

# 番茄煤污假尾孢叶斑病菌实时荧光定量PCR检测技术的建立及应用

康华军<sup>1</sup> 柴阿丽<sup>1\*</sup> 石延霞<sup>1</sup> 谢学文<sup>1</sup> 郭建光<sup>2</sup> 李宝聚<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 山西省运城市盐湖区蔬菜发展中心, 运城 044000)

**摘要:** 为快速、准确地对番茄煤污假尾孢 *Pseudocercospora fuligena* 进行检测与定量分析, 基于其 *Avr4* 基因设计特异性引物 JWB-9F/JWB-7R, 建立实时荧光定量PCR检测技术, 分析该检测技术的特异性和灵敏度, 并利用采集自重庆市、河北省和广西壮族自治区的14份材料对该检测技术的应用效果进行验证。结果表明, 引物 JWB-9F/JWB-7R 仅可从番茄煤污假尾孢基因组DNA中扩增出232 bp的目的片段, 特异性良好; 实时荧光定量PCR检测技术的灵敏度为67.09 copies/ $\mu$ L, 是普通PCR检测技术的1 000倍。且该实时荧光定量PCR检测技术可以实现未显症样本中番茄煤污假尾孢的定量检测, 检测限为  $6.02 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L, 实际应用效果较好。表明所建立的实时荧光定量PCR检测技术可用于番茄煤污假尾孢叶斑病的早期诊断和预测预报。

**关键词:** 煤污假尾孢; *Avr4*; 实时荧光定量PCR; 检测

## Establishment and application of real-time quantitative PCR assay for detection of fungal pathogen *Pseudocercospora fuligena* in tomato

Kang Huajun<sup>1</sup> Chai Ali<sup>1\*</sup> Shi Yanxia<sup>1</sup> Xie Xuwen<sup>1</sup> Guo Jianguang<sup>2</sup> Li Baoju<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. Vegetable Development Center of Yanhu District, Yuncheng 044000, Shanxi Province, China)

**Abstract:** To quickly and accurately detect and quantify *Pseudocercospora fuligena* of tomato, a real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR) method was established. The specific primer set JWB-9F/JWB-7R for qPCR was designed based on *Avr4* gene of *P. fuligena*, the specificity and sensitivity of qPCR method were analyzed, and a total of 14 materials from Chongqing City, Hebei Province, and Guangxi Zhuang Autonomous Region were used to test the practical application of this qPCR method. The results showed that the primer set JWB-9F/JWB-7R could only amplify a specific fragment of 232 bp from the genomic DNA of *P. fuligena* and the limit of detection was 67.09 copies/ $\mu$ L, which was 1 000 times that of conventional PCR. The pathogen could be quantitatively detected from asymptomatic tomato materials by this qPCR method and the detection limit was  $6.02 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L. The results indicated that the qPCR method in this study can be used for early diagnosis and forecast of tomato black leaf spot.

**Key words:** *Pseudocercospora fuligena*; *Avr4*; real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR); detection

煤污假尾孢叶斑病是热带、亚热带地区番茄上一种重要的真菌病害。1938年, Roldan(1938)首次

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0200300), 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-IVFCAAS), 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室开放课题(IVF2017)

\* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: chaiali@caas.cn, libaoju@caas.cn

收稿日期: 2018-12-25

在菲律宾的番茄上发现该病并对其进行了相关描述。此后,在大洋洲(Johnston, 1963)、非洲(Mulder & Holiday, 1975)、北美洲(Blazquez & Alfieri, 1974)、南美洲(Halfeld-Vieira, 2006)的部分番茄品种上均发现了该病。据报道,该病害可导致番茄约32%的产量损失(Hartman & Wang, 1995),造成的落叶率为68%(Mersha & Hau, 2009)。近年来,该病在我国发生较重,已知发病地区包括河南、河北和重庆等省市(张定法等, 2004; 王福妹等, 2006; 杨琦凤等, 2008)。该病病原菌为煤污假尾孢 *Pseudocercospora fuligena*, 主要侵染叶片, 其典型发病症状是在叶片正面产生褪绿斑点、背面着生黑色霉层, 另外该病害易与由褐孢霉 *Passalora fulva* (syn. *Cladosporium fulvum* 和 *Fulvia fulva*) 引起的番茄叶霉病相混淆(Braun et al., 2003; Halfeld-Vieira et al., 2006), 从而导致出现用药不对症的现象。

煤污假尾孢的传统鉴定方法主要是症状观察、形态学鉴定、柯赫氏法则验证(Subedi et al., 2014), 操作过程繁琐、且对鉴定人员的专业知识要求高; 由于煤污假尾孢在培养基上的生长速率缓慢(Thomma et al., 2005), 也导致检测周期偏长。目前, 分子生物学检测方法如PCR技术的应用提高了病原菌的检测效率和准确性, 克服了传统检测方法的不足。采用真菌ITS通用引物对病原菌基因组DNA进行PCR扩增(Saroj et al., 2014), 可实现对煤污假尾孢的准确鉴定, 但是无法精确定量。实时荧光定量PCR (real-time fluorescent quantitative PCR, qPCR) 技术是20世纪90年代发展起来的一项分子生物学检测技术, 是以普通PCR为基础在反应体系中加入了荧光基团, 由荧光信号强度的变化达到监测PCR进程的目的, 通过绘制的标准曲线和 $C_t$ 值即可实现对未知模板DNA的精确定量, 现已广泛应用于基因的定量以及表达研究中。如Harada et al. (2011)研究了康乃馨开花过程中花瓣生长和发育相关基因的表达, 通过qPCR检测技术分析发现4个木葡聚糖内传糖苷酶/水解酶基因 *XTH* 和3个扩展蛋白基因在康乃馨不同器官和不同生育期的表达均存在差异。

目前, 国内外对于煤污假尾孢的研究主要集中于生物学特性(王福妹等, 2006)、病害流行规律(Mersha & Hau, 2009; Mersha et al., 2014a, b)、抗性材料筛选(Wang et al., 1995)以及病害防控(Heine et al., 2011; Taguchi et al., 2012)等方面, 而关于该菌的检测技术还未有相关报道。本研究拟基于煤污假

尾孢 *Avr4* 基因设计特异性引物, 建立和优化qPCR检测技术, 并利用该检测技术探索煤污假尾孢在番茄植株中的数量动态, 以期为该病害的早期诊断、预测预报和有效防治提供理论依据和技术支撑。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试番茄: 品种为中杂105, 种子购自中疏种业科技(北京)有限公司。种子在28℃催芽后播种于穴盘中, 然后置于玻璃温室中, 于28℃常规培养至3~4叶期, 备用。

供试菌株: 3株煤污假尾孢菌株编号为FQ10013003、FQ10010325、FQ09051407, 分别采集自海南省、河北省、广西壮族自治区(简称广西)的番茄上; 其余17种常见蔬菜病原菌分别为菜豆假尾孢 *Ps. cruenta* 菌株JD12020807(从海南省豇豆上分离获得)、灰色假尾孢 *Ps. griseola* 菌株DJ14082815(从云南省豆角上分离获得)、茄生假尾孢 *Ps. solanum-melongenicola* 菌株QZ10110627(从重庆市茄子上分离获得)、褐孢霉菌株FQ12031701和FQ10082910(分别从山东、河北省番茄上分离获得)、球座钉孢 *Pa. personata* 菌株HS12091202(从北京市花生上分离获得)、核果钉孢 *Pa. circumscissa* 菌株YT11101416(从北京市樱桃上分离获得)、茄链格孢 *Alternaria solani* 菌株JGFQ15080702(从新疆维吾尔自治区加工番茄上分离获得)、链格孢 *A. alternata* 菌株JG-FQ15080469(从新疆维吾尔自治区加工番茄上分离获得)、致病疫霉 *Phytophthora infestans* 菌株FQ09092001(从甘肃省番茄上分离获得)、立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 菌株FQ120513110(从西藏自治区番茄上分离获得)、灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 菌株FQ17041203(从山东省番茄上分离获得)、多主棒孢 *Corynespora cassicola* 菌株FQ15062302(从湖北省番茄上分离获得)、茄匍柄霉 *Stemphylium solani* 菌株FQ14111912(从北京市番茄上分离获得)、辣椒疫霉 *Ph. capsici* 菌株LJ13032802(从北京市辣椒上分离获得)、茄病镰孢 *Fusarium solani* 菌株FQ17102628(从河北省番茄上分离获得)、尖孢镰孢 *F. oxysporum* 菌株FQ15051401(从山东省番茄上分离获得)、核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* 菌株FQ17031401(从浙江省番茄上分离获得)。

培养基: 马铃薯葡萄糖(potato dextrose, PD)培养液: 马铃薯200g、葡萄糖20g、蒸馏水1L; 马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基: 马

铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 L; 麦芽浸膏琼脂(malt extract agar, MEA)培养基: 麦芽提取物 30 g、蛋白胨 4 g、葡萄糖 20 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 L; LB(Luria-Bertani)培养基: 胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 L; V8 汁液培养基: V8 蔬菜汁 200 mL、碳酸钙 3 g、琼脂 20 g、蒸馏水 1 L。

试剂: 2×*Taq* PCR Master Mix、BM 5000 DNA Marker, 北京博迈德基因技术有限公司; 2×Super Real PreMix Plus、50×ROX Reference Dye、RNase-free ddH<sub>2</sub>O、植物基因组 DNA 提取试剂盒, 北京天根生化科技有限公司; pEASY-T1 载体、*Easy Pure* Quick Gel Extraction Kit、*Easy Pure*<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit、大肠杆菌 *Escherichia coli* Trans-T1 感受态细胞, 北京全式金生物技术有限公司; 其余试剂均为国产或进口分析纯。

仪器: 3-18K 型高速离心机, 德国 Sigma 公司; Spectrophotometers 分光光度计, 美国 Nano Drop 公司; PTC-200 型 PCR 仪、Jel Doc 2001 型凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司; Applied Biosystems<sup>®</sup> 7500 Real-Time PCR Systems, 赛默飞世尔科技有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 供试菌株基因组 DNA 的提取

将煤污假尾孢 3 株菌株接种到 MEA 培养基上, 其它 17 种常见蔬菜病原真菌接种到 PDA 培养基上, 均于 28℃、12 h 光照/12 h 黑暗条件下培养 7 d 后, 分别在其菌落边缘打取直径 6 mm 的菌饼并取 4~5 个菌饼置于 PD 培养液中, 于 160 r/min、28℃ 条件下恒温振荡培养 7 d, 然后采用干净的纱布收集菌丝体并放于冻干机中冻干; 分别称取 0.1~0.2 g 供试菌株的菌丝体于灭菌研钵中, 加液氮充分研磨成粉末, 转入 1.5 mL 离心管中, 加入 65℃ 预热的 CTAB 裂解缓冲液 700 μL, 放入 65℃ 水浴锅中水浴 30 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃沉淀, 收集上清液于新的灭菌离心管中, 加入等体积的体积比为 24:1 的氯仿·异戊醇混合液, 轻轻混匀, 12 000 r/min 离心 10 min, 吸取上清液于新的灭菌离心管中, 重新用体积比为 24:1 的氯仿·异戊醇混合液抽提并离心, 将上清液转入新的灭菌离心管中, 加入 2 倍体积的无水乙醇并于 -20℃ 放置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 倒掉上清液加入 1 mL 75% 乙醇漂洗沉淀, 以 12 000 r/min 再离心 5 min, 倒掉上清液, 晾干沉淀后加入 50 μL ddH<sub>2</sub>O, 提取的 DNA 经分光光度计定量后, 于 -20℃ 保存备用。

### 1.2.2 特异性引物的设计及验证方法

在 GenBank 中根据煤污假尾孢 *Avr4* 基因序列, 通过 NCBI 网站 BLAST 程序 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 检索假尾孢属下与 *Avr4* 基因具有同源性的其它物种的基因序列; 采用 MEGA 5.0 软件对下载的煤污假尾孢 *Avr4* 基因序列 (GenBank 登录号 KR108309.1) 与检索到的假尾孢属下同源基因序列进行比对, 确定差异位点, 基于差异位点运用 Primer Premier 5.0 软件设计特异性引物 JWB-9F (5'-TCGCCAGCAGATGACTCCTAC-3')/JWB-7R (5'-TATTTGCCTGCGCAGATGGTCAG-3'), 预期产物大小为 232 bp, 引物由北京博迈德生物技术有限公司合成。分别以 1.2.1 中提取的 3 株煤污假尾孢以及其它 17 种常见蔬菜病原菌的基因组 DNA 为模板, 利用所设计的引物进行普通 PCR 和 qPCR 扩增。普通 PCR 反应体系: 2×*Taq* PCR Master Mix 10 μL、10 μmol/L 引物 JWB-9F 和 JWB-7R 各 0.5 μL、病原菌基因组 DNA 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。反应程序: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 64℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 反应结束后, 取 5 μL 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。qPCR 反应体系: 2×Super Real PreMix Plus 10 μL、病原菌基因组 DNA 1 μL、10 μmol/L 引物 JWB-9F 和 JWB-7R 各 0.2 μL、50×ROX Reference Dye 0.4 μL, RNase-free ddH<sub>2</sub>O 补足至 20 μL。反应程序: 94℃ 预变性 15 min; 94℃ 变性 10 s, 64℃ 退火 32 s, 共 40 个循环。反应结束后, 按 0.1℃/s 的升温速率从 72℃ 升至 94℃, 在升温时收集信号, 建立熔解曲线。

### 1.2.3 普通 PCR 与 qPCR 的灵敏度比较

采用普通 PCR 扩增煤污假尾孢菌株 FQ10013003 的 *Avr4* 基因片段, 扩增体系及程序同 1.2.2。扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳、切胶回收后, 与 pEASY-T1 载体进行连接, 然后转入大肠杆菌 Trans-T1 感受态细胞中进行克隆。对克隆所得产物进行普通 PCR 检测和测序验证, 并参照 *Easy Pure*<sup>®</sup> Plasmid Miniprep Kit 说明书提取煤污假尾孢菌株 FQ10013003 含有 *Avr4* 基因片段的质粒 DNA 作为阳性标准品。

质粒 DNA 经分光光度计测定浓度并根据摩尔定律计算拷贝数, 然后按 10 倍梯度稀释为系列浓度 6.709×10<sup>9</sup>、6.709×10<sup>8</sup>、6.709×10<sup>7</sup>、6.709×10<sup>6</sup>、6.709×10<sup>5</sup>、6.709×10<sup>4</sup>、6.709×10<sup>3</sup>、6.709×10<sup>2</sup>、6.709×10<sup>1</sup>、6.709 copies/μL。以稀释后得到的煤污假尾孢菌株

FQ10013003 质粒 DNA 为模板, 分别进行普通 PCR 以及 qPCR 扩增, 扩增体系及程序同 1.2.2。

#### 1.2.4 qPCR 标准曲线的建立

以 1.2.3 中煤污假尾孢菌株 FQ10013003 各个浓度的质粒 DNA 进行 qPCR 扩增时所得  $C_t$  值为纵坐标轴, 以起始质粒拷贝数的对数为横坐标轴, 制作 qPCR 标准曲线。标准曲线反映了循环数  $C_t$  与 qPCR 模板质粒 DNA 起始浓度之间的线性关系。因此, 将待测样品在 qPCR 过程中的循环数代入标准曲线, 可求出相对应的模板 DNA 起始浓度。

#### 1.2.5 人工模拟接种发病样本的定量检测

将直径为 6 mm 的煤污假尾孢菌株 FQ10013003 菌饼接种至 PD 培养液中, 28℃、160 r/min 条件下振荡培养 20 d 后, 采用 4 层纱布过滤菌悬液收集菌丝体并用吸水纸吸净表面多余的培养液, 再将菌丝体重悬于无菌水中进行研磨, 至菌丝段长度约为 450~750 μm。然后用无菌水配制成浓度分别为  $6 \times 10^6$ 、 $6 \times 10^5$ 、 $6 \times 10^4$ 、 $6 \times 10^3$ 、 $6 \times 10^2$ 、 $6 \times 10$  菌丝段/mL 的悬浮液 (Hafeld-Vieira et al., 2006), 采用喷雾法接种番茄叶片。采用喷雾接种法分别将不同浓度的菌丝段悬浮液均匀喷施于 3~4 叶期的健康番茄幼苗叶片背面, 喷至叶片背面雾滴滴下为止, 对照接种无菌水。每个处理接种 10 株幼苗, 3 次重复。接种完毕后将所有番茄幼苗置于温度为 28℃、相对湿度为 90% 的保湿柜中, 在 12 h 光照/12 h 黑暗条件下培养 72 h, 之后置于温度为 27℃、相对湿度为 70%~80% 的温室中进行常规培养, 光照条件同上。接种后于每天 17:00 观察番茄幼苗发病情况, 并在接种后第 3、5、7、10、15 天各取 1 次样品, 每次每个处理取 3 片接种叶片, 将采集的样品各取 1 g 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取番茄基因组 DNA。对提取的 DNA 分别进行 qPCR 检测, 以确定不同接种浓度下煤污假尾孢数量随时间的动态变化。qPCR 检测方法同 1.2.2。

#### 1.2.6 田间发病样本病原菌的定量检测

分别从河北省、重庆市和广西番茄产区的番茄植株上剪取叶片, 然后装入干净的密封袋中, 共收集 14 份番茄叶片样本, 其中 6 份样本具有典型煤污假尾孢叶斑病症状, 3 份具有疑似症状, 5 份无任何症状, 每份样品各取 1 g 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒分别提取基因组 DNA, 分别进行普通 PCR 及 qPCR 检测, 反应体系及程序同 1.2.2, 同时进行病原菌的分离培养, 以确定所建立 qPCR 检测技术的实际应用效果。病原菌分离培养参照 Subedi et al. (2014) 方法。取 6 份具有典型病症的样品, 用灭菌剪刀分

别剪取直径为 0.5~1.0 cm 的病斑, 利用 0.5% NaClO 表面灭菌 1 min, 然后置于 V8 汁液培养基中, 在 28℃、连续荧光灯照射下培养 2 周。以李宝聚等 (2010) 鉴定结果为判断依据对分离病原菌进行形态鉴定, 即煤污假尾孢在 V8 汁液培养基上的菌落形态为深褐色, 菌丝体为黄褐色, 具隔膜; 分生孢子梗簇生在子座上或仅少数从气孔伸出, 不分枝, 直立或稍弯, 浅青黄色, 0~3 个隔膜, 18.5~50.5 μm×2.5~5.0 μm; 分生孢子单生, 浅青黄色, 倒棍棒形, 基部圆锥形平截, 直立或中度弯曲, 3~8 个隔膜, 35~75.5 μm×2.5~5.0 μm。

## 2 结果与分析

### 2.1 特异性引物的设计与验证结果

基于煤污假尾孢 *Avr4* 基因序列与 GenBank 中其它同源基因序列的差异位点设计特异性引物 JWB-9F/JWB-7R, 经 BLAST 程序进行不同物种间的同源性比较, 比对结果表明引物 JWB-9F/JWB-7R 与煤污假尾孢 *Avr4* 基因同源性为 100%, 与其它物种的同源性很低。

使用引物 JWB-9F/JWB-7R 对煤污假尾孢以及其它 17 种常见蔬菜病原菌基因组 DNA 分别进行普通 PCR 扩增和 qPCR 扩增。普通 PCR 扩增结果显示, 引物 JWB-9F/JWB-7R 均可从煤污假尾孢 3 株菌株基因组 DNA 中扩增出 232 bp 的特异性目的片段, 而对其它 17 种常见蔬菜病原菌基因组 DNA 均无任何扩增片段 (图 1)。qPCR 扩增结果显示, 40 个循环内, 仅在煤污假尾孢基因组 DNA 的反应孔内收集到了荧光信号, 且扩增曲线为典型的 S 型 (图 2-A); 熔解曲线显示有单一的熔解峰, 而在其它孔内没有收集到任何荧光信号, 扩增曲线为直线 (图 2-B)。表明引物 JWB-9F/JWB-7R 对煤污假尾孢具有良好的特异性, 可以用于建立 qPCR 检测体系。

### 2.2 普通 PCR 与 qPCR 的灵敏度比较

普通 PCR 检测结果显示, 当煤污假尾孢质粒 DNA 浓度为  $6.709 \times 10^3$  copies/μL 时无扩增产物 (图 3-A), 因此普通 PCR 灵敏度为  $6.709 \times 10^4$  copies/μL; 荧光定量 PCR 检测结果显示, 当质粒 DNA 浓度为 6.709 copies/μL 时, 未收集到荧光信号 (图 3-B), 因此 qPCR 检测的灵敏度为 67.09 copies/μL。表明 qPCR 检测灵敏度比普通 PCR 高 1 000 倍。

### 2.3 qPCR 标准曲线的建立

以质粒 DNA 拷贝数的对数为横坐标、 $C_t$  值为纵坐标绘制标准曲线,  $y = -3.522x + 40.242$ ,  $R^2 = 0.976$ , 扩增效率为 112.455%。表明含有煤污假尾孢 *Avr4* 基

因的质粒DNA在浓度 $6.709 \times 10^9 \sim 6.709 \times 10^0$  copies/ $\mu$ L 范围内具有良好的线性关系。

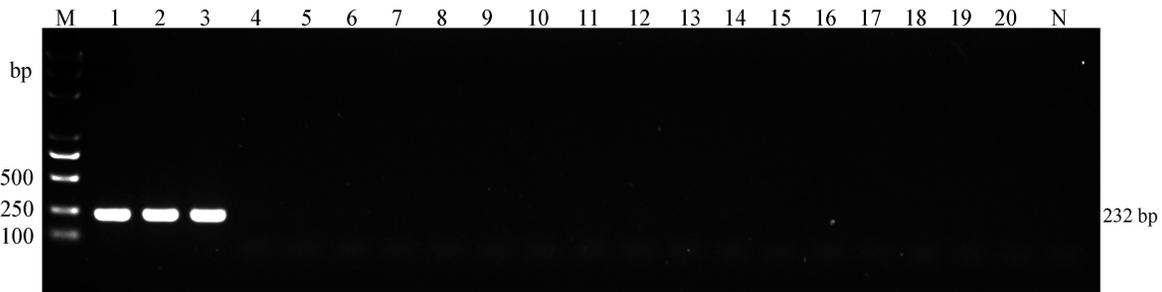


图1 引物JWB-9F/JWB-7R对煤污假尾孢的普通PCR特异性扩增

Fig. 1 Conventional PCR specific amplification of *Pseudocercospora fuligena* by primers JWB-9F/JWB-7R

M: BM 5000 DNA marker; 1~3: 煤污假尾孢; 4~20: 菜豆假尾孢、灰色假尾孢、茄生假尾孢、茄链格孢、链格孢、致病疫霉、立枯丝核菌、灰葡萄孢、多主棒孢、褐孢霉、球座钉孢、核果钉孢、茄葡柄霉、辣椒疫霉、茄病镰孢、尖孢镰孢、核盘菌; N: 阴性对照。M: BM 5000 DNA marker; 1~3: *Ps. fuligena*; 4~20: *Ps. cruenta*, *Ps. griseola*, *Ps. solani-melongenicola*, *Alternaria solani*, *A. alternata*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Corynespora cassiicola*, *Passalora fulva*, *Pa. personata*, *Pa. circumscissa*, *Stemphylium solani*, *Ph. capsici*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*; N: negative control.

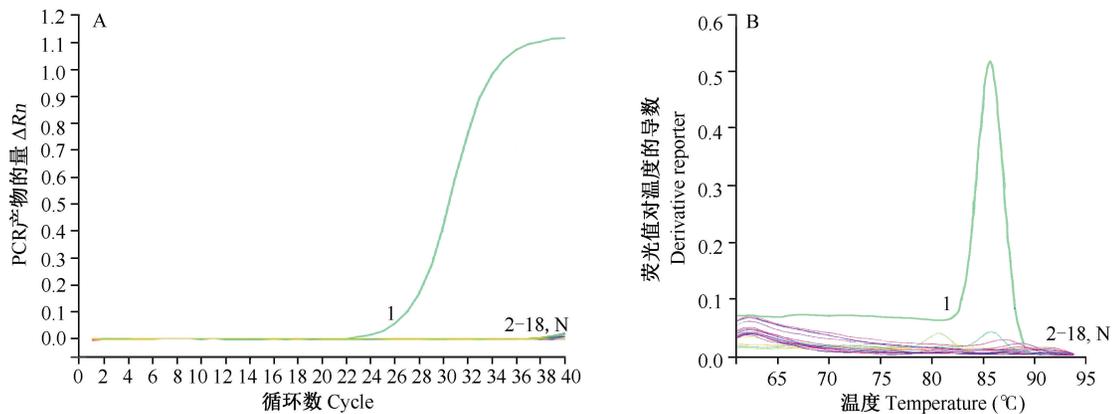


图2 引物JWB-9F/JWB-7R对煤污假尾孢的实时荧光定量PCR特异性扩增曲线(A)和熔解曲线(B)

Fig. 2 Real-time fluorescent quantitative PCR specific amplification curve (A) and melt curve (B)

of primers JWB-9F/JWB-7R for *Pseudocercospora fuligena*

1: 煤污假尾孢; 2~18: 菜豆假尾孢、灰色假尾孢、茄生假尾孢、茄链格孢、链格孢、致病疫霉、立枯丝核菌、灰葡萄孢、多主棒孢、褐孢霉、球座钉孢、核果钉孢、茄葡柄霉、辣椒疫霉、茄病镰孢、尖孢镰孢、核盘菌; N: 阴性对照。1: *Ps. fuligena*; 2~18: *Ps. cruenta*, *Ps. griseola*, *Ps. solani-melongenicola*, *Alternaria solani*, *A. alternata*, *Phytophthora infestans*, *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Corynespora cassiicola*, *Passalora fulva*, *Pa. personata*, *Pa. circumscissa*, *Stemphylium solani*, *Ph. capsici*, *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*; N: negative control.

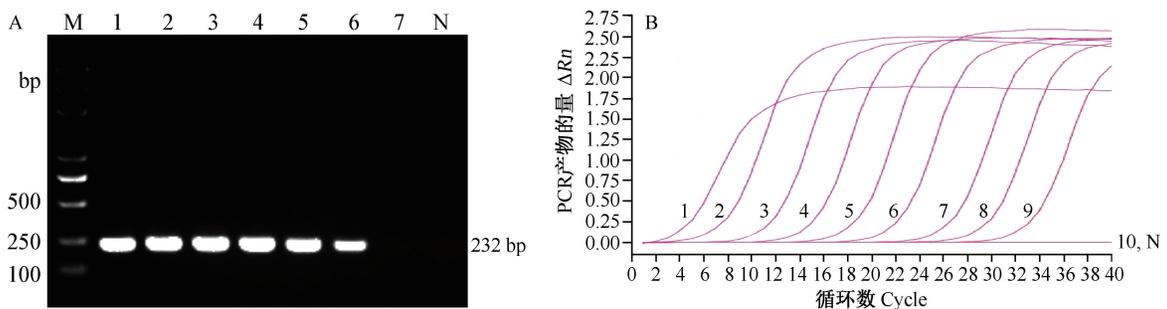


图3 引物JWB-9F/JWB-7R对煤污假尾孢的普通PCR(A)和实时荧光定量PCR(B)的检测灵敏度

Fig. 3 The sensitivities of conventional PCR (A) and real-time fluorescent quantitative PCR (B)

of primers JWB-9F/JWB-7R for *Pseudocercospora fuligena*

M: BM 5000 DNA marker; 1~10:  $6.709 \times 10^9$ ,  $6.709 \times 10^8$ ,  $6.709 \times 10^7$ ,  $6.709 \times 10^6$ ,  $6.709 \times 10^5$ ,  $6.709 \times 10^4$ ,  $6.709 \times 10^3$ ,  $6.709 \times 10^2$ ,  $6.709 \times 10^1$ ,  $6.709$  copies/ $\mu$ L. N: 阴性对照。N: Negative control.

## 2.4 人工模拟接种番茄叶片上煤污假尾孢定量检测

将煤污假尾孢菌接种至番茄叶片上,接种浓度越高,叶片表现症状时间越早,叶片上带菌量越多。当浓度为 $6\times 10^6$ 、 $6\times 10^5$ 、 $6\times 10^4$ 菌丝段/mL时,分别于接种后9、12、15 d叶片上出现了发病症状;接种浓度小于 $6\times 10^3$ 菌丝段/mL时,叶片上未表现出症状。qPCR检测结果显示,接种后3 d,在浓度为 $6\times 10^6$ 、 $6\times$

$10^5$ 、 $6\times 10^4$ 菌丝段/mL的接种叶片中煤污假尾孢基因组DNA拷贝数分别为 $2.30\times 10^4$ 、 $1.00\times 10^3$ 、 $4.99\times 10^2$  copies/ $\mu$ L,说明qPCR检测体系可以在病害未显症前检测到病原菌,而在接种浓度为 $6\times 10^3$ 、 $6\times 10^2$ 、 $6\times 10^1$ 菌丝段/mL的叶片中未检测到病原菌;接种后15 d,各接种浓度发病叶片中煤污假尾孢基因组DNA拷贝数在 $1.07\times 10^2$ ~ $9.14\times 10^4$  copies/ $\mu$ L之间(表1)。

表1 人工模拟接种番茄叶片中煤污假尾孢的定量检测结果

Table 1 Quantitative detection of *Pseudocercospora fuligena*-infected tomato leaves

| 浓度(菌丝段/mL)<br>Concentration<br>(hyphae fragments/mL) | 接种后3 d<br>3 d post inoculation |               | 接种后5 d<br>5 d post inoculation |               | 接种后7 d<br>7 d post inoculation |               | 接种后10 d<br>10 d post inoculation |               | 接种后15 d<br>15 d post inoculation |               |
|--|--------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|--------------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|----------------------------------|---------------|
|  | qPCR<br>(copies/<br>$\mu$ L)   | 症状<br>Symptom | qPCR<br>(copies/<br>$\mu$ L)   | 症状<br>Symptom | qPCR<br>(copies/<br>$\mu$ L)   | 症状<br>Symptom | qPCR<br>(copies/<br>$\mu$ L)     | 症状<br>Symptom | qPCR<br>(copies/<br>$\mu$ L)     | 症状<br>Symptom |
| $6\times 10^6$                                       | $2.30\times 10^4$              | -             | $2.11\times 10^4$              | -             | $2.44\times 10^4$              | -             | $3.59\times 10^4$                | +             | $9.14\times 10^4$                | +             |
| $6\times 10^5$                                       | $1.00\times 10^3$              | -             | $2.82\times 10^3$              | -             | $1.28\times 10^3$              | -             | $3.03\times 10^3$                | -             | $1.49\times 10^4$                | +             |
| $6\times 10^4$                                       | $4.99\times 10^2$              | -             | $7.73\times 10^2$              | -             | $9.34\times 10^2$              | -             | $7.78\times 10^2$                | -             | $2.54\times 10^3$                | +             |
| $6\times 10^3$                                       | /                              | -             | $1.87\times 10^2$              | -             | $1.07\times 10^2$              | -             | $3.99\times 10^2$                | -             | $1.81\times 10^3$                | -             |
| $6\times 10^2$                                       | /                              | -             | $2.00\times 10^2$              | -             | $1.66\times 10^2$              | -             | $2.67\times 10^2$                | -             | $8.90\times 10^2$                | -             |
| $6\times 10^1$                                       | /                              | -             | /                              | -             | /                              | -             | /                                | -             | $1.07\times 10^2$                | -             |

+: 出现症状; -: 未出现症状; /: 未检测到病原菌。+: Symptoms appear; -: no symptoms appear; /: no pathogen.

## 2.5 田间病害样本中病原菌的定量检测

对采集自不同地区的病害样本和健康样本分别进行了普通PCR和qPCR检测。采自重庆市(编号1~3)、广西(编号7、8)和河北省(编号10)的6份具典型病症样本中,普通PCR和qPCR检测结果一致,均检测到了煤污假尾孢,其基因组DNA拷贝数在 $4.70\times 10^3$ ~ $6.34\times 10^4$  copies/ $\mu$ L之间;但来自广西(编号9)与河北省(编号11、12)的3份疑似样本中,仅

qPCR检测到了煤污假尾孢,其基因组DNA拷贝数在 $6.02\times 10^2$ ~ $1.02\times 10^3$  copies/ $\mu$ L之间,而普通PCR未能检测到病原菌;其余5份无症状样品中均未检测到病原菌(表2)。同时,为了验证PCR检测结果,对供试6份具典型病症样品进行病原菌的分离培养,发现qPCR检测结果与分离培养结果一致。表明本研究所建立的煤污假尾孢qPCR检测技术可以用于田间番茄上煤污假尾孢的定量检测。

表2 不同地区番茄煤污假尾孢叶斑病样本普通PCR与实时荧光定量PCR检测结果比较

Table 2 Comparison of results between conventional PCR and real-time fluorescent quantitative PCR for the detection of *Pseudocercospora fuligena* from different regions

| 地区<br>Location  | 样本编号<br>Sample code | 症状<br>Symptom | 检测结果 Result of detection  |                           |                           |
|-----------------|---------------------|---------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
|                 |                     |               | 普通PCR<br>Conventional PCR | qPCR<br>(copies/ $\mu$ L) | 分离培养<br>Isolation         |
| 重庆<br>Chongqing | 1                   | 明显 Obvious    | +                         | $6.34\times 10^4$         | 煤污假尾孢 <i>Ps. fuligena</i> |
|                 | 2                   | 明显 Obvious    | +                         | $1.97\times 10^4$         | 煤污假尾孢 <i>Ps. fuligena</i> |
|                 | 3                   | 明显 Obvious    | +                         | $5.82\times 10^3$         | 煤污假尾孢 <i>Ps. fuligena</i> |
|                 | 4                   | 无 No          | -                         | -                         | -                         |
|                 | 5                   | 无 No          | -                         | -                         | -                         |
|                 | 6                   | 无 No          | -                         | -                         | -                         |
| 广西<br>Guangxi   | 7                   | 明显 Obvious    | +                         | $7.13\times 10^3$         | 煤污假尾孢 <i>Ps. fuligena</i> |
|                 | 8                   | 明显 Obvious    | +                         | $4.70\times 10^3$         | 煤污假尾孢 <i>Ps. fuligena</i> |
|                 | 9                   | 疑似 Suspected  | -                         | $1.02\times 10^3$         | 煤污假尾孢 <i>Ps. fuligena</i> |
| 河北<br>Hebei     | 10                  | 明显 Obvious    | +                         | $2.15\times 10^4$         | 煤污假尾孢 <i>Ps. fuligena</i> |
|                 | 11                  | 疑似 Suspected  | -                         | $7.88\times 10^2$         | 煤污假尾孢 <i>Ps. fuligena</i> |
|                 | 12                  | 疑似 Suspected  | -                         | $6.02\times 10^2$         | 煤污假尾孢 <i>Ps. fuligena</i> |
|                 | 13                  | 无 No          | -                         | -                         | -                         |
|                 | 14                  | 无 No          | -                         | -                         | -                         |

+: 检测到病原菌; -: 未检测到病原菌。+: Pathogen; -: no pathogen.

### 3 讨论

番茄煤污假尾孢叶斑病属于世界性病害,在国内外的番茄产区均有不同程度的发生,危害较大。该病在发病初期的症状与番茄叶霉病较为相似(Halfeld-Vieira et al., 2006),因此难以通过症状进行诊断。普通PCR检测技术可以准确检测出病组织中的病原菌,但相对于qPCR检测技术来说灵敏度较低,且无法准确定量。因此本研究建立了能够实时快速、精确定量的番茄煤污假尾孢qPCR检测技术,而其中最关键的部分是特异性引物的设计。引物不仅特异性要高,而且不能产生二聚体等非特异性扩增(Denman & Mcsweeney, 2005)。本研究系统地比较分析了假尾孢属下不同种的*Avr4*基因同源序列,根据具有碱基差异的区域设计了煤污假尾孢特异性引物JWB-9F/JWB-7R,经过普通PCR和qPCR检测,证明该引物具有很好的特异性,可以有效区分其它常见蔬菜病原真菌,且没有产生二聚体,适合用于建立qPCR检测技术。一般来说,为保证扩增效率,扩增产物的大小应控制在50~200 bp(Denman & Mcsweeney, 2005),本研究中扩增产物的大小为232 bp,但仍然保持了较高的扩增效率,且建立的标准曲线具有良好的线性关系,利用标准曲线方程即可对番茄中煤污假尾孢数量进行动态监测。

qPCR检测技术作为一种非常实用的分子生物学技术,具有灵敏度高、定量能力强、动力学范围宽等优点,目前已经被广泛应用于病原菌的种类鉴定、定量分析以及病害流行预测等方面。如孙炳剑等(2015)基于 *$\beta$ -tubulin*基因建立了小麦纹枯病菌*Rhizoctonia cerealis*的qPCR检测技术,可实现对小麦纹枯病菌的早期检测,灵敏度达到 $6.5 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L;王恒波等(2015)根据甘蔗宿根矮化病菌*Leifsonia xyli* subsp. *xyli*的*Pat1*基因保守序列设计特异性引物和探针,建立了该病原菌的qPCR检测技术,检测下限为 $10^2$  copies/ $\mu$ L;王律等(2017)建立了扁桃拟茎点霉*Phomopsis amygdali*的普通PCR和qPCR检测技术,且qPCR检测技术的灵敏度( $4 \times 10$  copies/ $\mu$ L)是普通PCR( $100$  fg/ $\mu$ L)的1 000倍。本研究建立的qPCR检测技术对煤污假尾孢基因组DNA的灵敏度也较高,为67.09 copies/ $\mu$ L,是普通PCR检测灵敏度的1 000倍。对于人工接种样本的检测,本研究中qPCR检测技术的最低限为 $1.07 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L,与任海英等(2016)利用qPCR技术检测人工接种杨梅样本中凋萎病菌*Pestalotiopsis versicolor*和*P. micros-*

*pora*的灵敏度一致。植物在病原菌侵染早期一般不会表现出症状,当病原菌积累到一定量时才逐渐出现肉眼可见的症状,因此可利用本研究所建立的qPCR检测技术对番茄叶片进行提前检测,确定植物是否受到了病原菌侵染。

植物病害的防治原则是“预防为主,综合防治”,因此在病害症状出现之前及时检测出病原菌对于病害防治显得尤为重要。本研究从不同地区共收集到了14份疑似番茄煤污假尾孢叶斑病和健康番茄的样本,比较了普通PCR与所建立的qPCR技术的检测结果,发现普通PCR技术只能检测到已显症样本中的病原菌,检测不到未显症样本中的病原菌,而qPCR技术在未显症样本与已显症样本中均可以检测到病原菌。此外,qPCR技术对田间病害样本中煤污假尾孢DNA的最低检测量是 $6.02 \times 10^2$  copies/ $\mu$ L,比质粒DNA的检测限低1个数量级,可能是由于番茄中存在的PCR抑制剂干扰了qPCR反应(Schrader et al., 2012)。综上所述,本研究建立的qPCR检测技术特异性好,灵敏度高,可以实现对病原菌的定量分析以及病害的预测预报。

### 参 考 文 献 (References)

- Blazquez CH, Alfieri SA Jr. 1974. *Cercospora* leaf mold of tomato. *Phytopathology*, 64: 443-445
- Braun U, Crous PW, Dugan F, Groenewald JZ, de Hoog GS. 2003. Phylogeny and taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, including *Davidiella* gen. nov., the teleomorph of *Cladosporium* s. str. *Mycological Progress*, 2(1): 3-18
- Denman SE, Mcsweeney CS. 2005. Quantitative (real-time) PCR.// Makkar HPS, Mcsweeney CS. *Methods in gut microbial ecology for ruminants*. Dordrecht: Springer, pp. 105-115
- Halfeld-Vieira BA, Nechet KL, Barbosa RNT. 2006. *Pseudocercospora fuligena* causing leaf mold of tomato in Roraima, Brazil. *Fitopatologia Brasileira*, 31(3): 320
- Harada T, Torii Y, Morita S, Onodera R, Hara Y, Yokoyama R, Nishitani K, Satoh S. 2011. Cloning, characterization, and expression of xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase and expansin genes associated with petal growth and development during carnation flower opening. *Journal of Experimental Botany*, 62(2): 815-823
- Hartman GL, Wang TC. 1995. Black leaf mold development and its effect on tomato yield. *Plant Disease*, 76(5): 462-465
- Heine G, Max JFJ, Fühns H, Moran-Puente DW, Heintz D, Horst WJ. 2011. Effect of manganese on the resistance of tomato to *Pseudocercospora fuligena*. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 174(5): 827-836
- Johnston A. 1963. Host list of plant diseases in the New Hebrides. Food and Agriculture Organization of Plant Protection Commit-

- tee for the South East Asia and Pacific Region. Technical Document No. 27
- Li BJ, Zhou YF, Meng SY, Shi YX, Guo YL. 2010. Pathogen identification of suspected black leaf mold of tomato caused by *Pseudocercospora fuligena*. *China Vegetables*, (11): 23–24 (in Chinese) [李宝聚, 周艳芳, 孟书元, 石延霞, 郭英兰. 2010. 由煤污假尾孢引起的疑似番茄叶霉病的病原鉴定. *中国蔬菜*, (11): 23–24]
- Mersha Z, Hau B. 2009. Effect of black leaf mold (*Pseudocercospora fuligena*) epidemics on host growth parameters of tomato (*Solanum lycopersicum*) grown under protected cultivation in Thailand. *Acta Horticulturae*, 808: 33–39
- Mersha Z, Zhang SA, Hau B. 2014a. Seasonal dynamics of black leaf mould (*Pseudocercospora fuligena*) on greenhouse-grown fresh market tomatoes. *Journal of Phytopathology*, 162(3): 158–169
- Mersha Z, Zhang SA, Hau B. 2014b. Effects of temperature, wetness duration and leaf age on incubation and latent periods of black leaf mold (*Pseudocercospora fuligena*) on fresh market tomatoes. *European Journal of Plant Pathology*, 138(1): 39–49
- Mulder JL, Holliday P. 1975. *Cercospora fuligena*.//CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria no. 465. Kew, Surrey, UK: the Commonwealth Mycological Institute
- Ren HY, Qi XJ, Liang SM, Zheng XL. 2016. Use of conventional and real-time quantitative PCR to detect *Pestalotiopsis*, the cause of bayberry twig blight. *Acta Phytopathologica Sinica*, 46(1): 1–10 (in Chinese) [任海英, 戚行江, 梁森苗, 郑锡良. 2016. 利用常规PCR和实时荧光定量PCR检测杨梅凋萎病菌. *植物病理学报*, 46(1): 1–10]
- Roldan EF. 1938. New or noteworthy lower fungi of the Philippine Islands, II. *Philippine Journal of Science*, 66(1): 7–13
- Saroj A, Kumar A, Srivastava AK, Khaliq A, Absar N, Alam M, Samad A. 2014. New report of black leaf spot mold (*Pseudocercospora fuligena*) on *Withania somnifera* from India. *Plant Disease*, 98(9): 1275
- Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R. 2012. PCR inhibitors: occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology*, 113(5): 1014–1026
- Subedi N, Testen AL, Baysal-Gurel F, Miller SA. 2014. First report of black leaf mold of tomato caused by *Pseudocercospora fuligena* in Ohio. *Plant Disease*, 99(2): 285
- Sun BJ, Chen QQ, Yuan HX, Shi Y, Li HL. 2015. Establishment of SYBR green I real-time PCR for quantitatively detecting *Rhizoctonia cerealis* in winter wheat. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(1): 55–62 (in Chinese) [孙炳剑, 陈清清, 袁虹霞, 施艳, 李洪连. 2015. SYBR Green I实时荧光定量PCR检测小麦纹枯病菌体系的建立和应用. *中国农业科学*, 48(1): 55–62]
- Taguchi H, Suzuki H, Kuroda K. 2012. Efficacy of fungicides in the control of *Pseudocercospora fuligena* on tomato. *Annual Report of the Kansai Plant Protection Society*, 54: 7–12
- Thomma BPHJ, van Eesse HP, Crous PW, de Wit PJGM. 2005. *Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a highly specialized plant pathogen as a model for functional studies on plant pathogenic Mycosphaerellaceae. *Molecular Plant Pathology*, 6(4): 379–393
- Wang FM, Song YJ, Liu ZH, Fan HM, Yan JF. 2006. The biological characteristics of *Cercospora fuligena*. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 37(2): 186–190 (in Chinese) [王福妹, 宋云锦, 刘志恒, 樊慧梅, 闫建芳. 2006. 番茄煤霉病菌生物学特性研究. *沈阳农业大学学报*, 37(2): 186–190]
- Wang HB, Chen PH, Gao SJ, Guo JL, Chen RK. 2015. Development of a real-time fluorescence quantitative PCR assay for detection of *Leifsonia xyli* subsp. *xyli* in sugarcane. *Acta Phytopathologica Sinica*, 45(3): 232–238 (in Chinese) [王恒波, 陈平华, 高三基, 郭晋隆, 陈如凯. 2015. 甘蔗宿根矮化病菌实时荧光定量PCR检测方法的建立. *植物病理学报*, 45(3): 232–238]
- Wang L, Zhang H, Zhao YQ, Chu SP, Wu CP, Tian YL, Hu BS. 2017. Development and application of *TaqMan* fluorescence quantitative PCR for detection of *Phomopsis amygdali*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 47(1): 26–34 (in Chinese) [王律, 张华, 赵玉强, 褚姝频, 吴翠萍, 田艳丽, 胡白石. 2017. 扁桃拟茎点霉 *TaqMan* 荧光定量PCR检测方法的建立与应用. *植物病理学报*, 47(1): 26–34]
- Wang TC, Black LL, Hsieh WH, Hanson PM. 1995. Inheritance of black leaf mold resistance in tomato. *Euphytica*, 86(2): 111–115
- Yang QF, Yin XG, Pan GH, Zhang Y. 2008. Occurrence and control of black leaf spot of tomato in Chongqing. *South China Agriculture*, 2(5): 30–31 (in Chinese) [杨琦凤, 尹贤贵, 潘光辉, 张赞. 2008. 重庆地区番茄煤霉病的发生与防治. *南方农业*, 2(5): 30–31]
- Zhang DF, Liu MT, Gao FJ. 2004. Studies on pathogen identification and biological characteristic of tomato *Cercospora* leaf mold. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 33(10): 59–61 (in Chinese) [张定法, 刘鸣韬, 高付军. 2004. 番茄尾孢叶霉病原鉴定及生物学特性研究. *河南农业科学*, 33(10): 59–61]

(责任编辑:李美娟)