

# 泡桐丛枝病的分子生物学研究进展

雷启义<sup>1,2</sup>, 董志, 周江菊, 张国辉\*

(1. 凯里学院生物科学技术系, 贵州凯里 556000; 2. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037)

**摘要** 对泡桐丛枝病病原、症状、分子检测技术等国内外现状和进展进行了论述和评价, 并对泡桐丛枝病分子研究中存在的主要问题和对策作了总结和展望。

**关键词** 泡桐; 丛枝病; 进展

中图分类号 S763.14 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2008)22 - 09609 - 02

## Advance of the Moleular Research on Paulownia Witches Broom Disease

LEI Qi-yi et al (Depart nert of Biological Science and Technology, Kaili College, Kaili, Guizhou 556000)

**Abstract** The current situations and advances of the research on the pathogen, symptom, molecular detection technology of Paulownia Witches broom disease and so on at home and abroad were discussed and evaluated. The main existing problems and countermeasures in the molecular research of witches broom disease were summarized and prospected.

**Key words** Paulownia; Witches broom disease; Advance

泡桐 (*Paulownia fortunei* (seem.) Hensl) 是我国重要的速生用材树种, 兼有农田防护、园林绿化等多种用途。目前, 由于我国林木育种中普遍采用无性系育种, 特别是杨树和泡桐的育种, 从而使品种单一化, 必然会造成遗传基础变窄, 树种基因资源迅速减少, 对不良环境的适应能力和对病虫害的抗性降低。泡桐丛枝病 (*Paulownia Witches Broom*) 已成为泡桐最主要的病害, 我国虽然对泡桐丛枝病的分子生物学研究与应用做了大量工作, 取得了一些成果, 但目前该病仍未得到有效的控制<sup>[1]</sup>。如何对泡桐苗木和无性繁殖材料在发病早期进行快速准确地检测显得尤为重要。当今分子检测方法相对于生物学、电镜等检测技术更为快速、灵敏、准确, 越来越得到广泛的应用。笔者对泡桐丛枝病病原的分子检测方法的研究进展进行了综述。

### 1 泡桐丛枝病的症状

泡桐丛枝病的症状主要表现为正常的生理紊乱、内源激素平衡失调、叶片黄化、腋芽萌生、丛枝、带化、巨芽、花变叶等<sup>[2]</sup>。一般从局部枝条开始, 腋芽和不定芽大量萌发, 生出许多细弱小枝, 节间变短, 叶序紊乱, 叶片黄化且小, 并有花叶状。病枝上小枝又可重复抽出小枝, 导致枝叶丛生, 形似鸟巢。根孽苗表现为丛枝状, 有的当时表现不明显, 在第2年萌芽时即表现为丛枝。另外, 一年生苗和平茬苗发病时, 全株叶片皱缩, 边缘下卷, 叶色黄绿相间, 发病的苗木和幼树当年枯死。大树感病后, 逐年发病加重, 最终全株呈丛枝状, 随后枯死。

### 2 泡桐丛枝病的病原及病原分布

**2.1 病原** 泡桐丛枝病从1880年发现于日本九州到目前已有100多年历史, 在这漫长历程中, 曾出现过生理病害说、真菌病原说、病毒病原说等。这些学说在以后的研究中都相继被否定, 直至1967年日本土居养二才通过电子显微镜确认了该病病原为类菌原体 (*Mycoplasma like Organism, MLO*)<sup>[3]</sup>。1967~1992年, 300多种植物的黄化和丛枝病害被鉴定为

MLO, 直到1992年, 类菌原体才被正式俗名植原体 (*Phytoplasma*)<sup>[4]</sup>。最近有人报道了泡桐丛枝病病原的电子显微镜研究结果, 表明在泡桐丛枝病病株叶脉韧皮部筛管细胞中有形态多样的MLO, 多数圆形或椭圆形, 质粒大小为100~670 nm, 没有细胞壁, 外部由3层单位膜、2层蛋白膜和中间1层脂肪膜组成, 厚度为10 nm, 内部有核糖核蛋白颗粒和脱氧核糖核酸的核质样纤维。电镜下还观察到有的类菌原体正处于二均分裂状态, 认为它的繁殖主要是二均分裂, 其次是出芽繁殖和从细胞内释放新生体<sup>[5-7]</sup>。

**2.2 病原分布** 1984年La Y J观察到泡桐类菌原体主要分布在病树的病枝和根中, 病树的健康枝中没有, 且病原在树体内的分布是不均匀的。植原体侵入寄主后, 通过韧皮部的筛管先下行到根部, 在根部进行繁殖, 然后向上运行引起泡桐发病, 才表现出泡桐丛枝病症状。病原越冬时, 在地上部分分布很少, 几乎不能在地上部分越冬。

### 3 泡桐丛枝病的发病过程及机理

**3.1 发病过程的物质变化** 泡桐受到丛枝病类菌原体侵染后, 寄主体内的物质随之发生明显的变化。至今人们还没有对泡桐的整个免疫机制进行研究, 目前主要是通过对比健、病植株的生理生化指标, 获得与泡桐丛枝病发生相关的某些生化特征的变化, 以反映泡桐丛枝病发病时免疫系统的变化。研究表明, 这种变化主要集中在激素、氨基酸蛋白质 (酶)、酚类物质、DNA、无机离子含量上<sup>[8]</sup>。以上5种主要成分的变化与泡桐丛枝病的发生有一定的相关性, 但这些变化是否是引起病症的根本原因以及这种活性成分变化的产生机制有待于进一步研究。

**3.2 发病机理** 丛枝病类菌原体侵入泡桐体内后, 泡桐免疫系统会根据信号物质反馈产生大量的胍胍质, 堵塞发病部位的筛管孔和周围组织细胞的胞间连丝, 阻挡菌原体向其他细胞和组织转移。对于寄主细胞来说, 这是一种积极的自我保护反应, 但是胍胍质在筛管细胞中的大量积累, 也使蔗糖、酶、激素等的运输受到阻碍, 树木的协调生长受到破坏, 导致某些感病部位和组织畸形生长而表现病症, 从而造成某些器官和组织的生长受到抑制。胍胍质具有调节筛管成分的渗透性梯度的作用, 大量胍胍质堵塞筛管使皮层细胞维持正常

基金项目 贵州省教育厅自然科学基金项目资助 (2007105)。

作者简介 雷启义 (1974 - ), 男, 贵州黄平人, 硕士, 副教授, 从事植物分子与细胞生物学、生物化学的教学和研究。\* 通讯作者。

收稿日期 2008-05-19

渗透压的功能遭到破坏,病皮层电解质外渗率升高,病木质部电解质外渗率降低,皮层细胞差别透性增大,木质部细胞差别透性减小,从而导致组织抗逆性降低。

胼胝质的积累可能是泡桐细胞对外源有害物质侵入的一种应激反应,由丛枝病类菌原体合成物质所激发,但对类菌原体不具有专一性,不能完全阻挡类菌原体的转移。而胼胝质的积累,反过来却使细胞和组织受到很大伤害。弄清胼胝质的积累在丛枝病类菌原体引起发病的过程中处于何种地位以及它与丛枝病发生的直接关系等问题将会对揭示丛枝病的致病机理有帮助。

#### 4 泡桐丛枝病病原的分子生物学检测

**4.1 单克隆抗体 ELISA 检测** 林木兰等<sup>[9]</sup>以部分纯化的泡桐 MLO 为抗原,取免疫6周龄 BALB/C 雌鼠脾细胞与鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 融合,从4次融合产生的459个杂交瘤细胞克隆中,用部分纯化的泡桐 MLO 和同样方法制备的健康泡桐抽提物分别为检测抗原,以间接 ELISA 法双重筛选,获得稳定分泌抗泡桐丛枝病 MLO 的杂交瘤细胞2株。用奥氏琼脂双扩散法检测2个抗体分别属于 IgG2a 和 IgG3a,2个杂交瘤细胞腹水抗体效价用间接 ELISA 法测定均超过  $1.6 \times 10^4$ ,用斑点酶联免疫法检测抗原时,最小检出量为 10 ng;对样品检测结果表明,所有的病症植株全部阳性,并还检测出带毒的隐性植株,从而证实2个单克隆抗体确系泡桐丛枝病 MLO 的单抗。PWB MLO 单克隆抗体对于 PWB MLO 具有高度的特异性,可以采用多种血清学技术(免疫荧光、ELISA)进行检测,这些方法具有灵敏、简便、特异等特点,有条件的地方均可用于泡桐丛枝病检测,为诊断鉴定泡桐丛枝病开辟了新的领域。

**4.2 分子杂交技术检测** 张春立等<sup>[10]</sup>首次进行了泡桐丛枝病(PWB) MLO 的分子克隆。以部分纯化的泡桐 MLO 为材料,抽提 DNA 进行 EcoR - Hnd 双酶切后用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离,并回收 0.5 ~ 6.6 kb 片段,将回收的 DNA 片段插入到载体 PGEM3zf(+) 中,转化 Escherichia coli DH5a。经双重杂交初步筛选以及 Dot blot 和 Southern blot 杂交的回交确证,获得2个与患丛枝病泡桐总核酸有杂交而与健康对照无杂交的克隆(A4, 1.69 kb; C42, 2.08 kb)。由此可鉴定 A4 和 C42 为具备 PWB MLO DNA 专性的阳性克隆。分别以 A4 和 C42 的插入片段为模板,以 Universal forward primer 为引物,从 EcoR 插入位点开始进行部分测序,结果表明,A4 和 C42 插入片段中 A+T 含量分别为 72.5% 和 67.9%,具有典型支原体属微生物的碱基组成特征。用 A4 和 C42 克隆的插入片段制标记探针,对多种植物材料进行检测,从而为核酸杂交技术或 PCR 技术检测 PWB MLO 创造了有利条件。

**4.3 PCR 检测** 近几年,PCR 检测方法开始用于植物 MLO 检测<sup>[11-12]</sup>。秦国夫等<sup>[13]</sup>对泡桐丛枝病 MLO 进行了 PCR 检测试验。按菜氏无胆甾原体和 MLO 的核糖体蛋白基因序列的保守区域,合成1对寡核苷酸引物,用 CTAB 法直接提取田间发病的桑萎缩病和泡桐丛枝病树皮层的 DNA,以健康树作平行对照,进行 PCR 扩增。结果表明,以病树 DNA 为模板成功扩增出 1.26 Kb 左右的产物,而对照样品均未出带,证明该项技术可检测 MLO,同时也为研究菌原体的分子系统学奠定

了一定的理论基础。

**4.4 巢式 PCR 试剂盒检测** 为了克服 PCR 扩增时出现的非特异增幅,秦国夫等<sup>[14]</sup>从引物的筛选入手,对 DNA 提取方法和试剂进行了筛选,合成了高严谨的巢式 PCR 检测试剂盒。巢式 PCR 中以扩增 16S rDNA 的通用引物 R16mF2/R16mR1 或 R16F2/R16R2 加上暂定种特异引物 R16(I) F1/R16(I) R1 的检测灵敏度和稳定性最好。该试剂盒可以广泛用于种根检测、无毒性检测、繁殖材料的进出境检验检疫、媒介昆虫的鉴定、丛枝病林间带毒率调查和定量分析等。

#### 5 存在的问题及对策

随着现代生物技术的发展,人们对泡桐丛枝病的防治做了大量的分子生物学方面的研究工作,但是,迄今为止还没有真正地从根本上解决丛枝病问题,对泡桐丛枝病防治研究仍存在许多问题,如生化特性、遗传特性和致病的分子机制尚未清楚以及分子育种技术的不成熟等。今后对泡桐丛枝病的分子生物技术方面的研究主要从以下几方面入手。

(1) 通过对泡桐丛枝病病毒外壳蛋白基因进行克隆与表达,获得泡桐丛枝病病毒的外壳蛋白基因工程植株,对抗病毒基因的定位和转移进行研究,利用杂交技术和基因转移进行抗病基因的重组和转移,获得抗性品系和植株进行泡桐品种改良。

(2) 综合利用基因工程、细胞工程等现代生物技术方法和手段对植原体进一步培养和研究,弄清其遗传本质、生化特性、营养要求等,同时研制并利用基因芯片快速检测和分析,从本质上掌握植原体的致病机理,为预防和治疗泡桐丛枝病提供充分的理论基础。

(3) 植原体对寄主细胞的作用有多个层次:细胞层次、代谢产物及分子层次,这是植原体致病研究的核心所在,利用分子生物学技术从分子水平揭示病毒—植物—介体间的相互关系,弄清植原体对寄主细胞的作用方式和途径以及分子机制,从而建立和完善抗病毒理论与策略。

综上所述,泡桐丛枝病的研究应当借助于组织与细胞培养、细胞融合、重组、外源基因导入等生物技术,从分子水平和细胞水平入手,筛选出抗丛枝病的泡桐品种,解决长期以来困扰我国泡桐发展的主要病害难题,取得经济、生态和社会效益,对于林业经济发展将具有重要的意义。

#### 参考文献

- [1] 杨俊秀,张刚龙,王培新,等.抗丛枝病泡桐表型单株选择及其育种技术[J].西北农林科技大学学报,2007,35(9):90-95.
- [2] 刘小勇,田素忠,秦国夫,等.柿树带化和刺槐丛枝的 PCR 检测[J].北京林业大学学报,1999,21(3):26-28.
- [3] 宋晓武,郑文峰,张学武.泡桐丛枝病病原研究的回顾与展望[J].陕西林业科技,1996(1):64-67.
- [4] 秦国夫,赵俊,刘小勇.植原体分子分类的现状与问题[J].林业科学,2002,38(6):125-136.
- [5] 沈菊英,钱力,陈作义,等.泡桐丛枝病病原的电子显微镜研究[J].生物化学与生物物理学报,1980,12(2):207-208.
- [6] 朱本明.泡桐丛枝病树种的类菌原体与病毒[J].生物化学与生物物理学报,1982,14(4):393-396.
- [7] 任国兰.泡桐丛枝病的研究现状与进展[J].河南农业大学学报,1996,30(4):358-364.
- [8] 冯志敏,汪新娥,万开军.泡桐丛枝病植原体研究综述[J].信阳农业高等专科学校学报,2007,17(4):126-128.
- [9] 林木兰,陈维伦.泡桐丛枝病类菌原体单克隆抗体的研制初步应用[J].植物学报,1993,35(9):710-715.

本总计节约8.69%(表2)。施用有机追肥的1号区的产出是投入的4.35倍,2号区只有3.62倍(表3)。

在豆角的栽培过程中,施用有机基肥比化肥基肥节省成本12.30%;追肥成本节省32.46%;农药成本节省35.97%;成本总计节约21.78%(表2)。施用有机追肥的1号区的产

出是投入的3.86倍,2号区只有2.99倍(表3)。

可见,2种蔬菜栽培过程中施加生物有机肥和化肥会产生不同的经济效应。施用生物有机肥的效益明显好于化肥,栽培上海青和豆角施用生物有机肥产出/投入分别为4.35和3.86;而施用化肥的产出/投入为3.62和2.99。

表2 不同肥料处理下上海青、豆角栽培成本比较

Table 2 Comparison of the cultivation cost under different fertilizer treatments between Shanghaiqing and snap bean

元

肥料种类 Fertilizer kinds	上海青 Shanghaiqing						豆角 Snap bean					
	基肥成本 Base fertilizer cost	追肥成本 Topdressing cost			农药成本 Pesticide cost	总计 Total	基肥成本 Base fertilizer cost	追肥成本 Topdressing cost			农药成本 Pesticide cost	总计 Total
叶面喷施 Foliage spraying	根施 Root fertilization	尿素 Urea	叶面喷施 Foliage spraying	根施 Root fertilization			尿素 Urea					
有机肥1号 Organic fertilizer(Nb.1)	38.14	3.30	1.50	1.04	4.50	48.48	32.74	3.30	1.50	1.04	13.56	52.14
化肥2号 Chemical fertilizer(Nb.2)	41.57		6.84		9.12	57.17	37.00		8.64		21.02	66.66
1号较2号节省 % Saved cost of Fertilizer Nb.1 than Fertilizer Nb.2	8.30		9.80		50.60	15.20	12.30		12.40		35.97	21.78

注:表中数据以单位面积(即小区面积7.2 m<sup>2</sup>)计算得出,下表同。

Note: The data in the table were calculated by using the unit area (plot area 7.2 m<sup>2</sup>). The same as below.

表3 不同处理下上海青和豆角投入和产出比较

Table 3 The input and output comparison of Shanghaiqing and snap bean under different treatments

品种及区号 Cultivar and its code	投入成本 Input cost 元	产出收益 Output profit 元	净收入 Net income 元	产出/投入 Output-input ratio
上海青1号 Shanghaiqing Nb.1	48.48	211.20	162.72	4.35
上海青2号 Shanghaiqing Nb.2	57.17	206.70	149.53	3.62
豆角1号 Snap bean Nb.1	52.14	201.15	149.01	3.86
豆角2号 Snap bean Nb.2	66.66	199.35	132.69	2.99

### 3 结论

过对比试验发现,生物有机肥的施用能减少农药的使用和增加产量而提高经济效益,作物栽培中施用生物有机肥的经济效益明显好于施用化肥。栽培上海青和豆角施用生物有机肥产出/投入比分别为4.35和3.86;而施用化肥的产出/投入比3.62和2.99。

生物有机肥的施用过程中,农药的减少施用能节约能源、减少污染并改善作物口感和口味<sup>[8]</sup>。如在油菜和木薯的

生产中施用生物有机肥可以提高作物品质,提高土壤有机质含量,培肥地力<sup>[9-10]</sup>;同时它能提高作物的产量,产生较高的经济效益,又能够较好地防治病虫害,减少农药和化肥的用量,具有较好的生态效益。

### 参考文献

- [1] 葛诚. 微生物肥料生产应用基础[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2000.
- [2] 葛诚, 吴薇. 我国微生物肥料的生产、应用及问题[J]. 中国农学通报, 1994(3): 24-28.
- [3] GNA V, GRAEME B, ROD L. Measurement of decomposition and associated nutrient release from straw (O. ryzasativa L.) of different rice varieties using a perfusion system[J]. Hart and Soil, 2000, 223: 1-11.
- [4] HLAND F, KLAMER M, IIND A M, et al. Influence of Initial C/N ration chemical and microbial composition during long term composting of straw[J]. Microbial Ecology, 2001, 41: 272-280.
- [5] 杨朝新. 有机生物肥的特性及施用效果[J]. 湖北农业科学, 2001(12): 38-40.
- [6] 陈宝奎, 陈洪存, 郑克勤, 等. 水稻田施用生物有机肥替代无机化肥试验[J]. 北京农业, 2007(9): 13-14.
- [7] 蔡湘文, 罗亚平, 黄志琼, 等. 有机肥施用增产效益研究[J]. 广西农业科学, 2006, 37(6): 694-696.
- [8] 刘丽生. 生物肥料的作用特点和发展趋势[J]. 黑龙江农业科学, 2001(5): 30-31.
- [9] 罗兴录, 岑忠用, 潘英华, 等. 木薯施用生物有机肥的增产效应[J]. 中国农学通报, 2006, 22(6): 240-244.
- [10] 孔跃, 徐有明, 张家成, 等. 生物有机肥对小油菜生长及品质的影响[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(2): 479-483.
- [12] 邓晓东, 费小雯, 刘志昕, 等. 橡胶丛枝病分子检测研究[J]. 热带作物学报, 2001, 22(2): 8-12.
- [13] 秦国夫, 沈瑞祥. PCR检测树木菌原体的研究[J]. 森林病虫通讯, 1995(2): 18-19.
- [14] 秦国夫, 赵俊, 方岩, 等. 泡桐丛枝病检测试剂盒的研制和应用[J]. 森林病虫通讯, 2000(6): 8-11.

(上接第9610页)

- [10] 张春立, 林栏, 胡勤学, 等. 泡桐丛枝病类菌原体DNA分子克隆与序列分析[J]. 植物学报, 1994, 36(4): 278-282.
- [11] 何放亭, 武红巾, 陈子文, 等. 几种植物类菌原体(MLOs)的分子检测及其相关性比较[J]. 植物病理学报, 1996, 26(3): 251-255.