

葡萄拟尾孢菌 PCR 检测方法的建立

Development of a PCR detection method for leaf spot pathogen *Pseudocercospora vitis*

雷翠云 娄兵海* 宋雅琴 陈爱军 何建军 刘 萍

(广西特色作物研究院, 广西柑橘生物学重点实验室, 桂林 541004)

Lei Cuiyun Lou Binghai* Song Yaqin Chen Aijun He Jianjun Liu Ping

(Guangxi Key Laboratory of Citrus Biology, Guangxi Academy of Specialty Crops, Guilin 541004, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China)

葡萄褐斑病又称叶斑病,是葡萄生产上的一种常见病害,根据病斑大小和病原物不同分为大褐斑病和小褐斑病。我国各地报道的葡萄褐斑病主要以大褐斑病为主,其病原为葡萄拟尾孢菌 *Pseudocercospora vitis* (梁春浩等,2009),主要为害葡萄叶片,可造成叶片早期脱落,光合作用下降。目前该病的鉴别主要通过技术人员实地观察,主观性强,传统的病原分离培养和鉴定虽然结果准确,但需较长时间。分子检测方法具有灵敏度高、特异性强、速度快等特点(王娜等,2004),但在该病的鉴定上尚未见相关应用报道。尽管目前葡萄拟尾孢菌尚未完成全基因组测序,但该菌的 RNA 聚合酶基因序列已公布(GenBank 登录号 KX348076)。因此,本研究拟建立一种锚定葡萄拟尾孢菌 RNA 聚合酶基因的 PCR 检测方法,以期对葡萄褐斑病的快速准确鉴定提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品:2017年12月从广西壮族自治区兴安县溶江镇莲塘村葡萄园中的巨峰和夏黑葡萄植株上采集感染褐斑病的样品,每株采8片发病叶为1份样品,每个品种采集10份样品。葡萄霜霉病菌 *Plasmopara viticola*、葡萄溃疡病菌 *Neofusicoccum parvum*、葡萄白粉病菌 *Uncinula necator*、葡萄灰霉病菌 *Botrytis cinerea*、葡萄枝枯病菌 *Pestalotia menezesi* 及葡萄炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 六种病菌均由本实验室提供;葡萄皮尔斯病菌 *Xylella fastidiosa* 由美国农业部农业研究服务署 Xiangyang Shi 博士提供。

试剂:多糖多酚 DNA 提取试剂盒、真菌 DNA 提

取试剂盒,北京华越洋生物科技有限公司;常规 PCR 试剂,日本 TaKaRa 公司;琼脂糖凝胶回收试剂盒,德国 Qiagen 公司。

仪器:S1000 型 PCR 仪和 GEL DOC XR 凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司;Lambda 35 紫外可见分光光度计,美国 PE 公司。

1.2 方法

DNA 的提取:切取供试葡萄叶片样品病健交界组织放入液氮中研磨成粉末,称取 50 mg 使用多糖多酚 DNA 提取试剂盒提取总 DNA;葡萄皮尔斯病菌 DNA 的提取参照娄兵海等(2014)方法;其余 6 种葡萄真菌 DNA 的提取使用真菌 DNA 提取试剂盒,各称取 50 mg 菌丝于 1.5 mL 离心管中加液氮研磨成粉末供测,其余步骤参照试剂盒说明书进行。均用紫外分光光度计对提取的总 DNA 浓度进行测定,并调节总 DNA 浓度至 100 ng/μL。

PCR 体系的建立和克隆测序:根据 GenBank 中葡萄拟尾孢菌 RNA 聚合酶基因序列,运用 Primer-BLAST 软件设计特异性引物对 PV-4F (5'-CGCCTGGATCTCCGCTTATT-3')/PV-4R (5'-TCTCTGGCTTCTGCTGGTTG-3'),扩增目的片段为 550 bp,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。25 μL PCR 反应体系:2.5 mmol/L dNTP Mixture 2 μL、10× PCR Buffer (含 15 mmol/L MgCl₂) 2.5 μL、5 μmol/L 上下游引物各 1 μL、5 U/μL 热启动 Taq DNA 聚合酶 0.2 μL、DNA 1 μL、ddH₂O 17.3 μL。反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 45 s,56℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min;并设健康葡萄植株 DNA 阴性对照和清水对照。采用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化回收目标 DNA 片段并进行克隆,从

阳性重组质粒中挑选3个样品送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。测序所得序列用Bioedit 7.1 软件编辑获得一致性序列,并进行BLASTn 比对。

引物特异性验证:将提取的巨峰和夏黑葡萄病样DNA 以及其它7种葡萄病原菌的DNA 用本研究建立的PCR 方法进行扩增,以检验该方法的特异性。以本课题组前期预试验中测序确定的葡萄拟尾孢菌为阳性对照,并设健康葡萄植株DNA 阴性对照和清水对照。

2 结果与分析

2.1 葡萄拟尾孢菌检测体系的建立及扩增效果分析

感褐斑病葡萄样品DNA 提取物在PCR 扩增后

出现550 bp 的目的条带,将目的片段纯化回收,克隆测序后获得550 bp 的核苷酸序列(GenBank 登录号MH620824),BLASTn 比对结果显示,所得序列与NCBI 数据库中多个葡萄拟尾孢菌株系的RNA 聚合酶基因序列具有最高同源性,达100%。说明本研究建立的PCR 方法可用于葡萄拟尾孢菌的检测。

2.2 葡萄拟尾孢菌PCR 检测方法的特异性验证

巨峰和夏黑葡萄病样以及阳性对照均扩增出了550 bp 的特异性目的条带,而葡萄霜霉病菌、葡萄溃疡病菌、葡萄白粉病菌、葡萄灰霉病菌、葡萄枝枯病菌、葡萄炭疽病菌和葡萄皮尔斯病菌的DNA 和阴性对照及清水对照均未扩增到目的条带(图1),说明所建方法可以特异性检测葡萄拟尾孢菌。

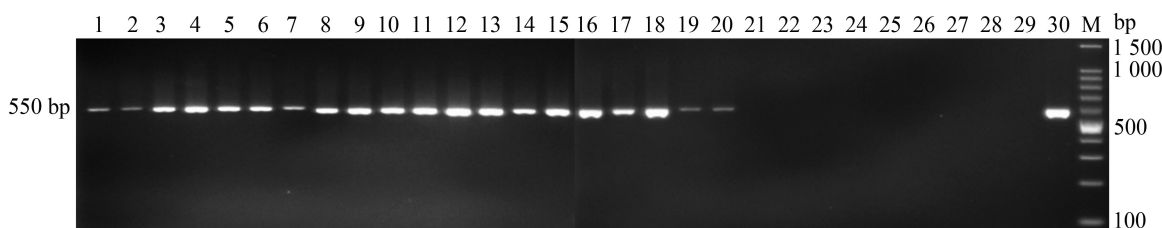


图1 葡萄拟尾孢菌PCR 检测方法的特异性验证

Fig. 1 Evaluation of the specificity of the PCR detection method for *Pseudocercospora vitis*

M: DNA ladder. 1~10: 感褐斑病巨峰葡萄样品; 11~20: 感褐斑病夏黑葡萄样品; 21~27: 葡萄霜霉病菌、葡萄溃疡病菌、葡萄白粉病菌、葡萄灰霉病菌、葡萄枝枯病菌、葡萄炭疽病菌和葡萄皮尔斯病菌; 28: 阴性对照; 29: 清水对照; 30: 阳性对照。
1~10: Samples of Kyoho grape infected by *P. vitis*; 11~20: samples of Summer Black grape infected by *P. vitis*; 21~27: *Plasmopara viticola*, *Neofusicoccum parvum*, *Uncinula necator*, *Botrytis cinerea*, *Pestalotia menezesiana*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Xylella fastidiosa*; 28: negative control; 29: water control; 30: positive control.

3 讨论

葡萄褐斑病多发生于高温、高湿的环境中,一般于6月开始发生,7—8月进入发病盛期(果实采收期),在一年一收栽培模式下通常不会造成重大经济损失,因此并未得到足够重视。近年来,台湾、广西、广东、海南和福建等省区陆续推广葡萄一年两收技术,如果一造果采收后暴发褐斑病,将直接影响二造果的产量和质量,严重时甚至造成二造果毁产(刘鑫铭等,2016),因此及早对葡萄褐斑病进行鉴别和控制尤为重要。相比传统的病原学检测和鉴定方法,PCR 方法具有快速、灵敏和准确的优点,本研究建立的葡萄拟尾孢菌PCR 方法对巨峰和夏黑葡萄褐斑病样品的检测结果均为阳性,而对其它7种葡萄病原菌的检测结果均为阴性,表明该方法可用于葡萄拟尾孢菌的特异性检测,对葡萄褐斑病的及时防治具有重要意义,有利于葡萄一年两收技术的推广。

参考文献 (References)

Liang CH, Liu CY, Miao ZY, Huang YQ, Zhao KH. 2009. Biological

activity of several fungicides and mixtures against grape leaf spot. *Agrochemicals*, 48(1): 66–68 (in Chinese) [梁春浩, 刘长远, 苗则彦, 黄玉茜, 赵奎华. 2009. 几种杀菌剂及混剂对葡萄褐斑病的生物活性测定. *农药*, 48(1): 66–68]

Liu XM, Chen T, Lei Y, Wang JC, Cai SH. 2016. Research progress on two-year cultivation techniques of grapes. *Sino-Overseas Grapevine & Wine*, (5): 131–134 (in Chinese) [刘鑫铭, 陈婷, 雷龔, 王建超, 蔡胜华. 2016. 葡萄一年两收栽培技术研究进展. *中外葡萄与葡萄酒*, (5): 131–134]

Lou BH, Song YQ, Zhao XL, Bai XJ, Deng CL. 2014. Quantitative distribution of *Candidatus Liberibacter asiaticus* in flowers and seeds of Shatian pummelo and its applications. *Journal of Plant Protection*, 41(4): 447–452 (in Chinese) [娄兵海, 宋雅琴, 赵小龙, 白先进, 邓崇岭. 2014. 柑橘花器和种子中黄龙病菌的定量分布及应用. *植物保护学报*, 41(4): 447–452]

Wang N, Ma YJ, Wang ZZ, Dai GH. 2004. The application of PCR to the detection of plant diseases (review). *Acta Agriculturae Shanghai*, 20(4): 112–115 (in Chinese) [王娜, 马雅军, 王喆之, 代光辉. 2004. PCR 相关技术方法在植物病害检测中的应用(综述). *上海农业学报*, 20(4): 112–115]

(责任编辑:李美娟)