

应用 PCR-RFLP 和巢式 PCR 检测黄瓜尖镰孢菌

陈 微^{1,2} 李永刚¹ 文景芝^{1*}

(1. 东北农业大学农学院植保系 哈尔滨 150030)

(2. 哈尔滨市农业技术推广服务中心 哈尔滨 150070)

摘 要: 以 3 株黄瓜尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumarinum*)、23 株镰孢菌属(*Fusarium* spp.)真菌和分离自土壤的 20 株真菌、6 株细菌和 7 株放线菌为材料,采用化学裂解法提取总 DNA,进行 PCR-RFLP 和巢式 PCR 检测,试验证明 PCR-RFLP 程序不能完全区分 *Fusarium* 属内不同种,而巢式 PCR 对黄瓜尖镰孢菌具有特异性。运用优化的 PCR-RFLP 和巢式 PCR 检测程序对染病黄瓜组织进行了检测,结果表明,两种方法均可在接种发病早期(未显症时)检测出黄瓜枯萎病菌,PCR-RFLP 在感病品种接种后 3d 即可检测到病原菌,而巢式 PCR 在接种后 5d 才能检测到病原菌。
关键词: 黄瓜枯萎病,黄瓜尖镰孢菌,PCR-RFLP,巢式 PCR

Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumarinum* by PCR-RFLP and Nested-PCR

CHEN Wei^{1,2} LI Yong-Gang¹ WEN Jing-Zhi^{1*}

(1. Department of Plant Protection, Agricultural College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

(2. Harbin Agricultural Technique Extension Centre, Harbin 150070)

Abstract: Using three strains of *Fusarium oxysporum* f.sp.*cucumarinum*, twenty three other *Fusarium* isolates, thirty three comparison strains from cucumber rhizosphere as materials, we used PCR-RFLP and Nested-PCR for detecting *Fusarium oxysporum* f.sp.*cucumarinum* on base of total DNA chemical cracking method. It showed that PCR-RFLP could not differentiate different species of *Fusarium*. Nested-PCR is special for *Fusarium oxysporum* f.sp.*cucumarinum*. PCR-RFLP and Nested-PCR detected successfully the pathogen in diseased cucumber plants inoculated with *Fusarium oxysporum* f.sp.*cucumarinum*. The two programs both can be used to detect *Fusarium oxysporum* f.sp.*cucumarinum* in cucumber tissues without eyeable symptoms. PCR-RFLP could detect *Fusarium oxysporum* f.sp.*cucumarinum* in the inoculated tissues of susceptible cucumber plants on 3rd day after inoculation, but Nested-PCR could detect the pathogens on the 5th day after inoculation. It indicates that PCR-RFLP is more sensitive than Nested-PCR in detection of *Fusarium oxysporum* f.sp.*cucumarinum*.

Keywords: Cucumber Fusarium Wilt, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumarinum*, PCR-RFLP, Nested-PCR

黄瓜枯萎病是由半知菌亚门镰孢属黄瓜尖镰孢菌(*Fusarium oxysporum* (Schl.) f. sp. *cucumarinum* Owen)^[1]侵染所致,是黄瓜生产上的一种重要的土传病害。黄瓜尖镰孢菌可在土壤中存活多年,是一种广泛分布的土壤习居菌。形态复杂,易受环境条件影响而发生变异,所以常将同种异态的菌株作为新种来描述,因此其鉴定和检测十分困难^[2]。传统的镰孢菌鉴定主要采取培养性状与形态特征相结合的方法,但该类方法耗时长,效率和灵敏度均较低^[3],因此建立快速、准确的早期检测方法具有重要的理论意义和应用价值。随着生物技术的发展,国内外学者从不同角度对病原菌的分子检测进行了大量研究,但有关尖镰孢菌引起的枯萎病的分子检测和早期诊断方法尚未见报道。

本试验采用经过优化的 RFLP-PCR 和 Nested-PCR 程序,对由黄瓜尖镰孢菌引致的黄瓜枯萎病进行早期侵染检测研究,为该病的早期诊断和及时有效的防治提供技术方法和理论依据,同时为其他同类病害的早期诊断鉴定奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌种见表 1。

1.2 方法

1.2.1 供试菌种总 DNA 的提取: 真菌 DNA 提取方法采用 SDS 法^[4],细菌 DNA 提取采用沈德新的方法^[5],放线菌 DNA 提取采用彭源东的方法^[6]。

1.2.2 待测接种植株总 DNA 的提取: 供试黄瓜品种为津研 4 号(感黄瓜枯萎病)和龙杂黄 7 号(抗黄瓜枯萎病),按文献^[7]的方法接种,分别于接种后 1d, 3d, 5d, 7d, 9d, 11d, 13d, 15d 采样。每次随机取 2 株,采用 CTAB 法^[8]提取植株总 DNA,以健康植株为空白对照。

1.2.3 PCR-RFLP 扩增: 采用镰孢属真菌 ITS 区特异引物 ITS1/ITS4^[9]对 59 个纯培养菌株进行 PCR 扩增,引物序列如下: ITS1: 5 CTTGCGTTGAT-TACG-TCCC 3 ; ITS4: 5 TCCTCCGCTTATTGATATGC 3 。

本论文选用 *EcoR*、*Hind*、*Hae*、*Hinf*、*Mse* 和 *Hpa* 6 种限制性内切酶,反应体系为: PCR 产物 9 μ L, 10 \times 内切酶 buffer 2 μ L, 内切酶 5 U, 加入去离子水补足至 20 μ L, 37 $^{\circ}$ C 温浴 1 h, 加入 2 μ L 6 \times Loading buffer 终止反应,然后在 2% 琼脂

糖凝胶上电泳检测。

1.2.4 巢式 PCR 扩增: 所用引物为内外引物对^[10]。本试验将原外引物 BIK1/BIK2 调整为 BIK1/BIK4, 内引物为 BIK2/BIK3。引物序列如下:

BIK1: 5 ATTCAAGAGCTAAAGGTCC 3 ;

BIK2: 5 AAAGGTAGTATATCGGAGG 3 ;

BIK3: 5'GTTCTACGGATAAGACC 3 ;

BIK4: 5'TTTGACCAAGATAGATGCC 3 。

2 结果与分析

2.1 RFLP-PCR 扩增

采用镰孢属真菌 ITS 区特异引物 ITS1/ITS4 对镰孢属 26 个菌株和 33 个对照菌株进行 PCR 扩增,结果表明,镰孢属所有菌株均扩增出一条约 750 bp 的片段(表 1),其他对照菌株没有扩增产物,表明该引物具有属的特异性,可将 *Fusarium* sp. 与其他属菌株区分开。

供试镰孢属菌株的 PCR 产物经 6 种限制性内切酶酶解,结果只有 *Hinf* I 得到差异片段(图 1)。所有菌株共获得 7 个 RFLP-PCR 标记。来自土壤的 *F. solani* (泳道 4) 与来自菜豆的 *F. acuminatum* (泳道 6) 产生 4 条带,带型类似;来自黄瓜的无毒 *F. oxysporum* (泳道 1) 与来自玉米的 *F. graminearum* (泳道 5)、*F. moniliforme* (泳道 8)、来自小麦的 *F. graminearum* (泳道 10)、来自大豆的 *F. solani* (泳道 16)、来自甘蓝的 *F. oxysporum* (泳道 11) 产生两条带,前 5 个菌株带型基本相同;黄瓜尖镰孢枯萎病菌(泳道 9, 13, 17)与来自西瓜的 *Fusarium* sp. (泳道 2, 3, 14, 15)、来自甜瓜的 *Fusarium* sp. (泳道 18)、来自大豆的 *F. oxysporum* (泳道 7)、来自草上的 *Fusarium* sp. (泳道 12) 产生 3 条片段。虽然有些 *Fusarium* 属菌株没有经过种类鉴定,但从分类地位已知的几个种看,基于 *Hinf* I 的 PCR-RFLP 不能完全区分 *Fusarium* 属内不同种。

2.2 巢式 PCR 扩增

采用 Annalisa^[10]的外引物对 BIK1/BIK2 和内引物对 BIK3/BIK4 对表 1 中的供试菌株进行巢式 PCR 扩增,结果所有菌株均没有条带产生。将外引物改为 BIK1/BIK4 后对供试菌株进行第一轮扩增,电泳检测结果表明所有菌株均没有条带产生,以第一轮扩增产物为模板,用内引物 BIK2/BIK3 进行第二轮扩增,则能从黄瓜尖镰孢菌 DNA 模板得到 1 条约

800bp 的 PCR 产物(泳道 4, 7, 11), 而 *F. solani*(泳道 1)、*F. graminearum*(泳道 2, 8)、*F. acuminatum*(泳道 3)、*F. moniliforme*(泳道 6)、*F. oxysporum*(泳道 5, 9, 10)、*Fusarium* sp.(泳道 12)以及黄瓜根际真菌(泳道

13, 14)、细菌(泳道 15, 16)和放线菌(泳道 17, 18, 19)没有扩增产物(表 1 和图 2), 表明引物 BIK1/BIK4 和 BIK2/BIK3 结合使用可以特异地检测尖镰孢菌黄瓜专化型。

表 1 引物特异性检测
Table 1 Primers capable of differentiating *Fusarium* spp. from other strains

序号 No.	菌株 Isolates	来源 Sources	采集地 Locations	PCR by primer ITS1/ITS4	Nested PCR by primer BIK1/BIK4 and BIK2/BIK3
1	<i>F.o.f.sp.cucumarinum</i>	黄瓜	北京 ^a	+	+
2	<i>F.o.f.sp.cucumarinum</i>	黄瓜	哈尔滨	+	+
3	<i>F.o.f.sp.cucumarinum</i>	黄瓜	沈阳 ^b	+	+
4	<i>F. oxysporum</i>	黄瓜	哈尔滨	+	-
5	<i>F. oxysporum</i>	大豆	哈尔滨 ^c	+	-
6	<i>F. oxysporum</i>	黄瓜	哈尔滨	+	-
7	<i>F. oxysporum</i>	番茄	北京 ^a	+	-
8	<i>F. oxysporum</i>	棉花	北京 ^a	+	-
9	<i>F. acuminatum</i>	菜豆	讷河	+	-
10	<i>F. solani</i>	大豆	哈尔滨	+	-
11	<i>F. solani</i>	大豆	哈尔滨 ^c	+	-
12	<i>F. solani</i>	土壤	沈阳 ^b	+	-
13	<i>F. graminearum</i>	玉米	沈阳 ^b	+	-
14	<i>F. graminearum</i>	小麦	哈尔滨	+	-
15	<i>F. graminearum</i>	西瓜	哈尔滨	+	-
16	<i>F. graminearum</i>	苜蓿	北京 ^d	+	-
17	<i>F. moniliforme</i>		北京 ^d	+	-
18	<i>F.o.f.sp. conglutinans</i>	甘蓝	北京 ^d	+	-
19	<i>Fusarium</i> sp.	草	阿城	+	-
20	<i>Fusarium</i> sp.	西瓜	哈尔滨	+	-
21	<i>Fusarium</i> sp.	西瓜	哈尔滨	+	-
22	<i>Fusarium</i> sp.	西瓜	哈尔滨	+	-
23	<i>Fusarium</i> sp.	西瓜	哈尔滨	+	-
24	<i>Fusarium</i> sp.	西瓜	哈尔滨	+	-
25	<i>Fusarium</i> sp.	甜瓜	讷河	+	-
26	<i>Fusarium</i> sp.	甜瓜	讷河	+	-
27~46	20 株真菌 20 isolates of fungi	黄瓜 根际	哈尔滨	-	-
47~52	6 株细菌 6 isolates of bacteria	黄瓜 根际	哈尔滨	-	-
53~59	7 株放线菌 7 isolates of actinomycetes	黄瓜 根际	哈尔滨	-	-

+: 用引物 ITS1/ITS4 或 BIK1/BIK4 与 BIK2/BIK3 扩增后有条带

-: 用引物 ITS1/ITS4 或 BIK1/BIK4 与 BIK2/BIK3 扩增后无产物

+: There is a significant PCR product band by primers ITS1/ITS4 or BIK1/BIK4 and BIK2/BIK3

-: There is no significant PCR product band by primers ITS1/ITS4 or BIK1/BIK4 and BIK2/BIK3

a: 由东北农业大学刘学敏教授提供; b: 由大连民族学院吕国忠教授提供; c: 由中国科学院东北地理与农业生态研究所许艳丽研究员提供; d: 中国农业大学刘西莉副教授提供

a: Presented by professor LIU Xue-Min who works in Northeast Agricultural University; b: Presented by professor LV Guo-Zhong who works in Dalian Nationalities University; c: Presented by professor XU Yan-Li who works in Northeast Institute of Geography and Agroecology, CAS; d: Presented by professor LIU Xi-Li who works in China Agricultural University

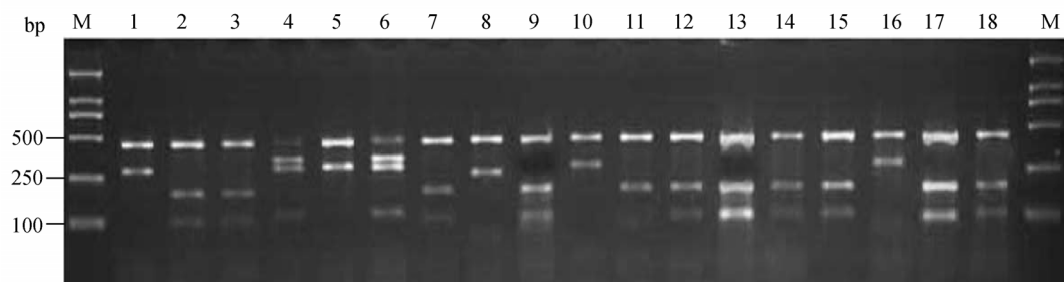


图1 镰孢属菌株 ITS 区 PCR 扩增产物 *Hinf* 酶切图谱(部分图谱)

Fig.1 Restriction endonuclease digest profiles of ITS-PCR products amplified from DNA of *Fusarium* spp. with primer ITS1/ITS4 and *Hinf*

M: DL2000 marker; 9,13,17: *F. o. f. sp. cucumarium*; 1: *F. oxysporum* from cucumber(avirulent to cucumber); 2,3,14,15: *Fusarium* sp. from watermelon; 4: *F. solani* from soil; 5: *F. graminearum* from corn; 6: *F. acuminatum*; 7: *F. oxysporum* from soybean; 8: *F. moniliforme*; 10: *F. graminearum* from wheat; 11: *F. oxysporum* from cabbage; 12: *Fusarium* sp. from grass; 16: *F. solani* from soybean; 18: *Fusarium* sp. from melon

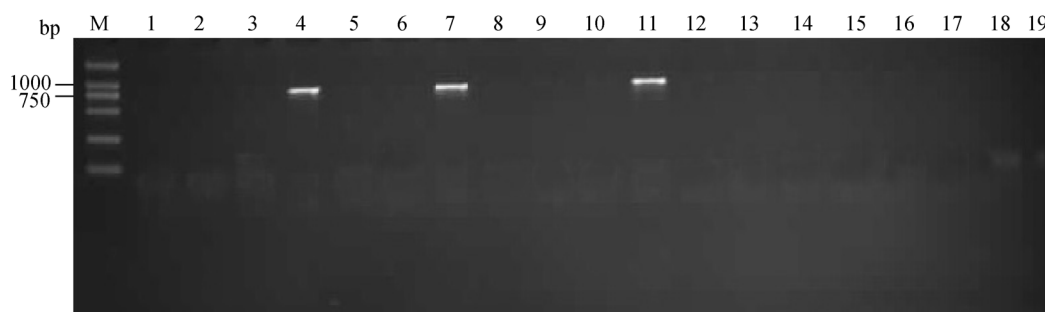


图2 引物 BIK1/BIK4 和 BIK2/BIK3 的 PCR 扩增电泳图(部分图谱)

Fig. 2 Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products amplified with the primers BIK1/BIK4 and BIK2/BIK3

M: DL2000 marker, lane4, 7, 11: *F. o. f. sp. cucumarium*; lane1: *F. solani* from soil; lane2: *F. graminearum* from corn; lane3: *F. acuminatum*; lane5: *F. oxysporum* from soybean; lane6: *F. moniliforme*; lane8: *F. graminearum* from wheat; lane9: *F. oxysporum* from tomato; lane10: *F. oxysporum* from cabbage; lane12: *Fusarium* sp. from watermelon; lane13-14: Fungi; lane15-16: Bacteria; lane17-19: Actinomycetes

2.3 检测应用

2.3.1 PCR-RFLP 检测接种发病的黄瓜病组织: 津研4号(感)和龙杂黄7号(抗)分别接种黄瓜枯萎

病菌后, 定期取样, 对黄瓜植株总 DNA 进行 PCR 扩增, 结果见图3(津研4号)和图4(龙杂黄7号), 可以看出, 津研4号接种3d后, 龙杂黄7号接种5d

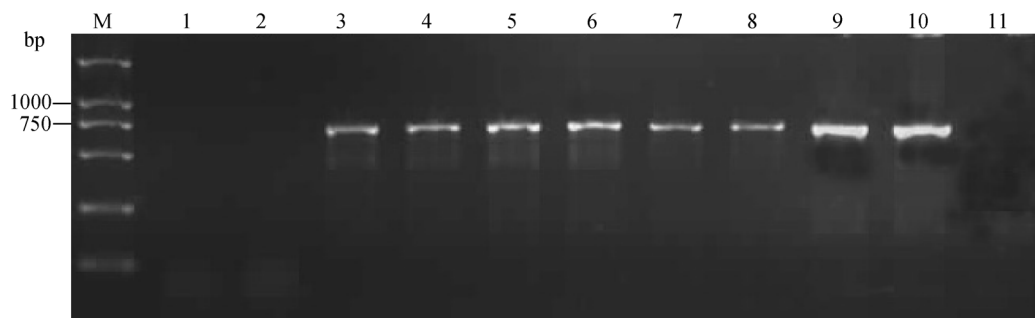


图3 感病品种接种黄瓜尖镰孢菌后的 PCR 检测电泳图

Fig. 3 Agarose gel electrophoresis profiles of PCR products amplified from DNA of susceptible cucumber plants inoculated with *F. o. f. sp. cucumarium*

M: DL2000 marker; 1: Healthy plant; 2-9: Plants of 1d, 3d, 5d, 7d, 9d, 11d, 13d, 15d after inoculation; 10: Positive control(DNA from mycelia of *F. o. f. sp. cucumarium*); 11: Negative control without template

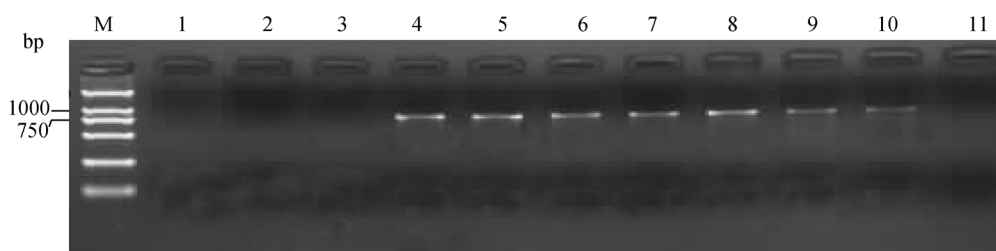


图 4 抗病品种接种黄瓜尖镰孢菌后的 PCR 检测电泳图

Fig. 4 Agarose gel electrophoresis profiles of PCR products amplified from DNA of resistant cucumber plants inoculated with *F. o. f. sp. cucurmarinum*

M: DL2000 marker; 1: Healthy plant; 2-9: Plants inoculated for 1d, 3d, 5d, 7d, 9d, 11d, 13d, 15d; 10: Positive control (DNA from mycelia of *F. o. f. sp. cucurmarinum*); 11: Negative control without templet

后, 均能扩增出一条约 750 bp 的片段, 表明引物 ITS1/ITS4 可以用于检测接种发病的黄瓜病组织。

从接种染病的黄瓜植株中扩增到的 DNA 片段经 *Hinf* I 酶解后没有差异(图 5 和 6), 均产生 3 条带, 大小分别为 480 bp、200 bp 和 100 bp, 与黄瓜尖镰孢菌纯培养条件下的 PCR-RFLP 标记完全一致, 证明在备检植株中有 *F. o. f. sp. cucurmarinum* 的存在。

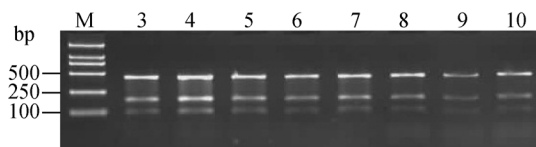


图 5 感病品种接种黄瓜尖镰孢菌后 PCR 扩增产物 *Hinf* 酶切电泳图

Fig.5 Restriction endonuclease digest profiles of ITS-PCR products amplified from DNA of susceptible cucumber plants after inoculated with *F. o. f. sp. cucurmarinum* by primer ITS1/ITS4 and restriction endonuclease *Hinf*

M: DL2000 marker; 3-9: Plants inoculated for 3d, 5d, 7d, 9d, 11d, 13d, 15d; 10: Positive control(DNA from mycelia of *F. o. f. sp. cucurmarinum*)

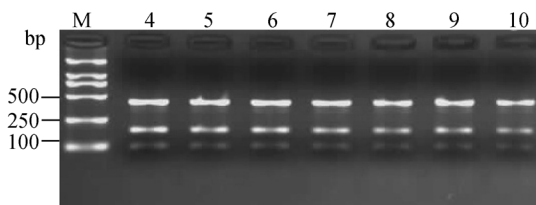


图 6 抗病品种接种黄瓜尖镰孢菌后 PCR 扩增产物 *Hinf* 酶切电泳图

Fig.6 Restriction endonuclease digest profiles of ITS-PCR products amplified from DNA of resistant cucumber plants after inoculated with *F. o. f. sp. cucurmarinum* by primer ITS1/ITS4 and restriction endonuclease *Hinf*

M: DL2000 marker; 3-9: Plants inoculated for 3d, 5d, 7d, 9d, 11d, 13d, 15d; 10: Positive control(DNA from mycelia of *F. o. f. sp. cucurmarinum*)

2.3.2 巢式 PCR 检测接种发病的黄瓜病组织 : 分别

从接种后 1d, 3d, 5d, 7d, 9d, 11d, 13d, 15d 的感病品种津研 4 号和抗病品种龙杂黄 7 号中随机抽取 2 株, 提取植株总 DNA, 用引物对 BIK1/BIK4 和 BIK2/BIK3 进行巢式 PCR 检测, 结果从接种 5d、7d、9d、11d、13d、15d 的感病品种和接种 7d、9d、11d、13d、15d 的抗病品种中均扩增出约 800bp 的清晰目的条带(图 7 和图 8), 未接种的健康植株没有扩增带, 而相同品种出现枯萎症状约在 15d 左右, 说明巢式 PCR 方法可以在症状出现前约 10d 检测到侵入的病原菌。

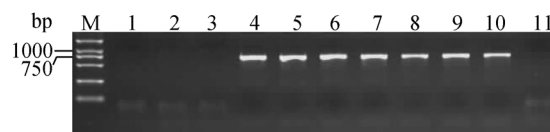


图 7 感病品种接种黄瓜尖镰孢菌后的巢式 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 7 Agarose gel electrophoresis profiles of nested-PCR products amplified from DNA of susceptible cucumber plants inoculated with *F. o. f. sp. cucurmarinum*

M: DL2000 marker; 1: Healthy plant; 2-9: Plants inoculated for 1d, 3d, 5d, 7d, 9d, 11d, 13d, 15d; 10: Positive control (DNA from mycelia of *F. o. f. sp. Cucurmarinum*); 11: Negative control without templet

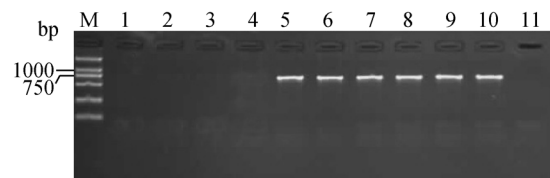


图 8 抗病品种接种黄瓜尖镰孢菌后的 PCR 扩增产物电泳图

Fig. 8 Agarose gel electrophoresis profiles of nested-PCR products amplified from DNA of resistant cucumber plants inoculated with *F. o. f. sp. cucurmarinum*

M: DL2000 marker; 1: Healthy plant; 2-9: Plants inoculated for 1d, 3d, 5d, 7d, 9d, 11d, 13d, 15d; 10: Positive control (DNA from mycelia of *F. o. f. sp. cucurmarinum*); 11: Negative control without templet

3 讨论与结论

近年来,随着分子生物学的发展,越来越多的分子生物学技术手段应用到植物病理学研究领域,在对植物病害早期诊断中起到不可估量的作用。从本试验中可以看出,与 PCR-RFLP 相比,巢式 PCR 具有更高的特异性,这是因为巢式 PCR 包括两次不同的 PCR 扩增。首先,以待测 DNA 为模板,在第一对引物的引导下扩增出一条 DNA 片段,再以此 DNA 片段为模板,在第二对引物的引导下扩增出第二条 DNA 片段,因为是在第一条扩增片段的基础上扩增,故分子量比前者小。由于应用了两对不同的引物进行 PCR 扩增,大大提高了扩增产物的特异性,不仅使所测的 DNA 特征带明显、无杂带,而且简化了核酸提纯的步骤,产物可以直接进行分析,工作效率大大提高。本试验中,单用外引物 BIK1/BIK4 扩增无条带产生,可能是扩增产物量没有达到电泳检测的最低量,二次扩增后扩增产物量大大增加,因而通过电泳可以检测到。本试验以接种黄瓜枯萎病菌早期的黄瓜植株为材料,将巢式 PCR 与 PCR-RFLP 进行了检测应用研究,结果表明,PCR-RFLP 和巢式 PCR 均可在侵染的早期(在显症前 12 d ~ 10 d)准确地检测出侵入的黄瓜枯萎病菌。但 PCR-RFLP 比巢式 PCR 更加灵敏,主要是因为 PCR-RFLP 所用的引物为 ITS1/ITS4,它在真菌基因组中大约有 60 ~ 200 个拷贝^[11,12],所以 PCR 检测时很容易获得扩增,而巢式 PCR 扩增的片段拷贝数低。综合分析认为,巢式 PCR 兼具特异性好和方法简便的特点,更适于黄瓜枯萎病菌的实际检测。

参 考 文 献

- [1] 黄仲生. 黄瓜枯萎病防治技术问答. 吉林蔬菜, 1996, 4: 69
- [2] 王拱辰, 郑 重, 叶琪明, 等. 常见镰刀菌鉴定指南. 北京: 中国农业科技出版社, 1996, p. 3.
- [3] 张向民. 镰刀菌属分类学研究历史与现状. 菌物研究, 2005, 3(2): 59-60.
- [4] 文景芝. 大豆疫霉根腐病检测鉴定方法及病害传播途径研究. 哈尔滨: 东北林业大学, 2001, p. 28.
- [5] 沈德新. 细菌 DNA 提取方法比较. 中原医学, 2004, 31(10): 20-22.
- [6] 彭源东, 柯丹兵, 张忠泽. Frankia 基因组 DNA 提取及其 PCR 带型. 微生物学杂志, 1997, 17(3): 1-5.
- [7] 张宝俊, 李志岗, 郭明霞. 枯萎病菌的 PCR-RFLP 分子检测和早期诊断. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33: 88-90.
- [8] Murray M, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Euphytica, 1998, 104(2): 79-86.
- [9] 杨 红, 李 颖, 关国华, 等. 尖孢镰刀菌异核体及其不同核型分离子 rDNA ITS 区序列分析. 农业生物技术学报, 2002, 10(4): 318-384.
- [10] Annalisa C. PCR Detection of *F. oxysporum* f. sp. *basilicon* Basil. Plant Disease. 2001, 85(6): 607-611.
- [11] 陈风毛. 真菌 ITS 区序列结构及其应用. 林业科技开发, 2007, 21(2): 5-7.
- [12] 陈剑山, 郑服丛. ITS 序列分析在真菌分类鉴定中的应用. 安徽农业科学, 2007, 35(13): 3785-3786.

稿件规范化与标准化

论文中阿拉伯数字的使用

凡是可以使用阿拉伯数字且很得体的地方均应使用阿拉伯数字。世纪、年代、年、月、日、时刻必须使用阿拉伯数字,年份必须用全称。对科技期刊来说,凡处在计量单位和计数单位前面的数字,包括 9 以下的各位数字,除个别特例外,均应使用阿拉伯数字。不是表示科学计量和有统计意义数字的一位数可以用汉字,例如:一本教材,两种商品等。