

大豆疫霉的分子检测^{*}

陈长卿¹, 康振生¹, 王晓杰¹, 黄丽丽¹, 左豫虎²

(1 西北农林科技大学 植保学院, 陕西 杨凌 712100;

2 黑龙江八一农垦大学 植物科技学院, 黑龙江 大庆 163319)

[摘 要] 利用核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列通用引物 ITS1/ITS4 分别获得了大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)和辣椒疫霉(*P. capsici*)的 ITS 序列, 通过获得序列设计了大豆疫霉的特异性引物 PS1 和 PS2, 并建立了分子检测方法。该方法对大豆疫霉(*P. sojae*)菌丝体和土壤中卵孢子检测的灵敏度分别为 10^{-5} ng/ μ L 和每克土壤 0.05 个卵孢子。

[关键词] 大豆疫霉; ITS 分析; PCR; 分子检测

[中图分类号] S41-30

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)08-0073-05

由大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae* Kauf. et Gerd.)引起的大豆疫霉根腐病是我国 I 类对外检疫的危险性病害, 它可在大豆生长的任何阶段危害, 引起寄主根、茎、枝和种子腐烂, 严重时造成绝产^[1]。因此, 准确、快速地检验检疫该病原菌具有重要的理论和实际意义。

目前, 对大豆疫霉(*P. sojae*)的检测常用组织分离法、叶碟诱捕法和酶联免疫吸附检测(ELISA)等方法, 但这些方法在应用过程中都存在一些缺点和不足, 如 ELISA 方法检测特异性不强, 存在假阳性现象; 叶碟诱捕法和组织分离法所耗时间过长, 检测准确率低。近年来, 随着分子生物学技术在植物病理学中的广泛应用, 特别是 PCR 技术及相关分子标记技术的应用加快了这一学科的发展。利用病原菌核糖体内转录间隔区(ITS)基因序列进行病原菌鉴定、分类、检测和病害诊断, 已受到越来越多的重视。本研究根据大豆疫霉 ITS 保守序列设计特异性引物, 建立了 PCR 检测体系, 以便为我国大豆疫霉的检验检疫提供理论基础和技术方法。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试大豆疫霉菌株 Ps111、Ps126、Ps411、597-3、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、茄腐镰刀菌(*F. solani*)、立枯丝核菌(*Rizoctonia solani*)、腐霉菌

(*Pythium* spp.)、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)及自然带菌土壤由黑龙江八一农垦大学左豫虎教授提供。美国生理小种 R1、R25、美国菌株、巴西菌株由中国农科院王晓鸣研究员提供。致病疫霉(*P. infestans*)、寄生疫霉(*P. parasitic*)、辣椒疫霉(*P. capsici*)及人工接菌土壤来源于西北农林科技大学植病研究所。

1.2 菌株的培养

供试菌株分别液培, 6 d 后收集菌丝, 冷冻干燥后备用。大豆疫霉菌(*P. sojae*)、寄生疫霉(*P. parasitic*)、致病疫霉(*P. infestans*)分别用常规胡萝卜培养液、燕麦培养液和黑麦培养液培养^[2], 其他供试菌株用常规马铃薯葡萄糖培养液培养。

1.3 大豆疫霉卵孢子悬浮液的制备

参照 Margaret 等^[3]的方法。

1.4 DNA 的提取

1.4.1 从大豆疫霉菌丝体、病残体中提取 DNA

参照 Chen 等^[4]的方法。

1.4.2 土壤基因组 DNA 的提取及纯化 参照 Zhou 等^[5]的方法并加以改进。取 1 g 含有 Ps411 卵孢子的土壤放入 5 mL 灭菌离心管中, 加入适量石英砂, 剧烈振荡 1 min。然后加 2 mL Na_3PO_4 缓冲液(0.12 mol/L, pH 8.0), 于 30 °C 振荡 15 min (160 r/min), 10 000 r/min 离心 10 min 后, 弃上清。向沉

^{*} [收稿日期] 2004-11-22

[基金项目] 国家重点基础研究发展规划(2002CB111406); 国家杰出青年基金项目(30125031); 黑龙江省自然科学基金项目(TC2005-08)

[作者简介] 陈长卿(1978-), 男, 黑龙江伊春人, 在读硕士, 主要从事植物免疫学研究。E-mail: ccqjy@163.com

[通讯作者] 康振生(1958-), 男, 四川安岳人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物免疫学研究。E-mail: kangzs@nwsuaf.edu.cn

淀中加入 3 mL DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L EDTA, 100 mmol/L Na_3PO_4 , 20 mmol/L NaCl, 1% CTAB, pH 8.0), 30 μL 蛋白酶 K (10 mg/mL) 和 0.5 mL 溶菌酶(50 mg/mL), 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 20 min (225 r/min), 随后加入 0.4 mL 20% SDS, 置 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1.5 h, 经 2~3 次冻融处理后, 室温条件下 6 000 r/min 离心 10 min, 收集上清, 加入等体积酚:氯仿:异戊醇, 12 000 r/min 离心 10 min。在上清中加 0.6 倍体积异丙醇, 4 $^{\circ}\text{C}$ 沉淀 1 h, 室温条件下 14 000 r/min 离心 15 min, 收集核酸沉淀, 经体积分数 70% 乙醇漂洗 2~3 次, 风干后, 加 100 μL 无菌水溶解 DNA, 备用。纯化方法采用 DNA 凝胶回收纯化法^[6]。

1.5 核糖体 DNA ITS 区的 PCR 扩增

ITS 区域 PCR 扩增通用引物分别为^[7]

ITS1: TCC GTA GGT GAA CCT GCG G,

ITS4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC。

PCR 反应体系为 25 μL : 10 $\times$ Buffer (750 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.1% Tween-20) 2.5 μL , 25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μL , 2.5 mmol/L dNTP 1.5 μL , ITS1/ITS4 引物 (20 ng/ μL) 各 2.0 μL , Taq 酶 1 U, 模板 DNA (20 ng/ μL) 1 μL , 加 ddH₂O 至 25 μL 。反应循环参数是: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 51.2 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min, 35 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 7 min。所用试剂及引物购自上海生工生物工程有限公司。扩增反应在 PTC-100 热循环仪上进行, PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 1 $\times$ TAE 缓冲液中电泳分析, EB 染色后用凝胶成像系统(型号 Gene Genius)分析。

1.6 PCR 产物的回收、克隆和测序

PCR 产物经凝胶回收、纯化后, 与 PGEM-T easy 载体连接后转化 *E. coli* JM 109, 经菌落 PCR 和酶切鉴定后, 挑选阳性克隆委托上海生工生物工程有限公司测序。

1.7 PCR 检测体系的建立

用 DNAMAN 软件对测序结果及 GenBank 数据库中已登录的同属疫霉菌 *P. capsici*, *P. palmivora*, *P. medicaginis*, *P. trifolii*, *P. cryptogea*, *P. cactorum* ITS 序列(登录号: AY208130, AY208126, AF266799, AF266800, AF228101, AF087480)进行多重同源性比较, 选取大豆疫霉保守序列, 用 Primer 5.0 软件设计引物。然后根据引物变性温度 T_m 值设立 55~66 $^{\circ}\text{C}$ 退火温度梯度, 并以致病疫霉 (*P. infestans*)、寄生疫霉 (*P. parasitic*)、辣椒疫霉

(*P. capsici*)、尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、茄腐镰刀菌 (*F. solani*)、立枯丝核菌 (*Rizoctonia solani*)、腐霉菌 (*Pythium* spp.)、核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 8 种病原真菌为对照, 通过引物的特异性来确定退火温度。

1.8 PCR 灵敏度检测

分别以大豆疫霉菌丝体和接种大豆疫霉卵孢子的土壤基因组 DNA 为模板, 采用梯度稀释法稀释模板, PCR 扩增检测该体系所能达到的最低理论检测量。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

从大豆疫霉菌丝体、病残体和土壤中提取的基因组 DNA 经琼脂糖凝胶电泳和分光光度计分析, 结果表明(图 1), 泳道 1、2、3 条带亮度和清晰度好, 说明提取的 DNA 量、纯度和完整性较好, 适于后续工作。



图 1 大豆疫霉菌丝体、病残体和土壤基因组 DNA 的电泳图谱

1. 大豆疫霉菌丝体 DNA; 2. 病残体 DNA; 3. 土壤基因组 DNA

Fig 1 A agarose gel electrophoresis of Genomic DNA

1. DNA from *P. sojae* mycelia;

2. DNA from diseased tissue of soybean;

3. DNA from soil with oospore of *P. sojae*

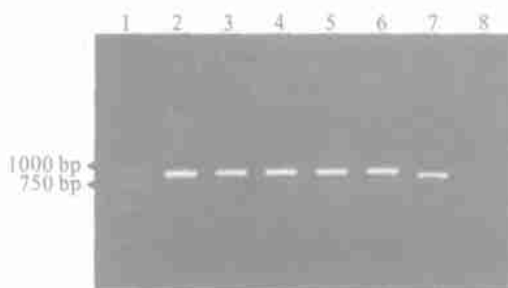


图 2 疫霉菌核糖体 DNA ITS 区的 PCR 扩增结果

1. 2 kb ladder; 2. Ps111; 3. Ps126; 4. Ps411;

5. R1; 6. R25; 7. 辣椒疫霉; 8. CK

Fig 2 PCR amplification products of ITS of rDNA of *P. sojae* *P. capsici*

1. 2 kb ladder; 2. Ps111; 3. Ps126; 4. Ps411;

5. R1; 6. R25; 7. *P. capsici*; 8. CK

2.2 疫霉菌核糖体 DNA ITS 区的 PCR 扩增

利用通用引物 ITS1/ITS4 对 Ps111、Ps126、Ps411、R1、R25 和辣椒疫霉 (*P. capsici*) 的 DNA 模

板进行 PCR 扩增, 由 PCR 产物(图 2)可以看出, 大豆疫霉(*P. sojae*)和辣椒疫霉(*P. capsici*) ITS 片段分别为 900 bp 和 750 bp 左右的特异性扩增产物。

2 3 PCR 检测体系的建立

经过序列同源性分析, 在大豆疫霉保守区设计了大小分别为 20, 21 bp 的特异性引物 PS1/PS2, 其扩增产物为 96 bp。以待测 DNA 为模板, PS1/PS2

进行 PCR 扩增, 通过特异性筛选退火温度发现, 在退火温度 59.8℃时, 所有供试大豆疫霉株均能扩增出大小约 96 bp 的特异性条带, 而其他供试菌株及无菌水未扩增出任何条带(图 3)。由此说明引物 PS1/PS2 具有较高的特异性, 可以用于大豆疫霉的分子检测。

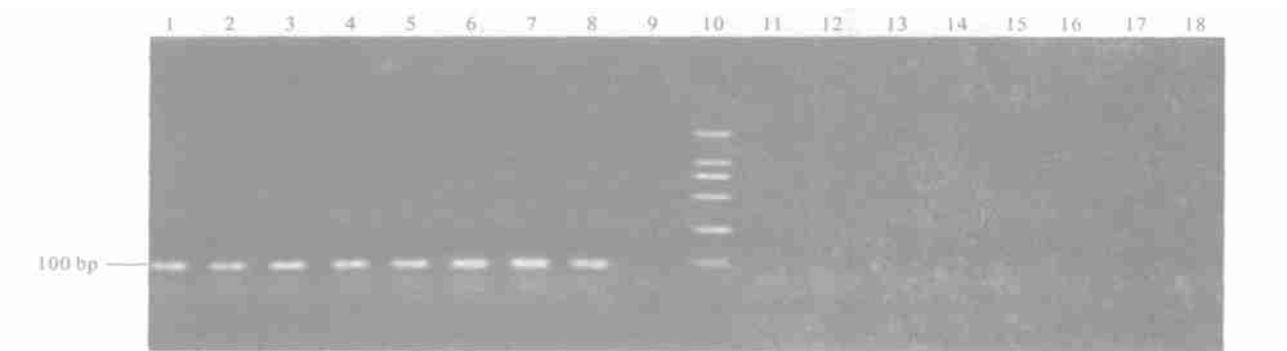


图 3 引物 PS1/PS2 对不同病原菌的特异性 PCR 检测结果

1. Ps111; 2. Ps126; 3. Ps411; 4. 597-3; 5. R1; 6. R25; 7. 美国菌株; 8. 巴西菌株; 9. CK; 10. 2 kb marker; 11. 致病疫霉; 12. 寄生疫霉; 13. 辣椒疫霉; 14. 尖孢镰刀菌; 15. 茄腐镰刀菌; 16. 立枯丝核菌; 17. 腐霉菌; 18. 核盘菌

Fig. 3 PCR amplification of DNA extraction from different fungal with specific primer PS1/PS2

1. Ps111; 2. Ps126; 3. Ps411; 4. 597-3; 5. R1; 6. R25; 7. *P. sojae* of U S A; 8. *P. sojae* of Brazil; 9. CK; 10. 2 kb marker; 11. *P. infestans*; 12. *P. parasitici*; 13. *P. capsici*; 14. *Fusarium oxysporum*; 15. *F. solani*; 16. *Rizoctonia solani*; 17. *Pythium* spp.; 18. *Sclerotinia sclerotiorum*

2 4 PCR 灵敏度检测

从 PCR 扩增结果(图 4, 5)可以看出, 菌丝体和

卵孢子 DNA 模板最低检测量分别为 10^{-5} ng/ μ L 和每 g 土壤 0.05 个卵孢子。

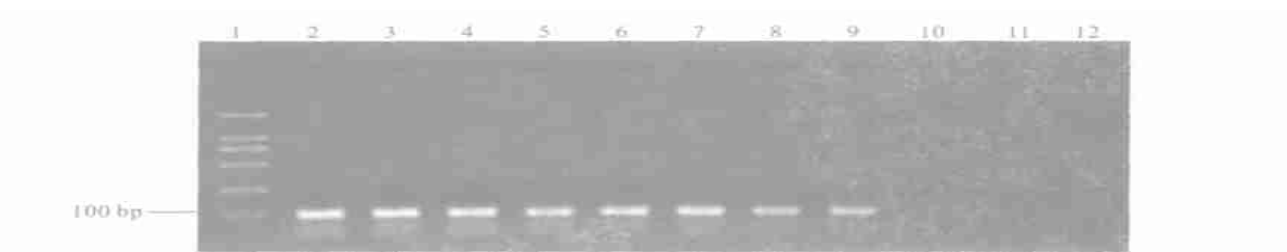


图 4 菌丝体 DNA 灵敏度检测结果

1. 2 kb marker; 2~ 11. 模板浓度分别为 20, 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ng/ μ L; 12. CK

Fig. 4 Sensitivity of PCR amplification of DNA from mycelia of *P. capsici*

1. 2 kb marker; 2~ 11. DNA concentration 20, 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} ng/ μ L; 12. CK

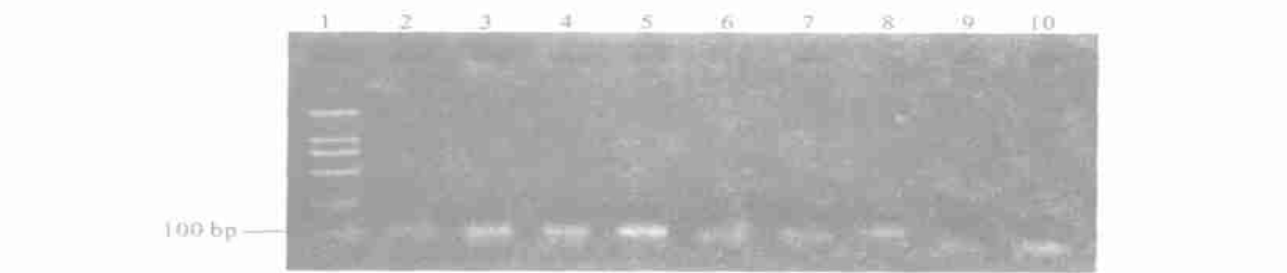


图 5 大豆疫霉卵孢子灵敏度检测结果

1. 2 kb marker; 2~ 9. 模板浓度分别为每克土壤 20, 10, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.01 个孢子; 10. CK

Fig. 5 Sensitivity of PCR amplification of gDNA from soil with oospore of *P. sojae*

1. 2 kb marker; 2~ 9. DNA concentration 20, 10, 1, 0.5, 0.2, 0.1, 0.05, 0.01(one oospore per gram soil); 10. CK

2.5 特异性引物的检测应用

用该体系对含大豆疫霉 *P. sojae* 病残体的土壤进行检测, 由图 6 可以看出, 在 96 bp 处均有 1 条清晰

的目的条带。而健康大豆植株和无大豆疫霉土壤等阴性对照未扩增出任何条带。由此可以说明, 该 PCR 检测体系对大豆疫霉的分子检测是可行的。

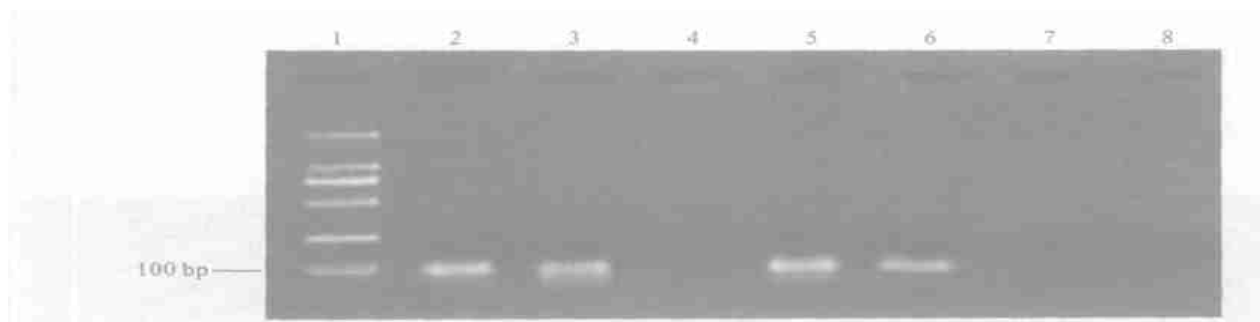


图 6 PCR 检测不同病原材料的结果

1. 2 kb marker; 2. *P. sojae* 菌丝体 DNA; 3. 病残体 DNA; 4. 健康大豆组织 DNA; 5. 人工接种卵孢子的土壤基因组 DNA; 6. 含有卵孢子的田间土壤基因组 DNA; 7. 不含 *P. sojae* 的土壤基因组 DNA; 8. CK

Fig. 6 PCR amplification products of DNA from different infested samples

1. 2 kb marker; 2. DNA from *P. sojae* mycelia; 3. Diseased sobean with *P. sojae*; 4. Healthy sobean; 5. Soil with oospore of *P. sojae* urtificially; 6. Soil with oospore of *P. sojae* from natural field; 7. Soil without *P. sojae*; 8. CK

3 讨 论

分子生物学的飞速发展使植物病理学研究提供了新的方法和手段, 以 PCR 为基础的病原菌快速检测技术以其快速、可靠的优点显示出了巨大的应用潜力。相对传统生物学方法, 分子检测特异性强, 灵敏度高, 可重复性强, 受外界因素影响较小。

真菌核糖体 DNA (rDNA) 相当保守, 但 rDNA ITS 进化相对较快。在同一属内因菌种不同而出现变异, 种间也存在一定的变异, 种内差异较小。ITS 分析法于 1990 年提出, 其优点是 rDNA 的 ITS 为多拷贝, 且较易于 PCR 扩增分离, 同时包含保守与变异序列, 易于根据保守序列中的变异位点设计特异性引物^[8]。本研究设计的 PS1/PS2 引物在检测大豆疫霉过程中表现出较高的特异性和灵敏度, 且试验时间由传统检测的 1 周缩短为 7~8 h, 大大提高了工作效率, 为海关口岸检验检疫提供了理论依据和技术保障。

大豆疫霉根腐病是典型的土传病害, 病原菌可

以通过病残体和土壤颗粒传播, 主要是以卵孢子形式存在。在试验过程中还发现, PCR 扩增含大豆疫霉卵孢子土壤基因组 DNA 时, 大豆疫霉卵孢子在模板加入量为 $0.5 \mu\text{L}^{-1}$ 左右时条带最亮。这说明可能在此浓度时, DNA 模板与引物能够充分结合, 从而有效地进行 PCR 扩增。由于粗制的土壤 DNA 样品中的蛋白质、糖类以及腐殖质等会影响 PCR 扩增效果, 因此不同的 DNA 纯化方式对检测结果会有一定影响。本研究采用凝胶回收 DNA 的纯化方式, 取得了较好的效果, 其检测灵敏度可达每克土壤 0.05 个卵孢子。

大豆疫霉根腐病是大豆生产中的毁灭性病害之一, 大豆疫霉是我国对外检疫的 I 类危险性病原真菌。病原菌的检疫是控制该病害最有效的防治措施, 本研究结果特异性强、灵敏度高、稳定性好, 不但可以为海关口岸提供快速检测危险性病原菌的方法, 还可以监测国内疫区病原菌群体动态变化, 为大豆生产及贸易往来提供技术保障。

[参考文献]

- [1] 窦坦德, 李宝筠, 沈崇尧. 快速检测大豆疫霉菌的酶联免疫吸附技术研究[J]. 植物检疫, 1997, 11(3): 138-142
- [2] 郑小波. 疫霉菌及其研究技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997: 82
- [3] Margaret Long N T, Keen O K. *Phytophthora megasperma* var. *sojae* development of wild-type strains for genetic research[J]. Phytopathology, 1975, 65: 592-597.
- [4] Chen X M, Line R F, Leung H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*[J]. Phytopathology, 1993, 83: 1489-1497.

- [5] Zhou J Z, Bruns M A, Tiedje J M. DNA recovery from soils of diverse composition[J]. Appl Environ Microbiol, 1996, 62: 316- 322
- [6] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版 金冬雁, 黎孟枫, 译 北京: 科学出版社, 1998 19- 21
- [7] 王源超, 张正光, 郑小波. 核糖体基因 ITS 作为苎麻疫霉、恶疫霉分类辅助性状的研究[J]. 菌物系统, 2000, 19(4): 485- 491
- [8] 葛芸英, 郭坚华. 甜菜银叶病菌的 PCR 检测[J]. 微生物学报, 2003, 43(2): 271- 275

Molecular detection of *Phytophthora sojae*

CHEN Chang-qing¹, KANG Zhen-sheng¹, WANG Xiao-jie¹, HUANG Li-li¹, ZUO Yu-hu²

(1 College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Plant Science and Technology Department, Heilongjiang August First and Reclamation University, Daqing, Heilongjiang 163319, China)

Abstract: Genetic PCR (polymerase chain reaction) products from the internal transcribed spacer (ITS) regions of the ribosomal DNA of *P. sojae* and *P. capsici* were cloned and sequenced. A pair of primers PS1/SP2 specific for *P. sojae* were designed according to multiple sequences analysis. PCR based on PS1/SP2 can amplify a 96 bp product from genomic DNA of *P. sojae* strains, but not other pathogens. PCR with the primers PS1/SP2 detected pathogen at a level of 10^{-5} ng/ μ L or 0.05 oospore theoretically. *P. sojae* in soils and tissues of diseased soybean can also be targeted by the molecular probe. The PCR protocol provides a rapid and reliable tool to detect *P. sojae* and identify diseases.

Key words: *Phytophthora sojae*; ITS analysis; PCR; molecular detection

欢迎订阅 2006 年《果树学报》

《果树学报》是中国农业科学院郑州果树研究所主办的国家级学术期刊, 中文园艺学核心期刊, 中国科技核心期刊, 已被美国化学文摘、俄罗斯文摘杂志、英国 CABI 等 20 余种国内外重要检索系统与数据库收录。据《中国科技期刊引证报告》(2004 年版) 统计结果, 《果树学报》的影响因子达 0.704, 已成为国内外有影响的学术期刊之一。《果树学报》着重选发密切结合我国果树科研、教学、生产实际, 反映学科学术水平和发展动向的优秀稿件, 及时报道重大科研成果、阶段性成果和科研进展情况。栏目设置有研究论文、专论与综述、研究报告、技术与方法、新品种选育快报及信息快递等; 内容包括生物技术、品种与种质资源、生理与栽培、土壤与肥料、植物保护、贮藏加工等。读者对象为果树学科的科研人员、高等农业院校师生及基层果树管理技术人员。

本刊为双月刊, 2006 年每期 128 页码, 定价 15 元, 全年 6 期共 90 元。邮发代号: 36- 93, 国际代号 BM / 1107。欢迎投稿, 欢迎订阅。

编辑部地址: 中国农业科学院郑州果树研究所 邮编: 450009

电话: 0371- 65330927/28 传真: 0371- 65330982 E-mail: chinagsxb@163.com