

水稻橙叶病 PCR 检测体系的建立

张松柏^{1,2}, 罗香文¹, 李华平²

(1 湖南省农业科学院 植物保护研究所, 湖南 长沙 410115; 2 华南农业大学 植物病毒研究室, 广东 广州 510642)

摘要:利用植原体通用引物 sP1 和 sP2, 采用 PCR 法从发病的水稻植株中扩增植原体一段保守的 16S rRNA 基因的核苷酸序列。结果表明, 从发病的水稻植株中都能够稳定扩增得到 1 条 558 bp 的特异性条带。对该条带进行克隆和序列分析表明, 该片段和 Genbank 中公布的众多植原体的相应区域的核苷酸序列相似性都高达 95% 以上, 表明利用植原体通用引物能有效扩增得到水稻橙叶病原的序列。利用此引物并优化 PCR 反应条件, 建立了水稻橙叶病的 PCR 检测方法。该方法对检测水稻橙叶病具有特异、灵敏和有效性。应用该检测体系检测从广东信宜、高州和从化采集的多份疑似标样, 结果表明, 在这几个地区均有水稻橙叶病的发生和危害。

关键词:水稻; 橙叶病; PCR 检测

中图分类号: S432.41

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)01-0028-04

The Establishment of PCR Detection System of Rice Orange Leaf Disease

ZHANG Song-bai^{1,2}, LUO Xiang-wen¹, LI Hua-ping²

(1 Institute of Plant Protection, Hunan Academy of Agriculture Sciences, Changsha 410115, China;

2 Lab of Plant Virology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: It is one of the important control strategies of rice orange leaf disease by development of a rapid disease detection technique. Conserved general primer pairs sP1 and sP2 for phytoplasma were synthesized, and the 558 bp segment of the phytoplasma 16S rRNA gene was specifically amplified by PCR. The sequencing results of the segment showed that the nucleotide acid sequence of this PCR product shared above 95% identical with the corresponding segment of other kinds of phytoplasma in Genbank, which testified that the PCR product was from the pathogen of rice orange leaf disease. The PCR detection system was established by optimizing the parameters of PCR reaction system and found that this system could effectively, sensitively, and accurately detected the disease. The several samples from the different locations of Xinyi, Gaozhou and Conghua in Guangdong Province were detected by the PCR system, and the results revealed rice leaf disease existed in these locations.

Key words: rice; orange leaf disease; PCR detection

水稻橙叶病于 1960 年在泰国首次发现, 随后在菲律宾、印度、马来西亚等东南亚国家也有零星发生, 并于 1976 年证实其病原为植原体 (phytoplasma)^[1]。在我国首次报道该病发生于云南稻区^[2]。20 世纪 90 年代, 该病在广东省部分稻区严重发生, 曾给当地水稻生产带来严重损失^[3,4]。近几年来, 该病在广东省茂名和广西部分稻区仍然频繁暴发, 成为了阻碍当地水稻生产重要的限制因子。水稻植原体病害除水稻橙叶病外, 在国外还发现有水稻黄萎

病的报道^[5]。二者在危害水稻症状、传毒介体等方面具有明显的不同^[4], 在我国迄今鲜见水稻黄萎病的报道。植原体病害主要通过无性繁殖材料、种苗或昆虫介体传播, 很少或不能通过种子传播, 而带病种苗可以非常有效地通过高温或抗菌素处理而脱掉病原^[6,7], 故带毒植物的早期诊断是防治植原体病害的关键。但由于植原体既不象真菌、细菌那样容易培养, 也不象病毒那样易于提纯, 因而植原体自发现后的几十年里, 其检测技术的发展一直没有大的突破。

收稿日期: 2007-05-01

作者简介: 张松柏 (1980—), 男, 助理研究员, 硕士; 通讯作者: 李华平 (1961—) 男, 教授, 博士, E-mail: huaping@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30370929); 广东省自然科学基金 (C036845)

在确定一种植物病害是否由植原体引起时,一般先根据病害症状初步推测,然后对植物注射或喷洒植原体敏感的四环素类物质,若症状受到抑制,就说明其病原物可能是植原体,最后通过电子显微镜观察加以确定^[2,7]。近10多年来,血清学和以DNA为基础的分子生物学技术用来鉴定和区分植原体,才使得植原体的鉴定研究有了较快的发展。植原体16S rRNA基因序列同源性分析是目前国际上植原体分类鉴定的最重要的方法之一,目前大多数植原体的鉴定通过植原体16S rRNA、23S rRNA和16S~23S rRNA间隔区等保守的DNA序列进行分子生物学检测和鉴定^[7-8]。水稻橙叶病的分子生物学检测方法至今鲜见报道。就水稻橙叶病而言,病害防治的关键时期,主要是在水稻秧苗期发现病害后,及早拔除病株、并喷施化学农药用以杀灭传毒昆虫介体,从而杜绝或减少病害的发生^[3-4]。本文利用PCR方法建立了水稻橙叶病的分子生物学检测方法,这为生产中水稻早期快速检测该病害发生,从而采取相应防治措施用以控制该病害的发生和危害奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

水稻疑似病株分别采集于广东省茂名市信宜的水稻品种博优3550和从化、高州的水稻品种博优3550、博优903。采集的标样种植于华南农业大学植物病毒研究室的防虫网室和直接保存于-70℃冰箱待用。

1.2 菌种

Escherichia coli JM109菌株为华南农业大学植物病毒研究室保存。pMD18-T载体购自TaKaRa生物有限公司。

1.3 引物的设计

根据Ahrens等^[9]报道的植原体16S rRNA基因的一段保守序列,合成了引物对sP₁和sP₂,引物对由上海生工生物工程有限公司合成。扩增片断约558 bp,引物序列分别为:

sP₁: 5'-ACGAAAGCGTGGGGAGCAAA-3',

sP₂: 5'-GAAGTCGAGTTGCAGACTT-3'.

1.4 水稻组织DNA的抽提

为了从发病水稻组织中抽提获得较好的DNA用作PCR扩增的模板,本文对报道的几种抽提方法进行了试验比较。这些方法包括:方法I($w=0.5\%$ 的SDS)^[8]、方法II($w=1.5\%$ 的SDS)^[9]、方法III($w=1.0\%$ 的CTAB)^[10]、方法IV($w=2.0\%$ 的CTAB)^[11]和方法V(简易法)^[12]。将抽提的DNA经DU^R-640型紫外分析仪测定和通过8 g/L琼脂糖凝胶电泳分析进行比较。

1.5 PCR检测体系的建立

PCR反应体系为:1×reaction buffer、2 mmol/L Mg²⁺、100 μmol/L dNTPs、5 μmol/L上下游引物、0.25 μL *Taq*酶、1 μL DNA模板,总体积20 μL。PCR扩增参数为:94℃预变性2 min、30个循环包括94℃变性1 min、50℃退火0.5 min、72℃延伸1 min,循环结束后72℃延伸10 min。反应结束后,取PCR扩增产物10 μL与2 μL 6×载样缓冲液($w=0.25\%$ 的溴酚兰, $w=40\%$ 的蔗糖)混匀,DNA marker DL2000,10 g/L的琼脂糖(含0.5 μg/mL溴化乙锭)于0.5×TBE缓冲液(45 mmol/L Tris-硼酸,1.0 mmol/L EDTA, pH8.0)在5 V/cm电场强度下电泳约1 h,用UVP凝胶成像系统观察和照相。

1.6 PCR产物序列的测定

用PCR产物回收试剂盒(华美生物工程公司)回收558 bp的目的DNA,具体步骤参照试剂盒说明;采用常规克隆方法将扩增片段克隆入pMD18-T载体,转化*E. coli*,阳性克隆抽提质粒后,送大连生物(华运)工程公司完成核苷酸序列测定。

1.7 PCR产物DNA序列同源性比较

DNA序列同源性比较通过国际互联网在美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行分析。

2 结果与分析

2.1 PCR检测方法的建立

2.1.1 水稻DNA抽提方法的比较分析 为了获得最简便和有效的方法抽提水稻DNA,比较了简易法、1.0% CTAB、2.0% CTAB、0.5% SDS、1.5% SDS 5种方法抽提水稻基因组DNA的效果。抽提的DNA经DU^R-640型紫外分析仪测定及通过8 g/L琼脂糖凝胶电泳分析比较,结果表明(表1):2.0% CTAB法、1.0% CTAB法、简易法均有较高的DNA产率,其中1.0% CTAB法取得的核酸的纯度最高,但其总核酸量少于2.0% CTAB法;而0.5% SDS法、1.5% SDS法抽提的总核酸量明显要比其他3种方法抽提的量要少得多,只有上述3种方法的1/8~1/4,而且得到的总核酸的纯度也相对要低得多。简易法抽提的总核酸纯度及产率都不及1.0% CTAB法和2.0% CTAB法,但其试验步骤简单,花费时间少、节约试验材料。鉴于2.0% CTAB法有最高的DNA产率和较高的纯度,因此本文随后所作试验的DNA抽提均采用2.0% CTAB法进行。

2.1.2 PCR体系优化及PCR的灵敏度 以sP₁、sP₂为引物、以病株所抽提的总核酸为模板,通过改变PCR反应体系中某一组分的量,对各组分量及

表1 几种DNA抽提方法提取水稻总DNA效果比较¹⁾

Tab.1 Comparison of the effects extracting DNA on rice tissues with different extraction methods

项目 item	1.0% CTAB	2.0% CTAB	0.5% SDS	1.5% SDS	简易法 simple methods
$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	2.208 ± 0.116	2.072 ± 0.121	1.807 ± 0.203	1.356 ± 0.227	2.012 ± 0.152
$\rho_{\text{DNA}}/(\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1})$	84.700 ± 24.841	93.500 ± 29.726	14.900 ± 8.033	14.100 ± 3.943	44.400 ± 13.164

1) 10次重复的平均值 ± 标准误

退火温度和反应条件进行了优化. 在试验过程中发现, 在相当宽松的条件下, 都能够得到准确的扩增结果. 但当退火温度大于 60 °C 时却得不到扩增的结果; PCR 反应对 DNA 的纯度要求不是很高, 只要不含有太多的抑制物质 (例如: 多糖、酚类以及蛋白质), DNA 的量在 50 ~ 500 ng 范围内不会影响扩增结果; 每个反应 *Taq* 酶用量约为 1 ~ 2 U, 引物有效的浓度范围为 0.05 ~ 2.00 $\mu\text{mol/L}$, Mg^{2+} 的浓度按照常规的用量为 1.5 ~ 2.0 mmol/L, dNTPs 的用量在 100 ~ 200 $\mu\text{mol/L}$ 范围内效果较好.

取显症的水稻叶片 200 mg 抽提总 DNA 溶于 100 μL TE 中, 抽提液用双蒸水 10 倍系列稀释后进行 PCR 扩增, 电泳结果 (图 1) 表明: DNA 抽提液在稀释 10^{-6} 后仍能扩增出 588 bp 的特异条带, 即 PCR 法能够检出相当于 50 ng 病叶中的植原体.

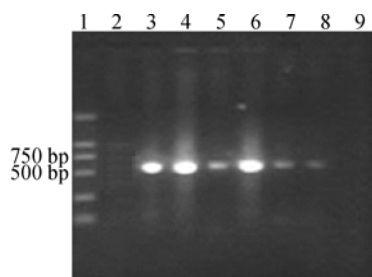
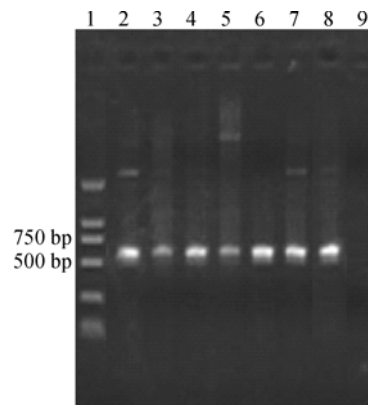
1: DNA marker DL2000; 2: 清水对照; 3 ~ 9: 病株总 DNA 稀释梯度 ($10^{-1} \sim 10^{-7}$)1: DNA marker DL2000; 2: water control; 3 ~ 9: dilution density of total DNAs from diseased plant ($10^{-1} \sim 10^{-7}$)

图1 水稻橙叶病株的 PCR 扩增体系的灵敏度分析

Fig.1 Analysis of sensitivity in PCR amplification system for detection of rice diseased leaves

2.1.3 PCR 法检测水稻不同部位 利用显症的水稻不同组织部位进行检测时发现, PCR 法能够有效地对水稻的根、茎、叶进行检测而得到特异扩增产物, 而健康水稻组织对照未得到目的条带 (图 2).

2.1.4 引物的特异性 利用引物对 sP1、sP2 电泳, 结果 (图 1、2) 表明, 得到 588 bp 的目的片断, 而清水与健康水稻样品对照未出现条带, 说明此引物具有较高的特异性. 将此 PCR 扩增片断进行克隆和测序, 结果表明该片断与 Genbank 中报道的众多植原体的 16S rRNA 基因的相应序列的相似率达到 95 %



1: DNA marker DL2000; 2, 3: 根; 4, 5: 茎; 6 ~ 8: 叶; 9: 健康植株对照

1: DNA marker DL2000; 2, 3: root; 4, 5: stem; 6 ~ 8: leaf; 9: healthy control

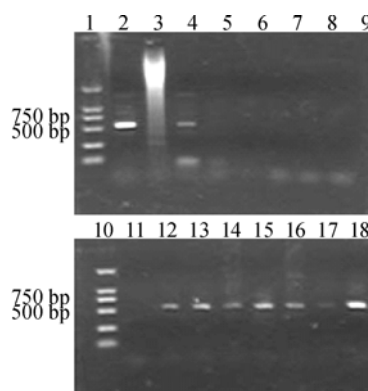
图2 PCR 检测发病水稻植株不同部位的电泳分析

Fig.2 PCR detection analysis of different rice tissues of diseased plants

以上 (数据未显示). 这揭示扩增的 588 bp 片断是对发生于水稻中的植原体 (水稻橙叶病原) 的专化性扩增.

2.2 检测方法的应用

用上述建立的 PCR 鉴定体系, 对分别采自广东省茂名市的信宜、高州、和广州从化的标样进行 PCR 检测. 结果 (图 3、4) 表明: 从来自信宜和高州的 13

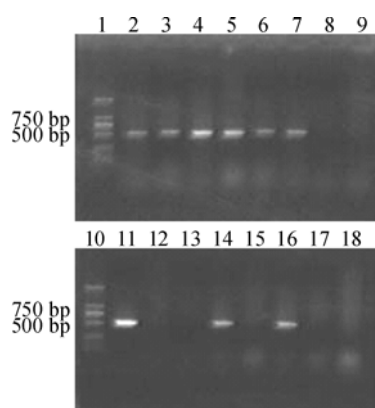


1、10: DNA marker DL2000; 2 ~ 7、12 ~ 18: 标样; 8、11: 清水对照; 9: 健康对照

1, 10: DNA marker DL2000; 2 ~ 7, 12 ~ 18: samples; 8, 11: water control; 9: healthy control

图3 PCR 检测采集于信宜和高州标样的电泳分析

Fig.3 PCR detection analysis of rice samples from Xinyi and Gaozhou



1,10; DNA marker DL2000; 2~8、11~18; 标样; 9; 健康对照
1,10; DNA marker DL2000; 2~8、11~18; samples; 9; healthy control

图4 PCR检测采集于从化标样的电泳分析

Fig.4 PCR detection analysis of rice samples from Conghua

个具有疑似症状的标样中,发现有9个标样能扩增出目的片段;在从化的15个样品中,有9个样品扩增出目的条带.这说明该分子检测方法可以有效地检测出该病害,同时也说明在这些地区存在该病害危害.

3 讨论与结论

水稻橙叶病是导致水稻部分产区严重经济损失的病害之一,近年来,在东南亚和我国的华南一带均有发生,且有逐渐扩大蔓延的趋势^[1-4].目前国内外关于该病害的分子生物学方面的研究报道还很少,也鲜见关于该病害的分子生物学检测的报道.目前该病害的检测方法还是依赖于症状观察,再进行超薄切片和电镜观察予以证实.这些方法不但繁琐、不可靠,而且更重要的是耗时较长,难于在较短时间内对疑似标样进行快速和准确检测.而控制该病害的关键在于尽早发现病害,即在病害发生早期和病害尚未通过虫媒大面积传播早期,及时拔除病株,并喷洒杀虫剂消灭和控制传毒虫媒的数量^[3-4].因此建立快速、可靠和有效的检测方法是当前防治该病害的当务之急.

本研究采用PCR方法,建立了水稻橙叶病的一套分子生物学检测方法和程序.该方法从病样DNA抽提、PCR扩增体系和反应程序等各方面都进行了优化,发现任何显症的水稻病样都能扩增出特异条带,并且能够从发病植株的叶、茎和根等不同部位均能检测,多次检测的结果一致,其检测所需的材料量仅相当于50 ng病叶,这表明本试验建立的PCR检测法特异性和稳定性强、检测灵敏度高.该方法的建立为水稻橙叶病发病早期鉴定病害、进而采取有效防治措施控制病害的传播和危害奠定了重要基础.

长期以来根据水稻橙叶病田间发病症状、四环

素对病株具有一定延缓死亡的特征、以及组织切片的电镜观察,人们一致认为该病仅在广东省茂名地区(包括信宜、高州)的稻区发生,而且主要集中在粤西信宜市稻区^[3].通过本研究建立的方法检测来源于信宜、高州和粤中地区的从化市稻区的疑似病株,结果发现不仅在信宜和高州存在该病害,而且在从未报道的粤中从化稻区也发现了该病害.这表明病害正在向粤中和粤东等地区蔓延,更大规模和范围的病害检测和普查工作急待进行,并需在此基础上采取相应防控措施,以阻止病害造成更大的危害.

参考文献:

- [1] SAITO Y, LING K C. MLO associated with rice orange leaf disease[J]. Plant Disease Reports, 1976, 60(8): 649-651.
- [2] 沈菊英,陈作义,彭加木. 水稻橙叶病在云南的发生——病原的电子显微镜研究[J]. 植物病理学报, 1989, 19(3): 55-56.
- [3] 张曙光,范怀忠,肖火根,等. 广东新发生流行的水稻橙叶病的鉴定[J]. 植物病理学报, 1995, 25(3): 233-237.
- [4] 陈景成,刘华荣,彭启德. 陆川县发生水稻橙叶病[J]. 广西植保, 2002, 14(2): 33.
- [5] JUNG H Y, SAWAYANAGI T, WANGKAEW P, et al., 'Candidatus phytoplasma oryzae', a novel phytoplasma taxon associated with rice yellow dwarf disease [J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2003, 53(6): 1925-1929.
- [6] 潘青化. 枣疯病研究进展及防治措施[J]. 北京农业科学, 2002, 20(3): 4-8.
- [7] 车海彦,罗大全. 植原体病害的检测方法研究进展[J]. 华南热带农业大学学报, 2006, 12(3): 69-72.
- [8] 廖晓兰,罗宽,陈红运,等. 植原体 TaqMan 探针实时荧光PCR检测鉴定方法的建立[J]. 植物病理学报, 2002, 32(4): 361-367.
- [9] AHRENS U, SEEMÜLLER E. Detection of DNA of plant pathogenic mycoplasma-like organisms by a polymerase chain reaction that amplifies a sequence of the 16S rRNA gene[J]. Phytopathology, 1992, 82: 828-832.
- [10] EDWARDS K, JOHNSTONE C, THOMPSON C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids research, 1991, 19(6): 1349.
- [11] 卢扬江,郑康乐. 提取水稻DNA的一种简易方法[J]. 中国水稻科学, 1992, 6(1): 45-47.
- [12] 宋敏,张云孙,胡卫红. 4种提取水稻基因组DNA方法的比较[J]. 云南大学学报, 2001, 23(1): 74-76.

【责任编辑 周志红】