

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2007)04-0206-03

马铃薯软腐病菌的 16SrDNA PCR 检测

王敏¹, 张茹²

(1. 甘肃省农业科学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 马铃薯软腐病是威胁马铃薯块茎的细菌性病害之一, 为了提高马铃薯的品质与产量, 减少贮藏期马铃薯块茎的腐烂, 对马铃薯进行软腐病检测与鉴定是十分必要的。利用 16SrDNA PCR 对马铃薯软腐病原菌的进行检测, 证实 16SrDNA PCR 检测技术是可行可靠的。在对 PCR 引物的筛选中, 要根据所检测的对象进行有效、合理的设计, 才能达到快速有效的目的。以马铃薯软腐病菌为代表, 利用 16SrDNA PCR 进行鉴定, 达到了预期的目的, 为病原菌的快速鉴定方法提供了依据。

关键词: 马铃薯; 16SrDNA; PCR; 病原菌

马铃薯软腐病是影响马铃薯生产的病害之一^[1]。马铃薯软腐病主要是病菌在种薯内越冬, 并通过切刀进行病害传播, 因此控制病害的初来源是病害防治的重要措施之一^[2]。为经济有效地防治马铃薯软腐病, 快速、准确的检测是十分重要的步骤。

在马铃薯软腐病检测中, 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。在马铃薯细菌性病原菌的检测中, 已有的检测方法有, 如革兰氏染色法^[3]、生理生化法^[3]、酶联吸附^[4]测定等方法已经证实是有效的, 但是它们的使用受到劳动力、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。随着聚合酶链式反应技术在 DNA 水平上检测病菌方法的发展, 本试验应用 16SrDNA PCR 技术检测马铃薯软腐病菌, 证明其是有效、可靠的, 本文将对这一研究方法及其结果作一个介绍。

1 方法

1.1 供试菌株

供试菌株由甘肃农业大学植保系李金花老师提供。

收稿日期: 2007-03-09

基金项目: 教育部国际合作项目: 应用基因工程提高马铃薯加工型品种的抗逆性

作者简介: 王敏(1980-), 女, 研究实习员, 主要从事植物生物技术育种。

菌株 DNA 的提取:

将培养至饱和状态的菌悬液在 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后, 按照《精编分子生物学实验指南》^[5] 的方法进行 DNA 的提取。

(1) TE 缓冲液

10%(W/V)十二烷基硫酸钠(SDS);

20 mg·mL⁻¹ 蛋白酶 K(分成单次使用的小份贮藏于-20℃);

5 mol·L⁻¹ NaCl;

CTAB/NaCl 溶液;

24:1 的氯仿/异戊醇;

异丙醇;

70%乙醇。

(2) 步骤

① 培养 5 mL 的细菌培养物至饱和状态, 取 1.5 mL 培养物离心 2 min;

② 沉淀物加入 567 μL 的 TE 缓冲液, 用吸管反复吹打使之重悬。加入 30 μL, 10%的 SDS 和 3 μL, 20 mg·mL⁻¹ 的蛋白酶 K, 混匀, 于 37℃温育 1 h;

③ 加入 100 μL, 5 mol·L⁻¹ NaCl, 充分混匀, 再加入 80 μL CTAB/NaCl 溶液, 混匀, 于 65℃温育 10 min;

从这一步开始可以除去多糖和其他污染的大分子物质。

④ 加入等体积的氯仿/异戊醇, 混匀, 离心 4~5 min; 将上清液转入一个新管中, 如果难以移出

上清, 先用牙签除去界面物质;

⑤ 加入等体积的酚/氯仿/异戊醇, 混匀, 离心 5 min, 将上清液转入一只新管中。

对于某些细菌株由于氯仿抽提形成的界面不够紧密, 不容易移出上清液, 这种情况下, 在移出上清液之前, 用无菌牙签挑出大部分的界面物质, 残存的 CTAB 沉淀物随后在酚/氯仿抽提中被除去。

⑥ 加入 0.6 体积的异丙醇, 轻轻混合直到 DNA 沉淀下来, 用一个封口的巴斯德管将沉淀转移至 1 mL 的 70%乙醇中洗涤;

⑦ 离心 5 min, 弃上清液, 用冻干机稍加干燥, 重溶于 100 μ L 的 TE 缓冲液, 保存于 -20 $^{\circ}$ C。

病原细菌培养至饱和状态后离心(10 000 $r \cdot \text{min}^{-1}$, 2 min), 10%的 SDS 去破壁, 蛋白酶 K 溶解蛋白, CTAB/NaCl 去多糖, 24:1 的氯仿/异戊醇和 25:24:1 的酚/氯仿/异戊醇抽提, 异丙醇沉淀 DNA, 最后以 TE 缓冲液溶解。

1.2 PCR 检测

(1) PCR 引物: 根据细菌特有的高度保守序列 16SrDNA, 设计合成了一对引物:

p1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')

p2(5'-TACCTTGTTACGACTT-3')

(2) PCR 混合物: 16S rDNA-PCR 的反应体系为 10 \times 的 Taq Buffer 4 μ L, dNTP 2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Taq 酶 1 μ L, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的引物 0.5 μ L, 模板 1 μ L, 使用超纯水将反应体系补至 50 μ L。

(3) PCR 反应: 热循环参数设置为: 预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 进行 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物采用北京天为时代科技有限公司的离心柱型 PCR 产物纯化试剂盒(普通型)进行纯化。取 6~8 μ L 扩增产物于 0.7%的琼脂糖凝胶上电泳, 利用凝胶成像系统成像, 并对 PCR 产物送上海生工公司测序。

2 结 果

试验是通过原核生物高度保守序列 16S rDNA 进行引物的设计与合成, 得到了与马铃薯软腐病原菌 *Erwinia persicinus* DNA 序列同源性在 100% rPCR 产物, 结果见图 1。

16S rDNA 约有 1500 多个核苷酸, 包括几个高度保守的区域和几个高变区域。对于 16S rDNA 进

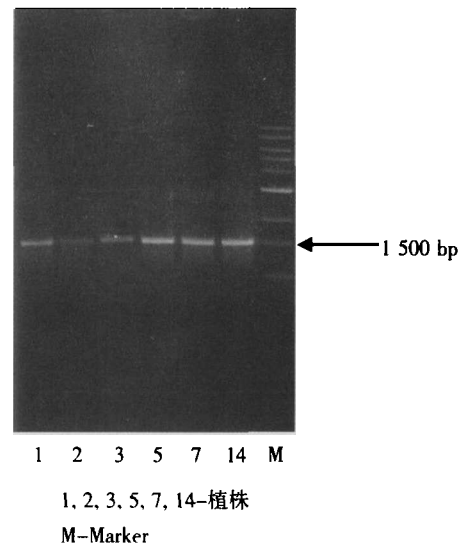


图 1 扩增产物

行序列分析主要采用 rRNA 寡核苷酸编目法, 16S rDNA 反转录法, 16S rDNA 直接测序法 3 种。目前在细菌分类鉴定中应用较多的是 16SrDNA 的直接测序: 提取总 DNA, 加入特定的引物, PCR 扩增出 16S rDNA 片段, 扩增产物被纯化后测序, 即可进行分类与鉴定 16S rDNA 序列分析已成为细菌种属鉴定和分类的标准方法, 大约 2500 个种的 16S rDNA 全序列已经被报道。

3 结 论

Erwinia persicinus 是土壤、水中的腐生细菌, 属于条件致病菌^[6-9]。由于马铃薯营养丰富, 播种时采用切块播种人为造成了伤口, 因此给一些腐生菌的生存和繁殖创造了条件, 加速了块茎的腐烂。

近年来, 利用 RAPD、AFLP、RFLP 以 rDNA 等分子生物学方法对细菌、真菌的分类及鉴定应用逐渐增多^[10-15]。16S rRNA 作为蛋白质合成的必要场所, 存在于所有原核生物的细胞中并执行相同的功能; 由于其分子序列变化缓慢, 能够跨越整个生命进化过程; 而且它的分子中含有进化速度不同的区域, 可用于进化程度不同的生物之间的系统发育研究^[3]。因此, 在原核生物的鉴定中应用非常广泛^[10, 13-16]。本试验利用序列分析, 鉴定到 *Erwinia persicinus* 1 个菌株(3, 5, 7, 14)。16S rDNA PCR 反应与其它检测方法对比起来, 对于检测马铃薯软腐病菌是具有巨大潜力的, PCR 技术应用对马铃薯病菌的检测提供了一种快捷方便的方法, 但是对于引物的设计

与合成提出了更高的要求。引物的设计对于 PCR 技术是十分重要的, 正确的引物设计可以使得检测更加准确与可靠。在本次试验中, 只是对 16S rDNA PCR 技术的应用作了一个介绍, 对于马铃薯软腐病菌的检测, 更应该利用病原菌本身特有的 DNA 序列进行引物的设计与合成, 这样会使结果更加真实可信。

[参 考 文 献]

- [1] 孙慧生. 马铃薯育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [2] 王金生, 张学军, 方中达. 马铃薯块茎对软腐病抗性的评价方法及我国部分地区主要马铃薯品种的反应 [J]. 中国农业科学, 1986(4): 45-50.
- [3] 方中达. 植病研究方法 [M]. 北京: 农业出版社, 1998.
- [4] 李利军, 衣春生, 韩英, 等. 马铃薯环腐病菌的 PCR 检测 [J]. 马铃薯杂志, 1997, 11(3): 186-187.
- [5] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 R E, 等. 精编分子生物学实验指南 [M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学技术出版社, 1998.
- [6] Behrendt U, Ulrich A, Schumann P. Description of *Microbacterium foliorum* sp. nov. and *Microbacterium phyllosphaerae* sp. nov., isolated from the phyllosphere of grasses and the surface litter after mulching the sward, and reclassification of *Aureobacterium resistens* as *Microbacterium resistens* comb. nov. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51(4): 1267-1276.
- [7] Hao M V, Brenner D J, Steigerwalt A G, et al. *Erwinia persicinus*, a new species isolated from plants [J]. Int J Syst Bacteriol. 1990, 40(4): 379-83.
- [8] 徐秉良. 孜然芹根腐病原鉴定及种子带菌测定 [J]. 甘肃农业大学学报, 2002, 37(2): 200-203.
- [9] 李敏权, 张自和, 柴兆祥, 等. 紫花苜蓿白粉病病原鉴定 [J]. 甘肃农业大学学报, 2002, 37(3): 303-306.
- [10] 魏周全, 宗世忠, 张廷义. 定西市马铃薯病害调查 [J]. 中国马铃薯, 2005, 19(2): 124.
- [11] 姬广海, 魏兰芳, 张世光. PCR 技术在植物病原细菌研究中的应用 [J]. 微生物学通报, 2002, 29(4): 77-81.
- [12] 陈志伟, 姜成英, 刘双江. 云南和广东部分热泉 *Alicyclobacillus* 分布及系统发育 [J]. 微生物学通报, 2004, 31(3): 50-54.
- [13] 曾静, 岳坦, 王磊, 等. 新疆地区盐湖的中度嗜盐菌 16SrDNA 全序列及 DNA 同源性分析 [J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 133-137.
- [14] 韩如肠, 闵航, 陈美慈, 等. 嗜热厌氧纤维素降解细菌的分离、鉴定及其系统发育分析 [J]. 微生物学报, 2002, 42(2): 138-143.
- [15] 辛玉华, 陈文新. 两个黄芪根瘤菌新类群代表菌株的 16SrDNA 全序列 [J]. 微生物学报, 2002, 42(5): 521-525.
- [16] 焦振泉, 刘秀梅. 细菌分类与鉴定的新热点: 16S-23S rDNA 区间 [J]. 微生物学报, 2001, 28(1): 85-89.

Test for Soft Rot Pathogenic Bacteria on Potato via the Method of 16SrDNA PCR

Wang Min¹, Zhang Ru²

(1. Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. College of Agromomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: The soft rot of potato is one of the bacterium diseases influencing potato production. In order to improve the quality and yield of potato and decrease the rotten tubers, it is necessary to test the pathogen responsible for the soft rot effectively in potato. The test of soft rot pathogenic bacteria on potato via the method of 16S rDNA PCR was proven to be feasible and reliable. In the process of primer screening, the right primer can be reached by effective design based on the target tested. In the case of soft rot, 16S rDNA PCR could be used to test the pathogen, and this work lay a sound foundation for rapid detection of soft rot in potato.

Key Words: potato; 16SrDNA; PCR; pathogen