

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.11.010

李凤巍, 裴悦宏, 张晓枫, 等. 基于 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 技术检测烟草靶斑病发病菌量 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(11): 96-105.

基于 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 技术检测烟草靶斑病发病菌量

李凤巍¹, 裴悦宏¹, 张晓枫¹, 王智³,
陈海涛², 徐宸², 冉茂², 孙现超¹1. 西南大学 植物保护学院, 重庆 400715; 2. 中国烟草总公司重庆市公司烟叶分公司, 重庆 400020;
3. 中国烟草总公司重庆市公司石柱分公司, 重庆 409100

摘要: 本研究根据烟草靶斑病菌(*Rhizoctonia solani*)与烟草赤星病菌(*Alternaria alternata*)、烟草棒孢霉叶斑病菌(*Corynespora cassiicola*)等田间常见烟草叶部病害病原菌的 rDNA-ITS(ribosomal DNA Internal Transcribed Spacers, rDNA-ITS)序列差异位点, 设计一对特异性检测引物 RSW1F/RSW2R, 建立烟草靶斑病菌实时荧光定量 PCR (Real time fluorescence quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR) 快速准确检测体系, 并分析烟草靶斑病最低发病菌量。结果表明, 设计的引物特异性良好, 灵敏度达到 1×10^{-3} ng/ μ L。利用已获得的实时荧光定量 PCR 体系计算得出引起烟草靶斑病发病的最低菌量为 12.03 pg/ μ L。此外, 对重庆龚滩地区烟叶中烟草靶斑病菌含量进行计算, 发现土壤以及周边杂草可能为该地区烟草靶斑病菌的侵染来源, 并进一步确定该地区预防烟草靶斑病的最佳时期为 5 月 15 日至 6 月 15 日, 为烟草靶斑病菌的田间预警预报及流行提供理论依据。

关键词: 烟草; 烟草靶斑病; 实时荧光定量 PCR中图分类号: S432.4⁺4

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)11-0096-10

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Using SYBR Green I Real-Time Quantitative PCR System for Detection of *Rhizoctonia solani*

LI Fengwei¹, PEI Yuehong¹, ZHANG Xiaofeng¹, WANG Zhi³,
CHEN Haitao², XU Chen², RAN Mao², SUN Xianchao¹

收稿日期: 2023-03-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(31870147); 中国烟草总公司重庆市公司科技项目(B20212NY2312, B20221NY1307, B20211-NY1315); 广西中烟工业有限责任公司项目(2021450000340029)。

作者简介: 李凤巍, 硕士研究生, 主要从事植物病理学研究。

通信作者: 冉茂, 硕士; 孙现超, 博士, 研究员, 博士研究生导师。

1. College of Plant Protection, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. Tobacco leaf Branch of Chongqing Company of China National Tobacco Corporation, Chongqing 400020, China;
3. Shizhu Branch of Chongqing Company of China National Tobacco Corporation, Chongqing 409100, China

Abstract: In this study, a pair of specific primers RSW1F/RSW2R were designed according to the sequence differences of rDNA-ITS of common tobacco leaf disease pathogens in the field such as *Rhizoctonia solani*, *Alternaria alternata* and *Corynespora cassiicola*. Based on this, a real-time fluorescence quantitative PCR detection system were further developed for the rapid detection of *R. solani* and analysis of minimum pathogen content to cause tobacco target spot. The results demonstrated that the primers were designed with good specificity and sensitivity of 1×10^{-3} ng/ μ L. Using the developed real-time quantitative PCR system, the minimum content of *R. solani* DNA resulting tobacco target spot was 12.03 pg/ μ L. Furthermore, the content of *R. solani* in tobacco leaves in Gongtan area of Chongqing was calculated. The soil and surrounding weeds were found to be the possible sources of pathogens of tobacco target spot in this area. And the best prevention time of tobacco target spot was determined to be from May 15 to June 15, which provided a theoretical basis for the field early warning, forecast and epidemic occurrence of tobacco target spot.

Key words: tobacco; tobacco target spot; RT-qPCR

烟草作为我国重要的经济作物,其产品质量受到生物与非生物胁迫等多方面的影响^[1-3]。烟草叶部病害往往是直接危害烟叶产量和质量最主要的因素之一,常见的烟草叶部真菌、病毒、细菌类病害主要有烟草赤星病^[4]、烟草病毒病^[5]、烟草野火病^[6]和烟草角斑病^[7]等,这些病害的发生往往会给烟草行业带来不可估量的经济损失。随着对几种常见烟草叶部病害重视的加强以及研究的深入,已经筛选出有效的防治手段及综合防控措施^[8-10],并且相关的病害发生预测模型^[11-13]也基本建立起来。比如,袁守超^[14]建立了烟草赤星病、野火病及角斑病等 3 种病害的预测模型,并推测出其发病规律与流行趋势,进一步分析出防治指标。

烟草靶斑病自 2005 年在我国辽宁丹东地区首次发现发生以来^[15],在东北烟区大面积发病,随后迅速扩散至全国各地。近 5 年来,云南^[16]、湖南^[17]、四川^[18]、贵州^[19]等多个西南地区的烟区均有报道烟草靶斑病的发生。烟草靶斑病发病时,烟草叶片形成不规则病斑,一般形成同心轮纹,坏死部分易脱落形成穿孔^[20],通常在田间相对湿度较大时容易大规模发生^[21-22],导致对其防治比较困难。目前对于烟草靶斑病比较有效的防治措施主要为化学防治,田亮等^[23]通过比较不同药剂对烟草靶斑病的防控效果,筛选出 80% 波尔多液+38% 吡唑醚菌酯·啶酰菌胺对烟草靶斑病防治效果较好,且药效持续时间长。吴元华^[24]在 11 种化学杀菌剂和 9 种生物杀菌剂中筛选出咯菌腈和丁子香酚对烟草靶斑病菌抑制作用最强。同时,最近也有研究表明 0.3% 四霉素对烟草靶斑病菌的抑制效果较好,其抑制中浓度 EC_{50} 达到 0.04 mg/L^[25]。在生物防治方面,目前对于烟草靶斑病的防治方法报道较少,莽春霞^[26]、尹秀娟等^[27]筛选出一种对烟草靶斑病菌具有抑制作用的生防菌灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*),其抑菌圈直径为 14 mm,抑菌率达到 90.88%。近几年,也有研究发现链霉菌 KX852460 (*Streptomyces strain*)^[28]、贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*)^[29]等生防菌对烟草靶斑病病原菌(*Rhizoctonia solani*)具有显著的拮抗作用。但是,目前国内外对于烟草靶斑病还没有有效的防治方法,也没有建立相关预测模型和形成完整的绿色防控体系。因此,十分有必要建立更快、更准确及时的烟草靶斑病检测体系,从而更有效地防治烟草靶斑病的发生,也更利于贯彻“预防为主,绿色防控”的方针。

实时荧光定量 PCR (Real time fluorescence quantitative Polymerase Chain Reaction, RT-qPCR) 相比于普通 PCR 具有更高的灵敏性及特异性的特点^[30],基于这些优点,近年来,越来越多应用 RT-qPCR 技术体

系快速检测植物病原菌的报道^[31]。例如,刘美等^[32]建立 SYBR Green I 染料的实时荧光定量 PCR 技术用于检测黄瓜绿斑驳花叶病毒,谢中玉等^[33]根据链格孢属 ITS 基因序列差异位点,设计特异性引物,并构建了基于 SYBR Green I 烟草赤星病菌实时荧光定量 PCR 快速定量检测方法。目前,已有研究报道了基于 Taqman 探针的实时荧光定量 PCR 体系用于检测烟草靶斑病菌^[34],但该方法存在检测成本较高,不适用于烟草田间大规模病害发生的检测等缺点。而基于 SYBR Green I 的实时荧光定量 PCR 技术成本相对较低,并且可以实现更快、更精确的定量。因此,本研究针对烟草靶斑病菌建立 SYBR Green I 实时荧光定量 PCR 检测体系,并确定了烟草靶斑病最低发病菌量,对烟草靶斑病的快速检测、提前防治以及降低经济损失具有重要意义,为田间烟草靶斑病的有效检测和及时防治提供有效依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

供试病原菌:烟草靶斑病病原菌(*Rhizoctonia solani* AG-3)YC-9 由沈阳农业大学吴元华教授馈赠,烟草赤星病病原菌(*Alternaria alternata*)PZh4 和烟草棒孢霉叶斑病病原菌(*Corynespora cassiicola*)3-2 由西南大学植物保护学院植物免疫与病害生态防控研究室保存。

1.1.2 试剂与引物

十六烷基三甲基溴化铵(2×CTAB),V(酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1;异丙醇、实时荧光定量 SYBRPrime qPCR 购自重庆葆光生物技术有限公司;Zero Background pTOPO-Blunt Simple Cloning Kit 和 DN45-FastBeat 土壤基因组 DNA 提取试剂盒(珠磨法)购自北京艾德莱生物技术有限公司;2×Taq Master Mix(Cat. No.:E005-01)购自苏州近岸蛋白质科技股份有限公司;DNA 回收试剂盒 Universal DNA Purification Kit 和质粒 DNA 提取试剂盒购自北京擎科生物科技有限公司;引物合成和测序均由北京擎科生物科技有限公司完成。

1.1.3 仪器

Q5000 超微量核酸蛋白测定仪(美国 QUAWELL 公司);RePure-A 基因扩增仪(杭州柏恒科技有限公司);CFX Connect™ 荧光定量 PCR 检测系统(伯乐科技有限公司);DYY-12 型电泳仪(北京六一仪器厂);凝胶电泳成像仪(基因有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 样品 DNA 提取

供试菌株及烟草叶片总 DNA 的提取:采用 CTAB 法提取供试菌株及烟草叶片总 DNA,根据韦学锋等^[35]的方法稍做改动。①取 0.1 g 叶片样品在液氮中快速研磨成粉状,加入 1 mL 65 °C 预热好的 CTAB 置于 65 °C 水浴裂解 45~60 min,每 10 min 混匀一次,于 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min;②吸取上清液 700~800 μL,在上清液中加入等体积的酚:氯仿:异丙醇(25:24:1)混合液充分颠倒混匀后于 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 10~15 min,重复操作两次。③取上清液 500~600 μL,加入等体积的-20 °C 预冷的异丙醇,于-20 °C 放置 2 h 左右;④于 4 °C 条件下 12 000 r/min 离心 15 min,弃上清,将剩余液体吸干,管底的沉淀物用 75% 的乙醇充分洗涤两次后弃上清,放置 3~5 min 待乙醇挥发后,加入 60 μL ddH₂O 溶解沉淀。提取的 DNA 用 Q5000 超微量核酸蛋白测定仪检测 DNA 浓度,并置于-20 °C 冰箱中保存备用。

土壤样品 DNA 的提取:采用 DN45-FastBeat 土壤基因组 DNA 提取试剂盒(珠磨法)提取土壤样品 DNA,提取过程严格按照试剂盒说明书(http://aidlab.cn/up_product/big/2018-2-13-98845451.pdf)操作。

1.2.2 特异性引物设计

利用 DNAMAN Version 9 软件对供试菌株 *R. solani* AG-3 的 DNA 测序结果与 NCBI GenBank 中的烟草赤星病菌(*A. alternata*)和烟草棒孢霉叶斑病菌(*C. cassiicola*)的 rDNA-ITS 基因序列进行比对,根

据 3 种病原菌不同的 ITS 序列差异, 利用 Primer3web version 4. 1. 0 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3/>) 设计引物共 3 对, 其中获得一对具有特异性的引物 RSW1-F (5'-TGTGAACTTGTGAGACAGTTGGGG-3') 和 RSW2-R (5'-CAAGGAATACCAAGGAGCGCAAG-3').

1. 2. 3 普通 PCR 引物特异性检测及灵敏度检测

将提取的供试菌株 *R. solani* AG-3 的 DNA 经超微量核酸蛋白测定仪检测浓度, 并按 10 倍梯度用 ddH₂O 依次稀释为 100, 10, 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ ng/μL, 使用特异引物 RSW1F/RWSW2R 进行常规 PCR 扩增, 50 μL 常规 PCR 体系按推荐的反应体系进行 (<https://www.novoprotein.com.cn/group1/M00/00/04/rBKQbGLszNiAI1DyAARWBqaNWR4981.pdf>), 以双蒸水作为阴性对照, 测定特异引物灵敏度。

1. 2. 4 PCR 扩增产物的克隆和序列测定

以 1. 2. 1 中提的烟草靶斑病菌基因组 DNA 为模板, 用设计的烟草靶斑病菌特异性引物 RSW1F/RWSW2R 进行常规 PCR 扩增, 得到 276 bp 左右的 PCR 产物. 将 PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳后胶回收, 将回收片段连接到 pTOPO-Blunt Simple 载体上, 并转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中, 挑取阳性菌落 37 °C 过夜培养, 菌检后将含有目的 DNA 片段的菌液送至北京擎科生物科技有限公司进行测序。

1. 2. 5 标准曲线的建立

提取含有目的 DNA 片段的大肠杆菌标准质粒, 以 10 倍梯度稀释后的标准质粒作为扩增模板, 采用 SYBR qPCR Master Mix 推荐的反应体系 (<http://cloud.bgbitech.com/#s/78DlXioQ>) 进行 RT-qPCR 扩增. 以拷贝数的对数 (lg Ct) 为横坐标, 循环阈值 (Ct) 为纵坐标制作标准曲线. 根据标准曲线所得数据分析拷贝数与 Ct 值之间的关系, 并建立数学模型, 检验相关性。

1. 2. 6 重庆龚滩烟区土壤及发病烟株叶片中靶斑病菌 RT-qPCR 检测

重庆龚滩地区土壤采样: 对重庆龚滩烟区土壤样品进行取样, 每个地区设置 3 个取样点. 3 个取样点分散在不同的地块上并各取 3 个处理, 每个处理取烟草根基周边土壤。

发病烟株叶片采样: 龚滩烟区每个地区设置 3 个取样点. 3 个取样点分散在不同的地块上并各取 3 个处理, 采集田间发病烟株中下部叶。

RT-qPCR 检测: 按照 1. 2. 1 的方法提取烟草叶片样品总 DNA 并进行荧光定量 PCR 检测, 反应体系与 1. 2. 5 相同。

1. 2. 7 利用 RT-qPCR 体系检测烟草靶斑病最低发病菌量

靶斑病菌接种: 采用菌饼接种法 (图 1). 试验采用 K326 烟草叶片进行接种, 用针均匀刺伤烟草叶片, 造成伤口, 然后将活化 15 d 左右的直径为 1 cm² 的靶斑菌菌饼接种在烟草叶片上, 以同等大小的水琼脂培养基接种健康烟草叶片为对照, 设置 3 个生物学重复, 接种后密封放置于室温 26 °C 观察. 从 0 h 开始每间隔 24 h 取一次样, 取两个接种菌饼之间的叶片样品 0. 1 g, 同时观察接种处发病情况并拍照记录. RT-qPCR 检测方法同 1. 2. 6.

1. 2. 8 数据分析

使用 SPSS 26 统计软件对试验数据进行统计分析, 采用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性检验. 使用 Microsoft excel 2016 软件进行标准曲线绘制。

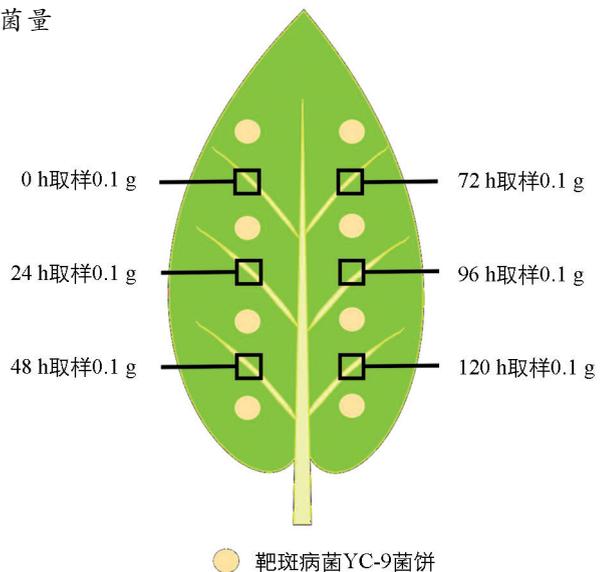
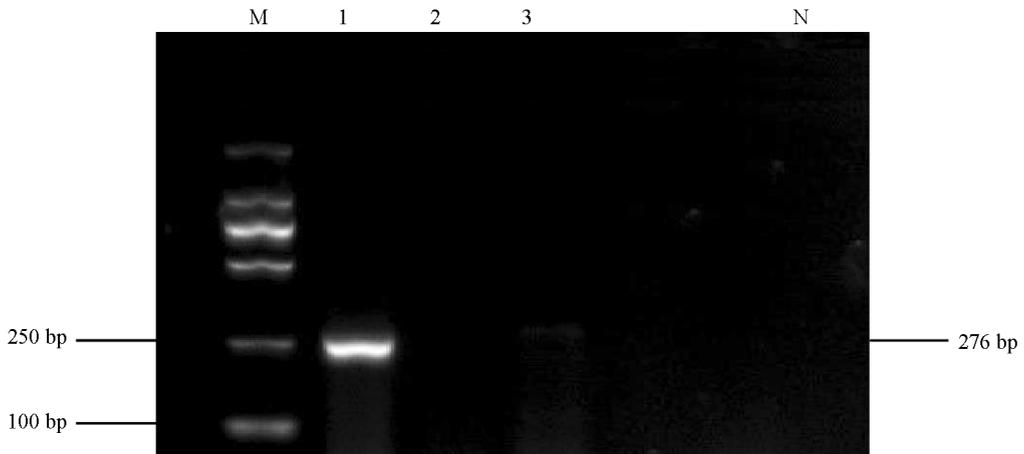


图 1 烟草靶斑病菌菌饼接种示意图

2 结果与分析

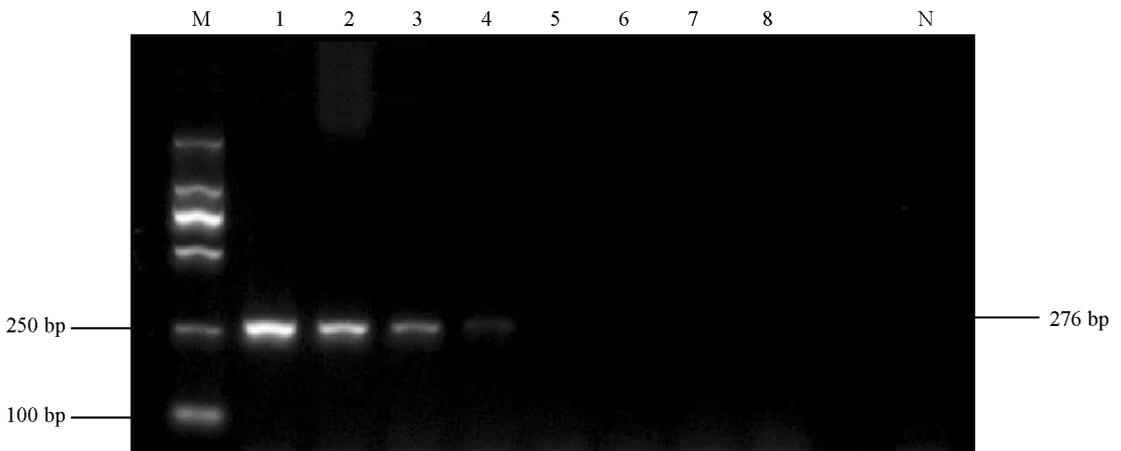
2.1 普通 PCR 引物特异性和灵敏度的检测

通过普通 PCR 技术检测引物的特异性. PCR 产物电泳结果显示, 引物 RSW1F/RSW2R 可以检测出烟草靶斑病菌, 并且烟草棒孢霉叶斑病菌、烟草赤星病菌没有扩增出条带, 说明该引物特异性较好. 测序结果表明该引物可以扩增出大小为 276 bp 的特异性条带(图 2). 扩增序列: TGTGAACTTGTGAGACAGT TGGGGAATTTATTTGTTATTTTTTGTAAATAAAATAATAAAGTCATTGAACCCTTCTGTCT ACTCAACTTATATAAACTCAATTTATTTTAAATGAATGTAATGGATGTAACACATCTCATACTAAGTTTCAACAACGGATCTCTTGGCTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACCTTGCCTCCTTGGTATTCCTTG. 进一步对不同浓度的烟草靶斑病菌 *R. solani* AG-3 的 DNA 进行普通 PCR 扩增, 电泳结果显示, 该引物最低能够检测到浓度为 1×10^{-1} ng/ μ L 的靶斑病菌 DNA(图 3).



M: DL 2000 DNA marker; 1~3: 靶斑病菌 DNA; 赤星病菌 DNA; 棒孢霉叶斑病菌 DNA; N: 阴性对照(ddH₂O).

图 2 烟草靶斑病菌引物特异性检测结果



M: DL 2000 DNA marker; 1~8: 标准质粒浓度分别为 1×10^2 ng/ μ L⁻¹, 1×10 ng/ μ L, 1×1 ng/ μ L, 1×10^{-1} ng/ μ L, 1×10^{-2} ng/ μ L, 1×10^{-3} ng/ μ L, 1×10^{-4} ng/ μ L 和 1×10^{-5} ng/ μ L; N: 阴性对照(ddH₂O).

图 3 靶斑病特异性引物 RSW1F/RSW2R 灵敏度检测结果

2.2 RT-qPCR 标准曲线的建立

将 1.2.5 中所得标准质粒按 10 倍梯度稀释为 6 个浓度, 每个梯度设置 8 个重复进行实时荧光定量

PCR 扩增, 计算每个梯度的 C_t 均值, 绘制标准曲线. 结果显示, 实时荧光定量 PCR 能够检测到浓度最低为 1×10^{-3} ng/ μ L 的标准质粒, 为常规 PCR 灵敏度的 100 倍(图 4a). 此外, 溶解曲线图可以看出溶解曲线呈单一溶解峰, 并且熔点温度趋于一致, 约为 82.1°C , 表明扩增产物比较单一, 引物的特异性较好并且无明显的引物二聚体生成(图 4b). 由扩增曲线可以看出计算得到标准曲线 $y = -3.5574x + 27.74$, 相关系数 R^2 为 0.9954(图 4c), 由扩增效率计算公式($E = 10^{-1/k} - 1$)计算出扩增效率 E 约为 91.03%, 趋近于 1, 表明所得标准曲线符合要求.

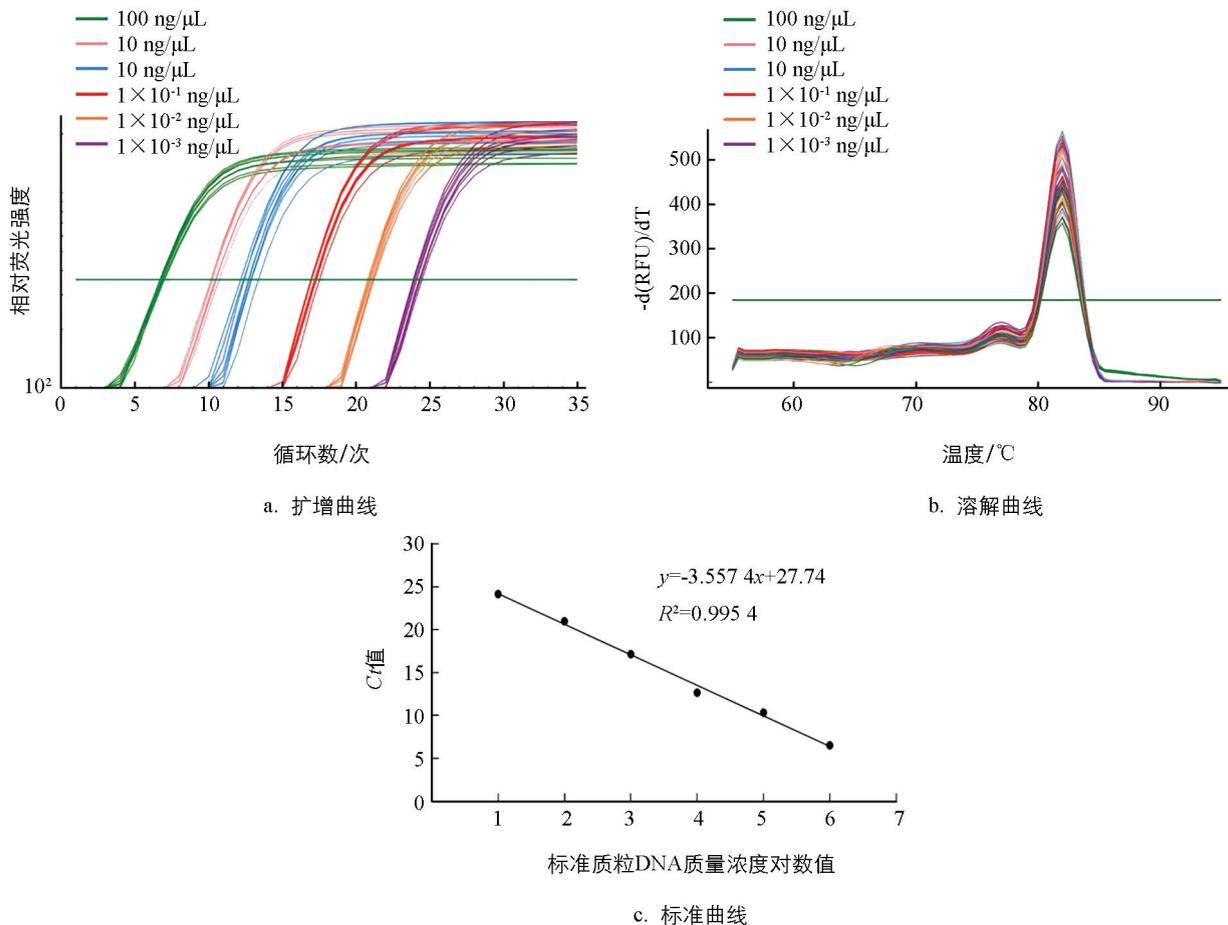


图 4 引物 RSW1F/RSW2R 的实时荧光定量 PCR 检测结果

2.3 RT-qPCR 体系检测烟草靶斑病最低发病菌量的检测

通过实时荧光定量 PCR 检测接种烟草靶斑病菌菌饼 24 h, 48 h, 72 h, 96 h 和 120 h 后两个接种菌饼之间叶片样品的靶斑病菌含量, 实时荧光定量结果显示接种后 5 个不同时间点的 C_t 值分别为 20.76, 20.65, 20.34, 17.61, 15.33, 对照健康叶片无 C_t 值, 将各处理 C_t 值代入标准曲线计算靶斑病菌的相对含量, 得出其烟草靶斑病菌含量分别为 9.16 pg/ μ L, 9.84 pg/ μ L, 12.03 pg/ μ L, 70.40 pg/ μ L 和 307.97 pg/ μ L. 由图 5 可以看出, 24~72 h 含菌量变化较小, 没有显著性差异, 接种处无明显病斑出现. 而第 96 h 与第 24~72 h 相比, 靶斑病菌含量显著上升, 并且伴随着较大病斑的出现. 说明在 72 h 时, 即 C_t 值为 20.34, 靶斑病菌含量为 12.03 pg/ μ L 时, 达到烟草靶斑病的最低发病菌量.

2.4 重庆龚滩烟区土壤和发病烟株叶片中靶斑病菌含量检测分析

使用设计的特异性引物对重庆龚滩烟区土壤样品 DNA 以及 5~7 月发病烟株的叶片样品 DNA 进行 RT-qPCR 检测其靶斑病菌含量. 实时荧光定量结果显示, 5 月 15 日、5 月 30 日、6 月 15 日龚滩烟区土壤 RT-qPCR 的扩增 C_t 值分别为 25.14, 24.12 和 23.91, 代入 2.2 所得标准曲线计算出其烟草靶斑病菌含量

分别为 $0.54 \text{ pg}/\mu\text{L}$, $1.04 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 和 $1.19 \text{ pg}/\mu\text{L}$ (图 6)。本研究发现重庆龚滩烟区土壤中的靶斑病菌含量随时间推移升高,一定程度上可以推测该地区的靶斑病菌可能通过土壤传播到烟株上,但具体证据需进一步的试验验证,但可说明需加强对该地区土壤的消毒杀菌,以降低土壤中烟草靶斑病菌含量。5月15日杂草以及6月15日、6月30日、7月30日龚滩烟区发病烟株叶片 RT-qPCR 的扩增 C_t 值分别为 23.95, 19.11, 17.40 和 22.29, 其烟草靶斑病菌含量分别为 $1.16 \text{ pg}/\mu\text{L}$, $26.66 \text{ pg}/\mu\text{L}$, $80.65 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 和 $3.40 \text{ pg}/\mu\text{L}$ (图 6b)。根据 2.2 中的标准曲线, 计算得出各时期龚滩烟区土壤样品、发病叶片样品中靶斑病菌含量,发现杂草中烟草靶斑病菌的含量较高,说明应当及时清除烟田周边杂草,以阻断烟草靶斑病菌从烟田周边杂草传入烟叶的可能。同时,结合 2.3 中已知的烟草靶斑病最低发病菌量的 C_t 值(20.34), 龚滩烟区烟叶 6月15日的烟草靶斑病菌含量接近临界发病菌量 C_t 值,说明应该在此之前对烟草靶斑病进行预防,以避免其进一步侵染为害其他烟株导致病害流行。此外,由图 6 可以看出,5~6月,龚滩烟区土壤和病叶中靶斑病菌含量显著上升。但到7月底发病叶片中含菌量显著下降,可能是由 2022 年重庆 7 月持续高温($>40^\circ\text{C}$)引起,表明高温对靶斑病菌生长有一定影响。

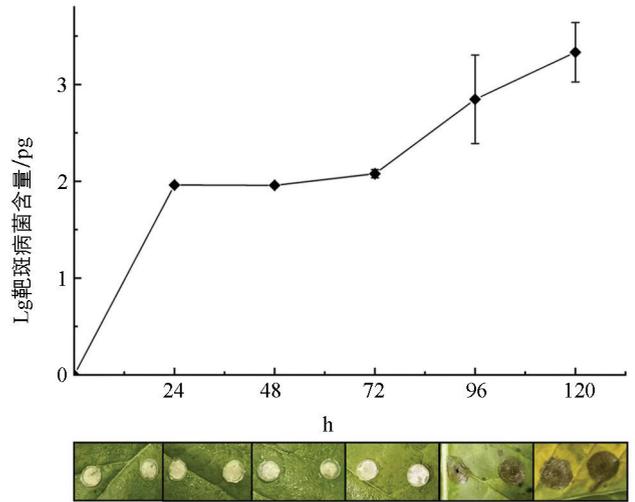
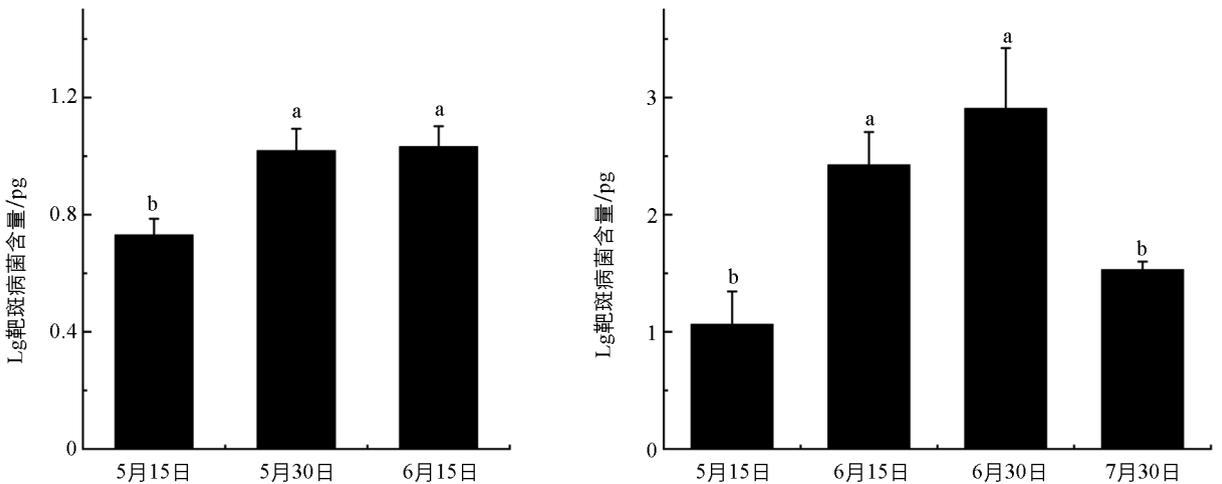


图 5 K326 叶片接种烟草靶斑病菌饼
不同时间靶斑病菌含量检测



小写字母不同表示差异有统计学意义($p < 0.05$)。

图 6 重庆龚滩烟区土壤样品和发病烟株叶片样品中靶斑病菌含量检测结果

3 讨论

烟草靶斑病自在我国首次发现以来,其扩散速度十分迅速,同时具有再侵染频繁、危害性大等特点^[15],一旦发病便带来巨大的经济损失。对于烟草靶斑病的有效防治仍然主要采取化学防治的手段,然而,烟草靶斑病在田间的发病症状与烟草赤星病、烟草棒孢霉叶斑病等常见烟草叶部病害的发病症状极为相似,尤其是与烟草赤星病常常难以区分^[36],而该 3 种烟草病害常用的有效药剂以及最佳防治时期不同,无法准确区分该 3 种病害往往会导致在化学药剂的针对性选择上以及准确把握药剂使用时期等方面造成困难。同时,在西南地区常发的烟草叶部病害主要有烟草赤星病、烟草棒孢霉叶斑病以及烟草靶斑病,尤其

是近几年烟草靶斑病在西南多个地区暴发^[37-39]。因此, 开发一种针对烟草靶斑病的特异性定量引物用于区分此 3 种症状相似的病害以及田间烟草靶斑病的快速准确检测十分重要, 一旦发病便可以对症下药, 选取有效的药剂以及在有效的防治时期进行防治。而对于烟草其他真菌病害, 如烟草黑胫病、烟草灰霉病等, 在症状上可以与烟草靶斑病有明显的区分, 对于药剂选择以及防治时期上没有造成困难。因此, 本研究针对烟草靶斑病以及与其症状相似的两种常见的烟草叶部病害设计了一对特异性引物 RSW1F/RSW2R, 结果表明该引物能够特异性检测烟草靶斑病菌 *R. solani* AG-3, 能够有效区分其与另外两种症状相似的烟草真菌病害, 从而可以对发病初期的烟草病害有针对性的进行化学防治。然而, *R. solani* 目前国内外已经报道的有 14 个融合群(AG1-13 和 AGBD)^[19]。根据地理位置不同, 烟草靶斑病的致病病原菌 *R. solani* 存在不同的菌丝融合群。目前在我国已鉴定出的烟草靶斑病病原菌主要为 *R. solani* AG-3 融合群, 主要分布于湖南^[17]、湖北^[38] 以及贵州^[39] 等地区, 但也有少数地区如广西、贵州等地区检测出 *R. solani* AG-2、*R. solani* AG-4^[40] 以及 *R. solani* AG-6^[41] 等融合群。因此, 对于重庆龚滩地区的烟草靶斑病病原菌是否存在除 *R. solani* AG-3 以外的融合群还需要进一步探究。

同时, 烟草靶斑病菌 *R. solani* 是一种土传真菌病害^[42-43], 其侵染范围广泛^[44-46], 可以侵染烟草、番茄、玉米和黄瓜等。本研究在重庆龚滩地区 5~6 月土壤样品及杂草中检测出靶斑病菌, 说明在该地区靶斑病初侵染来源主要存在于土壤和杂草中。Budge 等^[47] 的研究表明表面浅层土壤更容易比深层土壤中检测出 *R. solani*, 因此, 可以通过深翻耕等农艺措施来预防其侵染烟株地上部分。此外, 在重庆龚滩地区 5 月中旬—6 月中旬土壤中靶斑病菌含量逐渐增高。赵艳琴等^[48] 测定了辽宁丹东地区一年中土壤中靶斑病菌的动态变化数据, 发现在一年中该地区土壤靶斑病菌含量于 6 月 28 日达到最高值, 本研究结果与其基本一致, 表明 5~6 月为靶斑病菌在田间适宜生长的时期。另外, 田间 5~6 月叶片靶斑病菌含量变化趋势与土壤中变化趋势基本一致。同时, 叶片中 6 月中旬的 Ct 值较为接近最低发病菌量的 Ct 值, 提示我们可以在在此之前采集田间样品检测烟草靶斑病菌含量, 在其达到最低发病菌量之前采取措施防止靶斑病的进一步流行。因此, 在该地区靶斑病的最佳防治时期为 5 月 15 日至 6 月 15 日。另一方面, 7 月烟草叶片中靶斑病菌含量显著降低, 说明降雨、温度、湿度等环境因素对该菌的生长有较大的影响。

综上所述, 对于烟草靶斑病的防控可以根据建立的实时荧光定量 PCR 检测体系检测田间烟草靶斑病菌含量, 并在达到最低发病菌量之前及时利用药剂进行有效控制防治。此外, 聂晓等^[49] 根据新疆泽普县 2012—2019 年内的小麦白粉病发病情况进行调查统计和数据分析后, 将往年病害发生情况与病害发生流行的关键气象因子相结合, 利用多元回归分析法建立了小麦白粉病的病害预测模型。因此, 对于烟草靶斑病的预防, 还可以在将田间气候预测与 GIS 技术等相结合从而建立预测模型等方面继续深入探索, 做到精准把控田间施药, 以预防烟草靶斑病的发生与流行。

4 结论

本研究设计了一对能够特异性检测烟草靶斑病菌的引物 RSW1F/RSW2R, 该引物能够有效区分烟草靶斑病菌、烟草赤星病菌、烟草棒孢霉叶斑病菌等重庆烟区常见烟草病害, 同时建立了烟草靶斑病菌的实时荧光定量体系, 计算出烟草靶斑病的最低发病菌量为 12.03 pg/ μ L, 并且将已建立检测体系运用到重庆龚滩烟区靶斑病的检测, 发现该烟区的土壤和杂草可能为烟草靶斑病菌的来源, 同时确定了 5 月 15 日至 6 月 15 日为该地区预防烟草靶斑病的最佳时期, 为烟草靶斑病的预报预警及科学用药提供依据。

参考文献:

- [1] 周慧丹, 柳树勇, 杨洪武, 等. 烟叶质量提升方法与智慧烟草种植 [J]. 智慧农业导刊, 2021, 1(7): 17-19.
- [2] 刘晓丽, 向欢, 杨兴有, 等. 光照强度对烟草生长发育及产量和质量的影响研究进展 [J]. 现代农业科技, 2022(5): 14-17, 27.

- [3] STAVELY J R. Influence of Temperature and other Factors on Initiation of Tobacco Brown Spot [J]. *Phytopathology*, 1970, 60(11): 1591-1596.
- [4] 张万良, 翟争光, 谢扬军, 等. 烟草赤星病研究进展 [J]. *江西农业学报*, 2011, 23(1): 118-120.
- [5] SCHOLTHOF K G, ADKINS, S. Top 10 Plant Viruses in Molecular Plant Pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12: 938-954.
- [6] 王振国, 丁伟. 烟草野火病发生与防治的研究进展 [J]. *中国烟草学报*, 2012, 18(2): 101-106.
- [7] 姜新, 白建保, 王左斌, 等. 烟草角斑病研究进展 [J]. *安徽农业科学*, 2007, 35(7): 2014-2015.
- [8] 张超群, 肖荣贵, 管成伟, 等. 几种免疫诱抗剂防治烟草病毒病田间效果比较 [J]. *生物灾害科学*, 2019, 42(3): 195-198.
- [9] 万维肖, 丁伟, 帅红, 等. 烟草叶部病害种类及综合治理技术 [J]. *植物医生*, 2014, 27(4): 38-39.
- [10] 宋莉莎, 司世飞, 龙友华, 等. 烟草赤星病生防芽孢杆菌的筛选鉴定及其生长条件研究 [J]. *河南农业科学*, 2019, 48(1): 84-89.
- [11] 李北. 烟草野火病和角斑病预测模型及防治指标的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2020.
- [12] 刘晓宇. 黑龙江烟草产量预测及病害预警方法研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2012.
- [13] 刘延鑫, 王俊峰, 杜传印, 等. 基于 YOLOv3 的多类烟草叶部病害检测研究 [J]. *中国烟草科学*, 2022, 43(2): 94-100.
- [14] 袁守超. 吉林省烟草三种叶部病害预测模型及防治指标的研究 [D]. 长春: 吉林农业大学, 2021.
- [15] 吴元华, 王左斌, 刘志恒, 等. 我国烟草新病害—靶斑病 [J]. *中国烟草学报*, 2006, 12(6): 22, 51.
- [16] 赵秀香, 吴元华. 云南省烟草靶斑病菌菌丝融合群及 ITS 序列分析 [C] //中国植物病理学会 2017 年学术年会论文集. 泰安, 2017: 152.
- [17] 肖艳松, 钟权, 吴文信, 等. 湖南烟草靶斑病的病原鉴定及分子检测 [J]. *湖南农业大学学报(自然科学版)*, 2020, 46(6): 711-715.
- [18] 徐传涛, 张崇, 张明金, 等. 四川省烟草靶斑病病原鉴定及生物防治研究 [J]. *湖北农业科学*, 2021, 60(8): 87-90.
- [19] 聂忠扬, 林松, 祖庆学, 等. 贵州烟区靶斑病病原菌的融合群研究与戊唑醇室内毒力测定 [J]. *安徽农业科学*, 2022, 50(7): 137-140.
- [20] 吴元华, 赵艳琴, 赵秀香, 等. 烟草靶斑病原鉴定及生物学特性研究 [J]. *沈阳农业大学学报*, 2012, 43(5): 521-527.
- [21] 孙宏宇. 烟草靶斑病发生及防治技术研究进展 [J]. *中国植保导刊*, 2015, 35(7): 23-26.
- [22] 祖庆学, 张翼飞, 冯裕洋. 烟草靶斑病病原生物学与综合防控措施研究进展 [J]. *现代农业科技*, 2022(14): 71-76.
- [23] 田亮, 郭劲, 张旭飞, 等. 不同药剂对烟草赤星病和靶斑病的防控效果 [J]. *农技服务*, 2022, 39(5): 50-53.
- [24] 吴元华. 烟草赤星病和靶斑病生防菌的筛选及应用效果 [C] //中国植物病理学会 2015 年学术年会论文集. 海口, 2015: 235.
- [25] 黄宁, 周建云, 赵一君, 等. 烟草靶斑病病原鉴定及室内药剂毒力测定 [J]. *山地农业生物学报*, 2023, 42(3): 70-75.
- [26] 莽春霞. 烟草靶斑病生防链霉菌的鉴定、作用机理及应用研究 [D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2016.
- [27] 尹秀娟, 肖艳松, 李思军, 等. 防治烟草靶斑病复配增效配方筛选及田间防效 [J]. *农药*, 2022, 61(6): 453-457.
- [28] AHSAN T, CHEN J G, ZHAO X X, et al. Extraction and Identification of Bioactive Compounds (Eicosane and Dibutyl Phthalate) Produced by *Streptomyces strain* KX852460 for the Biological Control of *Rhizoctonia solani* AG-3 Strain KX852461 to Control Target Spot Disease in Tobacco Leaf [J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 1-9.
- [29] 陈丹阳, 甘勇, 张万金, 等. 烟草靶斑病拮抗菌的筛选鉴定及抗性研究 [J/OL]. *四川农业大学学报*, (2022-10-21) [2023-03-30]. <https://www.cnki.com.cn/Article/CJFDTOTAL-SCND20221019000.htm>.
- [30] 陈旭, 齐凤坤, 康立功, 等. 实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用 [J]. *东北农业大学学报*, 2010, 41(8): 148-155.
- [31] HARIHARAN G, PRASANNATH K. Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: a Mini Review [J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 10: 600234.
- [32] 刘美, 王毓洪, 彭斌, 等. 黄瓜绿斑驳花叶病毒实时荧光定量 PCR 检测体系的建立 [J]. *植物保护学报*, 2022, 49(4): 1063-1070.
- [33] 谢中玉, 王晓强, 沈宏, 等. 烟草赤星病菌实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *烟草科技*, 2021, 54(7): 11-16.

- [34] ZHAO Y Q, WU Y H, ZHAO X X, et al. The Establishment of Taqman Probe Real-Time PCR for the Detection of *Rhizoctonia solani* AG-3 in tobacco [J]. Acta Tabacaria Sinica, 2016, 22(1): 101-107.
- [35] 韦学锋, 张坚, 刘昌云, 等. 一种侵染薇甘菊的中国胜红蓟黄脉病毒 DNA-A 基因组特征及重组分析 [J]. 植物保护学报, 2021, 48(3): 638-644.
- [36] 邓浏平, 陈怡璇, 傅雪平, 等. 烟草靶斑病致病机理及防治技术研究进展 [J]. 湖南农业科学, 2021(3): 114-118.
- [37] 邹海露. 湖南烟草靶斑病病原鉴定与生防菌筛选 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2021.
- [38] RAJ KUMAR K P, VIGNESH P, SHANTHINIE A, et al. In-Silico Analysis and Functional Characterization of *Rhizoctonia solani* Effector Proteins [J]. International Journal of Plant & Soil Science, 2022: 1110-1117.
- [39] 邱梦娟, 黎妍妍, 徐婷婷, 等. 湖北省烟草靶斑病病原鉴定及其菌丝融合群遗传分化研究 [J]. 中国烟草科学, 2022, 43(5): 50-55.
- [40] 陈媛媛, 谭海文, 卢燕回, 等. 广西烟草立枯病菌和靶斑病菌菌丝融合群初步分析 [J]. 广东农业科学, 2016, 43(10): 106-111, 2.
- [41] SUN M L, SHI C H, JU L, et al. First Report of Target Spot Caused by *Rhizoctonia solani* AG-6 in Tobacco in China [J]. Plant Disease, 2022, 106(10): 2761.
- [42] PAPAIVIZAS G C. Ecology and Epidemiology of *Rhizoctonia solani* in Field Soil [J]. Phytopathology, 1975, 65(8): 871.
- [43] PANE C, PICCOLO A, SPACCINI R, et al. Agricultural Waste-Based Composts Exhibiting Suppressivity to Diseases Caused by the Phytopathogenic Soil-Borne Fungi *Rhizoctonia solani* and *Sclerotinia minor* [J]. Applied Soil Ecology, 2013, 65: 43-51.
- [44] TSROR L. Biology, Epidemiology and Management of *Rhizoctonia solani* on Potato [J]. Journal of Phytopathology, 2010, 158(10): 649-658.
- [45] AJAYI-OYETUNDE O O, BRADLEY C A. *Rhizoctonia solani*: Taxonomy, Population Biology and Management of *Rhizoctonia* Seedling Disease of Soybean [J]. Plant Pathology, 2018, 67(1): 3-17.
- [46] OHKURA M, ABAWI G S, SMART C D, et al. Diversity and Aggressiveness of *Rhizoctonia solani* and *Rhizoctonia*-Like Fungi on Vegetables in New York [J]. Plant Disease, 2009, 93(6): 615-624.
- [47] BUDGE G E, SHAW M W, COLYER A, et al. Molecular Tools to Investigate *Rhizoctonia solani* Distribution in Soil [J]. Plant Pathology, 2009, 58(6): 1071-1080.
- [48] 赵艳琴, 吴元华, 赵秀香, 等. 应用 Taqman 探针实时荧光定量 PCR 技术检测烟草靶斑病菌 *Rhizoctonia solani* AG-3 方法的建立 [J]. 中国烟草学报, 2016, 22(1): 101-107.
- [49] 聂晓, 周婷婷, 沈煜洋, 等. 新疆泽普县小麦白粉病流行的时间动态及预测模型 [J]. 植物保护, 2022, 48(5): 54-59, 115.

责任编辑 王新娟