revised: 3 May 2011