

土壤大丽轮枝菌微菌核的快速定量检测

魏 锋, 余真真, 商文静, 杨家荣, 徐向明, 胡小平*

(旱区作物逆境生物学国家重点实验室/西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100)

摘要:微菌核是大丽轮枝菌在土壤中的主要存活结构和黄萎病的初侵染来源。对土壤中大丽轮枝菌微菌核进行定量是黄萎病监测和预警的基础。本研究以大丽轮枝菌 Internal Transcribed Spacer (ITS) 区特异性引物对 P1/P2 扩增产物的重组质粒为标准品, 构建 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 反应的标准曲线, 结合土样水筛法建立了土壤大丽轮枝菌微菌核定量检测体系。同时, 建立了土壤中微菌核数量与棉花黄萎病发病率的关系模型。结果表明, 实时定量 PCR 检测灵敏度比常规 PCR 高 10 倍, 检测下限为 1 个微菌核/克土, 在 $5.54 \times 10^2 \sim 5.54 \times 10^7$ copies 范围内, DNA 拷贝数的对数值与 Ct 值具有良好的线性关系。建立的土壤中微菌核个数 n 与 Ct 值之间的关系为 $n = e^{7.3 - Ct/3.905}$ 。温室人工接种微菌核数量与棉花黄萎病发病率间的线性关系为 $y = 2.710n + 0.251$ 。

关键词:大丽轮枝菌; 微菌核; 水筛法; 实时荧光定量 PCR; 棉花黄萎病

Rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil

WEI Feng, YU Zhen-zhen, SHANG Wen-jing, YANG Jia-rong, XU Xiang-ming, HU Xiao-ping (College of Plant Protection, Northwest A & F University and State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, Yangling 712100, China)

Abstract: Microsclerotia are the main survival structure of *Verticillium dahliae* and primary causal inoculum agent of cotton in soil. The quantification of *V. dahliae* microsclerotia is the base for monitoring and prediction of Verticillium wilt. The standard curve of SYBR Green I real-time PCR (RT-PCR) detection assay for quantification of *V. dahliae* was successfully established using recombinant plasmid by the specific primer pair P1/P2 from Internal Transcribed Spacer (ITS). The quantification system of microsclerotia was developed using SYBR Green I RT-PCR based on wet-sieving extraction of microsclerotia. The model of microsclerotium number per gram soil and incidence of cotton Verticillium wilt was estimated using this system. The results showed that a linear relationship was observed between the log copies of recombinant plasmids DNA and cycle threshold (Ct) values of RT-PCR over a range of 5.54×10^2 to 5.54×10^7 copies. The detecting sensitivity for the SYBR Green I RT-PCR detection assay was 10-fold higher than that of the conventional PCR. The detection limit was 1 microsclerotium per gram soil. The relationship between Ct values and the number of microsclerotia was $n = e^{7.3 - Ct/3.905}$. The results of artificial inoculation in greenhouse indicated that there was a significantly positive correlation between the microsclerotium number of *V. dahliae* and the incidence of disease, $y = 2.710n + 0.251$.

Key words: *Verticillium dahliae*; microsclerotia; wet-sieving; SYBR Green I Real-time PCR; Verticillium wilt of cotton

中图分类号: S432.4

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2013)05-0449-09

收稿日期: 2012-10-06; 修回日期: 2013-06-12

基金项目: 陕西省自然科学基金(2010JM3018); “后稷学者”人才专项(Z111021008); 高等学校学科创新引智计划(B07049)

通讯作者: 胡小平, 教授, 主要从事植物病理学研究; E-mail: xphu@nwsuaf.edu.cn

第一作者: 魏 锋, 男, 内蒙古赤峰人, 博士研究生, 主要从事植物病理学研究; E-mail: weifeng0108@163.com。

大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 寄主范围极为广泛,可危害 200 多种植物,包括高价值的一年生和多年生农作物、景观植物、果树、观赏树木和灌木,且其寄主范围在继续扩大^[1]。由其引起的棉花黄萎病危害尤为严重,是继棉铃虫之后的又一个世界性难题^[2,3]。自 20 世纪 90 年代以来,棉花黄萎病在我国曾于 1993、1995、1996、2002 和 2003 年 5 次大流行,每年造成损失约合人民币 12 亿元^[4]。

微菌核是大丽轮枝菌在土壤中的主要存活结构和黄萎病的初侵染源^[5],在没有寄主存在的土壤中可存活 14 年之久^[6],其数量与黄萎病的发生程度关系十分密切^[7~9]。国内外学者已从微菌核的形态^[10,11]、形成^[12]、萌发^[13]、分布^[14]、存活^[15]与侵染^[16]等方面开展了大量的研究。20 世纪 70 年代以来,国内外学者对土壤中大丽轮枝菌微菌核的定量检测做了一些研究^[17~20],但这些检测方法比较费时且灵敏度不高。实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-PCR) 是在 PCR 定性技术基础上发展起来的核酸定量技术,不仅实现了对核酸模板的定量,而且具有灵敏度高、特异性和可靠性更强、能实现多重反应、自动化程度高、具有实时性等特点,目前已广泛应用于分子生物学和医学等领域^[21]。近年来,已有采用实时定量 PCR 定量土壤中微菌核的研究报道^[22~25],但这些方法检测结果的误差较大^[25]。鉴于此,本研究采用土样水筛法结合实时荧光定量 PCR 技术,建立了快速、准确、稳定的定量检测土壤中大丽轮枝菌微菌核的实时定量 PCR 检测体系,确定了微菌核个数与 Ct 值及黄萎病发病程度间的关系,为揭示病原菌种群结构、开展病害监测预警及防治效果评估等研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*)、*Gibellulopsis nigrescens*、黑白轮枝菌 (*V. albo-atrum*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、棉花枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*)、瓜果腐霉 (*Pythium aphanidermatum*) 由西北农林科技大学植物保护学院土传病害实验室提供,供试土壤样品采

集自西北农林科技大学试验田。

1.2 供试引物

基于大丽轮枝菌 ITS 序列设计的特异性引物 P1 (F: 5'-CATCAGTCTCTCTGTTTATACCAACG-3')/P2 (R: 5'-CGATGCGAGCTGTA ACTACTACGCAA-3')^[26]用于大丽轮枝菌常规 PCR 和实时定量 PCR 检测。

1.3 棉花黄萎病菌微菌核基因组 DNA 的提取

1.3.1 微菌核培养及收集 大丽轮枝菌微菌核培养及收集参考 Bai 等^[12]报道的方法。

1.3.2 土壤大丽轮枝菌微菌核 DNA 提取方法优化 将微菌核按重量比均匀接种到灭菌土壤中,使每克土中含有 0.05 g 微菌核,称取 0.5 g 土样,分别采用反复冻融酶解法、液氮研磨法、微型电钻研磨法、组织研磨仪法 4 种方法裂解后,用 CTAB 法和 FastDNA[®] Spin Kit for Soil (MP Biomedical, USA) 进行 DNA 提取。同时,称取含有 0.05 g 微菌核土样 100 g 和 10 g 各 3 份,分别提取蔗糖悬浮离心^[25] 100 g 土样和水筛^[18] 10 g 土样的 DNA,比较每克土中微菌核总 DNA 浓度。

1.4 常规 PCR 体系和质粒标准品构建

常规 PCR 反应体系为 25.0 μL : 模板 DNA 1.0 μL , 引物 P1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , 引物 P2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 2.0 μL , *Taq* 酶 (5 U/ μL) 0.2 μL , 10 \times Buffer 2.5 μL , MgCl_2 (2.5 mmol/L) 1.6 μL , dd H_2O 15.7 μL 。扩增条件为: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 10 min; 94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s, 58 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 30 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测和回收 (AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒, AxyGen Biosciences), 克隆至 pGEM-T easy 载体, 转化大肠杆菌 JM109, 经氨苄青霉素和蓝白斑筛选, 质粒酶切鉴定, 获得阳性转化子并测序。采用 NanoDrop 2 000 (Thermo Scientific, USA) 测定质粒 DNA 浓度并稀释至 20 ng/ μL , 采用拷贝数浓度计算公式:

$$\text{copies}/\mu\text{L} = (6.02 \times 10^{23} \text{ copies}/\text{mol}) \times (\text{浓度 g}/\mu\text{L}) / (\text{MW g}/\text{mol})$$

其中: 平均分子量 (MW g/mol) = 碱基数

(bp) × (650 daltons/bp)

计算得出质粒 DNA 浓度为 5.54×10^9 copies/ μL , 经 10 倍系列稀释后, 制成 $5.54 \times 10^1 \sim 5.54 \times 10^9$ copies/ μL 9 个浓度梯度的质粒标准品, -20°C 保存待用。

1.5 荧光定量 PCR 反应条件优化及标准曲线建立

按照 Maxima[®] SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 说明书推荐的 25 μL 体系, 退火温度以 58.0°C 为基础, 设定 51.0 、 51.9 、 53.3 、 55.2 、 58.1 、 60.1 、 61.4 和 62.0°C 8 个温度梯度进行退火温度优化。实时荧光定量 PCR 反应体系为: SYBR Green qPCR Master Mix 12.5 μL , 模板 DNA 1.0 μL , 引物 P1 (10 $\mu\text{mol/L}$) 和 P2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1.0 μL , dd H_2O 9.5 μL 。扩增条件为: 95°C 10 min; 95°C 15 s, 58°C 30 s, 72°C 30 s, 45 个循环。将浓度为 $5.54 \times 10^2 \sim 5.54 \times 10^7$ copies/ μL 6 个梯度质粒标准品, 进行实时荧光定量 PCR 扩增, 用仪器自带软件进行数据分析, 以质粒 DNA 量 (copies) 的对数 (x) 和对应的 Ct 值 (y) 绘制标准曲线。

1.6 实时定量 PCR 体系评价

特异性评价: 将供试大丽轮枝菌基因组 DNA 稀释成浓度约 1 ng/ μL , 以 1.1 中参照菌株 DNA、麦田土壤 DNA 及无菌水作为对照, 进行实时荧光定量 PCR 扩增。

灵敏性评价: 以浓度为 $5.54 \times 10^1 \sim 5.54 \times 10^7$ copies/ μL 的质粒标准品为模板, 分别进行常规 PCR 检测和实时定量 PCR 扩增, 确定所能检出的模板最低浓度。

重复性评价: 以浓度为 $5.54 \times 10^2 \sim 5.54 \times 10^7$ copies/ μL 的质粒标准品, 每个浓度重复 3 次, 在相同的扩增条件下进行实时定量 PCR 扩增, 计算变异系数, 评价重复性。

1.7 土壤中微菌核数量、Ct 值及发病程度之间的关系

1.7.1 土壤中微菌核数量与 Ct 值之间的关系

称取 10 g 灭菌土样, 分别加入微菌核 0、5、10、20、

50、100、200 和 1 000 个, 充分混匀, 共 8 个处理, 每个处理 3 个重复, 总计 24 个土样, 分别提取土样 DNA, 进行实时荧光定量 PCR 检测, 分析每克土中微菌核个数与 Ct 值之间的关系。

1.7.2 土壤中微菌核数量与棉花黄萎病发病之间的关系 土壤经高温灭菌后, 按照麦粒砂培养物与土壤干重比的 0.1%、0.2%、0.5%、1.0% 和 2.0% 进行接种, 设不接菌对照, 接种后充分混匀, 装入直径 25 cm、高 15 cm 的营养钵中, 每个处理 10 钵, 重复 3 次。在温室中放置 1 个月, 期间适量浇水。2011 年 4 月 28 日每钵播种 10 粒冀棉 11 (棉花黄萎病感病品种) 种子。出苗后, 每钵保留 3 株棉苗, 采用常规温室管理, 不使用任何杀菌剂、杀虫剂。2011 年 7 月 1 日起, 参照国家标准 (棉花抗病虫性评价技术规范, 第五部分: 棉花黄萎病) 进行分级调查^[27], 每周 1 次, 记录病害严重程度级别, 以最后一次调查结果计算发病率 (%) 和病情指数。

在棉花播种前 1 天 (2011 年 4 月 27 日), 采集土壤样品, 每个钵随机采 3 个点, 每个处理的土样为 30 个样点的混合样, 于室温风干 3 周, 轻轻研磨后过 2 mm 孔径筛网, 提取 DNA 并进行实时荧光定量 PCR 检测。

1.8 数据分析

试验数据采用 SAS (statistical analysis system) Version 8.01 统计软件包、Microsoft Office Excel 2003 和 iQ5 自带软件 (Bio-Rad Laboratories Co., USA) 进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 引物特异性

以大丽轮枝菌以外的其它供试菌株的总 DNA 为模板进行常规 PCR 扩增, 以无菌水为模板做阴性对照, 检测引物 P1/P2 的特异性。结果显示, 只有大丽轮枝菌的 DNA 扩增出了 324 bp 的目的条带, 而其它病原真菌及麦田土壤 DNA 均未扩增出目的条带 (图 1)。

2.2 土壤中大丽轮枝菌微菌核基因组 DNA 提取方法的优化

0.5 g 土样经 4 种方法破碎, 采用 CTAB 法提

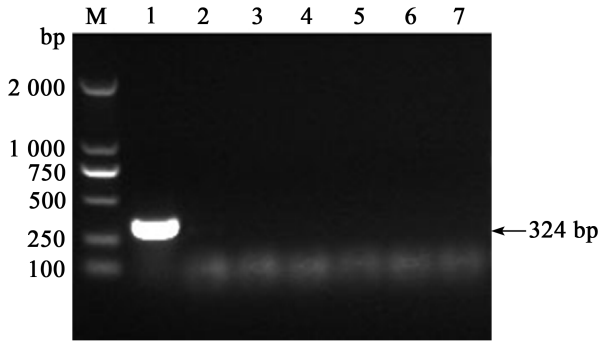


Fig. 1 Specificity of the primer pair P1/P2 in conventional PCR amplification using genomic DNA extracted from *Verticillium dahliae* and five other pathogens and wheat field soil

M: DNA ladder, TaKaRa DL 2 000; Lane 1-7: Gel electrophoretic analysis of conventional PCR amplification products obtained with the templates from *Verticillium dahliae* JY, *G. nigrescens*, *V. albo-atrum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Pythium aphanidermatum* and wheat field soil, respectively.

取总 DNA, 检测结果表明, 反复冻融酶解法获得的 DNA 浓度显著低于其它 3 种方法 ($p \leq 0.01$), 液氮研磨法获得的 DNA 浓度最高 ($47.18 \text{ ng}/\mu\text{L}$), 但 4 种方法获得 DNA 的 OD260/OD280 在 1.36 ~ 1.61 之间, OD260/OD230 在 0.87 ~ 1.11 之间, 纯度不高。样品液氮研磨后, 用 FastDNA[®] Spin Kit

for Soil 进行 DNA 提取, 获得 DNA 浓度和纯度 (OD260/OD280 = 1.83, OD260/OD230 = 1.91) 均较高 (表 1)。水筛法获得微菌核的 DNA 提取量 (每克土 2.78 μg) 显著高于蔗糖悬浮法获得微菌核的 DNA 提取量 (每克土 1.92 μg) ($p \leq 0.05$)。因此, 土壤中大丽轮枝菌微菌核 DNA 的最佳提取方法为: 10 g 土样, 经 38 μm 筛孔水筛, 收集筛网上的残留物 (约为 0.5 g), 液氮研磨后采用 FastDNA[®] Spin Kit for Soil 进行 DNA 提取。

2.3 标准曲线的建立

引物 P1/P2 的最佳退火温度为 58.1 $^{\circ}\text{C}$ 。在 Bio-Rad iQ5 荧光定量 PCR 仪上, 建立质粒浓度为 $5.54 \times 10^2 \sim 5.54 \times 10^7 \text{ copies}/\mu\text{L}$ 标准品曲线, 横轴 (x) 为起始模板拷贝数的对数, 纵轴 (y) 为 Ct 值 (图 2)。标准曲线方程为: $y = -3.563x + 37.837$, 相关系数为 0.999, 扩增效率为 90.8%, 线性范围可达 6 个数量级。

2.4 实时定量 PCR 体系特异性评价

以大丽轮枝菌、*Gibellulopsis nigrescens*、黑白轮枝菌、立枯丝核菌、棉花枯萎病菌、瓜果腐霉的总 DNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 检测。结果表明, 引物 P1/P2 对大丽轮枝菌 DNA 有明显的扩增信号, 而对其它样品 DNA 及阴性对照均无扩增信号 (图 3)。引物 P1/P2 扩增得到的产物溶解温度为 $86.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$, 引物二聚体溶解温度为 81.5°C (图 4)。

Table 1 The results of microsclerotia in soil DNA extraction by 5 methods

Method ^a	OD260/OD280	OD260/OD230	DNA concentration ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) ^b
1	1.36	0.98	10.54 B
2	1.39	1.11	47.18 A
3	1.41	0.87	43.49 A
4	1.61	0.96	39.57 A
5	1.83	1.91	32.55 A

^a 1-4: After repetitive freeze-thawing, liquid nitrogen grinding, electric hand drilling grinding, tissue lyser, extract DNA from soil using CTAB method respectively; 5: After liquid nitrogen grinding, extract DNA from soil using FastDNA[®] Spin Kit for Soil.

^b The means within same column followed by different letters are statistically significant difference at 0.01 level.

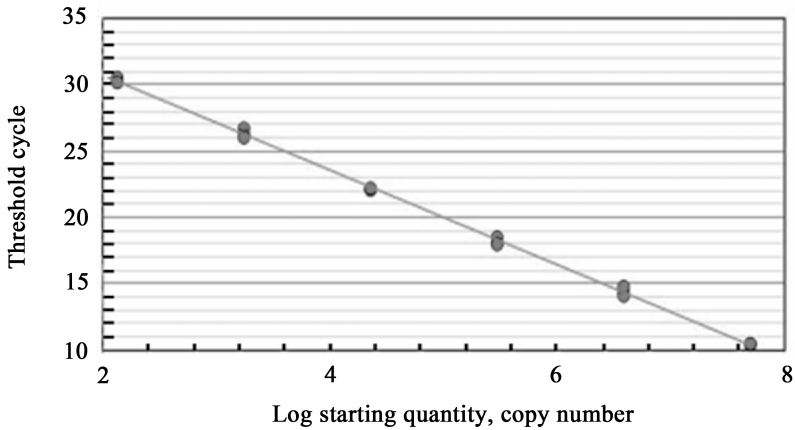


Fig. 2 Standard curve of *Verticillium dahliae* plasmid DNA dilution series with cycle threshold (Ct) value plotted against the log of DNA concentration

Correlation coefficient: 0.999; Slope: -3.563 ; $y = -3.563 + 37.837$; PCR efficiency: 90.8%.

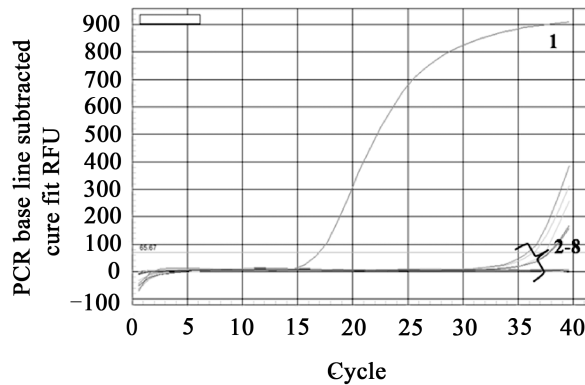


Fig. 3 The specific detection of the primer pair P1/P2 by real-time PCR

1-8: Real-time PCR amplification products obtained with the templates from *Verticillium dahliae* JY, *G. nigrescens*, *V. albo-atrum*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum*, *Pythium aphanidermatum* and wheat field soil, ddH₂O, respectively.

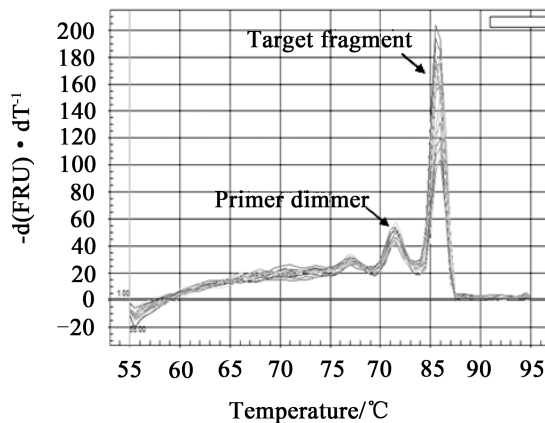


Fig. 4 Melting curve of real-time PCR products obtained with the primer pair P1/P2

2.5 实时定量 PCR 体系敏感性评价

对浓度为 $5.54 \times 10^1 \sim 5.54 \times 10^7$ copies/ μL 共 7 个梯度稀释的质粒标准品进行实时定量 PCR 检测,结果表明,该技术体系的检测下限为 5.54×10^2 copies/ μL (图 5),常规 PCR 检测中质粒标准品 5.54×10^3 copies/ μL 出现了微弱的阳性信号,其检测下限为 5.54×10^3 copies/ μL (图 6)。实时荧光定量 PCR 方法的灵敏度比常规 PCR 方法高 10 倍。

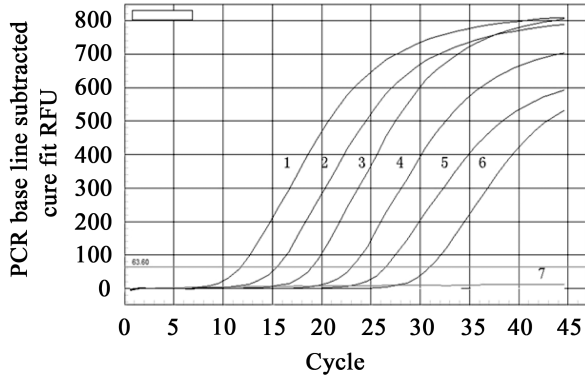


Fig. 5 Sensitivity of real-time PCR

Quantitative amplification curve obtained with the recombinant plasmid DNA as templates, 1-7: 5.54×10^7 copies, 5.54×10^6 copies, 5.54×10^5 copies, 5.54×10^4 copies, 5.54×10^3 copies, 5.54×10^2 copies and dd H_2O , respectively.

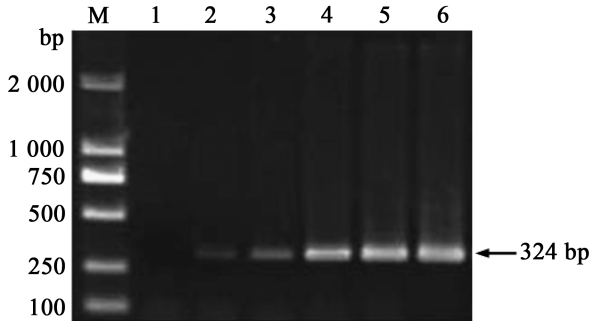


Fig. 6 Sensitivity of conventional PCR

M: DNA ladder, TaKaRa DL 2 000; Gel electrophoretic analysis of conventional PCR amplification products obtained with the recombinant plasmid DNA as templates, 1-6: 5.54×10^2 copies, 5.54×10^3 copies, 5.54×10^4 copies, 5.54×10^5 copies, 5.54×10^6 copies and 5.54×10^7 copies, respectively.

灭菌土壤中人工梯度添加已知数量微菌核定量检测结果表明,每克土中 0.5 个微菌核时没有荧光信号,每克土中 1 个微菌核时,Ct 值为 27.56。因此,该实时荧光定量 PCR 检测体系的检测下限为每克土中含 1 个微菌核。

2.6 实时定量 PCR 体系重复性评价

将浓度为 $5.54 \times 10^2 \sim 5.54 \times 10^7$ copies/ μL 的质粒标准品在相同条件下进行实时定量 PCR 扩增,每个浓度重复 3 次,Ct 值的平均值分别为 30.44、26.85、23.00、18.74、14.94 和 10.96,变异系数依次为 1.17%、1.03%、0.88%、1.02%、0.69% 和 1.06% (表 2)。结果表明,该检测体系具有良好的重复性。

Table 2 Repeatability of real-time PCR assay

Concentration (copies/ μL)	Mean Ct	S. D (n=3)	CVs (%)
5.54×10^7	10.96	0.08	1.06
5.54×10^6	14.94	0.10	0.69
5.54×10^5	18.74	0.17	1.02
5.54×10^4	23.00	0.15	0.88
5.54×10^3	26.85	0.25	1.03
5.54×10^2	30.44	0.38	1.17

2.7 土壤中初始微菌核数量与棉花黄萎病发生的关系

灭菌土壤中人工梯度添加已知数量微菌核定量检测结果表明,Ct 值(y)与每克土中微菌核个数的对数值(n)呈良好的线性关系, $y = -3.905n + 28.507$,相关系数(R^2)为 0.978。由此得出微菌核个数与 Ct 值间的关系为: $n = e^{7.3 - Ct/3.905}$ 。其中:n 为微菌核个数,取值范围为 1 ~ 100; $e \approx 2.718$ 。

室内人工模拟接种试验结果表明,接种量越大,Ct 值越低,每克土中的微菌核数量越多,棉花黄萎病发病越严重。当每克土壤中含棉花黄萎病菌微菌核 19.3 个时,病害发病率高达 50.1%,病情指数为 28.9(表 3)。对微菌核数量与棉花黄萎病发病率进行相关性分析,每克土中微菌核个数(n)与发病率(y)间的关系为: $y = 2.710n + 0.251$, $R^2 = 0.987$ 。

Table 3 Inoculum density of *Verticillium dahliae* microsclerotia, incidence of disease (%) and disease index in greenhouse surveyed during one season

Inoculum density (W/W %)	Ct value	Number of microsclerotia /g soil	Incidence of disease (%)	Disease index
0	--	--	0	0
0.1	31.05	0.5	1.5	0.8
0.2	25.39	2.2	7.1	3.5
0.5	22.75	4.4	10.1	6.7
1.0	18.21	14.0	42.0	24.4
2.0	16.96	19.3	50.1	28.9

The numbers of microsclerotia were calculated by the formula: $n = e^{7.3 - Ct/3.905}$, $e \approx 2.718$.

3 讨论

已报道检测土壤中大丽轮枝菌微菌核数量的方法有选择性培养基计数法、间接定量法、免疫测定法和分子生物学方法^[28]。选择性培养基计数法比较常用,该方法受不同土壤类型和不同土壤微生物区系的影响,致使检测结果误差较大^[29],且无法在形态上排除长孢轮枝菌(*V. longisporum*)和三体轮枝菌(*V. tricorpus*)等其它产生微菌核轮枝菌对计数的干扰^[30];间接定量法灵敏度较低,需要标准化的生长环境(比如温度,土壤湿度),并且各个阶段(移植、病害评估、根部培养)都需要专门的标准化技术^[28],不是一种真正意义上的定量检测方法,常用于抗病品种的筛选和生物防治效果的粗略评估^[31];酶联免疫吸附测定法(ELISA)并不常用于土壤中大丽轮枝菌的定量^[28];竞争 PCR 法^[19]通过内参 DNA 对土壤中大丽轮枝菌进行相对定量。实时定量 PCR 以其特异性强、灵敏度高、快速准确等优点,成为土壤中病原菌的绝对定量的新途径。

土壤样品含有较多的腐植酸、酚类化合物、鞣酸类重金属、不明沉淀物、菌体裂解成分等,从中获得完整的大片段 DNA 较为困难^[32]。提取高质量土壤样品真菌 DNA 的关键在于真菌细胞壁的裂解和土壤中妨碍 DNA 分离的腐殖质等酸类物质的去除。目前已报道的裂解真菌细胞壁的方法包括:物理方法(液氮研磨法、反复冻融法、超声波破碎法、组织研磨仪裂解法等)^[33]、化学方法(SDS、热氛、异硫氰酸胍等)和酶解法(裂解酶、溶菌酶、蛋白酶 K 等)。无论何种裂解方法都无法去除土壤中腐植酸等污染物,从而影响后续分子操作,因

此去除腐植酸及其他酶类抑制剂是土壤 DNA 纯化的关键。目前多采用加入 PVPP、脱脂奶或 CTAB 吸附腐植酸及其它酚类物质纯化 DNA^[33,34]。每种细胞壁裂解方法和纯化方法都各有优缺点,有的得到的 DNA 量比较大,有的比较省时^[34],但效果均不理想。本研究中微菌核细胞壁结构的特殊性为土壤中大丽轮枝菌微菌核 DNA 提取增加了难度。此前关于土壤微菌核 DNA 提取的报道大多采用组织研磨仪进行破碎结合土壤 DNA 提取试剂盒进行^[21~24]。作者通过比较反复冻融法、液氮研磨法、微型电钻研磨法、组织研磨仪裂解法 4 种常用的真菌细胞壁裂解方法以及 CTAB 法和 DNA 提取试剂盒的 DNA 提取量和纯度,确定的土壤微菌核 DNA 提取方法为液氮研磨后,使用 Fast DNA[®] Spin Kit for Soil 进行 DNA 提取和纯化,可以得到高质量的 DNA,直接用于分子定量检测,方便、快捷。

本研究通过构建重组质粒建立了土壤中大丽轮枝菌微菌核的实时定量 PCR 标准曲线, DNA 拷贝数的对数值与 Ct 值具有良好的相关性,相关性系数为 0.999。检测下限达到 5.54×10^2 copies/ μL ,比 Xiao 等^[22]建立实时荧光定量 PCR 检测体系的检测下限 3.8×10^3 copies/ μL 低 10 倍,低于竞争 PCR 的检测下限(每克土含有 5 个微菌核)^[19]和 Bilodeau 等^[24]建立实时定量 PCR 的检测下限(每克土含有 1~2 个微菌核),但高于 Debode 等^[25]用 100 mL 70% (w/w) 蔗糖溶液离心悬浮 100 g 土壤后进行实时定量 PCR 的检测下限(每克土含有 0.5 个微菌核)。首次建立了微菌核

数量与 Ct 值的关系。通常土壤 DNA 提取管只能进行小体积(0.25 ~ 0.5 g)土壤样品的提取,加之去除 PCR 抑制因子等多步纯化,会造成大丽轮枝菌微菌核密度较低的土壤(每克土中含 4 个以下微菌核)检测结果误差较大^[25]。对于田间土壤,有限的检测量代表性不强,易出现假阴性结果。作者研究发现土壤水筛后 DNA 提取量是蔗糖离心漂浮后 DNA 提取量的 1.45 倍,与 Harris 等^[17]的研究结果一致。

利用实时荧光定量 PCR 检测了 4 月份温室人工梯度接种土壤中微菌核数量,并调查了 9 月份棉花的发病情况,发现两者间存在良好的线性相关性。但由于大田土壤中病原菌群体分化为多种致病力类型^[35]及土壤温湿度等因素对微菌核数量的影响^[15],往往使接种体和病害之间关系更加复杂。因此,需要进一步研究和完善建立的土壤中微菌核数量与黄萎病发生程度的关系模型。同时,考虑到土壤总 DNA 中可能会包含部分死体大丽轮枝菌微菌核的 DNA,实时定量 PCR 方法检测结果可能会过高估计土壤大丽轮枝菌微菌核数量,如何准确估计土壤中活体大丽轮枝菌微菌核的数量,尚需进一步研究。

参考文献

- [1] Klosterman S J, Atallah Z K, Vallad G E, *et al.* Diversity, pathogenicity, and management of *Verticillium* species [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2009, 47: 39–62.
- [2] Liu X T, Song X X, Guo J C. Studies and advances on cotton *Verticillium* Wilt (in Chinese) [J]. *Cotton Science* (棉花学报), 1998, 10(1): 6–13.
- [3] Levin A G, Lavee S, Tsror L. Epidemiology of *Verticillium dahliae* on olive (*cv. Picual*) and its effect on yield under saline conditions [J]. *Plant Pathology*, 2003, 52 (2): 212–218.
- [4] Zhu H Q, Feng Z L, Yin Z X, *et al.* Pathogenicity differentiation and ISSR fringerprint analysis of cotton *Verticillium dahliae* in China (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2012, 42 (3): 225–235.
- [5] Devay J E, Forrester L L, Garber R H, *et al.* Characteristics and concentration of propagules of *Verticillium dahliae* in air-dried field soils in relation to prevalence of *Verticillium* Wilt in cotton [J]. *Phytopathology*, 1974, 64: 22–29.
- [6] Wilhelm S. Longevity of *Verticillium* wilt fungus in the laboratory and field [J]. *Phytopathology*, 1955, 45: 180–181.
- [7] Harris D C, Yang Y R. The relationship between the amount of *Verticillium dahliae* in soil and the incidence of strawberry wilt as a basis for disease risk prediction [J]. *Plant Pathology*, 1996, 45(1): 106–114.
- [8] López-Escudero F J, Blanco-López M A. Relationship between the inoculum density of *Verticillium dahliae* and the progress of *Verticillium* Wilt of olive [J]. *Plant Disease*, 2007, 91(11): 1372–1378.
- [9] Barbara D J, Ortega A, García-Jiménez J, *et al.* Inoculum density-disease development relationship in *Verticillium* Wilt of artichoke caused by *Verticillium dahliae* [J]. *Plant Disease*, 2007, 91: 1131–1136.
- [10] Krikun J, Bernier C C. Morphology of microsclerotia of *Verticillium dahliae* in roots of gramineous plants [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 1990, 12: 439–441.
- [11] López-Escudero F J, Roca J M, Valverde-Corredor A, *et al.* Correlation between virulence and morphological characteristics of microsclerotia of *Verticillium dahliae* isolates infecting olive [J]. *Journal of Phytopathology*, 2012, 160(7): 431–433.
- [12] Bai Y W, Hu D F, Hu X P, *et al.* Formation conditions for microsclerotia of *Verticillium dahliae* (in Chinese) [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2011, 30 (5): 695–701.
- [13] Klimes A, Amyotte S G, Grant S, *et al.* Microsclerotia development in *Verticillium dahliae*: regulation and differential expression of the hydrophobin gene *VDHI* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2008, 45(12): 1525–1532.
- [14] García-Cabello S, Pérez-Rodríguez M, Blanco-López M A, *et al.* Distribution of *Verticillium dahliae* through watering systems in widely irrigated olive growing areas in Andalucía (southern Spain) [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2012, 133(4): 877–885.
- [15] Yang J R, Shang H S, Gao L Q, 2004. The effect of soil habitat factors on survival of microsclerotia of *Verticillium dahliae* of cotton (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2004, 34 (2): 180–183.

- [16] Vallad G E, Subbarao K V. Colonization of resistant and susceptible lettuce cultivars by a greenfluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae* [J]. Phytopathology, 2008, 98: 871–885.
- [17] Harris D C, Yang Y R and Ridout M S. The detection and estimation of *Verticillium dahliae* in naturally infested soil [J]. Plant Pathology, 1993, 42: 238–250.
- [18] Yang J R, Shang H S. Screening the selective medium for isolating *Verticillium dahliae* of cotton from naturally infested soil (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2002, 32(3): 236–240.
- [19] Mahuku G S, Platt H W. Quantifying *Verticillium dahliae* in soils collected from potato fields using a competitive PCR assay [J]. American Journal of Potato Research, 2002, 79(2): 107–117.
- [20] Mansoori B. An improved ethanol medium for efficient recovery and estimation of *Verticillium dahliae* populations in soil [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2011, 33(1): 88–93.
- [21] Mikael K A, Jose M A, Martin B, et al. The real-time polymerase chain reaction [J]. Molecular Aspects of Medicine, 2006, 27: 95–125.
- [22] Xiao R, Yu Z Z, Elsharawy A A, et al. SYBR green I real time RT-PCR assay for quantitatively detecting the occurrence of *Verticillium dahliae* of cotton in naturally infested soil (in Chinese) [J]. Mycosystema (菌物学报), 2011, 30(4): 589–603.
- [23] Banno S, Saito H, Sakai H, et al. Quantitative nested real-time PCR detection of *Verticillium longisporum* and *V. dahliae* in the soil of cabbage fields [J]. Journal of General plant pathology, 2011, 77: 282–291.
- [24] Bilodeau G J, Koike S T, Uribe P, et al. Development of an assay for rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* in soil [J]. Phytopathology, 2012, 102(3): 331–343.
- [25] Debode J, Poucke K V, Franca S C, et al. Detection of multiple *Verticillium* species in soil using density flotation and Real-time polymerase chain reaction [J]. Plant Disease, 2011, 95(12): 1571–1580.
- [26] Zhu Y Y, Wang Y Y, Bruce R L. PCR detection of *Verticillium dahliae* from diseased plants (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 1999, 29(3): 250–255.
- [27] Ministry of Agriculture, Standardization Administration of the People's Republic of China, General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Technical specification for evaluating resistance of cotton to diseases and insect pests-Part 5: *Verticillium* wilt (in Chinese) [S]. Beijing: Ministry of Agriculture of the People's Republic of China (北京:中国农业部), 2009.
- [28] Goud J C, Termorshuizen A J. Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil [J]. European Journal of plant pathology, 2003, 109(6): 523–534.
- [29] Yang J R, Shang H S, Gao L Q. The effect of soil habitat factors on survival of microsclerotia of *Verticillium dahliae* of cotton (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2004, 34(2): 180–183.
- [30] Karapapa V K, Bainbridge B W, Heale J B. Morphological and molecular characterization of *Verticillium longisporum* comb. nov., pathogenic to oilseed rape [J]. Mycological Research, 1997, 101(11): 1281–1294.
- [31] Soesanto L. Ecology and biological control of *Verticillium dahliae* [D]. Wageningen; Wageningen University, 2000.
- [32] Tebbe C C, Vahjen W. Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation of recombinant DNA from bacteria and a yeast [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1993, 59(8): 2657–2665.
- [33] Miller D N, Bryant J E, Madsen E I, et al. Evaluation and optimization of DNA extraction and purification procedures for soil and sediment samples [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(11): 4715–4724.
- [34] Patra G, Sylvestre P, Ramisse V, et al. Isolation of a specific chromosomal DNA sequence of *Bacillus anthracis* and its possible use in diagnosis [J]. Fems Immunology and Medical Microbiology, 1996, 15: 223–231.
- [35] Jia T, Pei G L, Yang J R, et al. Pathogenicity differentiation of *Verticillium dahliae* of cotton in naturally infested soil (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物保护学报), 2007, 34(5): 519–523.