

实时荧光 PCR 技术对小麦矮腥黑穗病菌的检测

高 强^{1,2} 吴品珊¹ 朱水芳¹ 戴良英³ 廖慧敏²

(中国检验检疫科学研究院 北京 100029)¹ (吉首大学生物资源与环境科学学院 吉首 416000)²

(湖南农业大学植物保护学院 长沙 410128)³

摘要: 通过对小麦矮腥黑穗病菌 (TCK) 及其近似种小麦网腥黑穗病菌 (TCT) 和小麦光腥黑穗病菌 (TFL) 的 rDNA 序列 ETS 区间测序比较分析, 找出了 TCK 相对于 TCT 和 TFL 的特异性序列, 并根据 TCK 的特异性序列设计了实时荧光 PCR 探针, 利用实时荧光 PCR 技术成功实现了对 TCK 的检测。

关键词: TCK, TCT, TFL, ETS, 实时荧光 PCR

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2005) 06-0074-04

Detection and Identification of *Tilletia controversa* Kühn by Real-time fluorescent PCR

GAO Qiang^{1,2} WU Pin-Shan¹ ZHU Shui-Fang¹ DAI Liang-Ying³ LIAO Hui-Min²

(Chinese Academy of Inspection and Quarantine, Beijing 100029)¹

(College of Resource and Environment, Jishou University, Jishou 416000)²

(College of Plant Protection, Hunan Agriculture University, Changsha 410128)³

Abstract: By analysing the ribosome gene (rDNA) sequences in externally transcribed spacer (ETS) of wheat *T. controversa* (TCK) and its similar species *T. caries* (TCT) and *T. foetida* (TFL). The special sequences of TCK's ETS have been found. And designed Taqman probe according to the special sequences, TCK has been successfully detected by using Real-time Fluorescent PCR.

Key words: TCK, TCT, TFL, ETS, Real-time fluorescent PCR

小麦矮腥黑穗病菌属担子菌亚门 (Basidiomycotina)、冬孢菌纲 (Teliomycetes)、黑粉菌目 (Ustilaginales)、腥黑粉菌科 (Tilletiaceae)、腥黑粉菌属 (*Tilletia*)。小麦矮腥黑穗病菌是一种常见的小麦病菌, 也是我国一类检疫性病菌, 在我国日常的口岸检疫工作中我们发现有几类腥黑穗病菌冬孢子形态非常相似, 即小麦网腥黑穗病菌 *T. caries* (以下简称 TCT)、小麦矮腥黑穗病菌 *T. controversa* (以下简称 TCK) 和小麦光腥黑穗病菌 *T. foetida* (以下简称 TFL), 这给口岸检疫工作带来了很大的麻烦。几十年来, 国内外一些学者主要从腥黑穗病菌的形态学、血清学、生化等方面对它们进行鉴别区分, 本文探索了一种分子生物学方法, 实现了对 TCK 的有效检测。

真菌 rDNA 一般由转录区和非转录区构成, 转录区包括 5S, 5.8S, 17~18S, 25~28SrDNA 基因, 这些基因由两个内转录间隔区 (internal transcribed space, ITS) 分开, 此外在 17~18SrDNA 基因上游还有外转录间隔区 (external transcribed space, ETS^[1])。结构基因、内外转录间隔区和非转录间隔区分别以不同的速率进化, 转录区序列比较

通讯作者 Tel: 0743-8563021, E-mail: gaoqiang021@yahoo.com.cn

收稿日期: 2005-02-21, 修回日期: 2005-04-20

保守,可分别在属、科、目水平上用于不同生物种的分类鉴定研究;外转录间隔区(ETS)进化较快,是进行属以下种、亚种、变种甚至菌株分类的常用手段,多用于属内种间比较或种内群体比较^[2-4],本文比较分析了 TCK、TCT 和 TFL3 种腥黑穗病菌形态学相似种的 ETS 区间的碱基序列差异,发现了 TCK 相对于 TCT 和 TFL 的特异性序列,并利用实时荧光 PCR 检测方法实现了对 TCK 的检测。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

小麦矮腥黑穗病菌 TCK 株系 TCK-1 (美)、TCK-2 (美)、TCK-3 (德国)、TCK-4 (土耳其)、TCK-5 (加拿大),小麦网腥黑穗病菌 TCT-1、TCT-2、TCT-3、TCT-4、TCT-5,小麦光腥黑穗病菌 TFL-1、TFL-2、TFL-3、TFL-4、TFL-5;(没注明的菌种全部来自中国质检总局动植物检疫试验所真菌室)。

1.2 实验方法和步骤

1.2.1 DNA 的制备 (CTAB 法):取病菌各实验种冬孢子培养菌丝采用 CTAB 法分别提取细胞总 DNA。

1.2.2 引物的设计:利用扩增真菌 (basidiomycetes) ETS 区间的引物对 INVSRI1R 和 5SRNAR。引物序列为 INVSRI1R ACTGGCAGAATCAACCAGGTA 5SRNAR ACCGCATCCCGTCTGAT 北京赛百胜公司合成。

1.2.3 PCR 扩增反应:反应体系总体积 50 μ L,包含:10mmol/L Tris-HCl;50mmol/L KCl;1.5mmol/L MgCl₂;dNTP 浓度各 250 μ mol/L;引物浓度 100nmol/L;10~100ng 模板 DNA;2U TaqDNA 聚合酶。扩增程序设定为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3min,94 $^{\circ}$ C 变性 1min,54 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,设定 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 1 \times TAE 缓冲液中电泳,EB 染色。结果凝胶电泳照相选择特异性序列带紫外线下切割。

1.2.4 特异性片段的回收、克隆及序列测定:切胶法回收目的 DNA 片段,并进行目的 DNA 片段的克隆,最后取含目的 DNA 片段的菌液进行 DNA 序列测定 (上海基康生物公司测序)。

2 结果与分析

2.1 INVSRI1R/5SRNAR 扩增目的 DNA 片段电泳

电泳结果见图 1。

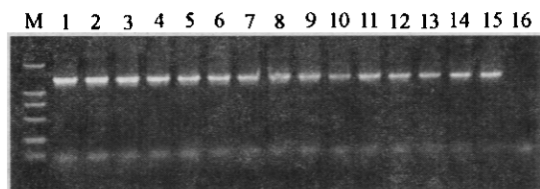


图 1 ETS PCR 产物电泳图

1, 2, 3, 4, 5 TCT, 6, 7, 8, 9, 10 TFL, 11, 12, 13, 14, 15 TCK, 16 空白, M DNA ladder

2.2 INVSRI1R/5SRNAR 扩增目的 DNA 片段测序 (DNAMAN 软件分析后部分序列)

测序结果见图 2。

ETS-3	CTGGCCATCGGCAATTATATTCACTTCTTTCTCCCTTGCA	440
ETS-2	CTGGCCATCGGCAATTATATTCACTTCTTTCTCCCTTGCA	439
ETS-1	CTGGCCATCGGCAATTATATTCACTTCTTTCTCCCTTGCA	439
Consensus	ctggccatcgccaattatattcacttctttctcccttgca	
ETS-3	ACCAAAGAGCGGAAACACAATGATTGTCAAACAGAGTCTG	480
ETS-2	ACCAAAGAGCGGAAACACAATGATTGTCAAACAGAGTTTG	479
ETS-1	ACCAAAGAGCGGAAACACAATGATTGTCAAACAGAGTTTG	479
Consensus	accaaagagccgaaacacaatgattgtcaaacagagtgtt	
ETS-3	CATATTTAATAATATGCTACTACTCAGCGCGCTGATCTCA	520
ETS-2	CATATTGTTAGATATGCTACTACTCAGCGCGCTGATCTCA	519
ETS-1	CATATTGTTAGATATGCTACTACTCAGCGCGCTGATCTCA	519
Consensus	catattgttacatattgctactactcagcgcgctgatctca	
ETS-3	GGCGAGTCAGGAACCCAAAGGCACCTGACCAACACCCCTCC	560
ETS-2	GGCGAGTCAGGAACCCAAAGGCACCTGACCAACACCCCTCC	559
ETS-1	GGCGAGTCAGGAACCCAAAGGCACCTGACCAACACCCCTCC	559
Consensus	ggcgagtcaggaacccaaggcacctgaccaacacccctcc	

图2 TCT、TFL、TCK ETS 区间部分序列比较

ETS-1 为 TCT, ETS-2 为 TFL, ETS-3 为 TCK

2.3 测序结果分析及实时荧光 PCR 引物和探针的设计

从图2结果可以看出 TCK ETS 区间序列在 DNAMAN 软件分析后的第 478、487、488、489、491 位有 5 个位置靠近的不同于 TCT 和 TFL 的碱基。因此可利用这一段特异性序列设计 TaqMan 荧光探针实现对 TCK 的检测。使用引物和探针设计软件 Primer 5.0 设计 TCK ETS 特异性区间引物 PF: 5'-CCG TTG CAA CCA AAG AGC C-3' (433~451 碱基), PR: 5'-TCC TGA CTC GCC TGA GAT CA -3' (513-532 碱基)。同理在 PF/PR 引物对扩增序列区间设计检测 TCK 的特异性探针 P (5'-CAC CAA TGA TTG TCA AAC AGA GTC TGC ATA-3')。此探针序列包括 TCK 的第 478、487、488、489、491 位 5 个碱基。探针 5 端标记报告荧光染料 6- Carboxyfluorescein (FAM), 3 端标记淬灭荧光染料 Tetramethylcarboxyrhodamine (TAMRA)。

2.4 实时荧光 PCR 反应体系设计

反应体系总体积 25 μ L, 包含: dH₂O 15.6 μ L; 10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L; 25mmol/L MgCl₂ 2 μ L; 10 mmol/L dNTP 0.5 μ L; 20 μ mol/L PF 0.5 μ L; 20 μ mol/L PR 0.5 μ L; 20 μ mol/L 探针 P 1 μ L; 5U/ μ L Taq 酶 0.2 μ L; 模板 DNA 10~100ng。

2.5 实时荧光 PCR 技术对 TCK 的检测

利用优化好的条件对 TCK 进行检测, 检测对象包括 TCK 5 个不同的菌株, TCT 1

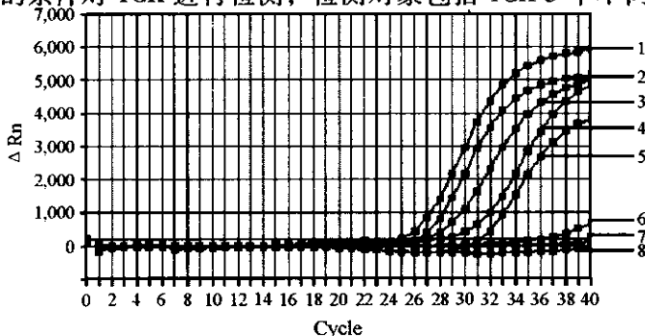


图3 实时荧光 PCR 技术对 TCK 的检测

1 TCK-1, 2 TCK-2, 3 TCK-3, 4 TCK-4, 5 TCK-5, 6 TCT, 7 TFL, 8 空白

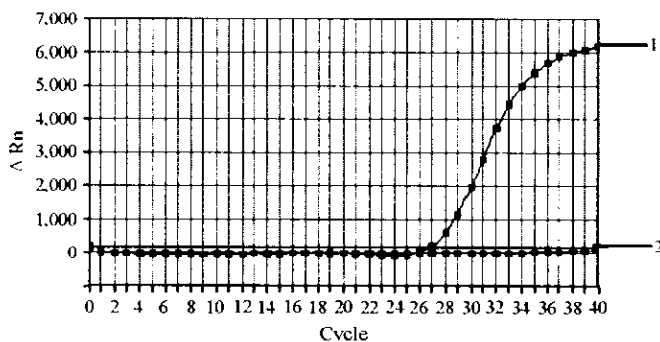


图 4 实时荧光 PCR 技术对 TCK 的检测

1 TCK-1, 2 空白

个随机抽样菌株, TFL 1 个随机抽样菌株, 实验设 3 组重复, 每组重复换用不同的 TCT 菌株和 TFL 菌株, 检测结果如图 3 和图 4 所示, 图 3 中 TCK 1~5, 它表示已检测到荧光信号, 水平线依次为 TCT: 6, TFL: 7, 空白 8, 水平线表示没有收集到荧光信号, 没有被检测到。因此利用引物对 PF、PR 和特异性探针 P 可以实现对 TCK 的检测, 即区分出 TCK 与 TCT、TFL。图 4 是对感病小麦粒 (单个 TCK 菌株) 的检测。

3 讨论

在 TCK、TCT 和 TFL 这 3 种形态学相似种的鉴定中, TCK、TCT 和 TFL 冬孢子形态相似, 特别是 TCK 和 TCT 由于冬孢子表面都有网纹而增加了实际检疫鉴定工作的困难, 早期文献认为 TCK 是 TCT 的一个变种。后来将它的分类地位上升到种。例如 Russell^[5] 用分子生物学技术从 TCK 和 TCT 两个种的菌丝和孢子以及他们的杂交 F1 代得到相似的电泳核型证明两个病菌的染色体是同源的。他们的工作进一步地揭示了这两个种可能是一个单一种的变种。而且不同来源菌株的遗传学和生化实验也证明了 TCK、TCT 和 TFL 仅仅是一个种的变种的证据。在 1944 年 Holton^[6] 发现田间存在 TCK、TCT、TFL 3 种腥黑穗病菌间的天然杂交, 其后代可能出现分离, 表现在形态学上, 既有近似于其亲本的后代, 也有网纹极其致密的、饰纹呈脑纹状的等各种中间型冬孢子类型, 以及前两种病菌冬孢子网脊高度值的交叉重叠存在; 表现在致病性上, 则可能产生新的小种。这些证据充分证明了这 3 种腥黑穗病菌之间存在密切的亲缘关系^[7]。

利用核糖体基因序列分析法, 在核糖体基因的外部转录间隔区找到了 TCK 相对于 TCT 和 TFL 的特异性序列。根据此特异性序列设计 Taqman 探针, 利用实时荧光 PCR 技术从 TCK、TCT 和 TFL 中鉴定出了 TCK。并实现了对感病小麦材料的检测。

参考文献

- [1] Pieter V, Rene H, Marjo B, *et al.* Nucleic Acids Research, 1995, **23** (21): 4407~4414.
- [2] Duran R, Fisher G W. Wash State Univ, 1991, **34**: 138~142.
- [3] Russell P J, Wagner K D. Mol Genetics, 1994, **196**: 275~282.
- [4] Hausner G, Reid J, Klassen C R, *et al.* Bot, 1992, **71**: 52~63.
- [5] Russell B W, Mills D. Phytopathology, 1994, **84**: 576~582.
- [6] Holton C S. Phytopathology, 1994, **34**: 586~592.
- [7] 章 正. 植物病理学报, 1980, **10**: 89~94.