基于实时荧光LAMP的马铃薯黑胫病菌快速可视化检测方法的建立

王海源 王 玥 马永强*

（青海大学农林科学院，青海省农业有害生物综合治理重点实验室，西宁 810016）

摘要：为构建马铃薯黑胫病的主要病原菌马铃薯黑腐果胶杆菌*Pectobacterium atrosepticum*的高效分子检测方法，基于环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）技术，以黑腐果胶杆菌*gyrB*基因的保守片段设计特异性LAMP引物，通过反应体系的筛选和优化，建立马铃薯黑胫病菌快速检测方法。结果表明：LAMP检测体系的最佳反应条件为Mg^{2+} 4 mmol/L、dNTP 1.6 mmol/L、*Bst* 2.0 DNA聚合酶6.4 U/mL、甜菜碱0.3 mol/L、反应温度61 ℃、反应时间40 min；LAMP反应体系对黑腐果胶杆菌的检测具有良好特异性，与其他供试病原菌均无交叉反应，对基因组DNA的最低检测限度为6.4 pg/μL，灵敏度是常规实时荧光定量PCR方法的25倍。利用该检测方法对田间疑似感染黑胫病样本检测的结果与常规PCR方法检测结果一致，表明所建立的可视化LAMP检测方法适用于黑腐果胶杆菌引发的马铃薯黑胫病的早期诊断和田间病情监测。

关键词：马铃薯；黑胫病；LAMP检测；黑腐果胶杆菌

Establishment of rapid detection method for potato blackleg disease based on LAMP real-time fluorescence and visualization

Wang Haiyuan Wang Yue Ma Yongqiang*

（Qinghai Provincial Key Laboratory of Integrated Pest Management in Agriculture, College of Agriculture and Forestry, Qinghai University, Xining 810016, Qinghai Province, China）

Abstract: In order to construct an efficient molecular detection method for *Pectobacterium atrosepticum*, the main pathogen of potato blackleg disease, a rapid detection method was established based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP). The specific LAMP primers were designed based on the conserved region of *gyrB* gene in *P. atrosepticum*, and a rapid detection method for this fungus was established by screening and optimizing the reaction system. The results showed that the optimal reaction conditions for the LAMP detection system were determined as follows: 4 mmol/L Mg^{2+}, 1.6 mmol/L dNTPs, 6.4 U/mL *Bst* 2.0 DNA polymerase, 0.3 mol/L betaine, a reaction temperature of 61 ℃, and a reaction time of 40 min. The LAMP reaction system had high specificity for the detection of *P. atrosepticum*, and had no cross-reaction with other pathogens tested. The minimum detection limit of the genomic DNA was 6.4 pg/μL, and the sensitivity was 25-fold that of the conventional qPCR method. The results of the detection of suspected blackleg samples in the field by this detection method were consistent with those of the conventional PCR method, indicating that the established visual LAMP detection method was suitable for the early diagnosis and field monitoring of potato blackleg disease caused by *P. atrosepticum*.

基金项目：青海省重点研发与转化项目（2025-NK-131）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：mayongqiang_163@163.com

收稿日期：2025-11-15

Key words: potato; potato black leg; LAMP detection; *Pectobacterium atrosepticum*

马铃薯*Solanum tuberosum*是仅次于水稻*Oryza sativa*、小麦*Triticum aestivum*和玉米*Zea mays*的全球第四大粮食作物（石立航等，2010；韩广涛等，2011）。马铃薯营养物质丰富，经济价值较高，具有生长周期短、产量高、适应性广、抗逆性强等特点，兼有粮食、蔬菜、饲料、工业原料等功能，且是潜在的生物质能源，具有极大的发展潜力（卢肖平，2015）。马铃薯在我国北方一作区（东北、西北、华北）、中原二作区、西南混作区以及南方冬作区广泛种植，总种植面积和产量均居世界首位（孔立等，2024）。马铃薯为无性繁殖作物，在生长过程中易受多种病害的威胁，导致产量和品质下降。马铃薯黑胫病是由果胶杆菌属*Pectobacterium* spp.和迪克氏菌属*Dickeya* spp.病原菌引起的一种细菌性病害，主要通过种薯进行传播，在马铃薯各生育期和贮藏期均可发生，被世界各国列为检疫性病害（夏善勇等，2021）。在我国，黑腐果胶杆菌*Pectobacterium atrosepticum*是引起马铃薯黑胫病的主要病原菌（孙平平等，2024），广泛分布于黑龙江、甘肃、河北、宁夏、贵州、云南、青海等省区的马铃薯主产区（孙秀梅，2006；王信等，2018；谭娇娇，2021）。此外，在福建、山东、广东等省份马铃薯产区也有报道（田艳丽等，2018；谭娇娇等，2021）。马铃薯黑胫病作为种传病害具有发病快、死苗率高、难防治等特点，近年来在我国马铃薯产区发生严重，造成了巨大的经济损失（夏善勇等，2021）。为实现对马铃薯黑胫病的有效防治，开发快速便捷的检测方法进行早期诊断对于病害的精准防控至关重要。

目前对马铃薯黑胫病的常用检测方法有分离培养鉴定法、免疫学检测方法和分子检测方法等（Czajkowski et al.，2015）。传统的分离培养和生化鉴定检测周期长、通量低，且需要专业的技术人员（Xu et al.，2016）。免疫学检测技术能将检测时间缩短至几小时（Bu et al.，2021），但也存在一定的局限性，其检测结果的可靠性高度依赖于抗血清的品质，若血清质量不佳，容易导致假阳性或假阴性结果（易汪雪等，2010）；常用的分子生物学方法有聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）、实时荧光定量PCR（quantitative real-time PCR，qPCR）、多重PCR等（Li et al.，2016；Xu et al.，2016），但以上技术的实施需要昂贵的仪器设备和专业的技术人员，且无法满足现场化快速检测的需求。随着新检测技术的不断出现，针对病原菌的检测方法逐渐摆脱实验室检测条件的局限性（李显明等，2020）。环介导等温扩增（loop-mediated isothermal amplification，LAMP）技术是由Notomi et al.（2000）开发的一种新型核酸扩增方法，该技术针对靶基因的6~8个区域设计4~6条特异性引物（包括内引物、外引物及环引物），在*Bst* DNA聚合酶的链置换活性作用下，于60~65 ℃恒温条件下即可实现核酸的高效扩增，仅需基础水浴设备即可完成检测，适合田间和现场的病原快速检测（Leonardo et al.，2001）。LAMP检测方法因其使用方便、成本低、操作简单、无需高成本设备（Ramya et al.，2018）等优点，被广泛应用于真菌（Marek et al.，2024）、细菌（王贤达等，2014；封立平等，2015）、病毒及植物寄生线虫等多种病原体的检测（Atceken et al.，2023）。

本研究以黑腐果胶杆菌的*gyrB*基因为靶标设计LAMP特异性引物，通过引物特异性和灵敏度测试，以及LAMP反应体系的优化，建立快速可视化LAMP检测方法，以期为马铃薯黑胫病的准确诊断及有效预防提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株：黑腐果胶杆菌由青海省农业有害生物综合防治重点实验室分离保存；密执安棒状杆菌*Clavibacter michiganensis*、青枯雷尔氏菌*Ralstonia solanacearum*、胡萝卜软腐果胶杆菌*P. carotovorum*和山葵果胶杆菌*P. wasabiae*由中国农业大学种子病害检验实验室提供。

供试马铃薯样本：从2023年采自青海省海东市乐都区、互助县、西宁市城北区等地的疑似感染黑胫病马铃薯样品中随机抽取6份进行检测验证，同时采集马铃薯健康植株。

供试培养基：LB（Luria-Bertani）液体培养基成分为蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、氯化钠5 g，加水定容到1 000 mL，120 ℃灭菌15 min；添加琼脂粉15 g即为LB固体培养基。

试剂及仪器：*Bst* 2.0 DNA聚合酶、LAMP Fluorescent Dye、$MgSO_4$，美国NEB公司；5 mol/L甜菜碱，美国Sigma-Aldrich公司；SYBR Green I荧光染料、无酶无菌水，北京索莱宝科技有限公司；dNTP Mixture、细菌基因组DNA快速抽提试剂盒，生工生物工程（上海）股份有限公司；PrimerSTAR Max

Premix，日本TaKaRa公司；其他试剂均为国产分析纯。ABI 7500实时荧光定量PCR仪、NanoDrop One微量核酸蛋白测定仪，美国赛默飞公司；ABI-9902 PCR扩增仪，北京五洲东方科技发展有限公司；CD成像系统，北京市六一仪器厂；PowerPac™通用电泳仪，美国Bio-Rad公司。

1.2 方法

1.2.1 黑腐果胶杆菌DNA的提取

取黑腐果胶杆菌供试菌株在LB固体培养基上活化后，挑取单菌落接种至LB液体培养基中于28 ℃、150 r/min下摇培12 h。采用细菌基因组DNA快速抽提试剂盒提取菌株菌液的DNA，用NanoDrop One微量核酸蛋白测定仪检测DNA浓度，当$A_{260\ nm}/A_{280\ nm}$的比值为1.7~1.9时可进行后续试验。

1.2.2 LAMP引物设计与合成

根据GenBank中黑腐果胶杆菌*gyrB*基因（GenBank登录号为JF311591.1）种内保守、种间变异序列，利用在线PrimerExplorer V5（https://primerexplorer.jp/lamp5.0.0/index.html）进行LAMP引物设计，包括内引物FIP和BIP、外引物F3和B3以及环引物LF和LB，引物序列（表1）均由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。

表1 本研究所用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Primer sequence (5′-3′)	长度 Length/bp
F3	GACATCGGCGTGGAAGTG	18
B3	TTCACGCGCATCATCACC	18
FIP	ACCGTCACGCTGCGGAATATTG GTTGCAGTGGAACGATGGTT	42
BIP	GCGATGACCCGTACGCTGAAGG TCGCGCTGATTTTGGAT	39
LF	GGATCCGGCACTTTCACAG	19
LB	CGAATCACTGGTGAACGAAAAGC	23

1.2.3 可视化LAMP检测体系的建立及优化

建立马铃薯黑胫病菌可视化LAMP初反应体系，25 μL反应体系包括10×*Bst* DNA聚合酶反应缓冲液2.5 μL、100 mmol/L Mg^{2+} 1.5 μL、10 mmol/L 3.5 μL dNTP、LAMP引物混合液9 μL，其中10 μmol/L内引物FIP和BIP各4 μL、10 μmol/L外引物F3和B3各0.5 μL、10 μmol/L环引物LF和LB各0.5 μL、8 000 U/mL *Bst* 2.0 DNA聚合酶1 μL、模板DNA 1 μL、ddH_2O 5.5 μL。在PCR扩增仪中进行65 ℃恒温扩增40 min。扩增结束后，向反应混合物中加入SYBR Green I 0.5 μL，于7 000 r/min下离心3~10 s后肉眼观察颜色变化，阳性呈绿色，阴性呈橙色。

为优化可视化LAMP检测体系中内外引物比例以及环引物、Mg^{2+}、dNTP、*Bst* 2.0 DNA聚合酶和甜菜碱的浓度，基于初反应体系进行单因素优化反应体系。变量设置如下：内、外引物浓度比设为1∶4、1∶6、1∶8、1∶10、1∶12、1∶14；环引物浓度为0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 μmol/L；Mg^{2+}浓度为0、2、4、6、8、10 mmol/L；dNTP浓度为0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8 mmol/L；*Bst* 2.0 DNA聚合酶浓度为4.8、6.4、8.0、9.6、11.2、12.8 U/mL；甜菜碱浓度为0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L。反应结束后在其产物中加入SYBR Green I 0.5 μL，观察结果确定各组分最适浓度。同时采用实时荧光LAMP反应对上述结果进行验证，25 μL实时荧光LAMP反应体系：10×*Bst* DNA聚合酶反应缓冲液2.5 μL、100 mmol/L Mg^{2+} 1.5 μL、10 mmol/L dNTP 3.5 μL、LAMP引物混合液9 μL，其中10 μmol/L内引物FIP和BIP各4 μL、10 μmol/L外引物F3和B3各0.5 μL、8 000 U/mL *Bst* 2.0 DNA聚合酶1 μL、模板DNA 1 μL、LAMP Fluorescent Dye 0.5 μL、ddH_2O 6 μL。使用实时荧光定量PCR仪进行实时荧光LAMP，反应程序：65 ℃ 15 s、65 ℃ 45 s；共90个循环，在65 ℃下收集荧光信号。根据不同荧光信号强度判断最佳内外引物比例、环引物浓度，根据阈值时间确定Mg^{2+}、dNTP、*Bst* 2.0 DNA聚合酶和甜菜碱的浓度。

基于优化后的可视化LAMP体系，设置59、61、63、65、67、69 ℃共6个温度梯度，以及10、20、350、40、50、60 min共6个时间梯度，分别对反应温度和反应时间进行优化。以马铃薯黑胫病菌的DNA为模板进行扩增，反应结束后取2.5 μL产物进行1.5%琼脂糖凝胶电泳，根据凝胶条带清晰度确定最佳反应温度与反应时间。

1.2.4 马铃薯黑胫病菌可视化LAMP灵敏度测定

以1.2.1中的马铃薯黑胫病菌DNA为模板，使用NanoDrop One微量核酸蛋白测定仪测定其浓度，并用无酶无菌水进行5倍梯度稀释至500、100、20、4、0.8、0.16 ng/μL和3.2、6.4、1.28 pg/μL共9个浓度，以各稀释度DNA模板，分别采用1.2.3优化后的可视化LAMP体系、实时荧光LAMP反应和以及实时荧光定量聚合酶链式反应（quantitative real-time polymerase chain reaction，qPCR）进行检测，实时荧光LAMP反应体系和程序同1.2.3，比较上述3种方法的灵敏度。20 μL qPCR扩增总体系：2×SG Fast qPCR Master Mix 10 μL、10 μmol/L外引物F3和B3

各0.4 μL、模板DNA 1 μL、DNF Buffer 2 μL、ddH_2O 6.2 μL。使用实时荧光定量PCR仪进行扩增反应，qPCR反应程序为：95 ℃预变性3 min；95 ℃变性3 s，60 ℃退火30 s，72 ℃延伸3 min，共40个循环。

1.2.5　*马铃薯黑胫病菌可视化LAMP特异性测定*

为验证优化后的可视化LAMP检测方法的特异性，以黑腐果胶杆菌为阳性对照，密执安棒状杆菌、青枯雷尔氏菌、胡萝卜软腐果胶杆菌和山葵果胶杆菌为阴性对照，ddH_2O为空白对照，各设3个重复。分别以1.2.3优化后的可视化LAMP体系、实时荧光LAMP和qPCR反应进行特异性检测。可视化LAMP的结果观察方法参考1.2.3；实时荧光LAMP反应体系和程序同1.2.3，qPCR反应体系和程序同1.2.4。实时荧光LAMP和qPCR的阳性对照均扩增并产生S荧光曲线，而阴性对照和空白对照均未扩增且不产生S荧光曲线。对熔解曲线进行分析，若没有双峰，表明在反应过程中没有引物二聚体的形成，说明引物特异性强。

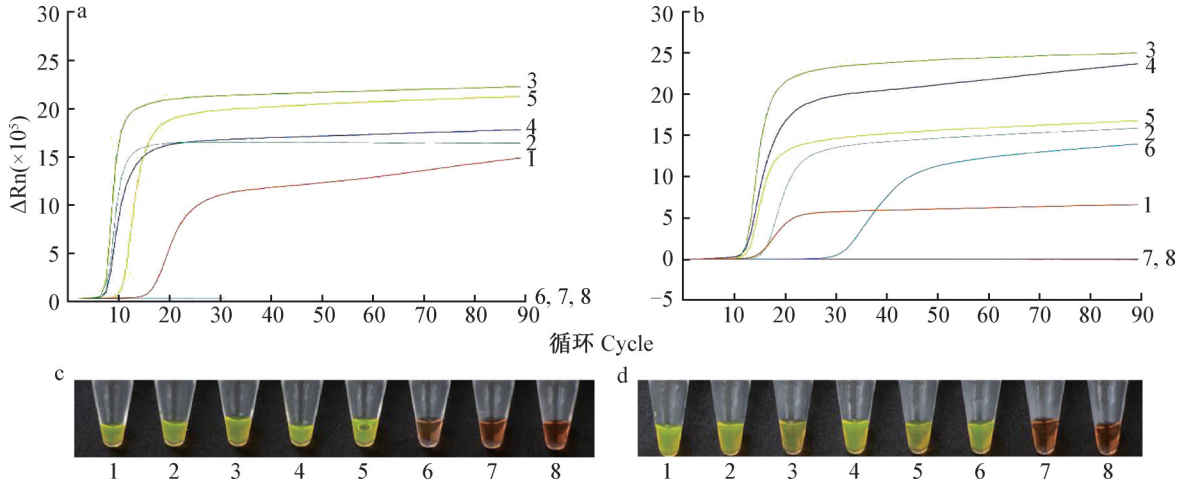
1.2.6　*马铃薯黑胫病菌田间样品检验*

利用所建立的马铃薯黑胫病菌可视化LAMP和常规PCR对6株感染黑胫病马铃薯样本进行检测，以健康植株作为阴性对照，评价可视化LAMP反应方法在田间检测马铃薯黑胫病菌的可行性。可视化LAMP反应体系同1.2.3，在水浴锅中于65 ℃恒温扩增40 min。扩增结束后，向反应混合物中加入SYBR Green I 0.5 μL，于7 000 r/min下离心3~10 s后观察颜色变化，阳性呈绿色，阴性呈橙色。25.0 μL PCR反应体系包括2×Primer STAR Max Premix 12.5 μL、10 μmol/L上游引物F3和下游引物B3各1 μL、DNA模板1 μL、ddH_2O 9.5 μL。PCR扩增程序为：98 ℃预变性2 min；98 ℃变性10 s，55 ℃退火5 s，72 ℃延伸5 s，共30个循环；最后72 ℃延伸5 min。

2　结果与分析

2.1　马铃薯黑胫病菌可视化LAMP检测体系的优化

根据荧光LAMP不同荧光信号强度和可视化LAMP结果判断可知，内外引物最优浓度比为1∶8的比例下实时荧光扩增效率最佳（图1-a、c）；环引物最优浓度为0.4 μmol/L，在此浓度下扩增效率最高（图1-b、d）。后续所有反应均采用上述最优条件进行。



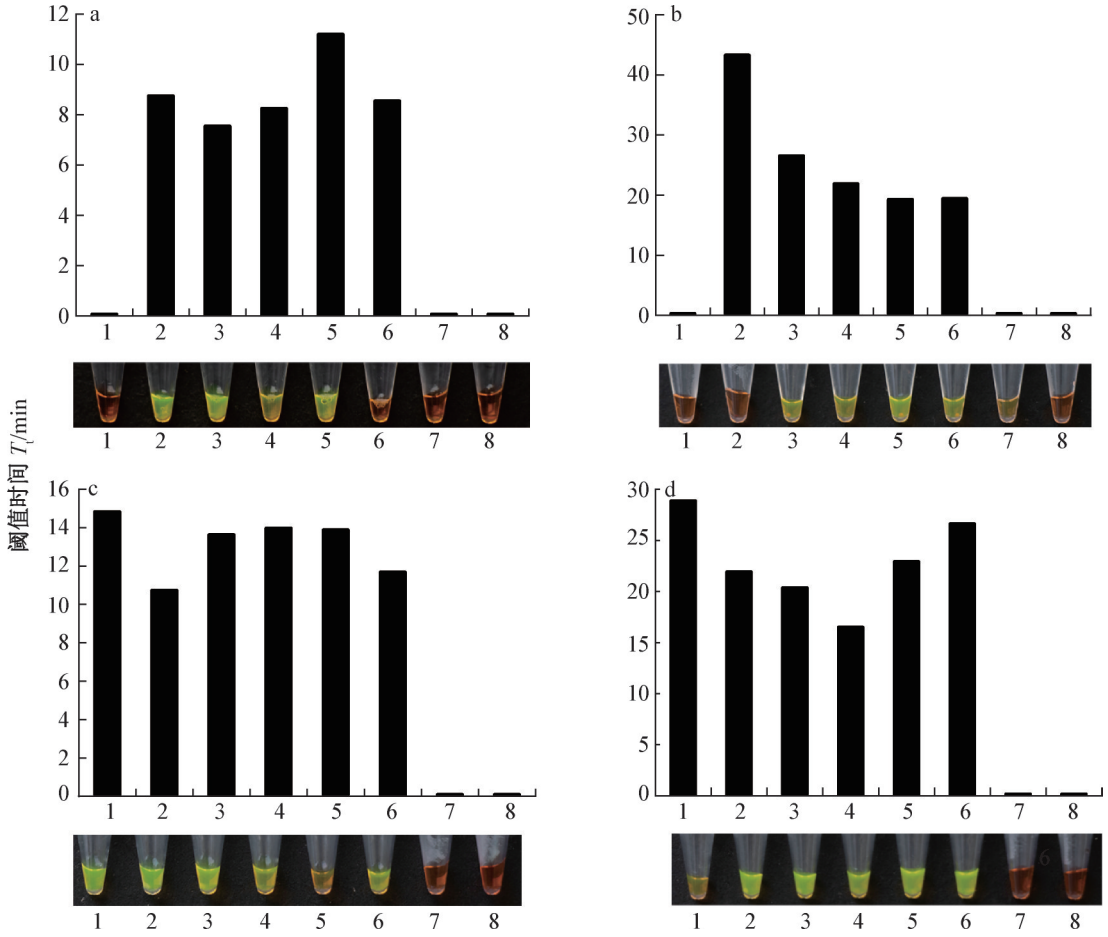
图a和c中1~6分别为内外引物的浓度比1∶4、1∶6、1∶8、1∶10、1∶12和1∶14。图b和d中1~6分别代表环引物浓度0、0.2、0.4、0.6、0.8和1.0 μmol/L。7和8均为ddH_2O。1−6 in fig. a and c: The concentration ratios of inner and outer primers with 1∶4, 1∶6, 1∶8, 1∶10, 1∶12 and 1∶14, respectively. 1−6 in fig. b and d: The concentrations of 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 and 1.0 μmol/L, respectively. 7 and 8: ddH_2O.

图1　荧光LAMP反应和可视化LAMP检测体系内外引物浓度比（a、c）及环引物浓度（b、d）优化

Fig. 1　Optimization of internal and external primer concentration (a, c) ratio and loop primer concentration (b, d) in fluorescent LAMP reaction and visual LAMP detection system

Mg^{2+}浓度在4 mmol/L时观察到显著的低阈值时间，可视化颜色在2、4、6和8 mmol/L中从橙色变成绿色，故Mg^{2+}使用量最佳浓度为4 mmol/L（图2-a）。1.6 mmol/L dNTP浓度下观察到显著的低阈值时间，可视化颜色在1.2、1.4、1.6、1.8时从橙色变为绿色，可确定dNTP最佳使用浓度为1.6 mmol/L（图2-b）。6.4 U/mL *Bst* 2.0 DNA聚合酶浓度下观察到显著的低阈值时间，可视化颜色在4.8、6.4、8.0、9.6、12.8 U/mL时从橙色变为绿色，可确定*Bst* 2.0 DNA聚合酶最佳浓度为6.4 U/mL（图2-c）。0.3 mol/L甜菜碱浓度下

观察到显著的低阈值时间，可视化颜色在0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 mol/L时从橙色变为绿色，故甜菜碱最佳浓度为0.3 mol/L（图2-d）。



各图中上面部分为荧光LAMP反应结果，下面部分为可视化LAMP反应结果。a：Mg^{2+}浓度优化结果，1~6分别为浓度0、2、4、6、8和10 mmol/L。b：dNTP浓度优化结果，1~6分别为浓度0.8、1.0、1.2、1.4、1.6和1.8 mmol/L。c：*Bst* 2.0 DNA聚合酶浓度优化结果，1~6分别为浓度4.8、6.4、8.0、9.6、11.2和12.8 U/mL。d：甜菜碱浓度优化结果，1~6分别为浓度0、0.1、0.2、0.3、0.4和0.5 mol/L。7和8：ddH_2O。The upper part of each diagram is the result of fluorescent LAMP reaction, and the lower part is the result of visual LAMP reaction. a: Mg^{2+} concentration optimization results, 1−6 were the concentration of 0, 2, 4, 6, 8 and 10 mmol/L, respectively. b: dNTP concentration optimization results, 1−6 were dNTP concentration of 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6 and 1.8 mmol/L, respectively. c: *Bst* 2.0 DNA concentration optimization results, 1−6 were *Bst* 2.0 DNA concentration of 4.8, 6.4, 8.0, 9.6, 11.2 and 12.8 U/mL, respectively. d: betaine concentration optimization results, 1−6 were betaine concentration of 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 and 0.5 mol/L, respectively. 7 and 8: ddH_2O.

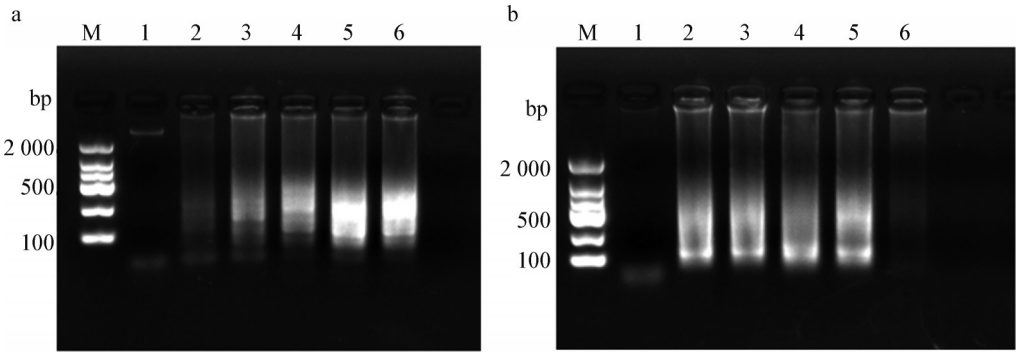
图2 可视化LAMP检测体系各主要组分浓度优化

Fig. 2 Concentration optimization of main components in LAMP visual detection system

反应时间在30 min时开始扩增出条带，40、50和60 min下的条带较为清晰明亮（图3-a），为了节省时间，确定可视化LAMP反应时间为40 min。基于最佳扩增时间，筛选最佳反应温度，结果显示，温度在61、63、65和67 ℃下的电泳条带较为清晰明亮（图3-b），因此选择61 ℃为最优反应温度。

2.2 实时荧光LAMP、可视化LAMP及qPCR灵敏度

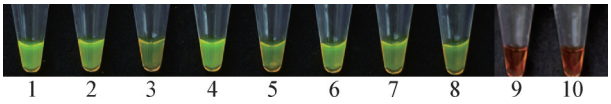
通过对黑腐果胶杆菌基因组DNA进行5倍稀释来评估所建立的LAMP检测方法的检测限度。实时荧光LAMP的扩增曲线显示黑腐果胶杆菌基因组检测限度为6.4 pg/μL；使用优化的可视化LAMP反应体系进行灵敏度检测，最低检测浓度也为6.4 pg/μL（图4），与实时荧光LAMP方法的检测限度一致；qPCR最低检测限度为0.16 ng/μL，可视化LAMP灵敏度是qPCR反应的25倍。



图a中1~6分别为10、20、30、40、50和60 min；图b中1~6分别为59、61、63、65、67和69 ℃。1−6 in fig. a: Reaction time with 10, 20, 30, 40, 50 and 60 min, respectively; 1−6 in fig. b: The reaction temperature with 59, 61, 63, 65, 67 and 69 ℃, respectively.

图3 可视化LAMP检测体系最佳反应温度(a)和最佳反应时间(b)筛选

Fig. 3 Visual LAMP detection system optimal reaction temperature (a) and optimal reaction time (b) screening



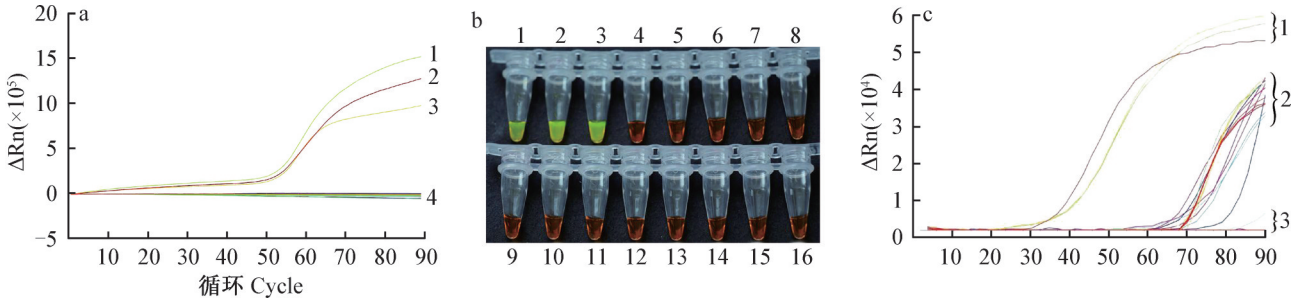
1~9：马铃薯黑胫病菌DNA浓度依次为500、100、20、4、0.8、0.16 ng/μL和3.2、6.4、1.28 pg/μL；10：ddH_2O。1−9: The DNA concentration of potato black shank with 500, 100, 20, 4, 0.8, 0.16 ng/μL and 3.2, 6.4, 1.28 pg/μL; 10: ddH_2O.

图4 可视化LAMP检测体系灵敏性分析

Fig. 4 Sensitivity analysis of visual LAMP detection system

2.3 实时荧光LAMP、可视化LAMP及qPCR特异性

实时荧光LAMP检测结果显示，所有阳性对照均成功扩增并产生荧光曲线，扩增反应的荧光值在65 min内呈指数线性增加（图5-a）。可视化LAMP结果显示，在扩增90 min内，所有阴性对照和空白对照均未检测到导致假阳性的交叉反应（图5-b）。表明本研究设计用于鉴定马铃薯黑胫病菌的LAMP引物具有特异性。与LAMP方法相比，qPCR反应结果中空白对照无扩增曲线，但是也有部分阴性对照出现了扩增曲线（图5-c），表明qPCR反应的特异性较差。



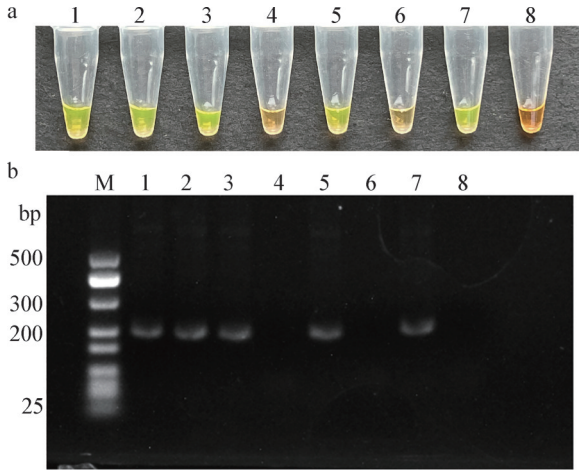
图a中1~3为马铃薯黑胫病菌阳性对照的3次重复，4为密执安棒状杆菌、青枯雷尔氏菌、胡萝卜软腐果胶杆菌、山葵果胶杆菌阴性对照以及空白对照ddH_2O。图b中1~3为马铃薯黑胫病菌，4~6为密执安棒状杆菌，7~9为青枯雷尔氏菌，10~12为胡萝卜软腐果胶杆菌，13~15为山葵果胶杆菌，16为ddH_2O。图c中1为阳性对照，2为扩增出曲线的阴性对照，3为未扩增出曲线的阴性对照和空白对照。1−3 in fig. a are the positive control of *P. atrosepticum* (three repetitions), 4 is the negative control of *C. michiganensis*, *R. solanacearum*, *P. carotovorum*, *P. wasabiae* and blank control ddH_2O. 1−3 in fig. b are *P. atrosepticum*, 4−6 are *C. michiganensis*, 7−9 are *Ralstonia solanacearum*, 10−12 are *P. carotovorum*, 13−15 are *P. wasabiae*, and 16 is ddH_2O. 1 in fig. c is positive control, 2 is the negative control of the amplified curve, and 3 is the negative control and blank control of the unamplified curve.

图5 马铃薯黑胫病菌的实时荧光LAMP(a)、可视化LAMP(b)和qPCR(c)特异性检测

Fig. 5 Specific detection of potato black shank by real-time fluorescent LAMP (a), visual LAMP (b) and qPCR (c)

2.4 田间样品中病原菌的检测

利用已优化的可视化LAMP体系和普通PCR方法对田间样本进行检测，结果显示，6份样品中有4份为阳性，2份为阴性，可视化LAMP结果与普通PCR检测结果一致（图6），表明建立的LAMP检测方法可以有效检测到马铃薯黑胫病菌。



图中1~6为田间疑似样品，7为阳性对照，8为阴性对照。1–6 in figure are suspected samples in the field, 7 is positive control, and 8 is negative control.

图6 马铃薯田间发病组织上黑腐果胶杆菌的可视化LAMP体系检测(a)和普通PCR检测(b)

Fig. 6 Visual LAMP system detection (a) and ordinary PCR detection (b) of *Pectobacterium nigrum* in potato field diseased tissues

3 讨论

实时荧光LAMP方法可以直观、实时地观察反应进度，但需要实时荧光扩增仪进行检测，不适用于现场快速检测。基于比色法的可视化LAMP检测可以消除仪器的局限性，无需昂贵仪器，仅需恒温装置即可实现反应，在加入荧光染料后可肉眼判读结果，具有耗时短、成本低、灵敏度高等优点，已被广泛应用于多种病害检测。在植物病毒病的检测中，武文娟(2023)建立了大豆花叶病毒(soybean mosaic virus，SMV)的可视化LAMP检测体系；在细菌病害检测中，李镇希等(2022)建立了柑橘黄龙病菌*Candidatus* Liberibacter asiaticus的可视化LAMP检测方法；李冉等(2023)运用该技术检测表皮葡萄球菌*Staphylococcus epidermidis*。本研究针对马铃薯黑腐果胶杆菌的*gyrB*基因保守区域设计LAMP引物，建立了一种快速可视化检测方法。该方法在61 ℃下反应40 min即可实现马铃薯黑腐果胶杆菌检测，检测限达6.4 pg/μL。

LAMP反应需要4条基本引物、2条外引物(F3、B3)和2条内引物(FIP、BIP)，在*Bst* 2.0 DNA聚合酶作用下实现恒温扩增，能够通过琼脂糖凝胶电泳或荧光染料显色验证LAMP扩增结果(Notomi et al.，2000)。本研究在引物设计过程中利用多序列比对分析软件筛选种间变异较小的保守基因序列设计引物，并通过近缘菌株进行特异性验证，确保了引物良好的特异性。有研究表明，环引物的添加能够提高LAMP反应速率(Lim et al.，2013)，本研究通过设计添加2条环引物，反应时间相较于Ren et al.(2025)的研究结果缩短了20 min。蒋子娟等(2023)研究认为Mg^{2+}浓度过高或者过低均会抑制LAMP反应，反应温度对反应沉淀颜色有一定影响，而反应时间对结果影响较小。本研究优化结果显示，内外引物浓度比、环引物浓度、反应温度、dNTP浓度、甜菜碱含量和Mg^{2+}含量对可视化检测体系的影响均比较明显，而反应时间对可视化检测体系的影响相对较小。这一研究结果与蒋子娟等(2023)的研究结果一致。由此可见，反应中各组分浓度对检测体系的稳定性至关重要。有研究表明，高浓度的引物可能会增加引物二聚体诱导的非特异性扩增的产生(Ren et al.，2025)，而甜菜碱可以通过减少与靶DNA无关序列的扩增来提高靶DNA扩增的选择性，并能减少碱基堆积来提高总体反应速率(Notomi et al.，2000)。因此，本研究将甜菜碱加入可视化LAMP反应体系，减少了引物二聚体的形成，抑制产生假阳性的风险。

灵敏度检测结果表明，实时荧光LAMP与可视化LAMP两种方法的最低检测限度均为6.4 pg/μL，其灵敏度是qPCR方法的25倍，表明可视化LAMP灵敏度优于qPCR。Zand et al.(2026)也获得类似结果，其采用LAMP检测方法检测蜜环菌*Armillaria mellea*，灵敏度达到0.1 fg/μL，比qPCR方法具有更高的灵敏度。

综上所述，本研究基于实时荧光LAMP技术建立了一种针对黑腐果胶杆菌的快速可视化检测方法，其灵敏度高、特异性强，且在扩增结束后仅需加入SYBR Green I染料即可通过观察管内反应液颜色变化实现结果的判定，极大简化了检测流程，提高了检测效率。该方法适用于马铃薯黑胫病的早期诊断，可为马铃薯黑胫病早期预警及防治提供科学依据。

参 考 文 献 (References)

Atceken N, Munzer Alseed M, Dabbagh SR, Yetisen AK, Tasoglu S, 2023. Point-of-care diagnostic platforms for loop-mediated isothermal amplification[J]. Advanced Engineering Materials, 25(8): 2201174

Bu SJ, Liu X, Wang Z, Wei HG, Yu SL, Li ZY, Hao Z, Liu WS, Wan

JY, 2021. Ultrasensitive detection of pathogenic bacteria by CRISPR/Cas12a coupling with a primer exchange reaction[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 347: 130630

Czajkowski R, Pérombelon MCM, Jafra S, Lojkowska E, Potrykus M, van der Wolf JM, Sledz W, 2015. Detection, identification and differentiation of *Pectobacterium* and *Dickeya* species causing potato blackleg and tuber soft rot: a review[J]. Annals of Applied Biology, 166(1): 18−38

Feng LP, Ni X, Wu XH, Lun CZ, Wu CP, Luan J, 2015. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii*[J]. 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, 2015. 玉米细菌性枯萎病菌的环介导恒温扩增(LAMP)检测方法[J]. 植物保护学报, 42(3): 347−352]

Han GT, Yang ZH, Zhu JH, Zhao DM, Han YQ, 2011. Development of duplex PCR assay for detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* and *Pectobacterium atroseptica* from potato[J]. Scientia Agricultura Sinica, 44(20): 4199−4206 (in Chinese) [韩广涛, 杨志辉, 朱杰华, 赵冬梅, 韩彦卿, 2011. 双重PCR技术检测马铃薯环腐病菌和黑胫病菌方法的建立[J]. 中国农业科学, 44(20): 4199−4206]

Jiang ZJ, Long P, He ZM, Chen ZH, 2023. Rapid and visual detection of *Lepiota brunneoincarnata* based on loop-mediated isothermal amplification[J]. Journal of Fungal Research, 21(S1): 207−213 (in Chinese) [蒋子娟, 龙攀, 何正蜜, 陈作红, 2023. 利用环介导等温扩增技术快速可视化检测肉褐鳞环柄菇[J]. 菌物研究, 21(增刊1): 207−213]

Kong L, Li D, Chen F, 2024. The policy effects of potato industry development under the concept of big food[J]. World Agriculture(6): 111−122 (in Chinese) [孔立, 李丹, 陈峰, 2024. 大食物观下马铃薯产业发展的政策效应研究[J]. 世界农业(6): 111−122]

Leonardo S, Toldrà A, Campàs M, 2021. Biosensors based on isothermal DNA amplification for bacterial detection in food safety and environmental monitoring[J]. Sensors, 21(2): 602

Li F, Xie GY, Zhou BQ, Yu P, Yu S, Aguilar ZP, Wei H, Xu HY, 2016. Rapid and simultaneous detection of viable *Cronobacter sakazakii*, *Staphylococcus aureus*, and *Bacillus cereus* in infant food products by PMA-mPCR assay with internal amplification control[J]. LWT-Food Science and Technology, 74: 176−182

Li R, Xue J, Guo WP, Kang JM, Liu JX, 2023. Development of loop-mediated isothermal amplification for rapid and visual detection of *Staphylococcus epidermidis*[J]. Journal of Chengde Medical College, 40(6): 456−460 (in Chinese) [李冉, 薛晶, 郭文平, 康精萌, 刘金霞, 2023. 环介导等温扩增技术可视化快速检测表皮葡萄球菌方法的建立[J]. 承德医学院学报, 40(6): 456−460]

Li XM, Zheng T, Gao L, Li F, Hou XD, Wu P, 2020. Recombinase polymerase amplification: from principle to performance[J]. Chemical Journal of Chinese Universities, 41(12): 2587−2597 (in Chinese) [李显明, 郑婷, 高露, 李峰, 侯贤灯, 吴鹏, 2020. 重组酶聚合酶扩增: 扩增原理及性能分析[J]. 高等学校化学学报, 41(12): 2587−2597]

Li ZX, Li WT, Huang JQ, Zheng Z, Xu MR, Deng XL, 2022. Detection of '*Candidatus* Liberibacter asiaticus' by membrane adsorption method combined with visual loop-mediated isothermal amplification[J]. Scientia Agricultura Sinica, 55(1): 74−84 (in Chinese) [李镇希, 李文婷, 黄家权, 郑正, 许美容, 邓晓玲, 2022. 膜吸附法结合可视化环介导等温扩增技术检测柑橘黄龙病菌[J]. 中国农业科学, 55(1): 74−84]

Lim KT, Teh CSJ, Thong KL, 2013. Loop-mediated isothermal amplification assay for the rapid detection of *Staphylococcus aureus*[J]. BioMed Research International, 2013: 895816

Lu XP, 2015. Strategy of potato as staple food: significance, bottlenecks and policy suggestions[J]. Journal of Huazhong Agricultural University (Social Sciences Edition)(3): 1−7 (in Chinese) [卢肖平, 2015. 马铃薯主粮化战略的意义、瓶颈与政策建议[J]. 华中农业大学学报(社会科学版)(3): 1−7]

Marek D, Eberl D, Otba K, Walter R, Kortekamp A, Schwab W, Niessen L, 2024. Detection of esca-associated fungi in grapevine trunks using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays[J]. Annals of Applied Biology, 184(2): 226−237

Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T, 2000. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 28(12): 63

Ramya M, Kayalvizhi M, Haripriya G, Rathinasabapathi P, 2018. Detection of microcystin-producing cyanobacteria in water samples using loop-mediated isothermal amplification targeting *mcyB* gene[J]. 3 Biotech, 8(9): 378

Ren LY, Wen K, Cheng BP, Jin JH, Srivastava V, Chen XR, 2025. Rapid detection of the phytopathogenic oomycete *Phytopythium helicoides* with a visualized loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Brazilian Journal of Microbiology, 56(1): 563−572

Shi LH, Hu J, Meng ML, Liu BY, 2010. The investigation of potato disease of North China region of storage and identification of pathogens[J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science Edition), 31(4): 53−57 (in Chinese) [石立航, 胡俊, 蒙美莲, 刘宝玉, 2010. 华北地区马铃薯贮藏病害种类调查及病原菌鉴定[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 31(4): 53−57]

Sun PP, Zhang L, Wei X, Zhang JD, Xia ZF, Li ZN, 2024. Isolation and whole genome analysis of a pathogenic bacterial strain causing potato blackleg in Wuchuan County, Inner Mongolia Autonomous Region[J]. Journal of Plant Protection, 51(4): 794−803 (in Chinese) [孙平平, 张磊, 魏旭, 张竞丹, 夏占峰, 李正男, 2024. 一株内蒙古自治区武川县马铃薯黑胫病菌的分离鉴定及全基因组分析[J]. 植物保护学报, 51(4): 794−803]

Sun XM, 2006. The occurrence and control of potato *Erwinia carotovara* pv. atroseptica in Heilongjiang Province[J]. Bulletin of Agricultural Science and Technology(12): 41 (in Chinese) [孙秀梅, 2006. 黑龙江省马铃薯黑胫病的发生与防治[J]. 农业科技通讯(12): 41]

Tan JJ, 2021. Isolation and identification of potato black leg pathogen in Ningxia and establishment of a fluorescence quantitative PCR detection system[D]. Yinchuan: Ningxia University (in Chinese) [谭娇娇, 2021. 宁夏马铃薯黑胫病菌的分离鉴定及荧光定量PCR检测体系建立[D]. 银川: 宁夏大学]

Tian JJ, Guo CJ, Wang XG, Guo RJ, Shen RQ, Li SD, 2021. Occurrence, distribution and pathogen identification of potato blackleg in Ningxia[C]//Peng YL, Song BA. Innovation in plant pathology and green control: Proceedings of 2021 Annual Conference of Chinese Society for Plant Pathology. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, pp. 371 (in Chinese) [谭娇娇, 郭成瑾, 王喜刚, 郭荣君, 沈瑞清, 李世东, 2021. 宁夏马铃薯黑胫病发生分布和病原菌鉴定[C]//彭友良, 宋宝安. 植物病理科技创新与绿色防控: 中国植物病理学会2021年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社 pp. 371]

Tian YL, Hu XD, Zhao YQ, Sun T, Zhou JJ, Fan JQ, Hu BS, 2018. Isolation and identification of the pathogen causing potato black leg in Inner Mongolia[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 48(6): 721−727 (in Chinese) [田艳丽, 胡旭东, 赵玉强, 孙婷, 周家菊, 范加勤, 胡白石, 2018. 内蒙古马铃薯黑胫病病原菌的分离和鉴定[J]. 植物病理学报, 48(6): 721−727]

Wang DG, Brewster JD, Paul M, Tomasula PM, 2015. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification[J]. Molecules, 20(4): 6048−6059

Wang X, Cheng L, Wang YY, Gao XS, Li SL, 2018. Identification of pathogen of potato black shank disease in Qinghai Province[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 30(8): 1369−1375 (in Chinese) [王信, 程亮, 王亚艺, 高旭升, 李松龄, 2018. 青海省马铃薯黑胫病病原菌的鉴定[J]. 浙江农业学报, 30(8): 1369−1375]

Wang XD, Lin XJ, Hu HQ, Wang ZH, Fan GC, 2014. Establishment and application of visual loop-mediated amplification assay on citrus Huanglongbing[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 35(5): 918−924 (in Chinese) [王贤达, 林雄杰, 胡菡青, 王宗华, 范国成, 2014. 柑橘黄龙病可视化LAMP检测技术的建立及应用[J]. 热带作物学报, 35(5): 918−924]

Wu WJ, 2023. Visual detection of soybean mosaic virus SC4 and SC7 based on loop mediated isothermal amplification[D]. Taigu: Shanxi Agricultural University (in Chinese) [武文娟, 2023. 基于环介导等温扩增可视化检测大豆花叶病毒SC4和SC7的研究[D]. 太谷: 山西农业大学]

Xia SY, Niu ZM, Li QQ, Sheng WM, 2021. Occurrence characteristics and control research progress of potato blackleg in China[J]. Xinjiang Farm Research of Science and Technology, 44(5): 31−33 (in Chinese) [夏善勇, 牛志敏, 李庆全, 盛万民, 2021. 我国马铃薯黑胫病发生特点及防治研究进展[J]. 新疆农垦科技, 44(5): 31−33]

Xu YG, Liu ZM, Zhang BQ, Qu M, Mo CS, Luo J, Li SL, 2016. Development of a novel target-enriched multiplex PCR (tem-PCR) assay for simultaneous detection of five foodborne pathogens[J]. Food Control, 64: 54−59

Yi WX, Chen SS, Yang CY, Yu C, 2010. The application and prospect of high-throughput detection in plant virus quarantine[J]. Hunan Agricultural Sciences(9): 105−108, 111 (in Chinese) [易汪雪, 陈舜胜, 杨翠云, 于翠, 2010. 高通量检测技术在植物病毒检疫中的研究应用及前景[J]. 湖南农业科学(9): 105−108, 111]

Zand N, Jafary H, Rasouli D, 2026. Development and comparison of a LAMP assay with PCR-based methods for detecting *Armillaria mellea* in soil and root samples[J]. Plant Pathology, 75: e70076

（责任编辑：王 璇）