

禾谷镰孢荧光定量检测体系的建立 及其在玉米苗枯病上的应用

葛 波^{1,2} 杨 洋^{1,2} 张申萍¹ 王晓鸣² 陈国康^{1*} 段灿星^{2*}

(1. 西南大学植物保护学院, 重庆 400715; 2. 中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081)

摘要: 为实现对田间土壤中禾谷镰孢 *Fusarium graminearum* 的定量检测, 本研究构建了土壤含菌量与玉米苗枯病病情指数的回归模型。基于禾谷镰孢甾醇 14 α -去甲基化酶基因 *CYP51C* 序列, 设计特异性引物 HQ1-F/HQ1-R, 利用引物建立实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 体系, 选取 4 个玉米自交系品种进行室内苗枯病接种试验, 调查其病情指数, 利用 RT-qPCR 体系检测土壤禾谷镰孢含菌量, 并对病情指数和土壤禾谷镰孢含菌量进行回归。结果表明, 仅禾谷镰孢扩增出目的条带并且可从多种病原菌土壤中检测出。RT-qPCR 的熔解曲线具有单一吸收峰, 扩增曲线的循环阈值与模板浓度呈良好的线性关系, 扩增效率为 104.7%, 标准曲线为 $y = -3.2137x + 34.9560$ ($R^2 = 0.9968$), 最低可检测到 1 pg/ μ L 的 DNA。随着土壤禾谷镰孢接菌量的增加, 单位土壤禾谷镰孢含菌量呈线性增加, 即 $y = 13.603x - 85.370$ ($R^2 = 0.9998$)。4 个玉米品种的病情指数与土壤禾谷镰孢含菌量的回归曲线分别为 $y = 0.0789x + 22.0590$ ($R^2 = 0.7949$)、 $y = 0.0304x + 7.8686$ ($R^2 = 0.9579$)、 $y = 0.0458x + 23.7540$ ($R^2 = 0.5420$)、 $y = 0.0471x + 32.0760$ ($R^2 = 0.6753$)。

关键词: 禾谷镰孢; 实时荧光定量检测; 土壤; 玉米苗枯病; 预警

Development of fluorescent quantitative detection system for fungal pathogen *Fusarium graminearum* and its application in maize seedling blight

Ge Bo^{1,2} Yang Yang^{1,2} Zhang Shenping¹ Wang Xiaoming² Chen Guokang^{1*} Duan Canxing^{2*}

(1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Institute of Crop Sciences/ National Key Facility of Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In order to quantify fungal pathogen *Fusarium graminearum* in field soil, the regression model between the number of soil fungi and the disease index of maize seedling blight was established. The specific primers HQ1-F and HQ1-R were designed based on the sequence of the Sterol 14 α -de-methylase gene *CYP51C*. The real-time quantitative PCR (RT-qPCR) system was established by using the serial dilution of *F. graminearum* DNA as the standard. Indoor pot experiments with soil inoculation of maize seedling blight pathogen were conducted to detect fungal content in the soil and investigate the disease index. The results showed that the target band was amplified only from *F. graminearum* and detectable from various pathogenic soils. The melt curve had a single absorption peak, and a fine linear relationship existed between threshold cycle and template concentration. The standard curve based on the formula $y = -3.2137x + 34.9560$, was established with the correlation coefficient of 0.9968 and with high

amplification efficiency (1.047), and as low as 1 pg/ μ L of *F. graminearum* DNA could be detected. Meanwhile, with the increase of the inoculation concentration of *F. graminearum* spores, the pathogen number in the soil also linearly increased, and the equation was: $y=13.603x-85.370$ ($R^2=0.9998$). In addition, the regression equations between disease index of different resistant inbred maize lines and the *F. graminearum* content in soil were constructed and they were $y=0.0789x+22.0590$ ($R^2=0.7949$), $y=0.0304x+7.8686$ ($R^2=0.9579$), $y=0.0458x+23.7540$ ($R^2=0.5420$), $y=0.0471x+32.0760$ ($R^2=0.6753$).

Key words: *Fusarium graminearum*; RT-qPCR; soil; maize seedling blight; early warning

玉米是我国重要的粮食和饲料作物,也是重要能源植物和工业原料。苗枯病是玉米生产上一种常见的苗期病害,广泛分布于我国各玉米种植区,田间发病率通常为10%~20%,严重时高达60%(王桂跃等,1996;刘春元等,2007;Meng et al.,2017)。种子、土壤带菌及病残体均可引起该病害的发生。近年来,由于秸秆还田、气候变化以及感病品种利用等原因,该病害发生呈逐年加重趋势。禾谷镰孢 *Fusarium graminearum* 是引起该病害的重要病原菌,属于半活体营养型真菌,其能够以死体营养方式在病残体或土壤中存活,直到下一个生长季再次侵入寄主植物,因此土壤中积累的病原菌为苗枯病的重要侵染源(王丽娟等,2011)。对玉米根际土壤中禾谷镰孢进行准确鉴定和定量监测将有助于玉米苗枯病病情的预测预报,因此,迫切需要建立一种简便、快捷、高效和灵敏的分子检测体系。

现有的常规PCR检测技术存在检测灵敏度低、假阳性或假阴性出现频率过高等问题,而环介导等温扩增反应技术只能进行定性检测(Cubero et al.,2001;Park et al.,2006)。实时荧光定量PCR(real-time PCR,RT-qPCR)具有较高的检测灵敏度和特异性,能对病原物进行定量检测,且不需要进行凝胶电泳分析,更适用于植物病原菌的研究。魏巍等(2010)基于ITS序列设计了1对镰孢属特异性引物并建立RT-qPCR体系,利用该体系对不同施肥方式下大豆苗期土壤中镰孢菌的含量进行了定量检测。Guo et al.(2012)利用禾谷丝核菌 *Rhizoctonia cerealis* 的 β 微管蛋白序列设计引物并建立荧光体系,其最低可检测到100 fg/ μ L浓度DNA。此外该技术在柑橘溃疡病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*(殷幼平等,2007)、菜豆荚斑驳病毒(*Bean pod mottle virus*,BPMV)(邓丛良等,2013)、啤酒花矮化类病毒(*Hop stunt viroid*,HSVd)(赵晓丽等,2013)、南瓜花叶病毒(*Squash mosaic virus*,SqMV)(孙宁等,2010)、水稻纹枯病菌 *Rizicotinia solani*(Sayler & Yang,2007)等检测方面均有应用。孙炳剑等

(2015)和程承等(2017)利用RT-qPCR技术定量检测病原菌含量,并用于植株发病情况的研究,但未见利用该技术检测土壤中病原菌及监测植物发病情况的报道。

本研究利用 *CYP51C* 基因的不同序列设计针对禾谷镰孢的特异性引物HQ1-F/HQ1-R,利用该引物建立RT-qPCR体系,利用该体系对不同土壤接菌量下玉米苗期土样中的禾谷镰孢进行检测并对不同土壤接菌量下玉米苗枯病的发生程度进行分析,旨在建立玉米苗枯病与土壤含菌量的回归方程,以期为该病害的发生提出预警,为相关防控措施的制定提供重要参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及植物:禾谷镰孢菌株D76-1和D66、层出镰孢 *F. proliferatum* 菌株D79-2、黄色镰孢 *F. culmorum* 菌株D95-3、拟轮枝镰孢 *F. verticillioides* 菌株D13、尖镰孢 *F. oxysporum* 菌株D16、茄镰孢 *F. solani* 菌株D69-1、藤仓镰孢 *F. fujikuroi* 菌株CP2AZ、腐霉菌 *Pythium* sp. 菌株SD5、黄曲霉 *Aspergillus flavus* 菌株SD3、青霉菌 *Penicillium* sp. 菌株SD1-2,共11株菌株,均由中国农业科学院作物科学研究所收集、分离和保存;抗禾谷镰孢茎腐病的自交系玉米品种齐319,中抗禾谷镰孢茎腐病自交系玉米品种B73,感禾谷镰孢茎腐病自交系玉米品种掖478和黄早四,均由中国农业科学院作物科学研究所提供。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar,PDA)培养基:马铃薯200g、葡萄糖20g、琼脂粉20g、蒸馏水1L;合成低营养琼脂(synthetic low nutrient agar,SNA)培养基:KH₂PO₄1g、KNO₃1g、MgSO₄·7H₂O0.5g、KCl0.5g、蔗糖0.2g、葡萄糖0.2g、琼脂20g、蒸馏水1L。

试剂及仪器:琼脂粉、10×PCR Buffer、dNTPs、Taq聚合酶,北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;SYBR Green I,日本TaKaRa公司;真菌基因组DNA

快速抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; BioFast Soil Genomic DNA Extraction Kit, 杭州博日科技有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。GeneAmp PCR System 9700 基因扩增仪、ABI 7500 Real-Time PCR System, 美国ABI公司; DYY-12型电泳仪, 北京六一仪器厂; HZQ-F160全温振荡培养箱, 常州诺基仪器有限公司; Q5000超微量核酸蛋白测定仪, 美国QUAWELL公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株DNA提取及引物设计

供试菌株基因组DNA的提取: 对供试11个菌株进行单孢分离和纯化, 挑取单孢分离和纯化的菌株, 将其置于贴有玻璃纸的PDA平皿上25℃培养7d, 待菌丝长满全皿时刮取菌丝, 液氮研磨粉碎后, 参照真菌基因组DNA快速抽提试剂盒说明书提取菌株DNA。

引物HQ1-F/HQ1-R的设计: 从NCBI下载禾谷镰孢的CYP51C基因的部分序列(GU785037.1), 利用Primer 5软件设计引物, 获得引物HQ1-F(TTGA-CAGCACATTCGCCACT)和HQ1-R(ATATCCGTC-TCGTCGCCTTG), 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2.2 引物评价及带菌土样特异性检测

10 μL常规PCR扩增体系: 模板1.0 μL、上下游引物各0.5 μL、10×Buffer 1.0 μL、dNTP 0.5 μL、Taq酶0.25 μL、ddH₂O 6.25 μL。反应程序: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 共35个循环; 72℃延伸10 min。取PCR产物于1.0%琼脂糖凝胶中电泳, 在凝胶成像系统上检测并拍照。

特异性检测: 以禾谷镰孢、层出镰孢、黄色镰孢、拟轮枝镰孢、尖镰孢、茄镰孢、藤仓镰孢、腐霉菌、黄曲霉、青霉菌的DNA为模板, 分别取1.0 μL模板进行常规PCR扩增特异性检测。

灵敏度检测: 将提取的禾谷镰孢基因组DNA用ddH₂O溶解, 利用核酸蛋白测定仪检测其浓度, 添加ddH₂O将其浓度调至10⁵ pg/μL, 取该浓度DNA溶液按照10倍梯度稀释得到10⁵、10⁴、10³、100、10、1、10⁻¹和10⁻² pg/μL八个浓度, 每个浓度梯度取1.0 μL进行常规PCR灵敏度检测。

带菌土样特异性检测: 挑取各菌株, 将其分别接种到不加琼脂的SNA培养液中, 于培养箱中25℃下以120 r/min培养3 d, 制备各菌株孢子悬浮液。将各孢子悬浮液接种到灭菌土中, 制备4种土样: 将

禾谷镰孢孢子悬浮液接种到灭菌土壤中制备土样1; 将禾谷镰孢菌株D66、层出镰孢菌株D79-2、拟轮枝镰孢菌株D13、尖镰孢菌株D16、茄镰孢菌株D69-1、黄色镰孢菌株D95-3、藤仓镰孢菌株CP2AZ、腐霉菌菌株SD5八种致病菌混合后接种到灭菌土壤中制备土样2; 将土样2除禾谷镰孢菌外的其余7种致病菌制备土样3; 以灭菌土样作为土样4。取4种土样风干过筛, 称取1 g土样按照BioFast Soil Genomic DNA Extraction Kit试剂盒说明书提取总DNA, 取1.0 μL DNA进行土样常规PCR特异性检测。

1.2.3 RT-qPCR体系和标准曲线的建立

分别以10⁵、10⁴、10³、100、10、1、10⁻¹和10⁻² pg/μL的DNA标准品为模板, 在35个循环阈值内进行RT-qPCR检测, 每个梯度标准品设3次重复。20 μL荧光PCR扩增体系: 2×SYBR Premix Ex Taq™ 10.0 μL、50×ROX Reference Dye II 0.4 μL、引物各0.8 μL、模板2.0 μL、ddH₂O 6.8 μL。反应程序: 95℃预变性30 s; 95℃变性5 s, 60℃退火34 s, 40个循环; 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s, 60℃ 15 s。

基于荧光检测仪输出的扩增曲线图与熔解曲线图, 选择温度合适且线性比例良好的浓度范围, 以DNA起始浓度的对数值为横坐标, 以循环阈值C_t值为纵坐标构建标准曲线。根据标准曲线的斜率计算扩增效率, 扩增效率 $E=10^{-1/a}-1$, a 为斜率。在试验重复性较好的情况下, 标准曲线需保证高的线性($R^2>0.99$)和合适的扩增效率(扩增效率 E 在90%~110%之间)(Dorak, 2006)。

1.2.4 利用RT-qPCR体系检测土壤含菌量

平均循环阈值C_t: 每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数, 取3个管的C_t值计算平均值。标准差: 以算数平均数为中心, 反映各观测值离散程度的一个绝对指标; 基于平均C_t值, Excel软件自动生成标准差。变异系数: 反映单位均值上的离散程度, 即变异系数可以消除单位和(或)平均数不同对2个或多个资料变异程度比较的影响。变异系数即为标准差与平均数的比值, 变异系数小于1%, 表明数据可重复性较好, 结果稳定(Vaerman et al., 2004)。

挑取禾谷镰孢菌株D66, 将其接种到不加琼脂的SNA培养液中, 于培养箱中25℃下以120 r/min培养3 d, 制备禾谷镰孢孢子悬浮液, 用血球计数板计算孢子浓度, 将其分别稀释为250、500、1 000、5 000、10 000个/g, 利用不同浓度的孢子悬浮液混合灭菌土, 制备带菌土样, 参照试剂盒说明书提取土壤

总DNA,并进行RT-qPCR检测。根据荧光检测仪输出的C_t值带入标准曲线方程计算土壤中禾谷镰孢含菌量,对检测的土壤禾谷镰孢含菌量及土壤接菌量的相关性进行分析。

1.2.5 苗枯病接种试验及病情调查

苗枯病接种试验:土样灭菌后与浓度为 2×10^5 个/mL 禾谷镰孢孢子悬浮液混合制得不同浓度的带菌土样,其分别为250、500、1 000、5 000、10 000个/g。选取4个玉米自交系品种掖478、齐319、B73和黄早四进行试验,每个品种于每个浓度的菌土中播种10盆,圆口盆上口直径16 cm、下口直径11 cm、高14 cm。每盆播种5粒种子,1周后间苗,每盆留3棵正常苗,以灭菌蒸馏水混合土样为空白对照,室内管理控制温湿度。

病情调查:待玉米4叶期时,调查玉米苗枯病的发病情况,每个品种每个浓度下调查10盆,每盆调查3棵。以王贵跃等(1996)的分级标准为主,结合刘春元等(2005)的分级标准,最终确定玉米苗枯病的病情分级标准,即0级:无病害;1级:病株地上部自下向上第1片叶子叶尖变黄,根系产生少量褐斑;2级:病株地上部自下向上第1~2片叶子叶尖变黄,根系病变占整个根系的1/3以下;3级:病株地上部自下向上第1~3片叶子叶尖变黄,第1片叶子开

始干枯,根系病变占整个根系的1/3以上,2/3以下;4级:病株叶子全部萎焉,干枯,根系全部呈黑褐色。根据调查的发病情况计算病情指数,病情指数= $100 \times \sum(\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查总叶数} \times \text{最高级代表值})$ 。

1.2.6 病情指数与土壤含菌量的回归分析

为了便于病害的预测,对RT-qPCR体系检测的土壤禾谷镰孢含菌量和4个玉米自交系品种的病情指数进行回归分析。

1.3 数据分析

应用SAS 9.4统计软件对数据进行统计分析,采用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 引物评价及带菌土样特异性检测

只有禾谷镰孢菌株能扩增出190 bp的特异性条带,其它供试菌株及空白对照均无扩增条带(图1),表明HQ1-F/HQ1-R引物是禾谷镰孢的特异性引物。HQ1-F/HQ1-R引物对禾谷镰孢基因组DNA检测的灵敏度为100 pg/ μ L(图2)。含禾谷镰孢孢子悬浮液的土样DNA(土样1)以及包括禾谷镰孢在内的8种混合致病菌土样DNA(土样2)均可检测出特异性条带(图3)。

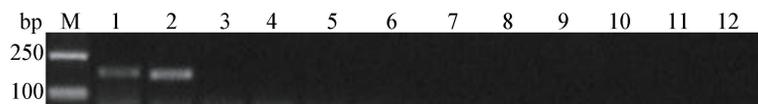


图1 禾谷镰孢的特异性引物检测结果

Fig. 1 The specificity of the primers HQ1-F/HQ1-R to *Fusarium graminearum*

M: DL2000 marker; 1-2: 禾谷镰孢; 3-8: 层出镰孢、黄色镰孢、拟轮枝镰孢、尖镰孢、茄镰孢、藤仓镰孢; 9-11: 腐霉菌、黄曲霉、青霉菌; 12: 空白对照。M: DL2000 marker; 1-2: *F. graminearum*; 3-8: *F. proliferatum*, *F. culmorum*, *F. verticillioides*, *F. oxysporum*, *F. solani*, *F. fujikuroi*; 9-11: *Pythium* sp., *Aspergillus flavus*, *Penicillium* sp.; 12: blank control.

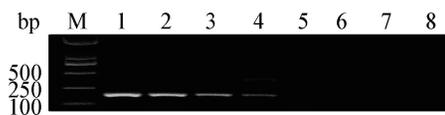


图2 禾谷镰孢特异性引物灵敏度检测结果

Fig. 2 Sensitivity detection of the specific *Fusarium graminearum* primers

M: DL2000 marker; 1-8: 10^5 , 10^4 , 10^3 , 100, 10, 1, 10^{-1} and 10^{-2} pg/ μ L, respectively.

2.2 RT-qPCR体系和标准曲线的建立

各条扩增曲线光滑、倾斜度较大且各个循环阈值间隔相等,RT-qPCR的灵敏度为1 pg/ μ L,比常规PCR灵敏度提高了100倍(图4-A)。标准品和样品熔点曲线峰型单一,且熔点温度相同,均为85.8 $^{\circ}$ C,

表明扩增产物单一,特异性好且无引物二聚体形成(图4-B)。标准曲线 $y = -3.2137x + 34.956$ ($R^2 = 0.9968$), R^2 大于0.99,斜率为-3.2137,扩增效率约为104.7%(图4-C),表明标准曲线满足要求。



图3 带菌土样的禾谷镰孢特异性检测结果

Fig. 3 The specific detection of *Fusarium graminearum* in soil samples with fungi

M: DL2000 marker; 1-4: 土样1~土样4; 5: 空白对照。M: DL2000 marker; 1-4: soil samples 1-4; 5: blank control.

2.3 利用RT-qPCR体系检测土壤含菌量

土壤中禾谷镰孢接菌量为250、500、1 000、5 000、10 000个/g土时,土样的变异系数分别为0.29%、0.41%、0.17%、0.12%和0.69%,均小于1.00%,表明数据可重复性较好,结果稳定。5个浓度接菌量的

土壤含菌量分别为19.09、46.80、82.82、372.22、741.77 pg/ μ L,表明随着土壤接菌量的增加,土壤含菌量呈线性增加,即 $y=13.603x-85.370$ ($R^2=0.9998$),表明所建立的RT-qPCR体系比较合理,可以准确反映土壤含菌量(表1)。

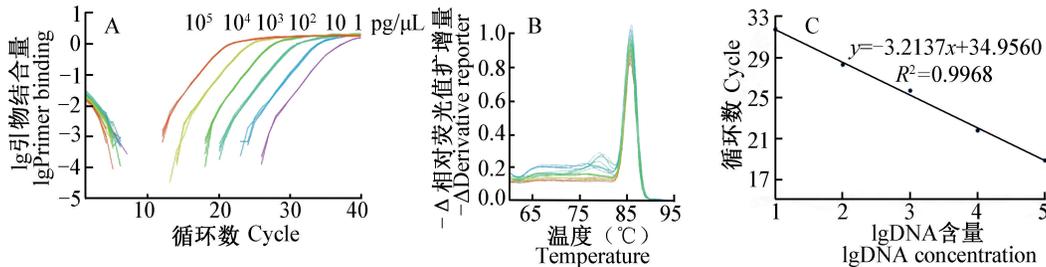


图4 10倍梯度稀释的禾谷镰孢RT-qPCR扩增曲线(A)、熔解曲线(B)和标准曲线(C)

Fig. 4 RT-qPCR amplification (A), melting (B) and standard (C) curves developed by using 10-fold dilution of *Fusarium graminearum* DNA

表1 不同土壤接菌量的土样RT-qPCR检测及4个玉米品种的病情指数

Table 1 RT-qPCR detection of soil sample with different soil inoculations and the disease indexes of four maize varieties

土壤接菌量 (个/g土) Inoculum concentration	平均C _t Mean C _t	标准差 Standard deviation (%)	变异系数 Coefficient of variation (%)	含菌量 Content of fungi (pg/ μ L)	病情指数 Disease index			
					齐319 Qi 319	掖478 Ye 478	B73	黄早四 Huangzaosi
250	30.84	0.092	0.29	19.09 \pm 1.28	6.66 \pm 0.00 b	11.10 \pm 2.22 d	4.45 \pm 2.22 d	17.76 \pm 2.23 c
500	29.59	0.119	0.41	46.80 \pm 4.06	8.87 \pm 2.21 b	18.89 \pm 1.11 d	31.07 \pm 2.23 c	37.76 \pm 2.23 c
1 000	28.79	0.050	0.17	82.82 \pm 3.03	11.09 \pm 2.21 b	42.22 \pm 2.22 c	42.20 \pm 2.20 b	57.76 \pm 2.23 a
5 000	26.69	0.033	0.12	372.22 \pm 8.95	22.20 \pm 2.20 a	64.44 \pm 2.22 b	54.47 \pm 5.88 a	44.43 \pm 4.43 b
10 000	25.74	0.180	0.69	741.77 \pm 92.76	28.87 \pm 4.43 a	73.33 \pm 6.67 a	44.40 \pm 2.20 b	62.17 \pm 4.43 a

C_t: 循环阈值。表中数据为平均数 \pm 标准差。同列不同字母表示经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。C_t: Cycle threshold. Data are mean \pm SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.4 不同土壤含菌量下的病情指数

相同土壤含菌量下,4个玉米品种的病情指数存在差异。当土壤含菌量为19.09、46.80、82.82、372.22和741.77 pg/ μ L时,玉米抗病自交系品种齐319的病情指数均低于玉米感病自交系掖478与黄早四;当土壤含菌量为741.77 pg/ μ L时,齐319病情指数达到28.87,而当土壤含菌量为46.80 pg/ μ L时,感病自交系黄早四病情指数就已经达到37.76,表明抗禾谷镰孢茎腐病的玉米自交系对苗枯病亦具有一定的抗性。随着土壤含菌量的增加,同一品种的病情指数整体呈增加趋势,但不同土壤含菌量下各品种病情指数的差异性不同,如当土壤含菌量为46.80、82.82、372.22和741.77 pg/ μ L时,感病自交系掖478病情指数为18.89、42.22、64.44、73.33,且四者之间差异显著($P<0.05$,表1)。

2.5 病情指数与土壤含菌量的回归分析

玉米感病自交系品种掖478、抗病自交系品种齐319、中抗自交系品种B73和感病自交系品种黄早四病情指数与土壤中禾谷镰孢含菌量的回归方程分别为 $y=0.0789x+22.0590$ 、 $y=0.0304x+7.8686$ 、 $y=0.0458x+23.7540$ 、 $y=0.0471x+32.0760$,其回归方程的决定系数 R^2 分别为0.7949、0.9579、0.5420和0.6753,表明在一定程度上可以通过检测土壤中禾谷镰孢含菌量来预测地上植株的发病情况。

3 讨论

目前已报道的镰孢菌特异性引物大部分是基于翻译延伸因子TEF-1 α 、ITS、 β 微管蛋白基因进行设计开发的(Nicholson et al., 1998; Bluhm et al., 2002; Mishra et al., 2003)。CYP51基因能通过编码甾醇

14 α -去甲基化酶来影响麦角固醇的合成途径,其中 *CYP51C* 为镰孢菌特有序列 (Deng, 2006), 该基因在镰孢种内高度保守, 种间存在丰富变化, 更适用于镰孢菌属种间的特异性检测 (Fernández-Ortuño et al., 2010)。本试验的 RT-qPCR 体系采用 SYBR Green 染料法, 其前提是 PCR 反应的特异性, 非特异性扩增和引物二聚体均会影响结果的准确性 (Halford et al., 1999); 此外, 标准曲线的构建同样重要, 在试验重复性较好的情况下, 需保证高的线性 ($R^2 > 0.99$) 和合适的扩增效率 (扩增效率在 90%~110% 之间) (Dorak, 2006)。本试验所建立的 RT-qPCR 体系无引物二聚体等非特异性扩增, 标准曲线及扩增效率均符合要求; 通过比较检测灵敏度发现, RT-qPCR 方法最低能检测到 1 pg/ μ L 的样品, 比常规 PCR 的检测灵敏度高出 100 倍, 可以实现对田间土壤中禾谷镰孢的检测。

在病害显症前, 感染玉米苗枯病菌的植株上部不表现症状或症状轻微, 难以直接进行诊断鉴定, 极易错过防治最佳时期, 不利于该病害的控制, 利用本试验所构建的 RT-qPCR 体系及土壤含菌量与病情指数的回归方程, 可以在病害显症前对该病害可能发生的严重程度进行预测预警, 进而有针对性地制定防控措施。同时, 禾谷镰孢也是玉米茎腐病 (陈捷, 2000; 苏前富等, 2015) 和穗腐病 (Duan et al., 2016; 周丹妮等, 2016) 的重要致病菌, 本试验建立的检测体系不仅仅局限于苗期玉米病害的检测, 还可用于实时监测整个生育期内玉米土壤中禾谷镰孢含量, 通过对土壤中病原菌动态变化的检测, 以期为玉米后期的重要病害防控提供一定的参考和依据。

从理论上讲, PCR 体系可以对从死亡的分生孢子和菌丝菌核中提取出的 DNA 进行扩增, 但是在实际土壤生态环境中, 这些死体的分生孢子、菌丝和菌核会迅速消解 (Nam et al., 2005), 因此试验中所用灭菌土样中的原菌量并不会影响试验结果, 虽然构建的单位土壤禾谷镰孢含菌量与其对应的灭菌土壤中接种孢子量呈线性关系, 但考虑到土壤环境的复杂性, 可能会影响实际土壤检测的灵敏度。由于该检测方法只进行了室内盆栽试验, 受环境条件的影响, 田间实际应用效果可能会与室内结果存在差异。

参 考 文 献 (References)

- Bluhm BH, Flaherty JE, Cousiin MA, Woloshuk CP. 2002. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in cornmeal. *Journal of Food Protection*, 65(12): 1955–1961
- Chen J. 2000. Status and perspective on research of ear rot and stalk rot in maize. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 31(5): 393–401 (in Chinese) [陈捷. 2000. 我国玉米穗、茎腐病害研究现状与展望. 沈阳农业大学学报, 31(5): 393–401]
- Cheng C, Li SL, Liu Y, Wang RS, Ding W, Zhang YQ. 2017. RT-qPCR detection and quantitative analysis of *Ralstonia solanacearum* in soil. *Tobacco Science & Technology*, 50(1): 12–16 (in Chinese) [程承, 李石力, 刘颖, 王璐笙, 丁伟, 张永强. 2017. 试验土壤中烟草青枯病菌的 RT-qPCR 检测分析. 烟草科技, 50(1): 12–16]
- Cubero J, Graham JH, Gottwald TR. 2001. Quantitative PCR method for diagnosis of citrus bacterial canker. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(6): 2849–2852
- Deng CL, Zhao XL, Shuang LH, Sun N, Chen JF. 2013. Bacterial magnetic particles real-time RT-PCR for detecting *Bean pod mottle virus*. *Journal of Plant Protection*, 40(1): 90–92 (in Chinese) [邓丛良, 赵晓丽, 双龙海, 孙宁, 陈继峰. 2013. 细菌磁颗粒实时荧光 RT-PCR 检测菜豆荚斑驳病毒. 植物保护学报, 40(1): 90–92]
- Deng JX. 2006. Structural, functional and evolutionary analyses of the rice blast fungal genome. Ph. D Thesis. Raleigh, United states: North Carolina State University
- Dorak MT. 2006. Real-time PCR. Abingdon: Taylor & Francis Group
- Duan CX, Qin ZH, Yang ZH, Li WX, Sun SL, Zhu ZD, Wang XM. 2016. Identification of pathogenic *Fusarium* spp. causing maize ear rot and potential mycotoxin production in China. *Toxins*, 8(6): 186
- Fernández-Ortuño D, Loza-Reyes E, Atkins SL, Fraaije BA. 2010. The *CYP51C* gene, a reliable marker to resolve interspecific phylogenetic relationships within the *Fusarium* species complex and a novel target for species-specific PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 144(2): 301–309
- Guo YP, Li W, Sun HY, Wang N, Yu HS, Chen HG. 2012. Detection and quantification of *Rhizoctonia cerealis* in soil using real-time PCR. *Journal of General Plant Pathology*, 78(4): 247–254
- Halford WP, Falco VC, Gebhardt BM, Carr DJJ. 1999. The inherent quantitative capacity of the reverse transcription-polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 266(2): 181–191
- Liu CY, Xing XP, Li HL, Wu JY, Zhao L. 2007. Biological characteristics of pathogen of maize seedling blight and prevention and control by fungicides. *Journal of Maize Sciences*, 15(3): 136–140 (in Chinese) [刘春元, 邢小萍, 李洪连, 吴建宇, 赵利. 2007. 玉米苗枯病菌生物学特性及药剂防治研究. 玉米科学, 15(3): 136–140]
- Liu CY, Xu XY, Wu JY, Li HL, Song WB. 2005. Identification of maize germplasm to resistance maize seedling blight. *Journal of Henan Agricultural University*, 39(2): 143–145 (in Chinese) [刘春元, 许小玉, 吴建宇, 李洪连, 宋伟彬. 2005. 玉米苗枯病抗病资源的鉴定. 河南农业大学学报, 39(2): 143–145]
- Meng Y, Hao JJ, Mayfield D, Luo LX, Munkvold GP, Li JQ. 2017. Roles of genotype-determined mycotoxins in maize seedling blight caused by *Fusarium graminearum*. *Plant Disease*, 101(7):

- Bluhm BH, Flaherty JE, Cousiin MA, Woloshuk CP. 2002. Multiplex polymerase chain reaction assay for the differential detection of trichothecene- and fumonisin-producing species of *Fusarium* in

- 1103–1112
- Mishra PK, Fox RTV, Culham A. 2003. Development of a PCR-based assay for rapid and reliable identification of pathogenic *Fusaria*. FEMS Microbiology Letters, 218(2): 329–332
- Nam HM, Srinivasan V, Gillespie BE, Murinda SE, Oliver SP. 2005. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. International Journal of Food Microbiology, 102(3): 161–171
- Nicholson P, Simpson DR, Weston G, Rezanoor HN, Lees AK, Parry DW, Joyce D. 1998. Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiological and Molecular Plant Pathology, 53(1): 17–37
- Park DS, Hyun JW, Park YJ, Kim JS, Kang HW, Hahn JH, Go SJ. 2006. Sensitive and specific detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* by PCR using pathovar specific primers based on *hrpW* gene sequences. Microbiological Research, 161(2): 145–149
- Sayler RJ, Yang Y. 2007. Detection and quantification of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA, the rice sheath blight pathogen, in rice using real-time PCR. Plant Disease, 91: 1663–1668
- Su QF, Jia J, Meng LM, Li H, Zhang W, Jin QM, Cong B. 2015. Analysis of symptoms associated with *Fusarium graminearum* infections detected by PCR in maize. Journal of Maize Sciences, 23(2): 152–154 (in Chinese) [苏前富, 贾娇, 孟玲敏, 李红, 张伟, 晋齐鸣, 丛斌. 2015. 玉米植株体内禾谷镰孢的PCR检测与症状表现分析. 玉米科学, 23(2): 152–154]
- Sun BJ, Chen QQ, Yuan HX, Shi Y, Li HL. 2015. Establishment of SYBR green I real-time PCR for quantitatively detecting *Rhizoctonia cerealis* in winter wheat. Scientia Agricultura Sinica, 48(1): 55–62 (in Chinese) [孙炳剑, 陈清清, 袁虹霞, 施艳, 李洪连. 2015. SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测小麦纹枯病菌体系的建立和应用. 中国农业科学, 48(1): 55–62]
- Sun N, Deng CL, Zheng XM, Chen JF. 2010. Detection of *Squash mosaic virus* by real-time RT-PCR. Journal of Plant Protection, 37(6): 570–572 (in Chinese) [孙宁, 邓丛良, 郑雪明, 陈继峰. 2010. 实时荧光 RT-PCR 技术检测南瓜花叶病毒. 植物保护学报, 37(6): 570–572]
- Vaerman JL, Saussoy P, Ingargiola I. 2004. Evaluation of real-time PCR data. Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents, 18(2): 212–214
- Wang GY, Yin WH, Jin JT, Jin DQ. 1996. Studies on occurrence and control of maize seeding wilt disease. Maize Science, 4(4): 75–77 (in Chinese) [王桂跃, 殷为汉, 金加同, 金德庆. 1996. 玉米苗枯病发生规律和防治方法研究. 玉米科学, 4(4): 75–77]
- Wang LJ, Xu XD, Jiang Y, Dong HY, Liu KJ. 2011. Identification of the *Fusarium* isolates of rDNA ITS in maize seedling blight in northeast of China. Journal of Maize Sciences, 19(4): 131–133, 137 (in Chinese) [王丽娟, 徐秀德, 姜钰, 董怀玉, 刘可杰. 2011. 东北玉米苗枯病原镰孢菌 rDNA ITS 鉴定. 玉米科学, 19(4): 131–133, 137]
- Wei W, Xu YL, Liu JB, Li CJ, Han XZ, Li WB, Li SX. 2010. Development and application of a real-time quantitative PCR assay for detection of *Fusarium* spp. in soil. Soybean Science, 29(4): 655–658, 662 (in Chinese) [魏巍, 许艳丽, 刘金波, 李春杰, 韩晓增, 李文滨, 李淑娴. 2010. 土壤镰孢菌 Real-Time QPCR 定量方法的建立及应用. 大豆科学, 29(4): 655–658, 662]
- Yin YP, Huang GJ, Zhao Y, Liu H, Wang ZK. 2007. Establishment and application of real time fluorescent PCR approaches for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Journal of Plant Protection, 34(6): 608–612 (in Chinese) [殷幼平, 黄冠军, 赵云, 刘洪, 王中康. 2007. 柑桔溃疡病菌实时荧光定量 PCR 检测与应用. 植物保护学报, 34(6): 608–612]
- Zhao XL, Zhou Q, Sun N, Deng CL. 2013. Development and application of RT-qPCR assay for detection of HSVd. Journal of Plant Protection, 40(4): 309–314 (in Chinese) [赵晓丽, 周琦, 孙宁, 邓丛良. 2013. 啤酒花矮化类病毒实时荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立与应用. 植物保护学报, 40(4): 309–314]
- Zhou DN, Wang XM, Li DD, Yang Y, Chen GK, Duan CX. 2016. Isolation and identification of *Fusarium* species causing maize ear rot in Chongqing and its vicinity. Journal of Plant Protection, 43(5): 782–788 (in Chinese) [周丹妮, 王晓鸣, 李丹丹, 杨洋, 陈国康, 段灿星. 2016. 重庆及周边地区玉米穗腐病致病镰孢菌的分离与鉴定. 植物保护学报, 43(5): 782–788]

(责任编辑:张俊芳)