

朱桂清,迟文娟,曹远银,等. 小麦散黑穗病病原菌 PCR 检测方法的研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):36-38.

小麦散黑穗病病原菌 PCR 检测方法的研究

朱桂清¹, 迟文娟², 曹远银¹, 陈秀梅¹

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学科学技术学院, 辽宁抚顺 113122)

摘要:小麦散黑穗病由小麦散黑粉菌引起,是世界各麦区发生的典型种传病害。近些年来,因缺少简便有效的种子检测技术,从而影响其防治的种子处理决策,使该病呈现出加重趋势。本研究以真菌 rDNA 非编码区 ITS1、5.8S 和 ITS2 的通用引物,分别对小麦散黑穗病菌等 10 种相关病菌进行 PCR 扩增、测序、Genbank 搜索,通过 Accelrys Gene 2.5 软件比对,设计以小麦散黑穗病菌为靶标的特异引物,对上述 10 种病菌进行检测,唯有靶标病菌呈阳性;经 1ng~1fg 7 个靶标病菌的 DNA 浓度灵敏度检测,表明对其最低检测限为 1pgDNA。本方法检测小麦散黑穗病快速、准确、灵敏,为实现带病种子检测提供了关键技术支撑。

关键词:小麦散黑穗病;PCR 检测;种传病害;特异性引物

中图分类号:S435.121.4⁺4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)01-0036-03

小麦散黑穗病由小麦散黑粉菌 [*Ustilago tritici* (Pers.) Rostr.] 引起,各国小麦产区均有发生^[1]。在我国以华中和华东麦区发病最重,而东北麦区则重于西北麦区。该病为典型的种传病害,带菌种子(胚内菌丝体)是唯一的传播途径。小麦单株一经罹病,其产量损失就近 100%,换句话说,小麦发病株率可约等于产量损失率。从对整体生产危害情况来看,未见有毁灭性的报道,严重地块可达 10% 以上,但一般中等发病率田块仅为 1%~5%。然而,近 20 年来,由于疏于药剂拌种处理,病情呈上升趋势。例如,被认为较轻发生的西北天水等地区也变得较普遍,重病田块发病率竟达 15%~20.0%^[2]。在国外的发生情况也呈类似上升,如加拿大西部小麦散黑穗病造成硬粒小麦和面包麦的产量损失更严重,已高达 27%^[3]。

该病的最有效防治手段是种子处理等化学方法,发病后的应急防治意义不大。因此,关于种子处理的各种化学药剂种类研发较多,但鲜有大规模应用于拌种的报道。其原因应与小麦散黑穗病的防治还未引起足够重视、种子处理费时费工、增加成本及污染有关,特别是因缺乏简便快速可靠的技术检测病种率而影响拌种的决策有关。为了改变这种现状,研制其简便可靠的检测方法是十分必要的。常规检验方法非常耗时,完全依赖专业人员的症状观察、筛选培养基进行培养、育苗观察、血清学等鉴定以及广博的分类知识,而且其准确性与灵敏度难以满足要求^[4-5]。现代分子生物学方法为种传病害检测提供了新的可靠途径,基于 DNA 检测的方法[如杂交探针、常规 PCR、PCR-RFLP、巢式 PCR、多重 PCR、反转录 PCR、荧光定量 PCR、PCR-ELISA、*in situ* PCR、DNA 印迹、基

因芯片以及 RAPD(Scar)、SSR、DNA 条形码等]快速简便实用,还能满足高通量和潜伏期检测的要求^[5-8]。国际上已制定了 61 种种传病害不同的标准检测方法^[5-8],好几种常见黑穗(粉)病已建立了分子检测方法,如常规 PCR 检测玉米瘤黑粉病^[9]、巢式 PCR 检测茭白黑粉病和甘蔗黑粉病^[10-11]、DNA 印迹和 PCR 检测与区分玉米丝黑穗病和瘤黑粉病^[12]等种传病害,但对小麦散黑穗病的分子检测方面,尚未见对该病菌的种特异性强、灵敏度高的经济、简便、快速分子检测方法的报道。本文报道了利用普通 PCR 检测小麦散黑穗病的新方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 主要仪器与设备 移液枪(德国, eppendorf); DYY-10 型三恒多用电泳仪(北京六一仪器厂);PCR 基因扩增仪(美国, Bio-Rad);超纯水制造系统(美国, MILLI-Q);高速冷冻离心机(日本, 日立公司);凝胶成像分析系统(美国, 柯达公司);紫外分光光度计 U-3010(日立公司)。

1.1.2 主要试剂 主要化学与生物试剂购自宝生物工程(大连)有限公司与美国 Sigma 公司,扩增引物与杂交探针均由上海生工生物工程有限公司合成。

1.1.3 供试菌种 供试菌株见表 1。小麦条锈菌由中国农业科学院植物保护研究所锈病组提供,其他菌系均由沈阳农业大学提供。

表 1 供试菌株名称和代号

病原菌	所致病害	菌系代号
大麦散黑粉菌 (<i>Ustilago nuda</i>)	小麦散黑穗病	XSH
丝孢堆黑粉菌 (<i>Sporisorium reilianum</i>)	玉米丝黑穗病	YSH
小麦白粉菌 (<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>)	小麦白粉病	XBF
葫芦科白粉菌 (<i>Erysiphe cucurbitacearum</i>)	黄瓜白粉病	HBf
条锈病菌 (<i>Puccinia striiformis</i> f. sp. <i>tritici</i>)	小麦条锈病	XTX
秆锈病菌 (<i>P. graminis</i> f. sp. <i>tritici</i>)	小麦秆锈病	XGX
细柄锈病 (<i>P. triticea</i>)	小麦叶锈病	XYX
禾谷镰孢菌 (<i>Fusarium graminearum</i>)	小麦赤霉病	XCM
小麦纹枯病菌 (<i>Rhizoctonia cerealis</i>)	小麦纹枯病	XWK
立枯丝核菌 (<i>Rh. solani</i>)	玉米纹枯病	YWK

收稿日期:2013-05-01
基金项目:国家公益性行业(农业)科研专项(编号:2013016);国家科技支撑计划(编号:2012BAD19B04)。
作者简介:朱桂清(1959—),女,高级实验师,主要从事植物病理学研究。E-mail:zhugq1959@126.com。
通讯作者:曹远银,研究员,博士,主要从事植物免疫学与分子植物病理学研究。E-mail:caoyy66@yahoo.com.cn。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种收集方法 (1)小麦散黑穗病菌和玉米丝黑穗病菌的收集。用解剖针从样品或菌瘿中挑取单个冬孢子置于 2% 琼脂平板上,于 20 ℃、12 h 光照条件下培养 15~20 d,显微镜下观察有无孢子萌发,将萌发孢子转移至 PDA 平板上,20 ℃ 培养 15 d,收集菌丝,4 ℃ 保存备用。(2)小麦白粉病菌的收集。在实验室内,将保存的白粉病菌单菌落用抖落法接种到高感品种小麦穗上,培养 7~14 d,待菌落长出,分生孢子大量繁殖时,在超净工作台上摇动花盆将其抖落到载玻片上,再用细毛笔将其刷进 1.5 mL 离心管中(可多次收集,每支管中达到 30~50 mg 孢子),将收集了孢子的离心管置于装有变色硅胶的干燥器中干燥 3~5 d, -20 ℃ 保存备用。(3)小麦秆锈病菌、小麦叶锈病菌的收集。将感病品种 McNair701 播种于花盆内,待幼苗长至 2 叶 1 心时剪取第 1 张叶,平展于铺有双层滤纸的培养皿内(叶背面朝上),培养皿中垫有浸过保鲜液的滤纸。用牙签沾上孢子,轻轻地向叶面涂抹,使叶面均匀地沾有 1 层孢子。接种后,用 5×10^{-4} Tween 20 溶液进行喷雾,18 ℃ 黑暗条件下保湿 6~18 h。18 ℃、8 000 lx 光照 14 h/d,培养 15 d 左右,收集孢子,干燥, -20 ℃ 保存备用。(4)其他参考菌株的收集。将在 PDA 培养基上培养 4 d 的各菌株接入马铃薯液体培养基中,振荡培养(25 ℃,100 r/min) 4~7 d,用无菌纱布过滤,再用无菌水冲洗 2 次,用滤纸吸干多余水分,将菌丝体放入 65 ℃ 恒温箱中干燥 2~4 h,取出碾碎,装入 1.5 mL 离心管中,置于 -20 ℃ 冰箱中保存备用^[13]。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 小麦散黑穗菌、玉米丝黑穗菌、小麦赤霉病菌、小麦纹枯病菌、玉米纹枯菌等分离纯化后接种至 PD 培养基中培养,菌丝体经真空抽滤,采用 Pascual 等改良后的 CTAB 法^[14]提取病菌 DNA。小麦白粉菌、黄瓜白粉菌、小麦条锈菌、叶锈菌和秆锈菌的小种或菌株在温室用各自的高感品种繁殖,分别收取孢子,采用 Enjalbert 等玻璃珠破碎病菌细胞壁的 CTAB 法^[15]提取 DNA,其中几个特别环节分述如下:(1)小麦白粉菌 DNA 的提取。隔离条件下收集白粉菌至 2 mL 离心管中,将菌体重量按 5 mL:1 g 比例加入裂解缓冲液,加入 3/10 总体积的石英砂,盖紧,涡旋振荡 5~8 min,65 ℃ 水浴 10 min,加入 600 μ L 7.5 mol/L NH_4Ac ,冰浴 8 min;然后反复抽提,收集沉淀,加入 1 \times TE,于 -20 ℃ 保存。(2)黄瓜白粉病菌提取。参照王娜等的方法^[16],用手指轻弹染病的叶片,使病菌孢子及菌丝落在滴加缓冲液的载玻片上,在解剖镜下用针将孢子和菌丝压碎后转移至离心管,加入 10 μ L Tween20,60 ℃ 水浴 3 h 后,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液, -20 ℃ 保存,待用。(3)小麦条锈病菌、小麦秆锈病菌、小麦叶锈病菌 DNA 的提取。称取小麦条锈菌、叶锈菌和秆锈菌孢子装于 2 mL 离心管中,加入玻璃珠及预热的 0.8% CTAB 提取缓冲液混匀,在涡旋仪上以最大速度振荡 3 min 后,于 65 ℃ 条件下水浴 1.5 h,然后反复抽提,收集沉淀,加入 1 \times TE,于 -20 ℃ 保存。(4)其他菌株 DAN 的提取。用液氮将病原菌快速研磨后转入事先装有 500 μ L 提取缓冲液 A 的 2 mL 离心管中,混匀后加入 50 μ L 10% SDS,混匀,置于水浴锅 37 ℃ 1 h;再加入 75 mL 5 mol/L NaCl 及 65 μ L 10% CTAB,再次混匀,置于 65 ℃ 水浴锅 20 min;然后反复抽提,收集沉淀,加入 1 \times TE,于 -20 ℃ 保存。

1.2.3 专化性引物的设计 选用扩增 ITS1、5.8S、ITS2 核糖体基因的通用引物 ITS1(5'-TCCGTAGCTGAACCTGCGG-3')和 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'),专一扩增 rDNA 中的 ITS1、5.8S、ITS2 区域^[17]。对得到的 PCR 产物,进行测序,用测序结果登录 Genebank,与相关菌的 ITS 序列进行比对,选取小麦散黑穗病菌的特异 DNA 序列做特异的 PCR 引物(图 1)。

1.2.4 PCR 扩增 PCR 反应体系(20 μ L):10 \times PCR buffer 2.0 μ L;25 mmol/L MgCl_2 1.5 μ L;10 mmol/L dNTP 0.4 μ L;引物(15 μ mol/L)各 0.8 μ L;Taq DNA 聚合酶(5 U) 0.2 μ L;DNA 模板(1ng/ μ L) 1.0 μ L;ddH₂O 14.1 μ L。

PCR 反应条件:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,58 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

1.2.5 PCR 产物电泳与染色观察 PCR 扩增完毕后,用 1 \times TBE 配制 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,每孔加样 5 μ L,100 bp Ladder Marker 为对照,电泳液为 1 \times TBE。凝胶在 0.5 μ g/mL 溴乙锭溶液染色 20 min,凝胶成像分析系统照相。

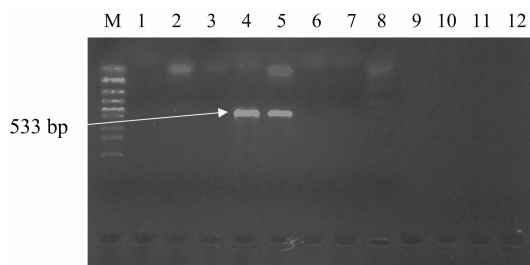
1.2.6 小麦散黑穗病菌 PCR 引物特异性检测 用设计合成的特异性引物对所有供试菌株及小麦叶片的 DNA 进行 PCR 扩增,检测设计引物的特异性。

1.2.7 小麦散黑穗病菌 PCR 引物灵敏性检测 将提取的小麦散黑穗病菌的 DNA 稀释成 1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg、1 fg 共 7 个不同浓度,用设计的引物进行 PCR 扩增,根据凝胶电泳结果测定引物的灵敏度。

2 结果与分析

2.1 小麦病害病原菌 PCR 引物设计结果

将小麦散黑穗病菌的 ITS 区域测序结果与 Genebank 中登录的相关菌的 ITS 序列进行比对,设计小麦散黑穗病菌的特异性引物,比对结果及特异性引物如图 1 所示,即设计出小麦散黑穗病菌的 PCR 的特异扩增引物对 XSHF(5'-AGGAGAAAATCCTCGCGTCT-3')/XSHR(5'-CAGAAG-CACTCCAAACAGCA-3')。F 和 R 引物的序列长度均为 20 个碱基,很理想。



M—100 bp 分子量标记;1—ddH₂O;2—小麦白粉病菌;3—黄瓜白粉病菌;4、5—小麦散黑穗病菌;6—小麦条锈病菌;7—小麦秆锈病菌;8—小麦叶锈病菌;9—小麦纹枯病菌;10—小麦赤霉病菌;11—玉米纹枯病菌;12—玉米丝黑穗病菌

图1 引物XSHF/R对供试的不同病原菌的PCR扩增结果

2.2 小麦散黑穗病菌特异性检测

以设计的小麦散黑穗病菌特异性引物 XSHF/R 对所有供试菌株的 DNA 进行 PCR 扩增,只有小麦散黑穗病菌能扩增出 533 bp 左右的条带,其他供试非靶标参考菌株未扩增出

条带,说明设计的引物对小麦散黑穗病菌具有特异性,结果见图 1。

2.3 小麦散黑穗病菌检测灵敏度测定

用引物 XSHF/R 对稀释成 1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg、1 fg 共 7 个不同浓度的小麦散黑穗病菌 DNA 进行 PCR 扩增,结果可以检测到最低含量为 1 pg 的 DNA(图 2)。

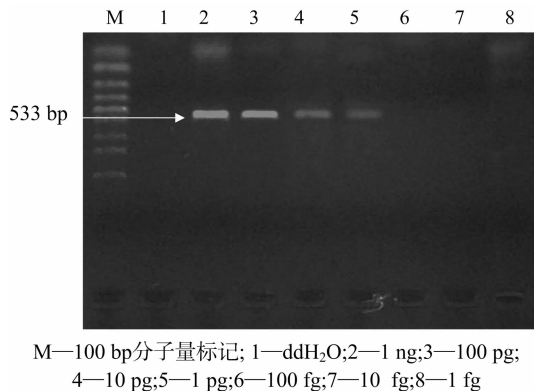


图2 引物XSHF/R对小麦散黑穗病菌DNA不同稀释浓度的PCR 扩增结果

3 结论与讨论

小麦散黑穗病是小麦常见的典型种传病害,带菌种子的病菌来源于生长季小麦扬花时,其他病穗上的冬孢子经风雨传给健康的花柱头,孢子萌发侵入子房,再以休眠菌丝潜伏在胚内。种子萌发时,病菌被激活生长且始终位于植株顶端和穗原基,直到抽穗,显露最易识别的症状:薄膜包裹的冬孢子团(病穗)^[18-19]。带菌种子或植株与无菌种子或植株外观均无可诊断的差异,因此,是否需要化学药剂拌种等防治处理的决策需要以带菌率检测作为科学依据。快速、简便、准确、可靠的检测方法是实现这一目标的可靠保证。本研究利用真菌通用引物^[18],对小麦散黑穗病菌的 ITS 区域序列进行 PCR 扩增、测序、Genbank 搜索,用其他 9 个相近病菌作参照,通过软件分析比对,设计了长度为 20 个碱基的该病菌的特异性引物 XSHF(5′-AGGAGAAA ATCCTCGCGTCT-3′)/XSHR(5′-CAGAAGCACTCCAAACAGCA-3′),能在 *Ustilago* 属内种的水平特异性上检测小麦散黑穗病菌,对小麦散黑穗病菌的检测限为 1 pg。该方法快速、准确、灵敏,为实现该病种子带菌率检测提供了关键技术支撑。

参考文献:

- [1] 裴维蕃. 农业植物病理学[M]. 北京:农业出版社,1982.
- [2] 李继平,万安民,金社林. 小麦散黑穗病空间分布型及抽样技术研究[J]. 甘肃农业科技,1995(8):37-39.
- [3] Randhawaa H S, Matheson B, Menzies J G, et al. Molecular and virulence relationships among races of *Ustilago tritici* collected from durum and bread wheat[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2009,31(2):220-231.
- [4] Walcott R R. Detection of seedborne pathogens[J]. Hortecchnology, 2003,13(1):40-47.

- [5] Munkvold G P. Seed pathology progress in academia and industry [J]. Annual Review of Phytopathology,2009,47:285-311.
- [6] McCartney H A, Foster S J, Fraaije B A, et al. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens[J]. Pest Management Science,2003,59(2):129-142.
- [7] Majumder D, Rajesh T, Kipgen T L. Molecular approaches for detection of plant pathogens,frontiers on recent developments[M]// Goyal A, Maheshwari P. Plant science. Bentham Science Publisher,2012: 116-136.
- [8] Capote N, Pastrana A M, Aguado A, et al. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance [M]//Cuma-gun C J. Plant pathology. Rijeka, Croatia: In Tech Europe,2012: 151-202.
- [9] Martínez - Espinoza AD, León - Ramírez CG, Singh N, et al. Use of PCR to detect infection of differentially susceptible maize cultivars using *Ustilago maydis* strains of variable virulence[J]. International Microbiology,2003,6(2):117-120.
- [10] Xu M L, Melchinger A E, Lübberstedt T. Species - specific detection of the maize pathogens *Sporisorium reilianum* and *Ustilago maydis* by dot blot hybridization and PCR - based assays[J]. Plant Disease,1999,83(4):390-395.
- [11] Shen W K, Xi P G, Li M H, et al. Development of a sensitive nested - polymerase chain reaction(PCR) assay for the detection of *Ustilago scitaminea*[J]. African Journal of Biotechnology,2012,11(46):10541-10547.
- [12] Ruey - Shyang C, Der - Syh Dean Tzeng. PCR - mediated detection of *Ustilago esculenta* in wateroat (*Zizania latifolia*) by ribosomal internal transcribed spacer sequences[J]. Plant Pathology Bulletin,1999,8:149-156.
- [13] 陈怀谷. 小麦纹枯病菌核糖体基因内转录区序列比较[J]. 植物病理学报,2005,35(1):24-29.
- [14] Enjalbert J, Duan X, Leconte M, et al. Genetic evidence of local adaptation of wheat yellow rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) within France[J]. Molecular Ecology,2005,14(7):2065-2073.
- [15] Pascual C B, Toda T, Raymondo A D, et al. Characterization by conventional techniques and PCR of *Rhizoctonia solani* isolates causing banded leaf sheath blight in maize[J]. Plant Pathology,2000,49: 108-118.
- [16] 王娜,马雅军,代光辉,等. 黄瓜霜霉病和白粉病病原菌的 rDNA - ITS 序列分析[J]. 西北农林科技大学学报,2007,35(10):155-158.
- [17] Amplification W T, methods D T, applications E I, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA gens for phylogenetics[M]//Innis M A. A guide to methods and applications. London:Academic Press,1998:315-322.
- [18] Malik M M S, Batts C C V. The infection of barley by loose smut [*Ustilago nuda* (Jens.) Rostr.] [J]. Transactions of the British Mycological Society,1960,43:117-125.
- [19] Malik M M S, Batts C C V. The development of loose smut of barley (*Ustilago nuda*) in the barley plant, with observations on spore formation in nature and in culture[J]. Transaction of the British Mycological Society,1960,43:126-131.