

罗龙辉, 张兴楠, 孟芳, 等. 2 种桑树病原真菌多重 PCR 检测方法的建立 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(5): 54-60.
LUO Longhui, ZHANG Xingnan, MENG Fang, et al. Establishment of multiplex PCR detection method for two mulberry pathogenic fungi[J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(5): 54-60.

2 种桑树病原真菌多重 PCR 检测方法的建立

罗龙辉[†], 张兴楠[†], 孟芳, 黄裕鑫, 刘吉平
(华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】褐斑病与轮纹病是桑树 *Morus alba* 的 2 种常见真菌性病害, 危害严重, 给生产上带来极大损失。本研究旨在快速准确地诊断 2 种病害的主要病原菌新褐斑壳丰孢 *Neophloeospora maculans* 与膝节霉 *Gonatophragmium triuniae*。【方法】基于多重 PCR 原理, 针对 2 种病原菌的核糖体内转录间隔区 (Internal transcribed spacer, ITS) 序列设计多重 PCR 的特异性引物, 优化多重 PCR 反应的条件, 并通过对 45 份不同地区桑树褐斑病与轮纹病样本进行检测以验证所建立的多重 PCR 的可行性。【结果】建立的多重 PCR 检测体系具有良好的可操作性, 特异性良好, 2 种病原菌的 DNA 检测灵敏度分别达 0.1 和 1.0 pg/μL, 通过对不同地区的田间收集的多份桑树病样进行检测, 可以明显区分出不同地区 2 种病害病原菌的种类。【结论】所建立的多重 PCR 技术可用于桑树褐斑病与轮纹病病原菌的快速检测, 可为桑树真菌性病害的防控建立基础。

关键词: 桑树; 褐斑病; 轮纹病; 新褐斑壳丰孢; 膝节霉; 多重 PCR
中图分类号: S432.44 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-411X(2022)05-0054-07

Establishment of multiplex PCR detection method for two mulberry pathogenic fungi

LUO Longhui[†], ZHANG Xingnan[†], MENG Fang, HUANG Yuxin, LIU Jiping
(College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】Mulberry brown spot disease and mulberry ring leaf spot disease are two common fungal diseases of mulberry trees (*Morus alba*), which are serious and cause great losses in production. This study was aimed to quickly and accurately diagnose the main pathogens of the two diseases, *Neophloeospora maculans* and *Gonatophragmium triuniae*. 【Method】Based on the principle of multiplex PCR, specific primers for multiplex PCR were designed for the ribosome internal transcribed spacer (ITS) sequences of two pathogenic fungi, and the conditions of multiplex PCR reaction were optimized. Tests were performed with 45 samples to verify the feasibility of the established multiplex PCR. 【Result】The established multiplex PCR detection system had good operability and good specificity, and the sensitivities for simultaneously detecting DNA of two pathogens were 0.1 and 1.0 pg/μL, respectively. The detection of mulberry disease samples could clearly distinguish the two types of pathogenic fungi in different regions. 【Conclusion】The established multiplex PCR technology can be used for rapid detection of the pathogens of mulberry brown spot and ring leaf spot diseases, and provides a foundation for the prevention and control of mulberry fungal disease.

收稿日期:2022-01-13 网络首发时间:2022-05-12 17:53:47
网络首发地址:<https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20220512.1023.002.html>
作者简介:罗龙辉, 硕士研究生, 主要从事桑树病虫害防控研究, E-mail: longhui2021@foxmail.com; 张兴楠, 硕士研究生, 主要从事桑树病虫害防控研究, E-mail: 2719817791@qq.com; [†]对本文贡献相同; 通信作者: 刘吉平, 教授, 博士, 主要从事家蚕微孢子虫及桑树、柞树病虫害防控研究, E-mail: liujiping@scau.edu.cn
基金项目:财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系资助

Key words: Mulberry; Brown spot disease; Ring leaf spot disease; *Neophloeospora maculans*; *Gonatophragmium triuniae*; Multiplex PCR

桑树 *Morus alba* 是多年生木本植物, 广泛分布于亚洲、非洲、欧洲等地区, 具有良好的经济效益^[1]。现代的蚕桑产业不再拘泥于传统的“种桑养蚕”, 更多的是朝着蚕桑资源综合利用的方向发展^[2-3], 以蚕桑产业作为扶贫项目的手段已经在我国广西、云南等地广泛实施。随着蚕桑产业的不断发展, 桑树的种植面积也不断扩大, 但作为蚕桑产业基石的桑树却受到诸多病害的影响, 尤其是桑树真菌性病害严重影响了桑叶的质量与产量。

桑树褐斑病与桑轮纹病同属于桑树 2 种主要的真菌性病害。桑褐斑病主要症状为桑树叶片出现褐色斑点, 病原菌为黏隔孢 *Septogium mori* 和褐斑壳丰孢 *Phloeospora maculans* 2 种病原真菌^[4-5]。Hong 等^[6] 研究认为黏隔孢与褐斑壳丰孢属于同种异名。2017 年, Videira 等^[7] 将二者名称统一更正为如今的新褐斑壳丰孢 *Neophloeospora maculans*。桑褐斑病分布广泛, 在巴西、土耳其及印度等地均有报道^[8-10], 桑感染褐斑病后桑叶中的主要营养成分含量会显著降低, 对家蚕的消化吸收率、虫蛹生命率均有影响^[11]。与褐斑病导致的症状类似, 桑轮纹病的主要症状为桑叶出现轮纹型斑块^[12], 主要病原菌为膝节霉 *Gonatophragmium triuniae*。该病原菌寄主有桑科桑属和无花果属等共 15 科 22 属的木本和草本植物, 危害严重^[13]。桑褐斑病与桑轮纹病病原菌具有较强的生命活力, 尤其是轮纹病病原菌膝节霉, 菌丝的致死温度可达到 85 ℃^[14]。不仅如此, 褐斑病与轮纹病病原菌均以分生孢子盘遗落在病叶或者土壤中, 可长期存活, 待适宜条件又可侵染桑树, 导致病害的大面积爆发^[4]。目前, 对 2 种病害病症的识别主要是通过肉眼观察法, 但桑叶上观测到 2 种病害症状的时候, 病原菌的增殖已达到一定数量, 给病害的防控工作带来极大的困扰。因此, 如何建立一种快速、准确的桑树褐斑病与轮纹病病原菌的检测技术是桑褐斑病与轮纹病早期防控的关键。

常见的植物病原菌核酸检测方法主要有聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 扩增法^[15]、实时定量聚合酶链式反应 (Real-time quantitative PCR, qPCR) 扩增法^[16]、环介导等温扩增 (Loop mediated isothermal amplification, LAMP) 法等^[17]。目前, 对桑树病害的检测多为普通 PCR 和 LAMP 检测^[18-19], 不同的检测技术各有优

势, 但多局限于对单个病原的检测。对于多种病原菌复合侵染的情况, 或对于症状相似的病害, 目前还鲜有较实用的快速检测方法, 且针对于桑轮纹病和桑褐斑病 2 种危害严重的桑树真菌病害仍需相应的检测技术。多重 PCR 技术是指在同一个反应体系中加入 2 对或 2 对以上的引物, 可以同时扩增出 2 组或 2 组以上的核酸片段, 实现多种病原菌的快速检测^[20]。本研究建立了桑褐斑病与桑轮纹病病原菌的多重 PCR 检测技术, 为桑树真菌性病害的防控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 样本收集

2019—2021 年从广东、广西、云南和陕西主要种桑地区不同品种上采集褐斑病和轮纹病病样共 250 份, 样本详细信息见表 1。

1.2 供试真菌与试剂耗材

主要病原菌: 新褐斑壳丰孢 *N. maculans* 与膝节霉 *G. triuniae* 等均分离保藏于亚太地区蚕桑培训中心。

其他真菌: 致密链格孢 *Alternaria compacta*、黑链格孢 *A. solani*、棒状孢子菌 *Corynespora cassiicola*、博宁炭疽菌 *Colletotrichum boninese*、木贼镰刀菌 *Fusarium equiseti*、禾谷镰刀菌 *F. graminearum*、胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、暹罗炭疽菌 *Colletotrichum siamense* 等均分离保藏于亚太地区蚕桑培训中心。

Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒、植物总 DNA 提取试剂盒购于生工生物工程 (上海) 股份有限公司, T3 PCR Mix、高纯度低电渗琼脂糖、DL 2000 DNA marker、TS-GelRed 核酸凝胶染料、1×TBE 速溶颗粒均购于北京擎科生物科技有限公司, 电泳仪 (Powerpac Basic) 采购于伯乐生命医学产品有限公司, PCR 仪 (A200) 采购于杭州朗基科学仪器有限公司, 超微分光光度计 (NDlife) 和全自动数码凝胶成像系统 (Tanon-120) 采购于广州誉维生物科技仪器有限公司。

1.3 病菌、病样及健康桑树 DNA 的提取

供试真菌总 DNA 提取采用 Ezup 柱式真菌基因组 DNA 抽提试剂盒。供试样本总 DNA 提取采用植物总 DNA 抽提试剂盒。提取后的 DNA 用分光光度计测量 DNA 的浓度, 使 DNA 的 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 控制在 1.8~2.0, 质量浓度为 1 ng/μL 左右。

表 1 样本材料收集信息
Table 1 Sample material collection information

感病类型 Type of infected disease	采样地区 Collection site	经纬度 Latitude and longitude	品种 Variety	样本数量 Number of sample
褐斑病 Brown spot disease	广西百色市隆林县	105.17°E, 24.64°N	桂优12号 Guiyou 12	30
	Longlin County, Baise City, Guangxi			
	陕西安康市石泉县 Shiquan County, Ankang City, Shaanxi	108.32°E, 32.97°N	强桑1号 Qiangsang 1	30
			大10 Da 10	30
			长果桑 Changguosang	30
	陕西安康市汉阴县	108.90°E, 32.62°N	强桑1号 Qiangsang 1	10
	Hanyin County, Ankang City, Shaanxi			
	云南楚雄彝族自治州永仁县	101.38°E, 26.06°N	强桑1号 Qiangsang 1	30
轮纹病 Ring leaf spot disease	Yongren County, Chuxiong Yi Autonomous Prefecture, Yunnan		农桑14 Nongsang 14	30
	广东清远市英德蚕种场	113.45°E, 24.18°N	抗青10号 Kangqing 10	30
	Yingde Silkworm Breeding Farm, Qingyuan City, Guangdong			
	广西百色市隆林县	105.57°E, 24.64°N	桂优12号 Guiyou 12	30
	Longlin County, Baise City, Guangxi			

1.4 多重 PCR 引物设计及特异性测定

根据多重 PCR 的反应原理,采用引物对 ITS1/ITS4^[21] 对新褐斑壳丰孢与膝节霉的核糖体内转录间隔区 (Internal transcribed spacer) 进行扩增,拟扩增片段大小为 560 bp 左右,经比较 NCBI 数据库中新褐斑壳丰孢与膝节霉的核糖体内转录间隔区序列与 2 种病原菌的测序结果,使用 DNAMAN 软件和 Primer Premier 5.0 软件分别设计特异性引物对 HBF6 (5'-GACCTCCAACCCCTGTG-3')/HBR6(5'-CGCGACTCTTCAGCGACATA-3') 和 LWF2(5'-CCTTTGACACAACCGTATCCC-3')/LWR2(5'-GACATGCTCCCTGGAGAACC-3'),并通过 Primer-BLAST(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 查询引物的具体参数及特异性。引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。以“1.3”中提取的新褐斑壳丰孢与膝节霉 DNA 为阳性对照,以健康桑叶总 DNA 为空白对照,以“1.2”中其他真菌的 DNA 为阴性对照,进行多重 PCR 扩增,验证引物的特异性。PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行双向测序。

1.5 多重 PCR 反应体系优化

多重 PCR 反应体系为 25 μ L 扩增体系:T3 PCR Mix 22 μ L,引物 HBF6/HBR6 和 LWF2/LWR2 各 1 μ L、DNA 模板 1 μ L。扩增程序:98 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 98 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 10 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 于 4 $^{\circ}$ C 保存。取 PCR 产物在 110 V 下经过 12 g/L 琼脂糖凝

胶电泳 30 min,用凝胶成像系统拍照观察。

按照 T3 PCR Mix 试剂盒说明,当引物 LWF2/LWR2 达到试剂盒使用浓度时(用量 1 μ L,在 25 μ L PCR 体系中浓度为 0.4 mmol/L),电泳结果中已出现明亮条带,因此确定 LWF2/LWR2 的用量为 1 μ L。在这基础上,对引物 HBF6/HBR6 用量进行优化,分别加入 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μ L 的初始浓度为 10 μ mol/L 的引物 HBF6/HBR6,确定引物最终用量后,将 2 对引物加入同一体系中,待测病原菌新褐斑壳丰孢与膝节霉的 DNA 模板各 1 μ L,进行不同的退火温度 (55~65 $^{\circ}$ C)(仪器自设) 最优条件探究,产物经过 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳进行检测,根据全自动数码凝胶成像系统中条带的亮度选择最优参数。

1.6 多重 PCR 灵敏度分析

将“1.3”提取的桑褐斑病病原菌新褐斑壳丰孢与桑轮纹病病原菌膝节霉的 DNA 质量浓度分别梯度稀释为 1 000、100、10、1、0.1、0.01、0.001 pg/ μ L,采用“1.5”最佳扩增体系及程序进行扩增,取病原菌新褐斑壳丰孢及膝节霉 DNA 模板各 1 μ L 加入同一体系中,根据全自动数码凝胶成像系统中有无目的条带判断该多重 PCR 的灵敏度。

1.7 多重 PCR 田间样本检测

对部分收集的田间病样提取总 DNA,以健康样本 DNA 为阴性对照。根据最优的多重 PCR 反应体系进行 PCR 扩增,检测 45 份田间病样 DNA

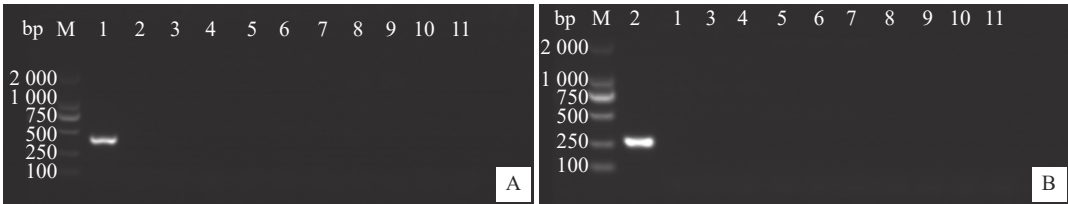
是否存在新褐斑壳丰孢与膝节霉。最后根据全自动数码凝胶成像系统中有无目的条带判断其对应的病原菌。

2 结果与分析

2.1 多重 PCR 检测的特异性

经过引物筛选, 本研究确定了引物组 HBF6/HBR6 和 LWF2/LWR2, 设计的新褐斑壳丰孢特异

引物 HBF6/HBR6 扩增出的目的片段大小为 406 bp(图 1A); 膝节霉特异引物 LWF2/LWR2 扩增出的目的片段大小为 248 bp(图 1B), 2 组引物只对阳性待测菌进行特异性扩增, 且条带明亮单一, 而空白对照及其他 8 种阴性对照真菌无法扩增出目的条带, 且 PCR 产物的测序结果与目的基因一致, 表明本研究设计的引物 HBF6/HBR6 和 LWF2/LWR2 具有良好的特异性。



M: DL 2000 marker; 1: 新褐斑壳丰孢; 2: 膝节霉; 3: 致密链格孢; 4: 黑链格孢; 5: 棒状孢子菌; 6: 博宁炭疽菌; 7: 木贼镰刀菌; 8: 禾谷镰刀菌; 9: 胶孢炭疽菌; 10: 暹罗炭疽菌; 11: 健康桑树

M: DL 2000 marker; 1: *Neophloeospora maculans*; 2: *Gonatophragmium triuniae*; 3: *Alternaria compacta*; 4: *A. solani*; 5: *Corynespora cassiicola*; 6: *Colletotrichum boninense*; 7: *Fusarium equiseti*; 8: *F. graminearum*; 9: *Colletotrichum gloeosporioides*; 10: *Colletotrichum siamense*; 11: Healthy muberry

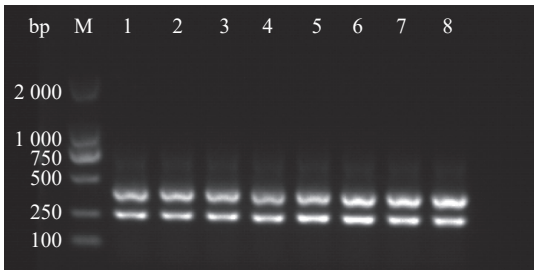
图 1 HBF6/HBR6 (A) 和 LWF2/LWR2 (B) 引物特异性检测结果

Fig. 1 The specificity detection results using primer sets HBF6/HBR6 (A) and LWF2/LWR2 (B)

2.2 多重 PCR 扩增体系的优化与建立

多重 PCR 扩增体系优化结果显示, 引物组 HBF6/HBR6 和 LWF2/LWR2 在 25 μ L 的反应体系中用量分别为 0.6 μ L(0.24 mmol/L) 和 1.0 μ L(0.40 mmol/L) 时, 多重 PCR 的检测结果最好, 条带最亮(图 2)。其次, 根据引物退火温度的筛选结果(图 3), 2 组混合引物的最佳退火温度为 59 $^{\circ}$ C。因此, 确定最优的多重 PCR 反应体系为: T3 PCR Mix 21.7 μ L、10 μ mol/L 引物 HBF6/HBR6 各 0.6 μ L、LWF2/LWR2 各 1.0 μ L、DNA 模板 1 μ L; 最佳的扩增程序的退火温度为 59 $^{\circ}$ C。利用最优条件对 2 种病原菌 DNA 进行扩增, 当只存在新褐斑壳丰孢 *N. maculans* 时, 仅检测到 1 条大小为 406 bp 的条带; 当只存在膝节霉 *G. triuniae* 时, 仅检测到 1 条大小

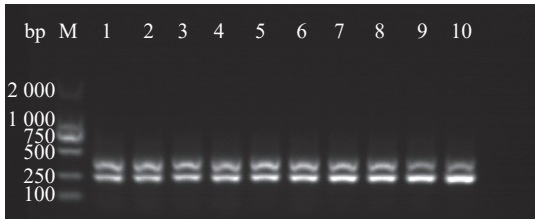
为 248 bp 的条带; 当存在 2 种病原菌的时候可以同时检测到上述 2 种条带(图 4)。表明本研究经优化的多重 PCR 检测方法可靠。



M: DL 2000 marker; 1~8: 55.0, 55.5, 56.7, 59.0, 61.0, 63.3, 64.5, 65.0 $^{\circ}$ C

图 3 多重 PCR 退火温度筛选结果

Fig. 3 Screening results of multiplex PCR annealing temperature

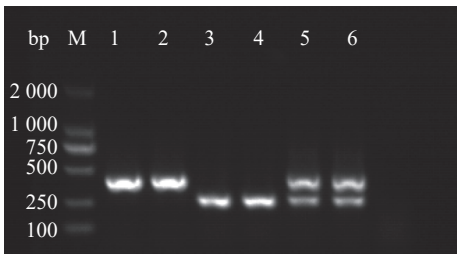


M: DL 2000 marker; 1~2, 3~4, 5~6, 7~8, 9~10 的 HBF6/HBR6 引物用量分别为 1.0、0.8、0.6、0.4、0.2 μ L; 1~10 中 LWF2/LWR2 引物用量均为 1.0 μ L

M: DL 2000 marker; The amounts of HBF6/HBR6 primer added in 1~2, 3~4, 5~6, 7~8, 9~10 were 1.0, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 μ L; The amounts of LWF2/LWR2 primer in 1~10 were all 1.0 μ L

图 2 HBF6/HBR6 引物用量筛选结果

Fig. 2 HBF6/HBR6 primer dosage test results



M: DL 2000 marker; 1~2: 新褐斑壳丰孢; 3~4: 膝节霉; 5~6: 新褐斑壳丰孢+膝节霉; 7: ddH₂O

M: DL 2000 marker; 1~2: *Neophloeospora maculans*; 3~4: *Gonatophragmium triuniae*; 5~6: *N. maculans* and *G. triuniae*; 7: ddH₂O

图 4 多重 PCR 体系对 2 种病原菌的扩增效果

Fig. 4 Amplification results of two pathogenic fungus by multiplex PCR system

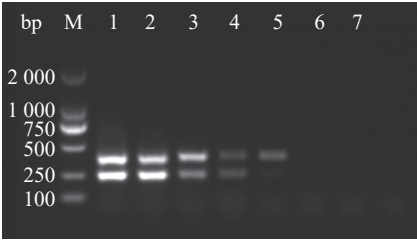
2.3 多重 PCR 检测的灵敏度

经过“2.2”优化后多重 PCR 体系检测不同质量浓度的新褐斑壳丰孢与膝节霉混合 DNA，结果表明新褐斑壳丰孢与膝节霉 DNA 最低检测限分别达 0.1 和 1.0 pg/μL(图 5)。说明本研究建立的多重 PCR 体系灵敏度较高，可用于桑轮纹病与褐斑病早期菌量较少时的检测。

2.4 桑褐斑病及桑轮纹病田间样品的检测结果

采用“2.2”优化的反应体系及程序对所收集

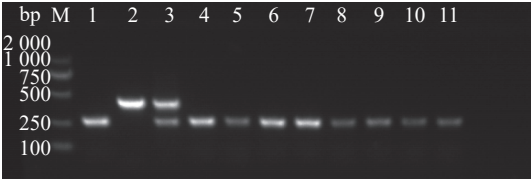
的 250 份田间病样随机抽取 45 份加以检测，结果(图 6、图 7)显示，在广东省英德蚕种场与广西隆林县的桑轮纹病病样中均检测到膝节霉，未检测到新褐斑壳丰孢，表明该桑轮纹病样本主要病原菌为膝节霉，未出现 2 种病原菌复合侵染的情况；而在广西隆林县收集的桑褐斑病病样中，不仅检测到新褐斑壳丰孢，也有部分检测到膝节霉，表明在广西隆林县收集的桑褐斑病病样中有轮纹病病原菌的存在，而在其他地区收集的多份桑褐斑病病样中，唯有陕西石泉县的 1 份样本和陕西汉阴县的 1 份样本中检测到 2 种病原菌，其余的均只检测到新褐斑壳丰孢 1 种病原菌；部分病样未检测到新褐斑壳丰



M: DL 2000 marker; 样品中含有等量新褐斑壳丰孢和膝节霉 DNA，且 1~7 中每种病原菌的质量浓度分别为 1 000、100、10、1、0.1、0.01 和 0.001 pg/μL

M: DL 2000 marker; Each sample has equal amounts of *Neophloeospora maculans* DNA and *Gonatophragmium triuniae* DNA, and the contents of each pathogenic fungus in 1~7 are 1 000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01 and 0.001 pg/μL, respectively

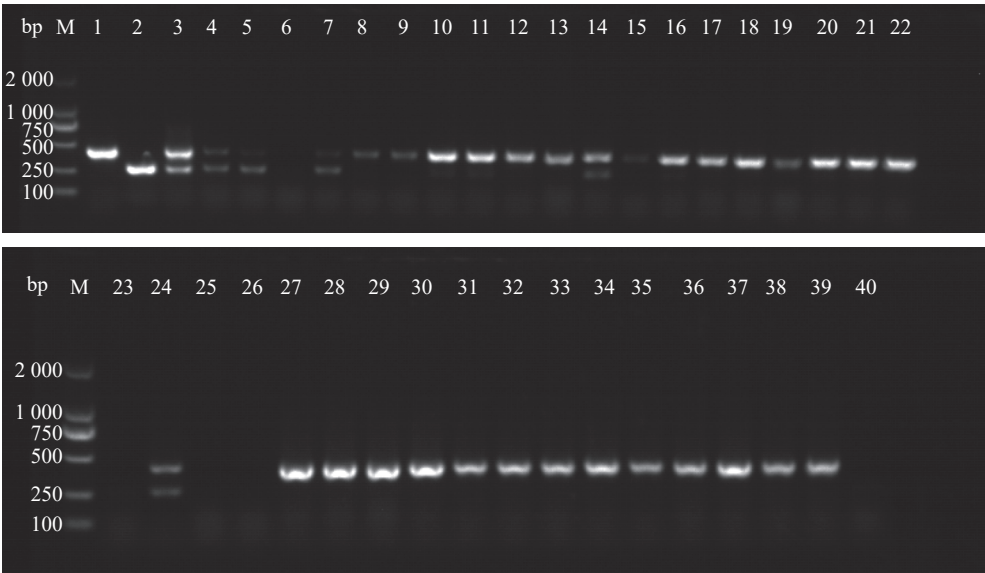
图 5 多重 PCR 体系对 2 种病原菌的灵敏度检测结果
Fig. 5 Sensitivity detection results of two pathogenic fungus by multiple PCR system



M: DL 2000 marker; 1: 膝节霉; 2: 新褐斑壳丰孢; 3: 膝节霉+新褐斑壳丰孢; 4~7: 广东省英德桑轮纹病病样; 8~11: 广西隆林县桑轮纹病病样

M: DL 2000 marker; 1: *Gonatophragmium triuniae*; 2: *Neophloeospora maculans*; 3: *G. triuniae* and *N. maculans*; 4~7: Sample with mulberry ring leaf spot disease from Yingde City, Guangdong Province; 8~11: Sample with mulberry ring leaf spot disease from Longlin County, Guangxi

图 6 桑树桑轮纹病病原菌的多重 PCR 检测结果
Fig. 6 Multiplex PCR detection results of mulberry ring leaf spot disease pathogen



M: DL 2000 marker; 1: 新褐斑壳丰孢; 2: 膝节霉; 3: 膝节霉+新褐斑壳丰孢; 4~7: 广西隆林县桑褐斑病病样; 8~12: 陕西省石泉县‘强桑 1 号’褐斑病病样; 13~17: 陕西省石泉县‘大 10’褐斑病病样; 18~22: 陕西省石泉县‘长果桑’褐斑病病样; 23~31: 陕西省汉阴县‘强桑 1 号’褐斑病病样; 32~35: 云南省永仁县‘强桑 1 号’褐斑病病样; 36~39: 云南省永仁县‘农桑 14’褐斑病病样; 40: 健康桑树

M: DL 2000 marker; 1: *Gonatophtagmium triuniae*; 2: *Neophloeospora maculans*; 3: *G. triuniae* and *N. maculans*; 4~7: Sample with mulberry brown spot disease from Longlin County, Guangxi; 8~12: Sample with mulberry brown spot disease from ‘Qiangsang 1’, Shiquan County, Shaanxi Province; 13~17: Sample with mulberry brown spot disease from ‘Da 10’, Shiquan County, Shaanxi Province; 18~22: Sample with mulberry brown spot disease from ‘Changguosang’, Shiquan County, Shaanxi Province; 23~31: Sample with mulberry brown spot disease from ‘Qiangsang 1’, Hanyin County, Shaanxi Province; 32~35: Sample with mulberry brown spot disease from ‘Qiangsang 1’, Yongren County, Yunnan Province; 36~39: Sample with mulberry brown spot disease from ‘Nongsang 14’, Yongren County, Yunnan Province; 40: Healthy mulberry

图 7 桑树褐斑病病原菌的多重 PCR 检测结果
Fig. 7 Multiplex PCR detection results of mulberry brown spot disease pathogen

孢与膝节霉, 出现了空白条带, 推测可能在取样或 DNA 的提取过程中未提取到病原菌的 DNA, 其次, 部分桑树真菌病害的特征与桑褐斑病非常相似, 导致出现了桑树病害的误判。综上, 本研究建立的多重 PCR 检测方法特异性好、灵敏度高, 能应用于桑树褐斑病与桑树轮纹病病原菌的检测。

3 讨论与结论

桑树轮纹病与桑树褐斑病危害严重, 目前鲜见相关病原菌的检测方法, 而开发适用于桑树褐斑病与轮纹病病原菌的检测技术, 是防控这 2 种病害的关键。桑树病原菌的检测方法分为传统鉴定法及分子生物学鉴定法, 传统的鉴定方法以形态学观察为主, 因为观察者的主观臆断易有较大的误差, 只能大体判断病原菌的类群。随着分子生物学的发展, 多种核酸检测技术得到开发与应用。但多重 PCR 因具有提高检测通量的优点, 而被广泛运用于临床上病原菌和转基因作物的检测。如 Egea 等^[22]基于多重 PCR 检测技术设计的反应可用于呼吸道感染的急性细菌性脑膜炎病原菌的诊断; 邢珍娟等^[23]应用多重荧光 PCR 快速筛查玉米中转基因成分。不仅如此, 多重 PCR 检测技术也被运用于植物病原检测, 杨怡华等^[24]建立的巢式多重 PCR 可以快速检测麦冬 2 种常见的真菌性病原炭疽菌 *Colletotrichum liriopes* 和互隔交链孢菌 *Alternaria alternata*; 李明骏等^[25]建立了 5 种玉米病毒的多重 PCR 检测体系, 极大地提高了玉米病毒的检测效率。本研究建立了桑轮纹病与桑褐斑病 2 种病原菌的多重 PCR 检测方法, 可以通过一步法对 2 种常见的桑树病原菌进行快速检测, 具有良好的可操作性。

本研究分别以膝节霉与新褐斑壳丰孢的 ITS 序列为靶基因进行了特异性引物设计与筛选, 最终确定了 HBF6/HBR6 和 LWF2/LWR2 引物组合作为桑褐斑病与轮纹病的最终检测引物。通过对 2 种病原真菌及其他从桑叶上分离真菌的多重 PCR 检测结果表明, 本研究建立的多重 PCR 检测技术, 同时检测 2 种病原菌新褐斑壳丰孢和膝节霉的 DNA 检出限分别达 0.1 和 1.0 pg/μL, 且非目标菌株以及空白对照都没有检测到特异性扩增, 表明本研究建立的桑褐斑病与桑轮纹病多重 PCR 检测技术具有良好的灵敏度与特异性。本研究优化了其他相关的反应参数与条件, 建立了桑轮纹病与桑褐斑病的多重 PCR 检测技术, 可以对 2 种病原菌进行快速、准确、有效的检测。

本研究建立的多重 PCR 检测方法整个流程可

在 4 h 内完成, 极大地节约了时间和经费开支, 并且具有特异性强和灵敏度高的优点, 可应用于桑轮纹病与桑褐斑病的准确鉴定。本研究建立的多重 PCR 体系在田间样本实际检测中, 检出率达到 91.4%, 有较高的准确率与可操作性。其次, 本研究在对部分症状类似于桑褐斑病与桑轮纹病的病样进行检测时, 并未检测到膝节霉与新褐斑壳丰孢, 推测部分叶斑状病样的病症虽与褐斑病相似, 但是为不同的病原菌侵染所致, 已有部分报道验证这一推测, 如关于炭疽病的报道^[26]。因此, 在对桑树褐斑病与轮纹病的检测过程中, 需结合其他病原菌的核酸特性, 对所检测病害加以分析。总之, 本研究建立的膝节霉与新褐斑壳丰孢的检测方法, 既可用于桑轮纹病与褐斑病的快速确诊, 也可以用于桑园中 2 种病害早期的病原筛查, 具有较强的实用性, 为桑树真菌性病害的防控建立了基础。

参考文献:

[1] DHANYALAKSHMI K H, NATARAJA K N. Mulberry (*Morus* spp.) has the features to treat as a potential perennial model system[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2018, 13(8): e1491267.

[2] 廖森泰, 肖更生, 黄先智, 等. 国家蚕桑产业技术体系成果: 蚕桑资源多元化利用技术与产品 (I) [J]. *蚕业科学*, 2017, 43(1): 169-176.

[3] 张波静, 孙孝龙. 蚕桑资源综合开发利用模式与应用探讨. *江苏蚕业*, 2012, 34(3): 32-35.

[4] 余茂德, 楼程富. 桑树学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2016: 356-357.

[5] 李月秋, 赵燕春, 赵丽章, 等. 云南大理州桑褐斑病发生、危害现状及防治[J]. *植物保护*, 2009, 35(5): 165-167.

[6] HONG S K, KIM W G, SUNG G B, et al. Occurrence of leaf spot on mulberry caused by *Phloeospora maculans* in Korea[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2011, 27(2): 193.

[7] VIDEIRA S, GROENEWALD J Z, NAKASHIMA C, et al. *Mycosphaerellaceae*: Chaos or clarity?[J]. *Studies in Mycology*, 2017, 87(1): 257-421.

[8] COSTA C, VELOSO J S, OLIVEIRA B F, et al. First report of *Neophloeospora maculans* causing leaf spots in *Morus nigra* and *M. alba* in Brazil[J]. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 2021, 128: 317-321.

[9] SOYLU S, KURT S, SOYLU E M. First report of *Phloeospora* leaf spot on mulberry caused by *Phloeospora maculans* (= *Cylindrosporium maculans*) in the East Mediterranean region of Turkey[J]. *Plant Pathology*, 2003, 52(3): 415.

[10] MUNSHIN A, TANKI T N, SAHAF K A, et al. Behaviour of some newly evolved mulberry genotypes against leaf spot and powdery mildew diseases in Kashmir under

field conditions[J]. Indian Journal of Sericulture, 2007, 46(2): 183-185.

[11] 江秀均, 柴建萍, 陆鹏飞, 等. 桑褐斑病叶的营养成分变化及对家蚕的健康效应分析[J]. 西南农业学报, 2019, 32(7): 1682-1686.

[12] 王谢, 唐甜, 张建华. 一种桑轮纹病病叶发病程度的评价指数[J]. 中国蚕业, 2018, 39(4): 19-21.

[13] 白景彰, 周顺心, 雷扶生, 等. 百色蚕区发生的桑轮纹病调查初报[J]. 广西蚕业, 1994, 31(2): 36.

[14] 章一鸣, 赵雁, 吴庭观, 等. 桑树轮纹病病原菌的分离鉴定及其生物学特性研究[J]. 西部林业科学, 2014, 43(3): 51-56.

[15] SAIKI R K, SCHARF S, FALOONA F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia[J]. Science, 1985, 230(4732): 1350-1354.

[16] HEID C A, STEVENS J, LIVAK K J, et al. Real time quantitative PCR[J]. Genome Research, 1996, 6(10): 986-994.

[17] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.

[18] 姜星. 桑枯萎病原细菌的分离、鉴定及分子检测方法的建立[D]. 镇江: 江苏科技大学, 2012.

[19] 杨宏宇, 周铁楠, 孙勋勋, 等. 桑源阴沟肠杆菌 LAMP 检测方法的建立和应用[J]. 蚕业科学, 2019, 45(3): 321-330.

[20] 陈明洁, 方偶, 柯涛, 等. 多重 PCR: 一种高效快速的分子生物学技术[J]. 武汉理工大学学报, 2005, 27(10): 33-36.

[21] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]. PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315-322.

[22] EGEE M N A, PITERA J G, GONZÁLEZ J C M, et al. Utility of multiplex PCR syndromic panel for respiratory infections in the diagnosis of acute bacterial meningitis. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2021, 39(9): 481-482.

[23] 邢珍娟, 董立明, 龙丽坤, 等. 应用多重荧光 PCR 快速筛查作物中转基因成分研究[J]. 玉米科学, 2021, 29(4): 35-42.

[24] 杨怡华, 王明郎, 曹瑱艳, 等. 麦冬主要病害病原菌巢式多重 PCR 检测方法的建立[J]. 植物保护学报, 2021, 48(4): 742-747.

[25] 李明骏, 廖萌, 蒋开蓉, 等. 五种玉米病毒多重 PCR 检测体系的建立[J]. 植物保护学报, 2021, 48(2): 465-466.

[26] XUE L, ZHANG L, YANG X X, et al. Characterization, phylogenetic analyses, and pathogenicity of *Colletotrichum* species on *Morus alba* in Sichuan Province, China[J]. Plant Disease, 2019, 103(10): 2624-2633.

【责任编辑 庄 延】

欢迎订阅 2023 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物。本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、综述等，涵盖动物科学、兽医学、农学、园艺学、土壤肥料、植物保护、生物学、林业科学、农业工程和食品科学等学科。本刊附英文目次和英文摘要。读者对象主要是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业技术人员。

本刊为《中文核心期刊要目总览》综合性农业科学核心期刊，《中国科学引文数据库 (CSCD)》、《中国科技论文统计源（中国科技核心期刊）》及《中国学术期刊综合评价数据库》等来源期刊，并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内；为《CNKI》《万方数据库》《中国生物学文摘》《化学文摘》《EBSCO》《Scopus》《CABI》《剑桥科学文摘》《动物学记录》《食品科技文摘》《文摘杂志》《日本科学技术振兴机构数据库》等国内外 40 多家数据库（文摘）收录。

双月刊，逢单月上旬出版，A4 幅面。定价 15.00 元/册，全年 90.00 元。自办发行，参加全国非邮发报刊联合征订发行，非邮发代号：6573。国内外公开发行人，欢迎订阅！

订阅款邮汇至：300381 天津市卫津南路李七庄邮局 9801 信箱，全国非邮发报刊联合征订服务部。

《华南农业大学学报》编辑部