

基于 CEEA 等温扩增技术的落叶枯梢病菌快速检测技术体系

刘正强¹ 裴婷倩¹ 安文静³ 刘蓝泽¹ 朱烨婷¹ 梁英梅^{2*}

(1. 北京林业大学, 森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083; 2. 北京林业大学博物馆, 北京 100083;
3. 北京市京西林场管理处, 北京 102300)

摘要: 落叶松枯梢病菌 *Neofusicoccum laricinum* (Sawada) Y. Hattori & C. Nakash 是中国进境植物检疫性有害生物和林业检疫性有害生物, 也是《重点管理外来入侵物种名录》中仅有的 2 种真菌性植物病菌之一。开展快速、准确、直观的检测技术研究, 对落叶松枯梢病的有效防治具有重要意义。本研究将复合酶指数扩增技术 (CEEA) 与侧向流试纸条 (LFD) 技术相结合, 利用落叶松枯梢病菌的特异性 CEEA 引物组及其探针, 在最佳反应温度 39 °C、反应时间 15 min 的条件下, 特异性检测出不同地区来源的落叶松枯梢病菌, 最低检测浓度为 100.0 fg·μL⁻¹, 且整个检测过程可在 30 min 内完成。同时, 该技术无需昂贵仪器, 且不识别落叶松上的其他真菌, 表现出良好的适用性, 具有高效、快速、灵敏等特点, 可为林间病原菌的就地快速检测、识别以及病害早期预警提供有力支持。

关键词: 新壳梭孢菌; 落叶松; 复合酶指数扩增; 侧向流试纸条; 检测技术

中图分类号: S763.11 文献标识码: A 文章编号: 2097-5279(2026)02-0040-09

DOI: 10.27035/j.cnki.issn2097-5279.20260205

Establishment of a rapid detection technology system for *Neofusicoccum laricinum* based on CEEA isothermal amplification

Liu Zhengqiang¹ Pei Tingqian¹ An Wenjing³ Liu Lanze¹ Zhu Yeting¹ Liang Yingmei^{2*}

(1. Key Laboratory of Forest Cultivation and Protection, Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Beijing Forestry University Museum, Beijing 100083, China; 3. Beijing Jingxi Forest Farm Management Office, Beijing 102300, China)

Abstract: *Neofusicoccum laricinum* (Sawada) Y. Hattori & C. Nakash is a quarantine pest of imported plants and a forestry quarantine pest in China. It is also one of only two fungal plant pathogens listed in the *Catalogue of Key Managed Invasive Alien Species*. Developing rapid, accurate, and visual detection method is crucial for effective prevention and control of this disease. In this study, a method combining composite enzyme index amplification (CEEA) technique with lateral flow dipstick (LFD) technology was developed. Using specifically designed CEEA primer sets and probes for *N. laricinum*, followed by optimization of reaction conditions (39 °C for 15 minutes), the method could specifically detect *N. laricinum* strains from diverse regions with a limit of detection (LOD) as low as 100.0 fg·μL⁻¹, the entire process to be completed in 30 minutes. This technology requires no expensive instruments and does not identify other fungi on *Larch*, demonstrating good applicability. With its high efficiency, speed, and sensitivity, this technology provides strong support for in-situ rapid detection and identification of pathogens in the forest, as well as for the early warning of disease.

Keywords: *Neofusicoccum laricinum*; Larch; composite enzyme index amplification; lateral flow test strips; detection technology

落叶松枯梢病菌 *Neofusicoccum laricinum* (Sawada) Y. Hattori & C. Nakash 是引发欧洲落叶松 *Larix decidua* Mill 和日本落叶松 *Larix kaempferi* Lamb 枯梢病的病

原菌(尚衍重, 1991; Hattori et al., 2021)。自发现以来, 该病菌一直被列为中国进境植物检疫对象和林业检疫性有害生物, 且被列入《重点管理外来入侵物种名

收稿日期: 2025-10-24; 修回日期: 2025-12-22。

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFD1400300)。

* 通信作者: 梁英梅(E-mail: liangym@bjfu.edu.cn), 教授。

引文格式: 刘正强, 裴婷倩, 安文静, 等. 2026. 基于 CEEA 等温扩增技术的落叶枯梢病菌快速检测技术体系[J]. 树木医学, 3(2): 40-48.

Liu Z Q, Pei T Q, An W J, et al. 2026. Establishment of a rapid detection technology system for *Neofusicoccum laricinum* based on CEEA isothermal amplification[J]. Tree Health, 3(2): 40-48.

录》,是其中仅有的2种真菌性植物病菌之一。落叶松枯梢病的检测检疫,除采用常规形态鉴定方法(王永民等,1992)外,刘秀薇等(2009)基于落叶松梢栖真菌 ITS 序列开展巢式 PCR 扩增,将落叶松枯梢病原菌与其他9种落叶松枯梢上的真菌加以区分,初步明确了该病害的分子检测方法,为落叶松枯梢病的快速检测奠定了一定的试验基础。然而,该方法仅能在具备条件的实验室中进行检测,且须借助多种专业仪器设备(彭丹丹等,2017),无法满足现场快速检测的需要。近年来,梁英梅等(2023,2025)构建了落叶松枯梢病菌的超分支滚环扩增体系(hyperbranched rolling circle amplification, HRCA),并进一步设计完成了基于锁式探针的 HRCA-LFD 技术检测流程,实现了落叶松枯梢病菌检测结果的可视化,但检测过程耗时较长。

等温扩增技术(isothermal amplification technology, ITA)仅需恒定的温度条件,可在水浴锅、金属浴等基础设备上实施,摆脱了核酸扩增对复杂精密温控设备的依赖,操作简便,无需专业技术人员参与(王帅等,2023),且不需要专业的实验室环境(Crannell, 2014; Wang et al., 2016; Babu et al., 2017; Lobato et al., 2018),因此极为适合现场快速检测。复合酶指数扩增(composite enzyme exponential amplification, CEEA)与重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)属

于同源的体外等温核酸扩增技术,可在 37~42 ℃ 的恒温条件下于 15~20 min 内完成反应,并已应用于病毒、真菌检测。借助侧流试纸条(lateral flow dipstick, LFD)可直接用肉眼观察 CEEA 扩增子。

本研究针对 *N. laricinum* 设计了特异性引物和探针,利用 CEEA-LFD 体系对不同地区来源的 *N. laricinum* 分离株以及落叶松上其他真菌进行检测,以验证该技术体系的适用性和特异性。该技术通过直接从病枝部位快速提取 DNA 的方法,实现了落叶松枯梢病在林间的快速检测,为落叶松枯梢病菌在林间的简单、快速、灵敏、准确检测提供了新的技术方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试菌株自内蒙古阿里河、黑龙江塔河、河北承德、吉林敦化和延吉、辽宁鞍山和抚顺、陕西北宁、宁夏固原、山东烟台以及北京房山等落叶松分布地区的落叶松枯梢上采集并分离获得。分离鉴定真菌共计 202 株,保存于北京林业大学森林病理实验室。经过形态学和分子系统学鉴定,从中挑选 6 株不同来源地的落叶松枯梢病菌作为阳性代表菌株进行适用性检验,将从落叶松枯梢上分离到的 14 株其他真菌作为特异性检验对象(表 1),并将来自吉林的 24 份疑似落叶松枯梢病的发病枝条作为待检测样本(表 2)。

表 1 供试落叶松枯梢上的真菌菌株
Tab. 1 The tested isolates of Larch shoot blight

种名 Species	菌株编号 Number	寄主 Host	来源地 Source location	检测类型 Type of test
<i>Neofusicoccum laricinum</i>	K7	兴安落叶松 <i>Larix gmelinii</i> (Rupr.) Kuzen.	内蒙古阿里河	适用性检测
	JX-21	华北落叶松 <i>Larix gmelinii</i> var. <i>principis-rupprechtii</i> (Mayr) Pilg.	北京房山	
	37-7	日本落叶松 <i>L. kaempferi</i>	山东烟台	
	H030	兴安落叶松 <i>L. gmelinii</i>	河北承德	
	Y042	日本落叶松 <i>L. kaempferi</i>	吉林延吉	
	HC-2	长白落叶松 <i>Larix olgensis</i> A. Henry	辽宁鞍山	
<i>Allantophomopsis</i> sp.	SKS-26	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	辽宁抚顺	特异性检测
<i>Aplosporella</i> sp.	Y097	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	吉林延吉	
<i>Botryosphaeria</i> sp.	Y029	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	辽宁抚顺	
<i>Cytospora</i> sp.	Y002	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	辽宁鞍山	
<i>Diaporthe</i> sp.	LDS-31-1	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	吉林延吉	
<i>Diplodia</i> sp.	LDS-31-2	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	吉林延吉	
<i>Tympanis</i> sp.	LDS-14	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	吉林敦化	
<i>Phaeobotryon</i> sp.	Y097-2	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	吉林延吉	
<i>Thyronectria</i> sp.	LDS-36-1	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	吉林敦化	
<i>Dothiorella acericola</i>	Y002-2	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	辽宁鞍山	
<i>Discosia muscicola</i>	LDS-32	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	吉林敦化	
<i>Pestalotiopsis hunanensis</i>	SKS-1	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	辽宁抚顺	
<i>Heterotruncatella spartii</i>	SHB-15	华北落叶松 <i>L. gmelinii</i>	河北承德	
<i>Cytospora sorbariae</i>	D12-1	长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	河北承德	

表 2 疑似落叶松枯梢病的待检测样本信息

Tab. 2 Information of the samples to be tested suspected of being infected with *Neofusicoccum laricinum*

寄主 Host	标本号 Specimen number	标本份数 Number of specimen	来源地 Source location	检测类型 Type of Test
长白落叶松 <i>L. olgensis</i>	LDS-31-5	1	吉林延吉	实际样本检测
	LDS-32-2	2	吉林敦化	
	LDS-45-1	5	吉林敦化	
	LDS-55-1	3	吉林敦化	
	LDS-68-2	2	吉林敦化	
	Y068-1	7	吉林延吉	
	Y069-1	3	吉林延吉	
	Y7	1	吉林敦化	

1.2 DNA 提取

采用 CTAB 法 (Cetyltrimethylammonium Bromide) 分别提取落叶松枯梢上分离得到的各种真菌菌株的 DNA 用于特异性检测。核酸快速释放剂(苏州基恩诺生物医疗科技有限公司)直接用于适用性检测以及林间样品组织的实际检测。DNA 恒温快速扩增试剂盒(48T)由本课题组研发,委托苏州基恩诺生物医疗科技有限公司生产。

1.3 落叶松枯梢病的病症观察

在体式显微镜(Olympus SZX2-FOF)下对典型落叶松枯梢病的特征进行观察,并用刀片横切病症部位,对比落叶松枯枝上不同真菌子实体的形态特征,以缩小检测范围,明确检测对象。

1.4 CEEA 引物及探针的设计

将 NCBI(National Center for Biotechnology Information,

国家生物技术信息中心)数据库下载的落叶松枯梢病菌基因组(*N.laricinum*.HLJ-QQHE-4, CP123724.1.g12009.t1)与其近似种的基因序列进行比对。选择一段碱基差异较大的特异性片段(TCCTGCCGCTTCGTTCCAATTTTCGCCCGGACCGTGCACCATGGAAGAACAAGCGGCCCCGAGATGCGGCCAGCCAGATAGCAAAACAGCATTTCAGTTCCAGCAGAACTCCCAAACAGCCCCAAAAGAAAAGGAAGCACCAGGAAGACCAGGACCTGTTTCGAGAAAATCAAGAAGGCAGTCCAGTGGCGATCCAACCGCTCCTTCAGGAAATCAGCCAGCTACGCCACCAAACGCAGCAACAGCAGCAGGAACTACAAAAG),根据 CEEA 引物及其探针设计原则,设计 4 条上游引物、5 条下游引物及 1 条探针(表 3),引物和探针均由北京诺赛基因研究中心合成。

表 3 引物及探针

Tab. 3 Primers and probes

引物名称 Primer name	序列 (5' to 3') Sequence	碱基长度/bp Base length
NT-NFO	[5'FAM]-CCCGAGATGCGGCCAGCCAGATAGCAAAACA[THF]CATTTCCAGTTCAG-[3'C3spacer]	46
NF-1	CTGCCGCTTCGTTCCAATTTTCGCCCG	27
NF-2	TCCTGCCGCTTCGTTCCAATTTTCGCCCG	29
NF-3	CTTCGTTCCAATTTTCGCCCGGACCGTGC	29
NF-4	TTCCAATTTTCGCCCGGACCGTGCACCATG	30
NR-1	[5-biotin]-TTTGTAGTTCCTGCTGCTGTTGCTGCGTTTG-3'	31
NR-2	[5-biotin]-TTCCTGCTGCTGTTGCTGCGTTTGGTGGCG-3'	30
NR-3	[5-biotin]-TAGCTGGCTGATTCCTGAAGGAGCGGTTGG-3'	31
NR-4	[5-biotin]-ATCGCCCACTGGACTGCCTTCTGATTTTCTCG-3'	33
NR-5	[5-biotin]-CCTTCTTGATTTTCTCGAACAGGTCCTGG-3'	29

1.5 CEEA-LFD 引物及探针的筛选

根据 CEEA-LFD 检测反应体系(总体积 50.0 μL; 包含 32.9 μL A Buffer、2.0 μL 浓度为 10 μmol·L⁻¹ 的引物 F、2.0 μL 浓度为 10 μmol·L⁻¹ 的引物 R、0.6 μL 浓度为 10 μmol·L⁻¹ 的探针、2.5 μL B buffer、5.0 μL DNA 和 5.0 μL ddH₂O)和反应条件(39 ℃, 20 min),使用 ddH₂O 作为样本对引物组与探针的搭配进行筛选,以排除假阳

性组合。反应结束后,将扩增产物稀释 10~20 倍,取 80 μL 稀释后的产物加入侧流试纸条点样孔,在室温下静置 5 min。如果试纸条仅在质控区显示蓝色条带,而在检测区无条带,则说明引物和探针的搭配组合不会出现假阳性,该组引物和探针可用于后续试验;反之,如果试纸条在质控区出现蓝色条带,检测区出现红色条带,则引物和探针的搭配组合结果是假阳

性,该引物组与探针组合不可用。

选取上述结果中不会出现假阳性的引物对和探针,开展可用于检测的阳性引物筛选试验。以落叶松枯梢病菌的 K7 菌株 DNA 作为阳性样本(从具有典型落叶松枯梢病特征的标本上分离得到标准菌株,故作为阳性样本),将其浓度稀释至 $100.0 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,以 ddH_2O 为阴性对照,用 CEEA-LFD 试剂盒反应结束后,使用侧向流试纸条读取结果。如果试纸条在质控区出现蓝色条带,检测区出现红色条带,则该组引物和探针可用于检测;反之,如果试纸条仅在质控区显示蓝色条带,而在检测区无条带,则说明该引物和探针的搭配组合不可用。

1.6 CEEA-LFD 特异性检测

使用上述筛选出的可用于检测的引物对和探针组合,采用 CEEA-LFD 反应体系,对落叶松上分离到的其他真菌进行特异性检测。以 K7 菌株作为阳性对照,以确认该引物和探针是否具有特异性。

1.7 CEEA-LFD 反应条件优化

采用筛选好的引物和探针进行反应条件的优化。设定不同温度(37、38、39、40、41、42 $^{\circ}\text{C}$)和不同时间(5、10、15、20 min),以 K7 菌株 DNA 作为阳性对照, ddH_2O 作为阴性对照,分别进行 CEEA-LFD 检测,以确定最佳反应温度和反应时间。

1.8 CEEA-LFD 检测的灵敏度和适用性分析

对提取的 K7 菌株的 DNA 使用超微量分光光度计(Nandrop)进行浓度测定,用超纯水将样品进行以 10 倍梯度稀释至 $1.0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100.0 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10.0 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100.0 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10.0 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1.0 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,再采用 CEEA-LFD 反应体系分别进行灵敏度检测。用来自内蒙古阿里河、北京房山、山东烟台、河北承德、吉林延吉、辽宁鞍山的 6 个落叶松枯梢病菌样本(表 1)进行适用性检测。以上试验全部使用 ddH_2O 作为阴性对照。

1.9 构建 CEEA-LFD 检测体系并验证

将筛选得到的性能最优特异性引物对和探针组合委托公司制成冻干粉,同时将反应体系中的 Buffer 制成微粒球,二者组装于 PC 冻存管中,制成落叶松枯梢病菌 CEEA-LFD 检测试剂盒(委托苏州基恩诺公司生产,规格为 48T)。同时构建 CEEA-LFD 体系的检测流程(图 1)用于林间样本的验证检测。

以 K7 菌株的 DNA 样本作为阳性对照,落叶松健康枝 DNA 和 ddH_2O 分别作为阴性对照,以采自吉林的 24 份疑似落叶松枯梢病样本不同部位病枝(表 2)作为实际样本,分别在体视显微镜下用刀片切取各

疑似枯梢病枝条的病组织若干,放入离心管中,采用核酸快速释放剂提取 DNA,依照设计的检测流程进行检测。

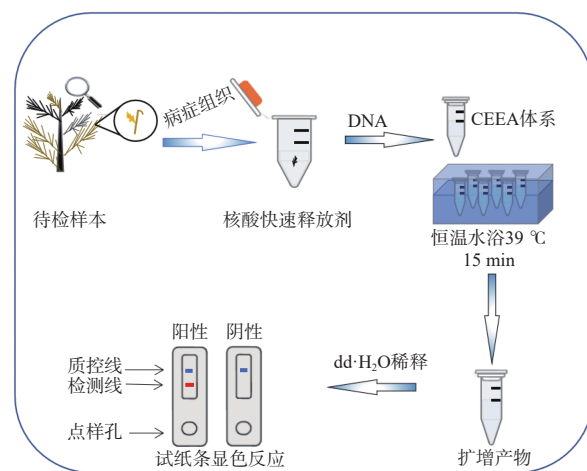


图 1 落叶松枯梢病菌 CEEA-LFD 检测流程
Fig. 1 *Neofusicoccum laricinum* CEEA-LFD detection flowchart

2 结果与分析

2.1 落叶松枯梢病典型特征

通过观察不同时期落叶松枯梢病的样本发现(图 2 A1-6),病程发展不同阶段的典型症状不同,具体如下:1)当年嫩枝梢弯曲呈“勾梢”状并伴有皱缩与萎蔫(图 2 A1-2);2)树冠呈现多层“扫帚状”枯梢(图 2 A3);3)直立枯梢(图 2 A4);4)丛枝状枯梢(图 2 A5);5)顶梢部针叶枯死(图 2 A6)。在体式显微镜下观察发现,病症部位呈梭形或明显皱缩,横切可发现子座单腔,瓶形或梨形,黑褐色,成熟时孔口外露,切开内部为白色(图 2 B1-7)。与引起落叶松枝枯的其他属真菌,如葡萄座腔菌 *Botryosphaeria* 进行对比,其不会引起如图 2 中 A1-6 所示的病状,病症表面与落叶松枯梢病菌的子实体相似,但横切后不是白色形态(图 2 C1-8)。

2.2 CEEA-LFD 引物组及探针的筛选结果

2.2.1 阴性筛选结果

为排除假阳性,以 ddH_2O 为样品模板,对设计的 4 条上游引物、5 条下游引物及 1 条探针分别搭配进行阴性筛选。结果表明:在阴性条件下,引物组 NF4、NR5 及引物组 NF3、NR1 与探针 NT-NFO 搭配时,试纸条仅在质控区显示蓝色条带,而在检测区无条带,未出现假阳性,可用于后续试验(图 3);其余搭配组合均有不同程度的假阳性出现,即试纸条的质控区显示蓝色条带,检测区出现红色条带,说明这些引物和

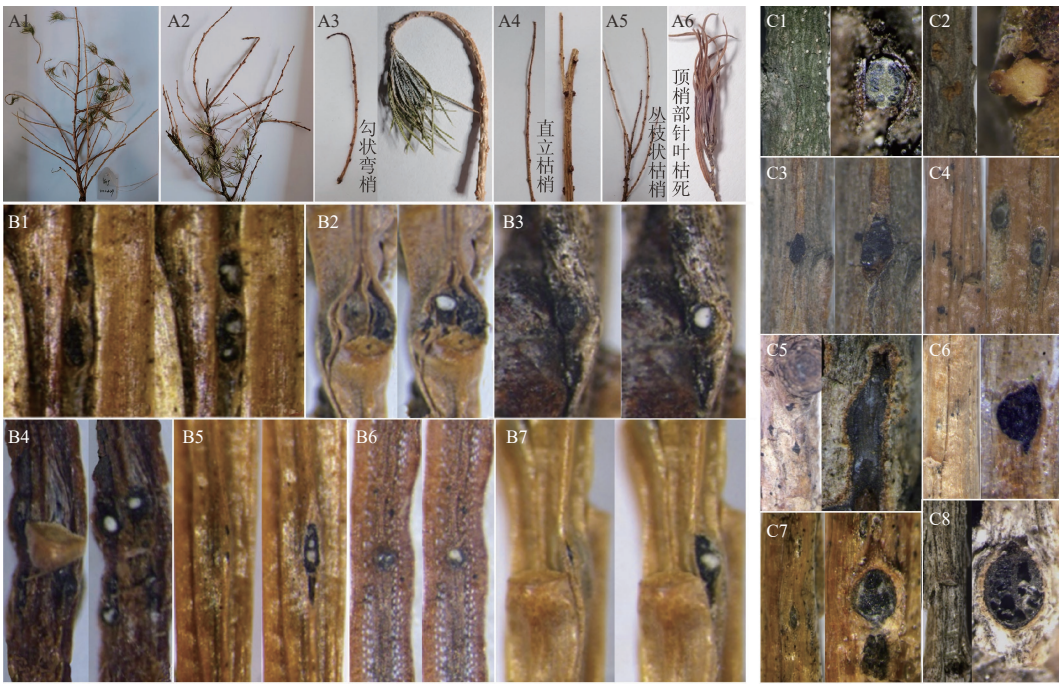


图 2 落叶松枯梢病症状及其他属形态观察结果

Fig. 2 Morphological characteristics of *Neofusicoccum laricinum* and similar fungi on Larch

注: A. 落叶松枯梢病典型为害特征; B. 落叶松枯梢病微观症状; C. 落叶松枯梢上分离的葡萄座腔菌属微观症状。
Notes: A. Typical symptom *Neofusicoccum laricinum*; B. Observations on *Neofusicoccum laricinum*; C. Morphology of *Phaeobotryon* isolated from Larch.

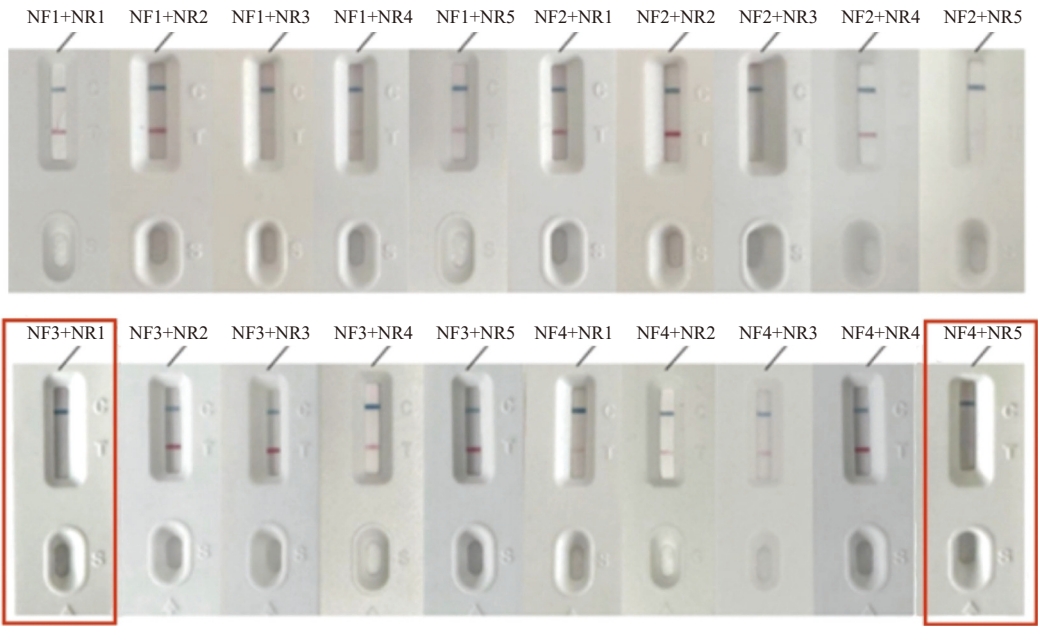


图 3 引物阴性筛选结果

Fig. 3 Primer screening results

探针的搭配组合会出现假阳性,不可用于后续的检测。
2.2.2 阳性筛选结果

对筛选出的引物组 NF4、NR5 和 NF3、NR1, 以及探针 NT-NFO 分别进行阳性筛选。结果显示(图 4): 对 DNA 浓度为 100.0 pg/μL 的 K7 落叶松枯梢病菌检测时, NF4、NR5 与探针 NT-NFO 组合以及 NF3、NR1

与探针 NT-NFO 组合的试纸条检测结果均呈阳性; 但 NF4、NR5 与探针 NT-NFO 搭配的试纸条阳性结果更明显, 表明引物组 NF4+NR5+NT-NFO 性能优于 NF3+NR1+NT-NFO, 可用于后续试验。

2.3 CEEA-LFD 特异性检测结果

以落叶松枯梢病菌 K7 菌株的 DNA 样本作为阳

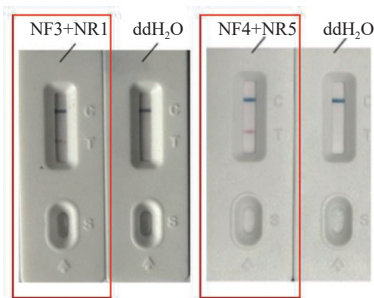


图4 阳性筛选结果

Fig. 4 Positive screening result chart

性对照, 以 ddH₂O 为阴性对照, 利用上述 NF4+NR5+NT-NFO 组合对落叶松枝枯上分离到的 15 种真菌样品的 DNA 进行特异性检测。结果显示: 供试的 15 种真菌中, 仅阳性对照能够被特异性检测出来, 试纸条质控线显示蓝色, 检测线显示红色, 检测结果呈阳性; 其余 14 种待检真菌 (表 1) 以及阴性对照 ddH₂O 均无法被检出, 显示出良好的特异性, 并能可视化直观显示 (图 5), 说明探针 NF4、NR5 与探针 NT-NFO 组合特异性良好, 适用于落叶松枯梢病的检测。

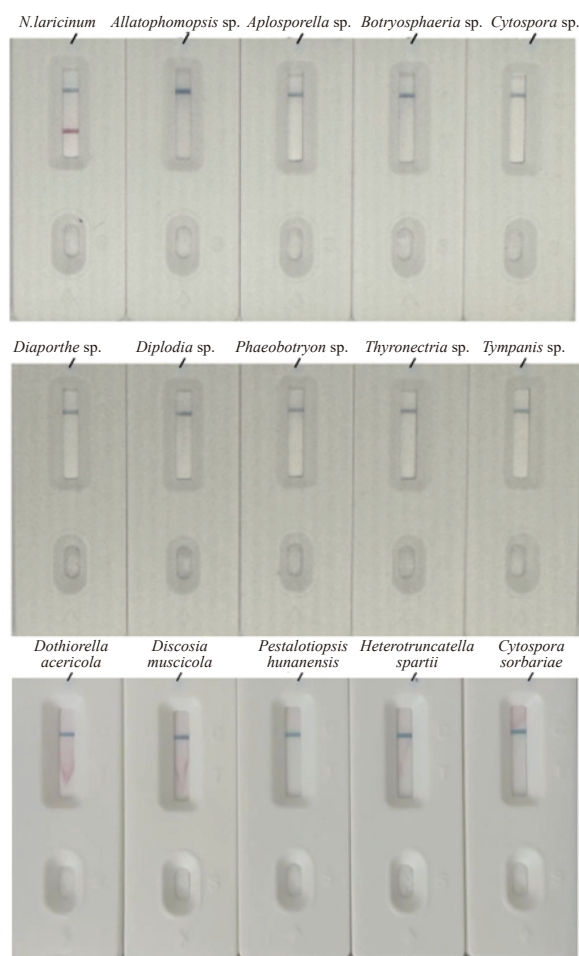


图5 特异性检测结果

Fig. 5 Specific detection results

2.4 CEEA-LFD 反应条件的优化结果

以 ddH₂O 为阴性对照, 分别在 37、38、39、40、41、42 °C 的系列反应温度条件下进行测试。结果显示, 当反应温度为 39 °C 时 T 线显色程度最明显 (图 6A); 同时在 5、10、15 和 20 min 不同反应时间下进行测试, 发现反应 15 min 和 20 min 的 CEEA 产物在检测条带呈现明显颜色 (图 6B)。为了避免长时间扩增带来的假阳性结果, 最终确定 15 min 作为最适反应时间。

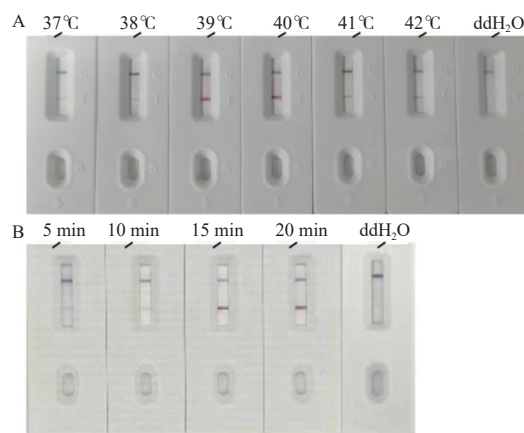


图6 反应温度及反应时间优化结果

Fig. 6 Optimization results of reaction temperature and time

注: A. 反应温度优化结果; B. 反应时间优化结果。

Notes: A. Optimization results of reaction temperature; B. Optimization results of reaction time.

2.5 CEEA-LFD 检测的灵敏度及适用性结果

取落叶松枯梢病菌 K7 菌株的 DNA 样本, 使用超纯水进行 10 倍梯度稀释 (浓度为 $1.0 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1} \sim 0.1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$), 分别取 $2 \mu\text{L}$ 作为模板待检, 以 ddH₂O 作为阴性对照, 采用试剂盒和荧光 PCR 仪进行扩增反应。结果表明, 除 10.0、1.0 和 $0.1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 这 3 个浓度未检出目标物外, 其余 5 个浓度均能检出, 说明 CEEA-LFD 试剂盒对落叶松枯梢病菌的最低检测浓度为 $100.0 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 在此浓度时可观察到显色反应 (图 7A)。同时, 以 K7 菌株的 DNA 样本作为阳性对照, 以 ddH₂O 为阴性对照, 对来源于内蒙古、北京、河北、山东、辽宁和吉林等不同地理区域的落叶松枯梢病病原菌株的 DNA, 按照 CEEA-LFD 体系的检测流程 (图 1), 使用试剂盒进行检测。结果显示, 除阴性对照未检出目标物外, 所有不同来源的落叶松枯梢病病原菌株均呈现阳性检测结果 (图 7B)。这表明该试剂盒体系具备良好的检测适用性。

2.6 CEEA-LFD 林间样本检测

以落叶松枯梢病 K7 菌株的 DNA 样本作为阳性对照, 以 ddH₂O 和落叶松健康枝为阴性对照, 按照已建立的落叶松枯梢病菌 CEEA-LFD 试剂盒检测方法 & 流程操作, 对落叶松林间样本进行检测。结果显示:

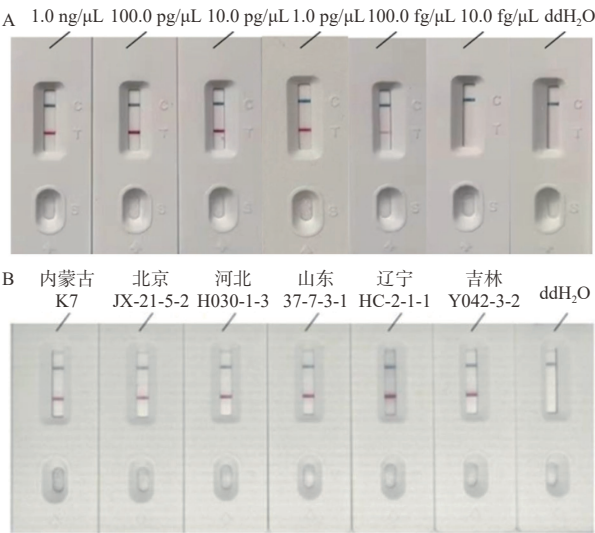


图 7 灵敏度及适用性检测结果
Fig. 7 Sensitivity and applicability detection results

注: A. 灵敏度检测结果; B. 适用性检测结果。
Notes: A. Sensitivity detection results; B. Applicability of test results.

24 份具有不同病症部位的样本和阳性对照 K7 菌株相同, 均在检测区出现了红色条带; 而健康枝条和阴性对照(ddH₂O)仅在质控区出现蓝色条带, 在检测区没有出现红色条带(图 8A)。该方法能够从病症组织

块中有效检测出落叶松枯梢病菌, 检出率为 91.3% (图 8B)。

3 讨论

落叶松枯梢病菌在非发病期生长速度相对缓慢, 采用常规的分离方法难以成功分离, 在病菌潜伏期或早期感染阶段亦难以精准检测(王战役等, 2006)。目前该病菌的检测主要存在以下问题: 1) 该病菌具有强大的侵染能力, 其侵染过程难以通过肉眼直接观察, 待植株表现出明显病症时, 病菌往往已在一定范围内扩散流行, 增加了检测和防控的难度(赵娟等, 2010); 2) 样本预处理流程相对复杂且耗时较长, 需经子实体提取、显微观察等多个步骤(尤斯涵等, 2023; 汤苗等, 2023), 不仅增加了检测的时间和经济成本, 也限制了其在快速检测中的应用; 3) 样本采集需操作人员具备专业知识和实践经验, 以确保采集样本的代表性(Zhou et al., 2021)。另外, 样本保存条件较为苛刻, 需严格避免样本污染并保持其生物活性, 否则易影响后续检测结果的准确性。

本研究针对落叶松枯梢病菌基因组特异性片段

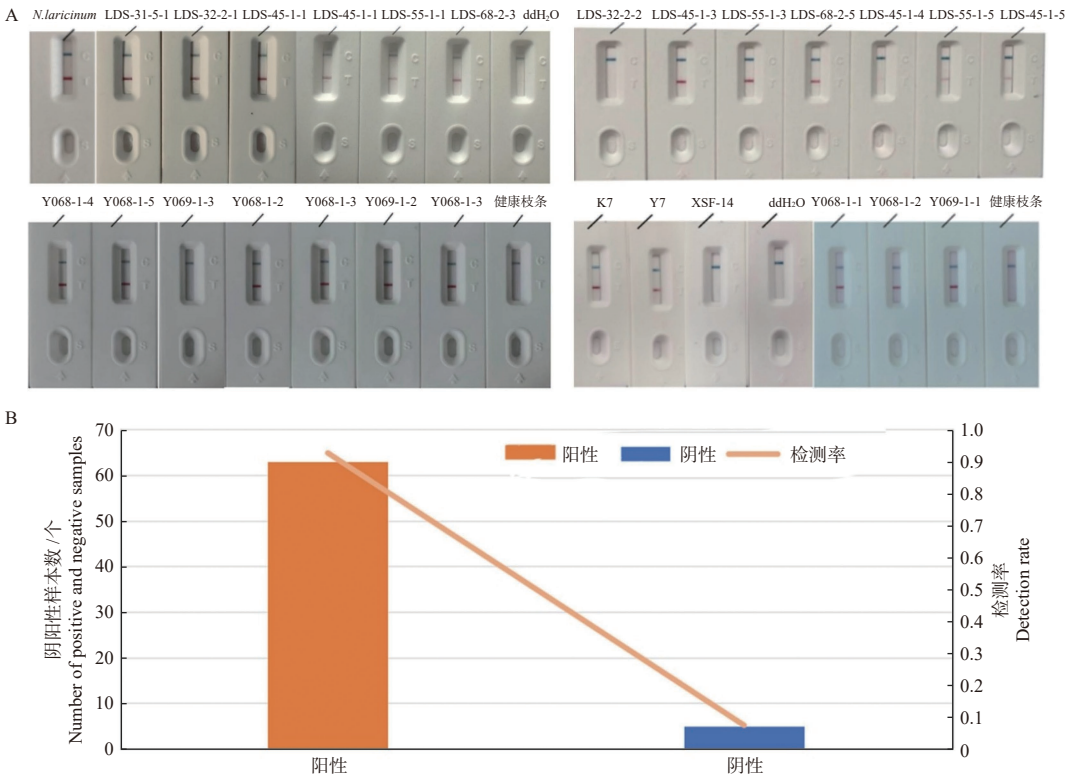


图 8 实际样本检测结果及检出率
Fig. 8 Actual sample detection results and detection rate

注: A. 实际样本检测结果; B. 检出率。A 中颜色一致的编号为同一份大标本中不同小枝, 为不同批次所检出。
Notes: A. Actual sample detection results; B. The detection rate. The consistent numbers in A are different branchlets from the same large specimen, which were detected in different batches.

设计了引物与探针,提出了基于 CEEA-LFD 技术的落叶松枯梢病菌检测方法。结果表明,该方法具有高度的特异性和灵敏度。传统引物与探针筛选通常为迭代式“试错”流程,具体步骤包括:1)进行多轮 PCR 扩增与凝胶电泳,初步验证扩增效率与特异性;2)对扩增产物进行克隆测序,确认其靶标准准确性;3)针对候选引物设计多条同源引物,与探针组合后进行广泛的反应条件优化。该过程需反复循环进行,不仅高度依赖实验人员的操作经验,还耗费大量试剂与时间(丁亚操等,2016)。本研究通过构建引物与探针直接搭配筛选的创新策略,有效简化了传统的引物探针筛选流程,极大降低了检测技术的研发成本。未来仍需针对落叶松枯梢病菌的遗传多样性和复杂性开展深入研究,进一步开发更精准、高效的检测技术。

本研究成功研发出落叶松枯梢病菌 CEEA-LFD 试剂盒检测技术,该技术操作简单、检测高效,可在 30 min 内完成全部检测流程,为基层林场开展落叶松枯梢病菌就地快速检测提供有力技术支撑,具有广阔的应用前景。该检测技术可直接以疑似发病枝条中的病症组织段为样本,使用核酸快速释放剂提取 DNA,按照 CEEA-LFD 检测技术流程操作,通过核酸试纸条显色结果判断样本中是否存在落叶松枯梢病菌。与传统鉴定方法相比,该方法无需从患病的落叶松枯枝中分离和纯化单一菌株,也无需提取 DNA 进行测序比对(Ju et al., 2025)。这一技术改进不仅显著缩短检测耗时,减少了人力成本,提升了检测的效率,而且降低了在分离过程中可能引入的外源污染风险(Kim et al., 2021)。本研究基于建立标准化检测体系,委托专业公司生产了单管检测体系,该体系仅需开盖一次加核酸样本,极大减少了反复开盖造成的气溶胶污染(Yang et al., 2023),从技术层面避免了样本间交叉反应的发生。上述优势使该技术在口岸卫生检疫、基层现场检测等资源受限的环境中展现出显著的实用价值与推广潜力。

4 结论

本研究开发了一种针对落叶松枯梢病菌的 CEEA-LFD 试剂盒检测技术,该技术具备特异性强、灵敏度高的显著特点。通过优化引物与探针的组合筛选策略,有效规避了由二聚体产物形成所引发的假阳性干扰。该方法在 39 ℃ 的恒温条件下,仅需 30 min 即可完成检测,操作简便且适用性广泛,特别适用于偏远地区及林业基层检疫与森防部门。无论在缺乏精密仪器的现场环境还是常规实验室条件下,该技

术均能实现对落叶松枯梢病菌的快速检测与诊断。

参 考 文 献

- 丁亚操. 2016. 桂花草杂交群体构建、性状分析及遗传图谱引物筛选[D]. 海口: 海南大学.
- Ding Y C. 2016. Character analysis and genetic map primers selection on constructed crossing population of *Stylosanthes*[D]. Haikou: Hainan University. (in Chinese)
- 梁英梅, 伍文慧, 田呈明, 等. 基于锁式探针的落叶松枯梢病菌滚环扩增引物组及应用: CN202310336499.2[P]. 2023-07-14.
- 梁英梅, 刘正强, 伍文慧, 等. 基于超分支滚环扩增检测落叶松枯梢病菌的探针引物组、试剂盒及检测方法: CN202411482036.8[P]. 2025-04-04.
- 刘秀徽. 2009. 落叶松枯梢病的生物防治与分子检测初步研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学.
- Liu X W. 2009. Biocontrol and molecular diagnosis of the larch shoot blight[D]. Harbin: Northeast Forestry University. (in Chinese)
- 彭丹丹, 张源明, 舒灿伟, 等. 2017. 植物病原真菌分子检测技术的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 36(5): 2015-2022.
- Peng D D, Zhang Y M, Shu C W, et al. 2017. Research progress on molecular detection techniques of plant pathogenic fungi[J]. Genomics and Applied Biology, 36(5): 2015-2022. (in Chinese)
- 尚衍重. 1991. 落叶松枯梢病菌的学名变更[J]. 森林病虫害通讯, 10(2): 17.
- Shang Y Z. 1991. Change of scientific name of larch shoot blight pathogen[J]. Forest Pest and Disease, 10(2): 17. (in Chinese)
- 汤苗, 叶绍翔, 文景玉, 等. 2023. 样品预处理对天然橡胶相对分子量测试的影响[J]. 中国热带农业(5): 37-43.
- Tang M, Ye S X, Wen J Y, et al. 2023. Effect of sample pretreatment on the relative molecular weight test of natural rubber[J]. China Tropical Agriculture, (5): 37-43. (in Chinese)
- 王帅, 杨艳歌, 吴占文, 等. 2023. 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, 44(9): 297-305.
- Wang S, Yang Y G, Wu Z W, et al. 2023. 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, 44(9): 297-305. (in Chinese)
- 王永民, 刘国荣, 王世君, 等. 1992. 落叶松枯梢病检疫技术的研究[J]. 林业科学研究, 5(6): 652-658.
- Wang Y M, Liu G R, Wang S J, et al. 1992. Study of quarantine techniques for larch shoot dieback[J]. Forest Research, 5(6): 652-658. (in Chinese)
- 王战役, 师恩帅. 2006. 落叶松苗期三种主要病害防治技术[J]. 林业勘察设计, 35(3): 47-48.
- Wang Z Y, Shi E S. 2006. Prevention and control techniques of three main diseases in larch seedling stage[J]. Forest Investigation Design, 35(3): 47-48. (in Chinese)
- 尤斯涵, 殷宏艳, 杨宋蕊, 等. 2023. 生物样品的预处理技术研究进展[J]. 神经药理学报, 13(5): 52-59.
- You S H, Yin H Y, Yang S R, et al. 2023. Advance in pretreatment techniques for biological samples[J]. Acta Neuropharmacologica, 13(5): 52-59. (in Chinese)

- 赵娟, 张继澍, 王玉国, 等. 2010. 致病真菌侵染对梨果实愈伤组织防御机制的影响[J]. 西北植物学报, 30(11): 2219–2224.
- Zhao J, Zhang J S, Wang Y G, *et al.* 2010. Effects of infection of epiphyte caused fruit rot on defense mechanism in pear fruit callus[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 30(11): 2219–2224. (in Chinese)
- Babu B, Washburn B K, Miller S H, *et al.* 2017. A rapid assay for detection of Rose rosette virus using reverse transcription-recombinase polymerase amplification using multiple gene targets[J]. *Journal of Virological Methods*, 240: 78–84.
- Crannell Z A, Rohman B, Richards-Kortum R. 2014. Quantification of HIV-1 DNA using real-time recombinase polymerase amplification[J]. *Analytical Chemistry*, 86(12): 5615–5619.
- Hattori Y, Ando Y, Nakashima C. 2021. Taxonomical re-examination of the genus *Neofusicoccum* in Japan[J]. *Mycoscience*, 62(4): 250–259.
- Ju F Y, Qi Z Q, Tan J J, *et al.* 2025. Development of a recombinase polymerase amplification method combined with a lateral flow dipstick assay for rapid detection of the larch pathogen *Neofusicoccum laricinum*[J]. *Plant Disease*, 109(2): 278–288.
- Kim J H, Oh S W. 2021. Pretreatment methods for nucleic acid-based rapid detection of pathogens in food: A review[J]. *Food Control*, 121: 107575.
- Lobato I M, O'Sullivan C K. 2018. Recombinase polymerase amplification: Basics, applications and recent advances[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 98: 19–35.
- Wang J C, Liu L B, Li R W, *et al.* 2016. Rapid and sensitive detection of canine parvovirus type 2 by recombinase polymerase amplification[J]. *Archives of Virology*, 161(4): 1015–1018.
- Yang Y H, Wang F, Xue B Y, *et al.* 2023. Field-deployable assay based on CRISPR-Cas13a coupled with RT-RPA in one tube for the detection of SARS-CoV-2 in wastewater[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 459: 132077.
- Zhou H W, Wang C H, Rao J, *et al.* 2021. The impact of sample processing on the rapid antigen detection test for SARS-CoV-2: Virus inactivation, VTM selection, and sample preservation[J]. *Biosafety and Health*, 3(5): 238–243.