

烟草三类根腐类病害病原真菌多重 PCR 检测方法的建立

陆星星¹,刘伟阳²,徐后娟^{2*}

1. 玉溪农业职业技术学院, 云南 玉溪 653100

2. 山东农业大学植物保护学院, 山东 泰安 271018

摘要: 本文分别设计和验证了烟草黑胫病菌和根黑腐病菌的特异性检测引物, 结合镰刀菌属通用引物, 进行了烟草三类根腐类病致病菌-烟草黑胫病菌、根黑腐病菌和镰刀菌的多重 PCR 检测, 并对影响多重 PCR 的退火温度、引物用量、dNTP 用量、模板用量分别进行了分析。结果显示, 退火温度在 43~61 °C 范围内, 烟草黑胫病菌、根黑腐病菌和镰刀菌的引物用量在 0.2:0.32~0.48:0.2 μmol·L⁻¹, dNTP 用量在 0.1~0.2 mmol·L⁻¹ μL/25 μL 反应体系中, 可以经济且高效的实现对烟草黑胫病菌、根黑腐病菌和镰刀菌的特异性同步检测。

关键词: 烟草; 根腐类病害; 多重 PCR; 同步检测

中图分类号: S431.9

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2016)04-0520-05

Establishment and Application of Multiplex PCR Method for Detection of Three Root Rotting Fungi on Tobacco

LU Xing-xing¹, LIU Wei-yang², XU Hou-juan^{2*}

1. Yuxi Agriculture Vocation-technical College, Yu xi 653100, China

2. College of Plant Protection/Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

Abstract: Specific primers for *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* and *Thielaviopsis basicola* were designed and verified. Based on these results and reported specific primer for *Fusarium* spp., a detection system using multiplex PCR was developed and optimized. Annealing temperature, the concentrations of primers and dNTPs were examined. An economic and efficient protocol were established and applied to detect the infected tobacco. In this protocol, annealing temperature was 43 to 61 °C, primers for *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*, *Thielaviopsis basicola* and *Fusarium* spp. were 0.2:0.32-0.48:0.2 μmol·L⁻¹, respectively and dNTP was 0.1 to 0.2 mmol·L⁻¹.

Keywords: Tobacco; root rot diseases; multiplex PCR; simultaneous detection

烟草是一种重要的经济作物, 田间易受到多种病虫害的威胁, 其中根腐类病害危害较为严重, 成为制约其优质适产的重要因子^[1]。引起烟草根部腐烂的病原种类较多, 其中寄生疫霉烟草致病变种(*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*)、镰刀菌(*Fusarium* spp.)和基生根串珠霉(*Thielaviopsis basicola*)为三类重要的烟草根腐类真菌病原, 三者均能危害包括烤烟、晾烟、晒烟、香料烟、白肋烟等所有栽培烟草, 可在烟草的任何生育阶段侵染为害, 以大田期为主, 导致烟叶产量和质量下降, 烟农经济利益受损^[2-4]。

尽管三种病原引起的病害种类不同, 寄生疫霉菌危害烟草形成黑胫病(Tobacco black shank), 镰刀菌类危害病害统称为根腐病(Tobacco root rot), 而串珠霉菌危害引起根黑腐病(Tobacco black root rot), 但三种病害症状具有相似性, 且在田间容易混合发生, 导致生产中难以对病害做出及时而错过最佳防治时期, 或由于误诊而盲目用药, 其结果是不仅无法有效控制病害的发生蔓延, 而且导致烟叶化学农药残留严重, 环境污染和生产成本的上升。因此研究一种快速、准确、简便的病害检测技术日益提上日程, 成为烟草病害防治过程中亟待解决的问题。本试验旨在利用多重 PCR 进行同步检测三种病原菌, 并对影响因素进行优化, 建立一种烟草根腐类病害的准确、灵敏的检测方法。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试菌株烟草黑胫病菌(*P. parasitica*)菌株 *pp-sdyn12* 和根黑腐病菌(*T. basicola*)菌株 *tb-sdys3* 由山

收稿日期: 2016-03-14

修回日期: 2016-04-11

基金项目: 中国烟草总公司山东省公司面上项目:烟草细菌性叶斑病快速鉴定技术研究与应用

作者简介: 陆星星(1976-),女,硕士,研究方向为烟草栽培及生理. E-mail:yxnzyxcb@163.com

*通讯作者: Author for correspondence. E-mail:xhjuan@sdau.edu.cn

东农业大学烟草实验室提供;根腐病菌茄病镰刀菌(*F. solani*)菌株 *fsyx1*、尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*) *foyx5*、厚孢镰刀菌(*F. chlamydosporium*)菌株 *fcyx4* 由玉溪农业职业技术学院提供。引物特异性筛选对照菌株包括四种烟草根茎部病害致病菌,分别为烟草炭疽病菌(烟草炭疽菌, *Colletotrichum micotianae*)、烟草猝倒病菌(瓜果腐霉, *Pythium aphanidormatum*)、烟草低头黑病菌(辣椒刺盘孢烟草变型, *Colletotrichum capsici f. nicotianae*)和烟草立枯病菌(立枯丝核菌, *Rhizoctonia solani*),由山东农业大学烟草实验室提供。烟草根腐类病害材料分别采集于山东沂水和云南玉溪。

1.2 烟草三类根腐类病原检测引物的设计

利用 Primer Premier 6.0 分别设计特异性检测引物 *ppf1/ppr1* 和 *tbf1/tbr1*, 镰刀菌通用引物 *Ff1/ Fr1* 参照 Muraosa *et al*^[5]。引物序列如表 1 所示,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 PCR 引物
Table 1 Primers used in PCR

| 引物 Primer | 序列 Sequence(5'-3') | 扩增片段长度 Product size (nt) | 解链温度 Tm(°C) |
|--------------|--------------------------|-----------------------------|----------------|
| <i>ppf1</i> | TGGGCTTCGGCCTGATTTAG | 576 | 59.3 |
| <i>ppr1</i> | AGCCAAGCCACCGAGATATG | | 61.9 |
| <i>tbf1</i> | AACGTACCTTTTCTAGCTGCTTTG | 427 | 58.6 |
| <i>tbr1</i> | TGAGGGTTTTTCGGCATGTTA | | 56.1 |
| <i>Ff1</i> | TGAAATCTGGCTCTCGGGCC | 222 | 61.9 |
| <i>Fr1</i> | GCTATCGGTCTCTGGCCGG | | 64.0 |

1.3 基因组 DNA 的提取方法

将各供试菌株接种于马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基中,25 °C 培养 5~7 d,收集菌丝进行基因组 DNA(gDNA)的提取;田间采集烟草根茎部病害病株材料,带回实验室内,洗净表明浮土,取病健交界部位进行基因组 DNA 的提取。

供试菌株及病株材料 DNA 的提取均采用 Omega 公司的 Fungal DNA Midi Kit。

1.4 引物的特异性检测

分别对烟草黑胥病菌的检测引物 *ppf1/ppr1* 和烟草根黑腐病菌的检测引物 *tbf1/tbr1* 的特异性进行了检测,对照为不同真菌的 gDNA,其中三种镰刀菌的基因组 DNA 等量混合,组成镰刀菌混合 DNA。PCR 扩增条件为:94 °C 5 min;94 °C 30 s,53 °C 30 s,72 °C 30 s,30 个循环;72 °C 10 min。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检验扩增结果。

1.5 多重 PCR 体系的优化

PCR 扩增体系采用 25 μ L,包括模板(三种供试病原菌 genomic DNA,各 100 ng),引物(*ppf1/ppr1*、*tbf1/tbr* 和 *Ff1/ Fr1*, 10 μ mol·L⁻¹, 各 1 μ L), dNTP Mixture (各 2.5 mM, 2 μ L), 10 \times 扩增缓冲液(Mg²⁺ plus)2.5 μ L, Taq DNA 聚合酶((5 U/ μ L, 0.5 μ L)), 双蒸水补齐到 25 μ L。PCR 扩增条件为:94 °C 4 min;94 °C 30 s,53 °C 30 s,72 °C 30 s,30 个循环;72 °C 10 min。

1.5.1 退火温度对多重 PCR 扩增效率的影响 PCR 扩增体系同 1.5,对 PCR 扩增条件中的退火温度进行梯度设置,梯度范围为 41~63 °C,梯度差为 2 °C,研究不同退火温度对多重 PCR 扩增效率的影响。

1.5.2 引物用量和配比对多重 PCR 扩增效率的影响 PCR 扩增体系设置引物用量为变量,其它成分加样量和扩增条件同 1.5,三对引物(初始浓度为 10 μ mol·L⁻¹)用量如表 2 所示。

表 2 引物用量
Table 2 The final concentration of different primers in the PCR mixture

| 不同设置 Different treatments | 引物终浓度 (μ mol·L ⁻¹) The final concentration of primers (μ mol·L ⁻¹) | | | | | |
|------------------------------|---|-------------|-------------|-------------|------------|------------|
| | <i>ppf1</i> | <i>ppr1</i> | <i>tbf1</i> | <i>tbr1</i> | <i>Ff1</i> | <i>Fr1</i> |
| 1 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 2 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 | 0.4 |
| 3 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 | 0.6 |
| 4 | 0.2 | 0.2 | 0.32 | 0.32 | 0.2 | 0.2 |
| 5 | 0.2 | 0.2 | 0.4 | 0.4 | 0.2 | 0.2 |
| 6 | 0.2 | 0.2 | 0.48 | 0.48 | 0.2 | 0.2 |
| 7 | 0.2 | 0.2 | 0.6 | 0.6 | 0.2 | 0.2 |
| 8 | 0.2 | 0.2 | 1 | 1 | 0.2 | 0.2 |

1.5.3 dNTP Mixture 用量对多重 PCR 扩增效率的影响 PCR 扩增体系设置 dNTP Mixture 为变量,其它成分加样量和扩增条件同 1.5; 在 25 μL PCR 反应体系中分别加入 0.25、0.5、1、2、4 和 8 μL 的 dNTP Mixture, 使其终浓度分别为 25、50、100、200、400 和 800 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 研究不同的 dNTP Mixture 用量对多重 PCR 扩增效率的影响, 筛选出经济高效的 dNTP Mixture 用量。

1.6 烟草三种根腐类病害的多重 PCR 同步检测体系的实际应用

利用 1.5 建立的烟草三种根腐类病害同步检测体系, 对田间采集的烟草根腐类病害标本进行了检测。对照为健康烟草植株, 单独接种了三种不同病原的发病植株以及混合接种的发病烟草植株。PCR 扩增体系采用 25 μL , 包括模板, 引物(ppf1/ppr1:tbfl/tbr:Ff1/ Fr1=0.5 μL :0.8 μL :0.5 μL), dNTP Mixture (各 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 1 μL), 10 \times 扩增缓冲液(Mg²⁺ plus)2.5 μL , Taq DNA 聚合酶((5 U/ μL , 0.5 μL)), 双蒸水补齐到 25 μL 。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 4 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 53 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。

2 结果与分析

2.1 引物的特异性检测

以供试菌株的 genomic DNA 为模板, 分别对烟草黑胫病菌的检测引物 ppf1/ppr1 和烟草根黑腐病菌的检测引物 tbfl/tbr1 的特异性进行了检测, 结果如图 1 所示。由图 1 可以看出, 以 ppf1/ppr1 为引物、不同菌株的 gDNA 为模板时, 只有烟草黑胫病菌能够扩增得到 576 bp 的条带, 而以 tbfl/tbr1 为引物时, 只有烟草根黑腐病菌能够扩增得到 427 bp 的条带, 说明引物特异性好, 可以用于对烟草黑胫病菌和根黑腐病菌两种菌的特异性检测。

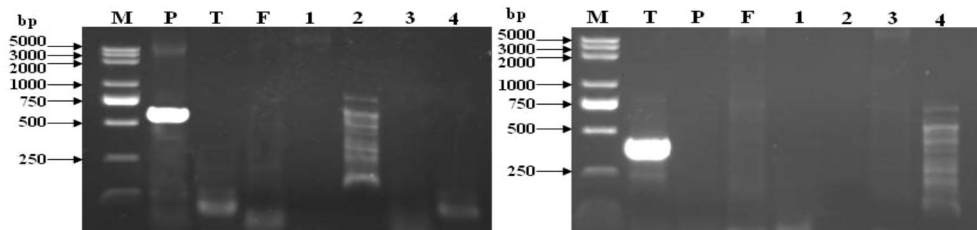


图 1 烟草黑胫病菌和烟草根黑腐病菌引物特异性的检测

Fig.1 Assessment of the specificity of primers for *P. parasitica* and *T. basicola*

M: DNA markerDL2000 plus; P: 烟草黑胫病菌; T: 烟草根黑腐病菌; F: 镰刀菌类烟草根腐病菌; 1: 烟草炭疽病菌; 2: 烟草猝倒病菌; 3: 烟草低头黑病菌; 4: 烟草立枯病菌

M: DNA markerDL2000 plus; P: *P. parasitica*; T: *T. basicola*; F: *Fusarium* spp.; 1: *C. nicotianae*; 2: *P. aphanidormatum*; 3: *C. capsici*; 4: *R. solani*

2.2 退火温度对多重 PCR 扩增效率的影响

由于三对(6个)引物在同一反应体系中进行, 且各自的解链温度不同, 因此每对引物所需的最适退火温度也存在着差异, 将退火温度设置在 41 $^{\circ}\text{C}$ 到 63 $^{\circ}\text{C}$ 范围内, 每隔 2 $^{\circ}\text{C}$ 为一个处理, 研究了不同退火温度对多重 PCR 的影响, 结果如图 2 所示。由图 2 可以看出, 退火温度从 43 $^{\circ}\text{C}$ 到 61 $^{\circ}\text{C}$ 范围内均可以扩增得到三条条带, 而 41 $^{\circ}\text{C}$ 和 63 $^{\circ}\text{C}$ 的退火温度时已经无法扩增得到镰刀菌的目的条带; 51 $^{\circ}\text{C}$ ~55 $^{\circ}\text{C}$ 为多重 PCR 的最佳退火温度, 在这个范围内, 烟草黑胫病菌、烟草根黑腐病菌和镰刀菌类烟草根腐病菌的非特异性目的条带最为清晰。

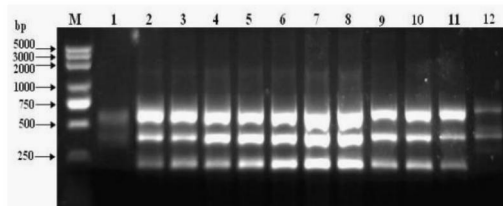


图 2 不同的退火温度对多重 PCR 的影响

Fig.2 Effect of different annealing temperature on multiplex PCR

1~12: 41 $^{\circ}\text{C}$, 43 $^{\circ}\text{C}$, 45 $^{\circ}\text{C}$, 47 $^{\circ}\text{C}$, 49 $^{\circ}\text{C}$, 51 $^{\circ}\text{C}$, 53 $^{\circ}\text{C}$, 55 $^{\circ}\text{C}$, 57 $^{\circ}\text{C}$, 59 $^{\circ}\text{C}$, 61 $^{\circ}\text{C}$, 63 $^{\circ}\text{C}$
1 to 12: 41 $^{\circ}\text{C}$, 43 $^{\circ}\text{C}$, 45 $^{\circ}\text{C}$, 47 $^{\circ}\text{C}$, 49 $^{\circ}\text{C}$, 51 $^{\circ}\text{C}$, 53 $^{\circ}\text{C}$, 55 $^{\circ}\text{C}$, 57 $^{\circ}\text{C}$, 59 $^{\circ}\text{C}$, 61 $^{\circ}\text{C}$, 63 $^{\circ}\text{C}$

2.3 引物用量对多重 PCR 扩增效率的影响

引物的用量和配比也会影响多重 PCR 的扩增效率。首先研究了等引物用量时多重 PCR 的扩增效率,由图 3 的 1, 2 和 3 可以看出,随着三对引物用量从 $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $0.6 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 均可实现对三种烟草根腐类真菌的特异性扩增,但扩增效率存在差异,烟草黑胫病菌目的条带最亮,镰刀菌次之,根黑腐病菌条带最弱。控制烟草黑胫病菌和镰刀菌的引物用量为 $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 根黑腐病菌引物用量从 $0.32 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加到 $1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 结果如图 3 的 4~8 所示。由图可以看出,随着根黑腐病菌引物用量的增加,其目的条带亮度增大,但当根黑腐病菌引物用量增加到 $0.6\sim 1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,烟草黑胫病菌目的条带变弱。因此,最佳的三对引物用量为黑胫病菌:根黑腐病菌:镰刀菌= $0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}:0.32\sim 0.48 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}:0.2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.4 dNTP 用量对多重 PCR 扩增效率的影响

研究了 dNTP 用量对多重 PCR 扩增效率的影响,结果如图 4 所示,由图 4 可以看出,当 dNTP 用量为 $0.25 \mu\text{L}$, 在反应体系($25 \mu\text{L}$)中终浓度为 $0.025 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,三个条带均扩增不成功; dNTP 用量提高到 $0.5 \mu\text{L}$, 终浓度为 $0.05 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,扩增效率大大提高,表现为三个条带均能成功扩增,但是条带较为微弱。随着 dNTP 用量的增加,扩增效率进一步提高,表现为图 4 中 3,4。但当 dNTP 用量提高到 $4 \mu\text{L}$ (图中 5) 和 $8 \mu\text{L}$ (图中 6), 终浓度分别为 $0.4 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.8 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,三个特异性条带均能成功扩增,但亮度和 dNTP 用量为 $2 \mu\text{L}$ (图中 4) 并没有明显差异。因此, $25 \mu\text{L}$ 反应体系中经济高效的 dNTP 用量范围为 $1\sim 2 \mu\text{L}$, 终浓度为 $0.1\sim 0.2 \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

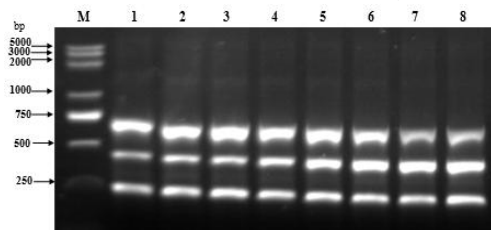


图 3 不同的引物用量对多重 PCR 的影响
Fig.3 Effect of different addition level of primers on multiplex PCR

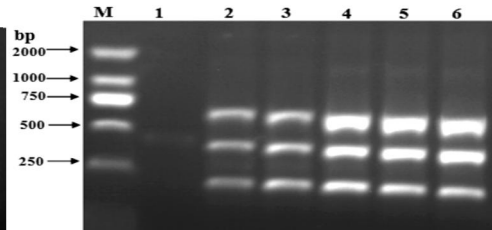


图 4 dNTP 用量对多重 PCR 的影响
Fig.4 Effect of different addition level of dNTP on multiplex PCR

1: $0.25 \mu\text{L}$; 2: $0.5 \mu\text{L}$; 3: $1 \mu\text{L}$; 4: $2 \mu\text{L}$; 5: $4 \mu\text{L}$; 6: $8 \mu\text{L}$
1: $0.25 \mu\text{L}$; 2: $0.5 \mu\text{L}$; 3: $1 \mu\text{L}$; 4: $2 \mu\text{L}$; 5: $4 \mu\text{L}$; 6: $8 \mu\text{L}$

2.5 烟草三种根腐类病害的多重 PCR 同步检测体系的实际应用

利用筛选得到的烟草黑胫病菌和根黑腐病菌特异性检测引物,结合已报道的镰刀菌类通用引物,构建和优化了三种烟草根腐类病害的同步检测体系,并利用该体系进行了人工接种发病烟草植株和田间病害采集标本的检测,结果如图 5 和表 3 所示。由图 5 可以看出,建立的多重 PCR 体系不仅可以对接种后的感病烟草成功诊断,而且对田间采集的发病烟草也能实现正确的鉴别,因此可以用于田间烟草根茎部病害的诊断。运用此体系分别对采集于云南玉溪和山东沂水的发病烟草进行了扩增,在玉溪 43 株发病烟草中,黑胫病、根黑腐病和镰刀菌类根腐病分别为 13, 19 和 9 株,黑胫病和镰刀菌类根腐病混合发生 2 株,根黑腐病和镰刀菌类根腐病混合发生 1 株;同样在检测的山东沂水发病烟草标本中,也为三种病害单独侵染,复合侵染的有 1 株,为根黑腐病菌和镰刀菌混合侵染。

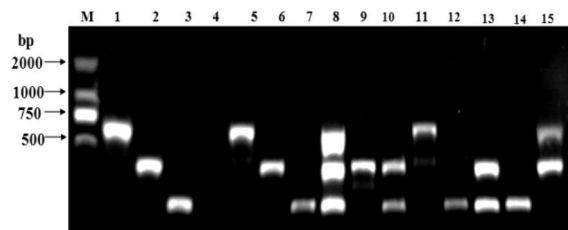


图 5 多重 PCR 检测田间烟草根腐类病害
Fig.5 Detection of root-infected tobacco by multiplex PCR

M: DNAMarker DL 2000; 1: 烟草黑胫病菌; 2: 烟草根黑腐病菌; 3: 尖孢镰刀菌; 4: 健康烟草; 5: 接种黑胫病菌的发病烟株; 6: 接种根黑腐病菌的发病烟株; 7: 接种尖孢镰刀菌的发病烟株; 8: 接种了黑胫病菌、根黑腐病菌和尖孢镰刀菌的发病烟株; 9~15: 田间采集的根腐类烟草病株
M: DNAMarker DL 2000; 1: *P. parasitica*; 2: *T. basicola*; 3: *F. oxysporum*; 4: Health tobacco; 5: Tobacco inoculated by *P. parasitica*; 6: Tobacco inoculated by *T. basicola*; 7: Tobacco inoculated by *F. oxysporum*; 8: Tobacco inoculated by *P. parasitic*, *T. basicola* and *F. oxysporum* simultaneously; 9 to 15: Root-infected tobacco from field.

表 3 多重 PCR 检测采集的根腐类病害标本(株)
Table 3 The detection result of infected tobacco by multiplex PCR method

| 标本采集地点 | 数量 | 黑 | 根 | 镰 | 黑+根 | 黑+镰 | 根+镰 | 黑+根+镰 |
|-------------------------------------|--------|-----|-----|------|----------|-----------|----------|----------------|
| Collection site of infected tobacco | Number | Tbs | Trr | Tbrr | Tbs+ Trr | Tbs+ Tbrr | Trr+Tbrr | Tbs+ Trr+ Tbrr |
| 云南玉溪 | 43 | 13 | 18 | 9 | 0 | 2 | 1 | 0 |
| 山东沂水 | 32 | 21 | 8 | 2 | 0 | 0 | 1 | 0 |

注:黑:黑胫病(Tobacco black shank); 根:根黑腐病; 镰:镰刀菌类根腐病。

Note: Tbs: Tobacco black shank; Trr: Tobacco root rot; Tbrr: Tobacco black root rot.

3 讨论与结论

多重 PCR 同步检测已经在多种病害(病原)上有报道,如岳红妮等^[6]对小麦三种病毒病-大麦条纹花叶病毒、大麦黄矮病毒 PAV 株系、小麦黄花叶病毒及小麦蓝矮植原体病害进行了同步检测,孙娟等^[7]同步检测棉黄萎病菌、枯萎病菌和炭疽病菌,许拉等^[8]对两种对虾病毒和 4 种弧菌进行了同步检测,但对于镰刀菌引起的根腐病、疫霉菌引起的黑胫病和串珠霉引起的根黑腐病目前没有同步检测的报道。由于我国烟区这三种根腐类病害发生危害十分严重,且三种病害的症状具有相似性,生产上难以做到准确判断,因此建立一个三种烟草根腐类病害的同步检测体系具有非常重要的实际意义。

多重 PCR 同步检测多种病原具有快速、节约、简便、高通量等优点^[9,10],但由于在同一反应体系中使用多对引物对多个模板进行扩增,要求各个引物之间具有相似的 Tm 值,可以使用同一个退火温度,同时也要避免各个引物对之间的相互干扰。而且由于引物和模板的不同,不同病原菌之间的最适多重 PCR 体系各有差异,因此需要针对不同的病原菌,从影响多重 PCR 的主要因素出发,逐步分析各影响因素并优化,以建立一个适合特定病原菌的最佳多重 PCR 检测体系。在本项目中,我们分别对影响最大的退火温度、引物用量和配比、dNTP 用量进行了分析,建立了一个可同步检测烟草黑胫病菌、根黑腐病菌和镰刀菌的同步检测体系,并进行了实际利用,为烟草生产上根腐类病害的诊断提供了技术支持。

参考文献

- [1] 陈瑞泰,朱贤朝,王智发,等.全国 16 个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告[J].中国烟草科学,1997(4):1-7
- [2] Campbell CL, Benson DM. Epidemiology and management of root diseases[M]. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1994:255-257
- [3] Katherine E, Drakea J, Michael M, et al. Black Shank Resistance and Agronomic Performance of Flue-Cured Tobacco Lines and Hybrids Carrying the Introgressed *Nicotiana rustica* Region, *Wz*[J]. Crop Science, 2014,55(1):79-86
- [4] Jusoh MNB, Zin NBM, Nagao H. Vegetative compatibility group of *Fusarium solani* pathogenic to tobacco plant in peninsular Malaysia[J]. Songklanakarin Journal of Science & Technology, 2013,35(6):615-621
- [5] Muraosa Y, Schreiber AZ, Trabasso P, et al. Development of cycling probe-based real-time PCR system to detect *Fusarium* species and *Fusarium solani* species complex (FSSC)[J]. Int J Med Microbiol, 2014,304(3-4):505-511
- [6] 岳红妮,吴云锋,李毅然,等.小麦 3 种病毒病 BSMV、BYDV-PAV、WYMV 及 WBD 植原体病害的多重 PCR 同步检测[J].中国农业科学,2008,41(9):2663-2669
- [7] 孙娟,陈舜胜,胡培龙,等.同步检测棉黄萎病菌、枯萎病菌和炭疽病菌三重 PCR 方法的建立[J].上海农业学报,2014(4):10-15
- [8] 许拉,黄健,戈蕾,等.同时检测两种对虾病毒和 4 种弧菌的同步 PCR 方法的建立[J].渔业科学进展,2008,29(4):39-45
- [9] Zhao Z, Li L, Wan Z, et al. Simultaneous Detection and Identification of *Aspergillus* and Mucorales Species in Tissues Collected from Patients with Fungal Rhinosinusitis[J]. J. Clin. Microbiol, 2011,49(4):1501-1507
- [10] Chen S, Cao YY, Li TY, et al. Simultaneous detection of three wheat pathogenic fungal species by multiplex PCR[J]. Phytoparasitica, 2015,43(4):449-460