

利用环介导等温扩增方法快速检测瓜类细菌性果斑病菌和番茄细菌性溃疡病菌

吴秀芹¹ 杨樱子¹ 罗金燕² 邱文^{1*} 安千里¹ 李斌^{1*}

(1. 浙江大学生物技术研究所, 农业部作物病虫分子生物学重点实验室, 杭州 310058;

2. 上海市农业技术推广服务中心, 上海 201103)

摘要: 为建立简单、快速和灵敏地检测瓜类细菌性果斑病菌 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) 和番茄细菌性溃疡病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) 的环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 方法, 以 Aac 的 *ugpB* 基因和 Cmm 的 *micA* 基因为靶标, 分别设计、合成和筛选特异性引物, 摸索和优化各项反应条件和反应体系, 成功建立了以钙黄绿素颜色为指示且只需要金属浴恒温反应 30~60 min 的 LAMP 扩增体系。特异性分析表明该 LAMP 方法可以快速检出 5 株不同的 Aac 菌株和 2 株不同的 Cmm 菌株, 其它对照菌株如燕麦嗜酸菌燕麦亚种 *A. avenae* subsp. *avenae*、丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae*、水稻黄单胞菌水稻致病变种 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 和茄科雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 则呈现阴性反应; 引物比目前报道的 LAMP 引物有更高的 DNA 样品检测灵敏度, Aac 和 Cmm 的灵敏度分别为 1.72×10^2 fg/ μ L 和 1.26×10^2 fg/ μ L。研究结果表明, 所设计的 Aac 和 Cmm 引物特异性好、灵敏度高, 更有利于从源头上控制这 2 种检疫性细菌病害的流行和传播。

关键词: 瓜类细菌性果斑病菌; 番茄细菌性溃疡病菌; 环介导等温扩增方法; 快速检测

Rapid detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* with loop-mediated isothermal amplification

Wu Xiuqin¹ Yang Yingzi¹ Luo Jinyan² Qiu Wen^{1*} An Qianli¹ Li Bin^{1*}

(1. Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insects, Ministry of Agriculture;

Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang Province, China;

2. Shanghai Agricultural Technology Extension & Service Center, Shanghai 201103, China)

Abstract: To establish a simple, sensitive and rapid loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac) causing melon bacterial fruit blotch and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) causing tomato bacterial canker disease, *ugpB* gene of Aac and *micA* gene of Cmm were used as the target for design of LAMP primers. Following primers screening and optimization of reaction systems and conditions, the LAMP method was finally established based on 30–60 min incubation by using calcein as an indicator. It showed a good prospect for application due to the reduction in both the reaction time and cost. The results of specificity analysis indicated a positive reaction for the five strains of Aac and two strains of Cmm and a negative reaction for the reference strains *A. avenae* subsp. *avenae*, *Pseudomonas syringae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Ralstonia solanacearum*, etc. In addition, the sensitivity of LAMP was 1.72×10^2 fg/ μ L for Aac

and 1.26×10^2 fg/ μ L for Cmm, respectively, which were higher than those of the previous reports. In general, the LAMP system is highly sensitive and specific and helpful for control of the epidemics and spread of the two bacterial diseases.

Key words: *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*; *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; loop-mediated isothermal amplification technique; rapid detection

瓜类细菌性果斑病是西瓜和甜瓜种植中危害最严重的毁灭性种传病害,病原菌是西瓜嗜酸菌 *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (Aac), 属世界性检疫病害。番茄细菌性溃疡病也是植物上的毁灭性病害,是由番茄细菌性溃疡病菌 *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) 引起,世界各地均有发生。这2种病害自20世纪80年代中在我国被报道以来,在全国大部分地区相继发生,其危害大、损失重,蔬果减产甚至绝收,给生产带来巨大威胁,已成为国内外西、甜瓜/番茄生产中亟待解决的问题(罗来鑫等,2004;曹春梅,2006)。这2种致病菌已被列为我国进境检疫性有害生物和全国农业植物检疫性有害生物。现有的检测技术主要包括传统的生理生化鉴定、Biolog全自动鉴定系统、脂肪酸鉴定、血清学检测和基于PCR方法的分子生物学检测如直接PCR、巢氏PCR(闵现华等,2011)、荧光PCR(王念武等,2014)等,但这些检测技术存在操作复杂、耗时较长、严重依赖仪器设备且需要一定的专业操作技能等缺点,难以用于现场检测,不利于在基层和田间推广。

环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是近年发展起来的应用微生物快速检测的分子生物学技术,工作原理是利用一种具有链置换活性的DNA聚合酶的链置换作用完成DNA扩增,同时释放出焦磷酸根离子,与 Mg^{2+} 结合生成肉眼可视的白色焦磷酸镁沉淀(Notomi et al., 2000)。LAMP具有特异性强、等温高效、敏感性高、操作简单和不需要昂贵仪器等优点,非常适合现场的快速检测,已被用于检测寄生虫(Arimatsu et al., 2015)、螺血吸虫 *Oncomelania hupensis* (Tong et al., 2015)、线虫(魏洪岩等,2016)、真菌(段亚冰等,2016)、病毒(杜琳琳等,2014)和细菌(封立平等,2013;赵赛等,2015;吕青阳等,2017)等多种动植物病原。LAMP具有广阔的应用前景,目前主要的制约因素是污染造成的假阳性和引物设计要求高。

针对番茄细菌性溃疡病菌和瓜类细菌性果斑病菌这2种重要的检疫性病原菌,国内外学者已初步建立了LAMP检测体系,但其设计引物的专化性和

灵敏度均有待提高。本研究基于Aac中 *ugpB* 基因和Cmm中 *micA* 基因的序列特点,首先根据这2个靶基因序列的特异性区域分别设计引物,并摸索和优化各项反应条件,最终建立一套适合基层的、快速、灵敏、可靠和简便的瓜类细菌性果斑病菌和番茄细菌性溃疡病菌的LAMP检测体系,以期在生产中这2种病原菌的及时高效检测提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:瓜类细菌性果斑病菌5株,分别为SD01、XJL12、O01、AH01和HB02;番茄细菌性溃疡病菌2株,分别为LMG3683和ICMP13696,中国检验检疫科学研究院提供;其它对照菌株包括燕麦嗜酸菌燕麦亚种 *A. avenae* subsp. *avenae* RS-2、丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae*、水稻黄单胞菌水稻致病变种 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*、茄科雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum*,各1株,均由本实验室保存。

培养基:LB液体培养基:酵母浸出粉10g、胰蛋白胨5g、NaCl 10g、蒸馏水1000mL, pH 7.0~7.5; LB固体培养基:每1000mL液体LB培养基加入17g琼脂粉。

试剂及仪器: *Taq* PCR Master Mix, 杭州擎科生物技术有限公司; LAMP法脱氧核糖核酸扩增试剂盒、钙黄绿素显色剂, 荣研生物科技有限公司; 细菌基因组DNA提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 其它试剂均为国产分析纯。GenoSens 1850凝胶成像系统, 上海勤翔科学仪器有限公司; Nanodrop ND-2000超微量核酸蛋白测定仪, 赛默飞世尔(中国)科技公司; DNP-9162型电热恒温培养箱、DK-8D型电热恒温水槽, 上海精宏实验设备有限公司; LA-302型LAMP实时浊度仪, 荣研生物科技有限公司; Centrifuge 5415R离心机, 艾本德中国有限公司; HZ-9610KB型Refrigerator Shaker, 太仓市华利达实验设备有限公司。

1.2 方法

1.2.1 LAMP引物的设计和筛选

首先从NCBI数据库下载瓜类细菌性果斑病菌

及其近似种的基因组序列, 同源性分析寻找适合设计LAMP引物的高保守性和强特异性的基因, 确定瓜类细菌性果斑病菌的编码胞外溶解结合蛋白的看家基因 *ugpB* (登录号为 Aave_0609) 为该检疫性病原菌的靶标基因; Yasuharabell et al. (2013) 报道番茄细菌性溃疡病菌编码抗菌肽的保守基因 *micA* (登录号为 DQ458780) 具有高保守性和强特异性, 故以 *micA* 作为番茄细菌性溃疡病菌的靶标基因。针对所选取的靶标基因序列, 利用在线设计软件 Primer Explorer 4 设计特异性较高的 LAMP 引物, 引物由杭州擎科生物技术有限公司合成。以参试菌株的 DNA 为模板, 对合成的引物进行 LAMP 扩增筛选, 确定适合这 2 种重要检疫性病原菌 LAMP 检测的最优引物。

1.2.2 LAMP方法的特异性检测

用普通 LB 固体培养基对 11 株参试菌株和对照菌株进行菌体的活化培养, 四区划线后放入 30℃ 恒温培养箱中培养 24~48 h。挑取单菌落于 5 mL LB 液体培养基中, 180 r/min、30℃ 摇床中振荡培养过夜, 至吸光值 OD_{600} 为 0.8。离心收集菌体, 参照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取各病原菌总 DNA, 分光光度计检测 DNA 质量和浓度, -20℃ 冰箱保存备用。

分别以瓜类细菌性果斑病菌菌株 SD01、XJL12、O01、AH01 和 HB02 或番茄细菌性溃疡病菌菌株 LMG3683 和 ICMP13696 的 2 μ L 基因组 DNA 为模板, LAMP 扩增体系: RM 缓冲液 12.5 μ L、8 000 U/mL 的 BST 酶 1 μ L、40 μ mol/L FIP 引物和 BIP 引物各 1 μ L、20 μ mol/L LF 引物和 LB 引物各 1 μ L、5 μ mol/L B3 和 F3 各 1 μ L、钙黄绿素显色剂 1 μ L、DNA 模板 2 μ L、灭菌双蒸水 2.5 μ L, 即内引物、环化引物和外引物摩尔比为 8:4:1, 恒温 63℃ 下在 LAMP 实时浊度仪中反应 60 min。以燕麦嗜酸菌燕麦亚种菌株 RS-2、丁香假单胞菌、水稻黄单胞菌水稻致病变种、茄科雷尔氏菌的等量基因组 DNA 为阴性对照, 双蒸水作为空白对照进行 LAMP 扩增。采用染色法及实时浊度法对结果进行鉴定。

LAMP 扩增反应结果可以通过肉眼或凝胶成像仪来判定, 具体判定标准如下: 肉眼观察到反应产物呈翠绿色, 则该反应为阳性, 肉眼观察到反应产物呈橙色, 则该反应为阴性; 凝胶成像仪观察到反应产物有荧光, 即有焦磷酸镁白色沉淀生成, 则该反应为阳性, 凝胶成像仪未观察到荧光现象, 则该反应为阴性。

1.2.3 LAMP方法的灵敏度检测

分别选取瓜类细菌性果斑病菌的代表性菌株

SD01 和番茄细菌性溃疡病菌的代表性菌株 LMG3683 进行各自 LAMP 方法的灵敏度检测, 具体方法如下: 首先用 Nanodrop ND-2000 超微量核酸蛋白测定仪测定这 2 种重要检疫性病原菌的基因组 DNA 浓度, 然后用双蒸水对基因组 DNA 进行 10 倍梯度稀释, 并取 2 μ L 不同稀释浓度的 DNA 作为模板分别进行 LAMP 扩增和常规 PCR 反应, LAMP 扩增体系和程序同 1.2.2, 常规 PCR 扩增体系和程序参考傅华英等 (2017) 方法稍有改动, 25 μ L 反应体系: 2 \times Taq PCR Master Mix 12.5 μ L、10 μ mol/L 上下游引物各 1 μ L、DNA 模板 1 μ L、灭菌双蒸水 9.5 μ L; 扩增程序: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 最后 72℃ 再延伸 5 min。最后通过肉眼观察颜色变化来判定 LAMP 扩增体系的检测灵敏度, 并与常规 PCR 扩增体系的检测灵敏度进行比较。

2 结果与分析

2.1 LAMP引物设计和筛选

利用瓜类细菌性果斑病菌的 *ugpB* 基因和番茄细菌性溃疡病菌的 *micA* 基因序列分别设计不同的 LAMP 引物, 然后根据 LAMP 扩增体系和程序对所有的参试菌株和对照菌株分别进行扩增, 并分析和比较各 LAMP 引物扩增的特异性和灵敏度, 最终筛选出适合这 2 种重要检疫性病原菌 LAMP 检测的最佳引物为 F3、B3、FIP、BIP、LF 和 LB (表 1); 利用该 LAMP 引物扩增后所有阳性样品都呈现浑浊状, 有白色沉淀, 加入钙黄绿素后, 颜色变为翠绿色, 而所有阴性对照样品则依然为橙色。

2.2 LAMP方法的特异性检测

2.2.1 瓜类细菌性果斑病菌的LAMP特异性检测

以瓜类细菌性果斑病菌菌株 SD01、XJL12、O01、AH01 和 HB02 基因组为模板的 PCR 管经 LAMP 扩增反应后均有光亮并呈现荧光绿色, 而以其它来自不同属的对照菌株及双蒸水空白对照的 PCR 管都无光亮并呈现橙色, 说明均未发生扩增反应。表明本试验所设计的 LAMP 引物在检测瓜类细菌性果斑病菌时具有较强的特异性 (图 1-A)。

只有以瓜类细菌性果斑病菌的菌株为模板的 LAMP 扩增反应液能检测出明显的浊度值, 以其它来自不同属的对照菌株 DNA 和双蒸水为模板的 LAMP 扩增反应液均未检测出浊度值。在瓜类细菌性果斑病菌的 5 个菌株中, 除了菌株 AH01 在 26 min 前后开始检测出浊度, 其它均集中在 18~20 min 开

始检测出浊度值,说明本试验所设计的瓜类细菌性果斑病菌的引物特异性强且反应效率高;同时5个瓜类细菌性果斑病菌菌株均在反应60 min前后开

始达到浊度的最大值(0.62~0.72)和平台期,说明本试验所设计的LAMP引物检测瓜类细菌性果斑病菌的最佳反应时间是60 min(图2-A)。

表1 瓜类细菌性果斑病菌和番茄细菌性溃疡病菌的LAMP检测引物

Table 1 Primers used for LAMP detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*

引物代码 Code	引物序列 Primer sequence(5'-3')	登录号 GenBank ID
F3	TGGTGAACCTTGATGCCGATG	Aave_0609
B3	ACCGGCATCACCGTCAA	Aave_0609
FIP	CGCTACGGCAAGATGATGAGCCGGGGTTGGTCC ATTCCTTG	Aave_0609
BIP	CAGCCGTCGTAGATGGACTTGACGACCTCATCCAGGAAGG	Aave_0609
LB	GAGGTCTGCAGCTTCTCGA	Aave_0609
F3	GAACACAGGTGGAACACGA	DQ458780
B3	GCCACATTCGATGGTGAGC	DQ458780
FIP	GAGCAGCATGTCCACCGGTGAACGACATCCTCGAGACG	DQ458780
BIP	TCCAGACCCAGATCGACGCGCTGCTGGACATGTACG	DQ458780
LF	TGACCATGACGGGGTCT	DQ458780
LB	AGTTCCGTCGCTCGTG	DQ458780

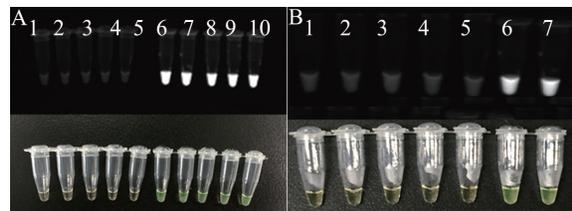


图1 LAMP检测瓜类细菌性果斑病菌(A)和番茄细菌性溃疡病菌(B)的特异性

Fig. 1 Specificity of the LAMP for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (A) and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (B)

1~5: 阴性对照,分别为蒸馏水、燕麦嗜酸菌燕麦亚种菌株RS-2、茄科雷尔氏菌、水稻黄单胞菌水稻致病变种和丁香假单胞菌;图A中6~10: 瓜类细菌性果斑病菌菌株AH01、HB02、SD01、O01和XJL12;图B中6~7: 番茄细菌性溃疡病菌菌株LMG3683和ICMP13696。1-5: Negative control with distilled water, *A. avenae* subsp. *avenae* strain RS-2, *R. solanacearum*, *X. oryzae* pv. *oryzae*, *P. syringae*, respectively; 6-10 in Fig. A: *A. avenae* subsp. *citrulli* strain AH01, HB02, SD01, O01 and XJL12; 6-7 in Fig. B: *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* strain LMG3683 and ICMP13696.

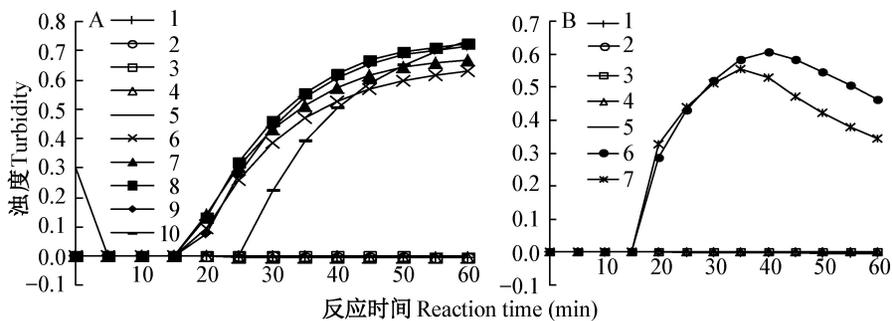


图2 LAMP瓜类细菌性果斑病菌(A)和番茄细菌性溃疡病菌(B)特异性检测的实时浊度曲线

Fig. 2 Real-time turbidity curves of LAMP detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (A) and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (B)

1: 燕麦嗜酸菌燕麦亚种菌株RS-2; 2: 茄科雷尔氏菌; 3: 丁香假单胞菌; 4: 水稻黄单胞菌水稻致病变种; 5: 双蒸水; 图A中6~10: 瓜类细菌性果斑病菌菌株SD01、HB02、O01、XJL12和AH01; 图B中6~7: 番茄细菌性溃疡病菌菌株LMG3683和ICMP13696。1: *A. avenae* subsp. *avenae* strain RS-2; 2: *R. solanacearum*; 3: *P. syringae*; 4: *X. oryzae* pv. *oryzae*; 5: distilled water; 6-10 in Fig. A: *A. avenae* subsp. *citrulli* strains SD01, HB02, O01, XJL12 and AH01; 6-7 in Fig. B: *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* strains LMG3683 and ICMP13696.

2.2.2 番茄细菌性溃疡病菌的LAMP特异性检测

类似地,以番茄细菌性溃疡病菌菌株 LMG3683 和 ICMP13696 基因组为模板的扩增反应液有光亮和荧光绿色,表明发生了 LAMP 扩增反应,而其它来自不同属的对照菌株 DNA 和双蒸水为模板的 LAMP 检测液均无光亮并呈现橙色,表明未发生 LAMP 扩增反应,结果显示本试验所设计的 LAMP 引物在检测番茄细菌性溃疡病菌时具有较强的特异性(图 1-B)。

只有以番茄细菌性溃疡病菌的 2 株菌株 LMG3683 和 ICMP13696 为模板的 LAMP 扩增反应液检测出明显的浊度值,而其它来自不同属的对照菌株 DNA 和双蒸水为模板的 LAMP 扩增反应液均未检测出浊度值。番茄细菌性溃疡病菌的 2 株菌株均在 16 min 前后开始检测出浊度值,说明番茄细菌性溃疡病菌引物特异性强且反应效率高;同时番茄细菌性溃疡病菌的 2 株菌株均在 35 min 前后浊度

达到最大值,约 0.55~0.60, 35 min 之后开始下降,说明本研究所设计的 LAMP 引物检测番茄细菌性溃疡病菌的最佳反应时间是 35~40 min(图 2-B)。

2.3 LAMP方法的灵敏度检测

2.3.1 瓜类细菌性果斑病菌的LAMP灵敏度检测

提取的瓜类细菌性果斑病菌代表性菌株 SD01 的基因组 DNA 浓度经测量为 1.72×10^8 fg/ μ L。用灭菌的双蒸水进行 10 倍梯度稀释,进行 LAMP 及常规 PCR 检测。当菌株 SD01 的基因组浓度为 10^2 fg/ μ L 时检测体系呈现翠绿色,而当其浓度为 10 fg/ μ L 时溶液为橘黄色,经计算 LAMP 检测瓜类细菌性果斑病菌体系的灵敏度可以达到 1.72×10^2 fg/ μ L(图 3-A)。菌株 SD01 的基因组浓度为 10^3 fg/ μ L 时,常规 PCR 可以看到清晰的目的条带,浓度为 10^2 fg/ μ L 时条带隐约可见,在 10 fg/ μ L 时该条带消失不见,计算结果表明常规 PCR 检测灵敏度是 1.72×10^3 fg/ μ L(图 4-A)。

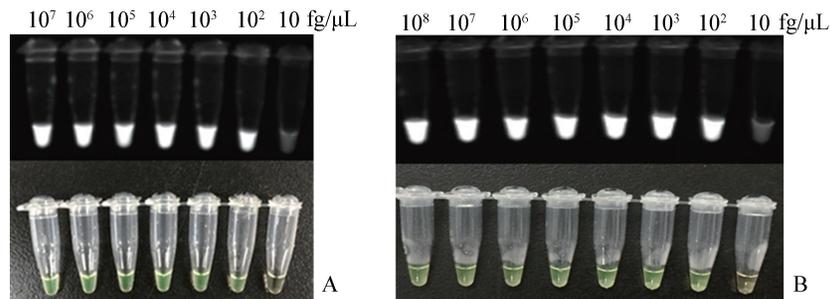


图3 LAMP 检测瓜类细菌性果斑病菌(A)和番茄细菌性溃疡病菌(B)的灵敏度
Fig. 3 Sensitivity of the LAMP for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (A) and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (B)

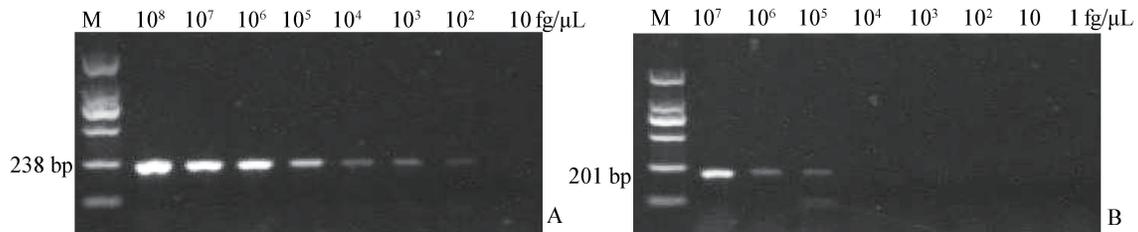


图4 常规 PCR 检测瓜类细菌性果斑病菌(A)和番茄细菌性溃疡病菌(B)的灵敏度
Fig. 4 Sensitivity of the conventional PCR for the detection of *Acidovorax avenae* subsp. *citrulli* (A) and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (B)

M: 分子标记。M: Marker.

2.3.2 番茄细菌性溃疡病菌的LAMP灵敏度检测

番茄细菌性溃疡病菌菌株 LMG3683 的基因组 DNA 浓度经测量为 1.26×10^8 fg/ μ L。灭菌的双蒸水进行 10 倍梯度稀释后进行 LAMP 及常规 PCR 扩增检测。当菌株 LMG3683 的基因组浓度为 10^2 fg/ μ L 时检测体系呈翠绿色,而当浓度为 10 fg/ μ L 时,溶液呈

现橙色,经计算 LAMP 检测番茄细菌性溃疡病菌基因组的灵敏度可达 1.26×10^2 fg/ μ L(图 3-B);菌株 LMG3683 的基因组浓度为 10^5 fg/ μ L 时,常规 PCR 可以看到清晰的目的条带,而当其浓度降低为 10^4 fg/ μ L 时,则该条带消失不见,经计算常规 PCR 检测番茄细菌性溃疡病菌的灵敏度是 1.26×10^5 fg/ μ L(图 4-B)。

3 讨论

针对瓜类细菌性果斑病菌和番茄细菌性溃疡病菌这2种典型的种传检疫性病原细菌,国内外学者已经对其检测技术特别是适合基层和田间现场的LAMP技术进行了大量有益的探索,例如赵玉强等(2015)基于功能未知的 *Aave_4063* 和 *Aave_4064* 基因建立了瓜类细菌性果斑病菌的LAMP检测技术;封立平等(2013)基于 *16S rRNA* 基因建立了番茄细菌性溃疡病菌的LAMP检测技术;Yasuharabell et al. (2013)基于 *micA* 基因建立了番茄细菌性溃疡病菌的LAMP检测技术;赵赛等(2015)基于核糖体转录间隔区序列建立了番茄细菌性溃疡病菌的LAMP检测技术;吕青阳等(2017)基于致病岛上的 *chpc* 基因建立了番茄细菌性溃疡病菌的LAMP检测技术。但这些LAMP检测技术在专化性和灵敏度上均存在不足,易造成漏检和假阳性,从而引起这2种检疫性病害的传播和流行。本研究首次基于序列高度保守又具有种特异性的看家基因 *ugpB* 序列来设计LAMP引物检测瓜类细菌性果斑病菌。Yasuharabell et al. (2013)已经报道利用相对保守又有特异性的 *micA* 功能基因设计LAMP引物检测番茄细菌性溃疡病菌,但设计的引物序列与本研究的引物不同。本研究根据瓜类细菌性果斑病菌看家基因 *ugpB* 和番茄细菌性溃疡病菌功能基因 *micA* 设计的引物专化性高,所有参试菌株LAMP检测均出现颜色反应和白色沉淀,而其它来自不同属的对照菌株均未出现颜色变化和白色沉淀;常规PCR的预试验结果显示,所有目标菌株均扩增出单一的目的条带,而包括本研究中阴性菌株在内的11株参照菌株均没有出现目的条带,这说明所设计引物具有较高的专化性。虽然本研究的对照菌株比较少,但研究结果在一定程度上表明设计的LAMP引物具有较高的专化性。

本研究所设计的瓜类细菌性果斑病菌和番茄细菌性溃疡病菌的LAMP引物也具有较高的检测灵敏度,Aac的LAMP检测灵敏度和常规PCR类似,为 1.72×10^3 fg/ μ L,约相当于17 CFU/mL,与赵玉强等(2015)报道的LAMP检测瓜类细菌性果斑病菌的灵敏度相似,表明看家基因 *ugpB* 可用于检测瓜类细菌性果斑病菌的LAMP引物设计。虽然Yasuharabell et al. (2013)利用 *micA* 功能基因设计了LAMP引物来检测番茄细菌性溃疡病菌,但并未测定其引物的灵敏度,本研究结果显示利用 *micA* 功能基因设计的Cmm引物的检测灵敏度约常规PCR的1 000倍,

而目前报道的用于检测番茄细菌性溃疡病菌的LAMP引物的灵敏度通常比常规PCR高约10~100倍(封立平等,2013;赵赛等,2015;吕青阳等,2017),这显示了基于 *micA* 功能基因设计的番茄细菌性溃疡病菌LAMP引物具有较高的灵敏度。

本研究成功地建立了一套快速、灵敏和高效的瓜类细菌性果斑病菌和番茄细菌性溃疡病菌的LAMP检测技术,只需要金属浴恒温反应30~60 min,不仅比传统的细菌学测试时间大大缩短,也比目前广泛使用的免疫学和PCR检测时间缩短,大大提高了检测效率,降低了检测成本,适合于基层和田间的现场检测,具有良好的应用前景。另一方面,相对于DNA样品的高灵敏度,模拟带菌预试验仅成功检测出 10^4 CFU/mL Aac 和 10^6 CFU/mL Cmm 菌悬液处理的西瓜和番茄种子,还需要进一步优化各项反应条件与反应体系,提高针对实际样品的检测灵敏度。

参考文献 (References)

- Arimatsu Y, Kaewkes S, Laha T, Sripa B. 2015. Specific diagnosis of *Opisthorchis viverrini* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) targeting parasite microsatellites. *Acta Tropica*, 141 (B): 368–371
- Cao CM. 2006. Tomato canker and its control. *Inner Mongolia Agricultural Science and Technology*, (5): 70 (in Chinese) [曹春梅. 2006. 番茄溃疡病的发生和防治. 内蒙古农业科技, (5): 70]
- Du LL, Wang LJ, Zhou T, Lan Y, Fan YJ, Zhou YJ. 2014. Comparison of detection methods for *Southern rice black-streaked dwarf virus*. *Journal of Plant Protection*, 41(3): 352–359 (in Chinese) [杜琳琳, 王踈姣, 周彤, 兰莹, 范永坚, 周益军. 2014. 南方水稻黑条矮缩病毒检测方法的比较. 植物保护学报, 41(3): 352–359]
- Duan YB, Xiao XM, Yang Y, Cao JH, Shi YY, Zhang XK, Wang Y, Wang JX, Zhou MG. 2016. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification method for detection of carbendazim-resistant mutants in *Fusarium graminearum*. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 39(1): 97–105 (in Chinese) [段亚冰, 效雪梅, 杨莹, 曹君红, 施一渊, 张晓柯, 王勇, 王建新, 周明国. 2016. 一种基于LAMP技术快速检测小麦赤霉病菌对多菌灵抗药性方法的建立及应用. 南京农业大学学报, 39(1): 97–105]
- Feng LP, Ni XM, Wei XT, Shao XL, Wu XH, Li Y. 2013. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Food Safety and Quality*, 4(4): 1207–1212 (in Chinese) [封立平, 尼秀娟, 魏晓棠, 邵秀玲, 吴兴海, 厉艳. 2013. 番茄溃疡病菌的环介导等温核酸扩增技术检测方法. 食品安全质量检测学报, 4(4): 1207–1212]
- Fu HY, Ge DF, Li XY, Wu XB, Chen RK, Gao SJ. 2017. Nested-PCR detection of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, the pathogen of red stripe on sugarcane. *Journal of Plant Protection*, 44(2): 276–

- 282 (in Chinese) [傅华英, 葛丹凤, 李晓燕, 吴小斌, 陈如凯, 高三基. 2017. 甘蔗赤条病菌巢式PCR检测. 植物保护学报, 44(2): 276–282]
- Luo LX, Zhao TC, Li JQ, Zhang L, Li Y, Hasan B. 2004. Progress in research on bacterial canker of tomato caused by *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 37(8): 1144–1150 (in Chinese) [罗来鑫, 赵廷昌, 李健强, 张乐, 李勇, Hasan B. 2004. 番茄细菌性溃疡病研究进展. 中国农业科学, 37(8): 1144–1150]
- Lü QY, Jiang N, Han SN, Li JQ, Luo LX. 2017. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomato seed by loop-mediated isothermal amplification based on virulence gene sequence. *Acta Phytopathologica Sinica*, 47(5): 630–639 (in Chinese) [吕青阳, 蒋娜, 韩思宁, 李健强, 罗来鑫. 2017. 基于致病基因序列的LAMP方法检测番茄种子携带的溃疡病菌. 植物病理学报, 47(5): 630–639]
- Min XH, Liu J, Han YW, Wen ZH, Wang JP, Liu ST, Liu YL, Song R, Shi YB. 2011. Nested-PCR for detection of seed-borne pathogen of tomato bacterial canker, *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 20(7): 28–31 (in Chinese) [闵现华, 刘箐, 韩跃武, 文朝慧, 王军平, 刘姝彤, 刘雅莉, 宋蕤, 施颖波. 2011. 检测种传番茄细菌性溃疡病菌. 西北农业学报, 20(7): 28–31]
- 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
- Tong QB, Chen R, Zhang Y, Yang GJ, Kumagai T, Furushima-Shimogawara R, Lou D, Yang K, Wen LY, Lu SH, et al. 2015. A new surveillance and response tool: risk map of infected *Oncomelania hupensis* detected by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) from pooled samples. *Acta Tropica*, 141(B): 170–177
- Wang NW, Wang T, Shen JG, Hu FP. 2014. Rapid detection for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* using real-time PCR based on padlock probe. *Scientia Agricultura Sinica*, 47(5): 903–911 (in Chinese) [王念武, 王婷, 沈建国, 胡方平. 2014. 基于锁式探针的番茄溃疡病菌实时荧光PCR快速检测. 中国农业科学, 47(5): 903–911]
- Wei HY, Wang X, Li HM, Sun WR, Gu JF. 2016. Loop-mediated isothermal amplification assay for rapid diagnosis of *Meloidogyne mali*. *Journal of Plant Protection*, 43(2): 260–266 (in Chinese) [魏洪岩, 王暄, 李红梅, 孙文荣, 顾建锋. 2016. 采用环介导等温扩增法(LAMP)快速检测苹果根结线虫. 植物保护学报, 43(2): 260–266]
- Yasuharabell J, Kubota R, Jenkins DM, Alvarez AM. 2013. Loop-mediated amplification of the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* *micA* gene is highly specific. *Phytopathology*, 103(12): 1220–1226
- Zhao S, Li JY, Zhou Y, Yang WX, Gui YX, Zhang N, Liu DQ. 2015. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 38(3): 19–23 (in Chinese) [赵赛, 李建娜, 周颖, 杨文香, 贵亚欣, 张娜, 刘大群. 2015. 番茄溃疡病菌LAMP快速检测方法的建立. 河北农业大学学报, 38(3): 19–23]
- 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]

(责任编辑:张俊芳)