



# 基于 *TaqMan* MGB 探针的大豆北方茎溃疡病菌快速检测

李雪莲<sup>1,2</sup>, 于洪娟<sup>1,3</sup>, 朱小琼<sup>3</sup>, 段维军<sup>1,2</sup>

(1. 宁波检验检疫科学技术研究院, 浙江 宁波 315012; 2. 中华人民共和国宁波海关, 浙江 宁波 315012; 3. 中国农业大学 植物保护学院, 北京 100193)

**摘要:** 为准确快速检测检疫性真菌大豆北方茎溃疡病菌, 根据大豆北方茎溃疡病菌及其近似种的模式分离物 ITS 序列差异, 设计并合成 1 对特异性引物和 1 条 MGB 探针, 建立大豆北方茎溃疡病菌的实时荧光 PCR 检测方法。特异性试验结果表明: 该检测方法能特异性检测大豆北方茎溃疡病菌。灵敏度试验结果表明: 最低检测限量为 10  $\mu\text{L}$  反应体系中总 DNA 含量 1.0 pg; 实时荧光 PCR 优化反应条件为引物终浓度 0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 探针终浓度 0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。实际样品检测结果表明: 该方法可用于疑似受大豆北方茎溃疡病菌侵染的进境大豆样品的检测与初筛。此方法准确、快速、灵敏, 整个反应过程约 1 h, 检测过程完全闭管, 无需 PCR 后续处理, 可作为大豆北方茎溃疡病菌检测防控方法。

**关键词:** 大豆北方茎溃疡病菌; 实时荧光 PCR; *TaqMan*-MGB 探针; 快速检测

## *TaqMan* MGB-based Real-time Fluorescent PCR Method for The Rapid Detection of *Diaporthe caulivora*

LI Xuelian<sup>1,2</sup>, YU Hongjuan<sup>1,3</sup>, ZHU Xiaoqiong<sup>3</sup>, DUAN Weijun<sup>1,2</sup>

(1. Ningbo Academy of Inspection and Quarantine, Ningbo 315012, China; 2. Ningbo Customs District P. R. China, Ningbo 315012; 3. China College of Plant Protection, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** In order to accurately and rapidly detect the quarantine fungi *Diaporthe caulivora*, a species-specific real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) assay was developed for the detection of *D. caulivora*. A pair of specific primers and a *TaqMan*-MGB probe were designed and synthesized according to the difference of ITS sequence between *D. caulivora* type and related species. A novel real-time fluorescent PCR was established to detect *D. caulivora*. The minimal detectable concentration of targeted DNA was 1.0 pg in 10  $\mu\text{L}$  reaction mixture. Optimal primer concentration and probe concentration were 0.5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  and 0.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , respectively. The method could be used for the detection and preliminary screening of the samples suspected of carrying *D. caulivora*. The new method is more accurate, sensitive and time-saving than the traditional method and is suitable for routine use. It also provides a valuable tool for early rapid sensitive detection and identification of *D. caulivora* in plants and gives plant protection offices the chance to react accordingly and to evaluate measures for plant disease management against *D. caulivora*.

**Keywords:** *Diaporthe caulivora*; real-time fluorescent PCR; *TaqMan*-MGB probe; rapid detection

大豆茎溃疡病 (soybean stem canker) 是大豆上最严重的病害之一, 于 20 世纪 40 年代末至 50 年代初在美国中北部<sup>[1-5]</sup> 和加拿大<sup>[6]</sup> 被报道, 目前主要分布在北美洲的美国<sup>[7]</sup> 和加拿大<sup>[7]</sup>, 南美洲的阿根廷<sup>[8]</sup>、巴西<sup>[9]</sup> 和厄瓜多尔<sup>[7]</sup>, 欧洲的保加利亚<sup>[7]</sup>、克罗地亚<sup>[10]</sup>、前南斯拉夫<sup>[11]</sup>、法国<sup>[7]</sup>、意大利<sup>[7]</sup>、俄罗斯<sup>[12]</sup> 和塞尔维亚<sup>[13]</sup>, 大洋洲的澳大利亚<sup>[7]</sup>, 以及亚洲的韩国<sup>[14]</sup> 等国家。病害症状主要表现为茎秆处形成褐色溃疡斑, 导致大豆植株萎蔫干枯, 乃至死亡, 受其侵染后大豆产量损失严重。引起该病害的主要病原菌为大豆北方茎溃疡病菌 (*D. caulivora*) 和大豆南方茎溃疡病菌 (*D. aspalathi*), 均属于真菌界 (Fungi), 子囊菌门 (Ascomycota), 盘菌亚门 (Pezizomycotina), 粪壳菌纲 (Sordariomycetes), 间座壳目 (Diaporthales), 间座壳科 (Diaporthaceae), 间座

壳属 (*Diaporthe*)。大豆北方茎溃疡病菌除了侵染大豆 (*Glycine max*), 还可侵染苘麻 (*Abutilon theophrasti*)、紫花苜蓿 (*Medicago sativa*)、白草木樨 (*Melilotus alba*)、车前草 (*Trifolium incarnatum*)、红青花苜蓿 (*T. pratense*)、青花苜蓿 (*T. repens*) 和豌豆 (*Pisum sativum*)<sup>[15]</sup>、菜豆 (*Phaseolus vulgaris*)、向日葵 (*Helianthus annuus*) 和羽扇豆属 (*Lupinus* sp.) 等植物<sup>[12]</sup>。由于该病菌危害严重, 易传播又难以防治, 因此被列入我国进境植物检疫性有害生物名录。

大豆北方茎溃疡病菌自 2005 年宁波口岸从进境美国大豆中截获<sup>[16]</sup> 以来, 已先后在全国多个口岸截获。目前口岸检疫部门对大豆北方茎溃疡病菌的检疫鉴定, 主要是参照《大豆茎溃疡病菌检疫鉴定方法》(SN/T 1899-2007)<sup>[17]</sup> 和《大豆茎溃疡病菌检疫鉴定方法—*TaqMan* MGB 探针实时荧光 PCR

收稿日期: 2023-08-10

基金项目: 国家重点研发计划 (2022YFF0608804); 海关总署科研项目 (2022HK011); 宁波市社会公益科研项目 (2022S010)。

第一作者: 李雪莲 (1980—), 女, 学士, 高级农艺师, 主要从事植物检疫研究。E-mail: shellyny@163.com。

通讯作者: 段维军 (1977—), 男, 博士, 研究员, 主要从事植物检疫研究。E-mail: weijunduan@aliyun.com。

检测方法》(SN/T 3399-2012)<sup>[18]</sup>进行,即主要采用形态学鉴定及实时荧光PCR检测方法进行检疫鉴定。但是,在实际检测工作中,大豆北方茎溃疡病的分生孢子不易产生,与大豆茎荚枯腐病菌(*D. sojae*)、大豆拟茎点种腐病菌(*D. longicolla*)、大豆南方茎溃疡病菌(*D. aspalathi*)等近似种形态极为相似,单独依赖形态学特征难以快速区分鉴定。同时,近年来对大豆上间座壳属分离物的研究,已经表明该属真菌在大豆上有很高的多样性,而原有实时荧光PCR检测方法由于建立较早,并未对这种情况进行研究比较。为了提高检测效率,克服现行标准中存在的问题,本研究以大豆北方茎溃疡病菌的模式分离物 ITS 基因片段为靶标,通过设计特异性引物、探针及优化反应条件,建立了一套基于 TaqMan MGB 探针的快速检测体系,以期口岸和国内农林相关部门对大豆北方茎溃疡病菌的检测鉴定及后续处理提供技术支持。

1 材料与方法

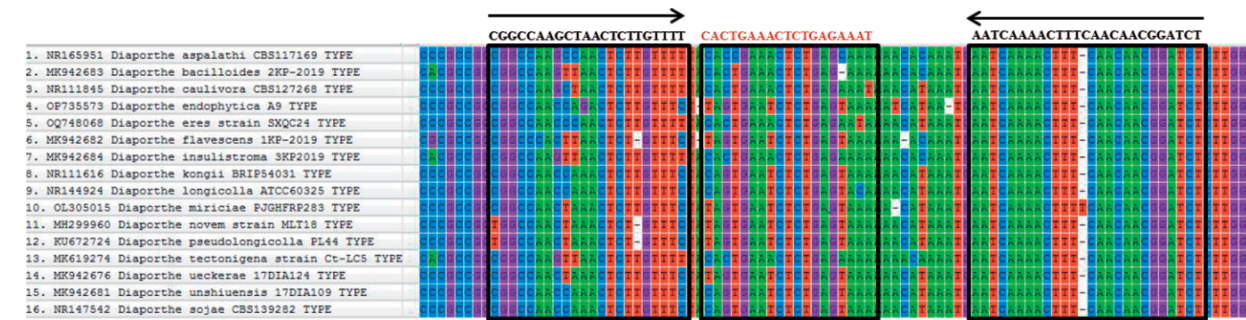
1.1 材料

供试菌株共计 71 株,包括本实验室从进境的美

国、巴西和加拿大等不同来源的大豆上分离鉴定的大豆北方茎溃疡病菌(*D. caulivora*)36 株、大豆南方茎溃疡病菌(*D. aspalathi*)4 株、大豆拟茎点种腐病菌(*D. longicolla*)14 株、菜豆间座壳病菌(*D. phaseolorum*)4 株、*D. unshiuensis* 1 株、链格孢属(*Alternaria* sp.)1 株、变灰尾孢(*Cercospora canescens*)1 株、毛壳菌属(*Chaetomium* sp.)2 株、刺盘孢属(*Colletotrichum* sp.)1 株、镰孢属(*Fusarium* sp.)1 株、藤仓赤霉菌(*Gibberella fujikuroi*)1 株、*Marasmiaceae* sp. 1 株、菜豆球壳孢(*Macrophomina phaseolina*)1 株、粪壳菌属(*Sordaria* sp.)1 株、*Thielavia hyrcaniae* 1 株和 *Talaromyces assiutensis* 1 株。

1.2 方法

1.2.1 引物和探针的设计合成 根据大豆北方茎溃疡病菌及其近似种模式分离物 ITS 序列的差异,利用软件 Primer Express 3.0 设计了特异性引物 DCF (5'-CGGCCAAGCTAACTCTTGTITT-3')、DCR (5'-AGATCCGTTGTTGAAAGTTTGTATT-3') 以及特异性探针 DCP (5'-CACTGAAACTCTGAGAAAT-3'), 预期产物大小为 79 bp (图 1)。探针和引物委托英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。



注:黑色框表示正向引物区,反向引物区和探针区,箭头代表方向。  
Note: The black box indicates the region of forward primer,reverse primer and the region of probe,and the arrow means the direction.

图 1 大豆北方茎溃疡病菌及其近似种模式分离物 ITS 片段序列的比较

Fig.1 DNA sequence comparison of the ITS regions between *D. caulivora* and closely related type species

1.2.2 DNA 提取 菌丝 DNA 提取:用灭菌枪头刮取在 PDA 平板上培养 20 d 左右的菌丝体<sup>[19]</sup>,使用 TANBead® Plant DNA Auto Kit 试剂盒,利用核酸自动化提取仪(Thermo Fisher,Kingfisher mL 型)提取 DNA。经超微量分光光度计(Thermo Fisher,NanoDrop 2000C 型)检测提取 DNA 的浓度,保存于-20℃备用。

样品 DNA 提取:取进境美国大豆 32 份,每份样品取 100 g,去掉发霉、变色的大豆,放入 500 mL 锥形瓶中,并加入 250 mL 蛋白胍缓冲水。用 PBS 缓冲液在 200 r·min<sup>-1</sup> 摇瓶洗脱 1 h,4 400 r·min<sup>-1</sup> 离心去除上清,转移到 50 mL 离心管,继续离心

20 min,收集最后的沉淀物并用上述试剂盒和方法提取及检测 DNA。

1.2.3 特异性试验 以供试菌株的 DNA 为模板,无菌水为空白对照,进行实时荧光 PCR 扩增。10 μL 扩增体系:5 μL 2 × TaqMan® Universal PCR Master Mix,0.5 μL 引物 DCF (10 μmol·L<sup>-1</sup>),0.5 μL 引物 DCR (10 μmol·L<sup>-1</sup>),0.5 μL 探针 DCP (10 μmol·L<sup>-1</sup>),1 μL 模板 DNA,加 RNase free ddH<sub>2</sub>O 至 10 μL。在定量 PCR 仪(ABI Prism 7900 型)中进行反应,反应程序为:95℃ 10 min;95℃ 15 s,60℃ 1 min,共 40 个循环。

1.2.4 实时荧光 PCR 体系的优化 引物浓度优

化:以大豆北方茎溃疡病菌 BF125 菌株的 DNA 为模板,按照 1.2.3 反应体系中其他成分浓度不变,将正反引物浓度设置为 0.1 ~ 1.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,以 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  递增,根据扩增反应的循环阈值(Ct)和扩增曲线的荧光信号增加值( $\Delta\text{Rn}$ )选择最佳引物浓度。

探针浓度优化:以 BF125 菌株的 DNA 为模板,按照 1.2.3 反应体系中其他成分浓度不变,选择最佳引物浓度,探针浓度设置为 0.1 ~ 1.0  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,以 0.1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  递增,根据扩增反应的 Ct 值和扩增曲线的  $\Delta\text{Rn}$  值确定最佳探针浓度。

1.2.5 灵敏度试验 以 BF125 菌株的 DNA 为模板,用 ddH<sub>2</sub>O 将 DNA 进行 10 倍梯度稀释,共 8 个梯度,每个梯度做 3 次重复,进行灵敏度试验。在 10  $\mu\text{L}$  反应体系中,DNA 含量分别设置为 10 ng、1.0 ng、100 pg、10 pg、1.0 pg、100 fg、10 fg 和 1.0 fg。利用优化后的体系进行实时荧光 PCR,测定灵敏度并建立标准曲线。

1.2.6 重复性试验 以 BF125 菌株的 DNA 为模板

进行重复性检测。用上述相同的条件分别进行 3 次独立实验,分析组间差异。计算平均 Ct 值、标准偏差(Standard Deviation, SD)和变异系数(Coefficient of Variation, CV)。

1.2.7 样品检测 取本实验室保存的进境美国大豆样品,参照 1.2.2 方法提取 DNA 后,共获得 32 份 DNA 样品。以 BF125 菌株的 DNA 为阳性对照,无菌水为阴性对照,进行实时荧光 PCR 检测,检验该方法的实用性。

## 2 结果与分析

### 2.1 特异性检测

供试的 36 株大豆北方茎溃疡病菌以及其他 35 株参试菌株在相同条件下进行 *TaqMan* MGB 实时荧光 PCR 检测,用无菌水作为空白对照,结果显示:36 株不同地理来源的大豆北方茎溃疡病菌的 PCR 反应均生成明显的扩增曲线,而其他 35 株参试菌株及空白对照均无扩增(表 1 和图 2),说明设计的引物和探针具有较好的特异性。

表 1 参试菌株信息及检测结果  
Table 1 Sources of strain used in the study and detection results

| 菌株编号<br>Strain number | 菌种名<br>Strain name         | 来源地<br>Location | 寄主<br>Host | 鉴定时间(年.月)<br>Identification time<br>(year. month) | 实时荧光 PCR 检测结果<br>Result of real-time PCR |
|-----------------------|----------------------------|-----------------|------------|---|--|
| BF-2                  | <i>Diaporthe caulivora</i> | 美国              | 大豆         | 2018.03   | 阳性 Positive                              |
| BF-3                  | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.03   | 阳性 Positive                              |
| BF-4                  | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.03   | 阳性 Positive                              |
| BF-5                  | <i>D. caulivora</i>        | 巴西              | 大豆         | 2018.03   | 阳性 Positive                              |
| BF10                  | <i>D. caulivora</i>        | 阿根廷             | 大豆         | 2018.10   | 阳性 Positive                              |
| BF11                  | <i>D. caulivora</i>        | 阿根廷             | 大豆         | 2018.10   | 阳性 Positive                              |
| BF12                  | <i>D. caulivora</i>        | 阿根廷             | 大豆         | 2018.10   | 阳性 Positive                              |
| BF13                  | <i>D. caulivora</i>        | 阿根廷             | 大豆         | 2018.10   | 阳性 Positive                              |
| BF14                  | <i>D. caulivora</i>        | 阿根廷             | 大豆         | 2018.10   | 阳性 Positive                              |
| BF15                  | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.10   | 阳性 Positive                              |
| BF16                  | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.10   | 阳性 Positive                              |
| BF100                 | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.01   | 阳性 Positive                              |
| BF101                 | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.03   | 阳性 Positive                              |
| BF102                 | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.03   | 阳性 Positive                              |
| BF105                 | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |
| BF106                 | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |
| BF109                 | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |
| BF110                 | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |
| BF111                 | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |
| BF120                 | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |
| BF121                 | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |
| BF122                 | <i>D. caulivora</i>        | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |

表 1(续)

| 菌株编号<br>Strain number | 菌种名<br>Strain name             | 来源地<br>Location | 寄主<br>Host | 鉴定时间(年.月)<br>Identification time<br>(year. month) | 实时荧光 PCR 检测结果<br>Result of real-time PCR |
|-----------------------|--------------------------------|-----------------|------------|---|--|
| BF123                 | <i>D. caulivora</i>            | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |
| BF125                 | <i>D. caulivora</i>            | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |
| BF126                 | <i>D. caulivora</i>            | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |
| BF127                 | <i>D. caulivora</i>            | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |
| BF128                 | <i>D. caulivora</i>            | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阳性 Positive                              |
| BF130                 | <i>D. caulivora</i>            | 加拿大             | 大豆         | 2019.01   | 阳性 Positive                              |
| BF131                 | <i>D. caulivora</i>            | 加拿大             | 大豆         | 2019.01   | 阳性 Positive                              |
| BF132                 | <i>D. caulivora</i>            | 加拿大             | 大豆         | 2019.01   | 阳性 Positive                              |
| BF134                 | <i>D. caulivora</i>            | 加拿大             | 大豆         | 2019.01   | 阳性 Positive                              |
| BF135                 | <i>D. caulivora</i>            | 加拿大             | 大豆         | 2019.06   | 阳性 Positive                              |
| BF137                 | <i>D. caulivora</i>            | 加拿大             | 大豆         | 2019.06   | 阳性 Positive                              |
| BF138                 | <i>D. caulivora</i>            | 加拿大             | 大豆         | 2019.06   | 阳性 Positive                              |
| BF140                 | <i>D. caulivora</i>            | 加拿大             | 大豆         | 2019.06   | 阳性 Positive                              |
| BF150                 | <i>D. caulivora</i>            | 美国              | 大豆         | 2019.06   | 阳性 Positive                              |
| Select-1              | <i>D. aspalathi</i>            | 美国              | 大豆         | 2008.08   | 阴性 Negative                              |
| BF112                 | <i>D. aspalathi</i>            | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阴性 Negative                              |
| BF113                 | <i>D. aspalathi</i>            | 美国              | 大豆         | 2018.05   | 阴性 Negative                              |
| P1232                 | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.08   | 阴性 Negative                              |
| P1233                 | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.08   | 阴性 Negative                              |
| P1234                 | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.08   | 阴性 Negative                              |
| P1235                 | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.08   | 阴性 Negative                              |
| P1236                 | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.08   | 阴性 Negative                              |
| P1237                 | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.08   | 阴性 Negative                              |
| P1231                 | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.08   | 阴性 Negative                              |
| P1238                 | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.08   | 阴性 Negative                              |
| P1239                 | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.08   | 阴性 Negative                              |
| P1240                 | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.08   | 阴性 Negative                              |
| P1241                 | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.08   | 阴性 Negative                              |
| P1242                 | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.08   | 阴性 Negative                              |
| P1220                 | <i>D. phaseolorum</i>          | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| P1222                 | <i>D. phaseolorum</i>          | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| P1224                 | <i>D. phaseolorum</i>          | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| P1227                 | <i>D. phaseolorum</i>          | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| NJ9                   | <i>D. unsluensis</i>           | 美国              | 大豆         | 2021.10   | 阴性 Negative                              |
| NJ10                  | <i>D. longicolla</i>           | 美国              | 大豆         | 2021.10   | 阴性 Negative                              |
| NJ12                  | <i>D. aspalathi</i>            | 美国              | 大豆         | 2021.10   | 阴性 Negative                              |
| Ba18                  | <i>Alternaria</i> sp.          | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| Ba21                  | <i>Cercospora canescens</i>    | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| Ba2                   | <i>Chaetomium</i> sp.          | 巴西              | 大豆         | 2018.11   | 阴性 Negative                              |
| Ba1                   | <i>Chaetomium arxii</i>        | 巴西              | 大豆         | 2018.11   | 阴性 Negative                              |
| Ba22                  | <i>Colletotrichum</i> sp.      | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| Ba17                  | <i>D. longicolla</i>           | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| Ba9                   | <i>Fusarium</i> sp.            | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| Ba15                  | <i>Gibberella fujikuroi</i>    | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| C5                    | <i>Marasmiaceae</i> sp.        | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| Ba39                  | <i>Macrophomina phaseolina</i> | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| Ba32                  | <i>Sordaria</i> sp.            | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| Ba4                   | <i>Thielavia hycaniae</i>      | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |
| Ba7                   | <i>Talaromyces assiutensis</i> | 巴西              | 大豆         | 2020.04   | 阴性 Negative                              |

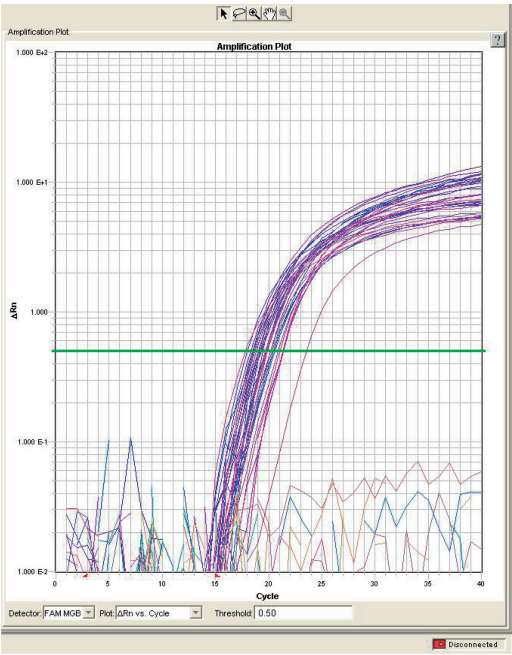


图 2 大豆北方茎溃疡病菌实时荧光 PCR 的特异性试验

Fig.2 Specificity of the real-time fluorescent PCR assay for *D. caulivora*

2.2 实时荧光定量 PCR 反应体系优化

2.2.1 引物浓度优化 设置不同浓度的引物,从  $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  至  $1.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,以  $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  递增,进行引物浓度优化试验。结果显示,在  $0.1\sim 0.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  范围内,Ct 值随着浓度增大而减小,而  $\Delta\text{Rn}$  值随着浓度增大而增大。因此,引物的最佳浓度为  $0.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,此时 Ct 值最小,并且  $\Delta\text{Rn}$  值达到最大(图 3)。

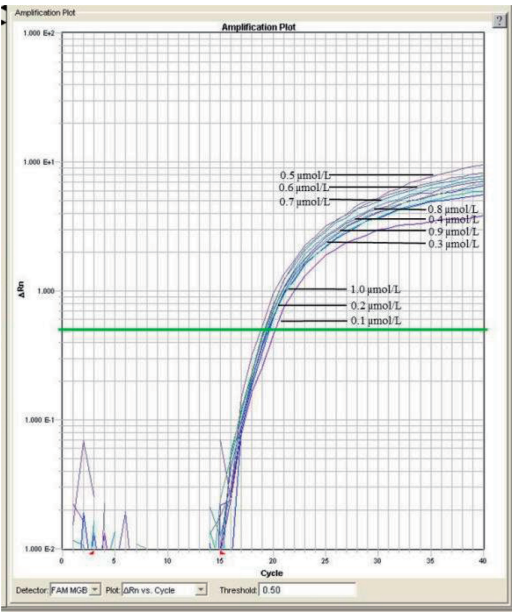


图 3 引物浓度的优化

Fig.3 The optimization of primer concentration

2.2.2 探针浓度优化 在确定最佳引物浓度的基础上,设置不同浓度的探针,从  $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  至  $1.0\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,以  $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  递增,进行探针浓度优化试验。结果显示:Ct 值随着浓度增大而减小, $\Delta\text{Rn}$  值随着浓度增大而增大;当探针浓度为  $0.6, 0.8$  和  $0.9\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, $\Delta\text{Rn}$  值均较高,Ct 值均较小,三者差别不大(图 4)。因此,从经济实惠的角度考虑,最终选定  $0.6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  为探针的最佳浓度。

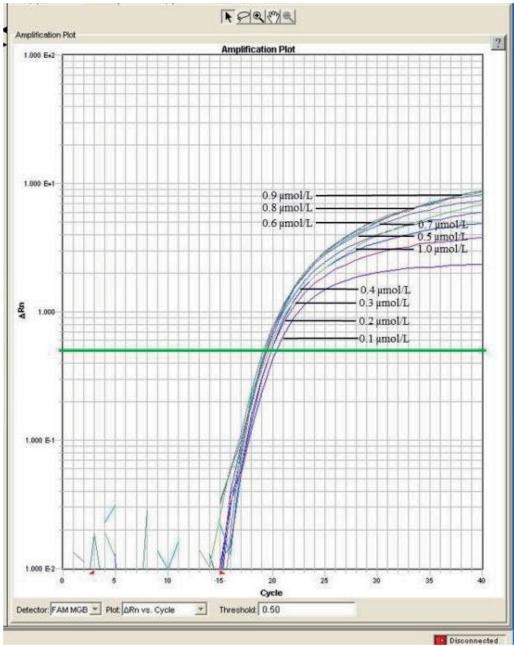


图 4 探针浓度的优化

Fig.4 The optimization of probe concentration

2.2.3 优化后的反应体系 实时荧光 PCR 引物和探针浓度筛选结果表明,采用  $0.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的引物浓度和  $0.6\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的探针浓度进行检测时,可获得较高的  $\Delta\text{Rn}$  值和较小的 Ct 值,即优化后的反应体系为: $5\text{ }\mu\text{L } 2\times\text{ TaqMan}^{\circledR}\text{ Universal PCR Master Mix}$ ,  $0.5\text{ }\mu\text{L}$  引物 DCF ( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $0.5\text{ }\mu\text{L}$  引物 DCR ( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $0.6\text{ }\mu\text{L}$  探针 DCP ( $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $1\text{ }\mu\text{L}$  DNA, ddH<sub>2</sub>O 补足  $10\text{ }\mu\text{L}$ 。

2.3 灵敏度检测及标准曲线的建立

灵敏度对比结果显示,当 DNA 含量为  $1.0\text{ pg}$  时,可以检测到最低的  $\Delta\text{Rn}$  值,此时对应的 Ct 值不大于  $35.0$ ;当 DNA 含量为  $1.0\text{ pg}$  以下时,检测不到荧光信号,因此本研究所建立的实时荧光 PCR 方法的最低检测限是  $1.0\text{ pg}$ (图 5)。

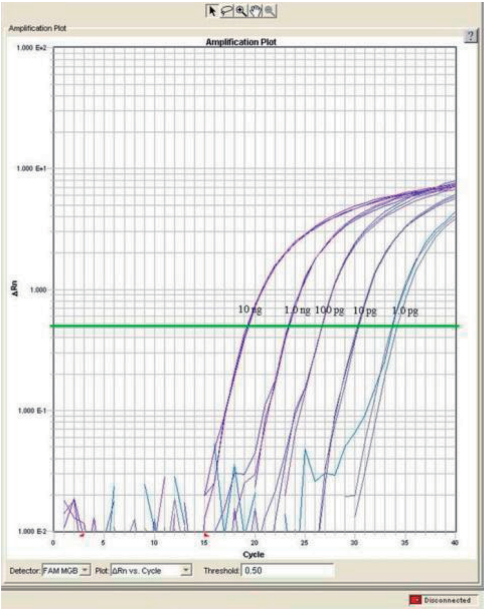


图5 大豆北方茎溃疡病菌实时荧光 PCR 的灵敏度试验

Fig.5 Relative sensitivity of the real-time fluorescent PCR assays for *D. caulivora*

通过对已知浓度梯度的总 DNA 进行实时荧光 PCR 检测,发现 DNA 浓度的对数与可检测到的荧光信号的循环数呈负相关,3 个平行试验结果显示,标准曲线  $y = -3.75x + 19.26 (R^2 = 0.9972)$ ,  $x$  代表 DNA 浓度的对数, $y$  代表相应的 Ct 值(图 6)。

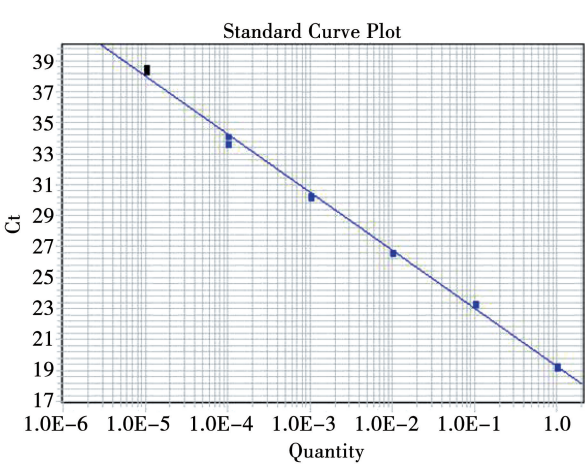


图6 大豆北方茎溃疡病菌实时荧光检测标准曲线

Fig.6 Standard curve obtained for the total DNA quantification of the real-time fluorescent PCR for *D. caulivora*

2.4 重复性检测

以 BF125 菌株 DNA 的 5 个浓度(20,2,0.2,0.02,0.002  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )进行 3 次组间重复测定。从表 2 可知,组内重复 CV 值在 0.02% ~ 0.79% 之间,组间重复 CV 值在 0.09% ~ 0.94% 之间,小于 1%,说明本研究所建立的大豆北方茎溃疡病菌 TaqMan MGB 荧光 PCR 检测方法的重复性和稳定性良好。

表 2 重复性试验结果

Table 2 The results of repeatability TaqMan MGB real-time PCR

| 项目<br>Item     | DNA/<br>( $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) | Ct       |          |          |       |      |      |
|----------------|--|----------|----------|----------|-------|------|------|
|                |  | 重复 1     | 重复 2     | 重复 3     | 平均值   | 标准偏差 | 变异系数 |
|                |  | Repeat 1 | Repeat 2 | Repeat 3 | Mean  | SD   | CV/% |
| 组内 Intra-group | 20   | 19.27    | 19.25    | 19.20    | 19.24 | 0.04 | 0.19 |
|                | 2  | 23.43    | 23.38    | 23.31    | 23.37 | 0.06 | 0.26 |
|                | 0.2  | 26.63    | 26.64    | 26.64    | 26.64 | 0.01 | 0.02 |
|                | 0.02   | 30.31    | 30.32    | 30.32    | 30.32 | 0.01 | 0.02 |
|                | 0.002  | 33.73    | 34.12    | 33.61    | 33.82 | 0.27 | 0.79 |
| 组间 Inter-group | 20   | 19.21    | 19.42    | 19.30    | 19.31 | 0.11 | 0.55 |
|                | 2  | 22.72    | 22.74    | 22.70    | 22.72 | 0.02 | 0.09 |
|                | 0.2  | 26.52    | 26.57    | 26.60    | 26.56 | 0.04 | 0.15 |
|                | 0.02   | 30.72    | 30.63    | 30.45    | 30.60 | 0.14 | 0.45 |
|                | 0.002  | 34.42    | 33.81    | 33.94    | 34.06 | 0.32 | 0.94 |

2.5 实际样品检测

通过本研究设计的引物及探针对 1.2.7 中 32 份进境美国大豆 DNA 样品进行北方茎溃疡病菌的特异性筛查,共检测出阳性样品 19 份(图 7)。说

明本研究所建立的大豆北方茎溃疡病菌 TaqMan MGB 荧光 PCR 检测方法效果良好,能够直接用于进境大豆样品中针对大豆北方茎溃疡病菌的检测筛查。

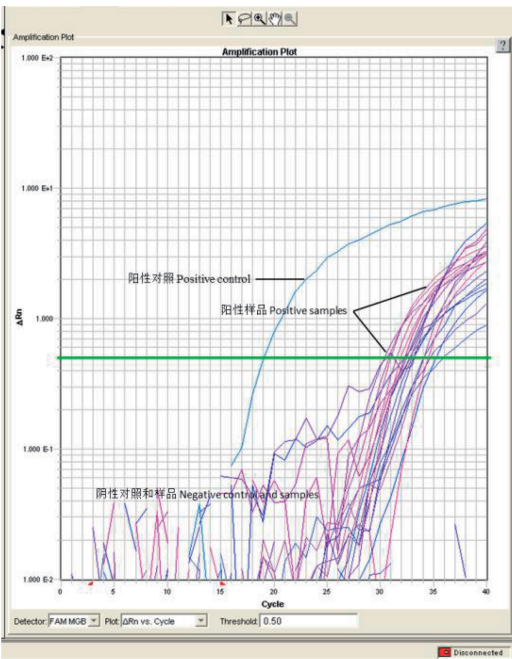


图7 实际样品中大豆北方茎溃疡病菌的检测

Fig.7 Detection of *D. caulivora* in soybean samples

3 讨论

自古以来,营养丰富的大豆及其制品是中国和亚洲各国的传统美食。随着中国对大豆制品和饲料的需求不断增加,每年从美国、巴西和阿根廷等国进口的大豆已近1亿t,是我国进口规模最大的粮食产品。大豆是初级加工农产品,携带有害生物种类繁多,疫情复杂,是口岸检疫工作中疫情截获较多的农产品<sup>[20]</sup>,大量进口大豆对我国生物安全构成了巨大的挑战。由于真菌类生物形态微小、鉴定特征复杂和培养纯化耗时较长等原因,真菌类有害生物是目前口岸各类有害生物中检测用时最长的一类检测对象。为保证进口粮食生物安全前提下快速检测和通关,有必要采用快速检测方法进行初筛和检测,为后续样品分离鉴定等工作提供指引。

大豆北方茎溃疡病菌以菌丝和子囊壳在大豆植株残体上越冬,在次年5—6月,10~27℃下形成子囊,子囊成熟后开始持续释放子囊孢子<sup>[21]</sup>,子囊孢子通过雨滴和风传播扩散,构成侵染循环。带菌种子、混在种子中的植物病残体是大豆北方茎溃疡病菌远距离传播的重要载体。对于大豆北方茎溃疡病菌的检测和鉴定,单纯依靠形态学方法进行鉴定存在一定困难。间壳座属已报道的种类有1000余种,其中大部分种类是腐生或非专性寄生菌<sup>[22]</sup>。间壳座属种类形态特征十分相似,主要根据其在寄

主上或在活体培养时产生的分生孢子器、分生孢子以及菌落形态特征进行区分,但这些特征受外部环境影响较大,存在较大的变异性,容易与近似种类相混淆<sup>[23]</sup>。早期的大豆种子病害报道中,涉及间壳座属种类较少,仅有 *D. aspalathi*、*D. caulivora*、*D. kongii*、*D. longicolla* 和 *D. sojae* 等少数种类的报道<sup>[24]</sup>,且由于认识和研究手段局限性,对大豆北方茎溃疡病菌及其近似种物种识别能力非常有限,大量近似种类并未获得准确鉴定。随着真菌分类研究的不断深入,近年来的研究报道了大量新的种类,例如美国大豆上的 *D. novem*<sup>[25]</sup>、*D. ueckeræ*<sup>[26]</sup>、*D. unshiuensis*<sup>[26]</sup>、*D. bacilloides*<sup>[26-27]</sup>、*D. flavescens*<sup>[26-27]</sup> 和 *D. insulistroma*<sup>[26-27]</sup> 等。因此,建立在旧的物种识别基础上的检测方法也不可避免地具有极大的局限性,这些种类间形态相似,亲缘关系相近,很难准确区分<sup>[28]</sup>,容易误判。此外,在实际检测过程中,大豆北方茎溃疡病菌需要培养近30d左右才能产生有性繁殖结构,如子囊和子囊孢子,很难产生分生孢子器和分生孢子<sup>[16]</sup>,采用形态学检测方法也具有较大局限性。

基于DNA序列对物种进行分类鉴定是提高物种识别鉴定能力的有效手段。张建成<sup>[16]</sup>、王颖<sup>[29]</sup>、张莹<sup>[30]</sup>等利用形态学和ITS序列测定相结合方法,分别从美国和加拿大等国进境样品中鉴定出大豆北方茎溃疡病菌。ITS序列在植物病原真菌种类鉴定中种内变异小、种间变异大<sup>[31]</sup>,已被广泛用于构建系统进化树、确定物种分类地位等,并被推荐为真菌通用DNA条形码<sup>[32]</sup>。在间壳座属内,ITS序列具有一定物种划分能力,但对该属内一些复合种和近源种等难以有效鉴定,利用多基因序列分析对该属物种进行划分更加科学,但较为耗时耗力。由于人类认识自然局限性,目前的物种划分可能并不准确,因此建立在目前分类基础之上的各类检测识别方法不可避免地也具有一定时代局限性。传统上,用作种名根据的标本被称为模式标本(type),它是物种名称的依附实体,是“名称的携带者”。以模式材料为对象的研究更加科学可靠,因此依赖模式分离物的DNA序列开展快速检测方法研究更加有效可靠,溯源准确性更高,是物种识别分类的“源头”。

本研究以大豆北方茎溃疡病菌及其近似种模式分离物的ITS序列为基础,建立了大豆北方茎溃疡病菌实时荧光PCR检测方法,通过对反应体系优

化,确定大豆北方茎溃疡病菌实时荧光 PCR 反应的最佳条件:引物终浓度 0.5 μmol·L<sup>-1</sup>,探针终浓度 0.6 μmol·L<sup>-1</sup>。该检测方法快速简单,只需少量样品 DNA,仅需 1 h 就可完成 PCR 步骤,得到检测结果,避免了普通分子检测技术中的探针制备、电泳等处理过程。具有特异性强、灵敏度高和交叉污染低等特点,整个检测过程完全闭管,不需 PCR 后处理,消除了 PCR 产物的污染。该方法以模式分离物序列为设计基础,能够准确识别大豆北方茎溃疡病菌,从而大大提高口岸进境大豆中对该病菌的检验鉴定效率,有效控制其所导致的生物入侵病害的传播与扩散。

4 结论

本研究利用 TaqMan MGB 探针,建立了大豆北方茎溃疡病菌的实时荧光 PCR 快速检测方法。通过优化翻译,确认了实时荧光 PCR 反应的最佳条件:引物终浓度 0.5 μmol·L<sup>-1</sup>,探针终浓度 0.6 μmol·L<sup>-1</sup>。通过灵敏度试验,确定了在 10 μL 反应体系中,DNA 含量最低检测限达 1.0 pg。重复性检测表明本检测方法的重复性和稳定性良好。实际样本检测结果表明,所建立的大豆北方茎溃疡病菌 TaqMan-MGB 荧光 PCR 能够成功用于该病菌检测。本研究为大豆北方茎溃疡病菌的准确鉴定提供了依据,能够有效提高疫情检出率,降低该病菌传入和扩散风险。

参考文献

[1] WELCH A W, GILLMAN J C. Hetero-and homo-thallic types of *Diaporthe* in soybeans[J]. *Phytopathology*, 1948, 38: 628-637.

[2] ANDREWS E A. Stem blight of soybeans in Michigan[J]. *Plant Disease Reporter*, 1950, 34: 214.

[3] CRALL J M. Soybean disease in Iowa in 1949[J]. *Plant Disease Reporter*, 1950, 34: 96-97.

[4] KERNKAMP M F, GILBERT J W. Diseases of soybeans new to Min-nesota[J]. *Plant Disease Reporter*, 1951, 35: 509-510.

[5] ATHOW K L, CALDWELL R M. A comparative study of *Diaporthe* stem canker and pod and stem blight of soybean [J]. *Phytopathology*, 1954, 44: 319-325.

[6] HILDEBRAND A A. Stem canker: A disease of increasing importance on soybean in Ontario[J]. *Soybean Digest*, 1952, 12(9): 12-15.

[7] EPPO, 2023. EPPO Global database. In: EPPO Global database, Paris, France; EPPO. <https://gd.epppo.int/>.

[8] PIOLI R N, MORANDI E N, BISARO V. First report of soybean stem canker caused by *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* in

Argentina[J]. *Plant Disease*, 2001, 85(1): 95.

[9] COSTAMILAN L M, YORINORI J T, ALMEIDA Â M R , et al. First report of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* infecting soybean plants in Brazil[J]. *Tropical Plant Pathology*, 2008, 33(5): 381-385.

[10] VRANDECIC K, COSIC J, RICCIONI L, et al. Isolation of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* from Abutilon theophrasti in Croatia[J]. *Plant Pathology*, 2005, 54(4): 576.

[11] JASNIC S, VIDIC M. *Diaporthe phaseolorum* (Cke. & Ell. ) Sacc. var. *caulivora* Athow & Caldwell, a new parasite of soybean in Yugoslavia[J]. *Zastita Bilja*, 1983, 34(2): 213-223.

[12] SKRIPKA O V, PODKINA D V. Stem cancer-A dangerous soybean disease[J]. *Mikologiya i Fitopatologiya*, 1990, 24(3): 265-267.

[13] VIDIC M. Variability of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* on soybean in the Vojvodina province in Serbia[J]. *Zastita Bilja*, 1991, 42(3): 183-189.

[14] OH JEUNG HAING. Effect of field sanitation on the pod and stem blight caused by *Phomopsis* spp. in soybean[J]. *Korean Journal of Plant Pathology*, 1998, 14(5): 526-530.

[15] FROSHEISER F I. Studies on etiology and epidemiology of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*, the case of stem canker of soyabean[J]. *Phytopathology*, 1957, 47: 87-94.

[16] 张建成, 顾建锋, 徐瑛, 等. 美国进境大豆北方茎溃疡病菌的分离与鉴定[J]. *植物保护*, 2007, 33(2): 104-108. (ZHANG J C, GU J F, XU Y, et al. Isolation and identification of northern stem canker of soybean from America[J]. *Plant Protection*, 2007, 33(2): 104-108. )

[17] 国家质量监督检验检疫总局. 大豆茎溃疡病菌检疫鉴定方法: SN/T 1899 - 2007 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2007. (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Identification of *Diaporthe phaseolorum* (Cooke et Ell. ) Sacc. var. *caulivora* Athow et Caldwell and *Diaporthe phaseolorum* (Cooke et Ell. ) Sacc. var. *meridionalis* F. A. Fernandez; SN/T 1899 - 2007 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2007. )

[18] 国家质量监督检验检疫总局. 大豆茎溃疡病菌检疫鉴定方法—TaqMan MGB 探针实时荧光 PCR 检测方法: SN/T 3399—2012 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2013. (General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. Detection and identification of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* and *Diaporthe phaseolorum* var. *meridionalis*-Real-time fluorescent PCR with TaqMan MGB probe; SN/T 3399—2012 [S]. Beijing: Standards Press of China, 2013. )

[19] 段维军, 段丽君, 党晨阳, 等. 检疫性真菌 DNA 提取方法的比较[J]. *植物检疫*, 2015, 29(4): 43-47. (DUAN W J, DUAN L J, DANG C Y, et al. The comparison of different DNA extraction procedures for molecular detection of quarantine fungi [J]. *Plant Quarantine*, 2015, 29(4): 43-47. )

[20] 吕燕, 郭立新, 张慧丽, 等. 2009 – 2019 年中国进口大豆中检疫性有害生物截获情况分析[J]. 大豆科学, 2021, 40(2): 257-264. (LYU Y, GUO L X, ZHANG H L, et al. Interception analysis of quarantine pests in China’s imported soybeans from 2009 to 2019[J]. Soybean Science, 2021, 40(2): 257-264. )

[21] VIDIC M, JASNIC S. Effect of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* on yield and quality of soyabean[J]. Zastita Bilja, 1988, 39(2): 217-225.

[22] CROUS P W, GAMS W, STALPERS J A, et al. MycoBank: An online initiative to launch mycology into the 21st century [J]. Studies in Mycology, 2004, 50(1): 19-22.

[23] 段维军, 段丽君, 陈先锋, 等. 进境乌克兰玉米中夹杂向日葵间座壳菌的鉴定[J]. 菌物学报, 2016, 35(12): 1503-1513. (DUAN W J, DUAN L J, CHEN X F, et al. Identification of the quarantine fungus *Diaporthe helianthi* from the corn seeds imported from Ukraine[J]. Mycosystema, 2016, 35(12): 1503-1513. )

[24] 吴品珊, 严进. 值得关注的大豆新病害[J]. 植物检疫, 2003, 17(4): 226-228. (WU P S, YAN J. New soybean diseases worthy of attention [J]. Plant Quarantine, 2003, 17(4): 226-228. )

[25] 张莹, 胡佳续, 滕少娜, 等. 进境美国大豆中值得关注的真菌 *Diaporthe novem* [J]. 菌物学报, 2022, 41(3): 412-419. (ZHANG Y, HU J X, TENG S N, et al. A noteworthy fungus *Diaporthe novem* on soybean imported from America [J]. Mycosystema, 2022, 41(3): 412-419. )

[26] 史亚千, 江宏, 朱崧琪, 等. 美国大豆 3 种间座壳属新种及其检疫重要性[J]. 植物检疫, 2022, 36(5): 73-76. (SHI Y Q, JIANG H, ZHU S Q, et al. 3 new species of *Diaporthe* from US soybean and their quarantine significances[J]. Plant Quarantine, 2022, 36(5): 73-76. )

[27] PETROVIĆ K, SKALTSAS D, CASTLEBURY L A, et al. *Diaporthe* seed decay of soybean [*Glycine max* (L.) merr.] is endemic in the United States, but new fungi are involved [J]. Plant Disease, 2021, 105(6): 1621-1629.

[28] 段维军, 郭立新. 基于 PCR 技术的植物病原真菌检测技术研究进展[J]. 植物检疫, 2008, 22(6): 385-388, 384. (DUAN W J, GUO L X. Research progress on detection technology of plant pathogenic fungi based on PCR technology [J]. Plant Quarantine, 2008, 22(6): 385-388, 384. )

[29] 王颖, 陈枝楠, 章桂明, 等. 大豆北方茎溃疡病菌的检疫鉴定[J]. 植物检疫, 2007, 21(4): 195-197. (WANG Y, CHEN Z N, ZHANG G M, et al. Identification of northern stem canker from imported soybean [J]. Plant Quarantine, 2007, 21(4): 195-197. )

[30] 张莹, 罗加凤, 刘鹏, 等. 加拿大进境燕麦种子中大豆北方茎溃疡病病菌的检疫鉴定[J]. 中国植保导刊, 2018, 38(2): 76-80. (ZHANG Y, LUO J F, LIU P, et al. Identification of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* from improting oat seeds from Canadian [J]. China Plant Protection, 2018, 38(2): 76-80. )

[31] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics [M]//PCR Protocols. Amsterdam; Elsevier, 1990: 315-322.

[32] SCHOCH C L, SEIFERT K A, HUHNDOERF S, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012, 109(16): 6241-6246.

## 协 办 单 位

中国作物学会大豆专业委员会  
东北农业大学大豆研究所  
吉林省农业科学院大豆研究所  
南京农业大学大豆研究所  
辽宁省农业科学院作物研究所  
河北省农林科学院粮油作物研究所