

沙田柚黄龙病病原体的电镜观察与 PCR 检测

董高峰 黄涛 李耿光 张兰英 徐信兰

(中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

摘要: 柑桔黄龙病可以侵染沙田柚而产生典型的‘斑驳’症状。我们通过电镜观察表明, 带病沙田柚的病原体在形态、大小和构造上均与柑桔黄龙病病原体(类细菌)相似; PCR 扩增也证明其病原体 DNA 与柑桔黄龙病病原体的 PCR 产物具有很高的同源性。

关键词: 沙田柚; 柑桔黄龙病; 病原体形态; 聚合酶链式反应

中图分类号: S436.661.19

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2003)01-0007-04

Detection of Citrus Yellow Shoot Pathogen in Shatianyou Pommelo by Electron Microscopy and PCR Method

DONG Gao-feng HUANG Tao LI Geng-guang ZHANG Lan-ying XU Xing-lan

(South China Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: Citrus yellow shoot disease (citrus huanglongbing) leaves of *Citrus maxima* cv. Shatianyou collected from pommelo orchard in Meizhou, Guangdong Province, showed typical symptom of leaf mottling. The pathogen which was observed under electron microscopy was similar in morphology and structure to bacteria-like organism of citrus huanglongbing disease. Polymerase chain reaction (PCR) analysis also proved that the DNA of the pathogen was greatly homologous with PCR product from that of citrus huanglongbing pathogen. The result exhibits that the citrus yellow shoot could infect pommelo, which seldom appeared in this fruit.

Key words: ‘Shatianyou’ pommelo (*Citrus maxima* cv. Shatianyou); Citrus huanglongbing; Citrus yellow shoot; Pathogen morphology; Polymerase chain reaction (PCR)

柑桔黄龙病 (Citrus huanglongbing) 是世界柑桔生产上的一种毁灭性病害, 在我国南方柑桔产区尤为严重。本病主要通过嫁接和木虱虫媒传染, 一般认为病原体是一种类细菌 (bacteria-like organism, BLO), 多在寄主筛管细胞和薄壁细胞中分布, 只侵染柑桔属、金桔属和枳属植物^[1-4]。目前, 柑桔黄龙病的检测方法主要包括电镜观察^[5]、荧光诊断法^[6]、血清学检测法^[2]及聚合酶链式反应 (PCR)^[1,7]等。由于电镜观察和荧光诊断法都不够稳定可靠, 因此现在只是作为一种辅助检测方法。血清学检测法虽然以其简捷灵敏的特点成为目前应用最为广泛的一种检测方法, 但是它也存在着效价

低、很难检测未显病症材料的 BLO 等优点。聚合酶链式反应 (PCR) 则以其准确、灵敏而且还能检测出未显病症材料的 BLO 等优点逐渐得到应用。邓晓玲、田亚南等曾先后利用 PCR 技术检测出蕉柑、红江橙、芦柑及福桔等多个柑桔品种的黄龙病病原^[1,8]。

沙田柚作为柚类的一个优质品种, 近年来在全国尤其是广东发展很快。1998 年, 全国柚类栽培面积 18.26 hm², 占柑桔总栽培面积的 11.75%, 居柑桔类的第一位, 其中沙田柚的面积占柚类栽培面积的 45.25%, 在广东更占到 60% 以上。随着柚类栽培面积的不断扩大, 各种传染性病原体病害也在逐渐扩展, 以前很少在柚类中发现的黄龙病已在瑄溪蜜柚中鉴定出来^[9]。本文通过电镜观察与 PCR 扩增, 已初步检测出带有黄龙病病原体的沙田柚病株, 从而可为今后选育沙田柚无毒苗木及病害的防治提供

收稿日期: 2001-12-31 接受日期: 2002-04-05

基金项目: 国家自然科学基金 (39870539); 广东省自然科学基金 (980478); 广东百项创新工程 (99B05902X)。

必要的早期诊断方法。

1 材料和方法

材料 供试的感病材料为表现斑驳症状的沙田柚(*Citrus maxima* (Burm.) Merr. cv. Shatianyou) 病叶, 采自广东省梅州市南口镇柚果园。作为正对照材料的甜橙病叶采自温室内嫁接接种的病苗, 带有典型的黄龙病症状。保持在温室内的健康一年生椪柑实生苗作为负对照材料。

电镜技术 参照柯冲等的方法^[5], 略有改进。取沙田柚病叶与健康叶的叶脉部, 切成 1 mm × 2 mm 小块, 戊二醛、锇酸双固定, 乙醇梯度脱水, Epon 812 包埋。包埋块经超薄切片机 LKB-1 切片, 铅盐和铀盐双染色后, 在 JEM-1010 型透射电镜下观察。

PCR 引物的设计 参照邓晓铃等^[7] 和 Villechanoux 等^[10]报道的方法, 根据柑桔黄龙病病原体的亚洲株系 In-2.6 的 DNA 序列设计 PCR 引物。引物 1 (P₁) 与 In-2.6 的 DNA 序列的 134-153 位核苷酸同源, 碱基序列为: 5' - GCGTTCATGTAG AAGTTGTG-3'。引物 (P₂) 与 In-2.6 的 DNA 序列的 514-533 位核苷酸互补, 碱基序列为: 3' - ATCTC AGTCGGTGGACATCC-5'。DNA 扩增片段大小为 400 bp。

模板 DNA 的提取 采用 CTAB 法从沙田柚病叶中提取和扩增病原体 DNA^[11]。取 0.5 g 病叶叶脉, 剪碎, 加入液氮磨成粉末状; 加入 CTAB 缓冲液混匀, 分装于 Eppendorf 管中; 用苯酚/氯仿/氯仿/异戊醇抽提 2-3 次, 取上清液, 加入 1/10 体积 3 mol/L NaOAc (pH7.0) 及 2 倍体积无水乙醇于 -20℃ 过夜; 于 4℃ 下 16 000 × g 离心 20 min 弃上清液, 分别用 70% 和 95% 的乙醇洗沉淀各 1 次, 用风筒吹干并在室温下放置 5 min 干燥 DNA 沉淀。

PCR 扩增反应 PCR 试剂盒采用广州华美生物工程公司的 PCR Kit 试剂。PCR 反应体系的总体积为 50 μl, 反应体系包括: 10 × PCR 反应缓冲液 5 μl, 2 mol/L dNTP 5 μl, P₁ 和 P₂ 各 1 μl (物质的量为 25 pmol), 模板 DNA 2 μl, 灭菌双蒸水 35 μl, 最后加入 Taq DNA 聚合酶 1 μl (3 U μl⁻¹), 混合后置于 PCR 仪 (PERKINELMER GeneAmp PCR System 2400) 上进行扩增反应。反应条件为: 94℃ 变性 5 min 后, 依 94℃ 变性 1 min → 55℃ 退火 1 min → 72℃ 延伸 1 min (最后一次 10 min) 顺序进行 30 个循环。反应完毕后, 取 PCR 扩增底物 10 μl, 用

1.2 g L⁻¹ 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体 DNA 的正对照各一个, 每项试验均重复 3 次。

2 实验结果

2.1 沙田柚病株症状

我们调查发现, 在广东梅州已有大面积的沙田柚发病, 其中以南田镇最为严重, 发病率达 20% 以上。该病症状以夏秋梢最为明显, 春梢则不明显, 与柑桔黄龙病极其相似。在发病初期部分新梢黄化, 出现“黄梢”, 黄梢最初出现在树冠顶部, 后渐扩散, 经 1-2 年发病; 病叶初期表现花叶症状, 再逐渐发展成典型的斑驳症状(图 1), 在后期大部分脱落; 枝条从上端向下枯死, 最后全株死亡; 病树次年春季提前开花, 花小畸形, 果实萎缩, 果质不佳。



图 1 沙田柚病叶症状 (1-3 为病叶, 4 为健康叶)
Fig. 1 Disease symptom in leaves of 'Shatianyou' pummelo
(1-3, diseased leaves; 4, healthy leaf)

2.2 电镜观察

在透射电镜下观察沙田柚斑驳叶片的切片, 前后 4 次采集的样本均可以观察到类似的病原体。病原体多数呈圆形或椭圆形, 少数呈不规则形, 大小在 50-600 nm × 100-1 000 nm 之间。其外围的单位膜是由三层膜构成的, 内外层的电子密度较浓, 而中间层的电子密度较稀, 厚度约在 20 nm 左右 (图 2A, B)。内部含有似核糖蛋白体质粒及脱氧核糖核酸线粒体的结构(图 2A)。箭头所示病原体正处于二分裂状态(图 2B)。这种病原体在形态、大小及构造上均与以前报道的柑桔和蜜柚的黄龙病病原一类细菌(BLO)基本相同^[5,9]。健康样本的电镜切片均未观察到类似的病原类细菌。

2.3 PCR 检测

我们采用 PCR 技术成功地从感病的沙田柚叶片样本中检测到带有黄龙病病原体 DNA 的 PCR

产物,与作为正对照的已感染柑桔黄龙病的甜橙样本的 DNA PCR 产物具有相同的分子量,均为 400 bp,而作为负对照的健康椪柑实生苗样本均表现阴性反应。上述结果表明:叶片表现典型斑驳症状的沙

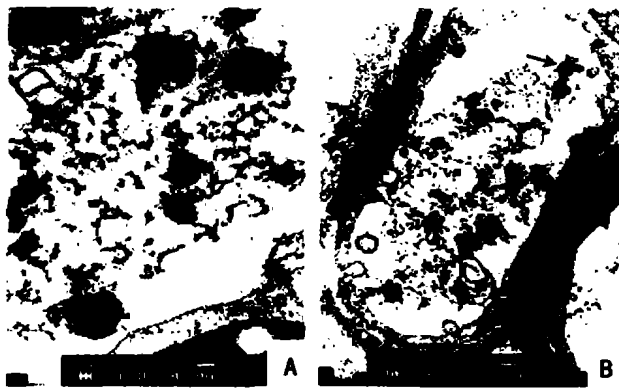


图 2 沙田柚病树叶脉韧皮部薄壁细胞内的病原体

(A: 20 000 倍; B: 10 000 倍, 箭头示病原体处于二分裂状态)

Fig. 2 'Shatianyou' pommelo's pathogen in parenchyma cell of vein phloem of diseased leaf, arrow in B showing binary fission

(A, × 20 000; B, × 10 000)

3 讨论

关于柑桔黄龙病病原体,以前有很多争论,现在一般认为是一种类细菌,以木虱作为传播媒介^[3,5,9]。目前又有人提出该病原是一种细菌,称为韧皮部杆菌(*Liberobacter asiaticum*)^[8,12]。我们根据所观察的沙田柚病原体形态结构,仍将其归为类细菌。

应用 PCR 技术对柑桔黄龙病病原体的 DNA 进行体外扩增,可以准确、有效地检测出黄龙病病原体。由于 PCR 扩增的引物 P₁ 和 P₂ 是根据柑桔黄龙病病原体亚洲株系 In-2.6 的 DNA 序列设计的,对该病原体具有特异性,因此在供检测的样本中,只有感染了柑桔黄龙病病原体的样本才能扩增出特异性的电泳谱带。由此也进一步证明我们检测的沙田柚病株带有柑桔黄龙病病原体。另外,由于通过 PCR 技术可以扩增获得大量的病原体 DNA,因此对于那些已感染了柑桔黄龙病病原体但因量少还未显症状的柑桔样本,仍可以利用 PCR 检测出来,这点是血清法所无法比拟的^[2,8]。

综上所述,电镜观察和 PCR 技术均证明沙田柚的典型‘斑驳’症状是由柑桔黄龙病病原体侵染所导致的,这对于我们今后有计划地开展沙田柚无毒

田柚以及作为正对照的甜橙样本都能检测到黄龙病病原体,而在作为负对照的健康椪柑实生苗样本中则无法检测出黄龙病病原体(图 3)。

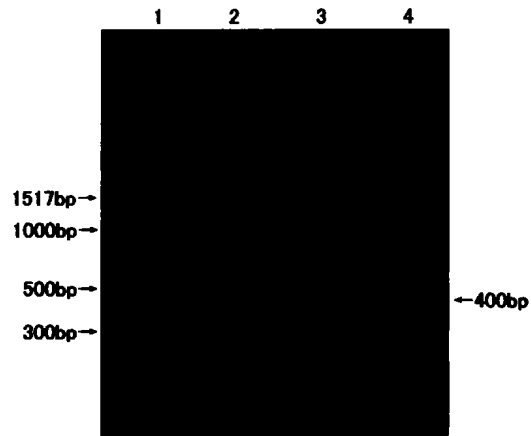


图 3 PCR 检测沙田柚黄龙病病原体

Fig. 3 Detection of huanglongbing pathogen from 'Shatianyou' pommelo by PCR

1. 100 bp DNA ladder 分子量标准物 100 bp DNA ladder marker; 2. 健康椪柑实生苗 Sample from healthy seedling of Ponkon mandarin; 3. 检测沙田柚 'Shatianyou' pommelo sample; 4. 表现典型黄龙病症状的甜橙 Sweet orange sample expressing typical symptom of huanglongbing disease

苗木的选育和病害的早期防治具有重要的意义。此外,电镜观察和 PCR 技术还可以运用到其它果树病原体类病害的早期检测中去,在及时控制病害的蔓延、提高水果的产量和质量方面发挥必要的作用。

致谢 本实验承蒙华南农业大学植物病理室邓晓铃老师帮助做了大量的工作,在此表示衷心感谢。

参考文献

- [1] Tian Y N (田亚南), Ke S (柯穗), Ke C (柯冲). Detection and quantitation of citrus huanglongbing pathogen by polymerase chain reaction [J]. Acta Phytopathol Sin (植物病理学报), 1996, 26(3): 243-250. (in Chinese)
- [2] Li D W (李德望), Tang W W (唐伟文), Fan H Z (范怀忠). Preliminary studies on the methods of rapid serological detection and diagnosis of the BLO associated with citrus shoot-yellowing [J]. J South China Agri Univ (华南农业大学学报), 1992, 13(2): 16-22. (in Chinese)
- [3] Ke S (柯穗), Tang W W (唐伟文), Gao Q W (高乔婉), et al. A preliminary study on purification of the pathogen of citrus yellow shoot and its serology [J]. J South China Agri Univ (华南农业大学学报), 1989, 10(1):1-8. (in Chinese)
- [4] Lu P K (吕佩珂), Pang Z (庞震), Liu W Z (刘文珍). Primary Color Illustration of Diseases and Pests of Fruit Tree in China [M]. Beijing: Huaxia Press, 1993. 156-157. (in Chinese)
- [5] Ke C (柯冲), Lin X Z (林先沾), Chen H (陈辉), et al.

- Preliminary study on the relation between a rickettsia-like organism and a filamentous virus to citrus yellow shoot disease [J]. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 1979, (10): 463-466. (in Chinese)
- [6] Wu S P (吴世盘). Direct fluorescence detection method for diagnosing citrus yellow shoot disease [J]. *J South China Agri Univ (华南农业大学学报)*, 1987, 8(2):45-48. (in Chinese)
- [7] Deng X L, Tang W W. Application of polymerase chain reaction to the detection of citrus huanglongbing pathogen [J]. *J Zhejiang Agri Univ*, 1998, 24(5):557-562.
- [8] Deng X L (邓晓玲), Liang Z H (梁志慧), Tang W W (唐伟文). Studies on the rapid detection of citrus huanglongbing pathogen [J]. *J South China Agri Univ (华南农业大学学报)*, 1999, 20(1): 1-4. (in Chinese)
- [9] Tian Y N (田亚南), Ke S (柯穗), Li D (李韬), et al. Detection of huanglongbing pathogen in Guanximiyou pomelo by electron microscopy and PCR analysis [J]. *Acta Phytopathol Sin (植物病理学报)*, 2000, 30(1):76-81. (in Chinese)
- [10] Villechanoux S, Garnier M, Laigret F. 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 [J]. *Curr Microbiol*, 1993, 26(1):161-166.
- [11] Murry M G, Thomposon W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nuc Acids Res*, 1985, 8(12): 4321-4324.
- [12] Jagoueix S, Bove J M, Garnier M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the subdivision of the proteobacteria [J]. *J Intern Syst Bacteriol*, 1994, 44(2): 379-386.