

小麦叶锈菌的特异性分子诊断检测技术

曹丽华^{1,2} 徐世昌² 陈万权^{2*} 刘太国² 蔺瑞明²

(1. 河南农业大学植物保护学院, 郑州 450002; 2. 中国农业科学院植物保护研究所,
植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

摘要: 小麦叶锈病由 *Puccinia triticina* 引起, 是我国小麦生产上的重要病害。本研究旨在建立小麦叶锈菌快速、准确的 PCR 诊断检测技术体系, 用于病害精准测报和综合防控。以真菌 β -微管蛋白基因的保守序列为引物, 进行小麦锈菌 gDNA 的 PCR 比较分析, 发现小麦叶锈菌具有长度为 268 bp 的特异性 DNA 片段; 序列分析后设计了 2 对专化性引物, 成功获得检测灵敏度为 5.00 pg/ μ L 模板 DNA 浓度水平的小麦叶锈菌种的特异性 SCAR 标记。对 55 个来自我国不同麦区的小麦叶锈菌标样以及其它麦类病原真菌的检测表明, 该叶锈菌标记的检测可靠性达 100%。人工接种条件下, 叶锈菌侵染 24 h 后, 即可在小麦叶片内检测到该标记。

关键词: 小麦叶锈菌; SCAR 标记; PCR 检测

Molecular diagnosis and detection of *Puccinia triticina* in China

Cao Lihua^{1,2} Xu Shichang² Chen Wanquan^{2*} Liu Taiguo² Lin Ruiming²

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, Henan Province, China; 2. State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094, China)

Abstract: Wheat leaf (brown) rust, caused by *Puccinia triticina*, is one of the important foliar diseases of wheat in the world. Our objective of this research was to develop PCR assays for rapid identification and detection of *P. triticina*, which would be utilized in the accurate forecast and seasonal control of this destructive disease. The genomic DNA of *P. triticina* and *P. striiformis* was comparably amplified by a pair of primers based on conserved β -tubulin gene sequence, and then a 268 bp specific DNA fragment of *P. triticina* was isolated and purified. Based on its sequence, another two primer sets were designed successfully to obtain the new sequence characterized amplified region (SCAR) markers of *P. triticina*, which could be amplified in all test isolates of *P. triticina*, whereas no DNA fragment was obtained in the other alien fungus species. The detection accuracy of the primer sets of BAFBY (f1) /BAFBY(r) was 5.00 pg/ μ L. The new SCAR markers of *P. triticina* can also be detected in wheat leaves post-inoculated 24 h. Development of a high-through kit for the rapid diagnosis and detection of wheat leaf rust based on the result would be anticipated in the further study.

Key words: *Puccinia triticina*; SCAR marker; PCR detection

由小麦叶锈菌 *Puccinia triticina* 引起的小麦叶锈病是世界性的禾谷类病害, 也是影响我国小麦安

全生产的重要病害。由于小麦叶锈菌生理小种结构复杂, 主要毒性类型及毒性频率不断变化, 生产上小

基金项目: 中国博士后基金(20060400539), 国家“973”计划课题(2006CB100203, 2002CB111406), 国家“863”计划课题(2006AA10Z429, 2006AA10Z1C1), 国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BAD02A16, 2006BAD08A05)

作者简介: 曹丽华, 女, 1971 年生, 副教授, 主要从事小麦锈病分子流行病学研究, email: caolihua@hotmail.com, Tel: 010-62816081

* 通讯作者(Author for correspondence), email: wqchhen112@ippcaas.cn; 收稿日期: 2007-10-31

麦品种的抗锈性丧失严重^[1-3]。因此,鉴定分析小麦叶锈菌生理小种(毒性类型)组成、系统监测病菌群体的消长动态,对于指导病害测报、抗病育种和品种布局具有重要意义。

长期以来,小麦锈病的预测预报主要基于定期、大规模的田间病情调查和室内病菌小种的活体分离、培养和鉴定。不仅耗时费工,而且其结果的准确性和可信度也在很大程度上取决于调查测报人员的技术水平和经验,难以满足快速、高通量诊断检测的实际需求。叶锈病和条锈病的苗期症状区别不甚明显,一些基层植物保护人员常常将二者混淆,不能准确区分。在小麦叶锈菌的潜育阶段,寄主的发病症状不易观察,难以界定初侵染的时期和规模。因此,有必要利用现代生物技术,研发简单易行、灵敏准确的小麦叶锈菌快速诊断和检测手段。

与传统方法相比,DNA/RNA 探针技术和聚合酶链式反应(PCR)具有强专化性、高灵敏度以及程序化试验操作等特点,现已被广泛用于丝核菌 *Rhizoctonia solani*、*R. oryzae*、*R. oryzae-sativae*^[4],炭疽菌 *Colletotrichum acutatum*^[5],多黏菌 *Polymyxa betae*^[6],黑粉菌 *Tilletia indic*、*T. walkeri*^[7]、*Ustilago hordei*^[8],镰刀菌 *Fusarium oxysporum*^[9]、*F. culmorum*、*F. graminearum*、*F. avenaceum*^[10],叶枯菌 *Stagonospora nodorum*、*Septoria tritici*^[11]等多种植物病原真菌的鉴定检测。近年来,随着基因芯片和实时 PCR 技术的发展,基于特定基因序列开发的特异 PCR 引物或探针,已被越来越多地用在病原菌的生物学、群体结构、流行动态、基因漂移等研究中。对病害诊断、病原菌鉴定而言,靶标序列的获得通常源自保守基因的序列比较或染色体组的随机探查^[12]。真菌的 β -微管蛋白基因(β -tubulin genes)序列比较保守,相对容易获得基因全长序列或设计序列专化性引物,在真菌检测的应用上仅次于 Ribosomal DNAs (rDNAs)^[13]。本研究以 β -微管蛋白基因的保守区段为引物,以小麦叶锈菌、条锈菌等病原菌的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 比较扩增,以期获得小麦叶锈菌种的专化性 PCR 检测引物及 SCAR(sequence characterized amplified region)标记,用于病害的诊断、检测和测报调查。

1 材料与方法

1.1 供试小麦病原真菌的繁殖与保藏

供试真菌由中国农业科学院植物保护研究所小麦病害组提供。其中小麦叶锈菌夏孢子的繁殖在感

病品种郑州 5389 上进行;小麦条锈菌、秆锈菌的夏孢子以及小麦白粉菌的菌丝、分生孢子均在铭贤 169 上繁殖;其它小麦病原真菌在铺垫赛璐珞膜的 PDA 培养基上培养。备用菌种在 4℃ 冰箱内暂存,或真空封存后于液氮内长期保存。

1.2 小麦病原真菌基因组 DNA(gDNA)的提取

采用 Villaréal 等^[14]的方法,略作改良。小麦 3 种锈菌和白粉菌 gDNA 分别提取自潜育期的感病小麦叶片和病原菌夏孢子或分生孢子,其它小麦病原真菌的 gDNA 则来源于营养体菌丝。感病小麦叶片或营养体菌丝直接用液氮冷冻研磨至粉状,锈菌、白粉菌孢子则采用玻璃珠震荡法破壁,其余 DNA 提取操作同常规。以适量 RNase 消化 RNA 后,采用紫外分光光度法测定 gDNA 的质量与浓度。

1.3 PCR 比较分析及小麦条锈菌特异性核酸序列的克隆、测序

PCR 分析均在 M J Research, Inc. 的 PTC-220 型 PCR 仪上进行。引物 BAF6(f):5'-ACCCACAACCGC-CAACATGCGTGA-3'和 BAF2(r):5'-CGTACCGGGCT-CGAGATCGACGAG-3'源自小麦叶枯菌 *Septoria nodorum* 的 β -微管蛋白基因的保守序列(EMBL-56922)^[15]。小麦叶锈菌和条锈菌 gDNA 的 PCR 比较扩增体系为 25 μ L,其中包括 10 $\times$ PCR Buffer (Mg^{2+} Plus) 2.5 μ L, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2.0 μ L, BAF6(f) (10 μ mol/L) 1.5 μ L, BAF2(r) (10 μ mol/L) 1.5 μ L, 模板 DNA (20 ng/ μ L) 1.0 μ L, *TaKaRa Taq* (5 U/ μ L) 0.5 μ L, ddH₂O 16.0 μ L。PCR 反应条件为:94℃ 5 min, 1 个循环;94℃ 30 s, 50℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 个循环;72℃ 5 min 1 个循环。扩增产物用质量分数 1.5 的琼脂糖凝胶, 0.5 $\times$ T BE 电泳缓冲液电泳分离,以 ULTRA-URLET PRODUCTS 凝胶成像系统记录分析电泳谱型。

在紫外灯下快速切取小麦叶锈菌的特异性 PCR 条带,以深圳依诺金生物有限公司 Catcher Spin GEK-050 凝胶回收试剂盒回收纯化,交北京奥科生物技术公司双向测序。测序结果以 NCBI 的 Basic Local Alignment Search Tool 进行序列拼接,得到特异性 PCR 片段的序列全长;继而以 BLASTN 程序与 GenBank、EMBL、DDBJ、PDB 中的序列进行同源性比对。

1.4 小麦叶锈菌 SCAR 标记的转化与验证

根据 PCR 比较扩增获得的特异性片段的全长序列,以 Primer 3.0 软件在线设计 SCAR 特异性引物,交北京赛百盛基因技术有限公司化学合成。通过进

一步优化 PCR 反应体系及循环条件,获得小麦叶锈菌特异性的 SCAR 标记。

梯度稀释叶锈菌模板 DNA,进行 PCR 扩增,确定该 SCAR 标记的检测灵敏度。以小麦主要病原真菌即小麦条锈菌 *Puccinia striiformis*、秆锈菌 *Puccinia graminis*、赤霉菌 *Fusarium graminearum*、白粉菌 *Erysiphe graminis*、纹枯菌 *Rhizoctonia cerealis*、叶枯菌 *Alternaria trititica*、根腐菌 *Cochliobolus sativus*、光腥黑粉菌 *Tilletia foetida* (Wallr.) Liro、矮腥黑粉菌 *Tilletia controversa* Kühn 为对照,检测 2005—2007 年度采集的 55 个小麦叶锈菌标样,以确定该 SCAR 标记在小麦叶锈菌检测上的特异性。

1.5 感病小麦叶片内叶锈菌的检测

以小麦叶锈菌菌株(070430)室内苗期接种郑州 5389,接种菌量为 5 mg/盆,对照处理喷滑石粉。接种后,每 24 h 取样小麦叶片,以无菌水清洗叶面后,液

氮速冻,储存于 -80°C ,用于小麦锈病显症前叶锈菌的检测。

2 结果与分析

2.1 PCR 比较分析与小麦叶锈菌特异性核酸序列的克隆、测序

用引物 BAF6(f)和 BAF2(r)组合对小麦叶锈菌和条锈菌的 gDNA 进行 PCR 比较扩增。结果表明,小麦叶锈菌具有长度为 268 bp 的特异性 DNA 片段(图 1)。回收、纯化该片段,双向测序后进行 BLAST (bl2seq) 拼接分析,获得该特异性 PCR 片段的全长序列 (GenBank accession EU084038) (图 2)。在线运行 BLASTN 程序表明,除两端引物 BAF6(f)和 BAF2(r)外,该特异性 PCR 片段与 GenBank、EMBL、DDBJ 和 PDB 中的序列没有同源性。

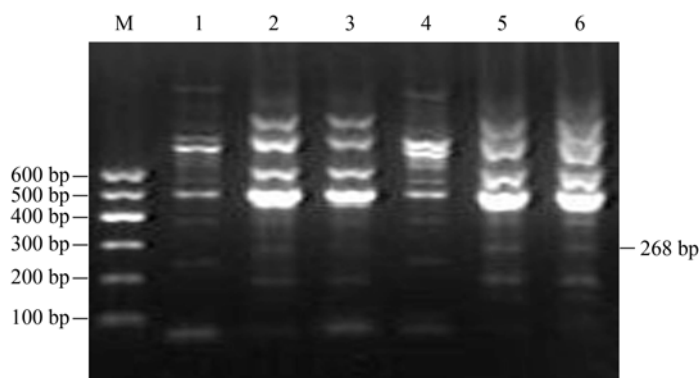


图 1 引物组合 BAF6(f)/BAF2(r)对小麦叶锈菌和条锈菌基因组 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig.1 The PCR patterns of gDNA of *P. trititica* and *P. striiformis* by the primer set BAF6(f)/BAF2(r)

注:M;DNA 分子量标记;1~6 分别为:*P. striiformis* (CYR32)、*P. trititica* (071807)、*P. trititica* (072403)、*P. striiformis* (CYR29)、*P. trititica* (072406)、*P. trititica* (071804)。Note: M; DNA marker; 1-6; *P. striiformis* (CYR32), *P. trititica* (071807), *P. trititica* (072403), *P. striiformis* (CYR29), *P. trititica* (072406), *P. trititica* (071804)。

```

1  acccacaacc gccaacatgc gtgatgatcc gagtctttata taaccctact ttctccaccc
61 accagccctc tcgcgccctcc gatgtaggct ggatcgtaag caggacaccg cggtatgtcc
121 acagaagcag gatgcatgta gctgacggcg ggttgctgcg tctggtttgg cttgagcagc
181 ttgcagcggc cgcggtcttt gtgccgacga tgggctacct gatgagcccc cgggcccggc
241 agcactcgtc gatctcgagc ccggtacg

```

图 2 小麦叶锈菌特异性 PCR 片段的全长序列

Fig. 2 Nucleotide sequence of the specific band of *P. trititica*

2.2 SCAR 标记的扩增

根据小麦叶锈菌特异性 DNA 片段序列,以 Primer 3.0 软件在线设计叶锈菌的特异性扩增引物,由北京赛百盛基因技术有限公司化学合成。其引物名称和序列为:BAF6(f): 5'-CCTCCGATGTAGGCTG-

GAT-3';BAF6(r): 5'-CCGATGTAGGCTGGATCGTA-3';BAF2(f): 5'-CTCATCAGGTAGCCCATCGT-3';BAF2(r): 5'-CTCATCAGGTAGCCCATCGT-3'。

试验中对检测 PCR 的各项参数进行了优化:10 × PCR Buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL, dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L) 2.0 μL, BAF6(f)/

BAFBY(f2) (10 μmol/L) 1.5 μL, BAFBY(r) (10 μmol/L) 1.5 μL, 模板 DNA (20 ng/μL) 1.0 μL, TaKaRa Taq(5 U/μL) 0.5 μL, ddH₂O 14.5 μL; PCR 反应条件为:94 ℃ 5 min,1 个循环;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,35 个循环;72 ℃ 5 min 1 个循环。用

上述引物对叶锈菌菌株进行扩增结果表明:以引物组合 BAFBY(f1) 与 BAFBY(r) 扩增,可得到长度为 151 bp 的小麦条锈菌 SCAR 标记;以引物组合 BAFBY(f2) 与 BAFBY(r) 扩增,可得到长度为 148 bp 的小麦叶锈菌 SCAR 标记(图 3)。

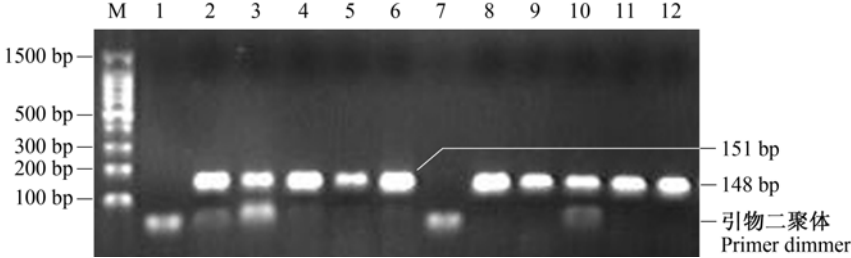


图 3 小麦叶锈菌 SCAR 标记的 PCR 扩增

Fig. 3 The PCR amplification of SCAR markers of *P. tritici*

注:M;DNA 分子量标记;1~6 的扩增引物为 BAFBY(f1)/BAFBY(r);7~12 的扩增引物为 BAFBY(f2)/BAFBY(r)。1,7: ddH₂O; 2,8: 071807; 3,9: 072403; 4,10: 051804; 5,11: 070301; 6,12: 070502。Note: M: DNA marker; 1-6 was amplified with primer sets BAFBY(f1)/BAFBY(r); 7-12 was amplified with primer sets BAFBY(f2)/BAFBY(r). 1,7: ddH₂O; 2,8: 071807; 3,9: 072403; 4,10: 051804; 5,11: 070301; 6,12: 070502.

2.3 SCAR 标记的灵敏度与特异性检测结果

梯度稀释叶锈菌模板 DNA 浓度为 1.00 pg/μL、2.50 pg/μL、5.00 pg/μL、10.00 pg/μL、100.00 pg/μL、1.00 ng/μL、10.00 ng/μL 和 100.00 ng/μL,选用

特异性引物 BAFBY(f1)/BAFBY(r) 进行扩增。结果表明,从 5.00 pg/μL~100.00 ng/μL 的模板 DNA 中均检测到长度为 151 bp 的 SCAR 标记,且模板 DNA 浓度越大,扩增出的产物量越高(图 4)。

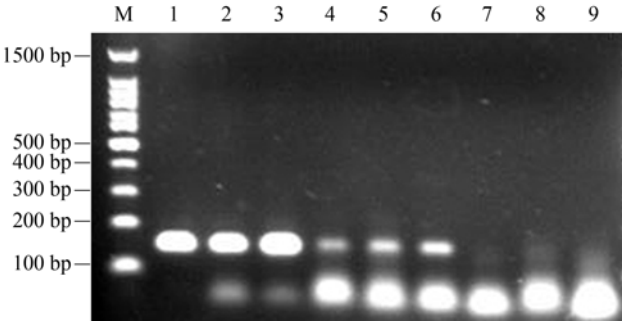


图 4 小麦叶锈菌 SCAR 标记的灵敏度检测

Fig. 4 The sensitivity test of the SCAR marker

注: M;DNA 分子量标记;1~8 的模板浓度分别为 100.00 ng/μL、10.00 ng/μL、1.00 ng/μL、100.00 pg/μL、10.00 pg/μL、5.00 pg/μL、2.50 pg/μL 和 1.00 pg/μL; 9:ddH₂O。Note: M: DNA marker; 1-8: template DNA with the concentration of 100.00 ng/μL, 10.00 ng/μL, 1.00 ng/μL, 100.00 pg/μL, 10.00 pg/μL, 5.00 pg/μL, 2.50 pg/μL and 1.00 pg/μL; 9: ddH₂O.

以小麦主要病原菌(条锈、秆锈、赤霉、白粉、纹枯、叶枯、根腐、光腥、矮腥病菌)为对照,对供试的 55 个小麦叶锈菌菌株进行回检。结果表明,该 SCAR 标记对小麦叶锈菌的检测具有高度的专化性,在所有参检的小麦叶锈菌标样中均呈现阳性扩增;而在对照的 15 个小麦条锈菌菌株、2 个小麦秆锈菌株及其它小麦病原真菌中则没有扩增到该标记

(图 5)。

2.4 感病小麦叶片内叶锈菌的 PCR 检测

以小麦叶锈菌菌株 070430 在室内苗期接种郑州 5389,接种后每 24 h 取样。结果表明,引物组合 BAFBY(f1)/BAFBY(r) 及引物组合 BAFBY(f2)/BAFBY(r) 都可以在显症前的小麦叶片中成功地检测到相应的小麦叶锈菌 SCAR 标记(图 6)。

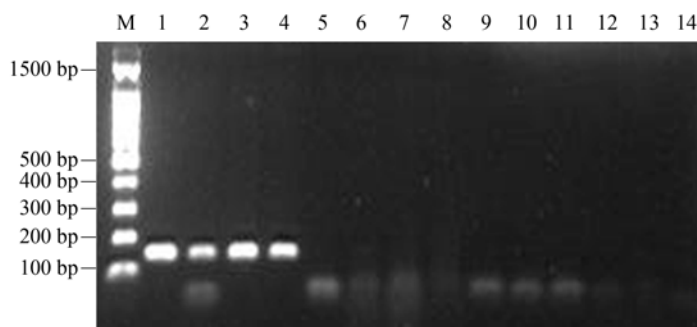


图 5 小麦叶锈菌 SCAR 标记的特异性检测

Fig. 5 The specificity detection of the SCAR marker of *P. triticina*

注: M: DNA 分子量标记; 1~4 的模板 DNA 分别为 *P. triticina* 标样 052404、070301、070510、072409; 5~13 的模板 DNA 分别为 *P. striiformis*、*P. graminis*、*Fusarium graminearum*、*Erysiphe graminis*、*Rhizoctonia cerealis*、*Alternaria triticina*、*Tilletia foetida*、*Tilletia contraversa*、*Cochliobolus sativus*; 14: ddH₂O。Note: M: DNA marker; 1~4: 052404, 070301, 070510, 072409 (*P. triticina*); 5~13: template DNA of *P. striiformis*, *P. graminis*, *Fusarium graminearum*, *Erysiphe graminis*, *Rhizoctonia cerealis*, *Alternaria triticina*, *Tilletia foetida*, *Tilletia contraversa*, *Cochliobolus sativus*; 14: ddH₂O.

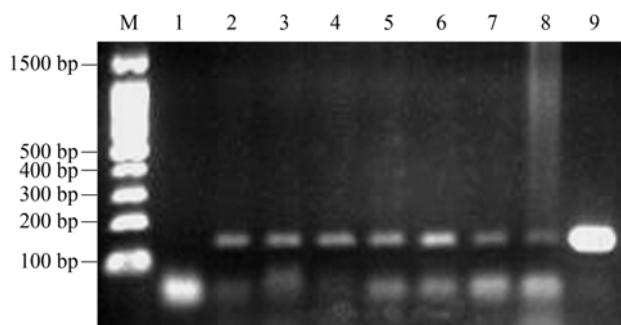


图 6 感病小麦叶片内叶锈菌的 PCR 检测

Fig. 6 The PCR detection of wheat leaves infected by *P. triticina*

注: M: DNA marker; 1: CK, 滑石粉处理的小麦叶片; 2~8: 接种后 1、2、3、4、5、6、7 天的 wheat 叶片; 9: 070430 (*P. triticina*)。Note: M: DNA marker; 1: CK, wheat leaves inoculated with French chalk; 2~8: wheat leaves post-inoculated 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 d; 9: 070430 (*P. triticina*).

3 讨论

随着现代生物技术的发展,PCR 扩增、核酸杂交、基因芯片、实时 PCR 等技术已广泛应用于植物病理学研究的各个领域,使病原物的鉴定检测、病害发生流行动态监测以及病原物毒性、适应性或寄主品种抗性水平的评价更加简单、迅捷^[13-14]。

本研究以真菌 β -微管蛋白基因的保守序列为引物,进行小麦锈菌 gDNA 的 PCR 比较分析,发现小麦叶锈菌的特异性 PCR 片段,并设计了 2 对专化性引物,成功获得小麦叶锈菌的特异性 SCAR 标记,其检测的灵敏度可达 5.00 pg/ μ L 模板 DNA 浓度水平。在检测来自我国不同麦区的 55 个小麦叶锈菌标样中,该标记均稳定显现,而在小麦条锈、秆锈及

其它麦类病原真菌上则没有“污染性”扩增,说明研发的小麦叶锈菌种的特异性 SCAR 标记具有较高的可靠性。在此研究基础上,可进一步制备出小麦叶锈菌种的分子诊断、检测试剂盒,供我国县级以上植保植检部门推广应用。

小麦叶锈菌成功感染寄主小麦后,一般需要 9~14 天甚至更长时间才能产生新的传播体(病菌夏孢子)。室内接种试验表明,小麦叶锈菌侵入寄主后 24 h,即可利用该 SCAR 标记检测到叶锈菌的特异性 DNA 片段,并且在受侵染的小麦叶片内,随着病原菌潜育时间的延长,该 SCAR 标记表现出增量表达。因此,在小麦生产实践中,可以在病害潜育阶段进行 PCR 检测,根据叶锈菌特异性 SCAR 标记的出现概率进行病害早期预警,以提早开展病害流行

测报和及时指导病害防治。这对于降低小麦叶锈病的防治成本、阻断病害的扩散蔓延、确保我国小麦安全生产具有重要意义。

参 考 文 献(References)

- 1 陈万权, 胡长程, 张淑香. 中国小麦叶锈菌群体的毒性基因分析. 中国农业科学, 1993, 26(2): 17-23
- 2 河北农业大学小麦叶锈病研究组. 小麦叶锈菌生理分化研究中的问题和改进意见. 河北农业大学学报, 1992, 15(3): 91-94
- 3 袁景顺, 王焕如, 朱之靖. 小麦叶锈菌生理小种监测及其观点和方法的改进. 华北农学报, 1991, 6: 115-120
- 4 Johansson A, Turner H C, McKay G J, et al. A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheath-blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzae-sativae*. FEMS Microbiology Letters, 1998, 162(2): 289-294
- 5 Sreenivasaprasad S, Sharada K, Brown A E, et al. PCR-based detection of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. Plant Pathology, 1996, 45(4): 650-655
- 6 Mutasa E S, Chwarszcynska D M, Asher M J C. Single-tube, nested PCR for the diagnosis of *Polymyxa betae* infection in sugar beet roots and colorimetric analysis of amplified products. Phytopathology, 1996, 86(5): 493-497
- 7 Frederick R D, Snyder K E, Tooley P W, et al. Identification and differentiation of *Tilletia indica* and *T. walkeri* using the polymerase chain reaction. Phytopathology, 2000, 90(9): 951-960
- 8 Willits D A, Sherwood J E. Polymerase chain reaction detection of *Ustilago hordei* in leaves of susceptible and resistant barley varieties. Phytopathology, 1999, 89(3): 212-217
- 9 Moricca S, Ragazzi A, Kasuga T, et al. Detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *vasinfectum* in cotton tissue by polymerase chain reaction. Plant Pathology, 1998, 47(4): 486-494
- 10 Schilling A G, Moller E M, Geiger H H. Polymerase chain reaction-based assays for species-specific detection of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum*, and *F. avenaceum*. Phytopathology, 1996, 86(5): 515-522
- 11 Beck J J, Ligon J M. Polymerase chain reaction assays for the detection of *Stagonospora nodorum* and *Septoria tritici* in wheat. Phytopathology, 1995, 85(3): 319-324
- 12 McCartney H A, Foster S J, Fraaije B A, et al. Molecular diagnostics for fungal plant pathogens. Pest Management Science, 2003, 59(2): 129-142
- 13 Atkins S D, Clark I M. Fungal molecular diagnostics: a mini review. Journal of Applied Genetics, 2004, 45(1): 3-15
- 14 Villaréal L M M A, Lannou C, De Vallavieille-Pope C, et al. Genetic variability in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* populations sampled on a local scale during natural epidemics. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6138-6145
- 15 Fraaije B A, Lovell D J, Coelho J M, et al. PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria tritici* and *Stagonospora nodorum*) and rust (*Puccinia striiformis* and *Puccinia recondita*) diseases. European Journal of Plant Pathology, 2001, 107(9): 905-917