

# 国内外樱桃植原体(*Phytoplasma*)病害研究进展

穆雪, 赵洋, 李春艳, 汪卫星\*

(西南大学园艺园林学院, 重庆北碚 400716)

**摘要:** 植原体是一类无细胞壁、不能人工培养、存在于植物筛管内的专性寄生菌, 世界各地已报道植原体可引起 1 000 余种各类植物系统性病害, 涵盖农作物、园艺、花卉、果树和林木等, 该病害传播性强、症状明显、危害较大, 可不同程度引起植物生长发育异常或变异, 甚至造成植株死亡。樱桃植原体病害就是其中一种, 近年来该病害已经成为威胁樱桃产业发展最为重要的病害之一, 主要引起樱桃花变叶(绿)及花器官、叶片、果实的生长发育异常和变异, 并最终导致植株 2~5 a(年)内迅速死亡, 对我国乃至世界樱桃产业造成了非常重大的损失。随着我国近几年不同地区樱桃植原体病害发生面积、规模及危害程度地不断增加, 尤其是笔者研究发现的重庆地区大规模爆发引起了极大威胁, 使得有关其致病机制、植株生长发育特性及防治方法的系统研究显得迫在眉睫、尤为重要。针对樱桃植原体病害研究的需求, 笔者综述了国内外有关研究进展, 主要从植原体的分类、检测与传播以及樱桃植原体病害等多个方面进行阐述, 为进一步开展樱桃植原体病害研究与防治等提供重要基础, 并对未来的研究前景与应用价值进行了分析。

**关键词:** 樱桃; 植原体; 病害

中图分类号: S662.5

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2019)12-1754-09

## International advances of the research on the phytoplasma diseases in cherry

MU Xue, ZHAO Yang, LI Chunyan, WANG Weixing\*

(College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400716, China)

**Abstract:** Phytoplasmas, which was originally called mycoplasma, are a class of A prokaryote resembling a bacterium that have no cell walls, the mycelium is only surrounded by a unit membrane composed of adipose membrane, it cannot be cultured, and exist in plant screens. Its morphological structure is easily affected by external environmental conditions, and it is still difficult to conduct in vitro artificial culture. It has been reported that phytoplasma can cause more than 1 000 kinds of plant systemic diseases in various parts of the world. The extent of the disease includes crops, horticulture, flowers, fruit trees and forest trees, etc., the disease is highly transmitted, obvious symptoms, and great harm, the phytoplasma infection can cause plant hormone or growth regulator disorders, which can lead to abnormal growth or variation of plants, and if seriously it can even cause plant death. Our country has announced more than 100 original body related diseases, and this number continues to rise, the current domestic for the naming of the original body has more than 60 kinds of graft, and constantly have new candidate reports and named reported from the plant in the original body has 16S rDNA group members across the world in addition to classify according to symptoms and features on the body, the early name are caused in the diseases of plants with the characteristics of the disease, such as paulownia witches' original body since the late 1980s, has designed many PCR primers combination to amplify the operon part is used for the diagnosis and the system development, due to the availability of general primers, rooted in the history of the original diagnosis and system development has been based on 16S rRNA

收稿日期: 2019-04-19 接受日期: 2019-09-06

基金项目: 重庆市基础科学与前沿技术研究项目(cstc2017jcyjAX0355); 中央高校基本科研业务费专项资金项目(XDJK2018B038)

作者简介: 穆雪, 女, 在读硕士研究生, 主要从事果树栽培管理与产业化发展方面的研究。Tel: 15340520403, E-mail: 874940506@qq.com

\*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13883716907, E-mail: 350518857@qq.com

genes and 16S-23S rRNA spacer to detect plant disease is the most difficult to solve and prevention and control of the original body is difficult to control the spread of the original body, under natural conditions, plant not only can the original body by leafhoppers aphids Insects such as psyllid can be spread and diffused as mediators. In addition, phytoplasma can be spread by grafting Cherry phytoplasma disease is one of them. In recent years, this disease has become one of the most important diseases threatening the development of cherry industry, mainly causing cherry phyllody (virescence) disease and abnormal growth and variation of the flower organs, leaves and fruits. Eventually, the plant will die rapidly within 2-5 years, causing a very significant loss to the cherry industry in China and the world. The extent of the disease varies from region to region. With the increasing area, scale and damage degree of cherry phytoplasma in different regions in recent years, especially cherry phytoplasma breaks out in large area of Chongqing city, which has brought us severe threat. The yield and quality of cherry planting area in this area have been greatly affected, which has caused serious losses to the cherry planting industry around Chongqing. So the systematic research on its pathogenic mechanism, plant growth and development characteristics and control methods is particularly important. Only a systematic study of all relevant information can cure the disease. In view of the research needs of cherry phytoplasma disease research, this paper reviews the research progress at home and abroad, mainly from the classification, detection and transmission of phytoplasma and cherry phytoplasma diseases, etc., it provides an important basis for further research and prevention of cherry plant diseases, and analyses the future research prospect and application value.

**Key words:** Cherry; Phytoplasma; Disease

樱桃 (Cherry) 属蔷薇科 (Rosaceae) 李亚科 (Prunoideae) 樱属 (*Cerasus* Mill.) 落叶果树, 主要包括中国樱桃 [*C. pseudocerasus* (Lindl.) G. Don]、欧洲甜樱桃 [*C. avium* (L.) Moench] 和毛樱桃 [*C. tomentosa* (Thunb.) Wall.] 等, 因其具有丰富的营养价值、保健价值与鲜食加工价值而受到广大消费者的喜爱, 尤其是近几年已经成为国内外早春季节最受欢迎的鲜食水果之一<sup>[1]</sup>。樱桃起源于欧洲及西亚大陆, 主要分布在美国、加拿大、欧洲等地; 1871年前后由传教士引入我国, 最早在山东烟台种植, 目前已经初步形成以山东、黑龙江、陕西、吉林、辽宁、四川、河南、重庆、贵州、云南等地区为主要分布区域的优势产业发展区。

随着樱桃产业的迅速发展, 各类病虫害已经逐渐成为了主要的限制因素, 包括褐斑病、褐腐病、根癌病等; 而近几年, 国内外发现的樱桃植原体病害逐渐成为非常严重而又难以防控的“毁灭性病害”。植原体 (Phytoplasma), 原称类菌原体 (Mycoplasmas organism, 简称 MLO), 是一类无细胞壁、不可人工培养、存在于植物韧皮部筛管细胞中以及介体昆虫中的植物病细菌, 近半个世纪以来植原体病害一直被误认为病毒病害, 1967年日本科学家 Doi 等<sup>[2]</sup>利用

电子显微镜首次发现类菌原体, 类菌原体在1994年的第十届国际菌原体组织会议上正式被更名为植原体。尽管植原体发现较晚, 但世界各地已报道植原体可引起1000余种植物的系统性病害, 涵盖农作物、园艺、花卉、果树和林木等病害。樱桃植原体病害可引起黄化<sup>[3]</sup>、衰退<sup>[4]</sup>、花变叶或花变绿<sup>[5-6]</sup>、X病<sup>[7]</sup>等, 并最终导致植株2~5 a(年)内迅速死亡, 已经成为严重影响和威胁樱桃植株生长和产业严重病害<sup>[8]</sup>。

## 1 植原体研究进展

### 1.1 植原体的生理学特征

植原体是引起多种植物病害的重要病原菌, 无细胞壁, 细胞结构由厚度为8~10 nm的单位膜包裹, 可以随周围介质变化而改变, 一般为椭圆形、球形或多态不规则形, 大小为200~800 nm, 具有细胞结构, 比病毒的生理结构复杂<sup>[2]</sup>。菌体内含有大量的丝状体DNA、丝状或螺旋状的核糖体蛋白、可溶性RNA、可溶性蛋白和各种代谢物质。一方面, 由于植原体无细胞壁, 因此对青霉素类的抗生素不发生反应, 对四环素却很敏感。另一方面, 由于无细胞壁, 植原体代谢过程中不需要合成肽聚糖等物质, 所以对环境

内糖浓度的变化不敏感,使其很好地寄生于植物韧皮部筛管组织中。

固醇是植原体细胞膜形成的主要部分,由于植原体不能自体合成固醇,所以植原体生长过程中需要从外界获取固醇。在植物的细胞质和昆虫介体的血液中含有固醇成分,这一特征使植原体通过寄存于植物韧皮部和昆虫体内来获取所需的固醇内物质并大量繁殖,引发植物病害<sup>[9]</sup>。

## 1.2 植原体的分类

自 1967 年植原体被发现以来,试图利用各种方法在无细胞培养基中培养植原体的尝试遭遇失败,使得难以通过原核生物培养的传统方法来确定植原体的分类地位。经过多年的研究,植原体分类研究利用现代柔膜菌纲系统学基于表型、基因型和系统发育标准的多相分类学系统<sup>[10-12]</sup>,但由于缺乏表型标准,植原体主要是基于分子特征和系统发育来进行分类,事实证明基于分子水平的分析比长期用于植原体鉴定的生物学标准更准确和可靠,尤其是 20 世纪 80 年代后期和 90 年代早期开发的基于 PCR 的检测方法,通过提供更加灵敏的植原体检测手段,促进了植原体的检测和分类研究<sup>[13]</sup>。

**1.2.1 植原体的传统分类** 植原体刚提出时,植原体主要依据植物的发病特征及不同的寄主等生物学特征进行初步分类,根据植原体侵染后植物症状将植原体分为衰退、丛簇和变绿 3 个主要组。但由于植原体侵染植物后易受到外界环境和其他植物病害的干扰,导致使用传统的生物学分类方法对植原体的分类往往存在不够全面的缺点。

**1.2.2 基于 16S rRNA 基因与其他基因的分生物学分类** 高度保守的 16S rRNA 基因序列是植原体研究群体中使用最广泛的标记,已经成为植原体初步分类的重要分子工具。主要通过利用 16 S rDNA PCR-RFLP 分析或基于计算机模拟限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP) 对植原体进行分类<sup>[14-15]</sup>。目前,植原体的物种命名主要基于 16S rDNA 序列在植原体中的差异性,2.5% 不相似度的任意阈值用作定义新物种的指标<sup>[16]</sup>。Schneider 等<sup>[17]</sup>采用 RFLP 分析 PCR 扩增的 16S rRNA 基因序列,基于 17 种限制性内切酶的 RFLP 分析的结果,为植原体建立了一个全面的分类方案,该分类方案是基于 1.2 kb PCR 扩增子的集体 RFLP 模式的相似系数<sup>[14]</sup>,不超过 90% 的相似系数可

分为 2 个不同的组,而组内的亚组分类则是基于该扩增子内的限制性位点分析,如果一个未知的植原体菌株有一个或多个限制性位点不同于该组的现有成员的限制性位点,则确定为一个新的亚组<sup>[18-21]</sup>。植原体的分类随着研究的深入正在不断地进行完善和补充。国际比较菌原体学研究计划署 (IRPCM) 早期将植原体划分为 17 个组,24 个种,至少 40 个亚组,并制定了相应的分类标准,直至 2004 年,该组织将植原体划分为 33 个组,35 个种,至少 110 个亚组<sup>[16]</sup>。

基于 16S rRNA 基因的植原体分类系统的优点在于其高度的序列保守性,通用寡核苷酸引物的设计相对容易,除了 16S rRNA 基因以外,另外还设计了 16S-23S 基因间隔区、部分 23S rRNA 基因序列的几种通用引物对或通用寡核苷酸引物对和不同的基因(如 *tuf*、*rp*、*secY* 基因等。)用于植原体分类学研究<sup>[22]</sup>。编码延伸因子 *EF-Tu* 的 *tuf* 基因是另一个高度保守的基因,用于植原体的分化和分类<sup>[23-24]</sup>。1997 年,Schneide 等<sup>[25]</sup>设计的引物对可用于扩增大多数植原体 *tuf* 基因序列,使用几种限制性内切酶基于 RFLP 分析可以区分植原体组和亚组。虽然在植原体中分离不同谱系的解决效果略低于 16S rRNA 基因<sup>[26]</sup>,然而,在某些情况下,*tuf* 基因可用于 16S rRNA 亚组内各种生态株或菌株变体的分化<sup>[27-28]</sup>,*tuf* 聚合酶链式反应序列分析可用于植原体分类群 16SrI、16SrV、16SrXII-A 和 XII-B。例如,基于对 *tuf* 基因序列的分析,在 16XII-A 和 16XII-B 内识别了几种菌株变体。*tuf* 基因除了用于确认植原体菌株的分类地位之外,还可以追踪寄主植物和昆虫载体中的植原体菌株的扩散。

核糖体蛋白基因 (Ribosomal protein, *rp*) 比 16S rRNA 基因更易变,并具有更多的系统发生信息特征。早期对 16SrI 和 16SrV 植原体菌株进行分化的研究表明,*rp* 基因序列的分析不仅容易描绘出与 16Sr 亚组一致的亚组,而且在一些亚组内还鉴定出通过分析 16S rRNA 基因序列不能分辨的另外的不同菌株(谱系)<sup>[29]</sup>。例如,被归类为 16SrI-B 亚群的成员的玉米丛矮 (Maize bushy stunt, MBS) 植原体,其中宿主植物和特异性载体的宽窄范围不同于 16SrI 群的其他成员,代表独特的 *rp* 亚群。同样,用几种选定的关键限制性酶进行 RFLP 分析,亚组 16SrV-C 可以进一步分化为几个 *rp* 亚组。Martini<sup>[30]</sup>等利用两

个核糖体蛋白基因 *rplV*(*rpl22*)和 *rpsC*(*rps3*)来分析来自46个代表植株的12个16Sr组的植原体菌株,构建了全面的系统发育树。这种基于 *rp* 基因的系统发育树,明确了植原体株系之间的系统发育关系,并划定了更明显的植原体亚群和不同的谱系,而不是16S rRNA基因树。

编码蛋白质的亚基的 *secY* 基因是另一种有助于植原体菌株分化的分子标记。*secY* 基因序列变异性与 *rp* 基因的变异性相似。两个给定的16Sr植原体组别之间的平均 *secY* 基因序列相似性为57.4%~76.0%。根据对来自16SrI和16SrV植原体的 *secY* 基因序列的RFLP分析得到的结果表明:*secY* 亚组通常与用 *rp* 基因序列分析的结果一致<sup>[31]</sup>。但是,结果也表明,*secY* 的分辨能力比 *rp* 基因序列略好,*secY* 基因与 *rp* 基因一样,可能是植原体菌株分类的良好候选标记。

### 1.3 植原体的检测

细菌中的rRNA操纵子由16S rRNA基因、内部转录间隔区(Internal transcribed spacer, ITS)、23S rRNA基因组成,自20世纪80年代后期以来,已经设计出许多PCR引物组合来扩增该操纵子的部分基因,用于诊断和系统发育。由于通用引物的可用性,植原体诊断和系统发育历史上一直基于16S rRNA基因和16S-23S rRNA间隔区来检测<sup>[32]</sup>。例如P1和P7是通用引物,用于诊断来自所有植原体系统发育群体的DNA<sup>[33]</sup>。然而,基于这些引物的诊断偶尔会出现假阳性。基于16S rRNA基因开发了用于普通和特异性植原体检测的实时PCR检测方法,与传统的PCR方法相比,具有更好的自动化和操作容易的优点<sup>[34]</sup>。此外,基于16S rRNA基因的寡核苷酸阵列系统由21~33nt的寡核苷酸组成,可以用来鉴定来自不同亚组的植株。在该系统中,通用引物用于扩增16S rRNA基因的特定区域,并且PCR产物用特定的限制性内切酶消化并分析,通常使用聚丙烯酰胺凝胶电泳以便消化产物良好分辨。相对于RFLP分析,基于16S rRNA的特定模式可以鉴定植原体并将其分为组和亚组<sup>[14]</sup>。相关研究表明:在2006年之前,利用分析结果确定了18个16Sr群和40多个子群<sup>[15]</sup>。Wei等<sup>[35]</sup>已经在国家生物技术信息中心(NCBI)核苷酸序列数据库中设计了保存的序列的系统,其中使用计算机模拟方法如AcaClone对

限制性消化通量进行了模拟,用于各种酶的pDRAW32系统,通过定义公式<sup>[36]</sup>计算限制性片段的相似系数,根据结果可得出任意给定菌株之间共有和不同片段的数目,计算机系统可以很好地处理新的植原体序列。另外,已经建立了基于这些基因序列的替代诊断方法,例如异源双链体移动性测定(Heteroduplex mobility assays, HMAs)<sup>[37]</sup>、单链构象多态性(Single-strand conformation polymorphisms, SSCP)<sup>[38]</sup>、T-RFLP<sup>[39]</sup>、LAMP<sup>[40]</sup>和荧光定量PCR(Real-time PCR)<sup>[41]</sup>。

然而,基于单个高度保守基因的系统发育关系检测存在一定的局限性,而且由于菌株之间的序列差异,可以用于植原体中其他基因的通用引物比较困难。目前大多数生物体正在使用的方法是通过组合一系列不同基因的序列数据,如 *tuf* 和 *rp* 操纵子的引物已经设计用于特定的16Sr组中,可用于亚组区分,而且可为 *rp* 操纵子和 *secA* 的通用引物设计半通用引物基因<sup>[26]</sup>,利用16S rRNA基因的系统发育确定分组,而利用其他基因分析的结果提供了更好的分离株分辨率,并且还确定了不同植原体之间DNA和氨基酸序列的大量变异。这些新的序列也正在发展成为替代植原体诊断系统,目的在于提供鉴定植原体并将其分配到特定系统分类的快速方法。

### 1.4 植原体的传播

大多数植原体的传播媒介属于半翅目(Hemiptera)头喙亚目(Auchenorrhyncha),如叶蝉(Cicadellidae)、飞虱(Delphacidae)等,也有一些植物通过木虱(Psyllidae)[属胸喙亚目(Sternorrhyncha)]传播,由木虱传播的植原体病害包括果树疾病,例如梨衰退病(pear decline, PD)、苹果丛枝病(Apple proliferation, AP)和欧洲坚果黄化病(European stone fruit yellows, ESFY)等<sup>[42]</sup>。未感染的昆虫在受感染植物的韧皮部中进食,从游离氨基酸和糖中获得营养并摄取寄存在其中的植原体颗粒,摄入的植原体颗粒必须穿透昆虫中肠细胞并移动到昆虫血囊中,通过血淋巴传播到昆虫体内,通过需要经过一段潜伏期,大约为10天到3周,在此期间,植原体颗粒侵入昆虫唾液腺组织并进行繁殖,当昆虫在吸食新的植物韧皮部时释放含有植原体的唾液腺分泌的唾液,此时植原体将占据植物宿主并开始繁殖,经过潜伏期(高度变异和寄主植物依赖)后,植物开始发生疾病症

状。一旦植原体的浓度足够高,该植物就可以作为任何载体上的载体物种的获取宿主<sup>[10]</sup>。

## 2 樱桃植原体病害研究进展

樱桃植原体病害可引起叶片黄化<sup>[3]</sup>、植株衰退<sup>[4]</sup>、花变绿(图 1-B)<sup>[5]</sup>、花变叶(图 1-C)<sup>[43]</sup>、X 病症

状<sup>[7]</sup>等,这些病害中的有些疾病是致命的。据报道,引起樱桃发生植原体病害的植物体有 6 种,包括 *Ca. Phytoplasma asteris*、*Ca. Phytoplasma pruni*、*Ca. Phytoplasma ziziphi*、*Ca. Phytoplasma prunorum*、*Ca. Phytoplasma pyri*、*Ca. Phytoplasma solani*<sup>[43]</sup>,根据其 16S rRNA 基因序列的 RFLP 分析,已知的樱桃植原



A. 正常樱桃花;B. 花瓣变为绿色,花药与柱头等雌雄器官败育;C. 花器官萌发新梢与新叶。

A. Normal cherry flowers; B. Petals turn green, anthers and stigma and other male and female organs abort; C. Flower organs sprout new shoots and new leaves.

图 1 樱桃花变绿(叶)植原体花器官变异

Fig. 1 Variation of floral organ of cherry virescence (phyllody) phytoplasma

体属于 5 个不同的核糖体群,即 16SrI、16SrIII、6SrV、16SrX、和 16SrXII。

### 2.1 樱桃致死黄化植原体

1982 年,四川省西昌市发现樱桃树出现一种毁灭性病害,暂称致死黄化,其主要症状为:叶片黄化、丛枝、开花推迟,果实小而少、不成熟,发病 3~4 d 后全株枯死。在电镜下,只在病株樱桃叶脉筛管中找到了典型的类菌原体,研究表明,四环素对此病具有一定的治疗效果,而青霉素无效,因此初步认为此病由类菌原体引起<sup>[44]</sup>。为检测樱桃致死黄化植原体,林彩丽等<sup>[45]</sup>用引物分别进行普通 PCR 和非特异性实时定量 PCR (Real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 检测,结果表明,用引物 R16nF/R16nR 进行 RT-qPCR 可以定量检测不同组的樱桃植原体,也可用于泡桐丛枝、苦楝丛枝和板栗黄化皱缩等植原体检测。

Stanienė 等<sup>[46]</sup>在体外诱导外植体培养 1 d 后,分析了微芽中的植原体与类病毒分布,并确定了体外培养物中植原体和类病毒的分布规律。通过 RFLP 分析 16S rDNA 的序列表明,甜樱桃致死黄化中检测到的植原体属于两个植原体亚群,分别是 16SrIII-T 和 16SrI-B 两个植原体亚群,而且被感染了植原体和类病毒的植株感染别的病毒概率更高。另外,在 2014—2015 年期间,捷克共和国境内的甜樱桃种质

收集和植原体疾病的调查研究发现在受黄化植原体感染的样品中发现了 16SrI-A 和 16SrI-B 亚组相关的植原体<sup>[47]</sup>。

### 2.2 樱桃衰退植原体

樱桃衰退病首先表现在根部,起初一部分须根出现坏死斑块,扩大后使全部根系枯死。由于根部受害,新梢生长量减少,叶小而硬,色淡而早落;变红和过早落叶的症状和表现出分支增殖和非季节开花;病树花多、果少,且小而坚硬,3~5 d 后逐渐衰退而死。Valiunas 等<sup>[4]</sup>将其命名为樱桃衰退病 (Designated cherry decline, ChD) 植原体,并暂时被归类为 16S rDNA RFLP 组 16SrIII (X-病植原体组),命名为 16SrIII-T 的新亚组成员;ChD 植原体 16S rDNA 分别与西方 X 病 (GenBank accession No. L04682) 和加拿大 X 病 (GenBank accession No. L33733) 相关的核果植原体的 16S rDNA 密切相关,且 ChD 的 16S rRNA 基因序列与蒲公英花变绿病 (Dandelion virescence, DanVir) *rrnB* 的高度相似性表明 ChD 和 DanVir 可能属于单一的植原体物种,并推测蒲公英可能是 ChD 植原体的一个转主寄主。2014 年, Wang 等<sup>[6]</sup>于国内首次报道樱桃衰退病 16SrV 组植原体研究,结果表明樱桃衰退病病株叶片中中脉和枝韧皮部提取总 DNA 的 RFLP 图谱与 16 SrV-B 亚组成员 JWB-Hubei

菌株(GenBank accession No. AF305240)相同。

### 2.3 樱桃花变绿植原体

2007年,在我国山东省烟台地区果园实地考察时发现,超过100株‘红灯’樱桃显示绿化症状,主要症状是花变绿、花变叶、衰退、节间短、不育等,花变绿则指花瓣有不同程度的绿色,有些花呈浅绿色,有些花完全是绿色,而有些花呈叶状,这些症状只发生在一些嫩枝上,而邻近枝条的花朵则是正常的,发生花变绿或花变叶的症状的枝条不结实。随后将有症状的接穗嫁接到10株健康樱桃树上,2 d后,4株树出现了花变绿现象,说明该病害是可传播的。与樱桃花序相关的潜在植原体被命名为ChV-YT(Cherry virescence in Yantai), Wang等<sup>[6]</sup>研究认为我国樱桃的ChV-YT分离物属于菊黄化植原体组(Aster yellows group),代表了一个新的亚组,初步命名为16SrIS。2012年郑晓慧等<sup>[5]</sup>比较3个株系的核苷酸及编码的氨基酸序列差异,可看出ChV株系与CLY5(Cherry lethal yellows, CLY5)、PY-In(Peach yellows, PY-In)的差异均大于CLY5和PY-In之间的差异,由于CLY5和PY-In在分类上分别属于rpVB亚组和rpV-M亚组,因此认为该樱桃花变绿植原体株系(ChV)代表植原体rpV组中的新亚组(rpV-N),这是在植原体rpV组中首次报道的一个新亚组。2013年4月,位于中国山东省泰安郊区的两个果园中甜樱桃树呈现花瓣绿化症状,对其序列进行分析发现,甜樱桃绿化(Sweet cherry virescence, SCV)病与一种与参考株Candidatus *Phytoplasma ziziphi*密切相关的植原体感染有关,而且SCV植原体是16SrV-B亚群的新成员<sup>[5]</sup>。由于大多数以前被描述为樱桃花变绿病植原体在病因上都与枣丛枝病(jujube witches-broom, JWB)有关, Wang等<sup>[48]</sup>将这些高度一致的植原体病害称为SCV-JWB系。

### 2.4 樱桃花变叶植原体

花变叶植原体表现为花器官被叶片代替,任何花器官,甚至胚珠,都可以变成叶子状或颜色。2008年春,在土耳其某些果园中同样出现一些花变叶的症状的植株(5%至100%)。Engin等<sup>[49]</sup>在2008年4月初采集的芽样品的观察表明,大部分花芽仍处于萼片分化和雌蕊开始之间的阶段,这个事实表明,受一些应激因素的影响,花瓣、雄蕊和雌蕊原基的进程尚未形成,如果顶端从花瓣原基到早期雌蕊原基的过渡被终止,它就会恢复到植物状态。Beppu等<sup>[50]</sup>

提供了许多发生这种异常的物种的例子,许多因素如环境条件以及植原体和病毒的感染可能是造成这种现象的原因。Engin等<sup>[49]</sup>指出如果环境因素(如花芽分化周围的炎热天气)是致病原因,那么这个地区的所有甜樱桃树都会显示出这种异常情况,但其他果园中的一些树木看起来完全自由和健康,因此推测出植原体是出现异状花的原因之一。2008年,高瑞<sup>[43]</sup>在我国首次报道了樱桃花变叶病,樱桃花变叶病株主要表现为树势衰弱,开花延迟,花萼和花瓣都变成叶片,表现症状的花瓣多半花柄变短,有的小枝上所有的花瓣都变成叶片,也有的枝条上部分花瓣变成叶片。通过测定2个PCR反应克隆到的片段序列,确定为樱桃花变叶植原体引起,且暂命名为樱桃花变叶病(Cherry phyllody, ChP),并证明该植原体可能是16SrI组的一个新亚组。

2018年,笔者研究团队在重庆地区发现了大规模疑似植原体病害<sup>[51]</sup>,主要表现为花变叶(绿)、不结果或僵果、植株早衰至死亡等症状,从采集到表现花变叶的症状的中国樱桃枝条样品中,利用透射电镜在感病樱桃枝条韧皮部筛管细胞内观察到直径为200~500 nm的圆形或者近圆形典型植原体粒子。提取感病和健康枝条的总DNA,利用植原体16S rRNA基因及延伸因子 $rp$ 基因通用引物进行PCR扩增,从感病枝条中扩增得到了长度分别约为1.4和1.2 kb的片段。序列一致率分析表明,樱桃花变叶植原体16S rRNA基因和 $rp$ 基因均与四川甜樱桃花变绿植原体相应基因的核苷酸一致率最高,分别为100%和99.8%;16SrRNA基因相似系数分析表明,樱桃花变叶植原体与四川甜樱桃花变绿植原体、枣疯植原体的相似系数均为1.00;基于16SrRNA基因和 $rp$ 基因构建系统进化树时发现,樱桃花变叶植原体均与16SrV-B亚组成员聚为一簇。电镜和分子生物学鉴定结果表明,樱桃花变叶病株内存在植原体,且该植原体属于榆树黄化组的16SrV-B亚组。

### 2.5 樱桃X病植原体

樱桃X病症状出现在至少3 a的植物上,导致生活力降低,并且大多数情况下,在树干或树枝中可观察到树皮脱落、韧皮部坏死。Uyemoto等<sup>[52]</sup>对樱桃X病的传播进行嫁接实验,结果表明接种在‘马哈利’樱桃(*P. mahaleb*)砧木上的樱桃树X病感染,表现在砧木和接穗连接处愈伤组织的生活力迅速下降;除此之外,Uyemoto对樱桃X病传播的季节性变化及

昆虫媒介的传播进行研究,结果表明樱桃 X 植原体在春季的感染潜力平均为 10%,而来自同一来源树木的夏季感染力平均为 64%,在夏季树势迅速下降并濒临死亡;每隔一段时间(4 月至 9 月)在感病与健康樱桃树上饲养叶蝉,叶蝉感染植原体的相对百分比不同,感病植株叶蝉 4 月份没有感染,5、6 月份感染率均低于 5%,而 8、9 月份分别为 24%与 20%,感染率相对更高,但在健康樱桃树上的叶蝉是非感染性的。González 等<sup>[7]</sup>对樱桃 X 病进行病原鉴定,将该植原体归为核糖体亚群 16SrIII-J(与 X 疾病组相关),所有表现症状的植物均鉴定出该植原体,但在无症状的植物中未鉴定出该植原体。

### 3 小结与展望

#### 3.1 植原体的分类与检测

由于无法获得体外培养物和植原体表型标准,基于 DNA 的探针和基于 PCR 的敏感检测程序等分子工具已经基本取代了基于生物特性的传统程序,推进了植原体疾病诊断及植原体的鉴定<sup>[15]</sup>。目前,植原体分类和物种命名主要基于 16S rRNA 基因,采用 Murray 等<sup>[53]</sup>提出的非培养细菌的临时分类系统。Brown 等<sup>[54]</sup>认为高度保守的 16S rRNA 基因可以用作细菌形态的主要系统发育参数,以取代基于 DNA-DNA 同源性的繁琐的常规方法。系统发育研究的进展和培养细菌中大量基因组测序项目的完成,使得人们对基因组组织和确定细菌界基因组多样性和表型特征的基本成分和主要成分有了深入的了解。因此,原核生物现代分类学的观点已经发生了变化。

通过比较基因组研究,可以选择不同程度遗传变异性的与生物化学、表型生物学特性相关的各种分子标记来进行植原体分类与检测,确定属、种和菌株。在人工培养基中获得纯细菌培养物的正确命名一直存在争议,而分子测序可以完全基于基因组序列数据而不需要活细菌培养,随着 DNA 测序技术的不断发展,包括植原体在内的大量细菌基因组序列将在不久的将来出现,分子方法也将成为检测和鉴定细菌的最直接和最主要手段。

#### 3.2 樱桃植原体病害研究与防治

有关樱桃植原体病害研究目前主要集中于病原菌的分离与基因组分析。

据报道,有六种不同的植原体导致樱桃植原体

病,而这些已知的樱桃植原体属于 5 个不同的核糖体群<sup>[43]</sup>。早期研究表明,有几种叶蝉(Cicadellidae)和木虱(Psyllidae)可能参与了 16SrIII 和 16SrX 植原体在包括樱桃在内的核果类果树的传播。国内外对樱桃植原体病害进行了病原分离与基因组分析,对樱桃植原体研究取得了初步进展,但对于樱桃感染后植株生长发育等研究未见相关报道。

樱桃植原体病害目前未见非常有效的治疗手段的相关报道,但管理植原体载体和疾病的策略很多,可用于该病害的防控,减少病害传播与蔓延,迄今为止最有效的控制手段是物理保护,即安装隔离网阻断传播,但它们的缺点是木本植物很容易撕裂网,或者在热带地区,由于强烈的太阳辐射会破坏隔离网。Wang 等<sup>[48]</sup>发现一种治疗植物冷冻疗法的新方法,表明由冷冻处理植原体感染的茎尖获得的植株都不含植原体,因此可以通过这种方法处理感病植株茎尖,再利用茎尖微芽嫁接等方法得到不含植原体的新植株,但这些技术不是预防性的,一旦这些植物暴露于传染性载体,它们也会被感染;而且当前用化学试剂处理植原体感染植物恢复后也可以被再度感染。因此要防治樱桃植原体病害,一方面应该由载体管理慢慢转向作物的各种遗传操作,以产生真正具有抗性的植物;另一方面,应该加强植物感病机制的研究,对植物生长发育异常与变异等各类症状形成的细胞生物学和分子生物学机制进行深入研究,以利于进一步研究防控方法;最后,要加强治疗植原体病害药物的研发,真正做到感病可治。

#### 参考文献 References:

- [1] 俞德浚. 中国植物志(第 38 卷)[M]. 北京: 科学出版社, 1986. YU Dejun. Flora Reipublicae Popularis Sinicae(Tomus 38)[M]. Beijing: Science Press, 1986.
- [2] DOI Y, TERANAKA M, YORA K, ASUYAMA H. Mycoplasma-or PLA group-like microorganisms found in the phloem elements of plants infected with mulberry dwarf, potato witches' broom, aster yellows, or paulownia witches' broom[J]. Japanese Journal of Phytopathology, 1967, 33(4): 259-266.
- [3] JOMANTIENE R, ZHAO Y, LEE I M, DAVIS R E. Phytoplasmas infecting sour cherry and lilac represent two distinct lineages having close evolutionary affinities with clover phyllody phytoplasma[J]. European Journal of Plant Pathology, 2011, 130(1): 97-107.
- [4] VALIUNAS D, JOMANTIENE R, IVANAUSKAS A, ABRAITIS R, STANIENE G, ZHAO Y, AIS R E. First report of a new phytoplasma subgroup, 16SrIII-T, associated with decline disease affecting sweet and sour cherry trees in Lithuania[J]. Plant Disease, 2009, 93(5): 550.

- [5] 郑晓慧,朱国翱,王连春,朱建勋,蔡红,陈海如. 樱桃花变绿病植原体的分子鉴定[J]. 植物病理学报, 2012, 42(5): 546-550. ZHENG Xiaohui, ZHU Guoao, WANG Lianchun, ZHU Jianxun, CAI Hong, CHEN Hairu. Molecular identification of a phytoplasma associated with cherry virescence disease[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2012, 42(5): 546-550.
- [6] WANG J W, ZHU D Z, LIU Q Z, DAVIS R E, ZHAO Y. First report of sweet cherry virescence disease in China and its association with infection by a 'Candidatus Phytoplasma ziziphi'-related strain[J]. Plant Disease, 2014, 98(3): 419.
- [7] GONZÁLEZ F, ZAMORANO A, PINO A M, PALTRINIERI S, BERTACCINI A, FIORE N. Identification of phytoplasma belonging to X-disease group in cherry in Chile[J]. Bulletin of Insectology, 2011, 64: S235-S236.
- [8] GUNDERSEN D E, LEE I M, REHNER S A, DAVIS R E, KINGSBURY D T. Phylogeny of mycoplasma-like organisms (phytoplasmas): a basis for their classification[J]. Journal of Bacteriology, 1994, 176(17): 5244-5254.
- [9] 顾沛雯. 小麦蓝矮病植原体的鉴定及其免疫膜蛋白(Imp)基因分子特征研究[J]. 河北林业科技, 2003(4): 1-2. GU Peiwen. Identification of phytoplasma and molecular characterization of immunodominant membrane protein gene from wheat blue dwarf [J]. The Journal of Hebei Forestry Science and Technology, 2003(4): 1-2.
- [10] WEINTRAUB P, BEANLAND L. Insect vectors of phytoplasmas[J]. Annual Review of Entomology, 2006, 51: 91-111.
- [11] MURRAY R G E, BRENNER D J, COLWELL R R, VOS P D, GOODFELLOW M, GRIMONT P A D, PFENNIG N, STACKEBRANDT E, ZAVARZIN G A. Report of the ad hoc committee on approaches to taxonomy within the proteobacteria[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1990, 40(2): 121-124.
- [12] VANDAAMME P, POT B, GILLIS M, DEVOS P, KERSTERS K, SWINGS J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics[J]. Microbiology Review, 1996, 60(2): 407-438.
- [13] LEE I M, DAVIS R E, GUNDERSEN RINDAL D E. Phytoplasma phytopathogenic mollicutes[J]. Annual Reviews in Microbiology, 2000, 54(1): 221-255.
- [14] LEE I M, GUNDERSEN RINDAL D E, DAVIS R E, BARTOSZYK I M. Revised classification scheme of phytoplasmas based on RFLP analyses of 16SrRNA and ribosomal protein gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1998, 48(4): 1153-1169.
- [15] WEI W, DAVIS R E, LEE I M, ZHAO Y. Computer-simulated RFLP analysis of 16SrRNA genes, identification of ten new phytoplasma groups[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(8): 1855-1867.
- [16] FIRRAO G, ANDERSEN M, BERTACCINI A, BOUDON E, BOVE J M, DAIRE X. 'Candidatus Phytoplasma', a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2004, 54(4): 1243-1255.
- [17] LEE I M, HAMMOND R W, DAVIS R E, GUNDERSEN D E. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms[J]. Phytopathology, 1993, 83(8): 834-842.
- [18] LEE I M, BOTTNER K D, SECOR G, RIVERA VARAS V. 'Candidatus Phytoplasma americanum', a phytoplasma associated with a purple top wilt disease complex[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2006, 56(7): 1593-1597.
- [19] LEE I M, MARTINI M, MARCONE C, ZHU S F. Classification of phytoplasma strains in the elm yellows group (16SrV) and proposition of 'Candidatus Phytoplasma ulmi' for the phytoplasma associated with elm yellows[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(2): 337-347.
- [20] LEE I M, GUNDERSEN D E, DAVIS R E, BOTTNER K D, MARCONE C, SEEMÜLLER E. 'Candidatus Phytoplasma asteris', a novel phytoplasma taxon associated with aster yellows and related diseases[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(4): 1037-1048.
- [21] ZHAO Y, SUN Q R, WEI W, DAVIS R E, WEI W, LIU Q Z. '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(10): 2496-2504.
- [22] NAMBA S, OYAIZU H, KATO S, IWANAMI S, TSUCHIZAKI T. Phylogenetic diversity of phytopathogenic mycoplasma-like organisms[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1993, 43(3): 461-467.
- [23] SELA S, YOGY D, RAZIN S, BERCOVIER H. Duplication of the *tuf* gene: a new insight into the phylogeny of eubacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1989, 171(1): 581-584.
- [24] LUDWIG W, NEUMAIER J, KLUGBAUER N, BROCKMANN E, ROLLER C, JILG S, REETZ K, SCHACHTNER I, LUDVIGSEN A, BACHLEITNER M, FISCHER U, SCHLEIFER K H. Phylogenetic relationships of bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase  $\beta$ -subunit genes[J]. Antonie van Leeuwenhoek, 1993, 64(3/4): 285-305.
- [25] SCHNEIDER B, GIBB K S. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor Tu gene used in differentiation and classification of phytoplasmas[J]. Microbiology, 1997, 143(10): 3381-3389.
- [26] MARCONE C, LEE I M, DAVIS R E, RAGOZZIN A, SEEMÜLLER E. Classification of aster yellows-group phytoplasmas based on combined analyses of rRNA and *tuf* gene sequences[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50(5): 1703-1713.
- [27] RIOLO P, LANDI L, NARDI S, ISIDORO N. Relationships among *Hyalesthes obsoletus*, its herbaceous host plants and 'bois noir' phytoplasma strains in vineyard ecosystems in the Marche region (central-eastern Italy) [J]. Bulletin of Insectology, 2007, 60(2): 353-354.
- [28] IRTI M, QUAGLINO F, MAFFI D, CASATI P, BIANCO P A, FAORO F. *SOLANUM MALACOXYLON*, a new natural host of *Stolbur* phytoplasma[J]. Journal of Phytopathology, 2008, 156(1): 8-14.
- [29] MARTINI M, BOTTI S, MARCONE C, MARZACHI C, CASATI P, BIANCO P A, BENEDETTI R, BERTACCINI A. Genetic variability among Flavescence dorée phytoplasmas from different origins in Italy and France[J]. Molecular and Cellular



- Probes, 2002, 16(3): 197-208.
- [30] MARTINI M, LEE I M, BOTTNER K D, ZHAO Y, BOTTI S, BERTACCINI A, HARRISON N A, CARRARO L, MARCONE C, OSLER R. Ribosomal protein gene-based phylogeny for finer differentiation and classification of phytoplasmas[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(9): 2037-2051.
- [31] LEE I M, ZHAO Y, BOTTNER K D. *SecY* gene sequence analysis for finer differentiation of diverse strains in the aster yellows phytoplasma group[J]. Molecular and Cellular Probes, 2006, 20(2): 87-91.
- [32] RAO G P, MADHUPRIYA K M, TOMAR S, MAYA B, SINGH S K, JOHNSON M. Detection and identification of four 16Sr subgroups of phytoplasmas associated with different legume crops in India[J]. European Journal of Plant Pathology, 2018, 150(2): 507-513.
- [33] FIRRAO G, GIBB K, STRETTEN C. Short taxonomic guide to the genus '*Candidatus phytoplasma*' [J]. Journal of Plant Pathology, 2005, 87(4): 249-263.
- [34] GALETTO L, BOSCO D, MARZACHÌ C. Universal and group-specific real-time PCR diagnosis of flavescente dorée (16Sr-V), bois noir (16Sr-XII) and apple proliferation (16Sr-X) phytoplasmas from field-collected plant hosts and insect vectors[J]. Annals of Applied Biology, 2005, 147(2): 191-201.
- [35] WEI W, LEE I M, DAVIS R E, SUO X B, ZHAO Y. Automated RFLP pattern comparison and similarity coefficient calculation for rapid delineation of new and distinct phytoplasma 16Sr subgroup lineages[J]. International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology, 2008, 58(10): 2368-2377.
- [36] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [37] WANG K, HIRUKI C. Distinctions between phytoplasmas at the subgroup level detected by heteroduplex mobility assay[J]. Plant Pathology, 2005, 54(5): 625-633.
- [38] MUSIĆ M Š, KRAJAČIĆ M, ŠKORIĆ D. The use of SSCP analysis in the assessment of phytoplasma gene variability[J]. Journal of Microbiological Methods, 2008, 73(1): 69-72.
- [39] HODGETTS J, BALL T, BOONHAM N, MUMFORD R, DICKINSON M. Use of terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) for identification of phytoplasmas in plants[J]. Plant Pathology, 2007, 56(3): 357-365.
- [40] ASH G. J, LANG J M, TRIPLETT L R, STODART B J, VERDIER V, VERA CRUZ C, ROTT P, AND LEACH J E. Development of a genomics-based LAMP (Loop-Mediate Isothermal Amplification) assay for detection of *Pseudomonas fuscovaginae* from rice[J]. Plant Disease, 2014, 98(7): 909-915.
- [41] HREN M, BOBEN J, ROTTER A, KRALJ P, GRUDEN K, RAVNIKAR M. Real-time PCR detection systems for Flavescente dorée and Bois noir phytoplasmas in grapevine: comparison with conventional PCR detection and application in diagnostics[J]. Plant Pathology, 2007, 56(5): 785-796.
- [42] SEEMÜLLER E, SCHNEIDER B. '*Candidatus Phytoplasma mali*', '*Candidatus Phytoplasma pyri*' and '*Candidatus Phytoplasma prunorum*', the causal agents of apple proliferation, pear decline and European stone fruit yellows, respectively[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(4): 1217-1226.
- [43] 高瑞. 山东省六种植原体病害的分子检测及鉴定[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008.
- GAO Rui. Molecular detection and identification of six plant diseases in Shandong province[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2008.
- [44] 朱水方, 舒秀珍, 何光烈, 林庆文. 樱桃致死黄化病病原研究[J]. 植物病理学报, 1992, 22(1): 25-28.
- ZHU Shuifang, SHU Xiuzhen, HE Guanglie, LIN Qingwen. A mycoplasma-like organism was found on cherry[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1992, 22(1): 25-28.
- [45] 林彩丽, 宋传生, 胡佳绩, 赵文军, 朱水芳, 牟海青, 田国忠. 实时定量 PCR 检测樱桃黄化致死植原体含量[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2011 年学术年会论文集, 2011: 256.
- LIN Caili, SONG Chuansheng, HU Jiaxu, ZHAO Wenjun, ZHU Shuifang, MU Haiqing, TIAN Guozhong. Quantitative real-time quantitative PCR detection of phytoplasma in cherry yellow[C]// Chinese Phytopathological Society. Chinese Society of Plant Pathology 2011 Conference Proceedings, 2011: 256.
- [46] STANIENĖ G, STANYS V, VINSKIENĖ J, ABRAITIS R, JOMANTIENĖ R. *In vitro* culture of phytoplasma and viroid infected sweet cherry (*Prunus avium* L.) [J]. Žemdirbystė, 2009, 96(3): 129-140.
- [47] FRÁNOVÁ J, LENZ O, PŘIBYLOVÁ J, ŠPAK J, KOLONIUK I, SUCHÁ J, PAPERŠTEIN F. '*Candidatus Phytoplasma asteris*' and '*Candidatus Phytoplasma mali*' strains infecting sweet and sour cherry in the Czech Republic[J]. Journal of Phytopathology, 2018, 166(1): 59-66.
- [48] WANG Q C, VALKONEN J P T. Efficient elimination of sweet potato little leaf phytoplasma from sweet potato by cryotherapy of shoot tips[J]. Plant Pathology, 2008, 57(2): 338-347.
- [49] ENGIN H, GOKBAYRAK Z. Phyllody (Flower abnormality) in sweet cherry (*Prunus avium* L.) [J]. The Journal of Animal & Plant Sciences, 2010, 20(3): 217-219.
- [50] BEPPU K, IKEDA T, KATAOKA I. Effect of high temperature exposure time during flower bud formation on the occurrence of double pistils in 'Satohnishiki' sweet cherry[J]. Scientia Horticulturae, 2001, 87(1): 77-84.
- [51] 高瑞, 杨淑珂, 王洁, 路兴波, 孙玉刚, 田延平, 汪卫星. 中国樱桃花变叶病相关植原体的分子检测及鉴定 [J]. 园艺学报, 2019, 46(7): 1249-1256.
- GAO Rui, YANG Shuke, WANG Jie, LU Xingbo, SUN Yugang, TIAN Yanping, WANG Weixing. Molecular detection and identification of subgroup 16SrV-B phytoplasma associated with Chinese cherry phyllody disease in China[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(7): 1249-1256.
- [52] UYEMOTO J K, LUHN C F. In-season variations in transmission of cherry X-phytoplasma and implication in certification programs[J]. Journal of Plant Pathology, 2006, 88(3): 317-320.
- [53] MURRAY R G E, SCHLEIFER K H. Taxonomic notes, a proposal for recording the properties of putative taxa of prokaryotes [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1994, 44(1): 174-176.
- [54] BROWN D, WHITCOMB R F, BRADBURY J M. Revised minimal standard for description of new species of the class Mollicutes (division Tenericutes) [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2007, 57(11): 2703.