

# 基于 *Ypt1* 靶标的非洲菊隐地疫霉 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测

王丽花<sup>#1</sup>, 孙爱青<sup>#1,2</sup>, 张艺萍<sup>1</sup>, 许凤<sup>1</sup>, 杨秀梅<sup>\*1</sup>

1 云南省农业科学院花卉研究所 云南省花卉育种重点实验室 国家观赏园艺工程技术研究中心,  
云南 昆明 650205

2 云南大学 农学院, 云南 昆明 650091

王丽花, 孙爱青, 张艺萍, 许凤, 杨秀梅. 基于 *Ypt1* 靶标的非洲菊隐地疫霉 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 检测[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3658-3672.

WANG Lihua, SUN Aiqing, ZHANG Yiping, XU Feng, YANG Xiumei. A *Ypt1*-targeted TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR method for detection of *Phytophthora cryptogea* P. on *Gerbera jamesonii*[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3658-3672.

**摘要:**【背景】隐地疫霉(*Phytophthora cryptogea* P.)是一种可危害多种植物且危害症状较为严重的检疫性病原卵菌, 在世界范围内危害严重。【目的】建立一种特异性强、灵敏度高且能定量分析 *P. cryptogea* 携带情况的高效检测方法。【方法】根据隐地疫霉 *Ypt1* 基因的保守序列设计并筛选实时荧光定量 PCR 的特异性引物和探针, 在优化引物浓度、探针浓度和退火温度的基础上获得最优反应体系和条件, 利用最优反应条件构建标准曲线及检测体系, 并验证检测体系的特异性、灵敏性和重复性。【结果】综合考虑  $C_q$  值、最终荧光信号值(relative fluorescence units, RFU)和经济角度, 优化后的隐地疫霉荧光定量 PCR 最佳退火温度为 60 °C, 上、下游引物浓度均为 20  $\mu\text{mol/L}$ , 探针浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ ; 所建立的标准曲线为  $y=-3.323x+40.767$ , 相关系数( $R^2$ )为 0.998, 扩增效率( $E$ )为 99.9%, 相关性好、扩增效率高; 对其他 8 种常见卵菌及真菌均无扩增曲线, 表明所设计的引物探针组合特异性强; 灵敏度检测结果显示最低检出限为 1 copy, 最低稳定检出限为 10 copies, 较常规 PCR 技术的灵敏度提高了 10–100 倍; 同浓度批组内和批组间重复性试验  $C_q$  值标准差为 0.04–0.13, 变异系数(coefficient of variation, CV)为 0.20%–0.58%, 重复性及稳定性好、可靠性高。【结论】基于 *Ypt1* 靶标建立了非洲菊隐地疫霉 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测技术体系, 可高效特异地鉴别出疫霉属中广

资助项目: 云南省种子种业联合实验室项目(202205AR070001-05); 国家花卉产业体系昆明综合试验站项目(CARS-23-G56); 云南省标准化研究项目(2023BZHXM05)

<sup>#</sup>对本文贡献相同

This work was supported by the Yunnan Seed Industry Joint Lab Project (202205AR070001-05), the Kunming Comprehensive Experimental Station Project of National Flower Industry System (CARS-23-G56), and the Standardization Research Project of Yunnan Province (2023BZHXM05).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Corresponding author. E-mail: yangxm77@sina.com

Received: 2024-01-03; Accepted: 2024-02-13; Published online: 2024-04-03

泛感染非洲菊的隐地疫霉病菌，对于口岸通关和田间隐地疫霉的快速高效检测，尤其是原原种、原种等核心材料的痕量病原菌的检测鉴定和病害早期精准诊断，以及有效防控意义重大，应用前景广阔。

关键词：非洲菊；隐地疫霉；*Ypt1* 基因；实时荧光定量 PCR；TaqMan 探针

## A *Ypt1*-targeted TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR method for detection of *Phytophthora cryptogea* P. on *Gerbera jamesonii*

WANG Lihua<sup>#1</sup>, SUN Aiqing<sup>#1,2</sup>, ZHANG Yiping<sup>1</sup>, XU Feng<sup>1</sup>, YANG Xiumei<sup>\*1</sup>

1 Yunnan Key Laboratory for Flower Breeding, National Engineering Research Center for Ornamental Horticulture, Flower Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, Yunnan, China

2 School of Agriculture, Yunnan University, Kunming 650091, Yunnan, China

**Abstract:** [Background] *Phytophthora cryptogea* P. is a quarantine pathogen causing serious symptoms in a variety of plants in the global range. [Objective] To establish a specific, sensitive, and quantitative assay for the detection of *P. cryptogea*. [Methods] Specific primers and probes for real-time fluorescence quantitative PCR were designed and screened according to the conserved sequence of *Ypt1* in *P. cryptogea*. The reaction system and procedure were optimized in terms of primer concentration, probe concentration, and annealing temperature, and the standard curve and detection system were established under the optimal reaction conditions. The specificity, sensitivity, and repeatability of the established detection system were evaluated. [Results] Considering  $C_q$ , RFU, and cost, the optimal PCR conditions were determined as the primer concentration of 20  $\mu\text{mol/L}$ , the probe concentration of 10  $\mu\text{mol/L}$ , and annealing at 60  $^{\circ}\text{C}$ . The linear equation of the established standard curve was  $y = -3.323x + 40.767$ , with  $R^2 = 0.998$  and  $E = 99.9\%$ , which indicated the established system had good correlation and high amplification efficiency. No amplification curve appeared for the other eight common species of oomycetes and fungi, which indicated that the designed primers and probe had strong specificity. The established method showed the minimum limit of detection being only 1 copy and the minimum limit of stable detection being 10 copies. Compared with conventional PCR, the method established in this study increased the detection sensitivity by 10–100 times. The intra-batch and inter-batch tests with the established method showed the standard deviation (SD) of  $C_q$  ranging from 0.04 to 0.13 and the coefficient of variation (CV) ranging from 0.20% to 0.58%, indicating that the method had good repeatability, stability, and reliability. [Conclusion] We established a *Ypt1*-targeted TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR method for the detection of *P. cryptogea*. This method can efficiently and specifically identify *P. cryptogea* infecting *Gerbera jamesonii*, serving the rapid and efficient detection of this pathogen at port clearance and in the field, particularly for the detection and identification of trace pathogens in

core materials such as breeder's seed and original species. It is essential for the early diagnosis and effective prevention and control of diseases, demonstrating a broad application prospect.

**Keywords:** *Gerbera jamesonii*; *Phytophthora cryptogea* P.; *Ypt1*; real-time fluorescence quantitative PCR; TaqMan probe

隐地疫霉(*Phytophthora cryptogea* P.)是一种重要的植物检疫性病原卵菌,危害程度大、寄主范围广<sup>[1-2]</sup>,主要以抗逆性极强的卵孢子、厚垣孢子在土壤中越冬,当田间温度和湿度适宜时,卵孢子打破休眠萌发,以游动孢子、孢子囊及菌丝体等不同菌体形式通过幼根或伤口侵入寄主,可造成根、茎部腐烂,导致受感染植物叶片迅速萎蔫枯死,对植株造成毁灭性灾害<sup>[1,3]</sup>。近年来,随着我国设施农业的大规模发展以及花卉、蔬菜等农产品进出口渠道的多元化,由隐地疫霉所致的病害及造成的经济损失逐年加重。据不完全调查,由隐地疫霉侵染导致的非洲菊根腐病为一种较难防控的顽固性土传病害,发病率达30%以上,可通过水流、农事操作、昆虫、风力等介质近距离或远距离传播,并且传播速度快,在氮肥过重、株行距过密、地下水位高的地块发病尤为严重,导致切花质量和产量严重下降,严重时仅有零星产量或减产甚至绝产<sup>[4,6]</sup>。除非洲菊外,隐地疫霉还可以侵染康乃馨、紫罗兰、草莓、番茄及多种花卉蔬菜类植物引发疫病<sup>[1,7-8]</sup>。该病目前主要发生在中国、美国、英国、印度、澳大利亚等20多个国家和地区<sup>[2,9]</sup>,在中国的非洲菊产区(浙江、广东、云南等)广泛发生,并且发生较严重<sup>[4]</sup>,因此,建立一套非洲菊隐地疫霉的快速、准确、高灵敏度的检测体系对其早期病原菌的监测和控制具有重要意义。目前,隐地疫霉的检测方法有形态学鉴定<sup>[5]</sup>、PCR检测<sup>[10-11]</sup>和实时荧光定量PCR检测<sup>[10]</sup>等。传统的形态学鉴定方法在隐地疫霉的检测中发挥了重要作用,但是费时费力

且要求操作者具备专业的疫霉菌分离和形态学鉴定知识。然而,郭成宝等<sup>[11]</sup>和 Minerdi 等<sup>[10]</sup>建立的PCR检测法和SYBR Green实时荧光定量PCR方法灵敏度较低,仅为10 pg和160 ag,对于原种等核心材料的痕量检测存在灵敏度和准确度有限的问题。目前也存在环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)、重组酶聚合酶扩增(recombinant enzyme polymerase amplification, RPA)等恒温扩增检测病原菌技术,但这些技术存在引物设计困难、检测灵敏度低、样本类型限制,以及结果假阳性或假阴性等缺点<sup>[12]</sup>。因此,综合目前其他检测技术,基于TaqMan探针的实时荧光定量PCR技术更为高效、灵敏、特异,特别在植株感病初始阶段,应用效果尤为突出和优越<sup>[13-16]</sup>。分子生物学检测一般通过筛选和锁定适合的靶标基因来实现病原菌的特异快速检测,目前应用较多的是核糖体内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列<sup>[17-20]</sup>。但是越来越多的研究发现,在疫霉属中,部分疫霉菌种间ITS序列差异很小,以ITS为靶标设计的引物难以将该类别疫霉菌与其近源种区分开<sup>[21-22]</sup>。随着基因组测序工作的进行,很多检测的靶标序列被开发并加以利用,如疫霉属中与elicitin相关的*parA1*基因、储存蛋白编码的*Lpv*基因、线粒体中的编码基因*Cox1*与*Cox2*,以及编码Ras蛋白的*Ypt1*基因<sup>[23-25]</sup>。前人研究证明<sup>[26-27]</sup>,*Ypt1*基因非编码区具有较多的特异性位点,并且其序列在种内相对高度保守,可作为疫霉属种水平病原菌分子检测的靶标基因,能有效区别和特异

检测疫霉属种水平病原菌。本研究以非洲菊隐地疫霉的 *Ypt1* 基因为靶标, 设计特异性引物和探针, 在优化引物浓度、探针浓度和退火温度的基础上获得最优反应体系和条件, 继而构建检测体系并验证其特异性、灵敏性和重复性, 为非洲菊隐地疫霉的早发现和科学防控, 以及从源头遏制病原菌传播提供技术支撑。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 样品

菌株隐地疫霉(*P. cryptogea*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* S.)、烟草疫霉(*Phytophthora nicotianae* B.)、茄镰孢菌(*Fusarium solani* S.)、霜霉菌(*Peronospora brassicae* G.)、尾孢菌(*Cercospora insulana* S.)、致病疫霉(*Phytophthora infestans* M.)、掘氏疫霉(*Phytophthora drechsleri* T.)、恶疫霉(*Phytophthora cactorum* S.)均由本实验室保存。

14 株非洲菊待检测样品为 5 株组培瓶苗、5 株穴盘苗及 4 株开花植株。其中, 组培瓶苗和穴盘苗来自云南省玉溪市江川区九溪镇; 2 株开花植株来自云南省昆明市晋宁县, 2 株开花植株来自云南省红河哈尼族彝族自治州开远市。

### 1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA) (g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 琼脂 20.0。

马铃薯葡萄糖肉汤培养基(potato dextrose broth, PDB) (g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0。

V8 培养基: V8 汁 10 mL, UP H<sub>2</sub>O 90 mL, 琼脂 2 g。

### 1.3 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒、PCR 扩增试剂盒、胶回

收试剂盒、限制性快切酶 QuickCut™ *Hind* III、克隆 T 载体 pMD™19-T Vector Cloning Kit、感受态细胞 *E. coli* DH5α Competent Cells、质粒提取试剂盒、实时荧光定量 PCR 扩增试剂盒和定量 PCR 专用稀释液 EASY Dilution, 宝日医生物技术(北京)有限公司。

微量分光光度计和高速冷冻离心机, Thermo Scientific 公司; 实时荧光定量分析仪、PCR 扩增仪、凝胶电泳仪和凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; 超净工作台, Airtech 公司。

### 1.4 菌株的培养及菌丝粉的制备

无菌条件下将供试菌株接种至 PDA 培养基上, 25 °C 黑暗培养 3 d 后从菌落边缘切取 2 mm×2 mm 菌丝块。将疫霉菌转接至 V8 液体培养基, 将其他菌株接种至 PDB 培养基中, 25 °C、180 r/min 振荡培养 3–5 d, 经无菌滤纸过滤收集菌丝, 经冷冻抽干后研磨成菌丝粉, 于–20 °C 保存备用。

### 1.5 引物探针设计

从 GenBank 中下载 KJ755146.1、LC596221.1、LC596220.1、DQ162987.1、MH988437.1 共 5 条隐地疫霉 *Ypt1* 基因序列以及烟草疫霉、恶疫霉、掘氏疫霉、致病疫霉的 *Ypt1* 基因序列, 对所有下载的 *Ypt1* 基因序列用 DNAMAN 软件进行比对分析获得隐地疫霉特异性高度保守片段。以该片段为靶标, 用 Primer Premier 5.0 软件和 NCBI Primer-BLAST 联合分析设计出 7 对引物及探针(表 1), 然后按郭成宝等<sup>[11]</sup>的 PCR 方法分别对该 7 对引物进行扩增并用琼脂糖凝胶电泳检测其特异性, 筛选出最优引物对 P.cry-F7/P.cry-R7 及对应的探针 P.cry-Probe 7, 探针 5'端用 FAM 标记, 3'端用 BHQ-1 修饰。探针及引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 引物探针序列

Table 1 Primers and probe sequences

引物名称 Primer Name	序列 Sequence (5'→3')	片段长度 Fragment size (bp)
P.cry-F1	GACGGCAAGACCATCAA	116
P.cry-R1	TCCCACTACAACAGCAA	
P.cry-Probe 1	CTCCAGATTGTACGTCTACATAGGA	
P.cry-F2	CCATCAAGCTCCAGATT	190
P.cry-R2	GTCACGTCTGTACACCAC	
P.cry-Probe 2	CGTCTACATAGGATTTGGATCTCTT	
P.cry-F3	CGACAAGGTCCAATAAA	166
P.cry-R3	AACAAGAACTTCCACAA	
P.cry-Probe 3	CTCTAGTATTTTTTCTGACTTGTG	
P.cry-F4	TGTTGTGGAAGTTCTTG	200
P.cry-R4	TACCTATCGATCTCGTG	
P.cry-Probe 4	TTCCGCACGATCACTAGCAGTTACT	
P.cry-F5	TTGCTGTTGTAGTGGGA	176
P.cry-R5	ATGAAGTTGAGTTCGCG	
P.cry-Probe 5	TTCCGCACGATCACTAGCAGTTACT	
P.cry-F6	CCGTACTATCGAGCTGGACG	170
P.cry-R6	TGCTAGTGATCGTGCGGAAA	
P.cry-Probe 6	AATTGCTGTTGTAGTGGGACACGGCCGGACA	
P.cry-F7	GGACCAGGAGTCATTCAACAA	122
P.cry-R7	GGCAATCACAACAAGCTACAC	
P.cry-Probe 7	CATACAACAATGAAGTTGAGTTCGCGCC	

## 1.6 DNA 的提取

取少量各病原菌菌丝粉,按照 DNA 提取试剂盒说明书提取各病原菌的 DNA,最后加 30–50  $\mu\text{L}$  的 RNase Free ddH<sub>2</sub>O 溶解提取的基因组沉淀物,利用超微量分光光度计测定 DNA 的浓度及纯度,于 -20  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

## 1.7 质粒标准品的制备

以隐地疫霉的 DNA 为模板,利用筛选出的特异性引物对 P.cry-F7/P.cry-R7 按照 PCR 扩增试剂盒说明书进行 PCR 扩增,PCR 反应体系: dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 2.5  $\mu\text{L}$ , 10 $\times$ Ex Taq Buffer (20 mmol/L) 2.5  $\mu\text{L}$ , Ex Taq 酶(5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.25  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ , P.cry-F7 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , P.cry-R7 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , RNase Free

ddH<sub>2</sub>O 16.75  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min。取 5  $\mu\text{L}$  PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳,仅有一条亮带且位置正确,将产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序,测序结果经 BLAST 进一步验证为隐地疫霉。其余 PCR 产物根据胶回收试剂盒说明书经纯化回收,将回收产物克隆至 pMD19-T 载体并转化至感受态细胞 *E. coli* DH5 $\alpha$  Competent Cells 中,筛选并按照质粒提取试剂盒说明书提取阳性克隆的质粒并测序验证。然后将构建好的隐地疫霉质粒用限制性快切酶 QuickCut<sup>TM</sup> Hind III 酶切线性化并进行胶回收,利用超微量分光光度计测定胶回收产物的浓度,根据以下公式换

算成质粒标准品的拷贝数: 质粒拷贝数=质粒浓度( $\text{ng}/\mu\text{L}$ ) $\times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}$ /( $660 \times$ 重组质粒碱基数), 计算得出隐地疫霉的质粒拷贝数为  $5.9 \times 10^9$  copies, 利用 EASY Dilution 将其稀释为  $5 \times 10^9$  copies/ $\mu\text{L}$  并进行 10 倍梯度稀释, 依次稀释至  $5 \times 10^{-1}$  copies/ $\mu\text{L}$ , 获得 10 个浓度梯度的阳性质粒标准品。

### 1.8 实时荧光定量 PCR 检测体系的优化

以隐地疫霉 DNA 为模板, 按照实时荧光定量 PCR 扩增试剂盒说明书配制实时荧光定量 PCR 反应体系(25  $\mu\text{L}$ ): 2 $\times$ Premix *Ex Taq* 12.5  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2.0  $\mu\text{L}$ , P.cry-F7 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , P.cry-R7 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , P.cry-Probe 7 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1.0  $\mu\text{L}$ , RNase Free ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 58–62  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。采用矩阵法分别对不同的引物浓度(1、10、20、50  $\mu\text{mol/L}$ )、探针浓度(1、10、20、50  $\mu\text{mol/L}$ )和退火温度(58、60、62  $^{\circ}\text{C}$ )进行优化, 根据扩增曲线的  $C_q$  值和最终荧光信号(relative fluorescence units, RFU)确定最优的引物探针浓度和退火温度。在此基础上, 以不同浓度( $10^8$ – $10^2$  copies)的隐地疫霉质粒为模板, 开展标准曲线构建的条件微调优化, 以获得最佳的引物探针浓度和退火温度。

### 1.9 特异性检测

以 RNase Free ddH<sub>2</sub>O 为空白对照,  $10^6$  copies 的质粒标准品为阳性对照, 以携带隐地疫霉、尖孢镰刀菌、烟草疫霉、茄镰孢菌、霜霉菌、尾孢菌、致病疫霉、掘氏疫霉和恶疫霉的 DNA 样品为检测对象, 空白对照、阳性对照及样品均设置 3 个重复, 开展本研究建立方法的特异性检测。

### 1.10 实时荧光定量 PCR 标准曲线的建立

以 RNase Free ddH<sub>2</sub>O 为空白对照, 以 8 个

稀释梯度( $10^8$ – $10^1$  copies)的质粒标准品为模板, 每个梯度浓度设置 3 个重复, 采用优化后的反应条件进行扩增, 构建隐地疫霉标准曲线。以  $\log_{10}$ (质粒拷贝数) (lgC) 为横坐标, 以循环阈值( $C_q$  值)为纵坐标, 制作标准线性回归方程, 根据标准曲线的相关系数( $R^2$ )、斜率、扩增效率( $E$ )来验证该方法的有效性。

### 1.11 灵敏度检测

以 RNase Free ddH<sub>2</sub>O 为空白对照, 以 9 个稀释梯度( $10^8$ – $10^0$  copies)的质粒标准品为模板, 每个梯度的质粒设置 3 个重复, 用优化后的反应条件进行检测, 检验其灵敏度。并利用上述 9 个梯度的质粒标准品为模板进行实时荧光定量 PCR 和常规 PCR 检测, 比较并分析 2 种方法的灵敏度差异。

### 1.12 重复性试验

以 RNase Free ddH<sub>2</sub>O 为空白对照, 以隐地疫霉质粒标准品  $10^7$ – $10^3$  copies 5 个浓度为模板, 利用优化后的反应条件进行检测, 每个梯度的质粒设置 3 个重复(批组内), 并在不同时间分次开展 3 次重复性试验(批组间), 分别计算批组内和批组间的平均  $C_q$  值、标准偏差(standard deviation, SD)和变异系数(coefficient of variation, CV), 变异系数计算公式为: 变异系数(CV) (%) = 标准差(SD)/均数 $\times 100$ 。

### 1.13 抽检样品检测应用

对 1.1 的 14 株待检测样品(5 株组培瓶苗、5 株穴盘苗、4 株开花株)开展检测应用, 其中 3 株开花植株样品有不同程度的萎蔫和茎基部黑色腐烂。分别取 14 个样品植株的茎基部 0.1 g, 按照 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA, 利用优化的实时荧光定量 PCR 体系检测, 并以阳性质粒为阳性对照, ddH<sub>2</sub>O 为空白对照。同时按郭成宝等<sup>[11]</sup>的常规 PCR 方法加以验证。

## 2 结果与分析

### 2.1 实时荧光定量 PCR 检测体系的优化结果

通过优化荧光定量 PCR 检测体系(图 1), 综合  $C_q$  值、RFU 值和经济角度, 引物浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$ , 探针浓度为 10  $\mu\text{mol/L}$ , 退火温度( $T_m$ ) 为 58  $^{\circ}\text{C}$ 或 60  $^{\circ}\text{C}$ 时, 单样品检测效果最佳。在此基础上开展标准曲线构建的条件优化, 进一步微调  $T_m$  值和引物探针加入量, 综合扩增效率 ( $E$ ) 和相关系数( $R^2$ ) 的关系, 最终获得最优的反应条件(图 2), 成功建立了隐地疫霉实时荧光定量 PCR 检测技术体系。反应体系(25  $\mu\text{L}$ ): Premix Ex Taq (2 $\times$ )混合液 12.5  $\mu\text{L}$ , RNase Free ddH<sub>2</sub>O 8.5  $\mu\text{L}$ , P.cry-F7 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , P.cry-R7 (20  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , P.cry-Probe 7 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 95  $^{\circ}\text{C}$  5 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 40 个循环。

### 2.2 特异性检测结果

以 RNase Free ddH<sub>2</sub>O 作为空白对照, 以隐地疫霉质粒作为阳性对照, 利用建立的隐地疫霉荧光定量 PCR 技术体系分别对携带隐地疫霉、尖孢镰刀菌、烟草疫霉、茄镰孢菌、霜霉菌、尾孢菌、致病疫霉、掘氏疫霉、恶疫霉的基因片段进行检测, 检测结果(图 3)显示, 仅阳性质粒和携带隐地疫霉的样品出现典型扩增曲线, 其  $C_q$  平均值分别为 21.23 和 23.68, 其余样品及空白对照均未出现扩增曲线或扩增曲线  $C_q$  值大于 35, 将扩增曲线  $C_q$  值大于 35 的 2 个样品(烟草疫霉、尾孢菌)进行再次检测, 检测  $C_q$  值仍大于 35, 说明该 2 个样品检测结果为阴性。以上试验结果表明本研究设计的引物探针特异性好, 可以高效特异地检测出样品携带的隐地疫霉。

### 2.3 标准曲线的建立

以  $10^8$ – $10^1$  copies 8 个梯度的隐地疫霉质粒

标准品为模板, 以最优条件进行实时荧光定量 PCR 扩增(图 4), 成功构建了隐地疫霉的标准曲线, 标准曲线线性方程为  $y=-3.323x+40.767$ , 其中  $R^2=0.998$ ,  $E=99.9\%$ 。根据线性方程可看出, 随着隐地疫霉质粒拷贝数的降低,  $C_q$  值也逐渐递增(图 4A), 并且两者之间呈现出良好的线性关系(图 4B), 这表明本研究建立的标准曲线与隐地疫霉质粒浓度之间相关性好, 扩增效率高。

### 2.4 灵敏度检测结果

以  $10^8$ – $10^0$  copies 9 个梯度的隐地疫霉质粒标准品为模板, 分别进行实时荧光定量 PCR 和常规 PCR 的灵敏度检测, 结果显示本研究建立的实时荧光定量 PCR 最低检出限达 1 copy, 最低稳定检出限为 10 copies (图 5A), 而常规 PCR 的最低检出限为 100 copies (图 5B), 表明本研究建立的隐地疫霉实时荧光定量 PCR 检测体系的灵敏度非常高, 是常规 PCR 的 10–100 倍。

### 2.5 重复性检测结果

以  $10^7$ – $10^3$  copies 5 个梯度的隐地疫霉质粒标准品为模板在 3 次不同时间进行 3 个重复的质粒标准品检测, 分别验证本研究建立的检测体系批组内和批组间的重复性和稳定性。由表 2 可知, 同一浓度  $C_q$  值标准偏差组内仅为 0.04–0.13、组间仅为 0.06–0.08; 变异系数 CV 组内仅为 0.20%–0.58%, 组间仅为 0.23%–0.46%, 组内和组间的标准偏差和变异系数均较小, 表明本研究建立的实时荧光定量 PCR 检测体系具有较好的稳定性和可靠性。

### 2.6 抽检样品检测结果

非洲菊组培瓶苗、穴盘苗、开花植株共 14 个样品的样品编号及检测结果见表 3。实时荧光定量 PCR 法检测结果(图 6A)中, 阳性质粒的检测  $C_q$  为 14.00; 5 个组培瓶苗中 2 个样品有扩

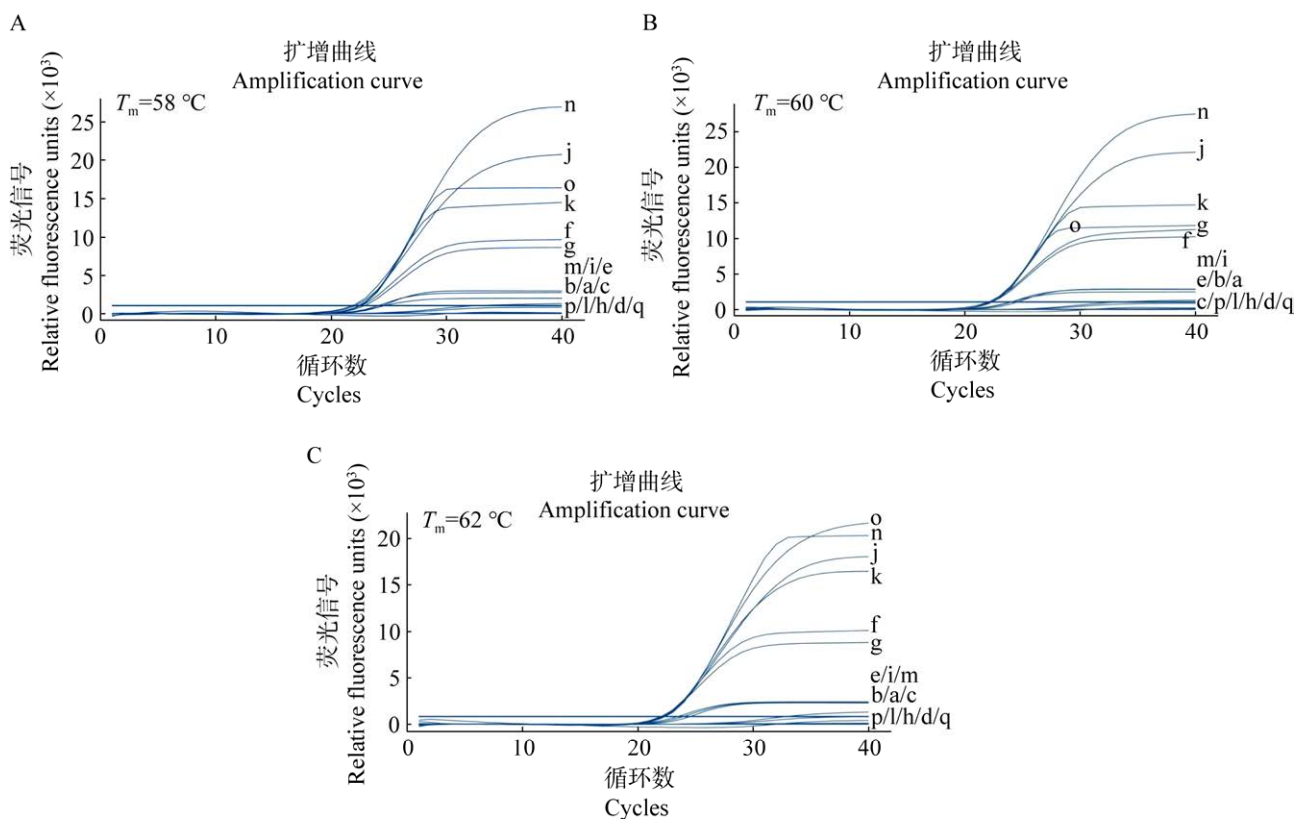


图 1 不同引物浓度、探针浓度、退火温度下实时荧光定量 PCR 扩增曲线 A–C 分别代表  $T_m$  在 58、60、62 °C 下不同引物探针浓度的荧光定量 PCR 扩增曲线. a: 引物=1  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=1  $\mu\text{mol/L}$ ; b: 引物=1  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=10  $\mu\text{mol/L}$ ; c: 引物=1  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=20  $\mu\text{mol/L}$ ; d: 引物=1  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=50  $\mu\text{mol/L}$ ; e: 引物=10  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=1  $\mu\text{mol/L}$ ; f: 引物=10  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=10  $\mu\text{mol/L}$ ; g: 引物=10  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=20  $\mu\text{mol/L}$ ; h: 引物=10  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=50  $\mu\text{mol/L}$ ; i: 引物=20  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=1  $\mu\text{mol/L}$ ; j: 引物=20  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=10  $\mu\text{mol/L}$ ; k: 引物=20  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=20  $\mu\text{mol/L}$ ; l: 引物=20  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=50  $\mu\text{mol/L}$ ; m: 引物=50  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=1  $\mu\text{mol/L}$ ; n: 引物=50  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=10  $\mu\text{mol/L}$ ; o: 引物=50  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=20  $\mu\text{mol/L}$ ; p: 引物=50  $\mu\text{mol/L}$ , 探针=50  $\mu\text{mol/L}$ ; q: ddH<sub>2</sub>O

Figure 1 Real-time fluorescence quantitative PCR amplification curves of different primer concentration, probe concentration, and annealing temperature. A–C represent the fluorescence quantitative PCR amplification curves of  $T_m$  at 58, 60 and 62 °C with different primer and probe concentrations, respectively. a: Primer=1  $\mu\text{mol/L}$ , probe=1  $\mu\text{mol/L}$ ; b: Primer=1  $\mu\text{mol/L}$ , probe=10  $\mu\text{mol/L}$ ; c: Primer=1  $\mu\text{mol/L}$ , probe=20  $\mu\text{mol/L}$ ; d: Primer=1  $\mu\text{mol/L}$ , probe=50  $\mu\text{mol/L}$ ; e: Primer=10  $\mu\text{mol/L}$ , probe=1  $\mu\text{mol/L}$ ; f: Primer=10  $\mu\text{mol/L}$ , probe=10  $\mu\text{mol/L}$ ; g: Primer=10  $\mu\text{mol/L}$ , probe=20  $\mu\text{mol/L}$ ; h: Primer=10  $\mu\text{mol/L}$ , probe=50  $\mu\text{mol/L}$ ; i: Primer=20  $\mu\text{mol/L}$ , probe=1  $\mu\text{mol/L}$ ; j: Primer=20  $\mu\text{mol/L}$ , probe=10  $\mu\text{mol/L}$ ; k: Primer=20  $\mu\text{mol/L}$ , probe=20  $\mu\text{mol/L}$ ; l: Primer=20  $\mu\text{mol/L}$ , probe=50  $\mu\text{mol/L}$ ; m: Primer=50  $\mu\text{mol/L}$ , probe=1  $\mu\text{mol/L}$ ; n: Primer=50  $\mu\text{mol/L}$ , probe=10  $\mu\text{mol/L}$ ; o: Primer=50  $\mu\text{mol/L}$ , probe=20  $\mu\text{mol/L}$ ; p: Primer=50  $\mu\text{mol/L}$ , probe=50  $\mu\text{mol/L}$ ; q: ddH<sub>2</sub>O.



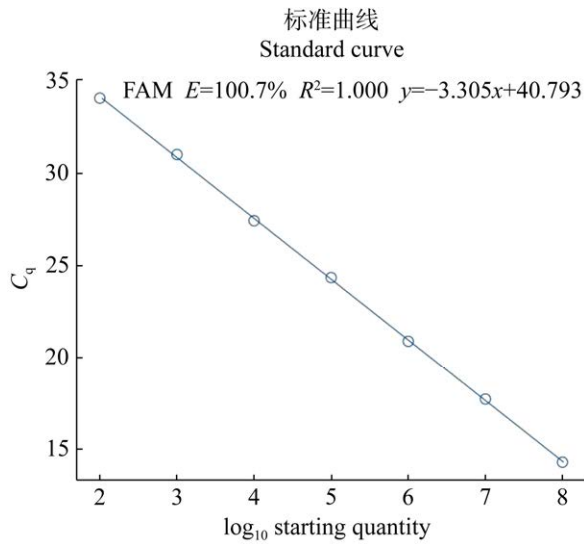


图2 不同检测条件的微调下最优标准曲线  
Figure 2 Optimal standard curve under fine-tuning of different detection conditions.

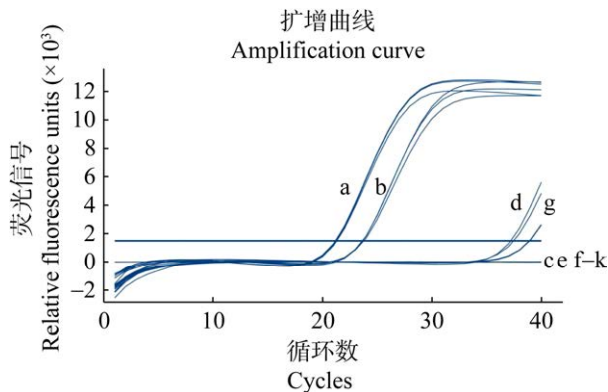


图3 实时荧光定量PCR特异性检测扩增曲线 a: 阳性质粒; b: 阳性样品; c: 尖孢镰刀菌; d: 烟草疫霉; e: 茄镰孢菌; f: 霜霉菌; g: 尾孢菌; h: 致病疫霉; i: 掘氏疫霉; j: 恶疫霉; k: ddH<sub>2</sub>O  
Figure 3 The amplification curves for specific detection by real-time fluorescence quantitative PCR. a: Positive plasmid; b: Positive samples; c: *Fusarium oxysporum*; d: *Tobacco black shank*; e: *Fusarium solani*; f: *Peronospora brassicae Gaumann*; g: *Cercospora insulana Sacc*; h: *Phytophthora infestans*; i: *Phytophthora dunbergii*; j: *Phytophthora cactorum*; k: ddH<sub>2</sub>O.

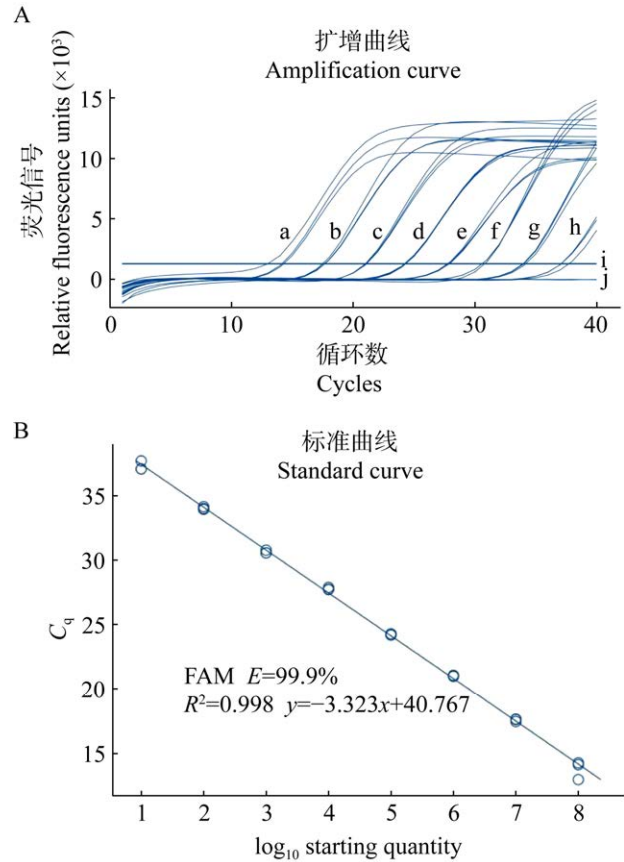


图4 实时荧光定量PCR标准曲线及扩增曲线 A: 标准曲线扩增曲线. B: 标准曲线. a-h:  $10^8-10^1$  copies; i: ddH<sub>2</sub>O  
Figure 4 Real-time fluorescence quantitative PCR standard curve and amplification curves. A: Standard curve amplification curves. B: Standard curve. a-h:  $10^8-10^1$  copies; i: ddH<sub>2</sub>O.

扩增曲线,  $C_q$ 值分别为 33.95 和 39.62, 3 个样品无扩增曲线; 5 个穴盘苗中 4 个样品出现扩增曲线, 其  $C_q$ 值为 30-39.5, 1 个样品无扩增曲线; 4 个开花植株均出现扩增曲线, 其中 3 个样品的  $C_q$ 值在 22-30 之间, 1 个样品的  $C_q$ 值为 38.91。14 个样品开展实时荧光定量 PCR 检测, 其中 10 个样品有荧光  $C_q$ 值, 不同类型样品的隐地疫霉载量排序为: 开花植株>穴盘苗>组培瓶苗。利用常规 PCR (图 6B)对其进行验证, 显

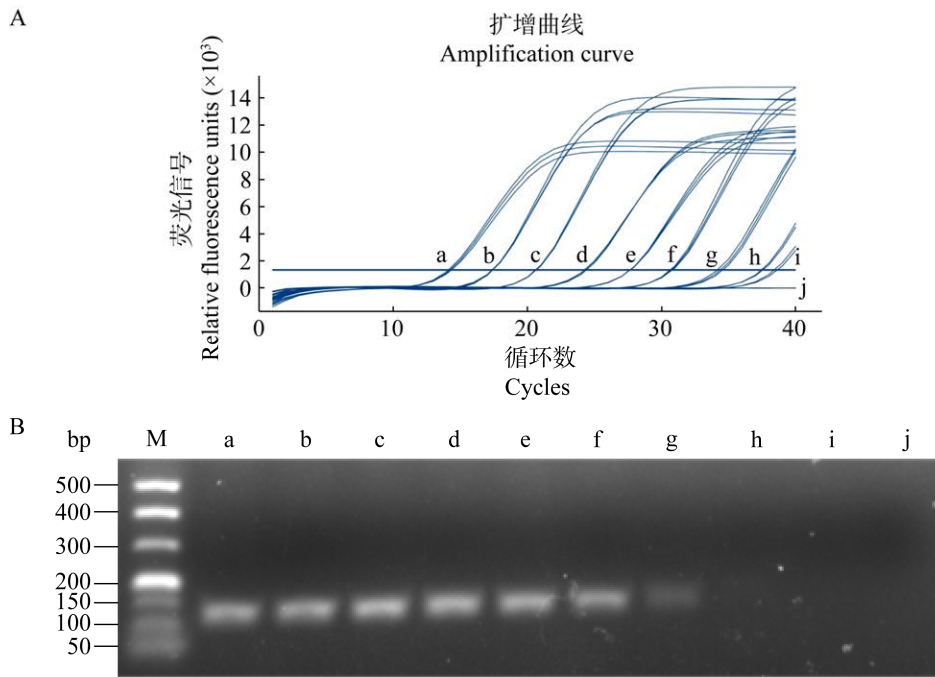


图 5 实时荧光定量 PCR 和常规 PCR 灵敏度检测结果 A: 实时荧光定量 PCR 灵敏度检测结果. B: 常规 PCR 灵敏度检测结果. a-i:  $10^8-10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ ; j:  $\text{H}_2\text{O}$

Figure 5 Real-time fluorescence quantitative PCR and conventional PCR sensitivity detection result. A: Quantitative real-time PCR sensitivity detection results. B: Conventional PCR sensitivity detection result. a-i:  $10^8-10^0$  copies/ $\mu\text{L}$ ; j:  $\text{H}_2\text{O}$ .

表 2 实时荧光定量 PCR 检测体系的重复性试验

Table 2 The repeatability results of the real-time fluorescence quantitative PCR detection

阳性质粒拷贝数 Positive plasmid copy number (copies/ $\mu\text{L}$ )	组内 $C_q$ 值 $C_q$ values within the group			组间 $C_q$ 值 $C_q$ values between the groups		
	平均值 Mean	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation (%)	平均值 Mean	标准差 Standard deviation	变异系数 Coefficient of variation (%)
	$10^7$	17.58	0.10	0.58	17.51	0.08
$10^6$	21.05	0.04	0.20	20.85	0.06	0.27
$10^5$	24.27	0.06	0.24	24.28	0.07	0.31
$10^4$	27.80	0.09	0.32	27.67	0.07	0.24
$10^3$	30.65	0.13	0.41	30.84	0.07	0.23

示实时荧光定量 PCR 检测结果  $C_q$  值 $>34$  的样品, PCR 检测结果为未检出隐地疫霉,  $C_q$  值 $\leq 34$  的样品, PCR 结果为携带有隐地疫霉, 这进一步说明荧光定量 PCR 法的检测灵敏度比常规 PCR 高, 本研究所建立的方法可靠、灵敏和高效。

### 3 讨论与结论

核糖体内转录间隔区(ITS)是最早用于鉴定和检测疫霉菌的靶标基因, 目前已成功应用于多种疫霉菌的检测, 但大量研究结果表明<sup>[21,28-30]</sup>, 一些近似种的 ITS 序列相似性超过

表3 14个样品实时荧光定量PCR和常规PCR检测结果

Table 3 Detection results for real-time fluorescence quantitative PCR and conventional PCR of 14 sample

样品编号 Sample No.	样品类型 Sample type	样品来源 Sample source	检测结果 Detection results	
			荧光定量检测 C <sub>q</sub> 值 C <sub>q</sub> value of fluorescence quantitative detection	PCR
a	开花植株 1 Flowering plant 1	开远 Kaiyuan	38.91	无条带 None
b	开花植株 2 Flowering plant 2	开远 Kaiyuan	29.72	条带亮 Bright band
c	穴盘苗 1 Spatula seedling 1	九溪 Jiuxi	39.11	无条带 None
d	穴盘苗 2 Spatula seedling 2	九溪 Jiuxi	37.67	无条带 None
e	穴盘苗 3 Spatula seedling 3	九溪 Jiuxi	33.10	条带暗 Gray band
f	穴盘苗 4 Spatula seedling 4	九溪 Jiuxi	N/A	无条带 None
g	穴盘苗 5 Spatula seedling 5	九溪 Jiuxi	30.32	条带暗 Gray band
h	组培瓶苗 1 Tissue culture seedling 1	九溪 Jiuxi	N/A	无条带 None
i	组培瓶苗 2 Tissue culture seedling 2	九溪 Jiuxi	N/A	无条带 None
j	组培瓶苗 3 Tissue culture seedling 3	九溪 Jiuxi	33.95	条带暗 Gray band
k	组培瓶苗 4 Tissue culture seedling 4	九溪 Jiuxi	39.62	无条带 None
l	组培瓶苗 5 Tissue culture seedling 5	九溪 Jiuxi	N/A	无条带 None
m	开花植株 3 Flowering plant 3	晋宁 Jinning	26.43	条带亮 Bright band
n	开花植株 4 Flowering plant 4	晋宁 Jinning	22.61	条带亮 Bright band
o	阳性质粒* Positive plasmid*		14.00	条带亮 Bright band
p	ddH <sub>2</sub> O		N/A	无条带 None

\*: 步骤 1.7 获得的隐地疫霉质粒标准品

\*: Standard plasmids of *Phytophthora cryptogea* obtained in step 1.7.

95%，设计出能区分疫霉属内种水平病原菌的特异性引物变得非常困难。源于线粒体编码 Ras 蛋白的 *Ypt1* 基因由于存在保守的编码区和变化差异较大的非编码区，使得根据其编码区设计区分不同属的简并引物，或根据其非编码区设计区分同一属内不同种的特异性引物成为可能。结合 *Ypt1* 基因的特点，*Ypt1* 靶标基因已越来越多地被应用于疫霉菌的检测中，如李毛毛等<sup>[24]</sup>通过比对辣椒疫霉、大豆疫霉(*P. sojae*)、恶疫霉、隐地疫霉、烟草疫霉等多个疫霉属的 *Ypt1* 基因序列，分别在序列变异较大的内含子区域和序列较为保守的编码区设计出辣椒疫霉特异性引物和疫霉检测通用引物；戴婷婷等<sup>[26]</sup>通过比对大豆疫霉和其他疫霉菌的 *Ypt1* 基因序列，

设计了 5 条引物建立了大豆疫霉的环介导等温扩增检测技术；Schen 等<sup>[31]</sup>通过对 *P. ramorum*、*P. kernoviae*、*P. citricola* 和 *P. quercina* 的序列比对分析，基于 *Ypt1* 基因设计了各自的特异性引物成功将这 4 种疫霉菌进行区分；Meng 等<sup>[32]</sup>开展了由 *P. tentaculata* 引起的木香疫病组织及病田土壤的 *Ypt1* 基因分子检测；纪睿等<sup>[33]</sup>通过比对雪松疫霉(*P. lateralis*)根腐病菌和其他疫霉菌的 *Ypt1* 基因序列，设计了一套 5 对引物联合开展雪松疫霉根腐病菌的环介导等温扩增检测；孟军<sup>[34]</sup>通过比对致病疫霉菌与 30 余种疫霉菌的 *Ypt1* 基因序列，设计了 1 对特异性引物和 1 对通用引物，成功建立了致病疫霉的套式 PCR 技术。

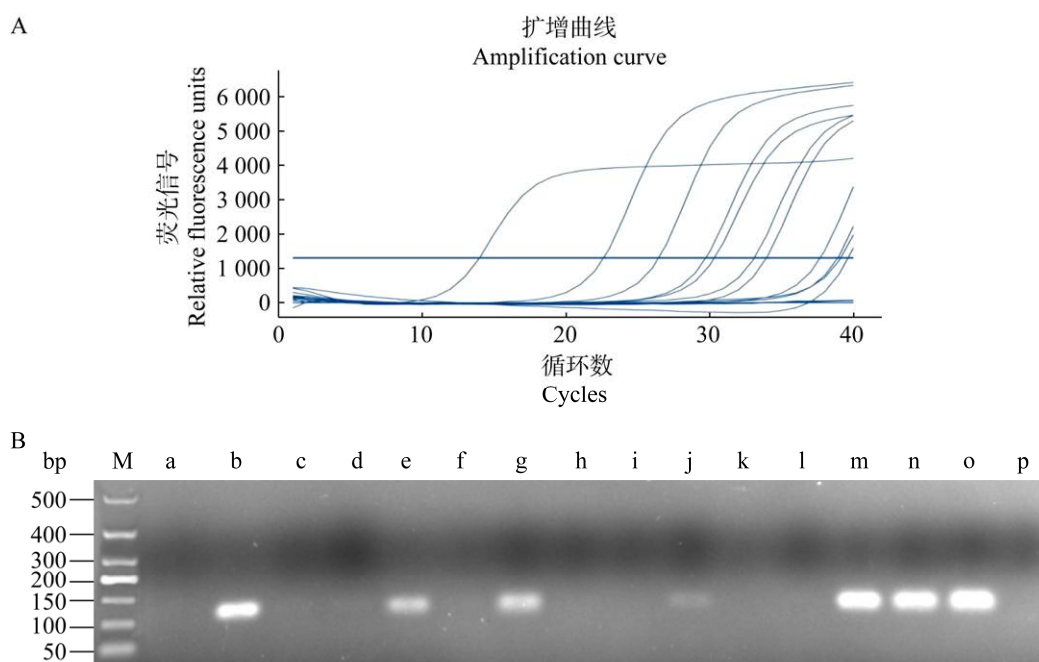


图 6 14 个样品 qPCR (A)和常规 PCR 检测图(B) M: 500 bp marker; a 和 b: 开花植株 1 和 2; c-g: 穴盘苗 1-5; h-l: 组培瓶苗 1-5; m 和 n: 开花植株 3 和 4; o: 阳性质粒; p: ddH<sub>2</sub>O

Figure 6 Detection for real-time fluorescence quantitative PCR (A) and conventional PCR (B) of 14 sample. M: 500 bp marker; a and b: Flowering plant 1 and 2; c-g: Spatula seedling 1-5; h-l: Tissue culture seedling 1-5; m and n: Flowering plant 3 and 4; o: Positive plasmid; p: ddH<sub>2</sub>O.

国内外学者对隐地疫霉的检测研究鲜有报道,最早为 2001 年由谢为龙等<sup>[5]</sup>建立的常规分离培养和形态学显微技术鉴定,并于 2006 年起草了出入境检验检疫行业标准“隐地疫霉菌检疫鉴定方法 SN/T 1820—2006”<sup>[3]</sup>;同年,郭成宝等<sup>[11]</sup>以 *ITS* 基因为靶标,探索了非洲菊疫霉根腐病的分子诊断技术,建立的 PCR 检测体系能够扩增出 620 bp 的特异性条带,但灵敏度仅为 10 pg,并且对于属内其他近源种的引物特异性如何未作探讨;2008 年,Minerdi 等<sup>[10]</sup>建立了常规 PCR 和 SYBR Green 法实时荧光 PCR 技术,其检测灵敏度达到 50 copies 或 160 ag。然而,目前,基于 TaqMan 探针法的实时荧光定量 PCR 检测该病原菌尚未见报道,随着分子生物学技术的发展,实时荧光定量 PCR 技术在植

物病害检测中的应用越来越普及,相较于常规 PCR,实时荧光定量 PCR 具有操作简便、检测用时短、灵敏度高的特点<sup>[14]</sup>;对于病原菌的定量检测,相比于 SYBR Green 染料法, TaqMan 探针法实时荧光定量 PCR 特异性更强、检测灵敏度更高、试验结果稳定性和重复性更好,不易发生偶然性从而对试验结果产生颠覆性影响<sup>[14,35]</sup>。因此,本研究以非洲菊隐地疫霉 *Ypt1* 基因为靶标,建立了基于 TaqMan 探针法的实时荧光定量 PCR 检测体系,整个检测可在 1 h 内完成,检测高效、用时较短;建立的标准曲线相关系数( $R^2$ )为 0.998,扩增效率( $E$ )为 99.9%,线性关系优秀,荧光曲线与病原菌浓度之间相关性好,即植株被病原菌感染越严重,植株病原菌浓度越高,样品检测的  $C_q$  值越低,也表明本研究建

立的检测体系准确性和扩增效率高；引物探针组合对尖孢镰刀菌、烟草疫霉、茄镰孢菌、霜霉菌、尾孢菌、致病疫霉、掘式疫霉、恶疫霉的基因片段不产生典型扩增曲线，特异性强且灵敏度高，最低检出限仅为 1 copy，最低稳定检出限为 10 copies，较常规 PCR 技术检测灵敏度提高了 10–100 倍，比前人研究<sup>[10]</sup>的灵敏度提高了 5–50 倍；同一浓度组内和组间  $C_q$  值标准偏差均小于 0.15，变异系数均小于 0.6%，重复性及稳定性好，有效规避了假阳性或假阴性的发生。14 个抽检非洲菊样品的检测结果进一步显示，本研究建立的实时荧光定量 PCR 法比常规 PCR 法检测灵敏度高，检测结果准确且可靠。而且，相较于常规 PCR，实时荧光定量 PCR 不仅可鉴定出样品是否携带隐地疫霉，而且能检测出样品携带病原菌的具体数据载量，无需琼脂糖凝胶电泳即可直接观察结果，检测用时大大减少，因此更简便高效。不同样品类型的隐地疫霉菌载量排序(开花植株>穴盘苗>组培瓶苗)说明开花期植株更容易被隐地疫霉菌感染，这与我们多年来的田间调查结果一致。

由隐地疫霉侵染引起的非洲菊根腐病是一种极难防治的顽固性土传病害，因此早检测、早预防是该病害科学防控的唯一途径。本研究基于非洲菊隐地疫霉的 *Ypt1* 基因设计了特异性实时荧光定量 PCR 引物和探针，最终建立了一套特异性强、灵敏度高、重复性和准确性好的基于 TaqMan 探针法的实时荧光定量 PCR 检测技术体系，该方法可规模化应用于非洲菊隐地疫霉的快速高效检测鉴定，具有较好的灵敏性和应用效果，尤其是对于原原种、原种等核心材料的痕量病原菌检测应用效果显著，其广泛应用将进一步提高口岸检疫速度和检疫精准率，在隐地疫霉的早期准确诊断和有效防治方面意义重大，应用前景广阔。

## REFERENCES

- [1] 唐红艳, 顾振芳, 张鲁民, 黄云, 陈捷. 7 种杀菌剂对非洲菊根腐病原菌的毒力测定[J]. 江苏农业科学, 2007, 35(4): 67-69.  
TANG HY, GU ZF, ZHANG LM, HUANG Y, CHEN J. Toxicity determination of seven fungicides to *Gerbera jamesonii* root rot pathogen[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2007, 35(4): 67-69 (in Chinese).
- [2] BEAL EJ, WAGHORN IAG, PERRY JN, CLOVER GRG, CROMEY MG. Susceptibility of garden plants to *Phytophthora* root rot[J]. Plant Disease, 2021, 105(6): 1610-1620.
- [3] 谭群英, 廖力, 喻国泉. 隐地疫霉菌检疫鉴定方法: SN/T 1820—2006[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.  
TANG QY, LIAO L, YU GQ. Identification of *Phytophthora cryptogea* Pethybridge & Lafferty: SN/T 1820—2006[S]. Beijing: Standards Press of China, 2006 (in Chinese).
- [4] 唐红艳. 上海市主要花卉病害调查及非洲菊根腐病的研究[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2007.  
TANG HY. Studies on diseases species of major flower plants in Shanghai and root rot of *Gerbera jamesonii*[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2007 (in Chinese).
- [5] 谢为龙, 谭群英. 隐地疫霉的鉴定和处理[J]. 植物检疫, 2001, 15(4): 198-200.  
XIE WL, TAN QY. Identification and control of *Phytophthora cryptogea*[J]. Plant Quarantine, 2001, 15(4): 198-200 (in Chinese).
- [6] 陈文乐. 非洲菊根腐病研究进展[J]. 农业科技通讯, 2022(9): 238-242.  
CHEN WL. Research progress of *Gerbera jamesonii* root rot[J]. Bulletin of Agricultural Science and Technology, 2022(9): 238-242 (in Chinese).
- [7] BILY D, NIKOLAEVA E, OLSON T, KANG S. *Phytophthora* spp. associated with Appalachian oak forests and waterways in Pennsylvania, with *P. abietivora* as a pathogen of five native woody plant species[J]. Plant Disease, 2022, 106(4): 1143-1156.
- [8] BELL NL, JEFFERS SN, HITCHCOCK DR, WHITE SA. Potential susceptibility of six aquatic plant species to infection by five species of *Phytophthora*[J]. Plant Disease, 2021, 105(12): 4074-4083.
- [9] WU H, WANG B, HAO XY, ZHANG YY, WANG TC, LU ZH, LAI ZX, CHENG CZ. *Piriformospora indica* promotes the growth and enhances the root rot disease resistance of gerbera[J]. Scientia Horticulturae, 2022, 297: 110946.

- [10] MINERDI D, MORETTI M, LI Y, GAGGERO L, GARIBALDI A, GULLINO ML. Conventional PCR and real time quantitative PCR detection of *Phytophthora cryptogea* on *Gerbera jamesonii*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2008, 122(2): 227-237.
- [11] 郭成宝, 张正光, 王源超, 郑小波. 非洲菊疫霉根腐病的快速分子诊断[J]. 植物病理学报, 2006, 36(2): 97-101.  
GUO CB, ZHANG ZG, WANG YC, ZHENG XB. Rapid diagnostic of *Phytophthora* Root rot of *Gerbera jamesonii* by PCR[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(2): 97-101 (in Chinese).
- [12] 赵史宇辰, 汤思淇, 冯亚莉, 张莹. 病毒检测方法研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2023, 50(11): 4536-4544.  
ZHAO SYC, TANG SQ, FENG YL, ZHANG Y. Research progress on virus detection methods[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2023, 50(11): 4536-4544 (in Chinese).
- [13] YU J, ZOU JW, LIU X, PAN Y, MU YY, LI SY, WANG JH, XU FZ, WANG Y. TaqMan-probe-based multiplex real-time RT-qPCR for simultaneous detection of GoAstV, GPV, and GoCV[J]. Poultry Science, 2023, 102(2): 102396.
- [14] LIANG H, GENG J, BAI S, AIMUGURI A, GONG Z, FENG R, SHEN X, WEI S. TaqMan real-time PCR for detecting bovine viral diarrhoea virus[J]. Polish Journal of Veterinary Sciences, 2019, 22(2): 405-413.
- [15] ZHANG LT, JIANG ZW, ZHOU ZT, SUN JM, YAN SY, GAO WT, SHAO YK, BAI YH, WU YF, YAN ZF, SHENG SZ, LAI A, SU S. A TaqMan probe-based multiplex real-time PCR for simultaneous detection of porcine epidemic diarrhoea virus subtypes G1 and G2, and porcine rotavirus groups A and C[J]. Viruses, 2022, 14(8): 1819.
- [16] YAMKASEM J, TATTIYAPONG P, SURACHETPONG W. Development and application of TaqMan probe-based quantitative PCR assays for the detection of tilapia parvovirus[J]. Journal of Fish Diseases, 2022, 45(3): 379-386.
- [17] LIEW ECY, MACLEAN DJ, IRWIN JAG. Specific PCR based detection of *Phytophthora medicaginis* using the intergenic spacer region of the ribosomal DNA[J]. Mycological Research, 1998, 102(1): 73-80.
- [18] WANG YC, ZHANG WL, WANG Y, ZHENG XB. Rapid and sensitive detection of *Phytophthora sojae* in soil and infected soybeans by species-specific polymerase chain reaction assays[J]. Phytopathology, 2006, 96(12): 1315-1321.
- [19] LU XY, XU H, SONG W, YANG ZT, YU J, TIAN YE, JIANG M, SHEN DY, DOU DL. Rapid and simple detection of *Phytophthora cactorum* in strawberry using a coupled recombinase polymerase amplification-lateral flow strip assay[J]. Phytopathology Research, 2021, 3(1): 12.
- [20] ABAD ZG, BURGESS TI, REDFORD AJ, BIENAPFL JC, SRIVASTAVA S, MATHEW R, JENNINGS K. *IDphy*: an international online resource for molecular and morphological identification of *Phytophthora*[J]. Plant Disease, 2023, 107(4): 987-998.
- [21] MARTIN FN, TOOLEY PW. Phylogenetic relationships of *Phytophthora ramorum*, *P. nemorosa*, and *P. pseudosyringae*, three species recovered from areas in California with sudden oak death[J]. Mycological Research, 2003, 107(Pt 12): 1379-1391.
- [22] 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.
- [23] MARTIN FN, ABAD ZG, BALCI Y, IVORS K. Identification and detection of *Phytophthora*: reviewing our progress, identifying our needs[J]. Plant Disease, 2012, 96(8): 1080-1103.
- [24] 李毛毛, 赵伟, 汪涛, 谷雨, 高智谋, 戚仁德. 以 *Ypt1* 基因序列为靶标的辣椒疫病快速分子检测[J]. 植物病理学报, 2014, 44(5): 546-551.  
LI MM, ZHAO W, WANG T, GU Y, GAO ZM, QI RD. Rapid molecular detection of *Phytophthora capsici* based on its *Ypt1* gene[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2014, 44(5): 546-551 (in Chinese).
- [25] MENG J, WANG YC. 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.
- [26] 戴婷婷, 郑小波, 吴小芹. 基于 *Ypt1* 靶标的大豆疫霉环介导等温扩增技术的研究[J]. 植物病理学报, 2015, 45(6): 576-584.  
DAI TT, ZHENG XB, WU XQ. LAMP assay for rapid detection of *Phytophthora sojae* based on its *Ypt1* gene[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2015, 45(6): 576-584 (in Chinese).
- [27] XU Y, YANG X, LI YX, CHEN ZP, DAI TT. First report of *Phytophthora pini* causing foliage blight and shoot dieback of *Rhododendron pulchrum* in China[J]. Plant Disease, 2021, 105(4): 1229.
- [28] BONANTS P, WEERDT MHD, van GENT-PELZER M, LACOURT I, COOKE D, DUNCAN J. Detection and

- identification of *Phytophthora fragariae* Hickman by the polymerase chain reaction[J]. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103(4): 345-355.
- [29] BRASIER CM, KIRK SA, DELCAN J, COOKE DEL, JUNG T, MAN IN'T VELD WA. *Phytophthora alni* sp. nov. and its variants: designation of emerging heteroploid hybrid pathogens spreading on *Alnus* trees[J]. Mycological Research, 2004, 108(Pt 10): 1172-1184.
- [30] KROON LPNM, BAKKER FT, van den BOSCH GBM, BONANTS PJM, FLIER WG. Phylogenetic analysis of *Phytophthora* species based on mitochondrial and nuclear DNA sequences[J]. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41(8): 766-782.
- [31] SCHENA L, COOKE DEL. Assessing the potential of regions of the nuclear and mitochondrial genome to develop a "molecular tool box" for the detection and characterization of *Phytophthora* species[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 67(1): 70-85.
- [32] MENG J, LIU Y, FANG ZX. Molecular detection of *Phytophthora tentaculata* in infected *Aucklandia lappa* tissues and soil on the basis of *Ypt1* gene[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2013, 43(1): 95-99.
- [33] 纪睿, 曾丹丹, 廖太林, 郑小波, 张正光, 周锐. 基于环介导等温扩增技术检测雪松疫霉根腐病菌[J]. 植物检疫, 2017, 31(1): 42-47.
- JI R, ZENG DD, LIAO TL, ZHENG XB, ZHANG ZG, ZHOU R. A rapid detection method for *Phytophthora lateralis* based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Plant Quarantine, 2017, 31(1): 42-47 (in Chinese).
- [34] 孟军. 以 *Ypt1* 基因为靶标的致病疫霉菌 *Phytophthora infestans* 的分子检测[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(1): 46-53.
- MENG J. Molecular detection of *Phytophthora infestans* based on *Ypt1* gene[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2012, 28(1): 46-53 (in Chinese).
- [35] CUI MX, ZHOU H, ZHANG B, CARR MJ, GUO MJ, SHI WF. Rapid detection of the emerging tick-borne Tamdy virus by TaqMan-based real-time reverse transcription PCR[J]. Journal of Virological Methods, 2022, 305: 114538.