

利用双重 PCR 技术检测柑橘溃疡病菌

陈小帆, 莫瑾, 左静, 王象贤, 王光锋, 彭梓, 钟文英, 朱金国

(湖南出入境检验检疫局, 湖南长沙 410004)

摘要:建立了柑橘溃疡病菌的双重 PCR 检测方法. 根据柑橘溃疡病菌的基因片段 OPM-12 SCAR fragment (AF312370), 设计特异性 PCR 检测引物, 并结合 rpf 基因设计的引物对柑橘溃疡病菌和其近缘菌株、植物原性细菌的 DNA 进行了双重 PCR 检测方法的研究. 该方法特异性强, 菌液浓度检测灵敏度达到 10^2 CFU/mL, 能够满足快速、准确诊断柑橘溃疡病菌的要求.

关键词:双重 PCR; 柑橘溃疡病菌; 检测

中图分类号: Q939.95

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)03-0032-04

Douplx PCR Method for Detecting of the *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*

CHEN Xiao-fan, MO Jin, ZUO Jing, WANG Xiang-xian, WANG Guang-feng,
PENG Zi, ZHONG Wen-ying, ZHU Jin-guo

(Hunan Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Changsha 410004, China)

Abstract: A PCR-DHPLC method was developed for detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. It was established by using one pair of primers unique to OPM-12 SCAR fragment (GeneBank AF312370) and the other pair of primers was reported unique to rpf gene. By using the two pairs of primer, the douplx PCR could be a special method for monitor *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* and could detect 10^2 CFU/mL bacterial cells. The result showed that the douplx PCR method would be a rapid, reliable, sensitive and simple approach method for detecting *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*.

Key words: douplx PCR; *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*; detection

柑橘溃疡病是由柑桔溃疡病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 感染所致的重要检疫性病害, 严重影响柑橘产业安全和柑橘对外贸易^[1], 已被我国国家质检总局列入 2007 年公布的《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》. 该病菌在叶、枝梢及果实的病斑中越冬, 翌年春条件适宜时从病部溢出, 借风雨、昆虫传播, 经寄主的气孔, 皮孔和伤口侵入. 使叶片、嫩梢和果实发病. 我国多数甜橙和柚类产区此病有不同程度发生, 在经济上造成较大损失. 目前还没有一种有效根除该病菌的方法^[2].

柑橘溃疡病通常根据症状进行检疫. 但对于症

状不明显或未显现症状的带菌样品检测比较困难. 目前国内外已有对柑橘溃疡病菌 PCR 和实时荧光 PCR 检测技术的研究^[3-6], 但大多是局限于单一基因区域的扩增检测. 本研究对 GeneBank 中的柑橘溃疡病菌基因信息进行分析, 针对编号为 AF312370.1 的基因 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* OPM-12 SCAR fragment) 设计检测柑橘溃疡病菌的特异性引物, 结合 Coletta-Filho 等^[6] 报道的柑橘溃疡病菌特异性检测引物 Xac, 研究检测柑橘溃疡病菌的双重 PCR 方法. 对柑橘溃疡病菌、柑橘材料中分离菌和近缘种植物源细菌进行双重 PCR 检测方法的研究. 以期建

收稿日期: 2009-07-29

作者简介: 陈小帆 (1956—), 男, 博士; 通信作者: 朱金国 (1965—), 男, 高级工程师, E-mail: zhujg@hnciq.gov.cn

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局课题 (2006IK155); “十一五” 国家科技支撑计划项目 (2006BAD08A16)

立一套更准确和灵敏度高的柑橘溃疡病菌分子检测方法.

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌种 柑橘溃疡病菌分别由重庆大学、湖南农业大学以及中国检验检疫科学研究院赠送. 其他参试菌株为柑橘自然材料中收集以及从菌种保藏中心购买的植物病原菌株. 菌株具体信息见表 1.

表 1 供试菌种及来源

Tab. 1 Reference strains and origins

菌株编号	菌种名称	来源
A1	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	中国检验检疫科学研究院
A2	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	中国检验检疫科学研究院
A3	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	重庆大学
A4	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	重庆大学
A5	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	湖南农业大学
CK1	<i>Burkholderia gladioli</i>	自然界柑橘叶片中分离
CK2	<i>Xanthomonas</i> sp.	自然界柑橘叶片中分离
CK3	<i>Pseudomonas</i> sp.	自然界柑橘叶片中分离
CK4	<i>Pantoea</i> sp.	自然界柑橘叶片中分离
CK5	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	NCPPB 1431
CK6	<i>Burkholderia cepacia</i>	CGMCC 1. 1813
CK7	<i>Pseudomonas avenae</i> pv. <i>panici</i>	CGMCC 1. 1726
CK8	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i>	CGMCC1. 1781
CK9	<i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>holcicola</i>	CGMCC1. 1530
CK10	<i>Pantoea agglomerans</i>	NCPPB 2274
CK11	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	NCPPB 2446
CK12	<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i>	NCPPB 1632
CK13	<i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i>	NCPPB 4207
CK14	<i>Pantoea stewartii</i> subsp. <i>stewartii</i>	ATCC 29227
CK15	<i>Erwin in herbicola</i>	NCPPB 1269
CK16	<i>Erwinia amylovory</i>	ATCC 15580
CK17	<i>Xanthomonas populi</i>	NCPPB 2987
CK18	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	ATCC 14456

1.1.2 仪器及试剂 PCR 扩增仪 (Biometra)、凝胶成像系统 (GE). *Taq* 酶购自 MBI 公司, Marker 购自北京天根生物技术公司.

1.2 方 法

1.2.1 菌悬液制备 划线接种法接种柑橘溃疡病菌于营养琼脂平板上, $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 培养 24 h 后, 挑取营养琼脂平板上菌落至 LB 培养基, 置于 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、180 r/min 条件下振荡培养 16 h, 用系列稀释法测定振荡培养的菌液浓度. 取振荡培养菌液 1 mL, 8 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体. 菌体用 1.5 mL 0.01 mol/L 的 PBS 缓冲液 (pH 7.4) 溶解, 再次离心, 洗涤 3 次, 最后用 1 mL PBS 缓冲液溶解. 所得菌

液 96°C 处理 5 min 后, -20°C 保存备用.

1.2.2 细菌基因组 DNA 的提取 按照《分子克隆实验指南》中细菌基因组提取方法, 提取细菌基因组 DNA^[7].

1.2.3 引物设计与合成 对国内外所报道的多对柑橘溃疡病检测的 PCR 引物进行检测筛选和比对分析, 发现一些报道的引物能将部分黄单孢菌属菌如水稻细菌性条斑病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* 等扩增出明显的大小一致的片段. 通过多次比对筛选, 发现 Coletta-Filho 等^[6] 报道的针对 *rpf* 基因设计的引物与该试验设计引物间无干扰, 扩增的特异性较好, 其引物序列如下:

Xac01: 5' - CGCCATCCCCACCACCACCACGAC - 3';

Xac02: 5' - AACCGCTCAATGCCATCCACTTCA - 3'.

扩增产物片段大小为 582 bp.

分析以上引物的扩增特性, 再设计并筛选与之匹配的另 1 对引物. 根据 NCBI 报道的柑橘溃疡病菌 OPM-12 SCAR (GeneBank AF312370) 片段, 设计 PCR 扩增引物, 通过筛选后得到以下引物与 Xac 引物间无干扰, 特异性强, 其序列如下:

gjky05 - F: 5' - ACGCTCGATCTGCACCTATT - 3';

gjky05 - R: 5' - CCAACGAGTCTCAAGCATCA - 3'.

扩增产物预期片段大小为 236 bp. 引物委托上海生工生物工程技术服务公司合成.

1.2.4 双重 PCR 扩增检测 采用 2 对引物共同扩增供试菌株 DNA, 扩增条件如下:

PCR 扩增体系: 10 × PCR Buffer 2.5 μL, DNTPs (10 mmol/L) 0.625 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL, 10 μmol/L 正反向引物各 1.0 μL, *Taq* DNA Polymerase (2 U/μL) 1.0 μL, 1 ~ 10 ng/μL DNA 模板 5 μL, 以双蒸水补足至 25 μL.

PCR 反应条件: 96°C 5 min; 96°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 循环反应 30 次; 72°C 5 min.

PCR 产物电泳鉴定: PCR 产物在 15 g/L 琼脂糖凝胶上进行电泳分析, 电泳电压为 120 V, 并以 DNA Marker 做分子标记, 凝胶成像仪进行分析并拍照.

1.2.5 PCR 检测的特异性 将供试的阳性菌株和参照菌株应用设计的引物和反应条件进行双重 PCR 扩增, 采用凝胶电泳方法检测扩增得到的 PCR 产物.

1.2.6 PCR 产物测序 双重 PCR 中的单一引物分别 PCR 扩增 5 株柑橘溃疡病菌, 电泳并从凝胶中回收 PCR 电泳产物并纯化, 送往上海生工生物工程有限公司测序.

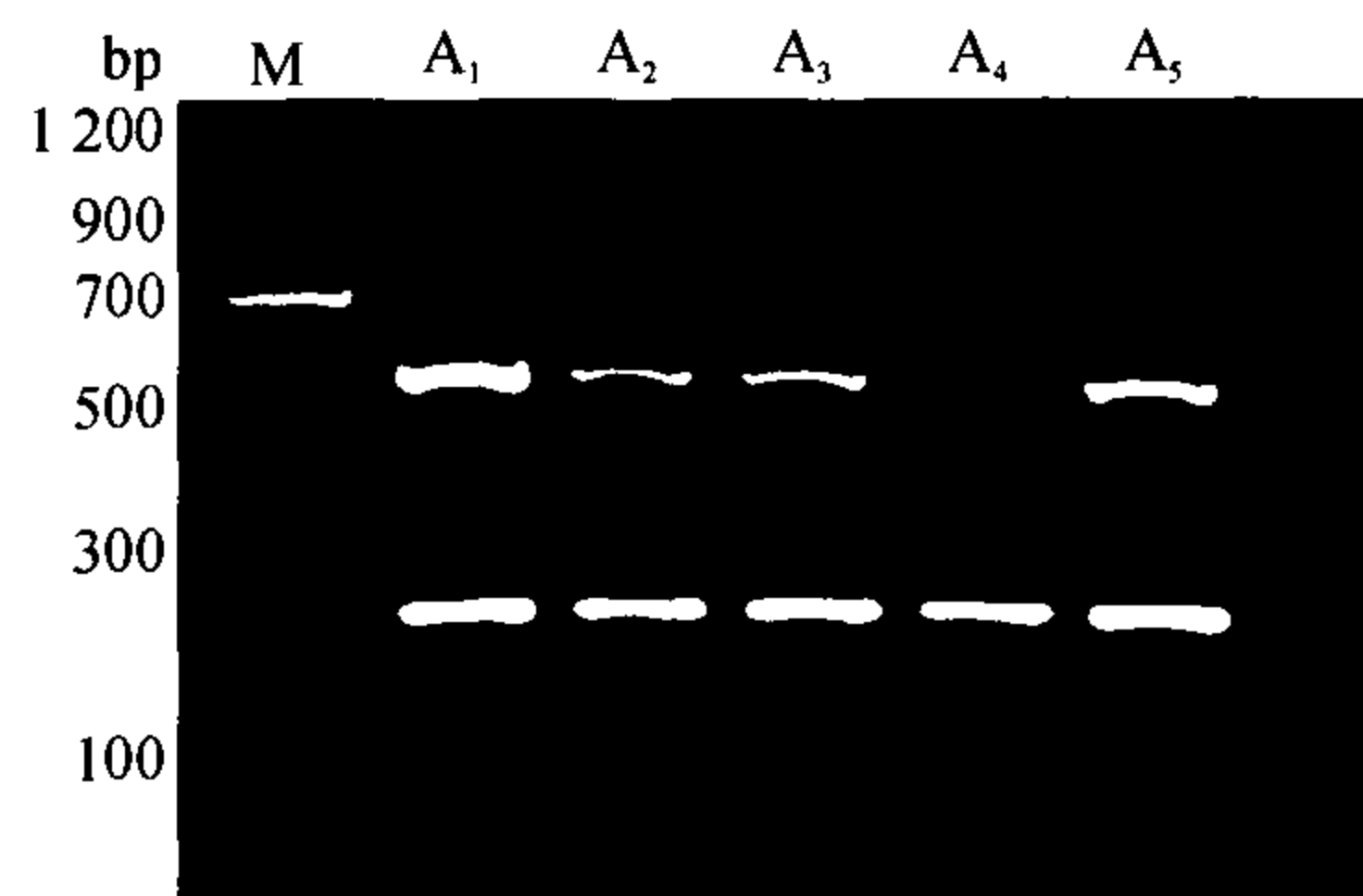
1.2.7 PCR 检测的灵敏度 接种柑橘溃疡病菌于 100 mL 的 LB 液体培养基中, (28 ± 1) °C 震荡培养 16 h 后, 平板计数法对菌液浓度进行测定, 并将菌液稀释成 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 、 2×10^1 CFU/mL 7 个浓度. 参照 1.2.2 方法提取 DNA, 采用双重 PCR 程序进行灵敏度检测.

1.2.8 对柑橘样本中柑橘溃疡病菌的检测 对采集的 45 个柑橘叶片材料进行双重 PCR 柑橘溃疡病菌的检测. 阳性材料的制备: 将制备的阳性菌液喷洒在检疫温室栽种的健康柑橘植株叶片两面, 风干制备成未显症状的阳性材料 12 个; 采集自四川和湖南长沙、石门等地的带病斑叶片 7 个; 检疫温室栽种的健康柑橘材料 26 个. 用 6 mm 打孔器在叶片上分别打取小孔共 45 片, 有病斑材料的打取病斑部分, 分别加入 1 mL 双蒸水振荡洗涤, 取洗涤液 8 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 取沉淀参照 1.2.2 中方法提取细菌 DNA, 进行双重 PCR.

2 结果

2.1 双重 PCR 检测引物的特异性分析

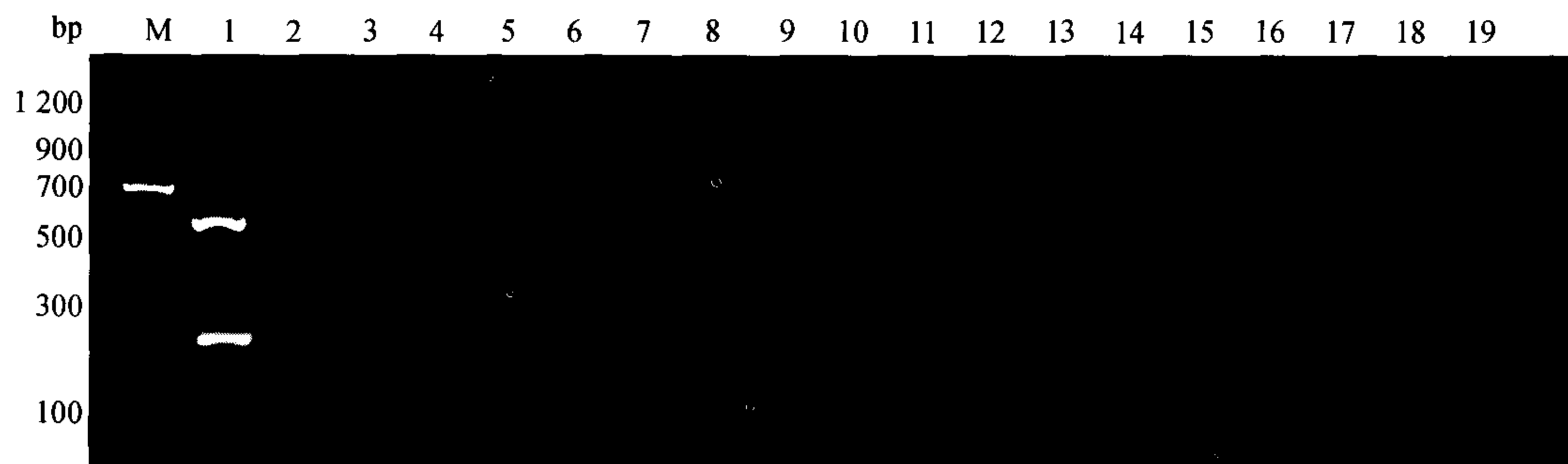
对参试菌株进行双重 PCR 扩增的特异性检测, 结果阳性菌株柑橘溃疡病菌扩增得到了 2 条片段大小分别为 582 bp 和 236 bp 的 PCR 条带(图 1), 其他 18 株参试菌未扩增出阳性产物(图 2).



M: DNA Marker; A₁ ~ A₅: 参试菌株.

图 1 双重 PCR 扩增 5 株柑橘溃疡病菌

Fig. 1 Douplx PCR of 5 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*



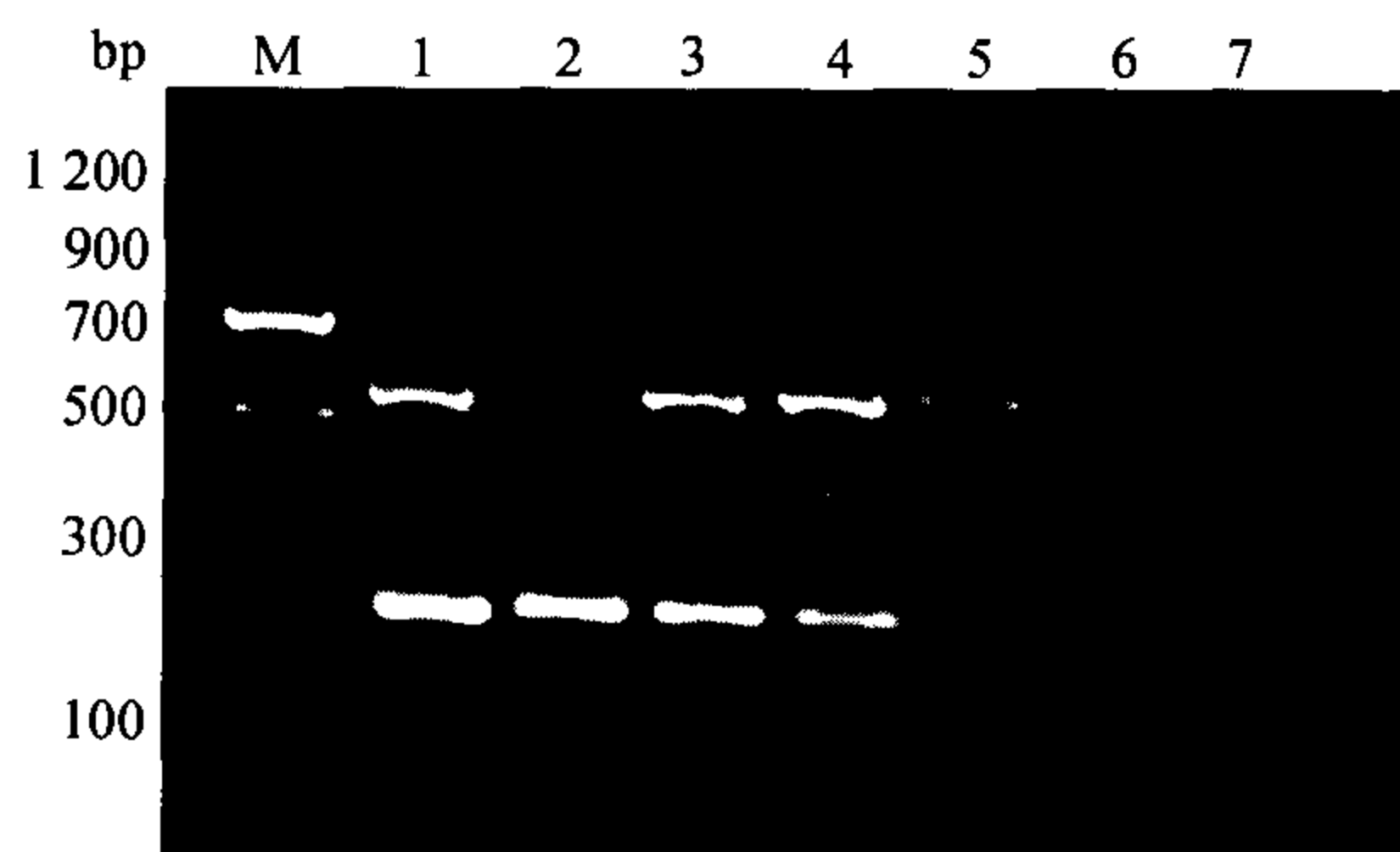
1: A1 菌株; 2 ~ 19: CK1 ~ CK18; M: DNA Marker.

图 2 双重 PCR 扩增特异性检测

Fig. 2 Specificity of douplx PCR

2.2 双重 PCR 灵敏度测试

从图 3 结果可见, 在 2×10^2 CFU/mL 菌液浓度下, 2 对引物均能扩增出明显的条带, 表明所采用的双重 PCR 检测方法能从含柑橘溃疡病菌 2×10^2 CFU/mL 液体中检测出阳性结果.



1 ~ 7 分别代表菌液浓度为 2×10^7 、 2×10^6 、 2×10^5 、 2×10^4 、 2×10^3 、 2×10^2 和 2×10^1 CFU/mL, M: DNA Marker.

图 3 双重 PCR 检测灵敏度

Fig. 3 Sensitivity of douplx PCR

2.3 PCR 产物鉴定

将柑橘溃疡病菌各对引物扩增产物的测序结果与 GeneBank 中的序列用 BLAST 软件进行相似性分析. 结果表明, 所得片段为柑橘溃疡病菌特异性扩增片段.

2.4 对柑橘样本中柑橘溃疡病菌的检测

采用双重 PCR 方法对柑橘样本提取的总 DNA 进行 PCR 扩增检测. 结果(表 2)表明, 检测结果: 采自四川及湖南长沙、石门等地的带病斑柑橘材料和接种了阳性菌未显症状的柑橘叶片均检测出柑橘溃

表 2 柑橘叶片中柑橘溃疡病菌检测结果

Tab. 2 Results of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* on leaf

样本	数量/片	阳性/片	阴性/片
自然显症叶	7	7	0
未显症阳性叶	12	12	0
健康叶	26	0	26

溃疡病菌;健康柑橘叶片检测结果均为阴性. 试验证明该方法适合用于检测柑橘材料中的柑橘溃疡病菌.

3 结论

柑橘溃疡病菌与其他黄单孢菌及有关亚种、变种和近源种不但生物性状相似程度高,且保守区序列也具有较高的相似性,因此单一的 PCR 检测可能会导致假阳性或检测特异性差等情况. 通过双重 PCR 检测可更大程度上加强对柑橘溃疡病菌检测特异性的控制,能有效地避免假阳性的产生. 本研究针对柑橘溃疡病菌 AF312370.1 特异性基因片段设计和筛选引物,将设计的引物输入 GeneBank 数据库中进行比较,并通过了试验证明,从而得到特异性较强的引物,同时采用了 Coletta-Filho 等^[6]报道的柑橘溃疡病菌特异性检测引物 Xac01 和 Xac02 进行柑橘溃疡病菌的分子检测.

目前针对柑橘溃疡病菌的分子检测多是利用单一引物 PCR 和实时荧光 PCR 等方法,实时荧光 PCR 方法具有密闭反应体系,能控制污染和实行探针杂交,但其荧光探针标记成本较高,不易长期保存. 柑橘溃疡病双重 PCR 检测鲜见报道. 本试验中通过对多对设计引物和报道引物配对筛选后,得到 2 对相互无干扰的引物,用于对柑橘溃疡病菌进行双重 PCR 检测方法的研究. 通过对阳性菌和阴性参考菌株进行反复试验,结果只有柑橘溃疡病菌产生 2 条清晰阳性条带,其他菌株均未出现扩增条带,证明这 2 对检测引物特异性强,其检测灵敏度达到病菌浓度 2×10^2 CFU/mL. 健康组织材料和感病组织中的柑橘溃疡病菌检测结果也证明该方法准确性好.

双重 PCR 技术可针对 2 个不同区域的 DNA 序列进行检测,大大提高 DNA 分子检测的准确度. 在双重 PCR 试验中,避免引物间的干扰是需要解决的关键问题,必需保证引物之间不形成引物二聚体,其检测体系必须同时适应于 2 对引物的反应条件,引物与目标模板区域具有高度特异性. 2 对引物间若相互干扰,会导致假阴性或假阳性结果. 本文设计选定的 2 对引物及反应体系能成功地实现柑橘溃疡病菌双基因区域的扩增检测. 在实际检测中,需注意和解决好 PCR 检测中常出现的实验室污染问题,发挥其

在技术上快速准确的优势.

柑橘溃疡病是柑橘类作物的重要病害,一直受到多个国家的关注,建立该病的非疫生产区域也是多个国家对进口产品的要求. 对柑橘种苗和种植地的病害监测对于防止该病害的传播及危害起关键作用. 本研究所建立的双重 PCR 鉴定柑橘溃疡病菌方法,特异性强、准确性高更大程度上避免了检测过程中假阳性结果的产生,为柑橘材料的进出口管理和国内柑橘产区的监测管理提供了一套快速、准确、灵敏度高的检测方法.

致谢:感谢重庆大学王中康教授、湖南农业大学高必达教授和中国检验检疫科学研究院赵文军博士提供柑橘溃疡病菌阳性菌株!

参考文献:

- [1] 唐科志,周常勇,王雪峰,等. 应用 PCR 技术快速检测柑桔溃疡病的研究[J]. 中国南方果树,2005,34(2):1-4.
- [2] 胡春华,邓子牛. 柑橘溃疡病致病基因 *pthA* 的克隆及序列分析[J]. 湖南农业大学学报,2008,34(2):173-176.
- [3] DONG S P, HYUNB J W, PARKA Y J. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences[J]. Microbiological Research, 2006 (161):145-149.
- [4] 王中康,孙宪昫,夏玉先,等. 柑橘溃疡病菌 PCR 快速检验检疫技术研究[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2004,34(1):14-20.
- [5] 殷幼平,黄冠军,赵云,等. 柑橘溃疡病菌实时荧光定量 PCR 检测与应用[J]. 植物保护学报,2007,34(6):607-613.
- [6] COLETTA-FILHO H D, TAKITAL M A, DE SOUZA A A. Primers based on the *rpf* gene region provide improved detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in naturally and artificially infected citrus plants[J]. The Society for Applied Microbiology, Journal of Applied Microbiology, 2006,100:279-285.
- [7] 萨姆布鲁克 J,拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂,译. 北京:科学出版社,2002:270-300.

【责任编辑 周志红】