

分子生物学技术在全蚀病诊断中的应用^{*}

王美南, 商鸿生

(西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 依据国内外近年来的研究结果, 总结了用于全蚀病菌鉴定和诊断的几种主要分子生物学技术, 并对分子生物学技术诊断中的实用性及其发展方向进行了评价。

[关键词] 分子生物学技术; 病害诊断; 全蚀病

[中图分类号] Q 949.32

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)04-0069-05

病害诊断技术对病原物的检测、鉴定、分类、病害的管理, 植物的生产及植物检疫有着深远的影响。全蚀病是禾本科植物根部的重要病害, 其病原真菌禾顶囊壳 (*Gaeum annomyces gram inis*) 依据形态和致病性差异可分为 4 个变种^[1]。不进行有性态的观察, *G. gram inis* 与许多根部寄生菌及病原真菌易混淆^[2]。随着分子生物学技术的发展, 从植物组织和土壤中直接分离 DNA/RNA 技术的提高, 以及酶学操作、特异性探针、检测系统和 PCR 设备的不断改进, 分子诊断技术渐渐成为病害实验室诊断的常规方法^[3-8]。本文综述了近年来全蚀病病菌诊断中的一些主要方法技术。

1 依据生理生化特性的鉴定技术

有性态的诱导在 *G. gram inis* 鉴定中意义重大, 但是有性态的诱导周期长, 为了缩短鉴定时间, 研究者相继开发了许多快速的鉴定技术。Juhnke 等^[9]研究出了几种半选择性培养基 SM-GGT3, SM-GGT4, SM-GGT7, 可以鉴定禾顶囊壳小麦变种 (*Gaeum annomyces gram inis* var. *tritici*) (简称 *Ggt*), 该培养基中含有二羟苯丙氨酸 (L- β 3, 4-dihydroxyphenylalanine), *Ggt* 利用它可合成黑色素, 从培养基颜色变化上可以方便地检测到 *Ggt*。Duffy 等^[10]研究发现, 生长在含利福平的 PDA 培养基上的 *Ggt* 菌落周围颜色会出现橙色到紫色的变化, 这一生理特性可以区分 *Ggt* 与其他根部病菌, 如腐霉菌 (*Phy thium*)、纹枯菌 (*R hizoctonia*)、镰刀菌 (*Fusari-um*), 其结果在 24 h 内即可观察到。

早期的分子检测技术一般基于蛋白的检测, Abbott 等^[11]用可溶蛋白分析了禾顶囊壳 3 个变种的关系, 发现在 *Ggt* 禾顶囊壳燕麦变种 (*Gaeum annomyces gram inis* var. *aveana* (简称 *Gga*))、禾顶囊壳禾谷变种 (*Gaeum annomyces gram inis* var. *gram inis* (简称 *Ggg*)) 中, 前两者相似性最高。Mass 等^[12]运用可溶蛋白的聚丙烯酰胺凝胶电泳结合光谱分析, 将 *Ggt* 及禾谷瓶梗霉 (*Phialophora gram inicola*)、玉米瓶根霉 (*P. zeicola*)、纹枯菌 (*R hizoctinia*) 等几种可产生相似症状的病原菌作了区分。

2 基于核酸分子的诊断方法

2.1 DNA 探针

利用随机病原真菌 DNA 片段可以构建质粒文库, 筛选真菌 DNA 片段质粒库可以找到专化性的探针。在 *Phy topthora* 的文库中, 已筛选到可将 *P. parasitica* 和 *P. citrophthora* 与其他种区分开的专化性片段。利用 DNA 杂交, 可以从叶盘诱饵中直接检测到 *P. parasitica*。并且发现用一个种专化性 DNA 随机片段做探针, 可对 *P. cinnam om i* 进行半定量检测。用随机 DNA 片段可区分稻瘟病菌 (*M og-naporthe grisea*) 在水稻和谷子上的不同致病菌株^[13]。

系统发育分析可以产生许多真菌种的 DNA 序列, 与来自随机文库建立的探针不同, 对这些序列分析更易选择到专化性序列。以不同物种间的 rDNA 片段作探针, 也可用于种的鉴定。以 *Neurospora crassa* 的 18S 和 26S 部分片段 pKD002 和 pKD003

* [收稿日期] 2004-06-24

[基金项目] 国家“十五”攻关项目 (2001BA509B03); 陕西省自然科学基金项目 (2004C112); 西北农林科技大学青年基金项目

[作者简介] 王美南 (1969-), 男, 陕西临潼人, 副研究员, 博士, 主要从事植物病理学和植物免疫学研究。E-mail: mnmwang@cnipm.com

为探针,与 *EcoR* I, *Hind* III + *EcoR* I, *Hind* III + *Pst* I 酶切的 *G. graminis* 变种基因组杂交进行 RFLP 分析,可以区分变种间及变种内不同致病性菌株^[14]。植物的 rDNA 也被用作异源探针检测全蚀病菌。Tan^[15]分别用小麦 18S rDNA 和 26S rDNA 片段作探针,与 *G. graminis* 不同变种及致病类型杂交,26S rDNA 探针可以有效区分 *Ggt* 变种的 3 个不同致病性亚群。Bryan 等^[16]用小麦的 rDNA 探针 pTA 71 与全蚀病菌杂交,可以正确区分 *Ggt*, *Gga* 及 *Ggg* 中的燕麦致病菌,为正确鉴别变种和不同致病性类群提供了分子工具。

重复序列片段也是鉴别真菌的有效探针。Borrome 等^[17]以探针 PGR613MGR586 与稻瘟病菌的水稻致病菌株和 16 种杂草致病菌株的基因组 *EcoR* I 酶切产物杂交产生的分子指纹,可以明确区分各菌株。Herdina 等^[18]用 pUC19 构建了一个 *Ggt* 的基因组文库,从中找到一个高度重复序列克隆 pG158,单拷贝序列克隆 pG217,二者具有很高的灵敏度, pG217 能明显区分 *G. graminis* 的 3 个变种,可以用于种间鉴定。

2.2 线粒体基因组序列的应用

Henson 等^[19-21]用 pUC18 构建了一个 *G. graminis* 的线粒体基因组文库, Schester 等^[22]从中找到一个 4.3 kb 的克隆 pMSU315,并设计了 1 对引物 KS1F/KS2R,但该引物特异性差,重新设计内部引物 KS4F/KS5R 后,可以从中扩增到 181 bp 的片段,而在其他根部病菌中无扩增产物,该片段是 *G. graminis* 的特征片段,可以从单个子囊孢子中扩增到目标产物。但变种间无多态性,不能用于变种间的区分。Ward^[23]研究发现,特异性差的原因是 PCR 的退火温度过低,引物 KS1F/KS2R 提高退火温度后可将 *Ggg* 与 *Gga* 和 *Ggt* 区分开。经过改进设计的 nest-PCR 引物可以从 *G. graminis* 中扩增出 287 bp 和 188 bp 两个片段,该引物对 *G. graminis* 有专化性^[23]。

2.3 RAPD 技术的应用

RAPD 技术是利用随机短序列引物在基因组范围内快速寻找物种多态性的实用方法,在真菌鉴定中应用广泛^[24-26]。过去 10 年中,许多研究利用 RAPD 技术区分 *G. graminis* 与 *Phialophora* 的种、变种及其菌株,并在 *Ggt* 内鉴定了几个亚群。Fouly 等^[27]用 RAPD 技术分析了 *G. graminis* 变种间的 DNA 多态性,将几个变种区分开。Wetzel 等^[25]用 RAPD 分析成功区分了 *Gaeum annamycetes* 及与其相

关的草坪草根部的产生黑色素的真菌。Bryan 等^[16]对 *Ggt* 黑麦致病群 *Ggt*-R、燕麦致病群 *Ggt*-AT 及非黑麦致病群 *Ggt*-N 进行 RAPD 分析,用 179 个位点可将这 3 个类群明显区分开,但在同类群不同菌株间片段存在多态性,这个结果与 RFLP 数据及 rDNA 序列的系统学分析结果一致。Augustin 等^[28]研究了数百个来自不同地方和不同寄主上的 *G. graminis*,用两个引物将 *Ggt* 变种内分为 A~F 6 个类型,Ulrich 等^[29]进一步用 RAPD 和 rDNA 序列分析证实了 E 类型是一个不同于 *G. graminis* 其他变种的新类型。禾顶囊壳玉米变种 (*G. graminis* var. *maydis* (简称 *Ggm*)) 是分布于我国的一个新变种。王美南^[30]运用 RAPD 技术,证实 *Ggm* 与其他 *G. graminis* 变种有稳定的遗传差异,目前已经开发出可以区别全蚀病菌 *Ggt* 和 *Ggm* 的 RAPD 标记,并将其转化为单一扩增产物的 SCAR 标记。

2.4 rDNA 序列的分析

基因组编码核糖体 RNA 的基因序列 (rDNA) 由编码 18S rRNA, 5.8S rRNA, 26S rRNA 的 DNA 序列和基因转录间隔区 (ITS) 组成,该区域在真菌的分类、鉴定研究中应用最多。编码 18S rRNA 与 26S rRNA 的 DNA 序列成功地用于区分 *G. graminis* 的不同变种。Fouly 等^[31]在研究 *G. graminis* 18S rDNA 序列中发现, *Ggt* 与 *Gga* 的 18S 序列有 20 bp 插入/缺失的不同,依据差异设计了 *Ggt* 和 *Gga* 的专化性引物 *Ggt*-RP 和 *Gga*-RP。结合通用引物 NS5, 引物组合 NS5/*Ggt*-RP 在 *Ggt* 和 *Gga* 中分别扩增出 410, 400 bp 片段; 引物组合 NS5/*Gga*-RP 在 *Ggt* 和 *Gga* 中均可扩增到 400 bp 片段,在其他相关种中两对引物均无扩增产物,可作为变种检测的特异标记。在接种的植物根部用该引物扩增可以区分 *G. graminis* 与其他真菌。Tan 等^[32]对 26S rRNA 基因的 Group I 内含子分析后发现, *Ggt*, *Gga*, *Ggg* 存在多态性, *Ggg* 无内含子, *Gga* 和 *Ggt* 有一个共同的内含子 AT 和各自特异性内含子 A 和 T。Wong 等^[33]已用这一结果快速鉴定 Bermuda 草全蚀病原物 *Ggg*。

ITS 区是研究目标种属之间差异的最佳选择^[30-33]。以通用引物 IST1/IST4 扩增的产物酶切后在凝胶上分离,可以用作种间、种内鉴定。Ward 等^[34]发现,许多限制酶可以将 *G. graminis* 变种区分开, *Hha* III, *Dde* I, *Hha* I 可以将 *G. graminis* 的 3 个变种区分开,但是一些非典型菌株产生的多态性

条带使其无法正确的归类。Ulrich 等^[29]用 dDNA-RFLP 鉴定出一个德国的 *Phialophora* E 类型, 与其他已报道的 *G. graminis* 及 *G. cylindrosporus* 有不同的 *Hinf* I, *Msp* I, *Taq* I 和 *Sac* I 酶切片段长度多态性。这说明 dDNA 的序列分析可以将 *G. graminis* 的几个变种区分开, 并且也可以鉴定新发现的类型。用 dDNA 序列, 尤其是 ITS1 和 ITS2 可以区分 *Ggt* 变种内的燕麦致病类型 *Ggt*AT, 黑麦致病类型 *Ggt*R 及非黑麦致病类型 *Ggt*N。Bryan 等^[35]分析 ITS1~ ITS2 的序列认为, *Ggt* 与 *Gga* 的关系更近, 构成一个单型系。Ward 等^[36]分析 ITS1~ ITS2 序列发现 *Phialophora radicola* 与 *P. zeicola* 亲缘最近, 它们可能是 *Ggm* 的无性阶段。王美南^[30]分析了 *G. graminis* 4 个变种的 ITS1~ ITS2 序列, 依据变种间该区域序列的差异设计了 *Ggm* 的特异引物, 可以将 *Ggm* 与该种的其余 3 个变种相区分, 为 *Ggm* 的正确分类和鉴定提供了依据。

2.5 功能基因编码区的 PCR 检测

Rachadwong 等^[37]依据燕麦素酶和燕麦素酶类似物基因序列设计出专化性 PCR 技术, 用于鉴定 *Ggt*, *Gga*, *Ggg*。将变种专化性引物与通用引物结合, 可在几个变种间扩增出不同大小的 DNA 片段。但是有些 *Ggt* 菌株扩增出的片段与 *Ggg* 大小相同, 该技术仍需改进。

3 评价

病原菌的性状特征是病原鉴定、病害诊断的基础。同形态特征、生理性状、生态特性一样, 分子遗传特征无疑可以作为真菌鉴定和病害诊断的依据。相对于其他性状特征, 核酸分子特征比较稳定, 一般的丝状真菌个体小, 可供选择的形态特征有限, 分子特征可以提供更多的信息。真菌中一些大的属和种间形态特征重叠较多而难以区分的类群, 运用分子证据则较为客观。真菌的鉴定以有性态特征为主, 许多真菌有性态的形成需要很长时间, 有些真菌有性态的诱导需要特殊条件, 甚至人工条件下无法获得有性态, 这些均是传统形态鉴定中的难题, 分子特征可以弥补传统分类的这些不足。但是作为诊断的分子

特征应当是被鉴定对象的专化性种征。假如一种分子信息与其他性状的鉴定结果相矛盾, 不能轻易下结论, 需要用多种分子方法再作测试, 寻找其他的特征加以验证。

目前, 尽管有许多分子方法用于 *G. graminis* 的鉴定, 但很少有对每个变种的所有菌种都能成功鉴定的方法, 一些菌种会出现非典型的分子检测结果。这主要是由于传统方法的缺陷, 在鉴定中会导致很多测试过的菌株并没有鉴定到种或变种水平。此外, 每个研究者所用菌种是有限的, 这也容易导致误差。如, 由于取材限制, 一些文献中所研究的变种仅有一个菌株, 这很难代表该变种的所有特征, 试验结果很难支持其论点。

与大多数传统方法相比, 真菌的核酸分子鉴定花费时间很短, 一般的病害分子检测或诊断可以直接用寄主的组织进行操作, 可快速得到结果。但是, 很少有直接在土壤样品或感染的根部检测全蚀病菌的报道, 大量的测试工作还需要在分离和获得全蚀病菌纯培养的前提下进行。常用的分离方法中在病根表面消毒时易杀死弱致病菌, 使分离的菌株代表性不强。因此, 为了直接从根部检测全蚀病, 还有大量的工作有待进一步开展。

4 展望

目前, *G. graminis* 诊断的主要分子技术集中在 PCR、RFLP、核酸杂交、序列分析几个方面, 尤其是以特异性 Nest-PCR 为基础的检测技术, 因其操作简便, 无需接触同位素, 不用酶切及测序, 假阳性几率小, 花费少, 结果判断简单, 可作为实验室检测的主要手段。但是 PCR 结果提供检测的信息较少, 不利于同时检测多种病原菌。随着真菌基因组学的发展, 越来越多的真菌基因信息被发现, 并且核酸的微阵列、基因芯片等高通量检测技术也逐渐用于真菌鉴定。目前已设计出几个真菌(如 *Phytophthora* 和 *Pythium* 相近种)的专化性寡核苷酸探针, 制成了微阵列, 应用于卵菌的鉴定。今后, 在大批量准确鉴定真菌方面, 高通量检测真菌的基因芯片技术将会有很好的应用前景。

[参考文献]

- [1] 王美南, 商鸿生. 陕西小麦全蚀病菌变种类型及其主要特征[J]. 西北农业学报, 2000, 9(4): 78- 82
- [2] 王美南, 商鸿生, 袁红旭. 西北地区小麦根部瓶根霉新致病类型的形态学研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(5): 874- 876
- [3] Zhang Z G, Zhang J Y, Zheng X B, et al. Molecular distinctions between *Phytophthora capsici* and *Ph. tropicalis* based on ITS sequences of

- ribosomal DNA [J]. J Phytopathology, 2004, 152: 358- 364
- [4] Anfoka G H, Khalil A B, Fattash I. Detection and molecular characterization of a phytoplasma associated with big bud disease of tomatoes in Jordan[J]. J Phytopathology, 2003, 151: 223- 227.
- [5] Mazzaglia Angelo, Anselmi Aldo, Gasbarri Andrea, et al. Development of a Polymerase Chain Reaction (PCR) assay for the specific detection of *biscogniauxia mediterranea* living as an endophyte in oak tissue[J]. Mycol Res, 2001, 105(8): 952- 956
- [6] Mauchline T H, Kerry B R, Hirsch P R. Quantification in soil and the rhizosphere of the nematophagous fungus *Verticillium chlamydosporium* by competitive PCR and comparison with selective plating[J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(4): 1846- 1853
- [7] Doorn J V an, Hollinger T C, Oudega B. A analysis of the type IV fibrillar-subunit gene *fimA* of *Xanthomonas hyacinthi*: application in PCR-mediated detection of yellow disease in hyacinths[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67(2): 598- 607.
- [8] Gomes N C M, Fagbola O, Costa R, et al. Dynamics of fungal communities in bulk and maize rhizosphere soil in the tropics[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(7): 3758- 3766
- [9] Juhnke M D, Mathre D E, Sanda D C. A selective medium for *Gaeum annomyces graminis* var. *tritici*[J]. Plant Dis, 1984, 68: 233- 236
- [10] Duffy B K, Weller D M. A semiselective and diagnostic medium for *Gaeum annomyces graminis* var. *tritici*[J]. Phytopathology, 1994, 84: 1407- 1415
- [11] Abbott L K, Holland A A. Electrophoretic patterns of soluble proteins and isoenzymes of *Gaeum annomyces graminis*[J]. Aust J Bot, 1975, 23: 1- 12
- [12] Maaserna M C, Elritha V an Zyl, Steyn P L, et al. Comparison of soluble proteins of *Gaeum annomyces graminis* var. *tritici* and *Phialophora* spp. by polyacrylamide gel[J]. Mycol Res, 1990, 94(1): 78- 82
- [13] Vijji G, Gnananickam S S, Levy M. DNA polymorphisms of isolates of *Magnaporthe grisea* from India that are pathogenic to finger millet and rice[J]. Mycol Res, 2000, 104(2): 161- 167.
- [14] Tan M K, Wong P T W, Holley M P. Characterization of nuclear ribosomal DNA (rDNA) in *Gaeum annomyces graminis* and correlation of rDNA variation with *G. graminis* varieties[J]. Mycol Res, 1994, 98: 553- 561
- [15] Tan M K. Origin and inheritance of group I introns in 26S rRNA genes of *Gaeum annomyces graminis*[J]. J Mol Evol, 1997, 44: 637- 645
- [16] Bryan G T, Labourdette E, Melton R E, et al. DNA polymorphism and host range in the take-all fungus, *Gaeum annomyces gm inis*[J]. Mycol Res, 1999, 103: 319- 327.
- [17] Borrome E S, Nelson R J, Bonman J M, et al. Genetic differentiation among isolates of *Pyricularia* infecting rice and weed hosts[J]. Phytopathology, 1993, 83: 393- 399
- [18] Herdina Harvey P, Ophel-Keller K. Quantification of *Gaeum annomyces graminis* var. *tritici* in infected roots and soil using slot-blot hybridization[J]. Mycol Res, 1996, 100(8): 926- 970
- [19] Henson J M. DNA probe for identification of the take-all fungus, *Gaeum annomyces graminis*[J]. Appl Environ Microbiol, 1989, 55: 284- 288
- [20] Henson J M. DNA hybridization and polymerase chain reaction (PCR) tests for identification of *Gaeum annomyces*, *Phialophora* and *Magnaporthe* isolates[J]. Mycol Res, 1992, 96: 629- 636
- [21] Henson J M, Goins T, Grey W, et al. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeum annomyces graminis* DNA in plants grown in artificially and naturally infested soil[J]. Phytopathology, 1993, 83: 283- 287.
- [22] Schesser K, Luder A, Henson J M. Use of polymerase chain reaction to detect the take-all fungus, *Gaeum annomyces graminis*, in infected wheat plants[J]. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 553- 556
- [23] Ward E. Improved polymerase chain reaction (PCR) detection of *Gaeum annomyces graminis* including a safeguard against false negatives[J]. Eur J Plant Pathol, 1995, 101: 561- 566
- [24] Grajal-Martin M J, Simon C J, Muchlbauer F J. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) to characterize race 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *psidi*[J]. Phytopathology, 1993, 83: 612- 614
- [25] Wetzel III H C, Demoen P H, Millener P D. Identification of darkly pigmented fungi associated with turfgrass roots by mycelial, characteristics RAPD-PCR[J]. Plant Dis, 1996, 80: 359- 364
- [26] Elliott M L, Des Jardin E A, Henson J M. Use of a polymerase chain reaction assay to aid in identification of *Gaeum annomyces graminis* from different grass hosts[J]. Phytopathology, 1993, 83: 414- 418
- [27] Fouly H M, Wilkinson H T, Domier L L. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) for identification of *Gaeum annomyces* species[J]. Soil Biol Biochem, 1996, 28: 703- 710
- [28] Augustin C, Ulrich K, Ward E, et al. RAPD-based inter- and intravarietal classification of fungi of the *Gaeum annomyces-Phialophora* complex[J]. J Phytopathology, 1999, 147: 109- 117.
- [29] Ulrich K, Augustin C, Werner A. Identification and characterization of a new group of root-colonizing fungi within the *Gaeum annomyces-Phialophora* complex[J]. New Phytol, 2000, 145: 127- 135

- [30] 王美南 禾顶囊壳(*Gaeum annamyces gram inis* (Sacc.) v. Arx & Oliver) 遗传差异研究[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2002
- [31] Fouly H M, Wilkinson H T. Detection of *Gaeum annamyces gram inis* varieties using polymerase chain reaction with variety-specific primers[J]. Plant Dis, 2000, 84: 947- 951.
- [32] Tan M K, Wong P T W. Group I introns in 26S rRNA genes of *Gaeum annamyces gram inis* as possible indicators of host specificity of *G. gram inis* varieties[J]. Mycol Res, 1996, 100: 337- 342
- [33] Wong P T W, Tan M K, Beehag G W. Confirmation of take-all patch disease in Tifdwarf hybrid couch grass bermudagrass by morphological and DNA method[J]. Austr Plant Pathol, 2000, 29: 19- 23
- [34] Ward E, Akrofi A Y. Identification of fungi in the *Gaeum annamyces-Phialophora* complex by RFLPs of PCR amplified ribosomal DNA s[J]. Mycol Res, 1994, 98: 219- 224
- [35] Bryan G T, Daniels M J, Osbourn A E. Comparison of fungi within the *Gaeum annamyces-Phialophora* complex by analysis of ribosomal DNA sequences[J]. Appl Environ Microbiol, 1995, 61: 681- 689
- [36] Ward E, Bateman G L. Comparison of *Gaeum annamyces*- and *Phialophora*-like fungal pathogens from maize and other plants using DNA methods[J]. New Phytol, 1999, 141: 323- 331.
- [37] Rachadwong S, Cramer C L, Grabau E A, et al *Gaeum annamyces gram inis* var *avenae*, *gram inis*, and *tritici* identified using PCR amplification of avenacinase-like genes[J]. Plant Dis, 2002, 86: 652- 660

The molecular techniques of diagnosis used in take-all disease

WANG Mei-nan, SHANG Hong-sheng

(Plant Protection College, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: This article reviews and summarizes the main molecular biology techniques used in the diagnosis and identification of take-all disease in recent years, and discusses the feasibility of the molecular techniques in the plant disease diagnosis

Key words: molecular biology technique; disease diagnosis; take-all disease