

DOI:10.12403/j.1001-1498.20220420

北美栅锈菌和松杨栅锈菌可视化检测体系建立

蓝燕, 农花萍, 彭子嘉, 陆颖, 李坤蓬, 徐勇, 余仲东*

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: [目的] 为实现北美栅锈菌和松杨栅锈菌快速有效的鉴别及鉴定。[方法] 本研究根据两种锈菌的 28S rDNA 基因序列设计若干组 LAMP 引物。经筛选得到的引物以北美栅锈菌、松杨栅锈菌、图拉斯叉钩丝壳菌、芍药白粉菌、梨胶锈菌、羊肚菌、金针菇的基因组 DNA 为模板进行 LAMP 反应并完成特异性检测; 首先建立初始 LAMP 反应体系, 再进一步优化 LAMP 反应体系的组分和反应条件, 加入羟基萘酚蓝实现可视化检测; 最后确定检测体系灵敏度。[结果] 表明, 筛选出的引物具有特异性; 25 μL 北美栅锈菌 LAMP 检测体系最佳 Mg^{2+} 浓度为 $6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 最佳内外引物比例为 8: 1, 最佳 dNTPs 浓度为 $1.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 同样地, 25 μL 松杨栅锈菌 LAMP 检测体系最佳 Mg^{2+} 浓度为 $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 最佳内外引物比例为 6: 1, 最佳 dNTPs 浓度为 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。加入 160 μM 羟基萘酚蓝 (HNB) 可清晰地指示反应结果, 两种检测体系在 61°C 条件下, 分别反应 30 min 和 40 min 可实现目视判断结果, 且灵敏度分别可达 $34 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 和 $60 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。[结论] 通过建立两种锈菌的可视化 LAMP-HNB 检测体系可实现对北美栅锈菌和松杨栅锈菌进行区分及鉴定, 为快速鉴定和区分重要杨树锈病提供了技术支撑和实践参考。

关键词: 杨树; 北美栅锈菌; 松杨栅锈菌; 环介导等温扩增技术; 羟基萘酚蓝

中图分类号: S763.15

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2023)05-0140-09

杨树是杨柳科 (*Salicaceae* Mirb.) 杨属 (*Populus* L.) 多年生落叶乔木, 因其速生成林、防风固沙、抗逆性强、木材质佳等优势, 成为我国用材林、防护林主要造林树种之一^[1]。我国杨树栽培规模不断扩大, 但受限于栽培技术和杨树病虫害的日益频发。杨树叶锈病是一种严重的叶部病害, 导致杨树的生长量和材积严重降低, 造成杨树人工林巨大经济损失^[2]。杨树叶锈病的病原菌多为栅锈菌属 (*Melampsora* Castagne) 锈菌。北美栅锈菌 (*Melampsora medusae* Thümen.) 原寄主为北美洲东部的美洲黑杨 (*Populus deltoides* W. Bartram ex Marshall), 后逐渐传播至世界各地, 是印度、欧洲、日本等国家和地区的检疫性有害生物^[3], 也是我国最近发现的外来入侵种, 危害极

大, 并有持续传播的趋势^[4]。该种与我国本土流行种松杨栅锈菌 (*Melampsora larici-populina* Kleb.) 在形态、寄主谱范围等方面高度相似, 给杨树叶锈病的检验检疫带来了实际困难, 因此亟待建立一种快速准确的杨树叶锈病检测技术。

目前林木真菌病原检测方法主要包括传统检测法和分子生物学法。传统检测法多为形态观察, 较为直观但对一线检疫人员的要求较高。如形态结构相似的同属不同种真菌, 往往需要扫描电子显微镜 (SEM) 才能实现有效辨别; 同种病原菌在不同时期或不同生长条件下也会表现出不同的形态特征等。因此, 对新病原菌或疑难种病原菌进行物种水平的辨别常常有困难。分子生物学法中广泛使用的

收稿日期: 2022-08-24 修回日期: 2022-09-09

基金项目: 国家自然科学基金 (31670650); 大学生创新创业训练计划项目 (X202110712224)

* 通讯作者: 余仲东, 博士, 教授, 主要研究方向: 森林病理学、林业微生物学 E-mail: yuzhongdong001@nwsuaf.edu.cn

常规 PCR 及以常规 PCR 为基础建立的多重 PCR、实时荧光 PCR 等技术特异性强,检出率高,但依赖昂贵的仪器,耗时较长,且需要专业的技术人员进行操作^[5-7]。因此,以上两种方法很难满足目前生产实践中快速准确检测的需求。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是 Notomi 等人在 2000 年建立的一种恒温核酸扩增技术,在恒定温度下,利用 4~6 条引物及 Bst DNA 聚合酶对模板进行扩增,经 30~60 min 可将微量模板扩增 10^9 倍^[8-9]。LAMP 结果检测方法多样化,除了琼脂糖凝胶电泳外,目前常用的方法还有浊度法、显色法、实时荧光法等,这些方法可以实现闭管检测,从而降低污染概率^[10-11]。LAMP 具特异性好、灵敏度高、反应速度快和操作简易便捷等特点,应用前景广阔^[12-14],在林业病害检测方面已有许多报道^[15-16]。另外,LAMP 还广泛应用于医学^[17-18]、农业^[19-20]、食品^[21-22]等行业。

本研究以北美栅锈菌和松杨栅锈菌为研究对象,根据 LAMP 的反应原理,针对两种不同锈菌的靶标序列分别设计了多组引物。经实验初步筛选引物后,再以北美栅锈菌(*M. medusae*)、松杨栅锈菌(*M. larici-populina*)、图拉斯叉钩丝壳菌(*Sawadaia tulasnei* (Fuck.) Homma)、芍药白粉菌(*Erysiphe paeoniae* Zheng & Cheng)、梨胶锈菌(*Gymnosporangium asiaticum* Miyabe ex Yamada)、羊肚菌(*Morchella esculenta* (L.) Pers.)、金针菇(*Flammulina velutipes* (Curt.:Fri.) Sing)的基因组 DNA 为模板进行特异性检测,后续进行体系优化、反应条件优化、灵敏度检测等研究,并结合羟基萘酚蓝(HNB)建立 LAMP-HNB 可视化检测体系,以期为松杨栅锈菌和北美栅锈菌的快速、准确的鉴别及鉴定提供技术支持。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

供试北美栅锈菌(*M. medusae*)、松杨栅锈菌(*M. larici-populina*)、羊肚菌(*M. esculenta*)、金针菇(*F. velutipes*),菌株由西北农林科技大学森林病理学实验室保存并提供,其余参考菌株包括图拉斯叉钩丝壳菌(*S. tulasnei*)、芍药白粉菌(*E. paeoniae*)、梨胶锈菌(*G. asiaticum*)均采

自西北农林科技大学南校区内感病植株。等温扩增试剂盒、引物均购于生工生物(上海)股份有限公司;Bst DNA 聚合酶购于 NEB(北京)公司;羟基萘酚蓝购于上海麦克林生化科技有限公司;dNTPs 购于宝日医(大连)公司。

1.2 试验方法

1.2.1 CTAB 法提取真菌基因组 DNA 将 CTAB 缓冲液置于 65 ℃ 水浴锅中充分裂解。向盛有样品的离心管中加入 500 μL CTAB 缓冲液,添加适量石英砂充分研磨,再加入 2 μL 巯基乙醇,置于恒温孵育器中 65 ℃ 保温 1 h,每 10 min 颠倒均匀一次。保温结束后加入 500 μL DNA 提取液(氯仿:异戊醇=24:1),室温离心 11 000 rpm, 10 min, 2 次。取上清液,加入 2 倍体积无水乙醇,上下颠倒均匀,-20 ℃ 保存 2~3 h 后取出,室温离心 11 000 rpm, 10 min。弃上清液,加入 75% 乙醇 750 μL,再室温离心 12 000 rpm, 10 min, 2 次,弃上清液,于超净工作台吹干后加入 50 μL TE 缓冲液,于-20 ℃ 保存,备用。

1.2.2 LAMP 引物设计与筛选 在 NCBI 上获取 *M. medusae* 和 *M. larici-populina* 的 28S rDNA 基因序列。根据两种菌的 28S rDNA 序列,利用在线 LAMP 引物设计工具(PrimerExplorer V5)分别设计多组引物,以 dimer 值、引物两端自由能为依据初步选出若干组引物(每组引物包括两条内引物:FIP、BIP,两条外引物:F3、B3),送至生工生物(上海)股份有限公司合成。

根据研究目的,需确保引物在 *M. medusae* 与 *M. larici-populina* 之间不发生交叉反应,因此需要对引物进一步筛选。每组引物分别以 *M. medusae*、*M. larici-populina* 基因组 DNA 为模板进行 LAMP 扩增反应。参考厂家等温扩增试剂盒说明书建立反应体系。25 μL 体系包括 12.5 μL LAMP MasterMix、2 μL FIP、2 μL BIP、0.5 μL F3、0.5 μL B3、2 μL 模板 DNA、0.5 μL Bst DNA 聚合酶,最后 ddH₂O 补至 25 μL。在冰上将各组分置于 PCR 管中并涡旋混匀,反应条件为 65 ℃ 水浴 60 min 后 80 ℃ 水浴 10 min。反应结束后取 7 μL 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。通过观察 LAMP 梯状条带,选出仅扩增 *M. medusae* 或 *M. larici-populina* 基因组 DNA 的引物进行后续特异性检测。

1.2.3 引物特异性检测 在北美栅锈菌引物特异

性检测中,同时以提取的松杨栅锈菌、芍药白粉菌、图拉斯叉钩丝壳菌、梨胶锈菌、羊肚菌、金针菇基因组 DNA 为模板进行 LAMP 扩增反应;同样地,松杨栅锈菌引物特异性检测中,同时以提取的北美栅锈菌及上述菌种基因组 DNA 为模板进行 LAMP 扩增反应;两组试验均以 ddH₂O 为空白对照。反应体系和条件同 1.2.2。反应结束后取 7 μL 产物在 1.5% 琼脂糖进行凝胶电泳。通过观察 LAMP 梯状条带判断 LAMP 方法的特异性。

1.2.4 反应体系建立 参考 NEB 公司的 Bst DNA 聚合酶使用说明书建立初始反应体系(表 1)。

表 1 初始反应体系
Table 1 Initial reaction system

组分及浓度 Components and Concentrations	体积 Volume/ μL
10 \times Buffer	2.5
Mg ²⁺ (100 mmol·L ⁻¹)	1.5
dNTPs (10 mmol·L ⁻¹ each)	3.5
FIP (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	4.0
BIP (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	4.0
F3 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.5
B3 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.5
模板 template	1.5
Bst DNA 聚合酶 Bst DNA polymerase (8 000 U·mL ⁻¹)	0.5
ddH ₂ O	补至 25 μL

在冰上将各组分置于 PCR 管中并涡旋混匀,反应条件为 65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min 后 80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 10 min。

在初始反应体系和条件的基础上,按表 2 设置的梯度依次对 Mg²⁺、内外引物比例、dNTPs 进行单因素优化,同时以 ddH₂O 为空白对照,反应结束后取 7 μL 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。根据 LAMP 梯状条带的有无以及清晰度确定最佳浓度及比例。

在优化后的体系中加入 2 μL 羟基萘酚蓝 (2 mmol·L⁻¹) 指示 LAMP 反应的结果。同时以 ddH₂O 为空白对照,通过目视溶液颜色,判断是否发生反应(阳性为蓝色,阴性为紫色),反应结束后取 7 μL 产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,观察羟基萘酚蓝的指示效果。

1.2.5 反应条件优化 在组分优化后的体系中加入羟基萘酚蓝为显色剂,并依次进行温度和时间的优化。初始反应温度为 65 $^{\circ}\text{C}$,初始反应时间为 60

表 2 组分梯度

Table 2 component gradient

因素 Factor	梯度 Gradient
Mg ²⁺ 浓度 Mg ²⁺ concentration/ (mmol·L ⁻¹)	2、4、6、8、10
内外引物比例 ratio of internal to external primer	1:1、2:1、4:1、6:1、8:1、10:1
dNTPs 浓度 dNTPs concentration/ (mmol·L ⁻¹)	1、1.2、1.4

min。优化反应温度时,反应时间为初始反应时间,温度梯度设置如表 3 所示;优化反应时间时,以上一步得出的优化温度作为反应温度,时间梯度设置如表 3 所示。以 ddH₂O 为空白对照,筛选出颜色分化时对应的最低反应温度和最短反应时间,从而进一步优化反应条件。

表 3 条件梯度

Table 3 Conditional gradient

因素 Factor	梯度 Gradient
温度 Temperature/ $^{\circ}\text{C}$	61、63、65、67
时间 Time/min	30、40、50、60

1.2.6 灵敏度检测 *M. medusae* 和 *M. larici-populina* 基因组 DNA 经浓度测定后进行 10 倍浓度的梯度稀释,在优化后的体系和反应条件中进行反应。同时以 ddH₂O 为空白对照,观察反应后的溶液颜色以判断最低检测浓度。

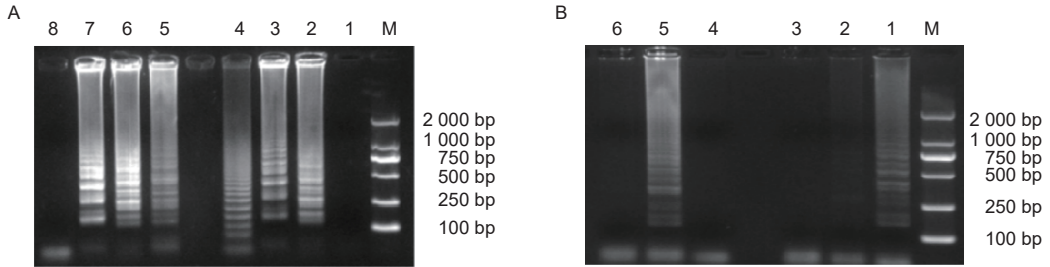
2 结果与分析

2.1 引物筛选

通过在线引物设计软件共设计了 12 组引物,经过初步筛选,得到 *M. medusae* 引物 BM①、BM②、BM③、BM④以及 *M. larici-populina* 引物 SY⑤、SY⑥、SY⑦。进一步的引物筛选结果如图 1 所示。图 1-A 显示 *M. medusae* 的 4 组引物中, BM①所属的电泳道中仅以 *M. larici-populina* 基因组 DNA 为模板进行 LAMP 反应时出现梯状条带,表明 BM①无法扩增目标菌; BM②和 BM③所属的电泳道均出现了梯状条带,表明这两组引物既能以 *M. medusae* 基因组 DNA 为模板进行扩增,又能以 *M. larici-populina* 基因组 DNA 为模板进行扩增,因此不具有特异性; BM④所属的两个电泳道中,仅以 *M. medusae* 基因组 DNA 为模板进行

LAMP 反应时出现了梯状条带。因此, 4 组引物中只有 BM④能够特异性扩增 *M. medusae*。图 1-B 显示 *M. larici-populina* 的 3 组引物中, SY⑤所属的电泳道中仅以 *M. medusae* 基因组 DNA 为模板进行 LAMP 反应时出现梯状条带, 表明 SY⑤不能扩增目标菌; SY⑥所属的两个电泳道中, 仅以 *M. larici-populina* 基因组 DNA 为模板进行 LAMP

反应时出现了梯状条带; SY⑦所属的两个电泳道中均无梯状条带, 表明 SY⑦发生无效扩增; 因此, 3 组引物中只有 SY⑥能够特异性扩增 *M. larici-populina*。综上, 仅 BM④和 SY⑥能够有效区分 *M. medusae* 和 *M. larici-populina*, 因此可用于建立 LAMP 检测体系。二者序列如表 4 所示。



注: A: *M. medusae* 引物筛选; B: *M. larici-populina* 引物筛选 A: 引物: 1、5 泳道: BM①, 2、6 泳道: BM②, 3、7 泳道: BM③, 4、8 泳道: BM④; DNA: 泳道 1~4: *M. medusae*, 泳道 5~8: *M. larici-populina*; B: 引物: 1、4 泳道: SY⑤; 2、5 泳道: SY⑥; 3、6 泳道: SY⑦; DNA: 泳道 1~3: *M. medusae*, 泳道 4~6: *M. larici-populina*; M: DL2000 DNA Marker

Notes: A, Primer selection for *M. medusae*; B, Primer selection for *M. larici-populina* A: Lane 1, 5, Primer BM①; Lane 2, 6, primer BM②; Lane 3, 7, primer BM③; Lane 4, 8, primer BM④; DNA, Lane 1~4, *M. medusae*; Lane 5~8, *M. larici-populina*; B: Lane 1, 4, primer SY⑤; Lane 2, 5, primer SY⑥; Lane 3, 6, primer SY⑦; DNA, Lane:1~3, *M. medusae*; Lane 4~6, *M. larici-populina*; M, DL Marker 2000

图 1 供试引物筛选

Fig. 1 Tested primer's selection

表 4 特异性引物序列

Table 4 Specific primer sequences

编号 No.	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences
BM④	F3	AGCAAGTCAACATCAGTCT
	B3	CTAATACTCGCAAGCATGT
	FIP	TCGAGGTCCCAAGCTATAACAGAGTGTGGAAAAAGGGC
	BIP	GTTCGAAAGAGCCTCCTTACTCTTGGTCCGTGTTTCAAG
SY⑥	F3	AAGCTTTGAGCGGATTCGA
	B3	AATGATCCAGACTGGTCGA
	FIP	CCGTGTTTCAAGACGGGTCCGATCTCCTTACTATGGATGTTGG
	BIP	ACCAAGGAGTCTAACATGCTTGC GGATCACATCTGAAATCACT

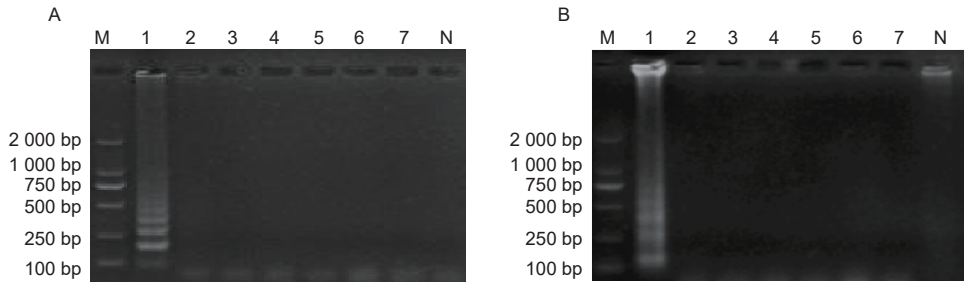
2.2 引物特异性检测

图 2-A 显示, BM④只有以 *M. medusae* 基因组 DNA 为模板进行 LAMP 扩增时出现了典型的梯状条带, *M. larici-populina*、*E. paeoniae*、*S. tulasnei* 等菌株以及空白对照均未出现梯状条带; 图 2-B 显示, SY⑥只有以 *M. larici-populina* 基因组 DNA 为模板进行 LAMP 扩增时出现了典型的梯状条带, *M. medusae*、*E. paeoniae*、*S. tulasnei*

等菌株以及空白对照均未出现梯状条带。综上, BM④和 SY⑥具备特异性扩增目标菌的能力。

2.3 反应体系建立

图 3-A 第 3 泳道、图 3-B 第 5 泳道、图 3-C 第 2 泳道梯状条带最为清晰明亮, 因此确定 25 μL *M. medusae* 体系最佳 Mg^{2+} 浓度为 6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 最佳内外引物比例为 8: 1, 最佳 dNTPs 浓度为 1.2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; 图 3-D 第 2 泳道、图 3-E 第 4 泳

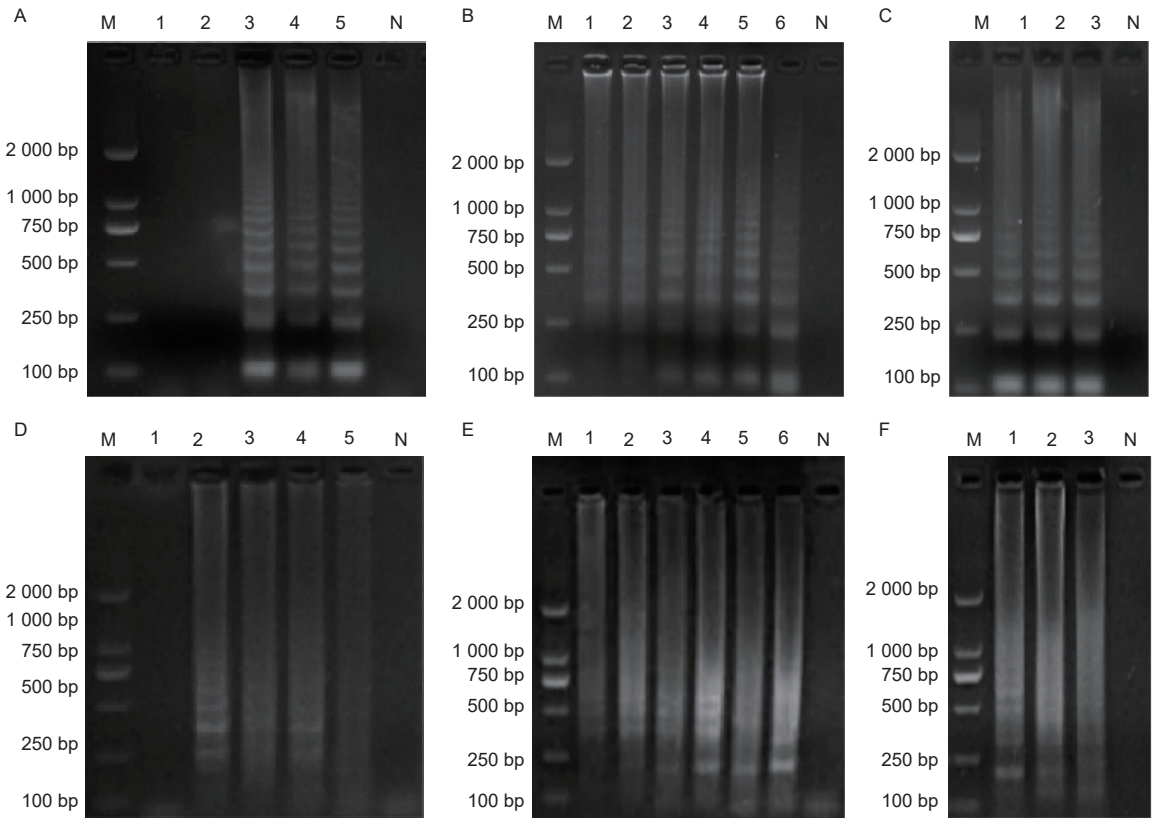


注: A: BM④特异性检测; B: SY⑥特异性检测 A: 泳道 1~7: *M. medusae*、*M. larici-populina*、*E. paeoniae*、*S. tulasnei*、*G. asiaticum*、*M. esculenta*、*F. velutipes*; B: 泳道 1~7: *M. larici-populina*、*M. medusae*、*E. paeoniae*、*S. tulasnei*、*G. asiaticum*、*M. esculenta*、*F. velutipes*; M: DL Marker 2000; N: 空白对照

Notes: A, Specificity detection for BM④; B, Specificity detection for SY⑥ A, Lane 1~7, *M. medusae*, *M. larici-populina*, *E. paeoniae*, *S. tulasnei*, *G. asiaticum*, *M. esculenta*, *F. velutipes*; B, Lane 1~7, *M. larici-populina*, *M. medusae*, *E. paeoniae*, *S. tulasnei*, *G. asiaticum*, *M. esculenta*, *F. velutipes*; M, DL Marker 2000; N, the blank

图 2 引物特异性检测

Fig. 2 Primer-specific detections



注: A: *M. medusae* Mg^{2+} 浓度优化; B: *M. medusae* 内外引物比例优化; C: *M. medusae* dNTPs 浓度优化; D: *M. larici-populina* Mg^{2+} 浓度优化; E: *M. larici-populina* 内外引物比例优化; F: *M. larici-populina* dNTPs 浓度优化; A、D: 泳道 1~5 的 Mg^{2+} 浓度: $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; B、E: 泳道 1~6 的内外引物比例: 1: 1, 2: 1, 4: 1, 6: 1, 8: 1, 10: 1; C、F: 泳道的 1~3 dNTPs 浓度: $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; M: DL Marker 2000; N: 空白对照

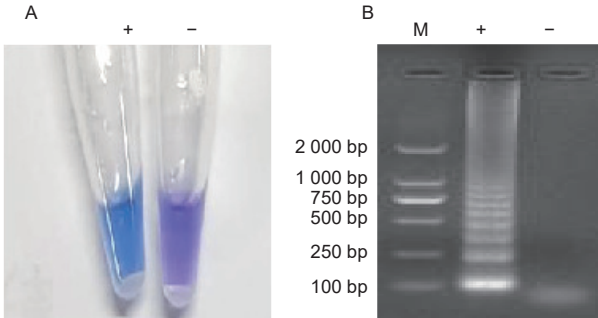
Notes: A: Optimization of Mg^{2+} concentration for LAMP system of *M. medusae*; B: Optimization of ratio of internal primer to external primer for LAMP system of *M. medusae*; C: Optimization of dNTPs concentration for LAMP system of *M. medusae*; D: Optimization of Mg^{2+} concentration for LAMP system of *M. larici-populina*; E: Optimization of ratio of internal primer to external primer for LAMP system of *M. larici-populina*; F: Optimization of dNTPs concentration for LAMP system of *M. larici-populina*; A、D: Lane 1~5 Mg^{2+} concentration: $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $6\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $8\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; B、E: Lane 1~6 ratio of internal primer to external primer: 1:1, 2:1, 4:1, 6:1, 8:1, 10:1; C、F: Lane 1~3 dNTPs concentration, $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $1.4\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$; M, DL Marker 2000; N, the blank

图 3 反应体系优化

Fig. 3 Reaction system optimization

道、图3-F第1泳道中梯状条带最为清晰明亮,因此确定 $25\ \mu\text{L}$ *M. larici-populina*体系最佳 Mg^{2+} 浓度为 $4\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,最佳内外引物比例为6:1,最佳dNTPs浓度为 $1\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

图4-A左PCR管中溶液呈蓝色为阳性,对应图4-B左泳道出现典型的梯状条带;图4-A右PCR管中溶液呈紫色为阴性,对应图4-B右泳道无任何条带,显色结果与电泳结果相互印证,不同结果颜色区分明显。



注: A: 显色检测 B: 电泳检测; “+”: 阳性, “-”: 阴性; M: DL Marker 2000

Notes: A, Products detection by hydroxynaphthol blue dye; B, Products detection by agarose gel electrophoresis; “+”, Positive sample; “-”, Negative sample; M, DL Marker 2000

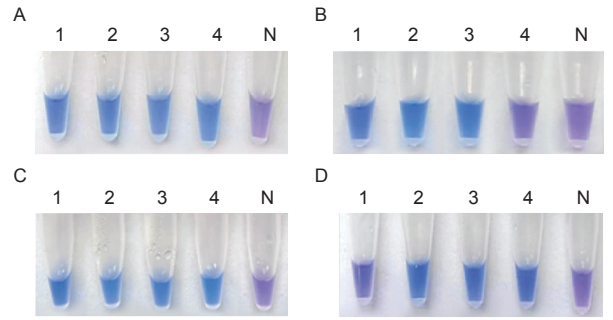
图4 可视化体系建立

Fig. 4 Establishment of visualization system

2.4 反应条件优化

图5-A中1~4号PCR管中溶液呈明显蓝色为阳性结果,表明*M. medusae*体系在 $61\ ^\circ\text{C}$ 、 $63\ ^\circ\text{C}$ 、 $65\ ^\circ\text{C}$ 、 $67\ ^\circ\text{C}$ 的温度条件下均能发生扩增反应且最低温度为 $61\ ^\circ\text{C}$;图5-C中1~4号PCR管中溶液呈明显蓝色为阳性结果,表明温度为 $61\ ^\circ\text{C}$ 时,*M. medusae*体系在30 min、40 min、50 min、60 min的时间条件下均能充分扩增且最短时间为30 min。

图5-B中1~3号PCR管中溶液呈明显蓝色为阳性结果,4号PCR管中溶液呈紫色为阴性结果,表明温度为 $67\ ^\circ\text{C}$ 时不利于*M. larici-populina*体系进行扩增,因此能够保证*M. larici-populina*体系发生扩增的反应温度为 $61\ ^\circ\text{C}$ 、 $63\ ^\circ\text{C}$ 、 $65\ ^\circ\text{C}$,最低温度为 $61\ ^\circ\text{C}$;图5-D中1号PCR管中溶液呈紫色为阴性结果,2~4号PCR管中溶液呈明显蓝色,为阳性结果,表明在温度为 $61\ ^\circ\text{C}$,反应时间为30 min时,*M. larici-populina*体系由于时间过短无法充分扩增而导致HNB显色不佳,因此能



注: A: *M. medusae*体系温度优化; B: *M. larici-populina*体系温度优化; C: *M. medusae*体系时间优化; D: *M. larici-populina*体系时间优化 A、B:1~4温度: $61\ ^\circ\text{C}$ 、 $63\ ^\circ\text{C}$ 、 $65\ ^\circ\text{C}$ 、 $67\ ^\circ\text{C}$; C、D: 1~4时间: 30 min, 40 min, 50 min, 60 min; N: 空白对照

Notes: A, Temperature optimization for LAMP system of *M. medusae*; B, Temperature optimization for LAMP system of *M. larici-populina*; C, Time optimization for LAMP system of *M. medusae*; D, Time optimization for LAMP system of *M. larici-populina*; A、B: Tube 1~4 of temperature: $61\ ^\circ\text{C}$, $63\ ^\circ\text{C}$, $65\ ^\circ\text{C}$, $67\ ^\circ\text{C}$; C、D: Tube 1~4 of time: 30 min, 40 min, 50 min, 60 min; N, the blank

图5 反应条件优化

Fig. 5 The optimization of reaction conditions

够保证*M. larici-populina*体系充分反应的时间为40 min、50 min、60 min,最短时间为40 min。

最终得到体系和反应条件如表5所示。

2.5 灵敏度检测

图6-A所示1~7管呈现蓝色为阳性,其余呈紫色为阴性,即将出现颜色分化时对应的最低浓度梯度为 $34\ \text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。图6-B所示1~7管呈现蓝色为阳性,其余呈紫色为阴性,即将出现颜色分化时对应的最低浓度梯度为 $60\ \text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。因此*M. medusae*反应体系灵敏度可达 $34\ \text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,*M. larici-populina*反应体系灵敏度可达 $60\ \text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。

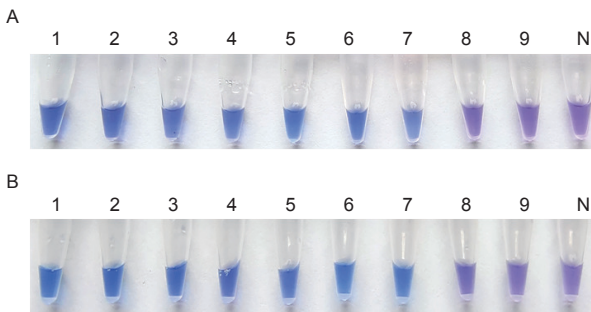
3 讨论

一直以来,松杨栅锈菌和北美栅锈菌引起的杨树叶锈病困扰着杨树产业发展,建立快速的杨树叶锈病分子检测方法在口岸检疫、产地检疫及锈病流行监测等方面具有重要意义。2019年,陆红艳以松杨栅锈菌HMJAU85核糖体RNA基因为靶序列设计了LAMP特异性引物,在试剂盒的基础上建立了基于钙黄绿素- Mn^{2+} 显色的松杨栅锈菌可视化检测体系,在 $65\ ^\circ\text{C}$ 下反应50 min即可观察结果,为青杨锈病的检测提供了重要的技术支持^[23]。但在栅锈菌属的鉴别上,特别是北美栅锈菌的鉴别上,国内外均缺乏相关研究。本研究建立了能够相互区别的北美栅锈菌和松杨栅锈菌的LAMP检测

表 5 最终体系及反应条件

Table 5 Terminal optimization of reaction system and reaction conditions

组分及浓度 Components and Concentrations	体积/ μL Volume	
	<i>M. medusae</i>	<i>M. larici-populina</i>
10 × Buffer	2.5	2.5
Mg^{2+} (100 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.0	0.5
dNTPs (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ each)	3.0	2.5
FIP (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	4.0	3.0
BIP (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	4.0	3.0
F3 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.5	0.5
B3 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.5	0.5
模板 template	1.5	1.5
Bst DNA聚合酶 (8 000 $\text{U}\cdot\text{ml}^{-1}$) Bst DNA polymerase	0.5	0.5
羟基萘酚蓝 (2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) Hydroxynaphthol blue	2.0	2.0
ddH ₂ O	补至25 μL	
反应条件 Reaction conditions	61 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min后80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min Water bath at 61 $^{\circ}\text{C}$ for 30 min followed 80 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min	61 $^{\circ}\text{C}$ 水浴40 min后80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴10 min Water bath at 61 $^{\circ}\text{C}$ for 40 min followed 80 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min



注: A: *M. medusae* 体系灵敏度检测, 1~9 DNA 浓度: 34 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ~340 $\text{ag}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; B: *M. larici-populina* 体系灵敏度检测, 1~9 DNA 浓度: 60 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ~600 $\text{ag}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, N: 空白对照; 注: A: *M. medusae* 体系灵敏度检测, 1~9 DNA 浓度分别为: 34 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 3.4 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 340 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 34 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 3.4 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 340 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 34 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 3.4 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 340 $\text{ag}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; B: *M. larici-populina* 体系灵敏度检测, 1~9 DNA 浓度分别为: 60 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 6 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 600 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 60 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 6 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 600 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 60 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 6 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 600 $\text{ag}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; N: 空白对照

Notes: A, Sensitivity detection for LAMP system of *M. medusae*, tube 1~9 DNA concentration is 34 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 3.4 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 340 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 34 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 3.4 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 340 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 34 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 3.4 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ and 340 $\text{ag}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, respectively; B, Sensitivity detection for LAMP system of *M. larici-populina*, tube 1~9 DNA concentration is 60 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 6 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 600 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 60 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 6 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 600 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 60 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 6 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ and 600 $\text{ag}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, respectively; N, the blank

图 6 LAMP 灵敏度检测

Fig. 6 Sensitivity detection of LAMP

体系并且可以实现对这两种锈菌的鉴定。与陆红艳的研究相比, 本研究中 LAMP 检测的灵敏度略低, 为 60 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 但在显色剂的选择、反应条

件、检测成本 3 个方面均有所改进。首先, 钙黄绿素作为 LAMP 常用显色剂之一, 与 MnCl_2 搭配使用, 二者之间的配比要极为精细才有明显效果, 因此需要深入研究离子配比; 有研究表明, Mn^{2+} 会降低 LAMP 反应效率, 使 Bst DNA 聚合酶的错配率达 0.8%^[10,24], 本研究使用的显色剂为羟基萘酚蓝, 具有颜色区分度好、配置方便, 无需优化离子配比等优势, 且对 LAMP 反应过程无影响; 在配置体系时最后加入 Mg^{2+} 并混匀, 可得到更好的显色效果。其次, 本研究将松杨栅锈菌的检测温度降低至 61 $^{\circ}\text{C}$, 检测时间缩短至 40 min, 在反应温度和时间上得以进一步优化, 也可以降低发生非特异性扩增的概率。最后, 以试剂盒为基础建立的反应体系将导致检测经济成本提高, 本研究通过自配试剂并探索最佳检测体系及反应条件, 在降低检测成本的同时也保证了引物和各组间的高效配合。

具有特异性的有效引物是建立检测体系的关键。LAMP 引物设计难度较高, 引物序列长, 一般需要通过实验检验其特异性。大多数 LAMP 体系建立过程中, 往往先建立好最优体系, 再进行特异性检测。若最终检测结果表明引物无特异性, 则需要重新设计引物, 这会导致人力、物力及时间的浪费。因此本研究将引物特异性检测放至建立体系之前, 先用通用试剂盒建立的稳定体系对引物进行筛选及特异性检测, 若引物不具备特异性, 则可以直

接排除,从而提高了引物筛选效率。

LAMP 因其特异性强、灵敏度高、操作简易而备受关注;同时,LAMP 技术也存在一定的局限性。LAMP 扩增的产物量大,如有操作不慎,极易造成气溶胶污染,导致假阳性结果。有研究表明,建立 UDG-dUTP 反应系统可有效解决气溶胶污染问题,可尝试在本研究建立的体系基础上加入 UDG 酶以及 dUTP,以增强反应特异性^[25]。为了将 LAMP 检测技术应用于现场快速检测,本研究可以结合锈菌夏孢子快速提取 DNA 技术^[26],建立更高效的杨树叶锈病 LAMP 检测技术,为病害的检疫和防控争取更多的主动性。

4 结论

本研究通过环介导等温扩增技术(LAMP)建立了特异性强、灵敏度高的可视化检测体系,实现了北美栅锈菌和松杨栅锈菌快速、准确的鉴定及区分。本研究设计的两组引物可特异性识别相应的靶基因序列。在体系中加入 160 μM 羧基萘酚蓝后可以直观地对供试的病原菌进行鉴别,极大地克服了传统电泳检测的弊端,并且检测体系灵敏度分别达到了 34 fg·μL⁻¹ 和 60 fg·μL⁻¹。基于本研究建立的可视化体系,在 61 °C 恒温条件下,分别反应 30 min 与 40 min 后即可观察结果,可达到快速检测的目的。

参考文献:

- [1] 曾伟生,陈新云,杨学云,等.我国人工杨树生物量建模和生产力分析[J].林业科学,2019,55(11):1-8.
- [2] 何经纬,张伊莹,田呈明,等.区域景观格局对杨树锈病为害流行的影响——以北京延庆地区银白杨为例[J].林业科学,2020,56(4):99-108.
- [3] BOUTIGNY A L, GUINET C, VIALLE A, et al. A sensitive real-time PCR assay for the detection of the two *Melampsora medusae* formae speciales on infected poplar leaves[J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 136(3): 433-441.
- [4] ZHENG W, NEWCOMBE G, HU D, et al. The first record of a north American poplar leaf rust fungus, *Melampsora medusae*, in China[J]. Forests, 2019, 10(2): 182.
- [5] 王云飞,张昊,杨美欣,等.南方镰孢 *Fusarium meridionale* 特异性 PCR 检测方法的建立与应用[J].植物保护,2022,48(2):162-166,172.
- [6] 杨玉文,乔培,刘德华,等.基于多重PCR技术的西瓜噬酸菌分组检测方法及其应用[J].植物保护,2022,48(4):211-219.
- [7] 陈鑫源.木材腐朽菌的DNA提取及PCR检测研究[D].哈尔滨:东北林业大学,2019.
- [8] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers[J]. Molecular and Cellular Probes, 2002, 16(3): 223-229.
- [9] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.
- [10] GOTO M, HONDA E, OGURA A, et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxynaphthol blue[J]. Biotechniques, 2009, 46(3): 167-172.
- [11] ZHOU S, HUANG Q, YU M, et al. Rapid visual detection of *Aeromonas salmonicida* by loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye[J]. Journal of Fish Diseases, 2021, 44(12): 1993-2001.
- [12] LAI M Y, OOI C H, LAU Y L. Validation of SYBR green I based closed-tube loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for diagnosis of *knowlesi malaria*[J]. Malaria Journal, 2021, 20(1): 1-6.
- [13] LIU H, YU H, PENG Z Q, et al. Visual and rapid detection of *Plesiomonas shigelloides* using loop-mediated isothermal amplification method[J]. Letters in Applied Microbiology, 2019, 69(6): 411-416.
- [14] WONG Y, OTHMAN S, LAU Y, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A versatile technique for detection of micro-organisms[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(3): 626-643.
- [15] 连文旭,王萌,张宇,等.橡胶树胶孢炭疽菌复合群lamp检测方法的建立及应用[J].植物病理学报,2022,52(5):841-848.
- [16] 纪睿,曾丹丹,廖太林,等.基于环介导等温扩增技术检测雪松疫霉根腐病菌[J].植物检疫,2017,31(1):42-47.
- [17] SAITO Y, MATSUI A, MICHYUKI S, et al. Loop-Mediated isothermal amplification as Point-of-Care testing for EGFR-Mutated lung adenocarcinoma[J]. Micromachines, 2022, 13(6): 897.
- [18] ZHU H H, LI Y, WU L X, et al. Internal heating method of loop-mediated isothermal amplification for detection of HPV-6 DNA[J]. Mikrochimica Acta, 2022, 189(5): 212.
- [19] YASUHARA-BELL J, MARRERO G, De SILVA A, et al. Specific detection of *Pectobacterium carotovorum* by loop-mediated isothermal amplification[J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(9): 1499-1505.
- [20] REN J, ZHU Y, RAN C, et al. Development of a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of strawberry crinkle virus[J]. Journal of Phytopathology, 2021, 169(11-12): 733-739.
- [21] CHEN Y, LI H, YANG L, et al. Rapid detection of *Clostridium botulinum* in food using Loop-Mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(9): 4401.
- [22] SHANG Y, YE Q, CAI S, et al. Loop-mediated isothermal ampli-

fication (LAMP) for rapid detection of *Salmonella* in foods based on new molecular targets[J]. *LWT-food science and technology*, 2021, 142: 110999.

- [23] 陆红艳. 五种杨树病害病原的lamp检测技术研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2019.
- [24] 廖 红, 陆 剑, 刘选明, 等. Mn^{2+} 驱动的不同长度DNA片段

PCR随机突变研究[J]. *湖南大学学报(自然科学版)*, 2013, 40(6): 92-95.

- [25] 徐敬潇. 印第安纳沙门菌快速检测方法的建立[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020.
- [26] 余仲东, 高爱琴, 曹支敏. 锈菌夏孢子DNA的微量快速提取方法[J]. *生物技术通讯*, 2005, 16(1): 48-50.

Establishment of a Visual Detection System for *Melampsora medusae* and *Melampsora larici-populina*

LAN Yan, NONG Hua-ping, PENG Zi-jia, LU Ying, LI Kun-peng, XU Yong, YU Zhong-dong

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract: [Objective] To achieve the rapid and effective differentiation and identification of *M. medusae* and *M. larici-populina*. [Methods] In this study, several sets of primers for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) were designed based on the 28S ribosomal DNA gene of the two rust fungi. The putative primers selected from experiments were employed for LAMP reactions, and for the specific detection with the controls of genomic DNA from *M. medusae*, *M. larici-populina*, *Sawadaia tulasnei*, *Erysiphe paeoniae*, *Gymnosporangium asiaticum*, *Morchella esculenta* and *Flammulina velutipes*. The initial LAMP reaction system was established firstly and then the reaction system components and reaction conditions were further optimized. Hydroxynaphthol blue dye (HNB) was supplied into the reaction system to realize visual detection. Finally the sensitivity of the detection system was determined by the lowest DNA substrate. [Results] The results showed that the selected primers had specificity-species. The optimal Mg^{2+} concentration in the 25 μ L LAMP detection system for *M. medusae* was 6 $mmol \cdot L^{-1}$, the optimal internal and external primer ratio was 8:1, and the optimal dNTPs concentration was 1.2 $mmol \cdot L^{-1}$. Meanwhile, the correspondent case for *M. larici-populina* was 4 $mmol \cdot L^{-1}$, 6:1 and 1 $mmol \cdot L^{-1}$. And all reaction products could be clearly detected with 160 μ M hydroxynaphthol blue dye (HNB). The two rusts detection system can be visually determined at 61 $^{\circ}C$ for 30 min and 40 min, respectively, each corresponding to the lowest DNA substrate concentration of 34 $fg \cdot \mu L^{-1}$ and 60 $fg \cdot \mu L^{-1}$. [Conclusion] Through establishing a visual LAMP-HNB detection system, *M. medusae* and *M. larici-populina* can be differentiated and identified by the LAMP technology. This study provides a technological support in practice for rapid identification and detection of the important poplar rust diseases.

Keywords: Poplar; *M. medusae*; *M. larici-populina*; LAMP; Hydroxynaphthol blue dye

(责任编辑: 崔 贝)