

# 葡萄根癌病菌的快速检测技术

樊金娟<sup>1</sup>, 王 平<sup>1</sup>, 刘长远<sup>2</sup>, 赵奎华<sup>2</sup>, 梁春浩<sup>2</sup>

(1. 沈阳农业大学 植物保护学院, 辽宁 沈阳 110161; 2. 辽宁省农业科学院 植物保护研究所, 辽宁 沈阳 110161)

**摘 要:** 根据葡萄根癌病菌核糖体基因间隔片段(16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Spacer, ITS)特异区域设计, 合成了一对引物, 建立了快速检测葡萄根癌病菌的 PCR 方法, 并对反应条件进行优化, 组装成快速检测试剂盒。结果表明: 只有葡萄根癌病菌能扩增出大小为 758 bp 的特异性条带, 而非葡萄根癌病菌均未能扩增出任何条带。检测灵敏度达 10 个细菌/ $\mu$ L 左右, 且稳定性好, 经多次反复冻融, 扩增条带未发现有明显变化。通过对田间病样进行检测, 证实该试剂盒具有操作简便、快速(4 h 左右完成检测)、灵敏度高、特异性强、重复性和稳定性好等优点。

**关键词:** 葡萄根癌病菌; 快速检测; 试剂盒

**中图分类号:** S 432 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)24-0162-04

葡萄根癌病是由葡萄土壤杆菌 (*Agrobacterium vitis* Ophel & Kerr) 引起的一种的土传病害。葡萄土壤杆菌从侵入到显瘤需数周到 1 a 时间, 多为 2~3 个月。而寄主细胞变成癌瘤后, 即使没有病菌癌瘤仍能继续扩大, 癌瘤有时易与生产中的嫁接愈伤瘤混淆。在中国东北、华北、西北、黄河及长江流域的许多省市区都有葡萄根癌

病发生, 有的葡萄园发病率高达 80%~90%, 产量损失 30%~70%, 甚至绝收, 造成了重大经济损失。

葡萄主要利用茎段扦插和嫁接等方式进行繁殖, 由于葡萄根癌病的潜伏期比较长, 苗木带菌是导致该病蔓延和扩散的主要途径。随着该病危害的加重, 近年来, 我国已将葡萄根癌病列入检疫对象。所以有效的检疫手段是防止葡萄根癌病传播蔓延的第一道防线。在对苗木进行根癌病菌的检疫检测过程中, 研究了很多方法, 如血清取样法 (Serological sampling procedure)<sup>[1]</sup>、水一排量方法 (Water-displacement)<sup>[2]</sup>、滑动凝集试验 (The slide agglutination test, 简称 SAT)<sup>[3]</sup>、单克隆抗体 (Monoclonal antibody, 简称 McAb)<sup>[4]</sup> 等。但上述方法一方面操作复杂, 对实验室条件要求高; 另一方面检测周期比较长, 灵敏度低。因此, 非常有必对葡萄根癌病菌建立一种简单、快速、准确的检测方法, 从源头上控制病害的

**第一作者简介:** 樊金娟(1972-), 女, 博士, 副教授, 现主要从事植物分子生物学研究工作。E-mail: jinjuanf@sohu.com.

**通讯作者:** 赵奎华(1955-), 男, 博士, 研究员, 现从事园艺作物病害防治研究工作。E-mail: zhkhua55@sina.com.

**基金项目:** 国家农业科技成果转化资助项目(2008GB2B000060); 辽宁省农业科学院博士后工作站资助项目。

**收稿日期:** 2010-10-18

## Effect of Different Nitrogen Sources and Carbon Sources on Pathogens Growth of *Aconitum coreanum* Root Rot Disease

WEI Shu-qin

(Jilin Agricultural Science and Technology College Jilin, Jilin 132101)

**Abstract:** Used concave slide method, fusarium growth influence of *Aconitum coreanum* root rot disease by different carbon and nitrogen treatment were studied. The results showed that the pathogen spore germination were promoted under different carbon sources, simple sugars> disaccharide> polysaccharide. pathogens of *Aconitum coreanum* root rot disease to carbon absorption from high to low as follows: essential amino acids> amides> ammonium salt type> nitrate, which alanine, asparagine, glutamic acid, urea spore had some role in promoting nitrogen sources, the other salts inhibited pathogen spore germination.

**Key words:** nitrogen sources; carbon sources; *Aconitum coreanum*; root rot disease

传播。

聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, 简称 PCR) 因其具有简便、快速、灵敏度高和特异性强的优点, 广泛应用于病原菌检测上。核糖体基因间隔序列 (ITS) 在进化过程中承受的自然选择压力非常小, 因而有一定程度的特异性, 根据病原菌核糖体 ITS 区段的特异性检测病原菌已成为研究热点<sup>[5-8]</sup>。该研究根据葡萄根癌病菌核糖体基因间隔片段特异区域设计合成了一对引物, 建立了快速检测葡萄根癌病菌的 PCR 方法, 并对反应条件进行优化, 组装成快速检测试剂盒, 用于葡萄根癌病菌的检测。

1 材料与方法

1.1 菌株和试剂

葡萄土壤杆菌 (*Agrobacterium vitis*)、埃希氏大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、黄瓜细菌性角斑病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* (Smith et Bryan) Young, Dye and Wilkie) 和甘蓝黑腐病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Pammel) Dowson) 等由辽宁省农业科学院植物保护研究室保存。葡萄土壤杆菌 (*Agrobacterium vitis*) 阳性菌株由中国农业科学院植保所赵庭昌老师提供。PCR 试剂购自凯基生物科技发展有限公司。

1.2 葡萄土壤杆菌病菌 ITS 扩增

参照细菌 ITS PCR 扩增通用引物的 1405f-456r<sup>[9]</sup>, 扩增菌株的 rDNA 16S-23S ITS。引物为 1405f (TGYACA-CACCGCCCGT) 和 456r (CCTTTCCCTCACGGTACTG)。

将测得的序列与 GenBank 中已提交的序列进行 blast, 据特异区段使用 Oligo 6.0 软件设计 1 对葡萄土壤杆菌特异扩增引物, 并交由南京金思特科技有限公司合成。FL/RI: 5' TTT CCA ACT TGT TCC GCT TTA 3' / 5' CCC TTT CCT GAT GAT CCC TA 3'。

1.3 菌体总 DNA 模板提取

直接菌体加入法、病株枝条 PBS 研磨液、反复冻融法、热裂解法, 参照孔繁德等方法<sup>[10]</sup>。CTAB 碱裂解法; 试剂盒法, 参照凯基细菌基因组 DNA 小提试剂盒说明书进行。

1.4 PCR 检测方法的建立和反应体系的优化

采用 25  $\mu$ L 的 PCR 反应体系, 对影响反应的条件进行优化, 包括退火温度 (50 ~ 61  $^{\circ}$ C)、引物浓度 (0 ~ 20  $\mu$ mol/L)、镁离子浓度 (0 ~ 5  $\mu$ L 25mM)、TaqDNA 聚合酶浓度 (0 ~ 0.35  $\mu$ L 5 U/ $\mu$ L), 确定最佳反应体系。

1.5 PCR 检测试剂盒性能测定

特异性检测: 用建立的反应体系检测埃希氏大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、黄瓜细菌性角斑病菌和甘蓝黑腐病菌等 5 种非葡萄土壤杆菌和 2 株葡萄土壤杆菌, 相同条件 PCR 扩增, 鉴定其特异性。灵敏度检验: 将纯化的浓度为 1 012 cfu/mL 的葡萄土壤杆菌悬液以 10 倍梯度稀释, 稀释到 PCR 扩增后无法检测到条带, 再对各稀释菌悬液涂布平板培养, 计算菌落数, 最后计算最低检出量。稳定性检测: 将 PCR 反应体系混匀后分装, 经多次反复冻融, 定期检测。田间病样检测: 取田间未发现和已发现病症葡萄茎, 利用建立的 PCR 反应体系检测。

2 结果与分析

2.1 PCR 条件优化及扩增结果

在 25  $\mu$ L 的 PCR 反应体系中, 分别对菌体总 DNA 模板提取方法 (图 1, 直接菌体加入法、反复冻融法、热裂解法、CTAB 碱裂解法、试剂盒法)、退火温度 (图 3, 50 ~ 61  $^{\circ}$ C)、引物浓度 (图 4, 1 ~ 7; 25 ~ 0  $\mu$ mol/L)、镁离子浓度 (图 2, 0 ~ 6  $\mu$ L 25 mM)、TaqDNA 聚合酶浓度 (图 4, 8 ~ 14; 0.35 ~ 0  $\mu$ L 5 U/ $\mu$ L)、dNTPs 浓度 (图 5, 1 ~ 7; 0 ~ 6  $\mu$ L dNTPs 各 2.5 mM) 进行优化, 确定最佳反应体系为: 10 $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu$ L, Mg<sup>2+</sup> (25 mM/L) 1  $\mu$ L, 上下游引物 (10  $\mu$ mol/L) 各 0.5  $\mu$ L, 菌液 1  $\mu$ L, Taq DNA 聚合酶 (5 U/ $\mu$ L) 0.1  $\mu$ L, dNTPs (各 2.5 mM) 2  $\mu$ L, 加灭菌 dd H<sub>2</sub>O 至终体积 25  $\mu$ L。

反应条件: 94  $^{\circ}$ C, 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56  $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4  $^{\circ}$ C 保温。

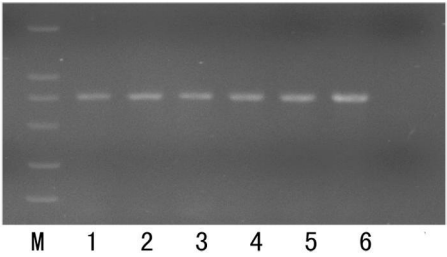


图 1 DNA 模板提取方法筛选

注: M; DNA Marker DL 2000; 1; CTAB 碱裂解法; 2 直接菌体加入法; 3; 反复冻融法; 4; 试剂盒法; 5; 热裂解法; 6; 冠瘿瘤研磨液上清液。

2.2 PCR 检测试剂盒性能测定

特异性检测: 相同条件 PCR 扩增, 只有葡萄土壤杆菌阳性菌株及分离得到的葡萄土壤杆菌扩增出 758 bp 条带, 和预期的相符。而其它菌株扩增结果均为阴性, 未出现任何条带 (图 6)。

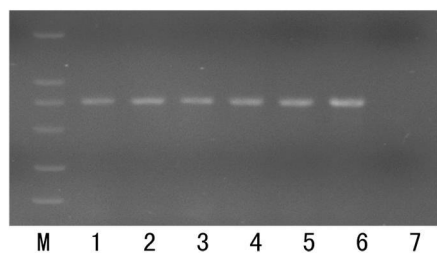


图2 镁离子浓度筛选

注: M: DNA Marker DL 2000; 1~7 分别为: 6.5、4.3、2.1、0.1  $\mu$ L。

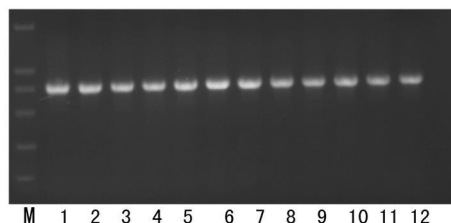


图3 PCR 退火温度筛选

注: M: DNA Marker DL 2000; 1~12 分别为: 50、0、50、3、51、0、51、8、53、1、54、7、56、6、58、2、59、3、60、2、60、8、61、0  $^{\circ}$ C。

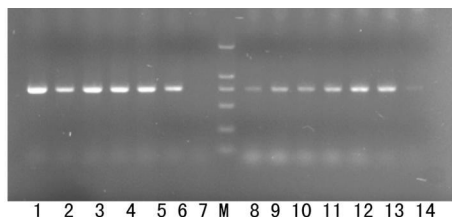


图4 引物浓度和 Taq 酶浓度筛选

注: M: DNA Marker DL 2000; 1~7: 不同引物浓度; 8~14: 不同 Taq 酶浓度。

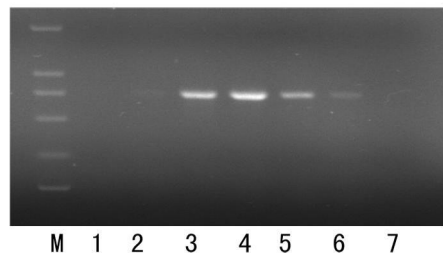


图5 dNTP 浓度筛选

注: M: DNA Marker DL 2000; 1~7: 不同 dNTP 浓度筛选。

灵敏度检验: 将纯化的浓度为 1 012 cfu/mL 的葡萄土壤杆菌菌悬液以 10 倍梯度稀释, 稀释到 PCR 扩增后无法检测到条带, 再对各稀释菌悬液涂布平板培养, 计算菌落数, 最后计算最低检出量。PCR 检测结果表明, 检测灵敏度达 10 个细菌左右(图7)。

稳定性检测: 将 PCR 反应体系混匀后分装, 经多次反复冻融, 定期检测(图8)。结果表明, 该试剂盒的稳定性较好, 可以长期保存。

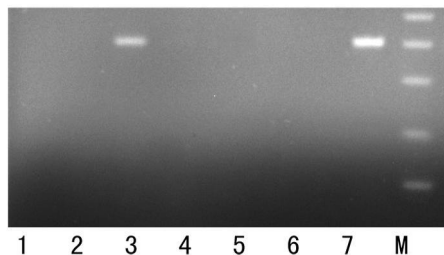


图6 特异性检测

注: M: DNA Marker DL 2000; 1: 埃希氏大肠杆菌; 2: 金黄色葡萄球菌; 3: 葡萄土壤杆菌阳性菌株; 4: 根癌农杆菌; 5: 黄瓜细菌性角斑病菌; 6: 甘蓝黑腐病菌; 7: 葡萄土壤杆菌。

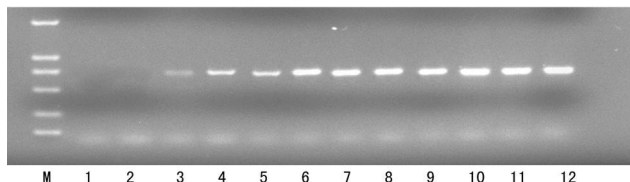


图7 灵敏度检测

注: M: DNA Marker DL 2000; 12~1: 10 倍梯度稀释菌悬液。

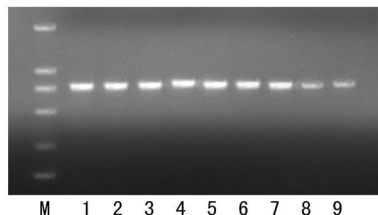


图8 稳定性检测

注: M: DNA Marker DL 2000; 1: 冻融 5 次植株; 2: 冻融 10 次; 3: 冻融 15 次; 9: 冻融 45 次。

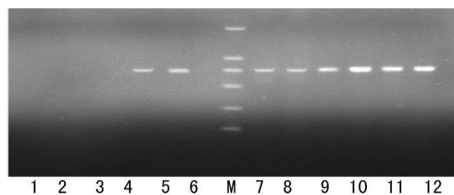


图9 田间病样检测

注: M: DNA Marker DL 2000; 1~6: 未表现症状; 7~12: 已表现症状植株。

田间病样检测: 取田间未发现和已发现病症葡萄茎, 利用建立的 PCR 反应体系检测, 检测结果为, 肉眼可见病症的葡萄茎 PBS 提取液均可扩增出 758 bp 的条带, 未见病症的 PBS 提取液, 除 2 株外其余都未出现任何条带(图9)。未发现病症却出现特异条带的植株, 1 个月后植株上发现冠瘿瘤, 未有特异条带扩增的植株一直没有观察到冠瘿瘤的发生。检测结果说明, 该试剂盒可对已表现病症的葡萄植株中病原菌和潜伏期病原菌进行特异性检测。

3 讨论

随着葡萄生产的发展和葡萄苗木的频繁调运, 葡萄根癌病扩展迅速, 危害日益严重, 已成为阻碍葡萄生产发展的主要因素之一。对葡萄接穗和砧木母株及苗木进行准确的检测是有效控制该病的重要手段, 尤其适用于大面积普查。该研究建立的试剂盒, 对实验室设备要求较低, 普通的分子生物学实验室都可以进行, 无需购买特殊设备和试剂, 操作简单, 只需在试剂盒反应液中加入菌体(待测样本茎的 PBS 提取液)和 *Taq* DNA 聚合酶即可进行检测, 无需进行病菌的分离培养和 DNA 的提取, 从取样到检测出结果仅需 4 h 左右, 大大缩短了检测时间, 为尽早正确诊断葡萄根癌病发生情况、防止带菌苗木的传播、减少病害带来的经济损失提供了科学依据。

参考文献

[ 1 ] Bazzi C, Piazza G, Burr T J. Detection of *Agrobacterium tumefaciens* in grapevine Cuttings [ J ]. Eppo Bulletin, 1987( 1): 105-112.  
[ 2 ] Tarbah F A, Goodman R N. Rapid detection of *A. tumefaciens* in grapevine propagating material and the basis for an efficient indexing system [ J ]. plant Disease, 1986( 6): 566-568.  
[ 3 ] Sawada H, Imada J, Ieki H. Evaluation of serodiagnosis for differentiating serogroups of *A. tumefaciens* biovar 3 [ J ]. Review of plant pathology, 1992(11): 894.

[ 4 ] Bishop A L, Baurr T J. A monoclonal antibody specific to *A. tumefaciens* biovar 3 and its utilization for indexing grapevine propagation material [ J ]. Phytopathology, 1989( 9): 995-998.  
[ 5 ] Johanson A, Turner H C, McKay G J, et al. A PCR—based method to distinguish fungi of the rice sheath-blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae*, *R. oryzae-sativae* [ J ]. FEMS Microbiology Letter, 1998, 162: 289-294.  
[ 6 ] Cherif A, Borin S, Rizzi A, et al. *Bacillus anthracis* Diverges from Related Clades of the *Bacillus cereus* Group in 16S-23S Ribosomal DNA Intergenic Transcribed Spacers Containing tRNA Genes [ J ]. APPL. ENVIRON. MICROBIOL, 2003( 1): 33-40.  
[ 7 ] Gayle C, McGhee, Elise L, et al. Relatedness of Chromosomal and Plasmid DNAs of *Erwinia pyrifoliae* and *Erwinia amylovora* [ J ]. Applied And Environmental Microbiology, 2002( 12): 6182-6192.  
[ 8 ] Catarina S Lopes A, Falcão Rodrigues J, Clementino Maysa BM, et al. Application of PCR ribotyping and tDNA-PCR for *Klebsiella pneumoniae* identification [ J ]. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2007, 102( 7): 827-832.  
[ 9 ] Gurtler B, Stanisich V A. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rDNA spacer region [ J ]. Microbiology, 1996 142: 3-16.  
[ 10 ] KONG Fan-de, XU Shu-fa, CHEN Qiong, et al. Development and application of rapid PCR detection kit for salmonella. [ J ]. Veterinary Science in China, 2007, 37(2): 103-107.

Rapid Molecular Detection of *Agrobacterium vitis*

FAN Jin-juan<sup>1</sup>, WANG Ping<sup>1</sup>, LIU Chang-yuan<sup>2</sup>, ZHAO Kui-hua<sup>2</sup>, LIANG Chun-hao<sup>2</sup>

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161; 2. Institute of Plant Protection, Liaoning Academy of Agricultural Sciences Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract:** To establish a simple, sensitive, accurate and rapid PCR method for detection of *Agrobacterium vitis* in grape, one pair of specific primers were designed and synthesized according to the conserved 16S-23S ITS available in grape, and reaction parameters were optimized to develop a PCR selection kit. The results showed that the ITS of 758 bp was amplified in all detected grape by the PCR and no any fragments in non-grape species. The sensitivity of PCR was 10 CFU and stability was good. The amplified sequence had nothing abnormality after repeated freezing and thawing. The developed kit was rapid, simple, sensitive, specific, accurate and easy for detection by field sample testing.

**Key words:** *Agrobacterium vitis*; rapid detection; kit