



龙嘉惠,薛龙海,李春杰,朱永群.垂穗披碱草近壳多胞叶斑病快速检测技术的建立与应用[J].中国农业大学学报,2026,31(03):89-96.
LONG Jiahui, XUE Longhai, LI Chunjie, ZHU Yongqun. Establishment and application of molecular detection for *Parastagonospora nodorum*-induced leaf spot disease in *Elymus nutans*[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2026, 31(03):89-96.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2026.03.08

垂穗披碱草近壳多胞叶斑病快速检测技术的建立与应用

龙嘉惠^{1,2} 薛龙海^{1,2*} 李春杰² 朱永群¹

(1. 四川省农业科学院 农业资源与环境研究所, 成都 610066;

2. 兰州大学 草地农业科技学院/草种创新与草地农业生态系统全国重点实验室, 兰州 730020)

摘要 为建立一种由颖枯近壳多胞病菌(*Parastagonospora nodorum*)引发垂穗披碱草(*Elymus nutans*)叶斑病的快速检测体系,利用病原菌的*RPB2*(RNA polymerase II subunit 2)保守序列设计了具有高度特异性的引物Pr-F/Pr-R,建立了一种高效、快速、稳定的PCR检测垂穗披碱草近壳多胞叶斑病的分子检测技术。结果表明:1)检测体系可以特异地从颖枯近壳多胞菌中扩增出一条127 bp的条带,Pr-F/Pr-R对颖枯近壳多胞菌基因组DNA的检测灵敏度为100 pg/ μ L。2)引物Pr-F/Pr-R可对发病垂穗披碱草叶片组织中颖枯近壳多胞病菌进行特异性检测,还可用于对田间疑似带病垂穗披碱草植株的快速检测。本研究结果为垂穗披碱草叶斑病的早期发现和针对性防治提供了技术支持。

关键词 垂穗披碱草;颖枯近壳多胞菌;叶斑病;分子检测

中图分类号 S543.9

文章编号 1007-4333(2026)03-0089-08

文献标志码 A

Establishment and application of molecular detection for *Parastagonospora nodorum*-induced leaf spot disease in *Elymus nutans*

LONG Jiahui^{1,2}, XUE Longhai^{1,2*}, LI Chunjie², ZHU Yongqun¹

(1. Institute of Agricultural Resources and Environment, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Chengdu 610066, China;

2. College of Pastoral Agriculture Science and Technology/State Key Laboratory of Herbage Improvement and Grassland Agro-ecosystems, Lanzhou University, Lanzhou 730020, China)

Abstract To establish a rapid detection system for leaf spot disease of *Elymus nutans* caused by *Parastagonospora nodorum*, highly specific primers Pr-F/Pr-R targeting the conserved *RPB2* (RNA polymerase II subunit 2) gene sequence of the pathogen was designed. An efficient, rapid, and stable PCR molecular detection technique was developed to identify *Parastagonospora* leaf spot in *E. nutans*. The results indicated: 1) The detection system specifically amplified a 127 bp band from *P. nodorum*, and the sensitivity of Pr-F/Pr-R for detecting genomic DNA of *P. nodorum* was 100 pg/ μ L. 2) The Pr-F/Pr-R primers can specifically detect *P. nodorum* in infected *E. nutans* leaf tissues, as well as in suspected diseased field-collected *E. nutans* plants. These results provide a technical basis for the early detection and targeted control of leaf spot disease in *E. nutans*.

Keywords *Elymus nutans*; *Parastagonospora nodorum*; leaf spot disease; molecular detection

收稿日期: 2025-07-23;接受日期: 2025-12-16

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFD1401101);“双一流”建设经费-队伍建设经费-科研启动经费项目(561120201);国家农业产业技术体系项目(CARS-34)

第一作者: 龙嘉惠(ORCID:0009-0002-9396-1654),硕士研究生,E-mail:longjh2023@lzu.edu.cn

通讯作者: 薛龙海(ORCID:0000-0002-1158-2152),青年研究员,主要从事草类植物病理学和草地生态学等研究,E-mail:xuelonghai55@126.com

垂穗披碱草(*Elymus nutans*)植物作为青藏高原高寒草地的主要草种和优势牧草,在我国高寒地区广泛分布,具有重要的生态利用和经济开发价值^[1]。然而,病害是限制披碱草品质和产量的重要因素之一^[2],由近壳多胞菌属(*Parastagonospora* sp.)引起的禾本科叶斑病普遍发生^[3-6],其中包括颖枯近壳多胞菌(*Parastagonospora nodorum*)。颖枯近壳多胞菌对垂穗披碱草有较强的致病性^[5],该病原菌在全球主要小麦产区(如中国、美国和北欧等)广泛分布^[7-8],还可侵染多种谷物及野生禾草^[9-10]。它作为一种死体营养型病原真菌,通过产生坏死性效应子(NES)和相关酶来诱导寄主叶片组织形成叶斑病斑^[6,11]。寄主组织坏死后,病原菌仍可长期存活,使病原体持续增殖,造成病害循环^[12]。因此,如何及时有效、快速准确地对感染近壳多胞叶斑病的垂穗披碱草进行诊断和鉴定,对牧草叶斑病的防治至关重要。目前还未有颖枯近壳多胞菌分子检测等方面的研究。

传统鉴定依赖病原分离培养、形态学观察及多基因(如*ITS/SSU/TEF*)联合分析等方法鉴定出颖枯近壳多胞菌^[9,13],过程耗时费力且难以满足快速检测的需求。近年来迅速发展的分子技术显著提升了鉴定效率,PCR技术是植物病原体分子诊断的基础,包括常规PCR、多重PCR(Multiplex PCR)、巢式PCR(Nested PCR)、实时荧光定量qPCR(Quantitative real-time PCR)等技术^[14],可根据试验需求选择不同类型的PCR技术。如采用多重PCR技术以*tub2*基因作为靶区,建立一种可以定量检测小麦4种真菌病原体的方法,可以同时扩增不同大小的PCR产物,检测多个基因或病原体^[15]。而巢式PCR主要用于鉴定病症不明显或隐症病害,需要2套引物和2轮PCR对靶向DNA进行扩增,具有较高的灵敏度和特异性,但过程较为繁琐,耗时耗材,并且分2次进行扩增,期间容易产生污染,造成假阳性^[16]。随着分子生物学发展,牧草病害的诊断和鉴定方法从传统耗时费力的形态学鉴定方法发展到快速分子诊断水平。其中,内转录间隔区(*ITS*)序列、*RPB2*序列(DNA-directed RNA polymerase II subunit 2)、 β -微管蛋白基因(β -*tubulin*, *tub2*)等被广泛应用于病原菌的分子鉴定中。研究表明,在同一植物个体中*ITS*的变异程度高,可能影响分子鉴定的准确性^[17]。本研

究前期在进行披碱草叶斑病病原鉴定时发现,颖枯近壳多胞菌与同样危害披碱草^[18]的亚隔孢壳属(*Didymella*)、细小球壳属(*Leptosphaerulina* sp.)、新壳二孢属(*Neoascochyta* sp.)的*ITS*序列相似性较高,较难通过*ITS*序列将其区分开,因此有必要选择其他的基因片段进行该病菌的检测。在真菌系统学研究中,*RPB2*基因片段常用于分子鉴定和系统发育分析。因*RPB2*覆盖度高、扩增结果更稳定且在个体内的变异程度较低的特点,使其在对近壳多胞菌属的鉴定检测中更具优势^[17,19]。有学者利用病原菌(如小麦矮腥黑粉菌^[20]和长枝木霉^[21])的*RPB2*基因片段设计特异性引物,通过PCR检测方法建立快速检测体系,可提高病原菌检测的准确性。此外,谢晓梅^[22]利用子囊菌类盘菌属*RPB2*序列设计了特异性引物,并进行了引物特异性验证、适用性和灵敏度分析,检出浓度低至1 fg/ μ L,建立了一种准确、快速和低成本的毒蘑菇物种检测方法。目前有关披碱草叶斑病病原菌的分子快速鉴定方法的研究较少,且利用*RPB2*建立颖枯近壳多胞菌检测方法的研究并不多见。

本研究在颖枯近壳多胞菌新的分类进展基础上,拟以垂穗披碱草叶斑病作为研究对象,采用*RPB2*序列对比分析方法,通过寻找新的分子靶标*RPB2*特殊序列实现对颖枯近壳多胞菌的特异性检测,最终建立准确和快速的分子检测技术,为垂穗披碱草叶斑病的早期鉴定和针对性防治提供技术支持;同时,基于*RPB2*序列建立的检测体系为发掘其他病原菌检测新靶标提供新思路。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株见表1。所有菌株均为本课题组从甘肃、青海、四川、贵州和云南等天然草地和人工草地中分离鉴定所得,目前保存于草地微生物菌种保藏库(Grassland microbiome culture collection, GMCC)。其中包含7种在披碱草上分离鉴定所得的亚隔孢壳科病原菌^[23],14种在天然草原植物上分离出的常见病原菌。

1.2 病原菌DNA及发病垂穗披碱草组织DNA提取

供试菌株在PDA平板上生长4~7 d后,小心刮取病原菌菌丝,采用E. Z. N. A.® Fungal DNA Mini

表 1 特异性引物 Pr-F/Pr-R 对供试菌株的验证

Table 1 Validation of specific primers Pr-F/Pr-R for test strains

编号 Number	供试菌株 Test strain	病原寄主 Pathogen host	引物扩增结果 Primer amplification results
1	ddH ₂ O	—	—
2	亚隔孢壳属 <i>Didymella boeremae</i>	垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>	—
3	亚隔孢壳属 <i>Didymella pomorum</i>	老芒麦 <i>Elymus sibiricus</i>	—
4	异壳二孢属 <i>Neosascochyta cylindrispora</i>	垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>	—
5	异壳二孢属 <i>Neosascochyta europaea</i>	老芒麦 <i>Elymus sibiricus</i>	—
6	异壳二孢属 <i>Neosascochyta desmazieri</i>	垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>	—
7	小光壳属 <i>Leptosphaerulina miscanthi</i>	垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>	—
8	颖枯近壳多胞菌 <i>Parastagonospora nodorum</i>	垂穗披碱草 <i>Elymus nutans</i>	+
9	壳多胞属 <i>Stagonospora bicolor</i>	发草 <i>Deschampsia caespitosa</i>	—
10	炭疽菌属 <i>Colletotrichum boninense</i>	蒲公英 <i>Taraxacum mongolicum</i>	—
11	炭疽菌属 <i>Colletotrichum cereale</i>	溲草 <i>Koeleria macrantha</i>	—
12	燕麦镰刀菌 <i>Fusarium avenaceum</i>	花苜蓿 <i>Medicago ruthenica</i>	—
13	三线镰刀菌 <i>Fusarium tricinctum</i>	赖草 <i>Leymus secalinus</i>	—
14	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis trachycarpicola</i>	多花黑麦草 <i>Lolium multiflorum</i>	—
15	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis telopeae</i>	多花黑麦草 <i>Lolium multiflorum</i>	—
16	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis lushanensis</i>	多花黑麦草 <i>Lolium multiflorum</i>	—
17	拟盘多毛孢属 <i>Pestalotiopsis australasiae</i>	多花黑麦草 <i>Lolium multiflorum</i>	—
18	根腐离蠕孢菌 <i>Bipolaris sorokiniana</i>	多花黑麦草 <i>Lolium multiflorum</i>	—
19	双孔孢属 <i>Bipolaris zeae</i>	狗尾草 <i>Setaria viridis</i>	—
20	交链格孢属 <i>Alternaria alternata</i>	披碱草 <i>Elymus dahuricus</i>	—
21	癭囊腔菌 <i>Plectosphaerella cucumerina</i>	披碱草 <i>Elymus dahuricus</i>	—
22	粉红粘帚霉 <i>Gliocladium roseum</i>	紫羊茅 <i>Festuca rubra</i>	—
23	黑附球菌 <i>Epicoccum nigrum</i>	剪股颖 <i>Agrostis matsumurae</i>	—

注：“+”代表有特异性条带，“—”代表无特异性条带。
Note: “+” represents a specific band, “—” represents a non-specific band.

Kit(OMEGA 真菌基因组 DNA 提取试剂盒)进行病原菌 DNA 的提取。提取完成后测定其浓度与纯度,放置-20℃保存备用。

收集由颖枯近壳多胞菌引起的垂穗披碱草叶斑病发病组织,消毒叶片表面后置于液氮预冷的研钵中;研磨成粉状后,采用 E. Z. N. A.® Plant DNA Kit (OMEGA 植物组织基因组 DNA 提取试剂盒)提取植物发病组织的 DNA。用同样的方法提取健康垂穗披碱草植株组织 DNA 作为健康对照组,以接种亚隔孢

壳属、异壳二孢属、小光壳属 (*Leptosphaerulina miscanthi*)、拟盘多毛孢属 (*Pestalotiopsis* sp.)、壳多胞属 (*Stagonospora bicolor*)、根腐离蠕孢菌 (*Bipolaris sorokiniana*)、交链格孢属 (*Alternaria alternata*) 和癭囊腔菌 (*Plectosphaerella cucumerina*) 引起的垂穗披碱草叶斑病作为负对照组。

1.3 颖枯近壳多胞菌特异性引物设计及 PCR 扩增

根据 GenBank 中登录的颖枯近壳多胞病菌一段 RPB2 基因保守序列 (RPB2:PQ675422),使用软件

SnapGene 设计颖枯近壳多胞菌的特异性引物,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。Pr-F: 5'-CAATTCGCATTGGGGTCTTGT TTG-3', Pr-R: 5'-GAAGTCGATGATTGGAGTAGCG-3'。

PCR 反应体系总体积为 25 μ L: 12.5 μ L 2 $\times$ High Fidelity PCR Master Mix, 引物 Pr-F/Pr-R (10 μ mol/L)各 1 μ L, 1 μ L 模板 DNA, 加入 ddH₂O 补足到 25 μ L。将反应体系混匀后置于普通 PCR 仪中进行扩增反应,反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。将扩增产物于 1.0% 琼脂凝胶中电泳,进行引物特异性验证,在凝胶成像仪中检测拍照。

1.4 PCR 扩增灵敏度检测

将颖枯近壳多胞菌 DNA 浓度从 100 ng/ μ L 依次稀释到 50 ng/ μ L、25 ng/ μ L、10 ng/ μ L、1 ng/ μ L、500 pg/ μ L、100 pg/ μ L、50 pg/ μ L 和 1 pg/ μ L,共 9 个稀释度。依照方法“1.3”所述的反应体系与程序,将

DNA 原液及稀释液作为模板进行 PCR 反应,检测颖枯近壳多胞菌 PCR 反应的灵敏度,试验重复 3 次。

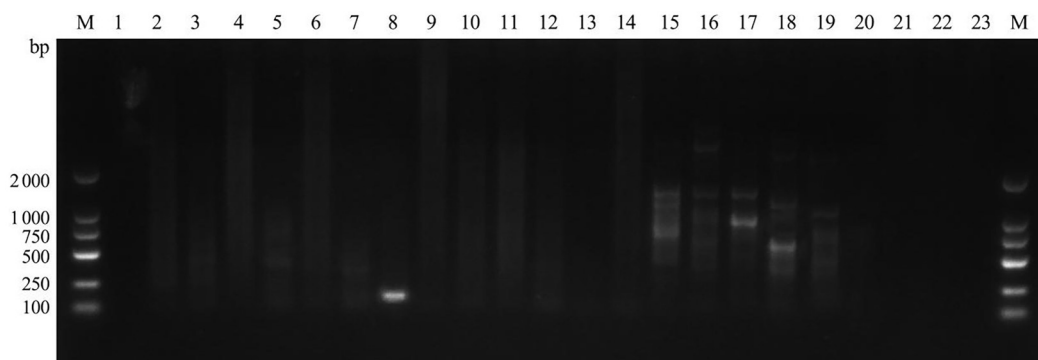
1.5 发病植株组织的快速检测

以接种颖枯近壳多胞菌的发病垂穗披碱草叶片、接种表 1 中常见病原菌的发病叶片和健康叶片组织中提取的基因组 DNA 为模板进行常规 PCR 反应,反应体系和程序如 1.3 所述。最终产物经 1.0% 琼脂凝胶电泳后成像检测,试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 特异性验证检测

特异性验证结果表明(图 1),本研究建立的颖枯近壳多胞菌 PCR 检测方法具有高度特异性,只有颖枯近壳多胞菌 DNA 模板的反应中出现片段大小为 127 bp 的特异性条带,而其他 21 种病菌及 ddH₂O 均无扩增条带。表明该引物是颖枯近壳多胞菌特异性引物,可用于颖枯近壳多胞菌的分子鉴定及分子检测。



M: DL2 000 DNA Marker; 1: ddH₂O; 2~23: 表 1 菌株以 Pr-F/Pr-R 为引物的扩增结果。
M: DL2 000 DNA Marker; 1: ddH₂O; 2-23: The PCR products from the strains of Table 1.

图 1 颖枯近壳多胞菌 PCR 特异性检测结果

Fig. 1 PCR specific detection results of *P. nodorum*

2.2 Pr-F/Pr-R 对颖枯近壳多胞菌灵敏度检测

颖枯近壳多胞菌 PCR 灵敏度检测的结果显示,当 DNA 的模板浓度在 100 ng/ μ L、50 ng/ μ L、25 ng/ μ L、10 ng/ μ L、1 ng/ μ L、500 pg/ μ L 及 100 pg/ μ L 时,PCR 均能扩增出条带;而 DNA 模板浓度为 50 pg/ μ L 和 1 pg/ μ L 时无条带(图 2),说明 Pr-F/Pr-R 对颖枯近壳多胞菌基因组 DNA 的检测灵敏度为 100 pg/ μ L。

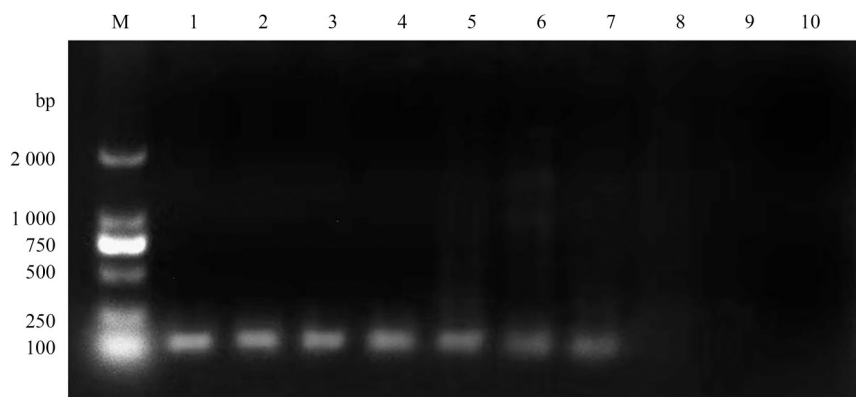
2.3 发病植物组织的快速检测

对接种颖枯近壳多胞菌后发病的垂穗披碱草叶

片组织的基因组 DNA 进行常规 PCR 扩增(图 3),该样品能扩增出 127 bp 的特异性条带,而接种亚隔孢壳属、异壳二孢属、小光壳属、拟盘多毛孢属、壳多胞属、根腐离蠕孢菌、交链格孢属和癭囊腔菌引起的垂穗披碱草叶斑病及健康垂穗披碱草叶片基因组 DNA 均不能扩增出条带,说明 Pr-F/Pr-R 能对颖枯近壳多胞菌 *P. nodorum* 引起的病害进行快速分子检测。

3 讨论

在建立颖枯近壳多胞菌的检测方法中,Iori 等^[24]

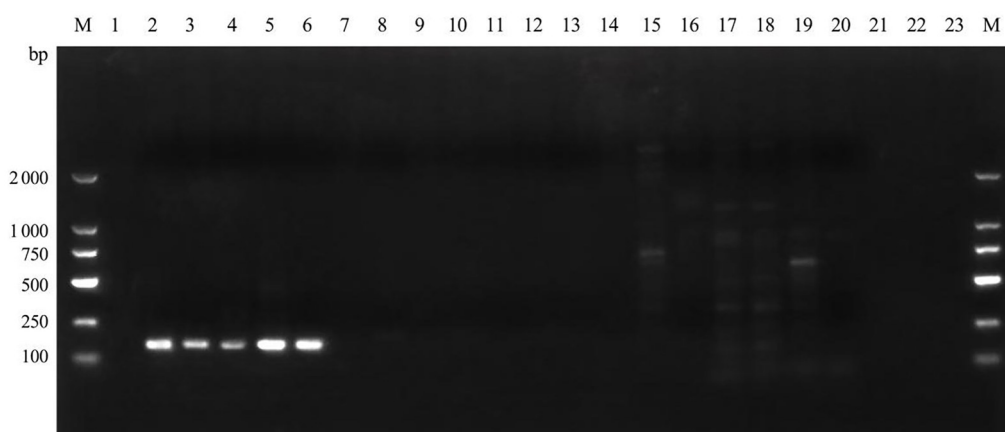


M: DL 2 000 DNA Marker; 1~9: 以颖枯近壳多胞菌 DNA 浓度分别为 100 ng/μL、50 ng/μL、25 ng/μL、10 ng/μL、1 ng/μL、500 pg/μL、100 pg/μL、50 pg/μL 和 1 pg/μL 的 PCR 扩增结果; 10: 阴性对照。

M: DL 2 000 DNA Marker; 1-9: PCR products from 100 ng/μL, 50 ng/μL, 25 ng/μL, 10 ng/μL, 1 ng/μL, 500 pg/μL, 100 pg/μL, 50 pg/μL, and 1 pg/μL; 10: Negative control.

图2 颖枯近壳多胞菌 PCR 灵敏度检测结果

Fig. 2 PCR sensitivity detection results of *P. nodorum*



M: DL 2 000 DNA Marker; 1: 阴性对照; 2~6: 以接种颖枯近壳多胞菌的垂穗披碱草发病叶片 DNA 为模板的 PCR 扩增结果; 7~11: 健康垂穗披碱草叶片 DNA 的 PCR 扩增结果; 12~23 均为垂穗披碱草接种不同病原菌下的发病叶片 DNA 的 PCR 扩增结果, 其中 12: *Didymella boeremae*; 13: *Didymella pomorum*; 14: *Neoscochyta cylindrispora*; 15: *Neoscochyta europaea*; 16: *Neoscochyta desmazieri*; 17: *Leptosphaerulina miscanthi*; 18: *Pestalotiopsis trachycarpicola*; 19: *Pestalotiopsis lushanensis*; 20: *Stagonospora bicolor*; 21: *Bipolaris sorokiniana*; 22: *Alternaria alternata*; 23: *Plectosphaerella cucumerina*。

M: DL 2 000 DNA Marker; 1: Negative control; 2-6: PCR amplification results using the DNA of diseased leaves of *E. nutans* inoculated with *P. nodorum*; 7-11: PCR amplification results of DNA from healthy *E. nutans* leaves; 12-23 were all PCR amplification results of DNA from diseased leaves of *E. nutans* inoculum with different pathogens. 12: *D. boeremae*; 13: *D. pomorum*; 14: *N. cylindrispora*; 15: *N. europaea*; 16: *N. desmazieri*; 17: *L. miscanthi*; 18: *P. trachycarpicola*; 19: *P. lushanensis*; 20: *S. bicolor*; 21: *B. sorokiniana*; 22: *A. alternata*; 23: *P. cucumerina*。

图3 应用 Pr-F/Pr-R 引物对发病及健康垂穗披碱草叶片 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR amplification with primers Pr-F/Pr-R on diseased and healthy *E. nutans* leaves

基于高光谱成像分析和 qPCR 验证, 建立了一种用于早期检测颖枯近壳多胞病菌的方法, 这种快速且无创的技术可以在接种病原菌仅 48 h 后区分健康和病变组织的光谱。Oliver 等^[25]使用基于 SYBR Green 的 qPCR 测定方法对感病植物叶片的颖枯近壳多胞菌进行定量。qPCR 的绝对定量精度较高,

但设备成本显著增加。在继承常规 PCR 简易性与可靠性的前提下, 本研究通过靶向 *RPB2* 基因保守域的单次扩增, 克服了巢式 PCR 的高污染风险与多重 PCR 的优化复杂性, 并且降低了耗材和设备成本。本研究成功从发病的垂穗披碱草叶片组织中直接检测到病原菌, 颖枯近壳多胞菌生长缓慢, 该

体系大大缩短检测周期,简化操作流程,便于处理大量样本。*RPB2*是单拷贝蛋白编码基因,具有高覆盖度,且有足够的变异用于系统发育和物种类别分析^[19],更适合种属水平上的区分,能够避免*ITS*的多拷贝问题或*IGS*区可能存在的重复序列变异问题。在本检测体系建立过程中,设计特异性引物需要注意引物长度、GC含量、退火温度、靶序列保守性和引物序列的二级结构、PCR体系中的循环周期等因素,以确保PCR反应高效、准确地进行^[26]。特异性的缺乏通常可以通过调整退火温度或引物的初始浓度来改善^[27]。PCR扩增完成后使用凝胶成像系统进行验证时,主要看PCR扩增产物是否与预期PCR产物(以靶序列为模板设计引物)大小一致,以及特异性条带是否明显,是否有发夹结构和引物二聚体^[28]。本研究建立的技术成功检测到回接样品中的颖枯近壳多胞病菌,特异性条带明亮清晰,未形成发夹结构和引物二聚体条带,与靶序列大小相当,说明扩增产物质量高;而对于天然草原植物上分离出的常见病原菌以及回接到垂穗披碱草植株上的非颖枯近壳多胞叶斑病原菌无条带或无特异性条带,说明Pr-F/Pr-R引物对垂穗披碱草近壳多胞叶斑病具有高度特异性。本研究填补了颖枯近壳多胞病菌鉴定没有特异性检测方法的空缺,首次将*RPB2*序列分析应用于颖枯近壳多胞病菌的快速鉴定中,为近壳多胞叶斑病的鉴定开拓了途径,同时,基于*RPB2*序列建立的检测体系对于发掘其他病原菌检测新靶标提供新思路。

感染禾草的近壳多胞菌属种类繁多,本研究聚焦于颖枯近壳多胞菌的快速检测鉴定,引物Pr-F/Pr-R对青藏高原高寒草地常见病原菌(如*Didymella boeremae*、*Neoscochyta cylindrispora*、*Bipolaris sorokiniana*等)均无交叉反应,证实该引物的高度特异性。李金庆等^[4]设计特异性引物进行麦类壳多胞斑点病菌(*P. pseudonodorum*)的检测,对照组选用6种进境大麦中经常截获的病菌,与本试验对照组设置思路一致,均未对靶向病原菌的近缘种或同属不同种进行特异检测。未来可进一步验证该体系是否适用于颖枯近壳多胞病菌近缘种的快速检测。此外,颖枯近壳多胞病菌可侵染多类寄主,但本研究仅验证了该体系可直接检测侵染垂穗披碱草引起的叶斑病植物组织,该检测体系是否普适于小麦、大麦等其他经济

禾谷类作物上的颖枯近壳多胞菌检测,是下一步需要验证的重点。

4 结 论

本研究利用颖枯近壳多胞病菌*RPB2*保守序列设计了具有高度特异性的引物Pr-F/Pr-R,建立了一种高效、快速、稳定的PCR检测近壳多胞叶斑病的分子技术,Pr-F/Pr-R对颖枯近壳多胞菌基因组DNA的检测灵敏度为100 pg/ μ L。该技术成功检测到回接样品中的颖枯近壳多胞病菌,而对于天然草原植物上分离出的常见病原菌无条带或无特异性条带。本研究将*RPB2*序列分析应用于颖枯近壳多胞病菌的鉴定中,为近壳多胞叶斑病的鉴定开拓了途径,为田间快速诊断、大规模样本筛查提供了新的可能。同时,基于*RPB2*序列建立的检测体系对于发掘其他病原菌检测新靶标提供新思路。

致 谢

衷心感谢许玲玲、刘佳奇为本研究提供试验所需的菌株,感谢刘俊英、张海娟在试验设计与操作中给予的悉心指导和技术支持。

参考文献 References

- [1] 郭荣明,赵蕊,高国荣,苗彦军.垂穗披碱草的研究进展[J].畜牧与饲料科学,2024,45(2):73-81
Guo R M, Zhao X, Gao G R, Miao Y J. Research progress on *Elymus nutans* [J]. *Animal Husbandry and Feed Science*, 2024, 45(2): 73-81 (in Chinese)
- [2] 薛龙海,刘佳奇,李春杰.披碱草属真菌病害研究进展[J].草业学报,2024,33(2):226-241
Xue L H, Liu J Q, Li C J. Progress in research on fungal diseases of the genus *Elymus* [J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2024, 33(2): 226-241 (in Chinese)
- [3] Gao Y, Zhong T F, Eungwanichayapant P D, Jayawardena R S, Hyde K D, Faraj T K, Wanasinghe D N, Gui H. Two new species of *Parastagonospora* and a new species of *Phaeoseptoriella* (Phaeosphaeriaceae, Pleosporales) from grasslands in Yunnan Province, China [J]. *MycologyKeys*, 2024, 109: 239
- [4] 李金庆,王英超,段维军,张京宣,张静.麦类壳多胞斑点病菌研究进展[J].植物检疫,2023,37(2):28-31
Li J Q, Wang Y C, Duan W J, Zhang J X, Zhang J. Research progress on *Parastagonospora pseudonodorum* [J]. *Plant Quarantine*, 2023, 37(2): 28-31 (in Chinese)
- [5] 许玲玲,刘佳奇,龙嘉惠,薛龙海,李春杰.我国西部天然草原植物真菌病害调查研究[J].草地学报,2025,33(9):2765-2776
Xu L L, Liu J Q, Long J H, Xue L H, Li C J. Investigation and research on plant fungal diseases of natural grassland in western China [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2025, 33(9): 2765-2776 (in Chinese)

- [6] Lhamo D, Sun Q, Friesen T L, Karmacharya A, Li X H, Fiedler J D, Faris J D, Xia G M, Luo M C, Gu Y Q, Liu Z H, Xu S S. Association mapping of tan spot and *Septoria nodorum* blotch resistance in cultivated emmer wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2024, 137(8): 193
- [7] Kariyawasam G K, Nelson A C, Williams S J, Solomon P S, Faris J D, Friesen T L. The necrotrophic pathogen *Parastagonospora nodorum* is a master manipulator of wheat defense [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2023, 36(12): 764-773
- [8] 龚明霞. 小麦真菌性叶斑病快速诊断技术研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2024
- Gong M X. Research on rapid diagnosis technology of wheat fungal leaf spot [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2024 (in Chinese)
- [9] 常建萍, 倪如原, 贺晨帮, 芦光新, 刘钟歌, 来有鹏, 祁鹤兴. 青贮玉米近壳多胞叶斑病菌的分离鉴定及其致病性分析[J]. 草地学报, 2024, 32(11): 3400-3407
- Chang J P, Ni R Y, He C B, Lu G X, Liu Z G, Lai Y P, Qi H X. Identification and pathogenicity analysis of *Parastagonospora* leaf spot pathogens from *Silage Maize* [J]. *Acta Agrestia Sinica*, 2024, 32(11): 3400-3407 (in Chinese)
- [10] Croll D, Crous P W, Pereira D, Mordecai E A, McDonald B A, Brunner P C. Genome-scale phylogenies reveal relationships among *Parastagonospora* species infecting domesticated and wild grasses [J]. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 2021, 46(1): 116-128
- [11] Choupannejad R, Sharifnabi B, Collemare J, Massah A, Gholami J, Mehrabi R. Interaction of wheat-*Parastagonospora nodorum* isolates: Exploring host susceptibility and fungal virulence [J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2024, 130: 102235
- [12] 许志刚. 普通植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003
- Xu Z G. *General Plant Pathology* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2003 (in Chinese)
- [13] Zhang Y W, Nan Z B. First report of leaf blotch caused by *Parastagonospora nodorum* on *Leymus chinensis* (Chinese ryegrass) in China [J]. *Plant Disease*, 2018, 102(12): 2661
- [14] 段维军, 郭立新. 基于PCR技术的植物病原真菌检测技术研究进展[J]. 植物检疫, 2008(6): 385-388, 384
- Duan W J, Guo L X. Advances in the detection of plant pathogenic fungi based on PCR technology [J]. *Plant Quarantine*, 2008(6): 385-388, 384 (in Chinese)
- [15] Fraaije B A, Lovell D J, Coelho J M, Baldwin S, Hollomon D W. PCR-based assays to assess wheat varietal resistance to blotch (*Septoria Tritici* and *Stagonospora Nodorum*) and rust (*Puccinia Striiformis* and *Puccinia Recondita*) diseases [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2001, 107: 905-917
- [16] Llop P, Bonaterra A, Peñalver J, López M M. Development of a highly sensitive nested-PCR procedure using a single closed tube for detection of *Erwinia amylovora* in asymptomatic plant material [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(5): 2071-2078
- [17] 韩玉立, 王迪, 周洁, 何晓兰, 崔宝凯. 南方灵芝 ITS、EF1- α 和 RPB2 序列多态性研究(英文) [J]. 菌物学报, 2019, 38(5): 679-685
- Han Y L, Wang D, Zhou J, He X L, Cui B K. Intragenomic polymorphisms of the ITS, EF1- α and RPB2 sequences of *Ganoderma australe* [J]. *Mycosystema*, 2019, 38(5): 679-685 (in Chinese)
- [18] 刘佳奇. 高寒草地披碱草亚隔壳科叶斑病的病原鉴定及杀菌剂筛选[D]. 兰州: 兰州大学, 2023
- Liu J Q. Identification and fungicide screening of Didymellaceae leaf spot pathogens on *Elymus* spp in alpine grasslands [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2023 (in Chinese)
- [19] Větrovský T, Kolařík M, Žižňáková L, Zelenka T, Baldrian P. The *rpb2* gene represents a viable alternative molecular marker for the analysis of environmental fungal communities [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(2): 388-401
- [20] 高飞, 高利, 刘太国, 高继国, 陈万权. 小麦矮腥黑粉菌及其近缘种的 RPB2 基因片段序列分析 [J]. 植物保护, 2010, 36(1): 42-46, 54
- Gao F, Gao L, Liu T G, Gao J G, Chen W Q. Sequence analysis of RPB2 gene of *Tilletia controversa* and its related species [J]. *Plant Protection*, 2010, 36(1): 42-46, 54 (in Chinese)
- [21] 李承达, 张亚鑫, 刘权德, 唐玉琴. 长枝木霉引发灵芝绿霉病的快速检测体系的建立 [J]. 天津农业科学, 2021, 27(7): 61-65
- Li C D, Zhang Y X, Liu Q D, Tang Y Q. Establishment of the rapid detection system of green mold on *Ganoderma lingzhi* caused by *Trichoderma Longibrachiatum* [J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2021, 27(7): 61-65 (in Chinese)
- [22] 谢晓梅. 子囊菌类有毒蘑菇所属类群DNA条形码的筛选及快速检测技术研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2022
- Xie X M. Study of DNA barcodes of genera ascomycete poisonous mushrooms belonging to and their fast detection techniques [D]. Changchun: Jilin Agricultural University, 2022 (in Chinese)
- [23] Liu J Q, Xue L H, Li C J. Characterization of Didymellaceae leaf spot associated with *Elymus* plants in the Tibetan Plateau of China [J]. *Plant Disease*, 2025, 109(11): 2280-2288
- [24] Iori A, Scala V, Cesare D, Pinzari F, D'Egidio M G, Fanelli C, Fabbri A A, Reverberi M, Serranti S. Hyperspectral and molecular analysis of *Stagonospora nodorum* blotch disease in durum wheat [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2015, 141(4): 689-702
- [25] Oliver R P, Rybak K, Shankar M, Loughman R, Harry N, Solomon P S. Quantitative disease resistance assessment by real-time PCR using the *Stagonospora nodorum*-wheat pathosystem as a model [J]. *Plant Pathology*, 2008, 57(3): 527-532
- [26] 张新宇, 高燕宁. PCR 引物设计及软件使用技巧 [J]. 生物信息学, 2004(4): 15-18, 46
- Zhang X Y, Gao Y N. To design PCR primers with oligo 6 and primer premier5 [J]. *China Journal of Bioinformatics*, 2004(4): 15-18, 46 (in Chinese)
- [27] Henson J M, French R C. The polymerase chain reaction and plant disease diagnosis [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1993, 31(1): 81-109
- [28] 尤超, 赵大球, 梁乘榜, 周春华. PCR 引物设计方法综述 [J]. 现代农业科技, 2011(17): 48-51
- You C, Zhao D Q, Liang C B, Zhou C H. Review of the PCR primer design method [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2011(17): 48-51 (in Chinese)

责任编辑: 董金波



第一作者简介: 龙嘉惠,女,汉族,湖南娄底人,兰州大学硕士研究生。在校期间获得兰州大学校级专硕学业一等奖学金、二等奖学金及“中科美菱奖学金”,获“中国草学会2024年会”墙报展示二等奖、宁夏草原学会2025年第二届“生态文明和农业高质量发展”研究生论坛墙报展示三等奖、草种创新与草地农业生态系统全国重点实验室第八届研究生“学术十杰”提名奖,曾担任草地研究国际研讨会暨第五届国际草地农业生态系统学术大会志愿者。主要从事生态学及草原植物病理学的研究,参与国家重点研发计划子课题和国家农业产业技术体系项目。以第一作者身份在 *Plant Disease*、《草地学报》各发表论文1篇,合著论文5篇。



通讯作者简介: 薛龙海,博士,青年研究员(正高四级),硕士生导师。主要从事草类植物病理学和草地生态学等研究。命名(病原)真菌新种7个,发现我国寄主植物上的新纪录种50余个。近年,一直致力于青藏高原高寒草甸植物叶斑病的诊断、监测、防控、生态调节等研究。被聘为全国研究生教育评估监测专家库专家、学术桥评审专家库成员。在 *Plant Disease*、*Plant Pathology*、*Fungal Ecology*、*Journal of Agricultural and Food Chemistry*、*New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*、*Phytotaxa*、《草业学报》、《草地学报》、《西南农业学报》等知名期刊上共发表学术论文49篇;其中以第一作者或通讯作者发表SCI论文29篇。参编编著2部(编委),参与发明专利8个、实用新型专利1个,制定地方标准1个。长期为 *Plant Disease*、*Plant Pathology*、*Journal of Phytopathology*、*Annals of Applied Biology*、*Scientific Reports*、*Biology*、*Climate*、*Molecules*、*Sustainability*、*The European Zoological Journal*、*Advancements in Life Sciences*、*Mitochondrial DNA Part B: Resources* 等杂志审稿。