



李朋朋, 尤扬, 刘可, 等. 玉米鞘腐病菌 ISSR-PCR 反应体系优化[J]. 黑龙江农业科学, 2021(1):68-72.

# 玉米鞘腐病菌 ISSR-PCR 反应体系优化

李朋朋, 尤 扬, 刘 可, 刘极一

(河北工程大学 园林与生态工程学院, 河北 邯郸 056038)

**摘要:**玉米鞘腐病的主要病原为层出镰孢(*Fusarium proliferatum*), 为明确其 ISSR-PCR 最佳反应体系, 本文以层出镰孢 DNA 为模板, 筛选各因子浓度范围, 利用单因素试验, 对 5 因素进行优化, 确定最佳反应体系, 从 13 条供试引物中筛选扩增条带清晰、多态性好的引物, 并筛选最适退火温度。结果表明:ISSR-PCR 最佳反应体系各因子浓度分别为模板 DNA  $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、镁离子浓度  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、引物浓度为  $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、dNTPs 浓度  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、Taq 酶浓度为  $2.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 最适 ISSR 引物为 808, 最适退火温度是  $58^\circ\text{C}$ , 用筛选的最适引物 808 对供试菌株扩增出 14 条条带, 多态性条带 13 条, 多态性条带比率为 92.90%。

**关键词:**玉米鞘腐病菌; ISSR-PCR; 反应体系

玉米鞘腐病是近年我国玉米生产上发生的一种新病害, 受害叶鞘呈黑褐色腐烂症状, 在田间, 该病发生在玉米生长的中后期, 与纹枯病、褐斑病类似<sup>[1-3]</sup>。2008 年徐秀德等<sup>[4]</sup>首次报道我国东北春玉米发生了鞘腐病, 致病菌为层出镰孢(*Fusarium proliferatum*)。目前, 该病成为严重威胁我国玉米生产的重要真菌病害之一, 在河北、河南、山东、山西等玉米产区均有严重发生且呈逐年加重的趋势, 危害程度达 3~5 级, 严重地块达 7 级, 给玉米生产造成了惨重的损失。

自 2008 年至今, 本课题组对玉米鞘腐病的病原组成、致病因子等方面进行了深入研究, 发现玉米鞘腐病的主要致病菌为层出镰孢, 此外, 还包括木贼镰孢、禾谷镰孢和串珠镰孢。以生产上主推品种和自交系为试材, 通过田间抗鞘腐病鉴定, 筛选获得了不同抗性表现的玉米品种和自交系。通过室内独立测定筛选出了对层出镰孢具有较好抑制作用的化学杀菌剂多菌灵、戊唑醇等, 并在此基础上进行了玉米鞘腐病的田间防效试验并得到了较好的防治效果, 对挽回玉米产量损失具有重要意义。目前, 科研工作者已对多种植物病原菌的遗传多样性进行了分析, 而对于鞘腐病而言, 研究起步较晚, 尚未见关于玉米鞘腐病菌层出镰孢遗传多样性的研究报道。在真菌遗传多样性研究中

ISSR、RFLP 和 SSR 技术已被大量应用<sup>[5-12]</sup>。ISSR 是 Zietkiewicz 等在 1994 年提出的一种分子标记技术<sup>[13]</sup>。在植物病原真菌的遗传多样性研究中得到了广泛应用。Nirmaladevi<sup>[14]</sup>利用 ISSR 对 69 株尖孢镰孢进行了遗传多样性分析, 发现 69 株菌株存在明显多样性。Thangavel 等<sup>[15]</sup>利用 ISSR 技术对香蕉枯萎病菌研究发现 107 株菌株存在明显多态性。张述义<sup>[16]</sup>等研究表明, 利用 ISSR 可把 33 株尖孢镰孢全部区分开。

目前, 未见关于玉米鞘腐病菌遗传多样性的研究报道, 本研究对 ISSR-PCR 的影响因素和退火温度进行优化, 对 13 条引物进行筛选。明确层出镰孢 ISSR-PCR 最佳反应体系, 可为玉米鞘腐病菌遗传多样性的研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株 本实验室分离并保存的玉米鞘腐病菌菌株。

1.1.2 供试仪器 PCR 扩增仪、凝胶成像分析系统(Sigma 公司)、电泳仪(北京六一仪器厂)。

1.1.3 供试试剂 DNA marker、Taq 酶、dNTP、Buffer 购于上海生工生物工程有限公司。

1.1.4 供试引物 ISSR 引物来自哥伦比亚大学公布的序列, 由上海生工生物工程有限公司合成。

### 1.2 方法

1.2.1 病原菌的培养及基因组 DNA 的提取 将本实验室分离并保存的层出镰孢菌株于 PDA 培养基  $25^\circ\text{C}$  培养 7 d 后进行层出镰孢 DNA 提取。

收稿日期:2020-10-22

基金项目:河北省高等学校科学技术研究项目(QN2018055);河北工程大学博士科研启动基金。

第一作者:李朋朋(1987—),女,博士,讲师,从事植物病理学研究。E-mail:726508104@qq.com。

1.2.2 ISSR-PCR 扩增体系优化及设计 以本实验室基本 ISSR 反应体系为基础:模板 DNA 0.8  $\mu\text{L}$ ,浓度为 20  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ;引物 1.0  $\mu\text{L}$ ,浓度为 0.5  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;dNTPs 0.5  $\mu\text{L}$ ,浓度为 0.2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ;

*Taq* 酶 0.3  $\mu\text{L}$ ,浓度为 2.5  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ;  $\text{MgCl}_2$  0.6  $\mu\text{L}$ ,浓度为 25  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 10  $\times$  *Taq* Buffer 2  $\mu\text{L}$ ;ddH<sub>2</sub>O 14.8  $\mu\text{L}$ 。对上述因素浓度进行单因素试验(表 1)。

表 1 ISSR-PCR 试验因素及浓度

因素	浓度							
模板/( $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	80.0	160.0	320.0
$\text{Mg}^{2+}$ /( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0
引物/( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
dNTP Mix/( $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30	0.35	0.40
<i>Taq</i> 聚合酶/( $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ )	0.5	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0

1.2.3 ISSR 引物筛选及退火温度筛选 利用优化的反应体系,对 13 条合成的 ISSR 引物(引物序列详见表 2,引物由上海生工生物工程有限公司合成)进行筛选,筛选时随机选取 5 个 DNA 模板进行扩增,扩增产物在 1%琼脂糖凝胶中分离扩增产物,用凝胶成像分析系统拍照记录,从 13 个引物中筛选多态性好、扩增条带清晰且稳定的引物,为玉米鞘腐病菌的遗传多样性分析提供参考。将筛选出的 ISSR 引物,设置 11 个退火温度梯度 50.0,51.0,52.0,53.0,54.0,55.0,56.0,57.0,58.0,59.0 和 60.0  $^{\circ}\text{C}$ ,随机选取 5 个 DNA 模板做扩增筛选,扩增反应结束后,在 1%琼脂糖凝胶中分离扩增产物,用凝胶成像分析系统拍照记录,记录每种引物相应退火温度,用于 64 个 DNA 样品的扩增。

表 2 引物序列

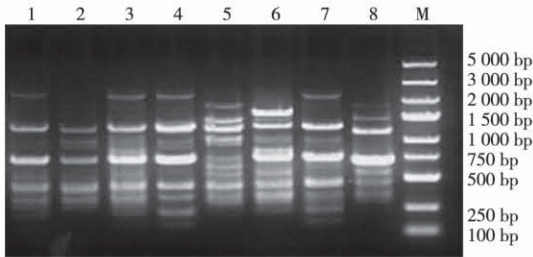
引物	序列
807	(AG)8T
808	(AG)8C
809	(AG)8G
812	(GA)8A
831	(AC)8YA
835	(AG)8YC
882	VBV(AT)7
883	BVB(TA)7
884	HBH(AG)7
885	BHB(GA)7
888	BDB(CA)7
889	DBD(AC)7
891	HVH(TG)7

1.2.4 条带统计及分析 PCR 产物电泳分离后,记录每条引物的扩增结果。电泳图谱中每 1 条扩增带均代表了引物与模板 DNA 互补的 1 对结合位点,可记为 1 个分子标记。将 DNA 条带转换成二进制数据,有带的记为 1,无带的记为 0。利用 NT-SYSpC (Version 2.10e)软件进行聚类分析并构建种间及种内的系统聚类图。

2 结果与分析

2.1 不同模板 DNA 浓度的 ISSR-PCR 反应结果

DNA 浓度分别设为 2.5,5.0,10.0,20.0,40.0,80.0,160.0 和 320.0  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。由图 1 可知,DNA 浓度为 40  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,扩增效果最好,条带数多而且条带清晰;DNA 浓度为 2.5,5.0,10.0,20.0,80.0,160.0 和 320.0  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时,条带数较 DNA 用量为 40.0  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时少,其中,浓度为 2.5 和 5.0  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时条带数最少,所以,模板浓度定为 40.0  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。



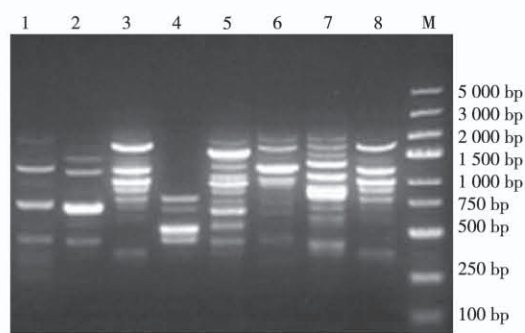
泳道 1~8:模板 DNA 浓度分别为 2.5,5.0,10.0,20.0,40.0,80.0,160.0 和 320.0  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ;M:Marker 5000

图 1 不同模板 DNA 浓度对扩增反应的影响



## 2.2 不同 $Mg^{2+}$ 浓度的反应结果

$Mg^{2+}$  浓度分别设为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 和 4.0  $mmol \cdot L^{-1}$ , 由图 2 可知, 镁离子浓度为 2.5  $mmol \cdot L^{-1}$  时, 扩增效果最好, 此浓度下, 扩增条带数最多而且条带清晰;  $Mg^{2+}$  浓度为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 3.5 和 4.0  $mmol \cdot L^{-1}$  时, 扩增条带数较镁离子浓度为 2.5  $mmol \cdot L^{-1}$  时少或扩增条带不清晰, 其中, 浓度为 0.5, 1.0, 1.5 和 2.0  $mmol \cdot L^{-1}$  时只能扩增出少数几条带且不清晰, 浓度为 3.0, 3.5 和 4.0  $mmol \cdot L^{-1}$  时扩增的条带清晰但条带数少, 所以镁离子的最适浓度为 2.5  $mmol \cdot L^{-1}$ 。

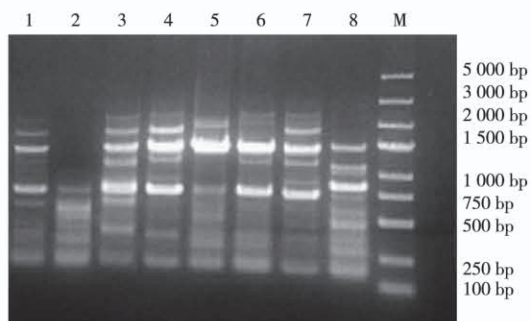


泳道 1~8:  $Mg^{2+}$  浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 和 4.0  $mmol \cdot L^{-1}$ ; M: Marker 5000

图 2 不同  $Mg^{2+}$  浓度的扩增反应结果

## 2.3 不同引物浓度的反应结果

引物浓度分别设为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 和 0.8  $\mu mol \cdot L^{-1}$ 。由图 3 可知, 引物浓度为 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.6, 0.7 和 0.8  $\mu mol \cdot L^{-1}$  时条带数较少或条带模糊, 引物浓度在 0.4  $\mu mol \cdot L^{-1}$  时扩增效果最好, 其中, 浓度为 0.2  $\mu mol \cdot L^{-1}$  条带数最少且模糊, 所以, 引物最适浓度为 0.4  $\mu mol \cdot L^{-1}$ 。

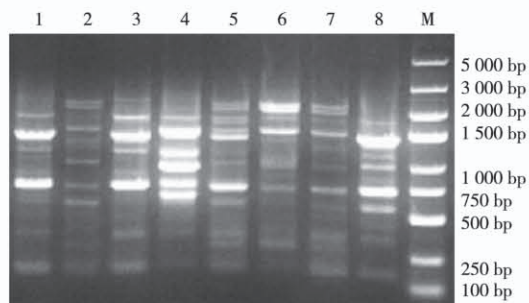


泳道 1~8: 引物浓度分别为 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7 和 0.8  $\mu mol \cdot L^{-1}$ ; M: Marker 5000

图 3 不同引物浓度的扩增反应结果

## 2.4 不同 dNTPs 浓度的反应结果

dNTPs 的浓度分别设为 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 和 0.40  $mmol \cdot L^{-1}$ 。由图 4 可知, dNTPs 浓度为 0.1 和 0.35  $mmol \cdot L^{-1}$  时所有条带模糊; 浓度为 0.05, 0.15, 0.25, 0.30 和 0.40  $mmol \cdot L^{-1}$  时条带数少但条带清晰; 浓度为 0.20  $mmol \cdot L^{-1}$  时扩增效果最好, 此浓度下, 条带多而且清晰, 因此, dNTPs 的最适浓度为 0.20  $mmol \cdot L^{-1}$ 。

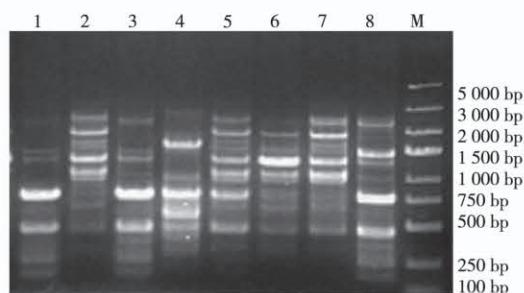


泳道 1~8: dNTPs 浓度分别为 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 和 0.40  $mmol \cdot L^{-1}$ ; M: Marker 5000

图 4 不同 dNTPs 浓度的扩增反应结果

## 2.5 不同 *Taq* 酶浓度的反应结果

*Taq* 酶的浓度分别设为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 和 4.0  $U \cdot \mu L^{-1}$ 。由图 5 可知, 浓度在 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 3.5 和 4.0  $U \cdot \mu L^{-1}$  时, 条带数较少, 浓度在 2.5  $U \cdot \mu L^{-1}$  时, 条带多而清晰, 所以, *Taq* 酶最终浓度定为 2.5  $U \cdot \mu L^{-1}$ 。



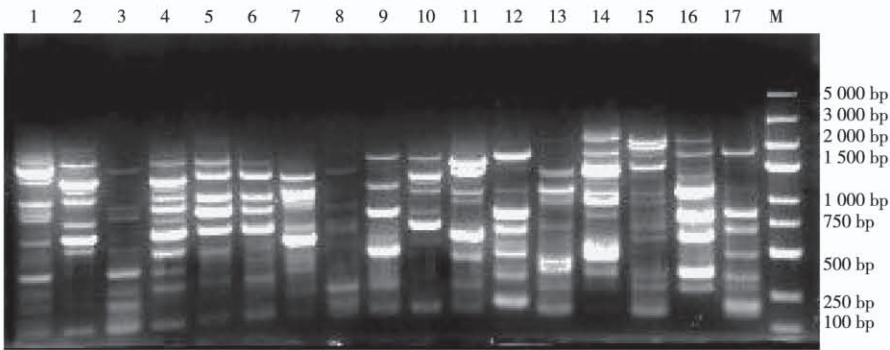
泳道 1~8: *Taq* 酶浓度分别为 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5 和 4.0  $U \cdot \mu L^{-1}$ ; M: Marker 5000

图 5 不同 *Taq* 酶浓度的扩增反应结果

## 2.6 引物筛选

对 13 条引物进行筛选, 引物 808 扩增效果较好, 引物 808 扩增出 14 条带, 13 条为多态性条带, 多态性比例为 92.90% (表 3)。图 6 为 808 对随机挑选的 17 株玉米鞘腐病菌层出镰孢菌株的

扩增结果,由图 6 可知,引物 808 对大多数供试菌株 株扩增效果较好,条带清晰可见而且条带数较多。



泳道 1~17:17 株供试菌株的扩增结果;M:Marker 5000

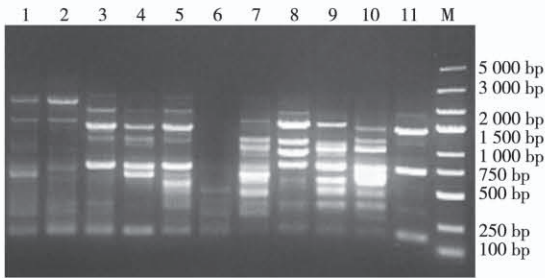
图 6 引物 808 的扩增反应结果

表 3 用于玉米鞘腐病层出镰孢遗传多样性分析的 ISSR 引物

引物 编号	5'-3' 序列	退火温 度/℃	扩增 条带	多态性 条带	多态性 比例/%
808	(AG) <sub>8</sub> C	50	14	13	92.90

2.7 退火温度确定

以 808 为例,设定 11 个退火温度梯度:50.0, 51.0,52.0,53.0,54.0,55.0,56.0,57.0,58.0, 59.0 和 60.0℃。引物 808 的退火温度在 50.0, 51.0,52.0,53.0,54.0 和 55.0℃时条带较少,退火温度在 57,59 和 60℃时扩增条带少但清晰,在 58.0℃时扩增效果最好,扩增条带明显增多而且清晰,因此,最适退火温度为 58.0℃(图 7)。



泳道 1~11:退火温度分别为 50.0,51.0,52.0,53.0,54.0, 55.0,56.0,57.0,58.0,59.0 和 60.0℃

图 7 不同退火温度的扩增结果

3 结论与讨论

ISSR-PCR 是基于 PCR 反应的技术,受诸多因素的影响。因此,必须对反应体系进行优化,本文通过优化,最终确定了玉米鞘腐病菌的最适 ISSR-PCR 反应体系各因子浓度分别为:模板 DNA 浓度 40 ng·μL<sup>-1</sup>,Mg<sup>2+</sup> 浓度 2.5 mmol·L<sup>-1</sup>,

引物浓度 0.4 μmol·L<sup>-1</sup>,Taq 酶浓度为 2.5 U·μL<sup>-1</sup>、dNTPs 浓度 0.2 mmol·L<sup>-1</sup>。筛选出扩增条带清晰、多态性好的引物 808,最适退火温度为 58℃,引物 808 对供试菌株扩增的多态性条带比率为 92.90%。

玉米鞘腐病菌 ISSR-PCR 反应体系优化是研究其遗传多样性的基础,目前,已有多种关于植物病原真菌 ISSR 类群与菌株地理来源关系的研究报道。Neeraja 等<sup>[18]</sup>报道,印度红花枯萎病菌(*Fusarium oxysporum* f. sp.)的 ISSR 类群划分与菌株的地理来源具有相关性。Santillan 等<sup>[19]</sup>研究表明,墨西哥镰刀菌种群的遗传变异性是由寄主来源而非地理区域构成的。Dinolfo 等<sup>[20]</sup>指出,梨孢镰孢的 ISSR 类群与其地理来源无明显相关性。本课题组下一步将对玉米鞘腐病菌菌株的 ISSR 类群划分与其地理来源是否相关、菌株遗传相似性与其地理来源是否存在相关进行深入研究,研究可为玉米鞘腐病的防治及抗病育种提供基础。

参考文献:

[1] 胡兰,徐秀德,姜钰,等.玉米鞘腐病原菌生物学特性研究[J].玉米科学,2008,16(5):131-134.  
[2] 董金皋.农业植物病理学[M].北京:中国农业出版社,2001(2):183-185.  
[3] 白金铠.杂粮作物病害[M].北京:中国农业出版社,1997(11):98-104.  
[4] 徐秀德,姜钰,王丽娟,等.玉米新病害-鞘腐病研究初报[J].中国农业科学,2008,4(10):3083-3087.  
[5] Visentin I,Tamietti G,Valentino D,et al. The ITS region as a taxonomic discriminator between *Fusarium verticillioides* and *Fusarium proliferatum* [J]. Mycological Research,



- 2009,113(10): 1137-1145.
- [6] Yli M T, Hussien T, Gavrilova O, et al. Morphological and molecular variation between *Fusarium avenaceum*, *Fusarium arthrosporioides* and *Fusarium anguoides* strains[J]. Pathogens(Basel, Switzerland), 2018, 7(4): 94.
- [7] Pritesh B, Purvi R, Vrinda T. Molecular marker development from ISSR for fungal pathogens of *Mangifera indica* L. [J]. Indian Phytopathology, 2020, 73(2): 257-265.
- [8] Andrea V T, Mario E F, Rocio M, et al. Assessment of the genetic diversity of Argentinean isolates of *Beauveria bassiana* (Ascomycota: Hypocreales) using ISSR markers[J]. Journal of King Saud University-science, 2019, 31(4): 1264-1270.
- [9] Zhang B J, Zhang J R, Guo M X, et al. PCR-RFLP analysis of rDNA ITS of *Fusarium*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2007, 15(6): 545-546.
- [10] Longya A, Talumphai S, Jantaturiyarat C. Morphological characterization and genetic diversity of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*, from Thailand using ISSR and SRAP markers[J]. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 2020, 6(1): 38.
- [11] Duan H J, Zhang C Y, Li X H, et al. Assessment of genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. niveum by RAPD, ISSR and AFLP analysis [J]. Mycosystema, 2008, 27(2): 267-276.
- [12] Bayraktar H, Dolar F S, Maden S. Use of RAPD and ISSR markers in detection of genetic variation and population structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris isolates on chickpea in Turkey[J]. Journal of Phytopathology, 2008, 156(3): 146-154.
- [13] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [14] Nirmaladevi D, Venkataramana M, Srivastava R K, et al. Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici[J]. Scientific Reports, 2016, 2: 1-14.
- [15] Thangavelu R, Kumar K M, Devi P G, et al. Genetic diversity of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense isolates (Foc) of India by inter simple sequence repeats (ISSR) analysis [J]. Molecular Biotechnology, 2012, 51(3): 203-11.
- [16] 张述义, 李新风, 韦晓艳, 等. 33 株尖孢镰孢菌遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 生态学杂志, 2013, 32(5): 1195-1202.
- [17] Bayraktar H, Dolar F S, Maden S. Use of RAPD and ISSR markers in detection of genetic variation and population structure among *Fusarium oxysporum* f. sp. ciceris isolates on chickpea in Turkey [J]. Journal of Phytopathology, 2008, 156: 146-154.
- [18] Neeraja S, Garima A, Rupam K. Virulence and genetic diversity among *Fusarium oxysporum* f. sp. carthami isolates of India using multilocus RAPD and ISSR markers [J]. Tropical Plant Pathology, 2019, 44 (5): 409-422.
- [19] Santillan M R, Pineda V D, Fernandez P S, et al. Genetic diversity of *Fusarium mexicanum*, causal agent of mango and big leaf mahogany malformation in Mexico [J]. Molecular Biology Reports, 2019, 46(4): 3887-3897.
- [20] Dinolfo M I, Sebastian S A, Moreno M V. ISSR markers detect high genetic variation among *Fusarium poae* isolates from Argentina and England [J]. Europe Journal of Plant Pathology, 2010, 127: 483-491.

## Optimization of ISSR-PCR Reaction System of *Fusarium proliferatum*

LI Peng-peng, YOU Yang, LIU Ke, LIU Ji-yi

(College of Landscape and Ecological Engineering, Hebei Engineering University, Handan 056021, China)

**Abstract:** The major pathogen of corn sheaths rot is *Fusarium proliferatum*. In order to clarify the optional response system of ISSR-PCR of *F. proliferatum*, DNA was used as a template to screen the concentration range of each factor, and orthogonal test was used to optimize 5 factors to determine the best response system. The primers with clear amplified bands and good polymorphism were selected from 13 primers and selected optional annealing temperature. The results showed that ISSR-PCR optional reaction system: template  $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ , magnesium concentration  $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , primer concentration  $0.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dNTPs concentration  $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Taq* enzyme concentration  $2.5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , the optional primer was 808 and optional annealing temperature was  $58^\circ\text{C}$ , a total of 14 bands were amplified with the screening out of primers 808. And polymorphic bands were 13 among them. The percentage of polymorphic bands was 92.9%.

**Keywords:** corn sheath rot; ISSR-PCR; reaction system