

马铃薯土传病原菌快速检测方法的比较分析及其应用

李 磊 赵昱榕 谢学文 石延霞 柴阿丽 李宝聚*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 马铃薯土传病害日益严重, 对病原菌进行快速检测是病害早期诊断、预测监控、综合防治的重要基础。本文综合比较了普通 PCR、巢式 PCR、实时荧光定量 PCR、多重 PCR 和环介导等温扩增技术 (LAMP) 在灵敏度和特异性等方面的特点, 以及在检测马铃薯土传病害时的优缺点; 总结了各病害检测报道的引物信息和检测体系的优势。同时, 对各技术的应用前景进行展望, 旨在对马铃薯土传病害的快速检测方法及其发展趋势有一个全面的了解。

关键词: 马铃薯土传病害; 快速检测; PCR; 灵敏度; 特异性; 综述

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是世界第四大粮食作物, 仅次于小麦、水稻和玉米 (黄强 等, 2019)。我国是马铃薯生产大国, 种植面积和总产量均居世界首位, 但随着马铃薯种植面积不断扩大, 不及时轮作倒茬, 加之种植区间的频繁调种, 使马铃薯土传病害日益严重 (安小敏 等, 2017; 吕镇城 等, 2018)。

马铃薯疮痂病、粉痂病、晚疫病、黑痣病、黑胫病和环腐病等是常见的马铃薯土传病害, 病害严重时可造成马铃薯大幅度减产, 病害较轻时也会影响马铃薯品质, 带病种薯为主要传播途径, 环腐病等诸多病害也被列为进出口植物检疫对象 (何云霞 等, 2004)。马铃薯土传病害易感地区的管理策略和预测系统取决于该地区病原体的早期诊断和检测, 因此建立快速、准确、灵敏的土传病害检测方法, 对于控制病害传播和及时防治有重要意义 (Khan et al, 2017)。

李磊, 男, 博士, 副研究员, 专业方向: 蔬菜病害生物防治, E-mail: lilei01@caas.cn

* 通讯作者 (Corresponding author): 李宝聚, 男, 博士, 研究员, 专业方向: 蔬菜病害综合防治, E-mail: libaoju@caas.cn

收稿日期: 2019-12-02; 接受日期: 2020-04-29

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2018YFD020080703), 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS), 农业农村部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

1 马铃薯土传病害快速检测技术研究的意义

传统的病原菌检测主要包括病原学检测 (革兰氏染色法、形态结构观察法、指示植物接种鉴定法) 和免疫学检测 (乳胶凝集试验、酶联免疫吸附测定法、荧光免疫检测法) 等 (Mancini et al., 2016)。由于病原学检测耗时长、敏感性低、需投入大量人力物力, 对经典分类学要求极高等, 已不适用于病害的快速检测 (Goud & Termorshuizen, 2003)。免疫学检测由于个体差异导致抗原抗体的产生量、出现时间、消退能力不同, 容易出现假阳性和假阴性结果 (李婷和杨坤, 2018)。随着分子生物学的发展, 以聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 和等温扩增技术 (isothermal amplification technology, LAMP) 为代表的核酸扩增技术已越来越多地应用于病原菌检测中, 但都不同程度地存在缺陷。因此, 开发快速、灵敏、准确、便捷的检测技术对马铃薯土传病害的检测具有极为重要的意义。本文对现阶段广泛应用于马铃薯土传病害的检测技术进行比较分析, 并展望了其应用前景。

2 马铃薯土传病害快速检测方法

2.1 普通 PCR

普通 PCR 是检测马铃薯土传病害的常规手

段, 目前主要以 16S rDNA、ITS 序列或其他基因为模板设计特异引物进行 PCR 扩增。普通 PCR 虽然检测速度快、成本低, 但灵敏度较低, 只能定性检测, 仅对显症马铃薯薯块具有很好的鉴定效果。

由于马铃薯土传病害的侵染具有潜伏性, 很多薯块虽然带菌但不呈现症状, 而且病原物在薯块中分布不均匀, 会导致普通 PCR 检测出现一定假阴性。常用于马铃薯土传病害普通 PCR 检测的引物信息

表 1 马铃薯土传病害普通 PCR 检测引物信息

检测病害	引物名称	引物序列 (5'-3')	目标基因	PCR 产物大小/bp	参考文献
马铃薯	Rs1F2	TTGGTTGTAGCTGGTCTATTT	ITS	500	Lees et al., 2002
黑痣病	Rs2R1	TATCACGCTGAGTGGAACCA			
马铃薯	Sps1	CCTGGGTGCGATTGTCTGTT	ITS	391	Bell et al., 1999
粉痂病	Sps2	CACGCCAATGGTTAGAGACG			
	SsF	GTCGGTTCTACCGGCAGACC	ITS	434	Qu et al., 2006
	SsR	GCACGCCAATGGTTAGAGACG			
马铃薯	HF5-1	CCGACTCTGGGATAACTG	16S rDNA	541	魏琪 等, 2010
环腐病	HF3-1	ATTCCACCGCTACACCAG			
马铃薯	Stx1a	GTGGACCGTGGAGCATCT	<i>txtAB</i> 毒素合成基因	402	González et al., 2008
疮痂病	Stx1b	CAGTTCGGCGTAACTCAGC			
	primerB (L)	GACGCCGCTCCCCTGCTGGTTCTG	<i>txtA</i> 、 <i>txtB</i> 、 <i>txtC</i> (<i>P450</i>)、 <i>txtD</i>	—	郭凤柳 等, 2013
	primerB (R)	TTCTGGGAGGCCGGGAGGTTGTG	(<i>nos</i>) 毒素合成基因		
马铃薯	O8-3	GAAAGGCATAGAAGGTAGA	—	258	Judelson & Tooley, 2000
晚疫病	O8-4	TAACCGACCAAGTAGTAAA			

详见表 1。

2.2 巢式 PCR

巢式 PCR (nested PCR) 利用 2 对引物进行 2 轮扩增反应, 外引物在第 1 轮扩增中用以产生一个长的扩增产物, 此产物在内引物的存在下进行第 2 轮扩增, 产生一个短的扩增产物。半巢式 PCR 内引物中的一条与外引物相同, 而另一条在外引物的内侧 (陈恩发, 2011)。巢式 PCR 的优点: 第 1 次

特异扩增可为第 2 次特异扩增提供大量模板, 同时如果第 1 次扩增产生了错误片段, 则第 2 次扩增能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低 (迟航 等, 2015)。巢式 PCR 经过 2 轮扩增, 适合微量靶序列的检测, 具有非常高的灵敏度和扩增特异性, 对于还在潜伏期的马铃薯土传病害的诊断具有重要意义 (彭丹丹 等, 2017)。常用于马铃薯土传病害巢式 PCR 检测的引物信息详见表 2。

表 2 马铃薯土传病害巢式 PCR 检测引物信息

检测病害	引物名称	引物序列 (5'-3')	目标基因	PCR 产物大小/bp	参考文献
马铃薯环腐病	CMSIF1	TGTACTCGGCCATGACGTTGG	插入因子 IS1121	—	Lee et al., 1997
	CMSIR1	TACTGGGTCATGTTGGT			
	CMSIF2	TCCCACGGTAATGCTCGTCTG			
	CMSIR2	GATGAAGGGGTCAAGCTGGTC			
马铃薯疮痂病	NecF1	ACCTCGCCTGCAGAGAGGAC	<i>nec1</i> 毒素合成基因	462	Cullen & Lees, 2007
	NecR1	GTTCGTAAGTCTCCGAGCGG			
	NecNF1	CACTCTTGGAGATCTCATGC		279	
	NecNR2	CGGTACAGTTCATGGAGGTC			

2.3 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR 技术 (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 最早由 Higuchi 等 (1992) 于 1992 年提出。根据加入的荧光基团不同, 实时

荧光定量 PCR 可分为两种, STBR Green I 荧光染料法和 TaqMan 探针法, 后者应用更加广泛。STBR Green I 是一种结合于小沟中的双链 DNA 嵌合染料, 具有通用性好、价格相对较低、灵敏度高

等特点,但有假阳性现象;TaqMan 探针法特异性高、可进行多重 PCR 反应,但成本高(陈恩发,2011)。近年来,qRT-PCR 技术检测植物病原菌的利用越来越广泛。qRT-PCR 与普通 PCR 相比,检

测速度更快、灵敏度更高、特异性更强,不受病害症状的影响,更有利于马铃薯土传病害的早期诊断。表 3 列出了常用于马铃薯土传病害实时荧光定量 PCR 检测的引物信息。

表 3 马铃薯土传病害实时荧光定量 PCR 检测引物信息

检测病害	引物名称	引物序列 (5'-3')	目标基因	PCR 产物大小/bp	参考文献
马铃薯黑痣病	RsTqF1	AAGAGTTTGGTTGTAGCTGGTCTATTT	ITS	98	Lees et al., 2002
	RsTqR1	AATTCCCCAACTGTCTCACAAGTT			
	PQP1	TTTAGGCATGTGCACACCTCCCTCTTTC			
马铃薯粉痂病	SsTQF1	CCGGCAGACCCAAAACC	ITS	—	Graaf et al., 2003
	SsTQR1	CGGGCGTCACCCTTCA			
	SsTQP1	CAGACAATCGCACCCAGGTTCTCATG	ITS	72	Ward et al., 2004
	Spon 421F	TGGCTTCTGATTCGTCTCTAACC			
	Spon 494R	TCATTTGAGATCTAGAGTCAGAAATGG			
马铃薯环腐病	Spon 445T	TTGGCGTGCCCGTCCACATAGA	质粒 pCS1 上的 <i>CelA</i> 纤维素酶 A 基因	150	Gudmestad et al., 2009
	CelA-F	TCTCTCAGTCATTGTAAGATGAT			
	CelA-R	ATTCGACCGCTCTCAAA	16S rDNA	142	魏琪 等, 2010
	CelA probe	TTCGGGCTTCAGGAGTGCGTGT			
	QHF5	CTGGGATAACTGCTAGAAATGG			
	QHF3	CGTCGTAGGCTTGGTGAG			
	HFP	TTCGGTTGGGGATGGACTCGCGGCC			
	NecTqF1	TCGCACTCTTGGAGATCTCATG	<i>nec1</i> 毒素合成基因	83	Cullen & Lees, 2007
马铃薯疮痂病	NecTqR1	TCGTAAGAACGCGACGCTTT			
	NecTqP1	AGTGACGCCAAAGACTCAATCAAGTTCGC	<i>nec1</i> 、 <i>txtAB</i> 毒素合成基因	87	邓宽平 等, 2012
	S1	CTGAAAATCGCACTCTTGGAGAT			
	S2	AAGAACGCGACGCTTTGGCGAA			
	P	AACCTCTGGAGTGACGCCAAAGACTCAAT			
马铃薯黑胫病	Y1	GAATATCAATAGCACTATCCTCAG	—	—	杨松 等, 2009
	Y2	CACATTATCAACCAACAGAACC			

2.4 多重 PCR

多重 PCR (multiplex PCR) 又称多重引物 PCR 或复合 PCR, 是在同一 PCR 反应体系中加入 2 对或 2 对以上的引物, 同时扩增出多个核酸片段的 PCR 反应。主要用于多种病原微生物的同时检测或鉴定。目前多重 PCR 大多与 qRT-PCR 相结合, 不仅具有单一 PCR 的灵敏性和特异性, 还大大节省了检测时间和试剂开支, 但多重 PCR 有时也会出现多态性现象和引物竞争靶标序列等问题(彭丹丹 等, 2017)。表 4 列举了常见马铃薯土传病害多重 PCR 检测的引物信息。

2.5 环介导等温扩增技术 (LAMP)

环介导等温扩增技术 (LAMP) 能够在等温条件下短时间内实现 DNA 的大量扩增。林桐司骐

等 (2017) 基于 LAMP 环介导等温扩增技术, 用马铃薯晚疫病病菌 ITS 区域片段, 设计出 1 对特异性 LAMP 引物, 并对反应条件进行优化, DNA 的检测下限为 8×10^{-5} ng, 产物直接加入稀释 100 倍的 SYBR Green I 荧光染料, 可立即在自然光或紫外光下对 LAMP 反应产物进行可视化检测。相比 PCR 技术, LAMP 技术大大缩短了反应时间, 降低了对仪器的依赖, 同时检测的灵敏度和特异性都有不同程度的提高, 并且加入荧光染料后, 可使检测结果可视化。但 LAMP 技术的引物设计复杂且数量多、难度大; 极易出现气溶胶污染, 造成假阳性; 只能定性判断, 不能定量分析(李婷和杨坤, 2018)。表 5 为马铃薯土传病害 LAMP 检测引物信息。

表4 马铃薯土传病害多重 PCR 检测引物信息

检测病害	引物名称	引物序列 (5'-3')	目标基因	PCR 产物 大小/bp	参考文献
马铃薯黄萎病	VertBt-F	AACAACAGTCCGATGGATAATTC	β 微管蛋白基因	115	Atallah et al., 2007
	VertBt-R	GTACCGGGCTCGAGATCG			
	PotAct-F	TGAACACGGAATTGTCTAGCA	<i>act</i> 肌动蛋白基因	—	
	PotAct-R	GGGGTTAAGAGGGGCTTCAG			
马铃薯疮痂病	trpB-280F	TGGGTCGCCAACGTCGACCG	<i>trpB</i> 毒素合成基因	125	Xu et al., 2016
	trpB-405R	CGTTCGAGGATCTGGCGCCGC			
	trpB-TaqManpb314	TCGGGACCGTGGCCGGGC			
	trpB-59F	AGACGCGGGTCATCGCCGAG		591	
	trpB-650R	GATCGAGTACGGCTCGGTGATCTG			
	trpB-HybDonor309	CCTGTTCGGGACCGTGGCCG			
	trpB-HybAcceptor330	GCCCCACCCCTTCCCCGC			
	Sca-F	CGGTGGCC (T/C) AACCCGTAAG	ITS	252/261	
	Sca-R	TTCCACACCCACAAGGGGTAGT			
	Aci-F	ATATCACT (T/C) CTGCTGCATGG		468	
	Aci-R	CCTACCGAACTCTAGCCTGC			
	Tur-F	CGGAAACATCCAGAGATGGGTG		723	
	Tur-R	CTTCACCGCTTCCCTCATCG			
马铃薯晚疫病、环腐病	P.IN1	TGAAGAACGCTGCGAACTGC	ITS	363	刘秀丽 等, 2015
	P.IN2	CGAAGCCAACCATACCACGA			
	C.IN1	GCAATGTTGCACGCTGTTG	16S~23S	218	
	C.IN2	TGAATCGTTTCGCCTCCC			
马铃薯环腐病、黑胫病	CMS1	CCCTGGGTGGGTCATACATTTTC	pCS1 质粒上纤维素酶 A 基因	913	韩广涛 等, 2011
	CMS2	TGCGGCTCGTGTGGAGA			
	ECA1f	CGGCATCATAAAAACACG		690	
	ECA2r	GCACACTTCATCCAGCGA			
马铃薯晚疫病、青枯病	INF1	CGGTTGGTTTTCGGACCGA	ITS	324	陈庆河 等, 2009
	INF2	CATTTCCCAAATGGATCGACC			
	759	GTCGCCGTCAACTCACTTTCC		281	
	760	GTCGCCGTCAGCAATGCGGAATCG			

表5 马铃薯土传病害 LAMP 检测引物信息

检测病害	引物名称	引物序列 (5'-3')	目标基因	PCR 产物 大小/bp	参考文献
马铃薯环腐病	FIP	TCACATTTTGAATAGGCGCGCTAACACAGGCTAGGAGAACGA	pCSL0067 保守区域	—	汪万春 等, 2014
	BIP	GCGCGACTTCGACACCTTTTGGCCATGATGCATCACCAGG			
	F3	TCCTCGAGTGACGCTTGA			
	B3	GTGATGCCTTTGCCAACATG			
马铃薯黑胫病	FIP	TCAGCGTACGGGTCATCGCCAACAATATTCGCGACGCTGAT	<i>gyrB</i>	—	胡连霞 等, 2017
	BIP	ATCCAAAATCAGCGCGACCGGTCACAGACACACAGCAATC			
	FOP	GATGGTTTCCAGGAAAACA			
	BOP	ACTTCGGATCCGGCACTT			
	FLP	CGGCCAAGTGTGTACCACC			
	BLP	TGATGCGCGCGAAGGG			

3 马铃薯主要土传病害检测方法的应用

3.1 同时对块茎和土壤等样品进行检测

马铃薯土传病害检测过程中若直接对块茎、土壤等样品进行检测,可以省去病原菌分离培养的过程,大大提高了检测效率,缩短检测时间。Lees 等(2002)根据马铃薯黑痣病菌的 ITS 序列分别设计普通 PCR 引物和 TaqMan 荧光定量 PCR 引物及探针,可以有效检测出土壤和带病种薯中的立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)。Bell 等(1999)根据马铃薯粉痂病菌的 ITS 序列设计引物用于检测马铃薯种皮、块茎洗涤液和土壤中的粉痂病菌,并建立了从土壤中快速提取粉痂病菌的方法。Graaf 等(2003)利用 TaqMan 荧光定量技术检测土壤、水和植物组织中处于不同生长阶段的粉痂病菌,可快速、简便地对大量样品进行处理。郭凤柳等(2013)根据疮痂病菌(*Streptomyces* spp.)特有的毒素合成基因簇中的基因 *txtA*、*txtB*、*txtC* (*P450*)、*txtD* (*nos*) 等序列设计引物,可特异性扩增疮痂病原链霉菌、病薯样品组织和病田土样中的致病菌株。Cullen 和 Lees (2007)通过对马铃薯块茎和土壤样品中致病疮痂链霉菌的毒力基因 *nec1* 进行实时荧光定量检测,证明链霉菌的致病性与 *nec1* 基因的存在有明显的相关性。Tagawa 等(2008)针对马铃薯疮痂病原菌 *Streptomyces scabiei*、*S. acidiscabiei* 和 *S. turgidiscabiei* 的 16S rDNA 基因和 16S、23S 之间的 ITS 序列设计了 3 对特异性引物,建立了马铃薯疮痂病的多重 PCR 体系,可检测土壤和马铃薯样品中的病原菌。Zhang 等(2005)根据马铃薯黄萎病菌黑白轮枝菌的 ITS 序列设计特异性引物,可检测马铃薯组织和土壤中的黑白轮枝菌,引物检测灵敏度为 10 fg 基因组 DNA,土壤病原菌检测灵敏度为分生孢子含量 100 个·g⁻¹ 土壤。

3.2 提高特异性或灵敏度

马铃薯土传病害在进行分子检测时,引物的特异性和灵敏度至关重要。根据病原菌的毒素基因设计的引物往往具有较高的特异性,再结合检测体系的优化、DNA 提取方法的改良或者选定内参基因作为对照,灵敏度也会有大幅度的提升。李瑞琴等(2013)优化了马铃薯黑痣病菌荧光定量 PCR 方

法,直接利用土壤 DNA 进行立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)的定量检测,能检测到土壤中浓度为含拷贝 1×10² 个·g⁻¹ 的马铃薯立枯丝核菌,扩增效率为 1.04,具有检出限低、扩增效率高的特点。Qu 等(2006)针对马铃薯粉痂病菌设计的引物可特异扩增出 434 bp 的产物,并用改良的土壤 DNA 提取方法对检测体系进行了优化,最低检测量为每克土壤 1 个孢子。Ward 等(2004)针对马铃薯粉痂病菌的 ITS 序列设计引物及荧光探针,同时以马铃薯内参基因细胞色素氧化酶作为对照,能有效防止假阴性结果的产生,灵敏度是 ELISA 和普通 PCR 的 100 倍。Lee 等(1997)根据马铃薯环腐病菌上的插入原件 IS1121 设计的巢式 PCR 引物,能在无症状的马铃薯植株或块茎中超灵敏检测到极低浓度的密执安棒杆菌马铃薯环腐致病变种。Gudmestad 等(2009)根据马铃薯环腐病菌密执安棒杆菌马铃薯环腐致病变种质粒 pCS1 上的纤维素酶 A 设计了特异性引物,比该菌的通用引物特异性更强。魏琪等(2010)根据马铃薯环腐病菌 16S rDNA 保守序列设计特异性引物及探针,建立了马铃薯环腐病菌实时荧光定量 PCR 检测体系,检测极限可以达到几个拷贝。汪万春等(2014)根据马铃薯环腐病菌(*Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*)特有的保守区域(pCSL0067)设计一套特异性 LAMP 引物,建立了马铃薯环腐病菌 LAMP 检测体系,DNA 和菌体检测灵敏度分别达到了 5.27×10⁻⁴ ng·μL⁻¹ 和 150 CFU·mL⁻¹。González 等(2008)设计的特异性引物可扩增马铃薯疮痂病菌的毒素合成基因序列 *txtAB*,并可在大量马铃薯 DNA 的干扰下准确检测,保持灵敏度。郭凤柳等(2013)根据疮痂病菌(*Streptomyces* spp.)特有的毒素合成基因簇序列设计的引物,灵敏度为 20 pg·μL⁻¹。邓宽平等(2012)应用实时定量 PCR 技术对马铃薯疮痂病进行检测,在 *nec1*、*txtAB* 致病基因上进行引物探针的设计,在 *nec1* 基因上筛选获得最佳探针引物,此方法灵敏度比普通 PCR 高出 100 倍,链霉菌(*Streptomyces* spp.)最低可检测量为 9.635×10⁻⁴ ng·μL⁻¹。Judelson 和 Tooley (2000)设计的马铃薯晚疫病病菌特异性检测引物,比普通 ITS 引物灵敏度高 100 倍。杨松等(2009)设计出马铃薯黑胫病菌特异性引物,建立实时荧光 PCR 检测体系,可

将马铃薯黑胫病菌与其他马铃薯常见病害区分,检测最低浓度为 $3.6 \sim 3.9 \text{ CFU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。胡连霞等(2017)根据马铃薯黑胫果胶杆菌(*Pectobacterium atrosepticum*) *gyrB* 基因进行 LAMP 引物设计,建立 RTFQ-LAMP 检测体系,方法灵敏度为 $58.9 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,并检测出在侵染早期病原菌 DNA 含量随培养时间呈指数增长趋势。

3.3 对多种病原菌加以区分

马铃薯疮痂病和黄萎病的病原菌可以来自同一属的不同种,所以在检测时要加以区分。症状相似的病害难以区分时可以借助多重 PCR 检测。Xu 等(2016)根据 *trpB* 基因设计 4 对引物和荧光探针,建立了马铃薯疮痂病常见病原菌 *Streptomyces scabies* 和 *Streptomyces europaeiscabiei* 的实时荧光定量 PCR 体系。Atallah 等(2007)根据马铃薯黄萎病菌大丽轮枝菌的 β 微管蛋白和肌动蛋白基因序列设计特异性引物,可以在马铃薯 DNA 的干扰下特异性扩增大丽轮枝菌的序列,并将黑白轮枝菌有效地区分开。刘秀丽等(2015)针对马铃薯环腐病菌和晚疫病菌 ITS 序列,设计引物并构建双重 PCR 反应体系,能从马铃薯环腐病菌和晚疫病菌的混合 DNA 及感染这两种病菌的马铃薯植株中同时扩增到特异片段。韩广涛等(2011)根据马铃薯环腐病菌 pCS1 质粒上纤维素酶 A 基因序列设计引物 CMS1/CMS2,与已发表的马铃薯黑胫病菌特异性引物 ECA1f/ECA2r 结合,建立双重 PCR 体系,检测灵敏度在 DNA 水平上达 $600 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。陈庆河等(2009)根据马铃薯晚疫病菌的 ITS 序列设计特异性引物 INF1/INF2,与马铃薯青枯病菌特异引物结合建立双重 PCR 体系,能从马铃薯晚疫病菌和青枯病菌总基因组 DNA 以及人工接种和自然发病的马铃薯植株中分别或同时扩增到特异片段。

4 小结与展望

马铃薯土传病害危害马铃薯地下块茎,潜伏期长,很难通过地上部分直接判断是否遭受病害,且病原菌在植物组织中分布不均匀,给病害的早期检测和防治带来了困难(唐利华等,2018)。传统的植物病原菌检测往往结合了病原菌的分离纯化、形态观察、致病性接种试验和生理生化测定等方面的结果,鉴定过程耗时长并需要大量的经

典分类法知识,不能快速获得检测结果(Goud & Termorshuizen, 2003; 彭丹丹等, 2017)。免疫学检测成本高且操作繁琐,灵敏度较低,也不能定量检测,对于不显症阶段的病害检测可靠性较低,同样只能用于马铃薯土传病害的初步诊断(肖翠等, 2017)。随着分子生物学的发展,国内外的马铃薯病原菌检测多采用 PCR 法,不同的 PCR 技术虽然各有优点,但也存在很多不足。普通 PCR 检测成本低,但灵敏度相对最低,更适用于样品的初步检测。巢式 PCR 提高了检测的灵敏度和准确率,但灵敏度往往低于实时荧光定量 PCR (Morgan et al., 2012)。实时荧光定量 PCR 是目前检测马铃薯土传病害比较常用的方法,灵敏度较高,可实现快速、早期检测,但成本较高且对试验条件有较高的要求。PCR 技术通常依赖昂贵的仪器设备,需要高温反应条件,扩增时间长。相比 PCR 技术, LAMP 技术大大缩短了反应时间,降低了对仪器的依赖,同时检测的灵敏度、特异性都有不同程度的提高,更适合田间大规模的样品检测(彭丹丹等, 2017; 肖翠等, 2017)。无论应用何种检测技术,马铃薯土传病害的快速检测都倾向于设计特异性更高、灵敏度更强的引物,同时检测马铃薯块茎和土壤中的病原菌,并建立病害发生预警体系,以便在病情初期进行防治。本文总结了马铃薯主要土传病害检测的引物信息,以期为其快速检测提供理论基础,但检测方法各有利弊,还需根据要求和实际情况进行选择。

参考文献

- 安小敏, 胡俊, 武建华, 刘智慧, 蒙美莲. 2017. 马铃薯枯萎病病原菌研究概述. 中国马铃薯, 31 (5): 302-306.
- 陈恩发. 2011. 多重实时定量 PCR 检测马铃薯主要的真细菌病原菌(硕士论文). 呼和浩特: 内蒙古大学.
- 陈庆河, 李本金, 兰成忠, 赵健, 邱荣洲. 2009. 双重 PCR 检测马铃薯晚疫病菌和青枯病菌方法的建立及应用. 植物病理学报, 39 (6): 578-583.
- 迟航, 郑学星, 盖微微, 王翀, 张渭蛟. 2015. 中东呼吸综合征冠状病毒半巢式 PCR 检测方法的建立. 中国病原生物学杂志, 10 (1): 1-5.
- 邓宽平, 丁海兵, 雷尊国. 2012. 马铃薯疮痂病的实时定量 PCR 检测方法. 浙江农业科学, (11): 1543-1546.
- 郭凤柳, 张海颖, 于秀梅, 赵伟全, 刘大群. 2013. 中国马铃薯疮痂病菌快速 PCR 检测技术. 中国农业科学, 46 (23): 4926-

- 4932.
- 韩广涛, 杨志辉, 朱杰华, 赵冬梅, 韩彦卿. 2011. 双重 PCR 技术检测马铃薯环腐病菌和黑胫病菌方法的建立. 中国农业科学, 44 (20): 4199-4206.
- 何云霞, 张儒喜, 白艳菊, 吕典秋, 胡林双. 2004. 马铃薯环腐病菌鉴定检测技术研究进展. 中国马铃薯, 18 (3): 159-162.
- 胡连霞, 张岱, 赵冬梅, 杨志辉, 朱杰华. 2017. 实时荧光定量循环介导等温扩增方法检测马铃薯黑胫病菌. 植物保护学报, 44 (5): 863-864.
- 黄强, 郑敏, 王钊, 舒婷, 欧阳满. 2019. 马铃薯晚疫病的危害及防治措施. 江西农业, (2): 15.
- 李瑞琴, 刘星, 邱慧珍, 张文明, 张春红. 2013. 发生马铃薯立枯病土壤中立枯丝核菌的荧光定量 PCR 快速检测. 草业学报, 22 (5): 136-144.
- 李婷, 杨坤. 2018. 等温扩增技术在寄生虫及其他病原体检测中的应用. 中国血吸虫病防治杂志, 30 (2): 232-236.
- 林桐司, 苏瑞, 谢欣媛, 叶芯好, 王伟伟. 2017. 马铃薯晚疫病 LAMP 检测方法研究. 泰安: 中国植物病理学会 2017 年学术年会.
- 刘秀丽, 庞博, 张金文, 王蒂, 张俊莲. 2015. 双重 PCR 检测马铃薯晚疫病和环腐病方法的建立. 植物保护, 41 (2): 114-119.
- 吕镇城, 周香露, 徐良雄, 陈兆贵. 2018. 马铃薯主要病害及防治研究进展. 惠州学院学报: 自然科学版, 38 (6): 7-14.
- 彭丹丹, 张源明, 舒灿伟, 周而勋. 2017. 植物病原真菌分子检测技术的研究进展. 基因组学与应用生物学, 36 (5): 2015-2022.
- 唐利华, 郭堂勋, 李其利, 黄穗萍, 莫贱友. 2018. 柑橘黄龙病田间诊断与检测技术研究进展. 中国植保导刊, 38 (8): 81-87.
- 汪万春, 袁钧, 郑春生, 高文娜. 2014. 马铃薯环腐病菌 LAMP 检测方法的建立. 植物检疫, 28 (1): 29-31.
- 魏琪, 胡林双, 董学志, 闵凡祥, 王晓丹. 2010. 马铃薯环腐病菌 Real-time Taqman-PCR 检测体系的建立. 中国马铃薯, 24 (5): 301-305.
- 肖翠, 廖晶晶, 何利刚, 仝铸, 吴黎明. 2017. 柑橘黄龙病快速诊断与检测技术研究进展. 农业科技通讯, (12): 341-344.
- 杨松, 胡林双, 吕文河, 魏琪, 董学志. 2009. 实时定量荧光 PCR 法检测马铃薯黑胫病菌. 中国马铃薯, 23 (1): 1-5.
- Atallah Z K, Bae J, Jansky S H, Rouse D I, Stevenson W R. 2007. Multiplex real-time quantitative PCR to detect and quantify *Verticillium dahliae* colonization in potato lines that differ in response to *Verticillium Wilt*. Phytopathology, 97: 865-872.
- Bell K S, Roberts J, Verrall S, Cullen D W, Williams N A F, Harrison J G, Toth I K, Cooke D, Duncan J M, Claxton J R. 1999. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* in soils and on tubers using specific PCR primers. European Journal of Plant Pathology, 105: 905-915.
- Cullen D W, Lees A K. 2007. Detection of the *necl* virulence gene and its correlation with pathogenicity in *Streptomyces* species on potato tubers and in soil using conventional and real-time PCR. Journal of Applied Microbiology, 102 (4): 1082-1094.
- González R F, Velasco I, Montes F. 2008. Detection and characterization of *Streptomyces* causing potato common scab in Western Europe. Plant Pathology, 57: 162-169.
- Goud J C, Termorshuizen A J. 2003. Quality of methods to quantify microsclerotia of *Verticillium dahliae* in soil. European Journal of Plant Pathology, 109: 523-534.
- Graaf P, Lees A K, Cullen D W, Duncan J M. 2003. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* in soil, water and plant tissue samples using real-time PCR. European Journal of Plant Pathology, 109: 589-597.
- Gudmestad N C, Mallik I, Pasche J S, Anderson N R, Kinzer K. 2009. A real-time PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulase gene sequence. Plant Disease, 93: 649-659.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh P S, Griffith R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology, 10 (4): 413-417.
- Judelson H S, Tooley P W. 2000. Enhanced polymerase chain reaction methods for detecting and quantifying *Phytophthora infestans* in plants. Phytopathology, 90 (10): 1112-1119.
- Khan M, Li B J, Jiang Y, Weng Q Y, Chen Q H. 2017. Evaluation of different PCR-based assays and LAMP method for rapid detection of *Phytophthora infestans* by targeting the *Ypt1* Gene. Froniers in Microbiology, 8: 1920-1930.
- Lee I M, Bartoszyk I M, Gundersen D E, Mogen B, Davis R E. 1997. Nested PCR for ultrasensitive detection of the potato ring rot bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Applied and Environmental Microbiology, 63 (7): 2625-2630.
- Lees A K, Cullen D W, Sullivan L, Nicolson M J. 2002. Development of conventional and quantitative real-time PCR assays for the detection and identification of *Rhizoctonia solani* AG-3 in potato and soil. Plant Pathology, 51: 293-302.
- Mancini V, Murolo S, Romanazzi G. 2016. Diagnostic methods for detecting fungal pathogens on vegetable seeds. Plant Pathology, 65: 691-703.
- Morgan J K, Zhou L J, Li W B, Shatters R G, Manjunath. 2012. Improved real-time PCR detection of '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' from citrus and psyllid hosts by targeting the intragenic tandem-repeats of its prophage genes. Molecular and Cellular Probes, 26 (2): 90-98.
- Qu X S, Kavanagh J A, Egan D, Christ B J. 2006. Detection and quantification of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* by PCR in host tissue and naturally infested soils. American Journal of Potato Research, 83: 21-30.
- Tagawa M, Tamaki H, Manome A, Koyama O, Kamagata Y. 2008. Development of a genotyping method for potato scab pathogens based on multiplex PCR. Bioscience, Biotechnology and

- Biochemistry, 72 (9): 2324-2334.
- Ward L I, Beales P A, Barnes A V, Lane C R. 2004. A real-time PCR assay based method for routine diagnosis of *Spongiospora subterranea* on potato tubers. Journal of Phytopathology, 152: 633-638.
- Xu R, Falardeau J, Avis T J, Tambong J T. 2016. HybProbes-based real-time PCR assay for specific identification of *Streptomyces scabies* and *Streptomyces europaeiscabiei*, the potato common scab pathogens. Letters in Applied Microbiology, 62 (2): 153-159.
- Zhang Z G, Chen R H, Wang Y C, Wang K R, Zheng X B. 2005. Molecular detection of *Verticillium albo-atrum* by PCR based on its sequences. Agricultural Sciences in China, 4 (10): 760-766.

Comparative Analysis and Application of Rapid Detection on Potato Soil-borne Pathogens

LI Lei, ZHAO Yu-rong, XIE Xue-wen, SHI Yan-xia, CHAI A-li, LI Bao-ju*

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

Abstract: Potato soil-borne diseases are becoming increasingly serious. Rapid detection on pathogenic bacteria is an important basis for early diagnosis, predictive monitoring, and comprehensive control of the diseases. This paper comprehensively compared the characteristics of conventional PCR, nested PCR, real-time quantitative PCR, multiplex PCR and LAMP technology in sensitivity and specificity, and evaluated their merits and demerits in detecting potato soil-borne diseases. The paper also summarized the primer information of various diseases detection reports and advantages of this detection system. At the same time, the paper prospected the applying future of each technology, aiming at obtaining an overall understanding about the rapid detection methods and their development tendency on potato soil-borne diseases.

Key words: Potato soil-borne disease; Rapid detection; PCR; Sensitivity; Specificity; Review

· 封面说明 ·

金船蜜香 F₁

早中熟, 雌花始生于第 10~11 节, 以后每隔 2~3 节着生 1 朵雌花, 易坐果, 连续结果能力强。谢花后 39 天左右瓜成熟, 瓜为棒槌形, 老熟瓜皮橙红色、肉橙黄色, 瓜长约 44 cm, 肉厚 4 cm 左右, 单瓜质量 4~5 kg。肉质细腻香甜, 口感好, 水分少, 耐运输贮藏。定植后 70 天左右可初收, 一般每 667 m² (1 亩) 产量可达 3 300 kg。抗白粉病和霜霉病, 中抗病毒病, 适应性广。

金船大密本南瓜 F₁

植株匍匐生长, 分枝性强, 雌花始生于第 12~13 节。果形靓丽, 坐果率高, 瓜顶端膨大, 肩部钝圆, 成熟时瓜皮橙黄色, 披蜡粉, 肉厚, 瓜肉橙红色, 淀粉细腻, 味甜, 水分少, 口感绵柔, 品质优良。大果, 单瓜质量 5 kg 左右, 水分充足、管理得当时单瓜质量可超过 6 kg, 产量高, 定植后 85 天左右可初收, 耐贮运, 抗逆性强。

汕头市金韩种业有限公司

地址: 广东省汕头市龙湖区国道 324 宜华城旁香榭邸 20 栋 02-03

邮编: 515065

电话: 0754-88345961 88345962

传真: 0754-88345963