

DOI:10.13718/j.cnki.zwyx.2025.05.004

大豆尖孢镰刀菌 ERA 快速检测方法的建立

李宜纯, 管宁, 刘文, 李博泽,
张航源, 范文忠, 徐亚维

吉林农业科技学院 生物与制药工程学院, 吉林 吉林 132101

摘要: 大豆尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)作为一种土传性病害的发病菌,严重影响大豆产量。为减轻其对大豆减产造成的经济损失,基于酶促重组等温扩增技术(Enzymatic Recombinase Amplification, ERA),于CYP505区间的保守序列设计特异引物和探针,建立了对大豆尖孢镰刀菌的快速检测方法。该方法通过组合筛选获得最佳引物对F29/R335,实现了恒温40℃、反应20min、检测下限为90 fg/ μ L的检测,且与疫霉菌、灰斑菌、茄腐镰刀菌、锐顶镰孢菌、东北霜霉菌、腐皮镰孢菌等均无交叉反应。相较于传统的PCR和实时定量PCR,研究建立的大豆尖孢镰刀菌ERA检测方法具有快速、便捷的特点,为大豆尖孢镰刀菌的快速检测提供了新的技术手段。

关键词: 大豆尖孢镰刀菌; 酶促重组等温扩增
技术; 快速; 检测

中图分类号: S432.4

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 2097-1354(2025)05-0023-10

Establishment of a ERA Method for Detecting *Fusarium oxysporum* in Soybean

LI Yichun, GUAN Ning, LIU Wen, LI Boze,
ZHANG Hangyuan, FAN Wenzhong, XU Yawei

School of Biological and Pharmaceutical Engineering, Jilin Agricultural Science and Technology University, Jilin Jilin 132101, China

Abstract: *Fusarium oxysporum*, as a pathogen of soil-transmitted disease, has seriously affected soybean yield. In order to reduce the economic loss due to soybean yield reduction by this

收稿日期: 2025-04-02

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(YDZJ202201ZYTS641)

作者简介: 李宜纯, 研究方向为分子诊断试剂开发。

通信作者: 徐亚维, 博士, 教授。

pathogen, Enzymatic Recombinase Amplification (ERA) technology was used to design a specific primer probe based on the conserved sequence of CYP505 interval to establish a rapid detection method for *Fusarium oxysporum* of soybean. The optimal primer pair F29/R335 was obtained by combination screening. The detection limit of 90 fg/ μ L was achieved under the condition of constant temperature of 40 °C for 20 minutes. There was no cross-reaction with *Phytophthora sojae*, *Cercospora sojina*, *Haematonectria haematococca*, *Fusarium acuminatum*, *Peronospora manshurica* and *Fusarium solani*. Compared with traditional PCR and real-time quantitative PCR, the ERA detection method established in this study has the characteristics of fast and convenient, which provides a new technical means for the rapid detection of *Fusarium oxysporum*.

Key words: *Fusarium oxysporum*; Enzymatic Recombinase Amplification; rapid; detection

大豆尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)是全球十大植物病原真菌之一,其引发的大豆根腐病是一种分布广、危害重且防治困难的土传病害。该病在大豆整个生育期均可发生:幼苗期侵染种子导致烂种,出土后危害茎基部引发猝倒,生长期侵染茎秆造成植株矮化或枯死,最终导致大豆产量降低^[1]。为提前预防和及时干预,迫切需要能够在大豆种植前检测土壤或发病前及时干预的检测技术,解决减产问题。

已知的尖孢镰刀菌研究初期是采用培养基菌落平板稀释法进行分析的,其优点是制作材料廉价,操作难度较低,但是实验周期较长,效率和灵敏度较低,难以实现更准确、更快速的检测^[2]。自分子检测技术的快速发展,常规 PCR、实时定量 PCR 因其较好的灵敏度和准确性被广泛应用于植物病原真菌的检测,但需要专业的技术人员操作大型的仪器设备,且实验时间长,不利于快速便捷的检测。酶促重组等温扩增技术(ERA)是一种新型核酸等温扩增技术,利用重组聚合酶单链 DNA 结合蛋白和链置换酶,即可在 25~42 °C 的恒温环境下完成靶基因数百万倍扩增,具有反应条件简单、不需昂贵仪器、操作便捷、灵敏度高和特异性好等一系列优势,满足快速准确检测的需要^[3]。近年来,ERA 技术已经广泛应用于植物真菌检测中,例如对玉米锈病菌^[4]、黄氏根腐病^[5]、梨火疫病菌^[6]等的检测,表明 ERA 在植物病害检测方面,技术已经逐渐成熟,这为大豆尖孢镰刀菌的检测奠定了基础。

本研究使用 ERA 技术,针对大豆尖孢镰刀菌设计特异性引物,预期建立一种能够快速、便捷、高灵敏的检测体系,实现对大豆尖孢镰刀菌的早期诊断和快速筛查,在提高经济效益的同时也为吉林省大豆根腐病的快速筛查提供新的检测技术与检测产品。

1 材料、试剂及仪器

1.1 主要材料

大豆尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)^[2]、大豆灰斑菌(*Cercospora sojina*)、茄腐镰刀菌(*Haematonectria haematococca*)、东北霜霉菌(*Peronospora manshurica*)、锐顶镰孢菌(*Fusarium acuminatum*)、腐皮镰孢菌(*Fusarium solani*)均为吉林农业科技学院农学院赠送。

1.2 主要试剂

基础型核酸扩增试剂盒(ERA 法)购自苏州先达基因科技有限公司;十二烷基磺酸钠(SDS)、DL 500bp DNA Marker 购自上海生物工程有限公司;十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)、月桂酰肌氨酸钠(N-Methylglycinol)购自天津福晨化学试剂有限公司;四正丁基溴化铵(TB-

AB)购自上海生物工程有限公司;自聚乙烯吡咯烷酮(PVP)购自飞科生物科技有限公司; β -巯基乙醇(BME)购自天津大茂化学科技有限公司;核酸提取磁珠(通用型)购自迈途医药科技有限公司;DL 15000bpDNA Marker、Premix Ex Taq Version 2.0(Loadng dye Mix)购自宝日医生物技术有限公司^[3]。

1.3 主要仪器

台式高速冷冻离心机(Centrifuge 5430R,德国艾本德公司);恒温水浴锅(HH-12468,常州郎越仪器制造有限公司);电泳仪(DYY-60,北京六一生物科技有限公司);紫外分光光度计(BioSpec-nano,日本岛津公司);高压灭菌锅(MVS-83,北京冠普佳科技有限公司);凝胶成像仪(GenoSens 2000,上海勤翔科学仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 基因组 DNA 提取

2.1.1 SDS 法

将用液氮研磨提取后的粉末状真菌,立即用 800 μ L 预热后的 SDS 裂解液溶解,并加入 40 μ L β -巯基乙醇,振荡混匀,55 $^{\circ}$ C 水浴 40 min,且每隔 5 min 振荡混匀 1 min,12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min^[7]。取上清液于新管中,加入等体积的事前配制好的酚-氯仿-异戊醇(25:24:1),上下颠倒 1 min 混匀后,12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 10 min^[8]。取上清液加入 2 倍体积预冷的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C 冰箱静置 20 min,离心管内会出现半透明的絮状沉淀,离心管朝一个方向轻轻旋转,使絮状基因组缠绕,12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 8 min,沉淀用预冷的 70%乙醇洗涤后 10 000 r/min 离心 5 min(重复 2 次),弃上清液,然后在超净工作台上放在冰上晾干,然后加入 30 μ L TE 溶解和 3 μ L RNaseA 去除 RNA,测浓度后于约 20 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.1.2 改良 SDS 法

将用液氮研磨提取后的粉末状真菌装管后立即加入预热的 SDS-盐酸胍混合裂解液 1 mL,振荡混匀,55 $^{\circ}$ C 水浴 40 min,且每隔 5 min 振荡混匀 1 min,其后步骤同 SDS 法^[8]。

2.1.3 月桂酰肌氨酸钠法

将用液氮研磨提取后的粉末状真菌,迅速装管后加入预热的月桂酰肌氨酸钠裂解液 1 mL,振荡混匀,55 $^{\circ}$ C 水浴 40 min,且每隔 5 min 振荡混匀 1 min,后续操作同 SDS 法^[9]。

2.1.4 改良 SDS-季铵盐法

将用液氮研磨提取后的粉末状真菌装管后,立即加入预热后含有 2.5 mol/L 四正丁基溴化铵的 SDS-盐酸胍混合裂解液 1 mL,振荡混匀,55 $^{\circ}$ C 水浴 40 min,且每隔 5 min 振荡混匀 1 min,后续操作同 SDS 法^[10]。

2.1.5 改良 CTAB 法

将用液氮研磨提取后的粉末状真菌,装管后迅速加入 800 μ L 预热的 2% CTAB 裂解液,20 μ L 蛋白酶 K,振荡混匀,55 $^{\circ}$ C 水浴 40 min,且每隔 5 min 振荡混匀 1 min,其后步骤同 SDS 法。

2.2 大豆尖孢镰刀菌的鉴定及特异性片段的筛选

利用已知引物 EF、ITS、RPB2(引物序列见表 1)对大豆尖孢镰刀菌进行多次常规 PCR 扩增鉴定,PCR 扩增体系为:正反向引物 2.5 mmol/L 各添加 2 μ L,终浓度为 30 ng/ μ L 的基因组 0.8 μ L, Premix Ex Taq Version 2.0(Loadng dye Mix)12.5 μ L,用水补充至 25 μ L。程序设定:

预变性 94 °C 5 min, 变性 94 °C 30 s, 退火 57 °C 30 s, 延伸 72 °C 1 min, 30 个循环, 后延伸 72 °C 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测后, 将 PCR 反应产物送至生工上海生物工程有限公司测序并与 NCBI 上大豆尖孢镰刀菌进行序列比对^[11]。

表 1 本研究所用引物序列

引物名称	引物序列(5→3)
EF595F	CGTGACTTCATCAAGAACAT
EF1160R	CCGATCTTGTAGACGTCCTG
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
fRPB2-5F	GAYGAYMGWGATCAYTTYGG
fRPB2-7cR	CCCATRGTGTYTTRCCCAT
F29	GGATGGAAGACTTGAATGGTAATGAGATGG
F26	AGTGGATGGAAGACTTGAATGGTAATGAGATG
R335	TTTCGGGGCGTCGAAACCTCGACCAACAGG
R243	GACAGTATCCTCCCAGGCTTCAAAGTCGCT
R212	AACATGTCACTTGTGGCAGCATCTGCACTACC

在 NCBI 上选择并下载大豆尖孢镰刀病菌和本实验中所用真菌的基因组序列, 利用 SnapGene 软件和 NCBI 网站进行比对分析, 同时进行文献筛查, 最终经过多个基因的筛选确定能特异性扩增的基因 CYP 505, 作为特异性片段并进行引物设计^[10]。

2.3 ERA 引物设计

根据目的片段的基因序列, 利用 Primer 5.0 引物设计软件设计引物如表 1 所示, 均交于生工上海生物工程有限公司合成^[4]。

2.4 基础型 ERA 反应体系建立及最佳引物对筛选

使用苏州先达基因科技有限公司的基础型 ERA 试剂盒进行 ERA 扩增。首先将基础反应试剂从 -20 °C 冰箱中取出并室温放置 10 min。反应体系: ddH₂O 21 μL、溶解剂 20 μL、正反向引物各 2.5 μL、10 ng/μL 基因组 2 μL、激活剂 2 μL(加入到管盖内侧, 防止激活剂提前进入反应管内开始反应而影响试验), 同时用 ddH₂O 制备阴性对照, 混匀离心后立即于 40 °C 水浴锅中孵育 20 min, 取出加入 6×loading buffer 于 56 °C 孵育 5 min, 最后用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 电泳条件设定为 80 V 恒压, 电泳时间 55 min, 电泳结束后对 6 个引物组合的电泳结果进行分析, 筛选出最佳引物对^[12]。

2.5 基础 ERA 反应条件的优化

2.5.1 最优反应温度确定

确定最佳引物探针浓度组合, 设置 37 °C、38 °C、39 °C、40 °C、41 °C、42 °C 6 个反应温度^[13]。根据步骤“2.4”中筛选出的最佳引物对配制相同反应体系, 并利用 ddH₂O 制备阴性对照, 于相对应的 6 个温度条件下孵育 20 min, 时间到后立即取出并加入 6×loading buffer, 于 56 °C 孵育 5 min, 反应结束后进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 电泳条件设定为 80 V 恒压, 电泳时间 55 min^[5], 电泳结束后对电泳结果进行分析。

2.5.2 最优反应时间确定

以 10 min 为反应起始时间, 每隔 5 min 设置一个反应时间直到 30 min., 根据步骤“2.4”中筛选出的最佳引物对配制相同反应体系, 并利用 ddH₂O 制备阴性对照, 采用步骤“2.5.1”中最佳反应温度分别孵育 10 min、15 min、20 min、25 min、30 min, 时间到后取出并加入 6×load-

ing buffer, 于 56 °C 孵育 5 min, 反应结束后进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 电泳条件设定为 80 V 恒压, 电泳时间 55 min, 电泳结束后对电泳结果进行分析^[14]。

2.6 试验验证

2.6.1 灵敏度验证

将大豆尖孢镰刀菌的 DNA 浓度依次稀释为 9×10^7 、 9×10^6 、 9×10^5 、 9×10^4 、 9×10^3 、 9×10^2 、 9×10 、 $9 \text{ fg}/\mu\text{L}$ 8 个模板浓度, 以步骤“2.4”中筛选出的最佳引物对配制反应体系并检测灵敏度^[15]。按不同浓度制备扩增体系, ddH₂O 制备阴性对照, 在最优反应温度和最优反应时间条件下孵育, 时间到后立即取出并加入 $6 \times$ loading buffer, 于 56 °C 孵育 5 min, 反应结束后进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 电泳条件设定为 80 V 恒压, 电泳时间 55 min, 确定 ERA 对大豆尖孢镰刀菌 DNA 的最低检测限。

2.6.2 特异性验证

用筛选出的 ERA 体系对大豆尖孢镰刀菌、大豆疫霉菌、大豆灰斑菌、茄腐镰刀菌、东北霜霉菌、锐顶镰孢菌、腐皮镰孢菌的 DNA 进行检测, 设置 ddH₂O 为阴性对照, 时间到后立即取出并加入 $6 \times$ loading buffer, 于 56 °C 孵育 5 min, 反应结束后进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 电泳条件设定为 80 V 恒压, 电泳时间 55 min, 评价该检测方法的特异性。

2.6.3 试验样本验证

从田间采集自然发病的大豆尖孢镰刀菌菌丝、未感染大豆尖孢镰刀菌的大豆植株、感染尖孢镰刀菌大豆植株、感染大豆疫霉菌大豆植株、大豆灰斑菌菌丝、茄腐镰刀菌菌丝、锐顶镰孢菌菌丝样品提取 DNA 稀释至均一浓度, 并利用 ddH₂O 制备阴性对照, 在上述实验得到的最适反应条件下孵育, 时间到后立即取出并加入 $6 \times$ loading buffer, 于 56 °C 孵育 5 min, 反应结束进行 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 电泳条件设定为 80 V 恒压, 电泳时间 55 min, 电泳结束后对电泳结果进行分析, 用以验证此试验是否能在生产生活中得到应用。

3 结果与分析

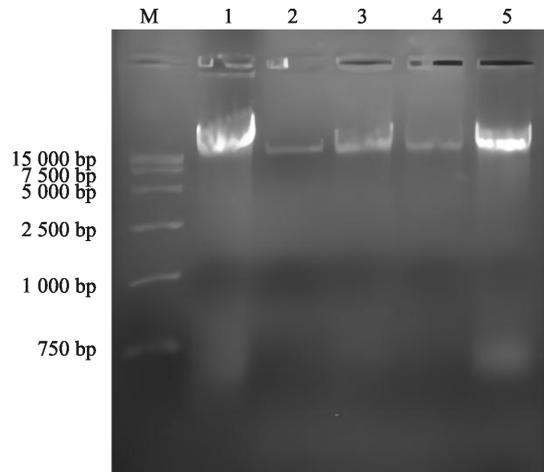
3.1 尖孢镰刀菌 DNA 提取结果

不同提取方法对大豆尖孢镰刀菌基因组的提取结果如表 2 所示。在生物学研究中, 纯基因组 DNA 的 OD_{260/280} 比值处于 1.8~1.9 时, 通常被视为样品 DNA 纯度良好的标志。该比值大于 1.9, 往往意味着样品可能受到了 RNA 或其他杂质的污染; 当该比值小于 1.8 时, 则表明样品可能存在蛋白质或酚类物质的污染情况。综合以上及数据所得, 改良 SDS-季铵盐法和改良 SDS 法提取的基因组浓度较高, 但改良 SDS 的 OD_{260/230} 值低于 2 时, 可能有杂质污染, 因此, 改良 SDS-季铵盐法提取效果更好。

表 2 不同提取方法 DNA 的紫外鉴定结果

提取方法	DNA 浓度/(ng · μL ⁻¹)	OD _{260/280}	OD _{260/230}
改良 SDS 法	1 150.8	1.94	1.78
改良 CTAB 法	1 589.3	1.92	2.03
SDS 法	983.4	1.78	1.48
月桂酰肌氨酸钠法	833.6	1.97	2.13
改良 SDS-季铵盐法	2 250.5	1.86	2.08

将不同种提取方法的 DNA 进行 0.7 % 凝胶电泳验证, 不同提取方法的电泳结果如图 1 所示。所有泳道均有条带, 说明 5 种方法均能提取出尖孢镰刀菌 DNA; 第 1、5 泳道提取结果条带最明亮, 说明改良 CTAB 法、改良 SDS-季铵盐法均能获得较好浓度和纯度的 DNA, 但改良 CTAB 法存在少量 DNA 降解现象; 第 2、3、4 泳道条带较暗, 说明 SDS 法、改良 SDS 法、月桂酰肌氨酸钠法提取浓度低于其他方法, 但也能满足后续 PCR 扩增。

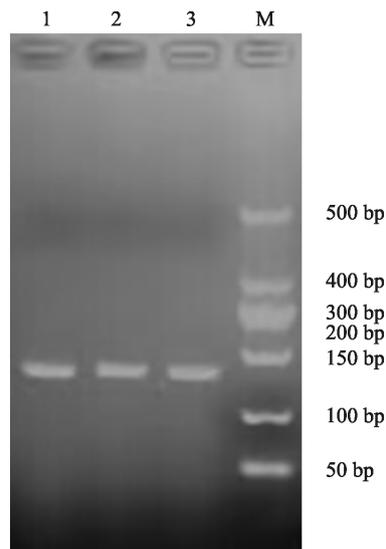


M: DL 15000bp DNA Marker; 1: 改良 CTAB 法; 2: SDS 法; 3: 改良 SDS 法; 4: 月桂酰肌氨酸钠法; 5: 改良 SDS-季铵盐法

图 1 不同方法提取尖孢镰刀菌 DNA 电泳图

3.2 特异性引物验证

利用已知特异性引物 CYP505 PCR 扩增大豆尖孢镰刀菌全基因组, 进行 3 次重复实验并电泳验证(图 2), 显示结果与预期大小相符, 送交生工上海生物工程有限公司测序并进行序列比对, 与 NCBI 上大豆尖孢镰刀菌的同源性达到 99% 以上, 满足设计 RPA 引物的需要。

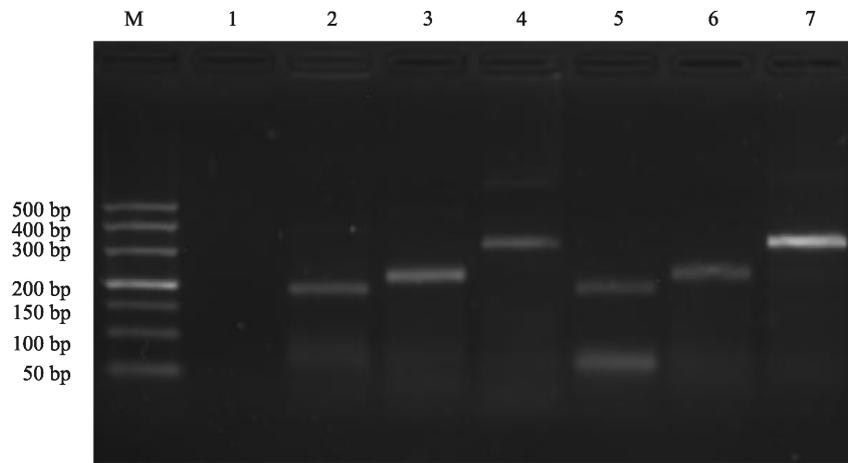


M: DL 500 bp DNA Marker; 1: CYP505 特异引物扩增(1); 2: CYP505 特异引物扩增(2); 3: CYP505 特异引物扩增(3)

图 2 CYP 505 引物 PCR 扩增大豆尖孢镰刀菌全基因组电泳图

3.3 最优引物对筛选

由图 3 可知,参与实验的 6 对引物,均可扩增出特异性条带。其中,泳道 2、3、4、5 均出现非特异性条带,泳道 6 比泳道 7 条带较暗,扩增效果不如泳道 7。经多次验证,第 7 泳道对应引物的扩增效果更好,由此得出最适引物对为 F29/R335,扩增长度为 247 bp。

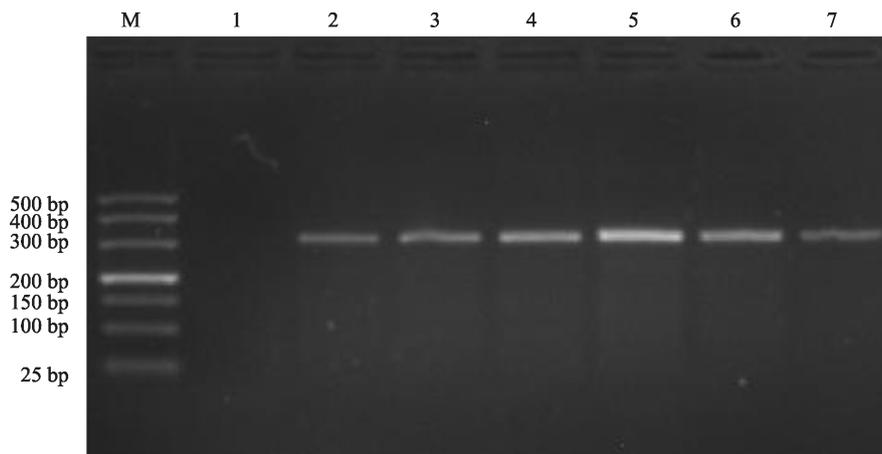


M: DL 500 bp DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: F26/R212; 3: F26/R243; 4: F26/R335; 5: F29/R212; 6: F29/R243; 7: F29/R335

图 3 最优引物对筛选琼脂糖凝胶电泳图

3.4 最优反应温度确定

设置反应温度梯度为 37 °C、38 °C、39 °C、40 °C、41 °C、42 °C。根据图 4 显示,以上反应温度均可出现条带,但泳道 5 明显亮于其他条带,其中泳道 2、3、4 可能因为温度较低不能使酶反应充分,而泳道 6、7 可能因为温度较高而反应酶部分失活。综上,在泳道 5 的温度下,条带更亮,反应更充分,40 °C 为最优反应温度。



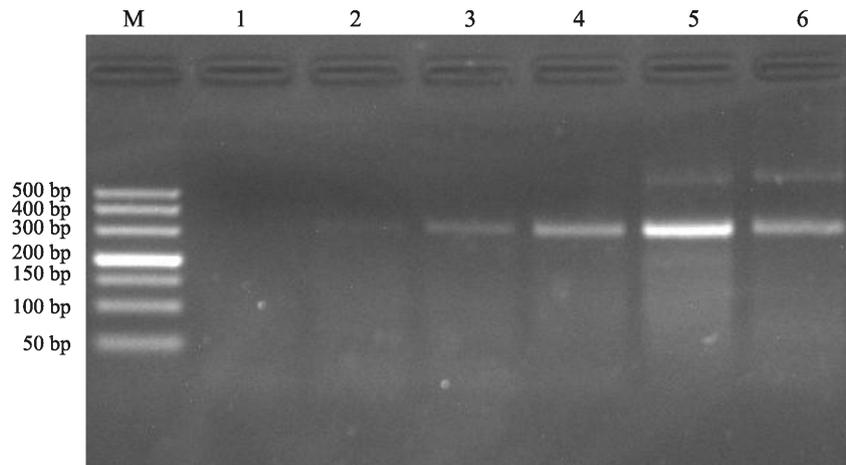
M: DL 500bp DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: 37 °C; 3: 38 °C; 4: 39 °C; 5: 40 °C; 6: 41 °C; 7: 42 °C

图 4 最优反应温度确定琼脂糖凝胶电泳图

3.5 最优反应时间确定

从图 5 可以看出,所有泳道均出现条带,泳道 2、3、4 无非特异条带,其中泳道 2、3 条带较暗,而泳道 4 较于泳道 2、3 条带更亮,表明扩增效果更好;泳道 5、6 出现非特异性条带,原因

可能是反应时间过长,发生了非特异性扩增。因此,最终确定最佳反应时间为 20 min。

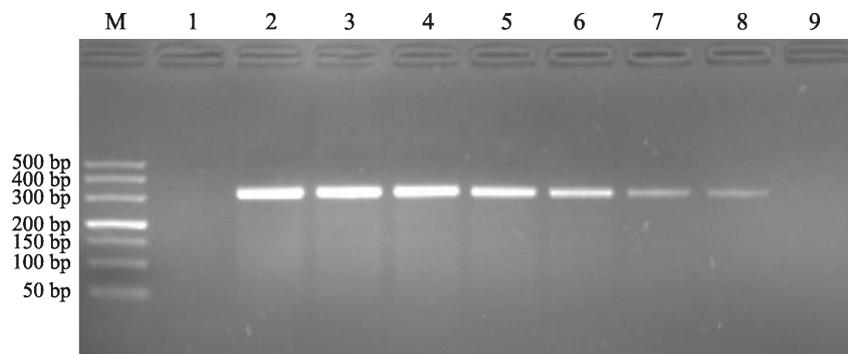


M: DL 500bp DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: 10 min; 3: 15 min; 4: 20 min; 5: 25 min; 6: 30 min

图5 最优反应时间确定琼脂糖凝胶电泳图

3.6 灵敏度验证

灵敏度结果如图6,随着DNA浓度的不断降低,各泳道的亮度也在不断减弱,RPA检测方法在 9×10^4 fg/ μ L的时候仍可见较浅的条带,但是到第9泳道9 fg/ μ L时,所拍照片肉眼观察不到条带。因此,可以得出RPA的检测限为90 fg/ μ L。

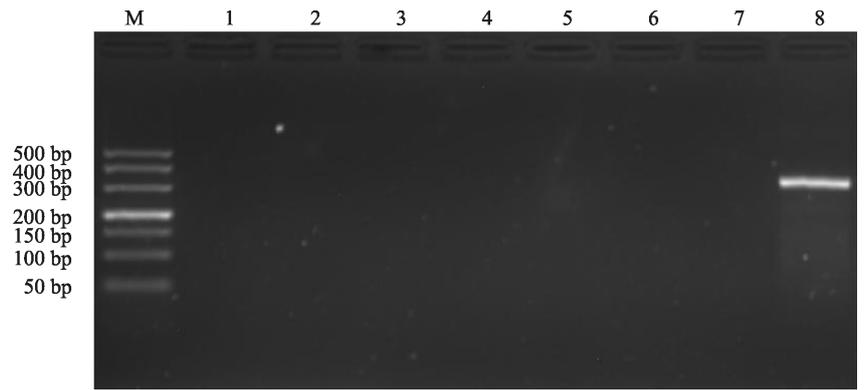


M.: DL 500bp DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: 9×10^7 fg/ μ L; 3: 9×10^6 fg/ μ L; 4: 9×10^5 fg/ μ L;
5: 9×10^4 fg/ μ L; 6: 9×10^3 fg/ μ L; 7: 9×10^2 fg/ μ L; 8: 9×10^1 fg/ μ L; 9: 9 fg/ μ L

图6 灵敏度验证琼脂糖凝胶电泳图

3.7 特异性验证

特异性验证结果如图7所示,在相同扩增条件下,只能检测出第8泳道的大豆尖孢镰刀菌,而其他泳道的大豆疫霉菌、大豆灰斑菌、茄腐镰刀菌、东北霜霉菌、锐顶镰孢菌、腐皮镰孢菌均未出现目的条带,证明本试验具有较高的特异性。

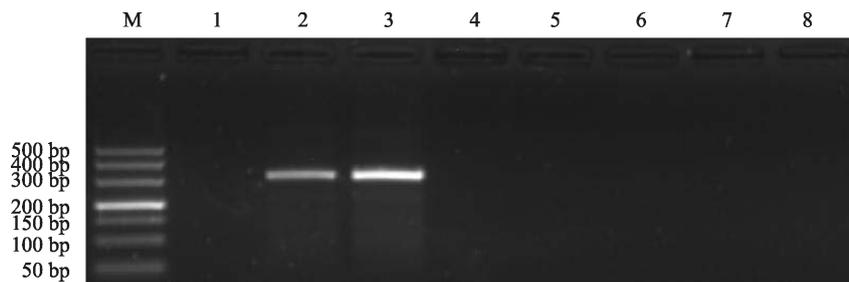


M: DL 500 bp DNA Marker; 1: 阴性对照; 2: 大豆灰斑菌; 3: 茄腐镰刀菌; 4: 腐皮镰孢菌;
5: 大豆疫霉菌; 6: 锐顶镰孢菌; 7: 东北霜霉菌; 8: 尖孢镰刀菌

图 7 特异性验证琼脂糖凝胶电泳图

3.8 试验样本验证

试验样本验证结果如图 8 所示,感染大豆疫霉菌大豆植株、大豆灰斑菌菌丝、茄腐镰刀菌菌丝、东北霜霉菌菌丝、锐顶镰孢菌菌丝均未扩增出条带,与阴性对照相同;只有第 2、3 泳道的感染尖孢镰刀菌大豆植株、大豆尖孢镰刀菌菌丝在实际样本验证时仍具有较强特异性。



M: DL 500bpDNA Marker; 1: 阴性对照; 2: 感染尖孢镰刀菌大豆植株; 3: 大豆尖孢镰刀菌菌丝;
4: 感染大豆疫霉菌大豆植株; 5: 大豆灰斑菌菌丝; 6: 茄腐镰刀菌菌丝; 7: 东北霜霉菌菌丝; 8: 锐顶镰孢菌菌丝

图 8 特异性验证琼脂糖凝胶电泳图

4 讨论与结论

随着大豆尖孢镰刀菌造成的减产危害愈来愈大,须及时高效地检测病害,以减少经济损失^[16]。目前的检测技术有菌落平板稀释法、常规 PCR、实时定量 PCR,但其中存在着实验周期长,需要大型仪器的问题,不能实现快速的现场检测。本研究应用等温扩增的 ERA 技术建立了针对该菌的快速检测方法,并创新应用了 2.5 mol/L 四正丁基溴化铵与 SDS 相结合的方法,提取出了较好的大豆尖孢镰刀菌的基因组。季铵盐在乙醇等有机溶剂中的溶解度也更高,因此,在相同工作浓度条件下具有更低的成本,可得到浓度和纯度较好的基因组 DNA。根据 NCBI 上下载的大豆尖孢镰刀菌基因 CYP 505 的特异性区段,并运用 Primer 5 设计了两对正向引物和三对反向引物并进行实验筛选,确认了 F29/R335 为最佳引物对。通过不断地优化检测体系,与其他检测植物病虫害的体系相比:在检测灵敏度方面,本研究的检测下限可达 90 fg/ μ L,而同样应用 ERA 技术仅检测到 10 μ g/ μ L 的样本;在检测时间方面,本试验最优反应时间为 20 min,而王春伟等^[5]则需要 30 min。因此,本试验建立的反应体系具有更灵敏、更快速的优势。

综上,本研究应用 ERA 技术建立的针对大豆尖孢镰刀菌检测方法可以在常温 40 ℃、20 min 内即可显现结果,最低 90 fg/ μ L 时即可检出,具有操作快速、准确、灵敏的优势,可实现现场化的快速检测,为大豆尖孢镰刀菌的检测提供了一个新的方向,对于该病的田间检测和早期诊断有重要意义。

参考文献:

- [1] 何海涛,唐雅楠,顾学虎,等.防治大豆根腐病的药剂筛选及田间应用[J].农药,2023,62(1):55-58.
- [2] 董超,方香玲.植物病原真菌尖孢镰刀菌检测与定量研究进展[J].草地学报,2021,29(7):1599-1604.
- [3] 叶景芬,武绍碧,陈世雄,等.空肠弯曲菌 RPA-LFD 快速检测方法的建立及评价[J].中国兽医学报,2024,44(12):2579-2584.
- [4] 吴佳冲,王颖,张盼盼,等.基于 RPA 的玉米锈病菌快速检测技术的研究[J].植物检疫,2024,38(2):43-49.
- [5] 王春伟,李广信,周书悦,等.引起黄芪根腐病的锐顶镰刀菌的 RPA 检测方法[J].中国植保导刊,2024,44(9):5-9.
- [6] 蒲姝暘,张瑾逸,暴晓阳,等.梨火疫病病菌的 RPA 快速检测技术的研发[J].植物保护,2024,50(4):242-249,282.
- [7] BELLEMARE A, JOHN T, MARQUETEAU S. Fungal Genomic DNA Extraction Methods for Rapid Genotyping and Genome Sequencing[J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1775: 11-20.
- [8] 王海英,刘航空.番茄基因组 DNA 不同微量提取方法的比较及适用性分析[J].西北农业学报,2022,31(12):1560-1567.
- [9] 宋文静,董志涛,荣馨锐,等.基于 RPA 恒温扩增技术对大豆尖孢镰刀菌的快速检测[J].中国植保导刊,2024,44(1):9-15.
- [10] 李欣,崔秀明,刘迪秋,等.三七根腐病菌尖孢镰刀菌的 Real-time PCR 检测方法[J].华北农学报,2019,34(S1):324-330.
- [11] 崔志燕,王瑛丽,张永锋,等.镰刀菌入侵烟草的土壤微生物群落及网络结构特征[J].植物医学,2025,4(2):23-35.
- [12] DE QUEIROZ L T, DE OLIVEIRA BAPTISTA B, DE ABREU-FERNANDES R, et al. Novel Isothermal Nucleic Acid Amplification Method for Detecting *Malaria Parasites* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2024, 108(1): 544.
- [13] 林而舒.鳃鲰疱疹病毒基础 RPA 及 RPA-LFD 检测方法的比较[J].渔业研究,2024,46(4):367-374.
- [14] 卢小雨,张然,欣玮玮.基于 RPA 的玉米锈病菌快速检测技术[J].农村科学实验,2024(24):178-180.
- [15] 乾义柯,魏霜,黄法余,等.向日葵茎溃疡病菌 RPA 检测方法的建立[J].植物检疫,2021,35(2):39-43.
- [16] 刘爽,于海业,隋媛媛,等.大豆病害分类的高光谱分析[J].光谱学与光谱分析,2023,43(5):1550-1555.

责任编辑 杨光明