

实时定量荧光PCR法检测马铃薯黑胫病菌

杨 松^{1,2}, 胡林双^{2*}, 吕文河^{1*}, 魏 琪², 董学志², 吕 明³, 高秀妍¹

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 黑龙江 150030; 2. 黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 哈尔滨 黑龙江 150086;
3. 黑龙江生态工程职业学院, 哈尔滨 黑龙江 150025)

摘 要: 马铃薯黑胫病是国内外马铃薯产区发生比较普遍的一种细菌性病害, 严重地影响了马铃薯的产量和质量。本研究根据 Potato Black Leg 序列, 设计出马铃薯黑胫病菌特异性的引物, 对 10 种供试菌株进行了实时荧光 PCR 检测。结果表明, 该方法的特异性好, 可以将马铃薯黑胫病菌和其它马铃薯常见病害相区分; 灵敏度较高, 可检测出最低的黑胫病菌浓度为 $3.6\sim 3.9 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$; 而且检测时间仅用 4 h, 大大缩短了检测周期。该方法可有效地应用于马铃薯黑胫病菌的检测和监控。

关键词: 马铃薯; 黑胫病; 实时定量荧光 PCR

马铃薯黑胫病(Potato Black Leg)是由 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 引起的一种细菌性病害, 它的寄主范围仅限于马铃薯^[1], 是马铃薯生产上危害比较大的病害之一。据国外资料报道, 产量损失率为 3%~68%, 平均 15%^[2], 在大田生长期常引起烂种和死芽死苗, 严重时可导致缺苗断垄^[3], 还可在温度高的薯窖内引起严重烂薯。凡有马铃薯种植的地方黑胫病均有发生^[3-5]。常用的防治方法是种植无病种薯^[4,5], 但无病种薯种植田间仍然受到侵害^[4-7]。田间侵染途径除带菌雨水、昆虫、灌溉水、汽雾、机械和杂草^[5-10]等外, 土壤传播也很重要^[4-7]。在土壤传播中马铃薯病组织具有很强作用^[3,9], 病组织经过各种渠道进入农家肥后施到田间^[11]。虽然病菌群体减少, 但在病组织腐烂之前仍能存活^[7]。带菌种薯播种后, 在适宜条件下, 细菌沿维管束侵染块茎幼芽, 随着植株生长, 侵入根、茎、匍匐茎和新生块茎, 并从维管束向四周扩展, 侵入附近薄壁组织的细胞间隙, 分泌果胶酶溶解细胞的中胶层, 使细

胞离析, 组织解体, 呈腐烂状^[11]。

到目前为止, 我国尚未建立起对马铃薯黑胫病检疫性有害生物快速、有效的检测方法, 由于这种病主要靠种薯传播, 如控制不好病原, 将会给我国马铃薯生产造成不可估量的损失, 后果不堪设想。建立一套完整的黑胫病病原细菌的检测方法, 可以有效地控制这种病菌的传播, 对保护我国马铃薯生产、维护我国正常的贸易、使我国的经济利益不受损失、在解除贸易壁垒同时成功地对外实施技术壁垒上有着重大意义。鉴于实时定量荧光PCR高效的检测速度、检测的灵敏度和准确度^[12], 本研究首次应用此方法对马铃薯黑胫病菌进行实时定量荧光PCR的检测。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

试验中所用的菌株采集地与采集年限等情况见表 1。

1.2 主要仪器与试剂

荧光 PCR 试剂盒(欧比特仪器有限公司ABI), rTaq 酶、dNTPs、DNAMarker DL2000 均购自大连宝(TaKaRa)生物工程公司, DYY-2C 电泳仪(北京六一), UV-2550 紫外分光光度计(岛津), PCR 仪 TGRADIENT(BIOMETRA), MIKRO 22R 台式离心

收稿日期: 2008-11-12

基金项目: 黑龙江省青年基金(QC06C083); 黑龙江省攻关计划项目(GB06B108-2/GB06B108-3); 黑龙江省重点攻关计划项目(GA08B102)。

作者简介: 杨松(1979-), 男, 硕士研究生, 主要从事马铃薯抗病育种研究。

* 通讯作者: E-mail: hulinshuang@126.com; whlu@mail.neau.edu.cn

机(德国 Hettich), 7300 实时荧光 PCR 仪(美国 ABI 公司)。马铃薯黑胫病菌、马铃薯环腐病菌、马铃薯青枯病菌、马铃薯晚疫病菌(黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所)。

表 1 供试菌株的检测地及采集时间

菌株号	菌株	地区	采集时间
1	gsh1	甘肃	2007
2	byr1	巴彦	2007
3	byr2	巴彦	2007
4	byh3	巴彦	2007
5	byh3	巴彦	2007
6	bl1	哈尔滨红旗农场	2007
7	bl2	哈尔滨红旗农场	2007
8	nmh1	内蒙	2007
9	gdh1	广东	2008
10	gxh1	广西	2008

1.3 方法

1.3.1 实时定量荧光 PCR 的引物的设计

利用引物设计软件 primer premier 5.0, 设计荧光 PCR 引物与内参引物 Y1/Y2、NC1/NC2。引物由上海生工合成。序列如下:

Y1(5'GAATATCAATAGCACTATCCTCAG3')

Y2(5'CACATTATCAACCAACAGAACC3')

NC1(5'ATAATGTGCCTGCCGAGCCAAG3')

NC2(5'GCCGCCTACGCCAATGACC3')

1.3.2 核酸的提取

参照文献[13]中的从细菌中制备基因组 DNA 的基本方案进行。

1.3.3 实时定量荧光 PCR 引物 Y1/Y2 特异性试验

分别以马铃薯黑胫病菌、马铃薯环腐病菌、马铃薯青枯病菌、马铃薯晚疫病菌为模板, 以 Y1/Y2 为引物进行 PCR 检测, PCR 反应体系如下:

模板 1 μL , Taq 酶(5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)0.125 μL , L10 \times buffer 2.5 μL , Mg^{2+} (25 mmol)1.5 μL , dNTP 0.5 μL , 上游引物(100 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)0.5 μL , 下游引物(100 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)0.5 μL , 灭菌 dd H₂O 18.375 μL , 总体积 25 μL 。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 7 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环。再次 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.3.4 实时定量荧光 PCR 检测

将所有样品放入 7300 实时荧光 PCR 仪反应板

上, 设置反应条件, 进行荧光 PCR 检测, 反应结束后, 设置分析软件的基线和阈值, 最后得到每个样品的 Ct 值。反应体系如下:

ABI 荧光试剂 12.5 μL , 上游引物(100 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)0.5 μL , 下游引物(100 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$)0.5 μL , 模板 2.0 μL , 去离子水 9.5 μL 。反应条件: 第 1 个循环为 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 min, 后 40 个循环为 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min。

1.3.5 实时定量荧光 PCR 灵敏度检测

通过 CVP 培养基培养菌株 byh3, 配制 0.01 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO₄ 溶液。挑取马铃薯黑胫病菌落放入 0.01 mol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgSO₄ 溶液中, 在分光光度计下, 通过改变 MgSO₄ 溶液中黑胫病菌的浓度, 调整 OD 值为 0.06, 作为标准菌液(0.06=3.6~3.9 $\times 10^7$ cfu $\cdot\text{mL}^{-1}$), 然后将此标准菌液 10 倍梯度进行稀释。将不同的浓度的菌液, 用 Y1/Y2 引物进行实时荧光 PCR 扩增检测试验, 以确定 PCR 反应的灵敏度。

1.3.6 实时定量荧光 PCR 数据分析

采用比较 CT 法(ddCT)。

相对表达量 = $2^{-\Delta\text{CT}} = 2^{-(\text{CT}_{\text{处理}} - \text{CT}_{\text{对照}})} = 2^{-(\text{CT}_{\text{处理}} - \text{CT}_{\text{内参}})}$
(CT 对照 - CT 内参)

数据取 2 次重复平均值。

2 结果与分析

2.1 实时定量荧光 PCR 引物特异性

分别以马铃薯黑胫病菌 DNA、环腐病菌 DNA、青枯病菌 DNA、晚疫病菌 DNA 为模板, 以马铃薯荧光 PCR 引物 Y1/Y2 为引物, 进行 PCR 扩增, 结果只有黑胫病菌表现为阳性扩增, 而其它马铃薯常见病菌及阴性对照都没有扩增(图 1)。

2.2 实时定量荧光 PCR 检测

利用设计的实时定量荧光 PCR 引物对检测菌株 byh3、gsh1、nmh1、gdh1 及阴性对照进行实时定量荧光 PCR 检测, 结果被检测菌株有强的荧光增强信号, 表现为阳性扩增, 而阴性对照都没有荧光信号增加, 表现为阴性(图 2)。溶解曲线只有一个峰, 表明反应过程中没有非靶标产物的生成, 主峰明显、扩增曲线也十分光滑, 表明结果较为可靠。

2.3 实时定量荧光 PCR 灵敏度

当菌株 byh3 稀释液浓度 > 3.6~3.9 cfu $\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 可以检测到较强的荧光信号。当 byh3 稀释液浓度为 0.36~0.39 cfu $\cdot\text{mL}^{-1}$ 时, 荧光信号非常地微弱。可见 Real-time PCR 检测灵敏度为 3.6~3.9 cfu $\cdot\text{mL}^{-1}$ (图 3)。

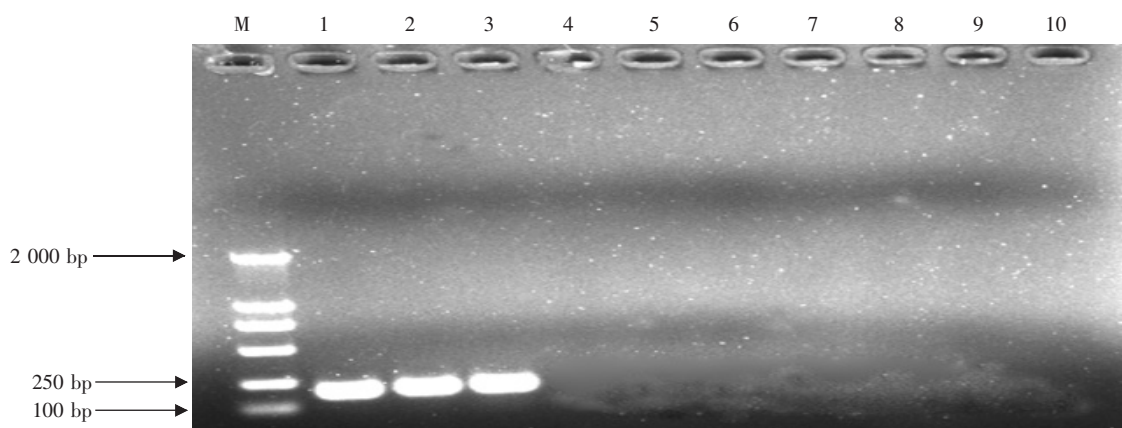


图 1 马铃薯实时定量荧光 PCR 检测引物 Y1/Y2 对黑胫病菌、环腐病菌、青枯病菌、晚疫病菌进行 PCR 检测

M : marker DL2000 ; 1-3 : 黑胫病 ; 4、5 : 环腐病 ; 6、7 : 青枯病 ; 8、9 : 晚疫病 ; 10 : 阴性对照。

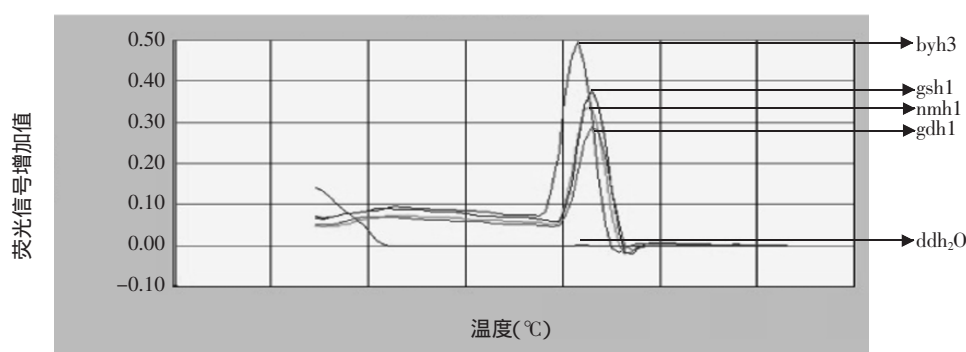


图 2 实时定量荧光 PCR 产物的熔解曲线

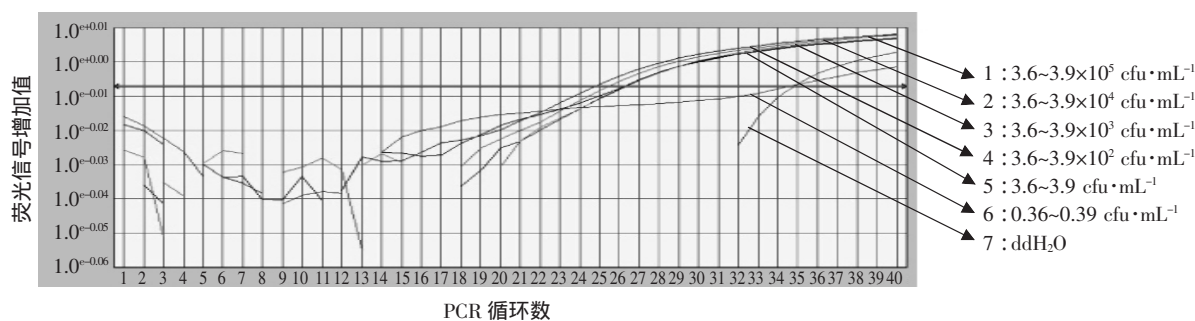


图 3 实时定量荧光 PCR 检测灵敏度

2.3 马铃薯黑胫病菌实时荧光 PCR 数据分析

表 2 是实时定量荧光 PCR 的检测结果, 其中相同的菌株经过两次重复试验, 仪器读取 CT_1 、 CT_2 两个数值。

CT_1 和 CT_2 取平均值即为 CT 值。根据公式计算得到 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示检测的马铃薯黑胫病起始浓度与阳性黑胫病起始浓度的比值。阳性马铃薯黑胫病起始浓度为 $3.6\sim 3.9\times 10^7$ cfu·mL⁻¹, 以此确定了各

待测菌株的起始浓度。虽然所有的马铃薯测试的样品看上去很健康, 大约一半以上的马铃薯薯块带有 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 的潜在感染。根据薯块的黑胫病不同的浓度水平, 种植后植株上的表现也不相同。一般是较低的或者没有受到 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 的感染马铃薯薯块, 在分子检测后被认定是更适合于长期的储存; 并且可能是在第二年马铃薯种植中的首选。因

为它的产量和质量能够提高。通过此种方法的应用, 可以监控马铃薯薯块上 *Erwinia carotovora*

subsp. *atroseptica* 的浓度, 从而达到对 *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* 的控制。

表 2 马铃薯黑胫病菌实时定量荧光 PCR 检测

样品	引物	CT ₁	CT ₂	CT	dCT	ddCT	2 ^{-dΔCT}
H ₂ O	Y1/Y2	-	-	34.67	-	-	-
CK	Y1/Y2	35.87	36.57	36.22	-	0	1
CK	N1/N2	26.05	22.31	24.18	-	0	1
byr1	Y1/Y2	13.30	13.91	13.60	22.62	-18.79	2 ^{18.79}
byr1	N1/N2	20.24	20.46	20.35	3.83	-	-
byr2	Y1/Y2	24.23	24.39	24.31	11.91	-16.93	2 ^{16.93}
byr2	N1/N2	28.50	29.90	29.20	-5.02	-	-
byh2	Y1/Y2	25.82	28.88	27.35	8.87	-13.24	2 ^{13.24}
byh2	N1/N2	27.86	29.24	28.55	-4.37	-	-
byh3	Y1/Y2	15.52	15.31	15.42	20.80	-10.18	2 ^{10.18}
byh3	N1/N2	13.25	13.87	13.56	10.62	-	-
gsh1	Y1/Y2	17.47	17.63	17.55	18.67	-16.73	2 ^{16.73}
gsh1	N1/N2	22.21	22.27	22.24	1.94	-	-
nmh1	Y1/Y2	22.26	21.98	22.12	14.10	-13.55	2 ^{13.55}
nmh1	N1/N2	23.60	23.66	23.63	0.55	-	-
gdh1	Y1/Y2	26.26	26.18	26.22	10.00	-10.98	2 ^{10.98}
gdh1	N1/N2	25.49	24.83	25.16	-0.98	-	-
bl1	Y1/Y2	25.44	24.69	25.06	11.16	-17.19	2 ^{17.19}
bl1	N1/N2	30.11	30.31	30.21	-6.03	-	-
bl2	Y1/Y2	25.36	25.11	25.24	10.98	-13.48	2 ^{13.48}
bl2	N1/N2	27.52	25.84	26.68	-2.50	-	-
gxh1	Y1/Y2	33.87	33.00	33.44	2.78	-11.24	2 ^{11.24}
gxh1	N1/N2	31.75	33.53	32.64	-8.46	-	-

3 讨论

SYBR Green 是一种结合于小沟中的双链 DNA 结合染料。在 PCR 反应体系中, 加入过量 SYBR Green 荧光染料, 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后, 发射荧光信号, 而不掺入链中的染料分子不会发射任何荧光信号, 从而保证荧光信号的增加与 PCR 产物的增加完全同步, 当 PCR 扩增完成后, SYBR Green 染料与双链产物结合, PCR 系统检测到荧光的净增量加大^[14]。Ct 值是指每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数, PCR 反应的前 15 个循环的荧光信号作为荧光本底信号。研究表明, 每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, Ct 值越小^[15]。本研究中, SYBR Green 荧光染料能与所有

的 DNA 双链相结合, 不必因模板不同而特别定制, 试验设计简单, 成本低廉, 可用于多种目标基因的检测, 通过熔解曲线分析可以识别扩增产物和引物二聚体, 因而可以区分非特异扩增, 与常规 PCR 相比, SYBR Green 实时荧光 PCR 具有灵敏度高、特异性更强、自动化程度高和有效解决 PCR 污染问题等优点, 同时 SYBR Green 实时荧光 PCR 对引物要求较高, 为避免二聚体的产生, 扩增目的片段一般控制在 100~200 bp 以内, 对模板 DNA 的纯度要求也相对较高。

本研究成功地设计并且合成了马铃薯黑胫病菌实时定量荧光 PCR 特异性引物, 建立了马铃薯黑胫病菌实时定量荧光 PCR 检测体系。结果表明此检测体系有如下特点: (1) 可靠性好、敏感性高。可检测到浓度为 3.6~3.9×10⁷ cfu·mL⁻¹ 的黑胫病菌,

比普通PCR方法灵敏度有所提高。可检测未经过分离纯化的样品。(2)特异性强。收集荧光在较高的退火温度进行,排除了模板的非特异性扩增,同时,其它马铃薯常见病菌为模板时没有扩增带。可用于马铃薯黑胫病菌特异性的实时定量荧光PCR检测。(3)操作简单,结果观察直观明了。采用闭管检测和荧光技术,避免了普通PCR反应后的样本处理以及可能的残留物污染和容易产生交叉污染的缺陷,并可防止病毒扩散及环境污染,以及强致癌物溴乙锭对操作人员的危害。(4)持续监控。由于马铃薯黑胫病菌在马铃薯块茎上普遍存在,可以通过此方法对储藏马铃薯的黑胫病菌浓度进行监控,以选择相应的储藏条件。(5)快速检测。传统的马铃薯黑胫病菌分离方法耗时较长,至少需半个月,而本方法所需时间仅4 h,比传统方法大为缩短,并且具有高通量检测的特点,适用于马铃薯黑胫病菌的快速准确的检测。

[参 考 文 献]

- [1] Pérombelon, M C M, Salmond, G P C. Bacterial soft rots[M] // Singh U S, Singh R P, Kohmoto K. Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. Oxford: Pergamon Press, 1995, 1-17.
- [2] Lund M B. Bacteria soft rot of potatoes in plant pathogens [M]. New York: New York Academic Press, 1979.
- [3] 黑龙江省农业科学院马铃薯研究所. 中国马铃薯栽培学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994.
- [4] Elphinstona T G. Contamination of progeny tubers of potato plants by seed and leaf borne *Erwinia carotovora* [J]. Potato Research, 1986, 29(1): 77-93.
- [5] Harrison M D, Nielsen L W. Blackleg, bacterial soft rot [M]. Hooker W J. Compendium of potato diseases, St. Paul, USA: APS, 1981.
- [6] Powelson M L, Apple J D. Potato blackleg in progeny plantings from diseased and symptomless parents [J]. Phytopathology, 1986, 76(1): 56-60.
- [7] Pérombelon M, Kelman A. Ecology of the soft rot *Erwinia* [J]. Annu Rev Phytopathol, 1980, 18: 361-387.
- [8] Jorge P E, Harrison M D. The association of *Erwinia carotovora* with surface water in northeastern Colorado [J]. American Potato Journal, 1986, 63(10): 517-538.
- [9] Maher E A, De Boer S H, Kelman A. Serogroups of *Erwinia carotovora* involved in systemic infection of potato plants and infection of progeny tubers [J]. Am Potato J, 1986, 63: 1-11.
- [10] Kimura S, Yanagita K. Population of blackleg pathogens on disease potato plants [J]. Res Bull Hokkaido Natl Agric Exp Stn, 1980, 125: 17-22.
- [11] 孙秀梅. 黑龙江省马铃薯黑胫病的发生与防治[J]. 中国农村小康科技, 2005, 12: 44.
- [12] Weller S A, Dteael D E. Detection of root rot associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR [J]. J Appl Microbiol, 2002, 92: 118-126.
- [13] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998.
- [14] Morrison T B, Weis J J, Wittwer C T. Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR-Green monitoring during amplification [J]. Bio Techniques, 1998, 24: 954-962.
- [15] 朱水芳. 实时荧光聚合酶链反应(PCR)检测技术 [M]. 北京: 中国计量出版社, 2003.

Detection of Potato Blackleg by Real-time Quantitative PCR

Yang Song^{1,2}, Hu Linshuang², Lu Wenhe¹, Wei Qi², Dong Xuezhi², Lu Ming³, Gao Xiuyan¹

(1. Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China;

2. Virus-free Seedling Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China;

3. Heilongjiang Vocational Institute of Ecological Engineering, Harbin, Heilongjiang 150025, China)

Abstract: Potato blackleg, a seed tuber-born disease, is caused by *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Eca) in temperate regions, which seriously threatens the potato production and tuber quality. In this research, specific primers were designed and developed for potato blackleg based on its sequences, and ten samples were tested by QPCR. The method was specific for potato blackleg and could distinguish this disease from others. Also, it was sensitive and as low as 3.6~3.9 cfu·mL⁻¹ could be detected. The test process needed only 4 h and therefore reduced the time for testing the disease. This method should be used for testing and monitoring potato blackleg.

Key Word: potato; potato blackleg; real-time quantitative PCR