

平菇细菌性褐斑病病原菌 RT-PCR 检测方法的建立及其应用

徐岩岩, 陈璐, 李金萍, 谢学文, 石延霞, 李宝聚*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 平菇细菌性褐斑病是一种严重危害平菇生产的病害, 早期监测和防治是关键。采用平菇细菌性褐斑病病原菌托拉斯假单胞杆菌 (*Pseudomonas tolaasii*) 毒素基因的特异性引物 (Pt-1A) / (Pt-1D1), 通过扩增条件优化, 建立了该菌的实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescence quantitative Polymerase Chain Reaction) 检测及富集方法, 并利用该方法完成了该菌在平菇表层的动态监测。试验结果表明, 实时荧光定量 PCR 对托拉斯假单胞杆菌的检测范围为 $10^2 \sim 10^9$ cfu · mL⁻¹, 在经过选择性培养基富集后, 检测灵敏度进一步提高了 100 倍。利用选择性培养基富集及荧光定量 PCR 检测方法, 可在病害症状未显现之前检测到病原菌, 为平菇细菌性褐斑病的流行监测和早期防治奠定了技术支持。

关键词: 平菇; 托拉斯假单胞杆菌; 实时荧光定量 PCR

中图分类号: S 646.1⁺4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2013) 01-0169-10

Development and Application of Real-time Fluorescent Quantitative PCR for Detection of *Pseudomonas tolaasii*

XU Yan-yan, CHEN Lu, LI Jin-ping, XIE Xue-wen, SHI Yan-xia, and LI Bao-ju*

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Brown blotch disease caused by *Pseudomonas tolaasii* is an important mushroom disease. It can cause serious yield and quality loss. Early detection and monitoring of the pathogen is crucial step for disease control. A real-time fluorescent quantitative PCR by using specificity primer (Pt-1A) / (Pt-1D1) and enrichment method was developed to detect the bacterial pathogens of *P. tolaasii*. The method was used to analyze the bacterial population dynamic change of *P. tolaasii* on the *Pleurotus ostreatus* sporocarp surface. Our results showed that the detection range of this was from 10^2 to 10^9 cfu · mL⁻¹, and the sensitivity with enrichment step can reach about 100-fold higher than that without enrichment step. We conclude that the real-time quantitative PCR with the enrichment method can be used to detect *P. tolaasii* at the early stage of infection, and can provide technical support for the mushroom bacterial epidemic surveillance and early prevention of the disease.

Key words: *Pleurotus ostreatus*; *Pseudomonas tolaasii*; real-time fluorescent quantitative PCR

收稿日期: 2012-08-29; 修回日期: 2012-10-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31071838)

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

近年来,由托拉斯假单胞杆菌(*Pseudomonas tolaasii* Paine)引起的平菇细菌性褐斑病在国内外大面积发生(Rainey et al., 1991; Soler-Rivas et al., 1999; 张瑞颖 等, 2007; Singh et al., 2010),而且还会引起双孢菇(*Agaricus bisporus*)、香菇(*Lentinula edodes*)、金针菇(*Flammulina velutipes*)等的褐斑病(Fletcher, 1979; Rainey et al., 1992; Tsuneda et al., 1995; Lee & Cha, 1998)。尤其在春秋季节,平菇细菌性褐斑病在菇场内极易发生,而且一旦发生,就很难控制,严重时发病率能达到80%以上,给平菇生产造成严重的损失(Soler-Rivas et al., 1999)。

托拉斯假单胞杆菌产生的毒素 Tolaasins 是一种可以破坏细胞膜使之形成溶洞的脂多糖(Brodey et al., 1991; Rainey et al., 1991, 1992)。Tolaasins 可与 *Pseudomonas reactans* 在琼脂平板上形成白线(white line test, WLT)(Goor et al., 1986; Wells et al., 1996),利用这种现象可快速有效地鉴定托拉斯假单胞杆菌(Rainey et al., 1992),但是这种方法只能应用于纯培养物的鉴定而不是田间样品的检测。因而特异性强,灵敏性高的检测方法对于研究托拉斯假单胞杆菌的生态学,传播途径以及病害的早期诊断极为必要(Lee et al., 2002)。

应用实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescent quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-PCR) 技术可以在症状未出现前检测到病原菌,为病害流行监测和早期预防提供科学依据,而且该技术操作简便,快速高效,敏感性和特异性强,有效地解决了传统 PCR 定量只能终点检测的局限(Silvar et al., 2005; Zhang et al., 2006)。目前实时荧光定量 PCR 技术已经应用于多种病原的检测,但是至今尚无应用于托拉斯假单胞杆菌的检测。

本试验中利用选择性富集与实时荧光定量 PCR 相结合的方法建立了托拉斯假单胞杆菌定量检测方法,在症状出现前就能够快速、准确地检测出托拉斯假单胞杆菌,为采取有效防治措施提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂和仪器

供试平菇品种:‘黑美人’平菇菌种(感病品种)由北京房山农业科学研究所提供。

供试病原菌株:托拉斯假单胞杆菌(*Pseudomonas tolaasii* Paine)、胡萝卜欧文氏菌胡萝卜软腐致病变种[*Erwinia carotovora* ssp. *carotovora* (Jones) Bergey et al.]、泛菌(*Pantoea* sp.)、美洲欧文氏菌(*Ewingella americana*)、假产碱假单胞菌(*Pseudomonas pseudoalcaligenes*)、土生克雷伯氏菌(*Klebsiella terrigena*)和丁香假单胞菌黄瓜致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*),各菌株保存于中国农业科学院蔬菜花卉研究所菜病综防实验室。

托拉斯假单胞杆菌选择性培养基(PAF):蛋白胨 20 g,甘油 10 g, K_2HPO_4 1.5 g, $MgSO_4$ 1.5 g,酒石酸钠 2 g, 0.1%结晶紫 5 mL, 0.2%溴百里酚蓝 15 mL,放线菌酮 100 mg, 75 mg 新生霉素, 75 mg 青霉素,咪唑胺 50 mg,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。

牛肉膏蛋白胨培养基(NA/NB):牛肉膏 3 g,蛋白胨 10 g, NaCl 5 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。

供试引物:参考 Lee 等(2002)根据托拉斯假单胞杆菌毒素 Tolaasin 序列(GenBank 登录号:AF291753)设计的特异性引物 Pt-1A: ATCCCTTCGGCGTTTACCTG, Pt-1D1: CAAAGTAACCCCTGCTTCTGC,产物大小为 449 bp,由上海生工生物工程技术有限公司(Sangon)合成。

主要试剂和仪器: BIO-RAD iCycler iQ5 荧光定量 PCR 仪购自 BIO-RAD 公司; DNA 产物纯化试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒等购自天根生化科技有限公司; Sigma 高速

离心机、Chelex-100 购自 Sigma 公司; SYBR Premix Ex *Taq*TM 与其他酶和试剂购自大连宝生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌菌株的培养

用接种环挑取各细菌菌株单个菌落接于装有 NB 培养基 (100 mL) 的三角瓶 (150 mL) 中, 以 $160 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 28°C 振荡培养 48 h (Rodriguez & Royse, 2007)。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 标准曲线的绘制

将克隆获得的携带托拉斯假单胞杆菌目的基因的质粒按 10 倍梯度稀释为 $10^{-1} \sim 10^{-15}$ 系列浓度。反应体系 (25 μL): 12.5 μL SYBR premix Ex *Taq* (2 \times), 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上下游引物各 0.5 μL , DNA 模板 2 μL , ddH₂O 9.5 μL ; 荧光定量 PCR 扩增条件: 95°C 预变性 10 s; 95°C 变性 10 s, 60°C 退火 15 s, 72°C 延伸 30 s, 40 个循环; 55°C 延伸 10 s。

溶解曲线分析: $60 \sim 95^\circ\text{C}$, 每升高 0.5°C 检测 1 次荧光信号。标准曲线的纵坐标为临界循环值 C_t , 横坐标为模板数的对数值。根据标准曲线所得线性计算公式, 将样品的 C_t 值代入公式, 得到相应模板数。按照 Hietala 等 (2003) 的推算方法计算拷贝数: (1) 待测样本浓度 ($\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) = $\text{OD}_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}$; (2) 样本分子量 = 碱基数 $\times 324$; (3) 待测样本拷贝数 = (待测样本浓度 / 样本分子量) $\times 6 \times 10^{14}$ 。

1.2.3 引物的特异性检测

将各供试菌株培养液用 CTAB 法提取总 DNA (Lee & Taylor, 1990; 孟鹤 等, 2011) 作为 PCR 模板, 检测引物对 (Pt-1A) / (Pt-1D1) 的普通 PCR 特异性。PCR 反应体系 (20 μL): 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的上、下游引物各 1 μL , $10\times$ Buffer 2 μL , *Taq* 酶 0.5 μL , 模板 DNA 1 μL , ddH₂O 11.5 μL 。PCR 反应条件: 94°C , 10 min; 94°C , 1 min, 60°C , 1 min, 72°C , 2 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。

以各供试菌株 DNA 为 PCR 模板, 检测引物对 (Pt-1A) / (Pt-1D1) 的实时荧光定量 PCR 特异性, 反应体系及反应条件同标准曲线的绘制。

1.2.4 引物的灵敏性检测

托拉斯假单胞杆菌基因组 DNA 用紫外分光光度计测定浓度后, 将其逐级稀释至 10^{-10} , 普通 PCR 扩增检测引物对 (Pt-1A) / (Pt-1D1) 的灵敏度。

将托拉斯假单胞杆菌质粒 DNA 用紫外分光光度计测定浓度后, 逐级稀释至 10^{-15} , 采用已建立的荧光定量 PCR 体系进行扩增, 检测引物对 (Pt-1A) / (Pt-1D1) 的灵敏度。

1.2.5 托拉斯假单胞杆菌富集曲线的绘制

将 $1 \times 10^6 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 托拉斯假单胞杆菌悬浮液做 10 倍梯度稀释, 得到浓度为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10 和 $1 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌液。分别吸取 1 mL 的菌悬液于 9 mL 液体选择性培养基中, 以 30°C $170 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 分别振荡培养 6 h、12 h、24 h, 以无菌水为阴性对照。

采取 Chelex-100 法提取总 DNA, 取 1 mL 菌液以 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 弃上清, 加入 200 μL 5% Chelex-100 悬浊液, 漩涡混匀。 65°C 水浴 2 h, 沸水浴 10 min, 冰浴 3 min, $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液转移至新的离心管中, 保存于 -20°C 备用。

首先进行普通 PCR 检测, 然后按照建立好的荧光定量 PCR 检测体系定量。托拉斯假单胞杆菌富集曲线的横坐标为富集前起始菌量, 纵坐标为富集后最终菌量。

1.2.6 托拉斯假单胞杆菌在平菇表层的增殖动态监测

将 $1 \times 10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 托拉斯假单胞杆菌悬浮液做 10 倍梯度稀释, 得到浓度为 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 和 $10 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌液。分别取 3 mL 菌悬液均匀喷施在平菇表层, 以清水喷施平菇表层为阴性对照,

分别在 4 h、8 h、16 h、24 h、48 h 取样, 参考 Rodriguez 和 Royse (2007) 的分级标准调查病情指数及发病时间。

取 0.05 g 平菇表层样品于 2 mL 离心管中 (含有 1 mL 选择性培养液), 以 30 °C 170 r·min⁻¹ 振荡培养 6 h 后, Chelex-100 法提取总 DNA。采用已建立的实时荧光定量 PCR 技术进行检测。每批做 3 次重复。根据托拉斯假单胞杆菌富集曲线所得线性计算公式, 将样品的最终拷贝数值代入公式, 得到相应初始菌量。

根据 Excel 2003 和 Matlab 7.12.0 (R2011a) 软件进行数据处理及曲线拟合。

2 结果与分析

2.1 RT-PCR 标准曲线的建立

将质粒 DNA 标准品做 10⁻¹ ~ 10⁻¹⁵ 梯度稀释后进行荧光定量 PCR 检测, 以 10⁻² ~ 10⁻⁷ 稀释倍数的质粒 DNA 拷贝数的对数值为横坐标, 以循环数 *Ct* 值为纵坐标, 获得 PCR 标准曲线 (图 1)。

扩增反应循环数 *Ct* 值与质粒 DNA 拷贝数的对数值之间具有良好的线性关系 $Y = 0.635 - 3.443X$, ($R^2 = 0.998$), 扩增效率为 95.1%, 阴性对照均无扩增。

熔解曲线分析可以用来确定不同的反应产物, 包括非特异性产物。扩增反应完成后, 温度从 60 °C 升至 95 °C, 每 10 s 升高 0.5 °C 监测每一步的荧光信号来产生熔解曲线 (图 2), 熔解温度上有一特征峰 (*T_m*, DNA 双链解链 50% 的温度), 用这个特征峰就可以将特异产物与其它产物如引物二聚体区分开, 因为它们在不同的温度熔解。10⁻² ~ 10⁻⁸ 梯度稀释的托拉斯假单胞杆菌标准

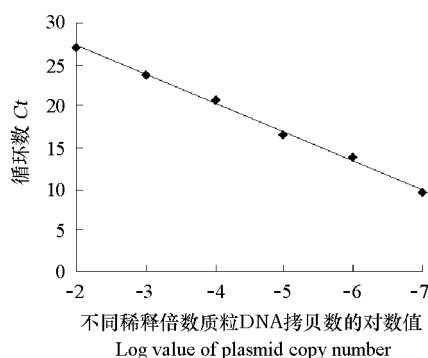


图 1 托拉斯假单胞杆菌标准质粒 RT-PCR 的标准曲线
Fig. 1 Real-time fluorescence quantitative standard curve of *Pseudomonas tolaasii* plasmid DNA

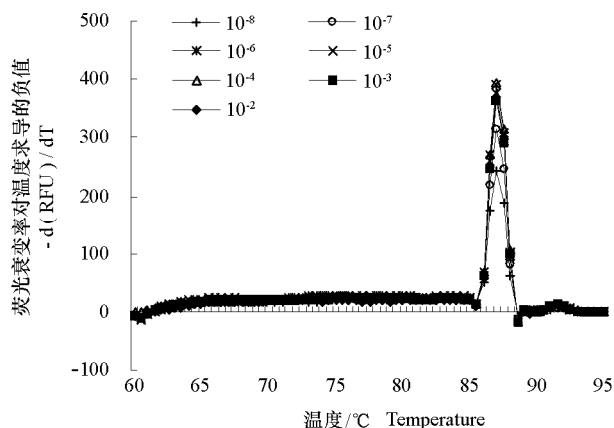


图 2 托拉斯假单胞杆菌标准质粒 RT-PCR 的熔解曲线

10⁻² ~ 10⁻⁸: 托拉斯假单胞杆菌标准质粒梯度稀释。

Fig. 2 Real-time fluorescence quantitative melting curve of *Pseudomonas tolaasii* plasmid DNA

10⁻² - 10⁻⁸: Serial dilution of *Pseudomonas tolaasii* plasmid DNA.

质粒的熔解曲线随着温度的升高只有一个明显的特异性单峰(图2),说明此引物特异性高,没有非特异性的扩增产物。

2.2 引物特异性检测

以灭菌后的双蒸水为阴性对照,以7个供试菌株的基因组DNA为模板,检测(Pt-1A)/(Pt-1D1)引物的特异性,结果表明,以托拉斯假单胞杆菌DNA为模板,可以稳定地扩增出449 bp的单一片段(图3),其他6菌株均未有条带,且目的片段条带明亮,扩增稳定性及特异性好。

在荧光定量PCR特异性分析中,托拉斯假单胞杆菌基因组DNA及标准质粒DNA只出现单一峰(图4),而阴性对照和其他6菌株没有出现目的产物的熔点峰。

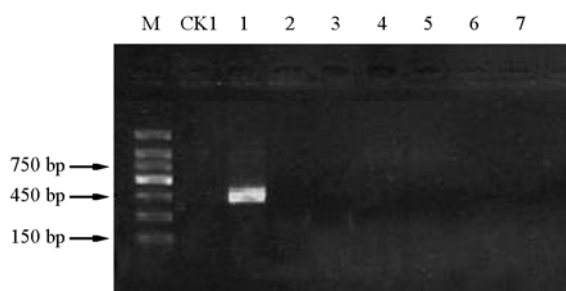


图3 普通PCR引物特异性检测

M: DNA Marker; CK1: 阴性对照; 1: 托拉斯假单胞杆菌; 2: 胡萝卜欧文氏菌胡萝卜软腐致病变种; 3: 泛菌; 4: 美洲欧文氏菌; 5: 假产碱假单胞菌; 6: 土生克雷伯氏菌; 7: 丁香假单胞菌黄瓜致病变种。

Fig. 3 Specificity of general PCR assay

M: DNA Marker; CK1: Negative control; 1: *Pseudomonas tolaasii*; 2: *Erwinia carotovora*; 3: *Pantoea* sp.; 4: *Ewingella americana*; 5: *Pseudomonas pseudoalcaligenes*; 6: *Klebsiella terrigena*; 7: *Pseudomonas syringae*.

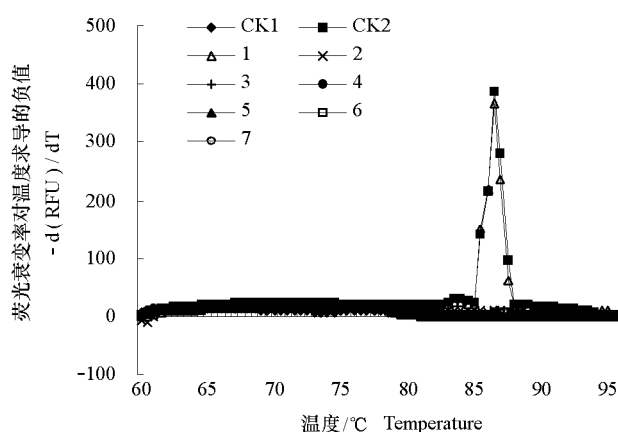


图4 RT-PCR引物特异性检测熔解曲线

CK1: 阴性对照; CK2: 托拉斯假单胞杆菌标准质粒; 1: 托拉斯假单胞杆菌; 2: 胡萝卜欧文氏菌胡萝卜软腐致病变种; 3: 泛菌; 4: 美洲欧文氏菌; 5: 假产碱假单胞菌; 6: 土生克雷伯氏菌; 7: 丁香假单胞菌黄瓜致病变种。

Fig. 4 Fluorescence quantitative PCR specificity Melting Curve of premier

CK1: Negative control; CK2: *Pseudomonas tolaasii* plasmid DNA; 1: *Pseudomonas tolaasii*; 2: *Erwinia carotovora*; 3: *Pantoea* sp.; 4: *Ewingella americana*; 5: *Pseudomonas pseudoalcaligenes*; 6: *Klebsiella terrigena*; 7: *Pseudomonas syringae*.

2.3 引物灵敏性检测

托拉斯假单胞杆菌基因组 DNA 分光光度计测定浓度为 $385.6 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 将初始 DNA 稀释至 10^{-7} ($38.56 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 仍能检测到 DNA 的存在 (图 5)。

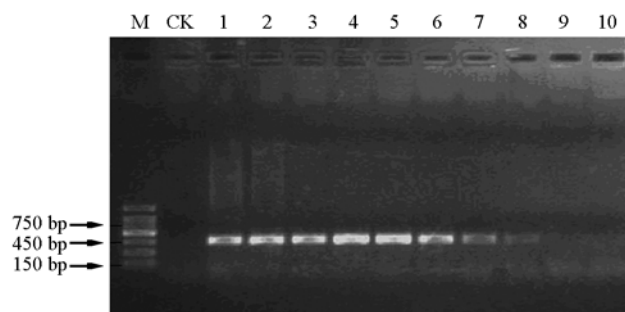


图 5 普通 PCR 引物灵敏性检测

M: DNA Marker; CK: 阴性对照; 1~10: DNA 依次稀释梯度为 $1 \sim 10^{-10}$ 。

Fig. 5 Sensibility of general PCR assay

M: DNA Marker; CK: Negative control; 1 - 10: 10-fold serial dilution of DNA $1 - 10^{-10}$.

每个梯度均有特异性扩增曲线, 呈明显的“S”型 (图 6), 说明 (Pt-1A) / (Pt-1D1) 引物用于荧光定量 PCR 定量检测托拉斯假单胞杆菌时灵敏度高, 图 6 中横坐标代表 PCR 反应的循环数 (Cycle number), 纵坐标代表 DNA 与 SYBRGreen I 荧光染料结合后的荧光强度 (R_n), 不同拷贝数的阳性模板随循环数的增加, 其荧光强度逐渐增强, 当到达一定的循环数时曲线趋于平行。综合重复验证结果, 变异系数均小于 5%, 表明该方法具有良好的稳定性。

通过灵敏性检测确定了 SYBR Green I 染料法对托拉斯假单胞杆菌的检测下限为 10^{-9} , 即 $0.049 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (相当于靶标基因拷贝数 $202 \cdot \text{L}^{-1}$), 检测灵敏度显著高于普通 PCR。

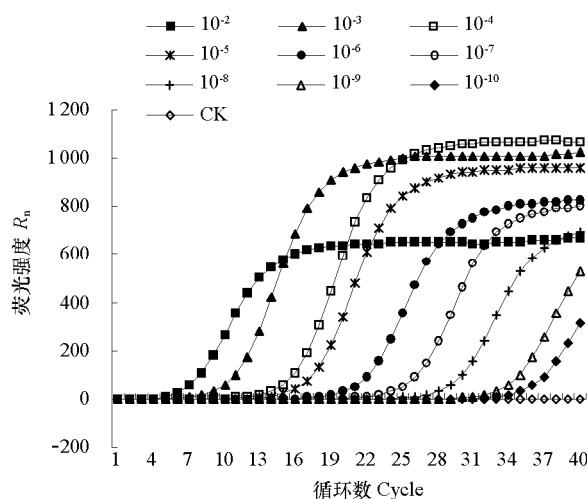


图 6 RT-PCR 引物灵敏性检测扩增曲线

$10^{-2} \sim 10^{-10}$: 质粒标准品 10 倍梯度稀释。

Fig. 6 Sensibility amplification curve of Real-time fluorescence quantitative PCR

$10^{-2} - 10^{-10}$: 10-fold serial dilution of *Pseudomonas tolaasii* plasmid DNA.

2.4 托拉斯假单胞杆菌富集曲线的绘制

2.4.1 托拉斯假单胞杆菌富集后常规 PCR 检测

将托拉斯假单胞杆菌悬液按 10 倍梯度稀释为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、10、1 cfu · mL⁻¹ 系列浓度，经过选择性培养液分别富集 6 h、12 h、24 h 之后进行普通 PCR 检测。不同浓度菌悬液经过选择性培养液富集 6 h、12 h 后有明显的亮度梯度，但富集 24 h 后条带亮度一致，无明显浓度梯度，所以将 6 h 选作富集时间（图 7）。

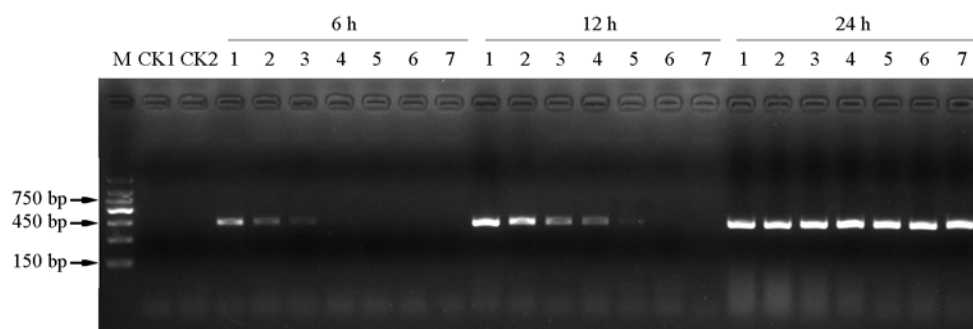
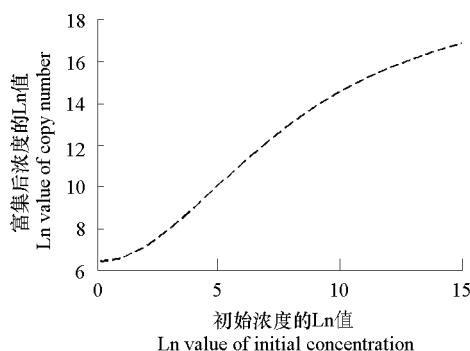


图 7 托拉斯假单胞杆菌富集后普通 PCR 检测

M: DNA Marker; CK1, CK2: 阴性对照; 1~7: *Pseudomonas tolaasii* 依次稀释浓度为 $10^6 \sim 1$ cfu · mL⁻¹。

Fig. 7 General PCR detection of *Pseudomonas tolaasii* after enriching

M: DNA Marker; CK1, CK2: Negative control; 1~7: *Pseudomonas tolaasii* dilution $10^6 \sim 1$ cfu · mL⁻¹.



2.4.2 托拉斯假单胞杆菌富集曲线的绘制

将托拉斯假单胞杆菌菌悬液富集 6 h，经过荧光定量 PCR 检测之后，将初始带菌量与最终拷贝数之间确定了明确的线性关系（图 8），线性关系公式为： $\text{Ln}(y) = 19.74 + (6.40 - 19.74) / \{1 + [\text{Ln}(x) / 8.07]^{2.05}\}$ ，($R^2 = 1$)。

RT-PCR 检测结果与常规 PCR 的结果相符，而且检测的敏感性显著提高，在细菌数量为 $0 \sim 10^6$ cfu · mL⁻¹ 范围内经富集之后均能比较准确地反应细菌的数量。

图 8 托拉斯假单胞杆菌不同浓度菌液富集 6 h 曲线

Fig. 8 Standard curve of different concentration of *Pseudomonas tolaasii* enriching 6 h

2.5 托拉斯假单胞杆菌在平菇表层增殖动态检测

不同浓度的托拉斯假单胞杆菌悬液处理引发平菇褐斑症状的时间不同。 $10^5 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌悬液处理平菇后, 16 h 即可增至发病浓度, 引发褐斑症状, $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌液在 24 h 引发褐斑病。其他低浓度菌悬液 (10^3 , 10^2 , $10 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$) 及不接菌的对照在平菇采收时均未发病。

将不同浓度的托拉斯假单胞杆菌处理的平菇样品 0.05 g 匀浆富集后, Chelex-100 法提取总 DNA, 运用引物对 (Pt-1A) / (Pt-1D1) 进行荧光定量 PCR 的检测, 之后根据标准曲线及富集曲线计算出平菇表层的最终带菌量。结果表明实时荧光定量 PCR 技术检测平菇表层托拉斯假单胞杆菌数量的结果与症状表现趋势一致。将所有处理富集后检测发现, 除未接菌的对照没有荧光信号外, 其他带菌平菇的 DNA 提取液均有荧光信号产生, 可以定量检测到全部接种平菇上的托拉斯假单胞杆菌。接种浓度为 $10 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理平菇 4 h 后, 托拉斯假单胞杆菌为 $27.9 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

不同浓度的托拉斯假单胞杆菌处理平菇后的 0~24 h 之间, 致病菌在平菇表层均呈明显上升趋势 (图 9)。平菇表层的病原菌浓度达到 $10^7 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 可引发褐斑症状。托拉斯假单胞杆菌接种浓度低于 $10^4 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 处理的平菇, 在 48 h 采收时带菌量仍低于 $10^7 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

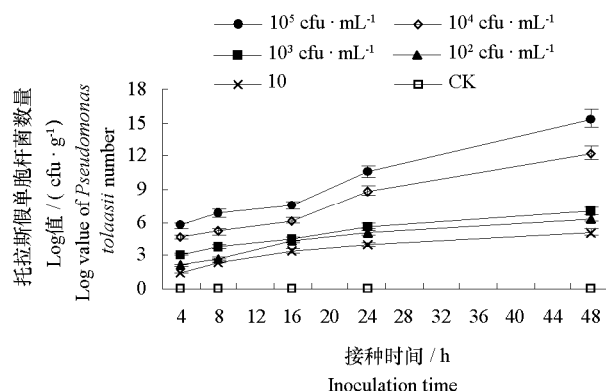


图 9 不同浓度的托拉斯假单胞杆菌在平菇表层的动态变化

Fig. 9 Dynamic change of *Pseudomonas tolaasii* on the *Pleurotus ostreatus* sporocarp surface with inoculation time

选择性培养基不仅富集了托拉斯假单胞杆菌的数量, 而且部分抑制了其他杂菌的生长, 进行荧光定量 PCR 检测过程中, 阴性对照熔解曲线无特异性熔解峰出现, 标准质粒及接种托拉斯假单胞杆菌的样品 DNA 的熔解曲线均在 $85 \sim 90 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间只出现单一峰, 表明无其他杂菌及非特异性片段扩增。

3 讨论

在平菇生产过程中, 由托拉斯假单胞杆菌引起的平菇细菌性褐斑病的早期监测和防治显得非常重要。Lee 等 (2002) 运用托拉斯假单胞杆菌 tolaasin 毒素基因特异性引物进行免疫捕捉—嵌套 PCR 检测样品中的病原菌含量。本试验在此基础上进行的常规 PCR 检测的灵敏度可以达到 $38.56 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 荧光定量 PCR 检测体系在未富集托拉斯假单胞杆菌的条件下, 检测的线性范围为 $10^2 \sim 10^9 \text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$, 之后运用选择性培养基解决了微量富集的问题, 检测灵敏度进一步提高了 100 倍。

荧光定量 PCR 技术检测病原菌时使用较大的扩增产物在国内外文献中均有报道 (Schroeder et al., 2006; Kernaghan et al., 2008; 李琼 等, 2011)。Schroeder 等 (2006) 运用荧光定量 PCR 技术检测土壤中的 9 种腐霉菌, 其引物对扩增片段在 $277 \sim 414 \text{ bp}$ 之间, 扩增效率在 $80\% \sim 92\%$ 之间,

且每对引物在溶解曲线中均出现单一特异性溶解峰, 可以准确定量土壤中的不同腐霉菌。扩增产物片段的大小主要影响荧光定量 PCR 的扩增效率。一般认为实时荧光定量 PCR 技术采用约 200 bp 较短的扩增产物, 以缩短扩增时间。本文中引物对 (Pt-1A) / (Pt-1D1) 扩增片段虽然达到 449 bp, 但扩增效率在 95% 以上, 而且, 引物对 (Pt-1A) / (Pt-1D1) 存在于托拉斯假单胞杆菌毒素基因片段内, 高度保守, 在荧光定量 PCR 检测过程中不仅特异性强而且灵敏度高, 具有实际可操作性, 运用 SYBRGreen I 荧光染料法通用程序即可完成检测。

平菇表层的细菌多且复杂, 通过选择性培养液的选择性富集及特异性引物的选择性扩增, 对平菇表层的托拉斯假单胞杆菌进行了双重选择, 显著提高了特异性及灵敏性。通过对托拉斯假单胞杆菌在平菇表层的增殖动态研究发现, 致病菌达到 $10^7 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 才会引发褐斑病, 低于 $10^7 \text{ cfu} \cdot \text{g}^{-1}$ 时不能出现褐斑症状。托拉斯假单胞杆菌易于侵染平菇表层, 虽然未出现褐斑症状, 但在温度适宜, 湿度较高及通风不畅的条件下, 会突然大面积爆发, 往往导致菇农来不及采取防治措施, 造成严重经济损失。在平菇初潮或者发病初期平菇、菌种、培养料、土壤等均可以通过选择性培养基富集后, 进行荧光定量 PCR 检测, 及早地预防和及时地切断传染源及传播途径, 进行早期治疗。这为平菇细菌性褐斑病的流行发生提供了有效预测, 为进一步有效防治平菇细菌性褐斑病提供科学依据。

References

- Brodey C L, Rainey P B, Tester M, Johnstone K. 1991. Bacterial blotch disease of the cultivated mushroom is caused by an ion channel forming lipodepsipeptide toxin. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 1: 407 - 411.
- Fletcher J T, 1979. Bacteria and mushrooms. *Mushroom Journal*, 82: 451 - 457.
- Goor M, Vantomme R, Swings J, Gillis M, Kersters K, Deley J. 1986. Phenotypic and genotypic diversity of *Pseudomonas tolaasii* and white line reacting organisms isolated from cultivated mushrooms. *Journal of General Microbiology*, 132: 2249 - 2264.
- Hietala A M, Eikenes M, Kvaalen H, Solheim H, Fossdal C G. 2003. Multiplex real-time PCR for monitoring *Heterobasidion annosum* colonization in Norway spruce clones that differ in disease resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 69 (6): 4413 - 4420.
- Kernaghan G, Reeleader R D, Hoke S M T. 2008. Quantification of *Pythium* populations in ginseng soils by culture dependent and real-time PCR methods. *Applied Soil Ecology*, 40: 447 - 455.
- Lee H I, Cha J S. 1998. Cloning of a DNA fragment specific to *Pseudomonas tolaasii* causing bacterial brown blotch disease of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). *Korean Journal of Plant Pathology*, 14: 177 - 183.
- Lee H I, Jeong K S, Cha J S. 2002. PCR assays for specific and sensitive detection of *Pseudomonas tolaasii*, the cause of brown blotch disease of mushrooms. *Letters in Applied Microbiology*, 35: 276 - 2801.
- Lee S B, Taylor J W. 1990. Isolate of DNA from fungal mycelia and single spore//Innis M A, Gelfand D H, Sninsky T J, White T J. PCR protocols: A guide to methods and applications. New York: Academic Press: 282 - 287.
- Li Qiong, Kong Bao-hua, Fan Jing-hua, Cai Hong, Fu Yang, Chen Hai-ru. 2011. Early detection of rice blast by TaqMan real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction. *Acta Phytopathologica Sinica*, 41 (2): 118 - 123. (in Chinese)
- 李 琼, 孔宝华, 范静华, 蔡 红, 傅 杨, 陈海如. 2011. 应用 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 技术早期检测稻瘟病. *植物病理学报*, 41 (2): 118 - 123.
- Meng He, Jin Mao-yong, Xiao Ju-qing, Zhang Bao-zhu, Ming Jun, Yuan Su-xia, Liu Chun, Zhang Ning. 2011. Detection of *Xanthomonas campestris* pv. *dieffenbachiae* on *Anthurium andraeanum* by Nested-PCR. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (10): 2017 - 2022. (in Chinese)
- 孟 鹤, 金茂勇, 肖橘清, 张宝珠, 明 军, 袁素霞, 刘 春, 张 宁. 2011. 安祖花细菌性疫病的Nested-PCR检测. *园艺学报*, 38 (10): 2017 - 2022.
- Rainey P B, Brodey C L, Johnstone K. 1991. Biological properties and spectrum of activity of tolaasin, a lipodepsipeptide toxin produced by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39: 57 - 70.
- Rainey P B, Brodey C L, Johnstone K. 1992. Biology of *Pseudomonas tolaasii*, cause of brown blotch disease of the cultivated mushroom. *Advances in Plant Pathology*, 8: 95 - 117.

- Rodriguez Estradada A E, Royse D J. 2007. Yield, size and bacterial blotch resistance of *Pleurotus eryngii* grown on cottonseed hulls/oak sawdust supplemented with manganese, copper and whole ground soybean. *Bioresource Technology*, 98: 1898 – 1906.
- Schroeder K L, Okubara P A, Tambong J T, Lévesque C A, Paulitz T C. 2006. Identification and quantification of pathogenic *Pythium* spp. from soils in Eastern Washington using real-time polymerase chain reaction. *Ecology and Epidemiology*, 96 (6): 637 – 647.
- Silvar C, Duncan J M, Cooke D E L. 2005. Development of specific PCR primers for identification and detection of *Phytophthora capsici* Leon. *European Journal of Plant Pathology*, 112: 43 – 52.
- Singh P, Langowski H C, Wani A A, Saengerlaub S. 2010. Recent advances in extending the shelf life of fresh *Agaricus* mushrooms: A review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90: 1393 – 1402.
- Soler-Rivas C, Joliet S, Arpin N, Olivier J M, Wichers H J. 1999. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *FEMS Microbiological Reviews*, 23: 591 – 614.
- Tsueda A, Suyama K, Murakami S, Ohira A. 1995. Occurrence of *Pseudomonas tolaasii* on fruiting bodies of *Lentinula edodes* formed *Quercus* logs. *Mycoscience*, 36: 283 – 288.
- Wells J M, Sapers G M, Fett W F, Butterfield L E, Jones J B, Bouzar H, Miller F C. 1996. Postharvest discoloration of the cultivated mushroom *Agaricus bisporus* caused by *Pseudomonas tolaasii*, *P. reactans* and *P. gingeri*. *Phytopathology*, 86: 1098 – 1104.
- Zhang Z G, Li Y Q, Fan H, Wang Y C, Zheng X B. 2006. Molecular detection of *Phytophthora capsici* in infected plant tissues, soil and water. *Plant Pathology*, 55: 770 – 775.
- Zhang Rui-ying, Hu Dan-dan, Zuo Xue-mei, Wang He-xiang, Jiang Rui-bo. 2007. Research advancement on brown blotch disease of oyster mushroom and button mushroom. *Acta Phytophylacica Sinica*, 34 (5): 449 – 554. (in Chinese)
- 张瑞颖, 胡丹丹, 左雪梅, 王贺祥, 姜瑞波. 2007. 平菇和双孢蘑菇细菌性褐斑病研究进展. *植物保护学报*, 34 (5): 449 – 554.

征 订

《中国蔬菜栽培学》(第2版)

《中国蔬菜栽培学》(第2版)于2009年10月由中国农业出版社出版发行。全书约250万字,分总论、各论、保护地蔬菜栽培、采后处理及贮藏保鲜共4篇。总论篇概要地论述了中国蔬菜栽培的历史、产业现状,中国蔬菜的起源、来源和种类,蔬菜作物生长发育和器官形成与产品质量的关系,蔬菜生产分区、栽培制度和技术原理,蔬菜栽培的生理生态基础以及环境污染与蔬菜的关系等;各论篇较详细地介绍了根菜类、薯芋类、葱蒜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、叶菜类、瓜类、茄果类、豆类、水生类、多年生类、芽苗菜以及食用菌类蔬菜的优良品种、栽培技术、病虫害综合防治、采收等方面的技术经验和研究成果;保护地蔬菜栽培篇论述了中国蔬菜保护地的类型、构造和应用,主要栽培设施的设计、施工,保护地环境及调节,保护地蔬菜栽培技术;采后处理及贮藏保鲜篇重点介绍了蔬菜采后处理技术及贮藏原理和方法等。与原著(1987年版)相比较,具有如下特点:

1. 重点增加了自20世纪80年代后期以来,中国在蔬菜栽培理论、无公害蔬菜栽培技术、推广应用的新品种、病虫害综合防治以及在蔬菜产品质量、产品采后处理及贮藏保鲜原理和技术等方面取得的新成果、新进展;概述了改革开放以来中国蔬菜产、销通过商品基地建设、流通体系建设等在解决蔬菜周年生产和供应方面所取得的成绩。
2. 对蔬菜栽培历史,蔬菜的起源、来源,分类,蔬菜学名,病虫害学名等进行了复核,校勘。
3. 尽可能地反映不同学术思想和观点;尽量反映不同生态区,包括中国台湾地区在内的栽培技术特点。
4. 删去了“蔬菜的加工”和“野生蔬菜”两章,以使本书的内容更加切题。另在附录中增加了“主要野生蔬菜简表”、“主要野生食用菌简表”和“主要香辛料蔬菜简表”3个附表。

本书由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主编,组织全国有较高学术水平和实际工作经验的专家、学者和技术人员130余人分别撰写,反映了21世纪初中国蔬菜栽培科学研究和蔬菜生产技术的水平,内容较全面、系统,科学性、学术性强,亦有较强的实用性,插有近500张彩图,可供相关科研人员、农业院校师生、专业技术及管理人员等参考。

定价:330元(含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街12号中国农科院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部,邮编100081。