

黄瓜细菌性萎蔫病菌分子诊断研究

王楠^{1,2}, 张改红¹, 王伟²

(1. 郑州轻工业学院 食品与生物工程学院, 河南 郑州 450001;
2. 华东理工大学 生物工程学院/生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: 从田间黄瓜细菌性萎蔫病植株分离获得病原菌, 比对其近源种的 16S rDNA 序列, 确定该病原菌为嗜维管束欧文氏菌(*Erwinia tracheiphila*), 并设计出特异引物 ET-P1/ET-P2. 经过对该引物的 PCR 扩增条件优化, 扩增出一条 794 bp 的黄瓜细菌性萎蔫病菌特异条带, 检测灵敏度达 100 fg/ μ L, 可准确扩增出黄瓜发病植株和根围土壤中的 DNA 片段.

关键词: 黄瓜细菌性萎蔫病; 嗜维管束欧文氏菌; 特异性引物; 分子诊断技术

中图分类号: TS255.2; S432.42 文献标志码: A DOI: 10.3969/j.issn.2095-476X.2013.05.005

Study on molecular diagnosis of cucumber bacterial wilt

WANG Nan^{1,2}, ZHANG Gai-hong¹, WANG Wei²

(1. College of Food and Bioengineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450001, China;
2. College of Bioengineering, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: The pathogen was obtained by separating the cucumber bacterial wilt plant, and by comparing with the closely-related species 16S rDNA sequence, it was identified as *Erwinia tracheiphila* and specific primers ET-P1/ET-P2 was designed. A 794 bp cucumber bacterial wilt special band can be amplified by optimizing the PCR amplification of ET-P1/ET-P2 primers with the detection sensitivity of 100 fg/ μ L, and can amplify the DNA of bacterial wilt cucumber and rhizosphere soil. The molecular diagnosis technology of cucumber bacterial wilt.

Key words: cucumber bacterial wilt; *Erwinia tracheiphila*; specific primer; molecular detection technique

0 引言

细菌性萎蔫病是由欧文氏菌属(*Erwinia*)引起的葫芦科病害, 黄瓜、西瓜、甜瓜、南瓜等植株都易受该病菌侵染, 黄瓜和甜瓜较其他植株更易发病. 该病原菌在 2 种危害黄瓜的害虫——黄瓜色条叶甲

虫和十一星根萤叶甲虫的肠道中存活越冬, 当携带病原菌的黄瓜色条叶甲虫危害植株时, 会损伤植株组织并排出粪便, 病原菌则通过损伤植株的组织液侵入维管束, 在木质部大量繁殖, 从而阻碍植株的水分疏导, 被感染的茎蔓只能提供正常茎蔓 1/5 的水分, 最终阻碍植株的水分运输系统, 引起大面积

收稿日期: 2013-03-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(30871664); 国家重点实验室专项经费(2060204)

作者简介: 王楠(1983—), 女, 江苏省徐州市人, 郑州轻工业学院助教, 主要研究方向为植物病害生物防治.

通信作者: 王伟(1963—), 男, 黑龙江省双城市人, 华东理工大学教授, 博士, 主要研究方向为植物病害生物防治及微生物农药创制.

凋萎^[1-2]. M. A. Sasu 等^[3]报道,欧文氏菌属除了通过昆虫侵蚀植株传播外,还会通过花粉进行传播.该病害近年来发病严重,给黄瓜生产造成极大危害.发病初期叶片上出现小的黄色病斑,可愈合成长条斑,叶子变成黄褐色至深褐色,接着出现深绿色水渍状病斑,植株迅速干枯死亡.该病害在发病初期与瓜类枯萎病症状类似,难以区分病症特征,给黄瓜病害的早期鉴定和防治带来极大困难.控制该病害的有效方法之一是加强检疫,防止病原菌的扩大传播.近年来利用分子生物学手段对病原菌进行分类及鉴定的应用逐渐增多^[4-5],国内外对欧文氏菌属系统发育研究已有很多报道^[6-7],但是针对 *Erwinia tracheiphila* 尚未见单独的检测报道.本文拟对黄瓜细菌性萎蔫病菌进行分离培养,分析 16S rDNA 序列,设计出特异引物,建立一种能够在发病初期针对植株或根围土壤快速检测病害种类的技术,以便及时采用有针对性的防治措施控制病害的发生和传播^[8-9].

1 实验

1.1 材料

菌株:从来自上海、海南、北京 3 地区(编号分别为 1[#] 2[#] 3[#]) 发病黄瓜果实和茎基部分离获得的 15 株分离物中选出 3 个黄瓜细菌性萎蔫病代表性菌株;其他供试植物病原菌菌株为从不同地方收集、纯化并经回接实验所得,以及其他组织赠予所得,种名、来源及数量见表 1.

试剂:所用试剂均为 AR 级,上海生物工程公司生产.

1.2 黄瓜细菌性萎蔫病菌的分离纯化

从田间大棚采集新鲜黄瓜细菌性萎蔫病发病植株茎蔓和果实,分离病原菌.分离方法采用平板划线法,获得纯培养,并进行回接实验^[10].

1.3 黄瓜细菌性萎蔫病菌基因组 DNA 的提取

1.3.1 病原菌 DNA 的提取 挑取病原菌单菌落接种于液体 Luria-Bertani(LB) 培养基,37 °C 培养过夜,吸取 1.5 mL 菌液离心,沉淀加入 567 μL TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl,1 mmol/L EDTA pH = 8.0),30 μL 10% 十二烷基磺酸钠(SDS),轻轻颠倒混匀于 37 °C 水浴 1 h,加入 100 μL 5 mol/L NaCl 溶液,80 μL 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)/NaCl 溶液,轻轻颠倒混匀于 65 °C 水浴 10 min,等体积苯酚/氯仿/异戊醇抽提 1 次,等体积氯仿/异戊醇抽提

表 1 其他供试植物病原菌菌株

菌株	寄主	来源	数量
<i>Acidovorax avenae</i>	黄瓜	上海	3
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	土壤	上海	3
<i>Agrobacterium. rhizogenes</i>	土壤	上海农科院	2
<i>Botrytis cinerea</i>	黄瓜	上海	3
<i>B. cinerea</i>	草莓	日本	3
<i>B. cinerea</i>	番茄	上海	4
<i>Cladosporium cucumerinum</i>	黄瓜	山西	2
<i>Colletotrichum orbiculare</i>	黄瓜	上海	2
<i>Col. orbiculare</i>	西瓜	山东	4
<i>Col. lindemuthianum</i>	菜豆	上海农科院	2
<i>Col. gloeosporioides</i>	草莓	海南	1
<i>Col. sansevieriae</i>	草莓	日本	3
<i>Corynespora cassiicola</i>	黄瓜	沈阳	4
<i>Curvularia lunata</i>	小麦	上海农科院	2
<i>Fusarium oxysporium</i>	黄瓜	上海	2
<i>F. oxysporum</i>	甜瓜	上海农技中心	2
<i>F. oxysporum</i>	西瓜	河北农科院	4
<i>F. graminearu</i>	小麦	上海交大	4
<i>Fulvia fulva</i>	番茄	上海交大	4
<i>Mycosphaerella meloni</i>	西瓜	上海	2
<i>Pseudomonas solanacearum</i>	番茄	上海	4
<i>P. fluorescens</i>	未知	上海	4
<i>P. syringae pv. lachrymans</i>	黄瓜	北京	1
<i>P. syringae pv. syringae</i>	丁香	美国	1
<i>P. syringae pv. tomato</i>	番茄	美国	1
<i>P. syringae pv. tagetis</i>	万寿菊	美国	1
<i>Pythium aphanidermatum</i>	番茄	郑州	2
<i>Ralstonia solanacearum</i>	茄子	上海交大	2
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	黄瓜	上海交大	2
<i>S. sclerotiorum</i>	西瓜	上海	2
<i>S. sclerotiorum</i>	番茄	上海农技中心	2
<i>Sphaerotheca fuliginea</i>	黄瓜	上海农技中心	2
<i>Verticillium dahliae</i>	草莓	北京	1
<i>V. dahliae</i>	草莓	上海	2
<i>V. albo-atrum</i>	未知	上海	2
<i>Xanthomonas campestris</i>	黄瓜	北京	2

1 次,加入 0.1 倍体积 3 mol/L NaAc(pH = 5.2) 和等体积异丙醇,轻轻颠倒混匀,-20 °C 沉淀 1 h,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,70% 乙醇洗涤,离心,风干.加入 100 μL TE,加终浓度为 20 μg/mL RNaseA,以水解溶液中的少量 RNA,-20 °C 保存备用^[11].

1.3.2 发病组织 DNA 的快速提取 采用 H. Wang 等^[12]的方法:取新发病的黄瓜组织,每 mg 组织加入 20 μL 0.5 mol/L NaOH,充分研磨后移至 1.5 mL EP

管 12 000 r/min 离心 5 min,取 5 μ L 上清液,加 495 μ L 0.1 mmol/L Tris-HCl (pH = 8.0) 充分混匀,取 1 μ L 进行 PCR 反应。

1.3.3 发病植株根围土壤 DNA 的提取 按照本实验室优化后的 DNA 提取方法,提取发病植株根围土壤微生物 DNA。

1.4 黄瓜细菌性萎蔫病菌 16S rDNA 的 PCR 扩增及测序

采用细菌 16S rDNA 通用引物 27F (5'-AGAGT-TTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-GGTTACCTT-GTTACGACTT-3')。PCR 反应体系: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 各 1 μ L, 20 μ mol/L 引物 27F/1492R 各 0.25 μ L, Taq 酶 1.25 U, 模板 1 μ L。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。反应结束取 5 μ L 样品进行琼脂糖凝胶电泳, UVP 凝胶成像系统观察、照相。扩增产物由上海生工测序。

1.5 黄瓜细菌性萎蔫病菌 16S rDNA 序列分析

双向测序所得 2 个单向序列有重叠的部分, 利用软件 DNASTar v7.10 中的 EditSeq, CLUST X 2.1, 拼接成完整的 16S rDNA 基因组序列。用 Bioedit v7.00 软件对本研究中所测定的 16S rDNA 序列以及从 Genbank 中搜索的近种序列, 分析其同源性。利用 DNASTar v7.10 中 MegAlign 进行比对, 再用 PAUP 4.0 以 NJ 法构建系统发育树。

1.6 特异引物设计

根据黄瓜细菌性萎蔫病菌 16S rDNA 序列, 比对近缘种及其他瓜类病原菌的序列同源性, 用 DNA Star 设计出特异性引物 ET-P1/ET-P2 (ET-P1: 5'-AAGTCGAGCGGTAGCACAGGCTAG-3', ET-P2: 5'-ACACGCGTCAAGGGCACAAC-3')。

1.6.1 引物 ET-P1/ET-P2 退火温度的选择 根据 ET-P1/ET-P2 的碱基序列, 初步估算退火温度为 60 $^{\circ}$ C, 为提高检测灵敏度和特异性, 需进一步考察退火温度并尽量提高退火温度, 在 60 $^{\circ}$ C ~ 72 $^{\circ}$ C 设计梯度 PCR 程序。

1.6.2 引物 ET-P1/ET-P2 的 PCR 扩增 引物 ET-P1/ET-P2 检测黄瓜细菌性萎蔫病菌的 PCR 反应体系: 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L MgCl₂ 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 各 2 μ L, 10 μ mol/L 引物 ET-P1/ET-P2 各 0.5 μ L, 模板 1 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸

7 min。反应结束取 5 μ L 样品进行琼脂糖凝胶电泳, UVP 凝胶成像系统观察、照相。

2 结果与分析

2.1 27F/1492R 对黄瓜细菌性萎蔫病菌 16S rDNA 的扩增

采用 16S rDNA 通用引物 27F/1492R 对供试 3 株病原菌基因组 DNA 扩增, 得到约 1 500 bp 条带, 克隆该片段并进行测序分析。扩增结果如图 1 所示, 其中 M: DL2000 Marker; 1: 阴性对照; 2—3: 样品 1[#]; 4—5: 样品 2[#]; 6—7: 样品 3[#]。

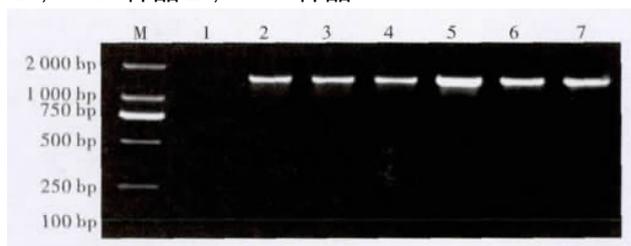


图 1 引物 27F/1492R 对黄瓜细菌性萎蔫病菌的扩增图

2.2 黄瓜细菌性萎蔫病菌 16S rDNA 序列分析

测序结果显示, 3 株所测黄瓜细菌性萎蔫病菌同源性分别是: 样品 1[#]和样品 2[#]同源性为 99.6%, 样品 1[#]和样品 3[#]同源性为 99.8%, 样品 2[#]和样品 3[#]同源性为 99.4%。用 DNAMAN 软件将所测的 3 株病原菌的序列和 GeneBank 报道的欧文氏菌属 16S rDNA 序列进行 BLAST 分析, 结果表明, 这 3 个菌株与欧文氏菌属的 *Erwinia tracheiphila* (Y13250, EU490598) 同源性最高, 达 98%。

2.3 黄瓜细菌性萎蔫病菌 16S rDNA 聚类分析

将该 3 株病原菌与欧文氏菌属其他相关种的 16S rDNA 进行多序列比对分析和构建发育树(见图 2) 结果表明这 3 个菌株在发育树上和 *Erwinia tracheiphila* 聚在一起, 支持度为 95%。

2.4 引物 ET-P1/ET-P2 的退火温度优化

设计从 60 ~ 72 $^{\circ}$ C 的梯度进行 PCR 扩增, 结果如图 3 所示, 其中 M: DL2000 Marker; 1—12 分别为 60 $^{\circ}$ C, 60.3 $^{\circ}$ C, 61.1 $^{\circ}$ C, 62.8 $^{\circ}$ C, 63.8 $^{\circ}$ C, 65.3 $^{\circ}$ C, 66.7 $^{\circ}$ C, 68.1 $^{\circ}$ C, 69.6 $^{\circ}$ C, 70.9 $^{\circ}$ C, 71.7 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C。由图 3 可见, 60 ~ 62.8 $^{\circ}$ C 之间有明亮的条带, 而在 64 $^{\circ}$ C 之后条带变淡, 至 69.6 $^{\circ}$ C 条带已很弱。为保持检测灵敏性及特异性, 选择退火温度为 63 $^{\circ}$ C。

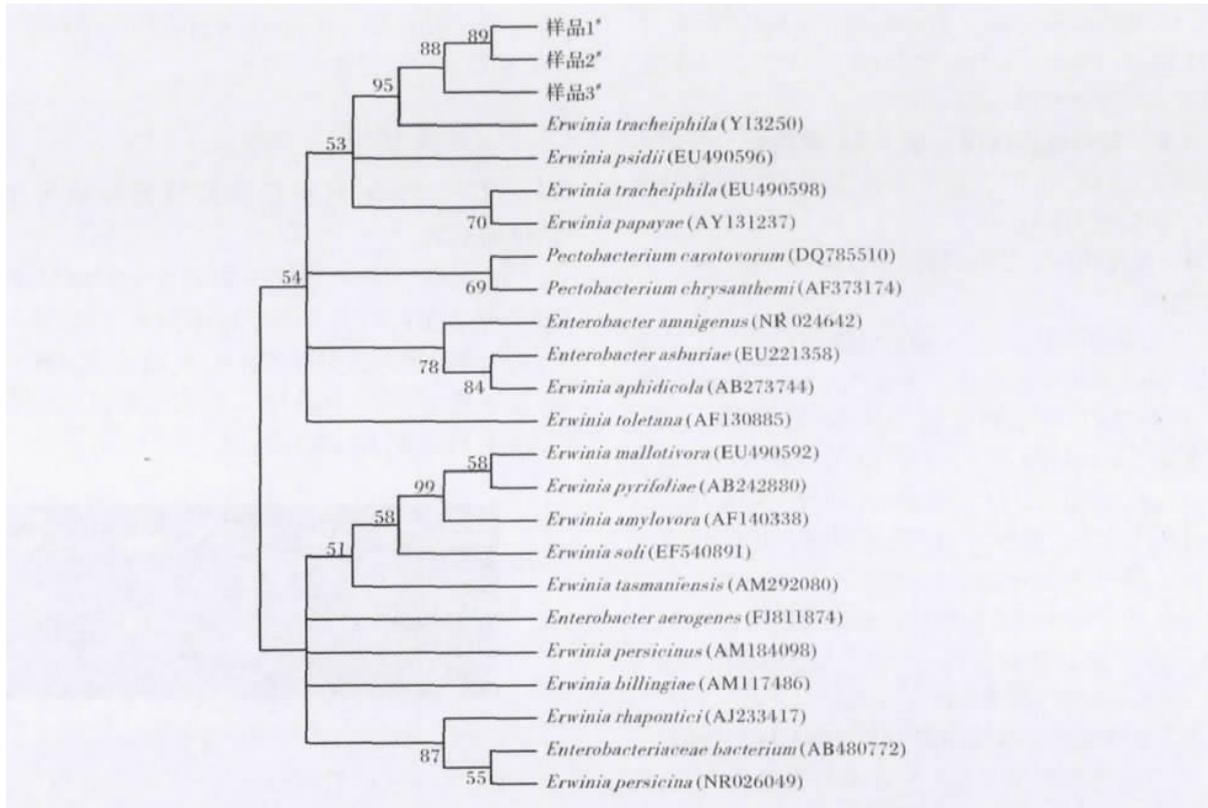


图 2 黄瓜细菌性萎蔫病菌的 16S rDNA 聚类分析树状图(NJ 法)

2.5 引物 ET-P1/ET-P2 的特异性检测

引物 ET-P1/ET-P2 对病原细菌和病原真菌的扩增图分别如图 4 和图 5 所示. 图 4 中 M: DL2000 Marker; 1—4: 黄瓜细菌性萎蔫病菌; 5—6: 胡萝卜欧文氏菌; 7—8: 青枯病菌; 9—10: 黄瓜果斑病菌; 11—12: 黄单胞杆菌; 13: 丁香假单胞菌丁香致病型; 14: 丁香假单胞万寿菊致病型; 15: 丁香假单胞甜菜致病型; 16: 丁香假单胞菌黄瓜致病型; 17: 丁香假单胞菌番茄致病型; 18—19: 发根农杆菌; 20—21: 根癌农杆菌. 图 5 中 M: DL2000 Marker; 1—4: 黄瓜细菌性萎蔫病菌; 5: 黄瓜灰霉病菌; 6: 黄瓜菌核病菌; 7: 黄瓜黑星病菌; 8: 黄瓜枯萎病菌; 9: 黄瓜褐斑病菌; 10: 黄瓜炭疽病菌; 11: 黄瓜白粉病菌; 12: 番茄菌核病菌; 13: 番茄灰霉病菌; 14: 番茄叶霉病菌; 15: 西瓜菌核病菌; 16: 甜瓜果腐病菌; 17: 甜瓜枯萎病菌; 18: 西瓜蔓枯病菌; 19: 瓜果腐霉病菌; 20—21: 菜豆炭疽病菌; 22: 西瓜枯萎病菌; 23: 禾谷链孢菌; 24: 新月弯孢菌. 可见, 引物 ET-P1/ET-P2 从供试黄瓜细菌性萎蔫病菌中扩增出约 800 bp 特异条带, 克隆该片段并测序分析得到 794 bp DNA 片段, 而其他的 20 个病原菌及近似菌株均无该条带, 表明该引物能将黄瓜细菌性萎蔫病菌与其他病原菌特异检测区分.



图 3 引物 ET-P1/ET-P2 温度梯度 PCR 的扩增图



图 4 引物 ET-P1/ET-P2 对病原细菌的扩增图

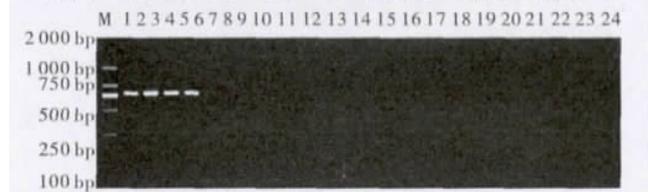


图 5 引物 ET-P1/ET-P2 对病原真菌的扩增图

2.6 引物 ET-P1/ET-P2 的灵敏度测定

提取黄瓜细菌性萎蔫病菌 DNA 后, 用核酸定量

仪测定基因组 DNA 浓度,并依次稀释到不同浓度,用优化后 PCR 体系扩增其灵敏度如图 6 所示,其中 M: DL2000 Marker; 1: 10 ng; 2: 1 ng; 3: 100 pg; 4: 10 pg; 5: 1 pg; 6: 100 fg; 7: 10 fg; 8: 1 fg; 9: 100 ag. 可见,引物 ET-P1/ET-P2 扩增后的灵敏度可达到 100 fg. *Erwinia tracheiphila* 通过植株伤口组织等部位侵入维管束,短时间内可在病菌浓度很低的情况下对田间生产造成严重危害. 本检测方法能够从田间早期发病植株和根围土壤中成功检测该病原菌.

2.7 黄瓜细菌性萎蔫病发病组织及田间土壤的快速检测

田间大棚采集黄瓜萎蔫病植株的茎蔓、果实和根围土壤,同时采集部分健康黄瓜植株组织,按 1.3 中的方法提取发病植株组织和根围土壤的基因组 DNA,用引物 ET-P1/ET-P2 检测,PCR 扩增结果如图 7 所示,其中 M: DL2000 Marker; 1: 阴性对照; 2: 阳性对照; 3: 健康组织; 4—5: 黄瓜萎蔫病发病组织; 6: 健康植株组织; 7—10: 黄瓜萎蔫病发病植株根围土壤; 11—16: 健康植株根围土壤. 可见,在发病黄瓜植株和根围土壤中均能检测到 *Erwinia tracheiphila* 特异条带,而健康植株则为阴性,这表明该检测方法能够成功对黄瓜萎蔫病植株和根围土壤进行田间检测和快速诊断.

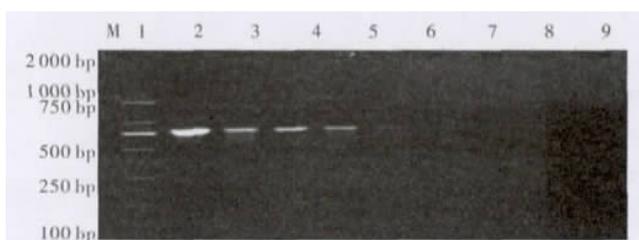


图 6 引物 ET-P1/ET-P2 扩增黄瓜萎蔫病菌灵敏度检测结果

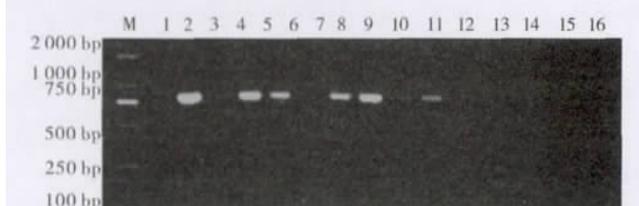


图 7 引物 ET-P1/ET-P2 检测黄瓜萎蔫病发病组织及根围土壤的 PCR 扩增结果

3 结论

从全国各地采集症状似黄瓜萎蔫病的发病黄

瓜茎蔓、果实,采用传统分离方法得到 15 株病原菌,选取 3 株进行研究.通过提取病原菌 DNA、进行 16S rDNA 扩增和序列分析,比对鉴定该病原菌为嗜维管束欧文氏菌(*Erwinia tracheiphila*),设计的引物 ET-P1/ET-P2 可从该病原菌中扩增出 794 bp 的特异条带,检测灵敏度达 100 fg/ μ L,可从发病植株组织和根围土壤中实现检测.

参考文献:

- [1] Staub J E, Peterson C E. Comparisons between bacterial wilt resistant and susceptible gynoecious cucumber lines and F_1 progeny [J]. Hort Science, 1986, 21: 1428.
- [2] 耿建芬, 于凌春, 张乃琴. 黄瓜细菌性萎蔫病的发生与防治 [J]. 莱阳农学院学报, 2002, 18(2): 147.
- [3] Sasu M A, Seidl-Adams I, Wall K. Floral transmission of *Erwinia tracheiphila* by cucumber beetles in a wild cucurbita pepo [J]. Environmental Entomology, 2010, 39(1): 140.
- [4] Monstein H J, Nikpour-Badr S, Jonasson J. Rapid molecular identification and subtyping of *Helicobacter pylori* by pyrosequencing of the 16S rDNA variable v1 and v3 regions [J]. FEMS Microbiology Letters, 2001, 199(1): 103.
- [5] 王敏. 马铃薯软腐病菌的 16S rDNA 的 PCR 检测 [J]. 中国马铃薯, 2007, 21(4): 206.
- [6] 王建荣, 回文广, 赵廷昌, 等. 哈密瓜细菌性果斑病菌快速检测方法的建立 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(11): 2495.
- [7] 贾迎, 李亚利. 采用 16S rDNA 鉴定甜瓜细菌性叶斑病菌 [J]. 植物保护, 2007, 33(3): 65.
- [8] Lydon J, Konga H, Blackwood C et al. The genetic characterization of *Pseudomonas syringae* pv. *tagetis* based on the 16S-23S rDNA intergenic spacer regions [J]. Biological Control, 2005, 32: 356.
- [9] 燕艳, 陈健, 燕昌江, 等. 利用分子生物学技术鉴定土壤微生物的方法 [J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(3): 129.
- [10] 李德葆, 周雪平, 许建平, 等. 基因工程操作技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 94-98.
- [11] LaMontagne M G, Michel Jr F C. Evaluation of extraction and purification methods for obtaining PCR-amplifiable DNA from compost for microbial community analysis [J]. Journal of Microbiological Methods, 2002, 49: 255.
- [12] Wang H, Qi M Q, Cutler A J. A simple method of preparing plant samples for PCR [J]. Nucleic Acids Research, 1993, 21(21): 4153.