

杨帆, 胡章薇, 姚强. 青稞坚黑穗病 LAMP 快速检测技术的建立[J/OL]. 大麦与谷类科学, 2021, 38(1): 48-52. <https://doi.org/10.14069/j.cnki.32-1769/s.2021.01.010>.

## 青稞坚黑穗病 LAMP 快速检测技术的建立

杨帆, 胡章薇, 姚强\*

(青海大学农林科学院 / 青海省农业有害生物综合治理重点实验室 / 农业农村部西宁作物有害生物科学观测实验站, 青海 西宁 810016)

**摘要:** 由大麦坚黑粉菌(*Ustilago hordei*)引起的坚黑穗病广泛分布于我国青稞主产区, 病原侵染后形成病穗从而造成产量损失。基于前期初步建立的青稞黑穗病快速检测体系, 通过对种子洗涤沉淀物的总基因组 DNA 进行提取, 并进行环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 检测人工模拟及实际种子带菌情况, 以期建立完善的青稞坚黑穗病快速检测技术。结果表明, 裂解液快速提取法可以对样品总 DNA 进行有效提取, 完善后的 LAMP 快速检测技术可以有效开展青稞种子携带大麦坚黑粉菌的检测。

**关键词:** 青稞, 大麦坚黑粉菌, 环介导等温扩增技术

中图分类号: S431, Q932, S512.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-6486-20200821

青稞(*Hordeum vulgare*)为禾本科大麦属, 是大麦的一种特殊类型, 又名裸大麦, 因其具有较强的耐寒性, 多分布在青藏高原高海拔的农业区。种传病害是影响青稞安全生产的重要因素之一, 其中由大麦坚黑粉菌(*Ustilago hordei*)引起的坚黑穗病为害较为严重。大麦坚黑粉菌的休眠菌丝体和冬孢子附着在种子表面, 次年播种后分别以休眠菌丝体蔓延到芽鞘上, 或冬孢子萌发形成侵染丝自幼苗胚芽鞘侵入为害<sup>[1]</sup>。受侵染植株田间显症前与健康植株无异, 显症后再进行防治意义不大。凌立等于 1940 年调查发现, 大麦坚黑穗病的田间发病率一般在 10% 左右, 最高可达 60%<sup>[1]</sup>。利用内吸性种子处理杀菌剂进行播前种子处理可有效控制该病害<sup>[2]</sup>。虽然 21 世纪坚黑穗病的发生率、危害程度均远不及 20 世纪, 但现生产上每年仍有发生, 若不采取有效措施, 病原菌随种子传播侵染, 病害发生则会逐年加重<sup>[3]</sup>。在生产上, 仅为了防控该病害就进行种子杀菌处理, 具有一定的盲目性, 同时造成一定的化学药剂残留

和环境污染。因此, 建立快速检测技术至关重要。

本研究应用的环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是 Notomi 等于 2000 年报道的一种能够特异、高效、快速地扩增靶基因的新型核酸扩增技术<sup>[4]</sup>。该技术在 1 h 左右即可完成扩增, 其灵敏度是普通 PCR 的 100 倍<sup>[4]</sup>。结果可通过电泳仪<sup>[5]</sup>、real-time PCR 仪<sup>[5]</sup>及浊度仪<sup>[6]</sup>进行检测, 还可通过 SYBR Green<sup>[7]</sup>、钙黄绿素<sup>[8]</sup>、羟基奈酚蓝<sup>[9]</sup>染色后用肉眼识别。目前, 这种分子检测技术已广泛应用于真菌<sup>[10]</sup>、细菌、病毒<sup>[11]</sup>等方面。鉴于 LAMP 检测过程操作简单, 反应时间短, 结果易于判断, 我们基于初步建立的黑穗病快速 LAMP 检测体系, 通过优化种子洗涤沉淀物总 DNA 的提取方法<sup>[12]</sup>, 以期建立完善的青稞坚黑粉菌快速检测技术体系, 通过掌握种子的带菌程度, 进行精准施策, 为青稞绿色生产提供技术支撑。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 试验材料、试剂与仪器

试验材料: 青稞种子(北青 1 号、北青 2 号、北青 3 号、北青 6 号、北青 8 号、昆仑 14 号、昆仑 15 号以及柴青 1 号)及试验供试菌株大麦坚黑粉菌(*Ustilago hordei*)、裸黑粉菌(*Ustilago nuda*)、禾生指葡孢霉(*Dactylobostry graminicola*)、麦类核腔菌(*Pyrenophora graminea*)、大麦网斑菌(*Pyrenophora teres*)、禾谷镰孢

收稿日期: 2020-12-31

基金项目: 青海省基础研究计划项目(2020-ZJ-748), 青海省重点实验室项目(2020-ZY-Y11)。

作者简介: 杨帆(1995—), 女, 硕士研究生, 主要从事作物病害流行规律研究。E-mail: 909641836@qq.com。

\* 通信作者: 姚强(1983—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事麦类病害流行规律和防控技术研究。E-mail: yaoqiang2010@126.com。

菌(*Fusarium graminearum*)均由青海省农业有害生物综合治理重点实验室提供。

试验试剂 Lysis Buffer for Microorganism to Direct PCR、dNTP Mixture、Loading Buffer, 购自 TaKaRa 公司;吐温-20, 购自索莱宝公司;Bst 2.0 WarmStart DNA Polymerase (10 Isothermal Amplification Buffer、MgSO<sub>4</sub>、Bst DNA 聚合酶) 购自美国 NEB 公司;氢氧化钠 购自四川西陇科学有限公司。

主要仪器 DK-600A 电热恒温水槽, 购自上海一恒科学仪器有限公司;TD5A 台式低速离心机 购自湖南赫西仪器装备有限公司;Centrifuge 5418R 高速冷冻离心机, 购自德国 Eppendorf 公司;ABI 7500 实时荧光定量仪 购自美国 Applied Biosystems 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 人工模拟种子带菌。取大麦坚黑穗菌菌缕 1 粒 (约 150 mg) 混于 2 mL 水中, 分别取其 1/10、1/100、1/1 000 菌悬液混入 1.800、1.980、1.998 mL 水中, 裸黑粉菌取冬孢子粉 150 mg;其他对照病原菌, 在室内培养基培养至满皿后, 加入无菌水制备菌悬液。最后将其分别倒入 50 g 种子中, 加 200 mL 水、吐温-20 1 mL 振荡 5 min, 洗涤液 3 000 r/min 离心 10 min, 去上清后备用。

1.2.2 裂解液快速提取 DNA。1)将“1.2.1”节中制备的人工模拟样品加入 1 mL 浓度为 3 mol/L 的 NaOH

溶液, 65 °C 水浴 30 min。取出离心管, 加 1 mol/L HCl 中和, 10 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 加无菌水冲洗样品, 至 pH 值为 7~8。2)用牙签分别挑取少量种子洗涤沉淀物, 置于洁净载玻片上摩擦, 并不时在显微镜下观察。待冬孢子破裂后取 20 μL 裂解液于载玻片上与待测样品混合, 转至离心管内, 裂解液补足至 50 μL, 80 °C 水浴裂解 15 min, 短暂离心后 -20 °C 保存备用。

1.2.3 RT-LAMP 检测青稞种子中大麦坚黑粉菌。以冬孢子粉添加量为 1 粒、1/10 粒、1/100 粒、1/1 000 粒和加有裸黑粉菌、禾生指葡孢霉、麦类核腔菌、大麦网斑菌以及禾谷镰孢菌的种子洗涤沉淀样品提取的 DNA 为检测样本, 以 ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照, 进行 RT-LAMP 检测, 并在检测结束加入 SYBR Green (10 000×) 0.5 μL。供试引物为利用 ITS(internal transcribed spacer) 基因序列通过在线软件 Primer ExploreV5 ([http:// primerexplorer.jp/lampv5e/index.html](http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html)) 设计, 详见表 1。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。检测体系为 25 μL, 各组分含量如表 2 所示。65 °C 反应 1 h, 每 1 min 读取荧光, 反应结束后加 0.5 μL SYBR Green。根据实时荧光扩增(曲线若为“S”型则为阳性, 呈 1 条直线则为阴性)和 SYBR Green 显色法(显示绿色为阳性, 橙色则为阴性)为判定依据。

表 1 LAMP 引物

| 扩增类型 | 引物名称 | 引物序列(5'→3')                                 |
|------|------|---|
| LAMP | FIP  | AGAGCAAAATCGAGCTTTCGTCTTGAAATAGATTAGCGCATCC |
|      | BIP  | GCCGGGTTTTGATACTATCAGGAGAAGCACTCCAAACAGCA   |
|      | F3   | TTTTGCCATTTACCGTGG                          |
|      | B3   | TAAAATAAACTCGGCATGGG                        |
|      | LF   | AATCTATTCAAGGGAGCCA                         |
|      | LB   | GGAGAGGTTGAGATGGGTA                         |

表 2 RT-LAMP 与可视化 LAMP 检测体系

| RT-LAMP 体系                          |        | 可视化 LAMP 体系                         |        |
|-------------------------------------|--------|-------------------------------------|--------|
| 组分                                  | 体积 /μL | 组分                                  | 体积 /μL |
| 10× Isothermal Amplification Buffer | 2.5    | 10× Isothermal Amplification Buffer | 2.5    |
| dNTPs                               | 4.5    | dNTPs                               | 4.5    |
| 甜菜碱                                 | 4.0    | 甜菜碱                                 | 4.0    |
| MgSO <sub>4</sub>                   | 2.0    | MgSO <sub>4</sub>                   | 2.0    |
| Bst DNA 聚合酶                         | 1.0    | Bst DNA 聚合酶                         | 1.0    |

(续表)

| RT-LAMP 体系                |                    | 可视化 LAMP 体系               |                    |
|---------------------------|--------------------|---------------------------|--------------------|
| 组分                        | 体积 / $\mu\text{L}$ | 组分                        | 体积 / $\mu\text{L}$ |
| 引物 FIP                    | 1.0                | 引物 FIP                    | 1.0                |
| 引物 BIP                    | 1.0                | 引物 BIP                    | 1.0                |
| 引物 Loop- F                | 1.0                | 引物 Loop- F                | 1.0                |
| 引物 Loop- B                | 1.0                | 引物 Loop- B                | 1.0                |
| 引物 LF                     | 1.0                | 引物 LF                     | 1.0                |
| 引物 LB                     | 1.0                | 引物 LB                     | 1.0                |
| SYBR Green (10 $\times$ ) | 1.5                | SYBR Green (10 $\times$ ) | 0.0                |
| DNA                       | 2.0                | DNA                       | 2.0                |
| ddH <sub>2</sub> O        | 1.5                | ddH <sub>2</sub> O        | 3.0                |
| 石蜡油                       | 20.0               | 石蜡油                       | 20.0               |

1.2.4 青稞坚黑穗病 LAMP 可视化检测技术验证。随机抽选实验室保存的 8 个不同品种的青稞种子各 50 g, 加 200 mL 水、吐温 - 20 1 mL, 振荡 5 min, 洗涤液 3 000 r/min 离心 10 min, 提取 DNA, 方法同“1.2.2”节。获得种皮洗涤沉淀物的总基因组 DNA 后作为模板, ddH<sub>2</sub>O 为阴性对照, 进行 LAMP 可视化检测。检测体系中各成分含量如表 2, 反应前加 SYBR Green (10 000 $\times$ ) 于 PCR 管盖内, 反应结束后 瞬时离心观察显色情况, 若为绿色则为阳性, 橙色则为阴性。

## 2 结果与分析

### 2.1 冬孢子破裂

大麦坚黑粉菌与裸黑粉菌成熟的单个黑粉菌冬孢子具有内壁和外壁, 外壁厚且坚硬, 严重阻碍

冬孢子 DNA 的提取。本研究参考并改进了一年四季提取小麦矮腥黑穗菌冬孢子的方法<sup>[9]</sup>, 用 3 mol/L 的 NaOH 溶液水浴种子洗涤沉淀物, 65  $^{\circ}\text{C}$ 、30 min 后取适量在洁净载玻片上来回摩擦, 并不时放于显微镜下观察, 如图 1-B 时即可进行 DNA 提取。由于大麦坚黑粉菌冬孢子为 (5~9) $\mu\text{m}$   $\times$  (6~7) $\mu\text{m}$ , 相比于直径为 5~9  $\mu\text{m}$  的裸黑粉菌冬孢子体积至少大 1 倍, 因此用载玻片来回摩擦十多下, 可使大麦坚黑粉菌冬孢子破裂, 而裸黑粉菌冬孢子外壁却不受影响。

### 2.2 RT-LAMP 检测青稞种子中大麦坚黑粉菌

人工模拟种子带菌样品的实时荧光扩增曲线 (图 2-A) 和 SYBR Green 显色 (图 2-B) 结果均显示, 仅 4 种不同冬孢子数量的种子洗涤沉淀样品为阳性, 其他为阴性。表明所建立的青稞坚黑穗病快速检测技术能够特异性检测出青稞的大麦坚黑粉菌。

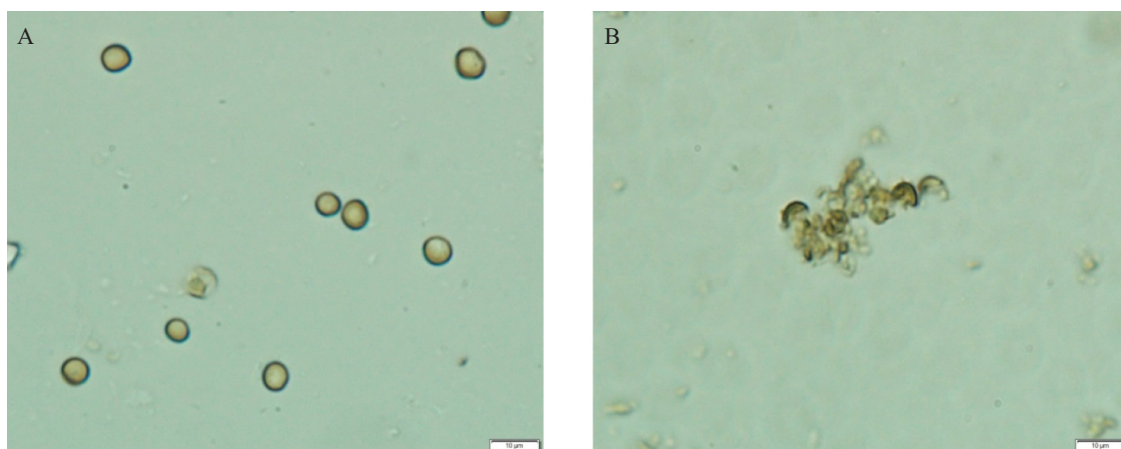
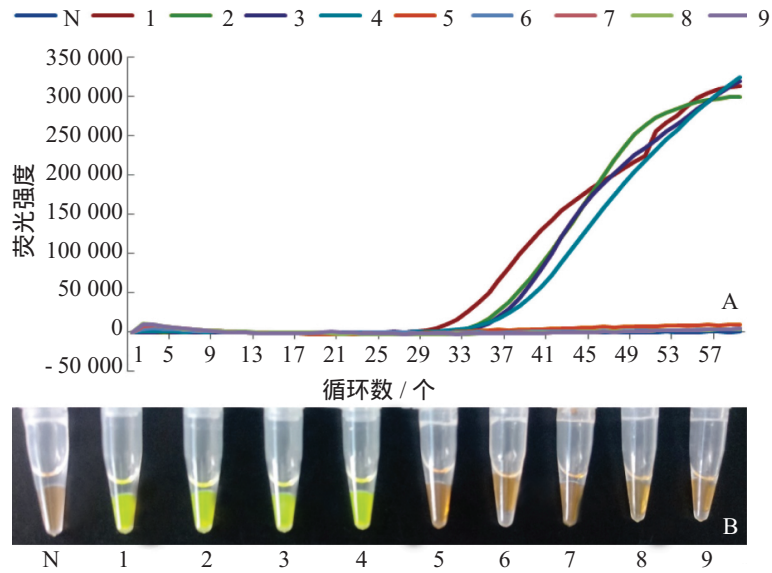


图 1 破壁前(A)、后(B)的大麦坚黑粉菌冬孢子



A. 实时荧光扩增曲线 ;B. SYBR Green 显色结果。

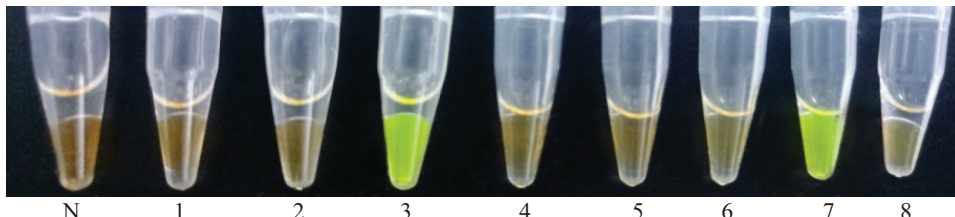
N. 阴性对照 ;1~4 分别表示大麦坚黑粉菌孢子添加量为 1、1/10、1/100、1/1 000 粒 结果阳性 ;5~9 分别表示裸黑粉菌、禾生指孢霉、麦类核腔菌、大麦网斑菌以及禾谷镰孢菌 结果阴性。

图 2 人工模拟种子带菌检测

### 2.3 青稞坚黑穗快速检测技术验证

分别以随机选取的 50 g 青稞不同品种(北青 1 号、北青 2 号、北青 3 号、北青 6 号、北青 8 号、昆仑 14 号、昆仑 15 号以及柴青 1 号)种子的洗涤沉淀物总 DNA 为模板 进行 LAMP 可视化检测 结果如图

3 所示 ,北青 3 号和昆仑 15 号为绿色(阳性) ,其他为橙色(阴性) ,表明北青 3 号和昆仑 15 号 2 个品种中携带大麦坚黑粉菌 ,建立的快速检测体系可用于青稞播前检测大麦坚黑粉菌。



N. 阴性对照 ;1. 北青 1 号 2. 北青 2 号 3. 北青 3 号(结果阳性) ;4. 北青 6 号 5. 北青 8 号 ; 6. 昆仑 14 ;7. 昆仑 15(结果阳性) ;8. 柴青 1 号。

图 3 青稞种子可视化 LAMP 检测

## 3 讨论与结论

坚黑穗病是青稞生产中最为常见、发病较为广泛的种传病害之一。田间显症后只能通过拔出病株来降低种子带菌率 ,这种方式耗时耗力。种子处理杀菌剂的应用可有效防治大麦坚黑粉菌对青稞的侵染。但是带菌种子与健康种子表观没有差异 ,导致在实际生产中出现药物滥用的现象 给环境和粮食安全带来巨大压力。因此 ,建立种子播前的快速检测技术对生产具有重要的指导意义。然而 ,目前

国内外对大麦坚黑粉菌的研究多集中于病原 - 寄主互作<sup>[13]</sup>、分子变异和遗传结构分析<sup>[14]</sup>以及侵染机制等方面<sup>[15]</sup> ,在快速检测方面成果甚少。20 世纪对于此病害检测方面的研究主要集中于传统检测 ,包括显微镜直接观察法、种皮携带物洗涤离心后显微观察法以及冷冻吸水纸法等<sup>[16]</sup>。

本研究为建立完善的青稞坚黑粉菌检测技术 ,基于初步建立的 LAMP 检测体系 ,经裂解液快速提取法提取种子表皮携带物的总 DNA 后 ,进行 LAMP (环介导等温扩增技术)检测并验证。结果表明 ,裂解液快速提取法提取种皮洗涤沉淀物总基因组

DNA,仅混有大麦坚黑粉菌的种子洗涤沉淀物实时荧光和 SYBR Green 可视化 LAMP 检测均为阳性,其他病原菌(大麦坚黑粉菌、裸黑粉菌、禾生指葡孢霉、麦类核腔菌、大麦网斑菌、禾谷镰孢菌)2种检测均为阴性。最后,通过对实际青稞种子进行检测,在8个不同品种中检测出北青3号和昆仑15种子携带有大麦坚黑粉菌。

虽然目前仅有的大麦坚黑粉菌与裸黑粉菌分子生物学信息均不能区分两者,未能设计出特异性引物,但是本研究基于2种黑粉菌在种子上带菌方式和孢子的体积大小的不同,成功建立出可特异性检测青稞种子中大麦坚黑粉菌的技术体系。所建立的检测技术可应用于生产,为防治青稞坚黑穗病提供科学的依据。

#### 参考文献:

- [1] 刘惕若. 黑粉菌与黑粉病[M]. 北京:农业出版社,1984.
- [2] 王海光,马占鸿. 植物病害流行病学[M]. 北京:科学出版社,2009.
- [3] 蔺瑞明,冯晶,陈万权,等. 大麦病害概略[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2014.
- [4] NOTOMI T,OKAYAMA H,MASUBUCHI H,et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000,28(12):63.
- [5] 张双纳,李正男,范旭东,等. 苹果褪绿叶斑病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 中国农业科学,2018,51(9):1706-1716.
- [6] 胡连霞,张岱,赵冬梅,等. 实时荧光定量环介导等温扩增方法检测马铃薯黑胫病菌[J]. 植物保护学报,2017,44(5):863-864.
- [7] 杜然,张静,杨龙,等. 油菜黑胫病菌和茎基溃疡病菌的 LAMP 检测方法的建立[J/OL]. 植物病理学报. [2020-08-27]. <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000514>. DOI: 10.13926/j.cnki.apps.00514.
- [8] 黄雯,徐进,张昊,等. 植物青枯菌 LAMP 检测方法的建立[J]. 中国农业科学,2016,49(11):2093-2102.
- [9] 吴凡,李杨秀,黄海娟,等. 桑脉带相关病毒 RT-LAMP 检测方法的建立[J]. 植物保护,2019,45(1):116-120.
- [10] 祝菊澧,梁静思,张佩,等. 基于 qPCR 和 LAMP 技术的马铃薯晚疫病病菌快速检测方法[J]. 作物杂志,2019(6):168-176.
- [11] 张洋,薛强,金英,等. 柞蚕核型多角体病毒实时荧光 LAMP 检测方法的初步建立[J]. 蚕业科学,2017,43(6):957-961.
- [12] 年四季. 小麦矮腥黑穗菌常规 PCR 与实时荧光定量 PCR 检验检疫技术研究[D]. 重庆:重庆大学,2007.
- [13] SHARMA K V,KAUR A,CHEEMA B S,et al. Development of inoculation method for resistance evaluation against covered smut of barley[J]. Agricultural Research Journal,2017,54(3):369-372.
- [14] KASHYAP PL,KUMAR S,KUMAR RS,et al. Identification of novel microsatellite markers to assess the population structure and genetic differentiation of *Ustilago hordei* causing covered smut of barley[J]. Frontiers in Microbiology,2019,10:2929.
- [15] 张新明. 大麦坚黑粉菌遗传转化体系优化及其侵染机制初探[D]. 杭州:浙江大学,2010.
- [16] MENZIES J G,THOMAS P L,WOODS S,et al. Incidence and severity of loose smut and surface-borne smuts of barley on the Canadian prairies from 1972 to 2009 [J]. Canadian Journal of Plant Pathology,2014,36(3):300-310.

## Establishment of a LAMP-based Rapid Detection System for Covered Smut of Hulled Barley

YANG Fan, HU Zhang-wei, YAO Qiang

(Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Key Laboratory of Agricultural Integrated Pest Management of Qinghai Province / Scientific Observing and Experimental Station of Crop Pest in Xining, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China, Xining 810016, China)

**Abstract:** Covered smut, caused by *Ustilago hordei*, widely occurs in the main growing areas of hulled barley in China. The pathogen infection of hulled barley ears leads to diseased ears, thus reducing the yield. Based on a previously established preliminary rapid detection system for covered smut of hulled barley, this study aimed to develop an advanced rapid detection system for *Ustilago hordei*, which consists of extraction of the total genomic DNA of the sediment resulting from seed washing, and conduction of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) to detect artificially simulated and actual seed-borne bacteria. Results showed that the rapid extraction method of lysate can effectively extract the total DNA of the sample, and that the improved LAMP-based rapid detection technology can effectively detect smut fungus carried by hulled barley seeds. The establishment of this technical system lays the foundation for the detection of seed-borne bacteria in the later stage, thus providing effective scientific guidance for the green prevention and control of covered smut of hulled barley.

**Key Words:** Barley; *Ustilago hordei*; Loop-mediated isothermal amplification