

# 基于 URP-PCR 多态性片段的苦瓜枯萎病菌 特异性检测技术的建立

郭康迪, 赵莹, 李震, 丁胜利\*, 文才艺\*

(河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002)

**摘要:**通过 URP(Universal Rice Primers)-PCR 分析尖孢镰孢菌苦瓜专化型基因组 DNA 扩增片段多态性, 筛选检测尖孢镰孢菌苦瓜专化型的特异性引物, 并建立了基于该引物的 PCR 检测方法。结果表明, 特异性引物为 FOMM-SPF/FOMM-SPR, PCR 检测体系为 25  $\mu\text{L}$ , 包括 2  $\times$ Green *Taq* Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的上下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ , 灭菌去离子水补足至 25  $\mu\text{L}$ ; PCR 程序为 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 57 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s, 共 30 个循环, 循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min; 特异性扩增片段大小 294 bp, 检测灵敏度为 2  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  DNA 或 50 个孢子 $\cdot 500\text{ mg}^{-1}$  土壤。该引物及其检测方法对尖孢镰孢菌苦瓜专化型的检测特异性好、灵敏度高, 可以从土壤和植物样品中快速准确地检测出苦瓜枯萎病菌, 无需病原菌的分离培养和致病性检测, 对苦瓜枯萎病的早期诊断和预警及有效防控具有重要的指导意义。

**关键词:**URP-PCR 多态性片段; 苦瓜枯萎病; 尖孢镰孢菌苦瓜专化型; 分子检测

**Development of special detection technology for *Fusarium oxysporum* f. sp. *momodicae* based on URP-PCR polymorphic bands** GUO Kang-di, ZHAO Ying, LI Zhen, DING Sheng-li\*, WEN Cai-yi\* (College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Special primers and detection approach were developed based on the DNA amplification fragment polymorphs by URP (Universal Rice Primers)-PCR in *Fusarium oxysporum* f. sp. *momodicae* causing bitter gourd wilt. The application showed that the specific 294 bp amplicon was generated with the specific primer pair FOMM-SPF/FOMM-SPR in 25  $\mu\text{L}$  of detection volume including 12.5  $\mu\text{L}$  of 2  $\times$ Green *Taq* Master Mix, 1  $\mu\text{L}$  of 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  each primer, 1  $\mu\text{L}$  of template DNA, and sterile ddH<sub>2</sub>O to obtain the final volume; Cycling conditions were 3 min initial denaturation at 95 $^{\circ}\text{C}$ , 30 cycles of 15 s at 94 $^{\circ}\text{C}$ , 30 s at 57 $^{\circ}\text{C}$ , 20 s at 72 $^{\circ}\text{C}$  and final elongation 5 min. The specific primer pair for 294 bp product and the detection sensitivity is 2  $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  for genomic DNA of *F. oxysporum* f. sp. *momodicae* and 50 spores $\cdot 500\text{ mg}^{-1}$  soil for the soil pathogen. The processing methods exhibited the high specificity and sensitivity *F. oxysporum* f. sp. *momodicae* that could be detected in the soil and plant samples rapidly and accurately instead of pathogen isolation and pathogenicity test, which would be beneficial in significance for the early diagnosis, early warning, and effective control of the bitter gourd *Fusarium* wilt disease.

**Key words:** universal rice primers-PCR polymorphic fragment; bitter gourd *Fusarium* wilt; *Fusarium oxysporum* f. sp. *momodicae*; molecular detection

收稿日期: 2018-06-15; 修回日期: 2018-09-18; 网络出版时间: 2018-09-20

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20180920.1056.001.html>

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201503110)

通讯作者: 丁胜利, 教授, 主要从事植物病原真菌生物学和分子遗传学研究; E-mail: shengli ding@henau.edu.cn

文才艺, 教授, 主要从事植物病害生物防治研究; E-mail: wencaiyi@henau.edu.cn

第一作者: 郭康迪, 硕士研究生, 主要从事植物病害生物防治研究; E-mail: guokangdi0316@163.com。

中图分类号: S432.44; S436.42

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2019)03-0306-08

由尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*) 侵染蔬菜瓜类引起的枯萎病是一种典型土传病害,也是一种毁灭性维管束病害。近年来,由于设施农业的广泛推广,以及作物重茬面积不断扩大,瓜类枯萎病的发生和危害日益严重。瓜类枯萎病发病率一般在 10%~30%,严重时高达 80%,甚至绝产,且一旦发病,难以根除,已成为影响瓜类生产的严重障碍之一。

尖孢镰孢菌寄主范围广泛,但对不同属(种)寄主植物以及同种寄主植物不同品种的致病性存在明显差异,因此具有高度的寄主专化性。我国已明确报道的尖孢镰孢菌瓜类专化型有 6 个<sup>[1-3]</sup>。研究表明,瓜类枯萎病菌各专化型并非严格的寄主专化性,不同专化型菌株除强侵染相应的寄主植物外,也可侵染其它寄主植物,如尖孢镰孢菌黄瓜专化型菌株除强侵染黄瓜外,还可弱侵染甜瓜和西瓜;尖孢镰孢菌西瓜专化型菌株除强侵染西瓜外,还可弱侵染黄瓜和甜瓜<sup>[4]</sup>;尖孢镰孢菌苦瓜专化型菌株除强侵染苦瓜外,还可弱侵染葫芦和瓠子<sup>[5]</sup>,给瓜类枯萎病害的有效防控和早期诊断带来了一定的困难。针对黄瓜、西瓜和甜瓜枯萎病菌,基于 RFLP (restriction fragment length polymorphism)、RAPD (randomly amplified polymorphism)、AFLP (amplified fragment length polymorphism)、SSR (simple sequence repeat)、ISSR (internal simple sequence repeat) 等多态性分析技术和 rDNA (ribosomal DNA) 序列分析的 PCR 技术相继应用于病原菌的特异性检测<sup>[6-10]</sup>,但这些检测技术在实际应用中均存在操作复杂、检测成本高等局限性,加之对瓜类枯萎病菌的分类鉴定除采用形态学和分子生物学方法外,还必须结合病原菌分离物对不同寄主植物的致病性测定结果,一方面,鉴定结果受接种操作等人为因素的影响;另一方面,致病性鉴定时间长,且受寄主植物品种的影响,鉴定结果具有不确定性。因此,有必要建立准确、快速、灵敏和实用的瓜类枯萎病菌检测技术,以实现瓜类枯萎病的早期诊断,为有效防控瓜类枯萎病提供依据。

对于由尖孢镰孢菌苦瓜专化型侵染引起的苦瓜枯萎病而言,相关报道多集中在病原菌分离鉴定

及其多态性分析<sup>[5,11,12]</sup>,而对于该病原菌特异、准确、快速的检测方法研究较少。本文利用单引物扩增的 Universal Rice Primers (URP)-PCR 技术<sup>[13-16]</sup>,对尖孢镰孢菌苦瓜专化型和其它专化型的分离物总 DNA 进行 PCR 扩增,获得了苦瓜枯萎病菌特异性扩增条带,筛选出特异性 PCR 引物,并建立了稳定的 PCR 扩增体系,实现了对尖孢镰孢菌苦瓜专化型的特异、灵敏、快速的分子检测,为苦瓜枯萎病害的早期诊断、预警和有效防控提供了依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试病原菌

试验所用的尖孢镰孢菌苦瓜专化型均为河南农业大学植物保护学院植物病害生物防治研究室分离保存;尖孢镰孢菌黄瓜专化型由中国农业大学吴学宏教授惠赠;尖孢镰孢菌古巴专化型(1号小种和4号小种)由中国热带农业科学院海口实验站曾会才研究员惠赠;尖孢镰孢菌西瓜专化型由河南省农业科学院园艺研究所西瓜甜瓜研究室梁慎博士惠赠;假禾谷镰孢菌、变红镰孢菌、茄镰孢菌、*Fusarium commune*、层出镰孢菌和禾谷镰孢菌均由河南农业大学植物病害综合防治研究室分离保存。以上病原菌的分生孢子甘油悬浮液保存于-80℃冰箱,菌株编号及来源如表 1 所示。

### 1.2 DNA 提取

培养基平板上培养一周的菌丝体和寄主不同组织,采用 SCIENTZ-48 高通量组织研磨器,70 Hz 震荡研磨破碎细胞,60 s 间歇一次,共 5 次,用 CTAB 法提取菌丝体和植物基因组 DNA, Nano-Drop 定量 DNA 浓度。

混有分生孢子的菌土和田间土壤总 DNA 提取,按照 Mag-Bind Soil DNA Kit M5635-01 土壤 DNA 提取试剂盒说明书介绍的方法进行,每管加 300 μL 研磨沙,提取土壤总 DNA 作为后续 PCR 扩增模板。

### 1.3 PCR 扩增及引物设计

URP-PCR 引物见表 2,扩增反应体系和凝胶电泳检测参照文献<sup>[14]</sup>的方法进行。

Table 1 Strains of *Fusarium* spp. used in this study

Isolate	Species or f. sp.	Source	Accession number
ShanD5	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>momodicae</i>	This study	MF445427
JiangX9	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>momodicae</i>	This study	MG242174
GuangX28	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>momodicae</i>	This study	MF445490
HeN6	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>momodicae</i>	This study	KY765418
HuN2	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>momodicae</i>	This study	MF445456
FuJ11	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>momodicae</i>	This study	MG242194
GuangD11	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>momodicae</i>	This study	MG242148
HaiN8	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>momodicae</i>	This study	MF445449
TGKW2	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i>	Henan Academy of Agricultural Sciences	KY798174
XGKW1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	Henan Academy of Agricultural Sciences	KY798170
HK3	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cucumerinum</i>	China Agricultural University	KY798180
FOC1	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences	-
FOC4	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences	-
Fgra1	<i>F. graminearum</i>	This study	-
Fpgra1	<i>F. pseudograminearum</i>	This study	-
GuangD7	<i>F. proliferatum</i>	This study	KY785010
HaiN1	<i>F. incarnatum</i>	This study	KY785009
GuangX15	<i>F. solani</i>	This study	KY785013
ZheJ30	<i>F. commune</i>	This study	KY785008

Table 2 Primers used for URP-PCR

Primer	Primer sequence (5'-3')
URP-1F	ATCCAAGGTCCGAGACAACC
URP-2F	GTGTGCGATCAGTTGCTGGG
URP-2R	CCCAGCAACTGATCGCACAC
URP-4R	AGGACTCGATAACAGGCTCC
URP-6R	GCAAGCTGGTGGGAGGTAC
URP-9F	ATGTGTGCGATCAGTTGCTG
URP-13R	TACATCGCAAGTGACACAGG
URP-17R	AATGTGGGCAAGCTGGTGGT
URP-25F	GATGTGTTCTTGAGCCTGT
URP-30F	GGACAAGAAGAGGATGTGGA
URP-32F	TACACGTCTCGATCTACAGG
URP-38F	AAGAGGCATTCTACCACCAC

分别使用上述 12 条单引物扩增,使用 25  $\mu\text{L}$  反应体系,包括 2  $\times$ Green *Taq* PCR Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的上述一条单引物 2  $\mu\text{L}$ , DNA 模板溶液 2  $\mu\text{L}$ , 灭菌去离子水 8.5  $\mu\text{L}$ ; PCR 程序为 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 1 min, 55 $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 共 35 个循环, 循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min, 降温至 16 $^{\circ}\text{C}$ ; 首先分别使用上述 12 条引物扩增供试菌株 DNA, 每一次反应仅使用

1 条通用引物, 以供试的不同尖孢镰孢菌基因组 DNA 为模板扩增, 1% 琼脂糖凝胶电泳, 初步分析比较苦瓜枯萎病菌特异扩增条带, 挑选能产生特异特征条带的引物, 同样方法扩增, 产物用 1.8% 琼脂糖凝胶低压长时间电泳, 切胶回收特征条带, 测序 [生工生物工程(上海)股份有限公司], 获得特异性序列, 在 <http://fungi.ensemble.org> 网站上, 分别比对已有的 13 个尖孢镰孢菌基因组数据库(未发现苦瓜枯萎病菌基因组数据), 根据未比对上的部分序列, 或者即使大部分比对上, 选择 3' 端几个碱基未比对上的序列, 再综合考虑在正负链上的位置, 设计多条正向和反向引物, 进行自由配对, 利用上述同样 DNA 模板进行扩增, 每对引物的扩增体系不变, 扩增程序根据产物大小和引物溶解温度不同而定, 筛选出稳定扩增特异性片段的最佳引物组合。扩增体系的建立原则是反应过程尽量耗时少, 减少预变性、变性和退火的时间, 在保证足够扩增产物前提下, 尽量减少循环次数, 最后确定最佳 PCR 体系。

#### 1.4 引物特异性检测

对供试的 19 株植物病原菌菌株的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。25  $\mu\text{L}$  反应体系包括: 2  $\times$

Green Taq Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的上下游引物 FOMM-SPF/FOMM-SPR 各 1  $\mu\text{L}$ , 模板溶液 1  $\mu\text{L}$ , 灭菌去离子水补足至 25  $\mu\text{L}$ ; PCR 程序为 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 57 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s, 共 30 个循环, 循环结束后 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 降温至 16 $^{\circ}\text{C}$ 。

### 1.5 灵敏度检测

用核酸测定仪测定模板 DNA 浓度并进行梯度稀释后, 利用上述 PCR 体系进行扩增反应, 检测该方法的灵敏性。

### 1.6 对土壤中病原菌孢子的检测

过滤收集尖孢镰孢菌苦瓜专化型菌株的分生孢子, 无菌水悬浮, 血球计数板计数, 梯度稀释, 分别获得孢子浓度为  $5\times 10^6$ 、 $5\times 10^5$ 、 $5\times 10^4$ 、 $5\times 10^3$ 、 $5\times 10^2$  和  $5\times 10^1$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$  的孢子悬浮液, 无菌水为对照; 取 1 mL 转入新的螺口带橡皮垫圈且耐低温的 2 mL 灭菌的离心管, 12 000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  冷冻离心 1 min, 弃上清液, 加入 500 mg 过筛的灭菌土充分混匀, 即为菌土。按照土壤 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA, 采用上述 PCR 反应体系进行扩增, 取 6  $\mu\text{L}$  PCR 产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.7 对人工接种植物组织中病原菌的检测

在 8 cm  $\times$  12 cm 的塑料盆中播种苦瓜用于接种病原菌。苦瓜品种为如玉 39 号, 购于福建农科农业良种开发有限公司。在 24 $^{\circ}\text{C}$  ~ 26 $^{\circ}\text{C}$  的温室中培育苦瓜苗, 待苦瓜生长至 3~4 叶期时, 用  $5\times 10^5$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$  的苦瓜枯萎病菌孢子悬浮液 50 mL 灌根接种苦瓜, 50 mL 无菌水灌根处理为对照。接种处理后第 9 d 取样, 分别采取处理组和对照组苦瓜植株的子叶、叶柄和主根各 0.5 g, 切成小段, 放入有灭菌钢珠的耐低温 2 mL 旋口离心管中, 液氮速冻, -80 $^{\circ}\text{C}$  保存。装有样品的离心管在液氮中预处理, 然后在震荡仪上 70 Hz 震荡 30 s, 取出离心管液氮处理后, 再震荡 30 s, 如此重复 5 次, 用来破碎苦瓜组织和真菌的细胞壁。用 CTAB 法提取植物组织 DNA, 按照上述 PCR 反应体系和反应条件, 扩增 DNA, 取 6  $\mu\text{L}$  PCR 产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.8 田间土壤样品检测及验证

按照 5 点取样法, 从山东泰安的两个苦瓜保护

地分别采集土壤样品各一份。其中, 连作 3 年以上、病害发生严重的地块土壤样品编号为 T1; 首次种植、无病害发生的地块样品编号为 T2。按照 1.2 的方法提取土壤总 DNA, 作为模板用于 PCR 扩增, 取 6  $\mu\text{L}$  PCR 产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.9 田间罹病植株组织样品检测及验证

分别从山东泰安和福建漳州采集健康苦瓜和罹病苦瓜植株各 3 份。其中, 山东泰安的一份健康植株样品的编号为 J1, 两份罹病植株样品的编号分别为 B1 和 B2; 福建漳州的一份健康植株样品编号为 J2, 两份罹病植株样品编号分别为 B3 和 B4。按照 2.1 中的方法提取植物组织样品的总 DNA, 作为模板用于 PCR 扩增, 取 6  $\mu\text{L}$  PCR 产物, 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 苦瓜枯萎病菌 URP-PCR 特异性片段的筛选及 PCR 扩增体系建立

通过 12 条通用引物的 PCR 筛选, URP-32F 获得 1 014 bp 苦瓜枯萎病菌特异性条带(图 1)。特异性条带测序后, 经过对已知的尖孢镰孢菌基因组序列 BLAST 检索, 仅发现 20 bp 左右不同位置的匹配序列, 未发现长的同源序列。

根据比对结果, 在未匹配区域, 手动设计引物, 随机配对, 进一步 PCR 扩增, 筛选获得 1 对特异性引物 FOMM-SPF (5' AAGGATAACGAGGCT-AGCT3')/FOMM-SPR (5' GTATAGAGCATCTAG-ACACGAATGC3'), 扩增特异性片段大小为 294 bp, 该片段序列与预期序列一致。引物特异性检测结果(图 2)。用引物 FOMM-SPF/FOMM-SPR 扩增 19 个供试菌株, 只有尖孢镰孢菌苦瓜专化型菌株出现了 294 bp 的条带, 其它菌株没有相应的扩增片段。

不同退火温度的 PCR 结果(图 3)。从 53 $^{\circ}\text{C}$ 、55 $^{\circ}\text{C}$ 、57 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 、62 $^{\circ}\text{C}$  至 65 $^{\circ}\text{C}$ , 梯度 PCR 产物结果均很特异, 本研究选择 57 $^{\circ}\text{C}$  为最佳退火温度。PCR 反应体系(表 3), 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min; 扩增 30 个循环(包括: 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s; 57 $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s); 循环结束后, 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。



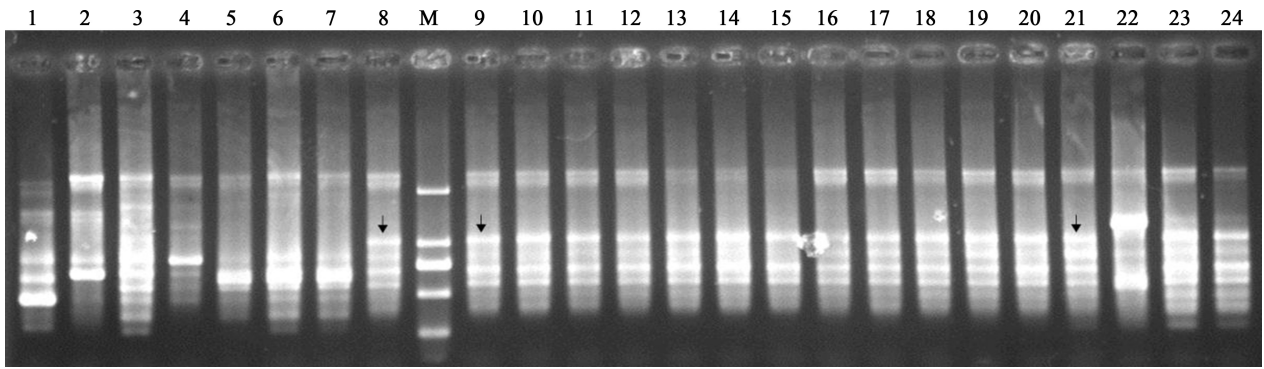


Fig. 1 PCR amplification with primer URP-32F for genomic DNA from different strains of *Fusarium oxysporum* forma specialis

1, 2: *F. oxysporum* f. sp. *cubense* FOC1 and FOC4; 3, 4: *F. oxysporum* f. sp. *melonis* FOM-1 and FOM-2; 5-7: *F. oxysporum* f. sp. *niveum* FON-1, FON-2 and FON-3; M: DNA marker (DL2000); 8-24: Isolates of *F. oxysporum* f. sp. *momodiccae*.



Fig. 2 PCR amplification with primer FOMM-SPF/FOMM-SPR for 19 strains (*Fusarium* spp.)

M: DNA marker (DL2000); CK1: Negative control; CK2: Positive control; 1-19: ShanD5, JiangX9, GuangX28, HeN6, HuN2, FuJ11, GuangD11, HaiN8, *F. oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. oxysporum* f. sp. *niveum*, *F. oxysporum* f. sp. *cucumerinum*, *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC1), *F. oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC4), *F. graminearum*, *F. pseudograminearum*, *F. proliferatum*, *F. incarnatum*, *F. solani*, *F. commune*.

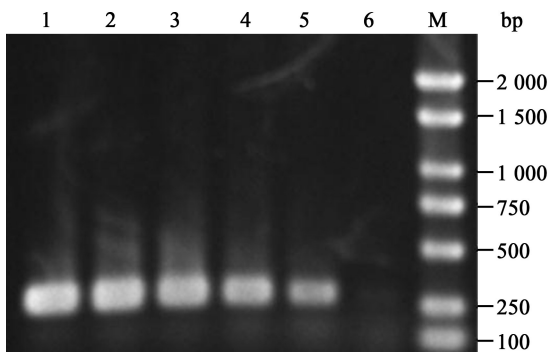


Fig. 3 PCR amplification with primer FOMM-SPF/FOMM-SPR at different annealing temperatures

1-6: 53°C, 55°C, 57°C, 60°C, 62°C and 65°C; M: DNA marker (DL2000).

Table 3 The protocol for URP-32F PCR amplification

Reaction content	Volume/ $\mu\text{L}$
2 $\times$ Green Taq Master Mix	12.5
Primer FOMM-SPF ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	1.0
Primer FOMM-SPR ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	1.0
Template	1.0
ddH <sub>2</sub> O	9.5
Total volume	25.0

## 2.2 检测灵敏度

对模板 DNA 梯度稀释和含病原菌孢子的人工病土样品总 DNA 的 PCR 结果 (图 4、图 5)。反应体系中 DNA 浓度为  $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  和每 500 mg

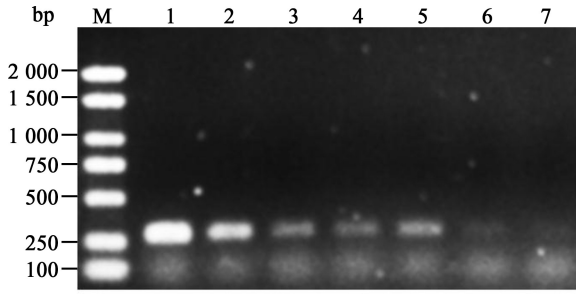


Fig. 4 Sensitivity of PCR with primer FOMM-SPF/FOMM-SPR for genomic DNA

M: DNA marker (DL2000); 1-7: PCR products from  $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $2 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,  $0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  genomic DNA, respectively.

土壤中含有 50 个苦瓜枯萎病菌分生孢子时,均能检测出来。因此,该引物的检测灵敏度高,适合于实验室和生产过程中对苦瓜枯萎病菌的有效检测。

### 2.3 人工接种的植物组织检测结果

室内接种试验表明,苦瓜植株一般在接种病原菌后第 9 d 开始发病,接种后 13~15 d 表现为典型的枯萎病症状,接种后第 21 d 感病植株完全枯死。本研究 PCR 检测结果(图 6)。苦瓜枯萎病菌分生孢子灌根处理后第 9 d,植株的子叶、叶柄和根组织中均可以扩增出特异性条带,检测为尖孢镰孢菌苦瓜专化型,而无菌水处理的植株中均未检测出特异性条带,表明该引物及其 PCR 检测方法适用于植物组织样品中苦瓜枯萎病菌的检测。

### 2.4 田间土壤苦瓜枯萎病菌的 PCR 检测结果

田间土壤样品的 PCR 检测结果(图 7)。编号为 T1 的土壤样品中能检测到特异苦瓜枯萎病菌

目标条带,检测为阳性,表明该土壤中含有苦瓜枯萎病菌;编号为 T2 的土壤样品检测结果为阴性,表明该土壤中不含有苦瓜枯萎病菌。检测结果与实际情况一致,表明该引物及其 PCR 检测方法适用于苦瓜种植地土壤中病原菌的检测。

### 2.5 田间罹病苦瓜植株的检测结果

PCR 检测结果(图 8)。从山东泰安和福建漳州采集的健康植株样品中未能扩增出苦瓜枯萎病菌的特异性条带,检测结果均为阴性;而从两个地区采集的罹病植株样品中均能扩增出苦瓜枯萎病菌的特异性条带,检测结果均为阳性。以上检测结果与田间的实际情况一致,表明该引物及其 PCR 检测方法对田间病株的检测具有很强的特异性和可靠性。

## 3 讨论

苦瓜枯萎病是苦瓜生产上危害严重的土传病害之一,尚无有效防治措施,一旦发生很难控制。该病害的早期诊断和预警是有效防控的关键。现有的苦瓜枯萎病菌的鉴定方法一般采用分离培养、形态学观察、分子生物学鉴定和致病性测定等方法。其中,病原菌致病性测定由于目前并没有公认的鉴别寄主,且接种试验结果受环境条件的影响较大,因此,测定结果往往具有不确定性,加之,致病性测定的时间长(从接种到发病并表现典型的症状一般为 9~13 d),费时费工,不利于苦瓜枯萎病的早期诊断,导致错失病害防控的最佳时机,给生产造成难以挽回的损失。本研究筛选的特异性引物及其 PCR 检测方法,能实现对苦瓜枯萎病菌的特异性检测,且检测灵敏度高、操作简便、检测时间

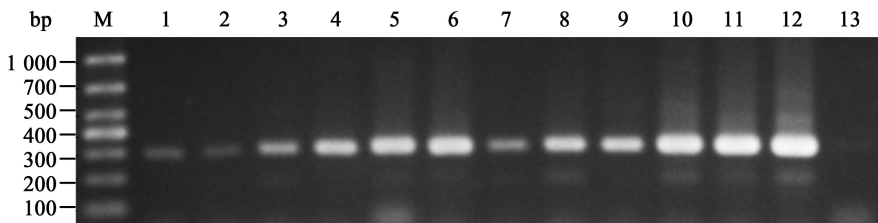


Fig. 5 PCR with primer FOMM-SPF/FOMM-SPR for measuring spores of *Fusarium oxysporum* f. sp. *momodicase* in fresh soil

M: DNA marker (DL1000); Serial dilution of spores was used for mixture with 500 mg soil; Lane 1 and 7,  $5 \times 10^1$ ; Lane 2 and 8,  $5 \times 10^2$ ; Lane 3 and 9,  $5 \times 10^3$ ; Lane 4 and 10,  $5 \times 10^4$ ; Lane 5 and 11,  $5 \times 10^5$ ; Lane 6 and 12,  $5 \times 10^6$ ; Lane 13: Sterile soil.

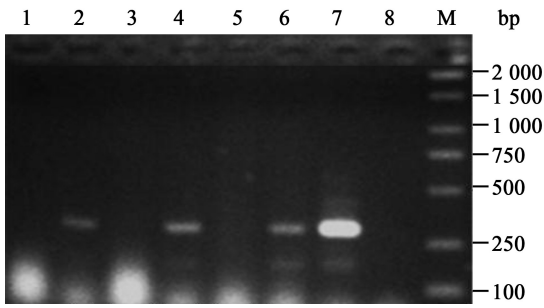


Fig. 6 PCR of genomic DNA extracted from plant inoculated by *Fusarium oxysporum* f. sp. *momodicase* with primer FOMM-SPF/FOMM-SPR

Lane1, lane3 and lane5 represented health plant of cotyledon, root, and petiole, respectively; Lane 2 to 6 represented inoculation with *Fusarium oxysporum* f. sp. *momodicase*; lane 2 cotyledon, lane 4 root, lane 6 petiole; Lane7: Positive control; Lane8: Negative control; M: DNA marker (DL2000).

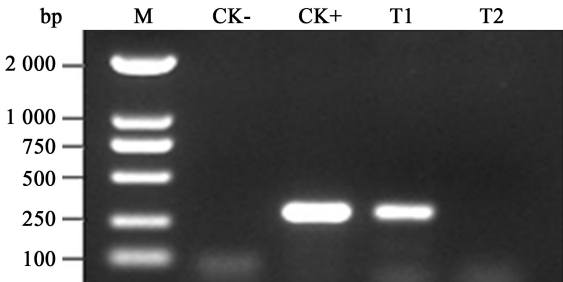


Fig. 7 PCR of genomic DNA extracted from field soil samples collected from Taian, Shandong with primer FOMM-SPF/FOMM-SPR

M: DNA marker (DL2000); CK-: Negative control; CK+: Positive control; T1: Soil sample from Fusarium wilt disease field; T2: Healthy soil sample.

短,既可以实现土壤中病原菌的特异性、快速检测,也可以从植物组织中特异性、快速地检测病原菌,如能应用于生产实践,可为苦瓜枯萎病的预测预警、早期诊断和防控提供及时、准确的信息和指导,对苦瓜枯萎病的有效控制有重要意义。

尖孢镰孢菌种内存在显著的遗传分化,如营养体亲和群(VCG)、生理小种或专化型,形态上难以区分,分子技术应用于其种内的检测和鉴定有重要的意义。一方面,是基于PCR技术的各种分子标

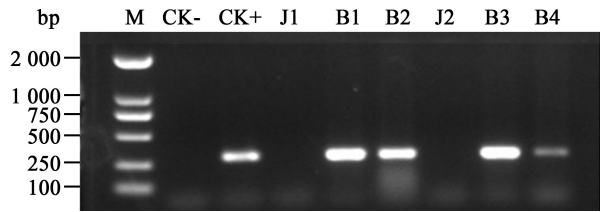


Fig. 8 PCR of genomic DNA extracted of healthy and naturally infected plants with primer FOMM-SPF/FOMM-SPR

M: DNA marker (DL2000); CK-: Negative control; CK+: Positive control; J1: Healthy plant from Taian, Shandong; B1 and B2: Fusarium wilt disease plant from Taian, Shandong; J2: Healthy plant from Zhangzhou, Fujian; B3 and B4: Fusarium wilt disease plant from Zhangzhou, Fujian.

记,其PCR检测的效率高,获得的PCR引物基本上可满足检测对特异性的要求。如基于PCR技术RFLP、AFLP、RAPD、SSR、ISSR、SCoT<sup>[17]</sup>等广泛用于病原菌种间和种内的鉴定,但是,这些技术是在分析种内遗传分化的基础上,开发出来的对亚群特异的分子标记,其筛选工作量都非常大,而本文基于Kang等<sup>[13-15]</sup>的水稻基因组重复序列的方法,仅利用筛选获得的12条引物,反应严谨性和稳定性高,获得特异性分子标记的工作量显著降低,该方法已经广泛应用于植物、动物和微生物等基因组指纹分析<sup>[18,19]</sup>。另一方面,是基于某些特殊基因位点,如rDNA的转录间隔区(Internal Transcribed Spacers, ITS)和翻译延伸因子(Translation Elongation Factor 1- $\alpha$ )基因等,开发出来的PCR检测技术,然而,ITS-PCR在种内的分辨率有限,多数情况核糖体DNA ITS区特异引物适用于对病原菌属和种间的区分鉴定。尖孢镰孢菌种内分离物之间的基因组序列的同源性相当高,特别是功能基因,如果以某个或某些基因为目标来筛选特异性分子标记,其盲目性较大,而且要以基因组序列为基础,因此,在应用上有一定的限制性。本研究利用UPR-PCR筛选特异性尖孢镰孢菌专化型特异性扩增片段,不需要预先知道专化型的基因组序列,筛选出的特异性片段没有偏好性,且有较高的成功率。

本研究利用URP引物进行初筛,从URP-32F扩增的特异性条带序列中优化出一对特异性引物,可从土壤和苦瓜植株中特异性扩增出尖孢镰孢菌苦瓜专化型的特异性条带,而区别于对其他专化型

如尖孢镰孢菌黄瓜专化型、西瓜专化型、甜瓜专化型和古巴专化型,实现了对苦瓜枯萎病菌的特异性检测。该研究思路为其他瓜类枯萎病菌的特异性检测技术的研究提供了参考。

## 参考文献

- [1] Wu Y C, Wang S Z. A preliminary study on pathogen and forma specialis identification of gourd-wilt (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 1994, 24 (1): 95.
- [2] Qi P K. A survey on the *Fusarium oxysporum* f. spp. of Cucurbitaceae (in Chinese) [J]. Journal of South China Agricultural University (华南农业大学学报), 1995, 16 (4): 110-114.
- [3] Zhu T S, Qi P K. Study on the pathogen of bitter gourd wilt in Guangdong (in Chinese) [J]. Journal of South China Agricultural University (华南农业大学学报), 1998, 19 (4): 14-18.
- [4] Zhang S. Studies oil the physiological differentiation and differential expression of *FochsV* gene from three melons Fusarium wilt (in Chinese) [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University (沈阳:沈阳农业大学), 2013.
- [5] Chen Z D, Yuan G Q, Li Q Q, et al. Identification and genetic diversity of *Fusarium oxysporum* isolates from bitter gourd (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2014, 44(1): 36-45.
- [6] Wang Q, Lin L. Research progress on Fusarium wilt of cucurbits (in Chinese) [J]. China Cucurbits and Vegetables (中国瓜菜), 2016, 29(3): 1-6.
- [7] Zhang S M, Zhao X Y, Zhang X C, et al. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* in cucumber, watermelon and melon (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2010, 40(6): 636-641.
- [8] Su J, Gao Z G, Yao Y, et al. Assessment of genetic diversity among Fusarium wilt pathogens of the cucurbits detected by ISSR markers (in Chinese) [J]. Northern Horticulture (北方园艺), 2014 (17): 97-101.
- [9] Lin Y H, Chen K S, Chang J Y, et al. Development of the molecular methods for rapid detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* and *F. oxysporum* f. sp. *niveum* in Taiwan [J]. New Biotechnology, 2010, 27(4): 409-418.
- [10] Chang P, Lin Y, Chang J, et al. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, the causing agent of watermelon *Fusarium* wilt disease [J]. Phytopathology, 2009, 99(6): S21-S21.
- [11] Chen Z D, Huang R K, Li Q Q, et al. Development of pathogenicity and AFLP to characterize *Fusarium oxysporum* f. sp. *momordicae* isolates from Bitter gourd in China [J]. Journal of Phytopathology, 2015, 163 (3): 202-211.
- [12] Chen Z D. Studies on the identification, genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *momodicae* and differentially proteomic analysis on the pathogen-host interaction (in Chinese) [D]. Guangxi: Guangxi University (广西:广西大学), 2014.
- [13] Kang H W. Genetic diversity analysis of fungal species by universal rice primer (URP)-PCR [J]. Korean Journal of Mycology, 2012, 40(2): 78-85.
- [14] Kang H W, Park D S, Park Y J, et al. PCR based detection of *Phellinus linteus* using specific primers generated from universal rice primer (URP) derived PCR polymorphic band [J]. Mycobiology, 2002, 30(4): 202-207.
- [15] Kang H W, Park D S, Go S J, et al. Fingerprinting of diverse genomes using PCR with universal rice primers generated from repetitive sequence of Korean weedy rice [J]. Molecules & Cells, 2002, 13(2): 281-287.
- [16] Lee H H, Kang N, Park I, et al. Characterization of newly bred cordyceps *militaris* strains for higher production of cordycepin through HPLC and URP-PCR analysis [J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2017, 27(7): 1223-1232.
- [17] SankhLa A K, MaLik C P, Parashar M. A review on start codon targeted (SCoT) marker [J]. Journal of Plant Science Research, 2015, 31(2): 153-160.
- [18] Xiong F, Liu J, Jiang J, et al. Molecular profiling of genetic variability in domesticated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) based on ISJ, URP, and DAMD markers [J]. Biochemical Genetics, 2013, 51: 889-900.
- [19] Mann M B, Spadari C C, Feltrin T, et al. Genetic variability of bipolaris sorokiniana isolates using URP-PCR [J]. Tropical Plant Pathology 2014, 39(2): 163-171.