

实时荧光定量 PCR 检测柑橘黄龙病田间试验药剂防治效果

唐利华, 郭堂勋, 李其利, 黄穗萍, 莫贱友*

(广西农业科学院植物保护研究所/广西作物病虫害生物学重点实验室, 广西南宁 530007)

摘要 [目的]评价柑橘黄龙病田间试验药剂橘叶青的防控效果。[方法]采用实时荧光定量 PCR 检测喷施橘叶青后的柑橘叶片和果皮中黄龙病病原菌的含量。[结果]喷施橘叶青后的叶片和果皮组织含菌量明显降低, 叶片组织含菌量降低了近 35 倍, 果皮组织含菌量降低了约 7 倍。[结论]防治药剂橘叶青对柑橘黄龙病具有较好的防控效果, 可以有效控制病原菌在柑橘组织中发展。

关键词 实时荧光定量 PCR; 柑橘黄龙病; 田间防控

中图分类号 S436.661 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)24-0128-02

Evaluation on Control Efficacy of the Chemical Agent against Huanglongbing Using Real-time PCR

TANG Li-hua, GUO Tang-xun, LI Qi-li et al (Institute of Plant Protection, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Guangxi Key Laboratory of Biology for Crop Diseases and Insect Pests, Nanning, Guangxi 530007)

Abstract [Objective] To evaluate the control efficacy of chemical agent Juyeqing in field trial. [Method] The copy numbers of *Candidatus Liberibacter asiaticus* (Las) in citrus leaf and fruit peel tissues which were sprayed Juyeqing were detected by using real-time PCR. [Result] The copy numbers of Las in citrus tissues obviously decreased, in leaf tissues with 35-fold decline, and in fruit peel tissues with 7-fold decline. [Conclusion] The chemical agent Juyeqing has good control efficacy against huanglongbing, and could effectively control the development and proliferation of Las in citrus tissues.

Key words Real-time PCR; Citrus huanglongbing; Control efficacy in field

柑橘黄龙病(citrus huanglongbing, HLB)是世界范围内流行的毁灭性柑橘病害^[1-2], 其显著特征是引起柑橘叶片黄化和果实变绿, 即为“青果”或“红鼻子果”, 该病害对东南亚、非洲以及中国、印度、巴西、美国佛罗里达和加利福尼亚等国家(地区)柑橘生产均造成严重的经济损失^[3-5]。柑橘黄龙病的病原菌为局限于韧皮部的革兰氏阴性细菌, 分为亚洲种(*Candidatus Liberibacter asiaticus*, Las)、美洲种(*Ca. americanus*, Lam)和非洲种(*Ca. africanus*, Laf), 亚洲种是我国柑橘黄龙病的主要病原^[6], 在全世界分布最为普遍, 除了非洲地区, 在其他有黄龙病发生的国家均有发现^[7]。目前尚无防治柑橘黄龙病的特效药剂和抗病品种, 防控木虱、挖除病树和种植无病苗木是防控柑橘黄龙病的三大核心措施^[8], 柑橘黄龙病防控药剂筛选研究也一直在进行^[9]。越来越多的研究者通过荧光定量 PCR 技术追踪检测柑橘植株体内黄龙病菌的含量, 以评估防控药剂对柑橘黄龙病的防控效果, 荧光定量 PCR 检测柑橘黄龙病病原的灵敏度是常规 PCR 的 100~1 000 倍, 是巢式 PCR 的 10 倍, 其特异性好、灵敏度高^[10-12]。笔者采用实时荧光定量 PCR 检测柑橘黄龙病田间试验药剂橘叶青的防控效果, 以期进一步促进柑橘黄龙病的田间防控。

1 材料与方法

1.1 材料 田间试验药剂: 橘叶青(美国布朗特公司研制); 柑橘品种: 南丰蜜橘; 检测组织: 南丰蜜橘的叶片和果皮; 检测技术: 实时荧光定量 PCR。

1.2 方法

1.2.1 喷施地点、时间和方法。选取南宁市武鸣区陆斡镇南丰蜜橘为试验对象, 试验面积 1.33 hm², 将橘叶青配制成 30~36 倍液, 以喷雾的方式喷施植株, 第 1 次喷施时间为 2017 年 4 月 28 日, 第 2 次喷施时间为 2017 年 7 月 27 日。

1.2.2 田间取样时间和方法。第 2 次喷施橘叶青 90 d 之后(即 2017 年 11 月 3 日)采集叶片和果实样品。随机选取 5 株不喷施橘叶青的对照植株和 5 株喷施橘叶青的处理植株, 每株树随机采集 1 个叶片组织样品和 1 个果实样品。对照叶片组织检测编号对应为 D₁、D₂、D₃、D₄、D₅; 处理叶片组织检测编号对应为 E₁、E₂、E₃、E₄、E₅; 对照果皮组织检测编号对应为 F₁、F₂、F₃、F₄、F₅; 处理果皮组织检测编号对应为 G₁、G₂、G₃、G₄、G₅。

1.2.3 检测取样方法。取叶片组织中脉 0.1 g, 果皮 0.2 g 用于 DNA 提取, 注意取样时不同样品勿互串污染。标准品: 浓度为 24 ng/μL, 将标准品 10 倍梯度稀释, 分别稀释 10~10⁵ 倍 5 个梯度作为模板和待测样品同批上机检测。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 反应体系(20.0 μL)。Premix Ex Taq(2×, TaKaRa) 10.0 μL、引物 HLBas(10 μmol/L) 0.5 μL、引物 HLBr(10 μmol/L) 0.5 μL、探针 HLBp(10 μmol/L) 0.5 μL、ddH₂O 7.5 μL、模板 1.0 μL。每个样品设置 3 个重复, 加样时避免交叉污染, 阴性对照最后加样。引物和探针设计参考 Li 等^[13]。

1.2.5 实时荧光定量 PCR 反应条件。预变性 95 ℃ 30 s、变性 95 ℃ 5 s、退火/延伸 60 ℃ 30 s, 第 2 步至第 3 步 40 个循环。

2 结果与分析

从叶片组织病原菌含量检测结果看, 每个样品的循环数值(Ct)重复性非常好, 对照、处理的重复样品之间病原菌拷贝数差异较大, 在叶片组织检测结果中对照样品 D₁ 拷贝数

基金项目 广西农业科学院科技发展基金项目(桂农科 2015YT39); 南宁市科学研究与技术开发计划项目(20162323); 南宁市青秀区科学研究与技术开发计划项目(2017040); 广西作物病虫害生物学重点实验室基金项目(17-259-47-ST-3)。

作者简介 唐利华(1986—), 女, 广西全州人, 助理研究员, 硕士, 从事植物病理研究。* 通讯作者, 研究员, 从事植物病理研究。

收稿日期 2018-06-19

为 584 748.55 拷贝/ μL , D_5 拷贝数为 259.26 拷贝/ μL , 相差约 2 254 倍, 处理样品 E_3 拷贝数为 13 149.43 拷贝/ μL , E_2 拷贝数为 193.26 拷贝/ μL , 相差约 67 倍。在果皮组织检测结果中对照样品 F_3 拷贝数为 855 151.54 拷贝/ μL , F_2 拷贝数为 248.82 拷贝/ μL , 相差约 3 435 倍, 处理样品 G_2 拷贝数为 134 856.85 拷贝/ μL , G_1 拷贝数为 105.42 拷贝/ μL , 相差约 1 278 倍。

因样品为田间随机取样, 病原菌的不均匀分布造成叶

片、果皮组织带菌量存在较大差异属于正常现象, 但对照样品带菌量总体比喷施橘叶青后的样品带菌量高, 叶片组织中对对照样品平均拷贝数为 125 882.69 拷贝/ μL , 处理样品平均拷贝数为 3 492.24 拷贝/ μL , 含菌量降低近 35 倍; 果皮组织中对对照样品平均拷贝数为 211 212.88 拷贝/ μL , 橘叶青处理样品平均拷贝数为 27 300.69 拷贝/ μL , 含菌量降低约 7 倍 (表 1、2)。以上结果表明橘叶青对柑橘黄龙病具有一定的抑制作用, 可以有效控制病原菌在柑橘植株中的发生。

表 1 叶片组织病原菌含量检测结果

Table 1 Test results of pathogen content in leaf tissue

处理 Treatment	样品编号 Sample No.	Ct_1 值 Ct_1 value	Ct_2 值 Ct_2 value	Ct_3 值 Ct_3 value	平均 Ct 值 Average Ct value	拷贝数 Copy number 拷贝/ μL	平均拷贝数 Average copy number//拷贝/ μL
对照 Control	D_1	20.50	20.36	20.26	20.37	584 748.55	125 882.69
	D_2	29.08	29.03	29.44	29.18	2 562.38	
	D_3	32.24	33.18	32.71	32.71	291.47	
	D_4	24.74	24.58	24.67	24.66	41 551.82	
	D_5	32.86	32.63	33.21	32.90	259.26	
喷施橘叶青 Spray Juyeqing	E_1	32.11	32.18	32.16	32.15	411.63	3 492.24
	E_2	33.17	33.62	33.34	33.38	193.26	
	E_3	26.30	26.65	26.64	26.53	13 149.43	
	E_4	28.88	29.06	29.12	29.02	2 833.77	
	E_5	31.21	30.86	30.72	30.93	873.14	

表 2 果皮组织病原菌含量检测结果

Table 2 Test results of pathogen content in fruit peel tissue

处理 Treatment	样品编号 Sample No.	Ct_1 值 Ct_1 value	Ct_2 值 Ct_2 value	Ct_3 值 Ct_3 value	平均 Ct 值 Average Ct value	拷贝数 Copy number 拷贝/ μL	平均拷贝数 Average copy number//拷贝/ μL
对照 Control	F_1	22.86	22.82	22.85	22.84	127 579.58	211 212.88
	F_2	33.29	32.61	33.00	32.97	248.82	
	F_3	19.64	19.82	19.81	19.76	855 151.54	
	F_4	26.17	25.85	25.77	25.93	19 033.53	
	F_5	24.25	24.39	24.07	24.24	54 050.95	
喷施橘叶青 Spray Juyeqing	G_1	33.42	35.57	34.09	34.36	105.42	27 300.69
	G_2	22.70	22.71	22.85	22.75	134 856.85	
	G_3	31.76	31.48	31.32	31.52	606.94	
	G_4	31.18	31.34	31.17	31.23	725.73	
	G_5	34.01	33.20	32.55	33.25	208.52	

3 讨论

从整体而言, 防控木虱、挖除病树和种植无病毒木是防控柑橘黄龙病三大核心措施, 可降低整个田间生态中柑橘黄龙病病原含量, 就植株个体而言, 一些防控技术措施可降低植株个体内含菌量, 抑制还未呈明显症状的带毒植株中病原菌的扩展, 目的不一样, 只是针对的范围、环境不同。该试验中荧光定量 PCR 检测结果显示同处理不同样品之间含菌量差异较大, 是因为病原菌在组织中存在分布不均匀的现象, 前人研究证明了这一点。Kawabe 等^[14]通过荧光定量 PCR 比较分析了感黄龙病植株不同样品、不同组织的含菌量差异, 发现柑橘叶柄、叶中脉的病原菌含量较高, 树皮稍低, 而树根最低。刘晓露^[15]从田间感黄龙病沙糖橘植株上采集不同部

位的叶片样品, 利用探针法荧光定量 PCR 技术检测 Las 的浓度, 结果发现在表现黄龙病症状的枝条上, 老叶病原菌浓度最低, 嫩叶稍高, 成熟叶片中的浓度最高。另外, 实时荧光定量 PCR 检测结果表明药剂橘叶青对柑橘黄龙病具有较好的防控效果, 喷施 2 次之后降低了柑橘带菌量, 可以有效控制病原菌在组织内增殖, 因此该药剂可进一步作为田间防控药剂进行试验。

参考文献

- [1] HALBERT S E, MANJUNATH K L. Asian citrus psyllids (Sternorrhyncha: Psyllidae) and greening disease in citrus: A literature review and assessment of risk in Florida[J]. Florida entomologist, 2004, 87(3): 330-353.
- [2] BOVÉ J M. Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus[J]. Journal of plant pathology, 2006, 88: 7-37.

以仪器稳定性即测定值分散性是构成峰面积测量不确定度的主要因素,仪器进样量及仪器示值误差可不必考虑。标准溶液连续测定 10 次,以浓度值的分散性代表峰面积的分散性。

根据公式(2)对表 1 峰面积数据进行计算,得出标准液测定峰面积引入的不确定度 $u(A_s)$ 为 1.12,根据公式(3)得出其相对不确定度 $u_{rel}(A_s)$ 为 0.40%。

2.5.2 样品溶液中被测农药峰面积 A 引入的不确定度。 样品溶液中被测农药峰面积引入的不确定度计算方法同“2.5.1”, $u(A)=0.50$ 、 $u_{rel}(A)=0.52\%$ 。

2.5.3 溶液中被测农药峰面积引入的相对不确定度。 将“2.5.1”和“2.5.2”计算结果导入公式 $u_{rel}(A_c) = \sqrt{u_{rel}^2(A_s) + u_{rel}^2(A)}$,得出相对不确定度为 0.66%。

2.6 合成标准不确定度 将各分量相对不确定度进行合成,即得到测定农药的相对合成标准不确定度(表 3)。计算公式:

$$u_{rel}(\omega) = \sqrt{u_{rel}^2(x) + u_{rel}^2(V) + u_{rel}^2(m) + u_{rel}^2(V_b) + u_{rel}^2(A_c)}$$

$$= 2.06\%$$

2.7 扩展不确定度 按置信概率 $p=95\%$,取 $k=2$,则该供试黄瓜中甲胺磷残留量测定的相对扩展不确定度为: $u_{rel} = k \times u_{rel}(\omega) = 4.12\%$ 。从表 1 可知,该供试样品黄瓜中甲胺磷残留量的最佳估计值为 0.026 1 mg/kg,故其扩展不确定度为 $U_{95} = 0.026 \text{ 1 mg/kg} \times 4.12\% = 0.001 \text{ 1 mg/kg}$ 。

2.8 样品测定结果的表示 经测量分析,供试黄瓜样品中甲胺磷残留量为: $X_{(\text{甲胺磷})} = (0.026 \text{ 1} \pm 0.001 \text{ 1}) \text{ mg/kg} (k=2)$ 。

3 结论与讨论

从试验结果及不确定度分析数据来看,供试样品加标黄瓜中甲胺磷农药残留量测定的测量不确定度主要来源为样品处理中的样品溶液定容体积、标液制备中的 0.1 mL 分度吸量管,其次为重复性测量、提取溶剂总体积及仪器的稳定性,其他因素影响较小。因此,通过选择更高精度的移液、定容器皿,规范操作就可以有效减少不确定度,保证测量结果的准确、可靠。

(上接第 129 页)

- [3] GOTTWALD T R. Current epidemiological understanding of citrus Huanglongbing[J]. Annual review of phytopathology, 2010, 48: 119-139.
- [4] 宋晓兵, 彭埃天, 陈霞, 等. 柑橘黄龙病病原培养及分子检测技术进展[J]. 广东农业科学, 2013, 40(23): 65-69.
- [5] 陈文利, 徐婉, 程保平, 等. 柑橘黄龙病检测及治疗方法的研究进展[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2017(5): 10-17.
- [6] WANG X F, SU H N, HUANG L, et al. Identification of a novel 1033-nucleotide deletion polymorphism in the prophage region of 'Candidatus Liberibacter asiaticus': Potential applications for bacterial epidemiology [J]. Journal of phytopathology, 2015, 163(7/8): 681-685.
- [7] ALBRECHT U, BOWMAN K D. Candidatus Liberibacter asiaticus and Huanglongbing effects on citrus seeds and seedlings[J]. HortScience, 2009, 44(7): 1967-1973.
- [8] 陈仕钦, 卢小林, 陈玉龙, 等. 柑橘黄龙病防控药剂筛选试验初报[J]. 植物保护, 2014, 40(2): 166-170.
- [9] ZHANG M, POWELL C A, GUO Y, et al. A graft-based chemotherapy method for screening effective molecules and rescuing huanglongbing-affected citrus plants[J]. Phytopathology, 2012, 102(6): 567-574.
- [10] WANG Z, YIN Y, HU H, et al. Development and application of molecular-

表 3 相对合成标准不确定度分量

Table 3 Relative synthetic standard uncertainty component

不确定度来源 Source of uncertainty		不确定度分量 Uncertainty component	甲胺磷 Methamidophos %
重复测量 Repeated measurement		$u_{rel}(x)$	0.62
样品处理 Sample processing	提取溶剂总体积	$u_{rel}(V_1)$	0.58
	用于检测的提取溶液体积	$u_{rel}(V_2)$	0.12
	样品溶液定容体积	$u_{rel}(V_3)$	1.20
合成		$u_{rel}(V)$	1.34
		$u_{rel}(m)$	0.23
样品称量 Sample weighing			
标准溶液制备 Preparation of standard solution	0.1 mL 分度吸量管	$u_{rel}(V_{b1})$	1.20
	5.0 mL 分度吸量管	$u_{rel}(V_{b2})$	0.29
	5 mL 容量瓶	$u_{rel}(V_{b3})$	0.23
	10 mL 容量瓶	$u_{rel}(V_{b4})$	0.12
	合成	$u_{rel}(V_b)$	1.26
仪器稳定性 Instrument stability	标准溶液峰面积	$u_{rel}(A_s)$	0.40
	样品溶液峰面积	$u_{rel}(A)$	0.52
	合成	$u_{rel}(A_c)$	0.66
合成标准不确定度 Synthetic standard uncertainty		$u_{rel}(\omega)$	2.06

参考文献

- [1] 叶德培, 赵峰, 施昌彦, 等. 测量不确定度评定与表示: JF 1059.1—2012 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [2] 王斗文, 施昌彦, 曹实, 等. 检测实验室中常用不确定度评定方法与表示: GB/T 27411—2012 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013.
- [3] 刘长武, 刘潇威, 刘凤枝, 等. 蔬菜和水果中有机磷、有机氯、拟除虫菊酯和氨基甲酸酯类农药多残留检测方法: NY/T 761—2004 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2004.
- [4] 罗小玲, 刘长勇, 谢勇, 等. 气相色谱法测定蔬菜中有机磷农药残留量的测量不确定度评定[J]. 石河子大学学报(自然科学版), 2006, 24(6): 736-739.
- [5] 殷朝珍, 翟付凤, 董卫峰. 气相色谱法测定蔬菜中有机磷农药残留量不确定度评定研究[J]. 现代农业科技, 2014(17): 153-155.
- [6] 王媿. 蔬菜与水果农残检测中的质量控制措施[J]. 现代农业科技, 2011(9): 156-157.
- [7] 崔振峰, 魏永强, 韩肖聪, 等. 芹菜中噻嗪酮农药残留检测的不确定度分析[J]. 长春工程学院学报(自然科学版), 2014, 15(2): 122-124.
- [8] 杜书利, 张志清, 谢军燕, 等. 常用玻璃量器检定规程: JJG 196—2006 [S]. 北京: 中国计量出版社, 2007.
- based diagnosis for 'Candidatus Liberibacter asiaticus', the causal pathogen of citrus huanglongbing[J]. Plant pathology, 2006, 55: 630-638.
- [11] MORGAN J K, ZHOU L J, LI W B, et al. Improved real-time PCR detection of 'Candidatus Liberibacter asiaticus' from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes [J]. Molecular and cellular probes, 2012, 26(2): 90-98.
- [12] TEIXEIRA D C, SAILLARD C, COUTURE C, et al. Distribution and quantification of Candidatus Liberibacter americanus, agent of huanglongbing disease of citrus in São Paulo State, Brasil, in leaves of an affected sweet orange tree as determined by PCR [J]. Molecular and cellular probes, 2008, 22(3): 139-150.
- [13] LI W, 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.
- [14] KAWABE K, TRUC N T N, LAN B T N, et al. Quantification of DNA of citrus huanglongbing pathogen in diseased leaves using competitive PCR [J]. Journal of general plant pathology, 2006, 72(6): 355-359.
- [15] 刘晓露. 柑橘黄龙病菌在植株体内含量变化的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2014.