

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240022



主持人: 缪卫国, 吴少英

大丽轮枝菌巢氏 PCR 检测方法的建立及在棉籽上的应用

方雨萧[#], 刘丽娟, 张玉芳, 缪卫国, 陈代朋^{*}

(海南大学 热带农林学院, 海南海口 570228 中国)

摘要: 棉花黄萎病是棉花上的重要病害, 严重威胁棉花产业。中国棉花黄萎病病原为大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*)。棉花黄萎病防治困难, 建立快速准确的分子检测方法对于该病的早期诊断、预警和防治具有重要意义。通过 NCBI BLAST 进行序列比对, 找到大丽轮枝菌种内具有高度种间特异性和种内保守性的物种特异性序列, 根据序列设计 6 对引物, 筛选出特异性强、灵敏度高可用于检测大丽轮枝菌的巢氏 PCR 引物, 并摸索最佳扩增条件。筛选到了两组巢氏 PCR 引物分别是 VD-2 和 VD-5, 扩增条件为: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s; 58 °C 30 s; 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min, 条带大小分别为 512 和 375 bp。该方法可检测到的病菌 DNA 下限为 $1 \times 10^{-6} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 比常规 PCR 灵敏度提高了 3 个数量级, 使用包括长孢轮枝菌在内的 15 种菌对引物特异性进行了验证, 检测混有大丽轮枝菌孢子的棉籽发现该方法的检测下限是每颗棉籽可达 10 个孢子。

关键词: 棉籽; 棉花黄萎病; 大丽轮枝菌; 巢氏 PCR; 分子检测

中图分类号: S432.44

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2025)03-0415-08

方雨萧, 刘丽娟, 张玉芳, 等. 大丽轮枝菌巢氏 PCR 检测方法的建立及在棉籽上的应用 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(3): 415-422. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240022

大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 寄主范围广, 可危害 660 种植物, 其中包括近 200 种作物^[1-2]。在中国, 大丽轮枝菌最常见的寄主有马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、辣椒 (*Capsicum annuum*)、瓜类 (*Cucurbitaceae*)、番茄 (*Lycopersicon esculentum*)、豆类 (*Fabaceae*)、茄子 (*Solanum melongena*)^[3]。大丽轮枝菌是引起中国棉花黄萎病的病原菌^[4]。

中国是世界前三的棉花生产大国, 形成了以新疆为主, 包括长江流域、黄河流域的 3 大产棉区^[5]。棉花黄萎病是棉花生产上危害最严重的病害之一, 发病后可造成叶片失绿变黄、蕾铃脱落甚至整株死亡, 严重影响棉花的产量和品质。由于棉花黄萎病症状表现多样, 且其症状常因不同的环境条件、发病阶段、品种及生育期而呈现较大变

化, 当田间症状不够典型或诊断者经验不足时, 只依据田间病害症状不易准确判别^[6]。因此, 为了准确地预测和有效地控制该病害, 应用准确、快速、低成本的诊断方法进行早期诊断是控制棉花黄萎病的基础。

大丽轮枝菌可在土壤存活, 是病害流行的主要侵染源。据报道, 其产生的微菌核可以在土壤中存活数十年。棉籽带菌是大丽轮枝菌远距离传播的主要方式^[7]。棉花黄萎病菌一旦在棉花维管束定殖, 药剂防治困难。因此, 及时地检测棉田土壤中大丽轮枝菌的菌量和棉籽带菌情况对棉花黄萎病的早期监测预警和防治具有重要意义。国内外已经开发了各种各样的分子检测技术检测病原菌, 如普通 PCR 分子检测^[8]、荧光定量 PCR 检测

收稿日期: 2024-02-05

修回日期: 2024-03-19

基金项目: 海南省自然科学基金高层次人才项目 (323RC406); 海南省崖州湾种子实验室揭榜挂帅项目 (B21HJ0905), 国家自然科学基金地区项目 (32360642)

[#]第一作者: 方雨萧 (1998—), 男, 海南大学热带农林学院 2021 级硕士研究生。E-mail: fangyuxiao2023@163.com

^{*}通信作者: 陈代朋 (1987—), 男, 博士, 讲师。研究方向: 分子植物病理学。E-mail: chen.daipeng@163.com

技术^[9]、巢式 PCR 检测技术^[10]、LAMP 检测技术^[11]及 RPA-CRISPR/Cas12a 技术^[12]等, 针对大丽轮枝菌也已开发多种分子检测技术和方法。包括 PCR^[8]、LAMP 技术^[6, 9]、微滴式数字 PCR 和实时定量 PCR^[10], 以及 RAPD-PCR^[11]技术等。但这些技术大多针对土壤中是否携带大丽轮枝菌微菌核的检测。巢氏 PCR 技术在病原菌检测方面的应用已经极为广泛^[12-13], 且国内外也有巢氏 PCR 检测大丽轮枝菌的报道^[14-15], 但这技术只是用于土壤带菌检测, 且不能区分大丽轮枝菌的近源种^[16-19], 针对棉籽带菌检测的巢氏 PCR 技术还未见开发。笔者筛选到一段大丽轮枝菌不同菌株中高度保守、种间有明显差异的基因序列(CP010981.1), 依托其中一小段大丽轮枝菌特有的序列, 设计了多对引物, 通过筛选, 找到了一组特异性强、灵敏度高的引物, 并建立了检测棉籽是否携带大丽轮枝菌的巢氏 PCR 检测技术。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及种子材料 试验所用的健康棉籽

及大丽轮枝菌菌株由新疆农业科学院刘海洋副研究员和徐建辉副研究员及江苏省农业科学院植物保护研究所林铃研究员馈赠, 使用的发病田棉籽由石河子大学任毓忠副教授馈赠。立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)由中国农业科学院棉花研究所魏锋副研究员馈赠, 长孢轮枝菌(*Verticillium longisporum*)由甘肃省农业科学院植物保护研究所何苏琴副研究员馈赠, 非苜蓿轮枝菌(*Verticillium nonalfalfae*)、黑白轮枝菌(*Verticillium albo-atrum*)、变黑轮枝菌(*Verticillium nigrescens*)由中国农业科学院苏晓峰副研究员馈赠, 苜蓿轮枝菌(*Verticillium alfalfae*)、云状轮枝菌(*Verticillium nubilum*)由西北农林科技大学胡小平教授馈赠, 哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)、棉花角斑病黄单胞菌(*Xanthmonas citri* subsp. *malvacearum*)、大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)、棘孢木霉(*Trichoderma asperellum*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*)、稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)为海南大学植物保护学院保存(表 1)。

表 1 供试菌株
Tab. 1 Pathogens under test

种名 Species	分离材料 Separation materials	来源 Source	数量/株 Number/strain	培养 Medium
大丽轮枝菌(<i>Verticillium dahliae</i>)	棉花(<i>Gossypium hirsutum</i>)	新疆 江苏	16	PDA
长孢轮枝菌(<i>Verticillium longisporum</i>)	萝卜(<i>Raphanus sativus</i>)	青海	1	PDA
非苜蓿轮枝菌(<i>Verticillium nonalfalfae</i>)	—	—	1	PDA
变黑轮枝菌(<i>Verticillium nigrescens</i>)	—	—	1	PDA
黑白轮枝菌(<i>Verticillium albo-atrum</i>)	—	—	1	PDA
苜蓿轮枝菌(<i>Verticillium alfalfae</i>)	—	—	1	PDA
云状轮枝菌(<i>Verticillium nubilum</i>)	—	—	1	PDA
立枯丝核菌(<i>Rhizoctonia solani</i>)	—	河南	1	PDA
哈茨木霉(<i>Trichoderma harzianum</i>)	土壤 Soil	—	1	PDA
禾谷镰刀菌(<i>Fusarium graminearum</i>)	小麦(<i>Triticum aestivum</i>)	—	1	PDA
辣椒疫霉(<i>Phytophthora capsici</i>)	辣椒(<i>Capsicum annuum</i>)	—	1	V8
棉花角斑病黄单胞菌(<i>Xanthmonas citri</i> subsp. <i>malvacearum</i>)	棉花(<i>Gossypium hirsutum</i>)	—	1	NA
大豆疫霉(<i>Phytophthora sojae</i>)	大豆(<i>Glycine max</i>)	—	1	V8
棘孢木霉(<i>Trichoderma asperellum</i>)	土壤 Soil	—	1	PDA
尖孢镰刀菌(<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>)	香蕉(<i>Musa nana</i>)	—	1	PDA
稻瘟菌(<i>Magnaporthe oryzae</i>)	水稻(<i>Oryza sativa</i>)	—	1	PDA

注: 表中“—”表示分离材料或来源未知。
Note: In the table “—” indicates that the separation material or source is unknown.

1.2 DNA 提取 将各供试真菌接种在 PDA 培养基上培养 15~20 d 后刮取其菌丝, 采用 Fungal DNA Kit(OMEGA BIOTEK 公司)提取总 DNA。大豆疫霉和辣椒疫霉经 V8 液体培养基摇菌培养后获得菌体, 用 CTAB 法提取基因组 DNA。棉花细菌性角斑病菌通过 NA 液体培养基培养后获得菌体, 用 TIANamp Bacteria DNA Kit(TIANGEN 公司)提取基因组 DNA。混菌棉花种子采用 Fungal DNA Kit(OMEGA BIOTEK 公司)提取其 DNA。

1.3 种子混菌 将经 PDA 培养的大丽轮枝菌接种到液体查氏培养基中, 25 ℃, 180 r·min⁻¹ 培养

3~5 d, 过滤获得孢子悬浮液。在显微镜下用血球计数板将浓度分别稀释成 10⁴、10³、10² 和 10 个·μL⁻¹ 共 4 个梯度, 用移液器分别各取其中 100 μL 滴入每颗切开的棉籽内部(胚芽上), 并以接入无菌水的棉籽作为阴性对照, 室内风干 0.5~1.0 h, 直至胚芽表面干燥。

1.4 巢氏 PCR 体系的建立

1.4.1 引物设计 通过序列比对确定候选序列(CP010981.1)利用 NCBI (National Center of Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 Primer 5 共同设计 6 对引物(表 2)。

表 2 巢式 PCR 供试引物表

Tab. 2 Nested PCR primer

引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	PCR产物长度/bp Length/bp	引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	PCR产物长度/bp Length/bp
VD-1F	ATGAAACGTAAGGTAGGTAGC	601	VD-4F	GCCAATCGTGA CTGCCTCTT	465
VD-1R	CCAGAGCAGCGCCTCATTCGG		VD-4R	GCGCAA ACTTGACCAACAGC	
VD-2F	GCGGAAGGGGCACTAGTAAT	512	VD-5F	CTCGGCCAAGTCGGA ACTTT	375
VD-2R	CGCGCAA ACTTGACCAACAG		VD-5R	CGCGCAA ACTTGACCAACA	
VD-3F	GTAGGGACGCAACAATGAGC	410	VD-6F	CGCCTATGGTCGTGGTCTTT	170
VD-3R	TGACCAACAGCAGCCAGATC		VD-6R	GTCGGTGAGCTATGCCAGAA	

1.4.2 第 1 轮 PCR 引物灵敏度及特异性筛选 PCR 体系(20 μL): 上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.2 μL, 2×Taq Plus Master Mix II (Dye Plus)10 μL, DNA 1.0 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。

PCR 程序: 95 ℃ 5 min; 95 ℃ 30 s; 58 ℃ 30 s; 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 10 min, 产物通过 2% 的凝胶电泳检测。

1.4.3 巢式 PCR 引物灵敏度及特异性筛选 将第 1 轮 PCR 扩增产物稀释 1 000 倍, 稀释产物作为第 2 轮巢式 PCR 扩增模板。巢式 PCR 第 2 轮体系(20 μL): 巢式 PCR 第 2 轮上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 0.2 μL, 2×Taq Plus Master Mix II (Dye Plus)10 μL, 第 1 轮稀释后的 PCR 扩增产物 2 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 程序同 1.4.2, PCR 产物通过 2% 的凝胶电泳检测。

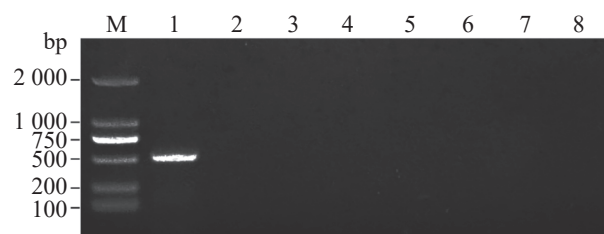
1.4.4 发病棉籽的巢式 PCR 检测与培养基培养方法比较分析 从田间带病棉籽中随机抽取 2 份, 每份 400 颗棉籽, 一份使用建立的巢式 PCR 方法检测, 另一份使用 NP-10 培养基培养, 棉籽先浸泡在 75% 的乙醇中消毒 1 min, 然后用无菌水泡

洗 3 次, 每次 30 s, 用灭菌的滤纸吸干棉籽表面的水分, 最后在每个 NP-10 培养基上放置 5 颗棉籽, 28 ℃ 培养 7~10 d, 与阳性对照对比观察形态, 从而确定培养基培养出大丽轮枝菌的棉籽颗粒数。最后计算两种方法的棉籽带菌率并比较。NP-10 培养基由两部分组成。第一部分: PGA(P-3889) 5 g, 0.025 mol·L⁻¹ 的氢氧化钠, 蒸馏水定容至 500 mL, 121 ℃ 下高压灭菌 15 min。第二部分: 乳脂 15 g, 硝酸钾 1 g, 氯化钾 1 g, 七水合硫酸镁 0.5 g, 壬基酚聚氧乙烯醚(NP-10)0.5 mL, 蒸馏水定容至 500 mL, 121 ℃ 下高压灭菌 15 min, 冷却至 50 ℃ 时, 加入 50 mg·L⁻¹ 的氯霉素、硫酸链霉素、盐酸金霉素。待第一部分也冷却至 50 ℃ 时, 将两部分混合。

2 结果与分析

2.1 候选 DNA 片段特异性分析 目前国内外用于大丽轮枝菌快速检测的靶标序列主要为 ITS、IGS、Gpd 基因和 ef-1α 基因等序列, 笔者将这些靶标序列在 NCBI 数据库进行 BLAST 比对, 发现与

枝菌在内的 6 种大丽轮枝菌亲缘种基因组 DNA 以及立枯丝核菌、哈茨木霉、禾谷镰刀菌等 9 种植物病原菌基因组 DNA 以及 ddH₂O 作为模板, 利用设计的巢氏 PCR 第 1 轮引物进行扩增, 验证第 1 轮引物的特异性, 优先使用灵敏度最高的 VD-2 引物扩增。结果表明只有以大丽轮枝菌基因组 DNA 为模板的样品在 512 bp 位置扩增出单一条带, 说明该巢氏 PCR 第 1 轮引物(VD-2)已具有高特异性(图 4、5)。



M: DL2000; 1: 大丽轮枝菌基因组 DNA; 2: 长孢轮枝菌基因组 DNA; 3: 非苜蓿轮枝菌基因组 DNA; 4: 变黑轮枝菌基因组 DNA; 5: 黑白轮枝菌基因组 DNA; 6: 苜蓿轮枝菌基因组 DNA; 7: 云状轮枝菌基因组 DNA; 8: ddH₂O。

M: DL2000; lane 1: Genomic DNA of *V. dahliae*; lane 2: Genomic DNA of *V. longisporum*; lane 3: Genomic DNA of *V. nonalfalfae*; lane 4: Genomic DNA of *V. nigrescens*; lane 5: Genomic DNA of *V. albo-atrum*; lane 6: Genomic DNA of *V. alfalfae*; lane 7: Genomic DNA of *V. nubilum*; lane 8: ddH₂O。

图 4 常规 PCR 检测大丽轮枝菌的特异性

Fig. 4 The specificity of conventional PCR for detection of *Verticillium dahliae*



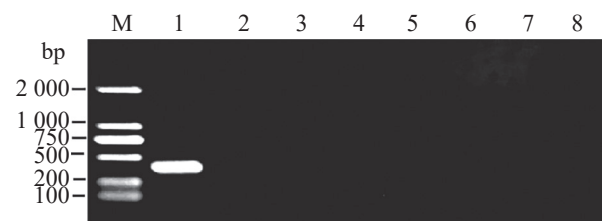
M: DL2000; 1: 大丽轮枝菌基因组 DNA; 2: 立枯丝核菌基因组 DNA; 3: 哈茨木霉基因组 DNA; 4: 禾谷镰刀菌基因组 DNA; 5: 辣椒疫霉基因组 DNA; 6: 棉花角斑病菌基因组 DNA; 7: 大豆疫霉基因组 DNA; 8: 棘孢木霉基因组 DNA; 9: 尖孢镰刀菌(FOC)基因组 DNA; 10: 稻瘟菌基因组 DNA; 11: ddH₂O。

M: DL2000; lane 1: Genomic DNA of *V. dahliae*; lane 2: Genomic DNA of *R. solani*; lane 3: Genomic DNA of *T. harzianum*; lane 4: Genomic DNA of *F. graminearum*; lane 5: Genomic DNA of *P. capsici*; lane 6: Genomic DNA of *XCM*; lane 7: Genomic DNA of *P. sojae*; lane 8: Genomic DNA of *T. asperellum*; lane 9: Genomic DNA of *FOC*; lane 10: Genomic DNA of *M. oryzae*; lane 11: ddH₂O。

图 5 常规 PCR 检测大丽轮枝菌的特异性

Fig. 5 Specificity of *Verticillium dahliae* detected by conventional PCR

2.4 巢式 PCR 引物组特异性分析 仍然以提取的大丽轮枝菌及其他 15 种供试菌的基因组 DNA 的巢氏 PCR 第 1 轮扩增产物稀释 1 000 倍后作为模板, 利用设计的 2 对巢氏 PCR 第 2 轮引物(VD-5、VD-6)进行扩增, 验证引物组的特异性。发现结合引物对 VD-6 时, 虽然只有阳性对照有目的条带, 但也出现了较多杂带, 而结合引物对 VD-5 时, 结果表明, 仅大丽轮枝菌基因组 DNA 在 375 bp 位置扩增出单一条带(图 6、7), 证明经巢氏 PCR 的两轮扩增后, 仍具有高度特异性, 可以满足大丽



M: DL2000; 1: 大丽轮枝菌基因组 DNA; 2: 长孢轮枝菌基因组 DNA; 3: 非苜蓿轮枝菌基因组 DNA; 4: 变黑轮枝菌基因组 DNA; 5: 黑白轮枝菌基因组 DNA; 6: 苜蓿轮枝菌基因组 DNA; 7: 云状轮枝菌基因组 DNA; 8: ddH₂O。

M: DL2000; lane 1: Genomic DNA of *V. dahliae*; lane 2: Genomic DNA of *V. longisporum*; lane 3: Genomic DNA of *V. nonalfalfae*; lane 4: Genomic DNA of *V. nigrescens*; lane 5: Genomic DNA of *V. albo-atrum*; lane 6: Genomic DNA of *V. alfalfae*; lane 7: Genomic DNA of *V. nubilum*; lane 8: ddH₂O。

图 6 巢式 PCR 检测大丽轮枝菌的特异性

Fig. 6 The specificity of nested PCR for detection of *Verticillium dahliae*



M: DL2000; 1: 大丽轮枝菌基因组 DNA; 2: 立枯丝核菌基因组 DNA; 3: 哈茨木霉基因组 DNA; 4: 禾谷镰刀菌基因组 DNA; 5: 辣椒疫霉基因组 DNA; 6: 棉花角斑病菌基因组 DNA; 7: 大豆疫霉基因组 DNA; 8: 棘孢木霉基因组 DNA; 9: 尖孢镰刀菌基因组 DNA; 10: 稻瘟菌基因组 DNA; 11: ddH₂O。

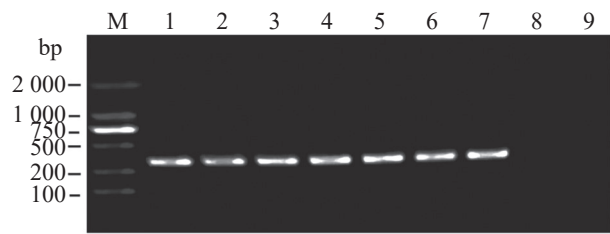
M: DL2000; lane 1: Genomic DNA of *V. dahliae*; lane 2: Genomic DNA of *R. solani*; lane 3: Genomic DNA of *T. harzianum*; lane 4: Genomic DNA of *F. graminearum*; lane 5: Genomic DNA of *P. capsici*; lane 6: Genomic DNA of *XCM*; lane 7: Genomic DNA of *P. sojae*; lane 8: Genomic DNA of *T. asperellum*; lane 9: Genomic DNA of *FO*; lane 10: Genomic DNA of *M. oryzae*; lane 11: ddH₂O。

图 7 巢式 PCR 检测大丽轮枝菌的特异性

Fig. 7 The specificity of nested PCR for detection of *Verticillium dahliae*

轮枝菌的检测要求。

2.5 巢式 PCR 引物组灵敏度分析 将第 1 轮巢氏 PCR 产物稀释 1 000 倍后作为模板,用第 2 轮引物进行巢氏 PCR 扩增。结果表明 $1 \times 10^{-6} \sim 1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的基因组 DNA 作为模板时,目的条带明显,模板浓度稀释到 $1 \times 10^{-7} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,目的条带消失,表明经巢氏 PCR 扩增后的检测灵敏度为 $1 \times 10^{-6} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的大丽轮枝菌基因组 DNA(图 8),比只使用第 1 轮引物扩增的灵敏度提高了 1 000 倍,证明本研究的巢氏 PCR 引物具有高灵敏度。



M: DL2000; 1: $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 2: $1 \times 10^{-1} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 3: $1 \times 10^{-2} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 4: $1 \times 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 5: $1 \times 10^{-4} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 6: $1 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 7: $1 \times 10^{-6} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 8: $1 \times 10^{-7} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 9: ddH₂O。

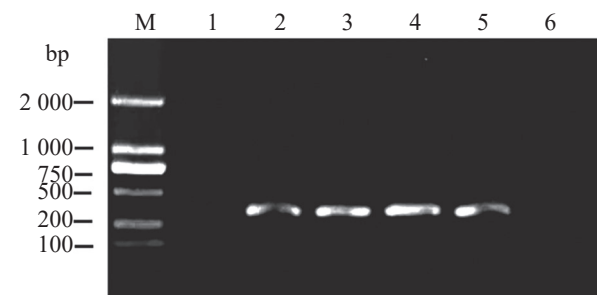
M: DL2000; lane 1: $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; lane 2: $1 \times 10^{-1} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; lane 3: $1 \times 10^{-2} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; lane 4: $1 \times 10^{-3} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; lane 5: $1 \times 10^{-4} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; lane 6: $1 \times 10^{-5} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; lane 7: $1 \times 10^{-6} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; lane 8: $1 \times 10^{-7} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; lane 9: ddH₂O。

图 8 巢氏 PCR 检测大丽轮枝菌的灵敏度

Fig. 8 Sensitivity of nested PCR for detection of *Verticillium dahliae*

2.6 混有大丽轮枝菌孢子的棉籽检测 为了验证本方法能否用于检测带菌棉籽,从未发生棉花黄萎病的棉田中采集一批棉籽,约 3 000 颗。按照 GB15569 中对于种子抽样的标准,随机抽取 200 个棉籽,提取总 DNA 后,使用上述巢氏 PCR 引物组扩增,产物经凝胶电泳观察后,均未产生目的条带,说明该批棉籽均不携带棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌。用不同浓度大丽轮枝菌孢子与棉籽充分混匀,提取带菌棉籽 DNA。用上述巢氏 PCR 进行检测,结果表明,经第 2 轮巢氏 PCR 扩增后,扩增条带单一且检测灵敏度为每颗棉籽里混入 10 个孢子(图 9),可以满足棉籽携带大丽轮枝菌的检测要求。

2.7 田间发病棉籽的检测与培养 从田间有疑似黄萎病的棉花植株上摘取一批棉籽作为检测样本,从这批棉籽中随机抽取 400 颗棉籽,提取总 DNA 后,用建立的巢式 PCR 检测方法检测,结果从该 400 颗棉籽中检测到共 246 颗棉籽携带棉花黄萎病大丽轮枝菌,检出率为 61.5%。另外随机抽



1: 0 个孢子; 2: 10 个孢子; 3: 100 个孢子; 4: 1 000 个孢子; 5: 10 000 个孢子; 6: ddH₂O。

Lane 1: 0 spores; lane 2: 10 spores; lane 3: 100 spores; lane 4: 1 000 spores; lane 5: 10 000 spores; lane 6: ddH₂O。

图 9 巢氏 PCR 检测混入不同孢子数量的棉籽 DNA
Fig. 9 Detection of cotton seed DNA mixed with different number of spores by nested PCR

取的 400 颗棉籽放在 NP-10 培养基上培养,培养出大丽轮枝菌的棉籽共 163 颗,检出率为 40.75%。

3 讨论

目前在中国,检测棉花黄萎病带菌棉籽,主要依据中华人民共和国国家标准 GB/T 28084-2011 及中华人民共和国出入境检验检疫行业标准 SN/T 5138—2019,两种标准中检测带菌棉籽的方法都需要先分离培养,然后进行形态学及分子学鉴定,这些方法耗时长(需要 10 d 以上),检测灵敏度低,操作复杂且需要操作人员具有一定的专业知识。为了能够缩短时间、简化步骤以及节约成本,需要开创一种能够快速、微量检测棉籽是否携带大丽轮枝菌的方法,从而快速预防和阻遏棉花黄萎病菌的远距离传播,增加棉花作物产量,推动经济发展。巢氏 PCR 因为成本低、操作简单、特异性强及灵敏度高等优点,适合用于棉籽带菌的分子检测。现已有大量研究者以大丽轮枝菌的基因内间隔区(intergenic spacer)、Gpd(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶)基因、 β -微管蛋白基因和转录内间隔区(internal scribed spacer)等设计引物检测土壤中大丽轮枝菌,但这些引物基于的片段序列,均与大丽轮枝菌的部分亲缘种有不同程度的重叠。

笔者找到 1 条 916 bp 的基因序列,通过大量比对后在差异位点设计了 1 组特异性巢氏 PCR 引物,该方法特异性强,比常规 PCR 灵敏度提高了 1 000 倍且成本低、操作简单,适合用于棉籽携带棉花黄萎病大丽轮枝菌的快速检测,成功从田间发病棉籽中检测到了大丽轮枝菌,且灵敏度高于

常规使用培养基培养的方法。最终建立了针对棉籽棉花黄萎病菌大丽轮枝菌的快速分子检测技术。

参考文献:

- [1] BHAT R G, SUBBARAO K V. Host range specificity in *Verticillium dahliae*[J]. *Phytopathology*, 1999, 89(12): 1218 – 1225.
- [2] 林玲, 张昕, 邓晟. 棉花黄萎病研究进展[J]. *棉花学报*, 2014, 26(3): 260 – 267.
- [3] 殷锡圣, 刘润进. 棉花黄萎病研究进展[J]. *中国棉花*, 1996, 23(5): 2 – 6.
- [4] 李廷刚, 巩东营, 张倩倩. 棉花抗黄萎病遗传学研究进展[J]. *农学学报*, 2022, 12(9): 31 – 36.
- [5] 喻树迅, 张雷, 冯文娟. 棉花生产规模化、机械化、信息化、智能化和社会服务化发展战略研究[J]. *中国工程科学*, 2016, 18(1): 137 – 148.
- [6] 田擎, 张海峰, 曾丹丹, 等. 环介导等温扩增技术检测大丽轮枝菌[J]. *植物病理学报*, 2016, 46(6): 721 – 729.
- [7] 朱荷琴, 李志芳, 冯自力, 等. 我国棉花黄萎病研究十年回顾及展望[J]. *棉花学报*, 2017, 29(S1): 37 – 50.
- [8] 沈林波, 吴楠楠, 冯小艳, 等. 我国蔗区甘蔗宿根矮化病发生情况的分子检测[J]. *热带生物学报*, 2019, 10(4): 314 – 318.
- [9] 杜艳楠, 王萌, 马建强, 等. 植物病原真菌早期检测技术及其在橡胶树炭疽病预测预报中的应用[J]. *热带生物学报*, 2021, 12(1): 124 – 131.
- [10] BAO J, CHEN Y, XING Y, et al. Development of a nested PCR assay for specific detection of *Metschnikowia bicuspidata* infecting *Eriocheir sinensis*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 930585.
- [11] 许晓琳, 袁向芬, 孔玉方, 等. 猴痘病毒实时荧光 LAMP 检测方法的建立[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2024(2): 72 – 78.
- [12] ZHANG K, SUN Z, SHI K, et al. RPA-CRISPR/Cas12a-based detection of *Haemophilus parasuis*[J]. *Animals*, 2023, 13(21): 3317.
- [13] 李园. 土壤消毒及土传病原真菌的分子生物学鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2006.
- [14] MORADI A, ALMASI M A, JAFARY H, et al. A novel and rapid loop-mediated isothermal amplification assay for the specific detection of *Verticillium dahliae*[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 116(4): 942 – 954.
- [15] WANG D, JIAO X, JIA H, et al. Detection and quantification of *Verticillium dahliae* and *V. longisporum* by droplet digital PCR versus quantitative real-time PCR[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 995705.
- [16] PÉREZ-ARTÉS E, GARCÍA-PEDRAJAS M D, BEJARANO-ALCÁZAR J, et al. Differentiation of cottondefoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* by RAPD and specific PCR analyses[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2000, 106(6): 507 – 517.
- [17] PÉREZ-ARTÉS E, MERCADO-BLANCO J, RUZ-CARRILLO A R, et al. Detection of the defoliating and nondefoliating pathotypes of *Verticillium dahliae* in artificial and natural soils by nested PCR[J]. *Plant and Soil*, 2005, 268(1): 349 – 356.
- [18] 庞莉, 李梅, 孙青, 等. 棉花黄萎病病原菌大丽轮枝菌的快速分子检测[J]. *植物保护学报*, 2016, 43(6): 892 – 899.
- [19] WANG D, ZHANG D D, USAMI T, et al. Functional genomics and comparative lineage-specific region analyses reveal novel insights into race divergence in *Verticillium dahliae*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2021, 9(3): e0111821.

Establishment of nested PCR detection method for *Verticillium dahliae* and its application in pathogen detection of cotton seeds

FANG Yuxiao[#], LIU Lijuan, ZHANG Yufang, Miao Weiguo, CHEN Daipeng^{*}

(School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Cotton verticillium wilt is a destructive disease that seriously affects the cotton industry. *Verticillium dahliae* is the main causing agent of cotton verticillium wilt in Chin. It is difficult to effectively controll this disease through conventional methods, and it hence is of great significance to establish a rapid and efficient detection method for early monitoring, diagnosis, and controlling of this disease. A highly conserved DNA sequence among strains of *V. dahliae* and a high divergence among different species were discovered by using NCBI BLAST. Based on this DNA segment, six pairs of PCR primers were designed and one set of primers that are highly specific and sensitive were eventually selected for detecting *V. dahliae* through nested PCR. And the optimal amplification conditions for these primers were determined. A set of nested PCR primers were identified, namely V.d-2 and V.d-5. The amplification conditions are as follows: 95 °C for 5 minutes, 95 °C for 30 seconds, 58 °C for 30 seconds, 72 °C for 1 minute, performed 35 cycles. The resulting bands are of sizes 512 bp and 375 bp, respectively. Resulting nested PCR can be used to detect the lowest amount of pathogenic DNA at 1×10^{-6} ng· μ L⁻¹, which is 3 orders of magnitude higher in sensitivity compared to the conventional PCR. The primer specifity was verified by using 15 species of pathogens such as *Verticillium longisporum*, etc. The lowest number of 10 spores each conton seed bearing pathogen of *V. dahliae* can be detected by using this method.

Keywords: cotton seed; cotton verticillium wilt; *Verticillium dahliae*; nested PCR; molecular detection

(责任编辑: 钟云芳)