

赖宝春, 姚锦爱. 蜜柚间座壳黑点病菌 (*Diaporthe citri*) LAMP 可视化检测技术的建立 [J]. 福建农业学报, 2022, 37 (11): 1470–1475.

LAI B C, YAO J N. Establishment of a LAMP Assay for Rapid Detecting *Diaporthe citri* on Pomelo [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2022, 37 (11): 1470–1475.

蜜柚间座壳黑点病菌 (*Diaporthe citri*) LAMP 可视化检测技术的建立

赖宝春¹, 姚锦爱^{2*}

(1. 漳州市农业科学研究所, 福建 漳州 363005; 2. 福建省作物有害生物监测与治理重点实验室/福建省作物有害生物绿色防控工程研究中心/福建省农业科学院植物保护研究所, 福建 福州 350013)

摘要:【目的】建立一种蜜柚间座壳黑点病菌快速、简便、灵敏的 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 可视化检测方法, 在植株表现症状之前或初期实现病原菌的监测, 为病害的早期监测、诊断及防治提供依据。【方法】以 *EF-1a* (*Elongation factor-1a*) 基因序列为靶序列, 设计了一套 LAMP 特异性引物; 以蜜柚黑点病菌 DNA 为模板, 优化反应温度和反应时间, 建立 LAMP 检测反应体系, 开展特异性和灵敏度验证及田间病株检测。【结果】建立的 LAMP 反应体系可特异有效地检测出蜜柚黑点病菌。该体系最佳反应温度、反应时间分别为 65 °C 和 60 min。灵敏度验证结果表明, LAMP 检测最小质量浓度为 10 fg·μL⁻¹。采用 LAMP 法对 15 份疑似蜜柚黑点病田间样本进行快速检测, 检出率为 100%。【结论】本研究建立的蜜柚间座壳黑点病菌 LAMP 快速检测方法不仅特异性强、灵敏度高, 且检测结果可视, 可用于田间黑点病菌的实时监测和快速检测。

关键词: 蜜柚; 黑点病; 间座壳菌; 环介导等温核酸扩增技术; 检测

中图分类号: S 436

文献标志码: A

文章编号: 1008-0384 (2022) 11-1470-06

Establishment of a LAMP Assay for Rapid Detecting *Diaporthe citri* on Pomelo

LAI Baochun¹, YAO Jinai^{2*}

(1. Zhangzhou Institute of Agricultural Sciences, Zhangzhou, Fujian 363005, China; 2. Fujian Key Laboratory for Monitoring and Integrated Management of Crop Pests/Fujian Engineering Research Center for Green Pest Management, Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 【Objective】A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for visual, rapid, and accurate detection of *Diaporthe citri* on pomelos in early stage of black spot disease was developed. 【Method】Based on the elongation factor-1a (*EF-1a*) sequence of *D. citri*, a set of LAMP primers was designed. Template DNA from the infected leaves was used to establish the optimal temperature and time for the LAMP operation. Assay specificity and sensitivity were verified by positive detection of the infected plants in the field. 【Result】The newly established LAMP method could effectively and specifically detect *D. citri* on pomelo at the optimal temperature of 65 °C with 60 m for the reaction time. The detection limit of the assay on *D. citri* was 10 fg·μL⁻¹. On 15 field samples with the typical black spot symptoms, a 100% positive detection rate was achieved by the LAMP assay. 【Conclusion】The established visual and rapid LAMP assay demonstrated a high specificity, sensitivity, and perfect detection of *D. citri* on diseased pomelo. It was considered appropriate for field application.

Key words: Pomelo; black spot; *Diaporthe citri*; loop-mediated isothermal amplification; detection

收稿日期: 2022-09-01 初稿; 2022-10-10 修改稿

作者简介: 赖宝春 (1979-), 女, 副研究员, 主要从事植物病害生物防治研究 (E-mail: lbc1999@163.com)

* 通信作者: 姚锦爱 (1978-), 女, 研究员, 主要从事植物病害生物防治研究 (E-mail: yaoja@163.com)

基金项目: 福建省科技计划项目 (2020N0057); 福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (STTT2021-2-2); 福建省农业高质量发展超越“5511”协同创新工程项目 (XTCXGC2021017、XTCXGC2021011)

0 引言

【研究意义】蜜柚是漳州平和县的地方名果，至今已有 500 多年的栽培历史，在清代乾隆年间被列为清廷贡品。其味道酸甜，含有丰富的维生素 C 及大量营养元素，是现代追求健康的理想食物。1995 年平和县被命名“中国琯溪蜜柚之乡”，2007 年琯溪蜜柚被认定为中国驰名商标。2008 年，琯溪蜜柚被认定为中国名牌农产品，并被欧盟列为地理标志保护品种。平和县成为中国柚类第一大县，被誉为“世界柚乡”“中国柚都”。自 20 世纪 80 年代开始大面积种植，主要销往欧盟、北美、俄罗斯、东南亚等 40 多个国家和地区。全县现有 40 多万人从事与蜜柚相关的工作，占家庭经济收入的 50%，已成为促进财政增加、农村发展、农民增收、助力乡村振兴的支柱产业^[1]。蜜柚黑点病又称砂皮病、树脂病、褐色蒂腐病，由间座壳属 (*Diaporthe*) 真菌引起，该属真菌是一类非常重要的植物病原真菌类群，它们侵染蜜柚的叶片、果实和枝干的表面，由于寄主的抗病反应，分泌胶质，干燥后形成凸起的细小坚硬的斑点，通常称之为黑点病，严重时果实表面形成沙皮症状。在一些山地果园，该病的为害降低果实外观品质尤为突出，也可引起储运期间烂果，发病果园的病果率一般为 5%~30%，严重时达 80%~100%^[2]。目前蜜柚黑点病防治存在的问题日益凸显，一是单纯依靠化学农药，不重视其他防治方法；二是果园管理粗放，生态环境脆弱。这些问题加重了病害的发生^[3]。因此，为解决上述问题，生产上迫切需要建立一种快速、准确检测蜜柚黑点病菌的方法。在蜜柚果园管理中对黑点病的发生进行实时监测检测，通过监测和检测可以提前做好预测预报，做到早预防，早治疗，可大大减轻病害发生及传播。【前人研究进展】环介导等温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 是日本学者 Notomi 公开发表的适用于基因鉴定的核酸扩增技术。在 60~65 °C 恒温以及链置换 DNA 聚合酶催化的条件下，特异性地针对靶基因的 6 个区域设计 LAMP 引物，能与目标序列的两端结合循环产生环状单链结构，不断地合成新链，15~60 min 即可实现目标基因高效扩增，可将目的基因片段扩增到 $10^9 \sim 10^{10}$ 个数量级，反应中产生副产物焦磷酸镁沉淀可通过肉眼观察，可以看到明显的白色沉淀，为了更加准确地对副产物焦磷酸镁沉淀进行定时定量的监控，可通过实时浊度仪检测浊度和 SYBR 染色检测来观察结果^[4-6]。LAMP 方法和 PCR 反应相比，其优点在于不需要进行反复热变性和反复升降

温这样繁琐且时间较长的操作过程，反应体系置于恒温条件下就可进行持续的快速扩增，经济、便捷，且反应体系稳定可靠。针对基因的 6 个位点进行识别，使其具有很高的灵敏性和特异性，并且能够快速检测病原菌，不受污染样品和干扰片段的影响^[7]。目前该检测技术已成功应用于炭疽菌属 *Colletotrichum* spp.、镰刀菌属 *Fusarium* spp.、疫霉菌属 *Phytophthora* spp. 等植物病原真菌的快速检测^[8-10]。

【本研究切入点】LAMP 检测技术应用于琯溪蜜柚黑点病菌 *Diaporthe citri* 检测的研究有待深入探讨。

【拟解决的关键问题】为了获得特异性和灵敏度高的可用于蜜柚间座壳黑点病菌 LAMP 检测的特异性引物，本研究选取在间座壳菌种的水平上信息丰富保守基因 *EF-1a* (*Elongation factor-1a*) 为靶点，对 *D. citri* 的 *EF-1a* 基因和其他间座壳属真菌的序列进行差异性分析，选取 6 个特定区域，设计了 4 条特异性的 LAMP 引物，建立一种 LAMP 可视化检测方法，以期在蜜柚黑点病发生初期实现病原菌的实时监测和快速准确检测，为病害的早期防控提供依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料及 DNA 提取

供试菌株包括间座壳黑点病菌 *Diaporthe citri*、蜜柚炭疽病菌 *Colletotrichum gloeosporioides*、细极链格孢菌 *Alternaria tenuissima*、禾谷镰孢菌 *Fusarium graminearum*、大斑凸脐蠕孢 *Exserohilum turcicum*、直立帚枝杆孢 *Sarocladium strictum* 和蜜柚黑斑病菌 *Phyllosticta citriasiana*。病原菌在装有 100 mL 马铃薯葡萄糖液体培养基 (每升蒸馏水中含 200 g 马铃薯，20 g 葡萄糖) 的 250 mL 三角烧瓶中，在 26 °C 恒温摇床 $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养 5~6 d；真空过滤收集各菌株菌丝，后冻干 48 h，用 DNA 提取试剂盒 (天根生物技术有限公司) 提取各菌株基因组 DNA，DNA 浓度使用 NanoDrop 2000C 分光光度计测定 (Thermo Fischer Scientific, USA)，DNA 作为 LAMP 检测的模板用无菌双蒸馏水按要求稀释。

1.2 引物设计及合成

采用 DNASTar 6.0 软件对间座壳菌 (*Diaporthe citri*) DNA 序列进行比对，利用在线 LAMP 引物设计软件 Primer software Explorer V4 (<http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html>; Eiken Chemical Co., Japan) 对蜜柚间座壳黑点病菌的高度保守区域 RDRP 和 NP 序列进行引物设计。特异性 LAMP 引物组，包括 1 对外侧引物 F3/B3 和 1 对内侧引物 FIP/BIP 组成，引物序列由上海生工生物技术有限公司合成：F3: 5'-ACG

GAAAATGCTTCCTCTGC-3'; B3: 5'-GGTGGTGGTGA CAAGGATTG-3'; FIP: 5'-CGCCCCCGATATGACGA AG-CGCACTGCACCTCCAATC-3'; BIP: 5'-ACCCCT CGCTTTGGATTTTCCA-AGGGTTTTGGAGTAG GAGA-3'。

1.3 LAMP 反应体系优化

参考李华伟等^[7]的方法建立蜜柚间座壳黑点病菌 LAMP 反应体系 (25 μL)。LAMP 反应温度及时间优化: 将底物 (10 \times Thermolpol 缓冲液 2.5 μL 、8000 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Bst 聚合酶 1 μL 、终浓度为 1.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTPs 3.5 μL 、终浓度为 8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MgSO_4 1.5 μL)、引物 (内侧引物 FIP 和 BIP 各 4 μL 、外侧引物 F3 和 B3 各 2 μL)、模板 DNA 2.5 μg 依次加入 PCR 管混匀, 无菌双蒸水补至 25 μL , 分成 2 组; 1 组用于最佳温度梯度试验, 反应设 60、61、62、63、64、65、66、67 $^{\circ}\text{C}$ 等 8 个温度梯度, 反应时间为 60 min; 另 1 组取前 1 组中最佳反应温度, 后设 30、40、50、60、70 min 等 5 个时间梯度; 两组试验最后分别于 80 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 min, 最后在冰上终止反应; 试验设 3 次重复。LAMP 扩增结果的判定: 反应前在 PCR 管盖内侧加入 2 μL 的 1000 \times SYBR Green I, 反应后瞬时离心将 1000 \times SYBR Green I 离心至管底与 LAMP 反应产物混匀, 观察 LAMP 反应产物颜色判定扩增结果。LAMP 检测结果可靠性验证: 以蜜柚间座壳黑点病菌 DNA 为阳性对照、无菌双蒸水为阴性对照, 利用 LAMP 浊度仪与 SYBR Green I 肉眼观察法同步观察反应结果。

1.4 LAMP 特异性验证

选用蜜柚间座壳黑点病菌 *D. citri* 及蜜柚炭疽病菌 *C. gloeosporioides*, 细极链格孢菌 *A. tenuissima*, 禾谷镰孢菌 *F. graminearum*, 大斑凸脐蠕孢 *E. turcicum*, 直立帚枝杆孢 *S. strictum*, 蜜柚黑斑病菌 *P. citriasiana* 的 DNA 为模板, 以去无菌双蒸水代替 DNA 模板作为阴性对照, 分别用本试验筛选后的特异性 LAMP 引物进行反应, 利用 LAMP 浊度仪与 SYBR Green I 肉眼观察法同步观察反应结果。

LAMP 反应体系与程序: (1) LAMP 反应初始体系: 25 μL 体系中含有 10 \times Thermolpol 缓冲液 2.5 μL 、8000 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Bst 聚合酶 1 μL 、DNA 模板 2.5 μg 、终浓度为 1.6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTPs 3.5 μL 、终浓度为 8 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MgSO_4 1.5 μL 、内侧引物 FIP 和 BIP 各 4 μL (引物浓度 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、外侧引物 F3 和 B3 各 2 μL (引物浓度 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 余量为超纯水。(2) 于实时浊度仪中进行反应, 反应设置为: 65 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min, 80 $^{\circ}\text{C}$ 灭活 5 min。(3) 将产物中加入 1 μL SYBR Green I 进行染色观察。

1.5 LAMP 灵敏度验证

将蜜柚间座壳黑点病菌的 DNA 稀释成 1 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、100 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、10 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、1 $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、100 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、10 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、1 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、0.1 $\text{fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 质量浓度梯度, 每个稀释度分别取 2 μL 模板进行 LAMP 试验, 以无菌双蒸水代替 DNA 模板作为阴性对照, 以建立的 LAMP 最佳反应体系和最佳反应条件进行扩增, 利用 LAMP 浊度仪与 SYBR Green I 肉眼观察法同步观察反应结果, 以确定 LAMP 反应的灵敏度。LAMP 反应初始体系与程序同 1.4。

1.6 田间发病样品的 LAMP 检测

将建立的 LAMP 检测方法对 15 个采自田间自然感染疑似蜜柚黑点病的样本进行检测, LAMP 检测样本 DNA 参照 Lan 等^[11]的方法提取; 同时也采用组织分离法进行检测验证, 组织分离法参照 Yao 等^[12]的方法进行, 将病原菌从病株上分离纯化后, 在显微镜下观察孢子的形态特征, 通过形态学鉴定进行验证。

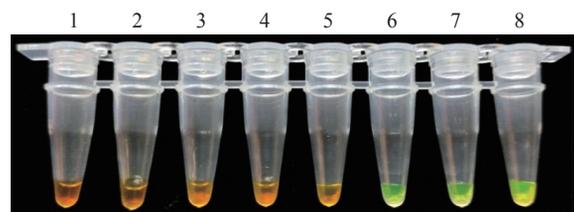
2 结果与分析

2.1 LAMP 检测方法建立

LAMP 反应温度及时间优化结果表明, 在 8 个温度梯度中, 当反应温度为 60~64 $^{\circ}\text{C}$ 时, PCR 产物阴性呈橙黄色, 随着反应温度的提高, 当温度为 65 $^{\circ}\text{C}$ 时 PCR 产物首次阳性呈绿色, 因此确认 65 $^{\circ}\text{C}$ 为反应的最适温度 (图 1); 在 5 个时间梯度中, 当反应时间为 30~50 min 时, PCR 产物阴性呈橙黄色, 随着反应时间的增加, 当时间为 60 min 时 PCR 产物首次阳性呈绿色, 因此确认 60 min 为反应的最适时间 (图 2)。试验结果表明 LAMP 反应温度和时间分别为 65 $^{\circ}\text{C}$ 和 60 min。

2.2 LAMP 特异性检测及灵敏度验证

特异性检测结果显示, 供试菌株中仅有间座壳黑点病菌的 LAMP 反应管呈阳性反应, 其他菌株

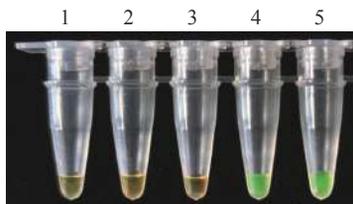


LAMP 产物颜色反应。1: 60 $^{\circ}\text{C}$; 2: 61 $^{\circ}\text{C}$; 3: 62 $^{\circ}\text{C}$; 4: 63 $^{\circ}\text{C}$; 5: 64 $^{\circ}\text{C}$; 6: 65 $^{\circ}\text{C}$; 7: 66 $^{\circ}\text{C}$; 8: 67 $^{\circ}\text{C}$ 。

Color reaction of LAMP products. 1: 60 $^{\circ}\text{C}$; 2: 61 $^{\circ}\text{C}$; 3: 62 $^{\circ}\text{C}$; 4: 63 $^{\circ}\text{C}$; 5: 64 $^{\circ}\text{C}$; 6: 65 $^{\circ}\text{C}$; 7: 66 $^{\circ}\text{C}$; 8: 67 $^{\circ}\text{C}$ 。

图 1 LAMP 反应最佳温度筛选

Fig. 1 Optimal temperature for LAMP assay

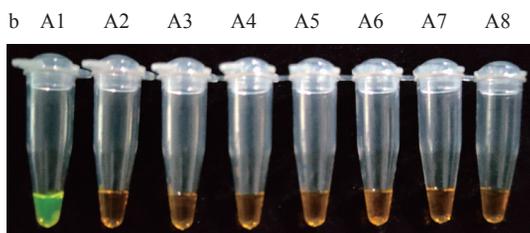
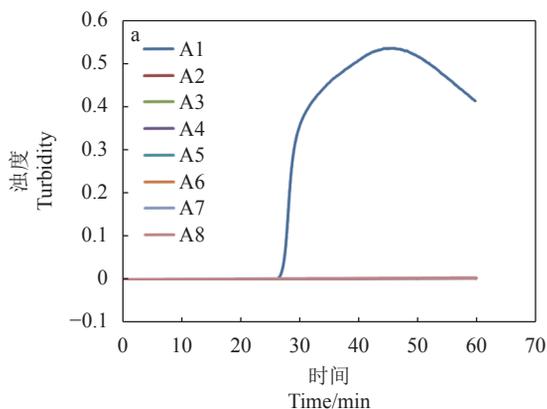


LAMP 产物颜色反应。1: 30 min; 2: 40 min; 3: 50 min; 4: 60 min; 5: 70 min。

Color reaction of LAMP products. 1: 30 min; 2: 40 min; 3: 40 min; 4: 60 min; 5: 70 min.

图 2 LAMP 反应最佳时间测定

Fig. 2 Optimal time for LAMP assay



A1: 间座壳菌; A2: 蜜柚炭疽病菌; A3: 细极链格孢菌; A4: 禾谷镰孢菌; A5: 大斑凸脐蠕孢; A6: 直立帚枝杆孢; A7: 蜜柚黑斑病菌; A8: 空白对照。

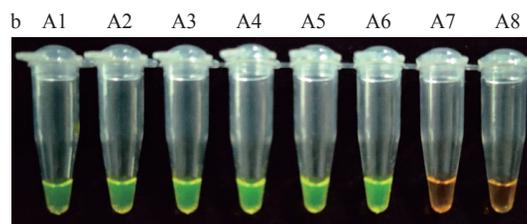
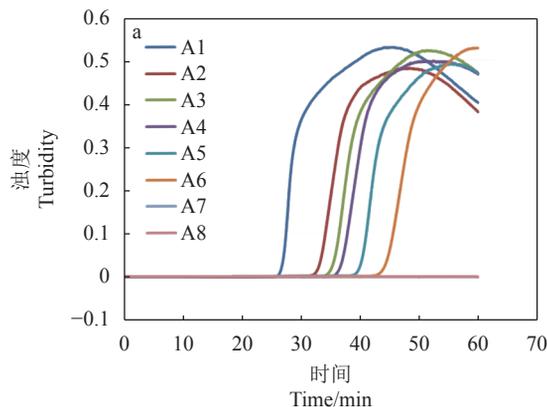
A1: *D. citri*; A2: *Colletotrichum gloeosporioides*; A3: *Alternaria tenuissima*; A4: *Fusarium graminearum*; A5: *Exserohilum turcicum*; A6: *Sarocladium strictum*; A7: *Phyllosticta citriasiana*; A8: blank CK.

图 3 LAMP 检测特异性验证 (a: 扩增曲线; b: LAMP 产物)

Fig. 3 Specificity of LAMP assay (a: primary curve; b: LAMP products)

LAMP 反应管均呈阴性反应 (图 3-a); 进行 LAMP 浊度仪反应, 仅 A1 间座壳黑点病菌菌株出现曲线, 其他 6 株菌株和空白对照均没有产生曲线 (图 3-b)。说明本研究建立的 LAMP 检测方法具特异性, 仅能检出间座壳黑点病菌 *D. citri*。

灵敏度验证结果显示, 当间座壳黑点病菌 *D. citri* 样本 DNA 质量浓度为 $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 时, LAMP 产物呈绿色, 发生阳性反应, 对应的 LAMP 浊度仪反应出现曲线 (图 4-a、b)。试验结果说明本研究建立的 LAMP 检测方法灵敏度高。



A1-8: DNA 质量浓度分别为 $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

A1-8: amplified products using DNA at concentrations of $1 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、 $0.1 \text{ fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。

图 4 LAMP 灵敏度检测验证 (a: 扩增曲线; b: LAMP 产物)

Fig. 4 Sensitivity of LAMP assay (a: primary curve; b: LAMP products)

2.3 田间发病样品的 LAMP 检测

在田间选取的 15 份疑似自然感染蜜柚黑点病的组织样本, 其中 9 份有明显的病斑; 4 份症状不明显, 2 份无发病症状。经 LAMP 检测和组织分离法分别检测结果表明, 田间间座壳黑点病菌的检出率均为 100%。

3 讨论与结论

LAMP 检测技术是新兴的基因扩增技术, 被广泛用于植物病原菌的快速检测, 与 PCR 检测相比, 其可在更短时间、简便地扩增到靶标病原菌^[13]。本研究根据蜜柚间座壳黑点病菌 *D. citri* 的靶标基因序列 *EF-1a* 的 6~8 个特异性区域设计一套特异性 LAMP 引物组, 通过 LAMP 体系优化, 建立了蜜柚间座壳黑点病菌 LAMP 快速检测方法, 其对蜜柚黑点病发病样品的检测结果与组织分离法检测的结果一致, 可用于由间座壳菌引起蜜柚黑点病的田间快速检测。

对于一个酶促反应来讲, 确保酶的活性非常重要, 而温度是影响限制酶活性最重要的因素。Bst DNA 聚合酶反应的最佳温度在 $60 \sim 65 \text{ }^\circ\text{C}$, 在这个反应温度内, DNA 可以同时双链解离和新链延伸, 温度太高会造成酶的失效并且会导致引物无法

与目的片段结合从而降低了扩增效率；如果温度过低，引物之间容易互补配对形成聚集体，甚至出现交叉错配的现象，导致假阳性的结果。为了避免假阳性，保证酶扩增的高效性，本研究对最佳反应温度和时间进行了筛选。结果表明蜜柚黑点病菌 LAMP 体系的最适温度和时间分别为 65 °C 和 60 min。

特异性是 LAMP 检测技术中的一个重要指标，国内外学者在间座壳菌及相关种的 LAMP 检测中利用不同靶标基因序列设计特异性引物^[14-15]，并根据这些特异性引物建立相应的 LAMP 检测体系。*EF-1a* 基因序列信息丰富，有研究表明 *EF-1a* 基因在种间具有一定的保守性，与 *rDNA-ITS*、*RAPD*、*β-tubulin* 等基因相比更具特异性^[16]，说明 *EF-1a* 基因序列适用于间座壳菌 LAMP 引物的设计。本研究选择间座壳黑点病菌的 *EF-1a* 作为靶标基因序列设计 LAMP 特异性引物有效扩增到了供试的间座壳菌分离株，未能扩增所有其他菌株，包括一些密切相关的蜜柚炭疽菌和黑斑病菌等真菌，表现出很高的特异性，进一步为本研究建立的 LAMP 方法的高特异性提供了依据。

灵敏度是 LAMP 检测技术中的另一个重要指标，许多研究结果表明 LAMP 检测灵敏度一般高于相应的 PCR 检测^[17]。本研究建立的 LAMP 方法经优化后，其 DNA 检测最小质量浓度为 10 fg·μL⁻¹，其灵敏度高于沈浩等^[16]以同属的 *Diaporthe phaseolorum* 的 *EF-1a* 基因为靶点设计的 LAMP 方法。

本研究建立的间座壳黑点病菌 LAMP 快速检测技术体系，不仅特异性强、灵敏度高，而且检测结果可视、假阳性低，在田间能快速检测出由间座壳菌黑点病，具有很好的应用推广前景。今后，可进一步对各种不同专化型的靶标基因序列进行探究，建立更加特异、灵敏的黑点菌专化型 LAMP 快速检测技术体系。

参考文献:

- [1] 曾保忠. 琯溪蜜柚主要病害的发生规律与防治措施 [J]. 福建热作科技, 2017, 42 (3): 46-50.
- ZHENG B Z. Occurrence regularity and control measures of main diseases of Guanxi honey pomelo [J]. *Fujian Science & Technology of Tropical Crops*, 2017, 42 (3): 46-50. (in Chinese)
- [2] 赖宝春, 吴顺章, 郑春明, 等. 琯溪蜜柚黑点病的发生规律 [J]. 现代农业科技, 2017 (11): 129-130.
- LAI B C, WU S Z, ZHENG C M, et al. Occurrence regularity of black-dot disease of *Citrus grandis*(L). qsbeck cv. guanximiyou [J]. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2017 (11): 129-130. (in Chinese)
- [3] 赖镇国. “透心甜”琯溪蜜柚黑点病的发生及综合防治技术 [J]. 农技服务, 2017, 34 (5): 82-82,81.
- LAI Z G. Occurrence and comprehensive control of black spot disease of guanxi honey pomelo [J]. *Agricultural Technology Service*, 2017, 34 (5): 82-82,81. (in Chinese)
- [4] DAI T T, LU C C, LU J, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Phytophthora sojae* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 334 (1): 27-34.
- [5] HERRERA-VÁSQUEZ J A, PUCHADES A V, ELVIRA-GONZÁLEZ L, et al. Fast detection by loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of the three *Begomovirus* species infecting tomato in Panama [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2018, 151 (1): 243-250.
- [6] TIAN Q, LU C C, WANG S S, et al. Rapid diagnosis of soybean anthracnose caused by *Colletotrichum truncatum* using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2017, 148 (4): 785-793.
- [7] 李华伟, 许泳清, 罗文彬, 等. 马铃薯S病毒PVSO株系RT-LAMP检测方法的建立及应用 [J]. 园艺学报, 2018, 45 (8): 1613-1620.
- LI H W, XU Y Q, LUO W B, et al. Establishment of Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of Potato virus S Ordinary Strain [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2018, 45 (8): 1613-1620. (in Chinese)
- [8] CHANDRA A, KEIZERWEERD A T, QUE Y X, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of *Colletotrichum falcatum* causing red rot in sugarcane [J]. *Molecular Biology Reports*, 2015, 42 (8): 1309-1316.
- [9] LI G R, HUANG G M, ZHU L H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection of *Phytophthora hibernalis*, *P. syringae* and *P. cambivora* [J]. *Journal of Plant Pathology*, 2019, 101 (1): 51-57.
- [10] SHAN L, ABDUL HASEEB H, ZHANG J, et al. A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for the rapid detection of toxigenic *Fusarium temperatum* in maize stalks and kernels [J]. *Int J Food Microbiol*, 2019, 291: 72-78.
- [11] LAN C Z, RUAN H C, YANG X J, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and specific detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen [J]. *Phytoparasitica*, 2018, 46 (3): 283-293.
- [12] YAO J A, HUANG P, LAN C Z, Stem rot on *Cymbidium ensifolium* (Orchidaceae) caused by *Fusarium oxysporum* in China[J]. *Canada Journal of Plant Pathology*, 2018, 40(1): 105-108.
- [13] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28 (12): e63.
- [14] 杨辉耀. 基于环介导等温扩增技术的大豆南、北方茎溃疡病菌检测技术体系[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- YANG H Y. Visual detection of *Diaporthe phaseolorum*(Cke. &Eill.) Sacc. var. *Meridionalis* Morgan-Jones(DPM) and *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora*(DPC) using Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University,

2014. (in Chinese)
- [15] 沈浩. 大豆茎部病原菌环介导等温扩增技术快速检测的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015.
- SHEN H. Application of loop-mediated isothermal amplication(LAMP) in rapid detection of three soybean stem pathogens[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.
- [16] 沈浩, 戴婷婷, 吴翠萍, 等. 基于环介导等温扩增技术检测大豆北方茎溃疡病菌 [J]. *南京农业大学学报*, 2015 (2): 255-260.
- SHEN H, DAI T T, WU C P, et al. The tef1 α -LAMP method for rapid detection of *Diaporthe phaseolorum* var. *caulivora* [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2015 (2) : 255-260. (in Chinese)
- [17] MENG X L, XIE X W, SHI Y X, et al. Evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay based on hrpZ gene for rapid detection and identification of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* in cucumber leaves [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2017, 122 (2) : 441-449.

(责任编辑: 林海清)