

菜豆晕疫病检测技术研究进展

陈曦, 张明哲, 林晓佳, 夏拯, 陈吴健, 吴志毅* (浙江省检验检疫科学技术研究院, 浙江杭州 310016)

摘要 介绍了生理生化检测技术、经典血清学检测技术、现代分子检测技术3种常用的菜豆晕疫病传统检验技术,并讨论了免疫磁性-实时荧光PCR技术、环介导等温扩增技术和红外光谱检测技术3种植物病原细菌最新检测技术应用于菜豆晕疫病的可能性。

关键词 菜豆晕疫病;检测技术;研究进展

中图分类号 S435.29 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)10-04365-01

目前我国外来生物入侵情况十分严重,一些危险性外来有害生物相继传入,新的疫情不断突发,据中国农业科学院万方浩研究员报道,每年各种外来有害生物对我国造成的总经济损失估计在2000亿以上。另外,随着社会和经济的发展,我国为了使各种蔬菜杂粮能保障供应,开通了农副产品的绿色通道,使得以前仅在局部地区发生的疫情也逐步扩散蔓延。

2011年浙江共进口大豆302万t,至2012年已达到331万t。随着大豆进口量的日益增加,其可能携带的有害生物进入我国的风险也越来越大。菜豆晕疫病菌(*Pseudomonas savastanoi* pv. *Phaseolicola*)作为一种豆科重要病原物,可侵染扁豆、赤豆、木豆、桑橙、多花菜豆、月豆、菜豆、碗豆、葛、野葛、绿豆、豇豆和大豆。尽管很多国家采取了一系列防御措施,该病害仍以惊人的速度传播和蔓延,至今已在世界各大洲的60多个国家和地区有分布。该病菌主要传播途径是通过带毒种子传播,在种子上可潜伏存活2年以上时间,一旦进入我国将造成巨大损失。因此,加强口岸检疫工作,从源头杜绝该病菌是最佳方法。鉴于此,笔者介绍了该病目前常用的检验技术,并探讨了植物病原细菌的最新检测技术应用用于菜豆晕疫病的可能性,以期预防菜豆晕疫病提供借鉴。

1 菜豆晕疫病传统检测技术

菜豆晕疫病作为一种豆科细菌性病害,其传统的检测技术主要有生理生化检测技术^[1]、血清学检测技术^[2-3]及现代分子检测技术^[4]。

1.1 生理生化检测技术 以前生理生化检测技术主要依据菌落形态、培养性状、烟草过敏反应及Koch假说测定、生理生化测定等方法对植物病原细菌进行检测鉴定。现今科学技术迅猛发展,衍生出许多新的检测方法,如Biolog、脂肪酸(FAME)等。但是这些方法普遍存在检测周期长、检测过程繁琐的缺点。

1.2 经典血清学检测技术 血清学检测技术应用于植物病原细菌检测已有较长时间,目前已形成多种检测方法,如ELISA、单克隆抗体检测法、免疫放射性分析法、离体检测法等。国内较常用的主要是ELISA中的双抗体夹心酶联法,目

前针对菜豆晕疫病菌已有较多该方法检测试剂盒。该方法效果较好,检测过程易操作。但是该方法检测目标单一,不适用于口岸检测。

1.3 现代分子检测技术 现代分子检测技术的建立使得植物病原细菌检测向更快捷、稳定的方向发展。20世纪后期,核酸分子杂交技术在植物病原细菌检测方面广泛应用。但是由于其耗时长、自动化程度低、检测结果稳定性差、试验条件难以掌握的特点,逐渐被PCR技术取代。PCR技术的发展经历了从传统PCR技术到实时荧光PCR技术的发展,目前国内对菜豆晕疫病菌的2种PCR检测技术都已做了相关研究。然而,传统PCR技术易有假阳性的发生,而实时荧光PCR技术则存在设备成本高的缺点。

2 植物病原细菌检测新技术

由于传统的检测技术在日常检测中存在各种问题与缺陷,随着科学技术的发展,对植物病原细菌的检测手段也日益繁多。下面介绍了几种植物病原细菌检测新技术,并探讨了其在菜豆晕疫病检测中的应用。

2.1 免疫磁性-实时荧光PCR技术 免疫磁性-实时荧光PCR技术将经典的血清学检测技术与现代分子检测技术相结合,其检测灵敏度达到50~100 cfu/ml,将PCR检测技术灵敏度提高了100倍左右^[5]。该方法具有准确、灵敏、快速等优点。

由于血清学和荧光PCR检测技术在菜豆晕疫病菌检测中已被普遍应用,所以利用免疫磁性-实时荧光PCR技术对该菌进行检测已具备完善基础,仅需进行部分反应条件的探索,即可在实际检测中应用。

2.2 环介导等温扩增技术 环介导等温扩增(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术是近年来发展出的一种利用4个特殊设计的引物和具有置换活性的DNA聚合酶,在恒温条件下特异、高效、快速的新核酸扩增技术^[6]。LAMP技术在微生物检测领域中的应用十分成熟^[7],已有多项利用LAMP技术检测细菌的国标和行标发行。

LAMP具有特异性强、等温高效、敏感性高、操作简单等优点,在建立快速检测菜豆晕疫病菌方面具有广阔的应用前景。LAMP技术的关键在于能否设计专化、高效的特异性引物^[8]。菜豆晕疫病菌属于假单胞杆菌属,而很多研究表明假单胞杆菌属的细菌中普遍存在一种编码毒素的基因簇——

(下转第4367页)

基金项目 浙江省检疫局项目(ZK200996x, zk201310, ZK200957)。
作者简介 陈曦(1986-),男,浙江杭州人,助理农艺师,在读硕士,从事植物检疫工作, E-mail: cx9201@163.com。*通讯作者,高级农艺师,博士,从事植物检疫工作, E-mail: zwy@zjq.jov.cn。
收稿日期 2013-03-01

表 1 不同剂量参试药剂对草原蝗虫的防治效果

处理	防前虫口密度	平均残留虫口密度//头/m ²				防治效果//%				校正防效//%			
	头/m ²	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 15 天	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 15 天	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 15 天
A ₁	74.30	22.50	14.20	14.70	8.70	69.73	80.60	80.00	88.28	74.30	83.88	82.35	86.08
A ₂	89.40	14.50	3.80	12.00	4.20	83.85	95.75	86.58	95.25	86.20	96.53	88.53	93.30
A ₃	85.80	6.80	3.50	2.60	3.10	91.85	96.05	96.95	96.53	93.08	96.73	97.18	94.73
B ₁	112.60	73.00	67.80	45.60	37.60	34.60	41.78	58.50	66.30	43.70	52.10	62.60	59.78
B ₂	114.60	69.60	30.20	30.40	15.80	37.65	73.93	72.10	85.25	46.33	78.60	76.23	86.48
B ₃	97.60	29.20	13.40	12.00	9.60	70.53	87.50	88.88	90.38	74.75	89.85	88.63	89.78
F	59.80	17.20	13.60	5.60	5.20	73.73	79.13	89.28	92.50	77.23	82.63	90.83	87.13
CK	82.20	97.40	100.20	82.70	74.10	-17.50	-22.58	-13.20	-21.10				

对表 1 数据进行方差分析,结果表明, $F = 9.484 > F_{0.05} = 2.573$, $P < 0.05$, 差异显著。进一步做新复极差测验,结果表明,黑克 A₁、A₂、A₃ 处理的平均校正防治效果分别为 81.65%、91.14% 和 95.43%; 印楝素乳油 B₁、B₂、B₃ 处理的平均校正防治效果分别为 50.60%、71.91% 和 86.90%; 虫毙净 F 处理的平均校正防治效果为 88.59%。其中 A₃、A₂、F、B₃ 处理间无显著差异 ($P > 0.05$), 但与 B₁、B₂、A₁ 处理间均存在显著差异 ($P < 0.05$)。因此,在大面积防治草原蝗虫时,可喷施 A₃、A₂、F、B₃ 处理药剂及剂量,即黑克 375、300 ml/hm², 虫毙净 300 ml/hm², 印楝素乳油 150 ml/hm²。

3 结论

该研究表明,采用超低量喷雾方法喷施 20% 黑克 225、

300、375 ml/hm² 防治青海省草原蝗虫的平均校正防治效果分别为 81.65%、91.14% 和 95.43%; 喷施 0.3% 印楝素乳油 60、105、150 ml/hm² 的平均校正防治效果分别为 50.60%、71.91% 和 86.90%; 喷施 4.5% 虫毙净 300 ml/hm² 的平均校正防治效果为 88.59%。方差分析表明,喷施 4.5% 虫毙净 300 ml/hm²、20% 黑克 300 和 375 ml/hm²、0.3% 印楝素乳油 150 ml/hm² 时对草原蝗虫的平均校正防治效果之间差异不显著,可进行大面积推广应用。

参考文献

- [1] 景生明. 青海省情[M]. 西宁:青海人民出版社,1986.
- [2] 海西州区划大队. 都兰县农牧业综合区划文集[C]. 海西,都兰,1988.

(上接第 4365 页)

假单胞杆菌毒素基因簇^[9]。该基因簇包含 6 个独立区域,这些毒素基因簇大多通过抑制与寄主植物的次级代谢有关的酶使寄主的某些植物激素增加,从而干扰正常的生理功能。Borowicz 等已根据假单胞杆菌毒素基因簇序列^[10], 尝试设计更加特异性的引物,以在分子水平上检测该属的植物病原菌。因此,设计菜豆晕疫病 LAMP 检测引物也可从该基因簇上出发考虑。

2.3 红外光谱检测技术 应用红外光谱技术检测、鉴定细菌的研究近年才发展起来。目前已有较多研究表明该技术可在种、菌株及血清型等不同分类学水平上用于区分细菌^[11]。但是,前期许多研究主要应用于食源性致病菌的检测鉴定。如 Cecilia 等针对 5 种不同的李斯特菌进行的种间及种内鉴别研究^[12]。近年来学者们已开始针对植物病原细菌展开研究,如 Samantha 等利用该技术检测柑橘黄龙病与柑橘其他病害的区别^[13]。上述研究为利用红外光谱技术检测、鉴定菜豆晕疫病提供了参考。

3 结语

菜豆晕疫病是菜豆上发生的一种重要病害,且在世界范围内分布广泛,一旦感染难以除去。对种苗的检验工作是预防菜豆晕疫病的关键,该病检测技术的研究具有重要的社会与经济价值。

参考文献

- [1] GROSS D C,VIDAVER A K. Aselectiveme dium forisolation of *Corynebacterium nebraskense* from soil and plant parts[J]. Phytopathology,1979,62:

82-87.

- [2] VAN VUURDE J W L, VAN HENTEN C. Immunosorbent dilution-plating (ISDP):New methods for the detection of plant pathogenic bacteria[J]. Seed Sei Technol,1983,11:523-533.
- [3] ZHAO Y F. Concise pamphlet of phytopathogen[M]. Beijing:Beijing Experimental Insitation of Plant-Quarantine of Agriculture Department,1992.
- [4] PABOL LLOP, ANNA BONATERRA, JAVIER PEÑALVER, et al. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material[J]. Appl Environ Microbio,2000,66(5):2071-078.
- [5] 赵丽涵,王笑,谢关林,等. 免疫捕捉 PCR 法检测西瓜细菌性果斑病[J]. 农业生物技术学报,2006(6):120-125.
- [6] 保华,李贺,高家明,等. 使用 LAMP 技术快速检测单增李斯特氏菌[J]. 中国动物检疫,2008,25(12):42-44.
- [7] 焦文强,殷相平,柳晓省. 环介导等温扩增技术原理及其在检测诊断病原微生物中的应用[J]. 生物技术通报,2009(9):50-53.
- [8] 刘巍,毛新亮. LAMP 技术及其在人类传染病病原体检测的研究进展[J]. 应用预防医学,2007(13):247-250.
- [9] AGUILERA S, LOPEZ-LOPEZ K, NIETO Y, et al. Functional characterization of the gene cluster from *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola NPS3121 involved in synthesis of phaseolotoxin[J]. Journal of Bacteriology,2007,189:2834-2843.
- [10] BOROWICZ B P, MACKOWIAK A, POSPIESZNY H. Improved identification of *Pseudomonas savastanoi* pv. phaseolicola at the molecular level. OEPP/EPPO[J]. Bulletin OEPP/EPPO Bulletin,2002,32:467-469.
- [11] DIETER NAUMANN, DIETER HELM, HARALD LABISCHINSKI. Microbiological characterizations by FTIR spectroscopy[J]. Nature,1991,351:81-82.
- [12] REBUFFO-SCHEER C A, DIETRICH J, WENNING M, et al. Identification of five *Listeria* species based on infrared spectra (FTIR) using macro-samples is superior to amicrosample approach[J]. Anal Bioanal Chem,2008,390:1629-1635.
- [13] HAWKINS S A, PARK B, POOLE G H, et al. Comparison of FTIR spectra between Huanglongbing (citrus greening) and other citrus maladies[J]. Journal of Microbiological Methods,2006,66:539-547.