

红掌毁灭炭疽菌的分子检测

邢红梅^{1,2} 丁平² 王克荣² 周晓云¹

1. 广州花卉研究中心, 广州 510360; 2. 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095

摘要 根据 GenBank 中炭疽属 *Colletotrichum* 不同种的 ITS 序列差异, 设计了毁灭炭疽菌 *Colletotrichum destructivum* 的特异性引物 F1/ITS4, 由此建立的 PCR 检测体系可以从 80 个毁灭炭疽菌菌株中扩增得到 1 条 486 bp 的特异性条带, 而扩增其他近似或相关种的菌株时没有相应的特异性条带。该检测体系对毁灭炭疽菌基因组 DNA 的扩增灵敏度达到 10 pg。将引物 F1/ITS4 与 ITS 区通用引物进行套式 PCR 扩增后, 检测灵敏度至少提高 10 000 倍, 每克土中含有 200 个毁灭炭疽菌分生孢子时即可检测出。进一步利用此检测体系对携带病原菌的灌溉水、发病组织进行检测, 均能快速准确地检测出病原菌。

关键词 毁灭炭疽菌; 红掌; 分子检测; 套式 PCR

中图分类号 S 432.44 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)05-0589-05

红掌 *Anthurium andraeanum* 为天南星科花烛属多年生草本植物, 是世界名贵花卉。毁灭炭疽菌 *Colletotrichum destructivum* 是引起红掌炭疽病的病原之一。红掌自苗期至成株期均可发病, 并以成株期发病最重。研究发现红掌上至少存在 2 种炭疽菌复合侵染(胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* 和毁灭炭疽菌), 在发病初期准确检测炭疽菌种类, 有利于预测该病害的发生和进行有效防治。

核糖体基因 ITS 序列在真菌种间的高度变异和种内的稳定性, 为病原物的分子检测提供了理想的靶序列^[1]。廖晓兰等^[2] 依据获得的 ITS 序列设计特异探针, 建立了柑桔黄龙病病菌检测的实时荧光 PCR 方法, 并应用此方法对柑桔样品进行检测, 结果显示该检测方法具有快速、特异、敏感、重复性好等优点; 葛芸英等^[3] 利用 16S-23S rDNA 间的内源转录间隔区通过多重比较设计特异引物, 应用于小麦苗枯病菌的快速、可靠检测; Martinez-Culebras 等^[4] 利用 ITS 序列设计出了炭疽属的检测引物。Sreenivasprasad 等^[5] 根据 ITS 序列, 设计出 *C. acutatum* 的特异性检测引物 CaInt2/ITS4。Cullen 等^[6] 根据 ITS1 和 ITS2 的序列, 设计出 *C. coccodes* 的特异性检测引物 Cc1NF1/Cc2NR1。

笔者通过 *Colletotrichum* 属的 ITS 序列设计出 *C. destructivum* 的特异性引物, 旨在快速准确地检

测出 *C. destructivum*, 并与 *C. gloeosporioides* 等一系列相近菌株区分开。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株、寄主及来源详见表 1。

1.2 DNA 的提取

采用 CTAB 法^[7] 提取基因组 DNA; 分生孢子的收集、DNA 的提取, 参考邢红梅等^[8] 的方法进行; 土壤中病原菌 DNA 的提取, 参考邢红梅等^[8] 的方法进行; 灌溉水中病原菌 DNA 的提取: 从广州花卉研究中心各基地采集水样, 各水样取 200 mL, 12 000 r/min 离心 10 min, 将沉淀物按 CTAB 法提取 DNA; 发病组织 DNA 的提取, 参考邢红梅等^[8] 的方法进行。

1.3 引物设计与 PCR 扩增

1) 引物设计。根据 GenBank 中 *Colletotrichum* 属不同种的 ITS 序列间的差异, 用 Primer 5 软件设计 *C. destructivum* 的异性引物 F1/ITS4。序列: F1, 5'-CCG GAG CCC AGC TCC GGC G-3'; ITS4, 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'。

2) 常规 PCR 反应。25 μ L PCR 反应体系包括 2.5 μ L 10 \times PCR 反应缓冲液、2 μ L 2.5 mmol/L Mg²⁺、1.5 μ L 2.5 mmol/L dNTP、0.2 μ L Taq

收稿日期: 2010-11-18

基金项目: 广东省科技攻关计划项目(2009B020401006)

邢红梅, 硕士研究生。研究方向: 植物病原真菌学。E-mail: xingxingxiangtiaowu@yahoo.com.cn

通讯作者: 周晓云, 硕士, 高级农艺师。研究方向: 花卉病虫害防治。E-mail: xyzh28@126.com

表 1 供试菌株的寄主、来源、数量及其引物扩增特征

Table 1 Isolates of *Colletotrichum* spp. and other fungal isolates used to screen the primers

种名 Species	寄主 Host	来源 ¹⁾ Locality	数量 Number of isolates	扩增引物 F1/ITS4 ²⁾ Amplification with primers
毁灭刺盘孢 <i>C. destructivum</i>	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>	广州 Guangzhou	65	+
		扬州 Yangzhou	1	+
		南京 Nanjing	14	+
胶胞炭疽菌 <i>C. gloeosporioides</i>	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>	广州 Guangzhou	32	—
		北京 Beijing	4	—
		南京 Nanjing	1	—
		浙江 Zhejiang	1	—
		FLNJAU	1	—
芸蓼炭疽菌 <i>C. higgisianum</i>	小白菜 <i>Brassica chinensis</i>	FLNJAU	1	—
大豆炭疽菌 <i>C. truncatum</i>	大豆 <i>Glycin max</i>	FLNJAU	1	—
辣椒炭疽菌 <i>C. capsici</i>	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	FLNJAU	1	—
香蕉炭疽菌 <i>C. musae</i>	香蕉 <i>Musa nana</i>	FLNJAU	1	—
西瓜炭疽菌 <i>C. orbiculare</i>	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	FLNJAU	10	—
加拿大炭疽菌 <i>C. lindemuthianum</i>	菜豆 <i>Phaseolus vulgaris</i>	FLNJAU	10	—
高粱炭疽菌 <i>C. graminicola</i>	拟金茅 <i>Eulaliopsis binata</i>	杭州 Hangzhou	1	—
高粱炭疽菌 <i>C. graminicola</i>	佩兰 <i>Eupatorium fortunei</i>	杭州 Hangzhou	1	—
球炭疽菌 <i>C. coccodes</i>	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	宁夏 Ningxia	2	—
毛豆炭疽菌 <i>C. boninense</i>	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>	广州 Guangzhou	5	—
苜蓿疫霉 <i>Phytophthora boehmeriae</i>	棉花 <i>Gossyphum</i> sp.	FLNJAU	2	—
芋疫霉 <i>P. colocasiae</i>	芋头 <i>Colocasia esculenta</i>	FLNJAU	1	—
致病疫霉 <i>P. infestans</i>	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	FLNJAU	1	—
苜蓿疫霉 <i>P. medicaginis</i>	苜蓿 <i>Medicago</i> sp.	FLNJAU	1	—
大豆疫霉 <i>P. sojae</i>	大豆 <i>Glycin max</i>	FLNJAU	1	—
尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	西瓜 <i>Citrullus lanatus</i>	FLNJAU	3	—
雪腐镰刀菌 <i>F. nivale</i>	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	FLNJAU	2	—
禾谷镰刀菌 <i>F. graminearum</i>	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	FLNJAU	2	—
串珠镰刀菌 <i>F. moniliforme</i>	水稻 <i>Oryza sativa</i>	FLNJAU	1	—
串珠镰刀菌 <i>F. moniliforme</i>	棉花 <i>Gossyphum</i> sp.	FLNJAU	1	—
茄镰刀菌 <i>F. solani</i>	未知植物 Unknown	南京 Nanjing	2	—
镰刀菌 <i>Fusarium</i> sp.	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>	广州 Guangzhou	1	—
黑白轮枝菌 <i>Verticillium albo-atrum</i>	棉花 <i>Gossyphum</i> sp.	FLNJAU	1	—
大丽轮枝菌 <i>V. dahliae</i>	棉花 <i>Gossyphum</i> sp.	FLNJAU	1	—
灰葡萄孢 <i>Botrytis cinerea</i>	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	FLNJAU	1	—
灰葡萄孢 <i>B. cinerea</i>	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	FLNJAU	1	—
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	大豆 <i>Glycin max</i>	FLNJAU	2	—
立枯丝核菌 <i>R. solani</i>	香瓜 <i>Cucumis melo</i>	FLNJAU	1	—
拟盘多毛孢 <i>Pestalotiopsis</i> sp.	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>	广州 Guangzhou	1	—
稻瘟病菌 <i>Magnaporthe grisea</i>	水稻 <i>Oryza sativa</i>	FLNJAU	2	—
曲霉 <i>Aspergillus</i> sp.	棉花 <i>Gossyphum</i> sp.	FLNJAU	1	—
棉壳二孢 <i>Ascochyta gossypii</i>	棉花 <i>Gossyphum</i> sp.	FLNJAU	1	—
麦散黑粉菌 <i>Ustilago nuda</i>	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	FLNJAU	1	—
小麦印度腥黑穗病菌 <i>Tilletia indica</i>	小麦 <i>Triticum aestivum</i>	FLNJAU	1	—
梨火疫病菌 <i>Erwinia amylovora</i>	人参果 <i>Solanum muricatum</i>	Doctor Hu B S	1	—
尾孢霉 <i>Cercospora</i> sp.	女贞 <i>Ligustrum lucidum</i>	FLNJAU	1	—
玉米细菌性枯萎病菌 <i>Pantoea stewartii</i>	玉米 <i>Zea mays</i>	Doctor Hu B S	1	—
栗疫病菌 <i>Cryphonectria parasitica</i>	板栗 <i>Castanea mollissima</i>	FLNJAU	1	—
番茄早疫病菌 <i>Alternaria solani</i>	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	FLNJAU	1	—
黑斑病菌(交链胞) <i>Alternaria</i> sp.	未知植物 Unknown	FLNJAU	1	—
长柄链格孢 <i>A. longipes</i>	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	福建 Fujian	1	—
蚕豆壳二孢 <i>Ascochyta fabae</i>	蚕豆 <i>Vicia faba</i>	福建 Fujian	1	—

1) FLNJAU; 南京农业大学真菌实验室 Fungi Laboratory of Nanjing Agricultural University;

2) +: 具有引物 F1/ITS4(486 bp) 的特异性扩增条带 486 bp products amplified by primers F1/F2; -: 无扩增产物 No amplified products.

DNA 聚合酶(5 U/ μ L)、0.35 μ L 引物(20 μ mol/L), 加入模板后用灭菌水补足体积。在 PE 2400 PCR 仪上进行扩增反应。反应参数设置: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。反应结束后取 8 μ L 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶中电泳 30 min(100 V), 在凝胶成像系统上检测并拍照。

3) 套式 PCR 反应。以 ITS 区通用引物 ITS1/ITS4(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3'/5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') 作为第一轮反应引物, 反应体系同上。反应参数设置: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。然后取 1 μ L PCR 产物(适当稀释)为模板与

引物 F1/F2 组合进行套式 PCR,体系、程序均同常规 PCR 反应。

2 结果与分析

2.1 引物 F1/ITS4 对 DNA 扩增的特异性

引物 F1/ITS4 只能从 80 个毁灭炭疽菌 *C. de-*

structivum 菌株的 DNA 中特异地扩增出 486 bp 的条带(图 1),而扩增后得到的 101 个其他供试菌株的 DNA 及空白对照均无 486 bp 的特异性条带,表明该对引物具有种的特异性,通过分析对比可以将毁灭炭疽菌 *C. destructivum* 与其他近似种及相关种区分开。

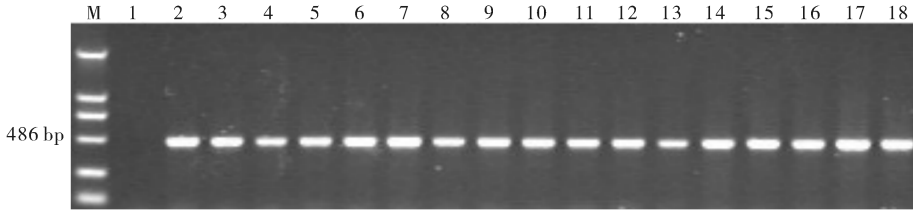


图 1 特异性引物 F1/ITS4 扩增红掌毁灭炭疽菌的电泳图

M: 2 000 bp DNA marker; 1: 蒸馏水; 2~10: 广州菌株; 11~17: 南京菌株; 18: 扬州菌株 L. 1: Distilled water; 2-10: Isolates of *C. destructivum* from Guangzhou; 11-17: Isolates of *C. destructivum* from Nanjing; 18: Isolates of *C. destructivum* from Yangzhou.

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified products using specific primers F1/ITS4 for *C. destructivum*

2.2 扩增基因组 DNA 灵敏度的检测

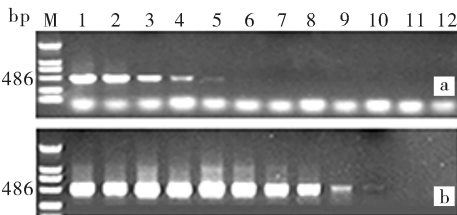
将毁灭炭疽菌株 C08 的基因组 DNA 从 100 ng/ μ L 开始向下 10 倍稀释至 1 fg/ μ L,每浓度梯度各取 1 μ L 为模板用特异性引物 F1/ITS4 进行常规 PCR 扩增。结果表明:在 25 μ L 的反应体系中含有 10 pg 的基因组 DNA 时仍可稳定地扩增到 486 bp 的特异性条带(图 2-a)。

采用引物 ITS1/ITS4 与 F1/ITS4 组合进行套

式 PCR。结果显示,套式 PCR 产物量与常规扩增的 PCR 产物量相比有明显提高,能使扩增不出条带的样品产生明显的条带(图 2-a、图 2-b),灵敏度至少提高了 10 000 倍,可以满足检测的需求。

2.3 菌株分生孢子灵敏度的测定

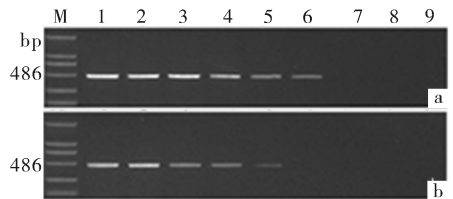
将红掌毁灭炭疽菌菌株 C08 的分生孢子计数,将孢子浓度定为 10^6 个/ μ L 后提取 DNA,并按 10 的数量级稀释到 1 个/ μ L 的 DNA。结果显示,在 25 μ L 反应体系中含有 10 个分生孢子的 DNA 量时可检测到特异性的扩增条带(图 3-a)。将 5.6×10^7 个孢子与 1 g 灭菌土混匀后提取 DNA,将终产物以 56 μ L 灭菌水溶解。同样以 10 的数量级稀释到 1 个



a: 常规 PCR 扩拉不同量基因组 DNA 的灵敏度检测; b: 以引物 ITS1/ITS4 和 F1/ITS4 组合进行套式 PCR 反应的结果。a: Regular PCR with primers F1/ITS4 using different quantity of DNA; b: Nested PCR with primers ITS1/ITS4 for the first round of amplification and primers F1/ITS4 for the second round amplification. M: DNA marker; 1~12:分别为 25 μ L 的反应体系中含有 100 ng、10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg、1 fg、100 ag、10 ag、1 ag 量的 DNA 的扩增结果。1-12: Products amplified DNA at quantity of 100 ng, 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, 100 ag, 10 ag, 1 ag in a 25 μ L PCR reaction system respectively.

图 2 引物 F1/ITS4 扩增毁灭炭疽菌基因组 DNA 的灵敏度检测

Fig. 2 Sensitivity of primers F1/ITS4 for detection of *C. destructivum* genomic DNA



a: 引物 F1/ITS4 扩增不同数量分生孢子 DNA 的结果; b: 相应地从土壤中提取的分生孢子 DNA 的扩增结果。a: PCR with primers F1/ITS4 using different quantity of conidia DNA; b: Amplified product with the conidia DNA extracted from soil. M: DNA marker; 1~8:分生孢子数量分别为 10^6 、 10^5 、 10^4 、 10^3 、 10^2 、 10^1 、 10^0 、0。1-8: Number of conidia was 10^6 , 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 , 10^0 , 0.

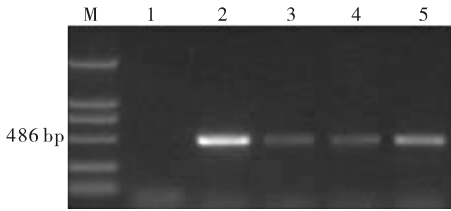
图 3 红掌毁灭炭疽菌分生孢子的灵敏度检测

Fig. 3 Sensitivity of PCR using primers F1/ITS4 for *C. destructivum* DNA from conidia

孢子/ μL 的 DNA, 每浓度梯度取 $1\ \mu\text{L}$ 为模板进行引物 F1/ITS4 的 PCR 扩增。结果显示, 在 $25\ \mu\text{L}$ 反应体系中含有 10^2 个分生孢子的 DNA 量时可检测到特异性的扩增条带(图 3-b)。

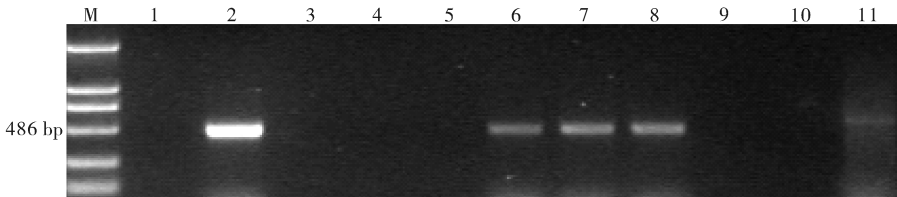
2.4 灌溉水中毁灭炭疽菌的检测

从广州花卉研究中心各基地(花都、从化、芳村)采集水样, 用毁灭炭疽菌的特异性引物 F1/ITS4 进行扩增。结果表明: 从化高山、花都、芳村本部基地灌溉水中都检测到该病原菌(图 4), 这与从各基地病株上都分离到毁灭炭疽菌的结果相同。



M: DNA marker; 1: 蒸馏水; 2: 毁灭炭疽菌基因组 DNA; 3~5: 从化、花都、芳村各地水样。1: Distilled water; 2: *C. destructivum*; 3-5: Water samples from Conghua, Huadu and Fangcun.

图 4 引物 F1/ITS4 扩增广州花卉各基地水样的电泳图
Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified products using specific primers F1/ITS4 for water samples from Guangzhou



M: DNA marker; 1: 健康植株; 2: 毁灭炭疽菌; 3, 4: 感染有胶孢炭疽菌初发病的植株; 5: 感染有胶孢炭疽呈典型发病症状的植株; 6, 7: 分别为感染毁灭炭疽菌表现早期症状的植株和具典型症状的植株; 8~10: 田间随机采集的病株; 11: 同时感染了胶孢炭疽和毁灭炭疽的病株。1: Healthy plant; 2: *C. gloeosporioides*; 3, 4: Latent infected plant by *C. gloeosporioides*; 5: Diseased plant by *C. gloeosporioides*; 6, 7: Latent infected plant by *C. destructivum*; 8-10: Diseased plant collected from the field, randomly; 11: Diseased plant infected both by *C. gloeosporioides* and *C. destructivum*.

图 5 引物 F1/ITS4 扩增发病植株 DNA 的电泳图

Fig. 5 Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified products using specific primers F1/ITS4 for DNA extracted from diseased plants

笔者根据 GenBank 中登录的炭疽属 33 个种的 ITS 序列差异设计了引物 F1/ITS4, 建立的 PCR 检测体系能区分 *C. destructivum* 和其他 *Colletotrichum* spp., 从而具有种的特异性; 检测 *C. destructivum* 基因组 DNA 的灵敏度可达到 $10\ \text{pg}$, 通过套式 PCR 检测灵敏度至少可提高 10 000 倍, 灵敏度达到 $1\ \text{fg}$, 可以满足实际需求, 仅有 10 个分生孢子

2.5 植物组织中毁灭炭疽菌的快速检测

以 *C. destructivum* 基因组 DNA 作为阳性对照, 用常规 PCR 检测, 阴性对照(健康植株基因组 DNA)以套式 PCR 检测。结果显示: 套式 PCR 扩增红掌的健康叶片以及感染有 *C. gloeosporioides* 的红掌叶片均无扩增条带(图 5 泳道 1、3、4、5), 而发病初期表现褪绿症状、具有典型症状以及同时感染了 *C. gloeosporioides* 和 *C. destructivum* 的叶片经常规 PCR 扩增后均检测到了病原物(图 5 泳道 6、7、11)。同时, 从大棚内随机采集具炭疽病症状的病叶和佛焰苞片提取基因组 DNA, 以常规 PCR 检测。结果显示: 其中 1 叶片检测到 *C. destructivum* (图 5 泳道 8), 其他叶片和佛焰苞片均未扩增到 486 bp 的片段(图 5 泳道 9、10), 后经分离试验及检测, 表明此植株已被 *C. gloeosporioides* 感染。

3 讨论

研究证明 ITS 序列在真菌物种内菌株间是高度保守的, 该区域 DNA 核苷酸序列差异比较有助于相似种的鉴别^[9], 现已有不少应用 ITS 研究 *Phytophthora*^[10]、*Pythium*^[11]、*Verticillium*^[12]、*Fusarium*^[13]、*Botryosphaeria*^[14]、*Hypoxylon*^[15] 和 *Colletotrichum*^[16] 等真菌鉴别和检测的报道。

该引物即能检测出来。从土壤中提取病原菌 DNA 会有不同程度的损失, 本试验中每克土仅存 200 个分生孢子时即可被检测出。进一步利用该检测体系对携带病原菌的灌溉水、发病组织进行检测, 均能快速准确地检测出病原菌。该方法可以在病害潜伏期和初发期进行病菌 DNA 的 PCR 扩增, 为红掌炭疽发病植株的病害诊断提供科学依据。

参 考 文 献

- [1] 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.
- [2] 廖晓兰, 朱水芳, 赵文军, 等. 柑桔黄龙病病原16S rDNA克隆、测序及实时荧光PCR检测方法的建立[J]. 农业生物技术学报, 2004, 12(1): 80-85.
- [3] 葛芸英, 郭坚华. 小麦苗枯病病原的ITS分析及PCR检测[J]. 植物病理学报, 2003, 33(3): 198-202.
- [4] MARTINEZ-CULEBRAS P V, QUEROL A, SUAREZ-FERNANDEZ M B, et al. Phylogenetic relationships among *Colletotrichum* pathogens of strawberry and design of PCR primers for their identification[J]. Journal of Phytopathology, 2003, 151(3): 135-143.
- [5] SREENIVASPRAD S, SHARADA K, BROWN A E, et al. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry[J]. Plant Pathology, 1996, 45(4): 650-655.
- [6] CULLEN D W, LEES A K, TOTH I K, et al. Detection of *Colletotrichum coccodes* from soil and potato tubers by conventional and quantitative real-time PCR[J]. Plant Pathology, 2002, 51(3): 281-292.
- [7] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19: 11-15.
- [8] 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.
- [9] BRUNS T D, WHITE T J, TALLYOR J W. Fungal molecular systematics[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 1991, 22: 525-564.
- [10] LEE S B, TAYLOR J W. Phylogeny of five fungus-like protocistan *Phytophthora* species, inferred from the internal transcribed spacers of ribosomal DNA[J]. Molecular Biology and Evolution, 1992, 9(4): 636-653.
- [11] CHEN W. Tetra-nucleotide fragment length polymorphism in enzymatically amplified ribosomal DNAs of three heterothallic *Pythium* species[J]. Phytopathology, 1992, 82(12): 1467-1472.
- [12] NAZAR R N, HU X, SCHMIDT J, et al. Potential use of PCR-amplified ribosomal intergenic sequences in the detection and differentiation of *Verticillium* wilt pathogens[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1991, 39(1): 1-11.
- [13] O'DONNELL K. Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the Phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*) [J]. Current Genetics, 1992, 22(3): 213-220.
- [14] ZHOU S, SIMITH D R, STANOSZ G R. Differentiation of *Botryosphaeria* species and related anamorphic fungi using inter simple or short sequence repeat (ISSR) fingerprinting[J]. Mycological Research, 2001, 105(8): 919-926.
- [15] MAZZAGLIA A, ANSELMINI N, GASBARRI A, et al. Development of a polymerase chain reaction (PCR) assay for the specific detection of *Biscogniauxia mediterranea* living as an endophyte in and tissues [J]. Mycological Research, 2001, 105(8): 952-956.
- [16] BROWN A E, SREENIVASAPRASAD S, TIMMER L W. Molecular characterization of slow-growing orange and key lime anthracnose strains of *Colletotrichum* from citrus as *C. acutatum* [J]. Phytopathology, 1996, 86(5): 523-527.

Molecular detection of *Colletotrichum destructivum* in *Anthurium andraeanum*XING Hong-mei^{1,2} DING Ping² WANG Ke-rong² ZHOU Xiao-yun¹

1. Guangzhou Flower Research Center, Guangzhou 510360, China;

2. College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract *Colletotrichum destructivum* is the pathogen of anthracnose in *Anthurium andraeanum*. Based on internal transcribed space (ITS) sequences of *Colletotrichum* genus, a pair of specific primers (F1 and ITS4) to detect *C. destructivum* was synthesized. The primer sets amplified a single PCR band of 486 bp with DNA extracted from *C. destructivum* isolated from *A. andraeanum*, while other relative strains within different species had no corresponding band. The detection sensitivity was 10 pg of genomic DNA. When using ITS1/ITS4 as the first round primers and F1/ITS4 as the second round primers, the detection sensitivity increased 10 000-fold to 10 fg. The detection sensitivity for the soil pathogens was 200-conidia per gram soil. The PCR-based method developed here could stably and quickly detect the pathogen from water samples and diseased plants.

Key words *Colletotrichum destructivum*; *Anthurium andraeanum*; molecular detection; nested PCR