

基于全基因组开发小麦矮腥黑粉菌特异性分子标记

高瑞芳^{1*}, 赵鹏², 汤怡静¹, 刘宵宵¹, 徐欣宇¹, 郑铭森¹

1 深圳海关动植物检验检疫技术中心, 广东 深圳 518045

2 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

摘要: 由小麦矮腥黑粉菌 *Tilletia controversa* (TCK)引起的小麦矮腥黑穗病是一种危害大、防控难、影响特别大的危险性真菌病害, 被称为“小麦一号病”, EPPO、澳大利亚、中国等国家/地区和组织将其列为检疫性病害。小麦矮腥黑粉菌与小麦光腥黑粉菌等近似种在形态学、分子生物学上的区分鉴定较困难, 在检疫检查中容易造成误诊。本研究在全基因组水平上开发 TCK 的特异性分子标记, 筛选到 4 个候选差异基因, 即 *OG0008430*、*OG0008601*、*OG0008603*、*OG0008610*, 针对这 4 个基因分别设计了引物和探针, 经过组合验证, 建立了两组“三重+单重”实时荧光 PCR 方法, 可以有效区分目标种(TCK)和近似种, 实现小麦腥黑粉菌的准确鉴定, 也可区分腥黑粉菌属的不同种。

关键词: 小麦矮腥黑粉菌; 多重实时荧光 PCR; 分子标记; 全基因组; 检测方法

[引用本文]

高瑞芳, 赵鹏, 汤怡静, 刘宵宵, 徐欣宇, 郑铭森, 2026. 基于全基因组开发小麦矮腥黑粉菌特异性分子标记. 菌物学报, 45(2): 250175

Gao RF, Zhao P, Tang YJ, Liu XX, Xu XY, Zheng MS, 2026. Screening of molecular markers specific for *Tilletia controversa* based on the whole genome sequence. Mycosystema, 45(2): 250175

资助项目: 海关总署科研项目(2023HK001); 西藏自治区科技计划项目重点研发计划项目(XZ202201ZY0011N)

This work was supported by the Scientific Research Projects of the General Administration of Customs (2023HK001) and the Key Research and Development Projects of the Xizang Autonomous Region Science and Technology Plan (XZ202201ZY0011N).

*Corresponding author. E-mail: gaoruifang606@sina.com

Received: 2025-06-10; Accepted: 2025-07-31

Screening of molecular markers specific for *Tilletia controversa* based on the whole genome sequence

GAO Ruifang^{1*}, ZHAO Peng², TANG Yijing¹, LIU Xiaoxiao¹, XU Xinyu¹, ZHENG Mingsen¹

1 Animal and Plant Inspection and Quarantine Technology Center of Shenzhen Customs District of P. R. China, Shenzhen 518045, Guangdong, China

2 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Wheat dwarf smut, caused by *Tilletia controversa* (TCK), is a dangerous fungal wheat disease that is highly destructive and difficult to eradication, possessing a significant impact. The disease is known as “No. 1 disease of wheat”, and is listed as a quarantine pest by European Plant Protection Organisation (EPPO), Australia, China and other countries/regions and organizations. Due to difficulties for distinguishing TCK from other closely related species such as *Tilletia laevis* in levels of morphological characteristics and molecular biology, misdiagnosis easily happen in quarantine inspections. In this study, TCK-specific molecular markers were developed at the genomic level, and four candidate genes, namely *OG0008430*, *OG0008601*, *OG0008603* and *OG0008610*, were screened. Eight pairs of primers and four probes based on these four candidate genes were designed. Validation of combinations among the primers and probes were verified, and two sets of “triple + single” real-time fluorescence PCR methods were established. This combined method can effectively distinguish target species (TCK) from closely related species, achieving accurate identification of TCK, and it can also be used to distinguish different species within the genus *Tilletia*.

Keywords: *Tilletia controversa*; multiple real-time fluorescence PCR; molecular marker; genome; detection method

小麦 *Triticum aestivum* L. 是世界上最重要的主食作物之一。小麦矮腥黑穗病是小麦的一种经济毁灭性疾病，通过种子和土壤传播的疾病，经常危害冬季长期积雪地区的冬小麦 (Muhae-Ud-Din *et al.* 2020a)。积雪较多促进小麦矮腥黑粉菌生长。土壤冻结前的长期寒冷、稳定湿润条件，适合冬孢子萌发和侵染。冬孢子具有很强的抗逆性，在有利的环境条件下，病原菌可以存活长达 10 年 (Helback 1959; Trione 1982; Goates & Peterson 1999)。此病害会导致小麦产量减少，在严重发生条件下，损失可能达到 70%–80%，甚至完全绝收 (Parlak 1981)。释放三甲胺产生腐烂鱼腥味，也导致面粉质量下降 (Parlak 1981; Chen *et al.* 2016)。该病害是小麦上危害大、防控难、影响特别大的一种危险性真菌病害，被称为“小麦一号病” (Mathre 1996)。该病害首次于 1847

年在捷克被发现，目前在欧洲、美洲、亚洲和非洲等 31 个国家均有分布 (Gassner & Niemann 1954; Dewey 1975; Trione 1982; Grey 1986)。该病害大流行可使小麦减产 75% 以上，甚至绝产 (Trione 1982; Trione *et al.* 1989)。其致病菌小麦矮腥黑粉菌 *Tilletia controversa* J.G. Kühn 寄主多达 80 余种，其繁殖体冬孢子可在土壤中存活长达 10 年以上，传播途径多样、抗逆性强，一旦传入则难以根除，欧洲地中海植物保护组织 (EPPO) 及泛非植物保护委员会 (IAPPC)、澳大利亚、土耳其、捷克等区域性植物保护组织及国家均将其列入检疫性病害名录。我国于 1966 年将该病菌列为对外检疫性病菌 (农业部与商务部联合发布《进口植物检疫对象名单》)，之后多次修订名录，仍将该病菌保留在检疫性有害生物名录至今。

检疫性有害生物的准确鉴定是植物检疫的技术基础,直接影响植物检疫链条。进口小麦中常有雀麦、黑麦草、早熟禾等其他禾本科杂草种子,这些杂草种子是小麦矮腥黑粉菌近似种的寄主,如小麦光腥黑粉菌 *T. laevis*、雀麦腥黑粉菌 *T. bromi*、禾草腥黑粉菌 *T. fusca* var. *bromi-tectorum*,而小麦矮腥黑粉菌与这些同属不同种的形态特征相似,在检疫过程中容易造成误判(Wilcoxson & Saari 1996; Carris *et al.* 2006)。为了寻找准确、快速、简便的检测方法,几十年来,国内外学者对 *T. controversa* 及其近似种的比较形态学、自发荧光显微学、萌发生物学、血清学、生化技术等方面进行了大量研究。基于分子生物学技术的研究最多,以此建立了实时荧光 PCR、数字 PCR、MALDI-TOF MS 等(Pimentel *et al.* 2000; Gao *et al.* 2010; Liu *et al.* 2020; Muhae-Ud-Din *et al.* 2020b; Chen *et al.* 2021),但是,这些方法在特异性、适用性等方面都相对有限。有些方法不能准确区分 *T. controversa* 和其他种(Josefsen & Christiansen 2002; Kochanová *et al.* 2004; Mulholland & Mcewan 2010; Zouhar *et al.* 2010; Pieczul *et al.* 2018);有些方法仅针对有限数量的样本有效(Liu *et al.* 2009)。由于常用于系统发育分析的基因组区域缺乏多态性(Mulholland & Mcewan 2010; Jayawardena *et al.* 2019),因此,必须探索其他 DNA 区域以开发特异性分析。现有的国标《植物检疫-小麦矮腥黑穗病菌检疫鉴定方法》(GB/T 18085-2000)在应用时存在依靠检测人员的经验、耗时长、常规分子鉴定区分能力有限等不足,然而,植物检疫需要建立准确、快速的检测方法,形成相应检测鉴定的标准。因此,需要建立精准、快速、高灵敏性的检测鉴定方法。本研究通过比较全基因组分析筛选同源基因,设计引物验证同源基因的特异性,建立多基因联合筛选,以有效区分该病菌与其近似种。建立多重实时荧光 PCR 方法,适用于口岸检测,提高小麦检疫通关效率,防止小麦矮腥黑粉菌随小麦原粮贸易和种质资源交流而扩散传播到其他地区的风险,保障我国小麦生产和贸易安全,为解决贸易争端提供检疫检测技

术手段。

1 材料与方法

1.1 供试材料

进行比较全基因组分析的 *Tilletia* 属全基因组数据共 31 份,3 份为自测全基因组,28 份来自 GenBank 组装注释的全基因组,其中 *T. controversa* 共有 7 份全基因组数据(表 1)。3 份自测全基因组为 2 个 *T. controversa* (编号为 TCK-79 和 TCK-XJ),1 个 *T. laevis* (编号 TFO-XJ)。

1.2 基因片段筛选分析

使用 OrthoFinder (version 2.5.4)的序列相似性,对供试病菌的蛋白序列进行同源序列聚类,初步筛选出 *T. controversa* 特有的蛋白序列,依次确定其对应的核酸序列,使用 MUSCLE (v3.8.31)进行核酸序列的多序列比对,筛选出一致性 100%的核酸序列片段。

1.3 序列片段验证

将筛选的序列片段比对到 GenBank 数据库中,根据提交的全基因组信息筛选出核酸序列的编码序列(coding domain sequence, CDS),通过 NCBI 在线 BLASTX 比对到 NR 数据库, CDS 片段序列及其蛋白序列分别比对到转录组数据分析获得的基因序列上。

1.4 基因引物探针设计

对筛选出的核酸序列补充其全基因组中上下游各 100 bp,使用 Oligo 7 (MDL Information Systems)、Primer 6 (PREMIER Biosoft)、NCBI 提供的在线工具 Primer-BLAST (整合了 Primer 3 和 Blast 工具的功能)对片段进行引物设计。

1.5 基因特异性验证

1.5.1 PCR 扩增

对供试样本进行 PCR 扩增,验证目标基因的分度度,用于特异性验证的菌种材料见表 2,制备 DNA 用于验证模板。PCR 扩增体系为 50 μ L,其中 *Taq* Mix 25.0 μ L、引物(10 pmol/ μ L) 2.0 μ L、DNA 模板(100 ng/ μ L) 1.0 μ L,补充 ddH₂O 至 50 μ L。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s,退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s; 72 $^{\circ}$ C 8 min。引物特征、退火温度、循环数见表 3。

表 1 用于全基因组分析的 *Tilletia* 菌株信息Table 1 Information of isolates of *Tilletia* species used for whole genomic analysis

序号	中文名	拉丁名	菌系	全基因组数据来源
Serial number	Chinese name	Scientific name	Isolate code	Source of genome data
1	小麦矮腥黑粉菌	<i>T. controversa</i>	TCK-79	自测(This study)
2	小麦矮腥黑粉菌	<i>T. controversa</i>	TCK-XJ	自测(This study)
3	小麦光腥黑粉菌	<i>T. foetida</i>	TFO-XJ	自测(This study)
4	小麦矮腥黑粉菌	<i>T. controversa</i>	OR	GenBank (GCA_905071765.1)
5	小麦光腥黑粉菌	<i>T. laevis</i>	ATCC 42080	GenBank (GCA_009428275.1)
6	小麦光腥黑粉菌	<i>T. laevis</i>	DAOMC 238040	GenBank (GCA_009428285.1)
7	小麦光腥黑粉菌	<i>T. laevis</i>	L-19	GenBank (GCA_905071715.1)
8	小麦光腥黑粉菌	<i>T. laevis</i>	LLFL	GenBank (GCA_905071755.1)
9	黑麦草腥黑粉菌	<i>T. walkeri</i>	DAOMC 238049	GenBank (GCA_009428295.1)
10	黑麦草腥黑粉菌	<i>T. walkeri</i>	DAOMC 236422	GenBank (GCA_001645055.2)
11	印度腥黑粉菌	<i>T. indica</i>	DAOMC 236408	GenBank (GCA_009428345.1)
12	印度腥黑粉菌	<i>T. indica</i>	DAOMC 236416	GenBank (GCA_001645015.2)
13	印度腥黑粉菌	<i>T. indica</i>	DAOMC 236414	GenBank (GCA_009428365.1)
14	小麦网腥黑粉菌	<i>T. caries</i>	DAOMC 238032	GenBank (GCA_001645005.2)
15	小麦网腥黑粉菌	<i>T. caries</i>	AI	GenBank (GCA_905068135.1)
16	小麦网腥黑粉菌	<i>T. caries</i>	AA11	GenBank (GCA_905072865.1)
17	小麦网腥黑粉菌	<i>T. caries</i>	AZH3	GenBank (GCA_905071745.1)
18	小麦网腥黑粉菌	<i>T. caries</i>	AO	GenBank (GCA_905071735.1)
19	小麦矮腥黑粉菌	<i>T. controversa</i>	DAOMC 236426	GenBank (GCA_001645045.2)
20	小麦矮腥黑粉菌	<i>T. controversa</i>	DAOMC 238052	GenBank (GCA_009428265.1)
21	小麦矮腥黑粉菌	<i>T. controversa</i>	OA2	GenBank (GCA_905071725.1)
22	小麦矮腥黑粉菌	<i>T. controversa</i>	OL14	GenBank (GCA_905071785.1)
23	小麦矮腥黑粉菌	<i>T. controversa</i>	OW	GenBank (GCA_905071705.1)
24	小麦矮腥黑粉菌	<i>T. controversa</i>	OV	GenBank (GCA_905071775.1)
25	稻粒腥黑粉菌	<i>T. horrida</i>	TX6	GenBank (GCA_030462715.1)
26	稻粒腥黑粉菌	<i>T. horrida</i>	TX7	GenBank (GCA_030504495.1)
27	稻粒腥黑粉菌	<i>T. horrida</i>	TX5	GenBank (GCA_030462695.1)
28	稻粒腥黑粉菌	<i>T. horrida</i>	TX3	GenBank (GCA_030462655.1)
29	稻粒腥黑粉菌	<i>T. horrida</i>	TX1	GenBank (GCA_030462675.1)
30	稻粒腥黑粉菌	<i>T. horrida</i>	TX2	GenBank (GCA_030462665.1)
31	稻粒腥黑粉菌	<i>T. horrida</i>	TX4	GenBank (GCA_030462685.1)

1.5.2 Sanger 测序

扩增产物送美格基因进行测序,验证扩增产物是否为目标基因。使用软件 MEGA 7 (Mega Limited)进行比对排序。

1.5.3 全基因组测序比对

对供试菌系 *T. controversa* TCK-XJ、*T. foetida* TFO-XJ 和 *T. secalis* CBS122087 进行全基因组测序,构建文库后采用 Illumina 平台进行 PE150 测序(美格基因),与 *T. controversa* 全基因组比对相似性。

1.6 多重实时荧光 PCR 体系优化

针对 PCR 扩增引物,设计相应荧光探针进

行测试,开发多重荧光 PCR 检验体系,进行组合优化。明确检测目标数量为四重 PCR 或“三重+单重”PCR。使用 Bioer 9600 荧光定量 PCR 仪(FQD-96A,博日科技),根据仪器支持的荧光通道,匹配出所有可行的组合方案。删除光谱重叠组合及本身发荧光的基因组合,根据 Ct 值,结合普通 PCR 扩增结果为参照,判断样本有效扩增性。单探针对照验证单独运行各探针,检查基因是否有效扩增。混合模板测试验证用阳性 TCK 模板验证多通道同时检测的准确性,是否与普通 PCR 结果一致。

表 2 用于小麦矮腥黑粉菌特异性验证的 *Tilletia* 属菌株材料
Table 2 *Tilletia* species materials used for *T. controversa* specificity validation

序号 Serial Number	编号 Isolate	拉丁名 Scientific name	中文名 Chinese name
1	ATCC42079	<i>Tilletia controversa</i>	小麦矮腥黑粉菌
2	TCK-XJ	<i>T. controversa</i>	小麦矮腥黑粉菌
3	CBS121955	<i>T. walkeri</i>	黑麦草腥黑粉菌
4	CBS121956-1	<i>T. walkeri</i>	黑麦草腥黑粉菌
5	CBS121956-2	<i>T. walkeri</i>	黑麦草腥黑粉菌
6	5114	<i>T. indica</i>	印度腥黑粉菌
7	ATCC42080	<i>T. foetida</i>	小麦光腥黑粉菌
8	CBS121950	<i>T. laevis</i>	小麦光腥黑粉菌
9	CBS32432	<i>T. laevis</i>	小麦光腥黑粉菌
10	CBS324.32	<i>T. laevis</i>	小麦光腥黑粉菌
11	CBS121949	<i>T. laevis</i>	小麦光腥黑粉菌
12	TFO-XJ	<i>T. laevis</i>	小麦光腥黑粉菌
13	CBS122992	<i>T. fusca</i> var. <i>fusca</i>	禾草腥黑粉菌
14	ATCC90926	<i>T. fusca</i> var. <i>fusca</i>	禾草腥黑粉菌
15	CBS121948	<i>T. brevifaciens</i>	/
16	CBS122991	<i>T. goloskokovii</i>	/
17	CBS122995	<i>T. goloskokovii</i>	/
18	CBS123001-1	<i>T. bromi</i>	雀麦腥黑粉菌
19	CBS123001-2	<i>T. bromi</i>	雀麦腥黑粉菌
20	CBS119.19-1	<i>T. tritici</i>	小麦网腥黑粉菌
21	CBS119.19-2	<i>T. tritici</i>	小麦网腥黑粉菌
22	CBS121954	<i>T. vankyi</i>	/
23	CBS372.36	<i>T. caries</i>	小麦网腥黑粉菌
24	CBS366.36	<i>T. caries</i>	小麦网腥黑粉菌
25	CBS371.36	<i>T. caries</i>	小麦网腥黑粉菌
26	CBS121951	<i>T. caries</i>	小麦网腥黑粉菌
27	CBS373.36	<i>T. caries</i>	小麦网腥黑粉菌
28	CBS370.36	<i>T. caries</i>	小麦网腥黑粉菌
29	CBS160.85	<i>T. caries</i>	小麦网腥黑粉菌
30	CBS372.36	<i>T. caries</i>	小麦网腥黑粉菌
31	CBS368.36	<i>T. caries</i>	小麦网腥黑粉菌
32	CBS374.36	<i>T. caries</i>	小麦网腥黑粉菌
33	CBS369.36	<i>T. caries</i>	小麦网腥黑粉菌
34	CBS375.31	<i>T. caries</i>	小麦网腥黑粉菌
35	ATCC90927	<i>T. fusca</i> var. <i>bromitectorum</i>	禾草腥黑粉菌
36	CBS277.28	<i>T. horrida</i>	稻粒腥黑粉菌
37	CBS122087	<i>T. secalis</i>	黑麦草腥黑粉菌

2 结果与分析

2.1 比较全基因组分析筛选同源基因片段

检索 *T. controversa* 全基因组信息共 7 条, 其数据编号信息如下: GCA_001645045、GCA_009428265、GCA_905071705、GCA_905071725、GCA_905071765、GCA_905071775、GCA_

905071785, 其中 GCA_905071765 为目标菌 TCK 的参考基因组(Ref)。使用 OrthoFinder 软件聚类共获得 12 587 个基因簇, 其中在目标菌中存在基因拷贝, 同时, 在同属的其他种中不存在拷贝的基因簇共 15 条(表 4)。根据核酸序列比对结果, 去除序列差异较大的基因簇, 保留在 7 条全基因组中至少 5 条全基因组中序列完全一致的基因

表 3 引物特征和 PCR 反应条件

Table 3 Primer characteristics and PCR reaction conditions

基因 Gene	引物 Primer	引物长度 Length of primer/bp	T _m /°C	GC/%	片段长度 Length of fragment/bp	退火温度 Annealing temperature/°C	循环数 Number of cycles
<i>OG0008430</i>	primer-8430-1F	19	56.3	57.9	121	52	32
	primer-8430-1R	19	56	57.9			
	primer-8430-2F	19	56.4	57.9	264	54	33
	primer-8430-2R	20	56.1	55			
<i>OG0008601</i>	primer-8601-1F	22	55.9	50	262	54	35
	primer-8601-1R	20	56.1	55			
	primer-8601-2F	20	55.8	60	127	54	35
	primer-8601-2R	20	56.1	55			
<i>OG0008603</i>	primer-8603-1F	21	55.9	57.1	265	54	36
	primer-8603-1R	20	55.7	55			
	primer-8603-2F	21	56.5	52.4	266	54	36
	primer-8603-2R	19	55.9	57.9			
<i>OG0008610</i>	primer-8610-1F	19	56.1	57.9	180	52	35
	primer-8610-1R	21	56.2	57.1			
	primer-8610-2F	19	55.6	52.6	177	54	35
	primer-8610-2R	20	55.9	55			

表 4 初步筛选获得的同源基因

Table 4 Homologous genes preliminarily screened

同源基因 Orthogroup	GCA_001645045	GCA_009428265	GCA_905071705	GCA_905071725	GCA_905071765	GCA_905071775	GCA_905071785
<i>OG0007373</i>	1	1	4	1	3	2	2
<i>OG0008089</i>	2	2	1	2	1	1	1
<i>OG0008411</i>	1	1	1	1	2	1	1
<i>OG0008418</i>	1	1	1	1	1	2	1
<i>OG0008429</i>	1	1	1	1	2	1	1
<i>OG0008430</i>	1	1	1	1	2	1	1
<i>OG0008581</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>OG0008593</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>OG0008596</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>OG0008601</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>OG0008602</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>OG0008603</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>OG0008608</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>OG0008610</i>	1	1	1	1	1	1	1
<i>OG0008612</i>	1	1	1	1	1	1	1

片段,共筛选到 8 个同源序列片段。核酸序列中的 CDS 片段在线比对到 NR 数据库的结果显示,除目标菌的蛋白序列能够有较好比对结果外,其他种部分也有比对结果,为了保证特异性,避免扩增假阳性,需去除此类序列,最终保留的序列片段作为候选的特异性片段,共有 4 条,分别为 *OG0008430*、*OG0008601*、*OG0008603*、*OG0008610*。对 37 个 *Tilletia* 属的种进行 PCR 扩增和 Sanger 测序验证,结果显示其中 4 个全基因组组合可对 *Tilletia* 属的种进行区分鉴定(表 5)。针对 *T. controversa*,需要对这 4 个基因进行同时扩增,才可与近似种区分。因此,针对此 4 个候

选基因设计引物探针,建立检测方法。

2.2 候选基因引物探针设计

针对 *OG0008430*、*OG0008601*、*OG0008603*、*OG0008610* 这 4 个基因及保留的上下游碱基,采用默认条件进行引物设计,获取引物信息,4 个基因共设计了 8 对引物(表 6)。结合普通 PCR 结果,设计荧光探针,优化建立的实时荧光 PCR 反应体系为 20 μL,其中 2×qPCR Mix 10.0 μL、引物(10 pmol/μL) 0.4 μL、荧光探针 0.2 μL、DNA 模板(100 ng/μL) 4.0 μL,补充 ddH₂O 至 20 μL。反应条件为 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 58 °C 20 s, 72 °C 30 s,共 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C

表 5 筛选的基因扩增后对 *Tilletia* 属的种水平区分鉴定效率Table 5 The identification efficiency of species of the genus *Tilletia* based on amplification with screened genes

样本编号 Sample	拉丁名 Scientific name	筛选的基因 Genes screened			
		OG0008430	OG0008601	OG0008603	OG0008610
TCK-79	<i>Tilletia contorversa</i>	√	√	√	√
TCK-XJ	<i>T. contorversa</i>	√	√	√	√
CBS121956	<i>T. walkeri</i>	-	-	-	√
CBS121956	<i>T. walkeri</i>	-	-	-	-
CBS121955	<i>T. walkeri</i>	-	-	-	-
CBS32432	<i>T. laevis</i>	-	√	-	-
CBS324.32	<i>T. laevis</i>	-	-	-	-
CBS121949	<i>T. laevis</i>	-	-	-	√
TFO-XJ	<i>T. laevis</i>	-	-	-	-
TFe-XJ	<i>T. laevis</i>	-	-	-	√
CBS366.36	<i>T. caries</i>	√	-	-	√
CBS371.36	<i>T. caries</i>	-	-	-	-
CBS121951	<i>T. caries</i>	-	-	-	-
CBS373.36	<i>T. caries</i>	-	-	-	√
CBS370.36	<i>T. caries</i>	-	-	-	√
CBS160.85	<i>T. caries</i>	-	-	-	√
CBS372.36	<i>T. caries</i>	-	-	-	-
CBS368.36	<i>T. caries</i>	-	-	-	-
CBS374.36	<i>T. caries</i>	-	-	-	-
CBS369.36	<i>T. caries</i>	-	-	-	√
CBS385.36	<i>T. caries</i>	-	-	-	-
CBS122995	<i>T. goloskokovii</i>	√	-	√	√
CBS122991	<i>T. goloskokovii</i>	-	-	√	√
ATCC90927	<i>T. bromitectorum</i>	-	-	√	√
CBS277.28	<i>T. horrida</i>	√	-	√	-
CBS121954	<i>T. vankyi</i>	-	-	-	-
CBS122087	<i>T. secalis</i>	√	-	√	√
ATCC42080	<i>T. foetida</i>	√	-	√	√
ATCC90926	<i>T. fusca</i>	√	-	√	√
CBS121948	<i>T. brevifaciens</i>	√	-	-	√
CBS123001	<i>T. bromi</i>	-	-	-	-
CBS119.19	<i>T. tritici</i>	-	-	-	-

注: -表示没有扩增结果, √表示有扩增结果

Note: - indicates no amplification result, and √ indicates an amplification result.

1 min, 72 °C 15 s, 梯度温度 0.5 °C, 梯度恒温时间 20 s。

2.3 多重实时荧光 PCR 方法的建立

为了提高检测方法的效率,建立多重实时荧光 PCR, 反应体系及扩增程序见表 7。在多重 qPCR 中针对不同靶标菌的检测, 选用不同光谱波长范围的荧光基团。虽然, 许多荧光光谱相似的荧光基团的最大发射波长不同, 但是, 在其附

近的波段内, 仍然会相互重叠。因此, 需要排除掉可能存在的发射光谱之间相互干扰的荧光基团组合, 选取部分样本对其余多组探针组合进行测试, 最终获得一组组合方式, 能够将多对引物探针同时进行扩增, 并且扩增结果与普通 PCR 结果一致。经过多次组合检测测试, 形成“三重+单重”的实时荧光 PCR 方式, 可有效区分目标种和其他种, 组合方式共有 2 种(表 7,

表 6 对候选基因片段设计的引物探针序列信息

Table 6 Information of primer and probe sequences of candidate gene fragments

基因编号	引物名称	引物序列	探针	探针序列
Gene code	Primer	Primer sequence (5'→3')	Probe	Probe sequence
OG0008430	primer-8430-1F	TGATGACGCTCCAGCCAGA	primer-8430-1PF	5'-FAM-TCTTCGACCACT
	primer-8430-1R	GCCATGACGACGGACGAAT		GGAGAGTCA-3'-MGB
	primer-8430-2F	GCCGTCGCTGTTGTCTTGA	primer-8430-2PR	5'-JOE-CCACCGACGACC
OG0008601	primer-8430-2R	AGCCTTGC GGAAGTCATACG		TGACGCTCT-3'-BHQ1
	primer-8601-1F	CCTGTGAATGAACTTGGCTGAC	primer-8601-1PF	5'-HEX-CTCCGAACACGA
	primer-8601-1R	GTTGGCGTAGATGGCACTCA		CCCTCAACG-3'-MGB
OG0008603	primer-8601-2F	GTTCACTCCGACCGAGAAGG	primer-8601-2PF	5'-JOE-AGTCTTGGTCGGT
	primer-8601-2R	GTTGGCGTAGATGGCACTCA		CAGGGCAT-3'-BHQ1
	primer-8603-1F	CTACCACCACACCACCTTTC	primer-8603-1PF	5'-FAM-ACTCAAGGCAAG
OG0008610	primer-8603-1R	GTCCGCTTGGTCGTAGTTGA		GTTGGGACA-3'-BHQ1
	primer-8603-2F	TACCACCACACCACCTCTTCA	primer-8603-2PF	5'-JOE-AGGTTGGGACAA
	primer-8603-2R	AGGTCCGCTTGGTCGTAGT		AGCTATCGG-3'-BHQ1
OG0008610	primer-8610-1F	AGGCGGTAAGTGCGTTGTC	primer-8610-1PR	5'-ROX-ATGATGTAGCGT
	primer-8610-1R	AGACTTGAGGACGAGGAGGAG		TGCTCCAGG-3'-BHQ2
	primer-8610-2F	AAGGCGGTAAGTGCGTTGT	primer-8610-2PR	5'-CY-5-TGTAGCGTTGCT
	primer-8610-2R	TTGAGGACGAGGAGGAGCAT		CCAGGGTGT-3'-BHQ2

表 7 多重 qPCR 组合及其检测结果(组合一)

Table 7 Combination and results of multiple qPCR (Combination 1)

组合	引物名称	探针	供试菌	检测	Ct 值	检测	Ct 值	检测	Ct 值
Combination	Primer	Probe	Species	Test	Ct	Test	Ct	Test	Ct
				(8601-2)	value	(8603-1)	value	(8610-1)	value
三重	primer-8601-2F	primer-8601-2PF	<i>Tilletia walkeri</i>	-	33.39	-	34.23	-	29.12
Triple	primer-8601-2R		<i>T. goloskokovii</i>	√	28.61	√	29.11	√	27.92
(OG0008601,	primer-8603-1F	primer-8603-1PF	<i>T. bromitectorum</i>	-	34.13	√	32.19	√	28.59
OG0008603,	primer-8603-1R		<i>T. secalis</i>	√	32.28	√	32.59	√	28.66
OG0008610)	primer-8610-1F	primer-8610-1PR	<i>T. caries</i>	-	35.06	-	35.33	-	29.29
	primer-8610-1R		<i>T. caries</i>	-	34.7	-	-	-	28.9
			<i>T. contorversa</i>	√	30.76	√	31.52	√	28.28
			CK	-	-	-	-	-	-
单重	primer-8430-2F	primer-8430-2PR	<i>T. secalis</i>	-	-				
Single	primer-8430-2R		<i>T. goloskokovii</i>	-	-				
(OG0008430)			<i>T. foetida</i>	√	33.53				
			<i>T. caries</i>	-	-				
			<i>T. fusca</i>	√	33				
			<i>T. caries</i>	-	-				
			<i>T. contorversa</i>	√	34.69				
			-	-	-				

注: TCK-XJ 为阳性对照, CK 为阴性对照; 阴性对照无 Ct 值时, 样本有 Ct 值即判定为有效扩增; 阴性对照有 Ct 值时, 样本 Ct 值<阴性 0.5 以上即判定为有效扩增; -表示没有扩增结果、√表示有扩增结果; 下同

Note: TCK-XJ serves as the positive control, while CK serves as the negative control. When the negative control has no Ct value, the sample is considered to have effective amplification if it has a Ct value; when the negative control has a Ct value, the sample is considered to have effective amplification if its Ct value is less than 0.5 of the negative control. “-” Indicates no amplification result, while √ indicates an amplification result. The same below.

表 8), 一种为“三重(OG0008601、OG0008603、OG0008610)+单重(OG0008430)”, 另一种为“三重(OG0008430、OG0008603、OG0008610)+单重(OG0008601)”。

2.4 特异性验证

所有样本有 Ct 值即判定为有效扩增。TCK-XJ 为阳性对照, CK 为阴性对照, 当阴性对照无 Ct 值, 样本有 Ct 值即判定为有效扩增(图 1,

图 2)。试验结果表明, 探针 primer-8601-2PF、primer-8603-1PF、primer-8610-1PR 三重 qPCR 组合, 以及 primer-8430-1PF、primer-8603-1PF、primer-8610-2PR 三重 qPCR 组合可以有效进行扩增, 扩增结果与普通 PCR 扩增结果一致, 满足 *Tilletia* 属大部分种的区分鉴定。对于这两种多重 qPCR 无法有效区分的 *Tilletia* 属的种, 针对探针 primer-8430-2PR、primer-8601-1PF 进行单独 PCR 扩增。针对 8 条探针的两组“三重 qPCR+单重 qPCR”组合, 可将 *Tilletia* 属的全部供试种

进行有效区分。两组“三重+单重”扩增结果需同时满足 4 个目的片段均为阳性, 则可对 *T. controversa* 和近似种进行区分。

2.5 准确性验证

通过扩增后测序进行序列比对来验证扩增结果的准确性和建立结果的可靠性。4 个基因片段对 *Tilletia* 属内各个种可以实现准确的鉴定和区分, 各基因对相应种的 BLAST 比对结果(表 9)表明在全基因组水平筛选的基因可以实现准确的种水平上的鉴定。

表 8 多重 qPCR 组合及其检测结果(组合二)

Table 8 Combination and results of multiple qPCR (Combination 2)

	引物名称 Primer	探针 Probe	供试菌 Species	检测 Test (8430-1)	Ct 值 Ct value	检测 Test (8603-1)	Ct 值 Ct value	检测 Test (8610-2)	Ct 值 Ct value
三重 Triple (OG0008430, OG0008603, OG0008610)	primer-8430-1F primer-8430-1R primer-8603-1F primer-8603-1R primer-8610-2F primer-8610-2R	primer-8430-1PF primer-8603-1PF primer-8610-2PR	<i>Tilletia caries</i> <i>T. bromitectorum</i> <i>T. foetida</i> <i>T. caries</i> <i>T. caries</i> <i>T. caries</i> <i>T. caries</i> <i>T. controversa</i> CK	√ - √ - - - - √ -	26.29 - 27.61 26.94 27.96 27.5 27.5 26.83 -	- √ √ - - - - √ -	- 28.13 28.29 - - - - 27.97 -	√ √ √ - √ √ √ √ -	24.42 27.5 27.84 29.02 27.47 28.37 27.92 -
单重 Single (OG0008601)	primer-8601-1F primer-8601-1R	primer-8601-1PF	<i>T. laevis</i> <i>T. caries</i> <i>T. secalis</i> <i>T. foetida</i> <i>T. fusca</i> <i>T. caries</i> <i>T. controversa</i> -	√ - √ - - - √ -	33.5 - 32.66 35.78 36.15 35.55 29.97 -	- - - - - - - -	- - - - - - - -	- - - - - - - -	

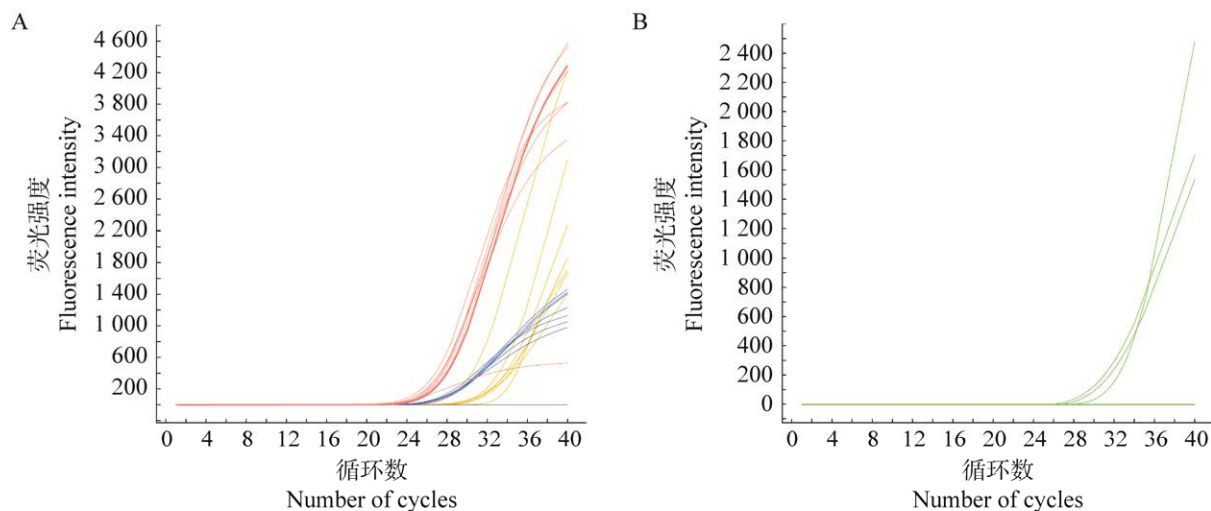


图 1 多重实时荧光 PCR 扩增曲线(组合一) A: 三重(OG0008601、OG0008603、OG0008610); B: 单重(OG0008430)
Fig. 1 Multiple real-time fluorescence PCR amplification curve (Combination 1). A: Triple (OG0008601, OG0008603, OG0008610); B: Single (OG0008430).

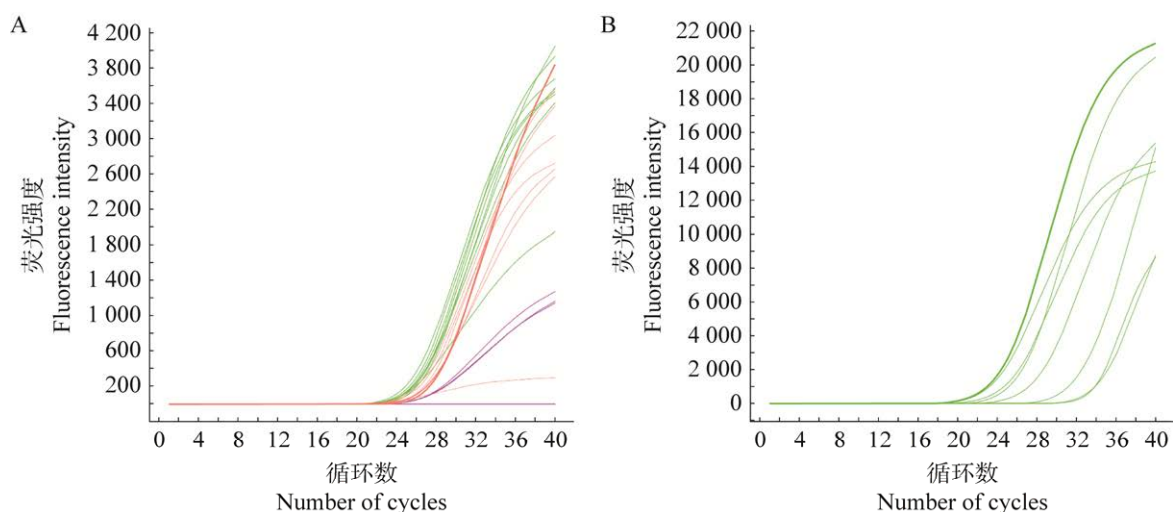


图 2 多重实时荧光 PCR 扩增曲线(组合二) A: 三重(OG0008430、OG0008603、OG0008610); B: 单重(OG0008601)
 Fig. 2 Multiple real-time fluorescence PCR amplification curve (Combination 2). A: Triple (OG0008430, OG0008603, OG0008610); B: Single (OG0008601).

表 9 筛选的 4 对引物对 *Tilletia* 属的种的扩增序列验证准确性

Table 9 Validation of four pairs of primers for *Tilletia* species based on amplification

样本名称 Sample	基因代码 Gene code	比对结果 Blast results						
		Max score	Total score	Query cover	E value	Per. Ident.	Acc. Len.	Accession
<i>Tilletia controversa</i>	OG0008601	309	309	16%	1E-88	100	167	Query_321797
<i>T. indica</i>	OG0008430	/	/	/	/	/	/	/
<i>T. foetida</i>	OG0008430	68	68	10%	5E-17	95.24	45	Query_6580459
<i>T. vankyi</i>	OG0008430	80.5	80.5	10%	1E-20	100	50	Query_309859
<i>T. walkeri</i>	OG0008601	/	/	/	/	/	/	/
<i>T. bromi</i>	OG0008601	311	311	16%	3E-89	99.42	171	Query_512181
<i>T. goloskokovii</i>	OG0008603	322	322	34%	8E-93	98.37	188	Query_5118639
<i>T. laevis</i>	OG0008610	/	/	/	/	/	/	/
<i>T. tritici</i>	OG0008610	/	/	/	/	/	/	/

3 讨论

小麦矮腥黑粉菌对我国影响的风险评估研究认为,在新疆维吾尔自治区北部、西藏、四川、河南、山东和淮河流域等主要的冬小麦种植区具有非常高的风险(陈克等 2002; 周益林等 2007)。因此,对小麦矮腥黑粉菌的检疫一直以来都是国际粮食贸易谈判的焦点,也是国际大小麦粮食贸易会谈和双边植物检疫协定关注的重要内容。*T. controversa* 的准确鉴定直接关系到对疫区划定、议定书条款签订、检疫政策制定、指定口岸能力考核、实验室检疫、除害处理效果评价、后续监管等。*T. controversa* 鉴定方法最早于 1961 年 3 月获准试行,1963 年冬,又获准在

上海、天津、广州、青岛等口岸扩大试行。1973 年在北美小麦中首次检出后,经历了近 30 年的实践摸索,检疫鉴定方法不断完善,于 2000 年发布并实施国家标准 GB/T 18085-2000 《植物检疫 小麦矮化腥黑穗病菌检疫鉴定方法》。然而,自 2000 年开始使用该标准,针对未发现菌瘿只看到零星冬孢子等情形如何鉴定,未给出规定,在口岸检疫中寻找菌瘿却需要大量的人力物力。标准中还缺少分子生物学检测方法,而采用传统的形态学、荧光特性、萌发特性等鉴定方法耗时长,影响货物快速通关,这种低效率的检测手段对企业利益、码头安全都是很大的挑战。

关于 *T. controversa* 精准快速鉴定方法的制

定是粮食检疫现实所需,但一直以来都是难点。利用常规基因对 *T. controversa* 及近似种区分,但区分的近似种数量有限,特异性和准确度有待提高。近年来,有研究从全基因组水平筛选基因片段用于区分鉴定近似种,取得了一些进展 (Sharifnabi *et al.* 2018; Liu *et al.* 2020; Chen *et al.* 2021; Forster *et al.* 2022)。Nguyen *et al.* (2019) 分析了 *T. controversa* 等 5 个 *Tilletia* 属的种的 10 个菌系的全基因组,设计了不同种的特异性引物探针,但对小麦或者没有菌瘿时的单个孢子的鉴定效力未作讨论。Sedaghatjoo *et al.* (2021) 比较了该属 6 个种的 21 个菌系的全基因组,以识别出在所有 *T. controversa* 分离物中特异且保守的 DNA 区域,开发了环介导等温扩增技术 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 检测方法,但是,对 *T. trabutii* 产生假阳性信号,特异性为 97.7%。Sedaghatjoo *et al.* (2022) 对 *T. controversa* 和 *T. cares*、*T. laevis* 的全基因组分析认为 3 个物种的全基因组非常相似,使用 241 个单拷贝基因可以进行区分。本研究基于前人对 *T. controversa* 在基因组水平筛选特异标记基因的经验,在全基因组水平通过比较全基因组的方法,利用同源基因进化分析得出 *OG0008430*、*OG0008601*、*OG0008603*、*OG0008610* 这 4 个基因可以有效区分 *T. controversa* 及其他近似种,验证了 4 个基因联合使用对 *T. controversa* 鉴定的特异性和准确性,弥补了利用常规方法通过一个基因对 *T. controversa* 鉴定在准确性上的不足。

4 结论

本研究在全基因组水平通过比较全基因组的方法,利用同源基因进化分析得出 *OG0008430* 等 4 个基因可以有效区分小麦矮腥黑粉菌及其他近似种,设计了 8 对引物探针并建立了两组“三重+单重”组合实时荧光 PCR 检测方法,该方法耗时短、可精准快速地对 *Tilletia* 属的种进行有效区分,可直接应用于进口小麦的原粮检疫。进一步,可针对未发现菌瘿的单个冬孢子或者少量冬孢子开展鉴定效力的测试验证,从理论上可明显提高检测效率和有效性。

作者贡献

高瑞芳: 论文构思及撰写; 赵鹏: 分子生物学分析; 汤怡静: 样品整理及试验; 刘宵宵: 引物探针的筛选和优化; 徐欣宇: 试验、表格制作、图片绘制; 郑铭森: 数据处理。

利益冲突声明

该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Carris LM, Castlebury LA, Goates BJ, 2006. Nonsystemic bunt fungi – *Tilletia indica* and *T. horrida*: a review of history, systematics, and biology. *Annual Review of Phytopathology*, 44(1): 113-133
- Chen D, Muhae-Ud-Din G, Liu T, Chen W, Liu C, Gao L, 2021. Wheat varietal response to *Tilletia controversa* JG Kühn using qRT-PCR and laser confocal microscopy. *Genes*, 12(425): 1-14
- Chen J, Guttieri MJ, Zhang J, Hole D, Souza E, Goates B, 2016. A novel QTL associated with dwarf bunt resistance in Idaho 444 winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(12): 2313-2322
- Chen K, Yao WG, Zhang Z, Xiao YY, Yan J, Xu Y, Bai ZH, Chen XF, Bao LM, 2002. Establishment risk analysis and divisions of TCK in China. *Acta Phytopathologica Sinica*, 32(4): 312-318 (in Chinese)
- Dewey WG, 1975. Susceptibility of barley to *Tilletia controversa*. *Phytopathology*, 65: 654-657
- Forster MK, Sedaghatjoo S, Maier W, Killermann B, Niessen L, 2022. Discrimination of *Tilletia controversa* from the *T. caries/T. laevis* complex by MALDI-TOF MS analysis of teliospores. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 106(3): 1257-1278
- Gao L, Chen WQ, Liu TG, 2010. Development of a SCAR marker by inter-simple sequence repeat for diagnosis of dwarf bunt of wheat and detection of *Tilletia controversa* Kühn. *Folia Microbiologica*, 55: 258-264
- Gassner G, Niemann E, 1954. Untersuchungen über die Temperatur- und Lichtabhängigkeit der Sporenkeimung verschiedener *Tilletia*-Arten. *Phytopathologische Zeitschrift*, 21: 109-124
- Goates BJ, Peterson GL, 1999. Relationship between soilborne and seedborne inoculum density and the incidence of dwarf bunt of wheat. *Plant Disease*, 83(9): 819-824
- Grey WE, 1986. Importance of seedborne *Tilletia controversa* for infection of winter wheat and its relationship to

- international commerce. *Plant Disease*, 70(70): 122-125
- Helback H, 1959. Domestication of food plants in the Old World: joint efforts by botanists and archeologists illuminate the obscure history of plant domestication. *Science*, 130(3372): 365-372
- Jayawardena RS, Hyde KD, Jeewon R, Ghobad-Nejhad M, Kang JC, 2019. One stop shop II: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera. *Fungal Diversity*, 94(1): 41-129
- Josefsen L, Christiansen SK, 2002. PCR as a tool for the early detection and diagnosis of common bunt in wheat, caused by *Tilletia tritici*. *Mycological Research*, 106(11): 1287-1292
- Kochanová M, Zouhar M, Prokinová E, Ryšánek P, 2004. Detection of *Tilletia controversa* and *Tilletia caries* in wheat by PCR method. *Plant Soil & Environment*, 50(2): 75-77
- Liu J, Li C, Muhae-Ud-Din G, Liu T, Gao L, 2020. Development of the droplet digital PCR to detect the teliospores of *Tilletia controversa* Kühn in the soil with greatly enhanced sensitivity. *Frontiers in Microbiology*, 11(4): 1-9
- Liu JH, Gao L, Liu TG, Chen WQ, 2009. Development of a sequence-characterized amplified region marker for diagnosis of dwarf bunt of wheat and detection of *Tilletia controversa* Kühn. *Letters in Applied Microbiology*, 49(2): 235-240
- Mathre DE, 1996. DWARF BUNT: politics, identification, and biology. *Annual Review of Phytopathology*, 34(1): 67-85
- Muhae-Ud-Din G, Chen D, Liu T, Chen W, Gao L, 2020a. Characterization of the wheat cultivars against *Tilletia controversa* Kühn, causal agent of wheat dwarf bunt. *Scientific Reports*, 10(1): 9029
- Muhae-Ud-Din G, Chen D, Liu T, Chen W, Gao L, 2020b. Methyljasmonate and salicylic acid contribute to the control of *Tilletia controversa* Kühn, causal agent of wheat dwarf bunt. *Scientific Reports*, 10(1): 19175
- Mulholland V, Mcewan M, 2010. PCR-based diagnostics of *Microdochium nivale* and *Tilletia tritici* infecting winter wheat seeds. *EPP0 Bulletin*, 30(3-4): 543-547
- Nguyen HDT, Sultana T, Kesanakurti P, Hambleton S, 2019. Genome sequencing and comparison of five *Tilletia* species to identify candidate genes for the detection of regulated species infecting wheat. *IMA Fungus*, 10(1): 1-17
- Parlak Y, 1981. Seed-borne pathogens on wheat (particularly smuts) in Turkey1. *EPP0 Bulletin*, 11(2): 83-86
- Pieczul K, Perek A, Kubiak K, 2018. Detection of *Tilletia caries*, *Tilletia laevis* and *Tilletia controversa* wheat grain contamination using loop-mediated isothermal DNA amplification (LAMP). *Journal of Microbiological Methods*, 154: 141-146
- Pimentel G, Peever TL, Carris LM, 2000. Genetic variation among natural populations of *Tilletia controversa* and *T. bromi*. *Phytopathology*, 90(4): 376-383
- Sedaghatjoo S, Forster MK, Niessen L, Karlovsky P, Maier W, 2021. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Tilletia controversa* based on genome comparison. *Scientific Reports*, 11(1): 11611
- Sedaghatjoo S, Mishra B, Forster MK, Becker Y, Keilwagen J, Killermann B, Thines M, Karlovsky P, Maier W, 2022. Comparative genomics reveals low levels of inter- and intraspecies diversity in the causal agents of dwarf and common bunt of wheat and hint at conspecificity of *Tilletia caries* and *T. laevis*. *IMA Fungus*, 13(1): 1-23
- Sharifnabi B, Ghaderi F, Haghghi F, 2018. Molecular identification of *Tilletia controversa* and *T. caries*, the causal agent of wheat dwarf and common bunt. *Mycologia Iranica*, 5(2): 63-70
- Trione EJ, 1982. Dwarf bunt of wheat and its importance in international wheat trade. *Plant Disease*, 66(1): 1083-1088
- Trione EJ, Hess WM, Stockwell VO, 1989. Growth and sporulation of the dikaryons of the dwarf bunt fungus in wheat plants and in culture. *Canadian Journal of Botany*, 67(6): 1671-1680
- Wilcoxson RD, Saari EE, 1996. Bunt and smut diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico. 1-66
- Zhou YL, Duan XY, Jia WM, Chen WQ, Qiu Z, 2007. Advances in risk analyses of introduction and establishment of wheat dwarf bunt in China. *Plant Protection*, 33(2): 6-10 (in Chinese)
- Zouhar M, Mazáková J, Prokinová E, Váňová M, Ryšánek P, 2010. Quantification of *Tilletia caries* and *Tilletia controversa* mycelium in wheat apical meristem by real-time PCR. *Plant Protection Science*, 46(3): 107-115

[附中文参考文献]

- 陈克, 姚文国, 章正, 肖悦岩, 严进, 徐岩, 白章红, 陈小帆, 包黎明, 2002. 小麦矮腥黑穗病在中国定殖风险分析及区划研究. *植物病理学报*, 32(4): 312-318
- 周益林, 段霞瑜, 贾文明, 陈万权, 邱焯, 2007. 小麦矮腥黑穗病(TCK)传入中国及其定殖的风险分析研究进展. *植物保护*, 33(2): 6-10