



## 三种猕猴桃根腐病致病菌多重实时定量 PCR 检测技术的建立及应用

毕晓琼<sup>Δ</sup> 高菡<sup>Δ</sup> 郭倩 崔浪军 李明珠\*

陕西师范大学生命科学学院 西北濒危药材资源开发国家工程实验室 陕西 西安 710119

**摘要:**【背景】近年来,随着猕猴桃种植面积的不断扩大,病害的频繁发生已逐渐影响猕猴桃的产量和品质。恶疫霉(*Phytophthora cactorum*)、樟疫霉(*P. cinnamomi*)和雪松疫霉(*P. lateralis*)是一类可引起猕猴桃根腐病的致病疫霉菌。【目的】建立并优化可以同时检测3种致病疫霉的多重实时定量检测技术,并调查猕猴桃主要产区的致病菌分布情况。【方法】基于 *Ypt1* (ras-related protein gene) 基因设计恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉的特异性 TaqMan 探针和引物,建立并优化多重实时荧光定量 PCR 检测体系。利用近缘种检验检测体系特异性并进行灵敏度测试,应用该检测体系分析猕猴桃主要产区根际土壤中3种致病疫霉的 *Ypt1* 基因含量。【结果】供测试的11个恶疫霉近缘种、11个樟疫霉近缘种、13个雪松疫霉近缘种及非目标菌种 DNA 样品中均无荧光信号,反应结果为阴性,而在恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉 DNA 样品中分别检测出 HEX、FAM 和 ROX 荧光信号,反应结果为阳性。三种疫霉的检测灵敏度均达到 100 fg。此外,通过对猕猴桃主产区陕西省周至县和眉县果园共 166 份土壤样品的检测发现,恶疫霉的分布最广泛且 *Ypt1* 基因含量最高,樟疫霉和雪松疫霉则相对较少。【结论】建立的猕猴桃根腐病致病疫霉多重实时定量检测体系特异性强、灵敏度高,适合于恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉的检测及定量分析。该技术可为猕猴桃疫霉病害的早期诊断、监测及预防提供指导。

**关键词:** 猕猴桃, 恶疫霉, 樟疫霉, 雪松疫霉, *Ypt1* 基因, 多重实时定量 PCR

## Development and application of a multiplex real-time PCR assay for quantitative detection of three pathogens related to kiwifruit root rot disease

BI Xiao-Qiong<sup>Δ</sup> GAO Han<sup>Δ</sup> GUO Qian CUI Lang-Jun LI Ming-Zhu\*

National Engineering Laboratory for Resource Developing of Endangered Chinese Crude Drugs in Northwest China, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an, Shaanxi 710119, China

**Abstract:** [Background] In recent years, with the expansion of kiwifruit cultivation area, frequent

**Foundation items:** Natural Science Basic Research Plan in Shaanxi Province (2019JM-491); Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (GK201703033, GK201603110)

<sup>Δ</sup>These authors equally contributed to this work

\*Corresponding author: Tel: 86-29-85310266; E-mail: limz@snnu.edu.cn

Received: 10-05-2019; Accepted: 17-07-2019; Published online: 16-09-2019

基金项目: 陕西省自然科学基金基础研究计划(2019JM-491); 中央高校基本科研业务费专项资金(GK201703033, GK201603110)

<sup>Δ</sup>共同第一作者

\*通信作者: Tel: 029-85310266; E-mail: limz@snnu.edu.cn

收稿日期: 2019-05-10; 接受日期: 2019-07-17; 网络首发日期: 2019-09-16

occurrences of diseases have increasingly affected the yield and quality of kiwifruit. *Phytophthora cactorum*, *P. cinnamomi* and *P. lateralis* are a group of pathogens that cause the kiwifruit root rot disease. **[Objective]** The present study aimed to establish and optimize a multiplex quantitative real-time PCR assay for simultaneously detecting the three pathogenic *Phytophthora* species, and to investigate the distribution of these pathogens in the main production areas of kiwifruit. **[Methods]** The *Ypt1* (ras-related protein gene) sequences were aligned to develop species-specific TaqMan probes and primers for *P. cactorum*, *P. cinnamomi* and *P. lateralis*, respectively. A multiplex quantitative real-time PCR assay was established and optimized, and the specificity and sensitivity were tested. Finally, the detection system was used to analyze the *Ypt1* gene content of three pathogens from the rhizosphere soils in the main production areas of kiwifruit. **[Results]** HEX, FAM and ROX fluorescence signals were detected in the DNA samples of *P. cactorum*, *P. cinnamomi* and *P. lateralis*, respectively, but no fluorescence signals in those of their closely related and other soil-borne pathogens. The sensitivity was 100 fg for each pathogen. By assaying 166 rhizosphere soil samples of kiwifruit plants from Zhouzhi and Meixian Prefecture of Shaanxi Province, *P. cactorum* was found to be the most widely distributed along with the highest *Ypt1* gene content, while *P. cinnamomi* and *P. lateralis* were relatively less frequent. **[Conclusion]** The established multiplex quantitative detection method was specific and sensitive, and was suitable for the detection and quantification of *P. cactorum*, *P. cinnamomi* and *P. lateralis*. This technique would be useful in early diagnosis, monitoring and prevention of *Phytophthora* disease in kiwifruits.

**Keywords:** Kiwifruit, *Phytophthora cactorum*, *Phytophthora cinnamomi*, *Phytophthora lateralis*, *Ypt1* gene, Multiplex quantitative real-time PCR

疫霉菌(*Phytophthora de Bary*)是一类重要的植物病原菌,破坏性大且寄主范围广,对林木、农作物和花卉等都能造成非常大的危害<sup>[1]</sup>。据报道有多种疫霉菌,包括隐地疫霉(*P. cryptogea*)、柑橘褐腐疫霉(*P. citrophthora*)、掘氏疫霉(*P. drechsleri*)、棕榈疫霉(*P. palmivora*)、恶疫霉(*P. cactorum*)、樟疫霉(*P. cinnamomi*)、大雄疫霉(*P. megasperma*)、柑橘生疫霉(*P. citricola*)和雪松疫霉(*P. lateralis*)与猕猴桃病害密切相关<sup>[2-4]</sup>。1990年,在河南省首次从染病猕猴桃树的根中分离出恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉3种疫霉菌<sup>[5]</sup>。

从1993年至今,猕猴桃种植面积不断增加。自2013年以来,中国已成为世界上猕猴桃产量最多且种植面积最大的国家<sup>[6]</sup>。陕西省作为国内最大的猕猴桃生产基地,年产60万t以上,占据了国内猕猴桃生产总产量的一半<sup>[6]</sup>。王汝贤等曾对陕西省猕猴桃产区的病害进行过调查,发现猕猴桃疫霉病在大多数果园均有不同程度的发生,重病园发病率达到了20%–30%,死亡率达到10%–20%<sup>[7]</sup>。

疫霉菌卵孢子、厚壁孢子和菌丝体随病残体可

在土壤中越冬。春末夏初随雨水或灌溉水传播,病害一旦发生往往难以控制。PCR技术已成为植物病害诊断和研究的重要工具。大多数PCR诊断技术是基于核编码核糖体DNA(rDNA)基因的内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)或序列特征性扩增区(sequence characterized amplified regions, SCAR)建立的<sup>[1]</sup>,但是ITS序列往往无法区分近缘种<sup>[8]</sup>,同时SCAR引物的设计比较繁琐<sup>[9]</sup>。此外,线粒体*cox1*和*cox2*基因、 $\beta$ 微管蛋白基因、*elicitin*基因和*Ypt1*(ras-related protein gene)基因也逐渐被应用于疫霉菌分子标记的开发中<sup>[10-11]</sup>。其中*Ypt1*基因具有保守的外显子和高度可变的内含子,几乎适用于所有疫霉菌种特异性标记的开发<sup>[10]</sup>。

近年来一些新的等温扩增技术也相继出现,如环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)<sup>[12]</sup>和重组酶聚合酶扩增(recombinase polymerase amplification, RPA)<sup>[13]</sup>。然而这些检测有一定的局限性,比如在实际操作中容易污染、成本高且无法进行多目标检测。

本研究建立了一种多重PCR实时定量检测

技术, 可以同时检测恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉 3 种猕猴桃致病疫霉, 并成功将该技术应用于我国猕猴桃主产区疫霉病害的定量检测分析。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 主要试剂和仪器

氯化苜、脱脂乳、醋酸钠, 国药集团化学试剂(北京)有限公司; V8 汁琼脂培养基(340 mL V8 juice, 6.8 g 碳酸钙, 16 g/L 琼脂)、玉米粉琼脂培养基(CMA), 海博生物科技有限公司; 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA), 北京奥博星生物科技有限公司; MagExtractor Plant Genome Kit, Toyobo 公司; TaKaRa *Taq* Hot Start Version 和 Probe qPCR Mix, TaKaRa 公司; 探针和引物均由 TaKaRa 公司合成。荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司; Qubit 3.0、PCR 仪, Thermo Fisher Scientific 公司; 凝胶成像分析系统, 天能公司; Field Scout pH 400 m, Spectrum Technologies 公司。

#### 1.1.2 供试菌株与菌株培养

供试菌株: 共 50 种不同菌种, 其中 44 种疫霉菌和 6 种土传性病原菌, 包括腐霉菌属、镰刀菌属、丝核菌属和轮枝菌属(表 1)。供试菌株来源于多个菌种资源保存机构, 包括荷兰菌种保藏中心(Centraalbureau fur Schimmelcultures, the Netherlands, CBS)、世界疫霉遗传资源中心(World Phytophthora Genetic Resource Collection, USA, WPC)、日本农业部(Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan, MAFF)、日本 NITE 生物资源中心(NITE Biological Resource Centre, Japan, NBRC)和日本岐阜大学。其余菌株则从陕西省周至县和眉县的猕猴桃果园内分离所得。菌种放置于 V8 汁琼脂培养基(V8A)、玉米粉琼脂培养基(CMA)或马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA)中于 20 °C 黑暗中保存。

#### 1.1.3 根际土壤样品的收集

于 2017 年 4 月在陕西省眉县收集根际土壤样品 20 份; 2017 年 6 月在陕西省周至县和眉县分别收集土壤样品 25 份和 5 份; 同年 10 月在周至县和

眉县各收集 24 份和 15 份土壤样品; 2018 年 5 月在周至县和眉县各收集 18 份土壤样品; 同年 10 月分别收集周至县和眉县土壤样品 23 份和 18 份。每份土壤样本均从表层土壤 10 cm 以下取土约 500 g, 储存于 5 °C 保温箱中。使用 Field Scout pH 400 m 实地测量土壤 pH 值。土壤质地及结构则以 International Society of Soil Science<sup>[15]</sup>为标准进行判定。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 菌丝及土壤 DNA 的提取

供试疫霉菌采用 V8 液体培养基进行培养, 挑取适量的菌丝, 采用改良的磁珠提取法<sup>[16]</sup>提取菌丝 DNA。土壤 DNA 的提取与纯化方法与菌丝 DNA 的提取方法相同。具体操作步骤为: 2 mL 的离心管中加入 0.2 g 土壤和 0.2 g 直径为 1 mm 的磁性玻璃珠, 并加入 250  $\mu$ L 的提取液(100 mmol/L pH 为 9.0 的 Tris-HCl, 40 mmol/L 的 EDTA, 10% SDS, 0.8% 脱脂乳), 4 000 r/min 旋涡振荡 1 min, 然后加入 150 mL 氯化苜并振荡混匀。60 °C 放置 15 min 后, 在悬浮液中加入 3 mol/L 醋酸钠 150  $\mu$ L, 轻微振荡混合, 于冰上放置 15 min 后, 15 000 r/min 离心 10 min 后将上清液转移到新的 1.5 mL 离心管内。按照 MagExtractor Plant Genome Kit 的操作说明纯化土壤 DNA, 将提取所得的 DNA 保存于 -20 °C 备用。

#### 1.2.2 探针设计与 PCR 扩增

采用 Bi 等<sup>[17]</sup>基于 *Ypt1* 基因序列设计恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉的特异性引物(表 2)。从 NCBI 数据库中获取 50 种疫霉菌和 3 种腐霉菌的 *Ypt1* 基因序列(表 3), 利用软件 BioEdit V7.0.0 (Ionis Pharmaceuticals, Dublin, Ireland)进行序列分析, 使用软件 Beacon Designer V7.51 (PREMIER Biosoft International, USA)设计 TaqMan 探针(表 2)。分别用 HEX、FAM 和 ROX 荧光染料标记恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉探针。

PCR 反应体系(25  $\mu$ L): 正、反向引物(25  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, HotStart *Taq* DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.125  $\mu$ L, dNTP 混合物(2.5 mmol/L) 2  $\mu$ L, 1 $\times$ PCR

表 1 特异性检验

Table 1 Specificity tests

进化 分支 Clade <sup>#</sup>	模式 菌株 Type isolate	菌种 Species	分离株 Isolate <sup>&amp;</sup>	来源 Origins	地区 Region	特异性检测 Specificity tests <sup>s</sup>		
						Yph_cac_ R5/Yph1F_ mod2/cac_ Ypro	Yph_cin_ R1/Yph1F_ mod2/cin_ Ypro	Yph_lat_ R2/Yph1F_ mod2/lat_ Ypro
1		<i>Phytophthora nicotianae</i>	GF468	Strawberry	Gifu, Japan	-	-	-
1a		<i>P. cactorum</i>	CH989A11	Strawberry	Gifu, Japan	+	-	-
			ZZ017	Kiwifruit	Shaanxi, China	+	-	-
	*	<i>P. hedraiaandra</i>	CBS111725	<i>Viburnum</i> sp.	Netherlands	-	-	-
	*	<i>P. idaei</i>	WPC6767	<i>Rubus idaeus</i>	UK	-	-	-
	*	<i>P. pseudotsugae</i>	WPC10339	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	USA	-	N	N
1b		<i>P. clandestina</i>	WPC3942	<i>Trifolium subterraneum</i>	Australia	-	N	N
	*	<i>P. iranica</i>	CBS374.72	<i>Solanum melongena</i>	Iran	-	-	-
	*	<i>P. tentaculata</i>	CBS552.96	<i>Chrysanthemum leucanthemum</i>	Germany	-	N	N
1c		<i>P. infestans</i>	MAFF305586	Potato	Hokkaido, Japan	-	N	N
	*	<i>P. ipomoeae</i>	WPC10225	<i>Ipomoea longipedunculata</i>	Mexico	-	-	-
		<i>P. mirabilis</i>	WPC3005	<i>Mirabilis jalapa</i>	Mexico	-	N	N
		<i>P. phaseoli</i>	WPC10145	<i>Phaseolus lunatus</i>	USA	-	N	N
2		<i>P. citricola</i>	WPC1321	<i>Rubus</i> sp.	California, USA	-	-	-
2a		<i>P. citrophthora</i>	CBS950.87	<i>Citrus</i> sp.	California, USA	-	-	-
2b		<i>P. capsici</i>	WPC1319	Green bell pepper	California, USA	-	-	-
3		<i>P. pseudosyringae</i>	CBS111772	<i>Quercus robur</i>	Germany	-	-	-
5		<i>P. heveae</i>	WPC1102	Avocado	Guatemala	-	-	-
6		<i>P. humicola</i>	WPC6701	<i>Citrus</i> sp.	Taiwan	-	-	-
		<i>P. megasperma</i>	NBRC32176	White trumpet lily	Yokohama, Japan	-	-	-
7a		<i>P. cambivora</i>	WPC0592	<i>Abies procera</i>	USA	-	-	-
	*	<i>P. europaea</i>	CBS109049	<i>Quercus rhizosphere</i>	France	-	-	-
	*	<i>P. fragariae</i>	CBS209.46	<i>Fragaria</i> sp.	England	N	-	N
	*	<i>P. uliginosa</i>	CBS109054	<i>Quercus robur</i>	Poland	N	-	N
7b		<i>P. cajani</i>	WPC3105	<i>Cajanus cajan</i>	India	-	-	-
		<i>P. cinnamomi</i>	WPC2160	Grape	South Africa	-	+	-
			ZZ029	Kiwifruit	Shaanxi, China	-	+	-
	*	<i>P. parvispora</i>	CBS411.96	<i>Beaucamea</i> sp.	Germany	-	-	-
	*	<i>P. melonis</i>	WPC6870	Cucumber	Japan	-	-	-
		<i>P. niederhauserii</i>	CH96HE1	<i>Hedera helix</i>	Chiba, Japan	N	-	N
	*	<i>P. pistaciae</i>	CBS137185	<i>Pistachia vera</i>	Iran	N	-	N
		<i>P. sojae</i>	WPC7358	Soybean	NA	-	-	-
		<i>P. vignae</i>	Ph-9	Adzuki bean	Hokkaido, Japan	-	-	-

(待续)

(续表 1)

8a	<i>P. cryptogea</i>	WPC1088	<i>Callistephus chinensis</i>	California, USA	-	-	-
	* <i>P. drechsleri</i>	WPC1087	Beet	California, USA	-	-	-
	<i>P. medicaginis</i>	WPC10138	<i>Medicago sativa</i>	California, USA	N	N	-
	<i>P. sansomeana</i>	WPC3163	<i>Silene latifolia</i> subsp. <i>alba</i>	New York, USA	N	N	-
8b	<i>P. brassicae</i>	CBS179.87	<i>Brassica oleracea</i>	Netherlands	-	-	-
	<i>P. primulae</i>	CBS620.97	<i>Primula acaulis</i>	Germany	N	N	-
8c	<i>P. syringae</i>	MAFF645010	<i>Malus pumila</i>	Aomori, Japan	-	-	-
	* <i>P. foliorum</i>	WPC10974	Azalea	Tennessee, USA	N	N	-
	<i>P. hibernalis</i>	CBS114104	<i>Citrus sinensis</i>	Australia	-	-	-
	* <i>P. lateralis</i>	WPC3361	<i>Chamaecyparis lawsoniana</i>	Oregon, USA	-	-	+
	* <i>P. ramorum</i>	CBS101553	<i>Rhododendron catawbiense</i>	Germany	-	-	-
9	* <i>P. insolita</i>	WPC6195	Soil	Taiwan	-	-	-
10	<i>P. kernoviae</i>	NA	NA	NA	-	-	-
	<i>Pythium vexans</i>	MS6-10-8V	Forest soil	Gifu, Japan	-	-	-
	<i>Py. helicoides</i>	NBRC100107	Rose	Gifu, Japan	-	-	-
	<i>Py. irregulare</i>	CBS263.30	<i>Nicotiana tabacum</i>	USA	-	-	-
	<i>Fusarium oxysporum</i>	MAFF727510	NA	NA	-	-	-
	<i>Rhizoctonia solani</i>	S02	NA	NA	-	-	-
	<i>Verticillium alboatrum</i>	Vaal 130308	NA	NA	-	-	-

注: \*: 模式菌株; #: 分子系统发育进化枝<sup>[14]</sup>; &: CBS: 荷兰菌种保藏中心, 荷兰; WPC: 世界疫霉遗传资源保藏中心, 美国; MAFF: 日本农业部, 日本; NBRC: NITE 生物资源中心, 日本; §: 3 个菌种均以 Yph1F\_mod2 为正向引物; NA: 信息不详; +: 扩增; -: 无扩增; N: 未检测。

Note: \*: Type isolate of species; #: Molecular phylogenetic clade according to Martin et al.<sup>[14]</sup>; &: International identification abbreviations; CBS: Centraalbureau fur Schimmelcultures, The Netherlands; WPC: World Phytophthora Genetic Resource Collection, USA; MAFF: Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan; NBRC: NITE Biological Resource Centre, Japan; §: Yph1F\_mod2 was used as the forward primer for all 3 species; NA: Not available; +: Amplified; -: Not amplified; N: Not tested.

表 2 本研究使用的引物和 TaqMan 探针

Table 2 Primers and TaqMan probes used in this study

菌种	基因	引物/探针	引物类型	序列	$T_m$	扩增片段长度	参考文献
Species	Gene	Primer/Probe	Primer type	Sequence (5'→3')	(°C)	Amplified fragment length (bp)	References
<i>Phytophthora cactorum</i>	Ypt1	Yph1F_mod2	Forward	CGACCATKGGTGTGGACTTTG	54	112	[17]
		Yph_cac_R5	Reverse	CTGGGCACAACCGCAATAAAGA	55		[17]
		cac_Ypro		(HEX)-TCTGCGCTAGGCGACCTT TGCGAGCT-(BHQ1)	78.9		This study
<i>P. cinnamomi</i>	Ypt1	Yph1F_mod2	Forward	CGACCATKGGTGTGGACTTTG	54	229	[17]
		Yph_cin_R1	Reverse	CACTACAGCAGCACCATTATT	52		[17]
		cin_Ypro		(FAM)-CTCCACGAACAGCTTCCA ACAGGCGAA-(BHQ1)	75.1		This study
<i>P. lateralis</i>	Ypt1	Yph1F_mod2	Forward	CGACCATKGGTGTGGACTTTG	54	189	[17]
		Yph_lat_R2	Reverse	GGAAAAATCTCCCGCAGACA	52		[17]
		lat_Ypro		(ROX)-CGTACGGATTTCTAAAT -(MGB-X)	47.7		This study

注:  $T_m$  值的计算参照文献[18].

Note: The  $T_m$  was calculated according to reference [18].

表 3 NCBI 数据库疫霉菌种 *Ypt1* 基因序列登录号Table 3 Accession information for *Ypt1* sequences in the NCBI database

菌种	分离株	登录号	菌种	分离株	登录号
Species	Isolates	Accession No.	Species	Isolates	Accession No.
<i>Phytophthora alni</i> subsp. <i>alni</i>	SCR2P	DQ162953	<i>P. lateralis</i>	IMI040503	DQ162991
<i>P. boehmeriae</i>	SCR2P23	DQ270324		US1-2	KM975317
<i>P. cactorum</i>	IMI296524	DQ162960	<i>P. medicaginis</i>	SCR2P407	DQ162990
	CH03OKTYPE1	HQ850000	<i>P. megakarya</i>	P8517	HQ850008
<i>P. cambivora</i>	SCR2P82	DQ162956	<i>P. megasperma</i>	IMI133317	DQ162986
<i>P. capsici</i>	IMI352321	DQ162972	<i>P. melonis</i>	PMNJHG1	EF649778
<i>P. cinnamomi</i>	CBS270.55	DQ162959	<i>P. mirabilis</i>	CBS678.85	HQ850009
	SCR2P118	DQ270317	<i>P. multivesiculata</i>	CBS545.96	HQ850010
<i>P. citricola</i>	SCR2P143	DQ162971	<i>P. nemorosa</i>	SCR2P910	DQ162965
<i>P. citrophthora</i>	IMI332632	DQ162973	<i>P. nicotianae</i>	CH02FPK3	HQ849999
<i>P. clandestina</i>	CBS347.86	HQ850002	<i>P. obscura</i>	BBA 2/94-II-B	KJ755158
<i>P. cryptogea</i>	IMI045168	DQ162987	<i>P. palmivora</i>	IPPc3	HQ850011
<i>P. drechsleri</i>	ATCC46724	DQ162989	<i>P. phaseoli</i>	CBS120373	HQ850012
<i>P. erythroseptica</i>	SCR2P240	DQ162988	<i>P. pistaciae</i>	IMI386658	DQ162957
<i>P. europaea</i>	SCR2P622	DQ162952	<i>P. pseudosyringae</i>	SCR2P734	DQ162967
<i>P. foliorum</i>	CBS121655	KJ755148	<i>P. pseudotsugae</i>	CBS444.84	HQ850013
<i>P. fragariae</i>	SCR2P245	DQ162950	<i>P. psychrophila</i>	SCR2P630	DQ162964
<i>P. hedraiandra</i>	CBS111725	HQ850003	<i>P. quercina</i>	SCR2P550	DQ162979
<i>P. hibernalis</i>	JKI906242	KJ755160	<i>P. ramorum</i>	SCR2P911	DQ162992
<i>P. idaei</i>	CBS971.95	HQ850004	<i>P. sansomeana</i>	—	FJ966876
<i>P. ilicis</i>	SCR2P379	DQ162963	<i>P. sojae</i>	SCR2P555	DQ162958
<i>P. infestans</i>	CBS368.51	HQ850005	<i>P. syringae</i>	CBS110161	KF882681
<i>P. insolita</i>	IMI288805	DQ162974	<i>P. tentaculata</i>	C45	HQ850014
<i>P. inundata</i>	SCR2P649	DQ162985	<i>P. uliginosa</i>	BBA 12/02-1	KJ755139
<i>P. ipomoeae</i>	CBS122203	HQ850006	<i>P. vignae</i>	BBA P3071	KJ755145
<i>P. iranica</i>	CBS374.72	HQ850007	<i>Pythium oedoehilum</i>	CBS597.68	HQ850015
<i>P. katsurae</i>	SCR2P388	DQ162980	<i>P. helicoides</i>	TCG3	HQ850016
<i>P. kernoviae</i>	SCR2P722	DQ162975	<i>P. ostracodes</i>	CBS768.73	HQ850017

注: —: 无数据.

Note: —: No data.

Buffer 2.5  $\mu$ L, Bovine serum albumin (BSA) (4 mg/mL) 2.5  $\mu$ L, DNA 模板 2  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 13.875  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 62  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 共 40 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。

实时荧光定量 PCR 反应体系(20  $\mu$ L): DNA 样

品 2  $\mu$ L, 1 $\times$ Premix *Taq* 10  $\mu$ L, BSA (4 mg/mL) 2  $\mu$ L, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.5  $\mu$ L, 分别加入对应的引物和探针: 恶疫霉正向引物(20  $\mu$ mol/L) 0.2  $\mu$ L, 反向引物(40  $\mu$ mol/L) 0.1  $\mu$ L, 探针(40  $\mu$ mol/L) 0.1  $\mu$ L; 樟疫霉正向引物(20  $\mu$ mol/L) 1.6  $\mu$ L, 反向引物(80  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ L, 探针(40  $\mu$ mol/L) 0.4  $\mu$ L;

雪松疫霉正向引物(20  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.8  $\mu\text{L}$ , 反向引物(40  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.45  $\mu\text{L}$ , 探针(40  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.45  $\mu\text{L}$ 。反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  35 s, 共 40 个循环。在每个 PCR 循环退火阶段监测荧光信号, 通过 Bio-Rad CFX Manager 软件获取  $C_t$  值。

## 2 结果与分析

### 2.1 分子标记的特异性检测

由于引物的特异性在 Bi 等<sup>[17]</sup>建立的常规 PCR 检测体系中已证实, 本研究仅在实时荧光定量 PCR 实验中对引物及探针进行了特异性检验。选取了 2 个恶疫霉的菌株及 Clade1<sup>[19]</sup>中的 11 个近缘种, 2 个樟疫霉的菌株及 Clade7<sup>[19]</sup>中的 11 个近缘种, 1 个雪松疫霉的菌株及 Clade8<sup>[19]</sup>中的 13 个近缘种, 此外还有 9 个疫霉属其他进化分支菌种及 6 种常见土传性病原菌(包括腐霉菌、镰刀霉菌、立枯丝核菌及轮枝菌)(表 1)。结果显示, HEX 的荧光信号只在含有恶疫霉 DNA 的样本中被检测到, FAM 的荧光信号只在含有樟疫霉 DNA 的样本中被检测到, 而 ROX 的荧光信号只在含有雪松疫霉 DNA 的样本中被检测到, 在其他非目标菌株样本中均无荧光信号。

### 2.2 实时荧光定量 PCR 反应体系的优化

为了优化恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉实时荧光定量 PCR 体系, 共设计了 21 种不同浓度的引物和探针组合进行测试。结果显示, 恶疫霉在 0.2  $\mu\text{mol/L}$  的引物和探针浓度下扩增效率最佳; 樟疫霉在 1.6  $\mu\text{mol/L}$  的引物与 0.8  $\mu\text{mol/L}$  的探针浓度下扩增效率最佳; 雪松疫霉在 0.8  $\mu\text{mol/L}$  的引物与探针浓度下扩增效率最佳。退火温度分别测试了 58、60、62 和 65  $^{\circ}\text{C}$ , 其中退火温度为 60  $^{\circ}\text{C}$  时恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉的引物和探针的特异性和扩增效率都最佳。在多重实时荧光定量 PCR 中镁离子的浓度也是一个重要因素, 通过在反应体系中加入不同浓度的镁离子进行测试, 得出加入 1.5 mmol/L 的氯化镁时 3 种疫霉反应体系的扩增效率均最优。

### 2.3 多重实时荧光定量 PCR 的灵敏度测试

将恶疫霉 CH989A11、樟疫霉 WPC2160 和雪松疫霉 WPC3361 的 DNA 等浓度混合, 按 10 倍梯度稀释成 6 个浓度, 即(1.0 $\times$ 10<sup>3</sup>)-(1.0 $\times$ 10<sup>-2</sup>)  $\mu\text{g/L}$  再进行 PCR 检测。结果表明, 3 对特异性引物及探针在所建立的实时荧光定量 PCR 体系中对(1.0 $\times$ 10<sup>3</sup>)-(1.0 $\times$ 10<sup>-1</sup>)  $\mu\text{g/L}$  浓度的目标菌种 DNA 均有扩增, 恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉在多重反应体系中的灵敏度均为 100 fg。

以不同稀释倍数的 DNA 浓度对数值为横坐标, 反应循环数( $C_t$  值)为纵坐标, 构建标准曲线。标准曲线如图 1 所示, 标准曲线显示目标菌种 DNA 浓度和  $C_t$  值呈线性关系, 恶疫霉的相关系数为 0.996, 扩增效率为 104.84%; 樟疫霉的相关系数为 0.998 9, 扩增效率为 102.43%; 雪松疫霉的相关系数为 0.998 8, 扩增效率为 112.09%。

### 2.4 恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉在猕猴桃种植区的分布与数量关系

在陕西省周至县 2017 年 6、10 月和 2018 年 10 月采集的土壤样品中同时检测出恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉 3 种疫霉; 在 2018 年 5 月的样品中仅检测出恶疫霉。在眉县 2017 年 4 月的样品中只检测出恶疫霉, 而在 2017 年 6 月和 10 月的样品中检测出恶疫霉和雪松疫霉 2 种疫霉; 在 2018 年 5 月采集的样品中同时检测出 3 种疫霉菌, 而在 2018 年 10 月的样品中检测出恶疫霉和樟疫霉 2 种疫霉(表 4)。

周至县猕猴桃种植区恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉的分布为: 共采集 90 份土壤, 其中 24 份土壤中检测到恶疫霉, *Ypt1* 基因的浓度范围为 15-89 pg/g 土壤, 其中 2017 年 6 月检测出的样品数最多(图 2A); 6 份土壤中检测到樟疫霉, *Ypt1* 基因的浓度范围为 15-43 pg/g 土壤, 其中 2018 年 10 月检测出的样品数最多(图 2B); 6 份土壤中检测到雪松疫霉, *Ypt1* 基因的浓度范围为 25-56 pg/g 土壤, 2017 年 6、10 月和 2018 年 10 月均有 2 个样品被检测出(图 2C)。

眉县猕猴桃种植区恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉

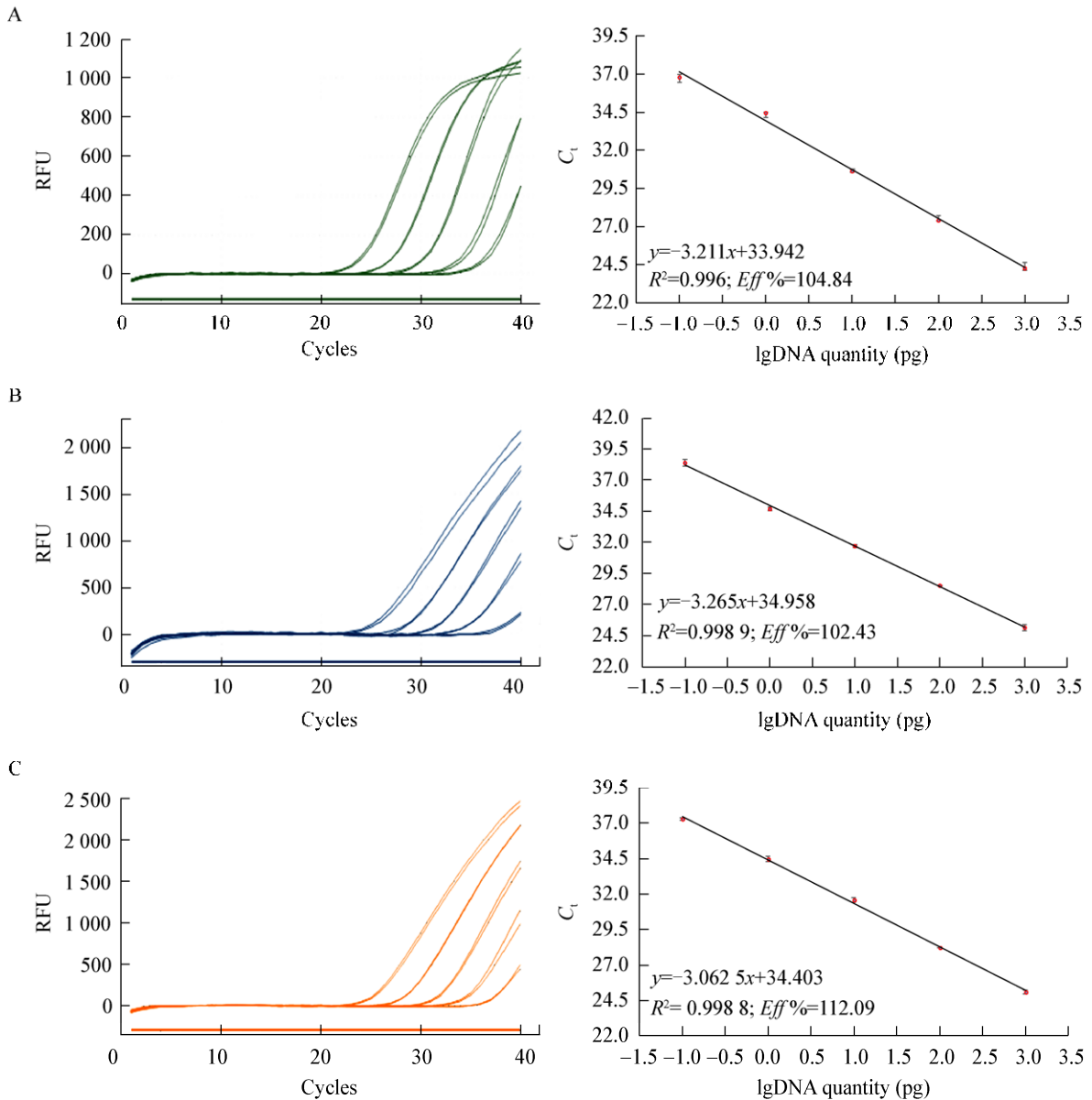


图1 恶疫霉(A)、樟疫霉(B)和雪松疫霉(C)的敏感度检测、标准曲线、相关系数及扩增效率

Figure 1 Sensitivity tests, standard curves, correlation coefficients and amplification efficiencies assessed for *Phytophthora cactorum* (A), *P. cinnamomi* (B) and *P. lateralis* (C)

注: 多重实时 PCR 扩增前将 3 个菌种的 DNA 等浓度混合在一起, 连续稀释得到最终浓度为  $(1.0 \times 10^3)$  pg/ $\mu$ L  $-(1.0 \times 10^{-1})$  pg/ $\mu$ L 的 DNA 样品。

Note: Total DNA from the three species was mixed together and serially diluted to yield final concentrations ranging from  $1.0 \times 10^3$  pg/ $\mu$ L to  $1.0 \times 10^{-1}$  pg/ $\mu$ L before multiplex real-time PCR amplification.

的分布为: 共采集 76 份土壤, 14 份土壤中检测到恶疫霉, *Ypt1* 基因的浓度范围为 10–67 pg/g 土壤, 其中 2018 年 5 月检测出的样品数最多(图 3A); 3 份土壤中检测到樟疫霉, *Ypt1* 基因的浓度范围为

17–151 pg/g 土壤, 其中 2018 年 5 月检测出的样品数最多(图 3B); 7 份土壤中检测到雪松疫霉, *Ypt1* 基因的浓度范围为 9–59 pg/g 土壤, 2017 年 10 月和 2018 年 5 月均有 3 个样品被检测到(图 3C)。



表 4 猕猴桃主要产区恶疫霉、樟疫霉及雪松疫霉的检测

Table 4 Detection of *Phytophthora cactorum*, *P. cinnamomi* and *P. lateralis* in the main kiwifruit planting areas

地区	取样日期	感染疫霉样本数/样本采集数	土壤质地	pH	症状	检测到的病原菌
Prefecture	Sampling date	Samples with <i>Phytophthora</i> / Samples collected	Soil texture		Symptoms in field	Detected pathogens
周至 Zhouzhi	Jun-17	10/25	L, SL, CL	5.9–6.9	Phytophthora rot, leaves yellowing	<i>P. cactorum</i> , <i>P. cinnamomi</i> , <i>P. lateralis</i>
	Oct-17	8/24	N	6.2–6.8	Leaves yellowing	<i>P. cactorum</i> , <i>P. cinnamomi</i> , <i>P. lateralis</i>
	May-18	1/18	N	6.3–7.1	Leaves yellowing, gray mold	<i>P. cactorum</i>
	Oct-18	9/23	N	N	Root rot, leaves yellowing	<i>P. cactorum</i> , <i>P. cinnamomi</i> , <i>P. lateralis</i>
眉县 Meixian	Apr-17	3/20	L, SL, CL	7.1–7.6	Bacterial canker, leaves yellowing	<i>P. cactorum</i>
	Jun-17	1/5	N	6.8–7.7	Root rot, leaves yellowing	<i>P. cactorum</i> , <i>P. lateralis</i>
	Oct-17	4/15	N	7.0–7.5	Bacterial canker, leaves yellowing	<i>P. cactorum</i> , <i>P. lateralis</i>
	May-18	7/18	N	N	Bacterial canker	<i>P. cactorum</i> , <i>P. cinnamomi</i> , <i>P. lateralis</i>
	Oct-18	4/18	N	N	Leaves yellowing, root rot	<i>P. cactorum</i> , <i>P. cinnamomi</i>

注: L: 壤土; SL: 沙质土; CL: 黏土; N: 没有检测。

Note: L: Loam; SL: Sandy loam; CL: Clay loam; N: Not tested.

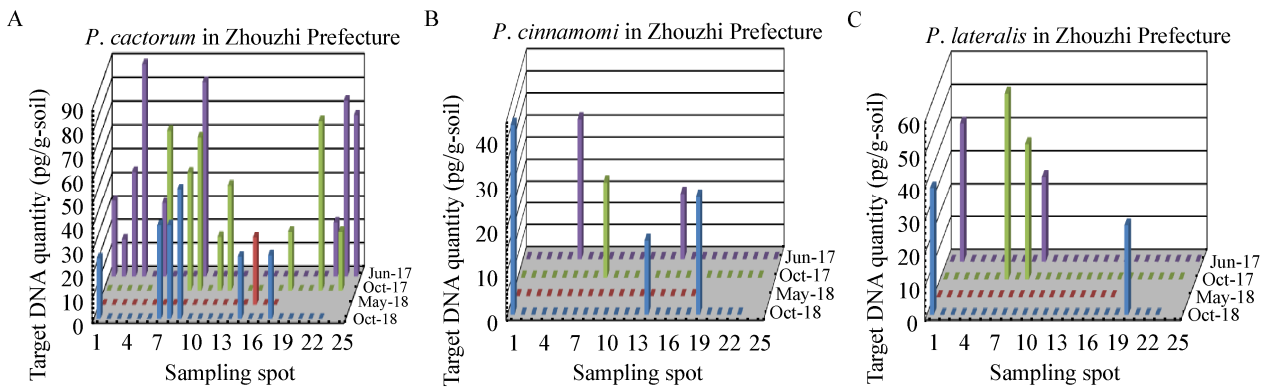


图 2 陕西省周至县恶疫霉(A)、樟疫霉(B)及雪松疫霉(C)的分布及 *Ypt1* 基因含量

Figure 2 Distributions and the *Ypt1* amounts of *Phytophthora cactorum* (A), *P. cinnamomi* (B) and *P. lateralis* (C) in Zhouzhi Prefecture of Shaanxi Province

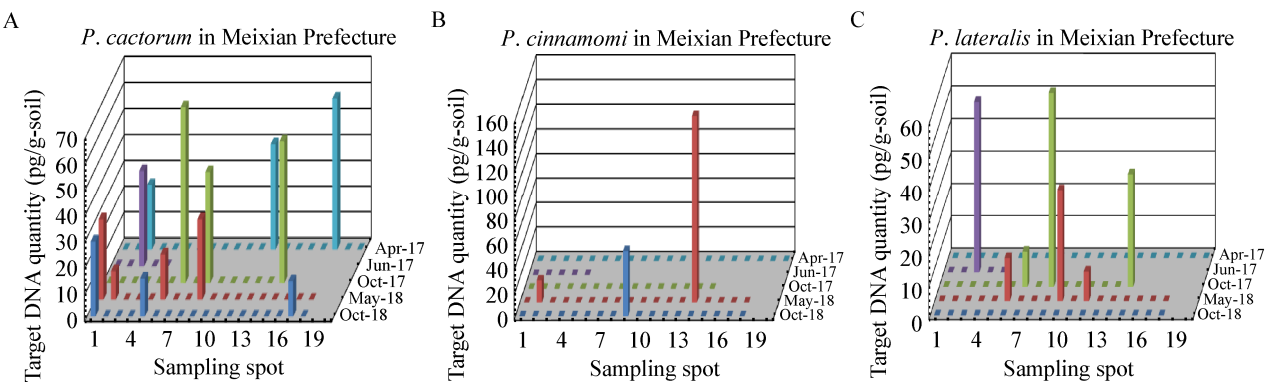


图 3 陕西省眉县恶疫霉(A)、樟疫霉(B)及雪松疫霉(C)的分布及 *Ypt1* 基因含量

Figure 3 Distributions and the *Ypt1* amounts of *Phytophthora cactorum* (A), *P. cinnamomi* (B) and *P. lateralis* (C) in Meixian Prefecture of Shaanxi Province

### 3 讨论与结论

在本研究中我们建立了可以同时鉴定和定量 3 种猕猴桃根腐病致病疫霉(恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉)的方法。在设计雪松疫霉的探针时,由于可设计区域有限且(G+C)mol%含量低,无法满足 TaqMan 探针的设计要求,因此使用了 TaqMan-MGB 探针。MGB 既可提高探针的  $T_m$  值<sup>[16]</sup>,又可以保证其特异性,从而达到实现多个 DNA 片段同时扩增的目的。

引物及探针特异性对 PCR 的检测至关重要。在之前的研究中 Li 等共检测了 9 个 DNA 位点,包括 rDNA 的 ITS 区域、28S rRNA 基因、核糖体蛋白 60S 的 *L10* 基因、 $\beta$  微管蛋白基因、延长因子 *I- $\alpha$*  基因、烯醇酶基因、热休克蛋白 90 基因、*tigA* 融合蛋白基因和 *Ypt1* 基因<sup>[15]</sup>。为了找出可以区别种间差异的特异性引物,对恶疫霉和其近缘种<sup>[20]</sup>的不同 DNA 序列进行分析,发现只有 *Ypt1* 基因适合恶疫霉特异性引物的设计<sup>[14]</sup>。

根据 Henegariu 等<sup>[21]</sup>关于多重 PCR 影响因素的研究结论,本实验共优化了 5 个因素:退火温度、退火时间、探针和引物浓度及镁离子浓度。此外,为了平衡 *Ypt1* 基因同时扩增的竞争性反应,本研究调整了不同种特异性引物和探针的浓度,最大程度地提高了多重实时定量 PCR 检测灵敏度。

对于樟疫霉和雪松疫霉的分子检测,虽然已经报道了一些特异性标记<sup>[8,20,22]</sup>,但大多数研究缺少对近缘种的检验。Kunadiya 等提出,特异性分子标记在使用前应该至少对同一分支中亲缘关系密切的物种进行确认<sup>[19]</sup>,并测试了 8 组已报道樟疫霉特异性引物,发现仅有 3 组是真正对樟疫霉具有特异性的。

rDNA 基因为多拷贝基因,而 *Ypt1* 基因是单拷贝基因。虽然 *Ypt1* 基因的灵敏度低于 rDNA 基因,但在灵敏度测试中恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉均可达到 100 fg,可以满足环境样品定量检测的要求。此外,单拷贝基因更有利于对单个繁殖体进行准确

定量分析<sup>[23]</sup>。

Bi 等<sup>[17]</sup>针对恶疫霉、樟疫霉及雪松疫霉建立的多重 PCR 检测方法为常规 PCR 检测技术,虽然引物特异性强,但是敏感度较低,因此难以检测出低浓度的样品。本研究在 Bi 等的基础上建立多重定量检测方法,敏感度提高 25 倍,不仅检测出更多的低浓度感染样品,还可以实现靶基因浓度的准确定量。

通过对陕西省猕猴桃栽培区的调查发现,虽然只有少数果园有疫霉病害史,但在一些没有疫霉病害史的果园中也检测到恶疫霉,这表明该地区猕猴桃果园可能不同程度地受到恶疫霉的侵染。从恶疫霉、樟疫霉和雪松疫霉在周至县和眉县不同时期 *Ypt1* 基因含量柱状图来看,致病菌数量与季节有一定联系。与 4、5 月份采集的样品相比,6、10 月份的土壤样品中 3 种疫霉的 DNA 含量较高,这有可能与温度和降水量有关。

疫霉菌病害引起的症状与其他病原引起的症状非常相似,但防治方法有所不同。因此,正确的诊断对保护农田生态环境具有重要意义。本文介绍的方法对猕猴桃疫霉病害的鉴定及防治具有重要的科学意义和应用价值。

致谢:感谢日本岐阜大学景山幸二教授提供了很多重要疫霉菌种,并且感谢周至和眉县植物保护站提供猕猴桃种植区土壤样本的信息。

### REFERENCES

- [1] O'Brien PA, Williams N, Hardy GES. Detecting *Phytophthora*[J]. Critical Reviews in Microbiology, 2009, 35(3): 169-181
- [2] Akilli S, Serce CU, Katicioğlu YZ, et al. Involvement of *Phytophthora citrophthora* in kiwifruit decline in Turkey[J]. Journal of Phytopathology, 2011, 159(7/8): 579-581
- [3] Kurbetli İ, Ozan S. Occurrence of *Phytophthora* root and stem rot of kiwifruit in Turkey[J]. Journal of Phytopathology, 2013, 161(11/12): 887-889
- [4] Lee YH, Jee HJ, Cha KH, et al. Occurrence of *Phytophthora* root rot on kiwifruit in Korea[J]. The Plant Pathology Journal, 2001, 17(3): 154-158
- [5] Huang YJ, Qi PK. Studies on the cause of root rot of kiwifruit in Guangdong Province[J]. Journal of South China

- Agricultural University, 1998, 19(4): 19-22,35 (in Chinese)  
黄亚军, 戚佩坤. 广东省猕猴桃根腐病病因研究[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(4): 19-22,35
- [6] Ferguson AR. Kiwifruit in the world – 2014[J]. Acta Horticulturae, 2015. DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1096.1
- [7] Wang RX, Cao ZJ. Diagnosis of blight of *Yangtao actinidia* in Shaanxi Province[J]. Acta Universitatis Agriculturae Boreali-Occidentalis, 1999, 27(4): 75-78 (in Chinese)  
王汝贤, 曹张军. 陕西省猕猴桃疫霉病的诊断及病原鉴定[J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(4): 75-78
- [8] Engelbrecht J, Duong TA, van den Berg N. Development of a nested quantitative real-time PCR for detecting *Phytophthora cinnamomi* in *Persea americana* rootstocks[J]. Plant Disease, 2013, 97(8): 1012-1017
- [9] Schena L, Nigro F, Ippolito A, et al. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi[J]. European Journal of Plant Pathology, 2004, 110(9): 893-908
- [10] Chen Y, Roxby R. Characterization of a *Phytophthora infestans* gene involved in vesicle transport[J]. Gene, 1996, 181(1/2): 89-94
- [11] Wang Y, Meng JC. Rapid detection of *Phytophthora nicotianae* in infected tobacco tissues and soil samples based on its *Ypt1* gene[J]. Journal of Phytopathology, 2010, 158(1): 1-7
- [12] Hansen ZR, Knaus BJ, Tabima JF, et al. Loop-mediated isothermal amplification for detection of the tomato and potato late blight pathogen, *Phytophthora infestans*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2016, 120(4): 1010-1020
- [13] Alejandro Rojas J, Miles TD, Coffey MD, et al. Development and application of qPCR and RPA genus- and species-specific detection of *Phytophthora sojae* and *P. sansomeana* root rot pathogens of soybean[J]. Plant Disease, 2017, 101(7): 1171-1181
- [14] Martin FN, Blair JE, Coffey MD. A combined mitochondrial and nuclear multilocus phylogeny of the genus *Phytophthora*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2014, 66: 19-32
- [15] Li MZ, Asano T, Suga H, et al. A multiplex PCR for the detection of *Phytophthora nicotianae* and *P. cactorum*, and a survey of their occurrence in strawberry production areas of Japan[J]. Plant Disease, 2011, 95(10): 1270-1278
- [16] Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, et al. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(2): 655-661
- [17] Bi XQ, Hieno A, Otsubo K, et al. A multiplex PCR assay for three pathogenic *Phytophthora* species related to kiwifruit diseases in China[J]. Journal of General Plant Pathology, 2019, 85(1): 12-22
- [18] Panjkovich A, Norambuena T, Melo F. dnaMATE: a consensus melting temperature prediction server for short DNA sequences[J]. Nucleic Acids Research, 2005, 33(S2): W570-W572
- [19] Blair JE, Coffey MD, Park SY, et al. A multi-locus phylogeny for *Phytophthora* utilizing markers derived from complete genome sequences[J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(3): 266-277
- [20] Winton LM, Hansen EM. Molecular diagnosis of *Phytophthora lateralis* in trees, water, and foliage baits using multiplex polymerase chain reaction[J]. Forest Pathology, 2001, 31(5): 275-283
- [21] Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, et al. Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol[J]. BioTechniques, 1997, 23(3): 504-511
- [22] O'Brien PA. PCR primers for specific detection of *Phytophthora cinnamomi*[J]. Australasian Plant Pathology, 2008, 37(1): 69-71
- [23] Kageyama K, Komatsu T, Suga H. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil[J]. Journal of General Plant Pathology, 2003, 69(3): 153-160