

实时荧光PCR检测香梨黑斑病菌

王凤军¹, 张祥林², 马海波³, 冯新忠¹, 冯俊丽⁴, 华 鹏¹

(1.库尔勒出入境检验检疫局, 新疆 库尔勒 841000; 2.新疆出入境检验检疫局, 新疆 乌鲁木齐 830000;
3.新疆农业大学农学院, 新疆 乌鲁木齐 830000; 4.浙江理工大学生物工程研究所, 浙江 杭州 310018)

摘 要: 根据梨黑斑病原菌链格孢子基因组保守序列, 设计合成特异性引物和双荧光标记探针, 通过对12个梨花样本、30个梨果样本和94个玻片样本检测分析, 建立对香梨黑斑病菌的TaqMan实时荧光聚合酶链式反应(PCR)检测方法。此外, 对其他4种香梨植物病害病原菌进行了荧光PCR检测比对。结果表明: 只有香梨黑斑病菌产生荧光信号, 与其他4种病害病原菌无交叉反应。与常规PCR相比, TaqMan实时荧光 PCR检测特异性强、灵敏度高, 能检测到质量浓度为1.9pg/μL的DNA样本, 且不必通过病原菌的分离与纯化培养, 可直接用于病变样品的检测以及植物病害的筛查与动态监测, 适合植物病害的快速诊断和预防控制。

关键词: 香梨; 链格孢菌; 实时荧光PCR; TaqMan探针; 快速检测

Real-Time Fluorescence PCR Identification of *Alternaria alternata* Causing Black Spot Disease of Fragrant Pear

WANG Feng-jun¹, ZHANG Xiang-lin², MA Hai-bo³, FENG Xin-zhong¹, FENG Jun-li⁴, HUA Peng¹

(1. Korla Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Korla 841000, China;
2. Xinjiang Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Ürümqi 830000, China;
3. College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Ürümqi 830000, China;
4. Institute of Bioengineering, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: A real-time fluorescence PCR method was established by using a pair of specific primers and double-fluorescence labeling probe according to the conserved sequence of the pathogen *Alternaria alternata* causing fragrant pear black spots. Totally 12 flowers, 30 fruits and 94 slides from fragrant pears were detected in this study. The real-time fluorescence PCR was used to detect four other plant disease pathogens on pears. Results showed that only in the pathogen causing black spots, fluorescence signal could be collected with the specific primers and probe. The assay for specific detection was more sensitive than conventional PCR, and could detect the concentration of DNA template as low as 1.9 pg/μL without pathogen separation and purification. This method is a reliable, sensitive, quick and easy-handling method suitable for rapid diagnosis and dynamic monitoring of the plant pathogen.

Key words: fragrant pear; *Alternaria alternata*; real-time fluorescence polymerase chain reaction; TaqMan probe; rapid detection

中图分类号: Q945.8

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630(2013)20-0170-04

doi:10.7506/spkx1002-6630-201320035

梨黑斑病是梨种植区广泛发生的一种世界性病害, 是梨三大病害之一, 它是由链格孢菌(*Alternaria alternata*)引起的贮藏期病害^[1-3]。主要侵染叶片、新梢和果实, 果实成熟期时在果实表面形成近圆形或不规则的黑褐色病斑, 中间凹陷, 潮湿时病斑表面产生黑色霉层, 严重影响果实的产量和品质。链格孢菌为半知菌亚门丝孢纲丝孢目链格孢属真菌, 是一种寄主范围广泛的弱寄生菌, 已在苹果、梨、甘薯、柑橘、番茄、鸭梨、非洲菊、苜蓿等蔬果上有报道^[4-9]。链格孢菌可在花期和果实发育期

经各种途径侵入而潜伏至贮藏期发病, 是一种典型的潜伏侵染性病害。

国内外对梨黑斑病的分离与鉴定进行了广泛研究。目前, 对链格孢菌等真菌传统鉴定方法需要经过组织分离、单孢纯化、培养保存和显微观察等, 检验时间较长, 而且形态学上的变异容易造成检验误区。近年来开展的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、巢式PCR等诸多植物病原的分子生物学检测技术具有一定的有效性, 但仍需进一步分子杂交或克隆测序鉴定,

收稿日期: 2012-12-02

基金项目: 国家质量监督检验检疫总局资助项目(201110022-3; 2012IK290); 库尔勒市重点科技项目

作者简介: 王凤军(1984—), 女, 工程师, 硕士, 主要从事植物病害和转基因检测研究。E-mail: wfj0808@sohu.com

难以满足快速诊断的需要^[10-12]。实时荧光PCR技术已广泛应用于植物病原菌的检测与鉴定^[13-17]，本研究通过设计特异性引物和探针，以期建立基于TaqMan探针的实时荧光PCR检测技术，对香梨黑斑病的快速检测提供技术保障。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

梨花和梨果于2012年花期初至梨果采收完毕(即4月初至9月底)，采自新疆库尔勒市阿瓦提香梨园和沙依东香梨园，梨花每3d采样1次，梨果每周采样1次。

梨黑斑病链格孢子阳性菌株由河北出入境检验检疫局馈赠。

供试玻片，将涂有凡士林的载玻片分别置于两香梨园的空中孢子捕捉器中，每周采样2次。

基因组DNA提取试剂盒 天根生化科技(北京)有限公司；荧光定量PCR检测试剂盒 宝生物工程(大连)有限公司；探针与引物委托美国Invitrogen公司合成。

1.2 仪器与设备

ABI7500实时荧光定量PCR仪 美国应用生物系统公司；ND2000C核酸蛋白分析仪 美国热电公司；1-14ED小型离心机 美国Sigma公司。

1.3 方法

1.3.1 香梨园中黑斑病菌孢子监测

2012年4~9月，在2个香梨园分别设置空中孢子捕捉器各1个，将孢子捕捉器放在果园中央，在每一孢子捕捉器中各放置2片表面涂有凡士林的载玻片，设置转速和定时工作时间(每天12h)，每隔3d取出孢子捕捉器中的载玻片，编号后放入载玻片盒中，并在孢子捕捉器中放入新的涂有凡士林的载玻片，使之继续工作。将载玻片盒带回实验室，按编号顺序在显微镜下观察链格孢菌分生孢子的有无及数量。共采集样本94片，两香梨园各47片。

1.3.2 香梨开花期黑斑病发生动态监测

从花序伸出期至落花期，在供试果园中放置孢子捕捉器的周围选4棵树作为观测点，每3d采集1次样品，每次采集梨花25朵，其中15朵切取各段组织进行分离培养，花序伸出期取全花，经0.25%次氯酸钠表面消毒45s，用无菌水清洗2~3次，置于马铃薯-胡萝卜琼脂培养基(PCA)上25℃黑暗培养5~7d，待长出菌落后进行纯化鉴定，另10朵花用于PCR鉴定。

1.3.3 香梨结果期黑斑病发生动态监测

香梨幼果形成期至成果采收完毕，每周在供试果园中采集1次果实样品，每次采集20果实，其中10个样品用于分离培养，即先用75%酒精脱脂棉擦拭果实表面，用灭菌的解剖刀切取萼端、胴部和梗端，0.25%次氯酸钠表面消毒1min，用无菌水清洗2~3次，移至PCA平板上，25℃黑暗培养5~7d，待长出菌落后进行纯化鉴定，另10个样品用于PCR鉴定。

1.3.4 基因组DNA的提取

取梨花或梨果样品100mg，按照基因组DNA提取试

剂盒说明书进行操作，加入50μL无菌水洗脱两次。用核酸蛋白分析仪检测DNA提取的纯度和质量浓度。

1.3.5 引物和探针设计

根据NCBI的GenBank核酸序列数据库中真菌核糖体18S rDNA基因序列中表达链格孢菌的OPAI-3基因组序列(EF503810)^[18]，使用Primer Premier 5.0软件和Primer Express 3.0软件设计引物和探针，在DNAStar软件上评价引物的特异性，在BLAST网页上比对扩增产物的特异性。

1.3.6 实时荧光定量反应

在0.2mL光学PCR反应管中依次加入：灭菌蒸馏水15.75μL、10×PCR Buffer 2.5μL、dNTP(400μmol/L) 2μL、引物(10μmol/L)0.5μL、探针(10μmol/L)0.5μL、500U Taq DNA聚合酶 0.25μL和DNA模板3μL，反应混合液在实时定量PCR仪中进行扩增。反应条件设置为95℃预处理15s，再以95℃变性15s，60℃退火延伸1min，进行40个循环。定量中设置重复实验和阴性对照实验，阴性对照中不加模板DNA，而以灭菌蒸馏水代替，用于检验是否存在PCR污染和较高的引物二聚体污染。

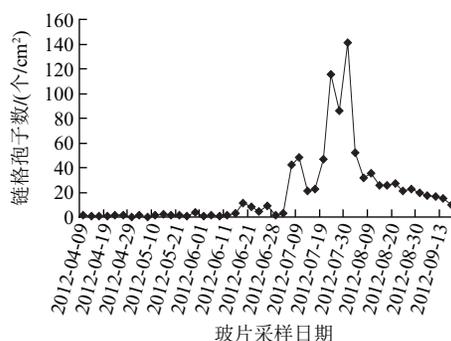
1.3.7 建立标准曲线

将测定好质量浓度的香梨黑斑病菌基因组DNA作为标准品，进行5倍梯度稀释，共设置6个梯度，分别为6.0000、1.2000、0.2400、0.0480、0.0096ng/μL和0.0019ng/μL，稀释介质为灭菌蒸馏水。对6个梯度的标准品进行实时荧光定量反应，每个梯度设置3个重复。

2 结果与分析

2.1 香梨黑斑病的分离鉴定及发生规律

从花序伸出期到成果采收完毕的6个月中，对2个香梨园中黑斑病菌孢子动态监测，共取得玻片样本94片，2个香梨园各47片，对玻片镜检可发现引起梨黑斑病的链格孢子多在6月底果实即将成熟时开始大量产生，直到采收完毕，但在开花期也有出现(图1A、B)。对采集的梨花(12次采样结果)和梨果样本(30次采样结果)进行病原菌的分离与鉴定，结果表明除了花序伸出期初(两梨园第1次梨花采样结果)和幼果形成期初(两梨园第1次梨果采样结果)之外，采集到的样本中均检出梨黑斑病链格孢属(图1C、D)。



A.采自阿瓦提香梨园中的玻片样本

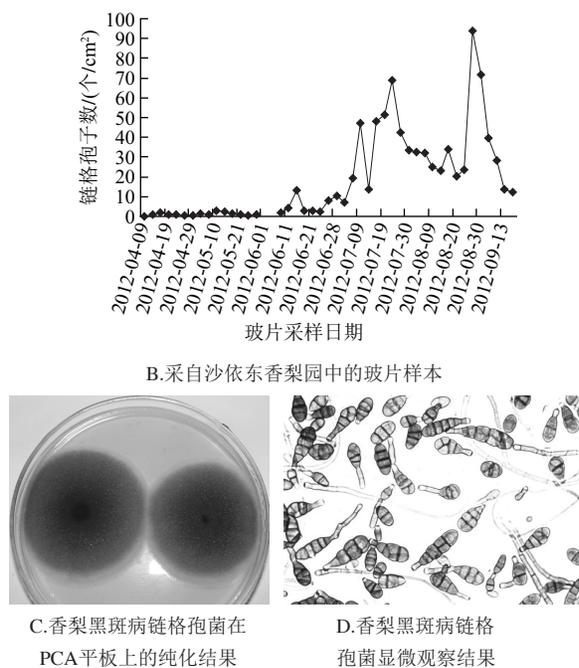


图1 香梨黑斑病链格孢菌的分离与鉴定

Fig.1 Isolation and identification of *Alternaria alternata* causing fragrant pear black spots

2.2 香梨黑斑病链格孢菌属的实时PCR鉴定

2.2.1 引物和探针特异性检测

根据真菌核糖体18S rDNA基因中表达链格孢菌的 *OPA1-3* 基因组序列(EF503810), 设计上游和下游引物及 *TaqMan* 探针, 探针5'端以FAM为荧光标记, 3'端以TAMRA为标记。引物和探针序列见表1。

表1 香梨黑斑病病原菌基因引物和探针序列

Table 1 Primers and probes for the gene in *Alternaria alternata* causing fragrant pear black spots

检测基因	栏目2	序列(5'→3')	扩增长度
OPA	F-primer	TCACTACAGACCAAATCCCTT	142bp(扩增位点为317~458)
	R-primer	CCTACATCTCAAATGCCAAA	
	Probe	TATCTTCTCACGTCGGGCCCTGA	

以梨霉心病、梨黑心病、梨黑星病和梨轮纹烂果病病变组织样品的总DNA为模板进行实时荧光定量PCR, 验证香梨黑斑病病原菌基因引物和探针的特异性。结果显示只有以香梨黑斑病DNA为模板的反应管中显示了指数型扩增曲线, 其他梨病害样本均无信号, 证明香梨黑斑病病原菌基因引物和探针在梨病害的鉴定中具有特异性。

2.2.2 重复性和灵敏性检测

分别以6个质量浓度梯度的香梨黑斑病菌标准品为模板进行实时荧光定量反应, 扩增曲线见图2。以标准品质量浓度的自然对数值为横坐标, 以Ct值为纵坐标做标准曲线, 其线性回归方程为 $y = -1.81x + 29.45$, $R^2 = 0.996$ 。对Ct值统计分析(表2), 同一参照样品的重复间Ct值变异较小, 链格孢菌基因Ct值变化范围在27.93~34.21之间, 标

准偏差在0.033~0.223之间, 表明该方法具有较好的重复性和稳定性。

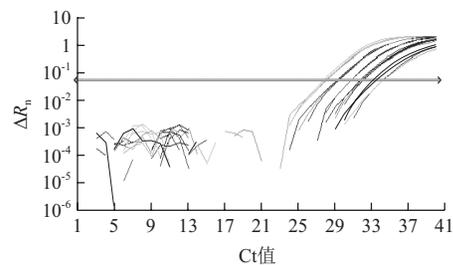


图2 梨黑斑病链格孢菌基因扩增曲线

Fig.2 Amplification curve of *Alternaria alternata* causing fragrant pear black spots

表2 梨黑斑病菌标准品Ct值分析表

Table 2 Ct value analysis of standard strain of *Alternaria alternata* causing fragrant pear black spots

样品质量浓度/(ng/μL)	Ct值	Ct平均值	标准偏差
6.0000	28.03 28.07 27.93	28.01	0.072
1.2000	29.14 29.32 29.22	29.23	0.092
0.2400	30.68 30.60 30.64	30.64	0.033
0.0480	32.03 32.06 31.83	31.97	0.129
0.0096	33.33 33.17 33.01	33.17	0.223
0.0019	34.12 34.21 34.16	34.16	0.062

由表2可见, 在最高稀释度的样品中, 香梨黑斑病链格孢菌基因得到扩增, Ct值为34.21, 接近检测临界限(Ct=35), 结果表明香梨黑斑病链格孢菌基因在模板质量浓度为0.0096ng/μL时为有效扩增, 即确定该质量浓度为最低定量限, 最低检测限为0.0019ng/μL, 即1.9pg/μL。

3 讨论

实时荧光PCR技术作为一种高灵敏、高特异性的核酸检测手段, 相较于病原菌分离培养和显微镜观察方法快捷准确, 已在由真菌、细菌、病毒、线虫等引起植物病害的病原诊断和防治控制研究上得到了广泛应用。此外, 在研究植物病害的产生机理及发生规律时, 还能获知复杂环境中植物病原真菌数量动态变化, 为预防为主, 早期诊断和动态监测提供技术保障。

霉心病、黑心病、黑星病和轮纹烂果病是梨树易感的植物病害, 其中大多为真菌病害。梨黑斑病不仅影响香梨的产量和品质, 还会造成储藏期果损, 在香梨的进出口贸易中受到进口国的密切关注。2004年美国 and 加拿大以在我国出口鸭梨中检出黑斑病为由暂停中国鸭梨出口^[6]。目前对黑斑病的检测仅靠真菌病原菌传统鉴定方法, 耗时时间长、检测灵敏度低, 最近报道的常规PCR检测需要通过电泳分析也不能达到快速灵敏的效果, 因此有关该病原菌的快速、灵敏和准确的检测方法受到国内外普遍关注。

本研究建立的基于TaqMan实时荧光定量PCR技术快速检测梨黑斑病菌方法,使用了双荧光标记探针,扩增过程在一个闭管中进行,并同时设置阴性、阳性、空白对照及重复。通过对梯度稀释的标准品实时荧光反应建立标准曲线, R^2 为0.996,最低检测限为1.9pg/ μ L,结果表明该方法特异性好、荧光信号强、灵敏度高,减少了交叉污染,可为梨黑斑病的早期诊断、动态监测和防治控制提供一种稳定可靠的检测技术。

参考文献:

- [1] SIMMONS E G, ROBERTS R G. *Alternaria* themes and variations[J]. *Mycotaxon*, 1993, 48: 109-140.
- [2] 刘新伟, 陈岩, 宋福, 等. 我国梨和部分国外梨果实上链格孢菌的鉴定研究[J]. *植物检疫*, 2009, 23(5): 1-5.
- [3] ATSUNORI I, KAZUYA A, MIKIHIRO Y, et al. Endopolygalacturonase is essential for citrus black rot caused by *alternaria citri* but not brown spot caused by *Alternaria alternata*[J]. *The American Phytopathological Society*, 2001, 14(6): 749-757.
- [4] 李永才, 毕阳. 苹果梨黑斑病的发生及侵染过程[J]. *植物保护学报*, 2006, 33(2): 131-135.
- [5] OBA K, OGA K, URITANI I. Metabolism of ipomeamarone in sweet potato root slices before and after treatment with mercuric chloride or infection with *Ceratocystis fimbriata*[J]. *Phytochemistry*, 1982, 21(8): 1921-1925.
- [6] PRUSKY D, FUCHS Y, YANKO U. Assessment of latent infections as a basis for control of postharvest disease of mango[J]. *Plant Disease*, 1983, 67(7): 816-818.
- [7] 张志铭, 宋福, 孙淑贞, 等. 河北鸭梨黑斑病病原菌的鉴定[J]. *植物检疫*, 2003, 17(4): 212-214.
- [8] 刘芳, 高原, 张竞颐, 等. 北京地区非洲菊叶斑病病原菌鉴定[J]. *菌物学报*, 2010, 29(1): 22-25.
- [9] 王婷, 王生荣. 甘肃苜蓿斑点病的初步研究[J]. *草地学报*, 2010, 18(3): 372-377.
- [10] 杨晓平, 胡红菊, 王友平, 等. 梨黑斑病病原菌的生物学特性及其致病性观察[J]. *华中农业大学学报*, 2009, 28(6): 680-684.
- [11] SPIEGEL S, SCOTT S W, BOWMAN-VANCE V, et al. Improved detection of prunus necrotic ring spot virus by the polymerase chain reaction[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1996, 102(7): 681-685.
- [12] ROSNER A, MALESNIN L, SPIEGEL S. The use of short and long PCR products for improved detection of prunus necrotic ringspot virus in woody plants[J]. *Journal of Virological Methods*, 1997, 67(2): 135-141.
- [13] PEEVER T L, IBANEZ A, AKIMITSU K, et al. Worldwide phylogeography of the citrus brown spot pathogen, *Alternaria alternata*[J]. *Ecology and Population Biology*, 2002, 92(7): 794-802.
- [14] HELGUERA P R, TABORDA R, DOCAMPO D M, et al. Immunocapture reverse transcription polymerase chain reaction combined with nested PCR greatly increases the detection of *Prunus necrotic ringspot* virus in the peach[J]. *Journal of Virological Methods*, 2001, 95(1/2): 93-100.
- [15] 郑静, 张震, 姜华, 等. 稻曲病菌分生孢子实时PCR定量检测方法的建立及初步应用[J]. *中国水稻科学*, 2012, 26(4): 500-505.
- [16] 朱建裕, 黄秋霞, 高必达, 等. 建立基于TaqMan探针的李坏死环斑病毒实时荧光RT-PCR检测方法[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(8): 1295-1299.
- [17] PEEVER T L, SU G, CARPENTER-BOGGS L, et al. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species[J]. *Mycologia*, 2004, 96(1): 119-134.
- [18] 王宏. 梨黑斑病菌(*Alternaria alternata* Japanese pear pathotype)生物学特性及其生物-化学协同控制技术的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2006.