

# RFLP 在植物类菌原体鉴定和分类中的应用

林含新 谢联辉

(福建农业大学植物病毒研究所, 福州 350002)

植物类菌原体 (Mycoplasmalike Organism, 简称 MLO) 为 1967 年日本学者土居原二首次发现, 现已报道了近 600 种植物上有这类病害, 经济损失严重<sup>[1]</sup>。由于目前 MLO 在体外无法进行培养<sup>[2]</sup>, 给植物 MLO 病害的病原鉴定和分类带来了极大的困难。早期 MLO 的鉴定和分类主要依据生物学特性, 如症状学、寄主范围、介体专化性、多抗血清等, 这些方法费时费工, 需要大量的材料, 结果常常不可靠。在过去的七八年间, MLO 特异性探针及 DNA 杂交技术的发展, 为 MLO 的鉴定和分类提供了一种快速、可靠的方法, 根据从不同 MLO 中克隆出的 DNA 探针, 研究 MLO 之间的遗传相关性, 初步划分了翠菊黄化 (AY)、榆木黄化 (EY)、桉树黄化 (AshY)、X 病、三叶草变叶 (CP) 等 5 个 MLO 类群 (cluster)<sup>[3~9]</sup>, 每个类群中 MLO 之间的 DNA 序列具有广泛的一致性, 而不同类群间的 MLO 差别很大。但若得到更详细的基因型情况, 如同一类群中各成员之间的遗传相关性, 以及各成员内株系 (或基因型) 的分化情况, 则必须通过 RFLP 分析来进行。下面就 RFLP 的原理及应用概况作一介绍。

## 1 原理

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) 即意为限制性片断长度多态性。限制性内切酶能识别双链 DNA 分子中特异的短序列, 并在特定的位点将 DNA 切开, 由此产生的 DNA 片断称为限制性片断。用同一种限制性内切酶切割不同个体基因组 DNA 后, 含同源序列的酶切片断在长度上表现出的差异就是 RFLP。差异的显示和检测是用克隆的 DNA 片断作为探针进行分子杂交, 再通过

放射自显影 (或非同位素技术) 实现的<sup>[10]</sup>。

RFLP 分析是建立在核酸杂交的基础上, 其所用的探针分为两类, 一类是特异性核酸探针, 另一类是通用性的核酸探针。特异性核酸探针仅能检测少数几种 MLO, 无通用性, 而且目前也仅克隆出几种 MLO 的特异性探针。后来研究发现大多数 MLO 的 16S rRNA 序列具有较高的同源性<sup>[11]</sup>, 所以人们根据该基因序列设计了一些 DNA 探针, 其中包括通用性探针, 用于多种 MLO 的检测与鉴定<sup>[2, 12~16]</sup>。近二三年来, 人们把聚合酶链式反应 (Polymerase Chain Reaction, 简称 PCR) 技术运用于 MLO 的鉴定和分类中<sup>[12, 13, 17~21]</sup>, 并与 RFLP 分析相结合<sup>[2, 14~16, 22~26]</sup>。PCR 技术的原理是: 首先合成两个寡核苷酸片断作为引物, 一个引物可以和靶序列的一端相结合, 另一引物可以和靶序列的另一端相结合, 在 DNA 聚合酶的作用下进行体外扩增, 一再重复变性、引物结合、DNA 复制这一循环过程, 便可以取得靶序列的大量拷贝。1 $\mu$ g 的 DNA 经过 20 个循环的扩增之后增加了  $2 \times 10^5$  倍。由于 PCR 扩增的无限性, 病株中只含有极少量的 MLO 都可得到高浓度的病原产物, 在 PCR 反应中, 以通用性探针为引物对不同的 MLO 进行扩增, 其产物酶切后可直接通过电泳进行 RFLP 分析, MLO 之间相似率计算公式为:  $F = 2N_{XY} / (N_X + N_Y)$ , 其中  $N_X$  和  $N_Y$  分别代表株系 X 和 Y 中的限制性杂交片断数或酶切后的片断数,  $N_{XY}$  代表两个株系共有的杂交片断数或酶切片断数<sup>[2, 21]</sup>。

## 2 应用

1994-11-05 收稿

表1 据16S rDNA序列的RFLP分析而建立的类菌原体(MLO)分类<sup>a</sup>

MLO 株系	MLO	来源	16S rRNA 组 <sup>b</sup>	类群(型) <sup>c</sup>
BB	番茄巨芽*	阿肯萨斯	I-A	AY(I)
OKAY1	西方翠菊黄化	俄克拉荷马	I-A	AY(I)
AY27	西方翠菊黄化	加拿大	I-A	AY(I)
CN13	长春花细叶	康涅狄格	I-A	AY(I)
CN1	长春花细叶	康涅狄格	I-A	AY(I)
NJAY	新泽西翠菊黄化	新泽西	I <sup>e</sup> -A	AY(I)
NAY	东方翠菊黄化	加拿大	I-A	AY(I)
AY1	马里兰翠菊黄化*	马里兰	I-B	AY(II)
DAY	西方翠菊矮缩黄化	加利福尼亚	I-B	AY(II)
SAY2	西方翠菊严重黄化	加利福尼亚	I-B	AY(II)
TLAY2	Tulelake 翠菊黄化	加利福尼亚	I-B	AY(II)
OKAY3	西方翠菊黄化	俄克拉荷马	I-B	AY(II)
CY2	翠菊黄化	意大利	I-B	AY(II)
NYAY	东方翠菊黄化	纽约	I-B	AY(II)
CPh	三叶草变叶*	加拿大	I-C	AY(III)
MIAY	密执根翠菊黄化	密执根	I-B	...
SL1	长春花黄化	密苏里	I-A	...
SL5	长春花黄化	密苏里	I-B	...
SL7	长春花黄化	密苏里	I-B	...
SL8	长春花黄化	密苏里	I-B	...
Hyph1	绣球花变叶	意大利	I-B	...
IO <sub>b</sub> WB	甘薯丛枝	台湾	I-B	...
PaWB	泡桐丛枝*	台湾	I-D	...
BBS1	蓝浆果矮缩*	密执根	I-E	...
PnWB	花生丛枝*	台湾	II	...
RBCWB	红鸟仙人掌丛枝	台湾	II	...
UDI	红鸟仙人掌丛枝	台湾	II	...
CX	加拿大桃 X 病*	加拿大	III-A	PX(I)
WX	西方 X 病	加利福尼亚	III-A	PX(II)
CYE	三叶草黄边*	加拿大	III-B	PX(III)
LY3	可致致死黄化*	佛罗里达	IV-B	...
EY1	榆木黄化*	纽约	V	EY
EY2	榆木黄化	纽约	V	EY
EYIta	意大利榆木黄化	意大利	V	EY
CP	三叶草丛枝*	加拿大	VI	CP
PWB	马铃薯丛枝	加拿大	VI	CP
VR	甜菜叶蝉传绿化病	加利福尼亚	VI	...
AshY	桉树黄化*	纽约	VII	AshY
LfWB	Loofah 丛枝*	台湾	VIII	...
PPWB	鸽子豌豆丛枝*	佛罗里达	IX	...
AP-A	苹果丛枝	意大利	X-A <sup>e</sup>	...
AP-G	苹果丛枝	德国	X-A <sup>e</sup>	...
ACLR	杏树褪绿卷叶	意大利	X-B <sup>e</sup>	...

a. RFLP 分析所用限制酶: AluI, MseI, HpaI, HpaII, KpnI, EcoRI, EcoRII, DraI, RsaI, HinfI, HaeIII, Sau3A, TaqI, ThaI.

b. A, B, C, D 代表 16S rRNA 亚组.

c. AY, PX, EY, CP, AshY 分别代表翠菊黄化, 桃 X 病, 榆木黄化, 三叶草变叶, 桉树黄化类群.

d. 未定. e. 未发表资料. \* 各亚组典型成员.

Davis 等研究了意大利北部的葡萄黄化病 FDU 株系与南部的 FDB 株系以及意大利长春花绿化病 G 株系之间的区别,发现 FDB 与 MLO-G 株系之间有同源性,其 RFLP 相似率达到 38%,而 FDU 与 FDB 之间则无多大同源性,RFLP 相似率仅达 13%,这个结果表明至少有两个不同的 MLO 基因组类群与意大利的葡萄黄化病有关<sup>[21]</sup>。

葡萄黄化病不但发生于意大利,在法国、德国、美国也报道了与黄化症状相似的葡萄病害<sup>[27]</sup>。Prince 等人通过 RFLP 分析对来自这些国家的 10 个株系进行了鉴定和分类,发现它们分属于三个不同的 MLO 基因组类群,其中来自美国弗吉尼亚的 FDVA1 株系和来自意大利北部的 FAU 株系属于 X-病类群;来自意大利南部帕格利尔地区的 FDB 株系和拉齐奥地区的 FDR 株系、北部的 CA1、CH1、SAN1、SAN2 株系以及来自德国的 FDG 株系都属于翠菊黄化病类群;而来自法国的 FDF 株系属于榆木黄化病类群<sup>[16]</sup>。

Lee 等研究了加拿大桃东方 X 病害(CX)和西方 X 病(WX)及三叶草黄边病(CYE)的关系,这三种病症状相似,寄主范围也相似,但亲缘关系不明。RFLP 分析结果发现 CX 与 WX 之间的相似率为 0.53,CX 与 CYE 之间为 0.31,WX 与 CYE 之间为 0.39,这三者虽然同属于 X 病类群,但显然代表着三个不同的基因型<sup>[9]</sup>。1993 年, Lee 等根据密执根翠菊黄化病的 16S rRNA 的保守区序列设计了一些引物,其中通用性引物 R16F2R2 只扩增病株中的核酸而不扩增健株中的核酸,他们利用这个引物扩增了来自北美、亚洲和欧洲的 40 种 MLO 的核酸,并进行 RFLP 分析,结果发现这 40 种 MLO 可以分为 9 个不同的 16S rRNA 组和 14 个亚组,其中 5 个组与 5 个根据核酸点杂交分析建立的基因组类群是一致的(表 1)<sup>[2]</sup>。

最近, Lee 等设计出一些 16S rRNA 特异性引物,其中 R16F1/R1 能特异性地扩增 16S rRNA I 组, R16F2/R1 能特异性扩增 II 组, R16F1/R1 能特异性扩增 V 组,利用这 3

个特异性引物和通用性引物 R16F2/R2 同时进行 PCR 扩增、RFLP 分析就能鉴定出混合感染的 MLO 病原<sup>[26]</sup>。

Schneider 等根据 16S rRNA 基因序列合成了 5 个引物,对来自世界各地的 52 个 MLO 分离物进行 16S rDNA 的 PCR 扩增、RFLP 分析,发现利用 Alu I 酶可以将这些分离物分为 7 个组, I ~ VII 组的典型成员分别为美国翠菊黄化(AAY)、杏树褪绿卷叶(ACLR)、榆木黄化(AshY)、桉树黄化(EY)、苹果变叶(AP)、西方 X 病(WX)、甘蔗白叶(SCWL)<sup>[24]</sup>。

### 3 讨论

类菌原体仅能在植物的韧皮部为害,病原浓度低,在植物各器官内分布不均匀,在体外无法培养<sup>[26]</sup>,传统的生物学技术难于进行快速、精确、灵敏的检测和鉴定,给 MLO 的分类带来了极大的困难。而 RFLP 分析与 PCR 技术的结合给我们提供了一种十分灵敏的方法,即使在复杂的感染情况下,如一种植物或昆虫介体同时感染上 2 种或 2 种以上的 MLO,都能进行准确的鉴定。目前的工作已为我们提供了一个植物类菌原体分类的基本轮廓<sup>[2, 24]</sup>,现在已有可能在不同的寄主中检测和鉴定尚不清楚的 MLO 病原。

RFLP 分析应用于植物类菌原体的鉴定和分类中只是近三年来的事<sup>[2, 14~16, 22~26]</sup>,早在 1974 年, Grodzicker 等已将 RFLP 用作腺病毒温度敏感突变的遗传标记,此后, RFLP 得到了广泛的应用,范围包括人类遗传病的基因治疗、动植物遗传图谱的建立、植物亲缘关系和进化起源的研究、基因组结构的研究及基因突变的研究等领域<sup>[28]</sup>。

### 参 考 文 献

- [1] McCoy R E, Candwell A, Chang C J, *et al.* The Mycoplasma. Vol 5, Academic Press, New York: 1989, 545~560.
- [2] Lee I-M, Hammond R W, Davis R E, *et al.* Phytopathology, 1993, 83: 834~842.
- [3] Davis R E, Lee I-M, Douglas S M, *et al.* Phytopathology, 1990, 80:789~793.

- [4] Davis R E, Lee I M, Sinclair W A, *et al.* Mol plant-Microbe Interact, 1992, **5**: 163~169.
- [5] Lee I M, Davis R E, Hiruki C. Appl Environ Microbiol, 1991, **57**: 3565~3569.
- [6] Lee I M, Davis R E, Chen T A, *et al.* phytopathology, 1991, **81**: 1169. (Abstract)
- [7] Lee I M, Davis R E, Hiruki C. Phytopathology, 1990, **80**: 958. (Abstract)
- [8] Lee I M, Gunderson D E, Davis R E, *et al.* Phytopathology, 1991, **81**: 1169. (Abstract)
- [9] Lee I M, Gunderson D E, Davis R E, *et al.* Journal of Bacteriology, 1992, **174**: 6694~6698.
- [10] 朱立煌.作物杂志, 1991, (3): 7~9.
- [11] Lim P, Sears B B. Journal of Bacteriology, 1989, **171**: 5901~5906.
- [12] Deng S, Hirukic C. J Microbiol Methods, 1991, **14**: 53~61.
- [13] Ahrens U, Seemüller E. Phytopathology, 1992, **82**: 828~832.
- [14] Lee I M, Hammond R W, Davis R E, *et al.* Phytopathology, 1992, **82**: 1094. (Abstract)
- [15] Lee I M, Mogen B D, Davis R E. Phytopathology, 1992, **82**: 1094. (Abstract)
- [16] Prince J P, Davis R E, Wolf T K, *et al.* Phytopathology, 1993, **83**: 1130~1137.
- [17] Davis R E, Prince J P, Hammond R W, *et al.* Petria, 1992, **2**: 184~193.
- [18] Deng S, Hiruki C. Phytopathology, 1991, **81**: 1475~1479.
- [19] Kirkpatrick B C, Gao J, Harrison N. Phytopathology, 1992, **82**: 1083. (Abstract)
- [20] Lee I M, Davis R E, Sinclair W A, *et al.* Phytopathology, 1993, **83**: 829~833.
- [21] Davis R E, Dally E L, Bertaccini, Phytopathology, 1993, **83**: 772~776.
- [22] Lee I M, Davis R E, Chen T A, *et al.* Phytopathology, 1992, **82**: 977~986.
- [23] Davis R E, Lee I M. Phytopathology, 1993, **83**: 1008~1011.
- [24] Schneider B, Ahrens U, Kirkpatrick B C. J Gen Microbiol, 1993, **139**: 519~527.
- [25] Griffiths H M, Sinclair W A, Davis R E. Phytopathology, 1994, **84**: 119~126.
- [26] Lee I M, Gundersen D E, Hammond R W, *et al.* Phytopathology, 1994, **84**: 559~566.
- [27] Caudwell A. Agronomic, 1990, **10**: 655~663.
- [28] 林兵.全国高校青年教师遗传学进展报告文集, 1990, 211~215.