

# 类菌原体研究现状与发展趋势

黄文晋\* 崔晓江 林木兰\* 彭学贤

(中国科学院微生物研究所, 北京 100086)

引起植物病害的病原生物是多方面的, 如病毒、类病毒、细菌、真菌、线虫等。长期以来, 科技工作者一直在努力探寻各种病害的诱因, 进而采取预防、治疗以至根除病害的有效措施。

造成植物病害的病原生物, 以病毒、类病毒、细菌等研究的比较深入, 无论是病原学、病理学还是抗病策略, 都有一些完善、系统的理论及实验方法。事实上, 植物的病原微生物还有类菌原体等, 国内外对于这些病原生物的研究, 不论是基础理论还是应用实践, 都相当薄弱。

类菌原体引起的植物病害的症状之一, 即黄化, 但病毒、类病毒、生理性病因造成的植物病害都可以表现黄化。类菌原体引起的植物黄化症状与其他病因造成的黄化症状相似, 但还可产生其他一些症状, 如腋芽萌发、丛枝、花器返祖和巨芽症等。起初, 有些植物的黄化病害被认为是生理性病害, 后来却发现这种病害可以传染, 但在病株中一直找不到病毒等其他病原微生物。这就激发人们去寻找新的病原生物, 最终导致了类菌原体的发现。

1967年, 日本科学家土居养二等利用电子显微镜观察感染丛枝病的泡桐等植物的超薄切片, 发现韧皮部筛管细胞中存在形态结构类似动物支原体的病原生物。因此, 他将这种病原生物称为类菌原体 (Mycoplasma-like-organism, MLO)。以后在传播介体的昆虫体内也发现了MLO。但由于提取、体外培养很困难等方面的原因, MLO的研究进展一直很缓慢。80年代以后, 由于分子生物学技术的引进, MLO的研究才有所突破。

在西非和加勒比海地区, MLO曾造成椰子种植园毁灭性破坏, 仅牙买加和坦桑尼亚就

有1000万株椰子树绝产。MLO引起的致死黄化病对全球椰子生产造成严重危害<sup>[1]</sup>。在我国, MLO引起的枣疯病曾摧毁40万株密云金丝小枣树。泡桐、棉花、甘蔗、水稻、小麦等也受到MLO的侵害。过去认为由MLO引起的柑桔黄龙病现在确认其病因是类细菌(BLO)。

本文拟从以下几个方面综述MLO研究的进展。

## 1 病原学

MLO大小介于病毒与细菌之间, 一般长80-800nm左右, 其形态呈多形性, 并随生长发育阶段的不同而有所不同。基本形态有圆球形、椭圆形、梭形等, 较少见的如丝状(有分枝)和酵母分裂状, 外形大致呈螺旋状态的特称为螺原体(Spiroplasma)。

和动物支原体一样, MLO没有细胞壁。菌体最外层为8-12nm厚的单位膜。细胞质内有核糖体和DNA状丝状物, 还有各种代谢物质、可溶性蛋白、rRNA及少量其他核糖核酸等。没有细胞核, 遗传物质为dsDNA。

MLO因无细胞壁, 在代谢方面无需合成肽聚糖及其前体, 但螺原体要外界提供胆甾醇等以合成细胞膜。

MLO的繁殖一般有三种形式, 即二均分裂、出芽生殖和菌体内形成小体后释放出去等。

叶蝉类昆虫可以传播MLO。无毒昆虫经饲毒后, MLO首先出现于肠细胞, 经过血淋巴被带到唾液腺, 再扩散到昆虫其它部位, 如马氏管、神经节等。唾液腺中有MLO后, 昆虫在吸食植物汁液过程中, 可使MLO侵染植物。菌体在昆虫体内要再繁殖, 因而昆虫传播MLO

\* 中国科学院武汉病毒研究所  
1993-05-19收稿

的潜育期长。由蚜虫持久性传播的植物病毒,如马铃薯卷叶病毒,也有这些特点。MLO 可通过嫁接的方式传染。在我国,陈永萱、王祈楷和柯冲等人对 MLO 作过深入的研究。

## 2 分类

类菌原体属软球菌纲(Mollicutes)。此纲内科的分类标准为形态、生化及营养需求。类菌原体从形态上可分为螺原体及非螺旋形 MLO 两类。螺原体已体外培养成功,其代谢依赖胆甾醇等,菌体有可溶性 NADH 氧化酶。国际上将螺原体列入螺原体科(Spiroplasmataceae)。

非螺旋形 MLO 目前尚未体外培养成功,缺少基因组结构、营养需求、膜组成等分类所需的信息,究竟归属哪个科,有待确定。然而,根据现有资料,如 16SrRNA 基因序列<sup>[2]</sup>和核糖体蛋白质基因序列<sup>[3,4]</sup>,初步判断非螺旋形 MLO 很接近于非醇菌原体科(Acholeplasmataceae)。此科代谢不依赖胆甾醇, NADH 氧化酶结合在膜上。奇怪的是,非螺旋形 MLO 基因组大小接近动物支原体基因组的大小,但比非醇菌原体基因组要小。近年来,用分子生物学技术获得了一些 MLO rRNA 基因序列。随着这方面资料的积累,可能从 rRNA 基因的同源性高低的角度,也就是从分子水平对 MLO 进行分类。象植物病毒一样,同一种 MLO 可能还有株系上的差别。

## 3 病理学

MLO 引起的黄化症状是由于菌体干扰了植物的正常代谢活动所引起的。关于 MLO 的致病机理有以下几种假说:(1) MLO 可能产生某些毒素干扰了植物的正常激素活动,引起代谢混乱。如干扰生长激素的作用和运输,使植物失去顶端优势,腋芽萌发,形成丛枝;也可能干扰开花激素的产生和作用,使开花期提前或推后,以至花器变异为枝叶。(2) MLO 的寄生使植株体内某些酶活性发生变化;病株细胞内铜离子、氨基酸含量升高。(3) MLO 似乎可以破坏植物细胞壁<sup>[5]</sup>。

MLO 通过昆虫口器侵入植物韧皮部后,寄生阻塞在筛管细胞中,通过筛管细胞将菌体

和代谢物质运送到植物其他部位。MLO 在病株中的移动主要是利用筛管的筛板上的筛孔。比筛孔小的 MLO 直接通过筛孔,比筛孔大的可能以变形的方式通过筛孔。MLO 在植物体内的消长规律与病株病情变化大体一致。另外,在用光电镜观察感染丛枝病的植物超薄切片时,往往发现病毒和 MLO 混合感染的现象,导致了对引起某些植物病害的病因的争论。

对感染 MLO 的甘蔗类作物研究表明,病株细胞结构变化在病叶细胞的叶绿体、线粒体及细胞核上反映的最明显。病株细胞在碳水化合物、胆甾醇、还原性糖、叶绿素、蛋白质、氨基酸及氮含量方面与健康株比较有显著变化。MLO 在病组织中的存在增加了细胞呼吸速率及氧化酶活性,干扰了寄主的碳水化合物代谢,导致已糖合成加强,而纤维素、半纤维素等物质含量减少<sup>[6]</sup>。水稻感染 MLO60 天后,病株的总可溶性糖、蛋白质和自由氨基酸含量都增加了<sup>[7]</sup>。

## 4 诊断和鉴定

从 60 年代末发现 MLO 到 80 年代初, MLO 的诊断方法没有什么突破。传统的诊断法是首先根据 MLO 引起的病害的独特症状,如腋芽萌发、丛生等,初步推测病害由 MLO 造成。当然,这种推测很不可靠。然后,对木本植物韧皮部注射 MLO 敏感的盐酸四环素,对草本植物用四环素喷洒叶面或浸泡根部,若症状受到抑制,就进一步说明病因来自 MLO。最后,通过超薄切片法直接观察病原体加以确定。以上方法从灵敏度、可靠性、简便性和特异性等方面来衡量是很不够的,尤其是用超薄切片观察易产生假阳性。所以 80 年代以后,国内外科学家都在努力探索新的诊断法。

单克隆抗体技术及核酸杂交技术的发展与完善导致了 MLO 的诊断方法的革命。运用这两种技术诊断鉴定 MLO 已构成目前 MLO 研究的主流。在过去几年里,已制造出数种抗螺原体与非螺旋形 MLO 的单抗杂交瘤细胞株,并具体运用于免疫印迹、ELISA 和免疫荧光显微镜等方法中<sup>[8]</sup>。中科院武汉病毒所林木

兰等已获得抗泡桐丛枝病 MLO 的 McAb 杂交瘤细胞株,为生产上迅速早期诊断严重危害泡桐生长的 MLO 打下了基础<sup>[9]</sup>。该法的最大优点是灵敏、特异。

MLO 核酸杂交技术需分离纯化染色体 DNA 及染色体外 DNA,建立基因组文库。克隆的 MLO-DNA 片段有两种类型。一种是通用探针,在所有 MLO 中都具有或高或低的同源性,如 rRNA 基因探针,用于诊断 MLO 病原及不同种 MLO 之间、MLO 与原核生物之间同源关系的研究。另一种是特异探针,只为特定 MLO 所独有或与其他 MLO 之同源性很低,用于鉴定特定 MLO。用重组 DNA 片段做探针与分离的 MLO DNA 杂交,灵敏度高,速度快。但用 dsDNA 做探针时,杂交的信噪比太高,因此又通过体外转录法发展了 ss-RNA 探针。核酸杂交法目前大量用来研究不同 MLO 之间、MLO 与原核生物之间的关系及检测诊断 MLO 疾病<sup>[8]</sup>。林木兰等已获得泡桐 MLO 的两个特异探针。

最近又发展了 PCR 检测 MLO 的技术<sup>[12,13]</sup>

## 5 分子生物学

关于 MLO 的分子生物学资料积累很少,进展缓慢;探针制备及杂交鉴定是 MLO 在分子水平研究上最活跃的领域。在制备 MLO 核酸探针过程中,事实上就建立了此种 MLO 部分或全部的基因组文库。

MLO 的基因组包括染色体及染色体外 DNA (质粒)两部分,遗传物质为 dsDNA,分子量  $5 \times 10^8$  道尔顿,估计编码 650 个基因。染色体 DNA 中 AT 含量丰富,GC 含量低,只有 29.5%。染色体为环状,长度为 640-1185kb<sup>[10]</sup>。

个别 MLO 的核糖体蛋白质操纵子中的一段序列已测定,包括 rp123 基因的 3'区域及 rp12、rps19、rp122、rps3<sup>[3,4]</sup>基因的全部。rp12 基因有 276 个密码子,rps19 有 89 个密码子,二者间为 12bp 的间隔区;rp122 有 129 个密码子,rps3 有 252 个密码子。

MLO 有 2 个拷贝的 rRNA 操纵子,个别

MLO 其中一个 rRNA 操纵子的 16SrRNA 基因序列已搞清,并推导了其二级结构。这个基因中存在某种特异的寡聚核苷酸重复片段。16SrRNA 基因 GC 含量为 48%,低于其他生物,该基因与 23SrRNA 基因间有一个 tRNA<sup>trn</sup> 基因,此基因末端 2 个碱基对后为 ACCA,这是所有 tRNA 的氨基酸结合位点。推测在 tRNA<sup>trn</sup> 基因后曾存在另一个 tRNA 基因,但在进化过程中消失了<sup>[2]</sup>。

关于染色体外 DNA,在螺原体 Spiroplasma Citri 中发现了质粒,大小为 7.8kb,且可整合到染色体 DNA 中。在非螺旋形 MLO,如西方翠菊黄化 MLO (AY-MLO) 的三个株系中也发现了质粒的存在,DAY-MLO 与 TLAY-MLO 各有四种质粒,分别为 7.4kb、5.1kb、3.5kb 和 1.7kb。另一株系 SAY-MLO 中也有 4 种质粒,大小为 5.2kb、4.9kb、3.4kb、1.7kb。目前的研究未发现这些质粒整合到染色体 DNA 中。MLO 质粒的发现有助于病理研究,并可用于制作探针,也有改造成为 MLO 转化载体的潜在应用价值<sup>[11]</sup>。

新近研究表明,在螺原体中有 ds-DNA 及 ss-DNA 病毒寄生,在非螺旋形 MLO 中尚未发现寄生病毒。

## 6 MLO 防治策略

经典的防治 MLO 病害的方法是建立无病苗圃,防虫,选育抗性品种,给植物注射或喷洒四环素类药物等,要消耗大量的人力、物力,且达不到预期的效果。植物基因工程在抗病毒等方面已取得不少进展,但在培育抗 MLO 植物方面国内外还无任何报道。

我国林木兰已获得抗泡桐 MLO 的杂交瘤细胞株。如果能从 MLO McAb 杂交瘤细胞中克隆抗体轻、重链基因的可变区段,体外重组成单链抗体,在植物细胞中表达后可能封闭 MLO 膜上的特异蛋白质的活性位点。但该策略由于单抗的特异性太高,可能只对特定的 MLO 有效。

如果弄清 MLO 引起病害的原因是产生某种毒素,通过对毒素的结构和作用机理的研究,

利用短肽封闭其活性位点或利用酶使其失活,也可能达到防治病害的目的。也可尝试往螺原体的寄生病毒中引入新的基因,通过病毒带入MLO中,杀死寄主MLO或阻碍毒素的产生。很多MLO病害的传播依赖于昆虫,抗虫基因工程的进展必然对防止MLO病害的蔓延有所帮助。随着MLO分子生物学研究的深入,相信会出现新的抗性策略。

## 7 研究难点

除少数螺原体外,其它MLO还未在人工培养基上培养成功。这与MLO寄生在细胞内的特性有关,且MLO无细胞壁,寄生环境渗透压高。根据培养螺原体的经验,培养基需保持较高渗透压,并应含胆甾醇等物质。目前,国外有少数科学家正在积极探索体外培养MLO的方法。如果体外培养取得突破,必将大大促进MLO分子生物学的研究,从而为培育抗MLO植物打下基础。

## 参 考 文 献

[1] Harrison N A et al. *Phytopathology*, 1992, **82**(2): 216

-224.

- [2] Pyung-Ok Lim et al. *J. Bacteriol*, 1989, **171**(11): 59C1-5905.
- [3] Pyung-Ok Lim et al. *FEMS Microbiology Letters*, 1991, **84**: 71-74.
- [4] Pyung-Ok Lim et al. *J. Bacteriol*, 1992, **174**(8): 2606-2611.
- [5] 裘维蕃. *植物病毒学*, 北京: 科学出版社, 1985, 293-320.
- [6] Shukla U S et al. *Indian Journal of Plant Pathology*, 1988, **6**(2): 164-170.
- [7] Rao G N et al. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 1989, **19**(2): 161-167.
- [8] Hiruki C. *Rev Trop pl path 6, Today and Tomorrow's Printers and Publishers, New Delhi-110005 (India)*, 1989, 225-238.
- [9] 林木兰等. *植物学报*, 印刷中.
- [10] Harold Neimark et al. *Molecular Microbiology*, 1993, **7**(1): 21-28.
- [11] KUSKE C R et al. *J Bacteriol*, 1990, **172**(3): 1628-1633.
- [12] Shigetou Namba et al. *Phytopathology*, 1993, **83**: 786-791.
- [13] Deng S et al. *J Microbiol Methods*, 1991, **14**: 53-61,