

城市绿地中立枯丝核菌和齐整小核菌的 qPCR 快速检测方法

雒淑红¹, 骆玉珍¹, 赵莺莺², 张维维^{2,3}, 刘文², 何山文², 安磊², 王永杰¹, 韩继刚²

(1. 上海海洋大学 食品学院, 上海 200120; 2. 上海市园林科学规划研究院, 上海 200232; 3. 东北大学 资源与土木工程学院, 辽宁 沈阳 110819)

摘要: 【目的】土传病原真菌立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 和齐整小核菌 *Sclerotium rolfsii* 严重威胁园林绿化植物正常生长。建立针对这 2 种土壤病原真菌的快速定量检测方法。【方法】通过筛选 2 种病原菌特异性引物, 优化反应条件。【结果】初步建立了 2 种病原菌的实时荧光定量 PCR(qPCR) 检测方法。引物 ST-RS1/ITS4 和 SRITSF/SRITSR 可以分别用于立枯丝核菌和齐整小核菌的 qPCR 检测, 其灵敏度分别达 24×10^6 和 22×10^6 拷贝 $\cdot L^{-1}$, 2 次重复反应的变异系数分别为 3.37%~4.61% 和 0.66%~8.61%。对上海绿地土壤样品的检测结果表明: 立枯丝核菌和齐整小核菌的检出率分别为 100% 和 19%。【结论】建立的 qPCR 检测方法具有较强特异性、较高灵敏度和较强重复性, 可以用于上海城市绿地土壤中立枯丝核菌和齐整小核菌的快速、有效定量检测。图 2 表 5 参 29

关键词: 城市绿地土壤; 立枯丝核菌; 齐整小核菌; qPCR

中图分类号: Q949.32 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2022)05-1087-09

Quantitative real-time PCR for rapid detection of *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* in urban green space

LUO Shuhong¹, LUO Yuzhen¹, ZHAO Yingying², ZHANG Weiwei^{2,3}, LIU Wen²,
HE Shanwen², AN Lei², WANG Yongjie¹, HAN Jigang²

(1. College of Food Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 200120, China; 2. Shanghai Academy of Landscape Architecture Science and Planning, Shanghai 200232, China; 3. College of Resources and Civil Engineering, Northeastern University, Shenyang 110819, Liaoning, China)

Abstract: [Objective] This study aims to establish a rapid quantitative detection method for *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*, 2 soil-borne pathogenic fungi that seriously threaten the normal growth of landscape plants in Shanghai. [Method] The reaction conditions were optimized by screening 2 pathogen specific primers. [Result] A quantitative real-time PCR (qPCR) method was established for the detection of the two pathogens. The primers ST-RS1/ITS4 and SRITSF/SRITSR could be used for qPCR detection of *R. solani* and *S. rolfsii*, with sensitivity of 24×10^6 and 22×10^6 copies $\cdot L^{-1}$, respectively. The coefficients of variation of the 2 repeated reactions were 3.37%–4.61% and 0.66%–8.61%, respectively. The detection results of soil samples in Shanghai green space showed that the detection rates of *R. solani* and *S. rolfsii* were 100% and 19%, respectively. [Conclusion] The established qPCR method has high specificity, sensitivity and repeatability, and

收稿日期: 2021-12-14; 修回日期: 2022-05-28

基金项目: 上海市绿化和市容管理局科技攻关项目 (G200201); 上海市科学技术委员会科研计划项目 (19dz1203300)

作者简介: 雒淑红 (ORCID: 0000-0001-8129-1927), 从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: 2495240181@qq.com。通信作者: 韩继刚 (ORCID: 0000-0001-9717-4725), 教授, 博士, 从事城市绿地土壤质量监测和土壤功能微生物研究。E-mail: jghan9@gmail.com

can be used for rapid and effective quantitative detection of *R. solani* and *S. rolfsii* in Shanghai urban green soil. [Ch, 2 fig. 5 tab. 29 ref.]

Key words: urban green space soil; *Rhizoctonia solani*; *Sclerotium rolfsii*; qPCR

城市绿地是生态城市建设的基础和重要组成部分^[1]。植物病害特别是土传病害已经对绿地生态系统健康造成了严重威胁^[2-3]，由真菌引起的植物病害占全部植物病害的 2/3 以上^[4]，其中土传植物病原真菌是造成植物病害的主要类群^[5]。研究表明：立枯丝核菌 *Rhizoctonia solani* 和齐整小核菌 *Sclerotium rolfsii* 是上海绿地土壤中最常见的土传植物病原真菌^[6]。立枯丝核菌属于无孢科 Agonomycetaceae 丝核菌属 *Rhizoctonia*^[7]，在自然界中广泛存在，是引起植物根腐和茎腐症状的重要病原菌，被认为是最具破坏力的土传植物病原菌之一^[8]。海桐 *Pittosporum tobira*、八角金盘 *Fatsia japonica*、高羊茅 *Festuca arundinacea* 和女贞 *Ligustrum lucidum* 等 360 个属的园林绿化植物均能被立枯丝核菌感染^[9]。齐整小核菌属于无孢科小核菌属 *Sclerotium*^[6]，是一种世界性传播的土传病原真菌，可以引起植物白绢病，致使植物腐烂死亡^[10]。木棉属 *Bombax* 和紫檀属 *Pterocarpus* 植物以及樟树 *Cinnamomum camphora* 和夹竹桃 *Nerium oleander* 等园林绿化植物常被齐整小核菌侵染^[11]。

土传病原真菌的传统检测方法主要是根据病原菌形态特征、选择性平板计数等方法进行^[12-13]，但耗时费力、效率较低，时效性较差，已不能满足实际工作需求。随着分子生物学技术的发展，实时荧光定量 PCR (qPCR) 因具有特异性强、灵敏度高等特点，已经越来越多地被应用于土传病原真菌的检测。目前，已经有应用该技术对农田土壤中立枯丝核菌和齐整小核菌进行定性、定量检测的报道^[14-16]。但是，尚缺乏应用 qPCR 技术对城市绿地土壤进行立枯丝核菌和齐整小核菌定量检测的研究。与农田土壤存在明显差异，城市绿地土壤异质性高，普遍面临着重金属和有机污染物等的威胁^[1, 17]，因此，针对城市绿地土壤中立枯丝核菌和齐整小核菌，探索建立具有较强特异性、较高灵敏性和较好重复性的分子生物学检测方法，对于及时了解上海城市绿地土壤中立枯丝核菌和齐整小核菌的分布，保障植物和城市绿地生态系统健康具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

立枯丝核菌和齐整小核菌标准菌株购买于中国农业微生物菌种保藏管理中心 (Agricultural Culture Collection of China, ACCC)，编号分别为 ACCC37615 和 ACCC37946。菌株的培养参照《丝状真菌分子细胞生物学与实验技术》^[18]。

1.2 绿地土壤样品采集

2018 年 7 月，采用多点混合采样法，在上海市随机采集绿地 0~20 cm 表层土壤样品。采样点信息见表 1。每个采样点设置 5 个子样点，每个土壤样品由 5 个子样点样品混合而成。土壤样品充分混合后，去除石块、草根等杂物，-20 ℃ 保存，用于后续试验^[17]。

1.3 DNA 提取

采用 AntGene DNA 提取试剂盒 (武汉安特捷生物技术有限公司) 提取立枯丝核菌和齐整小核菌标准菌株 DNA。采用土壤基因组 DNA 提取试剂盒 (FastDNA spin kit for soil, MP Biomedicals, 美国) 提取绿地土壤样品 DNA。使用 NanoDrop 2000 微量分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 测定 DNA 的吸光度比值 $D(260)/D(280)$ 及 $D(260)/D(230)$ ，确定 DNA 质量及浓度，之后于 -80 ℃ 超低温冰箱保存。

1.4 qPCR 引物的筛选及在线特异性验证

通过文献检索，根据已有报道选择了 ST-RS1/ITS4、ITS1/GMRS-3 等引物进行扩增立枯丝核菌的特异性引物的筛选，选择 SCR-F/SCR-R、SRITSF/SRITSR 等引物进行扩增齐整小核菌的特异性引物的筛选 (表 2)，引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。通过美国国家生物技术信息中心 (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 中 Primer-BLAST 功能将 4 对引物分别与 Non-Redundant Protein Sequence (NR) 数据库进行序列比对，在线筛选和验证引物的特异性。

表 1 绿地土壤样品信息

Table 1 Information of green space soil samples					
样品编号	绿地类型	采样位置			
		行政区	绿地名称	纬度(N)	经度(E)
1	道路绿地	金山区	朱平公路中央绿化带内	30°49′	121°08′
2	公园绿地	闵行区	闵行文化公园	31°10′	121°21′
3	公园绿地	金山区	亭林公园	30°20′	121°18′
4	道路绿地	金山区	亭卫公路	30°20′	121°20′
5	公园绿地	奉贤区	奉浦四季生态园	30°56′	121°27′
6	公园绿地	崇明区	崇明新城公园	31°37′	121°25′
7	公园绿地	黄浦区	复兴公园	31°13′	121°27′
8	道路绿地	徐汇区	虹梅路	31°08′	121°24′
9	道路绿地	普陀区	真北路	31°16′	121°23′
10	道路绿地	浦东新区	杨高中路	31°13′	121°32′
11	道路绿地	浦东新区	杨高北路	31°15′	121°35′
12	道路绿地	浦东新区	济阳路上浦路	31°08′	121°29′
13	道路绿地	浦东新区	杨高南路	31°11′	121°31′
14	道路绿地	青浦区	外青松公路	31°12′	121°07′
15	道路绿地	浦东新区	唐镇路	31°12′	121°38′
16	公园绿地	宝山区	炮台湾湿地公园	31°23′	121°30′
17	公园绿地	宝山区	淞南公园	31°20′	121°28′
18	道路绿地	闵行区	华宁路剑川路	31°01′	121°23′
19	道路绿地	杨浦区	殷行路	31°19′	121°31′
20	公园绿地	浦东新区	名人苑公园北门东侧	31°14′	121°33′
21	公园绿地	嘉定区	汇龙潭公园	31°22′	121°14′

表 2 用于立枯丝核菌和齐整小核菌 qPCR 的引物信息

Table 2 qPCR primer sets of <i>R. solani</i> and <i>S. rolfsii</i>					
病原菌	引物名称	引物序列 (5'→3')	产物大小/bp	退火温度/℃	参考文献
立枯丝核菌	ST-RS1	AGTGTATGCTTGCTTCCACT	187	60	[19]
	ITS4	TCTCCGCTTATTGATATGC			
	ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	564	65	[20]
	GMRS-3	AGTGGAACCAAGCATAACACT			
齐整小核菌	SCR-F	CGTAGGTGAACCTGCGGA	540	54	[21]
	SCR-R	CATACAAGCTAGAATCCC			
	SRITSF	TACACCTGTGAACCAACTG	465	52	[22]
	SRITSR	CATACAAGCTAGAATCCC			

1.5 质粒标准品的制备

以 2 种病原菌标准菌株 DNA 为模板，分别使用筛选的特异性引物对其进行 PCR 扩增。PCR 产物经质量分数为 2% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收目的条带，使用通用型 DNA 纯化试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司，中国北京] 对目的条带进行纯化回收。按照 pGM-T Fast 连接试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司，中国北京] 说明书将回收所得片段连接到 pGEM-T Easy 载体上 (Promega, 美国)，转化至 JM109 感受态细胞中 (Promega, 美国)，经蓝白斑筛选阳性克隆子，并进行菌落 PCR 验证后，按照质粒抽提试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司，中国北京] 说明书进行质粒抽提，提取所得重组质粒送至上海美吉生物医药科技有限公司测序。使用 NanoDrop 2000 微量分光光度计 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 测定质粒标准品浓度，计算质粒拷贝数^[23]。

1.6 qPCR 检测方法的建立和优化

1.6.1 反应条件的优化 qPCR 反应体系包含有 10 μL GoTaq q-PCR Master Mix (Promega, 美国), DNA 模板用量分别设置为 0.5、1.0、2.0、3.0、4.0 μL , 上、下游引物 ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 分别设置为 0.1、0.3、0.5、0.7、0.9 μL , 加无菌重蒸水补足至 20 μL 。阴性对照使用无菌重蒸水代替 DNA 模板。使用 Roche Light Cycle 480 II 型 qPCR 仪 (罗氏医学仪器公司, 瑞士)。qPCR 反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 退火温度下退火 40 s [退火温度在文献中引物 T_m 值 (表 2) 上下浮动 3 $^{\circ}\text{C}$ 范围内设置 7 个温度梯度], 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 45 个循环。循环结束后进入熔解曲线程序: 65 $^{\circ}\text{C}$ 升温至 95 $^{\circ}\text{C}$, 隔 1 $^{\circ}\text{C}$ 采集荧光信号。

1.6.2 标准曲线的建立 将立枯丝核菌和齐整小核菌质粒标准品分别进行 10 倍梯度稀释, 质粒标准品浓度范围为 $10^8\sim 10^1$ ($\times 10^6$ 拷贝 $\cdot\text{L}^{-1}$), 分别得到 8 个稀释浓度的质粒标准品模板, 使用 1.6.1 中优化后的 qPCR 反应条件进行扩增, 绘制标准曲线。

1.7 方法特异性评价

以质粒标准品和绿地土壤样品 DNA 为模板进行 qPCR 扩增, 通过熔解曲线判断 qPCR 扩增产物是否单一。qPCR 扩增产物利用质量分数为 2% 琼脂糖凝胶电泳 (110 V, 40 min) 检测, 通过紫外凝胶成像系统对电泳条带进行观察和分析。将质粒标准品和土壤样品扩增产物送至上海美吉生物医药科技有限公司进行克隆测序, 并利用 NCBI 数据库对质粒标准品和土壤样品 PCR 扩增产物测序结果进行序列比对。

1.8 方法灵敏性评价

分别将 2 种病原真菌的质粒标准品进行 10 倍梯度稀释, 从 $10^8 \times 10^6$ 拷贝 $\cdot\text{L}^{-1}$ 稀释至 $10^1 \times 10^6$ 拷贝 $\cdot\text{L}^{-1}$, 取稀释好的质粒标准品作为模板, 按照 1.6 中优化后的 qPCR 条件进行扩增, 根据试验结果确定方法的最低检测限, 验证此方法的灵敏性。

1.9 方法重复性评价

随机选择 5 个不同类型绿地土壤样品 DNA 作为模板, 按照 1.6 中优化后的方法进行立枯丝核菌和齐整小核菌 qPCR 扩增, 每个反应重复 2 次。随后根据每个样品组内重复间拷贝数的变异系数, 验证方法的重复性和稳定性。

1.10 上海绿地土壤中立枯丝核菌和齐整小核菌的定量检测

采用 1.6 中优化后的 qPCR 方法对 21 份上海绿地土壤样品进行立枯丝核菌和齐整小核菌定量检测, 每个反应设置 3 个平行试验, 计算土壤样品中病原菌 ITS 基因的拷贝数, $y=c \times n \times v/s$ 。其中: y 为基因拷贝数 (拷贝 $\cdot\text{g}^{-1}$), c 为浓度 ($\times 10^6$ 拷贝 $\cdot\text{L}^{-1}$), n 为模板稀释倍数, v 为 DNA 洗脱体积 (μL), s 为土壤干质量 (g)。

1.11 数据处理

运用 Excel 2016 软件对数据进行分析处理。

2 结果与分析

2.1 qPCR 引物的筛选及 NCBI 在线特异性验证

使用 NCBI 中 Primer-BLAST 功能将表 2 的 4 对引物分别与 NR 数据库进行序列比对。结果显示: 引物 ST-RS1/ITS4 和 ITS1/GMRS-3 均可有效匹配目的序列 900 余条, 错配率分别为 7.7% 和 6.3%, 在理论上均可实现对立枯丝核菌种水平特异性扩增 (表 3)。与引物 ITS1/GMRS-3 相比, 引物 ST-RS1/ITS4 扩增目的片段长度小于 200 bp, 更适用于在 qPCR

表 3 qPCR 引物在线比对结果

引物名称	目的序列 长度/bp	匹配目的 序列数/条	匹配非目的 序列数/条	错配 率/%
ST-RS1/ITS4	187	908	76	7.7
ITS1/GMRS-3	564	936	63	6.3
SRITSF/SRITSR	465	429	38	8.1
SCR-F/SCR-R	540	30	4	13.3

方法中的应用, 因此, 本研究仅保留引物 ST-RS1/ITS4 用于后续立枯丝核菌定量检测方法的建立。引物 SRITSF/SRITSR 可有效匹配目的序列 429 条, 错配率为 8.1%, 理论上可以实现对齐整小核菌种水平特异性扩增, 而引物 SCR-F/SCR-R 仅匹配 30 条目的序列, 覆盖率相对低于引物 SRITSF/SRITSR, 且该引物错配率较高, 因此, 本研究仅保留引物 SRITSF/SRITSR 用于后续齐整小核菌定量检测方法的建立 (表 3)。

2.2 qPCR 检测方法的建立和优化

2.2.1 反应条件的优化 以 2 种病原菌质粒标准品为模板进行 qPCR 反应条件的优化。结果表明：引物 ST-RS1/ITS4 最佳退火温度为 60 ℃，引物 SRITSF/SRITSR 最佳退火温度为 52 ℃。在上述退火温度下，2 种病原菌 qPCR 扩增效率最高。因此，最终确定立枯丝核菌 qPCR 扩增条件为：95 ℃ 预变性 5 min；95 ℃ 变性 15 s，60 ℃ 退火 40 s，72 ℃ 延伸 40 s，45 个循环。齐整小核菌 qPCR 扩增条件为：95 ℃ 预变性 5 min；95 ℃ 变性 15 s，52 ℃ 退火 40 s，72 ℃ 延伸 40 s，45 个循环。

2 种病原菌 qPCR 反应体系中最适引物用量均为 0.3 μL (10 μmol·L⁻¹)，DNA 模板用量均为 2 μL (10 mg·L⁻¹)，在该反应条件下荧光信号最强。因此，最终确定 2 种病原菌 qPCR 反应体系 (20 μL) 为：模板 2 μL (10 mg·L⁻¹)，上下游引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.3 μL，GoTaq[®] q-PCR Master Mix (Promega, 美国) 10 μL，无菌重蒸水 7.4 μL。

2.2.2 标准曲线的建立 以 10 倍梯度稀释的质粒标准品为模板，使用 2.2.1 优化后的 qPCR 反应条件进行扩增，绘制标准曲线。立枯丝核菌标准曲线线性关系表达式为 $y = -3.319x + 33.98$ (y 为 C_t 值， x 为模板量)，决定系数 (R^2) 为 0.999 5，扩增效率为 100.1%。齐整小核菌标准曲线线性关系表达式为 $y = -3.552x + 33.65$ (y 为 C_t 值， x 为模板量)，决定系数 (R^2) 为 0.997 9，扩增效率为 91.2%。结果表明：2 种病原菌 qPCR 的 C_t 值与质粒标准品浓度的对数均具有良好的线性关系，扩增效率符合 qPCR 定量检测方法的要求，表明本研究建立的 2 种病原菌定量检测方法具有较高的准确度和有效性，可作为立枯丝核菌和齐整小核菌快速定量检测的方法。对立枯丝核菌的线性检测范围为 $2.42 \times 10^1 \sim 2.42 \times 10^8$ ($\times 10^6$ 拷贝·L⁻¹)，对齐整小核菌的线性检测范围为 $2.20 \times 10^1 \sim 2.20 \times 10^8$ ($\times 10^6$ 拷贝·L⁻¹)。

2.3 方法特异性评价

以质粒标准品和绿地土壤样品 DNA 为模板进行 qPCR 扩增。结果显示：溶解曲线均为单一熔解峰，无杂峰，表明 qPCR 扩增产物单一且未产生引物二聚体。qPCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳结果显示：引物 ST-RS1/ITS4 扩增得到约 200 bp 的片段，引物 SRITSF/SRITSR 扩增得到约 450 bp 的片段，均与目的片段大小一致 (图 1)。利用 NCBI 数据库对 PCR 扩增产物克隆测序的结果进行序列比对，结果见表 4。采用引物 ST-RS1/ITS4 从质粒标准品及土壤样品扩增到的产物分别与立枯丝核菌 *R. solani* BTRFB1 (登录号: MZ158299) 和 *R. solani* AG-F (登录号: JQ343829) 序列相似度最高，相似度为 99.4%。采用引物 SRITSF/SRITSR 从质粒标准品及土壤样品扩增到的产物分别与齐整小核菌 *S. rolfii* NTNM (登录号: MT126473) 和 *S. rolfii* SR1 (登录号: MG847186) 序列相似度最高，分别为 99.5% 和 98.8%。扩增产物测序结果说明：利用引物 ST-RS1/ITS4 和 SRITSF/SRITSR 扩增到的 DNA 序列均与目的片段序列一致，具有较强的特异性。

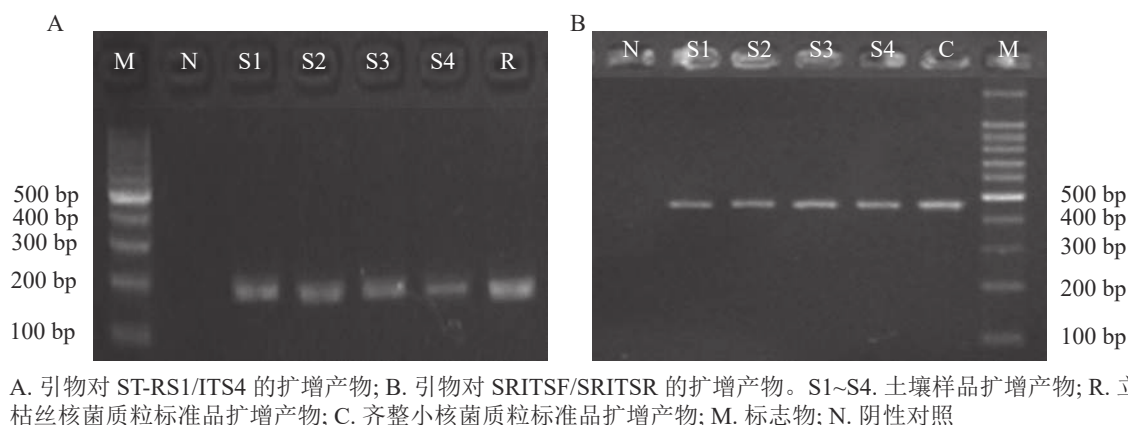


图 1 立枯丝核菌和齐整小核菌 DNA 的 PCR 扩增

Figure 1 PCR amplification of *R. solani* and *S. rolfii* DNA

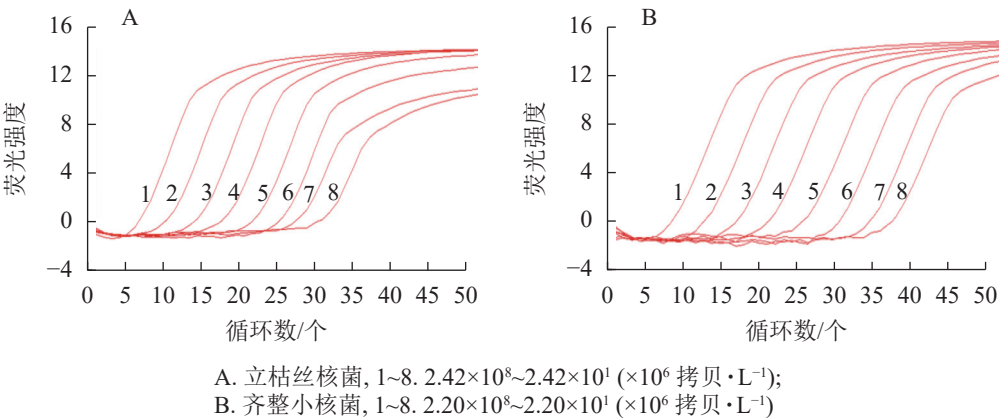
2.4 方法灵敏性评价

以 10 倍梯度稀释的质粒标准品为模板，使用 2.2.1 优化后的 qPCR 反应条件进行扩增，进行 qPCR 灵敏性验证。结果显示：本研究建立的 qPCR 定量检测方法对立枯丝核菌和齐整小核菌的检测限分别可达 24×10^6 和 22×10^6 拷贝·L⁻¹ (图 2)。

表 4 质粒标准品和土壤样品测序比对结果

Table 4 Sequencing alignment result of plasmid standard and soil sample

引物	样品	同源菌株	基因登录号	相似度/%
ST-RS1/ITS4	质粒标准品	<i>R. solani</i> BTRFB1	MZ158299	99.4
	土壤样品	<i>R. solani</i> AG-F	JQ343829	99.4
SRITSF/SRITSR	质粒标准品	<i>S. rolfsii</i> NTNM	MT126473	99.5
	土壤样品	<i>S. rolfsii</i> SR1	MG847186	98.8



A. 立枯丝核菌, 1~8. $2.42\times10^8\sim2.42\times10^1$ ($\times10^6$ 拷贝 $\cdot\text{L}^{-1}$);
B. 齐整小核菌, 1~8. $2.20\times10^8\sim2.20\times10^1$ ($\times10^6$ 拷贝 $\cdot\text{L}^{-1}$)

图 2 qPCR 的灵敏性

Figure 2 Sensitivity test of qPCR

2.5 方法重复性评价

随机选择 5 个绿地土壤样品 DNA 作为模板，使用本研究建立的方法对样品中立枯丝核菌和齐整小核菌 ITS 基因拷贝数进行测定。结果表明：绿地土壤样品立枯丝核菌和齐整小核菌 ITS 基因拷贝数 2 次检测结果的变异系数范围分别为 3.37%~4.61% 和 0.66%~8.61%(表 5)，变异系数均低于 10%，表明本研究建立的立枯丝核菌和齐整小核菌定量检测方法具有较好的重复性和稳定性。

表 5 qPCR 的重复性

Table 5 Repeatability of qPCR

病原菌	样品编号	第1次试验		第2次试验		变异系数/%
		C_t	拷贝数/($\times10^6$ 拷贝 $\cdot\text{L}^{-1}$)	C_t	拷贝数/($\times10^6$ 拷贝 $\cdot\text{L}^{-1}$)	
立枯丝核菌	4	31.74	3.09×10^1	31.60	3.25×10^1	3.57
	5	30.54	6.45×10^1	30.56	6.15×10^1	3.37
	6	29.49	1.23×10^2	29.51	1.17×10^2	3.54
	10	30.98	4.91×10^1	31.03	4.60×10^1	4.61
	12	29.71	1.07×10^2	29.74	1.01×10^2	4.08
齐整小核菌	3	33.76	2.16×10^2	33.53	2.44×10^2	8.61
	6	35.15	1.02×10^2	35.09	1.05×10^2	2.05
	14	35.04	1.08×10^2	35.05	1.07×10^2	0.66
	16	36.55	4.77×10^1	36.63	4.57×10^1	3.03
	18	35.72	7.46×10^1	35.67	7.66×10^1	1.87

2.6 上海绿地土壤中立枯丝核菌和齐整小核菌的定量检测

将本研究建立的立枯丝核菌和齐整小核菌定量检测方法应用于上海绿地土壤样品的检测。检测结果表明：立枯丝核菌的检出率为 100%，ITS 基因拷贝数最高为 2.61×10^6 拷贝 $\cdot\text{g}^{-1}$ ；齐整小核菌的检出率为 19%，检出样品的 ITS 基因拷贝数最高为 2.94×10^5 拷贝 $\cdot\text{g}^{-1}$ 。说明立枯丝核菌在上海绿地表层土壤中广泛存在。

3 讨论

引物的特异性是对土传病原真菌进行 qPCR 检测的关键^[24]。真菌 ITS 序列目前已被广泛用于真菌的亲缘关系分析, 为病原菌的分子检测提供了较为理想的分子标记^[25]。本研究通过检索文献^[19, 22] 及数据库, 筛选得到了基于真菌 ITS 区域设计的立枯丝核菌和齐整小核菌种水平特异性引物 ST-RS1/ITS4 和 SRITSF/SRITSR。NCBI NR 数据库在线比对结果显示: ST-RS1/ITS4 和 SRITSF/SRITSR 目的片段错配率分别为 7.7% 和 8.1%, 理论上可实现对立枯丝核菌和齐整小核菌种水平特异性扩增; 同时, qPCR 熔解曲线均为单一熔解峰, 扩增产物片段大小与序列均与目的片段一致。上述结果均表明: 本研究建立的立枯丝核菌和齐整小核菌荧光定量检测方法具有较强的特异性。此外, qPCR 检测方法的灵敏性是评价其是否可行的另一个关键因素, 一般是指可以准确测量的样品最小拷贝数^[26]。前人的研究表明: 对农田土壤立枯丝核菌和大豆茎褐腐病菌 *Phialophora gregata* 等土传病原菌 qPCR 检测的灵敏度可以达 $26.7 \sim 100.0 (\times 10^6 \text{ 拷贝} \cdot \text{L}^{-1})$ ^[13, 27-28]。本研究针对立枯丝核菌和齐整小核菌检测限分别可达 24×10^6 和 22×10^6 拷贝 $\cdot \text{L}^{-1}$, 具有较高的灵敏度。因此, 本研究所建立的 qPCR 检测方法可以用于城市绿地土壤中立枯丝核菌和齐整小核菌的定量检测。

立枯丝核菌和齐整小核菌是寄主范围广、危害性强的土传病原真菌, 可侵染一些重要经济植物, 例如水稻 *Oryza sativa*、花生 *Arachis hypogaea*、樟树和海桐等, 造成植物根腐病和白绢病等病害的发生^[7, 10]。鉴于这 2 种病原菌分布的广泛性, 因此有必要了解其在城市绿地土壤中的分布情况, 从而有效预防园林植物立枯病、根腐病和白绢病等病害的发生。本研究中上海绿地表层土壤立枯丝核菌的检出率达 100%, 表明立枯丝核菌在上海绿地土壤中广泛存在。齐整小核菌检出率较低, 为 19%。齐整小核菌检出率低, 可能有两方面的原因。一方面, 随着对城市绿地养护技术和措施的不断提高和加强, 齐整小核菌在土壤中的存在范围可能缩小了; 另一方面, 也可能是由于采样点的局限性, 还不足以反映上海绿地土壤中齐整小核菌整体的存在情况, 后期需要通过扩大绿地土壤样品采集范围, 更为全面地检测齐整小核菌在上海绿地土壤中的分布情况。同时应该看到, 应用 qPCR 方法检测土壤中病原菌的数量时, 并不能有效区分活体和死体病原菌的 DNA, 检测结果可能会过高估计土壤中病原菌基因的丰度^[29]。因此, 如何准确、快速测定城市绿地土壤中活体立枯丝核菌和齐整小核菌基因的丰度, 尚需进一步研究。

综上所述, 本研究通过立枯丝核菌和齐整小核菌 qPCR 引物的筛选和特异性验证、qPCR 反应条件的建立及灵敏性和重复性评价, 建立了针对立枯丝核菌和齐整小核菌的快速、特异且灵敏度较高的 qPCR 检测方法, 可用于城市绿地土壤中这 2 种病原菌的定量检测。

4 参考文献

- [1] 马想, 张浪, 黄绍敏, 等. 上海城市绿地土壤肥力变化分析[J]. 中国园林, 2020, 36(5): 104 - 109.
MA Xiang, ZHANG Lang, HUANG Shaomin, et al. Analysis on the change of soil fertility in Shanghai urban space [J]. *Chin Landscape Archit*, 2020, 36(5): 104 - 109.
- [2] 李世东, 缪作清, 高卫东. 我国农林园艺作物土传病害发生和防治现状及对策分析[J]. 中国生物防治学报, 2011, 27(4): 433 - 440.
LI Shidong, LIAO Zuoqing, GAO Weidong. Challenges, opportunities and obligations in management of soilborne plant diseases in China [J]. *Chin J Biol Control*, 2011, 27(4): 433 - 440.
- [3] 付先惠, 曹敏, 唐勇. 植物病原菌在森林动态中的作用[J]. 生态学杂志, 2003, 22(3): 59 - 64.
FU Xianhui, CAO Min, TANG Yong. Effects of plant pathogens on forest dynamics [J]. *Chin J Ecol*, 2003, 22(3): 59 - 64.
- [4] 彭丹丹, 张源明, 舒灿伟, 等. 植物病原真菌分子检测技术的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(5): 2015 - 2022.
PENG Dandan, ZHANG Yuanming, SHU Canwei, et al. Research progress on the molecular detection techniques of plant pathogenic fungi [J]. *Genomics Appl Biol*, 2017, 36(5): 2015 - 2022.
- [5] 杨珍, 戴传超, 王兴祥, 等. 作物土传真菌病害发生的根际微生物机制研究进展[J]. 土壤学报, 2019, 56(1): 12 - 22.
YANG Zhen, DAI Chuanchao, WANG Xingxiang, et al. Advance in research on rhizosphere microbial mechanisms of crop soil-borne fungal diseases [J]. *Acta Pedol Sin*, 2019, 56(1): 12 - 22.

- [6] 蒋杰贤, 严巍. 城市绿地有害生物预警及控制[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2007: 207 – 225.
JIANG Jiexian, YAN Wei. *Pest Warning and Control in Urban Green Space*[M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 2007: 207 – 225.
- [7] 骆丹, 田慧, 张彩霞, 等. 植物立枯丝核菌根腐病研究进展[J]. *中国植保导刊*, 2020, **40**(3): 23 – 31.
LUO Dan, TIAN Hui, ZHANG Caixia, *et al.* Advances in the research on plant root rot caused by *Rhizoctonia solani* [J]. *China Plant Prot*, 2020, **40**(3): 23 – 31.
- [8] ANDERSON N A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani* [J]. *Ann Rev Phytopathol*, 2003, **20**(1): 329 – 347.
- [9] FARR D F, BILLS G F, CHAMURIS G P, *et al.* Fungi on plants and plant products in the United States [J]. *Mycologia*, 1990, **82**(3): 243 – 246.
- [10] BILLAH K M M, HOSSAIN M B, PRINCE M H, *et al.* Pathogenicity of *Sclerotium rolfsii* on different host, and its over wintering survival: a mini review [J]. *Int J Adv Agric Sci*, 2017, **2**(7): 1 – 6.
- [11] FLORENCE E J M, SHARMA J K, SANKARAN K V, *et al.* Some diseases of forest tree seedlings in India caused by *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani* [J]. *Eur J For Pathol*, 1985, **15**(3): 187 – 190.
- [12] 曹月霞. 尖孢镰刀菌西瓜专化型分子检测技术的建立及其效应子的初步鉴定[D]. 北京: 中国农业科学院, 2016.
CAO Yuexia. *The Establishment of the Molecular Detection Technique and Basic Identification of Effectors of Fusarium oxysporum f. sp. niveum*[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2016.
- [13] 申永铭, 郭成瑾, 王喜刚, 等. 土壤中立枯丝核菌 AG3 菌核的荧光定量 PCR 快速检测[J]. *菌物学报*, 2017, **36**(10): 1383 – 1391.
SHEN Yongming, GUO Chengjin, WANG Xigang, *et al.* Rapid detection of *Rhizoctonia solani* AG3 sclerotia in soil by quantitative real-time PCR [J]. *Mycosystema*, 2017, **36**(10): 1383 – 1391.
- [14] OKUBARA P A, SCHROEDER K L, PAULITZ T C. Identification and quantification of *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* using real-time polymerase chain reaction [J]. *Phytopathology*, 2008, **98**(7): 837 – 847.
- [15] MILNER H, JI Pingsheng, SABULA M, *et al.* Quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) and fluorescent in situ hybridization (FISH) detection of soilborne pathogen *Sclerotium rolfsii* [J]. *Appl Soil Ecol*, 2019, **136**: 86 – 92.
- [16] GAO Yuhan, WU Miao, GUO Rongjun, *et al.* Real time PCR quantification of *Sclerotium rolfsii* in chilli tissue and soil [J]. *Plant Prot Sci*, 2015, **51**(2): 61 – 66.
- [17] 骆玉珍, 张维维, 李雅颖, 等. 上海市公园绿地土壤肥力特征分析与综合评价[J]. *中国土壤与肥料*, 2019(6): 86 – 93.
LUO Yuzhen, ZHANG Weiwei, LI Yaying, *et al.* Analysis and comprehensive evaluation of soil fertility characteristics for the urban park in Shanghai [J]. *Soil Fert Sci China*, 2019(6): 86 – 93.
- [18] 林福呈, 王洪凯. 丝状真菌分子细胞生物学与实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 2010.
LIN Fucheng, WANG Hongkai. *Molecular Cell Biology and Experimental Techniques of Filamentous Fungi* [M]. Beijing: Science Press, 2010.
- [19] LIEVENS B, BROUWER M, VANACHTER A, *et al.* Real-time PCR for detection and quantification of fungal and oomycete tomato pathogens in plant and soil samples [J]. *Plant Sci*, 2006, **171**(1): 155 – 165.
- [20] JOHANSON A, TURNER H C, MCKAY G J, *et al.* A PCR-based method to distinguish fungi of the rice sheath-blight complex, *Rhizoctonia solani*, *R. oryzae* and *R. oryzae-sativae* [J]. *FEMS Microbiol Lett*, 2010, **162**(2): 289 – 294.
- [21] JEEVA M L, MISHRA A K, VIDYADHARAN P, *et al.* A species-specific polymerase chain reaction assay for rapid and sensitive detection of *Sclerotium rolfsii* [J]. *Australas Plant Pathol*, 2010, **39**(6): 517 – 523.
- [22] PRAVI V, JEEVA M L, ARCHANA P V. Rapid and sensitive detection of *Sclerotium rolfsii* associated with collar rot disease of *Amorphophallus paeoniifolius* by species-specific polymerase chain reaction assay [J]. *Mol Biotechnol*, 2014, **56**(9): 787 – 794.
- [23] 汪最, 李丽, 刘鹏, 等. ALV-J、REV 和 MDV 多重荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. *中国动物传染病学报*, 2020, **28**(6): 73 – 78.
WANG Zui, LI Li, LIU Peng, *et al.* Establishment of a triple real-time PCR detection ALV-J, REV and MDV [J]. *Chin J Anim Infect Dis*, 2020, **28**(6): 73 – 78.
- [24] 张敏, 杨丹娇, 蓝岚, 等. 羊口疮病毒 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 法的建立[J]. *四川畜牧兽医*, 2021, **48**(2): 25 – 28.

- ZHANG Min, YANG Danjiao, LAN Lan, *et al.* Establishment of SYBR Green I real-time fluorescence quantitative PCR method for sheep mouth virus [J]. *Sichuan Anim Vet Sci*, 2021, **48**(2): 25 – 28.
- [25] 赵爽. 土壤病原真菌的检测及土壤中真菌群落多样性的研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2012.
- ZHAO Shuang. *Soil Pathogens Detection and Soil Fungi Distribution in Soil*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012.
- [26] BUSTIN S A, BENES V, GARSON J A, *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. *Clin Chem*, 2009, **55**(4): 611 – 622.
- [27] CARRILLO J, MAYORQUIN J S, STAJICH J E, *et al.* Probe-based multiplex real-time PCR as a diagnostic tool to distinguish distinct fungal symbionts associated with *Euwallacea kuroshio* and *E. whitfordiodendrus* in California [J]. *Plant Dis*, 2019, **104**(1): 227 – 238.
- [28] MALVICK D K, IMPULLITTI A E. Detection and quantification of *Phialophora gregata* in soybean and soil samples with a quantitative, real-time PCR assay [J]. *Plant Dis*, 2007, **91**(6): 736 – 742.
- [29] 魏锋, 余真真, 商文静, 等. 土壤大丽轮枝菌微菌核的快速定量检测[J]. 植物病理学报, 2013, **43**(5): 449 – 457.
- WEI Feng, YU Zhenzhen, SHANG Wenjing, *et al.* Rapid detection and quantification of *Verticillium dahliae* microsclerotia in soil [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2013, **43**(5): 449 – 457.