

姚凯文, 王成浩, 逯佳琪, 等. 基于微创组织取样检测的番茄枯萎病预警技术[J]. 江苏农业学报, 2026, 42(6): 1148-1157.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2026.06.007

基于微创组织取样检测的番茄枯萎病预警技术

姚凯文^{1,2}, 王成浩², 逯佳琪², 褚姝频³, 卢鹏³, 乐秀虎¹, 魏利辉², 邓晟²

(1.河北工程大学园林与生态工程学院, 河北 邯郸 056038; 2.江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014;
3.江苏省植物保护植物检疫站, 江苏 南京 210036)

摘要: 枯萎病是设施番茄生产中常见的土传性病害, 传统植物保护策略以预防为主, 病原菌侵染植株显症后, 目前无有效防治方法。本研究创新性采用微创穿刺取样技术, 结合环介导核酸等温扩增(LAMP)和重组酶介导核酸等温扩增(RAA)检测技术, 构建了番茄枯萎病精准检测及防治技术体系。首先, 通过无菌注射器针头在番茄茎基部穿刺获取微量维管束组织, 取样后取样植株与对照植株相比, 生长无显著差异; 其次, 在室内人工接种条件下, 通过微创组织取样方法, 结合 LAMP 和 RAA 检测技术, 可在典型症状出现前检测到植株维管束中靶标病原菌, 带菌植株阳性检出率为 47.6%, 为病害早期治疗提供了重要的时间窗口; 在此窗口期内, 及时采用三氟吡啶胺、贝莱斯芽孢杆菌 JSBV63 进行灌根处理, 两次施药后防治效果可达到 90.00% 以上, 甚至还有增绿和促进生长的效果。该微创取样+LAMP 和 RAA 检测+药剂处理, 实现了从病原菌侵染早期诊断到病害防治的一整套枯萎病防治技术体系。本研究结果丰富了维管束病害的预防与控制技术措施, 为后续作物维管束病害预防、预警和防治提供了理论依据和技术支撑。

关键词: 番茄枯萎病; 尖孢镰刀菌; 微创穿刺取样; 环介导核酸等温扩增(LAMP); 重组酶介导等温扩增(RAA)

中图分类号: S641.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2026)06-1148-10

Tomato wilt disease early warning technology based on minimally invasive tissue sampling and detection

YAO Kaiwen^{1,2}, WANG Chenghao², LU Jiaqi², CHU Shupin³, LU Peng³, LE Xiuhu¹, WEI Lihui², DENG Sheng²

(1.School of Landscape and Ecological Engineering, Hebei University of Engineering, Handan 056038, China; 2.Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 3.Plant Protection and Quarantine Station of Jiangsu Province, Nanjing 210036, China)

Abstract: *Fusarium* wilt is a common soil-borne disease in protected tomato production. Traditional plant protection

收稿日期: 2025-08-13

基金项目: 财政部和农业农村部; 国家现代农业产业技术体系资助项目(CARS-24-C-01); 江苏省农业科技自主创新基金项目[CX(23)1033]; 邯郸市科学技术研究与发展计划项目(21422012329)

作者简介: 姚凯文(2000-), 男, 山东枣庄人, 硕士研究生, 研究方向为土传病害。(E-mail) 1977814285@qq.com。王成浩为共同第一作者。

通讯作者: 乐秀虎, (E-mail) lexihu@163.com; 邓晟, (E-mail) dengsheng@jaas.ac.cn

strategies focus primarily on prevention, and there are currently no effective curative measures once plants are infected by pathogens and show consequent symptoms. In this study, we established a precision control technology system for tomato *Fusarium* wilt by employing minimal-wound puncture sampling combined with loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and recombinase-aided amplification (RAA) detection. Firstly, micro-samples of vascular bundle tissue were obtained by puncturing the stem base of tomato plants using sterile syringe needles.

Compared with non-sampled plants, sampled plants showed no significant differences in growth. Secondly, under controlled artificial inoculation conditions, using the minimally invasive tissue sampling method combined with LAMP and RAA detection technologies, the target pathogen in the plant vascular tissue could be detected before the appearance of typical symptoms. The positive detection rate of infected plants was 47.6%, providing a crucial time window for early disease treatment. Within this window, timely root drenching treatments with cyclobutrifluram and *Bacillus velezensis* strain JSBV63 achieved a control efficacy of over 90.00% after two applications, and even exhibited greening and growth-promoting effects. The combination of minimally invasive sampling, LAMP and RAA detection, and chemical/biological treatment achieved a complete technical system for *Fusarium* wilt control, spanning from early pathogen infection diagnosis to disease treatment. This study enriches the control strategies for vascular diseases and provides a theoretical foundation and technical support for the future prevention, early warning, and treatment of tomato *Fusarium* wilt and other crop vascular diseases.

Key words: tomato wilt; *Fusarium oxysporum*; minimally invasive puncture sampling; loop-mediated isothermal amplification (LAMP); recombinase-aided amplification (RAA)

番茄(*Solanum lycopersicum*)是全球重要的蔬菜作物之一,因其营养丰富、产量高、效益好且适应范围广,在农业生产中占据重要地位。据联合国粮农组织统计,全球番茄年产量超 1.8×10^8 t,中国番茄产量占比约 35%,主要分布在山东、河南、新疆等地^[1],平均每年 1 hm²可带来 1.5×10^5 元的收入。当前由于主要采用设施栽培,番茄连茬种植现象普遍,导致枯萎病、青枯病和根腐病等土传病害频发,其中,枯萎病已成为番茄生产中最具破坏性的土传病害之一,常造成20%~50%的产量损失,重发田块甚至绝收,严重制约产业可持续发展^[2-3]。

番茄枯萎病是由尖孢镰刀菌番茄专化型菌株(*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Fol)侵染引起的土传维管束病害^[4-5]。尖孢镰刀菌经常以抗逆性很强的休眠结构(厚垣孢子、菌索)或菌丝体作为初侵染源,潜伏于种子、土壤、栽培基质或植物病残体中,伺机侵染植株,病害传播途径主要包括带病原菌种子(苗)及病原菌污染的土壤、栽培基质调运和病原菌污染灌溉水流动等,病原菌通过根系伤口或自然裂口侵入并在维管束内定殖,随后通过阻塞导管或分泌果胶酶、纤维素酶等细胞壁降解酶破坏植物维管束系统,最终导致植株系统性萎蔫^[6-7]。番茄枯萎病多发生于开花结果期,病程进展因品种和栽培环境而异,通常为15~90 d。病害前期症状隐蔽,但病原菌已完成根系侵染和维管束定殖;显症初期,植株矮小,长势衰弱,老叶在中午萎蔫、早晚恢复,随着病程推进,新生叶片也陆续出现萎蔫症状,最终导致整株叶片萎蔫枯黄或全株早衰^[8]。因此,枯萎病的预防与控制需在症状出现前及时开展。

目前,基于DNA扩增的分子诊断技术已取得长

足发展,如聚合酶链式反应(PCR)、实时荧光定量PCR(qPCR)、环介导等温扩增(LAMP)、重组酶聚合酶扩增(RPA)及重组酶介导等温扩增(RAA)等,被广泛应用于植物病原体的检测与鉴定。其中,LAMP技术与RAA(或RPA)技术因对仪器设备要求低、反应速度快、操作简便、结果可肉眼判定等优势,已成为当前重要的微生物检测技术^[9-10]。在作物常见维管束病害诊断及对应病原菌检测方面,已有大量基于LAMP和RAA(或RPA)方法的相关研究。Kato等^[11]通过靶向病原菌的Han和Skippy转座子序列,建立了针对尖孢镰刀菌草莓专化型的LAMP检测体系;Hu等^[12]靶向CYP51C基因,建立了草莓枯萎病的RPA快速诊断技术。本研究团队前期针对莲藕腐败病,靶向病原菌线粒体基因组的特异性DNA序列,建立了可快速鉴别尖孢镰刀菌与裸胞壳镰刀菌的LAMP及PCR检测方法^[13]。

尖孢镰刀菌从作物根系侵染后,定殖于作物木质部维管束系统,并在其中繁殖,分生孢子随蒸腾流由下至上扩散到整个植株,因此,茎基部维管束部位常含有较高的病原菌量^[14]。基于这一特点,受临床医学活检穿刺取样技术的启发^[15],本研究拟建立作物维管束活体微创取样技术,可在不影响植株正常生长的前提下,于显症前5~7 d检测出被尖孢镰刀菌侵染的植株,为病害早期干预提供重要的时间窗口。在此窗口期内,通过进一步评价相关生物菌剂与化学药剂的防治效果,构建一套从微创取样、快速检测到病害防治的番茄枯萎病综合防治技术流程,以期为设施番茄生产中枯萎病及其他维管束病害的早期诊断与有效防治提供理论依据和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 番茄品种及其种植条件

番茄品种为 Money maker, 由江苏省农业科学院植物保护研究所保存。种子预处理: 精确称取 0.3 g 番茄种子 (约 100 粒), 置于无菌操作台, 先用 75% 乙醇溶液浸泡 1 min, 随后倒出乙醇, 再用无菌水漂洗 5 次, 每次漂洗时间大于 30 s, 确保完全去除乙醇, 接着将种子转移至有效氯浓度 10% 次氯酸钠溶液中浸泡 3 min, 浸泡完成后立即倒出次氯酸钠溶液, 再用无菌水漂洗 5 次, 每次间隔 1 min, 最后用无菌滤纸吸干表面水分, 随后将种子播种于底部打孔 (孔径 5 mm) 的纯蛭石育苗杯中, 每杯播种 2 粒, 播种深度控制在 8~10 mm, 环境温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 空气相对湿度 70%~80%, 保持基质含水量在 30%~60%; 光暗周期为 12 h 光照/12 h 黑暗, 光照度 10 000 lx, 至长出真叶后, 每隔 14 d 浇灌 1 次营养液 (营养液配方: 全氮 200.0 $\mu\text{g/mL}$, P_2O_5 200.0 $\mu\text{g/mL}$, K_2O 200.0 $\mu\text{g/mL}$, 以及 B 1.5 $\mu\text{g/mL}$, Fe 1.5 $\mu\text{g/mL}$, Mn 1.0 $\mu\text{g/mL}$, Zn 1.0 $\mu\text{g/mL}$, Cu 0.5 $\mu\text{g/mL}$)。

1.2 供试培养基

马铃薯葡萄糖液体培养基 (PDB) 按照以下比例进行配制: 马铃薯 (去皮) 200 g, 切成厚度约为 5 mm 的小片, 加入适量纯水煮沸 25 min (确保马铃薯完全软化), 随后用双层纱布过滤, 取滤液加入 20 g 葡萄糖并搅拌至完全溶解, 最后补加纯水定容至 1 000 mL, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min。在上述灭菌前的 PDB 培养基中加入质量体积比为 2% 的琼脂粉, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min 后, 得到马铃薯琼脂培养基 (PDA)。

1.3 病原菌菌株的保存及活化

供试菌株: LYG 9-1, 分离自连云港的番茄病株, 经鉴定为尖孢镰刀菌番茄专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*) 小种 3 号 (race 3), 该菌株以分生孢子形态悬浮于终浓度为 25% 的甘油中, 于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境中长期保存。取适量甘油保存的 LYG 9-1 菌株, 接种至 PDA 平板, 置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中暗培养 3 d 后备用。

1.4 尖孢镰刀菌孢子液的制备及接种

1.4.1 孢子液制备 在超净工作台, 采用 6 mm 无菌打孔器, 从活化后的尖孢镰刀菌菌落边缘切取 3 块等量菌丝块, 分别转移至装有 100 mL PDB 培养

基的 250 mL 容量的三角瓶中, 置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温振荡培养箱中 180 r/min 振荡培养 72 h。将振荡培养后的液体培养物用两层灭菌纱布过滤, 去除菌丝体, 收集含分生孢子的滤液并转移至 50 mL 离心管中, 于室温下 4 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 重复上述过滤、离心步骤, 直至收集完所有分生孢子。用适量无菌蒸馏水悬浮沉淀的分生孢子, 采用血球计数板在显微镜 (物镜, $\times 20$) 下进行孢子计数, 根据计数结果加入无菌水, 将孢子液中孢子含量调整至 $1\text{ mL } 1\times 10^6$ 个孢子, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光保存, 备用。

1.4.2 植物接种 选取出苗后 30 d, 具有 2 片真叶的健壮番茄幼苗进行接种。向每株番茄幼苗的茎基部栽培基质中, 缓慢浇灌 30 mL 上述孢子含量的孢子悬浮液 ($1\text{ mL } 1\times 10^6$ 个孢子), 对照以等量无菌水处理。

1.5 番茄植株的取样及检测分析

1.5.1 样品采集 番茄幼苗接种尖孢镰刀菌孢子液后, 分别在第 7 d、第 14 d、第 21 d、第 28 d、第 35 d 对番茄植株进行拍照记录。采集时, 在距离土壤表面 1 cm 处使用无菌注射器针头 (针头直径 1.2 mm、长 38.0 mm) 小心穿透待测植株茎秆, 由于机械力, 部分茎秆组织会附着在针头内, 此时需小心将附着在针头内的茎秆组织转移至 1.5 mL 离心管中, 然后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存, 或暂存于干冰中备用。所有注射器针头均为单株专用, 操作过程中需避免接触其他植株及环境污染物, 并对废弃针头进行妥善处置。

1.5.2 核酸提取 从 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱或干冰中取出样品, 使用预冷的无菌研磨杵快速将样品研磨至粉末状, 加入 150 μL 核酸提取缓冲液 (Buffer), 该缓冲液组成为 20.0 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、pH 8.0、25.0 mmol/L 氯化钠 (NaCl)、2.5 mmol/L 乙二胺四乙酸 (EDTA) 及 0.05% 十二烷基硫酸钠 (SDS)。将离心管置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱或干冰上冷冻, 随后进行 2 次冻融循环, 确保细胞壁完全破碎。取新的 1.5 mL 离心管, 依次加入 36 μL 磁珠溶液 (诺唯赞生物科技股份有限公司产品) 和 20 μL 冻融上清液, 轻弹混匀后静置 5 min, 将离心管置于磁吸架上, 待溶液澄清后移除上清液, 向离心管中加入 200 μL 70% 乙醇溶液, 将离心管重新置于磁吸架上, 待溶液澄清后尽可能移除上清液, 重复该洗涤步骤 1 次。将离心管留在磁吸架上静置 5~10 min, 待乙醇

基本挥发完后,加入 30 μL Tris-HCl 溶液,其中 Tris 浓度为 10 mmol/L、pH 8.0,轻弹混匀并采用低转速离心,静置 5 min。最终,将 25 μL 澄清溶液转移至新的 PCR 管中,作为后续 LAMP/RAA 检测的模板。

1.5.3 等温扩增检测 LAMP 反应所用的 Bst DNA polymerase large fragment DNA 聚合酶购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司,反应缓冲液、检测引物

(表 1)以及反应所需条件参照文献[13],反应温度 62 $^{\circ}\text{C}$,反应时间 90 min,其他条件参照试剂说明书。RAA 核酸扩增试剂盒购于江苏奇天基因生物科技有限公司,所用 RAA 引物详见表 2,反应体系显色的 HybriDetect 胶体金试纸条购于安普未来(常州)生物科技有限公司,反应温度 37 $^{\circ}\text{C}$,其他条件参照试剂盒说明书。

表 1 尖孢镰刀菌环介导等温扩增(LAMP)引物

Table 1 Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers for *Fusarium oxysporum*

引物名称	引物序列(5'→3')
Lamp-Fo3-1-FIP	CCGAAGCTTAGCTTATAGTTAGCTAATATTTTTGTTTTGACTAAATCTAGTCACCA
Lamp-Fo3-1-BIP	ATGACTATAGGTAAGCTATTACTACTAAGTTTTTTCACCTTAGGATAAATTGTTATTGTTTC
Lamp-Fo3-1-LB	GTTTATATTGAGGAAAGTTATAAT
Lamp-Fo3-1-LF	CCAGTAATTTCTGTAATAGCGGTAG
Lamp-Fo3-1-F3	AACAGTAGCATATTATCTGTGC
Lamp-Fo3-1-B3	GCTATAGCTTACTATTTCTACCAG

表 2 尖孢镰刀菌重组酶介导等温扩增(RAA)引物

Table 2 Recombinase-aided amplification (RAA) primers for *Fusarium oxysporum*

引物名称	引物序列(5'→3')
FoRAA-F3	CATATTATCTGTGCTGTTTTGACTAAATCTAG
FoRAA-R2	CCTTAGGATAAATTGTTATGTTTCATTATAA
RAA-Fo3-R3L2-Pro2	/i6FAM-dT/CTACCGCTATTACAGAAATTACTGGTATTA/idSp/CTAACTATAAGCTAA/iSpC3/

1.6 茎秆横截面采集与观察方法

对照植株和接种尖孢镰刀菌植株分别在接种后的第 7 d、第 14 d、第 21 d、第 28 d、第 35 d 和明显显症后采集茎秆横截面进行观察和记录。茎秆横截面采集方法:在无菌穿刺取样位点上方 5 mm 处,使用无菌手术刀截取 3 cm 长的茎秆,每次分别采集 3 株对照植株和 3 株处理植株。将采集的茎秆带回实验室,进一步横切为 1.0 mm 厚的横截面薄片。将薄片置于载玻片上,采用 Leica DFC 7000T 摄像头和 Leica M205FA 体视显微镜观察维管束褐变情况并拍照记录。

1.7 药剂处理

在番茄接种尖孢镰刀菌后第 28 d,选择 2 种药剂分别对接种植株和对照植株进行灌根处理(表 3),处理药剂包括 1g 1×10^9 个活菌的贝莱斯芽孢杆菌(*Bacillus velezensis*) JSBV63 可湿性粉剂(江苏

省农业科学院植物保护研究所研制)和 450 g/L 三氟吡啶胺悬浮剂(先正达作物保护有限公司产品),每个药剂处理不少于 3 株,共进行 2 次生物学重复。

1.8 植株病情指数分析

本研究以阴性对照和阳性对照作为各处理的参照。其中,阴性对照病情指数代表健康植株在自然生长过程中,因自然衰老导致的叶片变黄和脱落现象的统计值,并非病原菌接种后病害严重度的统计结果;所有处理植株均存在自然衰老现象,引入阴性对照可有效区分自然衰老与病原菌侵染导致的症状。

根据《番茄主要病害抗病性鉴定技术规程 第 3 部分:番茄抗枯萎病鉴定技术规程》方法(NY/T 1858.3-2010)统计病害发病等级(表 4),并按照公式(1)和公式(2)计算病情指数和防治效果。

表 3 防治番茄枯萎病不同药剂及其处理方法

Table 3 Different pesticides and their treatment methods for controlling tomato blight

接种病菌	药剂	药剂配制及处理方法
人工接种尖孢镰刀菌	贝莱斯芽孢杆菌(<i>Bacillus velezensis</i>)可湿性粉剂	取 10 g 贝莱斯芽孢杆菌可湿性粉剂用 300 mL 纯水悬浮,混匀后每株苗浇灌 30 mL
	三氟吡啶胺悬浮剂	取 12 mL 三氟吡啶胺悬浮剂用 1 000 mL 纯水稀释,混匀后每株苗灌根 30 mL
	无菌水灌根(阳性对照)	每株苗浇灌清水 30 mL
未接种对照	无菌水灌根(阴性对照)	每株苗浇灌清水 30 mL

表 4 番茄枯萎病病情调查等级划分标准

Table 4 Classification criteria for tomato wilt disease survey

病级	症状描述
0 级	无症状
1 级	1~2 片子叶明显变黄、脱落
2 级	1~2 片真叶变黄或全株叶片变成黄绿色,叶片下垂呈轻微萎蔫
3 级	全株明显萎蔫或叶片严重变黄,植株生长受阻、稍矮化
4 级	全株叶片严重萎蔫甚至枯死

病情指数 = $\Sigma(\text{各病级株数} \times \text{各病级级数}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高病级级数}) \times 100$ (1)

防治效果 = $(\text{阳性对照植株病情指数} - \text{处理区病情指数}) / \text{阳性对照植株病情指数} \times 100\%$ (2)

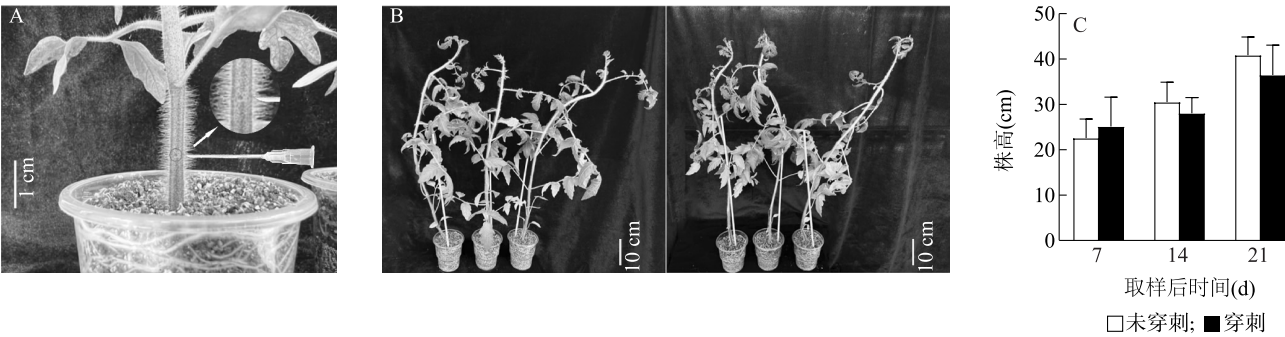
1.9 数据统计

采用 Excel 2016 软件对试验数据进行分析处理;用 GraphPad Prism 10.1.2 软件绘制图表。

2 结果与分析

2.1 微创穿刺取样后番茄植株生长情况

番茄种子出芽后 30 d 使用无菌医用注射器针头,在距离栽培基质 1 cm 处对植株茎秆进行单点穿刺取样(图 1A)。穿刺取样后第 35 d 观察穿刺植株和对照植株的生长情况并拍照。结果(图 1B、图 1C)表明,穿刺取样组与未取样对照组的所有植株均未发生死亡,穿刺取样后第 7 d、第 14 d 和第 21 d,穿刺植株平均株高分别为 25.12 cm、28.03 cm 和 36.46 cm,与未穿刺对照植株株高无显著性差异($P>0.05$)。



A: 番茄茎秆微创取样示意图;B: 穿刺与未穿刺番茄植株生长情况;C: 穿刺与未穿刺取样后番茄植株平均株高。

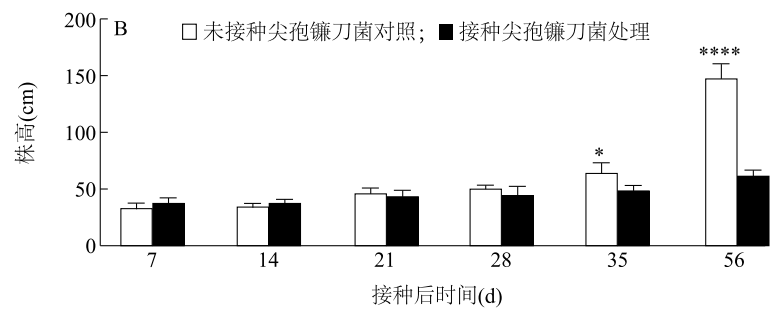
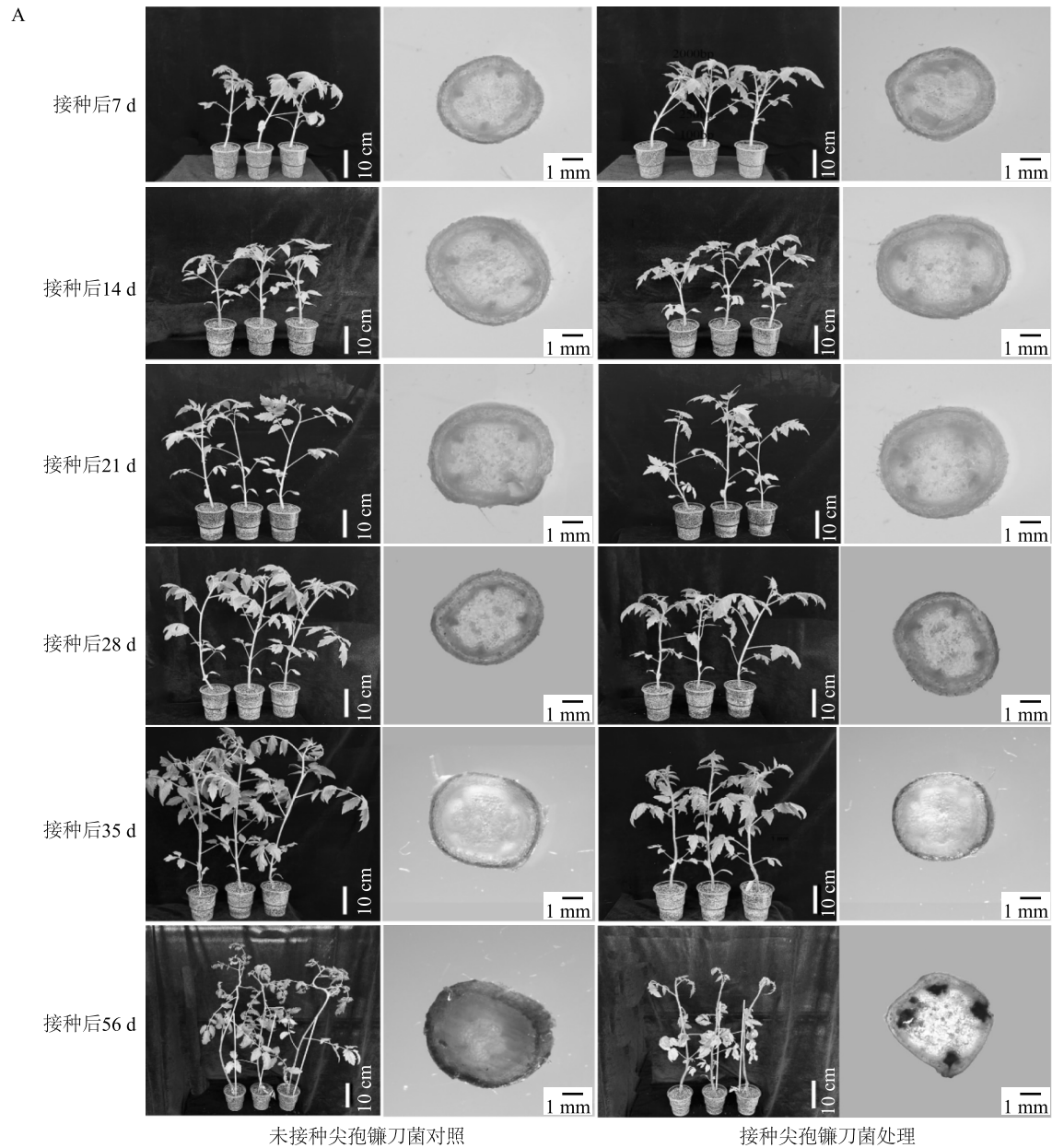
图 1 番茄茎秆微创取样及其对植株生长的影响

Fig.1 Minimally invasive sampling from tomato stems and its effects on plant growth

2.2 接种尖孢镰刀菌对番茄表型及维管束的影响

从图 2 可知,在环境温度为(25±2)℃,空气相对湿度70%~80%,栽培基质含水量为30%~60%的培养条件下,番茄植株在接种尖孢镰刀菌后的 28 d 内,与未接种的对照植株相比无显著差异($P>0.05$);接种后第 35 d,植株开始相继出现枯萎病的

典型症状,包括株高显著低于对照,茎基部叶片提前早衰黄化。番茄枯萎病显症后,除了表现出地上部叶片黄化萎蔫、植株矮化等,还会表现出茎基部维管束组织褐变,同时病原菌的数量也会在其中大量积累。在接种后第 56 d,植株枯萎病症状更加明显,维管束组织也明显褐变。



A: 未接种尖孢镰刀菌对照与接种尖孢镰刀菌处理番茄表型特征及植株维管束内的变化; B: 未接种尖孢镰刀菌对照与接种尖孢镰刀菌处理番茄植株平均株高。同一接种后时间图柱上 * 表示处理间差异显著 ($P < 0.05$); **** 表示处理间差异极显著 ($P < 0.0001$)。

图2 接种尖孢镰刀菌后番茄植株长势与茎秆横截面

Fig.2 Growth of tomato plants and cross-sections of stems after inoculation with *Fusarium oxysporum*

2.3 接种尖孢镰刀菌植株 LAMP 和 RAA 的检测结果

番茄植株接种尖孢镰刀菌后第 7 d、第 14 d、第 21 d、第 28 d 和第 35 d, 分别进行茎秆微创组织取样和 DNA 快速提取, 然后用 LAMP 和 RAA 检测体系对相关样本进行病原菌检测。结果(图 3A)表明, 接种后第 7 d 和第 14 d 的样本中 LAMP 未检出含有靶标病原菌 DNA 的阳性样本; 从第 21 d 至第 35 d 样本 LAMP 检测结果可知, 阳性检出率随时间推移呈快速增加趋势, 具体表现为第 21 d 检出率 19.00%、第 28 d 检出率 47.60%、第 35 d 检出率 61.90%。此外, 在接种后的第 35 d, 采用更灵敏的 RAA 对第 3 次生物学重复的 7 株番茄样品进行检测, 结果(图 3B)发现其中 6 株为阳性, 阳性检出率达 89.71%。

2.4 药剂早期处理效果

番茄植株接种尖孢镰刀菌后第 28 d 能检测出 47.60% 的植株携带尖孢镰刀菌, 但没有明显的发病症状。本研究尝试在此窗口期用不同药剂进行干预处理, 接种尖孢镰刀菌后第 28 d 进行第 1 次药剂处理, 药剂处理后第 20 d (即接种尖孢镰刀菌后第 48 d) 进行第 1 次病情指数调查以及药剂防治效果统计; 第 1 次药剂处理后第 21 d 进行第 2 次药剂处理, 第 2 次药剂处理后 20 d (即接菌后第 69 d) 再次进行病情指数调查以及药剂防治效果统计(表 5)。从表 5 可知, 第 2 次调查结果, 阳性对照的番茄植株生长势弱, 整体叶片黄化, 部分植株已经完全枯死, 病情指数为 83.33%; 三氟吡啶胺处理的植株整体长势较好, 叶片较绿, 病情指数为 8.33%, 防治效果为 90.00%; 贝莱斯芽孢杆菌 JSBV63 处理的植株生长势较强, 且叶片多为绿色, 病情指数为 0, 防治效果为 100.00%。总体而言, 化学药剂三氟吡啶胺处理、生物药剂贝莱斯芽孢杆菌 JSBV63 处理均表现出较好的防治效果, 其生长势好于阴性对照, 有促进生长和延缓衰老的效果(图 4)。

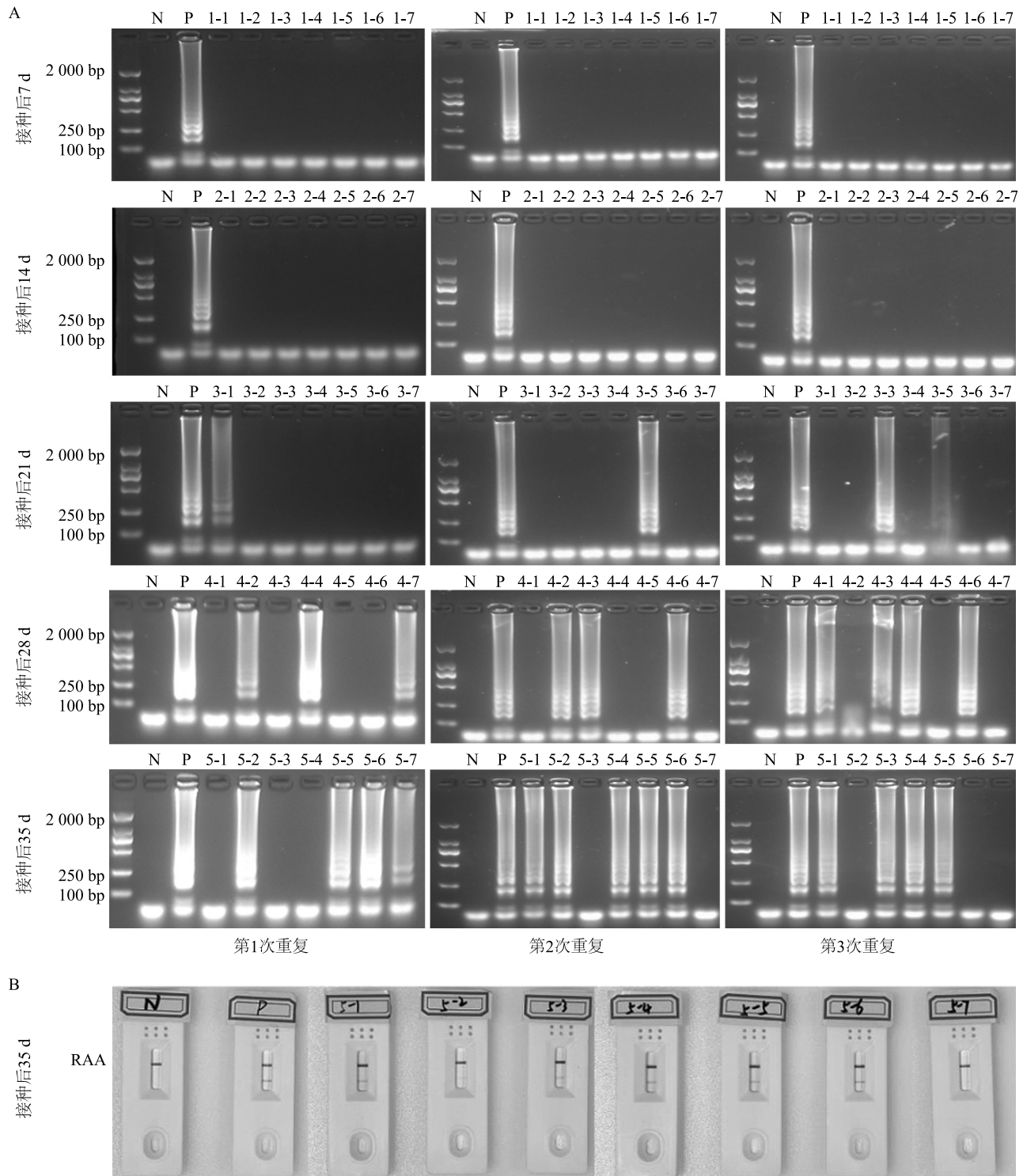
3 讨论

番茄枯萎病是设施番茄生产中一种重要的土传病害, 与地上部病害相比, 其发生初期症状隐蔽, 病原菌自根系侵染后通常需 15~90 d 才能表现出明显表型症状。传统的诊断方法主要依赖于显症植株的表型特征观察及病原物的分离与鉴定, 不仅对操作人员的田间经验与操作技术有较高要求, 还受限于症状显现的滞

后性, 加之病原菌分离周期较长(约 3~7 d), 待确诊时往往已错过最佳防治窗口期, 即使施药处理也难以实现有效控制, 显症植株难以恢复, 产量损失不可避免, 严重制约番茄优质高产与产业可持续发展。

基于上述问题和土传病害前期的隐蔽性, 本研究试图建立一种在作物种植后、病害显症前, 对植株进行靶标病原菌快速检测的技术体系, 以实现带菌植株的有效治疗。Ayukawa 等^[16]通过靶向 *SIX4* 和 *SIX5* 基因 DNA 序列, 建立了鉴别尖孢镰刀菌番茄专化型菌株及其 1 号生理小种(race 1)的 LAMP 体系, 并实现了用无菌牙签从植株的维管束组织内挑取微量组织进行检测的方法。不过, 在该方法中待检测植物样品都是从田间采集的植株上切割或剥离后离体取样, 被鉴定的植株已经失去再生长能力。受该研究的启发, 并结合临床医学微创穿刺取样方法^[15], 本研究基于 LAMP 和 RAA 两种分子快速检测平台, 建立了一种高效、低损伤的检测方法。在不影响植株正常生长的前提下, 可在番茄枯萎病显症前 5~7 d 精准识别维管束中是否存在尖孢镰刀菌, 为病害早期防治提供了重要的时间窗口。在此窗口期内, 本研究进一步评价了相关生物菌剂和化学药剂的防治效果, 形成了从微创取样、快速检测到病害防治的一整套番茄枯萎病防治技术流程, 其中, 从植株微创取样到检测结果判定在 2 h 左右即可完成, 为后续病害的及时预警和感染植株的快速筛查奠定了基础。

本研究选择 2 种药剂作为尖孢镰刀菌防治应急性药剂, 包括对该病原菌有特效的三氟吡啶胺^[17], 以及贝莱斯芽孢杆菌 JSBV63 可湿性粉剂。JSBV63 可湿性粉剂由江苏省农业科学院植物保护研究所蔬菜病害防控创新团队研发, 前期在大蒜叶枯病和紫斑病上表现出了较好的防治效果^[18]。本研究发现, 番茄枯萎病显症前(人工接种后 28 d 内)使用三氟吡啶胺或 JSBV63 菌剂灌根处理, 对该病具有很好的防治效果, 可有效阻断病害发展进程, 持续确保病原菌接种后 60 d 以上不表现任何发病症状, 但是否达到治愈程度, 后续还需要通过大田试验完成全生育期的验证。本研究在人工接种温室环境下完成[环境温度为 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$, 空气相对湿度为 70%~80%, 栽培基质含水量为 30%~60%], 大田不同种植模式(设施、露天以及大规模无土栽培)、不同番茄品种等复杂情况下的效果以及用药关键窗口期和用药剂量都需要进一步探索。



A:接种尖孢镰刀菌后定期 LAMP 检测结果;B:接种后第 35 d RAA 检测结果。RAA 检测中仅有 C 线显色表明未检测到靶标病原菌,T 线和 C 线同时显色表明存在靶标病原菌。N 代表阴性对照,P 代表阳性对照。1-1 至 1-7、2-1 至 2-7、3-1 至 3-7、4-1 至 4-7、5-1 至 5-7 分别代表接种尖孢镰刀菌的 7 株番茄植株。

图 3 番茄植株接种尖孢镰刀菌后环介导等温扩增 (LAMP) 和重组酶介导等温扩增 (RAA) 检测结果

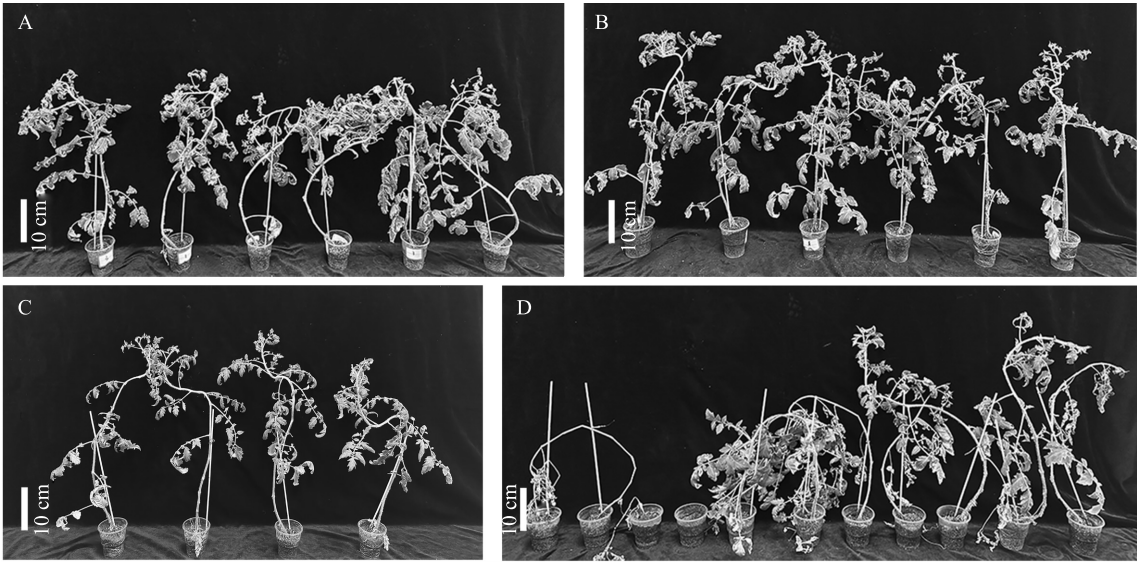
Fig.3 Results of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) and recombinase-aided amplification (RAA) assays for the detection of *Fusarium oxysporum* in tomato plants after inoculation

表 5 不同处理对番茄植株病情指数及防效的影响

Table 5 Effects of different treatments on disease index and control efficacy in tomato plants

处理	第 1 次调查病情指数 (第 1 次药剂处理后 20 d)	第 1 次用药防效 (%)	第 2 次调查病情指数 (第 2 次药剂处理后 20 d)	第 2 次用药 防效(%)
人工接种尖孢镰刀菌+贝莱斯芽孢杆菌 JSBV63 悬浮液灌根	16.67	65.21	0	100.00
人工接种尖孢镰刀菌+三氟吡啶胺悬浮剂灌根	12.50	73.91	8.33	90.00
人工接种尖孢镰刀菌+无菌水灌根(阳性对照)	47.92	—	83.33	—
未接种尖孢镰刀菌+无菌水灌根(阴性对照)	18.75	—	31.25	—

阴性对照病情指数代表的是健康植株生长过程中自然衰老所导致的叶片变黄和脱落的现象统计值,并非病原菌接种植株后的病害严重度统计值。



A:人工接种尖孢镰刀菌植株应用三氟吡啶胺灌根;B:人工接种尖孢镰刀菌植株应用贝莱斯芽孢杆菌 JSBV63 灌根;C:无菌水灌根(阴性对照);D:人工接种尖孢镰刀菌植株应用无菌水灌根(阳性对照)。

图 4 不同处理番茄植株的生长情况

Fig.4 Growth of tomato plants under different treatments

土传病害的预防和控制涉及土壤、水源、种苗、栽培基质等多种潜在带菌农业生产要素,因此亟需建立一套立体的、多维度的预警和管控技术体系,以指导精准用药,最终实现土传病害可预警、可预防,乃至早期诊断后的可治愈目标。当前番茄枯萎病预防与控制措施以种植前土壤消毒及种植抗病品种为主^[3],辅以化学药剂或生物菌剂灌根处理。本研究结果可为后续番茄枯萎病以及其他作物维管束病害预警提供理论依据和技术支撑,进一步丰富维管束土传病害的综合防治技术体系。

4 结 论

本研究通过构建“微创取样-等温核酸扩增检测-药剂干预”的番茄枯萎病精准防治技术体系,实

现了病害的早期预警与有效防治。试验结果表明,采用无菌注射器针头对番茄茎基部进行微创穿刺取样,不影响植株正常生长,结合 LAMP 或 RAA 核酸检测技术,可在典型症状出现前5~7 d 检测到维管束中存在尖孢镰刀菌,阳性检出率最高可达 89.71%,为番茄枯萎病的早期防治提供了关键窗口期。在此窗口期内用三氟吡啶胺或贝莱斯芽孢杆菌 JSBV63 进行灌根处理,防治效果均达 90.00% 以上,且能维持植株健康生长。本研究结果为后续作物维管束病害预防、控制和防治提供了理论依据和技术支撑。

参考文献:

[1] 李君明,项朝阳,王孝宣,等. “十三五”我国番茄产业现状及展

- 望[J]. 中国蔬菜, 2021(2):13-20.
- [2] MCGOVERN R J. Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*[J]. Crop Protection, 2015, 73:78-92.
- [3] PANDEY A, KARNATI D, SAM NIRMALA N, et al. *Fusarium* wilt of tomato: past, present, and future [C]//Plant Pathogen Interaction Berlin, Germany: Springer, 2024:55-87.
- [4] GORDON T R. *Fusarium oxysporum* and the *Fusarium* wilt syndrome[J]. Annual Review of Phytopathology, 2017, 55:23-39.
- [5] 詹发强, 侯敏, 杨蓉, 等. 一株番茄枯萎病生防菌的鉴定、定殖与盆栽防效研究[J]. 新疆农业科学, 2013, 50(7):1277-1287.
- [6] LI J T, YANG L M, DING S Z, et al. Plant PR1 rescues condensation of the plastid iron-sulfur protein by a fungal effector[J]. Nature Plants, 2024, 10(11):1775-1789.
- [7] AWU J E, NYAKU S T, AMISSAH J N, et al. Grafting for sustainable management of *Fusarium* wilt disease in tomato production in Ghana[J]. Journal of Agriculture and Food Research, 2023, 14:100710.
- [8] 闫敏, 庞金梅, 焦晓燕, 等. 番茄枯萎病对植株维管束危害及抗氧化系统影响的研究[J]. 中国生态农业学报, 2013, 21(5):615-620.
- [9] 应淑敏, 郭俭, 王教瑜, 等. 环介导等温扩增技术在植物病原体检测中的应用[J]. 植物保护学报, 2020, 47(2):234-244.
- [10] 马文娣, 田逸英, 焦志远, 等. 重组酶聚合酶扩增技术在植物病原快速检测中的应用[J]. 植物保护, 2021, 47(3):1-5, 13.
- [11] KATOH H, YAMAZAKI S, FUKUDA T, et al. Detection of *Fusarium oxysporum* f.sp.*fragariae* by using loop-mediated isothermal amplification[J]. Plant Disease, 2021, 105(4):1072-1079.
- [12] HU S D, YAN C Y, YU H, et al. Establishment of the recombinase polymerase amplification-lateral flow dipstick detection technique for *Fusarium oxysporum*[J]. Plant Disease, 2023, 107(9):2665-2672.
- [13] DENG S, MA X, CHEN Y F, et al. Lamp assay for distinguishing *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* in lotus (*Nelumbo nucifera*) rhizomes[J]. Plant Disease, 2022, 106(1):231-246.
- [14] 高晓敏, 王璐钢, 马立国, 等. 尖孢镰刀菌致病机理和化感作用研究进展[J]. 微生物学通报, 2014, 41(10):2143-2148.
- [15] 范艳蕾, 李中跃. 肝穿刺活检在儿童遗传代谢性肝病中的诊断价值[J]. 中国实用儿科杂志, 2024, 39(7):544-548, 554.
- [16] AYUKAWA Y, KOMATSU K, KASHIWA T, et al. Detection and differentiation of *Fusarium oxysporum* f.sp.*lycopersici* race 1 using loop-mediated isothermal amplification with three primer sets[J]. Letters in Applied Microbiology, 2016, 63(3):202-209.
- [17] LI Y W, DAI T, TANG Y D, et al. Inhibitory activity to *Fusarium* spp. and control potential for wheat *Fusarium* crown rot of a novel succinate dehydrogenase inhibitor cyclobutrifluram[J]. Pest Management Science, 2024, 80(4):2001-2010.
- [18] 李佳暄, 马金骏, 周冬梅, 等. 大蒜紫斑病生防菌的筛选、鉴定及其田间应用[J]. 中国生物防治学报, 2023, 39(2):389-396.

(责任编辑:黄克玲)