

土壤中黄瓜棒孢叶斑病病原菌实时 荧光定量 PCR 检测技术研究

高 苇^{1,2}, 李宝聚², 王万立¹, 郝永娟¹, 石延霞²

(1. 天津市植物保护研究所, 天津 300381; 2. 中国农业科学院 蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要:筛选到应用于多主棒孢实时荧光定量 PCR 检测的特异性引物 CIR5/CIF5, 并建立了土壤中多主棒孢的实时荧光定量 PCR 检测技术。引物 CIR5/CIF5 能够从多主棒孢基因组 DNA 中特异性扩增出一条 259 bp 的片段, 常规 PCR 检测中灵敏度可达 10 fg/μL。利用实时荧光定量 PCR 检测模拟带菌土壤中的带菌量, 结果证明该技术对土壤中多主棒孢的检测下限为 1 个孢子/g 土壤, 可以快速、准确地定量土壤中病原菌的孢子数目, 为栽培前土壤中病原菌的监测预报提供有效的技术手段。

关键词:多主棒孢; 实时荧光定量 PCR; 土壤检测

中图分类号:S642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)02-0071-04

Detection of *Corynespora cassiicola* in Soil with Real-time Quantitative PCR

GAO Wei^{1,2}, LI Bao-ju², WANG Wan-li¹, HAO Yong-juan¹, SHI Yan-xia²

(1. Tianjin Institute of Plant Protection, Tianjin 300381, China; 2. The Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In this research, a specific primer pair CIR5/CIF5 for *C. cassiicola* was developed, and Real-time PCR based specific detection method of this pathogen in soil was established. The primer pair gave a single amplification of 259 bp from *C. cassiicola* and could be distinguished from other soil-borne pathogen strains. The detection limit was 10 fg/μL in conventional PCR. The pathogen in soil could be detected by Real-time quantitative PCR, and the sensitivity was down to *C. cassiicola* DNA of 1 conidia/g. This Real-time quantitative PCR method could assist in the implementation of quarantine measures for prevention and control of *Corynespora* spot leaf.

Key words: *Corynespora cassiicola*; Real-time quantitative PCR; Soil detection

多主棒孢(*Corynespora cassiicola*)能够引起热带及亚热带地区的蔬菜、树木和观赏作物等 530 余种植物的棒孢叶斑病^[1]。该病原菌主要侵染寄主植物的叶片, 同时也可危害茎、花和果实, 严重时造成落叶、落果等现象^[2]。近年来, 由多主棒孢引起的黄瓜棒孢叶斑病在我国^[3-4]、日本^[5]及韩国^[6]等亚洲国家大面积暴发, 造成巨大的经济损失。病原菌能够以菌丝体、厚垣孢子或分生孢子的形式, 随病残体、杂草在土壤中存活 2 年以上^[6-7], 土壤带菌是该病害的主要侵染源^[7]。因此, 实现土壤中多主棒孢定量检测对病害防治具有重要意义。目前, 除 Qi 等^[8-9]采用常规 PCR 和巢式 PCR 方法对橡胶落叶

病病原菌多主棒孢进行定性检测外, 国内外还未见该病原菌实时荧光定量 PCR 检测方面的报道。本研究根据多主棒孢的 rDNA-ITS 区序列设计了一对特异性的引物, 建立了土壤中多主棒孢的实时荧光定量 PCR 检测技术, 以期实现栽培前土壤中多主棒孢数量的实时监控, 对该病害的发生预测及防治策略的制定提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 供试菌株培养及基因组 DNA 提取

供试菌株的种类和来源见表 1, 共包括 6 株不同寄主来源的多主棒孢和 11 株其他属的病原菌。

收稿日期: 2013-06-13

基金项目: 大宗蔬菜产业技术体系建设专项(CARS-25)

作者简介: 高 苇(1982-), 女, 辽宁大连人, 助理研究员, 博士, 主要从事植物病原真菌学的研究。

通讯作者: 李宝聚(1967-), 男, 黑龙江饶河人, 研究员, 博士, 主要从事蔬菜病害防治研究。

所有菌株均由中国农业科学院蔬菜花卉研究所菜病综防组提供。各菌株在 PD 液体培养基中, 28 ℃,

120 r/min 振荡培养 5 d。收集菌丝体, 采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA^[10]。

表 1 供试菌株的种类及来源

Tab. 1 *Corynespora cassiicola* and outgroup fungi used in this study

	菌株编号 Isolate No.	拉丁名 Species	中文名 Chinese name	引起病害 Disease
1	SD3	<i>Corynespora cassiicola</i>	多主棒孢	黄瓜棒孢叶斑病
2	SD21	<i>C. cassiicola</i>	多主棒孢	黄瓜棒孢叶斑病
3	HB15	<i>C. cassiicola</i>	多主棒孢	黄瓜棒孢叶斑病
4	XJ6	<i>C. cassiicola</i>	多主棒孢	橡胶棒孢落叶病
5	FQ4	<i>C. cassiicola</i>	多主棒孢	番茄棒孢叶斑病
6	QZ6	<i>C. cassiicola</i>	多主棒孢	茄子棒孢叶斑病
7	HG08090201	<i>Ascochyta citrullina</i>	西瓜壳二孢	黄瓜蔓枯病
8	H504281	<i>Fusarium oxysporum</i>	尖孢镰刀菌	黄瓜枯萎病
9	HG08092201	<i>Pythium aphanidermatum</i>	瓜果腐霉	黄瓜猝倒病
10	SDWK	<i>Rhizoctonia solani</i>	立枯丝核菌	黄瓜立枯病
11	IVF215	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	核盘菌	黄瓜菌核病
12	HG08073201	<i>Colletotrichum orbiculare</i>	瓜类刺盘孢	黄瓜炭疽病
13	WFH	<i>Botrytis cinerea</i>	灰葡萄孢	番茄灰霉病
14	LJ08042301	<i>Colletotrichum capsici</i>	辣椒刺盘孢	茄子炭疽病
15	FQ08071501	<i>Septoria lycopersici</i>	番茄壳针孢	番茄斑枯病
16	HG09102001	<i>Alternaria cucumerina</i>	瓜链格孢	黄瓜黑斑病
17	CD08092903	<i>Colletotrichum truncatum</i>	平头刺盘孢	菜豆炭疽病

1.2 模拟带菌土壤的制备及 DNA 提取

将活化后的多主棒孢转接在 PDA 平板上, 25 ℃ 恒温培养 7 d, 然后用灭菌刷刷下平板上的孢子, 配成浓度为 10^6 个孢子/mL 悬浮液。将配好的孢子悬浮液 10 倍梯度稀释, 得到浓度为 10^6 , 10^5 , …… 10^1 个孢子/mL 的悬浮液。将 100 mL 菌悬液加入到 100 g 模拟土壤(草炭:蛭石 = 1:2)中, 制备浓度为 10^6 , 10^5 , ……1 个孢子/g 的模拟带菌土壤, 每个浓度设 3 个重复。在每 100 g 模拟带菌土中随机抽取 1 g 土样, 冷冻干燥后, 采用 Chelex-100 法^[11] 提取带菌土壤的总 DNA。

1.3 引物设计

利用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTG CGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGCTT ATTGAT-3'), 扩增多主棒孢 rDNA-ITS 区, 获得 500 bp 左右的片段, 然后在中国农业科学院作物科学研究所测序。将测得的 ITS 区序列与 GenBank 上其近缘菌 ITS 序列进行比对, 通过 Primer 5.0 软件设计多主棒孢的特异性引物。本试验所用的引物均由上海生工合成。

1.4 引物的特异性和灵敏性检测

利用合成的引物 CIR5/CIF5 扩增 17 个供试菌株的基因组 DNA。PCR 反应体系 (20 μ L) 为: $10 \times$ PCR Buffer 1.5 μ L, dNTP (10 μ mol/L) 1.0 μ L, 引物

(20 μ mol/L) 0.6 μ L, 模板 DNA 1.0 μ L, Taq 聚合酶 0.3 μ L, 最后以 ddH₂O 补足至 20 μ L。PCR 反应条件: 94 ℃ 5 min; 60 ℃ 50 s, 94 ℃ 40 s, 72 ℃ 80 s, 30 个循环; 72 ℃ 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

采用 Spectrophotometers 分光光度计测定提取多主棒孢基因组 DNA 的浓度, 并用 $1 \times$ TE 缓冲液将 DNA 溶液稀释至 10 ng/ μ L。采用 10 倍梯度稀释法, 得到浓度为 1 ng/ μ L、100 pg/ μ L、……0.1 fg/ μ L 和 0.01 fg/ μ L 的基因组 DNA 溶液。常规 PCR 扩增检测引物 CIR5/CIF5 的灵敏度。

1.5 实时荧光定量 PCR 检测

1.5.1 阳性质粒的构建 回收引物 CIR5/CIF5 扩增后得到的 259 bp 目的片段, 与 PMD-20-T 载体连接, 连接产物转化至 *Escherichia colia* DH5 α 感受态细胞中, 经 Amp 抗性和菌落 PCR 筛选, 提取并检测带有目的片段的质粒浓度。

1.5.2 Real-time PCR 标准曲线的建立: 将重组质粒做 10 倍梯度稀释, 以 10^2 , 10^3 , …… 10^8 稀释倍数质粒 DNA 为模板, 建立实时荧光定量 PCR 标准曲线。使用 Bio-rad iCycleri Q5 PCR 仪进行实时荧光定量 PCR。采用 50 μ L PCR 反应体系: 引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ L, SYBR Premix Ex TaqTM 25 μ L, 模板

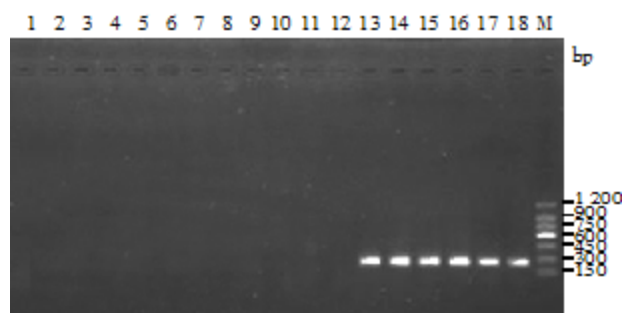
DNA 4 μL , ddH₂O 19 μL 。优化后的反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s; 95 $^{\circ}\text{C}$ 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 每循环延伸后检测荧光, 共 45 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 s。每个反应设 3 次重复。溶解曲线分析: 55 ~ 95 $^{\circ}\text{C}$ 内, 每升高 0.5 $^{\circ}\text{C}$ 检测荧光信号。以质粒 DNA 量对数为横坐标, 反应循环数 (Ct) 为纵坐标绘制标准曲线。

1.6 模拟带菌土壤实时荧光定量 PCR 检测

以不同浓度模拟带菌土壤总 DNA 为模板, 采用引物 CIR5/CIF5 通过实时荧光定量 PCR 检测模拟的带菌土壤, 确定该引物对土壤中病原菌分生孢子的检测灵敏度。

2 结果与分析

2.1 引物的特异性和灵敏性检测



M. 150 bp DNA ladder Marker; 1. 阴性对照; 2 ~ 12. 西瓜壳二孢 (*Ascochyta citrullina*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、瓜果腐霉菌 (*Pythium aphanidermatum*)、立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、瓜类刺盘孢 (*Colletotrichum orbiculare*)、灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*)、辣椒刺盘孢 (*Colletotrichum capsici*)、番茄壳针孢 (*Septoria lycopersici*)、瓜链格孢 (*Alternaria cucumerina*)、平头刺盘孢 (*Colletotrichum truncatum*); 13 ~ 18. 菌株 SD3、SD21、HB15、XJ6、FQ4、QZ6。

M. 150 bp DNA ladder Marker; 1. Negative control; 2 ~ 12. *Ascochyta citrullina*, *Fusarium oxysporum*, *Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Colletotrichum orbiculare*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum capsici*, *Septoria lycopersici*, *Alternaria cucumerina*, *Colletotrichum truncatum*; 13 ~ 18. Strains of SD3, SD21, HB15, XJ6, FQ4, QZ6.

图 1 引物 CIR5/CIF5 对多主棒孢的特异性检测

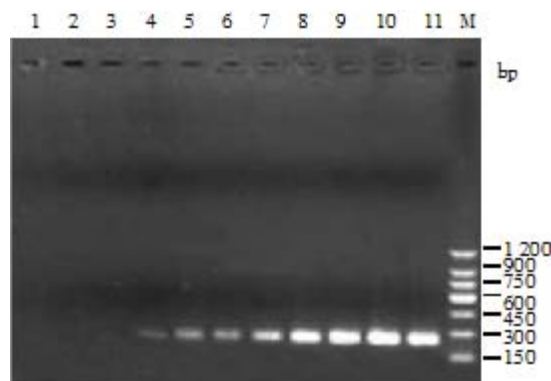
Fig. 1 Specific amplification of *Corynespora cassiicola* by primer pairs CIR5/ CIF5

采用通用引物 ITS1/ITS4 对多主棒孢 rDNA-ITS 区进行扩增, 获得 500 bp 左右扩增产物。将测序得到的多主棒孢 ITS 序列和 GenBank 中其他近缘菌种的 ITS 区域进行比对, 得到多主棒孢特异性引物 CIR5 (5'-GGACCCACCACAAACCCA-3')/CIF5 (5'-ACAGACGCCCAAACACCAA-3'), PCR 扩增得到特异性片段大小为 259 bp。

采用引物 CIR5/CIF5 扩增 17 个供试菌株的基因组 DNA, 扩增结果表明, 该引物仅从 6 株不同来源的多主棒孢中扩增出 259 bp 特异性片段, 其他菌株及阴性对照中, 均无扩增产物 (图 1), 由此说明引物 CIR5/CIF5 具有较强的特异性, 可以应用于多主

棒孢的特异性检测。

以特异性引物 CIR5/CIF5 检测多主棒孢基因组 DNA 的 10 倍梯度稀释液。结果表明, 1 fg/ μL 多主棒孢 DNA 经过引物 CIR5/CIF5 扩增后可以隐约看到大小为 259 bp 的特异性片段。而浓度低于 0.1 fg/ μL 时, 无明显的扩增条带 (图 2)。说明该引物对多主棒孢基因组 DNA 具有较高的灵敏度, 检测下限为 1 fg/ μL 。



M. 150 bp DNA ladder Marker; 1. 阴性对照; 2 ~ 11. 浓度为 0.01 fg/ μL 、0.1 fg/ μL 、1 fg/ μL 、10 fg/ μL 、100 fg/ μL 、1 pg/ μL 、10 pg/ μL 、100 pg/ μL 、1 ng/ μL 、10 ng/ μL 多主棒孢基因组。

M. 150 bp DNA ladder Marker; 1. Negative control; 2 ~ 11. DNA concentrations of 0.01 fg/ μL , 0.1 fg/ μL , 1 fg/ μL , 10 fg/ μL , 100 fg/ μL , 1 pg/ μL , 10 pg/ μL , 100 pg/ μL , 1 ng/ μL , 10 ng/ μL .

图 2 引物 CIR5/CIF5 对多主棒孢的灵敏度检测

Fig. 2 Sensitivity amplification of *Corynespora cassiicola* by primer pairs CIR5/ CIF5

2.2 基因组 DNA 实时荧光定量 PCR 检测及标准曲线的建立

应用引物 CIR5/CIF5 扩增 10 倍梯度稀释的多主棒孢质粒 DNA, 获得稀释倍数为 10^2 , 10^3 , ..., 10^8 的标准曲线。质粒 DNA 浓度的对数 (x) 与对应的 Ct 值 (y) 之间具有良好的线性关系 ($R^2 = 0.995$) (图 3)。荧光定量 PCR 扩增溶解曲线仅出现一个特异性单峰 (图 4), 说明该引物特异性良好, 可以保证 SYBR Green I 染料定量 PCR 检测的特异性。

2.3 模拟带菌土壤的实时荧光定量 PCR 检测

利用实时荧光定量 PCR 技术对 10 倍梯度稀释的孢子浓度为 10^6 , 10^5 , ..., 1 个孢子/g 的模拟带菌土壤和未加菌土壤进行定量检测, 该技术可以检测到每克土壤中含 1 个孢子, 而且未加菌的土壤 DNA 中未检测到拷贝数。证明该引物特异性强, 灵敏度高, 可以应用于土壤中多主棒孢的定量检测。另外, 土壤中多主棒孢分生孢子的实时荧光定量 PCR 标准曲线显示: 分生孢子数目的对数 (x) 和每个反应对应的 Ct 值 (y) 之间符合直线回归关系 ($R^2 = 0.986$): $y = -4.712x + 38.649$ (图 5)。

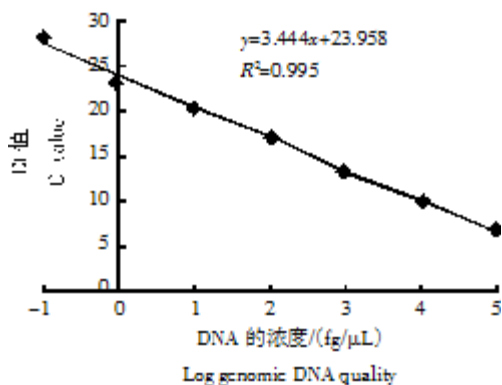


图3 多主棒孢质粒 DNA 实时荧光定量标准曲线

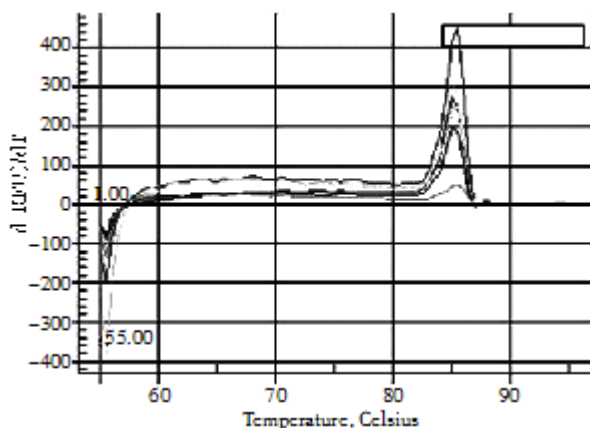
Fig.3 Standard curve of Real-time PCR for plasmid DNA of *Corynespora cassiicola*

图4 多主棒孢质粒 DNA 为模板的溶解曲线

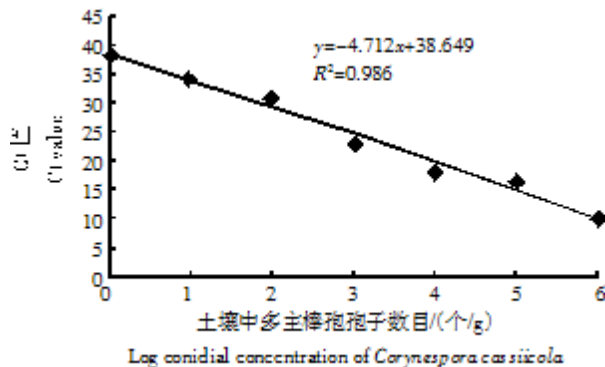
Fig.4 Melt curve of *Corynespora cassiicola* plasmid

图5 土壤中多主棒孢分生孢子数目与 Ct 值线性关系

Fig.5 Standard curve between log number of *Corynespora cassiicola* in soil and corresponding cycle threshold (Ct) values

3 讨论

多主棒孢寄主范围广泛,是一种重要的土传病原菌,土壤中病原菌的精确定量对病害的预测预报及防治策略的制定极为重要。实时荧光定量 PCR 技术是土壤微生物快速、准确、灵敏地定量检测的有效技术手段,并已在多种土壤微生物和病原菌的监

测中得到广泛的应用^[12-13]。本研究中筛选到的多主棒孢引物 CIR5/CIF5,特异性强,不易形成引物二聚体,扩增效率高;建立的多主棒孢实时荧光定量 PCR 检测技术,可克服土壤检测中病原菌含量少、杂质多等弊端,能够满足土壤中病原菌定量检测的要求。同时,建立了土壤中病原菌孢子数目同检测循环数之间的线性关系($R^2=0.986$),每克土壤中含有 1 个孢子即可被检测到。但土壤中微生物总 DNA 的富集提取是该检测手段实际应用中的关键问题,仍需进一步深入研究解决该检测技术的成果应用。

参考文献:

- [1] Dixon L J, Schlub R L, Pernezny K, et al. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola* [J]. *Phytopathology*, 2009, 99(9): 1015 - 1027.
- [2] Ellis M B. *Dematiaceous hyphomycetes* [M]. Kew, UK: CABI, 1971: 372 - 373.
- [3] 李宝聚, 赵彦杰, 于淑晶, 等. 2008 年秋季河北青县黄瓜棒孢叶斑病大发生 [J]. *中国蔬菜*, 2008(11): 51 - 52.
- [4] 郝永娟, 刘春艳, 王 勇, 等. 天津市蔬菜病害发生动态及防治对策 [J]. *天津农业科学*, 2009, 15(1): 69 - 71.
- [5] Miyamoto T, Ishii H, Seko T, et al. Occurrence of *Corynespora cassiicola* isolates resistant to boscalid on cucumber in Ibaraki Prefecture Japan [J]. *Plant Pathology*, 2009, 58(6): 1144 - 1151.
- [6] Kwon M K, Kang B R, Cho B H, et al. Occurrence of target leaf spot disease caused by *Corynespora cassiicola* on cucumber in Korea [J]. *Plant Pathology*, 2003, 52(3): 424.
- [7] Erick D, Wolf D, Scott A. Disease cycle approach to plant disease prediction [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2007(45): 203 - 220.
- [8] Qi Y X, Zhang X, Pu J J, et al. Detection of *Corynespora cassiicola* in hevea rubber tree from China [J]. *Australasian Plant Disease Notes*, 2007(2): 153 - 155.
- [9] Qi X Y, Zhang X, Pu J J, et al. Nested PCR assay for detection of corynespora leaf fall disease caused by *Corynespora cassiicola* [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2009, 38(2): 141 - 148.
- [10] Raeder U, Broda P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 1985(1): 17 - 20.
- [11] Volossiuk T, Robb E J, Nazar R N. Direct DNA extraction for PCR-mediated assays of soil organisms [J]. *Appl Env Microbiol*, 1995, 61(11): 3972 - 3976.
- [12] 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*, 2012, 40(2): 380 - 388.
- [13] 宋志强, 王 暄, 林 宇, 等. 土壤中南方根结线虫的实时荧光 PCR 检测和定量 [J]. *植物保护学报*, 2013, 40(3): 255 - 260.