

DOI: 10.3969/j.issn.2095-3704.2012.03.007

# 江西省大余县柑橘黄龙病菌 PCR 检测

刘登全<sup>1</sup>, 涂怀妹<sup>2</sup>, 李霖<sup>1</sup>, 蒋军喜<sup>1\*</sup>

(1. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西省安义县农业局, 江西 安义 330500)

**摘要:** 采用PCR扩增和核苷酸序列测定技术, 对分别采自江西省大余县青龙镇郭屋坝果园和丰顺果园的各5份疑似柑橘黄龙病样品进行病原检测。结果表明: 2个青龙郭屋坝果园样品中检测到柑橘黄龙病菌, 分别命名为DY-LAS01和DY-LAS02, 其他8份样品中则未检测到该病菌。此结果表明大余县已有柑橘黄龙病发生, 希望引起当地有关部门的高度重视。

**关键词:** 柑橘黄龙病菌; 病原检测; 多聚酶链式反应; 序列测定

中图分类号: S436.661

文献标志码: A

文章编号: 2095-3704 (2012) 03-0261-03

## PCR Detection of Citrus Huanglongbing Pathogen in Dayu County of Jiangxi Province

LIU Deng-quan<sup>1</sup>, TU Huai-mei<sup>2</sup>, LI Lin<sup>1</sup>, JIANG Jun-xi<sup>1\*</sup>

(1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China;

2. Agricultural Bureau of An'yi County, An'yi 330500, China)

**Abstract:** Pathogenic detection of ten suspected citrus huanglongbing (HLB) leaf samples from Qinglongguowuba orchard and Fengshun orchard in Dayu County of Jiangxi Province was performed using PCR and nucleotide sequencing technology. *Candidatus Liberibacter asiaticus* was detected from two samples of Qinglongguowuba orchard, and they were given the name of DY-LAS01 and DY-LAS02, respectively, while *Ca. Liberibacter asiaticus* was not detected from the other eight samples. The results showed that HLB has occurred in Dayu County, which should be paid attention by the local government.

**Key words:** Citrus Huanglongbing; pathogenic detection; PCR; sequencing

柑橘黄龙病(*Citrus Huanglongbing*, HLB)是全球柑橘生产最具毁灭性的病害之一。柑橘发病后, 整株黄化, 长势衰退<sup>[1]</sup>, 轻者影响柑橘产量和品质, 重者则造成树体死亡。已有的研究表明, 柑橘黄龙病菌属于寄生于韧皮部的原核变形菌门韧皮部杆菌属细菌, 该细菌不能进行人工培养, 主要通过柑橘木虱、接穗和苗木传播<sup>[2]</sup>。长期以来, 该病在我国广东、广西、福建及台湾等地发生严重, 江西、浙江、四川、贵州、云南等省亦有部分地区发生<sup>[3]</sup>。

近年来在巴西和美国也相继发现了黄龙病。根据16S rRNA基因及16S / 23S rRNA基因区间的DNA序列差异, 该病原菌可分为3个种, 即亚洲种(*Candidatus Liberibacter asiaticus*)、非洲种(*Ca. Liberibacter africanus*)和美洲种(*Ca. Liberibacter americanus*)<sup>[4-7]</sup>, 我国柑橘黄龙病病原属于亚洲种<sup>[8]</sup>。本试验采用PCR扩增和核苷酸序列测定技术对江西省大余县青龙镇郭屋坝果园和丰顺果园的柑橘黄龙病疑似病株进行检测, 以确证当地是否有黄

收稿日期: 2012-09-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31160358)。

作者简介: 刘登全, 男, 硕士研究生, 研究方向为分子植物病理学, E-mail: liudengqunliu@163.com; \* 通信作者: 蒋军喜, 男, 江西湖口人, 教授, 博士, 主要从事植物病害综合治理研究, E-mail: jxjiang64115@yahoo.com.cn。

龙病发生。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品采集

2012年3月从江西大余县青龙镇郭屋坝果园和丰顺果园的各5株柑橘黄龙病疑似病树上分别采集病叶样品, 样品带回预处理后于-20℃保存备用。实验中以已检测到黄龙病菌的江西省万安县柑橘病叶为阳性对照, 以采自江西农业大学科技园的健康柑橘叶片为阴性对照。

### 1.2 DNA提取

采用CTAB法<sup>[4]</sup>提取样品总DNA。(1)取柑橘病叶中脉剪成小段放入预冷研钵中, 加入液氮快速研磨成粉末;(2)取0.05 g粉末于灭菌离心管中, 加入0.6 mL CTAB抽提缓冲液, 充分振荡, 65℃水浴45 min, 每隔5 min颠倒混匀一次;(3)加入等体积的氯仿: 异戊醇(24:1)混匀, 12 000 rpm离心10 min, 抽提2次;(4)上清液转移至新的灭菌离心管中, 加入等体积异丙醇, 12 000 rpm离心10 min;(5)弃上清液, 加70%乙醇1 mL混匀, 12 000 rpm离心5 min;(6)DNA沉淀用20 μL去离子水溶解, -20℃冰箱保存备用。

### 1.3 引物设计

根据Genbank中柑橘黄龙病菌亚洲种特异性序列设计引物A2/J5<sup>[5]</sup>, 5'端引物(A2)序列为: 5'-TATAAAGGTTGACCTTTCGAGTTT-3', 对应于模板序列的第1~24 nt; 3'端引物(J5)序列为: 5'-ACAAAAGCAGAAATAGCACGAACAA-3', 与模板序列的第679~703 nt反向互补。扩增片段长度预计703 bp, 为部分核糖体蛋白基因。

### 1.4 PCR扩增

PCR反应体系总体积为25 μL, 包括4 μL DNA模板, 12.5 μL 2×Pfu PCR MasterMix, 引物各1 μL (10 μM), 6.5 μL去离子水, 混匀后进行PCR扩增。反应条件为94℃预变性4 min; 94℃变性1 min, 60℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃补平10 min。PCR扩增完成后进行0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.5 目的片段的克隆及序列测定

将扩增得到的大小约700 bp的目的片段进行回收、纯化后, 导入pGEM-T Easy Vector进行重组, 重组质粒转化大肠杆菌DH5α感受态细胞, 经蓝白斑

显色, 筛选阳性克隆, 阳性克隆经PCR和酶切鉴定后提取重组质粒, 送至天根生化科技有限公司测序部(北京)进行测序, 得到的序列经DNAStar软件拼接后递交NCBI数据库进行序列鉴定, 并用DNAStar软件对两个样品的序列进行同源性比较及分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA提取及PCR扩增

采用CTAB法从待测的10个样品及阴性、阳性样品中, 均提取到较高质量的基因组总DNA。以此DNA为模板, 用设计的亚洲黄龙病菌特异性引物A2/J5进行PCR扩增, 结果从阳性对照和青龙镇郭屋坝果园4号和5号两个样品中扩增到符合预期大小(703 bp)的条带, 而从其他8个样品和阴性对照中均未扩增到相应的条带(图1)。

### 2.2 序列测定及同源性分析

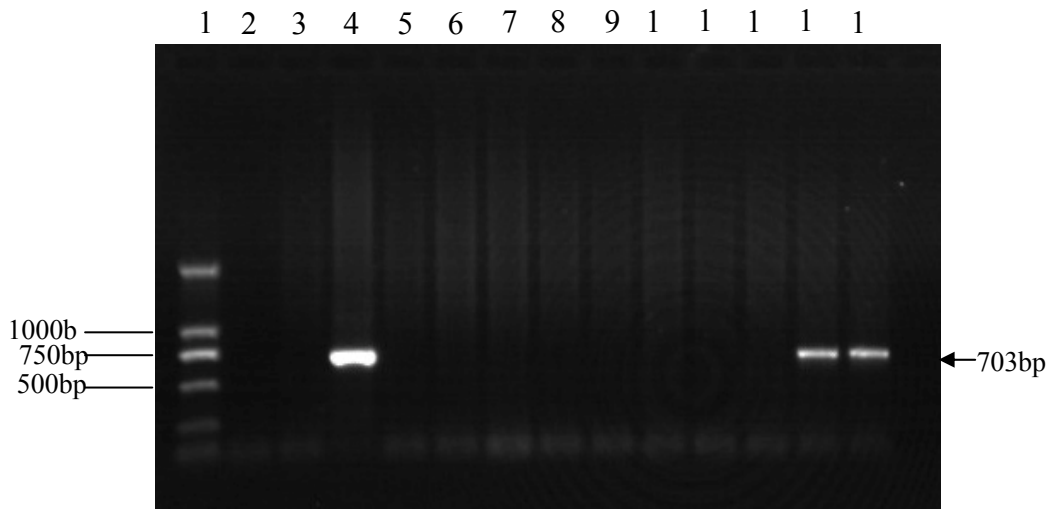
对青龙郭屋坝果园4号和5号样品中的目的片段进行克隆测序, 测序结果经DNAStar拼接得到长度均为703 bp的序列(包含两端引物序列), 经DNAStar比对, DY-LAS01和DY-LAS02两个样品的序列完全相同, 序列已递交GenBank, 登录号分别为JX122406和JX122405。将此序列递交NCBI数据库中进行序列比对, 发现与柑橘黄龙病菌亚洲种对应序列(基因登录号: CP001677)的同源性均为100%。

## 3 讨论

青龙郭屋坝果园和丰顺果园是江西大余县两个栽培面积均达千亩以上的脐橙园, 近年来, 植株陆续出现黄梢、叶片黄化或斑驳等疑似黄龙病的症状<sup>[8-9]</sup>。为了明确该疑似症状是否确为柑橘黄龙病, 本文从上述两果园各随机采集5份病叶样品, 应用PCR扩增和序列测定技术对其病原进行了检测。根据PCR扩增的特异性条带的大小及100%的核苷酸序列同源性比对结果, 我们认为青龙郭屋坝果园4号和5号样品无疑属于柑橘黄龙病样品。柑橘黄龙病属于国内外检疫对象, 带有毁灭性, 该病在大余县青龙郭屋坝果园的出现, 对该县柑橘产业是一个潜在的威胁, 希望引起当地有关部门高度重视。其他8个样品在本试验中并未检测到柑橘黄龙病菌, 这8个样品在黄龙病症状表现上不如青龙郭屋坝果园4号和5号

样品典型，即便如此，我们还是不能轻易排除它们是否真的不含柑橘黄龙病菌，需要采用更为灵敏的检测方法如巢氏PCR等对其进行进一步确诊。

致谢：江西省植保植检局黄凌洪、宋建辉，大余县蔡德珍、王旭明等同志参加部分工作，特此致谢！



1: DNA ladder; 2: 空白对照; 3: 阴性对照; 4: 阳性对照; 5~9: 丰顺果园1~5号;  
10~12: 青龙郭屋坝果园1~3号; 13~14: 青龙郭屋坝果园4~5号。

图1 PCR产物0.8%的琼脂糖凝胶电泳图

#### 参考文献:

- [1] Villechanoux S, Garnier M, Laigret F, et al. The genome of the non-cultured, bacterial-like organism associated with citrus greening disease contains the nusG rplKAJL gene cluster and the gene for a bacteriophage type DNA polymerase[J]. Current Microbiology, 1993, 26: 161-166.
- [2] 肖运辉, 丁芳, 曾继吾, 等. 黄龙病和衰退病的同步PCR和RT-PCR检测[J]. 果树学, 2006, 23(4): 642-645.
- [3] 邹敏, 周常勇. 柑橘黄龙病病原和检测方法研究进展[J]. 植物保护, 2005, 31(3): 10-14.
- [4] Bove J M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus[J]. Journal of Plant Pathology, 2006, 88(1): 7-37.
- [5] Jagoueix S, Bove J M, Gsrnier M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the proteobacteria[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44(3): 379-386.
- [6] Garnier M, Jagoueix S, Cronje P R, et al. Genomic characterization of a liberibacter present in an ornamental rutaceous tree, *Caloderdrum capense*, in the Western Cape province of South Africa. Proposal of 'Candidatus Liberibacter africanus subsp. Capensis'[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2000, 50: 2119-2125.
- [7] Teixeira D C, Danet J L, Eveillard S, et al Citrus Huanglongbing in Sao Paulo State, Brazil: PCR detection of the 'Candidatus' Liberibacter species associated with the Disease[J]. Molecular and Cellular Probes, 2005, 19: 173-179.
- [8] 廖晓兰, 朱水芳, 赵文军, 等. 柑橘黄龙病病原 16SrDNA 克隆, 测序及实时荧光PCR检测方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(1): 80-85.
- [9] 欧阳冬梅, 蒋军喜, 宋水林, 等. 应用PCR和测序技术诊断吉安和抚州两地区的柑橘黄龙病[J]. 江西农业大学学报, 2009, 31(6): 1035-1038.
- [10] 鹿连明, 胡秀荣, 张利平, 等. 常规和巢式PCR对柑橘黄龙病菌的检测灵敏度比较[J]. 热带作物学报, 2010, 31(6): 1280-1287.