

环介导等温扩增技术在植物病原物检测中的应用

应淑敏¹ 郭 俭¹ 王教瑜² 李 玲^{1*} 张传清^{1*}

(1. 浙江农林大学农业与食品科学学院, 临安 311300;

2. 浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021)

摘要: 环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术是一种新型的由环介导的等温核酸扩增分子技术, 不仅特异性强、操作简便、成本低, 还能快速、高效地检测病原物, 为植物病害的防控提供更精准的防治适期, 从而可以减少农药的滥用。本文主要针对LAMP技术的原理、发展、优缺点、在真菌、细菌、病毒等多种植物病原物检测及在抗药性检测中的应用进行总结, 并结合国内外研究进展对其应用前景进行了分析。

关键词: LAMP技术; 检测; 植物病原物

Application of LAMP in the detection of plant pathogens

YING Shumin¹ GUO Jian¹ WANG Jiaoyu² LI Ling^{1*} ZHANG Chuanqing^{1*}

(1. College of Agricultural and Food Sciences, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300, Zhejiang Province, China; 2. Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang Province, China)

Abstract: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technology is a new type of loop-mediated isothermal nucleic acid amplification molecular technology, which has significant advantages such as strong specificity, easy operation and low cost, and was used to fast, high efficiently detect pathogens. LAMP technology provides more accurate control period for the effective prevention and control of plant diseases, so as to reduce the abuse of pesticide. This paper mainly summarizes the principle, development, advantages and disadvantages of LAMP technology, and its application in the detection of various plant pathogens such as fungi, bacteria, and viruses, as well as the detection for pesticide resistance, and analyzes its application prospects in accordance with domestic and foreign research progress.

Key words: loop-mediated isothermal amplification (LAMP); detection; plant pathogens

植物病害严重影响着农作物的产量与品质, 全球主要农作物每年由于植物病害所导致的平均损失约占总产量的10%~15%(康振生, 2010)。此外, 植物病原物分泌的黄曲霉毒素、DON毒素等有害物质也严重威胁着人类和牲畜的安全(康振生, 2010)。植物病害的诊断对于防治至关重要, 如果早期被诊断, 不仅可以避免病原菌的传播以及危险性病原物的扩散, 降低经济损失, 而且能避免杀菌剂的滥用, 减少环境中农药残留。

目前病原物的检测方法主要包括常规分离鉴定法、免疫学检测法、红外光谱技术以及核酸检测法等, 其中最常用的是核酸检测法(黄灿和陈沁, 2016)。核酸扩增技术通过复制实现微量核酸的大量扩增, 该技术在生物技术领域及病害诊断方面被广泛应用(Parida et al., 2008)。多聚酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)扩增技术是最常用的核酸扩增技术, 此外还有其它的扩增技术, 如滚环扩增(rolling circle amplification, RCA)技术、自我持

基金项目: 浙江省重点研发项目(2018C02G2011099), 国家自然科学基金(31701723), 浙江农林大学学生科研训练项目(KX20180020)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: liling-06@163.com, cqzhang@zafu.edu.cn

收稿日期: 2019-04-03

续序列复制 (self-sustained sequence replication, 3SR) 技术和链置换扩增 (strand displacement amplification, SDA) 技术等 (Bull & Pease, 1995; Chen et al., 2009; Tsiftaris et al., 2010)。不同的核酸扩增技术对温度变化的要求不同, PCR 技术需要在变温条件下完成 DNA 的复制, 而 SDA 技术在恒定温度下即可启动 DNA 的合成, 获得目标 DNA 的扩增序列 (Chen et al., 2009)。核酸扩增技术虽日趋成熟, 但操作繁琐且依赖于精密仪器, 因而在实际生产中受到限制 (Fang et al., 2008)。近些年, 科研人员致力于新型核酸扩增技术的开发和利用, 成功建立了环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification method, LAMP) 技术, 该技术能在等温条件下于 1 h 内将有限数量的 DNA 扩增至 100 万份, 开启了核酸扩增技术的新纪元 (Notomi et al., 2000)。Zanoli & Spoto (2013) 根据 LAMP 技术不需要循环变温步骤的特点, 研发了微型化的核酸检测微流装置。本文主要针对 LAMP 技术的原理、发展过程、优缺点、在真菌、细菌、病毒等多种植物病原物检测及在抗药性检测中的应用进行总结, 并结合国内外研究进展分析了其应用前景, 以期能为植物病原物的检测提供参考。

1 LAMP技术的原理及产物检测

LAMP 技术是一种新型的核酸扩增分子技术。LAMP 技术的反应体系由 dNTPs、*Bst* DNA 聚合酶、引物及 DNA 模板等组成。在等温条件与 *Bst* DNA 聚合酶作用下, 4 或 6 种特异性引物与目标基因的不同区域相结合, 最终扩增形成长度不一的茎环状 DNA (Notomi et al., 2000)。LAMP 反应的引物集由 1 对外部引物 (上游外部引物 F3 和下游外部引物 B3)、1 对内部引物 (上游内部引物 FIP 和下游内部引物 BIP) 以及 1 对环引物 (上游环引物和下游环引物) 组成, 引物集中的各引物分别特异性识别目标 DNA 的 6 个不同区域, 多引物的结合使得 LAMP 技术具有高度的特异性 (Notomi et al., 2000)。

LAMP 反应主要步骤: (1) 上游内部引物 FIP 的 F2 区域与目标 DNA 的 F2c 区域杂交并启动互补链的合成, 引物 F3 与目标 DNA 的 F3c 区域互补合成 DNA, 并置换出上游内部引物 FIP 结合的互补链, 被取代的链在 5' 端形成 1 个环状结构。(2) 5' 端带环的单链 DNA 作为下游内部引物 BIP 的模板链, 模板链的 B2c 区域和 B2 杂交并合成 DNA 互补链, 同时打开 5' 端环状结构。(3) 下游外部引物 B3 与目标 DNA

的 B3c 区域杂交并延伸, 置换出与下游内部引物 BIP 结合的互补链, 形成哑铃型 DNA (图 1-a~b)。在 *Bst* DNA 聚合酶的作用下, 核苷酸被添加到目标基因上游 F1 区域的 3' 端并不断延伸, 最终打开 5' 端的环状结构。哑铃型 DNA 转换成具有茎环结构的 DNA, 从而启动 LAMP 反应的第 2 阶段——循环扩增阶段。循环扩增阶段由上游内部引物 FIP 和下游内部引物 BIP 引导, 经过多次循环扩增最终形成长度不一的茎环状 DNA (图 1) (Notomi et al., 2000; Wong et al., 2018)。

LAMP 反应产物常用的检测方法包括实时监测法、琼脂糖凝胶电泳检测法以及比色检测法 (图 2)。实时监测法通过设定明确阈值, 利用实时监测仪对 LAMP 反应产生的焦磷酸镁白色沉淀或定量环介导等温扩增 (quantitative loop-mediated isothermal amplification, qLAMP) 反应形成的荧光信号产物进行实时监测, 检测结果比肉眼观测更客观 (图 2-a) (Mashooq et al., 2016; Ooscorbin et al., 2016)。LAMP 反应结果可以由琼脂糖凝胶电泳检测法获得, 但由于 LAMP 技术扩增得到的 DNA 片段长短不一, 因而经琼脂糖凝胶电泳后条带呈梯带状 (图 2-b) (Chen et al., 2016a; Wong et al., 2018)。此外, LAMP 反应结果还可以由比色检测法获得, 在 LAMP 反应体系中加入特定染料至反应结束后, 目标样本的颜色发生变化, 非目标样本的颜色不变, 从而判定检测结果。当 LAMP 反应体系中加入 SYBR Green I 染料, 含有目标扩增产物的试管内颜色由红橙色变为黄绿色 (图 2-c) (Chen et al., 2016b); 当 LAMP 反应体系中加入羟基萘酚蓝 (hydroxynaphthol blue, HNB) 时, 含有目标扩增产物的试管内颜色由紫色变成天蓝色 (图 2-d) (Fischbach et al., 2015; Wong et al., 2018)。比色检验法可以直接获取检测结果, 大大提高了检测速度, 从而实现田间植物病原物的快速检测。

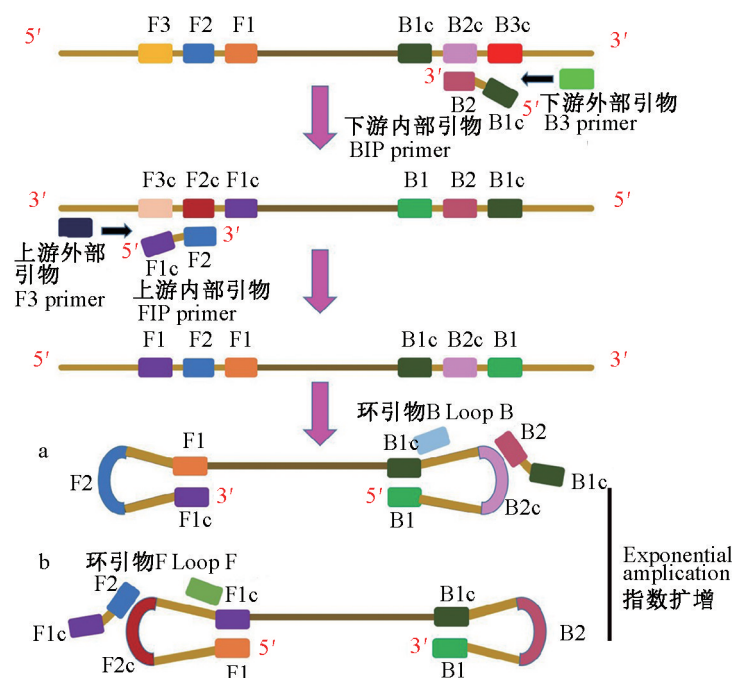
2 LAMP技术的发展

Notomi et al. (2000) 首次报道了 LAMP 技术, 随后以 LAMP 技术为核心的核酸扩增技术相继问世, 包括反转录 LAMP (reverse transcriptase LAMP, RT-LAMP) 技术、多重 LAMP 技术及其它 LAMP 技术等 (Wong et al., 2018)。

RT-LAMP 技术使用逆转录酶合成与 RNA 互补的 cDNA, 再以 cDNA 为模板利用 *Bst* DNA 聚合酶进行下一步扩增 (Notomi et al., 2000)。RT-LAMP 技

术主要用于以RNA为遗传物质的病毒检测,如苹果褪绿叶斑病毒(apple chlorotic leaf spot virus, ACLSV)、柑橘褪绿矮化相关病毒(citrus chlorotic

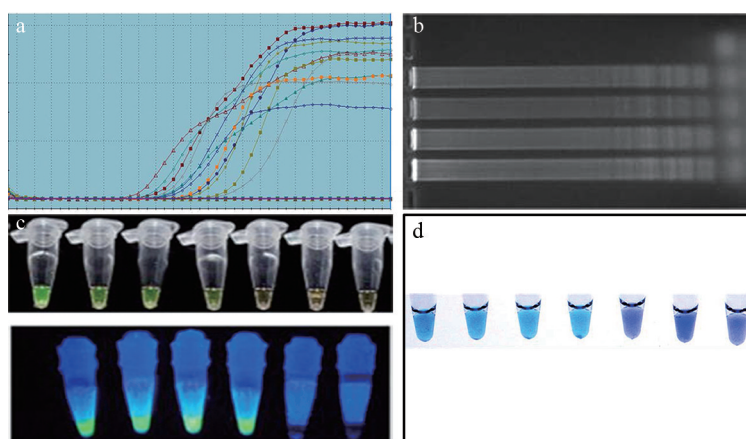
dwarf-associated virus, CCDaV)、香蕉条斑病毒(banana streak virus, BSV)的检测等(彭军等, 2012; 刘科宏等, 2017; 张双纳等, 2018)。



B1c、B2c、B3c: 目标基因下游的特异区域; F1、F2、F3: 目标基因上游的特异区域; F1c、F2c、F3c: 分别与F1、F2、F3互补的特异区域; B1、B2、B3: 分别与B1c、B2c、B3c互补的特异区域; a: F1区域与F1c区域互补形成哑铃型DNA; b: B1区域与B1c区域互补形成哑铃型DNA。B1c、B2c、B3c: Specific region downstream of the target gene; F1, F2, F3: specific region upstream of the target gene; F1c, F2c, F3c: specific regions complementary to F1, F2, and F3, respectively; B1, B2, B3: specific regions complementary to B1c, B2c, and B3c, respectively; a: F1 region is complementary to the F1c region, forming a dumbbell DNA; b: B1 region is complementary to the B1c region, forming a dumbbell DNA.

图1 LAMP技术反应原理示意图(Notomi et al., 2000; Wong et al., 2018)

Fig. 1 LAMP reaction and its principle diagram(Notomi et al., 2000; Wong et al., 2018)



a: 实时监测法(Mashooq et al., 2016); b: 琼脂糖凝胶电泳检测法(Wong et al., 2018); c: SYBR Green I染料(Chen et al., 2016b); d: 羟基萘酚蓝染料(Wong et al., 2018)。a: Real-time monitoring(Mashooq et al., 2016); b: agarose gel electrophoresis(Wong et al., 2018); c: SYBR Green I dye(Chen et al., 2016b); d: hydroxynaphthol blue dye(Wong et al., 2018)。

图2 LAMP最终产物的检测方法

Fig. 2 Detection methods for LAMP final products

多重 LAMP 技术通过对多个目标基因的特异序列设计相应的 LAMP 引物, 从而构建多重 LAMP 体系, 实现 2 种及以上待测病原物的检测 (Wong et al., 2018), 该技术大多用于动物病原物的检测, 如 Iseki et al. (2007) 采用多重 LAMP 检测方法设计了 2 套针对弓形虫牛巴贝斯虫 *Babesia bovis* 和牛双芽巴贝斯虫 *B. bigemina* 棒状体相关蛋白 1 基因的 LAMP 引物, 将牛巴贝斯虫和牛双芽巴贝斯虫成功区分。Lau et al. (2015) 将多重 LAMP 技术与 RT-LAMP 技术结合在一起研发了登革热病毒的检测方法, 证明多重 LAMP 技术与 RT-LAMP 技术结合可用于病毒的检测, 为植物病毒病原物的检测提供了新思路。

Salinas & Little (2012) 阐述了 Electric LAMP 技术的发展。Electric LAMP 通过电子模拟可以快速筛选出适应性强的 LAMP 引物, 提高了 LAMP 检测体系的效率。In-disc LAMP (iD-LAMP) 反应器是一种集成设备, 由嵌在光盘上的一些微型反应器组成, 可用于目标 DNA 的实时测定。该技术的显著优点是所需模板量较少, 反应体系可以低至 3 μL (Santiago-Felipe et al., 2016)。

3 LAMP 技术与其它检测方法的比较

随着现代生物学技术的发展, 植物病原物的检测方法由传统的分离鉴定法逐渐转变为分子检测方法。与早期的形态学诊断方法相比, 分子检测方法能区分极为相似的病原物, 显著提升了检测结果的准确性。常见的分子检测方法有普通 PCR 技术、生物质 PCR (biomass PCR, Bio-PCR) 技术、巢式 PCR (nested-PCR) 技术、逆转录 PCR (reverse transcriptase PCR, RT-PCR) 技术、数字 PCR (digital PCR, dPCR) 技术、实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, qPCR) 技术及磁捕获杂交 PCR (magnetic-capture hybridization PCR, MCH-PCR) 技术等 (Mancini et al., 2016)。

普通 PCR 技术利用特异性引物通过变性、退火、延伸等过程的交替循环, 特异性扩增出大量目标 DNA 片段, 是植物病原物检测的常用方法之一。普通 PCR 技术成功实现了对扁豆枯萎病菌 *Ascochyta lentis*、胡萝卜黑斑病菌 *Alternaria radicina* (Hussain et al., 2000; Pryor & Gilbertson, 2001)、十字花科黑斑病菌 *A. brassicae*、罂粟霜霉病菌 *Peronospora arborescens* 等多种植物病原物的检测 (Guillemette et al., 2007; Landa et al., 2007)。与传统的常规分离鉴定法相比, 普通 PCR 技术能快速且相对准确地检测

出大部分植物病原物, 提高了病原物的检测效率。

由于 PCR 抑制因子的存在, 对于病原物含量极低的样本, PCR 技术难以直接检测 (de Boer et al., 1995)。为此, Schaad et al. (1995) 研发了 Bio-PCR 技术, 该技术通过对病原物进行培养, 提高了病原物的生长量, 从而有利于后续的检测工作。该技术可用于病原真菌和细菌的检测 (Munkvold, 2009)。与普通 PCR 技术相比, Bio-PCR 技术灵敏度更高, 消除了 PCR 抑制因子的影响, 且在扩增前不需要提取 DNA。此外, Bio-PCR 技术检测对象是活细胞, 避免了死细胞 DNA 所导致的假阳性检测结果 (Schaad et al., 1995)。该技术缺点是成本相对较高, 且病原物需要较长的培养时间, 降低了检测效率 (Walcott, 2003)。

巢式 PCR 技术也适用于检测目标病原物含量较低的样本, 该技术利用 2 对相似引物进行扩增, 且第 2 对引物需要结合到第 1 次 PCR 扩增产物内部, 从而提高了扩增的特异性 (Massung et al., 1998)。该技术对豌豆上炭疽病菌 *Colletotrichum lindemuthianum* DNA 最低检测量为 10 fg/ μL , 其灵敏度比普通 PCR 高 1 000 倍 (Chen et al., 2007)。巢式 PCR 包括 2 轮循环扩增, 第 2 次 PCR 扩增引起交叉污染的风险较大 (Aslam et al., 2017)。

大部分植物病毒的主要遗传物质为 RNA, 普通 PCR 技术无法直接检测 RNA 病毒, 而 RT-PCR 技术在特异性引物和反转录酶的作用下, 将 mRNA 反转录成 cDNA, 然后以 cDNA 为模板进行核酸扩增, 从而实现了病毒的检测 (Aslam et al. 2017)。死体中的 mRNA 易降解, RT-PCR 技术仅针对活体病原物进行检测, 降低了死体 mRNA 所导致的假阳性风险 (Capote et al., 2012)。该技术主要应用于 RNA 病毒的检测。

qPCR 技术通过加入荧光染料产生一种特殊的荧光信号, 利用集成荧光计对荧光信号进行检测, 输出实时的动力学分析结果, 从而实现对目标 DNA 的定量化 (Gachon et al., 2004)。为了保证 qPCR 检测结果具有足够的特异性和灵敏度, 选择合适的靶基因片段是建立 qPCR 检测系统的关键 (Mancini et al., 2016)。该技术在扩增后无其它操作步骤, 降低了反应混合物交叉污染所带来的假阳性风险 (Tomlinson et al., 2005), 已成功用于葡萄穗霉病菌 *Stachybotrys chartarum*、菠菜种子黄萎病菌 *Verticillium dahliae* 等多种植物病原物的定量检测 (Cruz-Perez et al., 2001; Duressa et al., 2012)。

dPCR技术同样通过采集荧光信号对扩增产物进行定量分析,将标准PCR反应体系平均分配成数百万个PCR反应,从而实现对样品的绝对定量,其结果分析不依赖于扩增曲线的循环阈值,不受扩增效率的影响,与qPCR技术相比具有较高的准确度和重复性(Vogelstein & Kinsler, 1999; 冯兆民和舒跃龙, 2017)。但dPCR技术依赖于精密的仪器和复杂的芯片,高昂的成本限制了其广泛应用(林彩琴和姚波, 2012)。

MCH-PCR技术利用覆盖了单链DNA探针的磁珠,从样品中捕获特异的目标DNA,再以目标DNA为模板进行PCR扩增,适用于特殊DNA序列的检测(Jacobsen, 1995)。目前,MCH-PCR技术已成功用于含有PCR抑制化合物的植物病原微生物的检测,如洋葱上灰霉病菌*Botrytis aclada*的检测(Walcott et al., 2004)。

以上是以PCR技术为基础的各具优势的核酸扩增技术,但这些技术普遍依赖于精密的仪器设备,且操作复杂,检测工作通常需要在实验室里进行。相较于传统PCR技术,LAMP技术在检测的特异性、灵敏度及反应速度方面均显示出更大的优势。LAMP技术采用4或6种特异性引物,这些特异性引物与目标基因不同区域结合,使其具有高度特异性(Wong et al., 2018)。此外,LAMP技术具有高灵敏度,检测需要的扩增模板极少,如水稻恶苗病菌*Fusarium fujikuroi* DNA的检测极限为100~999 pg/ μ L,稻瘟病菌*Magnaporthe oryzae* DNA的检测极限是10~99 pg/ μ L(Ortega et al., 2018),高灵敏度使其在病害监测方面具有更大的应用价值。此外,LAMP技术检测的效率更高,一般在1 h内即可完成。LAMP技术还具有以下优势:LAMP反应在恒温条件下进行,普通的水浴锅即可满足LAMP反应所需的恒温条件,无需精密昂贵的仪器,大幅降低了检测成本(Notomi et al., 2000);LAMP技术检测结果的呈现方式简单多样,检测结果可以通过实时浊度仪进行实时监测,也可以通过加入染料直接用肉眼观察颜色的变化,而不仅仅局限于凝胶电泳检测方法(Wong et al., 2018)。鉴于LAMP技术的优势,在各类扩增技术中,LAMP技术是一种首选的病原物检测方法,具有灵敏度高、特异性强、操作方便、简单实用且适应性强的特点(Notomi et al., 2015)。

4 LAMP技术的应用

LAMP技术已成功用于植物病原物真菌、细菌、

病毒等病原物及抗药性检测,并表现出明显的优势和巨大的潜能。

4.1 LAMP技术在植物病原真菌检测中的应用

Duan et al.(2013; 2014a)分别以灰霉病菌*B. cinerea*的*Bcos5*及十字花科菌核病菌*Sclerotinia sclerotiorum*的*Ssos5*为目标基因进行LAMP反应,最适反应温度为63℃,时间45 min,通过加入HNB染料实现了对灰霉病菌及十字花科菌核病菌的可视化检测,HNB染色法结果与凝胶电泳结果一致,表明LAMP技术检测结果可靠;该技术对灰霉病菌和十字花科菌核病菌的检测极限分别是 10^{-3} ng/mL和0.1 fg/ μ L,是普通PCR检测灵敏度的10倍和1 000倍。LAMP技术与DNA提取试剂盒结合,可有效地检测不同品种水稻种子上的水稻恶苗病菌及稻瘟病菌,如Ortega et al.(2018)利用LAMP技术分别对水稻恶苗病菌的伸长因子EF- α 序列及稻瘟病菌钙调蛋白序列检测,检测极限分别为100~999 pg/ μ L和10~99 pg/ μ L DNA。此外,Villari et al.(2017)将qLAMP技术与孢子陷阱捕捉系统相结合,在症状出现前的12 d,距离最近的潜在侵染源6 m处就能检测到空气中的10个分生孢子,成功实现了对引起黑麦草叶片灰斑病病原菌——稻瘟病菌的特异、快速且定量检测。Chen et al.(2013)针对瓜类疫霉病菌*Phytophthora melonis*的Ras相关蛋白的*Ypt1*基因分别进行了LAMP技术、PCR技术及巢式PCR技术检测,LAMP技术与巢式PCR技术的检测极限均为0.4 fg/ μ L,比普通PCR技术灵敏1 000倍,且LAMP技术检测更简便、快速且成本低廉,所以LAMP技术在瓜类疫霉病菌的检测方面更具潜力。当LAMP技术与DNA快速提取技术结合后,具有高度的特异性与灵敏度,如Kong et al.(2016)利用LAMP技术进行特异性扩增后,将葡萄霜霉病菌*Plasmopara viticola*从其它38种病原物中鉴定出来,并且在30 min内完成了低于1.32 fg/ μ L目标DNA的检测,该技术同样可用于葡萄霜霉病菌的田间检测,为葡萄霜霉病防控适期的确定提供指导。赵媛媛等(2019)利用LAMP技术成功检测了引起玉米茎腐病的强雄腐霉*Pythium arrhenomanes*,且在60 min内即可快速、准确地获得检测结果,最低检测灵敏度为10 pg/ μ L,比普通PCR灵敏1 000倍,能够满足现场快速检测的要求(表1)。

在田间试验中,LAMP技术的灵敏度可能会下降。Thiessen et al.(2018)利用qLAMP技术对葡萄白粉病菌*Erysiphe necator*进行田间检测,并以qP-

CR 检测结果作为参照,在 2013 年试验结果中,qLAMP 技术与 qPCR 技术的灵敏度无显著差异,而在 2014 年试验结果中,qPCR 技术灵敏度比 qLAMP 技术高;此外,qLAMP 在试验早期对 1 个孢子敏感,

但在试验结束时其敏感度降低到 20 个孢子以上,表明用于田间检测葡萄白粉病的 qLAMP 技术,稳定性不高,试验可重复性较差,有待进一步优化。

表 1 LAMP 技术在植物病原真菌检测中的应用

Table 1 Application of LAMP technology in detection of plant pathogenic fungi

病原物 Pathogen	检测极限 Detection limit	与普通 PCR/qPCR 灵敏度比较 Comparison with PCR/qPCR sensitivity	检测时间/min Detection time	参考文献 Reference
灰霉病菌 <i>Botrytis cinerea</i>	10^{-3} ng/mL	比普通 PCR 灵敏 10 倍 10 times more sensitive than PCR	45	Duan et al., 2014a
菌核病菌 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	0.1 fg/ μ L	比普通 PCR 灵敏 1 000 倍 1 000 times more sensitive than PCR	45	Duan et al., 2013
水稻恶苗病菌 <i>Fusarium fujikuroi</i>	100~999 pg/ μ L	与 qPCR 一致 Consistent with qPCR	18~22	Ortega et al., 2018
稻瘟病菌 <i>Magnaporthe oryzae</i>	10~99 pg/ μ L	PCR 比 LAMP 灵敏 10 倍 PCR is 10 times more sensitive than LAMP	13~16	Ortega et al., 2018
白粉病菌 <i>Erysiphe necator</i>	10 个孢子 Ten spores	qLAMP 与 qPCR 无显著差异 No significant difference between qLAMP and qPCR	50	Thiessen et al., 2018
葡萄霜霉病菌 <i>Plasmopara viticola</i>	1.32 fg/ μ L	比普通 PCR 灵敏 100 倍 100 times more sensitive than PCR	60	Kong et al., 2016
瓜类疫霉病菌 <i>Phytophthora melonis</i>	0.4 fg/ μ L	比普通 PCR 灵敏 1 000 倍 1 000 times more sensitive than PCR	60	Chen et al., 2013
强雄腐霉 <i>Pythium arrhenomanes</i>	10 pg/ μ L	比普通 PCR 灵敏 1 000 倍 1 000 times more sensitive than PCR	60	赵媛媛等, 2019 Zhao et al., 2019

4.2 LAMP 技术在植物病原细菌检测中的应用

Bühlmann et al. (2013) 利用 LAMP 技术对梨火疫病病菌 *Erwinia amylovora* 的目标基因编码序列 CDSs 进行了特异性扩增,并利用等温扩增荧光检测系统对产物进行了检测,检测极限为 100 CFU/mL。封立平等 (2015) 利用 LAMP 技术检测了木薯细菌性萎蔫病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv., 检测极限为 1 pg/ μ L。黄雯等 (2016) 分别利用 LAMP 技术和普通 PCR 技术对植物青枯菌 *Ralstonia solanacearum* GMI1000 菌株的 DNA 原液及不同梯度的稀释液进行检测,LAMP 技术的检测极限为 1.42 pg/ μ L,比普通 PCR 灵敏度高 10 倍。黄雯等 (2016) 又分别以混入青枯菌 Po41 菌株的马铃薯组织浸出液和混入青枯菌 Z-Aq-1 菌株的姜组织浸出液为扩增模板进行检测,结果表明 LAMP 检测不受植物组织浸出液的干扰,可以准确地检测青枯菌。张仑等 (2013) 通过对柑橘溃疡病菌 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* 中 *Xac* 基因的特异性保守序列设计 LAMP 引物,建立了柑橘溃疡病菌的快速 LAMP 检测方法,该检测方法的灵敏度可达 2.03×10^{-5} ng/ μ L。赵玉强等 (2015) 针对西瓜嗜酸菌 *Acidovorax citrulli* 基因组的特异序列设计了特异引物,建立了西瓜嗜酸菌的 LAMP 检测体系,该体系可在 1 h 内通过荧光显色完

成对西瓜嗜酸菌的检测。上述结果均表明 LAMP 检测技术在效率、特异性、灵敏度及简便性方面具有较大的优势(表 2)。

4.3 LAMP 技术在植物病原病毒检测中的应用

水稻黑条矮缩病毒 (rice black-streaked dwarf virus, RBSDV) 和南方水稻黑条矮缩病毒 (southern rice black-streaked dwarf virus, SRBSDV) 在病毒粒体形态、症状、寄主范围等方面非常相似,传统检测方法难以区分。周彤等 (2012) 建立了一种利用 RT-LAMP 技术快速检测 RBSDV 的方法,其检测极限是 3.25×10^{-5} μ g/ μ L。马铃薯纺锤块茎类病毒 (potato spindle tuber viroid, PSTVd) 是欧洲和南美洲马铃薯检疫性病原物之一,Lenarčič et al. (2014) 建立 RT-LAMP 技术并对其进行检测,只需 15~25 min 即可得到检测结果,检测极限是 100~1 000 拷贝子,灵敏度是 qPCR 的 10 倍,此外 LAMP 检测仪器的便携性使其更适合田间检测。陈柳等 (2015) 利用 RT-LAMP 技术建立了草莓轻型黄边病毒 (strawberry mild yellow edge virus, SMYEV) 的检测方法,检测极限是 10^{-5} 的稀释度,灵敏度是 qPCR 检测的 100 倍且耗时短。赵雪君等 (2016) 建立了黄瓜花叶病毒 (cucumber mosaic virus, CMV) 的可视化 RT-LAMP 检测体系,该体系操作简便且成本低,可以对多种蔬菜的

CMV 进行高效快速检测,适合生产上的检测。甘薯羽状斑驳病毒(sweet potato feathery mottle virus, SPFMV)能够侵染甘薯并造成严重危害,姜珊珊等(2018)建立了 SPFMV 的 RT-LAMP 快速特异性检测方法,最低可检测的 RNA 浓度为 1.22×10^{-2} ng/ μ L,灵敏度是 qPCR 技术的 10 倍,另外,在田间样品检测中,RT-LAMP 条带扩增结果与可视化检测结果一

致,表明 RT-LAMP 快速检测方法可有效用于 SP-FMV 的田间检测。南芥菜花叶病毒(arabis mosaic virus, ArMV)的寄主范围广,极易传播扩散,是我国的重要检疫对象之一。陈先锋等(2013)研制了针对 ArMV 的 RT-LAMP 检测试剂盒,所建立的 RT-LAMP 体系能在 60 min 完成该病毒的检测,其检测下限为 10^{-3} 病毒稀释液(表 3)。

表 2 LAMP 技术在植物病原细菌检测中的应用

Table 2 Application of LAMP technology in detection of plant pathogenic bacteria

病原物 Pathogen	检测极限 Detection limit	与 PCR/qPCR 灵敏度比较 Comparison with PCR/qPCR sensitivity	检测时间 Detection time/min	参考文献 Reference
青枯病菌 <i>Ralstonia solanacearum</i>	1.42 pg / μ L	比普通 PCR 灵敏 10 倍 10 times more sensitive than PCR	45	黄雯等,2016 Huang et al., 2016
木薯细菌性萎蔫病菌 <i>Xanthomonas axonopodis</i>	1 pg/ μ L	比普通 PCR 灵敏 100 倍 100 times more sensitive than PCR	60	封立平等,2015 Feng et al., 2015
梨火疫病病菌 <i>Erwinia amylovora</i>	100 CFU/mL	比 qPCR 灵敏 More sensitive than qPCR	30	Bühlmann et al., 2013
柑橘溃疡病菌 <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>citri</i>	2.03×10^{-5} ng/ μ L	比 qPCR 灵敏 100 倍 100 times more sensitive than qPCR	30	张仑等,2013 Zhang et al., 2013
西瓜嗜酸菌 <i>Acidovorax citrulli</i>	20 CFU/mL	比普通 PCR 灵敏 100 倍 100 times more sensitive than PCR	60	赵玉强等,2015 Zhao et al., 2015

表 3 LAMP 技术在植物病原病毒检测中的应用

Table 3 Application of LAMP technology in detection of plant pathogenic virus

病原物 Pathogen	检测极限 Detection limit	与 qPCR 灵敏度比较 Comparison with PCR sensitivity	检测时间/min Detection time	参考文献 Reference
甘薯羽状斑驳病毒 Sweet potato feathery mottle virus	1.216×10^{-2} ng/ μ L	RT-LAMP 比 qPCR 灵敏 10 倍 RT-LAMP is 10 times more sensitive than qPCR	75	姜珊珊等,2018 Jiang et al., 2018
草莓轻型黄边病毒 Strawberry mild yellow edge virus	10^{-5} 稀释度 10^{-5} dilution	RT-LAMP 比 qPCR 灵敏 100 倍 RT-LAMP is 100 times more sensitive than qPCR	45	陈柳等,2015 Chen et al., 2015
黄瓜花叶病毒 Cucumber mosaic virus	10^{-6} 稀释度 10^{-6} dilution	RT-LAMP 比 qPCR 灵敏 100 倍 RT-LAMP is 100 times more sensitive than qPCR	40	赵雪君等,2016 Zhao et al., 2016
马铃薯纺锤块茎类病毒 Potato spindle tuber viroid	100–1 000 拷贝子 100–1 000 viroid copies	RT-LAMP 比 qPCR 灵敏 10 倍 RT-LAMP is 10 times more sensitive than qPCR	15–20	Lenarčič et al., 2014
水稻黑条矮缩病毒 Rice black-streaked dwarf virus	3.255×10^{-5} μ g/ μ L	RT-LAMP 与 qPCR 基本一致 RT-LAMP is basically the same as qPCR	60	周彤等,2012 Zhou et al., 2012
南芥菜花叶病毒 Arabis mosaic virus	10^{-3} 稀释度 10^{-3} dilution	RT-LAMP 比 RT-PCR 灵敏 10 倍 RT-LAMP is 10 times more sensitive than RT-PCR	60	陈先锋等,2013 Chen et al., 2013

4.4 LAMP技术在植物病原菌抗药性检测中的应用

传统的植物病原物抗药性检测方法存在检测周期长、操作繁琐、效率低等缺点。而 LAMP 技术具有快速、可靠、稳定及可操作性强等优点,适用于抗药性群体的动态监测与抗性风险评估。Duan et al. (2014b; 2015)应用 LAMP 技术建立了小麦赤霉病菌 *F. graminearum* 对多菌灵、十字花科菌核病菌对

苯并咪唑类杀菌剂抗药性的快速检测方法,为小麦赤霉病及十字花科菌核病的抗药性治理提供合理的用药指导。钱铸锴等(2016)利用 LAMP 技术对浙江省杭州市临安区 3 个铁皮石斛基地的灰霉病菌进行抗性检测,为科学防治铁皮石斛灰霉病提供了理论依据。林婷(2015)基于 β -tubulin 基因,建立了特异性检测草莓胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeospo-*

rioides 的 LAMP 技术, 该技术实现了灵敏度菌株和抗药性菌株的区分。

5 展望

目前, 植物病原物的检测技术大多依赖于精密的仪器设备和昂贵的试剂, 不仅检测成本高, 而且对检测人员专业能力要求也高, 难以广泛用于田间植物病原物的现场检测。LAMP 技术的高灵敏度为病害的检测和预防提供了更准确地指导和借鉴。与 PCR 相比, LAMP 技术在灵敏度方面更具优势, 如 LAMP 技术在灰霉病菌、青枯菌及马铃薯纺锤块茎类病毒上的检测灵敏度均比 PCR 高 10 倍(周彤等, 2012; Duan et al., 2014a; 黄雯等, 2016)。其次, LAMP 技术具有高特异性, 在检测过程中更易于将目标病原物与非目标病原物区分开, 使检测结果更加准确可靠。将 LAMP 技术用于田间植物病原物的检测, 可为植物病害的有效防控提供理论依据, 给防治工作带来巨大便利。

虽然 LAMP 技术有巨大的潜力, 但 LAMP 技术也存在一些不足。比如对于特殊菌株或某个基因的高度保守区域, 选择一个正确的、适当的目标位点是非常困难的; 引物设计较困难, 即使有免费的线上软件帮助设计引物, 仍可能无法选中一些首选的靶位点, 还需依赖于手动设计引物(Watts et al., 2014); 因为 LAMP 最终产物是 1 个大型 DNA 链, 因此该技术不适用于克隆或产物为小型 DNA 的片段, 与 PCR 相比, 其适用范围更窄(Sahoo et al., 2016); 由于在扩增过程中产生了大量的拷贝, LAMP 技术还有较高的污染风险, 这往往会导致阴性对照中出现假阳性结果(Hsieh et al., 2014)。因此, 对于涉及需要打开反应管的步骤, 建议在超净台中进行反应, 试验过程中需要单独使用一套配有带滤芯枪头的移液枪, 以避免污染(Wong et al., 2018), 还可以通过在反应开始前加入检测染料或在反应完成后设计一种释放染料的方法来减少污染(Ocenar et al., 2019)。LAMP 反应结果的比色检测虽然方便快捷, 但高度依赖于检测人员对颜色的感知, 主观性较强, 在颜色变化不明显的情况下, 无法给出客观的检测结论(Bista et al., 2007)。

LAMP 技术作为一种极具突破性的核酸扩增技术, 虽然仍存在着不足之处, 但与其它检测方法相比更适于植物病原物的快速检测和植物病害的识别, 尤其是在田间现场检测过程中具有较大的潜力。在 LAMP 技术发展的十几年里, 其诸多方面进行了改

进, 使其更加适于现场检测。Chen et al. (2016a) 研发了冻干型的 LAMP 试剂, 在用于检测之前该试剂能经受周围环境温度的变化, 延长了储存期, 提高了现场诊断的可能性。此外, 为了减少反应体系, LAMP 微流体设备应运而生, LAMP 微流体设备操作简单、微型、成本低廉, 通常用于食品检测、癌症筛查和病毒检测, 有望改进后应用于植物病原物的检测(Wang et al., 2012; Wong et al., 2018)。DNA 提取技术也是植物病原物检测过程中的关键一环, DNA 提取方法有粗提取和利用 DNA 试剂盒提取 2 种方法, 其中利用 DNA 试剂盒提取的 DNA 纯度较高, 增加了 LAMP 反应的可靠性。近年来, 科研人员还开发了多种基于 LAMP 的生物传感器, 包括比色生物传感器、荧光生物传感器、电化学生物传感器等(林晟豪等, 2019)。低成本、高灵敏度、自动化、微型化的 LAMP 生物传感器, 操作简便, 适合于非专业人员现场检测, 提高植物病原物的检测效率, 从而为农业生产及时采取合理的防治措施提供依据, 降低农业生产中因植物病原物的侵染而造成的严重损失。

参考文献 (References)

- ASLAM S, TAHIR A, ASLAM MF, ALAM MW, SHEDAYI AA, SADIYA S. 2017. Recent advances in molecular technique for the identification of phytopathogenic fungi: a mini review. *Journal of Plant Interactions*, 12(1): 493–504
- BISTA BR, ISHWAD C, WADOWSKY RM, MANNA P, RANDHAWA PS, GUPTA G, ADHIKARI M, TYAGI R, GASPER G, VATS A. 2007. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *BK virus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(5): 1581–1587
- BÜHLMANN A, POTHIER JF, REZZONICO F, SMITS THM, ANDREOU M, BOONHAM N, DUFFY B, FREY JE. 2013. *Erwinia amylovora* loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid pathogen detection and on-site diagnosis of fire blight. *Journal of Microbiological Methods*, 92: 332–339
- BULL JJ, PEASE CM. 1995. Why is the polymerase chain reaction resistant to in vitro evolution? *Journal of Molecular Evolution*, 41: 1160–1164
- CAPOTE N, PASTRANA AM, AGUADO A, SÁNCHEZ-TORRES P. 2012. Molecular tools for detection of plant pathogenic fungi and fungicide resistance. // *Plant pathology*. Rijeka, Croatia: In-Tech, pp.151–202
- CHEN HW, WEISSENBERGER G, CHING WM. 2016a. Development of lyophilized loop-mediated isothermal amplification reagents for the detection of *Leptospira*. *Military Medicine*, 181(5): 227–231
- CHEN L, JIAO ZY, LIU DM, LIU XL, XIA ZH, DENG CL, ZHOU T, FAN ZF. 2016b. One-step reverse transcription loop-mediated

- isothermal amplification for the detection of *Maize chlorotic mottle virus* in maize. *Journal of Virological Methods*, 240: 49–53
- CHEN L, SHANG QX, CHEN XY, XING DM, RAN C, WEI YM, ZHAO XY, LIU ZP. 2015. Detection of *Strawberry mild yellow edge virus* by RT-LAMP. *Scientia Agricultura Sinica*, 48(3): 613–620 (in Chinese) [陈柳, 尚巧霞, 陈笑瑜, 邢冬梅, 冉策, 魏艳敏, 赵晓燕, 刘正坪. 2015. 草莓轻型黄边病毒 RT-LAMP 检测方法的建立. *中国农业科学*, 48(3): 613–620]
- CHEN QH, BIAN ZH, CHEN M, HUA X, YAO YC, XIA H, KUANG H, ZHANG X, HUANG JF, CAI GR, et al. 2009. Real-time monitoring of the strand displacement amplification (SDA) of human cytomegalovirus by a new SDA-piezoelectric DNA sensor system. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(12): 3412–3418
- CHEN QH, LI BJ, LIU PQ, LAN CZ, ZHAN ZX, WENG QY. 2013. Development and evaluation of specific PCR and LAMP assays for the rapid detection of *Phytophthora melonis*. *European Journal of Plant Pathology*, 137(3): 597–607
- CHEN XF, ZHANG JH, CUI JX, ZHANG HL, GUO LX, YU SQ. 2013. Detection of *Arabidopsis mosaic virus* by RT-LAMP. *Journal of Plant Protection*, 40(2): 189–190 (in Chinese) [陈先锋, 张吉红, 崔俊霞, 张慧丽, 郭立新, 余淑琼. 2013. 南芥菜花叶病毒的 RT-LAMP 检测试剂盒的研制. *植物保护学报*, 40(2): 189–190]
- CHEN YY, CONNER RL, GILLARD CL, BOLAND GJ, BABCOCK C, CHANG KF, HWANG SF, BALASUBRAMANIAN PM. 2007. A specific and sensitive method for the detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in dry bean tissue. *Plant Disease*, 91(10): 1271–1276
- CRUZ-PEREZ P, BUTTNER MP, STETZENBACH LD. 2001. Specific detection of *Stachybotrys chartarum* in pure culture using quantitative polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 15(3): 129–138
- DE BOER SH, WARD LJ, LI X, CHITTARANJAN S. 1995. Attenuation of PCR inhibition in the presence of plant compounds by addition of BLOTTO. *Nucleic Acids Research*, 23(13): 2567–2568
- DUAN YB, GE CY, ZHANG XK, WANG JX, ZHOU MG. 2013. A rapid detection method for the plant pathogen *Sclerotinia sclerotiorum* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Australasian Plant Pathology*, 43: 61–66
- DUAN YB, GE CY, ZHANG XK, WANG JX, ZHOU MG. 2014a. Development and evaluation of a novel and rapid detection assay for *Botrytis cinerea* based on loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE*, 9(10): e111094
- DUAN YB, YANG Y, WANG JX, LIU CC, HE LL, ZHOU MG. 2015. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detecting the highly benzimidazole-resistant isolates in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Scientific Reports*, 5: 17278
- DUAN YB, ZHANG XK, GE CY, WANG Y, CAO JH, JIA XJ, WANG JX, ZHOU MG. 2014b. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum*. *Scientific Reports*, 4: 7094
- DURESSA D, RAUSCHER G, KOIKE ST, MOU B, HAYES RJ, MARUTHACHALAM K, SUBBARAO KV, KLOSTERMAN SJ. 2012. A real-time PCR assay for detection and quantification of *Verticillium dahliae* in Spinach seed. *Phytopathology*, 102(4): 443–451
- FANG XE, LI J, CHEN Q. 2008. One new method of nucleic acid amplification-loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Virologica Sinica*, 23(3): 167–172
- FENG LP, LI HL, NI X, WANG J, JI Y, GAN QH. 2015. 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. 2015. 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 ZM, SHU YL. 2017. An overview of digital PCR. *Chinese Journal of Virology*, 33(1): 103–107 (in Chinese) [冯兆民, 舒跃龙. 2017. 数字 PCR 技术及其应用进展. *病毒学报*, 33(1): 103–107]
- FISCHBACH J, XANDER NC, FROHME M, GLÖKLER JF. 2015. Shining a light on LAMP assays: a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of berberine. *Biotechniques*, 58(4): 189–194
- GACHON C, MINGAM A, CHARRIER B. 2004. Real-time PCR: what relevance to plant studies? *Journal of Experimental Botany*, 55(402): 1445–1454
- GUILLEMETTE T, IACOMI-VASILESCU B, SIMONEAU P. 2007. Conventional and real-time PCR-based assay for detecting pathogenic *Alternaria brassicae* in cruciferous seed. *Plant Disease*, 88(5): 490–496
- HSIEH K, MAGE PL, CSORDAS AT, MICHAEL E, SOH HT. 2014. Simultaneous elimination of carryover contamination and detection of DNA with uracil-DNA-glycosylase-supplemented loop-mediated isothermal amplification (UDG-LAMP). *Chemical Communications*, 50(28): 3747–3749
- HUANG C, CHEN Q. 2016. Application of modern biological methods in detecting of plant phytopathogens. *Food Research and Development*, 37(13): 215–219 (in Chinese) [黄灿, 陈沁. 2016. 现代生物技术在植物病原菌检测中的应用. *食品研究与开发*, 37(13): 215–219]
- HUANG W, XU J, ZHANG H, XU JS, DING W, FENG J. 2016. Development of a LAMP approach for detection of *Ralstonia solanacearum*. *Scientia Agricultura Sinica*, 49(11): 2093–2102 (in Chinese) [黄雯, 徐进, 张昊, 许景升, 丁伟, 冯洁. 2016. 植物青枯菌 LAMP 检测方法的建立. *中国农业科学*, 49(11): 2093–2102]
- HUSSAIN S, TSUKIBOSHI T, UEMATSU T. 2000. Quick detection of *Ascochyta lentis* from lentil seeds using polymerase chain reaction (PCR) based techniques. *Pakistan Journal of Botany*, 32(1): 45–56
- ISEKI H, ALHASSAN A, OHTA N, THEKISOE OMM, YOKOYAMA N, INOUE N, NAMBOTA A, YASUDA J, IGARASHI I. 2007. Development of a multiplex loop-mediated isothermal am-

- plification (mLAMP) method for the simultaneous detection of bovine *Babesia* parasites. *Journal of Microbiological Methods*, 71(3): 281–287
- JACOBSEN CS. 1995. Microscale detection of specific bacterial DNA in soil with a magnetic capture-hybridization and PCR amplification assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(9): 3347–3352
- JIANG SS, FENG J, ZHANG M, WANG SJ, XIN ZM, WU B, XIN XQ. 2018. Development of RT-LAMP assay for rapid detection of *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV). *Scientia Agricultura Sinica*, 51(7): 1294–1302 (in Chinese) [姜珊珊, 冯佳, 张眉, 王升吉, 辛志梅, 吴斌, 辛相启. 2018. 甘薯羽状斑驳病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立. *中国农业科学*, 51(7): 1294–1302]
- KANG ZS. 2010. Current status and development strategy for research on plant fungal diseases in China. *Plant Protection*, 36(3): 9–12 (in Chinese) [康振生. 2010. 我国植物真菌病害的研究现状及发展策略. *植物保护*, 36(3): 9–12]
- KONG XJ, QIN WT, HUANG XQ, KONG FF, SCHOEN CD, FENG J, WANG ZY, ZHANG H. 2016. Development and application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Plasmopara viticola*. *Scientific Reports*, 6: 28935
- LANDA BB, MONTES-BORREGO B, MUÑOZ-LEDESMA FJ, JIMÉNEZ-DÍAZ RM. 2007. Phylogenetic analysis of downy mildew pathogens of opium poppy and PCR-based in planta and seed detection of *Peronospora arborescens*. *Phytopathology*, 97(11): 1380–1390
- LAU YL, LAI MY, TEOH BT, ABD-JAMIL J, JOHARI J, SAM SS, TAN KK, ABUBAKAR S. 2015. Colorimetric detection of dengue by single tube reverse-transcription-loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE*, 10(9): e0138694
- LENARČIČ R, MORISSET D, MEHLE N, RAVNIKAR M. 2014. Fast real-time detection of *Potato spindle tuber viroid* by RT-LAMP. *Plant Pathology*, 62: 1147–1156
- LIN CQ, YAO B. 2012. Recent advance in digital PCR. *Progress in Chemistry*, 24(12): 2415–2423 (in Chinese) [林彩琴, 姚波. 2012. 数字PCR技术进展. *化学进展*, 24(12): 2415–2423]
- LIN SH, DU ZH, ZHANG XJ, HUANG KL, LIU QL, XU WT. 2019. Progress on biosensors based on loop-mediated isothermal amplification. *Current Biotechnology*, 9(6): 599–610 (in Chinese) [林晟豪, 杜再慧, 张秀杰, 黄昆仑, 刘清亮, 许文涛. 2019. 基于环介导等温扩增技术的生物传感器研究进展. *生物技术进展*, 9(6): 599–610]
- LIN T. 2015. Mechanisms, detection techniques, and management of fungicide resistance in *Colletotrichum gloeosporioides* complex isolates from strawberry and grape. Master Thesis. Hangzhou: Zhejiang A&F University (in Chinese) [林婷. 2015. 胶孢炭疽菌杀菌剂抗药性的机制、检测技术及治理研究. 硕士学位论文文. 杭州: 浙江农林大学]
- LIU KH, CHEN HM, ZHOU Y, SONG Z, LI ZG. 2017. Establishment of LAMP assay for detection of *Citrus chlorotic dwarf-associated virus* (CCDaV). *Acta Horticulturae Sinica*, 44(5): 999–1004 (in Chinese) [刘科宏, 陈洪明, 周彦, 宋震, 李中安. 2017. 柑橘褪绿矮化相关病毒 LAMP 检测体系的建立. *园艺学报*, 44(5): 999–1004]
- MANCINI V, MUROLO S, ROMANAZZI G. 2016. Diagnostic methods for detecting fungal pathogens on vegetable seeds. *Plant Pathology*, 65: 691–703
- MASHOOQ M, KUMAR D, NIRANJAN AK, AGARWAL RK, RATHORE R. 2016. Development and evaluation of probe based real time loop mediated isothermal amplification for *Salmonella*: a new tool for DNA quantification. *Journal of Microbiological Methods*, 126: 24–29
- MASSUNG RF, SLATER K, OWENS JH, NICHOLSON WL, MATHER TN, SOLBERG VB, OLSON JG. 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(4): 1090–1095
- MUNKVOLD GP. 2009. Seed pathology progress in academia and industry. *Annual Review of Phytopathology*, 47: 285–311
- NOTOMI T, MORI Y, TOMITA N, KANDA H. 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *Journal of Microbiology*, 53(1): 1–5
- NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T. 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*, 28(12): e63
- OENAR J, ARIZALA D, BOLUK G, DHAKAL U, GUNARATHNE S, PAUDEL S, DOBHAL S, ARIF M. 2019. Development of a robust, field-deployable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for specific detection of potato pathogen *Dickeya dianthicola* targeting a unique genomic region. *PLoS ONE*, 14(6): e0218868
- ORTEGA SF, TOMLINSON J, HODGETTS J, SPADARO D, GULLINO ML, BOONHAM N. 2018. Development of loop-mediated isothermal amplification assays for the detection of seedborne fungal pathogens, *Fusarium fujikuroi* and *Magnaporthe oryzae*, in rice seeds. *Plant Disease*, 102(8): 1549–1558
- OSCORBIN IP, BELOUSOVA EA, ZAKABUNIN AI, BOYAR-SKIKH UA, FILIPENKO ML. 2016. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques*, 61(1): 20–25
- PARIDA M, SANNARANGAIAH S, DASH PK, RAO PVL, MORITA K. 2008. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in Medical Virology*, 18(6): 407–421
- PENG J, GUO LJ, WANG GF, YANG LY, WANG J, HUANG JS. 2012. Development of a LAMP method for rapid detection of *Banana streak virus*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 42(6): 577–584 (in Chinese) [彭军, 郭立佳, 王国芬, 杨腊英, 汪军, 黄俊生. 2012. 香蕉条斑病毒 LAMP 快速检测方法的建立. *植物病理学报*, 42(6): 577–584]
- PRYOR BM, GILBERTSON RL. 2001. A PCR-based assay for detection of *Alternaria radicina* on carrot seed. *Plant Disease*, 85(1):

- 18–23
- QIAN ZK, ZHANG CQ, ZHOU G, DAI DJ, SHI HJ. 2016. Establishment of loop-mediated isothermal amplification assay to rapidly detect carbendazim high resistant Strain of *Botrytis cinerea*. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 31(S1): 438–442 (in Chinese) [钱铸锴, 张传清, 周根, 戴德江, 时浩杰. 2016. 铁皮石斛灰霉病多菌灵高抗菌株的 LAMP 快速检测体系的建立. 华北农学报, 31(S1): 438–442]
- SAHOO PR, SETHY K, MOHAPATRA S, PANDA D. 2016. Loop mediated isothermal amplification: an innovative gene amplification technique for animal diseases. Veterinary World, 9(5): 465–469
- SALINAS NR, LITTLE DP. 2012. Electric LAMP: virtual loop-mediated isothermal amplification. ISRN Bioinformatics, 21: 696758
- SANTIAGO-FELIPE S, TORTAJADA-GENARO LA, CARRASCO-SA J, PUCHADES R, MAQUIEIRA Á. 2016. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc micro-reactors. Biosensors and Bioelectronics, 79: 300–306
- SCHAAD NW, CHEONG SS, TAMAKI S, HATZILIOUKAS E, PAN-POULOS NJ. 1995. A combined biological and enzymatic amplification (BIO-PCR) technique to detect *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean extracts. Phytopathology, 85(2): 243–248
- THIESSEN LD, NEILL TM, MAHAFFEE WF. 2018. Development of a quantitative loop-mediated isothermal amplification assay for the field detection of *Erysiphe necator*. PeerJ, 6: e4639
- TOMLINSON JA, BOONHAM N, HUGHES KJD, GRIFFEN RL, BARKER I. 2005. On-site DNA extraction and real-time PCR for detection of *Phytophthora ramorum* in the field. Applied and Environmental Microbiology, 71(11): 6702–6710
- TSAFTARIS A, PASENTZIS K, ARGIRIOU A. 2010. Rolling circle amplification of genomic templates for inverse PCR (RCA-GIP): a method for 5'- and 3'-genome walking without anchoring. Biotechnology Letters, 32(1): 157–161
- VILLARI C, MAHAFFEE WF, MITCHELL TK, PEDLEY KF, PIECK ML, PEDUTO HF. 2017. Early detection of airborne inoculum of *Magnaporthe oryzae* in turfgrass fields using a quantitative LAMP assay. Plant Disease, 101(1): 170–177
- VOGELSTEIN B, KINZLER KW. 1999. Digital PCR. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(16): 9236–9241
- WALCOTT DB, GITAITIS RD, LANGSTON DB Jr. 2004. Detection of *Botrytis aclada* in onion seed using magnetic capture hybridization and the polymerase chain reaction. Seed Science and Technology, 32: 425–438
- WALCOTT RR. 2003. Detection of seedborne pathogens. HortTechnology, 13(1): 40–47
- WANG TZ, ZHANG Y, HUANG GL, WANG C, XIE L, MA L, LI ZY, LUO XB, TIAN H, LI Q, et al. 2012. Detect early stage lung cancer by a LAMP microfluidic chip system with a real-time fluorescent filter processor. Science China Chemistry, 55(4): 508–514
- WATTS MR, JAMES G, SULTANA Y, GINN AN, OUTHRED AC, KONG FR, VERWEIJ JJ, IREDELL JR, CHEN SCA, LEE R. 2014. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Strongyloides stercoralis* in stool that uses a visual detection method with SYTO-82 fluorescent dye. American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 90(2): 306–311
- WONG YP, OTHMAN S, LAU YL, RADU S, CHEE HY. 2018. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. Journal of Applied Microbiology, 124(3): 626–643
- ZANOLI LM, SPOTO G. 2013. Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices. Biosensors, 3(1): 18–43
- ZHANG L, YIN YP, WU YJ, WANG ZK. 2013. Regular LAMP and fast LAMP for the detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Plant Protection, 39(3): 95–101 (in Chinese) [张仑, 殷幼平, 吴瑜佳, 王中康. 2013. 柑橘溃疡病菌的普通 LAMP 及快速 LAMP 检测方法的建立. 植物保护, 39(3): 95–101]
- ZHANG SN, LI ZN, FAN XD, ZHANG ZP, REN F, HU GJ, DONG YF. 2018. Establishment of RT-LAMP assay for detection of *Apple chlorotic leaf spot virus* (ACLSV). Scientia Agricultura Sinica, 51(9): 1706–1716 (in Chinese) [张双纳, 李正男, 范旭东, 张尊平, 任芳, 胡国君, 董雅凤. 2018. 苹果褪绿叶斑病毒 RT-LAMP 检测方法的建立. 中国农业科学, 51(9): 1706–1716]
- ZHAO XJ, DENG YJ, WEI ZL, ZHANG W, HUANG GL, LI B, CHEN DX, QING L, SUN XC. 2016. Development of a RT-LAMP method for the rapid detection of *Cucumber mosaic virus* from vegetables. Acta Horticulturae Sinica, 43(6): 1203–1210 (in Chinese) [赵雪君, 邓永杰, 魏周玲, 张旺, 黄国联, 李斌, 陈德鑫, 青玲, 孙现超. 2016. 蔬菜中黄瓜花叶病毒的 RT-LAMP 快速检测. 园艺学报, 43(6): 1203–1210]
- ZHAO YQ, TIAN YL, LUO JY, YAO HM, YU H, CHEN L, HU BS. 2015. Rapid diagnostic methods for *Acidovorax citrulli* using LAMP. Plant Protection, 41(5): 116–120 (in Chinese) [赵玉强, 田艳丽, 罗金燕, 姚红梅, 余慧, 陈磊, 胡白石. 2015. 基于环介导等温扩增技术检测瓜类细菌性果斑病菌. 植物保护, 41(5): 116–120]
- ZHAO YY, SHEN DY, YU J, XU H, DOU DL. 2019. Rapid detection of corn stalk rot caused by *Pythium arrhenomanes* using loop-mediated isothermal amplification. Journal of Plant Protection, 46(3): 626–633 (in Chinese) [赵媛媛, 沈丹宇, 于佳, 徐衡, 窦道龙. 2019. 基于环介导等温扩增技术检测由强雄腐霉引起的玉米茎腐病. 植物保护学报, 46(3): 626–633]
- ZHOU T, DU LL, FAN YJ, ZHOU YJ. 2012. Development of a RT-LAMP assay for rapid detection of *Rice black-streaked dwarf virus*. Scientia Agricultura Sinica, 45(7): 1285–1292 (in Chinese) [周彤, 杜琳琳, 范永坚, 周益军. 2012. 水稻黑条矮缩病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立. 中国农业科学, 45(7): 1285–1292]

(责任编辑:张俊芳)