

麦冬主要病害病原菌巢式多重PCR检测方法的建立

杨怡华 王明郎 曹瑱艳 申屠旭萍* 俞晓平*

(中国计量大学生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018)

摘要: 为准确快速地诊断浙江省慈溪市麦冬常见真菌病害——炭疽病和黑斑病, 基于巢式多重PCR技术, 针对核糖体内转录间隔区(ITS)序列分别设计特异性引物, 并优化巢式多重PCR反应条件, 建立可同时快速准确检测炭疽病病原菌山麦冬炭疽菌 *Colletotrichum liriopes* 和黑斑病病原菌互隔交链孢菌 *Alternaria alternata* 的方法。结果表明, 建立的巢式多重PCR检测体系特异性好, 同时检测2种病原菌的灵敏度高达100 pg DNA/ μ L, 对10个田间病样进行检测, 有5个病样检测到2种病原菌, 3个病样检测到其中1种病原菌, 2个样品未检测到目标病原菌, 验证了该体系的可行性与准确性。表明所建立的巢式多重PCR技术可用于快速准确检测麦冬2种主要病害的病原菌。

关键词: 麦冬; 山麦冬炭疽菌; 互隔交链孢菌; 巢式多重PCR

Nested multiplex PCR to detect two major fungal pathogens of mondo grass *Ophiopogon japonicus*

Yang Yihua Wang Mingyun Cao Zhenyan Shentu Xuping* Yu Xiaoping*

(Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Science, China Jiliang University, Hangzhou 310018, Zhejiang Province, China)

Abstract: In order to accurately and quickly diagnose two major diseases of *Ophiopogon japonicus* in Cixi City of Zhejiang Province, anthracnose and black spot, specific primer sets were designed based on the internal transcribed spacer (ITS) region sequences of the two pathogens, *Colletotrichum liriopes* and *Alternaria alternata* and conditions of a nested multiplex PCR assay were optimized for reliable, rapid and simultaneous detection of *C. liriopes* and *A. alternata*. The results showed that the nested multiplex PCR system had a high specificity and could detect *C. liriopes* and *A. alternata* in infected plant tissues rapidly with a sensitivity at 100 pg DNA/ μ L. To verify the feasibility and accuracy of the detection system, ten disease samples were randomly collected from the field. The two pathogenic fungi were simultaneously detected in five samples, either of two pathogenic fungi was detected in three samples, and no target pathogenic fungi was found in the other two samples. These findings indicated that the nested multiplex PCR method established in this study could provide reliable and informative identification of two major pathogens of *O. japonicus*.

Key words: *Ophiopogon japonicus*; *Colletotrichum liriopes*; *Alternaria alternata*; nested multiplex PCR

麦冬 *Ophiopogon japonicus* 是百合科沿阶草属多年生常绿草本植物, 其块根为中药, 有生津解渴、润肺止咳之效, 是传统的名贵中药材, 也是我国药典所列药食同源品类之一。麦冬产区主要在四川省和

浙江省, 而产自浙江省杭州、慈溪等市的麦冬习称为浙麦冬、笕麦冬, 为传统“浙八味”道地药材之一(刘霞等, 2017)。浙麦冬具有形状短壮饱满、色泽黄亮、滋粘糯性、味甘气清香和优质地道等优点(马秀杰等,

基金项目: 浙江省公益技术研究项目(2017C32006, 2018C02030), 中国计量大学学生科技创新专项(2021YW95)

* 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: stxp@cjlu.edu.cn, yxp@cjlu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-18

2012)。麦冬中的主要活性成分包括甾体皂苷类、高异黄酮类和多糖类等,具有降血糖、保护心血管系统、提高免疫力、抗皮肤衰老、抗炎、抗肿瘤等药理作用(彭婉等,2018)。以麦冬为主要成分的参麦注射液、灯盏生脉胶囊等产品在2015年销售额高达20多亿元(李响明等,2019;穆雪梅等,2019)。随着市场需求量不断增大,人工种植麦冬的面积也在不断扩大,但由于种植技术不规范,农药乱用、滥用的现象频发,使得植株抗病性减弱,病源累积,严重影响了麦冬的产量与质量(苟琰等,2018)。

炭疽病和黑斑病是麦冬最常见的2种真菌病害,病原菌分别是山麦冬炭疽菌 *Colletotrichum liriopes* 和互隔交链孢菌 *Alternaria alternata* (张海珊等,2008;刘翠翠等,2019;Wang et al.,2020)。这些病原菌长期存活于土壤,遇到适宜的气候条件便会造成病害的大暴发(Li et al.,2019)。此外这些病害常常混合发生,存在多种病原菌复合侵染的现象,且不同病原菌在麦冬不同发育时期、不同环境条件下所表现的症状可能一样,仅靠肉眼辨别存在一定的困难与误差。植物病害的早期发现是控制病害的关键(翟宇瑶等,2019)。传统的病原菌检测方法是基于形态学特征开展的,不仅需要丰富的分类学知识,还耗时耗力,整个过程可能需要15~20 d(王震等,2010)。若能在早期阶段诊断出病害,对选择准确的防控策略至关重要。因此,建立一种准确、快速、经济有效的麦冬病害检测方法是保证其优质高产的关键。

与传统方法相比,PCR技术因其灵敏度高而被广泛用于病原微生物的检测(干驰等,2020)。多重PCR是指在同一个反应体系里添加2对或2对以上的引物,能够同时扩增出2对或2对以上核酸片段的PCR反应,极大地节省了时间,多用于同时检测多种病原微生物。多重PCR具有高效性、系统性、经济性等优点。而巢式PCR是在常规PCR技术基础上发展的一种新方法,通过2轮PCR反应,先后使用2套引物,1对普通引物1对巢式引物,第1轮PCR引物扩增片段和普通PCR相似,第2轮引物称为巢式引物,特异性扩增位于第1轮PCR产物内的一段DNA片断,使得第2轮PCR扩增片段短于第1轮(陈明洁等,2005)。巢式PCR方法特异性和灵敏度高,如果第1轮扩增产生了错误片段,则第2轮不能在错误片段上进行引物配对扩增;且第2轮所设计的巢式引物,使其DNA扩增数以双重指数级增加,大幅提高了灵敏度(段维军和郭立新,2008)。当巢氏PCR与多重PCR结合应用于植物病原菌的快速检测时,不仅提高了检测的灵敏度还可以实现多种病

原菌的多目标快速检测,节约了时间和经费开支(Cao et al.,2021)。本研究将多重PCR与巢式PCR相结合,拟建立一种能同时快速准确检测麦冬黑斑病和炭疽病病原菌的方法,以期对麦冬真菌病害的防治提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料及菌株:2019年从麦冬主产地浙江省慈溪市庵东镇富北村采集具有典型麦冬黑斑病和麦冬炭疽病症状的麦冬叶片各50份;取温室内26℃、光周期12 L:12 D、相对湿度60%条件下培养的健康麦冬植株叶片供试。病原菌山麦冬炭疽菌和互隔交链孢菌,对照菌球毛壳菌 *Chaetomium globosum*、半裸镰刀菌 *Fusarium inarnatum*、尖孢镰刀菌 *F. oxysporum* 和细线炭疽菌 *C. lineola*,均由浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室保存并提供。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基:马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂20 g、蒸馏水1 L。

试剂和仪器:CTAB提取液,北京索莱宝科技有限公司;Hieff™ Taq DNA Polymerase,上海翊圣生物有限公司;DNA Marker,生工生物工程(上海)股份有限公司;其余试剂均为国产分析纯。JXFSTPRP-II-02均质仪,上海净信实业发展有限公司;Gel-2000凝胶成像仪、T100 PCR扩增仪,美国Bio-Rad公司;DYY-6C型凝胶电泳仪,北京六一仪器厂;NanoDrop 2000/2000C超微量分光光度计,美国赛默飞世尔科技公司。

1.2 方法

1.2.1 供试病样、病菌及健康植物的DNA提取

采用改良CTAB法提取供试所有样品的DNA。分别取26℃下在PDA平板上暗培养7 d的山麦冬炭疽菌、互隔交链孢菌、球毛壳菌、半裸镰刀菌、尖孢镰刀菌和细线炭疽菌的新鲜菌丝体以及田间采集的带病麦冬叶片和健康麦冬叶片各2 g,于液氮中冷冻,加入10颗直径为1 mm钢珠及500 μL CTAB提取液,置于均质仪上,4.0 m/s振荡10 min。用移液枪吸取离心管中的溶液至新离心管中,于液氮内冷冻2 min,置于75℃水浴锅融化2 min,重复3次,最后1次于75℃水浴锅融化30 min,加入500 μL DNA抽提试剂(酚:氯仿:异戊醇以体积比25:24:1混合,pH>7.8),上下颠倒混匀,以12 000 r/min离心10 min,取上清液,加入2倍体积的冰无水乙醇沉淀1 h,以12 000 r/min离心10 min,弃上清液,将沉淀用70%乙醇洗涤,自然风干后用50 μL ddH₂O溶解DNA,

于-20℃保存备用。将提取的DNA用分光光度计测定吸光度值,使 $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 控制在1.8~2.0之间,作为后续PCR扩增模板(李金璐等,2013)。

1.2.2 巢式多重PCR检测的特异性测定

本研究根据NCBI数据库中山麦冬炭疽菌和互隔交链孢菌的核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS),使用Clustal X 1.83和Primer Premier 5.0软件分别设计特异性引物对MTJ8-F(5'-ATACCCTTTGTGACATACCT-3')/MTJ8-R(5'-CGAATCCCAATGCGAGAC-3')和AI-F(5'-GTCTTTTTCGCTACTTCTTGT-3')/AI-R(5'-GAACAGGCATGCCCTTGGA-3')。对1.2.1中提取的山麦冬炭疽菌和互隔交链孢菌DNA的ITS序列进行巢式多重PCR扩增,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以健康麦冬DNA为空白对照,其他4种常见植物病原菌球毛壳菌、半裸镰刀菌、尖孢镰刀菌和细线炭疽菌作为阴性对照。

巢式单重PCR检测:第1轮PCR使用真菌通用引物ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3')/ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')扩增1.2.1中提取的病原菌DNA的ITS序列,25 μL扩增体系:10×Taq Buffer(Mg^{2+} free) 2.5 μL、25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μL、10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μL、5 U/μL Hieff™ Taq DNA Polymerase 0.2 μL、10 μmol/L引物ITS1/ITS4各3 μL、DNA模板1 μL、ddH₂O 16.3 μL。扩增程序:94℃预变性2 min;94℃变性45 s,55℃退火30 s,72℃延伸45 s,35个循环;72℃再延伸10 min,于4℃保存备用。第2轮PCR使用稀释10倍后的第1轮PCR扩增产物为DNA模板进行扩增,25 μL扩增体系:10×Taq Buffer(Mg^{2+} free) 2.5 μL、25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μL、10 mmol/L dNTP Mix 0.5 μL、5 U/μL Hieff™ Taq DNA Polymerase 0.2 μL、10 μmol/L引物MTJ8-F/MTJ8-R各0.6 μL或AI-F/AI-R各2.0 μL、DNA模板1 μL、ddH₂O补足25 μL。扩增程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸35 s,20个循环;72℃最终延伸8 min,于4℃保存备用。取第2轮扩增产物10 μL在120 V下经2%琼脂糖凝胶电泳40 min,用凝胶成像系统观察拍照。

巢式多重PCR检测:在同一管中完成巢式多重PCR反应。其反应体系和条件同巢式单重PCR检测,但在第2轮PCR扩增时需同时加入第1轮2种PCR产物、引物MTJ8-F/MTJ8-R 0.6 μL和AI-F/AI-R 2.0 μL进行扩增,扩增结果检测方法同上。

1.2.3 巢式多重PCR检测体系的优化

为了保证MTJ8-F/MTJ8-R和AI-F/AI-R这2对

引物在同一体系中均能达到最高的扩增效率,在1.2.2所建巢式多重PCR检测体系的基础上,对退火温度(50、51、52、53、54、55、56、57℃)、循环数(15、20、25、30、35个)以及2对引物MTJ8-F/MTJ8-R和AI-F/AI-R用量(0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 μL)进行优化,扩增产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测,根据条带的亮度选择最佳扩增条件。

1.2.4 巢式多重PCR检测的灵敏度分析

将1.2.1制备的山麦冬炭疽菌和互隔交链孢菌DNA分别按10倍浓度梯度稀释为100 ng DNA/μL、10 ng DNA/μL、1 ng DNA/μL、100 pg DNA/μL、10 pg DNA/μL、1 pg DNA/μL、100 fg DNA/μL、10 fg DNA/μL、1 fg DNA/μL、100 ag DNA/μL,采用1.2.2巢式单重PCR进行扩增,检测单一引物的灵敏度。同时将2种病原菌的DNA等量混合,按10倍浓度梯度依次从100 ng DNA/μL稀释至100 ag DNA/μL,梯度浓度同上,采用1.2.2巢式多重PCR进行扩增,根据凝胶成像仪下目的条带的有无判断该巢式多重PCR体系的灵敏度。

1.2.5 巢式多重PCR检测的实际应用效果验证

随机选取10份田间病样,取1份健康样品为对照,采用1.2.1改良CTAB法分别提取样品的DNA。根据1.2.3建立的巢式多重PCR扩增优化体系,检测10份田间样品的DNA中是否存在山麦冬炭疽菌和互隔交链孢菌。最后用凝胶成像系统观察拍照,根据扩增出的条带片段大小判断其对应的病原菌。

2 结果与分析

2.1 巢式多重PCR检测的特异性

本研究设计的山麦冬炭疽菌特异性引物MTJ8-F/MTJ8-R扩增出的目的片段大小为433 bp(图1-A);互隔交链孢菌特异性引物AI-F/AI-R扩增出的目的片段为249 bp(图1-B),且条带明亮单一,而在空白对照健康麦冬和其他4种阴性对照病原菌中均未扩增出任何条带。表明本研究设计的引物MTJ8-F/MTJ8-R和AI-F/AI-R特异性好。

2.2 巢式多重PCR扩增体系的优化与建立

巢式多重PCR扩增体系优化结果显示,当退火温度为55℃、循环次数为20个、引物对MTJ8-F/MTJ8-R和AI-F/AI-R中单个引物在25 μL体系中的最佳用量分别为0.6 μL和2.0 μL时扩增效果最好。经优化后的巢式多重PCR检测体系扩增结果表明,当只有山麦冬炭疽菌存在时可扩增出433 bp的目的条带,只有互隔交链孢菌存在时可扩增出249 bp的目的条带,当2种病原菌存在时可同时扩增出433 bp

和249 bp的目的条带(图2)。表明本研究经优化后的巢式多重PCR检测方法可靠。

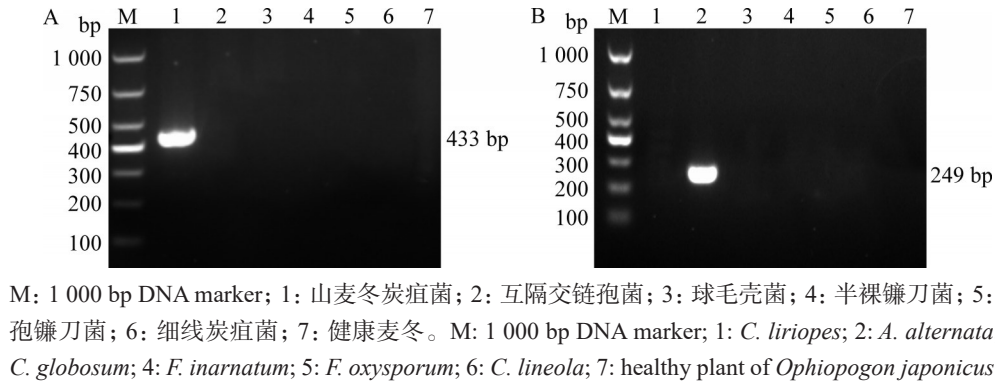


图1 MTJ8-F/MTJ8-R(A)和AI-F/AI-R(B)引物的特异性检测结果

Fig. 1 The specificity detection results using primer sets MTJ8-F/MTJ8-R (A) and AI-F/AI-R (B)

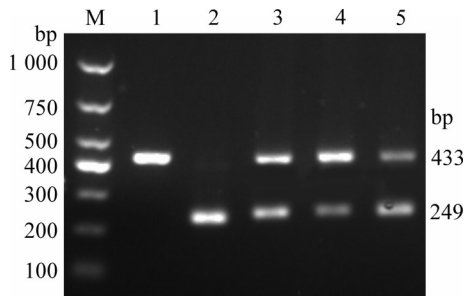


图2 巢式多重PCR体系对麦冬中2种病原菌的扩增效果

Fig. 2 The nested multiple PCR amplification of two pathogenic fungi in *Ophiopogon japonicus*

2.3 巢式多重PCR检测的灵敏度

经巢式单重PCR检测结果显示,山麦冬炭疽菌的最低检测限可达100 pg DNA/μL(图3-A),互隔交

链孢菌的最低检测限可达10 fg DNA/μL(图3-B)。而本研究所设计的巢式多重PCR体系同时检出这2种病原菌的最低检测限也可达100 pg DNA/μL(图4)。说明本研究所建立的巢式多重PCR体系灵敏度较高,可以检测出微量的病原菌。

2.4 麦冬田间感病样品的检测结果

经优化后的巢氏多重PCR检测结果表明,4号样品中扩增出433 bp条带,表明其被山麦冬炭疽菌侵染,7、8号样品中扩增出249 bp的目的条带,表明其被互隔交链孢菌侵染,1、2、3、5、6号样品中扩增到了2个目的条带,表明被2种病原菌复合侵染,9、10号样品和健康麦冬中未扩增到相应条带(图5)。推测9号和10号样品田间染病症状与炭疽病和黑斑病相似,但不是由本研究中的2种病原菌引起,说明还存在其他病原菌,有待进一步验证。综上,本研究建立的巢式多重PCR方法特异性好,灵敏度高,能够应用于麦冬主要真菌病害病原菌的田间检测。

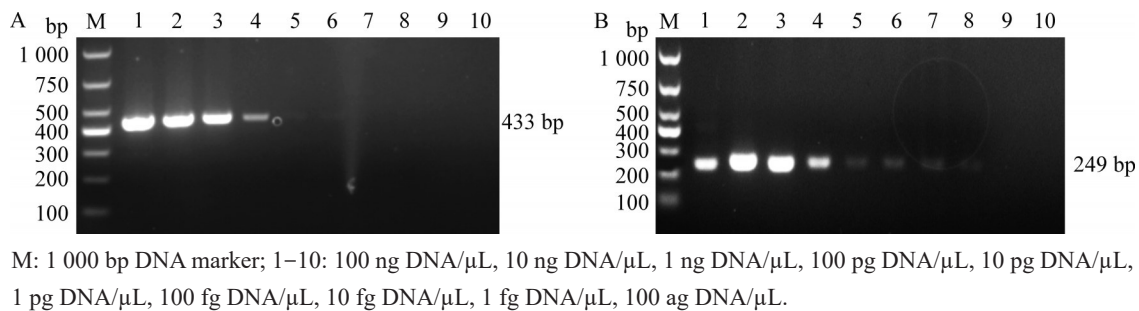


图3 巢式单重PCR体系对山麦冬炭疽菌(A)和互隔交链孢菌(B)的检测灵敏度

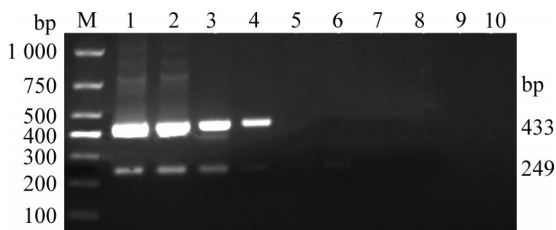
Fig. 3 The sensitivity detection results of *Colletotrichum liriopes* (A) and *Alternaria alternata* (B) using the nested PCR system

3 讨论

随着分子生物学的快速发展,各种PCR技术得到了快速开发与利用。由于多重PCR具有提高检测通量的优点,在植物病原菌检测中被广泛应用。

如Lu et al.(2019)建立的多重PCR方法可以同时检测玉米中的新月弯孢霉菌 *Curvularia lunata*、玉米小斑菌 *Bipolaris maydis* 和玉米北方炭疽菌 *Aureobasidium zeae*; 同时在柑橘、大豆和黄瓜等多种病害的检测中也被广泛应用(何宛芹等,2017; Das et al.,

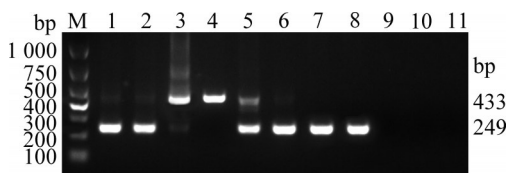
2019; Yu et al., 2019)。巢式PCR由于其较高的特异性和灵敏度,已被用于如甘蔗赤条病菌 *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*、柑橘黄龙病菌 *Candidatus Liberibacter asiaticus* 和葡萄溃疡病菌 *Neofusicoccum parvum* 等植物病原菌的分子快速检测,显示了较好的应用价值(张玮等, 2012; 傅华英等, 2017; Hong et al., 2019)。目前,多重PCR和巢式PCR的结合已应用于马铃薯、木薯和芒果等多种植物病害的诊断(Ni et al., 2012; Bernal-Galeano et al., 2018; Ashmawy et al., 2020),而浙麦冬作为一种常用滋补中药,相关病害诊断和病原菌快速检测的研究报道较少。本研究根据NCBI数据库中麦冬病原菌山麦冬炭疽菌和互隔交链孢菌的ITS序列,分别设计出山麦冬炭疽菌特异性引物 MTJ8-F/MTJ8-R(433 bp)和互隔交链孢菌特异性引物 AI-F/AI-R(249 bp),并建立和优化了病原菌山麦冬炭疽菌和互隔交链孢菌的巢式多重PCR检测技术,可以同时对这2种病原菌进行准确及时的检测。



M: 1 000 bp DNA marker; 1~10: 浓度分别为 100 ng DNA/ μ L、10 ng DNA/ μ L、1 ng DNA/ μ L、100 pg DNA/ μ L、10 pg DNA/ μ L、1 pg DNA/ μ L、100 fg DNA/ μ L、10 fg DNA/ μ L、1 fg DNA/ μ L、100 ag DNA/ μ L 的山麦冬炭疽菌和互隔交链孢菌 DNA 混合液模板。M: 1 000 bp DNA marker; 1~10: *C. liriope* and *A. alternata* DNA mixture template in different concentrations 100 ng DN/ μ L, 10 ng DNA/ μ L, 1 ng DNA/ μ L, 100 pg DNA/ μ L, 10 pg DNA/ μ L, 1 pg DNA/ μ L, 100 fg DNA/ μ L, 10 fg DNA/ μ L, 1 fg DNA/ μ L and 100 ag DNA/ μ L, respectively.

图4 巢氏多重PCR体系的灵敏度检测结果

Fig. 4 Sensitivity detection results of the nested multiple PCR system



M: 1 000 bp DNA marker; 1~10: 麦冬病株; 11: 健康麦冬。M: 1 000 bp DNA marker; 1~10: the *Ophiopogon japonicus* plants with different disease symptoms; 11: the healthy plant.

图5 巢氏多重PCR体系对麦冬田间病样的应用效果

Fig. 5 The application of the field disease samples using the nested multiple PCR detection system

巢氏PCR与多重PCR结合应用于植物病原菌的快速检测时,不仅可以提高检测的灵敏度还可以实现多种病原菌的多目标快速检测。本研究结果表明,巢氏单重PCR技术对山麦冬炭疽菌的最低检测限可达 100 pg DNA/ μ L,对互隔交链孢菌的最低检测限可达 10 fg DNA/ μ L,而构建的巢氏多重PCR体系同时检测2种病原菌的灵敏度达 100 pg DNA/ μ L。该检测方法整个流程只需要 5~6 h,极大地节约了时间和经费开支,并且具有特异性强和灵敏度高的优点,可应用于麦冬田间炭疽病和黑斑病的准确鉴定,为该类病害的及时有效防控提供技术支持。

利用本研究所建立的巢氏多重PCR体系在麦冬田间样品的实际检测中,检出率达到 80%,准确率高,有2个显症样品未扩增出对应条带,推测麦冬还存在田间染病症状与炭疽病和黑斑病相似的其他病原菌引起的病害,但有待进一步调查验证。该检测体系可用于麦冬早期病害的有效、快速诊断,从而控制病害发生及蔓延,减少农药乱用、滥用现象,最终达到提高麦冬质量与产量的效果。

参考文献 (References)

- Ashmawy NA, El-Bebany AF, Shams AHM, Shoeib AA. 2020. Identification and differentiation of soft rot and blackleg bacteria from potato using nested and multiplex PCR. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 127(2): 141–153
- Bernal-Galeano V, Ochoa JC, Trujillo C, Rache L, Bernal A, López CA. 2018. Development of a multiplex nested PCR method for detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* in cassava. *Tropical Plant Pathology*, 43(4): 351–350
- Cao ZY, Yang YH, Song Y, Shentu XP, Yu XP. 2021. Simultaneous detection of four pathogens in *Dendrobium officinale* by nested multiplex PCR assay. *Crop Protection*, 140: 105445
- Chen MJ, Fang T, Ke T, Xiong ZY, He GY. 2005. Multiplex PCR: a molecular biotechnique of high efficiency and speed. *Journal of Wuhan University of Technology*, 27(10): 33–36 (in Chinese) [陈明洁, 方倜, 柯涛, 熊志勇, 何光源. 2005. 多重PCR: 一种高效快速的分子生物学技术. *武汉理工大学学报*, 27(10): 33–36]
- Das AK, Nerkar S, Gawande N, Thakre N, Kumar A. 2019. SCAR marker for *Phytophthora nicotianae* and a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *P. nicotianae* and *Candidatus Liberibacter asiaticus* in citrus. *Journal of Applied Microbiology*, 127(4): 1172–1183
- Duan WJ, Guo LX. 2008. Advances in detection of plant pathogenic fungi based on PCR technology. *Plant Quarantine*, 22(6): 385–388, 384 (in Chinese) [段维军, 郭立新. 2008. 基于PCR技术的植物病原真菌检测技术研究进展. *植物检疫*, 22(6): 385–388, 384]
- Fu HY, Ge DF, Li XY, Wu XB, Chen RK, Gao SJ. 2017. Nested-PCR detection of *Acidovorax avenae* subsp. *avenae*, the pathogen of red stripe on sugarcane. *Journal of Plant Protection*, 44(2): 276–

- 282 (in Chinese) [傅华英, 葛丹凤, 李晓燕, 吴小斌, 陈如凯, 高三基. 2017. 甘蔗赤条病菌巢式PCR检测. 植物保护学报, 44(2): 276–282]
- Gan C, Mo Q, Tao Y. 2020. Advances in PCR for pathogenic bacteria diagnosis. Chinese Journal of Laboratory Diagnosis, 24(4): 683–687 (in Chinese) [干驰, 莫茜, 陶悦. 2020. PCR技术在病原菌诊断中的研究进展. 中国实验诊断学, 24(4): 683–687]
- Gou Y, Geng Z, Wu Q, Liu FH, Gao BX, Zhou J, Guo L, Gao C. 2018. Multi-residue analysis of pesticides in radix ophiopogonis by GC-MS/MS. Chinese Pharmaceutical Journal, 53(7): 555–560 (in Chinese) [苟琰, 耿昭, 吴强, 刘繁红, 高必兴, 周娟, 郭力, 高驰. 2018. 气相色谱-串联质谱法检测麦冬中农药残留. 中国药理学杂志, 53(7): 555–560]
- He WQ, Fu Y, Lu WL, Chang XL, Yang WY. 2017. A multiplex PCR detection technique for the pathogenic *Fusarium* species causing soybean root rot. Journal of Plant Protection, 44(4): 609–616 (in Chinese) [何宛芹, 付瑶, 鲁雯璐, 常小丽, 杨文钰. 2017. 大豆根腐病致病镰孢菌的多重PCR检测技术. 植物保护学报, 44(4): 609–616]
- Hong YY, Luo YY, Yi JL, He L, Dai LY, Yi TY. 2019. Screening nested-PCR primer for '*Candidatus Liberibacter asiaticus*' associated with citrus Huanglongbing and application in Hunan, China. PLoS ONE, 14(2): e0212020
- Li JL, Wang S, Yu J, Wang L, Zhou SL. 2013. A modified CTAB protocol for plant DNA extraction. Chinese Bulletin of Botany, 48(1): 72–78 (in Chinese) [李金璐, 王硕, 于婧, 王玲, 周世良. 2013. 一种改良的植物DNA提取方法. 植物学报, 48(1): 72–78]
- Li MJ, Wang QX, Liu ZB, Pan XX, Zhang YY. 2019. Silicon application and related changes in soil bacterial community dynamics reduced ginseng black spot incidence in *Panax ginseng* in a short-term study. BMC microbiology, 19(1): 263
- Li XM, Sun SB, Jiang GZ. 2019. Advances in quality control, toxicity and clinical compatibility of Shenmai injection. Drug Evaluation Research, 42(11): 2294–2300 (in Chinese) [李响明, 孙胜斌, 姜国志. 2019. 参麦注射液的质量控制、毒性及临床配伍研究进展. 药物评价研究, 42(11): 2294–2300]
- Liu CC, Yang T, Ma JJ, Sun FC, Li XX. 2019. Identification system for leaf diseases of *Ophiopogon japonicus* based on PCA-SVM. Journal of Chinese Agricultural Mechanization, 40(8): 132–136 (in Chinese) [刘翠翠, 杨涛, 马京晶, 孙付春, 李晓晓. 2019. 基于PCA-SVM的麦冬叶部病害识别系统. 中国农机化学报, 40(8): 132–136]
- Liu X, Lin YH, Xie CX, Zeng FL, Ma XC, Sun W, Tu PF, Chen SL. 2017. Ecogenetic and differentiation of genuine medicinal materials: ophiopogonis radix in Sichuan and Zhejiang provinces. Chinese Journal of Experimental Prescriptions, 23(17): 27–33 (in Chinese) [刘霞, 林韵涵, 谢彩香, 曾凡琳, 马晓冲, 孙伟, 屠鹏飞, 陈士林. 2017. 道地药材川麦冬和浙麦冬的生态遗传分化. 中国实验方剂学杂志, 23(17): 27–33]
- Lu YY, Song YB, Xue ZQ. 2019. Multiplex polymerase chain reaction detection of *Curvularia lunata*, *Bipolaris maydis*, and *Aureobasidium zeae* in infected maize leaf tissues. Journal of Basic Microbiology, 59(9): 862–866
- Ma XJ, Wang GM, Han LB. 2012. Genetic diversity in Lilyturf germplasm detected by SRAP markers. Pratacultural Science, 29(11): 1686–1691 (in Chinese) [马秀杰, 王冠明, 韩烈保. 2012. 不同产地麦冬遗传多样性的SRAP分析. 草业科学, 29(11): 1686–1691]
- Mu XM, Mi N, Zu XP, Ye J, Yang PM, Zhang WD. 2019. Research advance in chemical compounds, pharmacological action and clinical application of Dengzhan Shengmai capsules. China Journal of Chinese Materia Medica, 44(18): 3917–3923 (in Chinese) [穆雪梅, 米楠, 祖先鹏, 叶霁, 杨培明, 张卫东. 2019. 灯盏生脉胶囊化学成分、药理作用及临床应用研究进展. 中国中药杂志, 44(18): 3917–3923]
- Ni HF, Yang HR, Chen RS, Hung TH, Liou RF. 2012. A nested multiplex PCR for species-specific identification and detection of *Botryosphaeriaceae* species on mango. European Journal of Plant Pathology, 133(4): 819–828
- Peng W, Ma X, Wang J, Zeng N, Dong TW, Li L, Li M. 2018. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Ophiopogon japonicus*. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 49(2): 477–488 (in Chinese) [彭婉, 马骁, 王建, 曾南, 董泰玮, 李雷, 李敏. 2018. 麦冬化学成分及药理作用研究进展. 中草药, 49(2): 477–488]
- Wang MS, Hou X, Wang HZ. 2020. Genomic sequence resource of *Alternaria alternata* strain B3 causing leaf blight on *Ophiopogon japonicus*. Plant Disease, 105: 684–687
- Wang Z, Yang M, Yang YQ, Peng ZK, Zhou EX. 2010. Morphological and molecular identification of citrus anthracnose pathogen from Guangdong Province. Mycosystema, 29(4): 488–493 (in Chinese) [王震, 杨媚, 杨迎青, 彭正凯, 周而勋. 2010. 广东省柑橘炭疽病原菌的形态与分子鉴定. 菌物学报, 29(4): 488–493]
- Yu J, Zhao YY, Ai G, Xu H, Dou DL, Shen DY. 2019. Development of multiplex PCR assay for simultaneous detection of five cucumber pathogens based on comparative genomics. Australasian Plant Pathology, 48(4): 369–372
- Zhai YY, Duan WL, Shen GA, Guo BL. 2019. Determination of paclobutrazol and uniconazole in ophiopogonis radix by QuEChERS-HPLC-MS/MS. Drugs & Clinic, 34(3): 591–595 (in Chinese) [翟宇瑶, 段万里, 中国安, 郭宝林. 2019. QuEChERS-反相高效液相色谱-串联质谱法测定麦冬中多效唑、烯效唑. 现代药物与临床, 34(3): 591–595]
- Zhang HS, Tan GJ, Chen L. 2008. Biological characteristics of 2 species of *Colletotrichum* causing *Ophiopogon japonicus* anthracnose. Acta Prataculturae Sinica, 17(4): 118–123 (in Chinese) [张海珊, 檀根甲, 陈莉. 2008. 2种麦冬炭疽病菌生物学特性的研究. 草业学报, 17(4): 118–123]
- Zhang W, Yan JY, Huang JB, Wang J, Qiao GH, Li XH. 2012. Establishment of an efficient nested PCR detection system of *Neofusicoccum parvum*. Journal of Plant Protection, 39(5): 479–480 (in Chinese) [张伟, 燕继晔, 黄金宝, 王军, 乔广行, 李兴红. 2012. 葡萄溃疡病菌巢式PCR高效检测体系的建立. 植物保护学报, 39(5): 479–480]

(责任编辑:李美娟)