

网络出版时间:2024-10-11 11:11 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2025.04.009  
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1390.S.20241010.1119.010

# 葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 检测体系的建立

黄强,张强强,顾沛雯

(宁夏大学 农学院,宁夏 银川 750021)

**【摘要】**【目的】建立葡萄霜霉病菌(*Plasmopara viticola*)重组酶聚合酶扩增-侧流层析试纸条(recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick,LFD-RPA)检测体系,为快速准确诊断和有效防治葡萄霜霉病提供参考。【方法】依据葡萄霜霉病菌内转录间隔区(ITS)序列设计了 PF1/PR1、PF2/PR2 和 PF3/PR3 共 3 对引物及探针 RPA-P,对葡萄霜霉病菌 DNA 的 ITS 序列进行 PCR 扩增,建立了葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 检测体系,并对其反应条件进行优化,对其特异性和灵敏性进行检测。【结果】建立了葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 检测体系,引物 PF1/PR1 和探针 RPA-P 对靶标片段具有良好的特异性,检测条件为 36 °C 扩增 30 min,对葡萄霜霉病菌具有特异性;最低检测下限为 10 pg/ $\mu$ L,灵敏性略低于常规 PCR(1 pg/ $\mu$ L)和荧光定量 PCR(100 fg/ $\mu$ L);对田间发病叶片的检测结果与常规 PCR 一致,准确性高。【结论】建立的葡萄霜霉病菌重组酶聚合酶扩增-侧流层析试纸条(LFD-RPA)检测体系,可以对目标物质进行快速、可视化检测,具有操作简单、特异性强、灵敏度高的特点,适宜推广使用。

**【关键词】** 葡萄霜霉病;葡萄生单轴霉;重组酶聚合酶扩增-侧流层析试纸条检测;病原检测

**【中图分类号】** S436.631.1

**【文献标志码】** A

**【文章编号】** 1671-9387(2025)04-0089-09

## Establishment of the LFD-RPA detection system for *Plasmopara viticola*

HUANG Qiang,ZHANG Qiangqiang,GU Peiwen

(School of Agriculture,Ningxia University,Yinchuan,Ningxia 750021,China)

**Abstract:**【Objective】The detection system of recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick (LFD-RPA) assay for *Plasmopara viticola* was established to provide reference for rapid and accurate diagnosis and effective prevention and treatment of grape downy mildew.【Method】Based on the internal transcribed spacer (ITS) sequence of *P. viticola*,three pairs of primers (PF1/PR1,PF2/PR2 and PF3/PR3) and a probe (RPA-P) were designed,and the ITS sequence of *P. viticola*'s DNA was amplified by PCR,and the detection system of recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick (LFD-RPA) assay for *P. viticola* was established.The reaction conditions were optimized,and the specificity and sensitivity were detected.【Result】The LFD-RPA detection system of *P. viticola* was established.The primers PF1/PR1 and the probe RPA-P had good specificity to the target fragment.The detection condition was 36 °C amplification for 30 min,which was specific to *P. viticola*.The minimum detection limit was 10 pg/ $\mu$ L,and the sensitivity was slightly lower than that of conventional PCR (1 pg/ $\mu$ L) and Real-time PCR (100 fg/ $\mu$ L).The detection results of diseased leaves in the field were consistent with those of conventional PCR,which indicated the high accuracy of the detection system.【Conclusion】The es-

〔收稿日期〕 2024-01-19

〔基金项目〕 宁夏回族自治区重大科技成果转化项目“酿酒葡萄病虫害信息化监测预警技术应用”(2023CJE09038)

〔作者简介〕 黄强(1999—),男,宁夏中卫人,在读硕士,主要从事资源利用与植物保护研究。E-mail:15769563981@163.com

〔通信作者〕 顾沛雯(1969—),女,宁夏银川人,教授,博士,博士生导师,主要从事植物病理学、生物防治及微生物资源利用等研究。E-mail:gupeiwen2019@nxu.edu.cn

established LFD-RPA detection system for *P. viticola* can be used for rapid and visual detection of target substances. With the characteristics of simple operation, strong specificity and high sensitivity, the system can be popularized and applied for further use.

**Key words:** grape downy mildew; *Plasmopara viticola*; recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick (LFD-RPA) detection; detection of pathogens

葡萄霜霉病是葡萄的主要叶部病害之一,是一种典型的流行性病害,由葡萄生单轴霉(*Plasmopara viticola*)侵染引起<sup>[1]</sup>。葡萄生单轴霉主要以卵孢子在土壤和病残体中越冬,成为翌年发病的重要初侵染源<sup>[2-3]</sup>。温湿度适宜时其卵孢子在水滴或潮湿土壤中萌发形成孢子囊,孢子囊借助气流或雨滴溅洒到葡萄植株上,并释放原发性感染游动孢子到寄主叶片上进行初次侵染;病变处的孢囊梗和孢子囊在一个生长季可多次萌发进行再侵染,从而导致病情传播,危害加重<sup>[3]</sup>。葡萄霜霉病发病规律具有初侵染快、再侵染频繁等特点。一般情况下,病原菌从侵入到发病仅需 3~5 d<sup>[3]</sup>;一旦环境条件适宜,从田间出现中心病株到全田普发,仅需 10~15 d<sup>[4]</sup>。目前,在我国所有葡萄栽培地区均有葡萄霜霉病的发生,发病严重时可造成葡萄减产 50% 以上,甚至绝收。该病在很大程度上制约着葡萄的优质、高产,对葡萄产业发展构成极大威胁<sup>[5]</sup>。因此,开发一套精确且高效的葡萄霜霉病菌检测技术,用于病菌快速检测和病害早期诊断,对于有效遏制病原菌的扩散和传播至关重要。

葡萄霜霉病菌为活体营养专性寄生菌,人工培养难度大<sup>[6]</sup>。传统的病原菌检测以叶盘法为主,该方法需要先将病原菌进行分离纯化培养,再利用显微镜对其形态学特征进行观察,从而达到识别病原菌的目的。然而,该方法复杂耗时且耗费大量的人力和物力,难以实现早期快速准确的诊断,给病害的监测和防控工作带来了一定困难。目前,常用分子检测方法对病原菌进行特异性鉴定,主要包括常规 PCR<sup>[7]</sup>、环介导等温扩增(LAMP)<sup>[8]</sup>和实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)<sup>[9]</sup>等,但上述方法均存在操作繁琐、检测周期长、耗费成本大以及需要专业设备等问题,难以满足实际生产需求。

PIEPENBURG 等<sup>[10]</sup>于 2006 年首次提出一种名为重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)技术,该技术利用重组酶与引物结合,形成一种独特的蛋白-DNA 复合物,该复合物能够在双链 DNA 中精准寻找并定位同源序列,从而实现目标区域在模板上的指数级扩增。侧流层

析试纸条(lateral flow dipstick, LFD)的样品端融入了纳米金颗粒,其检测线含有生物素抗体。当使用生物素标记的引物和羧基荧光素(fluorescein amide, FAM)标记的探针对目的基因进行扩增后,只需将试纸条的样品端浸入缓冲液中,生物素抗体与核酸纳米金颗粒便会在检测线上形成复合体,从而呈现出明显的暗红色条带,表明目的基因已被成功扩增<sup>[11-12]</sup>。重组酶聚合酶扩增(RPA)与侧流层析试纸条(LFD)相结合,可以实现对目标物质快速、可视化检测,具有特异性强、灵敏度高的特点。到目前为止,重组酶聚合酶扩增(RPA)主要应用于各种病原菌的检测,如人体<sup>[13]</sup>、动物<sup>[14]</sup>、植物<sup>[15]</sup>、病毒<sup>[16]</sup>、真菌<sup>[17]</sup>等的检测,但对于葡萄病害检测及应用方面的研究尚未见报道。葡萄霜霉病分子检测方法的建立是进行病害早期监测预测和防控的关键<sup>[18]</sup>。本研究旨在建立一套快速、准确的葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 检测体系,以期为葡萄生产中病害的早期诊断及有效防治提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试病原菌

供试病原菌有 6 种,具体名称、寄主植物和地理来源详见表 1。

### 1.2 主要仪器与试剂

1.2.1 主要仪器 Simpli Nan 超微量分光光度计,美国 GE HealthCare 公司; Mixer 4K 涡旋混合器,上海生工生物工程有限公司; Sigma 3K-15 离心机,美国 Sigma 公司; qTOWER 2.2 荧光定量 PCR 仪,德国 Jena 公司; A300 快速梯度 PCR 仪,杭州朗基科学仪器有限公司; 电泳仪,北京六一厂; Azure c200 凝胶成像系统,美国 Azure Biosystems 公司。

1.2.2 主要试剂 真菌 DNA 提取试剂盒(Biospin<sup>®</sup> Fungus Genomic DNA Extraction Kit),日本 BioF lux 公司; 植物 DNA 提取试剂盒(E. Z. N. A.<sup>®</sup> HP Plant DNA Mini Kit),美国 Omega Biotek 公司; RPA 核酸扩增试剂盒、侧流层析试纸条,杭州众测生物科技有限公司; 2 × EcoTaq<sup>®</sup> PCR SuperMix、2 × Trans-Start<sup>®</sup> Tip Green SuperMix,均购于北京全式金生

物技术有限公司。

表 1 试验供试病原菌

Table 1 Tested pathogens in this study

病原菌种类 Species of pathogens	寄主植物 Host plant	地理来源 Geographical source
葡萄霜霉病菌 <i>Plasmopara viticola</i>	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	立兰酒庄 Lilan Winery
葡萄白粉病菌 <i>Uncinula necator</i>	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	新牛酒庄 Xinniu Winery
葡萄灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	美贺酒庄 Meihe Winery
葡萄炭疽病菌 <i>Colletotrichum siamense</i>	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	美贺酒庄 Meihe Winery
葡萄溃疡病菌 <i>Botryosphaeria dothidea</i>	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	宁夏大学农学院植物病理实验室 Laboratory of Plant Pathology, College of Agriculture, Ningxia University
玉米黑粉病菌 <i>Ustilago maydis</i> (DC) Corola	玉米 <i>Zea mays</i>	宁夏大学农学院植物病理实验室 Laboratory of Plant Pathology, College of Agriculture, Ningxia University

### 1.3 引物及探针设计

以葡萄霜霉病菌的 ITS 基因序列为靶标,依据赵玉梅<sup>[19]</sup>和于佳<sup>[20]</sup>描述的 RPA 引物设计原则设计特异性引物及探针。具体方法为:利用真菌 DNA 提取试剂盒提取葡萄霜霉病菌 DNA,具体操作参考试剂盒说明书。对葡萄霜霉病菌 DNA 的 ITS 序列使用引物 ITSPv5 (5'-CGCATATTGCACTTTC-GCGTT-3') 和 ITSPv6 (5'-TGGCTTTACTTCCAC-

CGACT-3')<sup>[21]</sup>进行 PCR 扩增,将获得的测序结果与 GenBank 数据库中同属 ITS 序列(GenBank ID 分别为 ON183983、ON183963、MG552108、MW652681、ON183969、OK584078、MT017599、KM279697、KF652198 和 MH310175)进行多序列比对分析,选择保守区域,设计 3 对葡萄霜霉病菌引物 PF1/PR1、PF2/PR2、PF3/PR3 和探针 RPA-P,引物及探针序列见表 2,均由上海生工生物工程有限公司合成。

表 2 RPA 引物及探针信息

Table 2 Information of primers and probes of RPA

引物(探针)名称 Name of primers (probe)	引物(探针)序列(5'→3') Sequences of primers (probe)(5'→3')
PF1	TCCAAATTTTGAACGCATATTGCACTTCCGGG
PR1	Biotin-TTAGTCCTGGGAATATGCCTGTATCAGTGTCCGTACATCTAACTTG
PF2	CGTTTCAACCAAATAGTTGGGGATGAAATAGG
PR2	Biotin-CGAAGACTTTCGTCTCAGTATAATCAGTA
PF3	GAATATACTGTGGGGACGAAAGTCTCTGCTTT
PR3	Biotin-TTCGCATAACGTATCGCAGTTCGCAGCGTTCT
RPA-P	FAM-TGGCGGTTGCAGCTAATGGATTCTATCAT/THF/AGTGAAATAGTTTGA-C3 spacer

注: Biotin-. 5'端生物素标记; FAM-. 5'荧光基团标记; THF. 空碱基位(四氢呋喃); -C3 spacer. 3'端封锁。

Note: Biotin-. 5' end biotin labeling; FAM-. 5' fluorescent group labeling; THF. Vacant base position (tetrahydrofuran); -C3 spacer. 3' end blocking.

### 1.4 样品 DNA 的提取

为获得纯葡萄霜霉病菌 DNA,参考 AMMOUR 等<sup>[22]</sup>的方法,采集叶片背面出现典型油斑病变并有新鲜孢子囊产生的葡萄霜霉病叶,用无菌水冲洗 3~4 次,以去除杀菌剂和葡萄霜霉病菌孢子囊。将叶片置于温度 25℃、相对湿度 95% 的人工气候箱中培养 24~48 h。随后,用无菌刀片轻轻采集新生孢子囊,置于无菌离心管中备用。利用真菌基因组 DNA 提取试剂盒按说明提取供试病原菌 DNA; 称取 0.5 g 健康无毒无菌组培葡萄叶片,利用植物组织基因组 DNA 提取试剂盒按说明提取葡萄叶片 DNA,检测 DNA 浓度及 OD 值, -20℃ 保存备用。

### 1.5 引物筛选

利用真菌 DNA 提取试剂盒,参照说明书提取供试病原菌 DNA,保持其他条件不变,以葡萄霜霉

病菌基因组 DNA 为模板,使用表 1 中设计的 3 对 RPA 引物,配置反应体系。用于引物初筛的常规 PCR 反应体系(25 μL)为: 2×EcoTaq<sup>®</sup> PCR Super Mix 12.5 μL, 1 μmol/L 正反向引物各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足。PCR 反应程序: 94℃ 预变性 10 min; 94℃ 变性 30 s, 58.5℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 反应结束后 4℃ 保存。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后,凝胶成像系统分析,筛选葡萄霜霉病菌 RPA 最佳引物。

### 1.6 LFD-RPA 反应体系的建立

利用 RPA 核酸扩增试剂盒,建立 LFD-RPA 分子检测体系。具体为:向装有反应干粉的检测单元管(试剂盒提供)中加入 ddH<sub>2</sub>O 12.9 μL, A Buffer 25.0 μL, 上、下游引物各 2.0 μL, 探针 0.6 μL, 待测

DNA 样本 5  $\mu\text{L}$ , 然后再向检测单元管盖上加入 B Buffer 2.5  $\mu\text{L}$ , 盖上管盖, 上下颠倒轻甩 5~6 次混匀。3 000  $g$  低速离心 10 s, 将检测单元管放入 39  $^{\circ}\text{C}$  恒温金属浴中孵育 30 min。反应结束后, 将 50  $\mu\text{L}$  反应体系液用 300  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液稀释。为了直观读取 RPA 扩增结果, 使用侧流层析试纸条检测 RPA 扩增产物。取 10  $\mu\text{L}$  稀释后的核酸扩增产物, 滴加到侧流层析试纸条的样品垫上。然后将侧流层析试纸条的样品垫向下插入含有 100  $\mu\text{L}$  PBS 缓冲液的微孔板中。5~10 min 内, 记录判读区的检测结果。判读时试纸条上出现两条红色条带, 一条为质控线, 表明试纸条是有效的; 另一条为检测线, 代表检测结果阳性, 表明样本中含有待检测的核酸片段; 反之则代表检测结果阴性, 表明样本中无待检测的核酸片段<sup>[20]</sup>。

### 1.7 LFD-RPA 反应条件的优化

1.7.1 反应时间优化 按 1.6 节的加样方法, 反应温度为 39  $^{\circ}\text{C}$ , 反应时间分别设置 10, 15, 20, 25, 30, 35 和 40 min, 进行 LFD-RPA 反应时间优化, 以获得葡萄霜霉菌 LFD-RPA 检测方法的最佳反应时间。反应结果的可视化同 1.6 节。

1.7.2 反应温度优化 按 1.6 节的加样方法, 反应时间为 30 min, 反应温度分别设置为 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45 和 48  $^{\circ}\text{C}$  8 个温度梯度, 进行 LFD-RPA 反应温度优化, 以获得葡萄霜霉菌 LFD-RPA 检测方法的最佳反应温度。反应结果的可视化同 1.6 节。

### 1.8 葡萄霜霉菌 LFD-RPA 反应体系的特异性和灵敏度检测

1.8.1 特异性检测 分别以 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  葡萄霜霉菌 DNA 与其他供试病原菌 DNA 为模板, 采用优化后的 LFD-RPA 检测体系进行检测, 反应结果的可视化同 1.6 节。

1.8.2 灵敏度检测 将葡萄霜霉菌 DNA 进行 10 倍梯度稀释, 用于常规 PCR、优化后的 LFD-RPA 和 Real-time PCR 检测, 对比不同方法的灵敏度。

(1) 常规 PCR 检测。以 10 倍梯度稀释后的葡萄霜霉菌 DNA 标准品为模板, 使用引物 PF1/PR1 进行常规 PCR 扩增, 常规 PCR 反应体系及反应程序均同 1.5 节。

(2) LFD-RPA 检测。以 10 倍梯度稀释后的葡萄霜霉菌 DNA 标准品为模板, 使用引物 PF1/PR1 进行 RPA 扩增, 反应结果可视化检测同 1.6 节。

(3) Real-time PCR 检测。以 10 倍梯度稀释后的葡萄霜霉菌 DNA 标准品为模板, 使用引物

PF1/PR1 进行 Real-time PCR 扩增。Real-time PCR 反应体系 (20  $\mu\text{L}$ ): 2  $\times$  TransStart<sup>®</sup> Tip Green SuperMix 10  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{mol}/\text{L}$  正反向引物各 0.4  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足。Real-time PCR 反应程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 30 s; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 s, 58.5  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 40 个循环。反应结束后, 先加热至 95  $^{\circ}\text{C}$  后再降至 60  $^{\circ}\text{C}$  并保持 15 s, 再按照 5  $^{\circ}\text{C}/\text{s}$  升温至 95  $^{\circ}\text{C}$ , 每升高 0.5  $^{\circ}\text{C}$  收集荧光信号 1 次, 选择荧光值稳定且线性比例良好的浓度范围, 以浓度常用对数值为  $x$  轴、循环阈值 ( $C_t$ ) 为  $y$  轴, 建立葡萄霜霉菌 DNA 的 Real-time PCR 标准曲线。

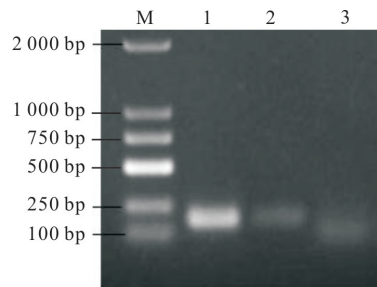
### 1.9 田间自然发病叶片检测

从田间采集葡萄霜霉菌病罹病叶片, 分别称取 0.5 g 人工接种葡萄霜霉菌罹病叶片、田间自然发病葡萄霜霉菌罹病叶片和无菌葡萄组培苗叶片, 利用 E. Z. N. A.<sup>®</sup> HP Plant DNA Kit 试剂盒, 参照说明书提取葡萄叶片总 DNA, 以 ddH<sub>2</sub>O 为对照, 进行常规 PCR 和 LFD-RPA 检测, 具体操作同上。

## 2 结果与分析

### 2.1 葡萄霜霉菌 RPA 引物筛选

PCR 扩增结果 (图 1) 表明, 引物 PF2/PR2 扩增出目标条带, 但清晰度较差; 引物 PF3/PR3 未扩增出目标片段; 引物 PF1/PR1 扩增出的目标条带最清晰, 且无杂带, 目标片段大小为 196 bp, 可用于后续试验。



M. DNA DL 2000 Marker; 1. 引物 PF1/PR1;  
2. 引物 PF2/PR2; 3. 引物 PF3/PR3。

M. DNA DL 2000 Marker; 1. Primers PF1/PR1;  
2. Primers PF2/PR2; 3. Primers PF3/PR3。

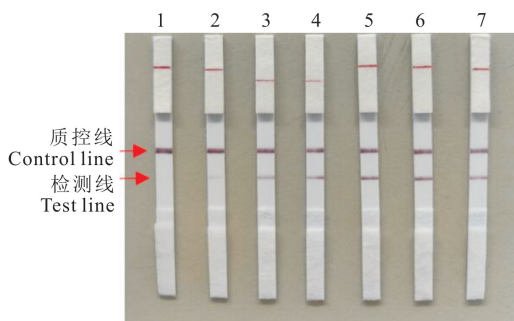
图 1 葡萄霜霉菌 RPA 引物筛选

Fig. 1 Screening of RPA primers for *Plasmopara viticola*

### 2.2 葡萄霜霉菌 LFD-RPA 检测体系的建立及条件优化

2.2.1 反应时间优化 为优化最佳扩增时间, 在模板 DNA 质量浓度为 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  时, 分别设置 10, 15, 20, 25, 30, 35 和 40 min 共 7 个时间梯度, 反应温度为 39  $^{\circ}\text{C}$ , 用侧流层析试纸条检测反应结果。检

测结果(图 2)表明,葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 反应扩增时间为 15~40 min 时均能实现扩增,有检测线,呈阳性,且在扩增时间为 30 min 时,检测线最清晰。因此确定葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 检测体系的最佳反应时间为 30 min。

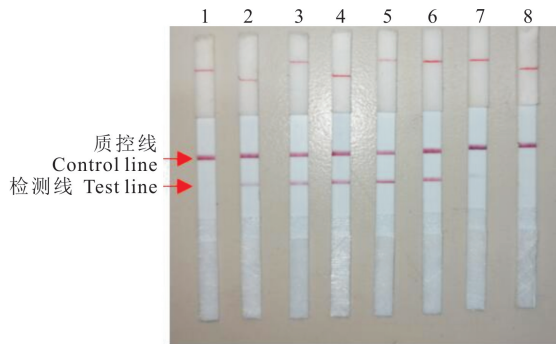


1~7. 依次为反应时间 10,15,20,25,30,35 和 40 min。  
1-7. The reaction times are 10,15,20,25,30,35, and 40 minutes in sequence.

图 2 LFD-RPA 检测体系反应时间的优化

Fig. 2 Optimization of reaction time of LFD-RPA detection method

2.2.2 反应温度优化 在模板 DNA 质量浓度为 100 ng/ $\mu$ L,反应时间为 30 min 条件下,设置 27,30,33,36,39,42,45 和 48  $^{\circ}$ C 共 8 个温度梯度进行扩增,并用侧流层析试纸条检测反应结果。检测结果(图 3)表明,葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 检测方法的扩增温度为 30~45  $^{\circ}$ C 时均有检测线,且 36  $^{\circ}$ C 条件下检测线最清晰。



1~8. 依次为反应温度 27,30,33,36,39,42,45 和 48  $^{\circ}$ C。

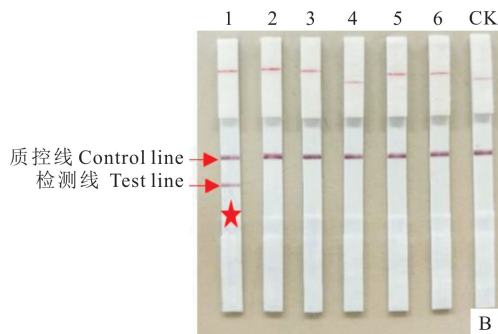
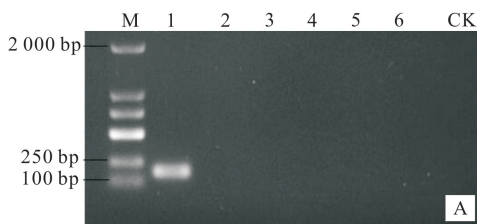
1-8. The reaction temperatures are 27,30,33,36,39,42,45, and 48  $^{\circ}$ C in sequence.

图 3 LFD-RPA 检测体系反应温度的优化

Fig. 3 Optimization of reaction temperature of LFD-RPA detection method

### 2.3 葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 检测的特异性

以表 1 中供试病原菌 DNA 和无菌葡萄组培苗叶片 DNA 分别为模板,使用引物 PF1/PR1 进行 RPA 扩增,再经过凝胶电泳与侧流层析试纸条检测扩增产物。结果表明,其他供试病原菌 DNA 及无菌葡萄组培苗叶片 DNA 均未出现电泳条带,只有葡萄霜霉病菌 DNA 扩增效果明显,出现目标条带(图 4-A)。其他供试病原菌 DNA 及无菌葡萄组培苗叶片 DNA 的侧流层析试纸条均未出现红色检测线,表明检测结果呈阴性;葡萄霜霉病菌 DNA 的侧流层析试纸条出现红色检测线,表明检测结果呈阳性(图 4-B)。



A. PF1/PR1 扩增结果;B. PF1/PR1 LFD-RPA 特异性检;M. DNA DL 2000 Marker;1~6. 依次为葡萄霜霉病菌、葡萄白粉病菌、葡萄灰霉病菌、葡萄炭疽病菌、葡萄溃疡病菌和玉米黑粉病菌;CK. 无菌葡萄组培苗叶片。

A. Amplification results of PF1/PR1;B. LFD-RPA-specific detection of PF1/PR1;M. DNA DL 2000 Marker;1-6. 1-6 are *Plasmopara viticola*, *Ucinula necator*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum siamense*, *Botryosphaeria dothidea*, *Ustilago maydis*, in sequence;CK. Grape tissue culture seedling leaves.

图 4 葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 检测的特异性

Fig. 4 Specificity of LFD-RPA detection for *Plasmopara viticol*

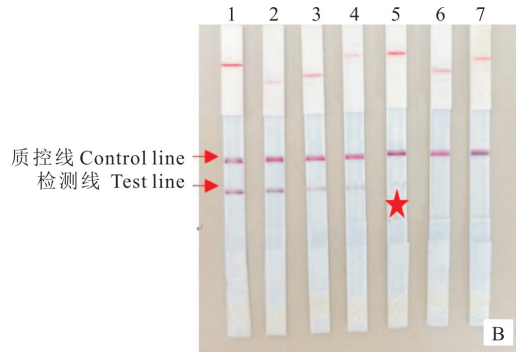
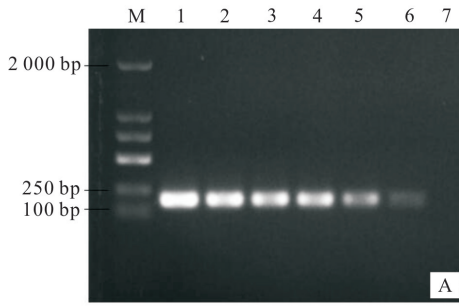
### 2.4 葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 检测的灵敏度

2.4.1 常规 PCR 与葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 检测的灵敏度 将葡萄霜霉病菌 DNA 质量浓度分别按照  $10^2, 10, 1, 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}$  和  $10^{-4}$  ng/ $\mu$ L 梯度

进行稀释,以梯度稀释的 DNA 为模板进行常规 PCR 与 LFD-RPA 方法检测。结果(图 5)表明,当模板 DNA 质量浓度为  $10^{-3}$  ng/ $\mu$ L 时,常规 PCR 出现目标条带(图 5-A);当模板 DNA 质量浓度为

10<sup>-2</sup> ng/μL 时, LFD 出现检测线(图 5-B), 表明葡萄霜霉病菌常规 PCR 检测下限为 1 pg/μL, LFD-RPA

最低检测下限为 10 pg/μL, 说明 RPA 检测灵敏度略低于常规 PCR。



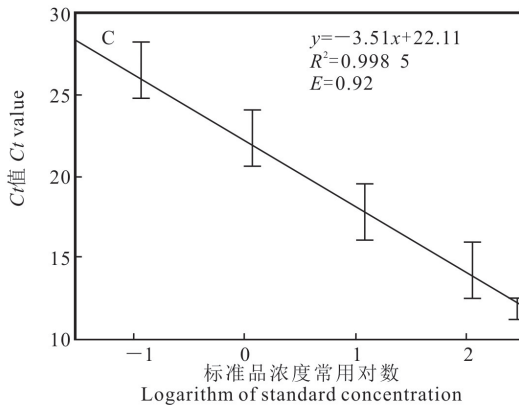
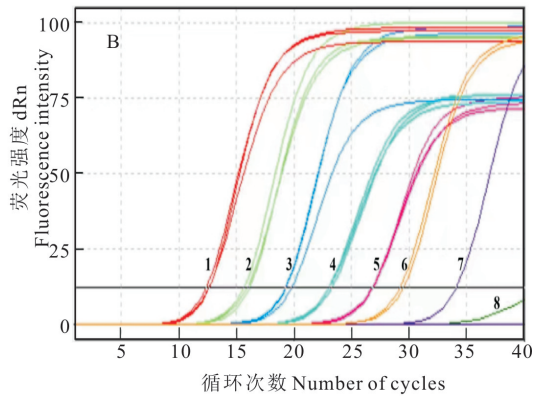
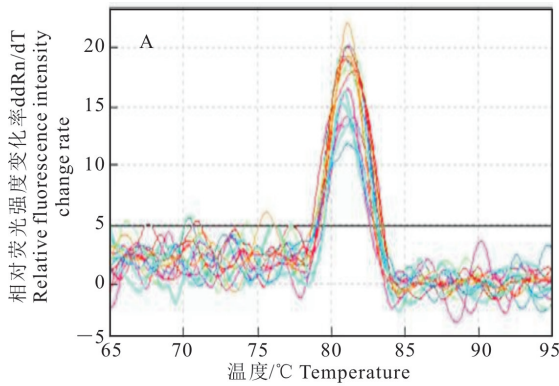
A. 常规 PCR; B. LFD-RPA; M. DNA DL 2000 Marker; 1~7. 葡萄霜霉病菌 DNA 质量浓度分别为 10<sup>2</sup>, 10, 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> 和 10<sup>-4</sup> ng/μL。  
 A. Conventional PCR; B. LFD-RPA; M. DNA DL 2000 Marker; 1-7. The DNA concentrations of *Plasmopara viticola* were 10<sup>2</sup>, 10, 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup> and 10<sup>-4</sup> ng/μL.

图 5 常规 PCR 与 LFD-RPA 检测方法的灵敏度

Fig. 5 Determination of the sensitivity of conventional PCR and LFD-RPA detection method

2.4.2 Real-time PCR 的灵敏度 将葡萄霜霉病菌 DNA 质量浓度调整为 100 ng/μL, 按 10 倍梯度稀释成 10<sup>2</sup>, 10, 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> 和 10<sup>-5</sup>

ng/μL 共 8 个质量浓度标准品, 进行 Real-time PCR 检测。



A. 熔解曲线(不同颜色线条代表不同质量浓度的葡萄霜霉病菌 DNA); B. 实时扩增曲线; C. 标准曲线。

1~8. 葡萄霜霉病菌 DNA 质量浓度依次为 10<sup>2</sup>, 10, 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> 和 10<sup>-5</sup> ng/μL。

A. Melt curve(Different colored lines represent different concentrations of *P. viticola* DNA.); B. Real-time amplification plot; C. Standard curve.

1-8. The DNA concentrations of *Plasmopara viticola* were 10<sup>2</sup>, 10, 1, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> and 10<sup>-5</sup> ng/μL.

图 6 葡萄霜霉病菌的 Real-time PCR 反应

Fig. 6 Real-time PCR reactions of *Plasmopara viticola*

由熔解曲线可知, 葡萄霜霉病菌 DNA 的

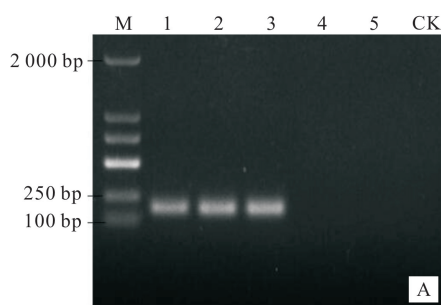
Real-time PCR 熔解曲线在 81 °C 有唯一的产物吸

收峰,表明引物 PF1/PR1 为特异性扩增(图 6-A),且扩增效果较好,灵敏度为  $100 \text{ fg}/\mu\text{L}$ (图 6-B)。由标准曲线可知,以 DNA 质量浓度常用对数值为  $x$  轴,循环阈值( $C_t$ )为  $y$  轴建立标准曲线,线性关系为  $y = -3.51x + 22.11$ ,相关系数  $R^2 = 0.9985$ ,扩增效率  $E = 0.92$ ,线性范围 7 个数量级(图 6-B),扩增效果理想(图 6-C)。

### 2.5 田间自然发病叶片病原菌检测

为进一步验证所建立的葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 检测方法的准确性,对人工接种葡萄霜霉病叶片、田间自然发病葡萄霜霉病叶片和无菌葡萄组培苗叶片,分别应用常规 PCR 和建立的葡萄霜霉病菌

LFD-RPA 方法进行检测。结果(图 7)表明,常规 PCR 在人工接种葡萄霜霉病发病叶片和田间自然发病葡萄霜霉病叶片样本中均成功扩增出了目的条带,但在无菌葡萄组培苗叶片样本和空白对照中未扩增出目的条带(图 7-A);侧流层析试纸条结果表明,红色阳性检测线只出现在人工接种葡萄霜霉病发病叶片和田间自然发病葡萄霜霉病叶片样本中,而无菌葡萄组培苗叶片样本和空白对照中均未出现红色检测线(图 7-B)。表明 LFD-RPA 的检测方法与常规 PCR 完全一致,进一步证实了所建立的葡萄霜霉病菌 LFD-RPA 检测方法具有很高的准确性,能够有效检测出葡萄霜霉病菌。



A. 常规 PCR 检测结果;B. LFD-RPA 检测结果。M. DNA DL 2000 Marker;1. 人工接种葡萄霜霉病叶片;  
2~3. 田间自然发病葡萄霜霉病叶片;4~5. 无菌葡萄组培苗叶片;CK. 空白对照。

A. Results of PCR;B. Results of LFD-RPA. M. DNA DL 2000 Marker;1. Manually inoculated grape downy mildew leaves;

2~3. Downy mildew leaves of grapes in the field;4~5. Grape tissue culture seedling leaves;CK. Blank control.

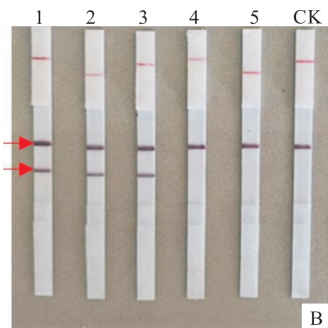


图 7 LFD-RPA 方法的田间检测结果

Fig. 7 Field test results of LFD-RPA methods

## 3 讨论

RPA-LFD 技术作为一种新兴的核酸检测方法,在植物病害检测方面展现了广泛的应用前景,可以在资源有限的环境中快速诊断目标物。于佳<sup>[19]</sup>针对多种作物土传病害病原真菌和卵菌,建立了 2 种疫霉菌和 3 种腐霉菌的 LFD-RPA 分子检测方法,为作物土传病害的快速诊断提供了高效、简便的分子检测工具。申世凯等<sup>[23]</sup>以柑橘衰退病毒外壳蛋白的保守区域为靶标,建立了柑橘衰退病毒的 RT-RPA-LFD,结果表明在  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ ,反应 25 min 条件下,最低可检测到  $2.12 \times 10^{-1}$  拷贝/ $\mu\text{L}$  的柑橘衰退病毒核酸,灵敏度是 RT-PCR 检测方法的 100 倍。王姝然等<sup>[24]</sup>根据嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)促旋酶 B 亚单位(*gyrase subunit B*, *gyrB*)基因的保守序列建立了一种针对嗜水气单胞菌的 RPA-LFD 快速检测方法,该方法在  $38 \text{ }^\circ\text{C}$ 、30 min 内可最小检出  $10^3$  CFU/mL 嗜水气单胞菌纯培

养物和  $100 \text{ pg}/\mu\text{L}$  的基因组 DNA。

与传统检测方法相比,首先,LFD-RPA 方法可在很短时间内完成 DNA 扩增,并获得可视化结果,适用于需要迅速获得检测结果的实际应用场景;其次,该方法操作相对简单,不需要复杂的实验室设备或专业技能,适用于各种不同的使用者和实验室;此外,LFD-RPA 试剂稳定、易储存,试剂和试纸条保质期长,适合在野外或资源受限的环境以及偏远地区使用。虽然 RPA 与 PCR 技术有一定的相似之处,但 RPA 引物与探针的设计不能完全套用 PCR 引物的设计原则<sup>[25]</sup>。RPA 引物与探针的设计需要考虑多种因素,如目标序列的长度、序列的 GC 含量、引物与探针的特异性等。尽管有些软件可以辅助设计 RPA 引物与探针,但尚未见专门针对 RPA 探针和引物的设计软件。这可能是因为 RPA 技术相对较新,尚需要进一步的研究和优化。总之,RPA 在植物病害检测方面是一种具有重要应用价值的体外扩增技术,随着 RPA 技术的不断发展和优化,其有望成

为快速、简便诊断和检测植物病害的有力工具。

## 4 结 论

本研究以葡萄霜霉病菌 ITS 基因序列为靶标,设计了 RPA 引物与探针,建立了葡萄霜霉病菌的 LFD-RPA 检测方法。该方法能特异性检测葡萄霜霉病菌 DNA,可以实现对目标物质快速、可视化检测,检测条件为 36 °C 扩增 30 min,最低检测下限为 10 pg/ $\mu$ L,略低于常规 PCR(1 pg/ $\mu$ L)和荧光定量 PCR(100 fg/ $\mu$ L)。该方法具有操作简单、特异性强、灵敏度高的特点,适宜推广使用。

### [参考文献]

- [1] GIRAUD F, MOLITOR D, BLEUNVEN M, et al. Fungicide sensitivity profiles of the *Plasmopara viticola* populations in the Luxembourg grape-growing region [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2013, 1(S1): 55-62.
- [2] HONG C F, BREWER M T, BRANNEN P M, et al. Temporal disease dynamics and relative importance of sexual and asexual reproduction of grape downy mildew (*Plasmopara viticola*) in an isolated vineyard in the North Georgia Mountains, USA [J]. *Plant Pathology*, 2020, 69(9): 1721-1730.
- [3] BURRUANO S. The life-cycle of *Plasmopara viticola*, cause of downy mildew of vine [J]. *Mycologist*, 2000, 14(4): 179-182.
- [4] VERCESI A, TOFFOLATTI S L, ZOCCHI G, et al. A new approach to modelling the dynamics of oospore germination in *Plasmopara viticola* [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 128(1): 113-126.
- [5] 张眉, 吴斌, 姜珊珊, 等. 济南地区葡萄霜霉病发生规律、流行关键气象因子分析及预测 [J]. *山东农业科学*, 2020, 52(12): 93-98.
- ZHANG M, WU B, JIANG S S, et al. Occurrence regularity and epidemic key meteorological factors analysis and prediction of grape downy mildew in Jinan area [J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2020, 52(12): 93-98.
- [6] DUBRESSON R, KRAVCHUK Z, NEUHAUS J M, et al. Optimisation and comparison of transient expression methods to express the green fluorescent protein in the obligate biotrophic oomycete *Plasmopara viticola* [J]. *Vitis-Journal of Grapevine Research*, 2008, 47(4): 235-240.
- [7] GINDRO K, LECOULTRE N, MOLINO L, et al. Development of rapid direct PCR assays to identify downy and powdery mildew and grey mould in *Vitis vinifera* tissues [J]. *OENO One*, 2014, 48(4): 261-268.
- [8] KONG X J, QIN W T, HUANG X Q, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Plasmopara viticola* [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28935.
- [9] VALSESIA G, GOBBIN D, PATOCCHI A, et al. Development of a high-throughput method for quantification of *Plasmopara viticola* DNA in grapevine leaves by means of quantitative real-time polymerase chain reaction [J]. *Phytopathology*, 2005, 95(6): 672-678.
- [10] PIEPENBURG O, WILLIAMS C H, STEMPLE D L, et al. DNA detection using recombination proteins [J]. *PLoS Biology*, 2006, 4(7): e204.
- [11] JAROENRAM W, OWENS L. Recombinase polymerase amplification combined with a lateral flow dipstick for discriminating between infectious *Penaeus stylirostris* densovirus and virus-related sequences in shrimp genome [J]. *Journal of Virological Methods*, 2014, 208: 144-151.
- [12] EULER M, WANG Y J, NENTWICH O, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus [J]. *Journal of Clinical Virology*, 2012, 54(4): 308-312.
- [13] 邓王平, 洪清华, 徐斌, 等. 基于 RPA-LFD 的日本血吸虫循环核酸快速可视化检测方法的建立及初步评价 [J]. *中国寄生虫学与寄生虫病杂志*, 2020, 38(3): 286-292.
- DENG W P, HONG Q H, XU B, et al. Development and preliminary evaluation of a rapid visualization detection method for circulating nucleic acids of *Schistosoma japonicum* based on RPA-LFD [J]. *Chinese Journal of Parasitology and Parasitic Diseases*, 2020, 38(3): 286-292.
- [14] 胡清霞, 李颖, 张琰杰, 等. 重组酶聚合酶扩增技术在动物疫病诊断中的应用研究进展 [J]. *动物医学进展*, 2023, 44(9): 82-86.
- HU Q X, LI Y, ZHANG Y J, et al. Progress on recombinase polymerase amplification technology in the application of diagnosis of animal infectious diseases [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2023, 44(9): 82-86.
- [15] 高波, 马娟, 李秀花, 等. 马铃薯腐烂茎线虫 RPA-LFD 可视化快速检测方法的建立 [J]. *植物病理学报*, 2022, 52(6): 984-992.
- GAO B, MA J, LI X H, et al. Development of RPA-LFD visualization assay for rapid detection of *Ditylenchus destructor* [J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2022, 52(6): 984-992.
- [16] ABD EL WAHED A, SANABANI S S, FAYE O, et al. Rapid molecular detection of zika virus in acute-phase urine samples using the recombinase polymerase amplification assay [J]. *PLoS Currents*, 2017, 9. [2017-01-25]. DOI: 10. 1371/currents.outbreaks.a7f1db2c7d66c3fc0ea0a774305d319e.
- [17] BENTAHIR M, AMBROISE J, DELCORPS C, et al. Sensitive and specific recombinase polymerase amplification assays for fast screening, detection, and identification of *Bacillus anthracis* in a field setting [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(11): e00506-e00518.
- [18] 唐兴敏, 孙磊, 张玮, 等. 葡萄霜霉病抗病性鉴定方法及品种抗病性测定 [J]. *植物保护*, 2018, 44(1): 166-169.
- TANG X M, SUN L, ZHANG W, et al. Development of resistance identification method and determination of disease resistance of different grape cultivars to the grapevine downy



- mildew [J]. *Plant Protection*, 2018, 44(1):166-169.
- [19] 赵玉梅. 三种重要疫霉菌 LFD-RPA 快速检测技术研究 [D]. 福州:福建农林大学, 2020.  
ZHAO Y M. Rapid detection of three main *Phytophthora* spp. using lateral flow dipstick-recombinase polymerase amplification assay [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020.
- [20] 于佳. 作物土传病害病原真菌和卵菌的三种分子检测方法研究 [D]. 南京:南京农业大学, 2019.  
YU J. Study on three molecular detection methods of crop soilborne fungi and oomycetes [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019.
- [21] 张涛. 酿酒葡萄霜霉病菌卵孢子形成、生活力和越冬量检测体系建立 [D]. 银川:宁夏大学, 2021.  
ZHANG T. Oospore formation, viability and establishment of overwintering quantity detection system of wine grape downy mildew [D]. Yinchuan: Ningxia University, 2021.
- [22] AMMOUR M S, BOVE F, TOFFOLATTI S L, et al. A real-time PCR assay for the quantification of *Plasmopara viticola* oospores in grapevine leaves [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11:1202.
- [23] 申世凯, 曾婷, 乔兴华, 等. 柑橘衰退病毒 RT-RPA-LFD 可视化检测方法的建立及应用 [J]. *果树学报*, 2023, 40(12): 2652-2660.  
SHEN S K, ZENG T, QIAO X H, et al. Establishment and application of RT-RPA-LFD visualization assay for rapid detection of citrus tristeza virus [J]. *Journal of Fruit Science*, 2023, 40(12):2652-2660.
- [24] 王姝然, 徐嘉楠, 范厚勇, 等. 嗜水气单胞菌 RPA-LFD 快速检测方法的建立 [J]. *水生生物学报*, 2024, 48(5):849-858.  
WANG S R, XU J N, FAN H Y, et al. Establishment of a method for rapid detection of *Aeromonas hydrophila* by recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow strips [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, 48(5):849-858.
- [25] 王帅, 杨艳歌, 吴占文, 等. 重组酶聚合酶扩增、重组酶介导等温扩增及酶促重组等温扩增技术在食源性致病菌快速检测中的研究进展 [J]. *食品科学*, 2023, 44(9):297-305.  
WANG S, YANG Y G, WU Z W, et al. A review of the application of recombinase polymerase amplification, recombinase-aided amplification and enzymatic recombinase amplification in rapid detection of foodborne pathogens [J]. *Food Science*, 2023, 44(9):297-305.

(责任编辑:陈丽)

(上接第 88 页)

- [27] 胡风烨, 赵锐锋, 张丽华, 等. 黄河首曲湿地植物群落生产力、物种多样性及其与生境的关系 [J]. *生态学报*, 2023, 43(24): 10238-10249.  
HU F Y, ZHAO Y F, ZHANG L H, et al. Productivity and species diversity of plant communities and their relationship with habitats in the wetland of first meander of Yellow River [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2023, 43(24):10238-10249.
- [28] 海旭莹, 董凌勃, 汪晓珍, 等. 黄土高原退耕还草地 C、N、P 生态化学计量特征对植物多样性的影响 [J]. *生态学报*, 2020, 40(23):8570-8581.  
HAI X Y, DONG L B, WANG X Z, et al. Effects of carbon, nitrogen, and phosphorus ecological stoichiometry characteristics on plant diversity since returning farmland to grassland on the Loess Plateau [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2020, 40(23):8570-8581.
- [29] LI Y T, YU Y H, SONG Y P. Stoichiometry of soil, microorganisms, and extracellular enzymes of *Zanthoxylum planispinum* var. *dintanensis* plantations for different allocations [J]. *Agronomy*, 2022, 12(7):1709.
- [30] 邓健, 张丹, 张伟, 等. 黄土丘陵区刺槐叶片-土壤-微生物碳氮磷化学计量学及其稳态性特征 [J]. *生态学报*, 2019, 39(15): 5527-5535.  
DENG J, ZHANG D, ZHANG W, et al. Carbon, nitrogen, and phosphorus stoichiometry and homeostasis characteristics of leaves, soil, and microbial biomass of *Robinia pseudoacacia* forests in the Loess Hilly Region of China [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(15):5527-5535.
- [31] NOTTINGHAM A T, SCOTT J J, SALTONSTALL K, et al. Microbial diversity declines in warmed tropical soil and respiration rise exceed predictions as communities adapt [J]. *Nature Microbiology*, 2022, 7:1650-1660.

(责任编辑:李小平)