

大豆疫霉菌 ITS 分子检测程序的建立及其应用*

刘春来^{1,2} 杨明秀¹ 文景芝^{1**}

(东北农业大学农学院植保系 哈尔滨 150030) (黑龙江省农科院植保所 哈尔滨 150086)

摘要 依据 GenBank 中登录的大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)近缘种及相似种 rDNA 的 ITS 区序列差异,进行多重比较后设计合成一对大豆疫霉菌特异引物,并在 PCR 反应体系和扩增条件优化的基础上,对包括大豆疫霉菌在内的共 140 个菌株进行 PCR 检测。结果表明,电泳后只有大豆疫霉菌扩增出一条 288bp 的特异性条带。运用设计的大豆疫霉菌专用引物(专利申请号 200610089105.4)及建立的检测程序对大豆疫霉菌纯培养游动孢子、接种于土壤中的游动孢子和卵孢子以及接种发病的大豆染病组织进行了检测应用,结果显示该检测程序对接种于土壤中的大豆疫霉菌游动孢子和卵孢子的检测理论精度分别达 0.3 和 0.06 个孢子,对染病组织检测也表现出了较高的灵敏度。

关键词 大豆疫霉菌 rDNA-ITS 土壤检测 染病组织检测

中图分类号:Q93-3 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)06-1158-05

Molecular Detection of *Phytophthora sojae* *LIU Chun-Lai^{1,2}, YANG Ming-Xiu¹, WEN Jing-Zhi^{1**}

(Department of Plant Protection, Agriculture College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

(Institute of Plant Protection, Heilongjiang Academy of Agricultural Science, Harbin 150086)

Abstract An oligonucleotide primer pair was designed and synthesized after comparison and homological analysis of rDNA ITS sequences among *Phytophthora sojae*, its related *Phytophthora* species and allied fungal and bacterial species from GenBank. PCR amplifications were carried out for 140 isolates including *Phytophthora sojae*. It showed that only isolates of *Phytophthora sojae* can be amplified and a special fragment of 288bp were produced by the primers. These primers were used to detect *Phytophthora sojae* in pure culture, inoculated diseased soybean plants, and inoculated soil samples. The detection protocol has good sensitivity to diseased tissues.

Key words *Phytophthora sojae* rDNA ITS, Detection of soil, Detection of diseased soybean tissues

由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)引起的大豆疫霉根腐病是一种危害大豆生产的世界性病害^[1]。鉴于大豆疫霉菌的破坏性和毁灭性,1992年起大豆疫霉根腐病被我国列为对外公布的 I 类危险性、检疫性病害,其快速检测和鉴定对于口岸检疫、田间病害诊断和防治具有重要意义。传统的大豆疫霉菌分离、培养及鉴定技术如病组织分离和叶碟诱捕法由于程序繁琐、周期长、灵敏度低^[2],酶联免疫吸附测定(ELISA)由于抗血清效价不高、特异性不强等问题^[3],已远远不能满足日益增长的大豆生产和贸易需要,尤其是口岸检疫检测急需一种快速、灵敏、准确、方便的大豆疫霉菌检测鉴定方法。

核糖体基因转录间隔区 ITS(internal transcribed spacer)是由 Gonzalez 1990 年提出并逐步发展起来的全新的分子标记,由于该分子标记技术具有快速、准确、微量、灵敏度高、程序简单等优点,现已广泛应用于病原菌的分类鉴定、检测和病害诊断中。本试验根据 ITS 区序列的多态性设计出了可用于大豆疫霉菌检测的专用引物,建立了大豆疫霉菌的分子检测程序,并对其进行了检验和应用。

1 材料和方法

1.1 参试菌株及其培养

140 株参试菌株见表 1,对所有的参试菌株都进

* 国家“十五”科技攻关项目(No. 2004BA520A16-0106),公益性行业(农业)科研专项(No. nyhyz07-053)和大豆生物学教育部重点实验室(No. SB06A03)资助。

** 通讯作者 Tel: 0451-55191045, E-mail: jzhwen2000@yahoo.com.cn

收稿日期:2007-06-25,修回日期:2007-07-19

行了纯化,方法见参考文献[4]。真菌和细菌活化后转移到普通胡萝卜培养液(杨明秀,硕士学位论文,2005,pp.1~38)中,真菌24℃~26℃培养7d左右,收集菌丝团,冷冻干燥后备用;细菌培养至对数生长期,收集菌体提取基因组DNA。

1.2 大豆疫霉菌游动孢子和卵孢子悬浮液的制备及检测

游动孢子和卵孢子悬浮液的制备及计数方法参照文献[5]的方法。

纯培养游动孢子直接用石英砂破碎法。参照文献[6]的方法。破碎后直接取0.3μL~10μL上清液为模板进行PCR检测。

土壤中游动孢子的检测也采用石英砂破碎法。参照文献[6]的方法。破碎后也直接取0.3μL~10μL上清液为模板进行PCR检测。

1.3 大豆染病根组织的获得

挑取籽粒饱满的Williams82(抗病品种)和Sloan(感病品种)大豆种子数粒,催芽后分装到装有15mL无菌水的安瓿瓶中,每瓶2株,置恒温恒湿光照培养箱内。1片复叶期,每瓶接种1000个游动孢子,隔15min取1次根样,每次取2株,以接种前的根样为对照。为避免附着在根上但又未侵入的游动孢子对试验产生影响,取出的根样经超声振荡清洗5min后,用自来水冲洗数秒,无菌滤纸吸干,放入封口袋中于-20℃冰柜中保存备用。

1.4 大豆染病茎组织的获得

分别在装有灭菌土的塑料钵内种植Williams82(抗病品种)和Sloan(感病品种)数株,真叶展开时,下胚轴伤口接种(接种量为0.9cm²的菌碟),发病后切取肉眼可见的褐色发病组织,装入封口袋中于-20℃冰柜中保存备用。

1.5 大豆染病种子的获得

种植合丰25(感病品种)数株,并在鼓粒期和成熟期,选择生长一致的豆荚用菌悬液(浓度3×10⁹个孢子/mL)注射接种,0.2mL/荚。分别收获后剥开豆荚,取籽粒装入封口袋中备用。

1.6 基因组DNA的提取

真菌参考刘学敏(大豆灰斑病菌遗传标记的建立[博士学位论文],1996,pp.21~23)的方法;细菌采用传统法^[8],放线菌采用微波法;染病组织及健康组织采用CTAB法(稍加改进);土壤中卵孢子DNA

的提取参考文献[9]的方法。

1.7 引物设计与合成

根据GenBank中登录的大豆疫霉菌、近缘种及相似种rDNA的ITS区序列,利用生物学软件DNAMAN对序列进行差异比较、同源性分析,选取适当的界定值,在多态性丰富的区域运用OLIGO软件设计合成一寡核苷酸引物。引物序列为上游18bp:5'-CTGGATCATGAGCCCACT-3';下游19bp:5'-TCTCCATCCACCGACTACA-3'(专利申请号200610089105.4)。根据序列比较预测该引物的扩增产物大小为288bp,引物由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.8 特异性PCR扩增及其产物检测

表1列出的所有140个菌株基因组DNA样本用于检测所设计引物的特异性。PCR反应体系:10×PCR缓冲液5μL,模板(50ng)1.0μL,引物(10pmol/μL)1.0μL,dNTP(10mmol/L)0.5μL,MgCl₂(25mmol/L)1.0μL,Taq DNA聚合酶0.5μL,Tween-20 0.5μL,BSA(0.1%)5μL,适量的双蒸水补足至50μL。PCR检测程序为:94℃预变性5min;94℃变性25s,56℃ 25s,72℃ 25s,30个循环;最后72℃延伸10min。PCR扩增产物用1.5%的TBE胶检测,用DL2000 DNA Marker作对照。电泳结束后,用Bio Imaging System GeneGenius LP-400全自动凝胶成像系统(美国)观察结果并扫描于计算机软件中保存。

2 结果与分析

2.1 引物的特异性验证

利用建立的检测程序,对参试的7株疫霉菌和10株常见病原真菌进行PCR扩增,结果见图1。只有大豆疫霉菌(泳道1和13)产生1条约288bp的特异性片段,其它参试菌株均无扩增产物。同样对分离自大豆根际的38株真菌、18株细菌和46株放线菌也进行了扩增,也无扩增产物(图片未给出)。说明该引物具有较强的特异性,可用于检测环境中的大豆疫霉菌。

2.2 对大豆疫霉菌游动孢子的检测灵敏度

纯培养游动孢子的检测结果如图2所示,不同模板量均可得到288bp特异性扩增产物,且扩增产量随模板量的增加而增多,检测的理论精度可达到0.3个游动孢子。

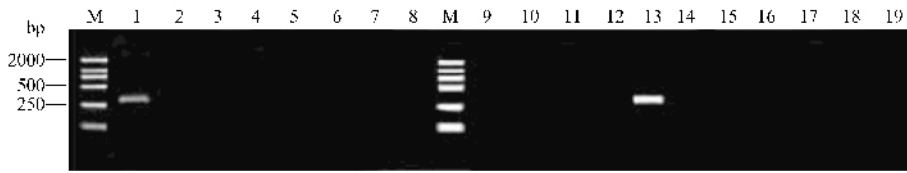


图1 大豆疫霉菌(2个菌株)和疫霉属其它4个代表种(7个菌株)及10种常见病原真菌 PCR 扩增产物电泳图

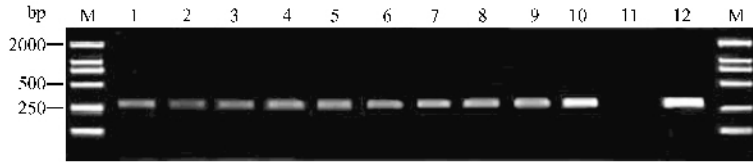


图2 纯培养大豆疫霉菌游动孢子 PCR 扩增产物电泳图

接种于土壤中的游动孢子检测结果见图3,不同模板量均产生288bp特异性扩增条带,检测的理论精度也可达到0.3个游动孢子,但条带的亮度比

检测纯培养游动孢子时要弱,且随着模板量的增加,扩增产物未表现出明显增多的趋势,可能是土壤中的腐殖质对PCR产生了负面影响。

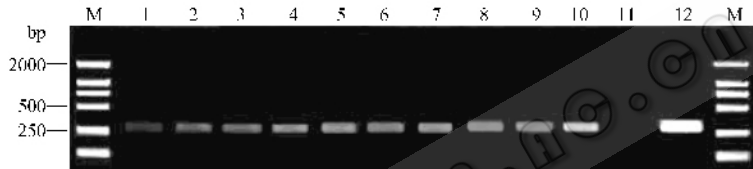


图3 接种于土壤中的大豆疫霉菌游动孢子 PCR 扩增产物电泳图

2.3 对接种于土壤中的大豆疫霉菌卵孢子的检测灵敏度

从含有10个卵孢子的1g土壤中提取DNA,用去离子水适量稀释后,取1μL~7μL的模板量按优化

的检测程序进行PCR检测,结果见图4,各模板量均扩增出288bp特异片段,且随着模板量的增加,扩增产量也具有增加的趋势。检测的理论精度最低可达0.06个卵孢子。

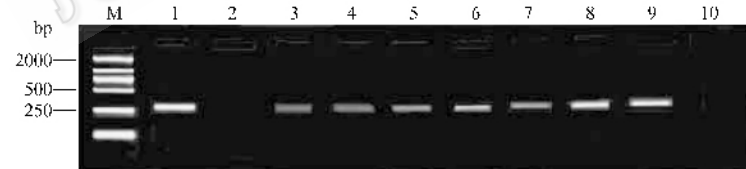


图4 接种于土壤中的卵孢子 PCR 扩增产物电泳图

2.4 染病种子及茎组织的PCR检测

检测结果见图5,健康大豆茎、籽粒组织均无扩增条带产生,染病茎及鼓粒期接种的籽粒种皮和胚均可扩增出288bp特异片段,成熟期接种的籽粒只在种皮检测出特异片段,胚未检测到扩增产物,说明随着籽粒的成熟,病菌扩展受到限制,只能侵入到种

皮,不能达到胚。

2.5 染病根组织的PCR检测

结果如图6所示,感病品种Sloan接种后1h即可检测出大豆疫霉菌的存在(泳道3~5);而抗病品种Williams82,阳性检测结果则推迟到接种后的2h才出现(泳道8~10)。从阳性的检测结果所需的最低模板量上看,抗病品种Williams82需要的模板量为0.5μL,比感病品种需要的模板量0.2μL多1.5倍,进一步说明大豆疫霉菌游动孢子对感病品种的侵入时间要早于抗病品种,定殖的量也多于抗病品种,同时也说明该检测程序对染病根组织中的大豆疫霉菌具有很高的检测灵敏度,检测出抗感病品种

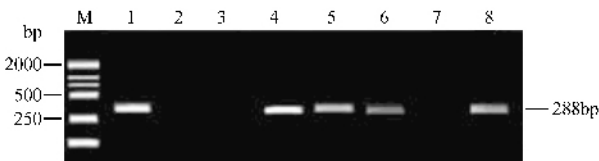


图5 大豆染病种子及茎组织 PCR 扩增产物电泳图

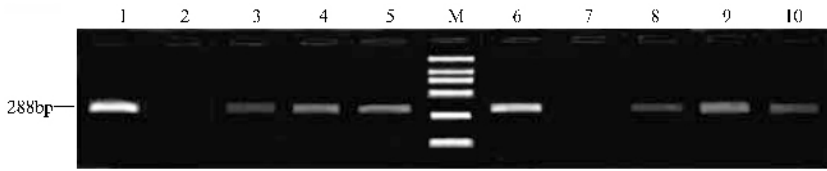


图6 大豆染病根组织 PCR 扩增产物电泳图

的侵染和定殖时间为接种后的 1h ~ 2h。

3 讨论

大豆疫霉根腐病是典型的土壤传播病害,病残体和带菌土壤为该病的主要侵染源和传播途径。但带菌种子能否传病一直在争论。周肇蕙等^[10]通过人工接种试验及种子传病试验证明了大豆疫霉根腐

病可产生带菌的种子,带菌种子确有传病作用,从而为实施大豆疫霉根腐病的种子检疫检验提供了科学依据。同时指出了大豆疫霉在胚和子叶中以菌丝体形式存在,卵孢子只存在于种皮中,且种子干燥后胚和子叶中的菌丝体失去活性,从而提出大豆疫霉菌的种子检验只需检查种皮,以种皮内疫霉菌卵孢子存在与否为指标。本试验 PCR 检测结果表明,大豆

表1 供试菌株及其来源

| 序号 No. | 菌株 Isolates | 寄主 Hosts | 来源 Locations | 序号 No. | 菌株 Isolates | 寄主 Hosts | 来源 Locations |
|----------|----------------------------------|----------|--------------|---------|----------------------------------|----------|--------------|
| 1 | <i>P. sojae</i> 855 ₁ | 大豆 | 八五五农场 | 2 | <i>P. sojae</i> 855 ₂ | 大豆 | 八五五农场 |
| 3 | <i>P. sojae</i> JK1 | 大豆 | 农垦总局 | 4 | <i>P. sojae</i> F ₈ | 大豆 | 密山 |
| 5 | <i>P. sojae</i> 597-3 | 大豆 | 五九七农场 | 6 | <i>P. sojae</i> Li | 大豆 | 五九七农场 |
| 7 | <i>P. sojae</i> H ₂ | 大豆 | 红河农场 | 8 | <i>P. sojae</i> Ja | 大豆 | 佳南 |
| 9 | <i>P. sojae</i> Za | 大豆 | 扎兰屯 | 10 | <i>P. sojae</i> Aa | 大豆 | 阿荣旗 |
| 11 | <i>P. sojae</i> W ₁ | 大豆 | 五九七农场 | 12 | <i>P. sojae</i> R ₁ | 大豆 | 红河农场 |
| 13 | <i>P. sojae</i> R ₃ | 大豆 | 八五五农场 | 14 | <i>P. sojae</i> R ₇ | 大豆 | 北京 |
| 15 | <i>P. sojae</i> R ₉ | 大豆 | 八五五农场 | 16 | <i>P. sojae</i> R ₁₀ | 大豆 | 北京 |
| 17 | <i>P. sojae</i> R ₁₃ | 大豆 | 红河农场 | 18 | <i>P. sojae</i> R ₁₅ | 大豆 | 五九七农场 |
| 19 | <i>P. sojae</i> R ₂₄ | 大豆 | 北京 | 20 | <i>P. sojae</i> R ₄₃ | 大豆 | 八五五农场 |
| 21 | <i>P. sojae</i> R ₄₄ | 大豆 | 农垦总局 | | | | |
| 22 | <i>P. capsici</i> | 辣椒 | 哈尔滨 | | | | |
| 23 | <i>P. capsici</i> | 南瓜 | 桦南 | | | | |
| 24 | <i>P. infestans</i> | 番茄 | 哈尔滨 | | | | |
| 25 | <i>P. infestans</i> | 马铃薯 | 哈尔滨 | 26 | <i>P. infestans</i> | 马铃薯 | 克山 |
| 27 | <i>P. cinnamomi</i> | | 南京 | 28 | <i>P. citrophthora</i> | | 南京 |
| 29 | <i>Botrytis cinerea</i> | 黄瓜 | 北京 | | | | |
| 30 | <i>Magnaporthe grisea</i> | 水稻 | 北京 | | | | |
| 31 | <i>Fusarium graminearum</i> | 小麦 | 北京 | 32 | <i>Rhizoctonia cerealis</i> | 小麦 | 北京 |
| 33 | <i>Bipolaris sorokiniana</i> | 小麦 | 哈尔滨 | 34 | <i>Verticillium lecanii</i> | | 哈尔滨 |
| 35 | <i>Cercospora sojae</i> | 大豆 | 哈尔滨 | 36 | <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> | 大豆 | 哈尔滨 |
| 37 | <i>Fusarium oxysporum</i> | 大豆 | 哈尔滨 | 38 | <i>Rhizoctonia solani</i> | | 北京 |
| 39 ~ 76 | 38 株真菌 | 大豆 根际 | 哈尔滨 | 77 ~ 94 | 18 株细菌 | 大豆 根际 | 哈尔滨 |
| 95 ~ 140 | 46 株放线菌 | 大豆 根际 | 哈尔滨 | | | | |

荚感染时间的早晚决定了其中的病菌分布。早期感染的种皮和胚都带菌,后期感染的病菌只能停留在种皮内而不能进入种胚内,可能是随着种子的成熟,病菌的扩展受到限制,其机制有待研究。

王述彬等^[11]用电镜对辣椒疫霉菌游动孢子在抗、感基因型辣椒根表侵入活动进行了研究,表明游动孢子在感病基因型辣椒根表的侵入时间为接种后60min~90min,在根表能产生吸盘的游动孢子的数量为9.6个;游动孢子在抗病基因型辣椒根表的侵入时间为接种后60min~150min,在根表能产生吸盘的游动孢子的数量为0.96个;且接种4h~24h,在抗、感基因型辣椒根表所产生的菌丝和孢子囊的数量差异较大。左豫虎等^[12]用电镜研究了大豆疫霉菌游动孢子侵染抗、感病品种大豆幼苗下胚轴的过程,从接种后的1.5h开始取样观察,结果表明,接种1.5h后游动孢子在感病品种上即形成休止孢并萌发产生附着孢由表皮细胞间隙侵入;抗病品种比感病品种迟,且侵入菌丝数量明显少于感病品种。本试验用大豆疫霉菌游动孢子分别定量接种抗病品种和感病品种幼苗根部,从接种后15min开始连续定期取样进行PCR检测,结果表明,大豆疫霉菌游动孢子在抗、感品种根部的侵入时间分别为接种后的2h和1h;定殖量感病品种多于同期的抗病品种。

王立安等^[6]报道了其设计的一对大豆疫霉菌

ITS引物(专利申请号03131531.3),其检测理论精度分别为0.5个游动孢子和0.5个卵孢子,而本研究设计的大豆疫霉菌专用引物的检测理论精度分别为0.3个游动孢子和0.06个卵孢子;此外,还对染病种子和染病根组织也进行了检测应用,均取得了很好的效果。

参考文献

- [1] Schmitthenner A F, Root Rot of Soybean. *Plant Disease*, 1985, **69** (4) 362~368.
- [2] 许修宏, 吕慧颖, 曲娟娟. 大豆科学, 2002, **21**(2):147~150.
- [3] 文景芝, 张晓玲, 辛敏. 东北农业大学学报, 2002, **33**(3):209~212.
- [4] 方中达. 植病研究方法. 北京: 中国农业出版社, 1998. pp.137~139
- [5] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术. 北京: 中国农业出版社, 1997, pp.86, 93.
- [6] 王立安, 张文利, 王源超, 等. 南京农业大学学报, 2004, **27** (3) 38~41.
- [7] 沈德新, 封志纯, 杜江. 中原医刊, 2004, **31**(10) 20~22.
- [8] 徐平, 李文均, 徐丽华, 等. 微生物学报, 2003, **30**(4) 82~84.
- [9] Volossiouk T, Robb E J, Nazar R N. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, **61**(11) 3972~3976.
- [10] 周肇蕙, 严进. 粮食储藏, 2001, **30**(6) 3~6.
- [11] 王述彬, 赵华伦, 丁梨平, 等. 植物病理学报, 1994, **25** 86.
- [12] 左豫虎, 康振生, 黄丽丽, 等. 植物病理学报, 2005, **35**(3) 235~241.