

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2006)04-0197-03

应用 PCR 技术快速检测马铃薯环腐病菌

胡林双, 何云霞, 郭梅, 王晓丹, 闵凡祥

(黑龙江省农业科学院植物脱毒苗木研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要: 根据马铃薯环腐病菌 16S rDNA 基因片段核苷酸序列设计引物 (引物 1 5'-TGTA CTGGCCAT-GACGTTGG-3 和引物 2 5'-TACTGGGTCATGTTGGT-3), 进行马铃薯环腐病菌 PCR 特异性扩增试验。合成的引物能从马铃薯环腐病菌总基因组 DNA 和细菌纯培养, 以及人工接种和自然发病的马铃薯块茎中特异性扩增环腐病菌 16S rDNA 基因片段 1046 bp。该试验结果为马铃薯环腐病的鉴定、检测及病害流行病学研究提供了新的技术和方法。

关键词: 马铃薯; 环腐病; 检测; PCR

马铃薯环腐病 (Potato ring rot) 是由 *Erwinia michiganensis* subsp. *sepedonicus* 引起的细菌性病

害, 它是马铃薯生产上危害最大的病害之一, 在全国各地都有分布, 每年都造成重大损失。近几年来, 在全国马铃薯主产区环腐病普遍发生, 危害日趋严重。环腐病主要通过种薯传播蔓延, 而种薯带菌又是马铃薯环腐病历年发病和远距离传播的主要侵染源, 由此可见, 控制种薯病原菌是防治环腐病蔓延的重要措施。马铃薯环腐病菌侵染在马铃薯块

收稿日期: 2006-02-22

基金项目: 国家科技部重点基础研究发展规划 (973) 资助项目 (2001CCC02900)

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

Transfer of Tuber Soft Rot Resistance from *Solanum brevidens* into Cultivated Potato by Somatic Hybridization

Si Huaijun¹, Zhang Ning¹, Wang Di², Conner A J³

(1. College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China;

2. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China; 3. Lincoln University, Christchurch, New Zealand)

Abstract: Resistance to potato soft rot caused by *Erwinia carotovora* was tested for tubers of tetraploid potatoes derived from leaf tissue culture of somatic hybrids between tetraploid cultivated potato and diploid wild potato *Solanum brevidens*, and pentaploid potatoes derived from backcross of the somatic hybrids and tetraploid potatoes. The results showed that the plant line SC107 regenerated from leaf tissue culture of somatic hybrids had higher resistance to potato soft rot. Most of the backcrossed progenies developed from cross of somatic hybrids and a susceptible cultivated potato showed high levels of tuber soft rot resistance. The results demonstrated that resistance to potato soft rot was transferred from *Solanum brevidens* to the cultivated potatoes.

Key Words: potato; somatic hybrids; potato soft rot; *Solanum brevidens*

茎上, 前期没有症状表现, 用传统的革兰氏染色、胶乳凝集作用、荧光免疫以及酶联免疫吸附测定 (DAS-ELISA) 等检测方法无法检测到病菌。因此, 研究一种快速、准确、简便的环腐病检测技术以确保种薯质量是防治环腐病蔓延亟待解决的问题。Lee 等^[1]和 Mriza 等^[2]报道, 应用 PCR 技术扩增马铃薯环腐病菌 16S rDNA 基因序列进行分析, 然后利用 RAPD 技术获得环腐病菌特异性片段, 经克隆测序后, 设计特异性引物进行 PCR 扩增, 对马铃薯环腐病菌进行特异性检测。该试验应用合成一对寡核苷酸引物进行马铃薯环腐病菌特异性扩增试验, 探索马铃薯环腐病菌的鉴定和快速检测, 提供一种实用的检测技术和方法。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株及培养

供试菌株详见表 1, 纯化培养的培养基为 YGM, 菌株均以平板划线法挑取典型菌落进行纯化, 菌种长期保存采用灭菌水菌悬液冷冻保存。

表 1 供试菌株

| 菌株名称 | 菌株号 | 来源 |
|---------|----------|--------------|
| 马铃薯环腐病菌 | NCPB2140 | 国际植物病原细菌保藏中心 |
| 马铃薯环腐病菌 | P1 | 黑龙江省讷河市 |
| 马铃薯环腐病菌 | P2 | 黑龙江省克山县 |
| 马铃薯黑颈病菌 | Eca1526 | 中国农业科学院植物保护所 |
| 马铃薯青枯病菌 | Po1 | 中国农业科学院植物保护所 |

1.2 供试菌株基因组 DNA 提取

各菌株基因组 DNA 提取均参照文献[3]的方法, DNA 提取后溶解于 TE 缓冲液中, 在 1.0% 的琼脂糖胶上电泳后测定其浓度待用。

1.3 细菌灵敏度检测

马铃薯环腐病菌株, 在肉汁-酵母琼脂培养基 (NBV)^[4]上培养 5~7 d, 用无菌水配置细菌悬浮液, 采用 10 倍稀释法稀释菌悬液, 各吸取 500 μL 涂于 TZC 平板上估计浓度。每个 PCR 反应管中加入 1 μL 用于 PCR 扩增。

1.4 提取马铃薯块茎中的 DNA

人工污染和自然发病的马铃薯块茎, 经 70%

酒精去皮消毒后, 用灭菌刀切成小块, 放入预冷的研钵中, 加入 5 mL TENP 缓冲液研磨, 将混合液转入离心管中, 4000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 上清液转入另一个新离心管中, 加入 1 mL SDS 缓冲液, 振荡混合后, 加入等体积的饱和酚并振荡 10 min, 离心 (10000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min, 搜集水相, 再加入等体积的氯仿/异戊醇振荡 10 min, 离心 (10000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min, 搜集水相, 然后加入 2 倍体积的无水乙醇, 离心 (12000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$) 10 min 搜集 DNA。用 70%乙醇洗 DNA 2 次, 干燥后加入适量 TE 缓冲液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.5 引物

根据马铃薯环腐病菌 16S rDNA 基因片段核苷酸序列设计引物, 由上海生物工程公司合成。

引物 1: 5-TGTA CT CGGCCATGACGTTGG-3 和引物 2: 5-TACTGGGT CATGTTGGT-3。

1.6 PCR 扩增条件及扩增产物检测

扩增条件采用 20 μL 反应体系, 其中 1X PCR 缓冲液, 引物 1 和引物 2 各 0.5 μm , Dntp 0.25 mm, 0.7 μL 的 Taq 酶, 模板 1 μL 。扩增反应在基因扩增仪上进行。扩增循环为 95 变性 30 s, 64 退火 30 s, 68 延伸 2 min (前 10 个循环) 或 2 min 20 s 后 20 个循环), 共 30 个循环。取 6 μL 扩增产物于 1.5% 琼脂糖胶上电泳分离, 经溴化锭染色后于紫外灯下观察结果, 并用紫外成像系统进行图像采集和保存。

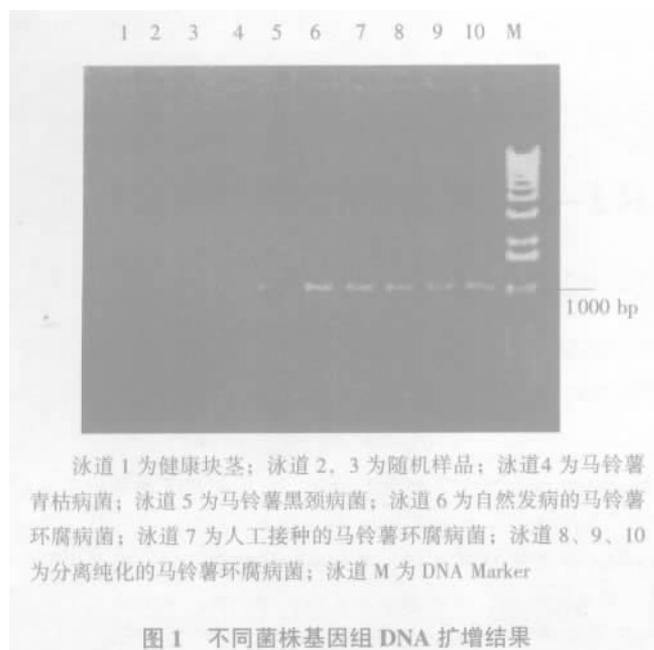
2 结果与分析

2.1 引物特异性

利用设计的引物, 以自然发病、人工接种的马铃薯环腐病菌基因组 DNA 和其它病菌、健康马铃薯块茎基因组 DNA 进行 PCR 特异性扩增反应 (图 1), 从图 1 中可知, 该试验合成的这一对引物只对带有马铃薯环腐病菌样品有扩增产物, 并且扩增到 1000 bp 左右, 而其他病菌和健康的马铃薯块茎没有扩增产物, 与预先设计扩增片段长度和结果一致。

2.2 检测灵敏度

该试验中采用马铃薯环腐病菌不同浓度的菌悬液, PCR 扩增结果平板细菌计数, 结果表明 PCR 检测灵敏度高达 $10^5 \text{ cfu}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。



3 讨论

该试验合成的这一对寡核苷酸特异性引物能准确的将马铃薯环腐病菌和其他病菌区别开来, 能够特异性扩增马铃薯环腐病菌 16S rDNA 基因序列片

段 1046 bp。PCR 反应具有较高的重复性、可靠性。该 PCR 程序对特异性鉴定马铃薯环腐病菌株提供了一种快速特异的检测手段。

[参 考 文 献]

- [1] Lee I M, Bartoszyk L M, Gundersen D E, et al. Nested PCR assays for ultrasensitive detection of potato ring rot bacterium, *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* [J]. *Phytopathology*, 1996, 86(1): 96.
- [2] Mirza M S, Rademaker J L W, Janse J D, et al. Specific 16s ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe against *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* [J]. *Can J Microbiol*, 1993, 39(4): 1024-1034.
- [3] Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, et al. *Short protocols in molecular biology* [M]. 4th ed. USA: John Wiley and Sons, Inc, 1999.
- [4] Slack S A, Drennan J L, Westra A A G. Comparison of PCR, ELISA, and DNA hybridization for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in field-grown potatoes [J]. *Plant Disease*, 1996, 80(2): 519-524.

Rapid Detection for Potato Ring Rot by the Technique of PCR

Hu Linshuang, He Yunxia, Guomei, Wang Xiaodan, Min Fanxiang

(Plant Virus-free Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086, China)

Abstract: The special oligodeoxynucleotide primers (primer 1: 5' - TGTACTCGGATGACGTTGG - 3' and primer 2: 5' - TACTGGGTCATGTTGGT - 3') were synthesized according to 16S rDNA sequence of potato ring rot bacteria. The primers synthesized in this research could be used to amplify 16S rDNA gene fragment of ring rot bacteria for 1046 bp from the total genomic DNA of potato ring rot bacteria and the tubers inoculated artificially or infected naturally. This research provides a new technique and method for the detection and identification of potato ring rot bacteria, and the research of disease epidemiology.

Key Words: potato; ring rot bacteria; detection; PCR