

玉米内州萎蔫病菌的巢式 PCR 检测方法

封立平^{1*}, 余冬冬², 王英超¹, 吴翠萍³, 吴兴海¹, 张京宣¹, 王简¹, 宋涛¹

(1. 山东出入境检验检疫局检验检疫技术中心, 青岛 266002; 2. 黄岛出入境检验检疫局, 青岛 266002;
3. 江苏出入境检验检疫局, 南京 210001)

摘要: **目的** 建立了一种特异、敏感、快速的玉米内州萎蔫病菌的巢式 PCR(Nest-PCR)检测方法。**方法** 根据玉米内州萎蔫病菌(*Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, Cmn)和 *C. michiganensis* 种下其他 4 个亚种细菌 Cmm、Cmi、Cms、Cmt 的 ITS 序列差异性基因位点设计 CmnFP-OUTER/CmnRP-OUTER 为外侧引物, CmnFP-INNER/CmnRP-INNER 为内侧引物的巢式-PCR, 并对所有参试菌株 DNA 和菌悬液进行了扩增。**结果** 经过两轮扩增, 能从参试的玉米内州萎蔫病菌中特异性地扩增出 1 条 122 bp 的片段, 而其他参试菌株没有扩增信号。该巢式 PCR 检测方法对菌悬液的最低检测限为 3.54×10^2 CFU/mL, 检测灵敏度比常规 PCR 提高了 1000 倍。**结论** 本研究建立的玉米内州萎蔫病菌的巢式 PCR(nest-PCR)检测方法具有良好的特异性和灵敏性, 将会在玉米内州萎蔫病的早期诊断及预防传入方面发挥重要作用。

关键词: Nested-PCR; 玉米内州萎蔫病菌; 检测

Nested-PCR detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*

FENG Li-Ping^{1*}, YU Dong-Dong², WANG Ying-Chao¹, WU Cui-Ping³, WU Xing-Hai¹,
ZHANG Jing-Xuan¹, WANG Jian¹, SONG Tao¹

(1. Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China; 2. Huangdao Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Qingdao 266002, China; 3. Jiangsu Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Nanjing 210001, China)

ABSTRACT: Objective This study is to develop a nested-PCR detection method, which is specific, sensitive and effective, to detect *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*. **Methods** According to the difference of gene loci of intergenic transcription spacer (ITS) areas of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Cmn) and related species including Cmm, Cmi, Cms and Cmt, the nested-PCR with primers including CmnFP-OUTER/CmnRP-OUTER and CmnFP-INNER/CmnRP-INNER was designed, and the tested bacteria strain DNA and suspension were amplified. **Results** After two rounds of amplification, a band of 122 bp was amplified from Cmn strains but not from other tested bacteria species. The nested PCR detection method can detect the Cmn suspension with minimum limit of 3.54×10^2 CFU/mL, and the sensitivity of this method is 1000 times higher than conventional PCR method. **Conclusion** The nested-PCR detection method developed in this study has a good specificity and sensitivity for detecting *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, and it will play an important role in early diagnosis and prevention of Goss's bacterial wilt and

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2009IK254、2011IK286、2012IK278)

Fund: Supported by the Scientific and Technological Project of the General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China (2009IK254, 2011IK286, 2012IK278)

*通讯作者: 封立平, 高级农艺师, 主要研究方向为植物病理学。E-mail: fengciq@163.com

*Corresponding author: Feng Li-Ping, Senior Agronomist, Technical Center of Shandong Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, No.70, Qutangxia Road, Shinan District, Qingdao 266002, China. E-mail: fengciq@163.com

blight of maize.

KEY WORDS: nested-PCR; *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*; detection

1 引言

玉米内州萎蔫病菌(*Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*)是一种重要的检疫性植物病原细菌,此类病原菌可引起玉米内州萎蔫病(Goss's bacterial wilt and blight of maize)。玉米内州萎蔫病是玉米的毁灭性病害,在该病害大暴发时,可导致玉米产量损失率达 40%^[1-3]。玉米是我国的重要作物之一,并且已成为我国一种新的大宗进口商品。从 2010 年起,我国出现了玉米净进口态势,进口量超过过去十五年进口量之和。2012 年我国全年进口玉米 520.74 万吨,同比增长 197.08%。2013 年、2014 年仍然保持了玉米进口的高增长态势。玉米内州萎蔫病菌随进口玉米种子传入我国的风险很高。同时,该病菌还有可能通过混杂在进口大豆中的玉米籽粒传入我国,风险同样不容忽视^[4]。而且有研究表明我国的玉米种植区的大部分均为该病原细菌在中国潜在的适生区域^[5]。因此该病害在我国传播、定殖的潜在风险非常高,且一旦发生无有效的防治方法。1969 年,该病首次报道于美国内布拉斯加州中部,目前病害已在美国中西部各州发生,包括印第安纳州^[6]、明尼苏达州^[7]、德克萨斯州^[8]及加拿大安大略省、曼尼托巴省^[9]等发生。国内尚无该病害分布的报道。自 1997 年以来,该病菌一直被列为我国重要的检疫性有害生物。目前该病菌的检测方法主要有分离培养^[10]、免疫学方法^[11]、常规 PCR^[12]、实时 TaqMan-PCR^[13]等,都存在耗时长、效率低、灵敏度不高或无法应用于实际检测工作中等缺点。随着该病害传入风险的加大,已有的检测方法难以达到实际工作的要求。

巢式 PCR(nest-PCR)是一种变异的聚合酶链式反应(PCR),使用两对 PCR 引物扩增完整的片段。第一对 PCR 引物扩增片段和普通 PCR 相似,第二对引物称为巢式引物,结合在第一次 PCR 产物内部。如果第一次扩增产生了错误片断,则第二次扩增能在错误片段上进行引物配对并扩增的概率极低,可以有效的将第一次扩增的假阳性结果剔除,因此巢式-PCR 具有较强的特异性。利用巢式-PCR 方法检测检疫性病原菌一方面提高了检测的灵敏度,另一方面降低了结

果假阳性的几率,大大提高了检测能力^[14-15]。

本研究根据玉米内州萎蔫病菌和其种内其他 4 个近缘亚种 ITS 区域序列差异性基因位点设计了一对引物,并对其特异性检测和灵敏度进行了研究,开发了一种快速、灵敏、特异的玉米内州萎蔫病菌的巢式 PCR 检测方法。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 供试菌株

玉米内州萎蔫病菌菌株 *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Cmn), ATCC27795; 苜蓿萎蔫病菌菌株 *C.m.subsp.insidiosus* (Cmi), ATCC33114; 密执安棍状杆菌棋盘亚种 *C.m.subsp.tessellarius* (Cmt), ATCC33566; 马铃薯环腐病菌 *C.m.subsp.sepedonicus* (Cms), ATCC33113; 番茄细菌性溃疡病菌 *C.m. subsp. Michiganensis*(Cmm), ATCC7433。来源于美国 ATCC(American Type Culture Collection)。

2.1.2 培养基与试剂

NBY 培养基: 营养肉汤(nutrient broth) 8.0 g, 酵母提取物 2.0 g, K₂HPO₄ 2.0 g, KH₂PO₄ 0.5 g, 葡萄糖 5.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.25 g, 加蒸馏水定容到 1000 mL, 121 °C 灭菌 20 min, 备用。

LB 培养基: 酵母提取物 5 g, 胰蛋白胨 10 g, 氯化钠 10 g, 加蒸馏水定容到 1000 mL, 121 °C 灭菌, 20 min, 备用。

试剂: 10×PCR buffer、Taq DNA 聚合酶及 dNTPs Mixture、DNA Ladder 均购自宝生物工程(大连)有限公司(Takara)公司。

2.1.3 仪器与设备

美国 MJ Research 公司 PCR 仪(PIC-100); 北京六一仪器厂核酸电泳槽; 美国 Bio-Rad 公司核酸电泳仪; 美国 Bio-Rad 公司凝胶成像仪(ChemiDoc XRS); 超净工作台。

2.1.4 供试菌株菌悬液制备

将供试各菌株接于 NBY 固体培养基上, 28 °C 培养直至长出单菌落, 挑取单菌落接种于 LB 液体培养基中, 28 °C, 140 r/min 进行震荡培养, 48 h 后测定菌液的 OD₆₀₀, 菌液 OD₆₀₀ 达到 1 后, 吸取 1 mL 菌液,

12000 r/min 离心 1 min, 收集菌体。以无菌 PBS 将此细菌培养液梯度稀释为 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 共 7 个梯度, 将原菌液记为 10^0 , 振荡均匀。将各梯度的纯菌液各 100 μL 均匀倒于培养皿中, 再在培养皿中倒入适温的 NBY 固体培养基约 15 mL 并立即摇匀。每个梯度的计数菌液设 3 个重复。待培养基冷却凝固, 将平板倒置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 72 h 后进行平板菌落计数。经换算, 10^{-1} - 10^{-7} 的 7 个梯度纯菌液, 对应的计数结果分别为 3.54×10^7 - 3.54×10^1 CFU/mL。

2.2 方法

2.2.1 巢式-PCR 特异性引物的设计与合成

选取玉米内州萎蔫病菌和其他相关参试菌株的 ITS 序列为目标序列, 进行特异性引物的设计。从 NCBI 数据库中分别获取 *C.michiganensis* 种下 5 个不同亚种细菌的 ITS 序列, 索取号分别为 U09381 (Cmn)、U09380 (Cmm)、U09378 (Cmi)、U09382 (Cms) 和 L43095 (Cmt), 采用 DNAMAN 软件进行序列比较, 选取差异性基因位点进行引物设计。引物由 TaKaRa 公司合成。

2.2.2 Nested-PCR 检测体系

Nested-PCR 反应体系为 25 μL , 包括 2.5 μL $10 \times \text{PCR buffer}$ (25 mmol/L MgCl_2), 2.0 μL dNTPs (2.5 mmol/L), 引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 0.5 μL Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/ μL), 1.0 μL 模板, 加灭菌的超纯水补足至 25 μL 。

Nested-PCR 反应程序为: 1.0 μL 模板, 99 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 10 min; 然后放置冰上冷却 5 min, 加入 PCR 反应成分, 以引物 CmnFP-OUTER/CmnRP-OUTER 为外侧引物各 1 μL 进行第一轮扩增, 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 循环条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 63 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 35 循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取扩增后的产物

1 μL 为模板, 以引物 CmnFP-INNER/CmnRP-INNER 为内侧引物各 1 μL 进行第二轮扩增, 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 循环条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 共 35 循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min。置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.2.3 巢式-PCR 引物特异性检测

按照 Nested-PCR 检测体系的方法, 利用引物对 CmnFP-OUTER/CmnRP-OUTER 和 CmnFP-INNER/CmnRP-INNER 分别扩增供试的玉米内州萎蔫病菌 (Cmn) 菌株、苜蓿萎蔫病菌 (Cmi) 菌株、密执安棍状杆菌棋盘亚种 (Cmt) 菌株、马铃薯环腐病菌 (Cms) 菌株、番茄细菌性溃疡病菌 (Cmm) 菌株, 不经细菌 DNA 的提取, 直接以 10^8 CFU/mL 的供试菌悬液热裂解为 DNA 模板, 以无菌 PBS 缓冲液为阴性对照, PCR 反应条件同 2.2.2。PCR 反应结束后, 取 5 μL 产物于 1% 的琼脂糖凝胶中电泳, 电压为 100 V, 电泳时间为 40 min, 结束后于凝胶成像系统下观察结果。试验重复 3 次。

2.2.4 巢式-PCR 引物灵敏度检测

将系列梯度稀释法制备的 Cmn 菌悬液按 nested-PCR 程序扩增。分别取 1 μL 不同浓度的菌悬液, 加入 25 μL 的 nested-PCR 反应体系中, 根据是否扩增得到目标片段, 检测引物的灵敏度。扩增结束后在 1% 的琼脂糖凝胶中电泳并于凝胶成像系统下观察结果。

3 结果与分析

3.1 巢式-PCR 检测玉米内州萎蔫病菌

以玉米内州萎蔫病菌的 10^8 CFU/mL 菌悬液为模板进行第一轮扩增, 得到预期的 209 bp 大小的目标片段。以第一轮扩增产物的模板, 进行第二轮扩增, 得到预期的 122 bp 大小的目标片段。

表 1 试验引物
Table 1 The primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence	产物大小 Product size (bp)
CmnFP-OUTER	5'-TCCACCCATGAGCTCCACCC-3'	209
CmnRP-OUTER	5'-GGTACCCACCACCATCCAC-3'	
CmnFP-INNER	5'-GCCCTCGACATACCAGACCG-3'	122
CmnRP-INNER	5'-CCCCACCACCATCCACGAAA-3'	

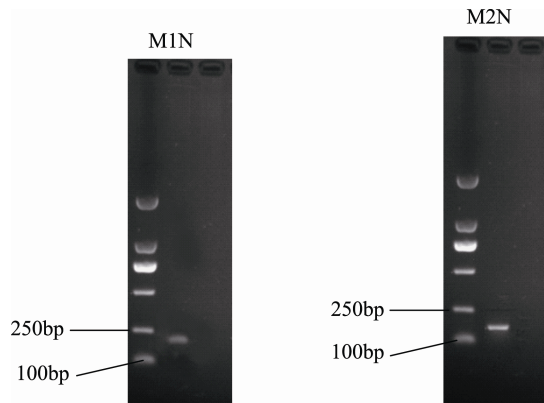


图 1 玉米内州萎蔫病菌菌悬液 nested-PCR 扩增结果

Fig. 1 Amplification products of Cmnp suspension by nested-PCR
M:DNA Marker DL2000; 1:引物 CmnpFP-OUTER/CmnpRP-OUTER 扩增结果; 2: 引物 CmnpFP-INNER/CmnpRP-INNER 扩增结果; N: 阴性对照

M:DNA Marker DL2000; 1:Amplification products by CmnpFP-OUTER/CmnpRP-OUTER ; 2:Amplification products by CmnpFP-INNER/CmnpRP-INNER; N: negative control

3.2 巢式-PCR 引物特异性检测结果

图 2 结果显示, 两对巢式-PCR 引物在上述 PCR 条件下, 可以以 Cmnp 菌株的 DNA 和菌悬液为模板, 经过巢式-PCR 两轮反应特异性扩增得到大小为 122 bp 的目标片段, 且仅有此一条明显的扩增产物, 无其他非特异性扩增产物; 同时 *C. michiganensis* 种下其他亚种则没有扩增产物。PCR 结果表明, 引物 CmnpFP-OUTER/CmnpRP-OUTER、CmnpFP-INNER/CmnpRP-INNER 对 Cmnp 具有亚种特异性, 且结果稳定, 重复性好, 可实现对玉米内州萎蔫病菌(Cmnp)进行检测。

3.3 巢式-PCR 引物灵敏度检测结果

图 3 结果显示, 经过第一轮反应, 只有浓度为 3.54×10^7 CFU /mL, 3.54×10^6 CFU /mL, 3.54×10^5 CFU /mL 浓度的菌悬液的反应体系扩增产物有明显的目标条带。图 4 结果显示, 经过第二轮反应, 浓度为 3.54×10^7 、 3.54×10^6 、 3.54×10^5 、 3.54×10^4 、 3.54×10^3 、 3.54×10^2 CFU/mL 浓度的菌悬液的反应体系扩增产物均有明显的目标条带。由此可见, 该巢式 PCR 检测体系对菌悬液的最低检测限为 3.54×10^2 CFU/mL。经过 Nested-PCR 两轮反应, 对玉米内州萎蔫病菌菌悬液检测灵敏度比一轮反应(常规 PCR)提高了 1000 倍。

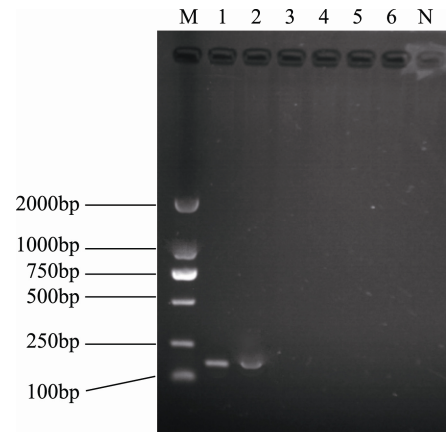


图 2 玉米内州萎蔫病菌 nested-PCR 引物特异性检测结果

Fig. 2 Specificity amplification test for Cmnp suspension by nested-PCR

M: DNA Marker DL2000; 1: 玉米内州萎蔫病菌基因组 DNA 扩增条带; 2: 玉米内州萎蔫病菌菌悬液扩增条带; 3: 苜蓿萎蔫病菌菌悬液扩增条带; 4: 密执安棍状杆菌棋盘亚种菌悬液扩增条带; 5: 马铃薯环腐病菌菌悬液扩增条带; 6: 番茄细菌性溃疡病菌菌悬液扩增条带; N: 阴性对照

M: DNA Marker DL2000; 1: Cmnp; 2: Cmnp; 3: Cmi; 4: Cmt; 5: Cms; 6: Cmm; N: negative control

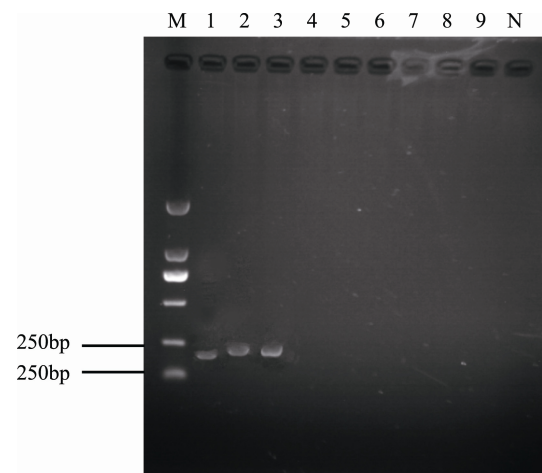


图 3 nested-PCR 第一轮反应检测 Cmnp 菌悬液的灵敏度扩增结果

Fig. 3 Sensitivity amplification test for Cmnp suspension by the first round of nested-PCR

M: DNA marker DL2000; 1-8: 玉米内州萎蔫病菌 (Cmnp)菌悬液样品浓度分别为 3.54×10^7 CFU/mL、 3.54×10^6 CFU/mL、 3.54×10^5 CFU/mL、 3.54×10^4 CFU/mL、 3.54×10^3 CFU/mL、 3.54×10^2 CFU/mL、 3.54×10^1 CFU/mL、 3.54×10^0 CFU/mL; N: 阴性对照。

M: DNA marker DL2000; 1-8: 3.54×10^7 CFU/mL、 3.54×10^6 CFU/mL、 3.54×10^5 CFU/mL、 3.54×10^4 CFU/mL、 3.54×10^3 CFU/mL、 3.54×10^2 CFU/mL、 3.54×10^1 CFU/mL、 3.54×10^0 CFU/mL; N: negative control.

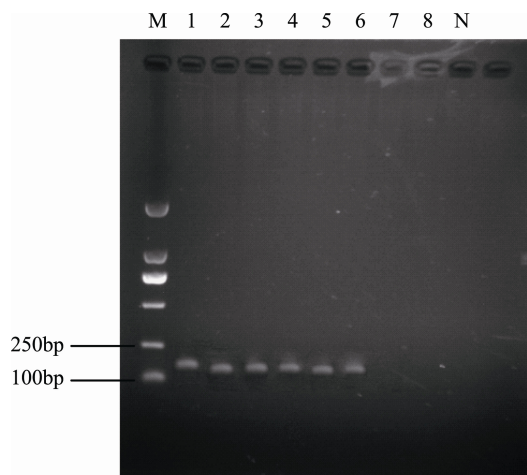


图 4 nested-PCR 第二轮反应检测 Cmn 菌悬液的灵敏度扩增结果

Fig. 4 Sensitivity amplification test for Cmn suspension by the second round of nested-PCR

M: DNA Marker DL2000; 1-8: 玉米内州萎蔫病菌 (Cmn) 菌悬液样品浓度分别为 3.54×10^7 CFU/mL、 3.54×10^6 CFU/mL、 3.54×10^5 CFU/mL、 3.54×10^4 CFU/mL、 3.54×10^3 CFU/mL、 3.54×10^2 CFU/mL、 3.54×10^1 CFU/mL、 3.54×10^0 CFU/mL; N: 阴性对照。

M: DNA Marker DL2000; 1-8: 3.54×10^7 CFU/mL、 3.54×10^6 CFU/mL、 3.54×10^5 CFU/mL、 3.54×10^4 CFU/mL、 3.54×10^3 CFU/mL、 3.54×10^2 CFU/mL、 3.54×10^1 CFU/mL、 3.54×10^0 CFU/mL; N: negative control.

4 讨论

玉米内州萎蔫病是严重危害玉米作物的一种毁灭性的病害, 玉米种子调运和人为携带是该病害远距离传播的重要途径。随着我国玉米进口量的剧增, 玉米内州萎蔫病菌传入我国的风险进一步增大。本研究根据玉米内州萎蔫病菌(Cmn)和 *C. michiganensis* 种下其他 4 个亚种细菌 Cmm、Cmi、Cms、Cmt 的 ITS 序列差异性基因位点设计了巢式-PCR 特异性引物, 建立了巢式-PCR 检测玉米内州萎蔫病菌的检测方法, 提高了检测灵敏度和准确性。引物对 CmnFP-OUTER / CmnRP-OUTER 和 CmnFP-INNER / CmnRP-INNER LAMP 具有亚种特异性, 且结果稳定, 重复性好, 能将 Cmn 与 *C. michiganensis* 种下其他 4 个亚种鉴定区分开。该巢式 PCR 检测体系对菌悬液的最低检测限为 3.54×10^2 CFU/mL, 检测灵敏度比常规 PCR 提高了 1000 倍。由于玉米内州萎蔫病菌是世界广泛关注的重要检疫性有害生物, 且没有有效的防治方法, 如果

进一步优化并研制该病菌的巢式-PCR 检测试剂盒, 将会在玉米内州萎蔫病的早期诊断及预防传入方面发挥重要作用。由于试验条件所限, 本研究建立的检测方法通过检测玉米内州萎蔫菌 DNA 和菌悬液评价引物特异性和灵敏度, 没有用该方法对带菌玉米种子的检测特异性和灵敏度进行评价。

参考文献

- [1] Jackson AT, Harveson RM, Vidaver AK. Goss's bacterial Wilt and Leaf Blight of corn. University of Nebraska-Lincoln Extension publication[EB/OL]. 2007, <http://www.extension.unl.edu/publications>.
- [2] CAB International. *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, [Distribution map]. Distribution Maps of PLANT DISs, UK: 2000. April (Edition 2), Map 549.
- [3] 王岭, 田世民, 高海霞, 等. 玉米内州萎蔫病研究进展[J]. 植物检疫, 2008, 22(2): 118-121.
Wang L, Tian SM, Gao HX, et al. Research progress of Fusarium Wilt of corn [J]. Plant Quarantine, 2008, 22(2): 118-121.
- [4] Biddle JA, Mcgee DC, Braun EJ. Seed transmission of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* in corn [J]. Plant Dis, 1990, 74(11): 908-911.
- [5] 陈寔, 高文娜, 汪万春, 等. 玉米内州萎蔫病在中国的适生性分析[J]. 植物检疫, 2009, 23(5): 9-12
Chen S, Gao WN, Wang WC, et al. Prediction of potential geographic distribution areas for the Goss's bacterial wilt and leaf blight of corn in China [J]. Plant Quarantine, 2009, 23(5): 9-12.
- [6] Ruhl G, Wise K, Creswell T, et al. First report of Goss's bacterial wilt and leaf blight on corn caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* in Indiana [J]. Plant Dis, 2009, 93(8): 841.
- [7] Malvick D, Syverson R, Mollov D, et al. Goss's bacterial blight and wilt of corn caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* occurs in Minnesota [J]. Plant Dis, 2010, 94(8): 1064.
- [8] Koms KA, Timmerman AD. First report of Goss's bacterial wilt and leaf blight (*Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*) of corn in Texas [J]. Plant Dis, 2011, 95(1): 73.
- [9] Agarkova IV, Lambrecht PA, Vidaver AK. Genetic diversity and population structure of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* [J]. Can J Microb, 2011, 57(5): 366-374.
- [10] Kevin AK. Evaluating commercially available diagnostic tests for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis*, cause of Goss's bacterial wilt and leaf blight in corn [D]. University of Nebraska-Lincoln, 2011.

- [11] 吴晓巍, 金涌, 田世民, 等. 玉米内州萎蔫病菌免疫学检测方法的建立[J]. 微生物学通报, 2010, 6: 929-933.
Wu XW, Jin Y, Tian SM, *et al.* Development of an immunosorbant assay for seedborne *Clavibacter michiganensis* subsp.*nebraskense* in corn seeds [J]. Microbiol China, 2010, 6: 929-933.
- [12] 周琦, 陈寔, 高文娜, 等. PCR 技术快速检测玉米内州萎蔫病菌研究[J]. 植物检疫, 2010, 24(2): 16-18.
Zhou Q, Chen S, Gao WN, *et al.* PCR for rapid identification of *Clavibacter michiganensis* subsp.*nebraskensis* [J]. Plant Quarantine, 2010, 24(2): 16-18.
- [13] Bach HJ, Jessen I, Schloter M, *et al.* A TaqManPCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies [J]. J Microbiol Meth, 2003, 52(1): 85-91.
- [14] 王茂华, 胡白石, 卢玲, 等. 利用巢式 PCR 检测玉米细菌性枯萎病菌[J]. 南京农业大学学报, 2005, 28(2): 37-40.
Wang MH, Hu BS, Lu L. Detection of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* by nested-PCR [J]. J Nanjing Agric Univ, 2005, 28(2): 37-40.
- [15] 张玮, 燕继晔, 黄金宝, 等. 葡萄溃疡病菌巢式 PCR 高效检测体系的建立[J]. 植物保护学报, 2012, 39(5): 479-480.
Zhang W, Yan JY, Huang JB, *et al.* Establish of an efficient nested PCR detection system of *Neofusicoccum parvum* [J]. Acta Phytophy Sinica, 2012, 39(5): 479-480.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



封立平, 本科, 高级农艺师, 主要研究方向为植物病理学。
E-mail: fengciq@163.com