

实时荧光定量PCR检测土壤西瓜枯萎病菌体系的建立

Establishment of real-time PCR system for quantitatively detecting *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soil

肖姬玲 张屹 李基光 朱菲莹 魏林 梁志怀*

(湖南省农业生物技术研究所, 长沙 410125)

Xiao Jiling Zhang Yi Li Jiguang Zhu Feiying Wei Lin Liang Zhihui*

(Hunan Research Institute of Agricultural Biotechnology, Changsha 410125, Hunan Province, China)

西瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, FON)引起的一种土传维管束病害,在各个时期均可发生,对西瓜产业构成严重威胁。该病具有传播途径多样、暴发快速、应急防治难等特点,因此及时准确监控土壤中的病原菌是防治西瓜枯萎病的关键。实时荧光定量PCR (quantitative real-time PCR, qPCR)技术能进行定量检测,且灵敏度高,可满足病原菌快速定性定量检测的需求,但该技术对引物的特异性要求高,不适用于多重PCR,而以往西瓜枯萎病特异性检测引物,或是特异性难以保证,或是引入多对引物的多重PCR,难以应用于qPCR检测体系(Lin et al., 2010)。基于此,本研究通过分析西瓜枯萎病菌的基因组信息,设计新的特异性引物,并建立土壤西瓜枯萎病菌SYBR Green I qPCR检测体系,以期对西瓜枯萎病的防控提供有效技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及土壤:FON 0、1、2号生理小种(Fon-0、Fon-1、Fon-2),均由北京市农林科学院提供;其8个近亲缘种的10株菌株:T-HB、HQY-4-A由中国农业大学提供;HN-K-SD、HN-K由河南省农业科学院提供;FOC-AM58385、FOC-AM 1262由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供;FL-1、Fne-1、FM-1由湖南省农业生物技术研究所分离获得;TJ-1、X-C-1、A7、T2-16、MO-1、PC170六个外围菌种均由湖南省植物保护研究所提供。采用湖南省水稻研究所常年种植水稻的土壤,配制成含水量约为20%、含菌量分别为0、 4×10^1 ~ 4×10^7 个孢子/g的对照土和标准带菌土,备用。

马铃薯葡萄糖肉汤(potato dextrose broth, PDB)

培养基:马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、ddH₂O 1 L, 120℃灭菌 20 min。

试剂及仪器:质粒 pKN, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所;2×Easy Taq[®] PCR Super Mix、Trans-Start[®] Tip green qPCR Super Mix, 北京全式金生物技术有限公司;DNeasy PowerSoil Kit[®] DNA Isolation Kit试剂盒,德国 QIAGEN 公司。T100 PCR 仪、iQ5 实时荧光定量 PCR 仪,美国 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

设计引物:比对西瓜枯萎病菌基因组与其近缘病菌基因组,找到特异性片段,并在 NCBI 的基因组库中进行 BLASTn 比对,选无比对结果的片段设计引物, Fonq-F: 5'-GTTGCTTACGGTTCTAACTGTGC-3'; Fonq-R: 5'-GGTACTTGGAAGGAATTGTGGG-3'; Fonp1-R: 5'-CTGGTACGGAATGGCCGATCAG-3'; FonqM-2F: 5'-GACTAGTCGTTGCTTACG-GTTCTAACTGTGC-3'; FonqM-2R: 5'-AAGGGCCC-TTGGTACTTGGAAGGAATTGTGGG-3', 均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

采用 CTAB 法提取各菌株的基因组 DNA。采用改良的 DNeasy PowerSoil Kit[®] DNA Isolation Kit 试剂盒提取土壤的总 DNA, 取试剂盒中含石英砂的离心管, 加入水稻土壤样品和 60 μL Solution C1 溶液摇匀, 先后置于液氮、65℃水中冻融 20 次, 再按试剂盒说明书操作提取水稻土壤总 DNA。以各菌株 gDNA 和水稻土壤总 DNA 为模板进行 PCR, 反应体系: 2×Easy Taq[®] PCR Super Mix 10 μL、引物各 0.5 μL、模板 1 μL、ddH₂O 8 μL。反应条件: 95℃预变性 4 min; 95℃变性 5 s, 60℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 33 个循环; 72℃延伸 10 min。产物通过浓度为 2% 琼脂糖凝胶

电泳检测 Fonq-F/Fonq-R 的特异性。

引物灵敏度检测和质粒标准曲线的建立:利用引物对 FonqM-2F/FonqM-2R 从 Fon-1 的基因组 DNA 中扩增西瓜枯萎病菌特异性片段,通过酶切连接,将其连接到质粒 pKN 上。重组质粒经 PCR 检测、测序正确后,检测浓度,计算质粒拷贝数。再对其进行 10 倍梯度稀释,以各梯度的质粒为模板,用引物对 Fonq-F/Fonq-R 进行 qPCR,以拷贝数对数值为横坐标,以 Ct 值为纵坐标,建立标准曲线,检测引物灵敏度。qPCR 反应体系:2×TransStart® Tip green qPCR Super Mix 10 μL、引物各 0.5 μL、模板 1 μL。反应条件:95℃ 30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s。

土壤含菌量标准曲线的建立:按上述方法提取对照土和带菌土总 DNA。以 DNA 为模板,利用 Fonq-F/Fonq-R 对包含 Fonq-F/Fonq-R 扩增序列的特异性片段进行 PCR 预扩增,18 个循环,其它反应体系及反应条件同上。再以 1 μL PCR 产物为模板进行荧光定量 PCR,并绘制标准曲线。

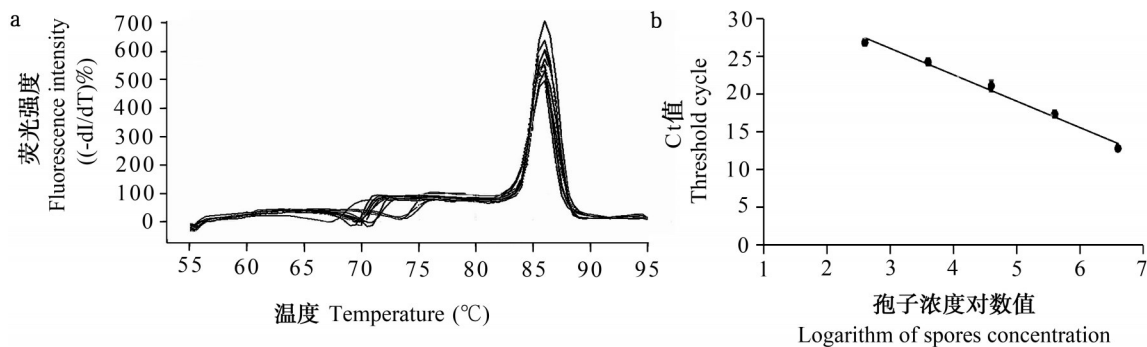


图 1 实时荧光定量 PCR 检测土壤中西瓜枯萎病菌孢子数量的标准曲线

Fig. 1 Standard curves of different spore concentrations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soil detected by using quantitative real-time PCR

a: 实时荧光定量 PCR 熔解曲线图; b: 土壤病原菌孢子数量的标准曲线。 a: Melting curves of real-time PCR amplification with primer pair Fonq-F/Fonq-R; b: standard curve development by soil of different spores concentrations.

3 讨论

本研究设计的引物 Fonq-F/Fonq-R 对西瓜枯萎病菌表现出高度特异性,可排除近亲缘菌种、外围菌种及水稻土壤中各种微生物基因组的干扰。巢式 PCR 可克服单次扩增平台期效应限制,提高扩增倍数,极大提高了 PCR 的灵敏度。本研究运用巢式 PCR 原理,在普通 PCR 的预扩增产物基础上进行 qPCR,定量检测下限为 10^2 个孢子/g,与 Peng et al. (2013) 构建的常规 qPCR 的检测下限一致,而供试土壤总量由其 10 g 降为 0.5 g,操作更简便。本研究设计了西瓜枯萎病菌特异性引物,建立了土壤中西瓜枯病菌定量检测体系,可为西瓜枯萎病的预测预

2 结果与分析

2.1 引物特异性检测

结果显示,引物对 Fonq-F/Fonq-R 能从西瓜枯萎病菌 gDNA 中扩增出大小为 244 bp 的片段,而不能从其它菌株和水稻土壤总 DNA 中扩增出的片段,说明该引物对可用于土壤中西瓜枯萎病菌的 PCR 检测。

2.2 引物灵敏度检测和质粒标准曲线的建立

各浓度重组质粒的 qPCR 检测结果显示,产物熔解曲线为特异性单峰(图 1-a),当拷贝量大于 4.4×10^2 copies/μL 时,质粒 DNA 浓度的对数(x)与对应的 Ct 值(y)之间具有良好的线性关系,获得标准曲线为 $y = -3.293x + 39.206$ 。

2.3 qPCR 检测土壤带菌量的标准曲线

带菌土壤 qPCR 检测结果表明,含菌为 $4 \times 10^2 \sim 4 \times 10^6$ 个孢子/g 土壤的孢子量对数值与扩增 Ct 值具有良好的线性关系,标准曲线为 $y = -3.497x + 36.557$,相关系数 R 为 0.988,扩增效率为 93.2%(图 1-b)。

报、综合防治措施的制定提供技术支持。

参考文献 (References)

- Lin YH, Chen KS, Chang JY, Wan YL, Hsu CC, Huang JW, Chang PFL. 2010. Development of the molecular methods for rapid detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* and *F. oxysporum* f. sp. *niveum* in Taiwan. *New Biotechnology*, 27(4): 409-418
- Peng J, Zhan YF, Zeng FY, Long HB, Pei YL, Guo JR. 2013. Development of a real-time fluorescence loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and quantitative detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soil. *FEMS Microbiology Letters*, 349(2): 127-134

(责任编辑:王 璇)