

植物病原真菌分子检测技术的研究进展

李辉 李献刚 肖晓静 毕秀 刘思宁 李雪梅 刘沙
东港海关综合技术服务中心
DOI:10.12238/as.v3i4.1894

[摘要] 在已知的植物病害中,70%~80%是由植物病原真菌引起。植物病原真菌种类繁多,并且它们的侵染方式、分化、侵染结构的功能以及营养策略上存在着很大的变化。植物病害研究最早的是由真菌引起的病害,因此真菌学的发展孕育并推动了植物病理学的产生和发展。对植物真菌病害分子诊断技术的种类、特点、应用情况,存在的问题及未来发展趋势进行了综述,旨在建立一种快捷准确的植物真菌病害分子诊断技术,以最大限度地减少农业损失。

[关键词] 植物病原真菌分子; 检测; 技术
中图分类号: V448.15+1 **文献标识码:** A

引言

传统的病原真菌鉴定方法主要包括病害症状识别、病原真菌形态和培养性状观察以及生物学特性测定等。但是,由于这些方法对病原真菌鉴别的时效性问题以及其准确性和可靠性在很大程度上依赖于研究者的专业技能与分类知识的掌握程度等,因而这些传统方法存在着很大的局限性。鉴于此,文章就植物病原真菌分子的检测技术进行了研究。

1 多重PCR技术

多重PCR技术是在同一个PCR反应体系中加入不止一对引物,这些引物能够分别与各自对应的特异互补模版DNA结合,因此能同时扩增出多个目标DNA片段,其反应原理与普通PCR反应是一致的。多重PCR不仅具有单一PCR的敏感性和特异性,而且大大地节省了时间、试剂和经费开支,还可提供内部对照,显示模板数量和质量,但有时也会出现多态性现象和引物竞争靶标序列等问题。近年来,该技术已广泛应用于植物病原真菌的检测。如Winton和Hansen(2001)利用原生物、真菌核糖体和植物小亚基的保守片段以及侧生疫霉(*P. lateral*) rD-NA-ITS序列各自设计了一对引物,将前者扩增出的片段产物作为对照,在存在侧生疫霉(*P. Lateralis*)模版DNA的同一个PCR反应体系中加入这两对引物,能同时扩增

出两个大小不同的片段。因此,多重PCR可将侧生疫霉(*P. lateral*)成功地检测出来。Cote等(2004)根据3种不同核果褐腐病菌(*Monilinia* spp.) DNA序列的差异,设计了1条共同的反向引物和3条正向特异性引物,建立了多重PCR检测方法,在同一反应体系中可同时分别扩增出美澳型核果褐腐病菌(*M. fructicola*)、核果褐腐菌(*M. laxa*)和苹果褐腐病菌(*M. fructigena*)各自的特异性片段。结果说明该方法可以根据特异扩增片段大小准确地将侵染核果的不同种类的褐腐病菌区分开来。此外,刘跃庭等(2015)为了防止检疫性疫霉菌(*Phytophthora* spp.)进入我国,根据疫霉属(*Phytophthora*)的18SrRNA、SHP90和Ypt13个基因分别设计通用引物以及丁香疫霉(*P. syringae*)和栗黑水疫霉(*P. cam-bivora*)的特异性引物,建立了同步检测这两种疫霉的三重PCR分子检测方法,为检疫部门提供了快速的检测方法。

2 纳米金辅助PCR技术

纳米金辅助PCR技术是在PCR反应体系中加入纳米金粒子(gold nanoparticles, AuNPs)而建立起来的一种新技术。AuNPs由于具有许多物理特性和良好的生物相容性等优点,已广泛应用于生物学各个领域。将其加入到PCR反应体系中,不仅为纳米材料在分子生物学中的应用开辟

了一条新途径,也解决了PCR非特异性扩增的问题。李海阔等(2005)首次提出了AuNPs可作为一种新型的添加剂,用于PCR反应体系,以消除两轮PCR错配产生的非特异性条带,从而提高PCR反应的特异性。Yang等(2008)报道,利用2.09nm的AuNPs与适量的天然TaqDNA聚合酶结合,可提高qRT-PCR的扩增效率,缩短检测时间。杨慧等(2013)使用纳米金辅助PCR技术对假丝酵母属(*Candida*)进行了鉴定,结果表明,AuNPs可减少非特异性条带的数量,从而增加目的条带的数量,且较未加AuNPs的半巢式PCR,反应灵敏度提高了10倍,表明AuNPs可提高PCR的扩增效率。

3 LAMP技术

2000年,Notomi等(2000)开发了一种快速、简便、廉价、新型的恒温核酸扩增技术,即环介导等温扩增技术(LAMP)。该技术针对靶基因的6个特异性保守区域设计了两对引物,即一对内引物(FIP与BIP)和一对外引物(F3和B3),依靠BstDNA聚合酶的链置换活性提供反应动力,合成延伸并发生链置换。该技术没有常规PCR的退火、复性过程,反应在恒温下进行,所以不需要特殊的仪器设备,且检测结果简单。LAMP反应效率高,在30~60min内便能达到10⁹~10¹⁰倍的扩增(Dai et al. 2012)。该技术自建立以来

已经在动植物检疫(赵秋明等, 2011)、食品检测(刘道明等, 2011)等领域得到广泛的应用, 特别适合于基层、养殖户和出入境检疫部门对病原菌的快速检测。近年来, 应用LAMP技术对植物病原真菌进行检测的报道逐年增多。Duan等(2014)应用LAMP技术快速检测植物病原真菌核盘菌(*S. sclerotiorum*), 研究结果表明, LAMP技术比常规PCR更简单、快速、灵敏和特异, 该技术对核盘菌DNA最低检测浓度是常规PCR对核盘菌DNA最低检出浓度的1/1000。Denschlag等(2014)针对两类镰刀菌的不同基因分别设计了两组LAMP扩增引物, 并组合使用, 可快速、灵敏地检测出产毒镰刀菌。Tanner等(2012)建立了一种基于淬灭释放的扩增检测(detection of amplification by release of quenching, DARQ)的靶特异实时多重LAMP技术。该技术设计简单, 在两重扩增条件下性能尤佳, 根据此特点, 在LAMP反应中引入内参基因进行同时检测, 可使诊断结果的可靠性提高。孙文献等(2014)报道了一种定量检测种传和土传稻曲病菌的专利技术, 即荧光核酸恒温扩增检测技术定量检测稻曲病菌技术。该技术克服了第一代LAMP检测技术的不足, 具有反应快速、低污染、灵敏度和特异性高、反应稳定等优点, 采用不开盖就能灵敏地检测反应产物的策略, 该技术不易受污染物的影响且能现场检测土壤样品, 分析判断反应产物的方法极为简单, 适宜广泛地推广应用。

4 PCR-ELISA技术

目前, 在植物病原真菌的分子鉴定方法中, 特异性PCR技术是比较准确和灵敏的方法。PCR-ELISA技术就是利用PCR技术的灵敏性和特异性、探针的特异性以及酶联免疫检测仪直接读取结果的客观性等优点而建立起来的一项实用检测技术。PCR-ELISA技术是一种定量PCR方法, 利用链霉亲和素与生物素特异性交联作用的特点, 在PCR扩增时, 使用生物素标记引物, 从而得到具有生物素标记

的PCR扩增产物, 然后与特异探针进行液相杂交, 最后通过酶联免疫吸附测定(ELISA)技术把探针固定在酶标板上, 用经过酶标记的抗体与杂交分子进行免疫反应, 加入底物后, 可用肉眼观察到反应体系中颜色的变化, 从而进行直接的观察和比较。除此之外, 使用酶标仪进行定量检测的效果可达到膜杂交水平, 全程只需要1~3h, 是一种将免疫学技术与PCR技术相结合的检测方法(黄留玉, 1997; 陈枝楠和卢泽高, 2004)。PCR-ELISA技术综合了PCR技术、分子杂交技术和ELISA技术三者的优点, 多用于病原菌和转基因产品检测。该技术在植物病原真菌检测方面已被成功应用。Somai等(2002)利用抗原荧光素和生物素分别成功标记了1对RAPD特异性引物的5'端, 然后进行PCR扩增, 利用3种可产生不同颜色的底物与被辣根过氧化物酶标记过的抗荧光素抗体对扩增产物进行检测, 每种产物对应一类病原真菌, 结果表明, 利用PCR-ELISA法在同一反应体系中能够将茎点霉(*Phoma* spp.)的13个分离物和瓜类蔓枯病菌(*Didymella bryoniae*)的45个分离物成功地检测出来。Bailey等(2002)利用地高辛标记PCR产物, 以真菌的ITS1序列作为捕获探针, 两者有效结合进行比色检验, 所有操作无需凝胶电泳和点杂交步骤, 在同一个PCR-ELISA反应中能成功地检测出8种疫霉(*Phytophthora* spp.)和10种腐霉(*Pythium* spp.), 因而可同时高效分析大量样品, 提高检测效率。

5 其它检测技术

迅速增长的人口给有限的食物资源带来了巨大的压力, 为了缓解稻瘟病带来的水稻产量损失, Yang等(2013; 2014)利用与几丁质酶Mgchi的相关基因, 克隆和表达了稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*=*M. grisea*)的几丁质酶Mgchi和一种水稻cDNA编码的凝集素蛋白Osmal。研究中发现, Mgchi可以作为一种生化标记检测水稻稻瘟病菌, 并且Mgchi与

Osmal有很特殊的相互作用。在PdNPs催化H₂O₂氧化TMB系统的基础上, 将Mgchi作为生化标记和Osmal作为识别探针, 可建立一种特异、灵敏的检测稻瘟病菌的方法。结果表明, 该检测技术是灵敏的、快速的和特异的。该研究为稻瘟病的早期诊断和稻瘟病菌的快速检测提供了一条新途径。

6 结语

传统的植物病原真菌的检测和鉴定往往是通过病原菌的分离培养、形态观察、接种试验和生理生化测定等方面进行的, 鉴定过程耗时长, 不能快速简单地检测病原菌。但由于一些病原真菌引起的病害症状相似和少数病原菌的形态特征会随着环境条件的改变而发生改变, 给病原菌的鉴定工作带来了困难, 加上有些病原真菌不能进行纯培养。因此, 在植物病原真菌检测工作中, 需要根据这些技术的优缺点, 将不同检测技术结合使用, 充分发挥各个检测技术的优点, 才能使最终的检测结果具有更高的精确性。随着生物技术的迅猛发展, 这些技术存在的不足将逐步得到修正和完善, 相信在不久的将来, 将会有更多的新方法、新技术被应用于植物病原真菌检测这一研究领域。

[基金项目]

基金项目: 大连海关科研项目(2020DK12)。

[参考文献]

- [1]钟小刚. 甘肃省苹果链格孢叶斑病原菌鉴定及诱导抗病性研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2013.
- [2]李姝江. 杂交竹梢枯病菌蛋白毒素及其精确作用机制研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2013.
- [3]谢文. 生物技术在园林植物病虫害防治中的应用探讨[J]. 现代园艺, 2019, (06): 41-42.

作者简介:

李辉(1987--), 男, 汉族, 山东高密人, 研究生学历, 农艺师, 研究方向: 植物检疫方向。