



新疆柳树花变叶植原体分子鉴定

李 丰,赖刚刚,赵志慧,张 萍,朱天生

(塔里木大学 植物科学学院,南疆农业有害生物综合治理兵团重点实验室/南疆特色果树高效优质栽培
与深加工技术国家地方联合工程实验室,新疆阿拉尔 843300)

摘 要 为研究新疆 7 个地区柳树花变叶病为何种病原物所造成,本研究以分子生物学技术对其进行鉴定。通过 CTAB 法提取柳树总 DNA,对其 16S rRNA 基因和 *tuf* 基因进行 PCR 扩增,将测序得到的基因片段通过 Blast 比对、同源性比较,构建系统进化树和 16S rRNA 虚拟 RFLP 分析。结果显示,PCR 扩增分别获得 16S rRNA(1 238 bp)和 *tuf*(824 bp)的片段,证明该病害与植原体有关,将其命名为柳树花变叶植原体(WPP);16S rRNA 序列分析表明,WPP 与中国桃黄化植原体(‘*Prunus persica*’ yellows phytoplasma)、枣疯病(‘*Ziziphus jujuba*’ witches’-broom phytoplasma)、杏褪绿卷叶植原体(Apricot leaf roll phytoplasma)同源性均为 99.68%;16S rRNA 虚拟 RFLP 分析结果表明,WPP 与枣疯病株系(GenBank 登录号:AB052876)有 99.8%的相似性,虚拟 RFLP 模式与 16SrV-B 亚组的参考模式相同,相似系数为 1.00,进一步证明 WPP 为 16SrV-B 亚组成员。WPP *tuf* 基因与榆树黄化组(EY)同源性达 99%以上,系统进化树显示,柳树花变叶植原体与榆树黄化组(16SrV)植原体聚为一枝。柳树花变叶植原体属于 16SrV-B、*tuf*-B 亚组。

关键词 柳树;植原体;分子鉴定;16S rRNA;*tuf*

中图分类号 S432.1

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2022)10-1374-07

柳树(Willow)是杨柳科(Salicaceae),柳属(*Salix*)的总称,属乔木或灌木,全世界约 520 种,柳树在中国栽培历史悠久,全国各地均有分布,主要栽培品种 250 多种^[1]。柳树分布范围广,用途广泛,不仅可以作为木材资源,还可用于园林绿化、防风固沙和医药等领域,特别是对于干旱地区荒漠化治理有重要作用。此外,由于近年来全球能源短缺,柳树生长速度快,生物量积累较多,对于一些短轮伐期速生柳来讲,具有潜在的开发潜力^[2]。

植原体(Phytoplasma)是一类专性寄生于植物韧皮部或半翅目昆虫体内,目前尚难以人工体外纯培养的原核微生物,主要由刺吸式口器昆虫(飞虱、叶蝉等)传播^[3]。植原体已经在全球引起 1 000 多种病害,中国已报道的有 100 多种^[4],主要包括园艺作物、花卉、林业和农业经济作物,严重威胁世界农林业发展安全。近年来,柳树丛枝病在我国西北部分地区普遍发生,甘肃、内蒙和新

疆已见报道。1992 年王纯利等^[5]通过电子显微镜对新疆柳树丛枝病病原进行初步观察鉴定,认为该病原为类菌原体(Mycoplasma-like Organism,简称 MLO)。2005 年朱天生^[6]对采自塔里木大学校园内的柳树花变叶植原体病害进行了分子鉴定,确定了其分类地位,并将其命名为柳树花变叶植原体(Willow phyllody phytoplasma)。李岩峰等^[7]报道了甘肃酒泉柳树也表现出丛枝、小叶和枝条增殖等症状,并对其进行防治试验研究。Zhang 等^[8]对内蒙鄂尔多斯市表现增殖和丛枝的柳树进行了分子检测和鉴定,并首次将中国柳树植原体病害鉴定到 16SrVI 组^[8]。国内报道的柳树植原体病害除丛枝、花变叶和增殖外,Wei 等^[9]报道的陕西柳树植原体病害为典型的黄化症状。此外,Mou 等^[10]在云南省元谋县发现了小叶柳(*Salix tetradenia*)丛枝与畸形。前期通过对新疆乌鲁木齐、伊犁、五家渠、阿克苏、和田、阿拉尔、巴州和喀什等地区调查发现,柳树花变叶和丛枝

收稿日期:2021-05-13 修回日期:2021-08-23

基金项目:国家自然科学基金(31060238);兵团财政科技计划(2019DA001,2020DA003);研究生科研创新计划(TDGRI202015)。

第一作者:李 丰,男,在读硕士,研究方向为植物病理学。E-mail:2925008071@qq.com

通信作者:朱天生,男,教授,硕士生导师,主要从事植物病理学研究。E-mail:ztszky@163.com

在新疆各地州普遍发生。本研究拟通过分子生物学手段鉴定新疆柳树花变叶病病原,利用 16S rRNA 和 *tuf* 基因一致性分析,构建系统发育树将其分类到亚组水平,并分析不同地区柳树花变叶植原体 16S rRNA 基因的差异性,以期为柳树植原体病害防治提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

采自和田市、阿拉尔市、喀什莎车县、克州阿图什市、巴州轮台县、阿克苏温宿县和图木舒克市的表现花变叶和丛枝症状的柳树。取发病枝条韧皮部,经灭菌水处理后,吸水纸吸干水分,自封袋分装后置于一80℃冰箱,备用。阳性对照枣疯病(‘Jujubew Witches’-broom Phytoplasma)样品,由山东省果树研究所高瑞副研究员提供。Taq DNA Polymerase、dNTPs(2.5 mmol/L)和 10× PCR buffer 购自北京全式金生物技术有限公司,DNA Marker 2000、DiaSpin 胶回收试剂盒及引物均购自上海生物工程有限公司。

1.2 DNA 提取

取 0.1~0.2 g 柳树韧皮部组织,采用 CTAB 法提取总 DNA^[11-12]。采用 Thermo ND-2000 微量分光光度计检测 DNA 浓度,琼脂糖凝胶电泳

检测 DNA 完整性,将检测合格的 DNA 置于一20℃保存,备用。

1.3 16Sr RNA 和 *tuf* 基因 PCR 扩增

植原体 16Sr RNA 基因扩增采用 Lee 等^[13]和 Gundersen 等^[14]所报道的植原体通用引物 R16mF2/R16mR1 和 R16F2/R16R2 分别进行直接 PCR 和巢式 PCR,*tuf* 基因扩增采用 Schneider 等^[15]报道的引物对 fTuf/rTuf,引物序列如下(表 1)。反应体系均为 25 μL,其中 10× PCR buffer 2.5 μL、10 μmol/L 引物各 1 μL、10 mmol/L dNTPs 1 μL、Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.5 μL、模板 DNA 1 μL。直接 PCR 结束后,将 PCR 产物稀释 30 倍,取 1 μL 作为巢式 PCR 模板。16Sr RNA 基因直接 PCR 扩增反应条件为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s;55℃退火 30 s,72℃延伸 2 min;共 30 个循环,最后 72℃延伸 10 min;巢式 PCR 条件将退火温度设为 57℃,其他均与第一次扩增相同。

tuf 基因 PCR 扩增反应条件为:94℃预变性 3 min;94℃变性 30 s;55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min;共 35 个循环,最后 72℃延伸 10 min。以健康的柳树总 DNA 为阴性对照,枣疯病 DNA 为阳性对照,无菌双蒸水为空白对照。PCR 产物在 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,观察结果。

表 1 PCR 引物
Table 1 Primer of PCRs in this study

基因 Gene	引物 Primer	预期 PCR 长度/bp Expected size of PCR	序列(5'→3') Sequence
16Sr RNA	R16mF2	1 500	CATGCAAGTCGAACGGA
	R16mR1		CTTACCCCCAATCATCGA
	R16F2	1 200	ACGACTGCTAAGACTGG
	R16R2		TGACGGGCGGTGTGTACAAACCCCG
<i>tuf</i>	fTuf	800	CCTGAAGAAAGAGAACGTGG
	rTuf		CGGAAATAGAATTGAGGACG

1.4 PCR 产物纯化及测序

使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒将目标条带进行切胶回收后,送上海生物工程有限公司进行测序。

1.5 序列比对和虚拟 RFLP 分析

利用 DNASTar SeqMan 软件对获得的序列进行校正及拼接后,提交到 GenBank 中获得基因序列号。在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中对获得的基因序列 Blast 在线比对获得同源序列,通过 MEGA7.0 软件构建系统进化

树,Boot strap 重复数为 1 000^[16]。利用植原体在线分类工具(iPhyClassifier(<https://plantpathology.ba.ars.usda.gov/cgi-bin/resource/iphy-classifier.cgi>))对获得的 16S rRNA 序列进行相似性系数分析和虚拟 RFLP 分析^[17]。

2 结果与分析

2.1 感病柳树表现症状

柳树在初春时期,枝条顶端未展开,多表现为丛枝症状(图 1-A~1-C);4 月花期,柳树花序畸

形,表现为花变叶,随着其生长,后期形成不规则疙瘩形状(图 1-D~1-F);7—8 月由于高温枝条顶

部水分及营养物质供应不足,导致病部及以上部分枝条干枯(图 1-G)。



A~C. 丛枝症状;D~G. 花变叶和枯死症状
A—C. Symptoms of witches'-broom; D—G. Symptoms of phyllody and dieback

图 1 新疆柳树花变叶和丛枝病表现症状

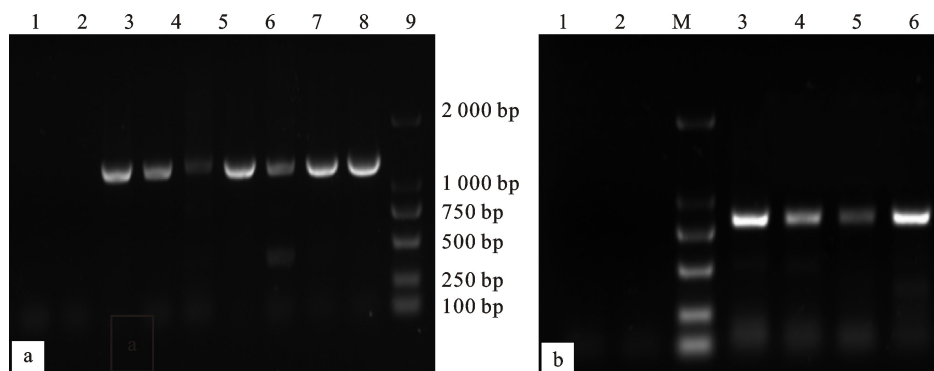
Fig. 1 Symptoms of willow phyllody and witches'-broom disease in Xinjiang

对新疆 7 个地区表现花变叶和丛枝的柳树植株总 DNA 经 PCR 扩增后,1% 琼脂糖电泳检测结果表明,利用引物对 R16F2/R16R2 经巢式 PCR 扩增到约为 1.2 kb 的 16S rRNA 片段;引物对 fTuf/rTuf 经 PCR 扩增得到约 800 bp 特异性条带,ddH₂O 空白对照与健康对照均为扩增出特异性条带(图 2)。

2.2 16S rRNA 序列比对及系统进化树分析

经测序结果表明,来自 7 个地区柳树病样扩增得到的 11 条 16S rRNA 基因片段长为 1 235~1 240 bp,将序列提交到 GenBank 登录号分别为:MW411190、MW411193~MW411201、MW390640。利用 MegAlign 软件对 7 个地区白柳花变叶植原

体 16S rRNA 基因序列一致性比较发现,G+C 含量为 45.6%,序列一致性为 99.4%~100.0% (表 2)。BLAST 分析表明,柳树花变叶植原体 16S rRNA 序列与榆树黄化组(EY)植原体文冠果丛枝(‘*Xanthoceras sorbifolia*’ Bunge witches'-broom phytoplasma, GenBank Accession No. KC331045)和桃黄化(‘*Prunus persica*’ yellows phytoplasma, Accession No. KF523370)同源性的 99.76%。初步确定柳树花变叶植原体属于 16SrV 组。系统进化树显示,柳树花变叶植原体与榆树黄化组(16SrV)组植原体聚为一枝,亲缘关系最近,进一步确定该植原体为 16SrV 组成员(图 3)。



a. 16S rRNA 巢式 PCR 产物(1. ddH₂O 空白对照;2. 健康对照;3~9. 发病柳树;M. DNA Marker 2000)Nest-PCR product of 16S rRNA (1. ddH₂O negative control; 2. Healthy control; 3—9. Diseased willow; M. DNA marker 2000)

b. *tuf* 直接 PCR 产物(1. ddH₂O 空白对照;2. 健康对照;3~6. 发病柳树;M:DNA Marker 2000)PCR product of *tuf*(1. ddH₂O negative control; 2. Healthy control; 3—6. Diseased willow; M. DNA Marker 2000)

图 2 柳树花变叶植原体 16S rRNA 和 *tuf* 基因 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR detection results of 16S rRNA and *tuf* gene of willow phyllody phytoplasma

表 2 利用 MegAlign 对 7 个地区 11 条 16S rRNA 序列一致性的分析

Table 2 Analysis of sequence identity of eleven 16S rRNA in seven regions by use of MegAlign %

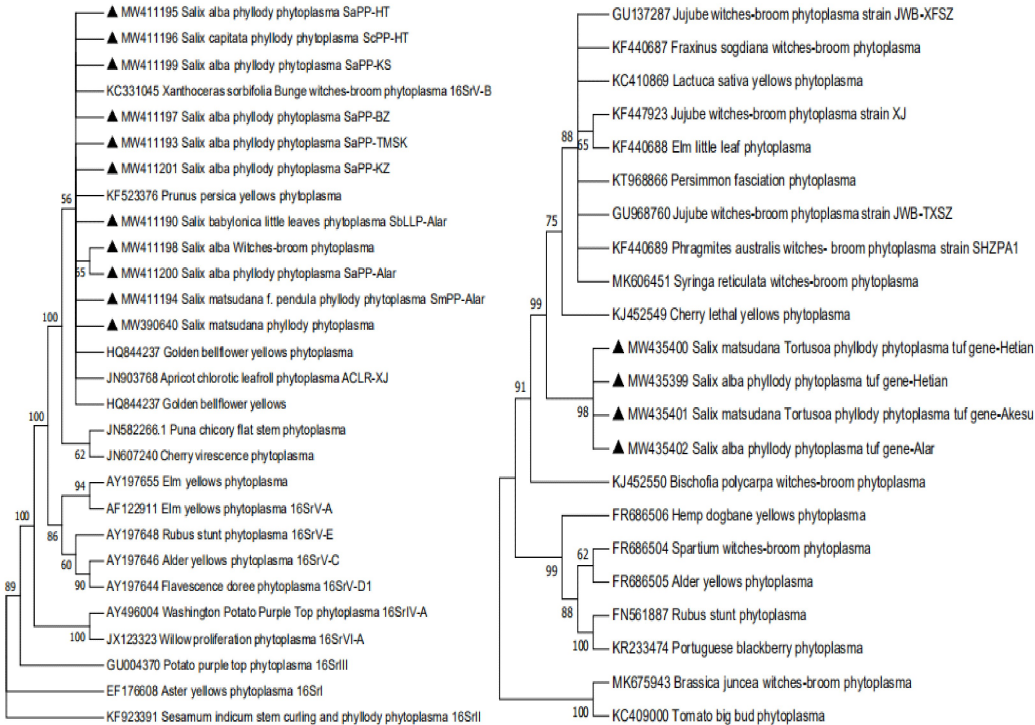
分离物 Isolate	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
A	100.0										
B	100.0	100.0									
C	100.0	100.0	100.0								
D	99.5	99.5	99.5	100.0							
E	99.8	99.8	99.8	99.5	100.0						
F	100.0	100.0	100.0	99.5	99.8	100.0					
G	99.9	99.9	99.9	99.4	99.8	99.9	100.0				
H	99.9	99.9	99.9	99.6	99.8	99.9	99.8	100.0			
I	99.9	99.9	99.9	99.4	99.8	99.9	100.0	99.8	100.0		
J	100.0	100.0	100.0	99.5	99.8	100.0	99.9	99.9	99.9	100.0	
K	100.0	100.0	100.0	99.5	99.8	100.0	99.9	99.9	99.9	100.0	100.0

注 Note: A. MW411190; B. MW411193; C. MW411194; D. MW411195; E. MW411196; F. MW411197; G. MW411198; H. MW411199; I. MW411200; J. MW411201; K. MW390640.

2.3 *tuf* 基因序列比对及系统进化树分析

从和田白柳、龙爪柳、阿拉尔白柳和阿克苏龙爪柳病样中 PCR 扩增出的 4 个 *tuf* 基因片段经测序得到 824 bp 的序列,GenBank 登录号分别为 MW435399~MW435402。将该序列与 NCBI 数据库的同源序列进行比对,结果表明,该序列与枣

疯病(GenBank 登录号:GU137287)的 *tuf* 基因序列相似性为 98.3%,采用邻近法构建系统进化树表明,柳树花变叶植原体 *tuf* 基因序列与榆树黄化组植原体聚为一枝,与中国樱桃黄化致死(GenBank 登录号:KJ452549)亲缘关系最近,属于榆树黄化组(EY)的 *tuf* V-B 亚组。



图中“▲”代表研究所得序列

In the figure,“▲” represents the sequence from this study

图 3 基于新疆柳树花变叶植原体 16S rRNA (左) 和 *tuf* 基因 (右) 序列以及相关植原体株系构建系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on 16S rRNA (left) and *tuf* (right) gene sequences of willow phyllody phytoplasma from Xinjiang and other related phytoplasma

2.4 16S rRNA 虚拟 RFLP 分析

柳树花变叶植原体 16S rRNA 虚拟 RFLP 分析结果表明,该植原体 16S rRNA 基因片段的限制性片段长度多态性与枣疯病株系(GenBank 登录号:AB052876)有 99.8% 的相似性,虚拟 RFLP 模式与 16SrV-B 亚组的参考模式相同,相似系数为 1.00。进一步证明柳树花变叶植原体为 16SrV-B 亚组成员。

3 讨论

本研究以在新疆发现的表现出丛枝和花变叶的柳树为材料,通过 16S rRNA 基因和 *tuf* 基因进行 PCR 扩增、构建系统进化发育树以及 16S rRNA 虚拟 RFLP 分析,结果显示,在新疆地区发现的柳树花变叶属于植原体病害 16SrV-B 亚组成员。

柳树在新疆分布广泛,品种较多。作为园林绿化和园艺观赏树种,对于干旱地区防风固沙和水土保持有重要作用。近年来,柳树植原体病害在国内外不断被发现并报道,云南、陕西、内蒙、甘肃和新疆均已见报道,分别属于 16SrI-B、16SrI-C 和 16SrVI-A 组,引起症状有黄化、小叶、丛枝、增殖和花变叶^[18-20]。伊朗和印度也发现该病害,研究人员报道该病害与植原体有关^[21-23]。这是首次报道柳树花变叶病害与 16SrV-B 亚组植原体有关。

1992 年王纯利等^[5]首次报道新疆柳树植原体病害,并将其命名为柳树丛枝病;朱天生^[6]在山东对柳树植原体病害进行了报道,将其命名为柳树花变叶植原体;魏婷等^[18]在陕西报道的柳树植原体病害症状主要表现为黄化;自 1992 以来,该病害在新疆各地区不断被发现,其发病不断加重。Luan 等^[20]在 2005 年对新疆柳树花变叶植原体病害进行了调查,结果显示,喀什及阿克苏地区发病率达到 60%,和田及阿拉尔地区近 50%,巴州地区近 10%。该病害在新疆不同地区、不同柳树品种上发病程度有所差异,严重者则树体顶枯,但尚未发现有整株死亡现象。植原体感染柳树后,部分柳树在不同时期症状表现也不同,如白柳,春季有花变叶、丛枝症状混合发生,夏秋两季多表现为丛枝症状。经过研究发现,花变叶和丛枝症状植原体 16S rRNA 和 *tuf* 基因序列间无差异,这与植原体能引起寄主植物多种症状的特性相符。但这是否与其他功能基因有关,仍需进一步研究。

该病害自发现以来,一直未见其传播介体的报道。由于其分布广,防治困难,再考虑到柳树的经济效益较低,因此,该病害的研究较为滞后,目前亟待有效控制该病害的措施,以控制该病害传播,减少林业损失。

参考文献 Reference:

- [1] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志:第 20 卷第 2 分册[M]. 北京:科学出版社,1984.
Flora of China Editorial Committee of Chinese Academy of Sciences. The Flora of China: Volume 20, Division 2[M]. Beijing: Science Press, 1984.
- [2] KARP A, HANLEY S J, TRYBUSH S O, *et al.* Genetic improvement of willow for bioenergy and biofuels[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2011(2): 151-165.
- [3] 刘仲健, 罗焕亮, 张景宁. 植原体病理学[M]. 北京: 中国林业出版社, 1999.
LIU ZH J, LUO H L, ZHANG J N. Phytoplasma Phytopathology [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 1999.
- [4] MCCOY R, CAUDWELL A, CHANG C, *et al.* Plant diseases associated with mycoplasma-like organisms[R]. 1989: 545-560.
- [5] 王纯利, 袁自清, 吕巡贤, 等. 新疆柳树丛枝病类菌原体(MLO)的电镜观察[J]. 新疆农业大学学报, 1992, 15(4): 17-19.
WANG CH L, YUAN Z Q, LÜ X X, *et al.* Electron microscopical study on mycoplasma-like organism (MLO) on willow witches' broom in Xinjiang[J]. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 1992, 15(4): 17-19.
- [6] 朱天生. 四种植原体病害的鉴定[D]. 山东泰安: 山东农业大学, 2007.
ZHU T SH. Molecular identification of four phytoplasmal diseases in China[D]. Tai'an Shangdong: Shandong Agricultural University, 2007.
- [7] 李岩峰, 邹大军. 四环素与阿维菌素复配防治柳树植原体病害初探[J]. 林业科技通讯, 2015(7): 47-48.
LI Y F, ZOU D J. Preliminary study on the control of willow phytoplasma disease with tetracycline and avermectin [J]. *Forest Science and Technology*, 2015(7): 47-48.
- [8] ZHANG L, LI Z N, WU Y F, *et al.* Detection and identification of group 16Sr VI phytoplasma in willows in China[J]. *Journal of Phytopathology*, 2012, 160(11/12): 755-757.
- [9] WEI T, WU Y F, WU K K, *et al.* First report of a 16SrI-C group phytoplasma associated with a yellows-type disease affecting willow plants in China [J]. *Plant Disease*, 2009, 93(2): 197.
- [10] MOU H Q, XU X. *Salix tetradenia* Hand. -Mazz: a new natural plant host of 'Candidatus phytoplasma' [J]. *Forest Pathology*, 2014, 44(1): 56-61.
- [11] 漆艳香, 朱水芳, 廖晓兰, 等. 植原体 DNA 提取方法的改良

- [J]. 生物技术通报, 2004(4):44-46.
- QI Y X, ZHU SH F, LIAO X L, *et al.* A improved method for extracting phytoplasma DNA[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2004(4):44-46.
- [12] 李正男. 西北地区常见植物植原体病害分子鉴定及株系多样性研究[D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学, 2015.
- LI ZH N. Molecular diagnosis of phytoplasma diseasea on common plants in northwest China and diversity study of the associated *Phytoplasma* [D]. Yangling Shaanxi: Northwest A&F University, 2015.
- [13] 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, 83:834-842.
- [14] GUNDERSEN D E, LEE I M. Ultrasensitive detection of phytoplasmas by nested-PCR assays using two universal primer pairs[J]. *Phytopathology Mediterranea*, 1996, 35(3):144-151.
- [15] SCHNEIDER B, GIBB K S, SEEMULLER, E. Sequence and RFLP analysis of the elongation factor *tuf* gene used in differentiation and classification of phytoplasmas[J]. *Microbiology*, 1997, 143:3381-3389.
- [16] SUDHIR K, GLEN S, KOICHIRO T. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis Version 7. 0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology & Evolution*, 2016(7):1870.
- [17] YAN Z, WEI W, LEE I M, *et al.* Construction of an interactive online phytoplasma classification tool, iPhyClassifi-
er, and its application in analysis of the peach X-disease phytoplasma group (16SrIII) [J]. *International Journal of Systematic & Evolutionary Microbiology*, 2009, 59(10Pt):2582-2593.
- [18] 魏 婷, 吴云锋, 侯 伟, 等. 柳树黄化病植原体的分子分类[J]. 微生物学报, 2009, 49(3):389-394.
- WEI T, WU Y F, HOU W, *et al.* Molecular classification of a phytoplasma associated with willow yellow disease [J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(3):389-394.
- [19] ZHANG L, LI Z, DU C, *et al.* Detection and identification of group 16SrVI phytoplasma in willows in China [J]. *Journal of Phytopathol*, 2012, 160:755-757.
- [20] LUAN Y M, ZHANG J W, ZHANG F T, *et al.* First report of a new 'Candidatus Phytoplasma asteris' subgroup of 16SrI associated with willow phyllody in China [J]. *Plant Disease*, 2018, 102(12):2634.
- [21] VERA V S, SINGH S. Witches'-broom of Indian willow [J]. *Zeszyty Problemowe Postepow Nauk Rolniczych*, 1981, 244:185-187.
- [22] GHAYEB Z M, TAHERI P. "Candidatus Phytoplasma solani" related strain associated with Babylon willow witches' broom in central provinces of Iran [J]. *Australasian Plant Disease*, 2017, 12:47.
- [23] SHAHRYARI F, ALLAHVERDIPOUR T. "Candidatus Phytoplasma trifolii" related strain affecting *Salix babylonica* in Iran [J]. *Australasian Plant Disease*, 2018, 13:40.

Molecular Identification of Phytoplasma Associated with Willow Phyllody in Xinjiang

LI Feng, LAI Ganggang, ZHAO Zhihui, ZHANG Ping and ZHU Tiansheng

(College of Plant Science, Tarim University, Southern Xinjiang Key Laboratory of IPM/ The National and Local Joint Engineering Laboratory of High Efficiency and Superior-Quality Cultivation and Fruit Deep Processing Technology of Characteristic Fruit Trees in South Xinjiang, Alar Xinjiang 843300, China)

Abstract In order to study the pathogenic agents of willow phyllody disease from 7 regions of Xinjiang, molecular biology techniques were used to identify the pathogens. The total DNA of the willow tree was extracted by the CTAB method, and the 16S rRNA gene and *tuf* gene were amplified by PCR, and the sequenced gene fragments were compared by Blast comparison and homology comparison to construct a phylogenetic tree, and analyze the virtual RFLP of 16S rRNA. The results showed that the fragments of 16S rRNA (1 238 bp) and *tuf* (824 bp) were obtained by PCR amplification, which proved that the disease was related to the phytoplasma, and was named as willow flower phytoplasma (WPP). The 16S rRNA sequence analysis showed that the WPP was 99.68% homologous to ‘*Prunus persica*’ yellows phytoplasma, ‘*Ziziphus jujuba*’ witches’-broom phytoplasma and apricot leaf roll phytoplasma homology. The results of the 16S rRNA virtual RFLP analysis showed that the WPP had 99.8% similarity with the JWB strain (GenBank accession number: AB052876). The virtual RFLP model was the same as the reference model of the 16SrV-B subgroup, and the similarity coefficient was 1.00. It further proved that WPP was a member of the 16SrV-B subgroup. The WPP *tuf* gene was more than 99% homologous to the Elm yellows (EY) group. The phylogenetic tree showed that the WPP and the EY group (16SrV) phytoplasma cluster together, the willow phyllody phytoplasma belonged to the 16SrV-B and *tuf*-B subgroups.

Key words Willow; Phytoplasma; Molecular identification; 16S rRNA; *tuf*

Received 2021-05-13

Returned 2021-08-23

Foundation item The National Natural Science Foundation of China (No. 31060238); Science and Technology Program of Xinjiang Production and Construction Corps (No. 2019DA001, No. 2020DA003); Postgraduate Research and Innovation Project (No. TDGRI202015).

First author LI Feng, male, master student. Research area: phytopathology. E-mail: 2925008071@qq.com

Corresponding author ZHU Tiansheng, male, professor, master supervisor. Research area: phytopathology. E-mail: ztszky@163.com

(责任编辑: 潘学燕 Responsible editor: PAN Xueyan)