

网络出版时间:2025-05-23

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20250522.1549.002

青稞禾生指葡萄孢霉(*Dactylobotrys gramincola*) LAMP 快速检测方法的建立及应用

张海青, 杜春梅, 董瑞芳, 姚强

(青海大学农林科学院, 青海西宁 810016)

摘要:青稞鞘腐病是由禾生指葡萄孢霉(*Dactylobotrys gramincola*)引起的穗部病害,严重影响青稞的产量和品质。本研究基于环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP),以*D. gramincola*的ITS序列为基础,设计并筛选出1组特异性引物,通过优化反应温度,建立了灵敏度高且可快速检测青稞*D. gramincola*的LAMP检测方法。进一步对该方法的特异性和灵敏度进行评估,并对田间疑似发病植株的茎、旗叶、穗组织进行检测。结果表明,该LAMP检测体系在64℃下反应70 min即可从6种青稞病原菌中有效检测*D. graminicola*,检测灵敏度达 $13.07 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,比常规PCR技术灵敏度高100倍。对田间疑似发病植株组织进行检测,穗部检出10份阳性样本,旗叶检出8份阳性样本,茎秆部位未检出,检出率为50%。该方法能够特异性检测青稞发病组织中的*D. graminicola*,为青稞鞘腐病的田间快速诊断及病原菌检测提供了新方法。

关键词:青稞;禾生指葡萄孢霉;环介导等温扩增;田间快速检测

中图分类号:S512.3;S435.123

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2025)07-0993-08

Establishment and Application of Loop-Mediated Isothermal Application Assay for Detecting *Dactylobotrys gramincola* in Highland Barley

ZHANG Haiqing, DU Chunmei, DONG Ruifang, YAO Qiang

(Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Qinghai University, Xining, Qinghai 810016, China)

Abstract: Highland barley sheath rot is a panicle disease caused by *Dactylobotrys gramincola*, which seriously affects the yield and quality of highland barley. In this study, a set of specific primers were designed and screened based on the ITS sequence of *D. gramincola* based on loop-mediated isothermal amplification(LAMP). By optimizing the reaction temperature, a LAMP detection method with high sensitivity and rapid detection of *D. gramincola* was established. The specificity and sensitivity of the method were further evaluated, and the stem, flag leaf, and panicle tissues of the suspected diseased plants in the field were detected. The results showed that the LAMP detection system can effectively detect *D. graminicola* from six highland barley pathogens at 64 °C for 70 min. The detection sensitivity was $13.07 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, which was 100 times higher than that of the conventional PCR. The tissues of the suspected diseased plants in the field were detected. Ten positive samples were detected in the panicle; eight positive samples were detected in the flag leaf; and no positive samples were detected in the stem. The detection rate was 50%.

Keywords: Highland barley; *Dactylobotrys gramincola*; Loop-mediated isothermal application; Rapid detection in the field

收稿日期:2024-07-18

修回日期:2024-12-08

基金项目:青海省科技计划-杰出青年基金项目(2023-ZJ-944J)

第一作者 E-mail:zhanghaiqing0703@163.com(张海青)

通讯作者 E-mail:yaoqiang2010@126.com(姚强)

青稞又称裸大麦^[1],禾本科大麦属,是青藏高原及周边高海拔地区种植的小禾谷类粮食作物,用于食品、饲料、酿酒和保健^[2-3]。青稞鞘腐病是青稞生产上的常发病害,在中国甘肃省、青海省、西藏自治区、四川省、云南省等青稞种植区域都有发生,重病田病穗率可达 20%~30%,局部病穗率可达 10%~15%,影响青稞的品质和产量^[4-5]。该病害病原菌为禾生指葡孢霉 *D. graminicola*,该病菌为无性真菌—从梗丝孢菌,寄主范围广泛,一些禾谷类作物及禾本科杂草都是其自然寄主^[5-6]。笔者田间调查发现,青稞穗部是主要发病部位,有时旗叶、茎秆会出现不同程度的病斑。

用于植物病害的分子检测技术常见的为 PCR^[7-8]及 RT-PCR^[9],这些检测手段耗时、耗力、工作量大,常需要在实验室内使用昂贵的仪器设备,对技术人员的专业要求高,检测程序繁琐、实验周期相对较长,无法即时指导生产实践。

2000 年,Notomi 等^[10]提出环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP),针对靶标序列设计 4~6 条引物,利用 Bst DNA 聚合酶在 63~67 °C 恒温环境下完成反应,可以直接通过肉眼观察结果^[11],便于田间进行。LAMP 结果的判定方式多样,有电泳检测法、浊度检测法^[12]以及实时荧光定量检测法^[13]。相比于普通 PCR 技术,LAMP 在检测方面具有诸多优势,更适合进行指定片段的大量扩增。

LAMP 目前被广泛应用于检测植物病原物。Fukuta 等^[14]在 2003 年发表了第一个关于植物病害检测的研究,该研究使用 RT-LAMP 检测山药花叶病毒(JYMV)。Marra 等^[15]利用 RT-LAMP 检测小麦纺锤条斑花叶病毒(WSSMV)。Poniatowska 等^[16]开发了引起苹果褐腐病的 3 种病原菌的 LAMP 检测方法。Feng 等^[17]使用 LAMP 技术来检测土壤和生菜中 4 种卵菌的 LAMP 检测方法。常海城等^[18]建立了向日葵核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的 LAMP 检测方法。胡章薇等^[19]基于麦类核腔菌(*Pyrenophora graminea*)的 ITS-rDNA 序列设计特异性引物,建立了 LAMP 技术体系。本研究基于 LAMP 检测技术,建立了快速检测青稞 *D. graminicola* 病害的方法,并从特异性、灵敏度、田间疑似病样检测等方面对其实用性进行了评价,为青稞鞘腐病的田间检测提供新方法。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试菌株:所用菌株共 6 种(表 1),均由青海省农业有害生物综合治理重点实验室提供。

表 1 用于 LAMP 检测的青稞病原菌信息

Table 1 Information on barley pathogens used for LAMP testing

菌株编号 Number of pathogen	病原菌 Pathogen
1	禾生指葡孢霉 <i>Dactylobostrys graminicola</i>
2	麦类核腔菌 <i>Pyrenophora graminea</i>
3	坚黑粉菌 <i>Ustilago horde</i>
4	裸黑粉菌 <i>Ustilago nuda</i>
5	禾谷镰孢 <i>Fusarium graminearum</i>
6	细链格孢 <i>Alternaria alternata</i>

主要试剂盒及试剂:DNA-LAMP 扩增试剂盒和荧光目视检测试剂盒均购自日本荣研化学株式会社,DL2000 DNA marker、Loading Buffer、2 × Taq PCR Marker Mix 均购于 Tiangen 公司。

仪器:Qiagen Tissue Lyser II 高通量组织研磨仪、Thermo sorvall ST 16R 高速冷冻离心机、ABI 7500 实时荧光定量仪、Applied Biosystems Veriti PCR 仪和 Bio-Rad 电泳仪等。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计合成及筛选

将 *D. graminicola* DNA 进行 ITS 序列(ITS1: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'、ITS4: 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增,测序拼接得到 *D. graminicola* ITS 序列。根据 *D. graminicola* ITS 序列,用在线软件 Primer Explore V5 设计青稞 *D. graminicola* 的 LAMP 引物,共设计 5 组引物进行特异性和灵敏度筛选,序列测序、引物合成由杨凌天润奥科生物科技有限公司完成。

1.2.2 DNA 模板的制备

采用改良 CTAB 法提取供试菌株 DNA^[20],置于 -20 °C 冰箱中冷冻保存。

1.2.3 LAMP 反应体系和结果判断

LAMP 检测体系为 2 × 等温扩增缓冲液 12.5 μL, Bst DNA 聚合酶 1 μL, 0.04 μmol · L⁻¹ 内引物 FIP/BIP 各 2.5 μL, 0.005 μmol · L⁻¹ 外引物 F3/B3 各 1 μL, 0.01 μmol · L⁻¹ 环引物 LF 1 μL, FD 1 μL, DNA 2 μL, ddH₂O 0.5 μL。LAMP 检测体系的条件为 65 °C, 70 min, 每隔 1 min 实时荧光

定量仪读取一次荧光。检测结果由两种方法判定。染色观察法:以黄绿素(FD)为显色指示剂,通过肉眼观察指示剂颜色变化判断扩增结果,阳性为荧光绿色,阴性为浅橘色;荧光检测法:阳性 DNA 扩增曲线为“S”型,阴性 DNA 扩增曲线为直线。

1.2.4 LAMP 检测体系的最佳温度筛选

筛选出特异性引物组后,对 LAMP 检测体系的反应温度进行优化。以 *D. graminicola* DNA 为模板,设置 60、61、62、63、64 和 65 °C 等 6 个温度梯度,筛选出 LAMP 检测体系的最佳反应温度。LAMP 结果采用染色观察法或荧光检测法来判别。

1.2.5 LAMP 特异性评价

用优化后的条件,以 *D. graminicola* DNA 作为模板,以 *P. graminea*、*U. hordei*、*U. nuda*、*F. graminearum*、*A. alternata* 菌株 DNA 及 ddH₂O 作为阴性对照,进行 LAMP 特异性检测。LAMP 结果采用染色观察法或荧光检测法来判别。

1.2.6 LAMP 灵敏度评价

以 *D. graminicola* DNA 为模板,将浓度为 130.7 pg · μL⁻¹ 的 DNA 进行 10 倍梯度稀释,使其质量浓度分别为 130.7 pg · μL⁻¹, 13.07 pg · μL⁻¹, 1.307 pg · μL⁻¹, 130.7 fg · μL⁻¹, 13.07 fg · μL⁻¹, 1.307 fg · μL⁻¹ 和 130.7 ag · μL⁻¹ 共 7 个梯度。各取 2 μL 模板 DNA 加入 LAMP 检测体系中,以 ddH₂O 为阴性对照。LAMP 扩增后,通过染色观察法或荧光检测法判别结果,并与常规 PCR 进行比较,以评估其灵敏度。常规 PCR 扩增体系(总体积为 25 μL):E×Taq 12.5 μL, F3 0.5 μL, B3 0.5 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 10.5 μL。PCR 反应程序:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 35 个循环;72 °C 终延伸 7 min。

1.2.7 田间疑似发病植株组织中禾生指葡孢霉的检测

在青海省海北藏族自治州门源县,采集青稞鞘腐病疑似发病植株,以穗、旗叶和茎三个组织的 DNA 为模板,*D. graminicola* DNA 为阳性对照,ddH₂O 为阴性对照,以最佳引物组(表 2)进行 LAMP 扩增。在 65 °C 反应 70 min,每 1 min 读取一次荧光,反应前体系中加入 1 μL 钙黄绿素。扩增结果采用染色观察法或荧光检测法来判别。

表 2 LAMP 扩增反应的引物序列

Table 2 Primer sequence of LAMP amplification reaction

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
F3	TGGTTCTGGCCTCGATGA
B3	GCCAATGGATTTGGGAGAGG
FIP	GGCGCAATGTGCGTTCAAAGAT- GAACGACGCGAAATGCGATA
BIP	GCCAGTACTCTGGCAGGCATCAC- CTCCAACACCAAGCC
LF	TCGATGATTACGGAATTCTG- CAAT

2 结果与分析

2.1 LAMP 引物组的筛选

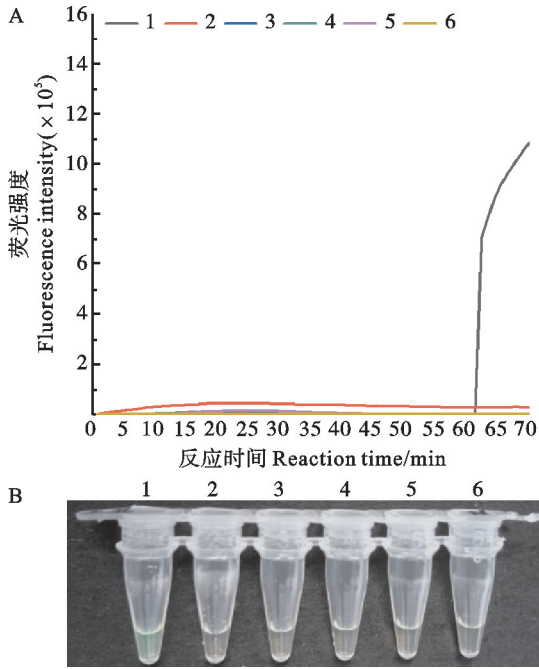
采用青稞的 *D. graminicola* ITS 序列共设计 5 组引物组用于 LAMP 检测,以 *D. graminicola* DNA 为模板,在 65 °C 恒温条件下反应 70 min。结果(图 1A)显示,只有引物组 1 的 DNA 扩增曲线呈“S”型,其余 4 组引物的扩增曲线及 ddH₂O 阴性对照均呈直线,非“S”型曲线。可视化结果(图 1B)显示,只有引物组 1 的反应溶液呈荧光绿色(阳性),其余 4 组引物及阴性对照反应溶液呈浅橘色(阴性)。因此,选用引物组 1 作为青稞的 *D. graminicola* LAMP 检测的最佳引物组,引物信息详见表 2。

2.2 LAMP 检测体系的最佳温度筛选

以 *D. graminicola* DNA 为模板,设置 60、61、62、63、64 和 65 °C 共 6 个温度,筛选 LAMP 检测体系的最佳温度。检测结果发现,在 6 个温度条件下都是“S”型 DNA 扩增曲线(图 2A),反应溶液呈荧光绿色(图 2B)。其中 64 °C 条件下,反应 45 min 时荧光曲线出峰最早,因此,选择 64 °C 为青稞的 *D. graminicola* LAMP 检测最佳反应温度。

2.3 LAMP 的特异性评价

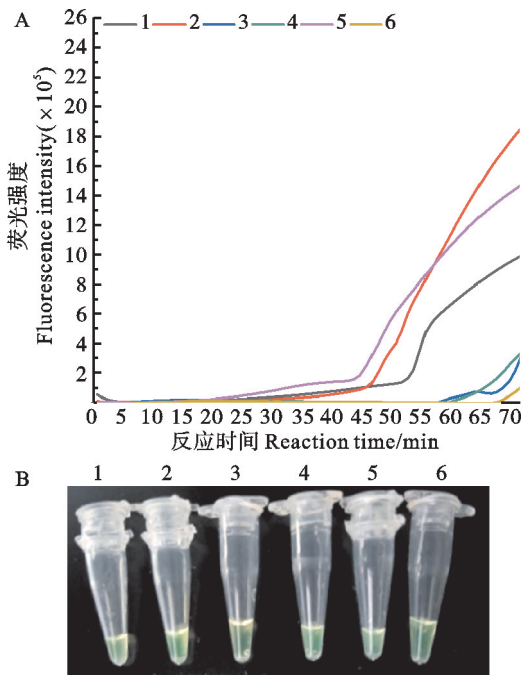
LAMP 反应体系的特异性检测,以表 1 中 6 株菌株的 DNA 为模板,进行 LAMP 扩增。结果显示(图 3),仅菌株 *D. graminicola* 检测结果呈阳性,其 DNA 扩增曲线呈现典型的“S”型,同时可视化反应颜色表现为荧光绿色。相比之下,非目标菌株及阴性对照组的检测结果均呈现阴性, DNA 扩增曲线为直线,且可视化反应颜色为浅橘色。表明所建立的 LAMP 检测体系具备特异性检测青稞的 *D. graminicola* 的能力。



A: DNA 扩增曲线; B: LAMP 可视化结果; 1~5 分别为引物组, 6 为 ddH₂O(阴性对照)。

A: DNA amplification curve; B: LAMP visualization results; 1-5 represent primer sets, respectively; 6 is ddH₂O(negative control).

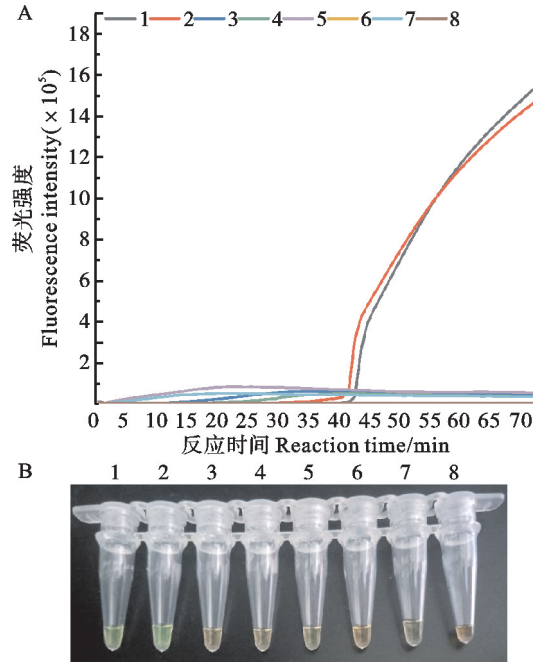
图 1 青稞鞘腐病 LAMP 引物筛选
Fig. 1 Screening of LAMP primers for hulless barley sheath rot



A: DNA 扩增曲线; B: LAMP 可视化结果; 1~6 分别为 60、61、62、63、64 和 65 °C。

A: DNA amplification curve; B: LAMP visualization results; 1-6 are temperatures at 60, 61, 62, 63, 64, and 65 °C, respectively.

图 2 LAMP 在不同温度条件下的扩增结果
Fig. 2 LAMP detection with different amplification temperatures



A: DNA 扩增曲线; B: LAMP 可视化结果; 1~2 为 *D. graminicola*; 3~7 分别为 *P. graminea*、*U. hordei*、*U. nuda*、*F. graminearum* 和 *A. alternata*; 8 为 ddH₂O(阴性对照)。

A: DNA amplification curve; B: Visualization of LAMP amplification products; 1 and 2 are *D. graminicola*; 3-7 are *P. graminea*, *U. hordei*, *U. nuda*, *F. graminearum*, and *A. alternata*, respectively; 8 is ddH₂O(negative control).

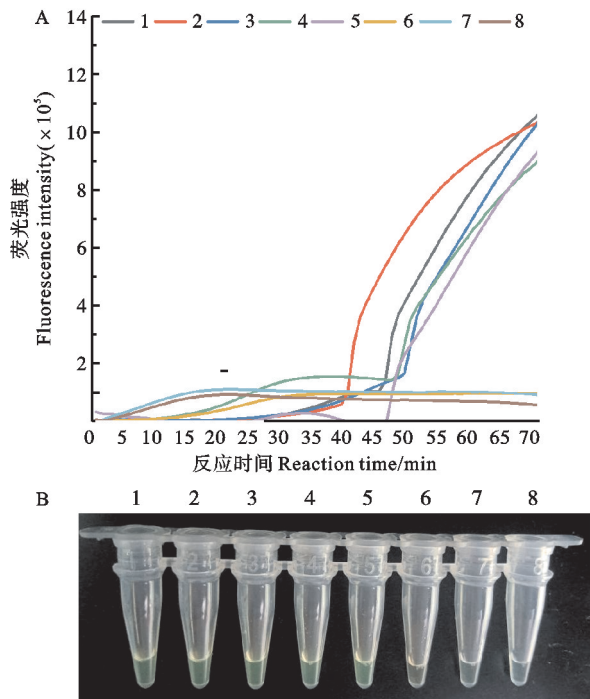
图 3 LAMP 反应的特异性检测
Fig. 3 Specific detection of LAMP reactions

2.4 LAMP 的灵敏度评价

以 *D. graminicola* 的 DNA 为模板, 将浓度进行 10 倍梯度的稀释, 进行 LAMP 和 PCR 反应, 比较灵敏度。结果显示, 随着 DNA 浓度的降低, DNA 扩增曲线出峰的时间变长, 当 DNA 浓度为 $13.07 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时 LAMP 仍能检测到“S”型 DNA 扩增曲线(图 4A)且可视化反应溶液颜色为荧光绿色(图 4B), 表明 LAMP 反应的 DNA 检测限为 $13.07 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 而常规 PCR 反应检测限为 $1.307 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 低于该浓度无扩增条带(图 5)。表明 LAMP 检测方法的灵敏度是常规 PCR 技术的 100 倍。

2.5 田间疑似发病植株组织中禾生指孢霉的检测

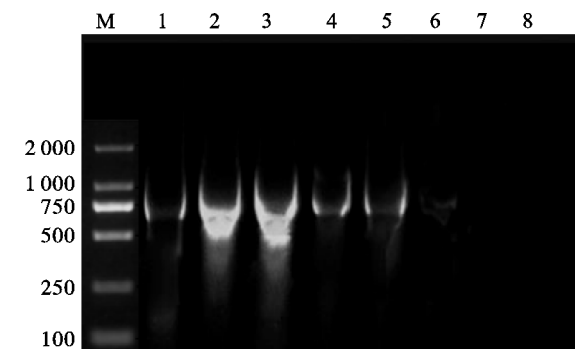
使用优化后的 LAMP 检测体系, 对青海省海北藏族自治州门源县采集的青稞鞘腐病疑似植株的穗、旗叶、茎秆组织进行检测。实时荧光检测法和荧光染色法结果均显示穗样本有 10 份阳性(图 6), 旗叶样本有 8 份阳性(图 7), 茎秆样本 0 份阳性(图 8), 表明在阳性样本中检测到了目标菌, 检出率 50%。



A: DNA 扩增曲线; B: LAMP 可视化结果; 1~7 分别为 $130.7 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $13.07 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1.307 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $130.7 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $13.07 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1.307 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $130.7 \text{ ag} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 8 为 ddH₂O 阴性对照。

A: DNA amplification curves; B: LAMP visualization results; 1-7 are concentrations at $130.7 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $13.07 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $1.307 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $130.7 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $13.07 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $1.307 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, and $130.7 \text{ ag} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 8 is ddH₂O (negative control).

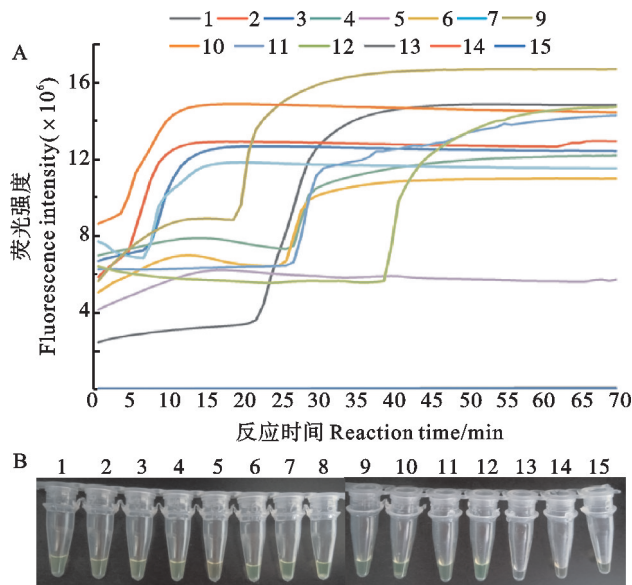
图 4 LAMP 灵敏度检测
Fig. 4 Sensitivity of LAMP method



M: DL2000; 1~7 分别为 $130.7 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $13.07 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1.307 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $130.7 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $13.07 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1.307 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 $130.7 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 8: ddH₂O 阴性对照。

M: DL2000; 1-7 are concentrations at $130.7 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $13.07 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $1.307 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $130.7 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $13.07 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $1.307 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ and $130.7 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 8 is ddH₂O (negative control).

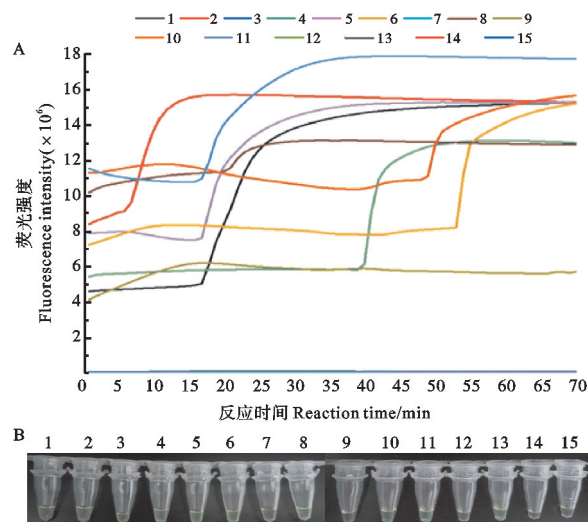
图 5 常规 PCR 灵敏度检测
Fig. 5 Routine PCR sensitivity testing



A: LAMP 扩增曲线; B: LAMP 扩增产物目视图; 1: 阳性对照; 2~13: 穗部疑似病害样本; 14: 穗部健康样本; 15: ddH₂O 阴性对照。

A: LAMP amplification curve; B: Visual diagram of LAMP amplification products; 1 is positive control; 2-13 are the suspected disease samples from the spike; 14 is healthy samples from the spike; 15 is ddH₂O (negative control).

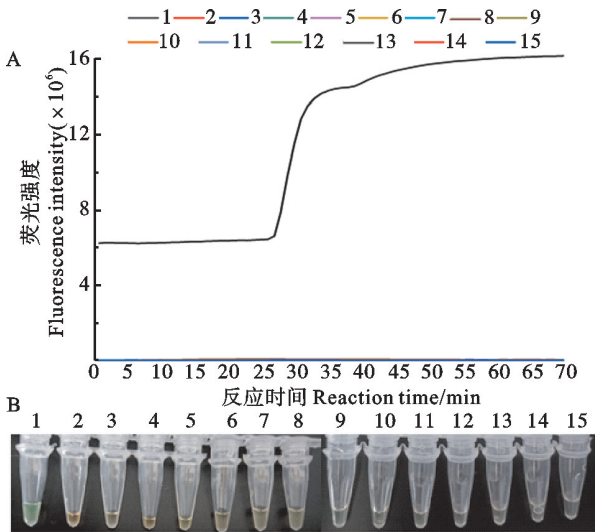
图 6 青稞田间穗部发病组织 *D. graminicola* 的检测
Fig. 6 Detection of *D. graminicola* in spikes of the diseased tissue in the barley field



A: LAMP 扩增曲线; B: LAMP 扩增产物目视图; 1: 阳性对照; 2~13: 旗叶疑似病害样本; 14: 旗叶健康样本; 15: ddH₂O 阴性对照。

A: LAMP amplification curve; B: Visual diagram of LAMP amplification products; 1 is positive control; 2-13 are the suspected disease samples of flag leaf; 14 is healthy flag leaf samples; 15 is ddH₂O (negative control).

图 7 青稞田间旗叶发病组织 *D. graminicola* 的检测
Fig. 7 Detection of *D. graminicola* on flag leaves of the diseased tissue in the barley field



A: LAMP 扩增曲线; B: LAMP 扩增产物目视图; 1: 阳性对照; 2~13: 茎秆疑似病害样本; 14: 茎秆健康样本; 15: ddH₂O 阴性对照。

A: LAMP amplification curve; B: Visual diagram of LAMP amplification products; 1 is positive control; 2-13 are the suspected stem disease samples; 14 is stem healthy samples; 15 is ddH₂O (negative control).

图 8 青稞田间茎秆发病组织 *D. graminicola* 的检测

Fig. 8 Detection of *D. graminicola* on stalks of the diseased tissue in the barley field

3 讨论

近几年,青稞鞘腐病在青稞产区普遍发生, *D. graminicola* 能侵染多种禾谷类作物及禾本科杂草,严重影响青稞种植业的发展。建立快速、准确检测病原菌的方法极为重要。可用于病害早期诊断,及时控制病害的传播和为害。

随着分子生物学技术的飞速发展,植物病原真菌的检测、鉴定与定量分析有了新的方法和手段。这一过程推动了植物真菌病害的诊断技术的转变,使之从传统的田间诊断和免疫学诊断,迈向了更加精准且高效的分子诊断阶段^[21]。常见的分子检测方法包括常规 PCR^[22]、qPCR^[23]、RAPD-PCR^[24]、PCR-RFLP^[25]、AFLP^[26]、巢式 PCR^[27]、实时定量 RT-PCR^[9]、IC-PCR^[28] 和 PCR-SSCP^[29] 等,这些方法被用于检测不同的病原菌。然而,这些检测方法通常需要较长的检测时间和 PCR 仪等设备,且其准确性和灵敏度相对较低。相比, LAMP 技术的恒温扩增是其一大优点,不依赖昂贵的控温设备,而且其反应速度快、特异性高、灵敏性高、反应结果判定简单,对于从事相关的技术

人员也可在很短时间学习相关技术的培训。对 DNA 质量要求不高,田间植物样品中粗提的 DNA 即可进行反应,已经被广泛地应用于地各个领域的病原生物检测和监控^[30-31]。Khan 等^[32]对马铃薯早疫病病菌进行 LAMP、常规 PCR、巢式 PCR 和 qRT-PCR 分析,发现 LAMP 方法具有更快速、更准确的结果,其灵敏度是常规 PCR 的 10 倍,巢式 PCR 的灵敏度是 LAMP 的 100 倍,是常规 PCR 的 1 000 倍。韩富庆等^[33]首次建立草莓枯萎病镰刀菌 LAMP 检测方法,其灵敏度是传统 PCR 的 1 000 倍。杨帆等^[34]建立的青稞黑穗病菌 LAMP 检测体系,可以在 65 °C、45 min 的条件下特异性检出裸黑粉菌,并在 60 min 内特异性检出大麦坚黑粉菌,其灵敏度达到 $2 \times 10^{-4} \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。本研究以钙黄绿素为荧光指示剂,建立的 LAMP 检测方法用时较少,灵敏度比传统的 PCR 技术高 100 倍。该技术只需提取青稞发病部位的 DNA,即可检测出发病组织中的禾生指葡萄霉,而通过显微镜直接观察形态特征、柯赫氏法则和分析 rDNA-ITS 序列等方法来检测病菌,实验周期长、操作复杂、繁琐^[6]。LAMP 检测快速、高效,避免了由于病害样本中含有多种微生物而导致手工难以分离纯化目标菌的影响。相信随着 LAMP 技术的发展,便携式设备的开发使得现场即时检测成为可能。

4 结论

本研究针对禾生指葡萄霉 ITS 序列,设计了 5 组引物,经筛选确定一组最优引物,并通过优化反应温度,成功建立了高效的青稞 *D. graminicola* 环介导等温扩增(LAMP)检测体系。该检测体系的最适温度为 64 °C,检测时长为 70 min,此方法能够特异性地将 *D. graminicola* 从 *P. graminea*、*U. hordei*、*U. nuda*、*F. graminearum* 和 *A. alternata* 中检测出来,表现出良好的特异性。其最低检测限度为 $13.07 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,较常规 PCR 灵敏度提高了 100 倍。该方法灵敏、快速且准确,在青稞鞘腐病的诊断和防治上具有重要的实用价值。

参考文献:

[1] THIEL T, MICHALEK W, VARSHNEY R K, et al. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106(3): 411.

- [2]刘雅洁,李茂,李超,等.75份青稞种质的品质性状综合评价[J].麦类作物学报,2024,44(7):855.
LIU Y J, LI M, LI C, *et al.* Comprehensive evaluation on quality traits of 75 highland barley germplasm [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2024, 44(7): 855.
- [3]LI Y, LONG C, KATO K, *et al.* Indigenous knowledge and traditional conservation of hulless barley (*Hordeum vulgare*) germplasm resources in the Tibetan communities of Shangri-la, Yunnan, SW China [J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2011, 58(5): 645.
- [4]何苏琴,王三喜,赵桂琴,等.燕麦和青稞的一种新病害——鞘腐病[J].甘肃农业科技,2010,41(10):3.
HE S Q, WANG S X, ZHAO G Q, *et al.* A new disease of oat and hulless barley—sheath rot disease [J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2010, 41(10): 3.
- [5]陈琳,蔺瑞明,王凤涛,等.禾生指葡孢霉的遗传多样性及对苗期青稞的致病性[J].中国农业科学,2020,53(1):213.
CHEN L, LIN R M, WANG F T, *et al.* Genetic diversity of *Dactylobostrys graminicola* and its pathogenicity to *Hordeum vulgare* var. nudum seedlings [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2020, 53(1): 213.
- [6]何苏琴,文朝慧,王生荣,等.引起青稞和燕麦鞘腐病的无性型菌物新属种——禾生指葡孢霉[J].菌物学报,2015,34(3):331.
HE S Q, WEN Z H, WANG S R, *et al.* *Dactylobostrys graminicola*: A new phytopathogen causing sheath rot of hulless barley and oats [J]. *Mycosystema*, 2015, 34(3): 331.
- [7]LABARRIOS L A A, HERRERA R R, GONZÁLEZ C, *et al.* Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. Nebraskensis (Schuster, Hoff, Mandely Lazar) vidavery mandel, usando la reacción en cadena de la polimerasa [J]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 2004, 22: 239.
- [8]寿南松,韦国春,姚鑫,等.香榧根腐病原真菌的多重 qPCR 检测方法的建立及初步应用[J/OL].分子植物育种,2024. [2024-11-14]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240603.1433.006.html>.
SHOU N S, WEI G C, YAO X, *et al.* Development and preliminary application of a multiplex qPCR for quantitative detection for the pathogens of *Torreya grandis* root rot disease [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2024. [2024-11-14]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240603.1433.006.html>.
- [9]SCHAAD N W, FREDERICK R D. Real-time PCR and its application for rapid plant disease diagnostics [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2002, 24(3): 250.
- [10]NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(12): E63.
- [11]吕青阳,蒋娜,韩思宇,等.基于致病基因序列的 LAMP 方法检测番茄种子携带的溃疡病菌[J].植物病理学报,2017,47(5):630.
LÜ Q Y, JIANG N, HAN S N, *et al.* Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* in tomato seed by loop-mediated isothermal amplification method based on virulence gene sequence [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2017, 47(5): 630.
- [12]MORI Y, KITAO M, TOMITA N, *et al.* Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA [J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 2004, 59(2): 145.
- [13]DA SILVA S J R, PARDEE K, PENA L. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of zika virus: A review [J]. *Viruses*, 2019, 12(1): 19.
- [14]FUKUTA S, IIDA T, MIZUKAMI Y, *et al.* Detection of Japanese yam mosaic virus by RT-LAMP [J]. *Archives of Virology*, 2003, 148(9): 1713.
- [15]MARRA M, MUSSANO P, PINTON E, *et al.* Rapid and specific detection of wheat spindle streak mosaic virus using RT-LAMP in durum wheat crude leaf extract [J]. *PLoS One*, 2024, 19(2): e0299078.
- [16]PONIATOWSKA A, MICHAŁECKA M, PUŁAWSKA J. LAMP-based detection of *Monilinia fructigena*, *Monilinia polystroma* and *Monilinia fructicola* in latently infected apple fruit [J]. *Plant Pathology*, 2024, 73(2): 355.
- [17]FENG W, HIENO A, KUSUNOKI M, *et al.* LAMP detection of four plant-pathogenic oomycetes and its application in lettuce fields [J]. *Plant Disease*, 2019, 103(2): 298.
- [18]常海城,李虎,郑立秋,等.向日葵核盘菌环介导等温扩增检测技术[J/OL].中国油料作物学报,2024. [2024-11-14]. <https://doi.org/10.19802/j.issn.1007-9084.2023217>.
CHANG H C, LI H, ZHENG L Q, *et al.* Loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in Sunflower [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2024. [2024-11-14]. <https://doi.org/10.19802/j.issn.1007-9084.2023217>.
- [19]胡章薇,杨帆,张学飞,等.青稞条纹病 LAMP 检测体系的建立[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2021,49(11):105.
HU Z W, YANG F, ZHANG X F, *et al.* Establishment of LAMP detection system of *Pyrenophora graminea* [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2021, 49(11): 105.
- [20]杜春梅,张海青,姚强.青海省青稞鞘腐病菌遗传多样性分析[J].青海大学学报,2023,41(4):33.
DU C M, ZHANG H Q, YAO Q. Genetic diversity analysis of sheath rot pathogen of highland barley in Qinghai Province [J]. *Journal of Qinghai University*, 2023, 41(4): 33.
- [21]常有宏,张磊,刘邮洲,等.植物病原真菌 PCR 检测技术研究进展[J].江苏农业科学,2012,40(2):89.
CHANG Y H, ZHANG L, LIU Y Z, *et al.* Research progress on PCR detection technology of plant pathogenic fungi [J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2012, 40(2): 89.
- [22]SHARMA T R, TEWARI J P. RAPD analysis of three *Alternaria* species pathogenic to crucifers [J]. *Mycological Re-*

- search, 1998, 102(7):807.
- [23] 李磊, 陈利达, 黄艺烁, 等. 马铃薯黑痣病菌实时荧光定量 PCR 检测体系的建立及应用[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(7):1417.
- LI L, CHEN L D, HUANG Y S, *et al.* Establishment and application of real-time quantitative PCR detection system for black scurf pathogen in potato (*Solanum tuberosum*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(7):1417.
- [24] 郝保军, 王保通, 李强, 等. 小麦条锈菌水源 11 类群的 RAPD 分析及 SCAR 标记的建立[J]. 植物病理学报, 2010, 40(1):1.
- HAO B J, WANG B T, LI Q, *et al.* RAPD analysis and SCAR marker establishment of Su 11 group of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2010, 40(1):1.
- [25] 张宝俊, 李志岗, 郭明霞, 等. 枯萎病菌的 PCR-RFLP 分子检测和早期诊断[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, 33(S1):88.
- ZHANG B J, LI Z G, GUO M X, *et al.* Molecular detection and early diagnosis of *Fusarium* with PCR-RFLP program [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2005, 33(S1):88.
- [26] VOS P, HOGERS R, BLEEKER M, *et al.* AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21):4407.
- [27] MERCADO-BLANCO J, RODRÍGUEZ-JURADO D, PÉREZ-ARTÉS E, *et al.* Detection of the defoliating pathotype of *Verticillium dahliae* in infected olive plants by nested PCR [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2002, 108(1):1.
- [28] 任春梅, 杨柳, 缪倩, 等. 种子种苗上黄瓜绿斑驳花叶病毒 IC-RT-PCR 检测方法的建立及应用[J]. 植物保护, 2022, 48(5):212.
- REN C M, YANG L, MIAO Q, *et al.* Establishment and application of IC-RT-PCR for cucumber green mottle mosaic virus in seeds and seedlings [J]. *Plant Protection*, 2022, 48(5):212.
- [29] 李文学, 吕苗苗, 胡丽杰, 等. 宁夏地区葡萄卷叶伴随病毒遗传变异的 PCR-SSCP 分析[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(10):1.
- LI W X, (LÜ/LV/LU/LYU) M M, HU L J, *et al.* PCR-SSCP analysis of genetic variation among GLRaVs in Ningxia [J]. *Journal of Southwest University (Natural Science Edition)*, 2019, 41(10):1.
- [30] GOMEZ-GUTIERREZ S V, GOODWIN S B. Loop-mediated isothermal amplification for detection of plant pathogens in wheat (*Triticum aestivum*) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:857673.
- [31] 戴婷婷, 陆辰晨, 郑小波. 环介导等温扩增技术在病原物检测上的应用研究进展[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(5):695.
- DAI T T, LU C C, ZHENG X B. Application research progress of loop-mediated isothermal amplification in the pathogenic microorganism [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2015, 38(5):695.
- [32] KHAN M, WANG R, LI B, *et al.* Comparative evaluation of the LAMP assay and PCR-based assays for the rapid detection of *Alternaria solani* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:2089.
- [33] 韩富庆, 史芳芳. 快速鉴定草莓枯萎病的 LAMP 检测技术[J]. 生物灾害科学, 2021, 44(2):153.
- HAN F Q, SHI F F. Rapid identification of *Fusarium* wilt in strawberries using LAMP detection technique [J]. *Biological Disaster Science*, 2021, 44(2):153.
- [34] 杨帆, 胡章薇, 严浩浩, 等. 青稞黑穗病菌 LAMP 检测体系的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2021, 49(9):67.
- YANG F, HU Z W, YAN H H, *et al.* Establishment of LAMP detection system for barley smut [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)*, 2021, 49(9):67.