

环介导等温扩增法(LAMP)检测最短尾短体线虫

刘星彤^{1,2} 林柏荣^{1,3} 廖金铃^{1,3} 卓 侃^{1,3}

1.华南农业大学农学院,广州 510642; 2.洛阳科技职业学院,洛阳 471822;
3.广东省微生物信号与作物病害防控重点实验室,广州 510642

摘要 为了快速、简便、准确地检测重要植物病原线虫—最短尾短体线虫(*Pratylenchus brachyurus*),依据 GenBank 中短体线虫的线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 I(mtDNA COI)序列,设计了扩增最短尾短体线虫的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)引物,并对 LAMP 反应条件进行优化,成功建立了一种可特异、快速检测最短尾短体线虫的 LAMP 体系。该体系在 64 ℃下反应 60 min,扩增效率最高。用琼脂糖凝胶电泳、酶切分析和 SYBR Green I 染色均能特异检测到最短尾短体线虫的扩增产物。所建立的 LAMP 体系能从供试的 9 种短体线虫和另外 10 种植物线虫中特异检测出最短尾短体线虫,其灵敏度可检测到 1/200 条线虫 DNA,是常规 PCR 的 10 倍。表明本研究建立的最短尾短体线虫的 LAMP 检测体系,可用于最短尾短体线虫的快速检测。

关键词 最短尾短体线虫; 环介导等温扩增; 线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 I; 快速检测
中图分类号 S 432.4⁺ 5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)06-0017-08

短体线虫(*Pratylenchus* spp.)又称根腐线虫,是一种重要的植物病原线虫,对农林作物造成的危害仅次于根结线虫(*Meloidogyne* spp.)和孢囊线虫(*Heterodera* spp.和*Globodera* spp.)^[1]。短体线虫侵染植物根部,通过穿刺、取食皮层薄壁细胞引起根部损伤,严重时可使根腐烂或坏死,致使寄主植物根系功能丧失,水分和营养的吸收与运输受阻,从而导致植物地上部矮小、叶片淡绿、黄化等,易与缺水、缺肥症状混淆^[2-3]。因此,由短体线虫引起的植物病害诊断较为困难,其病害诊断主要依赖病原线虫的分离和鉴定。传统的短体线虫鉴定一般根据雌虫的形态特征,然而形态特征通常存在种内变异及种间重叠,因此需要丰富的形态学专业知识与实践经验。此外,当在样品中仅分离到短体线虫幼虫时,很难根据形态学特征进行鉴定^[1]。随着分子生物学的发展,以 DNA 为基础的 PCR 检测技术已成为短体线虫辅助鉴定的重要手段之一,如利用双重 PCR 方法鉴定玉米短体线虫(*P. zeae*)和拟玉米短体线虫(*P. parazeae*)^[4];实时荧光定量 PCR 方法检测穿刺短体线虫(*P. penetrans*)、桑尼短体线虫(*P. thornei*)和落选短体线虫(*P. neglectus*)^[5-7]等。然而,这些

方法需要有昂贵的 PCR 仪或者荧光定量 PCR 仪,不利于基层及一些资源有限的实验室应用。

2000 年,一项快速检测病原物的技术—环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification,LAMP)问世^[8]。LAMP 技术使用 4~6 条引物分别识别扩增的 DNA 靶标区域,利用具有链置换活性的 *Bst* DNA 聚合酶在恒温条件下扩增,扩增反应通常在 1 h 内完成。另外,可直接在扩增产物中加入显色染料,如 SYBR Green I 等,通过肉眼观察扩增产物的颜色变化即可判断检测结果。因此,LAMP 技术具有特异性好、灵敏度高、检测快速及设备需求简单的优点^[8]。在植物线虫的检测中,LAMP 技术最早于 2009 年用于松材线虫的检测^[9]。近年来,该技术在植物线虫检测领域快速发展,目前已用于检测一些重要的植物病原线虫,如南方根结线虫(*M. incognita*)、象耳豆根结线虫(*M. enterolobii*)、北方根结线虫(*M. hapla*)、苹果根结线虫(*M. mali*)、相似穿孔线虫(*Radopholus similis*)、柑橘半穿刺线虫(*Tylenchulus semipenetrans*)、椰子红环腐线虫(*Bursaphelenchus cocophilus*)和维氏粒线虫(*Anguina wevelli*)^[10-18]等。最近,检测

收稿日期: 2018-06-26
基金项目: 国家自然科学基金项目(31471750); 广东省林业科技创新专项(2015KJ CX045)
刘星彤,硕士研究生。研究方向: 植物线虫学。E-mail: www.yutongle@qq.com
通信作者: 卓 侃,博士,副教授。研究方向: 植物线虫学。E-mail: zhuokan@scau.edu.cn

玉米短体线虫的 LAMP 技术也被成功开发^[19]。目前,我国已报道的短体线虫有 30 多种^[20],其中包括最短尾短体线虫(*P. brachyurus*)在内的多个种被认为可严重危害农林作物,造成重要经济损失^[1]。最短尾短体线虫在我国局部地区有分布,同时也是我国对外公布的检疫性线虫^[4,21-23]。近年来我国口岸已多次从进境的农林作物上截获最短尾短体线虫^[22-23]。该线虫一旦传入,可能会对我国农业和生态安全带来重大威胁。因此,研究最短尾短体线虫快速、准确的检测技术,不仅对我们进一步调查了解该线虫在我国的分布具有重要意义,而且对我国口岸部门的检疫和监控尤其重要。鉴于此,本研究通过比较短体线虫的线粒体细胞色素氧化酶 I 基因(mtDNA *COI*),设计检测最短尾短体线虫的特异性引物,并通过优化反应条件,开发了一套快速检

测最短尾短体线虫的 LAMP 体系,旨在为我国农林部门和检疫部门快速检测及检疫监测最短尾短体线虫提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 供试线虫

供试线虫的来源和寄主见表 1。本研究中供试的 9 种短体线虫、1 个潜根线虫未定种(*Hirschmanniella* sp.)、瑞特拟短体线虫(*Pratylenchoides ritteri*)和相似穿孔线虫等短体科(*Pratylenchidae*)线虫及 2 种根结线虫来源于笔者所在实验室采集、纯化、繁殖和保存的样品。所有的短体科线虫在胡萝卜愈伤组织上培养^[24],根结线虫在番茄上培养^[25]。其他供试线虫为本研究直接分离获得,并结合形态学和分子生物学进行鉴定。

表 1 供试线虫
Table 1 Nematodes tested in this study

线虫种类 Nematode species	编号 Code	寄主 Host	采集地 Geographical location
最短尾短体线虫 <i>Pratylenchus brachyurus</i>	GX655	玉米 <i>Zea mays</i>	广西北海 Beihai,Guangxi
最短尾短体线虫 <i>P. brachyurus</i>	HN340	菠萝 <i>Ananas comosus</i>	海南万宁 Wanning,Hainan
最短尾短体线虫 <i>P. brachyurus</i>	HN336	玉米 <i>Z. mays</i>	海南万宁 Wanning,Hainan
玉米短体线虫 <i>Pratylenchus zeae</i>	ZC13	玉米 <i>Z. mays</i>	广东广州 Guangzhou,Guangdong
拟玉米短体线虫 <i>Pratylenchus parazeae</i>	A90	甘蔗 <i>Saccharum sinense</i>	广西百色 Baise,Guangxi
咖啡短体线虫 <i>Pratylenchus coffeae</i>	JS26	花生 <i>Arachis hypogaea</i>	江苏扬州 Yangzhou,Jiangsu
卢斯短体线虫 <i>Pratylenchus loosi</i>	FJGYT	茶树 <i>Camellia sinensis</i>	福建宁德 Ningde,Fujian
落选短体线虫 <i>Pratylenchus neglectus</i>	GSY24S	胡麻 <i>Linum usitatissimum</i>	甘肃兰州 Lanzhou,Gansu
斯克里布纳短体线虫 <i>Pratylenchus scribneri</i>	SD1275	玉米 <i>Z. mays</i>	山东烟台 Yantai,Shandong
桑尼短体线虫 <i>Pratylenchus thornei</i>	GSY24L	胡麻 <i>L. usitatissimum</i>	甘肃兰州 Lanzhou,Gansu
伤残短体线虫 <i>Pratylenchus vulnus</i>	JXP	桃树 <i>Prunus persica</i>	江西九江 Jiujiang,Jiangxi
潜根线虫属线虫 <i>Hirschmanniella</i> sp.	Miti	芋头 <i>Colocasia esculenta</i>	海南琼海 Qionghai,Hainan
瑞特拟短体线虫 <i>Pratylenchoides ritteri</i>	NMG	樱桃 <i>Prunus pseudocerasus</i>	内蒙古赤峰 Chifeng,Neimenggu
相似穿孔线虫 <i>Radopholus similis</i>	RS	红掌 <i>Anthurium andraeanum</i>	广东广州 Guangzhou,Guangdong
饰环矮化线虫 <i>Tylenchorhynchus annulatus</i>	TA	甘蔗 <i>S. sinense</i>	广东广州 Guangzhou,Guangdong
丝尾垫刃线虫属线虫 <i>Filenchus</i> sp.	SW	甘蔗 <i>S. sinense</i>	广东广州 Guangzhou,Guangdong
小环线虫属线虫 <i>Criconemoides</i> sp.	CB	甘蔗 <i>S. sinense</i>	广东广州 Guangzhou,Guangdong
螺旋线虫属线虫 <i>Helicotylenchus</i> sp.	LX	甘蔗 <i>S. sinense</i>	广东广州 Guangzhou,Guangdong
南方根结线虫 <i>Meloidogyne incognita</i>	MI	番茄 <i>Solanum lycopersicum</i>	云南玉溪 Yuxi,Yunnan
爪哇根结线虫 <i>M. javanica</i>	MJ	菠菜 <i>Spinacia oleracea</i>	广东深圳 Shenzhen,Guangdong
针线虫属线虫 <i>Paratylenchus</i> sp.	BC	草(未知种) Grass	广东广州 Guangzhou,Guangdong

1.2 线虫 DNA 提取

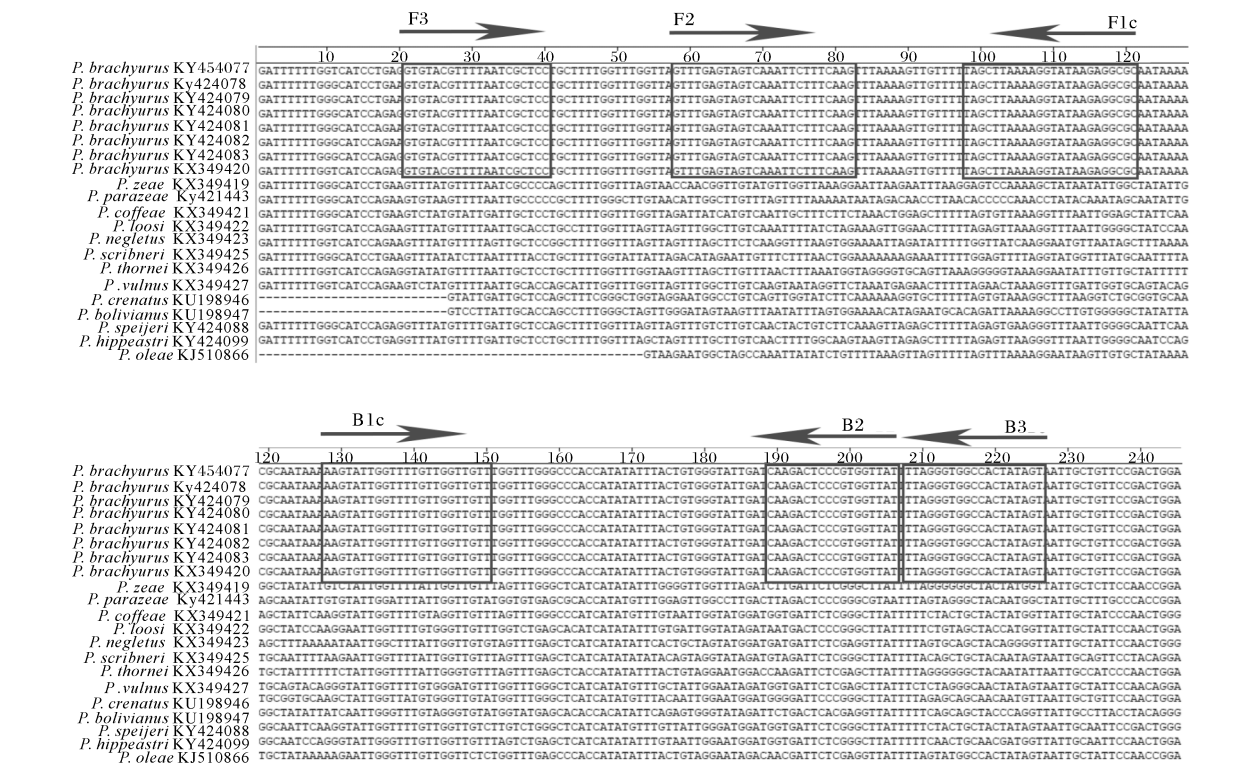
采用微量 DNA 提取法提取线虫 DNA,操作方法详见文献[25]。

1.3 LAMP 引物设计

下载 GenBank 中包括最短尾短体线虫在内的短体线虫 mtDNA *COI* 区序列,并用 MegAlign

7.1.0软件进行序列比对。比对结果表明最短尾短体线虫 mtDNA *COI* 序列在种内保守,但与其他种存在较大差异,因此,选择在该区域设计 LAMP 引物。使用 Primer Exploer V4 软件进行引物设计,包括外引物对 PBF3(5'-GTG TAC GTT TTA ATC GCT CC-3')/PBB3(5'-ACT ATA GTG GCC

ACC CTA A-3') 和内引物对 PBFIP(5'-GCG CCT AAG TGT TGG TTT TGT TGG TTG TT aaaaaa CTT ATA CCT TTT AAG CTA ggtatcc GTT TGA ATA ACC ACG GGA GTC TTG-3')(图 1)。引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。



方框和箭头表示引物的位置和方向。Boxes and arrows indicate direction and location of the primers.

图 1 COI 基因在不同短体线虫中的多序列比对及检测最短尾短体线虫环介导等温扩增引物

Fig.1 Multiple sequence alignment of COI sequences of different *Pratylenchus* species and primers for loop-mediated isothermal amplification to detect *P. brachyurus*

1.4 LAMP 反应体系及条件优化

根据环介导等温扩增手册(New England Bio-labs Ltd., London, UK)进行, 扩增反应体系如下: 10× Isothermal Amplification Buffer 2.5 μL、10 mmol/L dNTPs 3.5 μL、5 mol/L 甜菜碱 4.0 μL、100 mmol/L MgSO₄ 1.5 μL、10×LAMP 引物(包括内引物 PBFIP/PBBIP 1.6 μmol/L 和外引物 PBF3/PBB3 0.2 μmol/L)2.5 μL、*Bst*-2.0 DNA 聚合酶 1.0 μL、DNA 模板 1.0 μL、灭菌水补足至 25 μL。在配置扩增反应体系前, 先将 DNA 模板与引物混合并在 95 °C 下处理 2 min, 再置于冰上 2 min。

为了确定最佳的反应体系, 对反应温度和反应时间 2 个参数进行优化。反应温度优化如下: 设置 62、64、66 和 68 °C 4 个温度梯度进行 LAMP 扩增反应, 90 min 后, 分别取 10 μL 扩增产物, 用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳分离, 110 V 电泳 30 min。根据电泳条带的亮暗程度选择合适的退火温度。

反应时间优化如下: 挑取 100 条、10 条和单条线虫, 按本文“1.2”的方法分别提取 DNA; 将 100 条线虫的 DNA 分别稀释 1.25 倍、2.5 倍和 5 倍, 即各自对应 80 条、40 条和 20 条线虫的 DNA; 将单条线虫 DNA 稀释 100 倍, 即对应 0.1 条线虫的 DNA。从上述总体积为 20 μL 的各 DNA 中分别取 1 μL 利用实时荧光定量 PCR 仪进行 LAMP 反应, 即用于扩增反应的 DNA 模板分别为 100/20=5, 80/20=4, 40/20=2 和 1, 10/20=0.5, 1/20=0.05 和 0.1/20=0.005 条线虫 DNA。反应体系为: 10×Isothermal Amplification Buffer 2.5 μL、10 mmol/L dNTPs 3.5 μL、5 mol/L 甜菜碱 4.0 μL、100 mmol/L MgSO₄ 1.5 μL、LAMP 引物 2.5 μL、*Bst*-2.0 DNA 聚合酶 1.0 μL、DNA 模板 1.0 μL、EVA green 2.0 μL、灭菌水补足至 25 μL。反应温度选择上述优化的最适温度, 每 2 min 采集 1 次荧光信号, 设置 35 个循环。最终根据最低稀释倍数的 DNA

模板达到平台期所用的时间来确定最适反应时间。

1.5 LAMP 扩增产物的检测

采用 2 种方式检测 LAMP 扩增产物。(1)琼脂糖凝胶电泳法:取 10 μL 环介导等温扩增产物,用 2%的琼脂糖电泳进行分离,110 V 电泳 30 min。GoldView 染色后在凝胶成像系统拍照观察;(2)SYBRGreen I 染料显色法:在 LAMP 反应结束后,待产物降至室温后加入 SYBR Green I 1 000 倍稀释液 2 μL,混匀后肉眼直接观察颜色变化。

1.6 LAMP 特异性检测

为确保 LAMP 的特异性,采用 3 种方式进行验证。(1)在内引物 PBFIP 上设计 *Bam*H I 酶切位点,通过酶切实验进行验证。酶切体系为:10×Fast Digest green buffer 2.0 μL、经 DNA 纯化回收试剂盒(TIANGEN)纯化回收的 LAMP 产物 2.0 μL、*Bam*H I 1.0 μL、灭菌水补足至 20.0 μL;混匀后置于 37℃酶切 30 min;反应结束后,用 2%的琼脂糖凝胶进行电泳。(2)使用最短尾短体线虫的外引物对 PBF3/PBB3 进行 PCR 扩增,扩增体系为:2×*Taq* Mix 12.5 μL、外引物 PBF3/PBB3 各 0.5 μL、DNA 模板 1.0 μL、灭菌水补足至 25 μL。扩增程序为:95℃ 3 min;95℃ 30 s,40℃ 30 s,72℃ 40 s,35 个循环;72℃ 7 min。反应结束后,使用 1%的琼脂糖凝胶电泳,再切胶、回收并测序。(3)按本文“1.2”的方法提取表 1 中所有供试线虫的 DNA 模板并进行 LAMP 扩增反应,反应结束后加入 SYBR Green I 染料检测体系的特异性。此外,用引物 D2A(5'-ACA AGT ACC GTG AGG GAA AGT TG-3')/D3B(5'-TCG GAA GGA ACC AGC TAC TA-3')^[26]扩增各线虫的 28S rDNA D2D3 区,以确保 DNA 模板的有效性。反应体系为:10×Ex *Taq* PCR 缓冲液 2.5 μL;2.5 mmol/L dNTP 各 2 μL;10 μmol/L 的上下游引物各 0.5 μL;Ex *Taq* 酶(*TaKaRa*)0.125 μL;DNA 2 μL;灭菌水补足至 25 μL。扩增程序为:94℃ 3 min;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 90 s,39 个循环;72℃ 5 min。

1.7 LAMP 灵敏度检测

为了解 LAMP 的灵敏度,按本文“1.2”的方法分别提取 100 条、10 条和单条最短尾短体线虫 DNA;将单条线虫 DNA 稀释 10 倍获得 0.1 条线虫 DNA。从上述总体积为 20 μL 的 4 个梯度 DNA 中分别取 1 μL 进行 LAMP 反应,即用于 LAMP 反应的 DNA 模板分别为 0.1/20=0.005,1/20=0.05,

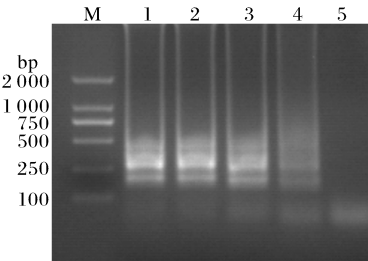
10/20=0.5 和 100/20=5 条线虫 DNA,反应结束后用琼脂糖凝胶电泳法和 SYBR Green I 染料显色法分别进行检测。

为比较 LAMP 与常规 PCR 的灵敏度差异,选择扩增 mtDNA COI 序列的 1 对通用引物 COIF(5'-GAT TTT TTG GKC ATC CWG ARG-3')/COIR(5'-CWA CAT AAT AAG TAT CAT G-3')^[27],对上述相同的 DNA 模板进行 PCR 扩增。

2 结果与分析

2.1 LAMP 反应体系的优化

为获得最佳反应结果,本研究对反应温度和时间进行优化。以最短尾短体线虫 DNA 为模板,设置 62、64、66 和 68℃ 4 个反应温度进行 LAMP 反应,扩增产物的电泳图如图 2 所示,结果显示在 4 个设置温度下均可获得扩增产物。当温度为 68℃时,扩增产物电泳条带明显弱;当温度为 62~66℃时,扩增产物电泳条带均较亮,但 64℃下的条带略亮于另 2 个温度,表明 64℃为最适反应温度。



M:DNA 分子质量标准;1~4:62、64、66 和 68℃条件下的扩增结果;5:以灭菌水作为模板的阴性对照。M: DNA marker; 1-4:The reactions were performed at temperature 62℃,64℃,66℃ and 68℃; 5:Negative control (distilled water).

图 2 最短尾短体线虫环介导等温扩增反应温度的优化
Fig.2 Temperature optimization for loop-mediated isothermal amplification to detect *Pratylenchus brachyurus*

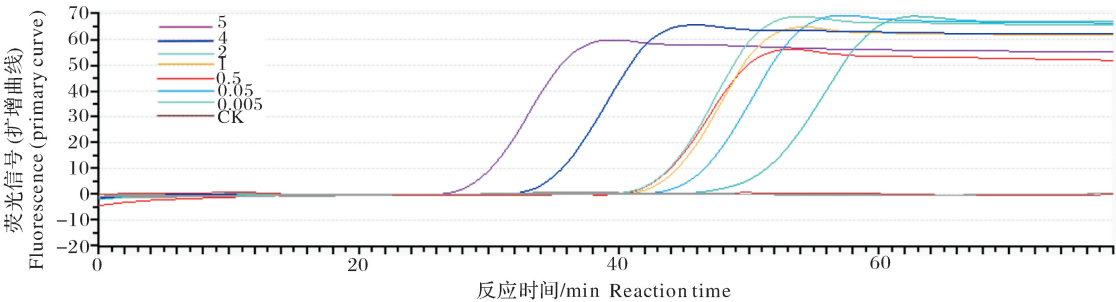
在 64℃的反应温度下,用实时荧光定量 PCR 仪进行 LAMP 反应以优化反应时间。由图 3 可见,基于 0.005 条最短尾短体线虫 DNA 模板(本研究中最低稀释倍数的 DNA 模板)的 LAMP 扩增,约从 45 min 开始出现荧光信号,到 60 min 时反应进入平台期。因此,选择 60 min 作为 LAMP 的最佳反应时间。

2.2 LAMP 反应特异性分析

首先用 *Bam*H I 对 LAMP 纯化产物进行酶切,结果表明 LAMP 纯化产物可被 *Bam*H I 完全酶切(图 4A)。其次将 SYBR Green I 染料加入到

LAMP 扩增产物里,结果显示最短尾短体线虫 3 个种群的扩增产物显示为阳性反应(绿色),其他线虫的扩增产物及灭菌水均显示为阴性反应(橙色)(图 4B)。最后将外引物 PBF3/PBB3 扩增的 PCR 产物

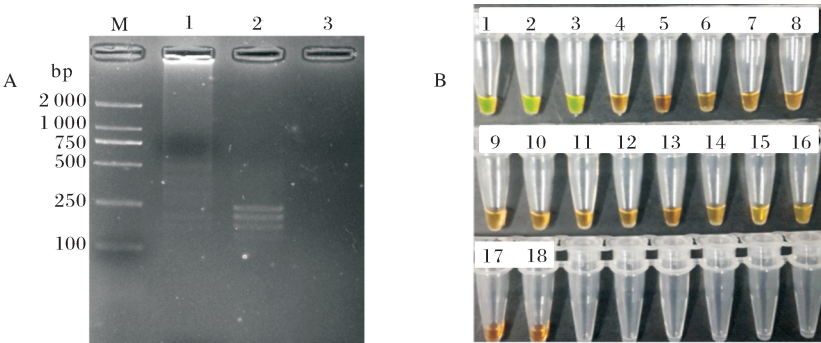
进行测序,结果表明所测序列与最短尾短体线虫的 *COI* 序列相似性为 100%。因此,酶切、染色和测序结果均说明本研究建立的最短尾短体线虫 LAMP 检测体系特异性良好。



标着数字的横线分别代表相应条数的线虫 DNA;标着 CK 的横线是以灭菌水作为模板的阴性对照。Lines labeled the number represent the DNA template from the corresponding quantity of nematode. CK: Negative control (distilled water).

图 3 最短尾短体线虫环介导等温扩增反应时间的优化

Fig.3 Optimization of the durationfor loop-mediated isothermal to detect *Pratylenchus brachyurus*



A:扩增产物酶切检测; M:DNA 分子质量标记; 1:未经 *Bam*H I 酶切的 LAMP 纯化产物; 2 :经 *Bam*H I 酶切的 LAMP 纯化产物; 3:以灭菌水作为模板的阴性对照; B:SYBR Green I 染色检测; 1~3:最短尾短体线虫 3 个种群; 4~17 分别为:玉米短体线虫、拟玉米短体线虫、饰环矮化线虫、丝尾垫刃线虫、小环线虫、螺旋线虫、瑞特拟短体线虫、落选短体线虫、桑尼短体线虫、伤残短体线虫、斯克里布纳短体线虫、南方根结线虫、爪哇根结线虫及潜根线虫; 18:以灭菌水作为模板的阴性对照。A:Restriction enzyme analysis of the LAMP products. M:DNA marker; 1:The purified LAMP products without *Bam*H I digestion; 2:The purified LAMP products with *Bam*H I digestion; 3:Negative control (distilled water); B:LAMP products visualized with SYBR green I; 1-3:*P. brachyurus*; 4-17: *P. zaeae*, *P. parazeae*, *Tylenchorhynchus annulatus*, *Filenchus* sp., *Criconemoides* sp., *Helicotylenchus* sp., *Pratylenchoides ritteri*, *P. neglectus*, *P. thornei*, *P. vulnus*, *P. scribneri*, *Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *Hirschmanniella* sp.; 18:Negative control (distilled water).

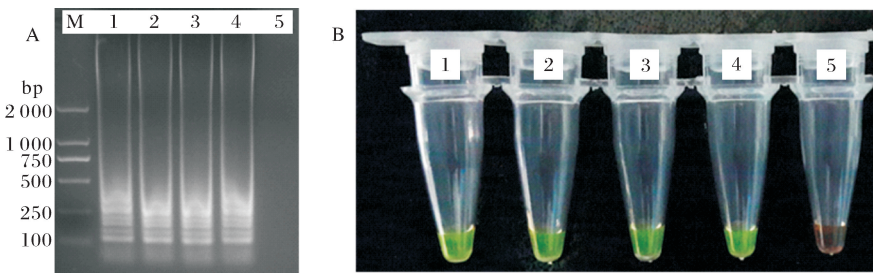
图 4 最短尾短体线虫环介导等温扩增反应特异性检测

Fig.4 Specificity of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Pratylenchus brachyurus*

2.3 LAMP 灵敏度分析

分别以 5、0.5、0.05 和 0.005 条线虫的 DNA 作为模板进行 LAMP 反应。反应结束后,将产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳,结果表明所有 DNA 模板均可扩增获得清晰条带(图 5A);另外,在产物中加入 SYBR Green I 染料,结果显示所有扩增产物均呈现阳性反应的绿色(图 5B),表明 LAMP 体系可检测到 0.005 条线虫 DNA。

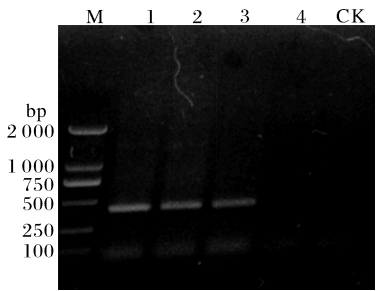
采用传统的常规 PCR 对上述各 DNA 模板进行扩增,扩增产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳,结果发现当 DNA 模板为 0.05、0.5 和 5 条线虫时,均有 1 条清晰的扩增条带;当 DNA 模板为 0.005 条短体线虫时,没有扩增条带,表明常规 PCR 无法检测 0.005 条线虫 DNA(图 6)。由此可知,LAMP 体系的检测灵敏度至少是常规 PCR 的 10 倍。



A:琼脂糖凝胶电泳检测 LAMP 产物; B:SYBR Green I 染色检测 LAMP 产物; M:DNA 分子质量标准; 1~4:分别对应 5 条、0.5 条、0.05 条、0.005 条线虫 DNA 模板; 5:以灭菌水为模板的阴性对照。A:LAMP products; B:LAMP products visualized with SYBR Green I; M:DNA marker; 1-4:DNA templates from 5, 0.5, 0.05, 0.005 *P. brachyurus* respectively; 5:Negative control (distilled water).

图 5 最短尾短体线虫环介导等温扩增反应灵敏度检测

Fig.5 Sensitivity of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Pratylenchus brachyurus*



M:DNA 分子质量标准;1~4:分别对应 5 条、0.5 条、0.05 条、0.005 条线虫 DNA 模板;CK:以灭菌水为模板的阴性对照。M:DNA marker; 1-4:DNA templates from 5, 0.5, 0.05, 0.005 *P. brachyurus* respectively; CK:Negative control (distilled water).

图 6 最短尾短体线虫常规 PCR 扩增灵敏度检测

Fig.6 Sensitivity of the conventional PCR for *Pratylenchus brachyurus*

3 讨论

本研究基于 mtDNA COI 基因序列建立了最短尾短体线虫的 LAMP 检测体系。合适的 DNA 靶标序列是分子鉴定和检测的基础,通常理想的靶标序列是在种内保守,而在种间变异大^[28]。在植物线虫中,核糖体 DNA 内转录间隔区(rDNA-ITS)是最常用的靶标区段^[29]。短体线虫的分子鉴定和检测通常也使用 ITS^[1]。然而,随着越来越多短体线虫的 ITS 区被测序,人们发现短体线虫 ITS 区种内变异较大,如玉米短体线虫 ITS 区变异高达 9.5%^[4];穿刺短体线虫 ITS 区变异 8%,甚至同一种群内都达到 6%的变异;斯克里布纳短体线虫(*P. scribneri*)ITS 区变异 8%;刻痕短体线虫(*P. crenatus*)ITS 分子变异 7%;而最短尾短体线虫的 ITS 区变异也可达到 8%^[30-31]。众所周知,mtDNA COI 基因是动物分子鉴定最重要的分子靶

标^[32]。近年来研究发现 COI 在短体线虫种内保守,而在种间有变异,如玉米短体线虫的 COI 种内变异最高仅为 2.4%^[19,33],而玉米短体线虫、拟玉米短体线虫、最短尾短体线虫等 9 种短体线虫的 COI 种间变异超过 20%^[19],表明 COI 可能是鉴定短体线虫更合适的分子靶标。因此,本研究通过比对包括最短尾短体线虫在内的短体线虫 COI 序列,设计检测最短尾短体线虫的 LAMP 特异引物,成功开发了特异性检测最短尾短体线虫的 LAMP 体系。

本研究构建的 LAMP 体系不会非特异扩增对照线虫的 DNA,表明该体系特异性好。此外,该 LAMP 体系可检测到 1/200 条线虫的 DNA,灵敏度至少是常规 PCR 的 10 倍。而且该检测体系在 64℃下反应 1 h 即可,不需要任何专业的 PCR 仪等设备,仅需一个恒温的水浴锅。检测结果的判定只要通过添加荧光染料,再用肉眼观察颜色的变化即可。因此,本研究开发的 LAMP 检测体系简单、经济、快速、特异、灵敏,可有效提高对最短尾短体线虫的检测效率和准确性。

虽然环介导等温扩增具有诸多优点,但由于 LAMP 反应具有极高的扩增效率(10^9 拷贝数/h),反应结束后,在开盖加染料的过程中,气溶胶易扩散到空气中,可能会导致后续 LAMP 反应出现假阳性^[34-35]。之前有研究通过在反应液中加入少量石蜡油密封等方法来避免假阳性的出现^[12]。在本研究中,我们在反应结束后将离心管冷却至室温,再开盖加入染料可避免假阳性的发生。另外,反应时间过长也会增大假阳性出现的可能,因此,本研究严格控制恒温扩增的时间,借助实时荧光定量 PCR 仪,准确确定反应到达平台期的时间,从而确定 LAMP 反应的时间。此外,每次实验均设置阴性对照,通过实

验组和对照组的差异综合判定结果,通过这些操作,避免了因假阳性而影响到检测结果的准确性。

参 考 文 献

- [1] CASTILLO P,VOVLAS N. *Pratylenchus* (Nematoda:Pratylenchidae): diagnosis, biology, pathogenicity and management [M]. Leiden: Brill, 2007.
- [2] POTTER J W,OLTHOF T A. Nematode pests of vegetable crops [M]//EVANS E K,TRUDGILL D L,WEBSTER J M. Plant parasitic nematodes in temperate agriculture. Wallingford, U.K: CAB International, 1993: 171-207.
- [3] 魏吉利,黄诚华,商显坤,等. 广西甘蔗线虫种类及分布[J]. 南方农业学报, 2012, 43(2): 184-186.
- [4] WANG H H, ZHUO K, YE W M, et al. Morphological and molecular characterisation of *Pratylenchus parazeae* n. sp. (Nematoda: Pratylenchidae) parasitizing sugarcane in China [J]. European journal of plant pathology, 2015, 143(1): 173-191.
- [5] SATO E, MIN Y Y, SHIRAKASHI T, et al. Detection of the root-lesion nematode, *Pratylenchus penetrans* (Cobb), in a nematode community using real-time PCR [J]. Japanese journal of nematology, 2007, 37(2): 87-92.
- [6] YAN G, SMILEY R W, OKUBARA P A. Detection and quantification of *Pratylenchus thornei* in DNA extracted from soil using real-time PCR [J]. Phytopathology, 2012, 102(1): 14-22.
- [7] YAN G, SMILEY R W, OKUBARA P A, et al. Developing a real-time PCR assay for detection and quantification of *Pratylenchus neglectus* in soil [J]. Plant disease, 2013, 97(6): 757-764.
- [8] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA [J]. Nucleic acids research, 2000, 28(12): e63.
- [9] KIKUCHI T, AIKAWA T, OEDA Y, et al. A rapid and precise diagnostic method for detecting the pinewood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* by loop-mediated isothermal amplification [J]. Phytopathology, 2009, 99(12): 1365-1369.
- [10] NIU J, GUO Q, JIAN H, et al. Rapid detection of *Meloidogyne* spp. by LAMP assay in soil and roots [J]. Crop protection, 2011, 30(8): 1063-1069.
- [11] NIU J H, JIAN H, GUO Q X, et al. Evaluation of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays based on 5S rDNA-IGS2 regions for detecting *Meloidogyne enterolobii* [J]. Plant pathology, 2012, 61(4): 809-819.
- [12] 何旭峰, 彭焕, 丁中, 等. 植物罹病组织中象耳豆根结线虫的 LAMP 快速检测方法[J]. 中国农业科学, 2013, 46(3): 534-544.
- [13] PENG H, LONG H B, HUANG W K, et al. Rapid, simple and direct detection of *Meloidogyne hapla* from infected root galls using loop-mediated isothermal amplification combined with FTA technology [J]. Scientific reports, 2017, 7: 44853.
- [14] 魏洪岩, 王暄, 李红梅, 等. 采用环介导等温扩增法(LAMP)快速检测苹果根结线虫[J]. 植物保护学报, 2016, 43(2): 260-266.
- [15] PENG H, PENG D, HU X, et al. Loop-mediated isothermal amplification for rapid and precise detection of the burrowing nematode, *Radopholus similis*, directly from diseased plant tissues [J]. Nematology, 2012, 14(8): 977-986.
- [16] LIN B R, WANG H H, ZHUO K, et al. Loop-mediated isothermal amplification for the detection of *Tylenchulus semi-penetrans* in soil [J]. Plant disease, 2016, 100(5): 877-883.
- [17] IDE T, KANZAKI N, GIRALDO PP P, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of the red ring nematode, *Bursaphelenchus cocophilus* [J]. Nematology, 2017, 19(5): 559-565.
- [18] YU L Z, SONG S Y, YU C, et al. A loop mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and reliable detection of *Anguina wevelli*, a grass parasitic nematode [J]. European journal of plant pathology, 2018, 150(3): 725-734.
- [19] LIU X T, WANG H H, LIN B R, et al. Loop-mediated isothermal amplification based on the mitochondrial COI region to detect *Pratylenchus zeae* [J]. European journal of plant pathology, 2017, 148(2): 435-446.
- [20] 于焦, 金猩猩, 秦萌, 等. 西藏农作物短体线虫种类的鉴定和描述[J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(5): 20-24.
- [21] 杨意伯, 张绍升. 番石榴根部短尾短体线虫的鉴定[J]. 热带作物学报, 2013, 34(8): 1557-1563.
- [22] 赵立荣, 崔汝强, 王金成, 等. 从尼日利亚进境的芋头中截获最短尾短体线虫[J]. 植物检疫, 2011, 25(4): 35-38.
- [23] 章淑玲, 王宏毅, 金亮, 等. 寄生台湾春兰的短体线虫种类鉴定[J]. 热带作物学报, 2013, 34(12): 2463-2466.
- [24] CASTILLO P, TRAPERO-CASAS J L, JIMÉNEZ-DÍAZ R M. Effect of time, temperature, and inoculum density on reproduction of *Pratylenchus thornei* in carrot disk cultures [J]. Journal of nematology, 1995, 27(1): 120-124.
- [25] HU M, ZHUO K, LIAO J L. Multiplex PCR for the simultaneous identification and detection of *Meloidogyne incognita*, *M. enterolobii*, and *M. javanica* using DNA extracted directly from individual galls [J]. Phytopathology, 2011, 101(11): 1270-1277.
- [26] DE LEY P, FELIX M A, FRISSE L M, et al. Molecular and morphological characterisation of two reproductively isolated species with mirror-image anatomy (Nematoda: Cephalobidae) [J]. Nematology, 1999, 1(6): 591-612.
- [27] HE Y, JONES J, ARMSTRONG M, et al. The mitochondrial genome of *sensu stricto* (Nematoda: Enoplea): considerable economization in the length and structural features of encoded genes [J]. Journal of molecular evolution, 2005, 61(6): 819-833.
- [28] 卓侃, 廖金铃. 植物线虫分子鉴定研究进展[J]. 植物保护, 2015, 41(6): 1-8.
- [29] POWERS T O, TODD T C, BURNELL A M, et al. The rDNA

internal transcribed spacer region as a taxonomic marker for nematodes [J]. *Journal of nematology*,1997,29(4):441-450.

[30] WAEYENBERGE L, RYSS A, MOENS M, et al. Molecular-characterisation of 18 *Pratylenchus* species using rDNA restriction fragment length polymorphism [J]. *Nematology*, 2000,2(2):135-142.

[31] WAEYENBERGE L, VIAENE N, MOENS M. Species-specific duplex PCR for the detection of *Pratylenchus penetrans* [J]. *Nematology*,2009,11(6):847-857.

[32] DERYCKE S, VANAVERBEKE J, RIGAUX A, et al. Exploring the use of cytochrome oxidase c subunit 1 (*COI*) for DNA barcoding of free-livingmarine nematodes [J]. *PLoS One*, 2010,5(10):e13716.

[33] TROCCOLI A, SUBBOTIN S A, CHITAMBAR J J, et al. Characterisation of amphimictic and parthenogenetic populations of *Pratylenchus bolivianus* Corbett, 1983 (Nematoda: Pratylenchidae) and their phylogenetic relationships with closely related species [J]. *Nematology*,2016,18(6):651-678.

[34] NAGAMINE K, HASE T, NOTOMI T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers [J]. *Molecular and cellular probes*,2002,16(3):223-229.

[35] FU S, QU G, GUO S, et al. Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification [J]. *Applied biochemistry and biotechnology*,2011,163(7):845-850.

Detection of *Pratylenchus brachyurus*
by loop-mediated isothermal amplification

LIU Xingtong^{1,2} LIN Borong^{1,3} LIAO Jinling^{1,3} ZHUO Kan^{1,3}

- 1.College of Agriculture , South China Agricultural University , Guangzhou 510642,China ;
2.Luoyang Vocational College of Science and Technology , Luoyang 471822,China ;
3.Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control ,Guangdong Province ,
Guangzhou 510642, China

Abstract A loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay was developed for rapid and accurate detection of *Pratylenchus brachyurus*, one of the important plant pathogenic nematodes. Based on the mtDNA *COI* sequence, LAMP primers for specific detection of *P. brachyurus* were designed. The optimal conditions of the LAMP assay was the reaction time was 60 min at 64 °C. The LAMP products of *P. brachyurus* were confirmed using conventional polymerase chain reaction (PCR), enzyme digestion analysis with *Bam*HI and visual inspection by adding SYBR Green I to the products. *P. brachyurus* from nine *Pratylenchus* species and other ten plant-parasitic nematode species were successfully detected by the LAMP assay. The LAMP assay was also sensitive, which can detect DNA from 0.005 individual *P. brachyurus*, 10 times more sensitive than conventional PCR. The LAMP system constructed in this study can be used to detect *P. brachyurus* rapidly.

Keywords *Pratylenchus brachyurus*; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); mtDNA *COI*; rapid detection

(责任编辑:边书京)