



董文盼,杨纪潇,杨项明,等.尖孢镰刀菌西瓜专化型 RPA 检测方法的建立与评价[J].南京农业大学学报,2024,47(4):665-673.

DONG Wenpan, YANG Jixiao, YANG Xiangming, et al. The establishment and evaluation of a specialized RPA detection method for *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2024, 47(4): 665-673.

尖孢镰刀菌西瓜专化型 RPA 检测方法的建立与评价

董文盼,杨纪潇,杨项明,吕明慧,朱彦泽,蒋春号*

(南京农业大学植物保护学院生物农药及绿色植保实验室,江苏南京 210095)

摘要:[目的]构建了西瓜枯萎病菌——尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*, FON)的重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)的快速检测体系,以期为田间西瓜枯萎病的快速检测提供技术支持。[方法]从 NCBI 网站下载包括西瓜枯萎病菌在内的 11 种病原真菌的基因组序列,利用 SeqHunter 2 软件进行生物信息学分析,经比对得到 4 个 FON 的特异性基因片段,并对其进行引物设计和筛选。利用聚合酶链式反应(PCR)验证引物的特异性和灵敏度,然后利用建立的 RPA 检测体系对引物的特异性和灵敏度进行验证,最后进行人工接种 FON 的西瓜植株的 RPA 检测与评价。[结果]建立了 FON 的 RPA 检测体系,并对 DNA 恒温快速扩增试剂盒的扩增体系进行最佳反应时间(40 min)和最适反应温度(30 °C)的摸索,得到其最佳反应体系的检测下限为 100 pg·μL⁻¹。利用 DNA 恒温快速扩增试剂盒(胶体金试纸条型)进行扩增时,只需在 38 °C 反应 12 min,取 50 μL 稀释 20 倍的扩增产物用胶体金试纸条进行检测,5 min 后即可进行结果的判断,检测下限为 100 pg·μL⁻¹。[结论]成功构建 FON 的 RPA 检测体系,且建立的 RPA 检测体系能够从温室接种 FON 之后未显症的西瓜植物组织基因组 DNA 中检测到 FON,可为田间西瓜枯萎病早期的快速检测提供技术支持。

关键词:西瓜枯萎病;尖孢镰刀菌西瓜专化型;重组酶聚合酶扩增技术(RPA);快速检测

中图分类号:S432.1

文献标志码:A

文章编号:1000-2030(2024)04-0665-09

The establishment and evaluation of a specialized RPA detection method for *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*

DONG Wenpan, YANG Jixiao, YANG Xiangming, LÜ Minghui, ZHU Yanze, JIANG Chunhao*

(Laboratory of Biopesticide and Green Plant Protection, College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract:[Objectives] A recombinase polymerase amplification (RPA) system was constructed for the rapid detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* (FON) in order to provide technical support for the rapid detection of watermelon wilt in the field. [Methods] The genome sequences of 11 pathogenic fungi, including FON, were downloaded from the NCBI website for bioinformatics analysis using SeqHunter 2 software. Four specific gene fragments of FON were obtained by comparison and primers were designed and screened for them. The specificity and sensitivity of the primers were verified using polymerase chain reaction (PCR), and in addition, the specificity and sensitivity of the primers were verified using the established RPA detection system, and finally, the RPA detection evaluation of artificially inoculated watermelon plants was performed. [Results] The RPA detection system for FON was established, and the optimal reaction time (40 min) and optimal reaction temperature (30 °C) of the amplification system of DNA constant temperature rapid amplification kit were explored, and the detection limit of the optimal reaction system was 100 pg·μL⁻¹. When using the DNA constant temperature rapid amplification kit (colloidal gold test strip type) for amplification, it only needed to react at 38 °C for 12 min, and 50 μL of the amplified product diluted 20 times was detected with the colloidal gold test strip. After 5 min, the results could be judged, and the detection limit was 100 pg·μL⁻¹. [Conclusion] The RPA detection system of FON was successfully constructed. The established RPA detection system could detect FON from the genomic DNA of infected watermelon plant tissues, which could provide technical support for the rapid detection of watermelon *Fusarium* wilt in the field.

Keywords: watermelon wilt disease; *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; recombinant enzyme polymerase amplification technology (RPA); rapid detection

西瓜(*Citrullus lanatus*)甘甜多汁,清爽解渴,其维生素 C 等物质含量丰富,营养价值高,具有重要的经济价值,广受大家喜爱^[1]。西瓜是我国乃至全世界最重要的园艺作物之一,在世界范围内广泛种植^[2]。

收稿日期:2023-05-17

基金项目:中央高校基本业务费专项资金(KYZZ2022001);江苏省重点研发计划项目(BE2021364)

*通信作者:蒋春号,副教授,研究方向为植物病害的生物防治,E-mail:chjiang@njau.edu.cn。

据估计全球西瓜的年产量大约为8亿t。我国是世界上最大的西瓜产地与消费国,西瓜的播种面积超过200万 hm^2 ^[3-4]。研究表明,食用适量的西瓜能减少慢性病的发生^[5]。近年来,西瓜产业蓬勃发展,产量剧增,而长期连续单作使西瓜产生连作障碍,其表现方式之一就是西瓜枯萎病大面积发生。西瓜枯萎病通常导致西瓜减产15%~30%,严重时减产50%~85%,甚至绝收^[6]。尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)属半知菌类从梗孢目瘤座孢科镰刀菌属,是一种最重要的土传病原菌,被评为世界第五大病原真菌^[7-9]。尖孢镰刀菌的分生孢子和菌丝体通常以腐生的方式存在于植物残体中,厚垣孢子和菌丝可在土壤中存活5~6年^[10-11]。病原菌潜伏在土壤中越冬或越夏,通过带病种子、田间昆虫的移动、灌溉和堆肥传播。尖孢镰刀菌西瓜专化型FON一般通过西瓜植株的伤口、裂口或者根尖侵入^[12],侵入后一般在根皮层细胞间繁殖,随后侵入木质部,不断向上侵染。FON可分泌毒素,干扰西瓜植株的正常代谢;分泌果胶酶和纤维素酶,降解植物细胞壁,导致植株枯萎死亡^[13]。

病原物鉴定最经典的方法就是通过病害症状识别、症状鉴定和生物学特性分析等方法进行判断。该鉴定方法不仅鉴定周期长,而且需要相关操作人员具有丰富的专业知识,因此难以满足病害防控需求。在病原真菌的检测鉴定中,许多真菌病原体会产生相似的症状,难以区分不同的病原物。近年来,随着分子生物学的蓬勃发展,基于分子检测手段对病原物进行鉴定的方法越来越普遍,该方法可缩短鉴定周期,提高鉴定的准确性^[14-16]。

2006年,Piepenburg等^[17]利用参与细胞DNA合成、重组和修复的蛋白开发了重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)技术,该技术主要依赖于3种酶(在37~42℃具备活性的重组酶、聚合酶和单链结合蛋白),目前该技术已由TwistDx商业化^[17-18]。RPA的扩增产物可用琼脂糖凝胶电泳进行检测,可与探针结合进行实时定量检测,也可与侧流层析试纸条结合进行结果的即时检测和观察^[19]。

RPA检测技术具有操作简单、特异性强、灵敏度高等优点,检测下限可达fg级且反应只需要1对引物;反应所需温度低,在恒温37~42℃即可产生爆发式扩增;反应所需时间短,10~15min即可完成检测。有研究表明在缺少相关试验设备的情况下利用人体体温也可以进行RPA扩增反应,其检测结果与通过恒温水浴锅进行RPA扩增反应的结果一致,且具有较高的灵敏度^[20]。检测速度快、反应时间短、检测方式多样化以及检测结果可视化等优点使得RPA技术在动植物病毒的检测方面得到广泛应用,但在植物病原细菌方面的检测仅限于由植原体引起的病害,在植物病原真菌方面的检测报道较少。已有番茄细菌性叶斑病菌^[21]、柑橘溃疡病菌(黄单胞柑橘亚种)^[22]、水稻细菌性谷枯病菌和白叶枯病菌^[23]等的RPA检测体系被相继报道,但用于尖孢镰刀菌西瓜专化型的RPA检测体系未见报道。因此,本研究旨在建立FON的RPA检测体系,以期为田间西瓜枯萎病的快速诊断和检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和培养条件

供试菌株见表1。所有菌株保存于滤纸片上,置于-80℃冰箱中长期保存。将保存的真菌于PDA平板上活化,置于25℃培养箱中培养7d后将长满平板的边缘菌丝转接到新的PDA平板上,置于25℃培养箱中培养7d。

表1 供试菌株

Table 1 Test strain

菌株 Strains	病害名称 Disease name	病原真菌 Pathogen	拉丁学名 Latin scientific name	菌株来源 Strain source
XK22	西瓜枯萎病 Watermelon wilt	尖孢镰刀菌西瓜专化型	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i> (E.F.Smith) Wollen	本实验室分离保存 This laboratory collection
XJ22	香蕉枯萎病 Banana panana disease	尖孢镰刀菌古巴专化型	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	本实验室分离保存 This laboratory collection
JK22	菊花枯萎病 Chrysanthemum wilt	尖孢镰刀菌菊花专化型	<i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp. <i>chrysanthemi</i> Snyder et Hansen	本实验室分离保存 This laboratory collection
CK22	草莓枯萎病 Strawberry fusarium wilt	尖孢镰刀菌草莓专化型	<i>Fusarium oxysporum</i> Schl. f. sp. <i>fragariae</i> Winks et Willams	本实验室分离保存 This laboratory collection
JF22	金银花根腐病 Honeysuckle root rot disease	茄腐皮镰刀菌	<i>Fusarium oxysporum</i>	本实验室分离保存 This laboratory collection

续表 1 Table 1 continued

菌株 Strains	病害名称 Disease name	病原真菌 Pathogen	拉丁学名 Latin scientific name	菌株来源 Strain source
JF23	金银花根腐病 Honeysuckle root rot disease	变红镰刀菌	<i>Fusarium oxysporum</i>	本实验室分离保存 This laboratory collection
WK21	水稻纹枯病 Rice sheath blight disease	立枯丝核菌	<i>Rhizoctonia solani</i>	本实验室分离保存 This laboratory collection
FH21	番茄灰霉病 Tomato botrytis cinerea	灰葡萄孢菌	<i>Botrytis cinerea</i>	本实验室分离保存 This laboratory collection
MC21	小麦赤霉病 Scab of wheat	禾谷镰孢	<i>Fusarium graminearum</i> Schwabe	本实验室分离保存 This laboratory collection
LT21	莲雾炭疽病 Waxapple anthracnose	果生刺盘孢菌	<i>Colletotrichum fructicola</i>	本实验室分离保存 This laboratory collection
TM21	甜瓜蔓枯病 Mycosphaeralla melonis	小双胞腔菌	<i>Didymella bryoniae</i>	本实验室分离保存 This laboratory collection

1.2 真菌菌株 DNA 的提取

使用新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型 DP3112,无锡百泰克生物技术有限公司)提取真菌菌丝基因组 DNA。具体试验步骤参照试剂盒说明书。

1.3 西瓜枯萎病菌特异性片段的筛选

从 NCBI 网站下载西瓜枯萎病菌和所选病原真菌的基因组序列,利用 SeqHunter 2 软件比对基因组序列,共筛选到 20 个差异片段,利用 NCBI 网站比对分析,最终确定选用基因序列 NW_022158653.1、NW_022158654.1、NW_022158672.1 和 NW_022158681.1 进行引物设计。

1.4 RPA 引物和探针的设计

目前没有可用于 RPA 引物和探针设计的软件或网站,因此按照 RPA 引物设计的原则:1)引物长度一般 30~35 nt,不宜大于 45 nt;2)引物避免出现发卡结构,GC 含量最好 30%~70%,引物 5'端尽量为 G,避免出现连续的 C,3'端最好以 G 或 C 结尾;3)引物扩增子的长度最好 150~300 bp,不宜大于 500 bp。按照该原则在 1.3 节中筛选得到的 4 个特异性基因片段的上、下游各设计 3 条引物,根据正交组合,每个片段可得到 9 对不同的引物组合,所设计的引物序列如表 2 所示。按照 RPA 探针的设计原则:在上、下游引物中间找一段长为 46~52 nt 的片段,在该片段互补序列的 5'端用常用抗原 FAM 修饰;在其 3'端用 C3-Spacer 修饰;5'端和 3'端中间用四氢呋喃 THF 标记,作为探针的识别位点。

表 2 针对西瓜枯萎病菌特异性片段的 RPA 引物

Table 2 RPA primers for the specific fragment of FON

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'→3')
RPA-653-F1	CTCTATCGCCGGAAGTGAAGTTTAAATCCT	RPA-672-F1	AACGCACATGCGGACCTCTGAGCGATGGCC
RPA-653-F2	CACAAAGAGAAACACTTCTCCTTGCCGCAC	RPA-672-F2	TGCTTGACGGGTCATTATTACGCCCTTGTC
RPA-653-F3	GGTCCGTTGGTTAGACGGTAGATAGACCC	RPA-672-F3	AAGCTACACTTAAGCCACTAGTAATAGGTA
RPA-653-R1	TAAACACGAGAAGTTAGGGTATTGAAGTTCA	RPA-672-R1	AGGTCATCGCCAAGGGATCTCGGAAACTGAT
RPA-653-R2	GCAAAACCATTGCAAGCGCGGATTCATGGTT	RPA-672-R2	TCAAGGCTAATCTCGGTGTAGCGATTAGT
RPA-653-R3	AGAGTAGATTGCAACCCCATTTGCTCGATTTT	RPA-672-R3	TGAAGCTGCTTTAATTCATAGGATTTCCGGC
RPA-654-F1	CACGCCTACGCTACGTCGCTCGTCATCTTGCCG	RPA-681-F1	CCTGCCTCATGACATTTCTGTAATACCTCAAAC
RPA-654-F2	CCGGTGTGGGCTGACTTTCTCAGCCTCTC	RPA-681-F2	CCACCTAGGACATGGCTCTACCGAATACG
RPA-654-F3	CTACTGCTACTACCAATTGATTGGACCTGC	RPA-681-F3	GATGATAAAGGAGCAACAGCTTTACCATCT
RPA-654-R1	CTGGTGGGAACCAGAAATGAGTTAGCGTCACG	RPA-681-R1	TAGGTATGACTCTCGGCTTGAAAATGAATGA
RPA-654-R2	AGGAGAGTTTGGGACACAACCTCGACCCGA	RPA-681-R2	TTACTGGCAGATGGGTTGTTCTGCACTGG
RPA-654-R3	ACAAGCCGACGAAGTGGCTAACCTCACTC	RPA-681-R3	CGTAGAACCTGGATCACCCTTGATGCAGA

1.5 RPA 特异性检测

采用 DNA 恒温快速扩增试剂盒、HybriDetect 试纸条和 DNA 恒温快速扩增试剂盒(胶体金试纸条型)(安普未来生物技术有限公司),按照表 3 和表 4 的反应体系对设计的引物进行特异性检测,同时以表 5 所列的反应体系作为试验的正对照。具体试验步骤参照试剂盒说明书。

表3 DNA恒温快速扩增试剂盒扩增体系

Table 3 The amplification system of the DNA thermostat rapid amplification kit

组分 Component	体积/ μL Volume	组分 Component	体积/ μL Volume
A buffer	29.4	模板 Template	2.0
RPA-681-F($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	2.0	ddH ₂ O	12.1
RPA-681-R($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	2.0	B buffer	2.5
		总体积 Total volume	50.0

表4 DNA恒温快速扩增试剂盒(胶体金试纸条型)反应体系

Table 4 Reaction system of DNA thermostatic rapid amplification kit(colloidal gold test strip type)

组分 Component	体积/ μL Volume	组分 Component	体积/ μL Volume
A buffer	14.70	模板 Template	1.50
RPA-681-F($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.00	ddH ₂ O	5.25
RPA-681-R($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.00	B buffer	1.25
探针($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	0.30		
		总体积 Total volume	25.00

表5 DNA恒温快速扩增试剂盒正对照反应体系

Table 5 Positive control reaction system of DNA thermostatic rapid amplification kit

组分 Component	体积/ μL Volume	组分 Component	体积/ μL Volume
A buffer	29.4	ddH ₂ O	12.1
正对照引物 Positive control primers mix	4.0	B buffer	2.5
正对照模板 Positive control template	2.0		
		总体积 Total volume	50.0

1.6 RPA灵敏度检测

将提取得到的西瓜枯萎病菌基因组DNA进行梯度稀释,用筛选得到的特异性引物进行灵敏度的验证。所用FON基因组DNA浓度梯度依次为 $100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,每组试验重复3次。

1.7 温室接种西瓜枯萎病菌的RPA检测

西瓜种子播种当天进行西瓜枯萎病菌FON的活化。挑选 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存的西瓜枯萎病菌活化于PDA培养平板上,于 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养7d,挑选平板边缘新鲜菌块进行转接。转接后的PDA平板于 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养7d,用打孔器在PDA平板上打制菌碟。将菌碟转移至绿豆培养基中,于 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $220 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床上摇培7d,然后用3层擦镜纸进行孢子液的过滤,将孢子浓度稀释至 $1\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,每株西瓜浇灌 20 mL 孢子液。接种7d后随机选取4株西瓜植株进行取样,提取其基因组DNA,进行RPA检测。共选取4株接种FON后未显症的植物根茎和叶片进行基因组DNA的提取和RPA检测,并用未发病的西瓜植物基因组DNA作为对照,试验重复3次。

2 结果与分析

2.1 RPA反应体系的建立

由于得到的引物数量过多,考虑到反应成本问题,首先用普通PCR反应对设计的引物进行初步筛选,PCR反应结束后再用琼脂糖凝胶电泳对试验结果进行检测。从图1可知,所用引物(681-31-F/681-31-R)只从西瓜枯萎病菌基因组、香蕉枯萎病菌基因组和菊花枯萎病菌基因组中扩增出条带,且从香蕉枯萎病菌基因组中扩增出的条带相比扩增出的其他条带亮度较弱,因此选择681-31-F/681-31-R作为初步筛选到的特异性引物。

NW_022158681.1基因片段的部分序列信息和筛选得到的1对效果较好的RPA引物(681-31-F/681-31-R)的位置如图2所示。根据NW_022158681.1片段的特异性扩增序列进行探针的设计,按照1.4节中所述的探针设计原则得到探针序列:FAM-CGGCATCACTATTCTCTAGGAAAGTAGTGC-THF-AGACTTTGAGCGATC-C3 spacer。

用引物(681-31-F/681-31-R)结合DNA恒温快速扩增试剂盒(胶体金试纸条型)进行RPA扩增,从扩增产物取 $10 \mu\text{L}$ 稀释20倍之后进行胶体金试纸条检测,用试剂盒回收剩余 $15 \mu\text{L}$ 扩增产物后进行琼脂糖

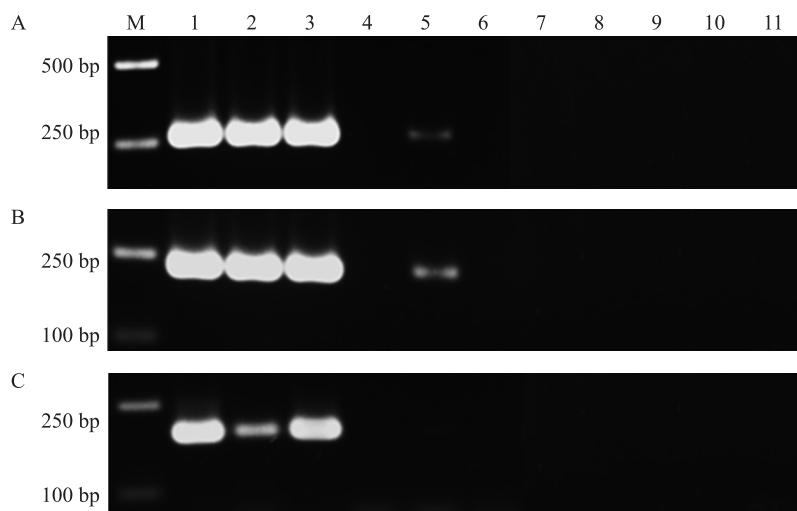


图 1 RPA 特异性引物的 PCR 扩增反应筛选结果

Fig. 1 PCR amplification reaction screening results of RPA specific primers

A. 引物(681-11-F/681-11-R)在 NW_022158681.1 基因中扩增片段大小约为 260 bp;B. 引物(681-21-F/681-21-R)在 NW_022158681.1 基因中扩增片段大小约为 223 bp;C. 引物(681-31-F/681-31-R)在 NW_022158681.1 基因中扩增片段大小约为 189 bp。

M. DNA 标准;1. 西瓜枯萎病菌基因组;2. 香蕉枯萎病菌基因组;3. 菊花枯萎病菌基因组;4. 草莓枯萎病菌基因组;5. 金银花根腐病(茄腐皮镰刀菌)基因组;6. 金银花根腐病(变红镰刀菌)基因组;7. 水稻纹枯病菌基因组;8. 番茄灰霉病菌基因组;9. 小麦赤霉病菌基因组;10. 莲雾炭疽病菌基因组;11. 甜瓜蔓枯病菌基因组。图 3 同。

A. Primer(681-11-F/681-11-R)amplifies a fragment size of about 260 bp in NW_022158681.1 gene;B. Primer(681-21-F/681-21-R)amplifies a fragment size of about 223 bp in NW_022158681.1 gene;C. Primer(681-31-F/681-31-R) in NW_022158681.1 gene amplifies a fragment size of about 189 bp.

M. DNA marker; 1. Genome of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*; 2. Genome of *F. oxysporum* f. sp. *ubense*; 3. Genome of *F. oxysporum* Schl. f. sp. *chrysanthemi*; 4. Genome of *F. oxysporum* Schl. f. sp. *fragariae*; 5. Genome of *F. solani*; 6. Genome of honeysuckle *F. culmorum*; 7. Genome of *Rhizoctonia solani*; 8. Genome of *Botrytis cinerea* (gray mold on tomato); 9. Genome of *F. graminearum* (wheat scab); 10. Genome of *Colletotrichum fructicola*; 11. Genome of *Didymella bryoniae* (gummy stem blight). The same in Table 3.

```

CATTTCGTAATACCTCAAACAGTTCACCTAGGACATGGCTCCTACCGAATACGAGGA
RPA-F
GATGATAAAGGAGCAACAGTCTTACCATCTGTTGAGCGAGATCTTGCGGTTATCAGCG
RPA-Probe
GACGAAATTTGGAATCAAACACTACGGTTTAGCCAAGTCACGGCATCACTATTCTCTAGGA
RPA-R
AAGTAGTGCAAGACTTTGAGCGATCCGCAGCGCCATCCCTCATTCAATTTCAAGCCGA
GAGTCATACCTAGACCACTGCAGAAACAACCCATCTGCCAGTAAATAAGGCTCTGCAT

```

图 2 RPA 引物和探针在 NW_022158681.1 基因中的位置

Fig. 2 RPA primers and probes in NW_022158681.1 gene

凝胶电泳检测,用 2 种检测方法来验证该引物在进行 RPA 扩增反应时的特异性,验证结果如图 3 所示。侧流层析试纸条结果(图 3-a)表明,以 FON 基因组 DNA 为模板的扩增产物在胶体金试纸条的质控线和检测线处均出现清晰的条带,而以其他 10 种供试病原真菌基因组 DNA 为模板的扩增产物在胶体金试纸条上只显示 1 条质控线,表明 681-31-F/681-31-R 引物对 FON 的特异性较强。琼脂糖凝胶电泳结果(图 3-b)表明,以 FON 基因组 DNA 为模板的 RPA 扩增产物回收后用 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,能够看到清晰的约 189 bp 的条带,而以其他 10 种供试病原真菌基因组 DNA 为模板的扩增产物回收后无扩增条带的产生,再次说明该引物对 FON 有良好的特异性。为验证本研究中筛选的引物对全国其他地域 FON 分离株的效果,选取 7 个不同地域的 FON 分离株进行特异性检测,结果(图 3-c)表明,引物 681-31-F/681-31-R 能够检测到来自全国 7 个不同地域的 FON 分离株。

2.2 RPA 反应灵敏度检测

将西瓜枯萎病菌基因组 DNA 进行梯度稀释,使其浓度分别为 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,利用 DNA 恒温快速扩增试剂盒(胶体金试纸条型)进行扩增,扩增产物分别进行侧流层析试纸条检测和琼脂糖凝胶电泳检测,检测结果如图 4 所示。琼脂糖凝胶

电泳试验结果表明建立的 RPA 检测体系的检测下限为 $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,侧流层析试纸条检测结果表明建立的 RPA 检测体系的检测下限为 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,两者结果不完全一致,分析原因可能是由于进行侧流层析试纸条检测时,对扩增产物稀释 20 倍之后才进行上样,导致灵敏度降低。

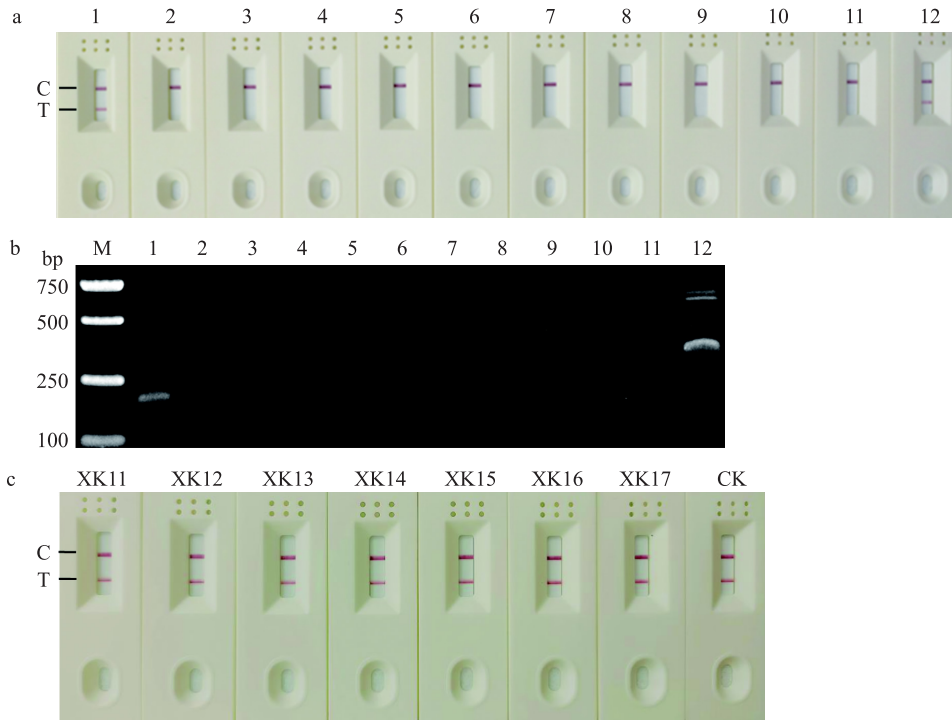


图3 RPA 特异性引物的筛选结果

Fig. 3 Screening results of RPA specific primers

a. 以不同病原真菌基因组 DNA 为模板的侧流层析试纸条检测结果;b. DNA 恒温快速扩增试剂盒(胶体金试纸条型)扩增产物经试剂盒回收之后的琼脂糖凝胶电泳结果;c. 以不同地域病株的 FON 基因组 DNA 为模板的侧流层析试纸条检测结果。12. 试剂盒正对照。XK11. 分离自江苏省南京市江宁区横溪镇的 FON;XK12. 分离自江苏省南京市六合区的 FON;XK13. 分离自江苏省南京市高淳区的 FON;XK14. 分离自江苏省淮安市的 FON;XK15. 分离自江苏省盐城市东台市的 FON;XK16. 分离自山东省寿光市的 FON;XK17. 分离自安徽省宿州市的 FON;CK. 试剂盒正对照。C. 对照;T. 试验组。下同。

a. The test results of side-flow chromatography strips using genomic DNA of different pathogenic fungi as templates;b. The agarose gel electrophoresis results of the DNA constant temperature rapid amplification kit (colloidal gold strip type) after the kit is recovered;c. The test results of side-flow chromatography strips using FON genomic DNA of diseased plants from different regions as templates. 12. Positive control of the kit. XK11. FON of Hengxi Town, Jiangning District, Nanjing City, Jiangsu Province;XK12. FON of Liuhe District, Nanjing City, Jiangsu Province;XK13. FON of Gaochun District, Nanjing City, Jiangsu Province;XK14. FON of Huai'an City, Jiangsu Province;XK15. FON of Dongtai City, Yancheng City, Jiangsu Province;XK16. FON of Shouguang City, Shandong Province;XK17. FON of Suzhou City, Anhui Province;CK. Positive control of the kit. C. Control;T. Treatment. The same as follows.

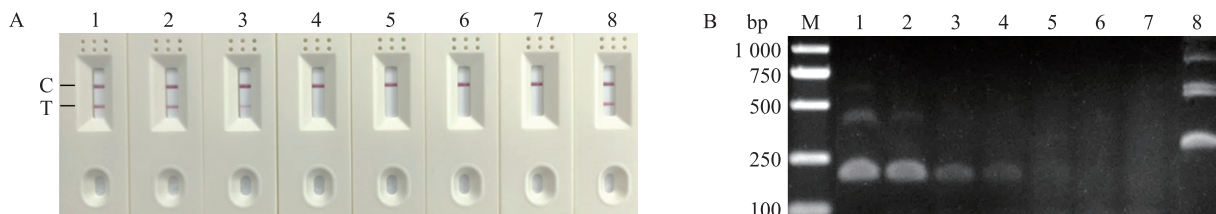


图4 RPA 反应灵敏度检测试验结果

Fig. 4 RPA sensitivity test results

A. 侧流层析试纸条检测结果;B. DNA 恒温快速扩增试剂盒(胶体金试纸条型)扩增产物经试剂盒回收后的琼脂糖凝胶电泳检测结果。1. $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;2. $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;3. $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;4. $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;5. $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;6. $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;7. $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;8. 试剂盒正对照。

A. The test results of the side-flow chromatography strip;B. The agarose gel electrophoresis test results of the DNA constant temperature rapid amplification kit (colloidal gold strip type) after the kit recovery of the amplified products. 1. $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;2. $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;3. $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;4. $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;5. $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;6. $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;7. $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$;8. Positive control of the kit.

2.3 温室接种西瓜的 RPA 检测

为验证本研究所建立的 RPA 检测体系在实际应用中的可行性和其在田间进行实际检测的效果,直接采用胶体金试纸条进行扩增结果的检测。接种西瓜枯萎病菌后在植株显症之前随机选取 4 株西瓜植株,提取其基因组 DNA,以未接种 FON 的西瓜植物组织基因组 DNA 为空白对照,利用 DNA 恒温快速扩增试剂盒(胶体金试纸条型)进行 RPA 检测。RPA 扩增结束后将扩增产物稀释 20 倍,取 50 μ L 稀释产物直接用胶体金试纸条进行反应结果的检测。结果(图 5)表明,以接种 FON 未显症的 4 株西瓜植物组织基因组 DNA 为模板的 RPA 扩增产物经试纸条检测后均出现 2 条条带,而以未接种 FON 的西瓜植物组织基因组 DNA 为模板的 RPA 扩增产物经试纸条检测后只出现 1 条质控线(图 5-A)。对取样的 4 株植物进一步观察,发现 4 株植物后期均出现典型的西瓜枯萎病的症状(图 5-B),说明本研究建立的 RPA 检测体系可成功应用于温室接种西瓜的 RPA 检测,并且可在植株未显症之前检测到 FON。

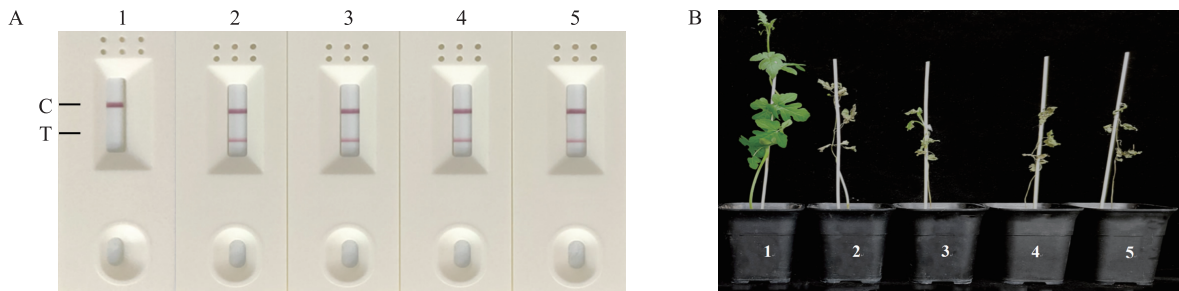


图 5 RPA 检测体系对温室接种西瓜植株的检测结果

Fig. 5 Results of RPA detection system on inoculated watermelon plants in greenhouse

A. 温室接种 FON 未显症的西瓜植株基因组 DNA 的 RPA 检测结果;B. 检测的西瓜植株后期的发病情况。1. 未接种 FON 的西瓜植株的试验检测结果;2~5. 温室接种 FON 的西瓜植株的试验检测结果。

A. The RPA detection results of genomic DNA of watermelon plants inoculated with FON in the greenhouse;B. The late-stage disease of watermelon plants. 1. The corresponding test results of watermelon plants without FON inoculation;2-5. Corresponding test results of watermelon plants inoculated with FON in greenhouse.

3 讨论与结论

西瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌西瓜专化型 FON 侵染西瓜引起的病害,该病害发病面积广,发病速度快,对西瓜的产量影响极大^[24]。目前没有可以彻底清除发病地块中西瓜枯萎病菌的方法,导致西瓜种植过程中的连作障碍逐年加重^[25]。我国作为西瓜生产和消费的第一大国,西瓜种植过程中一旦发生西瓜枯萎病将导致极大的经济损失^[3-4]。通过苗期管理、轮作和嫁接的方法防控西瓜枯萎病难度大和成本高,难以进行大面积推广;培育抗病品种周期长且 FON 分化类型多,难以进行多位点抗性育种^[26]。化学防治虽然见效快,防效高,但存在对人畜不安全、环境污染大等问题^[27]。生物防治是当下防治西瓜枯萎病的最佳选择之一,但生物防治见效慢,适用范围小且使用效果易受天气影响。因此,建立西瓜枯萎病菌的快速检测技术对西瓜枯萎病的流行预测以及制定有针对性的防控策略具有重要的意义。

近年来,曹月霞等^[28]利用 FON 的特异性引物和尖孢镰刀菌的通用引物,设计了双重 PCR 检测体系检测 FON,但该技术需要使用昂贵的实验仪器,难以在田间推广应用;肖姬玲等^[29]利用巢式 PCR 原理,建立了检测土壤中 FON 的 SYBR Green I qPCR 检测体系,但该技术同样需要使用昂贵的实验仪器,难以在田间推广应用;赵爽等^[30]采用基因宏阵列(Macroarray)和荧光定量 PCR(Real-time PCR)的方法,对 FON 进行了快速监测和快速绝对定量,但该方法需要在 Kodak Biomax 胶片上定影、显影后用扫描仪记录试验结果,更难以在田间进行操作。杨科等^[31]建立了 FON 的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测体系,该方法可直接根据反应产物的颜色变化进行结果的判断,60~65 $^{\circ}$ C 即可产生爆发式扩增,在恒温水浴锅中即可进行反应,不需要使用昂贵的实验仪器,但该方法容易产生气溶胶污染,反应使用的羟基萘酚蓝(HNB)显色剂不稳定,使用的 SYBR Green I 指示剂成本较高。本文建立的 RPA 检测体系在 37 $^{\circ}$ C 恒温即可产生爆发式扩增,用试纸条进行显色反应的结果更易观察,具有操作简单、检测灵敏度高、反应所需温度低和不需要使用昂贵的实验仪器以及更易在田间进行检测等优点,可为田间西瓜枯萎病的快速诊断提供技术支持。

本文通过生物信息学分析筛选得到了 FON 的 4 个特异性片段,并对其进行 RPA 引物的设计,通过普通 PCR 扩增反应对引物进行特异性和灵敏度的筛选,并用 DNA 恒温快速扩增试剂盒对其进行验证(结果未展示),得到对 FON 特异性和灵敏度较好的 1 对引物,利用该引物的扩增片段设计 RPA 探针,并对扩增效果较好的反向引物(RPA-681-R)进行修饰,再用 DNA 恒温快速扩增试剂盒(胶体金试纸条型)进行扩增反应,扩增结束后取 10 μL 扩增产物稀释 20 倍进行胶体金试纸条检测,用试剂盒回收剩余 15 μL 扩增产物后,进行琼脂糖凝胶电泳检测,以筛选确定合适的探针,最后利用筛选得到的特异性引物和探针进行温室接种西瓜植株的 RPA 检测,结果表明本研究中所建立的 RPA 检测体系能够从温室接种未显症的西瓜植株中检测到 FON,可为田间西瓜枯萎病早期的快速检测提供技术支持。RPA 的未来发展会更多地集中于现场检测 and 多重检测,且多重检测将通过一个 RPA 反应实现对多种病原的检测。

本研究首次报道了可用于尖孢镰刀菌西瓜专化型 FON 的 RPA 检测体系。利用 DNA 恒温快速扩增试剂盒(胶体金试纸条型)进行检测时,只需在 38 $^{\circ}\text{C}$ 反应 12 min(有研究表明利用人体体温进行 RPA 扩增反应仍具有较高的灵敏度^[20]),取 50 μL 稀释 20 倍的扩增产物用胶体金试纸条进行检测,5 min 后即可进行结果的判断,整个过程只需 20 min 即可完成 FON 的快速检测,检测下限为 100 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。本研究通过多种检测方法对 RPA 扩增结果进行检测,均得到一致的结果,且建立的 RPA 检测体系能够从温室接种未显症的西瓜植物组织基因组 DNA 中检测 FON,可为田间西瓜枯萎病早期的快速检测提供技术支持。

参考文献 References:

- [1] 张金鹏,耿伟,张爽爽,等. 长春及周边地区椭圆大果型西瓜品种比较试验[J]. 长江蔬菜,2020(2):58-61.
Zhang J P, Geng W, Zhang S S, et al. Comparative experiment of elliptical large fruit watermelon cultivars in Changchun and surrounding areas[J]. Journal of Changjiang Vegetables, 2020(2):58-61 (in Chinese with English abstract).
- [2] Garcia-Lozano M, Dutta S K, Natarajan P, et al. Transcriptome changes in reciprocal grafts involving watermelon and bottle gourd reveal molecular mechanisms involved in increase of the fruit size, rind toughness and soluble solids[J]. Plant Molecular Biology, 2020, 102(1):213-223.
- [3] 耿士均,刘刊,商海燕,等. 园艺作物连作障碍的研究进展[J]. 北方园艺,2012(7):190-195.
Geng S J, Liu K, Shang H Y, et al. Research progress of continuous cropping obstacle in horticultural plants[J]. Northern Horticulture, 2012(7):190-195 (in Chinese with English abstract).
- [4] 叶素芬. 黄瓜根系自毒物质对其根系病害的助长作用及其缓解机制研究[D]. 杭州:浙江大学,2004.
Ye S F. Research on promotive effects of *Fusarium* wilt in *Cucumis sativus* by cinnamic acid, an autotoxin in root exudates of *Cucumis sativus* L., and mitigation mechanism by grafting and cinnamic acid-degrading microbial strains[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004 (in Chinese with English abstract).
- [5] Romdhane M B, Haddar A, Ghazala I, et al. Optimization of polysaccharides extraction from watermelon rinds: structure, functional and biological activities[J]. Food Chemistry, 2017, 216:355-364.
- [6] Martyn R D. Fusarium wilt of watermelon: 120 years of research[J]. Horticultural Reviews, 2014, 42:349-442.
- [7] Dean R, van Kan J A, Pretorius Z A, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(4):414-430.
- [8] Kleczewski N M, Egel D S. A diagnostic guide for *Fusarium* wilt of watermelon[J]. Plant Health Progress, 2011, 12(1):27.
- [9] Wu H S, Raza W, Liu D Y, et al. Allelopathic impact of artificially applied coumarin on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(8):1297-1304.
- [10] 刘波,黄俊生,肖荣凤. 尖孢镰刀菌生物学及其生物防治[M]. 北京:科学出版社,2013.
Liu B, Huang J S, Xiao R F. Biology and Biological Control of *Fusarium oxysporum*[M]. Beijing: Science Press, 2013 (in Chinese).
- [11] 李培夫. 新疆陆地棉抗病育种现状及对策[J]. 西北农业学报,2000,9(2):128-131.
Li P F. The present condition and counter measure of Xinjiang upland cotton disease resistant breeding[J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2000, 9(2):128-131 (in Chinese with English abstract).
- [12] 周华众,李祥,刘慧. 棉花枯萎病菌侵染棉籽途径的研究 II. 从花器系统侵染棉籽的途径[J]. 华中农业大学学报,1997,16(4):263-267.
Zhou H Z, Li X, Liu H. Studies on the ways of infecting cottonseed in cotton fusarium wilt II. The ways of infecting cottonseed from floral organ system[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 1997, 16(4):263-267 (in Chinese with English abstract).
- [13] 邓小龙,颜继烂,李艳君,等. 西瓜枯萎病的发生及防治[J]. 安徽农学通报,2011,17(8):115-116.
Deng X L, Yan J L, Li Y J, et al. Occurrence and control of watermelon *Fusarium* wilt[J]. Anhui Agricultural Science Bulletin, 2011, 17(8):115-116 (in Chinese).
- [14] Kapoor R, Srivastava N, Kumar S, et al. Development of a recombinase polymerase amplification assay for the diagnosis of banana bunchy top virus in different banana cultivars[J]. Archives of Virology, 2017, 162(9):2791-2796.
- [15] Babu B, Washburn B K, Ertek T S, et al. A field based detection method for rose rosette virus using isothermal probe-based reverse transcription-

- recombinase polymerase amplification assay[J]. *Journal of Virological Methods*,2017,247:81-90.
- [16] Wu Y D, Xu M J, Wang Q Q, et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow (LF) strip for detection of *Toxoplasma gondii* in the environment[J]. *Veterinary Parasitology*,2017,243:199-203.
- [17] Piepenburg O, Williams C H, Stemple D L, et al. DNA detection using recombination proteins[J]. *PLoS Biology*,2006,4(7):e204.
- [18] 景志刚,董浩,狄栋栋,等. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. *生物技术通报*,2016,32(6):47-53.
Jing Z G, Dong H, Di D D, et al. Research progress on recombinase polymerase amplification[J]. *Biotechnology Bulletin*,2016,32(6):47-53 (in Chinese with English abstract).
- [19] Xu C, Li L, Jin W J, et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) of CaMV-35S promoter and nos terminator for rapid detection of genetically modified crops[J]. *International Journal of Molecular Sciences*,2014,15(10):18197-18205.
- [20] Li T, Huang S S, Dong M H, et al. Prognostic impact of SUMO-specific protease 1 (SEN1) in prostate cancer patients undergoing radical prostatectomy[J]. *Urologic Oncology*,2013,31(8):1539-1545.
- [21] 魏梅生,田茜,赵文军,等. 番茄细菌性叶斑病菌 RPA 检测技术[J]. *植物保护*,2016,42(1):150-153.
Wei M S, Tian Q, Zhao W J, et al. Rapid detection of *Pseudomonas syringae* pv. tomato by RPA method[J]. *Plant Protection*,2016,42(1):150-153 (in Chinese with English abstract).
- [22] 马志敏,段玉,许建建,等. 基于重组酶聚合酶扩增技术(RPA)的柑橘溃疡病菌检测方法[J]. *园艺学报*,2021,48(3):590-599.
Ma Z M, Duan Y, Xu J J, et al. The rapid detection of *Xanthomonas citri* ssp. *citri* (xcc) based on recombinase polymerase amplification (RPA) assay[J]. *Acta Horticulturae Sinica*,2021,48(3):590-599 (in Chinese with English abstract).
- [23] 方雪阳,田茜,孙羽佳,等. 水稻细菌性谷枯病菌和水稻白叶枯病菌荧光 RPA 快速检测方法的建立[J]. *植物检疫*,2023,37(1):49-55.
Fang X Y, Tian Q, Sun Y J, et al. Establishment of fluorescence RPA detection methods for *Burkholderia glumae* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* [J]. *Plant Quarantine*,2023,37(1):49-55 (in Chinese with English abstract).
- [24] 肖密. 哈茨木霉 T2-16 对西瓜枯萎病防治效果及机理初探[D]. 长沙:湖南农业大学,2015.
Xiao M. Effect and mechanism of *Trichoderma* inducing watermelon to resistance *Fusarium* wilt [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2015 (in Chinese with English abstract).
- [25] 曹云,吴华山,郭德杰,等. 沼液处理对连作西瓜枯萎病发生、产量及品质的影响[J]. *土壤*,2015,47(5):904-910.
Cao Y, Wu H S, Guo D J, et al. Effect of biogas slurry application on incidence of *Fusarium* wilt, fruit yield and quality of watermelon [J]. *Soils*, 2015,47(5):904-910 (in Chinese with English abstract).
- [26] 徐暄,王永强,孙其文. 西瓜枯萎病防治研究综述[J]. *安徽农学通报*,2016,22(17):94-95,100.
Xu X, Wang Y Q, Sun Q W. Review on control of watermelon *Fusarium* wilt [J]. *Anhui Agricultural Science Bulletin*,2016,22(17):94-95, 100 (in Chinese).
- [27] 穆静娟,焦加国,葛新成,等. 植物病原真菌广谱拮抗菌 M29 的筛选、鉴定及其抑菌机制[J]. *南京农业大学学报*,2017,40(1):84-92. DOI:10.7685/jnau.201604007.
Mu J J, Jiao J G, Ge X C, et al. Screening, identification and antifungal mechanism of broad-spectrum antagonistic strain M29 against plant pathogenic fung [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*,2017,40(1):84-92 (in Chinese with English abstract).
- [28] 曹月霞,凌健,谢丙炎,等. 西瓜枯萎病菌的快速检测与鉴定[J]. *生物技术通报*,2015,31(7):58-63.
Cao Y X, Ling J, Xie B Y, et al. Rapid detection and identification of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* [J]. *Biotechnology Bulletin*,2015, 31(7):58-63 (in Chinese with English abstract).
- [29] 肖姬玲,张屹,李基光,等. 实时荧光定量 PCR 检测土壤西瓜枯萎病菌体系的建立[J]. *植物保护学报*,2018,45(4):921-922.
Xiao J L, Zhang Y, Li J G, et al. Establishment of real-time PCR system for quantitatively detecting *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in soil [J]. *Journal of Plant Protection*,2018,45(4):921-922 (in Chinese with English abstract).
- [30] 赵爽,罗佳,凌宁,等. 基因宏阵列和荧光定量 PCR 方法对西瓜枯萎病害土壤中尖孢镰刀菌的快速检测和定量[J]. *土壤学报*,2010, 47(4):703-708.
Zhao S, Luo J, Ling N, et al. Quick check and quantification of *Fusarium oxysporum* in soil with macroarray and real-time PCR method [J]. *Acta Pedologica Sinica*,2010,47(4):703-708 (in Chinese with English abstract).
- [31] 杨科,肖姬玲,张屹,等. 西瓜枯萎病菌快速 LAMP 检测体系的建立[J]. *农业生物技术学报*,2021,29(9):1836-1844.
Yang K, Xiao J L, Zhang Y, et al. Establishment of a rapid LAMP detection assay for *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*,2021,29(9):1836-1844 (in Chinese with English abstract).

责任编辑:刘怡辰