



BOR-20185906

AGL

!CAS

\*!NLM\* !OCLC

MELINDA SULLIVAN  
APHIS  
USDA/APHIS/PPQ/CPHST Suite 108  
2301 Research Blvd  
Ft Collins, CO 80526

ATTN: SUBMITTED: 2009-12-18 11:17:05  
PHONE: (970) 494-7518 PRINTED: 2010-01-06 16:23:19  
FAX: REQUEST NO.: BOR-20185906  
E-MAIL: SENT VIA: World Wide Web

PATRON TYPE: USDA

---

BOR Regular

---

TITLE: WEI SHENG WU XUE BAO  
VOLUME/ISSUE/PAGES: 43(5) 626-634  
DATE: 2003  
AUTHOR OF ARTICLE: Liao, X., Zhu, S., Zhao, W., Luo, K., and Qi, Y.  
TITLE OF ARTICLE: DETECTION AND IDENTIFICATION OF XANTHOMONAS  
ORYZAE PV. ORYZAE AND XANTHOMONAS ORYZAE PV.  
ORYZICOLA BY REAL-TIME FLUORESC

DELIVERY: E-mail Post to Web: melinda.j.sullivan@aphis.usda.gov

REPLY: E-mail: melinda.j.sullivan@aphis.usda.gov

This document contains 9 pages. This is NOT an invoice.  
Collection Services Branch, National Agricultural Library  
301-504-5717 access@nal.usda.gov

ANY MATERIAL SUPPLIED MAY BE PROTECTED BY COPYRIGHT LAW (TITLE 17, USC)

---

## 水稻白叶枯病菌和水稻细菌性条斑病菌的 实时荧光 PCR 快速检测鉴定

廖晓兰<sup>1</sup> 朱水芳<sup>2\*</sup> 赵文军<sup>2</sup> 罗宽<sup>1</sup> 漆艳香<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 湖南农业大学植物保护学院 长沙 410128)

(<sup>2</sup> 国家质检总局动植物检疫实验所 北京 100029)

**摘要:** 成功建立了水稻白叶枯菌与水稻细菌性条斑病菌快速检测鉴定的实时荧光 PCR 方法。根据含铁细胞接受子基因设计两菌的通用引物 PSRCF/PSRGR (扩增一个 152bp DNA 片段) 和特异性探针 (Baiprobe 和 Tiaoprobe), 并对 13 种细菌和 1 种植原体进行实时荧光 PCR。结果表明, 两个特异性探针能分别特异性检测到目标病原菌产生荧光信号而其它参考菌不产生荧光信号。检测的绝对灵敏度是 30.6fg/ $\mu$ L 质粒 DNA 和  $10^3$  CFU/mL 的菌悬浮液, 相当于 1 个细菌细胞的基因, 比常规 PCR 电泳检测高约 100 倍, 相对灵敏度为  $10^5$  CFU/mL。整个检测过程只需 2h, 完全闭管, 降低了污染的机会, 无需 PCR 后处理。用这两个特异性探针分别对自然感染白叶枯菌和条斑菌的叶片 DNA 提取液和种子浸泡液进行实时荧光 PCR, 结果均可特异性检测到目标菌的存在并完全可将两种病原菌区分开来, 且只需 0.3g 叶片和 10g 种子。

**关键词:** 水稻白叶枯菌, 水稻细菌性条斑菌, 实时荧光 PCR, 检测, 鉴定

**中图分类号:** S432.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2003) 05-0626-09

水稻白叶枯病是水稻上一种主要的细菌性病害, 最早于 1884 年在日本冈县发现, 现已在亚洲、非洲、美洲和澳大利亚等地均有发生, 是许多国家的检疫对象。该病在亚洲尤其在周年种植水稻的南亚和东南亚地区的危害最为严重。我国大部分地区均有发生, 一般减产 10% ~ 30%, 严重可达 50% 以上。水稻细菌性条斑病亦是水稻一种重要的细菌性病害, 在亚洲广泛分布。在我国部分地区此病发生严重, 一般发病轻的减产 5% ~ 10%, 严重发病可减产 20% 以上, 是我国内检对象。目前细菌性病害在农业上还没有有效的防治方法, 并且种子带菌是两病重要的初侵染来源与传播途径, 因此及早检测发现种子上的病原菌及无症状病害, 对于预防及采取相应措施加以防治, 指导生产, 减少经济损失, 有着重要的意义。

水稻白叶枯病的病原为 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, 水稻细菌性条斑病的病原为 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, 为黄单胞菌属细菌同一种下的不同变种。目前, 对于这两种病原检测鉴定的主要依据是其症状特点、寄主范围、致病性、血清学反应、形态、培养、生理生化特性等。这些方法费时费力, 需要对病原进行分离纯化, 往往因为样品带菌少和分离纯化过程复杂等而失败, 从而造成漏检及病菌的扩散。因此生产上迫切需要建立快速、简单、灵敏、准确的检测鉴定这两种病菌的方法。

基金项目: 国家质检总局病原检测专项 (Z2000-3-128)

\* 通讯作者。Tel/Fax: 86-10-64912744; E-mail: zhshf@sina.com.cn

作者简介: 廖晓兰 (1962-), 女, 湖南常德人, 教授, 博士, 主要从事植物病原分子生物学研究。

收稿日期: 2002-12-13, 修回日期: 2003-07-03

10411771M



RETURN this loan to: CAS  
2540 Qiantang River Rd.  
P.O. Box 3012, Columbus, OH 43210-0012

近年来,PCR 技术用于水稻白叶枯病菌的检测已有许多报道<sup>[1-4]</sup>,但这些方法仍无法直接区分鉴别水稻白叶枯病菌与水稻细菌性条斑病菌这两种病原。并且所采用的普通 PCR 过程复杂,需要 PCR 后处理,易造成污染和假阳性,涉及溴化乙锭等对人体有害物质。实时荧光 PCR 是国际上最近几年发展起来的新技术,目前已开始被国内外医学研究者、质检部门应用于病原体检测、遗传病的诊断以及转基因产品的检测等<sup>[5-7]</sup>。将该技术用于植物病原细菌的检测鉴定国外仅报道了对 *Clavibacter sepedonicus*<sup>[8]</sup>, *Ralstonia solanacearum*<sup>[9]</sup>, *Agrobacterium strains*<sup>[10]</sup>, *Xylella fastidiosa*<sup>[11]</sup>, *Acidovorax avenae*<sup>[12]</sup> 等几种细菌的实时荧光 PCR 检测。本研究室已有一些用 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测鉴定植原体的相关报道<sup>[13]</sup>。实时荧光 PCR 是在普通 PCR 方法的基础上,加入了一条荧光标记的探针,利用荧光信号积累,实时监控整个 PCR 过程<sup>[13]</sup>。由于该方法使用了荧光探针,从而提高了检测的准确性和灵敏度,又由于整个过程无需对 PCR 产物进行后期处理,可以有效防止检测过程中的污染和假阳性,同时边扩增边检测,提高了检测速度,因此,实时荧光 PCR 法目前被认为是植物病原鉴定和病害诊断的革命性方式,将很快成为植物病害诊断的标准方法<sup>[14]</sup>。本研究的目的是建立水稻白叶枯病菌与水稻细菌性条斑病菌的实时荧光 PCR 快速检测鉴定方法,为农业和植物检疫部门提供可靠的技术支持和科学保障。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:**水稻白叶枯菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、水稻细菌性条斑菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*)、甘兰黑腐菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*)、柑桔溃疡菌 (*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *syringae*)、香蕉细菌性枯萎菌 (*Burkholderia solanacearum*)、胡萝卜软腐菌 (*Erwinia carotovora* pv. *carotovora*)、玉米细菌性枯萎菌 (*Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*)、根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、马铃薯环腐菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedoniensis*)、苜蓿细菌性萎蔫菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus*)、菜豆细菌性萎蔫菌 (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*)，均由动植物检疫实验所提供；泡桐丛枝植原体 (*Paulownia witches'-broom phytoplasma*) DNA 由中国林业科学院田国忠博士提供的病株提取，并克隆测序鉴定 (GenBank 登录号为 AY192577)；柑桔黄龙病原体 (*Liberobacter asiaticum*) DNA 是从福建厦门采集的柚子树病叶提取，并克隆测序鉴定 (该核苷酸序列已被 GenBank 收录，登录号为 AY192576)。

**1.1.2 植物样品和种子:**健康的种子及植株于 2002 年 8 月采自湖南长沙县星沙镇大田；自然感染细菌性条斑病菌的种子及病植株于 2002 年 8 月采自湖南邵阳县大田；白叶枯病菌病叶由湖南农业大学植物病理教研室提供干燥标本；感染白叶枯病菌的种子由人工接种发病后于 2002 年 10 月采集，由湖南省农业科学院水稻研究所提供。

**1.1.3 仪器和试剂:**PTC200 PCR 扩增仪 (JM Research)，ABI PRISM 7700 扩增仪 (PE 公司)，ALPHA 5500 型凝胶扫描仪 (Alpha Innotech 公司)，Beckman 紫外分光光度计 (Beckman)，Biofuge 28 RS 型台式冷冻离心机 (Beckman)。

Taq DNA 聚合酶、尿嘧啶 DNA-糖苷酶 (UNG 酶)、dNTP、PCR 缓冲液和 2.5 mol/L MgCl<sub>2</sub>

购自 Promega 公司;pMD18-T载体购自宝生物工程(大连)有限公司;引物由北京赛百盛基因技术公司合成;探针由上海申友生物技术有限责任公司合成。

### 1.2 实时荧光 PCR DNA 模板的制备

根据文献[15]进行细菌基因组 DNA 的提取。按照 CTAB 抽提法提取植物总 DNA<sup>[16]</sup>。

种子在 0.01% Tween 20 溶液中 4℃ 过夜<sup>[17]</sup>,浸泡液直接作模板或 16000r/min 4℃ 离心 20min,沉淀用灭菌双蒸水 10 $\mu$ L 溶解,取 1 $\mu$ L 悬浮液作模板进行实时荧光 PCR。

### 1.3 引物与探针的设计和合成

引物 PSRGF (5'-GAATATCAGCATCGGCAACAG-3') 和 PSRGR (5'-TACCGGAGCTGCGGTT-3')从 GenBank 水稻白叶枯菌和条斑菌的含铁细胞接受子基因(Putative siderophore receptor gene cds)的保守序列获得。预期 PCR 产物为 152bp。在引物对扩增片段区间找出白叶枯菌和条斑菌稳定性点突变区,应用引物和探针设计软件 Primer 5.0 设计白叶枯菌和条斑菌特异探针 Baiprobe(5'-CATCGCCTGCTCGGCTACCAGC-3')和 Tiaoprobe(5'-CATCGCCTGCTTGCTATCAGCC-3')(探针已申请专利<sup>[18]</sup>)。探针采用化学合成标记方法,5'端标记荧光染料为 6'-Carboxyfluorescein(FAM),3'端标记淬灭荧光染料为 Tetramethylrhodamine(TAMRA)。

### 1.4 实时荧光 PCR 检测

反应体系:10 $\times$  PCR 缓冲液 2.5 $\mu$ L, 25mmol/L MgCl<sub>2</sub> 5 $\mu$ L, 10mmol/L dATP、dUTP、dGTP、dCTP 各 0.5 $\mu$ L, 20 $\mu$ mol/L 引物各 0.5 $\mu$ L, 20 $\mu$ mol/L 探针 1 $\mu$ L, 1U/ $\mu$ L UNG 酶 0.15 $\mu$ L, 5U/ $\mu$ L Taq DNA 聚合酶 0.5 $\mu$ L, 模板 DNA 1 $\mu$ L, 加灭菌双蒸水使总体积为 25 $\mu$ L。

样品检测:将样品放入 ABI PRISM 7700 96 孔反应板上打开 Sequence Detection 1.71, 设置 PCR 反应条件,第一个循环为 50℃ 2min, 95℃ 10min;后 40 个循环为 94℃ 15s, 68℃ 1min。点击运行,进行 PCR 反应,1h 56min 反应结束,保存文件,打开分析软件,仪器自动分析试验结果。给出  $\Delta R_n$  (第 n 个循环时的荧光信号增加值)与循环数图象。

### 1.5 PCR 扩增产物的克隆和序列测定

以白叶枯菌和条斑菌基因组 DNA 为模板,用引物对 PSRGF/PSRGR 进行普通 PCR,得到 152bp 的 PCR 产物。纯化后连接到 pMD18-T 载体上,转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,获得阳性菌落,提纯含目的 DNA 片段的质粒,上海基康生物技术有限公司进行测序。

## 2 结果和分析

### 2.1 白叶枯菌探针(Baiprobe)和条斑菌探针(Tiaoprobe)的特异性

用 Baiprobe 与 Tiaoprobe 对 13 种细菌和 1 种植原体参考菌进行实时荧光 PCR 检测,结果 Baiprobe 仅观察到白叶枯菌产生荧光增加曲线, Tiaoprobe 仅观察到条斑菌产生荧光增长曲线,而其它 14 种参考菌及水对照没有荧光增加信号。表明 Baiprobe 和 Tiaoprobe 特异性强,它可将其与其它细菌及植原体区分开来。这对于今后快速诊断白叶枯菌和条斑菌具有实用价值。根据所设计的白叶枯菌和条斑菌共用引物 PSRGF/PSRGR,进行 PCR 扩增(图 1),在 152bp 位置仅有 *X. oryzae* pv. *oryzae*, *X. oryzae* pv. *oryzicola*, *X. campestris* pv. *campestris* 和 *X. axonopodis* pv. *citri* 4 种黄单胞菌属的细菌有扩增带,其它参考细菌和植原体及水对照无扩增带出现。进一步表明 Baiprobe 和 Tiaoprobe 具有很强的特异性,尽管引

物可把同属的非特异性模板扩增出来,但如果探针不能与模板特异性的结合,在实时荧光 PCR 仪上就不能观察到荧光增长信号。

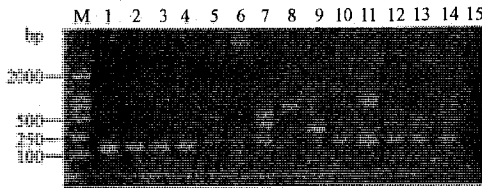


图1 实时荧光 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳检测图

Fig.1 Agarose gel electrophoretic of real time fluorescent PCR products

1. *X. oryzae* pv. *oryzae*; 2. *X. oryzae* pv. *oryzicola*; 3. *X. campestris* pv. *campestris*; 4. *X. axonopodis* pv. *citri*;
5. *P. syringae* pv. *syringae*; 6. *B. solanacearum*; 7. *E. carotovora* pv. *carotovora*; 8. *P. stewartii* subsp. *stewartii*;
9. *A. tumefaciens*; 10. *C. michiganensis* subsp. *sepedonians*; 11. *C. michiganensis* subsp. *insidiosus*;
12. *C. stewartii* pv. *flaccumfaciens*; 13. Paulownia witches'-broom phytoplasma; 14. *L. asiaticum*; 15. CK; M. DNA Marker.

### 2.2 PCR 扩增产物克隆和测序

白叶枯菌和条斑菌克隆测序结果显示,所克隆的片段序列长为 152bp,与 GenBank 中白叶枯和条斑菌的序列具有 100% 的同源性,从而证明所获得的重组质粒与实验结果的准确性,质粒可作为检测白叶枯菌和条斑菌时的阳性对照。

### 2.3 实时荧光 PCR 扩增的绝对灵敏度

将纯化的白叶枯菌质粒 DNA 稀释得到 306ng/μL (Beckman 紫外分光光度计测得)、30.6ng/μL、3.06ng/μL、306pg/μL、30.6pg/μL、3.06pg/μL、306fg/μL、30.6fg/μL 和 3.06fg/μL 等 9 个样品,分别加入到含有引物对 PSRCF/PSRCR 和 Baiprobe 的反应体系中,进行实时荧光 PCR。其检测到的稀释限点为 30.6fg/μL (图 2)。从图中还可观察到并不是模板浓度越高,扩增效率就越高,太高浓度的模板对 PCR 反应可产生干扰作用,使扩增效率降低,浓度为 3.06ng/μL 时  $\Delta R_n$  最高。将扩增产物作琼脂糖凝胶电泳观察 (图 3),可观察到明显的浓度梯度谱带,其可观察到的稀释限点为 3.06pg/μL。表明实时荧光 PCR 直接观察的灵敏度较普通 PCR 通过琼脂糖凝胶电泳观察的灵敏度高 100 倍。根据 Bak 等<sup>[19]</sup> 的假设, *X. oryzae* pv. *oryzae* 基因组的大小相当于 *P. fluorescens* 基因组的大小,为  $7.4 \times 10^3$  kb,实时荧光 PCR 检测的稀释限点 30.6fg/μL 质粒 DNA 大约代表 1 个细胞。

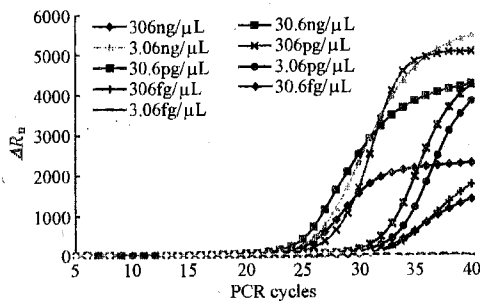


图2 实时荧光 PCR 检测的灵敏度

Fig.2 Sensitivity of real time fluorescent PCR method

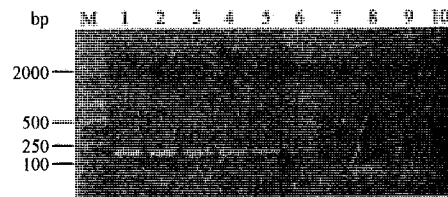


图3 实时荧光 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳检测的灵敏度

Fig.3 Sensitivity of agarose gel electrophoretic of real time fluorescent PCR products

1. 306ng/μL; 2. 30.6ng/μL; 3. 3.06ng/μL; 4. 306pg/μL;
5. 30.6pg/μL; 6. 3.06pg/μL; 7. 306fg/μL; 8. 30.6fg/μL;
9. 3.06fg/μL; 10. CK; M. DNA Marker.

1089324  
: AGRICU  
06-1-134  
AVE  
705-2326

10mon

27/201

将浓度为  $10^9$  CFU/mL (Beckman 紫外分光光度计测得) 的纯培养的白叶枯菌悬浮液以 10 倍梯度稀释 8 次, 取  $10\mu\text{L}$  悬浮液在 LB 琼脂培养皿上涂布, 放入  $28^\circ\text{C}$  温箱中培养 72h, 结果显示培养皿在稀释浓度为  $10^3$  CFU/mL 的培养皿中有 2 个菌落,  $10^4$  CFU/mL 的培养皿中有 31 个菌落, 而在  $10^5$  CFU/mL 时有 199 个菌落,  $10^6$  CFU/mL 时其菌落数无法统计 (图 4)。

同时将成倍稀释的悬浮液各取  $5\mu\text{L}$  直接进行实时荧光 PCR, 结果表明 (图 5), 在稀释浓度为  $10^3$  CFU/mL 时 ( $5\mu\text{L}$  模板中仅含 1 个细菌) 仍可检测到荧光信号增加值, 即只要反应体系中有 1 个细菌实时荧光 PCR 就可检测得到, 与上述质粒检测的灵敏度一致。从图中还可看到, 由于模板浓度极低 (最低为 1 个细菌), 所以可观察到的荧光信号增加值  $\Delta R_n$  也较一般实时荧光 PCR 所得  $\Delta R_n$  低, 其最高  $\Delta R_n$  仅为 300。

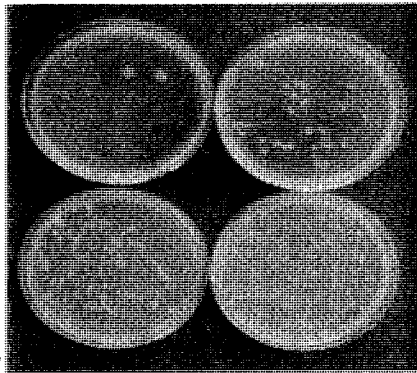


图 4 不同稀释浓度的白叶枯菌纯培养

Fig.4 Pure cultured of *X. oryzae oryzae* at different diluted concentration

1.  $10^3$  CFU/mL; 2.  $10^4$  CFU/mL;
3.  $10^5$  CFU/mL; 4.  $10^6$  CFU/mL.

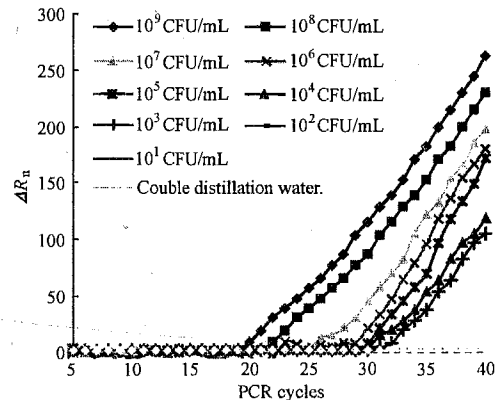


图 5 白叶枯菌的纯培养悬浮液不同稀释浓度实时荧光 PCR 检测图

Fig.5 Real time fluorescent PCR assay of *X. oryzae oryzae*'s suspension of pure culture at the different diluted concentration

#### 2.4 实时荧光 PCR 检测的相对灵敏度

取浓度为  $10^9$  CFU/mL 纯培养的白叶枯菌 10 倍梯度稀释悬浮液各 2mL, 分别加入到含 20 粒健康水稻种子的离心管中,  $4^\circ\text{C}$  浸泡过夜, 取  $5\mu\text{L}$  浸泡液作模板, 进行实时荧光 PCR, 结果表明可观察到荧光增加信号的最低细菌浓度为  $10^5$  CFU/mL, 较 DNA 和细菌纯培养检测灵敏度降低 100 倍, 这可能是由于种子浸泡液中一些干扰物质影响所造成的。

#### 2.5 实时荧光 PCR 对自然感病水稻叶片的检测

以水稻健株叶作阴性对照, 克隆质粒作阳性对照, 用探针 Baiprobe 和 Tiaoprobe 分别对白叶枯病叶和条斑病叶的 DNA 提取液进行实时荧光 PCR, 结果表明 Baiprobe 仅能检测到白叶枯病叶及白叶枯菌质粒产生增加信号, Tiaoprobe 仅能检测到条斑病叶及条斑菌质粒产生荧光增加信号, 而其健叶与水对照均无荧光信号, 进一步证实两个探针的特异性。

#### 2.6 实时荧光 PCR 对自然感病水稻种子的检测

实时荧光 PCR 对自然感病水稻种子的检测结果见表 1。50g 以上感病种子不管是直

接还是离心都能检测得到病原菌的存在,5g 以下检测结果不稳定。本试验最低检测得到病原菌的种子量为 10g,在此量下,离心后能稳定地检测到病原菌的存在。

表 1 实时荧光 PCR 对自然感病水稻种子的检测

Table 1 Naturally infected rice seeds detected by real time fluorescent PCR

| Seeds  | Weight/g | Volume/mL<br>0.01% Tween 20 | Templates           | Baiprobe<br>detection | Taiprobe<br>detection |
|--|----------|-----------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Healthy  | 250      | 375                         | Direction           | -                     | -                     |
|  |          |                             | After centrifugence | -                     | -                     |
|  | 50       | 75                          | Direction           | -                     | -                     |
|  |          |                             | After centrifugence | -                     | -                     |
|  | 10       | 15                          | Direction           | -                     | -                     |
|  |          |                             | After centrifugence | -                     | -                     |
|  | 5        | 7.5                         | Direction           | -                     | -                     |
|  |          |                             | After centrifugence | -                     | -                     |
| Infected by<br><i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>    | 250      | 375                         | Direction           | +                     | -                     |
|  |          |                             | After centrifugence | +                     | -                     |
|  | 50       | 75                          | Direction           | +                     | -                     |
|  |          |                             | After centrifugence | +                     | -                     |
|  | 10       | 15                          | Direction           | -                     | -                     |
|  |          |                             | After centrifugence | +                     | -                     |
|  | 5        | 7.5                         | Direction           | -                     | -                     |
|  |          |                             | After centrifugence | ±                     | -                     |
| Infected by<br><i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> | 250      | 375                         | Direction           | -                     | +                     |
|  |          |                             | After centrifugence | -                     | +                     |
|  | 50       | 75                          | Direction           | -                     | +                     |
|  |          |                             | After centrifugence | -                     | +                     |
|  | 10       | 15                          | Direction           | -                     | -                     |
|  |          |                             | After centrifugence | -                     | +                     |
|  | 5        | 7.5                         | Direction           | -                     | -                     |
|  |          |                             | After centrifugence | -                     | ±                     |

+ : Positive; - : Negative; ± : Varieties.

### 3 讨论

在植物病原细菌的分子诊断中,常被选用的靶基因有 16S rRNA 基因(16S rDNA)、23S rRNA 基因(23S rDNA)、16S~23S rRNA 间区、IS1113 插入序列等。因此我们分别对水稻白叶枯菌和水稻细菌性条斑病菌的 16S rDNA,16S-23S rRNA 间区,IS1113 插入序列进行了克

隆基因的测序,结果表明两菌的这些基因完全相同,用这些基因根本无法对这两个亲缘关系密切的变种进行检测鉴定。因此根据含铁细胞接受子基因序列中两菌的差异性设计了两种特异性探针。研究表明,用含铁细胞接受子基因作为靶基因,通过实时荧光 PCR 法可对亲缘关系密切的水稻白叶枯菌和水稻细菌性条斑病菌进行检测及鉴定区分,是一种简单、灵敏、可靠的基因鉴别诊断方法。在农业生产、种子流通和种子检验检疫中有重大意义。

本试验在国际国内首次根据含铁细胞接受子基因设计并合成了水稻白叶枯病菌和水稻条斑病菌特异性探针,并将实时荧光 PCR 技术应用于该两种病原的检测鉴定。并可直接从种子浸泡液中检测到病原菌,不需进行病原体的分离纯化,也不需进行 DNA 的抽提,无需 PCR 后处理,无需对 PCR 产物进行电泳鉴定,整个检测过程只需 2h。在检验检疫中具有广阔的应用前景。

研究表明,实时荧光 PCR 技术能被用于检测水稻种子上和植株上的白叶枯菌和条斑菌,其成功检测的前提是探针的特异性和灵敏性要好。在本研究中,引物虽然能把黄单胞菌属的细菌扩增出来,但探针却不能与目的片段以外的任何其它参考菌结合,表现高度的特异性。根据稀释梯度探针检测水平是在  $10^3$  CFU/mL 细菌纯培养,即 25 $\mu$ L 反应体系中只要有一个细菌就可检测到,灵敏度是 30.6fg/ $\mu$ L 质粒 DNA,相对灵敏度为  $10^5$  CFU/mL。这与 Weller 等<sup>[9]</sup>使用 TaqMan 探针,在 7700 扩增仪上,对 *R. Solanacearum* 进行实时荧光 PCR 检测所获得的绝对灵敏度为 100CFU/mL 的细菌纯培养和相对浓度为  $10^5$ - $10^6$  CFU/mL 的结果基本一致。我们所检测到的绝对灵敏度比 Weller 等检测到的相差 10 倍,这可能是由于所合成的探针本底荧光值太高所造成的。

本研究中种子带菌的定量研究结果,如:相对灵敏度为  $10^5$  CFU/mL,即每 mL 种子浸泡液中只要含有  $10^5$  个活细菌就可检测到;自然感病的水稻种子只需 10g 就可检测到病原菌的存在等,是我们用多份受感植株和种子进行多次重复实验的结果。但要使种子带菌的定量检测规范化和标准化,还有待进一步完善和研究。

### 参 考 文 献

- [1] Cottyn B, Bautista A T, Nelson R J, et al. Polymerase chain reaction amplification of DNA from bacterial pathogens of rice using specific oligonucleotide primers. *Int Rice Notes*, 1994, **19**: 30 ~ 32.
- [2] Gnanamanickam S S, Sakthivel N, Nelson R J, et al. Evaluation of Culture Media and Molecular Probes for Detection of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* in Rice. In: Verma J P, Varma A, KUMAR D. ed. *Detection of Plant Pathogens and Their Management*. New Delhi: Angkor Publishers, 1995. 336 ~ 349.
- [3] George M L C, Cruz W T, Nelson R J. DNA fingerprinting of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* by ligation-mediated polymerase chain reaction. *Int Rice Res Notes*, 1994, **19**: 29 ~ 30.
- [4] Sakthivel N, Mortensen C N, Mathor S B. Detection of *Xanthomonas oryzae pv. oryzae* in artificially inoculated and naturally infected rice seeds and plants by molecular techniques. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, **56**: 435 ~ 442.
- [5] Makino S L, Cheun H L, Watara M, et al. Detection of anthrax spores from the air by real-time PCR. *Let Appl Microbiol*, 2001, **33**: 237 ~ 240.
- [6] 江晓玲,李明,徐伟文,等. 恶性疾病原虫荧光定量聚合酶链反应检测. *中华医学检验杂志*, 2000, **23**(2): 71 ~ 73.
- [7] 黄文胜,马荣群,林祥梅,等. 利用 TaqMan 探针实时定量检测转基因大豆. *植物病理学报*, 2001, **31**(3): 73 ~ 79.



- [8] Schaad N W, Berthier-Schaad Y, Sechler A. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in potato tubers by BIO-PCR and automated real-time fluorescence detection system. *Plant Dis*, 1999, **83**:1095 ~ 1100.
- [9] Weller S A, Elphinstone J G, Smith N. Detection of *Ralstonia solanacearum* from potato tissue by post enriched TaqMan™ PCR, *Bull OEPP (Organ Eur Mediterr Prot Plant)*, 2000, **33**:381 ~ 383.
- [10] Weller S A, Stead D E. Detection of root rot associated *Agrobacterium* strains from plant material and other sample types by post-enrichment TaqMan PCR. *J Appl Microbiol* 2002, **92**:118 ~ 126.
- [11] Schaad N W, Opgenorth D, Gansh P. Real-time PCR for one-hour on-site diagnosis of Pierce's disease of grape in early season asymptomatic vines. *Phytopathology* 2002, **92**:721 ~ 728.
- [12] Schaad N W, Song W Y, Hatziloukas E. PCR primers for detection of plant pathogenic species and subspecies of *Acidovorax*. *United States Patent*, 2000, **6**:146 ~ 834.
- [13] 廖晓兰, 朱水芳, 陈红运, 等. 植原体 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测鉴定方法的建立. *植物病理学报*, 2002, **32** (4):361 ~ 367.
- [14] Schaad N W, Frederick R D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics. *Can J Plant Pathol*, 2002, **24**:250 ~ 258.
- [15] 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 RE(美), 等. 精编分子生物学实验指南. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998. 78 ~ 79.
- [16] Gachet E, Martin G G. Detection of genetically modified organism (GMO) by PCR: a brief review of methodologies available. *Trends in Food Science and Technology*, 1999, **9**:380 ~ 388.
- [17] Schaad N W, Cheong S S, Tamaki S, et al. A combined biological and enzymatic amplification technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seed extracts. *Phytopathology*, 1995, **85**:243 ~ 248.
- [18] 朱水芳, 廖晓兰, 赵文军, 等. 应用于水稻白叶枯病菌检测的探针和引物序列. 专利申请号: 03105358.0. 中华人民共和国国家知识产权局. 2003, 2(26).
- [19] Bak A L, Christiansen C, Stenderup N. Bacterial genome sizes determined by DNA denaturation studies. *J Gen Microbiol*, 1970, **64**:337 ~ 380.

### Detection and Identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* by Real-time Fluorescent PCR

Liao Xiaolan<sup>1</sup> Zhu Shuifang<sup>2\*</sup> Zhao Wenjun<sup>2</sup> Luo Kuan<sup>1</sup> Qi Yanxiang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Plant Protection, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China)

(<sup>2</sup> Animal and Plant Quarantine Institute, Beijing 100029, China)

**Abstract:** A novel and sensitive real time PCR was developed to detection *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, which cause the bacteria leaf blight (BLB) and leaf streak respectively, Universal and specific TaqMan probes, which were designed based on the sequence of Putative siderophore receptor gene cds were used to detect 13 bacteria and one phyto-plasmas, only in *X. oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola*, fluorescent signal can be collected with their specific probes respectively. The level of detection of the probe was 30.6fg plasmid, roughly equaling to one cell and 100 times sensitive than PCR gel electrophoresis detection. *X. oryzae* pv. *oryzae* and *X. oryzae* pv. *oryzicola* were detected from seed washes and DNA extract-

ed from the seed washes of naturally infected seeds and infected leaves as small as 10g naturally infected seeds or 0.3g leaf. This method is little time consumption (only 2h) and without contamination from PCR product.

**Key words:** *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, Real time PCR, Detection, Identification

Foundation item: AQSIQ Special Foundation for Plant Pathogen Detection(Z2000-3-128)

\* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-64912744; E-mail: zhshf@sina.com.cn

Received date: 12-13-2002

### 2002年《微生物学报》审稿专家名单

2002年以下专家为本刊审阅过稿件,在此表示衷心地感谢!(按姓氏汉语拼音排序)

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 白逢彦 | 鲍时翔 | 蔡文启 | 陈冠军 | 陈洪章 | 陈剑平 | 陈民钧 | 陈润生 | 陈三凤 | 陈文新 |
| 陈新文 | 陈永青 | 程光胜 | 程元荣 | 丁 鉴 | 丁久元 | 丁清泉 | 东秀珠 | 樊美珍 | 方 勤 |
| 高培基 | 葛 诚 | 龚建华 | 龚祖坝 | 郭 俊 | 郭三堆 | 郭顺星 | 郭志儒 | 韩文瑜 | 何忠效 |
| 赫荣乔 | 洪 健 | 胡福泉 | 胡丰林 | 胡学智 | 胡远扬 | 还连栋 | 黄大昉 | 黄 力 | 黄秀梨 |
| 黄耀焯 | 江 宁 | 姜文侠 | 蒋立科 | 荆玉祥 | 焦瑞身 | 柯家骏 | 孔显良 | 孔宪刚 | 雷肇祖 |
| 李电东 | 李阜棣 | 李季伦 | 李琦涵 | 李 钦 | 李若瑜 | 李顺鹏 | 李育阳 | 李 元 | 李增智 |
| 廖延雄 | 梁宗琦 | 林 敏 | 林稚兰 | 刘华珍 | 刘双江 | 刘杏忠 | 刘秀梵 | 刘志恒 | 刘志敏 |
| 刘志培 | 娄无忌 | 陆承平 | 陆德如 | 罗信昌 | 马清钧 | 闵 航 | 潘兹书 | 彭珍荣 | 钱世钧 |
| 钱新民 | 邱并生 | 曲音波 | 茹炳根 | 邵宗泽 | 沈 萍 | 盛 军 | 施巧琴 | 苏国富 | 孙君社 |
| 孙 明 | 孙志浩 | 孙忠富 | 谭华荣 | 唐国敏 | 唐 宏 | 田杰生 | 涂长春 | 汪洪刚 | 王敖全 |
| 王 东 | 王金生 | 王惠莲 | 王 平 | 王以光 | 王用楫 | 王有智 | 王正祥 | 吴克刚 | 吴 润 |
| 夏春谷 | 夏桂先 | 向 华 | 肖 天 | 谢 红 | 邢来君 | 徐 冲 | 徐德强 | 徐冠珠 | 徐 虹 |
| 徐建国 | 许建和 | 许周善 | 杨海花 | 杨建民 | 杨廉婉 | 杨寿钧 | 杨苏声 | 杨蕴刘 | 姚 斌 |
| 于嘉林 | 余泽华 | 喻子牛 | 袁 生 | 袁正宏 | 袁志明 | 袁中一 | 张博润 | 张楚瑜 | 张惠展 |
| 张建中 | 张 杰 | 张素琴 | 张小青 | 张渝英 | 张 正 | 章克昌 | 郑 平 | 赵大健 | 赵乃昕 |
| 郑天凌 | 钟耀明 | 周俊初 | 周培瑾 | 周雪平 | 邹国林 | 朱宝泉 | 朱关福 | 朱厚础 | 朱圣庚 |
| 朱玉贤 | 庄玉辉 | 诸葛健 |     |     |     |     |     |     |     |

RETURN this loan to: CAS  
2540 Qiantang River Rd.  
P.O. Box 2012; Columbus, OH 43210-0012