

猕猴桃软腐病菌的环介导等温扩增快速检测技术

Rapid detection of kiwifruit soft rot pathogen using loop-mediated isothermal amplification technology

王大会¹ 赵蕊¹ 刘丹丹¹ 赵志博^{1,2} 龙友华^{1,2} 樊荣^{1,2*}

(1. 贵州大学农学院, 贵阳 550025; 2. 贵州大学猕猴桃工程研究中心, 贵阳 550025)

Wang Dahui¹ Zhao Rui¹ Liu Dandan¹ Zhao Zhibo^{1,2} Long Youhua^{1,2} Fan Rong^{1,2*}

(1. College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China; 2. Kiwifruit Engineering Research Center, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou Province, China)

猕猴桃软腐病是主要发生于猕猴桃果实成熟期和采后贮藏期的一种真菌病害,病原菌为葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea*, 该病菌还能引起苹果轮纹病和冬青叶斑病等病害。猕猴桃软腐病扩展迅速,可造成惨重的经济损失,实际生产过程中仍缺乏对该病害快速准确的检测方法(Marsberg et al., 2017)。环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术具有操作简单、耗时短、检测灵敏度高特点,已被广泛用于多种真菌、细菌、病毒的快速检测(Villari et al., 2017)。为建立生产上可用的葡萄座腔菌快速准确的检测技术,本研究通过比较基因组分析,基于该病菌基因组1个特有的锌指蛋白编码基因区域设计扩增引物,拟建立以SYBR Green I为显色剂的LAMP快速检测技术,以为猕猴桃软腐病的快捷诊断和及时防治提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株及果实:交链格孢 *Alternaria alternata*、细极链格孢 *A. tenuissima*、小新壳梭孢 *Neofusicoccum parvum*、福士拟茎点霉 *Phomopsis fukushii*、可可毛色二孢菌 *Lasiodiplodia theobromae*、果生刺盘孢 *Colletotrichum fructicola*、猕猴桃软腐病菌各1株。另外,为检测引物对不同寄主来源的葡萄座腔菌的适用性,选用苹果轮纹病菌和冬青叶斑病菌各1株。以上菌株均由贵州大学农学院农产品质量安全实验室分离鉴定并保存。供试健康和感病猕猴桃果实样品均采自贵州省六盘水市,品种为红阳猕

猴桃。

试剂与仪器:真菌DNA提取试剂盒,天根生物科技(北京)有限公司;等温扩增PCR混合液试剂盒,生工生物工程(上海)股份有限公司;SYBR Green I(1 000×),北京索莱宝科技有限公司;2×*Taq* PCR MasterMix,南京诺唯赞生物科技股份有限公司;其他试剂均为国产分析纯。LA-320c环介导等温扩增仪,北京蓝谱生物科技有限公司;T100 PCR仪、Kashf电泳仪,美国伯乐公司。

1.2 方法

引物设计:对供试菌株进行比较基因组分析,获得葡萄座腔菌特异的基因作为靶基因。利用在线软件 Primer Explore 5 (<http://primerexplorer.jp/e/index.html>)设计靶基因LAMP引物128_FIP(5'-GCGG-GTCTGGTTCAAGATCTCGCCTTACCCTCCTCTT-CGCC-3')/128_BIP(5'-TG GTGCAAGGGTATCTGC-GCAACACAGAGCGGAAGTACAG-3')、128F3(5'-CCAAGATGCAGTTACCGT-3')/128B3(5'-CTTAC-CCCGTTGCACTGG-3')。本研究所有引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

特异性检测:按照真菌DNA提取试剂盒说明书提取上述9株供试菌株DNA,并参考汪少丽等(2020)方法建立LAMP检测体系:100 ng/μL DNA 1 μL、2×LAMP Master Mix 12.5 μL、DNA Polymerase 0.5 μL、10 μmol/L 128_FIP/128_BIP各2 μL、10 μmol/L 128F3/128B3各0.5 μL, ddH₂O补足至25 μL,于65℃恒温反应60 min,然后在80℃灭活10 min,用1 μL SYBR Green I(1 000×)染色,观察颜色反应结果。扩增产

基金项目: 国家自然科学基金(31901836, 32260658), 贵州省科技计划项目(黔科合平台人才[2018]5781号, ZK[2022]048)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: hongyanfaned@126.com

收稿日期: 2021-06-16

物呈荧光绿色为阳性,呈橙色为阴性,以 ddH₂O 代替 DNA 作为阴性对照。

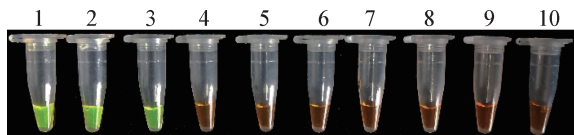
LAMP 及常规 PCR 反应灵敏度检测:以 100 ng/μL 猕猴桃软腐病菌基因组的 DNA 用 ddH₂O 进行 10 倍梯度稀释至 10 ng/μL~1 ag/μL 浓度作为模板进行 LAMP 和常规 PCR 扩增, LAMP 检测方法同上。以引物 128_F (5'-CTCCACGTTCTCTCCAAAGC-3')/128_R (5'-AGATACCCTTGCACCAATCG-3') 进行常规 PCR 扩增,反应体系:DNA 1 μL、128_F/128_R 各 2 μL、2×Taq PCR Starmix 10 μL、ddH₂O 补足至 25 μL。反应程序:94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 终延伸 10 min, 扩增后经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。比较 LAMP 和常规 PCR 的灵敏度。

人工接种和自然发病的猕猴桃果实中葡萄座腔菌的检测:参见李黎等(2016)方法人工接种葡萄座腔菌,接种部位出现初始病斑时,提取发病组织 DNA 并采用本研究建立的 LAMP 方法进行检测,以健康果实组织 DNA 和无菌水作为阴性对照,试验方法同上,试验重复 3 次。为确定猕猴桃实际带菌果实中 LAMP 检测结果的可靠性,采用传统的组织分离法对自然成熟后表现出疑似软腐病的 6 个红阳猕猴桃果实进行葡萄座腔菌的分离鉴定与 LAMP 检测,并比较结果是否一致。

2 结果与分析

2.1 LAMP 引物特异性检测

引物特异性检测发现,仅以葡萄座腔菌基因组 DNA 为模板的样品呈阳性反应,产物颜色变为荧光绿色(图 1)。表明设计的 LAMP 引物可作为葡萄座腔菌的特异性检测引物。



1: 猕猴桃软腐病菌; 2: 苹果轮纹病菌; 3: 冬青叶斑病菌; 4: 小新壳梭孢; 5: 福士拟茎点霉; 6: 细极链格孢; 7: 交链格孢; 8: 可可毛色二孢菌; 9: 果生刺盘孢; 10: 阴性对照。
1-3: *Botryosphaeria dothidea* obtained from kiwifruit, apple and holly; 4: *Neofusicoccum parvum*; 5: *Phomopsis fukushii*; 6: *Alternaria tenuissima*; 7: *A. alternata*; 8: *Lasiodiplodia theobromae*; 9: *Colletotrichum fructicola*; 10: negative control.

图 1 猕猴桃软腐病菌 LAMP 体系的特异性检测

Fig. 1 Specificity of LAMP detection of fungal pathogen *Botryosphaeria dothidea*

2.2 LAMP 与常规 PCR 的灵敏度检测

灵敏度检测结果表明, LAMP 检测方法的最

低检测限为 100 ag/μL, 而常规 PCR 最低检测限为 10 fg/μL, 说明 LAMP 方法的检测灵敏度是常规 PCR 检测灵敏度的 100 倍。

2.3 猕猴桃发病果实中葡萄座腔菌检测

接种 2 d 后猕猴桃果实出现初始病斑, LAMP 检测结果表明, 5 个样品的发病部位均为阳性, 而健康猕猴桃果肉组织和无菌水的检测均为阴性。此外, 对贵州省 6 份红阳猕猴桃果实腐烂样品的检测结果显示, 其中 4 份为阳性, 与随后进行的病原菌分离鉴定结果一致。说明该 LAMP 方法能排除果肉组织干扰, 准确检测到猕猴桃软腐病样品中的葡萄座腔菌。

3 讨论

目前, 对病菌的分子快速检测技术多依赖于病菌物种的保守区域如 ITS、β-tubulin 等设计引物(汪少丽等, 2020), 但真核生物基因组中普遍存在上述保守区域, 极易引起污染, 造成无效检测。基于基因组数据和生物信息学分析获得目标病菌的特异靶序列, 可大大提高对病菌的检测效率。本研究通过比较基因组分析, 以猕猴桃软腐病菌葡萄座腔菌特有的一个锌指蛋白编码基因为靶序列设计引物建立 LAMP 检测方法, 该方法具有较高的特异性和灵敏度, 对猕猴桃软腐病发病果实中葡萄座腔菌的检测快捷准确, 该方法具有良好的应用前景。

参 考 文 献 (References)

- Li L, Chen MY, Zhang P, Liu XL, Zhong CH. 2016. Identification of the pathogen causing fruit soft rot on kiwifruit. *Journal of Plant Protection*, 43(3): 527-528 (in Chinese) [李黎, 陈美艳, 张鹏, 刘小莉, 钟彩虹. 2016. 猕猴桃软腐病的病原菌鉴定. *植物保护学报*, 43(3): 527-528]
- Marsberg A, Kemler M, Jami F, Nagel JH, Postma-Smidt A, Naidoo S, Wingfield MJ, Crous PW, Spatafora JW, Hesse CN, et al. 2017. *Botryosphaeria dothidea*: a latent pathogen of global importance to woody plant health. *Molecular Plant Pathology*, 18(4): 477-488
- Villari C, Mahaffee WF, Mitchell TK, Pedley KF, Pieck ML, Hand FP. 2017. Early detection of airborne inoculum of *Magnaporthe oryzae* in turfgrass fields using a quantitative LAMP assay. *Plant Disease*, 101(1): 170-177
- Wang SL, Qu HH, Wang YZ, Wang PS, Luan BH, Wang GH. 2020. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of apple ring rot pathogen *Botryosphaeria dothidea*. *Journal of Plant Protection*, 47(1): 127-133 (in Chinese) [汪少丽, 曲恒华, 王英姿, 王培松, 栾炳辉, 王冠华. 2020. 苹果轮纹病菌 LAMP 快速检测方法的建立. *植物保护学报*, 47(1): 127-133]

(责任编辑:王 璇)