

邱曦锦,方绍兴,杨宇,等. 水稻白叶枯病菌实时荧光定量 PCR 检测体系的建立及在防效评价中的应用[J]. 江苏农业科学,2025,53(10):145-152. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.10.019

水稻白叶枯病菌实时荧光定量 PCR 检测体系的建立及在防效评价中的应用

邱曦锦^{1,2}, 方绍兴¹, 杨宇¹, 高顺玉¹, 王振吉¹, 阮文忠³, 段浩平⁴, 姚春⁵, 姬广海², 杨俊¹

(1. 楚雄师范学院资源环境与化学学院, 云南楚雄 675000; 2. 云南农业大学植物保护学院, 云南昆明 650201;

3. 楚雄彝族自治州农业科学院, 云南楚雄 675000; 4. 保山市农业科学研究院, 云南保山 678000;

5. 禄丰市中村乡农兴农业机械专业合作社, 云南楚雄 651299)

摘要:水稻白叶枯病是引起水稻减产的主要病害之一,为了监测施用防治药剂后水稻叶片中白叶枯病菌的含量,以评价防治效果,基于已完成基因组测序的水稻白叶枯病菌(*Xoo*)糖基转移酶基因设计引物,构建实时荧光定量 PCR (qPCR) 技术,并对温室开展的防治白叶枯病的药效试验开展评价。基于糖基转移酶基因设计特异性引物,以按梯度浓度(10^{-5} ~ 10 ng/ μ L)稀释的 *Xoo* DNA 作为标准品进行扩增。结果表明,通过常规 PCR 扩增得到的目的基因条带大小为 230 bp, *Xoo* DNA 检测的灵敏度为 1.43×10^1 pg/ μ L; qPCR 检测 *Xoo* DNA 的灵敏度为 2.5 pg/ μ L。研究结果表明, qPCR 的灵敏度比常规 PCR 高 10 倍左右,且标准曲线为 $y = -2.5793x + 43.9460$, $r^2 = 0.9999$ 。进一步利用 qPCR 技术对温室药效试验后的水稻叶片进行 *Xoo* 的定量分析,发现定量后叶片中的 *Xoo* 拷贝数与叶片病情指数成正相关,与温室防治效果结果一致。研究得出的 qPCR 技术的温室防效评价可为后续水稻白叶枯病的防治效果评价提供技术支持。

关键词:水稻;白叶枯病;实时荧光定量 PCR;定量检测;防效评价

中图分类号:S435.111.4⁺7 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2025)10-0145-07

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是世界最主要的粮食作物之一^[1],我国一半以上的人口以稻米为主食。因此,保障水稻的产量对我国粮食安全具有重要作用^[2]。在生产过程中,若发生病虫害,会对水稻产量造成一定的损失,而水稻白叶枯病 (bacterial leaf blight, BLB) 就是引起水稻减产的三大病害之一,该

病害是由水稻黄单胞菌水稻致病变种 [*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (简称: *Xoo*)] 引起的细菌性维管束病害^[3],在水稻的整个生命周期内均可发生。在一般发病条件下,水稻白叶枯病造成的产量损失约为 20%,发病条件适宜时造成的产量损失甚至超过 50%,更严重时会导致田块没有收成^[4]。水稻白叶枯病在华东、华南和华中地区的危害较大^[5],严重影响了我国水稻的产量。因此,针对水稻白叶枯病病害发生严重的稻区开展水稻白叶枯病的防治研究,对于保证粮食安全生产至关重要。

近些年来,随着水稻抗病基因的发掘和应用,水稻白叶枯病虽然在整体上得到了控制,但是有些稻区可能由于原有抗性基因的抗性丧失,因而出现了水稻白叶枯病扩展蔓延之势,给当地水稻生产造成了较大损失。例如,在云南省楚雄市的粳稻种植区,该病害的发病面积逐年增加,严重地块的发病率已达 100%。目前,防治水稻白叶枯病的方法有生物防治法、农药防治法等^[6-7]。其中,生物防治法主要利用拮抗作用、微生物代谢产物等防治水稻白叶枯病^[8],该方法具有健康环保、无公害等优

收稿日期:2024-04-21

基金项目:云南省应用基础研究计划青年项目(编号:202201AU070194);云南省基础研究计划地方高校联合专项-面上项目(编号:20221109144315);云南农业大学国家重点实验室一般项目(编号:gzkf2022005);云南省基础研究计划基础研究专项面上项目(编号:202401AT070301);乡村振兴科技专项-服务型科技特派员(编号:202304BK090504);楚雄师范学院校级科研课题(编号:XSKY2303);2024 楚雄师范学院校级科研团队建设项目(编号:B05);第九届全国大学生生命科学竞赛(科学探究类)(编号:910389)。

作者简介:邱曦锦(1999—),女,云南曲靖人,硕士研究生,从事植物保护研究。E-mail:1178087485@qq.com。

通信作者:姬广海,教授,主要从事植物细菌病害方面的研究, E-mail:550356818@qq.com;杨俊,博士,副教授,主要从事植物细菌病害方面的研究, E-mail:yangjun@cxtc.edu.cn。

点^[9-10],常见做法是利用从水稻根际土壤中或者水稻植株内部分离得到的生防菌进行防治^[11]。在农业生产中,防治水稻白叶枯病最常用的方法是化学防治法,该方法主要利用化学药品的拮抗杀菌作用防治病害,具有快速、高效等优点,是当前防治水稻白叶枯病最廉价、高效的应急举措之一,常用药剂有 20% 噻唑锌悬浮剂^[12]、6% 中生菌素可湿性粉剂、35% 啶啉铜·四霉素悬浮剂^[13]等。为了评估药剂对水稻白叶枯病的防控效果,不仅可以通过病情调查进行分析,还可以通过检测施药后水稻植株内病原菌的含量来分析。目前,检测 *Xoo* 的方法有病原菌分离培养后计数和分子生物学方法,如聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)、实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, qPCR)等^[14]。

随着分子生物学技术的发展,传统的检测方法已经不能满足快速检测的要求。PCR 法、qPCR 法等是目前检测 *Xoo* 较为常用的方法^[15]。常规 PCR 技术主要通过一定量的 DNA 进行扩增,扩增产物再通过琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, DNA 达到一定量时,常规 PCR 反应才能够灵敏。当 DNA 量较小时,常规 PCR 反应就不灵敏,此时就需要使用灵敏度更高的 qPCR 技术进行检测^[16-18]。qPCR 技术是近些年发展起来的一种灵敏性好、特异性强、能快速检测核酸分子的技术,在病原菌的快速检测中扮演重要角色,该技术常通过 PCR 反应体系与一定量的荧光染料结合,实时监测反应产物的扩增曲线、熔解曲线,后续通过结合分析软件进行定性、定量分析^[15]。qPCR 技术可以检测病原菌在植物体内的数量,它克服了常规 PCR 的诸多不足,使得该技术成为分子检测的热门技术^[17,19]。

目前,国内外广泛将 qPCR 技术应用于动植物病原菌的快速检测和定性、定量研究中。张健男等利用 qPCR,从水稻细菌性条斑病菌(*Xoc*)现有的基因入手,设计和筛选出适合 qPCR 检测的 *Xoc* 特异性引物,并建立了 qPCR 检测方法,可用于检测、鉴定 *Xoc*^[3]。Chaves 等开发了 1 种新的基于 TaqMan 探针的 qPCR 方法,该方法也可在常规 PCR 反应中进行,用于检测 4 种已知植物病原物种^[20]。在农业生产中,对农作物进行防治之后,利用 qPCR 技术对水稻叶片内的病原菌含量、数量变化进行检测已经得到广泛运用。唐利华等通过 qPCR 技术检测喷施化学农药后柑橘叶片中黄龙病病原菌的含量,发现喷施药剂后柑橘叶片中病原菌的含量大幅度降

低,说明该药剂对柑橘黄龙病具有防治效果,也说明 qPCR 技术可以用于化学防治效果的田间评价^[21]。王淑芳等利用 qPCR 技术对喷施生防菌前后水稻纹枯病菌的数量、发病情况及水稻产量进行评价,发现施用生防菌后,水稻纹枯病菌的数量有所降低,与防治效果、产量结果一致,说明 qPCR 技术可以用于生物防治效果的田间评价^[22]。

为了深入研究防治水稻白叶枯病的有效药剂,本研究拟对防治 *Xoo* 的相关药剂进行温室试验,并通过 qPCR 技术检测施用不同药剂后水稻白叶枯病菌在水稻叶片中的含量,进一步对其进行温室药效评价。以期能为田间防治水稻白叶枯病的高效用药提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试水稻材料为日本晴;供试接种菌株为水稻白叶枯病菌株(*Xoo*) LF21-38(分离于云南省楚雄彝族自治州禄丰县发病最严重的稻田,保存于楚雄师范学院环化学院生化与分子实验室)。NA 培养基配方:7 g 蛋白胨,3 g 牛肉膏,12 g 葡萄糖,1 g 酵母粉,18 g 琼脂,1 000 mL 蒸馏水,pH 值 7.0,配好后于 121 °C 灭菌 20 min。LB 液体培养基配方:10 g 胰蛋白胨,5 g 酵母粉,10 g NaCl,1 000 mL 蒸馏水,配好后于 121 °C 灭菌 20 min。供试生防菌为枯草芽孢杆菌(分离于云南省楚雄彝族自治州禄丰市水稻种植区的水稻叶片,保存于楚雄师范学院环化学院生化与分子实验室),供试药剂为 35% 啶啉铜·四霉素悬浮剂(青岛奥迪斯生物科技有限公司)、20% 噻唑锌悬浮剂(广州方富化工有限公司)、6% 中生菌素可湿性粉剂(福建凯立生物制品有限公司),均由楚雄师范学院资源环境与化学学院生化与分子实验室提供。

温室试验于 2023 年 5 月在楚雄师范学院资源环境与化学学院温室大棚进行。

1.2 试验方法

1.2.1 水稻白叶枯病病原菌 LF21-38 的基因组 DNA 提取 对病原菌 LF21-38 进行活化及传代培养。挑取单菌落于 5 mL 液体 LB 培养基中,在 28 °C 振荡培养 12 h(转速为 180 r/min)后进行基因组 DNA 的提取,提取方法参照天根生化科技(北京)有限公司的细菌基因组 DNA 提取试剂盒。

1.2.2 引物合成 参考 Lu 等的方法,基于 *Xoo* 糖

基转移酶基因设计引物 JLXoo F/R^[19], 该引物对水稻白叶枯病原菌具有较强的特异性。JLXoo F 序列为 5'-CCTCTATGAGTCGGGAGCTG-3'; JLXoo R 序列为 5'-ACACCGTGATGCAATGAAGA-3'。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成。

1.2.3 引物的特异性检测 用引物 JLXoo F/JLXoo R 对提取的病原菌 LF21-38 基因组 DNA 进行 PCR、qPCR 扩增, 检测引物的特异性, 以 Xoo(与 Xoo 为同种不同的致病变种)的基因组 DNA 作为阴性对照。

常规 PCR 反应体系(25 μ L): 12 μ L 2 \times Taq PCR Mix, 各 1 μ L 引物, 1 μ L DNA 模板, 用 ddH₂O 补足至 25 μ L。常规 PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 52.5 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。对常规 PCR 反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像系统分析结果。

Real-time PCR 反应体系(20 μ L): 10 μ L 2 \times SuperReal PreMix Plus[天根生化科技(北京)有限公司的 SuperReal 荧光定量预混试剂], 各 0.4 μ L 引物(10 μ mol/L), 1 μ L DNA 模板, 用 ddH₂O 补足至 20 μ L。Real-time PCR 反应条件(三步法): 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 54.5 $^{\circ}$ C 30 s, 95 $^{\circ}$ C 10 s(收集荧光信号), 40 个循环。PCR 循环结束后, 降温至 60 $^{\circ}$ C 并保持 60 s, 然后升温至 72 $^{\circ}$ C, 保持 72 s, 收集荧光信号, 建立溶解曲线。根据溶解曲线是否为单一特异的峰, 用来判断引物的特异性。

1.2.4 引物的灵敏度检测 Xoo 病原菌 LF21-38 基因组 DNA 按照 10 倍梯度稀释成 6 个浓度梯度, 先取 10 μ L 原浓度的 DNA(浓度为 1.01×10^2 ng/ μ L) 加入 90 μ L 无菌水中, 将 DNA 稀释成 10 倍, 再取 10 μ L 稀释成 10 倍的 DNA 加入 90 μ L 无菌水中, 稀释成 100 倍, 以此类推分别稀释成 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 浓度梯度, DNA 浓度依次为 4.35×10^1 ng/ μ L、3.30 ng/ μ L、 2.33×10^3 pg/ μ L、 1.93×10^2 pg/ μ L、 1.43×10^1 pg/ μ L、2.50 pg/ μ L、 1×10^3 fg/ μ L。分别用常规 PCR、qPCR 对进行梯度稀释的 DNA 进行引物灵敏度检测, 常规 PCR、qPCR 的反应体系及程序同引物特异性检测。根据扩增条带及荧光信号值大小, 检测所合成的引物在 2 种方法中对水稻白叶枯病原菌基因组 DNA 检测的灵敏度。

1.2.5 标准曲线的建立 以梯度稀释的 DNA 作为模板, 以 JLXoo R/Xoo F 为引物进行 qPCR。反应结

束后, 以模板 DNA 对数的 copy 值为 x 轴、循环阈值(cycle threshold, C_T) 为 y 轴, 建立 Xoo 特异性引物的标准曲线。根据 qPCR 仪系统分析的 lgDNA(浓度)值与 C_T 值之间的关系, 验证两者之间的相关度^[23]。

1.2.6 温室试验

1.2.6.1 温室预防水稻白叶枯病试验 将水稻日本晴幼苗进行移栽, 待水稻苗长到孕穗前期, 进行温室试验。用无菌水与菌株 LF21-38 配制成浓度为 3×10^8 CFU/mL($D_{600\text{nm}}$ 约为 0.5) 的菌悬液进行喷雾接种。在温室预防试验中, 先喷施供试药剂(35% 啶啉铜·四霉素悬浮剂、6% 中生菌素可湿性粉剂、20% 噻唑锌悬浮剂)及枯草芽孢杆菌, 12 h 后再喷施菌悬液, 施药量均为每种药剂的推荐使用剂量, 将枯草芽孢杆菌进行摇瓶发酵, 至菌悬液浓度约为 10^8 CFU/mL($D_{600\text{nm}}$ 约为 0.5)^[24], 以喷施等量无菌水的处理作为空白对照, 套袋保湿, 控制温室温度为 24~30 $^{\circ}$ C, 自然光照条件。药剂的推荐用量如下: 枯草芽孢杆菌 7500 mL/hm², 35% 啶啉铜·四霉素悬浮剂 480~540 mL/hm², 6% 中生菌素可湿性粉剂 450~600 g/hm², 20% 噻唑锌悬浮剂 1005~1500 mL/hm²。参试药剂用水量均为 600 L/hm², 进行温室预防水稻白叶枯病试验 7 d 后观察其发病情况。

1.2.6.2 温室治疗水稻白叶枯病试验 在温室治疗试验过程中, 先接种菌悬液, 48 h 后再喷施供试药剂、枯草芽孢杆菌, 施药量同温室预防试验, 以喷施等量无菌水作为空白对照。通过套袋进行保湿, 控制温室温度为 24~30 $^{\circ}$ C, 自然光照条件, 7 d 后观察其发病情况。

1.2.6.3 温室预防和治疗防治效果的测定 根据水稻发病状况进行药剂预防、治疗效果的测定, 测量接种叶片的病斑长、总叶片长, 并进行病情等级的分级。水稻白叶枯病的分级标准参照吴水祥等的方法^[12]。根据测量结果, 按照如下公式计算病情指数和防治效果: 病情指数 = $[\sum(\text{各级病叶数} \times \text{病情级数}) / (\text{调查总叶片数} \times 9)] \times 100$; 病情防治 = $[(\text{空白对照区病情指数} - \text{处理区病情指数}) / \text{空白对照区病情指数}] \times 100\%$ 。用 Excel 进行数据整理, 用 SPSS 16 进行数据间的差异分析。

1.2.7 水稻叶片总 DNA 的提取 采集温室试验处理后的水稻叶片, 用无菌水清洗水稻叶片 3 次后, 用液氮研磨成细粉, 采用十六烷基三甲基溴化铵

(CTAB)法提取叶片总 DNA,CTAB 法参考谭小艳等的方法^[25]。

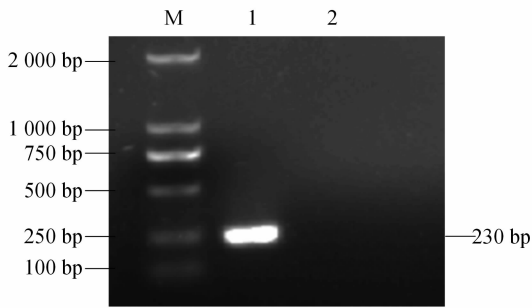
1.2.8 Real-time PCR 定量检测接种后水稻叶片中水稻白叶枯病原菌含量 按照上述 qPCR 的反应体系及程序对提取的水稻叶片总 DNA 进行 qPCR。根据反应标准曲线判断进行治疗试验、预防试验后水稻叶片上水稻白叶枯病原菌量的变化情况。将反应后的 C_T 值代入建立的标准曲线回归方程,可以计算出 lgDNA,再根据如下公式计算水稻白叶枯病原菌 DNA 的拷贝数:DNA 拷贝数 = [DNA 浓度($\text{ng}/\mu\text{L}$) \times DNA 体积(μL) $\times 6.02 \times 10^{23}$] / [片段长度 $\times 660 \text{ g/mol}$]^[26],从而对水稻叶片上水稻白

叶枯病病菌的数量进行定量。

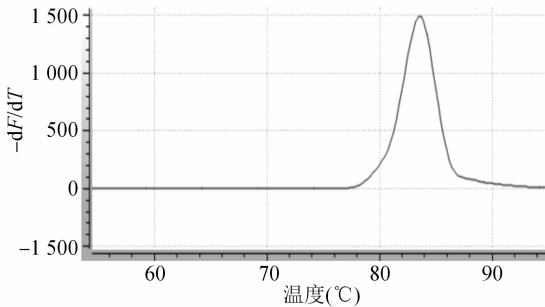
2 结果与分析

2.1 引物特异性验证

用引物 JL *Xoo* F/JL *Xoo* R 对水稻白叶枯病原菌 LF21-38 的 DNA 进行常规 PCR 扩增。由图 1-a 可知,水稻白叶枯病原菌的 DNA 扩增出 230 bp 的目标条带,而作为阴性对照的 *Xoc* 基因组 DNA 无扩增条带。用引物 JL *Xoo* F/JL *Xoo* R 进行 real-time PCR 扩增,图 1-b 结果显示,该引物仅对水稻白叶枯病原菌有单一的吸收峰。



a. 基因组 DNA 常规 PCR 扩增电泳结果



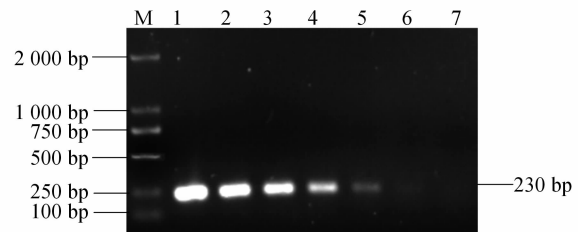
b. Real-time PCR 熔解曲线

M—marker(2 000 bp); 1—*Xoo* LF21-38 DNA PCR 扩增产物电泳检测结果; 2—*Xoc* DNA PCR 扩增产物电泳检测结果

图1 引物 JL *Xoo* F/JL *Xoo* R 特异性检测结果和 Real-time PCR 熔解曲线

2.2 引物的灵敏度检测

2.2.1 常规 PCR 检测引物的灵敏度 用引物 JL *Xoo* F/JL*Xoo* R 对按照浓度梯度稀释的基因组 DNA 进行常规 PCR 的灵敏度测定。由图 2 可以看出,该引物能扩增到浓度为 $1.93 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$ (泳道 4) 的基因组 DNA,目标条带大小约为 230 bp。在泳道 5 中,浓度为 $1.43 \times 10^1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 的 DNA 也能扩增出条带,但目标条带微弱、模糊。泳道 6、7 的 DNA 浓度分别为 $2.5 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 、 $1 \times 10^3 \text{ fg}/\mu\text{L}$,由于浓度较低,不能用常规的 PCR 检测出来,因此不能扩增出任何条带。根据上述结果分析可知,常规 PCR 的检测灵敏度为 $1.43 \times 10 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 。



M—Marker(2 000 bp); 1— $4.35 \times 10^1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ DNA; 2— $3.30 \text{ ng}/\mu\text{L}$ DNA; 3— $2.33 \times 10^3 \text{ pg}/\mu\text{L}$ DNA; 4— $1.93 \times 10^2 \text{ pg}/\mu\text{L}$ DNA; 5— $1.43 \times 10^1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ DNA; 6— $2.5 \text{ pg}/\mu\text{L}$ DNA; 7— $1 \times 10^3 \text{ fg}/\mu\text{L}$ DNA

图2 引物(JL *Xoo* F/JL*Xoo* R)常规 PCR 灵敏度检测

2.2.2 实时荧光定量 PCR 检测引物灵敏度 借助 real-time PCR 技术,用引物 JL *Xoo* F/JL*Xoo* R 进行灵敏度检测。由图 3-a 可知,荧光定量信号曲线均为单一、平滑的曲线,说明该引物的灵敏度较好。由图 3-b 可知,熔解曲线均出现明显单一的峰,说明该引物的灵敏度较好。a、b、c、d、e、f 这 6 个浓度梯度的 DNA 均有扩增曲线,g 浓度的 DNA 由于浓度过低,超出 qPCR 反应检测的下限,因而没有扩增

出曲线,也没有出现熔解峰。基于上述结果分析可知,qPCR 的检测灵敏度为 $2.5 \text{ pg}/\mu\text{L}$,是常规 PCR 检测灵敏度的 10 倍。

2.3 Real-time PCR 标准曲线的建立

以梯度稀释制备的 DNA 进行 qPCR 检测,由于引物 JL *Xoo* F/JL*Xoo* R 的扩增对数曲线规律较好(图 3-a),因此以不同稀释梯度的基因组 DNA 拷贝数的对数为 x 轴、 C_T 值为 y 轴构建标准曲线。由图 4 可知,该体系的线性关系良好($y = -2.579 3x + 43.946 0$), $r^2 = 0.999 9$,可用于后续水稻白叶枯病原菌荧光定量的检测。

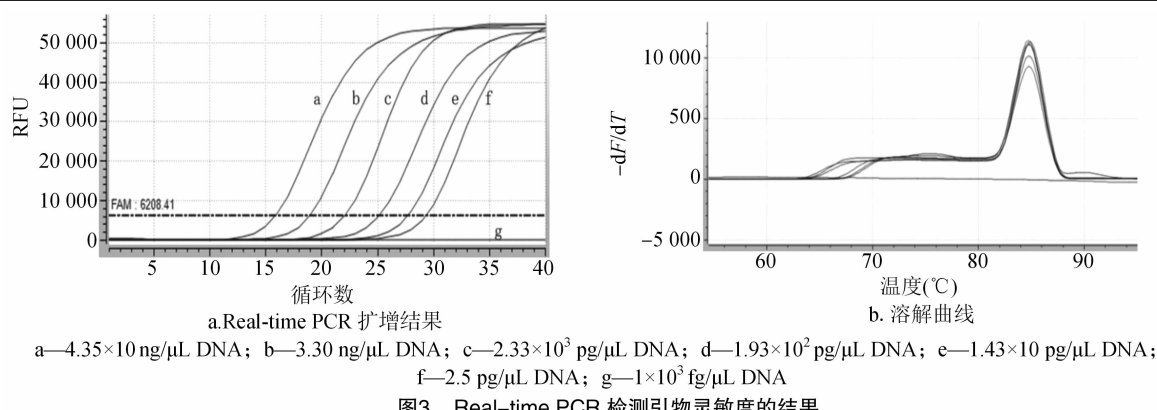


图3 Real-time PCR 检测引物灵敏度的结果

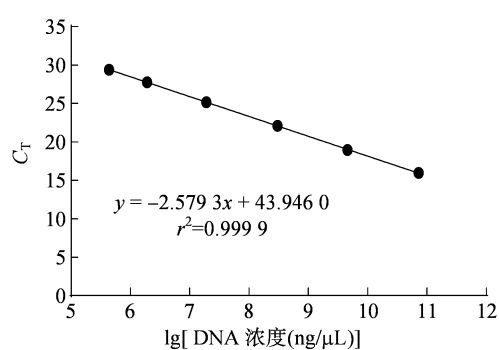


图4 Real-time PCR 标准曲线

2.4 水稻白叶枯病原菌 LF21-38 侵染叶片后病原菌的 real-time PCR 定量

通过对水稻叶片总 DNA 进行实时荧光定量 PCR 反应后,将扩增曲线上对应的 C_T 代入回归方

程 $y = -2.5793x + 43.9460$,便可计算出 DNA 浓度对数,再根据如下公式计算水稻白叶枯病原菌的 DNA 拷贝数:DNA 拷贝数 = [DNA 浓度 ($\text{ng}/\mu\text{L}$) \times DNA 体积 (μL) $\times 6.02 \times 10^{23}$] / [片段长度 $\times 660 \text{ g/mol}$]。由表 1 可知,在温室治疗和预防水稻白叶枯病试验过程中,35% 喹啉铜·四霉素悬浮剂、6% 中生菌素可湿性粉剂、20% 噻唑锌悬浮剂和枯草芽孢杆菌处理后水稻白叶枯病菌的拷贝数均低于对照组,35% 喹啉铜·四霉素悬浮剂处理后的拷贝数最低,其次是 6% 中生菌素可湿性粉剂、20% 噻唑锌悬浮剂和枯草芽孢杆菌处理。在不同处理后,无论是 C_T 值还是 DNA 拷贝数都具有显著差异,说明 35% 喹啉铜·四霉素悬浮剂的处理效果最好,6% 中生菌素可湿性粉剂次之,枯草芽孢杆菌的效果较差。

表 1 不同处理后水稻叶片中水稻白叶枯病菌的 real-time PCR 定量测定结果

药剂	剂型	治疗		预防	
		C_T 值	DNA 拷贝数	C_T 值	DNA 拷贝数
35% 喹啉铜·四霉素	悬浮剂	$31.41 \pm 0.98\text{a}$	$(1.93 \pm 0.15) \times 10^{10}\text{c}$	$32.21 \pm 0.98\text{a}$	$(1.81 \pm 0.16) \times 10^{10}\text{b}$
6% 中生菌素	可湿性粉剂	$27.86 \pm 1.09\text{a}$	$(2.48 \pm 0.17) \times 10^{10}\text{c}$	$28.65 \pm 1.10\text{a}$	$(2.35 \pm 0.17) \times 10^{10}\text{b}$
20% 噻唑锌	悬浮剂	$20.70 \pm 0.02\text{b}$	$(3.58 \pm 0.01) \times 10^{10}\text{b}$	$24.76 \pm 0.47\text{b}$	$(3.45 \pm 0.43) \times 10^{10}\text{a}$
枯草芽孢杆菌	发酵液	$19.97 \pm 1.69\text{b}$	$(3.69 \pm 0.26) \times 10^{10}\text{b}$	$22.67 \pm 1.65\text{b}$	$(3.27 \pm 0.25) \times 10^{10}\text{a}$
对照	—	$15.04 \pm 0.02\text{c}$	$(4.45 \pm 0.01) \times 10^{10}\text{a}$	$21.26 \pm 0.39\text{b}$	$(3.49 \pm 0.06) \times 10^{10}\text{a}$

注:同列数据后不同小写字母表示处理间具有显著差异($P < 0.05$)。表 2 同。

2.5 温室药效试验

为了明确 35% 喹啉铜·四霉素悬浮剂、6% 中生菌素可湿性粉剂、20% 噻唑锌悬浮剂 3 种药剂和枯草芽孢杆菌对水稻白叶枯病的防效,开展温室药效试验。在白叶枯病治疗试验中,水稻在接种 LF21-38 菌悬液后再喷施 3 种药剂和枯草芽孢杆菌。由表 2 可知,经过不同处理后,病斑长在 6.11 ~ 11.87 cm 之间,病情指数在 48.15% ~ 53.09% 之间。用 35% 喹啉铜·四霉素悬浮剂处理后,水稻叶

片的平均病斑长为 6.11 cm,病情指数为 48.15%,均低于其他处理组,治疗效果为 26.41%,均高于其他处理组,说明 35% 喹啉铜·四霉素悬浮剂处理对水稻白叶枯病的治疗效果最好。其次是 6% 中生菌素可湿性粉剂、20% 噻唑锌悬浮剂处理,枯草芽孢杆菌的治疗效果最差,且 35% 喹啉铜·四霉素悬浮剂、6% 中生菌素可湿性粉剂、20% 噻唑锌悬浮剂处理后的病情指数无显著差异。

白叶枯病的预防试验结果表明,35% 喹啉铜·

四霉素悬浮剂、6% 中生菌素可湿性粉剂、20% 噻唑锌悬浮剂和枯草芽孢杆菌处理后,白叶枯病的病情指数均低于对照处理。在水稻白叶枯病的预防试验中,病斑长在 3.04 ~ 9.48 cm 之间,病情指数在 32.72% ~ 48.76% 之间。其中,喷施 35% 啞啉铜·四霉素悬浮剂后,水稻叶片的平均病斑长为 3.04 cm,病情指数为 32.72%,均低于其他处理组,而预防效果为 50.92%,均高于其他处理组,说明 35% 啞啉铜·四霉素悬浮剂对水稻白叶枯病的预防效果

最好。其次是 6% 中生菌素可湿性粉剂、20% 噻唑锌悬浮剂处理,枯草芽孢杆菌的预防效果较差,防治效果不足 30%。综上,根据温室药效试验结果可知,整体上预防效果均好于治疗效果,且 35% 啞啉铜·四霉素悬浮剂对水稻白叶枯病防治有很好的效果,其次是 6% 中生菌素可湿性粉剂,20% 噻唑锌悬浮剂、枯草芽孢杆菌对水稻白叶枯病也有较好的防治效果。本试验结果与不同处理后水稻叶片中水稻白叶枯病原菌的 real-time PCR 定量结果一致。

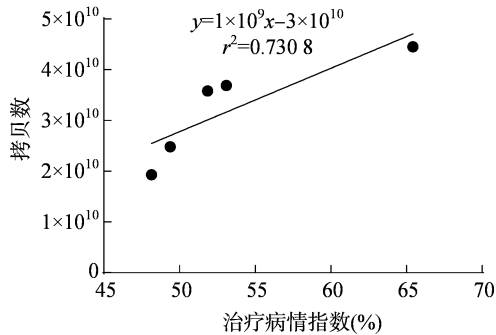
表 2 不同处理对白叶枯病的防治效果

药剂	治疗			预防		
	病斑长(cm)	病情指数(%)	防治效果(%)	病斑长(cm)	病情指数(%)	防治效果(%)
35% 啞啉铜·四霉素悬浮剂	6.11 ± 3.74c	48.15 ± 0.10a	26.41	3.04 ± 2.86b	32.72 ± 0.14b	50.92
6% 中生菌素可湿性粉剂	7.68 ± 5.01c	49.38 ± 0.10a	24.53	4.03 ± 2.45b	38.27 ± 0.09b	42.60
20% 噻唑锌悬浮剂	9.06 ± 4.96bc	51.85 ± 0.09a	20.76	6.07 ± 3.61b	45.68 ± 0.07b	31.48
枯草芽孢杆菌	11.87 ± 5.59ab	53.09 ± 0.11a	18.86	9.48 ± 6.36a	48.76 ± 0.05ab	26.86
对照	13.36 ± 5.09a	65.43 ± 0.08a		10.93 ± 4.62a	66.67 ± 0.03a	

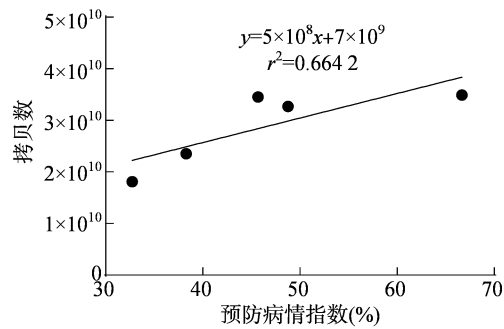
2.6 qPCR 检测结果与防治效果的相关性

为了进一步验证 qPCR 检测结果对水稻病害防治效果的评价相关性分析,本研究对不同处理后水稻叶片的病情指数和 qPCR 检测 *Xoo* 的拷贝数 (copys) 进行相关性分析,通过计算发现,各处理水

稻叶片 qPCR 检测的 *Xoo* 拷贝数与叶片病情指数的 Spearman 相关系数均表现出较强的正相关(图 5)。分析结果表明,qPCR 检测可以用于评价药物处理后水稻叶片白叶枯病害的病情指数,用于防效评价、分析。



a. qPCR 检测与治疗后叶片病情指数的相关性分析 (α=0.05, Spearman)



b. qPCR 检测与预防后叶片病情指数的相关性分析 (α=0.05, Spearman)

图 5 水稻叶片 *Xoo* 的 qPCR 检测拷贝(copy)数与叶片病情指数的相关性分析结果

3 讨论

3.1 引物特异性和灵敏度检测

水稻白叶枯病是水稻生产中典型的流行病害,而且病原菌可通过多种方式传播,对水稻的产量和质量产生严重影响,因此建立快速、高效的方法检测水稻白叶枯病菌具有重要意义。张健男等设计了细菌性条斑病的特异性引物 *Xoc* FhuE - F/*Xoc* FhuE - R,并采用实时荧光定量 PCR 扩增出特异性强且无引物二聚体的单一产物,表明该引物适用于

qPCR,且该引物无需用荧光标记的探针来保障引物检测的特异性,用荧光染料就可对 *Xoc* 进行 qPCR,这为水稻细菌性条斑病高效检测提供了依据^[3]。本试验利用引物 JL *Xoo* F/JL*Xoo* R 对水稻白叶枯病菌进行扩增,得到 1 条 230 bp 的单一产物,qPCR 也能扩增出单一峰,表明该引物特异性强。李文学等通过引物 (F - *cox* - Pv/R - Pv) 对葡萄霜霉病菌进行常规 PCR 以及构建 qPCR 检测体系,结果表明 qPCR 技术灵敏度比常规 PCR 高 100 倍^[26]。孟鸿洲为了建立可以检测水稻白叶枯病菌的 qPCR 体

系,通过常规 PCR 技术和 qPCR 技术对菌液、带菌种子、带菌土壤的检测,结果表明 qPCR 比常规 PCR 灵敏度高^[27]。韩阳等用引物 *Xoc* 2071 F/R 对水稻细菌性条斑病菌进行常规 PCR 和 qPCR 反应,结果表明 qPCR 的灵敏度比常规 PCR 高 100 倍左右^[28]。本试验通过引物 JL*Xoo* F/R 进行检测,常规 PCR 能检测到浓度为 1.43×10^1 pg/ μ L 的 DNA,而 qPCR 中对浓度为 2.5 pg/ μ L 的 DNA 可得到单一峰,表明常规 PCR 检测灵敏度比 qPCR 低 10 倍左右。

3.2 实时荧光定量对病原菌检测

近年来,qPCR 技术在植物病害方面的研究不断深入,不仅用于病原菌的鉴定,还可对被病害感染的植物进行病原菌定量分析,为防控药剂对植物病害的防控效果进行评价。王淑芬等利用 qPCR 技术对施用生防菌前后水稻田土壤中水稻纹枯病菌的数量进行监测,并对发病情况进行统计,结果表明对水稻纹枯病的防治效果随着生防菌浓度的增加而加强,与清水对照组相比,喷施生防菌后土壤中的水稻纹枯病菌数量随时间的推移不断减少,生防菌的防控效果与 qPCR 检测结果相一致,说明 qPCR 技术可以用于生物防治的田间防治效果评价^[22]。唐利华等利用 qPCR 对施药后柑橘叶片和果皮中柑橘黄龙病菌的含量进行检测,相比对照组施药后的柑橘叶片和果皮中病原菌的含量明显降低,柑橘叶片中病原菌含量降低了 97% 左右,果皮含菌量降低 87% 左右,表明喷施化学药剂后可通过 qPCR 进行防治效果评价^[21]。本试验通过对温室药效试验水稻叶片的总 DNA 进行 qPCR 检测,结果表明,施用不同药剂和枯草芽孢杆菌后水稻白叶枯病菌在水稻叶片上的病原菌含量低于清水对照组。在 35% 啶啉铜·四霉素悬浮剂作用下水稻白叶枯病菌的含量均比 6% 中生菌素可湿性粉剂、20% 噻唑锌悬浮剂和枯草芽孢杆菌处理的低,说明 35% 啶啉铜·四霉素悬浮剂处理后的水稻叶片病原菌数量最少,与温室防治效果相一致,说明 qPCR 技术可以用于生物防治和化学防治的防治效果评价。因此,qPCR 技术可对侵染阶段的病原菌进行监测与定量,该方法有利于早期准确估计病害发病情况,结合环境条件及时制定有效的防治策略。

4 结论

运用 qPCR 对白叶枯病菌 DNA 进行 PCR 检测,其灵敏度比常规 PCR 高出 10 倍。用 qPCR 对温室

药效试验后的水稻叶片进行水稻白叶枯病菌的定量分析,定量后叶片中的 *Xoo* 拷贝数与叶片病情指数呈正相关。

参考文献:

- [1]莫俊杰,胡嘉欣,林雄健,等. 水稻收获指数与产量形成主要性状的相关性研究[J]. 杂交水稻,2023,38(2):32-37.
- [2]章秀福,王丹英,方福平,等. 中国粮食安全和水稻生产[J]. 农业现代化研究,2005,26(2):85-88.
- [3]张健男,王依名,张洁净,等. 利用实时荧光定量 PCR 和数字 PCR 检测鉴定水稻细菌性条斑病菌[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版),2023,49(1):55-64.
- [4]Lu J L,Li Q L,Wang C C, et al. Identification of quantitative trait loci associated with resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* pathotypes prevalent in South China[J]. The Crop Journal,2022,10(2):498-507.
- [5]王华弟,陈剑平,严成其,等. 中国南方水稻白叶枯病发生流行动态与绿色防控技术[J]. 浙江农业学报,2017,29(12):2051-2059.
- [6]张芬. 水稻稻瘟病和白叶枯病拮抗细菌的筛选及防治作用研究[D]. 南京:南京农业大学,2011.
- [7]王剑,朱燕,赵黎宇,等. 水稻白叶枯病的发生流行与防治技术[J]. 四川农业科技,2020(10):35-36,39.
- [8]刘巍. 东北地区粳稻白叶枯病菌生理分化及水稻品种对 9 号小种抗性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2015.
- [9]李树江,张韵霞,刘羽,等. 辣椒根腐病生防菌的筛选鉴定及生防作用[J]. 中国蔬菜,2023(9):69-76.
- [10]张浩,张荣胜,齐中强,等. 生防菌解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 悬乳剂研制及其对水稻白叶枯病的防治效果评价[J]. 中国生物防治学报,2022,38(2):393-403.
- [11]张杰. 水稻健康叶片与白叶枯病叶内生微生物群落分析和白叶枯病菌南方菌株生理小种和分子型鉴定[D]. 北京:中国农业科学院,2019.
- [12]吴水祥,徐抗冬,狄蕊,等. 几种药剂防治水稻白叶枯病效果试验[J]. 湖北植保,2022(2):38-40.
- [13]侯雨萱,于林,李阳,等. 16 种杀菌剂对 3 种水稻病原细菌的室内抑菌效果研究[J]. 中国稻米,2023,29(6):28-32.
- [14]李云飞. 水稻黄单胞菌的检测方法研究[D]. 合肥:安徽农业大学,2013.
- [15]廖晓兰,朱水芳,赵文军,等. 水稻白叶枯病菌和水稻细菌性条斑病菌的实时荧光 PCR 快速检测鉴定[J]. 微生物学报,2003,43(5):626-634.
- [16]许忠祥,杨静,刘晓宇,等. 大豆南方茎溃疡病菌 PCR 检测方法的建立[J]. 植物检疫,2022,36(5):34-40.
- [17]李月,张志标,周玉蓉,等. 梅州地区柑橘黄龙病的常规 PCR 与实时荧光定量 PCR 检测技术研究与应用[J]. 现代农业科技,2020(8):103-105.
- [18]唐梦君,周倩,张小燕,等. 3 种分子生物学方法检测金黄色葡萄球菌的比较研究[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(6):2247-2251.

赵明,王智超,胡婕妤,等. 基于纳米硒的噻菌酯纳米农药制备及对番茄晚疫病病菌抑制作用[J]. 江苏农业科学,2025,53(10):152-158.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2025.10.020

基于纳米硒的噻菌酯纳米农药制备 及对番茄晚疫病病菌抑制作用

赵明¹, 王智超¹, 胡婕妤¹, 顾贇童², 孟志远¹, 陈小军¹, 王子建²

[1. 扬州大学植物保护学院, 江苏扬州 225009; 2. 上善康禾生物技术(扬州)有限公司, 江苏扬州 225127]

摘要:随着噻菌酯(Azo)的广泛使用,病原菌对其产生的抗性很大程度上影响了Azo的防治效果。硒在农业领域同样备受关注,适量的硒能够促进作物生长,改善作物品质。基于此,为进一步提高Azo的防治效果,以模板法制备纳米硒(Se),并以此为载体通过溶剂挥发法将Azo负载到Se中,制备出Azo@Se。结果表明,Azo可成功负载到Se的孔道中,并且羧甲基壳聚糖(CMCS)成功对其进行包封,Se对Azo的载药率为19.0%,CMCS@Azo@Se的载药率为14.3%。释放试验表明,CMCS@Azo@Se对Azo的释放呈现明显的碱响应特性。Azo@Se和CMCS@Azo@Se在离体条件下对番茄晚疫病病菌表现出了良好且稳定的抑制作用。喷施CMCS@Azo@Se能促进番茄植株的生长和光合作用,并不会对番茄植株产生负面影响,表明其对番茄植株具有较好的安全性。本研究所制备的CMCS@Azo@Se具有可控释放特性,能够有效抑制番茄晚疫病病菌,并对番茄植株的生长具有一定的促进作用。本研究为Azo纳米农药新制剂的开发提供了理论基础,为减药增效控害提供了新的途径。

关键词:纳米硒;噻菌酯;纳米农药;抑菌活性;番茄晚疫病

中图分类号:TQ450.6;S436.412.1⁺2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2025)10-0152-07

噻菌酯(Azo)属于甲氧基丙烯酸酯类难溶性化合物,既能抑制菌丝生长,又能抑制孢子萌发,并且

对几乎所有真菌病害都具有保护和治疗作用^[1]。由于Azo具有杀菌效果极佳、杀菌谱广、毒性小等特点,使其成为目前使用最广泛的杀菌剂之一^[2]。但有研究发现,大量使用Azo使得病原菌对其产生抗药性,降低了Azo的防治效果^[3]。因此,根据Azo理化性质研究制备纳米缓释剂,降低病原菌对Azo的抗药性、提高Azo的防治效果具有重要意义^[4-5]。硒在农业上的应用研究已经有几十年,适量的硒有助于提高作物产量,改善农产品品质,增强植物的

收稿日期:2024-06-17

基金项目:江苏省重点研发计划(现代农业)(编号:BE2023327);扬州市重点研发计划(现代农业)(编号:YZ2023038);江苏省普通高校毕业生实践创新计划(编号:SJCX22_1790)。

作者简介:赵明(1975—),男,江苏扬州人,硕士,高级实验师,主要从事植物保护教学和科研工作。E-mail:zhaoming@yzu.edu.cn。
通信作者:陈小军,博士,教授,从事农药高效利用与应用风险控制研究。E-mail:cxj@yzu.edu.cn。

[19] Lu W, Pan L Q, Zhao H J, et al. Molecular detection of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*, and *Burkholderia glumae* in infected rice seeds and leaves[J]. The Crop Journal, 2014, 2(6): 398-406.

[20] de Chaves M Q, Morán F, Barbé S, et al. A new and accurate qPCR protocol to detect plant pathogenic bacteria of the genus 'Candidatus Liberibacter' in plants and insects[J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 3338.

[21] 唐利华, 郭堂勋, 李其利, 等. 实时荧光定量PCR检测柑橘黄龙病田间试验药剂防治效果[J]. 安徽农业科学, 2018, 46(24): 128-129, 159.

[22] 王淑芳, 马桂珍, 李世东, 等. 应用实时荧光定量技术评价粉红粘帚霉对水稻纹枯病的田间防治效果[J]. 植物病理学报, 2014, 44(4): 422-427.

[23] 王吉成, 李洁, 丁天波, 等. 番茄褪绿病毒 TaqMan 荧光定量

PCR快速检测方法的建立与应用[J]. 昆虫学报, 2020, 63(2): 159-165.

[24] 张荣胜, 戴秀华, 陈志谊. 解淀粉芽孢杆菌 Lx-11 对水稻细菌性条斑病的防治效果[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 115-116.

[25] 谭小艳, 马耀华, 郝兆祥. 4种改良CTAB法提取石榴成熟叶片DNA的比较研究[J]. 中国南方果树, 2021, 50(3): 122-125.

[26] 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.

[27] 孟鸿洲. 湖北省水稻白叶枯菌的小种组成及定量检测体系的建立[D]. 武汉:华中农业大学, 2015.

[28] 韩阳, 张丽辉, 王永吉, 等. 水稻细菌性条斑病菌的实时荧光PCR检测技术研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2012, 27(3): 315-320.