

泡桐组培苗丛枝病原体 PCR 检测*

王克日 庞 辉

关键词 泡桐、类菌原体、PCR 检测

泡桐(*Paulownia* spp.)是优良的速生用材树种,在我国总栽植量达 11 亿株。泡桐丛枝病是泡桐最重要的病害,在我国泡桐主栽区,平均发病率约 50%,造成严重的危害^[1],已成为泡桐发展的主要障碍。病原类菌原体严格寄生于寄主植物韧皮部,不能进行体外培养,无法用柯赫氏法则进行检测。多年来,我国一直沿用传统的电镜检测和组织化学检测^[2],这些方法检测灵敏度较低,不能满足植物检疫的要求。血清学方法由于难以获得高纯度的 MLO 抗原,很难制备高效价的抗血清^[3~6]。分子克隆在泡桐丛枝病病原检测方面虽已取得一定进展,但尚不能应用于实践。因此泡桐丛枝病类菌原体的检测成为泡桐丛枝病研究的关键环节。

近年发展起来的 PCR(Polymerase Chain Reaction)技术为病害诊断提供了高灵敏度的检测方法。它是在 DNA 合成聚合酶(Taq 聚合酶)作用下,模拟 DNA 体内复制过程的体外 DNA 扩增技术。理论上,PCR 可以检测到一个 DNA 分子。Hiruki 和 Deng^[9]研究表明,PCR 检测植物类菌原体的灵敏度是用克隆 DNA 探针进行点杂交检测的 100~100 000 倍。本文首次报道用 PCR 扩增 MLO 16 S rDNA 特殊片段检测泡桐丛枝病类菌原体研究结果。

1 材料和方法

1.1 DNA 提取

从田间采取具有泡桐丛枝病典型症状的嫩病枝,通过室内组织培养获得泡桐丛枝病组培苗^[10]。泡桐健康组培苗是经过培养泡桐无病种子,再进行脱毒培养而得^[11]。取病株样本 3 个,健株样本 1 个,每个样本 3~5 g。将各样本在液氮中研磨,加 DNA 提取液 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH8.0,250 mmol·L⁻¹ NaCl,100 mmol·L⁻¹ EDTA)及适量的蛋白酶 K,十二烷基硫酸钠(SDS)和十二烷基肌胺酸钠,在 55 ℃水浴中保温提取 1 h,离心(3 000 g)取上清液加 95%乙醇沉淀 DNA。1 600 g 离心后,用 TE 缓冲液溶解,加入少量的 SDS 及蛋白酶 K,在 37 ℃水浴中保温消解 1 h。然后加 100~200 μL 5 mol·L⁻¹ NaCl 和 10%CTAB,65 ℃保温 10 min。离心取上清液,先用苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)提取,再用氯仿:异戊醇(24:1)提取,然后加入 95%乙醇沉淀。离心后用 100 μL TE 缓冲液溶解,即得较纯的 DNA。

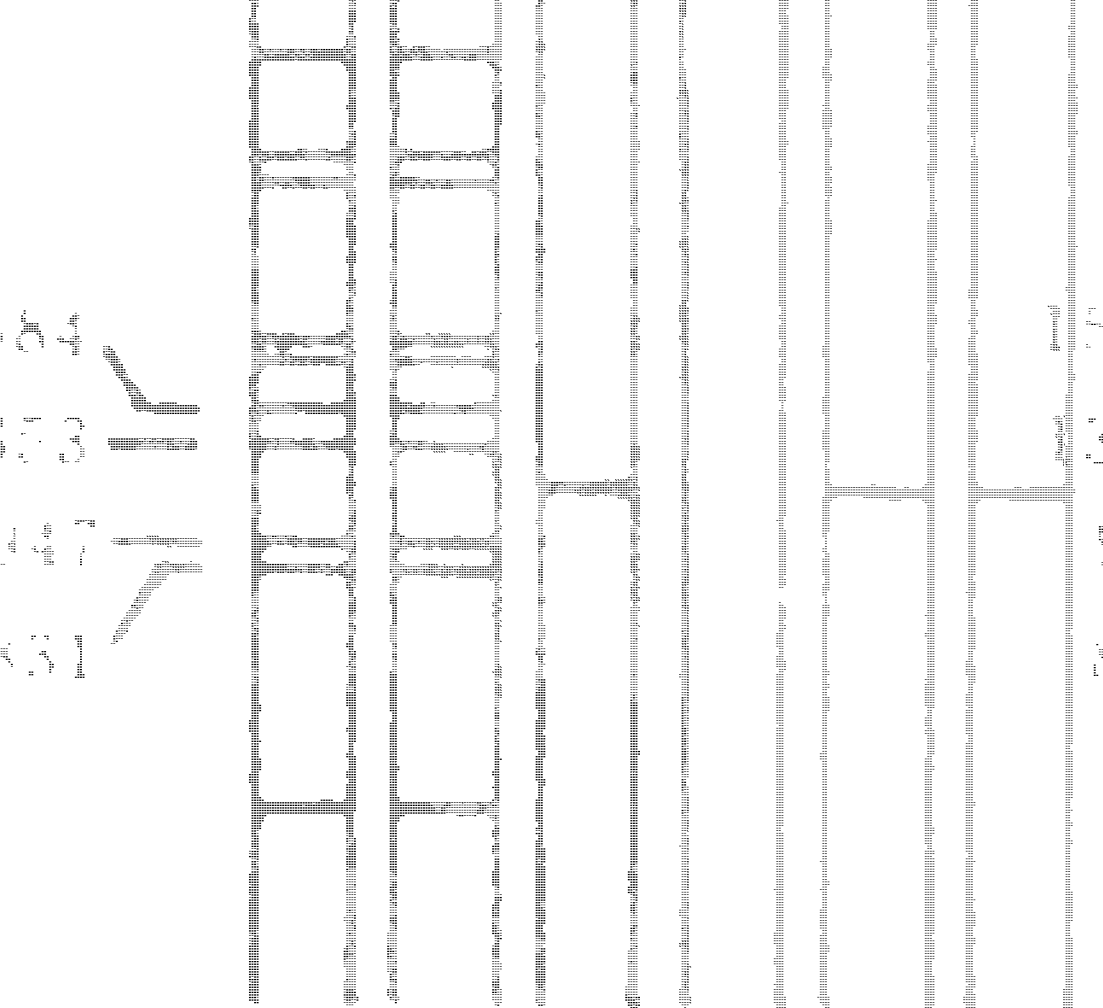
1.2 DNA 浓度测定

将提取的 DNA 稀释 50 倍,用紫外分光光度计分别在 260 nm 和 280 nm 处测定其吸光值,OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 的比值应大于 1.8。

1994—12—05 收稿。

王克日助理研究员,庞辉(林业部泡桐研究开发中心 郑州 450003)。

* 本文为中国林业科学研究院 1995 年科学基金课题和“八五”攻关课题“泡桐丛枝病防治技术研究”中的部分内容。研究工作得到泡桐中心李宗然副研究员和中国林业科学研究院林业研究所生物技术室的大力支持,谨此致谢。



水分析(右为未感染)PCR产物电泳

1. 未感染样本 2. 感染样本 3. 未感染样本 4. 感染样本 5. 未感染样本 6. 感染样本 7. 未感染样本 8. 感染样本



- 8 Sinha R C, Chiykowski L N. Purification and serological detection of mycoplasma-like organisms from plants affected by peach eastern X disease. *Can. J. Plant Pathol.*, 1984, 6(2): 200~205.
- 9 Deng S J, Hiruki C. Genetic relatedness between two nonculturable mycoplasma-like organisms revealed by nucleic acid hybridization and polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 1991, 81(12): 1475~1479.
- 10 王克日. 植物病毒病、类菌原体病害药物防治研究新方法. *河南农业科学*, 1994, (3): 40.
- 11 孙福生, 张锡津, 田国忠. 泡桐丛枝病脱毒组培苗电子显微镜检测. *林业科学研究*, 1993, 6(4): 470~472.
- 12 Deng S J, Hiruki C. Enhanced detection of a plant pathogenic mycoplasma like organisms by polymerase chain reaction. *Proc. Japan Acad.*, 1990, 66B(7): 140~144.
- 13 Lee I-M, Hammond R W, Davis R E, et al. Universal amplification and analysis of pathogen 16S rDNA for classification and identification of mycoplasma-like organisms. *Phytopathology*, 1993, 83(8): 834~842.
- 14 Kirkpatrick B C. Molecular and genetic perspectives. Vol. 3. eds; Kosuge T, Nester E W, In: *Plant-Microbe Interactions*. New York: McGraw-Hill, 1989. 241~293.

Detection of Mycoplasma-like Organism Associated with *Paulownia* Tissue Culture Witches'-Broom by Polymerase Chain Reaction (PCR)

Wang Keri Pang Hui

Abstract The polymerase chain reaction (PCR) was successfully employed to develop a specific assay for plant pathogenic mycoplasma-like organism associated with paulownia witches'-broom (PWB). A 1.2 kb DNA fragment was amplified from DNA extracted from PWB diseased paulownia tissue culture by PCR. No amplified DNA was detected from healthy paulownia sample. A minimum of only 2.5 pg total nucleic acids from PWB MLO-infected paulownia tissue culture were needed to detect PWB MLO when a 1.2 kb DNA fragment was amplified by PCR. Results showed that DNA amplification by PCR was a high sensitive method in detecting PWB MLO.

Key words *Paulownia*, mycoplasma-like organism, polymerase chain reaction detection