



核酸杂交技术在植物类菌质体病害研究中的应用进展

田 国 忠

(中国林业科学院林业研究所,北京)

1967年日本学者 Doi 等^[1]首次用透射电镜观察植物病组织超薄切片,证明桑树萎缩病、马铃薯丛枝病和泡桐丛枝病皆由一种新病原引起,称为类菌质体(Mycoplasma-like organism, 简称 MLO)。从此在国际上开始了对此类病害广泛深入地研究。原来误认为由生理或病毒引起的病害及病因不明的黄化型病害,后来证明是由 MLO 引起的。截至 1989 年的报道^[2],在自然或实验条件下,有 98 个科的 365 个属共计近 600 种植物(包括杂交组合)感染 MLO 病害,病害分布于五大洲约 85 个国家,以温带国家受害植物种类多,经济损失严重。许多病害在不同的国家和地区造成生产上的严重病害问题^[3-5]。MLO 病原不同于植物病原真菌、细菌、类细菌、病毒和类病毒,也有别于动物和昆虫的菌质体和螺原体病原。它本身所具有的某些特点,成为这类病害研究的难点,阻碍了病害防治研究的深入。

植物 MLO 病害的病原鉴定和分类是这类病害研究的基础和关键,所以它一直是这一领域研究的热点。早期 MLO 的鉴定和分类主要依据生物学特性,比如症状学、寄主范围、介体专化性等^[2]。后来,常规血清学用于这类病原的检测和鉴定^[6-9],但因 MLO 抗原纯化尚存在问题,故在应用上有很大局限性。随着生物技术在这一学科的不断渗透,杂交瘤和单克隆抗体技术已对 MLO 的鉴定和分类研究产生了变革性影响^[10,11];而核酸杂交技术在 MLO 研究中的应用,则是这一研究领域的又一重大进展。

核酸杂交技术(Nuclear acid hybridization technique)是将纯化的病原物核酸通过限制性内切酶酶解,获得的病原核酸片段,插入到

质粒上,转化大肠杆菌,经扩增可获得大量病原 DNA。用同位素或生物素标记后的 DNA 即为核酸探针,它能与相应或相关病原核酸特异性杂交,从而对其核酸特性进行研究。众所周知,核酸杂交技术已在动物病毒^[12]和菌质体^[13]、植物病原真菌、细菌、线虫、病毒和类病毒^[14,15]等研究中发挥了越来越大的作用。由于 MLO 不能象动物菌质体或螺原体可以人工培养,又不能象其它植物病原容易获得高纯度和高浓度的完整病原,因而多年来对这方面的研究一直比较薄弱。自 1987 年 Kirkpatrick 等^[16]首次报道了桃 X 病原 MLO 核酸探针的制备和应用之后,又陆续有了许多其他植物 MLO 病害核酸杂交研究的报道,如桃 X 病^[16,17],翠菊黄化病^[18-20,36],玉米簇矮病^[21],椰子黄化病^[22],核桃丛枝病^[23],白腊树黄化病^[24],苹果簇叶病^[25],月见草变叶病^[26]。本文就 MLO 核酸杂交技术中遇到的关键问题和解决办法,此技术在植物 MLO 病害研究中的应用进展,以及在解决我国同类病害防治问题中的应用潜力等三个方面作一评述,涉及核酸杂交探针制备程序及杂交方法已有许多专门的论著和报道^[27]。

(一) MLO 核酸杂交技术中的关键问题及解决途径

1. MLO 的提纯材料:由于 MLO 尚不能在体外人工培养,目前只能从活体组织中抽提和纯化 MLO^[2,28]。开始用自然染病植株叶脉、叶柄、幼枝和根皮等部位韧皮组织作为提纯材料,由此获得的 MLO 产量往往很低,木本植物体内 MLO 浓度更低,而且病原分布不均匀^[29],因而抽提更为困难。后来发现某些草本植物如长春花、莴苣、胡萝卜、芹菜等,是许多植物 MLO

良好的繁殖寄主, MLO 在这些植物体内浓度高^[29], 组织也易于破碎, 组织中所含有的干扰抽提的物质如单宁、几丁质及淀粉等含量少。植物组织培养技术的发展, 为更方便地保存和繁殖 MLO 提供了新的途径^[26,29]。1989年 Sear 等^[28]用胡克氏月见草的叶尖组织培苗来繁殖和提纯 MLO, 从而成功地制备了月见草变叶病原 MLO 的核酸探针。由于 MLO 仅限于韧皮部筛管中, 为了减少提纯过程中寄主成分的污染和组织捣碎造成的病原损失, Lee 等^[30,31]采用纤维素和果胶酶部分降解筛管束, 离析的筛管分子用于 MLO 纯化, 取得满意的效果。从介体昆虫中(如叶蝉、木虱、蚜象等)抽提 MLO 则是 MLO 纯化方法的又一重大改进^[29,32], 具有易于冰冻保存, MLO 产量高和排除了植物成分干扰等优点。要获得理想的 MLO 提纯材料, 必须充分考虑接种植株年龄、潜育期、症状严重程度和植株生长条件等因素, 以昆虫为繁殖材料时, 要注意病原在昆虫体内的浓度变化及对昆虫致死作用。

2. MLO 的纯化: 理想的 MLO 提纯标准, 要求获得高浓度、高纯度和具有完整细胞形态的病原。MLO 为仅由三层单位膜包围的无细胞壁原核微生物, 专性寄生在植物韧皮部筛管及介体昆虫的淋巴腺体中。这些特点决定了在提纯过程中因环境渗透压、pH 值及其它条件的突然改变, 而导致 MLO 细胞的破裂, 因而采用适宜的抽提缓冲液及在低温下操作(4℃)是很关键的。一般说来, 抽提缓冲液的渗透压要保持在 600 至 1200 渗透压毫克分子(mOsmole), pH 值在 7.0 至 8.0 之间, 并加入适量双价阳离子或其它膜稳定物质, 如亚精胺或甘氨酸等, 聚乙烯吡咯烷酮、牛血清白蛋白及某些还原剂能够减少植物蛋白酶及次生代谢物质对 MLO 的破坏作用。为了去除寄主杂质, Sinha^[33]用活性炭、硅藻土垫过滤, 及琼脂糖 2B 柱层析, 先后去掉抽提液中大量植物材料, 然后再经蔗糖密度梯度离心进一步纯化 MLO, 最后能够获得部分纯化的病原。1987年 Jiang 等^[34]采用不连续 Percoll (聚乙烯吡咯烷酮包被的硅胶)密

度梯度离心纯化翠菊黄化病原 (AY-MLO), 由于 Percoll 密度梯度为等渗透压密度梯度, 避免了蔗糖密度梯度离心过程中因渗透压变化造成的细胞破坏, 因而获得了相对高纯度和完整的 MLO。差速离心沉淀 MLO 时, 所选择的离心力要适当, 过低不能使 MLO 完全沉淀, 过高会造成 MLO 挤压而破碎^[33]。Davis 等用昆虫组织抽提 MLO 时, 将部分纯化的 MLO 经过一次微孔膜(微孔直径为 1.2 μm)过滤, 以去除侵染昆虫的细菌污染。免疫沉淀和亲和层析也开始用于 MLO 的纯化^[9,35], Jiang 等用 AY-MLO 的单克隆抗体亲和层析柱纯化 MLO, 获得理想的效果。

3. MLO 核酸的抽提: 已开展核酸杂交研究的 MLO 核酸根据其特点可分为三类: ① MLO-DNA 片段, 其大部分携带有编码 MLO 蛋白质基因; ② MLO 细胞内核糖体 RNA; ③ MLO 质粒 DNA。为了使核酸从 MLO 细胞膜内释放出来, 必须用去污剂处理。然后用苯酚/氯仿抽提, 最后经氯化铯平衡密度梯度离心, 而得到纯化的 MLO-DNA 或 RNA。

(二) 核酸杂交技术在植物 MLO 病害研究中的应用

1. 病原检测和病害早期诊断: 核酸杂交技术是在核酸水平上对病原进行鉴定的一种准确灵敏的手段, 它具有非常强的专化性, 因而具有以往检测技术如血清学、组织化学、电镜技术等所无法比拟的优点, 如前述桃 X 病、翠菊黄化病等 8 种 MLO 病原的核酸探针都已成功地用于病株和介体昆虫中病原 MLO 的检测, 并能够将引起植株类似症状的螺原体区分开来。Bonnet 等^[32]报道用苹果簇叶病原 MLO-DNA 探针, 可以从染病的苹果树和长春花植株上检测到苹果簇叶病原 MLO, 而与其它 18 种 MLO 病原无反应, 从长春花植株检测此病原的限度为 7—15ng DNA, 苹果树中为 15—30ngDNA, 并且此探针也能确定无症状病株。据 Davis^[34]的研究结果表明, 0.02—0.3g 病组织的核酸抽提物即可用印迹点杂交方法检测出病原 MLO, 可见此方法比以往检测手段灵敏。由于 DNA

分子稳定,故干燥的和失去蛋白免疫抗原活性的样品仍能用于杂交检测。

2. 植物 MLOs 之间亲缘关系和分类研究:

由于 MLO 研究手段和水平的限制,长期以来对几百种植物上发生的 MLO 病害的病原之间的亲缘关系了解甚少,无法对其进行系统的分类和鉴定研究,从而导致其它相关方面研究的困难。譬如,迄今所报道的许多 MLO 病害,很可能是同一种病原为害不同种植物的结果^[2],造成对已知 MLO 病害种类和数量的认识上的混乱和矛盾。核酸杂交技术是从基因水平研究 MLO 之间的同源性,因而为阐明侵染各种植物的 MLOs 之间的相关性带来新的希望。Kirkpatrick 等用桃西方 X 病原 MLO 的 DNA 探针与其它植物的 MLO-DNA 进行杂交分析,证明它与桃东方 X 病、山核桃和胡桃丛簇病及桃黄化病的病原 MLOs 有很高的同源性,而与植物螺原体 (*Spiroplasma citri*) 无同源性,说明桃西方 X 病与这几种植物 MLOs 的亲缘关系近,而与螺原体亲缘关系远。Lee 等^[30]用 AY-MLO 制备 DNA 和 16S rRNA 二种探针,用来比较不同来源的 AY-MLOs 及与其它植物上分离的 MLOs 的亲缘关系,结果表明,所有分离的 DNA 探针都能与各种来源的 AY-MLO DNA 杂交,而且与越橘矮化病、番茄巨芽病和一种未鉴定的 MLO 也能杂交;并且 9 个中的 8 个探针与桃西方 X 病和加拿大 X 病 MLO-DNA 杂交,只有 5 个与榆树黄化病原 MLO-DNA 杂交,6 个与叶蝉传甜菜黄化病原 MLO-DNA 杂交;没有探针与植物螺原体 DNA 杂交。用 AY 的 16S rRNA 基因探针进行的杂交分析表明,不同植物上发生的 MLOs 在核糖体 RNA 之间的差异似乎比其 DNA 要大些。Lee 等^[30]和 Kirkpatrick 等^[17]都发现桃西方 X 病的 16S rRNA 探针在检测 X 病原 MLO 的灵敏度和可靠性方面都比其 DNA 探针好。Kuske 等^[18], Kirkpatrick 等^[17]和 Lim 等^[19]分别对不同 MLO 病原的 16S rRNA 探针的结构进行序列分析和与其他微生物进行杂交测定,发现它们都与 *Bacillus subtilis*, *Mycoplasma cap-*

ricolum 和 *Escherichia coli* 的 16S rRNA 基因具有不同程度的同源性,这表明 MLOs 与这些微生物在系统发育上存在着某些联系。Kuske 等^[18]报道从 AY-MLO 不同株系中分离出 3—4 个超螺旋状质粒 DNA,大约在 6.5kb 至 1.5kb 之间,典型株系 MLO 质粒 DNA 探针可用于从芹菜、长春花、翠菊及叶蝉体内检测到不同的 AY-MLO 株系。

3. 病害流行病学研究:

MLO 的 DNA 或 RNA 探针不仅可以检测病植株组织中微量的 MLO,而且也能有效地从单个介体昆虫体内检测出 MLO 的存在,从而确认昆虫传毒情况。Davis 等在调查玉米从矮病原 MLO 传毒介体——玉米黄翅叶蝉的带毒情况时,用印迹点杂交方法测定了不同时期及不同病株上饲养的叶蝉的带毒率,结果表明所测定的叶蝉中 17—67% 是带毒的。已经知道,昆虫在 MLO 病害流行过程中起相当重要的作用。深入了解病害介体昆虫的种类、数量、传毒方式及消长规律对病害防治具有重大意义。目前昆虫传播 MLOs 病害的规律研究比较薄弱,核酸杂交技术必将促进这一领域研究的深入。

(三) 核酸杂交技术在我国 MLO 病害研究中的应用前景

核酸杂交技术作为植物 MLO 研究领域的一个新的研究方向,不仅本身有许多问题需要探讨和解决,而且尚有众多病害问题需要开展这方面的研究。对植物 MLO 病害发生既严重又普遍、又未开展这方面研究的我国来说,积极开展研究其意义就更重大。

早在 30 年代,我国就有植物 MLO 病害为害的报道,到 70 年代才证明桑树萎缩病、枣疯病、柑桔黄龙病和泡桐丛枝病等均为 MLO 引起的病害^[3]并相继发现了许多新的植物 MLO 病害。据陈作义^[37]统计,我国已报道的植物黄化型病害有 40 余种,除少数为类细菌和螺原体病原外,大多数为 MLO 引起的。近十多年来,虽然针对这类病害的防治进行了大量的探索,取得可喜进展,但由于许多与病害防治密切相关的基本问题未解决,病害防治技术研究受到

很大阻碍,如病原的人工培养,病原在植株体内的分布和运转规律、病害发生发展和介体传病规律、植株抗病机理和抗病性早期鉴定,种苗检疫等问题的解决都必须以准确、灵敏、快速的MLO检测和鉴定技术为前提。以泡桐丛枝病为例,多年来由于泡桐以种根为主要繁殖途径,随着泡桐栽植面积的不断扩大而又没有有效的MLO检测手段,丛枝病随种根调运而广泛传播扩散,原来只有河南省为泡桐丛枝病重病区,现在山东、陕西等省为害也很严重,无病区的四川省也有此病害发生。据1989年的统计资料表明,山东、河南、安徽、甘肃、河北、江苏、山西等省丛枝病发生面积共为504.32万亩,折合经济损失4302.15万元。将我国发生的泡桐丛枝病、枣疯病、桑树萎缩病和柑桔黄龙病四大病害造成的经济损失加起来每年可上亿元。有调查发现^[3],在我国泡桐丛枝病严重的地方,伴随着枣疯病和槐树丛枝病的发生,若能证实泡桐丛枝病和枣疯病及槐树丛枝病的关系,则对指导病害防治具有重要意义。

从我国植物MLO病害研究现状和国外研究进展来看,MLO的核酸杂交技术将成为解决上述种种问题的必要工具和手段,在此类病害防治技术研究中发挥重大作用。

参 考 文 献

- Doi Y et al.: Ann. Phytopathol. Soc. Jap, **33**: 259—266, 1967.
- McCoy R E et al.: The Mycoplasma 5th Ed. Academic press, INC. NY, p. 545—563, 1989.
- 朱本明: 植物类菌质体病害, p. 63—108, 上海科技出版社, 上海, 1981.
- Karl Maramorosch, et al.: Mycoplasma Diseases of Tree and Shrub. Academic Press, NY, p. 19—113, 1981.
- Mária Nemeth: Virus, Mycoplasma and Rickettsia Diseases of Fruit Trees, Martinus Nijhoff Publishers, Budapest, p. 576—647, 1986.
- Sinha R C: Can. J. Plant Pathol., **1**: 65—70, 1979.

- Sinha R C et al.: *Phytopathol.*, **73**: 1199—1202, 1983.
- Sinha R C et al.: *Can. J. Plant Pathol.*, **8**: 387—393, 1986.
- Hobbs D V R et al.: *Plant Pathol.*, **36**: 164—167, 1987.
- Lin C P et al.: *Science*, **227**: 1233—1235, 1985.
- Lin C P et al.: *Phytopathol.* **76**: 45—59, 1986.
- Pekka Halonon et al.: Control of Virus Diseases, Marcel Dekker INC. p. 501—520, 1984.
- Johansson K -E. et al.: *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **19**: 185—200, 1989.
- Miller S A et al.: *Ann. Rev. Phytopathol.*, **26**: 409—432, 1988.
- Karl Maramorosch et al.: *Methods in Virology*, 7th Ed, Academic Press, INC. Orlando, p. 122—224, 1984.
- Kirkpatrick B C et al.: *Science*, **238**: 197—200, 1987.
- Kirkpatrick B C et al.: *Phytopathol.* **79**: 1138 (Abst.), 1989.
- Kuske C R et al.: *Phytopathol.*, **78**: 1138 (Abst.), 1989.
- Lim, P O et al.: *Phytopathol.*, **79**: 1206 (Abst.), 1989.
- Lee I -M et al.: *Phytopathol.*, **79**: 1137 (Abst.), 1989.
- McDaniel L L et al.: *Phytopathol.*, **78**: (Abst.), 1988.
- Harrison N A et al.: *Plant Disease*, APS Program, 1990.
- Chen J et al.: *Plant Disease*, APS Program, 1990.
- Davis R C et al.: *Phytopathol.*, **78**: 1555 (Abst.), 1988.
- Bonnet F et al.: *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **3**: 438—443, 1990.
- Sear B B et al.: *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **2**: 175—180, 1989.
- Maniatis T et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N Y, 1982.
- Lee I -M et al.: *Ann. Rev. Phytopathol.*, **24**: 339—354, 1986.
- Hiruki C: *Tree Mycoplasmas and Mycoplasma Diseases*, University Press of Alberta, Edmonton, p. 179—192, 123—133, 1988.
- Lee I-M et al.: *Mol. Plant-microbe Interact.*, **1**: 303—310, 1988.
- Lee I-M et al.: *Phytopathol.*, **73**: 1540—1543, 1983.
- Davis J M et al.: *Mol. Plant-Microbe Interact.*, **1**: 295—302, 1988.
- Sinha R C: *Methods in Mycoplasma*. 2th Ed. Academic Press, p. 243—247, 1983.
- Jiang Y P et al.: *Phytopathol.*, **77**: 949—953, 1987.
- Jiang Y P et al.: *Phytopathol.*, **78**: 828—831, 1988.
- Kuske C R et al.: *Phytopathol.* **78**: 1569 (Abst.), 1988.
- 田波等: 病毒与农业, p. 107—114, 科学出版社, 北京, 1986.
- 金开璇等: 植物保护学报, **7**: 177—182, 1980.