

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2019.03.016

## 松赤枯病原的快速分子检测

袁川<sup>1</sup>, 吴南<sup>2</sup>, 刘应高<sup>3</sup>, 许秀兰<sup>3</sup>, 赵景阳<sup>3</sup>, 李万艳<sup>3</sup>

(1. 广安市林业技术推广站, 四川广安 638000; 2. 四川省林业有害生物防治协会, 四川成都 610081;

3. 四川农业大学林学院, 四川成都 611130)

**摘要:**为实现对松针中可导致松赤枯病的枯斑拟盘多毛孢的早期检测,依据枯斑拟盘多毛孢 ITS 区保守序列设计特异性引物 AF(R/F),建立了松赤枯病 PCR 检测体系。结果表明该方法可于枯斑拟盘多毛孢基因组 DNA 与松针基因组 DNA 中扩增出大小为 480 bp 的单一一条带,可从无明显症状的组织中检测到枯斑拟盘多毛孢。建立的 PCR 检测体系适用于枯斑拟盘多毛孢的分子鉴定及松赤枯病的早期诊断。

**关键词:**枯斑拟盘多毛孢;松针基因组 DNA;快速;分子检测

**中图分类号:**S763.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5508(2019)03-0077-05

## A Rapid Detection Method for the Pathogen of Pine Needle Blight

YUAN Chuan<sup>1</sup> WU Nan<sup>2</sup> LIU Ying-gao<sup>3</sup> XU Xiu-lan<sup>3</sup> ZHAO Jing-yang<sup>3</sup> LI Wan-yan<sup>3</sup>

(1. Forestry Technology Promotion Station, Guang'an 638000, China;

2. Sichuan Association for Forest Integrated Pest Management, Chengdu 610081, China;

3. College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** In order to realize the early detection of *Pestalotiopsis funerea* in Pine needles, the specific primer AF(R/F) was designed, and PCR detection system was established according to the conserved sequence of ITS region of *P. funerea*. The results showed that the method could amplify a single band of 480 bp in genomic DNA of *P. funerea* and pine needle genomic DNA. *P. funerea* could be detected in tissues without obvious symptoms. The established PCR detection system was suitable for molecular identification of *P. funerea* and early diagnosis of pine needle blight.

**Key words:** *Pestalotiopsis funerea*, Pine needle genomic DNA, Rapid detection, Molecular identification

由枯斑拟盘多毛孢 (*Pestalotiopsis funerea* Desm.) 引起的松赤枯病是松树幼龄林上常见的病害,分布广、危害严重。该病在四川自 1974 年开始发生危害,到 1980 年流行以来,已成为主要针叶林木病害,居林木病害首位<sup>[1~4]</sup>。目前对松赤枯病的检测主要是在病害表现出一定的症状之后,通过症状观察,用组织分离的方法,以“形态结构特征为主、生理生化、细胞化学和生态特征为辅”的分类原

则进行鉴定<sup>[5]</sup>,但这种方法耗时耗材,并且病害表现出症状后就已经给林木造成危害,不利于病害的早期诊断与防控。

利用病原菌在 rDNA 的 ITS 区段既具保守性,又在科、属、种水平上均有序列多态性,对 ITS 区进行 PCR 扩增、测序及序列分析后再设计特异引物来诊断和检测植物病原菌,尤其是植物病原真菌的分子检测已越来越被广泛应用<sup>[6~8]</sup>。依据真菌种内

收稿日期:2019-02-19

基金项目:四川省教育厅科研项目-四川几种重要林木真菌病害病原的分子检测技术研究(09ZA068)

作者简介:袁川(1985-),男,四川武胜人,工程师,硕士,主要从事林木病虫害防治、林业科技推广工作,e-mail:155145830@qq.com。

ITS 区保守序列设计引物可实现对该种真菌在患病植物体内的特异性扩增。

本研究为提高松赤枯病的检测效率,通过针对枯斑拟盘多毛孢设计特异性引物与待测松树基因组 DNA 进行 PCR 扩增反应,在松赤枯病症状出现前检测出病原物的有无,为该病害的早期防治提供依据,以达到提前预防该病害的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

#### 1.1.1 供试菌株

供试菌株由四川农业大学林学院森林保护实验室提供,阳性对照为枯斑拟盘多毛孢菌株;阴性对照为星形拟盘多毛孢、散沫拟盘多毛孢、针叶散斑壳、松针散斑壳、尖孢镰刀菌株。

表 1 供试菌株一览表

序号	1	2	3	4	5	6
菌株	枯斑拟盘多毛孢	星形拟盘多毛孢	散沫拟盘多毛孢	针叶散斑壳	松针散斑壳	尖孢镰刀菌株

#### 1.1.2 样本采集与处理

于 2015 年 9 月至 2016 年 8 月,对四川泸定二郎山林场和成都蒲江县石象湖马尾松林中随机选择 4—5 个样地中的高山松 (*Pinus. densata* Mast)、华山松 (*P. armandii* Franch.)、云南松 (*P. yunnanensis* Franch)、马尾松 (*P. massoniana*) 的 1 年生针叶共计进行 9 次采样。采得样本按叶尖、叶中和叶基分成 3 段,经 75% 的酒精表面消毒处理后,保存于 -70 °C 的冰箱备用。

#### 1.1.3 试验试剂

植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP305)、DNA 分子量标准 DL2000、PCR 反应试剂 (北京天根生化科技有限公司),琼脂糖 (北京赛百胜基因技术有限公司)。

### 1.2 试验仪器

5804R 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司),iCycler-PCR 扩增仪、Sub-Cell 水平电泳仪、Gel DocTM XR 凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司),电热恒温水浴锅 (天津民利科学器材厂)。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 松针基因组 DNA 和菌丝 DNA 的提取

利用天根植物组 DNA 提取试剂盒提取松针与

菌丝基因组 DNA,操作步骤见说明书。DNA 提取物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测完整性后,于紫外分光光度计检测浓度,并用 buff TE 稀释至终浓度为  $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , -20 °C 保存待用。

#### 1.3.2 引物设计与合成

从 Genbank 库中查找下载枯斑拟盘多毛孢的 DNA ITS 区序列及同属其他菌种同源基因,用 Clustal 进行多序列比对,DNA Star 根据差异位点进行引物设计。设计出 AF, GQ-1, GQ-2, GQ-3 四对引物。委托北京六合华大基因科技股份有限公司进行引物 AF, GQ-1, GQ-2, GQ-3 与在已发表的相关文献中选取的 3 对引物 (ITS4-ITS5<sup>[10]</sup>, LROR-LR5<sup>[11]</sup>, LR3R-LR3<sup>[11]</sup>) 的合成。

表 2 枯斑拟盘多毛孢菌的 7 对 PCR 引物序列

引物编号	引物序列 (5' - 3')	退火温度 (°C)
AF	上游:GTCAACCAGCGGAGGGAT	56
	下游:CGCCGTTGTATTTTCAGGAG	
GQ-1	上游:CCGGTGGACTACAACTCTTG	54
	下游:TAGGCTCCCAACTAAGCTAGG	
GQ-2	上游:TGGTTACCCTACCTTGGA	54
	下游:TTTCGCTGCGTTCTTCAT	
GQ-3	上游:AGCATTGGCCAAGGATGT	52
	下游:CGCTTCACTCGCCGTAT	
ITS4	上游:TCCTCCGCTTATTTGATATGC	52
ITS5	下游:GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	
LROR	上游:ACCCGCTGAACTTAAGC	53.5
LR5	下游:TCCTGAGGAAACTTCG	
LR3R	上游:GTCTTGAAACACGGAC	53.5
LR3	下游:CCGTGTTTCAAGACGGG	

#### 1.3.3 rDNA-ITS 扩增及产物测序

以所提松针基因组 DNA 作为模板,使用 1.3.2 所设计合成的引物对进行 PCR 扩增。反应体系 50  $\mu\text{L}$ :5  $\mu\text{L}$  松针基因组 DNA 原液,25  $\mu\text{L}$  Premix,上下游引物各 2  $\mu\text{L}$  ( $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ),用 ddH<sub>2</sub>O 补足 50  $\mu\text{L}$ 。反应在 iCycler-PCR 仪上进行,程序为:95 °C 预变性 4 min;95 °C 变性 30 s,56 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,进行 35 个循环;72 °C 延伸 7 min,10 °C 保存<sup>[9]</sup>。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 100 V 下电泳 20 min,260 nm 紫外灯下观察并照相。将条带清晰的 PCR 产物送往北京六合华大基因科技股份有限公司纯化测序。参考 Genbank 库中枯斑拟盘多毛孢序列并与测序结果进行 blastn 比对,以确定扩增产物是否为枯斑拟盘多毛孢。

#### 1.3.4 特异性检测

以枯斑拟盘多毛孢菌株为阳性对照,星形拟盘多毛孢、散沫拟盘多毛孢、针叶散斑壳、松针散斑壳、

尖孢镰刀菌株为阴性对照, ddH<sub>2</sub>O 为空白对照, 采用 1.3.2 所述引物对, 按照 1.3.3 的反应体系进行特异性检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选与扩增结果验证

据 Genbank 库中枯斑拟盘多毛孢的 ITS 区序列, 采用 DNASTar 工具共设计引物 8 对, 使用 BLAST 软件验证引物特异性, 筛选出 4 对 (AF, GQ-1, GQ-2, GQ-3), 在已发表的相关文献中选取引物 3 对 (ITS4-ITS5<sup>[10]</sup>, LROR-LR5<sup>[11]</sup>, LR3R-LR3<sup>[11]</sup>), 分别对实验室保存的枯斑拟盘多毛孢的菌丝 DNA 进行 PCR 反应, 反应结果见图 1。

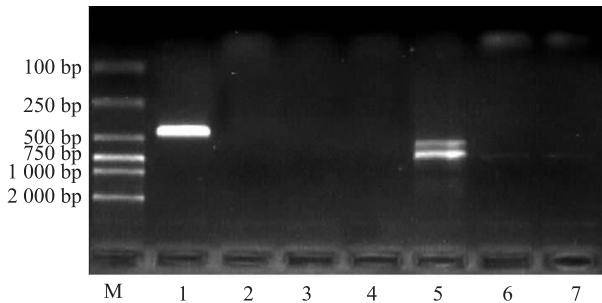


图 1 7 对引物扩增枯斑拟盘多毛孢菌丝 DNA 的电泳图谱  
M: DL2000 Marker; 1: AF; 2: GQ-1; 3: GQ-2; 4: GQ-3; 5: ITS4-ITS5; 6: LROR-LR5; 7: LR3R-LR3

从图 1 可以看出, 引物 AF 条带明亮、且无杂带, 满足特异扩增的要求。

使用引物 AF 对枯斑拟盘多毛孢和实验室存有的已报道过的其它树栖真菌菌丝 DNA 同时进行 PCR 反应, 反应结果见图 2。

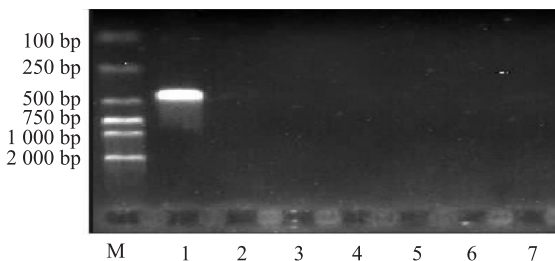


图 2 AF 引物扩增几种树栖真菌菌丝 DNA 的电泳图谱  
M: DL2000 Marker; 1: 枯斑拟盘多毛孢; 2: CK(空白); 3: 星形拟盘多毛孢; 4: 散沫拟盘多毛孢; 5: 针叶树散斑壳; 6: 松针散斑壳; 7: 尖孢镰刀菌

从图 2 可以看出, 阳性样品枯斑拟盘多毛孢条带明亮、且无杂带, 阴性样品及空白对照条带较暗或

无条带, 表明引物 AF 对枯斑拟盘多毛孢具有较强的特异性。

### 2.2 PCR 反应及电泳结果

试验共采样 9 次, 每次的样品 DNA 分别进行 PCR 反应及电泳检测后, 华山松、高山松针叶的电泳图无条带, 结果表明, 华山松、高山松针叶上全年均没有检测到松赤枯病病原菌。在 2016 年 3 月前采集的马尾松、云南松针叶样品的电泳图无条带, 结果表明, 在 2016 年 3 月前采集的马尾松、云南松针叶上均没有检测到松赤枯病病原菌。

将 2016 年 3 月在蒲江石象湖采集的马尾松针叶 DNA, 按叶尖、叶中、叶基分别发生 PCR 反应, 反应结果见图 3。

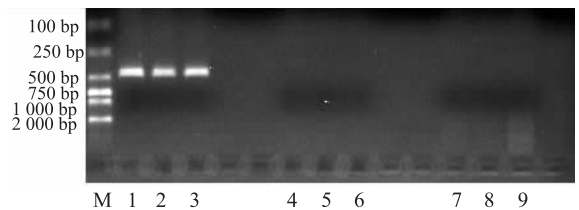


图 3 马尾松赤枯病 1 号样地 2016 年 3 月检测结果图  
M: DL2000 Marker; 1-3: 松针尖部; 4-6: 松针中部; 7-9: 松针基部

结果表明, 2016 年 3 月在蒲江石象湖采集的马尾松松针尖部, 首先检测到侵染针叶的枯斑拟盘多毛孢, 而针叶中部、基部均没有检测到枯斑拟盘多毛孢。

将 2016 年 3 月在泸定二郎山采集的云南松针叶 DNA, 按叶尖、叶中、叶基分别进行 PCR 反应, 反应结果见图 4。

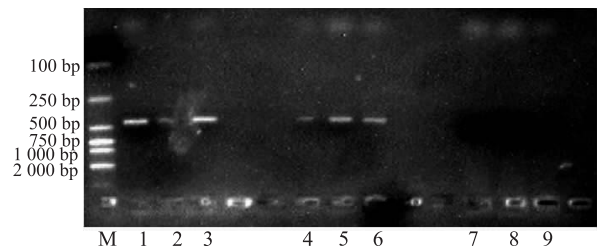


图 4 云南松赤枯病 2016 年 3 月检测结果图

M: DL2000 Marker; 1-3: 松针尖部; 4-6: 松针中部; 7-9: 松针基部

结果表明, 2016 年 3 月在泸定二郎山采集的云南松松针尖部、中部, 首先检测到侵染针叶的枯斑拟盘但电泳图谱中针叶中部条带较暗, 无法测序, 而针叶基部没有检测到枯斑拟盘多毛孢。

将 2016 年 5 月在泸定二郎山采集的云南松针叶 DNA, 按叶尖、叶中、叶基分别进行 PCR 反应, 反应结果见图 5。

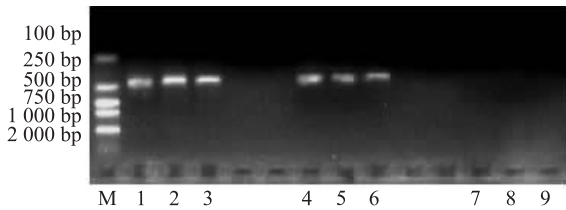


图5 云南松赤枯病2016年5月检测效果图

M:DL2000 Marker;1-3:松针尖部;4-6:松针中部;7-9:松针基部

结果表明,2016年5月在泸定二郎山采集的感染云南松的枯斑拟盘多毛孢在其针叶尖部、中部均被检测出来,电泳条带明显比3月时更明亮,针叶基部仍没有检测到枯斑拟盘多毛孢。

将2016年6月在泸定二郎山采集的云南松针叶DNA,按叶尖、叶中、叶基分别进行PCR反应,反应结果见图6。

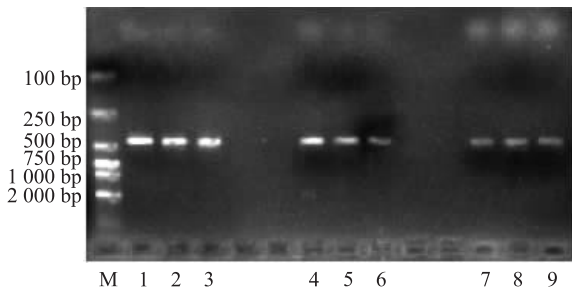


图6 云南松赤枯病2016年6月检测结果图

M:DL2000 Marker;1-3:松针尖部;4-6:松针中部;7-9:松针基部

结果表明,2016年6月在泸定二郎山采集的云南松的枯斑拟盘多毛孢在其针叶尖部、中部、基部均被检测出来,电泳条带除针叶基部略暗外,针叶尖部、中部都比较明亮。

### 2.3 测序及序列比对

条带明亮的PCR产物由北京六合华大基因科技股份有限公司测序,测序样品共15个,共得到8条理想的序列,在Genbank中与已注册的枯斑拟盘多毛孢序列AF405299.1、GQ412730.1经BLAST比对后<sup>[12]</sup>,相似度均高达97%~99%,并得到了枯斑拟盘多毛孢的ITS1和ITS2区序列,可以确定枯斑拟盘多毛孢感染了马尾松、云南松针叶。

## 3 结论与讨论

### 3.1 结论

试验表明,根据Genbank库已有的枯斑拟盘多毛孢序列,通过其ITS区序列设计特异性引物,对松针基因组DNA进行PCR扩增的方法来检测处于潜

伏期的枯斑拟盘多毛孢是可行的。使用这种方法可以提前两个月检测出松赤枯病病原,为病害防治争取了时间,同时也可以为病原真菌大规模的分类鉴定及分子检测工作提供参考。

### 3.2 讨论

从2016年3月开始检测到枯斑拟盘多毛孢,这是因为此时正是枯斑拟盘多毛孢以分生孢子和菌丝体在松树病叶中越冬完毕,在春季到来气候适宜时开始大量生长传播<sup>[13,14]</sup>,当新生针叶处于速生期,此时叶表皮细胞未全部角质化,抗逆能力差,病害便相继发生<sup>[15]</sup>。随着时间的推移,该菌在针叶上的量也增加,此时从松针中提取到的枯斑拟盘多毛孢DNA相比之前也大量增加,故检测结果也逐渐明显。

实验最先在松针尖部检测到枯斑拟盘多毛孢,可以初步判定该菌先从针叶尖部感染松针,这是因为松针尖部相对中部、基部而言,自然孔口更大,同时也相对柔嫩容易受伤,而枯斑拟盘多毛孢感染松针的时候,是从自然孔口或伤口侵入<sup>[16]</sup>,所以松针尖部相对更易被病菌感染。

植物病原真菌的检测鉴定大多采用传统方法,即分离培养、显微镜观察形态及简单的生理性状测定等,但由于这种以形态结构为基础的鉴定方法往往会受到人为因素和环境条件干扰,许多子实体类型经常难以获得,给鉴定工作带来困难,而且耗时长、不适合快速鉴定的要求。而常见的利用ITS序列来检测植物真菌病害主要是先分离得到纯培养的病病原菌株,进而得到其菌丝DNA,再利用通过引物ITS1和ITS4进行PCR反应,扩增出病原菌的ITS区序列,针对ITS序列设计特异性引物来对植物真菌病害进行分子检测<sup>[17~19]</sup>。本研究立足于前人的研究成果,直接从植物组织中提取植物组织基因组DNA,通过在Genbank库中查询已报道过的病原菌序列,通过分析该序列并设计特异性引物,然后对整个植物组织基因组DNA进行PCR反应,扩增出植物组织中可能含有的病原菌的ITS序列,达到检测病害的目的。相对而言,这种方法更省时、高效,节约了病害检测的时间和成本,有利于大规模的推广应用。

### 参考文献:

[1] 邱德勋,谭松波,吴纪才.马尾松赤枯病的初步研究[J].林业

- 科学,1980(3):203~207.
- [2] 杨佐忠,李君林,乐国富. 四川马尾松疱锈病原菌及转主寄主的初步研究[J]. 四川林业科技,1999,20(3):22~24.
- [3] 黄强,何建设. 油松赤枯病病原菌鉴定及生物学特性[J]. 四川林业科技,2000,21(3):28~30.
- [4] 朱天辉. 枯斑拟盘多毛孢菌毒素的研究[D]. 四川农业大学,2003,6.
- [5] 王欢. 松落针病原的快速分子检测技术研究[B]. 四川农业大学,2010,6.
- [6] 刘春来,文景芝,杨明秀,等. rDNA-ITS 在植物病原真菌分子检测中的应用[J]. 东北农业大学学报,2007,38(1):101~106.
- [7] 赵杰. ITS 序列分析及其在植物真菌病害分子检测中的应用[J]. 陕西农业科学,2004,4:35~37.
- [8] 林剑伟,阙友雄,陈天生,等. 核糖体 DNA 的内转录间隔区序列标记在真菌分类鉴定中的应用[J]. 生物技术通讯,2007,18(2):292~294.
- [9] D. S. Park, J. K. Sbm, J. S. Kim. PCR - based sensitive and specific detection of *Petobacterium astrosepticum* using primers based on Rbs family gene sequences [J]. *Plant Pathology*. 2006, 5:625~629.
- [10] Hongli Hu, Rajesh Jeewon, Dequn Zhou. Phylogenetic diversity of endophytic *Pestalotiopsis* species in *Pinus armandii* and *Ribes* spp: evidence from rDNA and  $\beta$  - tubulin gene phylogenies[J]. *Fungal Diversity*,2007;1~22.
- [11] Rajesh Jeewon, Edward C. Y. Liew, Kevin D. Hyde. Phylogenetic relationships of *Pestalotiopsis* and allied genera inferred from ribosomal DNA sequences and morphological characters[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*,2002,25:378~392.
- [12] S. Bouda, F. F. Del, Campo. RAPD and ITS - based variability revealed in *Atriplex* species introduced to semi - arid zones of Morocco[J]. *Scientia Horticulturae*,2008(118):172~179.
- [13] 中国林业科学研究院主编. 中国森林病害[M]. 中国林业出版社,1984:21~22.
- [14] 冯红,邱德勋,谭松波,等. 气温降水对马尾松赤枯病影响的通径分析[J]. 森林病虫通讯,1995,3:6~9.
- [15] 肖育贵,陈守常,谭松波,等. 马尾松赤枯病流行规律的研究[J]. 四川林业科技,1998,19(3):4~8.
- [16] 梁秋霞,潘锋英,李瑞兴. 马尾松赤枯病发生规律及其防治技术[J]. 浙江林业科技,2002,22(4):64~67.
- [17] 方正. 小麦纹枯病菌的多样性和分子检测[D]. 扬州大学,2003,6.
- [18] 杨佩文,李家瑞,杨勤忠,等. 根肿病菌核糖体基因 ITS 区段的克隆测序及其在检测中的应用[J]. 云南农业大学学报,2003,18(3):288~233.
- [19] 谢勇,王云月,陈建斌,等. 烟草黑胫病分子检测[J]. 云南农业大学学报,2000,15(2):176.

(上接第 73 页)

本试验仅从不同季节、不同扦插基质、不同砧木高度以及不同压条方式进行试验,后续将进行不同浓度生根剂、不同成熟度砧木以及不同外界因子胁迫等多因素试验,力求寻找适合绣球荚蒾繁殖的最佳方案,为绣球荚蒾在园林绿化推广应用方面提供理论依据。笔者采用的指标并不全面,故不同繁殖方式的差别也无法完全表述,需要进一步深入研究,并进行规范性建设。

#### 参考文献:

- [1] 沈敏东,邱森,邱士明. 珍贵观赏花木——绣球荚蒾[J]. 农村百事通,2010(2):32.
- [2] 陈碧华,余小涵,张娟,等. 不同季节绣球荚蒾扦插繁殖试验[J]. 中国园艺文摘,2017,33(10):6~7+19.
- [3] 张林. 荚蒾属部分植物种质资源汇集及利用研究[D]. 山东农业大学,2007.
- [4] 闵祥凤,姜卫兵,魏家星. “绣球”类观赏植物资源探究及应用开发[J]. 中国城市林业,2017,15(1):60~63.
- [5] 黄增艳. 上海地区荚蒾属植物引种及适应性研究[D]. 上海交通大学,2008.
- [6] 田朝阳,王列富,郑晓军,等. 河南荚蒾属植物资源、观赏价值及开发利用研究[J]. 河南农业大学学报,2009,43(2):201~203.
- [7] 李方文,蒋清. 荚蒾属植物的栽培技术和应用初探[J]. 中国植物园,2012(15):106~114.
- [8] 黄梓良,钱永平,林芳. 常绿荚蒾扦插生根试验初报[J]. 林业调查规划,2018,43(4):160~163.
- [9] 陈碧华,张娟,余小涵,等. 绣球荚蒾扦插繁殖试验[J]. 中国园艺文摘,2015,31(11):1~3.
- [10] Bihua Chen, Jianmin Li, Huihua Fan, et al. Cutting Propagation Technique of *Viburnum macrocephalum* Fort. [J]. *Bangladesh J. Bot*,2017,46(1):233~236.
- [11] 陈思. 砧木的选择对皂荚嫁接成活率及生长的影响[J]. 现代农业研究,2018(8):71~74.