

文章编号:1001-1498(2016)04-0615-05

管芯片技术通量检测杨树溃疡病病菌的应用

王凯英¹, 高 茜¹, 严东辉^{1,2*}

(1. 中国林业科学研究院森林生态环境与保护研究所 国家林业局森林保护学重点实验室,北京 100091;
2. 南京林业大学南方现代林业协同创新中心,南京 210037)

关键词: 溃疡病菌; *Botryosphaeria dothidea*; 芯片杂交; 检测; 管芯片

中图分类号: S792.11

文献标识码: A

Detection of Poplar Canker Fungal Pathogens by ArrayTube Technique

WANG Kai-ying¹, GAO Qian¹, YAN Dong-hui^{1,2}

(1. Research Institute of Forest Ecology, Environment and Protection, Chinese Academy of Forestry, Key Laboratory of Forest Protection of State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 2. Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China)

Abstract: [**Objective**] Using ArrayTube, a high-throughput microarray technology, to detect poplar canker pathogens in Beijing area. [**Method**] The DNA extracted from symptomatic and asymptomatic poplar bark were used to hybridizing by ArrayTube. The results of hybridization were recorded and analyzed by IconoClust-AT 3.0. Then the hybridization results were verified by cloning of the corresponding tissue. [**Result**] The results showed that *Botryosphaeria dothidea* and *Valsa sordida* were successfully detected as the target pathogens in symptomatic samples by microarray hybridization. The *B. dothidea* was also found as an endophyte in healthy tissue. [**Conclusion**] The results indicated that the ArrayTube technique is an effective method for quick detection of poplar canker pathogens, it could be further applied in other forest plant pathogen detection or diagnosis.

Keywords: canker pathogens; *Botryosphaeria dothidea*; microarray hybridization; detection; ArrayTube

基因芯片技术因能对生物样本进行快速、高通量的定性和定量分析,而在植物病害诊断中也得到普遍的应用^[1]。树木溃疡病是指引起木本植物树皮上出现溃疡腐烂等症状的病害^[2]。引起杨树溃疡病的真菌种类较多,加之其无性型和有性型多样,所以,关于杨树溃疡病病原菌的报道多有不同。另外,受地理位置、寄主植物关系及分类体系的限制,迫切需要发展不依赖于常规分离培养的病原鉴定新技术。

以 ArrayTube(AT)为基础的管芯片技术,在衣

原体、细菌及真菌鉴定中都得到了应用^[3-5]。Sachse等^[6]利用 AT 平台技术构建了包含 35 个探针有效针对 ompA 基因的管芯片技术,用于快速、准确分析衣原体菌株的基因分型。Borel 等^[7]利用 ArrayTube 检测衣原体,通过对 339 个样本的分析检测,发现 AT 可以检测混合感染临床样本,与传统 16S-PCR 相比,灵敏度更高。Felde 等^[5]为了检测环境样本中的炭疽杆菌 *Bacillus anthracis*,分别以毒力基因 *rpoB* 和 16S rDNA 为靶标基因设计探针,构建了 AT 芯片。采用 8 个供试菌株检测芯片的有效性,并结合环境

收稿日期:2016-03-09

基金项目:水解纤维素产烃树木内生菌资源利用技术引进(2013-4-10)、效应物在杨盘二孢半活养方式及亲和寄主致病性中的作用(31370645)

作者简介:王凯英(1990—),女,河北邯郸人,在读硕士研究生,森林植物微生物组学,E-mail:wkylibra@163.com

* 通讯作者:博士,研究员,主要从事森林病理与树木微生物群学(microbiomics),E-mail:yandh@caf.ac.cn

2 结果与分析

2.1 环境样本芯片杂交

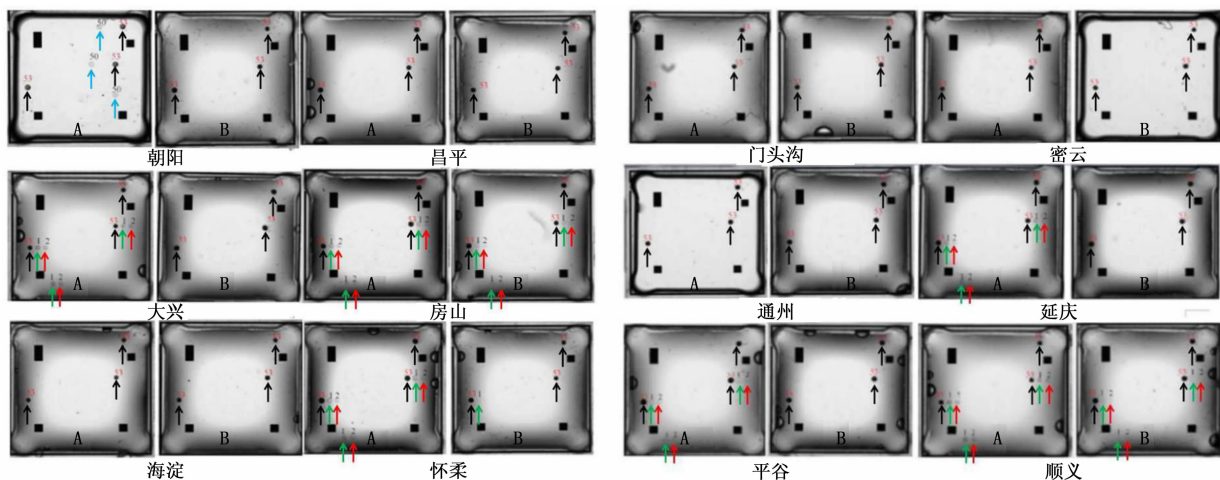
利用建立和完成的检测新技术,作者对北京地区杨树溃疡病的病原真菌进行了大量样本检测。其中12个感病样本中有6个样本检测出了 *B. dothidea*,分别采自延庆、平谷、大兴、房山、顺义和怀柔;只有采自朝阳区的杨树样品检测出了 *Valsa sordida*。而在健康样本中,有3个样本检测出含有 *B.*

dothidea,分别采自房山、顺义和怀柔;此外,采自昌平、海淀、门头沟、密云及通州的样品中没有杂交到任何靶标点。结果表明,在未感病的样本中也同样存在 *B. dothidea*,不过以潜伏侵染状态存在。与健康样本相比,感病样本中, *B. dothidea* 数量比较多,芯片杂交样本中只有靶标探针能成功杂交,结果表明,本实验室构建的芯片达到了预期目标。

芯片杂交结果见图2。

表2 芯片杂交样本采集地点、寄主和生境

地区	样点	寄主	生境
朝阳	索家坟	北京杨 <i>Populus beijingensis</i>	郊野天然林,榆树,柳树混交,树林成片死亡
昌平	百善	美洲黑杨 <i>Populus deltoides</i>	新栽植物与农耕地上林子,全死亡,树皮腐烂
大兴	鲍家堡	毛白杨 <i>Populus tomentosa</i>	人工林,壤土地,沙土地
怀柔	白河湾	美洲黑杨 <i>Populus deltoides</i>	天然林,灌木发达
海淀	北大未名	毛白杨 <i>Populus tomentosa</i>	行道树
房山	树子湾	美洲黑杨 <i>Populus deltoides</i>	郊野零星树
密云	番子牌	大青杨 <i>Populus ussuriensis</i>	郊野林,灌木发达
门头沟	妙峰山	山白杨 <i>Populus davidiana</i>	天然,零星树妙峰山500米处
平谷	东凡各庄	北京杨 <i>Populus beijingensis</i>	人工种植与农田旁的行道树
顺义	南坞	美洲黑杨 <i>Populus deltoides</i>	公路旁人工林,几种白杨派混交
通州	小杨各庄	银白杨 <i>Populus alba</i>	行道树
延庆	百草洼	美洲黑杨 <i>Populus deltoides</i>	郊野林



A. 感病样本;B. 无症状样本;黑色箭头指示53号探针;蓝色箭头指示50号探针;绿色箭头指示1号探针;红色箭头指示2号探针;

图2 环境样本芯片杂交结果

2.2 管芯片杂交结果的检验

通过 ITS1/ITS4 扩增后进行克隆,克隆结果见表3,采自门头沟、密云、通州、海淀及昌平5个地区的样本没有与任何探针成功杂交,其中采自前3个地区样本的寄主为山白杨、大青杨、银白杨,同样也没有克隆得到该菌,但克隆得到其他真菌 *Hyalodendriella* sp.、*Coniothyrium fuckelii*、*Peyronella* sp.,而

采自海淀和昌平的样本没有克隆结果;采自朝阳的样本杂交获得 *V. sordida*,但无克隆结果;采自房山、怀柔、顺义(寄主为美洲黑杨)、大兴(毛白杨)、平谷(北京杨)的样本则成功杂交到 *B. dothidea*,通过克隆也获得了 *B. dothidea* 和其他真菌。利用 ITS 克隆的同时也得到植物组织的 ITS 序列,如 *Populus deltoides*。总体克隆结果与管芯片结果相吻合。

表3 环境样本克隆结果和杂交比对

地区	样点	杂交结果	ITS-克隆结果
大兴	鲍家堡	<i>B. dothidea</i>	<i>B. dothidea</i> , <i>Populus deltoides</i>
房山	树子湾	<i>B. dothidea</i>	<i>Hyalodendriella</i> sp., <i>Lophiostoma cynaroidis</i> , <i>B. dothidea</i> , <i>Populus deltoides</i>
怀柔	白河湾	<i>B. dothidea</i>	<i>Peyronellaea</i> sp., <i>Coniothyrium fuckelii</i> , <i>B. dothidea</i> , <i>Dothideomycetes</i> sp., <i>Populus deltoide</i>
门头沟	妙峰山	无	<i>Hyalodendriella</i> sp., <i>Coniothyrium fuckelii</i>
密云	番子牌	无	<i>Hyalodendriella</i> sp., <i>Populus deltoides</i>
平谷	东凡各庄	<i>B. dothidea</i>	<i>B. dothidea</i> , <i>Ascomycita</i> sp., <i>Coniothyrium fuckelii</i> , <i>Dothidomycetes</i> sp.
顺义	南坞	<i>B. dothidea</i>	<i>B. dothidea</i> , <i>Peyronellaea</i> sp., <i>Populus deltoides</i>
通州	小杨各庄	无	<i>Ascomycita</i> sp., <i>Coniothyrium fuckelii</i> , <i>Populus alba</i>
延庆	百草洼	<i>B. dothidea</i>	<i>Hyalodendriella</i> sp., <i>B. dothidea</i> , <i>Populus deltoides</i>
朝阳	索家坟	<i>V. sordida</i>	—
昌平	百善	无	—
海淀	北大未名	无	—

3 结论与讨论

本研究采用引进的管芯片 (ArrayTube) 平台技术具有高通量分析能力,其处理具有即时性与平行性的特点。与片基生物芯片技术相比,管芯片平台技术中的芯片载体是 1.5 ml Eppendorf 离心管,芯片点制在截面的离心管底部内侧表面,即时与平行的通量处理,2 h 的杂交过程不仅减少了环境中污染,而且明显提高了实验效率。

全部的杂交结果可分为 3 种。第一种,在采自房山、顺义和怀柔三个地区的感病样本和未感病样本中均检测到 *B. dothidea*,表明 *B. dothidea* 既是致病菌,又是内生菌,但如何以无害的内生菌变成病原菌的机制尚不清楚,但外部环境及发育阶段等因素可能诱变内生菌为致病菌^[15];第二,在采自朝阳、大兴、延庆和平谷 4 个地区的样本中,只在感病样本中检测到了病原菌 *B. dothidea*,而在采自海淀、门头沟、密云、通州及昌平等 5 个地区的感病样本和非感病样本中均没有检测出任何病原菌,表明这 5 个地区发生的杨树溃疡病症状可能是由其他病原菌引起的。李如华等^[16]发现在北京地区引起杨树溃疡病的病原菌是多样的,可能是 *Lasiodiplodia theobromae* 或 *Neofusicoccum parvum*,也可能存在复合病原^[16-19]。由于本研究采用的探针是专化针对 *B. dothidea*,因此,采用本试验设计的管芯片技术无法检测出其他病原菌,但证明在这些地区发生的杨树溃疡病症状不是由 *B. dothidea* 引起的。

本文首次将管芯片技术应用到树木溃疡病病原的鉴定中,并且成功快速地检测到了致病菌。该技术为杨树溃疡病的病原生态及病害流行的探索提供

了新技术手段。由于一些病原菌也是内生菌,在一定条件下不引起任何症状,如本研究中检测出的 *B. dothidea* 既是病原菌又是内生菌,并且作为常见的树木内生真菌,寄主广泛,可能成为树木溃疡病的潜在病原^[20]。因此,病原菌与内生菌在什么条件下会相互转换,以及其与寄主或环境条件之间的关系如何,能否采用芯片技术加以解决,还有待于深入研究。

参考文献:

- [1] Cook K L, Saylor G S. Environmental application of array technology: promise, problems and practicalities[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2003, 14(3): 311-318.
- [2] 张星耀,骆有庆. 中国重大生物灾害[M]. 北京:中国林业出版社,2003.
- [3] Ruettger A, Feige J, Slickers P, et al. Genotyping of *Chlamydia trachomatis* strains from culture and clinical samples using an ompA-based DNA microarray assay[J]. Molecular and Cellular Probes, 2011, 25(1): 19-27.
- [4] Gawlik D, Slickers P, Engelmann I, et al. DNA-Microarray-based Genotyping of *Clostridium difficile*[J]. BMC microbiology, 2015, 15(1): 1.
- [5] Monecke S, Hochauf K, Gottschlich B, et al. A case of peritonitis caused by *Rhizopus microsporus*[J]. Mycoses, 2006, 49(2): 139-142.
- [6] Sachse K, Laroucau K, Vorimore F, et al. DNA microarray-based genotyping of *Chlamydomonas psittaci* strains from culture and clinical samples[J]. Veterinary Microbiology, 2009, 135(1): 22-30.
- [7] Borel N, Kempf E, Hotzel H, et al. Direct identification of chlamydiae from clinical samples using a DNA microarray assay-a validation study[J]. Molecular and Cellular Probes, 2008, 22(1): 55-64.
- [8] Felder K M, Hoelzle K, Wittenbrink M M, et al. A DNA microarray facilitates the diagnosis of *Bacillus anthracis* in environmental samples[J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 49(3): 324

-331.

- [9] 冯小慧. 树木溃疡病菌多重 PCR-基因芯片检测技术构建及在生态中的应用[D]. 北京:中国林业科学研究院, 2012.
- [10] Jasalavich C A, Ostrofsky A, Jellison J. Detection and identification of decay fungi in spruce wood by restriction fragment length polymorphism analysis of amplified genes encoding rRNA[J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2000, 66 (11): 4725 - 4734.
- [11] 杨模华, 李志辉, 张冬林, 等. 马尾松针叶 DNA 提取方法研究[J]. *中南林业科技大学学报:自然科学版*, 2008, 28 (3): 39 - 44.
- [12] White T J, Bruns T, Lee S, *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[J]. *PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications*, 1990, 18: 315 - 322.
- [13] Carbone I, Kohn L M. A method for designing primer sets for speciation studies in *filamentous ascomycetes*[J]. *Mycologia*, 1999, 91 (3): 553 - 556.
- [14] 王晓杰, 康振生, 黄丽丽. PCR 技术在植物病害检测中的应用[J]. *云南农业大学学报*, 2005, 20 (2): 179 - 182.
- [15] Patricia, Álvarez-Loayza, James F. *et al.* Light converts endosymbiotic fungus to pathogen, influencing seedling survival and niche-space filling of a common tropical tree, *Iriartea deltoidea*[J]. *Plos One*, 2011, 6 (1): e16386.
- [16] 李如华, 严东辉, 冯小慧, 等. 基于分子可操作分类单元的北京地区杨树内生葡萄座腔菌属真菌多样性[J]. *林业科学*, 2014, 50 (1): 109 - 115.
- [17] McDonald V, Eskalen A. Botryosphaeriaceae species associated with avocado branch cankers in California[J]. *Plant Disease*, 2011, 95 (11): 1465 - 1473.
- [18] Alves A, Crous P W, Correia A, *et al.* Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*[J]. *Fungal Diversity*, 2008, 28 (1): 1 - 13.
- [19] Abreo E, Martinez S, Bettucci L, *et al.* Characterization of Botryosphaeriaceae species associated with grapevines in Uruguay[J]. *Australasian Plant Pathology*, 2013, 42 (3): 241 - 249.
- [20] Slippers B, Wingfield M J. Botryosphaeriaceae as endophytes and latent pathogens of woody plants: diversity, ecology and impact[J]. *Fungal Biology Reviews*, 2007, 21 (2): 90 - 106.

(责任编辑:崔 贝)