

实时荧光定量环介导等温扩增方法检测马铃薯黑胫病菌

A real-time fluorescence quantitative loop mediated isothermal amplification for detection blackleg pathogen in potato tubers

胡连霞¹ 张 岱¹ 赵冬梅¹ 杨志辉¹ 朱杰华^{1*} 戚家明²

(1. 河北农业大学植物保护学院, 保定 071001; 2. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210000)

Hu Lianxia¹ Zhang Dai¹ Zhao Dongmei¹ Yang Zhihui¹ Zhu Jiehua^{1*} Qi Jiaming²

(1. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, Hebei Province, China;

2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210000, Jiangsu Province, China)

由马铃薯黑胫果胶杆菌 *Pectobacterium atrosepticum* 引起的生产上日趋严重的马铃薯黑胫病, 其初侵染来源是带菌种薯 (Mattinen et al., 2008), 种薯带菌数量直接决定田间病害发生的严重程度。因此, 播种前明确种薯中马铃薯黑胫果胶杆菌的含量至关重要。目前国内外应用实时荧光定量 PCR 方法对病原菌进行定量检测已有很多 (娄兵海等, 2014), 但还未见利用实时荧光定量环介导等温扩增 (real-time fluorescence quantitative LAMP, RTFQ-LAMP) 方法定量检测马铃薯黑胫病菌的报道。本试验通过建立 RTFQ-LAMP 方法, 检测马铃薯块茎中的马铃薯黑胫果胶杆菌, 以期实现马铃薯黑胫病的早期诊断, 减少病害的发生。

1 材料与方法

1.1 材料

供试马铃薯和菌株: 马铃薯品种为荷兰十五。马铃薯黑胫果胶杆菌 JG10-08 分离于河北省藁城市, YS09-01 和 YS09-02 分离于河南省商丘市, YS09-04 分离于河南省许昌市; 4 株马铃薯其它细菌性病原菌胡萝卜软腐果胶杆菌 *P. carotovorum* (MH11-01) 分离于内蒙古自治区, 菊基腐病菌 *Dickeya chrysanthemi* (CGMCC 1.7280), 中国普通微生物菌种保藏管理中心, 青枯雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* (ZS14-02), 中国农业科学院植物保护研究所, 马铃薯环腐病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (ZS10-01), 山西省农业科学院高寒区作物研究所; 以及其余 11 株与马铃薯黑胫果胶杆菌 *gyrB* 基因扩增区域 (397 bp) 同源性达 88% 以上的近缘种, 大肠杆菌 *Escherichia coli* (CMCC 44102)、

绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* (CMCC (B) 10104), 中国医学微生物菌种保藏管理中心, 粪肠球菌 *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)、恶臭假单胞菌 *P. putida* (ATCC 17485)、嗜麦芽糖寡养单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia* (ATCC 13637)、奇异变形菌 *Proteus mirabilis* (ATCC 29906)、肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352)、地衣芽胞杆菌 *Bacillus licheniformis* (ATCC 21424), 美国菌种保藏中心, 蜡样芽胞杆菌 *B. cereus* (CICC 10468)、鼠伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhimurium* (CICC 22956)、福氏志贺氏菌 *Shigella flexneri* (CICC 21678), 中国工业微生物菌种保藏管理中心。

试剂及仪器: BstDNA 大片段聚合酶, 美国 NEB 公司; SYBR Green I, 2.5 mmol/L dNTP, 北京全式金生物技术有限公司。ESE-Quant Tube Scanner 实时荧光 LAMP 分析仪, 德国 Qiagen 公司。

1.2 方法

引物设计与合成: 根据 GenBank 中马铃薯黑胫果胶杆菌 *gyrB* 基因 (GenBank 登录号 JF311589.1) 种内保守、种间变异序列, 在线 PrimerExplorer V4 (<https://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>) 进行 LAMP 引物设计, 引物序列均由生工生物工程 (上海) 技术服务有限公司合成。

RTFQ-LAMP 检测体系: 25 μ L RTFQ-LAMP 反应体系: 10 $\times$ Bst DNA 聚合酶反应缓冲液 2.5 μ L、10 μ mol/L 上下游内引物各 3.2 μ L、10 μ mol/L 上下游外引物各 0.8 μ L、10 μ mol/L 上下游环引物各 1.6 μ L、10 mmol/L dNTP 1.5 μ L、10 mol/L 甜菜碱 1.0 μ L、50 mmol/L MgSO₄ 0.5 μ L、8 U/ μ L 的 Bst DNA 聚合

酶大片段 1 μL 、10 000 $\times$ SYBR Green I (1:200 稀释) 0.3 μL 、DNA 模板 2 μL 和灭菌 ddH₂O 5 μL 。反应条件:设置 61 $^{\circ}\text{C}$,反应 40 min。通过供试菌株进行 RT-FQ-LAMP 检测并进行熔解曲线分析。

利用 RTFQ-LAMP 对马铃薯黑胫果胶杆菌系列浓度 184、36.8、7.4、1.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、294.4、58.9、11.8 $\text{fg}/\mu\text{L}$ 进行灵敏度检测。根据马铃薯黑胫果胶杆菌 DNA 初始浓度对数值和 Time 值(即 Ct 值,1 个 Ct 值=1 min),生成标准曲线,并利用 Excel 2007 软件进行线性回归分析。

RTFQ-LAMP 定量检测:利用 RTFQ-LAMP 每天定量检测接种量为 33 CFU/g、生长 6 d 的马铃薯块茎中马铃薯黑胫果胶杆菌基因组 DNA,并对马铃薯块茎未显症前的马铃薯黑胫果胶杆菌 DNA 含量进行分析。

2 结果与分析

2.1 RTFQ-LAMP 引物特异性验证

筛选出 RTFQ-LAMP 引物序列包括:上游内引物 FIP: 5'-TCAGCGTACGGGTCATCGCCAACAATA-TTCCGCAGCGTGAT-3',下游内引物 BIP: 5'-ATC-CAAAATCAGCGCGACCGGTCACAGACACACA-GCAATC-3';上游外引物 FOP: 5'-GATGGTTTC-CAGGAAAACA-3',下游外引物 BOP: 5'-ACTTCG-GATCCGGCACTT-3';上游环引物 FLP: 5'-CGGC-CAAGTGTGTACCACC-3',下游环引物 BLP: 5'-AT-GATGCGCGCAAGGG-3'。建立 RTFQ-LAMP 检测体系,对供试菌株进行检测,只有 4 株马铃薯黑胫果胶杆菌扩增结果为阳性,其它 15 株非马铃薯黑胫果胶杆菌和空白对照扩增结果均为阴性。RTFQ-LAMP 扩增产物的熔解曲线上,仅马铃薯黑胫果胶杆菌的扩增产物具有唯一的熔解温度,而且其熔解温度均在 85 $^{\circ}\text{C}$ 左右。

2.2 RTFQ-LAMP 灵敏度的确定及标准曲线的建立

实时监测的荧光扩增曲线表明,RTFQ-LAMP 检测 DNA 浓度在 184 $\text{pg}/\mu\text{L}$ ~58.9 $\text{fg}/\mu\text{L}$ 之间时,能准确定量,其灵敏度为 58.9 $\text{fg}/\mu\text{L}$ (图 1)。生成标准曲线的线性方程为 $y=-2.8477x+17.976$ ($R^2=0.9991$, $P<0.001$),其中 y 为反应时间(min), x 为黑胫病菌 DNA 初始浓度对数值(lg)。

2.3 RTFQ-LAMP 定量检测黑胫果胶杆菌

第 5 天检测到马铃薯黑胫果胶杆菌的 DNA 浓度为 140.86 $\text{pg}/\mu\text{L}$,此时马铃薯块茎表面才出现褐色斑点。在侵染早期(前 4 d),马铃薯中黑胫果胶杆

菌 DNA 含量随着培养时间呈指数增长趋势,其方程为 $y=0.0022e^{2.1266x}$ ($R^2=0.9784$, $P<0.001$)。

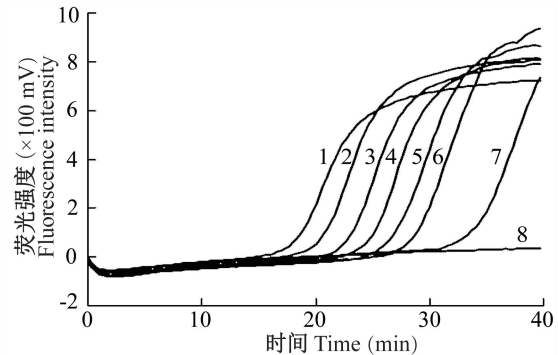


图 1 RTFQ-LAMP 法检测马铃薯黑胫果胶杆菌的灵敏度

Fig. 1 The sensitivity of RTFQ-LAMP detection of

Pectobacterium atrosepticum

1~7: 马铃薯黑胫果胶杆菌 DNA 浓度依次为 184、36.8、7.4、1.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$ 、294.4、58.9、11.8 $\text{fg}/\mu\text{L}$; 8: 空白对照。1~7: DNA concentrations of *P. atrosepticum* are 184, 36.8, 7.4, 1.5 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 294.4, 58.9, 11.8 $\text{fg}/\mu\text{L}$, respectively; 8: blank control.

3 讨论

本研究建立的 RTFQ-LAMP 方法的灵敏度为 58.9 $\text{fg}/\mu\text{L}$,而且在侵染早期,马铃薯黑胫果胶杆菌的 DNA 含量随着培养时间呈指数增长趋势,与潘娟娟等(2010)报道的条锈菌在小麦叶片内潜育期间随时间呈指数增长一致。该方法能实现马铃薯黑胫病的早期诊断,为病情预报提供技术支持。

参考文献 (References)

- Mattinen L, Somervuo P, Nykyri J, Nissinen R, Kouvonen P, Cortals G, Auvinen P, Aittamaa M, Valkonen JP, Pirhonen M. 2008. Microarray profiling of host-extract-induced genes and characterization of the type VI secretion cluster in the potato pathogen *Pectobacterium atrosepticum*. *Microbiology*, 154: 2387-2396
- Lou BH, Sony YQ, Zhao XL, Bai XJ, Deng CL. 2014. Quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in flowers and seeds of Shatian pummelo and its applications. *Journal of Plant Protection*, 41(4): 447-452 (in Chinese) [娄兵海, 宋雅琴, 赵小龙, 白先进, 邓崇岭. 2014. 柑橘花器和种子中黄龙病菌的定量分布及应用. *植物保护学报*, 41(4): 447-452]
- Pan JJ, Luo Y, Huang C, Sun ZY, Zhao L, Yan JH, Ma ZH. 2010. Quantification of latent infections of wheat stripe rust by using real-time PCR. *Acta Phytopathologica Sinica*, 40(5): 504-510 (in Chinese) [潘娟娟, 骆勇, 黄冲, 孙振宇, 赵磊, 闫佳会, 马占鸿. 2010. 应用 real-time PCR 定量检测小麦条锈菌潜伏侵染量方法的建立. *植物病理学报*, 40(5): 504-510]

(责任编辑:高峰)