

袁婷, 罗龙辉, 张雪吟, 等. 茄科雷尔氏菌 IMSA-LAMP 检测方法的建立 [J]. 华南农业大学学报, 2022, 43(4): 89-98.

YUAN Ting, LUO Longhui, ZHANG Xueyin, et al. Establishment of IMSA-LAMP detection method for *Ralstonia solanacearum* [J]. Journal of South China Agricultural University, 2022, 43(4): 89-98.

茄科雷尔氏菌 IMSA-LAMP 检测方法的建立

袁 婷, 罗龙辉, 张雪吟, 刘吉平

(华南农业大学 动物科学学院/亚太地区蚕桑培训中心, 广东 广州 510642)

摘要:【目的】桑树青枯病是由茄科雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 引起的一种危害严重的细菌性病害, 建立一种快速、灵敏的茄科雷尔氏菌检测方法, 对桑树青枯病的有效控制有重要意义。【方法】本研究以茄科雷尔氏菌果胶裂解酶基因 (Pectate lyase gene) 为靶标, 基于等温多自配引发扩增技术 (Isothermal multiple self-matching-initiated amplification, IMSA) 的引物设计原理, 结合环介导等温扩增技术 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 的反应体系, 建立一种快速有效检测茄科雷尔氏菌的 IMSA-LAMP 法, 并对该方法的最佳反应参数进行了筛选。【结果】基于果胶裂解酶基因建立的 IMSA-LAMP 检测方法在 64.5 °C 条件下, 45 min 内可完成对阳性样品的特异检测, 对茄科雷尔氏菌的模板 DNA 检测灵敏度达 200 fg/μL (对应菌为 1×10^2 CFU/mL); 对生产上收集的疑似桑树青枯病病样的检出率为 87.5%。【结论】IMSA-LAMP 检测方法具有良好的实用性, 可为桑树青枯病的快速检测、诊断与防疫提供新的技术支持。

关键词: 桑树青枯病; IMSA-LAMP; 茄科雷尔氏菌; 果胶裂解酶基因

中图分类号: S432.42

文献标志码: A

文章编号: 1001-411X(2022)04-0089-10

Establishment of IMSA-LAMP detection method for *Ralstonia solanacearum*

YUAN Ting, LUO Longhui, ZHANG Xueyin, LIU Jiping

(College of Animal Science, South China Agricultural University/Regional Sericulture Training
Center For Asia-Pacific, Guangzhou 510642, China)

Abstract: 【Objective】Mulberry bacterial wilt is a seriously harmful bacterial disease caused by *Ralstonia solanacearum*. Therefore, it is of great significance to establish a rapid and sensitive detection method for *R. solanacearum* to effectively control mulberry bacterial wilt. 【Method】Pectate lyase gene of *R. solanacearum* was used as the target. Based on the primer design principle of isothermal multiple self-matching-initiated amplification (IMSA), combining the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction system, a rapid and effective IMSA-LAMP method for detection of *R. solanacearum* was established. The optimal reaction parameters of this method were screened. 【Result】The IMSA-LAMP method based on pectate lyase gene could complete the specific detection of positive samples within 45 min at 64.5 °C, and the detection sensitivity of *R. solanacearum* template DNA was 200 fg/μL (the corresponding bacteria detection sensitivity was 1×10^2 CFU/mL); The detection rate of suspected mulberry bacterial wilt samples collected in production was 87.5%. 【Conclusion】This method has good practicability and can provide new technical support for the rapid

收稿日期: 2022-03-09 网络首发时间: 2022-05-13 14:30:21

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20220512.1854.010.html>

作者简介: 袁 婷, 硕士研究生, 主要从事植物病害防控研究, E-mail: yuanting361@163.com; 通信作者: 刘吉平, 教授, 博士, 主要从事蚕桑病虫害防控等研究, E-mail: liujiping@scau.edu.cn

基金项目: 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系

detection, diagnosis and epidemic prevention of mulberry bacterial wilt.

Key words: Mulberry bacterial wilt; IMSA-LAMP; *Ralstonia solanacearum*; Pectate lyase gene

桑树是一种药食同源的多年生木本植物, 广泛应用于医药、食品、畜牧养殖等各个行业中^[1-3]。桑树病害的发生一直制约着蚕桑产业的健康稳定发展, 其中, 桑树青枯病作为一种毁灭性的细菌性检疫病害, 严重影响了桑树的产量和质量^[4]。1969 年广东省顺德市首次报道了桑树青枯病的发生^[5], 随后传播至广东大部分的桑树种植区。至今, 桑青枯病仍在广东、广西等地的蚕桑主产区流行发生, 并在全国范围内的桑园种植地多有发生报道^[6-7]。桑树青枯病的病原菌为茄科雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum*, 茄科雷尔氏菌的寄主范围广, 能感染桑树在内的 450 余种植物的根或茎, 根据其针对不同寄主致病性差异的分类报道, 侵染桑树的茄科雷尔氏菌多为 5 号生理小种^[8-9]。由于茄科雷尔氏菌种类多, 存在不同的致病变种, 且致病机理复杂又危害严重, 被世界各国的检疫部门列入植物生产和出口贸易的重点检疫对象^[10-12]。

建立高效快速的桑树青枯病病原茄科雷尔氏菌检测技术, 不仅对桑树苗木的流通和检疫提供技术支持、为桑树产业的健康稳定发展保驾护航, 还对各种作物青枯病的防控有重要的参考价值。目前, 有关青枯病的病原菌茄科雷尔氏菌的分子检测技术主要有各种的聚合酶链式反应 (PCR) 法^[13-14] 和环介导等温扩增 (Loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术^[15]。然而这 2 种检测技术在实际应用中均存在一定的局限性, 如 PCR 法检测时间相对较长, 灵敏度低, 在桑树青枯病的检测中效果不明显^[16]; 而 LAMP 技术虽有检测灵敏度高、反应时间短等优点, 但环境的气溶胶往往影响检测结

果的可靠性或引起假阳性^[17-18]。等温多自配引发扩增 (Isothermal multiple self-matching-initiated amplification, IMSA) 技术是 2015 年马学军团队发明的一种新型核酸扩增技术^[19-20], 该技术主要针对靶基因设计 6 条引物, 并能特异性地识别 7 个基因位点, 与 LAMP 和荧光定量 PCR 相比具有更强的特异性及更高的灵敏度, 在食品安全、动物健康养殖、人畜共患病原菌的检测应用中证实是可靠的^[21-24], 但有关 IMSA 检测植物病原菌特别是桑树青枯病病原的报道较少。

本研究拟以茄科雷尔氏菌果胶裂解酶基因 (Pectate lyase gene) 为靶标, 尝试融合 IMSA 引物设计策略和 LAMP 扩增反应的技术体系, 建立一种快速高效的茄科雷尔氏菌 IMSA-LAMP 检测技术, 并对其反应体系和实用性等进行优化, 以期对桑树细菌病检测、桑树青枯病检疫和桑树种苗的流通提供新的检测技术和手段。

1 材料与方法

1.1 供试材料

2020—2021 年从广东、广西两地的桑园采集了疑似桑青枯病症状的茎及根共 24 份, 如表 1 所示。

桑青枯病病原菌茄科雷尔氏菌菌株 YZqk1、YLqk1(GDMCC No.: 1.1615)、XZqk2(GDMCC No.: 1.1619)、XCqk4(GDMCC No.: 1.1616)、LZqk5(GDMCC No.: 1.1617)、YDqk6(GDMCC No.: 1.1620) 和其他桑源细菌菌株: 阴沟肠杆菌 XCYG-001(GDMCC No.: 1.1600)、克雷伯氏菌 LCKL-001(GDMCC No.: 1.1602)、菠萝泛菌 LCFJ-

表 1 桑树青枯病田间病样
Table 1 Field samples of mulberry bacterial wilt

地区 District	坐标 Coordinate	品种 Cultivar	数量 Quantity
广东阳山 Yangshan, Guangdong	E112.641°, N24.465°	伦敦40 Lunjiao 40	2
广东罗定 Luoding, Guangdong	E111.570°, N22.768°	伦敦40 Lunjiao 40	2
广东广州 Guangzhou, Guangdong	E113.359°, N23.170°	伦敦40 Lunjiao 40	2
广东英德 Yingde, Guangdong	E113.454°, N24.179°	伦敦40 Lunjiao 40	3
广西都安 Du'an, Guangxi	E108.105°, N23.931°	粤桑11 Yuesang 11	3
广西来宾 Laibin, Guangxi	E109.234°, N23.727°	粤桑11 Yuesang 11	4
广西环江 Huanjiang, Guangxi	E108.258°, N24.826°	农桑14 Yuesang 11	2
广西忻城 Xincheng, Guangxi	E108.665°, N24.066°	粤桑11 Yuesang 11	2
广西宜州 Yizhou, Guangxi	E108.636°, N24.485°	粤桑11 Yuesang 11	4

001(GDMCC No.: 1.1601)、铜绿假单胞菌 YD-001(GDMCC No.: 60613)、丁香假单胞菌 ZJDX-003(GDMCC No.: 61844)、多黏类芽孢杆菌 YD-002(GDMCC No.: 61095)、短小杆菌 YDDX-001、芽孢杆菌 YD-003, 均由华南农业大学亚太地区蚕桑培训中心实验室分离鉴定, 含 GDMCC No. 的菌种由广东省菌种保藏中心保藏。

1.2 供试菌株培养

30 ℃ 条件下, 将茄科雷尔氏菌菌株置于 TTC 琼脂培养基^[25] 培养 5 d, 将非茄科雷尔氏菌菌株接种于 LB 琼脂培养基^[25] 培养 2 d。

1.3 细菌、疑似桑树青枯病病样及健康桑树 DNA 提取

供试细菌根据 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司, 以下简称 “生工”] 说明书提取总 DNA。供试病样及健康桑树样本根据 Ezup 柱式植物总 DNA 抽提试剂盒 (生工) 说明书提取总 DNA。DNA 提取后, 利用微量分光光度计 (NDlife) 进行浓度测定, 用 TE 缓冲液稀释到 10 ng/μL 左右, -20 ℃ 保存备用, 作为后续检测的模板。

1.4 IMSA-LAMP 引物设计与合成

IMSA-LAMP 引物设计, 如图 1A 所示, 在

IMSA-LAMP 检测中使用了 6 种引物, 包括 2 种茎引物 (SteF 和 SteR) 和 2 对嵌套杂交引物 (2 个外引物 DsF 和 DsR 和 2 个内引物 FIT 和 RIT); 引物特异性识别靶基因的 7 个不同区域, 从 5'端标记为 F3、F2、F1、T、R1c、R2c 和 R3c; DsF 和 DsR 引物由 F3 和 R3 以及 F1c 和 R1c 序列组成, FIT 和 RIT 引物由 F2 和 R2 以及 Tc 和 T 序列组成, SteF 和 SteR 引物分别是 R1c 和 F1c 序列^[26]。IMSA-LAMP 扩增原理如图 1B 所示, 为便于说明, DNA 合成从 DsF 开始, FIT 被设置为起始过程 (DNA 合成以类似方式在 DsR 和 RIT 中进行); 带箭头的水平直线代表底物延长方向, 带箭头的斜线代表与目标位点退火的引物, 带箭头的弧线表示 2 个区域的自动匹配。在该步骤中, 生成了 4 种不同长度的基本自匹配结构 (SMS-1~SMS-4)^[26]。根据 NCBI 报道的茄科雷尔氏菌果胶裂解酶基因 (WP_197360060.1) 序列, 利用引物在线设计软件 (<http://primerexplorer.jp/elamp> 5.0.0/index.html) 设计之后, 根据引物可能存在的二聚体和相近的退火温度, 调整并设计出 6 套 IMSA-LAMP 检测的引物组。所有引物均由擎科生物有限公司合成, 引物均用 HPLC 法纯化, 引物序列见表 2。

1.5 IMSA-LAMP 反应体系与反应条件

以提取的供试细菌、疑似桑树青枯病病样及健

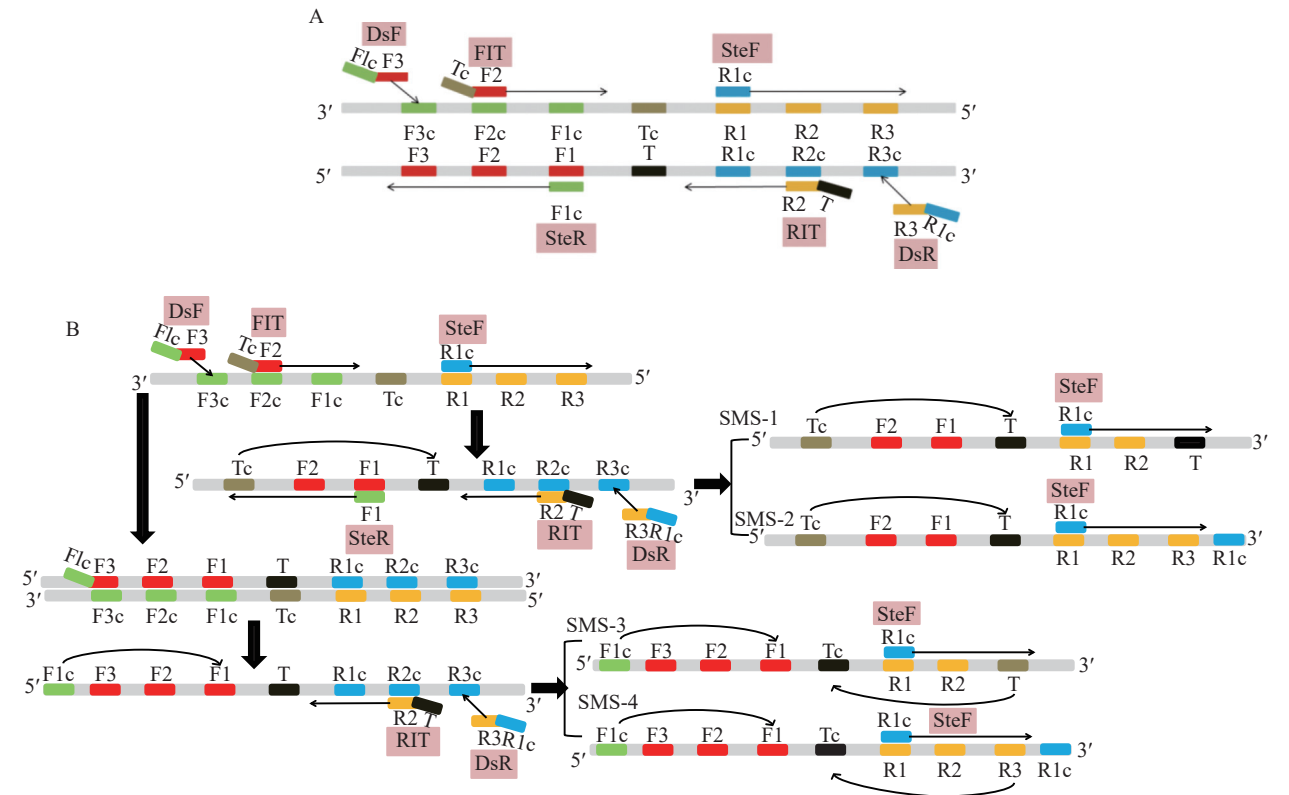


图 1 IMSA-LAMP 引物设计 (A) 及扩增 (B) 示意图^[26]
Fig. 1 Schematic diagram of primer design (A) and amplification (B) for IMSA-LAMP^[26]

表 2 用于扩增茄科雷尔氏菌果胶裂解酶基因的引物序列

Table 2 Primer sequences used for amplifying pectate lyase genes of *Ralstonia solanacearum*

引物组编号 Primer mix number	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	长度/bp Length
1	DsF-1	GTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCTAGTTGGTGGGGTAAAGGC	41
	DsR-1	GACAATGGGGGCAACCCTGATCCCAGGTATTACCCAGTGCGA	42
	FIT-1	CTGCCTCCCGTAGGAGCCTGCCAAGGCGAACGATCAGTAG	40
	RIT-1	CAGGCTCCTACGGGAGGCAGTCTTTCCGGACAAAAGTGCT	40
	SteF-1	GACAATGGGGGCAACCCTGATC	22
	SteR-1	GTGTCTCAGTCCCAGTGTGGC	21
2	DsF-2	GTACTGCGCGCTGGAGCTGGGAACAACCATTTCAGACGC	40
	DsR-2	GGAACATGCTGAACCAGCCGGGGCCGTTTGACCCGAACC	39
	FIT-2	AGCTTGCTCGCTTTGAGCTGCCCTCGACGGGGAATCAC	38
	RIT-2	GCAGCTCAAAGCGAGCAAGCTGCCGCCATGATGACCG	37
	SteF-2	GGAACATGCTGAACCAGCCGGG	22
	SteR-2	GTACTGCGCGCTGGAGCTGG	20
3	DsF-3	GTACTGCGCGCTGGAGCTGGACCATTTCAGACGCC	36
	DsR-3	GGAACATGCTGAACCAGCCGGGGCCGTTTGACCCGAACC	39
	FIT-3	GAACAGCTTGCTCGCTTTGAGCTCTCGACGGGGAATCACGA	41
	RIT-3	AGCTCAAAGCGAGCAAGCTGTTCGCCGCCATGATGACCG	39
	SteF-3	GGAACATGCTGAACCAGCCGGG	22
	SteR-3	GTACTGCGCGCTGGAGCTGG	20
4	DsF-4	AACATGCTGAACCAGCCGGGCGCCGTTTGACCCGAACC	38
	DsR-4	GTACTGCGCGCTGGAGCTGGACAACCATTTCAGACGCC	39
	FIT-4	GAACAGCTTGCTCGCTTTGAGCTTCGACGGGGAATCACGA	40
	RIT-4	AGCTCAAAGCGAGCAAGCTGTTCGAGCCGCCATGATGAC	40
	SteF-4	AACATGCTGAACCAGCCGGGC	21
	SteR-4	GTACTGCGCGCTGGAGCTGG	20
5	DsF-5	AGCAGTTGTACTGCGCGCTGGCCATTTCAGACGCCCTC	39
	DsR-5	CGACAACGCCGGCCAGAAGGCCGTTTGACCCGAAC	35
	FIT-5	CGAACAGCTTGCTCGCTTTGAGGAATCACGATGCGGGTTCC	41
	RIT-5	TCAAAGCGAGCAAGCTGTTTCGTCGAGCCGCCATGATGAC	39
	SteF-5	CGACAACGCCGGCCAGAA	18
	SteR-5	AGCAGTTGTACTGCGCGCTGG	21
6	DsF-6	AGCAGTTGTACTGCGCGCTGCCATTTCAGACGCCCTC	38
	DsR-6	CGACAACGCCGGCCAGAAGGCCGTTTGACCCGAAC	35
	FIT-6	CGAACAGCTTGCTCGCTTTGAGAATCACGATGCGGGTTCC	40
	RIT-6	TCAAAGCGAGCAAGCTGTTTCGGGAATCGAGCCGCCATGATGAC	43
	SteF-6	CGACAACGCCGGCCAGAA	18
	SteR-6	AGCAGTTGTACTGCGCGCTG	20

康桑树样本 DNA 为模板, 对茄科雷尔氏菌果胶裂解酶基因片段进行荧光定量 PCR 特异性扩增。扩增体系: 2× LAMP Master Mix 12.5 μL(生工), DNA Polymerase 0.5 μL(生工), Sterilized ddH₂O 8.0 μL

(生工), 5×10³ mmol SYTOTM 9 核酸染料 1 μL (Thermo Fisher Scientific), 引物 Mix 1.0 μL(外引物、茎引物、内引物体积比为 1:4:8), DNA 模板 2.0 μL, 共 25.0 μL。反应程序: 63 ℃ 1 min, 80 ℃ 1 min; 将

63 ℃ 1 min 作为 1 个循环, 设计 45 个循环。

1.6 IMSA-LAMP 引物特异性

为了验证“1.4”筛选的引物检测桑树青枯病菌的特异性, 以桑源茄科雷尔氏菌及非茄科雷尔氏菌菌株进行 IMSA-LAMP 引物特异性试验, 以健康桑树 DNA 作为阴性对照、无菌水为空白对照、茄科雷尔氏菌 DNA 为阳性对照, 反应条件同“1.5”。

1.7 IMSA-LAMP 不同引物浓度比例优化

为保证茄科雷尔氏菌 DNA 能在 IMSA-

LAMP 体系中达到最佳扩增效果, 在上述“1.5”反应扩增体系基础上, 对引物比例进行筛选。以 10 ng/μL 的茄科雷尔氏菌 YZqk1 DNA 为模板, 以“1.6”最佳引物组为扩增引物, 设置 4 组不同的引物浓度比例, 即外引物 (100 μmol/L)、茎引物 (100 μmol/L)、内引物 (100 μmol/L) 体积比依次为 1:4:8、1:2:4、1:1:2、1:8:4, 见表 3。使用荧光定量 PCR 仪进行 IMSA-LAMP 扩增, 根据起始扩增时间及荧光强度等选择最佳引物浓度比例。

表 3 外、茎、内引物体积配比
Table 3 Volume ratio of outer, stem and inner primers

外、茎、内引物体积比 Volume ratio of primers (Outer : Stem : Inner)	外引物		茎引物		内引物		无菌水 Sterilized ddH ₂ O	总和 Total
	Outer primer		Stem primer		Inner primer			
	DsF	DsR	SteF	SteR	FIT	RIT		
1 : 4 : 8	2	2	8	8	16	16	48	100
1 : 2 : 4	2	2	4	4	8	8	72	100
1 : 1 : 2	2	2	2	2	4	4	84	100
1 : 8 : 4	2	2	16	16	8	8	48	100

1.8 IMSA-LAMP 反应温度优化

以 10 ng/μL 的茄科雷尔氏菌 YZqk1 DNA 为模板, 在 61.5、62.0、62.5、63.0、63.5、64.0、64.5 和 65.0 ℃ 8 个反应温度下, 通过荧光定量 PCR 仪进行 IMSA-LAMP 扩增, 反应体系见“1.5”。通过比较不同反应温度的荧光扩增曲线, 获得最佳反应温度。

1.9 IMSA-LAMP 检测法与 PCR 法的灵敏度对比

将茄科雷尔氏菌 YZqk1 纯培养后置于 25 mL LB 肉汤中扩增培养, 于 28 ℃ 条件下培养 48 h, 用稀释涂布计数方法将菌液浓度稀释成 1×10⁶ CFU/mL, 取 1 mL 于离心机中 12 000 r/min 离心 4 min, 取沉淀, 根据 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取总 DNA。利用超微量分光光度计进行浓度测定, 按 10 倍稀释法用 TE 缓冲液将 DNA 梯度稀释 7 次, 具体计算公式: 稀释后 DNA 浓度=稀释前 DNA 浓度÷10^{稀释次数}, 将每个梯度作为模板进行 IMSA-LAMP 检测, 反应体系见“1.5”。选择优化后的引物、引物浓度比例及反应温度, 根据荧光扩增曲线判定检测结果; 同时, 采用 Primer Premier 5.0 软件对茄科雷尔氏菌果胶裂解酶基因设计 1 对 PCR 检测引物: PL-F (AGCTTGCTCGCTTTGAGCTGCTGCAAGACC)/PL-R(TGATCGCCCGAACAACCATTTCCAGACGCC), 拟扩增的目的片段长度为 135 bp, 并利用该引物对模板进行 PCR 检测, 反应体系为 2× Taq

PCR Master Mix 12.5 μL(生工), 10 μmol/L 引物 PL-F、PL-R 各 1 μL, DNA 模板 2 μL, Sterilized ddH₂O 补足至 25 μL; 扩增条件为 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s、55 ℃ 退火 30 s、72 ℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72 ℃ 最终延伸 8 min, 于 4 ℃ 保存。PCR 扩增产物取 5 μL 经 12 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.10 IMSA-LAMP 检测方法的验证

将广东、广西地区收集的 24 份疑似桑树青枯病病样(表 1)提取 DNA 后, 进行 IMSA-LAMP 检测, 并取 1 份健康桑树样本为阴性对照、茄科雷尔氏菌 YZqk1 DNA 为阳性对照。反应体系见“1.5”, 其中引物、引物浓度比例及反应温度均选择优化后的结果, 并通过荧光扩增曲线进行判读; 同时利用“1.9”的 PCR 反应体系和参数进行同步平行检测。

2 结果与分析

2.1 IMSA-LAMP 引物筛选

将本研究设计的 6 组引物(表 2)进行 IMSA-LAMP 检测, 检测结果如图 2 所示。引物组 1~6 均出现了扩增曲线, 引物组 6 于反应 20 min 时最先出现上升趋势, 35 min 后反应进入平缓期; 而其他引物组均在反应 25 min 后才出现扩增。因此, 选择引物组 6 作为 IMSA-LAMP 法最佳引物组; 最佳引物

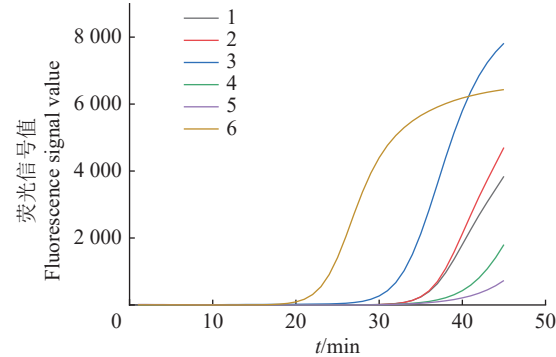


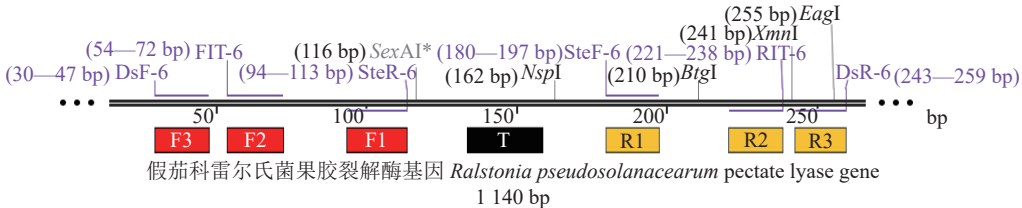
图 2 IMSA-LAMP 6 组引物对茄科雷尔氏菌的检测结果

Fig. 2 Detection results of *Ralstonia solanacearum* under six primer groups of IMSA-LAMP

组 6 的 6 条引物结合位置及 7 个特异识别位点, 如图 3 所示。

2.2 IMSA-LAMP 引物特异性试验

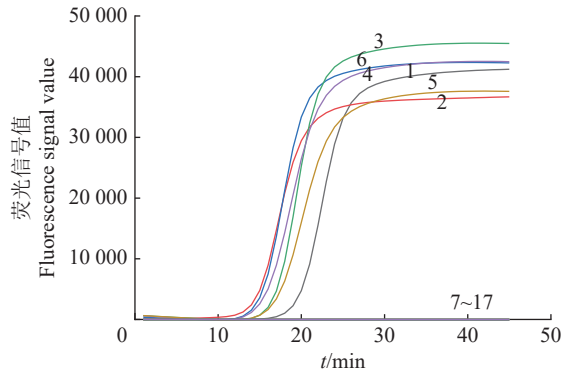
利用 IMSA-LAMP 对 6 株茄科雷尔氏菌及 8 株非茄科雷尔氏菌 DNA 进行检测, 结果如图 4 所示。6 株茄科雷尔氏菌 (YZqk1、YLqk1、XZqk2、XCqk4、LZqk5、YDqk6) 均在 45 min 内出现了“S”扩增曲线 (图 4: 曲线 1~6)。其他 8 株非茄科雷尔氏菌、无菌水及健康桑树 DNA 均未出现扩增曲线 (图 4: 曲线 7~17)。表明, IMSA-LAMP 检测方法筛选的引物能有效地检测茄科雷尔氏菌。



F1: CAGCGCGCAGTACAAGTCT, F2: GAATCACGATGCGGGTTCC, F3: CCATTTCCAGACGCCCTC, T: TCAAAGCGAGCAAGCTGTCGGGAA, R1: CGACAACGCCGGCCAGAA, R2: GTCATCATGCGGCTCGA, R3: GTTCGGTGCAAACGGCC

图 3 IMSA-LAMP 引物组 6 的 6 条检测引物的位置及 7 个特异识别位点

Fig. 3 Locations of six primers of primer group 6 and their seven specific recognition sites in IMSA-LAMP



1~6: 茄科雷尔氏菌 (YZqk1、YLqk1、XZqk2、XCqk4、LZqk5、YDqk6); 7: 阴沟肠杆菌 (XCYG-001); 8: 克雷伯氏菌 (LCKL-001); 9: 菠萝泛菌 (LCFJ-001); 10: 铜绿假单胞菌 (YD-001); 11: 丁香假单胞菌 (ZJDX-003); 12: 多黏类芽孢杆菌 (YD-002); 13: 短小杆菌 (YDDX-001); 14: 芽孢杆菌 (YD-003); 15: 无菌水; 16、17: 健康桑树 DNA

1~6: *Ralstonia solanacearum* (YZqk1, YLqk1, XZqk2, XCqk4, LZqk5, YDqk6); 7: *Enterobacter cloacae* (XCYG-001); 8: *Klebsiella* sp. (LCKL-001); 9: *Pantoea ananas* (LCFJ-001); 10: *Pseudomonas aeruginosa* (YD-001); 11: *Pseudomonas syringae* (ZJDX-003); 12: *Paenibacillus polymyxa* (YD-002); 13: *Bacillus pumilus* (YDDX-001); 14: *Bacillus* sp. (YD-003); 15: Sterile water; 16~17: DNA of healthy mulberry

图 4 茄科雷尔氏菌 IMSA-LAMP 特异性检测结果

Fig. 4 Specific detection results of IMSA-LAMP for *Ralstonia solanacearum*

2.3 IMSA-LAMP 引物浓度比例优化

设置外、茎、内引物浓度比例为 1:4:8、1:2:4、1:1:2、1:8:4, 以 10 ng/ μ L 的茄科雷尔氏菌 YZqk1 DNA 为模板进行 IMSA-LAMP 扩增, 扩增温度为

63 $^{\circ}$ C, 反应时间为 45 min, 结果如图 5 所示。4 种不同引物浓度比例均出现了“S”曲线, 当外、茎、内引物浓度比例为 1:4:8 时, 起始扩增时间最短, 为 12 min, 25 min 到达扩增的平缓期; 当外、茎、内引物浓度比例为 1:8:4 时, 起始扩增时间为 14 min, 30 min 达平缓期; 当外、茎、内引物浓度比例为 1:2:4 时, 起始扩增时间为 23 min, 35 min 达到平缓期; 当外、茎、内引物浓度比例为 1:1:2 时, 起始扩

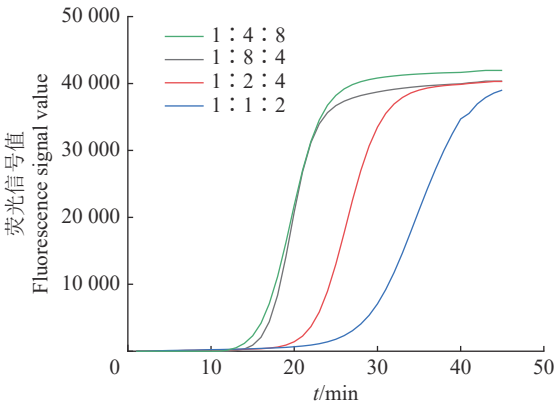


图 5 不同外、茎、内引物浓度比例下茄科雷尔氏菌 IMSA-LAMP 检测结果

Fig. 5 IMSA-LAMP detection results of *Ralstonia solanacearum* under different concentration ratios of outer, stem and inner primers

增时间为 25 min, 45 min 内未出现平缓期。最终可确定最佳外、茎、内引物比例为 1:4:8。

2.4 IMSA-LAMP 反应温度优化

根据最佳引物比例进行 IMSA-LAMP 反应温度筛选, 设置温度梯度为 61.5、62.0、62.5、63.0、63.5、64.0、64.5 及 65.0 °C, 结果如图 6 所示。在 61.5~65.0 °C 时, 均有扩增曲线。在 64.5 °C 时, 起始扩增时间最短, 为 13 min, 于 24 min 到达扩增的平缓期; 在 65.0 °C 时, 在 14 min 曲线开始扩增, 于 25 min 达到扩增平缓期; 在 61.5~64.0 °C 时, 均在反应 15 min 后开始扩增, 于 30 min 后达到扩增平缓期。故选择 64.5 °C 作为最佳反应温度。

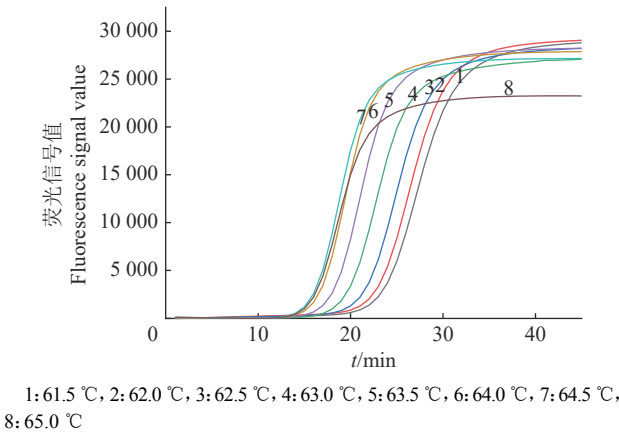


图 6 不同反应温度茄科雷尔氏菌 IMSA-LAMP 检测结果
Fig. 6 Detection results of IMSA-LAMP for *Ralstonia solanacearum* at different reaction temperatures

2.5 IMSA-LAMP 法的灵敏度

茄科雷尔氏菌 YZqk1 纯培养后, 取 1 mL 1×10^6 CFU/mL 的菌悬液, 根据 Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取总 DNA, 并利用超微量分光光度计进行浓度测定, 其 DNA 质量浓度为 2 ng/ μ L, 10 倍浓度梯度稀释 7 次, DNA 质量浓度为 2 ng/ μ L~200 ag/ μ L, 对应菌为 $1\times10^6\sim1\times10^{-2}$ CFU/mL, 将每个梯度作为模板进行 IMSA-LAMP 检测, 并利用 PCR 进行平行检测作为对照。IMSA-LAMP 检测结果如图 7 所示, 茄科雷尔氏菌 YZqk1 DNA 质量浓度为 2 ng/ μ L~200 fg/ μ L(对应菌为 $1\times10^6\sim1\times10^2$ CFU/mL), 均出现了扩增曲线; 而 DNA 质量浓度在 20 fg/ μ L~200 ag/ μ L(对应菌为 $1\times10^0\sim1\times10^{-2}$ CFU/mL) 未出现扩增曲线。因此, IMSA-LAMP 对茄科雷尔氏菌最低 DNA 检测质量浓度为 200 fg/ μ L, 对应菌为 1×10^2 CFU/mL。另外, PCR 检测到的桑树茄科雷尔氏菌 YZqk1 最低 DNA 质量浓度为 20 pg/ μ L, 对应菌为 1×10^4 CFU/mL(图 8)。IMSA-LAMP 检测桑树茄科雷尔氏菌具有良好的灵敏度, 是 PCR 的 100 倍。

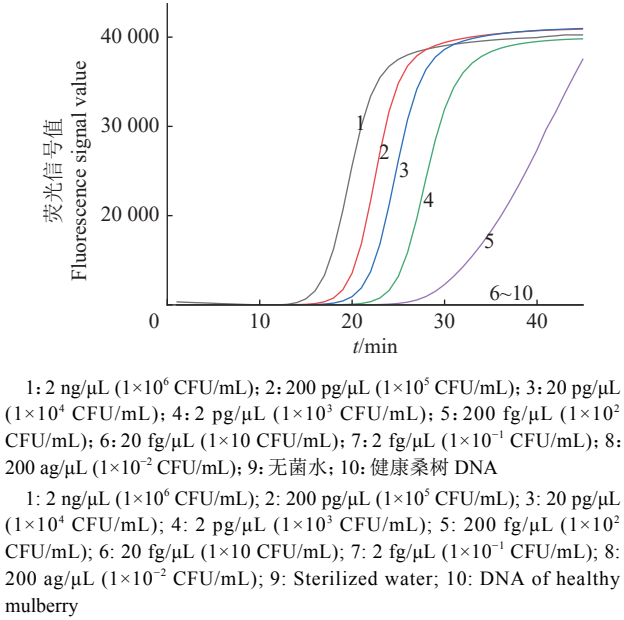


图 7 IMSA-LAMP 对茄科雷尔氏菌灵敏度的检测结果
Fig. 7 Sensitivity test results of IMSA-LAMP for *Ralstonia solanacearum*

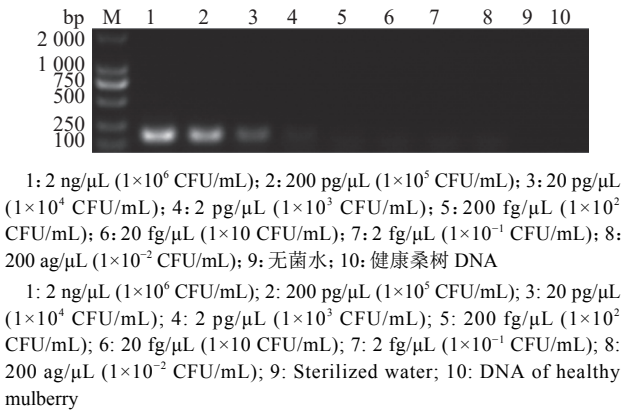


图 8 PCR 对茄科雷尔氏菌灵敏度检测结果
Fig. 8 Sensitivity test results of PCR for *Ralstonia solanacearum*

2.6 IMSA-LAMP 法对生产样本的检测

将收集的 24 份疑似桑树青枯病病样提取 DNA 后, 利用 IMSA-LAMP 法与 PCR 法进行试验, 评估 2 种检验方法的检测结果。IMSA-LAMP 检测结果如图 9 所示, 收集的疑似桑树青枯菌病样中, 有 21 份样本出现了“S”扩增曲线(曲线 2~22), 广西壮族自治区环江市及忻城市 3 份疑似桑树青枯病病样未出现扩增现象(曲线 23~25), 检出率为 87.5%。同步进行的 PCR 法, 其中 9 份样品为阳性, 15 份样品为阴性(图 10), 检出率为 37.5%, 9 份 PCR 检测阳性的样本在 IMSA-LAMP 法检测结果中也为阳性, 说明 2 种方法有一定的重复性, 但 IMSA-LAMP 法的检出率明显高于 PCR。

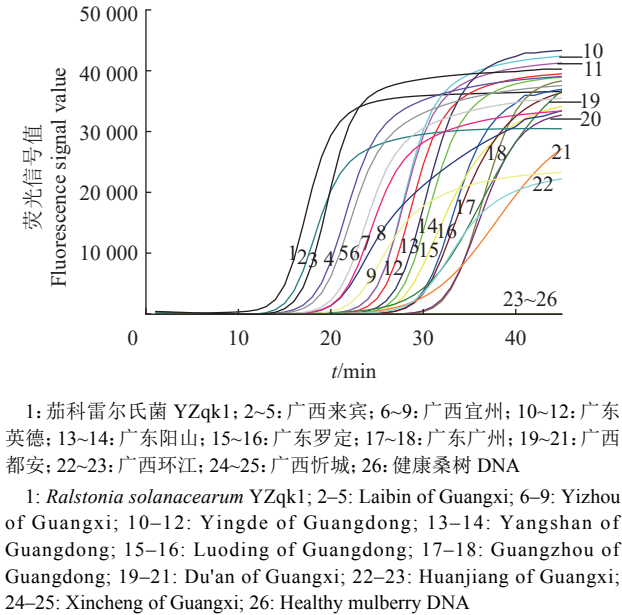


图 9 IMSA-LAMP 对不同地区疑似桑树青枯病病样的检测结果

Fig. 9 Detection results of suspected mulberry bacterial wilt samples from different districts by IMSA-LAMP

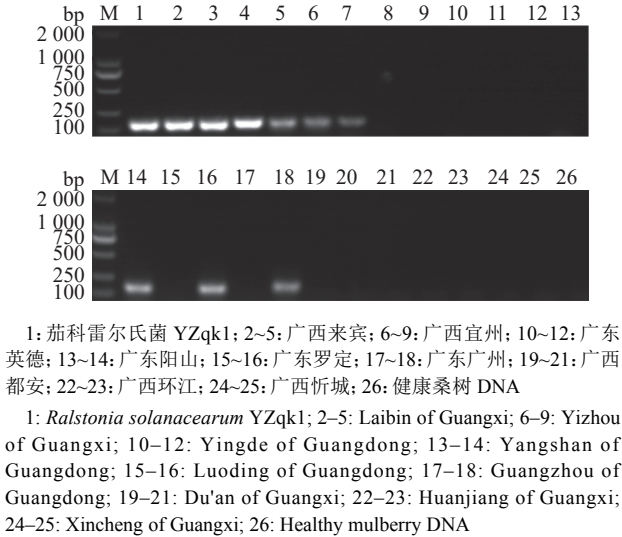


图 10 PCR 对不同地区疑似桑树青枯病病样的检测结果

Fig. 10 Detection results of suspected mulberry bacterial wilt samples from different districts by PCR

3 讨论与结论

桑树青枯病作为一种毁灭性的细菌性病害,被国家列为重点检疫对象^[27]。建立一种桑树茄科雷尔氏菌快速有效的检测方法,对预防桑树青枯病的发生和扩散具有重要的意义。桑树青枯病病原检测方法分为传统分离技术及分子检测技术。传统分离技术主要是通过病样组织分离病原菌的方式分离出桑树茄科雷尔氏菌,但操作繁琐,分离时间长,结果受人为影响大;随着分子检测技术的快速发展,核

酸检测技术被广泛应用于医疗诊断、动植物安全生产、食品安全及动植物检疫等检测中,大大提高检测效率^[28-30]。其中,LAMP 是常见的核酸检测技术,本研究前期将 LAMP 技术应用于蚕、桑病害的检测研究,能有效检测出蚕桑病毒、细菌及真菌等病原体^[31-33]。而 IMSA 技术的优点在于引物结合位点多,相较于 LAMP 技术拥有更高的灵敏度及特异性。Chen 等^[34]应用 IMSA 法对牛奶样品中金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* 进行检测,灵敏度比 LAMP 方法高 10 倍;Liu 等^[35]对人畜共患病病原肠毒素大肠埃希菌 (*Enterotoxigenic Escherichia coli*, ETEC) 进行了 IMSA 的检测应用研究,相比于荧光定量 PCR、LAMP、交叉引物等温扩增技术具有更高的灵敏度。同样地,本研究将 LAMP 反应体系与 IMSA 引物设计原理相结合应用于桑树青枯病的茄科雷尔氏菌检测,试验结果显示,IMSA-LAMP 检测技术明显优于 PCR 的检测结果,本方法节约时间,且结果准确可靠。

果胶酶是一类分解果胶物质的酶的总称,在细菌生长和繁殖代谢过程中都能合成,而果胶裂解酶基因在青枯菌侵染植物过程中发挥了重要作用^[36-37]。本研究在以 NCBI 登录的茄科雷尔氏菌基因组分析的基础上,以茄科雷尔氏菌果胶裂解酶基因 (WP_197360060.1) 序列为靶基因序列,进行了引物设计与筛选,经试验结果比较确定引物组 6 为最终的检测引物组。通过对茄科雷尔氏菌及桑源其他细菌的进行 IMSA-LAMP 检测,发现仅有茄科雷尔氏菌 DNA 样本出现扩增曲线,表明本研究建立的 IMSA-LAMP 检测技术特异性明显。对反应温度及引物比例进行优化,结果表明外、茎、内引物浓度比例为 1:4:8,恒温 64.5 °C 的荧光定量 PCR 仪在 45 min 内可完成检测,该方法比常规 PCR 方法快 60 min 以上,反应结果可通过荧光扩增曲线出现的先后进行快速判定,本研究建立的 IMSA-LAMP 法检测茄科雷尔氏菌 DNA 最低质量浓度达 200 fg/μL,对应的菌为 1×10² CFU/mL,比 Okiro 等^[38]与李信申等^[39]报道的青枯病 LAMP 检测方法的灵敏度高 10 倍左右,是常规 PCR 检测法灵敏度的 100 倍,同样的结果在 Gou 等^[40]使用 IMSA 检测猪圆环病毒 PCV3 的应用中得到佐证。

在对采自田间的 24 份疑似桑树青枯病样本检测中,IMSA-LAMP 检测出 21 份样本,3 份样本未检测出桑茄科雷尔氏菌;同时利用 PCR 法对 24 份病样进行平行检测,PCR 仅检测出 9 份,这 9 份样本也同时印证了 IMSA-LAMP 的检测结果。对于其

他 IMSA-LAMP 检测出而 PCR 未能检测出的阳性样本, 我们分析有 2 种原因, 一是说明 IMSA-LAMP 检测方法更加灵敏, 这个推测已经在本研究纯茄科雷尔氏菌模板检测中得到验证; 二是说明导致桑树青枯和枯萎症状的病原菌种类很多, 本课题组已经相继在桑树枯萎的病样中分离出阴沟肠杆菌^[25, 41]、菠萝泛菌^[42]及克雷伯氏菌^[43]。而阴沟肠杆菌、菠萝泛菌及克雷伯氏菌作为机会性植物致病病原菌, 在生产中导致植物枯萎的机理仍有待深入研究。综上, 本研究建立的茄科雷尔氏菌的 IMSA-LAMP 检测方法准确可靠, 可用于大批量桑树青枯病的快速分子诊断, 为桑树细菌病检测和防疫提供了新技术支持。

致谢: 试验过程中得到华南农业大学动物科学学院硕士研究生孟芳、王亚琴等的帮助, LAMP 检测试剂得到广州双螺旋基因技术有限公司张璜博士与林梦蝶实验员的大力支持。

参考文献:

[1] LIM S H, CHOI C I. Pharmacological properties of *Morus nigra* L. (black mulberry) as a promising nutraceutical resource[J]. *Nutrients*, 2019, 11(2): 437. doi: 10.3390/nu11020437.

[2] YUAN Q, ZHAO L. The mulberry (*Morus alba* L.) fruit: A review of characteristic components and health benefits[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2017, 65(48): 10383-10394.

[3] CAI M, MU L, WANG Z, et al. Assessment of mulberry leaf as a potential feed supplement for animal feeding in P. R. China[J]. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2019, 32(8): 1145-1152.

[4] 王越, 童金林, 叶伟清, 等. 桑青枯病发生原因及防治对策[J]. *中国蚕业*, 2006, 27(4): 25-26.

[5] 肖练章, 朱志德, 何坤良, 等. 桑细菌性青枯病发病规律研究[J]. *广东蚕业*, 1982(2): 3-5.

[6] 朱燕, 叶志毅, 吕志强, 等. 桑树青枯病的分布危害和防治的研究进展[J]. *蚕桑通报*, 2005, 36(1): 6-9.

[7] 毛铿祖. 广东桑青枯病的发生与防治[J]. *中国蚕业*, 1996, 30(4): 64-66.

[8] 赖文姜, 曾宪铭, 谭炳安, 等. 桑青枯病病原细菌的鉴定[J]. *华南农学院学报*, 1982, 3(1): 66-73.

[9] LOWE-POWER T M, KHOKHANI D, ALLEN C. How *Ralstonia solanacearum* exploits and thrives in the flowing plant xylem environment[J]. *Trends in Microbiology*, 2018, 26(11): 929-942.

[10] BRAGARD C, DEHNEN-SCHMUTZ K, DI SERIO F, et al. Pest categorisation of the *Ralstonia solanacearum* species complex[J]. *EFSA Journal*, 2019, 17(2): 5618. doi: 10.2903/j.efsa.2019.5618.

[11] NAKANO M, ICHINOSE Y, MUKAIHARA T. *Ralstonia solanacearum* type III effector RipAC targets SGT1

to suppress effector-triggered immunity[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2020, 61(12): 2067-2076.

[12] SUN T, WU W, WU H, et al. *Ralstonia solanacearum* elicitor RipX induces defense reaction by suppressing the mitochondrial *atpA* gene in host plant[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(6): 2000. doi: 10.3390/ijms21062000.

[13] SCHÖNFELD J, HEUER H, VAN ELSAS J D, et al. Specific and sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in soil on the basis of PCR amplification of *fliC* fragments[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(12): 7248-7256.

[14] OPINA N, TAVNER F, HOLLWAY G, et al. A novel method for development of species and strain-specific DNA probes and PCR primers for identifying *Burkholderia solanacearum*(formerly *Pseudomonas solanacearum*)[J]. *Asia Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 1997, 5(1): 19-30.

[15] PIRC M, ALIČ Š, DREO T. Rapid loop-mediated isothermal amplification for detection of the *Ralstonia solanacearum* species complex bacteria in symptomatic potato tubers and plants[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2021, 2354: 401-413.

[16] KYOSEI Y, YAMURA S, NAMBA M, et al. Antigen tests for COVID-19[J]. *Biophysics and Physicobiology*, 2021, 18: 28-39.

[17] 黄雯, 徐进, 张昊, 等. 植物青枯菌 LAMP 检测方法的建立[J]. *中国农业科学*, 2016, 49(11): 2093-2102.

[18] KUBOTA R, VINE B G, ALVAREZ A M, et al. Detection of *Ralstonia solanacearum* by loop-mediated isothermal amplification[J]. *Phytopathology*, 2008, 98(9): 1045-1051.

[19] 马学军, 丁雄, 聂凯, 等. 新型等温多自配引发扩增技术 (IMSA): CN104388581A[P]. 2015-03-04.

[20] 丁雄. 新型等温核酸扩增技术 (IMSA) 的建立及其对传染病病原 EV71、CVA16、H7N9 和 HIV-1 的快速检测应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2014.

[21] ZHAI J, YAN Z, PING F, et al. Establishment and application of isothermal amplification techniques for the detection of heat-stable I enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*, 2020, 15(4): e0230881.

[22] 张梦. 溧阳市肺结核病流行情况及等温多自配引发扩增技术在检测结核分枝杆菌中的应用分析[D]. 苏州: 苏州大学, 2018.

[23] 乐振穹, 许泽仰, 张细玲, 等. FQ-PCR 与 IMSA 检测转基因豆奶外源基因的比较研究[J]. *大豆科学*, 2018, 37(6): 943-949.

[24] 王琪, 徐文娟, 石盼盼. IMSA 技术快速检测肠出血大肠杆菌 O157:H7 方法的建立及应用[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(17): 263-269.

[25] 杨宏宇. 桑枯萎病病原鉴定及分子生物学研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.

[26] DING X, NIE K, SHI L, et al. Improved detection limit in rapid detection of human enterovirus 71 and coxsack-

- ievirus A16 by a novel reverse transcription-isothermal multiple-self-matching-initiated amplification assay[J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, 52(6): 1862-1870.
- [27] 董朝霞, 于翠, 邓文, 等. 桑树青枯病的发生与防治研究进展[J]. *北方蚕业*, 2019, 40(4): 1-7.
- [28] WANG D, YU J, WANG Y, et al. Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification(LAMP) assay and visual LAMP assay for detection of African swine fever virus(ASFV)[J]. *Journal of Virological Methods*, 2020, 276: 113775. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.113775.
- [29] HUANG W E, LIM B, HSU C C, et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(4): 950-961.
- [30] TECHATHUVANAN C, DRAUGHON F A, D'SOUZA D H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and sensitive detection of *Salmonella Typhimurium* from pork[J]. *Journal of Food Science*, 2010, 75(3): M165-M172.
- [31] 刘吉平, 程伟, 宋小景, 等. 一种家蚕蚕卵微孢子虫的 LAMP 检测引物及其应用: CN104372082A[P]. 2015-02-25.
- [32] 刘吉平, 周铁楠, 孙勋勋. 一组桑花叶病的 LAMP 检测引物及试剂盒: CN109055616A[P]. 2018-12-21.
- [33] 杨宏宇, 周铁楠, 孙勋勋, 等. 桑源阴沟肠杆菌 LAMP 检测方法的建立和应用[J]. *蚕业科学*, 2019, 45(3): 321-330.
- [34] CHEN X, WANG H, LIU C, et al. Technical note: Development of a closed-tube isothermal multiple self-matching-initiated amplification assay for visual detection of *Staphylococcus aureus* in milk samples[J]. *Journal of Dairy Science*, 2021, 104(3): 3569-3574.
- [35] LIU W, YUAN C, ZHANG L, et al. Establishment and application of isothermal multiple-self-matching-initiated amplification (IMSA) in detecting Type II heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli*[J]. *PLoS One*, 2019, 14(5): e0216272.
- [36] KUBICEK C, STARR T, GLASS N. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2011, 52: 427-451.
- [37] CHARKOWSKI A O, ALFANO J R, PRESTON G, et al. The *Pseudomonas syringae* pv. tomato HrpW protein has domains similar to harpins and pectate lyases and can elicit the plant hypersensitive response and bind to pectate[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(19): 5211-5217.
- [38] OKIRO L A, TANCOS M A, NYANJOM S G, et al. Comparative evaluation of LAMP, qPCR, conventional PCR, and ELISA to detect *Ralstonia solanacearum* in Kenyan potato fields[J]. *Plant Disease*, 2019, 103(5): 959-965.
- [39] 李信申, 黄小梅, 吴淑秀, 等. 植物青枯病菌环介导等温扩增快速检测技术研究[J]. *生物技术通报*, 2021, 37(1): 272-281.
- [40] GOU H, BIAN Z, CAI R, et al. The colorimetric isothermal multiple-self-matching-initiated amplification using cresol red for rapid and sensitive detection of porcine circovirus 3[J]. *Frontiers in Veterinary Science*, 2020, 7: 407. doi: 10.3389/fvets.2020.00407.
- [41] ZHOU Y, YANG H, LIU J. Complete genome sequence of *Enterobacter roggenkampii* strain KQ-01, isolated from bacterial wilt-resistant mulberry cultivar YS283[J]. *Plant Disease*, 2021, 105(3): 688-690.
- [42] 王继承. 桑枯萎病中菠萝泛菌的分离鉴定及防治研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2018.
- [43] 罗龙辉, 王继承, 刘吉平. 桑细菌性枯萎病病原菌的分离鉴定与全基因组序列分析[J]. *植物保护*, 2022, 48(1): 44-51.

【责任编辑 李庆玲】