

## 柑橘半穿刺线虫特异性PCR检测方法

Detection of citrus nematode *Tylenchulus semipenetrans* by using specific PCR amplification向超<sup>1</sup> 彭德良<sup>1</sup> 彭焕<sup>1</sup> 刘莹<sup>1</sup> 周涛<sup>2</sup> 黄文坤<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;

2. 湖南省永州市农业科学研究所, 永州 417000)

Xiang Chao<sup>1</sup> Peng Deliang<sup>1</sup> Peng Huan<sup>1</sup> Liu Ying<sup>1</sup> Zhou Tao<sup>2</sup> Huang Wenkun<sup>1\*</sup>

(1. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 2. Institute of Agricultural Sciences of Yongzhou, Yongzhou 417000, Hunan Province, China)

柑橘半穿刺线虫 *Tylenchulus semipenetrans* 侵染柑橘后可导致树势缓慢性衰退,引起柑橘慢衰病,植株表现症状与盐胁迫、缺素等引起的黄化症非常相似,导致农户常采取不当的防治措施而加重经济损失。目前,柑橘半穿刺线虫的分子检测方法较多,但耗时长、灵敏度较差(Song et al., 2017)。为提高该线虫分子生物学检测的特异性和灵敏度,基于其ITS序列设计1对特异性PCR扩增引物,并对其进行特异性和灵敏度检测,以期对柑橘慢衰病的检测、监测及综合治理提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试线虫:2017年3月—2018年5月,在湖南省永州市(15份,编号YZ1~YZ15)、福建省漳州市(6份,编号FJ1~FJ6)、四川省达州市(9份,编号SC1~SC9)果园采集表现黄化和慢衰症状的柑橘、夏橙、沙田柚等果树根际土壤30份,采用浅盘法分离2龄线虫,经形态学鉴定后每份样品分别保存多条柑橘半穿刺线虫于PCR管中。甜菜孢囊线虫 *Heterodera schachtii*、大豆孢囊线虫 *H. glycines*、小麦孢囊线虫 *H. avenae*、南方根结线虫 *Meloidogyne incognita*、咖啡短体线虫 *Pratylenchus coffeae* 的DNA均由本实验室保存并提供。

试剂及仪器:PCR扩增试剂盒、DNA提取试剂,宝日医生物技术(北京)有限公司。ABI Veriti 96孔梯度PCR仪,美国ABI公司。

### 1.2 方法

柑橘半穿刺线虫的ITS扩增:从分离的30份线虫样品中随机取13份,分别采用DNA提取试剂提取其DNA。采用Curran et al.(1994)设计的线虫通用

引物TW81(5'-GTTTCCGTAGGTGAACCTGC-3')和AB28(5'-ATATGCTTAAGTTCAGCGGGT-3')进行ITS区的PCR扩增。25 μL PCR反应体系:10×Ex Taq Buffer 2.5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、10 μmol/L上下游引物各0.3 μL、5 U/μL Ex Taq酶0.3 μL、DNA模板1 μL、ddH<sub>2</sub>O补足25 μL。反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,45℃退火45 s,72℃延伸60 s,35个循环;72℃延伸10 min。PCR产物经连接转化后测序。测序和引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。利用MEGA 7.0对所得序列以邻接法构建系统发育树,自检重复1 000次。

引物特异性检测:根据测序所得序列与已知柑橘半穿刺线虫ITS序列同源性最高的序列设计1对特异性引物Ts1-F(5'-TAATGAGTTCCAGATTCG-3')和Ts1-R(5'-ATACTTTAGTGCTCAGAATA-3'),分别以柑橘半穿刺线虫、甜菜孢囊线虫、大豆孢囊线虫、小麦孢囊线虫、南方根结线虫、咖啡短体线虫的DNA为模板进行PCR扩增,以检测该引物的特异性,目的片段约为190 bp。空白对照以ddH<sub>2</sub>O代替DNA模板。PCR反应体系及程序同上。

引物灵敏度检测:从13份已鉴定为柑橘半穿刺线虫的DNA样品中随机选取1份,逐级稀释至10<sup>5</sup>、10<sup>4</sup>、10<sup>3</sup>、10<sup>2</sup>、10<sup>1</sup> pg/μL,用Ts1-F/Ts1-R引物进行PCR扩增,以检测该引物的灵敏度。空白对照以ddH<sub>2</sub>O代替DNA模板,PCR反应体系及程序同上。

## 2 结果与分析

### 2.1 柑橘半穿刺线虫的ITS扩增结果

将测序所得ITS序列与从GenBank下载的柑橘半穿刺线虫、根结线虫、孢囊线虫、短体线虫ITS序

列进行比对分析,发现13份样品的ITS序列与柑橘半穿刺线虫ITS序列同源性最高,而与孢囊线虫、根结线虫、短体线虫的亲缘关系较远(图1)。

## 2.2 引物特异性检测结果

利用Ts1-F/Ts1-R引物进行PCR扩增,只有柑橘半穿刺线虫能特异性扩增出目的片段,其它5种线虫和空白对照均未扩增产物(图2-A),表明Ts1-F/Ts1-R

引物具有较好的特异性。

## 2.3 引物灵敏度检测结果

利用Ts1-F/Ts1-R引物对不同浓度的柑橘半穿刺线虫DNA进行PCR扩增,DNA浓度为 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$  pg/ $\mu$ L时均能扩增出特异性片段,其余浓度和空白对照均未扩增到目的片段(图2-B),表明Ts1-F/Ts1-R引物的灵敏度为100 pg/ $\mu$ L。

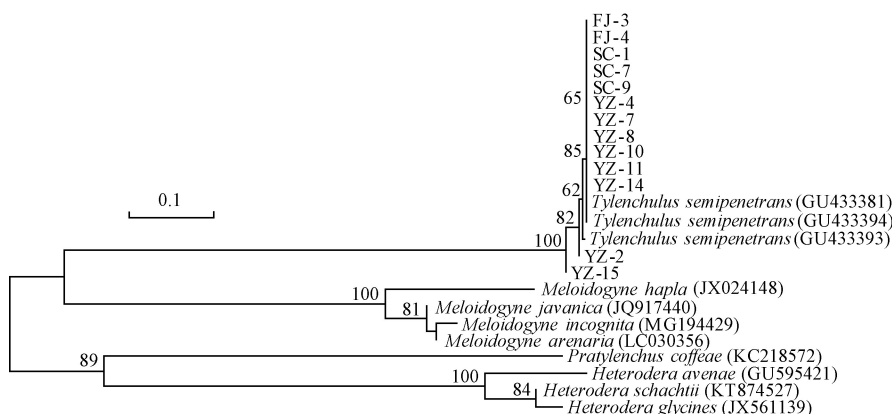


图1 基于ITS序列以邻接法构建柑橘半穿刺线虫及其近源种的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *Tylenchulus semipenetrans* and other nematods based on ITS sequences by using neighbor-joining method

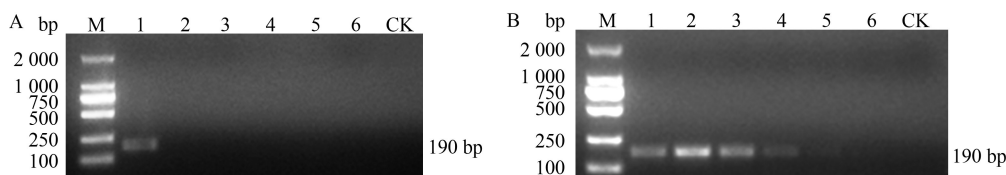


图2 Ts1-F/Ts1-R引物对柑橘半穿刺线虫的PCR特异性和灵敏度检测结果

Fig. 2 The specificity and sensitivity of the primers Ts1-F/Ts1-R for PCR detection of *Tylenchulus semipenetrans*

M: DL2000 marker; A图中1~6: 分别为柑橘半穿刺线虫、甜菜孢囊线虫、大豆孢囊线虫、小麦孢囊线虫、南方根结线虫、咖啡短体线虫的DNA; B图中1~6: DNA模板浓度分别为 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、 $10^1$  pg/ $\mu$ L; CK: 空白对照。M: DL2000 marker; 1~6 in Fig. A: DNA of *T. semipenetrans*, *H. schachtii*, *H. glycines*, *H. avenae*, *M. incognita*, *P. coffeae*; 1~6 in Fig. B: DNA concentrations are  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ ,  $10^1$  pg/ $\mu$ L, respectively; CK: negative control.

## 3 讨论

柑橘半穿刺线虫的雌虫为半内寄生,很难直接从寄主根系中分离或从土壤中分离的混合种群中挑取单条线虫,从而限制了单条线虫快速检测方法的应用。因此有必要开发从混合种群中准确、快速检测出靶标线虫的方法。本研究设计的柑橘半穿刺线虫PCR检测引物Ts1-F/Ts1-R只能从柑橘半穿刺线虫DNA中扩增出目的条带,且灵敏度均比Liu et al. (2011)设计的Ts-SF/Ts-SR引物和Lin et al. (2016)设计的LAMP引物高,且特异性强,可用于柑橘苗木运输、产地检验、果园检测等生产实践中。

## 参 考 文 献 (References)

Curran J, Driver F, Ballard JWO, Milner RJ. 1994. Phylogeny of

*Metarhizium*: analysis of ribosomal DNA sequence data. *Mycological Research*, 98(5): 547-552

Lin BR, Wang HH, Zhuo K, Liao JL. 2016. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Tylenchulus semipenetrans* in soil. *Plant Disease*, 100(5): 877-883

Liu GK, Chen J, Xiao S, Zhang SS, Pan DM. 2011. Development of species-specific PCR primers and sensitive detection of the *Tylenchulus semipenetrans* in China. *Agricultural Sciences in China*, 10(2): 252-258

Song ZQ, Cheng JE, Cheng FX, Zhang DY, Liu Y. 2017. Development and evaluation of loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Tylenchulus semipenetrans* using DNA extracted from soil. *The Plant Pathology Journal*, 33(2): 184-192

(责任编辑:李美娟)