

胡萝卜软腐欧文氏菌分子检测技术的研究

马改转¹, 修建华¹, 魏兰芳², 姬广海¹, 李 凡¹

(1 云南农业大学 农业生物多样性应用国家工程中心, 云南 昆明 650201; 2 云南农业大学 农科教学实验中心, 云南 昆明 650201)

摘要:胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜亚种 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 是引起魔芋和马蹄莲软腐病的主要病原细菌. 本研究根据细菌 *L*-氨基酸渗透酶同源基因设计 URP 核苷酸序列特异性引物进行普通 PCR、巢式 PCR, 同时采用细菌 16S-23S rDNA 间的 ITS 序列设计引物及 TaqMan 探针进行实时荧光 PCR, 对样品中存在的胡萝卜软腐欧文氏菌进行检测, 并比较了 3 种检测方法的特异性和灵敏度. 结果表明, 应用实时荧光 PCR 方法检测样品, 其中存在的胡萝卜软腐欧文氏菌的最低菌悬液浓度可达 10 cfu/mL; 巢式 PCR 灵敏度也可检测到 10 cfu/mL; 而用普通 PCR 最低可检测到 10³ cfu/mL. 用实时荧光 PCR 和巢式 PCR 方法检测病菌, 其灵敏度都比常规 PCR 提高了 100 倍, 且实时荧光 PCR 方法更快速、简便、安全、准确, 不需 PCR 的后续处理. 实时荧光 PCR 方法适用于种苗、种球等检测领域.

关键词:胡萝卜软腐欧文氏菌; 特异性引物; 分子检测技术; PCR

中图分类号: Q939

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2009)03-0022-05

Molecular Detection of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, the Main Causal Agent of Bacterial Soft Rot of Crops

MA Gai-zhuan¹, XIU Jian-hua¹, WEI Lan-fang², JI Guang-hai¹, LI Fan¹

(1 National Center for Agro-Biodiversity, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2 Experimental Agriculture Center, Yunnan Agricultural University, Kunming, 650201, China)

Abstract: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) is the main bacterial pathogen leading to bacterial soft rot of *Konjac* and *Zantedeschia*. The specific primer sets and TaqMan probe were designed based on the DNA sequence of URP and 16S-23S rDNA ITS. Conventional PCR, Nested-PCR and real-time fluorescent PCR were used for detection of Ecc from cell suspension of pure culture and extracts of infected *Konjac* plant tissues. The results showed that real-time fluorescent PCR and Nested-PCR could achieve higher specific and sensitive detection of Ecc, with threshold 10 cfu/mL compared with conventional PCR (threshold 10³ cfu/mL). However, real-time fluorescent PCR was simple, fast, assure and more accurate. It was suggested that this method was adopted to rapid detection of Ecc for the seed and seedling industry.

Key words: *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*; specific primers; molecular detection; PCR

魔芋、马蹄莲细菌性软腐病主要是由胡萝卜软腐欧文氏菌属胡萝卜亚种 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 引起的细菌性病害^[1-7]. 该病害在我国各个生产地均有发生, 对魔芋、马蹄莲造成了严重

的危害. 病菌可通过带菌种球远距离传播, 也可依赖寄主植物或病残体在土壤中存活很长时间. 因此, 为了避免病菌的传播扩散和循环侵染, 对温室或大田可能存在的病菌进行早期检测有利于控制病害的发

收稿日期: 2008-08-20

作者简介: 马改转(1981—), 女, 硕士研究生; 通讯作者: 姬广海(1970—), 副教授, 博士, E-mail: jghai001@yahoo.com.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30760139); 云南省自然科学基金(2003C0006Z, 2004C007Z); 农业部农业行业科研专项经费(nyhyzx07-056)

生与传播,以期减少损失。

近年来,以 PCR 为基础的分子检测技术的应用使植物病原细菌的检测更快速、灵敏和可靠。而在普通 PCR 基础上应用实时荧光 PCR,并且将该技术用于植物病原细菌的检测鉴定,国内仅报道了对水稻白叶枯病菌、青枯病菌、西瓜细菌性果斑病菌、番茄细菌性溃疡病菌和菊欧文氏菌^[8-12]等病原细菌的检测。本研究选用 10 个胡萝卜软腐欧文氏菌和其他 3 株菌为材料,使用 URP 特异性引物,采用常规 PCR 和巢式 PCR 对胡萝卜软腐欧文氏菌进行了检测和鉴定,并且进一步用实时荧光 PCR 方法对样品进行检测,拟建立特异性强、灵敏度高的胡萝卜软腐欧文氏菌的检测体系,为今后细菌性软腐病菌的检测研究提供技术手段。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

采自云南省几个不同地区,属于胡萝卜软腐欧文氏菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Ecc) 的 10 个菌株:分离自富源县魔芋组培基地的 MY2、MY9、MYG2,云南省富源县黄泥村的 MY14、MY15,楚雄东华的 MY4,陆良板桥的 MYG4,云南农业大学实验基地的 MY21,昆明锦苑基地马蹄莲种植区的 WM3、WM4。来自昆明的其他 3 株菌:属于荧光假单胞菌属的 G1,分离自大白菜;属于黄单胞菌属的 Z3,分离自水稻;属于菊欧文氏菌属的 T5,分离自蝴蝶兰。

1.2 主要试剂和仪器

PCR 试剂、荧光 PCR 仪、*Taq* DNA 聚合酶和引物(大连宝生物有限公司合成),探针由上海生工生物公司完成,采用 Perkin Elmer 5333 型热循环仪,其他试剂均为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 细菌基因组 DNA 提取 将菌株接种在 NB 培养液中,振荡培养(28 ℃、180 r/min)18 h。按李德葆等^[13]报道的细菌基因组 DNA 的提取方法,进行细菌总 DNA 的提取。

1.3.2 URP 核苷酸序列引物 PCR URP 核苷酸序列是根据与细菌 *L*-氨基酸渗透酶同源基因序列设计的引物,利用其对部分软腐菌株 DNA 和软腐细菌活菌体进行检测,普通 PCR 引物:EXECCR (5'-GCCG-TAATTGCCTACCTGCTTAAG-3') 和 EXECCF (5'-GAAGTTCGCACCGCCGACCTTCTA-3')^[14];巢式 PCR 引物:INECCR (5'-GGCCAAGCAGTGCCTGTATATCC-3') 和 INECCF (5'-TTCGATCACGCAACCTGCAT-TACT-3')。

1.3.3 特异性引物筛选 利用特异性引物两两组合,对部分菌株的 DNA 和软腐病菌活菌体进行 PCR 扩增,并从中筛选 1 对特异性好的引物,用于巢式 PCR 扩增。

1.3.4 特异性引物灵敏度测定 将魔芋软腐病菌活菌 MY2、MY9、MY15 的菌悬液从 1×10^6 cfu/mL 梯度稀释到 10 cfu/mL,用筛选出的特异性引物进行 PCR 扩增。然后,取 2 μ L PCR 产物作模板进行巢式 PCR,进行灵敏度测定。

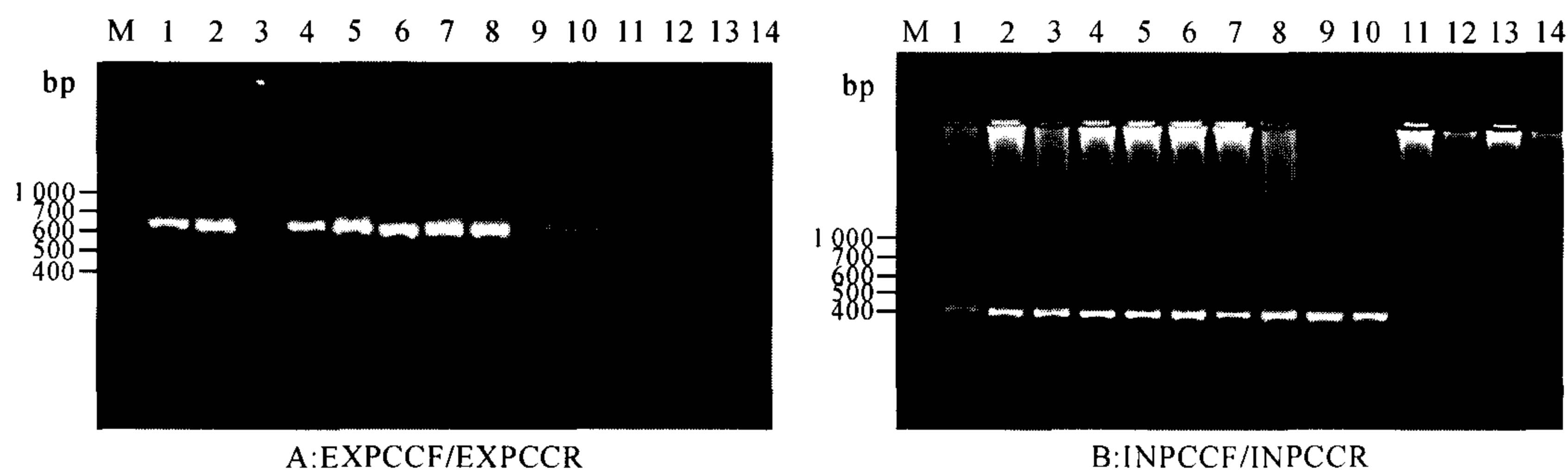
1.3.5 样品检测 将人工接种软腐病菌的魔芋球茎、茎和叶用自来水冲洗后,切成小块,放入灭菌的培养皿中,加入适量的无菌水浸泡 10 min。吸取浸泡液 1 mL 至已灭菌的离心管中,病土取 0.5 g 加 1 mL 无菌水 1 2000 r/min 离心 10 min;取 1 μ L 上清液用筛选出的引物进行普通 PCR,再用 PCR 产物作模板,进行巢式 PCR:取 1 μ L 普通 PCR 扩增产物作模板进行 PCR 扩增,用健康的植株、健土、无菌水做对照。每个扩增反应都重复 3 次。

1.3.6 实时荧光 PCR 反应体系 所用引物:已报道的细菌通用 ITS 引物(G1:5'-GAAGTCGTAACAAGG-3'; L1:5'-CAAGGCATCCACCGT-3')^[15-16]进行扩增并测序分析,再根据胡萝卜软腐欧文氏菌 ITS 序列特异区间,应用 Oligo 6.0 软件设计特异性引物 L(L1:5'-TCACAATGTCTGCTACCACTGATCG-3'; L2:5'-CCGTCCGACCATGTGATTCTG-3')。所用探针:5' (FAM)-CCTGACGAACCGCCATCGCCAGC-(Eclipse)-3'。反应体系:10 $\times$ 缓冲液 2.5 μ L,5 μ L 25 mmol/L MgCl₂,25 mmol/L dNTPs 0.5 μ L,10 μ mol/L 引物各 1 μ L,5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L,*Taq* Man 0.5 μ L,模板 DNA 2 μ L,灭菌双蒸水补足 25 μ L。反应程序:95 ℃ 3 min;95 ℃ 30 s,60 ℃ 40 s,循环 40 次。

2 结果与分析

2.1 URP 核苷酸序列引物检测结果

利用 URP 核苷酸序列特异性引物(EXPCCF/EXPCCR)对样品 DNA 进行普通 PCR 检测,其中胡萝卜软腐欧文氏菌的 1~10 号菌株在 600 bp 处有特异性条带,在 600 bp 以上还有一些微弱的条带;3 株对照菌株及无菌水均无带。而用引物(INPCCF/INPCCR)对样品进行巢式 PCR 检测,效果明显优于普通 PCR,并且 1~10 号菌株在 400 bp 处也均有 1 条亮带;其他 3 株对照菌株及无菌水均无带(图 1)。检测结果表明:URP 核苷酸序列引物在检测软腐病菌时能清楚地区分分离得到的菌株,而且具有很强的特异性。



M:100 bp DNA Ladder marker;1~10:胡萝卜软腐欧文氏菌;11:荧光假单胞菌 G1;12:黄单胞菌 Z3;13:菊欧文氏菌 T5;14:无菌水

图1 胡萝卜软腐欧文氏菌的 URP-PCR 检测

Fig.1 The DNA of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* identified through URP-PCR

2.2 特异性引物验证及检测结果

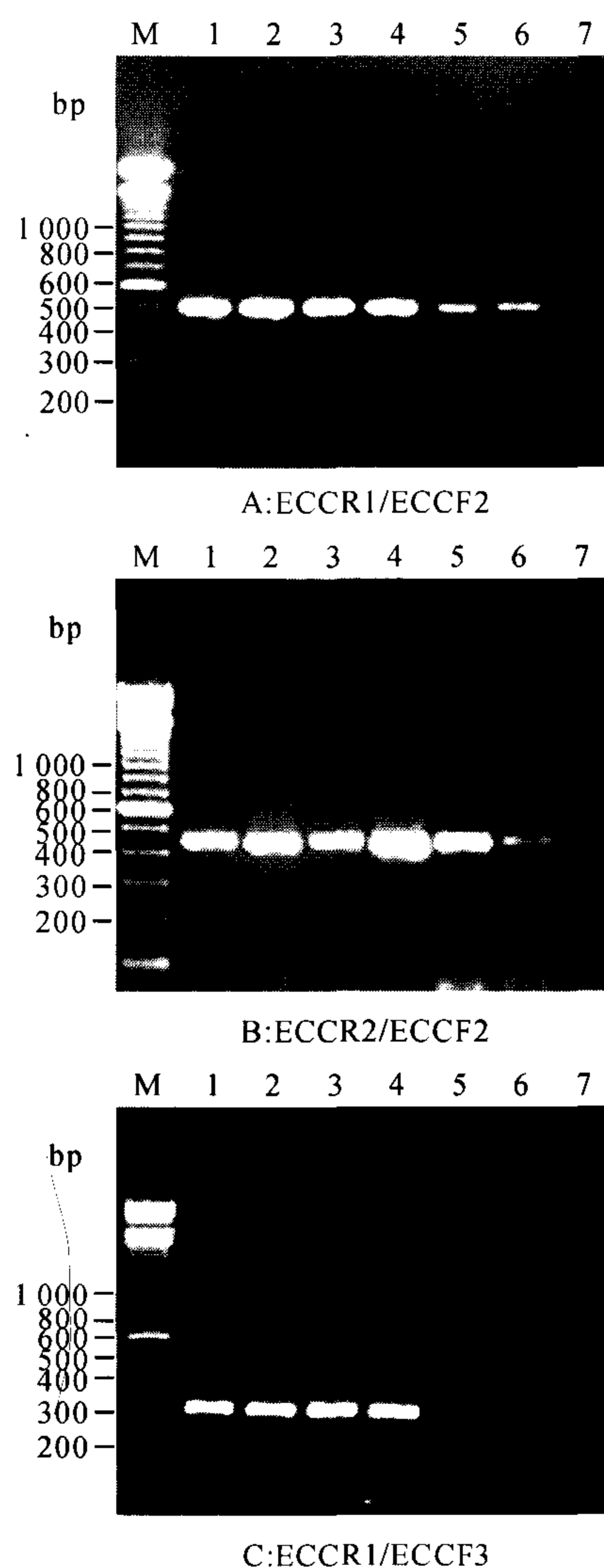
测序(序列已在 GenBank 中登陆,登录号为 EF179139、EF179140 和 EF179141)并与 GenBank 登陆的软腐病菌序列和其他相关病菌序列进行比较,选择特异区域设计并合成了 6 条特异性引物.正向引物(Sense primer):ECCR1(5'-TCAATCCCAGTTTCTGACCG-3'),ECCR2(5'-CTTGAGCTTGCTGTCCACGT-3'),ECCR3(5'-CGACTTTATCGCGGGCAATG-3');反向引物(Antisense primer):ECCF1(5'-CGGAAGAGATGGAAATCGGT-3'),ECCF2(5'-CACCGCCGACCTTCTATACC-3'),ECCF3(5'-TGTAGCGGCCTACCTGTCTG-3').

通过对这 6 条特异性引物进行两两配对,对部分软腐菌株 PCR 扩增筛选,最后筛选出 3 对特异性好的引物,即 ECCR1/ECCF2, ECCR2/ECCF2, ECCR1/ECCF3,分别在 500、450 和 300 bp 上有唯一一条特异性条带,并选定 ECCR1/ECCF3 用作巢式 PCR 引物(图 2).

2.3 灵敏度测定及样品检测

在病菌分子检测过程中,除了要求很高的引物特异性外,还需要较高的检测灵敏度.对已发生细菌性软腐病的魔芋植株提取液进行梯度稀释后进行 PCR 扩增,结果显示:利用 2 对引物 ECCR1/ECCF2 和 ECCR2/ECCF2 做普通 PCR 最低能检测到 10^3 cfu/mL,利用 ECCR1/ECCF3 引物做巢式 PCR 灵敏度可检测到 10 cfu/mL.以上 3 对引物均能检测出已被鉴定为胡萝卜软腐欧文氏菌的菌株,灵敏度都很高(图 3).

另外,利用 ECCR1/ECCF2 和 ECCR1/ECCF3 对病土、病球茎、病枝进行检测.结果显示,ECCR1/ECCF2 可以检测发病的魔芋球茎、病枝和土壤,在 500 bp 处有 1 条特异性条带,健康植株、健土、无菌水均无带;而用 ECCR1/ECCF3 做巢式 PCR 扩增在 300 bp 处有 1 条特异性条带,健康植株、健土、无菌水也

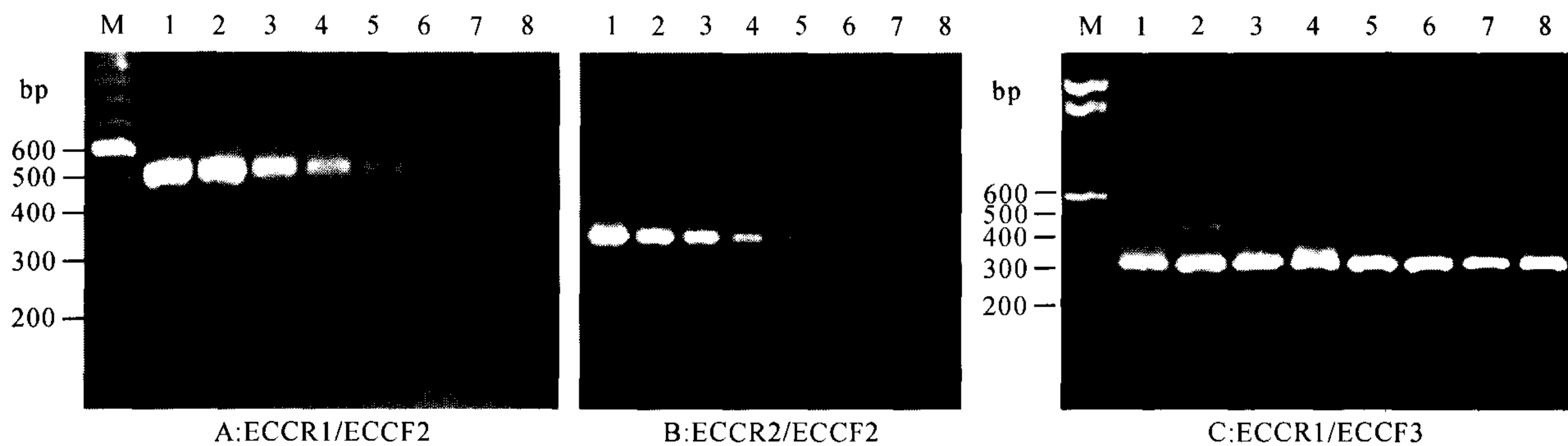


M:100 bp DNA Ladder marker;1: MY2; 2: MY9; 3: MY14; 4: MY15; 5: WM3; 6: WM4;7: 无菌水

图2 检测胡萝卜软腐欧文氏菌的特异性引物筛选

Fig.2 Screening of the detection specific primers for *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*

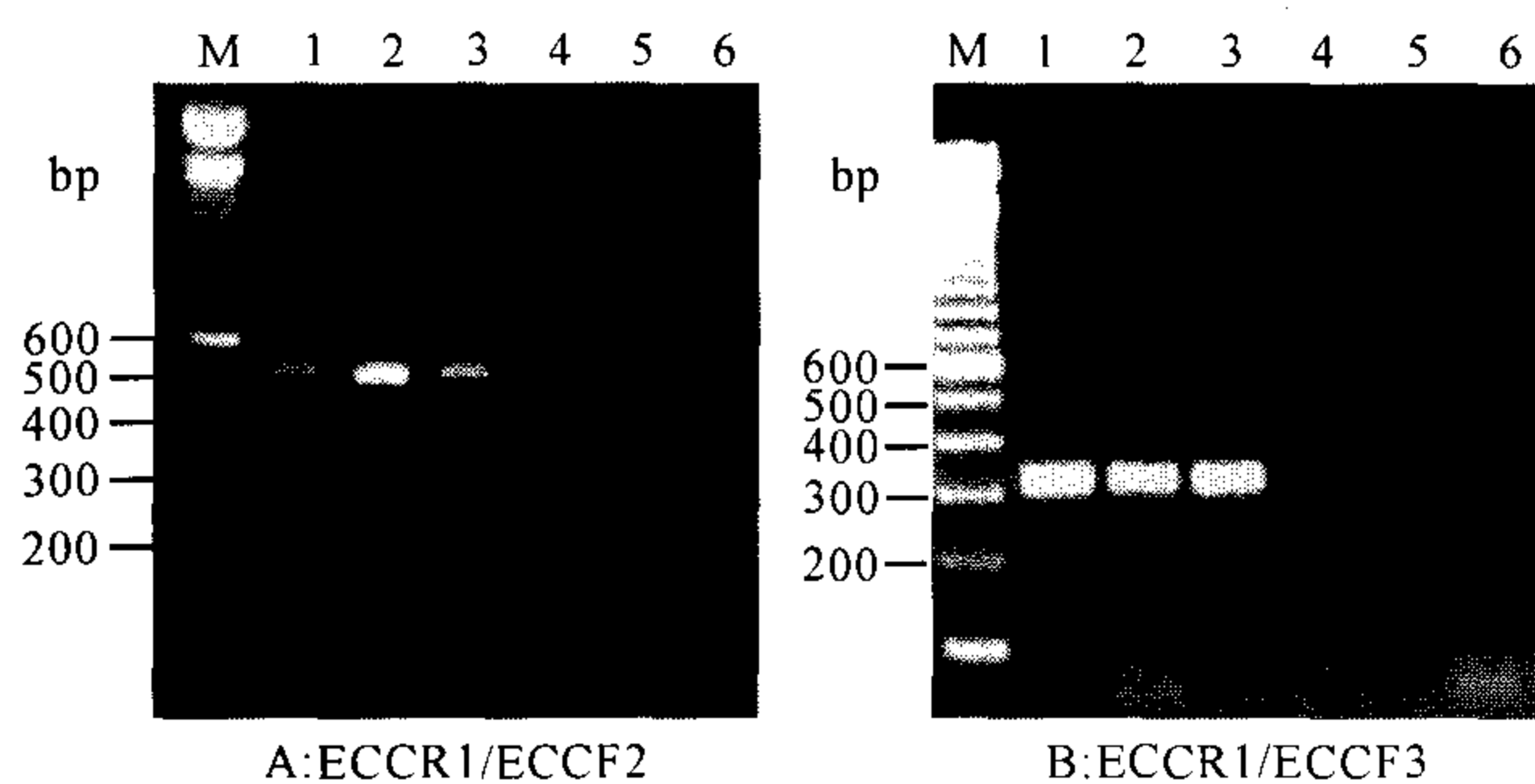
均无带,从(图 4)看出,巢式 PCR 扩增效果较好,提高了检测的灵敏度.



M:100 bp DNA Ladder marker;泳道 1~8 细菌浓度分别为 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 3.7×10^2 、 4.5×10 、 10 cfu/mL

图3 胡萝卜软腐欧文氏菌特异性引物的 PCR 灵敏度测定

Fig. 3 Sensitivity detection of the specific primers for *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* by PCR



M:100 bp DNA Ladder marker;1:病土;2:病球茎;3:病枝;4:健土;5:健株;6:无菌水

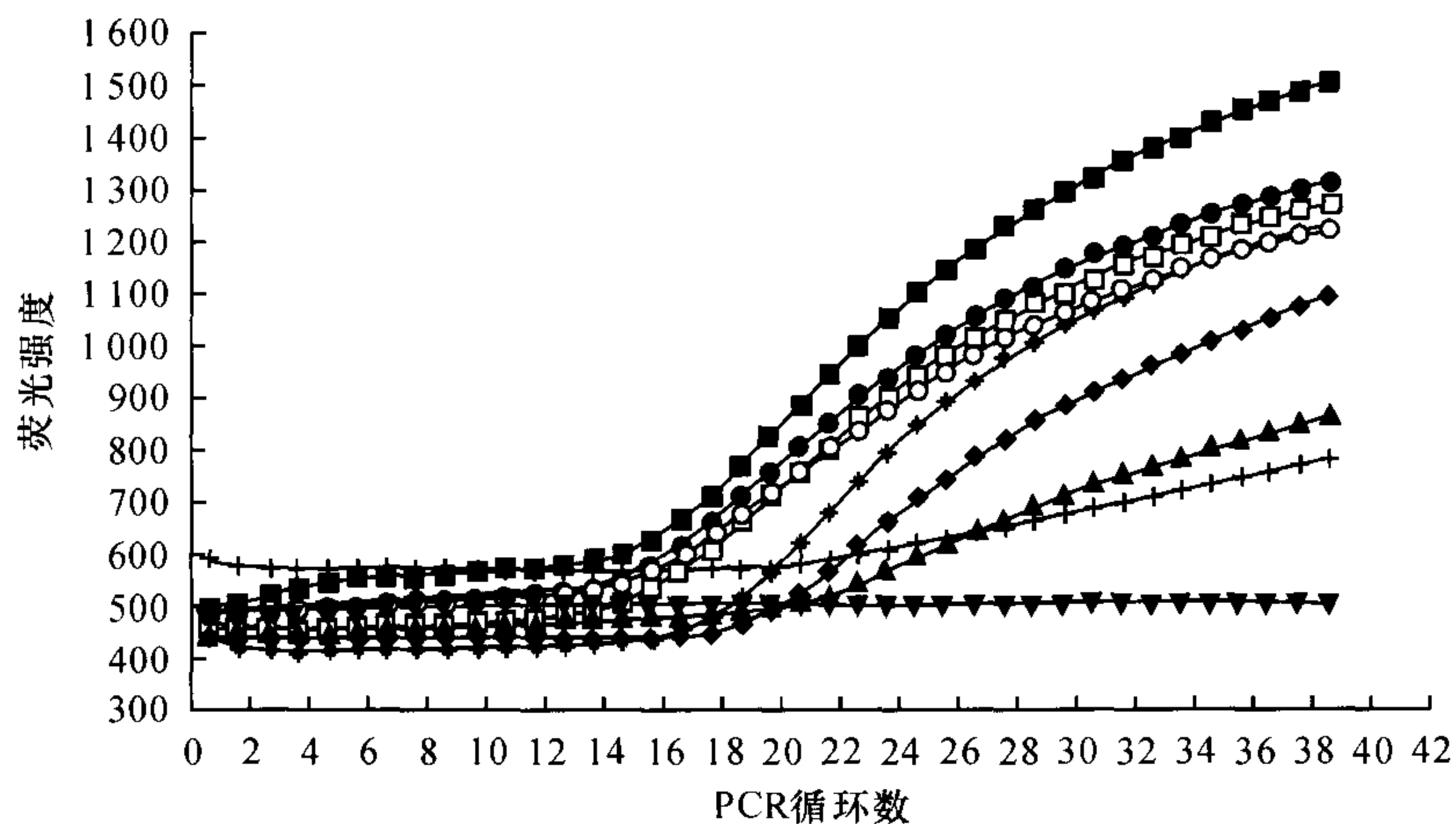
图4 人工接种胡萝卜软腐欧文氏菌的魔芋植株和种球的检测

Fig. 4 PCR detection of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* in infected plant tissues and tubers

2.4 实时荧光 PCR 检测结果

本试验利用实时荧光(Real-time) PCR 技术检

测胡萝卜软腐欧文氏菌,试验操作按照实时荧光 PCR 技术要求严格执行,选择了引起魔芋细菌性软腐病的胡萝卜软腐欧文氏菌代表菌株 MY9,将病菌待测样品提取液配制成浓度梯度菌悬液($10 \sim 10^9$ cfu/mL),分别取 $15 \mu\text{L}$ 作为模板,加入 $25 \mu\text{L}$ 体系中,进行实时荧光 PCR 扩增.从试验结果(图5)可以看出,待检测的8个样品都出现荧光曲线,其可检测样品的最低菌悬液浓度为 10 cfu/mL,而阴性对照无菌水没有出现荧光曲线,说明该 TaqMan 探针对魔芋软腐病病菌待测样品具备较好的特异性,可用于该病菌的检测.样品中细菌浓度为 10 cfu/mL 时在第25个循环出现荧光曲线信号,可见荧光 PCR 检测是一种灵敏度较高的检测技术.



□ 10^9 cfu/mL, ● 10^8 cfu/mL, ◆ 10^7 cfu/mL, ■ 10^6 cfu/mL, * 10^5 cfu/mL, ○ 10^4 cfu/mL, ▲ 10^3 cfu/mL, + 10 cfu/mL, ▼ 阴性对照(无菌水)

图5 实时荧光 PCR 检测胡萝卜软腐欧文氏菌侵染的发病植株提取液

Fig. 5 Detection of extracts from disease *Konjac* plants through real-time fluorescent PCR

3 结论

本研究通过 PCR 方法对胡萝卜软腐欧文氏菌进行检测,利用 URP 核苷酸序列特异性引物,常规 PCR

能够扩增出约 600 bp 的特异性条带,巢式 PCR 能够扩增出约 400 bp 的特异性条带,而对照菌株均无带.巢式 PCR 可以快速准确的检测并鉴定胡萝卜软腐欧文氏菌.试验中对魔芋和马蹄莲共 10 株胡萝卜软腐

欧文氏菌样品进行检测,目的是为了验证检测的有效性.在普通PCR试验中,最低可检测到 10^3 cfu/mL,巢式PCR灵敏度可检测到10 cfu/mL,并可以检测人工接种的魔芋植株和种球.而进一步用实时荧光PCR检测,其浓度为10 cfu/mL的菌悬液在第25个循环出现荧光曲线信号,可见实时荧光PCR检测是一种灵敏度很好的检测技术.URP核苷酸序列特异性引物的专化性在本试验中得到初步论证,但其可靠性还需要在以后的试验及检测中得到进一步的验证.

此试验设计的引物比Kang等^[17]报道的URP核苷酸序列引物灵敏度提高了10倍左右.另外,用常规PCR和巢式PCR方法进行软腐病菌DNA、纯菌体和人工接种病土、病株的检测,均检测成功,灵敏度也很高.从检测结果看,巢式PCR比常规PCR的灵敏度高了100倍.而用实时荧光PCR方法对病原菌进行检测,其灵敏度与巢式PCR相当,但实时荧光PCR与巢式PCR相比有着明显的优势,该技术的关键是使用荧光探针或者染料,有一定的装置检测荧光信号,并采用闭管检测,不需要PCR后处理,能够避免感染.另外,实时荧光PCR技术,为植物病原细菌实时定量分析,尤其是种传或土传细菌的分子检测鉴定,并作为最终认定结果提供了技术上的支持.

本研究成功建立了胡萝卜软腐欧文氏菌的分子检测体系,此技术为解决今后魔芋、马蹄莲引种调运、田间土壤病菌检测,以及栽培过程中软腐病菌增殖的情况等问题提供了快速检测方法,也为多种作物软腐病的控制提供了重要的技术手段.

参考文献:

- [1] 郭小密,王就光.魔芋软腐病病原细菌的初步鉴定[J].华中农业大学学报,1989,8(1):88-89.
- [2] 黄俊斌,邱仁胜,赵纯森,等.魔芋软腐病病原菌的鉴定及生物学特性初步研究[J].华中农业大学学报,1999,18(5):413-415.
- [3] 唐嘉义,张泽.魔芋软腐病病原菌鉴定及部分生物学特性研究[J].云南农业大学学报,2001,16(3):293-295.
- [4] 沈业寿,储苏.魔芋软腐病病原菌的分离及致病性研究[J].安徽大学学报:自然科学版,2002,26(1):96-100.
- [5] 赵廷昌,孙福在,阎克峰,等.马蹄莲细菌性软腐病及其防治[J].植物保护,2000,26(1):46-47.
- [6] RONALD C, SNIJDER J M. Evaluation of tests to determine resistance of *Zantedeschia* spp. (Araceae) to soft rot caused by *Erwinia carotobora* subsp. *carotovora* [J]. Plant Pathology, 2002, 108: 565-571.
- [7] WRIGHT P J. A soft rot of calls (*Zantedeschia* spp.) caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* [J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1998, 26: 331-334.
- [8] 廖晓兰,朱水芳,赵文军,等.水稻白叶枯病菌与水稻细菌性条斑病菌实时荧光PCR快速检测鉴定方法的建立[J].微生物学报,2003,43(5):626-634.
- [9] 漆艳香,谢艺贤,张辉强,等.香蕉细菌性枯萎病菌实时荧光PCR检测方法的建立[J].华南热带农业大学学报,2005,11(1):1-5.
- [10] 伍永明,张祥林,罗明.西瓜细菌性果斑病菌Taq Man探针实时荧光PCR检测鉴定方法的建立[J].新疆农业大学学报,2006,29(3):68-72.
- [11] 夏明星,赵文军,马青,等.番茄细菌性溃疡病菌的实时荧光PCR检测[J].植物病理学报,2006,36(2):152-157.
- [12] 刘鹏,黄国明,刘勇,等.菊欧文氏菌分子检测技术的研究[J].植物病理学报,2007,37(6):584-587.
- [13] 李德葆,徐平.重组DNA的原理和方法[M].杭州:浙江科学技术出版社,1996:130-132.
- [14] KWON S W, GO S J, KANG H W, et al. Phylogenetic analysis of *Erwinia* species based on 16S rDNA gene sequences [J]. International Union of Microbiological Societies, 1997, 47(4): 1061-1067.
- [15] TOTH I K, AVROVA A O, HYMAN L J. Rapid identification and differentiation of the soft rot *Erwinias* by 16S-23S intergenic transcribed spacer-PCR and restriction fragment length polymorphism analyses [J]. App Environ Microbiol, 2001, 67(9): 4070-4076.
- [16] 焦振泉,刘秀梅.细菌分类与鉴定的新特点:16S-23S rDNA 间区[J].微生物学通报,2001,28(1):85-89.
- [17] KANG H W, KWON S W, GO S J, et al. PCR-based specific and sensitive detection of *Pectobacterium carotovora* subsp. *carotovora* by primers generated from a URP-PCR fingerprinting-derived polymorphic band [J]. Plant Pathology, 2003, 52: 127-133.

【责任编辑 周志红】