

DOI:10.11830/ISSN.1000-5013.201709055



快速简单组织定位甘蔗 RSD 致病菌 Lxx 的原位 PCR 方法

胡敏¹, 汪文华², 何恩铭², 孟红岩², 郭莺^{1,2}

(1. 华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021;

2. 福建省亚热带植物研究所 福建省生理生化重点实验室, 福建 厦门 361006)

摘要: 提出对甘蔗冰冻切片中甘蔗宿根矮化病(RSD)致病菌 Lxx(*Leisionia xyli* subsp. *xyli*)进行定位的原位多聚酶链式反应(*in situ* PCR)方法,为 Lxx 与甘蔗互作致病机理研究提供有效的实验手段.以染 RSD 甘蔗品种 Badila 及其健康株为材料取样制作冰冻切片,切片经溶菌酶消化后,利用病原菌 Lxx 16S~23S rDNA 内部转录间隔区(ITS)特异性引物进行原位 PCR 扩增,并对随机参入扩增片段的与地高辛-11-dUTP 进行免疫组化,建立甘蔗样品冰冻切片中直接原位 PCR 方法.结果表明:直接原位 PCR 对 RSD 蔗株茎样品切片显色为阳性,阳性信号出现于甘蔗茎部的木质部、韧皮部,而健康蔗株茎样品无信号,方法特异性较好.

关键词: 甘蔗宿根矮化病;革兰氏阳性苛养致病菌;冰冻切片;原位多聚酶链式反应

中图分类号: Q 945.8 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-5013(2018)02-0221-06

Fast and Simple *In Situ* PCR Method for Localizing RSD Pathogen Lxx in Sugarcane Tissue

HU Min¹, WANG Wenhua², HE Enming²,
MENG Hongyan², GUO Ying^{1,2}

(1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China;

2. Fujian Key Laboratory of Subtropical Plant Physiology and Biochemistry,
Fujian Institute of Subtropical Botany, Xiamen 361006, China)

Abstract: An *in situ* polymerase chain reaction (*in situ* PCR) method was developed for visualizing the localization of the pathogen Lxx (*Leisionia xyli* subsp. *xyli*) in sugarcane frozen section with ratoon stunting disease (RSD), providing a tool for the study on RSD in sugarcane, especially on the mechanism of Lxx and sugarcane interaction. Frozen sections were obtained from both RSD-infected and uninfected sugarcane plants (cultivar Badila). After the digestion with lysozyme, *in situ* PCR was performed directly on the sections by amplifying Lxx 16S~23S rDNA internal transcriptional spacer (ITS) using the specific primers, the resulting products, which contained the random Digoxigenin-11-dUTP in the amplified fragments, were visualized based on immunohistochemistry, enabling a direct *in situ* PCR detection for Lxx on sugarcane frozen sections. The results showed that the positive signals in the stem of RSD-infected samples were detected and localized on sugarcane stem xylem and phloem, while no signals were found in the healthy samples, suggesting this method was

收稿日期: 2017-09-20

通信作者: 郭莺(1981-),女,副研究员,博士,主要从事植物病害检测和抗病分子育种的研究. E-mail:47402221@qq.com.

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目(31301381)

excellent in specificity.

Keywords: ratoon stunting disease; *Leisionia xyli* subsp. *xyli*; frozen sections; *in situ* polymerase chain reaction

甘蔗宿根矮化病(RSD)是由致病菌 Lxx(*Leisionia xyli* subsp. *xyli*)引起的,遍及世界各个蔗区的一种病害,Young^[1]推测 Lxx 菌来源于 20 世纪 20 年代印尼爪哇岛甘蔗种间杂交.染病蔗株发育阻滞,宿根发株少,蔗株矮化,蔗茎纤弱,生长不良.由于 RSD 没有明显的外部 and 内部症状,单从外观难以鉴定,加上病原细菌特别小,难以分离、培养和检测,传统的诊断方法准确性差,使得 RSD 诊断极其困难,其诊断技术经历了剖茎检视、相差显微镜检查、免疫技术和原位多聚酶链式反应(PCR)快速检测 4 个阶段.相关研究人员先后用电子显微镜在甘蔗木质部细胞^[2-4]、叶片细胞^[5]中观察到 Lxx,2016 年,Quecine 等^[6]利用基因工程改造的带有绿色荧光蛋白突变菌株对 Lxx 的定植生态位进行荧光检测,发现 Lxx 主要富集于叶肉细胞和导管系统周围的维管束鞘细胞.PCR 是目前较灵敏准确也是应用最多的 RSD 感病性检测方法^[7-9].Fegan 等^[10]、Pan 等^[11]、邓展云等^[12]、Fallon 等^[13]、沈万宽等^[14]、周凌云等^[15]、Carvalho 等^[16]分别利用 Lxx 16S~23S rDNA 基因间隔区特异性引物,建立了 Lxx 病原菌的 PCR 快速检测体系,并对 PCR 扩增获得的目的片段核苷酸序列进行测定与分析,均获得了 Lxx 的特异扩增片段.由于 Lxx 体外培养困难,工程菌构建、转化效率低、消耗高,技术要求高等问题,本文在甘蔗冰冻切片上,提出不涉及分子杂交的直接原位原位多聚酶链式反应(PCR)方法.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 甘蔗品种 Badila RSD 病株和健康株种植于福建省亚热带植物研究所内.

1.1.2 试剂 固定液为 63%的乙醇,5%的冰醋酸,2%为甲醛.洗脱液 I 为 63%的乙醇,5%的冰醋酸.洗脱缓冲液 II 为 0.1 mol·L⁻¹ Tris-Cl,0.15 mol·L⁻¹ NaCl,pH 值为 9.5.组织冰冻包埋剂购于 Leica 公司,10×封闭液为 10 mg 的 BSA 溶于 1 mL 10×PBS(pH=7.5).溶菌酶溶液购于天根生化科技(北京)有限公司.10×PCR buffer(Mg²⁺),dNTP Mixture,rTaq 购于宝日医生物技术(北京)有限公司.脱氧三磷酸尿苷相连的地高辛标记、连着碱性磷酸酶的地高辛抗体、碱性磷酸酶底物均为罗氏公司产品.正向引物 Lxx1,反向引物 Lxx2 委托英潍捷基(上海)贸易有限公司引物合成.

1.2 切片样品 RSD 感病性鉴定

提取染病与未染病甘蔗蔗汁基因组 DNA,将每一株蔗茎削去蔗皮,用钳子榨取局部蔗茎蔗汁于两管 2 mL 离心管中,并立即放入冰盒中,以减少蔗汁褐变,3 000 r·min⁻¹离心 2 min,取上清.将取自同株的蔗汁以 5 000 r·min⁻¹离心 1 min 后,弃上层取下层合并,获得浓缩蔗汁.将浓缩蔗汁当作菌液,参照 TIANamp Bacteria DNA Kit 细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取.PCR 引物用 Pan 等^[11]报道的 Lxx 16S~23S rDNA 内部转录间隔区(ITS)特异引物 Lxx1:5'-CCGAAGTGAGCAGATTGACC-3',Lxx2:5'-ACCCTGTGTTGTTTTCACG-3'及 439 bp 产物.PCR 反应体系为 0.25 μL 的 rTaq,1 μL 的 dNTP,2 μL 的 10×PCR Buffer(Mg²⁺),1 μL 的正向引物 Lxx1,1 μL 的反向引物 Lxx2,13.75 μL 的 ddH₂O.PCR 扩增程序为 95 ℃,5 min;95 ℃,30 s;55 ℃,30 s;72 ℃,30 s;40 个循环;72 ℃延伸 5 min.

1.3 冰冻切片

1.3.1 样品的准备和固定 在取材前,先制备好固定液,置于冰上,每个 2 mL 的离心管加入 1.8 mL 新鲜的固定液,置于冰上.使用解剖刀取样,蔗茎(长×宽×高)为 3 mm×3 mm×5 mm,切的时候保持垂直.使用柔软的刷子将样品放入固定液,保证样品自由晃动,充分接触固定液.抽真空,53.2 kPa,1.5 min 两次,管子开盖.固定 4 h,每小时换一次固定液.固定后,用洗脱缓冲液 I 洗 3 次,1.8 mL 洗 3 次,每次 10 min,4 ℃,一直在摇床上进行.

1.3.2 包埋和切片 用组织冰冻包埋剂在冰冻切片机的样品盘中包埋固定好的样品,常规切片,蔗茎切片厚 40 μm.

1.4 Lxx 直接原位 PCR 方法

技术方法参考文献[17],进而改进. RSD 致病菌 Lxx 原位 PCR 示意图,如图 1 所示.

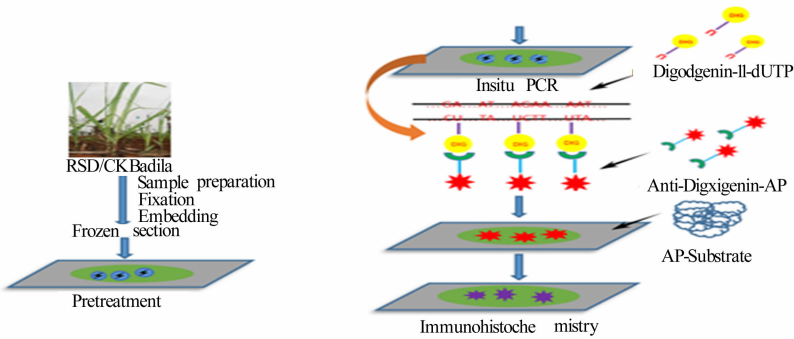


图 1 RSD 致病菌 Lxx 原位 PCR 示意图

Fig.1 Schematic diagram of *in situ* PCR for RSD pathogen Lxx

1.4.1 切片预处理 在低温下,将组织切片置于载玻片上,用含有体积分数为 0.15% Triton-X 100, pH 值为 7.5 的 1×PBS 缓冲液 50 μL 冰上浸没 10 min. 用 1×PBS 洗 3 遍,再用溶菌酶消化处理中,溶菌酶质量浓度为 1 mg · mL⁻¹[18]. 溶菌 37 °C 浸没处理切片 10~15 min, 用 1×PBS 洗 3 次.

1.4.2 原位 PCR 将载玻片置于金属浴,4 °C,每片切片样品上滴加 45 μL PCR 体系,一个载玻片上放 4 片切片,共 180 μL PCR 体系,盖上盖玻片,盖玻片周围用透明指甲油封住. 每片载玻片上 PCR 反应体系如下:18 μL 的 10×PCR Buffer (Mg²⁺),16 μL 的 2.5 mmol · L⁻¹dNTP Mixture,0.8 μL 的 25 mmol · L⁻¹地高辛-11-dUTP,4 μL 的 10 pmol · L⁻¹正向引物 Lxx1,4 μL 的 10 pmol · L⁻¹反向引物 Lxx2,2 μL 的 83.35 nkat · (μL)⁻¹rTaq 酶,180 μL 双蒸水. 反应程序如下:98 °C 预变性,5 min;98 °C 变性,35 s,55 °C 退火,35 s;72 °C 延伸,35 s,40 个循环;72 °C 延伸,5 min. 使用的是普通 PCR 仪器,为使载玻片受热均匀,将锡箔纸垫平铺放进普通 PCR 仪插孔上,盖子温度设置为 55 °C (防止普通 PCR 仪的 105 °C 高温盖子影响 PCR 反应).

1.4.3 免疫组化 加 1×封闭液(0.15% Triton-X 100)冰上孵育 30 min,加 Anti-DIG-AP 抗体,稀释 500 倍,室温孵育 1 h,移除抗体,加入洗脱缓冲液,洗片. 加入 50 μL 的碱性磷酸酶底物置于暗盒中,不加盖玻片(用之前将底物溶液上下颠倒混匀),置于室温中,每隔 10 min,观察一次,约 40~50 min 着色. 一旦着色吸掉碱性磷酸酶底物,洗脱缓冲液 II,5 min 洗 3 次,无菌水洗一次,200 μL 枪头吸掉所有的水,加 40 μL 40%甘油封片.

1.4.4 镜检 在光镜下进行拍照,阳性部位或者细胞呈现蓝紫色.

1.5 直接原位 PCR 特异性试验

对常规 PCR 分子鉴定后的 RSD 阳性/阴性蔗株茎部样品冰冻切片进行直接原位,每组样品分别在对 PCR 反应、免疫组化反应中,均设置条件缺失的对照试验,如表 1 所示. 表 1 中: + 表示在反应中有加 rtaq 酶、抗体 Anti-Digoxigenin-AP; - 表示反应中的 rtaq 酶、抗体 Anti-Digoxigenin-AP 被无菌水代替.

表 1 直接原位条件缺失对照试验设计表

Tab.1 Design form of conditions missing control trial in direct *in situ* PCR

样品	实验组别	PCR 反应 ± rtaq 酶	免疫组化 ± 抗体
RSD 阳性	a	+	-
	b	-	+
	c	+	+
RSD 阴性	d	+	-
	e	-	+
	f	+	+

2 结果与分析

2.1 蔗茎组织样品 RSD 感病性 PCR 鉴定

从对蔗茎组织样品的 RSD 感病性 PCR 检测的结果可知:甘蔗蔗茎样品中 7,8,9,10,11 号样品呈 RSD 阳性. 将各部位的有无染病的样品区分开,以便后续检测冰冻切片中 Lxx 直接原位 PCR 方法的建立. 甘蔗样品 PCR 产物电泳图,如图 2 所示.

图 2 中:M 为 DNA 标准参照物;1~12 为甘蔗蔗茎样品;P 为阳性对照;N 为阴性对照.

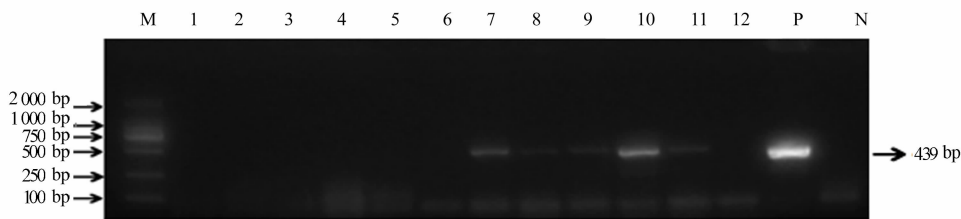
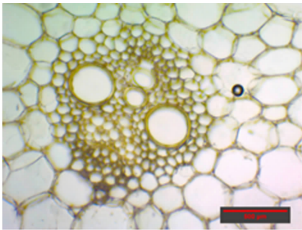


图 2 甘蔗样品 PCR 产物电泳图

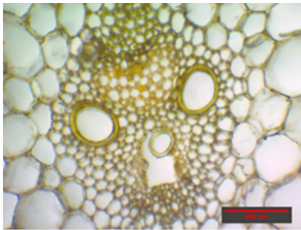
Fig. 2 PCR products of sugarcane samples

2.2 直接原位 PCR 特异性试验

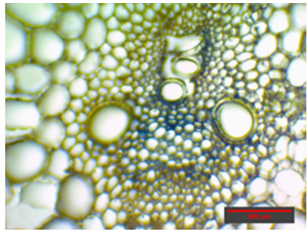
对常规 PCR 分子鉴定后的 RSD 阳性/阴性蔗株茎部样品冰冻切片进行直接原位, 每组样品分别在对 PCR 反应、免疫组化反应中均设置条件缺失对照试验, 如图 3 所示. 图 3 中: 图 3(a), (c) 分别为 RSD 阳性样品蔗茎切片图; 图 3(d), (f) 分别为 RSD 阴性样品蔗茎切片图. 由图 3 可知: 无论是 RSD 阴性组还是阳性组蔗茎样品冰冻切片 Lxx 检测, 在缺失 DNA 聚合酶或者抗体条件下, 切片镜检图均无阳性信号(图 3(a), (b), (d), (e), (f)), 证明直接原位 PCR 特异性较好.



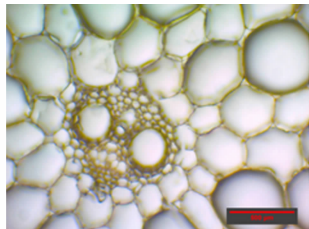
(a) +rTaq-Anti-Digoxigenin-AP



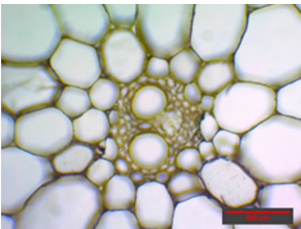
(b) -rTaq+ Anti-Digoxigenin-AP



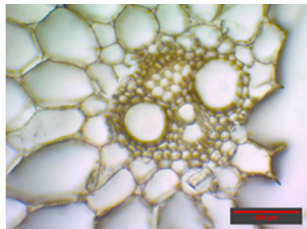
(c) +rTaq+ Anti-Digoxigenin-AP



(d) +rTaq-Anti-Digoxigenin-AP



(e) -rTaq+ Anti-Digoxigenin-AP



(f) +rTaq+ Anti-Digoxigenin-AP

图 3 直接原位条件缺失对照试验结果

Fig. 3 Result of conditions missing control trial in direct *in situ* PCR

3 讨论

病原菌的检测与定植生态位的探究是探索病原菌对寄主的致病机理的重要开端, 原位 PCR 的优势之一是能够直观地应用光学显微镜观察病原核酸在组织器官内细胞水平的确切分布和定位, 是研究病原致病机理的有效手段. 原位 PCR 在医学上应用较多, 主要用于疾病中外源性基因检测、诊断和某些相应基因的定位, 如 HIV, HBV, EB 等病毒的检测^[19]. 在动物方面的研究主要应用于流行病毒的检测, 如在猫肾 F81 细胞中检测犬细小病毒^[20]、蛋鸡 J 亚群禽白血病毒^[21]、鸡传染性法氏囊病毒^[22]等. 在动物样品中进行原位 PCR 的阐述和实验较为广泛, 详细具体的实验方案也已被提供^[23], 而关于植物材料原位 PCR 研究文献中对于组织样品的制备等实验方案均不够具体^[24-28]. 在植物冰冻切片上建立不涉及分子杂交的直接原位 PCR 方法, 解决 RSD 病原菌 Lxx 的组织定位, 是甘蔗与 Lxx 互作研究的一个创新点. 在现有较多的针对 Lxx 鉴定所设计的特异性引物中, 选择的引物扩增产物为 400~1 500 bp 较合适. 如果太短, 易发生非特异性扩增和胞外扩散; 太长, 则影响扩增效率^[17]. 文中选择 Pan 等^[11]报道的 Lxx 16S~23S rDNA 内部转录间隔区(ITS)特异引物 Lxx1, Lxx2, 以及 439 bp 的扩增产物. 采用的反应程序如下: 98 ℃ 预变性, 5 min; 98 ℃ 变性, 35 s; 55 ℃ 退火, 35 s; 72 ℃ 延伸, 35 s; 40 个循环; 72 ℃ 延伸, 5 min.

文献报道在原位 PCR 中,循环数不宜过高,一般为 20~30,以减少热循环中反复升降温对细胞的破坏^[29],但在实验中,由于甘蔗冰冻切片制样较厚,组织结构在 40 个循环后仍然清晰,故采用常规 PCR 中的 40 个循环。通过 PCR 特异性扩增病原菌 Lxx 16S~23S rDNA 内部转录间隔区(ITS)实现 Lxx 定植位点信号的一级放大,通过 PCR 参入的地高辛-11-dUTP、连接着碱性磷酸酶的地高辛抗体、碱性磷酸酶底物实现免疫组化,达到 Lxx 位点的信号的二级放大,间接实现定位 Lxx 病原菌。该方法与构建 GFP 工程菌探索 Lxx 分布的技术手段相比,规避了现阶段 Lxx 体外培养困难且周期较长的 RSD 研究困境。由于绿色荧光蛋白基因需要翻译后加工,相较于 PCR 捕捉 Lxx 生态位的灵敏性较低,并且不能确定工程菌与野生菌相比是否存在侵染压力。这一方法的建立,既能快速地检测甘蔗 RSD 的染病状况,又能观测 Lxx 不同侵染时期的定植位点,该方法为揭示 Lxx 的侵染机制和途径的基础研究提供了便捷的手段。

参考文献:

- [1] YOUNG A J. Possible origin of ratoon stunting disease following interspecific hybridization of saccharum species [J]. Plant Pathology, 2016, 65(9): 1403-1410. DOI: 10. 1111/ppa. 12545.
- [2] MARAMOROSCH K, PLAVSICBANJAC B, BIRD J, *et al.* Electron microscopy of ratoon stunted sugar cane: Microorganisms in xylem [J]. Journal of Phytopathology, 1973, 77(3): 270-273. DOI: 10. 1111/j. 1439-0434. 1973. tb04133. x.
- [3] WEAVER L, TEAKLE D S, HAYWARD A C, *et al.* Ultrastructural studies on the bacterium associated with the ratoon stunting disease of sugarcane [J]. Australian Journal of Agricultural Research, 1977, 28(5): 843-852. DOI: 10. 1071/AR9770843.
- [4] KAO J, DAMANN K E J. Microcolonies of the bacterium associated with ratoon stunting disease found in sugarcane xylem matrix [J]. Phytopathology, 1978, 68(4). DOI: 10. 1094/Phyto-68-545.
- [5] 陈明辉, 谢晓娜, 王盛, 等. 宿根矮化病菌对甘蔗品质及茎、叶超微结构的影响 [J]. 植物病理学报, 2014, 44(4): 379-386. DOI: 10. 13926/j. cnki. apps. 2014. 04. 006.
- [6] QUECINE M C, SILVA T M, CARVALHO G, *et al.* A stable *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* GFP-tagged strain reveals a new colonization niche in sugarcane tissues [J]. Plant Pathology, 2016, 65(1): 154-162. DOI: 10. 1111/ppa. 12397.
- [7] DAVIS M J, DEAN J L. Comparison of diagnostic techniques for determining incidence of ratoon stunting disease of sugarcane in Florida [J]. Plant Disease, 1984, 68(1): 896-899. DOI: 10. 1094/PD-68-896.
- [8] HOY J W, GRISHAM M P, DAMANN K E. Spread and increase of ratoon stunting disease of sugarcane and comparison of disease detection methods [J]. Plant Disease, 1999, 83(12): 1170-1175. DOI: 10. 1094/PDIS. 1999. 83. 12. 1170.
- [9] 沈万宽, 邓海华, 周国辉. 甘蔗宿根矮化病诊断方法比较研究 [J]. 江西农业大学学报, 2007, 29(4): 561-565. DOI: 10. 13836/j. jjau. 2007115.
- [10] FEGAN M, CROFT B J, TEAKLE D S, *et al.* Sensitive and specific detection of *clavibacter xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting disease of sugarcane, with a polymerase chain reaction-based assay [J]. Plant Pathology, 1998, 47(4): 495-504. DOI: 10. 1046/j. 1365-3059. 1998. 00255. x.
- [11] PAN Y B, GRISHAM M P, BURNER D M, *et al.* A polymerase chain reaction protocol for the detection of *clavibacter xyli* subsp. *xyli*, the causal bacterium of sugarcane ratoon stunting disease [J]. Plant Disease, 1998, 82(3): 285-290. DOI: 10. 1094/PDIS. 1998. 82. 3. 285.
- [12] 邓展云, 刘海斌, 李鸣, 等. 广西甘蔗宿根矮化病的 PCR 检测 [J]. 西南农业学报, 2004, 17(3): 324-327. DOI: 10. 16213/j. cnki. scjas. 2004. 03. 012.
- [13] FALLOON T, HENRY Y E, DAVIS M J, *et al.* First report of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli*, causal agent of ratoon stunting of sugarcane, in Jamaica [J]. Plant Disease, 2006, 90(2): 245. DOI: 10. 1094/PD-90-0245B.
- [14] 沈万宽, 周国辉, 邓海华, 等. 甘蔗宿根矮化病菌 PCR 检测及目的片段核苷酸序列分析 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(12): 413-416.
- [15] 周凌云, 周国辉. 甘蔗宿根矮化病菌 PCR 检测技术研究 [J]. 广西农业生物科学, 2006, 25(2): 172-174. DOI: 1008-3464(2006)02-0172-03.
- [16] CARVALHO G, SILVA T G E R D, MUNHOZ A T, *et al.* Development of a qPCR for *Leifsonia xyli*, subsp.

- xyli*, and quantification of the effects of heat treatment of sugarcane cuttings on Lxx[J]. Crop Protection, 2016, 80:51-55. DOI:10.1016/j.cropro.2015.10.029.
- [17] HISHIKAWA Y, AN S, YAMAMOTO-FUKUDA T, *et al.* Improvement of *in situ* PCR by optimization of PCR cycle number and proteinase K concentration; Localization of X chromosome-linked phosphoglycerate kinase-1 gene in mouse reproductive organs[J]. Acta Histochemica Et Cytochemica, 2009, 42(2):15. DOI:10.1267/ahc.09011.
- [18] 吴彩云, 蔡俊鹏, 杨汝德. 结合流式细胞仪检测技术的菌体原位 PCR 扩增[J]. 微生物学报, 2004, 44(3):399-401. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.2004.03.030.
- [19] 李昱莹. 苹果褪绿叶斑病毒的组织定位研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2014.
- [20] 刘雪燕, 黄韧, 刘忠华, 等. 猫肾 F81 传代细胞中犬细小病毒原位 PCR 检测方法[J]. 中国实验动物学报, 2001, 9(3):146-149. DOI:1005-4847(2001)03-0146-04.
- [21] 徐滨蕊, 乔素兰, 董卫星, 等. 原位 PCR 和原位杂交检测鸡 J 亚群禽白血病病毒[J]. 微生物学报, 2004, 44(5):584-587. DOI:10.13343/j.cnki.wsxb.2004.05.006.
- [22] 孙洁, 卢体康, 曾少灵, 等. 鸡传染性法氏囊病病毒 RT-PCR 检测方法的建立与应用[J]. 动物医学进展, 2013(12):6-10. DOI:10.16437/j.cnki.1007-5038.2013.12.026.
- [23] BAGASRA O. Protocols for the *in situ* PCR-amplification and detection of mRNA and DNA sequences[J]. Nature Protocols, 2007, 2(11):2782. DOI:10.1038/nprot.2007.395.
- [24] JOHANSEN B O. *In situ* PCR on plant material with sub-cellular resolution[J]. Annals of Botany, 1997, 80(5):697-700. DOI:10.1006/anbo.1997.0502.
- [25] KOLTAI H, BIRD D M. High throughput cellular localization of specific plant mRNAs by liquid-phase *in situ* reverse transcription-polymerase chain reaction of tissue sections[J]. Plant Physiology, 2000, 123(4):1203. DOI:10.1104/pp.123.4.1203.
- [26] PESQUET E, BARBIER O, RANOCIA P, *et al.* Multiple gene detection by *in situ*, RT-PCR in isolated plant cells and tissues[J]. Plant Journal, 2004, 39(6):947-959. DOI:10.1111/j.1365-313X.2004.02170.x.
- [27] MARTHALER T. Selective expression of a novel high-affinity transport system for acidic and neutral amino acids in the tapetum cells of Arabidopsis flowers[J]. Plant Journal for Cell and Molecular Biology, 2004, 40(1):60-74. DOI:10.1111/j.1365-313X.2004.02186.
- [28] PRZYBECKI Z, SIEDLECKA E, FILIPECKI M, *et al.* *In situ* reverse transcription PCR on plant tissues[J]. Methods in Molecular Biology, 2006, 334(334):181. DOI:10.1385/1-59745-068-5:181.
- [29] O'LEARY J J, CHETTY R, GRAHAM A K, *et al.* *In situ* PCR: Pathologist's dream or nightmare? [J]. Journal of Pathology, 1996, 178(1):11-20. DOI:10.1002/(SICI)1096-9896(199601)178:1<11::AID-PATH459>3.0.CO;2-R.

(责任编辑: 陈志贤 英文审校: 刘源岗)