

柑橘黄龙病和衰退病的同步 PCR 和 RT-PCR 检测

肖远辉^{1,2}, 丁芳³, 曾继吾¹, 易干军^{1*}, 张秋明²

(¹ 广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640; ² 湖南农业大学园艺园林学院, 长沙 410128;

³ 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070)

摘要: 柑橘黄龙病(HLB)和衰退病(CTV)是2种危害严重的世界性柑橘病害, 国内外对其病原检测的研究相当多。研究建立了同时检测 HLB 和 CTV 的多重 RT-PCR 体系, 从影响多重 RT-PCR 扩增的引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、*Taq* 酶浓度、dNTPs 浓度、退火温度等方面进行体系优化。结果表明, 多重 PCR 反应的退火温度应优先考虑退火温度高的引物, 退火温度高的引物所需浓度要大于相应退火温度低的引物。该体系实现了 DNA 病原和 RNA 病原的统一检测, 进一步体现了多重 RT-PCR 的优越性。

关键词: 柑橘黄龙病; 柑橘衰退病; RT-PCR

中图分类号: S665.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-9980(2006)04-642-04

Simultaneous detection of *Citrus Huanglongbing* and *Citrus tristeza virus* by multiplex RT-PCR

XIAO Yuan-hui^{1,2}, DING Fang³, ZENG Ji-wu¹, YI Gan-jun^{1*}, ZHANG Qiu-ming²

(¹ Fruit Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou, Guangdong 510640 China; ² College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha, Hunan 410128 China; ³ College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070 China)

Abstract: *Citrus Huanglongbing* (HLB) and *Citrus tristeza virus* (CTV) are two important citrus diseases worldwide. A multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (Mul-RT-PCR) was optimized to simultaneously detect the viruses of HLB and CTV in this article. The reaction of the main ingredients of multiple PCR: Primer, Mg^{2+} , *Taq* DNA Polymerase, dNTPs and annealing temperature was examined and optimized. The result showed that the choice of annealing temperature of Mul-RT-PCR should consider the higher annealing-temperature primer and the density of higher annealing temperature primer should be higher. The Mul-RT-PCR provides a simple and rapid method for detecting DNA pathogen (HLB) and RNA pathogen (CTV) in citrus plants.

Key Words: *Citrus Huanglongbing*(HLB); *Citrus tristeza virus*(CTV); Mul-RT-PCR

柑橘是世界上重要的果树种类之一。全世界有 80 多个国家栽培柑橘, 其产量位居水果之首, 是第 3 大国际贸易农产品, 但柑橘生产却受到条件病害的威胁。柑橘黄龙病(*Citrus Huanglongbing*, HLB)是由类细菌 *Candidatus liberibacter* 引起的一种毁灭性病害, 主要由接穗、苗木和木虱虫媒传播^[1], 根据其热反应、流行区域、虫媒种类及血清反应的不同, 其病原可分为亚洲株系和非洲株系。柑橘黄龙病多发生于亚洲、非洲等国家和地区, 在我国南部及西南部省份, 黄龙病危害甚为严重。日前, 已有通过直接提取 DNA 进行 PCR 检测柑橘黄龙病的报道^[1-4], 但

尚未见通过提取 RNA 运用 RT-PCR 检测柑橘黄龙病的报道。柑橘衰退病(*Citrus tristeza virus*, CTV)又称速衰病, 广泛分布于世界各柑橘产区, 有 50 多个国家和地区有此病发生, 20 多个国家将其列为检疫对象^[5]。柑橘衰退病毒属线形病毒属(*Closterovirus*), 病毒细长弯曲, 粒子大小为 11 nm×2000 nm, 病毒基因组由单链正义的 RNA(ssRNA)含 19296 个核苷酸组成, 是已知植物病毒中基因组最大的病毒^[6]。采用 RT-PCR 检测柑橘衰退病的报道已有不少^[6-7]。

多重 PCR 是一种特殊 PCR 技术, 能同时检测多种病害, 被广泛应用于动植物病害检测^[8-12]。迄今尚

收稿日期: 2005-10-16 接受日期: 2006-05-17

基金项目: 广东省科技重点计划项目(编号: 2003B21601)。

作者简介: 肖远辉, 在读硕士研究生, 主要从事果树病毒分子检测研究。Tel: 020-38765390, E-mail: tou_410@163.com

* 通讯作者。Author for correspondence. Tel: 020-38765869, E-mail: yiganjun@vip.163.com

未见应用多重 RT-PCR 方法检测柑橘黄龙病和柑橘衰退病的报道。本研究采用多重 RT-PCR 同时检测基因组 DNA 型柑橘黄龙病和基因组 RNA 型柑橘衰退病, 以期对柑橘黄龙病和衰退病的检测提供更快速、经济、简便的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

以广东省农业科学院果树研究所防虫隔离网室内嫁接的分别感染黄龙病和衰退病的暗柳橙[*Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] 叶片为材料, 以暗柳橙的实生苗叶片为对照。

1.2 引物来源

根据以发表论文合成 HLB 引物^[4]: (同源引物 23 bp) P₁ 5'-gcgcgtatgca atacgagcgca-3, A (互补引物 22 bp) P₂ 5'-gcctcgagacttcgaacccat-3, 2 引物间长度 1160 bp。CTV 引物^[7]: (同源引物 30 bp) P₃ 5'-tgacattagtaactacgacat catcagccc-3, (互补引物 30 bp) P₄ 5'-atgacgacgccacgggtataacgtacactc-3, 2 引物间长度 353 bp。由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 总核酸提取 参照 BIOzol 提取试剂盒说明书, 主要过程为: 取 0.5 g 柑橘叶片, 放入研钵中加液氮研磨成粉末, 转入预冷的 1.5 mL 离心管中, 加入 1 mL BIOzol 裂解液, 摇匀后室温放置 10 min, 12000 r/min, 4℃离心 10 min, 将上清液转到另一离心管, 加入 0.6 mL 苯酚/氯仿/异戊醇(25:24:1), 充分摇匀后放置 15 min, 12000 r/min, 4℃离心 15 min, 将上清液转到另一离心管, 加入 0.5 mL 预冷的异丙醇, -20℃沉淀 30 min, 12000 r/min, 4℃离心 10 min, 弃上清, 加入 75% 乙醇洗涤沉淀, 8000 r/min, 4℃离心 10 min, 弃上清, 用 50 μL DEPC 处理 H₂O 溶解, 电泳分析。

1.3.2 RT-PCR 体系 反转录体系: 在 0.2 mL PCR 管中加入 5×Buffer 4 μL, dNTPs 0.3 mmol/L, Rnasin 0.5 U/μL, 互补引物 0.2 μmol/L, MulV 5 U/μL, 总 RNA 约 5 μL, 用灭菌的 DEPC 处理 H₂O 补足 20 μL。反转录程序: 42℃温育 60 min, 95℃酶灭活 3 min, 4℃保存待用。

PCR 反应体系: 在 0.2 mL PCR 管中加入 10×Buffer 2.5 μL, dNTPs 0.2 mmol/L, Mg²⁺ 2.0 mmol/L, 引物 0.3 μmol/L, cDNA 1 μL, Taq DNA 聚合酶 0.02 U/μL, 用灭菌的 ddH₂O 补足 25 μL。PCR 反应程序:

94℃预变性 3 min; 94℃变性 30 s, HLB 退火温度 63℃(CTV 为 61℃) 30 s, 72℃延伸 1 min, 循环 35 次, 最后 1 个循环 72℃延伸 10 min。所用 RT 和 PCR 试剂购于北京鼎国生物技术有限公司。PCR 均在 PTC 100, MJResearch INC PCR 扩增仪上进行。

1.3.3 多重 PCR 体系的优化 反转录体系: 在 0.2 mL PCR 管中加入 5×Buffer 4 μL, dNTPs 0.3 mmol/L, Rnasin 0.5 U/μL, 互补引物 P₂ 和 P₄ 各 0.1 μmol/L, MulV 5 U/μL, 总 RNA 约 5 μL, 用灭菌的 DEPC 处理 H₂O 补足 20 μL。RT 反应程序: 42℃温育 60 min, 95℃酶灭活 3 min, 4℃保存待用。在有效的多重 PCR 体系条件下分别对引物浓度设 9 个处理: 1 (P₁, P₂ 0.30 μmol/L, P₃, P₄ 0.30 μmol/L); 2 (P₁, P₂ 0.30 μmol/L, P₃, P₄ 0.20 μmol/L); 3 (P₁, P₂ 0.30 μmol/L, P₃, P₄ 0.15 μmol/L); 4 (P₁, P₂ 0.30 μmol/L, P₃, P₄ 0.10 μmol/L); 5 (P₁, P₂ 0.20 μmol/L, P₃, P₄ 0.20 μmol/L); 6 (P₁, P₂ 0.20 μmol/L, P₃, P₄ 0.30 μmol/L); 7 (P₁, P₂ 0.20 μmol/L, P₃, P₄ 0.15 μmol/L); 8 (P₁, P₂ 0.20 μmol/L, P₃, P₄ 0.10 μmol/L); 9 (P₁, P₂ 0.15 μmol/L, P₃, P₄ 0.15 μmol/L); 对 Mg²⁺ 设 6 个处理: 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mmol/L, 分别在 3 个退火温度(61℃、62℃、63℃) 扩增; 对 Taq DNA 聚合酶设 6 个处理: 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06 U/μL; 对 dNTPs 设 6 个处理: 0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 mmol/L; 进行多重 PCR 体系优化。

1.3.4 扩增产物的检测分析 PCR 产物的电泳分析: 1×TBE 电泳缓冲液, 12 g/L 琼脂糖凝胶(含 EB 0.5 μg/mL), 5 μL 上样, 100 V 稳压电泳至谱带完全分开。在 BIO IMAGING SYSTEM 观察结果。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 特异性的测定

实验过程中, 通过提取 RNA 运用 RT-PCR 检测 HLB, 结果与直接提取 DNA 进行 PCR 检测的一样, 并建立了 HLB 和 CTV 多重 RT-PCR。应用 RT-PCR 检测 HLB 和直接提取 DNA 进行 PCR 的扩增条带大小相等, 多重 RT-PCR 扩增出现的 2 条带与单一 RT-PCR 扩增出现的条带大小相等(HLB 1160 bp 和 CTV 353 bp), 与设计的扩增片段大小吻合(图 1)。

2.2 引物浓度对多重 RT-PCR 扩增效果的影响

多重 RT-PCR 要求在一个反应体系中进行多个特异性扩增, 因而引物的竞争性扩增会影响多重 RT-PCR 的效果。实验过程中我们对引物浓度设了

9 个处理,通过 PCR 产物电泳结果可以看出(图 2),当引物浓度为 1(P_1, P_2 0.30 $\mu\text{mol/L}$, P_3, P_4 0.30 $\mu\text{mol/L}$); 2 (P_1, P_2 0.30 $\mu\text{mol/L}$, P_3, P_4 0.20 $\mu\text{mol/L}$); 6 (P_1, P_2 0.20 $\mu\text{mol/L}$, P_3, P_4 0.30 $\mu\text{mol/L}$) 时只出现 CTV 条带,在其它浓度时出现 2 条特异带;当引物处理为 3 (P_1, P_2 0.30 $\mu\text{mol/L}$, P_3, P_4 0.15 $\mu\text{mol/L}$) 时 2 条特异带比较理想。结果表明,多重 RT-PCR 反应体系中引物的 T_m 值越高,所需浓度越高。在引物浓度为 9 (P_1, P_2 0.15, P_3, P_4 0.15 $\mu\text{mol/L}$) 时 2 条特异带也较清晰,

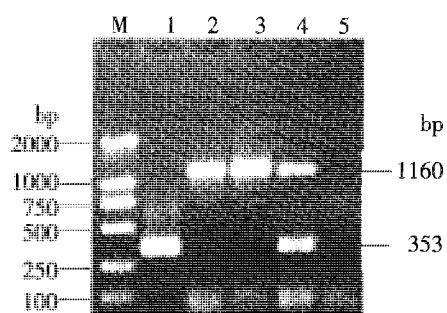


图 1 多重 RT-PCR 检测的特异性

M. 100 bp DNA Marker; 1. RT-PCR 扩增 CTV; 2. PCR 扩增 HLB; 3. RT-PCR 扩增 HLB; 4. 多重 RT-PCR 扩增 CTV+HLB; 5. 多重 RT-PCR 扩增健康植株

Fig.1 Specific products amplified by Mul RT-PCR

M. 100 bpDNA Marker; 1. CTV by RT-PCR; 2. HLB by PCR; 3. HLB by RT-PCR; 4. CTV+HLB by Mul RT-PCR; 5. Health by Mul RT-PCR

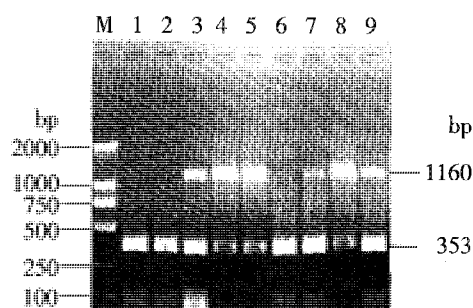


图 2 不同引物浓度的多重 RT-PCR 扩增效果

Fig. 2 Effect of different primer concentrations on MulRT-PCR

M. 100 bp DNA Marker; 1. P_1, P_2 0.30, P_3, P_4 0.30; 2. P_1, P_2 0.30, P_3, P_4 0.20; 3. P_1, P_2 0.30, P_3, P_4 0.15; 4. P_1, P_2 0.30, P_3, P_4 0.10; 5. P_1, P_2 0.20, P_3, P_4 0.30; 6. P_1, P_2 0.20, P_3, P_4 0.20; 7. P_1, P_2 0.20, P_3, P_4 0.15; 8. P_1, P_2 0.20, P_3, P_4 0.10; 9. P_1, P_2 0.15, P_3, P_4 0.15 (Unit: $\mu\text{mol/L}$)

说明引物浓度相对较低时,引物间的竞争性较低。

2.3 Mg^{2+} 浓度和退火温度对多重 RT-PCR 扩增效果的影响

为了探讨 Mg^{2+} 浓度和退火温度对多重 RT-PCR 扩增效果的影响,本试验对 Mg^{2+} 浓度设了 7 个处理,分别在 3 个退火温度下扩增。由多重 RT-PCR 扩增产物电泳分析表明(图 3),当退火温度 61℃ 时,只能

扩出 CTV 特异带而 HLB 条带不明显, Mg^{2+} 浓度高于 1.5 mmol/L 时 CTV 特异性变差。在 62℃ 时(图 4),当 Mg^{2+} 浓度 0.5、2.5、3.0 mmol/L 时带型不完整,出现非特异带。在 63℃ 下(图 5),CTV 和 HLB 在 6 个 Mg^{2+} 浓度都没有出现非特异带,当 Mg^{2+} 浓度为 1.0 和 1.5 mmol/L 的带型最清晰。因此,多重 RT-PCR 的退火温度以单一退火温度高的 (HLB63℃) 效果较好, Mg^{2+} 浓度以 1.0 和 1.5 mmol/L 为较好。结果表明 Mg^{2+} 浓度是影响 PCR 反应的特异性和扩增片段产率的一个重要因素,同样选择合适的退火温度是 PCR 扩

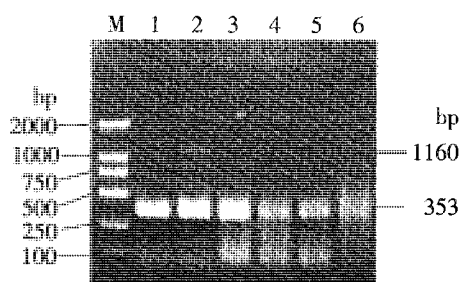


图 3 61℃ 时不同 Mg^{2+} 浓度的多重 RT-PCR 扩增效果

Fig. 3 Effect of different Mg^{2+} on MulRT-PCR in the annealing temperature of 61℃

M. 100 bpDNA Marker; 1. Mg^{2+} 0.5 mmol/L; 2. Mg^{2+} 1.0 mmol/L; 3. Mg^{2+} 1.5 mmol/L; 4. Mg^{2+} 2.0 mmol/L; 5. Mg^{2+} 2.5 mmol/L; 6. Mg^{2+} 3.0 mmol/L. The same as Fig. 4 and Fig. 5

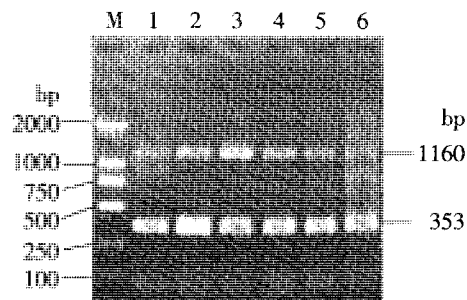


图 4 62℃ 时不同 Mg^{2+} 浓度的多重 RT-PCR 扩增效果

Fig. 4 Effect of different Mg^{2+} on MulRT-PCR in the annealing temperature of 62℃

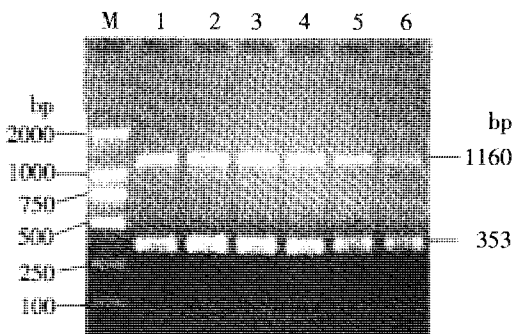


图 5 63℃ 时不同 Mg^{2+} 浓度的多重 RT-PCR 扩增效果

Fig. 5 Effect of different Mg^{2+} on MulRT-PCR in the annealing temperature of 63℃

增的关键所在,这与前人^[13]得出的结论一致。

2.4 Taq 酶和 dNTPs 浓度对多重 RT-PCR 扩增效果的影响

为使 PCR 效率达到最高,就必须保证反应体系中有足够量的 Taq 酶和 dNTPs,为了摸索出经济又高效的多重 RT-PCR 扩增体系,在实验过程中我们对 Taq 酶和 dNTPs 浓度各设了 6 个处理,电泳检测结果如图 6。结果表明:当 Taq 酶浓度为 0.01~0.05 U/ μ L 时,CTV 和 HLB 特异带的清晰度逐渐加大,当 Taq 酶达到 0.05、0.06 U/ μ L 时无明显差异,能满足多重 RT-PCR 扩增。dNTPs 浓度的影响与 Taq 酶的相似,当 dNTPs 浓度达到 0.25、0.30 mmol/L 时就能满足多重 RT-PCR 扩增的要求。

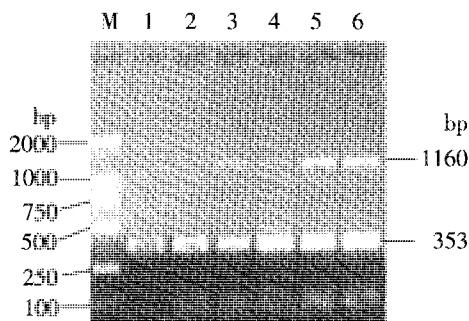


图 6 不同 dNTPs 浓度对多重 RT-PCR 扩增效果

Fig. 6 Effect of different dNTPs on MulRT-PCR

M. 100 bp DNA Marker; 1. dNTPs 0.05 mmol/L; 2. dNTPs 0.10 mmol/L; 3. dNTPs 0.15 mmol/L; 4. dNTPs 0.20 mmol/L; 5. dNTPs 0.25 mmol/L; 6. dNTPs 0.30 mmol/L.

3 讨论

柑橘是世界上最重要的水果之一,但是由于多种病害影响,阻碍了柑橘产业的正常发展。建立柑橘病害的快速检测方法,早期检测苗木的相关病害,可以有效预防相关病害的蔓延和传播。柑橘黄龙病和衰退病是 2 种典型的柑橘病害,广泛分布于世界柑橘主产区,已经给部分柑橘带来毁灭性损失,而且目前没有有效的防治方法。因此,建立一种能够同时检测这 2 种病害的有效方法,对于早期发现和控制这 2 种病害,防止其大面积传播和长距离蔓延,具有极其重要的意义。

多重 PCR 是一项特殊 PCR 技术,由于其快速、节约、简便,能同时检测多种不同的病原体等优点,已被广泛用于动植物病毒检测。国内外已有采用多重 RT-PCR 检测技术同时检测多种 RNA 病毒^[8-10]和 DNA 病原体^[11]的研究报道,也有同时检测 RNA 和 DNA^[12]病毒的研究,但多是先分别提取 DNA 和

RNA,然后进行反转录 RNA 成 cDNA,再与 DNA 混合进行多重 PCR。在本次实验过程中,成功采用 RT-PCR 检测出柑橘黄龙病(HLB),它与直接 PCR 的效果一致。并在 HLB 的 RT-PCR 检测和 CTV 的 RT-PCR 检测基础上,建立了多重 RT-PCR 体系,同时检测 HLB 和 CTV,仅提取 RNA 运用多重 RT-PCR 就能同时检测 2 种病害,进一步显示多重 RT-PCR 的优越性。

参考文献 References:

- [1] TIAN Y N, KE S, KE C (田亚南,柯穗,柯冲). Detection and quantitation of citrus huanglongbing pathogen by polymerase chain reaction [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 1996, 26(3): 243-250. (in Chinese)
- [2] DING F, YI C J, WANG G P (丁芳, 易干军, 王国平). Research on the PCR and Nest-PCR detection of citrus Huanglongbing pathogen [J]. Acta Horticulturae Sinica (园艺学报), 2004, 31(6): 803-806. (in Chinese)
- [3] JACONIX S, BOVE J M, GARNIER M. PCR detection of the two candidates liberobacter species associated with greening disease of citrus [J]. Molecular and Cellular Probes, 1996, 10: 43-50.
- [4] JAGONIX S, BOVE J M, GARNIER M. The phloem-limited bacterium of greening disease of citrus is a member of the alpha subdivision of the proteobacteria [J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1994, 44: 379-386.
- [5] ZHANG Z F, ZHANG C L, XIANG N, et al (张作芳, 张成良, 相宁, 等). Research of inhibition and limitation of plant virus 25-Citrus tristeza virus [J]. Plant Quarantine Research Report (植物检疫研究报告), 1990, 12: 1-27. (in Chinese)
- [6] LAIR S V, MIRKOV T E, DODDS J A, et al. A single temperature amplification technique applied to the detection of citrus tristeza Viral RNA in plant nucleic acid extracts [J]. J Virol Methods, 1994, 47: 141-152.
- [7] MATHEWS D M, RILEY K, DODDS J A. Comparison of detection methods for citrus tristeza virus in field trees during months of Nonoptimal Titer [J]. Plant Disease, 1997, 81(5): 525-529.
- [8] NIU J X, LIU L K, MA B G, et al (牛建新, 刘连科, 马兵钢, 等). Study on multiple RT-PCR detection technology of virus disease in kurlie Fragrant pear [J]. Journal of Shihezi University (Natural Science) (石河子大学学报自然科学版), 2004, 22(2): 93-96. (in Chinese)
- [9] ITO T, IEKI H, OZAKI K. Simultaneous detection of six citrus viroids and apple stem grooving virus from citrus plants by multiplex reverse transcription polymerase chain reaction [J]. Journal of Virological Methods, 2002, 106: 235-239.
- [10] NIU J X, CHEN P, MA B G (牛建新, 陈萍, 马兵钢). Study on multiple RT-PCR detection technology of virus disease in grapevine [J]. Journal of Fruit Science (果树学报), 2004, 21(2): 120-123. (in Chinese)
- [11] ZHAO L P, XIAO H, LI Y Q, et al (赵立平, 肖虹, 李艳琴, 等). ER-IC-PCR as a new tool for quick identification of environmental bacteria [J]. J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报), 1999, 5 (Suppl): 30-33. (in Chinese)
- [12] LIU J Z, CUI Y D, LI P, et al (刘建柱, 崔玉东, 李鹏, 等). Detection of classical swine fever, porcine pseudorabies by multiplex polymerase chain reaction [J]. Chin J Vet Sci (中国兽医学报), 2003, 23(6): 535-537. (in Chinese)
- [13] MULLIS K B, FERRÉ F, GIBBS R. The polymerase chain reaction [J]. Birkhäuser, Boston, 1994.