

小麦矮腥黑穗菌差异片段筛选与分子检测体系的建立

年四季 殷幼平 袁 青 夏玉先 王中康*

(重庆大学生物工程学院, 重庆大学基因工程研究中心, 重庆市功能基因及调控技术重点实验室 重庆 400030)

摘 要 采取随机扩增 DNA 多态性(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)引物介导的半特异 PCR 技术(RAPD primer mediated hemi-specific PCR, RM-PCR), 在从不同地域征集的 18 个小麦矮腥黑穗菌(*Tilletia controversa* Kühn, TCK)菌株和 29 个小麦网腥黑穗病菌(*Tilletia caries* (DC) Tul, TCT)菌株的总基因组 DNA 中筛选鉴定出 TCK 独有的大小为 1322bp 差异基因组片段。根据该片段序列设计筛选出 2 对特异性引物 CQUTCK2/CQUTCK3 和 CQUTCK4/CQUTCK5, 均可以从 18 个 TCK 菌株的菌丝体和冬孢子 DNA 中稳定地扩增出 747bp 和 200bp 的单一靶带 DNA, 而在 29 个 TCT 菌株的菌丝体或冬孢子 DNA 均无任何扩增产物。以腥黑穗菌属通用引物对 CQUK6/CQUK7 为内置对照, 可以确定被检样品是否含 PCR 抑制物质进而判断检测体系是否正确, 同时有效地排除样品检测结果的假阳性和假阴性。采用建立的 TCK 特异 PCR 检测技术体系, 实现简单而快速地鉴定小麦矮腥黑穗菌冬孢子或罹病小麦组织中侵染菌丝体的目的。

关键词: TCK; TCT; 差异片段; 内置对照

中图分类号: Q78, Q93 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)04-0725-04

由小麦矮腥黑穗菌(*Tilletia controversa* Kühn, TCK)引起的小麦矮腥黑穗病(Wheat dwarf bunt disease, DB), 是麦类黑穗病中危害最大、极难防治的国内外检疫性病害之一^[1, 2]。腥黑穗病菌中 TCK 与其近源种小麦网腥黑穗病菌(*Tilletia caries* (DC) Tul, TCT)冬孢子大小、网脊高度等指标交叉重叠, 形态学鉴别时容易混淆^[3], 生化鉴定操作耗时费事, 难以满足快速通关、田间早期诊断和病原鉴定的需求。因此建立 TCK 早期、快速、灵敏、准确的分子检测方法很有必要。而 TCK 与 TCT 在 rRNA 分子水平上(Intergenic Transcribed Spacer Region, ITS)同源性极高, 不易区分。国内外学者曾经利用 rRNA 的转录间区(ITS)序列分析、重复片段 PCR(repetitive-sequence-based PCR, Rep-PCR)基因指纹鉴别等方法对腥黑穗菌的种内及种间差异进行遗传分析, 但都没有发现能够稳定的区分 TCK 和 TCT 菌株有用的靶标基因^[4-6]。

采用随机扩增 DNA 多态性(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)引物介导的半特异性 PCR 方法(RAPD primer mediated hemi-specific PCR, RM-PCR)是一种将特异性引物与 RAPD 随机引物用于不对称复性温度的 PCR 扩增方法。在缺乏全基因组信息和 ITS 不能区别 TCK 及其近源种的情况下, 依据端粒相关序列(Telomere associated-sequence, TAS)高度多态性的显著特点, 利用端粒重复序列设计的特异性引物来扩增端粒相邻的序列。采用 RM-PCR 技术, 对近源种 TCK

和 TCT 的基因组差异片段进行筛选。用筛选的差异片段设计特异性引物对, 建立 PCR 检测体系, 用于种子带菌检验、麸皮、土壤带菌检测以及田间病害诊断, 并为 TCK 分子检测试剂盒的研制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 18 个 TCK 菌株由美国犹它州小谷物资源保存中心 Dr. Blair Gotes 惠赠, 属于美国北方小麦种植区经小麦鉴别寄主接种试验鉴定的 TCK 不同生理小种^[7]。29 个 TCT 菌株除部分在国内不同省区麦田采集外均与上述来源相同。大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 购置上海生物工程公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: Taq DNA Polymerase (promega), dNTPs (promega), 琼脂糖凝胶回收试剂盒(上海博亚生物技术公司), 克隆载体 pMD18-T(Takara), 10bp 随机引物(上海生物工程公司合成), PCR 仪(Bio-Rad), 电泳仪(Bio-Rad), 凝胶成像系统 Versadoc(Bio-Rad), DU640 紫外分光光度计(BECKMAN), J-20XP 高速冷冻离心机(BECKMAN), 5417R 离心机(Eppendorf)。

1.2 腥黑穗菌冬孢子萌发和菌株培养

萌发和培养方法参见文献^[8]进行操作。

基金项目: 国家 863 计划(2006AA10Z434); 农业部重点攻关项目(2006-37)

* 通讯作者。Tel/Fax 86-023-65120489; E-mail: zkwan646@sina.com

作者简介: 年四季(1977-), 男, 安徽人, 硕士研究生, 研究方向为分子微生物。E-mail: sijianian@hotmail.com

其他作者: 李敏惠

收稿日期: 2006-12-04; 接受日期: 2007-01-12; 修回日期: 2007-05-10

△ 王中康. 植物病害生物分子检验检疫技术研究及固相化检测试剂盒研制. 重庆大学博士学位论文, 2006.

1.3 基因组 DNA 的提取

采用氯化苜法提取基因组 DNA 具体操作参见文献 [9]。取提取的 DNA 1 μ L 于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 鉴定提取的 DNA 质量。

1.4 TCK、TCT 差异序列片段的筛选

为筛选 TCK 差异基因序列片段, 用 TCK 18 个菌株, TCT 29 个菌株的菌丝体基因组 DNA 作为模板, 采用不对称复性温度 PCR, 以不同的随机引物与端粒特异性引物 CQUTCK₁ 配对分别扩增 TCK 和 TCT 不同菌株的菌丝体基因组 DNA。端粒特异性引物 CQUTCK₁ 5' 端含有 2~3 个真菌端粒保守重复序列寡核苷酸, 3' 端分别添加 1~3 个选择性碱基^[10-12]。扩增程序: ① 94 $^{\circ}$ C 4min, 1 个循环; ② 高严谨性循环: 94 $^{\circ}$ C 30s, 53 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 5 个循环; ③ 复合循环: 共进行 10 个复合循环, 每个复合循环依次包括: a. 2 个高严谨性循环, b. 1 个低严谨性循环: 94 $^{\circ}$ C 30s, 36 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min; ④ 72 $^{\circ}$ C 10min。

1.5 差异片段的克隆、测序

比较 TCK、TCT DNA 扩增电泳条带, 选择差异目的条带回收纯化, 与 pMD18-T Vector 连接, 转化至感受态大肠杆菌 JM109 中, 经氨苄青霉素和蓝白斑筛选以及 PCR 验证为阳性克隆子后测序。

1.6 特异引物设计和嵌套式 PCR 验证

根据 TCK、TCT 差异片段序列, 应用引物设计软件 primer express 设计 TCK 专化嵌套引物 CQUTCK₂/CQUTCK₃; CQUTCK₄/CQUTCK₅, 引物序列见表 1。分别以 18 个 TCK 菌株、29 个 TCT 菌株基因组 DNA 为模板, 进行嵌套式 PCR 验证。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 2min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 60 $^{\circ}$ C 30s, 72 $^{\circ}$ C 45s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 8min。

表 1 本研究所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

Name	Sequence(5'→3')
P23-BA0166	AAGCGGCAG
CQUTCK ₁	CCCTAAACCCTAACCTAACCCWAA
CQUTCK ₂	TCTAACTTACCTGCGGATGG
CQUTCK ₃	ACGCACTGACGGGTGGATA
CQUTCK ₄	AGTGCTGAGCCGAAAAGGT
CQUTCK ₅	TTCTGGGCTC CACGACGTAT
CQUTC ₆	CCC ATGATCTATATTCGA AAC
CQUTC ₇	CAGAGTCCTCAAGATGCGGTG

1.7 灵敏度验证

PCR 反应体积为 25 μ L, 引物为 CQUTCK₄/CQUTCK₅, PCR 反应条件同 1.6。模板用 10 倍梯度稀释的 TCK 基因组 DNA 1 μ L (100 pg ~ 10fg), 健康小麦基因组 DNA、TCT 基因组 DNA 和纯水作对照。

1.8 内置对照引物与特异性引物鉴别 TCK、TCT

腥黑穗菌属通用引物 CQUTC₆/CQUTC₇ 作为内置对照引物^[13]与特异性引物 CQUTCK₂/CQUTCK₃ 和 CQUTCK₄/CQUTCK₅ 共同扩增 TCK、TCT。同时设置健康小麦基因组

DNA 和纯水阴性对照。

2 结果

2.1 基因组 DNA 提取

采用氯化苜法分别提取了 TCK、TCT 不同菌株菌丝的基因组 DNA, 用 RNaseA 去除 RNA, 紫外分光光度仪测定, 其 A₂₆₀/A₂₈₀ 比的值为 1.8 左右。DNA 的浓度为 1~3 μ g/ μ L。0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 得到大于 21kb 的 DNA 片段, RNA 去除干净。

2.2 TCK 特异 DNA 片段的筛选

不同的随机引物与端粒特异性引物 CQUTCK₁ 配对分别扩增 TCK 和 TCT 不同菌株, 结果随机引物 P23-BA0166 和 CQUTCK₁ 配对在 18 种 TCK 菌株中都能扩增得到一条 1322bp 的条带, 而在 29 种 TCT 菌株中没有扩增条带产生, 表明该片段对 TCK 特异性较高(图 1)。

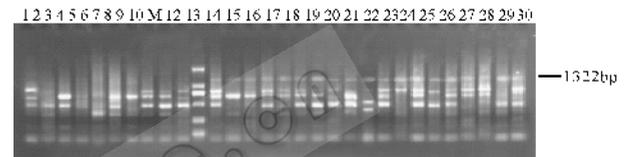


图 1 随机引物 CQUTCK₁/P23-BA0166 筛选 TCK 特异性片段

Fig. 1 Selection of specific fragment of TCK with primers CQUTCK₁/P23-BA0166. 1~10. Amplification of TCT 1~TCT 10 with primers CQUTCK₁, P23-BA0166; M. Marker DL2000(100bp, 250bp, 500, 750bp, 1000bp, 2000bp); 11~28. Amplification of TCK 1~TCK 18 with primers CQUTCK₁, P23-BA0166; 29. Amplification of TCK mixture with primers CQUTCK₁, P23-BA0166.

将该差异性片段 AT 克隆到大肠杆菌 JM109 中, 测序。测序结果已经提交 GenBank 数据库, 登录号为: No. DQ266258。在 GenBank 数据库中比对, 结果显示所获得的片段特异性极高, 与 TCT 及腥黑穗菌属的种类均无同源性。

2.3 引物专一性

以 TCK、TCT 基因组 DNA 为模板, 进行嵌套式 PCR 验证。结果表明用 CQUTCK₂/CQUTCK₃ 引物对扩增 18 个 TCK 菌株的基因组 DNA, 得到一条 747bp 单一靶带, 而 29 个 TCT 菌株的基因组 DNA 没有得到扩增。随机挑选 TCK、TCT 各 5 个菌株的基因组 DNA 并用引物对 CQUTCK₄/CQUTCK₅ 进行扩增, 结果 TCK 基因组 DNA 能扩增得到一条 200bp 的单一靶带, 而 TCT 基因组 DNA 则无扩增。说明此 1322bp 的 DNA 片段特异性较高, 引物对 CQUTCK₂/CQUTCK₃; CQUTCK₄/CQUTCK₅ 为 TCK 特异性引物并可用其来区别鉴定 TCK 与 TCT(图 2)。

2.4 检测灵敏度

引物 CQUTCK₄/CQUTCK₅ 在模板量为 100 pg ~ 10 fg 的范围内均可扩增出 TCK 目标靶带, 当模板量降到 10fg 时, 扩增的靶带很微弱。可见用常规 PCR 进行 TCK 检测的模板量达到 10fg 时就达到了 PCR 的检测下限(图 3)。

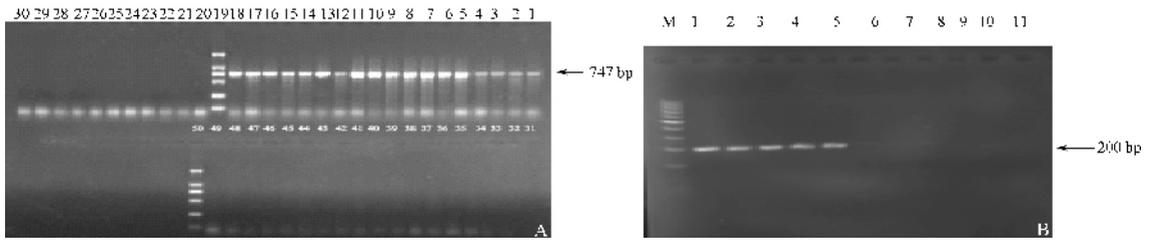


图 2 TCK 特异性引物 CQUTCK₂/CQUTCK₃ (A) 和 CQUTCK₄/CQUTCK₅ (B) 扩增 TCK、TCT 基因组 DNA
 Fig.2 Amplification of genomic DNA of TCK, TCT with specific primers CQUTCK₂/CQUTCK₃ (A) and with specific primers CQUTCK₄/CQUTCK₅ (B). A : 1 ~ 18. TCK1 ~ TCK18 ; 19 ~ 48. TCT1 ~ TCT29 ; 49. Negative control. B : M. 100bp DNA ladder ; 1 ~ 5. TCK ; 6 ~ 10. TCT ; 11. Negative control.

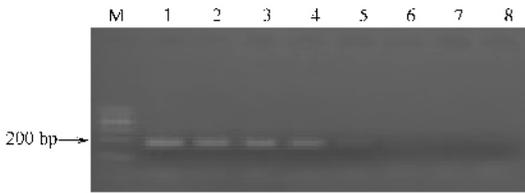


图 3 TCK 引物 CQUTCK₄/CQUTCK₅ 检测灵敏度测定
 Fig.3 The sensitivity of detection of TCK with specific primers CQUTCK₄/CQUTCK₅. M. Marker I 100 bp-600 bp (TIANGEN) ; 1 ~ 5. 100 pg ~ 10 fg Genomic DNA of TCK ; 6. 5 ng of genomic DNA of TCT ; 7. 7 ng of genomic DNA of healthy wheat ; 8. Water blank.

2.5 内置对照引物与特异性引物鉴别 TCK、TCT

内置对照引物 CQUTC6/CQUTC7 在 TCK、TCT 基因组 DNA 中都可以扩增得到一条 500bp 的靶带,特异性引物对 CQUTCK₂/CQUTCK₃ 和 CQUTCK₄/CQUTCK₅ 只能在 TCK 基因组 DNA 中扩增得到一条 747bp 和 200bp 的靶带(图 4)。

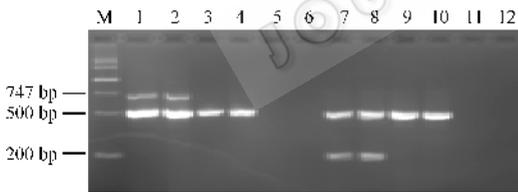


图 4 内置对照引物和特异性引物双重扩增 TCK、TCT genomic DNA

Fig.4 Duplication of TCK, TCT with internal control primers and specific primers. M. Marker III 200 bp ~ 4.5 kb ; 1 ~ 6. Duplication of TCK/TCT with internal control primers CQUTC₆/CQUTC₇ and specific primers CQUTCK₂/CQUTCK₃ (1 ~ 2. Amplification of TCK ; 3 ~ 4. Amplification of TCT ; 5 ~ 6. genomic DNA of health wheat control and water blank control) ; 7 ~ 12 Duplication of TCK/TCT with internal control primers CQUTC₆、CQUTC₇ and specific primers CQUTCK₄/CQUTCK₅ (7 ~ 8. Amplification of TCK ; 9 ~ 10. Amplification of TCT ; 11 ~ 12. genomic DNA of health wheat control and water blank control).

3 讨论

RM-PCR 是一种基于卫星 DNA 分子标记的差异基因分离新方法,它通过分析扩增片段多态性鉴定近源物种间的差异基因,克服了 mRNA 差异显示技术(differential display reverse

transcription PCR, DD-RT-PCR) 限制性片段长度多态性技术 (Restriction fragment length polymorphisma, RFLP) RAPD 的局限性,能够简易、快速地进行扩增片段的同一性验证,具有起始样本量少、灵敏度高、可重复性强等优点。该方法的原理在于利用 RAPD 引物与端粒重复序列的特异性引物配合,利用热不对称 PCR 扩增筛选获得 TCK 核苷酸差异片段 PR32 (1322bp),并依据 TCK 独有序列设计特异性引物对 CQUTCK₂/CQUTCK₃、CQUTCK₄/CQUTCK₅ 建立区分 TCK、TCT 的分子检测技术体系,有助于对小麦冬孢子流向进行动态监测,为制定科学的病害风险管理策略和监控方案提供了技术支持。

腥黑穗菌的冬孢子中往往含有三甲胺等抑制 PCR 反应的物质,检测时容易造成假阴性。利用腥黑穗菌属通用引物 CQUTC₆/CQUTC₇ 作为内置对照,如扩增出靶带 500bp 则表明检测样品无抑制物质,扩增出特异性 DNA 靶带,说明被检样品含 TCK,反之则含其它腥黑穗菌属菌株。从而有效避免 PCR 假阳性和假阴性,提高了检测特异性。从 TCK 冬孢子、纯培养菌丝体以及罹病植株 DNA,健康麦粒中混入 TCK 冬孢子的样品中都能稳定扩增出特异性靶带,而供试 TCT 菌株都没有靶带扩增,靶菌 DNA 的检测下限 10fg,表明这一检测体系对 TCK 特异、灵敏,结合适当的制样方法可以用于 TCK 冬孢子的快速鉴定。

参 考 文 献

[1] John SL. Dwarf bunt (*Tilletia controversa* Kühn) in winter wheat in Sweden: relationship to climate (1951-1987), survey result and cultivation measures (1967-1987). *J Plant Diseases and Protection*, 1992, **99** (3) 256 - 265.
 [2] Purdy LH, Kendrick EL, Hoffmann JA, et al. Dwarf bunt of wheat. *Annual Review of Microbiology*, 1963, **17**: 199 - 222.
 [3] 章 正,王 圆,姚文国,等. 冬孢子网脊高度值和自发荧光显微学在鉴别小麦矮腥和网腥菌瘦中的应用. *植物病理学报*, 1995, **25** (3) 207 - 214.
 [4] 李启新,杜 琦,邓善英. 小麦矮腥黑穗病菌鉴定研究进展. *植物检疫*, 1998, **12** (3) :170 - 173.
 [5] Rusell BW, Mills D. Morphological, physiological and genetic evidence in support of a conspecific status for *Tilletia caries*, *T.*

- [6] Shi YL, Loomis P, Christian D, *et al.* Analysis of the genetic relationships among the wheat bunt fungi using RAPD and ribosomal DNA markers. *Phytopathology*, 1996, **86** 311 – 318.
- [7] Goates BJ. Common bunt and dwarf bunt. In: Wilcoxson RD, Saari EE. eds. *Bunt and Smut Diseases of Wheat: Concepts and methods of disease management*. Mexico DF: CIMMYT, 1996, 12 – 25.
- [8] 刘波. 黑粉病菌及其防治(修订本). 北京: 农业出版社, 1965. 132 – 134
- [9] 单志萍, 孟好等. 丝状真菌三孢布拉霉 DNA 的提取研究. *生物技术*, 2001, **11**(3) 5 – 7.
- [10] Sohanpal B. Cloning of telomere-associated DNA using single-specific-primer polymerase chain reaction provides evidence for a conserved sequence directly adjacent to *Theileria parva* telomeric repeats. *Gene*, 2000, **255** 401 – 409.
- [11] 洪德军, 陈受宜. 2 个水稻端粒相关序列的克隆和特性分析. *科学通报*, 1995, **40**(13): 1229 – 1232.
- [12] 陈守义, 阮承迈, 李军涛等. 鸡组织细胞端粒相关序列的克隆及序列分析. *中国预防兽医学报*, 2003, **25**(1): 40 – 43.
- [13] Sachadyn P, Knur J. The construction and use of a PCR internal control. *Mol Cell Probes* 1998, **12** 259-262.

Selection of differential DNA fragment of *Tilletia controversa* Kühn and establishment of molecular detection approach

NIAN Si-ji, YIN You-ping, YUAN Qing, XIA Yu-xian, WANG Zhong-kang*

(College of Bioengineering of Chongqing University, Genetic Engineering Research Centre of Chongqing University, Key Laboratory of Gene Function and Regulation at Chongqing, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract : A reliable and simple polymerase chain reaction method for TCK pathogen was established firstly. A 1322bp unique fragment of TCK was amplified and identified by the technique of semi-specific random amplified polymorphism (RM-PCR). Two pairs of species-specific primers CQUK₂/CQUK₃ and CQUK₄/CQUK₅ were designed according to the unique fragment of TCK. The first pair primers were capable to stably amplify target DNA band of 747bp from chromosomal DNA of 18 strains of TCK isolates without any DNA bands obtained from 29 strains of TCT. The second pair primers could produce a 200bp target DNA band stably, while no band was amplified from teliospore or mycelium DNA of TCT of strains. *Tilletia* genus primers were used as internal control of molecular detection system, which can detect whether the PCR inhibitors exist in testing sample or avoid pseudo-negative and pseudo-positive of PCR reaction. The molecular detection approach could rapidly, accurately detect and identify the DNA of teliospore or mycelium of TCK from wheat tissues.

Keywords : TCK ; TCT ; genetic different fragment ; internal control primers

Foundation item : National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA10Z434) ; Key Technology Research and Development Program of Agriculture Ministry (2006-37)

* Corresponding author. Tel/Fax : 86-23-65120489 ; Email : zkwang646@sina.com

Other author : LI Min-hui

Received : 4 December 2006 / Accepted : 12 January 2007 / Revised : 10 May 2007