

苹果属 3 种检疫性疫霉的四重 PCR 分子检测^①

朱林慧¹, 廖芳², 曹保红¹, 李碧娟¹,
张豆豆¹, 罗加凤², 李关荣¹

1. 西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400176; 2. 天津市出入境检验检疫局, 天津 300461

摘要: 为建立苹果属冬生疫霉 *Phytophthora hibernali*、丁香疫霉 *P. syringae* 和栗黑水疫霉 *P. cambivora* 3 种检疫性疫霉的同步分子检测方法, 根据疫霉属 18S *rRNA*, ITS, HSP90 和 *Ypt1* 基因分别设计通用引物, 冬生疫霉、丁香疫霉及栗黑水疫霉特异引物, 建立了四重 PCR 检测方法, 并进行了灵敏度和模拟带菌测试. 建立了可同时检测苹果属上冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉的特异四重 PCR 检测体系: 在 20 μ L 反应体系中, 最佳引物浓度组合为 10 μ mol/L 的 18SUF/18SUR, PHSF/PHSR, PCSF/PCSR 和 PSSF/PSSR 分别为 0.2, 0.6, 0.8, 1.0 μ L; 最佳退火温度和退火时间分别为 63 $^{\circ}$ C 和 20 s. 该体系扩增冬生疫霉出现 884 bp 的 18S *rRNA* 条带和 232 bp 的 ITS 基因特异带, 丁香疫霉出现 884 bp 的 18S *rRNA* 条带和 683 bp 的 HSP90 基因特异带, 扩增栗黑水疫霉出现 884 bp 的 18S *rRNA* 条带和 314 bp 的 *Ypt1* 基因特异带, 对照菌只出现 18S *rRNA* 条带; 四重 PCR 反应体系检测灵敏度低于单重 PCR; 模拟带菌试验可同时扩增出 4 个片段. 表明该四重 PCR 检测方法能实现冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉的同步特异检测, 实现苹果属类水果及种苗检疫性疫霉的快速检测.

关键词: 苹果属; 检疫性真菌; 冬生疫霉; 丁香疫霉; 栗黑水疫霉; 四重 PCR 分子检测

中图分类号: S436.611.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)05-0007-08

苹果属 *Malus* Mill. 是蔷薇科经济价值较高的植物, 包括苹果 *Malus domestica* Borkh.、垂丝海棠 *Malus halliana* Koehne.、山定子 *Malus baccata* (Linn.) Borkh. 等重要水果品种和园林树种, 在北温带, 亚洲、欧洲及北美洲均有分布^[1]. 近年来, 我国进口苹果属水果及其种苗持续增加, 2013 年仅苹果进口量就约有 3.9 万 t, 金额达 6, 861 万美元. 随着苹果属水果及其种苗的进口持续增长, 有害生物随之传入我国的风险增大.

疫霉属 *Phytophthora* spp. 真菌是侵染苹果属植株的重要病菌, 通常多种病菌同时侵染同株果树, 可造成植株果腐(brown rot of fruit)、根腐(root rot)、树干基部脚腐(foot rot)等病害^[2-4]. 据报道, 全世界为害苹果属植物的疫霉约 9 种^[3-5], 其中冬生疫霉 *P. hibernalis*^[6]、丁香疫霉 *P. syringae*^[7] 和栗黑水疫霉 *P. cambivora*^[8] 为我国禁止进境的植物检疫性病原菌. 疫霉菌通过土壤传播, 其卵孢子和原膜孢子在土壤中可存活多年, 由疫霉菌引发植物病害后很难有效控制, 所以苹果植株、土壤和灌溉水中病原菌的早期诊断监测能有效控制病害的发生与恶化. 目前疫霉菌检测方法为传统的形态检测, 其周期长, 步骤繁琐^[6, 9-10], 不能满足高通量、快速的检测要求. 随着 DNA 检测技术的发展, PCR、多重 PCR 等方法已成为水果疫霉快速检测的主要方法. 但目前尚未有苹果属上述 3 种检疫性疫霉 PCR 检测的报道.

① 收稿日期: 2016-04-28

基金项目: 国家质检总局项目(2012IK286, 2013IK290); 国家“十二五”科技支撑计划(2012BAK11B02).

作者简介: 朱林慧(1988-), 女, 山西临汾人, 硕士, 主要从事微生物分子检测研究.

通信作者: 李关荣, 教授.

18S *rDNA* 区域在真菌种间变异度低,拷贝数多,是病原菌分子检测中质量控制的理想靶基因;*rDNA* 的 ITS 区具有在真菌种间变异度高、在种内稳定等特点,是病原菌分子检测理想的靶序列,以 ITS 序列分析为基础,已成功开发了多种疫霉的分子检测引物^[11-13]. 但并非所有的疫霉菌都必须通过 ITS 基因来鉴定区分,如烟草疫霉^[14]和樟疫霉^[15]可分别以 *elicitin* 1 基因和贮存蛋白家族基因来实现其特异检测,这两类基因没有内含子,不能像 ITS 基因一样被广泛应用. *Ras-like protein Ypt1* (*Yeast protein two* 1) 基因序列存在较多差异位点^[16],几乎可以适用于所有疫霉菌,但由于该基因序列较短使其应用受到限制. *Heat Shock Protein 90* (*HSP 90*) 基因序列较长,在疫霉菌间基因序列的相似性达 95% 左右,可通过序列比对设计部分疫霉菌的特异引物.

本文以冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉 3 种检疫性真菌病害及其他侵袭苹果属植物的疫霉为研究对象,分析其 18S *rDNA* 序列,设计通用引物,根据其 ITS、HSP 90 和 *Ypt1* 基因序列的分析分别设计冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉的特异性引物,经反应体系优化,建立苹果属冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉菌丝基因组 DNA 的四重 PCR 检测方法,并进行了灵敏度和模拟带菌测试.

1 材料与方法

1.1 材 料

供试菌株:本研究所用的 11 个供试菌株:冬生疫霉 ATCC56353 1 株;丁香疫霉 ATCC34002 和 Lif2012-4 共 2 株;栗黑水疫霉 ATCC36228 和 ATCC38811 共 2 株;另外 6 株为其近似种(表 1).

供试苹果:苹果品种为红灯 *Malus pumila*. cv. Red Fuji,产地为山东烟台.

表 1 供试材料代码、学名、寄主及来源

序号	代 码	拉 丁 名	寄 主	年份	来 源
1	ATCC56353	<i>P. hibernalis</i> 冬生疫霉	<i>Citrus sinensis</i> 甜橙	2013	Australia
2	ATCC34002	<i>P. syringae</i> 丁香疫霉	<i>Citrus limon</i> 柠檬	2013	USA
3	Ljf2012-4	<i>P. syringae</i> 丁香疫霉	<i>Citrus paradisi</i> 脐橙	2013	Israel
4	ATCC36228	<i>P. cambivora</i> 栗黑水疫霉	<i>Malus sylvestris</i> 苹果	2013	Australia
5	ATCC38811	<i>P. cambivora</i> 栗黑水疫霉	<i>Malus pumila</i> 苹果	2013	Japan
6	Ljf2011-9	<i>P. citrophthora</i> 柑橘褐腐疫霉	<i>citrus reticulate</i> 柑橘	2013	Australia
7	CBS114089	<i>P. cactorum</i> 恶疫霉	<i>Malus pumila</i> 苹果	2013	USA
8	ATCC32996	<i>P. megasperma</i> 大雄疫霉	<i>Medicago sativa</i> 苜蓿	2013	USA
9	CBS114340	<i>P. gonapodyides</i> 节水雾状疫霉	<i>Prunus persica</i> 碧桃	2013	France
10	ACCC37380	<i>P. cryptogea</i> 隐地疫霉	<i>Hevea brasiliensis</i> 橡树	2013	China
11	ACCC36153	<i>P. parasitica</i> 寄生疫霉	<i>Nicotiana tabacum</i> 烟草	2013	China

引物设计:比对 GenBank 公布的苹果属上 9 种疫霉菌的 18S *rRNA* 基因序列,在其保守区设计疫霉属的通用引物 18SUF/18SUR;以真菌 *rDNA* 内转录间隔区的通用引物 ITS4/ITS5 对 11 株疫霉菌扩增测序,据其序列差异位点设计冬生疫霉的特异引物 PHSF/PHSR;以樟疫霉的热激蛋白 *HSP 90* 基因(EU079760)设计引物 HSPF/HSPR,用于扩增供试真菌材料 *HSP 90* 基因,据其 *HSP 90* 基因序列差异设计丁香疫霉的特异引物 PSSF/PSSR;以棕榈疫霉的 *Ypt1* 基因(HQ850011)设计引物 YptF/YptR,用于扩增供试真菌材料 *Ypt1* 序列,据其 *Ypt1* 基因序列差异设计栗黑水疫霉的特异引物 PCSF/PCSR,引物设计采用 Primer Premier V5.0 软件,由上海英骏生物技术有限公司合成(表 2).

试剂及仪器:PCR 缓冲液、*Taq* DNA 聚合酶、dNTP 等购自大连宝生物公司;DNA 提取试剂盒 DNeasy Plant Mini Kit 购自美国 QIAGEN 公司. Tprofessional 梯度 PCR 仪,德国 Whatman Biometra 公司;Infinity-3026 凝胶成像系统,法国 VILBER LOURMAT 公司;岛津 Uvmini-1240 紫外分光光度计,日本岛津公司.

表 2 本研究使用的引物序列

扩增基因	引物	序列 5'-3'	长度/nt	退火温度/℃	产物大小/nt
18S <i>r</i> -RNA	18SUF	CGCGGTAATTCCAGCTCCAATA	22	63	882
	18SUR	AGAACATCTAAGGGCATCACAGACC	25		
ITS	ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	20	58	831
	ITS5	GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG	20		
	PHSF	CTTTGCTCGAAAAGCATAATGGAA	24	63	232
	PHSR	CCACTCTACTTCACACAACATCCT	24		
HSP 90	HSPF	GTGAAGAAGCACTCGGAGTT	20	60	892
	HSPR	CCTTCTTCTTGAGCTTCTCAATG	23		
	PSSF	AGGAGGAAGGCGAGAAGGCC	20	63	683
	PSSR	GTAGTAGATGCCGGGCTGCG	20		
Ypt1	YptF	TCGGTGTGGACTTTGTGAGTG	21	60	471
	YptR	ACGTTCTCGCAGGCGTATCT	20		
	PCSF	CAAGCTCCAGATTGTGCGTG	20	64	314
	PCSR	CGAATCAAAGCGGTCCAACC	20		

1.2 方 法

1.2.1 菌丝 DNA 提取、扩增测序及引物验证

将供试菌培养、收集菌丝,采用 DNA 提取试剂盒提取菌丝 DNA,并将菌丝 DNA 溶于 100 μL 1× TE 缓冲液中,其余菌丝 DNA 置于-70 ℃保存.对 11 个菌株菌丝基因组 DNA 进行通用引物 18SUF/18SUR 扩增,反应体系为 30 μL,包含 10×Buffer 3.0 μL(其中含终浓度为 1.5 mmol/L 的 MgCl₂);2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL;10 μmol/L 引物 18SUF/18SUR 各为 0.2 μL;0.4 μL *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL);DNA 模板 1 μL(约 20 ng),加双蒸水至 30 μL,以双蒸水为模板作为阴性对照.反应程序:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 30 s,63 ℃复性 20 s,72 ℃延伸 45 s,35 个循环;72 ℃延伸 7 min.2%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色并成像观察,对各产物测序并进行序列比对分析.

对 11 个菌株菌丝基因组 DNA 进行 ITS4/ITS5,HSPF/HSPR 及 YptF/YptR 引物扩增,反应体系中除引物体积各为 1.0 μL 外,其余参数同上;反应程序除退火温度不同外,其余条件均相同,72 ℃延伸 7 min.2%琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色及成像观察,对各产物测序并进行序列比对分析.对 11 个菌株菌丝基因组 DNA 分别进行特异性引物 PHSF/PHSR,PSSF/PSSR 及 PCSF/PCSR 扩增,反应体系与反应程序均同 HSPF/HSPR 引物扩增.2%琼脂糖凝胶电泳,溴乙锭染色及成像观察.

1.2.2 四重 PCR 扩增体系的优化

在其他因素保持不变的条件下,对通用引物浓度、特异引物浓度、退火温度、退火时间 4 方面优化.通用引物 18SUF/18SUR 扩增效率较强,设置其优化范围为 0.1~0.6 μL,梯度为 0.1 μL;10 μmol/L 特异引物 PHSF/PHSR,PCSF/PCSR 和 PSSF/PSSR 优化范围均为 0.2~1.2 μL,梯度为 0.2 μL;退火温度优化范围为 60~65 ℃,梯度为 1 ℃;退火时间优化范围为 5~30 s,梯度为 5 s.

1.2.3 菌丝基因组 DNA 四重 PCR 检测方法的建立

利用通用引物 18SUF/18SUR 及 3 对特异引物 PHSF/PHSR,PSSF/PSSR 和 PCSF/PCSR 扩增 11 个菌株菌丝基因组 DNA,采用上述优化结果建立的扩增体系为 20 μL:10×Buffer 2.0 μL(含终浓度为 1.5 mmol/L 的 MgCl₂);2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μL、5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.4 μL、10 μmol/L 引物 18SUF/18SUR,PHSF/PHSR,PCSF/PCSR 和 PSSF/PSSR 分别为 0.2,0.6,0.8,1.0 μL,DNA 模板 1.0 μL、加双蒸水至 20 μL,以冬生疫霉(ATCC56353)、丁香疫霉(ATCC34002)和栗黑水疫霉(ATCC36228)混合 DNA 的四重 PCR 扩增为阳性对照,以双蒸水代替模板作为阴性对照.反应程序:94 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 30 s,63 ℃复性 20 s,72 ℃延伸 35 s,35 个循环;72 ℃延伸 7 min,2%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色及成像观察.

1.2.4 四重 PCR 检测灵敏度测试

将冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉菌丝体基因组 DNA 用紫外分光光度计进行核酸质量浓度测定,

定量为 20 ng/ μ L 作为初始质量浓度, 再进行 10 倍梯度稀释, 共设置 6 个质量浓度梯度, 作为 PCR 扩增模板. 分别以不同质量浓度的 DNA 模板进行单重 PCR 和四重 PCR 反应, 阴性对照用 ddH₂O 代替模板 DNA. 单重 PCR 反应体系和程序同 1. 2. 1, 四重 PCR 反应体系和程序同 1. 2. 3, 扩增结束后 2% 琼脂糖凝胶电泳, 溴乙锭染色、观察.

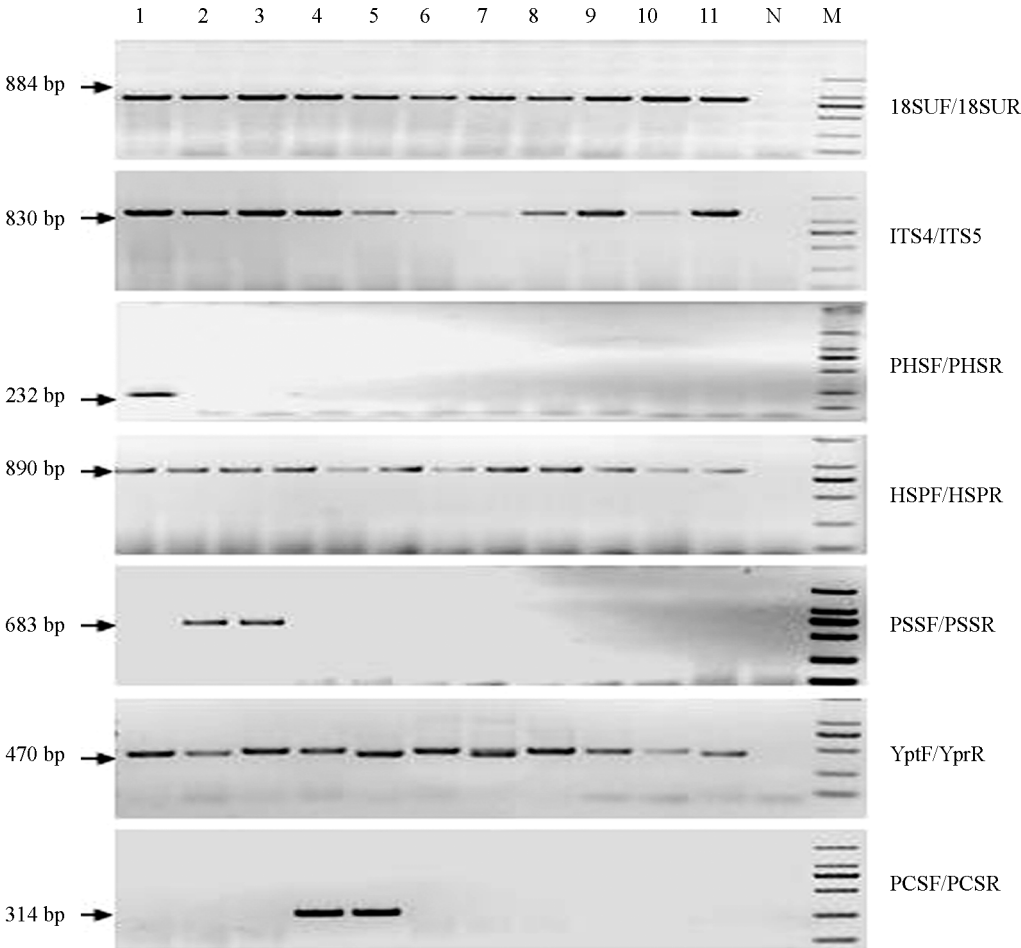
1. 2. 5 模拟带菌检测

将 11 株疫霉菌菌丝(每株约 2 mg)与新鲜的苹果组织(约 20 mg)混合后提取 DNA, 将提取的 DNA 进行四重 PCR 扩增, 扩增体系及循环参数设置见前, 设置阴性对照. 2% 琼脂糖凝胶电泳, EB 染色、观察.

2 结果与分析

2. 1 18S rDNA, ITS, HSP 90 及 Ypt1 基因引物设计与特异性验证

引物 18SUF/18SUR, ITS4/ITS5, HSPF/HSPR 和 YptF/YptR 对 11 个菌株菌丝基因组 DNA 进行扩增结果表明, 通用引物 18SUF/18SUR 扩增所有菌株出现相同大小目的条带, 经测序得到 18S rDNA 区域扩增片段 884 bp; ITS4/ITS5 扩增产物经测序得到大约 830 bp 的片段, 不同种菌株之间此片段大小略有差异, 扩增序列经 BLAST 分析均为 ITS 基因, 且比对结果表明 ITS 基因能够提供足够丰富的差异位点, 据此设计冬生疫霉的特异性引物 PHSR/PHSR; YptF/YptR 扩增产物经测序得到大小约为 470 bp 的片段, 经 BLAST 分析扩增结果表明 Ypt1 基因能够提供足够丰富的差异位点, 据此设计栗黑水疫霉的特异引物 PCSF/PCSR; HSPF/HSPR 扩增产物经测序得到大小约为 890 bp 的片段, 根据差异位点设计丁香疫霉的特异引物 PSSR/PSSR. 经验证 4 对引物的特异性均很好(图 1).



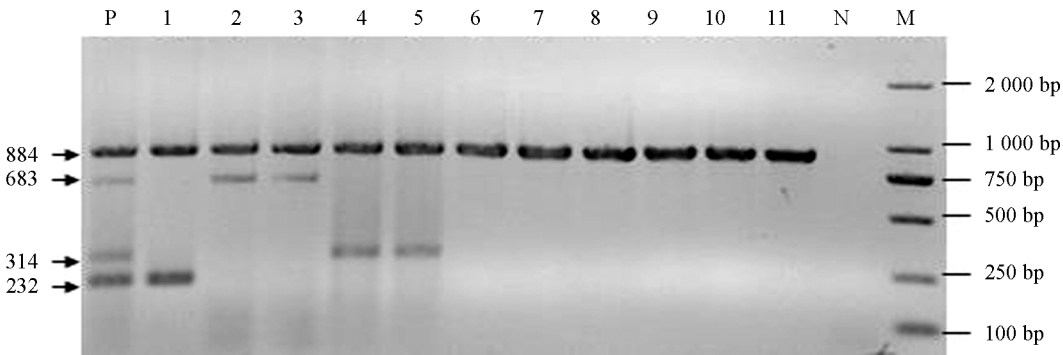
1~11: 参见表 1; N: 阴性对照(双蒸水); M: DL 2 000 bp DNA Ladder Marker.

图 1 冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉的通用引物及特异引物的单重 PCR 扩增验证

2.2 菌丝基因组 DNA 四重 PCR 检测体系的建立

经过多次条件优化, 确定最佳引物组合 8SUF/18SUR, PCSF/PCSR, PHSF/PHSR 和 PSSF/PSSR 依次为 0.2, 0.6, 0.8, 1.0 μ L, 最佳退火温度为 63 $^{\circ}$ C; 最佳退火时间为 20 s. 建立了苹果属冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉的四重 PCR 检测方法.

冬生疫霉(ATCC56353)、丁香疫霉(ATCC34002)和栗黑水疫霉(ATCC36228)混合 DNA 的四重 PCR 扩增产生 18S *r*RNA 区域的 884 bp、*HSP*90 区域的 683 bp、*Ypt*1 区域的 314 bp 和 *ITS* 区域的 232 bp 特异片段; 冬生疫霉 ATCC56353 四重 PCR 产生 18S *r*RNA 区域 884 bp 片段和 *ITS* 区域 232 bp 特异片段; 丁香疫霉的 2 个菌株 ATCC34002 和 Ljf2012-4 四重 PCR 产生 18S *r*RNA 区域 884 bp 片段和 *HSP*90 区域 683 bp 特异片段; 栗黑水疫霉的 2 个菌株 ATCC36228 和 ATCC38811 四重 PCR 扩增产生 18S *r*RNA 区域 884 bp 片段和 *Ypt*1 区域 314 bp 的特异片段; 苹果属上其他 6 株疫霉菌四重 PCR 扩增, 只产生 18S *r*RNA 区域 884 bp 条带, 无冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉特异引物扩增片段; 阴性对照无以上条带. 结果表明, 通过 2% 琼脂糖凝胶电泳能够明确区分冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉及苹果属的其他疫霉菌(图 2).

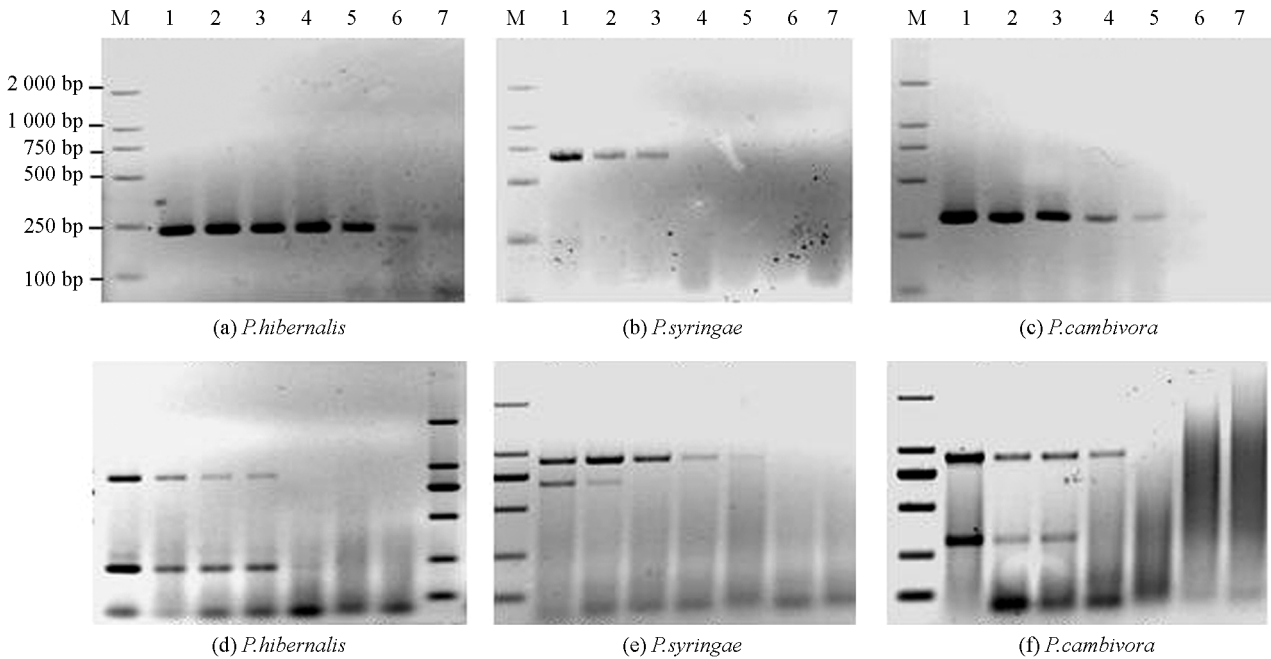


P: 阳性对照; 1~11: 参见表 1; N: 阴性对照(双蒸水); M: DL 2 000 bp DNA Ladder Marker.

图 2 苹果属疫霉菌丝基因组 DNA 四重 PCR 扩增

2.3 四重 PCR 灵敏度测试

单重 PCR 反应灵敏度检测中冬生疫霉灵敏度可达 0.2 $\text{pg}/\mu\text{L}$, 丁香疫霉灵敏度可达 0.2 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 栗黑水疫霉灵敏度可达 2 $\text{pg}/\mu\text{L}$ (图 3).



a-c: 冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉的单重 PCR 灵敏度; d-f: 冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉的四重 PCR 灵敏度. 1~6: 模板量分别为 20、2、 2×10^{-1} 、 2×10^{-2} 、 2×10^{-3} 、 2×10^{-4} ng; N: 阴性对照 ddH₂O; M: DL 2 000 bp DNA Ladder Marker.

图 3 冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉 PCR 扩增产物的灵敏度检测电泳图谱

在四重 PCR 反应灵敏度检测中, 18SUF/18SUR 扩增冬生疫霉和栗黑水疫霉模板低限质量浓度均为 $2 \text{ pg}/\mu\text{L}$, 丁香疫霉低限质量浓度均为 $0.2 \text{ pg}/\mu\text{L}$, PSSF/PSSR 扩增丁香疫霉模板低限质量浓度为 $2 \text{ ng}/\mu\text{L}$, PCSF/PCSR 扩增栗黑水疫霉模板低限质量浓度为 $0.2 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 与单重 PCR 反应体系相比, 冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉特异性扩增灵敏度均有所降低。

2.4 模拟带菌检测

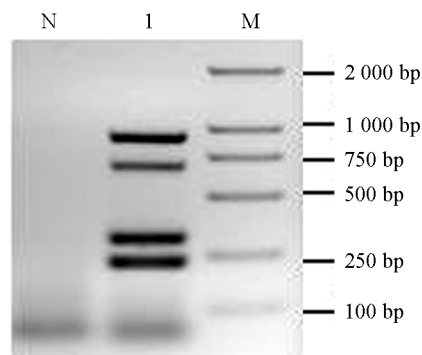
11 株疫霉菌与苹果混合 DNA 四重 PCR 产生 18S *rRNA* 区域 884 bp 扩增片段、*ITS* 区域 232 bp 特异片段、*Ypt1* 区域 314 bp 特异片段和 *HSP90* 区域 683 bp 特异片段(图 4), 添加无菌水为阴性对照则无相应目的片段。

3 讨 论

近年来, 国内外用于疫霉快速检测的主要方法是 PCR、多重 PCR、real-time PCR 等, 其中多重 PCR 以其灵敏度高、特异性强、成本低、快捷等优点, 已经在多种真菌检测中得到应用。多重 PCR 应用于疫霉菌检测以来, 在特异性和灵敏度等方面该技术较常规方法有很大的优势, 检测时间短, 且快速准确, 结果分析简单, 对待检样品要求不高。多重 PCR 技术实现了对多种菌的同步检测, 更加节约时间和成本, 成为口岸快速检测技术的重要研究方向。Li 等^[17]根据烟草疫霉 *P. Nicotianae* 的 *ITS* 基因和恶疫霉 *P. Cactorum* 的 *Ypt1* 基因分别设计其特异引物, 建立了草莓上烟草疫霉和恶疫霉的三重 PCR 检测方法。本研究根据 18S *rRNA*, *ITS*, *HSP90* 和 *Ypt1* 基因序列, 设计了疫霉属通用引物、冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉的特异性引物, 建立了苹果属 3 种检疫性疫霉的四重 PCR 检测方法。

影响多重 PCR 反应体系的因素很多^[18], 本研究选择从通用引物浓度、特异引物浓度、退火温度、退火时间 4 个方面进行优化。引物是多重 PCR 反应的关键, 18S *rDNA* 基因为多拷贝基因, 而 *Ypt1* 基因为单拷贝基因^[16], 引物对 18SUF/18SUR 的扩增效率高于 PHSF/PHSR, 同理 18SUF/18SUR 的扩增效率也高于 PCSF/PCSR 和 PSSF/PSSR, 所以引物对 18SUF/18SUR 用量少; 三对特异引物特异性均良好; 引物量的比例对扩增结果影响很大, 可调节引物比例达最佳化。退火温度影响 PCR 体系扩增的特异性, 在多重 PCR 体系中综合各个解链温度 T_m , 在 T_m 值允许范围内选择较高的复性温度以减少引物和模板间的非特异性结合, 确保 PCR 反应的特异性^[19]。退火时间决定了解链是否完全, 多重 PCR 反应中有多对引物, 退火时间要根据引物的扩增效率而定, 退火时间不宜过短, 否则解链不完全; 也不宜过长, 否则引物对间的竞争导致扩增效率较低的引物反应不充分。另外, 本研究所建立的多重 PCR 体系的灵敏性与单重 PCR 相比灵敏度降低, 分析原因可能为多重 PCR 在反应体系中加入了对引物, 而引物彼此间会形成引物二聚体或错配, 并且可能发生引物和非模板间的非特异性结合, 导致引物的利用率很低, 灵敏度下降^[20]。

本研究建立了苹果属植物上检疫性冬生疫霉、丁香疫霉和栗黑水疫霉的四重 PCR 同步检测方法。试验材料包含了侵染苹果属植株的 11 株疫霉菌, 菌株收集齐全, 4 对引物扩增片段大小差异明显, 便于琼脂糖凝胶电泳检测。模拟带菌试验表明可实现对带菌水果的直接检测, 全部检测可在 1 d 内完成, 可有效促进水果的快速通关。此方法特异性强、简便, 节约时间和检测成本, 为口岸检测及病原菌的田间监测提供了可靠的途径。



1: 11 株疫霉菌与苹果混合 DNA, N 为阴性对照, M 为 2 000 bp DNA Ladder Marker.

图 4 混合 DNA 四重 PCR 扩增产物的模拟带菌检测

参考文献:

- [1] 钱关泽, 汤庚国. 苹果属植物分类学研究进展. 南京林业大学学报, 2005, 29(3): 94—98.
- [2] WILCOX W F. Incidence and Severity of Crown and Root Rots on Four Apple Rootstocks Following Exposure to *Phytophthora* Species and Waterlogging [J]. JASHS, 1993, 118(1): 63—67.
- [3] MATHERON M E, YOUNG J, MATEJKA J C. *Phytophthora* Root and Crown Rot in Apple Trees in Arizona [J]. Plant Disease, 1988, 72(6): 481—484.
- [4] HARRIS D C. The *Phytophthora* Diseases of Apple [J]. Journal of Horticultural Science, 1991, 66(5): 513—544.
- [5] FUJITA K, NAKAZAWA N, FUKUSHIMA C, et al. *Phytophthora* Fruit Rot of Apple, Japanese Pear and European Pear Caused by *Phytophthora syringae* (Kleb.) Kleb [J]. Annals of the Phytopathological Society of Japan, 1994, 6(6): 717—724.
- [6] 中华人民共和国出入境检验检疫局. SN/T 2756-2011 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准——丁香疫霉菌检疫鉴定方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [7] 罗加凤, 刘跃庭, 廖芳, 等. 进境美国加州脐橙中丁香疫霉 *Phytophthora syringae* 的截获 [J]. 菌物学报, 2012, 31(1): 24—30.
- [8] 纪睿, 廖太林, 李百胜. 栗疫霉黑水病菌 [J]. 植物检疫, 2009, 23(6): 40—41.
- [9] 中华人民共和国出入境检验检疫局. SN/T 2759-2011 中华人民共和国出入境检验检疫行业标准——栗黑水疫霉病菌检疫鉴定方法 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [10] 张雪, 章桂明, 周德群, 等. 多重 PCR-DHPLC 检测三种检疫性疫霉研究 [C] // 郭泽建, 李宝筠. 中国植物病理学会 2012 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2012.
- [11] BONANTS P, WEERDT M H, GENT-PELZER M, et al. Detection and Identification of *Phytophthora Fragariae* Hickman by the Polymerase Chain Reaction [J]. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103(4): 345—355.
- [12] LACOURT I, BONANTS P J M, GENT-PELZER M P, et al. The Use of Nested Primers in the Polymerase Chain Reaction for the Detection of *Phytophthora Fragariae* and *P. cactorum* in Strawberry [J]. Acta Horticulturae, 1997, 439: 829—838.
- [13] ZHANG Z G, LI Y Q, FAN H, et al. Molecular Detection of *Phytophthora capsici* in Infected Plant Tissues, Soil and Water [J]. Plant Pathology, 2006, 55(6): 770—775.
- [14] KONG P, HONG C X, JEFFERS S N, et al. A Species-Specific Polymerase Chain Reaction Assay for Rapid Detection of *Phytophthora nicotianae* in Irrigation Water [J]. Phytopathology, 2003, 93(7): 822—831.
- [15] KONG P, HONG C X, RICHARDSON P A. Rapid Detection of *Phytophthora cinnamomi* Using PCR with Primers Derived from the Lpv Putative Storage Protein Genes [J]. Plant Pathol, 2003, 52(6): 681—693.
- [16] CHEN Y, ROXBY R. Characterization of a *Phytophthora infestans* Gene Involved in the Vesicle Transport [J]. Gene, 1996, 181(1/2): 89—94.
- [17] LI M Z, 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.
- [18] HENEGARIU O, HEEREMA N A, DLOUHY S R, et al. Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-By-Step Protocol [J]. BioTechniques, 1997, 23(3): 504—511.

- [19] 陈明洁, 方 倜, 柯 涛, 等. 多重 PCR——一种高效快速的分子生物学技术 [J]. 武汉理工大学学报, 2005, 27(10): 33—36.
- [20] 王 慧, 朱瑞良, 谭燕玲, 等. 多重 PCR 检测三种重要食源性致病菌方法的建立及应用 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(11): 2334—2340.

Quadruple-PCR Molecular Detection of Three Quarantine Fungal Diseases of *Malus*

ZHU Lin-hui¹, LIAO Fang², CAO Bao-hong¹, LI Bi-juan¹,
ZHANG Dou-dou¹, LUO Jia-feng², LI Guan-rong¹

1. College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716, China;

2. Tianjin Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Tianjin 300461, China

Abstract: To establish a synchronous molecular detection method for the three China entry-forbidden quarantine fungal *Phytophthora* pathogens of *Malus* (*P. hibernalis*, *P. syringae* and *P. cambivora*), universal primers 18SUF/18SUR and specific primers PHSF/PHSR for *P. Hibernalis*, PSSF/PSSR for *P. syringae* and PCSF/PCSR for *P. cambivora*, were designed based on the 18S *rRNA*, the *ITS*, *HSP90* and *Ypt1* genes respectively, to establish a quadruple PCR detection system and to carry out its sensitivity and simulation carrier tests. The established specific quadruple PCR reaction system simultaneously detecting *P. Hibernalis*, *P. syringae* and *P. cambivora* of *Malus* was as follows: in a 20 μL reaction system, the optimal primer combination of 18SUF/18SUR, PHSF/PHSR, PCSF/PCSR and PSSF/PSSR was 0.2, 0.6, 0.8, 1.0 μL , respectively, of its 10 $\mu\text{mol/L}$ stock solution, and the optimal annealing temperature and time was 63 $^{\circ}\text{C}$ and 20 s, respectively. Application of this system for *P. hibernalis* detected an 884 bp band of 18S *rRNA* and a 232 bp specific band to the *ITS* gene, for *P. syringae* detected an 884 bp band of 18S *rRNA* and a 683 bp specific band to the *HSP90* gene, and for *P. cambivora* detected also an 884 bp band of the 18S *rRNA* and a 314 bp specific band of the *Ypt1* gene, while the control only detected the band of the 18S *rRNA*. The sensitivity of the quadruple PCR was lower than that of conventional PCR. The simulated carrier test detected the four bands simultaneously. It showed that the established quadruple PCR could achieve the synchronous and specific detection of *P. hibernalis*, *P. syringae* and *P. cambivora*, and thus can be used effectively to promote the quick detection of the quarantine *Phytophthora* pathogens of *Malus* fruits and seedlings.

Key words: *Malus*; quarantine fungi; *Phytophthora hibernalis*; *P. syringae*; *P. cambivora*; quadruple-PCR detection

