

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2015.05.001

检疫性柑橘冬生疫霉和丁香疫霉 的三重 PCR 同步检测^①

朱林慧¹, 郭京泽², 廖芳², 罗加凤²,
黄国明², 任学毅³, 李关荣¹

1. 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400716; 2. 天津出入境检验检疫局, 天津 300461;
3. 重庆市食品药品检验所, 重庆 401121

摘要: 全世界危害柑橘的疫霉有 14 种, 其中冬生疫霉 *Phytophthora hibernalis* 和丁香疫霉 *Phytophthora syringae* 为我国规定禁止进境的两种检疫性柑橘真菌病害, 目前尚未见此两种病原菌的同步分子检测报道. 该研究根据 14 种柑橘疫霉的 18S rRNA, ITS, heat shock protein 90 (HSP 90) 等基因分别设计了疫霉属的通用引物 and 此两种检疫性疫霉的特异引物, 通过进行反应体系优化, 建立了同时检测柑橘上两种检疫性疫霉的特异三重 PCR 检测方法, 并进行了灵敏度试验. 用 15 个柑橘疫霉菌株与甜橙的混合 DNA 做模板进行模拟带菌试验, 结果表明该三重 PCR 分子检测能实现两种检疫性疫霉菌的同步特异检测, 这两种检疫性柑橘疫霉提供了特异、可靠、便捷、适于口岸应用的检测方法, 可有效促进柑橘类水果的快速通关.

关键词: 柑橘属; 冬生疫霉; 丁香疫霉; 检疫性真菌; 三重 PCR; 特异分子检测

中图分类号: S436.661.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2015)05-0001-08

柑橘属 *Citrus* L. 常称柑橘, 包括柠檬 *Citrus limon* L.、脐橙 *Citrus sinensis* Osbeck、葡萄柚 *Citrus paradisi* Macf 等, 是世界第一大果树品种. 全世界有 135 个国家和地区生产柑橘, 其种植面积和产量均居首位^[1]. 近年来我国进口大量柑橘属水果, 2013 年仅鲜橙、柚和柑桔 3 种水果进口量就达 11.9 万 t, 主要来自美国、澳大利亚等疫霉多发区, 大量而频繁的柑橘水果交易, 增大了检疫性有害生物入侵的风险.

疫霉属 *Phytophthora* spp 真菌是柑橘属果树上一类非常重要的病害, 常多种疫霉侵染同株果树, 复合侵染现象十分严重. 据报道, 全世界危害柑橘的疫霉有 14 种^[2-7], 不同国家或地区, 不同柑橘种类寄生的疫霉种类也不同. 冬生疫霉和丁香疫霉侵染柑橘引起的疫病是毁灭性病害, 为我国禁止进境的植物检疫性病原菌^[6-7], 在我国尚未发生. 冬生疫霉是在澳大利亚西部的柑橘果实上被首次发现的^[8], 随后在美国、法国等多个国家和地区均有报道^[9]. 该病害可导致柑橘果实褐腐, 叶部和小枝呈枯萎状, 受害果实味苦、具腐臭味. 2011 年, 天津市检验检疫局首次在美国脐橙上截获丁香疫霉^[10], 该病菌可危害柑橘的所有生长阶段, 与其他疫霉复合作用导致果腐(brown rot of fruit)、根腐(root rot)、树干基部的脚腐(foot rot)、果实和枝干的流胶病(gummosis of Citrus)等, 受感染的植株长势衰弱, 出现茎枯, 叶片褪绿萎蔫, 严重时整株死亡, 使果实产量减少和品质下降^[11].

① 收稿日期: 2013-12-20

基金项目: 中华人民共和国质检总局项目(2012IK286, 2013IK290); 科技部“十二·五”科技支撑项目(2012BAK11B02).

作者简介: 朱林慧(1988-), 女, 山西临汾人, 硕士, 主要从事微生物检测研究.

通信作者: 李关荣, 教授.

目前常规检疫方法是依据病原菌形态特征、生物学特性等的差异^[3-4]来鉴定. 张海峰等^[6]、Montenegro 等^[12]通过 ITS 序列分析, 建立了冬生疫霉的快速分子检测方法, 但至今并未建立同时检测柑橘属上冬生疫霉和丁香疫霉的分子生物学方法. 本文以此两种检疫性真菌病害及其他侵染柑橘属的疫霉为研究对象, 分析其 18S rRNA 序列, 设计通用引物; 并分别根据其 ITS 和 HSP 90 基因序列, 设计冬生疫霉和丁香疫霉的特异引物, 建立柑橘属水果上冬生疫霉和丁香疫霉菌丝基因组 DNA 的三重 PCR 检测方法; 考查其检测灵敏度并模拟了带菌检测.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验材料

本研究收集了世界上危害柑橘的所有不同疫霉, 共 15 个菌株, 分别来自美国、澳大利亚、以色列、中国, 其中 2 株(编号 2,3)菌为来自不同国家的丁香疫霉(表 1).

表 1 供试柑橘疫霉代码、学名、寄主及来源

序号	代 码	拉 丁 名	寄 主	收集年份	来 源
1	ATCC56353	<i>Phytophthora hibernalis</i>	<i>Citrus sinensis</i>	2013	Australia
2	ATCC34002	<i>Phytophthora syringae</i>	<i>Citrus limon</i>	2013	USA
3	Ljf2012-4	<i>Phytophthora syringae</i>	<i>Citrus paradisi</i>	2013	Israel
4	Ljf2011-9	<i>Phytophthora citrophthora</i>	<i>Citrus reticulate</i> Blanco	2013	Australia
5	ACCC36282	<i>Phytophthora citricola</i>	<i>Citrus</i> sp.	2013	China
6	Caiqz-zk3	<i>Phytophthora nicotianae</i>	<i>Trachycarpus fortunei</i>	2013	China
7	Caiqz-zk1	<i>Phytophthora palmivora</i>	<i>Quercus palustris</i>	2013	China
8	ACCC36284	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	<i>Vanilla fragrans</i>	2013	China
9	ACCC36153	<i>Phytophthora parasitica</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	2013	China
10	Caiqz-zk2	<i>Phytophthora capsic</i>	<i>Capsicum annuum</i>	2013	China
11	CBS113589	<i>Phytophthora cactorum</i>	<i>Malus pumila</i>	2013	USA
12	CBS292.35	<i>Phytophthora drechsleri</i>	<i>Beta vulgaris</i>	2013	USA
13	ATCC66635	<i>Phytophthora arecae</i>	<i>Citrus</i> sp.	2013	USA
14	ATCC32996	<i>Phytophthora megasperma</i>	<i>Medicago sativa</i>	2013	USA
15	ZM	<i>Phytophthora boehmeriae</i>	<i>Boehmeria nivea</i>	2013	Australia

1.1.2 引物及试剂

采用 MEGA 4.0 比对 GenBank 公布的柑橘属上 14 种疫霉菌的 18S rRNA 基因序列, 在其保守区设计疫霉属的通用引物 18SUF/18SUR; 采用真菌 rDNA 内转录间隔区的通用引物 ITS4/ITS5^[13]对 15 株疫霉菌扩增测序, 根据序列差异位点设计冬生疫霉的特异性引物 PHSF/PHSR; 以樟疫霉的热激蛋白 HSP 90 基因(EU079760)设计引物 HSPF/HSPR, 用于扩增供试真菌材料 HSP 90 基因, 根据其 HSP 90 基因序列差异设计丁香疫霉的特异性引物 PSSF/PSSR. 引物设计采用 Primer Premier5 引物软件, 由上海英骏生物技术有限公司合成(表 2); PCR 扩增相关试剂为大连宝生物(TaKaRa)工程公司产品, DNA 提取试剂盒为美国 QIAGEN 公司生产的 DNeasy Plant Mini Kit.

1.2 试验方法

1.2.1 菌丝 DNA 提取

采用 DNA 提取试剂盒所示方法提取菌丝 DNA, 并将菌丝 DNA 溶于 100 μ L 1 $\times$ TE 缓冲液中, 其余菌丝 DNA 置于-70 $^{\circ}$ C 保存.

1.2.2 18S rRNA, ITS 和 HSP 90 的 PCR 扩增测序及特异引物的设计和验证

对 15 个菌株菌丝基因组 DNA 进行通用引物 18SUF/18SUR、扩增, 反应体系为 30 μ L, 包含 10 $\times$ Buffer 3.0 μ L(其中含终浓度为 1.5 mmol/L 的 MgCl₂); 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L; 10 μ mol/L 引物

18SUF/18SUR 各为 0.2 μ L; 0.3 μ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L); DNA 模板 1.0 μ L(约 20 ng), 加双蒸水至 30 μ L, 以双蒸水为模板作为阴性对照. 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63 $^{\circ}$ C 复性 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min. 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色并成像观察, 对各产物测序并进行序列比对分析.

表 2 本研究使用的引物序列

扩增基因	引物	序列 5'-3'	长度/ nt	退火温度/ $^{\circ}$ C	预期产物大小/ bp
18S rRNA	18SUF	CGCGGTAATTCCAGCTCCAATAAGA	22	63	882
	18SUR	ACATCTAAGGGCATCACAGACC	25		
ITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	58	830
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	22		
	PHSF	CTTTGCTCGAAAAGCATAATGGAA	24	63	232
	PHSR	CCACTCTACTTCACACAACATCCT	24		
HSP 90	HSPF	GTGAAGAAGCACTCGGAGTT	20	60	892
	HSPR	CCTTCTTCTTGAGCTTCTCAATG	23		
	PSSF	AGGAGGAAGGCGAGAAGGCC	20	63	683
	PSSR	GTAGTAGATGCCGGGCTGCG	20		

对 15 个菌株菌丝基因组 DNA 进行 ITS4/ITS5 及 HSPF/HSPR 引物扩增, 除引物用量各为 1.0 μ L 外, 其余参数同上; 反应程序除退火温度不同外, 其余条件均相同. 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色并成像观察, 对各产物测序并进行序列比对分析, 设计特异性引物.

对 15 个菌株菌丝基因组 DNA 分别进行特异性引物 PHSF/PHSR 及 PSSF/PSSR 的扩增, 反应体系为 20 μ L, 包含 10 $\times$ Buffer 2.0 μ L(其中含终浓度为 1.5 mmol/L 的 MgCl₂); 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L; 10 μ mol/L 引物各为 0.2 μ L; 0.3 μ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L); DNA 模板 1.0 μ L(约 20 ng), 加双蒸水至 20 μ L, 以双蒸水为模板作为阴性对照. 反应程序同上.

1.2.3 三重 PCR 扩增体系的优化

在其他因素保持不变的条件下, 对通用引物浓度、引物浓度组合、退火温度、退火时间 4 个方面进行优化. 由于通用引物 18SUF/18SUR 扩增效率较高, 设置 18SUF/18SUR 的用量梯度为 0.1 μ L, 0.2 μ L, 0.3 μ L, 0.4 μ L, 0.5 μ L, 0.6 μ L, 实验结果显示 0.2 μ L 的扩增效果最好, 随后进行了 3 种引物浓度组合的 5 个梯度: 初浓度为 10 μ mol/L 的 18SUF/18SUR, PHSF/PHSR 和 PSSF/PSSR 引物用量分别为 0.2 μ L/0.2 μ L/0.2 μ L; 0.2 μ L/0.4 μ L/0.6 μ L; 0.2 μ L/0.6 μ L/0.8 μ L; 0.2 μ L/0.8 μ L/1.0 μ L; 0.2 μ L/1.0 μ L/1.2 μ L, 确定引物浓度组合后, 设置退火温度梯度为: 60 $^{\circ}$ C, 61 $^{\circ}$ C, 62 $^{\circ}$ C, 63 $^{\circ}$ C, 64 $^{\circ}$ C, 65 $^{\circ}$ C, 再进一步对退火时间进行优化, 设置梯度为: 5 s, 10 s, 15 s, 20 s, 25 s, 30 s.

1.2.4 菌丝基因组 DNA 三重 PCR 检测方法的建立

利用真菌通用引物 18SUF/18SUR 和冬生疫霉及丁香疫霉的特异引物 PHSF/PHSR 和 PSSF/PSSR 扩增 15 个菌株菌丝基因组 DNA, 采用上述优化结果, 建立扩增体系为 20 μ L: 10 $\times$ Buffer 2.0 μ L(其中含终浓度为 1.5 mmol/L 的 MgCl₂); 2.5 mmol/L dNTPs 为 2.0 μ L; 0.4 μ L Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L); 浓度为 10 μ mol/L 的引物 18SUF/18SUR, PHSF/PHSR 和 PSSF/PSSR 依次为 0.2 μ L/0.2 μ L, 0.8 μ L/0.8 μ L, 1.0 μ L/1.0 μ L; DNA 模板 1 μ L(约为 20 ng), 加双蒸水至 20 μ L, 以冬生疫霉(ATCC36353)和丁香疫霉(ATCC34002)混合 DNA 的 18SUF/18SUR 引物扩增片段克隆质粒为阳性对照. 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63 $^{\circ}$ C 复性 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色及成像观察目的条带.

1.2.5 三重 PCR 检测灵敏度测试

将冬生疫霉和丁香疫霉菌丝体基因组 DNA 用紫外分光光度计进行核酸质量浓度测定, 定量为 20 ng/ μ L

作为初始质量浓度, 再进行 10 倍梯度稀释, 共设置 6 个质量浓度梯度, 作为 PCR 扩增模板。

单重 PCR 反应灵敏度检测: 反应体系为 20 μL , 包含 10 $\times$ Buffer 2.0 μL (其中含终浓度为 1.5 mmol/L 的 MgCl_2); 2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL ; 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 PHSF/PHSR 和 PSSF/PSSR 各为 1.0 μL ; 0.4 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL); DNA 模板 1 μL (约 20 ng), 加双蒸水至 20 μL , 以双蒸水为模板作为阴性对照. 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 复性 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min. 设置阴性对照. 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色并观察特定目的大小带的有无。

三重 PCR 反应灵敏度检测: 反应体系及反应程序同上述建立的三重 PCR 检测方法, 设置阴性对照, 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色并观察特定目的大小带的有无。

1.2.6 模拟组织带菌检测

将 15 株疫霉菌菌丝(每种菌约 6 mg)与新鲜的甜橙组织(约 10 mg)混合提取 DNA, 将提取的 DNA 进行三重 PCR 扩增, 扩增体系及循环参数设置同三重 PCR 扩增体系, 设置阴性对照, 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色并观察特定目的大小带的有无。

2 结果与分析

2.1 18S rRNA, ITS 和 HSP 90 的扩增及特异引物设计

引物 18SUF/18SUR, ITS4/ITS5 和 HSPF/HSPR 对 15 个菌株菌丝基因组 DNA 进行扩增. 结果表明: 通用引物 18SUF/18SUR 扩增所有菌株出现相同大小目的条带, 18S rRNA 区域扩增片段为 884 bp. ITS4/ITS5 扩增经测序得到大小约为 830 bp 的片段, 不同种菌株之间大小存在差异, 扩增序列经 Blastn 分析均为 ITS 基因, 且比对结果表明 ITS 基因能够提供足够丰富的差异位点, 据此设计冬生疫霉的特异性引物 PHSR/PHSR; HSPF/HSPR 扩增并测序得到大小约为 890 bp 的片段, 根据差异位点设计丁香疫霉的特异性引物 PSSR/PSSR. 经 PCR 实验验证, 两对特异引物的特异性都很好(图 1)。

2.2 菌丝基因组 DNA 三重 PCR 检测体系的建立

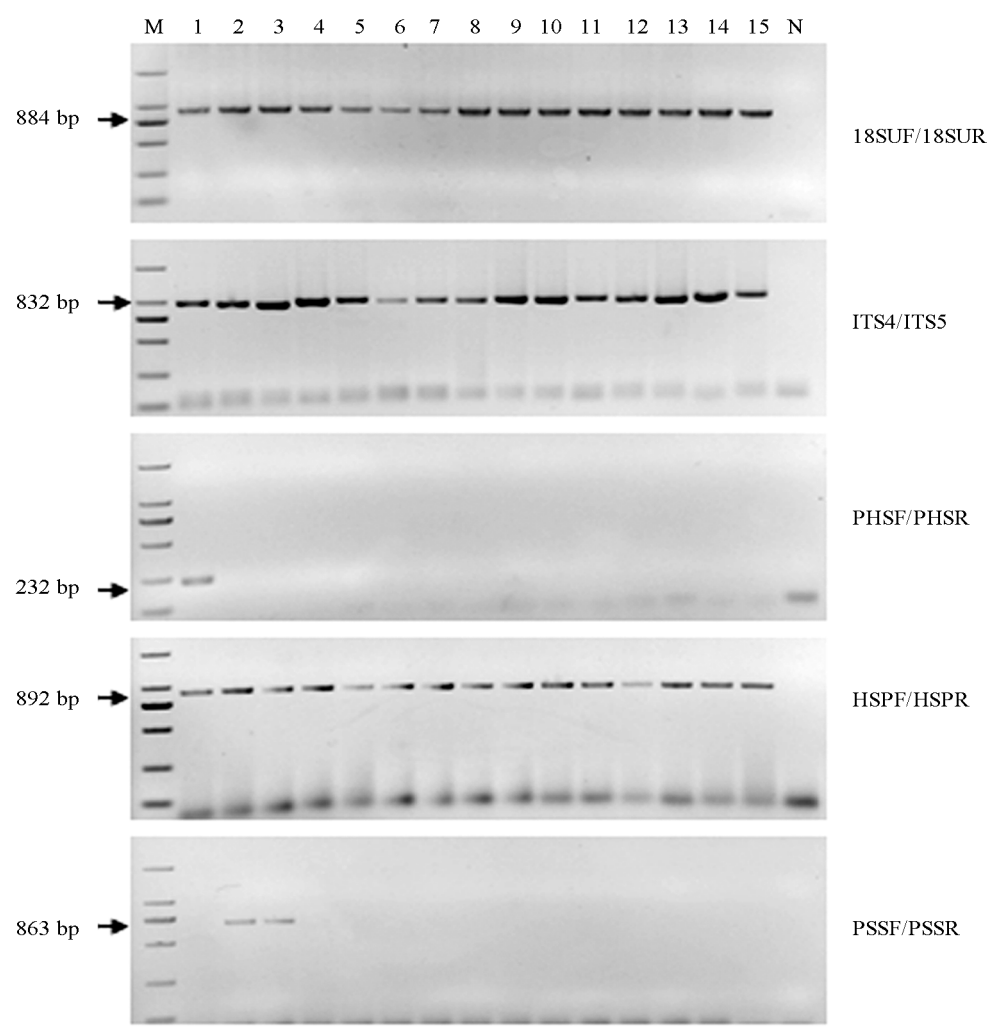
经过多次条件优化, 确定最佳引物组合 18SUF/18SUR, PHSF/PHSR 和 PSSF/PSSR 的用量依次为 0.2 μL , 0.8 μL , 1.0 μL , 最佳退火温度为 63 $^{\circ}\text{C}$; 最佳退火时间为 20 s. 经过优化建立柑橘属上冬生疫霉和丁香疫霉的三重 PCR 检测方法。

根据真菌 18S rRNA 区设计疫霉菌的通用引物 18SUF/18SUR 及自行设计的特异引物 PHSF/PHSR 和 PSSF/PSSR, 对 15 个菌株菌丝 DNA 进行三重 PCR 扩增. 结果表明引物 18SUF/18SUR 扩增阳性对照得到 884 bp 片段, 可作为阳性对照(泳道 P); 冬生疫霉(ATCC56353)三重 PCR 扩增产生 18S 区域 884 bp 扩增片段和 ITS 区域 232 bp 的特异片段(泳道 1); 丁香疫霉的 2 个菌株(ATCC34002 和 Ljf2012-4)三重 PCR 产生 18S rRNA 区域 884 bp 扩增片段和 HSP 90 区域 683 bp 特异片段(泳道 2, 3); 柑橘属上其他 12 株疫霉菌病菌三重 PCR 扩增, 只产生 18S rRNA 区域 884 bp 条带, 无冬生疫霉和丁香疫霉特异引物扩增片段(泳道 4—15); 阴性对照(ddH₂O)无以上条带(泳道 N). 因此, 通过 2% 琼脂糖凝胶电泳能够明确区分冬生疫霉和丁香疫霉以及柑橘属水果的其他疫霉菌病害(图 2), 从而实现柑橘属水果上冬生疫霉和丁香疫霉的特异分子检测。

2.3 三重 PCR 灵敏度测试

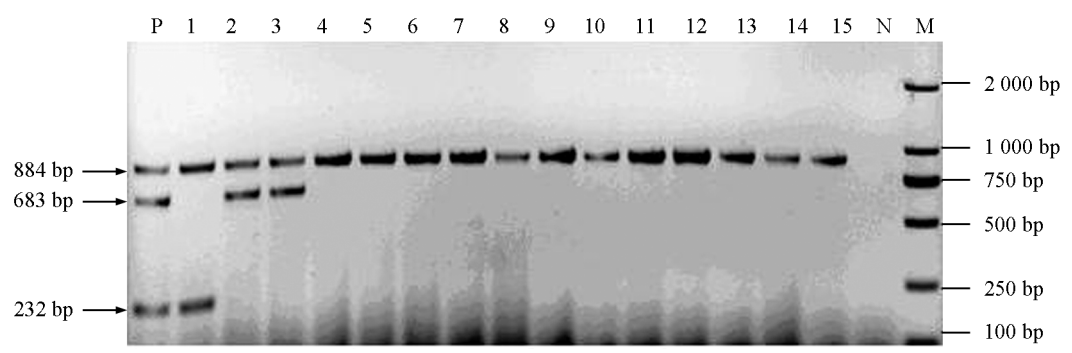
单重 PCR 反应灵敏度检测如图 3a、图 3b 所示, 冬生疫霉灵敏度可达 0.2 pg/ μL (图 3a); 丁香疫霉灵敏度达 0.2 ng/ μL (图 3b)。

三重 PCR 反应灵敏度检测如图 3c、图 3d 所示, 三重 PCR 反应体系中, 18SUF/18SUR 扩增冬生疫霉模板低限质量浓度为 2 pg/ μL (图 3c), 扩增丁香疫霉模板低限质量浓度为 20 pg/ μL (图 3d); PHSF/PHSR 扩增冬生疫霉模板低限质量浓度为 20 pg/ μL (图 3c); PSSF/PSSR 扩增丁香疫霉模板低限质量浓度为 2 ng/ μL (图 3d), 与单重 PCR 反应体系相比, 冬生疫霉和丁香疫霉特异性扩增灵敏度均有所降低。



M: 2 000 bp Marker. ; 1—15: *P. hibernalis*, *P. syringae*, *P. syringae*, *P. citrophthora*, *P. citricola*, *P. nicotianae*, *P. palmivora*, *P. cinnamomi*, *P. parasitica*, *P. capsic*, *P. cactorum*, *P. drechsleri*, *P. arecae*, *P. megasperma*, *P. boehmeriae*; N: 阴性对照(双蒸水).

图 1 疫霉的通用引物及冬生疫霉和丁香疫霉的特异引物扩增



P: 阳性对照; 1—15: 同图 1; N: 阴性对照(双蒸水); M: 2 000 bp Marker.

图 2 菌丝基因组 DNA 三重 PCR 扩增

2.4 模拟带菌检测

DNA 样品经 35 个循环的三重 PCR 扩增, 15 株疫霉菌菌丝与甜橙组织混合提取 DNA, 以其为模板, 进行三重 PCR 扩增, 能获得 18S rRNA 区域 884 bp 扩增片段、ITS 区域 232 bp 和 HSP 90 区域 683 bp 特异片段(泳道 1), 而阴性对照则无相应目的片段, 说明此三重 PCR 技术能对复合带菌的柑橘组织进行冬生疫霉和丁香疫霉的特异分子检测(图 4).

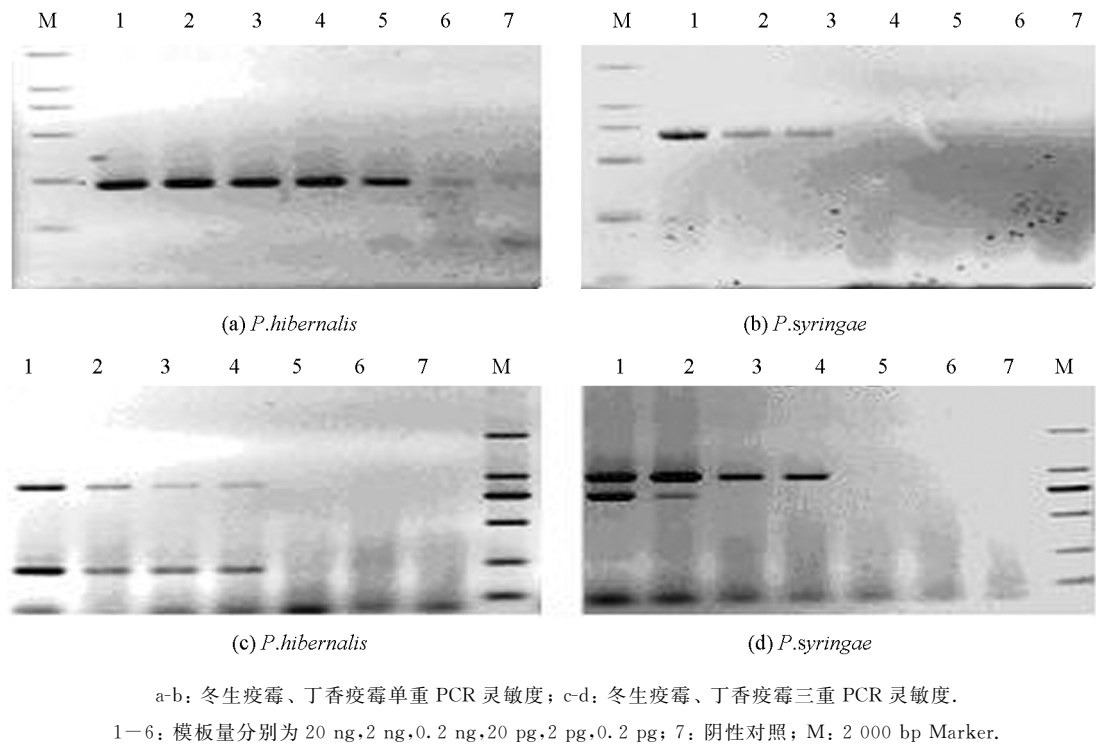


图 3 冬生疫霉、丁香疫霉 PCR 扩增的灵敏度检测

3 讨 论

柑橘属水果是世界最重要的水果之一，在国际农产品贸易中占有非常重要的地位，随着柑橘属水果的大量进口，有害生物随之传入我国的风险加大，因此急需加强对进境柑橘上携带的有害生物快速、准确的检测鉴定，有效保护和促进我国柑橘产业健康发展. 冬生疫霉和丁香疫霉的常规生物学检测方法是形态学鉴定^[14-15]，通过分离培养观察真菌病害菌落、孢子囊、孢子等的形状和颜色，从而进行鉴定. 由于冬生疫霉和丁香疫霉病菌形态存在交叉重叠，卵孢子的诱激有时需延长培养时间多至 4 周^[14]，费力耗时，且较难准确、快速、有效地鉴定两种病原菌，易造成漏检和误检，不能满足口岸“快验快放”的要求.

三重 PCR 检测引物设计至关重要. 在研究初期，本课题组对 ITS,HSP90,EF1- α 等多个基因序列进行比对分析，最终选定 ITS 和 HSP 90 两个基因设计特异性引物. 由于 rDNA 的 ITS 区域在真菌种间变异度高、在种内稳定等特点，为病原菌分子检测提供了理想的靶序列，以 ITS 序列分析为基础，目前已成功开发了多种疫霉的分子检测引物^[16-18]. 本研究通过分析比对了冬生疫霉与其他柑橘疫霉的 ITS 序列，设计出检测冬生疫霉的特异性引物 PHSF/PHSR. 通用引物采用根据 18S rRNA 基因设计的 18SUF/18SUR 而非真菌通用引物 ITS4/ITS5，是由于冬生疫霉特异性引物根据 ITS 基因设计，与 ITS4/ITS5 在同一体系中发生交叉反应，扩增出了非特异条带.

根据 Henegariu 等^[19]对多重 PCR 反应重要参数的研究，本实验选择从通用引物质量浓度、引物质量浓度组合、退火温度、退火时间 4 个方面进行优化. 退火温度影响 PCR 体系扩增的特异性，退火时间决定了解链是否完全，引物是多重 PCR 反应的关键. 本文三重 PCR 采用通用引物 18SUF/18SUR 是根据疫霉属 18S rRNA 基因设计的，扩增效率很高，引物用量少；冬生疫霉特异引物 PHSF/PHSR 和丁香疫霉特

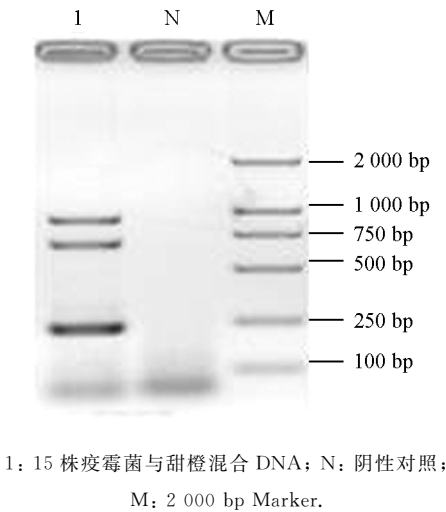


图 4 混合 DNA 三重 PCR 模拟带菌检测

异引物 PSSF/PSSR 特异性良好, 二者分别是根据 ITS 和 HSP 90 基因设计的, 扩增不同的基因片段, 混合使用时相互作用较少; 引物量比例对扩增结果影响很大, 可调节引物比例达最佳化, 冬生疫霉特异引物 PHSF/PHSR 比丁香疫霉特异引物 PSSF/PSSR 扩增片段小, 故扩增效率高, 在三重 PCR 体系中 PHSF/PHSR 比 PSSF/PSSR 用量少. 反应体系体积对扩增效果影响不大, 进行 18SUF/18SUR, ITS4/ITS5 和 HSPF/HSPR 扩增时需要测序, 反应体积为 30 μL , 进行特异性、三重 PCR 及灵敏度实验时不需测序, 故可减小反应体积.

本研究建立的三重 PCR 反应体系检测灵敏度要比单重 PCR 反应低, 单一 PCR 体系时, 冬生疫霉检测灵敏度达 0.2 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 丁香疫霉检测灵敏度为 0.2 $\text{ng}/\mu\text{L}$. 三重 PCR 体系时, 冬生疫霉检测灵敏度只能达到 20 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 比单重 PCR 体系降低了 2 个数量级; 丁香疫霉只能达到 2 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 降低了一个数量级. 三重 PCR 引物之间的相互作用可能降低了 PCR 反应的灵敏度.

本研究建立的三重 PCR 检测方法, 可同时检测柑橘上两种检疫性真菌冬生疫霉和丁香疫霉, 引入的实验材料包含侵染柑橘属植株的 14 种疫霉菌, 菌株收集齐全, 建立的分子检测方法可靠性更高, 多对引物扩增片段大小相差很大, 便于琼脂糖凝胶电泳观察. 模拟带菌实验, 可以实现对带菌水果的直接检测, 全部检测可在一天内完成, 可有效促进水果的快速通关, 还可进一步开发现场检测的试剂盒, 进行现场快速检测. 该方法特异性强、方法简便, 节约了时间和检测成本, 可有效应用于出入境口岸检测及田间监测.

参考文献:

- [1] 陈仕俏, 赵文红, 白卫东. 我国柑橘的发展现状与展望 [J]. 农产品加工·学刊, 2008(3): 21—24.
- [2] 余永年, 庄文颖, 李金亮. 柑橘疫霉 [J]. 真菌学报, 1986, 5(增刊): 31—39.
- [3] 成家壮, 韦小燕. 贮藏柑桔上疫霉种的鉴定 [J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(4): 31—33.
- [4] 成家壮, 韦小燕, 范怀忠. 广东柑橘疫霉研究 [J]. 华南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 25(2): 31—33.
- [5] GRAHAM J H, TIMMER L W. *Phytophthora* Diseases of Citrus [C] // Soil and Water Science. Florida: IFAS Extension, 2003: 1—10.
- [6] 张海峰, 任 众, 刘 翔, 等. 冬生疫霉(*Phytophthora hibernalis*)的快速分子检测 [J]. 植物病理学报, 2008, 38(3): 231—237.
- [7] 张秋娥, 饶玉燕, 何友元, 等. 丁香疫霉随进口美国柑橘果实传入中国风险分析 [J]. 植物检疫, 2012, 26(2): 37—40.
- [8] CARNE W M. A Brown Rot of Citrus in Australia (*Phytophthora hebernalis* sp) [J]. J R Soc West, 1925, 12(3): 13—41.
- [9] HOLLIDAY P. Fungus Diseases of Tropical Crops [M]. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1980: 607.
- [10] 罗加凤, 刘跃庭, 廖 芳, 等. 进境美国加州脐橙中丁香疫霉 *Phytophthora syringae* 的截获 [J]. 菌物学报, 2012, 31(1): 24—30.
- [11] GRAHAM J H, TIMMER L W, DROUILLARD D L, et al. Characterization of *Phytophthora* spp. Causing Outbreaks of citrus Brown Rot in Florida [J]. Phytopathology, 1998, 88(7): 724—729.
- [12] MONTENEGRO D, AGUÍN O, PINTOS C, et al. A Selective PCR-Based Method for the Identification of *Phytophthora hibernalis* Carne [J]. Spanish Journal of Agricultural Research, 2008, 6(1): 78—84.
- [13] 李 琳, 陈鸿宇, 柳 凤, 等. 马拉巴栗疫病病原的分离与鉴定 [J]. 园艺学报, 2011, 38(12): 2395—2400.
- [14] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T2567 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准——丁香疫霉检疫鉴定方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T2617 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准——冬生疫霉病菌检疫鉴定方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.
- [16] BONANTS P, WEERDT M H, MARGA G P, et al. Detection and Identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the Polymerase Chain Reaction [J]. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103(4): 345—355.
- [17] IPPOLITO A, SCHENA L, NIGRO F. Detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. citrophthora* in citrus Roots and Soils by Nested PCR [J]. European Journal of Plant Pathology, 2002, 108(9): 855—868.

- [18] ZHANG Z G, LI Y Q, FAN H, et al. Molecular Detection of *Phytophthora capsici* in Infected Plant Tissues, Soil and Water [J]. Plant Pathology, 2006, 55(6): 770—775.
- [19] HENEGARIU O, HEEREMA N A, DLOUHY S R, et al. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-By-Step Protocol [J]. BioTechniques, 1997, 23(3): 504—511.

Simultaneous Triplex-PCR Detection of Two Quarantine Fungal Pathogens of Citrus: *Phytophthora hibernalis* and *Phytophthora syringae*

ZHU Lin-hui¹, GUO Jing-ze², LIAO Fang², LUO Jia-feng²,
HUANG Guo-ming², REN Xue-yi³, LI Guan-rong¹

1. School of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China;

3. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China

Abstract: There are 14 *Phytophthora* pathogen species in citrus across the world, of which *P. hibernalis* and *P. syringae* are prohibited to enter China. So far no simultaneous molecular detection of the two pathogens has been reported. In the present study, universal primers for the genus *Phytophthora* and two pairs of specific primers for the two quarantine *Phytophthora* species were designed based on the 18S rRNA, ITS and heat shock protein 90 gene (HSP 90) sequences of the 14 *Phytophthora* pathogens. Through the optimization of the reaction conditions, a specific and simultaneous triplex detection method (riplex PCR) for *P. hibernalis* and *P. syringae* on citrus was established, and its sensitivity was tested. The simulated carrier detection by the mixed DNA template of all the 15 citrus *Phytophthora* strains and the sweet orange proved that *P. hibernalis* and *P. syringae* can be detected by the triplex PCR simultaneously and specifically. Thus, the established triplex PCR is a specific and reliable method to detect the two quarantine fungal diseases, suitable for surveillance at frontier ports, and can be used effectively to promote the customs clearance of citrus fruits.

Key words: Citrus; *Phytophthora hibernalis*; *Phytophthora syringae*; quarantine fungus; Triplex PCR; specific molecular detection

责任编辑 夏 娟

