

烟草黑胫病菌 RPA 检测方法的建立

杨懿德¹, 范志朋², 周婷², 许大凤³, 李林秋¹,
鄢敏¹, 杨洋¹, 羊国根², 周本国^{3*}, 潘月敏^{2*}

(1. 四川省烟草公司宜宾市公司, 宜宾 644600; 2. 安徽农业大学植物保护学院, 植物病虫害生物学与绿色防控安徽普通高校重点实验室, 合肥 230036; 3. 安徽省农业科学院烟草研究所, 合肥 230031)

摘要:烟草黑胫病是由烟草疫霉 (*Phytophthora nicotianae*) 引起的烟草重要土传病害。建立了烟草黑胫病菌 RPA 快速检测方法, 结合侧流层析试纸条, 该方法在 38 °C 恒温条件下 30 min 内完成可视化检测, 不需要 PCR 仪等仪器设备。以烟草黑胫病菌 YPT1 为靶标基因设计 RPA 引物 YPTIF 和 YPTIR, 以及 RPA 探针 YPTI-LFD-probe, 对烟草黑胫病菌具有较高的检测特异性, 其检测下限为 10 pg·μL⁻¹, 与普通 PCR 一致。因此, 建立的烟草黑胫病菌 RPA 检测技术具有快速、简单、实用等特点, 为烟草黑胫病菌的快速检测提供了新的方法。

关键词:烟草黑胫病菌; 重组酶聚合酶技术; 特异性; 灵敏性

中图分类号: S435.72

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)04-0547-05

Development of recombinase polymerase amplification for detection of *Phytophthora nicotianae*

YANG Yide¹, FAN Zhipeng², ZHOU Ting², XU Dafeng³, LI Linqiu¹, YAN Min¹,
YANG Yang¹, YANG Guogen², ZHOU Benguo³, PAN Yue-min²

(1. Sichuan Tobacco Company Yibin City Company, Yibin 644600, 2. School of Plant Protection, Key Laboratory of Biology and Sustainable Management of Plant Disease and Pests of Anhui Higher Education Institute, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, 3. Tobacco Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

Abstract: *Phytophthora nicotianae* is a soil-borne phytopathogenic oomycete that causes tobacco black shank. In this study, the recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow dipstick (LFD) technology for the rapid and sensitivity detection of *P. nicotianae* was successful developed. The optimum amplification of RPA products was observed at 38 °C within 30 min without PCR thermal cycler. The primers YPTIF, YPTIR and probe YPTI-LFD-probe for RPA assay were designed based on the YPT1 gene, which showed high specificity to *P. nicotianae*. The limit of detection of RPA assay was 10 pg·μL⁻¹ genomic DNA, indicating that RPA has an equal sensitivity to that of conventional PCR. The establishment of RPA assay for the detection of *P. nicotianae* has the characteristics of rapidity, simpleness and practicality, which provides a new method for the rapid detection of *P. nicotianae*.

Key words: *Phytophthora nicotianae*; RPA; specificity; sensitivity

烟草黑胫病是烟草生产上最具毁灭性的土传病害之一, 该病主要危害烟草的根和茎基部, 也可危害叶片。目前, 该病广泛分布于世界各地, 我国各烟区除黑龙江以外均有发生, 发生较重的有云南、贵州、四川等省份, 给我国烟草产业造成重大经济损失, 年均损失超过 1.23 亿元^[1]。烟草黑胫病是由卵菌门疫霉属烟草疫霉 (*Phytophthora nicotianae*) 所引起的, 目前已鉴定到烟草黑胫病菌生理小种 4

个, 分别是 0 号、1 号、2 号和 3 号^[2]。我国烟草黑胫病菌主要是 0 号和 1 号生理小种, 其中 0 号小种为优势小种, 危害最为严重^[3-5]。近些年来, 烟叶种植面积不断减少, 并且集中在西南山区省份, 导致烟叶连作频繁和种植品种集中, 烟草黑胫病发病率呈现上升趋势^[6]。化学防治是控制烟草黑胫病的主要手段, 长期施用化学药剂易诱导病菌产生抗药性, 引起农药残留量超标; 绿色防控技术的推广应用,

收稿日期: 2022-01-10

基金项目: 四川省烟草公司科技项目“烟草黑胫和根黑腐病原菌快检方法与产品开发”(SCYC201904) 资助。

共同第一作者简介: 杨懿德, 农艺师。E-mail: 757364325@qq.com 范志朋, 硕士研究生。E-mail: 2506229152@qq.com

* 通信作者: 潘月敏, 博士, 教授。E-mail: panyue-min2008@163.com 周本国, 研究员。E-mail: bgzhou@163.com

有利于烟叶安全生产,保障生态安全^[7-8]。

烟草黑胫病的早期快速诊断,可为烟草黑胫病防控精准施药提供重要依据,是绿色防控技术推广应用的重要基础。烟草黑胫病菌的传统检测方法主要依据病原菌形态及生理生化特征,随着分子生物学技术的发展,基于核酸检测的聚合酶链式反应(PCR)被广泛采纳^[9]。传统检测方法和常规 PCR 检测手段,均对操作人员的专业素养要求较高且需要专业仪器,无法在田间完成烟草黑胫病菌的快速检测。因此,为满足在不同环境条件下的扩增要求,自 1990 年代初以来,已开发出一系列核酸等温扩增方法,如滚环扩增技术(rolling circle amplification, RCA)、环介导等温扩增技术(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、依赖核酸序列的扩增(nucleic acid sequence-based amplification, NASBA)、链置换扩增技术(strand displacement amplification, SDA)、依赖解旋酶扩增技术(helicase-dependent amplification, HDA)和重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)等^[10]。重组酶聚合酶扩增技术因其具有简单、高灵敏度、高特异性、成本低及不受检测场地限制等优点,已广泛应用于各类植物病原物的快速检测^[11-12]。在 ATP 参与下,重组酶与引物结合成复合体,在 DNA 双链中寻找同源序列,引发单链置换反应,启动 DNA 合成,对模板上的目标区域进行指数式扩增。防止置换的单链被进一步替换,解开的 DNA 链会与单链 DNA 结合蛋白(SSB)结合^[11-12]。RPA 不需要热变性即可完成扩增反应,反应温度 23~45 °C 均可,反应时间仅需 10~20 min,便能检出扩增产物^[13-14]。

目前,RPA 检测技术已应用于如辣椒疫霉、马铃薯晚疫病菌、青枯病菌、水稻黑条矮缩病毒和小麦全蚀病菌等植物病原物的快速检测^[15-18],而关于烟草黑胫病菌的 RPA 检测方法还鲜见报道。本研究以烟草黑胫病菌 *YPT1* 序列为靶标基因设计 RPA 扩增引物 *YPT1F* 和 *YPT1R*,以及探针引物

YPT1-LFD-probe,结合侧流层析试纸条检测技术,建立烟草黑胫病菌 RPA 快速检测方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

供试菌株:烟草黑胫病菌(*Phytophthora nicotianae*)、烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、烟草青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)、烟草根黑腐病菌(*Thielaviopsis basicola*)、玉米纹枯病菌(*Rhizoctonia solani*)、假禾谷镰孢菌(*Fusarium pseudograminearum*)层出镰孢菌(*Fusarium proliferatum*)和大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)等均由安徽农业大学真菌学及植物真菌病害实验室分离和保存。

试剂:RPA 检测试剂盒 TwistAmp nfo,英国 TwistDx 公司;侧向流动试纸条 HybriDetect,德国 Milenia Biotec 公司;2× SanTaq PCR Mix,生工生物工程(上海)股份有限公司;DL2000 DNA Marker,宝生物工程(大连)有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 基因组 DNA 提取

采用 CTAB 法,提取供试病原菌物的基因组 DNA^[19];按照生工生物工程(上海)股份有限公司细菌基因组 DNA 快速抽提试剂盒操作指南,提取烟草青枯病菌基因组 DNA。利用超微量分光光度计 NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)测定 DNA 浓度,分别将 DNA 稀释至 100 ng·μL⁻¹,于 -20°C 保存备用。

1.3 烟草黑胫病菌 RPA 引物和探针的设计

根据烟草黑胫病菌的 *YPT1*(accession number: KJ567642.1)基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物 *YPT1F* 和 *YPT1R*,其中下游引物 *YPT1R* 的 5'端用生物素(Biotin)标记。以扩增片段内与 *YPT1R* 同源性最低区域为模板,设计长度为 50 nt 的探针 *YPT1-LFD-probe*,5'端用 FAM 标记,3'端用 C3-Spacer 修饰,探针 32 nt 处的“T”替换为四氢呋喃(THF)(表 1)。

表 1 RPA 扩增引物和探针

Table 1 The primers and probe used for RPA

引物/探针	序列(5'-3')
<i>YPT1F</i>	CAGGATTGCTGACATGATATCAACTGTTCTGCAG
<i>YPT1R</i>	Biotin-CAGCTCTTTTCCTTGGATCTTCTCTCGATAAG
<i>YPT1-LFD-probe</i>	FAM-CCGATGTACCAAATCACGTGTGTGTCTGTAG(THF)GGGACACGGCCGGACAGG-(C3-Spacer)

1.4 RPA 反应条件及扩增产物可视化检测

按照 RPA 检测试剂盒 TwistAmp nfo 操作指南,RPA 反应体系如下:Primer Free Rehydration buffer

29.5 μL、上下游引物(10 μmol·L⁻¹)各 2.1 μL、探针引物(10 μmol·L⁻¹) 0.6 μL 和模板 DNA(100 ng·μL⁻¹) 2 μL,补水至 47.5 μL,充分振荡混匀。然

后加入 2.5 μL 醋酸镁 ($280 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 充分混匀后于 $38\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中反应 20 min。

RPA 扩增产物采用侧向流动试纸条 (lateral flow dipstick, LFD) 检测。RPA 扩增产物用含 0.05% (V/V) Tween 20 的 PBS (PBST) 缓冲液稀释 50 倍后, 用微量移液器取 10 μL 稀释液滴加到侧向流动试纸条上样区, 然后将侧向流动试纸条于 PBST 缓冲液中静置 3 ~ 5 min, 观察试纸条检测带显色情况。

1.5 常规 PCR 扩增

PCR 扩增体系: $2\times$ San Taq PCR Mix 25 μL 、上下游引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 2 μL 、模板 ($100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 2 μL , 加 ddH₂O 至 50 μL 。PCR 扩增程序: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 30 s, $56\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, $72\text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 30 s, 34 个循环; $72\text{ }^\circ\text{C}$ 再延伸 5 min。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 以 DL2000 DNA Marker 为参照。

1.6 烟草黑胫病菌 RPA 检测的特异性测定

以烟草黑胫病菌、烟草赤星病菌、烟草青枯病菌、烟草根黑腐病菌、玉米纹枯病菌、假禾谷镰孢菌层出镰孢菌、大豆疫霉等供试病原菌的基因组 DNA 为模板, 利用烟草黑胫病菌 *YPT1* 的 RPA 引物和探针进行 RPA 检测。同时, 利用常规 PCR 扩增验证引物 *YPTIF* 和 *YPTIR* 的特异性。以 ddH₂O 为阴性对照, 试验重复 3 次以上。

1.7 烟草黑胫病菌 RPA 检测的灵敏度测定

以不同浓度的烟草黑胫病菌基因组 DNA 溶液 ($10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 为模板, 分别进行 RPA 检测和常规 PCR 扩增, 测定 RPA 检测与常规 PCR 扩增的灵敏度。以 ddH₂O 为阴性对照, 试验重复 3 次以上。

2 结果与分析

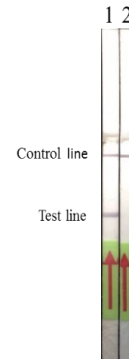
2.1 烟草黑胫病 RPA 可视化检测

以烟草黑胫病菌 DNA ($100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 为模板进行 RPA 扩增, 其侧向流动试纸条的质控线和检测线均出现条带 (阳性反应), 而阴性对照 ddH₂O 仅质控线显现条带 (阴性反应) (图 1), 表明所设计的引物和探针可用于烟草黑胫病菌的 RPA 检测。

2.2 烟草黑胫病菌 RPA 引物和探针特异性检测

以烟草黑胫病菌 DNA 进行 RPA 扩增, 侧向流动试纸条质控线和检测线均有条带, 而以其他病原菌 DNA 为模板的 RPA 扩增只有质控带 (图 2)。常规 PCR 扩增与 RPA 检测结果一致, 仅以烟草黑胫

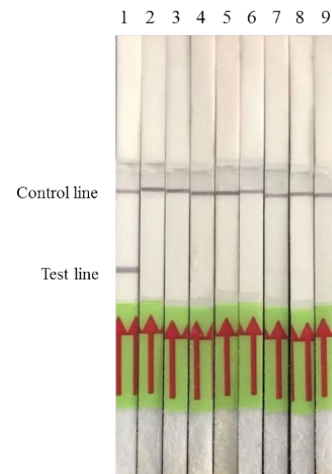
病菌的 DNA 为模板 PCR 扩增出大小为 347 bp 目的条带 (图 3), 表明所设计的引物 *YPTIF* 和 *YPTIR* 可用于 RPA 和 PCR 特异性检测烟草黑胫病菌。



1. 烟草黑胫病菌; 2. ddH₂O。

图 1 烟草黑胫病菌的 RPA 检测

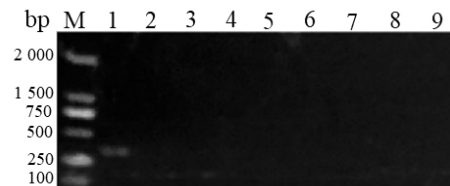
Figure 1 RPA detection for *P. nicotianae*



1. 烟草黑胫病菌; 2. 烟草赤星病菌; 3. 烟草青枯病菌; 4. 烟草根黑腐病菌; 5. 假禾谷镰孢菌; 6. 玉米纹枯病菌; 7. 层出镰孢菌; 8. 大豆疫霉; 9. ddH₂O。

图 2 烟草黑胫病菌 RPA 检测的特异性

Figure 2 Specificity of RPA detection for *P. nicotianae*



M. DL2000 DNA Marker; 1. 烟草黑胫病菌; 2. 烟草赤星病菌; 3. 烟草青枯病菌; 4. 烟草根黑腐病菌; 5. 假禾谷镰孢菌; 6. 玉米纹枯病菌; 7. 层出镰孢菌; 8. 大豆疫霉; 9. ddH₂O。

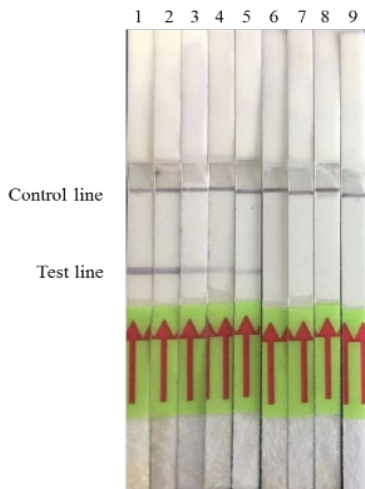
图 3 烟草黑胫病菌常规 PCR 扩增的特异性

Figure 3 Specificity of PCR detection for *P. nicotianae*

2.3 烟草黑胫病菌 RPA 和 PCR 检测的灵敏性

以不同浓度的烟草黑胫病菌 DNA 进行 RPA 扩增, 随着模板 DNA 浓度的降低, RPA 检测带的浓

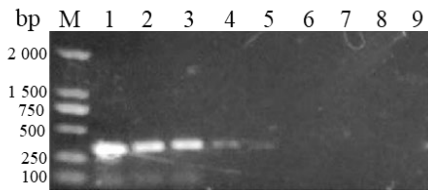
度逐渐下降。当 DNA 浓度为 $100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时, 侧向流动试纸条均出现质控带和检测带; DNA 浓度低于 $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 时, 侧向流动试纸条仅出现质控带(图 4)。同样, 常规 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳显示, DNA 浓度为 $100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 和 $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 均能扩增出大小为 347 bp 目的条带, 而 DNA 浓度低于 $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 均无产物扩增(图 5), 表明 RPA 检测的灵敏度与常规 PCR 扩增相当, 其检测下限均为 $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 。



1. $100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 2. $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 3. $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 4. $100 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 5. $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 6. $1 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 7. $100 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 8. $10 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 9. ddH₂O。

图 4 烟草黑胫病菌 RPA 检测的灵敏度

Figure 4 Sensitivity of RPA detection for *P. nicotianae*



M. DL2000 DNA Marker; 1. $100 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 2. $10 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 3. $1 \text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 4. $100 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 5. $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 6. $1 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 7. $100 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 8. $10 \text{ fg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$; 9. ddH₂O。

图 5 烟草黑胫病菌常规 PCR 扩增的灵敏度

Figure 5 Sensitivity of PCR detection for *P. nicotianae*

3 讨论

植物病原菌的监测与预警, 是有效控制植物病害、保障农业生产安全的基础。常规 PCR 技术已广泛应用于病原菌的监测, 由于实验条件的限制, 无法在田间实现现场检测。随着等温扩增技术的发展, 在一定条件下实现核酸扩增, 已经成为田间检测的重要手段^[20]。

目前, LAMP 作为最常见的等温扩增技术, 已

广泛应用于植物病原菌的检测。LAMP 技术具有廉价、操作简单等优点, 但也存在特异性和敏感性易受温度波动影响、引物存在难以设计和易形成引物二聚体导致假阳性等方面的不足^[21]。RPA 作为最近几年兴起的等温扩增技术, 可以不受温度波动影响, 扩增耗时少, 在植物病原菌检测应用日益增多。LAMP 需要 6 条引物才能完成扩增, RPA 只需 2 条引物, 其对靶标序列和引物要求也相对较低, 需要 $60 \sim 65 \text{ }^\circ\text{C}$ 甚至更高的反应温度, 才能完成 DNA 扩增^[22]。RPA 扩增产物长度应控制在 500 bp 以内, 尤其是扩增长度在 $100 \sim 250 \text{ bp}$ 之间, 可显著提高 RPA 的扩增效率和灵敏度^[23]。本研究设计的引物 YPTIF 和 YPTIR, 其扩增产物大小为 347 bp , 同样具有较高的特异性和灵敏度。

本研究建立的 RPA 检测体系, 与常规 PCR 扩增结果一致, 均能特异性检测烟草黑胫病菌。并明确了烟草黑胫病菌 RPA 检测的灵敏度, 其检测下限为 $10 \text{ pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, 显著高于其他疫霉属植物病原卵菌的 RPA 检测技术^[24]。另一方面, PCR 和 LAMP 检测技术平均耗时 2 h 和 1 h , RPA 检测仅需 30 min (其中 RPA 扩增反应 20 min , 侧向流动试纸条显色 $3 \sim 5 \text{ min}$), 检测时间大为缩短, 其检测效率明显优于 PCR 和 LAMP 检测技术^[18]。

综上所述, 本研究建立的 RPA 检测技术具有良好的特异性和灵敏度, 且扩增条件要求不高, 因此在烟草黑胫病菌的田间监测方面有较好的应用前景。

参考文献:

- [1] 王凤龙, 周义和, 任广伟. 中国烟草病害图鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2019.
- [2] GUTIÉRREZ W A, MILA A L. A rapid technique for determination of races of *Phytophthora nicotianae* on tobacco[J]. Plant Dis, 2007, 91(8): 985-989.
- [3] 朱贤朝, 郭振业, 刘保安. 在山东省烟草黑胫病菌 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) 中出现 0 和 1 号小种的分化[J]. 中国烟草, 1986 (2): 8-10.
- [4] 于海芹, 焦芳婵, 李德团, 等. 烟草品种黑胫病抗性鉴定及不同接种方法间的相关性分析[J]. 内蒙古农业科技, 2007 (6): 48-51.
- [5] LIU H, MA X, YU H Q, et al. Genomes and virulence difference between two physiological races of *Phytophthora nicotianae*[J]. Gigascience, 2016, 5(1): 3.
- [6] 邵高明. 攀枝花市烟草主要病虫害调查及防控技术研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2017.
- [7] 赵辉, 王喜英, 刘国权, 等. 烟草黑胫病发生因素及综合防治研究进展[J]. 湖南农业科学, 2020(11): 99-103.

- [8] 丁伟. 烟草青枯病与黑胫病绿色防控关键技术[J]. 植物医生, 2020, 33(1): 21-26.
- [9] 陆星星, 刘伟阳, 徐后娟. 烟草三类根腐类病害病原真菌多重 PCR 检测方法的建立[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2016, 47(4): 520-524.
- [10] ZHAO Y X, CHEN F, LI Q, et al. Isothermal amplification of nucleic acids[J]. Chem Rev, 2015, 115(22): 12491-12545.
- [11] LOBATO I M, O'SULLIVAN C K. Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances[J]. Trends Analyt Chem, 2018, 98: 19-35.
- [12] 景志刚, 董浩, 狄栋栋, 等. 重组酶聚合酶扩增技术研究进展[J]. 生物技术通报, 2016, 32(6): 47-53.
- [13] YU J, SHEN D, DAI T, et al. Rapid and equipment-free detection of *Phytophthora capsici* using lateral flow strip-based recombinase polymerase amplification assay[J]. Lett Appl Microbiol, 2019, 69(1): 64-70.
- [14] LU X Y, ZHENG Y, ZHANG F, et al. A rapid, equipment-free method for detecting *Phytophthora infestans* in the field using a lateral flow strip-based recombinase polymerase amplification assay[J]. Plant Dis, 2020, 104(11): 2774-2778.
- [15] LI C F, JU Y L, SHEN P F, et al. Development of recombinase polymerase amplification combined with lateral flow detection assay for rapid and visual detection of *Ralstonia solanacearum* in tobacco[J]. Plant Dis, 2021, 105(12): 3985-3989.
- [16] ZHAO C, SUN F, LI X J, et al. Reverse transcription-recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip for detection of rice black-streaked dwarf virus in plants[J]. J Virol Methods, 2019, 263: 96-100.
- [17] 鞠玉亮, 沈鹏飞, 范志朋, 等. 小麦全蚀病菌重组酶聚合酶检测方法的建立及应用[J]. 植物保护, 2020, 46(5): 150-155, 180.
- [18] IVANOV A V, SAFENKOVA I V, ZHERDEV A V, et al. The potential use of isothermal amplification assays for in-field diagnostics of plant pathogens[J]. Plants, 2021, 10(11): 2424.
- [19] ZHANG Y J, ZHANG S, LIU X Z, et al. A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains[J]. Lett Appl Microbiol, 2010, 51(1): 114-118.
- [20] LAU H Y, BOTELLA J R. Advanced DNA-based point-of-care diagnostic methods for plant diseases detection[J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 2016.
- [21] BALDI P, LA PORTA N. Molecular approaches for low-cost point-of-care pathogen detection in agriculture and forestry[J]. Front Plant Sci, 2020, 11: 570862.
- [22] ZANOLI L M, SPOTO G. Isothermal amplification methods for the detection of nucleic acids in microfluidic devices[J]. Biosensors, 2013, 3(1): 18-43.
- [23] LI J, MACDONALD J, von STETTEN F. A comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification[J]. Analyst, 2019, 144(1): 31-67.
- [24] MILES T D, MARTIN F N, COFFEY M D. Development of rapid isothermal amplification assays for detection of *Phytophthora* spp. in plant tissue[J]. Phytopathology, 2015, 105(2): 265-278.