

花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 和 *gyrA* 基因之選殖與分析

莊景光¹ 林長平^{1,2}

1. 臺北市 國立台灣大學植物病理學系

2. 聯絡作者：電子郵件 cplin@ccms.ntu.edu.tw，傳真 02-23661980

接受日期：中華民國 89 年 11 月 9 日

摘 要

莊景光、林長平. 2000. 花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 和 *gyrA* 基因之選殖。植病會刊 9:157-166.

Gyrase 酵素是由 *gyrA* 及 *gyrB* 基因分別轉譯出的 *gyrA* 蛋白 (A 次單位元) 及 *gyrB* 蛋白 (B 次單位元) 以 A₂B₂ 型式所組成之四連體蛋白。本研究在進行花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 及 *gyrA* 基因之選殖時，首先根據 *Acholeplasma laidlawii* 及 *Mycoplasma* spp. 等革蘭氏陽性細菌之 *gyrB* 基因序列之高保守性區域設計出 PCR 引子對 GBF2/GBR3，再以感染花生簇葉病病原菌質體的日日春植物全 DNA 為模板進行 PCR 反應，獲得一約 1.4 kb 大小之 PCR 產物。將此 PCR 產物選殖定序後，再以此序列設計出 PCR 引子對 GBF3/GBR5，以 PCR 增幅出篩選 *gyrB* 基因的 0.8 kb 核酸探針，再由感染花生簇葉病病原菌質體的日日春植物全 DNA 之基因庫篩選含 *gyrB* 基因片段之選殖株，我們獲得一選殖株重組質體 pPGB 1-4，定序此一 5308 bp 的 *EcoRI* DNA 嵌入片段，發現其包含三個完整 open reading frame (ORFs 1-3) 及一段與其他細菌 *gyrA* 基因 5' 端有同質性的 DNA 片段。而藉由 pPGB 1-4 上已知序列及比對其他細菌之 *gyrA* 基因核酸序列，再另行設計出 PCR 引子對 GAF1/GAR2 及 GAF3/GAR3，則可自罹病日日春全 DNA 中增幅出位於 *gyrA* 基因中且大小為 0.5 kb 之 *gyrA* 篩選用探針，並成功的選殖出另一重組質體 pPGA 2-3，其 *EcoRI* 嵌入片段經核酸序列解序得 3840 bp。此序列與 pPGB 1-4 的嵌入片段序列 (5308 bp) 共同進行核酸序列分析，再獲得另一完整的 ORF (ORF4) 序列。由 ORF3 及 ORF4 推衍所得之胺基酸序列進行比對分析後，發現其基因大小及基因結構與其他細菌的 *gyrB* 及 *gyrA* 基因具最高相似度。藉此推斷，ORF3 及 ORF4 應分別為花生簇葉病病原菌質體之 *gyrB* 及 *gyrA* 基因。由南方氏雜配反應的結果可發現在花生簇葉病病原菌質體中應僅具有單一套 (single copy) 之 *gyrB* 基因及 *gyrA* 基因。而由 RT-PCR 反應的結果可發現，在花生簇葉病病原菌質體中 *gyrB* 及 *gyrA* 基因應是以 *gyrB-gyrA* 共同轉錄 (cotranscription) 的方式進行轉錄。

關鍵詞： *gyrB* 基因、 *gyrA* 基因、花生簇葉病、植物病原菌質體

緒 言

植物菌質體 (phytoplasma)，原名似菌質體 (mycoplasma-like organism, MLO)，是一種重要的植物病原細菌，可造成罹病植株出現枝條增生、花器葉化、萎凋、黃化及簇葉等病徵。目前已知全球有超過兩百種的植物病害是由植物菌質體所引起⁽¹⁾。此病原菌最早是在 1967 年被發現，但由於迄今仍無法以人工方式對此病原菌作純培養，故吾人對其生理生化及生物特性的瞭解仍屬有限^(13,20,21)。花生簇葉病 (peanut witches' broom, PNWB) 在台灣首先於澎湖及苗栗兩地被發現。其病原經鑑定後，確定是由植物病原菌質體所引起之病害⁽²³⁾。花生簇葉病屬豆類簇葉病 (legume witches' broom) 之一，長期以來，台灣地區的花生栽培常受到此病害之危害，對本省花生產

業的發展影響很大。我們近年來陸續嘗試以植物病原菌質體為材料，進行其特定基因之分子生物學上之探討⁽²⁵⁾。DNA 分子在進行複製、轉錄、修補時，分子間的負超螺旋結構需要被釋放開來，而負責釋放 DNA 負超螺旋結構或在事後重新再讓雙股 DNA 分子形成負超螺旋結構的酵素，通稱為拓撲酵素 (topoisomerase)。DNA gyrase 屬於 type II topoisomerase⁽⁵⁾，正常有功能的 gyrase 蛋白是由 *gyrA* 及 *gyrB* 基因分別轉譯出的 GyrA 蛋白 (稱為 A 次單位元) 及 GyrB 蛋白 (稱為 B 次單位元) 以 A₂B₂ 型式所組成的四聯體 (tetramer) 蛋白⁽⁹⁾。在 gyrase 蛋白中，GyrA 次單位元負責切斷及重新連結核酸分子，GyrB 次單位元則具有 ATP 水解酵素活性，負責提供反應所需的能量^(15, 16)。由於細菌體內 DNA 的負超螺旋的結構皆以非常相似的機制進行 DNA 負超螺旋的釋放及形成之反應，所以 gyrase

蛋白在細菌體內有高度的保留性。本研究為進行花生簇葉病病原菌質體之 *gyrB* 基因及 *gyrA* 基因的選殖，並比較此一基因與其他細菌之 *gyrB* 與 *gyrA* 基因的核酸與胺基酸序列間有差異的部份，以期能對植物菌質體的基因結構有更深一層的認識與瞭解。

材料與方法

試驗植物與植物全 DNA (total DNA) 及全 RNA (total RNA) 之抽取

本實驗以日日春 (*periwinkle*, *Catharanthus roseus*) 作為試驗植物，利用菟絲子 (*dodder*, *Cuscuta australis*) 作為媒介，將花生病株上之病原植物菌質體由花生傳入日日春健株上⁽²³⁾來繁殖植物菌質體。其後利用旁嫁接法 (*side graft*) 將花生簇葉病病原菌質體由日日春病株傳至健株中繼續於溫室繁殖。由日日春中抽取全 DNA 之方法主要參考 Ko 等人的方法⁽¹⁰⁾，稍作修改後進行。由日日春中抽取全 RNA 之方法則採用 Yeh 等人的方法⁽²⁴⁾。抽取的植物組織為有病徵之簇葉葉片。

花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 基因篩選用核酸探針 (probe) 之製備

由國家衛生研究院巨分子序列分析軟體 (GCG, <http://gcg.nhri.org.tw/>) 基因資料庫及 NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 基因資料庫中，收集包括 *Acholeplasma laidlawii*, *Bacillus* sp., *Mycoplasma arthritidis*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Spiroplasma citri*, *Streptomyces spheroids*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* 及 *Escherichia coli* 之 *gyrB* 基因序列 (GenBank accession numbers 依序為：AF167102, AB010081, U83664, U09251, L35044, X77529, X53555, Z19108, Z17305, M86227, X83917 及 D87842) 等細菌之 DNA gyrase 酵素 B 次單位元 (DNA gyrase B subunit) 之胺基酸序列，利用 CLUSTAL⁽⁶⁾ 軟體進行比對，並參照前人所比對之結果⁽¹²⁾，設計出降解性寡核酸 (degenerate oligonucleotides) 引子 GBF2：5'-CATGCGGGGWWGAAATTT-3' 及 GBR3：5'-CATYTCWCCWARWCCTTT-3'。將此引子對與 50 ng 前述罹病或健康植物全 DNA 進行進行 35 個循環的 PCR 反應，兩引子之終濃度各為 0.5 μM。PCR 反應條件如下：94℃，30 秒；50℃，30 秒；72℃，3 分鐘。並利用 QIAquick PCR purification kit (QIAGEN GmbH, Germany) 及 TOPO TA Cloning[™] Kit (Invitrogen Corporation, USA) 進行 PCR 產物純化及選殖。所獲得之重組質體再利用重組質體嵌入片段上、下游之通用引子 (universal primer)，

根據 Sanger 之 didoxy chain termination 之方法⁽¹⁸⁾，使用 ABI PRISM[™] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit 和 ABI PRISM[™] 310 Genetic Analyzer (Perkin Elmer Corporation, USA) 核酸自動定序分析儀進行嵌入片段之解序。並依序由已定出序列片段的 3' 端序列，再行設計出約 20 鹼基之引子，以便往 3' 端繼續進行延伸定序 (圖一)，至嵌入片段的二股 DNA 的核酸序列均被解讀出來為止。

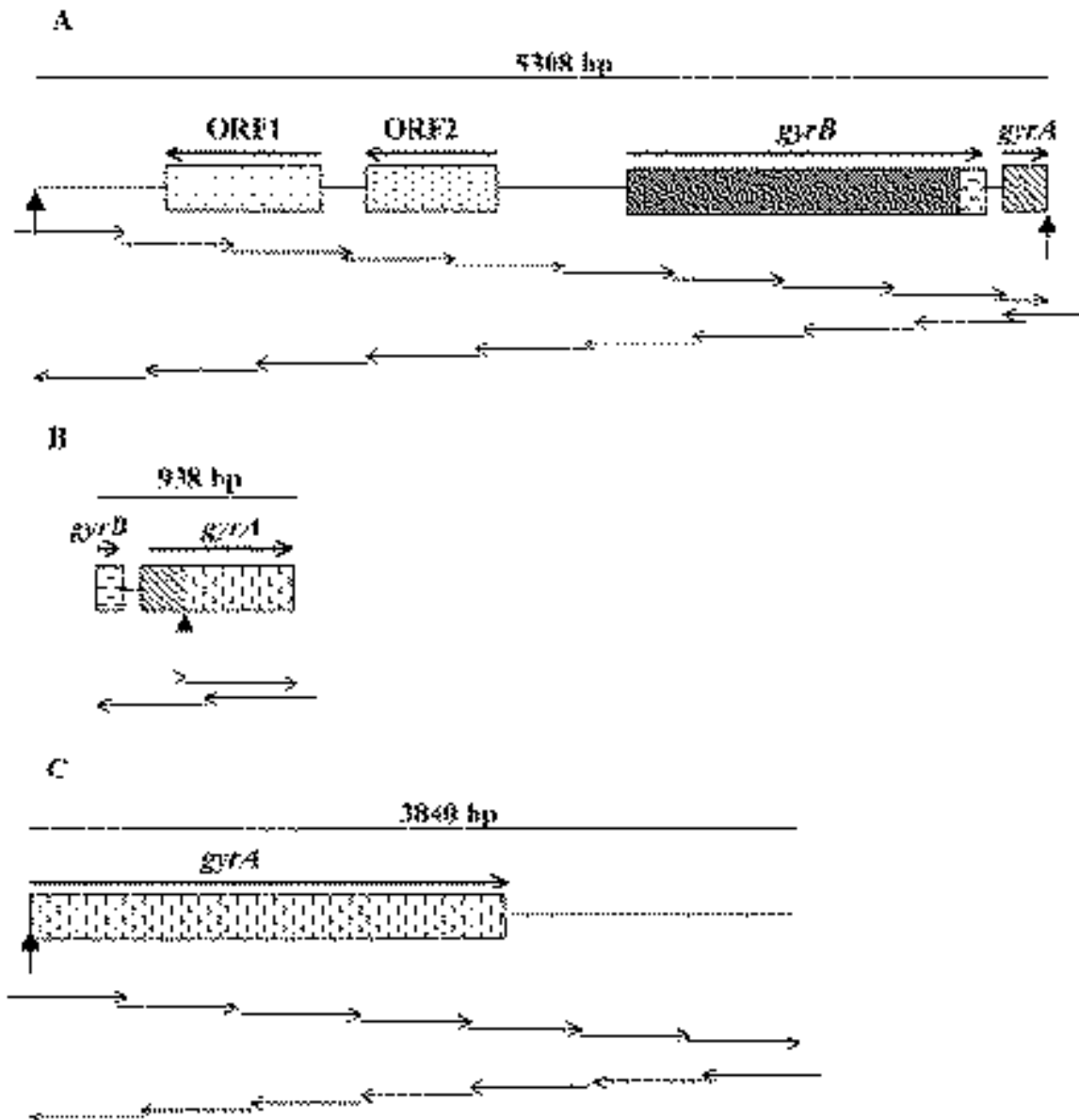
核酸探針之標識反應乃採用 Roche Molecular Biochemicals (Germany) 公司所生產之 PCR DIG Probe Synthesis Kit 進行，唯 PCR 非放射標識反應中所用之引子改採依核酸定序後所得之 *gyrB* 基因片段序列所設計之專一性引子對，其序列為 GBF3：5'-TCTAAAGGTGGTATTCAAG-3' (nt 3774-3792) 及 GBR5：5'-CGAAACCTGTACCAAAAGA-3' (nt 4533-4551) (GBF3 與 GBR5 引子相距 778 bp)。以此引子對對感病日日春植物全 DNA 進行 PCR 反應，可得到篩選 *gyrB* 的核酸探針。

花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 基因篩選

以前述方法製備得到 *gyrB* 基因篩選用核酸探針後，即可對花生簇葉病病原菌質體之基因庫進行噬菌體溶菌斑篩選。而花生簇葉病病原菌質體基因庫之建立乃依 Yu 等人⁽²⁵⁾之方法以感染花生簇葉病病原菌質體的日日春植物全 DNA 以 *EcoRI* 做部份切割後，採用 Strategene 公司 (Strategene, USA) 所生產之 Predigested lambda Zap[™] II/*EcoRI*/CIAP cloning kit 及 Gigapack II packaging extract 依廠商建議之方法進行。針對由基因庫篩選得到之選殖株重組質體 DNA，利用 pBluescript SK(-) 上之通用引子，對嵌入片段進行核酸定序分析。所得之序列以 DNASTAR 軟體 (DNASTAR Inc.) 及連結 NCBI 基因資料庫進行分析，分析時設定 ATG, GTG 及 TTG 為起始密碼，以 TGA, TAG 及 TAA 為終止密碼⁽¹¹⁾，找出可能之 open reading frame (ORF)。

花生簇葉病病原菌質體 *gyrA* 基因篩選用核酸探針之製備及 *gyrA* 基因之篩選

由其他細菌的研究資料指出：在革蘭氏陽性菌上 *gyrB* 及 *gyrA* 基因常以 *gyrB-gyrA* 偶合 (coupled) 的方式存在^(12,17)。為了進一步選殖出花生簇葉病病原菌質體的 *gyrA* 基因，遂利用已解序完成的 *gyrB* 基因下游序列設計一股正股引子 (forward primer) GAF1：5'-AAAGGGTTAGGAGAAAT-3'，並至 GCG 基因庫中收集包括 *Bacillus* sp., *Mycoplasma genitalium*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* 及 *E. coli* 等細菌之 *gyrA* 基因核酸序列 (GenBank accession numbers：AB010081, U09251, D10489, AF053121 及 X06373)，進行 *gyrA* 蛋白序列的比對，找出



圖一、對 pPGB 1-4、pTAGA 3 和 pPGA 2-3 選殖株嵌入 DNA 片段進行核醣酸定序之策略及各嵌入片段重疊之情形
Fig. 1. Sequencing strategy of the inserts of pPGB 1-4 (A), pTAGA 3 (B) and pPGA 2-3 (C). The four putative genes and their directions of transcription are indicated. Arrows below the bar indicated the direction and the extent of sequencing. Overlapped regions of the three insert DNAs were shaded in the same pattern. Upward arrows indicate the *EcoRI* sites.

GyrA 蛋白保留性高的區域進行 *gyrA* 基因篩選用探針反股引子 (reverse primer) 的設計，所設計的反股引子為 GAR2：5'-GTBGGRAARTCWGGWCC-3'。利用此引子對 GAR1/GAR2，以感染日日春植物的全 DNA 50 ng 為模板，進行 PCR 反應。兩引子終濃度各為 0.5 μM，而反應條件修改為以 94 °C，10 秒鐘；50 °C，5 秒鐘；72 °C，30 秒鐘；進行 35 個循環。PCR 反應產物之純化，選殖及定序則根據前述 *gyrB* 基因篩選用核酸探針之方法進行。定序後再利用所得之 *gyrA* 基因部分序列，設計出專一性引子對 GAR3：5'-GGATTATCTAATCAAGAACG-3' (nt 5347-

5328)，GAR3：5-CATTAAATCTTGAGTTTCTA-3' (nt 5770-5789)，增幅出 *gyrA* 基因片段。再以 PCR DIG Probe Synthesis kit 進行非放射標識後做為 *gyrA* 基因篩選用核酸探針。之後自花生簇葉病病原菌質體基因庫中篩選 *gyrA* 片段的選殖株、及進行該選殖株嵌入片段 DNA 之核醣酸定序分析，則與前述篩選及定序 *gyrB* 之方法相同。

南方轉漬 (Southern blotting)、北方轉漬 (Northern blotting) 及雜配反應 (hybridization)

取 5 μg 健康及感染花生簇葉病之植物全 DNA，分別

以 10 單位之 *Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III, *Kpn*I, *Sac*I, *Xba*I, *Xho*I 內限制酵素 (Roche, Germany) 進行酵解, 共進行 6 小時, 再於 0.8% 瓊脂凝膠中進行水平式電泳, 並將 DNA 轉漬至 Nylon 濾膜 (南方轉漬), 隨後進行雜配及呈色反應^(3,10)。

北方轉漬則取 20 µg 植物全 RNA 以 20 x SSC 進行轉漬。且呈色受質改為 CDP-StarTM chemiluminescent detection reagent (TROPIX, Inc., USA)。南方與北方轉漬膜之雜配反應溫度為 68 °C, 6 小時; 洗滌條件則依廠商之建議執行, 核酸探針為前述 *gyrB* 及 *gyrA* 基因篩選用核酸探針。

反轉錄聚合酵素連鎖反應 (reverse transcription PCR, RT-PCR)

進行反轉錄反應時, 將 5 µg 花生簇葉病原菌質體 RNA 溶於 4 µl nuclease-free H₂O 中, 以 10 unit RNase-free DNase I (Roche) 於 37 °C 處理 15 分鐘, 再經 68 °C 處理 10 分鐘, 並立即置於冰上待用。再依序加入 nuclease-free H₂O (使反應總體積為 20 µl)、4 µl 的 5x Reaction Buffer、終濃度為 1.25 µM 的 dNTPs mixture、終濃度為 2.5 µM 的反股引子 [SGBR2 (對應於 *gyrB* 基因 3' 端 nt 4106-4123): 5'-AGCTTCTTGCGGATTCTC-3'; 或 SGAR8 (對應於 *gyrA* 基因 3' 端 nt 5522-5540): 5'-AAACTGTAGGTTCTTCTC-3'], 及 200 unit M-MLV reverse transcriptase (Promega)。另有一控制組則不加酵素而僅加入 1 µl nuclease-free H₂O 以作為檢驗 RNA 中有無 DNA 殘留。此反應液於 37 °C 下反應進行 DNA 之合成 1 小時。之後, 取反應液 1 ml 加入正、反股引子對 [SGBF2 (位於 *gyrB* 基因 5' 端 nt 3393-3410): 5'-CACTTGTTTACAGTGGA-3'/SGBR2 (序列如上述, 對應於 *gyrB* 基因 3' 端); 或 SGBF5 (位於 *gyrB* 基因 5' 端 nt 4598-4615): 5'-TATTTTGCTCAACCTCCT-3'/SGAR8 (序列如上述, 對應於 *gyrA* 基因 3' 端)] 使終濃度各為 0.5 µM 進行 PCR 反應, PCR 條件為: 94 °C, 10 秒鐘; 50 °C, 5 秒鐘; 72 °C, 30 秒鐘; 進行 30 個循環。反應完成後, 於 1% 瓊脂凝膠 (1 x TAE 緩衝液) 進行電泳分析。在進行 cDNA 的 PCR 反應同時, 另以健康或罹病植物全 DNA 50 ng 代替 cDNA 以做為 PCR 反應的控制組。

結 果

花生簇葉病原菌質體 *gyrB* 基因之篩選

利用 *gyrB* 基因篩選用探針, 由感染花生簇葉病的日日春的全 DNA 基因庫中獲得 5 個重組質體。選取其中之一 pPGB 1-4 進行嵌入 DNA 全長之核酸定序分析。結果發現 pPGB 1-4 包含 5308 bp 嵌入片段, 由序列中發現一個 tRNA^{Gln} 及 3 個 ORFs, 分別命名為 ORF1, ORF2 及 ORF3 (圖一 A)。本文中後續所述之各序列均已登錄於 Genbank (AF263924), 請參照。其中, tRNA^{Gln}、ORF1、

ORF2 位於 ORF3 核酸序列之對應股上。以 ORF1 及 ORF2 之核酸及胺基酸序列於連結 NCBI 資料庫進行比對時, 並未發現其與任何已知基因有相似性。而 ORF3 之核酸序列轉譯成胺基酸序列與 NCBI 基因庫中所收集到之各種基因序列進行比對時發現其與細菌之 *gyrB* 基因具相似性, 故與各細菌之 *gyrB* 基因進一步進行比對, 發現除了與 *E. coli* 之 *gyrB* 基因的 GyrB 蛋白胺基酸序列有較低約為 37% 之相同度 (identity) 外, 與 *Acholeplasma laidlawi*、*Mycoplasma arthritidis*、*Mycoplasma gallisepticum*、*Mycoplasma genitalium*、*Mycoplasma hominis*、*Mycoplasma pneumoniae*、*Spiroplasma citri*、*Bacillus subtilis*、*Staphylococcus aureus*、*Streptococcus pneumoniae* 和 *Streptomyces spheroides* 之 *gyrB* 基因的 GyrB 蛋白在胺基酸序列上則分別有 57%、47%、49%、49%、49%、48%、50%、54%、53%、51% 和 46% 的相同度。ORF3 之核酸序列共有 1948 bp, 共可轉譯成有 648 個胺基酸, 基因產物之分子量估計約為 73.5 kD, 轉譯起始密碼為 ATG, 終止密碼為 TAA。ORF3 中 A+T 值為 71.9%, G+C 值為 28.1%, 其核酸組成為 G: 16.2%, A: 37.7%, T: 34.21%, C: 11.92%; 其密碼利用性 (codon usage) 如表一所示。而在胺基酸的利用上, ORFs 1,2,3 皆無發現有利用 UGA 為 tryptophan 密碼的情形, 與前人報導的菌質體的抗原蛋白沒有 UGA tryptophan 密碼的結果相符⁽²⁵⁾。此 ORF3 所推衍出之胺基酸序列上, 包含了在 *E. coli* 及其他細菌上 GyrB 蛋白所共同具有的保守性區域, 例如在 *E. coli* GyrB 蛋白的第 114、117、119 位置的 GXXGXG ATP-binding motif, 或與 ATP triphosphate 接觸的第 46、103、335 及 337 位置胺基酸 N, K, Q, K, 或與 ATP ribose ring 上 2'-hydroxyl 發生反應的第 5 位置胺基酸 Y, 及可與 ATP 上 adenine 官能基接觸的第 109 和 73 位置的胺基酸 Y, D⁽⁸⁾, 皆能在 ORF3 所推衍出的胺基酸該等相對位置上發現 (請參照 Genbank AF263924)。此外, 在 ORF3 之起始密碼 ATG 之上游約 20 至 25 個鹼基間, 有與植物菌質體⁽¹⁴⁾ 及一般原核生物的 16S rRNA 3' 端的互補序列 (5'AGGAG3'), 亦即有核糖體鍵結位置 (ribosome binding site, RBS) Shine-Dalgarno 序列的存在⁽¹⁹⁾。而在 ORF3 核酸序列下游約 84 bp 處有發現另一約 203 bp 序列具 ATG 起始密碼, 而結尾處為選殖時之 *Eco*RI 內限制酵素辨識切位, 疑似為另一 ORF 的部分核酸序列。經連結 NCBI 基因資料庫與其他細菌之基因進行比較, 發現此 203 bp 核酸序列推衍所得之胺基酸序列與 *Ureaplasma urealyticum*、*Mycoplasma genitalium* 的 *gyrA* 基因胺基酸序列有 49%、45% 的相同性。

花生簇葉病原菌質體 *gyrA* 基因之篩選

利用 ORF3 (*gyrB* 基因) 3' 端的序列以細菌 GyrA 蛋白

表一、花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 基因之密碼應用性Table 1. Codon usage in the PNWB-phytoplasma *gyrB* gene

1st base	Codon with 2nd base								3rd base
	U		C		A		G		
	Amino Acid	No. of occurrence	Amino Acid	No. of occurrence	Amino Acid	No. of occurrence	Amino Acid	No. of occurrence	
U	Phe (F)	24	Ser (S)	21	Tyr (Y)	29	Cys (C)	3	U
	Phe (F)	6	Ser (S)	2	Tyr (Y)	1	Cys (C)	0	C
	Leu (L)	50	Ser (S)	4	TER ¹	1	OPA ²	0	A
	Leu (L)	4	Ser (S)	1	TER	0	Trp (W)	3	G
C	Leu (L)	4	Pro (P)	13	His (H)	11	Arg (R)	4	U
	Leu (L)	0	Pro (P)	2	His (H)	0	Arg (R)	1	C
	Leu (L)	1	Pro (P)	3	Gln (Q)	24	Arg (R)	3	A
	Leu (L)	0	Pro (P)	3	Gln (Q)	3	Arg (R)	1	G
A	Ile (I)	49	Thr (T)	22	Asn (N)	37	Ser (S)	11	U
	Ile (I)	3	Thr (T)	0	Asn (N)	8	Ser (S)	1	C
	Ile (I)	10	Thr (T)	9	Lys (K)	60	Arg (R)	13	A
	Met (M)	11	Thr (T)	1	Lys (K)	2	Arg(R)	2	G
G	Val (V)	16	Ala (A)	31	Asp (D)	30	Gly (G)	21	U
	Val (V)	1	Ala (A)	3	Asp (D)	2	Gly (G)	6	C
	Val (V)	9	Ala (A)	6	Glu (E)	39	Gly (G)	7	A
	Val (V)	3	Ala (A)	4	Glu (E)	6	Gly (G)	4	G

¹. TER, termination codon². opal codon

保留區序列所推衍出的引子對 GAF1/GAR2，以罹病植物全 DNA 為模板，進行 PCR 可增幅出約 1 kb 預期大小之 DNA 片段，將該 PCR 產物選殖後，得一選殖株重組質體 pTAGA 3。對 pTAGA 3 進行嵌入片段解序，確定所增幅出之產物大小為 938 bp，其中包含先前進行 *gyrB* 基因選殖時所獲得之 pPGB1-4 重組質體中 *gyrB* 基因之 3' 端，及其下游至內限制酵素 *EcoRI* 辨識切位區域共約 427 bp，以及內限制酵素 *EcoRI* 辨識切位下游約 511 bp (圖一B)。而此一 511 bp 核酸序列與之後於 *gyrA* 基因選殖時所獲得選殖株重組質體 pPGA 2-3 (詳如後述，圖一C) 內限制酵素 *EcoRI* 辨識切位之DNA嵌入片段之一側 (*gyrA* 基因之 5' 端)核酸序列完全相符，因此得知重組質體 pPGB 1-4 及 pPGA 2-3 (後述) 所包含之 DNA 嵌入片段為一連續之核酸序列且二者間具有一內限制酵素 *EcoRI* 辨識切位，且該連續之序列於 *EcoRI* 切位附近的序列由 pTAGA3 序列重疊涵蓋 (圖一)。

利用 *gyrA* 基因篩選用探針，由感染菌質體的日日春的 *EcoRI* 基因庫中篩選獲得一選殖株 pPGA 2-3，將其嵌入片段 DNA 進行核酸定序後，發現為一 3840 bp 的 *EcoRI* 片段。將選殖株 pPGB 1-4 和 pPGA 2-3 之 *EcoRI* 嵌入 DNA 片段於 *EcoRI* 切位處相連結後，以 DNASTAR 軟體進行序列分析，結果顯示：此段約 9 kb 片段序列除前述的 tRNA^{Gln} 及 3 個 ORFs 外，還包含一個新的 ORF，稱為 ORF4 (圖一)。ORF4 之核酸序列共有 2541 bp，轉譯成胺基酸序列後共有 846 個胺基酸，基因產物分子量為 95.8

kD，轉譯起始密碼為 ATG，終止密碼為 TAA。ORF 中 A+T 值為 72.7%，G+C 值為 27.4%，其核酸組成為 G：15.7%，A：39.51%，T：33.14%，C：11.65%。其密碼利用性如表二所示，而在胺基酸的利用上，也沒有發現以 UGA 為 tryptophan 密碼的情形。將 ORF4 之核酸序列推衍成胺基酸序列與 NCBI 基因庫中收集到之各種基因序列進行比對時發現其與細菌之 *gyrA* 基因具相似性，故與各細菌之 *gyrA* 基因進一步進行比對，發現除了與 *E. coli* 之 *gyrA* 基因胺基酸序列有較低約為 36% 之相同度 (identity) 外，與 *Mycoplasma genitalium*、*Bacillus* sp.、*Staphylococcus aureus* 和 *Streptococcus pneumoniae* 的 *gyrA* 基因推衍出的 GyrA 蛋白在胺基酸序列上則分別有 40%、42%、41%、41% 的相同度。此 ORF4 所推衍出之胺基酸序列，亦包含了在 *E. coli* 及其他細菌 GyrA 蛋白序列所共同具有的保守性區域，例如相對於 *E. coli* GyrA 蛋白第 112 位置與 GyrA 蛋白催化兩股 DNA 分子形成鍵結有關的 tyrosine 胺基酸⁽⁸⁾。此外，在 ORF4 之起始密碼 ATG 之上游約 7 至 11 個鹼基間，有類似 Shine-Dalgarno 序列 (序列為 5'AACG3') 的存在。以上包含 tRNA^{Gln} 及 ORF1、ORF2、*gyrB* 與 *gyrA* 之基因序列與相關資料已登錄至 GenBank 資料庫，登錄號碼為 AF263924。

南方和北方雜配反應

南方雜配反應部分，以所製備的 *gyrB* 基因篩選用核

表二、花生簇葉病原菌質體 *gyrA* 基因之密碼應用性
Table 2. Codon usage in the PNWB-phytoplasma *gyrA* gene

1st base	Codon with 2nd base								3rd base
	U		C		A		G		
	Amino Acid	No. of occurrence	Amino Acid	No. of occurrence	Amino Acid	No. of occurrence	Amino Acid	No. of occurrence	
U	Phe (F)	28	Ser (S)	28	Tyr (Y)	18	Cys (C)	1	U
	Phe (F)	4	Ser (S)	3	Tyr (Y)	3	Cys (C)	3	C
	Leu (L)	60	Ser (S)	6	TER ¹	0	OPA ²	0	A
	Leu (L)	7	Ser (S)	2	TER	1	Trp (W)	0	G
C	Leu (L)	8	Pro (P)	14	His (H)	10	Arg (R)	14	U
	Leu (L)	1	Pro (P)	0	His (H)	3	Arg (R)	5	C
	Leu (L)	2	Pro (P)	1	Gln (Q)	41	Arg (R)	5	A
	Leu (L)	0	Pro (P)	4	Gln (Q)	3	Arg (R)	0	G
A	Ile (I)	61	Thr (T)	24	Asn (N)	57	Ser (S)	12	U
	Ile (I)	8	Thr (T)	4	Asn (N)	5	Ser (S)	0	C
	Ile (I)	21	Thr (T)	11	Lys (K)	86	Arg (R)	13	A
	Met (M)	21	Thr (T)	1	Lys (K)	6	Arg(R)	0	G
G	Val (V)	24	Ala (A)	30	Asp (D)	50	Gly (G)	24	U
	Val (V)	4	Ala (A)	1	Asp (D)	0	Gly (G)	3	C
	Val (V)	22	Ala (A)	9	Glu (E)	47	Gly (G)	17	A
	Val (V)	4	Ala (A)	0	Glu (E)	3	Gly (G)	4	G

¹. TER, termination codon

². opal codon

酸探針，對感染菌質體的日日春植物的全 DNA 經 *EcoRI* 酵解後做南方雜配，可在約 5 kb 之 DNA 片段處產生訊號；對以 *HindIII* 酵解者，可在約 3 kb 之 DNA 片段處產生訊號。而以其餘幾種內限制酵素酵解者，訊號約皆在 10 Kb 以上之 DNA 片段處產生（圖二A）。另以所製備的 *gyrA* 基因篩選用核酸探針，對以 *EcoRI* 酵解者做南方雜配，可在約 21 kb 之 DNA 片段處產生訊號；以 *HindIII* 酵解者，可在約 3 kb 之 DNA 片段處產生訊號，而以其餘幾種核酸內限制酵素酵解者訊號約皆在 10 Kb 以上之 DNA 片段處產生（圖二B）；而 *gyrB* 及 *gyrA* 基因探針對健康日日春之全 DNA 進行南方雜配反應，則沒有任何雜配訊號。由上述結果，我們可以推測 *gyrB* 及 *gyrA* 基因在花生簇葉病原菌質體應是以單套存在。而以 *gyrB* 或 *gyrA* 基因核酸探針對健康及菌質體感染的日日春之全 RNA 的北方雜配未獲得明確的雜配訊號。

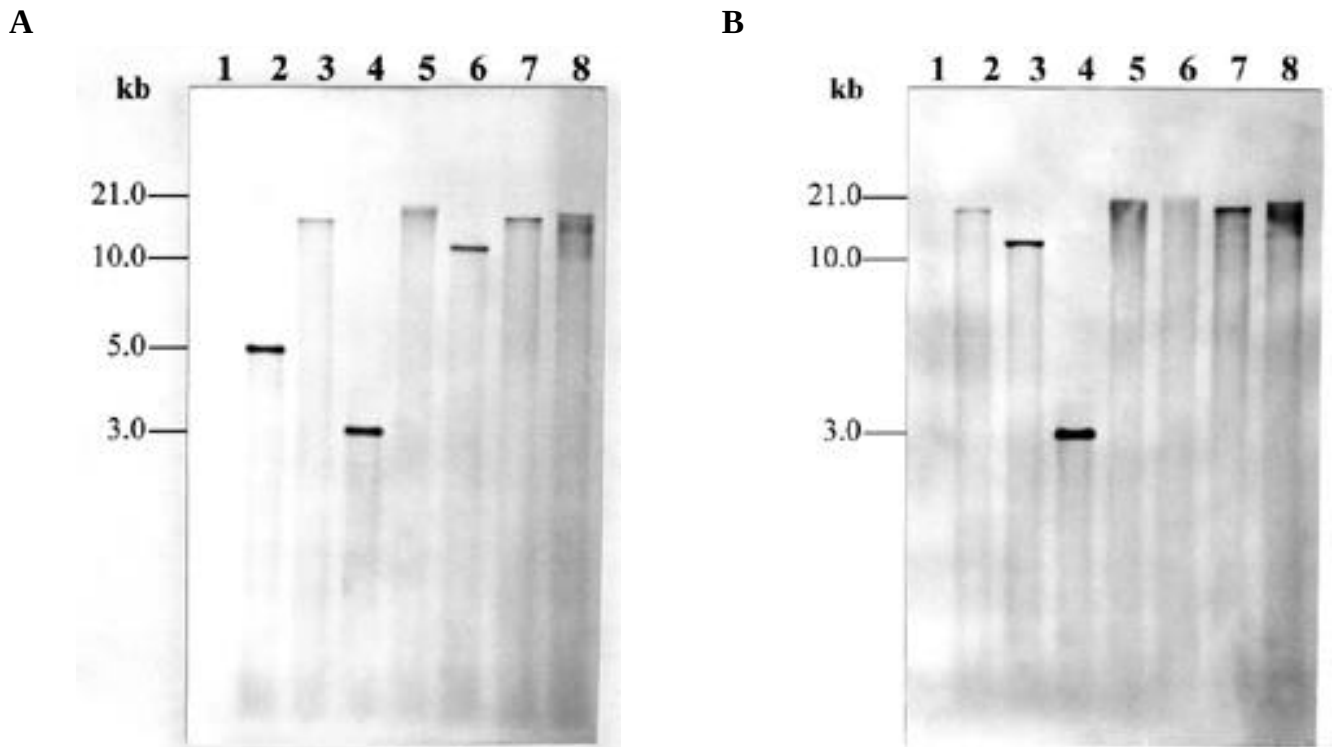
反轉錄聚合酵素連鎖反應

由於北方雜配無法證明花生簇葉病菌質體在日日春病株中的表現，我們接著嚐試以反轉錄聚合酵素連鎖反應證明菌質體在日日春植物中的表現，結果顯示：在 *gyrB* 基因部分，以 SGBF2 (序列位於 *gyrB* 基因 5' 端)/SGBR2 (序列位於 *gyrB* 基因 3' 端) 為引子對對罹病日日春的全 RNA 進行 RT-PCR 反應時，可增幅出 0.7 kb 之產物（預期產物為 731 bp）（圖三A）。但是對以健康日日春全 RNA 則不會

有 PCR 產物。另外，不加入反轉錄酵素的 RT 控制組及以健康日日春全 DNA 為模板的 PCR 控制組皆不會有 PCR 產物。以 SGBF5 (序列位於 *gyrB* 基因 5' 端)/SGAR8 (序列位於 *gyrA* 基因 3' 端) 為引子對對病株的全 RNA 進行 RT-PCR 反應，可增幅出 1 kb 之產物（預期產物為 943 bp）（圖三B），顯示 *gyrB* 與 *gyrA* 二基因有共同轉錄 (cotranscription) 之情形。同樣，以健康日日春全 RNA 進行 RT-PCR 反應則不會有 PCR 產物。另外，不加入反轉錄酵素的 RT 控制組及以健康日日春全 DNA 為模板的 PCR 控制組皆不會有 PCR 產物。

討 論

本實驗中，採用之基因選殖策略為先收集細菌 *gyrB* 及 *gyrA* 基因之核酸及胺基酸序列，再藉由序列比對後選取 *GyrB* 及 *GyrA* 蛋白序列保留性高的區域，設計出可增幅出目標基因片段之降解性 (degenerate) PCR 引子序列，而後利用 PCR 增幅獲得篩選用之探針，自感染花生簇葉病原菌質體的日日春 DNA 基因庫中，進行目標基因之篩選。由於植物菌質體在演化親緣上屬於革蘭式陽性菌 (Gram-positive bacteria) 的 Mollicutes 綱，所以本研究收集之序列乃以親緣關係較近之 Mollicutes 綱及其他革蘭式陽性細菌的 *gyrA* 及 *gyrB* 序列為主。由於構成 *gyrase* 蛋白的兩個基因 *gyrB* 及 *gyrA* 在基因庫中以 *gyrB* 基因的資料較為豐富，故先進行 *gyrB* 基因的篩選。



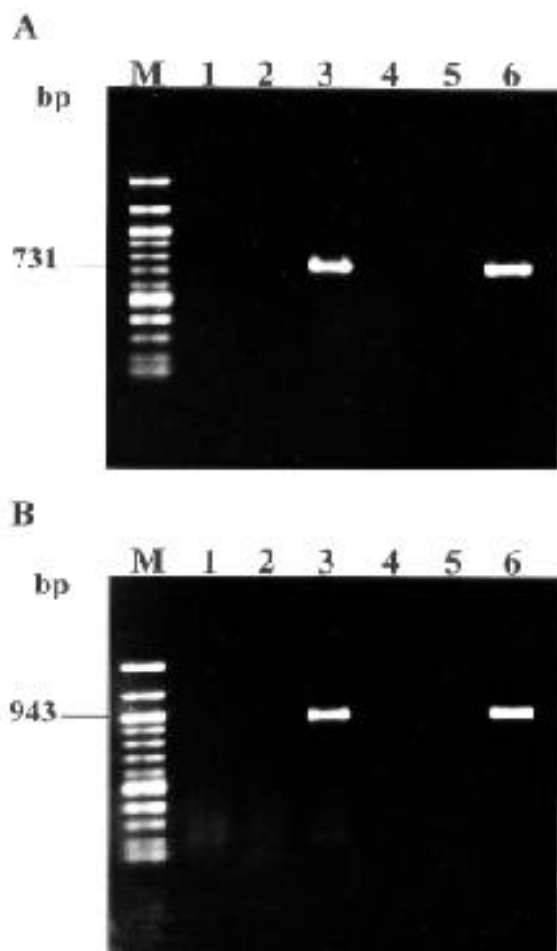
圖二、以 *gyrB* 基因核酸探針 (A) 及 *gyrA* 基因核酸探針 (B) 對以不同內限制酵素酵解後之健康及受花生簇葉病病原菌質體感染之日日春全 DNA 進行南方氏雜配分析之結果

Fig. 2. Southern blot analyses of total DNA (5 µg per lane) prepared from healthy periwinkle digested with restriction enzyme *EcoRI* (lane 1) and from diseased periwinkle infected with PNWB-phytoplasma digested with restriction enzymes *EcoRI* (lane 2), *BamHI* (lane 3), *HindIII* (lane 4), *KpnI* (lane 5), *SacI* (lane 6), *XbaI* (lane 7), *XhoI* (lane 8). Hybridizations were conducted at 68 for 6 hr using the PCR DIG-labeled *gyrB* gene probes (A) and *gyrA* probes (B). Sizes (in kb) of the hybridization signals are shown on the left.

本研究發現花生簇葉病病原菌質體的 *gyrA* 基因位於 *gyrB* 基因終止密碼下游約 84 個鹼基處。此一 *gyrB* 與 *gyrA* 基因相連的情形與其它革蘭氏陽性菌，如 *Bacillus subtilis* 二基因相距 214 個鹼基對，*Staphylococcus aureus* 二基因相距 39 個鹼基對及 *Mycoplasma pneumoniae* 二基因相距 1 個鹼基對重疊的情形相仿⁽⁸⁾，而與革蘭氏陰性菌如 *E. coli*、*Pseudomonas putida* 中 *gyrB* 及 *gyrA* 二基因相隔數幾千個鹼基⁽¹²⁾ 的分佈情形明顯不同。此外，本實驗中所選殖到之花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 及 *gyrA* 基因推衍所得之 GyrB 及 GyrA 蛋白與其他革蘭氏陽性菌 Mollicutes 綱細菌之 GyrB 及 GyrA 蛋白比較，在胺基酸序列上分別有 45 - 46% 及 40 - 41% 之相似度。其中 GyrA 蛋白保守性區域集中於蛋白質 N 端，其 C 端的保守性較低。在本研究所選殖到花生簇葉病病原菌質體之 GyrB 蛋白序列中，並未發現一段不存在於 *Bacillus subtilis*、*Borrelia burgdorferi*、*Haloferax* sp., *Mycoplasma pneumoniae* 及 *Staphylococcus aureus* 等革蘭氏陽性菌，而只廣泛存在於各革蘭氏陰性菌如 *E. coli* 與 *Pseudomonas putida* 的 GyrB 蛋白序列中一段約 150 個胺基酸序列的嵌入片段

⁽⁸⁾。這些皆可佐證所選殖到的 ORF3 及 ORF4 應為花生簇葉病病原菌質體之 *gyrB* 及 *gyrA* 基因。並且也與前人於 16S rRNA 序列分析中指出植物菌質體應屬革蘭氏陽性菌的結論相符⁽¹⁴⁾。

花生簇葉病病原菌質體的 GyrB 及 GyrA 蛋白除了分別与其它細菌之 GyrB 及 GyrA 蛋白有較高之相似度外，也分別与其它細菌之 ParE 及 ParC 蛋白有相似性（與 *E. coli* ParE 及 ParC 之相似度分別為 34% 及 22%）。*parE* 及 *parC* 之基因產物為 topoisomerase 蛋白，而 *gyrB* 及 *gyrA* 基因產物為 topoisomerase II 蛋白，兩者同屬於第二型 (Type II) 的 topoisomerase，在基因組成及蛋白結構上相當類似。在 *E. coli* 中，GyrB 及 GyrA 蛋白與 ParE 與 ParC 蛋白，甚至分別有 52% 及 41% 的相似度。在 *Mycoplasma genitalium* 的研究上，學者甚至利用 *gyrA* 基因的降解性引子對來進行 *parC* 基因的選殖⁽²⁾。本研究在對花生簇葉病病原菌質體之 *gyrB* 及 *gyrA* 基因之胺基酸序列分別与其它細菌之 *gyrB*、*gyrA* 及 *parE*、*parC* 基因胺基酸序列進行比對時，發現花生簇葉病病原菌質體之 GyrB 及 GyrA 蛋白与其它革蘭氏陽性及陰性菌之 GyrB 及 GyrA



圖三、以反轉錄聚合酵素連鎖反應 (RT-PCR) 分析 *gyrB* 基因及 *gyrB*、*gyrA* 基因之共同轉錄產物

Fig. 3. Transcription of the *gyrB* gene and cotranscription of the *gyrB* and the adjacent *gyrA* gene analyzed by RT-PCR. For each amplification, a pair of two synthetic oligonucleotide primers was chosen. A, primer pair was located inside the *gyrB* gene (sequence at bp 3393 – 3410 for the 5' primer SGBF2, and sequence corresponding to bp 4106 – 4123 for the 3' primer SGBR2). B, one primer was located in the 5' region of the *gyrB* gene and the other in the 3' region of the *gyrA* gene (*gyrB*-*gyrA* hybrid; sequence at bp 4598 – 4615 of the *gyrB* gene for 5' primer SGBF5, and sequence corresponding to bp 5522 – 5540 of the *gyrA* gene for the 3' primer SGAR8). Negative controls for RT-PCR were run in the absence of reverse transcriptase (lanes 2, 4). Lanes 1-2 show the amplification products from healthy periwinkle RNA and lanes 3-4 from RNA purified from periwinkle infected with PNWB-phytoplasma. DNA templates extracted from healthy periwinkle (lane 5), and periwinkle infected with PNWB-phytoplasma (lane 6) were used as positive controls for RT-PCR. PCR products were separated in a 1.0% agarose gel. Sizes (in bp) of PCR product are shown on the left.

蛋白相對於 ParE 及 ParC 蛋白，都有較高的相似度 (表三、表四)。據此，我們可作一個推測，本實驗中選殖所得的 ORF3 及 ORF4 基因，應為花生簇葉病病原菌質體之 *gyrB* 及 *gyrA* 基因，而非 *parE* 及 *parC* 基因。

表三、花生簇葉病病原菌質體 *gyrB* 基因之胺基酸序列與多種細菌之 *gyrB* 基因與 *parE* 基因之胺基酸序列相似度分析

Table 3. The percentage of identity of PNWB-phytoplasma putative GyrB protein compared with the GyrB proteins and ParE proteins of various organisms

Organisms	Percentage of identity of	
	PNWB-phytoplasma putative GyrB protein with	ParE protein of
	GyrB protein of	
<i>Mycoplasma genitalium</i>	49	41
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	48	44
<i>Mycoplasma hominis</i>	49	42
<i>Mycoplasma arthritidis</i>	47	40
<i>Bacillus</i> sp.	54	44
<i>Escherichia coli</i>	37	34

表四、花生簇葉病病原菌質體 *gyrA* 基因之胺基酸序列與多種細菌之 *gyrA* 基因與 *parC* 基因之胺基酸序列相似度分析

Table 4. The percentage of identity of PNWB-phytoplasma putative GyrA protein compared with the GyrA proteins and ParC proteins of various organisms

Organisms	Percentage of identity of	
	PNWB-phytoplasma putative GyrB protein with	ParE protein of
	GyrB protein of	
<i>Mycoplasma genitalium</i>	40	26
<i>Bacillus</i> sp.	42	32
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	41	30
<i>Escherichia coli</i>	36	22

在以南方雜配確定 *gyrB* 及 *gyrA* 基因於花生簇葉病病原菌質體基因體上所存在套數的分析中，不論以 *gyrB* 或 *gyrA* 基因之探針，以 7 種內限制酵素分別處理感染菌質體日日春的全 DNA 所得之雜配訊號，皆為單一訊號，顯示在花生簇葉病病原菌質體中，*gyrB* 及 *gyrA* 基因應是單一一套。在 *Vibrio parahaemolyticus* 中，學者也曾證明 *gyrB* 及 *gyrA* 基因為單一一套⁽²²⁾。

以花生簇葉病病原菌質體的 *gyrB* 及 *gyrA* 基因為探針，對病株及健株日日春的全 RNA 做北方雜配反應，二者皆無發現明確的雜配訊號，但若以位於 *gyrA* 基因起始密碼下游約 500 bp 處之反股引子搭配另一位於 *gyrB* 基因上，相距 *gyrA* 基因起始密碼上游約 440 bp 之正股引子，對病株及健株日日春全 RNA 做 RT-PCR，則僅在病株才可增幅出一段跨於 *gyrB* 及 *gyrA* 基因轉錄產物的 cDNA。因此在花生簇葉病病原菌質體很可能和其他革蘭氏陽性菌如 *Haloferax volcanii*⁽⁷⁾ 或 *Mycoplasma gallisepticum*⁽⁴⁾ 一樣，是以共同轉錄的方式轉錄出 *gyrB*-*gyrA* polycistronic mRNA。

引用文獻

1. Agrios, G. N. 1997. Plant diseases caused by mollicutes: phytoplasmas and spiroplasmas. Pages 457-470 in: Plant Pathology, 4th Ed. Academic Press, San Diego, CA.
2. Bailey, C. C., Younkins, R., Huang, W. M., and Bott, K. F. 1996. Characterization of genes encoding topoisomerase IV of *Mycoplasma genitalium*. *Gene* 168:77-80.
3. Chen, M. F., and Lin, C. P. 1997. DNA probes and PCR primers for the detection of a phytoplasma associated with peanut witches' broom. *Eur. J. Plant Pathol.* 103:137-145.
4. Forsyth, M. H., Sayed, A. S., and Geary, S. J. 1995. Sequence and transcriptional analysis of the genes encoding the class-II topoisomerase of *Mycoplasma gallisepticum*. *Gene* 163:161-162.
5. Gellert, M., Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., and Nash, H. A. 1976. DNA gyrase: an enzyme that introduces superhelical turns into DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:3872-3876.
6. Higgins, D. G., and Sharp, P. M. 1989. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. *Gene* 73:237-244.
7. Holmes, M. L., Nuttall, S. D., and Dyll-Smith, M. L. 1991. Construction and use of halobacterial shuttle vectors and further studies on *Halobacterium* DNA gyrase. *J. Bacteriol.* 173:3807-3813.
8. Huang, W. M. 1994. Type II DNA Topoisomerase Genes. pages 201-225 in: Advances in Pharmacology, DNA Topoisomerases. Vol. 29. L. F. Liu, ed., Academic Press, San Diego, CA.
9. Klevan L., and Wang, J. C. 1980. Deoxyribonucleic acid gyrase-deoxyribonucleic acid complex containing 140 base pairs of deoxyribonucleic acid and an $\alpha_2\beta_2$ protein core. *Biochemistry* 19:5229-5234.
10. Ko, H. C., and Lin, C. P. 1994. Development and Application of cloned DNA probe for a mycoplasma-like organism associate with sweet potato withes' -broom. *Phytopathology* 84:468-473.
11. Kozak, M. Y. 1983. Comparison of initiation of protein synthesis in prokaryotes, eucaryotes, and organelles. *Microbiol. Rev.* 47:1-45.
12. Ladefoged, S. A., and Christiansen, G. 1994. Sequencing analysis reveals a unique gene organization in the *gyrB* region of *Mycoplasma hominis*. *J. Bacteriol.* 176:5835-5842.
13. Lim, P. O., Sears, B. B., and Klomparens, K. L. 1992. Membrane properties of a plant- pathogenic mycoplasma-like organism. *J. Bacteriol.* 174:682-686.
14. Lim, P. O., and Sears, B. B. 1989. 16S rRNA sequence indicates that plant-pathogenic mycoplasma-like organisms are evolutionarily distinct from animal mycoplasmas. *J. Bacteriol.* 171:5901-5906.
15. Maxwell, A., and Gellert, M. 1984. The DNA dependence of the ATPase activity of DNA gyrase. *J. Biol. Chem.* 259:14472-14480.
16. Mizuuchi, K., O'Dea, M. H., and Gellert, M. 1978. DNA gyrase: subunit structure and ATPase activity of the purified enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75:5960-5963.
17. Oppegaard, H., and Sqrum, H. 1996. Cloning and nucleotide sequence of the DNA gyrase *gyrA* gene from the fish pathogen *Aeromonas salmonicida*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40:1126-1133.
18. Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467.
19. Shine, J., and Dalgarno, L. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementary to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1342-1346.
20. Sinha, R. C. 1979. Lipid composition of mycoplasma-like organisms purified from clover phyllody and aster yellows-affected plants. *Phytopath. Z.* 96:132-139.
21. Sinha, R. C., and Madhosingh, C. 1980. Proteins of mycoplasma-like organisms purified from clover phyllody and aster yellows-affected plants. *Phytopath. Z.* 99:294-300.
22. Venkateswaran, K., Dohmoto, N., and Harayama, S. 1998. Cloning and nucleotide sequence of the *gyrB* gene of *Vibrio parahaemolyticus* and its application in detection of this pathogen in shrimp. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:681-687.
23. Yang, I. L. 1988. Witches' broom diseases of sweet potato and peanut in Taiwan. Ph. D. Thesis. Hokkanido Univ., Japan.
24. Yeh, K. -W., Juang, R.-H., and Su, J.-C. 1991. A rapid and efficient method for RNA isolation from plants with high carbohydrate content. *Focus* 13:102-103.
25. Yu, Y. L., Yeh, K. -W., and Lin, C. P. 1998. An antigenic protein gene of a phytoplasma associated with sweet potato witches' broom. *Microbiology* 144:1257-1262.

ABSTRACT

Chuang, J. G.¹, and Lin, C. P.^{1,2} 2000. Cloning of *gyrB* and *gyrA* genes of phytoplasma associated with peanut witches' broom. Plant Pathol. Bull. 9:157-166. (¹ Department of Plant Pathology, Taipei, Taiwan; ² Corresponding author, E-mail: cplin@ccms.ntu.edu.tw, Fax No: 886-2-23661980)

DNA gyrase is a type II topoisomerase that is a tetrameric molecule composed of two A and two B subunits, which are encoded by the *gyrA* and *gyrB* genes, respectively. In order to clone the *gyrB* gene of phytoplasma associated with peanut witches' broom (PNWB), a pair of oligo- nucleotide PCR primers GBF2/GBR3 were designed according to the conserved amino acid sequences of the *gyrB* gene of various prokaryotes including *Acholeplasma laidlawii*, and *Mycoplasma* spp. Total DNA from diseased periwinkle infected with phytoplasma associated with peanut witches' broom (PNWB) was prepared for PCR reaction to amplify a 1458 bp-PCR fragment of the *gyrB* gene of the phytoplasma. A 768 bp-PCR product was further amplified by using the internal primer pair GBF3/GBR5 synthesized according to the sequence of the 1458 bp- PCR fragment. The 768-bp DNA fragment was DIG-labeled and used as a probe for screening of the PNWB-phytoplasma genomic library. A positive clone, pGDB1-4, was selected and the sequence of the insert DNA was determined. The sequence of the insert DNA (5308 bp) contained three complete open reading frames (ORFs 1-3), one of which showed sequence homology to the *gyrB* genes of many bacteria, and a partial sequence homology to the *gyrA* genes of many bacteria. The specific primer pair GAF3/GAR3 was then designed based on the sequences of the partially sequenced *gyrA* gene and the conserved domains of the *gyrA* gene product. The primer pair was used to amplify a 462 bp *gyrA* gene fragment from the PNWB-phytoplasma DNA and used as a probe to screen for the *gyrA* gene-containing clone from the PNWB-phytoplasma genomic library. Clone pPGA 2-3 was found and the sequence of the insert was determined. The complete sequence (3840 bp) of the insert was linked to the 5308-bp sequence previously determined and an ORF(ORF 4) was found to be homologous to the *gyrA* genes of several bacteria. Based on the homology data, we concluded that ORF 3 and ORF 4 represent the *gyrB* and *gyrA* genes of the PNWB-phytoplasma, respectively. Southern hybridization analysis indicated that PNWB- phytoplasma has only one copy of *gyrB* and *gyrA* in the genome; and the results of RT-PCR analyses indicated that *gyrB* and *gyrA* may be cotranscribed as a polycistronic mRNA in PNWB- phytoplasma.

Key words : *gyrB* gene, *gyrA* gene, peanut witches' broom, phytoplasma