

DOI: 10.3969/j.issn.2095-1787.20250062

基于 *TaqMan*-MGB 探针的小麦叶疫病菌快速检测方法

吕友红^{1,2}, 朱小琼², 刘芳³, 段维军^{1,4,5*}

¹宁波检验检疫科学技术研究院, 浙江 宁波 315012; ²中国农业大学植物保护学院农林生物安全国家重点实验室/农业农村部作物有害生物监测与绿色防控重点实验室, 北京 100193; ³中国科学院微生物研究所微生物多样性与资源创新利用国家重点实验室, 北京 100101; ⁴中华人民共和国宁波海关技术中心, 浙江 宁波 315012; ⁵宁波市口岸生物与食品安全检测重点实验室, 浙江 宁波 315012

摘要:【目的】小麦叶疫病菌为我国进境检疫性有害生物, 建立特异性的实时荧光 PCR 检测方法, 可实现对其快速、灵敏、准确的检测。【方法】依据小麦叶疫病菌及其近似种翻译延长因子(EF)序列差异, 设计合成特异性引物与 MGB 探针, 并优化实时荧光 PCR 反应条件, 优化后引物终浓度为 $0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 探针终浓度为 $0.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过特异性试验、灵敏度试验及模拟样品检测验证该方法的可行性。【结果】特异性试验显示, 该方法可特异性检出小麦叶疫病菌; 灵敏度试验表明, 在 $10 \mu\text{L}$ 反应体系中, 最低检测限量为总 DNA 含量 20 pg ; 模拟样品检测表明, 此方法适用于疑似携带小麦叶疫病菌样品的检测。整个反应过程约 1 h , 且检测全程闭管, 无需 PCR 后续处理。【结论】本研究建立的实时荧光 PCR 检测方法快速、灵敏、准确, 为小麦叶疫病菌的早期快速检测提供了重要技术参考, 对防范该检疫性真菌的传入与扩散具有重要意义。

关键词: 小麦叶疫病菌; 实时荧光 PCR; *TaqMan*-MGB 探针; 检测

A *TaqMan*-MGB probe-based real-time fluorescent PCR method for rapid detection of *Alternaria triticina*

LÜ Youhong^{1,2}, ZHU Xiaoqiong², LIU Fang³, DUAN Weijun^{1,4,5*}

¹Ningbo Academy of Inspection and Quarantine, Ningbo, Zhejiang 315012, China; ²College of Plant Protection, State Key Laboratory of Agricultural and Forestry Biosecurity and MARA Key Lab of Pest Monitoring and Green Management, China Agricultural University, Beijing 100193, China; ³National Key Laboratory of Microbial Diversity and Innovative Utilization, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ⁴Technical Center of Ningbo Customs District P.R. China, Ningbo, Zhejiang 315012, China; ⁵Ningbo Key Laboratory of Port Biological and Food Safety Testing, Ningbo, Zhejiang 315012, China

Abstract:【Aim】*Alternaria triticina* causing wheat leaf blight is a quarantine fungus in China. This study establishes a *TaqMan*-MGB probe-based real-time PCR method targeting species-specific genetic markers for rapid, sensitive, and accurate detection of this fungal pathogen.【Method】According to the sequence differences in the translation elongation factor (EF) between *Alternaria triticina* and its closely related species, a pair of species-specific primers and a minor groove binder (MGB) probe were designed via conserved region alignments. The real-time PCR conditions were optimized as follows: a final primer concentration of $0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ and a final probe concentration of $0.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$. The feasibility of the method was validated through specificity, sensitivity, and simulated sample testing.【Result】Specificity testing results demonstrated that the method can specifically detect *A. triticina* while showing no cross-reactivity with non-target species. Sensitivity testing results showed that the lowest detection limit was 20 pg of total DNA in a $10 \mu\text{L}$ reaction system. Simulated sample testing results confirmed the method's applicability for detecting samples suspected of carrying *A. triticina*. The entire reaction process took approximately 1 h , and the detection was performed in one-tube without

收稿日期(Received): 2025-04-30 接受日期(Accepted): 2025-06-22

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFF0608804); 国家自然科学基金项目(32322001); 海关总署科研项目(2022HK011); 宁波市社会公益科研项目(2022S010); 宁波中盛产品检测有限公司项目(2023ZS004)

作者简介: 吕友红, 女。研究方向: 植物病原真菌。E-mail: 2231472403@qq.com

* 通信作者(Author for correspondence), 段维军, E-mail: weijunduan@163.com

post-PCR handling. 【Conclusion】 The optimized real-time PCR detection method developed in this study is rapid, sensitive, and accurate. It provides a crucial technical reference for the early detection of *A. triticina*, which is critical for preventing the introduction and spread of this major wheat pathogen, supporting enhanced quarantine surveillance programs.

Key words: *Alternaria triticina*; real-time fluorescent PCR; *TaqMan*-MGB probe; detection

小麦 *Triticum aestivum* L. 是禾本科小麦属的一年或越年生草本植物, 原产于中东地区, 距今已有 5 000 多年的栽培历史(金善宝, 1996)。小麦是全球 1/3 以上人口的主要粮食, 是人类食物中热量和植物源性蛋白质的主要来源(Curtis *et al.*, 2002)。小麦真菌病害是小麦生产的主要限制因素, 据统计, 该类病害每年可造成 15% ~ 20% 的产量损失(Figueroa *et al.*, 2018)。

小麦叶疫病是小麦上的重要病害, 最早发现于印度, 曾于 1960—1961 年在印度次大陆流行并几乎摧毁了所有栽培品种, 造成 42.5% ~ 65.6% 的产量损失(Prabhu & Singh, 1974; Raut *et al.*, 1983)。该病害目前在世界各地广泛发生, 包括非洲的埃及(Beshir, 1994) 和尼日利亚(Anahosur, 1978), 北美洲的墨西哥(Waller, 1981), 南美洲的阿根廷(Perelló & Sisterna, 2005), 欧洲的丹麦、法国、希腊、北马其顿、葡萄牙(Logrieco *et al.*, 1990)、意大利(Casulli, 1990)、俄罗斯(Gor'kovenko, 2001), 亚洲的印度(Prabhu & Prasada, 1966)、孟加拉国(Rashid *et al.*, 1985)、伊朗(Somma *et al.*, 2019)、伊拉克(Khudhair *et al.*, 2014)、黎巴嫩(Logrieco *et al.*, 1990)、土耳其(Özçelik & Özçelik, 1997)。该病害在我国局部地区有发生报道(商鸿生等, 2000)。小麦叶疫病主要危害小麦叶片, 发病初期叶片呈淡褐色、不规则的椭圆形斑点, 病斑中心眼点状是黑褐色的叶组织坏死部, 病斑周围为深褐色的叶组织坏死部, 病斑可沿叶脉伸展, 形成较长的坏死线。坏死部位周围具有亮黄色的晕圈, 病斑表面可生灰黑色霉状物, 发病后期多个病斑连片形成大块坏死斑, 导致整叶枯死(王春江和商鸿生, 1999)。

小麦叶疫病的病原菌为小麦叶疫病菌 *Alternaria triticina* Prasada & Prabhu, 隶属于囊菌门 Ascomycota 座囊菌纲 Dothideomycetes 格孢腔菌目 Pleosporales 格孢腔菌科 Pleosporaceae 链格孢属 *Alternaria* (Prasada & Prabhu, 1962)。寄主植物除小麦外, 还包括燕麦 *Avena sativa* L.、箭叶旋花 *Convolvulus arvensis* L.、大麦 *Hordeum vulgare* L.、黑麦 *Secale cereale* L.、双粒小麦 *Triticum dicoccum* Schubl.、印度圆

粒小麦 *Triticum sphaerococcum* Perciv. 和硬粒小麦 *Triticum turgidum* L. 等(Khudhair *et al.*, 2014; Masiello *et al.*, 2020)。鉴于其严重危害性, 该病菌已被列入《中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录》, 是一种检疫性真菌(中华人民共和国农业部, 2007)。

当前, 国内口岸对小麦叶疫病菌的鉴定主要参照《小麦叶疫病菌检疫鉴定方法》(SN/T 4733-2016) 进行。根据该标准, 采用特异性引物 LJY1/LJY2 进行扩增后获得大小约 520 bp 的片段, 对该片段进行测序比对后, 判定是否为小麦叶疫病菌。分析发现, 现行标准中无明确可靠的参考序列。前期研究发现, GenBank 对小麦叶疫病菌的序列存在大量不一致之处。如不同研究中同一个小麦叶疫病菌分离物 E.G.S. 17-061, 其 ITS 序列 AY714476 与 AY762948 存在 9 个碱基差异(Mercado *et al.*, 2006; Xue & Zhang, 2007); 不同小麦叶疫病菌分离物 GAPDH 序列 CBS 763.84 (FJ214846) 与 E.G.S. 17-061 (JQ646281) 存在 22 个碱基差异(Andersen *et al.*, 2009; Lawrence *et al.*, 2013)。可见, GenBank 中该病菌序列存在较大差异, 难以利用该标准进行准确鉴定。实时荧光 PCR 检测技术具有快速、准确、不易污染等特点, 在大量植物病原真菌快速检测研究工作中已被广泛采用(段维军等, 2021; 郭立新等, 2020; 吕燕等, 2022)。为满足小麦叶疫病菌快速检测的实际需求, 本研究开展了该病菌的实时荧光 PCR 检测技术研究, 以期建立准确、灵敏、快速的检疫鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

核酸自动化提取仪(KingFisher mL, Thermo Fisher 公司), 实时荧光 PCR 仪(ABI PRISM7900 型, ABI 公司), 超微量分光光度计(NanoDrop 2000 C 型, Thermo Fisher 公司), 高通量组织破碎仪(MM400 型, Retsch 公司), 核酸提取试剂盒(磁珠法提取核酸试剂盒(植物)MAG Plant DNA Extraction Kit, 珠海立飞技术服务有限公司), Nuclease

free Water (北京兰杰柯科技有限公司), 2 × TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems 公司)。

1.2 供试菌株

供试菌株共 24 株,包括分别从荷兰真菌保藏中心、中国普通微生物菌种保藏管理中心、美国标准菌株典藏中心获得的小麦叶疫病菌各 1 株,从加拿大进境小麦分离到的 *A. alternata* 2 株、*A. infecto-*

ria 3 株、*A. tenuissima* 1 株、*Alternaria* sp.1 株,从哈萨克斯坦向日葵 *Helianthus annuus* L.上分离到的 *A. alternata*、*A. alstroemeriae*、*A. arborescens*、*A. compacta*、*A. helianthiinficiens*、*A. seleniiphila* 各 1 株、*A. tenuissima* 3 株,从委内瑞拉向日葵上分离到的 *A. alternata* 1 株,从进境澳大利亚大麦分离到的 *A. chartarum*、*A. infectoria*、*A. triticimaculans* 各 1 株,从进境阿根廷小麦分离到的 *A. solani* 1 株(表 1)。

表 1 供试菌株

Table 1 The strains used in the study

菌株编号 Strain code	物种名称 Strain name	来源国 Location	来源 Source	寄主植物 Host
CBS 121461	<i>A. triticina</i>	伊朗 Iran	CBS ^a	小麦 <i>T. aestivum</i>
CGMCC 3.9868	<i>A. triticina</i>	印度 India	CGMCC ^b	小麦 <i>T. aestivum</i>
ATCC 36205	<i>A. triticina</i>	印度 India	ATCC ^c	小麦 <i>T. aestivum</i>
XM2662-2-9	<i>A. alternata</i>	加拿大 Canada	本实验室保存 Laboratory preservation	小麦 <i>T. aestivum</i>
XK-5-21	<i>A. alternata</i>	哈萨克斯坦 Kazakhstan	本实验室保存 Laboratory preservation	向日葵 <i>H. annuus</i>
DK-2-17	<i>A. alternata</i>	委内瑞拉 Venezuela	本实验室保存 Laboratory preservation	向日葵 <i>H. annuus</i>
A16-22	<i>A. alternata</i>	加拿大 Canada	本实验室保存 Laboratory preservation	小麦 <i>T. aestivum</i>
XK-6	<i>A. alstroemeriae</i>	哈萨克斯坦 Kazakhstan	本实验室保存 Laboratory preservation	向日葵 <i>H. annuus</i>
XK-14	<i>A. arborescens</i>	哈萨克斯坦 Kazakhstan	本实验室保存 Laboratory preservation	向日葵 <i>H. annuus</i>
XM18912-1	<i>A. chartarum</i>	澳大利亚 Australia	本实验室保存 Laboratory preservation	小麦 <i>T. aestivum</i>
XK-2	<i>A. compacta</i>	哈萨克斯坦 Kazakhstan	本实验室保存 Laboratory preservation	向日葵 <i>H. annuus</i>
XK-19	<i>A. helianthiinficiens</i>	哈萨克斯坦 Kazakhstan	本实验室保存 Laboratory preservation	向日葵 <i>H. annuus</i>
XM18912-12	<i>A. infectoria</i>	澳大利亚 Australia	本实验室保存 Laboratory preservation	小麦 <i>T. aestivum</i>
XM2662-3	<i>A. infectoria</i>	加拿大 Canada	本实验室保存 Laboratory preservation	小麦 <i>T. aestivum</i>
A21	<i>A. infectoria</i>	加拿大 Canada	本实验室保存 Laboratory preservation	小麦 <i>T. aestivum</i>
A15	<i>A. infectoria</i>	加拿大 Canada	本实验室保存 Laboratory preservation	小麦 <i>T. aestivum</i>
XK-11	<i>A. seleniiphila</i>	哈萨克斯坦 Kazakhstan	本实验室保存 Laboratory preservation	向日葵 <i>H. annuus</i>
A1	<i>A. solani</i>	阿根廷 Argentina	本实验室保存 Laboratory preservation	小麦 <i>T. aestivum</i>
XM2662-1	<i>A. tenuissima</i>	加拿大 Canada	本实验室保存 Laboratory preservation	小麦 <i>T. aestivum</i>
XK-4	<i>A. tenuissima</i>	哈萨克斯坦 Kazakhstan	本实验室保存 Laboratory preservation	向日葵 <i>H. annuus</i>
XK-16	<i>A. tenuissima</i>	哈萨克斯坦 Kazakhstan	本实验室保存 Laboratory preservation	向日葵 <i>H. annuus</i>
XK17	<i>A. tenuissima</i>	哈萨克斯坦 Kazakhstan	本实验室保存 Laboratory preservation	向日葵 <i>H. annuus</i>
XM18912-5-6	<i>A. triticimaculans</i>	澳大利亚 Australia	本实验室保存 Laboratory preservation	小麦 <i>T. aestivum</i>
A2-19	<i>A. sp.</i>	加拿大 Canada	本实验室保存 Laboratory preservation	小麦 <i>T. aestivum</i>

a: 荷兰真菌保藏中心; b: 中国普通微生物菌种保藏管理中心; c: 美国标准菌株典藏中心。

a: Centraalbureau voor Schimmelcultures, CBS; b: China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC; c: American Type Culture Collection, ATCC.

1.3 DNA 提取

用灭菌枪头刮取在 PDA 平板上培养 7 d 菌株的菌丝体,将挑取的菌丝体置于 2 mL 离心管中,采用 MAG Plant DNA Extraction Kit 试剂盒,按操作说明书在核酸自动化提取仪上进行 DNA 提取。提取的 DNA 经超微量分光光度计检测浓度后,保存于 -20 °C 冰箱备用。

1.4 EF 基因扩增及序列比对分析

以供试菌株 DNA 为模板,采用通用引物 EF-728F 和 EF-986R (Carbone & Kohn, 1999) 进行翻译

延长因子(translation elongation factor, EF)片段扩增。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,确认扩增成功后,将纯化的 PCR 产物送至上海生物工程技术有限公司进行双向测序。为确认序列的可靠性,利用 NCBI 网站的 BLAST 程序对测定获得 EF 序列进行比对分析。自 NCBI 下载小麦叶疫病菌及其近似种的 EF 序列进行比对,筛选特异性位点。

1.5 引物和探针的设计

根据序列比对结果,选取小麦叶疫病菌的模式

分离物 CBS 763.84 (登录号: MZ 073960) 的 EF 基因, 使用 Primer Express 3.0 软件进行特异性引物和探针设计。

1.6 特异性检测

以表 1 供试菌株 DNA 为模板, 采用 10 μL 实时荧光扩增反应体系: $2 \times \text{TaqMan}^{\text{®}}$ Universal PCR Master Mix 5 μL , 正反向引物对 ATF/ATR 各 0.5 μL , 探针 ATP 0.5 μL , DNA 模板 1 μL , nuclease-free water 2.5 μL 。其中, 引物及探针浓度均为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以 nuclease-free water 为空白对照。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 1 min, 共 40 个循环。

1.7 实时荧光 PCR 体系的优化

引物浓度优化: 以 CGMCC 3.9868 的 DNA 为模板, 按照 1.6 中的体系, 将正反向引物浓度从 0.1 ~ 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、以 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 递增。探针浓度优化: 以 CGMCC 3.9868 的 DNA 为模板, 按照 1.6 中的体系, 设置引物浓度为 0.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 将探针浓度设置为 0.1 ~ 1.0 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、以 0.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 递增。反应条件同 1.6。

1.8 灵敏度试验

以 CGMCC 3.9868 的 DNA 为模板, 用 nuclease-free water 进行 10 倍梯度稀释, 共设计 7 个浓度 (依次为 20 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、2 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、200 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、20 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、2 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、200 $\text{fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、20 $\text{fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 每个浓度梯度 3 个重复。利用 1.6 中优化后的体系进行实时荧光 PCR, 测定灵敏度, 建立标准曲线。

1.9 重复性试验

以 CGMCC 3.9868 的 DNA 为模板进行系列稀释, 获得 4 个浓度 (20 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、2 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、200 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、20 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 为反应模板, 选取优化后的引物、探针浓度, 反应条件同 1.6, 组内及组间各设置 3 次重复, 进行重复性检测, 分析组内及组间差异。

1.10 模拟病害样品检测

称取 PDA 平板上培养 7d 的菌株 CGMCC 3.9868 小麦叶疫病菌菌丝 50、100 和 300 mg, 分别与 1 g 灭菌处理后的小麦粒混合, 作为模拟实际样品 1~3。将模拟实际样品分别放入 50 mL 研磨罐中, 加入 2 粒无菌钢珠, 置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱冷冻过夜后, 将研磨罐放入高通量组织破碎仪破碎 2 min, 破碎频率 20 Hz。将破碎好的粉末分别称取 3

份, 每份 0.1 g, 参照 1.3 方法进行 DNA 提取。利用优化后的实时荧光 PCR 反应体系, 以 CBS 121461 的 DNA 为阳性模板, 以 nuclease-free water 为阴性对照, 测定该方法在实际样品检测中的效果。

2 结果与分析

2.1 引物探针设计

分析发现, 3 株小麦叶疫病菌 (CBS 121461、ATCC 36205、CGMCC 3.9868) 的 EF 序列高度一致, 仅测定序列长度略有差异, 同时小麦叶疫病菌与其他分离物间的 EF 序列差异度较大, 证实 EF 序列具有高度的种内一致性和较大的种间差异性, 适合作为靶标序列设计特异性引物和探针。据此, 所设计正向引物 ATF: 5'-TCGCTCTCTGGAAGTTCGAA-3', 反向引物 ATR: 5'-CATGAGGAGAGTCAGCAGGAAGT-3', 探针 ATP: 5'-CCCCAAATACTACGTCA-3', 该探针的 5' 端含有 FAM 报告荧光染料, 3' 端为含有不发荧光的淬灭基团并具有 MGB 分子 (图 1)。引物和 *TaqMan*-MGB 探针由上海生工生物工程技术有限公司合成。

2.2 特异性分析

供试菌株在相同条件下进行实时荧光 PCR 检测, 只有 3 株小麦叶疫病菌有明显的扩增曲线产生, 其他参试菌株及空白对照均无扩增, 说明本研究所设计的引物和探针具有良好的特异性 (图 2)。

2.3 实时荧光 PCR 的体系优化

2.3.1 引物浓度优化 由图 3A 可知, 当引物浓度为 0.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ΔRn 值最大, Ct 值最小。经过 3 次重复试验, 确定 0.7 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为引物最佳浓度。

2.3.2 探针浓度优化 由图 3B 可知, 当探针浓度为 0.9 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$, ΔRn 值最大, Ct 值最小。经过 3 次重复试验, 确定 0.9 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 为探针最佳浓度。

2.4 灵敏度试验及标准曲线的构建

灵敏度试验结果显示, 本研究所建立的实时荧光 PCR 方法的最低检测限量为 20 $\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ (图 4A)。

通过对已知浓度梯度的总 DNA 进行实时荧光 PCR 检测, 发现 DNA 浓度越高, Ct 值越小, 3 个平行试验结果显示, 标准曲线 $y = -3.91x + 28.07$ ($R^2 = 0.9963$), x 代表 DNA 浓度的对数, y 代表相应的 Ct 值 (图 4B)。

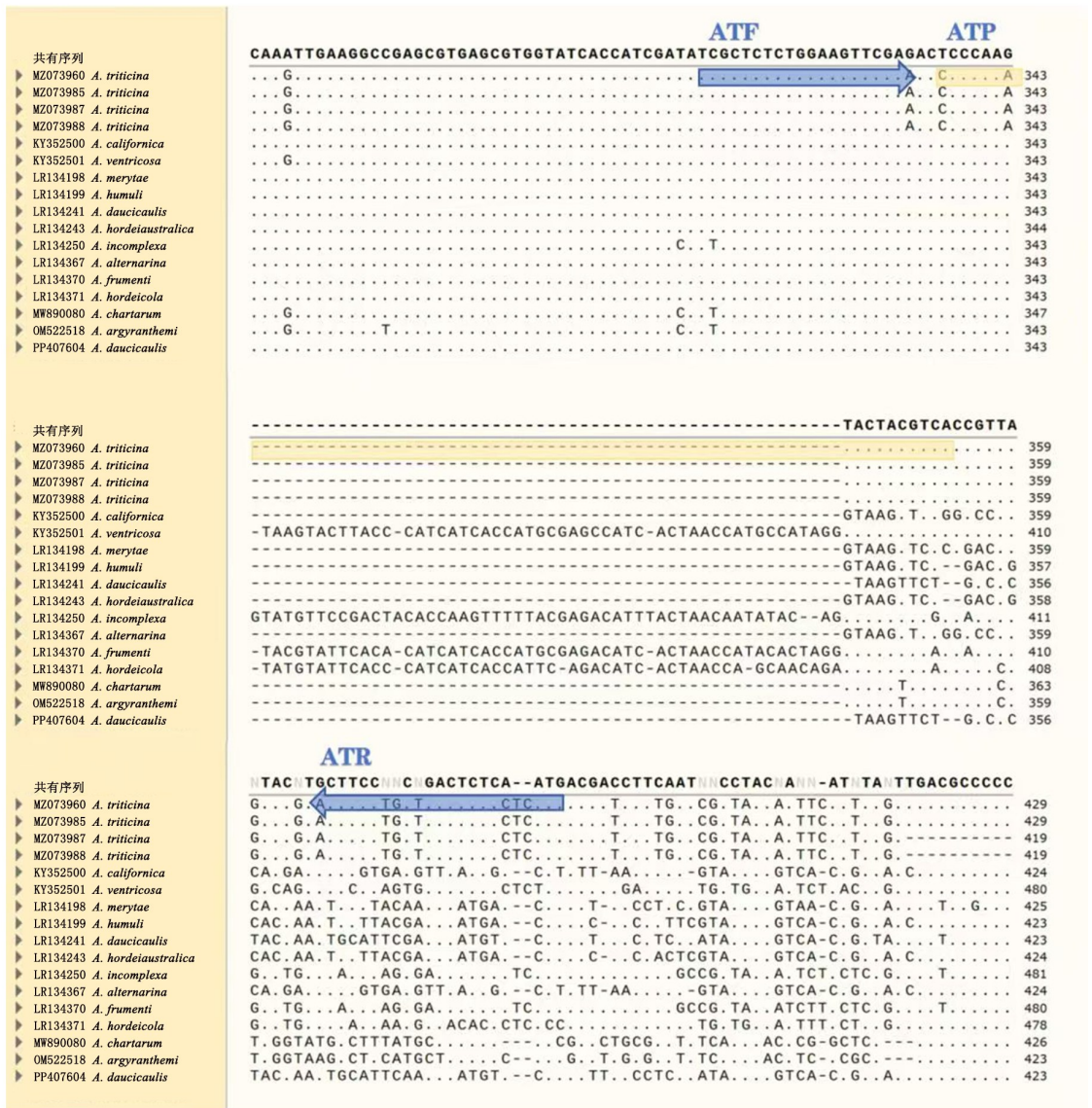


图 1 基于 EF 位点的实时荧光 PCR 引物和探针位置示意图

Fig.1 Real-time PCR primer-probe based on the EF regions

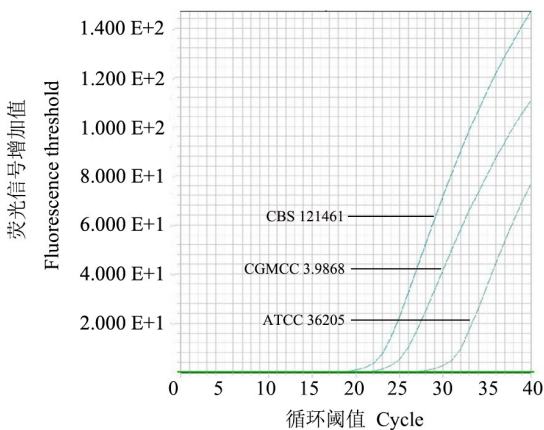


图 2 小麦叶疫病菌实时荧光 PCR 的特异性试验

Fig.2 Specificity of the real-time fluorescent PCR assay for *A. trititina*

2.5 重复性检测

由表 2 可知,组内重复 CV 值在 0.19% ~ 0.53%,组间重复 CV 值在 0.23% ~ 0.71%,均小于 1%。说明本研究所建立的小麦叶疫病菌 *TaqMan-MGB* 实时荧光 PCR 检测方法具有良好的重复性和稳定性。

2.6 模拟病害样品检测结果

模拟病害样品检测结果表明,3 份模拟病害样品均有明显扩增荧光信号,未添加小麦叶疫病菌的小麦样品无扩增荧光信号,阳性和阴性对照均正常(图 5)。

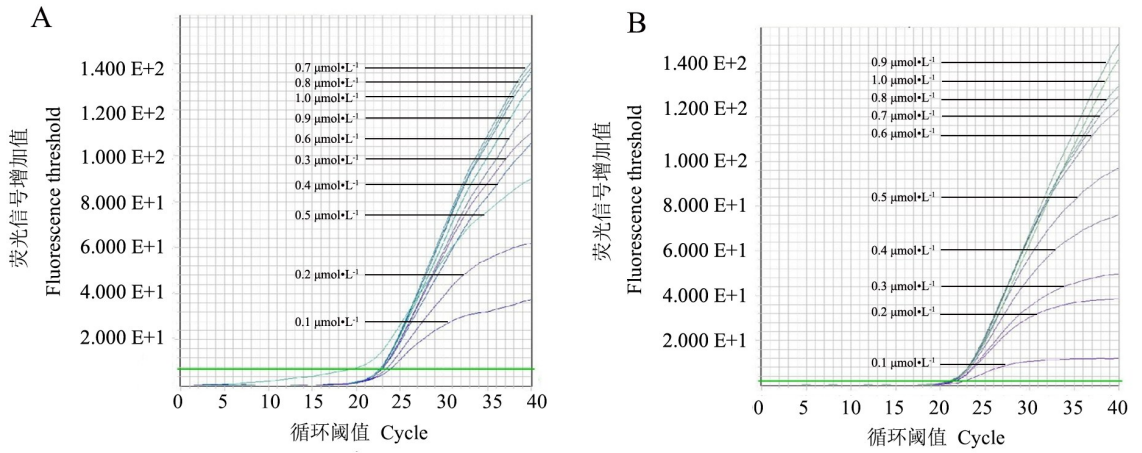


图 3 小麦叶疫病菌实时荧光 PCR 的引物浓度优化 (A) 和探针浓度的优化 (B)

Fig.3 The optimization of primer concentration (A) and probe concentration (B) for the real-time fluorescent PCR assay

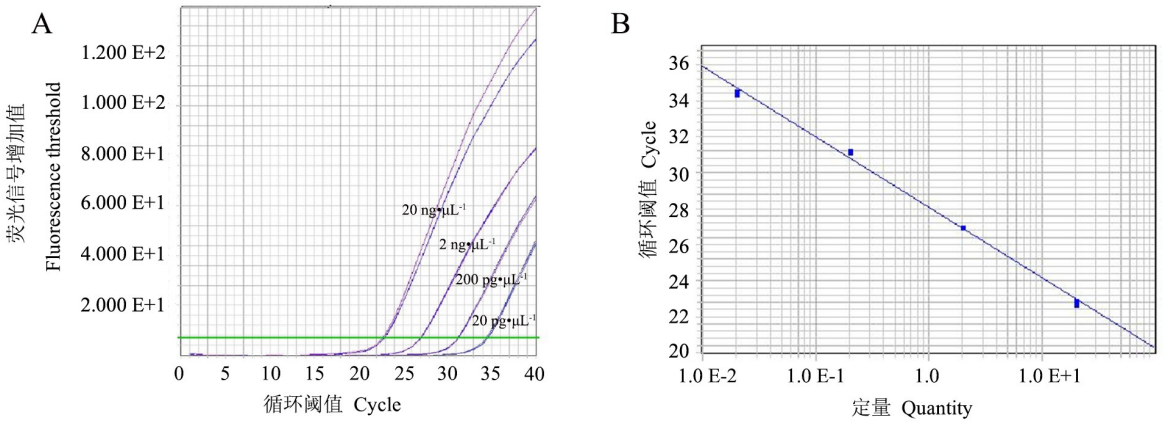


图 4 小麦叶疫病菌实时荧光 PCR 的灵敏度试验 (A) 及标准曲线的建立 (B)

Fig.4 Relative sensitivity (A) and standard curve (B) of the real-time fluorescent PCR assays for *A. tritricina*

表 2 小麦叶疫实时荧光 PCR 重复性试验结果

Table 2 The repeatability results of *TaqMan* MGB real-time PCR for *A. tritricina*

重复组 Repeatability	DNA 浓度 DNA concentration /(ng · μL ⁻¹)	<i>Ct</i>						标准偏差 SD	变异系数 CV/%
		重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	平均值 Mean				
组内 Intra-group	20.00	22.47	22.53	22.59	22.53	0.05	0.22		
	2.00	26.63	26.64	26.74	26.67	0.05	0.19		
	0.20	30.58	30.94	30.91	30.81	0.16	0.53		
	0.02	33.88	34.02	34.22	34.04	0.14	0.41		
组间 Inter-group	20.00	22.44	22.44	22.55	22.48	0.05	0.23		
	2.00	26.60	26.42	26.67	26.56	0.11	0.40		
	0.20	30.55	30.96	30.95	30.82	0.19	0.62		
	0.02	33.74	33.45	33.16	33.45	0.24	0.71		

3 讨论

链格孢属真菌 *Alternaria* sp. 是一类丝状子囊菌, 可营寄生、内生或腐生生活 (Thomma, 2003)。链格孢属的分类鉴定主要依据形态学方法 (Armitage *et al.*, 2015)。链格孢属可分为 2 类: 第一类可产大孢子, 由于其独特的形态和稳定的寄主范围, 较易鉴定 (Peever *et al.*, 2004); 第二类可产小孢子,

种类鉴定相对困难 (Pryor & Gilbertson, 2000)。由于其形态特性易受环境条件影响, 如营养条件、pH、温度、光照等多种因素, 使得链格孢属下种的描述及分类鉴定非常困难, 特别是对短喙或无喙的小孢子种, 对操作人员的专业素养要求较高 (冯中红和孙广宇, 2020)。

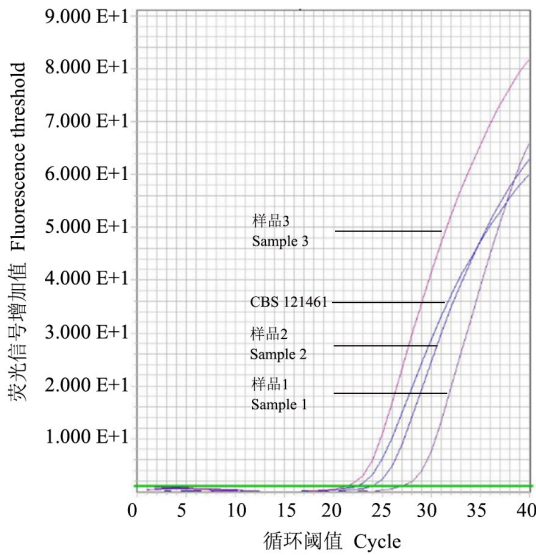


图 5 小麦样品中小麦叶疫病菌的检测

Fig.5 Detection of *A. triticina* in wheat samples

小麦叶疫病菌属于小孢子类中的 Infectoriae 分支,目前该分支物种的有性态尚未被发现(Pryor & Gilbertson, 2000)。早期,对该病菌鉴定与其他链格孢属物种类似,主要采用形态学方法(商鸿生等, 2000; Khudhair *et al.*, 2014; Peever *et al.*, 2004)。近年来, DNA 序列分析技术在链格孢属的系统发育分析和种类鉴定中被广泛应用,如核糖体内源转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)(王洪凯等, 2001)、微管蛋白基因(β -tubulin, TUB)(Peever *et al.*, 2004)、肌动蛋白(actin, ACT)(Park *et al.*, 2008)、组蛋白基因(histone, HIS)等(岳海梅等, 2010; 张荣等, 2009; Armitage *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2014)。这些基因片段在链格孢属物种种类划分中发挥了一定作用,但也有一定局限性。尽管 ITS 序列在真菌中被普遍使用,并被推荐作为真菌的 DNA 条形码,但该片段对链格孢属中的物种,特别对小孢子类群种类无法进行有效区分,同时线粒体大亚基核糖体 RNA 基因(mitochondrial large subunit ribosomal RNA, mt LSU rRNA)、线粒体小亚基核糖体 RNA 基因(mitochondrial small subunit rRNA gene, mtSSU)、链格孢过敏原基因(alternaria major allergen 1, Alt a1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenas, GAPDH)和质膜 ATP 酶(plasma membrane ATPase, ATP)等基因片段在小孢子链格孢中种间差异很小甚至无差异(王洪凯等, 2001; Somma *et al.*, 2019)。翻译延伸因子片段被广泛用于真菌系统发育研究,具有适

度的种内保守性和种间多态性,适合种特异性检测(Yang *et al.*, 1993)。特别是在链格孢属种类划分方面,具有良好的区分效果,被广泛应用于链格孢属内物种鉴定和快速检测方面(许然等, 2025; Patel & Zhang, 2017; Yin *et al.*, 2023)。

为确保小麦叶疫病菌检测所用引物和探针的特异性,本研究根据小麦叶疫病菌模式分离物 CBS 763.84(登录号: MZ073960)及其近似种的翻译延长因子序列差异,设计并合成了一对特异性引物和一条 MGB 探针。由特异性试验结果可知,所设计引物与探针的特异性较强,能够有效区分小麦叶疫病菌及其近似种。同时,由于 TaqMan MGB 探针 3' 端有小沟结合分子(minor groove binder, MGB),相对于 TaqMan 探针来说, TaqMan-MGB 探针提高了的退火温度,缩短了探针长度,能够分辨一个碱基的差异,因此保证了特异性。灵敏度试验研究表明,本检测方法在 10 μ L 反应体系中, DNA 含量最低检测限为 20 pg, 与以往针对其他植物病原真菌该靶标片段的检测灵敏度相当(郭立新等, 2020; 吕燕等, 2022), 低于针对其他植物病原真菌采用 ITS 片段作为靶标序列的检测方法灵敏度(段维军等, 2021)。这可能是由于 ITS 片段位于核糖体 RNA 基因中,是真核生物基因组中高度重复的多拷贝区域(Smith & Smith, 2002)。而 EF 基因属于单拷贝或低拷贝的蛋白质编码基因(通常每个单倍体基因组仅 1~2 个拷贝)(Colthurst *et al.*, 1992), 导致检测灵敏度较低。

重复性试验结果表明,不同浓度 DNA 样品检测中, C_t 值波动较小,稳定性较高,组内重复与组间重复的 CV 值均小于 1%,高稳定性为检测低浓度样品提供了保障。本研究根据灵敏度试验结果计算获得的标准曲线斜率为 -3.92, 接近理想值[理想的 PCR 扩增效率下,斜率应为 -3.32 (Higuchi *et al.*, 1992)],表明扩增效率良好。高效的扩增意味着即使是极微量的 DNA 模板,也能在较少的循环次数内被扩增到可检测水平,从而实现高灵敏度检测。另一方面,相关系数 $R^2 = 0.9963$, 接近于 1, 说明 DNA 浓度与 C_t 值之间呈现高度的线性关系。重复性试验保证了在低浓度样品检测时结果的可靠性,而标准曲线则从定量关系上展示了检测方法对低浓度样品的有效检测能力。

小麦叶疫病菌可随着带菌种子和病残体进行

远距离传播(严进和吴品珊,2013),带菌种子是远距离传播的主要载体(Dash & Narain,1989),田间发病的初侵染源主要来自带菌种子和土壤中的病残体(Mathur & Cunfer,1993)。为考察本研究所建立方法在携带该病菌的小麦种子上检测效果,本研究模拟制备了携带小麦叶疫病菌的小麦样品。试验结果表明,采用本研究所建立方法能有效自携带有不同含量的小麦叶疫病菌小麦种子样品中检出该病菌。

本研究利用 *TaqMan*-MGB 探针,建立并优化了小麦叶疫病菌的实时荧光 PCR 快速检测体系(引物最佳浓度为 $0.7 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,探针最佳浓度为 $0.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),在 $10 \mu\text{L}$ 反应体系中,DNA 含量最低检测限达 20 pg ,可靠性和稳定性良好,为该病菌的后续鉴定检测和防控工作提供了参考。

参考文献

段维军,段丽君,吕燕,陈倩,吴品珊,蔡磊,2021. 向日葵黑茎病菌 *TaqMan*-MGB 探针实时荧光快速检测方法. *植物病理学报*, 51(6): 975-986.

冯中红,孙广宇,2020. 链格孢属及相关属分类研究新进展. *菌物研究*, 18(4): 294-303.

郭立新,段丽君,王英超,段维军,2020. 基于 *TaqMan* MGB 探针的葡萄茎枯病菌实时荧光 PCR 检测方法. *植物病理学报*, 50(1): 97-106.

金善宝,1996. 中国小麦学. 北京: 中国农业出版社.

吕燕,郭立新,段维军,2022. 基于 *TaqMan* MGB 探针的可开花瘦病菌快速检测方法. *植物保护*, 48(5): 220-226.

商鸿生,王春江,王树权,2000. 小麦链格孢叶枯病的病原学研究. *植物病理学报*, 30(2): 129-132.

王春江,商鸿生,1999. 小麦叶疫病的诊断和病原菌鉴定. *植物保护*, 25(6): 19-20.

王洪凯,张天宇,张猛,2001. 应用 5.8 S rDNA 及 ITS 区序列分析链格孢种级分类. *菌物系统*, 20(2): 168-173.

许然,牟桂萍,龚静如,胡加谊,段维军,曾杨森,易建平,2025. 小麦叶疫病菌实时荧光 PCR 检测方法的建立. *植物检疫*, 39(1): 26-30.

严进,吴品珊,2013. 中国进境植物检疫性有害生物: 菌物卷. 北京: 中国农业出版社.

岳海梅,庄华,孙广宇,旺姆,2010. 银杏内生小孢子链格孢的分离与鉴定. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 38(7): 191-196.

张荣,岳海梅,孙广宇,2009. 小孢子链格孢 OPA2-1 核苷酸序列分析及系统发育研究. *菌物学报*, 28(4): 553-557.

中华人民共和国农业部,2007. 中华人民共和国农业部公告第 862 号,中华人民共和国进境植物检疫性有害生物名录. (2007-05-29) [2025-03-16]. http://www.moa.gov.cn/zwillm/tzgg/gg/200706/t20070604_827310.htm.

ANAHOSUR K H, 1978. *Alternaria triticina*. *Descriptions of Fungi and Bacteria*, 59(1): 583-584.

ANDERSEN B, SØRENSEN J L, NIELSEN K F, VAN DEN ENDE BG, DE HOOG S, 2009. A polyphasic approach to the taxonomy of the *Alternaria infectoria* species-group. *Fungal Genetics and Biology*, 46(9): 642-656.

ARMITAGE A D, BARBARA D J, HARRISON R J, LANE C R, SCREENIVASPRASAD S, WOODHALL J W, CLARKSON J P, 2015. Discrete lineages within *Alternaria alternata* species group: identification using new highly variable loci and support from morphological characters. *Fungal Biology*, 119(11): 994-1006.

BESHIR M A, 1994. Susceptibility of some wheat cultivars to *Alternaria triticina* and the biochemical changes associated with infection. *Annals of Agricultural Science, Moshthohor*, 32(2): 899-909.

CARBONE I, KOHN L M, 1999. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3): 553-556.

CASULLI F, 1990. Epidemiology of the main foliar diseases of durum wheat in Apulia and Basilicata. *Phytopathologia Mediterranea*, 29(3): 151-158.

COLTHURST D R, SCHAUDER B S, HAYES M V, TUIE M F, 1992. Elongation factor 3 (EF-3) from *Candida albicans* shows both structural and functional similarity to EF-3 from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 6(8): 1025-1033.

CURTIS B C, RAJARAM S, GÓMEZ MACPHERSON H, 2002. *Bread wheat: improvement and production*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

DASH S K, NARAIN A, 1989. Seed transmission of *Alternaria triticina* in wheat in Orissa. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 19(2): 157-160.

FIGUEROA M, HAMMOND-KOSACK K E, SOLOMON P S, 2018. A review of wheat diseases—A field perspective. *Molecular Plant Pathology*, 19(6): 1523-1536.

GOR'KOVENKO V S, 2001. Causal agents of leaf spot of winter wheat. *Zashchita i Karantin Rastenii*, 5: 33.

HIGUCHI R, DOLLINGER G, WALSH P S, GRIFFITH R, 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio Technology*, 10(4): 413-417.

KHUDHAIR M W, ABOUD H M, DHEYAB N S, SHBAR A K,

- KHALAF H S, 2014. The first record of *Alternaria triticina* the causative agent of *Alternaria* leaf blight in wheat and barley in Iraq. *International Journal of Phytopathology*, 3(3): 133–138.
- LAWRENCE D P, GANNIBAL P B, PEEVER T L, PRYOR B M, 2013. The sections of *Alternaria*: formalizing species-group concepts. *Mycologia*, 105(3): 530–546.
- LOGRIECO A, BOTTALICO A, SOLFRIZZO M, MULE G, 1990. Incidence of *Alternaria* species in grains from Mediterranean countries and their ability to produce mycotoxins. *Mycologia*, 82(4): 501–505.
- MASIELLO M, SOMMA S, SUSCA A, GHIONNA V, LOGRIECO A F, FRANZONI M, RAVAGLIA S, GIUSEPPE M, ANTONIO M, 2020. Molecular identification and mycotoxin production by *Alternaria* species occurring on durum wheat, showing black point symptoms. *Toxins*, 12(4): 1–20.
- MATHUR S B, CUNFER B M, 1993. *Seed-borne diseases and seed health testing of wheat*, 1993. Copenhagen: Danish Govt, Institute of Seed Pathology for Developing Countries.
- MERCADO V D, RENARD M E, DUVEILLER E, MARAITE H, 2006. Identification of *Alternaria* spp. on wheat by pathogenicity assays and sequencing. *Plant Pathology*, 55(4): 485–493.
- ÖZÇELİK N, ÖZÇELİK S, 1997. Investigations on some factors and strains affected the production of *Alternaria*-toxins by thin layer chromatographic method. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 21(1): 1–5, 31.
- PARK M S, ROMANOSKI C E, PRYOR B M, 2008. A re-examination of the phylogenetic relationship between the causal agents of carrot black rot, *Alternaria radicina* and *A. carotinculatae*. *Mycologia*, 100(3): 511–527.
- PATEL J S, ZHANG S, 2017. First report of *Alternaria* blight of Pitahaya (*Hylocereus undatus*) caused by *Alternaria* sp. in South Florida of the United States. *Plant Disease*, 101: 1046.
- PEEVER T L, SU G, CARPENTER-BOGGS L, TIMMER L W, 2004. Molecular systematics of citrus-associated *Alternaria* species. *Mycologia*, 96(1): 119–134.
- PERELLÓ A E, SISTERNA M N, 2005. Leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticina* in Argentina. *New Disease Reports*, 11(24): 2005–2035.
- PRABHU A S, PRASADA R, 1966. Pathological and epidemiological studies on leaf blight of wheat caused by *Alternaria triticina*. *Indian Phytopathology*, 19(2): 95–112.
- PRABHU A, SINGH A, 1974. Appraisal of yield loss in wheat due to foliage diseases caused by *Alternaria triticina* and *Helminthosporium sativum*. *Indian Phytopathology*, 28: 632–634.
- PRASADA R, PRABHU A S, 1962. Leaf blight of wheat caused by a new species of *Alternaria*. *Indian Phytopathology*, 15: 292–293.
- PRYOR B M, GILBERTSON R L, 2000. Molecular phylogenetic relationships amongst *Alternaria* species and related fungi based upon analysis of nuclear ITS and mt SSU rDNA sequences. *Mycological Research*, 104(11): 1312–1321.
- RASHID A B, MEAH M B, JALALUDDIN M, RAZZAQUE A H M, 1985. Effects of nitrogen, phosphorus and sulphur fertilizer combinations on the severity of *Alternaria*, drechslera and bacterial leaf blights of wheat. *Bangladesh Journal of Plant Pathology*, 1(1): 33–39.
- RAUT J G, GULDHE S M, WANGIKAR P D, 1983. Seed-borne infection of *Alternaria triticina* in wheat and its control. *Indian Phytopathology*, 36(3): 274–277.
- SMITH S E, SMITH F A, 2002. *Diversity and integration in mycorrhizas*. Berlin: Springer Science & Business Media.
- SOMMA S, AMATULLI M T, MASIELLO M, MORETTI A, LOGRIECO A F, 2019. *Alternaria* species associated to wheat black point identified through a multilocus sequence approach. *International Journal of Food Microbiology*, 293: 34–43.
- THOMMA B P H J, 2003. *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4(4): 225–236.
- THORNTON S, ANAND N, PURCELL D, LEE J, 2003. Not just for housekeeping: protein initiation and elongation factors in cell growth and tumorigenesis. *Journal of Molecular Medicine*, 81(9): 536–548.
- WALLER J M, 1981. The recent spread of some tropical plant diseases. *Tropical Pest Management*, 27(3): 360–362.
- WANG T, ZHAO J, SUN P, WU X, 2014. Characterization of *Alternaria* species associated with leaf blight of sunflower in China. *European Journal of Plant Pathology*, 140(2): 301–315.
- XUE F, ZHANG X G, 2007. *Ulocladium capsicum*, a new species identified by morphological and molecular phylogenetic data. *Sydowia*, 59(1): 161–178.
- YANG W A, BURKHART W, CAVALLIUS J, MERRICK W C, BOSS W F, 1993. Purification and characterization of a phosphatidylinositol 4-kinase activator in carrot cells. *Journal of Biological Chemistry*, 268(1): 392–398.
- YIN F Q, MA W L, DAN Y R, TANG Z X, SONG Z, XU Q, LIU M, 2023. First report of *Alternaria burnsii* causing leaf spot on *Bletilla striata* in China. *Plant Disease*, 268(1): 329–398.