

应用 PCR技术检测柑桔黄龙病病原的研究

邓晓玲 唐伟文

(华南农业大学植物保护系, 广州, 510642)

THE STUDIES ON DETECTION OF CITRUS HUANGLONGBIN PATHOGEN BY POLYMERASE CHAIN REACTION

Deng Xiaoling Tang Weiwen

(Dept. of Plant Protection, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

关键词 柑桔黄龙病;聚合酶链式反应

Key words Citrus Huanglongbin; Polymerase Chain Reaction (PCR)

中图分类号 S432.1

柑桔黄龙病是一种世界性的毁灭性病害,该病的主要防治方法:一是进行严格检疫,防止带病苗木的扩散;二是建立无病苗木基地,选种无病苗木;三是及早铲除病株。而这些方法的有效实施有赖于一套准确有效的检测技术,但传统的方法(包括血清学方法)还未能检测出未显症状的病株,给病害的防治带来极大的困难,也是该病至今仍不断扩展蔓延、为害猖獗的主要原因之一。本研究采用聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术检测了来自广州、东莞、四会、连州、深圳等地的桄柑、蕉柑、四会桔、甜橙、柚子等5个品种的柑桔黄龙病病株及感染了柑桔黄龙病病原的长春花。

根据柑桔黄龙病亚洲型 In2.6的核苷酸序列(Villechanoux, 1993),设计PCR的引物 P_1 、 P_2 ,扩增的核酸片段长度为563bp^{*}。用CTAB法提取待测样品中的叶脉总DNA,以 P_1 、 P_2 为引物,提取的总DNA为模板,进行PCR扩增。PCR反应的总体积为50 μ L,其中:10 $\times$ PCR反应缓冲液3 μ L, 2mmol/L dNTP 3 μ L, P_1 、 P_2 各1 μ L,待测样品DNA 2 μ L,灭菌无离子水35 μ L,最后加入Taq DNA聚合酶(3 $\times$ 10⁶ U/L)1 μ L,混合后在PCR仪(PERKIN-ELMER GeneAmp PCR System 2400)上进行扩增。94 $^{\circ}$ C变性5min后,依94 $^{\circ}$ C 1min $\rightarrow$ 55 $^{\circ}$ C 1min $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C 1min(最后一次10min)顺序,进行30次循环。反应完毕后,取上述混合物5 μ L,用1.2%琼脂糖进行凝胶电泳,在紫外灯下进行观察,进行30次循环。反应完毕后,取上述混合物5 μ L,用1.2%琼脂糖进行凝胶电泳,在紫外灯下进行观察。结果上述5个柑桔品种黄龙病病株及长春花病株均能扩增到563bp的特异性电泳区带,这与设计的扩增片段一致,为柑桔黄龙病病原的DNA片段,证明是带有柑桔黄龙病病原的植株。在健株样品中则扩增不到这条特异电泳区带(图版1)。

同时应用PCR技术检测未显症状的病株有新的进展。用以往的方法检测不到未显症状的病株中的病原,而用PCR技术则能检测到田间病株中未显症状的枝梢带有黄龙病的病原物;在温室条件下,顶部嫁接了带有黄龙病病原枝条的长春花及嫁接了黄龙病病枝的甜橙,在植株尚未表现症状之前则可检测到有黄龙病的病原物存在(图版2)。这样可以在未显症状前及早地发现病株,这对控制病害的蔓延具有重要的意义。

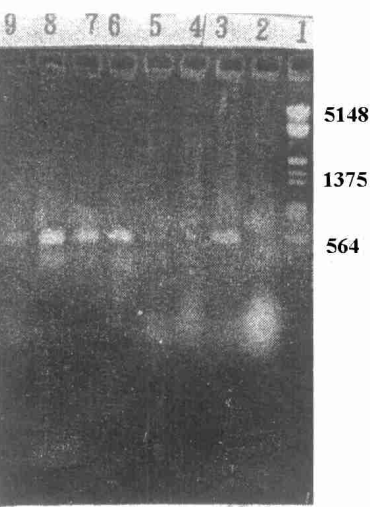
1996-06-14收稿

* 引物 P_1 、 P_2 由美国新泽西州立医学院田亚南博士提供。

本试验结果是国内首次应用 PCR技术成功地检测到果园及温室内已带病而未显症状的植株内的黄龙病病原物。

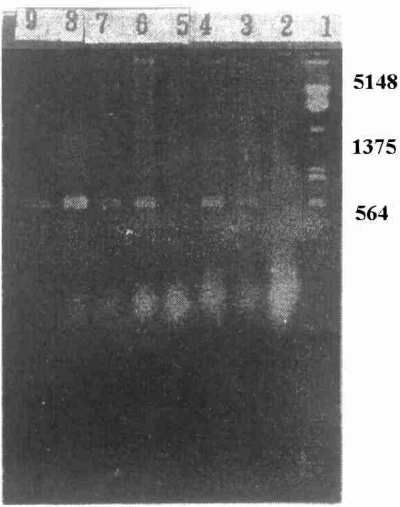
参 考 文 献

Villechanoux S, Garnier M, Bove J M. 1993. The genome of the non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus greeningdisease contains the *nusGrp1KAJLrpoBC* gene cluster and the gene for abacteriophage type DN A polymerase. Curr Microbiol, 26 161



图版 1 PCR扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中的电泳分析

- 1.入 DN A/EcoRI+ HindIII分子量标准物；
- 2.健康长春花的扩增样品；
- 3.感染了柑桔黄龙病病原的长春花的扩增样品；
- 4.健康柑桔实生苗的扩增样品；
- 5~ 9.黄龙病病株的扩增样品
(5.四会桔；6.蕉柑；7.沙田柚；8.桫柑；9.甜橙)



图版 2 未显症状病株的 PCR扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中的电泳

- 1.入 DN A/EcoRI+ HindIII分子量标准物；
- 2.健康长春花的扩增样品；
- 3~ 4.感染了柑桔黄龙病病原的长春花的扩增样品；
(3.尚未表现症状的长春花；4.已表现症状的长春花)
- 5.健康柑桔实生苗的扩增样品；
- 6~ 7.带有黄龙病病原的甜橙的扩增样品；
(6.已表现症状的甜橙；7.尚未表现症状的甜橙)
- 8~ 9.带有黄龙病病原的桫柑的扩增样品；
(8.已表现症状的桫柑枝梢；9.尚未表现症状的桫柑枝梢)