

丽格海棠细菌性叶斑病病菌检测技术^①

周丽洪, 王振硕, 韩 阳, 刘 峰, 姬广海

云南农业大学 植物保护学院, 昆明 650201

摘要: 对丽格海棠细菌性叶斑病菌基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 获得其 ITS 序列. 依据该病菌与该属其他细菌 ITS 序列的差异, 设计特异性引物对 XCB(2)/XCB(3), 其扩增片段为 400 bp, 由此建立了快速高效检测该病菌的 PCR 技术体系. 研究根据抗原抗体特异性结合的特点, 制备了免疫细菌抗体血清, 建立了体外检测病原细菌的血清学方法如琼脂糖双向扩散法及间接 ELISA 法, 为丽格海棠细菌性叶斑病的诊断提供了新的重要手段. 该研究还比较了 PCR 和血清学检测技术的灵敏度差异, 结果显示 PCR 技术检测灵敏度可达 27 pg/ μ L, 高于血清学检测技术.

关键词: ITS 序列; 特异性; 灵敏性; 血清学; 野油菜黄单胞菌秋海棠致病变种

中图分类号: S432

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2014)7-0017-07

丽格海棠(Rieger begonias)是用索科秋海棠 *B. socotrana* 与球根类秋海棠及其杂种进行杂交所得的一个秋海棠杂种群的统称. 1933 年美国 Fotsch 将其命名为 *Begonia* $\times$ *hiemalis* Fotsch^[1]. 荷兰全球年销售量高达 9 000 万株. 近 2 年来, 被誉为国际 10 大盆花之一的丽格海棠在栽培过程中开始爆发流行的细菌性叶斑病等^[2-3]. 为了丽格海棠产业的稳步发展, 本课题组在对此病害进行鉴定后, 陆续开展了病原菌检测等工作^[4].

随着分子生物学的发展, 各种分子生物学技术如 RAPD, RFLP, AFLP, rDNA 序列分析和特异性引物的 PCR 检测等在细菌病害研究中被广泛应用^[5]. 由于核糖体基因 ITS 序列在细菌种间的高度变异和种内的稳定性, 为病原菌分子诊断提供了靶序列^[6], 此分析技术已在病原细菌研究方面被广泛应用. 而酶联免疫吸附技术(ELISA)是目前植物细菌性病害和病毒病害诊断上应用比较广的一种免疫学方法^[7], 专化性好且灵敏度高. 本研究不仅针对丽格海棠叶斑病病原细菌 ITS 序列与其他同属细菌的差异, 设计了一组特异性引物 XCB(2)/XCB(3), 建立了一套准确且快速简便的 PCR 检测方法, 并且还根据抗原抗体特异性结合的特点, 制备了免疫细菌抗体血清, 建立了体外检测病原细菌的血清学方法, 为该病的诊断提供了新的重要手段. 本研究的目的是为了及时了解病原菌发生, 大幅度减少该病引起的经济损失, 并有效地进行该病的防治.

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株及菌株号: 丽格海棠细菌性叶斑病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *begonia*, Xcb、红掌细菌性疫病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, Xad-1、Xad-2、魔芋软腐病菌 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, Ecc、三七叶斑病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*, Pss、水稻白叶枯菌 *Xan-*

① 收稿日期: 2013-03-28

基金项目: 农业部公益性行业专项基金资助项目(201303015); 国家自然科学基金资助项目(31360002); 云南省博士新人奖资助项目.

作者简介: 周丽洪(1987-), 女, 四川自贡人, 博士研究生, 主要从事植物细菌病害研究.

通信作者: 姬广海, 教授.

thomonas oryzae pv. *oryzae*, Xoo-1、水稻细菌性条斑病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, Xoc-1、甘蓝黑腐病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, Xcc、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*, Bs、番茄疮痂病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesica*, Xcv.

供试丽格海棠品种: Dark Britt, Rebecca, Blitz, Barkos, Borias. 供试培养基: 病原细菌分离和鉴定常用的 NA, LB 培养基.

1.2 病原菌 PCR 检测试验

1.2.1 病原菌基因组 DNA 的提取

野生型菌株 Xcb 基因组 DNA 的提取: 细菌的基因组 DNA 提取采取快速微量提取法进行^[8], 利用琼脂糖电泳检测提取 DNA 体积质量分数和纯度.

海棠发病叶片组织 DNA 的提取: 于 NA 培养基上活化培养病原菌, 在 28 °C 下划线培养 2 d 后, 用无菌水稀释配成各种体积质量分数的菌悬浮液(核酸蛋白分析仪测得的 OD₅₉₀ 值为 0.5). 将不同体积质量分数的菌悬液, 用摩擦接种法和喷雾法接种在健康丽格海棠植株上, 10 d 后采集发病叶片. 用表面消毒后剪碎组织并摇菌的方法分离出病原菌, 然后提取其 DNA, 方法同上. 菌株标记为 Xcb2.

1.2.2 菌株 ITS 序列的获得

利用细菌 ITS 通用引物对丽格海棠细菌性叶斑病病菌 Xcb 进行 PCR 扩增^[9], 扩增引物序列如下: L1(5'-AGTCGTAACAACGTAGCCGT-3')/L2(5'-GTGCCAAGGCATCCACC-3'). PCR 反应体系总体积 25 μ L, 包括: 10 $\times$ PCR Buffer 2.5 μ L, MgCl₂(25 mmol/L) 2 μ L, dNTP mix(25 mmol/L) 0.5 μ L, 引物 L1(10 μ mol/L) 0.5 μ L, 引物 L2(10 μ mol/L) 0.5 μ L, 模板 DNA 1 μ L(1.05 ng/ μ L); Taq DNA 聚合酶(5 μ mol/ μ L) 0.25 μ L, 双蒸水 17.75 μ L. PCR 程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s; 56 °C 退火 50 s; 72 °C 延伸 1.5 min, 35 个循环, 72 °C 延伸 10 min.

PCR 扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳分离, 检测目的条带. 用 SanPrep 柱式 PCR 产物纯化试剂盒, 对 Xcb 的 PCR 产物进行纯化(纯化步骤参照试剂盒). 将纯化后产物进行克隆并送去测序公司测序.

1.2.3 特异性引物设计

将测序后 Xcb 的 ITS 序列在 NCBI 核酸数据库上采用 Blast 程序进行同源性比对, 根据序列比较结果, 下载相似性最高的几组序列 *Xanthomonas campestris* pv. *begonia* (Xcb-JQ337960); *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv-EU520129); *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (Xad-1 - HM181844, Xad-2 -EU203153); *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo-HM181732); *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* (Xoc-HM181902); *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc-HM181850).

然后用 DNA man 比对这些序列, 找出目的序列与其他序列的碱基差异点. 利用 Primer Primer 5 软件在这些差异点处设计出几对具有特异性的引物^[10-12]. 将设计出来的引物进行自身互补检测, 二聚体检测, 退火温度检测, GC 含量检测等, 最后选择最优引物对. 此次试验最终选择的丽格海棠细菌性叶斑病病原菌特异性引物序列为 XCB(2): 5'GGTATGCGAAAGTCCCATC3'; XCB(3): 5'GGTCATATGCCGTGTT-GTGT3'.

1.2.4 引物特异性检测试验

用设计的引物对不同供试菌株基因组 DNA 进行 PCR 特异性扩增^[13-14], 扩增体系为 25 μ L: 10 $\times$ PCR Buffer(Mg²⁺) 2.5 μ L, dNTP Mix 2 μ L, 上下游引物 XCB(2)/XCB(3)各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 17.1 μ L, Taq 酶 0.4 μ L. PCR 扩增反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s; 63.5 °C 退火 50 s; 72 °C 延伸 1.5 min; 将变性至延伸 3 个步骤设置为 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min. 对 PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 60 min(100 V), 然后在凝胶成像系统检测并拍照.

1.2.5 病原菌 PCR 灵敏性检测试验

测定保存待用的目的菌株 Xcb 的 DNA 体积质量分数时, 设定紫外光波长, 分别测定 230 nm, 260 nm, 280 nm 波长时的 OD 值. 计算待测样品的体积质量分数与纯度: DNA 样品的体积质量分数 (ng/ μ L): OD₂₆₀ $\times$ 稀释倍数 $\times$ 50/1 000; DNA 的纯度: OD₂₆₀/OD₂₈₀.

将已经测定好体积质量分数的 Xcb 的 DNA 体积质量分数分别稀释 10, 10², 10³, 10⁴, 10⁵, 10⁶, 10⁷, 10⁸.

并将稀释后的 DNA 均作为模板 DNA 进行 PCR 扩增, 得出可以检测到目的片段的最低 DNA 的稀释体积质量分数^[15-16]. PCR 扩增体系及反应程序同上. PCR 扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测并拍照.

1.3 病原菌血清学检测试验

1.3.1 丽格海棠病原菌抗原的制备

将供试菌株 Xcb 在 NA 平板上划线, 28 ℃ 培养 24~36 h, 无菌生理盐水洗脱、4 000 r/min 离心 10 min, 去上清并用灭菌生理盐水洗涤 3 次后, 悬浮装入透析袋中, 加入戊二醛溶液(终体积百分比为 2%)固定 24 h, 在蒸馏水中透析 48~72 h(4 ℃), 此间更换 6 次蒸馏水, 用血球计数板计菌数, 配制出体积单位约为 1×10^8 CFU/mL 的菌悬液, 将菌悬液装入离心管, 4 ℃ 冰箱保存、备用^[17].

1.3.2 兔子免疫抗体血清的制备

选择 2 只健康, 体质量 2 kg 左右的雄兔. 免疫前兔子采血 5 mL, 获取免疫前的阴性血清. 将制备好的免疫原给兔子进行静脉注射, 第 1 次注射采用皮下多点注射, 注射剂量 0.5 mL. 一周后进行第 2 次免疫注射, 肌肉多点注射和皮下多点注射, 注射剂量 1 mL. 此后每周注射 1 次, 静脉, 皮下, 肌肉交替进行, 注射剂量 1 mL. 第 5 次注射一周后采血 20 mL 进行效价测定. 若效价不高, 则可加强注射 1 次. 当效价达到 2 560~5 120 时, 从心脏采血分离抗血清.

1.3.3 丽格海棠病原菌血清效价的测定

采用试管凝集的方法检测血清的效价. 将血清稀释到 10 倍, 20 倍, 40 倍, 80 倍, 160 倍, 320 倍, 640 倍, 1 280 倍, 2 560 倍. 加入与抗体血清等量的抗原(OD₅₉₀ 值为 0.5), 用微量移液管吹打混匀后, 放入滤纸盒 24 h, 次日观测各试管的凝集效果, 若某试管内液体部分凝集, 上部液体仍浑浊, 则此试管的血清体积质量分数便是血清的效价结果. 实验设置 3 个重复, 免疫前的阴性血清作为阴性对照, 无菌生理盐水代替血清作为空白对照.

1.3.4 丽格海棠病原菌抗体血清的获得

在效价达标后, 采集血液 20 mL. 采集血清步骤如下; ① 用 100 mL 的大针筒扎入兔子心脏进行抽血, 将血液打入灭菌培养皿, 待红细胞凝固后, 用灭菌针以十字行划破凝结成一片的红细胞. ② 置于 37 ℃ 恒温箱 2 h, 取出后放入 4 ℃ 冰箱 24 h. ③ 次日取出, 用移液管吸取上层血清至灭菌离心管, 每管 1 mL. ④ 3 500 r/min 离心 5 min, 吸取上清液至新的灭菌管. ⑤ 每管加入 5% 的苯酚, 封口, 放入 -20 ℃ 冰箱保存备用^[18].

1.3.5 琼脂双向扩散检测试验

研究参照鲜思美^[19]所报道的琼脂双向扩散法检测病原菌特异性及敏感性. 特异性检测试验的供试菌株一共有 8 株, A 组从 1 号至 6 号分别是 Xcb, Pss, Xad, Ecc, Xoc-1, 无菌水对照. 设置 3 个重复. B 组从 1 号至 6 号分别是 Xcb, Xoo-1, Xcv, Xad, Xcc, 无菌水对照, 中央为海棠血清. C 组则用于检测血清的灵敏性. 周围从 1 号到 6 号血清分别稀释 2, 4, 8, 16, 32, 64 倍. 各处理均设置 3 个重复.

1.3.6 间接 ELISA 检测试验

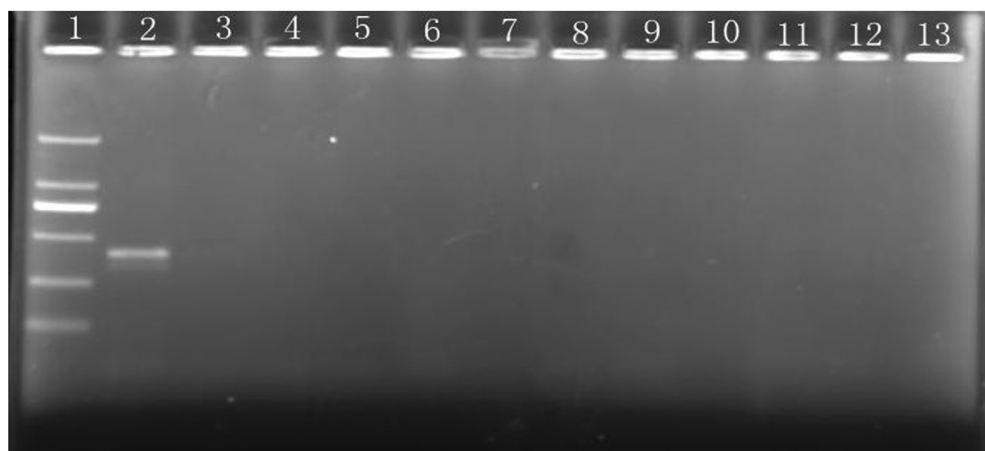
配置 OD₅₉₀ 为 0.5 的海棠病原菌悬浮液, 再分别稀释 $10^1 \sim 10^6$ 倍, 各试验处理设置 4 个重复, 用于检测病原菌和血清抗体之间的敏感性; 病原菌血清特异性检测实验的供试菌株有 Xoo-1, Xoc-1, Xcc, Xad-1, Xad-2, Ecc, Xcv, Pss. 以 CB 作为阴性对照, 无菌水为空白对照. 同时将接种后发病的 5 个海棠品种的病叶用无菌水摇菌 1 h 后, 12 000 r/min 离心 3 min, 取其上清液用于血清的敏感性检测^[20]. 研究利用间接 ELISA 法对病原菌进行特异性及敏感性检测, 具体方法参照王爱华等^[21]的相关报道.

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

2.1.1 特异性 PCR 扩增结果

PCR 扩增后, 凝胶成像系统检测结果为: 引物 XCB(2)/XCB(3)只能从野油菜黄单胞菌秋海棠致病变种的菌株 Xcb 中扩增到一条约 400 bp 的条带(图 1-1 号泳道), 而此对引物对其他病菌的菌株及空白对照(ddH₂O)均无扩增条带. 表明该引物具有种的特异性, 可以将 Xcb 与其他种属的病原菌很好地区分开.



泳道 1—13 分别是: marker, Xcb, Xcv, Xad-1, Xad-2, Ecc, Pss, Xoo-1, Xoc-1, Xcc, Bs, 无菌水, 空白泳道。

图 1 引物 XCB(2)/XCB(3) 特异性 PCR 检测电泳图

2.1.2 病原菌 PCR 敏感性检测实验结果.

UV-240 紫外分光光度测量病原菌 DNA 初始体积质量分数相关的数值为 $OD_{260} = 0.027$ AV, $OD_{280} = 0.015$ AV, $OD_{260}/OD_{280} = 1.8$. 由此计算出供试的病原菌 DNA 初始体积质量分数为 $0.27 \text{ ng}/\mu\text{L}$. 将此体积质量分数的 DNA 分别稀释 5, 10, 50, 100, 500, 1 000, 5 000, 10 000, 20 000 倍后进行 PCR 检测. 并用无菌水作为对照. PCR 检测结果为, 当病原菌体积质量分数为 $27 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 时, 仍可检测到目的片段, 但稀释到 $13.5 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 后便无法检测到目的片段. 因此, 本实验可检测到病原菌的 DNA 临界体积质量分数为 $27 \text{ pg}/\mu\text{L}$.

2.2 血清学检测实验结果

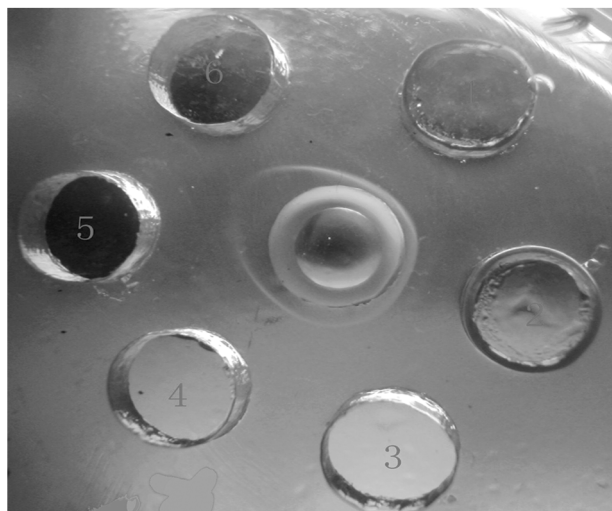
2.2.1 琼脂双向扩散检测法

琼脂双向扩散实验结果分别为: 在灵敏性实验中, 28°C 保存 96 h 后, 除去 6 号生理盐水即对照没有发生凝集反应外, 其余 5 孔均有凝集反应, 即丽格海棠细菌性叶斑病病原菌 Xcb 血清的敏感性程度为原血清体积质量分数的 $1/6$. 在血清特异性试验中, 28°C 保存 72 h 后, 只有丽格海棠细菌性叶斑病病原菌 Xcb 才出现了凝集反应的沉淀带, 而其他 8 株供试菌株(A 组 2—5 号: Pss, Xad-1, Ecc, Xoc-1. B 组 2—5 号: Xoo-1, Xcv, Xad-2, Xcc)和无菌水对照均无凝集反应. 琼脂双向扩散的灵敏性和特异性实验表明了由 Xcb 制备的血清在使用琼脂双向扩散的方法时, 灵敏性和特异性都非常好. 可以在低体积质量分数时检测到病原菌, 也具有种内的特异性检测能力(图 2、图 3、图 4).



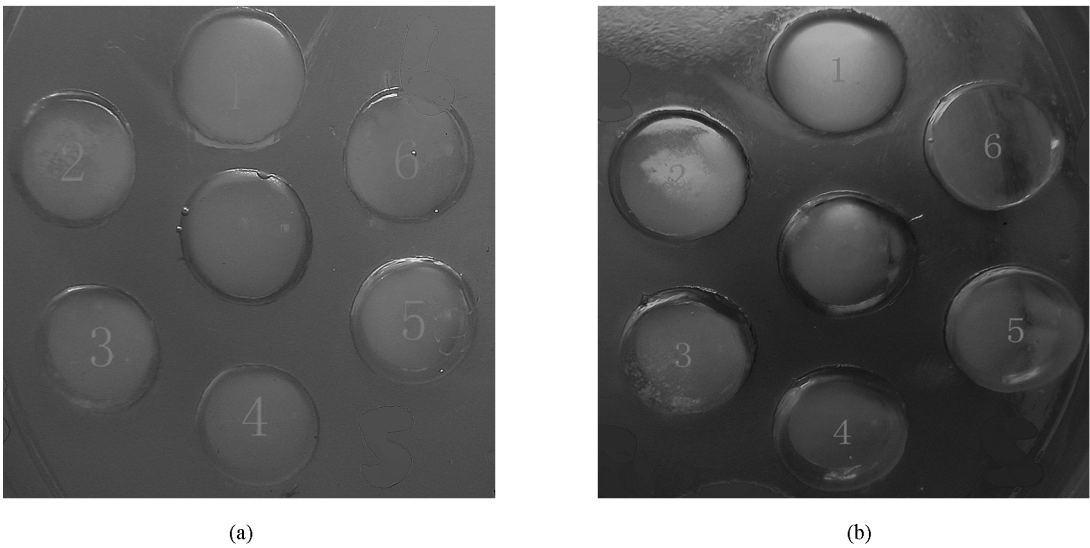
泳道 1: M; 2 000 bp DNA marker; 泳道 2—10: 2 000 bp DNA marke 菌株 Xcb 不同体积质量分数的 DNA; 泳道 11: 超纯水.

图 2 特异性引物 XCB(2)/XCB(3) 检测菌株 Xcb 的灵敏性



1—6 号依次是将 $OD_{590} = 0.5$ 的 Xcb 菌液稀释到 $2^1 \sim 2^6$ 倍后的菌液.

图 3 琼脂双向扩散法检测血清灵敏性



a 组 1—6 号分别是 Xcb,Pss,Xad-1,Ecc,Xoc-1, 超纯水; b 组 1—6 号分别是 Xcb,Xoo-1,Xcv,Xad-2,Xcc, 超纯水.

图 4 琼脂双扩散法检测抗血清特异性

2.2.2 间接 ELISA 检测法

间接 ELISA 检测结果计算方法: $P = \text{阳性对照} - \text{空白对照}$, $N = \text{阴性对照} - \text{空白对照}$. 当 $P/N \geq 2$ 时, 反应设定为阳性, 反之为阴性.

间接 ELISA 灵敏性试验检测结果显示(表 1), 以体积单位为 3×10^8 CFU/mL 的病原菌悬浮液作为母液时(即 OD_{590} 值为 0.5), 稀释 10^4 倍后仍可以检测到病原菌. 5 个品种接种后发病的叶片浸出液均可检测到病原菌. 柯赫氏法则接种后, 5 个品种的丽格海棠叶片浸出液均可检测到病原菌. 间接 ELISA 特异性实验检测结果显示, 只能检测与病原菌同种的 Xcv, 而 Xoo-1,Xoc-1,Xcc,Ecc,Pss 等, 其他种的病原菌则均不能检测到. 即制备的丽格海棠叶斑病病原菌配置的血清仅具有种间特异性.

表 1 间接 ELISA 法检测血清灵敏性及特异性

测试项目	光 密 度 值											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.380	0.275	0.241	0.210	0.118	0.105	0.095	0.095	0.096	0.091	0.089	0.093
B	0.372	0.309	0.236	0.188	0.141	0.110	0.095	0.091	0.094	0.090	0.103	0.086
C	0.423	0.301	0.266	0.197	0.131	0.113	0.099	0.087	0.093	0.089	0.104	0.082
D	0.313	0.274	0.209	0.173	0.116	0.101	0.096	0.092	0.090	0.082	0.097	0.079
E	0.180	0.291	0.107	0.102	0.116	0.104	0.101	0.100	0.111	0.101	0.096	0.089
F	0.141	0.305	0.103	0.104	0.113	0.100	0.103	0.091	0.121	0.093	0.086	0.084
G	0.155	0.300	0.109	0.108	0.115	0.107	0.105	0.087	0.116	0.096	0.095	0.077
H	0.174	0.288	0.112	0.101	0.116	0.103	0.103	0.089	0.115	0.091	0.102	0.088
均值											0.097	0.085

注: 1(A-D)-7(A-D): 以 $OD_{450} = 0.5$ 的病原菌菌液为基础的稀释液, 稀释倍数分别为 $10^1 - 10^6$ (A-D 为 4 组重复); 8(A-D): Xoo-1; 9(A-D): Xoc-1; 10(A-D): Xcc; 1(E-H): Dark Britt 叶片浸出液; 2(E-H): Rebecca 叶片浸出液; 3(E-H): Blitz 叶片浸出液; 4(E-H): Barkos 叶片浸出液; 5(E-H): Borias 叶片浸出液; 6(E-H): Xad-1; 7(E-H): Xad-2; 8(E-H): Ecc; 9(E-H): Xcv; 10(E-H): Pss; 11(A-H): CB 阴性对照; 12(A-H): 超纯水.

3 讨 论

对病原细菌分类鉴定的传统方法主要依赖于病原菌的致病性及形态学特性等, 这些观察、鉴定的方法容易受到环境和人为因素的制约. 而细菌基因组的 16S-23S rDNA 转录间隔区域(Intergenic Transcribed Spacer Region, ITS)是介于 18S rDNA, 5.8S rDNA 和 28S rDNA 之间的区域, 该区域选择压力小, 进化速率较快, 与 16S rDNA 和 23S rDNA 相比, 表现出广泛的序列多态性, 对细菌的鉴定和检测有更好的

准确性和灵敏性。根据种内不同个体之间具有高度保守性、种间差异较大和不同物种间线粒体 DNA 序列的差异等原理,对 ITS 序列进行比较分析可以用来作为细菌属、种分类和鉴定的依据^[22-23]。近年来,采用 PCR 扩增病原细菌核糖体 ITS 基因区段进行病原菌检测及病害诊断的技术已经得到了很大程度的应用与发展^[24-26]。

本实验是基于病原菌核糖体 ITS 基因区段的特异性序列和由病原菌所制备的特异性血清而建立的,主要用于检测并区分丽格海棠细菌性叶斑病原菌与其他的病原细菌。在利用引物设计软件设计出一对异性引物 XCB(2)/XCB(3)后,建立了一套 PCR 体系,这套体系可以快速有效地从 Xcb 中扩增出一条 400 bp 的特异性条带,而供试的其他相似或相近的细菌则无扩增条带,表明我们所设计的引物具有高度专化性。

另外,本研究还比较了常规 PCR 技术和血清学检测技术可检测到病原菌的灵敏度,结果显示常规 PCR 技术检测病原菌基因组 DNA 的灵敏度高于血清学检测技术,灵敏度可达 27 pg/ μ L。分子检测技术与免疫血清学技术相比较可以看出,在实际病害诊断及病原物检测方法中,免疫学方法无论在实用性和应用范围等方面均优于分子检测技术,并且许多免疫学技术已形成商业化,分子检测技术目前还局限在实验室研究的范围。但分子检测技术可提供的专一性和灵敏性均超越了免疫学的方法,特别是将 PCR(polymerase chain reaction)技术与等位基因寡聚核苷酸分析相结合,可检测出 DNA 分子中发生的点突变^[27]。分子生物学技术经过 20 多年的快速发展,为有害生物的诊断打下了坚实的基础^[28]。而能否制备出高效的抗体血清及抗原病菌,是否容易产生假阳性均是血清学实验成败的关键。关于建立多克隆抗体免疫荧光检测方法(IFA)来提高该病菌检测的特异性、灵敏性和稳定性的研究,以及比较鸡胚胎免疫抗体和兔免疫抗体血清特异性和灵敏性都在该病菌检测研究计划中^[29-30]。

参考文献:

- [1] 杨 亮,何顺志. 中国秋海棠属的研究进展 [J]. 时珍国医国药, 2008, 19(12): 2979—2982.
- [2] 韩继龙. 丽格海棠温室栽培新技术 [J]. 中国园艺文摘, 2010, 26(3): 109.
- [3] ORNEK H, AYSAN Y, MIRIK M, et al. First Report of Bacterial Leaf Spot Disease, Caused by *Xanthomonas axonopodis* pv. *begoniae*, on Begonia in Turkey [J]. Plant Pathology, 2007, 56(2): 347.
- [4] 周丽洪,王永吉,韩 阳,等. 丽格海棠细菌性叶斑病原菌鉴定 [J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 2012, 37(12): 56—61.
- [5] 张世珖,刘雅婷,姬广海,等. 烟草野火病原特性、快速检测及防治药剂筛选的研究 [C]. 昆明: 中国植物病理学会学术年会论文集, 2009.
- [6] 郑雪松,杨 虹,李道棠,等. 基因间隔序列(ITS)在细菌分类鉴定和种群分析中的应用 [J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(6): 678—684.
- [7] SINGH U, TREVORS C M, DE BOER S H, et al. Fimbrial-Specific Monoclonal Antibody-Based ELISA for European Potato Strains of *Erwinia Chrysanthemi* and Comparison to PCR [J]. Plant Disease, 2000, 84(4): 443—448.
- [8] 刘以祥,李柏林,欧 杰,等. 野油菜黄单胞菌基因组 DNA 快速提取方法和酶切 [J]. 食品科学, 2004, 25(11): 237—240.
- [9] 林 静,陈庆河,李本金,等. 杨桃细菌性斑点病菌的 ITS 序列分析及 PCR 检测 [J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(4): 777—784.
- [10] 张明程. 从 GenBank 获取基因序列及 PCR 引物设计的方法 [J]. 青海医学院学报, 2002, 23(2): 68—72.
- [11] 任 亮,朱宝芹,张铁博,等. 利用软件 Primer Primer 5.0 进行 PCR 引物设计研究 [J]. 锦州医学院学报, 2004, 25(6): 43—46.
- [12] 魏兰芳,姬广海,张世光. 云南马铃薯青枯病菌的 PCR 检测 [J]. 西南农业大学学报, 2002, 24(1): 72—74.
- [13] 关大伟. 光合细菌 PCR 检测技术的建立及其应用研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2007.
- [14] 赵 杰. ITS 序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用 [J]. 陕西农业科学, 2004, 4: 35—37.
- [15] 张爱红,苗红芹. 几种植物病原细菌的检测和鉴定技术 [J]. 河北农业科学, 2008, 12(8): 30—32.
- [16] 邢红梅,丁 平,周晓云,等. 红掌胶胞炭疽菌的分子检测 [J]. 植物病理学报. 2008, 38(2): 113—119.
- [17] 蔡家利,蓝希崧,潘国庆. 间接雪凝试验检测猪繁殖与呼吸综合症病毒抗体 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(1): 45—46.

[18] 刘 铀, 毕英佐, 曹永长. 用重组 HN 蛋白建立新城疫抗体检测的 ELISA 方法 [J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2005, 27(4): 509—511.

[19] 鲜思美. 应用琼脂扩散试验检测新城疫抗原 [J]. 贵州畜牧兽医, 2002, 26(2): 5—6.

[20] 潘俊鹏, 张祥林, 罗 明, 等. ELISA 及实时荧光 PCR 检测番茄细菌性溃疡病菌的方法比较 [J]. 植物检疫, 2008, 22(5): 275—278.

[21] 王爱华, 王建华, 宋毓民. 抗苦马豆素抗体 ELISA 检测方法的建立 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2008, 36(11): 52—56.

[22] 焦振泉, 刘秀梅. 细菌分类与鉴定的新热点: 16S-23SrDNA 间区 [J]. 微生物学通报, 2001, 28(1): 85—89.

[23] LOUWS F J, RADEMAKER J L W, BRUIJN F J. The Three Ds of PCR-Based Genomic Analysis of Phytobacteria: Diversity, Detection and Disease Dianosis [J]. Annual Review of Phytopathol, 1999, 37: 81—125.

[24] 侯丽冰, 贺 伟, 刘小勇, 等. 我国几种松干锈菌亲缘关系的 ITS 序列分析 [J]. 北京林业大学学报, 2002, 24(6): 175—182.

[25] 王源超, 张正光, 郑小波, 等. 核糖体基因 ITS 作为苎麻疫霉、恶疫霉分类辅助性状的研究 [J]. 菌物学报, 2000, 19(4): 485—491.

[26] 马荣群, 黄 粤, 宋正旭, 等. 辣椒炭疽病病原核糖体基因 ITS 区的序列测定及分析 [J]. 西南农业学报, 2007, 20(6): 1234—1236.

[27] SALAZAR L F, QUERCI M. Techniques for the Rapid Detection of Plant Pathogens [M]. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1992: 129—144.

[28] 宁 红, 秦 蓁. 分子生物学技术在检疫性有害生物诊断中的应用 [J]. 植物检疫, 2002, 16(2): 98—100.

[29] 李艳红, 谢 俐, 潘国庆, 等. 家蚕孢子虫抗体免疫荧光检测方法的建立及应用 [J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 28(6): 990—993.

[30] 李继祥, 杨平东, 徐 刚, 等. 特异性抗体对新城疫疫苗免疫原性的影响研究 [J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2004, 26(5): 655—658.

A New Detection Technology of *Xanthomonas campestris* pv. *begonia*

ZHOU Li-hong, WANG Zhen-shuo, HAN Yang,
LIU Feng, JI Guang-hai

Department of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan 2650201, China

Abstract: PCR amplification was performed of the genomic DNA of *Xanthomonas campestris* pv. *begonia* (Xcb) and its internal transcribed space (ITS) sequences were obtained. Based on the differences in ITS sequences between Xcb and other *Xanthomonas* bacteria, one pair species-specific primers XCB(2)/XCB(3) was designed, and the length of the PCR amplified fragment was 400 bp. Thus a new highly efficient means for the detection of *X. campestris* pv. *begonia* was developed. In this study, the sensitivity of PCR and serologic test techniques was compared. The PCR detection sensitivity was 27 pg/ μ L of genomic DNA, which was higher than the serologic test technique.

Key words: ITS sequence; specificity; sensitivity; serology; *Xanthomonas campestris* pv. *begonia*

