

番茄白粉菌的 PCR 分子检测

王文静¹, 李成伟^{1,2*}

(1. 商丘师范学院 生命科学系 植物与微生物互作重点实验室, 河南 商丘 476000;

2. 周口师范学院 生命科学系 植物遗传与分子育种重点实验室, 河南 周口 466001)

摘要: 根据番茄白粉菌核糖体 DNA 的 ITS (internal transcribed spacer) 序列的特异性, 设计 2 对引物 OidF1/R1、OidF2/R2, 对番茄白粉菌进行了 PCR 特异性扩增试验。结果表明: 2 对引物都可以从番茄白粉菌基因组 DNA 中扩增出 350 bp 左右的特异性扩增产物, 并具有专一性, 只在白粉菌和接种感病组织 DNA 中有扩增条带, 而番茄早疫病菌、叶霉菌以及健康组织 DNA 中均无特异性扩增片段; 引物具有高度的灵敏度, 可以检测含有 1 ng 的番茄白粉菌 DNA。由此证明, 该方法可快速、准确和灵敏地鉴定和检测番茄白粉病的发生。

关键词: 番茄白粉菌; PCR; 分子检测

中图分类号: S436.412.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2010)05-0072-04

PCR Detection of *Oidium neolycopersici*

WANG Wen-jing¹, LI Cheng-wei^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Plant-microbe Interactions, Department of Life Science, Shangqiu Normal University,

Shangqiu 476000, China; 2. Key Laboratory of Plant Genetics and Breeding, Department of Life Science,

Zhoukou Normal University, Zhoukou 466001, China)

Abstract: Based on the internal transcribed spacer (ITS) sequence difference between *Oidium neolycopersici* and other tomato fungal pathogens, two primer pairs (OidF1/R1, OidF2/R2) were designed to detect the fungal pathogen, tomato powdery mildew. For both pairs, specific bands around 350 bp were amplified respectively using genomic DNA extracted from *O. neolycopersici*, inoculated tomato leaf while no PCR product was amplified with DNA from other fungi inoculated and noninoculated tomato leaves. As low as 1 ng of *O. neolycopersici* genomic DNA can be detected by both specific primer pairs. This protocol provides a rapid, reliable and sensitive tool for detection and identification of *O. neolycopersici*.

Key words: *Oidium neolycopersici*; PCR; Molecular detection

番茄白粉病是一种专性寄生真菌性病害, 20 世纪 80 年代首次在欧洲发现该病^[1], 目前, 在我国河南、黑龙江、云南、辽宁、台湾和新疆等地都有发生^[2]。据报道, 引起该病的病原菌为番茄白粉菌 (*Oidium neolycopersici*), 栽培品种对其具有很强的易感性^[3]。20 世纪 90 年代在欧洲大发生, 造成

巨大的经济损失。近些年, 随着我国温室蔬菜的增多, 番茄白粉病在我国的番茄生产中有逐年加重趋势, 一般年份发病在 5%~15%, 严重地块达 80%~100%^[4], 已经成为无公害蔬菜的大敌。

传统病原菌检测鉴定主要是依据症状、形态、生理生化反应和血清学等方法。这些方法耗时费力,

收稿日期: 2009-12-10

基金项目: 国家自然科学基金(30600413); 教育部科学技术研究重点项目(207064); 河南高校杰出人才科研创新工程项目(2007K Y CX 017); 留学回国人员科研启动基金(教外司留[2007] 1108 号)资助

作者简介: 王文静(1983-), 女, 河南商丘人, 助教, 硕士, 主要从事分子植物病原体互作研究。E-mail: wangwenjingsq@sohu.com

*通讯作者: 李成伟(1972-), 男, 河南民权人, 教授, 博士, 主要从事分子植物病原体互作和分子育种研究。

且稳定性不高,不能直接从植物组织中检测出病原菌,因此,难以实现对病害的及时检测和有效控制,导致病原菌的传播和病害流行。近年来,随着分子生物学技术的快速发展以及计算机辅助分析技术的诞生,使细菌的快速检测成为可能。目前常用的检测方法主要有 RAPD、RFLP、ap-PCR、rDNA 序列分析和特异性引物的 PCR 检测等^[5,6]。真菌的 ITS 序列是核糖体 DNA 上的一个非编码区域,受外界环境因素的影响较小,进化速度快,因而可以提供较为丰富的信息位点。利用真菌 rDNA-ITS 序列在属、种水平上的差异,设计特异性引物,进行植物病害的诊断和病原菌的鉴定、检测,已经成为国际上广泛使用的分子生物学方法^[7]。本研究通过比对番茄白粉菌与其他番茄常见真菌病害的 ITS 全序列,找出可用于检测番茄白粉菌的特异性引物,开发能够用于番茄组织中白粉菌的分子检测技术,以利于及早有效地对其采取防治措施。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料番茄白粉菌(*O. neolycopersici*)、番茄叶霉菌(*Cladosporium fulvum*)、番茄早疫病菌(*Alternaria solani*)菌株均采自商丘师范学院温室,由实验室保存。番茄感病材料 Moneymaker 由商丘师范学院生命科学系植物与微生物互作重点实验室提供。

1.2 供试材料 DNA 提取

番茄白粉菌、番茄叶霉菌分别在温室用感病材料繁殖,采用 CTAB 法提取 DNA,方法如下:收取孢子于蒸馏水中,石英砂破碎病菌,加 5 倍体积的 2%CTAB 缓冲液,混匀。58℃水浴 1 h 后加等体积的氯仿:异戊醇(24:1)溶液,混匀,10 000 r/min 离心 10 min;取上清,加 1/10 体积的质量浓度为 100 g/L 的 CTAB,0.7 mol/L 的 NaCl,摇匀后加等体积的氯仿:异戊醇(24:1)溶液,10 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加入等体积的异丙醇,−20℃放置 30 min 后,12 000 r/min 离心 15 min;去上清,倒置片刻,加入 1 mL 70%酒精洗涤沉淀 2 次,充分干燥后溶于 30 μL 无菌去离子水中,−20℃保存。番茄早疫病菌分离纯化后接种于 PDA 培养基中培养,收集菌丝,同样采取 CTAB 法提取病菌 DNA。番茄材料基因组 DNA 提取也采用 CTAB 法。

1.3 特异性引物的设计

根据已报道的商丘地区番茄白粉病菌的 ITS

序列^[8,9](GenBank 登录号为 EU828521),通过应用 DNA star 分析软件中的 ClustalW 比对其与其他番茄真菌病害的 ITS 序列,设计特异性引物。

1.4 引物特异性验证

以真菌 ITS 序列通用 ITS1 (5′-TCCGTAGGT-GAACCTGCGC-3′)和 ITS4 (5′-TCCTCCGCTTATT-GATATGC-3′)对所有供试材料提取的 DNA 进行 PCR 扩增。反应体系 20 μL: 2 μL 10× buffer, 2 μL dNTP mixture, 1 μL 引物, 1 μL 模板 DNA, 0.5 μL Taq 酶。PCR 程序: 94℃ 5 min; 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

以特异性的引物对所有供试材料提取的 DNA 进行 PCR 扩增。反应体系同上。扩增产物在含有 1.0% 琼脂糖的凝胶上进行电泳,上样量为 5 μL 产物加 1 μL Loading buffer,电压 4 V/cm,EB 染色后通过凝胶成像仪 CLIN X 观察结果。

1.5 特异性引物灵敏度检测

采用核酸蛋白分析仪测定所提取的番茄白粉菌基因组 DNA 浓度,并以 10 倍浓度系列稀释法将提取 DNA 稀释成 100~0.1 ng/μL,用特异性引物,按照 1.4 的反应体系和程序进行 PCR 扩增,反应完成后,电泳检测。

1.6 发病叶片中白粉菌的分子检测

对健康的番茄植株进行白粉菌孢子接种,发病后采集叶片提取 DNA (方法同 1.2),并采集健康叶片同样提取基因组 DNA。利用设计合成的引物对感病叶片和健康叶片 DNA 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系与反应程序同 1.4。反应完成后,电泳检测。

2 结果与分析

2.1 ITS 序列的特异性引物

根据序列比对结果进行分析,设计了对番茄白粉菌具有特异性的 2 对引物,其序列分别为: OidF1: 5′-CAGAGCGTGAGGCTCAGTCGTGGCG-3′和 OidR1: 5′-CGCGACGGGCCCCAACACCGCAACC-3′; OidF2: 5′-AGAGCGTGAGGCTCAGTCGT-3′和 OidR2: 5′-CAACGCGACGGGCCCCAACA-3′,目的条带大约为 350 bp。

2.2 通用引物对番茄白粉菌的特异性 PCR 扩增结果

以番茄白粉菌基因组 DNA 为模板,用通用引物 ITS1/4 进行 PCR 扩增,得到大小为 600 bp 左右的片段(图 1)。以特异性引物 OidF1/R1、OidF2/

R2 对白粉菌 DNA 进行扩增, 结果显示: 2 对引物均

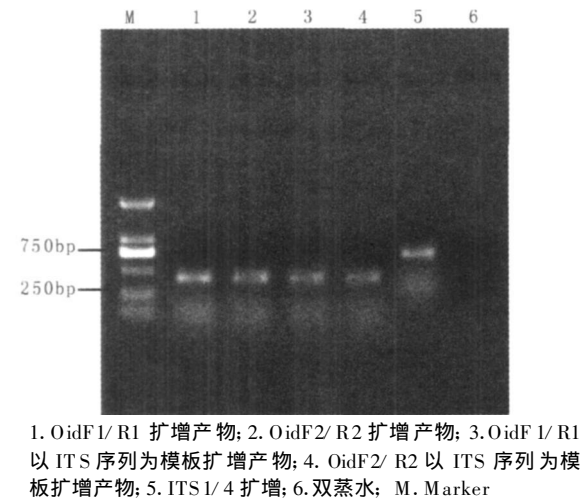
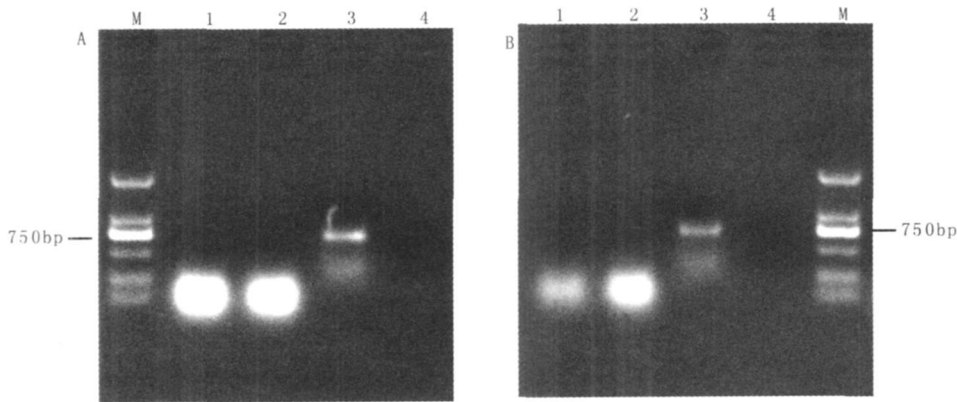


图 1 引物对白粉菌的 PCR 扩增结果

从番茄白粉菌中扩增出大小为 350bp 左右的特异性片段, 与预计结果一致, 且二者扩增的量没有明显差别(图 2)。进一步以通用引物进行 PCR 扩增的产物为模板, 分别以特异性引物进行套式 PCR 扩增。结果显示, 套式 PCR 产物大小与单独进行特异性引物扩增的 PCR 产物相比大小一致, 证实所设计引物扩增结果是 ITS 序列的特异性扩增。

2.3 通用引物对不同种属病菌的特异性 PCR 扩增结果

以提取的番茄早疫病病菌、叶霉菌基因组 DNA 作为模板, 用通用引物 ITS1/4 进行 PCR 扩增, 均可扩增出目的片段, 证明所提取的 DNA 符合扩增要求, 而所设计的特异性引物对其均无特异性扩增, 结果表明该引物具有种的特异性 (图 2)。



A. 番茄早疫病病菌; B. 番茄叶霉菌; 1. OidF1/R1 扩增结果; 2. OidF2/R2 扩增结果; 3. ITS1/4 扩增结果; 4. 双蒸水; M. Marker

图 2 引物对不同供试真菌的扩增结果

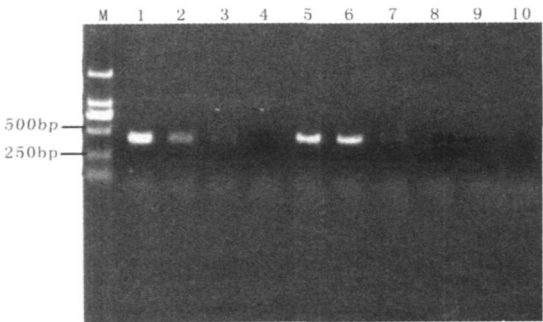
2.4 引物 PCR 扩增的灵敏度

将白粉菌基因组 DNA 定量, 并从 100 ng/ μ L 开始, 逐步按 10 倍的数量级向下稀释, 从每一个样品中取 1 μ L 为模板, 进行体系的灵敏度检测试验。结果显示: 20 μ L 的反应体系中含有 1 ng 的基因组 DNA 时, 引物 OidF1/R1、OidF2/R2 仍可以扩增到 350 bp 左右的特异性条带。进一步以寄主基因组 DNA 为模板进行扩增, 并无扩增条带出现 (图 3)。这说明本方法可以检测到 1 ng 的目标基因组 DNA, 灵敏度较高, 而且不受寄主 DNA 的干扰, 可用于白粉菌的分子检测。

2.5 发病组织中病菌的分子检测结果

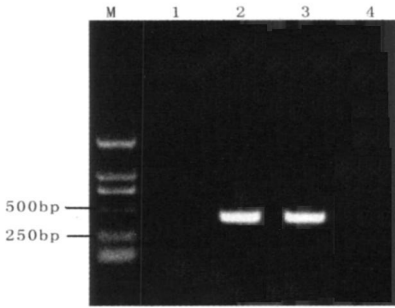
用特异性引物对健康和接种发病的番茄叶片组织的总 DNA 进行 PCR 扩增, 均能从接种发病的叶片组织总 DNA 中扩增出一条 350 bp 左右的特异性

条带, 而健康组织的总 DNA 中无 PCR 产物(图 4)。说明 2 对引物均能特异地检测到发病组织中 *O. neolycopersici* 的 DNA。



1—4. 引物 OidF1/R1 扩增产物, 模板浓度分别为 100、10、1、0.1 ng/ μ L; 5—8. 引物 OidF2/R2 扩增产物, 模板浓度分别为 100、10、1、0.1 ng/ μ L; 9. 番茄基因组 DNA 扩增结果; 10. 双蒸水; M. Marker

图 3 引物灵敏度检测结果



1. 健康组织 OidF1/ R1 扩增结果; 2. 发病组织 OidF1/ R1 扩增结果; 3. 发病组织 OidF2/ R2 扩增结果; 4. 健康组织 OidF2/ R2 扩增结果

图 4 番茄组织总 DNA 的 PCR 扩增结果

3 讨论

真菌核糖体 DNA 的 ITS 序列在种内具有高度保守性, 又在属间以及种间存在丰富的多态性, 利用这些特性进行 PCR 扩增, 不仅能对病原真菌的纯培养物进行分类鉴定和病菌监测, 而且对病原菌所致的真菌病害的感病组织和土壤中病原真菌的孢子检测也能达到很好的效果, 目前已经在植物病害的研究中得到越来越多的应用。相对于传统检测方法, 该方法具有高灵敏性、快速、准确、简便等优点。根据 ITS 序列差异设计特异性引物在种的鉴定中已经有了很多应用。Zhang 等^[10] 设计出西瓜枯萎病菌、西瓜蔓枯病菌的特异性引物; 邢红梅等^[11] 以 ITS 序列设计合成的引物对红掌炭疽菌进行有效的分子鉴定和分子检测, 并有着较高的检测灵敏度, 使引物能从土壤中、感病组织中以及携带病原菌的灌溉水直接检测到炭疽菌; 易建平等^[12] 结合线粒体 DNA 和核糖体 DNA ITS 序列设计的特异性引物对小麦腥黑穗病进行了检测。

本研究根据已发表的商丘地区番茄白粉菌 ITS 序列^[8-9] 与常见的几种番茄病原真菌 rDNA-ITS 区序列进行比对, 设计出对番茄白粉病基因组 DNA 有高度特异性的引物 OidF1/R1 和 OidF2/R2, 对番茄白粉菌 DNA 进行扩增, 2 对引物 OidF1/R1 和 OidF2/R2 都可以从番茄白粉菌 DNA 中扩增出 350 bp 左右的特异性扩增产物。其灵敏度较高, 可以达到 1 ng。用该 2 对引物对接种后的感病叶片提取的 DNA 扩增, 均得到特异性片段, 满足对白粉菌进行分子检测的要求。另外, 由于番茄白粉菌为寄主专化型, 只侵染番茄, 而同其他专化型如小麦白粉菌、黄瓜白粉菌等不相互侵染, 而本研究的目的是为了检测番茄材料中的白粉菌, 所以在测定引物的特异性试验材料中, 未使用其他专化型白粉菌, 而是采用

经常与白粉菌同时发病, 并在早期发病症状较为相似的番茄叶霉菌和番茄早疫病, 结果表明, 利用特异性引物只能从白粉菌和发病组织中扩增出特异性条带, 而其他病菌和健康组织都没有特异条带产生, 该引物可用于番茄白粉菌的病原菌检测。但由于 PCR 技术自身的限制, 本试验结果只能对病原菌进行定性检测, 而不能进行定量测定, 如果将该引物结合荧光定量 PCR 技术, 则可以通过测定反应体系中的 DNA 含量而准确测定感病组织的病原菌含量, 使病菌的检测更加准确^[13, 14]。

参考文献:

- [1] Spencer D M. The powdery mildews[M]. New York: Academic Press, 1978: 359-379.
- [2] 王世喜, 赵博虎, 金辉, 等. 番茄白粉病的发生与防治[J]. 植物保护, 1993, 19(5): 50.
- [3] Li C W. Transcriptional, microscopic and macroscopic investigations into monogenic and polygenic interactions of tomato and powdery mildew[D]. Wageningen: Wageningen University, 2005.
- [4] 王媛媛, 陈立杰, 段玉玺, 等. 沈阳地区温室番茄发生白粉病[J]. 植物保护, 2004, 30(5): 91.
- [5] 年四季, 殷幼平, 袁青, 等. 小麦矮腥黑穗菌差异片段筛选与分子检测体系的建立[J]. 微生物学报, 2007, 47(4): 725-728.
- [6] Gardes M, Bruns T D. ITS-RFLP matching for identification of fungi[M]. Totowa, New Jersey: Humana Press, 1996.
- [7] Bonants P, Weerd M H, Lacourt I. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* by the polymerase chain reaction[J]. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103: 345-355.
- [8] Li C W, Pei D L, Wang W J, et al. First report of powdery mildew caused by *Oidium neolycopersici* on tomato in China[J]. Plant Disease, 2008, 92(9): 1370.
- [9] 王文静, 裴冬丽, 马原松, 等. 商丘地区番茄白粉菌的鉴定[J]. 河南大学学报: 自然科学版, 2009, 39(5): 505-508.
- [10] Zhang Z G, Zhang J Y, Wang Y C. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 249: 39-47.
- [11] 邢红梅, 丁平, 周晓云, 等. 红掌炭疽菌的分子检测[J]. 植物病理学报, 2008, 38(2): 113-119.
- [12] 易建平, 沈禹飞. PCR 技术在印度腥黑穗病菌检测和鉴定中的应用[J]. 上海农业学报, 2002, 18(2): 57-61.
- [13] 漆艳香, 赵文军, 朱水芳, 等. 苜蓿萎蔫病菌 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法的建立[J]. 植物检疫, 2003, 17(5): 260-264.
- [14] Mavrodieva V, Levy L, Gabriel D W. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples[J]. Phytopathology, 2004, 94: 61-68.