

## 实验方法与技术

## Experimental Method &amp; Technology

## 豇豆疫霉 LAMP 检测方法的建立

李本金<sup>1</sup>, 刘小丽<sup>1</sup>, 刘裴清<sup>1</sup>, 王荣波<sup>1</sup>, 翁启勇<sup>1,2,\*</sup>, 陈庆河<sup>1,2,\*</sup>

(1. 福建省农业科学院植物保护研究所, 福建省作物有害生物监测与治理重点实验室, 福州 350013;

2. 福建农林大学, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福州 350002)

**摘要** 本研究以豇豆疫霉 *Phytophthora vignae* Purss 核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列为靶标片段,设计4条特异性引物,建立了环介导等温扩增(LAMP)检测方法。特异性检测结果表明:8株不同地理来源的豇豆疫霉菌株 LAMP 检测均为阳性(绿色),扩增产物用 2.0%琼脂糖凝胶电泳出现特有的梯形条带,而其他 11种卵菌近缘种及 12种常见病原真菌和细菌共 42个菌株均未观察到这些现象。灵敏度分析显示:该方法检测灵敏度在 DNA 水平上可达到 100 fg/25  $\mu$ L。采用 LAMP 方法对福建建瓯和宁德采集的 62份疑似豇豆疫病菌病株样本进行检测,并用组织分离方法进行验证。结果表明,LAMP 和组织分离方法的检出率分别为 67.7%(42/62)和 61.3%(38/62)。综合以上结果,LAMP 方法具有特异性强、灵敏度高、快速高效、操作简单的特点,适合基层部门用于田间豇豆疫霉快速检测。

**关键词** 豇豆疫霉; 内转录间隔区(ITS); 环介导等温扩增技术(LAMP); 分子检测

**中图分类号:** S 436.43 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017389

Development of a LAMP assay for the detection of *Phytophthora vignae*LI Benjin<sup>1</sup>, LIU Xiaoli<sup>1</sup>, LIU Peiqing<sup>1</sup>, WANG Rongbo<sup>1</sup>, WENG Qiyong<sup>1,2</sup>, CHEN Qinghe<sup>1,2</sup>

(1. Fujian Key Laboratory for Monitoring and Integrated Management of Crop Pests, Institute of Plant Protection, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; 2. State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

**Abstract** A set of four primers for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) were designed according to the internal transcribed spacer (ITS) sequence of *Phytophthora vignae*. The LAMP reaction conditions were optimized. The specificity, the sensitivity were assayed and the diseased cowpea tissues were detected using the optimized LAMP method. The specificity analysis results showed that eight *P. vignae* isolates from different counties of Fujian were positive (green color in reaction tube) and the reaction products showed typical ladder-like banding pattern on 2.0% agarose gel, but 29 isolates of 11 closely related species of oomycetes and 13 isolates of other plant pathogenic fungi and bacteria did not. Sensitivity analysis indicated that 100 fg DNA in 25  $\mu$ L PCR reaction solution could be detected using the developed LAMP detection system. A total of 62 cowpea suspected infected samples collected from Jian'ou and Ningde County were examined by the LAMP detection system and verified using the conventional tissue isolation method. The results showed that the detection rates were 67.7% (42 of 62) by the LAMP assay and 61.3% (38 of 62) for the conventional culture method, respectively. We concluded that the developed LAMP assay was specific, sensitive, fast and simple, and can be used in field detection of *P. vignae*.

**Key words** *Phytophthora vignae*; ITS; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); molecular detection

由豇豆疫霉 *Phytophthora vignae* Purss 引起的疫病于 1984 年在广州地区首次报道<sup>[1]</sup>,现已成为豇豆生产中的重要病害。该病主要危害茎蔓、叶片和豆荚,发病率一般为 25%~35%,严重的高达 75%。在高温多雨时,病情发展迅速,流行性强且具

毁灭性,给豇豆产量造成重大损失<sup>[2]</sup>。近几年由于保护地栽培面积不断扩大,重茬连作增多,该病有逐渐加重的趋势。为控制病害的扩展蔓延,建立快速检测和诊断豇豆疫霉技术非常必要。

目前对豇豆疫霉的检测大多仍采用常规的组织

收稿日期: 2017-10-12 修订日期: 2017-12-22

基金项目: 福建省属公益类科研院所基本科研专项(2015R1024-2,2016R1023-1);生物农药与化学生物学教育部重点实验室开放基金(Keylab2016-01);福建省农业科学院植物保护科技创新团队(STIT2017-1-8)

\* 通信作者 E-mail: wengqy@faas. cn; chenqh@faas. cn

分离方法,而传统的分类鉴定方法耗时长,程序繁琐,一般需要数天时间才能完成,且必须拥有病原菌详细的分类资料,满足不了病害控制中快速、灵敏、稳定的检测要求。实时荧光 PCR 技术虽然灵敏度高、特异性强,但其缺点是需要昂贵的仪器设备和试剂,不利于基层推广应用。环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)是近年来发展起来的一种新型核酸检测技术<sup>[3]</sup>,其特点是针对靶基因的 6 个区域设计 4 条特异性引物,利用高活性链置换 DNA 聚合酶 (*Bst* DNA polymerase),在恒温条件(60~65℃)下对目的片段进行高效扩增,反应产物不仅可以通过凝胶电泳仪、实时监控浊度仪及 Real-time PCR 仪进行检测,而且还可以通过钙黄绿素、羟基萘酚蓝、SYBR Green I 染色后肉眼识别。LAMP 技术因其具有简便、快速、灵敏、特异等特征,已成功用于病毒、细菌、线虫、真菌等检测和诊断<sup>[4-7]</sup>。

核糖体转录间隔区 ITS 序列是由交替的保守区

和可变区组成,在微生物基因组中以多拷贝出现,具有种的特异性,因此该序列成为在种的水平鉴定病原菌的理想靶标。目前根据 ITS 序列设计特异引物已成功应用于烟草疫霉 *P. nicotianae*、隐地疫霉 *P. cryptogea*、冬生疫霉 *P. hibernalis*、致病疫霉 *P. infestans* 等疫霉的检测<sup>[8-11]</sup>。国内外尚未见豇豆疫霉检测研究的报道,为此,本研究针对核糖体内转录间隔区(ITS)序列设计特异性 LAMP 引物,建立豇豆疫霉快速检测体系,并对豇豆疫霉及带菌植株进行检测,以期为该病的早期诊断和及时防控提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

本试验所用的 50 个分离物包括来自福建省不同地区的 8 个豇豆疫霉分离物、10 种其他疫霉分离物、瓜果腐霉及豇豆地周围或前季栽培作物上分离的 12 种病原真菌和细菌。供试分离物寄主和来源详见表 1。

表 1 供试分离物

Table 1 Isolates used in this study

种名 Species	寄主 Host	来源 Source	分离物数量 No. of isolates
豇豆疫霉 <i>Phytophthora vignae</i>	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	福建 Fujian	8
黄瓜疫霉 <i>P. melonis</i>	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	福建 Fujian	4
草莓疫霉 <i>P. fragariae</i>	草莓 <i>Fragaria ananassa</i>	福建 Fujian	2
致病疫霉 <i>P. infestans</i>	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	福建 Fujian	3
大豆疫霉 <i>P. sojae</i>	大豆 <i>Glycine max</i>	福建 Fujian	6
烟草疫霉 <i>P. nicotianae</i>	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	福建 Fujian	4
棕榈疫霉 <i>P. palmivora</i>	大花蕙兰 <i>Cymbidium hybridum</i>	福建 Fujian	1
辣椒疫霉 <i>P. capsici</i>	辣椒 <i>Capsicum annuum</i>	福建 Fujian	3
柑橘生疫霉 <i>P. citricola</i>	柑橘 <i>Citrus reticulata</i>	广东 Guangdong	1
大雄疫霉 <i>P. megasperma</i>	大豆 <i>Glycine max</i>	安徽 Anhui	1
荔枝霜疫霉 <i>Peronophythora litchii</i>	荔枝 <i>Litchi chinensis</i>	福建 Fujian	3
瓜果腐霉 <i>Pythium aphanidermatum</i>	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	福建 Fujian	1
平头炭疽菌 <i>Colletotrichum truncatum</i>	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	福建 Fujian	1
尖孢镰孢菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	大豆 <i>Glycine max</i>	福建 Fujian	1
立枯丝核菌 <i>Rhizoctonia solani</i>	水稻 <i>Oryza sativa</i>	福建 Fujian	1
灰葡萄孢 <i>Botrytis cinerea</i>	马铃薯 <i>Solanum tuberosum</i>	福建 Fujian	1
甘薯长喙壳 <i>Ceratocystis fimbriata</i>	甘薯 <i>Ipomoea batatas</i>	福建 Fujian	1
豇豆单胞锈菌 <i>Uromyces vignae</i>	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	福建 Fujian	1
天门冬拟茎点霉 <i>Phomopsis asparagi</i>	芦笋 <i>Asparagus officinalis</i>	福建 Fujian	1
黄曲霉 <i>Aspergillus flavus</i>	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	福建 Fujian	1
茄链格孢 <i>Alternaria solani</i>	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	福建 Fujian	1
野油菜黄单胞菌 <i>Xanthomonas campestris</i>	豇豆 <i>Vigna unguiculata</i>	福建 Fujian	2
青枯假单胞菌 <i>Pseudomonas solanacearum</i>	番茄 <i>Lycopersicon esculentum</i>	福建 Fujian	1
丁香假单胞菌黄瓜致病变种 <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>lachrymans</i>	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	福建 Fujian	1

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌株培养及 DNA 提取

菌株培养与基因组 DNA 的提取参照文献<sup>[12]</sup>和<sup>[13]</sup>。

### 1.2.2 引物设计

以供试的豇豆疫霉 DNA 为模板,采用真菌 ITS 通用引物 ITS1 和 ITS4 进行 PCR 扩增<sup>[12]</sup>。扩增产物通过胶回收试剂盒进行纯化回收后,连接到

pMD18-T 载体,连接产物转化到大肠杆菌 *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ ,经 PCR 扩增鉴定为阳性的克隆送生工生物工程(上海)有限公司测序。

用 Primer 5.0 软件将测得的豇豆疫霉 rDNA-ITS 序列与 GenBank 数据库中已登录的 30 多种疫霉近缘种序列进行同源性分析,利用 Primer Explorer V4 软件在线设计 4 条 LAMP 引物,其中外引物为 F3(3'-

CTTGGCTCTCTTCCTTCCG-5') 和 B3 (3'-TCCTCCATTAAACGCCGC-5'),前内引物 FIP (3'-TTCAAGGGACTCGCAGGCAGTGTAGTCCGGTGGATG-GAGAC-5'),由 F1 的反向互补序列 F1c 加上 F2 构成,后内引物 BIP (3'-TTGCTCGAAAAGCGT-GACGTTG-AGCAGACAAACTGGTTCGC-5'),由 B1 的反向互补序列 B1c 加上 B2 构成(图 1)。

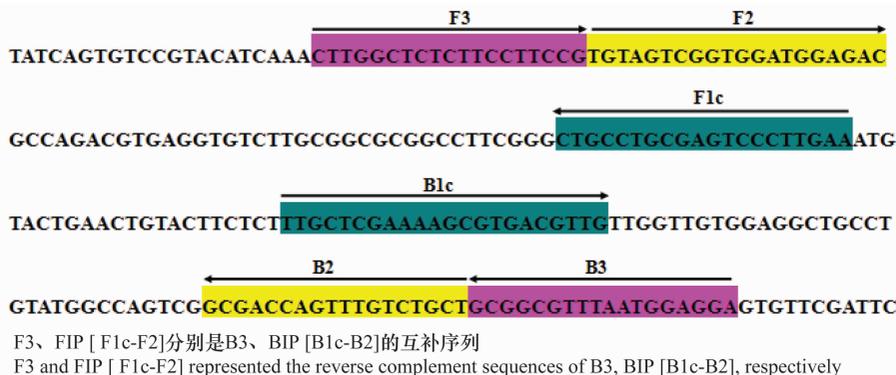


图 1 豇豆疫霉 LAMP 特异引物的设计图

Fig. 1 Partial sequence of *Phytophthora vignae* ITS and the location and sequences of four LAMP primers (F3, B3, FIP [F1c-F2] and BIP [B1c-B2]) targeting the *P. vignae* isolate

### 1.2.3 LAMP 反应体系和条件的优化

在反应温度 59~67℃,反应时间 30~90 min 范围内进行试验,以确定 LAMP 引物的最佳反应温度和时间。并对 LAMP 反应体系成分按以下范围进行优化,0.8~2.0 mmol/L dNTPs (Promega 公司,美国),0.6~1.6 mol/L 甜菜碱 (Sigma 公司,美国),2~12 mmol/L 硫酸镁 (Sigma 公司,美国),1~12 U *Bst* DNA 聚合酶 (New England Biolabs 公司,美国)。用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,条带最亮的为最佳使用浓度。本试验选用 50  $\mu$ mol/L 钙黄绿素-500  $\mu$ mol/L 氯化锰 (Sigma 公司,美国) 作为指示剂浓度<sup>[14]</sup>,阳性反应为绿色,阴性反应为橘黄色。

### 1.2.4 LAMP 反应的特异性检测

以 8 个豇豆疫霉分离物和其他 42 个分离物(卵菌、真菌和细菌)为材料,验证 LAMP 检测方法的特异性。以各菌株的 DNA 为模板,采用已优化的反应体系和程序进行试验,反应结束后,观察到绿色荧光的样品判断为阳性,橘黄色判断为阴性;或取 2  $\mu$ L 扩增产物用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,如果出现 LAMP 特征性的梯形带判断为阳性,没有出现扩增条带判断为阴性。

### 1.2.5 LAMP 反应的灵敏度检测

将豇豆疫霉 DNA 浓度用紫外分光光度计调为

100 ng/ $\mu$ L,并用豇豆植物组织液按 10 倍梯度( $10^{-1}$ ~ $10^{-8}$ )进行稀释,使其浓度依次为 10 ng/ $\mu$ L,1 ng/ $\mu$ L,100 pg/ $\mu$ L,10 pg/ $\mu$ L,1 pg/ $\mu$ L,100 fg/ $\mu$ L,10 fg/ $\mu$ L,1 fg/ $\mu$ L,然后以不同浓度的豇豆疫霉 DNA 为模板,对 LAMP 反应体系进行灵敏度验证。结果直接用肉眼观察,阳性反应显示绿色,阴性反应显示橘黄色,并用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.2.6 样品检测

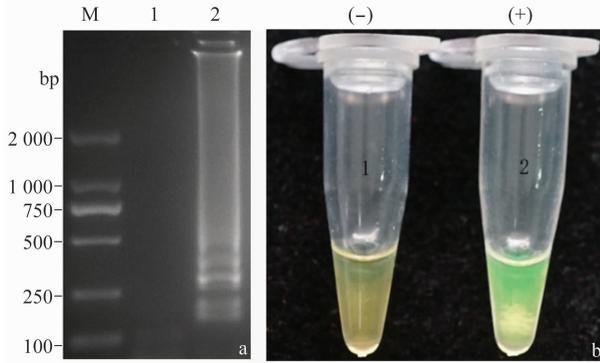
从福建建瓯和宁德采集 62 份豇豆疫病典型症状或可疑症状的植株以及 5 份健康的豇豆植株,用 NaOH 裂解法快速提取病组织 DNA 后,-20℃ 保存备用。采用可视化 LAMP 方法进行豇豆疫霉检测,并用传统组织分离方法加以验证,以确定 LAMP 方法的实际应用效果,每处理重复 3 次。以豇豆疫霉 DNA 为阳性对照,灭菌的超纯水为阴性对照。

## 2 结果与分析

### 2.1 LAMP 检测方法的建立

通过优化反应温度和时间,确定 LAMP 引物反应温度为 65℃,反应时间为 1 h。优化后用于检测豇豆疫霉的 LAMP 最佳反应体系为 25  $\mu$ L: 包括

2.5  $\mu\text{L}$  1 $\times$  Thermopol buffer, 1.0 mmol/L dNTPs, 0.2 mmol/L 外引物 F3 和 B3, 1.6 mmol/L 内引物 FIP 和 BIP, 0.8 mol/L 甜菜碱, 6.0 mmol/L 硫酸镁, 8 U *Bst* DNA 聚合酶, 10~50 ng DNA 模板, 50  $\mu\text{mol/L}$  钙黄绿素和 500  $\mu\text{mol/L}$  氯化锰, 不足部分用灭菌超纯水补足。反应条件为: 65 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h, 85 $^{\circ}\text{C}$  灭活 5 min。反应效果如图 2 所示。



a: LAMP产物琼脂糖凝胶电泳检测结果; b: LAMP产物钙黄绿素荧光显色结果。M: DL2000 DNA Marker; 1: 阴性对照(-); 2: 豇豆疫霉(+)  
a: LAMP assay detected by 2.0% agarose gel electrophoresis; b: Visual inspection of LAMP products stained by calcein, M: DL2000 DNA Marker; Lane 1 and Tube 1: Negative control; Lane 2 and Tube 2: *P. vignae*

图 2 LAMP 体系检测豇豆疫霉

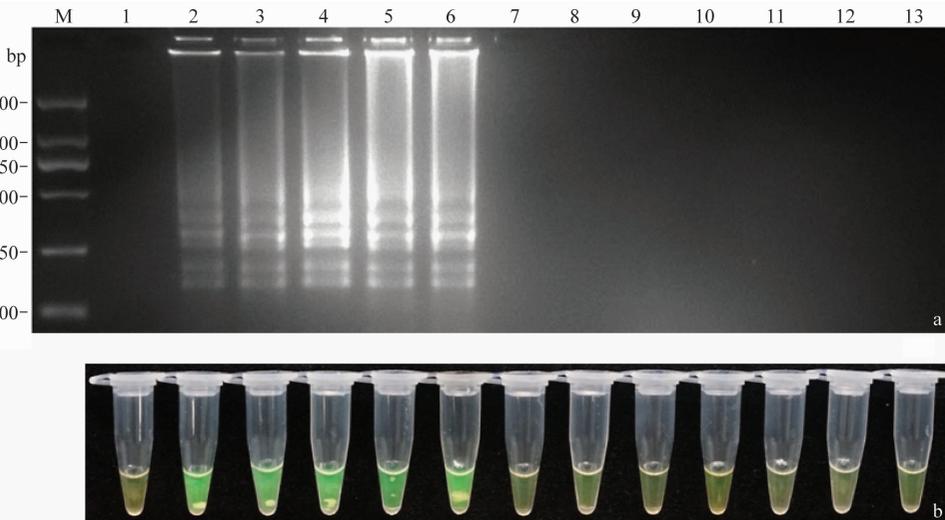
Fig. 2 Detection of *Phytophthora vignae* using the optimized LAMP system

## 2.2 特异性检测结果

分别以豇豆疫霉菌株和非豇豆疫霉菌株的 DNA 为模板进行 LAMP 扩增反应, 结果表明, 在钙黄绿素-氯化锰指示剂的作用下, 65 $^{\circ}\text{C}$  温育 1 h 后, 8 个不同地理来源的豇豆疫霉 LAMP 产物均显示绿色, 而其他供试的 11 种不同卵菌近缘种及 12 种常见病原真菌和细菌 LAMP 产物均显示橘黄色(图 3b)。进一步取 2  $\mu\text{L}$  扩增产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果除豇豆疫霉 LAMP 扩增产物出现特有的梯形条带外, 其他病原菌则没有出现任何条带(图 3a)。结果表明, 本研究建立的 LAMP 方法对豇豆疫霉具有很好的特异性。

## 2.3 灵敏度检测结果

为了验证 LAMP 体系的灵敏度, 以不同浓度 (10 ng/ $\mu\text{L}$ ~1 fg/ $\mu\text{L}$ ) 豇豆疫霉 DNA 为模板进行扩增, 琼脂糖凝胶电泳检测结果, 从 10 ng/25  $\mu\text{L}$  至 100 fg/25  $\mu\text{L}$  的模板 DNA 都可以出现 LAMP 产物特有的梯形条带(图 4a), 当豇豆疫霉 DNA 浓度少于 100 fg/25  $\mu\text{L}$  时没有出现任何条带。荧光染料显色结果与琼脂糖凝胶电泳是一致的(图 4b), 说明该 LAMP 反应体系可以检测到 100 fg/25  $\mu\text{L}$  的豇豆疫霉菌基因组 DNA。



a: LAMP产物琼脂糖凝胶电泳检测结果; b: LAMP产物钙黄绿素荧光显色结果。M: DL2000 DNA Marker; 1: 阴性对照; 2-6: 分离自不同地区的豇豆疫霉; 7: 黄瓜疫霉; 8: 致病疫霉; 9: 烟草疫霉; 10: 辣椒疫霉; 11: 瓜果腐霉; 12: 尖孢镰孢菌; 13: 立枯丝核菌  
a: LAMP assay detected by 2.0% agarose gel electrophoresis; b: Visual inspection of LAMP products stained by calcein. M: DL2000 DNA Marker; 1: Negative control; 2-6: *P. vignae* from different counties of Fujian; 7: *P. melonis*; 8: *P. infestans*; 9: *P. nicotianae*; 10: *P. capsici*; 11: *Pythium aphanidermatum*; 12: *Fusarium oxysporum*; 13: *Rhizoctonia solani*

图 3 LAMP 方法检测豇豆疫霉的特异性

Fig. 3 Specificity analysis of LAMP assay in detection of *Phytophthora vignae*

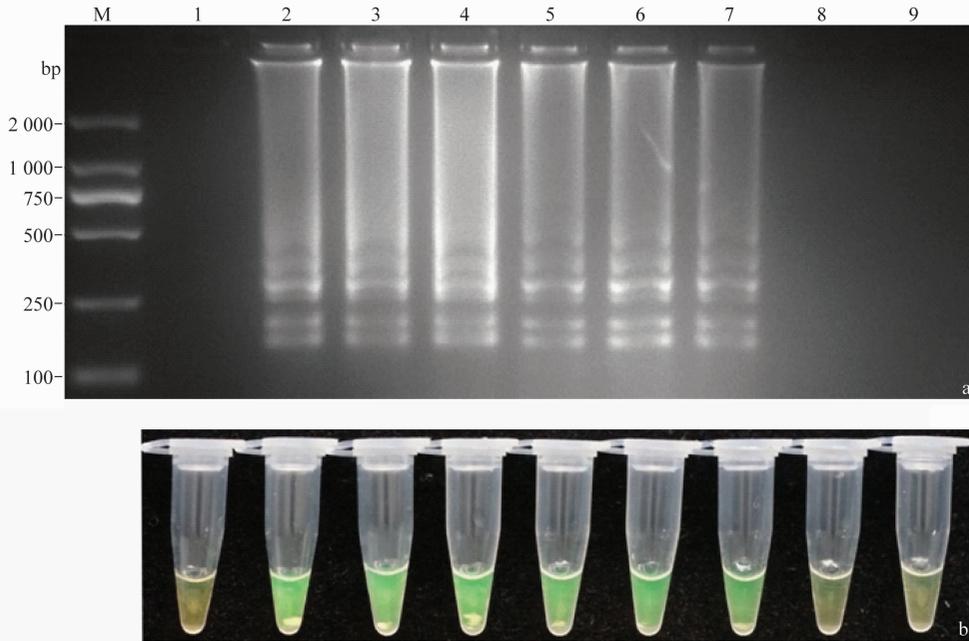
## 2.4 豇豆发病组织的检测

对福建建瓯和宁德采集的 62 份具有典型症状

或可疑症状的豇豆疫病植株进行检测, 结果表明, 传统分离培养和形态学鉴定共分离鉴定出 38 份豇

豆疫霉,检出率为 61.3%;使用 LAMP 方法检测出 42 份阳性样品(其中包含传统分离鉴定出的 38 份病株),检出率为 67.7%。其中,在建瓯采集的 32 份豇豆样品中,传统分离方法鉴定出豇豆疫霉 21 份,检出率为 65.6%,LAMP 方法检测的阳性样品为 24 份,检出率为 75.0%;在宁德采集的 30

份豇豆样品中,传统分离方法鉴定出豇豆疫霉 17 份,检出率为 56.7%,LAMP 方法检测的阳性样品为 18 份,检出率为 60.0%,5 份健康豇豆组织 2 种方法检测均为阴性。3 次重复取得一致结果,可见 LAMP 方法可用于发病豇豆植物组织中疫霉的检测。



a: LAMP 产物琼脂糖凝胶电泳检测结果; b: LAMP 产物钙黄绿素荧光显色结果。M: DL2000 DNA Marker; 1: 阴性对照; 2-9: 25  $\mu\text{L}$  反应体系中分别含有 10 ng、1 ng、100 pg、10 pg、1 pg、100 fg、10 fg、1 fg DNA

a: LAMP assay detected by 2.0% agarose gel electrophoresis. b: Visual inspection of LAMP products stained by calcein. M: DL2000 DNA Marker; 1: Negative control; 2-9: Amplified products using DNA at concentrations of 10 ng, 1 ng, 100 pg, 10 pg, 1 pg, 100 fg, 10 fg, 1 fg, respectively, in 25  $\mu\text{L}$  LAMP reaction

图 4 LAMP 方法检测豇豆疫霉灵敏度

Fig. 4 Sensitivity analysis of LAMP assay in detection of *Phytophthora vignae*

### 3 讨论

基于 LAMP 的快速检测方法具有普通 PCR 所不能比拟的优点,它具有更高的灵敏度和视觉判断性<sup>[15]</sup>。ITS 是最常用的病原菌分子检测靶标,根据 ITS 序列差异已成功开发出了多种卵菌的分子检测引物<sup>[8-11]</sup>。Huang 等<sup>[16]</sup>以 ITS 序列为靶点设计引物对烟草疫霉进行 PCR 检测,其检测灵敏度在 DNA 水平上为 10  $\text{pg}/\mu\text{L}$ ;杜洪忠等<sup>[10]</sup>根据 ITS 序列设计实时荧光 PCR 引物,可以检测到 50  $\text{fg}/\mu\text{L}$  冬生疫霉菌基因组 DNA;秦文韬<sup>[17]</sup>利用 ITS 区域设计一组 LAMP 引物,可检测到葡萄霜霉病菌 DNA 最低浓度为 33  $\text{fg}/\mu\text{L}$ 。本研究根据豇豆疫霉 ITS 序列差异设计特异性 LAMP 引物,建立了一种基于颜色判定的简单、快速和灵敏的豇豆疫霉快速检测方法,其检

测灵敏度可达 100  $\text{fg}/25 \mu\text{L}$ 。采用该 LAMP 方法对采自福建省的豇豆疫病病株及可疑症状植株样本进行检测,结果表明 LAMP 检测结果与传统形态学鉴定方法基本一致,说明该方法能成功应用于被疫霉侵染的豇豆样品组织早期检测。此外,豇豆疫病与细菌性疫病是影响豇豆产量的主要病害,而这两种病害症状相似,但采用的防治方法却不同,菜农很容易混淆,从而错过防治适期<sup>[18]</sup>。利用该检测方法能有效地区分这两种病害,避免了因防治措施不当造成的经济损失。

快速、经济地从植物样品中提取较高产量和质量的基因组 DNA 是进行分子生物学研究的重要前提。传统的 CTAB 提取法,虽然 DNA 浓度和纯度均较高,但操作步骤复杂,耗时长,且易交叉污染。另外,酚、氯仿等有机溶剂易造成环境污染,

有损操作者健康。目前国内外已开发了多种 DNA 提取纯化试剂盒,这些试剂盒操作简单、高效, DNA 质量较高,但价格昂贵,提取量少。在本试验中,笔者用 NaOH 裂解法提取植物组织 DNA,该方法更加方便快捷,整个提取过程不超过 10 min,且只需小型台式离心机或普通离心机等简单仪器,样品仅用塑料研磨棒或玻璃棒等简易器具在缓冲液中捣碎即可。

本研究成功建立了豇豆疫霉 LAMP 检测体系,弥补了传统组织分离法和 PCR 方法鉴定病原的多方面不足;它具有操作方便、经济廉价等优势,整个过程只需一个恒温水浴锅即可,且结果可通过反应管指示剂的颜色变化直接肉眼判断,不需要专门的检测仪器,同时可结合 NaOH 快速提取 DNA 技术,使豇豆疫病检测的实地应用成为可能。该技术为豇豆疫病早期检测提供了支撑,同时为农业生产上其他病害的快速诊断提供了重要参考。

## 参考文献

[1] 黄健坤,戚佩坤.长豇豆疫病的初步研究[J].植物病理学报,1984,14(4):193-199.

[2] 成家壮,韦小燕.眉豆疫病的病原鉴定及药剂防治[J].植物保护学报,1999,26(2):129-132.

[3] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): e63.

[4] FUKUTA S, KATO S, YOSHIDA K, et al. Detection of tomato yellow leaf curl virus by loop-mediated isothermal amplification reaction [J]. Journal of Virological Methods, 2003 (112):35-40.

[5] IWAMOTO T, SONOBE T, HAYASHI K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum

samples [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(6): 2616-2622.

[6] KUBOKI N, INOUE N, SAKURAI T, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of *African trypanosomes* [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2003, 41(12):5517-5524.

[7] ENDO S, KOMORI T, RICCI G, et al. Detection of *gpb43* of *Paracoccidioides brasiliensis* by the loop-mediated isothermal amplification(LAMP) method [J]. FEMS Microbiology Letters, 2004, 234(1):93-97.

[8] 高乔芬,秦西云,方敦煌,等.烟草疫霉的快速分子检测[J].云南农业大学学报,2012,27(2):156-159.

[9] 郭成宝,张正光,王源超,等.非洲菊疫霉根腐病的快速分子诊断[J].植物病理学报,2006,36(2):97-101.

[10] 杜洪忠,吴品珊,严进,等.冬生疫霉的实时荧光 PCR 检测方法 [J]. 植物检疫,2013(1):36-39.

[11] HANSEN Z R, KNAUS B J, TABIMA J F, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of the tomato and potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans* [J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(4): 1010-1020.

[12] 陈庆河,李本金,兰成忠,等.双重 PCR 检测马铃薯晚疫病菌和青枯病菌方法的建立及应用[J].植物病理学报,2009,39(6): 578-583.

[13] HE Y Q. An improved protocol for fungal DNA preparation [J]. Mycosystema, 2000, 19(3): 434.

[14] 陈丽璇.钙黄绿素(Calcein)於环形核酸增幅法(LAMP)之应用评估[J].家畜卫试所研报,2011(46):1-8.

[15] 贾蒙鹭,陈兴江,林叶春,等.基于环式等温扩增的烟草青枯病原菌快速检测方法[J].中国农业大学学报,2014,19(1):93-98.

[16] HUANG J L, WU J Z, LI C J, et al. Detection of *Phytophthora nicotianae* in soil with real-time quantitative PCR [J]. Journal of Phytopathology, 2010, 158(1):15-21.

[17] 秦文韬.葡萄霜霉病菌快速分子检测方法研究[D].北京:中国农业科学院植物保护研究所,2013.

[18] 童显安,周建辉,李永学.豇豆疫病与细菌性疫病的识别与防治 [J].上海蔬菜,2012(3):74-75.

(责任编辑:杨明丽)

(上接 118 页)

[15] 牛翠娟.基础生态学[M].第3版.北京:高等教育出版社,2015.

[16] PEA T, GAVILANEZSLONE J M, DUEBEN B D. Effects of sucrose in adult diet on mortality of males of *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) [J]. Florida Entomologist, 2014, 87(4): 487-491.

[17] 胡隄生,朱银飞,田呈明,等.枣实蝇成虫饲养初报[J].中国森林病虫,2012,31(4):31-32.

[18] 林明光,汪兴鉴,张艳,等.橘小实蝇、瓜实蝇和南亚果实蝇人工饲料的优化[J].应用昆虫学报,2013,50(4):1115-1125.

[19] 周波,刘映红,刘丽红.不同食料对南亚实蝇生长发育及繁殖的影响[J].西南大学学报自然科学版,2005,27(3):301-304.

[20] EPSKY N D, HEATH R B, HOLLER T C, et al. Corn steepwater as protein bait for *Anastrepha suspensa* (Diptera: Tephritidae) [J]. Environmental Entomology, 1994, 23(4):827-831.

[21] HEATH R R, EPSKY N D, BLOEM S, et al. pH effect on the attractiveness of a corn hydrolysate to the Mediterranean fruit fly and several *Anastrepha* species (Diptera: Tephritidae) [J]. Journal of Economic Entomology, 1994, 87(4): 1008-1013.

[22] 杜迎刚,陈家骅,李清.一种新型蛋白诱剂对橘小实蝇引诱作用[J].福建林学院学报,2007,27(3):259-262.

(责任编辑:田喆)