

马铃薯黑胫病菌检测技术

胡林双^{1*}, 杨松^{1,2}, 董学志¹, 魏琪¹, 吕文河²

(1. 黑龙江省农业科学院脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

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, 这种病害造成马铃薯块茎损失可高达 30%~50%, 严重地影响了马铃薯的产量和质量。文章就近几年国内外对该细菌的检测技术, 包括症状识别、细菌分离、酶联免疫吸附法、菌落免疫荧光染色法、AFLP 指纹识别技术、荧光实时定量 PCR 检测技术、PCR-RFLP 检测技术、T-RFLP 检测技术的研究进展做了阐述。

关键词: 马铃薯; 黑胫病; 检测技术

黑胫病(Potato Black Leg)是马铃薯的重要病害, 据国外资料报道, 损失率为 3%~68%, 平均 15%^[1], 造成的块茎损失有时可高达 30%~50%, 而且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^[2], 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均有发生^[3-5]。

马铃薯黑胫病的防治方法是种植无病种薯^[3,4], 但无病种薯种植田间仍然受侵^[3-6]。田间侵染途径除带菌雨水、昆虫、灌溉水、汽雾、机械和杂草^[4-9]等外, 土壤传播也很重要^[3-6]。在土壤传播中马铃薯病组织具有很强的作用^[3,9], 病组织通过各种渠道进入农家肥后施到田间^[10]。虽然病菌群体减少, 但在病组织腐烂之前仍能存活^[6]。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^[10]。

近 10 几年, 国内外学者从以传统生理学检测方法为基础的研究水平发展到以免疫学或分子生物学为基础的快速检测方法, 并在实践中不断取得新进展。本文主要就对马铃薯黑胫病快速检测

方法进行综述, 包括传统的检测方法、免疫学检测技术、核酸检测技术、核酸检测技术与免疫学检测技术相结合的检测技术。

1 传统的检测方法

1.1 症状识别

病株一般在植株高 16~20 cm 时表现症状。植株矮小, 叶色褪绿, 茎基以上部位组织发黑腐烂, 由于植株茎基和地下部受害, 影响水分和养分的吸收和传导, 早期病株很快萎蔫枯死, 不能结薯, 且根系不发达, 易从土中拔出。纵剖茎部可见维管束变褐色。纵剖块茎, 可看到病薯的病部和健部分界明显, 病组织柔软, 常形成黑色孔洞。病轻的, 只脐部呈很小的黑斑, 有时能看到薯块切面维管束呈黑色小点状或断线状。而感病最轻的, 病薯内部无明显症状。在马铃薯黑胫病检测中, 田间观察一直是病害监测的重要手段, 然而这种方法的准确性常常受到环境条件、非侵染性病害以及其它侵染性病害所引致的症状干扰, 使防治效果受到限制^[11]。

1.2 分离培养

在结晶紫多聚果酸钠培养基加入额外的溴甲酚紫, 黑胫病菌在结晶紫多聚果酸钠培养基中生长, 可以使果胶酸盐发生解聚作用, 生成盐酸, 导致培养基弱酸化, 3~4 d 后在培养基上形成典型的坑。此方法检测范围是每 40~60 cfu·cm⁻²^[12]。所有软腐欧氏杆菌均能在 CVP 琼脂培养基上形成半透明形

收稿日期: 2008-07-12

作者简介: 胡林双(1977-), 男, 硕士, 助理研究员, 从事马铃薯病害检测技术研究。

* 通讯作者: E-mail: hulinshuang@126.com

式的菌落,产生很深的、杯状的凹陷特征;在BPG琼脂平板上生长的菌落则呈白色或污白色,圆形凸起,边缘整齐、质地粘稠。此检测法基本特点是:操作相对粗放,使用受到劳动力、空间、灵敏度或特异性以及检测所需的时间等因素的限制,因此难以推广应用。

2 血清学检测方法

2.1 酶联免疫吸附测定(Enzyme Linked Immunosorbent Assay, ELISA)

酶联免疫吸附检测法主要用于植物病毒的检测,但近年来也在植物细菌检测上得到了应用。其原理是将抗原及抗体的免疫反应与酶的高效催化反应有机地结合起来,即通过化学的方法将酶和抗体结合起来,形成酶抗体。把抗原或抗体附着于固体表面,用结合了某种酶的特异抗体(酶标抗体)和抗原结合形成免疫和酶的复合物(抗原+酶标抗体),然后加入酶的反映底物,酶催化无色的底物发生水解、氧化或还原反应,生成可溶性或不可溶性的有色产物,从溶液的颜色变化,可以用肉眼或酶标仪判定和测定结果^[13]。国际推荐方法^[14]为双层抗体夹心的方法(DASI):在小孔中以4F6作为单克隆抗体识别Eca抗原,多克隆Eca抗体IVIA-4G4覆盖在小孔中并捕获细菌。与细菌发生交叉反应,多克隆抗体血清组犹如搭积木一样层层叠加,最顶层与酶相接触,溶液颜色发生变化,进行检测。它的检测范围是每mL富极培养基中含 $10^2\sim 10^6$ Eca细胞。鉴于此方法较高的特异性,可以应用单克隆抗体8B-IVIA为基础把酶与免疫吸收剂进行连接,进行DASI-ELISA检测。

2.2 菌落免疫荧光染色(Immunofluorescence Colony Staining, IFC)

这种方法是结合免疫荧光染色和菌落计数倒板选择性培养基进行检测。IFC方法的主要优势是确定菌株的数量。这种方法的灵敏性和稳定性是很高的,不依赖于背景的条件下可以检测到10~50个活细菌细胞。在菌落生长之后,如果培养基干枯了可以在任何时间着色、并计算^[13]。Gorris等^[14]采用7种Eca单克隆抗体对240个*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*细胞进行检测,有着颇高的灵敏性。但是IFC还有一些缺点,因为鉴于Eca的抗体成分,只有部分的抗体能够利用^[15]。

3 PCR技术在检测中的应用

3.1 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)指纹识别技术

Vos等^[16]首先描述了AFLP技术。此技术通过PCR对限制性片段进行选择性的扩增^[17],它可以在菌株种类之间进行有效的分离^[18],曾经用于大量有机体的基因差异和分离的研究。在不同的血清组中,AFLP指纹识别技术已经应用于*Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*的分类。Avrova等^[19]应用酶EcoRI和MseI对黑胫病菌标准菌株SCRI 1039进行酶切、扩增、并且与不同的细菌种类进行比较,发现AFLP对区分*E. carotovora* subsp. *atroseptica*有很好的作用。虽然在许多有关联的分类中种间关系比较远,不能够采用AFLP指纹识别技术,但是在一定程度上,这个方法还是可以起到很好的鉴定作用。

3.2 荧光实时定量PCR(Real-time Quantitative PCR)检测技术

该技术是指在PCR反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个PCR进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。目前,实时PCR有4种不同的荧光产生方法用于检测PCR扩增子的形成^[20]。由于实时荧光定量PCR技术不仅实现了PCR从定性到定量的飞跃,而且与常规PCR相比,它不需Southern杂交鉴定PCR产物,减少了交叉污染的可能性,而且需要的劳动力较少、自动化程度高、易于操作,可以用于多重PCR,近几年来,因其方便、快捷、精确、专一等显著特性,实时定量PCR技术已被越来越多地用于植物病原细菌的检测中^[21]。

3.3 PCR-RFLP(Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism)检测技术

RFLP是指一个物种的DNA被某种特定的限制性内切酶消化所产生的DNA片段长度的变异性,这种变异的产生或是由于单个碱基的突变所导致的限制性酶切位点的增加或消失,或是由于DNA序列插入、缺失、倒位、易位等变化所引起的结构重排所致^[22]。Waleron等^[23]采用PCR-RFLP对177个黑胫病菌株进行测试。用4种限制性内切酶(AluI, HinfI, TaqI和TruII)对PCR-RFLP扩增的DNA片段进行环切,根据环切片段的数量和位置进行鉴定,得出结论PCR-RFLP分析recA基因片段是检

测 *Erwinia* 的一个有效的方法。

3.4 T-RFLP (Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism) 检测技术

T-RFLP 检测技术又称为 16sRNA 基因的末端限制性片段分析技术。原理是根据保守区设计通用引物, 其中一个引物的 5' 末端用荧光物质标记, 常用荧光物质有 HEX, TET, 6-FAM 等。提取样品中的 DNA, 以它为模板进行 PCR 扩张, 所得到的 PCR 产物的一段就带有这种荧光标记, 然后 PCR 产物有合适的限制性内切酶进行消化, 一般选用酶切位点为 4 bp 的限制性内切酶。由于在不同细菌的扩增片段内存在核苷酸序列的差异, 酶切位点就会存在差异, 酶切后就会产生很多不同长度的限制性片段。消化产物用自动测序仪进行测定, 只有末端带有荧光性标记的片段能被检测到。因为不同长度的末端限制性片段必然代表不同的细菌, 通过检测这些末端标记的片段就可以反应微生物群落组成情况。Reiter 等^[24] 鉴于不同细菌间的 16sRNA 序列的不同, 通过 T-RFLP 实验发现感染了 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 的植株与健康的植株进行比较表现出较大的差异。Shannon-Weaver 显示感病的植株测定参数为 2.26 到 2.49, 不感病的植株测定参数为 1.58 到 1.79。这个数值和植株中所含 *E. carotovora* subsp. *atroseptica* 的浓度呈线性关系。此技术具有准确可靠等优点, 但该技术存在操作烦琐、放射污染等缺点, 而且细菌的基因组比较小, 酶切位点较少, 反映的多态性不丰富^[22]。

4 结 语

对于马铃薯黑胫病菌的常规检测, 血清学方法仍然不失为一种准确、快速、简易可行的鉴定方法。并且检测成本较低、可操作性强, 但如何克服与其它相近病菌的交叉反应以及如何进一步提高血清学反应的特异性和灵敏度, 是今后研究工作的重点。在分子水平上进行马铃薯黑胫病菌的检测前景广阔, 尤其针对存在于样品中的潜伏侵染的检测, 需要探讨研究的内容很广泛。因而实际推广应用难度较大。马铃薯黑胫病现在仍然是冷凉地区马铃薯生产上一种主要的细菌性病害, 对于黑胫菌的鉴定检测不能单单依靠一种方法, 因为任何一种方法都有其缺点和局限性, 为得到真实、可靠的判定结果, 应将多种方法取得的结果结合起来进行最终判

定, 因此针对马铃薯黑胫菌鉴定检测建立一套完整的技术体系十分必要。这个体系大致应包括田间病症诊断、病原菌的分离、生理生化特征鉴定和分子水平检测, 这样才能对样品进行宏观和微观的综合评价, 最后做出真实、客观的判定。

[参 考 文 献]

- [1] Lund B M. Bacterial soft rot of potatoes [M]// Lovelock D W, Davies R. Plant pathogens. Society of Applied Bacteriology Technical Series No 12. London/New York: Academic Press, 1979.
- [2] 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: 327-331.
- [3] 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.
- [4] Harrison M D, Nielsen L W. Blackleg, bacterial soft rot [M]// Hooker W J. Compendium of potato diseases. St. Paul: American Phytopathological Society, 1981: 27-29.
- [5] Powelson M L, Apple J D. Potato blackleg in progeny plantings from diseased and symptomless parents [J]. Phytopathology, 1986, 76(1): 56-60.
- [6] Pérombelon M, Kelman A. Ecology of the soft rot *Erwinia* [J]. Annu Rev Phytopathol, 1980, 18: 361-387.
- [7] 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.
- [8] Maher E A, De Boer S H, Kelman A. Serogroups of *Erwinia carotovora* involved in systemic infection of potato plants and infestation of progeny tubers [J]. Am Potato J, 1986, 63: 1-11.
- [9] Kimara S. Population of blackleg pathogen on diseased potato plants [J]. Potato Abstaces, 1980, 7(4): 63-82.
- [10] 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.
- [11] 于恒纯, 滕丽雅, 闫明宇. 黑龙江省马铃薯细菌病害调查初报 [J]. 中国马铃薯, 2003, 7(2): 122-123.
- [12] Arias R S, Murakami P K, Alvarez A M. Rapid detection of pectolytic *Erwinia* sp. in *Aglaonema* sp [J]. Hort Technology, 1998, 8: 464-626.
- [13] 于恒纯, 姚德海, 闫明宇. 酶联免疫吸附检测法(ELISA)在马铃薯环腐病检测中的应用 [J]. 中国马铃薯, 2003, 17(1): 44.
- [14] Gorris M T, Alarcon B, Lopez M M, et al. Characterization of

- monoclonal antibodies specific for *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and comparison of serological methods for its sensitive detection on potato tubers [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60 (6): 2076–2085.
- [15] Pearimbelon M C M, Van Der Wolf J M. Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *atrosepticum*) on potatoes [J]. *Scottish Crop Research Institute Occasional Publication*, 2002, 10:34–37.
- [16] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. A new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407–4414.
- [17] Janssen P, Coopman R, Huys G, et al. Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy [J]. *Microbiology*, 1996, 142: 1881–1893.
- [18] Vandamme P, Pot B, Gillis M, et al. A consensus approach to bacterial systematics[J]. *Microbiol Rev*, 1996, 60: 407–438.
- [19] Avrova A O, Hyman L J, Toth R L, et al. Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi* [J]. *Microbiology*, 2002(68): 1499–1508.
- [20] Mackayi M, Arden K E, Nitsche A. Survey of real-time PCR in virology [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 1292–1305.
- [21] 闻慧, 刘兴洋, 李国英, 等. 甜瓜细菌性果斑病菌检测技术研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35: 6182–6185.
- [22] 何云霞, 张儒喜, 白艳菊, 等. 马铃薯环腐病菌鉴定检测技术研究进展[J]. *中国马铃薯*, 2004, 18(3): 159–162.
- [23] Waleron M, Waleron K, Podhajska A J, et al. Genotyping of bacteria belonging to the former *Erwinia* genus by PCR-RFLP analysis of a *recA* gene fragment [J]. *Microbiology*, 2002, 148: 583–595.
- [24] Reiter B, Pfeifer U, Schwab H, et al. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(5): 2261–2268.

关于征集 2009 年中国马铃薯大会会议论文的通知

为落实 2008 年中国作物学会马铃薯专业委员会学术年会会议纪要精神, 马铃薯专业委员会决定于 2009 年 7 月在陕西榆林市召开 2009 年中国马铃薯大会, 会议主题为——马铃薯产业与粮食安全。为保证这次会议论文的正常出版, 现提前征集, 望广大马铃薯工作者相互转告。具体要求如下:

1. 论文必须是反映近年来各地(单位)科研、生产、开发等方面的成果、信息, 内容要新颖, 文字简练, 论点明确, 书写规范、数据可靠、图表清晰, 标点正确。

2. 综述学术及实验性论文一般不超过 6 000 字(含图表), 包括题目、作者姓名、工作单位、地址、邮政编码、中文摘要、关键词、正文、参考文献等。一般性论文(如栽培技术、产业开发、经验交流、品种介绍、病害防治等)要求在 3 000 字左右, 包括题目、作者姓名、工作单位、地址、邮编、正文等。

3. 论文来稿请注明第一作者简介, 包括性别、出生年、职务职称、从事工作或研究方向等, 还请在首页地脚处注明资助该论文的各种基金、课题项目名称及编号, 同时提供联系电话。

4. 论文来稿需提供电子版文档, 并注明“2009 年年会论文”字样。

来稿请寄: 哈尔滨市东北农业大学《中国马铃薯》编辑部 150030)

E-mail: potatobjb@neau.edu.cn

中国作物学会马铃薯专业委员会