

试验土壤中烟草青枯病菌的RT-qPCR检测分析

程承,李石力,刘颖,王榕笙,丁伟,张永强*

西南大学植物保护学院,重庆市北碚区天生路2号 400716

摘要:为有效防治烟草青枯病,利用实时荧光定量PCR(Real-time quantity PCR, RT-qPCR)技术,对土壤中烟草青枯病菌进行了定量检测,并建立了土壤中烟草青枯病菌的RT-qPCR检测方法。结果表明,该方法对试验土壤青枯菌的最低检测浓度为 5×10^2 cfu/g土壤,RT-qPCR检测技术对土壤中烟草青枯病菌的灵敏度比常规PCR检测技术提高了10倍。

关键词:烟草;青枯病;土壤;青枯雷尔氏菌;RT-qPCR

中图分类号:S432.41 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-0861(2017)01-0012-05

RT-qPCR detection and quantitative analysis of *Ralstonia solanacearum* in soil

CHENG Cheng, LI Shili, LIU Ying, WANG Rongsheng, DING Wei, ZHANG Yongqiang*

College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400716, China

Abstract: To effectively control tobacco bacterial wilt, real-time quantitative PCR (RT-qPCR) technique was developed and used to quantitatively detect *Ralstonia solanacearum* in soil. The results showed that the lowest concentration of *Ralstonia solanacearum* in soil detected by the developed system was 5×10^2 cfu/g. Comparing with conventional PCR detection, the sensitivity of RT-qPCR detection to *Ralstonia solanacearum* in soil increased by 10 times.

Keywords: Tobacco; Bacterial wilt; Soil; *Ralstonia solanacearum*; Real-time quantitative PCR

烟草青枯病(Tobacco bacterial wilt)是由青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)引起的细菌性土传病害,属于典型的维管束病害^[1],对烟叶的产量和品质影响极大。防治土传病害的关键是对土壤中病原菌数量进行适时监控和定量检测^[2]。烟草青枯病一旦发生,在田间发展迅速且目前尚缺乏特效的防治药剂,防治难度大^[3]。因此,定量检测土壤中烟草青枯病菌,对指导病害预测预报和制定综合防治措施有重要意义。近年来,利用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)可检测土壤中的植物病原物,定量研究病原物结构组成及数量,探索微生物群落的动态变化^[2],为病害的发生和防治提供了依据。目前对于植物病原菌的定量检测研究较多,Broeckling等^[4]利用定量PCR技术,在模拟植

物体根际环境条件下,检测了植物根系分泌物对土壤真菌群落组成和多样性的影响,认为根系分泌物是引起土壤真菌群落组成和多样性改变的主要原因;Weller等^[5]通过RT-qPCR可以特异性检测*R. solanacearum*,其检测灵敏度为 1×10^2 cfu/mL菌悬液;漆艳香等^[6]用RT-qPCR对香蕉细菌性枯萎病菌(*R. solanacearum* race 2)进行检测,其检测灵敏度为24.6 fg/ μ L菌悬液;Opina等^[7]设计了鉴定青枯菌的专一性引物759/760,对青枯菌具有种特异性;Prior等^[8]等验证了青枯菌、*P. syzygii*和侵染香蕉的细菌性病菌BDB,菌株扩增后均产生条带,扩增片段长度均为280 bp。随着RT-qPCR技术的快速发展,其在植物细菌、病毒等的检测和定量研究方面也应用广泛^[9-10],如茄科青枯菌^[11]、番茄溃

收稿日期:2015-12-17 修回日期:2016-07-25

基金项目:国家烟草专卖局重点科技项目“茄青枯病菌与烟草互作分子机制及其调控技术研究”(110201202002)。

作者简介:程承(1991—),在读硕士研究生,研究方向:烟草病虫害防控研究。E-mail:cici52425@163.com;通讯作者:张永强, E-mail:zyqiang@swu.edu.cn

引文格式:程承,李石力,刘颖,等. 试验土壤中烟草青枯病菌的RT-qPCR检测分析[J]. 烟草科技,2017,50(1):12-16. (CHENG Cheng, LI Shili, LIU Ying, et al. RT-qPCR detection and quantitative analysis of *Ralstonia solanacearum* in soil[J]. Tobacco Science & Technology, 2017, 50(1): 12-16.) DOI:10.16135/j.issn1002-0861.2015.0668

疡病菌(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)^[12]等,并且随着研究的不断深入,大大提高了植物病原菌的检测效率^[13]。为此,利用已知的青枯菌特异性引物 759/760,并优化引物退火温度,通过 RT-qPCR 确定土壤中烟草青枯菌数量,旨在建立一种简单高效的青枯菌定量检测方法、实时监控土壤中烟草青枯病菌数量,为该病害的有效防治提供依据。

1 材料与方 法

1.1 供试菌株

烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)由西南大学天然产物农药研究室提供。阴性对照菌株均由重庆大学生命科学学院基因中心提供,包括柑橘溃疡病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *citri*)、番茄细菌性溃疡病菌(*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*)、水稻白叶枯菌(*Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*)和水稻细菌性条斑病菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*)。

1.2 细菌 DNA 提取

采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司]进行 DNA 提取。

1.3 土壤微生物总 DNA 提取

将 OD₆₀₀ ≈ 1 (约 1 × 10⁹ cfu/mL) 的烟草青枯菌液依次 10 倍梯度稀释,使带菌量分别为 1 × 10⁹、1 × 10⁸、1 × 10⁷、1 × 10⁶、1 × 10⁵、1 × 10⁴ 和 1 × 10³ cfu/mL。按 0.2 g 土样加入 0.1 mL 的比例,将菌液分别加入到等量的健康土壤中,混匀后分别静置 1 h,模拟自然带菌环境。

分别取 0.5 g 带菌土壤,按照土壤微生物 DNA 提取试剂盒(美国 Omega Biotek 公司)说明书提取土壤微生物总 DNA。提取结果经琼脂糖凝胶电泳检测,超微量分光光度计检测土壤 DNA 总浓度和纯度,-20 °C 保存备用。

1.4 引物退火温度优化

青枯菌特异性引物 759/760(序列为 5'-GTCG-CCGTCAACTCACTTCC-3'、5'-GTCGCCGTCAG-CAATGCGGAATCG-3')由深圳华大基因科技服务有限公司合成,根据引物合成单上显示的退火温度 ± 2 °C 范围确定适宜的退火温度。

常规 PCR 扩增体系: Mix 12.5 μL, DNA 1 μL, 引物各 1 μL 并混合,加 ddH₂O 至 25 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 18 s; 58 °C ~ 62 °C 退火 30 s; 72 °C 延伸 90 s; 35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min, 16 °C 保存。反应结束后,取 5 μL 反应产物,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在

凝胶成像系统中观察拍照。

1.5 引物特异性及灵敏度检测

以烟草青枯菌 DNA 10 倍稀释液为模板,检测引物 759/760 对基因组 DNA 的灵敏度;以接种不同浓度细菌的土壤 DNA 为模板,检测该引物对土壤中青枯菌的灵敏度。

适宜退火温度的确定。常规 PCR 扩增体系同 1.4 节。反应结束后,取 5 μL 反应产物,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,在凝胶成像系统中观察拍照。

荧光定量 PCR 扩增体系为: SYBR. Premix. Ex. Taq. TMIImix 12.5 μL, DNA 2 μL, 引物 759 和 760 各 0.75 μL 并混合,加 ddH₂O 至 25 μL。反应程序为: 95 °C 预变性 1 min; 95 °C 变性 15 s, 59 °C 退火 15 s 和 72 °C 延伸 20 s, 40 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

1.6 盆栽试验验证

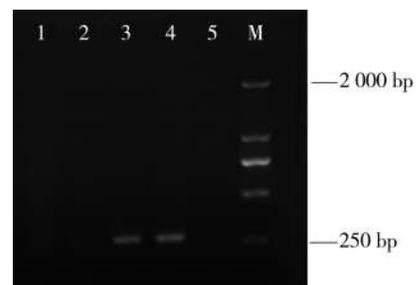
选取长势一致的烟草幼苗(五叶一心)60 株,每盆接种 10 mL 青枯病菌悬浮液(1 × 10⁷ cfu/mL),每天观察并记录烟草植株生长状况。从烟草青枯病发病之日起,每隔 24 h 调查烟草青枯病发病情况,总调查天数为 18 d,并计算发病率;从第一株烟苗发病开始,每天取发病烟株的根际土壤 20 g 风干待用,已取过土壤的烟苗放置于另一侧继续观察,直至所有烟苗全部发病。

发病率 = (发病株数 / 调查总株数) × 100%

2 结果与分析

2.1 引物退火温度的优化

对引物 759/760 退火温度进行优化,结果表明,在 58 °C、59 °C、60 °C、61 °C 和 62 °C 温度条件下,只有 59 °C 和 60 °C 时的烟草青枯菌能扩增出约 280 bp 大小的特异性条带,其他 3 个温度条件均没有明显条带;59 °C 条件下条带比 60 °C 条件下的条带略清晰,见图 1。因此,确定引物的适宜退火温度为 59 °C。



M. DL2 000 Marker 1. 62 °C 2. 61 °C 3. 60 °C 4. 59 °C 5. 58 °C

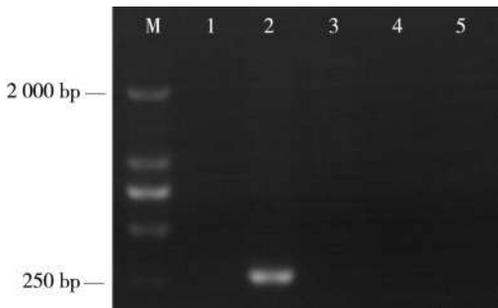
图 1 不同退火温度条件下 PCR 产物的电泳图谱

Fig.1 Electrophoregram of PCR products at different annealing temperatures

2.2 引物特异性及灵敏度的检测

PCR 检测结果(图 2)表明,除烟草青枯病菌能扩增出约 280 bp 大小的特异性条带外,其他供试菌株均没有发现扩增产物;荧光定量 PCR 检测结果(图 3)表明,除烟草青枯病菌 DNA 有 C_t 值外,其他供试菌株均无 C_t 值。说明该引物具有较强的特异性,可以用于烟草青枯病菌的检测。

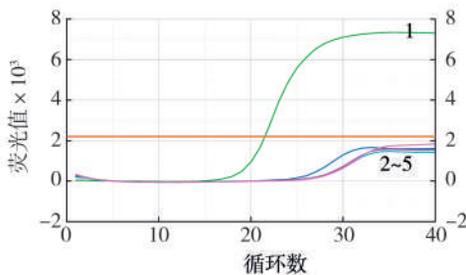
利用该病菌基因组 DNA 的 10 倍梯度稀释液作为模板进行荧光定量 PCR 扩增,结果见图 4。其检测下限为 43 pg/ μ L 基因组 DNA,说明该引物灵敏度很高。



M. DL2 000 Marker 1.柑橘溃疡病菌 DNA 2.烟草青枯病菌 DNA 3.番茄细菌性溃疡病菌 DNA 4.水稻白叶枯菌 DNA 5.水稻细菌性条斑病菌 DNA

图 2 引物特异性验证常规 PCR 产物电泳图谱

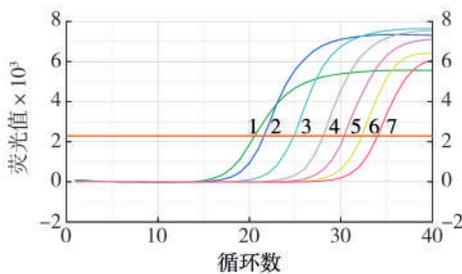
Fig.2 Electrophoregram of conventional PCR products to verify primer specificity



1.烟草青枯病菌 2.柑橘溃疡病菌 3.番茄细菌性溃疡病菌 4.水稻白叶枯菌 5.水稻细菌性条斑病菌

图 3 引物的特异性检测结果

Fig.3 Detection of primer specificity



1. 1×10^9 cfu/mL 2. 1×10^8 cfu/mL 3. 1×10^7 cfu/mL 4. 1×10^6 cfu/mL 5. 1×10^5 cfu/mL 6. 1×10^4 cfu/mL 7. 1×10^3 cfu/mL

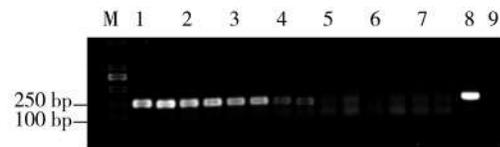
图 4 10 倍梯度稀释青枯病菌 DNA 的 RT-qPCR 扩增曲线

Fig.4 RT-qPCR amplification curves of *Ralstonia solanacearum* DNA of 10-fold serial dilutions

2.3 土壤微生物总 DNA 的提取及 PCR 扩增

利用超微量分光光度计检测土壤总 DNA 浓度为 0.06~0.14 μ g/ μ L, OD_{260}/OD_{280} 为 1.74~1.97,说明提取到的土壤微生物总 DNA 纯度较高,可以用于 PCR 扩增。

以人工接种土壤 DNA 为模板进行常规 PCR 扩增,PCR 产物用 1.2% 的琼脂糖电泳。由图 5 可以看出,4 个浓度梯度 DNA、Marker 和阳性对照,均条带明亮且无拖尾;条带亮度随着 DNA 浓度由高到低依次减弱,最高浓度 DNA (1×10^9 cfu/mL) 条带最亮,最低浓度 DNA (1×10^3 cfu/mL) 条带几乎没有;阳性对照为青枯病菌 DNA,条带亮度高于最高浓度接菌土壤 DNA。



M. DL2 000 Marker 1. 1×10^9 cfu/mL 2. 1×10^8 cfu/mL 3. 1×10^7 cfu/mL 4. 1×10^6 cfu/mL 5. 1×10^5 cfu/mL 6. 1×10^4 cfu/mL 7. 1×10^3 cfu/mL 8.阳性对照 9.阴性对照

图 5 人工接种土壤微生物 DNA 常规 PCR 产物的电泳图谱

Fig.5 Electrophoregram of conventional PCR products of inoculated soil microorganism DNA

2.4 细菌 DNA RT-qPCR 及标准曲线建立

用引物 759/760 对烟草青枯病菌 DNA 的 10 倍梯度稀释液进行 RT-qPCR 扩增。扩增结束后,用分析软件进行分析,以起始模板的对数为 x 轴,以 C_t 值为 y 轴做出回归曲线,获得烟草青枯病菌基因组 DNA 标准曲线。结果(图 6)显示, C_t 值与烟草青枯病菌 DNA 量(pg)的对数值之间呈负相关,标准曲线方程为 $y = -2.419 4x + 38.777 0$,决定系数 R^2 为 0.990 9。该体系的检测下限为 86 pg/ μ L 基因组 DNA,8 pg/ μ L 基因组 DNA 为模板及 2 μ L 超纯水代替模板 DNA 作为阴性对照均未能出现扩增。

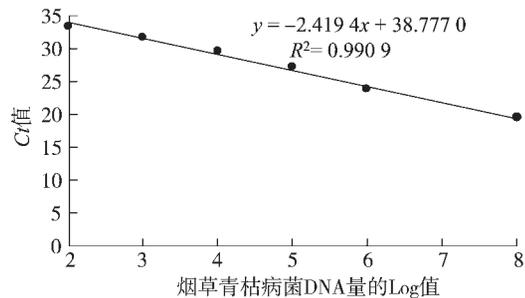


图 6 10 倍梯度稀释的青枯病菌 DNA 的 RT-qPCR 标准曲线

Fig.6 RT-qPCR standard curves of *Ralstonia solanacearum* DNA of 10-fold serial dilutions

2.5 人工接种土壤的RT-qPCR检测及标准曲线建立

用引物759/760对人工接种土壤微生物DNA进行RT-qPCR扩增。扩增结束后,用分析软件进行分析,以土壤中青枯菌浓度起始模板的对数为 x 轴,以 C_t 值为 y 轴做出回归曲线,获得人工接种土壤微生物DNA RT-qPCR标准曲线。结果(图7)显示, C_t 值与人工接种土壤青枯菌浓度的对数值之间呈负相关,标准曲线方程为 $y = -2.0115x + 35.956$,决定系数 R^2 为0.9853。该体系的检测下限为 5×10^2 cfu/g土壤。

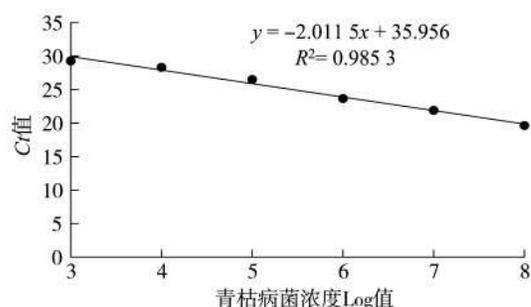


图7 人工接种土壤微生物DNA RT-qPCR标准曲线
Fig.7 RT-qPCR standard curve of inoculated soil microorganism DNA

2.6 盆栽试验验证

发病率调查结果(图8)表明:烟草青枯病始发期为接菌第6天,发病率为12.77%;随后密集发病,接菌第10天发病率为61.70%;接菌第15天,全部发病。

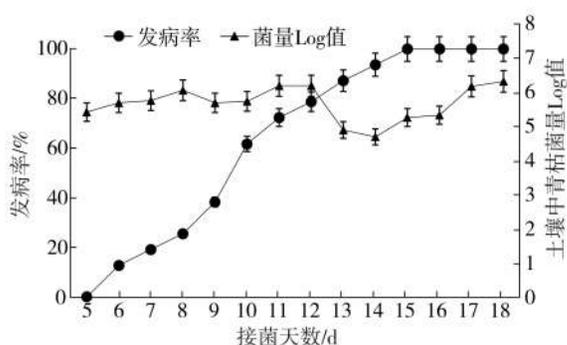


图8 发病率和土壤中青枯菌浓度检测结果
Fig.8 Incidence and concentration in soil of *Ralstonia solanacearum*

土壤中青枯菌浓度检测结果(图8)表明:从第6天到第12天,土壤中青枯菌浓度略微上升;第13天,土壤中青枯菌浓度显著下降;第15天至调查结束,土壤中青枯菌浓度逐步上升。土壤中青枯菌浓度在 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ cfu/g土壤范围之间。

3 结论与讨论

本研究中土壤样品的DNA按照土壤微生物DNA试剂盒说明书提取,提取结果 -20°C 保存备用。用该试剂盒提取土壤DNA与传统方法相比,具有简单高效的优点,重复性强,所提取的DNA浓度和纯度均能达到试验要求。在前人研究的基础上,对已验证的种特异性引物759/760进行试验,证实了该引物对烟草青枯菌和土壤中烟草青枯菌的灵敏度。将该引物与荧光染料SYBR Green结合,用RT-qPCR对土壤中的烟草青枯菌进行实时监测,前提条件是PCR反应必须是特异性的,非特异性扩增及引物二聚体等均会影响检测的准确性^[14-15]。此外,土壤中已经死亡的病原菌的存在可能影响定量的精确性^[16],但也有文献报道,土壤中死细胞的DNA会很快被降解^[17]。

有研究表明,在田间土壤中,只有病原菌繁殖到一定数量且生长一段时间后,即病原菌数量达到发病阈值以上,植株才会出现发病症状^[18]。本试验中建立的土壤烟草青枯菌检测方法,灵敏度为 5×10^2 cfu/g,能够满足检测要求。通过室内盆栽试验检测了烟草青枯病发病时土壤中青枯菌数量,结果表明,本试验中建立的检测方法可以快速、准确、灵敏地检测土壤中烟草青枯菌的数量。

但该检测方法仅进行了室内盆栽试验的应用验证,而田间病害的检测受环境的影响,可能会与室内试验结果存在一定差异。因此,在应用本检测方法进行田间诊断和实时监测土壤青枯菌方面还有待进一步深入研究与验证。

参考文献

- [1] 李盼盼,丁伟,刘秋萍,等. 硅和苯并噻二唑诱导烟草抗青枯病的机理分析[J]. 烟草科技, 2016, 49(7): 23-30.
LI Panpan, DING Wei, LIU Qiuping, et al. Mechanism of silicon and BTH-induced resistance to tobacco bacterial wilt[J]. Tobacco Science & Technology, 2016, 49(7): 23-30.
- [2] 陈巧玲. 荧光定量PCR方法在土传烟草青枯病生防研究中的应用[D]. 南京:南京农业大学, 2011.
CHEN Qiaoling. An application of real-time PCR in the study of biological control of tobacco wilt disease[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.
- [3] 吴金钟. 土壤中烟草青枯病菌分子检测方法研究[D]. 重庆:重庆大学, 2008.
WU Jinzhong. Research on molecular detection methods for *Ralstonia solanacearum* in soil[D]. Chongqing:

- Chongqing University, 2008.
- [4] Broeckling C D, Broz A K, Bergelson J, et al. Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(3): 738-744.
- [5] Weller S A, Elphinstone J G, Smith N C, et al. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 2853-2858.
- [6] 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.
- QI Yanxiang, XIE Yixian, ZHANG Huiqiang, et al. Detection of *Ralstonia solanacearum* by real-time fluorescent PCR[J]. *Journal of South China University of Tropical Agriculture*, 2005, 11(1): 1-5.
- [7] Opina N, Tavner F, Hollway G, et al. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum* (formerly *Pseudomonas solanacearum*) [J]. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 1997, 5(1): 19-30.
- [8] Prior P, Fegan M. Recent developments in the phylogeny and classification of *Ralstonia solanacearum* [C]// *The 1st International Symposium on Tomato Diseases*. Orlando, Florida, USA: International Society for Horticultural Science, 2005: 127-136.
- [9] 殷幼平, 黄冠军, 赵云, 等. 柑桔溃疡病菌实时荧光定量PCR检测与应用[J]. *植物保护学报*, 2007, 34(6): 607-613.
- YIN Youping, HUANG Guanjun, ZHAO Yun, et al. Establishment and application of real time fluorescent PCR approaches for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* [J]. *Acta Phytopylacica Sinica*, 2007, 34(6): 607-613.
- [10] 邓丛良, 赵晓丽, 双龙海, 等. 细菌磁颗粒实时荧光RT-PCR检测菜豆荚斑病毒[J]. *植物保护学报*, 2013, 40(1): 91-92.
- DENG Congliang, ZHAO Xiaoli, SHUANG Longhai, et al. Bacterial magnetic particles real-time RT-PCR for detecting *Bean pod mottle virus* [J]. *Acta Phytopylacica Sinica*, 2013, 40(1): 91-92.
- [11] 熊书, 殷幼平, 王芳, 等. 基于EMA-qPCR的茄科青枯菌活体检测技术的建立[J]. *微生物学通报*, 2013, 40(9): 1723-1732.
- XIONG Shu, YIN Youping, WANG Fang, et al. Establishment of a new method to detect viable cells of *Ralstonia solanacearum* by EMA-qPCR[J]. *Microbiology China*, 2013, 40(9): 1723-1732.
- [12] 吴兴海, 邵秀玲, 邓明俊, 等. 番茄溃疡病菌实时荧光PCR快速检测方法研究[J]. *江西农业学报*, 2007, 19(3): 34-36.
- WU Xinghai, SHAO Xiuling, DENG Mingjun, et al. Study on rapid detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by real-time fluorescent PCR [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2007, 19(3): 34-36.
- [13] 徐小刚, 刘雅婷. 实时荧光定量PCR在植物病害中的应用[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(7): 52-56.
- XU Xiaogang, LIU Yating. Application of real-time fluorescence quantitative PCR in plant disease [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2009, 25(7): 52-56.
- [14] Brownie J, Shawcross S, Theaker J, et al. The elimination of primer-dimer accumulation in PCR [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(16): 3235-3241.
- [15] Halford W P, Falco V C, Gebhardt B M, et al. The inherent quantitative capacity of the reverse transcription-polymerase chain reaction [J]. *Analytical Biochemistry*, 1999, 266(2): 181-191.
- [16] 康振辉. 土壤中烟草根黑腐病菌实时定量PCR检测方法研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2009.
- KANG Zhenhui. Research on real-time quantitative PCR detection methods for *Thielaviopsis basicola* in soil [D]. Chongqing: Chongqing University, 2009.
- [17] Nam H M, Srinivasan V, Gillespie B E, et al. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2005, 102(3): 161-171.
- [18] 彭怀俊, 顾钢, 纪成灿, 等. 烤烟根系土壤中青枯病菌动态与田间病害发生发展的关系[J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2005, 31(4): 384-387.
- PENG Huaijun, GU Gang, JI Chengcan, et al. Relationship between state of a disease in field and dynamic monitoring of *Ralstonia Solanacearum* in tobacco root soil [J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2005, 31(4): 384-387.

责任编辑 董志坚