

实时荧光定量PCR在植物病害中的应用

徐小刚, 刘雅婷

(云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明 650201)

摘要: 实时荧光定量PCR技术作为一项新兴技术, 越来越受到人们的重视。它以快速、准确定量、便捷等优点广泛应用于科学研究各个领域, 近年来, 实时荧光定量PCR技术在植物病害研究上不断深入, 大大提高了植物病害的检测效率和监测防治水平。结合了最近几年来应用于检测和鉴定植物病原病害的实时荧光定量PCR过程中引物与探针的设计、反应过程、结果评价情况, 综合论述了实时荧光定量PCR技术在由真菌、细菌、病毒、线虫引发的植物病害的检测与应用。

关键词: 实时荧光定量PCR; Ct值; 植物病害; 引物设计; 灵敏度

中图分类号: S432.4+1 **文献标识码:** A

Application of Real-time Fluorescence Quantitative PCR in Plant Disease

Xu Xiaogang, Liu Yating

(Yunnan Agricultural University in Agriculture and Biotechnology Institute, Kunming 650201)

Abstract: As an emerging technology, more and more people pay attention to the real-time fluorescence quantitative PCR. It has been widely used in different research areas, since it is fast, accurate, and easy use. In recent years, with the developing and more detailed of the technology, it has greatly improved the efficiency of detection and prevention and treatment in plant disease. In this review, it was introduced that real-time fluorescence quantitative PCR detects plant disease infected by the fungus, bacterial virus and nematode, the design of primers and probes, the reactions and the evaluation of real-time fluorescence quantitative PCR.

Key words: real-time fluorescence quantitative PCR, Ct, plant disease, primer design, sensitivity

实时荧光定量PCR (Real-time fluorescence quantitative PCR, RTFQ PCR)是在常规PCR基础上把荧光共振能量转移与荧光标记探针结合, 巧妙地把核酸扩增、杂交、光谱分析和实时检测技术融合在一起的一项创造性技术, 它具有快速、灵敏、高通量、特异性强、自动化程度高、重复性好、准确定量等特点。1983年美国PE Cetus公司的MULLIS博士发明了PCR技术, 1992年HIGUCHI提出了实时PCR的设想^[1], 继而在1996年美国Applied Biosystems公司研究出实时荧光定量PCR技术。实时荧光定量PCR技术发明至今,

人们利用实时荧光定量PCR技术本身的优越性把其广泛运用于医学诊断、海关检验检疫、国防军事、新型农业、基础研究等领域^[1-2]。目前尤其在动物医学病理和分子生物学研究领域应用十分广泛^[3]。而实时荧光定量PCR技术在植物病害研究上的报道较少, 但是最近几年实时荧光定量PCR技术的发展有力地促进了植物病害检测研究水平, 而且发挥着越来越重要的作用, 笔者将重点在这方面进行综合论述。

1 实时荧光PCR的原理

实时荧光定量PCR的原理是以荧光共振能量转

基金项目: 云南省自然科学基金项目“薊马传毒特性与番茄斑萎病毒病发生流行关系研究”(No.2005C0036M); “番茄斑萎病毒(TSWV)抗性破坏株系进化机制研究”(2007C0036M); 云南省教育厅自然科学基金项目“薊马传毒特性与番茄斑萎病毒病发生流行关系研究”(No.5Y0171B); 国家973项目“农业生物多样性控制害虫的效应、原理和方法”(2006CB100204)。

第一作者简介: 徐小刚, 男, 1984年出生, 浙江衢州人, 硕士在读, 专业: 生物化学与分子生物学。研究方向: 植物病毒病害鉴定。通信地址: 650201 云南省昆明市黑龙潭云南农业大学73号信箱, Tel: 0871-5230273, E-mail: xiaoxiaogang2003@126.com。

通讯作者: 刘雅婷, 女, 1971年出生, 湖南祁东人, 副教授, 博士, 研究方向: 植物病原微生物与寄主互作。通信地址: 650201 云南省昆明市黑龙潭云南农业大学农学院生物技术系办公室, Tel: 0871-5227732, E-mail: liuyating999@yahoo.com.cn。

收稿日期: 2008-12-16, **修回日期:** 2009-02-16。

移原理为基础的。首先介绍荧光共振能量转移原理 (fluorescence resonance energy transfer, FRET), 当一个荧光分子(供体分子)的荧光光谱与另一个荧光分子(受体分子)的激发光谱相重叠时, 供体荧光分子自身的荧光强度衰减, 受体荧光分子的荧光强度增强^[1]。Ct 值是指每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。Ct 值是实时荧光 PCR 中一个很关键的因素, C 代表循环(Cycle)^[4], T 代表阈值(Threshold)^[4]。每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系, 起始拷贝数越多, Ct 值越小。利用已知起始拷贝数的标准品可做出标准曲线, 因此, 实时荧光 PCR 则根据荧光共振能量转移的原理, 荧光探针的发光基团所发出的荧光强度与 PCR 产物的数量呈对应关系, 只要对荧光信号进行“实时”检测并获得未知样品的 Ct 值, 即可从标准曲线上计算出该样品的起始拷贝数^[3]。

2 实时荧光定量 PCR 的分类

已报道的实时荧光定量 PCR 杂交探针的设计是建立在两种染料——荧光供体和受体之间的能量共振转移的基础上的。根据荧光基团标记和实现能量共振转移方式的不同, 荧光 PCR 所用的探针可以分为五大类, 分别是 TaqMan 探针、分子信标、双链探针、杂交探针、单标记荧光探针与双链嵌入染料相结合的检测模式。除以上各种荧光探针外, 此外还有一些探针如 Light—UP、Cyclicons、LUX^[5-7]。另外实时荧光定量 PCR 技术根据荧光产生的来源不同分为两大类, 第一类为荧光标记探针, 如 TaqMan 探针、分子信标等, 建立在荧光能量共振转移原理(FRET)上^[8]; 第二类为双链 DNA 特异的荧光染料, 常用的有 SYBR Green 和 LC Green。实时荧光定量 PCR, 与常规 PCR 相比, 其主要优点就是可以实现准确定量。在实时荧光定量 PCR 中, 模板的定量有两种方法: 绝对定量和相对定量。绝对定量指用已知的标准曲线来推算未知的样本量; 相对定量指在一定样品中靶序列相对于另一参照序列的量的变化^[9]。

3 实时荧光定量 PCR 技术在植物病害诊断方面的应用

3.1 在由真菌引起的植物病理病害上的应用

1999 年 BOHM 等首次将实时荧光定量 PCR 应用于植物病害中真菌的检测。2002 年中国程颖慧等报道了小麦印度腥黑穗病的实时荧光定量 PCR 检测^[10]。高强等^[11]通过对小麦矮腥黑穗病菌(TCK)及其近似种小麦网腥黑穗病菌(TCT)和小麦光腥黑穗病菌(TFL)的 rDNA 序列 ETS 区域测序比较分析, 找出 TCK 的特

异性序列并设计了实时荧光 PCR 探针, 从分子生物学上成功利用实时荧光定量 PCR 技术对 TCK 的检测, 大大提高了对 TCK 检验检疫的准确性和效率。

内生真菌是生活史全部或局部在寄主体内, 而不表现明显病害症状的一类真菌^[12]。苏丹等^[13]选取内生真菌特异性引物, 成功设计并建立了利用实时荧光定量 PCR 技术对黑麦草中内生真菌感染情况的检测和定量分析方法。据报道芨状羊茅内生真菌(*Neotyphodium coenophialum*)和多年生黑麦草内生真菌(*Neotyphodium lolii*)对美洲等国家的畜牧业曾经造成过巨大损失。黄国明^[14]等设计了通用 TaqMan 探针及引物和特异 TaqMan 探针及共用引物, 结合通用探针的单色荧光 PCR 和特异探针的双色荧光 PCR 两种方法, 成功摸索出一种 *N.coenophialum* 和 *N.lolii* 的菌丝及单粒种子快速、稳定、可靠、特异性强的荧光 PCR 检测方法, 使检测时间由至少一个月缩短至 7~8 h, 而且检测灵敏度达到单粒种子。

3.2 在植物病原细菌病害上的应用

植物病原细菌(phytobacteria)能引起多种农作物、园林观赏、经济作物及牧草上的病害。利用荧光定量 PCR 技术准确成功鉴定的有柑桔黄龙病^[15-16]、番茄溃疡病菌^[17-18] (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*)、柑桔溃疡病^[19] (*Xanthomonas citri*(hasse) *Dowsom*)、西瓜细菌性果斑病菌^[20] (*Acidovorax avenae* subsp. *citrulli*, 简称 A.a.c)、梨火疫病病菌^[21] (*Erwinia amylovora*)、玉米细菌性枯萎病菌^[22] (*Pantoea stewartii* subsp. *Stewartii*, 简称 PS)、苜蓿细菌性萎蔫病菌^[23] (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Insidiosus*)、菜豆细菌性萎蔫病菌^[24] (*Curtobacterium flaccumfaciens* pv. *Flaccumfaciens*)、香蕉枯萎细菌性病菌^[25] (*Ralstonia solanacearum* race 2)、马铃薯环腐病菌 (*Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus*)、青枯劳尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*)、燕麦食酸菌 (*Acidovorax avenae*)、根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 木质部寄生难养菌 (*Xylella fastidiosa*)、密执安棒形杆菌的不同亚种 (*Cl.michiganensis.sub-spp.*)、梨火疫病病菌 (*E.amylovora*)、稻白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*)、水稻细菌性条斑病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*) 等细菌的检测^[23,26]。

传统方法对植物病原细菌的检测主要是采用生物学和血清学方法, 费时又费力。自从实时荧光定量 PCR 技术应用于植物病原细菌的检测之后, 不仅有效地提高了检测速度和水平, 而且检测的灵敏度也比一般的检测方法高出 100 倍左右。还有一个明显的优点

是实验中不需要PCR的后续处理及病原菌的分离培养,大大简化实验操作步骤,缩短检测时间。

3.3 在植原体导致的植物病害上的应用

廖晓兰等^[27]根据植原体(phytoplasma)16 S rDNA保守区设计了3个植原体组间点突变特异性探针和1个TaqMan广谱探针,选取植原体和细菌以及植物样本进行实时荧光定量PCR,成功建立了植原体分类鉴定和检测的TaqMan探针实时荧光定量PCR方法。

3.4 在病毒导致的植物病害上的应用

烟草环斑病毒(Tobacco ring spot virus, TRSV)为中国公布的二类禁止进境检疫有害生物,郑耘等^[28]首次应用直接结合反转录实时荧光PCR技术检测烟草环斑病毒,由于首次把PCR管吸附病毒外壳蛋白、病毒核酸分子杂交与高灵敏度实时荧光PCR技术相结合,从而使病毒检测在准确性、特异性、灵敏度、稳定性等技术指标上都比传统的PCR方法有所提高。与此同时杨伟东等^[29]首次应用免疫捕捉反转录实时荧光PCR技术(IC-RT-Realtime PCR)成功检测烟草环斑病毒,由此解决了烟草环斑病毒检测工作中由于隐症、干扰物质存在而影响检测结果的问题,为植物病毒病原的快速、简便有效检测提供了一套科学的方法。

3.5 在线虫导致的植物病害上的应用

松材线虫病(*Bursaphelenchus xylophilus*)是世界四大林木病害之一,也是世界重要的检疫性有害生物。近年来,尽管地理环境、气候、不同寄主的影响,在形态上存在一定的差异^[30],但是实时荧光定量PCR技术的运用,使中国口岸检验检疫中多次截获相似穿孔线虫(*Radopholus similis*),目前根据TaqMan探针成功进行线虫检测的实例有松材线虫检测^[31-33]和鳞球茎线虫(*Ditylenchus dipsaci*)检测^[34]。

4 实时荧光定量PCR技术中引物与探针的设计、反应过程、结果评价

近年来,在人们的实验过程中不断更新优化实时荧光定量PCR技术中各个条件,使得实时荧光定量PCR技术发展更新突飞猛进,综合了最近几年应用于检测和鉴定植物病原病害的荧光定量PCR过程中引物与探针的设计、反应过程、结果评价情况,做以分析。

4.1 引物与探针的设计

在实时荧光定量PCR过程中引物设计这一环节很关键,从引物设计情况来看,一般都是从NCBI网站核酸数据库或GeneBank中搜索植物病原及其近缘种的基因ITS保守区域,利用其保守序列来设计实时荧光定量PCR引物^[35-36]。也可通过比较同源性序列或特异性点突变区来设计引物,比较同源性序列或特异性

点突变区的生物软件有BioEdit、DNAMAN、MegAlign (CLUSTAL方法进行比对分析)^[20,37]。设计荧光定量PCR引物的软件有Primer Express、PRIMER5.0、Omega 3.0、Oligo 6.0、Primer Express Version 2.0 Software (Applied Biosystems)^[36-37];除了使用软件来设计引物外还可以按照引物设计的要求进行人工设计;也可以根据需要直接使用通用引物(广谱引物)^[38]。引物初步设计之后进行引物错配、二聚体和发夹结构的检查,检测的软件有DNAsis软件。

而探针的设计则是建立在引物对扩增片段区间的基础上,先找出植物病原该片断中稳定性点突变区,应用探针设计软件设计植物病原的特异探针,探针设计软件有Primer Express软件、Primer5.0软件、Primer Express Version 2.0软件^[35,38]。设计探针一般把目标特异位点设计在探针的中间,或在探针的3'端插入了小沟结合物(MGB)可以增加探针与模板DNA结合的特异性和稳定性。在设计引物和探针时常常发生软件设计的引物与探针配套不理想,研究人员需要用多种不同的软件设计多对引物来配合探针使用,从中筛选出一对最佳的引物,保证检测体系的特异性及灵敏性。

4.2 实时荧光定量PCR反应过程

实时荧光定量PCR检测使用的反应体系^[39-40]:10×PCR Buffer, MgCl₂, dNTPs, 上游引物(PBxF), 下游引物(PBxR), TaqMan荧光探针(ProbeBx), UNG酶, Taq DNA聚合酶, 模板DNA, 最后用灭菌超纯水补足到标准的反应体系,3 000 r/min离心5 s。

实时荧光定量PCR扩增仪^[41]:ABI 7300实时荧光定量PCR仪, ABI PRISM7700和ABI step one实时荧光定量PCR扩增仪210000(美国);Techne Quantica实时荧光定量PCR仪350000(英国);Corbett RG6000实时荧光定量PCR仪310000(澳大利亚);实时荧光定量PCR仪48 TL988C型193700、36TL988B型154700(中国西安天隆);荧光定量PCR检测系统Line Gene-3310 126500、LineGene-3320 148500、fqd-48a (m1) 126500(中国杭州博日);Light cyclerTM全自动实时荧光定量PCR仪(Roche公司)^[35]。

反应程序:设置PCR反应一般第一个循环条件为50℃, 2 min;95℃, 10 min(预变性阶段);后40个循环为94℃, 15 s;60℃, 1 min;具体温度要根据实验的要求进行适当修改。

反应结束,保存文件,打开分析软件,设置基线和阈值,仪器自动分析实验结果,给出 ΔRn (第n个循环时的荧光增加值)与循环数图像。

检测易出现的问题是由于植物病原核酸的提取中

蛋白酶K是PCR反应的抑制物,所以在实时荧光定量PCR检测前一定使其完成变性。

4.3 PCR结果评价

4.3.1 特异性强 实时荧光定量PCR相对于其它传统的检测方法具有较强的特异性。在松材线虫分子检测和小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑穗病菌、菜豆细菌性萎蔫病菌、番茄溃疡病菌、柑桔黄龙病病原、柑桔溃疡病菌、哈密瓜细菌性果斑病病原菌、黑麦草内生真菌、梨火疫病菌、鳞球茎茎线虫、苜蓿萎蔫病菌、玉米细菌性枯萎病菌、水稻白叶枯病菌和水稻细菌性条斑病菌和植原体等的检测和鉴定实例中应用实时荧光定量PCR方法对植物病原、相似植物病原以及已灭菌的水对照进行检测。结果表明:相似植物病原样品,无菌水阴性对照的荧光信号强度并未出现变化,结果为阴性,而植物病原样品一般都在25个反应循环之前荧光信号增加明显,结果为阳性^[35]。充分体现了实时荧光定量PCR技术对植物病原检测的特异性。同时实时荧光定量PCR技术中TaqMan探针具有一条特异性的荧光双标记探针,可将非特异性产物区分开,突出了该技术检测结果的特异性。

4.3.2 灵敏度高 实时荧光定量PCR的检测的最低DNA浓度可达pg级水平^[42],在辣椒实蝇不同DNA浓度检测SYBR Green PCR的灵敏度实验中,检测最低模板DNA量可达10pg以下,而常规PCR的检测限度则达不到10pg^[37]。对梨火疫菌株的7个不同浓度的菌悬液进行了实时荧光PCR和常规PCR检测。结果表明实时荧光PCR检测的灵敏度比常规PCR检测提高了10倍。在番茄溃疡病菌、苜蓿萎蔫病菌、柑桔黄龙病病原、水稻白叶枯病菌、水稻细菌性条斑病菌、玉米细菌性枯萎病菌的实时荧光定量PCR快速检测方法研究中,结果证明实时荧光定量PCR的检测灵敏度比常规PCR检测灵敏度高出100倍。

4.3.3 稳定性好费时少 实时荧光定量PCR反应管可以使用前次试验剩下的反应体系,仍然得到了明显的荧光增长曲线^[35]。实时荧光PCR的稳定可靠性还在于即使植物病原处于不同生长阶段或生长期,它都可以通过扩增曲线和溶解曲线来检验^[37]。相比于特异性引物PCR法和ITS-PCR-PFLP法,实时荧光定量PCR具有不再需要电泳、染色的步骤,其简便的操作大大降低了交叉污染的可能,同时避免了环境污染和染色剂EB对实验操作人员的危害。实时荧光PCR仪采用了新的升降温机制,从而大大缩短了扩增反应的时间;费时少,一般整个过程只需2h就可以了,而且结果分析简单便捷。

5 展望

目前实时荧光定量PCR技术还广泛应用于植物营养学研究、植物发育学研究、植物抗逆机理研究、转基因植物的检测、植物与微生物互作机理研究、植物抗病性检测、信号转导、环境对植物基因表达的影响等方面^[43]。微观方面,mRNA表达的研究、DNA拷贝数的检测、单核苷酸多态性(SNPs)的测定等^[44]方面其重要性日渐显出。同时随着分子生物学研究水平的不断提高,实时荧光定量PCR将会朝着单细胞和单分子方向发展^[45]。

当今科学越来越需要快速、有效、精确定量的技术,实时荧光定量PCR技术相对于传统检测技术优势更明显。但随着该技术应用的范围不断扩大延伸,研究的层次不断深入,它也开始显现出不足,比如它是基于短的DNA片段,所以无法检测到发生在转录后的基因沉默事件中的选择性剪接或部分转录降解等生物相关进程^[46],由于实时荧光定量PCR技术设备要求较高,荧光探针成本较大,所以在实时荧光PCR仪的购买仪器、探针的合成和专用PCR管(Roche)的使用上消耗很大,从而使得检验成本大大提高。同时实时荧光定量PCR中SYBR Green染料对样品中的任何双链DNA(特异的和非特异的)均能结合^[37],因此,通过检测SYBR Green染料荧光而获得的扩增曲线有可能是非特异性扩增,实时荧光PCR假阳性几率增加,所以设计和筛选特异性引物可以大大降低其假阳性几率。值得注意的是在PCR反应加样时DNA模板浓度不要太高,DNA模板浓度过高反而会抑制和干扰PCR反应,使扩增效率降低^[38]。

然而采用多种不同的分子技术相结合,可以实现单个技术所不能达到的研究效果。玉米细菌性枯萎病菌TaqMan探针实时荧光PCR检测方法就是国际国内首次结合单核苷酸多态性分子标记技术与实时荧光定量PCR技术进行病原细菌分类鉴定,对类似的植物细菌性病害的检测开创了一条新思路。随着科学技术与科学知识的增长,实时荧光定量PCR技术将继续被改进,新的问题被攻克,从而建立更新、更便捷、更完善的PCR体系,并应用到更广、更深的科学领域。

参考文献

- [1] 施林祥,李东辉. 荧光PCR研究新进展. *WORLD CHINESE JOURNAL OF DIGESTOLOGY*, 2005, 13(5):596-599.
- [2] 高斌,刘敬忠. 实时荧光PCR技术的研究及其应用进展. *诊断学理论与实践*, 2005, 4(6):507-508.
- [3] MIKAEL L, JOSEMA, MARTINB, et al. The real-time polymerase

- chain reaction. *Molecular Aspects of Medicine*, 2006, 27:95-125.
- [4] 赵焕英,包金凤.实时荧光定量PCR技术的原理及其应用研究进展. *中国组织化学与细胞化学杂志*,2007,16(4):492-497.
- [5] ISACSSON J, CAO H, OHISSON L, et al. Rapid and specific detection of PCR products using light-up probes. *Molecular Cell Protein*, 2000, 14:321-328.
- [6] SVANVIK N, STAHLBERG A, SEHLSTEDT U, et al. Detection of PCR products in real time using Light-up probes. *Analytical Biochemistry*, 2000, 287:179-182.
- [7] KANDIMALLA E.R, AGRAWAL. Cyclicons as hybridization-based fluorescent primer-probes: synthesis, properties and application in real-time PCR. *Bioorg.Med.Chem.*,2000,8: 1911-1916.
- [8] CLEGG RM. Fluorescence resonance energy transfer[J]. *Curt Opin. Biotechnol*, 1995, 6(1):103-110.
- [9] WANG SQ, WANG XH, CHEN SH, et al. A new fluorescent quantitative polymerase chain reaction technique. *Analytical Biochemistry*, 2002, 309:206-211.
- [10] 程颖慧,章桂明,王颖.小麦印度腥黑穗病菌实时荧光PCR检测. *植物检疫*,2002,16(6):321-325.
- [11] 高强,吴品珊,朱水芳,等.实时荧光PCR技术对小麦矮腥黑穗病菌的检测. *微生物学通报*,2005,32(6):74-77.
- [12] PETRINI O. *Microbial Ecology of Leaves*. New York Springer-Verlag Press, 1991:179-187.
- [13] 苏丹,任安芝,高玉葆.黑麦草内生真菌感染状况的检测及定量分析. *微生物学通报*,2006,33(5):12-16.
- [14] 黄国明,廖芳,刘跃庭,等.苇状羊茅内生真菌与多年生黑麦草内生真菌实时荧光PCR检测研究. *菌物学报*,2007,26(2):257-265.
- [15] TIANY-N, KES, KEC. Detection and quantization of citrus Huanglongbing pathogen by polymerase chain reaction. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1996, 26:243-250.
- [16] 廖晓兰,朱水芳,赵文军,等.柑桔黄龙病病原16S rDNA克隆、测序及实时荧光PCR检测方法的建立. *农业生物技术学报*,2004,12(1): 80-85.
- [17] 吴兴海,邵秀玲,邓明俊,等.番茄溃疡病菌实时荧光PCR快速检测方法研究. *江西农业学报* 2007,19(3):34-36.
- [18] 夏明星,赵文军,马青,等.番茄细菌性溃疡病菌的实时荧光PCR检测. *植物病理学报*,2006,36(2):152-157.
- [19] 殷幼平,黄冠军,赵云,等.柑桔溃疡病菌实时荧光定量PCR检测与应用. *植物保护学报*,2007,34(6):607-613.
- [20] 伍永明,张祥林,罗明.西瓜细菌性果斑病菌TaqMan探针实时荧光PCR检测鉴定方法的建立. *新疆农业大学学报*,2006,29(3):68-72.
- [21] 钱国良,胡白石,卢玲,等.梨火疫病病菌的实时荧光PCR检测. *植物病理学报*,2006,36(2):123-128.
- [22] 漆艳香,肖启明,朱水芳.玉米细菌性枯萎病菌16S rDNA基因克隆及TaqMan探针实时荧光PCR. *湖南农业大学学报:自然科学版*, 2003,29(3):183-187.
- [23] 漆艳香,赵文军,朱水芳,等.苜蓿萎蔫病菌TaqMan探针实时荧光PCR检测方法的建立. *植物检疫*,2003,17(5):260-264.
- [24] 漆艳香,朱水芳,肖启明.菜豆细菌性萎蔫病菌16S rDNA基因克隆及TaqMan探针实时荧光PCR检测. *仲恺农业技术学院学报*,2004, 17(4):10-17.
- [25] 漆艳香,谢艺贤,张辉强,等.香蕉细菌性枯萎病菌实时荧光PCR检测方法的建立. *华南热带农业大学学报*,2005,11(1):1-4.
- [26] MAVRODIEVA V, LEVY L, GABRIEL D W. Improved sampling methods for real-time polymerase chain reaction diagnosis of citrus canker from field samples. *Phytopathology*, 2004, 94:61-68.
- [27] 廖晓兰,朱水芳,陈红运,等.植原体TaqMan探针实时荧光PCR检测鉴定方法的建立. *植物病理学报*,2002,32(4):361-367.
- [28] 郑耘,杨伟东,陈枝楠,等.烟草环斑病毒DB-RT-Realtime PCR检测方法研究. *植物保护学报*,2007,33(1):117-119.
- [29] 杨伟东,郑耘,章桂明,等.烟草环斑病毒IC-RT-Realtime PCR检测方法研究. *中国病毒学*,2006,21(3):277-280.
- [30] ELBADRIG A, GERAERT E, MOENS M. Morphological differences among *Radopholus similis*(Cobb, 1893)Thorne 1949 populations. *Russian Journal of Nematology*, 1999, 7(2):139-153.
- [31] CAO X, LIU X Z, ZHU S F, et al. Detection of the pinewood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*, using a real-time PCR assay. *Phytopathology*, 2005, 95(5):566-571.
- [32] 王明旭,朱水芳,罗宽,等.松材线虫rDNA-ITS2的TaqMan探针实时荧光PCR检测. *林业科学*,2005,41(2):82-85.
- [33] 张卫东,廖力,谭群英,等.利用荧光PCR快速检测松材线虫. *仲恺农业技术学院学报*,2005,18(4):32-35.
- [34] 王翀,葛建军,陈长发.鳞球茎茎线虫实时荧光PCR检测技术的研究. *植物检疫*,2005,19(1):11-14.
- [35] 王焱,季镭,余本渊,等.3种松材线虫分子检测技术的比较分析. *南京林业大学学报*,2007,31(4):128-132.
- [36] 赵文军,陈红运,朱水芳,等.杂交诱捕实时荧光PCR检测番茄环斑病毒. *植物病理学报*,2007,37(6):666-669.
- [37] 余道坚,章桂明,陈志舜,等.SYBR Green实时荧光PCR快速鉴定辣椒实蝇. *植物检疫*,2006,20(1):10-14.
- [38] 漆艳香,朱水芳,赵文军,等.玉米细菌性枯萎病菌TaqMan探针实时荧光PCR检测方法的建立. *植物保护学报*,2004,31(1):51-56.
- [39] 冯建军,许勇,李健强,等.免疫凝集试纸条和TaqMan探针实时荧光PCR检测西瓜细菌性果斑病菌比较研究. *植物病理学报*,2006, 36(2):102-108.
- [40] 王金成,季镭,杨秀丽,等.松材线虫TaqMan探针实时荧光PCR诊断. *植物病理学报*,2006,36(3):281-284.
- [41] 宋丽,岳华,李明义,等.SYBR Green I实时荧光PCR检测网状内皮增生症病毒方法的建立. *中国动物检疫*,2008,25(8):26-29.
- [42] 易建平,刘素萍,印丽萍,等.TaqMan—MGB探针在小麦印度腥黑穗病菌和黑麦草腥黑穗病菌鉴定上的应用. *植物检疫*,2005,19(1): 15-19.
- [43] 胡丹丹,顾金刚,姜瑞波,等.定量RT-PCR及其在植物学研究中的应用. *植物营养与肥料学报*,2007,13(3):520-525.
- [44] 许琰,丛枯,魏强.实时荧光定量PCR的研究进展及应用. *中国实验动物学报*,2007,15(2):155-158.
- [45] MICHEAL W, PFAFFL. *The whole story of quantitative PCR—from Tissue Preparation to Bioinformatics*. Munich: Technical university Munich.2005:5.
- [46] 童汉华,郭亚文,章善庆,等.实时PCR技术在植物研究上的应用. *中国生物工程杂志*,2005,25(5):15-21.