

三七根中茄腐镰刀菌的实时荧光定量 PCR 检测

李 欣^{1,2}, 崔秀明^{1,2}, 刘迪秋^{1,2*}, 孙 恬³, 郭爱玲³, 陈 军³

1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500

2. 云南省三七资源可持续利用重点实验室, 云南 昆明 650500

3. 天方健(中国)药业有限公司, 广东, 广州 510623

摘要:目的 建立一种准确、快速地检测三七 *Panax notoginseng* 根腐病原真菌茄腐镰刀菌 *Fusarium solani* 的实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 方法。方法 基于茄腐镰刀菌的氨基己二酸还原酶 (*Lys2*) 基因设计了 qRT-PCR 的特异性引物对 Fs-QF 和 Fs-QR, 制备了该基因的重组质粒标准品, 建立了茄腐镰刀菌的 SYBR Green I 荧光定量 PCR 检测方法和实时荧光环介导恒温扩增技术 (LAMP) 体系。从三七种植区采集到 15 个具有根腐病、黑斑病典型症状的三七病株及三七种植土壤样品, 并提取了这些样品的总 DNA, 运用建立的检测方法进行检测。结果 建立的 qRT-PCR 检测方法和实时荧光环介导恒温扩增技术特异性强, 能快速检测到携带茄腐镰刀菌的三七根腐病病株。此外, 该方法灵敏度高, 检测模板质量浓度可低至 0.2 pg/μL。结论 建立的方法能明确三七种植土壤以及三七病株中茄腐镰刀菌数量的动态变化。可以为三七土壤处理、根腐病的早期诊断和动态监测以及为带病三七种子、种苗的快速分子检测提供技术支持。

关键词: 三七根腐病; 茄腐镰刀菌; 分子诊断; qRT-PCR; 实时荧光环介导等温扩增

中图分类号: R282.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2020)05-1302-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.05.029

Real-time PCR detection method for *Fusarium solani*, pathogen of *Panax notoginseng* root rot

LI Xin^{1,2}, CUI Xiu-ming^{1,2}, LIU Di-qiu^{1,2}, SUN Tian³, GUO Ai-ling³, CHEN Jun³

1. School of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

2. Key Laboratory of *Panax notoginseng* Resources Sustainable Development and Utilization, Kunming 650500, China

3. Tianfangjian (China) Pharma Co., Ltd., Guangzhou 510623, China

Abstract: Objective In order to establish an accurate and rapid real-time fluorescence quantitative PCR method for the detection of *Fusarium solani*, the pathogenic fungus of *Panax notoginseng* root rot. **Methods** Based on aminoadipate reductase *Lys2* gene of *F. solani*, specific primers Fs-QF and Fs-QR were designed. The recombinant plasmid standard was prepared and the SYBR Green I fluorescence real-time quantitative PCR method and real-time fluorescent loop-mediated isothermal amplification (LAMP) system for detecting *F. solani* was established. Fifteen samples including *P. notoginseng* plants with typical symptoms of root rot and black spot as well as soil of *P. notoginseng* planting area were collected. The total DNA of these samples were extracted as templates, and then detected by the real-time fluorescence quantitative PCR method and loop-mediated isothermal amplification established in this study. **Results** The real-time fluorescent quantitative PCR method and loop-mediated isothermal amplification technique established in this study had high specificity. *P. notoginseng* plants infected with *F. solani* can be detected quickly. In addition, the method has high sensitivity and the concentration of detection template can be as low as 0.2 pg/μL. **Conclusion** The method established in this study can be used to reveal the dynamic changes of *F. solani* concentration in the complex *P. notoginseng* planting soil and diseased plants. Furthermore, it can provide technical supports for the soil treatment, early diagnosis and dynamic monitoring of root rot, and rapid molecular detection of *P. notoginseng* seeds and seedlings.

Key words: *Panax notoginseng* root rot; *Fusarium solani*; molecular diagnosis; real-time PCR; real-time loop-mediated isothermal amplification

收稿日期: 2019-11-06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81560610); 云南省科技厅重大专项 (2017ZF001)

作者简介: 李 欣 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向为三七病害分子检测。Tel: 18206814800 E-mail: 18206814800@163.com

*通信作者 刘迪秋 (1979—), 女, 教授, 硕士生导师, 主要从事植物基因工程研究。E-mail: diqiliu@126.com

三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen 为五加科 (Araliaceae) 人参属 *Panax* C. A. Meyer 多年生草本植物。由于其在心脑血管疾病方面具有独特功效^[1], 近年来市场需求巨大^[2]。但三七性喜温暖阴湿, 其独特的生长环境易诱发病害发生, 尤其是三七根腐病等真菌病害^[3]。三七根腐病病原菌的传统检测方法有形态学鉴定和分子生物学检测等方法。缪作清等^[4]通过形态观察并结合致病力分析从三七根腐病病根中分离鉴定得到的柱孢属 *Cylindrocarpon* 和镰刀属 *Fusarium* 真菌。运用 rDNA-ITS 序列扩增鉴定三七根腐病植株中真菌的方法国内外已有许多相关报道, 并从三七根腐病植株的样本中分离鉴定到了人参链格孢 *Alternaria panax* Whetz、双胞柱孢 *C. didymium* Harting^[5]、毁灭柱孢霉 *C. destructans* Zinss^[6]、尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* Schl.、茄腐镰刀菌 *F. solani* Mart 和链格孢 *A. alternata* Keissl^[7]等多种病原真菌。

病原菌的形态学鉴定存在着准确性差、繁琐耗时耗力等缺点, 核糖体序列鉴定容易发生漏检情况。实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术是一种利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程并通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。该技术灵敏度高、特异性强, 已广泛应用于分子生物学研究领域^[8-9]。环介导恒温扩增 (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) 技术是由 Mori 等^[10]发明的一种恒温核酸扩增方法, 短时间内扩增效率可达到 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^{10}$ 个拷贝^[11]。

尽管报道的三七根腐病的病原菌种类繁多, 但是近年来的研究表明镰刀属真菌, 尤其是茄腐镰刀菌是三七根腐病的重要致病菌^[4]。本实验采用 qRT-PCR 和实时荧光 LAMP 法对茄腐镰刀菌进行快速检测分析, 旨在建立一种准确、快速的三七根腐病菌的检测方法, 为田间三七根腐病、带菌土壤以及种子种苗的快速分子检测提供依据和技术支持。

1 材料

茄腐镰刀菌 *F. solani* Mart、尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* Schl.、轮枝镰刀菌 *F. verticillioides* Nirenberg、禾谷镰刀菌 *F. graminearum* Schwabe 分离自三年生三七根腐病病株, 人参链格孢 *A. panax* Whetz 分离自三年生三七黑斑病病株。链格孢 *A. alternata* Keissl、核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* Bary、葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* Moug 等病原真菌保存于本实验室。所有三七样品采自云南

省文山州三七种植基地, 经笔者鉴定为三七 *Panax notoginseng* (Burk) F. H. Chen。所有试剂均购买自上海生工生物有限公司。

2 方法

2.1 茄腐镰刀菌特异性基因位点筛选及荧光定量特异性验证

从 GenBank 数据库中查找茄腐镰刀菌已公开的核酸序列, 从中随机挑选出 16 个基因, 下载这些基因的序列并设计 PCR 引物, 以上述 8 种真菌的纯培养菌株的全基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 筛选特异性基因位点。PCR 反应体系 (20 μ L), 包含 $2 \times$ Rapid Taq Master Mix 10 μ L、无菌双蒸水 7 μ L、上游引物和下游引物各 1 μ L、DNA 模板 1 μ L。PCR 扩增条件为 95 $^{\circ}$ C、3 min, 然后 94 $^{\circ}$ C、30 s, 57 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、40 s, 28 个循环, 72 $^{\circ}$ C、5 min。PCR 产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将特异扩增的条带进行胶回收并进行 TA 克隆, 测序并分析序列的同源性。

根据上述 PCR 筛选得到的茄腐镰刀菌特异的基因序列, 设计特异性荧光定量引物对 Fs-QF 和 Fs-QR。以 8 种真菌基因组 DNA 为模板, 进行 qRT-PCR 检测引物对 Fs-QF 和 Fs-QR 的特异性。qRT-PCR 反应体系 (20 μ L), 包含无核酸酶水 7 μ L、 $2 \times$ SYBR Green Mix 10 μ L、Fs-QF 2 μ mol/L、Fs-QR 2 μ mol/L 和 DNA 模板各 1 μ L。反应程序为 95 $^{\circ}$ C、2 min, 然后进行 45 个循环反应, 每个循环反应为 95 $^{\circ}$ C、1 min, 62 $^{\circ}$ C、30 s, 72 $^{\circ}$ C、1 min, 于 72 $^{\circ}$ C 时测定荧光值。每个真菌 DNA 模板设置 3 次重复, 并设置空白对照 (无模板)。qRT-PCR 使用的设备为美国 Bio-Rad iCyclerTM CFX96 Touch 荧光定量 PCR 检测系统。

2.2 qRT-PCR 标准曲线的建立

从上述茄腐镰刀菌特异扩增产物的阳性克隆子中提取重组质粒, 测定质粒浓度, 并计算质粒质量。将质粒 DNA 进行 10 倍梯度稀释制成 $0.1 \sim 1 \times 10^{-6}$ 倍系列标准样品, 稀释介质为无核酸酶水。以标准品为模板进行 qRT-PCR 反应, 每个梯度进行 3 次重复, 并根据荧光强度达到阈值的循环数 (C_t 值) 与浓度梯度构建标准曲线。此外, 将质粒 DNA 再进行更低浓度的稀释 ($1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-10}$ 倍) 后进行 qRT-PCR 反应, 每个梯度进行 3 次重复, 以确定该方法所能检测的最低核酸量。qRT-PCR 反应体系和程序与“2.1”项相同。

2.3 三七病株以及种植土壤的 qRT-PCR 检测

在文山州三七主产区采集具有根腐病、黑斑病典型症状的三七病株及三七种植土壤,运用本研究设计的引物及其检测方法对多个样品进行分析。用 CTAB 法提取各样品 (0.1 g) 的总 DNA,按“2.1”项反应体系及程序进行 qRT-PCR 反应,每个样品的检测进行 3 次重复。将得到的 C_t 值均值代入标准曲线中,计算样品中茄腐镰刀菌的含量。

2.4 qRT-PCR 结合 LAMP 法检测茄腐镰刀菌的体系

以特异性基因序列为模板设计了 LAMP 引物组,包括外侧上游引物 F3 (5'-GAGCGAATGGATGAGACG-3'),外侧下游引物 B3 (5'-TTGTCTCGGTAGTGCCTAA-3'),内侧上游引物 FIP (5'-TTGCACCACCGACAAGGATCGGTCACCGACTACGAC-3'),内侧下游引物 BIP (5'-CGGCGA-TGTCCTCACTACACTACACTTGATGATGGAGC-ATGAAG-3'),环状上游引物 LoopF (5'-CATCGC-AGGAGTGAGGTG-3'),环状下游引物 LoopB (5'-AAGGCACTTCGCCAACT-3')。LAMP 检测体系 (25 μ L),包含 2 $\times$ Lamp Master Mix 12.5 μ L、DNA Polymerase 0.5 μ L、DNA 模板 1 μ L、FIP 和 BIP 各 2 μ L、LoopF 和 LoopB 各 1 μ L、B3 和 F3 各 0.5 μ L、无菌双蒸水 4 μ L。于 65 $^{\circ}$ C 温育 30 min,80 $^{\circ}$ C 保温 5 min 终止反应。程序采用两步法,首先 95 $^{\circ}$ C、1 min,接着 40 个循环的扩增:95 $^{\circ}$ C、5 s,65 $^{\circ}$ C、31 s。最后熔解曲线分析:98 $^{\circ}$ C、15 s,80 $^{\circ}$ C、60 s,升温至 98 $^{\circ}$ C。采用上述实时荧光 LAMP 法分析检测了几个三七病株和土壤样品,以确认实时荧光 LAMP 法检测三七根腐病菌茄腐镰刀菌的有效性。实时荧光 LAMP 法使用的设备为英国 Genie[®]II 等温扩增荧光检测仪。

3 结果与分析

3.1 茄腐镰刀菌特异性基因位点分析

通过多个基因的筛选,获得了一个能特异性扩增茄腐镰刀菌的基因,茄腐镰刀菌的氨基己二酸还原酶 (Lys2) 基因 (GenBank 号为 AB586981.1),设计的引物为 5'-CTACGACTCACCTCACTCCTGCG-3' (Fs-F) 和 5'-CTGTTTCGGTACAACCTATC-ACGG-3' (Fs-R),PCR 产物的凝胶电泳结果见图 1。这对引物只在以茄腐镰刀菌 DNA 为模板的 PCR 扩增中产生 531 bp 的扩增产物,而在其他镰刀属真菌

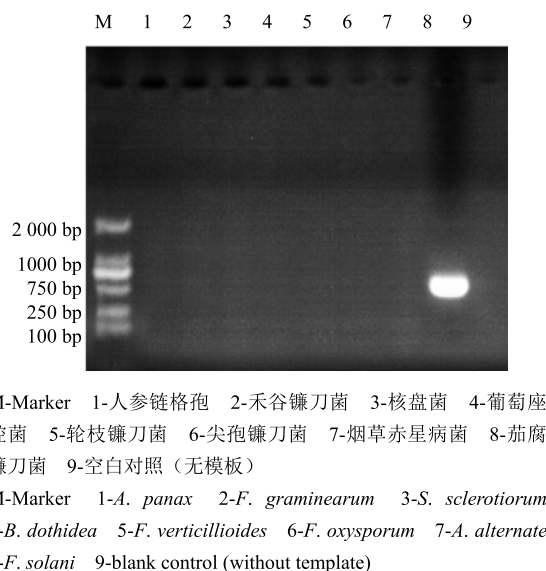


图 1 验证茄腐镰刀菌 Lys2 基因特异性的 PCR 产物电泳图
Fig. 1 Verification of specificity of Lys2 gene of *F. solani* by electrophoresis of PCR products

中不引起有效扩增。对扩增产物进行克隆和测序,序列的同源性分析显示扩增产物与茄腐镰刀菌 Lys2 基因有 99% 的相似性,证明 PCR 扩增产物为阳性产物。

3.2 qRT-PCR 引物特异性分析

以茄腐镰刀菌 Lys2 基因序列设计荧光定量 PCR 的引物对 Fs-QF 和 Fs-QR,上、下游引物序列分别为 5'-CCACGCTTGTGAGCTATGTAGTTC-3' (Fs-QF) 和 5'-CTCTTGAGGTAGACCACAGT-AGGC-3' (Fs-QR)。扩增片段长度为 124 bp。该引物的 qRT-PCR 扩增曲线如图 2-A 所示,引物 Fs-QF 和 Fs-QR 只在茄腐镰刀菌 DNA 中产生了有效的扩

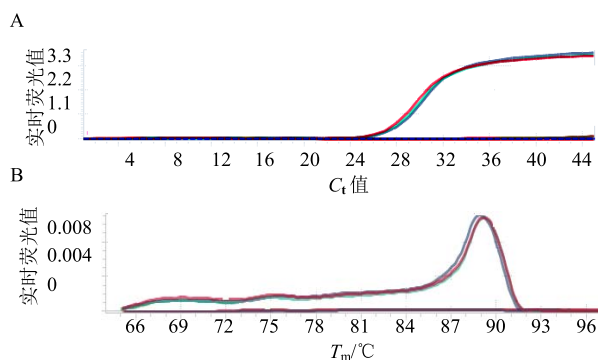


图 2 引物 Fs-QF 和 Fs-QR 对病原真菌 DNA 进行 qRT-PCR 分析的扩增曲线 (A) 以及熔解曲线 (B)

Fig. 2 Amplification curve (A) and melting curve (B) of real-time PCR of eight pathogenic fungi DNA with primers Fs-QF and Fs-QR

增, 3 次重复得到 3 条重合的扩增曲线, 其 C_t 值分别为 26.23、26.51、26.71。此外, 溶解曲线 (图 2-B) 峰形单一, 峰值均在 89.55 °C 左右, T_m 值相差 <0.1 °C, 可见本实验设计的 qRT-PCR 引物特异性强。

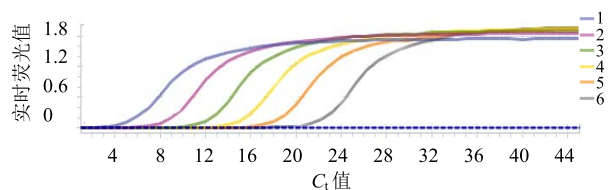
3.3 qRT-PCR 标准曲线的建立

本实验以已知质量浓度的 pGEM-T-*FSab5* 质粒作为标准品进行 10 倍梯度稀释, 所得 6 个梯度的质粒质量浓度见表 1, 它们对应的扩增结果如图 3 所示, 扩增曲线间隔均匀, 基线平整, 指数区较明显, 陡度大, 平台区汇于一起, 线性范围宽。

表 1 茄腐镰刀菌质粒标准品的质量浓度及其 C_t 值

Table 1 Concentration gradient and its C_t value of *F. solani* plasmid standard

编号	质粒/(ng·μL ⁻¹)	质粒质量/ng	C_t 均值	Lg 质粒质量
1	20	20	5.84	1.29
2	2	2	9.01	0.29
3	0.2	0.2	12.54	-0.71
4	0.02	0.02	15.55	-1.71
5	0.002	0.002	18.67	-2.71
6	0.000 2	0.000 2	21.32	-3.71



1~6-同表 1 中编号
1—6-same as number in Table 1

图 3 pGEM-T-*FSab5* 质粒的 qRT-PCR 的扩增曲线

Fig. 3 Amplification curve of real-time PCR of pGEM-T-*FSab5* plasmids

6 个标准品质粒质量对应的 C_t 均值见表 1, 据此构建标准曲线。以 C_t 均值为横坐标 (X), 以各梯度质量浓度对应的质粒质量对数值作为纵坐标 (Y), 得到线性回归方程 $Y = -0.3058X + 3.0695$, $r^2 = 0.9994$ 。不难发现 qRT-PCR 中标准样品质粒 DNA 在 $0.1 \sim 1 \times 10^{-6}$ 倍的梯度稀释范围内与 C_t 均值具有很好的线性关系。进一步实验结果显示, 质粒 DNA 的浓度稀释到 1×10^{-7} 倍以及更低浓度时, 质量浓度对应的质粒质量对数值和 C_t 均值不再具有线性关系, 扩增曲线不再与高浓度扩增曲线平行, 所以认为稀释到 1×10^{-6} 倍是 qRT-PCR 方法检测茄腐镰刀菌 DNA 的最低模板浓度, 本实验建立的茄腐镰刀菌 qRT-PCR 检测方法的最低模板质量浓度为 $0.2 \text{ pg}/\mu\text{L}$,

可见本实验的 qRT-PCR 检测方法灵敏度很高。

3.4 三七病株以及种植土壤的 qRT-PCR 检测

从三七根腐病、黑斑病病株及种植土壤中提取总 DNA, 然后进行 qRT-PCR 以检测茄腐镰刀菌的含量。将各样品 3 次重复的 C_t 均值带入“3.3”项中标准曲线, 计算得到茄腐镰刀菌含量见表 2, 各样品的扩增曲线见图 4。几个三七根腐病样品 (1~5 号) 有明显扩增, C_t 值平均值分别为 22.10、27.33、22.83、28.40、29.31, 茄腐镰刀菌的质量分数均大于 4 pg/g 样品, 质量分数高的达 615 pg/g , 可见茄腐镰刀菌在三七根腐病病株的根部样品中大量存在。根腐病土壤样品 (13、14 号) 茄腐镰刀菌的含量约为 0.3 pg/g , 表明在三七根腐病病株的土壤样品中也存在茄腐镰刀菌。而正常土壤样品 (15 号) 的 C_t 值很大, 6~12 号样品均无扩增, 说明在健康的三七根部、三七黑斑病病叶及健康叶片没有检测到茄腐镰刀菌。上述实验结果显示, 本实验设计的引物以及建立的 qRT-PCR 方法特异性强、灵敏、可靠, 能准确诊断三七根腐病样品中是否含有茄腐镰刀菌以及测定茄腐镰刀菌的含量。

3.5 实时荧光 LAMP 法检测三七根腐病菌茄腐镰刀菌

本实验初步建立了实时荧光 LAMP 法检测三七根腐病菌茄腐镰刀菌的体系, 并对 7 个三七病

表 2 三七及土壤样品的 qRT-PCR 检测结果

Table 2 Real-time PCR results of *P. notoginseng* and soil samples

编号	样品种类	C_t 值均值	茄腐镰刀菌/(pg·g ⁻¹)
1	根腐病根部	22.10	615
2	根腐病根部	27.33	15
3	根腐病根部	22.83	366
4	根腐病根部	28.40	7.2
5	根腐病根部	29.31	3.9
6	正常根部	—	—
7	正常根部	—	—
8	黑斑病病叶	—	—
9	黑斑病病叶	—	—
10	黑斑病病叶	—	—
11	健康叶片	—	—
12	健康叶片	—	—
13	根腐病土壤	31.67	0.6
14	根腐病土壤	32.60	0.3
15	正常土壤	39.38	—
16	阴性对照	—	—

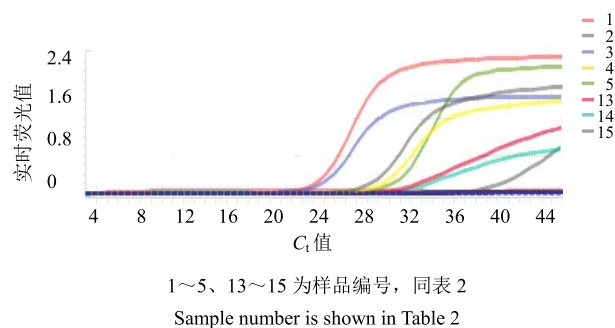


图 4 qRT-PCR 检测三七和土壤样品的扩增曲线

Fig. 4 Amplification curves of real-time PCR for detection of *P. notoginseng* and soil samples

株以及土壤样品进行了检测。扩增曲线见图 5，三七根腐病样品（1~5 号）均呈现明显“S”型扩增，出峰时间分别为 6:15、7:05、8:45、9:00、9:10。根腐病土壤样品 13 号也有扩增曲线，出峰时间为 23:45，而另一个根腐病土壤样品 14 号与阴性对照无扩增。熔解曲线见图 6，熔解曲线的峰型单一，峰值分别在 89.55 °C 附近， T_m 值相差 < 1 °C，检测结果表明实时荧光 LAMP 法扩增得到的产物为特异性扩增。上述结果表明，与 qRT-PCR 相比，采用荧光定量 LAMP 技术进行三七根腐病菌茄腐镰刀菌的检测，可以实现扩增与检测同步进行，不仅速度快，反应特异性也很高。

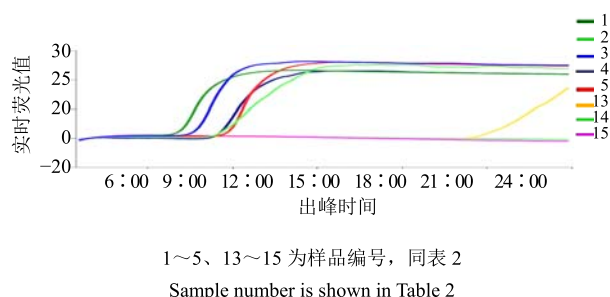


图 5 实时荧光 LAMP 扩增曲线

Fig. 5 Real-time fluorescence LAMP amplification curves

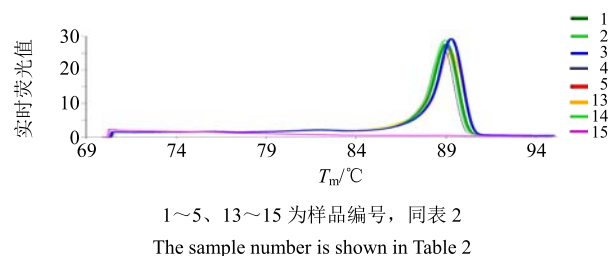


图 6 实时荧光 LAMP 熔解曲线

Fig. 6 Melting curves of real-time fluorescence LAMP

4 讨论

近年来，qRT-PCR 技术以其快速、准确定量、便捷等优点广泛应用于真菌病害的检测中，大大提高了植物真菌病害的检测效率和监测防治水平。Lastra 等^[12]建立了一种新的 TaqManqRT-PCR 方法，用于准确检测和定量草莓病害植株和草莓地种植前土壤中的茄腐镰刀菌。吴照祥等^[13]设计特异性引物对 CDU2 和 CDL2b，利用 SYBR Green IqRT-PCR 建立了毁灭柱孢菌的定量检测方法，发现三七根腐病发病植株根际土壤中的毁灭柱孢菌 rDNA 的拷贝数显著高于健康植株的根际土壤。关于实时荧光 LAMP 技术应用于真菌检测的研究也有一些文献记载。目前已有应用 LAMP 技术快速检测葡萄糖杆菌^[14]、黄曲霉^[15]、鼻疽伯克霍尔德菌 *Burkholderia mallei* Rotz^[16]、苜蓿疫霉根腐病菌 *Phytophthora medicaginis* Hans^[17]、尖孢镰刀菌^[18]等方面的报道。然而，运用 qRT-PCR 技术和实时荧光 LAMP 技术检测三七根腐病重要致病菌茄腐镰刀菌方法目前还没有相关报道。

茄腐镰刀菌是一种多寄主病原菌，能侵染多种作物并对其产生不同程度的伤害^[19]。由茄腐镰刀菌引起的三七根腐病的发病率呈逐年增高趋势，而目前没有有效的方法来对三七植株中的茄腐镰刀菌进行早期诊断和动态监测。本研究从三七根腐病重要致病真菌茄腐镰刀菌的多个基因中，筛选得到了 Lys2 基因，并设计基因特异引物。当以 4 种镰刀属真菌 DNA 和 4 种非镰刀属真菌 DNA 作为模板进行 PCR 扩增时，只以茄腐镰刀菌 DNA 作为模板产生特异的 PCR 扩增产物。表明该引物结合位点上，茄腐镰刀菌与其他几种镰刀属真菌以及 4 种非镰刀属真菌差异较大，因而这对引物可以从几种不同的真菌中快速检测出茄腐镰刀菌。

本研究运用 qRT-PCR 方法对 15 个具有根腐病、黑斑病典型症状的三七病株及三七种植土壤样品进行了检测，发现根腐病发病植株根部及根际土壤的茄腐镰刀菌含量显著高于健康植株及土壤，这说明茄腐镰刀菌在三七根腐病的发生过程中的确具有重要作用^[4]。同时本研究还进一步运用实时荧光 LAMP 法检测了上述的 15 个样品，结果与 qRT-PCR 数据吻合度较好，茄腐镰刀菌含量较高的几个样品均具有 S 形扩增曲线，并且熔解曲线呈现单峰。

根腐病是三七生长过程中危害最为严重的病害，目前尚无特异、环保的防治方法^[20]。本实验中

建立的三七根腐病原真菌茄腐镰刀菌的qRT-PCR检测体系以及实时荧光 LAMP 法检测体系能明确复杂三七种植土壤以及三七病株中茄腐镰刀菌的数量动态变化,因而可以为三七土壤处理、根腐病的早期诊断和动态监测以及带病三七种子、种苗的分子检测提供技术支持。但后续需要进一步加强在种植基地实地检测的研究,并进一步认识该病原菌致病过程与机制,有针对性地研究高效、环保的防治方法。

参考文献

- [1] 王晓燕, 张 腾. 浅谈三七及其制剂在心脑血管疾病之异病同治 [J]. 医学综述, 2013, 19(6): 1086-1088.
- [2] 崔秀明, 黄璐琦, 郭兰萍, 等. 中国三七产业现状及发展对策 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(4): 553-557.
- [3] 蒋 妮, 覃柳燕, 叶云峰. 三七病害研究进展 [J]. 南方农业学报, 2011, 42(9): 1070-1074.
- [4] 缪作清, 李世东, 刘杏忠, 等. 三七根腐病原研究 [J]. 中国农业科学, 2006, 39(7): 1371-1378.
- [5] Wang W, Zhao C, Chen Z, *et al.* Studies on the isolation, identification and *in vitro* growth rates of the three pathogenic fungi from *P. notoginseng* cultivated in wenshan eparchy [J]. *Agric Sci Technol*, 2015, 16(6): 1165-1171.
- [6] Mao Z S, Long Y J, Zhu Y Y, *et al.* First report of *C. destructans* var. *destructans* causing black root rot of Sanqi (*P. notoginseng*) in China [J]. *Plant Disease*, 2014, 98(1): 162.
- [7] 汪 静, 梁宗锁, 康 冰, 等. 文山三七根腐病原真菌的鉴定与药剂防治 [J]. 西北林学院学报, 2015, 30(1): 158-163.
- [8] Kędrak-Jabłońska A, Budniak S, Krupa M, *et al.* Detection of *Listeria* Spp. and *Listeria Monocytogenes* in biological samples by SYBR Green I and taqMan probe-based real-time PCRs [J]. *J Veter Res*, 2017, 61(4): 427-432.
- [9] 王 瑜, 马建忠, 张伟杰, 等. 腐皮镰刀菌 SYBR GreenqRT-PCR 快速检测方法的建立 [J]. 微生物学免疫学进展, 2018, 46(2): 34-39.
- [10] Mori Y, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases [J]. *J Infect Chemother*, 2009, 15(2): 62-69.
- [11] Zheng S, Wu X, Shi J, *et al.* Rapid specific and visible detection of porcine circovirus type 3 using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) [J]. *Transbound Emerg Diseases*, 2018, 65(3): 597-601.
- [12] Lastra E D L, Basallote-Ureba M J, Santos B D L, *et al.* A TaqMan real-time polymerase chain reaction assay for accurate detection and quantification of *F. solani* in strawberry plants and soil [J]. *Scient Horticult*, 2018, 237: 128-134.
- [13] 吴照祥, 郝志鹏, 曾 燕, 等. 三七根腐病原菌破坏柱孢霉分子定量检测方法及其应用 [J]. 微生物学通报, 2015, 42(3): 598-607.
- [14] 李月华. LAMP与SYBR GREEN IqRT-PCR方法检测酸奶中葡糖杆菌的研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2015.
- [15] Niessen L. The application of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for the rapid diagnosis of food-borne mycotoxigenic fungi [J]. *Curr Opin Food Sci*, 2018, 23: 11-22.
- [16] Pal V, Saxena A, Singh S, *et al.* Development of a real-time loop-mediated isothermal amplification assay for detection of *Burkholderia mallei* [J]. *Transbound Emerg Diseases*, 2018, 65(1): e32-e39.
- [17] 张裕君, 刘跃庭, 廖 芳, 等. 基于 LAMP 方法的苜蓿疫霉根腐病菌分子检测研究 [J]. 中国植保导刊, 2011, 31(10): 7-9.
- [18] 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.
- [19] 陈为京, 郭 峰, 陈建爱, 等. 连作花生根腐病镰刀菌分离与对峙培养 [J]. 花生学报, 2018, 47(2): 47-51.
- [20] 毛忠顺, 龙月娟, 朱书生, 等. 三七根腐病研究进展 [J]. 中药材, 2013, 36(12): 2051-2054.