

番茄细菌性斑点病菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立及应用

柴阿丽¹, 帕提古丽², 郭威涛¹, 石延霞¹, 谢学文¹, 席先梅³, 李宝聚^{1,*}

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ²新疆农业科学院园艺作物研究所, 乌鲁木齐 830091; ³内蒙古农牧业科学院植物保护研究所, 呼和浩特 010031)

摘要: 以番茄细菌性斑点病病原菌丁香假单胞菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, Pst) 的致病相关基因 *HrpZ* 为靶序列, 设计了特异性引物 Pst3F/Pst3R, 能从 Pst 基因组 DNA 中特异性扩增出大小为 161 bp 的目的片段。建立的 Pst 实时荧光定量 PCR 检测技术体系的检测灵敏度比普通 PCR 高 1 000 倍。利用实时荧光定量 PCR 检测体系, 检测模拟带菌种子中 Pst 的带菌量, 检测下限为 4.21 cfu · g⁻¹; 检测人工接种叶片组织中 Pst 的带菌量, 检测到 1 级发病叶片带菌量为 4.15 × 10² cfu · g⁻¹。对田间采集的 63 个番茄细菌性斑点病明显症状和疑似症状样本, 分别进行了实时荧光定量 PCR、普通 PCR 和病原菌分离检测, 检测到 54 个样本中含有 Pst, 3 种方法检测结果一致。结果表明, 建立的 Pst 实时荧光定量 PCR 检测体系具有特异性强、灵敏度高的特点, 可以快速准确地定量检测番茄种子和发病组织中 Pst 的含量, 为番茄细菌性斑点病的早期预防和流行监测提供了有效的技术手段。

关键词: 番茄; 丁香假单胞菌番茄致病变种; 实时荧光定量 PCR; 种子检测; 组织检测

中图分类号: S 641.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2019) 01-0182-11

Development and Application of Quantitative PCR for Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*

CHAI Ali¹, Patiguli², GUO Weitao¹, SHI Yanxia¹, XIE Xuewen¹, XI Xianmei³, and LI Baoju^{1,*}

(¹Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ²Institute of Horticulture, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China; ³Institute of Plant Protection, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Hohhot 010031, China)

Abstract: In the present work, a specific primer pair Pst3F/Pst3R was designed based on the pathogenicity-related gene *HrpZ* of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst), and a target fragment of 161 bp was specifically amplified from the genomic DNA of Pst. A real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) assay was developed for quantifying Pst in contaminated tomato seeds and infected tissues. The detection sensitivity of qPCR established in this study was 1 000 times higher than that of conventional PCR. The detection threshold was 4.21 cfu per gram of artificially contaminated tomato seeds. The amount of Pst was detected to be 4.15 × 10² cfu per gram of inoculated leaves with disease-grade level 1. For

收稿日期: 2018-06-27; **修回日期:** 2018-12-21

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2017YFD0200603); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目; 内蒙古自治区科学技术厅项目 (201702088)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: libaoju@caas.cn)

naturally infected tomato tissue samples, PCR, qPCR and classical culture methods were used for determination of Pst. Quantifiable levels of Pst were detected in 54 out of the 63 samples, and the results of the three methods were consistent. These studies showed that qPCR assay is a highly rapid and reliable method to quantify Pst in tomato seeds and infected tissues of leaves, stems and fruits. Application of the assay may potentially improve pathogen identification and disease management.

Keywords: tomato; *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*; quantitative PCR; seed detection; tissue detection

番茄细菌性斑点病 (Bacterial speck of tomato) 是一种严重影响番茄品质和产量的世界性病害, 其病原是丁香假单胞菌番茄致病变种 (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, Pst)。该病害于 1933 年首次在美国报道 (Bryan, 1933), 之后在摩洛哥、南非、印度、澳大利亚、新西兰等 20 多个国家都有发生, 并造成严重损失 (Yunis et al., 1980)。1998—2016 年, 该病害在中国吉林、辽宁、黑龙江、河北、山西、甘肃、宁夏、内蒙古、新疆、广西、北京和天津等地均有发生, 严重时发病率达 75% 以上 (王莹莹 等, 2015)。

番茄细菌性斑点病具有侵染途径多样、传播速度快、防治困难等特点, 苗期和成株期均可染病。Pst 可危害番茄叶片、茎秆、叶柄和果实, 发病初期产生黑色水渍状小圆点斑, 病斑周围有或无黄色晕圈, 后逐渐扩展成油渍状黑色斑块, 严重时整株枯死。Pst 除侵染番茄外, 还能侵染茄子、辣椒、龙葵、白花曼陀罗和毛曼陀罗等作物 (赵廷昌 等, 2001)。因其危害的严重性, Pst 病菌在 2007 年已被列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》

传统方法检测 Pst 多依赖于形态特征、培养性状、生理生化反应和致病性测定 (赵廷昌 等, 2001), 耗时费力, 不能满足快速鉴定的需求 (Dieter, 2002; 陈长军 等, 2011; 陈洪明 等, 2015)。以分子生物学为基础的 PCR、IMS-PCR 等技术, 已应用于番茄叶片或种子中 Pst 的定性检测 (张卉, 2003; Wreikat et al., 2006; 文朝慧 等, 2013), 但未能实现定量检测。

实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR) 技术可以对靶标核酸进行精确定量检测 (Schaad et al., 1999; Hietala et al., 2003), 具有快速、灵敏的特点, 已经应用于多种病原菌的定量检测, 如香蕉细菌性软腐病菌、平菇细菌性褐斑病菌、桑树桑疫病菌、十字花科细菌性黑斑病菌、辣椒疫霉病菌 (豆亚亚 等, 2013; 徐岩岩 等, 2013; 包奇 等, 2016; 王道泽 等, 2016; 程颖超 等, 2018), 为植物病原菌的快速、定量检测和病害防治提供技术支撑。

HrpZ 是植物病原细菌所独有的基因, 其编码产物与致病性有关 (Charkowski et al., 1997)。该基因是 Pst 快速检测的理想标记 (Zaccardelli et al., 2005), 并得到越来越多的应用 (文朝慧 等, 2013)。

本研究中以 Pst 的 *HrpZ* 为靶基因序列, 设计特异性引物, 建立了 Pst 的实时荧光定量 PCR 检测体系, 并应用于带菌种子和发病组织的快速定量检测, 以期对番茄细菌性斑点病的早期诊断和及时防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 2016 年 7 月—2018 年 2 月在中国农业科学院蔬菜花卉研究所完成。

供试菌株: 引物特异性检测所用菌株共 25 株, 包括 8 株 Pst 靶标菌株和 17 株非靶标菌株(表 1)。其中 1 株 Pst 模式菌株 DC3000 和 7 株对照菌株购自美国模式培养物保藏中心 (ATCC), 1 株对照菌株购自中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)。以上菌株均保存于中国农业科学院蔬菜花卉研究所。

供试番茄品种: ‘中杂 105’。

NA 培养基: 蛋白胨 10.0 g, 牛肉粉 3.0 g, NaCl 5.0 g, 琼脂 15 ~ 25 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

NB 培养基: 蛋白胨 10.0 g, 牛肉粉 3.0 g, NaCl 5.0 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 7.0。

LB 培养基: 胰蛋白胨 10.0 g, 酵母膏 5.0 g, NaCl 10.0 g, 蒸馏水 1000 mL, pH 7.4。

表 1 引物特异性检测供试菌株
Table 1 Strains used for primer specific test

| 病原菌 Species | 寄主 Host | 菌株编号 Isolate code | 采集地 Geographic origin | PCR |
|--|----------------------|------------------------------------|--------------------------|-----|
| 丁香假单胞菌番茄致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> , Pst | 番茄 Tomato | FQ13080301 | 中国山东 Shandong, China | + |
| | | FQ13080217 | 中国河北 Heibei, China | + |
| | | FQ14080202 | 中国甘肃 Gansu, China | + |
| | | FQ140225250 | 中国浙江 Zhejiang, China | + |
| | | FQ16071903 | 中国新疆 Xinjiang, China | + |
| | | DC3000 (ATCC BAA-871) ^T | 英国 United Kingdom | + |
| | | JGFQ15080408 | 中国新疆 Xinjiang, China | + |
| | | JGFQ15080441 | 中国新疆 Xinjiang, China | + |
| 丁香假单胞菌流泪致病变种 <i>P. syringae</i> pv. <i>lachrymans</i> , Psl | 黄瓜 Cucumber | ATCC 7386 | 美国 United States | - |
| | | ATCC 11965 | 不详 Unknown | - |
| | | HG12020802 | 中国河北 Heibei, China | - |
| 菊苣假单胞 <i>P. cichorii</i> , Pc | 不详 Unknown | CGMCC 1.4934 | 中国 China | - |
| | | 丝瓜 Towel Gourd | 中国山东 Shandong, China | - |
| 燕麦噬酸菌 <i>Acidovorax citrulli</i> , Ac | 西瓜 Citrullus lanatus | ATCC 29625 | 美国 United States | - |
| | | 甜瓜 Cucumis melo | 中国 China | - |
| 密执安棒状杆菌密执安亚种 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> , Cmm | 番茄 Tomato | ATCC 10202 | 不详 Unknown | - |
| | | FQ16110321 | 中国浙江 Zhejiang, China | - |
| 胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i> , Pcc | 番茄 Tomato | FQ10110801 | 中国山东 Shandong, China | - |
| | 马铃薯 Potato | ATCC 15713 | 丹麦 Denmark | - |
| 茄科雷尔氏菌 <i>Ralstonia solanacearum</i> , Rs | 番茄 Tomato | FQ1112080401 | 中国浙江 Zhejiang, China | - |
| | | FQ15090325 | 中国广西 Guangxi, China | - |
| 野油菜黄单胞菌油菜致病变种 <i>Xanthomonas campestris</i> pv. <i>campestris</i> , Xcc | 甘蓝 Cabbage | ATCC 33913 | 英国 United Kingdom | - |
| | | GL10080704 | 中国湖南 Hunan, China | - |
| 野油菜黄单胞菌辣椒斑点致病变种 <i>X. campestris</i> pv. <i>vesicatoria</i> , Xcv | 番茄 Tomato | ATCC 35937 | 新西兰 New Zealand | - |
| | 辣椒 Pepper | LJ1201090302 | 中国 China | - |

注: “T”, 模式菌株; ATCC, 美国模式培养物保藏中心; CGMCC, 中国普通微生物菌种保藏管理中心; “+”表示 PCR 反应阳性, “-”表示 PCR 反应阴性。

Note: “T”, type strain; ATCC, obtained from American type culture collection; CGMCC, obtained from China general microbiological culture collection center. PCR results are scored as “+” for positive reaction, and “-” for negative reaction.

1.2 方法

1.2.1 菌株培养与 DNA 提取

将供试菌株接种于 NA 平板上, 置于细菌培养箱中 28 °C 活化培养 24 h, 挑取单菌落转移到 NB

液体培养基中, 28 °C 条件下 260 r · min⁻¹ 培养 24 h。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (天根, 北京) 进行菌悬液 DNA 的提取。置于 -20 °C 冰箱备用。

1.2.2 引物设计

从 NCBI 网站下载 Pst 与丁香假单胞菌属的其他不同致病变种的 *HrpZ* 基因序列, 应用软件 MEGA 5.0 进行序列同源性比对, 分析序列的差异, 设计出 Pst 的特异性引物 Pst3F: 5'-GCTGCGGATGGCAAGTC-3', Pst3R: 5'-CCGACACCCGAACCAGAAC-3' (图 1), 扩增产物片段大小为 161 bp。引物由北京博迈德基因公司合成。

| | | | |
|------------------------------------|------------|--|---|
| | | | Pst3F GCTGCGGATGGCAAGTC |
| 丁香假单胞菌番茄致病变种 <i>Ps. tomato</i> | AY999001.1 | C TCG GCA AA ATGC TCGCC AA GGCC ATG | <u>GCTGCGGATGGCAAGTC</u> GGC TAAC AGC ATCGAT |
| 丁香假单胞菌适合致病变种 <i>Ps. aptata</i> | AF092879.1 | TTGGGC AA ACTGCTGGCC AAGTCGATG | GCTGCGGATGGCAAGTC GGC TAAC AGC ATCGAT |
| 丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Ps. tabaci</i> | FJ605454.1 | TTGGGC AAGT TGC TCGCC AAA GCGATGGCC | GCCAGTGCAA GGC TGGC GGCGGCCTCGAG |
| 丁香假单胞菌大豆致病变种 <i>Ps. glyccinea</i> | HM358043.1 | TTGGGC AAGT TGC TCGCC AAA GCGATGGCC | GCCAGTGCAA GGC TGGC GGCGGCCTCGAG |
| 丁香假单胞菌流泪致病变种 <i>Ps. lachrymans</i> | GU947714.1 | TTGG GCAA GC TGC TGGC GA AGTCGATGGC | GGCC GATGCG ATGGC TG GCGGC GGC ATTGA G |
| 丁香假单胞菌丁香致病变种 <i>Ps. syringae</i> | AB102727.1 | TTGGGC AA ACTGCTGGCC AAGTCGATGGCC | GCGGATGGCAA GGC AGGC GGC GGTATCGAG |
| | | | Pst3R GTTCTGGTTCG |
| 丁香假单胞菌番茄致病变种 <i>Ps. tomato</i> | AY999001.1 | TCTGCCG GCAATC GCGCG GGGTGGC | GGTGCGGTTGGC ATTG GCG GGCGCG <u>GTTCTGGTTCG</u> |
| 丁香假单胞菌适合致病变种 <i>Ps. aptata</i> | AF092879.1 | TCTGCCG GCAAC----- | ----- |
| 丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Ps. tabaci</i> | FJ605454.1 | TCTGCCG GCAAC----- | ----- |
| 丁香假单胞菌大豆致病变种 <i>Ps. glyccinea</i> | HM358043.1 | TCTGCCG GCAAC----- | ----- |
| 丁香假单胞菌流泪致病变种 <i>Ps. lachrymans</i> | GU947714.1 | GCTGCCG GCA----- | ----- |
| 丁香假单胞菌丁香致病变种 <i>Ps. syringae</i> | AB102727.1 | TCTGCCG GCAAC----- | ----- |
| | | | GGTGTCGG |
| 丁香假单胞菌番茄致病变种 <i>Ps. tomato</i> | AY999001.1 | <u>GGTGTCGG</u> TGGCGTCTG AGC AGCGACGC | GGGTGCC GG GCA ATCC GATC TG ATGA GCCAG |
| 丁香假单胞菌适合致病变种 <i>Ps. aptata</i> | AF092879.1 | -----GCCTCGG----- | -----G TACCGGACA GCAGGACCTGAT GACTCAG |
| 丁香假单胞菌烟草致病变种 <i>Ps. tabaci</i> | FJ605454.1 | -----GCCTCGG----- | -----ATACCGGACA ACCCGACTTGATGACACAG |
| 丁香假单胞菌大豆致病变种 <i>Ps. glyccinea</i> | HM358043.1 | -----GCCTCGG----- | -----ATACCGGACAACACGACTTGATGACACAG |
| 丁香假单胞菌流泪致病变种 <i>Ps. lachrymans</i> | GU947714.1 | -----GTC TGGGC----- | -----GGTG TCGGACAGCCTGACCTG ATGACGCAA |
| 丁香假单胞菌丁香致病变种 <i>Ps. syringae</i> | AB102727.1 | -----GCCTCGG----- | -----G TACCGGACAGCAGG ACCTGATGACTCAG |

图 1 丁香假单胞菌番茄致病变种 *HrpZ* 基因区域特异性引物设计位点

Pst3F 为正向引物, Pst3R 为反向引物。

Fig. 1 Sequence site of specific primer to *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* from the *HrpZ* gene

Pst3F, forward primer sequence; Pst3R, reverse primer sequence.

1.2.3 引物特异性检测

利用合成的引物 Pst3F/Pst3R 扩增 25 个供试菌株 (表 1) 的基因组 DNA。PCR 反应体系 (20 μL) 为: 引物 Pst3F/Pst3R (0.1 μmol · μL⁻¹) 各 0.2 μL, 2 × Taq PCR Master Mix (博迈德, 北京) 10 μL, 模板 DNA (10 ng · μL⁻¹) 1.0 μL, dd H₂O 8.6 μL。PCR 扩增条件为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 °C 补充延伸 5 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

1.2.4 标准质粒的制备

采用离心柱型琼脂糖凝胶回收试剂盒 (全式金, 北京) 对 PCR 扩增产物进行回收纯化。

将目标 DNA 与 pEASY®-T1 克隆载体 (全式金, 北京) 连接, 转化大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞 (全式金, 北京)。取 200 μL 菌液涂布在含有 100 g · mL⁻¹ 氨苄青霉素的 LB 固体平板培养基上, 置于 37 °C 恒温培养室倒置培养 24 h。随机挑取一定数量的白色单菌落, 在含 100 g · mL⁻¹ 的 LB 液

体培养基中振荡培养。PCR 鉴定为阳性克隆后, 随机选取 10~20 个阳性克隆, 送北京博迈德生物公司测序。

1.2.5 引物灵敏性检测

使用 Thermo Scientific NanoDrop 2000c 紫外分光光度计, 测定 Pst 质粒 DNA 的浓度, 将初始浓度 $1.67 \times 10^4 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 以 10 倍梯度稀释 9 个浓度后, 分别进行普通 PCR 和实时荧光定量 PCR 扩增, 检测引物灵敏性。

1.2.6 实时荧光定量 PCR 反应体系的建立

将克隆获得的携带 Pst 目的基因的重组质粒做 10 倍梯度稀释, 建立实时荧光定量 PCR 标准曲线。荧光定量 PCR SYBR Green I 反应体系 (20 μL) 为: 2 \times Super Real PreMix Plus (天根, 北京) 10 μL , 引物 Pst3F/Pst3R ($0.1 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 各 0.2 μL , 模板 DNA 1.0 μL , 50 \times ROX Reference Dye 0.4 μL (天根, 北京), ddH₂O 8.2 μL 。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 32 s, 运行 40 个循环。60~90 $^{\circ}\text{C}$, 每升高 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 检测 1 次荧光信号。以质粒 DNA 浓度的对数值为横坐标, 循环数 Ct 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 并计算回归方程。

样本拷贝数 = $[\text{DNA 浓度} (\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}) \times \text{NA}] / [(\text{n} \times \text{mw}) \times 1 \times 10^9]$ 。其中 n 表示每个基因组包含的碱基数 ($6.40 \times 10^6 \text{ bp}$), mw 表示单个碱基的平均分子量 ($660 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$), NA 为阿伏伽德罗常数 $6.023 \times 10^{23} \cdot \text{mol}^{-1}$ (Paul, 2010; Cottyn et al., 2011)。

1.2.7 模拟带菌种子 qPCR 检测

挑取单菌落转移到 NB 液体培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 下 $260 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 震荡培养 24 h, 测定 OD₆₀₀ 值约为 1.0 时用无菌水配制成浓度为 $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液, 备用。

取 25 g 无菌健康的番茄种子, 放入 100 mL 已灭菌的三角瓶中, 加入 50 mL 浓度分别为 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、 1×10^4 、 1×10^3 、 1×10^2 、 1×10^1 、 $1 \times 10^0 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Pst 菌悬液, 4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下浸泡 24 h, 置于室温条件下自然风干, 以此模拟带菌种子。每个处理重复 3 次。

每个处理随机抽取 0.2 g 种子, 冷冻干燥后用 TissuePrep 快速组织细胞破碎仪 (格林, 北京) 进行破碎处理, 细菌基因组试剂盒 (天根, 北京) 提取总 DNA, 利用 Pst 特异性引物 Pst3F/Pst3R 进行荧光定量 PCR 检测。

1.2.8 发病植株叶片 qPCR 检测

待番茄幼苗长出 4~5 片真叶时, 将浓度为 $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 Pst 菌悬液通过微量喷雾器均匀喷雾于叶片上, 对照采用无菌水喷雾, 置于相对湿度为 95% 的保湿柜中培养 48 h, 之后置于温室中常规管理。接种后 7~10 d, 待植株发病后, 采集不同病级发病叶片 (表 3, 图 6), 每个病级取 3 个叶片样本, 每个叶片取 0.3 g, 用建立的实时荧光定量 PCR 体系进行 Pst 定量检测。

1.2.9 Pst 荧光定量 PCR 检测体系适用性测试

为了确定建立的 qPCR 检测体系的适用性, 对 2016—2017 年从山东、河北、新疆、内蒙等番茄主产区采集的 63 份番茄细菌性斑点病叶片、茎秆和果实组织样本进行 qPCR、普通 PCR 和细菌分离培养 3 种方法进行检测。其中, 具有明显症状样本 28 份, 疑似症状样本 35 份。

2 结果与分析

2.1 引物特异性

以 ddH₂O 为阴性对照, 利用引物 Pst3F/Pst3R 对 8 株 Pst 靶标菌株和 17 株非靶标菌株基因组 DNA

进行 PCR 扩增。结果从 8 株 Pst 靶标菌株中扩增出单一明亮的 161 bp 特异性片段, 其他菌株及阴性对照均未扩增出条带 (图 2), 说明引物 Pst3F/Pst3R 特异性良好, 可以应用于 Pst 的特异性检测。

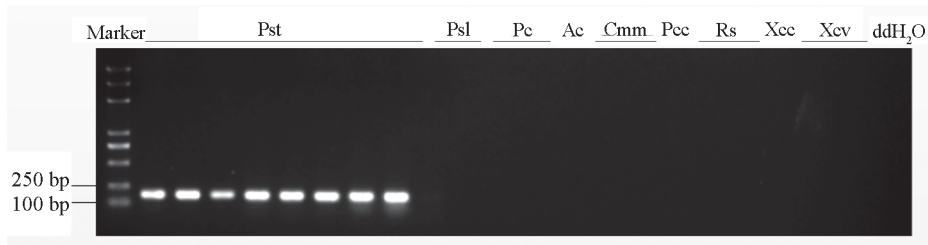


图 2 引物 Pst3F/Pst3R 特异性检测
 Fig. 2 Specific PCR amplification using the Pst3F/Pst3R primer pair

2.2 引物灵敏性

将质粒 DNA 稀释为 $1.67 \times 10^4 \sim 1.67 \times 10^{-4} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的浓度梯度, 分别进行普通 PCR 和 qPCR 扩增。结果表明, 引物 Pst3F/Pst3 利用普通 PCR 体系对浓度为 $1.67 \times 10^4 \sim 1.67 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 DNA 有扩增, 浓度低于 $1.67 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时无明显的扩增条带 (图 3); 而利用 qPCR 体系对浓度为 $1.67 \times 10^3 \sim 1.67 \times 10^{-3} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的 DNA 均有扩增, 检测下限为 $1.67 \times 10^{-3} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (图 4), 即 qPCR 检测灵敏度比普通 PCR 灵敏度高 1 000 倍。

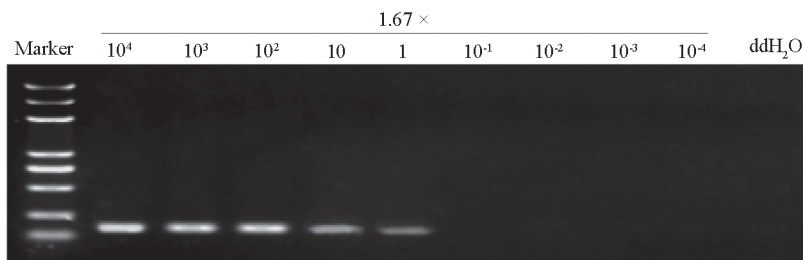


图 3 普通 PCR 引物灵敏度检测
 Fig. 3 Sensibility of general PCR assay

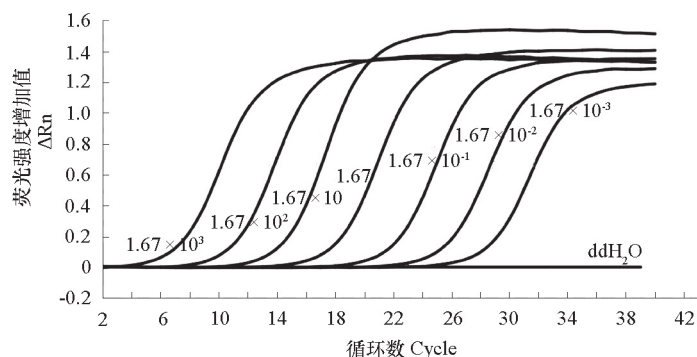


图 4 荧光定量 PCR 引物灵敏度检测扩增曲线
 质粒 DNA $1.67 \times 10^3 \sim 1.67 \times 10^{-3} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。
 Fig. 4 Sensitivity amplification curve of quantitative PCR
 Plasmid DNA $1.67 \times 10^3 - 1.67 \times 10^{-3} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$.

2.3 番茄细菌性斑点病菌 qPCR 检测体系

利用引物 Pst3F/Pst3R 对 Pst 菌 *HrpZ* 基因进行扩增, 得到 161 bp 产物, 割胶回收后连接至 pEASY[®]-T1 克隆载体上, 转化至大肠杆菌 Trans1-T1 感受态细胞中培养 24 h, 获得蓝白斑点的克隆, 其中白色菌落为阳性重组菌落。用 PCR 方法对阳性克隆检测, 白色重组菌落经 LB 液体培养基培养后, 提取阳性质粒 DNA 进行测序, 将测得序列利用 BLAST 软件进行序列比对, 结果显示与 Pst 序列 100%同源, 目标片段转化成功。

将 Pst 质粒 DNA 进行 10 倍梯度稀释, 以不同稀释倍数的质粒 DNA 为模板构建实时荧光定量 PCR 标准曲线。以质粒 DNA 浓度的对数值为横坐标, 循环数 Ct 值为纵坐标, 绘制标准曲线, 并计算回归方程。结果表明, 扩增反应循环数 Ct 值与质粒 DNA 拷贝数的对数值之间有良好的线性关系: $y = -3.2858x + 30.285$, 相关系数 $R^2 = 0.9938$, 扩增效率为 101% (图 5)。

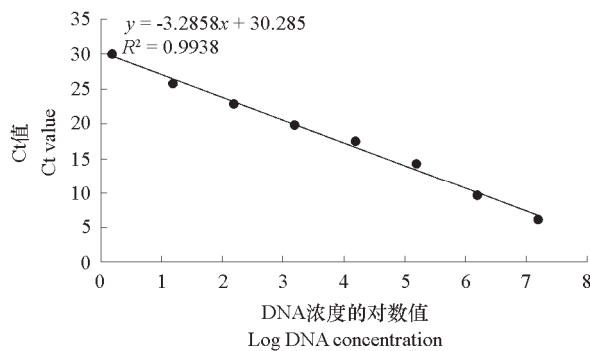


图 5 SYBR Green I 定量 PCR 标准曲线

质粒标准品 10 倍梯度稀释 ($1.67 \times 10^4 \sim 1.67 \times 10^{-3} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)。

Fig. 5 SYBR Green I quantitative PCR standard curve

10-fold serial dilution of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* plasmid DNA ($1.67 \times 10^4 - 1.67 \times 10^{-3} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$).

2.4 模拟带菌种子的 qPCR 检测

利用 qPCR 技术, 对 10 倍梯度稀释的 Pst 菌悬液接种的带菌种子和健康种子进行 *HrpZ* 基因定量检测。结果表明, 随着种子接菌浓度的降低, 检测到的种子带菌量呈下降趋势 (表 2)。

表 2 模拟带菌种子带菌量 qPCR 检测

Table 2 qPCR detection of Pst in artificially contaminated tomato seeds

| 接菌浓度/ (cfu · mL ⁻¹) Inoculating concentration of Pst | Ct 值 Ct value | 种子带菌量/ (cfu · g ⁻¹) Quantity of Pst in tomato seeds |
|---|------------------|--|
| 1×10^8 | 16.56 | 1.07×10^6 |
| 1×10^7 | 20.38 | 7.37×10^4 |
| 1×10^6 | 23.77 | 6.85×10^3 |
| 1×10^5 | 28.04 | 3.44×10^2 |
| 1×10^4 | 31.91 | 2.28×10^1 |
| 1×10^3 | 32.02 | 2.11×10^1 |
| 1×10^2 | 33.29 | 8.68×10^0 |
| 1×10^1 | 34.32 | 4.21×10^0 |
| 1×10^0 | > 35 | — |
| 0 | > 35 | — |

菌悬液浓度为 $1 \times 10^8 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的处理, qPCR 检测 Ct 值为 16.56, 对应种子带菌量为 $1.07 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。菌悬液浓度为 $1 \times 10^1 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的处理, qPCR 检测 Ct 值为 34.32, 对应种子带菌量为 $4.21 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。菌悬液浓度为 $1 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的处理和对照未加菌处理, qPCR 检测 Ct 值大于 35, 说明未检测到 Pst。因此, 该技术可以检测的种子带菌量下限为 $4.21 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。证明引物 Pst3F/Pst3 特异性强, 灵敏度高, 可以应用于种子中 Pst 的定量检测。

2.5 不同病级发病叶片 qPCR 检测

番茄幼苗接种 Pst 发病后, 采集不同病级的番茄叶片 (图 6)。

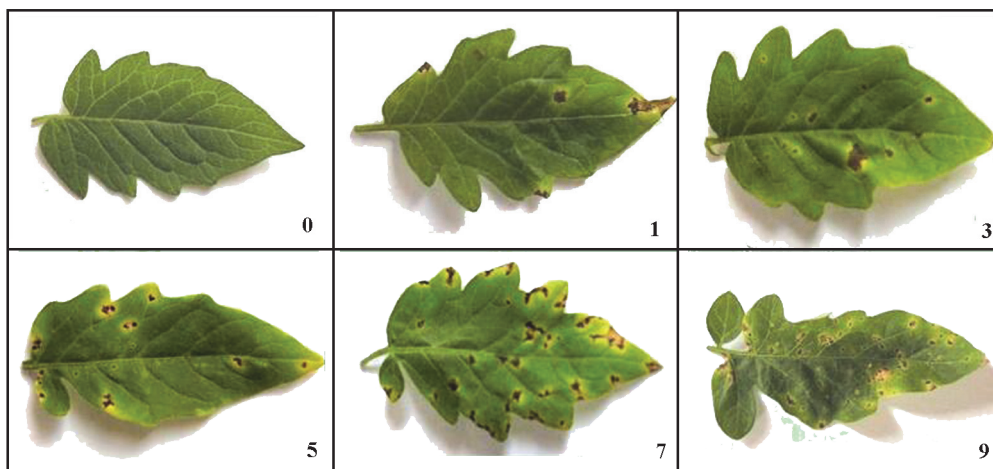


图 6 番茄细菌性斑点病发病 0~9 级叶片症状

Fig. 6 The leaf symptoms of tomato speck spot in 0 - 9 degrees

采用植物基因组提取试剂盒 (天根, 北京) 提取番茄发病叶片和对照健康叶片总 DNA, 以 Pst 纯培养 DNA 作为阳性对照进行荧光定量 PCR 扩增。结果表明, 病情级别为 9 级、7 级、5 级、3 级和 1 级的, qPCR 检测带菌量分别为 5.49×10^6 、 4.75×10^5 、 9.73×10^3 、 4.60×10^3 和 $4.15 \times 10^2 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ (表 3)。对照健康叶片中未检测到拷贝数。结果表明, 该技术可以定量检测病情级别为 1 级及以上的发病叶片。

表 3 不同病级叶片带菌量 qPCR 检测

Table 3 qPCR detection of Pst in leaves of different disease-grade levels

| 病级 Disease level | 病斑占叶片面积/% Percentage of diseased leaf area | Ct 值 Ct value | 叶片带菌量/ ($\text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$) Quantity of Pst in tomato leaf |
|---------------------|---|------------------|---|
| 9 | > 75 | 14.23 | 5.49×10^6 |
| 7 | 51 ~ 75 | 17.72 | 4.75×10^5 |
| 5 | 26 ~ 50 | 23.27 | 9.73×10^3 |
| 3 | 6 ~ 25 | 24.34 | 4.60×10^3 |
| 1 | 1 ~ 5 | 27.77 | 4.15×10^2 |
| 0 | 0 | — | — |

注: “—” 表示荧光定量 PCR 没有 Ct 值扩增, 检测结果为阴性。

Note: “—” indicates that there is no Ct amplification in quantitative analysis, and the results are negative.

2.6 Pst 菌 qPCR 检测体系的适用性

采用建立的 qPCR 体系对田间采集的 63 个番茄细菌性斑点病叶片、茎秆和果实样品进行了检测，结果显示，有 28 份具有明显症状的样品均能被稳定地检出 Pst 菌；35 份具有疑似症状样品中有 26 份检出 Pst，检出率为 74.29%，带菌量在 $6.5 \times 10^1 \sim 3.2 \times 10^5$ cfu · g⁻¹ 范围。部分结果见表 4。病原菌分离培养鉴定结果、普通 PCR 鉴定结果与 qPCR 检测结果与一致，说明建立的 qPCR 检测体系灵敏度高，能够满足田间病害监测的需要。

表 4 番茄细菌性斑点病显症及疑似症状样品检测结果
Table 4 Detection of symptomatic and suspected samples

| 寄主 Host | 症状 Symptom | 组织 Tissue | 样本编号 Sample code | 检测结果 Result of detection | | |
|---------------------------|-------------------------|--------------|---------------------|--------------------------|-------------------|------------------------|
| | | | | PCR | qPCR | 细菌分离鉴定 Pure culture |
| 番茄 Tomato | 明显病斑 Symptomatic | 叶片 Leaf | FQ16111208 | + | 2.6×10^3 | + |
| | | 茎秆 Stem | FQ16120715 | + | 3.2×10^5 | + |
| | | 果实 Fruit | FQ17071010 | + | 8.2×10^4 | + |
| | 疑似症状 Suspect symptom | 叶片 Leaf | FQ17030504 | + | 1.8×10^2 | + |
| | | 茎秆 Stem | FQ17051208 | - | N/A | - |
| 加工番茄 Processing tomato | 明显病斑 Symptomatic | 果实 Fruit | FQ17100903 | + | 6.5×10^1 | + |
| | | 叶片 Leaf | JGFQ16081203 | + | 4.6×10^3 | + |
| | | 茎秆 Stem | JGFQ17080401 | + | 2.9×10^4 | + |
| | 疑似症状 Suspect symptom | 叶片 Leaf | JGFQ17080509 | + | 1.7×10^3 | + |
| | | 茎秆 Stem | JGFQ16081304 | - | N/A | - |
| 果实 Fruit | JGFQ16071510 | - | N/A | - | | |

注：“+”表示检测结果为阳性，“-”表示检测结果阴性。“N/A”表示荧光定量 PCR 没有 Ct 值扩增无法计算拷贝数，检测结果为阴性。

Note: “+” means positive, “-” means negative. “N/A” means quantification without Ct value amplification can not calculate copy number, the test results are negative.

3 讨论

细菌性斑点病是国内外番茄生产上一种危害严重的细菌性病害，病原菌侵染植株后可通过雨水、昆虫、农事操作等进行传播（赵廷昌 等，2001），流行速度快，加之市场上现有防治细菌性病害的药剂效果有限，一旦发生很难防治（王莹莹 等，2015），该病害已成为限制番茄产业发展的重要因素。因此，建立灵敏、可靠的病原菌快速检测技术是非疫区病害预警监测与有效防控的技术保证。

目前，中国对于番茄细菌性斑点病的检测和诊断，主要依靠传统的症状观察、病原菌分离培养、病原菌生理生化鉴定和致病性测定等，但这些检测方法耗时较长，往往错过了病害的最佳防治时期。近年来，PCR 技术在植物病害检测中的得到了广泛应用（Wreikat et al., 2006；文朝慧 等，2013）。本文根据 *HrpZ* 基因设计了番茄细菌性斑点病菌 Pst 的特异性引物 Pst3F/Pst3R，扩增片段大小为 161 bp，建立了 qPCR 检测体系，对 Pst 病菌 DNA 检测下限为 1.67×10^{-3} pg · μL⁻¹，比普通 PCR 灵敏度高 1 000 倍，此灵敏度与 qPCR 检测其他病菌时的灵敏度相一致（陈思 等，2006）。在带菌种子检测方面，本研究建立的 qPCR 体系对人工模拟带菌种子的检测下限为 4.21 cfu · g⁻¹。Zaccardelli 等（2005）也根据 *HrpZ* 基因设计了特异性引物 MM5F/MM5R，扩增目的片段为 532 bp，建立了 Pst 普通 PCR 检测体系，该体系对人工模拟带菌种子的检测下限为 2.5×10^6 cfu · g⁻¹，其灵敏度远低于本研究中 qPCR 检测体系，而且不能实现定量检测。Fanelli 等（2007）建立了基于斑点杂交和分子标记 PCR 的 Pst 定量检测技术，对人工带菌种子洗脱液中 Pst 的检测下限为 1×10^2 cfu · g⁻¹，也低于本

研究中建立体系的灵敏度。本研究中建立的体系较高的灵敏度一方面跟引物特异性有关, 另一方面也跟近年来随着分子生物学技术的不断发展, qPCR 检测技术以及所用仪器、试剂的不断进步更新有关。Ross 和 Somssich (2016) 在研究拟南芥野生型和突变型接种荧光假单胞菌后生物量的变化中, 比较了荧光定量 PCR 与传统的病菌培养菌落计数方法, 发现二者在定量检测荧光假单胞菌方面表现出较好的相关性, 而荧光定量 PCR 方法较传统方法更加快速、灵敏, 说明荧光定量 PCR 是一种准确、快速、可靠的检测方法。

番茄细菌性斑点病菌在干燥的种子上可存活 20 年, 并随种子进行远距离传播 (Bashan et al., 1985; Jones et al., 1986), 播种带菌种子幼苗即可发病。此外, Pst 还可在番茄植株、病残体、土壤和杂草上越冬, 成为次年的初侵染源 (王莹莹 等, 2015)。鉴于目前该病害有继续蔓延趋势, 为防止其向非疫区传播, 调运种子前进行种子带菌检测非常必要。本研究中建立的 qPCR 体系适用于种子或植物组织带菌检测, 具有快速、灵敏、可靠等优点, 可用于国内外进境检疫和国内区域间番茄种质和种苗检疫。

References

- Bao Qi, Cao Meng-qi, Zhou Yu, Zheng Yu, Li Chang-long, Wang Hai-yan, Wang Jun, Sheng Cheng, Wu Fu-an. 2016. Detection of *Pseudomonas syringae* pv. *mori* on real-time quantitative PCR technology. *Sericulture Science*, (2): 210 - 218. (in Chinese)
- 包奇, 曹梦琪, 周雨, 郑煜, 李长龙, 王海燕, 王俊, 盛晟, 吴福安. 2016. 基于实时荧光定量 PCR 技术检测桑丁香假单胞菌. *蚕业科学*, (2): 210 - 218.
- Bashan Y, Okon Y, Henis Y. 1985. Detection of cutinases and pectic enzymes during infection of tomato by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Phytopathology*, 75 (8): 940 - 945.
- Bryan M K. 1933. Bacterial speck of tomatoes. *Phytopathology*, 23 (11): 897 - 904.
- Charkowski A O, Huang H C, Collmer A. 1997. Altered localization of *HrpZ* in *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* hrp mutants suggests that different components of the type III secretion pathway control protein translocation across the inner and outer membranes of gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology*, 179: 3866 - 3874.
- Chen Chang-jun, Li Jun, Zhao Wei, Wang Jian-xin, Zhou Ming-guo. 2011. Detection of *Sclerotinia sclerotiorum* by a quantitative real-time PCR. *Acta Phytopathologica Sinica*, 41 (5): 516 - 525. (in Chinese)
- 陈长军, 李俊, 赵伟, 王建新, 周明国. 2011. 利用实时荧光定量 PCR 技术检测油菜菌核病菌. *植物病理学报*, 41 (5): 516 - 525.
- Chen Hong-ming, Wang Xue-feng, Zhou Yan, Zhou Chang-yong, Guo Jun, Li Zhong-an. 2015. Biological characterization and RT-PCR detection of a new disease in Eureka lemon. *Journal of Plant Protection*, 43 (4): 557 - 563. (in Chinese)
- 陈洪明, 王雪峰, 周彦, 周常勇, 郭俊, 李中安. 2015. 尤力克柠檬上一种新病害的生物学特性及 RT-PCR 检测技术. *植物保护学报*, 43 (4): 557 - 563.
- Chen Si, Huang Kun, Xu Wen-tao, Li Yuan, Luo Yun-bo. 2006. Real-time fluorescence quantitative PCR method for detection of *E. coli* o157:h7. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 14 (5): 779 - 782. (in Chinese)
- 陈思, 黄昆, 许文涛, 李媛, 罗云波. 2006. 实时荧光定量 PCR 方法检测大肠杆菌 o157:h7. *农业生物技术学报*, 14 (5): 779 - 782.
- Cheng Ying-chao, Kang Hua-jun, Shi Yan-xia, Chai A-li, Zhang Hong-jie, Xie Xue-wen, Li Bao-ju. 2018. Development and application of real-time fluorescent quantitative PCR for detection of *Phytophthora capsici*. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (5): 997 - 1006. (in Chinese)
- 程颖超, 康华军, 石延霞, 柴阿丽, 张红杰, 谢学文, 李宝聚. 2018. 辣椒疫霉菌 RT-PCR 检测技术的建立及应用. *园艺学报*, 45 (5): 997 - 1006.
- Cottyn B, Baeyen S, Pauwelyn E, Verbaendert I, Vos P D, Bleyaert P, Höfte M, Maes M. 2011. Development of a real-time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grown lettuce, and its detection in irrigating water. *Plant Pathology*, 60 (3): 453 - 461.

- Dieter K. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends in Molecular Medicine*, 8 (6): 257 - 260.
- Dou Ya-ya, Ruan Xiao-lei, Yuan Yue, Liu Qiong-guang, Li Hua-ping. 2013. Utilization of a real time PCR based approach for rapid quantitative detection of bacterial soft rot of banana. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (2): 380 - 388. (in Chinese)
豆亚亚, 阮小蕾, 袁月, 刘琼光, 李华平. 2013. 利用实时荧光PCR方法检测香蕉软腐细菌. *园艺学报*, 40 (2): 380 - 388.
- Fanelli V, Cariddi C, Finetti-Sialer M. 2007. Selective detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using dot blot hybridization and real-time PCR. *Plant Pathology*, 56: 683 - 691.
- Jones J B, Gitaitis R D, Mccarter S M. 1986. Fluorescence on single-carbon sources for separation of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, and *Pseudomonas viridiflava* on tomato transplants. *Plant Disease*, 70 (2): 151 - 153.
- Paul D. 2010. Development of a real-time PCR assay for detection and quantitation of group B *Streptococci* with special reference to infection of vascular endothelium[M. D. Dissertation]. Manchester: University of Manchester.
- Ross A, Somssich I E. 2016. A DNA-based real-time PCR assay for robust growth quantification of the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* on *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods*, 12: 48.
- Wang Dao-ze, Zhang Li-li, Tao Zhong-yun, Xie Guan-lin. 2016. Development of a real time quantitative PCR assay for the specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in crucifers. *Journal of Plant Protection*, 43 (4): 559 - 566. (in Chinese)
王道泽, 张莉丽, 陶中云, 谢关林. 2016. 实时荧光定量PCR法检测十字花科细菌性黑斑病菌. *植物保护学报*, 43 (4): 559 - 566.
- Wang Ying-ying, Chai A-li, Li Bao-ju. 2015. Symptoms and integrated control of tomato bacterial speck. *China Vegetables*, (11): 82 - 84. (in Chinese)
王莹莹, 柴阿丽, 李宝聚. 2015. 番茄细菌性斑点病症状多样性与综合防治. *中国蔬菜*, (11): 82 - 84.
- Wen Chao-hui, Wang Jun-ping, He Su-qin. 2013. Identification and detection of tomato bacterial spot pathogens in Gansu. *Chinese Vegetables* (6): 68 - 73. (in Chinese)
文朝慧, 王军平, 何苏琴. 2013. 甘肃地区番茄细菌性斑点病菌的鉴定与检测. *中国蔬菜*, (6): 68 - 73.
- Wreikat B I, Al-Banna L S, Khlaif H M. 2006. Detection of identification of bacterial speck of tomato (*Pseudomonas syringae* pv. *tomato*) by polymerase chain reaction. *Jordan Journal of Agricultural Sciences*, 2: 45 - 56.
- Xu Yan-yan, Chen Lu, Li Jin-ping, Xie Xue-wen, Shi Yan-xia, Li Bao-ju. 2013. Development and application of real-time fluorescent quantitative PCR for detection of *Pseudomonas tolaasii*. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (1): 169 - 178. (in Chinese)
徐岩岩, 陈璐, 李金萍, 谢学文, 石延霞, 李宝聚. 2013. 平菇细菌性褐斑病原菌RT-PCR检测方法的建立及其应用. *园艺学报*, 40 (1): 169 - 178.
- Yunis H, Bashan Y, Okon Y, Henis Y. 1980. Weather dependence, yield losses and control of bacterial speck of tomato caused by *Pseudomonas tomato*. *Plant Disease*, 64: 937 - 939.
- Zaccardelli M, Spasiano A, Bazzi C, Merighi M. 2005. Identification and in planta detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using PCR amplification of *hrpZ*_{Pst}. *European Journal of Plant Pathology*, 111: 85 - 90.
- Zhang Hui. 2003. IMS-PCR for the detection of bacterial carriers of tomato bacterial spot disease[M. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Agricultural University. (in Chinese)
张卉. 2003. IMS-PCR检测番茄细菌性斑点病种子带菌研究[硕士论文]. 哈尔滨: 东北农业大学.
- Zhao Ting-chang, Sun Fu-zai, Song Wen-sheng. 2001. Identification of pathogenic bacteria of bacterial spot disease in tomato. *Journal of Plant Pathology*, 31 (1): 37 - 42. (in Chinese)
赵廷昌, 孙福在, 宋文生. 2001. 番茄细菌性斑点病病原菌鉴定. *植物病理学报*, 31 (1): 37 - 42.