

麦桂婉,肖文超,李云锋,等.香蕉细菌性鞘腐病菌实时荧光定量PCR检测方法的建立[J].华中农业大学学报,2025,44(5):308-313.
DOI:10.13300/j.cnki.hnlkxb.2025.05.031

香蕉细菌性鞘腐病菌实时荧光定量PCR检测方法的建立

麦桂婉,肖文超,李云锋,李华平,饶雪琴

华南农业大学植物保护学院/广东省微生物信号与病害防治重点实验室,广州 510642

摘要 为实现香蕉细菌性鞘腐病的早期准确检测,基于香蕉细菌性鞘腐病菌的管家基因*fusA*设计特异性引物,优化扩增条件,建立了SYBR Green I 实时荧光定量PCR 检测方法,并与常规PCR 进行比较。结果显示,SYBR Green I 实时荧光定量PCR 检测质粒DNA 的灵敏度为 3.3×10^{-5} ng/ μ L,是常规PCR 的100倍。利用建立的方法对接种香蕉细菌性鞘腐病菌 XJ5-1 的香蕉叶鞘和土样进行检测,结果发现该方法能检测到香蕉叶鞘中拷贝数为 4.31×10^3 copies/ μ L 和土样中拷贝数为 1.07×10^9 copies/ μ L 的 XJ5-1;能检测出接种浓度为 1×10^3 CFU/mL 的温室土样中的 XJ5-1,灵敏度是常规PCR 的100倍。结果表明,建立的SYBR Green I 实时荧光定量PCR 法快速简便、灵敏度高,可实现香蕉细菌性鞘腐病的早期诊断。

关键词 香蕉细菌性鞘腐病; *Dickeya dadantii*; SYBR Green I 实时荧光定量PCR

中图分类号 S432.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2025)05-0308-06

香蕉(*Musa spp.*)是我国重要的热带和亚热带水果,随着种植面积的扩大和复种指数的提高,生产过程中病虫害逐渐增多,给香蕉生产造成了严重经济损失。香蕉细菌病害主要包括细菌性枯萎病、细菌性软腐病、细菌性凋萎病和细菌性鞘腐病,其中,香蕉细菌性鞘腐病是为害香蕉的重要病害之一^[1]。香蕉细菌性鞘腐病是我国近年来新发现的病害,在我国南方香蕉产区部分地块发病率高达70%~80%^[2],常与香蕉细菌性软腐病同时发生^[3],给香蕉产业造成严重经济损失。

香蕉细菌性鞘腐病在我国广东、广西、云南和海南等地蕉园普遍发生,该病主要危害香蕉中下部叶鞘,病菌从香蕉最外层叶鞘侵染,产生黑褐色小点,随后病斑不断扩大,从外层叶鞘向假茎扩展导致腐烂,叶片由下往上迅速萎蔫黄化,极大影响香蕉生产^[4]。目前已公开报道的香蕉细菌性鞘腐病的病原为 *Dickeya dadantii*^[2, 5],Rao 等^[6]分析了其强致病力菌株XJ12 的全基因组序列。麦桂婉等^[4]鉴定了不同类型香蕉细菌性鞘腐病病原和致病力分化。为了避免该病害给香蕉生产带来更大的经济损失,建立快

速、准确、灵敏的香蕉细菌性鞘腐病菌的检测方法对早期病菌的监测具有重要意义。

Dickeya 所引起病害的常规检测方法有 PCR 和实时荧光定量 PCR。Liu 等^[2]根据管家基因设计引物,PCR 扩增后测序,并进行系统发育分析,明确区分了 *Dickeya* 属内不同菌株。实时荧光定量 PCR 技术根据荧光基团的累积,实时监测 PCR 过程,并通过标准曲线对样品进行定量分析^[7]。与常规 PCR 相比,实时荧光定量 PCR 因具有灵敏、省时、准确度高等优点^[8],已广泛应用于真菌^[9]、病毒^[10]和细菌^[11]等不同病原检测。目前尚未有香蕉细菌性鞘腐病原菌实时荧光定量 PCR 检测的报道。为了早发现和科学防控该病害,本研究在前期病原鉴定的基础上建立了香蕉细菌性鞘腐病原 *D. dadantii* SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测方法,以期为香蕉细菌性鞘腐病菌的早期诊断提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

华南农业大学植物病毒研究室保存的香蕉细菌

收稿日期:2024-12-25

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-31)

麦桂婉,E-mail: 824502063@qq.com

通信作者:饶雪琴,E-mail:raoxq@hotmail.com

性鞘腐病菌(*D. dadantii*)标准菌株XJ5-1^[2],分离自广州南沙‘广粉1号’。

1.2 实时荧光定量PCR体系的优化和常规PCR

细菌DNA的提取采用TIANGEN细菌基因组DNA提取试剂盒,提取的DNA保存于-20℃冰箱。根据*D. dadantii*的管家基因*fusA*设计特异性引物*fusA*-F (5'-GAACGCAGAACCAACAGGTAAC-3') 和 *fusA*-R (5'-CAACTGGAATGACTCCGAT-CAG-3')作为实时荧光定量PCR引物和常规PCR引物。对SYBR Green I 实时荧光定量PCR引物浓度和退火温度进行优化,以确定SYBR Green I 实时荧光定量PCR最佳反应体系。常规PCR反应条件为95℃ 5 min; 94℃ 40 s, 53℃ 30 s, 72℃ 1 min, 35个循环; 72℃ 7 min, 保存于4℃。PCR产物用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 实时荧光定量PCR标准曲线的建立

以提取的XJ5-1 DNA为模板进行特异性扩增,切胶回收后进行连接和转化。对阳性菌落进行PCR鉴定和质粒测序。阳性质粒的质量浓度用核酸蛋白测定仪(Implen,德国)进行测定。以浓度为3.3 ng/μL的质粒DNA作为质粒标准品,用无菌ddH₂O进行10倍梯度稀释,以不同稀释度的质粒DNA为模板分别进行实时荧光定量PCR反应,建立标准曲线,3次生物学重复、3次技术重复。

1.4 实时荧光定量PCR与常规PCR灵敏度检测

将3.3 ng/μL的质粒DNA标准品以10倍梯度稀释后作为模板,分别取3.3×10⁻¹、3.3×10⁻²、3.3×10⁻³、3.3×10⁻⁴和3.3×10⁻⁵ ng/μL的质粒DNA各1 μL进行SYBR Green I 实时荧光定量PCR和常规PCR检测,确定2种方法检测质粒DNA的灵敏度,以无菌ddH₂O作对照,3次生物学重复。

1.5 香蕉病株检测

利用针刺法对4~5叶的健康‘巴西蕉’接种XJ5-1,在叶鞘上分别注射浓度为1×10⁸、1×10⁶、1×10⁴、1×10² CFU/mL的XJ5-1菌液100 μL,随后于28℃温室中培养,1周后观察发病情况。以无菌ddH₂O代替菌液注射香蕉为对照。采集上述香蕉样品提取DNA,利用常规PCR和SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测香蕉植株中XJ5-1,3次生物学重复。

1.6 土样检测

利用相同浓度的XJ5-1菌液接种不同土样(新基质土、多年复种的温室土、华南农业大学跃进北大田

菜地土),用SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测不同土样中XJ5-1。将XJ5-1加入100 mL LB培养液中过夜培养,调整菌液浓度为1×10⁸ CFU/mL。在上述经过灭菌处理的不同土样(5 g)中加入3 mL 1×10⁸ CFU/mL XJ5-1菌液,放置0.5 h,以无菌ddH₂O处理作对照。随后取0.2 g土样提取DNA,利用SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测土样中XJ5-1,3次生物学重复。

用不同浓度XJ5-1菌液接种温室土样,用常规PCR和SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测温室土样中XJ5-1。将1×10⁸ CFU/mL XJ5-1菌液进行10倍梯度稀释,使菌液浓度为1×10³~1×10⁷ CFU/mL。分别取3 mL接种于5 g灭菌的温室土样中,放置0.5 h,以无菌ddH₂O处理作对照。随后取0.2 g土样提取DNA,进行常规PCR和SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测,3次生物学重复。

2 结果与分析

2.1 SYBR Green I 实时荧光定量PCR的标准曲线

经过多次试验,SYBR Green I 实时荧光定量PCR反应体系在退火温度为58℃、引物*fusA*-F/*fusA*-R浓度为0.2 μmol/L时,扩增效果最佳。采用优化后的体系对不同质量浓度的质粒DNA进行SYBR Green I 实时荧光PCR扩增,结果显示,以质量浓度分别为3.3×10⁻¹、3.3×10⁻²、3.3×10⁻³、3.3×10⁻⁴和3.3×10⁻⁵ ng/μL的质粒DNA为模板进行扩增,5条扩增曲线的Ct值间距较平均;而以无菌ddH₂O为模板时,无扩增曲线。熔解曲线分析结果显示,利用不同质量浓度质粒DNA为模板扩增的熔解曲线吸收峰单一,表明所建立的SYBR Green I 实时荧光定量PCR扩增体系特异性好,无引物二聚体吸收峰。所建立的标准曲线(图1)的线性方程为:y = -2.990x + 41.50,相关系数R²为0.993,扩增效率E为116%,表明标准样品质粒DNA质量浓度的对数值与Ct值呈线性相关。

2.2 SYBR Green I 实时荧光定量PCR与常规PCR的检测灵敏度

以10倍梯度稀释(3.3×10⁻¹~3.3×10⁻⁵ ng/μL)的XJ5-1质粒DNA为模板,进行实时荧光定量PCR和常规PCR灵敏度检测。

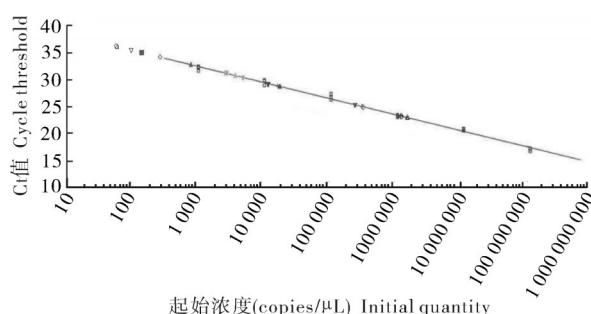
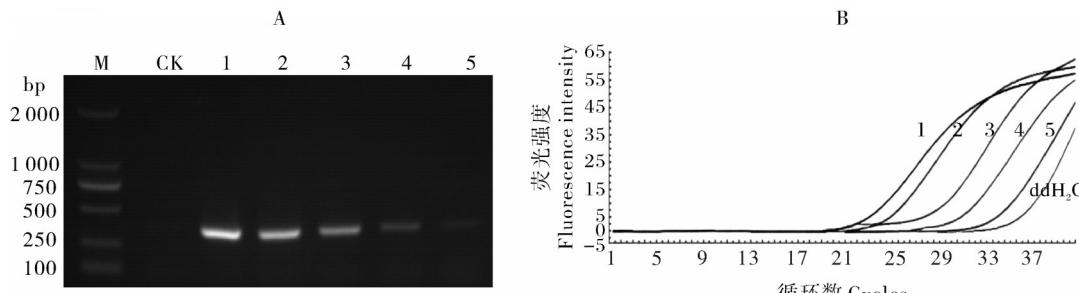


图1 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 标准曲线
Fig. 1 Standard curve for SYBR Green I real-time quantitative PCR

由图2可知,采用常规PCR方法,能从质量浓度为 $3.3 \times 10^{-1} \sim 3.3 \times 10^{-3}$ ng/μL的质粒DNA中扩增



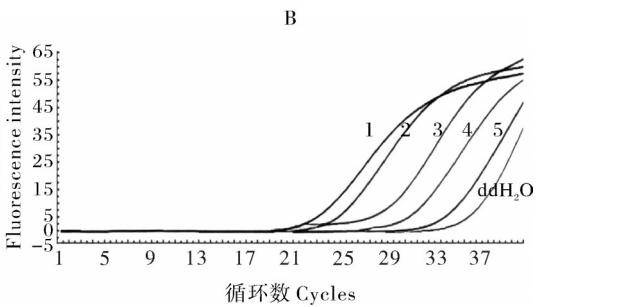
A:常规PCR检测 Conventional PCR detection; B:SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测 SYBR Green I real-time quantitative PCR detection. 1~5:XJ5-1质粒的质量浓度分别为 3.3×10^{-1} 、 3.3×10^{-2} 、 3.3×10^{-3} 、 3.3×10^{-4} 、 3.3×10^{-5} ng/μL。The concentrations of plasmid DNA were 3.3×10^{-1} , 3.3×10^{-2} , 3.3×10^{-3} , 3.3×10^{-4} , 3.3×10^{-5} ng/μL, respectively. M: DL 2 000 marker. CK: 阴性对照 Negative control. The same as below.

图2 常规PCR(A)和SYBR Green I实时荧光定量PCR(B)的检测灵敏度
Fig. 2 Sensitivity comparison of SYBR Green I real-time quantitative PCR and conventional PCR

2.3 不同香蕉病株中XJ5-1的SYBR Green I实时荧光定量PCR检测

将不同浓度XJ5-1菌液接种健康‘巴西蕉’,接种24 h后,香蕉假茎上开始出现褐色病斑,随后病斑逐渐扩大,菌液接种浓度越高发病越快。4 d后采集叶鞘病健交界处样本,提取DNA进行常规PCR和实时荧光定量PCR检测。结果显示,常规PCR可从接种量为 1×10^2 CFU/mL的香蕉叶鞘中检测出XJ5-1(图3A)。采用实时荧光定量PCR检测接种量分别为 1×10^8 、 1×10^6 、 1×10^4 、 1×10^2 CFU/mL的香蕉叶鞘,Ct值分别为23.84、26.59、28.64、30.63,XJ5-1拷贝数分别为 7.92×10^5 、 9.68×10^4 、 2.00×10^4 、 4.31×10^3 copies/μL(图3B)。以上结果表明,常规PCR和SYBR Green I实时荧光定量PCR方法均可以检测出香蕉植株中接种量为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^2$ CFU/mL的XJ5-1。

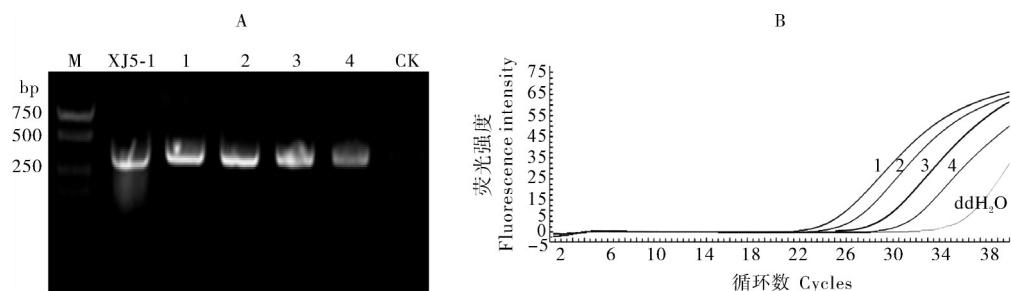
出明显的目的条带;质量浓度为 3.3×10^{-4} ng/μL的质粒DNA,PCR扩增条带弱、不清晰;质量浓度为 3.3×10^{-5} ng/μL的质粒DNA未扩增出目的条带,表明常规PCR检测质粒DNA的灵敏度为 3.3×10^{-3} ng/μL。采用SYBR Green I实时荧光定量PCR方法检测5个质量浓度的质粒DNA,5条扩增曲线的Ct值均小于30(Ct值>35视为阴性),而以无菌ddH₂O为模板的扩增曲线Ct值大于35,检测灵敏度为 3.3×10^{-5} ng/μL,表明SYBR Green I实时荧光定量PCR检测质粒DNA的灵敏度是常规PCR的100倍。



2.4 不同土样中XJ5-1的SYBR Green I实时荧光定量PCR检测

将浓度为 1×10^8 CFU/mL的XJ5-1菌液分别接种新基质土样、温室土样和大田菜地土样,以未接种的土样为对照,分别进行SYBR Green I实时荧光定量PCR检测。由图4可知,未接种的对照土样无扩增信号,而接种后的土样均能检测到较强的扩增信号,Ct值均在15以下(图4A),接种的新基质土样、温室土样和大田菜地土样中XJ5-1拷贝数分别为 4.57×10^9 、 2.88×10^9 、 1.07×10^9 copies/μL,表明SYBR Green I实时荧光定量PCR能有效检测出不同土样中XJ5-1。

以不同浓度XJ5-1菌液分别接种温室土样,提取DNA,用常规PCR和实时荧光定量PCR检测温室土样中XJ5-1。结果显示,常规PCR能从接种量为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^5$ CFU/mL的土样DNA中扩增出明显目的条带,接种量为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ CFU/mL的土样



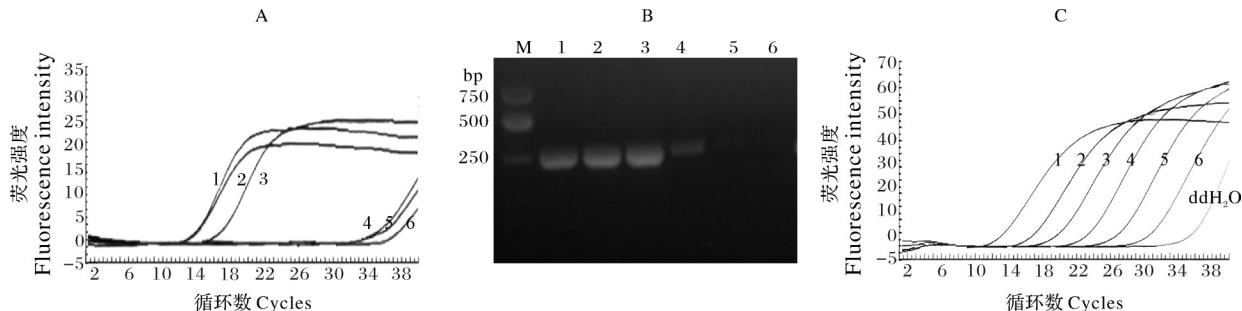
A:常规PCR检测 Conventional PCR detection ;B:SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测 SYBR Green I real-time quantitative PCR detection ;XJ5-1:阳性对照 Positive control;1~4:分别以 1×10^8 、 1×10^6 、 1×10^4 、 1×10^2 CFU/mL XJ5-1接种香蕉叶鞘 Banana leaf sheaths inoculated with 1×10^8 , 1×10^6 , 1×10^4 , 1×10^2 CFU/mL XJ5-1, respectively.

图3 不同接种量香蕉叶鞘中XJ5-1的常规PCR(A)和SYBR Green I实时荧光定量PCR(B)检测

Fig. 3 Conventional PCR and SYBR Green I real-time quantitative PCR detection of XJ5-1 in banana leaf sheaths with different inoculation amounts

DNA中不能扩增出目的条带(图4B),表明常规PCR能检测出接种量为 1×10^5 CFU/mL的温室土样中的XJ5-1。而采用实时荧光定量PCR检测方法,相同接种量的温室土样DNA均呈现明显的扩

增曲线(图4C),说明实时荧光定量PCR能检测出接种量为 $1\times10^3\sim1\times10^8$ CFU/mL的温室土样中的XJ5-1。SYBR Green I实时荧光定量PCR法检测温室土样中XJ5-1的灵敏度是常规PCR法的100倍。



A:接种量为 1×10^8 CFU/mL的不同土样中XJ5-1的SYBR Green I实时荧光定量PCR检测 SYBR Green I real-time quantitative PCR detection of different soil samples of XJ5-1 inoculated with 1×10^8 CFU/mL;1~3:接种土样 Soil samples inoculated with XJ5-1,4~6:未接种土样,其中1和4为基质土,2和5为温室土,3和6为大田菜地土 Uninoculated soil samples, samples 1 and 4 were substrate soil, samples 2 and 5 were used soil from greenhouse, samples 3 and 6 were soil planted vegetables. B:不同接种量温室土样中XJ5-1的常规PCR检测 Conventional PCR detection of used soil from greenhouse with different inoculability quantity of XJ5-1,1~6: $1\times10^8\sim1\times10^3$ CFU/mL. C:不同接种量温室土样中XJ5-1的SYBR Green I实时荧光定量PCR检测 SYBR Green I real-time quantitative PCR detection of used soil from greenhouse with different inoculability quantity of XJ5-1,1~6:同图B Consistent with Fig. B.

图4 不同土样中XJ5-1的常规PCR和SYBR Green I实时荧光定量PCR检测

Fig. 4 Conventional PCR and SYBR Green I real-time quantitative PCR detection of XJ5-1 in different soil samples

3 讨 论

细菌性病害常用的检测方法有常规PCR和实时荧光定量PCR等,而实时荧光定量PCR检测灵敏度高,准确性好,能对样品中病原进行准确定量检测^[12]。本研究建立了SYBR Green I实时荧光定量PCR方法检测香蕉细菌性鞘腐病菌,并对接种后的香蕉植株和不同土样进行了定量分析,为香蕉细菌性鞘腐病的防控奠定了基础。

在SYBR Green I实时荧光定量PCR检测方法

中,荧光染料SYBR Green I能非特异性地与DNA双链结合产生荧光信号,随着PCR产物的增多,荧光信号不断增加^[13];SYBR Green I也能与单链DNA结合产生引物二聚体而影响检测结果^[14],但是通过引物设计可以消除产生的引物二聚体^[15]。本研究根据香蕉细菌性鞘腐病菌的管家基因fusA设计了实时荧光定量PCR的特异引物,溶解曲线为单峰,没有产生引物二聚体,表明引物特异性较好。本研究建立的标准曲线相关系数($R^2=0.993$)和扩增效率($E=116\%$)均符合理想标准曲线的要求($R^2>0.98$,

$90\% < E < 120\%$),表明所建立的SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测结果可靠。

本研究中,不同接种浓度的香蕉植株发病程度不同,利用所建立的SYBR Green I 实时荧光定量PCR可以从接种量为 1×10^2 CFU/mL的香蕉叶鞘中检测出XJ5-1(拷贝数为 4.31×10^3 copies/ μ L),表明本研究建立的SYBR Green I 实时荧光定量PCR可用于香蕉细菌性鞘腐病的早期快速鉴定。同时,本研究对接种量为 1×10^8 CFU/mL的不同土样DNA进行了SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测,均成功检测出XJ5-1。虽然不同土样中的成分和pH值等不同,不同土样提取物对实时荧光定量PCR的干扰作用也不同,但是本研究建立的SYBR Green I 实时荧光定量PCR适用于检测不同土样中的XJ5-1。此外,本研究采用不同浓度的XJ5-1接种温室土,利用SYBR Green I 实时荧光定量PCR能从接种量为 1×10^3 CFU/mL的温室土样中检测到XJ5-1,检测灵敏度是常规PCR的100倍,与利用实时荧光定量PCR方法检测玉米、水稻和香蕉病原菌的结果一致^[16-18],说明SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测香蕉细菌性鞘腐病菌的灵敏度远高于常规PCR,该法比常规PCR更适用于香蕉植株和土样中香蕉细菌性鞘腐病菌的早期检测。

本研究中SYBR Green I 实时荧光定量PCR检测引物是根据*D. dadantii*不同菌株的管家基因*fusA*保守序列设计,由于目前香蕉上由*Dickeya*引起的病害有*D. zeae*引起的香蕉软腐病^[5]和*D. dadantii*引起的香蕉细菌性鞘腐病^[2],因此,本研究建立的SYBR Green I 实时荧光定量PCR方法对*Dickeya*引起的香蕉细菌性鞘腐病具有特异性,不但能检测田间香蕉植株及土壤中的*D. dadantii*,还能早期监测香蕉种苗及盆栽土样中的该病原菌。然而,该方法在其他作物上检测的特异性有待进一步验证。

参考文献 References

- [1] BLOMME G,DITA M,JACOBSEN K S,et al.Bacterial diseases of bananas and enset: current state of knowledge and integrated approaches toward sustainable management [J/OL].Frontiers in plant science, 2017, 8: 1290 [2024-12-25].
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01290>.
- [2] LIU Q,XIAO W,WU Z,et al.Identification of *Dickeya dadantii* as a causal agent of banana bacterial sheath rot in China [J].Journal of plant pathology, 2016,98 (3):503-510.
- [3] LIN B R,SHEN H F,PU X M,et al.First report of a soft rot of banana in mainland China caused by a *Dickeya* sp.(*Pectobacterium chrysanthemi*) [J/OL].Plant disease, 2010, 94 (5) : 640 [2024-12-25].<https://doi.org/10.1094/PDIS-94-5-0640C>.
- [4] 麦桂婉,肖文超,李云锋,等.不同类型香蕉的细菌性鞘腐病病原分子鉴定及致病性分析[J].华南农业大学学报,2024,45(4):535-541.MAI G W,XIAO W C,LI Y F,et al.Molecular identification and pathogenicity analysis of bacterial sheath rot pathogen in different types of banana [J].Journal of South China Agricultural University, 2024, 45 (4) : 535-541 (in Chinese with English abstract).
- [5] 肖文超.香蕉两种细菌病原鉴定及一株香蕉软腐病菌全基因组测序[D].广州:华南农业大学,2014.XIAO W C.Two bacterial diseases identification of banana and the whole genome sequencing of the banana soft rot bacteria [D].Guangzhou: South China Agricultural University, 2014 (in Chinese with English abstract).
- [6] RAO X Q,MAI G W,XIAO W C,et al.Complete genome sequence of *Dickeya dadantii* strain XJ12 causing banana bacterial sheath rot in China[J].Journal of plant pathology, 2023,105 (3):1109-1114.
- [7] 徐小刚,刘雅婷.实时荧光定量PCR在植物病害中的应用[J].中国农学通报,2009,25(7):52-56.XU X G,LIU Y T.Application of real-time fluorescence quantitative PCR in plant disease [J].Chinese agricultural science bulletin, 2009, 25 (7):52-56 (in Chinese with English abstract).
- [8] 杨凤秋,朱正歌.实时定量PCR技术及应用[J].生物学杂志,2006,23(3):44-46.YANG F Q,ZHU Z G.Real-time quantitative PCR and its applications [J].Journal of biology, 2006, 23 (3):44-46 (in Chinese with English abstract).
- [9] FREDERICK R D,SNYDER K E,TOOLEY P W,et al.Identification and differentiation of *Tilletia indica* and *T. walkeri* using the polymerase chain reaction[J].Phytopathology,2000,90(9):951-960.
- [10] 秦子禹,孙建设,王娜,等.苹果茎痘病毒TaqMan探针实时荧光定量RT-PCR检测方法的建立[J].园艺学报,2015,42 (7):1400-1408.QIN Z Y,SUN J S,WANG N,et al.Development of a TaqMan real-time RT-PCR method for detecting apple stem pitting virus (ASPV)[J].Acta horticulturae sinica, 2015,42(7):1400-1408 (in Chinese with English abstract).
- [11] 殷幼平,黄冠军,赵云,等.柑桔溃疡病菌实时荧光定量PCR检测与应用[J].植物保护学报,2007,34(6):607-613.YIN Y P,HUANG G J,ZHAO Y,et al.Establishment and application of real time fluorescent PCR approaches for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* [J].Journal of plant protection, 2007,34(6):607-613 (in Chinese with English abstract).
- [12] 周晓丽,朱国坡,李雪华,等.实时荧光定量PCR技术原理与应用[J].中国畜牧兽医,2010,37(2):87-89.ZHOU X L,ZHU G P,LI X H,et al.Principles and application of real-time fluorescent quantitative PCR technique [J].China animal husbandry & veterinary medicine, 2010,37(2):87-89 (in Chinese with English abstract).

- with English abstract).
- [13] GIULIETTI A, OVERBERGH L, VALCKX D, et al. An overview of real-time quantitative PCR applications to quantify cytokine gene expression [J]. Methods, 2001, 25(4):386-401.
- [14] 张吉宇, 王彦荣, 南志标. 相对定量和绝对定量: 以CsSAMDC基因表达分析为例[J]. 中国生物工程杂志, 2009, 29(8): 86-91. ZHANG J Y, WANG Y R, NAN Z B. Relative and absolute quantification-expression analysis of CsSAMDC gene as a case [J]. China biotechnology, 2009, 29(8):86-91 (in Chinese with English abstract).
- [15] 王大涛, 郭倩倩, 朱宏伟, 等. 以梅花鹿P21基因为模板比较相对和绝对荧光定量PCR的准确性[J]. 特产研究, 2013, 35(4): 10-13. WANG D T, GUO Q Q, ZHU H W, et al. Comparative studies between relative and absolute PCR value using sika deer P21 gene as an example [J]. Special wild economic animal and plant research, 2013, 35(4): 10-13 (in Chinese with English abstract).
- [16] 漆艳香, 朱水芳, 赵文军, 等. 玉米细菌性枯萎病菌TaqMan探针实时荧光PCR检测方法的建立[J]. 植物保护学报, 2004, 31(1):51-56. QI Y X, ZHU S F, ZHAO W J, et al. Detection and identification of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* using TaqMan probe [J]. Journal of plant protection, 2004, 31(1):51-56 (in Chinese with English abstract).
- [17] 韩阳, 张丽辉, 王永吉, 等. 水稻细菌性条斑病菌的实时荧光PCR检测技术研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2012, 27(3):315-320. HAN Y, ZHANG L H, WANG Y J, et al. Real-time quantitative PCR for detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* [J]. Journal of Yunnan Agricultural University (natural science), 2012, 27(3): 315-320 (in Chinese with English abstract).
- [18] 豆亚亚, 阮小蕾, 袁月, 等. 利用实时荧光PCR方法检测香蕉软腐细菌[J]. 园艺学报, 2013, 40(2):380-388. DOU Y Y, RUAN X L, YUAN Y, et al. Utilization of a real-time PCR-based approach for rapid quantitative detection of bacterial soft rot of banana [J]. Acta horticulturae sinica, 2013, 40(2): 380-388 (in Chinese with English abstract).

Establishment of SYBR Green I real-time quantitative PCR for detecting *Dickeya dadantii* of banana bacterial sheath rot

MAI Guiwan, XIAO Wenchao, LI Yunfeng, LI Huaping, RAO Xueqin

College of Plant Protection/Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China

Abstract Banana bacterial sheath rot, caused by *Dickeya dadantii*, is a significant threat to the production of banana in China. Accurately and quantitatively detecting this pathogen at an early stage is important to control banana bacterial sheath rot. A SYBR Green I real-time quantitative PCR method was established with specific primers based on the housekeeping gene *fusA* of *D. dadantii* and optimized conditions for amplification. Comparisons were made between the result of the established SYBR Green I real-time quantitative PCR and that of the conventional PCR. The established SYBR Green I real-time quantitative PCR was used to detect XJ5-1 in banana leaf sheaths and soil samples inoculated with banana bacterial sheath rot bacteria XJ5-1. The results showed that the sensitivity of SYBR Green I real-time quantitative PCR for detecting the plasmid DNA was 3.3×10^{-5} ng/ μ L, 100 times higher than that of conventional PCR. The established method was able to detect XJ5-1 in banana plants with a copy number of 4.31×10^3 copies/ μ L and in soil samples with a copy number of 1.07×10^9 copies/ μ L, and in samples of used greenhouse soil inoculated at an inoculum concentration of 1×10^3 CFU/mL. The sensitivity of detecting soil samples with the established method was 100 times higher than that with the conventional PCR. It is indicated that the established SYBR Green I real-time quantitative PCR method is rapid, simple, and sensitive. It will lay a foundation for the early diagnosis and monitoring of banana bacterial sheath rot.

Keywords Banana bacterial sheath rot; *Dickeya dadantii*; SYBR Green I real-time quantitative PCR

(责任编辑:葛晓霞)