

萝卜花变叶病病原鉴定及赤霉素合成与代谢途径中关键酶基因的表达*

刘俊男¹, 王柱华¹, 万琼莲², 许杏萍¹, 苏帆¹, 蔡银枫¹, 蔡红^{1**}

(1. 云南农业大学 植物保护学院, 云南省植物病理重点实验室, 云南 昆明 650201;

2. 玉溪师范学院 资源与环境学院, 云南 玉溪 653100)

摘要:【目的】明确云南元谋地区发生的萝卜花变叶病病原以及赤霉素合成途径中关键酶基因表达量的变化。

【方法】对自然表现花变叶、丛枝和节间缩短的萝卜感病植株总 DNA 进行植原体 16S rRNA 基因扩增、克隆、测序及系统进化树构建, 并采用实时荧光定量 PCR 技术分析赤霉素合成及代谢途径中关键酶基因 (*GA20ox1*、*GA3ox1* 和 *GA2ox1*) 表达量的变化。【结果】该植原体株系与 16SrII-A 亚组相似性最高 (0.98), 并与 16SrII-A 亚组中的其他植原体株系明显形成一个进化支。【结论】萝卜花变叶植原体 (*Raphanus sativus* phyllody, RsPh-YNym) 为植原体 16SrII-A 亚组成员, 且与候选种 *Candidatus* Phytoplasma aurantifolia 相关, 明确了该株系的分类地位; 感病植株茎中 3 种关键酶基因 *GA20ox1*、*GA3ox1* 和 *GA2ox1* 表达水平发生了变化, 表达量均下调, 说明植原体的侵染造成了植株赤霉素稳态被破坏, 从而导致植株表型改变。

关键词: 萝卜; 植原体; 赤霉素; 关键酶基因

中图分类号: S 631.101

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2020) 04-0614-08

Pathogen Identification of *Raphanus sativus* Phyllody Disease and the Expression Level of Key Enzyme Genes in Gibberellin Synthesis and Metabolism Pathway

LIU Junnan¹, WANG Zhuhua¹, WAN Qionglian², XU Xingping¹,

SU Fan¹, CAI Yinfeng¹, CAI Hong¹

(1. Key Laboratory for Plant Pathology of Yunnan Province, College of Plant Protection, Yunnan

Agricultural University, Kunming 650201, China; 2. College of Resources and Environment,

Yuxi Normal University, Yuxi 653100, China)

Abstract: [Purpose] To figure out the causal agent of *Raphanus sativus* phyllody disease occurred in Yuanmou of Yunnan Province and changes of expression level of key enzymes genes in gibberellin synthesis. [Method] The phytoplasmal 16S rRNA gene sequence was amplified from total DNAs extracted from natural *R. sativus* plant showing phyllody, witches broom and shortened internodes symptoms. Then the amplicons were cloned, sequenced and phylogentic tree were constructed.

收稿日期: 2019-02-28

修回日期: 2019-06-28

网络首发时间: 2020-07-17 15:33:17

*基金项目: 云南省高校科技创新团队支持计划 (云科教[2014] 22 号); 国家自然科学基金项目 (31060239, 31960535); 教育部、农业部、国家林业局第一批卓越农林人才教育培养计划 (拔尖创新型农业人才培养模式改革试点项目) (教高函[2014]7 号)。

作者简介: 刘俊男 (1993—), 女, 四川乐山人, 硕士研究生, 主要从事植原体病害的研究。

E-mail: LiuJunnan_666@126.com

**通信作者 Corresponding author: 蔡红 (1972—), 女, 云南宣威人, 博士, 教授, 主要从事植物病毒及类似病害研究。E-mail: caihong0623@126.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200715.1445.001.html>



Real-time fluorescence qualification RT-PCR was performed to detect changes of the expression level of key enzyme genes (*GA20ox1*, *GA3ox1*, *GA2ox1*) of gibberellin synthesis and metabolism pathway in this experiment. [**Result**] The phytoplasma strain had the highest similarity of 0.98 with the phytoplasma subgroup 16SrII-A, and formed an evolutionary branch with other phytoplasma strains which were classified in 16SrII-A subgroup. [**Conclusion**] The *R. sativus* phyllody phytoplasma (RsPh-YNym) strain belongs to phytoplasma 16SrII-A subgroup and is related to *Candidatus* phytoplasma aurantifolia. Meanwhile, we found that the expression levels of *GA20ox1*, *GA3ox1* and *GA2ox1* genes in the susceptible plants were down-regulated compared with the healthy plants and showed that the phytoplasma infection destroyed the homeostasis of gibberellin and changed the phenotypes of *Raphanus sativus*.

Keywords: *Raphanus sativus*; phytoplasma; gibberellin; key enzyme genes

植原体 (phytoplasma) 是一种无细胞壁、寄生在植物韧皮部、难培养的细菌性病害^[1], 主要通过具有刺吸式口器的昆虫, 如叶蝉和木虱等进行传播^[2]。在世界范围内广泛分布, 造成多种经济作物严重减产^[3]。目前在云南省已发现多种植原体病害, 尤其在元谋县干热河谷地区, 植原体病害频繁发生^[4-5]。2015 年在该地区发现大面积自然表现花变叶、节间缩短等疑似植原体感染的萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 植株, 感病植株后期不能正常结荚。

目前植原体的分类主要采用两种方式: 一种是基于 16S rDNA 基因 (16S rDNA), 通过分析该基因的全长或近全长序列来划分主要的组, 以代表具有明显差异的植原体^[6]; 另一种是 MURRAY 等^[7]提议的采用暂定种 *Candidatus* phytoplasma 来记述不能培养、核酸序列分析和形态鉴定均为同属、但对其合格命名还缺乏足够描述的一类原核生物。国际系统细菌学委员会 (International Committee on Systematic Bacteriology, ICSB) 柔膜菌纲分类组织 (Subcommittee on Taxonomy of Mollicutes) 同意并建议采用上述两种分类方式^[8]。早在 1987 年, SAITOU 等^[9]就提出了采用邻接法构建系统进化树用以辅助分类, 目前植原体的分类过程也借助该方法。

植原体侵染植株后会导致感病植株内源激素失衡进而造成表型变化。赤霉素 (gibberellin, GAs) 是一类基于赤霉烷 (ent-gibberellane) 骨架结构的双萜酸化合物, 在植株的生长发育过程中, 赤霉素生物合成基因在特定的组织或细胞中表达, 并且它们的转录水平在快速生长部位通常比较高^[10]。

研究发现: 赤霉素途径在植物整个生长周期中对调节植株的生长发育起着核心作用, 其中 2-酮戊二酸依赖性双加氧酶 GA20oxidase (GA20ox)、GA3oxidase (GA3ox) 和 GA2oxidase (GA2ox), 在生物合成途径中催化后续步骤和调节赤霉素活性水平极为重要^[11-12]。GA20ox 和 GA3ox 合成具有生物活性的赤霉素, GA2ox 通过分解代谢和赤霉素响应途径中的反馈调节来调控赤霉素水平, 这些酶在赤霉素生物合成的调节、器官特异性的表现及生理功能的分化方面具有重要意义。赤霉素的感知和信号传导途径将赤霉素信号转化成信号表达和植物表型的改变^[13]。DING 等^[14]发现感染马铃薯紫顶植原体 (potato purple top, PPT) 的番茄植株表现出“巨芽”症状, 经检测其内源赤霉素水平显著下降, 进一步分析表明是活性赤霉素合成关键酶基因 (*GA20ox1* 和 *GA3ox1*) 下调所致。此外, 研究表明 *GA20ox* 的过表达会造成拟南芥、番茄和烟草植株中赤霉素含量增加, 并且导致茎伸长^[15]。

本研究首先利用分子生物学的方法对萝卜花变叶病进行植原体的检测和鉴定, 明确植原体株系的分类地位, 然后通过比较萝卜感病植株和健康植株中与赤霉素合成与代谢相关的 3 种关键酶基因 *GA20ox1*、*GA3ox1* 和 *GA2ox1* 在 mRNA 水平上的表达差异, 检测萝卜感病后关键酶基因表达量的变化, 了解植原体致萝卜花变叶中植原体与赤霉素的关系, 为植原体致病机理的研究奠定基础。初步明确植原体对赤霉素途径的影响, 为萝卜植原体病害的防治提供理论支持。

1 材料和方法

1.1 试验材料和主要试剂

萝卜健康植株和感病植株均采自云南省元谋县。将采集到的样品置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒购自百泰克生物技术有限公司；引物合成由硕擎生物技术有限公司提供；试剂 EasyTag[®] DNA Polymerase 来自 Transgen 公司；克隆载体 pMD19-T Vector、RNAiso Plus 采用 TaKaRa 公司的产品。总 RNA 提取试剂 RNAiso Plus，反转录试剂盒 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser、实时荧光定量 PCR 试剂 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 均为 TaKaRa 公司产品。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取和 PCR 扩增

健株、病株分别混合取样后用液氮研磨，按照快速植物基因组 DNA 提取试剂盒使用说明提取植株总 DNA。采用巢式 PCR 扩增植原体的 16S rDNA，扩增引物采用通用引物，参照 SCHNEIDER 等^[16]设计的 P1/P7 (5'-AAGAGTTTG-ATCCTGGCTCAGGATT-3'/5'-CGTCCTTCATCG-GCTCTT-3') 以及 LEE 等^[17]设计的 R16F2n/R16R2 (5'-GAAACGACTGCTAAGACT-3'/5'-TGACGG-GCGGTGTGTACAAACCCCG-3') 序列合成。预期目标片段分别约为 1800 bp 和 1250 bp。阳性对照 DNA 来自实验室保存的蔓草虫豆丛枝植原体。两次 PCR 的扩增体系均为 25 μL ：10 $\times$ EasyTag[®] Buffer 2.5 μL ，2.5 mmol/L dNTP 2 μL ，EasyTag[®] DNA Polymerase 0.25 μL ，Forward Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ，Reverse Primer (10 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL ，ddH₂O 17.25 μL ，反应模板 1 μL 。直接 PCR 扩增条件：94 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min；94 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min，48 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min，72 $^{\circ}\text{C}$ ，2 min，30 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min。巢式 PCR 扩增条件：95 $^{\circ}\text{C}$ ，5 min；95 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s，55 $^{\circ}\text{C}$ ，1 min，72 $^{\circ}\text{C}$ ，1.5 min，35 个循环；72 $^{\circ}\text{C}$ ，10 min。扩增后的 PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 克隆及分类鉴定

选取有条带的 PCR 产物进行纯化，与 pMD19-T Vector 连接，转化到大肠杆菌并克隆，经蓝白斑筛选，利用菌落 PCR 筛选出阳性克隆后将含有目的条带的菌液送昆明铂尚生物技术有限公司测序。

将测序得到的 16S rDNA 序列去载体，通

过 BLAST 在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中在线比对，并通过植原体在线分析网站 iPhy-Classifer (<https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphyclassifier.cgi>) 进行相关植原体株系候选种的确定和基于相似系数分析的 16Sr 组/亚组的确定。同时利用 MEGA 软件，用邻接法构建基于 16S rDNA 的系统进化发育树，明确该植原体株系的组/亚组的分类地位以及与已知候选种的相关性。基于相似性系数分类的发育树中，其他植原体 16S rDNA 均为 16SrII 组；明确候选种分类的发育树中，用 38 个植原体候选种与萝卜植原体的 16S rDNA 基因序列进行构建。外群均选用莱氏不需固醇菌原体 (*Acholeplasma laidlawii*，GenBank 登录号：M23932)。

1.2.3 RNA 的提取和反转录

分别提取健康和感病植株叶片总 RNA，检测 RNA 的质量浓度，并使各样品的质量浓度统一到 500 ng/ μL 。然后采用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser 去除基因组 DNA 以及进行 Real Time RT-PCR 反转录。去除基因组 DNA 反应体系为 10 μL ：5 $\times$ gDNA Eraser Buffer 2 μL ，gDNA Eraser 1 μL ，总 RNA 1 μL ，RNase Free dH₂O 6 μL ，将配好的体系放入 PCR 仪中，42 $^{\circ}\text{C}$ ，2 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反转录总体体系为 20 μL ，去除基因组的反应液 10 μL ，包括 PrimeScript RT Enzyme Mix I 1 μL ，RT Primer Mix 1 μL ，5 $\times$ Prime Script Buffer 2.4 μL ，RNase Free dH₂O 4 μL 。将反应混合液放入 PCR 仪中，37 $^{\circ}\text{C}$ ，15 min；85 $^{\circ}\text{C}$ ，5 s，置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱长期保存。

1.2.4 赤霉素合成关键酶基因实时荧光定量 PCR 及数据分析

利用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, Q-PCR) 扩增以下基因 *GA20ox1* (AB771709)，*GA3ox1* (AB771710)，*GA2ox1* (AB771711)，内参基因为 *actin* (KC751568)。通过在线引物设计工具 Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计引物 (表 1)。反应混合液体系为 20 μL ，SYBR Premix Ex TaqII (2 $\times$) 10 μL ，PCR Forward Primer 0.8 μL ，PCR Reverse Primer 0.8 μL ，ROX Reference Dye II (50 $\times$) 0.4 μL ，cDNA 2 μL ，ddH₂O 6 μL 。反应条件：预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s；变性 95 $^{\circ}\text{C}$ ，5 s，退火 52 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s，延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ ，30 s，共 40 个循环。健康和感病植株的

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Tab. 1 Primers for real-time PCR

gene 基因	forward primer 正向引物	reverse primer 反向引物
actin	5'-TTCTCGGGTATTGCAGACCG-3'	5'-TCTGCTGGAATGTGCTGAGG-3'
GA20ox1	5'-GTATCGCCTAGCATCACTTACTC-3'	5'-TGGTCTGGGATATTGGGTGG-3'
GA3ox1	5'-TCCACATCCTATCCAACGG-3'	5'-GAGGCGATTCAACAAGACTAAC-3'
GA2ox1	5'-AAATGGGAGGTTCAAGAGCG-3'	5'-CAAAGAAGGTCCAGCGAAGTAA-3'

每个样本均做 3 个生物学重复和 3 个技术重复。与健康植株相比, 病株的相对表达量采用平均倍数相对变化 ($\Delta\Delta C_t$) 法进行数据处理。最终柱形图结果采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 呈现。

2 结果与分析

2.1 感病植株症状表现

如图 1 所示: 感病植株的花瓣变为绿色叶片状, 且大量丛生成簇状, 叶片变得细小, 颜色变深。茎长度较正常植株变短。田间大面积发病, 后期花变叶的花无法正常结莢。



注: a) 健康植株; b) 感病植株; c) 萝卜植株田间大面积发病, 表现为花变叶、丛生和节间缩短。

Note: a) healthy *R. sativus*; b) infected *R. sativus*; c) large area of *R. sativus* infected in the field. Sensitive plants show obvious phyllody, witches broom and shortened internodes symptoms compared with healthy plants.

图 1 萝卜花变叶病田间症状表现

Fig. 1 Symptoms of *R. sativus* phyllody disease in the field

2.2 萝卜花变叶植原体株系的分类鉴定

萝卜花变叶感病植株总 DNA 经巢式 PCR 扩增后, 均得到 1.2 kb 左右的特异条带, 大小与阳性对照一致。表型健康的植株和双蒸水对照没有扩增出特异条带, 可初步判断感病植株中含有植原体。克隆测序的序列经 BioXm 处理后得到大小为 1 248 bp 的 16S rDNA 序列。通过

BLAST 在线比对, 该序列与新诺顿豆小叶植原体 (*Neonotonia wightii* little leaf, NeoWLL-YNym, GenBank 登录号: KJ735778) 序列相似性最高。经 iPhyClassifier 在线分析, 表明该植原体与 16SrII-A 亚组 (GenBank 登录号: L33765) 相似性最高, 相似系数为 0.98, 可确定该病害由植原体引起。将该植原体株系命名为萝卜花变叶植原体 (*Raphanus sativus* phyllody, RsPh-YNym, GenBank 登录号: MH187866)。构建基于 16S rDNA 的系统发育树, 可看到该株系与其他 16SrII 组各植原体株系聚为一个稳定进化支, 其中又与 16SrII-A 亚组中的 SEPN、SEPT 和 PnWB-YNym 等 8 个株系明显形成一个进化支 (图 2), 表明 RsPh-YNym 与 16SrII-A 亚组株系遗传进化关系最近, 说明 RsPh-YNym 为 16SrII-A 亚组成员。从与 38 个植原体候选种构建的系统发育树可看出: 该株系与 *Ca. Phytoplasma australasiae* (GenBank 登录号: Y10097) 和 *Ca. Phytoplasma aurantifolia* (GenBank: 登录号 U15442) 形成一个亚枝 (图 3)。由于萝卜为非番木瓜属植物, 根据植原体候选种的命名规则^[18-19], 本文报道的萝卜花变叶植原体应属于候选种 *Candidatus Phytoplasma aurantifolia*。

2.3 赤霉素合成关键酶基因实时荧光定量测定

通过 Q-PCR (实时荧光定量 PCR) 测定萝卜中赤霉素生物合成和代谢关键酶合成基因 *GA20ox1*、*GA3ox1* 和 *GA2ox1* 的 mRNA 相对水平。健康与感病植株的 C_t 值和 $\Delta\Delta C_t$ 值如表 2 所示。与健康植株相比, 表现花变叶、丛生的感病植株茎部的 *GA20ox1* 和 *GA3ox1* 基因表达水平分别为 34% 和 22%, 而 *GA2ox1* 的表达水平为 56%, 均表现降低 (图 4)。根据赤霉素合成与代谢途径推测萝卜感染植原体后, 由于茎中 *GA20ox1*、*GA3ox1* 和 *GA2ox1* 基因下调, 推测可能导致植物赤霉素含量降低, 从而引起植株节间缩短、丛枝、花叶化等症状^[14]。

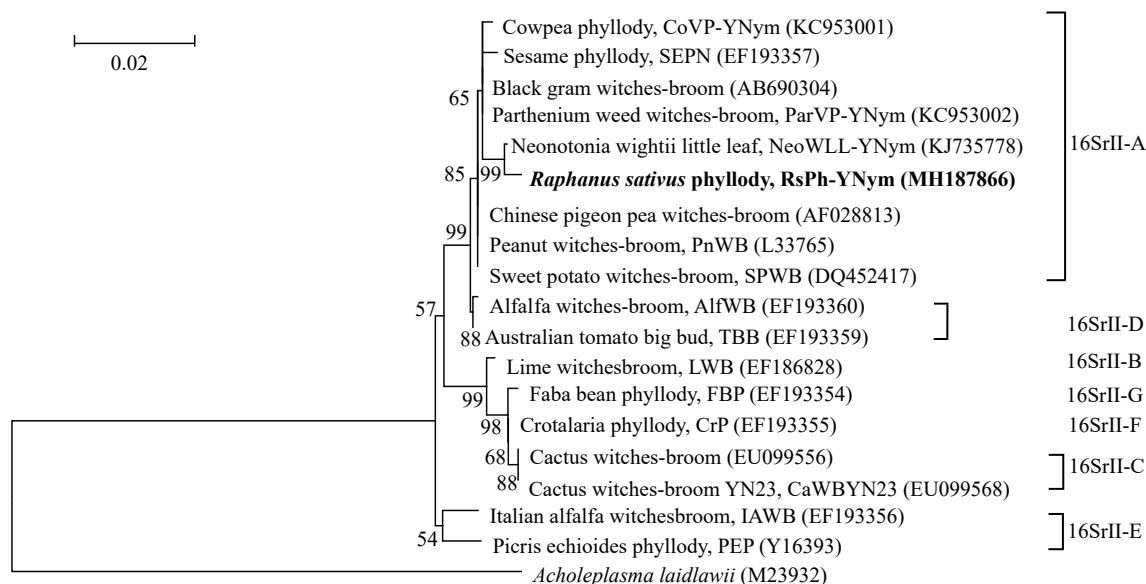


图 2 基于萝卜花变叶植原体和 16SrII 组其他植原体菌株 16S rDNA 序列的系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree based on 16S rDNA nucleotide sequences from *R. sativus* phyllody and 16SrII phytoplasma strains

3 讨论

经查阅相关文献资料,这是中国首次发现并报道植原体在野外自然侵染萝卜植株并造成萝卜花变叶病。该地区在之前曾报道过多种植原体病害,如:刀豆花变绿病、豇豆丛枝病、番茄丛枝病、番茄巨芽病、花生丛枝病、银胶菊花变绿病和花椰菜花变绿病等,经鉴定这些病害均为植原体侵染所致。尽管寄主植物和病害表现的症状不尽相同,但所感染的植原体株系均与候选种 *Candidatus phytoplasma aurantifolia* 相关,且均属于 16SrII-A 亚组成员^[5, 19-20],说明该植原体株系在云南元谋地区广泛存在,且自然侵染的寄主范围较广。由于植原体主要由韧皮部取食的刺吸式口器昆虫传播,因此在当地开展可能的介体昆虫的调查与鉴定,可为该类病害的防治奠定基础。

赤霉素通过调节生物合成和信号传导成分来介导环境对植物生长发育的影响^[21]。赤霉素作为与其他植物激素相互作用的分支点极为重要,在植物的生长和对环境的响应、影响作物的产量和质量方面起着举足轻重的作用。大量研究表明:植原体侵染后会引引起植株体内赤霉素水平的变化,从而使植株表型异常。枣疯病病株小枝丛生,赤霉素含量明显高于抗病枣树^[22]。感染翠菊黄化 (AY) 植原体的长春花植株表现出矮化症

状,同时赤霉素水平下降^[23]。感染马铃薯紫顶植原体的番茄植株,表现出巨芽症状,赤霉素水平下降^[14]。健康萝卜植株感染植原体后,丛生出大量腋芽,叶片变得细小,同时节间缩短、花叶化,与赤霉素缺乏的症状一致。

根据赤霉素生物合成途径可知:第 3 阶段的关键酶 *RsGA20ox1* 和 *RsGA3ox1* 促进赤霉素的合成,而 *RsGA20ox1* 通过 2-β 羟化作用使活性赤霉素失活^[24]。试验检测结果显示:花变叶的萝卜中 *GA20ox1*、*GA3ox1* 和 *GA2ox1* 均下调,推测萝卜感染植原体后,由于 *GA20ox1* 和 *GA3ox1* 的表达水平降低,导致活性赤霉素的含量减少。在正常植株中,赤霉素的稳态通过反馈调节维持。本研究中, *GA2ox1* 表达量降低可能是因为活性赤霉素含量减少,为保持赤霉素的含量,因而调节 *GA2ox1* 的表达水平使活性赤霉素不再进一步减少;还有可能是因为植原体的侵染造成基因的敏感性降低,所以导致这 3 个基因均下调,无法维持赤霉素的正常水平,从而表现出症状。

花叶化是植原体感染的典型症状之一,这种花器官转变为营养生殖器官的现象,称为返祖现象^[25]。在本试验中感染植原体的萝卜植株,花变成绿色、似叶片,植株返回到营养生长,无法正常结荚。由于赤霉素涉及调节植株幼态和成熟态的转换,花变叶这一典型症状与赤霉素含量的改

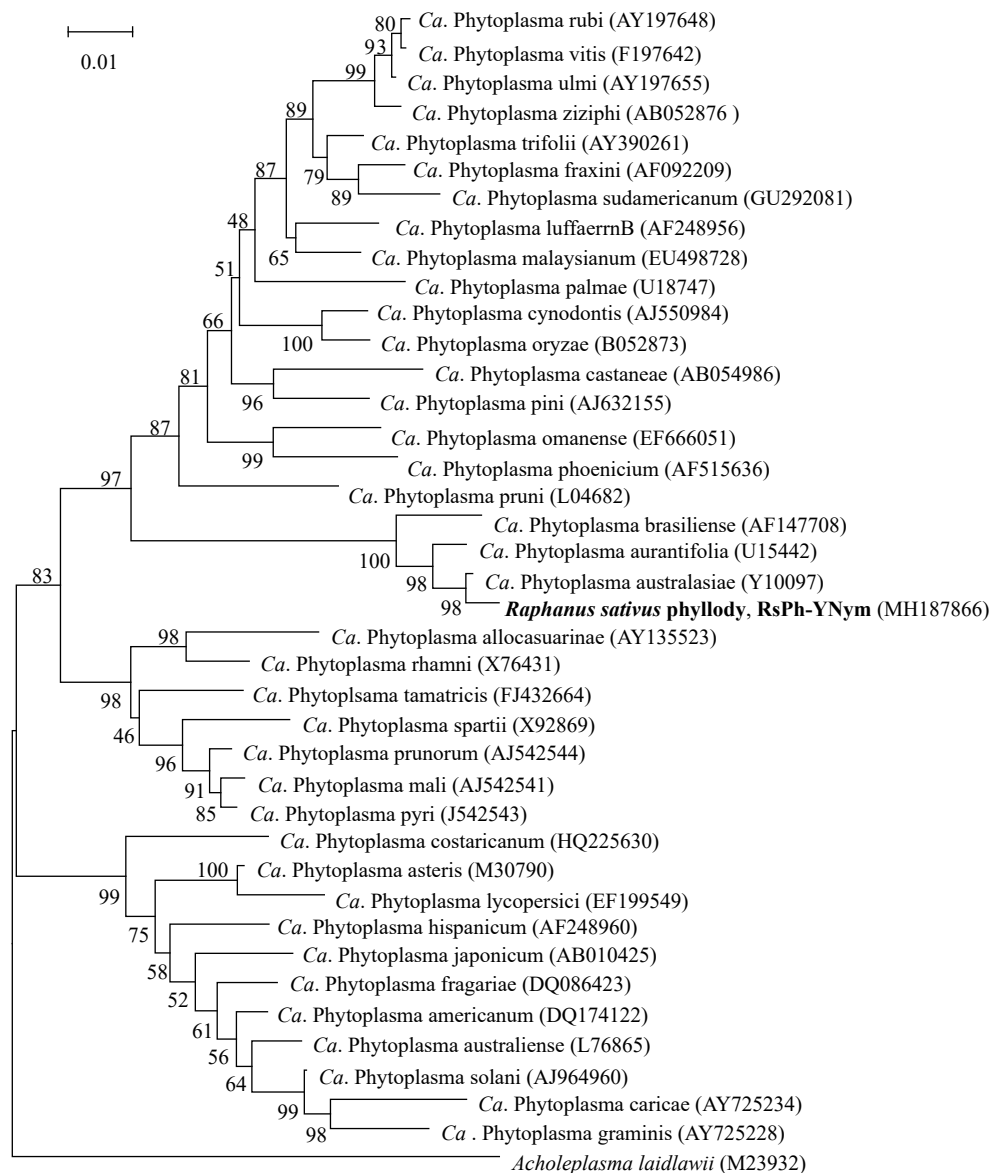


图 3 基于萝卜花变叶植原体和 38 个候选种 16S rDNA 序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rDNA nucleotide sequences of *R. sativus* phyllody phytoplasma and 38 *Candidatus* phytoplasmas

表 2 赤霉素途径关键酶基因表达情况

Tab. 2 Gene expression of key enzyme genes in gibberellin pathway

项目 item	<i>actin</i> 健康/感病 <i>actin</i> healthy/infected	<i>GA20ox1</i> 健康/感病 <i>GA20ox1</i> healthy/infected	<i>GA3ox1</i> 健康/感病 <i>GA3ox1</i> healthy/infected	<i>GA2ox1</i> 健康/感病 <i>GA2ox1</i> healthy/infected
C_t	21.23/18.93	35.29/34.57	31.52/31.38	31.11/29.63
ΔC_t	—	14.06/15.64	10.29/12.45	9.87/10.70
$\Delta\Delta C_t$	—	1.58	2.16	0.83
$2^{-\Delta\Delta C_t}$	—	0.33	0.22	0.56

变息息相关。赤霉素可以促进细胞伸长和分裂，但通过该试验的结果推测赤霉素含量是减少的，可能是由于细胞分裂素的含量产生了变化，诱导

侧芽生长。植株的表型是多种激素共同作用的结果，要明确具体原因还需结合其他激素一起分析。病原诱导植物的异常发育主要是由于植物激

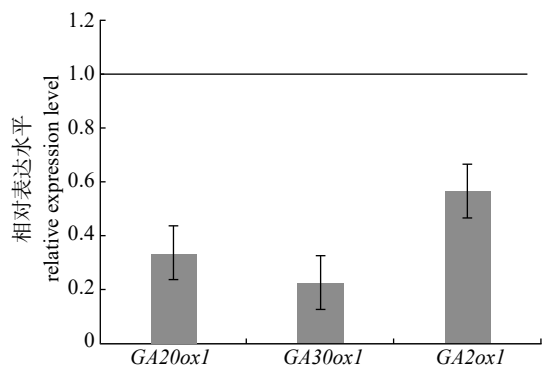


图 4 萝卜茎中赤霉素途径上 *GA20ox1*、*GA3ox1* 和 *GA2ox1* 相对表达水平

Fig. 4 The relative expression level of *GA20ox1*, *GA3ox1* and *GA2ox1* in gibberellin pathway of *R. sativus* in the stem

素如茉莉酸、生长素、脱落酸和赤霉素等介导的信号传导途径被破坏^[26]。病原进入宿主细胞后,分泌一系列的效应蛋白,改变植株正常的生长发育过程,使植株产生的代谢产物有利于病原的生长,而且这些效应物也影响激素的改变^[27-28]。尽管植原体中没有发现在其他植物病原细菌中发现的效应基因,但是在植原体中发现了一些蛋白,它们表现出与效应因子一样能导致植株不正常表型的功能。TENGU 是洋葱黄化植原体编码的小分泌肽,它通过抑制生长素相关途径,导致植株出现矮化和丛生症状^[29]; SPA11 (翠菊黄化丛枝植原体分泌的效应物之一) 诱导卷叶和丛生表型,并通过阻断植物中茉莉酸的生物合成来增强载体昆虫的适应性^[30]。将 SAP54 转入到拟南芥中,最终与感染 AY-WB 植原体的拟南芥表现出相似的症状:绿色的花并且花呈叶状,所有属性与表达效应物的植原体一样^[31]。这些研究均表明植原体影响激素途径而引起植株表型改变,但其分子机制尚不清楚,且萝卜花变叶植原体是如何作用于赤霉素途径造成表型改变还需要进一步研究。

赤霉素特定阶段发育作用的分子机制研究已经取得了许多进展,而赤霉素具体如何调节植株的生长和形态还尚不清楚。赤霉素信号传导与其他信号传导途径密切相关,但相互作用的分子机制还知之甚少^[32-33]。植株表型的改变是多种激素共同协作的结果,所以还需进一步的详细研究来明确植原体与植物激素的互作关系,从而探索植原体的致病机制。

[参考文献]

- [1] SUGIO A, MACLEAN A M, KINGDOM H N, et al. Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects[J]. Annual Review of Phytopathology, 2011, 49(1): 175. DOI: [10.1146/annurev-phyto-072910-095323](https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-072910-095323).
- [2] WEINTRAUB P G, BEANLAND L. Insect vectors of phytoplasmas[J]. Annual Review of Entomology, 2006, 51(1): 91. DOI: [10.1146/annurev.ento.51.110104.151039](https://doi.org/10.1146/annurev.ento.51.110104.151039).
- [3] LEE I, DAVIS R E, GUNDERSEN RINDAL D E. Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes[J]. Annual Review of Microbiology, 2000, 54(1): 221. DOI: [10.1146/annurev.micro.54.1.221](https://doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.221).
- [4] 蔡红. 云南省植原体株系及其相关病害的多样性研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2007.
- [5] 万琼莲. 云南元谋植原体病害多位点基因分子特性及相关株系的保存研究[D]. 昆明: 云南农业大学, 2013.
- [6] 蔡红, 祖旭宇, 陈海如. 植原体分类研究进展[J]. 植物保护, 2002, 28(3): 39. DOI: [10.3969/j.issn.0529-1542.22002.03.013](https://doi.org/10.3969/j.issn.0529-1542.22002.03.013).
- [7] MURRAY R G, SCHLEIFER K H. Taxonomic notes: a proposal for recording the properties of putative taxa of procaryotes[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(1): 174. DOI: [10.1099/00207713-44-1-174](https://doi.org/10.1099/00207713-44-1-174).
- [8] TULLY J G. International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on the Taxonomy of Mollicutes[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 1993, 43(2): 394. DOI: [10.1099/00207713-43-2-394](https://doi.org/10.1099/00207713-43-2-394).
- [9] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406. DOI: [10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454](https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454).
- [10] OLSZEWSKI N E, SUN T P, GUBLER F. Gibberellin signaling: biosynthesis, catabolism, and response pathways[J]. The Plant Cell, 2002, 14: 561. DOI: [10.1105/tpc.010476](https://doi.org/10.1105/tpc.010476).
- [11] ZHU Y, NOMURA T, XU Y, et al. Elongated uppermost internode encodes a cytochrome P450 monooxygenase that epoxidizes gibberellins in a novel deactivation reaction in rice[J]. The Plant Cell, 2006, 18(2): 442. DOI: [10.1105/tpc.105.038455](https://doi.org/10.1105/tpc.105.038455).
- [12] SAKAMOTO T, MIURA K, ITOH H, et al. An overview of gibberellin metabolism enzyme genes and their related mutants in rice[J]. Plant Physiology, 2004, 134(4): 1642. DOI: [10.1104/pp.103.033696](https://doi.org/10.1104/pp.103.033696).
- [13] SUN T, GUBLER F. Molecular mechanism of gibberellin signaling in plants[J]. Annual Review of Plant Biology, 2004, 5(1): 197. DOI: [10.1146/annurev.arplant.55.031903.141753](https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141753).
- [14] DING Y, WU W, WEI W, et al. Potato purple top phytoplasma-induced disruption of gibberellin homeostasis in tomato plants[J]. Annals of Applied Biology, 2013, 162(1): 131. DOI: [10.1111/aab.12008](https://doi.org/10.1111/aab.12008).

- [15] WITHANAGE S P, HOSSAIN M A, SURES K M, et al. Overexpression of *Arabidopsis thaliana* gibberellic acid 20 oxidase (*AtGA20ox*) gene enhance the vegetative growth and fiber quality in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) plants[J]. Breeding Science, 2015, 65(3): 177. DOI: [10.1270/jsbbs.65.177](https://doi.org/10.1270/jsbbs.65.177).
- [16] SCHNEIDER B, SEEMUELLER E, SMART C D, et al. Phylogenetic classification of plant pathogenic mycoplasma-like organisms or phytoplasmas[M]//RAZIN S, TULLY J G. Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology, volume1 molecular characterization. San Diego: Academic Press, Inc, 1995.
- [17] LEE I M, HAMMOND R W, DAVIS R E, et al. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms[J]. Phytopathology, 1993, 83(8): 834. DOI: [10.1094/Phyto-83-834](https://doi.org/10.1094/Phyto-83-834).
- [18] 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 Systematic and Evolutionary Microbiology, 2004, 54(4): 1243. DOI: [10.1099/ijs.0.02854-0](https://doi.org/10.1099/ijs.0.02854-0).
- [19] CAI H, WANG L C, YANG Z X, et al. Evidence for the role of an invasive weed in widespread occurrence of phytoplasma diseases in diverse vegetable crops: implications from lineage-specific molecular markers[J]. Crop Protection, 2016, 89: 193. DOI: [10.1016/j.cropro.2016.07.025](https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.07.025).
- [20] 万琼莲, 蔡红, 杨子祥, 等. 云南花生丛枝植原体 *secY* 基因序列分析及结构预测[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2013, 28(2): 163. DOI: [10.3969/j.issn.1004-390X\(n\).2013.02.003](https://doi.org/10.3969/j.issn.1004-390X(n).2013.02.003).
- [21] HEDDEN P, THOMAS S G. Gibberellin biosynthesis and its regulation[J]. Biochemical Journal, 2012, 444(1): 11. DOI: [10.1042/BJ20120245](https://doi.org/10.1042/BJ20120245).
- [22] 杜绍华, 卜志国, 刘洋. 植原体浸染对枣树内源激素含量的影响[J]. 北方园艺, 2013(13): 12.
- [23] CHANG C J. Pathogenicity of aster yellows phytoplasma and *Spiroplasma citri* on periwinkle[J]. Phytopathology, 1998, 88(12): 1347. DOI: [10.1094/PHYTO.1998.88.12.1347](https://doi.org/10.1094/PHYTO.1998.88.12.1347).
- [24] SCHOMBURG F M, BIZZELL C M, LEE D J, et al. Overexpression of a novel class of gibberellin 2-oxidases decreases gibberellin levels and creates dwarf plants[J]. The Plant Cell, 2003, 15(1): 151. DOI: [10.1105/tpc.005975](https://doi.org/10.1105/tpc.005975).
- [25] TOOKE F, ORDIDGE M, CHIURUGWI T, et al. Mechanisms and function of flower and inflorescence reversion[J]. Journal of Experimental Botany, 2005, 56(420): 2587. DOI: [10.1093/jxb/eri254](https://doi.org/10.1093/jxb/eri254).
- [26] GRANT M, JONES J D G. Hormone (dis) harmony moulds plant health and disease[J]. Science, 2009, 324(5928): 750. DOI: [10.1126/science.1173771](https://doi.org/10.1126/science.1173771).
- [27] BAI X, CORREA V R, TORUNO T Y, et al. AY-WB phytoplasma secretes a protein that targets plant cell nuclei[J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2009, 22(1): 18. DOI: [10.1094/MPMI-22-1-0018](https://doi.org/10.1094/MPMI-22-1-0018).
- [28] HOGENHOUT S A, LORIA R. Virulence mechanisms of gram-positive plant pathogenic bacteria[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2008, 11(4): 449. DOI: [10.1016/j.pbi.2008.05.007](https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.05.007).
- [29] HOSHI A, OSHIMA K, KAKIZAWA S, et al. A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(15): 6416. DOI: [10.1073/pnas.0813038106](https://doi.org/10.1073/pnas.0813038106).
- [30] SUGIO A, KINGDOM H N, MACLEAN A M, et al. Phytoplasma protein effector SAP11 enhances insect vector reproduction by manipulating plant development and defense hormone biosynthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(48): 19111. DOI: [10.1073/pnas.1105664108](https://doi.org/10.1073/pnas.1105664108).
- [31] MACLEAN A M, SUGIO A, MAKAROVA O, et al. Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in *Arabidopsis* plants[J]. Plant Physiology, 2011, 157(2): 831. DOI: [10.1104/pp.111.181586](https://doi.org/10.1104/pp.111.181586).
- [32] KANYUKA K, PREAKELT U, FRANKLIN K A, et al. Mutations in the huge *Arabidopsis* gene *BIG* affect a range of hormone and light responses[J]. The Plant Journal, 2003, 35(1): 57. DOI: [10.1046/j.1365-313X.2003.01779.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01779.x).
- [33] RHOADES M W, REINHART B J, LIM L P, et al. Prediction of plant microRNA targets[J]. Cell, 2002, 110(4): 513. DOI: [10.1016/S0092-8674\(02\)00863-2](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00863-2).

责任编辑: 何承刚