

黄瓜棒孢叶斑病菌 PCR 检测方法的建立

陈璐*, 石延霞*, 谢学文, 柴阿丽, 李宝聚**

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 根据黄瓜棒孢叶斑病菌多主棒孢 (*Corynespora cassiicola*) 与棒孢属下女贞棒孢 (*Corynespora lieustri*)、威尔士棒孢 (*Corynespora cambrensis*) 和其他常见病原真菌 *Actin* 基因序列差异, 设计多主棒孢的特异性引物 Caa5F/Caa5R, 建立了黄瓜棒孢叶斑病菌的 PCR 检测方法, 可对引起黄瓜棒孢叶斑病的病原菌扩增出 160 bp 的特异性条带, 检测灵敏性为 $4 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA, 并可从接种后发病的黄瓜叶片总 DNA 中检测到特异条带。该引物的 PCR 检测方法灵敏性较高, 可直接检测植株总 DNA, 无需病原菌的分离培养, 适用于对黄瓜棒孢叶斑病特异快速的检测。

关键词: 黄瓜棒孢叶斑病菌; 检测方法; *Actin* 基因; PCR 检测

中图分类号: S 642.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 03-0585-08

PCR Assay for Detection of *Corynespora cassiicola*, the Causal Agent of *Corynespora* Leaf Spot of Cucumber

CHEN Lu*, SHI Yan-xia*, XIE Xue-wen, CHAI A-li, and LI Bao-ju**

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A rapid PCR detection assay of *Corynespora cassiicola*, the causal agent of *Corynespora* leaf spot of cucumber, was developed based on the *Actin* gene of the pathogen. Primer pair Caa5F/Caa5R were designed on the different bases of *Actin* gene sequences between *C. cassiicola* and other common plant fungal pathogens, including *Corynespora lieustri* and *Corynespora cambrensis*, and only *C. cassiicola* performed a 160 bp amplification. *C. cassiicola* could be detected in infected cucumber leaves without isolation or cultivation by the PCR assay. The assay with a high sensitivity of $4 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA per reaction could be a useful tool of rapid detection of *Corynespora* leaf spot of cucumber.

Key words: *Corynespora cassiicola*; *Actin* gene; PCR

多主棒孢 [*Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei.] 是引起黄瓜棒孢叶斑病 (*Corynespora* leaf spot of cucumber) 的病原菌 (Date et al., 2004)。多主棒孢寄主范围广泛, 传播方式多样。近几年经调查发现, 由多主棒孢引起的黄瓜、番茄等蔬菜的叶斑病在中国的山东、河北、辽宁、内蒙古等 11 个省市区大面积发生, 造成了严重的经济损失。20 世纪末, 黄瓜棒孢叶斑病在辽宁省瓦房店市爆发, 严重危害黄瓜的生产。目前, 该病已成为保护地黄瓜的重要叶部病害之一 (李宝聚 等, 2012)。

收稿日期: 2013-10-25; 修回日期: 2014-02-09

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-25); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 同等贡献第一作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: libaoju@caas.cn)

黄瓜棒孢叶斑病病斑初期为小黄斑，逐渐扩大至近圆形，浅棕色，边缘较薄呈棕色，条件适宜时病斑迅速扩展，边缘呈现水浸状，严重时多个病斑连成片，并可蔓延至叶柄、茎蔓，造成果实流胶，干燥时造成穿孔（Pernezny et al., 1996）。黄瓜棒孢叶斑病发生初期症状极易与黄瓜细菌性角斑病和霜霉病混淆，后期不易与炭疽病区分，现阶段缺乏对黄瓜棒孢叶斑病菌的快速检测技术，给田间及时防控造成困难。

多主棒孢的检测方法包括 PCR 检测（Qi et al., 2007, 2009; 王伟青 等, 2013）、免疫检测（Lamotte et al., 2007; Sunderasan et al., 2009）以及彩色图像检测（岑喆鑫 等, 2007）等，并已成功应用于其遗传多样性等方面的研究（Atan & Hamid, 2003; Nghia et al., 2008; Dixon et al., 2009）。现有的免疫检测方法一般以多主棒孢寄主选择性毒素蛋白 cassiicolin 为抗原制备单克隆抗体，操作较为复杂，实验成本较高。基于计算机彩色图像的检测方法由于拍摄状态和光照等环境因素、发病程度及病斑的典型性不同，均可能对检测准确率产生影响。多主棒孢的 PCR 检测方法报道较少，现有方法所选用的对照菌株仅 3 ~ 4 株，引物特异性需进一步验证，检测技术尚不完善。同时，已有的黄瓜棒孢叶斑病菌 PCR 检测方法未能直接将黄瓜棒孢叶斑病菌与黄瓜霜霉病菌、炭疽病菌、细菌性角斑病菌加以区分。因此建立准确、快速、灵敏、实用的黄瓜棒孢叶斑病菌检测方法非常必要。

本研究利用黄瓜棒孢叶斑病菌的肌动蛋白（Actin）基因序列与棒孢属女贞棒孢、威尔士棒孢和其他常见病原真菌 Actin 序列差异，设计黄瓜棒孢叶斑病菌的 PCR 引物并建立检测方法，对该病菌实现特异、灵敏、快速的鉴定。

1 材料与amp;方法

1.1 供试菌株和作物

供试菌株：所用菌株 45 株。其中 20 株不同来源的黄瓜棒孢叶斑病菌保存于中国农业科学院蔬菜花卉研究所，已经过单孢分离法鉴定为多主棒孢（*Corynespora cassiicola*）；其他种属包括 24 株病原真菌，1 株病原细菌，由中国农业科学院蔬菜花卉研究所分离、鉴定和保存（表 1）。

供试作物：黄瓜（*Cucumis sativus* L.），品种为‘中农 6 号’。栽培措施及环境条件与生产上温室栽培管理相同，各重复间条件一致。

表 1 供试菌株及其来源
Table 1 Collection sites of isolates used in this study

菌株编号 Isolate code	病原菌名称 Pathogen name	采集地 Collection site
HG08122201	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	辽宁 Liaoning
HG0504010	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	北京 Beijing
HG09012018	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	山东 Shandong
SDHGYB0604	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	山东 Shandong
HG11101308	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	河北 Heibei
HG0805190101	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	山西 Shanxi
HG1001290401	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	海南 Hainan
HG11011101	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	海南 Hainan
HG09031508	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	内蒙古 Inner Mongolia
HG10020902	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	安哥拉 Angola
HG09101501	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	河南 Henan
HG11122409	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	河南 Henan
HG10090801	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	黑龙江 Heilongjiang

续表 1

菌株编号 Isolate code	病原菌名称 Pathogen name	采集地 Collection site
HG10110702	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	黑龙江 Heilongjiang
HG09112606	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	浙江 Zhejiang
HG10062510	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	重庆 Chongqing
HG10110701	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	浙江 Zhejiang
HG10062510	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	四川 Sichuan
HG10110704	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	新疆 Xinjiang
HG12030501	黄瓜棒孢叶斑病菌 <i>Corynespora cassiicola</i>	北京 Beijing
DTH1	威尔士棒孢 <i>Corynespora cambrensis</i>	北京 Beijing
JYNZ1	女贞棒孢 <i>Corynespora lieustri</i>	北京 Beijing
HG1309301	古巴假霜霉 <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	北京 Beijing
HG08090201	西瓜壳二孢 <i>Ascochyta citrullina</i>	河南 Henan
HG0504281	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	山东 Shandong
HG13051902	半裸镰刀菌 <i>Fusarium semitectum</i>	北京 Beijing
HG06110903	瓜果腐霉菌 <i>Pythium aphanidermatum</i>	山东 Shandong
HG0903150102	茄病镰刀菌 <i>Fusarium solani</i>	北京 Beijing
HG08092201	终极腐霉菌 <i>Pythium ultimum</i>	山东 Shandong
HG12080601	瓜枝孢 <i>Cladosporium cucumerinum</i>	广东 Guangdong
HGHF	红粉单端孢 <i>Trichothecium roseum</i>	辽宁 Liaoning
HG08073201	瓜类炭疽菌 <i>Colletotrichum orbiculare</i>	北京 Beijing
HG10011404	灰葡萄孢 <i>Botrytis cinerea</i>	河北 Hebei
HG1202080101	丁香假单胞 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	河北 Hebei
LJ1201071202	辣椒疫霉菌 <i>Phytophthora capsici</i>	山东 Shandong
HG120604110	匍柄霉 <i>Stemphylium solani</i>	北京 Beijing
CD07101101	变灰尾孢 <i>Cercospora canescens</i>	山东 Shandong
SD0801	立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	北京 Beijing
IVF215	核盘菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	山东 Shandong
QC12041826	芹菜壳针孢 <i>Lycopersicum esculentum</i>	山东 Shandong
MLS09102001	茄链格孢 <i>Alternaria solani</i>	新疆 Xinjiang
QZ12092301	褐纹拟茎点霉 <i>Phomopsis vexans</i>	北京 Beijing
QZ12061103	大丽轮枝菌 <i>Verticillium dahliae</i>	北京 Beijing
GL11111807	芸薹链格孢 <i>Alternaria brassicicola</i>	河南 Henan
BC08072501	芸薹根肿菌 <i>Plasmodiophora brassicae</i>	北京 Beijing

1.2 菌株培养与 DNA 提取

将供试菌株于马铃薯葡萄糖琼脂（potato dextrose agar, PDA）平板上培养后，挑取适当菌块于 PDA 培养基中，28 ℃培养 7 d，至有菌丝球出现，高压抽滤菌液后收集菌丝体于真空冷冻干燥机（ThermoSavant 公司）冻干。采用改良 CTAB 法提取 DNA（Ausubel et al., 1994）。利用离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒（北京天根公司）由黄瓜霜霉病植株叶片标本提取黄瓜霜霉病菌 DNA。提取的 DNA 保存于 -20 ℃备用。

1.3 引物设计

利用肌动蛋白基因引物 ACT-512F: 5'-ATGTGCAAGGCCGTTTCGC-3'和 ACT-783R: 5'-TACGA GTCCTTCTGGCCCAT-3'（Shimomoto et al., 2011），（北京诺赛基因公司合成）对 20 株黄瓜棒孢叶斑病菌 DNA 于 PTC-200 型 PCR 仪（美国 BIO-RAD 公司）进行序列扩增。25 μL 反应体系，包括 Premix Taq™（大连宝生物工程公司）12.5 μL，引物 ACT-512F/ACT-783R（10 pmol·L⁻¹）各 1 μL，模版 DNA（10 ng·μL⁻¹）2 μL 和 ddH₂O 8.5 μL。扩增条件均为：94 ℃预变性 2 min，94 ℃变性 1 min，58 ℃退火 1 min，72 ℃延伸 1 min，40 个循环；72 ℃延伸 7 min。PCR 产物于中国农业科学院作

物科学研究所测序中心测序。

测序结果通过 Blast 进行序列比对。应用 DNAMAN 软件将测得的黄瓜棒孢叶斑病菌 *Actin* 序列, 同 GenBank 中公布的病原真菌 *Actin* 序列进行比对, 根据其与棒孢属女贞棒孢 (*C. lieustri*)、威尔士棒孢 (*C. cambrensis*) 和其他常见病原真菌 *Actin* 序列差异 (登录号: JQ671669; JQ671723; HM148567; KF178566; JQ965663; JN168983; JQ429142; AY452181; JN038402; AF340964; DQ266124), 利用 Primer 5.0 软件对差异位点设计特异性引物, 由北京诺赛基因公司合成后进行引物特异性筛选与评价。

1.4 引物特异性检测

对上述 20 株黄瓜棒孢叶斑病菌和 25 株对照菌株基因组 DNA 进行 PCR 扩增。25 μL 反应体系, 包括 Premix Taq™ 12.5 μL 、引物 Caa5F/Caa5R ($10\text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.5 μL 、模板 DNA ($10\text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.5 μL 和 ddH₂O 10 μL 。阴性对照无 DNA。扩增条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。利用 PowerPac-3000 型电泳仪 (美国 BIO-RAD 公司), Eagle Eye II System 凝胶成像系统 (美国 Stragene 公司), 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.5 引物灵敏性检测

为鉴定引物对 Caa5F/Caa5R 及所建立的 PCR 反应体系所能测定的真菌 DNA 浓度, 采用离心柱型琼脂糖凝胶回收试剂盒 (北京天根公司) 对由黄瓜棒孢叶斑病菌特异性扩增的 160 bp 的 PCR 扩增产物进行凝胶回收, 产物连接到 pMD™ 18-T 载体 (大连宝生物工程公司) 后转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞 (大连宝生物工程公司) 中, 阳性克隆采用离心柱型普通质粒小提试剂盒 (北京天根公司) 提取质粒 DNA。

质粒 10 倍梯度稀释, 用 $4 \times 10^4 \sim 4 \times 10^{-4}\text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 不同浓度的黄瓜棒孢叶斑病菌质粒 DNA 作为模板进行扩增。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

1.6 发病植株叶片的检测

将供试黄瓜棒孢叶斑病菌菌株 HG08122201、HG0504010 于 PDA 培养基培养。黄瓜长至 2 片真叶时将孢子悬浮液用微量喷雾器均匀喷雾于叶片上, 每个菌株接种 5 株黄瓜, 对照采用无菌水喷雾。每个处理 3 次重复。黄瓜接种后于相对湿度 95% 保湿柜中保湿培养 48 h, 之后于温室中常规管理。

接种植株产生明显症状后, 利用离心柱型植物基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根公司) 分别取发病的黄瓜叶片和对照黄瓜叶片提取 DNA, 进行 PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 黄瓜棒孢叶斑病菌 *Actin* 序列分析及引物设计

利用引物 ACT-512F/ACT-783R 对 20 株黄瓜棒孢叶斑病菌 *Actin* 基因进行序列测定。测序结果通过 Blast 比对, 供试 20 株黄瓜棒孢叶斑病菌均与多主棒孢 *Actin* 序列有 100% 同源性 (登录号: AB539434)。采用该序列与女贞棒孢和威尔士棒孢以及常见病原真菌 *Actin* 基因序列进行比对, 设计引物 Caa5F/Caa5R, 扩增产物 160 bp (图 1)。其序列为, Caa5F: 5'-GCCAGCAAAGCGTCGAG-3'; Caa5R: 5'-CTAGCGGGGAGGGGTTC-3'。所用序列在 GenBank 比对, 与其他种属菌株无同源性。

CORYNESPORA_CASSIICOLA	GATGCCCGCCAGCAAAGCGTCGAGTTCGCCGCGAGGCCTGCACTCCGGCGCGCGCGTGCACGGA	64
CORYNESPORA_CAMBRENSIS	0
CORYNESPORA_LIEUSTRI	0
ALTERNARIA_BRASSICICOLA	CGAGGCTCCCATCAACCCCAAGTCACACCGTGAGAAGATGACACAGATTGTTTTCGAGACCTTC	64
ALTERNARIA_SOLANI	CGAGGCTCCCATCAACCCCAAGTCACACCGTGAGAAGATGACACAGATTGTTTTCGAGACCTTC	64
CLADOSPORIUM_CUCUMERINUMTGTGCAAGGCGGTTTCGCGCGGTGACGATGCGCCAGAGCCGTTTTCGTAAGTCTAAA	59
COLLETOTRICHUM_ORBICULARE	AGAGCTGTCTTCGTAAGTTGTCCATCCGCGACAGCCGA.ACCTCGCCCTTCAGGAGGTTCATCG	63
FUSARIUM_OXYSPORUM	TTCGACCCAGGCAACCCCGTTGACGCGCTCCTGTGGGCGTTAGCAGCCTTGATTGCTTACCC	64
FUSARIUM_SOLANI	CGAGGCTCCCATCAACCCCAAGTCACACCGTGAGAAGATGACACAGATTGTTTTCGAGACCTTC	64
PHYTOPHTHORA_CAPSICI	TCTGTTCGCAACCGGAAGAAAAGGGAATAGAGCTAAGTAGGCGCGTGGATCGGGGGATTTT	64
PLASMIDIOPHORA_BRASSICAEGACGTTTC	7
PYTHIUM_APHANIDERMATUM	GGAGGCTCCGCTCAACCCCAAGGTCACACCGTGAGCGTATGACGAGATCATGTTTCGAGACGTTT	64
SCLEROTINIA_SCLEROTIUM	GCTGTTCGCTAAGTAGACTATCTTGCAGGCAACAGCTACATCCTTGATTTCCATCAAAATC	64
VERTICILLIUM_DAHLIAE	0
CORYNESPORA_CASSIICOLA	ACGCCGCTCTTGGCCCTATCCTTGGATTACAAAACCTG.ACAGTTGG...CAGCTTCCATTGTC	124
CORYNESPORA_CAMBRENSISAAGGATAGGGCCAGAGACGGCGTTCGGTCGG...ACGCCCGCGCGG	44
CORYNESPORA_LIEUSTRIAAGGATAGGGCCAGAGACGGCGTTCGGTCGG...ACGCCCGCGCGG	44
ALTERNARIA_BRASSICICOLA	AACGCTCCGCGCTTCTACGTCTCCATCCAGGCGCTCCTGTCCCTGTA...CGCCTCCGGAAGT	124
ALTERNARIA_SOLANI	AACGCTCCGCGCTTCTACGTCTCCATCCAGGCGCTCCTGTCCCTGTA...CGCCTCCGGAAGT	124
CLADOSPORIUM_CUCUMERINUM	GACACCTGTTTCGCCCATCCCGCGATTCCGAGCTGAC..ACCAATCC...TAGCTTCCATTGTC	118
COLLETOTRICHUM_ORBICULARE	AGGTTCCGCGCTTCTTCTTAGACTCCATGGTTGCTGACACCTTTG...CAGCCTCCATGCTC	124
FUSARIUM_OXYSPORUM	TGGTTCCCTCTTTCAAGACACCATGATAAAACGTTGGTATCAAGGCT..ACCATAGCAGGCT	125
FUSARIUM_SOLANI	AACGCCCGCGCTTCTACGTCTCCATCCAGGCGCTTCTCCTGTA...CGCCTCCGGAAGT	124
PHYTOPHTHORA_CAPSICI	ACTGTGAGGTGAAGGACGATAGGACGCTCATTCCTC..CTGATAGATAGAGATATCAAGTCAC	126
PLASMIDIOPHORA_BRASSICAE	AACAGCGCGCGCATGTAGCTCGCCATCCAGGCGCTCCTGTCCGCTGTA...CGCCTCCGGAAGT	67
PYTHIUM_APHANIDERMATUM	AACGTCGCCAGCATGTAGCTGAACATCCAGGCGCTTCTCCTGTA...CGCCTCCGGAAGT	124
SCLEROTINIA_SCLEROTIUM	AGTCATGACAATAACCAATAATGAGCTTGAACCATCTTAACATGCAAAATAGCTTCCATTGTC	128
VERTICILLIUM_DAHLIAE	..GTGCTGCTTCCGTAAGTTCCCTACCCAAATTTCC..CTAGACCG...CAACTTTGGGTGCT	57
CORYNESPORA_CASSIICOLA	GGTCGCCCGCGCCACCATGGGTA...CGAGAACCCCTCCCGCTAGTCCCGCGTGATTGCG	182
CORYNESPORA_CAMBRENSIS	.AGTGCAGGCTCCGACGAGCTCG...ACACTTTGCTGGCGGGCATCGGGACGCGGGCGCG	102
CORYNESPORA_LIEUSTRI	.AGTGCAGGCTCCGACGAGCTCG...ACACTTTGCTGGCGGGCATCGGGACGCGGGCGGTG	102
ALTERNARIA_BRASSICICOLA	.ACCAACCGGTATCGTTCTCGAGTC..CGGTGACGGTGTCACTCAGCTTGTCCCATCTACG	182
ALTERNARIA_SOLANI	.ACCAACCGGTATCGTTCTCGAGTC..CGGTGACGGTGTCACTCAGCTTGTCCCATCTACG	182
CLADOSPORIUM_CUCUMERINUM	GGCAGACCCCGTACCATGGGTAT.GCATTCGCCCTGCGAACCCTCTATCGCGCGAGCC	178
COLLETOTRICHUM_ORBICULARE	GGTCGCCCTCGCCACCATGGGTATGTTCTTCATCGCTGCGGCAATTTCCGCCACCGAGTCGC	185
FUSARIUM_OXYSPORUM	AGGCGCGCGTGTGCTCCAGGCAATAGATGTTACTCGGGCAGTGTGAGCTGACGAGCGGTG	186
FUSARIUM_SOLANI	.ACCACTGGTATCGTCCCTGGATTC..CGGTGATGGTGTCACTCAGCTTGTCCCATCTACG	182
PHYTOPHTHORA_CAPSICI	.ACGGTGTGATGTGAGCTGCTCGG..AAGCGAAGCGGCAACTTCAGCATAGTGAGATCAA	184
PLASMIDIOPHORA_BRASSICAE	.ACCAACCGGTATCGTCCCTGGAGTC..CGGCGACGGTGTCTCCACACGGTCCCATCTACG	125
PYTHIUM_APHANIDERMATUM	.ACGACTGGTTCCGTGCTCGAGTC..TGCTGATGGTGTCTCGCACAGGGTGCCAAATTACG	182
SCLEROTINIA_SCLEROTIUM	GGTCGTCGCCGTATCATGGGTA...AGAAATCCATCCATATAACACCCCGCCATTTCCCG	186
VERTICILLIUM_DAHLIAE	GCGGGCAAGGCTCATCATGA.....TCTTTGATGCTG...ACCAATTCAGCTTCCATTGTC	111

图 1 黄瓜棒孢叶斑病菌 *Actin* 基因区域特异性引物设计位点

CORYNESPORA_CASSIICOLA: 多主棒孢, 登录号为 AB539434; CORYNESPORA_CAMBRENSIS: 威尔士棒孢, 菌株编号 DTH1; CORYNESPORA_LIEUSTRI: 女贞棒孢, 菌株编号 JYNZ1, 两菌株相应的序列均为本研究室自测; ALTERNARIA_BRASSICICOLA: 芸薹链格孢, 登录号为 JQ671669; ALTERNARIA_SOLANI: 茄链格孢, 登录号为 JQ671723; CLADOSPORIUM_CUCUMERINUM: 瓜枝孢, 登录号为 HM148567; COLLETOTRICHUM_ORBICULARE: 瓜类炭疽菌, 登录号为 KF178566; FUSARIUM_OXYSPORUM: 尖孢镰刀菌, 登录号为 JQ965663; FUSARIUM_SOLANI: 茄病镰刀菌, 登录号为 JN168983; PHYTOPHTHORA_CAPSICI: 辣椒疫霉菌, 登录号为 JQ429142; PLASMIDIOPHORA_BRASSICAE: 芸薹根肿菌, 登录号为 AY452181; PYTHIUM_APHANIDERMATUM: 瓜果腐霉菌, 登录号为 JN038402; SCLEROTINIA_SCLEROTIUM: 核盘菌, 登录号为 AF340964; VERTICILLIUM_DAHLIAE: 大丽轮枝菌, 登录号为 DQ266124。

Fig. 1 Sequences site of specific primer to *C. cassiicola* from the *Actin* gene

CORYNESPORA_CASSIICOLA: Accession number is AB539434; CORYNESPORA_CAMBRENSIS: Isolate code DTH1; CORYNESPORA_LIEUSTRI: Isolate code JYNZ1, corresponding sequences were got by our lab; ALTERNARIA_BRASSICICOLA: Accession number is JQ671669; ALTERNARIA_SOLANI: Accession number is JQ671723; CLADOSPORIUM_CUCUMERINUM: Accession number is HM148567; COLLETOTRICHUM_ORBICULARE: Accession number is KF178566; FUSARIUM_OXYSPORUM: Accession number is JQ965663; FUSARIUM_SOLANI: Accession number is JN168983; PHYTOPHTHORA_CAPSICI: Accession number is JQ429142; PLASMIDIOPHORA_BRASSICAE: Accession number is AY452181; PYTHIUM_APHANIDERMATUM: Accession number is JN038402; SCLEROTINIA_SCLEROTIUM: Accession number is AF340964; VERTICILLIUM_DAHLIAE: Accession number is DQ266124.

2.2 引物特异性

特异性引物 Caa5F/Caa5R 对黄瓜棒孢叶斑病菌进行扩增 (图 2) 结果表明, 不同来源的 20 株黄瓜棒孢叶斑病菌在 160 bp 处均有明显特异性扩增条带。

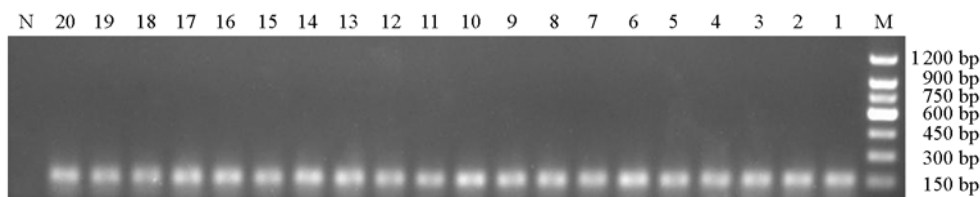


图2 引物 Caa5F/Caa5R 对 20 株不同来源的黄瓜棒孢叶斑病菌扩增结果

M: 150 bp ladder marker; 1~20: 多主棒孢黄瓜分离物; N: 阴性对照。

Fig. 2 Primer pair Caa5F/Caa5R for 20 *Corynespora cassiicola* strains isolated from cucumber in different collection places

M: 150 bp ladder marker; 1~20: *C. cassiicola* isolates of cucumber; N: Negative control.

采用黄瓜棒孢叶斑病菌 (HG08122201) 作为阳性对照, 对 25 株对照菌株进行引物特异性验证 (图 3), 只有黄瓜棒孢叶斑病菌在 160 bp 处有特异性扩增, 瓜果腐霉菌在 1 400 bp 左右有扩增, 其他对照菌株和阴性对照均无扩增条带。



图3 引物 Caa5F/Caa5R 特异性检测

M: 150 bp ladder marker; P: 黄瓜棒孢叶斑病菌; 1: 威尔士棒孢; 2: 女贞棒孢; 3: 褐纹拟茎点霉; 4: 西瓜壳二孢; 5: 芹菜壳针孢; 6: 茄链格孢; 7: 大丽轮枝菌; 8: 瓜类炭疽菌; 9: 红粉单端孢; 10: 核盘菌; 11: 茄病镰刀菌; 12: 尖孢镰刀菌; 13: 立枯丝核菌; 14: 匍柄霉; 15: 瓜枝孢; 16: 辣椒疫霉菌; 17: 半裸镰刀菌; 18: 终极腐霉菌; 19: 灰葡萄孢; 20: 变灰尾孢; 21: 芸薹生链格孢; 22: 芸薹根肿菌; 23: 丁香假单胞流注致病变种; 24: 古巴假霜霉; 25: 瓜果腐霉菌; N: 阴性对照。

Fig. 3 Specific PCR amplification using the Caa5F/Caa5R primer pair

M: 150 bp ladder marker; P: *C. cassiicola*; 1: *C. cambrensis*; 2: *C. lieustri*; 3: *P. vexans*; 4: *A. citrullina*; 5: *L. esculentum*; 6: *A. solani*; 7: *V. dahliae*; 8: *C. orbiculare*; 9: *T. roseum*; 10: *S. sclerotiorum*; 11: *F. solani*; 12: *F. oxysporum*; 13: *R. solani*; 14: *S. solani*; 15: *C. cucumerinum*; 16: *P. capsici*; 17: *F. semitectum*; 18: *P. ultimum*; 19: *B. cinerea*; 20: *C. canescens*; 21: *A. brassicicola*; 22: *P. brassicae*; 23: *P. syringae* pv. *lachryman*; 24: *P. cubensis*; 25: *P. aphanidermatum*; N: Negative control.

2.3 引物灵敏性

将质粒 DNA 稀释为 $4 \times 10^4 \sim 4 \times 10^{-4} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的浓度梯度进行灵敏性验证 (图 3), 引物对 Caa5F/Caa5R 及所建立的 PCR 反应体系能够在 $4 \sim 4 \times 10^4 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度 DNA 对黄瓜棒孢叶斑病菌有明显特异性扩增, 可知该反应体系的检测灵敏度为 $4 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

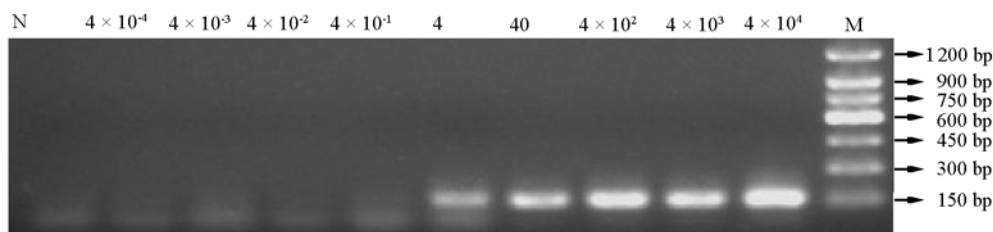


图4 普通 PCR 灵敏性扩增结果

M: 150 bp ladder marker; N: 阴性对照。

Fig. 4 Sensitivity of conventional PCR using the Caa5F/Caa5R primer pair

M: 150 bp ladder marker; N: Negative control.

2.4 发病植株叶片的 PCR 检测

用所设计的特异性引物分别扩增发病的黄瓜叶片和对照叶片总 DNA, 同时采用黄瓜棒孢叶斑病菌的 DNA 作为阳性对照, 阴性对照无 DNA。扩增结果表明: 阳性对照和发病黄瓜叶片的总 DNA 均能扩增出 160 bp 的特异性条带, 对照叶片中 DNA 和阴性对照无扩增产物 (图 4)。扩增结果说明, 该引物可用于黄瓜植株中棒孢叶斑病菌的快速检测, 且不受寄主 DNA 的干扰, 能满足黄瓜棒孢叶斑病菌快速诊断的要求。

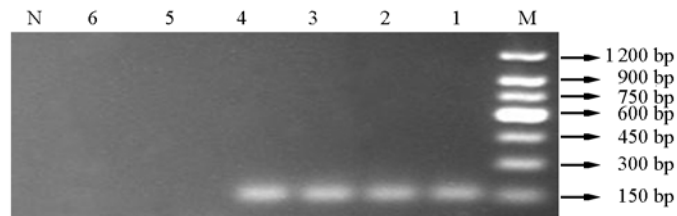


图 5 引物 Caa5F/Caa5R 对植株叶片 DNA 扩增结果

M: 150 bp ladder marker; 1: HG08122201 菌株 DNA; 2: HG0504010 菌株 DNA; 3: 接种 HG08122201 发病植株叶片 DNA; 4: 接种 HG0504010 发病植株叶片 DNA; 5, 6: 对照植株叶片 DNA; N: 阴性对照。

Fig. 5 PCR detection of plant leaf DNA using the Caa5F/Caa5R primer pairs

M: 150 bp ladder marker; 1: DNA of HG08122201 strain; 2: DNA of HG0504010 strain;
3: DNA of infected plant leaf with HG08122201 strain;
4: DNA of infected plant leaf with HG0504010 strain;
5, 6: DNA of control; N: Negative control.

3 讨论

多主棒孢寄主范围广泛, 侵染破坏力强, 在黄瓜上引起棒孢叶斑病, 一旦发生, 难于防治, 造成巨大的经济损失。黄瓜棒孢叶斑病在我国典型的田间症状包括大型斑、小型斑及角状斑 3 种, 与黄瓜霜霉病、细菌性角斑病及炭疽病极易混淆。因此, 黄瓜棒孢叶斑病菌快速、准确的检测方法亟需建立。

利用 PCR 检测多主棒孢的研究报道较少。Qi 等基于 ITS 序列建立橡胶多主棒孢检测方法, 用于鉴定中国云南省和海南省的橡胶多主棒孢, 普通 PCR 灵敏度为 16.8 pg, 巢式 PCR 灵敏度为 168 fg (Qi et al., 2007, 2009), 但多主棒孢是一个高度变异的群体, 不同寄主间差异较大 (李宝聚 等, 2012), 该方法是否适用于黄瓜棒孢叶斑病菌有待验证; 王伟青等基于 ITS 序列设计的黄瓜棒孢叶斑病菌 PCR 检测方法仅采用黄瓜黑星病菌、灰霉病菌和木霉 3 种对照菌株进行特异性验证 (王伟青 等, 2013), 未能将黄瓜棒孢叶斑病菌与黄瓜霜霉病菌、炭疽病菌、细菌性角斑病菌加以区分。多主棒孢肌动蛋白 (*Actin*) 基因具有高度保守性, 已被应用于多主棒孢系统发育分析, 遗传类群划分, 遗传多样性等研究中。本研究依据黄瓜棒孢叶斑病菌与棒孢属下女贞棒孢、威尔士棒孢和其他常见病原真菌 *Actin* 序列差异设计特异性引物, 得到的引物 Caa5F/Caa5R 特异性强, 在 25 株对照菌株中仅对黄瓜棒孢叶斑病菌扩增出 160 bp 的条带, 可将其与黄瓜霜霉病菌、炭疽病菌、细菌性角斑病菌等病原菌直接区分。利用该方法对黄瓜棒孢叶斑病菌的检测下限为 4 pg, 灵敏度较高。对人工模拟温室条件下的发病植株总 DNA 进行 PCR 检测, 可检测出发病叶片组织中的黄瓜棒孢叶斑病菌, 同时植株叶片组织 DNA 无扩增条带, 检测方法不受寄主 DNA 的干扰, 可以用于黄瓜棒孢叶斑病菌的快速诊断。

本研究对黄瓜棒孢叶斑病菌 *Actin* 基因序列与棒孢属下女贞棒孢、威尔士棒孢和其他常见病原真菌 *Actin* 序列进行比较分析并设计其特异性引物 Caa5F/Caa5R, 建立了黄瓜棒孢叶斑病菌的 PCR

检测方法。该方法灵敏性较高,且同时可应用于发病植株中黄瓜棒孢叶斑病菌的快速检测。但普通 PCR 检测方法只能对病原菌进行定性检测,尚不能对其进行定量检测。实时荧光定量 PCR 方法已广泛应用于植物病原真细菌的检测,利用实时荧光定量 PCR 方法对黄瓜棒孢叶斑病菌进行定量检测将成为今后的研究方向。

References

- Atan S, Hamid N H. 2003. Differentiating races of *Corynespora cassiicola* using RAPD and internal transcribed spacer markers. *Journal of Rubber Research*, 6: 58 - 64.
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. 1994. *Current protocols in molecular biology*. New York City, NY: John Wiley & Sons Inc.
- Cen Zhe-xin, Li Bao-ju, Shi Yan-xia, Huang Hai-yang, Liu Jun, Liao Ning-fang, Feng Jie. 2007. Advances in research of genes responsible for carotenoid biosynthesis in citrus. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (6): 1425 - 1430. (in Chinese)
- 岑喆鑫, 李宝聚, 石延霞, 黄海洋, 刘 君, 廖宁放, 冯 洁. 2007. 基于彩色图像颜色统计特征的黄瓜炭疽病和褐斑病的识别研究. *园艺学报*, 34 (6): 1425 - 1430.
- Date H, Kataoka E, Tanina K, Sasaki S, Inoue K, Nasu H, Kasuyama S. 2004. Sensitivity of *Corynespora cassiicola*, causal agent of *Corynespora* leaf spot of cucumber, to thiophanate-methyl, diethofencarb and azoxystrobin. *Japanese Journal of Phytopathology*, 70 (1): 10 - 13.
- Dixon L J, Schlub R L, Pernezny K, Datnoff L E. 2009. Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, 99 (9): 1015 - 1027.
- Lamotte F D, Duviau M P, Sanier C, Thai R, Poncet J, Bieysse D, Breton F, Pujade-Renaud V. 2007. Purification and characterization of cassiicolin, the toxin produced by *Corynespora cassiicola*, causal agent of the leaf fall disease of rubber tree. *Journal of Chromatography B*, 849: 357 - 362.
- Li Bao-ju, Gao Wei, Shi Yan-xia, Xie Xue-wen. 2012. Progress in researchs on *Corynespora* leaf spot. *Acta Phytophylacica Sinica*, 39 (2): 172 - 176. (in Chinese)
- 李宝聚, 高 伟, 石延霞, 谢学文. 2012. 多主棒孢和棒孢叶斑病的研究进展. *植物保护学报*, 39 (2): 172 - 176.
- Nghia N A, Kadir J, Sunderasan E, Mohd, Abdullah P, Malik A, Napis S. 2008. Morphological and Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. *Mycopathologia*, 166: 189 - 201.
- Pernezny K, Datnoff L E, Mueller T, Collins J. 1996. Losses in fresh-market tomato production in Florida due to target spot and bacterial spot and the benefits of protectant fungicides. *Plant Disease*, 80: 559 - 563.
- Qi Y X, Xie Y, Zhang X, Pu J J, Zhang H Q, Huang S L, Zhang H. 2009. Molecular and pathogenic variation identified among isolates of *Corynespora cassiicola*. *Molecular Biotechnology*, 41: 145 - 151.
- Qi Y X, Zhang X, Pu J J, Xie Y X, Zhang H Q, Hung S L, Zhang H. 2007. Detection of *Corynespora cassiicola* in Hevea rubber tree from China. *Australasian Plant Disease Notes*, 2: 153 - 155.
- Shimomoto Y, Satoc T, Hojod H, Moritab Y, Takeuchib S, Mizumotoa H, Kibaa A, Hikich Y. 2011. Pathogenic and genetic variation among isolates of *Corynespora cassiicola* in Japan. *Plant Pathology*, 60: 253 - 260.
- Sunderasan E, Rusni A, Kadir, Pujade-Renaud V, Lamotte F D, Yeang H Y, Nathan S. 2009. Single-chain variable fragments antibody specific to *Corynespora cassiicola* toxin, cassiicolin, reduces necrotic lesion formation in *Hevea brasiliensis*. *Journal of General Plant Pathology*, 75: 19 - 26.
- Wang Wei-qing, Yue Jin, Dong Jie. 2013. Molecular detection of *Corynespora cassiicola* in cucumber seed by PCR. *China Plant Protection*, 8: 13 - 17. (in Chinese)
- 王伟青, 岳 瑾, 董 杰. 2013. 黄瓜棒孢叶斑病种子带菌 PCR 分子检测. *中国植保导刊*, 8: 13 - 17.