

皖南烟田三种土传病原物分子检测

刘冰¹, 褚小静¹, 焦娇¹, 梁元存¹, 高正良², 周本国^{2*}

(1. 山东农业大学植物病理系, 山东 泰安 271018; 2. 安徽省农科院烟草研究所, 合肥 230031)

摘要: 为检测皖南烟田土传病害的分布, 2011—2012 年从皖南烟区烟田共采集土样 51 份, 采用分子生物学方法对烟田土壤进行了烟草黑胫病、根黑腐病和青枯病检测。结果显示, 烟田土壤中烟草黑胫病菌、根黑腐病菌和青枯病菌的阳性率分别为 19.6%、41.2% 和 56.9%, 3 种烟草土传病原菌在皖南烟区多数烟田均有分布, 其中青枯病菌检出率最高。本研究证明了应用分子生物学方法检测土传病原菌的可能性, 生产上可为烟草种植提供理论依据。

关键词: 烟草; 黑胫病; 根黑腐病; 青枯病; 分子检测

中图分类号: S572.08

文章编号: 1007-5119(2013)05-0100-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2013.05.020

Molecular Detection of Three Soil borne Pathogens from Tobacco Field in Anhui Province

LIU Bing¹, CHU Xiaojing¹, JIAO Jiao¹, LIANG Yuancun¹, GAO Zhengliang², ZHOU Benguo^{2*}

(1. College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271018, China;

2. Tobacco Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: Fifty one of soil samples were collected from southern Anhui Province to detect tobacco soil borne pathogens during 2011-2012. Tobacco soil borne pathogens were mainly composed of *Phytophthora parasitica*, *Thielaviopsis basicola*, and *Ralstonia solanacearum*, which were detected by a molecular biology method. The results demonstrated that the positive rates of *P. parasitica*, *T. basicola* and *R. solanacearum* of 51 samples were 19.6%, 41.2% and 56.9%, respectively. All three diseases occurred in Anhui province, but the detection rate of *R. solanacearum* was the highest among pathogens. This study demonstrates the potential application of molecular biology method in detecting soil borne plant pathogens, which can provide a theoretical basis for tobacco planting in the production.

Keywords: tobacco; black shank; black root rot; bacterial wilt disease; molecular detection

烟草是安徽省重要的经济作物, 随着户均规模的不断增加, 烟草连作种植面积越来越大, 一些病害的发生也逐年加重。据报道安徽省烟草侵染性病害有 31 种^[1], 其中, 烟草黑胫病、根黑腐病和青枯病是烟草病害中发病率较高, 具有毁灭性的土传病害^[1-2], 这 3 种病害近年来在皖南烟区的发病呈上升趋势。传统的病害诊断方法大多通过典型症状、病原菌的分离鉴定等, 但由于耗时较长, 不能及时指导病害预防^[3]。分子生物学的发展和 PCR (Polymerase Chain Reaction) 技术的诞生为快速、

准确检测病原菌提供了基础。根据微生物基因组的保守区段设计特异性引物用于检测病原菌的方法已得到广泛应用^[4-7]。本研究采用 PCR 方法对烟田上述 3 种土传病原菌的分布情况进行了检测。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 土样采集 2011—2012 年 4—5 月采集皖南烟区东至县、青阳县、宣城市、芜湖市烟田土壤样品 51 份, 土样主要来自烟-稻连作田。采样时, 按

基金项目: 安徽省烟草公司项目 (20100551002, 20100551005)

作者简介: 刘冰, 女, 在读硕士, 从事烟草病理学研究。E-mail: yuapiaoliubing@163.com。*通信作者, E-mail: bgzhou@163.com

收稿日期: 2012-12-09

修回日期: 2013-06-09

照 5 点取样法, 在每块烟田的 5 个不同位置取烟草根际土壤 100 g 左右, 混合后, 留下其中 100 g 做为该田病土。土样采集后均于 -4 °C 保存备用。

1.1.2 供试菌株 烟草黑胫病菌、烟草根黑腐病菌和烟草青枯病菌 3 种病原菌均由山东农业大学烟草研究室保存。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 烟草黑胫病菌和根黑腐病菌基因组 DNA 采用 CTAB 法^[8]提取, 烟草青枯病菌基因组 DNA 的提取参照酚-氯仿法^[9], 土壤总基因组 DNA 参照 Soil DNA Kit (购自 OMEGA 公司)说明书进行。提取的 DNA 于 -20 °C 保存备用。

1.2.2 特异性引物 参照文献^[10]方法设计烟草黑胫病菌特异性引物, 引物序列为 P1: 5'-GAAATGAACTTCCGCGCTCT-3', P2: 5'-TATTACAGTGACGCGCACG-3', 片段大小为 350 bp。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 40 s、60 °C 40 s、72 °C 40 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 7 min。参照文献^[11]方法设计烟草根黑腐病菌特异性引物, 引物序列为 P3: 5'-AACGTACCTTTTCTAGCTGCTTTG-3', P4: 5'-TGAGGGTTTTTCGGCATGTTA-3', 片段大小为 400 bp。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 1 min、64 °C 1 min、72 °C 30 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。参照文献^[12]方法设计烟草青枯病菌特异性引物, 引物序列为 P5: 5'-GTGCCTGCCTCCAAAACGACT-3', P6: 5'-GACGCCACCCGCATCCCTC-3', 片段大小为 159 bp。PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 2 min、62 °C 40 s、72 °C 40 s, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。1% 琼脂糖电泳后检测 PCR 产物的有无或大小。

2 结果

2.1 3 种病原菌特异性引物的验证

利用 3 对特异性引物对黑胫病菌、根黑腐病菌和青枯病菌的 DNA 进行 PCR 检测, 电泳后分别获

得 350、400、159 bp 的特异条带 (图 1), 扩增产物片段大小与预期结果一致, 并且这些特异性引物只能扩增出相应菌的特异条带, 片断大小能很好地区分 3 种病原菌, 可用于土壤中 3 种病菌的检测。

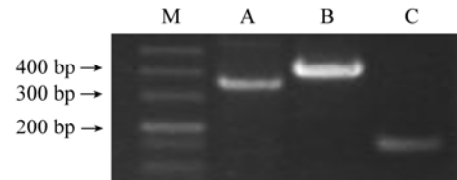


图 1 3 种病原菌的特异性引物扩增结果

Fig. 1 PCR detection for 3 pathogens with specific primers
注: M 为 DL500 DNA Marker; A 为烟草黑胫病菌; B 为烟草根黑腐病菌; C 为烟草青枯病菌。

2.2 土壤中 3 种土传病原菌的分子检测

2.2.1 土壤中烟草黑胫病菌的分子检测 利用特异性引物 P1/P2 对黑胫病菌 DNA 和土样 DNA 进行 PCR 扩增, 结果显示 (图 2), 黑胫病菌 DNA 和部分土样 DNA 能扩增出一条 350 bp 左右的特异性条带, 说明这些土样中含有黑胫病菌。

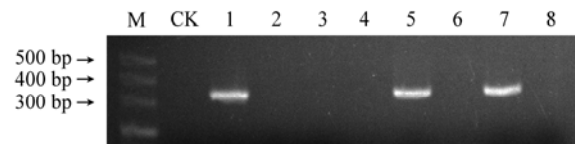


图 2 特异性引物检测土壤中烟草黑胫病菌

Fig. 2 Detection of *Phytophthora parasitica* from soil DNA by PCR with specific primers
注: M 为 DL500 DNA Marker; CK 为阴性对照; 1 为阳性对照; 2~8 为不同地块土壤 DNA。图 3、图 4 同。

2.2.2 土壤中烟草根黑腐病菌的分子检测 利用特异性引物 P3/P4 对根黑腐病菌 DNA 和土样 DNA 进行 PCR 扩增, 结果显示 (图 3), 根黑腐病菌 DNA 和部分土样 DNA 能扩增出一条 400 bp 左右的特异性条带, 说明这些土样中有根黑腐病菌。

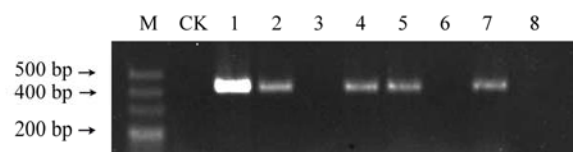


图 3 特异性引物检测土壤中烟草根黑腐病菌

Fig. 3 Detection of *Thielaviopsis basicola* from soil DNA by PCR with specific primers

2.2.3 土壤中烟草青枯病菌的分子检测 利用特异的引物 P5/P6 对青枯病菌 DNA 和土样 DNA 进行 PCR 扩增, 结果显示 (图 4), 青枯病菌 DNA 和部分土样 DNA 能扩增出一条 159 bp 左右的特异性条带, 说明这些土样中有青枯病菌。

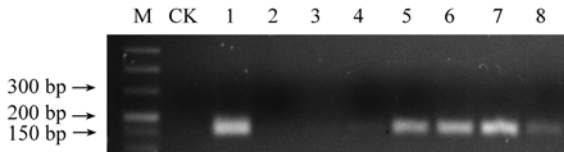


图 4 特异性引物检测土壤中烟草青枯病菌

Fig. 4 Detection of *Ralstonia solanacearum* from soil DNA by PCR with specific primers

2.3 51 份土壤样品中 3 种病原菌的检测结果

根据土壤中 3 种病原菌的 PCR 检测结果, 51 份土样中烟草青枯病菌和根黑腐病菌检出比率较高, 分别为 56.9% 和 41.2%, 黑胫病菌检出比率为 19.6%。其中部分烟田 3 种病菌都被检出, 占总土样的 11.7%, 3 种病原菌都未检出的土样占 17.6% (表 1、2)。

3 讨论

应用分子生物学方法检测土壤病原菌关键是设计出特异性引物, 在 3 对引物的筛选上, 要保证

引物的特异性高, 同时又要保证扩增产物大小不能太接近, 以免琼脂糖凝胶电泳时难以区分^[3]。本研究选取的 3 对引物特异性较强, 扩增片段大小易区分, 保证检测的准确性。更重要的是 3 种病原菌的特异性引物前人已经有很好的应用, 土壤中的其他微生物不能扩出相同大小的片段, 保证了检测的准确性。利用 PCR 技术可以快速灵敏地检测土壤中是否含有 3 种病原菌, 该方法简便可行, 但需要保证土壤 DNA 的浓度, 本研究采用 Soil DNA Kit 可以高效地从土壤中提取基因组 DNA, 提取的 DNA 浓度在 1000 μg/mL 左右, 远高于引物灵敏度所需的浓度, 可用于 PCR 检测。

相对于传统的病害诊断, 基于 PCR 的分子诊断可以检测土壤潜在的病原菌, 此方法无须进行病原菌的分离, 直接从土壤中提取基因组 DNA 用于 PCR 检测, 能快速、方便、准确地检测病原菌^[13]。近年来, 赵永强等^[11]利用 PCR 方法研究了烟草根黑腐病菌的分子检测, 结果表明, 此方法适用于从烟田土壤和罹病组织中检测病原菌。烟草黑胫病、根黑腐病和青枯病属烟草根茎部病害, 多年来在安徽烟区发生严重, 尤其在皖南烟区, 烟田多数采用烟-稻连作种植方式, 长期连作使得土传病害更为严

表 1 2011 年采集土样检测结果

Table 1 The results of PCR detection of soil samples collected in 2011

地点	序号	经纬度	黑胫病检测	根黑腐病检测	青枯病检测
东至县昭潭镇龙潭村	1	N29°45'23.04", E116°46'52.32"	-	-	+
	2	N29°45'27.04", E116°46'52.68"	-	-	+
	3	N29°45'27.72", E116°46'49.08"	-	+	+
	4	N29°45'29.52", E116°46'39.00"	-	-	+
	5	N29°45'19.08", E116°47'10.32"	-	-	+
东至县张溪镇梅亭农场	6	N30°14'26.88", E117°08'05.64"	-	-	+
东至县羊湖镇永济村	7	N34°09'15.84", E117°11'18.06"	+	+	+
	8	N30°09'15.12", E117°11'21.84"	-	-	+
东至县张溪镇土桥村	9	N30°17'35.52", E117°05'18.06"	-	-	+
	10	N30°17'29.76", E117°05'21.12"	-	-	-
石台县小河镇龙山村	11	N30°15'45.24", E117°18'58.68"	-	+	-
石台县小河镇安平村	12	N30°15'53.64", E117°19'739.00"	-	+	-
宣州区文昌镇福川村	13	N30°50'48.84", E118°30'34.92"	-	-	+
	14	N30°50'46.32", E118°30'33.84"	-	-	+
宣州区黄渡乡峰山村	15	N30°51'38.88", E118°50'32.64"	-	-	+
	16	N30°51'35.64", E118°50'29.76"	-	+	-
宣州区黄渡乡西扎村	17	N30°47'27.96", E118°51'50.76"	-	-	-
宣州区新田镇新田村	18	N30°45'05.04", E118°46'27.84"	-	-	-
	19	N30°43'19.02", E118°44'56.76"	-	-	-
宣州区金坝乡三合村	20	N30°50'31.56", E118°40'16.32"	+	+	-
宣州区文昌镇和州村	21	N30°50'05.64", E118°29'40.56"	+	+	-
宣州区文昌镇施田村	22	N30°51'08.64", E118°30'52.02"	+	-	+
	23	N30°51'57.67", E118°31'08.47"	-	+	-
	24	N30°51'48.32", E118°31'45.27"	-	-	-
宣州区寒亭镇义兴村	25	N30°50'34.08", E118°34'02.46"	-	+	-

注: “+”为阳性; “-”为阴性。下同。

表 2 2012 年采集土样检测结果

Table 2 The results of PCR detection of soil samples collected in 2012

地点	序号	经纬度	黑胫病检测	根黑腐病检测	青枯病检测	
青阳县杜村乡龙华村	26	N33°33'14.02", E117°43'26.68"	-	-	-	
	27	N33°33'13.62", E117°43'27.02"	-	-	-	
	28	N33°33'11.87", E117°43'27.03"	-	-	-	
	29	N33°33'11.60", E117°43'27.15"	-	-	+	
	30	N33°33'13.78", E117°43'28.31"	-	+	+	
	31	N33°33'13.02", E117°43'28.00"	-	+	-	
	32	N33°33'13.26", E117°43'28.31"	-	-	-	
	33	N30°31'31.17", E117°44'20.19"	-	-	+	
	青阳县杜村乡西珂村	34	N30°30'03.00", E117°43'44.35"	-	-	+
	东至县昭潭镇官营村	35	N29°45'45.72", E116°46'09.26"	+	+	+
	36	N29°45'48.15", E116°45'55.93"	+	+	-	
	37	N29°45'48.05", E116°45'55.83"	+	+	+	
东至县昭潭镇龙潭村	38	N29°45'03.13", E116°46'58.16"	-	+	-	
东至县木塔乡苏村	39	N29°45'27.00", E116°56'17.57"	-	-	+	
	40	N29°45'27.95", E116°56'19.99"	-	-	+	
东至县木塔乡苏村	41	N29°45'10.75", E116°56'48.83"	-	-	+	
东至县张溪镇梅术亭农场	42	N30°14'27.24", E117°08'17.23"	-	-	+	
	43	N30°14'33.05", E117°08'21.94"	-	-	+	
	44	N30°14'23.05", E117°07'55.89"	+	+	+	
	45	N30°14'12.56", E117°07'48.12"	-	-	+	
宣州区黄渡乡西扎村	46	N30°48'08.89", E118°52'03.80"	-	+	-	
	47	N30°48'10.52", E118°52'03.80"	-	+	-	
宣州区黄渡乡柏枫村	48	N30°44'13.74", E118°52'46.27"	-	-	+	
宣州区文昌镇和州村	49	N30°52'22.83", E118°29'01.19"	+	+	-	
	50	N30°52'13.21", E118°29'11.13"	+	+	+	
芜湖县湾沚镇杨村	51	N31°20' 07.76", E118°22'02.14"	-	+	+	

重，影响了皖南烟区烟叶生产的可持续发展。同时由于 3 种病害田间症状相似，易于混淆，而复合侵染更增加了诊断的困难。本研究为 3 种病害的快速诊断提供了依据。

根据本研究结果，皖南烟区烟草黑胫病菌、根黑腐病菌、青枯病菌的土壤阳性率分别为 19.6%、41.2%、56.9%，3 种病原菌都未检出的地块仅占 17.6%，说明 3 种烟草病原菌在皖南烟区分布非常普遍，其中青枯病菌检出率最高。生产上应加强对 3 种土传病害的预防，尤其是青枯病的防治工作，这也为烟草病害的综合防治提供了理论依据。

参考文献

[1] 高正良, 钱玉梅, 周本国. 烟草病害的发生特点与防治对策[J]. 安徽农业技术师范学院学报, 1997, 11(3): 47-49.

[2] 陈瑞泰, 朱贤朝, 王智发, 等. 全国 16 个主产烟省(区)烟草侵染性病害调查报告[J]. 中国烟草科学, 1997, 18(4): 1-7.

[3] 王楠, 王剑, 尹丹韩, 等. 三重 PCR 检测草莓灰霉病菌、炭疽病菌和黄萎病菌[J]. 中国农业科学, 2010, 43(21): 4392-4400.

[4] Picard C, Ponsonnet C, Paget E, et al. Detection and enumeration of bacteria in soil by direct DNA extraction and polymerase chain reaction[J]. Applied and

Environmental Microbiology, 1992, 58(9): 2717-2722.

[5] Seal S. PCR-based detection and characterization of *Pseudomonas solanacearum* for use in less developed countries[J]. EPPO Bulletin, 1995, 25: 227-231.

[6] Johanson A, Turner H C, McKay G J, et al. A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheath blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae*, *R. oryzae-sativae*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1998, 162: 289-294.

[7] Bonants P, Weerdt M H, Lacourt I, et al. Detection and identification of *Phytophthora fragariae* by the polymerase chain reaction[J]. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103: 345-355.

[8] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(6): 1349.

[9] 夏涵, 府伟灵, 陈鸣, 等. 快速提取细菌 DNA 方法的研究[J]. 现代预防医学, 2005, 32(5): 571-573.

[10] 梁元存, 刘爱新, 董汉松, 等. 寄生疫霉 parA1 基因的克隆及在大肠杆菌中的表达[J]. 微生物学报, 2004, 44(2): 202-205.

[11] 赵永强, 张成玲, 张薇, 等. 烟草根黑腐病菌的 PCR 分子检测[J]. 植物病理学报, 2009, 39(1): 23-29.

[12] Chen Y, Zhang W Z, Liu X, et al. A real-time PCR assay for the quantitative detection of *Ralstonia solanacearum* in horticultural soil and plant tissues[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2010, 20(1): 193-201.

[13] 陆琼娴, 杨慧勇, 王兵, 等. 小麦茎基部土传真菌病害的分子诊断[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(3): 531-536.