

苹果轮纹病菌 LAMP 快速检测方法的建立

汪少丽¹ 曲恒华² 王英姿^{1,3*} 王培松¹ 栾炳辉¹ 王冠华³

(1. 山东省烟台市农业科学研究院, 烟台 265500; 2. 烟台市果茶工作站, 山东烟台 264001; 3. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005)

摘要: 为建立快捷、灵敏检测苹果轮纹病菌 *Botryosphaeria dothidea* 的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法,以其内转录间隔区 ITS 序列为靶标,设计 6 条 LAMP 引物,对其特异性进行检测,优化反应条件并建立苹果轮纹病菌的 LAMP 检测方法。引物特异性检测结果表明,2 株苹果轮纹病菌反应结果呈绿色为阳性,而其它 3 株对照菌株反应结果呈橙色为阴性,表明了 LAMP 检测引物的高特异性。优化后的 LAMP 最佳反应条件:温度 65℃、扩增时间 60 min、FIP/BIP、F3/B3、LF/LB 引物终浓度分别为 1.0、0.25、0.5 μmol/L。LAMP 检测方法对苹果轮纹病菌 DNA 的检测灵敏度达到了 100 ag/μL,是常规 PCR 检测灵敏度的 100 倍。田间疑似轮纹病组织检测结果发现 LAMP 方法对苹果轮纹病菌的检出率高达 68%,而传统分离鉴定方法的检出率仅为 24%。表明所建立的苹果轮纹病菌 LAMP 快速检测方法简便快捷、特异性好、灵敏度高,尤其适用于基层植保机构对于苹果轮纹病菌的田间快速检测。

关键词: 苹果轮纹病菌; 内转录间隔区(ITS); 环介导等温扩增(LAMP); 快速检测

Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of apple ring rot pathogen *Botryosphaeria dothidea*

WANG Shaoli¹ QU Henghua² WANG Yingzi^{1,3*} WANG Peisong¹ LUAN Binghui¹ WANG Guanhua³

(1. Yantai Academy of Agricultural Sciences, Yantai 265500, Shandong Province, China; 2. Yantai Fruit and Tea Workstation, Yantai 264001, Shandong Province, China; 3. College of Agronomy, Yantai University, Yantai 264005, Shandong Province, China)

Abstract: To establish a convenient and quick detection method for *Botryosphaeria dothidea*, based on internal transcribed spacer sequence (ITS) of *B. dothidea* and using six LAMP primers, the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was successfully established after optimizing reaction conditions. The specificity assay of LAMP showed that the products of two *B. dothidea* strains displayed green and positive reaction, and three other control strains displayed orange and negative reaction, which suggested that the LAMP detection was specific for *B. dothidea*. The optimized conditions of LAMP reaction were constant temperature 65℃, 60 min of extension and 1.0 μmol/L FIP/BIP, 0.25 μmol/L F3/B3, 0.5 μmol/L LF/LB. The sensitivity of LAMP detection was 100 ag/μL for *B. dothidea* DNA, which was 100 times more sensitive than that of regular PCR detection. Finally, LAMP was applied to detect suspected apple ring rot samples collected from the field. The positive rate of LAMP detection was 68%, while the positive rate by using traditional identification methods was only 24%.

基金项目: 山东省现代农业产业技术体系果品产业创新团队病虫害防治与质量控制岗位专家(SDAIT-06-11), 山东省重点研发计划(2017CXGC0214)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: ytnkyzbs@yt.shandong.cn

收稿日期: 2019-02-18

The results indicated that the LAMP established in the study could rapidly and easily detect *B. dothidea*, and had the potential for detection of *B. dothidea* specifically for grassroots plant protection agencies.

Key words: *Botryosphaeria dothidea*; internal transcribed spacer; loop-mediated isothermal amplification; rapid detection

1907年日本科学家首次在梨和苹果中发现了苹果轮纹病菌,其名称多次发生变化,最终统一为囊菌亚门贝伦格葡萄座腔菌梨生专化型 *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola* (陈策, 1999)。2012年 Tang et al. (2012) 对不同来源的71个苹果轮纹病菌生理小种进行了分析,最终确定引起中国、韩国和日本苹果轮纹病的病原菌是葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*。苹果轮纹病在我国发生范围广、危害重,苹果树主干、枝条、果实及叶片都可发病,主干是主要发病部位,发病后会严重削弱树势,造成果园减产,带来严重的经济损失(董娟华和李保华, 2009)。目前针对苹果轮纹病尚无较好的抗病品种,并且轮纹病菌的潜伏期较长,早期难以通过肉眼观察发现病症,而对于苹果轮纹病菌的检测方法有传统形态学观察、常规PCR扩增(彭斌等, 2011)、荧光定量PCR检测(杨秋夏, 2017)等,但是这些方法操作复杂、费时费力,同时需要PCR仪、凝胶电泳仪等设备,无法满足田间快速检测的需求。因此,寻找一种快速、准确、简洁的检测方法对于该病害的早期防控以及田间快速检测具有十分重要的意义。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是一种新型DNA扩增技术,是有4~6条特异性引物及具有链置换反应活性的 *Bst* DNA聚合酶参与的、能够在60~65℃恒温条件下短时间大量扩增靶标DNA的技术,具有扩增效率高、特异性强、灵敏度高、结果可视化等优点。目前, LAMP检测技术已经用于柑橘溃疡病菌 *Xanthomonas citri* subsp. *citri* (顾渊等, 2017)、马铃薯黑胫病菌 *Pectobacterium atrosepticum* (胡连霞等, 2017)、梨火疫病病菌 *Erwinia amylovora* (Moradi et al., 2012)、辣椒疫霉病菌 *Phytophthora capsici* (赵伟等, 2015)等多种植物病原菌的检测,是一种较成熟的病原菌快速检测技术。同时, LAMP反应产物的检测不仅可以通过浊度仪、real-time PCR仪及凝胶电泳仪进行,而且可以通过SYBR Green I(吴敏亮等, 2013)、钙黄绿素(Tomita et al., 2008)、羟基萘酚蓝(Goto et al., 2009)染色后进行肉眼识别,使得其在各种病原菌的田间检测中得到广泛应用。目前,关于苹果轮

纹病菌LAMP检测技术的研究以及在田间的应用尚未见报道。

本研究拟基于苹果轮纹病菌的ITS序列设计用于检测苹果轮纹病菌的LAMP引物并对检测方法进行优化,建立以SYBR Green I为指示剂的LAMP检测技术,以期丰富对苹果轮纹病菌的检测手段,为其田间快速诊断及早期防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:2株苹果轮纹病菌 *Botryosphaeria dothidea*、1株苹果腐烂病菌 *Valsa mali*、1株苹果炭疽病菌 *Colletotrichum acutatum*、1株苹果霉心病菌 *Trichothecium roseum*,均由烟台市农科院植物保护实验室分离保存;50份具有疑似苹果轮纹病症的枝干组织均采自烟台市农业科学院果树实验农场内,其中编号2~31号的样本来自于10年生富士品种苹果树,编号32~41号的样本来自于10年生嘎啦品种苹果树,编号42~51号的样本来自于10年生金帅品种苹果树。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基;马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g,灭菌水定容至1 000 mL。

试剂及仪器:等温扩增PCR混合液试剂盒(2×LAMP PCR Master Mix、*Bst* DNA聚合酶及ddH₂O),生工生物工程(上海)股份有限公司;DNA Marker、*rTaq* DNA聚合酶,宝生物工程(大连)有限公司;基因组DNA提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;SYBR Green I,嘉美生物技术有限公司;100 mmol/L MgSO₄,美国NEB公司;10 mmol/L dNTPs,美国Promega公司。BioPhotometer Plus核酸蛋白测定仪, Eppendorf中国有限公司;MyCycler™ Thermal Cycler 580BR型PCR仪,美国Bio-Rad公司;DYCP-32C型水平电泳仪,北京六一仪器厂;Vilber Lourmat凝胶成像系统,法国Vilber Lourmat公司,Mini Dancer Plus桌面型迷你离心机,生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 方法

1.2.1 病原菌 ITS 序列测序及 LAMP 引物设计

将供试菌株分别于 PDA 培养基上 25℃ 暗培养 7 d 后, 刮取菌丝用锡纸包裹后用液氮冷冻保存。病原菌菌丝总 DNA 的提取采用基因组 DNA 提取试剂盒进行, 具体操作参照试剂盒说明, 提取的 DNA 于 -20℃ 保存备用。

将提取的 DNA 送测序公司进行 ITS 序列的扩增及测序, ITS 引物为 ITS1/ITS4 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'/5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-C-3'), PCR 反应体系为: DNA 1 μL, *rTaq* DNA 聚合酶 0.2 μL、10 μmol/L 上下引物各 0.5 μL、2.5 mmol/L dNTPs 2 μL、25 mmol/L MgSO₄ 0.2 μL、2 μL 10×PCR

Buffer, 加入灭菌 ddH₂O 补充至 25 μL。扩增程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 20 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。获得序列后利用 DNAMAN 软件进行序列比对, 筛选苹果轮纹病菌中与其它病原菌序列同源性低的片段, 然后将这部分序列利用在线软件 Primer Explore V5 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) 设计苹果轮纹病菌的 LAMP 引物, 包括外引物 F3/B3、前内引物 FIP、后内引物 BIP (由 B1 反向互补序列 B1c 加上 B2 构成)、环引物 LB 及 LF (表 1), 本试验所有引物合成、病原菌 ITS 基因测序均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司完成。

表 1 本研究所用 LAMP 及 PCR 引物

Table 1 Primers for LAMP and PCR in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Purpose
F3	CCCTTTGGTATTCCGAAG	LAMP
B3	CAGCGGGTATCCCTACCTGA	LAMP
FIP	CGCAAAGGACGGTGCCCAATGGCATGCCTGTTGAGCGTC	LAMP
BIP	ACATACATCTCGCTTCGCGAGGTCAACCTTGA	LAMP
LF	GAGCTTGAGGGTTGTAAT	LAMP
LB	GAGCGCAGGGCGTCGCCCGCCGG	LAMP
ITS-LW-F	TGGTATTCCGAAGGGCAT	PCR
ITS-LW-R	TTCCTCCGCTTATTGATA	PCR

1.2.2 LAMP 检测方法的建立及引物特异性检测

本研究所建立的 LAMP 检测方法反应体系: 菌丝 DNA 1 μL、2×LAMP PCR Master Mix 10 μL、8 U/μL *Bst* DNA 聚合酶 0.5 μL、10 μmol/L 内引物 FIP/BIP 2 μL、10 μmol/L 外引物 F3/B3 0.5 μL、10 μmol/L 环引物 LF/LB 1 μL, 加 ddH₂O 补足至 20 μL, 离心使反应试剂充分混匀, 然后加入 1 μL 的 SYBR Green I 染料。反应温度为 65℃, 反应时间为 60 min, 反应结束后 80℃、10 min 灭活 *Bst* DNA 聚合酶, 加入 SYBR Green I 染料进行颜色观察检测结果。

LAMP 引物的特异性检测: 检测靶标分别包括 2 株苹果轮纹病菌、1 株苹果炭疽病菌、1 株苹果腐烂病菌、1 株苹果霉心病, 按照上述 LAMP 检测体系进行检测。加入 SYBR Green I 染料后直接用肉眼观察, 呈绿色为阳性, 呈橙色为阴性, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测时, 条带呈弥散状态的为阳性, 无扩增条带的为阴性。

1.2.3 LAMP 检测方法的条件优化

LAMP 检测方法的优化在特异性检测体系的基础上进行, 通过设定不同的反应温度, 不同的反应时

间以及不同的 FIP/BIP 引物浓度, 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶电泳中的条带亮度来确定最佳反应条件。

根据内外引物及环引物组的 T_m 值, 将反应混合物分别在 62、63、64、65、66、67、68℃ 温度反应 60 min, 然后 80℃、10 min 终止反应。为了探索该 LAMP 检测体系的最佳反应时间, 在 65℃ 反应温度下, 分别进行 30、45、60、75、90 min 的反应, 然后 80℃、10 min 终止反应。外引物 F3/B3 只在 LAMP 反应的最初阶段起引导作用, 用量很少, 因此对内引物浓度的优化比较重要, 同时应固定外引物 F3/B3 与内引物的比例为 1:4, 固定环引物与内引物的比例为 1:2, 设定外引物 FIP/BIP 的反应终浓度为 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 μmol/L, 于 65℃ 反应 60 min, 然后 80℃、10 min 终止反应。LAMP 反应体系及过程同 1.2.2。将以上不同反应条件下的产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 条带最亮者为最佳反应条件。

1.2.4 LAMP 及 PCR 反应灵敏度检测

根据已优化的 LAMP 检测方法, 将苹果轮纹病菌的 DNA 利用核酸蛋白测定仪检测浓度后调为 10 ng/μL, 分别稀释为 1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、

1 pg/ μ L、100 fg/ μ L、10 fg/ μ L、1 fg/ μ L、100 ag/ μ L、10 ag/ μ L、1 ag/ μ L,将以上不同浓度苹果轮纹病菌DNA作为模板分别进行LAMP及常规PCR检测方法灵敏度检测。常规PCR检测方法以苹果轮纹病菌的ITS部分序列为检测靶标,扩增引物为ITS-LW-F/ITS-LW-R(表1),PCR反应体系:DNA模板1 μ L、rTaq DNA聚合酶0.2 μ L、10 μ mol/L引物ITS-LW-F/ITS-LW-R各0.5 μ L、2.5 mmol/L dNTPs 2 μ L、25 mmol/L MgSO₄ 0.2 μ L、2 μ L 10 \times PCR Buffer,加入灭菌ddH₂O补充至25 μ L。反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性3 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s(1~2 kb/min),30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min,将反应产物在1.5%的琼脂糖凝胶中进行电泳检测。以上试验均设置3次技术重复。灭菌ddH₂O作为空白对照,反应产物于1.5%琼脂糖凝胶中进行电泳检测,观察2种检测方法的灵敏度。试验均设置3次技术重复。

1.2.5 田间疑似苹果轮纹病组织的检测

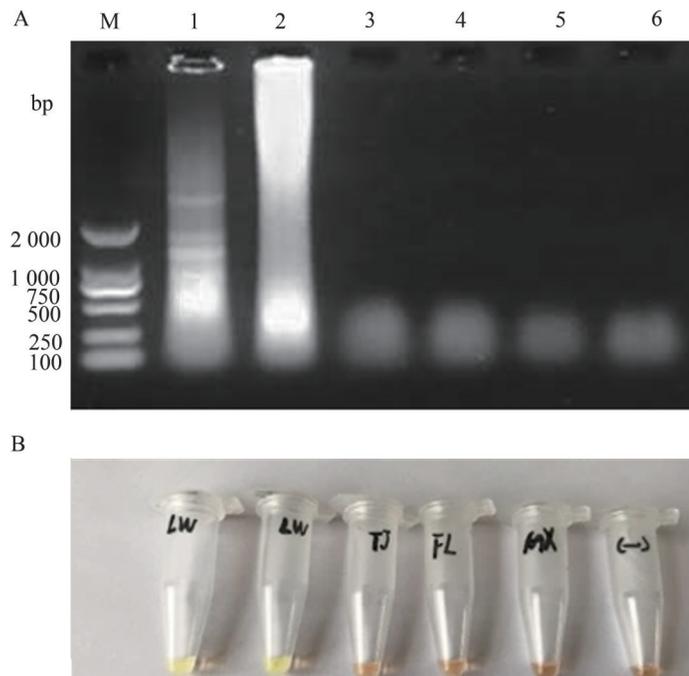
从烟台市农业科学院实验农场内采集50个具有田间疑似苹果轮纹病的枝条,参考彭斌等(2011)方法将病组织表面消毒后用手术刀刮取约0.5 cm \times 0.5 cm大小的病斑组织进行传统的分离鉴定。将病斑组织在超净工作台内用5%次氯酸钠溶液表面消

毒3 min后,无菌水冲洗3次,用灭菌的吸水纸吸干样品表面水分后置于PDA培养基上28 $^{\circ}$ C培养3 d后得到分离菌株。挑取分离得到的病原菌单菌丝获得病原菌纯培养物,通过观察菌落形态对病原菌进行初步鉴定。刮取另一部分消毒后的约0.5 cm \times 0.5 cm大小的病斑组织用基因组DNA提取试剂盒提取基因组DNA,以苹果轮纹病菌菌丝DNA为阳性对照,灭菌ddH₂O作为空白对照,分别采用常规PCR检测方法以及优化后的LAMP检测体系进行检测,方法同1.2.3和1.2.4,比较通过形态特征鉴定及2种检测方法的检出率。

2 结果与分析

2.1 LAMP检测方法的建立及引物特异性检测

分别以苹果轮纹病菌以及苹果腐烂病菌、苹果炭疽病菌、苹果霉心病菌的总DNA为模板进行LAMP扩增,结果显示:以苹果轮纹病菌DNA为模板的LAMP产物电泳条带呈弥散状,颜色变为绿色,而以苹果腐烂病菌、苹果炭疽病菌、苹果霉心病菌DNA为模板的LAMP检测产物电泳无条带,颜色仍为橙色(图1),表明该LAMP检测体系可以特异性地检测出苹果轮纹病菌。



A: 凝胶电泳检测LAMP产物; B: SYBR Green I检测LAMP产物; M: DL 2000 marker; 1~2: 苹果轮纹病菌; 3: 苹果炭疽病菌; 4: 苹果腐烂病菌; 5: 苹果霉心病; 6: 阴性对照。A: LAMP products were analysed by agarose gel electrophoresis; B: visual inspection of the LAMP products with SYBR Green I; M: DL 2000 marker; 1~2: *B. dothidea*; 3: *C. gloeosporioides*; 4: *V. mali*; 5: *T. roseum*; 6: negative control.

图1 LAMP引物对苹果轮纹病菌的特异性检测

Fig. 1 Specificity detection of LAMP primer on *Botryosphaeria dothidea*

2.2 LAMP检测方法的优化

在LAMP反应温度的优化中,电泳结果显示62、63、64、65、66、67、68℃下均有条带产生,表明62~68℃条件下均能进行扩增,其中65℃条件下的产物条带最亮,之后亮度不再增加(图2-A),从而确定最佳反应温度为65℃。

在65℃反应温度下,分别进行30、45、60、75、90 min的反应,电泳结果显示30 min时未能检测到扩增条带,45 min后即可检测到扩增条带,而60 min时产物条带亮度最大,之后亮度不再增加(图2-B),从而确定最佳反应时间为60 min。

在65℃反应温度下,反应时间为60 min, FIP/BIP的浓度为0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 $\mu\text{mol/L}$ 时,电泳结果显示当引物FIP/BIP浓度为0.4、0.6、0.8、1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,随着浓度升高,扩增条带的亮度随之上升,但当FIP/BIP引物浓度为1.0、1.2、1.4 $\mu\text{mol/L}$ 时,随着浓度增加条带亮度不再发生明显变化(图2-C),从而确定FIP/BIP的最适终浓度为1.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

综上,确定优化后的20 μL 苹果轮纹病菌LAMP检测体系为:模板DNA 1.0 μL 、2 \times LAMP PCR Master Mix 10 μL 、8 U/ μL *Bst* DNA聚合酶 0.5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ FIP/BIP各2 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ F3/B3各0.5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ LF/LB各1 μL 、 ddH_2O 补足20 μL ;65℃恒温反应1 h后,80℃、10 min灭活*Bst* DNA聚合酶。

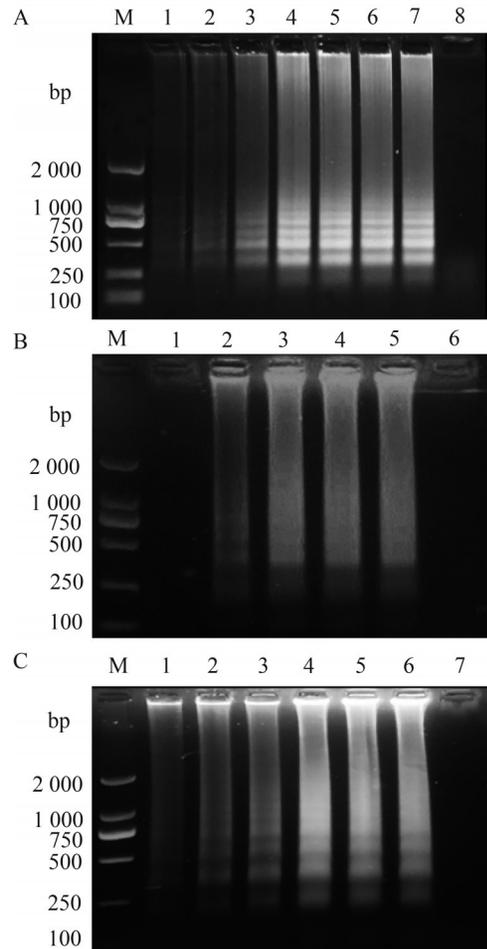
2.3 LAMP及常规PCR检测的灵敏度检测

将1.0 ng/ μL 的苹果轮纹病菌DNA按照10倍浓度梯度稀释至1 ag/ μL ,分别用常规PCR检测体系及LAMP优化后体系进行检测。常规PCR检测结果显示模板DNA量为1.0 ng/ μL ~10 fg/ μL 时均能扩增出目的条带,但模板DNA为1.0 fg/ μL 时则无法扩增出无目的条带(图3-A),表明其灵敏度为10 fg/ μL 。而在以浓度为1.0 ng/ μL ~100 ag/ μL DNA为模板时,LAMP反应产物均有弥散型扩增条带,但以浓度为10 ag/ μL 的DNA为模板的产物却无扩增条带(图3-B),说明该LAMP检测方法的灵敏度达到了100 ag/ μL ,是常规PCR检测方法灵敏度的100倍。

2.4 田间疑似苹果轮纹病样品的检测

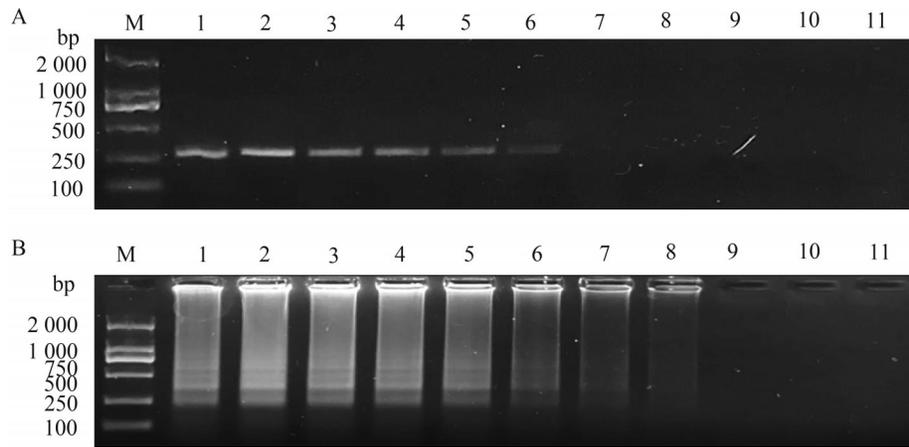
将田间采集的50份疑似苹果轮纹病样品分别进行传统形态学分离鉴定、LAMP扩增及常规PCR扩增检测。结果发现,通过常规分离培养和形态学鉴定,共分离鉴定出苹果轮纹病菌12份,检出率为24.0%;用常规PCR方法共检测出阳性样品32份,其

中包含传统分离方法鉴定出的12份病株,检出率为64.0%;而使用LAMP方法检测出阳性样品34份,其中包含常规PCR鉴定出的32份病株,检出率为68.0%,表明本研究所建立的LAMP检测方法检出率最高。



M: DL2000 marker. A: LAMP反应温度的优化,1~7分别为62、63、64、65、66、67、68℃,8为阴性对照; B: LAMP反应时间的优化,1~5分别为30、45、60、75、90 min,6为阴性对照; C: LAMP反应中FIP/BIP引物浓度的优化,1~6分别为0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的FIP/BIP,7为阴性对照; M: DL2000 marker. A: Optimization of temperature for LAMP detection, 1~7 are 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68℃ of amplification temperature, 8 is negative control; B: optimization of time for LAMP detection, 1~5 are 30, 45, 60, 75 and 90 min for amplification, 6 is negative control; C: optimization of FIP/BIP concentration for LAMP detection, 1~6 are 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 and 1.4 $\mu\text{mol/L}$ of FIP/BIP concentration; 7 is negative control.

图2 本研究所建立的LAMP检测方法的反应条件优化结果
Fig. 2 Optimization of reaction conditions for LAMP detection established in the study



1~10: 1.0 ng/ μ L、100 pg/ μ L、10 pg/ μ L、1.0 pg/ μ L、100 fg/ μ L、10 fg/ μ L、1.0 fg/ μ L、100 ag/ μ L、10 ag/ μ L、1.0 ag/ μ L 的苹果轮纹病菌 DNA; 11: 阴性对照; M: DL2000 marker。1~10: 1.0 ng/ μ L、100 pg/ μ L、10 pg/ μ L、1.0 pg/ μ L、100 fg/ μ L、10 fg/ μ L、1.0 fg/ μ L、100 ag/ μ L、10 ag/ μ L、1.0 ag/ μ L concentrations of DNA; 11: negative control; M: DL2000 marker.

图3 常规PCR(A)及LAMP(B)检测苹果轮纹病菌的灵敏度分析

Fig. 3 Sensitivity assay of PCR (A) and LAMP (B) detection of *Botryosphaeria dothidea*

3 讨论

目前苹果轮纹病菌的分离鉴定主要依靠传统的病原菌分离培养鉴定,但是该方法耗时长且需要有良好的专业,无法满足田间快速检测的需要。而随着分子生物学的发展,依托PCR仪的各种检测手段应运而生。杨秋夏(2017)建立了苹果轮纹病菌的定量PCR检测方法,灵敏度达到了10 ag/ μ L,是本研究中LAMP检测灵敏度100 ag/ μ L的10倍,但LAMP检测相比常规PCR及定量PCR的方法具有操作简单、灵敏度高、结果可视化的优点,同时相比常规PCR检测的2~3 h检测时间,LAMP检测时间被大幅缩短,在45 min的反应时间里即可快速检测到苹果轮纹病菌DNA片段,尤其适用于田间的快速检测和诊断。但LAMP检测具有高灵敏度的同时也存在易受大气气溶胶污染,产生假阳性的风险(封立平等,2015a),因此,本研究采用了不开盖检测的方法,即将SYBR Green I染料在反应前加入到PCR管内盖上,反应结束后离心即可显示颜色变化进行观察,能够进一步防止气溶胶污染。但在此之前的操作过程中仍需要严格做好试验分区,尤其是病原菌的DNA提取及LAMP检测反应操作应严格分区进行,同时还要做好反应器皿的灭菌工作,以防止假阳性的产生。

本研究发现反应温度对该LAMP检测方法的影响不大,在62~68 $^{\circ}$ C范围内都能进行有效扩增,这一结果与史亚娟等(2016)通过LAMP检测假禾谷镰刀菌 *Fusarium pseudograminearum* 的扩增温度范

围为61~66 $^{\circ}$ C,以及封立平等(2015b)利用LAMP检测木薯细菌性萎蔫病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* 的扩增温度范围为59~65 $^{\circ}$ C的结果类似,都反映了 *Bst* DNA聚合酶在较广泛的温度范围内即可进行有效扩增,这也暗示了在检测苹果轮纹病菌时一个普通的保温瓶即可满足田间LAMP检测,提高了试验的简便性和可操作性。

本研究是利用苹果轮纹病菌的DNA作为模板进行LAMP检测的,而田间采集的病组织中含有病原菌孢子或者菌丝体,无法直接作为LAMP的模板进行反应,而且DNA提取操作步骤相对繁琐,大约需40~50 min,且需要离心机等仪器设备,无法满足田间快速简便的提取要求。针对LAMP检测的DNA快速提取方法,生工生物工程(上海)股份有限公司研发出了All-DNA-Fast-Out一步法DNA提取试剂,加入该试剂后通过将病原组织在离心管中进行短暂研磨,80 $^{\circ}$ C孵育5~10 min,吸取上清液即可作为LAMP检测模板(胡小然,2018),该方法耗时短且操作简便,但将其应用于苹果轮纹病菌的DNA提取是否可行还需进行后续的试验验证。

本试验采用优化后的LAMP检测方法对50个田间采集的疑似苹果轮纹病组织进行检测,结果显示,传统形态学分离鉴定方法对苹果轮纹病菌的检出率为24.0%,远低于LAMP检测的68.0%及普通PCR检测的64.0%,而这一结果与赵伟等(2015)关于辣椒疫霉病菌的检测结果一致,说明LAMP检出率要高于传统分离鉴定方法及普通PCR检测方法。同时也证实了LAMP检测方法的高准确性及高灵

敏度,而这些优势有利于苹果轮纹病菌的及时发现及早期防控。本研究首次将可视化的LAMP技术应用于苹果轮纹病菌的检测,并对检测方法进行了优化,相比传统分离鉴定方法及常规PCR扩增,该方法具有快速、准确、灵敏、简便等优点,在苹果轮纹病菌的早期诊断和综合防控方面具有较高的应用价值,尤其适用于设备资源有限的基层植保机构对田间苹果轮纹病菌的快速检测。

参 考 文 献 (References)

- CHEN C. 1999. Advances in the research of apple ring rot. *Acta Phytopathologica Sinica*, 29(3): 193-198 (in Chinese) [陈策. 1999. 苹果实轮纹病研究进展. *植物病理学报*, 29(3): 193-198]
- DONG JH, LI BH. 2009. Advances in the research of apple ring rot. *Northern Fruits*, 25(1): 1-2 (in Chinese) [董娟华, 李保华. 2009. 苹果轮纹病的研究进展. *北方果树*, 25(1): 1-2]
- FENG LP, LI HL, NI X, WANG J, JI Y, GAN QH. 2015b. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for rapid detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis*. *Plant Protection*, 41(3): 93-99 (in Chinese) [封立平, 李洪林, 倪新, 王简, 纪瑛, 甘琴华. 2015b. 木薯细菌性萎蔫病菌的LAMP快速检测方法. *植物保护*, 41(3): 93-99]
- FENG LP, NI X, WU XH, LU CZ, WU CP, LUAN J. 2015a. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*. *Journal of Plant Protection*, 42(3): 347-352 (in Chinese) [封立平, 倪新, 吴兴海, 伦才智, 吴翠萍, 栾晶. 2015a. 玉米细菌性枯萎病菌的环介导恒温扩增(LAMP)检测方法. *植物保护学报*, 42(3): 347-352]
- GOTO M, HONDA E, OGIURA A, NOMOTO A, HANAKI KI. 2009. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxyl naphthol blue. *BioTechniques*, 46(3): 167-172
- GU Y, CEN MS, MA HJ, LI HY. 2017. Rapid detection of citrus bacterial canker by loop-mediated isothermal amplification. *Acta Agricultrae Zhejiangensis*, 29(1): 113-118 (in Chinese) [顾渊, 岑铭松, 马海杰, 李红叶. 2017. 柑橘溃疡病菌环介导等温扩增快速检测技术研究. *浙江农业学报*, 29(1): 113-118]
- HU LX, ZHANG D, ZHAO DM, YANG ZH, ZHU JH, QI JM. 2017. A real-time fluorescence quantitative loop mediated isothermal amplification for detection blackleg pathogen in potato tubers. *Journal of Plant Protection*, 44(5): 863-864 (in Chinese) [胡连霞, 张岱, 赵冬梅, 杨志辉, 朱杰华, 戚家明. 2017. 实时荧光定量环介导等温扩增方法检测马铃薯黑胫病菌. *植物保护学报*, 44(5): 863-864]
- HU XR. 2018. Development loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of resistant diseases in strawberry. Master Thesis. Hangzhou: Zhejiang A&F University (in Chinese) [胡小然. 2018. 草莓主要抗药性病害的环介导等温扩增(LAMP)检测. 硕士学位论文. 杭州: 浙江农林大学]
- MORADI A, NASIRI J, ABDOLLAHI H, ALMASI M. 2012. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Erwinia amylovora* based on chromosomal DNA. *European Journal of Plant Pathology*, 133(3): 609-620
- PENG B, LIU LF, WU HJ, TIAN LL, ZHOU ZQ, GU QS. 2011. The intraspecific genetic diversity of pathogenic fungi of apple ring rot. *Scientia Agricultura Sinica*, 44(6): 1125-1135 (in Chinese) [彭斌, 刘丽锋, 吴会杰, 田莉莉, 周增强, 古勤生. 2011. 苹果轮纹病菌种内遗传多样性研究. *中国农业科学*, 44(6): 1125-1135]
- SHI YJ, WANG YZ, WANG ZY, YUAN HX, SUN BJ, CHEN LL, SHI Y, LI HL. 2016. Loop mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Fusarium pseudograminearum*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 46(4): 566-568 (in Chinese) [史亚娟, 王英志, 王振跃, 袁虹霞, 孙炳剑, 陈琳琳, 施艳, 李洪连. 2016. 假禾谷镰刀菌LAMP快速检测方法的建立. *植物病理学报*, 46(4): 566-568]
- TANG W, DING Z, ZHOU ZQ, WANG YZ, GUO LY. 2012. Phylogenetic and pathogenic analyses show that the causal agent of apple ring rot in China is *Botryosphaeria dothidea*. *Plant Disease*, 96(4): 486-496
- TOMITA N, MORI Y, KANDA H, NOTOMI T. 2008. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*, 3(5): 877-882
- WU ML, ZHANG YX, LAN CZ, LIU PQ, LI BJ, CHEN QH, WENG QY. 2013. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Botryosphaeria rhodina*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 43(6): 574-580 (in Chinese) [吴敏亮, 张溢溪, 兰成忠, 刘裴清, 李本金, 陈庆河, 翁启勇. 2013. 番石榴焦腐病菌LAMP检测方法的建立及应用. *植物病理学报*, 43(6): 574-580]
- YANG QX. 2017. Detection method and identification of apple ring rot. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, (19): 100-101 (in Chinese) [杨秋夏. 2017. 苹果轮纹病菌检测方法及其鉴定. *现代农业科技*, (19): 100-101]
- ZHAO W, WANG T, QI RD. 2015. Rapid detection of *Phytophthora capsici* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Acta Phytopathologica Sinica*, 45(1): 93-96 (in Chinese) [赵伟, 汪涛, 戚仁德. 2015. 利用环介导等温扩增(LAMP)技术快速检测辣椒疫霉菌. *植物病理学报*, 45(1): 93-96]

(责任编辑:王 璇)