

基于 LAMP-CRISPR/Cas12a 的 *Ilyonectria mors-panacis* 快速检测技术

肖鹏举, 张慧莹, 高立强, 王强, 胡小平, 商文静*

西北农林科技大学植物保护学院 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室 西北农林科技大学作物抗逆与高效生产全国重点实验室 农业农村部西北黄土高原作物有害生物综合治理重点实验室, 陕西 杨凌 712100

摘要: *Ilyonectria mors-panacis* 是引起西洋参、人参锈腐病优势病原菌, 特异、灵敏和简便的快速病原检测技术是病害诊断、精准防控的关键。本研究基于 *Ilyonectria mors-panacis* 特异基因片段, 建立了一个 LAMP-CRISPR/Cas12a 快速检测技术体系, 该体系可在 61 °C 和 37 °C 恒温条件下 60 min 内完成对植物组织和土壤中目标菌的特异性快速检测, 检测灵敏度可达 10^{-3} fg/ μ L, 是普通 PCR 的 1 000 倍, 检测结果还可通过核酸试纸条颜色变化直观读取, 具有特异性强、灵敏度高、结果直观和操作简便等优点, 为中药材锈腐病早期诊断和精准防控提供了技术支撑。

关键词: *Ilyonectria mors-panacis*; 快速检测; 环介导等温扩增; CRISPR/Cas12a 检测技术

[引用本文]

肖鹏举, 张慧莹, 高立强, 王强, 胡小平, 商文静, 2025. 基于 LAMP-CRISPR/Cas12a 的 *Ilyonectria mors-panacis* 快速检测技术. 菌物学报, 44(9): 250075

Xiao PJ, Zhang HY, Gao LQ, Wang Q, Hu XP, Shang WJ, 2025. Rapid detection for *Ilyonectria mors-panacis* based on LAMP-CRISPR/Cas12a technology. Mycosystema, 44(9): 250075

资助项目: 秦巴生物资源与生态环境省部共建国家重点实验室开放基金(SLGPT2019KF04-03); 西洋参连作障碍成因与综合防控项目(XYS2023003)

This work was supported by the Open Fund of the State Key Laboratory of Qinba Biological Resources and Ecological Environment, Co-constructed by the Province and the Ministry (SLGPT2019KF04-03) and the Project of Mechanism and Prevention and Control System of Continuous Cropping Obstacles of American Ginseng (XYS2023003).

*Corresponding author. E-mail: shangwj@nwsuaf.edu.cn

Received: 2025-03-20; Accepted: 2025-04-22

Rapid detection for *Ilyonectria mors-panacis* based on LAMP-CRISPR/Cas12a technology

XIAO Pengju, ZHANG Huiying, GAO Liqiang, WANG Qiang, HU Xiaoping, SHANG Wenjing*

Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management of Ministry of Education, State Key Laboratory for Crop Stress Resistance and High-Efficiency Production, Key Laboratory of Integrated Pest Management on Crops in Northwestern Loess Plateau of Ministry of Agriculture and Rural Affairs, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: *Ilyonectria mors-panacis* is one of the dominant pathogens causing rust rot disease of American ginseng and ginseng. Specific, sensitive, and user-friendly rapid pathogen-detection technologies are critical for disease diagnosis and precise disease management. In this study, a LAMP-CRISPR/Cas12a rapid detection system was developed based on species-specific gene fragment of *Ilyonectria mors-panacis*. This system enables specific detection of the target pathogen in plant tissues and soil within 60 minutes under isothermal conditions of 61 °C and 37 °C, achieving a detection sensitivity of 10^{-3} fg/ μ L, or 1 000 times that of conventional PCR. Results can be visually obtained through color changes on nucleic acid test strips. With high specificity, ultra-sensitivity, visual interpretability, and operational simplicity, this system provides a robust technical platform for early diagnosis of rust rot disease in Chinese medicinal herbs.

Keywords: *Ilyonectria mors-panacis*; rapid detection; loop-mediated isothermal amplification; CRISPR/Cas12a detection technology

Ilyonectria 属真菌在自然界广泛分布于木本、草本植物及土壤中,多数为腐生菌或弱寄生真菌,是引起我国西洋参、人参锈腐病的主要病原菌(Cabral *et al.* 2012; Farh *et al.* 2018; 闫东 2020; 莫艳芳等 2024)。2019 年至 2021 年,课题组在陕西省留坝县分离到西洋参锈腐病的致病病原 *Ilyonectria mors-panacis* (A.A. Hildebr.) A. Cabral & Crous 和 *Ilyonectria robusta* (A.A. Hildebr.) A. Cabral & Crous, 其中 *I. mors-panacis* 为当地优势种,分离比及致病力均强于 *I. robusta* (耿英杰 2022)。西洋参锈腐病是典型的土传病害,病原主要以厚垣孢子、分生孢子和菌丝形态在土壤中越冬,严重危害参根的品质和产量。该病地上部症状极易与西洋参根腐病、菌核病等其他土传病害及生理病害混淆,参根症状通常会因环境条件、发病阶段、寄主生育时期的不同而出现显著差异(Seifert *et al.* 2003; 杨家学等 2009; 刘欣然 2019),目前生产上仍缺乏病害的田间诊

断和药材加工时的快速分级技术,是西洋参锈腐病综合防治和生产产品控的难点问题。

环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)技术利用链置换型 DNA 聚合酶,可在恒温条件下实现对靶标 DNA 的快速扩增,摆脱了对 PCR 仪、凝胶电泳等仪器的依赖,大大降低检测成本(傅俊范等 2019; Siegieda *et al.* 2021; 车晓莉等 2024)。CRISPR/Cas12a 系统(CRISPR-associated proteins 12a system)中的 Cas12a 蛋白可在 crRNA 的引导下对靶标 DNA 进行识别,并形成 Cas12a/crRNA/DNA 三元复合物,从而激活一端修饰了荧光基团另一端修饰猝灭基团的非特异性 ssDNA 报告分子的反式切割活性,通过检测体系荧光信号的变化,实现对目标 DNA 的快速检测,具有特异性强,灵敏度高等优点,在植物病原菌的现场检测中具有较强的应用前景(Doudna & Charpentier 2014; Chen *et al.* 2018; 卫艳珂等 2024)。

本研究拟利用 LAMP 等温扩增与 CRISPR/Cas12a 技术, 结合可视化核酸检测试纸条, 建立一个基于分子水平的快速、灵敏、特异、结果判断直观的 *I. mors-panacis* 检测体系, 为西洋参锈腐病的综合防控与加工品控提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株: *I. mors-panacis*、*I. robusta*、芬芳镰孢菌 *Fusarium redolens*、尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum*、禾谷镰孢菌 *Fusarium graminearum*、雪腐核盘菌 *Sclerotinia nivalis*、大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae*, 由西北农林科技大学作物病害监测与治理团队提供, 上述菌株均已完成形态学及分子生物学鉴定。

1.2 供试菌株培养及 DNA 提取

供试菌株分别接种到 PDA 培养基上, 置于 25 °C 恒温培养箱 7 d 后, 收集菌丝, 在液氮研钵中充分研磨, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA, Nanodrop 检测 DNA 的质量和浓度, -20 °C 保存供试。

1.3 引物、crRNA 及探针设计

基于 NCBI 数据库中的 *I. mors-panacis* 参考基因组(GenBank: GCA_030371025), 通过近缘种的比对筛选, 使用 New England Biolabs LAMP Primer Design Tools 软件设计 LAMP 特异性引物 LAMP-FIP/LAMP-BIP、LAMP-F3/LAMP-B3、

LAMP-LF/LAMP-LB, 使用 SnapGene 软件设计普通 PCR 引物 PCR-F/R、crRNA、荧光探针 ssDNA-FQ 和试纸条探针 ssDNA-FB 引物(表 1)。上述引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

1.4 LAMP 扩增体系建立

25 μL LAMP 反应体系: 2.5 μL 10×Isothermal Amplification Buffer, 1.5 μL MgSO₄(100 mmol/L), 3.5 μL dNTPs (10 mmol/L), 0.5 μL *Bst* DNA polymerase (8 U/μL), LAMP-FIP/BIP (10 μmol/L) 各 2 μL, LAMP-F3/B3 (10 μmol/L)各 0.5 μL, LAMP-LF/LB (10 μmol/L)各 0.5 μL, 1 μL 模板 DNA, 10 μL ddH₂O。充分混匀后将反应管置于恒温 65 °C 条件下反应 60 min, 反应产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测分析。

1.5 LAMP 扩增体系优化

LAMP 反应温度优化: 将 LAMP 反应温度分别设置为 57、58、59、60、61、62、63、64 和 65 °C, ddH₂O 为阴性对照, 试验重复 3 次, 优化出 LAMP 最佳反应温度。

LAMP 反应时间优化: 将 LAMP 反应时间分别设置为 20、30、40、50、60 和 70 min, ddH₂O 为阴性对照, 试验重复 3 次, 优化出 LAMP 最佳反应时间。

1.6 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系建立

参考 Wang Q *et al.* (2023)的方法建立 60 μL LAMP-CRISPR/Cas12a 试纸条检测体系: 6 μL NEB rCutsmart buffer, 6 μL LbCas12a (1 μmol/L),

表 1 PCR、LAMP 引物、crRNA 和探针序列
Table 1 Sequences of PCR、LAMP primers, crRNAs and probes

引物名称 Primer	序列 Sequence (5'→3')
PCR-F	ATGCCGTCCCTTTCTCGGTTTCATG
PCR-R	GCACCTCTGCCTTGGGATCAAGTG
LAMP-FIP	CTTACGAACGCCGACAGATCGCGGAAGCTGGATGAAGAT
LAMP-BIP	TGGGGGGTTTTTCGTATCCAGCTGGATGGGTTCTCCTCACAG
LAMP-F3	CCGTCCCTTTCTCGGTTCA
LAMP-B3	GCTGGCCAAGACATCAAGT
LAMP-LF	GTCGTCCGAGTTGCACGTC
LAMP-LB	AGAGTGTTCGAAAACATTGACAACC
crRNA	CTCGGACGACTCGTGCTGGATACATCTACACTTAGTAGAAATTA
ssDNA-FQ	FAM-/TTATTATT/-DBQI
ssDNA-FB	FAM-/TTATTATT/-Biotin

1.5 μL RNase Inhibitor (40 U/ μL), 18 μL crRNA (300 mmol/L), 24.5 μL Nuclease-free Water, 2 μL Probe FB (1 $\mu\text{mol/L}$), 2 μL LAMP 扩增产物。体系置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min, 将 Cas12/13 专用核酸试纸条(LeSunBio)的结合垫插入反应管中, 反应 5–10 min 后观察记录结果。在 CRISPR 体系中荧光探针一端标记为 FITC、另一端标记为 Biotin, 当 CRISPR 系统 Cas 酶未被激活时, 报告分子可使胶体金全部被捕获在质控线(C)处, 表明检测结果为阴性; 当有报告分子被 Cas 酶切断时, 与切断片段结合的胶体金无法被 C 线捕获, 但可被检测线(T)捕获而显色, 表明检测结果为阳性。在自然光下, 若 C 线和 T 线均出现或仅 T 线出现肉眼可见的红色条带判定为阳性结果; 若 C 线出现红色条带, T 线不显色则判定为阴性结果。

将上述反应体系中 ssDNA-FB 等量置换成 ssDNA-FQ, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下孵育 30 min, 反应产物利用酶标仪(SpectraMax i3x)检测荧光信号验证。

1.7 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系特异性验证

为了验证 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测技术对靶标菌是否具有高度特异性, 将已提取的所有供试菌株 DNA 作为模板, 采用优化后的 LAMP-CRISPR/Cas12a 体系进行检测, ddH₂O 为阴性对照, 试验设置 3 个重复。酶标仪检测荧光信号及试纸条检测线显色情况判断该体系是否具有特异性。

1.8 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系灵敏度验证

用微量分光光度计测定 *I. mors-panacis* 基因组 DNA 浓度, 梯度稀释为 100 pg/ μL 、10 pg/ μL 、1 000 fg/ μL 、100 fg/ μL 、10 fg/ μL 、1 fg/ μL 、10⁻¹ fg/ μL 、10⁻² fg/ μL 和 10⁻³ fg/ μL , 分别采用普通 PCR 和 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系进行检测, ddH₂O 为阴性对照, 试验重复 3 次。普通 PCR 反应结果用 1.5% 琼脂糖凝胶检测观察, LAMP-CRISPR/Cas12a 检测结果是依据酶标仪检测荧光信号或试纸条检测线是否出现显色反应判断。

1.9 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系的应用

1.9.1 土壤中目标菌的检测

I. mors-panacis 主要越冬态为土壤中的菌丝体、厚垣孢子和分生孢子。为验证 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系对带菌土壤的检测效果, 分别将 0.2、0.15、0.1、0.05 和 0.01 g *I. mors-panacis* 菌丝混合在 0.5 g (干重) 灭菌土壤中, CTAB 法提取 DNA 作为模板用 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测, 以无菌土壤为阴性对照, 试验重复 3 次。

1.9.2 田间样品的检测

为评估 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系的田间应用性, 2024 年 11 月于留坝西洋参产区随机采集 50 株二年生西洋参越冬参根, CTAB 法提取 DNA 作为模板, 分别进行普通 PCR 和 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测, 以 *I. mors-panacis* 基因组 DNA 为阳性对照, ddH₂O 为阴性对照, 试验重复 3 次。

1.10 数据处理

数据分析利用 GraphPad Prism 8 软件完成, 采用 T 检验和单因素方差分析(One-way ANOVA)方法进行统计学分析。其中*表示 $P < 0.05$ 具有统计学差异、**表示 $P < 0.01$ 具有显著统计学差异、***表示 $P < 0.001$ 具有极显著差异、ns 表示无显著性差异。

2 结果与分析

2.1 LAMP 扩增体系优化

2.1.1 LAMP 反应温度优化

基于 *Bst* DNA 聚合酶的最佳酶活温度, LAMP 反应分别设定 57、58、59、60、61、62、63、64 和 65 $^{\circ}\text{C}$ 共 9 个温度梯度, 以无菌 ddH₂O 为阴性对照, 反应时间为 60 min。通过琼脂糖凝胶电泳结果表明(图 1), 57–65 $^{\circ}\text{C}$ 范围内均可扩增出明显的梯形条带, 阴性对照无条带, 最终选择 61 $^{\circ}\text{C}$ 进行后续试验。

2.1.2 LAMP 反应时间优化

LAMP 反应时间分别设定为 20、30、40、50、60 和 70 min, ddH₂O 为阴性对照, 反应温度设置为 61 $^{\circ}\text{C}$ 。通过琼脂糖凝胶电泳结果表明(图 2), 30–70 min 可扩增出明显的梯形条带, 阴

性对照无条带，最终选用 30 min 进行后续试验。

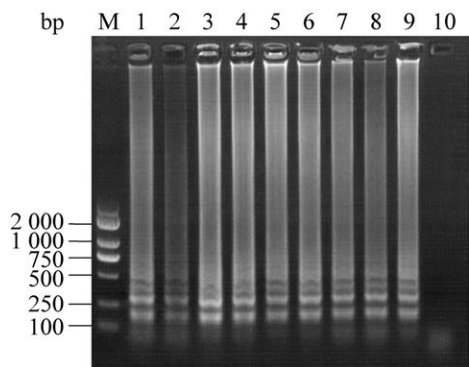


图1 LAMP 反应温度优化 M: DL2000 Marker; 泳道 1–10: 57、58、59、60、61、62、63、64、65 °C和阴性对照(反应温度为 65 °C)
Fig. 1 Optimization of LAMP reaction temperature. M: DL2000 Marker; Lanes 1–10: 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65 °C, and negative control (temperature: 65 °C).

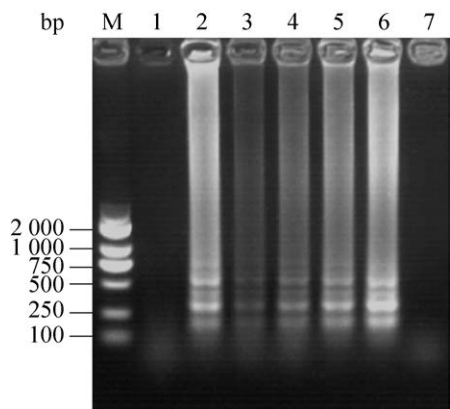


图2 LAMP 反应时间优化 M: DL2000 Marker; 泳道 1–7: 20、30、40、50、60、70 min 和阴性对照(反应时间为 70 min)
Fig. 2 Optimization of LAMP reaction time. M: DL2000 Marker; Lanes 1–7: 20, 30, 40, 50, 60, 70 min, and negative control (reaction time: 70 min).

2.2 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系特异性验证

使用所有供试菌株 DNA 作为模板进行 LAMP-CRISPR/Cas12a 体系检测，结果显示仅 *I. mors-panacis* 产生明显荧光信号，与其他菌株的荧光信号呈极显著差异(图3A)，试纸条检测结果

本研究建立的 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系可特异性检测 *I. mors-panacis*。

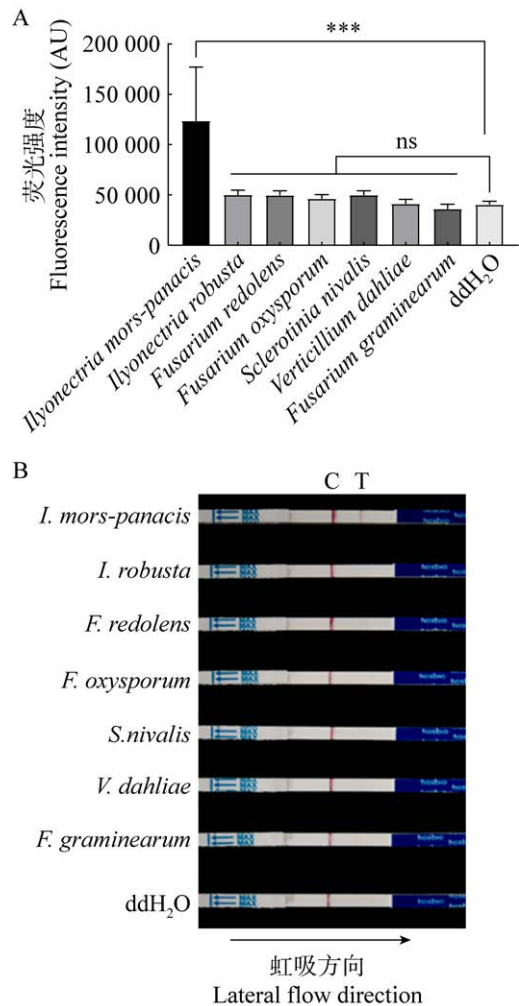


图3 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系特异性验证
A: 荧光检测结果，*** $P<0.001$ ，ns 表示无显著性差异；B: 试纸条检测结果. C: 质控线；T: 检测线
Fig. 3 Specificity validation of the LAMP-CRISPR/Cas12a detection system. A: Fluorescence detection results, *** $P<0.001$, ns denotes no significant difference; B: Test strip detection results, C: Control line; T: Test line.

2.3 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系灵敏度验证

对靶标基因组 DNA 进行梯度稀释后，分别用普通 PCR 和本研究建立的 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系进行检测，结果显示，普通 PCR 检测下限仅为 1 fg/μL (图 4A)，LAMP-CRISPR/

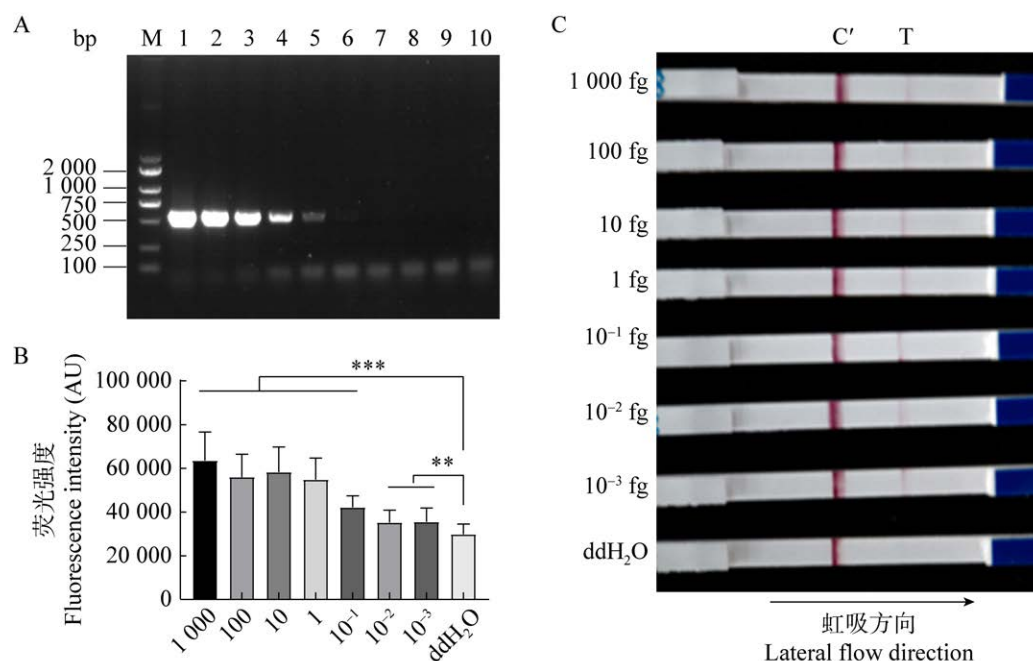


图 4 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系灵敏度验证 A: PCR 检测结果, M: DL2000 Marker; 泳道 1–10 分别为 100 pg/μL、10 pg/μL、1 000 fg/μL、100 fg/μL、10 fg/μL、1 fg/μL、 10^{-1} fg/μL、 10^{-2} fg/μL、 10^{-3} fg/μL, ddH₂O; B: 荧光检测结果, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$; C: 试纸条检测结果, C': 质控线; T: 检测线

Fig. 4 Sensitivity validation of the LAMP-CRISPR/Cas12a detection system. A: PCR detection results, M: DL2000 Marker; Lanes 1–10: 100 pg/μL, 10 pg/μL, 1 000 fg/μL, 100 fg/μL, 10 fg/μL, 1 fg/μL, 10^{-1} fg/μL, 10^{-2} fg/μL, 10^{-3} fg/μL, ddH₂O; B: Fluorescence detection results, *** $P < 0.001$, ** $P < 0.01$; C: Test strip detection results, C': Control line; T: Test line.

Cas12a 检测灵敏度可达 10^{-3} fg/μL (图 4B, 4C), 其灵敏度约为普通 PCR 检测的 1 000 倍。

2.4 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系的应用

2.4.1 土壤中目标菌的检测

采用人工模拟方法验证 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系对土壤中目标菌的检测效果, 结果显示, LAMP-CRISPR/Cas12a 试纸条检测体系能检测到 0.5 g 土壤中含有 0.01 g 的目标菌 (图 5), 表明该检测体系可用于复杂土壤样品中病原菌的检测。

2.4.2 田间样品的检测

分别用普通 PCR 方法和 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系对田间样品进行检测, 结果显示, 普通 PCR 在 50 份样品中仅检测出 2 份阳性样品 (图 6A), 而 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系在 50 份样品中检测出 8 份阳性样品 (图 6B), 表明 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系可大大提高

检出率, 显著提高检测结果的灵敏度和准确性, 完全适用于病害田间监测和西洋参加工品控。

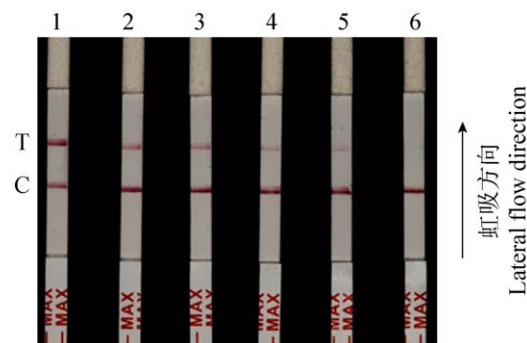


图 5 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系对土壤中目标菌的检测 1–6: 0.2、0.15、0.1、0.05、0.01 g 和阴性对照; C: 质控线; T: 检测线

Fig. 5 Detection of target fungi in soil using the LAMP-CRISPR/Cas12a system. 1–6: 0.2, 0.15, 0.1, 0.05, 0.01 g, and negative control; C: Control line; T: Test line.

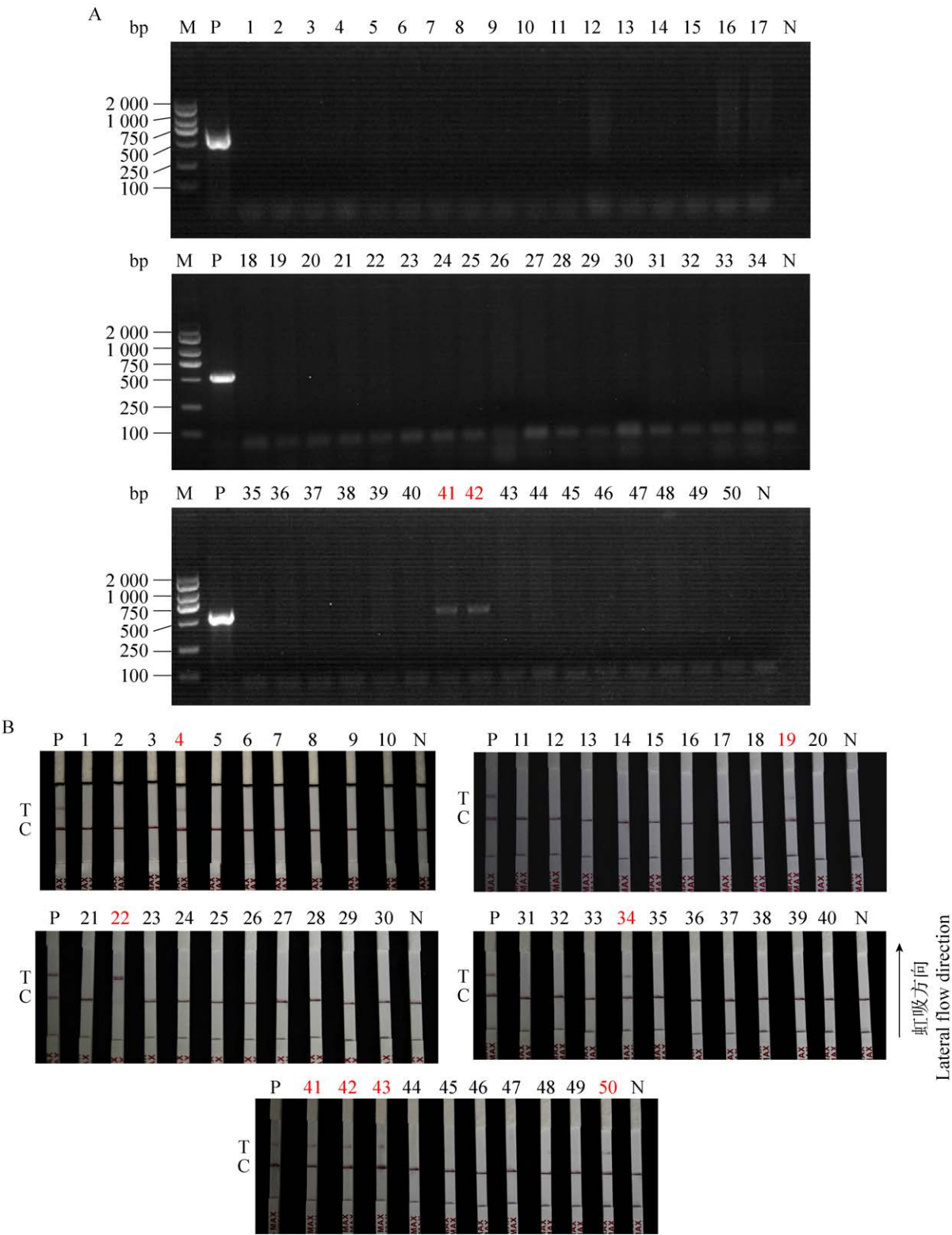


图 6 PCR 和 LAMP-CRISPR/Cas12a 检测体系对西洋参田间样品检测 A: PCR 检测结果; B: 试纸条检测结果; P: 阳性对照; N: 阴性对照; C: 质控线; T: 检测线

Fig. 6 Detection of American ginseng field samples using PCR and the LAMP-CRISPR/Cas12a detection system. A: PCR test results; B: Test strip detection results. P: Positive control; N: Negative control; C: Control line; T: Test line.

3 讨论

由 *Ilyonectria* 属真菌引起的西洋参、人参锈腐病在我国各个产区普遍发生严重,罹病参根皂苷含量大幅下降(Rahman & Punja 2005),造成产量和品质的双重损失,且有报道表明(赵方杰 2020; 耿英杰 2022),病原在土壤中的大量积累是引起西洋参连作障碍的重要原因之一,已成为阻碍我国西洋参、人参产业健康发展的瓶颈问题。目前,生产中锈腐病田间诊断和药品加工品控主要依赖症状识别,或采用病原菌形态、PCR 等传统病原鉴定方法,鉴定过程耗时长,操作专业性强,对仪器设备要求较高,难以达到快速、灵敏和特异的检测需求(杨家学等 2009; 傅俊范等 2019; 汤慧丽 2023)。

LAMP 等温扩增和 CRISPR/Cas12a 相关检测技术因简便、灵敏度高、特异性强及耗时短等诸多优点,已广泛应用于医学、农业等检测领域(田擎等 2016)。现代核酸检测技术在水参、西洋参产业中的应用更多集中在五加科人参属植物的混伪品辨识中,赵源等(2015)设计了人参的 LAMP 引物,用于现场快速鉴别人参混伪品,检测灵敏度可达普通 PCR 的 10 倍; Kesanakurti *et al.* (2021)设计并合成特异性水解探针,利用 qPCR (quantitative real-time polymerase chain reaction),使人参和西洋参的鉴别不再受样品形态和处理方式影响,并具有较高的灵敏性、特异性及可重复性; Wang X *et al.* (2023)利用 LAMP 扩增产生大量包含 G-四链体的序列, G-四链体与血红素结合形成脱氧核酶(deoxyribozyme),该酶能催化过氧化氢(H_2O_2)出现颜色变化,用于快速鉴别人参和西洋参,不但增加了检测的特异性和灵敏度,也使鉴别结果更加直观。现代核酸检测技术应用于西洋参、人参病原物鉴定和检测的报道较少, Farh *et al.* (2019)建立的 qPCR 检测方法,能够特异、灵敏地检测到连作障碍土壤中的 *I. mors-panacis*; 姜伊琳(2023)应用 qPCR 方法,在无症状人参根、茎、叶、种子及种植土壤中均检测到 *I. robusta* 的存在;高宇等(2022)建立了多重 PCR 检测方法,能够同时检测人参种植土壤中

的 *F. oxysporum*、*I. destructans* 和 *Rhizoctonia solani*,检测灵敏度为 1 ng/ μ L。但以上检测技术对场地、仪器和操作专业性要求较高,检测灵敏度不够,为此,本研究建立了基于 LAMP-CRISPR/Cas12a 技术,结合核酸试纸条可视化的快速检测体系,该体系可在 61 °C 和 37 °C 条件下, 60 min 内完成对发病组织中的 *I. mors-panacis* 的快速检测,检测灵敏度达到 10^{-3} fg/ μ L,是普通 PCR 的 1 000 倍,检测结果可通过试纸条直观读取,为西洋参、人参种植户、基层植保工作人员以及中药材加工企业提供了一种简单易用的检测方法。但检测体系验证中仅对田间随机采集的 50 株西洋参样品进行了目标病原检测,暂未作发病率的调查和检测,因此,对田间应用中可能的假阳性/假阴性结果及其原因有待将来进一步核实。

本研究研发的快速检测方法基本规避了传统检测方法的主要缺点,且检测灵敏度高于传统检测方法。但该体系在田间应用中尚有不足,如目标病原基因组 DNA 的简易高效提取仍存在技术难点,检测过程中会出现气溶胶污染引起的假阳性等问题。后续研究将简化高效 DNA 的提取方法,研发单管反应快速检测试剂盒,真正实现植物病害田间诊断的便携化。

作者贡献

肖鹏举: 温度和时间优化、特异性及灵敏度验证、土壤及田间样品检测、试验数据整理分析, 论文初稿撰写; 张慧莹: 材料制备及 DNA 的提取; 高立强: 试验材料采集; 王强: 论文审阅与修订; 胡小平: 试验整体设计、监督与指导; 商文静: 试验数据整体分析, 论文审阅与修订。

利益冲突

作者声明,该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Cabral A, Groenewald JZ, Rego C, Oliveira H, Crous PW, 2012. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola*

- species complex. *Mycological Progress*, 11(3): 655-688
- Che XL, Liang TT, Qu Y, Liu DQ, 2024. Establishment and application of real-time fluorescent LAMP rapid detection of *Fusarium solani* of *Panax notoginseng* root rot. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 32(4): 939-948 (in Chinese)
- Chen JS, Ma E, Harrington LB, Costa MD, Tian XR, Palefsky JM, Doudna JA, 2018. CRISPR-Cas12a target binding unleashes indiscriminate single-stranded DNase activity. *Science*, 360(6387): 436-439
- Doudna JA, Charpentier E, 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 346(6213): 1258096
- Farh ME, Han JA, Kim YJ, Kim JC, Singh P, Yang DC, 2019. Discovery of a new primer set for detection and quantification of *Ilyonectria mors-panacis* in soils for ginseng cultivation. *Journal of Ginseng Research*, 43(1): 1-9
- Farh ME, Kim YJ, Kim YJ, Yang DC, 2018. *Cylindrocarpon destructans*/*Ilyonectria radicola*-species complex: causative agent of ginseng root-rot disease and rusty symptoms. *Journal of Ginseng Research*, 42(1): 9-15
- Fu JF, Liu XR, Li ZB, Zhou RJ, Wang D, Han YL, 2019. Molecular identification of *Cylindrocarpon (Ilyonectria)* species associated with ginseng root rust rot in northeastern China. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 50(3): 339-344 (in Chinese)
- Gao Y, Feng S, Feng ZW, Song MH, Wang X, Yang LN, Liu ZH, Lu BH, Gao J, 2022. Establishment and application of multiplex PCR for detection of three soil-borne diseases of ginseng. *Journal of Jilin Agricultural University*, <https://doi.org/10.13327/j.jjlau.2021.1683> (in Chinese)
- Geng YJ, 2022. Study on biology and spatial distribution in soil of *Panax quinquefolium* rusty root rot pathogens in Liuba. MS Thesis, Northwest A&F University, Yangling. 1-60 (in Chinese)
- Jiang YL, 2023. Establishment and application of qPCR for detection of *Ilyonectria robusta* causing ginseng rusty root rot. MS Thesis, Jilin Agricultural University, Changchun. 1-61 (in Chinese)
- Kesanakurti P, Ragupathy S, Faller AC, Shanmughanandhan D, Buongiorno F, Della Noce I, Lu Z, Zhang Y, Newmaster SG, 2021. Development of hydrolysis probe-based qPCR assays for *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* for detection of adulteration in ginseng herbal products. *Foods*, 10(11): 2705
- Liu XR, 2019. Molecular identification and screening of fungicides of *Cylindrocarpon (Ilyonectria)* species associated with ginseng root rust rot in northeastern China. MS Thesis, Shenyang Agricultural University, Shenyang. 1-73 (in Chinese)
- Mo YF, Pu T, Luo Q, Shi ZF, Yang TY, Chen QB, Yang PW, 2024. Preliminary studying on Yunnan apple root rot caused by *Ilyonectria vredehoekensis*. *Acta Phytopathologica Sinica*, <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000952> (in Chinese)
- Rahman M, Punja ZK, 2005. Biochemistry of ginseng root tissues affected by rusty root symptoms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43(12): 1103-1114
- Seifert KA, McMullen CR, Yee D, Reeleder RD, Dobinson KF, 2003. Molecular differentiation and detection of ginseng-adapted isolates of the root rot fungus *Cylindrocarpon destructans*. *Phytopathology*, 93(12): 1533-1542
- Siegieda DG, Panek J, Frac M, 2021. "Shining a LAMP" (loop-mediated isothermal amplification) on the molecular detection of phytopathogens *Phytophthora* sp. and *Phytophthora cactorum* in strawberry fields. *Pathogens*, 10(11): 1453
- Tang HL, 2023. Study on quality evaluation of American ginseng of different origins and its correlation with soil factors. MS Thesis, Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan. 1-88 (in Chinese)
- Tian Q, Zhang HF, Zeng DD, Yao Y, Ren LR, Wang YC, Zheng XB, 2016. Rapid detection of *Verticillium dahliae* using a loop-mediated isothermal amplification assay. *Acta Phytopathologica Sinica*, 46(6): 721-729 (in Chinese)
- Wang Q, Qin M, Coleman JJ, Shang WJ, Hu XP, 2023. Rapid and sensitive detection of *Verticillium dahliae* from complex samples using CRISPR/Cas12a technology combined with RPA. *Plant Disease*, 107(6): 1664-1669
- Wang X, Liu M, Li Y, Zhou X, Zhang Z, Dong S, Shen M, Wang M, Wang H, Liu L, 2023. Development and application of a visualization method for identification of *Panax* species with LAMP and a DNase. *Analytical Biochemistry*, 679: 115298
- Wei YK, Wang Q, Xu XM, Hu XP, Shang WJ, 2024. Development and application of rapid detection system for *Fusarium pseudograminearum* based on RPA-CRISPR/Cas12a. *Mycosystema*, 43(8): 171-179 (in Chinese)
- Yan D, 2020. Taxonomy of fungal complex causing rusty root rot disease of *Panax ginseng* and the transcriptome

- analysis of *Ilyonectria robusta* infecting *P. ginseng* under biocontrol bacterial stress. MS Thesis, Jilin Agricultural University, Changchun. 1-63 (in Chinese)
- Yang JX, Jiao XL, Gao WW, 2009. Advances in the root diseases of *Panax quinquefolium*. Plant Protection, 35(6): 30-35 (in Chinese)
- Zhao FJ, 2020. Preliminary study on the causes and reduction measures of continuous cropping obstacles of *Panax quinquefolium* L. in Liuba, Shaanxi. MS Thesis, Northwest A&F University, Yangling. 1-61 (in Chinese)
- Zhao Y, Song Y, Li MF, Zhao Z, Ding XL, Xu J, Zhu YY, 2015. Research on the identification of *Panax ginseng* by loop-mediated isothermal amplification. Plant Quarantine, 29(5): 30-34 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 车晓莉, 梁婷婷, 曲媛, 刘迪秋, 2024. 三七根腐病菌茄腐镰刀菌的实时荧光 LAMP 快速检测方法的建立与应用. 农业生物技术学报, 32(4): 939-948
- 傅俊范, 刘欣然, 李自博, 周如军, 王丹, 韩月玲, 2019. 东北地区人参锈腐病菌的分子鉴定. 沈阳农业大学学报, 50(3): 339-344
- 高宇, 冯时, 冯志伟, 宋明海, 王雪, 杨丽娜, 刘泽华, 卢宝慧, 高洁, 2022. 3 种人参土传病害病菌多重 PCR 检测方法的建立与应用. 吉林农业大学学报, <https://doi.org/10.13327/j.jjlau.2021.1683>
- 耿英杰, 2022. 陕西留坝西洋参锈腐病菌生物学及其土壤空间分布研究. 西北农林科技大学硕士论文, 杨凌. 1-60
- 姜伊琳, 2023. 人参锈腐病菌 *Ilyonectria robusta* qPCR 检测方法的建立及应用研究. 吉林农业大学硕士论文, 长春. 1-61
- 刘欣然, 2019. 东北地区人参锈腐病菌分子鉴定及药剂筛选. 沈阳农业大学硕士论文, 沈阳. 1-73
- 莫艳芳, 普特, 罗强, 施竹凤, 杨童雨, 陈齐斌, 杨佩文, 2024. *Ilyonectria vredenhoekensis* 引起云南苹果根腐病研究初报. 植物病理学报, <https://doi.org/10.13926/j.cnki.apps.000952>
- 汤慧丽, 2023. 不同产地西洋参的品质评价及其与土壤因子的相关性研究. 山东中医药大学硕士论文, 济南. 1-88
- 田擎, 张海峰, 曾丹丹, 姚艳, 任林荣, 王源超, 郑小波, 2016. 环介导等温扩增技术检测大丽轮枝菌. 植物病理学报, 46(6): 721-729
- 卫艳珂, 王强, 徐向明, 胡小平, 商文静, 2024. 假禾谷镰孢 RPA-CRISPR/Cas12a 快速检测体系的建立与应用. 菌物学报, 43(8): 171-179
- 闫东, 2020. 人参锈腐病病原分类鉴定及生防细菌胁迫下 *Ilyonectria robusta* 侵染人参的转录组分析. 吉林农业大学硕士论文, 长春. 1-63
- 杨家学, 焦晓林, 高微微, 2009. 西洋参根部病害研究进展. 植物保护, 35(6): 30-35
- 赵方杰, 2020. 陕西留坝西洋参连作障碍成因及消减措施初步研究. 西北农林科技大学硕士论文, 杨凌. 1-61
- 赵源, 宋云, 李明福, 赵竹, 丁小兰, 许瑾, 朱有勇, 2015. 基于 LAMP 的人参物种鉴定技术的研究. 植物检疫, 29(5): 30-34