

五种玉米病毒多重PCR检测体系的建立

Establishment of a multiplex PCR assay for detection of five maize-infecting viruses

李明骏* 廖 萌 蒋开蓉 钟 源 吴根土 青 玲*

(西南大学植物保护学院, 植物病害生物学重庆市高校级重点实验室, 重庆 400716)

Li Mingjun* Liao Meng Jiang Kairong Zhong Yuan Wu Gentu Qing Ling*

(Chongqing Key Laboratory of Plant Disease Biology, College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China)

玉米在我国农业生产中占据重要地位,而病毒病的长期发生严重威胁我国玉米产业。随着病毒鉴定技术的发展,目前已报道侵染我国玉米的病毒有12种之多(张超等,2017)。病毒检测是病害防控中的重要环节,但田间玉米病毒种类的多样性及其复合侵染的普遍性增加了鉴定难度。为加强对玉米病毒的及时监测,本研究拟针对甘蔗花叶病毒(sugarcane mosaic virus, SCMV)、玉米褪绿斑驳病毒(maize chlorotic mottle virus, MCMV)、水稻黑条矮缩病毒(rice black streaked dwarf virus, RBSDV)、玉米黄化花叶病毒(maize yellow mosaic virus, MaYMV)和留尼旺玉米线条病毒(maize streak re-union virus, MSRV)这5种我国玉米上发生率较高的病毒建立多重PCR检测技术体系,以期对玉米田间病毒病的准确高效诊断和玉米病毒病害防控奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试玉米材料:2019年6月于云南省楚雄彝族自治州元谋县田间采集表现花叶、斑驳等症状的玉米病株5株,编号为YN1~YN5,于四川省攀枝花市采集表现花叶、黄化等症状的玉米病样8株,编号为SC1~SC8;含有SCMV、MCMV、RBSDV、MaYMV和MSRV的玉米病样及健康玉米植株由本实验室提供。

试剂及仪器:RNAiso Plus总RNA提取试剂、M-MLV反转录酶、pMD™ 19-T载体、T4 DNA连接酶、DNA Marker DL2000,日本TaKaRa公司;Gold Multiplex PCR Mix,北京康为世纪生物科技有限公司;大肠杆菌*Escherichia coli* Trans5α感受态细胞,北京全式金生物技术有限公司;通用型DNA纯化回收试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;其他化学试剂均为国产分析纯。S1000™ Thermal Cycler、凝胶成像系统,美国Bio-Rad公司;DYY-6C型电泳仪,北

京六一仪器厂。

1.2 方法

根据GenBank数据库中SCMV、MCMV、RBSDV、MaYMV和MSRV基因组序列保守区域分别设计检测引物,根据玉米*ubiquitin*(*UBI*)基因序列设计内参基因检测引物,所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

取约0.1 g同时含有SCMV、MCMV、RBSDV、MaYMV和MSRV五种病毒的玉米病叶,在液氮中研磨后参照RNAiso Plus总RNA提取试剂说明书提取总RNA;以M-MLV反转录酶反转录合成第一链cDNA,进行常规PCR扩增。20 μL常规PCR反应体系:cDNA 0.5 μL、10 μmol/L上下游引物各0.5 μL、Gold Multiplex PCR mix 10 μL、ddH₂O补至20 μL。反应程序:98℃预变性5 min,98℃变性30 s,根据不用引物设置退火温度并退火30 s,72℃延伸60 s,34个循环;72℃再延伸10 min。PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳分析,纯化PCR产物并连入pMD™ 19-T载体,转化大肠杆菌Trans 5α感受态细胞后筛选阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序,序列在GenBank数据库经BLAST比对确认为相应病毒基因组部分序列。考虑检测每种病毒的PCR扩增产物特异性、相近的最适退火温度、检测每种病毒的PCR产物长度在1%琼脂糖凝胶电泳时的良好区分度3个因素,筛选常规PCR扩增各病毒的最佳引物组合。

多重PCR检测体系建立:提取同时含有5种病毒的玉米病叶总RNA并反转录获得cDNA模板,在常规PCR反应体系和反应程序的基础上,同时加入5种病毒的检测引物和*UBI*内参基因扩增引物,调整引物浓度、cDNA模板量和退火温度。SCMV、RBSDV、MaYMV、MSRV和*UBI*上下游检测引物用量均设置0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μL共6个处

理,引物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$;MCMV 上下游检测引物用量设置 0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.6 μL 共 7 个处理,引物浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 。退火温度分别为 50.9、52.3、54.0、56.3、58.1 和 59.3 $^{\circ}\text{C}$;cDNA 模板量分别为 0.5、1.0 和 2.0 μL 。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,筛选能同时扩增出 5 种病毒及 *UBI* 内参基因清晰条带的最佳反应体系和程序。

参照上述方法提取自四川省和云南省采集的 13 个田间玉米病样的 RNA 并反转录为第一链 cDNA,采用本研究建立的多重 PCR 体系对各采集病

样的病毒种类进行检测,以本实验室所保存的含有 5 种病毒的玉米病样 cDNA 为阳性对照,以健康玉米 cDNA 为阴性对照。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 检测体系的建立

以含 5 种病毒的玉米病样 cDNA 为模板进行常规 PCR,筛选出最佳引物组合 *UBI*-F/*UBI*-R、*SCMV*-F/*SCMV*-R、*MCMV*-F/*MCMV*-R、*RBSDV*-F/*RBSDV*-R、*MSRV*-F/*MSRV*-R、*MaYMV*-F/*MaYMV*-R(表 1),扩增产物大小分别为 265、161、411、510、608 和 884 bp。

表 1 多重 PCR 检测引物筛选

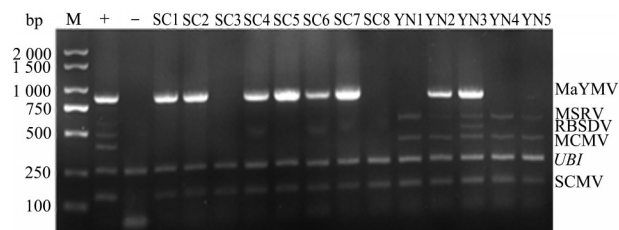
Table 1 Primers used for multiplex PCR assays in this study

引物 Primer	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	产物长度 Size/bp
<i>UBI</i> -F/ <i>UBI</i> -R	F: GGAAAAACCATTAACCTGGA/R: ATATGGAGAGAGGGCACCAG	265
<i>SCMV</i> -F/ <i>SCMV</i> -R	F: GGAAACCCTGTTTGAGTACC/R: AGAAGACACTGGGTCCAACC	161
<i>MCMV</i> -F/ <i>MCMV</i> -R	F: TGGCAGCACAATCACAGAT/R: CCAGGGCAGGTTGTAGGA	411
<i>RBSDV</i> -F/ <i>RBSDV</i> -R	F: AACAAACCGACCAACAATCACTC/R: TTGAGCAGGAACCTCACGACA	510
<i>MSRV</i> -F/ <i>MSRV</i> -R	F: TACTTCCATCCTGCGTGC/R: CCTGTTCCAAAGCGTAACG	608
<i>MaYMV</i> -F/ <i>MaYMV</i> -R	F: CCTCGAGATGTATGGTCTGC/R: ATTCCCAACCTGGAGGTCCT	884

本研究最终建立的 20 μL 多重 PCR 反应体系包含 cDNA 模板 0.5 μL ,浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 *RBSDV*、*MaYMV* 和 *MSRV* 上下游扩增引物各 0.8 μL ,浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 *SCMV* 上下游扩增引物各 0.2 μL ,浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的 *MCMV* 上下游扩增引物各 1.0 μL ,浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 *UBI* 上下游引物各 0.1 μL , ddH_2O 补至 20 μL 。反应程序:98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s,34 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。

2.2 多重 PCR 体系检测田间玉米病样

检测病样中复合侵染现象普遍发生,四川省玉米病样中主要检出 *SCMV* 和 *MaYMV*;云南省病样中病毒种类更多,5 个玉米样品中均检测到 *SCMV*、*MCMV* 和 *MSRV*,其中 YN2 中还检测到 *MaYMV*,YN3 中同时检出 5 种病毒(图 1)。



M: DNA marker DL2000; SC1~SC8、YN1~YN5: 采自四川省和云南省的田间玉米病样;+: 阳性对照;-: 阴性对照。SC1~SC8、YN1~YN5: Maize samples collected from Sichuan and Yunnan provinces, respectively;+: positive control;-: negative control.

图 1 应用多重 PCR 体系检测 13 个田间玉米病样中的病毒种类
Fig. 1 Detection of viruses in 13 maize samples collected from fields using multiplex PCR

3 讨论

本研究对四川省和云南省玉米病样的检测结果表明病毒复合侵染普遍发生,与 Wu et al.(2013)的研究结果一致。目前,基于多重 PCR 的病毒检测技术已在一些多年生木本植物如苹果、葡萄以及重要经济作物如草莓上有所应用(韩晓玉等,2020);玉米作为我国重要的粮食作物,病毒病危害严重且复合侵染发生普遍,而高效准确的病毒检测体系的缺乏不利于玉米病毒病害的防控。本研究经多次优化条件,首次建立了可同时检测 *SCMV*、*MCMV*、*RBSDV*、*MaYMV* 和 *MSRV* 玉米病毒的多重 PCR 检测体系,有助于及时发现田间玉米病株,防止病毒扩散。

参 考 文 献 (References)

- Han XY, Chen SY, Li G, Li HL, Shi Y. 2020. Identification of the pathogens causing strawberry virus disease in Henan Province and establishment of a multiplex PCR assay for five strawberry viruses. *Journal of Plant Protection*, 47(1): 219–220 (in Chinese) [韩晓玉, 陈思宇, 李刚, 李洪连, 施艳. 2020. 河南省草莓病毒病原的鉴定及 5 种草莓病毒多重 PCR 体系的建立. *植物保护学报*, 47(1): 219–220]
- Wu JX, Wang Q, Liu H, Qian YJ, Zhou XP. 2013. Monoclonal antibody-based serological methods for maize chlorotic mottle virus detection in China. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 14(7): 555–562
- Zhang C, Zhan BH, Zhou XP. 2017. Distribution and damage of maize viral diseases in China. *Plant Protection*, 43(1): 1–8 (in Chinese) [张超, 战斌慧, 周雪平. 2017. 我国玉米病毒病分布及危害. *植物保护*, 43(1): 1–8]

(责任编辑:王 璇)