

Neotyphodium coenophialum 和 *N. lolii* 的 PCR 检测*

刘跃庭 廖 芳 崔铁军 黄国明** 罗加凤

(天津出入境检验检疫局 天津 300456)

摘要: 以 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 及其近似种 *N. huerfanum*、*N. chisosum*、*N. aotearoae*、*N. sp.* 共 6 个种 18 个菌株及苇状羊茅和多年生黑麦草 8 个品种的供试种子, 通过对 Tub-2 基因引物 IS1 ~ IS3 和 NC25 基因引物 F1 ~ R1 进行扩增, 设计了种子中 *Neotyphodium* 属内生真菌套式扩增的通用引物 Tub-2-F ~ Tub-2-R, 设计了 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 的特异引物 F3 ~ R3, 建立了 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 的菌丝常规 PCR 和单粒种子套式 PCR 检测方法, 使 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 的检测达到了单粒种子的水平, 缩短了检测时间。建立的 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* PCR 检测方法特异性强, 结果可靠, 检测速度快。

关键词: *N. coenophialum*, *N. lolii*, PCR, 检测, 单粒种子

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2006) 04-0134-05

PCR Detection of *N. coenophialum* and *N. lolii**

LIU Yue-Ting LIAO Fang CUI Tie-Jun HUANG Guo-Ming** LUO Jia-Feng

(Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300456)

Abstract: 18 fungal strains including *N. coenophialum*, *N. lolii*, *N. huerfanum*, *N. chisosum*, *N. aotearoae*, *N. sp.* and 8 varieties of grass seeds belonging to *Festuca arundinacea* and *Lolium perenne* have been studied. With amplification of IS1 ~ IS3 and F1 ~ R1 of genomic DNA, the primers Tub-2-F ~ Tub-2-R from Tubulin-2 gene and F3 ~ R3 from NC25 gene have been designed. A PCR method to detect *N. coenophialum* and *N. lolii* was established, and also a nested-PCR method to detect *N. coenophialum* and *N. lolii* in single seed was established. These PCR detection methods are strongly special and much credible and rapid-speeded.

Key words: *N. coenophialum*, *N. lolii*, PCR, Detection, Single seed

内生真菌 (endophyte 或 endophytic fungi) 是指生活史中某一阶段生活在植物组织内, 对植物没有引起明显病害症状的一类真菌。这是内生真菌的广义定义, 包括菌根真菌和所有植物病原真菌在内的一个大的类群^[1]。但多数研究者倾向于一种狭义的概念—内生真菌是存在于健康植物体内, 形成不明显侵染的一类真菌 (本文将采用此概念)^[2]。内生真菌与植物的关系多种多样, 既可以是互利的, 也可以是暂时对宿主无害的寄生关系或中性关系。

苇状羊茅 (*Festuca arundinacea*) 和多年生黑麦草 (*Lolium perenne*) 是世界上重要的禾本科牧草, 其营养价值高, 为各类家畜所喜食, 广泛用于放牧草地的建植中。Bacon 首次报道了牛采食被苇状羊茅内生真菌 (*Acremonium coenophialum*, 现更名为 *N. coenophialum*) 侵染的苇状羊茅所发生的中毒病 (夏季综合症)^[3], 80 年代初, Fletcher 和 Harvey 发现多年生黑麦草内生真菌 (*A. lolii*, 现更名为 *N. lolii*) 与羊的黑麦

* 科技部基金资助项目 (No. 2001BA804A22)

** 通讯作者 Tel: 022-25792182, E-mail: hgm315@163.com

收稿日期: 2005-10-13, 修回日期: 2006-01-19

草蹒跚病 (Ryegrass stagger) 有直接关系^[4]。有毒内生真菌 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 曾对美国、新西兰等国家的畜牧业造成巨大经济损失, 国外对内生真菌的研究工作非常重视。

目前我国对有毒内生真菌 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 研究开始逐步深入, 刘跃庭、聂立影等对苇状羊茅和黑麦草中有毒内生真菌进行了分离培养^[5,6], 聂立影应用 AP-PCR 方法对 *N. lolii* 进行了初步鉴定, 本文建立了有毒内生真菌 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 快速、准确、特异性强的 PCR 检测方法, 检测灵敏度达到单粒种子。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株包括苇状羊茅内生真菌 *N. coenophialum* 和多年生黑麦草内生真菌 *N. lolii* 及其近似种 *N. huerfanum*、*N. chisosum*、*N. aotearoae*、*N. sp.* 共 6 种 18 个菌株, 见表 1。供试种子共计 8 个品种, 见表 2。

表 1 供试菌株

序号	菌种编号	拉丁学名	寄主	寄主来源
1	TJN1	<i>N. coenophialum</i>	<i>F. arundinacea</i>	进境美国种子
2	TJN2	<i>N. coenophialum</i>	<i>F. arundinacea</i>	进境美国种子
3	TJN3	<i>N. coenophialum</i>	<i>F. arundinacea</i>	进境美国种子
4	TJN4	<i>N. coenophialum</i>	<i>F. arundinacea</i>	进境美国种子
5	TJN5	<i>N. coenophialum</i>	<i>F. arundinacea</i>	进境美国种子
6	TJN6	<i>N. coenophialum</i>	<i>F. arundinacea</i>	进境美国种子
7	TJN7	<i>N. coenophialum</i>	Commercial mushroom	美国菌种库 ATCC 90664
8	TJN8	<i>N. lolii</i>	<i>L. perenne</i>	进境美国种子
9	TJN9	<i>N. lolii</i>	<i>L. perenne</i>	进境美国种子
10	TJN10	<i>N. lolii</i>	<i>L. perenne</i>	进境澳大利亚种子
11	TJN11	<i>N. lolii</i>	<i>L. perenne</i>	进境澳大利亚种子
12	TJN12	<i>N. lolii</i>	<i>L. perenne</i>	进境新西兰种子
13	TJN13	<i>N. lolii</i>	<i>L. perenne</i>	进境新西兰种子
14	TJN14	<i>N. huerfanum</i>	<i>Festuca arizonica</i>	美国菌种库 ATCC 64040
15	TJN15	<i>N. chisosum</i>	<i>Stipa eminens</i>	美国菌种库 ATCC 64037
16	TJN16	<i>N. aotearoae</i>	<i>Echinopogon ovatus</i>	美国菌种库 ATCC MYA-1229
17	TJN17	<i>N. aotearoae</i>	<i>Echinopogon ovatus</i>	美国菌种库 ATCC MYA-1234
18	TJN18	<i>N. sp.</i>	<i>Achnatherum inebrians</i>	美国菌种库 ATCC MYA-1228

表 2 供试种子

序 号	拉 丁 学 名	品 种	带 菌 率	来 源
a	<i>F. arundinacea</i>	Ky31	62.5%	美国
b	<i>F. arundinacea</i>	Rebel sentry	63.0%	美国
c	<i>F. arundinacea</i>	Southeast	53.0%	美国
d	<i>F. arundinacea</i>	Bargena II	0	美国
e	<i>L. perenne</i>	Gator	89.5%	美国
f	<i>L. perenne</i>	Victorian	68.6%	澳大利亚
g	<i>L. perenne</i>	MD warrior	33.3%	新西兰
h	<i>L. perenne</i>	Turf	0	美国

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取: (1) 菌丝基因组 DNA 的提取: *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 及其近似种基因组 DNA 的提取: 提取方法参照 Moller 等^[7], 稍作修改。采用 Perkin Elmer 公司制造的 Lamda35 型紫外可见光双光束分光光度计测量提取菌丝 DNA 的浓度和纯度。(2) 单粒种子 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 的基因组 DNA 的提取: 采用上海生工基因组 DNA 纯化试剂盒提取种子中 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 的基因组 DNA。

1.2.2 引物的设计: (1) 通用引物 Tub-2-F ~ Tub-2-R 的设计: 根据 Robert 所设计的 Tub-2 基因的引物 IS1 ~ IS3, 对 18 个菌株提取的 DNA 进行 PCR 扩增和序列测定, 发现这个基因并不能提供设计有效特异引物序列位点, 但能设计种子中 *Neotyphodium* 属内生真菌套式扩增的通用引物: Tub-2-F 5' -AGCTCGGAGGTACCATTGTA -3', Tub-2-R 5' -TCAAACCGGTCAGTCCGTAA-3'。(2) 特异引物 F3 ~ R3 的设计: 根据 GenBank 中的 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* NC25 基因序列, 设计引物 F1 ~ R1 进行了 18 个菌株的 DNA 扩增, 进行序列测定, 据此设计特异性引物 F3 ~ R3: F3 5' - ATTCTTTTTTACGCCAC-CCT -3', R3 5' - AGTTGCCCCGATTCCGAT -3'。

1.2.3 菌丝基因组 DNA 通用引物的 PCR 扩增: (1) 菌丝基因组 DNA Tub-2-F ~ Tub-2-R 的扩增: 按以下次序, 将各成分加入 PCR 管内混合, 反应总体积为 30 μ L: 0.5 μ L TaqDNA 聚合酶 (5U/ μ L)、10mmol/L Tris-HCl、50mmol/L KCl (pH8.3)、1.5mmol/L MgCl₂、200 μ mol/L dNTP、300nmol/L 引物 (Tub-2-F ~ Tub-2-R)、模板 DNA: 1 μ L。循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预热 5min, 然后进入循环反应: 94 $^{\circ}$ C 变性 20s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20s, 72 $^{\circ}$ C 20s, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存。电泳及成像观察。(2) 菌丝基因组 DNA F3 ~ R3 的扩增: 混合液制备同 Tub-2 通用引物的扩增, 引物为 (F3 ~ R3)。循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预热 5min, 然后进入循环反应: 94 $^{\circ}$ C 变性 20s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存, 电泳及成像观察。

1.2.4 单粒种子中 *N. coenophialum* 与 *N. lolii* 的套式扩增: (1) 单粒种子中 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* Tub-2 基因的套式扩增: 第 1 轮: 混合液制备同 Tub-2 通用引物的扩增, 引物为 IS1 ~ IS3。循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预热 1min, 然后进入循环反应: 94 $^{\circ}$ C 变性 15s, 60 $^{\circ}$ C 退火 1min, 循环 15 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存; 第 2 轮: 反应混合液制备同第 1 轮, 只是引物改为 Tub-2-F ~ Tub-2-R, 模板 DNA 为第 1 轮扩增产物 1 μ L。循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预热 5min, 然后进入循环反应: 94 $^{\circ}$ C 变性 20s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20s, 72 $^{\circ}$ C 20s, 循环 40 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存。电泳及成像观察。(2) 单粒种子中 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* NC25 基因的套式扩增: 第 1 轮: 混合液制备同 Tub-2 基因的第 1 轮扩增, 引物为 F1 ~ R1, 循环参数为 94 $^{\circ}$ C 预热 5min, 然后进入循环反应: 94 $^{\circ}$ C 变性 20s, 54 $^{\circ}$ C 退火 20s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45s, 循环 15 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存; 第 2 轮: 混合液制备同第 1 轮, 引物为 F3 ~ R3, 模板 DNA 为第 1 轮扩增产物 1 μ L; 循环参数为: 94 $^{\circ}$ C 预热 5min, 然后进入循环反应: 94 $^{\circ}$ C 变性 20s, 60 $^{\circ}$ C 退火 20s, 72 $^{\circ}$ C 30s, 循环 40 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 7min, 4 $^{\circ}$ C 保存。电泳及成像观察。

2 实验结果

2.1 Tub-2-F ~ Tub-2-R 对部分供试 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 菌株及近似种的 PCR 扩增

所有近似种和部分供试 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 菌株均被成功扩增, 片段大小约为 150bp, 水对照无扩增 (见图 1)。

2.2 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* NC25 特异引物的 PCR 扩增

近似种 TJN15、TJN14、TJN18、TJN16、TJN17 均没有扩增。TJN7 以及部分供试 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 菌株均被成功扩增，TJN7 和 *N. coenophialum* 的供试菌株 (TJN1、TJN3、TJN5、TJN6) 片段大小约为 530bp，*N. lolii* 菌株 (TJN8、TJN9、TJN10、TJN12) 片段大小约为 380bp，水对照无扩增 (见图 2)。

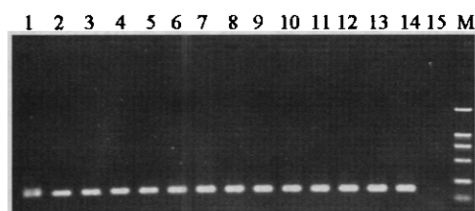


图 1 Tub-2-F ~ Tub-2-R 对部分供试材料的 PCR 扩增结果

1~14 分别为 TJN7、TJN15、TJN14、TJN18、TJN16、TJN17、TJN1、TJN3、TJN5、TJN6、TJN8、TJN9、TJN10、TJN12，15 水对照，M 2,000bp DNA marker (由上而下各带大小分别为 2,000bp，1,000bp，750bp，500bp，250bp 和 100bp)

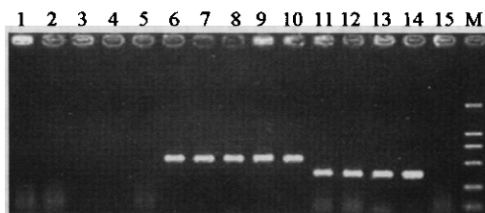


图 2 F3 ~ R3 对部分供试材料的 PCR 扩增结果 1~14 分别为 TJN15、TJN14、TJN18、TJN16、TJN17、TJN7、TJN1、TJN3、TJN5、TJN6、TJN8、TJN9、TJN10、TJN12，15 水对照 M 2,000bp DNA marker (同图 1)

2.3 单粒种子中 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* Tub-2 基因片段的套式扩增

N. coenophialum 的菌株 TJN1、*N. lolii* 的菌株 TJN8 及 a、b、c、e、f、g 等品种经过第 1 轮 IS1 ~ IS3 和第 2 轮 Tub-2-F ~ Tub-2-R 的套式扩增，均得到预期大小约为 150bp 的片段，不含内生真菌的 d 和 h 及水对照无对应的片段 (见图 3)。

2.4 单粒种子中 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* NC25 基因片段的套式扩增

N. coenophialum 的菌株 TJN1、*N. lolii* 的菌株 TJN8 及 a、b、c、e、f、g 等品种经过第 1 轮 F1 ~ R1 和第 2 轮 F3 ~ R3 的套式扩增，TJN1 和 a、b、c 均得到预期大小约为 530bp 的片段，TJN8 及 e、f、g 均得到预期大小约为 380bp 的片段，不含内生真菌的 d 和 h 及水对照无对应的片段 (图 4)。

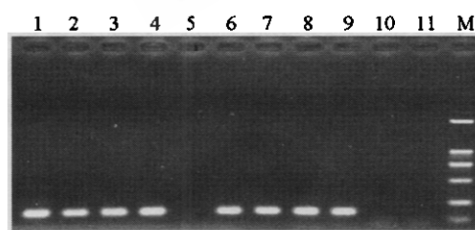


图 3 Tub-2-F ~ Tub-2-R 对单粒种子套式 PCR 扩增结果

1~5 分别为 TJN1、a、b、c、d，6~10 分别为 TJN8、e、f、g、h，11 水对照，M 2,000bp DNA marker，同图 1

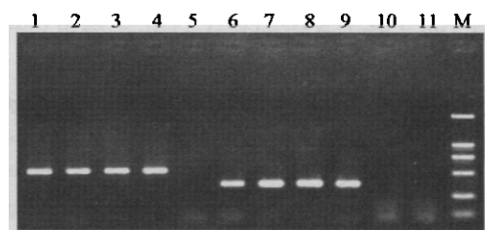


图 4 F3 ~ R3 对单粒种子套式 PCR 扩增结果 各泳道同图 3

3 讨论

内生真菌的检测最早采用的是苯胺蓝染色镜检法，此法简便易行，结果直接明了，现在仍然广泛使用，但该方法不能对内生真菌准确鉴定到种。在对国内外牧草种子和草坪草种子内生真菌的检测中，可用该方法作为一种比较简便实用的初筛，为用分离

培养和 PCR 方法进行进一步鉴定提供参考。

内生真菌的分离培养是菌种检测与鉴定（包括经典的形态学鉴定与分子生物学鉴定）的基础。经分离纯化，根据内生真菌形态特征如菌落特征、菌丝的生长特性、产孢特性等进行鉴别，但这一过程时间比较长，刘跃庭等对 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 的分离培养需要一个月以上的时间^[5]，同时部分内生真菌比较难以培养，或在人工培养基上的生长慢，不产孢或产孢能力弱。从已报道的研究结果看，内生真菌不产孢菌株占总菌株数的比例有的高达 41.3%^[8]，这些不产孢菌株无法用经典形态学方法鉴定，给分类鉴定带来困难。而 PCR 检测方法弥补了传统检测鉴定方法的不足，对分离培养得到的疑似菌株可以在比较短的时间内进行鉴定。

随着分子生物学技术的快速发展，PCR 技术开始应用在内生真菌的检测上。Robert 设计了基于 Tubulin-2 基因引物用来检测苇状羊茅中 *Neotyphodium* 属内生真菌^[9]。Christina 介绍了利用微卫星 PCR 进行指纹分析，建立了利用 5 个位点的荧光标记引物进行种的鉴定的复杂方法^[10]。目前我国对有毒内生真菌研究开始逐步深入，刘跃庭、聂立影等对苇状羊茅和黑麦草中有毒内生真菌进行了分离培养，聂立影应用 AP-PCR 方法对 *N. lolii* 进行了初步鉴定，本文克服了以往研究的不足，建立了一套完整的快速、准确的菌丝 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 及种子中两种内生真菌的 PCR 检测体系，具有重要的理论价值和应用价值。

本文设计了有毒内生真菌菌丝 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 基于 NC25 基因的特异性引物 F3 ~ R3，PCR 扩增产物的大小分别约为 530bp 和 380bp，优化实验条件，建立了 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 菌丝的常规 PCR 检测体系。通用引物 IS1 ~ IS3 的 PCR 扩增可以作为质量控制，来检测菌丝基因组 DNA 的提取是否成功，同时可以初步确定分离的内生真菌是否属于 *Neotyphodium* 属真菌。

本文在菌丝常规 PCR 检测方法的基础上，建立了单粒种子 *N. coenophialum* 和 *N. lolii* 的 PCR 检测方法，进一步缩短了检测时间，从而可以快速准确和灵敏地检测苇状羊茅和多年生黑麦草种子中的内生真菌 *N. coenophialum* 和 *N. lolii*。单粒种子中内生真菌 Tub-2 基因片段的套式 PCR 扩增可以作为质量控制，用来检验种子中内生真菌基因组 DNA 的提取质量，同时可以初步确定种子中内生真菌是否为 *Neotyphodium* 属真菌。为了进一步缩短检测时间和提高检测水平，还需进行两种内生真菌的实时荧光 PCR 检测方法的研究。

参 考 文 献

- [1] Siegel M R, Latch G C, Luttrell E S. Microbial Ann Rev Phytopathology, 1987, 25: 193 ~ 315.
- [2] Carroll G. Ecology, 1988, 69: 2 ~ 9.
- [3] Bacon C W, Porter J K, Robbins J D, et al. Applied Environmental Microbiology, 1977, 34: 576 ~ 581.
- [4] Fletcher L R, Harvey I C. New Zealand Veterinary Journal, 1981, 32: 139 ~ 140.
- [5] 刘跃庭, 崔铁军, 黄国明, 等. 植物检疫, 2005, 19 (4): 193 ~ 197.
- [6] 聂立影, 陈 磊, 任安芝, 等. 微生物学通报, 2005, 32 (1): 10 ~ 14.
- [7] Moller E M, Bahnweg G, Sandermann H, et al. Nucleic Acids Res, 1992, 20: 6115 ~ 6116.
- [8] Fisher P J, Sutton B C, Petrini L E, et al. Nova Hedwigia, 1994, 59: 195 ~ 200.
- [9] Moon Christina D. Appl Environ Microbiol, 1999, 65 (3): 1268 ~ 1279.
- [10] Doss Robert P. Plant Dis, 1998, 82 (7): 738 ~ 740.