

一种快速检测桉树焦枯病菌(*Cylindrocladium scoparium*) 的 LAMP 体系的建立及应用

张静 麻文建 朱天辉*

(四川农业大学 林学院 四川 雅安 625014)

摘要:【目的】建立桉树焦枯病快速有效的环介导等温扩增反应 LAMP 检测技术。【方法】以桉树焦枯病原菌 *Cylindrocladium scoparium* 为研究对象, 利用 Primer Explorer V4.0 设计软件, 针对 *C. scoparium* 的 Beta-tubulin gene 特异保守区域设计了一套 LAMP 特异性引物组(内引物 FIP/BIP, 外引物 F3/B3, 环引物 LooPF/LooPB), 优化并建立了桉树焦枯病原菌的 LAMP 快速检测体系。【结果】LAMP 反应体系为(50 μ L): *Bst* DNA polymerase (8 U) 1 μ L; 甜菜碱溶液(5 mol/L) 3.0 μ L; dNTPs (2.5 mmol/L) 3.5 μ L; 10 \times Thermopol II 2.5 μ L; MgCl₂ (100 mmol/L) 2 μ L; FIP/BIP (40 μ mol/L)各 1 μ L; F3/B3 (10 μ mol/L)各 0.5 μ L; LooPF/LooPB (10 μ mol/L)各 1 μ L; DNA 模板 2 μ L; 用 ddH₂O 补足体积至 50 μ L。反应程序为: 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 45 min, 90 $^{\circ}$ C 灭活 5 min 结束反应。特异性检测结果显示, 供试的 12 个样本菌株 LAMP 产物可以采用肉眼观察、紫外灯照射、添加荧光染料 SYBR Green I 以及电泳检测条带 4 种不同的形式予以区分。DNA 灵敏度检测结果显示, 建立的 LAMP 体系检测灵敏度可达到 40 μ g/L, 完全符合田间检测的要求。野外田间时效检测结果显示, 无论是利用紫外检测还是电泳检测均可成功地检测出各地区不同生理小种的桉树焦枯病原菌 *C. scoparium*, 且检测效果明显。【结论】该 LAMP 检测是一项能够作为野外基层田间检测的重要技术。

关键词: 桉树, 焦枯病原菌, 环介导等温扩增反应(LAMP), 快速检测, 早期诊断

Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Cylindrocladium scoparium* on Eucalyptus

ZHANG Jing MA Wen-Jian ZHU Tian-Hui*

(College of Forestry, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: [Objective] To establish a rapid detection technology LAMP for Eucalyptus dieback. [Methods] The pathogen against on Eucalyptus was studied. Based on the species-specific conserved region of beta-tubulin gene on *Cylindrocladium scoparium*, a set of primers (inner primer: FIP/BIP, outer primer: F3/B3, Loop primers: LooPF/LooPB) were designed, a LAMP assay for rapid detection of *C. scoparium* was developed, evaluated and optimized. [Results] The LAMP reaction system (50 μ L) consisted of *Bst* DNA polymerase (8 U) 1 μ L, Betaine solution (5 mol/L) 3.0 μ L, dNTPs

*通讯作者: Tel: 86-835-2883050; 信箱: zhuth1227@126.com

收稿日期: 2014-07-11; 接受日期: 2014-09-11; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-12-26

(2.5 mmol/L) 3.5 μ L, 10 \times Thermopool II 2.5 μ L, MgCl₂ (100 mmol/L) 2 μ L, FIP/BIP (40 μ mol/L) 1 μ L, F3/B3 (10 μ mol/L) 0.5 μ L, LooPF/LooPB (10 μ mol/L) 1 μ L, DNA template 2 μ L, with ddH₂O up to the volume of 50 μ L. Response procedures acted as the mixture was in 65 °C water bath pot for about 45 min first, and then inactivated 5 min under the 90 °C to end of reaction. Specificity assays showed that the amplification results of 12 test isolates can be distinguished though visual inspection, ultraviolet light, added fluorescent dye SYBR Green I, and electrophoresis test strip, and the 4 pathogens were positive, and that of the other 8 pathogens were negative. The detection limit of LAMP was 40 pg pure genomic DNA per 50 μ L reaction, which fits entirely in the field test. The wild field effectiveness showed that the different physiological small kinds different regions of *C. scoparium* can be detected with the method of LAMP, meanwhile the ultraviolet light and electrophoresis test strip were significantly. **[Conclusion]** Summing up the above, the LAMP rapid detection can be applied in filed effectively.

Keywords: Eucalyptus, *Cylindrocladium scoparium*, Loop-mediated isothermal amplification, Rapid detection, Early diagnosis

桉树(*Eucalyptus* spp.)别称尤加利树, 是桃金娘科(Myrtaceae)桉树属(*Eucalyptus*)植物的总称, 同时是世界著名的用材林树种和速生树种, 与杨树、松树并称为林业上的三大速生造林树种^[1-2]。桉树具有生长周期短、易存活、适生范围广、轮伐期短、用途多样化等优点, 在我国秦岭淮河以南地区被大规模的引种和栽培, 尤其以四川、云南、广东、广西、福建、湖南、贵州为主要栽培区^[3-4]。桉树在我国西南、东南、长江中下游等地区的生态环境建设以及解决生物能源问题中发挥着不可替代的作用, 具有重要的经济、社会、生态效益^[5]。目前世界范围内有关桉树叶部真菌性病害的报道较多, 其中由半知菌亚门(Deuteromycotina)、丝孢纲(Hyphomycetes)、丝孢目(Hyphomycetales)、丝孢科(Hyphomycetaceae)、帚梗柱孢属真菌 *Cylindrocladium quinqueseptatum* 和 *C. scoparium* 两个种引起的桉树焦枯病为害最为严重^[6]。桉树焦枯病主要为害桉树苗木和四年生以下幼树, 受焦枯病病原菌侵扰的桉树种植区, 轻者造成植株叶片脱落, 苗圃与幼林落叶枯稍、枝条萎蔫; 重者则会出现感病苗木叶片全部脱落、顶枯、植株枝条全部枯死等现象^[7]。桉树焦枯病目前已被定义为一种世界性病害, 其分布范围十分广泛, 严重威胁着澳大利亚、美国、中国、巴西、日本、印度尼西亚、泰国、越南等几十个桉树种植较为密集的国家^[8]。鉴于该病害的严重性及分布的局部性,

原林业部于 1996 年 1 月 5 日把它列入国内森林植物检疫对象。

加强检疫是防止该病害流行和暴发的重要手段^[9]。迄今为止, 国内外对桉树焦枯病的检疫主要依靠病原形态、病害特征等来判断, 这些方法费时且难以识别潜伏期病害, 在一定程度上会贻误病害的早期诊断和防治^[10]。因此, 建立快速、准确和高效率的桉树焦枯病害的检测方法对桉树焦枯病的早期诊断和有效防治十分必要。LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 又称“环介导等温扩增反应”, 是日本学者 Notomi 等发明的一种新型、快速、简便的核酸扩增方法, 其原理是利用一种链置换 DNA 聚合酶在恒温条件(一般在 60–65 °C 之间)反应 30–80 min, 即可实现核酸的快速扩增^[11-12]。与常规的 PCR 反应相比, LAMP 具有操作简便, 成本低、易识别、灵敏度高等优点, 因此建立桉树焦枯病原菌的 LAMP 反应体系对桉树焦枯病的诊断意义重大。本实验以引起四川桉树焦枯病的病原菌(*C. scoparium*)为靶生物, 旨在建立一种快速有效的桉树焦枯病原菌的 LAMP 反应体系, 并对其田间野外进行时效检测应用, 为桉树焦枯病的早期诊断和提前防治提供重要的技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

LAMP 反应试剂: 8 U *Bst* DNA polymerase,

NEB, 英国; 5 mol/L 甜菜碱溶液, Sigma, 美国; 2.5 mmol/L 的 dNTPs、硫酸镁、硫酸铵、氯化钾、Tris 碱、脱氧核苷三磷酸, 天根生化科技有限公司, 北京; SYBR Green I, Sigma, 美国; 100 mmol/L MgCl₂、10×Thermopol II、200 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L (NH₄)₂SO₄、100 mmol/L MgCl₂、1% Triton X-100 (pH 8.8), NEB, 英国。

1.2 方法

1.2.1 供试菌株的选择及菌丝体的培养: 实验所选用的供试菌株主要为从不同发病地区病株上分离得到的病原菌和非病原菌, 以及实验室保存的同属菌株。供试菌株名称、寄主、来源、数量详见表 1。将菌株接种在 PDA^[13] 平板, 28 °C 培养 5 d, 使用打孔器取直径为 5 mm 的菌饼分别转接至含有 200 mL 马铃薯-葡萄糖液体(PDB^[13])的锥形瓶中, 置于 28 °C 摇床振荡(转速 140 r/min)培养 8 d。用灭菌纱布过滤菌丝体后, 收集菌丝, 灭菌蒸馏水冲洗 3 次, 冷冻干燥, 存入灭菌 EP 管中于 -20 °C 备用。

1.2.2 供试菌株 DNA 提取: 供试菌丝 DNA 的提取: 菌丝基因组 DNA 的提取主要参照天根植物基因组 DNA 提取试剂盒(Plant Genomic DNA Extraction Kit)

的操作步骤, 具体可参照韩振云等^[13]的方法。取 30 mg 冷冻干燥的供试菌丝于研钵中, 加液氮后迅速研磨, 至菌丝呈白色粉末状; 后快速转移至 2 mL 离心管中, 加 1 mL 预热的 Lysis Buffer 混合均匀, 置于 65 °C 水浴锅中保温 1 h 左右; 于 12 000 r/min、4 °C 离心 10 min, 取上清液, 加入等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇=25:24:1 (体积比)混合有机溶剂, 于 12 000 r/min、4 °C 再次离心 10 min, 取上清液; 重复操作上述步骤 2 次; 最后加入 2 倍体积的预冷无水乙醇和 1/10 体积 3 mol/L 的醋酸钠溶液, -20 °C 沉淀 1 h 后于 12 000 r/min、4 °C 再次离心 10 min, 弃上清液; 75% 的酒精冲洗 3 次, 待晾干后加入 25 μL ddH₂O 溶解沉淀; 加入 100 μL TE (10 mmol/L Tris, 1 mmol/L EDTA) 稀释 DNA; 吸取 5 μL 的 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度, 其余 DNA 样品置于 -20 °C 备用。

样品组织 DNA 的提取: 在焦枯病发病期分别将从桉树栽培园区内采集的健康和发病的叶片组织用刀切成 2 cm×2 cm 大小的样块, 75% 酒精消毒后用蒸馏水冲洗 3 次, 晾干, 称取 100 mg 已处理过的新鲜发病叶片置于研钵中用液氮研磨成粉末, 进行 DNA 的提取, 后续提取步骤同上。

表 1 桉树焦枯病菌及其他参试菌株
Table 1 Tested strains and its sources

编号 Strain No.	菌种 Strain name	寄主 Host	来源 Locality	数量 Number of isolates
1	<i>C. scoparium</i>	<i>Eucalyptus</i>	攀枝花(Panzhihua)	1
2	<i>C. scoparium</i>	<i>Eucalyptus</i>	广元(Guangyuan)	1
3	<i>C. scoparium</i>	<i>Eucalyptus</i>	雅安(Ya'an)	1
4	<i>C. scoparium</i>	<i>Eucalyptus</i>	乐山(Leshan)	1
5	<i>C. ilicicola</i>	<i>Castanea mollissima</i>	实验室保存	1
6	<i>C. canadense</i>	Unknown	实验室保存	1
7	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>Eucalyptus</i>	攀枝花(Panzhihua)	1
8	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Eucalyptus</i>	雅安(Ya'an)	1
9	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	<i>Eucalyptus</i>	乐山(Leshan)	1
10	<i>Alternaria</i> sp.	<i>Eucalyptus</i>	雅安(Ya'an)	1
11	<i>Biscogniauxia</i> sp.	<i>Eucalyptus</i>	攀枝花(Panzhihua)	1
12	<i>Trichaptum</i> sp.	<i>Eucalyptus</i>	攀枝花(Panzhihua)	1

1.2.3 特异性引物的设计与合成: 利用 *Cylindrocladium* 属真菌 Beta-tubulin gene 区通用引物^[14-15] BT-T1-S (5'-AACATGCGTGAGATTGTAA GT-3')和 BT-CYLTUBIR-A (5'-AGTTGTCGGGAC GGAAGAG-3')对 *C. scoparium* 及所有参试真菌进行常规 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): 10 \times PCR buffer (100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 500 mmol/L KCl) 5.0 μ L, 25 mmol/L 的 MgCl₂ 3 μ L, 10 mmol/L dNTPs 1.5 μ L, 10 μ mol/L 的引物 BT-T1-S/BT-CYLTUBIR-A 各 1.5 μ L, *Taq* 酶(5 U/ μ L) 0.3 μ L, 模板 DNA 4.0 μ L, 加灭菌 ddH₂O 补足体积至 50 μ L, 同时以加 ddH₂O 代替 DNA 模板组做阴性对照。反应混合液于 Mastercycler Personal PCR 仪(Eppendorf)上进行扩增, 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 4 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s, 54 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 8 min。反应结束后, 取 5 μ L 样品于 1.5%琼脂糖凝胶中电泳 28 min (120 V), 经 EB 染色后, 在凝胶成像系统上观察并拍照。

PCR 产物送往上海生工生物工程公司进行测序。根据测序结果, 结合 GenBank 中已知 *Cylindrocladium* 属菌株的 Beta-tubulin gene 区序列, 先利用 MEGA 5.0 软件对 *Cylindrocladium* 属真菌 Beta-tubulin gene 进行差异性比较, 并建立该属菌株的系统发育树。比对后利用 LAMP 在线软件 4.0 (<https://primerexplorer.jp/e/>)其 β 微管蛋白保守区进行按树焦枯病菌 LAMP 特异性引物组的设计, 通过基因库 BLAST 比对验证引物的特异性。引物序列组如表 2 所示。

1.2.4 LAMP 反应体系的建立及优化: 用设计好的 LAMP 特异性引物组, 分别以供试菌株作为模板进行 LAMP 反应, 同时以加入等量 ddH₂O 作模板扩增作为阴性对照, 对 LAMP 反应体系和反应温度、时间进行优化, 最后对反应产物于 90 $^{\circ}$ C 灭活 5 min 结束反应。反应产物经 2%琼脂糖凝胶电泳(120 V) 45 min, 拍照观察, 以电泳检测最亮条带下的反应条件作为最佳反应体系。

表 2 LAMP 引物序列组
Table 2 The set of LAMP primers

引物名称 Primers	引物序列 Sequences (5'→3')
F3	CTCGACAGCAATGGTGTCT
B3	GCTCAAGATCGACGAGGAC
FIP	TGCGCGCTCTTCGCTACATACACAACGG TACCTCCGACC
BIP	CGCTCACCTGCGAGAAACAGCGCGAGG AACATACTGT
LooPF	GGAGCGCATGAACGTCTAC
LooPB	GATAGTGTGAGTGTATTATTC

1.2.5 LAMP 反应结果的判断: (1) 肉眼观察。判断反应结果进行肉眼观察即可, 若发生特异性扩增反应则反应液将变为白色浑浊(白色浑浊即为阳性, 否则阴性), 而对照组应无沉淀产生。(2) 紫外灯照射观察。紫外灯照射反应液, 若发生反应则可以看到白色浑浊液体, 实质上是发生扩增反应后生产的焦磷酸物质, 而对照组和参试菌不会产生焦磷酸物质, 紫外照射下应该没有发生变化。(3) 添加荧光染料 SYBR Green I。在扩增产物中加入 SYBR Green I 荧光染料观察颜色变化, 反应液颜色由橙色变成绿色为阳性, 否则颜色保持不变。(4) 电泳检测条带。LAMP 反应结束后, 扩增结束后取 5.0 μ L PCR 产物上样于含 0.5 mg/L EB 的 2%琼脂糖凝胶上电泳, 电压为 8.5 V/cm、时间为 40 min, 在凝胶成像系统上检测并拍照。观察是否产生特征性梯状或瀑布型电泳条带, 以证实是否发生了 LAMP 扩增反应。

1.2.6 DNA 灵敏度检测: 分别稀释按树焦枯病原菌 *C. scoparium* 基因组 DNA 到 400 mg/L、40 mg/L、4 mg/L、400 μ g/L、40 μ g/L、4 μ g/L 浓度梯度, 用于 LAMP 灵敏度检测。LAMP 反应体系和反应程序同 1.2.3 所述。

1.2.7 野外田间时效检测: 分别对乐山、攀枝花、雅安、广元、新津、资阳 6 个地区的按树栽培园区内的疑似按树焦枯病进行采样, 按照发病组织 DNA 提取方法提取 DNA 后, 照所述方法进行 LAMP 扩增, 同时以加 ddH₂O 代替 DNA 模板组和健康组作阴性对照。采用紫外灯照射和电泳检测判断反应

结果。

2 结果与分析

2.1 *Cylindrocladium* 属真菌系统发育树的构建

利用软件 MEGA 5.0 对 *Cylindrocladium* 属真菌进行以 Beta-tubulin gene 为参照的系统发育树构建, 结果如图 1 所示, 表明 *Cylindrocladium scoparium* 在 Beta-tubulin 上与其他种差异明显, 而其他各种间差异较小, 因此选取 *Cylindrocladium scoparium* 在 Beta-tubulin 基因上特异性极强的片段进行 LAMP 特异性引物组的设计具有重要的理论价值。

2.2 Beta-tubulin gene 区通用引物 PCR 扩增结果

利用 *Cylindrocladium* 属真菌 Beta-tubulin gene 区通用引物 BT-T1-S (5'-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3') 和 BT-CYLTUBIR-A (5'-AGTTGTCGGGACGGAAGAG-3') 对 *C. scoparium* 及所有参试真菌进行常规 PCR 扩增结果显示: BT-T1-S/BT-CYLTUBIR-A 能从桉树焦枯病原菌 *C. scoparium* 及

其他参试菌株中扩增出一条 500 bp 左右的条带, 而空白对照无条带(图 2), 表明所有菌株 DNA 均得到成功提取, 可以用于后续 PCR 扩增。应用软件 MEGA 5.0 对桉树焦枯病原菌 *C. scoparium* 的 Beta-tubulin gene 区碱基比对分析, 结果表明攀枝花、广元、乐山、雅安 4 个地区的 *C. scoparium* 病原菌 Beta-tubulin gene 区序列并无差异, 同源率 100%。

2.3 LAMP 反应体系的建立

当反应体系总体积设置为 50 μ L 时, 按照单因素原则对各组分进行预先条件优化, 优化后的各组分的含量如表 3 所示。优化的最佳反应时间为 45 min, 反应温度为 65 $^{\circ}$ C。桉树焦枯病原菌快速 LAMP 快速检测的反应程序为: 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中反应 45 min, 90 $^{\circ}$ C 灭活 5 min 结束反应。

2.4 特异性反应结果的判断

2.4.1 肉眼观察: 肉眼初步判断结果显示 *C. scoparium* 病原菌反应结束后可以看到白色浑浊液体, 实质上是发生扩增反应后生产的焦磷酸物质, 而对照组和参试菌没有发生变化(图 3)。

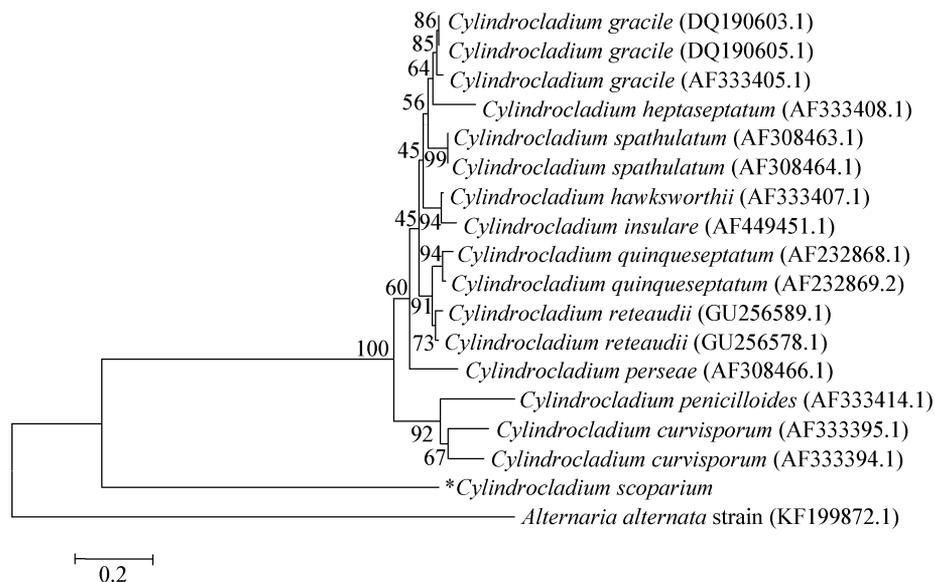


图 1 *Cylindrocladium* 属菌株在 Beta-tubulin 上的系统发育树

Figure 1 The phylogenetic tree of *Cylindrocladium* genus on its beta-tubulin gene

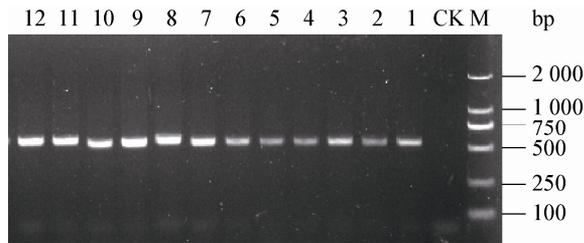


图2 PCR通用引物BT-T1-S/BT-CYLUBIR-A扩增反应结果

Figure 2 The results of PCR amplification using universal primers BT-T1-S/BT-CYLUBIR-A

注: M: DL2000 marker; 1-12: 通用引物 BT-T1-S/BT-CYLUBIR-A 对表 1 中所对应的供试菌株 DNA 溶液 PCR 扩增; CK: 阴性对照。

Note: M: DL2000 marker; 1-12: The strain numbers in table 1 for PCR amplification using universal primers BT-T1-S/BT-CYLUBIR-A; CK: Negative control.

表3 LAMP反应体系
Table 3 Reaction system of LAMP

成分 Component	浓度 Concentration (mmol/L)	体积 Volume (μ L)
10 \times Thermopol II		2.5
MgCl ₂	100.000	2.0
dNTPs	2.500	3.5
甜菜碱 Betaine	5.000	3.0
ddH ₂ O		32.0
Inner primers FIP/BIP	0.040	上下各 1.0
Outer primers F3/B3	0.010	上下各 0.5
Loop primers LooPF/LooPB	0.010	各 1.0
<i>Bst</i> DNA polymerase	8 U	1.0
DNA template		2.0

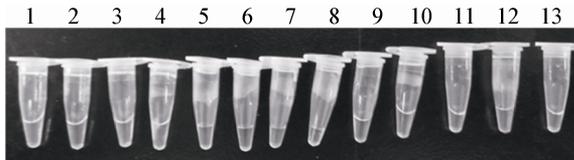


图3 LAMP肉眼检查结果

Figure 3 Visual inspection results of LAMP

注: 1-4: 病原菌; 5-12: 分别为表 1 中所对应参试菌; 13: 阴性对照。

Note: 1-4: *C. scoparium*; 5-12: Numbers as the strain numbers in table 1; 13: Negative control.

2.4.2 紫外灯照射观察: 紫外灯照射反应液结果显示(图 4): *C. scoparium* 病原菌反应结束后在紫外灯照射下可以明显的看到白色浑浊, 而对照组和参试菌没有发生变化。此外, 紫外照射下的白色浑浊现象较肉眼观察更为明显。

2.4.3 添加荧光染料 SYBR Green I: 添加荧光染料 SYBR Green I 结果显示 *C. scoparium* 病原菌反应结束后可以看到淡绿色液体, 而对照组和参试菌没有发生变化, 其颜色为 SYBR Green I 本身颜色(图 5)。

2.4.4 电泳检测条带: 电泳检测结果显示(图 6): 病原菌组均产生瀑布形特征条带, 且进一步对反应产物进行酶切结果分析, 经 DNAMAN 分析软件分析, 最终的扩增产物可被 *TAP* I 切成短小片段。酶切反应体系为: *TAP* I 1 μ L, 10 \times *TAP* I basal buffer 2 μ L, 0.1% BSA 2 μ L, LAMP 反应产物 1 μ L, 灭菌水补充至 20 μ L, 65 $^{\circ}$ C 反应 2 h。将反应后的产物送至上海生工生物工程有限公司测序, 得到大小 191 bp

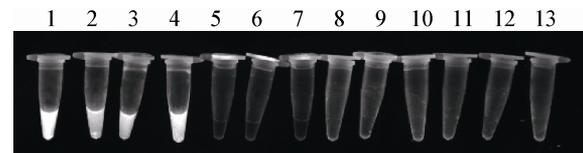


图4 LAMP紫外灯照射下检查结果

Figure 4 The results of LAMP in ultraviolet light

注: 1-4: 病原菌; 5-12: 分别为表 1 中所对应参试菌; 13: 阴性对照。

Note: 1-4: *C. scoparium*; 5-12: Numbers as the strain numbers in table 1; 13: Negative control.

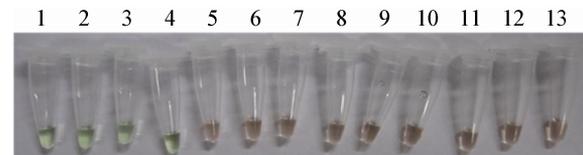


图5 添加荧光染料 SYBR Green I 检查结果

Figure 5 The results of added fluorochrome SYBR Green I

注: 1-4: 病原菌; 5-12: 分别为表 1 中所对应参试菌; 13: 阴性对照。

Note: 1-4: *C. scoparium*; 5-12: Numbers as the strain numbers in table 1; 13: Negative control.

和 89 bp 大小的两条片段, 与理论推导值相吻合, 进一步说明检测成功。

2.5 LAMP 反应 DNA 敏感度

LAMP 扩增桉树焦枯病原菌 *C. scoparium* 灵敏度结果(图 7); 按照已优化的 LAMP 反应体系和程序, 结果显示 LAMP 具有较高检测灵敏度, 可达到 40 $\mu\text{g/L}$, 完全符合田间检测的要求。

2.6 LAMP 野外田间时效

用 LAMP 试剂盒分别对乐山、攀枝花、雅安、广元、新津、资阳 6 个地区的桉树栽培园区内的疑似桉树焦枯病进行采样, 参照 1、2、7 所述方法进行 LAMP 扩增。采用紫外灯照射和电泳检测判断反应结果如图 8、9 所示。检测结果显示, 无论是利

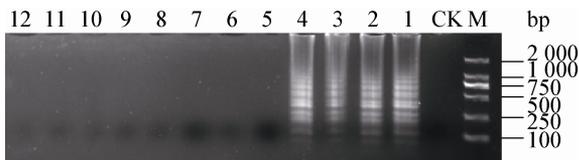


图 6 电泳检查结果

Figure 6 The results of electrophoresis

注: M: DL2000 marker; 1-4: 病原菌; 5-12: 分别为表 1 中所对应参试菌; CK: 阴性对照。

Note: M: DL2000 marker; 1-4: *C. scoparium*; 5-12: Numbers as the strain numbers in table 1; CK: Negative control.

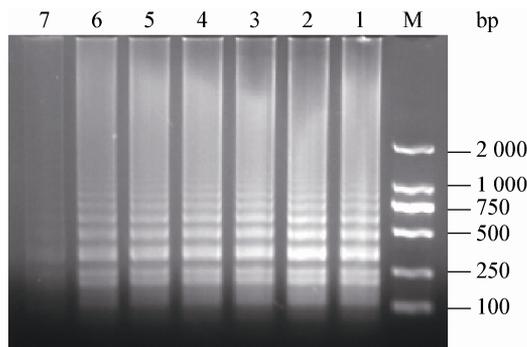


图 7 灵敏度电泳检查结果

Figure 7 Sensitivity detection of PCR

注: M: DL2000 marker; 1-7: 桉树焦枯病原菌 *C. scoparium* 基因组 DNA 浓度分别为 400 mg/L、40 mg/L、4 mg/L、400 $\mu\text{g/L}$ 、40 $\mu\text{g/L}$ 、4 $\mu\text{g/L}$ 。

Note: M: DL2000 marker; 1-7: Different quantity of DNA are 400 mg/L, 40 mg/L, 4 mg/L, 400 $\mu\text{g/L}$, 40 $\mu\text{g/L}$, 4 $\mu\text{g/L}$.

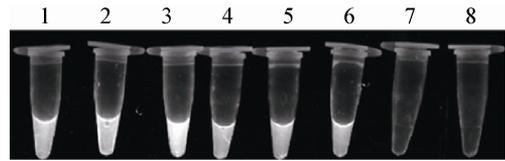


图 8 紫外灯照射检查结果

Figure 8 The results of ultraviolet light

注: M: DL2000 marker; 1-6: 分别为乐山、攀枝花、雅安、广元、新津、资阳 6 个地区的桉树焦枯病组织样品; 7: 健康组织样品; 8: 阴性对照。

Note: M: DL2000 marker; 1-6: The tissue samples were from Leshan, Panzihua, Ya'an, Guangyuan, Xinjin, Ziyang; 7: Healthy tissues; 8: Negative control (ddH₂O).

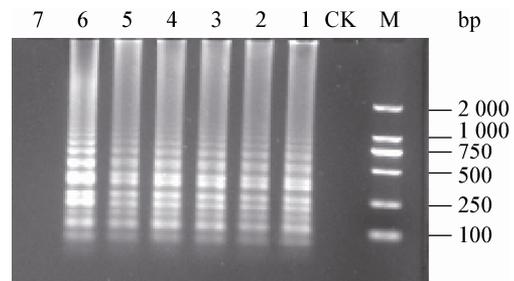


图 9 电泳检查结果

Figure 9 The results of electrophoresis

注: M: DL2000 marker; 1-6: 分别为乐山、攀枝花、雅安、广元、新津、资阳 6 个地区的桉树焦枯病组织样品; 7: 健康组织样品; CK: 阴性对照。

Note: M: DL2000 marker; 1-6: The Tissue samples were from Leshan, Panzihua, Ya'an, Guangyuan, Xinjin, Chongqing, Ziyang; 7: Healthy tissues; CK: Negative control (ddH₂O).

用紫外检测还是电泳检测均可成功地检测出各地区不同生理小种的桉树焦枯病原菌 *C. scoparium*, 且检测效果明显。此外, 再次通过对反应产物条带进行酶切分析, 经 DNAMAN 分析软件处理, 并将反应后的产物送至上海生工生物工程有限公司测序, 成功得到 191 bp 和 89 bp 的两条片段, 与前面理论推导值相吻合, 进一步说明桉树焦枯病原菌 *C. scoparium* 的 LAMP 检测体系构建成功, 可用于田间样品检测。

3 结论与讨论

近年来, 国内外分子生物学快速检测技术发展迅速, PCR 技术及基于 PCR 的检测方法快速、准

确、灵敏,在植物病害的检测上发挥着不可替代的作用^[16]。LAMP作为一种操作更为简便、灵敏度较高、实践性较强的快速扩增技术,也被越来越多的学者所认可,不同于常规PCR技术,LAMP对特异性引物组的要求更严格,而特异强的靶基因序列是LAMP反应引物组设计的关键因子^[17]。本实验前期分别对*C. scoparium*及其NCBI中同属菌株的核糖体内转录间隔区ITS1区和ITS2区、18S和28S基因、Beta-tubulin、Translation elongation factor 1-alpha (tef1)基因进行比对,得到*C. scoparium*与其同属菌株在28S、18S、tef1上的同源性较高,相似度达到95%以上,即无法作为LAMP特异性引物组设计的靶基因;而该病原菌在Beta-tubulin上与其他菌株差异明显,因此选择Beta-tubulin作为桉树焦枯病原菌LAMP检测的靶基因进行特异性引物组的设计。利用DNAMAN对*C. scoparium*的Beta-tubulin基因的保守区域进行分析,利用Primer Explorer V 4.0在线设计软件,设计出一套LAMP特异性引物组,并将设计出的引物对内引物FIP/BIP、外引物F3/B3、环引物LooPF/LooPB输入到Primer 6.0和Oligo 4.0软件进行特异性检验,得到该引物组具有较高的特异性,且满足引物设计的基本特性。

优化的LAMP反应体系是特异性检测成功的前提^[18]。优化的反应体系不仅可以提高模板DNA的扩增效率,同时也能够大大降低非特异性扩增的几率。LAMP反应体系中的每组成分对反应的发生具有特异功能,例如: Mg^{2+} 是催化酶反应的催化剂,同时与焦磷酸沉淀的产生密切相关,其浓度直接影响实验结果的肉眼观察结果;dNTPs是肉眼观测的基础物质;适当的引物浓度比是反应的前提保障;适合的反应温度和反应时间是反应产物量的关键因素等^[19]。本实验优化后的反应程序和反应条件能够扩增出明亮的梯形条带,并通过4种检测方法均可以有效地检测反应的有无,这为实践生产提供了强有力的可操作性。

桉树焦枯病作为一种世界性病害,严重威胁着桉树材积量的生产和桉树的林业生产建设,因此对

于桉树焦枯病的早期诊断迫在眉睫^[20]。常规的病原检测主要依靠形态学观察及生理指标测定分析,存在耗时、繁琐、需要较高的专业技术知识等弊端,甚至往往会出现判断错误的情况^[21]。目前,对于病原菌的快速检测技术主要有:常规PCR、巢式PCR、多重PCR、荧光定量PCR技术、以及LAMP检测。贾蒙鹭等^[22]的研究结果表明,基于环式等温扩增的病原菌快速检测方法与基于PCR的检测技术相比具有更高的灵敏度和视觉判断性,而LAMP作为一种新型的快速检测技术,弥补了传统病原鉴定的多方面不足,做到了可视性观测反应结果,具有操作方便、经济廉价等优势,使得桉树焦枯病的实际实地应用成为可能。LAMP快速检测桉树焦枯病原菌体系的成功建立,为桉树焦枯病的早期诊断提供了可靠的技术支持,同时为林业生产上其他真菌性林木病害的快速、高效、实时检测提供了重要的参考价值。

参考文献

- [1] Coble AP, Autio A, Cavaleri MA, et al. Converging patterns of vertical variability in leaf morphology and nitrogen across seven *Eucalyptus* plantations in Brazil and Hawaii, USA[J]. *Trees*, 2014, 28(1): 1-15
- [2] Martorell S, Diaz-espejo A, Medrano H, et al. Rapid hydraulic recovery in *Eucalyptus pauciflora* after drought: linkages between stem hydraulics and leaf gas exchange[J]. *Plant, Cell & Environment*, 2014, 37(3): 617-626
- [3] Liang RL, Jiang H, Su SX, et al. Afforestation trial of local broad-leaved species in low mountains of southern Guangxi[J]. *Guangxi Forestry Science*, 2014, 43(1): 126-129 (in Chinese)
梁瑞龙, 蒋虎, 苏树祥, 等. 广西南部低山区乡土阔叶树种造林试验[J]. *广西林业科学*, 2014, 43(1): 126-129
- [4] Xu DP, Zhang NN. Study development of ecological effect of eucalyptus plantation[J]. *Guangxi Forestry Science*, 2007, 35(4): 179-187 (in Chinese)
徐大平, 张宁南. 桉树人工林生态效应研究进展[J]. *广西林业科学*, 2007, 35(4): 179-187
- [5] Yang MS, Wu ZH, Chen SX. Ecological effect of eucalyptus forest and its ecological forest management[J]. *Eucalypt Science & Technology*, 2006, 23(1): 32-39 (in Chinese)
杨民胜, 吴志华, 陈少雄. 桉树的生态效益及其生态林经营[J]. *桉树科技*, 2006, 23(1): 32-39
- [6] Cooper JA. New species and combinations of some New Zealand agarics belonging to *Clitopilus*, *Lyophyllum*, *Gerhardtia*, *Clitocybe*, *Hydnangium*, *Mycena*, *Rhodocollybia* and *Gerronema*[J]. *Mycosphere*, 2014, 5(2): 263-288
- [7] Schoenlein-Crusius IH, Moreira CG, Takahashi JP, et al.

- Richness of ingoldian and facultative aquatic fungi in Parque Municipal do Ibirapuera, São Paulo, Brazil[J]. *Hoehnea*, 2014, 41(1): 61-76
- [8] Davis RA, Valentine LE, Craig MD, et al. Impact of *Phytophthora* dieback on birds in Banksia woodlands in south west Western Australia[J]. *Biological Conservation*, 2014, 171: 136-144
- [9] Liu JJ. Current status and perspective on forest pests control in China[J]. *Beijing Agriculture*, 2014, 6: 84 (in Chinese)
刘建军. 中国森林病虫害防治现状与展望[J]. *北京农业*, 2014, 6: 84
- [10] Schaad NW, Jones JB, Chun W, et al. Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria[M]. Minnesota: APS Press, 2001
- [11] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63-0
- [12] Notomi T, Ezura Y, Noda M, et al. Identification of two-pore channel 2 as a novel regulator of osteoclastogenesis[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2012, 287(42): 35057-35064
- [13] Han ZY, Song TT, Tian J, et al. Cloning and expression analysis of McUFGT in different cultivars of crabapple[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2014, 41(2): 301-310 (in Chinese)
韩振云, 宋婷婷, 田佳, 等. 苹果属观赏海棠 McUFGT 的克隆及其在不同叶色品种间的表达差异分析[J]. *园艺学报*, 2014, 41(2): 301-310
- [14] Chen QZ, Guo WS, Feng LZ, et al. Identification of *Calonectria* associated with *Eucalyptus* spp. cutting seedling leaf blight[J]. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 2013, 42(3): 257-262 (in Chinese)
陈全助, 郭文硕, 冯丽贞, 等. 桉树扦插苗焦枯病原鉴定[J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2013, 42(3): 257-262
- [15] Chen QZ. Pathogenic identification of *Cylindrocladium* leaf blight collected from Fujian province and studies on transcriptomics and proteomics of *Eucalyptus* induced by *Calonectria pseudoreteaudii*[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2013 (in Chinese)
陈全助. 福建桉树焦枯病菌鉴定及其诱导下桉树转录组和蛋白组学研究[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2013
- [16] Semagn K, Babu R, Hearne S, et al. Single nucleotide polymorphism genotyping using Kompetitive allele specific PCR (KASP): overview of the technology and its application in crop improvement[J]. *Molecular Breeding*, 2014, 33(1): 1-14
- [17] Rizzo L, Della SA, Fiorentino A, et al. Disinfection of urban wastewater by solar driven and UV lamp-TiO₂ photocatalysis: effect on a multi drug resistant *E. coli* strain[J]. *Water Research*, 2014, 53: 145-152
- [18] Tong QB, Chen R, Zhang Y, et al. A new surveillance and response tool: risk map of infected *Oncomelania hupensis* detected by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from pooled samples[J]. *Acta Tropica*, 2014, 8: 3278-3286
- [19] Wan HM, Li YF, Li S, et al. Rapid detection of heat-labile enterotoxinogenic *Escherichia coli* by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Modern Preventive Medicine*, 2011, 38(2): 321-323 (in Chinese)
万红梅, 李玉锋, 李帅, 等. 环介导等温基因扩增技术快速检测不耐热型肠毒素大肠杆菌反应条件的优化[J]. *现代预防医学*, 2011, 38(2): 321-323
- [20] Tang F, Feng LZ, Lin YP. *Cylindrocladium quinqueseptatum* resistant protective enzyme activity variation in eucalyptus induced by different concentrations of salicylic acid[J]. *Journal of Fujian College of Forestry*, 2013, 33(3): 249-252 (in Chinese)
唐芬, 冯丽贞, 林燕萍. 不同浓度水杨酸诱导桉树抗焦枯病保护酶活性变化[J]. *福建林学院学报*, 2013, 33(3): 249-252
- [21] Li RQ, Liu X, Qiu HZ, et al. Rapid detection of *Rhizoctonia* in rhizosphere soil of potato using real-time quantitative PCR[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2013, 136: 144 (in Chinese)
李瑞琴, 刘星, 邱慧珍, 等. 发生马铃薯立枯病土壤中立枯丝核菌的荧光定量PCR快速检测[J]. *草业学报*, 2013, 136: 144
- [22] Jia MD, Chen XJ, Lin YC, et al. Rapid and sensitive detection method for *Ralstonia solanacearum* based on loop-mediated isothermal amplification[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2014, 19(1): 93-98 (in Chinese)
贾蒙鹭, 陈兴江, 林叶春, 等. 基于环介导等温扩增的烟草青枯病原菌快速检测方法[J]. *中国农业大学学报*, 2014, 19(1): 93-98