

## 旱稻孢囊线虫的快速分子检测

王水南<sup>1,2</sup>, 彭德良<sup>3,4</sup>, 黄文坤<sup>3,4</sup>, 丁中<sup>1,2\*</sup>

(1.湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128; 2.植物病虫害生物学与防控湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410128; 3.中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193; 4.植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193)

**摘 要:** 根据旱稻孢囊线虫(*Heterodera elachista*)和常见孢囊线虫的 ITS 序列比对分析, 设计 1 对旱稻孢囊线虫特异性引物 He-F/He-R, 特异性片段长度为 281 bp。运用该特异性引物及建立的 DNA 提取方法和 PCR 体系, 可特异性检测旱稻孢囊线虫单条 2 龄幼虫, 可以从混合有 1 条旱稻孢囊线虫的 0.1 g 水稻根组织中特异性检测出目的 DNA 片段。特异性引物 He-F/He-R 与通用引物 D2A/D3B 结合, 运用一步双重 PCR 检测方法可快速鉴定单孢囊, 也可从初始分离的田间土壤总线虫样品中直接检测出旱稻孢囊线虫。

**关 键 词:** 旱稻孢囊线虫; PCR 检测; 特异性引物

中图分类号: S432.4<sup>+</sup>5

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)02-0178-05

### Rapid molecular diagnosis of rice cyst nematode (*Heterodera elachista*)

WANG Shui-nan<sup>1,2</sup>, PENG De-liang<sup>3,4</sup>, HUANG Wen-kun<sup>3,4</sup>, DING Zhong<sup>1,2\*</sup>

(1.College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Hunan Provincial Key Laboratory for Biology and Control of Plant Disease and Insect Pests, Changsha 410128, China; 3.Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China; 4. The State Key Laboratory for Biology of Disease and Insect Pests, Beijing 100193, China)

**Abstract:** Based on known ITS sequences of the rice cyst Nematode (*Heterodera elachista*) and common cyst nematodes, one species-specific primer pair named He-F and He-R was designed for *H. Elachista*, the expected fragment length of the PCR products using the primers was 281 bp. Using the established DNA extraction method and PCR system with the specific primers, target fragment detected from a single second instar larvae of nematode or an individual *H. elachista* mixed in 0.1 g rice root tissues. Combined the species-specific primers He-F and He-R with universal primer pairs D2A and D3B, a duplex PCR was established, which detects *H. elachista* from cyst nematode samples primarily separated from field soil.

**Key words:** *Heterodera elachista*; PCR detection; specific primers

旱稻孢囊线虫(*Heterodera elachista*)是一种主要侵染水稻的植物寄生线虫,最早于日本栃木县的稻田中被发现<sup>[1]</sup>。目前该线虫病害在湖南省多个县(市)丘陵地带的水稻田发生较为普遍<sup>[2]</sup>。旱稻孢囊线虫一般寄生在寄主根部,其危害症状与水肥失调引起的症状极其相似,除吸收寄主的营养和对植物

根部造成伤害外,还降低水稻对水的利用效率,继而影响寄主的生长和发育<sup>[3-4]</sup>,造成水稻减产 7%~19%<sup>[5]</sup>。建立简单快速检测旱稻孢囊线虫的方法有助于旱稻孢囊线虫的监测与防控。

早期对线虫主要依靠形态鉴定,需要大量线虫样品<sup>[6-7]</sup>,耗时费力,并可能出现误诊。简单、准

确、灵敏、对样品需求量少的分子生物学检测方法已成为当前研究的热点。

在植物寄生线虫分子检测中,基于线虫种间序列差异设计特异性引物,利用 PCR 及其衍生技术进行快速检测是鉴定线虫种类的重要方法<sup>[8]</sup>。Buimam 等<sup>[9]</sup>利用 2 对特异性引物及 1 对通用引物建立了快速检测马铃薯白线虫(*Globodera pallida*)和马铃薯金线虫(*Globodera rostochiensis*)的方法;王琼等<sup>[10]</sup>也设计出 1 对特异性引物,能快速检测出香蕉穿孔线虫(*Radopholus similis*)。

ITS 序列在线虫分子诊断中有重要意义,分析线虫的 ITS 区域可以快速有效地鉴定农业重要线虫种及线虫近缘种<sup>[11-13]</sup>。孢囊线虫属(*Heterodera*) ITS 片段长度基本相同,一般通过一种酶或几种酶酶切就可以将它们区分开<sup>[14]</sup>。但是酶切方法比较耗时,并且工作量较大,利用特异性引物 PCR 检测方法不仅操作简单,耗时较短,而且结果准确度高。利用这一技术已成功建立起快速检测甜菜孢囊线虫(*H. schachtii*)<sup>[15-16]</sup>、大豆孢囊线虫(*H. glycines*)<sup>[17-18]</sup>、禾谷孢囊线虫(*H. avenae*)<sup>[19]</sup>的方法。

笔者将旱稻孢囊线虫和常见孢囊线虫的 ITS 序列进行比对分析,设计 1 对旱稻孢囊线虫的特异性引物 He-F/He-R,通过 PCR 扩增,快速检测旱稻孢囊线虫。该方法不仅灵敏度高,特异性强,同时结合通用引物 D2A/D3B,进行双重 PCR 扩增,可快速鉴定或检测出单孢囊、单条 2 龄幼虫、田间土壤总线虫及水稻根组织中的线虫,现将结果报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

4 个旱稻孢囊线虫样品材料(HE-1、HE-2、HE-3 和 HE-4)分别采集于湖南省长沙县、桃江县、衡东县和永州市;豌豆孢囊线虫(*H. goettingiana*)样品采集于湖南省华容县;禾谷孢囊线虫、菲利普孢囊线虫(*H. Filipjevi*)及大豆孢囊线虫由中国农业科学院植物保护研究所彭德良研究员惠赠。线虫感染水稻根组织采集于长沙县干杉镇。

植物基因组 DNA 抽提试剂盒购自天根公司,Marker DL2000、6×Loading Buffer、PCR 扩增试剂

盒等购自 TaKaRa 公司。引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 DNA 的提取

1) 孢囊 DNA 的提取。挑取饱满的孢囊放入灭菌的 PCR 管中,加入 10 μL ddH<sub>2</sub>O, 7 μL 10×PCR Buffer 和 3 μL 蛋白酶 K 溶液(600 μg/mL),液氮中反复冻融 3 次,并用灭菌的玻棒研磨。冻结后,将 PCR 管置于-20 °C 冰箱中冷冻至少 2 h。将冷冻后的 PCR 管置于 65 °C 温育 90 min, 95 °C 加热 10 min 使蛋白酶 K 变性, 12 000 r/min 离心 1 min 后取上清, -20 °C 保存备用。

2) 2 龄幼虫 DNA 的提取。旱稻孢囊线虫 2 龄幼虫采用水稻土壤浸液孵化<sup>[20]</sup>获得。挑取分离获得的 2 龄幼虫线虫, ddH<sub>2</sub>O 清洗 3 次,吸取 10 μL 含单条至 15 条线虫的 ddH<sub>2</sub>O 于灭菌的 PCR 管中,加入 5 μL ddH<sub>2</sub>O、2 μL 10×PCR Buffer 和 3 μL 蛋白酶 K 溶液(600 μg/mL),液氮中反复冻融 5 次。其他操作同 1)。

3) 田间多种线虫混合样品 DNA 的提取。采集水稻根际土壤 500 mL,采用浅盘法在 30 °C 恒温箱中分离土壤样品中的线虫。从分离获得的线虫样品中随机挑取若干条, ddH<sub>2</sub>O 清洗 3 次,吸取 20~30 μL 线虫悬浮液于 PCR 管中,加入 10 μL ddH<sub>2</sub>O、4 μL 10×PCR Buffer、6 μL 蛋白酶 K 溶液(600 μg/mL),液氮中冷冻后充分研磨至冰融化,反复 5 次。其他操作同 1)。

4) 线虫与水稻根组织混合样品及线虫侵染的水稻根组织 DNA 的提取。采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取。

#### 1.2.2 特异性引物的设计与检测

从 NCBI 基因库中下载旱稻孢囊线虫及常见孢囊线虫的 ITS 序列,用 DNAMAN 软件进行比对和分析,设计 1 对旱稻孢囊线虫特异性引物: He-F(5'-ATTCACCACCTACCCTCGCTGCCTA-3'), He-R(5'-TTGGAGCAGCAAACCGACCAGCGAT-3')。引入内标引物: D2A(5'-ACAAGTACCGTGAGGGA AAGTTG-3'), D3B(5'-TCGGAAGGAACCAGCTA CTA-3'),可扩增出所有植物线虫的 D2D3 片段,能直观反映 DNA 提取质量,有效消除假阴性。

分别提取 15、10、5、1 条旱稻孢囊线虫 2 龄幼虫的 DNA,再以 2 倍浓度梯度将单条旱稻孢囊线虫 2 龄幼虫 DNA 分别稀释成原 DNA 浓度的 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256。用特异性引物 He-F/He-R 扩增不同数量旱稻孢囊线虫及稀释后的 DNA 模板,以检验引物 He-F/He-R 的灵敏度。PCR 反应体系为:10×PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup>Plus) 5 μL, dNTP Mixtue 4 μL, 引物 He-F/He-R(10 μmol/L) 2 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.4 μL, DNA 模板 2 μL, 灭菌 ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL。采用无 DNA 模板为阴性对照。PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 63 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环;72 °C 再延伸 7 min, 4 °C 保存。PCR 扩增结束后,取 5 μL PCR 产物,加 1 μL 6×Loading Buffer 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,采用 1×TAE 作为电泳缓冲液,120 V 下电泳 40 min,EB 染色后用凝胶成像仪照相观测。

### 1.2.3 特异性引物的扩增检测

取未感染线虫的水稻根组织 0.1 g 至 2 mL 离心管中,分别加入 10、5、3、2 和 1 条旱稻孢囊线虫 2 龄幼虫。液氮中充分研磨后,采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取水稻根组织和旱稻孢囊线虫混合样品中的 DNA,以水稻根 DNA 模板为对照,用特异引物 He-F/He-R 进行 PCR 扩增。

分别从湖南省长沙县干杉镇旱稻孢囊线虫危害的 3 个水稻田块以及无旱稻孢囊线虫危害的 3 个水稻田块采集水稻根组织,剪取 500 mg 至灭菌的 2 mL 离心管,液氮中充分研磨后,采用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,用特异性引物 He-F/He-R 进行 PCR 扩增。

### 1.2.4 特异性引物与通用引物结合的一步双重 PCR 扩增

分别提取旱稻孢囊线虫、菲利普孢囊线虫、燕麦孢囊线虫、豌豆孢囊线虫及大豆孢囊线虫孢囊的 DNA,进行特异性引物 He-F/He-R 与通用引物 D2A/D3B 结合的一步双重 PCR 扩增,以检测引物 He-F/He-R 的特异性。PCR 反应体系为:10×PCR Buffer(Mg<sup>2+</sup>Plus)5 μL, dNTP Mixtue 4 μL, 引物 He-F/He-R、D2A/D3B(10 μmol/L)各 2 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.4 μL, DNA 模板 2 μL, 灭菌 ddH<sub>2</sub>O

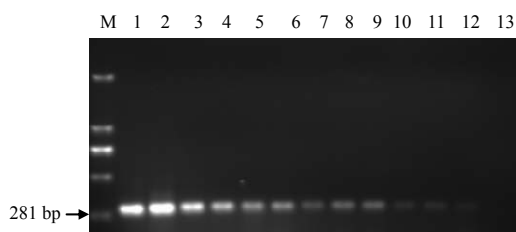
补足至 50 μL。采用无 DNA 模板为阴性对照。PCR 反应条件(退火温度改为 56 °C)及电泳、凝胶成像观测等同上。

将 6 个无旱稻孢囊线虫发生的水稻土样中分离的线虫混合样品分成 2 份,1 份加入 3 条旱稻孢囊线虫,并从旱稻孢囊线虫危害的地块采集并分离得到 4 个线虫混合样品,提取所有样品的 DNA,进行特异性引物 He-F/He-R 与通用引物 D2A/D3B 结合的一步双重 PCR 扩增,以检测引物 He-F/He-R 的特异性。

## 2 结果与分析

### 2.1 特异性引物的灵敏度

在特异性引物 He-F/He-R 扩增 15、10、5、1 条旱稻孢囊线虫 2 龄幼虫 DNA 样本及 8 个稀释后的 DNA 样本(1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256)中,15、10、5、1 条旱稻孢囊线虫 DNA 扩增出的 281 bp 特异性条带明亮清晰,单条旱稻孢囊线虫 DNA 量的 1/32 时扩增出 281 bp 特异性条带也比较清晰,单头旱稻孢囊线虫 2 龄幼虫 DNA 量的 1/256 时也能检测到特异性条带,阴性对照中没有条带(图 1)。说明特异性引物 He-F/He-R 检测旱稻孢囊线虫的灵敏度高。



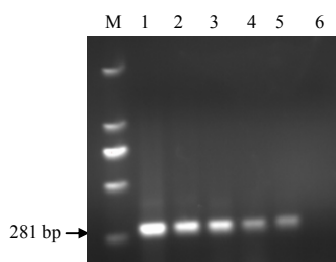
M Marker DL2000;1~4 分别为 15、10、5、1 条线虫的 PCR 产物;5~12 分别为单条线虫的 1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256;13 为阴性对照。

图 1 特异性引物灵敏度检测结果

Fig. 1 Sensitivity of the specific primers

### 2.2 特异性引物扩增结果

在 0.1 g 水稻根组织中,分别加入 10、5、3、2 和 1 条旱稻孢囊线虫,采用特异引物 He-F/He-R 对水稻根组织和线虫的混合 DNA 模板进行扩增,均得到 1 条 281 bp 的特异性条带,而从水稻根 DNA 模板中未扩增出该条带(图 2)。

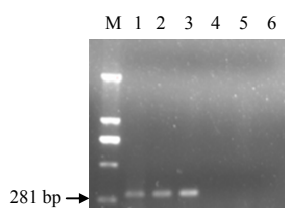


M Marker DL2000 ;1~5 分别为 0.1 g 水稻根组织中加入 15、10、5、3、1 条线虫；6 水稻根组织。

图 2 旱稻孢囊线虫与水稻根组织混合样品特异性引物的扩增结果

Fig.2 PCR amplification results for mixtures containing *H. elachista* and rice root tissues using specific primers

进一步对旱稻孢囊线虫侵染的水稻根组织 DNA 模板进行扩增(图 3),同样也能扩增出 281 bp 的特异性条带,而无旱稻孢囊线虫侵染的水稻根组织 DNA 没有扩增出该条带。表明特异性引物 He-F/He-R 以及 PCR 体系可以稳定地从水稻根组织中检测出旱稻孢囊线虫。



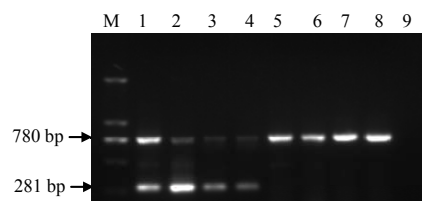
M Marker DL2000 ;1~3 旱稻孢囊线虫侵染的水稻根的 PCR 产物 ;4~6 无旱稻孢囊线虫危害的水稻根组织的 PCR 产物。

图 3 田间旱稻孢囊线虫侵染的水稻根检测

Fig.3 PCR detection of rice root tissues infected by *H. elachista* in field

## 2.3 一步双重 PCR 扩增结果

在旱稻孢囊线虫的一步双重特异性检测中,从 4 个县(市)采集的旱稻孢囊均扩增出 2 条稳定的条带,其中 281 bp 条带是由旱稻孢囊线虫的特异性引物 He-F/He-R 扩增产生,780 bp 左右的条带是由通用引物 D2A/D3B 扩增产生,而菲利普孢囊线虫、燕麦孢囊线虫、豌豆孢囊线虫及大豆孢囊线虫均只有引物 D2A/D3B 扩增产生的 780 bp 左右的条带,阴性对照中没有任何条带(图 4)。说明引物 He-F/He-R 能特异性检测旱稻孢囊线虫。

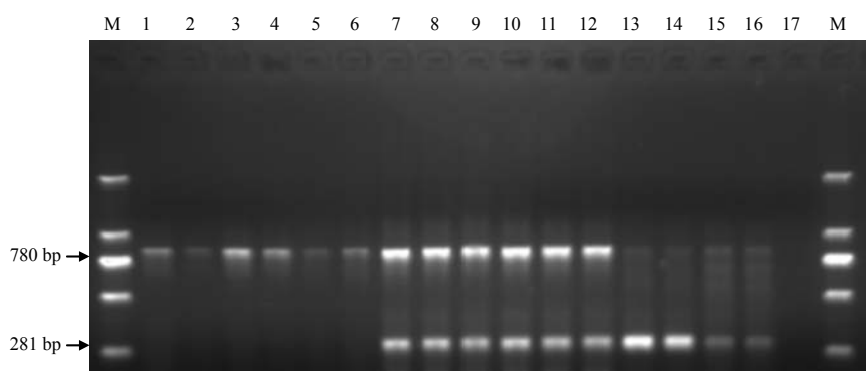


M Marker DL2000 ;1~4 旱稻孢囊线虫(HE-1、HE-2、HE-3、HE-4);5 菲利普孢囊线虫;6 燕麦孢囊线虫;7 豌豆孢囊线虫;8 大豆孢囊线虫;9 阴性对照。

图 4 旱稻孢囊线虫及其他常见孢囊线虫 DNA 双重 PCR 扩增结果

Fig.4 Duplex PCR amplification of DNA from *H. elachista* and other species of cyst nematode

对田间土壤总线虫样品进行检测,6 个无旱稻孢囊线虫的线虫样品只有引物 D2A/D3B 扩增产生的 780 bp 左右的条带,加入旱稻孢囊线虫后能扩增出 2 条稳定的条带,同时采集的旱稻孢囊线虫危害的水稻田土壤总线虫样品也能扩增出 2 条稳定的条带,阴性对照中没有任何条带(图 5)。说明引物 He-F/He-R 特异性高,能用于旱稻孢囊线虫的快速检测。



M Marker DL2000 ;1~6 无旱稻孢囊线虫危害的稻田采集分离的线虫混合样品 ;7~12 加入旱稻孢囊线虫的混合样品 ;13~16 旱稻孢囊线虫危害的稻田采集分离的线虫混合样品 ;17 阴性对照。

图 5 多种线虫混合 DNA 双重 PCR 扩增结果

Fig.5 Duplex PCR amplification from mixed DNA of various nematode samples

## 参考文献:

- [1] Ohshima Y. *Heterodera elachista* n. sp., an upland rice cyst nematode from Japan[J]. Japanese Journal of Nematology, 1974(4): 51–56.
- [2] Ding Z, Namphueng J, He X F. First report of the cyst Nematode(*Heterodera elachista*) on rice in Hunan province, China[J]. Plant Disease, 2012, 96(1): 151.
- [3] 刘存信. 植物寄生线虫在我国的危害特点[J]. 动物学杂志, 1989, 24(4): 51–54.
- [4] 丁中, Namphueng Janthathang, 何旭峰, 等. 旱稻孢囊线虫生活史及侵染特性[J]. 中国水稻科学, 2012, 26(6): 746–750.
- [5] Bridge J, Luc M, Plowright R A. Plant Parasitic Nematodes in Tropical and Subtropical Agriculture[M]. Wallingford: CAB International, 1990: 69–108.
- [6] Schmitz B, Burgermeister W, Braasch H. Molecular genetic classification of central European *Meloidogyne chitwoodi* and *M. fallax* populations[J]. Nachrichtenblatt des Deutschen Pflanzenschutzdienstes, 1998, 50(12): 310–317.
- [7] 赵宁, 刘勇, 张德永, 等. 分子生物学技术在植物寄生线虫检测鉴定中的应用[J]. 湖南农业科学, 2013(5): 17–20.
- [8] 王新荣, 谢辉. DNA 重组技术在植物寄生线虫分类上的应用及发展趋势[J]. 植物检疫, 2001, 15(4): 232–234.
- [9] Bulman S R, Marshall J W. Differentiation of Australasian potato cyst nematode(PCN) populations using the polymerase chain reaction(PCR)[J]. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 1997, 25: 123–129.
- [10] 王琼, 耿立凤, 张东升, 等. 香蕉穿孔线虫(*Radopholus similis*)特异性分子检测技术研究[J]. 植物病理学报, 2011, 41(2): 171–177.
- [11] 马娟, 李秀花, 于海滨, 等. 河北省小麦孢囊线虫种类鉴定[J]. 华北农学报, 2011, 26(增刊): 168–173.
- [12] Subbotin S A, Vierstraete A, Ley P D, et al. Phylogenetic relationships within the cyst-forming Nematodes (Nematoda, *Heteroderidae*) based on analysis of sequences from the ITS regions of ribosomal DNA[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2001, 21(1): 1–16.
- [13] 欧师琪, 彭德良, 李玉, 等. 禾谷孢囊线虫(*Heterodera avenae*)的分子鉴定及抗性基因研究进展[J]. 植物保护, 2008, 34(6): 7–11.
- [14] 欧师琪, 彭德良, 李玉, 等. 河南郑州小麦禾谷孢囊线虫(*Heterodera avenae*)的核糖体基因 ITS 序列和 RFLP 分析[J]. 植物病理学报, 2008, 38(4): 407–413.
- [15] Amiri S, Subbotin S A, Moens M. An efficient method for identification of the *Heterodera schachtii* sensu stricto group using PCR with specific primers[J]. Nematology mediate, 2001, 29: 241–246.
- [16] Amiri S, Subbotin S A, Moens M. Identification of the beet cyst nematode *Heterodera schachtii* by PCR[J]. European Journal of Plant Pathology, 2002, 108: 497–506.
- [17] Subbotin S A, Peng D L, Moens M. A rapid method for the identification of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* using duplex PCR[J]. Nematology 2001, 3(4): 365–371.
- [18] Ou S Q, Peng D L, Liu X M, et al. Identification of *Heterodera glycines* using PCR with sequence characterized amplified region(SCAR) primers[J]. Nematology, 2008, 10(3): 397–403.
- [19] 元晓莉, 彭德良, 彭焕, 等. 基于 SCAR 标记的小麦禾谷孢囊线虫快速分子检测技术[J]. 中国农业科学, 2012, 45(12): 4388–4395.
- [20] 贺沛成, 洪宏, 伍敏敏, 等. 旱稻孢囊线虫(*Heterodera elachista*)孵化特性研究[J]. 植物保护, 2011, 37(6): 101–103.

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维