

欧美杨溃疡病菌 (*Brenneria quercina*) 实时 荧光 PCR 检测技术的建立

商靖¹, 李永², 郭利民³, 贺伟^{1*},

(1. 北京林业大学森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083; 2. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所, 北京 100091; 3. 河南濮阳林业科学院, 濮阳 457000)

摘要: 欧美杨溃疡病 (*Brenneria quercina*) 在病害发生初期不易被发现, 而一旦发生, 病害防治困难。因此, 病原菌的检测在病害防治中尤为重要。为了早期诊断病害和检测病原菌在寄主体内的动态变化, 利用 *Brenneria quercina* 全基因组测序结果, 根据 *flhD* 基因设计了一对特异性引物 BQflhD-up/BQflhD-dn, 应用常规 PCR 和荧光染料 SYBR Green I 的方法, 对 5 个欧美杨溃疡病病原细菌菌株 (N2-5, 4-4, A2210, A2213, A2223)、3 个与病原菌同种的模式菌株 (ATCC29281, LMG26264, LMG26267)、其它亲缘关系较近的 6 属 10 种细菌 11 个模式菌株、和分离自欧美杨的其他种类的 25 个菌株, 共 36 个细菌菌株进行了检测。结果表明, 该特异性引物能检测出 5 个欧美杨溃疡病菌株和 3 个与病原菌同种的模式菌株, 而其它参试菌株均无电泳条带也未收集到荧光信号, 显示出了该引物的特异性。成功建立了欧美杨溃疡病病菌的实时荧光 PCR 检测方法。

通过对不同浓度菌悬液的常规 PCR 和实时荧光 PCR 扩增, 发现实时荧光 PCR 检测灵敏度比常规 PCR 高约 100 倍, 能很好地避免假阴性结果。以接种但未显症的二年生欧美杨枝条提取 DNA 作为模板, 常规 PCR 方法能在接种第 7 天检测到该菌, 而实时荧光 PCR 则可在接种后第 3 天就检测到该菌的存在。

为了确定欧美杨 DNA 是否影响 *flhD* 基因重组质粒 DNA 的定量分析, 本研究将 50 ng 重组质粒 DNA 进行 5 次 10 倍梯度稀释, 分别加入到含有 50 ng 欧美杨基因组 DNA 的样品中, 使得病菌 DNA 和植物 DNA 含量的比值从 1 : 1 变化到 1 : 100000, 用 BQflhD-up/BQflhD-dn 对 DNA 混合样品进行 RTQ-PCR 分析。结果表明, 重组质粒 DNA 浓度与 Ct 值之间呈高度的相关性。因此, 即使在高浓度的欧美杨 DNA 存在的情况下, BQflhD-up/BQflhD-dn 仍具有较好的特异性和灵敏度。本研究可直接应用植物总 DNA 作为试验材料, 无需进行病原菌的分离培养及性状观察进行检测。由于采用光电传导系统和计算机操作系统能够很直观地反映出整个 PCR 过程各个反应阶段的信息, 而且不需要进行 PCR 产物的后续处理, 可以提高检测效率, 减少污染。

本研究还建立了欧美杨溃疡病菌的分子定量法，测定 *Brenneria quercina* 侵染欧美杨植株后不同时间的种群量及其变化。与细菌平板计数法相比，RTQ-PCR 法定量结果基本相近或略高 (≤ 10 倍)，变化趋势基本相似，在 28℃ 条件下，接种 3 d 的植株内已有菌量积累，但不显症；从接种 9 d 开始，细菌明显增加，植株显症并逐渐加重；接种 9~13d 菌量增加到峰值，并进入稳定平台期，植株显症严重。用 RTQ-PCR 分子定量法可以直接对欧美杨植株内的病原菌进行动态定量研究。

关键词： 欧美杨溃疡病，*Brenneria quercina*，检测，实时荧光 PCR