

黑麦草内生真菌感染状况的检测及定量分析*

苏丹 任安芝 高玉葆**

(南开大学生命科学学院 天津 300071)

摘要: 选取内生真菌特异性引物, 成功建立了利用 PCR 技术对黑麦草中内生真菌感染状况的检测和定量分析方法。此检测方法的准确性高于常规乳酸—苯胺蓝染色法。利用实时荧光 PCR 定量分析的结果表明: 不同植株之间内生真菌含量差异较大, 而同株植物相同龄级分蘖之间内生真菌含量无显著差异。由此可见内生真菌的含量不仅与植物种以及品种有关, 也与植物的基因型密切相关。

关键词: 黑麦草, 内生真菌, *Neotyphodium lolii*, 实时荧光 PCR

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 05-0012-05

Detection and Quantification of the Endophyte in *Lolium perenne* L. *

SU Dan REN An-Zhi GAO Yu-Bao**

(College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071)

Abstract: A PCR assay used for detection and quantification of *Neotyphodium lolii* in tissues of the grass *Lolium perenne* L. was developed. Compared with the Microscopic analysis of stained tissues, this method was more accurate. For quantitative applications, real time PCR was used to quantify *Neotyphodium lolii* in *Lolium perenne* L. The results showed that there were some variations between different individuals, but no variance existed between different tillers from the same plant. Thus it can be concluded that fungal content in the plant is not only associated with species/variety specific, but also with the genotype of the host plant as well.

Key words: *Lolium perenne* L., Endophyte, *Neotyphodium lolii*, Real time PCR,

内生真菌 (endophyte 或 endophytic fungi) 是指生活史中某一阶段生活在植物组织内, 对植物没有引起明显病害症状的一类真菌^[1], 它对宿主植物的作用受真菌种类、染菌率和染菌量等因素的影响。以往对真菌种类的鉴定和染菌率的测定多采用组织化学和免疫学等手段, 近几年随着 PCR 技术的不断成熟和发展, PCR 检测法已被成功地应用于高羊茅体内的内生真菌 *Acremonium coenophialum* 的检测研究中^[3]。Groppe 等人选取微卫星引物通过 PCR 技术成功检测了 *Bromus erectus* 中的内生真菌 *Epichloë*^[4]。Moon 等人总结了 11 个微卫星位点在不同植物中内生真菌种类划分检测上的应用。因为不同种真菌的微卫星位点具有很高的多态性, 所以通过选择特异性的引物和合适的退火温度, 可以将不同种的内生真菌区分开^[5]。

综合已有报道, 很少涉及对感染植株内生真菌含量的研究。Belesky 等发现, 仅仅通过牧草的染菌率的情况不能切实反映在整个生长季中牧草毒性的变化^[6]。曾有研究者把生化标记物如葡萄糖胺、胞外漆酶和 ATP 作为检测土壤和植物-真菌共生体中真菌含量的指标, 但这些方法都存在着一些问题, 如方法的重复性达不到要求或样品的

* 国家自然科学基金项目资助 (No. 30370239)

** 通讯作者 Tel: 022-23508249, E-mail: ybgao@nankai.edu.cn

收稿日期: 2005-11-11, 修回日期: 2006-05-10

非真菌成分中也含有标记物^[7]。由此可见对感染植株内生真菌含量的研究是有意义的,但目前还没有合适的定量分析方法。本文首先利用常规 PCR 方法检测黑麦草中是否感染内生真菌,然后通过实时荧光 PCR 技术,建立了黑麦草中内生真菌定量分析的方法,以期对内生真菌-宿主植物共生体的相互关系研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料: 多年生黑麦草 (*Lolium perenne* L.) 品种 SR4000, 自澳大利亚购进, 由天津市红旗农场提供。建立黑麦草染菌和未染菌两个实验种群^[8], 随机选取 8 株长势相近的植株, 每个取 5 个龄级相近分蘖的叶鞘混合后提取 DNA, 检测不同株黑麦草中内生真菌的含量; 再选取 3 株长势相近的植株, 每个取 3 个龄级相近分蘖的叶鞘分别提取 DNA, 比较同株相同龄级分蘖中内生真菌的含量。

1.1.2 内生真菌材料: 从染菌黑麦草中分离获得, 种名为 *Neotyphodium lolii*。从种子中分离培养内生真菌^[9], 分离的菌落形态基本相同, 菌落隆起, 光滑蜡质, 有很多波浪型的沟回, 形似大脑, 不产生气生菌丝和分生孢子, 边缘比较陡直^[10] (图 1)。取一块布满内生真菌菌丝的琼脂块接种于新的 PDA 培养基上, 置于相同条件下培养 3 周, 收集生长良好的新鲜菌丝作为 DNA 提取的原始材料。

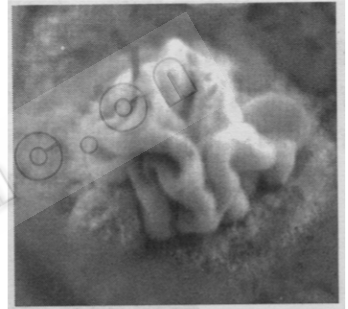


图 1 PDA 培养基上的菌落形态

1.2 DNA 的提取

内生真菌分离株基因组 DNA 和植物叶鞘基因组 DNA 提取方法参见 CTAB-SEVAG 方法^[11]。

1.3 PCR 反应

引物的选取: 内生真菌的引物 B1 扩增的是一段含有微卫星位点的单拷贝序列, 引物的基因序列为 5' -CGCACAATACGTCAGCTAGGAATG-3' 和 5' -CCTGAATCAACTTT-GCTATCAGGC-3'^[5]。黑麦草 *CDO504* 基因作为实时荧光 PCR 的内参照, 其引物序列为 5' -ACGACGACCCGAAGAG-3' 和 5' -GCCGTGTGGACGAGA-3'^[12]。

PCR 反应体系参照文献 [5] 略有改动, PCR 扩增改用以下程序: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 变性 20s; 60℃ 退火 20s; 72℃ 延伸 30s, 反应 40 个循环。

实时荧光 PCR 仪为美国 MJ RESEARCH 公司的 MJ OPTION II, 荧光染料为 SYB GREEN I。

1.4 实时荧光 PCR 标准曲线的建立及内生真菌含量的测定

本实验将内生真菌分离株 DNA 与未染菌黑麦草 DNA 以不同比例稀释, 然后用引物 B1 扩增内生真菌 DNA, 得出不同含量内生真菌的 Ct 值, 再以黑麦草内源基因作为内参照, 计算 Δ Ct 值, 绘制标准曲线 (见图 2)。用内生真菌的引物和黑麦草的引物分别扩增染菌黑麦草的 DNA, 计算出 Δ Ct 值, 然后在标准曲线上计算得 100ng 黑麦草叶鞘 DNA 中内生真菌 DNA 的含量, 并以此作为衡量内生真菌含量的指标。

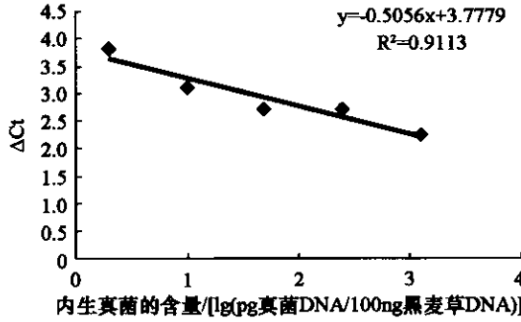


图2 通过实时荧光 PCR 测定黑麦草中内生真菌含量的标准曲线

2 结果

2.1 采用常规 PCR 法检测黑麦草中内生真菌的感染情况

本实验应用引物 B1 分别对内生真菌分离株、染菌和未染菌的黑麦草进行 PCR 扩增 (图 3), 真菌分离株获得一条长约 310bp 的 PCR 扩增片段; 染菌植株的 PCR 扩增产物与真菌分离株扩增产物碱基数基本相同, 条带亮度上有差异; 未染菌植株无扩增产物。结果说明: 真菌分离株与染菌植株 PCR 扩增产物为同一种物质, 但模板量不同。

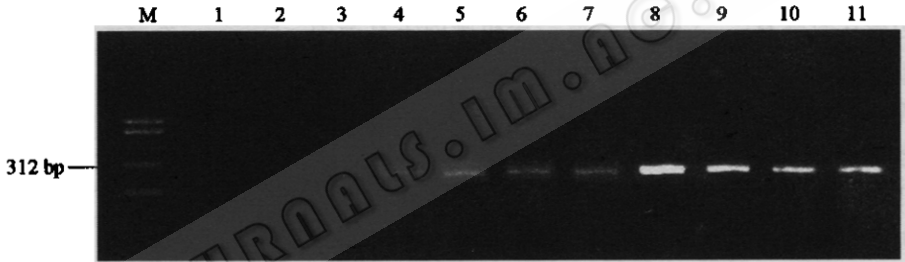


图3 植物和内生真菌分离株 PCR 扩增产物

M DNA marker SD011, 1~3 未染菌黑麦草, 4~7 染菌黑麦草, 8~11 内生真菌分离株

为了证实 PCR 方法检测内生真菌感染情况的准确性, 我们对 24 株黑麦草同时用乳酸-苯胺蓝染色的方法和 PCR 法进行鉴定 (图 4), 结果显示: 乳酸-苯胺蓝染色的方法检测出的 12 株阳性 (含内生真菌) 植株经 PCR 检测均为阳性, PCR 扩增得到 310bp 左右的条带; 而经乳酸-苯胺蓝染色的方法检测为阴性 (未含内生真菌) 的 12 株植株中有 1 株经 PCR 检测为阳性, 其余 11 株均为阴性。由此可见, PCR 检测内生真菌的方法与常规的组织染色的方法的结果基本一致, 并且 PCR 方法的阳性率高于组织染色的方法。

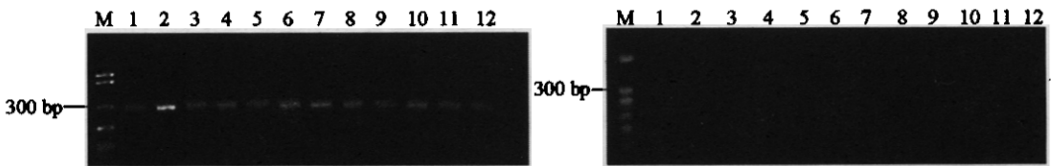


图4 植物 PCR 扩增产物

A: M DNA marker SD011, 1~12 经乳酸-苯胺蓝染色法检测染菌黑麦草,

B: M DNA marker SD010, 1~12 经乳酸-苯胺蓝染色法检测未染菌黑麦草

2.2 实时荧光 PCR 检测黑麦草中的内生真菌

2.2.1 同株黑麦草不同分蘖中内生真菌的定量检测：通过实时荧光 PCR 方法测定同株植物龄级相近分蘖中内生真菌的相对含量（图5），3株黑麦草中内生真菌的含量有显著差异，而同株黑麦草3个分蘖中内生真菌的含量无显著差异。

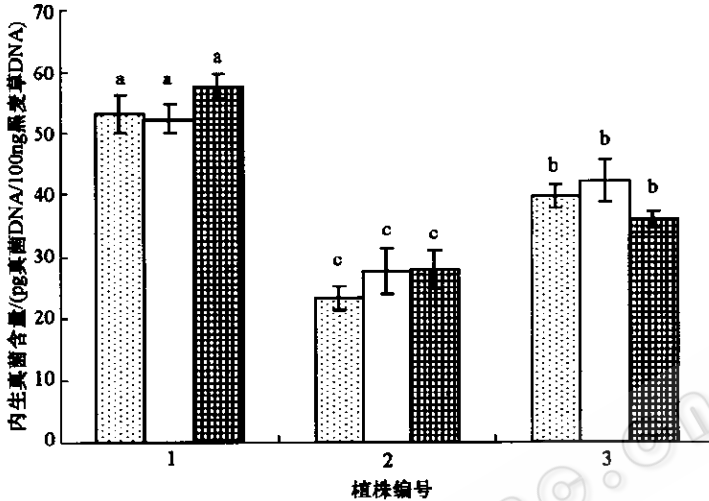


图5 实时荧光 PCR 检测黑麦草同株不同分蘖中内生真菌的含量

■分蘖1, □分蘖2, ▨分蘖3

2.2.2 不同株黑麦草中内生真菌的定量检测：通过实时荧光 PCR 检测 8 株黑麦草中内生真菌的含量（图6），发现长势相近的 8 个植株内生真菌的含量差异显著，说明内生真菌的含量在宿主植物中存在着显著的个体差异，而与宿主植物本身的自然生长状况相关性不显著。

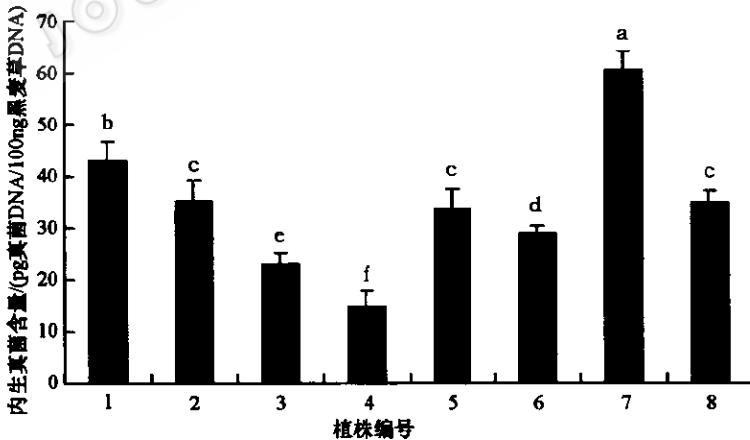


图6 实时荧光 PCR 检测不同株黑麦草中内生真菌的含量

3 讨论

检测植物组织中内生真菌的传统方法中，免疫学和组织化学最为常用。对于免疫学的方法，不但要求样品的量比较高，而且抗体和植物蛋白发生交联反应会影响检测

结果；而利用组织化学方法检测黑麦草中的内生真菌，不但要求检测人员具有丰富的实践经验和熟练的操作技术，而且当植物组织内的菌丝含量少、分布稀疏时，很难将它们检测出来。利用 PCR 的方法检测样品用量小，一般取新鲜植物的叶鞘 0.05g 即可进行；检测准确性更高，本实验中 PCR 方法的阳性率高于组织染色的方法。

目前对植物中内生真菌定量的方法国内未见报道，国外这方面的相关报道也很少。Richardson 等报道了从染有内生真菌的禾草种子的菌丝中提取麦角固醇作为检测真菌生物量的指标^[7]。因为麦角固醇普遍存在于真菌中，所以通过 Richardson 等人的方法检测植物-内生真菌共生体时不能排除病原真菌等对实验的干扰；此外麦角固醇的释放量受环境因子的影响较大。然而本实验基于 PCR 反应高特异性和真菌基因组 DNA 稳定性的特点避免了 Richardson 等人方法中的不足之处。Groppe 等人通过竞争 PCR 方法完成了 *Bromus erectus* 中内生真菌 *Epichloë* 的定量^[4]。本研究采用的实时荧光 PCR 的方法与竞争 PCR 相比，既省去了构建竞争内标物的繁琐过程，又减小了误差，增加了实验的准确性。本实验通过实时荧光 PCR 对真菌定量是一种相对定量的方法，即在一定量黑麦草叶鞘 DNA 中真菌 DNA 的含量。此种定量的方法是用内生真菌 DNA 的相对含量作为检测内生真菌生物量的指标。

Groppe 等人认为：*Bromus erectus* 中内生真菌 *Epichloë* 的含量和植物的自然生长状况呈正相关^[13]，然而本实验黑麦草 SR4000 中内生真菌的含量和黑麦草的自然生长状况没有显著的相关性，说明内生真菌含量对宿主植物自然生长状况的促进作用具有种的特异性。本实验研究结果表明：同一株黑麦草相近龄级不同分蘖间内生真菌的含量差异不显著；长势相近的不同株黑麦草中内生真菌的含量差异较大。在研究内生真菌和宿主植物间的相互作用时，由同一个无性系建立的种群优于由种子建立起的种群，因为前者除了避免植物基因型的影响外，也消除了内生真菌含量不同产生的影响，进而可以真实反映特定共生体的相互作用。

参考文献

- [1] Petrini O. *Microbial Ecology of Leaves*. New York: Springer-Verlag Press, 1991. 179 ~ 187.
- [2] 任安芝, 高玉葆. 微生物学通报, 2004, 31 (2): 130 ~ 133.
- [3] Doss R P, Welty R E. *Phytopathology*, 1995, 85: 913 ~ 917.
- [4] Groppe K, Boller T. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (4): 1543 ~ 1550.
- [5] Moon C D, Tapper B A, Scott B. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 3: 1268 ~ 1279.
- [6] Belesky D P, Stuedemann J A, Plattner R D, et al. *Agron J*, 1988, 80: 209 ~ 212.
- [7] Richardson M D, Logendra S. *J Agric Food Chem*, 1997, 45: 3903 ~ 3907.
- [8] 任安芝, 高玉葆, 陈悦. 生态学报, 2004, 24 (7): 1323 ~ 1329.
- [9] Clark E M, White J F, Patterson R M. *Journal of Microbiological Methods*, 1983, 1: 149 ~ 155.
- [10] 聂立影, 陈磊, 任安芝, 等. 微生物学通报, 2005, 32 (1): 10 ~ 14.
- [11] Zolan M E, Pukkila P J. *Mol Cell Biol*, 1986, 6: 195 ~ 200.
- [12] Taylor C, Madsen K, Borg S, et al. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 648 ~ 658.
- [13] Groppe K, Steinger T, Sanders I, et al. *Molecular Ecology*, 1999, 8: 1827 ~ 1835.