

DOI:10.11937/bfyy.201505037

番茄细菌性溃疡病菌的定性 PCR 检测方法

毛芙蓉¹, 李飞武², 刘燕妮¹, 刘井莉¹, 潘博¹

(1. 吉林省蔬菜花卉科学研究所, 吉林 长春 130033; 2. 吉林省农业科学院, 吉林 长春 130033)

摘 要:以 2 个番茄溃疡病菌株和其它 6 种植物病原菌为试验材料, 以 *micA*、*cytC*、*TomA* 等 3 个特异性基因为检测靶标, 采用检测引物设计与优化、特异性测试、灵敏度测试等方法, 研究建立番茄溃疡病菌的定性 PCR 检测方法。结果表明: 依据这 3 个基因建立的 PCR 检测方法可特异、精准检测番茄溃疡病菌, 其中, 以 *TomA* 基因为检测靶标的方法灵敏度可达到 5 copy/ μ L 或 10^3 cfu/mL, 优于另外 2 种方法, 为番茄溃疡病菌的早期诊断提供了快速、准确的技术手段。

关键词:植物病原菌; 番茄溃疡病; PCR; 分子检测

中图分类号:S 436.412.1⁺9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)05-0128-04

番茄细菌性溃疡病(Bacterial canker of tomato)是由密执安棒形杆菌密执安亚种(*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, 简称 *Cmm*)引起的一种维管束病害, 从番茄苗期到收获期均可发病。主要症状表现为叶缘坏死, 茎叶萎蔫, 茎部条斑后开裂, 维管束变色, 后期植株萎蔫死亡^[1-2]。病菌通过种子远距离传播, 通过农事操作和雨水灌溉近距离扩散传播^[3]。

自 1909 年首次在美国密执安州的温室番茄上发现以来, 现已广泛分布于全球 60 多个国家和地区, 在我国北京、黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古等地均发生严重, 近年来发病呈上升趋势, 成为番茄生产上的一种毁灭性的病害, 造成的产量损失高达 80% 以上^[4]。建立一种特异性强、灵敏度高的番茄溃疡病原菌的快速检测方法, 对于有效识别和防控番茄溃疡病菌, 指导农民生产至关重要。

随着现代分子生物学技术的快速发展, 植物病原物的分子诊断手段取得了显著进展。基于分子水平检测 *Cmm* 的技术主要有普通 PCR^[5]、实时荧光 PCR (Real time PCR)^[6]、巢式 PCR (Nested-PCR)^[7]、直接 PCR (Direct-PCR)^[8]、环介导等温扩增方法 (LAMP)^[9-10] 等。在已公开报道的 *Cmm* 分子检测方法中, 使用的引物大多是依据 *Cmm* 的核糖体 16S rDNA 序列或核糖体基因转录间隔区序列 (16S-23S rDNA ITS) 进行设计的, 这 2 个序列在植物病原菌中虽然具有较好的种间特异性, 但在亲缘关系非常近的亚种间往往仅有 2~3 个碱基的差异, 对检测方法的反应条件具有非常严格的要求^[11]。该研究以 *Cmm* 的 3 个功能基因 (*micA*、*cytC*、*tomA*) 为检测

第一作者简介: 毛芙蓉 (1980-), 女, 本科, 助理研究员, 研究方向为蔬菜病虫害综合防治。E-mail: lotusfurmao@gmail.com.
基金项目: 吉林省重点科技攻关资助项目 (20140204032NY)。
收稿日期: 2014-11-13

Study on the Resistance of Arbuscular Mycorrhizal Fungi to *Phytophthora capsici* of Pepper

ZHANG Shu-bin, LIU Jian-bin, WANG You-shan

(Institute of Plant Nutrition and Resource, Beijing Academy of Agriculture and Forest Science, Beijing 100097)

Abstract: Taking bell pepper 'Guoxi 109' as test material, a pot experiment was conducted to evaluate the influence of arbuscular mycorrhizal (AM) fungi on the *Phytophthora capsici* of pepper. There were five strains of *G. mosseae* and *G. intraradice* respectively. Most of AM fungi tested significantly reduced the harm of phytophthora blight of pepper, and relative control effect of phytophthora disease was for 37.0%—75.0%. Control effect was quite different between different AM fungi, and *G. mosseae* was more effective than *G. intraradices*, control effect of GM5 reached 75.0%, control effect of GI7 (one strains of *G. intraradices*) reached 50.0%. *G. mosseae* had the potential for the prevention and control of the *Phytophthora capsici* of pepper.

Keywords: arbuscular mycorrhizal (AM) fungi; *Phytophthora capsici*; disease index; colonization

靶标对象,旨在建立特异性强、灵敏度高的番茄溃疡病原菌的 PCR 检测方法,对于该病害的快速诊断和防控具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试菌株 2 个番茄溃疡病菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* (Smith) Davis *et al.*) 菌株:1 个由中国农业大学种子病理中心馈赠,1 个由吉林省蔬菜花卉科学研究院抗病性鉴定中心分离保存。6 种其它植物病原菌:番茄青枯假单胞菌 (*Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith)、茄青枯假单胞菌 (*Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith) 由广东省微生物菌种保藏中心馈赠;黄瓜角斑病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* (Smith et Bryan.) Yong, Dye & Wilkie)、西瓜果斑病菌 (*Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* Schaad *et al.*) 由吉林农业大学馈赠;马铃薯环腐病菌 (*Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* (Spieckermann & Kotthoff) Davis, *et al.*)、马铃薯疮痂病菌 (*Streptomyces scabies* (Thaxter) Waks. et Henvici) 由该实验室分离保存。

1.1.2 试剂及设备 细菌 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。Taq DNA 聚合酶、dNTPs、DNA 分子量 Marker 等购自宝生物工程(大连)有限公司。琼脂、胰蛋白胨、酵母提取物、核酸染料、琼脂糖等购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。台式离心机(德国 Eppendorf 公司),ND1000 紫外/可见分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司),C1000 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司),GelDoc XR⁺ 凝胶成像系统(美国 Bio-Rad 公司),电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.2 试验方法

1.2.1 细菌培养及 DNA 提取 将 *Cmm* 供试菌株在 LB 固体培养基上划线培养,28℃ 恒温培养 72 h 后挑取单菌落,接种于 5 mL 的 LB 液体培养基,28℃、160 r/min 条件下恒温振荡培养至 OD_{600nm} 值为 0.25 (细菌量约为 10⁸ cfu/mL)。按细菌 DNA 提取试剂盒(DP302,北京天根公司)的说明书进行操作,提取菌液总 DNA。用 ND1000 分光光度计检测 DNA 质量和浓度,将 DNA 稀释至 25 ng/μL, -20℃ 保存备用。

1.2.2 引物设计 选择番茄溃疡病菌的 3 个特异性基因 *micA*、*cytC* 和 *tomA* 作为靶标基因,并根据从 NCBI 数据库上查询到的 *micA* 基因(GenBank 登录号: DQ458780)、*cytC* 基因(GenBank 登录号: KJ123732)、*tomA* 基因(GenBank 登录号: HE861510)的序列信息,利用生物信息学软件 Primer Premier 5.0 设计 PCR 检测引物。全部引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成及纯化。引物信息见表 1。

表 1 番茄溃疡病菌 PCR 检测引物

Table 1 PCR primers for detecting

Clavibacter michiganensis subsp. *Michiganensis*

检测对象	引物名称	引物序列(5'-3')	扩增产物大小
Targeted	Primer	Primer	Amplicon
gene	name	sequences	size/ bp
<i>micA</i>	<i>micA</i> -F	CACAGGTGGAACACGATGAACGACA	190
	<i>micA</i> -R	CGATGGTGACCGTGCAGAGCC	
<i>cytC</i>	<i>cytC</i> -F	TCTTGGGAGACGGCTCGGTGCT	258
	<i>cytC</i> -R	CGATGCGTTCGGCTACGTGGAT	
<i>tomA</i>	<i>tomA</i> -F	CTCCCGAGAACGAGATGAATGG	235
	<i>tomA</i> -R	CTTCGGTCGTAACGCTCCATCAC	

1.2.3 灵敏度测试 将提取的 *Cmm* 菌液的 DNA 稀释至 18 ng/μL(根据 *Cmm* 基因组 DNA 大小计算^[12],相当于每微升 5×10⁶ 个 *Cmm* 基因组拷贝),用 0.1×TE 缓冲液依次进行 10 倍梯度稀释,将 *Cmm* 的 DNA 溶液稀释至 *Cmm* 基因组拷贝数含量为 5×10⁶、5×10⁵、5×10⁴、5×10³、500、50、5 copy/μL 的灵敏度测试样品,用 3 对特异性引物进行 PCR 扩增。

1.2.4 菌液直接 PCR 测试 将 OD_{600nm} 值为 0.25 (细菌量约为 10⁸ cfu/mL)的 *Cmm* 纯菌液,用灭菌超纯水依次进行 10 倍梯度稀释,至菌液浓度分别为 10⁶、10⁵、10⁴、10³、100、10 cfu/mL,用 3 对特异性引物,以菌液样品作为模板进行直接 PCR 扩增。

1.2.5 普通 PCR 反应 PCR 反应采用 25 μL 体系,包括:10×PCR 缓冲液(含 15 mmol/L Mg²⁺) 2.5 μL,2.5 mmol/L dNTPs 2 μL(每种 dNTP 终浓度为 200 μmol/L),10 μmol/L 上下游引物各 0.5 μL(终浓度为 200 nmol/L),5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.125 μL,细菌 DNA 或纯菌液 2 μL,加超纯水至终体积为 25 μL。PCR 反应程序:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 30 s,58℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共进行 35 次循环;72℃ 延伸 7 min。PCR 产物用 20 g/L 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

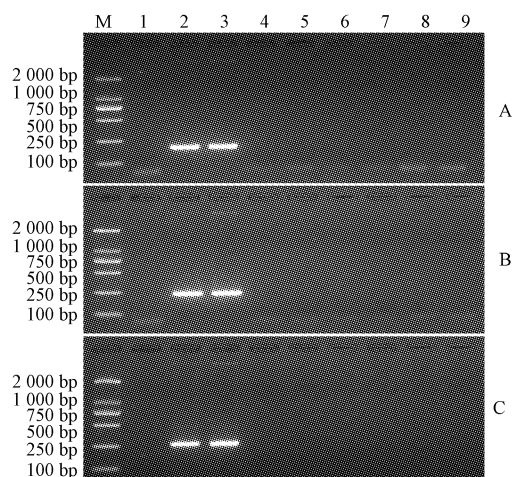
2 结果与分析

2.1 特异性测试

利用番茄溃疡病菌的 *micA*、*cytC*、*tomA* 3 个基因的检测引物,对 2 个 *Cmm* 菌株和 6 种其它病原菌的 DNA 样品进行 PCR 扩增。由图 1 可知,在 3 种检测体系中,均能从 *Cmm* 样品中获得预期的 PCR 扩增产物,而在番茄青枯假单胞菌、茄青枯假单胞菌、马铃薯环腐病菌、黄瓜角斑病菌、西瓜果斑病菌等其它病原菌中均没有任何扩增片段,表明依据 *micA*、*cytC*、*tomA* 3 个基因设计的检测引物均适用于番茄溃疡病原菌的特异性检测。

2.2 灵敏度测试

试验结果显示,基于 *micA* 基因和 *cytC* 基因的检测体系对 *Cmm* 菌液 DNA 的检测灵敏度均可达到 500 copy/μL(图 2-A、B),而基于 *tomA* 基因的检测体系对 *Cmm* 菌液 DNA 的检测灵敏度可达到 5 copy/μL

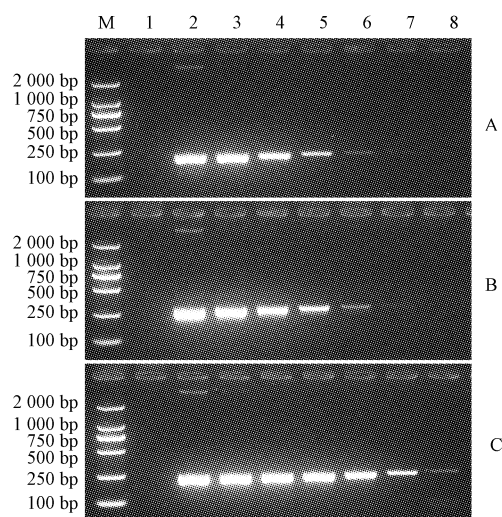


注: A, *micA* 基因; B, *cytC* 基因; C, *tomA* 基因; M, DL 2000 DNA Marker; 1, 空白对照; 2~3, *Cmm*; 4, 番茄青枯假单胞菌; 5, 茄青枯假单胞菌; 6, 马铃薯环腐病菌; 7, 黄瓜角斑病菌; 8, 西瓜果斑病菌; 9, 马铃薯疮痂病菌。

Note: A, *micA* gene; B, *cytC* gene; C, *tomA* gene. M, DL2000 DNA Marker; 1, Control; 2~3, *Cmm*; 4, *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith; 5, *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith; 6, *Pseudomonas syringae* pv. *Lachrymans* (Smith et Bryan.) Yong, Dye & Wilkie; 7, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* subsp. *citrulli* Schaad et al; 8, *Clavibacter michiganense* subsp. *sepedonicum* (Spieckermann & Kotthoff) Davis, et al; 9, *Streptomyces scabies* (Thaxter) Waks. et Henrici.

图1 检测方法的特异性测试结果

Fig. 1 Specificity test results of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*



注: A, *micA* 基因; B, *cytC* 基因; C, *tomA* 基因; M, DL 2 000 DNA Marker; 1, 空白对照; 2, 5×10^6 copy/ μ L; 3, 5×10^5 copy/ μ L; 4, 5×10^4 copy/ μ L; 5, 5×10^3 copy/ μ L; 6, 500 copy/ μ L; 7, 50 copy/ μ L; 8, 5 copy/ μ L

Note: A, *micA* gene; B, *cytC* gene; C, *tomA* gene. M, DL 2 000 DNA Marker; 1, Control; 2, 5×10^6 copy/ μ L; 3, 5×10^5 copy/ μ L; 4, 5×10^4 copy/ μ L; 5, 5×10^3 copy/ μ L; 6, 500 copy/ μ L; 7, 50 copy/ μ L; 8, 5 copy/ μ L

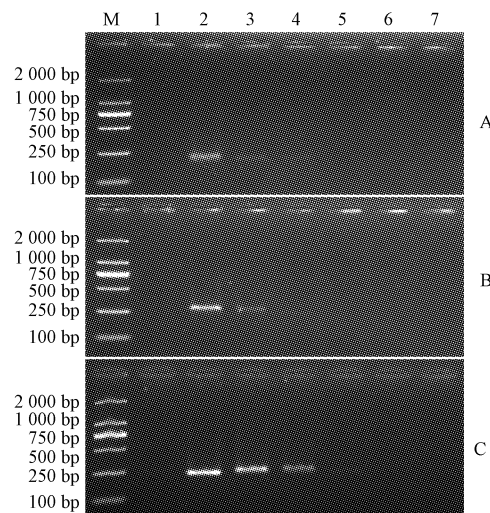
图2 检测方法对菌液 DNA 的灵敏度测试结果

Fig. 2 Sensitivity test results of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*

(图 2-C), 表明该研究建立的 3 种检测方法均能实现对 *Cmm* 的高灵敏度检测, 其中针对 *tomA* 基因的检测方法灵敏度优于其它 2 个基因。

2.3 菌液直接 PCR 测试

由图 3 可知, 利用 3 个基因的检测体系, 均能从 *Cmm* 菌液中扩增获得预期大小的 PCR 产物。对菌液进行直接 PCR 的检测方法的灵敏度分别为 10^4 cfu/mL (*micA* 基因, *cytC* 基因) 和 10^3 cfu/mL (*tomA* 基因), 表明该研究建立的 3 种检测方法均能用于 *Cmm* 菌液直接 PCR 检测, 基于 *tomA* 基因的检测方法的灵敏度要好于 *micA* 和 *cytC* 基因, 与用菌液 DNA 做模板时获得的结果一致。



注: A, *micA* 基因; B, *cytC* 基因; C, *tomA* 基因; M, DL 2 000 DNA 分子量 Marker; 1, 空白对照; 2, 10^6 cfu/mL; 3, 10^5 cfu/mL; 4, 10^4 cfu/mL; 5, 10^3 cfu/mL; 6, 100 cfu/mL; 7, 10 cfu/mL

Note: A, *micA* gene; B, *cytC* gene; C, *tomA* gene. M, DL 2 000 DNA Marker; 1, Control; 2, 10^6 cfu/mL; 3, 10^5 cfu/mL; 4, 10^4 cfu/mL; 5, 10^3 cfu/mL; 6, 100 cfu/mL; 7, 10 cfu/mL

图3 *Cmm* 菌液直接 PCR 检测结果

Fig. 3 Direct-PCR results of *Cmm* strain suspension

3 讨论与结论

番茄细菌性溃疡病是番茄生产中最主要的细菌病害, 在世界范围内每年均造成严重的经济损失, 是我国禁止入境的检疫性有害生物^[13]。建立特异、快速、高效的分子检测方法, 对于 *Cmm* 的早期诊断和制定切实有效的防控措施具有重要意义。目前国内外已报道的 *Cmm* 分子检测方法有很多种, 利用的技术有 PCR、LAMP、超滚环扩增(HRCA)等, 但绝大多数都是以 16S rDNA 或 ITS 等序列为检测靶标, 在方法特异性方面存在一定的风险^[14], 因此探索 *Cmm* 的新的特异性检测靶标对于 *Cmm* 的精准检测十分必要。

近年来, *Cmm* 中编码抗菌肽的基因(*micA* 基因)、铁氧化还原酶基因(*cytC* 基因)、番茄素酶基因(*tomA* 基因)等与 *Cmm* 的繁殖力或致病性相关的基因陆续被克

隆和鉴定^[10,12,15]。这些基因在 *Cmm* 中具有序列保守性,为 *Cmm* 的特异性分子诊断技术的建立提供了数据支撑,目前已有利用这 3 个基因建立 *Cmm* 分子检测方法的相关报道^[10,12,16]。该研究以上述 3 个基因的特异性序列作为模板设计检测引物,并应用不同来源的 2 个 *Cmm* 菌株和其它 6 种植物病原菌,对这 3 个靶标基因的检测体系进行特异性、灵敏度等测试,建立了既可检测 *Cmm* 菌液 DNA,又能直接检测 *Cmm* 菌体的 PCR 检测方法。通过对 3 种检测方法的灵敏度进行比较,以 *TomA* 基因为检测靶标的方法较另外 2 种方法具有更优异的灵敏度。

根据其它研究者的报道,在番茄生产上,当番茄组织内的 *Cmm* 菌体浓度达到每克鲜重 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^9$ cfu 时,番茄才会表现出症状^[17]。利用该研究建立的方法,无论是以 *TomA* 基因,还是 *cytC* 或 *micA* 基因为检测靶标,其灵敏度能达到 $10^3 \sim 10^4$ cfu/mL,完全能满足 *Cmm* 的早期诊断需求。

根据番茄溃疡病菌的 *micA*、*cytC*、*TomA* 3 个基因设计检测引物,并进行特异性、灵敏度测试以及直接 PCR 适用性的测试,建立了基于 PCR 技术的特异性强、灵敏度高的 *Cmm* 分子检测方法。

参考文献

- [1] Wittmann J, Gartemann K H, Eichenlaub R, et al. Genomic and molecular analysis of phage CMP1 from *Clavibacter michiganensis* subspecies *michiganensis* [J]. Bacteriophage, 2011, 1(1): 6-14.
- [2] 罗来鑫, 赵廷昌, 李建强, 等. 番茄细菌性溃疡病研究进展[J]. 中国农业科学, 2004, 37(8): 1144-1150.
- [3] 赵文军, 夏明星, 陈红运, 等. 番茄溃疡病菌 PCR 快速检测技术[J]. 植物检疫, 2007, 21(2): 75-77.
- [4] 王蕊, 罗来鑫, 李建强. 不同来源番茄溃疡病菌致病力差异研究[J]. 植物保护, 2010, 36(1): 73-77.
- [5] 李江利, 欧阳林杰, 郭森森, 等. 河南省番茄溃疡病的发现与分子确诊[J]. 河南农业大学学报, 2011, 45(3): 349-352.
- [6] 王念武, 王婷, 沈建国, 等. 基于锁式探针的番茄溃疡病菌实时荧光 PCR 快速检测[J]. 中国农业科学, 2014, 47(5): 903-911.
- [7] 闵现华, 刘菁, 韩跃武, 等. Nested-PCR 检测种传番茄细菌性溃疡病菌[J]. 西北农业学报, 2011, 20(7): 28-31.
- [8] 闵现华, 韩跃武, 刘菁, 等. 种传番茄溃疡病菌直接 PCR 和免疫捕捉 PCR 检测方法之比较[J]. 植物检疫, 2010, 24(4): 12-16.
- [9] 封立平, 尼秀媚, 魏晓棠, 等. 番茄溃疡病菌的环介导等温核酸扩增技术检测方法[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(4): 1207-1212.
- [10] Yasuhara-Bell J, Kubota R, Jenkins D M, et al. Loop-mediated amplification of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* *micA* gene is highly specific[J]. Phytopathology, 2013, 103(12): 1220-1226.
- [11] Cho M S, Lee J H, Her N H, et al. A quantitative and direct PCR assay for the subspecies-specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* based on a ferredoxin reductase gene[J]. Journal of Microbiology, 2012, 50(3): 496-501.
- [12] Gartemann K H, Abt B, Bekel T, et al. The genome sequence of the tomato-pathogenic actinomycete *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382 reveals a large island involved in pathogenicity[J]. Journal of Bacteriology, 2008, 190(6): 2138-2149.
- [13] 王念武, 王婷, 沈建国, 等. 超分支滚环扩增技术快速检测番茄溃疡病菌[J]. 植物检疫, 2013, 27(5): 66-70.
- [14] Bach H J, Jessen I, Schlöter M, et al. A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2003, 52(1): 85-91.
- [15] Holtsmark I, Mantzilas D, Eijsink V G, et al. Purification, characterization, and gene sequence of michiganin A, an actagardine-like lantibiotic produced by the tomato pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2006, 72(9): 5814-5821.
- [16] 吴兴海, 邵秀玲, 厉艳, 等. 应用分子生物学方法快速检测番茄溃疡病菌的研究[J]. 江西农业学报, 2006, 18(2): 5-7.
- [17] 付鹏, 郭亚辉, 张晓梅, 等. 番茄溃疡病菌分子检测技术[J]. 江苏农业学报, 2005, 21(2): 118-122.

Qualitative PCR Detection Method for *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*

MAO Fu-rong¹, LI Fei-wu², LIU Yan-ni¹, LIU Jing-li¹, PAN Bo¹

(1. Jilin Academy of Vegetables and Flowers, Changchun, Jilin 130033; 2. Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun, Jilin 130033)

Abstract: Using two *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* strains and six kinds of plant pathogen as experimental materials, through primers design, specificity and sensitivity testing, a PCR method for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by employing three specific genes of *micA*, *cytC*, and *TomA* were established. The results showed that this developed PCR method resulted in a specific and accurate detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. In particular, the sensitivity of the detection method using *TomA* gene as test target could reach 5 copy/ μ L or 10^3 cfu/mL, which was more sensitive than the other two methods by employing *micA* and *cytC* gene, respectively. This study provided a fast and precise technological means for the early diagnosis of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*.

Keywords: phytopathogen; *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; PCR; molecular detection