

海南万宁咖啡炭疽病菌 *Colletotrichum siamense* 的分离鉴定及 LAMP 快速检测体系的建立

温思为, 高圣风, 田 甜, 刘世超, 苟亚峰, 张若男, 薛 超*, 孙世伟*

中国热带农业科学院香料饮料研究所/海南省热带香辛饮料作物遗传改良与品质调控重点实验室/农业农村部香辛饮料作物遗传资源利用重点实验室, 海南万宁 571533

摘 要: 作为海南省万宁市特色农业支柱产业, 兴隆咖啡产业的可持续发展正面临炭疽病侵害的严峻挑战。咖啡炭疽病可导致咖啡叶片焦枯、枝条溃疡及浆果褐腐, 是咖啡的主要病害之一。本研究在万宁咖啡主产区采集咖啡炭疽病样品并分离病原菌, 通过 *ITS*、*TUB2*、*CHS-1*、*ACT*、*GAPDH* 多基因联合分析鉴定病原菌, 并基于环介导等温扩增技术 (LAMP) 建立快速检测体系。结果表明: (1) 采集典型病样 50 份, 经组织分离纯化获得炭疽菌株 24 株; (2) 明确万宁 5 个种植区的病原种群结构包含 4 个炭疽菌种, 即 *Colletotrichum tropicale*、*C. karstii*、*C. fructicola* 及优势种暹罗炭疽菌 (*C. siamense*, 45.8%)。 (3) 基于 *TUB2* 基因特异区域, 设计筛选得到特异性 LAMP 引物组 Tub-L1, 优化反应体系参数为 63 °C 恒温扩增 50 min, 内外引物浓度比为 8 : 1, Mg^{2+} 8 mmol/L, dNTPs 0.8 mmol/L, 无需甜菜碱。验证试验表明, 该体系检测灵敏度达 100 pg/ μ L (为常规 PCR 的 10 倍); 对炭疽菌属的 7 个近缘种 (*C. tropicale*、*C. fructicola*、*C. karstii* 等) 及 7 种非靶标植物病原菌[含咖啡驼孢锈菌 (*Hemileia vastatrix*)、菜豆间座壳菌 (*Diaporthe phaseolorum*) 等]均无阳性反应。采用优化后的 LAMP 检测体系对田间采集的病害叶片样本进行分析, 所有样品均成功检测出暹罗炭疽菌, 其结果与常规 PCR 检测方法一致。综上所述, 本研究建立并优化的咖啡炭疽病菌 LAMP 快速检测体系具有操作简便、反应高效、特异性强、灵敏度高以及结果可视化等优势, 适用于暹罗炭疽菌 (*C. siamense*) 的田间快速检测。该体系为咖啡炭疽菌的精准鉴定及高效检测提供了可靠的技术支撑, 对咖啡炭疽病的早期预警、病害监测及综合防控具有重要的实践意义和应用价值。

关键词: 咖啡炭疽病; 病原鉴定; 环介导等温扩增 (LAMP); 检测

中图分类号: S435.712

文献标志码: A

Isolation, Identification of *Colletotrichum siamense* Causing Coffee Anthracnose in Wanning, Hainan, and Development of a Rapid LAMP Detection System

WEN Siwei, GAO Shengfeng, TIAN Tian, LIU Shichao, GOU Yafeng, ZHANG Ruonan, XUE Chao*, SUN Shiwei*

Institute of Spice and Beverage Research, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Hainan Provincial Key Laboratory of Genetic Improvement and Quality Regulation for Tropical Spice and Beverage Crops / Key Laboratory of Genetic Resource Utilization of Spice and Beverage Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wanning, Hainan 571533, China

Abstract: Xinglong coffee, a pillar of the local characteristic agriculture in Wanning, faces severe threats to its sustainable production from anthracnose. This disease can cause leaf scorching, branch ulcers, and berry brown rot, making it one of the major diseases in the industry. In this study, samples of coffee anthracnose were collected from the main cof-

收稿日期 2025-02-12; 接受日期 2025-03-21

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 321QN329); 国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-11)。

作者简介 温思为 (1998—), 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 咖啡病虫害防治。*通信作者 (Corresponding author): 薛超 (XUE Chao), E-mail: cxue8716@163.com; 孙世伟 (SUN Shiwei), E-mail: sunshw@126.com。

fee-growing areas in Wanning and the pathogenic fungi were isolated. The pathogenic fungi were identified through the combined analysis of multiple genes, including *ITS*, *TUB2*, *CHS-1*, *ACT* and *GAPDH*. Furthermore, a rapid detection system based on the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique was established. 50 typical disease samples were collected, and through tissue separation and purification, a total of 24 *Colletotrichum* isolates were obtained. The pathogen population structure in the five planting areas of Wanning was clarified to comprise four species of *Colletotrichum* spp.: *C. tropicale*, *C. karstii*, *C. fruticola*, and the dominant species was *C. siamense* (accounting for 45.8%). Based on the specific region of *TUB2*, a specific LAMP primer set (Tub-L1) was designed and screened. The optimized reaction parameters were established as follows: isothermal amplification at 63 °C for 50 minutes, outer-inner primer concentration ratio of 8 : 1, Mg^{2+} 8 mmol/L, dNTPs 0.8 mmol/L, and without the need for betaine. Validation experiments demonstrated that the detection sensitivity of this system reached 100 pg/μL (10 times higher than conventional PCR). Furthermore, the system showed no positive reactions to seven closely related species within *Colletotrichum* spp. (including *C. tropicale*, *C. fruticola*, *C. karstii*) or seven non-target plant pathogens [including *Hemileia vastatrix* (coffee leaf rust), *Diaporthe phaseolorum*, and others]. Using the optimized LAMP detection system, the diseased leaf samples collected from the field were analyzed. *C. siamense* was successfully detected in all samples, and the results were completely consistent with those obtained by conventional PCR methods. In summary, the LAMP-based rapid detection system for *Colletotrichum* sp. established and optimized in this study demonstrates significant advantages, including simplified operation, high reaction efficiency, strong specificity, enhanced sensitivity, and visualizable results, making it highly suitable for field-based rapid detection of *C. siamense*. This system would provide reliable technical support for the precise identification and efficient detection of coffee anthracnose fungus, and have important practical significance and application value for the early warning, disease monitoring, and integrated control of coffee anthracnose.

Keywords: coffee anthracnose; pathogen identification; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); detection

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.07.020

咖啡为茜草科 (Rubiaceae) 咖啡属 (*Coffea*) 的多年生常绿木本植物, 作为热带与亚热带地区的关键经济作物, 对全球热带农业经济具有重要战略意义。海南地处热带作物优势产区, 经过百余年的栽培体系演化, 现成为我国中粒种咖啡 (*Coffea canephora* var. *robusta*) 的核心生产区域。万宁市在海南咖啡产业布局中占核心地位, 是当前海南省咖啡种植和收获面积最大的产区, 其“兴隆咖啡”凭借独特的风味特征和卓越的品质表现, 在国内外咖啡市场中享有较高知名度, 成功塑造了海南咖啡的地域品牌形象^[1-2]。

咖啡的生长种植过程中易受到多种病原物的侵染, 由炭疽菌属 (*Colletotrichum* spp.) 引起的咖啡炭疽病是许多咖啡种植国咖啡高质量生产的主要限制因素, 我国云南、海南等咖啡种植区均有发现该病为害, 且为害程度不断加重^[3]。咖啡炭疽病周年发生, 病原菌能够侵染咖啡植株的多个部位, 包括嫩叶、枝条以及果实等, 引发叶片脱落、枝条枯死、果实腐烂, 严重时甚至整株死亡^[4]。例如浆果炭疽菌 (*Colletotrichum kahawae*) 对高海拔地区种植的小粒种咖啡 (*Coffea arabica*) 造成严重威胁, 该病原菌已列入我国进境植物检

疫性有害生物名单, 该病原菌引起的咖啡浆果病致使非洲地区咖啡浆果产量损失高达 80%^[5-7]。咖啡炭疽病的发病率与当地气候条件密切相关。研究表明, 气温 20 °C 左右、相对湿度 90% 以上 (持续 7 h 以上) 的冷凉高湿环境为该病原菌侵染的最适条件, 特别是长期干旱后的连续降雨期间, 咖啡炭疽病的发病率与病情指数往往达到最大值, 常在 9—11 月达到峰值^[8-9]。

炭疽菌属真菌广泛分布于热带和亚热带地区。由于其寄主广泛, 侵染咖啡的炭疽菌种类呈高度多样性, 且优势病原种群分布与地理环境、寄主品种显著相关^[3]。CRISTÓBAL-MARTÍNEZ 等^[10]通过多基因系统发育分析对墨西哥小粒种咖啡的炭疽病菌进行研究, 鉴定出 *C. gigasporum*、*C. siamense*、*C. karstii*、*C. gloeosporioides* 和 *C. theobromicola* 五个种。CAO 等^[3]在海南 5 个咖啡种植区 (涵盖小粒种与中粒种), 共鉴定出 8 个炭疽菌种, 包括 *C. fruticola*、*C. siamense*、*C. tropicale* 等。目前国内对于咖啡炭疽菌的病原鉴定与检测研究中主要依赖于常规 PCR、实时荧光定量 PCR (qPCR)、巢式 PCR 等方法。然而, 这些技术存在操作流程复杂、设备要求高等局限性,

难以满足田间快速诊断病原的需求。因此，开发一种基于环介导等温扩增技术（LAMP）的高灵敏度、高特异性的快速检测方法，对于实现咖啡炭疽病的早期预警和精准防控具有重要的实践意义。

LAMP 是由 NOTOMI 等^[11]于 2000 年研发的新型等温核酸扩增技术。该技术具有操作简便（无需热循环仪器）、特异性强、灵敏度高等技术优势，在植物真菌、细菌、病毒的检测等领域得到了广泛应用，显著提升了田间病原物的诊断效率^[12]。马骏^[13]基于比较基因组学筛选出果生炭疽菌（*C. fructicola*）的特异性分子标记，成功建立了针对山核桃（*Carya cathayensis*）叶部病原真菌的 LAMP 快速检测体系，该体系可在接种病原菌 72 h 后准确检测出山核桃叶片病斑中的病原菌。汪涵^[14]针对甘蔗褐锈病菌（*Puccinia melanocephal*）和咖啡叶锈病菌（*Hemileia vastatrix*）ITS 基因的保守区域设计特异性引物构建 LAMP 体系，试验数据显示，该体系对 2 种病原物的检测效率均高于普通 PCR。秦艳红等^[15]以 SYBR Green I 为荧光指示剂，建立了针对地黄花叶病毒（ReMV）的逆转录 LAMP（RT-LAMP）体系，阳性检出率达 98.3%，远高于常规 RT-PCR（75.0%）。

炭疽菌属因种内遗传多样性丰富，受到环境因子、寄主差异等因素的影响，基于表型特征（菌落形态、培养性状及致病性等）的传统分类体系存在稳定性缺陷。本研究以咖啡炭疽病样品为研究对象，开展多位点系统发育分析，明确了暹罗炭疽菌（*C. siamense*）为咖啡炭疽病的优势致病种，进而针对其 β -tubulin（*TUB2*）基因保守区域设计特异性引物，经反应参数优化、特异性验证及灵敏度检测，系统构建 LAMP 快速检测体系，以期对咖啡炭疽病的早期诊断与田间预警提供高效检测技术。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 于 2022 年对海南省万宁市的 3 个咖啡种植园与中国热带农业科学院香料饮料研究所的 2 个试验基地（分别为兴隆热带植物园与大路试验示范基地）开展咖啡病害发生情况的实地调查。在调查过程中，采用随机法、五点取样法，采集具有咖啡炭疽病典型症状（如出现黑点、

萎缩病变等）的枝条样本，将其装入样本袋后带回实验室，在 4℃ 条件下保存。共采集 50 份样本进行菌株的分离、纯化。所有分离获得的菌株均保存于中国热带农业科学院香料饮料研究所。

1.1.2 主要试剂 *Taq* 酶、*Bst* DNA 酶以及配套的 Buffer、 $MgSO_4$ 、dNTPs 购自南京诺维赞生物科技股份有限公司；甜菜碱（betaine）与荧光指示剂 SYBR Green I（10 000×）购自索莱宝科技有限公司（北京）；DL2000 DNA marker 与 DL2000 plus marker 购自北京庄盟国际生物基因科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 多基因联合系统发育鉴定 选取 *ITS*、*TUB2*、*GAPDH*、*CHS-1*、*ACT*^[16-19]5 个保守序列基因位点的通用引物（表 1）进行 PCR 扩增。PCR 反应体系总体积为 50 μ L，包括 DNA 模板 2 μ L，2×*Taq* Master Mix 25 μ L，10 μ mol/L 正反向引物各 2 μ L，ddH₂O 19 μ L。PCR 反应程序：95℃ 预变性 3 min；95℃ 变性 15 s，55℃ 退火 15 s，72℃ 延伸 1 min，循环 30 次；72℃ 终延伸 5 min。PCR 扩增结束后，利用 1% 琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行检测，将产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司测序。将获得的测序结果提交至 NCBI GenBank 进行 BLASTn 同源性比对，筛选同源性 >98% 的参考菌株序列。所有供试菌株及参考菌株序列均通过 MEGA 7 软件的 CustalW 模块进行多序列比对，利用 TBtools 2 软件截取过滤低质量位点，最终采用最大似然法（maximum likelihood, ML）构建多基因联合系统发育树（最佳模型：TN93+G，bootstrap：1000）。

表 1 基因及引物序列
Tab. 1 Genes and primer sequences

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')
<i>ITS</i>	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG
	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC
<i>TUB2</i>	Bt2a	GGTAACCAAATCGGTGCTGCTTTC
	Bt2b	ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC
<i>CHS-1</i>	CHS-79F	TGGGGCAAGGATGCTTGGAAGAAG
	CHS-354R	TGGAAGAACCATCTGTGAGAGTTG
<i>ACT</i>	ACT-512F	ATGTGCAAGCCGGTTTCGC
	ACT-783R	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT
<i>GAPDH</i>	GDF1	GCCGTCAACGACCCCTTCATTGA
	GDR1	GGGTGGAGTCGTACTTGAGCATGT

1.2.2 LAMP 体系的建立与可视化结果 基于 LAMP 初步反应体系（表 2），参照 Bst DNA Polymerase Large Fragment 说明书设置等温扩增参数：60 ℃ 恒温反应 60 min，80 ℃ 灭活 10 min 终止反应。显色检测时加入 2 μL SYBR Green I（终浓度 1×），观察反应溶液的颜色变化。阳性扩增的反应液呈黄绿色荧光，阴性对照保持橙色；同步通过琼脂糖凝胶验证其扩增特异性，阳性产物显示梯形条带，阴性样本无条带。试验全程设立阴性对照（无模板 DNA）以确保检测特异性。

表 2 建立的 LAMP 初步反应体系（25 μL）
Tab. 2 Initially established LAMP reaction system (25 μL)

组分 Component	体积 Volume/μL	终浓度 Final concentration
10×ThermoPol buffer	2.5	1×
MgSO ₄ (100 mmol/L)	1.5	6 mmol/L
dNTP Mix (10 mmol/L)	3.5	1.4 mmol/L
Bst DNA polymerase large fragment	1.0	320 U/mL
甜菜碱 (20 mmol/L)	1.0	0.8 mmol/L
FIP/BIP primers (10 μmol/L)	4.0	1.6 μmol/L
F3/B3 primers (10 μmol/L)	0.5	0.2 μmol/L
DNA 模板	2.0	
Nuclease-free water	1.5	

1.2.3 LAMP 引物设计 基于咖啡暹罗炭疽（*C. siamense*）菌株 *TUB2* 的种内多序列比对结果，寻找序列特异区域。采用 Primer Explorer V5 (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>) 对保守差异片段进行 LAMP 引物设计，包括外部引物对 F3 和 B3、内部引物对 FIP 和 BIP、环引物 LoopF 和 LoopB；参照自由能（ $\Delta G \leq -4.0$ kcal/mol）与 GC 含量（40%~60%）等条件进行筛选，筛选获得 2 组候选引物（表 3），由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。引物验证同 1.2.2，进行荧光显色（SYBR Green I）与琼脂糖凝胶电泳（1%）。针对常规 PCR 中 *TUB2* 通用引物（Bt2a/Bt2b）种间特异性不足的问题，通过 Primer Premier 6 设计物种特异性 *TUB2* 引物，用于后续灵敏度分析及田间样本特异性验证。

1.2.4 LAMP 体系反应条件的优化 为确定 LAMP 反应的最佳温度，设置 6 个反应温度，分别为 54、57、60、63、65、70 ℃，在各设定温度下进行反应。同时，为优化反应时间，选择 8 个反应时长（20~90 min，间隔 10 min）进行对比试验。

表 3 LAMP 检测体系所用引物及其序列

Tab. 3 Primers and their sequences used for LAMP detection system

引物 Primer	引物序列（5'-3'） Primer sequence (5'-3')	长度 Length/bp
Tub-L1	1-F3 CTCGACAGCAATGGAGTGT	19
	1-B3 TACTTGTGTCGGAAGCC	18
	1-FIP GGAGCTCAGAGGTGCCGTTGC TGGCCACATTGGTGGTTG	39
	1-BIP ACCTTATAGCCCCACAGTGC AGGGTAGGAGCGAAGGTCA	40
Tub-L2	2-F3 GCGCATGATCGTCTACTTCA	20
	2-B3 ACCAGACTGGCCGAAGAC	18
	2-FIP TGGGTAGGAGCGAAGGTCAGT ATACCTTATAGCCCCACAGT	42
	2-BIP CGTCCTCGTCCATTGGAGCCA AGAGCTGGCCGAAAGGA	39
	2-LoopB TACCATGGACGCCGTCCGT	19
Tub-CS-L	1-F CCCACAGTGCAAGATAAACA	20
	1-R GCCGAAGACGAAGTTGTC	18

在时间与温度优化的基础上，进一步对体系组分进行优化。首先是内外引物配比优化，设定内外引物比分别为 8 : 1、6 : 1、4 : 1、2 : 1；鉴于 Mg^{2+} 浓度影响 DNA 聚合酶活性，试验分别设置 2、3、4、6、8、10、12 mmol/L Mg^{2+} 浓度梯度。而 dNTPs 作为扩增反应的原料，优化其浓度（测试浓度为 0~1.6 mmol/L，以 0.2 mmol/L 递增），避免因其过少限制扩增效率或过多导致非特异性扩增。此外，甜菜碱能够促进 DNA 解链并减少二级结构的产生，在 LAMP 反应中作为辅助剂，通过 0~1.6 mmol/L（间隔 0.2 mmol/L）浓度梯度进行甜菜碱的用量优化。分析流程参照 1.2.2。

1.2.5 LAMP 体系灵敏度与特异性验证 将已知浓度为 10 ng/μL 的咖啡炭疽菌 DNA 模板进行系列稀释，设置浓度梯度为 10 ng/μL、1 ng/μL、100 pg/μL、10 pg/μL、1 pg/μL、100 fg/μL、10 fg/μL、1 fg/μL、100 ag/μL，将不同浓度的模板加入体系中进行反应，以确认该体系的最低检测限。在特异性验证中，选取咖啡叶片以及已鉴定的 7 种植物病原菌：黑孢菌（*Nigrospora oryzae*）、菜豆间座壳菌（*Diaporthe phaseolorum*）、茄腐镰刀菌（*Fusarium solani*）、咖啡驼孢锈菌（*Hemileia vastatrix*）、咖啡尾孢菌（*Cercospora coffeicola*）、线浅孔菌（*Grammothele lineata*）、首都叶点霉（*Phyllosticta capitalensis*）。提取上述样品 DNA 加入 LAMP 体系中进行扩增，同时结合常规 PCR 扩增靶标基因进行测序。分析方法同 1.2.2。

1.2.6 优化后的 LAMP 体系对田间咖啡病原物的检测 提取田间采集疑似炭疽病感染的咖啡病叶组织 DNA, 并将其作为模板引入优化后的 LAMP 检测体系中进行扩增, 同时加入非炭疽菌样品进行检测。分析方法同 1.2.5。

2 结果与分析

2.1 炭疽病样本采集及病原菌分离

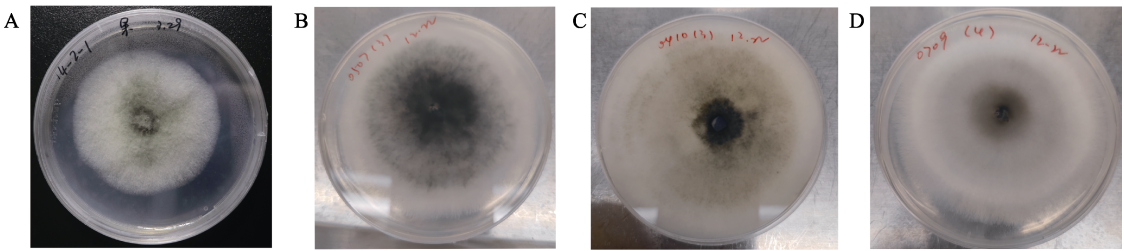
田间调查表明, 在 5 个咖啡种植园中, 均为中粒种咖啡呈现明显感病性 (图 1)。炭疽病侵染叶片呈现多阶段病理特征: 初期叶表出现黄褐色至黑褐色坏死斑; 进展期病斑扩展, 边缘可见暗褐色同心轮纹; 后期症状严重, 发展为带有黑色脓肿同心环的凹陷坏死病变。该病表现出全生育期侵染特性, 在营养生长期、果实发育期均可造成典型病症。



图 1 咖啡炭疽病的田间症状
Fig. 1 Field symptoms of coffee anthracnose

对采集的病叶样本进行组织分离, 共分离纯化获得 24 个炭疽菌株, 其地理分布信息见表 4。在 PDA 培养基上, 各菌株菌落均呈现典型形态特征: 菌落直径 35~48 mm (培养第 5 天), 中央区域为棉絮状白色菌丝体, 边缘呈波状或纤毛状扩展, 并逐渐过渡为灰色至炭黑色, 难以依据菌落形态学特征进行分组, 部分菌落形态见图 2。

表 4 炭疽菌分离株的采集地点			
Tab. 4 Collection location of <i>Colletotrichum</i> isolates			
菌株 Strain	采集地点 Collection location	菌株 Strain	采集地点 Collection location
DL-1	大路试验示范基地	LY-1	兴隆隆苑咖啡庄园
DL-2	大路试验示范基地	LY-2	兴隆隆苑咖啡庄园
DL-3	大路试验示范基地	LY-3	兴隆隆苑咖啡庄园
TYH-1	兴隆太阳河基地	LY-4	兴隆隆苑咖啡庄园
TYH-2	兴隆太阳河基地	LY-5	兴隆隆苑咖啡庄园
TYH-3	兴隆太阳河基地	LY-6	兴隆隆苑咖啡庄园
TYH-4	兴隆太阳河基地	GY-1	兴隆咖啡公园
ZWY-1	兴隆热带植物园	GY-2	兴隆咖啡公园
ZWY-2	兴隆热带植物园	GY-3	兴隆咖啡公园
ZWY-3	兴隆热带植物园	GY-4	兴隆咖啡公园
ZWY-4	兴隆热带植物园	GY-5	兴隆咖啡公园
ZWY-5	兴隆热带植物园	GY-6	兴隆咖啡公园



A: 兴隆热带植物园样品; B: 兴隆咖啡公园样品; C: 兴隆太阳河基地样品; D: 兴隆隆苑咖啡庄园样品。
A: Sample of the Xinglong tropical botanical garden; B: Sample of the Xinglong Coffee Park; C: Sample of the Sun River Base in Xinglong; D: Sample of the Longyuan Coffee Manor in Xinglong.

图 2 咖啡炭疽病病原菌株的菌落形态特征 (部分)

Fig. 2 Colony morphological characteristics of pathogenic fungal strains of coffee anthracnose (partial)

2.2 多基因联合鉴定结果

采用 MEGA 软件构建基于最大似然法 (maximum likelihood, ML) 的系统发育树, 对目标基因序列进行多序列比对及修剪。分析的基因片段顺序及长度如下: *ITS* (1~502 bp)、*TUB2* (503~885 bp)、*CHS-1* (886~1076 bp)、*ACT* (1077~1289 bp)、*GAPDH* (1290~1475 bp)。24 株炭疽病菌被划分为 *C. tropicale*、*C. karstii*、*C.*

fruticola、*C. siamense* 4 个类群 (图 3)。其中, *C. siamense* 分支包含 11 个菌株 (占总数的 45.8%), 且该分支菌株广泛分布于 5 个采样地点, 显示出显著的地理分布优势。

2.3 LAMP 体系引物的筛选

基于 *TUB2* 基因保守区设计的 LAMP 引物特异性评估显示, Tub-L1 引物有且仅对 *C. siamense* 产生典型 LAMP 扩增特征, 而其余 7 个炭疽菌属

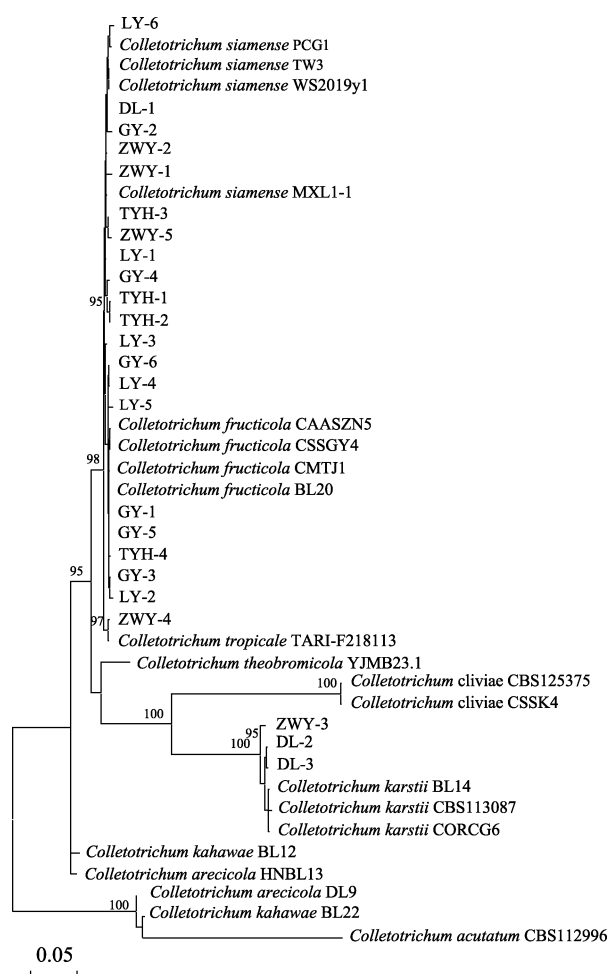
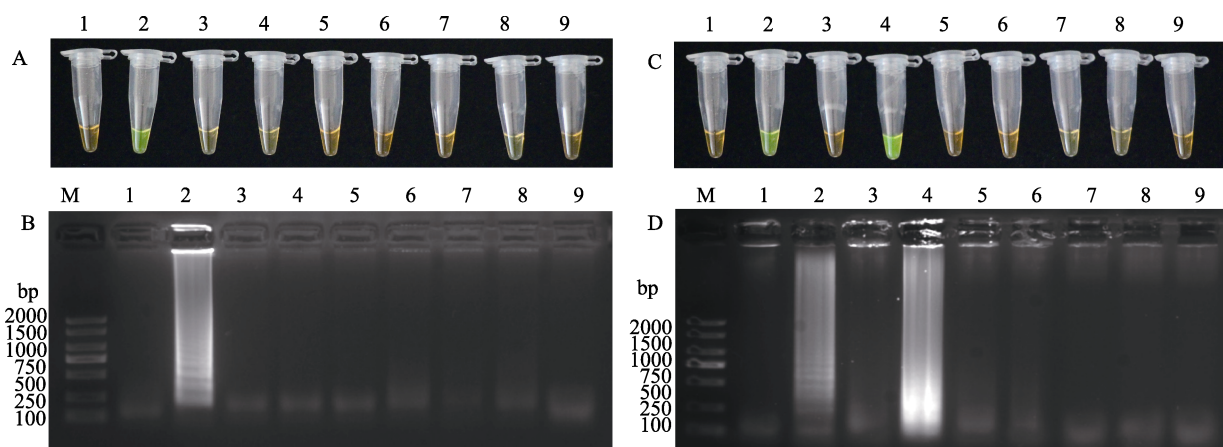


图 3 基于 *ITS*、*TUB2*、*CHS-1*、*ACT*、*GAPDH* 序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on *ITS*, *TUB2*, *CHS-1*, *ACT* and *GAPDH* sequences



A: Tub-L1 荧光可视化检测; B: Tub-L1 琼脂糖凝胶电泳图; C: Tub-L2 荧光可视化检测; D: Tub-L2 琼脂糖凝胶电泳图。M: DL2000 plus DNA marker; 1: 阴性对照 (CK⁻); 2: *C. siamense*; 3: *C. tropicale*; 4: *C. fructicola*; 5: *C. karstii*; 6: *C. theobromicola*; 7: *C. cliviae*; 8: *C. kahawae*; 9: *C. arenicola*。

A: Tub-L1 of fluorescence visualization detection; B: Tub-L1 of agarose gel electrophoresis detection; C: Tub-L2 of fluorescence visualization detection; D: Tub-L2 of agarose gel electrophoresis detection. M: DL2000 plus DNA marker; 1: Negative control (CK⁻); 2: *C. siamense*; 3: *C. tropicale*; 4: *C. fructicola*; 5: *C. karstii*; 6: *C. theobromicola*; 7: *C. cliviae*; 8: *C. kahawae*; 9: *C. arenicola*。

图 4 LAMP 引物 Tub-L1 和引物 Tub-L2 的特异性检测

Fig. 4 Specificity detection of LAMP primers Tub-L1 and Tub-L2

菌株样品 (包括 *C. fructicola*、*C. gloeosporioides* 等) 均未检测到特异性扩增条带 (图 4A、图 4B); Tub-L2 引物组在 2 号 (*C. siamense*) 和 4 号 (*C. fructicola*) 样本中引发特异性扩增 (图 4C、图 4D)。基于试验效率及引物特异性验证, 最终选定 Tub-L1 引物 (图 5) 作为后续检测体系的试验引物。

2.4 LAMP 体系的优化

2.4.1 LAMP 体系温度与反应时间优化 如图 6 所示, LAMP 扩增体系在 60~65 °C 的温度范围内均能实现特异性扩增, 均呈现明显的黄绿色阳性显色反应, 其中 63 °C 条件下扩增产物的电泳条带最清晰, 表明该温度为最适反应温度。

基于上述温度参数, 通过时间梯度试验进一步优化, 结果表明, 40 min 反应体系就可检测到典型梯形条带, 其扩增效率与 90 min 组无明显差异 (图 7)。鉴于 LAMP 技术快速检测的特性, 综合检测灵敏度与时效性, 选择 50 min 作为标准反应时间。对于低拷贝样本, 建议适当延长反应时间至 60 min 以提高产物积累量, 此时体系仍能保持良好扩增特异性。

2.4.2 LAMP 体系各组分最适浓度筛选 通过引物浓度配比试验发现, 当体系内外引物比 (F3/B3 : FIP/BIP) 为 2 : 1 时无扩增条带, 而 4 : 1、6 : 1、8 : 1 组均能产生特异性扩增产物; 经琼脂糖凝胶电泳分析, 8 : 1 组扩增条带亮度明显高于其他组 (图 8), 故维持初始引物浓度比 (8 : 1)。

```
CTGGCGAGCA CGGCCTCGAC AGCAATGGAG TGTATGTCAT GCCCCTTATC TGGCCACATT GGTGGTTGAC CGCTAAACTC
*****
<===== F3 =====> <===== F2 =====>

TAACAGCTAC AACGGCACCT CTGAGCTCCA GCTCGAGCGC ATGATCGTCT ACTTCAACGA AGTTTGTTC CTTATAGCCC
*****
<===== F1 =====> <===== B1 =====>

CCACAGTGCA AGATAAACAT ATTGACAAGT ACTGACCTTC GCTCCTACCC AGGCTTCCGG CAACAAGTAC GTGCCCCGTG
*****
=====> <===== B2 =====> <===== B3 =====>

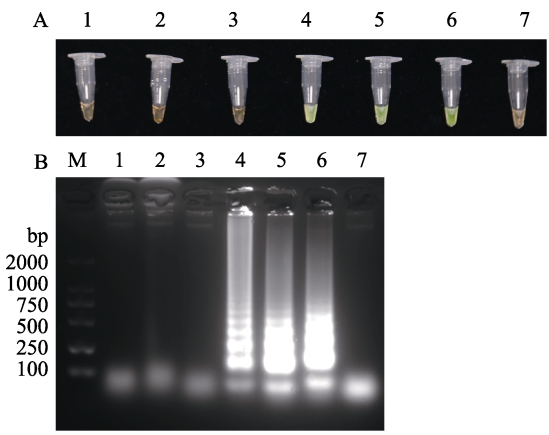
CCGTCCTCGT CCATTTGGAG CCGGCTACCA TGGACGCCGT CCGTGCCGGT CCTTTCGGCC AGCTCTTCCG CCCCGACAAC
*****
```

内引物 FIP 的 5'端和 3'端分别为 F1c (F1 的互补序列) 和 F2; BIP 的 5'端和 3'端分别为 B1c (B1 的互补序列) 和 B2。

5'-terminal and 3'-terminal of inner primer FIP are F1c (complementary sequence of F1) and F2, respectively; 5'-terminal and 3'-terminal of inner primer BIP are B1c (complementary sequence of B1) and B2, respectively.

图 5 LAMP 引物 Tub-L1 设计图

Fig. 5 Schematic diagram of LAMP primer Tub-L1 design

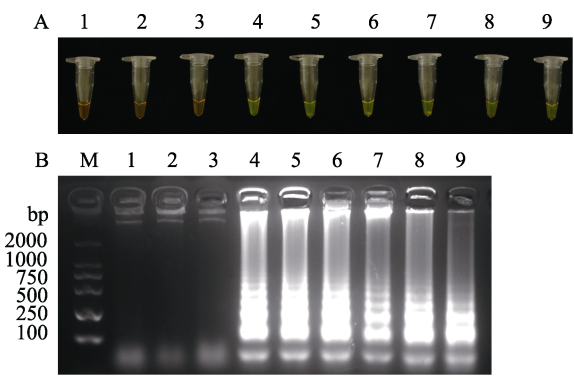


A: 荧光可视化检测; B: 琼脂糖凝胶电泳图。M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 54 °C; 3: 57 °C; 4: 60 °C; 5: 63 °C; 6: 65 °C; 7: 70 °C。

A: Fluorescence visualization detection; B: Agarose gel electrophoresis detection. M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 54 °C; 3: 57 °C; 4: 60 °C; 5: 63 °C; 6: 65 °C; 7: 70 °C。

图 6 LAMP 反应温度优化

Fig. 6 Optimization of LAMP reaction temperature

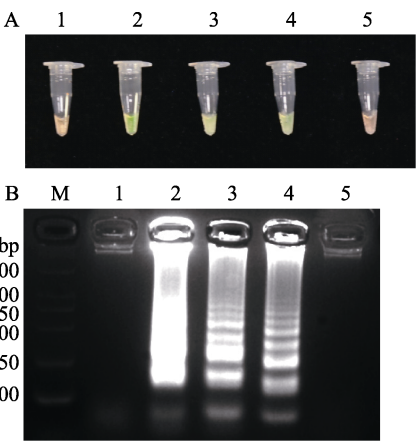


A: 荧光可视化检测; B: 琼脂糖凝胶电泳图。M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 20 min; 3: 30 min; 4: 40 min; 5: 50 min; 6: 60 min; 7: 70 min; 8: 80 min; 9: 90 min。

A: Fluorescence visualization detection; B: Agarose gel electrophoresis detection. M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 20 min; 3: 30 min; 4: 40 min; 5: 50 min; 6: 60 min; 7: 70 min; 8: 80 min; 9: 90 min。

图 7 LAMP 反应时间优化

Fig. 7 Optimization of LAMP reaction time



A: 荧光可视化检测; B: 琼脂糖凝胶电泳图。M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 8:1; 3: 6:1; 4: 4:1; 5: 2:1。

A: Fluorescence visualization detection; B: Agarose gel electrophoresis detection. M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 8:1; 3: 6:1; 4: 4:1; 5: 2:1。

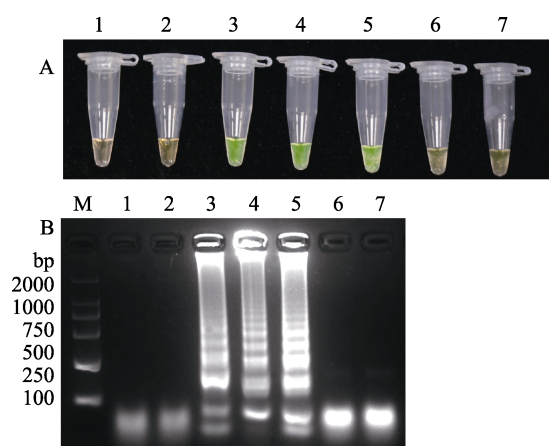
图 8 LAMP 内外引物浓度比优化

Fig. 8 Optimization of internal and external primer molarity ratio in LAMP

针对 Mg^{2+} 浓度的梯度试验表明, 4~8 mmol/L 范围内均能实现靶标扩增, 其中 8 mmol/L 组扩增效率最高, 产物梯形条带亮度明显 (图 9)。dNTPs 浓度优化结果显示, 0.8~1.8 mmol/L 浓度区间均可完成有效扩增, 但 0.8 mmol/L 浓度扩增效率与高浓度组无明显差异 (图 10), 且低浓度的 dNTPs 能有效降低焦磷酸镁沉淀风险。

甜菜碱浓度 (0.8~1.6 mmol/L) 的梯度试验表明, 其浓度变化对扩增效率及产物积累量无明显影响 (图 11), 证实该体系对甜菜碱无依赖性。基于成本效益分析, 最终确立 *TUB2* 靶标检测咖啡炭疽菌的优化体系为: 8 mmol/L Mg^{2+} 、0.8 mmol/L dNTPs, 且无需添加甜菜碱。

2.4.3 LAMP 体系反应灵敏度与特异性验证 对梯度稀释模板进行灵敏度验证显示, 该体系检

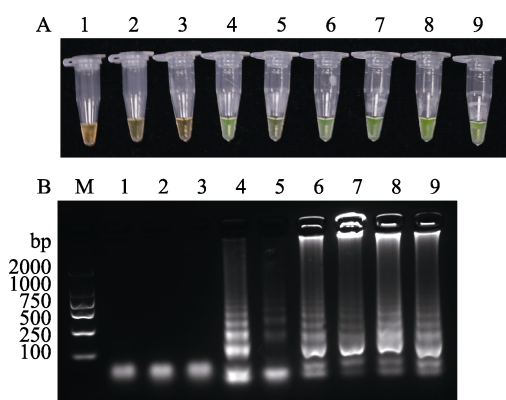


A: 荧光可视化检测; B: 琼脂糖凝胶电泳图。M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 2 mmol/L; 3: 4 mmol/L; 4: 6 mmol/L; 5: 8 mmol/L; 6: 10 mmol/L; 7: 12 mmol/L。

A: Fluorescence visualization detection; B: Agarose gel electrophoresis detection. M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 2 mmol/L; 3: 4 mmol/L; 4: 6 mmol/L; 5: 8 mmol/L; 6: 10 mmol/L; 7: 12 mmol/L。

图 9 LAMP Mg²⁺最适浓度筛选

Fig. 9 Optimization of Mg²⁺ molarity in LAMP



A: 荧光可视化检测; B: 琼脂糖凝胶电泳图。M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 0.4 mmol/L; 3: 0.6 mmol/L; 4: 0.8 mmol/L; 5: 1.0 mmol/L; 6: 1.2 mmol/L; 7: 1.4 mmol/L; 8: 1.6 mmol/L; 9: 1.8 mmol/L。

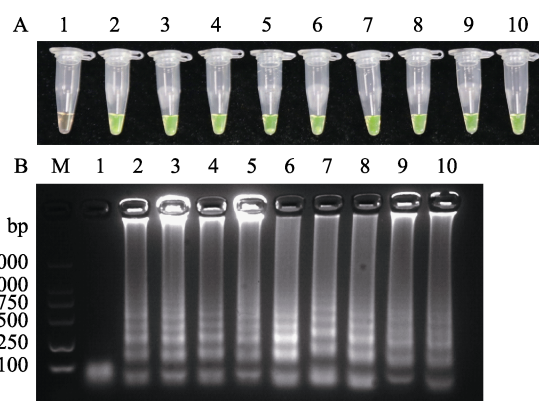
A: Fluorescence visualization detection; B: Agarose gel electrophoresis detection. M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 0.4 mmol/L; 3: 0.6 mmol/L; 4: 0.8 mmol/L; 5: 1.0 mmol/L; 6: 1.2 mmol/L; 7: 1.4 mmol/L; 8: 1.6 mmol/L; 9: 1.8 mmol/L。

图 10 LAMP dNTPs 最适浓度筛选

Fig. 10 Optimization of dNTPs molarity in LAMP

测限为 100 pg/μL, 模板浓度为 10 pg/μL 时无条带 (图 12)。值得注意的是, 常规 PCR 在相同模板浓度 (1 ng/μL) 下仅产生微弱条带, 而 100 pg/μL 时完全无扩增结果, 证实 LAMP 的灵敏度较 PCR 至少提升 1 个数量级。

采用 7 种植物病原菌及健康咖啡叶片 DNA 进行特异性验证, 如图 13 所示, SYBR Green I 荧光染色显示仅咖啡暹罗炭疽菌 (*C. siamense*) 反

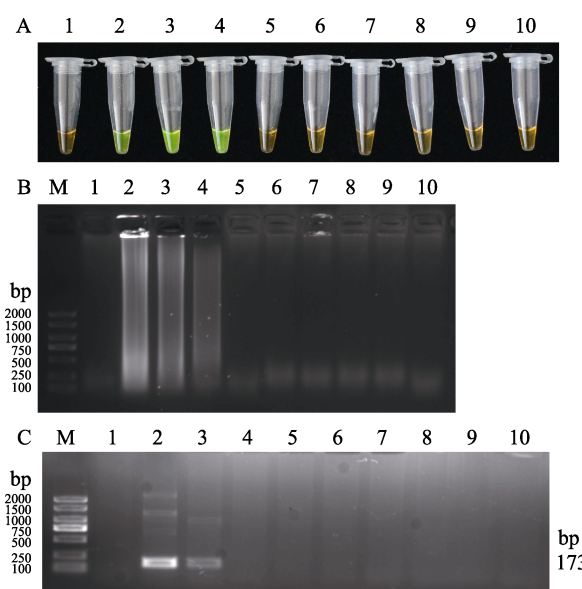


A: 荧光可视化检测; B: 琼脂糖凝胶电泳图。M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 0 mmol/L; 3: 0.2 mmol/L; 4: 0.4 mmol/L; 5: 0.6 mmol/L; 6: 0.8 mmol/L; 7: 1.0 mmol/L; 8: 1.2 mmol/L; 9: 1.4 mmol/L; 10: 1.6 mmol/L。

A: Fluorescence visualization detection; B: Agarose gel electrophoresis detection. M: DL2000 DNA marker; 1: Negative control; 2: 0 mmol/L; 3: 0.2 mmol/L; 4: 0.4 mmol/L; 5: 0.6 mmol/L; 6: 0.8 mmol/L; 7: 1.0 mmol/L; 8: 1.2 mmol/L; 9: 1.4 mmol/L; 10: 1.6 mmol/L。

图 11 LAMP 甜菜碱最适浓度筛选

Fig. 11 Optimization of Betaine molarity in LAMP



A: 荧光可视化检测; B、C: 分别为 LAMP 和 PCR 的琼脂糖凝胶电泳检测。M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 10 ng/μL; 3: 1 ng/μL; 4: 100 pg/μL; 5: 10 pg/μL; 6: 1 pg/μL; 7: 100 fg/μL; 8: 10 fg/μL; 9: 1 fg/μL; 10: 100 ag/μL。

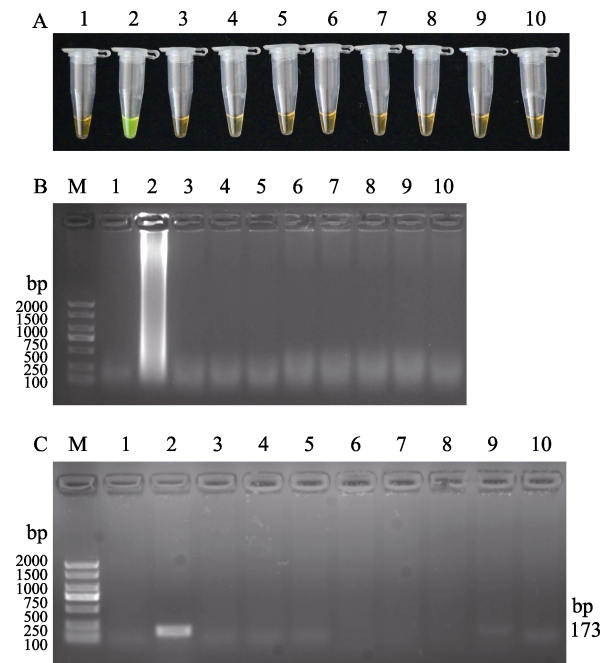
A: Fluorescence visualization detection; B, C: LAMP and PCR agarose gel electrophoresis detection, respectively. M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: 10 ng/μL; 3: 1 ng/μL; 4: 100 pg/μL; 5: 10 pg/μL; 6: 1 pg/μL; 7: 100 fg/μL; 8: 10 fg/μL; 9: 1 fg/μL; 10: 100 ag/μL。

图 12 LAMP 灵敏度验证

Fig. 12 LAMP sensitivity verification

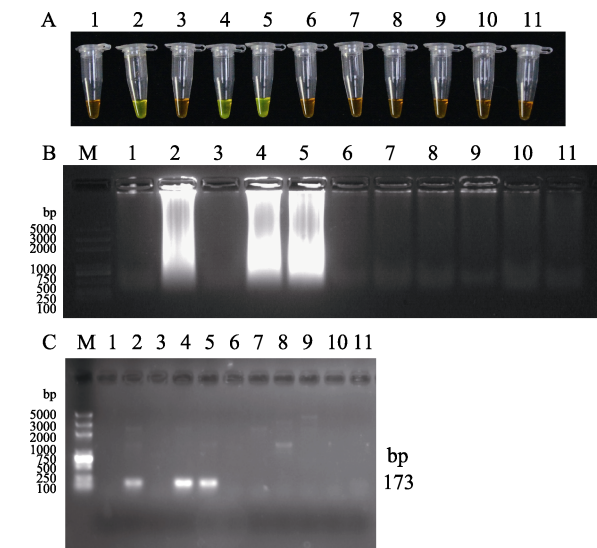
应体系呈现黄绿色荧光, 其余样本均保持橙色本底。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳进一步证实,

仅目标菌株出现阶梯状条带，空白对照与其他病原菌均无扩增条带。综合 2.3 引物筛选结果及上述试验结果表明，本研究建立的咖啡炭疽菌 *C. siamense* LAMP 反应体系具有高度特异性。



A: 荧光可视化检测；B、C：分别为 LAMP 和 PCR 的琼脂糖凝胶电泳检测。M：DL2000 DNA marker；1：CK⁻；2：暹罗炭疽菌；3：黑孢菌；4：菜豆间座壳菌；5：茄腐镰刀菌；6：线浅孔菌；7：首都叶点霉；8：咖啡驼孢锈菌；9：咖啡尾孢菌；10：咖啡叶片。
A: Fluorescence visualization detection; B, C: LAMP and PCR agarose gel electrophoresis detection, respectively. M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2: *Colletotrichum siamense*; 3: *Nigrospora oryzae*; 4: *Diaporthe phaseolorum*; 5: *Fusarium solani*; 6: *Grammothele lineata*; 7: *Phyllosticta capitalensis*; 8: *Hemileia vastatrix*; 9: *Cercospora coffeicola*; 10: Coffee leaf.
图 13 LAMP 特异性验证
Fig. 13 LAMP specificity verification

2.4.4 LAMP 体系检测田间病原菌 结果如图 14 所示，田间采集的 12 份咖啡病叶样本经 LAMP 检测显示，样品 2、4、5 反应体系出现明显黄绿色显色反应，琼脂糖凝胶电泳可见清晰梯形条带；其余 7 份均保持橙色，电泳无扩增条带。同步进行的 PCR 验证试验（引物 Tub-CS-L）表明，阳性样本 2、4、5 在 173 bp 处出现特异性条带，与 LAMP 检测结果一致。研究证实优化后的 LAMP 体系可成功检测田间样本中的咖啡暹罗炭疽菌（*C. siamense*），且检测周期较常规 PCR 缩短 62%（LAMP 为 50 min，PCR 为 130 min），满足田间样本快速、精准的检测需求。



A: 荧光可视化检测；B、C：分别为 LAMP 和 PCR 的琼脂糖凝胶电泳检测。M：DL2000 DNA marker；1：CK⁻；2~11：田间咖啡病叶样品。
A: Fluorescence visualization detection; B, C: LAMP and PCR agarose gel electrophoresis detection, respectively. M: DL2000 DNA marker; 1: CK⁻; 2~11: Field coffee leaf samples.
图 14 LAMP 田间样品检测结果
Fig. 14 LAMP field sample test results

3 讨论

作为植物病原真菌的重要类群之一，炭疽菌属真菌对多种具有重要经济价值的热带作物（特别是水果和观赏植物）造成严重危害，包括咖啡、胡椒、橡胶、菠萝蜜等^[20-23]。其中暹罗炭疽菌（*C. siamense*）最初常被误鉴定为胶孢炭疽菌（*C. gloeosporioides*），后经学者系统修订，确认为独立物种^[24]。本研究基于多基因系统发育分析方法，对 24 株咖啡炭疽菌分离株进行分离鉴定，其中 11 株鉴定为暹罗炭疽菌（占分离株总数的 45.8%），且分布最广，为优势种群。这一结果与前期研究一致，如巩佳莉^[25]从云南、海南收集的 74 株咖啡炭疽菌中鉴定出 7 个炭疽菌种，其中暹罗炭疽菌占比最高（32%）；陆英等^[26]对 55 株咖啡炭疽病菌的分类研究也显示暹罗炭疽菌为优势种，占比达 43.64%。值得注意的是，暹罗炭疽菌不仅是海南咖啡、橡胶和槟榔 3 种重要热带作物的主要病原菌，且因其在寄主间具有交叉感染能力，加之海南多年连作或相邻种植的栽培模式，导致该病原菌潜伏感染的风险加剧，严重阻碍了田间咖啡炭疽病害的有效防控^[27]。因此，建立基于 LAMP 技术的早期检测体系，结合病原菌种群动态监测，对实施精准防控和降低咖啡炭疽病流

行风险具有重要的实践价值。

LAMP 技术是基于特异性引物的多重识别机制,通过设计 4~6 条靶向基因保守区的引物实现高精度扩增,其特异性源于引物与靶标序列的严格互补匹配,若存在核苷酸错配或缺失,则扩增无法进行,从而确保检测的高度特异性。相较于传统 PCR 技术对热循环仪器的依赖,LAMP 技术因其恒温扩增特性,简化了试验流程并降低了设备需求;同时,该技术兼具扩增效率高、结果可视化等优点,因此更适用于基层实验室或资源受限场景的快速检测需求^[12, 28]。

LAMP 技术的关键核心在于靶标基因的精确筛选,需优先选择种内高保守,且种间多态性显著的基因区段。除常规应用的 *ITS*、*TUB2* 基因外,近年相关研究拓展至 *16S rDNA*、*CYP51C*、*CYP450* 等基因位点^[29-31]。如王贤达等^[32]基于葡萄炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*) 的 *ITS* 特异区域构建的 LAMP 体系,该体系对葡萄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、桃褐腐病菌 (*Monilinia laxa*) 等菌株无扩增反应。ARAVINDARAM 等^[33]基于辣椒炭疽菌 (*C. capsici*) 的 *TUB2* 基因构建了 LAMP 体系,该体系对菜豆壳孢菌 (*Macrophomina phaseolina*)、胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides*)、腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani*) 等 8 种病原菌均无扩增。王冠华^[34]开发了苹果炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*) *TUB* 靶向检测体系,该体系对苹果斑点落叶病菌 (*Alternaria alternaria*)、苹果霉心病菌 (*Trichothecium roseum*) 等常见病原体具有严格特异性。本研究以 *TUB2* 特异性区域序列为靶标,设计 LAMP 特异性引物组。通过验证试验表明,该体系对黑孢菌 (*Nigrospora oryzae*)、咖啡驼孢锈菌 (*Hemileia vastatrix*) 等 7 种非靶标菌株无扩增反应,同时对炭疽属内 7 个近缘种 (*C. tropicale*、*C. fructicola*、*C. karstii* 等) 亦无交叉反应。此外,对照试验进一步排除了咖啡叶片基因组 DNA 对检测结果的潜在干扰,证实了该 LAMP 检测体系的特异性与可靠性。

LAMP 反应产物的可视化检测常采用荧光指示剂,如利用 SYBR Green I、钙黄绿素-锰离子复合物、羟基萘酚蓝 (HNB) 等进行验证。研究表明,HNB 与 SYBR Green I 的检测灵敏度显著优于其他指示剂;然而,HNB 的显色机制依赖于反应过程中焦磷酸镁沉淀导致的 pH 变化,其浓度需精确调控,浓度过高会抑制 Bst DNA 聚合酶

活性^[13]。本研究选择 SYBR Green I 作为指示剂,其双链 DNA 结合特性可实现扩增终产物的即时荧光检测,但传统开盖加样操作易产生气溶胶污染,需严格执行分区操作(样本处理区、扩增区、检测区的物理隔离)并配合紫外臭氧灭菌。为规避污染风险,可借鉴闭管检测策略,即把 SYBR Green I 预加至 PCR 管盖内壁,扩增结束后通过高速离心实现染料与反应液的充分混合,该方法可有效降低假阳性率^[35]。

病原物检测体系的灵敏度是决定田间早期诊断效能的重要参数。本研究建立的咖啡炭疽病菌暹罗炭疽菌 (*C. siamense*) LAMP 体系,经梯度稀释模板验证,其最低检测限为 100 pg/μL。该灵敏度与已报道的向日葵核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)^[36]、余甘子果实斑点病菌 (*Diaporthe phoenicicola*)^[37]等体系相当。不同研究体系间其灵敏度存在差异,王贤达等^[32]基于葡萄炭疽病设计的检测体系灵敏度达 500 fg/μL,汪少丽等^[35]基于苹果炭疽菌基因构建的 LAMP 体系其灵敏度突破至 1 ag/μL,灵敏度的差异可能与靶标基因拷贝数、核酸纯化方法有关。尽管本体系的灵敏度处于中等水平,但仍优于常规 PCR 技术。

病原菌的精准快速鉴定是咖啡炭疽病综合防控体系的核心环节,直接影响病害预警的时效性及防控决策的科学性。本研究基于暹罗炭疽菌 (*C. siamense*) 的 *TUB2* 基因特异区域,成功构建了基于比色变化、快速精确的 LAMP 检测体系。该体系的建立突破了传统培养鉴定法周期长、分子检测依赖精密仪器等的技术瓶颈,为咖啡炭疽病的早期诊断及其精准防控策略的实施提供技术支撑,同时为咖啡的抗病育种及综合防治提供理论依据,也为农业生产上其他病害的快速诊断提供重要参考。

参考文献

- [1] 张慧坚,胡盛红,黄海文,王成丽,赵军明,古小玲,黄浩伦. 基于全球价值链的海南咖啡产业价值链赋能增值路径[J]. 中国热带农业, 2024(4): 5-14.
ZHANG H J, HU S H, HUANG H W, WANG C L, ZHAO J M, GU X L, HUANG H L. Research on the empowerment and value-added path of Hainan's coffee industry value chain based on global value chain[J]. China Tropical Agriculture, 2024(4): 5-14. (in Chinese)
- [2] 叶文香,张栋,吴舒婷. 海南与云南咖啡产业比较分析[J].

- 中国统计, 2023(9): 67-70.
- YE W X, ZHANG D, WU S T. Comparative analysis of coffee industries in Hainan and Yunnan[J]. China Statistics, 2023(9): 67-70. (in Chinese)
- [3] CAO X R, XU X M, CHE H Y, WEST J S, LUO D Q. Characteristics and distribution of *Colletotrichum* species in coffee plantations in Hainan, China[J]. Plant Pathology, 2019, 68(6): 1146-1156.
- [4] 陆英, 贺春萍, 吴伟怀, 梁艳琼, 黄兴, 郑金龙, 李锐, 易克贤. 聚乙二醇介导咖啡炭疽菌遗传转化体系的建立[J]. 南方农业学报, 2020, 51(11): 2706-2712.
- LU Y, HE C P, WU W H, LIANG Y Q, HUANG X, ZHENG J L, LI R, YI K X. Establishment of genetic transformation system of coffee *Colletotrichum* using polyethylene glycol-mediated method[J]. Journal of Southern Agriculture, 2020, 51(11): 2706-2712. (in Chinese)
- [5] GIDDISA G. A review on the status of coffee berry disease (*Colletotrichum kahawae*) in Ethiopia[J]. Journal of Biology, Agriculture and Healthcare, 2016, 6(19): 140-151.
- [6] VIEIRA A, DINIZ I, LOUREIRO A, PEREIRA A P, SILVA M C, VÁRZEA V, BATISTA D. Aggressiveness profiling of the coffee pathogen *Colletotrichum kahawae*[J]. Plant Pathology, 2019, 68(2): 358-368.
- [7] AVELINO J, ALLINNE C, CERDA R, WILLOCQUET L, SAVARY S. Multiple-disease system in coffee: from crop loss assessment to sustainable management[J]. Annual Review of Phytopathology, 2018, 56: 611-635.
- [8] 刘爱勤. 热带特色香料饮料作物主要病虫害防治图谱[M]. 北京: 中国农业出版社, 2013.
- LIU A Q. Control map of main pests and diseases of tropical specialty spice beverage crops[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2013. (in Chinese)
- [9] FERRUCHO R L, MARIN-RAMIREZ G A, OCHOA-CORONA F, ANGEL C C. PCR-based detection for the quarantine fungus *Colletotrichum kahawae*, a biosecurity threat to the coffee (*Coffea arabica*) industry worldwide[J]. Plant Disease, 2024, 108(9): 2615-2624.
- [10] CRISTÓBAL-MARTÍNEZ A L, DE JESÚS YÁÑEZ-MORALES M, SOLANO-VIDAL R, SEGURA-LEÓN O, HERNÁNDEZ-ANGUIANO A M. Diversity of *Colletotrichum* species in coffee (*Coffea arabica*) plantations in Mexico[J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 147(3): 605-614.
- [11] NOTOMI T, OKAYAMA H, MASUBUCHI H, YONEKAWA T, WATANABE K, AMINO N, HASE T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(12): E63.
- [12] 陈文静, 董章勇, 宋汉达, 罗梅. 环介导等温扩增技术在植物病原物检测中的应用[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2024, 37(4): 48-54.
- CHEN W J, DONG Z Y, SONG H D, LUO M. Application of loop-mediated isothermal amplification technology in plant pathogen detection[J]. Journal of Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2024, 37(4): 48-54. (in Chinese)
- [13] 马骏. 山核桃真菌性叶斑病原菌的分离鉴定及 LAMP 检测方法的建立[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2022.
- MA J. Isolation and identification of fungal leaf spot disease from *Carya cathayensis* Sarg. and establishment of LAMP detection method[D]. Hangzhou: Zhejiang A & F University, 2022. (in Chinese)
- [14] 汪涵. 两种热带作物锈菌 LAMP 分子检测技术的建立与应用[D]. 海口: 海南大学, 2018.
- WANG H. Establishment and application of LAMP molecular detection techniques for two rust fungi of tropical crops[D]. Haikou: Hainan University, 2018. (in Chinese)
- [15] 秦艳红, 鲁书豪, 文艺, 高素霞, 李绍建, 刘玉霞, 王飞, 鲁传涛. 地黄花叶病毒 RT-LAMP 快速检测方法的建立及应用[J]. 植物保护, 2024, 50(6): 246-253.
- QIN Y H, LU S H, WEN Y, GAO S X, LI S J, LIU Y X, WANG F, LU C T. Establishment and application of RT-LAMP method for rapid detection of Rehmannia mosaic virus[J]. Plant Protection, 2024, 50(6): 246-253. (in Chinese)
- [16] CARBONE I, KOHN L M. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes[J]. Mycologia, 1999, 91(3): 553-556.
- [17] WHITE T J, BRUNS T, LEE S, TAYLOR J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//PCR Protocols. New York: Academic Press, 1990: 315-322.
- [18] GLASS N L, DONALDSON G C. Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(4): 1323-1330.
- [19] SILVA D N, TALHINHAS P, VARZEA V, CAI L, PAULO O S, BATISTA D. Application of the Apn2/MAT locus to improve the systematics of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex: an example from coffee (*Coffea* spp.) hosts[J]. Mycologia, 2012, 104(2): 396-409.
- [20] CAO X, ZHANG Q, HE Y, CHE H, LIN Y, LUO D, WEST J S, XU X. Genetic analysis of *Colletotrichum siamense* populations from different hosts and counties in Hainan, China, using microsatellite markers[J]. Plant Disease, 2023, 107(1): 60-66.
- [21] LIN C H, FU L X, FAN Z Z, DUAN C F, JIANG T L, MIAO W G. First report of leaf anthracnose caused by *Col-*

- letotrichum karstii* of *Piper nigrum* in Yunnan province, China[J]. Plant Disease, 2022, 106(4): 1303.
- [22] DU Y, WANG M, ZOU L, LONG M, YANG Y, ZHANG Y, LIANG X. Quantitative detection and monitoring of *Colletotrichum siamense* in rubber trees using real-time PCR[J]. Plant Disease, 2021, 105(10): 2861-2866.
- [23] KHUNA S, KUMLA J, THITLA T, SENWANNA C, SUWANARACH N. First report of *Colletotrichum siamense* causing leaf anthracnose on jackfruit in Thailand[J]. Plant Disease, 2024, 108(12): 3654.
- [24] LIU F, WANG M, DAMM U, CROUS P W, CAI L. Species boundaries in plant pathogenic fungi: a *Colletotrichum* case study[J]. BMC Ecology and Evolution, 2016, 16: 81.
- [25] 巩佳莉. 我国咖啡炭疽病的病原鉴定及化防药剂筛选研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2020.
- GONG J L. Pathogen identification of coffee anthracnose and screening of chemical control agents in China[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2020. (in Chinese)
- [26] 陆英, 贺春萍, 吴伟怀, 梁艳琼, 郑金龙, 黄兴, 习金根, 谭施北, 易克贤. 我国咖啡炭疽病菌致病力分化[J]. 西南农业学报, 2021, 34(5): 1008-1014.
- LU Y, HE C P, WU W H, LIANG Y Q, ZHENG J L, HUANG X, XI J G, TAN S B, YI K X. Pathogenicity differentiation of coffee anthracnose in China[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(5): 1008-1014. (in Chinese)
- [27] CAO X, ZHU Z, CHE H, WEST J S, LIN Y, LUO D, XU X. Population structure, pathogenicity, and fungicide sensitivity of *Colletotrichum siamense* from different hosts in Hainan, China[J]. Plant Pathology, 2021, 70(5): 1158-1167.
- [28] 谢丽雪, 陈细红, 张小艳, 陈江珊, 张立杰, 高芳奎, 沈建国, 李韬. 西番莲病毒可视化多重 RT-LAMP 检测技术的建立[J]. 病毒学报, 2023, 39(6): 1682-1692.
- XIE L X, CHEN X H, ZHANG X Y, CHEN J S, ZHANG L J, GAO F L, SHEN J G, LI T. Establishment of visual multiplex RT-LAMP assay for simultaneous detection of passion fruit viruses[J]. Chinese Journal of Virology, 2023, 39(6): 1682-1692. (in Chinese)
- [29] 李彬. 柑橘黄龙病快速检测技术研制及应用[D]. 南宁: 广西大学, 2019.
- LI B. Development and application of rapid detection technology for citrus Huanglongbing[D]. Nanning: Guangxi University, 2019. (in Chinese)
- [30] ZENG D, YE W, XU M, LU C, TIAN Q, ZHENG X. Rapid diagnosis of soya bean root rot caused by *Fusarium culmorum* using a loop-mediated isothermal amplification assay[J]. Journal of Phytopathology, 2017, 165(4): 249-256.
- [31] 王雯雯, 刘心缘, 马云妮, 顾沛雯. 葡萄白粉病菌环介导等温扩增检测体系的建立与应用[J]. 中国果树, 2022(10): 22-29.
- WANG W W, LIU X Y, MA Y N, GU P W. Establishment and application of a ring-mediated isothermal amplification detection system for *Uncinula necator*[J]. China Fruits, 2022(10): 22-29. (in Chinese)
- [32] 王贤达, 郑巧美, 陈婷, 刘鑫铭, 蔡盛华, 范国成, 雷龔. 葡萄炭疽病可视化 LAMP 检测体系的建立及应用[J]. 果树学报, 2016, 33(3): 366-373.
- WANG X D, ZHENG Q M, CHEN T, LIU X M, CAI S H, FAN G C, LEI Y. Establishment and application of visual loop-mediated amplification assay on *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Journal of Fruit Science, 2016, 33(3): 366-373. (in Chinese)
- [33] ARAVINDARAM K, AKHTAR J, SINGH B, PAL D. Application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid and sensitive detection of fungal pathogen, *Colletotrichum capsici* in *Capsicum annuum*[J]. Journal of Environmental Biology, 2016, 37(6): 1355-1360.
- [34] 王冠华. 烟台地区苹果重要病害 LAMP 快速检测体系的建立[D]. 烟台: 烟台大学, 2020.
- WANG G H. Establishment of LAMP rapid detection system for apple diseases in Yantai[D]. Yantai: Yantai University, 2020. (in Chinese)
- [35] 汪少丽, 曲恒华, 王英姿, 王培松, 栾炳辉, 王冠华. 苹果轮纹病菌 LAMP 快速检测方法的建立[J]. 植物保护学报, 2020, 47(1): 127-133.
- WANG S L, QU H H, WANG Y Z, WANG P S, LUAN B H, WANG G H. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of apple ring rot pathogen *Botryosphaeria dothidea*[J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47(1): 127-133. (in Chinese)
- [36] 常海城, 李虎, 郑立秋, 李海燕, 孟庆林. 向日葵核盘菌环介导等温扩增检测技术[J]. 中国油料作物学报, 2024, 46(6): 1412-1420.
- CHANG H C, LI H, ZHENG L Q, LI H Y, MENG Q L. Loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Sclerotinia sclerotiorum* in sunflower[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2024, 46(6): 1412-1420. (in Chinese)
- [37] 赖多, 王德林, 邵雪花, 秦健, 庄庆礼, 肖维强. 余甘子果实斑点病菌 LAMP 可视化检测方法的建立[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2025, 53(1): 69-79.
- LAI D, WANG D L, SHAO X H, QIN J, ZHUANG Q L, XIAO W Q. Establishment of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for visual rapid detection of *Diaporthe phoenicicola* offruit spot disease on *Phyllanthus emblica*[J]. Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition), 2025, 53(1): 69-79. (in Chinese)