

张海燕, 张小芳, 魏兰芳, 等. 土壤中茄科雷尔氏菌实时荧光定量 PCR 快速检测体系的建立与应用[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(14): 17-20.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.005

土壤中茄科雷尔氏菌实时荧光定量 PCR 快速检测体系的建立与应用

张海燕¹, 张小芳¹, 魏兰芳², 李 雪¹, 艾 瑛³, 姬广海¹

(1. 云南农业大学植物保护学院, 云南昆明 650201; 2. 云南农业大学农科专业基础实验教学中心, 云南昆明 650201;

3. 云南省通海县植保植检站, 云南通海 652700)

摘要:根据茄科雷尔氏菌 *egl* 基因, 设计 1 对特异性引物, 建立并优化实时荧光定量 PCR 反应体系, 并对土壤中的茄科雷尔氏菌进行检测和评估。对采自云南省文山州 5 个县的 100 份青枯病带菌土壤进行检测, 结果表明, 100 份土壤样品中, 广南县 15、22、24 号, 丘北县 31、35、43 号, 麻栗坡县 62、67、68 号, 马关县 70、74、78、79、80、83、84 号, 共 16 份土壤样品中茄科雷尔氏菌含量大于 10^5 CFU/mL, 预测细菌性青枯病发病风险较高; 广南县 12、20、21、23、26、27、29 号, 丘北县 30、33、34、37、38、39、46、48 号, 麻栗坡县 50、52、54、58、59、60、61、63、64、65、66、69 号, 马关县 71、72、73、75、76、77、81、82、85、86 号, 砚山县 1、2、4、5、7、9 号, 共 43 份土壤样品检测出的茄科雷尔氏菌含量在 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL 之间, 预测细菌性青枯病发病风险中等; 其他土壤样品检测出的茄科雷尔氏菌含量均小于 10^3 CFU/mL, 预测细菌性青枯病发病风险低, 其中砚山县 3、10、87、88、89、90 号, 广南县 14、19、25、28、91、92、93 号, 丘北县 32、36、44、49、94、95、96 号, 麻栗坡县 51、57、97、98、99、100 号, 共 26 份土壤样品中未检测出茄科雷尔氏菌。

关键词:茄科雷尔氏菌; 实时荧光定量 PCR 检测; 快速检测体系; 细菌性青枯病

中图分类号: S432.4⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0017-03

茄科雷尔氏菌 [*Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi et al.] 是世界上最重要的植物病原细菌之一, 广泛分布于热带、亚热带及温带地区。该病原细菌的寄主范围较广, 可侵染 55 科数百种植物^[1]。在我国, 已报道有番茄、辣椒、茄子、马铃薯、烟草、花生、生姜、沙姜、桑、蕹菜、桉树等 10 余种作物受到该病原细菌的危害, 造成细菌性青枯病。该病原菌主要在土壤中及遗落土中的病株残体上越冬, 通过根部、叶柄或茎部的伤口侵入后, 在维管束内繁殖, 并沿维管束向上发展, 以致维管束阻塞, 腐烂变褐, 茎、叶因得不到水分、养分的供应而萎蔫^[2]。调查研究表明, 由该病原菌造成的烟草青枯病极为严重, 给我国西南地区及长江下游流域的烟草生产带来了很大威胁^[3]。其中个别年份烟草青枯病暴发流行, 发病重的地块, 产量损失达 80% 左右, 造成毁灭性损失^[4]。此外, 受该病原菌感染的番茄、茄子、辣椒等茄科作物的产量会大幅减少, 带来严重的经济损失^[5-7]。因此, 对温室或大田可能存在的病菌进行早期检测, 对于适时控制病害的发生有着极为重要的意义。

近年来, 随着分子生物学技术的快速发展, 实时荧光定量

PCR 技术在植物病害研究上也不断深入并广泛在多种病原菌定量检测中应用, 极大地提高了植物病害的检测效率^[8-11]。Nicholson 等利用实时荧光定量技术建立了小麦茎基部病原物的定量检测方法^[12]; 潘娟娟等利用 RT-PCR 技术建立了定量检测小麦条锈菌 (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) 潜伏侵染的方法, 对小麦条锈病进行早期检测, 指导病害的预测^[13-14]。目前, 国内外未有利用该方法对茄科雷尔氏菌进行检测的报道, 本研究拟查阅文献并分析茄科雷尔氏菌基因序列的保守区, 设计相关的荧光定量 PCR 的特异性引物, 并应用建立的方法对采自云南省各个地区土壤中的病原菌进行早期检测。

1 材料与方法

1.1 试验材料

茄科雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*) 标准菌株 Y45, 由云南省农业科学烟草研究院提供; 软腐果胶杆菌 (*Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*) MY9, 由笔者实验室保存; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (BioTeke), 购自生物工程 (上海) 股份有限公司; 土壤 DNA 提取试剂盒 (美国 MO BIO), 购自北京宝杰罗生物科技有限公司; PCR 引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成; TaKaRa SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time) 试剂盒, 购自宝生物工程 (大连) 有限公司; 荧光定量 PCR 仪器 (BIO-Rad IQTM5), 由云南农业大学生物多样性国家工程中心提供。

云南省文山州 5 个县 (广南县、丘北县、麻栗坡县、马关县、砚山县) 的 100 份土壤样品, 由云南省文山州烟草公司协助采集。

收稿日期: 2016-03-14

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31360002, 31460458); 公益性行业 (农业) 科研专项 (编号: 201303015); 云南省重点新产品计划 (编号: 2014BB005); 云南高校创新团队 (编号: 云教科 [2014] 22 号)。

作者简介: 张海燕 (1990—), 女, 河南安阳人, 硕士研究生, 主要从事植物细菌性病害研究。E-mail: 384952241@qq.com。

通信作者: 姬广海, 博士, 教授, 主要从事植物细菌性病害研究。E-mail: jghai001@aliyun.com。

1.2 试验方法

1.2.1 茄科雷尔氏菌标准菌株 DNA 提取与检测 使用细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (BioTeke) 提取茄科雷尔氏菌标准菌株 Y45 的 DNA, 于微量分光光度计下检测 DNA 浓度及 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.2 土壤 DNA 提取与检测 使用土壤 DNA 提取试剂盒 (美国 MO BIO) 进行土壤中烟草青枯病病菌基因组 DNA 的提取, 具体操作步骤参照试剂盒说明书。提取结果经 1% 琼脂糖凝胶电泳检查。Nano Drop 2000 超微量分光光度计检测土壤总 DNA 浓度和纯度, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 引物设计与合成 使用 PrimerPremier 5.0, 根据 GenBank 中茄科雷尔氏菌 *egl* 基因部分序列设计 1 对引物 RS-1; 5'-GTGCCTGCCTCCAAAACGACT-3'; RS-2; 5'-GACGCCACCCGCATCCCTC-3', PCR 引物由宝生物工程 (大连) 有限公司合成。

1.2.4 引物特异性检测 以茄科雷尔氏菌标准菌株 Y45 的 DNA 为模板, 标准菌株 Y45 的基因组 DNA 为阳性对照, 软腐果胶杆菌 MY9 的 DNA 为阴性对照, ddH₂O 为空白对照, 应用引物 RS-1、RS-2 进行普通 PCR 和 RT-PCR 扩增, 检测引物特异性。

茄科雷尔氏菌普通 PCR 反应体系: 2.5 μL Buffer, 2.0 μL dNTP Mix, 引物 RS-1、RS-2 各 0.5 μL , 1.0 μL Taq Enzyme, 2.5 μL DNA 模板, ddH₂O 补足 25.0 μL 。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 凝胶成像系统分析试验结果。

茄科雷尔氏菌 RT-PCR 反应体系: 引物 RS-1、RS-2 各 0.5 μL , 12.5 μL SYBR Premix Ex Taq, 2.0 μL DNA 模板, ddH₂O 补足 20.0 μL 。

1.2.5 RT-PCR 标准曲线的建立及引物灵敏度检测 取茄科雷尔氏菌 Y45 的 DNA, 并将 DNA 进行梯度稀释, 即取 10 μL DNA 加入到 90 μL ddH₂O 中, 把 DNA 的浓度稀释成 10^{-1} , 并依次稀释成 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} , 以 ddH₂O 为空白对照, RT-PCR 反应体系参照“1.2.4”节中青枯病菌 RT-PCR 的反应体系。

1.2.6 土壤样品中茄科雷尔氏菌的荧光定量 PCR 检测 反应体系参照“1.2.4”节中青枯病菌 RT-PCR 的反应体系。

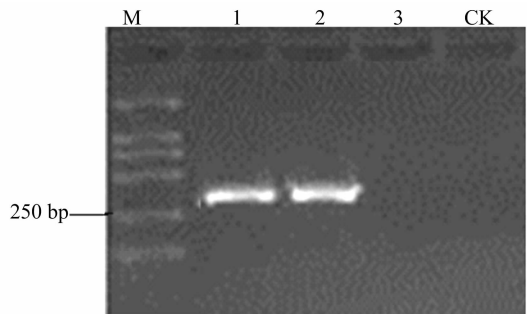
2 结果与分析

2.1 引物特异性检测结果

用所设计的引物 RS-1、RS-2 对茄科雷尔氏菌标准菌株 Y45 的 DNA 进行 PCR 扩增, 结果 (图 1) 表明, 仅茄科雷尔氏菌 Y45 菌株基因组 DNA 能扩增出 290 bp 的特异性条带, 与预测结果一致。说明所设计的引物具有特异性, 能够区别于其他病原菌。

2.2 土壤样品中青枯病菌的荧光定量 PCR 检测结果

由表 1 可知, 100 份土壤样品中, 广南县 15、22、24 号, 丘北县 31、35、43 号, 麻栗坡县 62、67、68 号, 马关县 70、74、78、79、80、83、84 号, 共 16 份土壤样品中检测到的茄科雷尔氏菌含量较高 (大于 10^5 CFU/mL), 预测细菌性青枯病发病风险较高; 广南县 12、20、21、23、26、27、29 号, 丘北县 30、33、34、



M—DL2000 marker; 1—Y45 DNA; 2—Y45 DNA 质粒; 3—软腐果胶杆菌 MY9; CK—ddH₂O 空白对照

图1 茄科雷尔氏菌标准菌株 Y45 DNA 特异性引物扩增结果

37、38、39、46、48 号, 麻栗坡县 50、52、54、58、59、60、61、63、64、65、66、69 号, 马关县 71、72、73、75、76、77、81、82、85、86 号, 砚山县 1、2、4、5、7、9 号, 共 43 份土壤样品中检测出的茄科雷尔氏菌含量在 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL 之间, 预测细菌性青枯病发病风险中等; 其他土壤样品检测出的茄科雷尔氏菌含量均小于 10^3 CFU/mL, 预测细菌性青枯病发病风险低, 其中砚山县 3、10、87、88、89、90 号, 广南县 14、19、25、28、91、92、93 号, 丘北县 32、36、44、49、94、95、96 号, 麻栗坡县 51、57、97、98、99、100 号, 共 26 份土壤样品中未检测出茄科雷尔氏菌。

3 讨论

茄科雷尔氏菌 (*R. solanacearum*) 是一种危害严重的土传病害病原菌, 具有非常广泛的宿主范围, 在世界各地均有分布^[15], 其中以茄科中的寄主种类最多, 茄科雷尔氏菌可以引起茄科作物上重要的细菌性病害, 在严重发生的年份甚至造成绝收^[16]。因此, 在发病前快速、准确地检测田间土壤中茄科雷尔氏菌的数量和动态变化规则能为该病的测报、防治策略或防控措施的制定和应用, 以及品种田间抗性评价提供重要的科学依据^[17]。

传统的茄科雷尔氏菌检测方法存在检测周期长、操作复杂、灵敏度不高等缺点, 不能较好地满足检测工作的要求。随着分子生物学技术的发展, 实时荧光定量 PCR 技术具有快速、灵敏度高、特异性强的特点, 可高通量定量检测土壤中病原菌数量, 可提前对烟草等茄科细菌性青枯病发生风险进行评估, 已经广泛运用于多种土传病原菌的快速检测研究领域^[18]。本研究建立的茄科雷尔氏菌的实时荧光定量 PCR 快速检测体系, 为该病原菌的快速检测提供了新的方法, 且能够实时监测作物病害发生发展过程中病原菌的动态变化, 为病原菌的预测预报及病害防控奠定了基础。

4 结论

本研究利用实时荧光定量 PCR 建立了茄科雷尔氏菌的快速检测技术体系, 并用该方法对来自云南省文山州 5 个县 100 份土壤样品进行了检测, 16 份土壤中茄科雷尔氏菌总数均大于 10^5 CFU/mL, 预测细菌性青枯病发生风险较高; 43 份土壤样品检测出的茄科雷尔氏菌含量在 $10^4 \sim 10^5$ CFU/mL 之间, 预测细菌性青枯病发病风险中等; 15 份土壤样品检测出的茄科雷尔氏菌含量均小于 10^3 CFU/mL, 预测细菌性青枯病发病风险低; 其余 26 份土壤样品中未检测出茄科雷尔氏菌。

表 1 100 份土壤样品中青枯病菌的荧光定量 PCR 检测结果

样品编号	平板 检测 菌落 数(个)	普通 PCR 检测 结果	荧光定量 PCR		
			C_T 值	病菌数 的对数 x [lg(CFU/mL)]	10^x (CFU/mL)
硃山县 1	2	+	28.13	4.039 511 91	10 952.466
硃山县 2	10	+	27.31	4.277 745 50	18 955.947
硃山县 3	0	—			
硃山县 4	6	+	28.11	4.045 322 49	11 099.987
硃山县 5	3	+	26.31	4.568 274 26	37 006.180
硃山县 6	2	+	29.31	3.696 687 93	4 973.796
硃山县 7	10	+	28.23	4.010 459 04	10 243.752
硃山县 8	4	+	29.03	3.778 036 03	5 998.408
硃山县 9	9	+	27.27	4.289 366 65	19 470.031
硃山县 10	0	—			
广南县 11	12	+	29.12	3.751 888 44	5 647.919
广南县 12	34	+	27.16	4.321 324 81	20 956.792
广南县 13	6	+	32.11	2.883 207 44	764.201
广南县 14	27	—			
广南县 15	12	+	22.47	5.683 904 71	482 952.820
广南县 16	11	+	29.18	3.734 456 71	5 425.712
广南县 17	3	+	30.66	3.304 474 14	2 015.924
广南县 18	2	+	29.67	3.592 097 62	3 909.288
广南县 19	10	—			
广南县 20	18	+	27.22	4.303 893 09	20 132.286
广南县 21	8	+	26.66	4.466 589 19	29 281.222
广南县 22	23	+	24.06	5.221 963 97	166 710.892
广南县 23	440	+	25.22	4.884 950 61	76 727.423
广南县 24	640	+	24.19	5.184 195 24	152 825.292
广南县 25	21	—			
广南县 26	0	+	25.17	4.899 477 05	79 337.238
广南县 27	11	+	26.33	4.562 463 68	36 514.359
广南县 28	51	—			
广南县 29	34	+	27.52	4.216 734 46	16 471.550
丘北县 30	32	+	26.19	4.603 137 71	40 099.385
丘北县 31	16	+	23.99	5.242 300 99	174 703.251
丘北县 32	39	—			
丘北县 33	680	+	25.46	4.815 223 71	65 346.707
丘北县 34	764	+	24.92	4.972 109 24	93 779.786
丘北县 35	625	+	23.88	5.274 259 15	188 043.856
丘北县 36	22	—			
丘北县 37	26	+	27.66	4.176 060 43	14 998.935
丘北县 38	28	+	27.31	4.277 745 50	18 955.947
丘北县 39	21	+	28.26	4.001 743 17	10 040.219
丘北县 40	17	+	29.38	3.676 350 96	4 746.254
丘北县 41	20	+	28.64	3.891 342 24	7 786.499
丘北县 42	19	+	28.33	3.981 406 16	9 580.897
丘北县 43	3	+	24.36	5.134 805 35	136 397.166
丘北县 44	26	—			
丘北县 45	19	+	28.34	3.978 500 87	9 517.018
丘北县 46	33	+	27.44	4.239 976 76	17 377.078
丘北县 47	29	+	28.31	3.987 216 73	9 709.944
丘北县 48	21	+	25.22	4.884 950 61	76 727.423
丘北县 49	37	—			
麻栗坡县 50	26	+	28.17	4.027 890 76	10 663.279
麻栗坡县 51	0	—			

续表 1

样品编号	平板 检测 菌落 数(个)	普通 PCR 检测 结果	荧光定量 PCR		
			C_T 值	病菌数 的对数 x [lg(CFU/mL)]	10^x (CFU/mL)
麻栗坡县 52	17	+	26.31	4.568 274 26	37 006.180
麻栗坡县 53	8	+	29.37	3.679 256 25	4 778.111
麻栗坡县 54	18	+	27.66	4.176 060 43	14 998.935
麻栗坡县 55	13	+	28.47	3.940 732 13	8 724.331
麻栗坡县 56	7	+	29.11	3.754 793 73	5 685.828
麻栗坡县 57	4	—			
麻栗坡县 58	145	+	25.39	4.835 560 72	68 479.522
麻栗坡县 59	210	+	25.18	4.896 571 76	78 808.264
麻栗坡县 60	160	+	24.97	4.957 582 80	90 694.886
麻栗坡县 61	189	+	25.13	4.911 098 20	81 488.852
麻栗坡县 62	3	+	23.88	5.274 259 15	188 043.858
麻栗坡县 63	55	+	25.09	4.922 719 35	83 698.823
麻栗坡县 64	23	+	27.18	4.315 514 24	20 678.272
麻栗坡县 65	146	+	24.91	4.975 014 53	94 409.245
麻栗坡县 66	190	+	25.22	4.884 950 61	76 727.423
麻栗坡县 67	34	+	23.78	5.303 312 03	201 053.681
麻栗坡县 68	0	+	24.39	5.126 089 48	133 687.094
麻栗坡县 69	66	+	25.22	4.884 950 61	76 727.423
马关县 70	43	+	23.12	5.495 061 01	312 651.856
马关县 71	16	+	26.99	4.370 714 70	23 480.898
马关县 72	0	+	28.04	4.065 659 50	11 632.137
马关县 73	11	+	24.95	4.963 393 38	91 916.478
马关县 74	21	+	23.88	5.274 259 15	188 043.858
马关县 75	15	+	26.77	4.434 631 03	27 203.891
马关县 76	1	+	27.34	4.269 029 63	18 579.312
马关县 77	21	+	27.12	4.332 945 96	21 525.139
马关县 78	19	+	24.31	5.149 331 78	141 036.585
马关县 79	26	+	24.29	5.155 142 36	142 936.242
马关县 80	33	+	24.37	5.131 900 06	135 487.759
马关县 81	193	+	25.01	4.945 961 65	88 300.192
马关县 82	263	+	24.93	4.969 203 95	93 154.524
马关县 83	435	+	24.75	5.021 499 13	105 074.935
马关县 84	425	+	24.24	5.169 668 80	147 798.082
马关县 85	69	+	26.77	4.434 631 03	27 203.891
马关县 86	60	+	27.51	4.219 639 74	16 582.108
硃山县 87 ~ 90	0	—			
广南县 91 ~ 93	0	—			
丘北县 94 ~ 96	0	—			
麻栗坡县 97 ~ 100	0	—			

注：“+”表示有条带，“—”表示无条带； $x = (42.034 - C_T) / 3.442$ 。

参考文献：

[1] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* [J]. Annual Review of Phytopathology, 1991, 29: 65—87.

[2] 胡澄清, 姜国庆, 刘惠英, 等. 番茄青枯病的发生及防治 [J]. 北京农业, 2015(20): 68—69.

[3] 陈瑞泰, 朱贤朝, 王智发. 全国 16 个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告 [J]. 中国烟草科学, 1997(4): 1—7.

朱彬彬,崔百明,向本春. 番茄叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *cab-1a* 的克隆与定位[J]. 江苏农业科学,2017,45(14):20-23.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.14.006

番茄叶绿素 a/b 结合蛋白基因 *cab-1a* 的克隆与定位

朱彬彬¹, 崔百明¹, 向本春²

(1. 石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832000;2. 石河子大学农学院,新疆石河子 832000)

摘要:在进行酵母双杂交试验时发现,马铃薯 Y 病毒 HC-Pro 蛋白与番茄未知蛋白发生相互作用,经测序、Blast 比对,确认为番茄叶绿素 a/b 结合蛋白 Cab-1A,Genbank 序列号为 XM_010318610.1。为初步验证这一发现,设计引物,然后以番茄 cDNA 文库为模板,克隆出 798 bp 的 *cab-1a* 全长序列,并构建了 *cab-1a* 基因的亚细胞定位载体 pSPGFP-Cab-1A,并运用叶盘法将其转化到烟草表皮细胞中,在荧光共聚焦显微镜下观察其定位情况。结果表明, *cab-1a* 基因编码的 Cab-1A-like 蛋白位于细胞核和细胞质中,为与马铃薯 Y 病毒(potato virus Y, PVY)蛋白 HC-Pro(helper component proteinase)相互作用的后续研究奠定理论基础。

关键词:番茄;叶绿素 a/b;蛋白 Cab-1A;亚细胞定位;GFP;烟草表皮细胞

中图分类号: S641.201 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)14-0020-04

光合作用是地球上生命现象的基础,高等植物光合作用光能的捕获与传递主要是通过光捕获叶绿素 a/b 结合蛋白(chlorophyll a/b binding protein, Cab)来完成^[1],在高等植物中大部分叶绿素分子都结合在光系统 I(PS I)和光系统 II(PS II)的天然色素蛋白复合物上^[2]。这些蛋白复合物共同组成一个很重要而又很庞大的家族,但特点又不是很明显。光捕获叶绿素 a/b 结合蛋白 Cab 是一类能捕获光能,并把光能转化成电能迅速传至光反应中心引起光化学反应的色素蛋

白,这些蛋白复合体由属于同一家族的色素结合蛋白与色素结合而形成,然后通过色素结合蛋白的跨膜区将其锚定在类囊体膜上。高等植物中大部分的叶绿素分子都结合在 PS I、PS II 的捕光色素蛋白复合物上,其中 PS II 捕光色素蛋白复合物结合的叶绿素约占类囊体膜上色素量的 50%^[3],除与光能的传递相关之外,其在响应外界生物胁迫方面也发挥着重要作用^[4-5],且随着电子晶体学研究方法的发展,对 Cab 蛋白晶体结构的分析也日趋深入^[6]。

叶绿素 a/b 结合蛋白由定位于细胞核内的 *cab* 基因编码^[7],核基因 *cab* 转录产生的 mRNA 在细胞质的 80 S 核糖体上翻译成前体多肽,这些前体多肽被运进叶绿体并被加工切割成成熟蛋白,其转移过程借助于被称为过渡肽(transit peptide)或引导肽(leader peptide)的 N 末端扩展序列。过渡肽和切割位点下游 6—15 氨基酸残基区域是 Cab 蛋白前体的

收稿日期:2016-03-22

基金项目:国家自然科学基金(编号:31260420)。

作者简介:朱彬彬(1989—),男,河南焦作人,硕士,研究方向为细胞分子生物学。E-mail:bbz525@163.com。

通信作者:向本春,博士,教授,研究方向为植物分子病理与植物保护。E-mail:xbc@shz.edu.com。

[4] 沈建国,翟梅枝,林奇英,等. 我国植物源农药研究进展[J]. 福建农林大学学报(自然科学版),2002,31(1):26-31.

[5] 刘海龙,黎妍妍,郑露,等. 番茄青枯病菌的分子鉴定及其生物学特性研究[J]. 南方农业学报,2015,46(3):415-420.

[6] 乔俊卿,陈志谊,刘卮洲,等. 茄科作物青枯病研究进展[J]. 植物病理学报,2013,43(1):1-10.

[7] 史忠良. 辣椒青枯病生防菌的分离和鉴定[J]. 安徽农业科学,2015,43(18):128-129.

[8] 孙炳剑,陈清清,袁虹霞,等. SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测小麦纹枯病菌体系的建立和应用[J]. 中国农业科学,2015,48(1):55-62.

[9] 王恒波,陈平华,高三基,等. 甘蔗宿根矮化病菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 植物病理学报,2015,45(3):232-238.

[10] 潘明森,王震铎,方敦煌,等. 土壤中黑胫病菌荧光定量 PCR 快速检测体系的建立及初步应用[J]. 江西农业大学学报,2015,37(4):712-718.

[11] Postma J, Schilder M T, van Hoof R A. Indigenous populations of three closely related *Lysobacter* spp. in agricultural soils using real-time PCR[J]. Microbial Ecology,2011,62(4):948-958.

[12] Nicholson P, Turner A S, Edwards S G, et al. Development of stem-base pathogens on different cultivars of winter wheat determined by quantitative PCR[J]. European Journal of Plant Pathology,2002,108(2):163-177.

[13] 潘娟娟,骆勇,黄冲,等. 应用 real-time PCR 定量检测小麦条锈菌潜伏侵染量方法的建立[J]. 植物病理学报,2010,40(5):504-510.

[14] 闫佳会,骆勇,潘娟娟,等. 应用 real-time PCR 定量检测田间小麦条锈菌潜伏侵染的研究[J]. 植物病理学报,2011,41(6):618-625.

[15] 成娟丽. 茄科雷尔氏菌 3-酮基脂酰 ACP 合成酶同源蛋白在脂肪酸合成代谢中的功能鉴定[D]. 广州:华南农业大学,2010.

[16] 钟贵,郑常格,汤历,等. 茄科作物青枯病生物防治研究进展[J]. 广东农业科学,2005(2):55-57.

[17] 贾春燕. 烟草青枯病菌的分子检测与烟草品种抗病性研究[D]. 泰安:山东农业大学,2011.

[18] Ginzinger D G. Gene quantification using real-time quantitative PCR:an emerging technology hits the mainstream[J]. Experimental Hematology,2002,30(6):503-512.