

快速检测柑桔黄龙病病原的研究^{*}

邓晓玲¹ 梁志慧² 唐伟文¹

(1 华南农业大学资源环境学院, 广州, 510642; 2 华南农业大学食品科学系)

摘要 应用 PCR 技术对柑桔黄龙病病原 DNA 进行体外扩增, 可建立一套快速、准确、有效的检测该病原的方法。研究结果表明: PCR 技术对柑桔黄龙病病原的检测具有很强的特异性, 只有感染了黄龙病病原的样品, PCR 才呈阳性反应。文章报道了应用 PCR 技术能检测已带病但尚未显症状的柑桔黄龙病病株。该检测技术可以对柑桔黄龙病进行早期诊断, 及早地控制带病苗木的传播, 这对选育无病苗木及病害的综合治理具有很高的应用价值。

关键词 柑桔; 黄龙病; 聚合酶链式反应(PCR); 检测

中图分类号 S432.42

柑桔黄龙病(Citrus Huanglongbing)是世界性的毁灭性病害, 其病原现在认为是细菌, 称为韧皮部杆菌 *Liberobacter asiaticum* (Jagoueix et al, 1994)。控制本病的关键在于: 一是实行严格检疫, 防止带病接穗及苗木的传播; 二是建立无病苗木基地, 选种无病苗木; 三是及早铲除病株及防治虫媒介体。这些防治方法的有效实施, 需要一套快速、准确的检测技术相配合。但目前尚未找到一种有效的检测柑桔黄龙病未显症状的病株的方法, 无法及早地控制带病苗木的传播(Graca, 1991; 李德望等, 1992)。在未显症状的病株体内, 病原浓度极低, 而以往的检测方法灵敏度不高, 不能检测出这样低浓度的病原。要解决这个难题, 只有寻找新的检测技术。聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术可将微量的目的 DNA 片段在几小时内特异性地扩增上百万倍(Saiki et al, 1985)。田亚南等(1996)报道用 PCR 技术检测了感染了柑桔黄龙病的芦柑、长春花以及在病株上取食的柑桔木虱样品中有黄龙病病原的存在。但是对于柑桔的其它品种, 特别是已带病但尚未显症状的病株能否检测到病原物, 少见有文献报道。本文应用 PCR 技术对柑桔黄龙病病原 DNA 进行体外扩增, 建立了一套快速、有效的检测柑桔黄龙病病原的方法, 这对防治柑桔黄龙病具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 植物材料

1.1.1 人工繁殖种在网室内的植物材料 (1) 感染了柑桔黄龙病病原的长春花(*Catharanthus roseus*)。 (2) 表现典型黄龙病症状的柑桔(*Citrus senensis* Osbeck)病株。 (3) 感染了芝麻丛枝病(*Sesama witches' broom*, SWB)的长春花。 (4) 感染了花生丛枝病(*Peanut witches' broom*, PWB)的长春花。 (5) 感染了柑桔衰退病(*Citrus tristeza disease*)的尤力克柠檬。 (6) 表现典型的生理黄化(缺 Mn)的柑桔。 (7) 健康的长春花、柑桔实生苗。

1.1.2 采自田间供检测的植物材料 (1) 柑(*Citrus reticulata* Blanco cv. ponkan); (2) 蕉柑(*C. reticulata* Blanco cv. tankan); (3) 甜橙(*C. sinensis* Osbeck); (4) 十月桔(*C. reticulata* Blanco); (5) 温州蜜

1998-04-21 收稿 邓晓玲, 女 32 岁, 讲师, 硕士

^{*} 国家自然科学基金(39700096)和广东省自然科学基金(960431)资助项目

柑(*C. unshia* Blanco); (6) 沙田柚(*C. grandis* Osbeck); (7) 红江橙(*C. sinensis* Osbeck).

1.2 方法

1.2.1 引物的设计 PCR的引物据柑桔黄龙病病原亚洲株系 In-2.6 的 DNA 序列(Villechanoux et al, 1993)设计的. 引物 1(P₁)与 In-2.6 的 DNA 序列的 39—61 位核苷酸同源, 碱基序列为: 5'-TGAATTCCTTCGAGGTGGTGAGC-3'. 引物 2(P₂)与 In-2.6 的 DNA 序列的 551—573 位核苷酸互补, 碱基序列为: 5'-AGAATTCGACTTAATCCCCACCT-3', 其扩增片段大小为 535 bp.

1.2.2 模板 DNA 的提取 采用 CTAB 法(Murray et al, 1980), 略作修改, 提取模板 DNA. 具体操作如下: 取 0.5 g 叶脉, 剪碎, 加液氮磨成粉末状; 加入 2~3 倍体积的 2 g/L CTAB 抽提缓冲液, 混匀, 分装于 Eppendorf 管中; 65 °C 水浴 1 h; 用苯酚/氯仿、氯仿/异戊醇抽提 1~2 次, 取上清, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaOAc (pH7.0) 及 2 倍体积无水乙醇, 置 -20 °C 过夜; 于 4 °C 下 16 000 r/min 离心 20 min 弃上清, 分别用 φ 为 70% 及 95% 乙醇洗沉淀各 1 次; 用风筒吹干并在室温放置 5 min 干燥 DNA 沉淀; 加入 100 μ L TE 溶解 DNA 沉淀; 取 2 μ L 在 1.2 g/L 脂糖凝胶上电泳, 紫外灯下观察 DNA 的纯度并估算其浓度, 其余置 -20 °C 保存备用.

1.2.3 PCR 的扩增反应 PCR 的试剂盒采用广州华美生物工程公司的 PCR Kit B 试剂盒. PCR 反应体系的总体积为 50 μ L. 反应体系包括: 10 $\times$ PCR 反应缓冲液 5 μ L, 2 mmol/L dNTP 5 μ L, P₁ 和 P₂ 各 1 μ L (物质的量为 25 pmol), 模板 DNA 2 μ L (每个反应为 10 ng), 灭菌双蒸水 35 μ L, 最后加入 TaqDNA 聚合酶 1 μ L (3 u/ μ L), 混合后置于 PCR 仪 (PERKIN-ELMER GeneAmp PCR System 2 400) 上进行扩增反应. 反应条件为: 94 °C 变性 5 min 后, 依 94 °C 变性 1 min $\rightarrow$ 55 °C 退火 1 min $\rightarrow$ 72 °C 延伸 1 min (最后 1 次 10 min) 顺序, 进行 30 次循环. 反应完毕后, 取 PCR 的扩增产物 10 μ L, 用 1.2 g/L 琼脂糖凝胶电泳, 在紫外灯下观察结果. 每次扩增反应均设空白负对照及含病原 DNA 的正对照各 1 个, 每个试验均进行 3 次重复.

2 结果

2.1 PCR 技术检测柑桔黄龙病病原具有特异性

在长春花及柑桔样品的材料中, 只有感染了柑桔黄龙病病原的长春花及表现典型黄龙病症状的柑桔样品才能扩增到 535 bp 特异性电泳区带, 而健康的长春花、感染了芝麻丛枝病 (SWB)、花生丛枝病 (PWB) 的长春花样品以及健康的柑桔实生苗、表现生理黄化的柑桔、表现衰退病的尤力克柠檬样品中均未见有特异性的电泳区带出现, 说明 PCR 技术检测柑桔黄龙病病原具有特异性. 结果见图 1.



1. Δ DNA/EcoRI+Hind III 分子量标准物; 2. 健康的长春花; 3. 感染了柑桔黄龙病病原的长春花; 4. 感染了芝麻丛枝病 (SWB) 的长春花; 5. 感染了花生丛枝病 (PWB) 的长春花; 6. 健康的柑桔实生苗; 7. 表现典型黄龙病症状的柑桔; 8. 表现生理黄化的柑桔; 9. 表现衰退病的尤力克柠檬

图1 PCR 技术检测柑桔黄龙病病原具有特异性的电泳分析

2.2 PCR 技术检测柑桔不同品种
的黄龙病病株的试验

PCR 技术检测了来自不同地区的 柑、蕉柑、甜橙、十月桔、温州蜜柑及沙田柚, 检测不同品种的黄龙病病株的样品数量共计 93 个, PCR 检测全部呈阳性反应, 而健康的柑桔实生苗则为阴性. 结果见表 1.

2.3 PCR 技术检测未显症状植株的试验

在表现典型黄龙病症状的柑植株上, 取与病梢相邻的“无症”枝梢的样品 15 个, 其中有 12 个样品 PCR 呈阳性反应. 在表现典型黄龙病症状的蕉柑植株附近, 取“无症”植株的样品 15 个, 其中有 5 个样品 PCR 呈阳性反应. 在红江橙苗圃中, 取 18 株“无症”的苗木, 其中有 2 个样品 PCR 呈阳性反应. 以上的检测试验说明, 在这些呈阳性反应的“无症”植株体内已有黄龙病病原的存在, 实际上是已带病的植株. 因此, PCR 技术能够对已带病但尚未显症状的植株进行检测, 见图 2 及表 2

表 1 PCR 技术检测不同品种的黄龙病病株的结果

品种类型	采集地点	样品数量	PCR 阳性反应
柑	广州	15	15
蕉柑	从化	15	15
甜橙	东莞	15	15
十月桔	四会	9	9
温州蜜柑	连州	15	15
沙田柚	深圳	24	24
健康柑桔实生苗	人工种植在网室内	15	0



1. (λDNA /EcoRI+Hind III)分子量标准物; 2. 健康的 柑实生苗; 3. 表现典型黄龙病症状的 柑; 4. 与病梢相邻的未显症状的 柑; 4. 健康的蕉柑实生苗 6. 表现典型黄龙病症状的 蕉柑; 7. 与病株相邻的未显症状的蕉柑; 8. 健康的红江橙实生苗; 9. 苗圃中未显症状的红江橙

图 2 PCR 技术检测未显症状植株的电泳分析

3 结论与讨论

试验结果表明: 应用 PCR 技术对柑桔黄龙病病原 DNA 进行体外扩增, 可建立一套快速、准确、有效的检测柑桔黄龙病病原的方法. PCR 的引物 P₁、P₂ 是我们根据柑桔黄龙病病原亚洲株系 In-2.6 的 DNA 序列设计的, 对黄龙病亚洲株系具有特异性. 在供检测的样品中, 只有感染了柑桔黄龙病病原的样品才能扩增出特异性的电泳区

表 2 PCR 技术检测未显症状植株的试验结果

检测样品	症状表现	样品数量/个	PCR 阳性反应
柑	典型症状的病梢	15	15
	与病梢相邻的“无症”枝梢	15	12
	健康实生苗的枝梢	15	0
蕉柑	典型症状的病株	15	15
	与病株相邻的“无症”植株	15	5
	健康的实生苗	15	0
红江橙	健康的实生苗	15	0
	苗圃中“无症”的苗木	18	2

带. PCR 技术检测来自不同地区的 6 个柑桔品种(包括蕉柑、柑、甜橙、十月桔、温州蜜柑、沙田柚)的黄龙病病株样品共计 93 个, PCR 为阳性反应. 因此, PCR 技术不仅能够检测病原浓度较高的蕉柑、柑, 甚至还能检测病原浓度较低的甜橙、十月桔、温州蜜柑、沙田柚的黄龙病病原. 应用 PCR 技术检测未显症状的柑桔黄龙病病株取得成功, PCR 技术不仅可以检测到与病枝相邻的无症状枝条中有黄龙病病原的存在, 而且还能够检测到在苗圃中已带病但尚未显症状的病株. 因此, 应用 PCR 技术对柑桔黄龙病进行早期诊断, 能有效地防止带病苗木的传播, 这对选育无病苗木及防治柑桔黄龙病具有重要的应用价值.

另外, 通过 PCR 扩增技术, 可以获得大量的纯病原 DNA, 这样就可以巧妙地绕过病原分离与提纯两大难关, 为柑桔黄龙病病原的分子生物学研究奠定了基础. 因此, 希望能在 PCR 扩增技术的基础上, 制备出生产上更加实用、方便的 DNA 分子探针来检测柑桔黄龙病, 这是我们目前正在进一步探索和研究的工作.

参 考 文 献

- 田亚南, 柯 穗, 柯 冲. 1996. 应用多聚酶链式反应技术和定量分析柑桔黄龙病病原. 植物病理学报, 26(3): 243~250
- 李德望, 唐伟文, 范怀忠. 1992. 柑桔黄龙病的血清学检测诊断方法的初步研究. 华南农业大学学报, 13(2): 16~22
- Graca J V. 1991. Citrus greening disease. Ann Phytopathol, 29(1): 109~136
- Jagoueix S, Bove J M, Garnier M. 1994. The phloem-limited bacterium of greening disease of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the proteobacteria. J Intern Syst Bacteriol, 44(2): 379~386
- Murray M G, Thomposon W F. 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Res, 8(12): 4 321~4 324
- Saiki R K, Mullis K B, Ehrlich H A. 1985. Primer directed enzymatic amplification of DNA with a DNA polymerase. Science, 230(5): 1 350~1 354
- Villechanoux S, Garnier M, Laigret F. 1993. The genome of the non-cultured, bacteria-like organism associated with citrus greening disease gene cluster and the gene for a bacteriophage type DNA polymerase. Curr Microbiol, 26(1): 161~166

Studies on the Rapid Detection of Citrus Huanglongbing Pathogen

Deng Xiaoling¹ Liang Zhihui² Tang Weiwen¹

(1 College of Natural Resources & Environments, South China Agric. Univ., Guangzhou, 510642;

2 Dept. of Food Science, South China Agric. Univ.)

Abstract The present study is aimed to develop an effective method for the detection of *Liberobacter asiaticum* that causes citrus Huanglongbing disease. It was shown that the DNA of the pathogen could be amplified by polymerase chain reaction (PCR) in vitro and the appearance of such DNA was significantly detected in the samples of infected citrus trees of the various cultivars. To use PCR for the detection of the infected trees without any symptom yet at the early stage of the infection. This technique can be effectively applied to screen disease-free seedlings, establish disease-free citrus nurseries, and control the spread of the diseased seedlings.

Key words citrus ; Huanglongbing; polymerase chain reaction (PCR); detection

【责任编辑 张 砾】