

杜娟, 李金, 张涛, 等. 应用 real-time PCR 定量检测果园葡萄霜霉病菌潜伏感染[J]. 江苏农业学报, 2021, 37( 4 ): 861-866.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.04.007

## 应用 real-time PCR 定量检测果园葡萄霜霉病菌潜伏感染

杜娟, 李金, 张涛, 张游, 姚珮, 顾沛雯  
(宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:** 为明确葡萄霜霉病菌潜伏感染阶段的菌量与病害发生的关系, 本研究对贺兰山东麓宁夏立兰酒庄酿酒葡萄园 3 个试验样地进行采样调查, 分析 3 个样地检测的分子病情指数(MDI)与果园田间调查的病情指数(DI)的相关性。结果表明, 宁夏立兰酒庄酿酒葡萄园 3 个样地的 MDI 和 DI 呈极显著相关, 3 个样地的 MDI 均与采样后 15 d 的 DI 拟合性最高; 当 MDI 值为 0.003 5~0.184 1 时, 采样后 12 d 葡萄霜霉病在果园零星发生。MDI 大于 0.003 5 时, 可作为当地酿酒葡萄霜霉病防治预警指标。

**关键词:** 葡萄霜霉菌; real-time PCR; 分子病情指数; 田间病情指数

**中图分类号:** S436.631.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)04-0861-06

## Quantitative detection of latent infection of grape downy mildew in field by real-time PCR

DU Juan, LI Jin, ZHANG Tao, ZHANG You, YAO Pei, GU Pei-wen  
(College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** In order to clarify the relationship between the latent infection amount of grape downy mildew in the orchard and the occurrence of the disease, three sample plots in Ningxia Lilan vineyard were investigated, and the correlation between molecular-detected disease index(MDI) and orchard disease index(DI) was analyzed. The results showed that there was a very significant correlation between MDI and DI in three sample plots of Ningxia Lilan vineyard, and the MDI of the three sample plots had the highest fitting with the DI on the 15th day after sampling. When the MDI value ranged from 0.003 5 to 0.184 1, grape downy mildew occurred sporadically in the orchard on the 12th day after sampling. When MDI is greater than 0.003 5, it can be used as an early warning index for prevention and control of local wine grape downy mildew.

**Key words:** *Plasmopara viticola*; real-time PCR; molecular-detected disease index; disease index

由葡萄生单轴霉(*Plasmopara viticola*)感染引起的葡萄霜霉病是世界范围内葡萄生产中最严重的病害之一<sup>[1-2]</sup>, 也是中国葡萄生产中最重要病害和监控研究的对象<sup>[3-5]</sup>。该病害主要依靠气流传播, 具有

发生范围广、流行速度快、危害程度重的特点<sup>[6]</sup>。潜伏期菌量的定量检测是病害进行早期监测预警的关键<sup>[7-8]</sup>。在潜伏期, 病原菌在葡萄叶片内不断蔓延, 一旦进入发病期, 在适宜条件下葡萄霜霉病便会大面积流行, 给葡萄生产造成严重损失<sup>[9]</sup>。因此, 对处于潜伏感染状态的葡萄霜霉病菌进行及时、准确的定量分析, 不仅可实现葡萄霜霉病的早期诊断和对该病流行趋势进行准确预测, 还可及早制定正确防控策略并采取防控措施, 减少产量损失。

近年来, real-time PCR 技术已被广泛应用于植物体内病原菌潜伏感染定量研究<sup>[10-11]</sup>。Yan 等<sup>[12]</sup>

收稿日期: 2021-01-26

基金项目: 国家重点研发项目(2019YFD1002502); 宁夏回族自治区科技重大专项(2019BBF02013)

作者简介: 杜娟(1995-), 女, 河南漯河人, 硕士研究生, 主要从事生物防治与菌物资源利用研究。(E-mail) dujuan3548@163.com

通讯作者: 顾沛雯, (E-mail) gupeiwen2019@nxu.edu.cn

首次提出分子病情指数 (*MDI*) 的概念,即病原菌 DNA 浓度与寄主植物 DNA 浓度的比值,并将它用于衡量病害潜伏感染的菌量。Zheng 等<sup>[13]</sup>利用人工接种的叶片建立了 *MDI* 和田间调查的病情指数 (*DI*) 的线性关系,从而对发病情况进行估测。潘阳等<sup>[14]</sup>建立了小麦条锈病菌双重 real-time PCR 检测体系,可在一个反应体系中同时确定病原菌和寄主植物 2 种目标 DNA 的浓度并获得 *MDI*。Knüfer 等<sup>[15]</sup>应用 real-time PCR 技术分析病害进展曲线下的面积来研究油菜黄萎病的潜伏期菌量。刘琦等<sup>[16]</sup>发现小麦条锈病潜伏期的 *MDI* 与 *DI* 之间存在极显著相关性,表明可以利用 *MDI* 对田间实际发病情况进行早期预测。Liu 等<sup>[17]</sup>研究认为,及时、准确地量化病原菌潜伏感染阶段的菌量,明确 *MDI* 与田间调查得到的 *DI* 的关系是病害预测和防治的关键。

目前国内外开展了一系列对葡萄霜霉病菌潜伏感染阶段的定性或定量研究<sup>[18-21]</sup>,大多为室内研究,有关果园葡萄霜霉病菌早期潜伏感染定量的研究尚未见报道。本研究在前期建立了葡萄霜霉病菌的 real-time PCR 定量检测体系的基础上,对处于潜伏感染阶段的样品进行 real-time PCR 检测,获得感染早期病原菌在寄主中的 *MDI* 值,病害发生后进行果园病情调查,计算 *DI* 值,通过葡萄霜霉病菌潜育期的 *MDI* 和 *DI* 的回归分析,确定 *MDI* 和 *DI* 的相关性,为有效测定葡萄霜霉病菌潜伏感染阶段的菌量和准确预测该病害的流行趋势提供新的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区概况

试验在宁夏贺兰山东麓立兰酒庄酿酒葡萄园 (38°16'N, 105°57'E, 海拔高度 1 190 m) 进行,7~9 月为酿酒葡萄霜霉病发生期,此期间平均气温 22.01 °C,平均湿度 56.16%。供试酿酒葡萄品种为赤霞珠 (*Cabernet Sauvignon*),树龄 7 a,株距×行距: 3 m×5 m,树形为斜干水平形,滴管水肥一体化,正常农事管理。

### 1.2 取样与调查

设置 3 个试验样地,记作 LF-1、LF-2 和 LF-3,每块试验样地面积 10.5 hm<sup>2</sup> (300 m×350 m),分割成 126 个 50 m×50 m 的样区。在葡萄霜霉病未显示症状时 (2019 年 7 月 9 日) 采集样品。每个样区标记 5 株葡萄树,每株随机采集 3 片叶,共计 15 片叶,混合

后作为一个样品进行 DNA 提取,进行 *MDI* 的检测。

采样结束后,对 126 个样区的相应位置进行病情调查,每 3 d 调查 1 次,至果园开始零星发病 (约第 12 d),随后统计第 12 d、15 d 和 18 d 的发病情况,进行 *DI* 的计算。*DI* 调查点与 *MDI* 采样点为同一株葡萄树。调查时,在每株葡萄树上部、中部、下部随机调查 30 张叶片,每个样区共计调查 150 张叶片,记录葡萄霜霉病普遍率与严重度,病害发生程度分级指标参照农业部农药检定所颁布的葡萄霜霉病发生程度分级标准<sup>[22]</sup>。

$$DI = \text{普遍率} \times \text{平均严重度} \times 100$$

普遍率是指发病的普遍程度,即发病率。普遍率 = (病叶数/调查总叶数) × 100%

平均严重度是指发病位点的严重程度。

$$\text{平均严重度} = \frac{\sum (\text{发病病级} \times \text{该级病叶数})}{\text{调查总病叶数}} \times 100\%$$

### 1.3 样品 real-time PCR 检测

1.3.1 葡萄叶片 DNA 的提取 按照 *E. Z. N. A.*® HP Plant DNA Kit (美国 Omega Bio-tek 公司产品) 说明书提取每个样区葡萄叶片总 DNA, -20 °C 保存备用。

1.3.2 Real-time PCR 定量检测叶片 DNA 和样品中病原菌 DNA 根据 GenBank 中葡萄 *EF1-α* 基因 (登录号: XM002284888.3) 设计引物 F-g-6、R-g-6, 扩增葡萄叶片 DNA。采用李文学等<sup>[21]</sup>报道的引物 F-cox-Pv、R-Pv 扩增葡萄霜霉病菌 DNA。采用 qTOWER 2.2 荧光定量 PCR 仪 (德国 Jena 公司产品) 进行 real-time PCR 扩增,引物序列见表 1。

表 1 本研究使用的引物序列

Table 1 Sequences of the primers used in this study

引物	序列 (5'→3')	<i>T<sub>m</sub></i> (°C)	长度 (bp)
F-g-6	CAGCACAATCTGCCTGTGAGGTAC	60.50	24
R-g-6	GTCGACTACCACTGGTCACTTGATC	59.28	25
F-cox-Pv	TCGTGTATTGATTACTGCGTCAAA	53.86	24
R-Pv	ACATTGTCCATAAAAAACACCTTGT	52.43	25

Real-time PCR 反应体系 (20.0 μl): 2×*Trans Start*® Tip Green SuperMix 10.0 μl (北京全式金生物技术有限公司产品), 正反引物 (10 μmol/L) 各 0.4 μl, DNA 模板 1.0 μl, ddH<sub>2</sub>O 补足。葡萄叶片和

葡萄霜霉病菌 real-time PCR 反应条件均为:94 ℃ 预变性 30 s;94 ℃ 变性 5 s,59 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 30 s,40 个循环。

标准曲线的建立:将已知质量浓度的葡萄叶片和葡萄霜霉病菌的 DNA 质量浓度和各自的  $C_t$  值,通过软件 real-time PCR soft 2.2 分别生成葡萄叶片 DNA 质量浓度和葡萄霜霉病菌 DNA 质量浓度与  $C_t$  值的标准曲线,其中葡萄霜霉病菌的线性方程为  $Y_1 = 18.01 - 3.60x_1$  ( $R^2 = 0.992\ 97$ ), $x_1$  为葡萄霜霉病菌 DNA 质量浓度的对数值( $\lg C$ ), $Y_1$  为葡萄霜霉病菌的  $C_t$  值;葡萄叶片的线性分析方程为  $Y_2 = 26.38 - 3.06x_2$  ( $R^2 = 0.995\ 98$ ),其中  $x_2$  为葡萄叶片 DNA 质量浓度的对数值( $\lg C$ ), $Y_2$  为葡萄叶片的  $C_t$  值。同时得到葡萄霜霉病菌 DNA 质量浓度定量检测的最小检测限为  $1.0 \times 10^{-4}$  ng/ $\mu$ l,而葡萄叶片 DNA 质量浓度定量检测最小检测限为  $1.0 \times 10^{-2}$  ng/ $\mu$ l。

1.3.3 MDI 的计算 参照闫佳会等<sup>[23]</sup>的方法分别计算每个样区的 MDI。

MDI = 葡萄霜霉病菌 DNA 质量浓度/葡萄叶片 DNA 质量浓度

#### 1.4 数据分析

对 3 个试验样地的 MDI 与 DI 通过 Excel 2016

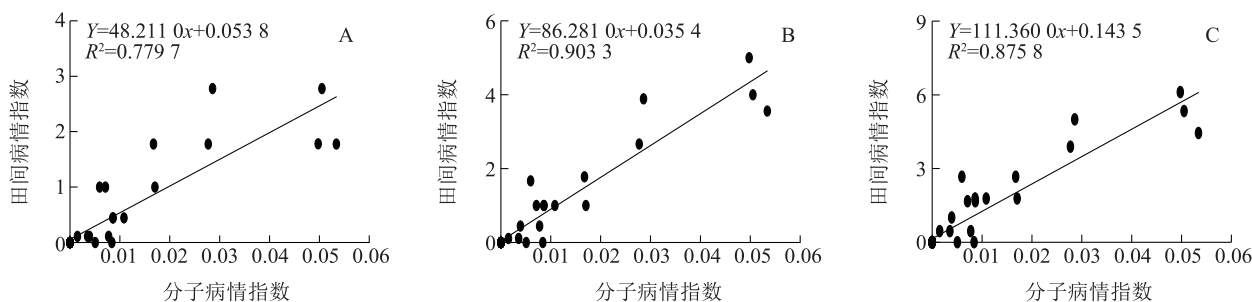
和 SPSS 22.0 进行回归分析,确定其相关性。

## 2 结果与分析

### 2.1 LF-1 试验样地的 MDI 和 DI 的回归分析

应用 SPSS 软件和 Excel 对立兰酿酒葡萄园 LF-1 试验样地的 MDI 与采样后 12 d、15 d 和 18 d 果园调查的 DI 进行回归分析。LF-1 样地的 MDI 和 DI 回归分析结果见图 1,MDI 与采样后 12 d DI 的回归方程为  $Y = 48.211\ 0x + 0.053\ 8$  ( $R^2 = 0.779\ 7$ ,  $P < 0.01$ );MDI 与采样后 15 d DI 的回归方程为  $Y = 86.281\ 0x + 0.035\ 4$  ( $R^2 = 0.903\ 3$ ,  $P < 0.01$ );MDI 与采样后 18 d DI 的回归方程为  $Y = 111.360\ 0x + 0.143\ 5$  ( $R^2 = 0.875\ 8$ ,  $P < 0.01$ ),结果表明,潜伏侵染阶段的 MDI 与 DI 极显著相关。当检测的 MDI 值在 0.003 5~0.053 4 时,12 d 后葡萄霜霉病在果园零星发生。

综合 3 次病情的回归结果分析,直线斜率为 48.211~111.360,即随田间病情指数调查时间的延后,利用 MDI 预测 DI 的单位增长率为 48.211~111.360,差异较大。直线截距为 0.035 4~0.143 5,差异较小。MDI 与采样后 15 d DI 的回归方程的  $R^2$  最高,此时 MDI 的最大检测值为 0.053 4,其相应的 DI 的最大值为 3.560。



A: 采样后 12 d; B: 采样后 15 d; C: 采样后 18 d。

图 1 LF-1 样地葡萄霜霉病分子病情指数与田间病情指数的线性回归

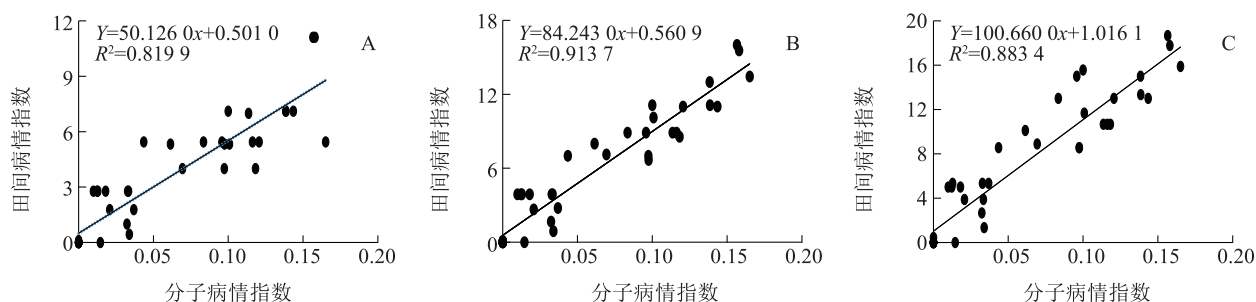
Fig.1 Linear regression between molecular-detected disease index and visualized disease index of grape downy mildew in LF-1

### 2.2 LF-2 试验样地 MDI 和 DI 的回归分析

LF-2 样地回归分析结果见图 2,MDI 与采样后 12 d DI 的回归方程为  $Y = 50.126\ 0x + 0.501\ 0$  ( $R^2 = 0.819\ 9$ ,  $P < 0.01$ );MDI 与采样后 15 d DI 的回归方程为  $Y = 84.243\ 0x + 0.560\ 9$  ( $R^2 = 0.913\ 7$ ,  $P < 0.01$ );MDI 与采样后 18 d DI 的回归方程为  $Y = 100.660\ 0x + 1.016\ 1$  ( $R^2 = 0.883\ 4$ ,  $P < 0.01$ ),结果表明,潜伏侵染阶段的 MDI 与 DI 极显著相关。当检测的 MDI 值为 0.009 9~0.165 1 时,采样后 12 d 葡萄

霜霉病在果园零星发生。

综合 3 次病情的回归结果分析,直线斜率为 50.126~100.660,即随调查田间病情指数时间的延后,利用 MDI 预测 DI 的单位增长率为 50.126~100.660。直线截距为 0.501 0~1.016 1,差异较小。MDI 与采样后 15 d 的 DI 回归方程的  $R^2$  最高,MDI 的检测范围在 0~0.165 1,其相应的 DI 范围在 0~16.000。LF-2 试验样地发病率较高,42 个样区中有 30 个检测到 MDI,且 MDI 值越大,发病越严重。



A: 采样后 12 d; B: 采样后 15 d; C: 采样后 18 d。

图 2 LF-2 样地葡萄霜霉病分子病情指数与田间病情指数的线性回归

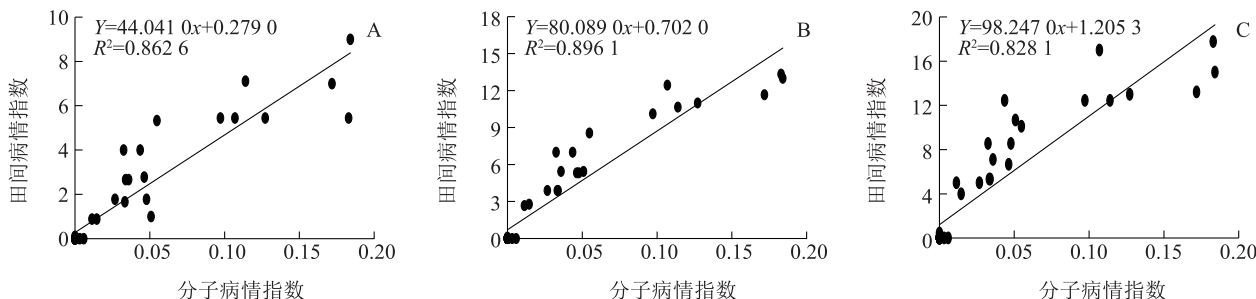
Fig.2 Linear regression between molecular-detected disease index and visualized disease index of grape downy mildew in LF-2

### 2.3 LF-3 试验样地 MDI 和 DI 的回归分析

LF-3 样地回归分析结果见图 3, MDI 与采样后 12 d DI 的回归方程为  $Y = 44.041 0x + 0.279 0$  ( $R^2 = 0.862 6, P < 0.01$ ); MDI 与采样后 15 d DI 的回归方程为  $Y = 80.089 0x + 0.702 0$  ( $R^2 = 0.896 1, P < 0.01$ ); MDI 与采样后 18 d DI 的回归方程为  $Y = 98.247 0x + 1.205 3$  ( $R^2 = 0.828 1, P < 0.01$ ), 结果表明, 潜伏侵染阶段的 MDI 与 DI 极显著相关。当检测的 MDI 值为 0.011 3~0.184 1 时, 采样后 12 d 葡萄霜霉病在果园

零星发生。

综合 LF-3 试验样地 3 次病情的回归结果分析, 直线斜率在 44.041~98.247, 即随调查田间病情指数时间的延后, 利用 MDI 预测 DI 的单位增长率为 44.041~98.247。直线截距为 0.279 0~1.205 3, 差异较小。MDI 与采样后 15 d 试验样地 DI 的回归方程的  $R^2$  最高, MDI 的检测范围为 0~0.184 1, 其相应的 DI 范围在 0~13.33。LF-3 试验样地 MDI 与采样后 15 d DI 的拟合性均低于 LF-1 和 LF-2。



A: 采样后 12 d; B: 采样后 15 d; C: 采样后 18 d。

图 3 LF-3 样地葡萄霜霉病分子病情指数与田间病情指数的线性回归

Fig.3 Linear regression between molecular-detected disease index and visualized disease index of grape downy mildew in LF-3

## 3 讨论

明确潜伏侵染阶段的菌量对于植物病害的预测和防治至关重要<sup>[23]</sup>。预测植物病害初始病情的传统方法主要是田间调查或室内离体培养<sup>[9, 24]</sup>, 传统方法预测与田间病害实际发生情况差异较大, 预测结果极为不准确。使用 real-time PCR 方法获得的 MDI 在病害流行病学研究中有广泛的应用前景, 相比于传统方法更加精确合理, 更适用于果园病害早期监测预警等流行病学的研究<sup>[22]</sup>, 是一种可靠的研究果园中葡萄霜霉病菌潜伏侵染的方法。

本研究通过对宁夏立兰酒庄酿酒葡萄园 3 个试验样地的 MDI 和 DI 的分析发现, 二者之间呈极显著相关, 这与 Zheng 等<sup>[13]</sup> 和闫佳会等<sup>[23]</sup> 在小麦白粉病和小麦条锈病上的研究结果相一致。3 个试验样地均能检测到葡萄霜霉病菌, 且 LF-1 试验样地存在 MDI 最低检测值为零, 说明应用此方法对果园样品进行检测时, 需要保证有充足的样本量才能够代表一个试验样地的分析结果。同时发现 3 个试验样地中都存在 MDI 的检测值不为零, 但其 DI 值为零的情况。这一结果说明应用 real-time PCR 可以有效检测到尚未显示症状的葡萄叶片中微量的潜伏侵



染阶段的菌量。综合 3 个试验样地调查的数据,当 *MDI* 检测值为 0.003 5~0.184 1 时,12 d 后葡萄霜霉病在果园零星发生。取 *MDI* 值大于 0.003 5 作为防治预警指标。考虑到能检测到 *MDI* 时,葡萄霜霉病菌已经侵染到寄主体内,建议在防治时采用内吸性杀菌剂进行防治。

闫佳会等<sup>[23]</sup>认为 *MDI* 与 *DI* 的回归分析成功的关键在于采样时间和调查时间的确定。本研究采样时间是依据宁夏贺兰山东麓地区采样年度的气候条件和往年果园最早出现病害的日期综合考量确定的。宁夏立兰酒庄地处贺兰山东麓酿酒葡萄产区,该地区气候干旱、少雨,葡萄霜霉病一般在 7 月中下旬开始发生,8 月进入盛发期<sup>[6,25-26]</sup>,因此本研究在 7 月上旬果园病害发生前进行样品采集,果园初见病斑时期进行果园调查,保证了在一个潜育期内完成果园样品检测和病情调查,避免了葡萄霜霉病菌再侵染对试验结果造成的干扰。

在植物病害的研究中,应用 real-time PCR 对植物病原菌潜伏侵染的研究已有很多<sup>[27-29]</sup>,Duvivier 等<sup>[30]</sup>建立了空气中小麦条锈菌孢子密度的 real-time PCR 检测体系,用于预测田间病情。在 *MDI* 的应用方面,初炳瑶等<sup>[31]</sup>应用检测到的 *MDI* 值,并结合病情调查进行分析,对 3 种小麦条锈菌杀菌剂的防治效果进行评价,证实了 *MDI* 在药剂筛选中应用的可行性。刘琦等<sup>[16]</sup>结合光谱数据将 *MDI* 值转化为建立模型所需的分类标签,验证 3 种模型对小麦条锈病潜伏期定性识别的准确率。这些研究结果进一步证明了采用 *MDI* 的分析方法在植物病害防治研究中的应用前景广泛。本研究通过 real-time PCR 建立的果园葡萄霜霉病菌潜伏侵染的 *MDI* 方法能够快速、准确地定位发病中心和潜伏侵染阶段菌量,进而在早期对葡萄霜霉病的发生做出预警,指导果园病害防治工作,有效减少农药使用量。此外,由于葡萄霜霉病的发生还受到气象条件的影响,如遇降雨时,即使具有相同 *MDI* 值,葡萄霜霉病潜伏期也会大大缩短,此时更应提前做好防治工作。本研究仅开展了赤霞珠品种葡萄霜霉病 *MDI* 的研究,后续将在其他酿酒葡萄品种上做进一步验证,以提高利用 *MDI* 进行病害防治预警的实用性。

## 参考文献:

[1] ZHAO H, JU Y L, JIANG J F, et al. Downy mildew resistance i-

dentification and SSR molecular marker[J]. Scientia Horticulturae, 2019, 252: 212-221.

- [2] CHEN M, BRUN F, RAYNAL M, et al. Use of probabilistic expert elicitation for assessing risk of appearance of grape downy mildew[J]. Crop Protection, 2019, 126: 104926.
- [3] 杜 惠,蒋晶晶,王春明,等. 天水地区葡萄霜霉病田间病情、孢子囊数量动态及病害始发关键因子分析[J]. 草业学报, 2020, 29(5): 191-197.
- [4] 郭艳兰,牟德生,王多文,等. 武威地区酿酒葡萄霜霉病发生流行规律研究[J]. 中国植保导刊, 2020, 40(1): 48-54.
- [5] 张 玮,燕继晔,刘 梅,等. 葡萄霜霉病流行与预测研究进展[J]. 中国果树, 2020(3): 11-15.
- [6] 李文学,马 榕,郭琰杰,等. 贺兰山东麓酿酒葡萄霜霉菌孢子囊扩散与田间病情的相关研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2020, 48(1): 111-118.
- [7] 朱文静,李 林,李美清,等. 红外热成像与近红外光谱结合快速检测潜育期番茄花叶病[J]. 光谱学与光谱分析, 2018, 38(9): 2757-2762.
- [8] 李小龙,马占鸿,赵龙莲,等. 基于近红外光谱技术的小麦条锈病菌潜伏侵染的检测[J]. 光谱学与光谱分析, 2014, 34(7): 1853-1858.
- [9] 金恭玺,岳永亮,宋玉萍,等. 葡萄霜霉病初次侵染来源和初侵染的特点及防治[J]. 新疆农业科学, 2015, 52(6): 1105-1111.
- [10] LUO Y, GU S, FELTS D, et al. Development of qPCR systems to quantify shoot infections by canker-causing pathogens in stone fruits and nut crops[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 122(2): 416-428.
- [11] LUO Y, LICHTENBERG P S F, NIEDERHOLZER F J A, et al. Understanding the process of latent infection of canker-causing pathogens in stone fruit and nut crops in California[J]. Plant Disease, 2019, 103(9): 2374-2384.
- [12] YAN J H, LUO Y, CHEN T T, et al. Field distribution of wheat stripe rust latent infection using real-time PCR[J]. Plant Disease, 2012, 96(4): 544-551.
- [13] ZHENG Y M, LUO Y, ZHOU Y L, et al. Real-time PCR quantification of latent infection of wheat powdery mildew in the field[J]. European Journal of Plant Pathology, 2013, 136(3): 565-575.
- [14] 潘 阳,谷医林,骆 勇,等. 双重 real-time PCR 定量测定小麦条锈菌潜伏侵染方法的建立与应用[J]. 植物病理学报, 2016, 46(4): 485-491.
- [15] KNÜFER J, LOPISSO D T, KOOPMANN B, et al. Assessment of latent infection with *Verticillium longisporum* in field-grown oilseed rape by qPCR[J]. European Journal of Plant Pathology, 2017, 147(4): 819-831.
- [16] 刘 琦,李 薇,王翠翠,等. 基于 Logistic、IBk 以及 Random-committee 方法的条锈病潜育期小麦冠层光谱的定性识别[J]. 植物保护学报, 2018, 45(1): 146-152.
- [17] LIU N, LEI Y, ZHANG M, et al. Latent infection of powdery mil-

- dew on volunteer wheat in Sichuan province, China[J]. Plant Disease, 2019, 103(6): 1084-1091.
- [18] AMMOUR M S, BOVE F, TOFFOLATTI S L, et al. A real-time PCR assay for the quantification of *Plasmopara viticola* oospores in grapevine leaves[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 1202.
- [19] MARIMUTHU K, AYYANAR K, GANESAN M V, et al. Loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of *Plasmopara viticola* infecting grapes[J]. Journal of Phytopathology, 2020, 168(3): 144-155.
- [20] 秦文韬,黄晓庆,孔繁芳,等. 葡萄霜霉病菌 PCR 检测方法的建立与应用[J]. 植物保护, 2014, 40(2): 99-102.
- [21] 李文学,肖瑞刚,吕苗苗,等. 葡萄霜霉病菌实时荧光定量 PCR 检测体系的建立和应用[J]. 中国农业科学, 2019, 52(9): 1529-1540.
- [22] 农业部农药检定所. 农药田间药效试验准则(二)第 122 部分: 杀菌剂防治葡萄霜霉病: GB/T 17980. 122-2004 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [23] 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.
- [24] 骆 勇. 植物病害分子流行病学概述[J]. 植物病理学报, 2009, 39(1): 1-10.
- [25] 沙月霞,王国珍,樊仲庆,等. 宁夏贺兰山东麓不同葡萄品种对霜霉病的抗性鉴定[J]. 果树学报, 2007, 24(6): 803-809.
- [26] 王国珍,樊仲庆,麻冬梅,等. 贺兰山东麓酿酒葡萄霜霉病流行规律及测报技术[J]. 植物保护, 2004, 30(4): 54-56.
- [27] 池俊玲,赵一博,郭江波,等. 不同浓度  $Cd^{2+}$  胁迫下烟草实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 南方农业学报, 2019, 50(10): 2133-2140.
- [28] 石盼盼,谢文佳,刘 燕,等. 多重实时荧光 PCR 快速检测转基因大豆[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(18): 77-81.
- [29] 涂丽琴,吴淑华,干射香,等. 江苏省蚕豆上菜豆黄花叶病毒的分子鉴定[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(4): 804-810.
- [30] DUVIVIER M, DEDEURWAERDER G, BATAILLE C, et al. Real-time PCR quantification and spatio-temporal distribution of airborne inoculum of *Puccinia triticina* in Belgium[J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 145(2): 405-420.
- [31] 初炳瑶,龚凯悦,谷医林,等. 应用 real-time PCR 评价三种杀菌剂对小麦条锈病的防治效果[J]. 植物病理学报, 2017, 47(4): 532-540.

(责任编辑:陈海霞)