

应用实时荧光定量 PCR 技术检测 土壤中根肿病菌休眠孢子

宋琼^{1,2}, 任佐华^{1,2}, 杨华^{1,2}, 刘二明^{1,2*}

(1.湖南农业大学植物保护学院, 湖南长沙 410128; 2.植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 湖南长沙 410128)

摘要:为准确、快速、便捷检测出土壤中根肿病菌休眠孢子量,应用所建立的根肿病菌实时荧光定量聚合酶链式反应检测技术,测定了湖南湘潭县响水乡、长沙县路口镇、桃江县桃花江镇十字花科作物根肿病发生地的42份土样的休眠孢子数量。检测结果表明,40份土样的根肿病菌休眠孢子量为 $(2.76 \times 10^4 \sim 4.37 \times 10^6)$ 个/g;休眠孢子量 10^4 个/g的土壤均有根肿病发生,而休眠孢子量为 8.42×10^2 、 9.78×10^2 个/g的2份土样未发生根肿病,说明当土壤中根肿病菌休眠孢子量 10^4 个/g时,根肿病害易发生。

关键词:十字花科作物;根肿病菌;休眠孢子量;荧光定量PCR;检测

中图分类号: S436.34; Q789

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)06-0631-05

Application of real-time fluorescent quantitative PCR for detection of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in field soil

Song Qiong^{1,2}, Ren Zuohua^{1,2}, Yang Hua^{1,2}, Liu Erming^{1,2*}

(1.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Diseases and Insect Pests, Changsha 410128, China)

Abstract: To detect the content of *Plasmodiophora brassicae* (*P. brassicae*) resting spores in soil samples accurately, quickly and conveniently, a real-time fluorescent quantitative PCR was applied to detect the content of resting spores of *P. brassicae* in 42 soil samples which collected from Xiangshui township in Xiangtan county, Lukou town of Changsha county and Taohuajiang town of Taojiang county. The results showed that the number of resting spores per gram soil in 40 of 42 soil samples were between 2.76×10^4 to 4.37×10^6 , in which the samples with resting spores 10^4 /g soil all had clubroot occurrence while the 2 samples with 8.42×10^2 and 9.78×10^2 resting spores per gram soil didn't have. Therefore, occurrence risk of the clubroot was large when the content of *P. brassicae* resting spores 10^4 /g soil.

Key words: cruciferae crops; *Plasmodiophora brassicae*; resting spore; fluorescent quantitative PCR; detection

十字花科作物根肿病又称根瘤病,由根肿病菌(*Plasmodiophora brassicae* Woronin)^[1]引起,是十字花科作物主要病害之一^[2]。作物根肿病菌以休眠孢子随病残体遗落在土壤中存活越冬,抗逆性强,在土壤中可存活并保持侵染力达10年以上^[3]。根肿病

菌是专性寄生菌,不能进行人工培养,采用传统方法难以对其进行鉴定和检测。PCR技术使得根肿菌检测研究有了跨越式的发展^[4]。Ito等^[5]将PCR技术应用于检测根肿病菌,并成功检测得到根肿菌;Faggian等^[6]制备了特异性的PCR引物用于检测根

肿菌。由于 PCR 技术受到试剂、模板、焦磷酸盐分子的聚集等多种因素的影响,使得 PCR 反应容易出现假阳性,因此,这一方法不能对根肿菌进行准确定量,其广泛应用受到限制^[7]。1991 年, Holland 等^[8]首次将探针与模板结合,运用外切酶将探针切断,破坏能量传递结构而发出荧光,实现定量检测。1996 年, Applied Biosystems 公司率先推出了实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)系列产品。与常规 PCR 技术对比, FQ-PCR 技术具有特异性较强、能够准确定量、操作快速便捷、反应体系全封闭等优点^[9]。 Wallenhammar 等^[10]采用 Taqman 探针与荧光定量技术相结合的方法,对田间病土和人工接种的带菌土壤进行了定量检测,精确度达到 500 个/g;李妍等^[11]运用构建的实时荧光定量 PCR 体系,定量检测了人工接种和田间采集的土壤样品;杨华^[12]的研究表明,土壤中根肿病菌休眠孢子含量的多寡直接影响作物根肿病的发生与否。

笔者应用实时荧光定量 PCR 技术,检测了湖南湘潭县响水乡、长沙县路口镇、桃江县桃花江镇十字花科作物根肿病发生地的 42 份土样的根肿病菌休眠孢子数量,探索了土壤中根肿病菌数量与作物根肿病发病之间的关系,以期进一步快速、精确地检测土壤中根肿病菌休眠孢子数量,及时作出病情预警、评估田间病菌分布和提高监测防治水平。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试根肿病菌菌原采自湖南省湘潭县响水乡冯家村的白菜、红菜苔和油菜病株。将病株根部肿根洗净后,编号并装入密封袋,置-20℃冰箱中保存。

供试土样分别采自湖南省湘潭县响水乡冯家村(FJC1~FJC9, 9 份),湘江村(XJC1~XJC3, 3 份),棋盘村(QPC1~QPC2, 2 份,未发病),长沙县路口镇龙华山(LK1~LK11, 11 份),益阳市桃江县桃花江镇长湖塘村(HT1~HT17, 17 份),共 42 份。采集土样时,提取距地表约 20 cm 的中上层土壤,采用“W”字形,每行至少随机取 5 个点,将每个点采集的土壤样品合并,混合均匀。土样自然风干后,研磨,过 380 μm 孔径的筛网后,装入密封袋,编号并置于-7℃冰箱中保存。

引物采用近年来已设计并发表的引物 PbF(5'-

AAACAACGAGTCAGCTTGAATGC-3')和 PbR(5'-TTCGCGCACAAGCACTTG-3')^[10],扩增片段长度为 607 bp,由上海生工生物工程公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 土壤 DNA 的提取及纯化

采用 MoBio PowerSoil Isolation 试剂盒(北京全式金生物技术有限公司生产)方法,提取土壤中的根肿菌 DNA,将提取的 DNA 用引物 PbF 和 PbR 进行扩增,以清水作为对照。总反应体系为 25 μL: Super Mix 12.5 μL, PbF 和 PbR 各 1 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 9.5 μL。扩增程序为: 95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 40 s, 35 个循环, 72℃ 延伸 7 min。扩增后进行琼脂糖凝胶电泳,用胶回收试剂盒回收电泳条带。

1.2.2 重组标准质粒的制备

重组标准质粒由中国农业大学张力群提供。由于芸薹根肿菌为专性寄生菌,很难获得纯 DNA,因此,需要将获得的根肿菌目标片段连接到载体上,获得重组质粒来制作 Real-time PCR 标准曲线,通过对目的基因的定量检测来计算待测样本中的初始模板量。

1.2.3 实时荧光定量 PCR

将提取的 DNA 用引物对 PbF/PbR 进行荧光定量 PCR 定量检测。总反应体系为 20 μL: Mix UDG 10 μL, PbF 和 PbR 各 0.5 μL, Dye I 0.4 μL, DNA 模板 2 μL, ddH₂O 6.6 μL。反应条件为: 50℃ 热激活 2 min, 94℃ 预变性 10 min, 94℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 15 s, 72℃ 延伸 31 s, 共 40 个循环, 72℃ 延伸 8 min。每个样品设 3 次重复,检测结果取平均值。

2 结果与分析

2.1 Real-time PCR 标准曲线的构建

重组标准品质粒经紫外分光光度计测得质量浓度为 4 ng/μL,采用梯度稀释法依次进行 10 倍稀释,获得质量浓度为(10²~10⁷) ng/μL 的 6 个质粒 DNA 作为模板,进行实时荧光定量 PCR 扩增。以模板 DNA 起始浓度的对数值(x)为横坐标,以 C_t值(y)为纵坐标作荧光定量 PCR 标准曲线,结果如图 1 所示。标准曲线方程 $y = -3.99x + 39.76$ $R^2 = 0.995$,

C_t 值与质粒浓度的对数值呈良好的线性关系。

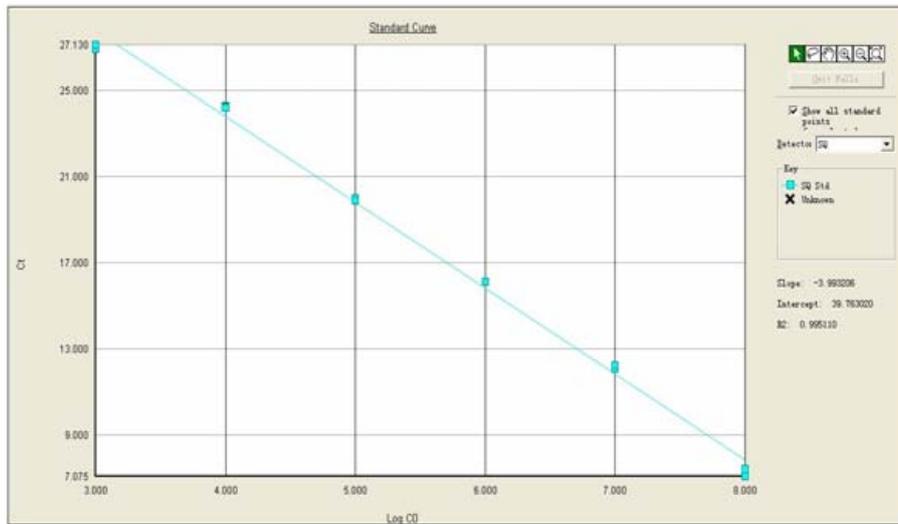
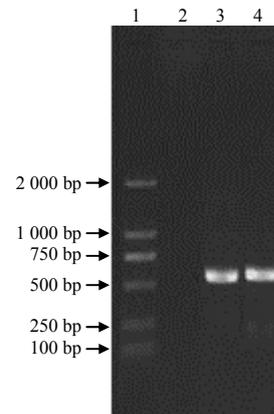


图 1 根肿菌质粒 DNA 梯度稀释后绘制的 QPCR 标准曲线

Fig.1 Standard curve of quantitative PCR for *Plasmodiophora brassicae* plasmid DNA gradiently diluted

2.2 扩增产物特异性检测结果

用引物 PbF/PbR 进行 FQ-PCR 扩增, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳, 发现无引物二聚体, 扩增片段位于 607 bp, 与预期片段大小一致(图 2)。标准质粒的溶解曲线(图 3)中出现明显的单个特异峰, 无非特异扩增产物, 说明产物具有良好的特异性。



1 Marker 2 000 ; 2 阴性对照 ; 3~4 扩增产物。

图 2 PbF/PbR 引物扩增根肿病菌基因组 DNA 的特异性

Fig.2 Specificity of *P. Brassicae* genome DNA amplified with primer pair PbF/PbR

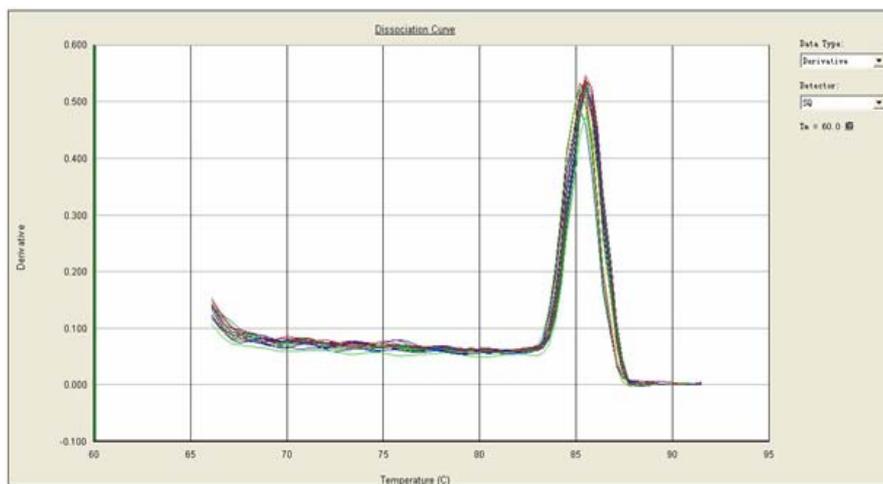


图 3 荧光定量 PCR 的溶解曲线

Fig.3 Melting curve of the fluorescent quantitative PCR

2.3 FQ-PCR 对 42 份土样的检测结果

对 42 份带菌土样的 DNA 进行荧光定量 PCR 检测,结果显示,所有土样都能检测到荧光信号,表明含有目的基因。有 40 份土样的休眠孢子数量

为 $2.76 \times 10^4 \sim 4.37 \times 10^6$ 个/g,其他 2 份未发病土样的检测结果为 8.42×10^2 、 9.78×10^2 个/g。如表 1 所示。

表 1 荧光定量 PCR 检测的土样根肿病菌休眠孢子量

Table 1 Number of resting spores in soil samples detected by fluorescent quantitative PCR

序号	编号	样品拷贝数	休眠孢子量/(个·g ⁻¹)	序号	编号	样品拷贝数	休眠孢子量/(个·g ⁻¹)
1	FJC1	3.44×10^2	6.88×10^4	22	LK8	6.02×10^2	1.20×10^5
2	FJC2	7.54×10^2	1.51×10^5	23	LK9	3.81×10^2	7.63×10^4
3	FJC3	3.44×10^2	6.88×10^4	24	LK10	2.50×10^2	5.01×10^4
4	FJC4	1.20×10^3	2.39×10^5	25	LK11	1.92×10^2	2.76×10^4
5	FJC5	1.42×10^3	2.84×10^5	26	CHT1	1.38×10^2	3.84×10^4
6	FJC6	1.88×10^3	3.75×10^5	27	CHT2	1.09×10^3	2.18×10^5
7	FJC7	2.73×10^2	5.46×10^4	28	CHT3	1.34×10^3	2.69×10^5
8	FJC8	2.32×10^2	4.64×10^4	29	CHT4	2.42×10^2	4.83×10^4
9	FJC9	3.19×10^2	6.38×10^4	30	CHT5	3.88×10^2	7.75×10^4
10	XJC1	2.56×10^2	5.12×10^4	31	CHT6	5.32×10^2	1.06×10^5
11	XJC2	1.22×10^3	2.43×10^5	32	CHT7	1.21×10^3	2.42×10^5
12	XJC3	2.68×10^2	5.37×10^4	33	CHT8	3.96×10^3	7.93×10^5
13	QPC1	4.21×10^0	8.42×10^2	34	CHT9	2.18×10^4	4.37×10^6
14	QPC2	4.89×10^0	9.78×10^2	35	CHT10	4.83×10^3	9.66×10^5
15	LK1	2.65×10^2	5.30×10^4	36	CHT11	2.87×10^2	5.73×10^4
16	LK2	3.54×10^2	7.08×10^4	37	CHT12	1.85×10^3	3.70×10^5
17	LK3	2.46×10^2	4.92×10^4	38	CHT13	7.37×10^2	1.47×10^5
18	LK4	2.08×10^2	4.16×10^4	39	CHT14	9.60×10^2	1.92×10^5
19	LK5	2.68×10^2	5.37×10^4	40	CHT15	1.34×10^3	2.68×10^5
20	LK6	1.54×10^2	3.08×10^4	41	CHT16	4.00×10^2	8.00×10^4
21	LK7	8.12×10^2	1.62×10^5	42	CHT17	1.69×10^3	3.38×10^5

2.4 作物根肿病发生与土样菌量的关系

定量检测 42 份土样,其中发病土样根肿病菌休眠孢子量在 $2.76 \times 10^4 \sim 4.37 \times 10^6$ 个/g, QPC1 和 QPC2 含菌量分别为 8.42×10^2 、 9.78×10^2 个/g,其采集地块所栽种的白菜未发生根肿病,说明当土壤中根肿病菌休眠孢子量 10^4 个/g 时,发病风险较大,易引起根肿病害的发生,需要采取措施加以防范。

3 讨论

实时荧光定量 PCR 分为荧光杂交探针和 DNA 结合染料(如 SYBR Green 或 BEBO^[13])两种^[14-15]。SYBR Green 可以与双链 DNA 小沟结合发出荧光,这种荧光约是游离 DNA 时强度的 1 000 倍^[11],在一个反应体系内,荧光信号的强度代表了双链 DNA 分子的数量,从而可以定量检测出样品的起始模板拷贝数^[16],为进一步深入分析提供技术支撑。

本研究中采用 SYBR Green I 作为荧光染料对根肿病菌进行定量检测,一方面避免使用昂贵的探针,节约了检测成本;另一方面,由于 SYBR Green I 容易与体系中的 DNA 双链结合,产生非特异性产物^[17-18],通过反复优化退火温度、引物浓度等反应条件,获得了理想的溶解曲线,有效地避免了染料与非特异性产物的结合^[19],使扩增效率达到 97% 以上,满足了试验的要求。

本研究中用已知浓度的标准品质粒 DNA,采用梯度稀释法制作标准曲线,具有很高的线性相关性、敏感性和可重复性,可以通过检测不同的浓度而计算出绝对拷贝数^[20],使得结果更为精确且具有可靠性及说服力。

引物的反应性能优劣是影响实时荧光定量 PCR 结果的最重要因素^[21]。经过多次平行试验,选定了最为合适的引物对 PbF/PbR,引物扩增的目标片段为 607 bp,通过溶解曲线分析,认为该对引物

符合检测的特异性要求,能满足根肿菌定量检测的需要。

应用实时荧光定量 PCR 检测体系对采集到的 42 份土样所含根肿病菌休眠孢子进行定量检测,发现未发病田块的土壤含菌量为 8.42×10^2 、 9.78×10^2 个/g,其他发病田块土壤含菌量普遍为 $2.76 \times 10^4 \sim 4.37 \times 10^6$ 个/g,表明当土壤中根肿病菌含量 10^4 个/g 时,作物发生根肿病的风险较大,需采取有效措施进行防治。

试验中未检测到所含根肿病菌休眠孢子为 10^3 个/g 的土样,尚无法确定休眠孢子量为 10^3 个/g 是否为根肿病的发病阈值,尚需扩大样品数量,进一步明确引起土样发生根肿病的根肿病菌休眠孢子数量,为防治根肿病提供依据。

参考文献:

- [1] Woronin M. *Plasmodiophora brassicae*, Urheber der Kohlpflanzen Hernie[J]. Jahrb Wiss Bot, 1878(11): 548-574.
- [2] 王靖,黄云,李小兰,等.十字花科根肿病研究进展[J].植物保护,2011,37(6):153-158.
- [3] 王芳展,刘亚培,张梅,等.十字花科作物根肿病的侵染生理与抗性遗传研究进展[J].中国油料作物学报,2012,34(2):215-224.
- [4] Xu X G, Liu Y T. Application of real-time fluorescence quantitative PCR in plant disease[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(7): 52-56.
- [5] Ito S, Mathara T, Marund E, et al. Development of a PCR-based assay for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil[J]. Journal of Phytopathology, 1999, 147: 83-88.
- [6] Faggian R, Bulman S R, Lawrie A C, et al. Specific polymerase chain reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water[J]. Phytopathology, 1999, 89: 392-397.
- [7] 尹兵.实时荧光定量PCR的原理及应用研究进展[J].科技信息,2010(17):58-59.
- [8] Holland P M, Abramson R D, Watson R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 7276-7280.
- [9] 施林祥,李东辉.荧光PCR研究新进展[J].世界华人消化杂志,2005,13(5):596-599.
- [10] Wallenhammar A C, Almquist C, Soderstrom M, et al. In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR[J]. Plant Pathology, 2012(61):16-28.
- [11] 李妍.大白菜根肿病病原菌检测与防治技术研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2010.
- [12] 杨华.湖南栽培十字花科品种抗根肿病鉴定、病菌小种及 qPCR 土壤病菌检测技术研究[D].长沙:湖南农业大学,2014.
- [13] Bengtsson M, Karlsson H J, Westman G, et al. A new minor groove binding asymmetric cyanine reporter dye for real-time PCR[J]. Nucleic Acids Res, 2003, 31(8): e45.
- [14] 陈英剑,胡成进,赵苗青. SYBE Green 实时荧光定量 PCR 技术平台的建立[J].实用医药杂志,2004,21(11):997-999.
- [15] 王小花,李建祥,王国卿,等. SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检测大豆转基因成分[J].食品科学,2009,30(8):171-175.
- [16] 欧阳松应,杨冬,欧阳红生,等.实时荧光定量 PCR 技术及其应用[J].生命的化学,2004,24(1):74-76.
- [17] 王学波,李建远.人线粒体 DNA 荧光定量 PCR 检测方法的建立[J].生物医学工程研究,2008,27(4):298-301.
- [18] David G, Ginzinger. Gene quantification using real-time quantitative PCR: An emerging technology hits the mainstream[J]. Experimental Hematology, 2002, 30: 503-512.
- [19] 韩彩霞,赵德明,吴长德,等.用实时荧光定量 RT-PCR 方法定量绵羊 PrP 基因的表达[J].中国农业大学学报,2006,11(2):61-64.
- [20] 徐楠楠,胡桂学.实时荧光定量 PCR 技术的研究进展及应用[J].黑龙江畜牧兽医,2011,24(21):24-27.
- [21] 张晶,张惠文,张成刚.实时荧光定量 PCR 及其在微生物生态学中的应用[J].生态学报,2005,24(6):1145-1150.

责任编辑:罗慧敏

英文编辑:罗维