

附件 2

草莓尖孢镰刀菌环介导等温扩增快速检测规程
编制说明

一、工作概况

(一) 任务来源

2025 年 6 月 7 日，根据新疆微生物学会团体标准立项范围及要求，由新疆生产建设兵团第十二师农业科学研究所申请制定《草莓尖孢镰刀菌环介导等温扩增（LAMP）快速检测规程》团体标准。本规程依托兵团中青年科技创新领军人才计划项目——“LAMP 检测及 DNA 条形码识别技术在草莓病害诊断中的研究与应用”，项目执行时间为 2019 年 1 月至 2021 年 12 月，执行期 3 年。

(二) 起草单位、协作单位

起草单位：新疆生产建设兵团第十二师农业科学研究所

协作单位：新疆维吾尔自治区农业科学院微生物研究所

(三) 主要起草人

表 1 主要起草人员信息及任务分工

姓 名	职务/职称	工作单位	任务分工
史芳芳	研究员	十二师农业科学研究所	主持制定标准
王 雷	高级农艺师	十二师农业科学研究所	指导标准编写
李 明	高级农艺师	十二师农业科学研究所	校正
陈烨华	研究员	十二师农业科学研究所	标准校正
包慧芳	研究员	新疆维吾尔自治区农业科学院微生物研究所	标准编写指导
王海琪	农艺师	十二师农业科学研究所	资料收集

冯 娇	农艺师	十二师农业科学研究所	资料收集
李梓嫣	农艺师	十二师农业科学研究所	验证过程
郑剑超	高级农艺师	十二师农业科学研究所	标准校正
梁武军	高级农艺师	十二师农业科学研究所	标准校正

二、制定标准的必要性和意义

草莓属蔷薇科草莓属多年生草本植物，果肉鲜美多汁，堪称“水果皇后”。我国草莓主要采用设施栽培，多年的连续种植导致草莓根茎部病害频繁发生，其中以真菌病害对草莓的影响最为显著，严重制约了我国草莓产业的健康发展。尖孢镰刀菌引起的枯萎病是一种毁灭性的土传真菌病害，致病能力强，感染面积广，被列为世界十大植物病原菌之一。近年来，新疆草莓频繁地调种、引种以及连作，导致病害发生严重，其中草莓枯萎病是主要病害，发生率达到 37%。该病可导致草莓结果减少、果实无法正常膨大、品质降低，甚至全株枯死，一般减产 20%~50%，该病传染性极强，几乎无药可施，因此对草莓枯萎病病原菌进行早期准确的鉴定是有效控制病害的关键。

目前，对草莓病害的检测方法主要通过传统的病原学和分子生物学检测技术，很难对病害进行及时、准确、快速的鉴定。环介导等温扩增技术（Loop-mediated isothermal amplification, LAMP）是日本的荣研株式会发明的一种新的核酸扩增技术，因为其操作简单、快速、特异性高、成本低等优点，成为可以替代普通 PCR 的新的核酸扩增技术。LAMP 已被应用于植物病毒、类病毒、真菌、细菌和线虫等方面的检测。比如，使用 HNB-LAMP 技术对番茄灰霉病进行检测；使用 SYBR Green I-LAMP 技术实现了对梨黑斑病的快速检

测；青稞黑穗病的 LAMP 检测体系；通过 LAMP 技术实现了对油橄榄炭疽病的快速检测。针对草莓枯萎病的 LAMP 检测技术国内还未见报道。该项技术是在 65℃左右恒温下扩增，只要恒温水浴锅即可，无需特殊仪器，所以操作方便，对设备要求低；且可用肉眼即可观察实验结果，检测周期非常短，适合于基层农业单位对田间草莓病害进行快速鉴定。因此，通过进一步改进实验方法，优化体系，建立起一套灵敏度高，准确性好，操作简便的枯萎病害 LAMP 快速检测技术规程，使草莓生产行业有规范可循，对于草莓病原菌实时监测和前期预警具有重要作用，为新疆草莓产业化可持续发展提供原始创新力。

三、起草工作简要过程

新疆生产建设兵团第十二师农业科学研究所作为起草单位对新疆草莓主产区发生病害的草莓植株进行调查与收集，通过前期项目实施，验证了试验过程，草拟征求意见稿，并整理送审材料，具体过程如下：

（一）开展了《LAMP 检测及 DNA 条形码识别技术在草莓病害诊断中的研究与应用》项目的研究，为本规范的制定提供了技术支撑和试验验证

本规范制定起草组于 2018 年-2021 年进行了兵团中青年科技创新领军人才计划--《LAMP 检测及 DNA 条形码识别技术在草莓病害诊断中的研究与应用》项目的研究。该项目取得如下研究成果：

（1）检测过程快速、简便：本项目直接鉴定草莓组织中的尖孢镰刀菌和炭疽菌，鉴定周期为 1h 内，非专业人员均可操作，鉴定方法适应性强，DNA 快速检测试剂盒价格低廉，方法简单，只用一种混合试剂，反应时间 5min 即得所需 DNA，适合向基层推广。

（2）准确性高、灵敏度高：本项目根据尖孢镰刀菌特异基因序列 IGS 设计特异的 LAMP 引物，检测结果准确可靠；普通 PCR 扩增所使用的最低 DNA 浓度为 10^{-1} ng/ μ l，利用本方法提取的 DNA 稀释至 10^{-4} ng/ μ l 进行 LAMP 技术扩增，其产物跑电泳可以看到清晰梯状条带，灵敏度提高了 1000 倍。

（3）检测的模板范围较广：本项目利用三种模板，即发病植株组织、分离培养物菌丝、含有病原菌土壤分别提取 DNA 进行 LAMP 扩增试验，显色反应均显示阳性结果。基于基层单位的实验条件有限，可以不经过室内病原菌的分离纯化即可有效快速地从土壤和病株中提取的 DNA 进行 LAMP 检测鉴定。

（4）检测结果特异性强：本项目中，利用 IGS 基因设计的 LAMP 引物具有特异性，能够特异性识别草莓尖孢镰刀菌，能够快速确定待测样品是否存在目标病原菌侵染，减少了时间消耗和成本。

（二）召开规范制定起草组会议，部署《草莓尖孢镰刀菌环介导等温扩增（LAMP）快速检测技术规程》初稿的起草工作

2024 年 6 月 20 日，召开标准起草工作会议。会议确定

了规范的制定原则，即按照 GB/T 1.1-2020《标准化工作导则 第1部分：标准的结构和编写》及 GB/T 1.2-2020《标准化工作导则 第2部分：标准中规范性技术要素内容确定方法》的要求进行编写，并就规范的主要内容进行了深入、广泛、细致、热烈的讨论。

在总结本规范制定起草组前期科学研究成果的基础上，密切联系实际，广泛查阅资料和进行调查研究，于2024年7月10日编写完成《草莓尖孢镰刀菌环介导等温扩增快速检测规程》草案稿，在反复讨论、修改后于2024年12月15日编写完成《草莓尖孢镰刀菌环介导等温扩增快速检测规程》征求意见稿。

四、编写原则和确定标准主要内容的依据

1. 制定标准的原则

本标准的制定以 GB/T1.1《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》为依据，以实用性、科学性和可操作性为基本原则，面向新疆草莓枯萎病快速检测技术的实际，具有良好的科学引导性。

2. 制定标准的依据

[1] T/WSWXH 002-2022《新疆主要果树和防护林腐烂病菌检测技术规程》

[2] WS 233-2002《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》

[3] SN/T 3767.27-2014《出口食品中转基因成分环介导等温扩增（LAMP）检测方法》

[4] SNT 2965-2011《植物病原真菌分子生物学检测规范》

[5] GB/T 6682-2008《分析实验室用水规格和试验方法》

[6] DB22/T 1820-2013《粮食中串珠镰刀菌的PCR检测》

3. 与现行法律、法规、标准的关系

本标准依据现行的法律、法规和标准制定，各项内容与其没有冲突。

五、技术经济分析论证和预期的经济效益

植物病原菌的检测是植物病害检测中的常规工作，但是专一病害的快速检测试剂盒比较少。等温扩增技术在病原菌的检测工作中有很大潜力。然而，目前国内在枯萎病检测领域尚无以此技术开发的商业试剂，国内也未见这方面的研究开发报道。因此，开发病原菌的环介导等温扩增试剂具有广阔的前景。

本项目是针对严重影响植物健康的病原菌的检测问题提出的，研究成果的实用性强，易于转化。在产品的研制工作中采用了现代分子生物学新技术，产品的科技含量高，生产成本低，利润空间大。本产品的生产不需特殊大型设备，产品定型后可向中小型生化试剂生产企业转让，因此，本项目的产业化前景广阔。

成果推广：研发的试剂盒在全国各地进行推广试用，目前推广至西北农林科技大学、江苏省农科院果树所、安徽省合肥市长丰县草莓专业合作社和烟台青旗农业科技开发有限公司等 10 个科研院所和企业。

建立了 1 套国内领先且具有推广价值的环介导等温扩增

快速检测技术，可快速地、专一性地鉴定尖孢镰刀菌。传统病原菌形态学鉴定耗时费力，近年来的分子生物学技术为病原菌检测和鉴定提供了新的方法，但是需要专业技术人员和昂贵的科研仪器。目前在检测草莓病害和病毒方面采用的大多数是分子生物学 PCR 扩增法，用到 LAMP 扩增技术的较少，尖孢镰刀菌是很草莓种植过程中常见导致枯萎病的病原菌。本研究根据尖孢镰刀菌特有的 IGS 基因序列设计特有的两对内外引物和一条环引物，即 FIP、BIP、F3、B3 和 Loop 组成，特异性识别靶序列上的 5 个独立区域，利用 IGS 基因设计的 LAMP 引物具有特异性，可快速、特异检测草莓专化型镰刀菌在草莓植株体内是否存在，含有尖孢镰刀菌的菌株呈现可视化的绿色荧光，属内其他菌种则显示橙色。首次利用 LAMP 技术检测草莓枯萎病，可为草莓病害检测领域的科研工作者和基层技术人员提供简便、快速的检测方法。尖孢镰刀菌快速检测试剂盒采用 LAMP（环介导等温扩增）技术，利用恒温装置在 45 分钟内快速准确地将草莓感染了尖孢镰刀菌检测出来，肉眼可直接看到检测结果。不仅检测灵敏度较 PCR 技术提高了 1000 倍，价格低、检测时间短、方法简单，不需要专业人员，适合向农业基层推广，对于草莓枯萎病病原菌实时监测和前期预警具有重要作用。

目前通用 LAMP 检测试剂盒检测一个样品的测试条价格在 40-100 元不等，该项目中检测试剂已委托公司进行生产，1 个测试条的销售价格是 50 元。一个试剂盒 24 个测试条，售价 1200 元。因此，该技术的推广可产生明显的经济效益。

六、采用国际标准和国外先进标准情况及水平对比

（一）采用国际标准和国外先进标准程度

本规程中，病害检测使用试剂符合WS 233 - 2002的规定。

（二）国内外同类标准水平的对比情况

国内对环介导等温扩增技术的标准介绍主要涉及出口食品中转基因成分，饲料中大肠杆菌，家畜布鲁氏菌，食品中致病菌检测等地方标准，未见有真菌病害的环介导等温扩增技术的相关标准。其内容偏重于食品安全的检测方法，其检测范围和领域不同，并且不同致病菌检测引物不同，不能作为尖孢镰刀菌 LAMP 检测的参考依据。

有关草莓病害的检测标准主要有草莓角斑病（GB/T 29429-2012）和枯萎病（GB/T 36810-2018）的鉴定，但其方法主要采用常规病原菌学和分子生物学 PCR 检测技术进行鉴定，检测手段较为传统。本标准详细编写了草莓枯萎病快速检测全过程的每一步关键环节，其检测技术优于国内其它同类标准。

七、作为团体标准的建议

为使该标准更好的发挥技术指导规范作用，提高新疆草莓枯萎病快速检测水平，起到草莓土传病害早期防治的作用，建议做好标准的宣传和培训工作，使基层专业技术人员掌握标准的各项操作程序，使标准应用真正落到实处。同时，对《草莓尖孢镰刀菌环介导等温扩增快速检测规程》团体标准执行情况进行跟踪调查，及时发现标准中存在的问题和不足，不断修订和完善。

八、贯彻实施标准的措施和建议

（1）充分认识实施本操作规程对草莓枯萎病及早预防的重要指导意义。

（2）加强宣传和技术培训力度，利用各种形式，对规程进行有计划、有步骤地组织讲解和培训，全面掌握、准确应用好规程，使其发挥出应有的指导作用。

（3）检查监督本规程的实施情况，认真解决实施过程中发现的问题，全面评估实施后规范的作用和效益。