

## 水稻细菌性谷枯病菌的实时荧光 PCR 检测技术研究

怀雁# 徐丽慧# 余山红 谢关林\*

(浙江大学 生物技术研究所/水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310029; # 共同第一作者; \* 通讯联系人, E-mail: glxie@zju.edu.cn)

Real Time Fluorescence PCR Method for Detection of *Burkholderia glumae* from Rice

HUAI Yan#, XU Lihui#, YU Shan hong, XIE Guan lin\*

(State Key Laboratory of Rice Biology/Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; # These authors contributed equally in this paper; \* Corresponding author, E-mail: glxie@zju.edu.cn)

**Abstract:** *Burkholderia glumae* causing seedling rot and grain rot of rice was listed as a plant quarantine disease of China in 2007. It's quite necessary to set up effective detection methods for the pathogen in order to prevent further spread of this disease. The real time PCR method was compared with classical PCR to develop an accurate, rapid and sensitive method to detect the pathogen in the seed quarantine for effective management of the disease. The results showed that all the tested strains of *B. glumae* produced about 139 bp specific fragments by the real time PCR and the general PCR method, while others showed negative PCR result. Comparing the sensitivity of these two detecting methods, about  $10^4$  CFU/mL of the bacterial suspension were detected by general PCR and below  $10^2$  CFU/mL could only be detected by the real time fluorescence PCR method. *B. glumae* can be detected when the healthy seeds and inoculated seeds are mixed with a proportion of 1:100.

**Key words:** *Burkholderia glumae*; detection; real time fluorescence polymerase chain reaction

**摘要:** 水稻细菌性谷枯病菌 *Burkholderia glumae* 于 2007 年被列为我国进境植物检疫性有害生物, 国内急需建立针对该菌切实可行的检测技术, 以有效控制它在我国的传播。采用实时荧光 PCR (real time fluorescence PCR) 和经典 PCR 技术进行水稻细菌性谷枯病菌检测。研究结果表明, 供试所有谷枯病菌都能产生 139 bp 左右的特异性片段, 非谷枯菌株均无特异性片段产生。两种检测方法的灵敏度比较发现, 常规 PCR 技术在病菌浓度为  $10^4$  CFU/mL 时即可检测到, 实时荧光 PCR 技术在病菌浓度为  $10^2$  CFU/mL 时即可检测到, 后者比前者的灵敏度高 100 倍。将模拟带菌种子与灭菌种子按 1:100 混合, 实时荧光 PCR 技术可以检测到该菌的存在。

**关键词:** 水稻细菌性谷枯病菌; 检测; 实时荧光聚合酶链式反应

中图分类号: S435.111.4+9

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2009)01-0107-04

*Burkholderia glumae* 引起的水稻细菌性谷枯病不但在穗期引起谷粒枯(腐), 而且也可以在苗期引起秧苗腐烂。该病于 20 世纪 50 年代首次在日本被发现, 70 年代后期由于实行工厂化育秧后上升为日本水稻上的主要病害<sup>[1]</sup>。目前该病在日本、越南等国严重发生, 不少东南亚国家、美洲及非洲等稻区也有发生。Shahjahan 等<sup>[2]</sup> 报道该病在美国可导致 15% ~ 80% 的水稻产量损失。该病是一种危险的种传病害, Sogou 等<sup>[3]</sup> 发现 *B. glumae* 菌能够在无明显症状的稻种上潜伏。我国虽然在田间未发现水稻细菌性谷枯病症状, 但罗金燕等<sup>[4-5]</sup> 在无谷枯病症状的稻种上检测到该病菌的存在, 这表明 *B. glumae* 菌已在中国大陆存在。而且, 我国东北及沿海不少地方已开始实行工厂化育秧和机械化移栽, 这些都给病害的流行创造了良好的外部环境条件。然而, 国内至今尚无水稻细菌性谷枯病菌的检测方法, 国际上也没有 *B. glumae* 菌成熟的检测技术。为有效控制该病菌在我国的传播和蔓延, 建立准确定性定量、快速、灵敏、实用的水稻细菌性谷枯病菌检测技术是该病治理的当务之急。

## 1 材料与方法

## 1.1 供试菌株

实验中所用菌株 LMG2196 为水稻细菌性谷枯病菌模式菌株, *B. cepacia* LMG1222 为洋葱伯克氏菌标准菌株, 系水稻附生菌, 皆由比利时根特大学国家菌种保藏中心提供; *B. glumae* Bg013、Bg0231、Bg0432 为分离自稻谷的水稻细菌性

谷枯病菌, *Pseudomonas syringae* PS3 为水稻分离菌, 均由本实验室提供。

## 1.2 主要仪器

PTG 200 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司), DYY-8B 型稳压稳流电泳仪, Fine do x3 数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司), iCyclerIQ 实时荧光 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司)。

## 1.3 引物的制备

特异性引物(glu1)和(glu2)来源于水稻细菌性谷枯病菌标准菌株 16S 23S rDNA, 引物间的片段长度为 139 bp<sup>[6]</sup>, 引物的核苷酸序列的上游和下游引物分别为: 5'-CTCTGCAACTCGAGTGATGAGC-3'; 5'-CGGTTAGACTAGCCACTTCTGGTAAA-3'。该引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

## 1.4 模板的制备

扩增模板: 挑待测菌单菌落在 LB 液体培养基中于 30、220 r/min 下摇动培养 24 h, 取 1 mL 菌悬液, 10 000 r/min 下离心 5 min, 弃上清液, 加入灭菌双蒸水配制成  $1 \times 10^8$  CFU/mL 浓度菌悬液, 作为 PCR 模板。

收稿日期: 2008-05-20; 修改稿收到日期: 2008-08-20。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671397); 农业部公益性行业科研专项资助项目(nyhyzx07-056)。

第一作者简介: 怀雁(1972-), 女, 博士研究生;

徐丽慧(1983-), 女, 硕士研究生。

**检测模板** 将菌液培养至对数生长期的水稻细菌性谷枯病菌以 10 倍梯度稀释,获得浓度分别为  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$  和 10 CFU/mL 的菌悬液样品,直接以 1  $\mu$ L 稀释液为模板进行常规 PCR 及实时荧光定量 PCR 检测。

1.5 模拟病种的制备

将无病区收获的健康水稻种子置于 500 mL 三角瓶中,把在 NB 培养基上 28  $^{\circ}$ C 下摇动培养(220 r/min) 24 h 的 *B. glumae* LMG2196 菌制成菌量约为  $1 \times 10^8$  CFU/mL 左右的菌悬液,将 20 g 水稻种子在菌悬液中浸泡 12 h 后,取出种子,于无菌操作台风干,然后按不同比例与灭菌种子混匀,作为模拟带菌种子。

1.6 直接 PCR 检测

**反应体系** :20  $\mu$ L 体系(10  $\mu$ L  $2 \times$  Taq PCR StarMix, 0.25  $\mu$ L glu1, 0.25  $\mu$ L glu2, 1  $\mu$ L DNA template & 5  $\mu$ L 灭菌 ddH<sub>2</sub>O)。反应程序为:94  $^{\circ}$ C 下预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 下变性 25 s,60  $^{\circ}$ C 下退火 25 s,72  $^{\circ}$ C 下延伸 1 min,共进行 30 个循环;72  $^{\circ}$ C 下延伸 6 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测,于紫外凝胶成像仪下观察结果。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测

**反应体系** :25  $\mu$ L 体系(12.5  $\mu$ L  $2 \times$  SYBR Green PCR Master Mix, 0.25  $\mu$ L glu1, 0.25  $\mu$ L glu2, 1  $\mu$ L DNA template, 11  $\mu$ L 灭菌 ddH<sub>2</sub>O)。反应程序为:95  $^{\circ}$ C 下预变性 2 min,95  $^{\circ}$ C 下变性 20 s,60  $^{\circ}$ C 下退火 25 s,72  $^{\circ}$ C 下延伸 35 s,共进行 40 个循环,最后 72  $^{\circ}$ C 下延伸 7 min。

**样品检测** 将所有样品放入实时荧光 PCR 仪反应板上,设置反应条件,让仪器自动实时监控 PCR 反应全过程并记录数据。反应结束后,打开分析软件,设置基线和阈值,仪器自动给出每个样品的循环阈值(Ct),分析检测结果。

2 结果与分析

2.1 特异性检测

将所有供试菌株配成  $1 \times 10^8$  CFU/mL 的悬浮液,进行常规 PCR 和实时荧光 PCR 反应。结果表明,所有参试 *B. glumae* 谷枯病菌均能产生 139 bp 左右的特异性片段(图 1),而 *Burkholderia* 属的其他菌株,包括水稻上的附生菌 *B. cepacia* 和 *Pseudomonas* 菌株与对照一样,均无特异性片段产生;其他常见水稻稻谷腐生菌株也没有扩增出特异性片段(数据略)。常规 PCR 与实时荧光 PCR 的特异性检测结果一致。

2.2 实时荧光 PCR 与普通 PCR 的相对灵敏度比较

从不同浓度梯度的 *B. glumae* LMG2196 菌液中取 1  $\mu$ L 进行常规 PCR 及实时荧光 PCR 的灵敏度检测,结果显示,普通 PCR 在菌液浓度为  $10^4$  CFU/mL 时即可检测到(图 2),而实时荧光 PCR 在菌液浓度为  $10^2$  CFU/mL 时即可检测到(图 3)。溶解曲线显示,样品都在 82.5  $^{\circ}$ C 处有一个单峰。由图 3 可见,并不是模板浓度越高,扩增效率越高,浓度太大的模板干扰 PCR 反应,使扩增效率降低。实时荧光 PCR 检测比普通 PCR 检测的灵敏度约高 100 倍。

2.3 实时荧光 PCR 与普通 PCR 不同检测浓度中的 *B. glumae* 活菌验证

将含菌量为  $1 \times 10^8$  CFU/mL (Beckman 紫外分光光度

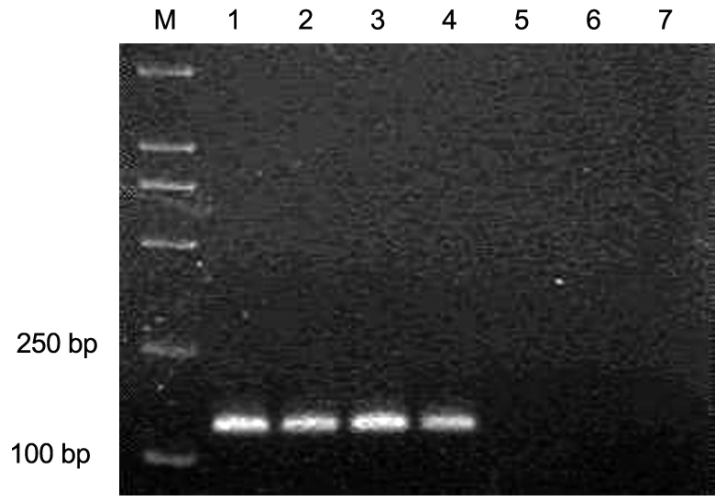


图 1 水稻谷枯病菌及相关菌株的 PCR 特异性扩增结果  
Fig. 1 PCR analysis of *B. glumae* and associated bacteria from rice with specific primers.

M - DNA marker; 1 - LMG2196; 2 - Bg013; 3 - Bg0231; 4 - Bg0432; 5 - LMG1222; 6 - PS3; 7 - 空白对照。

M, DNA marker; Lane 1, LMG2196; Lanes 2 to 4, *B. glumae* Bg013, Bg0231 and Bg0432, respectively; Lane 5, *B. cepacia* LMG1222; Lane 6, *P. syringae* PS3; Lane 7, Blank control.

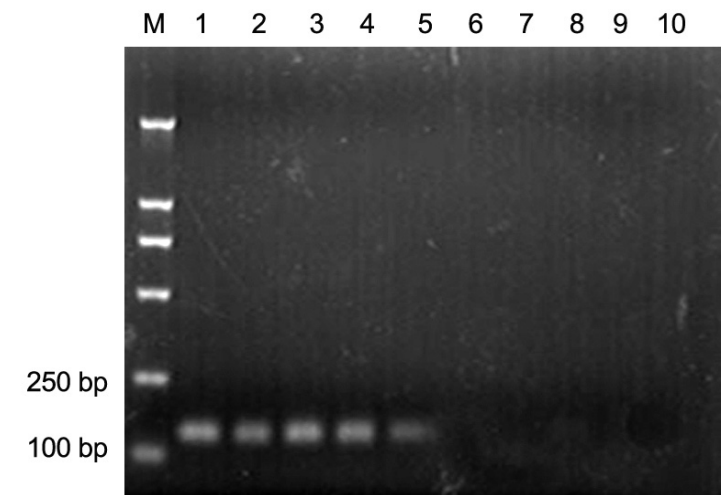


图 2 水稻谷枯病菌不同浓度的常规 PCR 检测  
Fig. 2. Precision of general PCR detection of *B. glumae*.

M - DNA marker; 1~9 - 菌液浓度分别为  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$ 、10 和 1 CFU/mL; 10 - 空白对照。

M, DNA marker; Lanes 1 to 9, Bacterial concentrations of  $10^8$ ,  $10^7$ ,  $10^6$ ,  $10^5$ ,  $10^4$ ,  $10^3$ ,  $10^2$ , 10 and 1 CFU/mL, respectively; Lane 10, Blank control.

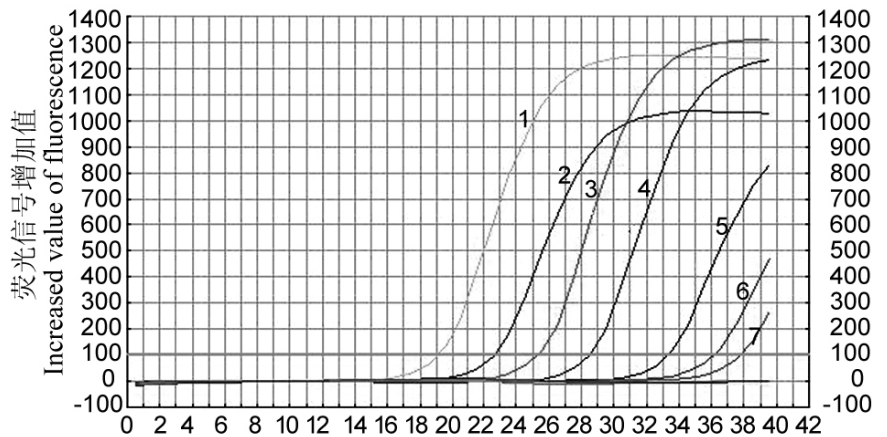


图 3 实时荧光 PCR 检测浓度  
Fig 3. Precision of real time PCR detection.

曲线 1~7 分别为浓度  $10^8$ 、 $10^7$ 、 $10^6$ 、 $10^5$ 、 $10^4$ 、 $10^3$ 、 $10^2$  CFU/mL 的菌液。

Curves 1 to 7 are the bacterial concentrations of  $10^8$  to  $10^2$  CFU/mL, respectively.

计测浓度) 纯培养的水稻细菌性谷枯病菌悬浮液以 10 倍梯度稀释 8 次, 取 10  $\mu$ L 悬浮液在 LB 琼脂培养皿上涂布, 置 28  $^{\circ}$ C 恒温箱中培养 36 h 后, 每处理重复 3 次。结果显示,  $1 \times 10^2$  CFU/mL 培养皿中平均有 4 个菌落,  $1 \times 10^3$  CFU/mL 培养皿中有 42 个菌落, 而在  $1 \times 10^4$  CFU/mL 培养皿中有 395 个菌落, 其他培养皿的菌落数无法统计。同时将 10 倍稀释的悬浮液各取 5  $\mu$ L 直接进行实时荧光 PCR, 结果表明, 在稀释菌液为  $1 \times 10^2$  CFU/mL 时(5  $\mu$ L 模板中只含 1~2 个活细菌)仍可检测到荧光信号增加值, 也就是说只要反应体系中有 1~2 个活细菌, 实时荧光 PCR 就可检测到。

### 2.4 实时荧光 PCR 检测 *B. glumae* 菌浓度与 PCR 循环阈值的 关系

实时荧光 PCR 检测过程中, 各浓度梯度样品中细菌的数量与对应的循环阈值(Ct 值)见表 1。Ct 值与细菌数量的对数值呈线性关系(图 4), 标准曲线的相关系数为 0.9901, 多次重复后得到一致的结果。

### 2.5 实时荧光 PCR 检测模拟病种

由于目前国内难以采集到水稻细菌性谷枯病的自然发病稻种, 故采用人工混菌的方法接种。分别以模拟带菌种子的总 DNA 及浸泡液为模板进行 PCR 扩增<sup>[7]</sup>。结果显示, 两种方案均能在反应过程中收集到很强的荧光信号。将模拟带菌稻种与健康无病稻种按 1:100 混合, 可以检测到该菌的存在(图 5)。表明水稻种子中的成分对 PCR 反应无抑制作用或抑制作用微弱。因此, 在实际应用中, 若种子带菌量较高, 可以直接提取水稻种子核酸或利用浸泡液进行 PCR 检测, 可提高检测效率, 降低工作量。

## 3 讨论

Urakami 等<sup>[8]</sup> 利用 PCR-RFLP 技术鉴定了 *B. glumae*, 成功地将它与 *Burkholderia* 属内其他细菌相区分。Takeuchi 等<sup>[9]</sup> 设计了特异性引物, 对 16S-23S rDNA 靶标基因进行检测, 能够扩增出 *B. glumae* 的 400 bp 左右的 PCR 产物。2006 年 Yukiko 等<sup>[10]</sup> 利用 *gyrB* 和 *rpoD* 片段序列设计特异性引物的多重 PCR 技术可以区分 *Burkholderia* 属的不同种。Sayler 等<sup>[6]</sup> 首次利用从美国阿肯色州水稻上分离到的 *B. glumae* 菌建立了实时 PCR 法, 但该方法尚未在其他地方应用。然而, 来自不同地区的 *B. glumae* 菌对水稻致病性存在很大差异<sup>[1, 10]</sup>, 2007 年 Weinberg 等<sup>[11]</sup> 在国际上首次发现 *B. glumae* 菌可引起幼儿肺病。这表明在建立 *B. glumae* 菌检测方法时, 除了有参考菌株外, 还需利用本地的菌株。2006 年我们成功地从未表现水稻细菌性谷枯病典型症状的谷粒上分离并鉴定出 *B. glumae* 菌<sup>[4-5]</sup>, 本研究在这一基础上, 利用本地的菌株, 建立了准确、快速、灵敏的 *B. glumae* 实时荧光 PCR 检测法。该法与普通 PCR 比较表明, 能检测到  $10^2$  CFU/mL 左右悬浮液或 PCR 反应体系中 1~2 个 *B. glumae* 活菌的浓度, 而普通 PCR 技术只能检测到  $10^4$  CFU/mL 左右的悬浮液或 395 个/mL *B. glumae* 活菌的浓度, 实时荧光 PCR 比直接 PCR 的灵敏度高 100 倍。此外, 将模拟带菌种子与灭菌种子按 1:100 混合, 仍可以检测到该菌的存在。而且在实验过程中不需要进行病原菌的分离培养, 不需要进行 PCR 的后续处理。由于实时荧光 PCR 在反应体系中加入荧光染料或荧光探针, 可对扩增结果进行实时检测,

表 1 实时荧光 PCR 检测中细菌数量与对应的 Ct 值

Table 1 Ct values for the bacterial cell dilutions in real time PCR detection.

序号 No.	细菌数量 Bacterial number/(CFU $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )	循环阈值 Ct value
1	$4 \times 10^2$	37.8
2	$4 \times 10^3$	36.1
3	$4 \times 10^4$	33.3
4	$4 \times 10^5$	28.5
5	$4 \times 10^6$	25.2
6	$4 \times 10^7$	22.7
7	$4 \times 10^8$	19.1

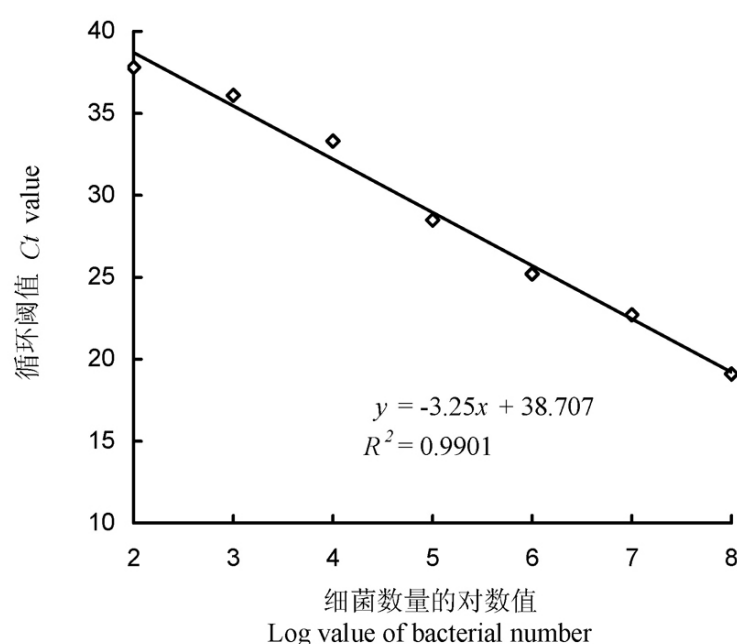


图 4 细菌数量与实时荧光 PCR Ct 值的线性关系

Fig 4 Correlation between bacterial number and real time PCR cycle threshold(Ct).

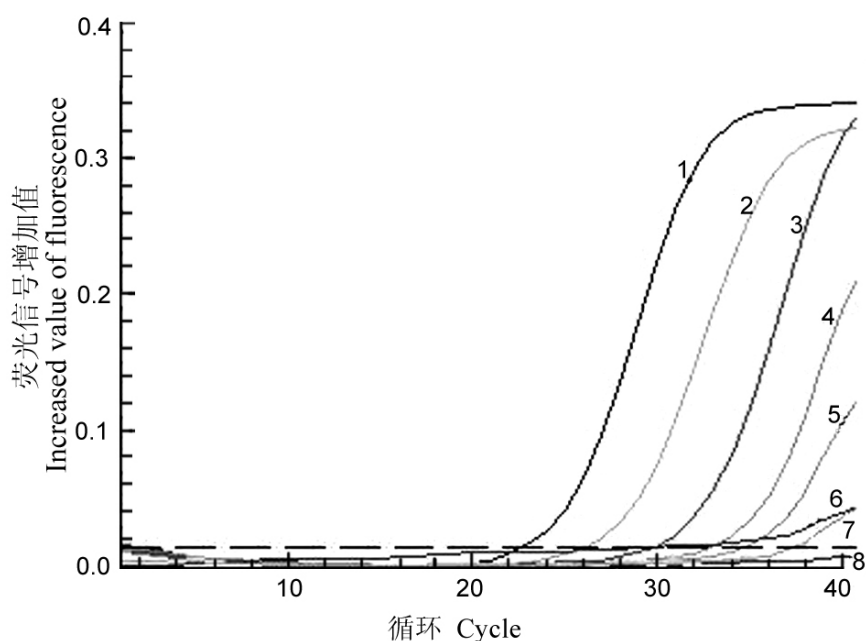


图 5 实时荧光 PCR 对模拟谷枯病病稻种的检测

Fig 5 Detection of artificially infected rice seeds of *B. glumae* with real time PCR.

1 - 阳性对照; 2~7 - 病健稻种比例分别为 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 和 1:100; 8 - 空白对照。

1, Positive control; 2 to 7, Inoculated and healthy seeds mixture ratios of 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 and 1:100, respectively; 8, Blank control.

而且完全实现闭管检测,无需进行电泳,这样不但提高检测效率,而且避免了在分析过程中不同反应体系间的相互影响及对试验环境造成污染,具有操作简单、省时省力、结果可靠和准确灵敏等优点<sup>[12-13]</sup>。该方法在种子及种苗检测领域具有广阔的应用前景。

然而,由于实时荧光 PCR 法采用荧光猝灭及双末端标记技术,因而猝灭难以彻底,本底较高;由于采用酶外切活性,定量时易受酶性能影响;此外,荧光探针的荧光标记见光极易分解,需避光保存,而且保存期不能太长。所以,在实际检测中为了得到稳定而可靠的 *B. glumae* 检测结果,必须考虑实时荧光 PCR 法的不足之处。

#### 参考文献:

- [1] Goto M . Fundamentals of Bacterial Plant Pathology . California : Academic Press , 1992 .
- [2] Shahjahan A K M , Rush M C , Groth D . Panicle blight recent research points to a bacterial cause . *Rice J* , 2002 , 103 : 26-28 .
- [3] Sogou K . The present situation of bacterial grain rot of rice . *Plant Prot* , 1985 , 39 : 396-402 .
- [4] 罗金燕 , 徐福寿 , 王平 , 等 . 水稻稻种细菌性谷枯病病原鉴定 . *中国水稻科学* , 2008 , 22(1) : 82-86 .
- [5] Luo J Y , Xie G L , Li B , et al . First report of *Burkholderia glumae* isolated from symptomless rice seeds in China . *Plant Dis* , 2007 , 91(10) : 1363 .
- [6] Saylor R J , Cartwright R D , Yang Y N . Genetic characterization and real time PCR detection of *Burkholderia glumae* , a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States . *Plant Dis* , 2006 , 90 : 603-610 .
- [7] 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 . *植物病理学报* , 2006 , 36(2) : 152-157 .
- [8] Urakami T , Ito Yoshida C , Araki H . Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp . and description of *Burkholderia vandii* sp . nov . *Int J Syst Bacteriol* , 1994 , 44 : 235-245 .
- [9] Takeuchi T , Sawada H , Suzuki F , et al . Specific detection of *Burkholderia plantarii* and *B. glumae* by using primers selected from the 16S-23S rDNA spacer regions . *Ann Phytopathol Soc Jpn* , 1997 , 63(6) : 455-462 .
- [10] Yukiko M , Hirotsuke S , Akinori K . Phylogenetic study and multiplex PCR-based detection of *Burkholderia plantarii* , *Burkholderia glumae* and *Burkholderia gladioli* using *gyrB* and *rpoD* sequences . *Int J Syst & Evol Microbiol* , 2006 , 56 : 1031-1038 .
- [11] Weinberg J B , Alexander B D , Majure J M , et al . *Burkholderia glumae* infection in an infant with chronic granulomatous disease . *J Clin Microbiol* , 2007 , 45 : 662-665 .
- [12] Schaad N W , Frederick R D . Real time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics . *Can J Plant Pathol* , 2002 , 24 : 250-258 .
- [13] 漆艳香 , 谢艺贤 , 朱水芳 , 等 . 香蕉细菌性枯萎病菌实时 PCR 方法的建立 . *华南热带农业大学学报* , 2005 , 11(1) : 1-5 .