

## 甜菜银叶病菌的 PCR 检测<sup>\*</sup>

葛芸英 郭坚华<sup>\*\*</sup>

(南京农业大学植物保护学院植物病理系 南京 210095)

**摘 要** 本研究用 16S-23S rDNA 间的 ITS 序列通用引物 LI(5'-AGTCGTAACAAGGTAGCCGT-3') 和 L2(5'-GTGCCAAGGCATCCACC-3') 扩增甜菜银叶病菌(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *betae*, *Cfb*) 和其它相近细菌的基因组 DNA; 并对其 PCR 产物进行回收、克隆和测序, 将所获序列和其它已报道的细菌内源转录间隔区(Internally Transcribed Spacer, ITS) 序列进行多重比较后设计出 *Cfb* 的特异性引物 B1(5'-GGCCTCGTGTGTCCTTATC-3') 和 B2(5'-GTCACCAATCAA-CAACCCGAG-3')。此引物可以从 *Cfb* 中扩增出 387bp 的特异性片段, 而其余参试的 21 个细菌 PCR 反应结果均为阴性。该方法可以应用于病害防治工作中的 *Cfb* 快速、可靠的检测。

**关键词** 甜菜银叶病菌 ITS 分析 PCR 检测

中图分类号 S435.32 文献标识码 A 文章编号 1006-6179(2003)02-0271-05

甜菜银叶病是甜菜生产上的一种严重病害, 1945 年首次在英国被报道, 正在世界(包括中国)的许多地方蔓延, 其病原为萎蔫短小杆菌甜菜致病变种(*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *betae*, *Cfb*)。该病原属革兰氏阳性细菌, 呈小而不规则的杆状, 不产生内生孢子, 没有异染粒。该病菌主要危害红甜菜, 受侵染植株首先沿叶脉出现银色, 很快扩展到整个叶片及其它叶片, 最后植株萎蔫死亡。在一些田地可以造成高达 75% 的损失<sup>[1,2]</sup>。本研究依据 ITS 序列多态性找出了可用于 *Cfb* 检测的特异性引物, 为 *Cfb* 的快速准确检测提供了必要的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 参试菌株

用于测序的细菌包括萎蔫短小杆菌的 6 个致病变种; 用于 PCR 扩增的还包括其它植物病原细菌属的模式种、大肠杆菌和一些腐生菌种(见表 1)。

### 1.2 细菌基因组 DNA 的提取<sup>[3]</sup>

用不同浓度的  $\lambda$ DNA 作对照, 将提取 DNA 用 TE 稀释至 20ng/ $\mu$ L, -20℃ 保存。

### 1.3 工具酶、试剂、序列测定和引物合成

Taq DNA 聚合酶和标准分子量购自 TAKARA 公司; dNTPs、pUC-T 载体购自 Sangon 公司; 玻璃奶回收试剂盒购自博大公司; 序列由上海博亚公司测定。

<sup>\*</sup> 国家自然科学基金(39970481) 和中国农业科学院植物保护研究所病虫害生物学国家重点实验室 2001 年度开放基金(pd3)资助项目

<sup>\*\*</sup> 通讯作者。E-mail: jhguo@njau.edu.cn

作者简介: 葛芸英(1977-), 女, 江苏人, 硕士, 从事植物细菌的分子检测研究。E-mail: jesygy@yahoo.com.cn

收稿日期: 2002-07-22, 修回日期: 2002-12-09

表 1 参试菌株及来源

Table 1 Strains tested and their origins

Latin name of strains	Number of strains	Resource
<i>Cur. f. pv. flaccumfaciens</i>	2584	ICMP
<i>Cur. f. pv. betae</i>	2594	ICMP
<i>Cur. f. pv. poinsettias</i>	2632	ICMP
<i>Cur. f. pv. oortii</i>	2566	ICMP
<i>Cur. f. pv. basellae</i>	BR10	Nanjing
<i>Cur. f. pv. beticila</i>	CV30	Neimeng
<i>Cur. citreum</i>	15828	ATCC
<i>Cur. luteum</i>	15830	ATCC
<i>Cur. albidum</i>	15831	ATCC
<i>Cur. pusillum</i>	19096	ATCC
<i>Cur. plantarum</i>	49174	ATCC
<i>Clavibacter michiganense</i> subsp. <i>michiganense</i>	2550	ICMP
<i>Cl. fangii</i>	Ta19	Yangzhou
<i>Rathayibacter tritici</i>	2626	ICMP
<i>Rhodococcus fascians</i>	5833	ICMP
<i>Arthrobacter ilicis</i>	2607	ICMP
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	A6	Jiangsu
<i>Ralstonia solanacearum</i>	LE24	Nanjing
<i>Erwinia chrysanthemi</i>	Ch10	Jiangsu
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>	Psp2	Jiangsu
<i>Escherichia coli</i>	JM101	Jiangsu
<i>Bacillus megaterium</i>	Ga5	Jiangsu

ICMP :International collection of micro-organism from plan( New Zealand );ATCC :American type culture collection.

1.4 通用引物设计及 PCR 扩增

选用 ITS 通用引物 L1( 5'-AGTCGTAACAAGGTAGCCGT-3' )<sup>[4]</sup>和 L2( 5'- GTGCCAAG-GCATCCACC-3' )扩增参试菌株<sup>[5]</sup>。扩增条件 :95℃ 5min ,94℃ 30s ,60℃ 1min ,72℃ 1min ,35 个循环 ;72℃ 10min。阴性对照用重蒸水代替模板。产物用 0.8% 琼脂糖凝胶分离。

1.5 PCR 产物的回收、克隆和测序

将需要测序的菌株的 PCR 产物经电泳分离后的 500bp 左右的片段从胶中切下 ,进行回收 ,与 pUC-T 载体连接后转化 *E. coli* JM110 ,经酶切鉴定后 ,挑选出阳性克隆并测序。

1.6 DNA 序列分析及引物设计

用 DNAMAN 软件对各片段序列及 GenBank 、EMBI、DDBJ 数据库中已报道的其它细菌 ITS 序列进行多重同源性比较 ,选取适当的界定值 ,在多态性丰富的区域设计引物。

1.7 特异性的 PCR 扩增

表 1 列出的所有细菌的基因组 DNA 用于检测设计的引物特异性。用不同的反应体系和循环参数进行 PCR 扩增 ,选择出最佳的扩增条件。最终反应体系为 :10 × buffer 2μL , dNTP( 10mmol/L ) 0.35μL ,引物 1/引物 2 ( 50μmol/L ) 0.3μL/0.3μL , rTag 酶 1U ,模板 DNA 1μL ,加 ddH<sub>2</sub>O 至 20μL ,最终循环参数是 :95℃ 5min ,94℃ 30s ,61℃ 1min ,72℃ 40s ,30 个循环 ,72℃ 10min。

2 结 果

2.1 L1/L2 引物扩增结果

L1/L2 对 14 个菌株进行 PCR 扩增时 ,其中 13 个参试菌在 500bp 处均得到了一条分子量稍有不同的主要扩增产物 ,而 *Cur. plantarum* 则有两个大小不同的 PCR 产物。

2.2 序列分析及引物设计

对萎蔫短小杆菌种下的 6 个致病变种及短小杆菌属下的 5 个腐生菌种进行了测序 ,其中 *Cfb* 的 ITS 全序列如图 1 所示 ,根据序列设计出 *Cfb* 的特异性引物 B1( 5'-GGCCTCGT-GTTGTCCCTTATC-3' )/B2 ( 5'-GTCACCAATCAACAACCCGAG-3' )。

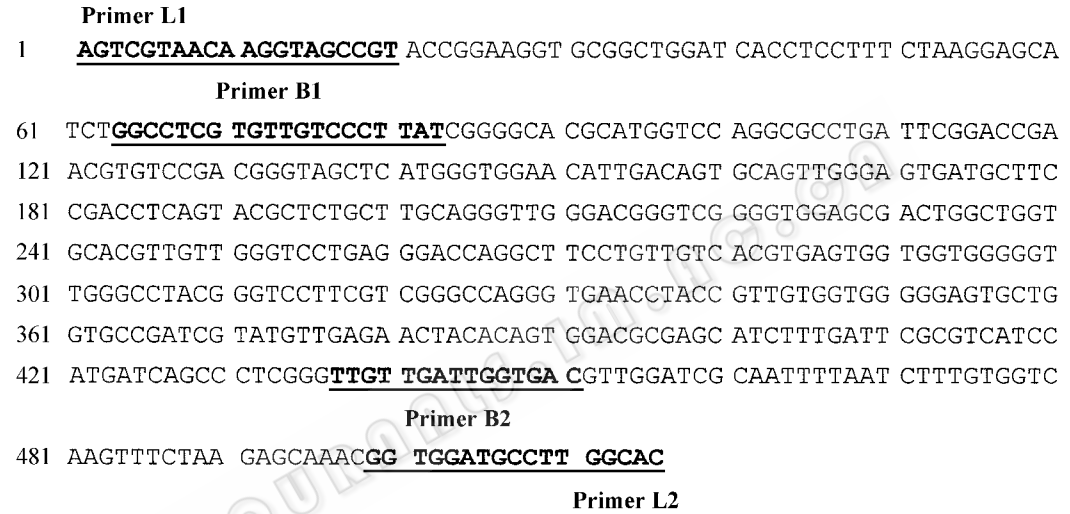


图 1 *Cfb* 的 16S 和 23SrDNA 间 ITS 序列

Fig.1 Sequence of the ITS between 16S and 23S rDNA of *Cfb*

The underlined regions are universal and specific primers sites.

2.3 引物 B1/B2 对 *Cfb* 扩增的特异性

引物 B1/B2 从目标菌 *Cfb* 中扩增出一条明显的分子量为 387bp 的产物 ,其余相应 21 个参试菌均无明显扩增主带( 图 2 )。 *Cfb* 的 PCR 产物带型清晰 ,结果稳定 ,说明 B1/B2 引物具有很高的特异性 ,在实际应用中仅需根据扩增产物的有无便可将目标菌检测出。

3 讨 论

ITS 是内源转录间隔区( Internally Transcribed Spacer )的英文缩写。 ITS 分析法于 1990 年提出 ,随后逐步发展成为全新的分子标记方法。其优点有 :具有高拷贝数 ,同时包含保守与变异序列 ,能根据保守序列中的变异位点设计特殊引物进行特异性扩增比较。

根据 ITS 全序列的同源性绘制短小杆菌属的 11 个菌株的同源性树状图( 图 3 )。 其中除 *Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *flaccumfaciens*( 序列未发表 )外 ,其余 10 个菌株序列在 GenBank 中的登录号为 AY191503-AY191509 ,AY191510-AY191512。

从图 3 可以看出, *Cur. flaccumfaciens* 种下的 6 个致病变种间的同源性达到 85.9%, 除 *Cur. f. pv. basellae* 外的 5 个致病变种的同源性高达 95.5%。落葵叶斑病菌和甜菜叶斑病菌是本实验室新近发现的两个细菌, 依据形态、生理生化特征、系统发育等传统的鉴定方法将之归为 *Cur. flaccumfaciens* 下的两个致病变种<sup>[6]</sup>。曾经有人研究除 *Cur. f. pv. basellae* 和 *Cur. f. pv. beticola* 外的 4 个致病变种的蛋白质 PAGE 图谱, 发现还不及同种不同菌株间的差异明显<sup>[7]</sup>。许多资料均表明萎蔫病菌的 6 个致病变种之间非常相似, 亲缘关系很近。本研究的结果为以上结论提供了另外的依据, 为以上的分类体系提供了有力的支持。由此可见, ITS 序列包含了生物物种的某些进化特征, 可以作为物种分类的一种辅助手段。

短小杆菌属其它 5 个腐生种之间及这 5 个种分别与 *Cur. flaccumfaciens* 之间的 ITS 碱基同源性不高, 可能这些腐生菌本身的亲缘关系不近, 当初仅因某些表面性状相近而将之归入短小杆菌属中。此结果与 Yamada 和 Komagata(1972) 等许多学者提出的“植物病原棒形细菌与人和动物的致病菌以及腐生的棒杆菌属细菌都无密切的相关性”<sup>[7]</sup> 说法吻合。

在我国, 曾经有人报道糖用甜菜上发现的“细菌性叶斑病”是由 *Cfb* 引起的, 症状表现为灰褐色病斑, 常开裂或穿孔, 叶脉黑褐色, 病叶易破碎, 无明显银叶现象<sup>[8]</sup>。说明 *Cfb* 引起的病害具有多种症状, 仅依据症状观察有时会作出错误的诊断。现阶段在生产上主要还是依靠传统的细菌检测和鉴定方法, 即先依据发病寄主范围、发病部位和病区的症状对病原菌作初步的判断, 然后对病原菌进行分离、培养和纯化, 观察菌落形态, 包括大小、质地、颜色等; 再对纯培养物进行染色和各种生理生化测定, 进一步对其作出判断。这种检测方法需要对病原菌进行分离和纯化, 且特性试验的结果因培养温度、培养时间长短、培养基成分和确定阴阳的标准不同而变化<sup>[9]</sup>, 不可靠、不稳定, 且费时费力, 不便于生产上的应用。本研究首次对该菌展开分子生物学方面的研究, 且找到了 *Cfb* 的一个特异

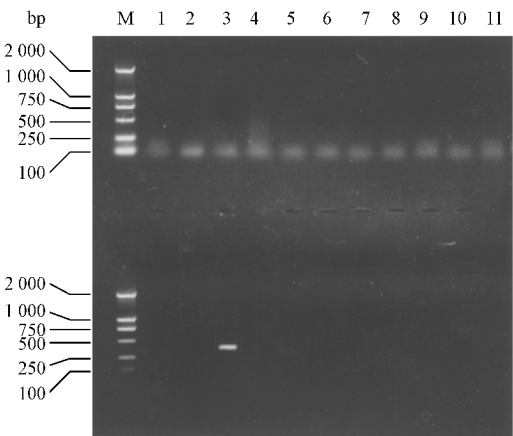


图 2 引物 B1/B2 对 22 个参试细菌 PCR 扩增结果

Fig.2 EB-stained PCR products following amplification with primers B1 and B2 from genomic DNA different tested bacteria

The upper lanes 1 – 11 :2607、5833、Ta19、2626、2550、Ga5、JM110、Psp2、Ch10、LE24、A6 ;The lower lanes 1 – 11 :2566、2632、2594、2584、CV30、BR10、49174、19096、15831、15830、15828 ;Lane M is DNA size markers DL2000.

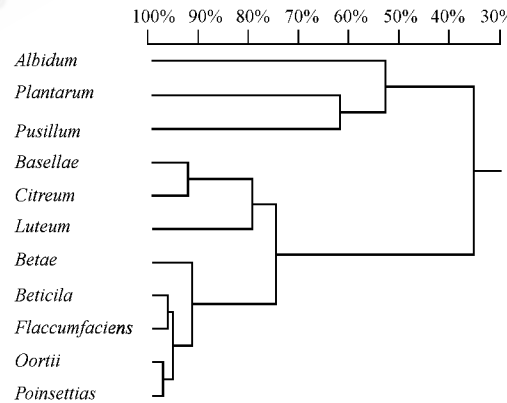


图 3 短小杆菌属的 ITS 序列同源性树状图

Fig.3 Homology tree of ITS sequences of Curtobacterium bacteria

首先依据发病寄主范围、发病部位和病区的症状对病原菌作初步的判断, 然后对病原菌进行分离、培养和纯化, 观察菌落形态, 包括大小、质地、颜色等; 再对纯培养物进行染色和各种生理生化测定, 进一步对其作出判断。这种检测方法需要对病原菌进行分离和纯化, 且特性试验的结果因培养温度、培养时间长短、培养基成分和确定阴阳的标准不同而变化<sup>[9]</sup>, 不可靠、不稳定, 且费时费力, 不便于生产上的应用。本研究首次对该菌展开分子生物学方面的研究, 且找到了 *Cfb* 的一个特异

性引物 B1/B2, 此引物可以特异性扩增 *Cfb* 的 ITS 序列。在使用此引物对 *Cfb* 进行检测过程中, 只需通过简单易行的 PCR 和琼脂糖凝胶电泳, 且结果可靠、稳定。

### 参 考 文 献

- [ 1 ] Keyworth W G, Howell J, Dowson W J. *Corynebacterium betae* ( sp . nov. ), the causal organism of silvering disease of red beet. *Plant pathology*, 1956, **5**: 88 ~ 90.
- [ 2 ] Keyworth W G. Silvering disease of red beet, a preliminary account. *Pep ant Veg Rse Sta Warwick*, 1953, ( 1952 ) : 12 ~ 13.
- [ 3 ] Li X A, De Boer S H. Selection of polymerase chain reaction primers from an RNA intergenic spacer region for specific detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Phytopathology*, 1995, **85**: 837 ~ 842.
- [ 4 ] Woese C R, Gutell R, Gupta R, et al. Detailed analysis of the higher-order structure of 16S-like ribosomal ribonucleic acids. *Microbiol Rev*, 1983, **47**: 621 ~ 669.
- [ 5 ] Brosius J, Dull T J, Noller H F. Complete nucleotide sequence of a 23S ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, **77**: 201 ~ 204.
- [ 6 ] 陈永芳, 郭坚华, 方中达. 落葵上发现短小杆菌属( *Curtobacterium* ) 一个新的致病变种. 植物病理学报, 2000, **30** ( 2 ): 171 ~ 175.
- [ 7 ] Yamada K, Komagata K. Taxonomy studies on coryneform bacteria II. *J Gen Appl Microbiol*, 1970, **16**: 103 ~ 113.
- [ 8 ] 袁美丽, 张佳怀, 高洁, 等. 甜菜四种细菌性病害的鉴定. 中国甜菜, 1991 ( 3 ): 22 ~ 25.
- [ 9 ] 任欣正. 植物病原细菌的分类和鉴定. 北京: 中国农业出版社, 1994.

## A Polymerase Chain Reaction Protocol for the Detection of *Curtobacterium flaccumfacies* pv. *betae* \*

Ge Yunying Guo Jianhua\*\*

( Department of Plant Pathology, College of Plant Protection, Nanjing Agriculture University, Nanjing 210095, China )

**Abstract** : A PCR protocol was developed that specifically detected *Curtobacterium flaccumfacies* pv. *betae* ( *Cfb* ), the causative agent of silvering disease of red beet. Generic PCR products from the internally transcribed spacer ( ITS ) region of 16S ~ 23S ribosomal DNA of *Cfb* and other related bacteria were cloned and sequenced. Based on a multiple sequences alignment among these obtained sequences and other-nonredundant highly homologous sequences from database, two *Cfb*-specific PCR primers were designed, B1 ( 5'-GGCCTCGTGTGTCCCTTATC-3' ) / B2 ( 5'-GTCACCAATCAACAACCCGAG-3' ). These two oligonucleotides primed the specific amplification of a 387bp DNA product from genomic DNA sample of *Cfb* strain. Amplification was not observed with other 21 tested bacteria, including 5 strains of other *Cur. f.* pvs., 3 strains of *Clavibacter* species, 8 type strains of other different genus and 5 strains of saprophytic bacteria. The PCR protocol provides a rapid, reliable and economical tool for routine detection and identification of *Cfb*.

**Key words** : *Curtobacterium flaccumfacies* pv. *betae*, ITS analysis, PCR detection

\* Project granted by Chinese National Science Fund ( 39970481 ) and Fund of Chinese National Pest Key Laboratory of Plant Protection Institute, Chinese Agriculture Academic of Science ( pd3 ).

\*\* Corresponding author. E-mail : jhguo@njau.edu.cn