

蔬菜土传病原菌三重 PCR 检测体系的建立与应用

刘芮池^{1,2}, 程有普², 柴阿丽¹, 石延霞¹, 谢学文¹, 帕提古丽³, 李宝聚¹

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 天津农学院园艺园林学院, 天津 300384; ³ 新疆农业科学院园艺作物研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘要: 【目的】针对生产中危害严重的 3 种蔬菜土传病原菌瓜果腐霉 (*Pythium aphanidermatum*)、尖镰孢 (*Fusarium oxysporum*)、大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*), 建立三重 PCR (triplex PCR) 检测体系, 为蔬菜土传真菌病害的早期诊断和鉴定提供技术与方法。【方法】筛选 3 种病原菌特异性引物组合, 通过设定不同的 PCR 退火温度、引物浓度、循环次数以及延伸时间, 探索影响三重 PCR 扩增的因素, 建立蔬菜土传病原菌三重 PCR 检测体系, 并对体系灵敏度进行检测。为了验证建立体系的稳定性, 选择 2 × Taq Master PCR Mix (北京博迈德生物技术有限公司) 和 TaKaRa Taq 酶 (大连宝生物工程有限公司) 2 个不同公司的试剂, 分别利用 C1000 Touch™ 型 (赛默飞世尔科技有限公司) 与 Aeris™ 型 (新加坡艺思高科技有限公司) 热循环仪进行三重 PCR 反应, 比较检测结果的可重复性。对田间采集的 35 份病害样本和 149 份土壤样本, 分别进行三重 PCR 和病原菌分离检测, 以确定所建立得三重 PCR 检测体系的适用性。【结果】三重 PCR 反应体系中引物对 AsAPH2B/AsPyF、F0F1/F0R1、VActF/VActR 可分别扩增出瓜果腐霉、尖镰孢、大丽轮枝菌长度为 163、328 和 530 bp 的特异性目的片段。反应体系 (25 μL): 0.12 μmol·L⁻¹ AsAPH2B/AsPyF, 0.16 μmol·L⁻¹ F0F1/F0R1, 0.24 μmol·L⁻¹ VActF/VActR, 2 × Taq Master PCR Mix 12.5 μL, 退火温度为 60.8℃, 35 个循环。该体系对病原菌纯培养物的检测灵敏度为 10⁻¹ ng·μL⁻¹, 对土壤中大丽轮枝菌、尖镰孢和瓜果腐霉的检测灵敏度分别为 10⁵、10⁶ 个孢子/g 土壤和 10⁻² mg 菌丝/g 土壤。分别采用 2 × Taq Master PCR Mix 和 TaKaRa Taq 酶, 利用 C1000 Touch™ 型和 Aeris™ 型热循环仪进行三重 PCR, 扩增结果一致, 说明三重 PCR 体系检测稳定性好。对田间采集的病害和土壤样本进行检测, 25 份病害样本和 71 份土壤样本中检测出带菌, 三重 PCR 检测与病原菌分离培养结果一致。【结论】本研究建立的瓜果腐霉、尖镰孢、大丽轮枝菌三重 PCR 检测体系具有灵敏度高、稳定性和重复性好的特点, 能够快速、准确地检测田间病株及其根围土壤中的瓜果腐霉、尖镰孢、大丽轮枝菌, 为蔬菜土传病害的早期预防和流行监测提供了有效的技术手段。

关键词: 蔬菜; 三重 PCR; 土传病害; 瓜果腐霉; 尖镰孢; 大丽轮枝菌

Establishment and Application of a Triplex PCR Detection System for Vegetable Soil-Borne Pathogens

LIU RuiChi^{1,2}, CHENG YouPu², CHAI ALi¹, SHI YanXia¹, XIE XueWen¹, PATIGULI³, LI BaoJu¹

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ² College of Horticultural and Landscape Architecture, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384; ³ Institute of Horticulture, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091)

Abstract: 【Objective】The objective of this study is to establish a triplex PCR system for the detection of *Pythium aphanidermatum*, *Fusarium oxysporum* and *Verticillium dahliae*, and to provide technology and method for early diagnosis and identification of soil-borne diseases of vegetables. 【Method】Three sets of specific primers were selected to analyze the influencing factors of triplex PCR and the primer concentration, annealing temperature, amplification cycles and extension time of PCR reaction

收稿日期: 2019-02-20; 接受日期: 2019-03-18

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD0200603)、中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS)、农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目、自治区区域协同创新专项 (2018E02027)

联系方式: 刘芮池, E-mail: LIURUICHI0@163.com. 通信作者柴阿丽, E-mail: chaiali@caas.cn. 通信作者李宝聚, E-mail: libaoju@caas.cn

were optimized. The best triplex PCR detection system for vegetable soil-borne pathogenic fungi was established and the sensitivity of the system was detected. In order to test the stability of the system, 2×Taq Master PCR Mix (Beijing Biomed Co. Ltd) and TaKaRa Taq enzyme (TaKaRa Biotechnology Dalian Co. Ltd) were used by C1000 Touch™ (Thermo Fisher Scientific Co. Ltd) and Aeris™ type (Esco Micro Pte Ltd) thermal cycle meter for amplification. The triplex PCR and pathogen isolation and detection of 35 disease samples and 149 soil samples collected in the field were carried out to determine the applicability of the triplex PCR detection system.

【Result】In the triplex PCR detection system, the specific target fragments of *P. aphanidermatum*, *F. oxysporum* and *V. dahliae* with the length of 163, 328 and 530 bp could be amplified by AsAPH2B/AsPyF, FOF1/FOR1, VActF/VActR, respectively. The 25 μL reaction system contained 0.12 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AsAPH2B/AsPyF, 0.16 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ FOF1/FOR1, 0.24 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ VActF/VActR, 2×Taq Master PCR Mix 12.5 μL . The annealing temperature was 60.8°C and the number of cycles was 35. The detection limitation was $10^{-1}\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ for pure culture of pathogens. For artificially infected substrate, the detection limitations were 10^5 , 10^6 spores/g and 10^{-2} mg hyphae/g for *V. dahliae*, *F. oxysporum* and *P. aphanidermatum*, respectively. The results were consistent of 2×Taq Master PCR Mix and TaKaRa Taq enzyme, which were amplified by C1000 Touch™ and Aeris™ type thermal cycle meter. It meant that the triplex PCR system was stable. The infected tissues and soil samples collected in the field were detected, and 25 tissues and 71 soil samples were detected for carrying pathogen, which were consistent with the results of isolation and culture. 【Conclusion】The triplex PCR detection system established in this study has the characteristics of high sensitivity, stability and reproducibility, and can be used for rapid and accurate detection of *P. aphanidermatum*, *F. oxysporum* and *V. dahliae* in the infected plant and the surrounding soil. It provides an effective technical means for early prevention and epidemic monitoring of vegetable soil-borne diseases.

Key words: vegetable; triplex PCR; soil-borne disease; *Pythium aphanidermatum*; *Fusarium oxysporum*; *Verticillium dahliae*

0 引言

【研究意义】瓜果腐霉(*Pythium aphanidermatum*)隶属卵菌门,是一种重要的土传病原菌,通常侵染幼苗的根和种子,造成大量死苗^[1]。尖镰孢(*Fusarium oxysporum*)是一种世界性分布的土传病原菌,引起维管束病害,近几年来蔬菜枯萎病发生面积逐年扩大^[2-3]。大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)可侵染大豆、番茄、茄子、马铃薯等,引发黄萎病、根腐病、茎基腐病等,目前尚无有效防治手段^[4]。由于这3种病原菌引起的病害症状与其他植物病害相似度高,尤其病害初期症状不明显,仅靠肉眼不能准确判断病害种类。而防治不同病原菌所用药剂不同,错误的诊断导致用药及防治失败,所以在病害潜伏期或发病初期作出准确诊断,有利于及时采取针对性防治措施,减少损失^[5-7]。因此,对于上述3种侵染蔬菜的土传病原菌,亟需建立科学、准确、快速、高通量的检测方法。【前人研究进展】传统的病害诊断依赖于病害症状的观察和病原菌的分离与鉴定,但病害的症状观察需要典型症状出现才可准确判断,病原菌的分离培养易受环境、培养条件等影响,操作复杂,耗时长,不能满足高通量、快速的检测要求,不利于大规模样品的分析鉴定^[8-12]。随着分子生物学的飞速发展,已有许多成熟的技术可用于植物病原菌的检测。THOMAS等^[13]利用腐霉属的18S rRNA 基因保守区域,设计特异性引物 Pyth712Fwd/Pyth1758Rev 对腐霉属进行了普通 PCR 检测;加拿

大地区的大豆生产受腐霉菌影响严重, MARCHAND 等^[14]于 2010—2012 年采集土壤样本,对分离出的腐霉菌进行 PCR 扩增和测序以鉴定不同的腐霉菌物种; GEISER 等^[15]采用引物 EF1/EF2 扩增 TEF 基因区域以鉴定镰孢菌; RAHJOO 等^[16]于 2004—2005 年在伊朗 11 个地区分离出 191 株镰孢菌,通过 TEF 区域特异性引物 VER1/2 和 PRO1/2 进行 PCR 扩增,鉴定结果显示分别为尖镰孢、层出镰孢(*F. proliferatum*)和黄色镰孢(*F. culmorum*); LI 等^[17]设计了引物 NMS1/NMS2 用于轮枝菌属的鉴定; BRESSAN 等^[18]通过 ITS 区域建立了一种快速、特异的 PCR 检测方法用于土壤中大丽轮枝菌的检测,检测灵敏度为 4 fg。【本研究切入点】针对多种土传病原菌的多重 PCR 检测技术的研究鲜有报道。针对田间多种病原菌复合侵染问题,建立 3 种土传病原菌的多重 PCR 体系,同时检测多种病原菌,提高检测效率,为病害防治赢得时间。【拟解决的关键问题】筛选适宜的检测引物,优化多重 PCR 检测体系,建立能够同时检测蔬菜瓜果腐霉、尖镰孢和大丽轮枝菌的多重 PCR 检测方法,提高病原菌检测效率,为病害的诊断提供技术支持。

1 材料与方 法

试验于 2017 年 12 月至 2018 年 12 月在中国农业科学院蔬菜花卉研究所完成。

1.1 试验材料

供试菌株由中国农业科学院蔬菜花卉研究所蔬菜

病害综合防治课题组提供，其中瓜果腐霉、尖镰孢、大丽轮枝菌为检测病菌（表 1）。

1.2 基因组 DNA 的提取

取适量冻干菌丝样品，采用 CTAB 法提取病原菌基因组 DNA，-20℃保存备用。

1.3 多重 PCR 引物组合

检索国内外关于瓜果腐霉、尖镰孢、大丽轮枝菌的分子检测报道，选取可能组合的引物。瓜果腐霉采用 ASANO 等^[19]设计的特异引物 AsAPH2B/AsPyF；尖镰孢引物采用 FOF1/FOR1^[20]；大丽轮枝菌采用引物 VActF/VActR^[21]。

通过 NCBI 网站对引物组进行 BLAST 比对，检测这 3 对引物之间相似度是否符合组成多重 PCR 的条件，设计试验进一步验证。引物由北京博迈德生物技术有限公司合成（表 2）。

1.4 多重 PCR 体系的建立

对影响三重 PCR 体系的重要因素进行优化。58—65℃之间设计梯度 PCR 反应程序，共 58、58.7、59.6、

60.8、62.4、63.7、64.5、65℃ 8 个梯度；引物 AsAPH2B/AsPyF 浓度设定 0.12、0.16 和 0.20 μmol·L⁻¹ 3 个梯度，引物 FOF1/FOR1 浓度设定 0.16、0.20 和 0.24 μmol·L⁻¹ 3 个梯度，引物 VActF/VActR 浓度设定 0.24、0.28 和 0.32 μmol·L⁻¹ 3 个梯度；3 个延伸时间分别设为 30 s、45 s、1 min；3 个循环次数分别设为 30、35、40 次。

PCR 仪进行扩增，反应结束后取 5 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，使用 Bio-rad 凝胶成像系统照相。结果按照病原菌扩增的特异性和敏感性，即条带的强弱、杂带的有无等进行综合评价。

1.5 阳性样品扩增产物的测序及分析

对阳性样品的扩增产物进行双向测序，并在 GenBank 中进行 BLAST 分析，以验证 PCR 的特异性。

1.6 三重 PCR 反应特异性检测

选取瓜果腐霉、尖镰孢、大丽轮枝菌基因组 DNA 等量混合均匀，分别以辣椒疫霉、立枯丝核菌、核盘菌等 16 株蔬菜土传病原菌基因组 DNA 为对照，利用

表 1 供试菌株
Table 1 The strains used in the test

病原菌 Pathogen	寄主 Host	菌株编号 Strain number	引物 Primer		
			AsAPH2B/AsPyF	FOF1/FOR1	VActF/VActR
瓜果腐霉 <i>P. aphanidermatum</i>	番茄 Tomato	FQ15092209	+	-	-
尖镰孢 <i>F. oxysporum</i>	黄瓜 Cucumber	HG12090201	-	+	-
大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	茄子 Eggplant	QZ12061103	-	-	+
茄镰孢 <i>F. solani</i>	黄瓜 Cucumber	HG14060601	-	-	-
	芹菜 Celery	QC15061008	-	-	-
核盘菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	青花菜 Broccoli	QHC18032301	-	-	-
	茄子 Eggplant	QZ11102201	-	-	-
辣椒疫霉 <i>Phytophthora capsici</i>	辣椒 Pepper	LJ12010805	-	-	-
	辣椒 Pepper	LJ18081001	-	-	-
灰葡萄孢 <i>Botrytis cinerea</i>	番茄 Tomato	FQ11051301	-	-	-
	黄瓜 Cucumber	HG11021509	-	-	-
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	白菜 Chinese cabbage	BC16052001	-	-	-
	生菜 Lettuce	SC16052001	-	-	-
茄科劳尔氏菌 <i>Ralstonia solanacearum</i>	番茄 Tomato	FQ12080802	-	-	-
	番茄 Tomato	FQ16060706	-	-	-
胡萝卜果胶杆菌 <i>Pectobacterterium carotovorum</i>	黄瓜 Cucumber	HG1501503604	-	-	-
	白菜 Chinese cabbage	BC18082306	-	-	-
密执安棒形杆菌密执安亚种 <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>	番茄 Tomato	FQ18082408	-	-	-
	番茄 Tomato	FQ18082410	-	-	-

“+” 阳性反应 Positive reaction; “-” 无目的条带 No PCR band

表 2 供试引物
Table 2 The primers used in the test

病原菌 Pathogen	序列 Sequence (5'-3')	产物大小 Product length (bp)	参考文献 Reference
瓜果腐霉 <i>P. aphanidermatum</i>	AsAPH2B: GCGCGTTGTTTACAATAAATTGC	163	[19]
	AsPyF: CTGTTCTTTCCTTGAGGTG		
尖镰孢 <i>F. oxysporum</i>	FOF1: ACATACCACTTGTTGCCTCG	328	[20]
	FOR1: CGCCAATCAATTTGAGGAACG		
大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	VActF: TAATTCACAATGGAGGGTAGG	530	[21]
	VActR: GTAAGGATACCACGCTTGG		

优化好的三重 PCR 反应条件进行三重 PCR 检测，检验该体系的特异性。

1.7 三重 PCR 反应灵敏度检测

将瓜果腐霉、尖镰孢、大丽轮枝菌基因组 DNA 模板浓度设置为 10、1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴ 和 10⁻⁵ ng·μL⁻¹，使用优化后的三重 PCR 反应条件进行 PCR 扩增，取 5 μL 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳，凝胶成像系统照相。分别检测单一病原菌及混合病原菌的反应灵敏度。

1.8 三重 PCR 检测体系的稳定性

为检验体系的稳定性和可重复性，分别使用北京博迈德生物技术有限公司的 2×Taq Master PCR Mix 和大连宝生物工程有限公司的 TaKaRa Taq 酶进行三重 PCR 反应。其中 TaKaRa Taq (5 units/μL) 0.125 μL，10×PCR Buffer 2.5 μL，dNTP Mixture (各 2.5 mmol·L⁻¹) 2 μL，其他条件相同。两种反应体系均分别使用 Aeris™ 型 (新加坡艺思高科技有限公司) 和 C1000 Touch™ 型 (赛默飞世尔科技有限公司) 的热循环仪进行扩增^[22]。

1.9 人工模拟接种基质中病原菌的检测

1.9.1 人工模拟带菌基质制备 将瓜果腐霉、尖镰孢、大丽轮枝菌菌株分别接种于 OA 和 PDA 平板，25℃ 恒温培养 10 d，收集瓜果腐霉菌丝，称重，制成终浓度为 10 mg·mL⁻¹ 的菌丝悬液，10 倍梯度稀释，将 100 mL 菌悬液加入到 100 g 无菌基质中，分别制备成浓度为 10、1、10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵ mg·g⁻¹ 的模拟带菌基质^[23]。用灭菌刷刷下尖镰孢和大丽轮枝菌平板上的孢子，分别配成浓度为 10⁶ 个孢子/mL 悬浮液，10 倍梯度稀释。将 100 mL 菌悬液加入到 100 g 无菌基质中，分别制备成浓度为 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10² 个孢子/mL 的模拟带菌基质。将分别带有 3 种病原菌的基质等比混合制成混合带菌基质。在每 100 g 模拟带菌土中随机抽取 1 g 土样，

冷冻干燥备用^[24]。

1.9.2 带菌基质中 DNA 的提取 采用 Fast DNA SPIN Kit for Soil (美国 MP Biomedicals 土壤基因组 DNA 提取试剂盒) 对基质进行基因组 DNA 的提取，-20℃ 保存。

1.9.3 三重 PCR 检测人工模拟带菌基质 以不同浓度模拟带菌基质总 DNA 为模板，使用优化的三重 PCR 方法检测模拟的带菌基质，确定该引物对基质中病原菌分生孢子的检测灵敏度。

1.10 三重 PCR 体系的应用

田间采集根腐病、枯萎病及黄萎病病害根茎样本 35 份，土壤样本 149 份，其中根围土壤取自距发病植株根围 2 mm，深 5—10 cm 的土壤，过筛去除杂物，取 0.5 g 根围土壤提取基因组 DNA，提取病组织和根围土壤基因组 DNA，并采用优化后的多重 PCR 反应体系进行检测，同时进行病原菌分离培养，以验证该三重 PCR 检测体系。

2 结果

2.1 三重 PCR 反应体系的建立

通过对退火温度、引物浓度组合、延伸时间和循环次数的优化，最终确定三重 PCR 反应体系 (总体积为 25 μL)：2×Taq Master PCR Mix 12.5 μL，10 μmol·L⁻¹ 的引物 AsAPH2B/AsPyF、FOF1/FOR1、VActF/VActR 分别为 0.3、0.4、0.6 μL，模板各 1 μL，补加 ddH₂O 至 25 μL。反应程序：94℃ 预变性 5 min；94℃ 变性 30 s，60.8℃ 退火 30 s，72℃ 延伸 30 s，35 个循环；72℃ 延伸 10 min (图 1)。

2.2 阳性样品扩增产物的测序及分析

采用优化后的三重 PCR 检测体系对瓜果腐霉、尖镰孢和大丽轮枝菌进行扩增，扩增产物经克隆测序后，通过 GenBank 上 BLAST 比对，同源性均达到 99%，因此确定扩增产物均为目标菌株 (表 3)。

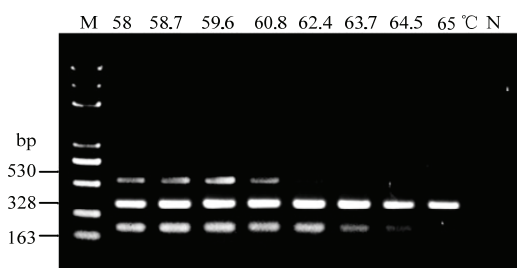


图 1 三重 PCR 退火温度优化

Fig. 1 Optimization of the annealing temperature for triplex PCR

表 3 扩增产物比对结果

Table 3 The results of PCR products

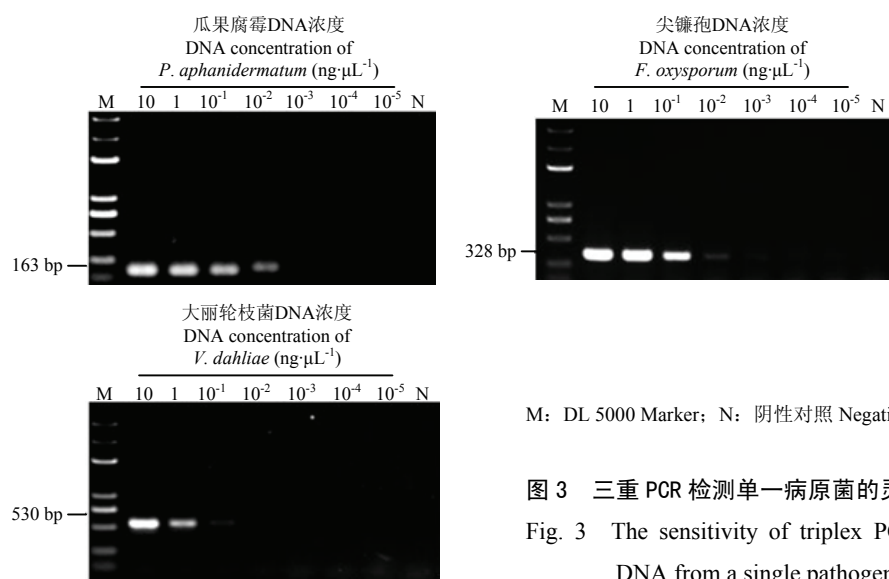
病原菌 Pathogen	GenBank 登录号 GenBank accession number	同源性 Homology rate (Blastn) (%)
瓜果腐霉 <i>P. aphanidermatum</i>	KU211462.1	99
尖镰孢 <i>F. oxysporum</i>	KU528856.1	99
大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	KU057923.1	99



M: DL 5000 Marker; 1: 瓜果腐霉、尖镰孢、大丽轮枝菌 *P. aphanidermatum*, *F. oxysporum* and *V. dahliae*; 2、3: 茄镰孢 *F. solani*; 4、5: 辣椒疫霉 *P. capsici*; 6、7: 核盘菌 *S. sclerotiorum*; 8、9: 立枯丝核菌 *R. solani*; 10、11: 灰葡萄孢 *B. cinerea*; 12、13: 茄科劳尔氏菌 *R. solanacearum*; 14、15: 胡萝卜果胶杆菌 *P. carotovorum*; 16、17: 密执安棒形杆菌密执安亚种 *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*; 18: 阴性对照 Negative control

图 2 三重 PCR 特异性检测

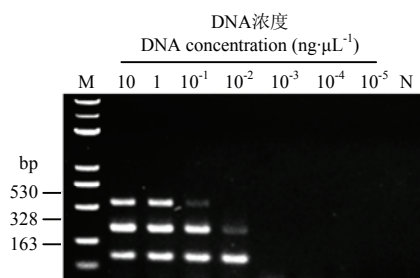
Fig. 2 The specific detection of triplex PCR



M: DL 5000 Marker; N: 阴性对照 Negative control

图 3 三重 PCR 检测单一病原菌的灵敏度

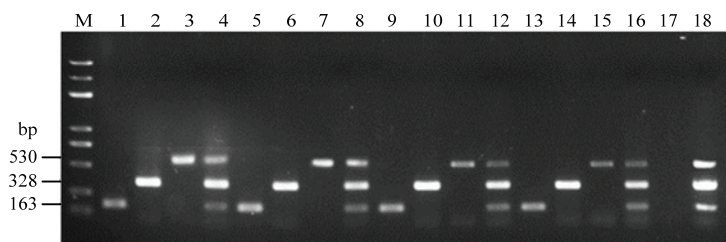
Fig. 3 The sensitivity of triplex PCR for detection of DNA from a single pathogen



M: DL 5000 Marker; N: 阴性对照 Negative control

图 4 三重 PCR 检测灵敏度

Fig. 4 The sensitivity of triplex PCR detection



M: DL 5000 Marker; 1、5、9、13: 瓜果腐霉 *P. aphanidermatum*; 2、6、10、14: 尖镰孢 *F. oxysporum*; 3、7、11、15: 大丽轮枝菌 *V. dahliae*; 4、8、12、16: 瓜果腐霉、尖镰孢、大丽轮枝菌混合 Mixture of *P. aphanidermatum*, *F. oxysporum* and *V. dahliae*; 17: 阴性对照 Negative control; 18: 阳性对照 Positive control. 1—4、9—12: 2×Taq Master PCR Mix; 5—8、13—16: TaKaRa Taq; 1—8: C1000 Touch™; 9—16: Aeris™

图 5 三重 PCR 体系稳定性检测

Fig. 5 The stability detection of triplex PCR system

镰孢模拟带菌基质、大丽轮枝菌模拟带菌基质、混合带菌基质和未加菌基质进行定量检测, 结果显示对瓜果腐霉的检测灵敏度为 10^{-2} mg 菌丝/g, 尖镰孢检测灵敏度为 10^6 个孢子/g, 大丽轮枝菌的检测灵敏度为 10^5 个孢子/g; 混合体系下对于尖镰孢和大丽轮枝菌的检测灵敏度为 10^6 个孢子/g, 对瓜果腐霉的灵敏度是 10^{-2} mg 菌丝/g; 而未加菌的基质 DNA 中未检测到(图 6)。因此, 所建立的三重 PCR 反应体系可应用于基质中瓜果腐霉、尖镰孢和大丽轮枝菌的检测。

2.7 三重 PCR 体系的应用

分别从 35 份病组织和 149 份土壤中提取基因组 DNA, 进行三重 PCR 检测。结果显示 4 份病组织中检测到大丽轮枝菌, 3 份病组织中检测到瓜果腐霉, 18 份病组织中检测到尖镰孢, 10 份病组织中未检测到目标菌, 病菌检出率为 71.43%, 检测结果与病害症状及分离培养结果吻合; 在土壤检测中 19 份土壤检测到大丽轮枝菌, 22 份土壤检测到尖镰孢, 30 份土壤检测到瓜果腐霉, 78 份土壤中未检测到目标菌, 检测结果与分离培养结果吻合(表 4)。由此可见, 通过对蔬

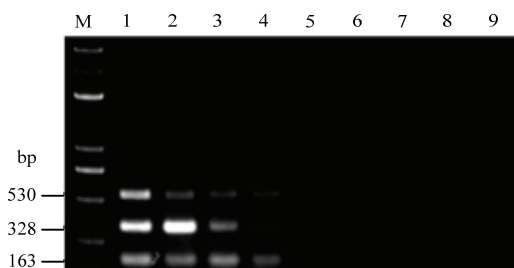
2.5 三重 PCR 检测体系的稳定性

采用大连宝生物工程有限公司和北京博迈德生物技术有限公司生产的 Taq 酶, PCR 仪采用赛默飞世尔科技有限公司的 C1000 Touch™ 和新加坡艺思高科技有限公司的 Aeris™ 热循环仪, 以 3 种病原菌的基因组 DNA 为模板, 进行三重 PCR 检测。结果显示, 均可以扩增出 3 种病原菌的特异性目的片段(图 5)。因此, 所建立的三重 PCR 反应体系稳定, 可用于瓜果腐霉、尖镰孢和大丽轮枝菌的快速诊断。

2.6 人工模拟接种基质检测

利用三重 PCR 方法对瓜果腐霉模拟带菌基质、尖

菜病组织及其根围土壤进行三重 PCR 检测, 可进行田间蔬菜瓜果腐霉、尖镰孢和大丽轮枝菌的快速诊断。



M: DL 5000 Marker; 1—7: 尖镰孢和大丽轮枝菌浓度分别为 10^8 、 10^7 、 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 个孢子/g, 瓜果腐霉浓度分别为 10、1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} mg·g⁻¹. The concentration of *F. oxysporum* and *V. dahliae* is 10^8 , 10^7 , 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 spores/g, respectively. The concentration of *P. aphanidermatum* is 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} mg·g⁻¹, respectively; 8: 未加菌基质 No pathogen in soil; 9: 阴性对照 Negative control

图 6 模拟带菌基质三重 PCR 检测灵敏度

Fig. 6 Sensitivity of triplex PCR detection in artificially inoculated substrate

表 4 不同地区病害样本三重 PCR 检测

Table 4 Identification of diseases samples in different areas by triplex PCR

采样时间 Sampling time	采样地点 Sampling site	寄主 Host	疑似病害 Suspected disease	采样部位 Sampling position	三重 PCR Triple PCR	分离培养 Isolated culture	样本数量 Number of samples
2017-12-09	浙江苍南 Cangnan, Zhejiang	茄子 Eggplant	黄萎病 <i>Verticillium</i> wilt	茎基 Stem	+	<i>V. dahliae</i>	4
				土壤 Soil	+	<i>V. dahliae</i>	4
2018-01-16	山东寿光 Shouguang, Shandong	黄瓜 Cucumber	枯萎病 <i>Fusarium</i> wilt	茎基 Stem	+	<i>F. oxysporum</i>	1
				土壤 Soil	+	<i>F. oxysporum</i>	1
2018-03-15	浙江苍南 Cangnan, Zhejiang	黄瓜 Cucumber	枯萎病 <i>Fusarium</i> wilt	茎基 Stem	+	<i>F. oxysporum</i>	1
				土壤 Soil	+	<i>F. oxysporum</i>	1
2018-03-20	山东寿光 Shouguang, Shandong	黄瓜 Cucumber	根腐病 Root rot	茎基 Stem	+	<i>P. aphanidermatum</i>	2
				土壤 Soil	+	<i>P. aphanidermatum</i>	2
2018	浙江苍南 Cangnan, Zhejiang	黄瓜 Cucumber	枯萎病 <i>Fusarium</i> wilt	茎基 Stem	+	<i>F. oxysporum</i>	2
				土壤 Soil	+	<i>F. oxysporum</i>	2
2018-10-21	山东寿光 Shouguang, Shandong	黄瓜 Cucumber	根腐病 Root rot	茎基 Stem	+	<i>P. aphanidermatum</i>	1
				土壤 Soil	+	<i>P. aphanidermatum</i>	1
2018-10-21	山东寿光 Shouguang, Shandong	黄瓜 Cucumber	根腐病 Root rot	茎基 Stem	-	—	1
				土壤 Soil	-	—	1
2018-03-15	浙江苍南 Cangnan, Zhejiang	黄瓜 Cucumber	枯萎病 <i>Fusarium</i> wilt	茎基 Stem	-	—	1
				土壤 Soil	-	—	1
2018-03-20	山东寿光 Shouguang, Shandong	黄瓜 Cucumber	根腐病 Root rot	茎基 Stem	-	—	1
				土壤 Soil	-	—	1
2018-08-31	新疆喀什 Kashi, Xinjiang	甜瓜 Muskmelon	枯萎病 <i>Fusarium</i> wilt	茎基 Stem		<i>F. oxysporum</i>	11
				茎基 Stem	-	—	4
2019-01-02	辽宁绥中 Suizhong, Liaoning	黄瓜 Cucumber	枯萎病 <i>Fusarium</i> wilt	茎基 Stem	+	<i>F. oxysporum</i>	3
				茎基 Stem	-	—	3
2017-2018	浙江苍南 Cangnan, Zhejiang	—	—	土壤 Soil	-	—	48
				土壤 Soil	+	<i>F. oxysporum</i>	12
				土壤 Soil	+	<i>V. dahliae</i>	12
2018	山东寿光 Shouguang, Shandong	—	—	土壤 Soil	-	—	27
				土壤 Soil	+	<i>V. dahliae</i>	3
				土壤 Soil	+	<i>F. oxysporum</i>	6
2018-08-24	宁夏平罗 Pingluo, Ningxia	—	—	土壤 Soil	+	<i>P. aphanidermatum</i>	12
				土壤 Soil	+	<i>P. aphanidermatum</i>	9
				土壤 Soil	+	<i>P. aphanidermatum</i>	6

“+”: 检测到病原菌 Positive reaction; “-”: 未检测到病原菌 No pathogen

3 讨论

我国蔬菜生产种苗需求量超过 6 800 亿株/年,育苗基质需求量大^[25],由于育苗基质原料来源复杂,基质生产未能实现标准化,由基质带菌引起的蔬菜土传病害大面积发生问题时有发生,造成严重的经济损失。2015 年渭南市大荔、临渭等西瓜产区种植户使用育苗基质培育西瓜苗后造成 80%以上秧苗叶片发黄、根茎部腐烂 (<http://bbs.hsw.cn/read-htm-tid-7334210-displayMode-1.html>); 2017 年 8 月,河南省崇召村菜农购买的育苗基质带菌,造成白菜、西兰花等蔬菜叶片大面积发黄、枯萎 (<http://www.cfvin.com/n/2017/08/24/164307287466.shtml>)。因此,为防止基质带菌引起土传病害发生和传播,基质出厂前的带菌检测非常重要。目前国内对蔬菜土传病原菌的多重 PCR 体系报道较少,大多为在植株发病后根据病情对相应的病原菌进行普通 PCR 检测,但此种方法不能提前发现基质中的病原菌,具有滞后性,且每次只能检测一种病原菌,而病原菌复合侵染情况在田间普遍存在,因此能够同时检测多种病原菌的多重 PCR 技术具有较大的应用价值。

多重 PCR 是在同一 PCR 体系里加入多对特异性引物,体系复杂,因素影响多,所以多重 PCR 反应体系建立较难。其中引物的选择直接影响 PCR 扩增的特异性与灵敏度,同时要防止引物相互配对,又要能够区分扩增片段大小。因此,需要选择适合长度的引物序列,从而获得最优的检测灵敏度和特异性以及各目标片段扩增均一性^[26-27]。目前国际上关于瓜果腐霉、尖镰孢和大丽轮枝菌的分子检测研究较多^[12-17],但同时检测这 3 种病原菌的多重 PCR 尚未见报道。根据多重 PCR 引物设计原则,本研究在参考大量文献引物的基础上,通过 NCBI 网站进行引物组 BLAST 比对,筛选出适用于多重 PCR 的引物组合,成功建立了对瓜果腐霉、尖镰孢和大丽轮枝菌进行检测的三重 PCR 检测体系。该体系降低了检测过程的复杂性和成本,节省时间并提高了检测的准确性,在混合 DNA 下检测灵敏度为 $10^{-1} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,与何宛芹等^[28]根据 EF-1 α 基因设计引物建立的镰孢菌四重 PCR 检测体系灵敏度一致。孙娟等^[29]建立了能够同步检测棉花黄萎病菌、枯萎病菌和炭疽病菌的三重 PCR 检测体系,灵敏度为 $1.06 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,其灵敏度低于本研究所建立的三重 PCR 检测体系。

另外,本研究建立的三重 PCR 检测体系可用于基

质中病原菌的检测,做到了预防病害发生,满足当前生产需要。同时,克服了土壤检测中病原菌含量少、杂质多等弊端,每克土壤中含有 10^6 个孢子即可被检测到。土壤微生物总 DNA 的富集和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。本研究建立的三重 PCR 体系可以在早期准确地检测出田间蔬菜病株根围土壤中的瓜果腐霉、尖镰孢和大丽轮枝菌,在病害潜伏期和发病初期就能对 3 种病害进行快速诊断,从而有效预防和控制蔬菜病害,具有较高的应用价值。

4 结论

通过引物筛选组合和条件优化,建立了可同时检测瓜果腐霉、尖镰孢和大丽轮枝菌 3 种蔬菜重要病原菌的三重 PCR 体系。该体系具有灵敏度高、稳定性和重复性好的特点,能够快速、准确地检测田间病株及其根围土壤中的瓜果腐霉、尖镰孢、大丽轮枝菌,为蔬菜土传病害的早期预防和流行监测提供了有效的技术手段。

References

- [1] KAGEYAMA K, SUZUKI M, PRIYATMOJO A, OTO Y, ISHIGURO K, SUGA H, AOYAGI T, FUKUI H. Characterization and identification of asexual strains of *Pythium* associated with root rot of rose in Japan. *Journal of Phytopathology*, 2003, 151(9): 485-491.
- [2] 刘会清. 植物生防菌剂对连作设施蔬菜的防病促生效果研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010.
LIU H Q. Studies on the growth promoting and disease prevention effect of biological control fungus to continuous cropping vegetables in greenhouse[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010. (in Chinese)
- [3] 乔世佳. 生物熏蒸对土传病害及黄瓜生长的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011.
QIAO S J. Effect of biofumigation on soilborne diseases and cucumber growth[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [4] 王丽丽, 蔡超, 罗明, 顾爱星, 王慧, 李克梅. 马铃薯黄萎病研究现状. *生物安全学报*, 2017, 26(1): 30-38.
WANG L L, CAI C, LUO M, GU A X, WANG H, LI K M. Research advances of *Verticillium* wilt of potato. *Journal of Biosafety*, 2017, 26(1): 30-38. (in Chinese)
- [5] 张旭, 尚楠, 张宝, 张志刚, 尚庆茂. 抗瓜果腐霉芽孢杆菌优良菌株的筛选及生物学特性. *食品科学*, 2012, 33(5): 138-143.

- ZHANG X, SHANG N, ZHANG B, ZHANG Z G, SHANG Q M. Screening and biological characteristics of *Bacillus* sp. with high anti-fungal activity against *Pythium aphanidermatum*. *Food Science*, 2012, 33(5): 138-143. (in Chinese)
- [6] TAHMATSIDOU V, O'SULLIVAN J, CASSELLS A C, VOYIATZIS D, PAROUSSI G. Comparison of AMF and PGPR inoculants for the suppression of *Verticillium* wilt of strawberry (*Fragaria × ananassa* cv. Selva). *Applied Soil Ecology*, 2006, 32: 316-324.
- [7] SASU M A, SEIDL-ADAMS I, WALL K, WINSOR J A, STEPHENSON A G. Floral transmission of *Erwinia tracheiphila* by cucumber beetles in a wild *Cucurbita pepo*. *Environmental Entomology*, 2010, 39(1): 140-148.
- [8] SCHROEDER K L, OKUBARA P A, TAMBONG J T, LÉVESQUE C A, PAULITZ T C. Identification and quantification of pathogenic *Pythium* spp. from soils in eastern Washington using real-time polymerase chain reaction. *Phytopathology*, 2006, 96(6): 637-647.
- [9] 王楠, 王剑, 尹丹韩, 高观朋, 王伟. 三重 PCR 检测草莓灰霉病菌、炭疽病菌和黄萎病菌. 中国农业科学, 2010, 43(21): 4392-4400.
- WANG N, WANG J, YIN D H, GAO G P, WANG W. Triplex PCR detection of *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Verticillium dahlia* in infected strawberry plant tissues. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 43(21): 4392-4400. (in Chinese)
- [10] 高永洋, 王楠, 高观朋, 王伟. 瓜黑星病菌、枯萎病菌和蔓枯病菌的三重 PCR 检测. 植物病理学报, 2010, 40(4): 343-350.
- GAO Y Y, WANG N, GAO G P, WANG W. Triplex PCR detection of *Cladosporium cucumerinum*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2010, 40(4): 343-350. (in Chinese)
- [11] 严蕾艳, 张宴瑜, 马凯慧, 宋慧, 王毓洪. 两种瓜类镰刀菌的多重 PCR 检测. 华北农学报, 2014, 29(增刊): 44-47.
- YAN L Y, ZHANG Y Y, MA K H, SONG H, WANG Y H. Multiple PCR detection of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium solani* in cucurbitaceous plants. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2014, 29(Suppl.): 44-47. (in Chinese)
- [12] 王楠, 王伟. 三重 PCR 检测黄瓜炭疽病菌、菌核病菌和细菌性萎蔫病菌. 植物病理学报, 2014, 44(2): 129-138.
- WANG N, WANG W. Triplex PCR detection of *Colletotrichum orbiculare*, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Erwinia tracheiphila* in infected cucumber tissues. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2014, 44(2): 129-138. (in Chinese)
- [13] THOMAS S H, HOUSLEY J M, REYNOLDS A N, PENCZYKOWSKI R M, KENLINE K H, HARDEGREE N, SCHMIDT S, DUFFY M A. The ecology and phylogeny of oomycete infections in *Asplanchna rotifers*. *Freshwater Biology*, 2011, 56(2): 384-394.
- [14] MARCHAND G, CHEN Y, BERTHANE N A, WEI L, ANDRÉ LÉVESQUE C, XUE A G. Identification of *Pythium* spp. from the rhizosphere of soybeans in Ontario, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2014, 36(2): 246-251.
- [15] GEISER D M, JIMÉNEZ-GASCO M M, KANG S, MAKALOWSKA I, VEERARAGHAVAN N, WARD T J, ZHANG N, KULDAU G A, O'DONNELL K. *FUSARIUM-ID* v.1.0: A DNA sequence database for identifying *Fusarium*. *European Journal of Plant Pathology*, 2004, 110: 473-479.
- [16] RAHJOO V, ZAD J, JAVAN-NIKKHAH M, MIRZADI GOHARI A, OKHOVAT S M, BIHAMTA M R, RAZZAGHIAN J, KLEMSDAL S S. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. *Journal of Plant Pathology*, 2008, 90(3): 463-468.
- [17] LI K N, ROUSE D I, GERMAN T L. PCR primers that allow intergeneric differentiation of ascomycetes and their application to *Verticillium* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60(12): 4324-4331.
- [18] BRESSAN M, BLUM A, CASTEL L, TRINSOUTROT-GATTIN I, LAVAL K, GANGNEUX C. Assessment of *Verticillium* flax inoculum in agroecosystem soils using real-time PCR assay. *Applied Soil Ecology*, 2016, 108: 176-186.
- [19] ASANO T, SENDA M, SUGA H, KAGEYAMA K. Development of multiplex PCR to detect five *Pythium* species related to turfgrass diseases. *Journal of Phytopathology*, 2010, 158(9): 609-615.
- [20] NEL B, STEINBERG C, N. LABUSCHAGNE N, VILJOEN A. Isolation and characterization of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from the rhizosphere of healthy banana plants. *Plant Pathology*, 2006, 55(2): 207-216.
- [21] GHARBI Y, TRIKI M A, TRABELSI R, FENDRI I, DAAYF F, GDOURA R. Genetic structure of *Verticillium dahliae* isolates infecting olive trees in Tunisia using AFLP, pathogenicity and PCR markers. *Plant Pathology*, 2015, 64(4): 871-879.
- [22] 康华军, 柴阿丽, 石延霞, 谢学文, 袁军海, 李宝聚. 番茄细菌性斑点病菌、溃疡病菌、青枯病菌和疮痂病菌的四重 PCR 检测方法. 园艺学报, 2018, 45(11): 2254-2264.
- KANG H J, CHAI A L, SHI Y X, XIE X W, YUAN J H, LI B J. Quadruple PCR detection of *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Ralstonia solanacearum* and *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in infected tomato tissues. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45(11): 2254-2264. (in

- Chinese)
- [23] 李淑芬, 莫照兰, 凡娜, 朱明, 茅云翔. 一株紫菜腐霉的鉴定及其对条斑紫菜的致病性. 中国海洋大学学报, 2016, 46(7): 27-34.
- LI S F, MO Z L, FAN N, ZHU M, MAO Y X. Identification of a *Pythium porphyrae* strain causing the red rot disease of *Porphyra yezoensis*. *Periodical of Ocean University of China*, 2016, 46(7): 27-34. (in Chinese)
- [24] 高苇, 李宝聚, 王万立, 郝永娟, 石延霞. 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. 华北农学报, 2014, 29(2): 71-74.
- GAO W, LI B J, WANG W L, HAO Y J, SHI Y X. Detection of *Corynespora cassicola* in soil with real-time quantitative PCR. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2014, 29(2): 71-74. (in Chinese)
- [25] 张真和, 马兆红. 我国设施蔬菜产业概况与“十三五”发展重点——中国蔬菜协会副会长张真和访谈录. 中国蔬菜, 2017(5): 1-5.
- ZHANG Z H, MA Z H. Overview of China's facility vegetable industry and key points of the 13th five-year plan——Interview with Zhang Zhenhe, vice president of China Vegetable Association. *China Vegetables*, 2017(5): 1-5. (in Chinese)
- [26] 何玮玲, 张驰, 杨静, 黄明, 杨军. 食品中 4 种肉类成分多重 PCR 的快速鉴别方法. 中国农业科学, 2012, 45(9): 1873-1880.
- HE W L, ZHANG C, YANG J, HUANG M, YANG J. A quick multiplex PCR method for the identification of four meat ingredients in food products. *Scientia Agricultura Sinica*, 2012, 45(9): 1873-1880. (in Chinese)
- [27] HE Y, ZHAO Y, ZHOU G, HUANG M. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from aged refuse for microbial community analysis. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(11): 2043-2051.
- [28] 何宛芹, 付瑶, 鲁雯璐, 常小丽, 杨文钰. 大豆根腐病致病镰孢菌的多重 PCR 检测技术. 植物保护学报, 2017, 44(4): 609-616.
- HE W Q, FU Y, LU W L, CHANG X L, YANG W Y. A multiplex PCR detection technique for the pathogenic *Fusarium* species causing soybean root rot. *Journal of Plant Protection*, 2017, 44(4): 609-616. (in Chinese)
- [29] 孙娟, 陈舜胜, 胡培龙, 于子翔, 于翠, 杨翠云. 同步检测棉黄萎病菌、枯萎病菌和炭疽病菌三重 PCR 方法的建立. 上海农业学报, 2014, 30(4): 10-15.
- SUN J, CHEN S S, HU P L, YU Z X, YU C, YANG C Y. A triplex PCR method to simultaneously detect *Verticillium dahlia*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* and *Colletotrichum gloeosporioides*. *Acta Agriculturae Shanghai*, 2014, 30(4): 10-15. (in Chinese)

(责任编辑 岳梅)