柑橘黄龙病常规 PCR 检测技术研究与初步应用

梁 亮， 田志清， 胡雪芳， 张志民， 王士奎*

（农业部农产品产后处理重点实验室，农业部规划设计研究院，北京 100121）

摘要 柑橘黄龙病是世界范围具有毁灭性危害的柑橘细菌性病害，在我国大部分柑橘产区发生，严重制约了我国柑橘产业的发展。本文根据黄龙病病原物亚洲韧皮杆菌核糖体 16S rRNA 基因设计了 1 对 PCR 引物 HLBF468/HLBR877，并以此为基础建立了常规 PCR 反应体系，确定了检测体系的特异性和灵敏度。结果表明该体系的检测灵敏度比先前报道的常规 PCR 方法有了明显提高。利用建立的 PCR 体系完成了对广东和广西两省区果园柑橘黄龙病的抽样检测。本研究建立的常规 PCR 方法可以作为一种简便、准确、灵敏的检测技术应用于柑橘黄龙病的早期诊断。

关键词 柑橘黄龙病； 亚洲韧皮杆菌； 常规 PCR； 灵敏度； 早期诊断

中图分类号： S 436.66 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2017071

Detection of citrus Huanglongbing by conventional PCR

LIANG Liang， TIAN Zhiqing， HU Xuefang， ZHANG Zhimin， WANG Shikui

（*Key Laboratory of Agro-Products Postharvest Handling*, *Ministry of Agriculture*, *Chinese Academy of Agricultural Engineering*, *Beijing* 100121, *China*）

Abstract Citrus Huanglongbing (HLB) is a devastating bacterial disease on citrus in the world and seriously restricts the development of citrus industry in our country. Polymerase chain reaction (PCR) approach was established based on a pair of primers, HLBF468/HLBR877, designed from the ribosomal gene sequence of 16S rRNA of *Candidatus* Liberibacter asiaticus, and its sensitivity was obviously higher than that of the previous reported PCR approach. The samples infected by HLB were collected from Guangdong and Guangxi and were tested by this method. The results showed that this method could be applied for early diagnosis of HLB.

Key words citrus Huanglongbing (HLB); *Candidatus* Liberibacter asiaticus; PCR; sensitivity; early diagnosis

柑橘黄龙病(citrus Huanglongbing，HLB)是世界范围具有毁灭性危害的柑橘细菌性病害，在我国大部分柑橘产区发生，并造成巨大损失，严重制约了我国柑橘产业的生存与健康发展[1-2]。柑橘黄龙病的病原物已于 1994 年被确定为韧皮部杆菌属类细菌“*Candidatus* Liberibacter spp.”，是一种限于筛管组织内寄生的革兰氏阴性细菌。根据耐热性和地理分布分为三个种：亚洲种 *Candidatus* Liberibacter asiaticus，非洲种 *Candidatus* Liberibacter africanus 和美洲种 *Candidatus* Liberibacter americanus。在我国分布的是亚洲韧皮部杆菌 *Candidatus* Liberibacter asiaticus。柑橘黄龙病的传播与症状表现具有较长的潜伏期(一般为 3 至 8 个月)，这使得该病的防治和早期诊断工作变得十分困难[3-5]，为此，建立成本低廉、操作简便、结果稳定且可靠的快速的柑橘黄龙病早期诊断技术，对于防止柑橘黄龙病进一步扩散传播，减少果农经济损失具有重大意义。

PCR 检测灵敏度和可信度高，可批量进行，除了能对显症的植物组织中的病原进行定性和定量分析外，还能对未显症的植物材料、媒介昆虫中的病原物进行检测，目前已成为植物病虫害诊断的可靠方法之一[4]。近年来，国内外研究人员利用常规 PCR 检测方法开展了对柚、柑、橙、橘等果园主要栽培的

收稿日期： 2017-03-09 **修订日期：** 2017-10-15
基金项目： “十二五”国家科技支撑计划(2013BAB01B03-2)
* 通信作者 E-mail：wosk@sohu.com

芸香科果树品种的柑橘黄龙病诊断工作，一般情况下可以完成对黄龙病的快速准确检测[6-14]。但由于黄龙病病原菌在柑橘植株体内含量较低且分布不均匀，常规 PCR 检测结果会出现假阴性，影响了其在黄龙病早期诊断中应用的可靠性。本研究通过设计筛选黄龙病病原物特异性引物对，优化常规 PCR 体系与反应条件，以提高常规 PCR 检测方法的灵敏度，以期为黄龙病早期诊断提供一种简便可靠的常规 PCR 检测方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

黄龙病阳性样品：采自广东康士生物科技股份有限公司江门市新会果园内具有典型黄龙病斑驳症状的柑橘树叶片。

黄龙病阴性样品：为广州市齐美植物保护有限公司提供的柑橘脱毒苗叶片。

特异性测试对照样品：包括笔者从柑橘叶面分离培养的腐生菌，以及由中国农业大学植物保护学院提供的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌。

空白对照样品：DNase/RNase-Free 去离子水(RT121)，购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计

在 GenBank 数据库中检索亚洲韧皮部杆菌 *Candidatus* Liberibacter asiaticus 及其同属其他菌种序列长度大于 1 000 bp 的 16S rRNA 基因同源序列(GenBank 登录号分别为：DQ432005.1、AB038369.1、AY-919311.1、AJ542545.1、KF926817.1 和 KT273280.1)，对获得的所有基因片段序列用 DNAMAN 软件进行多序列比对，寻找亚洲韧皮部杆菌的保守位点，同时该保守位点又能特异地区分同属其他种类，在该位点人工设计引物，利用 Oligo 7.0 软件对引物进行评估。通过预试验筛选出最佳引物对 HLBF468/HLBR877(HLBF468：5′-GCGATTAAGTTAGAG-GTGA-3′；HLBR877：5′-TACCATCTCTGATAT-CGTCCTATA-3′)，预期扩增片段长度为 433 bp。引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 DNA 提取

柑橘叶片组织：分别称取 0.1 g 柑橘叶中脉及叶柄置于 2.0 mL 的离心管中，使用 Bullet Blender® GOLD24 组织细胞破碎仪进行样品粉碎，然后使用植物基因组 DNA 提取试剂盒[DP305，天根生化科技(北京)有限公司]进行基因组 DNA 提取，具体操作流程参照试剂盒说明书。

菌液：分离培养的柑橘叶面腐生菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌，使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒[DP302，天根生化科技(北京)有限公司]进行基因组 DNA 提取，具体操作流程参照试剂盒说明书。

1.2.3 PCR 扩增和产物测序

使用筛选出的引物对 HLBF468/HLBR877 进行 PCR 扩增，通过不断调整 PCR 反应试剂用量以及退火温度、时间等，最终确定 PCR 反应体系总体积为 30 μL，具体包括：2×*Taq* PCR MasterMix [KT201，天根生化科技(北京)有限公司] 15.0 μL，10 μmol/L 上下游引物各 1.0 μL，ddH_2O 11 μL，模板 2.0 μL。反应条件为 95℃预变性 3 min 后进行 40 次 PCR 循环：95℃变性 30 s，55℃退火延伸 30 s，72℃延伸 30 s；最后 72℃延伸 3 min，PCR 产物保存于 4℃。扩增反应结束后，取 5 μL PCR 扩增产物在 1.0%琼脂糖凝胶(已加入 SYBGreen 荧光染料)上进行电泳检测，在紫外灯下观察结果。将出现条带的 PCR 产物委托上海生工生物工程有限公司纯化并进行双向测序，返回的测序结果进行 BLAST 比对，以确定扩增产物是否为目的基因片段。

1.2.4 引物 HLBF468/HLBR877 的特异性检测

分别以黄龙病阳性样品、黄龙病阴性样品、柑橘叶面腐生菌、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 DNA 为模板，以 DNase/RNase-Free 去离子水为空白对照，利用引物对 HLBF468/HLBR877，按照 1.2.3 的反应体系进行特异性检测。

1.2.5 引物对 HLBF468/HLBR877 的灵敏度检测

使用大量琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒[DP210，天根生化科技(北京)有限公司]回收纯化目的条带，具体操作流程参照说明书。用 NanoDrop® ND-1000 分光光度计检测 DNA 浓度，得到的 DNA 浓度为 11.7 ng/μL，用于后续的灵敏度检测。

将浓度为 11.7 ng/μL 的 DNA 用 DNase/RNase-Free 去离子水按照 10 倍梯度依次稀释为 1.17、0.117、1.17×10^{-2}、1.17×10^{-3}、1.17×10^{-4}、1.17×10^{-5}、1.17×10^{-6}、1.17×10^{-7}、1.17×10^{-8} 和 1.17×10^{-9} ng/μL。以每种稀释液为模板，水为阴性对照，用引物对 HLBF468/HLBR877 分别对不同浓度的模板 DNA 按照 1.2.3 中的反应体系和反应程序

进行 PCR 扩增。

1.2.6 引物对 HLBF468/HLBR877 与 CQULA03F/CQULA03R[15] 的灵敏度对比

胡浩等[15]利用引物对 CQULA03F/CQULA03R 进行黄龙病常规 PCR 检测,该引物对的灵敏度为 4.39×10^{-1} pg/μL,为国内记载的最高灵敏度。将 CQULA03F/CQULA03R 和本研究筛选出的引物对 HLBF468/HLBR877 进行灵敏度检测比较。

按 1.2.2 的方法提取黄龙病阳性柑橘树叶片的基因组 DNA,并将其按 10 倍梯度进行稀释,以各感病叶片组织基因组 DNA 稀释液为模板,分别用引物对 CQULA03F/CQULA03R 按照胡浩等[15]的 PCR 反应体系和本研究的引物对 HLBF468/HLBR877 按照 1.2.3 的 PCR 反应体系进行扩增。

1.2.7 检测体系的应用

2016 年 6 月,在广西恭城陈德全果园选取具有明显黄龙病红鼻子果症状,已确诊感染柑橘黄龙病的 2 株砂糖橘老树作为应用效果检验的阳性样本;在广西恭城新建无黄龙病疫情的金燕子合作社和广东新会果园,分别选取 2 株红心柚树和 1 株柠檬树作为应用效果检验的阴性样本。检测时分别选取 2 株感病砂糖橘树上未表现柑橘黄龙病症状的新生叶和其他 3 株作为阴性样本的果树新生叶提取样本的 DNA,然后应用本研究建立的 PCR 检测方法进行柑橘黄龙病早期诊断,验证本研究建立体系的检测效果。

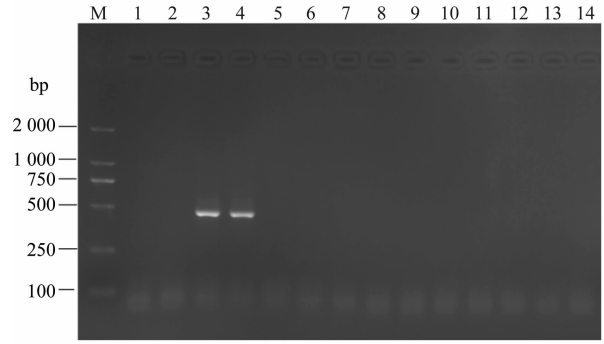
2　结果与分析

2.1　PCR 产物测序与相似性比对结果

委托上海生工生物工程有限公司对预期位置出现特异性条带的 PCR 产物进行纯化和双向测序,反馈回来的测序文件经过 DNAMAN 进行正反向序列拼接后所得序列信息在 NCBI 上进行 BLAST 比对(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov)。比对结果显示扩增片段序列与 GenBank 中登记的亚洲韧皮部杆菌 16S rRNA 基因片段(DQ432005.1、AB038369.1、AY919311.1)信息相似度为 100%,证明扩增出来的基因片段即为预期扩增的目的基因片段。

2.2　引物对 HLBF468/HLBR877 的特异性检测结果

PCR 产物经凝胶电泳检测后黄龙病阳性样品在 433 bp 位置出现特异片段;阴性样品、其他菌种样品和空白对照未出现该特异片段(图 1),表明设计的引物 HLBF468/HLBR877 特异性好。



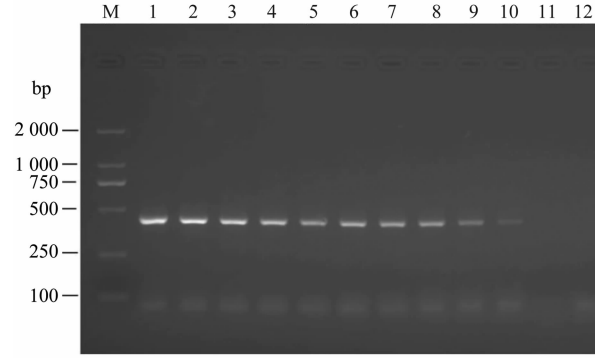
M: D2000 Marker; 1~2: 柑橘脱毒苗; 3~4: 黄龙病阳性柑橘DNA; 5~9: 柑橘腐生菌; 10~11: 大肠杆菌; 12~13: 金黄色葡萄球菌; 14: ddH_2O
M: D2000 Marker; 1-2: Negative control; 3-4: Positive control; 5-9: Saprophytic bacteria of citrus; 10-11: *Escherichia coli*; 12-13: *Staphylococcus aureus*; 14: ddH_2O

图 1　引物对 HLBF468/HLBR877 的特异性检测结果

Fig. 1　Specificity test of primers HLBF468/HLBR877

2.3　引物对 HLBF468/HLBR877 的灵敏度检测结果

灵敏度检测结果表明,本研究确定的 PCR 反应体系可检测出稀释 10^8 倍的 PCR 纯化产物,即目的片段浓度达到 1.17×10^{-7} ng/μL 的情况下,可以检测出黄龙病阳性样品(图 2)。



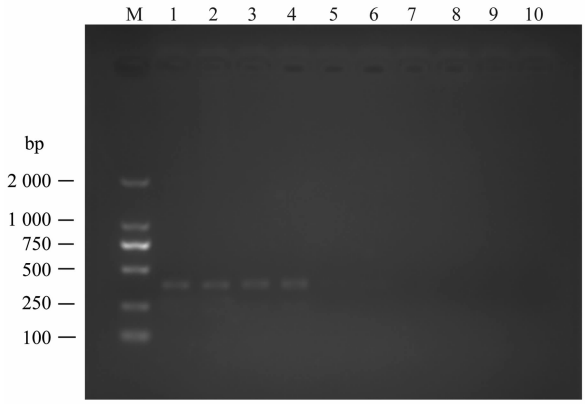
M: D2000 Marker; 1~11: 模板DNA浓度依次为11.7, 1.17, 0.117, 1.17×10^{-2}, 1.17×10^{-3}, 1.17×10^{-4}, 1.17×10^{-5}, 1.17×10^{-6}, 1.17×10^{-7}, 1.17×10^{-8}和1.17×10^{-9} ng/μL; 12: ddH_2O
M: D2000 Marker; 1-11: Template DNA with the concentrations of 11.7, 1.17, 0.117, 1.17×10^{-2}, 1.17×10^{-3}, 1.17×10^{-4}, 1.17×10^{-5}, 1.17×10^{-6}, 1.17×10^{-7}, 1.17×10^{-8} and 1.17×10^{-9} ng/μL, respectively; 12: ddH_2O

图 2　引物对 HLBF468/HLBR877 的灵敏度检测结果

Fig. 2　Sensitivity test of primers HLBF468/HLBR877

2.4　HLBF468/HLBR877 与 CQULA03F/CQULA03R[15] 的灵敏度对比结果

按照胡浩等[15]的 PCR 反应体系和本研究确定的 PCR 反应体系分别进行反应,扩增产物电泳结果见图 3 和图 4。结果显示前者在感病叶片组织基因组 DNA 稀释 10 倍的情况下出现特异性条带;后者可在感病叶片组织基因组 DNA 稀释 1 000 倍的情况下出现特异性条带。



M: D2000 Marker; 1~2: 模板DNA原液; 3~4: 模板DNA的10倍稀释液; 5~6: 模板DNA的10^2倍稀释液; 7~8: 模板DNA的10^3倍稀释液; 9~10: 模板DNA的10^4倍稀释液。下同
M: D2000 Marker; 1-2: DNA original solution; 3-4: DNA with 10-fold dilution; 5-6: DNA with 10^2-fold dilution; 7-8: DNA with 10^3-fold dilution; 9-10: DNA with 10^4-fold dilution. The same below

图 3 引物对 CQULA03F/CQULA03R 的检测结果

Fig. 3 Test of primers CQULA03F/CQULA03R

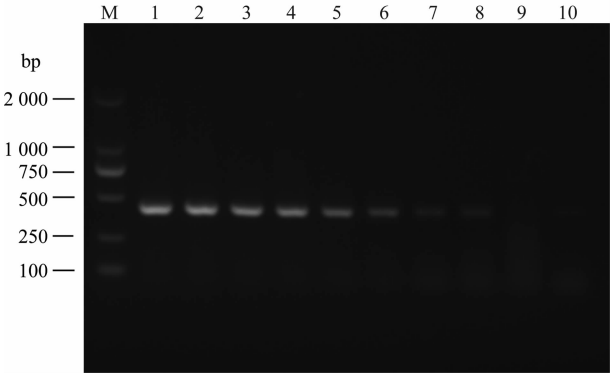


图 4 引物对 HLBF468/HLBR877 的检测结果

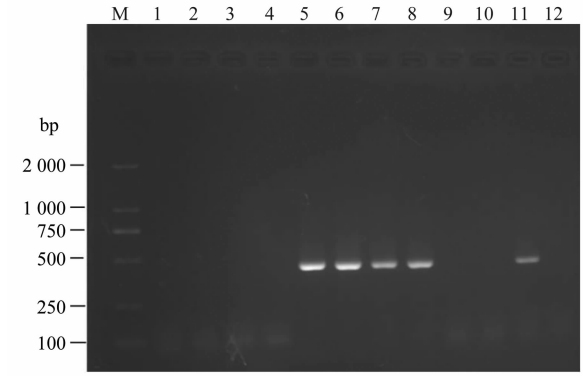
Fig. 4 Test of primers HLBF468/HLBR877

2.5 检测体系应用效果验证结果

应用本研究建立的柑橘黄龙病检测方法对广西恭城、广东新会等地果园的果树进行柑橘黄龙病早期诊断。结果如图 5 所示，检测结果与被测 5 株果树实际情况一致，初步说明本检测方法能够从未表现症状的感染黄龙病的果树的新生叶组织中检测出柑橘黄龙病病原物，从而实现对柑橘黄龙病的早期诊断和监测预警。同时根据我们的检测结果建议当地果园负责人及时对感病树进行防治，防止柑橘黄龙病的传播蔓延，以减少经济损失。

3 结论与讨论

本研究针对我国柑橘黄龙病，通过对病原物亚洲韧皮杆菌特异性引物的设计筛选、常规 PCR 反应体系的优化，结合使用适当的植物基因组 DNA 提取方法，建立了一种能够高效检测柑橘黄龙病菌的常规 PCR 检测技术体系，为柑橘黄龙病的早期诊断提供了一种简便、准确、可靠的检测方法。



M: D2000 Marker; 1~2: 广西恭城金燕子合作社红心柚树1(HLB⁻); 3~4: 广西恭城金燕子合作社红心柚树2(HLB⁻); 5~6: 广西恭城陈德全果园砂糖橘树1(HLB⁺); 7~8: 陈德全家果园砂糖橘树2(HLB⁺); 9~10: 广东新会柠檬树(HLB⁻); 11: 阳性对照; 12: ddH_2O
M: D2000 Marker; 1-2: Guangxi red pomelo No.1(HLB⁻); 3-4: Guangxi red pomelo No.2(HLB⁻); 5-6: Guangxi orange No.1(HLB⁺); 7-8: Guangxi orange No.2(HLB⁺); 9-10: Guangdong lemon(HLB⁻); 11: Positive control; 12: ddH_2O

图 5 果园柑橘黄龙病抽样检测结果

Fig. 5 Detection of HLB from the samples in orchard by PCR

PCR 技术具有操作简单、快速、准确、灵敏的特点，在植物病原微生物的检测鉴定方面已得到广泛应用。但柑橘黄龙病病原菌主要寄生于寄主植物的维管束细胞中，在寄主体内含量较少且分布不均匀，同时无法通过离体培养的方式进行繁殖，使得提取到的病原微生物 DNA 太少，造成 PCR 检测结果出现假阴性。因此，常规 PCR 技术的灵敏度高低决定了该方法检测柑橘黄龙病结果的可靠性，但目前国内多数报道的黄龙病常规 PCR 检测技术缺乏灵敏度的检验[16-18]，本研究设计筛选出的引物对 HLBF468/HLBR877 对我国柑橘黄龙病病原物亚洲韧皮杆菌具有较高的特异性及更高的灵敏度，检测灵敏度比国内文献记载的黄龙病菌常规 PCR 检测方法的灵敏度有了明显的提高。灵敏度的提高将有效避免应用常规 PCR 检测出现假阴性的情况，能够满足黄龙病早期诊断的需要。

虽然黄龙病的巢式 PCR 和实时荧光定量 PCR 检测方法相较于常规 PCR 的灵敏度更高[19-24]，但是巢式 PCR 完成一次检测需要进行两轮 PCR 反应，检测所用时间及成本至少为常规 PCR 方法的 2 倍。而实时荧光定量 PCR 的检测过程涉及一些较高端的仪器设备，检测成本也较高，更适合作为监测黄龙病病原物动态变化的研究方法。我们认为基于基因片段序列差异而设计的种特异性引物的常规 PCR

检测方法,具有简便、快速、准确的特点,只要引物设计合理,扩增片段长度适中,就能获得较好的效果,更适于推广应用。

参考文献

[1] 陈凯男, 李充壁. 柑橘黄龙病研究概况[J]. 浙江农业科学, 2015, 56(7): 1048 - 1050.

[2] 李雪燕, 项宇, 胡文召. 中国柑橘黄龙病发生情况及防治现状[J]. 中国植保导刊, 2011, 31(4): 14 - 16.

[3] COLETTA-FILHO H D, CARLOS E F, ALVES K C S, et al. In planta multiplication and graft transmission of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' revealed by real-time PCR [J]. European Journal of Plant Pathology, 2010, 126(1): 53 - 60.

[4] 许美容, 陈燕玲, 邓晓玲. 柑橘黄龙病症状与"*Candidatus* Liberibacter asiaticus" PCR 检测结果的相关性分析[J]. 植物病理学报, 2016, 46(3): 367 - 373.

[5] 高玉霞,卢占军,钟八莲,等.柑桔黄龙病常规 PCR 检测 4 对引物的特异性和灵敏度[J].中国南方果树,2014,43(1):5 - 8.

[6] 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.

[7] 张利平, 陈国庆, 王海琴, 等. 浙江柑橘黄龙病病原 β-操纵子核糖体蛋白基因的 PCR 检测及其序列比对[J]. 植物保护, 2010, 36(1): 80 - 82.

[8] 王春梅, 张秋明, 王红. 湖南岳阳地区柑橘黄龙病 PCR 检测[J]. 中国农学通报, 2014,30(10): 303 - 306.

[9] 郭丽英,郭雁君,麦丽瑶,等.肇庆、云浮地区砂糖橘黄龙病 PCR 快速检测技术的建立[J].广东农业科学,2014(6):96 - 98.

[10] 杨毅,车海彦, 曹学仁, 等. 海南柑橘黄龙病 PCR 检测分析[J]. 甘肃农业, 2015(24): 50 - 51.

[11] 胡龙娇, 伍建榕, 叶维雁, 等. 云南普文葡萄柚黄龙病病原分子检测及鉴定[J]. 中国南方果树, 2015, 44(2): 14 - 17.

[12] 王红, 张秋明, 王春梅. 湘南地区柑橘黄龙病的 PCR 检测[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(2): 164 - 166.

[13] DO CARMO TEIXEIRA D, 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(3): 173 - 179.

[14] TEIXEIRA D C, LOPES S A, YAMAMOTO P T, et al. PCR detection of the two Liberibacter species associated with citrus huanglongbing in São Paulo State, Brazil [C]//HILF M E, DURAN-VILA N, ROCHA-PEÑA M A. 16th International Organization of Citrus Virologist Conference Proceedings. IOCV, Riverside, CA. 2005: 432 - 438.

[15] 胡浩, 殷幼平, 张利平, 等. 柑桔黄龙病的常规 PCR 及荧光定量 PCR 检测[J]. 中国农业科学, 2006, 39(12): 2491 - 2497.

[16] 孟祥春, 钟云, 刘岩, 等. 柑桔黄龙病 PCR 快速检测技术的建立与应用[J]. 西北植物学报, 2007, 27(7): 1461 - 1463.

[17] 张伟. 柑橘黄龙病 PCR 检测技术研究[J]. 生物灾害科学, 2012, 35(2): 164 - 168.

[18] 王春梅, 张秋明, 王红. 柑橘黄龙病 PCR 检测技术研究[J]. 湖南农业科学, 2013(15): 13 - 15.

[19] LI Wenbin, HARTUNG J S, LEVY L. Quantitative real-time PCR for detection and identification of *Candidatus Liberibacter* species associated with citrus Huanglongbing [J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 66(1): 104 - 115.

[20] KAWAI T, KIKUKAWA K, SASAKI T, et al. Technique for detection of Huanglongbing using nested-PCR [J]. Research Bulletin of the Plant Protection Service (Japan), 2007(43): 27 - 32.

[21] DENG Xiaoling, ZHOU Gen, LI Huaping, et al. Detection of *Candidatus* Liberibacter asiaticus from Wampee (*Clausena lansium* Skeels) by nested PCR [J]. Plant Health Progress, 2007, 10: 1094.

[22] 邓崇岭,陈传武,赵小龙,等.用 Nested-PCR 检测广西黄皮与九里香黄龙病病原[J].中国农学通报,2010,26(17):273 - 276.

[23] 肖远辉, 陈国平, 傅翠娜. 柑橘黄龙病实时荧光 PCR 鉴定技术研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(6): 3339 - 3340.

[24] 黄宏明, 王茜, 徐宁, 等. 广西砂糖橘黄龙病亚洲种的 Nested-PCR 检测[J]. 南方农业学报, 2013, 44(12): 1997 - 2000.

(责任编辑: 杨明丽)