



生物实验室

马铃薯立枯丝核菌拮抗菌 QHZ11 的实时荧光定量 PCR 快速检测与应用

董莉^{1,2} 邱慧珍^{*1,2} 周洋子^{1,2} 董爱菊^{1,2} 陈兰兰^{1,2} 王友玲^{1,2} 王川³

1 甘肃农业大学资源与环境学院 甘肃省干旱生境作物学重点实验室 甘肃 兰州 730070

2 甘肃省畜禽废弃物资源化利用工程研究中心 甘肃 兰州 730070

3 甘肃农业大学动物医学院 甘肃 兰州 730070

摘要:【背景】植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)在根际的定殖是其发挥作用的基础,直观有效的跟踪技术和定量方法是研究 PGPR 在根际原位分布规律的重要工具。【目的】建立一种马铃薯黑痣病病原菌——立枯丝核菌拮抗菌 QHZ11 的实时荧光定量 PCR 快速检测体系,并检测拮抗菌 QHZ11 在马铃薯根际的动态变化。【方法】根据 GenBank 中登录的类芽孢杆菌及近源菌株 *gyrB* 基因序列差异筛选特异性引物,优化反应条件;通过盆栽试验对马铃薯根际拮抗菌进行快速检测。盆栽试验设 3 个处理, T1: 对照(无菌水, CK); T2: QHZ11 菌悬液灌土(QHZ11); T3: 将功能菌在有机肥中进行二次固体发酵制成生物有机肥(BOF11)。【结果】筛选出拮抗菌 QHZ11 的专用引物为 *gyrB*-F/*gyrB*-R; 建立的拮抗菌 QHZ11 实时荧光定量 PCR 检测方法特异性好、灵敏度高且重复性较好,线性相关系数为 0.999 8,检测组内变异系数均在 1%以内,扩增效率为 0.9,可检测出 1×10^3 – 1×10^{10} copies/g-soil 的拮抗菌,具有检出限低和扩增效率高的特点。盆栽试验结果发现, T3 处理马铃薯根际拮抗菌 QHZ11 的数量从接种的第 10 天即高出 T2 处理一个数量级,并于马铃薯盛花期(接种后第 60 天)达到峰值,说明二次固体发酵增加了拮抗菌在根际土壤中的存活和繁殖。【结论】建立的实时荧光定量 PCR 快速检测体系灵敏、高效,可为研究拮抗菌在马铃薯根际原位分布以及与病原菌的互作方面提供便捷有效的方法。

关键词: 马铃薯, 立枯丝核菌, 拮抗菌 QHZ11, 实时荧光定量 PCR, 动态变化

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31760614); National Key Research and Development Program of China (2017YFD0800200)

***Corresponding author:** Tel: 86-931-7631731; E-mail: hzqiu@gsau.edu.cn

Received: 11-02-2020; **Accepted:** 29-04-2020; **Published online:** 21-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31760614); 国家重点研发计划(2017YFD0800200)

***通信作者:** Tel: 0931-7631731; E-mail: hzqiu@gsau.edu.cn

收稿日期: 2020-02-11; **接受日期:** 2020-04-29; **网络首发日期:** 2020-05-21

Rapid detection and application of antagonistic bacterium QHZ11 against *Rhizoctonia solani* in potato by real-time fluorescence quantitative PCR

DONG Li^{1,2} QIU Hui-Zhen^{*1,2} ZHOU Yang-Zi^{1,2} DONG Ai-Ju^{1,2} CHEN Lan-Lan^{1,2}
WANG You-Ling^{1,2} WANG Chuan³

1 Gansu Provincial Key Laboratory of Arid-land Crop Science, College of Resources and Environmental Sciences, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China

2 Engineering Research Center of Livestock and Poultry Waste Resource Utilization in Gansu Province, Lanzhou, Gansu 730070, China

3 College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China

Abstract: [Background] The colonization of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) in rhizosphere is the basis of its function. Direct and effective tracking techniques and quantitative methods are important tools to study the distribution of PGPR in rhizosphere. **[Objective]** To establish a real-time fluorescence quantitative PCR system for rapid detection of antagonistic bacteria QHZ11 against the pathogen, *Rhizoctonia solani* and to detect the dynamic changes of antagonistic bacterium QHZ11 in potato rhizosphere. **[Methods]** The specific primers were screened according to the genetic sequence difference between the *Paenibacillus* and proximal strain *gyrB* in GenBank. The reaction conditions of fluorescence quantitative PCR were optimized. A soil pot experiment of potato was arranged to detect the number of antagonistic bacteria QHZ11 in potato rhizosphere, with three treatments: T1: CK (sterile water was irrigated); T2: QHZ11 bacterial suspension was irrigated (QHZ11); T3: the biological organic fertilizer, secondary solid fermented with antagonistic bacteria QHZ11 was applied (BOF11). **[Results]** A pair of special primers *gyrB-F/gyrB-R* for antagonistic QHZ11 were screened. The established of antagonistic bacteria QHZ11 real-time fluorescence quantitative PCR method could detect the antagonistic bacteria of $1 \times 10^3 - 1 \times 10^{10}$ copies/g-soil, with such advantages as very good specificity, high sensitivity and better reproducibility, and the linear correlation coefficient was 0.999 8, the coefficient of variation within the detection group was less than 1%, the amplification efficiency was 0.9, characterized by a lower detection limit and higher amplification efficiency. The results of pot experiment showed that the number of antagonistic bacteria QHZ11 in potato rhizosphere of T3 was one order of magnitude higher than that of T2 treatment from the 10th day after inoculation, and reached the peak at the 60th day after inoculation, indicating that the survival rate and reproduction rate of antagonistic bacteria in rhizosphere soil were increased by secondary solid fermentation. **[Conclusion]** The established real-time fluorescence quantitative PCR system is sensitive and efficient, which provides a convenient and effective method for understanding the distribution of antagonistic bacteria in potato rhizosphere and the interaction between antagonistic bacteria and pathogens.

Keywords: Potato, *Rhizoctonia solani*, Antagonistic bacterium QHZ11, Real-time fluorescence quantitative PCR, Dynamic changes

马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 是一年生茄科植物, 粮—菜—饲—加工兼用, 适种区广, 是继水稻、玉米和小麦之后的第四大粮食作物^[1]。随着我国马铃薯主粮化战略的实施, 马铃薯生产在我国粮食安全、经济发展和种植业结构调整中越来越发挥着重要作用^[2]。然而, 日益加剧的土传病害严重威胁着

这一产业的可持续发展^[3], 尤其由立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 侵染引起的马铃薯黑痣病 (potato black scurf), 对马铃薯的块茎产量和外观品质均造成不良影响, 成为我国马铃薯生产中的主要土传病害^[4-10]。

据报道, 2017 年河北和内蒙古马铃薯种植区

内马铃薯黑痣病薯块的发病指数分别为 30.73 和 13.33^[11]。甘肃省定西市作为我国重要的马铃薯种植基地和全省最大的马铃薯主产区^[10,12], 马铃薯黑痣病重病田发病率高达 75%以上, 普通田病株率也在 10%–20%, 连作 7 年年限地块发病率甚至达到 96.71%^[13-14]。

目前马铃薯黑痣病的防治方法主要采用化学防治、农业防治及生物防治等方法。其中化学防治是普遍采用且防治效率显著的方法, 但会导致土壤微生物活性降低和微生物区系遭受破坏, 同时会造成农药残留和环境污染^[15-18], 农业防治方法效果有限^[19]。近年来辅以植物根际促生菌(plant growth-promoting rhizobacteria, PGPR)的生物有机肥, 因其环境友好、安全无毒等特点, 在农业生产上得到广泛应用^[20]。将 PGPR 与有机肥料进行二次固体发酵成微生物有机肥施入土壤, 其有机载体和植物根系分泌物可以帮助进入土体的 PGPR 生长繁殖、聚集成膜, 发挥促生和拮抗土传病害的作用^[21-24]。有效施用辅以 PGPR 菌株的生物有机肥在防治小麦根腐病^[25]、香蕉枯萎病^[26]、黄瓜枯萎病^[10,27]等土传病害上获得了显著的效果, 成为防控土传病害有效且安全的方法。

PGPR 在作物根际的有效定殖是发挥其作用的基础, 而直观有效的跟踪技术和定量方法是研究 PGPR 在根际原位分布规律的重要工具^[25,28-29]。根际促生菌(PGPR)的检测通常有稀释平板计数法、形态特征观察、生理生化鉴定、抗性标记分子法等, 这些方法工作量较大, 耗时长且效率不高, 均存在各种不足。本实验室从马铃薯根际筛选出一株对马铃薯立枯丝核菌具有显著生防效果的拮抗菌 QHZ11, 抑菌率达到 66.7%, 对立枯丝核菌拮抗效果稳定、拮抗能力较强, 对真菌抗菌谱宽, 能促进马铃薯植株的生长, 提高植株系统抗性和生长条件, 与马铃薯生长的大田环境基本相符, 具备一株优良生防菌的必要条件^[8-10,30]。然而, 对马铃薯立枯丝核菌拮抗菌 QHZ11 的鉴定与定量方法仍采用

传统的平板稀释分离鉴定与计数, 工作量大、费时费力且易受环境因子影响等, 难以准确监测其在自然状态下的动态变化。

近年来, 随着分子生物技术的发展, 实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR) 技术由于其时效快、实时监测、假阳性率低、准确度高、自动化程度高、可量化及耗时短等优点逐渐得到广泛应用, 为快速准确地定量检测土壤微生物提供了方便, 使利用基因水平上的差异特异性定量检测微生物成为可能, 不再单纯采用平板培养与计数^[31-33]。实时荧光定量 PCR 可以定量到不可培养细菌, 克服了普通 PCR 只能定性不能定量的缺点^[34-35]。这一方法是否适用于马铃薯立枯丝核菌拮抗菌 QHZ11 的定量检测尚未见报道。为此, 本研究采用实时荧光定量 PCR 技术, 建立优化马铃薯立枯丝核菌拮抗菌 QHZ11 的实时荧光定量 PCR 检测方法, 并对盆栽马铃薯根际土壤中拮抗菌的数量进行检测和定量, 以探明拮抗菌 QHZ11 在马铃薯根际土壤中的动态变化趋势, 为后期拮抗菌 QHZ11 在马铃薯根际的原位分布以及与病原微生物的互作研究提供便捷而有效的方法途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试土壤

土壤采自定西市安定区香泉乡马铃薯长期定位试验点的对照处理(不施肥)土壤, 基本农化形状为: 有机质含量 32.94 g/kg, 全氮 1.73 g/kg, 碱解氮含量 161 mg/kg, 速效磷 140.23 mg/kg, 速效钾 122 mg/kg, pH 8.1。

1.1.2 供试肥料

有机肥料: 由江阴联业生物科技有限公司提供; 生物有机肥料: 本课题组以有机肥为载体, 加入功能菌 QHZ11 进行二次固体发酵制成生物有机肥(BOF11), 有机质 46.1%, 全氮 1.96%, P₂O₅ 3.09%, K₂O 1.52%, 功能菌总量达 7.95×10⁸ CFU/g。

1.1.3 供试菌株

类芽孢杆菌(*Paenibacillus jamilae*) QHZ11、QHZ11-gfp (绿色荧光蛋白 pHAP II 质粒电转入 QHZ11), 萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*) QHZ-2、QHZ-3、QHZ-5, 莫海威芽孢杆菌(*Bacillus axarquiensis*) strain QHZ-4, 均由本实验室保存; 大肠埃希菌、蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) LJXA3 由甘肃农业大学动物医学院微生物学实验室提供。

1.1.4 灭菌土及菌悬液

灭菌土壤的准备: 将采回的土壤在 1×10^5 Pa 下灭菌 2 次, 每次 30 min, 置于阴凉处自然晾干后备用。

QHZ11 菌悬液的制备: 将 QHZ11 30 °C、170 r/min 培养过夜的种子液以 2% 的量接种到 LB 液体培养基, 30 °C、170 r/min 培养 48 h 后, 4 °C、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 PBS 重悬备用, 功能菌总量达 10^8 CFU/mL。

1.1.5 供试品种

供试马铃薯品种“大西洋”, 由甘肃省定西市农业科学研究院提供。

1.1.6 主要试剂和仪器

质粒 DNA 小提试剂盒、Chamq™ Universal SYBR® qPCR Master Mix、DL5000 Plus DNA Marker、pMD18-T 载体, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 胶回收试剂盒、IPTG、Amp、X-Gal、土壤基因组 DNA 提取试剂盒, 北京全式金生物技术有限公司。

离心机、PCR 仪、凝胶成像系统、核酸蛋白检测仪, Eppendorf 公司; 荧光定量 PCR 仪, Roche 公司。

1.2 试验设计

马铃薯盆栽试验共设 3 个处理: T1: CK (无细菌); T2: QHZ11 (菌悬液灌土, 按菌液体积: 土壤质量=1:100 的量均匀拌入灭菌土壤); T3: BOF11 (按生物有机肥质量: 土壤质量=1.5:100 的量均匀拌入灭菌土壤), 处理后于当天播种。

各处理采用等养分(N、P、K)设计, 每处理 20 盆重复, 每盆装土 6 kg。播种前马铃薯用 KMnO_4 浸种消毒, 催芽待种子露白后用于播种, 每盆定植 4 株。2019 年 8 月 15 日播种, 12 月 15 日收获。

1.3 供试样品采集

1.3.1 根际土壤样品

分别在马铃薯播种后的第 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110 和 120 天采集根际土壤样品, 共 12 次, 每处理 3 次重复, 每重复 3 株, 将马铃薯整株根系挖出, 用灭菌刷将附着在马铃薯根系的土刷下即为根际土, 将土样充分混匀装入 10 mL 的无菌管中, 置于 4 °C 冰盒带回实验室, 保存于 -80 °C 冰箱中。提取马铃薯根际土壤 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 保存于 -20 °C。

1.3.2 供试菌株基因组 DNA 的提取

供试菌株在 LB 液体培养基中于 30 °C、220 r/min 培养 12 h, 用 CTAB^[36]法提取基因组 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 保存于 -20 °C。

1.4 测定项目与方法

1.4.1 拮抗菌 QHZ11 的引物筛选和特异性验证

根据 GenBank 中类芽孢杆菌及其近源菌株的 *gyrB* 基因序列, 遵循荧光定量 PCR 引物设计原则, 利用 Primer 5.0 设计 3 对 *gyrB* 基因特异性引物 (表 1), 由金唯智生物科技有限公司合成。用合成引物对供试的其他菌株 DNA 进行普通 PCR 扩增。PCR 反应体系 (50 μL): *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/ μL) 25 μL , 上、下游引物 (10 mmol/L) 各 2 μL , DNA 模板 (10 mmol/L) 2 μL , ddH_2O 19 μL 。PCR 反应条件:

表 1 拮抗菌 QHZ11 的引物筛选

Table 1 Primer screening of antagonistic bacterium QHZ11

Primers name	Primers sequence (5'→3')	Size (bp)
<i>gyrB</i> -U	CGGGTAAATTGGCAGACTGT	140
<i>gyrB</i> -L	TTACCTCTGAGCGGCAGAAT	140
<i>gyrB</i> -F	CGAAGGCTCTCGTGACACGATTC	150
<i>gyrB</i> -R	AATAATCCGGGTTAATGCACTC	150
<i>gyrB1</i> -U	GCCTGTTCCAGTTCATTGGT	150
<i>gyrB1</i> -L	CGTGACGATGGTATTGATGC	150

94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行引物特异性验证。

1.4.2 荧光定量 PCR 检测体系的优化

引物浓度: 引物浓度设置为 0.6–0.8 μL (10 mmol/L), 进行实时荧光定量 PCR 扩增, 观察溶解曲线和扩增效率。

模板浓度: DNA 模板浓度设置为 1–3 μL (10 mmol/L), 观察不同浓度对扩增效率的影响。

退火温度: 根据设计引物的 T_m 值设置为 55–60 °C, 选择 C_t 最小且溶解曲线为单峰的退火温度。

PCR 反应体系: Chamq™ Universal SYBR® qPCR Master Mix 12.5 μL, 上、下游引物(10 mmol/L) 各 0.6–0.8 μL, DNA 模板(10 mmol/L) 0.5–2.0 μL, ddH₂O 补足至 25 μL。

PCR 反应条件: 95 °C 300 s; 95 °C 5 s, 55–60 °C 10 s, 72 °C 20 s, 40 个循环; 95 °C 10 s, 60 °C 60 s, 95 °C 1 s, 根据荧光信号的变化得出溶解曲线。

1.4.3 标准曲线的建立

将拮抗菌 QHZ11 特异性引物的 PCR 扩增产物纯化, 连接至 pMD18-T 载体, 转化至 *E. coli* Top10 感受态细胞中, 蓝白斑筛选阳性菌落, 菌液 PCR 验证, 提取重组质粒送至金唯智生物科技有限公司测序。用核酸蛋白检测仪检测重组质粒浓度, 绘制拮抗菌 QHZ11 的标准曲线。

1.4.4 精密度检验

以 10 倍稀释浓度的质粒为模板进行荧光定量 PCR 扩增, 依据组内 C_t 值重复间的标准偏差和变异系数, 检验标准曲线的精确度和重复性。

1.4.5 有效性检验

荧光定量 PCR 扩增后, 用标准曲线的 R^2 、斜率、扩增效率(E)等, 检验建立的荧光定量 PCR 方法的有效性。

1.5 拮抗菌 QHZ11 在马铃薯根际的动态变化

用优化后的荧光定量 PCR 扩增体系检测拮抗菌 QHZ11 在马铃薯根际土壤中的动态变化。

1.6 数据分析

实验结果运用 Excel、SPSS 25 和 Origin 2017 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 拮抗菌 QHZ11 的引物筛选及特异性验证

经过多次试验, 遵循荧光定量 PCR 原则对设计的 3 对拮抗菌常规引物进行筛选, 确定 PCR 特异性引物为 *gyrB*-F (5'-CGAAGGCTCTCGTGACA CGATTC-3') 和 *gyrB*-R (5'-AATAATCCGGGTTAAT GCACTC-3'), 利用 *gyrB*-F/*gyrB*-R 引物对, 设定扩增 T_m 值为 60 °C, 对供试菌株总 DNA 进行 PCR 扩增, 仅有拮抗菌 QHZ11 和 QHZ11-gfp 扩增出 150 bp 大小的特异性条带(图 1), 说明筛选出的引物是拮抗菌 QHZ11 的专用引物。

2.2 荧光定量 PCR 检测体系

2.2.1 重组质粒荧光定量 PCR 标准曲线的建立

琼脂糖凝胶电泳检测表明, 扩增得到的基因和重组质粒片段与目的基因长度相符(图 2)。设置浓

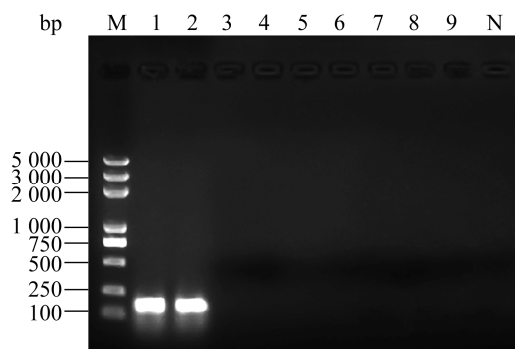


图 1 普通 PCR 检测引物特异性结果

Figure 1 Primer specific detection by normal PCR

注: M: DL5000 DNA Marker; 1: 类芽孢杆菌 QHZ11; 2: 类芽孢杆菌 QHZ11-gfp; 3: 萎缩芽孢杆菌 QHZ-2; 4: 萎缩芽孢杆菌 QHZ-3; 5: 莫海威芽孢杆菌 QHZ-4; 6: 萎缩芽孢杆菌 QHZ-5; 7: 大肠埃希菌; 8: 蜡状芽孢杆菌; 9: 枯草芽孢杆菌 LJXA3; N: 阴性对照(ddH₂O)。

Note: M: DL5000 DNA Marker; 1: *Paenibacillus jamilae* QHZ11; 2: *Paenibacillus jamilae* QHZ11-gfp; 3: *Bacillus atrophaeus* QHZ-2; 4: *Bacillus atrophaeus* QHZ-3; 5: *Bacillus axarquiensis* strain QHZ-4; 6: *Bacillus atrophaeus* QHZ-5; 7: *Escherichia coli*; 8: *Bacillus cereus*; 9: *Bacillus subtilis* LJXA3; N: Negative control (ddH₂O).

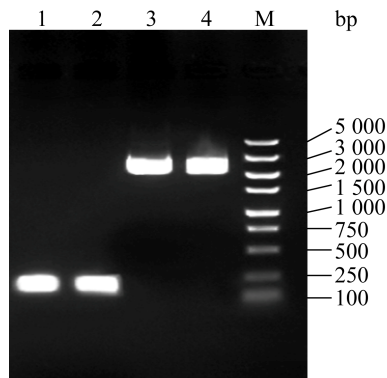


图2 菌液 PCR 扩增产物及阳性质粒验证

Figure 2 PCR amplification product of bacterial liquid and positive plasmid verification

注: 1-2: 菌液 PCR 扩增产物; 3-4: 阳性质粒验证; M: DL5000 DNA Marker.

Note: 1-2: PCR amplification product of bacterial liquid; 3-4: Positive plasmid verification; M: DL5000 DNA Marker.

度在 1.0×10^{10} – 1.0×10^3 copies/g 范围的标准质粒进行荧光定量 PCR 扩增。结果得出标准曲线方程为 $Y = -3.548 2X + 45.902$, X 轴为标准质粒拷贝数 Log 值, Y 轴为 C_t 值, 质粒浓度的 Log 值与 C_t 值线性关系良好, 相关性系数为 0.999 8 (图 3)。

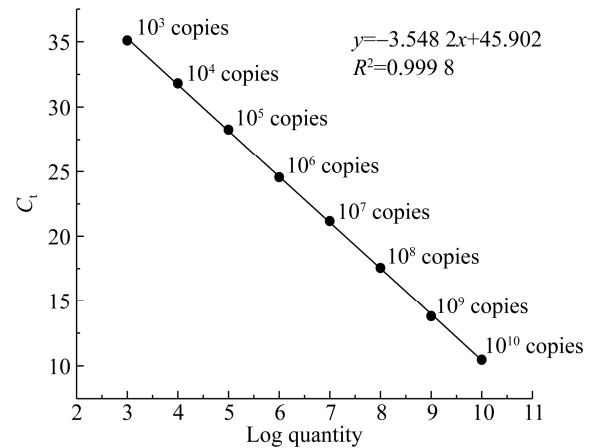


图3 重组质粒荧光定量 PCR 标准曲线

Figure 3 Recombinant plasmid fluorescence quantitative PCR standard curve

2.2.2 引物的特异性验证及反应条件优化

荧光定量 PCR 体系优化后, 上、下游引物 (10 mmol/L) 各 $0.8 \mu\text{L}$, DNA 模板 $2 \mu\text{L}$, T_m 为 60°C 。利用不同浓度质粒标准品为模板进行荧光定量 PCR, 得到扩增动力学曲线 (图 4A), 图中 X 轴为荧光定量反应循环数 (cycle number), Y 轴为荧光

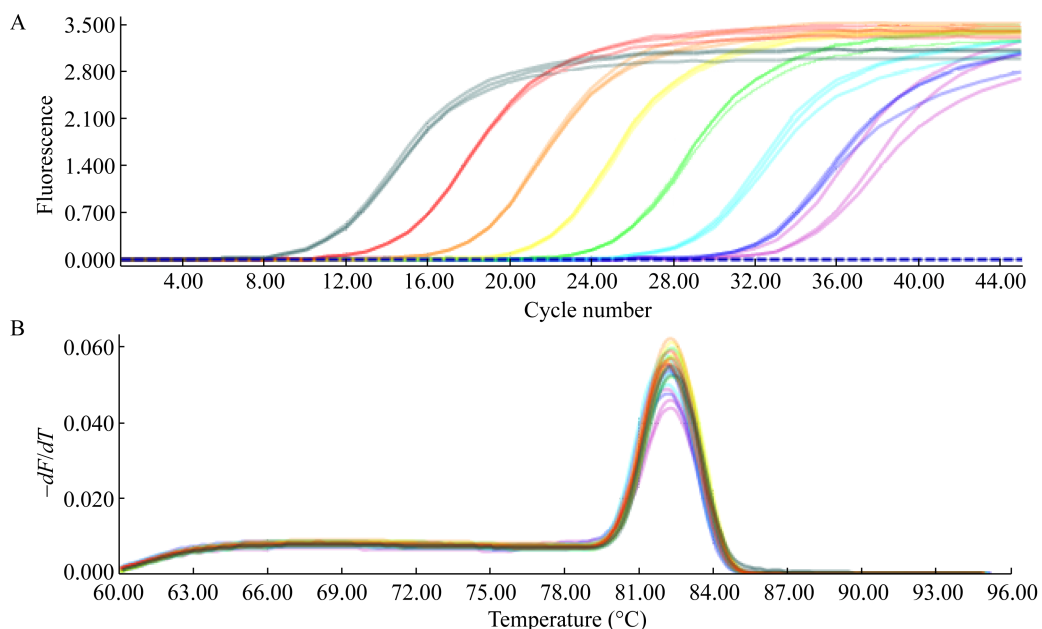
图4 实时荧光定量 PCR 检测 *gyrB* 重组质粒 DNA 动力学曲线(A)与溶解曲线(B)

Figure 4 Real-time fluorescence quantitative PCR detection *gyrB* recombinant plasmid DNA kinetics curve (A) and melting peaks (B)

Note: Standard curve of recombinant plasmid: plot obtained by plotting fluorescence data against their cycle number. Eight serial dilution of calibration dilutions (1.0×10^{10} – 1.0×10^3 copies/ μL).

强度(fluorescence)。由动力学曲线可知,随循环数的增加荧光强度逐渐增强;溶解曲线无杂峰,扩增产物单一(图 4B),说明引物特异性较强。荧光定量 PCR 反应条件得到优化。

2.3 方法精密度

不同浓度梯度质粒荧光定量 PCR 反应后,重复间 C_t 值的标准差(standard deviation, SD)为 0.01–0.08、变异系数为 0.12%–0.80%(表 2),说明本研究建立的标准曲线有较好的精确度和重复性。

2.4 方法有效性

荧光定量 PCR 扩增效率(E)为 0.9,相关性系数为 0.999 8,斜率为 $-3.570 7$,方法 C_t 值的 SD 小于 0.2。综合评价认为,建立的荧光定量 PCR 体系具有较高的准确度、重复性和精密度,可作为拮抗菌 QHZ11 的快速定量检测方法。

2.5 拮抗菌 QHZ11 在马铃薯根际的动态变化

盆栽试验于处理后每隔 10 d 采集一次根际样品,应用本试验建立的荧光定量 PCR 方法对土壤中的拮抗菌 QHZ11 进行定量检测,结果图 5 所示。对照处理 T1 未加拮抗菌,在检测过程中未定量到拮抗菌的存在,用 ND (no detectable)表示。

从图 5 结果可以看出,以拮抗菌 QHZ11 灌土的 T2 处理和用功能菌进行二次固体发酵制成生物有机肥 BOF11 的 T3 处理中,根际土壤中拮抗菌的数量从一开始就表现出显著差异。在拮抗菌接种后第 10 天, T2 和 T3 处理的绝对积累量分别为 2.81×10^4 copies/g-soil 和 2.75×10^5 copies/g-soil,

表 2 不同质粒浓度荧光 PCR 检测的精密度

Table 2 Precision of fluorescence PCR detection with different plasmid concentrations

Plasmid concentration (copies/g)	C_t value (Mean±SD)	CV (%)
1.0×10^{-4}	31.81±0.05	0.27
1.0×10^{-5}	28.26±0.08	0.51
1.0×10^{-6}	24.56±0.04	0.27
1.0×10^{-7}	21.17±0.04	0.35
1.0×10^{-8}	17.55±0.01	0.13
1.0×10^{-9}	13.80±0.01	0.12
1.0×10^{-10}	10.46±0.05	0.80

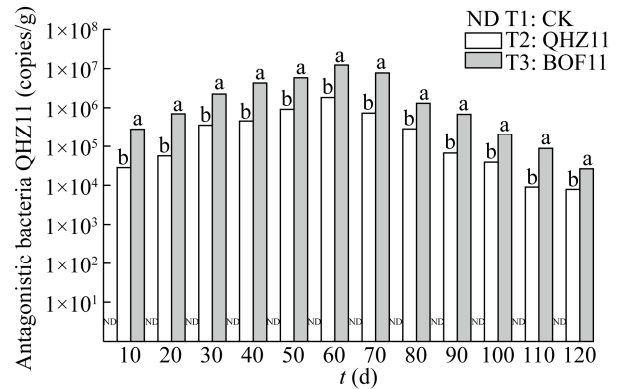


图 5 马铃薯根际土壤立枯丝核菌拮抗菌 QHZ11 的动态变化趋势

Figure 5 The dynamic changing trend antagonistic bacteria strain QHZ11 of *Rhizoctonia solani* in potato rhizosphere soil

相差一个数量级,说明以氨基酸有机肥作为载体时增加了拮抗菌在根际土壤中的存活和繁殖能力。这种差异一直维持到处理后的第 120 天试验结束。随着马铃薯生育进程的推进, T2 和 T3 处理中拮抗菌的数量在处理后的第 60 天时达到最大值,分别为 1.81×10^6 copies/g-soil 和 1.23×10^7 copies/g-soil。此时正值马铃薯盛花期,大量的根系分泌物为 QHZ11 在马铃薯根际的定殖和繁殖创造了条件。随后,每隔 20 d, T2 和 T3 处理中拮抗菌的数量下降一个数量级,至 120 d 马铃薯成熟停止生长时,拮抗菌在 T2 和 T3 两个处理中的绝对数量降到最低,仅为 7.94×10^3 copies/g-soil 和 2.63×10^4 copies/g-soil。

3 讨论

1999 年 Böhm 首次将实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 技术应用到植物病理学研究中,但未在植物促生菌方面得到广泛应用^[37]。随着实时荧光定量 PCR 技术的发展,岑浴^[38]建立了多粘类芽孢杆菌的实时荧光 PCR 定量方法,在茶树的叶际中扩增特异性高。陶萌等^[39]对生防菌粉红粘帚霉 67-1 的 ITS 区进行序列分析,建立了实时荧光定量 PCR 体系方法。魏巍等^[40]建立了生防木霉菌的实时荧光定量方法体系,在不同的施肥处理土壤中扩增特异性较高,证明了实时荧光定量 PCR 技

术在促生菌方面的可行性。

实时荧光定量 PCR 技术通过标准曲线对未知模板进行定量分析, 实现了 PCR 技术定性到定量的跨越^[41-44]。Hu 等利用普通 PCR 技术对土壤类芽孢杆菌 *gyrB* 基因与其他类芽孢杆菌进行研究, 发现它们的相似性为 70.3%–79.2%, 可利用其差异序列设计特异引物^[45-47]。为避免非特异性扩增, 本研究根据 GenBank 中报道的类芽孢杆菌及其近缘菌株的 *gyrB* 基因序列, 利用高变区序列差异设计特异性引物, 充分避免了引物二聚体和发夹结构。本研究采用实时荧光定量 PCR 方法检测马铃薯根际土壤中拮抗菌, 灵敏度高且特异性强, 所需时间短, 具有扩增效率高、检出限低的优点, 扩增效率为 0.91, 可检测出马铃薯根际土壤中浓度为 1×10^3 – 1×10^{10} copies/g-soil 的拮抗菌。实现了不通过传统的稀释平板法和革兰氏染色鉴定等方法就可以检测到马铃薯根际土壤拮抗菌 QHZ11 的数量分布情况, 探寻了一种快速准确的实时荧光定量 PCR 检测方法。

本研究利用建立的拮抗菌 QHZ11 实时荧光定量 PCR 检测方法, 对土壤中不同接种方式的拮抗菌 QHZ11 进行定量检测, 研究表明拮抗菌 QHZ11 随着生育进程的推进在马铃薯根际的数量逐渐减少, T2 处理拮抗菌 QHZ11 的绝对定量为 10^3 – 10^6 copies/g-soil, T3 处理拮抗菌 QHZ11 的绝对定量为 10^4 – 10^7 copies/g-soil, 达到发挥拮抗作用的数量。李瑞琴等利用实时荧光定量 PCR 法对马铃薯黑痣病立枯丝核菌进行定量, 发现播前累积量最大达到 7.58×10^6 copies/g-soil, 播种后病原菌随着生育进程的推进数量开始降低^[8-9,48]。拓宁等^[9,49]通过对马铃薯黑痣病立枯丝核菌对马铃薯的侵染过程研究, 发现马铃薯播种后 10–20 d 后芽上出现褐色病斑, 35–50 d 后在茎基部、根系和匍匐茎上可观察到黑褐色病斑。本研究发现拮抗菌 QHZ11 接种到土壤后第 10 天即可聚集成膜发挥生防作用, 在马铃薯根际定殖的生态位与病原菌相似,

马铃薯黑痣病主要发生在前期, 拮抗菌 QHZ11 在马铃薯根际土壤中 10–60 d 时数量增多, 达到最高为 10^7 copies/g-soil。这为拮抗菌 QHZ11 能够作为生防因子发挥其防病与促生作用奠定了基础。

4 结论

本研究成功建立了拮抗菌 QHZ11 的实时荧光定量 PCR 快速检测方法, 该方法特异性强、灵敏度高、重复性好, 整个反应程序只需 1.1 h, 目前该技术应用较少。研究发现拮抗菌以二次固体发酵生物有机肥为载体接种到土壤中其定殖数量始终比拮抗菌灌土接种高出一个数量级, 通过将拮抗菌与有机肥进行二次固体发酵可以保证拮抗菌的生存, 为在马铃薯根际进行生态位和营养竞争提供保障。本研究为后期拮抗菌 QHZ11 在马铃薯根际的原位分布以及与病原微生物互作的研究提供便捷而有效的方法途径。

REFERENCES

- [1] Gao YL, Xu J, Liu N, et al. Current status and management strategies for potato insect pests and diseases in China[J]. *Plant Protection*, 2019, 45(5): 106-111 (in Chinese)
高玉林, 徐进, 刘宁, 等. 我国马铃薯病虫害发生现状与防控策略[J]. *植物保护*, 2019, 45(5): 106-111
- [2] Pang WL. Significance and implementation of potato main grain strategy[J]. *Grain Processing*, 2019, 44(2): 59-61 (in Chinese)
庞文录. 马铃薯主粮化战略的意义与实施[J]. *粮食加工*, 2019, 44(2): 59-61
- [3] Liu JX, Li N, Li J, et al. Effects of multiple microbial agents on the soil ecology and crop yield under continuous potato cropping in the arid area of Gansu[J]. *Chinese Journal of Soil Science*, 2019, 50(3): 675-682 (in Chinese)
刘锦霞, 李娜, 李晶, 等. 多效微生物制剂对甘肃干旱区马铃薯连作土壤生态及产量的影响[J]. *土壤通报*, 2019, 50(3): 675-682
- [4] Yao WG, Cui MS. *Potato Pests and Their Quarantine*[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2001: 1-15 (in Chinese)
姚文国, 崔茂森. 马铃薯有害生物及其检疫[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 1-15
- [5] Frank JA, Leach SS. Comparison of tuberborne and soilborne inoculum in the rhizoctonia disease of potato[J]. *Phytopathology*, 1980, 70(1): 51-53
- [6] Liu BY, Hu J, Meng ML, et al. Molecular identification and

- biological characters of the pathogen causing black scurf disease in potato[J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2011, 38(4): 379-380 (in Chinese)
刘宝玉, 胡俊, 蒙美莲, 等. 马铃薯黑痣病原菌分子鉴定及其生物学特性[J]. *植物保护学报*, 2011, 38(4): 379-380
- [7] Zhu JH. Discussion on the occurrence of potato diseases and the optimization of their control agents[J]. *Pesticide Market News*, 2015(17): 33-35 (in Chinese)
朱杰华. 浅议马铃薯病害的发生及其防治药剂的优选[J]. *农药市场信息*, 2015(17): 33-35
- [8] Zhang HX. Study on metabolites of *Rhizoctonia solani* in potato[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2017 (in Chinese)
张慧秀. 马铃薯中立枯丝核菌代谢产物的研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2017
- [9] Ma L. Isolation of antagonistic bacterium strains against pathogen causing black scurf of potato and the acting mechanism[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2016 (in Chinese)
马龙. 马铃薯黑痣病生防细菌的筛选鉴定及其生防作用机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2016
- [10] Dong XC. Microbial community of potato-cultivated soils and Its response to fertilization managements in the semi-arid area of central Gansu Province[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Gansu Agricultural University, 2019 (in Chinese)
董星晨. 甘肃中部半干旱地区马铃薯农田土壤微生物群落结构及对施肥管理的响应[D]. 兰州: 甘肃农业大学博士学位论文, 2019
- [11] Huang YL, Gao QG, Su Y, et al. Control efficacy of 250 g/L azoxystrobin SC on black scurf of potato in two regions[J]. *Chinese Potato Journal*, 2018, 32(3): 171-174 (in Chinese)
黄燕丽, 高庆刚, 苏毅, 等. 250g/L 啞菌酯悬浮剂对 2 个地区马铃薯黑痣病的防治效果[J]. *中国马铃薯*, 2018, 32(3): 171-174
- [12] Zhang J, Dong XC, Zhang H, et al. Effect of long-term nitrogen application on bacterial community structure of potato soil in semi-arid area[J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 2019, 54(1): 30-41 (in Chinese)
张健, 董星晨, 张鹤, 等. 长期施氮对马铃薯田土壤剖面硝态氮积累及细菌群落结构的影响[J]. *甘肃农业大学学报*, 2019, 54(1): 30-41
- [13] Liu XJ, An JH, Mo J, et al. Control efficacy of five fungicides on potato black scurf[J]. *Chinese Potato Journal*, 2019, 33(3): 170-174 (in Chinese)
刘小娟, 安建华, 莫娟, 等. 5 种杀菌剂对马铃薯黑痣病的田间防效试验[J]. *中国马铃薯*, 2019, 33(3): 170-174
- [14] Xie KZ, Lu LY, Luo AH, et al. Effects of long-term continuous cropping on soil-borne diseases and yield of potato[J]. *China Seed Industry*, 2018(2): 65-67 (in Chinese)
谢奎忠, 陆立银, 罗爱花, 等. 长期连作对马铃薯土传病害和产量的影响[J]. *中国种业*, 2018(2): 65-67
- [15] Zhao J, Li Y, Ran W, et al. Effects of organic manure partial substitution for chemical fertilizer on crop yield and soil microbiome in a rice-wheat cropping system[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2016, 39(4): 594-602 (in Chinese)
赵军, 李勇, 冉炜, 等. 有机肥替代部分化肥对稻麦轮作系统产量及土壤微生物区系的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2016, 39(4): 594-602
- [16] Liu XW, Wang HY, Zhu DJ, et al. Effect of N fertilization method on rice yield and N, P and K uptake and use efficiency[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2017, 40(2): 203-210 (in Chinese)
刘晓伟, 王火焰, 朱德进, 等. 氮肥施用方式对水稻产量以及氮、磷、钾养分吸收利用的影响[J]. *南京农业大学学报*, 2017, 40(2): 203-210
- [17] Su Q. Analysis of the advantages and disadvantages of chemical control and biological control[J]. *Inner Mongolia Agricultural Science and Technology*, 2011(6): 84-85,132 (in Chinese)
苏琴. 化学防治与生物防治的优缺点浅析[J]. *内蒙古农业科技*, 2011(6): 84-85,132
- [18] Wang XJ, Cao CM, Lu CX, et al. Survivability and underground infection ability of potato *Rhizoctonia solani* (Sclerotium) in Inner Mongolia[J]. *Chinese Potato Journal*, 2018, 32(2): 101-107 (in Chinese)
王晓娇, 曹春梅, 逯春杏, 等. 内蒙古自治区马铃薯黑痣病原菌(菌核)存活力及地下侵染研究[J]. *中国马铃薯*, 2018, 32(2): 101-107
- [19] Liu XJ, Wang WH, Yang Y, et al. Primary report on resistance of six potato cultivars to mole disease[J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2018(2): 26-29 (in Chinese)
刘小娟, 王文慧, 杨扬, 等. 6 个马铃薯品种对黑痣病抗性初报[J]. *甘肃农业科技*, 2018(2): 26-29
- [20] Lugtenberg B, Kamilova F. Plant-growth-promoting rhizobacteria[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2009, 63(1): 541-556
- [21] Liu YP. Mechanism of rhizosphere colonization and induction of systemic resistance by *Bacillus amyloliquefaciens*[D]. Beijing: Post-Doctor Work Report of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2019 (in Chinese)
刘云鹏. 根际促生解淀粉芽孢杆菌根际定殖和诱导植物

- 系统抗性的机理研究[D]. 北京: 中国农业科学院博士后研究报告, 2019
- [22] Xu ZH, Zhang RF, Wang DD, et al. Enhanced control of cucumber wilt disease by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 by altering the regulation of its DegU phosphorylation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(9): 2941-2950
- [23] Zhang N, Wu K, Shen YF, et al. Investigation of the colonization patterns of plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 on banana roots[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2014, 37(6): 59-65 (in Chinese)
张楠, 吴凯, 沈怡斐, 等. 根际益生菌解淀粉芽孢杆菌 SQR9 在香蕉根表的定殖行为研究[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(6): 59-65
- [24] Luo X, Feng HC, Xia LM, et al. Transcriptomic profiling of plant growth-promoting rhizobacteria *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9 in response to banana root exudates[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2019, 42(1): 102-110 (in Chinese)
罗兴, 冯海超, 夏丽明, 等. 根际促生解淀粉芽孢杆菌 SQR9 对香蕉根系分泌物响应的转录组分析[J]. 南京农业大学学报, 2019, 42(1): 102-110
- [25] Liu P, Zhang B, Qi JS, et al. Preliminary study on control effect and mechanism of bioorganic fertilizers on wheat root rot[J]. Journal of Triticeae Crops, 2019, 39(9): 1132-1137 (in Chinese)
刘苹, 张博, 齐军山, 等. 生物有机肥对小麦根腐病的防效及其机理初探[J]. 麦类作物学报, 2019, 39(9): 1132-1137
- [26] Wang J, Dong WB, Wei JH, et al. Effects of bio-organic fertilizer on plant growth and banana *Fusarium* wilt control[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 30(7): 1565-1569 (in Chinese)
王瑾, 董文斌, 韦家华, 等. 生物有机肥对香蕉植株生长和香蕉枯萎病防控研究[J]. 西南农业学报, 2017, 30(7): 1565-1569
- [27] Ma X, Dong XC, Zhang J, et al. Determining antagonistic and growth promoting factors of bacteria strains against cucumber *Fusarium* wilt and studies on their biological effects[J]. Agricultural Research in the Arid Areas, 2018, 36(3): 130-138 (in Chinese)
马兴, 董星辰, 张健, 等. 黄瓜枯萎病拮抗菌的拮抗促生因子检测及生物效应研究[J]. 干旱地区农业研究, 2018, 36(3): 130-138
- [28] Xu ZH. The molecular mechanisms of biofilm formation and cucumber root colonization of *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2014 (in Chinese)
徐志辉. 解淀粉芽孢杆菌 SQR9 生物膜形成和根际定殖分子机理研究[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2014
- [29] Li LL. Transcriptomic and metabolomics study of the early interactions between *Siraitia grosvenorii* roots and *Meloidogyne incognita*[D]. Guilin: Master's Thesis of Guangxi Normal University, 2019 (in Chinese)
李璐璐. 罗汉果根系与南方根结线虫早期互作的转录组 and 代谢组研究[D]. 桂林: 广西师范大学硕士学位论文, 2019
- [30] Guan XM. Isolation of antagonistic bacterium strains against pathogen causing black scurf of potato and its acting mechanism[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2014 (in Chinese)
关小敏. 马铃薯黑痣病生防细菌的筛选及其生防作用机理研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2014
- [31] Budhia S, Haring LF, Mcconnell I, et al. Quantitation of ovine cytokine mRNA by real-time RT-PCR[J]. Journal of Immunological Methods, 2006, 309(1/2): 160-172
- [32] Luo ZY, Wang Y, Yang ZX. Establishment of SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR method for detection of PRRSV[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2016, 37(4): 1-5 (in Chinese)
罗忠永, 王印, 杨泽晓. SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测 PRRSV 方法的建立[J]. 动物医学进展, 2016, 37(4): 1-5
- [33] Zhang J, Liu XW, Bai J, et al. Establishment and application of SYBR Green I real-time PCR assay for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J]. Chinese Veterinary Science, 2019, 49(12): 1505-1513 (in Chinese)
张杰, 刘雪威, 白娟, 等. 猪繁殖与呼吸综合征病毒 SYBR Green I 荧光定量 PCR 方法的建立与应用[J]. 中国兽医科学, 2019, 49(12): 1505-1513
- [34] Yu YX, Wang YG, Liu ZC, et al. Development of a real-time PCR method for the detection of *Vibrio splendidus* based on *gyrB* gene[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(3): 134-142 (in Chinese)
于永翔, 王印庚, 刘智超, 等. 基于 *gyrB* 基因的 SYBR Green I 实时定量 PCR 检测病原灿烂弧菌[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 134-142
- [35] Han CX, Liu HX, Zhao DM. The quantification of prion gene expression in sheep using real-time RT-PCR[J]. Virus Genes, 2006, 33(3): 359-364
- [36] Wilson K. Preparation of genomic DNA from bacteria[J]. Current Protocols in Molecular Biology, 2001, 56(1): 2.4.1-2.4.5
- [37] Böhm J, Hahn A, Schubert R, et al. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants[J]. Journal of Phytopathology, 1999,

- 147(7/8): 409-416
- [38] Cen Y. Colonization of *Paenibacillus polymyxa* in the rhizosphere of *Camellia sinensis* and its effect on the bacterial community[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei University of Science and Technology, 2016 (in Chinese)
岑浴. 多粘类芽孢杆菌在茶叶上的定殖及其对叶际细菌群落的影响[D]. 石家庄: 河北科技大学硕士学位论文, 2016
- [39] Tao M, Li SD, Zhang YH. Development of real-time PCR quantitative assay for rapid detection of *Gliocladium roseum* 67-1, an effective biocontrol agent, in soil[J]. Chinese Journal of Biological Control, 2009, 25(1): 35-40 (in Chinese)
陶萌, 李世东, 张拥华. 土壤中生防菌粉红粘帚霉 67-1 的荧光定量 PCR 检测方法[J]. 中国生物防治, 2009, 25(1): 35-40
- [40] Wei W, Xu YL, Zhu L, et al. Establishment and application of a real-time quantitative PCR assay for the detection of soil *Trichoderma* spp.[J]. Soil and Crop, 2013, 2(1): 53-58 (in Chinese)
魏巍, 许艳丽, 朱琳, 等. 土壤木霉菌实时荧光定量 PCR 检测体系的建立及应用[J]. 土壤与作物, 2013, 2(1): 53-58
- [41] Wang C, Wu R, Li FD, et al. Construction of sheep *PrP* gene standard plasmid DNA and curve using molecular beacon real-time RT-PCR[J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2011, 27(8): 708-711 (in Chinese)
王川, 吴润, 李发弟, 等. 分子信标实时荧光定量 PCR 构绵羊 *PrP* 基因质粒和标准曲线[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(8): 708-711
- [42] Zhao HY, Bao JF. Research progress in principles and applications of real-time quantitative PCR[J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2007, 16(4): 492-497 (in Chinese)
赵焕英, 包金凤. 实时荧光定量 PCR 技术的原理及其应用研究进展[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2007, 16(4): 492-497
- [43] Pan B, Cai Q, Lu Q, et al. Establishment of standard curve for mouse *Bax* gene recombinant plasmid by real-time qPCR[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2013, 34(12): 64-68 (in Chinese)
潘博, 蔡青, 鲁强, 等. 小鼠 *Bax* 基因实时荧光定量 PCR 标准品质粒的构建[J]. 动物医学进展, 2013, 34(12): 64-68
- [44] Li J. Transcriptome sequence and analysis of biocontrol *Bacillus methylotrophicus* NJ13 induced by *Ilyonectria robusta*[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin Agricultural University, 2019 (in Chinese)
李佳. 人参锈腐病菌诱导生防甲基营养型芽孢杆菌 NJ13 的转录组测序及分析[D]. 长春: 吉林农业大学硕士学位论文, 2019
- [45] Hu XF, Li SX, Wu JG, et al. Transfer of *Bacillus mucilaginosus* and *Bacillus edaphicus* to the genus *Paenibacillus* as *Paenibacillus mucilaginosus* comb. nov. and *Paenibacillus edaphicus* comb. nov.[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2010, 60(2): 8-14
- [46] Wu JG. Development and application of specific PCR methods for two silicate bacteria, *Paenibacillus mucilaginosus* and *P. edaphicus*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang Sci-Tech University, 2010 (in Chinese)
吴金光. 两种硅酸盐细菌特异性 PCR 方法的建立及应用[D]. 杭州: 浙江理工大学硕士学位论文, 2010
- [47] Zhang SS, Wu JG, Hu XF. Development of a PCR identification method for *Paenibacillus edaphicus*[J]. Journal of Zhejiang Sci-Tech University, 2012, 29(6): 852-857 (in Chinese)
张珊珊, 吴金光, 胡秀芳. 土壤类芽孢杆菌 PCR 鉴定方法的建立[J]. 浙江理工大学学报, 2012, 29(6): 852-857
- [48] Li RQ, Liu X, Qiu HZ, et al. Rapid detection of *Rhizoctonia* in rhizosphere soil of potato using real-time quantitative PCR[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2013, 22(5): 136-144 (in Chinese)
李瑞琴, 刘星, 邱慧珍, 等. 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[J]. 草业学报, 2013, 22(5): 136-144
- [49] Tuo N, Zhang J, Qiu HZ, et al. Pathogenic mechanism of *Rhizoctonia solani* potato blight I micro-structure observation of the infection process and measurement of cell wall degradation enzyme activity[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2015, 24(12): 74-82 (in Chinese)
拓宁, 张君, 邱慧珍, 等. 立枯丝核菌对马铃薯侵染过程的显微结构观察与胞壁降解酶活性的测定[J]. 草业学报, 2015, 24(12): 74-82