

基于环介导等温扩增技术检测东北地区大豆主要品种(系)种子携带的病原菌

袁咏天, 叶文武, 曾丹丹, 王晓莉, 王源超, 郑小波

(南京农业大学 植物保护学院, 江苏 南京 210095)

摘要: 为了解东北地区大豆种子携带病原菌的情况, 选取了该地区 52 个大豆主要品种(系), 采用环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)快速检测其种子携带胶孢炭疽菌、平头炭疽菌、冬青丽赤壳菌、亚细亚镰孢菌、黄色镰孢菌、木贼镰孢菌、禾谷镰孢菌、层出镰孢菌、尖镰孢菌、茄腐镰孢菌、轮枝镰孢菌、接骨木镰孢菌、大豆炭腐病菌、大豆拟茎点种腐病菌、大豆疫霉菌和立枯丝核菌 16 种大豆主要病原菌的状况。结果表明: 在其中 38 个品种(系)的种子样本中累计检测出上述 8 种病原菌, 检出率由高到低依次为: 大豆拟茎点种腐病菌、立枯丝核菌、木贼镰孢菌、亚细亚镰孢菌、禾谷镰孢菌、层出镰孢菌、尖镰孢菌和平头炭疽菌。不同大豆品种(系)种子带菌的种类及数量存在较大差异, 其中品种绥 12-18 和 29182 被检出的病原菌多达 4 种。本研究对了解东北地区大豆种子携带病原菌的状况有参考价值, 并为大豆种子带菌检测提供了新的方法。

关键词: 大豆病害; 种子带菌; 环介导等温扩增技术; 病原快速检测

中图分类号: S435. 651 **文献标识码:** A **DOI:** 10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2017. 04. 0592

Detection of Soybean Seed-borne Pathogens in Northeast China Using Loop-mediated Isothermal Amplification Assays

YUAN Yong-tian, YE Wen-wu, ZENG Dan-dan, WANG Xiao-li, WANG Yuan-chao, ZHENG Xiao-bo

(Plant Protection College of Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: In order to know the situation of soybean seed-borne pathogens in Northeast China, the seeds of 52 major soybean cultivars(lines) collected from this area were analyzed, using loop-mediated isothermal amplification(LAMP) assays for specific detection of 16 known soybean pathogen species, including *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. truncatum*, *Calonectria ilicicola*, *Fusarium asiaticum*, *F. culmorum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. proliferatum*, *F. solani*, *F. sambucinum*, *F. verticillioides*, *Macrophomina phaseolina*, *Phomopsis longicolla*, *Phytophthora sojae*, and *Rhizoctonia solani*. The result showed that there were 38 soybean cultivars(lines) carrying a total of 8 species of seed-borne pathogens, and the most frequent species was *Phomopsis longicolla*, followed by *Rhizoctonia solani*, *Fusarium equiseti*, *F. asiaticum*, *F. graminearum*, *F. proliferatum*, *F. oxysporum* and *Colletotrichum truncatum*. The number of detected species in each cultivar of seeds were between 1 and 4. In summary, a simple, rapid, and sensitive method for detecting soybean seed-borne pathogens was developed and successfully used to reveal the situation of soybean seed-borne pathogens in Northeast China.

Keywords: Soybean disease; Seed-borne pathogens; LAMP (loop-mediated isothermal amplification); Rapid detection of pathogen

大豆(*Glycine max* (L.) Merri.)是一种重要的粮食作物和油料作物, 内含丰富的蛋白质、维生素、矿物质等, 对人类健康和农业发展具有重要的意义。然而, 生产中大豆病害对其产量和品质造成了严重影响^[1]。目前全世界已报道的大豆病害有 70 余种^[2], 其中大豆根腐病、大豆炭疽病等真菌病害所占的比例较高, 分布广泛, 危害较重^[3]。特别是

随着品种抗性、栽培方式以及气候条件等方面的变化, 引起大豆病害的主要病原菌种类也发生着改变, 一些新的病害种类被发现并呈现危害加重的趋势, 例如: 大豆红冠腐病(*Calonectria ilicicola*)^[4]和大豆茎枯病(*Phomopsis longicolla*)^[5]等陆续被发现和报道。

种子携带病原菌是大豆等许多农作物种子在

收稿日期: 2017-04-27
基金项目: 国家公益性行业农业科研专项(201303018); 国家高技术研究发展计划“863 计划”(2012AA101501); 国家现代农业产业技术体系(CARS-004-PS14)。
第一作者简介: 袁咏天(1993 -), 女, 硕士, 主要从事卵菌与真菌分子遗传的研究。E-mail: 2015102039@njau.edu.cn。
通讯作者: 郑小波(1957 -), 男, 教授, 主要从事卵菌与真菌分子遗传的研究。E-mail: xzbzheng@njau.edu.cn。

贮藏期乃至在田间的苗期及生长期发生病害的重要初侵染源。种子带菌导致种子的发芽率显著降低,还影响幼苗活力,导致作物减产和品质下降。更为重要的是,病原菌可随种子调运至无病区,造成病害的大范围传播。因此,做好种子带菌检测有助于及时发现病原菌和预防种传病害的传播,是保证大豆产量和品质的基础^[6]。

传统的种子带菌检测方法有肉眼观察^[7]、平板分离培养^[8]、吸水纸法^[9],以及分子生物学的基于 PCR 的分子检测方法^[10]等。随着技术水平的发展,Notomi 等^[11]在本世纪初建立了环介导等温扩增技术(Loop-mediated isothermal amplification, LAMP),该技术和普通 PCR 相比,具有检测所需时间短、特异性强、灵敏度高和检测结果可直接用肉眼判别等优点,因此很快被广泛应用于细菌、病毒、寄生虫及植物病原真菌的检测。迄今为止,将 LAMP 技术应用于大豆种子带菌检测的报道不多。田擎等^[12]采用特异的 LAMP 检测体系(*Rbp1*-Ct-LAMP)对来自全国各地的 10 份大豆种子样本进行检测,发现其中有 6 份种子携带平头炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)。曾丹丹等^[13]采用特异针对 13 种主要病原菌的 LAMP 检测体系对我国黄淮地区大豆样本进行检测,结果在 29 个品种(系)中发现有 20 个携带病原菌。

东北地区是我国主要的大豆产区之一,在不同年度均有关于病害发生的报道^[14],然而目前关于该地区主栽大豆品种种子带菌情况的相关研究较少。本研究采用本实验室研发的可以分别特异性检测 16 种大豆主要病原菌的 LAMP 检测技术,首次结合超声波震荡洗涤大豆种子的方法,对东北地区的 52 个大豆主要品种(系)进行种子带菌的检测分析,以期大豆种子产区间安全调运、播前种子处理等提供理论依据,同时也为大豆种传病原菌的快速检测提供新的技术。

1 材料与方法

1.1 供试种子材料及其基因组 DNA 的提取

东北地区主栽的 52 个大豆品种(系)的种子由黑龙江省农业科学院佳木斯分院的丁俊杰老师提供。每份大豆种子在容器中混匀后,采用五点取样法称取 50 g,倒入事先用 ddH₂O 润洗过的干净三角瓶(250 mL)中,随后加入 200 mL ddH₂O,滴加 3~5 滴的 20% 吐温。用锡箔纸封住瓶口后,置于超声波清洗器的水槽内,以 40 kHz 的频率震荡洗涤 10 min。

用 200 目钢筛对震荡洗涤后的混合液进行过滤,过滤后钢筛上剩下的大豆残渣用少量 ddH₂O 冲洗。将收集的滤液分装于 50 mL 离心管中,用冷冻离心机以 6 500 r·min⁻¹ 的转速离心 5 min,弃上清液后收集沉淀。沉淀物 DNA 的提取与保存参见曾丹丹等^[13]报道的方法。

1.2 大豆种子携带病原菌的 LAMP 检测

采用本实验室较新研发的 16 个 LAMP 检测技术,可特异性检测大豆 16 种主要病原菌,包括:胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、平头炭疽菌(*C. truncatum*)、冬青丽赤壳菌(*Calonectria ilicicola*)、亚细亚镰孢菌(*Fusarium asiaticum*)、木贼镰孢菌(*F. equiseti*)、黄色镰孢菌(*F. culmorum*)、禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)、尖镰孢菌(*F. oxysporum*)、层出镰孢菌(*F. proliferatum*)、茄腐镰孢菌(*F. solani*)、接骨木镰孢菌(*F. sambucinum*)、轮枝镰孢菌(*F. verticillioides*)、大豆炭腐病菌(*Macrophomina phaseolina*)、大豆拟茎点种腐病菌(*Phomopsis longicolla*)、大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)和立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)。

其中,用于层出镰孢菌 LAMP 检测的特异性引物(未发表)见表 1,其它 15 种病原菌的 LAMP 特异性检测方法见表 2。LAMP 反应体系的总体积为 26 μL,其中:10 × ThermoPol Buffer 2.5 μL, MgSO₄ (50 mmol·L⁻¹) 4 μL,甜菜碱(5 mol·L⁻¹) 4 μL, dNTPs (10 mmol·L⁻¹) 3.5 μL, 内引物 FIP 和 BIP (20 μmol·L⁻¹) 各 2 μL, 外引物 F3 和 B3 (10 μmol·L⁻¹) 分别为 0.5 μL, 环引物 LF 和 LB (10 μmol·L⁻¹) 分别为 1 μL, HNB (2.4 mmol·L⁻¹) 2 μL, Bst DNA 聚合酶(8 U·μL⁻¹) 1 μL, 大豆种子样品提取的 DNA 2 μL。反应温度是 62℃ 恒温,反应时间是 70 min。反应结果可用肉眼直接进行观察判断,呈天蓝色时为阳性,呈紫色则为阴性。检测过程中以特定的目标病原菌标准菌株的 DNA 为模板作为阳性对照,以 ddH₂O 代替病菌的 DNA 作为阴性对照。

1.3 大豆种子携带病原菌的分离验证

根据 LAMP 检测结果,选取携带病原菌种类较多的 6 个大豆品种(系)育苗并诱导幼苗自然发病,对发病组织进行病原菌的分离鉴定,进一步验证大豆种子带菌的 LAMP 检测结果,具体方法参见曾丹丹等^[13]。采用植物组织提取基因组试剂盒提取病原菌纯菌丝的基因组(DNAsecure Plant Kit;天根生化科技(北京)有限公司,离心柱型,方法步骤参见说明书),并用 LAMP 体系再次对所提取的 DNA 样本进行种的特异性鉴定。

表 1 用于检测层出镰孢菌的 LAMP 引物

Table 1 LAMP primers used for specific detection of *Fusarium proliferatum*

目标病原菌	靶标基因	灵敏度	引物名称	序列
Target pathogen	Target gene	Sensitivity/(pg·μL ⁻¹)	Primer name	Sequence(5' ~ 3')
层出镰孢菌 <i>F. proliferatum</i>	<i>RED1</i>	400	Fp-FIP	CTATGCCAGAGCCGACGTAGACC
				CAAGCATTCCTCCCCCT
			Fp-BIP	GACCCCAATGGCTGAGGTACCTC
				GCGAAGTAGTCAACCATCT
			Fp-F3	ATCGGCGTTTTCAACTCTCT
			Fp-B3	TTGGATGCTGACGACATGAA
			Fp-LF	CTTTGCAGCTGGGGCTG
			Fp-LB	GTTTACTTACGCCGCCGCCAAA

表 2 其它 15 种大豆病原菌的 LAMP 检测技术

Table 2 LAMP assays used for the other 15 species of pathogens

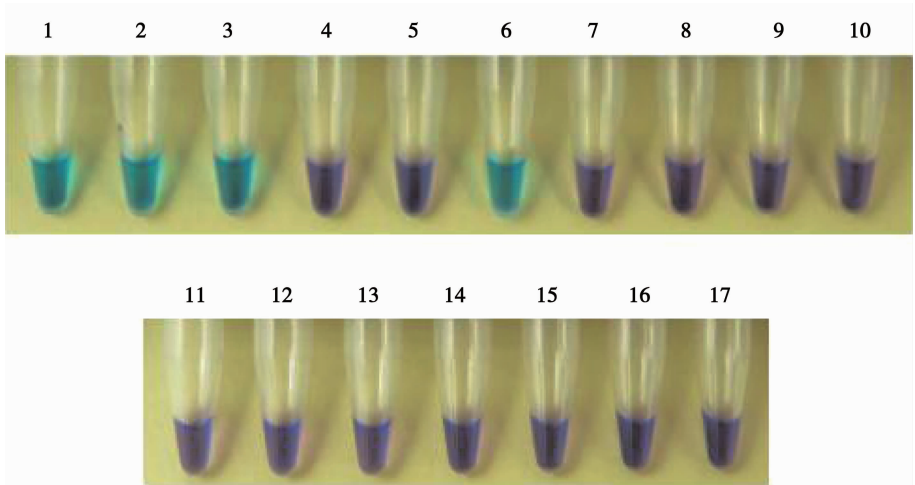
技术体系名称	目标病原菌	靶标基因	灵敏度	参考文献
Name of LAMP assay	Pathogen detected	Target gene	Sensitivity/(pg·μL ⁻¹)	Reference
<i>GS-Cg-LAMP</i>	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<i>IGS</i>	1	专利 ZL201510030095.6 ^[15]
<i>Rpb1-Ct-LAMP</i>	<i>C. truncatum</i>	<i>Rpb1</i>	100	Tian 等 ^[12]
<i>TUB-Ci-LAMP</i>	<i>Calonectria ilicicola</i>	<i>β-tublin</i>	10	陆辰晨 ^[3]
<i>CYP51C-Fas-LAMP</i>	<i>Fusarium asiaticum</i>	<i>CYP51C</i>	100	Xu 等 ^[16]
<i>CYP51C-Fc-LAMP</i>	<i>F. culmorum</i>	<i>CYP51C</i>	100	Zeng 等 ^[17]
<i>CYP51C-Fe-LAMP</i>	<i>F. equiseti</i>	<i>CYP51C</i>	100	Lu 等 ^[18]
<i>CYP51C-Fg-LAMP</i>	<i>F. graminearum</i>	<i>CYP51C</i>	100	Lu 等 ^[18]
<i>CYP51C-Fo-LAMP</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>CYP51C</i>	100	Lu 等 ^[19]
<i>TEF-1α-Fs-LAMP</i>	<i>F. solani</i>	<i>TEF-1α</i>	100	陆辰晨 ^[3]
<i>TEF-1α-Fsa-LAMP</i>	<i>F. sambucinum</i>	<i>TEF-1α</i>	100	许苗 ^[20]
<i>Pgk-Fv-LAMP</i>	<i>F. verticillioides</i>	<i>Pgk</i>	100	曾丹丹 ^[22]
<i>ITS-Mp-LAMP</i>	<i>Macrophomina phaseolina</i>	<i>ITS</i>	100	Lu 等 ^[22]
<i>TEF1α-Pl-LAMP</i>	<i>Phomopsis longicolla</i>	<i>TEF1α</i>	100	Dai 等 ^[23]
<i>A3apro-Ps-LAMP</i>	<i>Phytophthora sojae</i>	<i>A3apro</i>	10	Dai 等 ^[24]
<i>ITS-Rs-LAMP</i>	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>ITS</i>	10	Lu 等 ^[22]

2 结果与分析

2.1 东北地区大豆种子携带 16 种病原菌的 LAMP 检测结果

应用能分别特异性检测 16 种大豆主要病原菌的 16 个 LAMP 检测技术,对东北地区 52 个品种

(系)的大豆种子的带菌情况进行 LAMP 检测。以品种绥 12-18 种子带菌的 LAMP 检测结果为例,可通过肉眼观察直接判断出其大豆种子携带有大豆拟茎点种腐病菌(*Phomapsis longicolla*)、立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、木贼镰孢菌(*Fusarium equiseti*)和亚细亚镰孢菌(*F. asiaticum*)4 种病原菌(图 1)。



1:拟茎点种腐病菌; 2:立枯丝核菌;3:木贼镰孢菌;4:层出镰孢菌;5:黄色镰孢菌;6:亚细亚镰孢菌;7:禾谷镰孢菌;8:尖镰孢菌;9:茄腐镰孢菌;10:接骨木镰孢菌;11:轮枝镰孢菌;12:大豆炭腐病菌;13:冬青丽赤壳菌;14:平头炭疽菌;15:胶孢炭疽菌;16:大豆疫霉病菌;17:阴性对照。

1: *Phomopsis longicolla*; 2: *Rhizoctonia solani*; 3: *Fusarium equiseti*; 4: *F. proliferatum*; 5: *F. culmorum*; 6: *F. asiaticum*; 7: *F. graminearum*; 8: *F. oxysporum*; 9: *F. solani*; 10: *F. sambucinum*; 11: *F. verticillioides*; 12: *Macrophomina phaseolina*; 13: *Calonectria ilicicola*; 14: *Colletotrichum truncatum*; 15: *C. gloeosporioides*; 16: *Phytophthora sojae*; 17: Negative control.

图 1 绥 12-18 大豆种子携带病原菌的 LAMP 检测结果

Fig. 1 Results of the LAMP assays for Sui 12-18 soybean cultivar

表 3 为 52 个大豆品种(系)种子携带病原菌的检测结果,表明东北地区大豆种子普遍带菌。供试品种(系)中有 73. 08% 的品种(系)的种子样本携带上述某些病原菌;不同品种(系)的大豆种子携带病原菌的种类与数量有较大差异,如绥 12-18 和 29182 的种子均携带 4 种病原菌,而绥 13-5973 仅携带 1 种病原菌;在 16 种病原菌中,供试种子样本共检测到 8 种病原菌,其中大豆拟茎点种腐病菌的检出率最高,达 36. 54%,即 19 个品种(系)检测到大豆拟茎点种腐病菌,其次是立枯丝核菌,检出率为 23. 08%,再次是木贼镰孢菌,检出率为 19. 23%。此外,亚细亚镰孢菌、禾谷镰孢菌、尖镰孢菌、层出镰孢菌和平头炭疽菌 5 种病原菌的检出率由高到低,分别是 15. 38%、11. 54%、3. 85%、3. 85%

和 1. 92%。

2. 2 东北地区大豆种子携带病原菌的分离与鉴定

选择携带病原菌种类较多的绥 12-18、圣豆 37、29182、2561、1545 和合丰 47 共 6 个品种(系)育苗并诱导幼苗自然发病后,对发病组织进行病原菌的分离鉴定,以验证上述 LAMP 检测结果的可靠性。从结果可以看出,6 个品种(系)的种子所携带的病原菌大部分可以引起大豆幼苗发病,同时分离菌株的鉴定结果与种子携带病原菌的 LAMP 检测结果基本一致(表 4)。部分在种子 DNA 中被检测发现的病原菌在组织分离与鉴定中未被发现,可能是由于分离方法的检测灵敏度远远低于 LAMP 检测,或是种子带菌量低而不足以引起大豆幼苗发病等原因所导致。

表 3 东北地区 52 个大豆品种(系)种子携带病原菌的 LAMP 检测结果

Table 3 LAMP detection of soybean seed-borne pathogens

序号 No.	大豆品种(系) Soybean cultivars (lines)	检测到的病原菌 Pathogens detected	序号 No.	大豆品种(系) Soybean cultivars (lines)	检测到的病原菌 Pathogens detected
1	绥 13-6067 Sui 13-6067	Fe, Fas	27	峰豆 1 号 Fengdou 1	—
2	绥 13-5973 Sui 13-5973	Fg	28	宝交 13-5203 Baojiao 13-5203	Rs
3	绥 13-5784 Sui 13-5784	—	29	K99	Rs
4	绥 135007 Sui 135007	Fe, Rs	30	K100	Fe
5	绥 12-18 Sui 12-18	Fe, Pl, Rs, Fas	31	15-189	Pl, Fas
6	绥 10-6053 Sui 10-6053	Fas	32	12-0932	—
7	双 702 Shuang 702	Fo	33	12-036	Pl
8	双 602 Shuang 602	Fe, Fg	34	29182	Fe, Fg, Pl, Fas
9	双 302 Shuang 302	Fe, Pl	35	2946	Fg, Pl

续表 3

序号 No.	大豆品种(系) Soybean cultivars(lines)	检测到的病原菌 Pathogens detected	序号 No.	大豆品种(系) Soybean cultivars(lines)	检测到的病原菌 Pathogens detected
10	圣豆 37 Shengdou 37	Fe, Fg, Pl	36	2744	—
11	垦农黑豆 2 号 Kennongheidou 2	Rs	37	2593	Pl
12	垦农大粒豆 Kennongdalidou	Pl	38	2561	Pl, Ct, Rs
13	垦农 64 Kennong 64	—	39	1548	—
14	垦农 55 Kennong 55	Pl	40	1545	Pl, Fp, Fas
15	垦农 54 Kennong 54	—	41	1036	Pl, Rs
16	垦农 53 Kennong 53	Pl	42	948	Fg
17	垦农 52 Kennong 52	—	43	866	—
18	垦农 51 Kennong 51	Pl	44	849	—
19	垦农 50 Kennong 50	Fp	45	774	Fg
20	垦农 49 Kennong 49	Fe, Fo	46	664	—
21	垦农 47 Kennong 47	Rs	47	620	Pl
22	垦农 46 Kennong 46	—	48	612	Pl
23	垦农 45 Kennong 45	Rs	49	182	Pl
24	垦丰 14 Kenfeng 14	—	50	148	Rs
25	江农 417 Jiangnong 417	—	51	142	Pl
26	江农 416 Jiangnong 416	Fas	52	合丰 47/Hefeng 47	Rs, Fas

Ct;平头炭疽菌;Fo;尖镰孢菌;Fe;木贼镰孢菌;Fp;层出镰孢菌;Fg;禾谷镰孢菌;Fas;亚细亚镰孢菌;Pl;拟茎点种腐病菌;Rs;立枯丝核菌;—:没有检测到。

Ct;Colletotrichum truncatum; Fo; Fusarium oxysporum; Fe; F. equiseti; Fp; F. proliferatum; Fg; F. graminearum; Fas; F. asiaticum; Pl; Phomopsis longicolla; Rs; Rhizoctonia solani; —: None.

表 4 6 个大豆品种(系)种子携带的病原菌的分离与鉴定结果

Table 4 Isolation and identification of soybean seed-borne pathogens in 6 soybean cultivars(lines)

大豆品种(系) Soybean cultivars(lines)	组织分离 Pathogens isolated	LAMP 检测 Pathogens detected by LAMP assays
绥 12-18 Sui 12-18	Fe, Pl, Rs	Fe, Pl, Rs, Fas
圣豆 37 Shengdou 37	Fe, Fg, Pl	Fe, Fg, Pl
29182	Fe, Fg, Pl	Fe, Fg, Pl, Fas
2561	Pl	Pl, Ct, Rs
1545	Pl	Pl, Fp, Fas
合丰 47 /Hefeng 47	—	Rs, Fas

Ct;平头炭疽菌;Fe;木贼镰孢菌;Fp;层出镰孢菌;Fg;禾谷镰孢菌;Fas;亚细亚镰孢菌;Pl;拟茎点种腐病菌;Rs;立枯丝核菌;—:没有检测或分离到。

Ct;Colletotrichum truncatum; Fe; F. equiseti; Fp; F. proliferatum; Fg; F. graminearum; Fas; F. asiaticum; Pl; Phomopsis longicolla; Rs; Rhizoctonia solani; —: None.

3 结论与讨论

本研究基于一套新开发的能特异性检测 16 种大豆主要病原菌的 LAMP 检测体系,对东北地区 52 个大豆主要品种(系)的种子进行了带菌检测。研究结果表明,东北地区大豆种子携带病原菌是一种普遍现象。供试的 52 个品种(系)中有 38 个品种的种子携带病原菌,即种子带菌的品种占 73.08%。

在上述种子样本中共检测到大豆拟茎点种腐病菌、立枯丝核菌、木贼镰孢菌、亚细亚镰孢菌、禾谷镰孢菌、层出镰孢菌、尖镰孢菌和平头炭疽菌 8 种病原菌。其中检出率最高的是大豆拟茎点种腐病菌,达 36.54%,其次是立枯丝核菌,检出率为 23.08%,再次是木贼镰孢菌,检出率为 19.23%。本研究结果对了解该地区大豆种子携带病原菌的状况提供了有价值的参考,并为大豆种子带菌的快速检测和鉴

定提供了新的方法。

将本研究的检测结果与曾丹丹等^[13]对我国黄淮地区大豆种子携带病原菌的 LAMP 检测结果相比较,发现平头炭疽菌、木贼镰孢菌、尖镰孢菌、层出镰孢菌和大豆拟茎点种腐病菌 5 种病原菌在来自东北和黄淮地区的大豆品种(系)上均被检测到;但东北地区检出率最高的是大豆拟茎点种腐病菌,其次是立枯丝核菌,而黄淮地区检出率最高的是平头炭疽菌,其次是大豆拟茎点种腐病菌^[13];东北地区品种(系)绥 12-18 和 29182 检出的病原菌多达 4 种,而黄淮地区带菌种类最多的品种漂 39001 携带有 6 种病原菌^[13]。两次结果的对比从一定程度上反映了两个大豆主产区之间不同大豆种子在携带病原菌的种类和数量上存在差异。

与过去的大豆种子带菌的 LAMP 检测研究^[12-13]相比,本研究不仅选取了更为丰富的大豆品种和待检测的目标菌,还在供试大豆种子携带病原菌的取样方法上作了改进,即用超声波震荡洗涤种子表面的方法替代了传统的对种子的摇床震荡洗涤法(见材料方法 1.1)。在预试验中,以大豆品种合丰 47 种子为样本,采用上述两种方法分别洗涤处理种子样本后提取基因组 DNA 供 LAMP 检测,经过 3 次重复试验,发现供试种子经超声波震荡处理后提取的 DNA 中检测出了亚细亚镰孢菌(*F. asiaticum*)和立枯丝核菌(*R. solani*),而用传统的摇床震荡洗涤提取的 DNA 中未得到任何阳性结果。因此,本研究采用的超声波震荡种子洗涤处理方法有助于提高种子带菌检测的灵敏度,能更准确反映大豆种子表面带菌的真实状况。

传统的种子带菌检测方法一般都存在检测所需时间长、操作较复杂、难以鉴定到病原菌种等问题。本研究所采用的 LAMP 技术依赖于识别靶标序列上 6 个特异区域的 4 条引物,能够在等温条件下特异、高效、快速地扩增靶标基因^[11]。此外,基于 LAMP 建立的检测技术操作简单、不需要昂贵设备、成本较低。应用 LAMP 技术完成一次大豆种子带菌检测,整个过程只需 4 h 左右。而且本实验室研发的 16 个 LAMP 检测技术是分别特异性针对 16 种病原菌的,因而病原菌的检测与种的鉴定可同步完成。

参考文献

[1] 刘志勇. 大豆种子主要寄藏真菌及其分布[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012. (Liu Z Y. The main genraand distribution of seed - borne [D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2012.)

[2] 马淑梅, 丁俊杰, 顾鑫, 等. 黑龙江省大豆主要病害发生危害

调查[J]. 黑龙江农业科学, 2005(6): 48-52. (Ma S M, Ding J J, Gu X, et al. Survey on the occurrence and damage in main disease of soybean in Heilongjiang province [J]. Heilongjiang Agrcultural Sciences, 2005(6): 48-52.)

[3] 陆辰晨. 基于环介导等温扩增技术快速诊断大豆根部主要病害的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2015. (Lu C C. Rapid diagnosis of soybean root diseases based on Loop-mediated isothermal amplification(LAMP)[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2015.)

[4] Souma J, Takeda N. Occurrence of soybean root necrosis caused by *Calonectria ilicicola* in Hokkaido[J]. 53rd Annual Report of the Society of Plant Protection of North Japan, 2002, 53:101-104.

[5] 崔友林. 大豆茎枯病病原菌鉴定及 3 种检疫性大豆病原菌适生性分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009. (Cui Y L. I-identification of pathogen causing soybean stem blight and potential geographic distribution of three quarantine pathogens of soybean [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2009.)

[6] 魏思楠, 朱晓峰, 陈立杰, 等. 我国不同地区大豆主栽品种种子携带真菌研究[J]. 大豆科学, 2014, 33(6): 890-895. (Wei S N, Zhu X F, Chen L J, et al. Seed-borne fungi detection in different soybean cultivars [J]. Soybean Science, 2014, 33(6): 890-895.)

[7] Ahmad I S, Reid J F, Paulsen M R, et al. Color classifier for symptomatic soybean seeds using image processing[J]. Plant Disease, 1999, 83(4): 320-327.

[8] Begum M M, Sariah M, Puteh A B, et al. Detection of seed-borne fungi and site of infection by *Colletotrichum truncatum* in naturally-infected soybean seeds[J]. International Journal of Agricultural Research, 2007, 2(9): 812-819.

[9] ShovanL R, Bhuiyan M K A, Sultana N, et al. Prevalence of fungi associated with soybean seeds and pathogenicity tests of the major seed-borne pathogens[J]. International Journal of Sustainable Crop Production, 2008, 3(4): 24-33.

[10] 张仑, 殷幼平, 王中康. 环介导等温扩增技术的研究进展[J]. 贵州农业科学, 2009, 37: 21-25. (Zhang L, Ying Y P, Wang Z K. The advances and development of loop-mediated isothermal amplification method[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 2009, 37: 21-25.)

[11] Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63-E63.

[12] 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.

[13] 曾丹丹, 张海峰, 田擎, 等. 基于环介导等温扩增技术检测黄淮地区大豆主栽品种种子携带的病原菌[J]. 南京农业大学学报, 2016, 39(6): 947-953. (Zeng D D, Zhang H F, Tian Q, et al. Detection of soybean seed-borne pathogens in Huang-huai area using LAMP assays[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2016, 39(6): 947-953.)

[14] 李沐慧. 东北地区大豆田间病害调查研究与鉴定[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016. (Li M H. Investigation and identification of soybean diseases in Northeast China[D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University, 2016.)

ARIMA model and the a RCH-type models [J]. Statistics & Information Forum, 2013(6): 16-21.)

[6] 段青玲,张磊,魏芳芳,等. 基于时间序列 GA-SVR 的水产品价格预测模型及验证[J]. 农业工程学报,2017,33(1):308-314. (Duan Q L, Zhang L, Wei F F, et al. Forecasting model and validation for aquatic product pricebased on time series GA-SVR[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2017,33(1): 308-314.)

[7] 喻胜华,龚尚花. 基于 Lasso 和支持向量机的粮食价格预测[J]. 湖南大学学报(社会科学版),2016,30(1):71-75. (Yu S H, Gong S H. A study price prediction based on Lasso and support vector machine [J]. Journal of Hunan University (Social Sciences), 2016, 30(1): 71-75.)

[8] Gandhi N, Petkar O, Armstrong L J, et al. Rice crop yield prediction in India using support vector machines[C]//Computer Science and Software Engineering (JCSSE), 2016 13th International Joint Conference on. IEEE, 2016: 1-5.

[9] Yousefi M, Khoshnevisan B, Shamshirband S, et al. Support vector regression methodology for prediction of output energy in rice production[J]. Stochastic environmental research and risk assessment, 2015, 29(8): 2115-2126.

[10] Su Y, Xu H, Yan L. Support vector machine-based open crop model (SBOCM): Case of rice production in China[J]. Saudi Journal of Biological Sciences, 2017, 24(3): 537-547.

[11] 陈荣,梁昌勇,谢福伟. 基于 SVR 的非线性时间序列预测方法应用综述[J]. 合肥工业大学学报(自然科学版),2013,36(3):369-374. (Chen R, Liang C Y, Xie F W. Application of nonlinear time series forecasting methods based on support vector regression [J]. Journal of Hefei University of Technology(Natural Science), 2013,36(3):369-374.)

[12] 林树宽,杨玫,乔建忠等. 一种非线性非平稳时间序列预测建模方法[J]. 东北大学学报(自然科学版),2007,28(3): 325-328. (Lin S K, Yand M, Qiao J Z, et al. Prediction modeling method for non-linear and nonstationary time series [J]. Journal of Northeastern University(Natural Science), 2007, 28(3): 325-328.)

[13] 徐进,费少梅,张树有等. 自适应粒子群求解资源动态分配项目调度问题[J]. 计算机集成制造系统, 2011, 17(8): 1790-1797. (Xu J, Fei S M, Zhang S Y, et al. Adaptive particle swarm optimization for the project scheduling problem with dynamic allocation of resource [J]. Computer Integrated Manufacturing Systems, 2011, 17(8): 1790-1797.)

[14] 刘欢,张冬青. 基于分位数回归的国产大豆价格影响因素分析[J]. 大豆科学,2014,33(5):759-763. (Liu H,Zhang D Q. Analysis on influencing factors of domestic soybean price based on quantile regression [J]. Soybean Science, 2014, 33(5): 759-763.)

(上接第 597 页)

[15] 郑小波,王帅帅,陆辰晨,等. 一种检测胶孢炭疽菌的环介导等温扩增引物组合物及其应用: 中国, 201510030095. 6[P]. 2015-05-13. (Zheng X B, Wang S S, Lu C C, et al. A primer combination for detecting *Colletotrichum gloeosporioides* using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays and its application: China, 201510030095. 6[P]. 2015-05-136.)

[16] Xu M, Ye W W, Zeng D D, et al. Rapid diagnosis of wheat head blight caused by *Fusarium asiaticum* using a loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Australasian Plant Pathology, 2017, 46(3):261-266.

[17] Zeng D D, Ye W W, Xu M, et al. Rapid diagnosis of soybean root rot caused by *Fusarium culmorum* using a loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Journal of Phytopathology, 2017, 165(4): 249-256.

[18] Lu C C, Zhang H F, Wang Y C, et al. Rapid diagnosis of *Fusarium* root rot in soybean caused by *Fusarium equiseti*, or *Fusarium graminearum*, using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays [J]. Australasian Plant Pathology, 2015, 44(4): 437-443.

[19] Lu C C, Dai T T, Zhang H F, et al. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay to detect *Fusarium oxysporum* [J]. Journal of Phytopathology, 2015, 163(1): 63-66.

[20] 许苗,叶文武,王淑琛,等. 快速检测马铃薯干腐病病原接骨

木镰孢的环介导等温扩增技术[J]. 植物病理学报, 2017. DOI: 10.13926/j.cnki.apps.000038. (Xu M, Ye W W, Wang S C, et al. Rapid diagnose of potato dry rot caused by *Fusarium sambucinum* using a loop-mediated isothermal amplification assay [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2017. DOI: 10.13926/j.cnki.apps.000038.)

[21] 曾丹丹. 拟轮枝镰孢、黄色镰孢、雪松疫霉、栗黑水疫霉及大豆种传病原菌的 LAMP 检测[D]. 南京: 南京农业大学, 2017. (Zeng D D. LAMP detetion of *Fusarium Verticillioide*s, *F. Culorum*, *Phytophthora Lateralis*, *P. Cambivora* and seed-borne pathogens on soybean[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2017.)

[22] Lu C C, Song B, Zhang H F, et al. Rapid diagnosis of soybean seedling blight caused by *Rhizoctonia solani* and soybean charcoal rot caused by *Macrophomina phaseolina* using LAMP assays[J]. Phytopathology, 2015, 105(12): 1612.

[23] Dai T T, Shen H, Zheng X B. Establishment and evaluation of aTEF1- α , based loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Phomopsis longicolla*[J]. Australasian Plant Pathology, 2016, 45(3): 335-337.

[24] 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.