

应用 PCR 及 Nested-PCR 技术检测柑橘黄龙病病原研究

丁芳^{1,2} 易干军^{2*} 王国平^{1*}

(¹ 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070; ² 广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640)

摘要: 以采自田间和广东省农业科学院果树研究所防虫隔离网室内嫁接并感染黄龙病的 5 个柑橘品种叶片为材料, 以草本指示植物长春花 (*Catharanthus roseus*) 和木本指示植物椴柑 (*Citrus reticulata* Blanco) 鉴定为基础, 采用改良的 CTAB 法提取总 DNA, 在此基础上进行常规 PCR 与 Nested-PCR 检测, 并对特异目的片段进行克隆、测序。试验证明 Nested-PCR 比常规 PCR 的灵敏度更高。这两种方法均可以检测出未显症的黄龙病材料, 但 Nested-PCR 可以在木本指示植物嫁接后 40 d 左右、草本指示植物摩擦接种 1 个月左右检测到病原; 而常规 PCR 在木本植物嫁接后 60 d 左右、草本植物摩擦接种近 2 个月左右才能检测到病原。常规 PCR 所能检测到的最低 DNA 的量为 pg 数量级; Nested-PCR 检测病原 DNA 灵敏度约为常规 PCR 的 10^4 倍。

关键词: 柑橘; 黄龙病; PCR; Nested-PCR; 检测

中图分类号: S 666 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 06-0803-04

Research on the PCR and Nested-PCR Detection of Citrus Huanglongbing Pathogen

Ding Fang^{1,2}, Yi Ganjun^{2*}, and Wang Guoping^{1*}

(¹ Plant Science and Technology Academy, Huazhong Agriculture University, Wuhan 430070, China; ² Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510640, China)

Abstract: The experiment was conducted with five species of citrus Huanglongbing material. On the base of the bioassay, we used PCR and Nested-PCR were used to detect precisely. The special DNA fragment was cloned and sequenced. The results showed that: both of these two PCR methods can detect the material with no obvious symptom. However the Nested-PCR was better: It could detect the *Catharanthus roseus* and *Citrus reticulata* Blanco just within one or two months after the inoculation; but when PCR was used, the pathogen could be detected over two months after inoculation. The lowest concentration of DNA that can be detected by Nested-PCR was lower than fg, yet PCR is only pg. The sensitivity of Nested-PCR is nearly ten thousand times higher than that of PCR.

Key words: Citrus; Huanglongbing; PCR; Nested-PCR; Detection

1 目的、材料与方

柑橘黄龙病 (Citrus Huanglongbing) 是一种在柑橘生产上危害极其严重的类细菌病害^[1]。由于其病原一直难于进行人工培养, 使得对该病害的研究受到了很大的限制。近年来随着 PCR 技术的发展, 特别是 Villechanoux 等^[2]发表了柑橘黄龙病病原的部分 DNA 序列以来, 运用 PCR 技术检测此类病害成为可能。田亚南等^[3]报道运用 PCR 技术对该病进行检测, 李韬等^[4]运用了嵌套式聚合酶链式反应 (Nested-PCR) 对柑橘木虱及其寄主“九里香”的带菌率进行了研究。本研究同时采用 PCR 和 Nested-PCR 技术对柑橘黄龙病进行检测, 对特异的柑橘黄龙病病原 DNA 片段进行克隆, 测序分析, 并

收稿日期: 2004-03-03; 修回日期: 2004-06-01

基金项目: 国家“863”计划项目 (2001AA241142); 广东省重大科技专项资助项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: Yiganjun@vip.163.com; E-mail: Gpwang@mail.hzau.edu.cn)

对两种方法加以比较, 以期为柑橘黄龙病的检测提供更为灵敏的检测方法。

以采自田间和广东省农业科学院果树研究所防虫隔离网室内嫁接的 5 个柑橘品种的黄龙病叶片为材料, 即: ①椪柑、②红江橙、③暗柳橙、④十月桔、⑤萝岗甜橙, 以及经汁液摩擦接种的草本指示植物长春花 (*Catharanthus roseus*) 为待检材料, 以健康的柑橘及长春花叶片为对照材料。通过汁液摩擦接种长春花, 多芽腹接木本指示植物椪柑, 以表现典型黄龙病症状的指示植物总 DNA 为阳性对照, 以健康的指示植物总 DNA 为阴性对照。叶片总 DNA 的提取采用改良的 CTAB 法^[5]。PCR 及 Nested-PCR 引物根据柑橘黄龙病病原亚洲株系 16SrDNA, 参考李稻等^[4]、孔维文等^[6]的设计, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应均在 PTC-100, MJ Research INC PCR 仪上进行, 25 μ L 体系中含有 2.5 μ L 10 $\times$ PCR Buffer, 150 μ mol/L dNTP, Taq 酶 0.6 U, 5 ng 提取的总 DNA。两对引物均为 0.4 μ mol/L, PCR 引物 (即 Nested-PCR 外侧引物): P1 5'-TGAATTCTTCGAGGTTGGTGAG-3', P2 5'-AGAATTTCGACTTAATCCCCACCT-3'; Nested-PCR 内侧引物: P3 5'-GCGTTCATGTAGAAGTTGTG-3', P4 5'-CCTACAGGTGGCTGACTCAT-3'。PCR (即 Nested-PCR 第 1 轮扩增) 反应程序为, 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 53 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环, 最后 1 次 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。Nested-PCR 第 2 轮扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 3 min, 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。每个扩增反应都重复 3 次, 均设阴性对照及黄龙病阳性材料对照。

2 结果与讨论

2.1 草本指示植物鉴定结果

草本指示植物长春花摩擦接种 3 个月左右开始显示症状, 表现为下部叶片最先从叶脉开始黄化, 上部叶片仍表现为健康的绿色。之后整个叶片逐渐均匀黄化, 并且黄化的叶片由下而上逐渐增多, 最后黄化叶片逐渐脱落。

2.2 木本指示植物鉴定结果

木本指示植物感病品种椪柑从嫁接后近 10 个月左右显现症状: 初始叶片变黄, 后期为黄绿相间的斑驳型黄化, 病叶明显较健康叶片小, 叶片角质化变硬。

2.3 PCR 产物电泳观察

用改良的 CTAB 法提取的 DNA 为模板, 对田间采取的 5 个品种共计 52 个标样进行 PCR 检测, 46 个标样扩增得到了特异目的 DNA 片段 535 bp (图 1)。所检测材料中包括典型的黄化、斑驳症状, 以及无症状的疑似材料, PCR 扩增有 6 个标样未检测出病原, 主要是无症状疑似材料。黄龙病病菌在寄主体内分布不均, 可能是造成部分材料未检测出的原因。

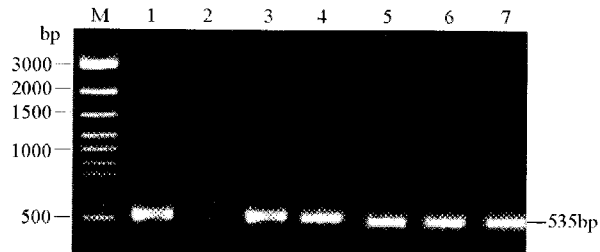


图 1 田间供试材料的 PCR 检测

M. 100 bp DNA Marker; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照;
3. 萝岗甜橙; 4. 红江橙; 5. 十月桔;
6. 暗柳橙; 7. 椪柑。

Fig. 1 Detection of field material by PCR

M. 100 bp DNA Marker; 1. Positive control; 2. Negative control;
3. Luogangtiansheng; 4. Hongjiangcheng; 5. Shiyueju;
6. Anliucheng; 7. Penggan.

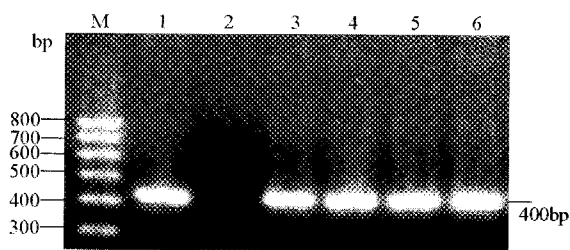


图 2 汁液摩擦接种 1 个月的长春花 Nested-PCR 检测

M. DNA Marker; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3. 接种红江橙病叶汁液; 4. 接种十月桔病叶汁液; 5. 接种暗柳橙病叶汁液; 6. 接种椪柑病叶汁液。

Fig. 2 Detection of *Catharanthus roseus* one month after inoculation by Nested-PCR

1. Positive control; 2. Negative control; 3. Succus of Hongjiangcheng leaves; 4. Succus of Shiyueju leaves; 5. Succus of Anliucheng leaves; 6. Succus of Penggan leaves.

2.4 Nested-PCR 检测结果

对防虫隔离网室内嫁接后 40 d 左右 4 个品种的黄龙病叶片材料以及通过汁液摩擦接种 1 个月左右的长春花在常规 PCR 的基础上进行了 Nested-PCR 检测, 扩增出了特异目的 DNA 片段 400 bp, 试验结果如图 2, 图 3。长春花在汁液摩擦接种 1 个月左右 Nested-PCR 可检测到病原存在; 木本指示植物桫欏嫁接接种后 40 d Nested-PCR 可检测到病原的存在; 而常规 PCR 直到两个月以后才能检测到病原存在 (图 4)。

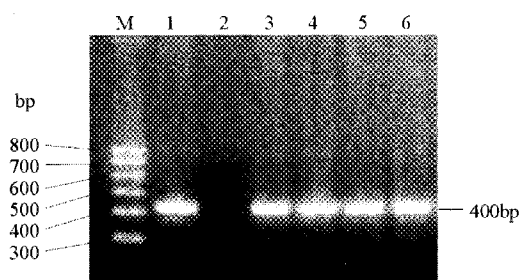


图 3 嫁接后 40 d 的 4 个品种的黄龙病材料 Nested-PCR 检测

M. DNA Marker; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3. 红江橙;
4. 暗柳橙; 5. 十月桔; 6. 桫欏。

Fig. 3 Detection of 4 kinds of Citrus Huanglongbing material 40 days after inoculation by Nested-PCR

1. Positive control; 2. Negtive control; 3. Hongjiangcheng;
4. Anliucheng; 5. Shiyueju; 6. Penggan.

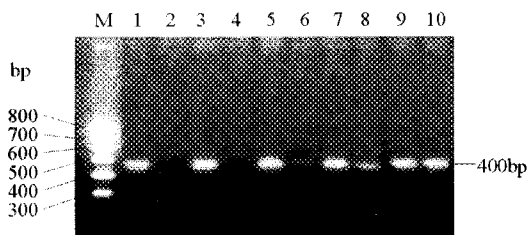


图 4 木本指示植物桫欏接种后不同时期的 PCR 及 Nested-PCR 检测结果

1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3. 40 d Nested-PCR; 4. 40 d PCR;
5. 50 d Nested-PCR; 6. 50 d PCR; 7. 60 d Nested-PCR;
8. 60 d PCR; 9. 70 d Nested-PCR; 10. 70 d PCR。

Fig. 4 Detection of Penggan different stage after inoculation by PCR and Nested-PCR

1. Positive control; 2. Negative control; 3. Nested-PCR 40 days; 4. PCR 40 days; 5. Nested-PCR 50 days; 6. PCR 50 days; 7. Nested-PCR 60 days; 8. PCR 60 days; 9. Nested-PCR 70 days; 10. PCR 70 days.

2.5 PCR 产物的克隆和序列分析

PCR 扩增得到的特异目的片段 535 bp, 经 PCR Fragment Recovery Kit 回收纯化, 与 pMD18-T Vector 连接后转化 *E. Coli* JM109 菌株感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 挑取白色菌落进行培养。经 PCR 鉴定获得重组质粒, 阳性克隆中扩增出特异目的 DNA 片段 535 bp (图 5)。

所获得的阳性重组质粒, 由上海生工生物工程技术服务有限公司进行序列测定, 经 GeneBank BLAST 搜索, 与已发表的柑橘黄龙病病原 DNA 序列的同源性为 99.9%, 证明所克隆的 DNA 片段为柑橘黄龙病病原的 DNA 序列 (图 6)。

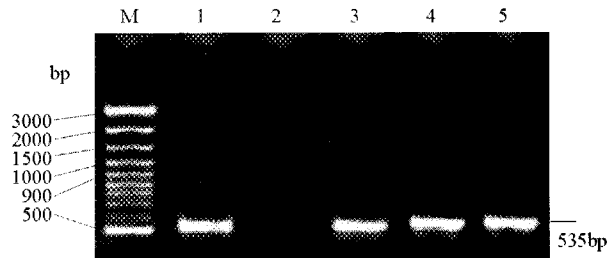


图 5 特异 DNA 片段 535 bp 克隆 PCR 鉴定

M. 100 bp DNA Ladder Marker; 1. 阳性对照;
2. 阴性对照; 3~5. 重组质粒 PCR 产物。

Fig. 5 PCR Detection of cloned DNA fragment

M. 100 bp DNA Ladder Marker; 1. Positive control; 2. Negtive control; 3~5. Recombination plasmid PCR product.

```

GAAT TCTTCGAGGT TGGTGAGCGG GTTGTGTCT CTGATGGTCC GTTTGCTTCT TTAAATGGTA
TTGTAAGAA TGTCGATGAA GAAAAATCTC GCGTTCATGT AGAAGTTGTG ATTTTIGGTC GTGTCACACC
AGTAGAGTTA GCATACAAGC AAGTTGAGAA GATCGTATGA TATTTTGATT TCGGTCATGA GTGGGCGTAT
TATTATTGCT TTTGTGTTTG TTTTATATAG TAGGTTGGTT GTTTTTTAGA AAGGCTAGGG ATGGCTAAAG
TAGTTTCTCG TATAGTTAAG TTGCAGATAG AGTCGGGTTT TGCAAAGCCT TCGCCGCCGG TTGGTCTTGC
AATTGGACAG GCTGGTATTC CCATTATGGC GTTTTGTAAG GCGTTTAATG CGGCAACTGA GGGTATGGAA
AAGGGTATTC CCATCCCAAC TACTGTGACT TGTATAAAG ATAAGTCTTT TACTTTTACG ATGAGTCAGC
CACCTGTAAG CTTTTTCTT AAAAAAGAGG TGGGGATTAACT CGGGATCT

```

图 6 特异 DNA 片段 535 bp 的碱基序列 (划线部分为引物序列)

Fig. 6 The sequence of the special DNA fragment (Sequence of primers used for PCR amplification are underlined)

2.6 PCR 与 Nested-PCR 检测灵敏度比较

总 DNA 经浓度调整为 $10 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 运用 PCR 检测只能检测出 10^{-4} 倍稀释, 相当于 pg 数量级; 而 Nested-PCR 可检测出 10^{-8} 倍稀释, 低于 fg 数量级 (图 7)。

按照理论上讲, 只要有单拷贝的完整模板存在, 应用 PCR 技术进行扩增应该会得到预期的产物。但实际上, 当病原含量太低时, 特别是应用 PCR 技术进行病原检测时, 微量 (低于 pg 数量级) 的模板以常规 PCR 有可能检测不出来, 本试验对通过汁液摩擦接种 1 个月左右的长春花以及嫁接后 40 d 左右的 5 个品种的 32 个黄龙病材料运用常规 PCR 进行检测时, 均未检测出病原 DNA, 而随后运用 Nested-PCR 进行了进一步检测, 结果均扩出了特异性目的片段, 这说明并非只要有病原存在就能用常规 PCR 检测。试验中对从 0.3 g 叶脉中提取的总 DNA 经浓度调整后进行了梯度稀释, 常规 PCR 仅能检测到稀释 10^{-4} 倍, 相当于 1.0 pg; Nested-PCR 可检测到稀释 10^{-8} , 相当于 0.1 fg, 这表明 Nested-PCR 技术在检测灵敏度上远高于常规 PCR。

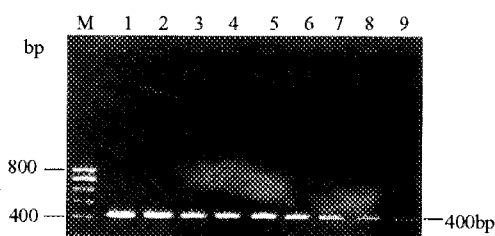


图 7 Nested-PCR 可检测的 DNA 稀释度

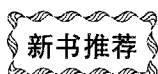
M. DNA Marker; 1. 10^0 ; 2. 10^{-1} ; 3. 10^{-2} ; 4. 10^{-3} ; 5. 10^{-4} ; 6. 10^{-5} ; 7. 10^{-6} ; 8. 10^{-7} ; 9. 10^{-8} .

Fig. 7 Detectible DNA concentration of Nested-PCR

M. DNA Marker; 1. 10^0 ; 2. 10^{-1} ; 3. 10^{-2} ; 4. 10^{-3} ; 5. 10^{-4} ; 6. 10^{-5} ; 7. 10^{-6} ; 8. 10^{-7} ; 9. 10^{-8} .

参考文献:

- 1 Jagoueix S, Bové J M, Garnier M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of a subdivision of the proteobacteria. *J. of Syst. Bacteriol.*, 1994, 44 (3): 379 ~ 386
- 2 Villechanoux S, Garnier M, Renaudin J, et al. Detection of several strains of the bacterium-like organism of citrus greening disease by DNA probes. *Current Microbiology*, 1992, 24: 89 ~ 95
- 3 田亚南, 柯 穗, 柯 冲. 应用多聚酶链式反应 (PCR) 技术检测和定量分析柑橘黄龙病病原. *植物病理学报*, 1996, 26 (3): 243 ~ 250
- 4 李 韬, 柯 冲. 应用 Nested-PCR 检测柑橘木虱及其寄主九里香的柑橘黄龙病带菌率. *植物保护学报*, 2002, 29 (1): 31 ~ 35
- 5 易干军, 霍合强, 蔡长河, 等. 适用于 AFLP 分析用的荔枝 DNA 的提取方法. *华南农业大学学报*, 1999, 20 (3): 123 ~ 124
- 6 孔维文, 邓晓玲, 梁志慧, 等. 柑橘黄龙病病原 DNA 片段的克隆及序列分析. *植物病理学报*, 2000, 30 (1): 71 ~ 75



新书推荐

《分子克隆实验指南》第三版 (英文原版)

该书于 2001 年 1 月由美国冷泉港实验室出版社出版, 三卷本, 大 16 开, 平装, 2100 页, 比 10 年前的第二版增加近 450 页, 内容经过了全面改写与更新, 是当今生命科学领域的重要工具书。各卷目录为:

Volume 1: 1. Plasmids and Their Usefulness in Molecular Cloning; 2. Bacteriophage lambda and Its Vectors; 3. Working with Bacteriophage M13 Vectors; 4. Working with High-capacity Vectors; 5. Gel Electrophoresis of DNA and Pulsed-field Agarose Gel Electrophoresis; 6. Preparation and Analysis of Eukaryotic Genomic DNA; 7. Extraction, Purification, and Analysis of mRNA from Eukaryotic Cells

Volume 2: 8. In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction; 9. Preparation of Radiolabeled DNA and RNA Probes; 10. Working with Synthetic Oligonucleotide Probes; 11. Preparation of cDNA Libraries and Gene Identification; 12. DNA Sequencing; 13. Mutagenesis; 14. Screening Expression Libraries

Volume 3: 15. Expression of Cloned Genes in Escherichia coli; 16. Introducing Cloned Genes into Cultured Mammalian Cells; 17. Analysis of Gene Expression in Cultured Mammalian Cells; 18. Protein Interaction Technologies Appendices

定价: 1300 元 (含邮费)。购书者请通过邮局汇款至《园艺学报》编辑部。

