

马铃薯干腐病主要致病菌DNA提取方法比较

韩峰¹,李凤兰^{1,2},李学湛²,胡国富¹,郭梅²,闵凡祥²,冯艳忠²,闫长团¹,胡宝忠¹

(¹东北农业大学生命科学学院,哈尔滨 150030;²黑龙江省农业科学院,哈尔滨,150086)

摘要:马铃薯干腐病是由镰刀菌导致的马铃薯窖储真菌病害之一,获得高质量镰刀菌的DNA是建立马铃薯干腐病分子检测的前提。本试验采用改良SDS法和2×CTAB法对黑龙江省马铃薯干腐病五种镰刀菌的DNA提取方法进行了比较。结果表明,在腐皮镰刀菌(*Fusarium solani* (Mart.))和拟丝孢镰刀菌(*Fusarium trichothecioides* Wollenw)的DNA提取过程中,改良SDS法优于2×CTAB,获得的DNA含量较高、条带较亮、纯度较高、完整性较好,而对于燕麦镰刀菌(*Fusarium avenaceum* (Corda & Fr.) Sacc)、接骨木镰刀(*Fusarium sambucinum* Fuckel)和拟枝镰刀菌(*Fusarium sporotrioides* Sherb)的DNA提取两种方法差异不大,但获得的DNA都可以很好的应用到后面的分子实验过程中,此试验获得的结果可以为马铃薯干腐病致病菌的分子生物学研究提供基础。

关键词:马铃薯干腐病;镰刀菌;DNA提取方法;改良SDS法;2×CTAB法

中图分类号:S188

文献标志码:A

论文编号:2010-1883

Comparison of the Major Pathogen DNA Extraction Methods of Potato Dry Rots

Han Feng¹, Li Fenglan^{1,2}, Li Xuezhan², Hu Guofu¹, Guo Mei², Min Fanxiang²,

Feng Yanzhong², Yan Zhangtuan¹, Hu Baozhong¹

(¹College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030;

²Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: Potato dry rot is one of fungal diseases caused by *Fusarium* when it was stored in pit, while in order to detect this kind of disease in the molecular level, it is necessary to obtain high quality DNA. In this study, through modified SDS method and 2 × CTAB method, we compared five *Fusarium* DNA extraction methods of potato dry rot in Heilongjiang Province. The results showed that Modified SDS method was better than 2 × CTAB for *Fusarium solani* (Mart.) and *Fusarium trichothecioides* Wollenw, the DNA content higher, the band brighter, the purity higher and the integrity better. But, two methods of DNA extraction difference was little for *Fusarium avenaceum* (Corda & Fr.) Sacc, *Fusarium sambucinum* Fuckel, and *Fusarium sporotrioides* Sherb. However, the acquired DNA could be well applied into molecule experiment. The experiment results obtained could provide some basis for the molecular research of potato dry rot pathogen.

Key words: potato dry rot; *Fusarium*; DNA extraction method; SDS method; 2 × CTAB method

0 引言

马铃薯为黑龙江省的主要作物,种植量占全国的10%左右,一直排在全国的第四位^[1]。由于中国北方气候比较寒冷,收获的马铃薯往往需要进行长时间的窖储(最长可以达到半年),因此,马铃薯窖储的质量直接影响了中国北方地区马铃薯的商品价值。马铃薯干腐

病是由镰刀菌(*Fusarium ssp*)导致的马铃薯长时间贮藏的主要真菌病害之一^[2]。在窖藏过程中,由于窖温较高、湿度较大,镰刀菌病会大面积发生,往往会导致“烂窖”,一般年份损失率约15%~35%,重灾年高达50%左右,已经给中国马铃薯产业造成了巨大的经济损失^[3]。此外,镰刀菌在侵染马铃薯的时候,还会产生

基金项目:马铃薯产业创新体系(NYCYTX-15);黑龙江省博士后启动基金(LBH-Z07025)。

第一作者简介:韩峰,男,1986年出生,内蒙古,在读硕士研究生,研究方向为植物分子生物学。E-mail: hanfeng19861209@163.com。

通讯作者简介:胡宝忠,男,1962年出生,黑龙江,教授,研究方向为植物生殖生物学与分子生物学。Email-bzhu@neau.edu.cn。

收稿日期:2010-06-22,修回日期:2010-7-27。

大量单端孢霉烯毒素,如果大量食用携带有毒素的薯块会造成人畜中毒^[4]。因此,马铃薯的镰刀菌病已经成为影响中国马铃薯储藏和商品品质的重大障碍。据资料报道和统计,在世界范围内能够引起马铃薯干腐病的镰刀菌有十几种,并且不同国家或地区镰刀菌种类不同,其致病力也有所差别。研究表明,北美洲和欧洲地区最普遍的致病病原菌为硫色镰刀菌(*F. sulphureum* Schlechtend)和接骨木镰刀菌(*F. sambucinum* Fuckel)^[5]。中国对马铃薯干腐病的病原菌进行分离鉴定主要是开始于20世纪90年代,研究表明在中国可以引起马铃薯干腐病的镰刀菌种类也很多,也多达十几种,主要有深蓝镰刀菌(*F. coeruleum*),腐皮镰刀菌(*F. solani*),尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*),燕麦镰刀菌(*F. avenaceum*),和接骨木镰刀菌(*F. sambucinum*)拟枝镰刀菌(*F. sporotrichioides*),拟丝镰刀菌(*F. trichothecioides*),柔毛镰刀菌(*F. flocciferum*)等^[6]。李金花等人^[7]对甘肃地区的马铃薯贮藏期真菌性病害病原菌的分离鉴定研究表明,接骨木镰刀菌(*F. sambucinum*)和腐皮镰刀菌(*F. solani*)和硫色镰刀菌(*F. sulphureum*)是引起甘肃省马铃薯干腐病的主要病

原。李克来等人^[8]对蒙古地区马铃薯干腐病的病原菌进行调查表明,接骨木镰刀菌(*F. sambucinum*)、燕麦镰刀菌(*F. avenaceum*)和腐皮镰刀菌蓝色变种(*F. solani* var. *coeruleum*)致病力最强,而且分布广泛,是内蒙古地区马铃薯干腐病的主要致病菌。谭宗九等人^[9]对河北省马铃薯干腐病病原菌进行分离,共分离出6个镰刀菌,其中腐皮镰刀菌蓝色变种(*F. solani* var. *coeruleum*)为主要致病小种,而对于黑龙江地区干腐病的病原菌的分离和鉴定还未见报道。

此试验采用不同的方法对黑龙江省地区马铃薯镰刀菌干腐病的主要致病种进行了DNA提取,为建立有效、快速检测马铃薯干腐病的分子方法提供基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究中所用菌株如表1所示,菌株均由黑龙江省农业科学院鉴定和提供,各菌株保存在PDA(马铃薯葡萄糖琼脂培养基)斜面上,于25℃恒温暗室中培养10天后,置于4℃冰箱保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 改良 SDS 法提取基因组 DNA^[10-16] 称取 0.5 g 菌

表1 实验所用供试菌株

菌株编号	种名	采集地
1	燕麦镰刀菌 <i>Fusarium avenaceum</i> (Corda & Fr.) Sacc	哈尔滨、加格达奇
2	腐皮镰刀菌 <i>Fusarium solani</i> (Mart.)	讷河、哈尔滨
3	接骨木镰刀 <i>Fusarium sambucinum</i> Fuckel	鹤岗、牡丹江
4	拟丝孢镰刀菌 <i>Fusarium trichothecioides</i> Wollenw	宁安、嫩江
5	拟枝镰刀菌 <i>Fusarium sporotrioides</i> Sherb	克山、巴彦

丝,在液氮中迅速冷却并研磨成粉末于1.5 mL离心管中,加入750 μL缓冲液,20 μL β-巯基乙醇,充分混匀,置65℃水浴1 h。加入等体积的饱和酚抽提1次,充分混匀,4℃ 12000 r/min离心10 min,收集上清液。用等体积的酚-氯仿-异戊醇萃取1次,每次于4℃ 12000 r/min离心10 min,收集上清液。用等体积的氯仿-异戊醇抽提1次,4℃ 12000 r/min离心10 min,收集上清液。上清液中加入1/10体积的3 mol/L NaAc,1倍体积以上的异丙醇,混匀后置于-20℃静置30 min以上,取出,于4℃ 8000 r/min离心5 min,去上清。用75%乙醇洗涤,风干,沉淀用50 μL无菌水溶解,-20℃保存备用。

1.2.2 2×CTAB法提取基因组DNA^[11,15] 称取0.5 g菌丝,在液氮中迅速冷却并研磨成粉末于1.5 mL离心管中,加入750 μL提取缓冲液,充分混匀,置65℃水浴1 h。加入等体积氯仿-异戊醇抽提1次,充分混匀,4℃

12000 r/min离心10 min,收集上清液。用等体积的氯仿-异戊醇抽提1次,4℃ 12000 r/min离心10 min,收集上清液加入1倍体积以上的异丙醇,混匀后置于-20℃静置30 min以上,8000 r/min离心5 min,去上清,用75%乙醇洗涤,风干。沉淀用50 μL无菌水溶解,-20℃保存备用。

1.2.3 DNA浓度测定及提取量的计算^[14] 各取3 μL DNA稀释10倍,以稀释所用的超纯水为对照,Lambda 35型分光光度计测其在260 nm,280 nm波长处的光吸收值、R值。

DNA浓度(μg/mL)=OD₂₆₀ × 50 × 稀释倍数;

总DNA的量(μg)=DNA浓度(μg/mL)×体积(mL)

$R = A_{260}/A_{280}$

R表示DNA在波长为260 nm和280 nm处吸光值的比值。

OD_{260} 表示DNA在260 nm波长处的吸光值。

1.2.4 提取核酸的PCR验证 采用真菌内转录间隔区ITS1-5.8s-ITS2区序列进行验证。根据GENEBANK上公布的真菌内转录间隔区片段(基因GENEBANK号)设计引物,上游引物5'-CAAGCATTGTCGCCACTC-3'下游引物5'-GTTTGGCTCTACCGGGACTG-3',扩增片段大小为1000 bp左右,反应总体积25 μ L。DNA模板1 μ L,上游引物1 μ L,下游引物1 μ L,去离子水17.3 μ L, Buffer 2.5 μ L, dNTP 2.0 μ L, Taq酶0.2 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C预变性3 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 20 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30个循环, 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。扩增产物经1.0%琼脂糖电泳分离,溴化乙锭染色,在紫外光灯下观察。

2 结果与分析

2.1 不同方法获得的DNA含量比较

使用2 \times CTAB法和改良SDS法提取马铃薯干腐病镰刀菌0.5 g菌丝粉末总DNA平均检测结果见表2。

从表2.1中数据可以看出2 \times CTAB法、改良SDS法的R值(OD_{260}/OD_{280})均小于1.8,说明所提取的DNA中含有蛋白质或酚的污染,需要进一步纯化,实验得出马铃薯镰刀菌总DNA浓度、产量由高到低依次是:改良SDS法、2 \times CTAB法,将实验所得数据统计分析得出2种方法的显著性差异:腐皮镰刀菌、拟枝镰刀菌菌株的显著性差异明显,燕麦镰刀菌、接骨木镰刀、拟丝孢镰刀菌菌株的显著性差异不明显。

表2 两种马铃薯干腐病镰刀菌DNA提取方法的比较

菌株编号	2 \times CTAB					SDS				
	吸光值 A260	吸光值 A280	R值	DNA浓度 (μ g/mL)	DNA总量 / μ g	吸光值 A260	吸光值 A280	R值	DNA浓度 (μ g/mL)	DNA总量 / μ g
1	0.3827	0.3397	1.1266	191.3	1.1481	0.4847	0.4201	1.1537	242.0	1.4520
2	0.3656	0.3381	1.081*	182.8	1.0968	0.5786	0.3629	1.594*	289.3	1.7358
3	0.4217	0.3677	1.1468	210.8	1.2648	0.4976	0.3782	1.3157	248.8	1.4927
4	0.3967	0.3591	1.102	198.3	1.1901	0.5561	0.4690	1.185	278.1	1.6683
5	0.3564	0.3452	1.032*	178.2	1.0692	0.5899	0.3721	1.585*	294.6	1.7697

注:*代表显著性差异。



1~5分别代表:燕麦镰刀菌、腐皮镰刀菌、接骨木镰刀、拟丝孢镰刀菌、拟枝镰刀菌

图1 不同镰刀菌DNA的琼脂糖凝胶电泳检测(A表示2 \times CTAB法获得的基因组;B表示改良SDS法获得的基因组)

2.2 不同方法的琼脂糖凝胶电泳检测结果比较

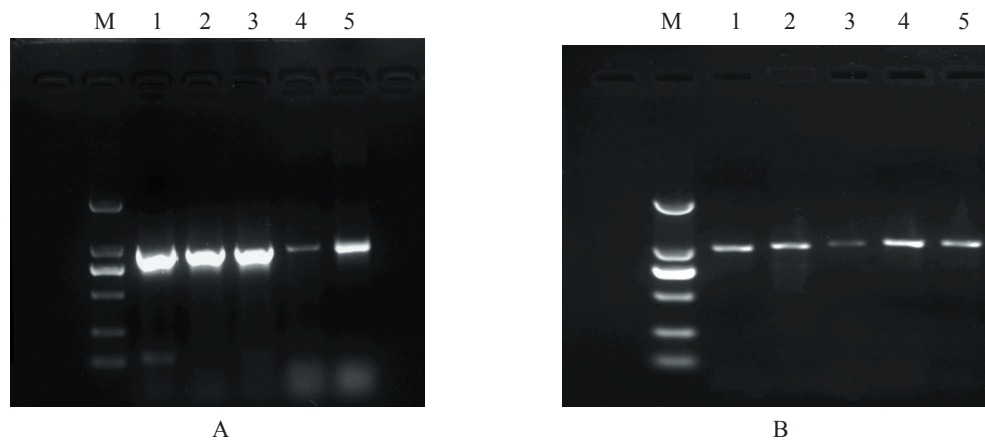
使用2 \times CTAB法、改良SDS法提取菌丝粉末总DNA,琼脂糖凝胶电泳检测结果见图1。

通过图1可以看出,采用2 \times CTAB方法时,燕麦镰刀菌(*Fusarium avenaceum* (Corda & Fr.) Sacc)和接骨木镰刀菌(*Fusarium sambucinum* Fuckel)的电泳图谱条中出现弥散而且很亮的一团,说明其中含有蛋白质或酚的污染,需要进一步纯化。采用改良SDS法电泳图谱中可看出,拟丝孢镰刀菌(*Fusarium*

trichothecioides Wollenw)和拟枝镰刀菌(*Fusarium sifiporotrioides* Sherb)条带带型较宽,条带明亮,DNA含量较高。根据紫外检测结果,改良SDS法提取DNA的浓度和产量大于2 \times CTAB法提取的DNA,这与琼脂糖凝胶电泳检测结果一致。

2.3 PCR检测结果比较

以2种不同方法提取的基因组DNA为模板做的PCR分析结果如图2所示。以DL 2000为标量,分析扩增片段的分子量大小。结果表明,以2种方法提取



M代表DL 2000; 1~5分别代表燕麦镰刀菌、腐皮镰刀菌、接骨木镰刀、拟丝孢镰刀菌、拟枝镰刀菌

图2 PCR检测结果(A表示2×CTAB法获得的基因组PCR结果;B表示改良SDS法获得的基因组PCR结果)

的DNA为模板得到的PCR产物,长度都在1000 bp左右,与预期片段的大小相符,所以用改良SDS法和2×CTAB法提取的DNA为模板进行PCR扩增结果稳定,而且条带特异性强,无拖尾现象,适合用于PCR扩增分析及其他分子生物学试验。

3 讨论

基因组DNA提取的质量直接影响到PCR扩增、基因文库的构建等其他分子生物学方面的研究^[17,18]。目前,已有多种真菌DNA提取方法见诸报道,如刘伟成等^[12]采用液氮冷冻研磨破碎菌体细胞壁,氯仿-异戊醇反复抽提去蛋白的方法,成功地提取了球壳孢目5属17种24个菌株的DNA,朱衡等利用氯化苄破壁法提取真菌DNA,所得DNA质量较高、产量稳定。这些方法因所研究的对象和目的不同而各有差异。

此实验通过对两种提取DNA方法的比较,发现采用改良SDS法提取腐皮镰刀菌(*Fusarium solani* (Mart.))、拟枝镰刀菌(*Fusarium sporotrioides* Sherb)菌株DNA的显著性差异较大,所提取的DNA含量较高、条带较亮、纯度较高、完整性较好,所以,这两菌株更适合改良SDS方法。但改良SDS法提取DNA过程中用到了饱和酚有机溶剂来萃取DNA,操作过于繁琐,而且容易造成蛋白质和酚的污染,从而影响DNA纯度,同时,对人体有很大的伤害。对于燕麦镰刀菌(*Fusarium avenaceum* (Corda & Fr.) Sacc)、接骨木镰刀(*Fusarium sambucinum* Fuckel)、拟丝孢镰刀菌(*Fusarium trichothecioides* Wollenw)等菌株没有显著性差异,所以,采用2×CTAB法或改良SDS法均可,无太大影响,采用2×CTAB法提取DNA操作简单、缩短试验时间。尽管在本试验中两种方法提取的DNA都可用于PCR操作,但两种方法所提取的DNA的纯度不太理想,说明在提取DNA样品过程中可能抽提的不够

彻底,对于镰刀菌这种特殊真菌,无性时期属于半知菌亚门,有性时期为子囊菌亚门,这一特性使其在DNA抽提过程中增加了破壁难度,妨碍了DNA的释放,所以仍会含有一些杂的蛋白或多酚类物质,也可能长时间多次抽提造成DNA的流失,同时,实验过程中来回的颠倒摇晃也有可能造成DNA的断链,从而影响了测得R值。为了保证获得高质量的基因组DNA,可增加抽提的次数,在提取过程中加入RNA酶去除RNA,对于沉淀DNA,异丙醇明显优于无水乙醇,可以减少DNA的损耗,加PVP(聚乙烯吡咯烷酮)可以减少酚类、醌类及丹宁类物质的影响^[19],还可以购买试剂盒来获取高质量DNA。实验中发现,通过两种方法提取镰刀菌DNA时,在提取过程中,会出现颜色不同的提取液,如:燕麦镰刀菌(*Fusarium avenaceum* (Corda & Fr.) Sacc)常出现浅黄色、拟丝孢镰刀菌(*Fusarium trichothecioides* Wollenw)常出现酒红色,但提取的DNA一般都呈白色。色素对后续的分析工作影响不大,如何除去色素尚待进一步研究。

参考文献

- [1] 刘在东,徐凤花,于德才,等.黑龙江省马铃薯产业发展现状及对策[J].黑龙江省农业科学,2008,6(4):124-126.
- [2] 魏周全,张廷义,杜玺.马铃薯块茎干腐病发生危害及防治[J].植物保护,2006,32(2):103-105.
- [3] 陈彦云.宁夏西吉县马铃薯贮藏期病害调查及药剂防治研究[J].耕作与栽培,2007,3(4):15-16.
- [4] Snelling W J, McKenna J P, Lecky D M, et al. Survival of *Campylobacter jejuni* in Waterborne Protozoa [J]. Appl Environ Microbiol.2005,71:5560-5571.
- [5] Mecteau M. R, Arul J, Tweddell R J. Effect of organic and inorganic salts on the growth and development of *Fusarium sambucinum*. a causal agent of potato dry rot. [J] Mycol. Res. 2002, 106:688-696.

- [6] 叶琪明,王拱辰.浙江马铃薯干腐病病原研究初报[J].植物病理学报,1994,25:148.
- [7] 李金花,柴兆祥,王蒂,等.甘肃马铃薯贮藏期真菌性病害病原菌的分离鉴定[J].兰州大学学报(自然科学版),2007,43(2):39-42.
- [8] 李克来.呼和浩特马铃薯 *Fusarium* 分离和鉴定, [J]内蒙古大学学报(自然科学版),1992,23(3):429-433.
- [9] 谭宗九,田世民,明亚,等.马铃薯贮藏(块茎)病害种类调查及综防技术[J].中国作物学会马铃薯专业委员会会论文集,1999,277-284.
- [10] Bomke C, Rojas M C, Hedden P, et al. Loss of Gibberellin Production in *Fusarium verticillioides* (*Gibberella fujikuroi* MP-A) is Due to a Deletion in the Gibberellic Acid Gene Cluster [J]. *Appl. Environ. Microbiol.*,2008,74:7790-7801.
- [11] 昂莎莎,莢荣,卢伟.白腐真菌总DNA提取方法的研究[J].生物学杂志,2009,26(4):83-84.
- [12] 刘伟成,吕国忠,周永力,等.球壳孢目真菌高分子量纯DNA的大量提取[J].沈阳农业大学学报 1996,27(3):183-189.
- [13] 张宝俊,李志岗,张家榕,等.4种镰刀菌基因组DNA提取方法的比较研究[J].安徽农业科学,2008,36(31):2-3.
- [14] 刘丹,刘太国,张敏,等.小麦光腥黑粉菌冬孢子总DNA提取方法比较[J].植物保护,2006,3(2):93-95.
- [15] 何月秋.真菌菌丝培养和提取DNA方法的改进[J].菌物系统,2000,19(3):434.
- [16] 陈德富,陈喜文.现代分子生物学实验原理与技术[M].北京:科学出版社,2006:96-98.
- [17] 李振宇,解焱.中国外来入侵种[M].北京:中国林业出版社,2002:231.
- [18] 尹绍武,颜亨梅,王洪全,等.福寿螺的生物学研究[J].湖南师范大学自然科学学报,2000,23(2):76-82.
- [19] 吴发红,黄东盖,黄小龙,等.几种真菌DNA提取方法的比较[J].中国农学通报,2009,25(08):62-64.