

辣椒疫霉菌 RT-PCR 检测技术的建立及应用

程颖超, 康华军, 石延霞, 柴阿丽, 张红杰, 谢学文*, 李宝聚*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 根据辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici* Leonian) 与致病疫霉菌 (*Phytophthora infestans*) 及其他 8 种常见土传病害病原菌 *Actin* 基因序列差异, 设计并筛选出辣椒疫霉菌的特异性引物 YM2F/YM2R, 建立辣椒疫霉菌的实时荧光定量 PCR 检测体系, 并利用该体系定量检测人工模拟带菌样品及田间发病土壤样品中的辣椒疫霉菌。试验结果表明, 利用该引物建立的实时荧光定量 PCR 检测体系线性关系良好, 灵敏度为 $1 \times 10^{-1} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 是普通 PCR 的 100 倍。该体系无需病原菌的分离培养即可对土壤中的辣椒疫霉菌进行快速、特异且定量检测。对田间土壤样品的检测结果表明, 在一定范围内病害发生、流行程度与病原菌密度成正比, 从而为该病的流行监测和早期防控提供科学依据。

关键词: 辣椒疫霉菌; 南瓜; 荧光定量 PCR; 检测技术; *Actin*

中图分类号: S 642.1; S 436.418 **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X (2018) 05-0997-10

Development and Application of Real-time Fluorescent Quantitative PCR for Detection of *Phytophthora capsici*

CHENG Yingchao, KANG Huajun, SHI Yanxia, CHAI Ali, ZHANG Hongjie, XIE Xuewen*, and LI Baoju*

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: According to the different bases of *Actin* gene sequences between *Phytophthora capsici* Leonian, *P. infestans* and other eight common soil pathogenic pathogens, we designed and screened out a specific primer pair YM2F/YM2R to establish a real-time fluorescent quantitative PCR detection assay of *P. capsici*, and using this assay to monitor *P. capsici* in soil samples prepared by artificial simulation and collecting form attacked yields. The results showed that the assay had a good liner relationship and a high sensitivity of $1 \times 10^{-1} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ DNA, which is 100 times more than normal PCR. *P. capsici* could be detected rapidly, specifically and quantitatively in infected soil without isolation or cultivation by the RT-PCR assay. The detection result of soil samples collected form attacked field indicated that the incidence and epidemiology of disease were proportional to the density of pathogenic bacteria within a certain range, which can provide scientific basis for the epidemic and early prevention of the disease.

Keywords: *Phytophthora capsici*; pumpkin; real-time fluorescent quantitative PCR; detection assay; *Actin*

收稿日期: 2018-01-19; **修回日期:** 2018-03-06

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFD0201010); 公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (201303112); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: Libaoju@caas.cn, xiexuewen@caas.cn)

辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici* Leonian) 是重要土传病害辣椒根腐型疫病以及南瓜疫病的致病病原菌。辣椒根腐型疫病是一种毁灭性土传真菌病害, 可造成叶片枯萎、果实腐烂、茎秆出现坏死斑以及整株萎蔫死亡等多种症状 (易图永和谢丙炎, 2002)。蔬菜设施栽培中, 其环境条件较适宜病原菌生长和积累, 使其从苗期至果期均能发病, 造成严重的经济损失。据报道, 其每年给全世界仅蔬菜产业造成的损失就高达 10 亿美元 (Lamour et al., 2012)。此外, 近些年南瓜疫病也成为主要病害。在中国, 籽用南瓜的主产区黑龙江省, 由辣椒疫霉菌引起的南瓜疫病轻者减产 20%~30%, 重者减产 50% 以上甚至绝产 (刘志刚, 2011)。2010 年, 黑龙江省东宁县籽用南瓜疫病爆发, 导致大面积绝产 (朱正霞, 2011)。

传统检测植物病害的方法为直接对发病症状进行观察, 分离纯化病原物, 再进行形态学鉴定。但是辣椒疫霉菌引起的病害极易与腐霉菌 (*Pythium*)、镰刀菌 (*Fusarium* spp.) 引起的病害相混淆 (赵伟 等, 2012), 且病原物的分离纯化鉴定过程长达 2~3 周, 给防治工作带来不便 (罗加风 等, 2012)。近年来分子检测技术已被成功应用于检测病原菌, 其中以 PCR 为基础的实时荧光定量 PCR 技术在快速准确鉴定且量化病原菌中的应用越来越广泛。目前实时荧光定量 PCR 检测技术已成功用于大豆疫霉菌 (Bienapfl et al., 2011)、冬生疫霉菌 (杜洪忠 等, 2013)、雪松疫霉菌 (纪睿 等, 2014) 和丁香疫霉菌 (刘劼 等, 2016) 的快速检测和鉴定, 但对于辣椒疫霉菌的报道较少。

本研究中根据辣椒疫霉菌的肌动蛋白基因序列 (*Actin*) 及土壤中其他常见病原菌的 *Actin* 序列差异, 设计辣椒疫霉菌的特异性引物并建立其实时荧光定量 PCR 检测体系, 实现对该病原菌的特异、灵敏、快速且定量的鉴定。

1 材料与方法

1.1 供试菌株培养与 DNA 提取

供试菌株: 疫霉属的 2 株病原卵菌, 其他种属 6 株真菌, 2 株病原细菌, 共 10 株, 均由中国农业科学院蔬菜花卉研究所菜病综防组分离、鉴定和保存 (表 1)。

表 1 供试菌株信息
Table 1 Isolates used in the test

序号 No.	菌株编号 Isolate code	病原菌名称 Pathogen name	引起病害 Disease
1	LJ12010805	辣椒疫霉菌 <i>Phytophthora capsici</i>	疫病 <i>Phytophthora</i> blight
2	FQ09092001	致病疫霉菌 <i>Phytophthora infestans</i>	晚疫病 Late blight
3	HG15060516	尖孢镰刀菌 <i>Fusarium oxysporum</i>	根腐病 Root rot
4	HG13060501	茄病镰刀菌 <i>Fusarium solani</i>	根腐病 Root rot
5	31636	短密木霉菌 <i>Trichoderma brevicompactum</i>	生防菌 Biocontrol bacteria
6	31642	拟康宁木霉菌 <i>Trichoderma koningiopsis</i>	生防菌 Biocontrol bacteria
7	Itr-2	绿色木霉菌 <i>Trichoderma viride</i>	生防菌 Biocontrol bacteria
8	JGFQ15080702	茄链格孢 <i>Alternaria solani</i>	早疫病 Early blight
9	FQ1204120102	胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种 <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. <i>carotovorum</i>	软腐病 Soft rot
10	FQ1112080401	劳尔氏菌属茄科青枯菌 <i>Ralstonia solanacearum</i>	青枯病 Bacterial wilt

供试疫霉菌采用燕麦培养基进行活化, 3 d 后挑取适当大小的菌块于液体燕麦培养基培养, 其他供试真菌菌株于 PDA 培养基活化 3 d 后, 挑取适当大小的菌块于 PD 培养基培养。28 °C 培养 5 d 至有菌丝球出现, 4 层纱布过滤去除菌液收集菌丝体后于真空冷冻干燥机冻干, 采用改良 CTAB 法提取 DNA (Ausubel et al., 1994)。供试细菌菌株采用 NA 平板活化后挑取单菌落于 NB 培养基中, 28 °C

培养 24 h, 采用离心柱型细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根公司) 提取 DNA。提取的 DNA 保存于 -20 °C 备用。

1.2 引物设计

从 GenBank 中下载 8 种供试菌株 (细菌除外) 的肌动蛋白 (*Actin*) 基因部分序列, 登录号分别为 JQ429142.1、KM522995.1、KY798318.1、KM231204.1、JN133583.1、DQ381954.1、DQ111970.1 和 JQ671723.1。应用 MEGA 软件对辣椒疫霉菌的 *Actin* 序列与其他供试菌株 *Actin* 序列进行比对, 利用 Primer 5.0 软件对其差异位点设计特异性 RT-PCR 引物。通过 Blast program (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对所设计的引物序列与其它生物种属之间的同源性。引物由北京博迈德基因公司合成后对特异性进行筛选与评价。

1.3 普通 PCR 检测引物特异性

以辣椒疫霉菌以及其他 9 种对照菌株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。总体积为 20 μL, 其中 2× Taq PCR Master Mix 10 μL, 上、下游引物各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。反应程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 补充延伸 10 min。1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果。

1.4 荧光定量 PCR 检测引物特异性

以辣椒疫霉菌以及其他 9 种对照菌株基因组 DNA 为模板进行实时荧光定量 PCR 扩增。总体积为 20 μL, 其中 2× SuperReal PreMix Plus 10 μL, 上、下游引物各 0.2 μL, DNA 模板 1 μL, 50× ROX Reference Dye 0.4 μL, ddH₂O 补足至 20 μL。反应程序: 95 °C 预变性 10 min, 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 32 s, 共 40 个循环。在升温时收集荧光信号, 检测引物特异性。

1.5 普通 PCR 与实时荧光定量 PCR 分别检测引物灵敏度

测得质粒 DNA 的初始浓度为 1.0×10^4 pg · μL⁻¹, 按 10 倍梯度稀释 10 个浓度后分别进行普通 PCR 扩增和实时荧光定量 PCR 扩增以检测引物灵敏度。

1.6 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

采用离心柱型琼脂糖凝胶回收试剂盒 (北京天根公司) 将对辣椒疫霉菌特异性扩增的 245 bp 扩增产物进行凝胶回收, 回收产物连接到载体 pMD18-T Vector 上后转入到 50 μL Trans-T1 感受态细胞中, 提取质粒 DNA 并进行 PCR 扩增后送北京博迈德公司进行测序。阳性克隆质粒 DNA 浓度以 10 倍梯度稀释, 以不同稀释倍数的 DNA 为模板, 构建实时荧光定量 PCR 标准曲线, 每个反应 3 次重复。反应体系及条件同上。以模板 DNA 浓度对数值为横坐标, 以反应循环数 (Ct) 值为纵坐标绘制标准曲线。

1.7 人工模拟带菌样品检测

供试作物 ‘哈金龙’ 南瓜, 其种子购自山东寿光丰农种业有限公司。

将供试辣椒疫霉菌 (编号为 LJ12010805) 于燕麦培养基平板活化 5 d, 挑取适当大小的菌块于液体燕麦培养基中 28 °C 培养 7 d 至有菌丝球出现, 用豆浆机打碎菌丝后拌土接种于未灭菌的基质土中。南瓜长至一片真叶后将其定植于菌土中, 对照采用不接菌的普通基质, 温室中常规管理。

分别于定植后 0、1、3、5、7、15 和 30 d 从南瓜根际土壤进行取样, 采用离心柱型土壤基因组

DNA 提取试剂盒（北京天根公司）提取土壤中总 DNA，并进行实时荧光定量 PCR 检测。

根据下列公式（Cottyn et al., 2011）计算基因拷贝数 $N = C \times AN / (n \times mw)$ 。其中 C 表示 DNA 浓度， AN 表示阿伏伽德罗常数 (6.023×10^{23} molecules · mol⁻¹)， n 表示基因组包含的碱基数 ($\times 10^6$ bp)， mw 表示单个碱基的平均分子量 (660 g · mol⁻¹)。

1.8 不同发病程度田块中病原菌的定量检测

采用 5 点取样法，分别于 2015 和 2016 年 5 月中旬在黑龙江省牡丹江市林口县不同发病程度的 3 个田块中（分别编号为 T1、T2、T3）采集土样，5 个点采集的土样混为 1 份，共 3 份即 3 次重复，带回实验室后每份采用对角线法（李继平等，2013）称取 0.5 g 土壤（余土置于 -20 °C 保存备用）利用离心柱型土壤基因组 DNA 提取试剂盒（北京天根公司）提取土壤中总 DNA，并进行实时荧光定量 PCR 检测以定量土样中的病原菌，计算拷贝数。另外，分别于 2015 和 2016 年的 8 月中旬（南瓜疫病高发期）调查田间标记采样点周围 20 株南瓜的发病情况，计算病情指数并分析前期检测的菌量与其病害发生和流行的关系。

病害调查采用南瓜疫病分级标准：0 级：无病；1 级：茎上出现些微水渍状的病斑；2 级：茎上病斑扩展，但不超过株高 1/4，不萎焉；3 级：病部超过整株 1/4，向下延伸至根部不超过株高 3/4，茎基部轻微萎焉；4 级：病部超过整株或蔓延至全株，包括根和叶柄，茎基部严重缢缩，叶片枯萎，已死亡。

病情指数 = Σ (各级病株数 × 相应级别) / (调查总株数 × 最大级数) × 100。

2 结果与分析

2.1 设计引物验证

运用改良的 CTAB 法提取辣椒疫霉菌（编号为 LJ12010805）DNA，并设计 11 对引物对其 DNA 进行 PCR 检测，结果表明：仅引物 YM2F/2R (YM2F: 5'-ATTCCTCCTGATAGATAG-3', YM2R: 5'-CCCTCATCACAGAATGC-3') 扩增条带单一，阴性对照无扩增条带（图 1）。引物序列在 GenBank 比对与其他生物种属之间无同源性。

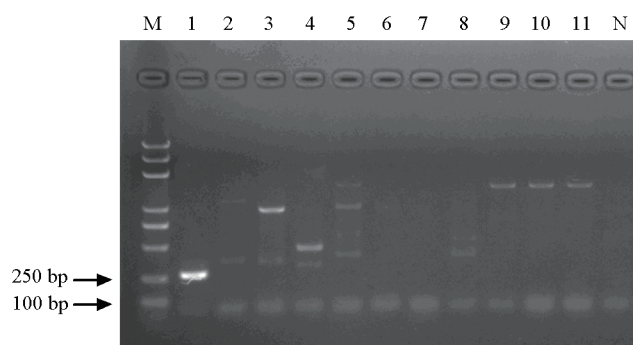


图 1 引物设计及筛选结果

Fig. 1 Primer designed and screened results

M: BM5000 DNA marker; 1: YM2F/2R; 2: YM3F/3R; 3: YM4F/4R; 4: YM5F/5R; 5: YM6F/6R; 6: YM7F/7R;
7: YM8F/8R; 8: YM9F/9R; 9: YM10F/10R; 10: YM11F/11R; 11: YM12F/12R; N: ddH₂O.

2.2 普通 PCR 检测引物特异性

采用引物 YM2F/2R 对 10 种供试菌株 (表 1) DNA 进行 PCR 扩增, 凝胶电泳结果显示, 仅辣椒疫霉菌在 245 bp 处有扩增, 其他对照菌株与阴性对照均无扩增现象, 说明引物 YM2F/2R 特异性良好 (图 2)。

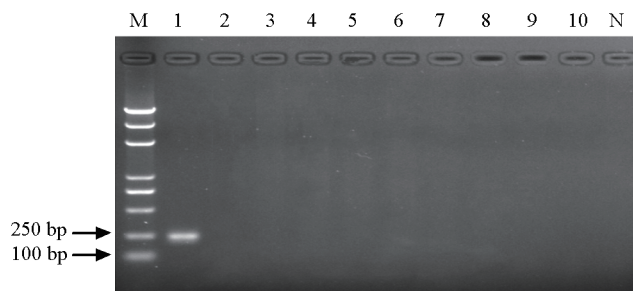


图 2 普通 PCR 检测引物特异性结果

M: BM5000 DNA marker; 1: 辣椒疫霉菌; 2: 致病疫霉菌; 3: 尖孢镰刀菌; 4: 茄病镰刀菌; 5: 短密木霉菌; 6: 拟康宁木霉菌; 7: 绿色木霉菌; 8: 茄链格孢; 9: 胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种; 10: 劳尔氏菌属茄科青枯菌; N: 阴性对照 ddH₂O。

Fig. 2 Primer-specific detection by normal PCR

M: BM5000 DNA marker; 1: *Phytophthora capsici*; 2: *Phytophthora infestans*; 3: *Fusarium oxysporum*; 4: *Fusarium solani*; 5: *Trichoderma brevicompactum*; 6: *Trichoderma koningiopsis*; 7: *Trichoderma viride*; 8: *Alternaria solani*; 9: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; 10: *Ralstonia solanacearum*; N: Negative control ddH₂O.

2.3 荧光定量 PCR 检测引物特异性

荧光定量 PCR 检测结果表明, 引物 YM2F/2R 对辣椒疫霉菌 (编号为 LJ12010805) 模板 DNA 扩增良好 (图 3), 溶解曲线只有单一峰, 无非特异性扩增及引物二聚体现象 (图 4)。

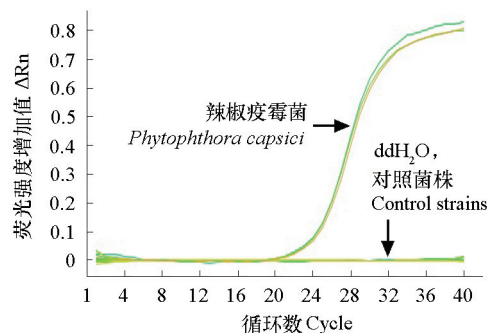


图 3 RT-PCR 检测引物特异性——扩增曲线

Fig. 3 Primer-specific detection by RT-PCR
—Amplification curve

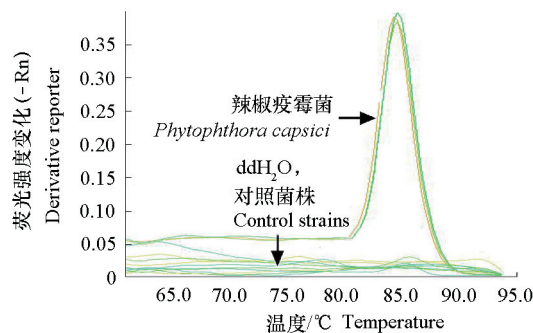


图 4 RT-PCR 检测引物特异性——溶解曲线

Fig. 4 Primer-specific detection by RT-PCR
—Melt curve

2.4 普通 PCR 与实时荧光定量 PCR 分别检测引物灵敏度

将质粒 DNA 稀释为 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^{-5} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 的浓度梯度分别进行普通 PCR 及实时荧光定量 PCR 扩增, 结果表明引物 YM2F/2R 及所建立的 PCR 体系对 $1.0 \times 10^4 \sim 10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度的 DNA 有扩增 (图 5), 故该引物的普通 PCR 灵敏度为 $10 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; 而引物 YM2F/2R 及所建立的实时荧光定量 PCR 检测体系对 $1.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^{-1} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 浓度的 DNA 均有扩增 (图 6), 故其灵敏度为 $1.0 \times 10^{-1} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。即实时荧光定量 PCR 比常规 PCR 灵敏度高 100 倍。

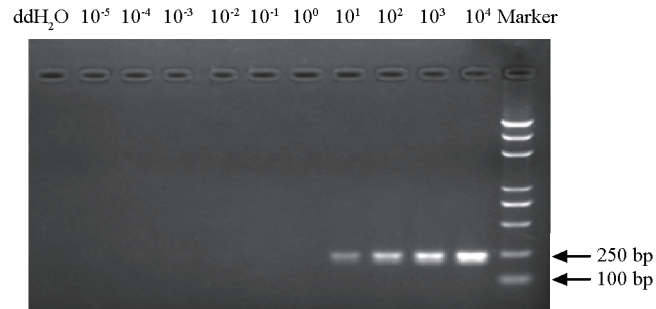


图 5 普通 PCR 检测引物灵敏度

Fig. 5 Sensitivity of normal PCR using the YM2F/2R primer pair

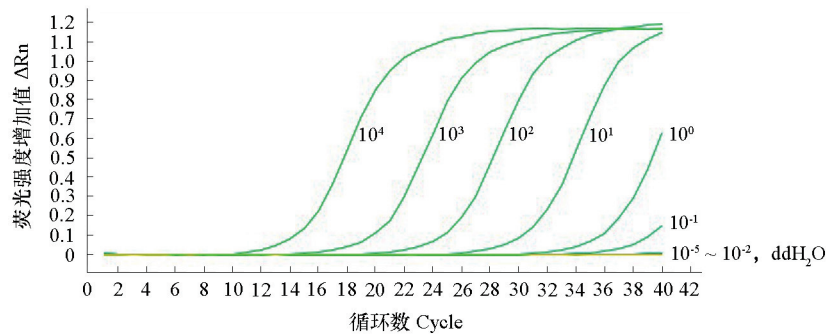


图 6 荧光定量 PCR 检测引物灵敏度

Fig. 6 Sensitivity of RT-PCR using the YM2F/2R primer pair

2.5 辣椒疫霉菌荧光定量 PCR 标准曲线的建立

将重组质粒 DNA 进行 10 倍浓度梯度 ($1.6 \times 10^4 \sim 1.6 \times 10^{-4} \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 稀释制备标准品, 以不同稀释倍数的质粒 DNA 为模板, 构建实时荧光定量 PCR 标准曲线。以质粒 DNA 浓度对数为横坐标, 反应循环数 (Ct) 为纵坐标绘制标准曲线 (图 7)。该体系线性关系良好 ($Y = 41.026 - 3.7026X$), $R^2 > 0.97$ 。

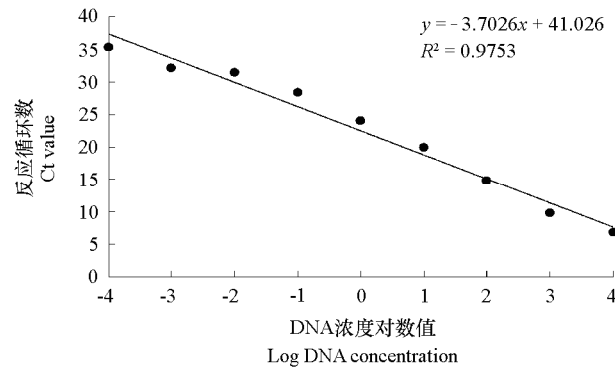


图 7 辣椒疫霉菌荧光定量 PCR 标准曲线

Fig. 7 Real-time fluorescence quantitative standard curve of *Phytophthora capsici*

2.6 人工模拟带菌样品检测

用所建立的实时荧光定量 PCR 检测体系分别扩增不同时间（定植后 0、1、3、5、7、15 和 30 d）取样后菌土与对照土中提取的 DNA，同时采用辣椒疫霉菌 DNA 作阳性对照，不加辣椒疫霉菌 DNA 的为阴性对照。荧光定量 PCR 检测结果表明，阳性对照与接种后的菌土 DNA 有扩增曲线（图 8），且溶解曲线在 85 °C 左右有单一的峰值（图 9）。对照土样 DNA 与阴性对照无扩增。随着时间的变化，基质土中辣椒疫霉菌 DNA 拷贝数总体呈上升趋势，且在定植后 15 d 时最大，为 9.79×10^7 copys · g⁻¹（图 10）。即表明该检测体系可用于土壤中辣椒疫霉菌的定量检测，不受土壤中其他 DNA 的干扰，可满足快速诊断疫病的要求。

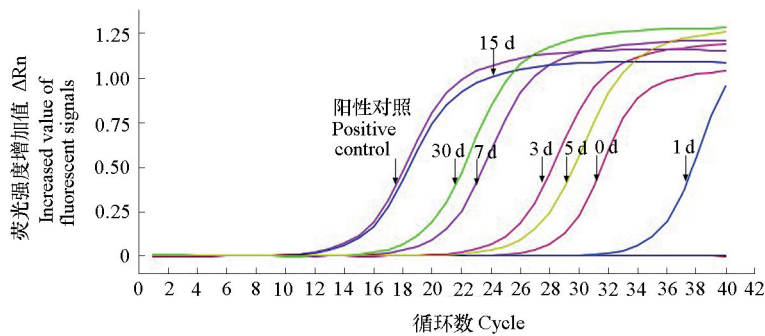


图 8 RT-PCR 检测定植后 30 d 菌土中的辣椒疫霉菌——扩增曲线

Fig. 8 The detection of *P. capsici* in the soil from 0 to 30 d after colonization by RT-PCR—Amplification curve

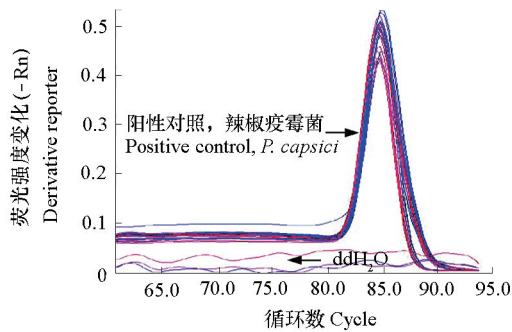


图 9 RT-PCR 检测定植后 30 d 菌土中的辣椒疫霉菌——溶解曲线

Fig. 9 The detection of *P. capsici* in the soil from 0 to 30 d after colonization by RT-PCR—Melt curve

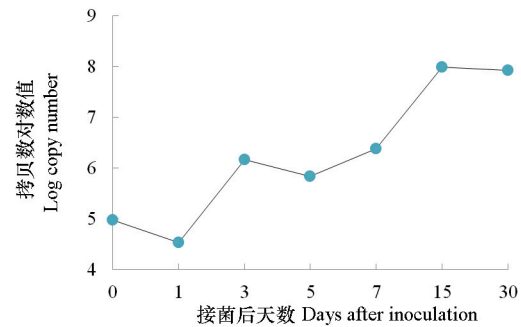


图 10 土壤中辣椒疫霉菌的动态监测结果

Fig. 10 The result of dynamic monitoring of *Phytophthora capsici* in soil

2.7 不同发病程度田块中病原菌的定量检测结果

利用建立的实时荧光定量 PCR 检测体系分别定量检测 3 个田块（T1、T2、T3）中的辣椒疫霉菌，并于病害高发期调查疫病发生情况（表 2）。结果表明该体系可以用于田间土壤中辣椒疫霉菌的定量检测，在一定范围内，田间发病程度与病原菌密度成正比，即土壤中菌量越高越有利于病害的发生与流行。

表 2 不同田块中辣椒疫霉菌定量检测及发病情况调查结果

Table 2 The result of quantitative detection of *Phytophthora capsici* and disease investigation in different fields

地块 Block	2015			2016		
	菌量/ (copies · g ⁻¹)	发病率/%	病情指数	菌量/ (copies · g ⁻¹)	发病率/%	病情指数
	Number of bacteria	Incidence rate	DI	Number of bacteria	Incidence rate	DI
T1	5.88 × 10 ¹³ C	22.00 C	12.75 C	7.88 × 10 ¹⁴ C	23.00 C	13.75 C
T2	7.60 × 10 ¹⁵ B	40.00 B	35.00 B	2.74 × 10 ¹⁵ B	39.00 B	30.00 B
T3	8.81 × 10 ¹⁷ A	79.00 A	72.00 A	3.85 × 10 ¹⁸ A	81.00 A	74.00 A

注：同列不同字母表示经 Duncan's 法检验在 0.01 水平差异显著。

Note: Different letters in the same column indicate significant difference at 0.01 level by Duncan's test.

3 讨论

辣椒疫霉菌是一种重要的土传病害病原菌，其寄主范围较广，可引起辣椒、番茄、黄瓜和南瓜等多种重要蔬菜作物的疫病。该病原菌侵入植株后迅速蔓延，短时间内即可暴发成灾，且其症状与传统镰刀菌引起的病害症状相似，在生产防治上难度较大（李宝聚等，2008），易给蔬菜生产造成毁灭性的灾害，故建立灵敏、特异、快速的辣椒疫霉菌检测方法尤为重要。

1999年，首次被应用于植物病理学研究的实时荧光定量 PCR 技术（Böhm et al., 1999）是基于普通 PCR，将核酸扩增、杂交、光谱分析和实时检测等多项技术融合在一起的一项创造性技术，与常规 PCR 相比，其操作更简便快速，敏感性更强，重复性且特异性更好。

本研究基于辣椒疫霉菌与常见土传病害病原菌及生防菌的肌动蛋白（Actin）序列差异设计的引物 YM2F/YM2R 特异性强，在 10 株供试菌株中，仅对辣椒疫霉菌扩增出 245 bp 的条带，可将其与致病疫霉菌、尖孢镰刀菌和茄病镰刀菌等直接区分。利用该引物建立的 RT-PCR 检测体系，可以实现直接对土壤中辣椒疫霉菌的快速定量检测及实时监测其动态变化，对辣椒疫霉菌 DNA 检测下限为 0.1 pg · μL⁻¹，相对普通 PCR 而言，提高了 100 倍，此灵敏度表现与其在检测其他病原菌时相似，如已建立的首蓿萎蔫病菌（*C. m. subsp. insidiosus*）、丁香疫霉菌（*Phytophthora hibernalis*）、托拉斯假单胞杆菌（*Pseudomonas tolaasii* Paine）的荧光定量 PCR 检测方法均较普通 PCR 提高了 100 倍（漆艳香等，2003；徐岩岩等，2013；刘劫等，2016）。而赵伟等（2015）利用 *PcYpt1*-LAMP 检测辣椒疫霉菌 DNA 的浓度仅为 100 pg · μL⁻¹，因此，就检测下限而言，本研究所建立的 RT-PCR 检测体系更灵敏，可为辣椒疫霉菌所致病害的早期预警提供更加可靠的技术支持。

此外，传统的土壤中病原菌定量的方法为采用选择性培养基分离培养，而后通过观察形态特征并计数以确定菌量，此方法工作量大，且容易产生误差，以致于延误了病害的田间防治工作，导致病害严重发生且大面积流行。近年来 RT-PCR 在植物病害流行病学中的潜伏感染病原菌的定量分析（Winton et al., 2003；闫佳会等，2011）、寄主抗病性鉴定（Carmen et al., 2007；马占鸿，2010）以及病害流行动态监测（Schena et al., 2004）等方面得到了广泛应用。本研究中利用建立的辣椒疫霉菌 RT-PCR 检测体系监测不同发病程度田块中病原菌菌量，与之前的报道（Liu et al., 2004；秦帅，2016）一致，表明在一定范围内田间病害发生和流程度与病原菌密度成正比，解决了流行病学定量研究中的难题，从而为病害早期防治及管理决策提供科学依据。

References

- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidman J G, Smith J A, Struhl K. 1994. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons Inc.

- Bienapfl J C, Malvick D K, Percich J A. 2011. Specific molecular detection of *Phytophthora sojae* using conventional and real-time PCR. *Fungal Biology*, 115 (8): 733 - 740.
- Böhm J, Hahn A, Schubert R, Bahnweg G, Adler N, Nechwatal J, Oehlmann R, Obwald W. 1999. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *Journal of Phytopathology*, 147 (7 - 8): 409 - 416.
- Carmen G, Oscarmartínez D I, Federico P, Fuencisla M D C. 2007. Assessment of real-time PCR as a method for determining the presence of *Verticillium dahliae* in different Solanaceae cultivars. *European Journal of Plant Pathology*, 118 (3): 199 - 209.
- Cottyn B, Baeyen S, Pauwelyn E, Verbaendert I, De Vos P, Bleyaert P, Höfte M, Maes M. 2011. Development of a real-time PCR assay for *Pseudomonas cichorii*, the causal agent of midrib rot in greenhouse-grown lettuce, and its detection in irrigating water. *Plant Pathology*, 60 (3): 453 - 461.
- Du Hong-zhong, Wu Pin-shan, Yan Jin, Zhang Qiu-e. 2013. Real-time PCR detection of *Phytophthora hibernalis*. *Plant Quarantine*, 27 (1): 36 - 39. (in Chinese)
- 杜洪忠, 吴品珊, 严进, 张秋娥. 2013. 冬生疫霉的实时荧光 PCR 检测方法. *植物检疫*, 27 (1): 36 - 39.
- Ji Rui, Wang Jian-sheng, Liao Tai-lin, Li Bai-sheng, Zhang Zheng-guang, Zheng Xiao-bo. 2014. Rapid molecular detection of *Phytophthora lateralis*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 44 (2): 113 - 120. (in Chinese)
- 纪睿, 王健生, 廖太林, 李百胜, 张正光, 郑小波. 2014. 雪松疫霉 (*Phytophthora lateralis*) 的快速分子检测. *植物病理学报*, 44 (2): 113 - 120.
- Lamour K H, Stam R, Jupe J, Huitema E. 2012. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, (13): 329 - 337.
- Li Bao-ju, Shi Yan-xia, Wang Man-yi, Zhu Hui. 2008. Diagnosis and control of *Phytophthora* blight of pepper root rot. *China Vegetables*, (6): 55 - 56. (in Chinese)
- 李宝聚, 石延霞, 王满意, 朱辉. 2008. 辣椒根腐型疫病诊断与防治. *中国蔬菜*, (6): 55 - 56.
- Li Ji-ping, Li Min-quan, Hui Na-na, Wang Li, Ma Yong-qiang, Qi Yong-hong. 2013. The regular pattern of population dynamics of major pathogenic fungi in soil of potato continuous cropland. *Acta Prataculturae Sinica*, 22 (4): 147 - 152. (in Chinese)
- 李继平, 李敏权, 惠娜娜, 王丽, 马永强, 漆永红. 2013. 马铃薯连作田土壤中主要病原真菌的种群动态变化规律. *草业学报*, 22 (4): 147 - 152.
- Liu Jie, Jiao Bin-bin, Song Shao-yi, Yu Cui, Yin Li-ping, Yi Jian-ping. 2016. Detection of *Phytophthora syringae* by PCR and real-time PCR. *Acta Phytopathologica Sinica*, 46 (6): 730 - 738. (in Chinese)
- 刘劫, 焦彬彬, 宋绍祎, 于翠, 印丽萍, 易建平. 2016. 丁香疫霉菌 PCR 和实时荧光 PCR 检测. *植物病理学报*, 46 (6): 730 - 738.
- Liu X M, Zhou Y L, Li L J, Pan Z Y. 2004. Effect of inoculum density, soil water matric potential and soil temperature on mortality of pepper caused by *Phytophthora capsici*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 34 (3): 254 - 260.
- Liu Zhi-gang. 2011. Causes and integrated control measures of pumpkin seed disease. *China Plant Protection*, 31 (1): 22 - 23. (in Chinese)
- 刘志刚. 2011. 籽用南瓜疫病发生原因及综合防治措施. *中国植保导刊*, 31 (1): 22 - 23.
- Luo Jia-feng, Liu Yue-ting, Liao Fang, Hu Xiao-hong, Liu Peng, Huang Guo-ming. 2012. Interception of *Phytophthora syringae* on citrus fruits imported from California, USA. *Mycosystema*, 31 (1): 24 - 30. (in Chinese)
- 罗加凤, 刘跃庭, 廖芳, 胡晓红, 刘鹏, 黄国明. 2012. 进境美国加州脐橙中丁香疫霉 *Phytophthora syringae* 的截获. *菌物学报*, 31 (1): 24 - 30.
- Ma Zhan-hong. 2010. *Plant Epidemiology*. Beijing: Science Press. (in Chinese)
- 马占鸿. 2010. 植病流行病学. 北京: 科学出版社.
- Qi Yan-xiang, Zhao Wen-jun, Zhu Shui-fang, Xiao Qi-ming, Liao Xiao-lan, Chen Hong-yun. 2003. Detection and identification of *Clavibacter michiganensis* subsp. *insidiosus* by TaqMan probe. *Plant Quarantine*, 17 (5): 260 - 264. (in Chinese)
- 漆艳香, 赵文军, 朱水芳, 肖启明, 廖晓兰, 陈红运. 2003. 苜蓿萎蔫病菌 TaqMan 探针实时荧光 PCR 检测方法的建立. *植物检疫*, 17

- (5): 260 - 264.
- Qin Shuai. 2016. Quantitative detection and dynamic analysis of *Ralstonia solanacearum* of tobacco in soil by real-time PCR[M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 秦 帅. 2016. 实时荧光定量 PCR 技术用于土壤中烟草青枯病菌的定量检测及动态分析[硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Schena L, Nigro F, Ippolito A, Gallitelli D. 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, 110 (9): 893 - 908.
- Winton L M, Manter D K, Stone J K, Hansen E M. 2003. Comparison of Biochemical, molecular, and visual methods to quantify *Phaeocryptopus gaeumannii* in Douglas-Fir foliage. *Phytopathology*, 93 (1): 121 - 126.
- Xu Yan-yan, Chen Lu, Li Jin-ping, Xie Xue-wen, Shi Yan-xia, Li Bao-ju. 2013. Development and application of real-time fluorescent quantitative PCR for detection of *Paedomonas tolaasii*. *Acta Horticulturae Sinica*, 40 (1): 169 - 178. (in Chinese)
- 徐岩岩, 陈 璐, 李金萍, 谢学文, 石延霞, 李宝聚. 2013. 平菇细菌性褐斑病原菌 RT-PCR 检测方法的建立及其应用. *园艺学报*, 40 (1): 169 - 178.
- Yan Jia-hui, Luo Yong, Pan Juan-juan, Wang Hai-guang, Jin She-lin, Cao Shi-qin, Ma Zhan-hong. 2011. Quantification of latent infection of wheat stripe rust in the fields using real-time PCR. *Acta Phytopathologica Sinica*, 41 (6): 618 - 625. (in Chinese)
- 闫佳会, 骆 勇, 潘娟娟, 王海光, 金社林, 曹世勤, 马占鸿. 2011. 应用 real-time PCR 定量检测田间小麦条锈菌潜伏侵染的研究. *植物病理学报*, 41 (6): 618 - 625.
- Yi Tu-yong, Xie Bing-yan. 2002. Research progress on the control of pepper *Phytophthora* blight. *China Vegetables*, (5): 52 - 54. (in Chinese)
- 易图永, 谢丙炎. 2002. 辣椒疫病防治研究进展. *中国蔬菜*, (5): 52 - 54.
- Zhao Wei, Wang Tao, Qi Ren-de. 2012. Molecular detection technique of *Phytophthora capsici* targeted with *YPT1* gene sequence//Anhui Entomological Society. Anhui Institute of Plant Pathology 2012 Annual Conference Proceedings. (in Chinese)
- 赵 伟, 汪 涛, 戚仁德. 2012. 以 *YPT1* 基因序列为靶标的辣椒疫病菌的分子检测技术//安徽省昆虫学会、安徽省植物病理学会 2012 年学术年会论文集.
- Zhao Wei, Wang Tao, Qi Ren-de. 2015. Rapid detection of *Phytophthora capsici* by a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay. *Acta Phytopathologica Sinica*, 45 (1): 93 - 96. (in Chinese)
- 赵 伟, 汪 涛, 戚仁德. 2015. 利用环介导等温扩增 (LAMP) 技术快速检测辣椒疫霉菌. *植物病理学*, 45 (1): 93 - 96.
- Zhu Zheng-xia. 2011. Causes and control measures of pumpkin *Phytophthora* blight in Dongning country. *China Agricultural Technology Extension*, 27 (11): 44. (in Chinese)
- 朱正霞. 2011. 东宁县南瓜疫病流行原因及防治措施. *中国农技推广*, 27 (11): 44.