

柑桔微芽嫁接苗黄龙病的早期检测

廖祥六, 刘魁英*, 赵宗芸 (广东海洋大学农学院, 广东湛江524088)

摘要 柑桔微芽嫁接组织培养试管苗采用微量黄龙病病原DNA提取法, 获得的DNA用作PCR检测的模板, 可快速检测柑桔黄龙病病毒。为工厂化生产无病毒苗的选育及病害防治提供早期诊断依据。

关键词 柑桔; 黄龙病; PCR检测

中图分类号 S436.661.1⁺9 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)09-02578-01

Early Detection of Citrus Huanglongbing Pathogen in Shoot-tip Grafting Plant

LIAO Xiangliu et al (College of Agronomy, Guangdong Haiyang University, Zhanjiang, Guangdong 524088)

Abstract Micro extraction of DNA from citrus shoot-tip grafting plant is fit for PCR detection of Huanglongbing, which is a fast and accurate method. The production of free-virus plants can use this technique to detect Huanglongbing pathogen early.

Key words Citrus; Huanglongbing; PCR detection

柑桔黄龙病(Huanglongbing)是世界柑桔生产上的检疫性病害之一,在我国各柑桔产区危害严重^[1]。该病病原为类细菌(BLO),根据病原物对热的敏感性、虫媒和地理分布,分为亚洲种(*L. asiaticum*)和非洲种(*L. africanum*),我国的柑桔黄龙病属于亚洲种^[2]。该病的主要防治方法:一是进行严格的检疫,防止带病苗木的扩散;二是建立无病毒苗木基地,选育无病毒苗木;三是及早铲除病株。但是这些方法都要依赖于有效的检测技术。一些传统的方法如指示植物法、血清法、电子显微镜法等都不能准确地检测出未显症状的带病植株,给病害的防治带来了很大的困难。在选育无病毒苗的过程中,如果能对组织培养的无病毒苗进行早期的黄龙病病原检测,可以降低选育成本,并快速有效地繁育无病毒苗。该试验采用微量DNA提取法提取柑桔组织的黄龙病病原DNA,再进行PCR扩增,检测到带病材料体内含有的黄龙病病原,为工厂化生产柑桔无病毒苗的早期检测提供有效的依据。

1 材料与方 法

1.1 材料 实验在广东海洋大学农学院园艺实验室进行。实验材料:带6、7片真叶的红江橙微茎尖嫁接苗,嫁接苗砧木为柠檬,接穗为田间已感染黄龙病且经过热处理的0.2 mm的微茎尖,采用“倒T”法嫁接^[3];已知感染黄龙病的红江橙;表现有黄龙病症状的红江橙;健康的红桔实生苗。分别切取各料的新鲜叶片,取叶脉分别于-20℃保存。

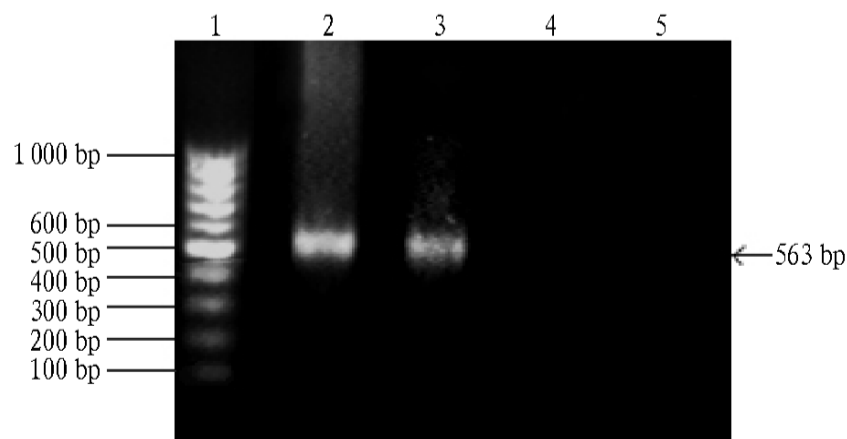
1.2 试剂 CTAB缓冲液:2%(W/V)CTAB,1.4 mmol/L NaCl;20 mmol/L EDTA(pH值8.0),100 mmol/L Tris-HCl(pH值8.0),0.2%β-巯基乙醇,5 mmol/L NaCl;TE缓冲液:0.01 mmol/L Tris-HCl(pH值8.0),0.001 mmol/L EDTA。

1.3 方 法

1.3.1 柑桔黄龙病DNA的提取。参照邹敏等^[4-7]所用微量DNA提取方法,并加以改进:取在低温保存下的实验材料叶片的叶脉各30 ng,切碎放入1.5 ml的离心管中,并加入少许石英沙,置液氮中冷冻10 min,然后用灭过菌的在-20℃中预冷的尖头玻璃棒在小离心管中研磨成细粉,再向管中加入65℃预热的2倍体积的CTAB抽提缓冲液和终浓度为2%的

β-巯基乙醇,充分混匀,55℃水浴1 h,每隔10 min取出上下轻轻颠倒,待小管稍微冷却后加入等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),颠倒混匀,静置10 min,于室温下12 000 r/min离心10 min,取上清液,转入另一小管中,加入5 mmol/L NaCl,再加入-20℃冰冻的0.6倍体积的异丙醇,-20℃放置30 min,4℃、12 000 r/min离心20 min,去上清液,得到的沉淀用70%的酒精冲洗几次,沉淀,然后在室温下快速干燥,最后加入20 μl 1×TE充分溶解,于-20℃保存备用。

1.3.2 PCR扩增反应。引物参照田亚南^[1]用于检测亚洲黄龙病所用的引物,P1:5'-TCTGTTTCTTCGAGGTTGGTGAG-3';P2:5'-ACCGCAAGACTCCTTACCAGGAAG-3'。引物由北京鼎国生物技术有限责任公司合成。PCR反应体系的总体积为25 μl,其中包括0.1 μg的DNA模板2 μl,10×PCR buffer 2.5 μl,浓度为12.8 pmol/L的引物P1、P2各1 μl,5 U μl的Taq DNA聚合酶0.4 μl,2 mmol/L dNTPs 2.5 μl。混合后置于PCR仪(Whatman Biometra T1 Thermocycler)上进行扩增反应,反应程序为:94℃预变性5 min,94℃变性45 s,55℃退火45 s,72℃延伸45 s,共35次循环,72℃延伸10 min,PCR产物于1.0%琼脂糖凝胶上电泳,经溴化乙锭(EB)染色,凝胶成像系统观察拍照。



注:1.分子量;2.阳性对照;3.表现黄龙病症状的材料;4.微茎尖嫁接苗;5.阴性对照。

图1 PCR扩增结果

2 结果与分析

该实验和传统的取田间成年态柑桔组织提取黄龙病病原DNA不同,采用微量DNA提取法提取了组织培养微芽嫁接苗、健康的红桔实生苗(阴性对照)、感染了黄龙病的红江橙(阳性对照)和疑似带有黄龙病的红江橙等材料的病原DNA,并作为PCR检测的对象。结果表明,阳性对照感染黄

作者简介 廖祥六(1979-),男,湖北黄冈人,硕士研究生,研究方向:柑桔提纯复壮。* 通讯作者,教授。

(上接第2578页)

龙病的材料和表现黄龙病症状的材料均扩增出563 bp 的特异性条带(图1),这和田亚南所得的结果一致^[1],而阴性对照和微茎尖嫁接苗都没有条带。

3 讨论

利用柑桔黄龙病亚洲株系In-2.6 设计引物P1 和P2,对试管培养的柑桔微芽嫁接组织材料进行黄龙病病原PCR 检测,同一般的柑桔黄龙病的检测相比,可以更早地在无菌繁殖阶段诊断该苗是否感染了黄龙病,节省了大量的时间和财力,同时微量法提取病原DNA 的操作方法简单快速,所用的试剂便宜,且用量少,在实验室很容易进行。此方法特别适用于工厂化生产无病毒苗的鉴定,植物的快繁。另外采用微量黄龙病病原DNA 提取方法,可以更好更快速地提

取DNA,能够在实验室条件下检测到黄龙病病原,这一方法也可以借用到其他植物病毒的早期检测上。

参考文献

- [1] 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桔黄龙病病原[J].植物病理学报,1996,26(3):243-245.
- [2] 孔维文,邓晓玲,梁志慧,等.柑桔黄龙病病原DNA片段的克隆及序列分析[J].植物病理学报,2000,30(1):71-75.
- [3] 谭祖国,钟丙辉.红江橙热处理——茎尖微芽嫁接脱毒方法的研究[J].湛江师范学院学报,1996,17(2):113-115.
- [4] 邹敏,宋震,唐科志,等.柑橘黄龙病病原DNA微量提取方法比较[J].植物检疫,2005,19(5):17-20.
- [5] 周常勇.一种微量快速提取柑橘衰退病毒(CIV)核酸应用于RT-PCR扩增的方法[J].福建农业大学学报,2001,30(增刊):200.
- [6] SANDRINE JAGUEIX, JOSEPH MARIE BOVE, MONIQUE GARNIER. PCR detection of two candidates liberobacter species associated with greening disease of citrus[J]. Molecular and Cellular Probes, 1996,10:43-50.
- [7] 张健,夏海武,吕柳新,等.柑桔组织培养材料基因组DNA的快速提取[J].福建果树,2006(3):35-36.