

# PCR 技术在植物病害检测中的应用\*

王晓杰, 康振生, 黄丽丽

(西北农林科技大学植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

**摘要:** PCR 技术是 20 世纪末出现的新兴生物技术。当前, 该技术广泛地应用于分子生物学、医学、农学等学科。简要介绍了在植物病害检测中, 病原特异的 PCR 引物的设计、模板的制备、PCR 反应体系对检测灵敏度和特异性的影响等几个方面, 并综述 PCR 技术在植物病害检测中的应用。

**关键词:** PCR; 植物病害; 分子检测

中图分类号: S 41 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 390X(2005)02 - 0179 - 04

## Application of PCR Technology on the Detection of Plant Disease

WANG Xiao-jie, KANG Zhen-sheng, HUANG Li-li

(College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

**Abstract:** PCR is a new biological technology in later 20 century. At present, PCR is applied to molecular biology, medicine, agronomy and other fields. This paper briefly described the design of primers, DNA preparation, effect of PCR reaction system on specificity and sensitivity, etc. Finally, application of PCR technology was described in the detection of plant disease.

**Key words:** PCR; plant disease; molecular detection

PCR 技术是 20 世纪 80 年代中期建立的一项体外迅速、大量扩增目的基因的技术, 与以往的体外合成基因, 或建立文库筛选基因相比较, 它有快速、简便、经济等特点<sup>[1]</sup>。近年来, PCR 技术以及与其密切相关的 RFLP, RAPD, AFLP 的分子标记技术的广泛应用, 已成为分子生物学及其相关学科的重要研究手段。由于 PCR 技术在研究过程中具有省时、省力, 扩增 DNA 纯度高许多优良特性, 从它诞生之日起, 就表现出旺盛的生命力, 几乎渗透于分子生物学的各个方面, 极大地推动着分子生物学的研究。已广泛地应用于分子生物学、医学、农学等学科, 进行基因的克隆遗传分析和疾病诊断等。

用于植物病害的诊断研究是近几年兴起的新技术, 由于 PCR 能够特异性扩增某一 DNA 片段, 因此, 在病原微生物的检测上, 它比传统方法有优势,

如 PCR 检测生物体时不需要培养, 具有极高的灵敏度和在混合培养物中不需要放射性标记, 检测单个靶分子的潜力, 而且该项技术快速通用。对于那些用常规方法研究较困难的植物病害, 如类病毒、MLO 等, 以及专性寄生病原菌的检测, PCR 技术的应用就显示出它的优越性。

以下将从引物设计、模板的制备、PCR 检测的特异性和灵敏度以及在植物病害检测中的应用等几方面做一阐述。

### 1 病原特异的 PCR 引物设计

选择病原特异的引物, 是利用 PCR 进行检测的关键。(1) 在确定一个病原以后可以查阅相关文献或直接在 Gene bank 里边查找该基因的序列, 并与亲缘关系相近的序列进行比较, 找出该病原特异

收稿日期: 2004 - 06 - 07

\* 基金项目: 国家 973 计划项目(G200016201)

作者简介: 王晓杰(1977 - ), 女, 山东莱阳人, 硕士研究生, 主要从事小麦条锈病的研究。

的序列设计。(2)对未知病原基因序列,可采用克隆病原菌 DNA 片段的方法,通过杂交,找出病原菌特异的片段,测序,设计引物<sup>[2,3]</sup>。(3)随着对 rDNA 及其间隔区研究的深入,使之成为分子诊断的热点,rDNA 虽然在病原基因组中高拷贝,保守,但不同生物又有细微差别<sup>[4]</sup>。可通过序列变化来设计引物进行 PCR 扩增<sup>[5]</sup>。此外转录内间隔区(ITS)、转录外间隔区(MTS)、基因内间隔区(IGS)、重复序列间的非编码区存在的序列差别也可以用来设计引物。文献报道较多的是利用转录内间隔区(ITS)对病原微生物进行分类。

## 2 模板的制备

PCR 模板的制备主要有 2 个步骤:(1)确定样品来源,样品可由纯化的病原<sup>[6]</sup>,感病寄主<sup>[5]</sup>,传毒昆虫<sup>[7]</sup>,及土壤中获取。由感病材料制备模板,实质上是提取植物和病原的总的 DNA,由于病原的丰度对 PCR 反应的影响,所以要确定病原在植株上的富含部位和富含时期,这样才能保证 PCR 的成功。(2)使用理化的方法处理样品,以得到纯净的 DNA 模板。主要工作就是去除 DNA 聚合酶抑制物。

## 3 PCR 检测的灵敏度和特异性

### 3.1 影响 PCR 检测灵敏度的因素

#### 3.1.1 靶序列的拷贝数

靶序列若选择高拷贝的片段则较单拷贝或寡拷贝的片段灵敏度要高。S R BULMAN 等<sup>[8]</sup>对来自 3 个不同国家的马铃薯粉痂菌(*Spongospora subterranean*)的 ITS 区进行测序,并对 ITS 区设计引物成功从马铃薯粉痂病中检测到了马铃薯粉痂菌。选择 rDNA 和 ITS 区作靶序列,是因为 DNA 的高拷贝。在模板量相同的情况下,高拷贝片段相对于单拷贝寡拷贝更容易扩增出来。

#### 3.1.2 模板的纯度

模板的纯度也是影响 PCR 检测的灵敏度和特异性的一个重要因素。理论上讲,对于一个靶 DNA 分子,PCR 就可以把它扩增出来。但在实际反应中往往存在其它 DNA 分子与模板竞争引物的情况,多糖、蛋白质与模板结合也会阻止 PCR 的启动,以及植物内源的酚类、其它氧化物对 Taq 酶活力的抑制,这些都将影响 PCR 的正常扩增。

### 3.2 PCR 反应体系对检测灵敏度和特异性的影响

(1)理论上讲,有助于 PCR 反应的措施都有助于检测灵敏度的提高。如增加 Taq DNA 聚合酶的量,增加缓冲液中  $Mg^{2+}$  的浓度,增加反应的循环次数,降低退火温度,但这些措施也相对增加了非特异性扩增的机会。所以在保证反应灵敏度的情况下,要求特异性好,必须对反应条件进行摸索,找到二者的平衡点。

(2) $Mg^{2+}$  的浓度对 PCR 扩增效率的影响很大,因为 Taq DNA 聚合酶反应需要  $Mg^{2+}$  的存在,而且 PCR 反应混合物中的模板、引物、dNTP 的磷酸基团均可与  $Mg^{2+}$  结合,所以建议  $Mg^{2+}$  的量要比 dNTP 的浓度高 0.5 ~ 1.0 mmol/L,最好对模板, dNTP, 引物进行  $Mg^{2+}$  的优化。

## 4 PCR 技术在植物病害检测中的应用

在植物病害检测中,传统的检测方法一般是在植物出现症状后,借助其发病症状,病原物的分离、鉴定等一系列繁琐的过程,而且有一些病原物在分离鉴定上的困难,特别专性寄生菌难以人工离体培养,以及病原物毒性类型鉴定费时且毒性表达受环境条件的影响很大,使得快速而精确地检测病原物的毒性类型在田间的群体动态增加了难度,也给农业生产的防治延误时机。PCR 技术的问世,使得病原物的快速检测成为可能,通过快速监测病原物毒性结构的动态变化,可以直接为化学防治提供依据。本文将探讨一下如何成功地利用 PCR 技术来进行植物病害的检测。

### 4.1 PCR 对病原物进行分子检测方法

(1)利用随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphic RAPD) 获得大量的分子标记,通过比较分析各毒性类型 PCR 扩增条带可得到病原物毒性类型的特异性分子标记。D W PARRY 等<sup>[9]</sup>利用 RAPD 技术从梨孢镰刀菌(*F. poae*)中克隆了 2 个片段,并设计了两对引物(Fp8 F/R 和 Fp82 F/R)成功的检测了梨孢镰刀菌(*F. poae*)。

(2)对某一生物体的特异 DNA,选择合适的引物对其进行 PCR,从而达到检测它的目的。易建平<sup>[10]</sup>利用嵌套 PCR 直接检测印腥冬孢子,检测的灵敏度可达 1 个冬孢子。肖火根等<sup>[11]</sup>建立了检测香蕉组织和单头蚜虫内的香蕉束顶病毒(BBTV)的 PCR 技术;孔维文等<sup>[12]</sup>和田亚南等<sup>[13]</sup>利用 PCR 技术研究柑桔黄龙病时同样发现,利用 PCR 技术能在未显症状前检测出病原,而且快速准确方便。

HENSON 等<sup>[14]</sup>利用 PCR 技术对小麦全蚀病菌 (*Gaeumannomyces graminis*)进行了分子检测。

(3) 特异性较低的引物通常可以扩增有亲缘关系生物体大小相似的 DNA 片段,扩增产物可以被限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 识别。例如,有亲缘关系的植物病毒或类病毒,其具有相同序列,但是可以扩增这个序列用 RFLP 来鉴别<sup>[15]</sup>。对于大于 500 bp 的 PCR 产物,则通常以有 4 个碱基识别位点的限制性核酸内切酶较为合适,因为每 256 bp 可产生 1 次特殊的 4 个碱基序列。但少于 500 bp 的扩增 DNA,则又未必含有足够能鉴别分离物的位点。例如从病毒侵染的真核绿藻中分离出许多限制性核酸内切酶。其中之一即是 CviJI,它能识别嘌呤一 A - G - 嘧啶位点,这个位点平均每 64 个核苷酸产生 1 次。CviJI 可以鉴别大麦矮病毒 (BYDV) 田间分离物的 PCR 产物。通过杂交分析,从这些分离中不能鉴定出 BYDV 的 PAV 株系,但通过 CviJI 消化后很容易把 1 个燕麦分离物同其它分离物分开。

(4) SANO 等 (1992) 建立一种免疫 - PCR 技术<sup>[16]</sup>。它是一种灵敏的抗体 - DNA 复合物的检测技术。方法是将 DNA 片断连接到抗原 - 抗体复合物上, A 蛋白和连接分子的链菌素抗生蛋白部分分别结合到抗体和 DNA 上,作为一种非放射性标记物。样品中的抗原结合特异抗体,再依次结合连接分子。后者被结合到非特异生物素标记的 DNA 序列上,用于以后的 PCR 扩增。检测洋李痘病毒 (Plum pox potyvirus) 免疫 PCR 灵敏度比直接 PCR 高 250 倍。

#### 4.2 植物病原菌的定量

对植物病原菌的定量是研究病害流行的基础。许多病原菌存在于健康的植株或土壤中,而病害症状是植株受到侵染并达到一定程度后的结果,因此利用传统方法很难对其定量。改进的 PCR 技术 - 定量 PCR (Quantitative - PCR) 技术的问世使得这一问题得以解决一般情况下以 PCR 进行的 DNA 扩增,有很好的重复性,因此这个方法可以用来估计模板 DNA 的浓度,但要有 1 个已知含量的模板作为对照与未知模板同时扩增<sup>[17]</sup>。田亚南等<sup>[18]</sup>利用 Q - PCR 定量分析不同柑橘样品中黄龙病病原菌的含量。用 Q - PCR 测定田间土壤中小麦全蚀病菌 (*G. graminis*) 数量的估计值有助于预测田间小麦全蚀病的发病率和严重程度。定量 PCR 还可精

确地确定病原物致病过程中其生物量的变化。HU 等<sup>[19]</sup>用定量 PCR 技术对比研究抗感病品种对病菌侵染的反应,发现向日葵对大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 的抗性表现在病菌侵染的初始阶段,而苜蓿对黑白轮枝菌 (*P. albo-atrum*) 的抗性表现在病菌定殖寄主组织之后的迅速失活。并利用定量 PCR 检测了大丽轮枝菌 (*P. dahliae*) 和黑白轮枝菌 (*P. albo-atrum*) 在寄主植物体内的扩展情况,尽管传统的平板培养法检测该菌的结果与 PCR 一致,但 PCR 是最灵敏的。寄主植物被接种后 (孢子浸渍),在茎端通过 PCR 立刻检出靶序列,而传统方法接种 24 h 后仍未能检测到病菌侵入后定植的结果。

除此之外,PCR 技术对病原菌的植物病原菌生理小种的鉴定、遗传变异分析、DNA 指纹图谱分析方面也有不少的研究。

PCR 技术的建立和发展已使传统的分子生物学方法发生了革命性的变化<sup>[1]</sup>。PCR 技术由于其灵敏、快速以及灵活多样而受到生命科学各个研究领域的广泛重视。用分子生物学的手段来研究植物病害,为植物病理学的研究注入了新鲜血液,植物病害的检测由最初的症状观察,形态观察、生理生化分析、到血清学、免疫学以至于 PCR 检测,经历了由宏观到分子水平的过渡,检测的灵敏度在不断的提高。目前 PCR 技术的热点已不是其本身,而是向生命科学各个领域的拓展应用,PCR 技术的应用已使植物病理学研究中的问题可望在更高的水平得到阐明。

#### [参 考 文 献]

- [1] JOAN M H, ROY FRENCH. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis [J]. Ann. Rev. Phytopathol, 1993, 31: 81 - 109.
- [2] DONG L C. Use of polymerase chain reaction to detect pathogenic strains of *Agrobacterium* [J]. phytopathology, 1992, 82: 434 - 439.
- [3] PILLAI S D. Specific detection of rhizobia in root nodules and soil using the polymerase chain reaction [J]. Soil Biol, Biochem., 1992, 24: 885 - 895.
- [4] HADIDI A. Detection of pome fruit viroids by enzymatic cDNA amplification [J]. J. virol. Met., 1990, 30: 261 - 270.
- [5] SIMON L. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots [J]. Appl. Environ. Microbiol, 1992, 58: 291 -

- 295.
- [6] LANGEVELD S A, MEMELINK J, DERKS A L M. vander Vlugt C. I. M. Identification of polyviruses using the polymerase chain reaction with degenerate primers[J]. *J. Gen. Virol*, 1991, 72: 1 531 – 1 541.
- [7] LOPEZ-MOYA J J, LOPEZ-ABELLA D, DIAZ-RURIZ J R. Detection of cauliflower mosaic virus in single aphids by the polymerase chain reaction[J]. *Virol. Met.*, 1992, 37: 129 – 138.
- [8] BULMAN S R, MARSHALL J W. Detection of *spongospora subterranean* in potato tuber lesions, using the polymerase chain chain reaction[J]. *Plant Pathology*, 1998, 47: 759 – 766.
- [9] PARRY D W, NICHOLSON P. Development of a PCR assay to detect *Fusarium poae* in wheat[J]. *Plant Pathology*, 1996, 45: 383 – 391.
- [10] 易建平, 陶庭典, 潘良文, 等. 套式 PCR 直接检测印度腥黑穗病菌冬孢子[J]. *植物检疫*, 2002, 16(4): 197 – 200.
- [11] 肖火根, 胡晋生. 香蕉束顶病毒 PCR 检测技术研究[J]. *华南农业大学学报*, 1999, 20(1): 5 – 8.
- [12] 孔维文, 邓晓玲. 柑桔黄龙病原大 DNA 片段的克隆及序列分析[J]. *植物病理学报*, 2000, 30(1): 71 – 75.
- [13] 田亚, 柯穗, 柯冲. 应用电镜与 PCR 技术检测王官溪蜜柚黄龙病病原[J]. *植物病理学报*, 2000, 30(1): 76 – 81.
- [14] HEREON J M. Use of polymerase chain reaction to detect *Gaeum-nomyc. Framinis* DNA in plants grown in artificially-and naturally-infested soil[J]. *Phytopathology*, 1993, 83(2): 283 – 287.
- [15] YANG X, HAELIDI A, GAMSEY M. Enzymatic DNA amplification of citrus exocortis and cachexia viroids from infected citrus hosts[J]. *Phytopathology*, 1992, 82(3): 279 – 285.
- [16] SANO T, MITH C L, CANTOR C R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody – DNA complexes[J]. *Science*, 1992, 258: 120 – 122.
- [17] STEFFAN R J, ATLAS R M. Pol – rase Chain reaction: application in environmental microbiology[J]. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1991, 45: 137 – 162.
- [18] 田亚南, 柯穗. 柯冲应用多聚酶链式反应(PCR)技术和定量分析柑桔黄龙病病原[J]. *植物病理学报*, 1996, 26(3): 243 – 250.
- [19] HU X, NAZAR R N, ROBB J. Quantification of *Verticillium* biomass in wilt disease development[J]. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1993, 43: 238 – 245.