

我国作物病菌标准品的研究进展

杨文莉 朱梨梨 陈健 陈燕欣 姚涓 姜大刚

(华南农业大学生命科学学院, 广州 510642)

摘要: 作物在生长发育过程中, 容易受到病菌侵染, 造成巨大的经济损失。及时准确地对作物感染病菌的情况进行检测, 有助于为制定病害的防治措施提供参考依据。作物病菌标准品是作物病害检测工作中的重要参考, 在作物病菌的定性和定量检测工作中具有十分重要的地位。目前, 作物病菌标准品相关研究的报道较少, 因此有序开展作物病菌标准品的研制工作极为迫切。本文通过对作物病菌检测方法、检测标准及作物病菌标准品研究进展进行梳理总结, 以期为我国作物病菌标准品的研制提供理论参考。

关键词: 计量学; 标准品; 作物病菌; 检测方法

DOI:10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2023-0607

Research Progress in the Reference Materials of Crop Pathogens in China

YANG Wen-li ZHU Li-li CHEN Jian CHEN Yan-xin YAO Juan JIANG Da-gang

(College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: Crops are often infected by pathogenic bacteria during their growth and development stages, thus leading to huge economic losses. Timely and accurate detection for infected crop is helpful to provide reference for formulation of disease prevention and control methods. The reference materials of crop pathogens are important reference in the process of crop disease detection. They play a very important role in the qualitative and quantitative detection of crop disease. At present, there are few reports on the reference materials of crop pathogens, then it is urgent to support and develop them in an orderly manner. In this literature, we summarize the research progress of crop pathogen detection methods, detection standards and crop pathogen reference materials, aiming to provide theoretical direction for study on reference material of crop pathogens in China.

Key words: metrology; standards; plant pathogens; detection methods

作物在生长发育过程中容易受到病菌感染, 导致其生长状况、产量和品质受到影响。为控制病菌传播速度, 减少病菌对农作物的侵害, 及时准确地检测出染病的植株极为重要。传统的病菌检测方法主要通过观察染病植株和菌群的表征进行诊断, 存在检测滞后、成本高、灵敏度低等问题, 影响对作物病害的控制。近年来, 分子检测技术在作物病菌检测工作上的应用和发展, 极大地缩短了检测时间, 提高了检测灵敏度, 对病害的感染情况能够更及时

的掌握。国内相关监管部门陆续出台了分子检测标准与方法, 以规范和促进作物病菌检测工作的进行。在作物病菌的分子检测工作中, 标准品可为检测结果提供可靠的参考值, 提高检测结果的可靠性和精准性。

根据中华人民共和国国家标准《标准样品工作导则第2部分: 常用术语及定义》(标准号: GB/T 15000.2—2019) 及中国合格评定国家认可委员会 (CNAS)《标准物质/标准样品生产者能力认

收稿日期: 2023-06-27

基金项目: 农业生物育种重大项目 (2023ZD04062)

作者简介: 杨文莉, 女, 硕士研究生, 研究方向: 农业生物技术与标准物质; E-mail: 879404571@qq.com

通讯作者: 姜大刚, 男, 博士, 副研究员, 研究方向: 农业标准物质及转基因检测; E-mail: dagangj@scau.edu.cn

可准则》(标准号: CNAS-CL04)指出,标准品是指适用于计量或检测中,已被确定其符合测量过程的、具有高度均匀性和稳定性的材料^[1]。标准品主要用于测量系统的校准、测量程序的评估和质量控制等几个方面^[2-3]。在全球范围内,美国国家标准与技术研究院(National Institute of Standards and Technology, NIST)、澳大利亚国家检测研究所(National Measurement Institute, Australia, NMIA)、中国计量科学研究院(National Institute of Metrology, China, NIMC)等多所专业机构已经开展标准品的研制^[4]。经过多年发展,许多标准品已经被成功研制并投入使用。但作物病菌标准品方面的相关研制依然较少,不利于我国开展对作物病害的检测防治工作。本文通过对作物病菌检测方法、检测标准及作物病菌标准品研究进展进行梳理总结,以期为我国作物病菌标准品的研制提供参考。

1 作物病菌及其检测方法

作物病菌主要可以分为细菌、真菌和病毒3种^[5]。作物感染病菌后,会出现变色、坏死、萎蔫、腐烂和畸形等症状。真菌感染存在易复发、传播性强等问题,需要对受感染的作物进行及时的追踪检测和治疗。病毒感染具有隐秘性强、传播性强、表征不明显等特点,通常无法及时发现并给予相对应的措施。据不完全统计,在全世界范围内,由于作物感染病菌导致的直接或者间接的经济损失高达400亿美元/年^[6]。也有相关研究发现,在全球气候变暖的环境影响下,土壤中作物潜在病原体的相对丰度会增加,使作物更容易感染病菌^[7-8]。基于作物病菌对农业生产造成的危害,在《中华人民共和国农业农村部公告第351号》中,有15种病菌被列入了《全国农业植物检疫性有害生物名单》和《应施检疫的植物及植物产品名单》,其中细菌7种,真菌6种,病毒3种(表1)。例如,瓜类果斑病菌(bacterial fruit blotch, BFB)是一种严重的细菌性病害,该病菌可以侵染西瓜、甜瓜、南瓜、葫芦等葫芦科植物,使果实形成暗褐色病斑,后逐渐发展形成黑褐色坏死斑,最终导致腐烂,影响葫芦科植物产品质量及产量,造成巨大的经济损失,已成为影响我国葫芦科植物农产品生产的主要病害之一^[9]。玉米褪绿斑

驳病毒(maize chlorotic mottle virus, MCMV)侵染玉米后会导致作物坏死,玉米产量下降,是我国禁止入境的检疫性有害生物之一^[10]。对于病菌引起的作物病害,在生产上可以通过作物轮作、使用抗性品种等方法降低作物病菌感染^[11],但无法在病害出现之前发现作物的感病情况。因此对作物感染病菌早期进行及时准确的检测,可以为作物病害防治工作提供参考,减少经济损失。

目前,常用的作物病菌检测方法主要包括形态学、微生物学、生化鉴定以及分子检测等。其中,传统的方法是根据作物的生理状态如枯萎、溃烂等症状进行初步的判断,再通过分离病菌,观察病菌的形态做出诊断^[12-13]。虽然这些方法应用广泛,但需要诊断者具备一定的专业知识,具有比较大的主观性和不确定性;而且对于难以在体外培养的致病微生物(如病毒),鉴定难度大。为此,需要一种高效的方法,对感病的植株进行及时准确的检测。分子检测技术具有准确性好、检测速度快等优点,在作物病菌检测中应用越来越广泛。李兴红等^[14]通过酶联免疫吸附(enzyme-linked immune sorbent assays, ELISA)的方法对辣椒轻斑驳病毒(pepper mild mottle virus, PMMoV)进行检测,谯天敏等^[15]通过巢式聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)检测桉树焦枯病。近年来实时荧光定量PCR(quantitative real-time polymerase chain reaction, qPCR)、数字PCR(digital PCR, dPCR)等分子检测技术,也被运用到作物病菌检测工作中^[16]。高艳玲等^[17]建立了苜蓿花叶病毒(alfalfa mosaic virus, AMV)的RT-PCR和RT-qPCR检测体系,可用于检测马铃薯组织中及蓟马和蚜虫体内的苜蓿花叶病毒;李辉等^[18]建立了多年明孢盘菌(*N. perennans*)导致的苹果牛眼果腐病微滴式数字PCR检测体系,实现对该病原菌的高效、高精度检疫鉴定。dPCR作为一种新的核酸定量技术,其不依赖于标准曲线可以对靶标基因的拷贝数进行绝对定量,具有灵敏度高、结果精准等优势。将dPCR应用于作物病菌检测工作,可以使结果更加准确可靠,具有广泛的应用前景^[19-20]。《柑橘黄龙病菌数字PCR检测》(标准号: DB 44/T 2220-2019)的出台,将dPCR技术应用到实际检测工作中,在提高柑橘黄龙病菌检测工作效

表 1 部分常见作物感染病菌类型

Table 1 Types of pathogens infecting some common crops

感染作物 Infected crop	病菌名称 Name of the pathogen	病菌类型 Type of pathogen	主要症状 Main symptoms
西瓜等葫芦科植物	瓜类果斑病菌	细菌	暗褐色状病斑
柑橘等芸香科植物	柑橘黄龙病菌(亚洲种)	细菌	病根腐烂
番茄等茄科植物	番茄溃疡病菌	细菌	萎蔫、畸形
油菜等十字花科植物	十字花科黑斑病菌	细菌	淡褐色或黑褐色圆形病斑
水稻种子、秧苗、稻草	水稻细菌性条斑病菌	细菌	枯黄、条斑
梨等蔷薇科植物	梨火疫病病菌	细菌	黑褐色枯萎
黄瓜等葫芦科植物	黄瓜黑星病菌	真菌	枯萎、腐烂
香蕉芭蕉属植物	香蕉镰刀菌枯萎病菌 4 号小种	真菌	枯萎
玉米种子、秸秆	玉蜀黍霜指霉菌	真菌	枯萎
大豆种子、豆荚	大豆疫霉病菌	真菌	腐烂、枯萎
马铃薯种薯、块茎	内生集壶菌	真菌	腐烂、恶臭
苜蓿种子、饲草	苜蓿黄萎病菌	真菌	萎蔫、坏死
桃等蔷薇科植物	李属坏死环斑病毒	病毒	坏死
玉米种子、秸秆	玉米褪绿斑驳病毒	病毒	坏死
西瓜等葫芦科植物	黄瓜绿斑驳花叶病毒	病毒	枯萎、畸形

注：表中信息来源于《中华人民共和国农业农村部公告第 351 号》

Note: The information in the table is from the Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China Announcement No. 351

率和结果准确性的同时，也为 dPCR 技术应用到其他的病菌检测中提供了参考。

为了使检测过程更加规范和标准化，经查询全国标准信息公共服务平台 (<https://std.samr.gov.cn>)，我国已制定并发布超过 230 项作物病菌检测标准 (表 2)，以规范和加快在生产上的应用。在这些标准中，国家标准共 71 项，占比 30%；行业标准占比最多，共 133 项，占比 55%；地方标准有 32 项，占比 13%；另有 5 项国家标准计划，目前处于起草阶段 (图 1)。柑橘黄龙病是一种由柑橘黄龙病菌感染柑橘属、金柑属等芸香科植物，导致染病作物叶片变黄和柑橘产量下降的疾病，该病已成为影响柑橘产业最严重的病害。目前已经制定和发布了《柑桔黄龙病菌实时荧光 PCR 检测方法》(标准号：GB/T 28062-2011)、《柑橘黄龙病菌数字 PCR 检测》(标准号：DB44/T 2220-2019) 等相关检测标准，促进了柑橘黄龙病检测与防治工作的开展^[21]。水稻细菌性条斑病 (rice bacterial leaf streak, BLS) 是对水稻危害最严重的细菌性病害之一，对水稻条斑病菌进行及时的检测，可以控制病菌在水稻间的传播速度，减少经济损失^[22]。目前《水稻细菌性条斑病菌的检

疫鉴定方法》(标准号：GB/T 28099-2011) 标准的出台，对病菌信息、鉴定方法、鉴定标准等方面做出了详细的介绍，使鉴定方法更加规范化，检测结果更加准确。这些检测标准的出台对作物病菌检测工作的规范化、检测结果的标准化和可靠性有重要意义。

2 标准品与标准物质

在作物病菌检测工作中，为确保检测结果的准确性，需要标准菌株作为对照，提供参考依据。标准菌株是一种可溯源的且生物学特性稳定的标准品，在检测中起到对照菌株、培养基性能检验、试剂的标准性和设备性能检测的作用^[23]。我们查询了标准信息网 (<http://www.gbwo.org.cn>)、国家标准样品网 (<http://www.crmch.com>) 及标物中心网 (<http://www.gjwzx.cn>)，有 52 种作物病菌标准品研制成功并投入使用 (表 3)；其中，真菌标准品研制数量最多，共有 46 种，占比 88%；细菌和病毒的标准品研制较少，各只有 3 种，分别占比 6%。例如，水稻细菌性谷枯病是由伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia glumae*) 属引起水稻苗腐、鞘腐以及谷粒腐烂的细菌性病害，该病菌标准品的成功研制，有助于水稻细菌性谷枯

表 2 我国发布的作物病菌检测标准

Table 2 The published standards for the detection of crop pathogens in China

标准号 Standard code	标准名称 Standard name	标准类型 Standard type
20221857-T-469	大豆茎溃疡病菌检疫鉴定方法	国家标准计划
20221118-T-469	向日葵黑茎病菌检疫鉴定方法	国家标准计划
20221115-T-469	柑橘黄龙病菌实时荧光定量 PCR 检测技术规程	国家标准计划
20221116-T-469	葡萄苦腐病菌检疫鉴定方法	国家标准计划
20221122-T-469	小麦矮腥黑穗病菌检疫鉴定方法	国家标准计划
GB/T 28062-2011	柑橘黄龙病菌实时荧光 PCR 检测方法	国家标准
GB/T 18086-2000	植物检疫 烟霜霉菌病菌检疫鉴定方法	国家标准
GB/T 18085-2000	植物检疫 小麦矮化腥黑穗病菌检疫鉴定方法	国家标准
GB/T 40626-2021	杨树细菌性溃疡病菌检疫鉴定方法	国家标准
GB/T 40627-2021	油菜茎基溃疡病菌活性检测方法	国家标准
GB/T 40447-2021	鸭茅蜜穗病菌检疫鉴定方法	国家标准
GB/T 40453-2021	柑橘黑斑病菌检疫鉴定方法	国家标准
SN/T 3432-2012	向日葵茎溃疡病菌检疫鉴定方法	行业标准
SN/T 3435-2012	油棕枯萎病菌检疫鉴定方法	行业标准
SN/T 3423-2012	黄瓜黑色根腐病菌检疫鉴定方法	行业标准
SN/T 3675-2013	草莓花枯病菌检疫鉴定方法	行业标准
SN/T 3682-2013	葡萄茎枯病菌检疫鉴定方法	行业标准
SN/T 3579-2013	大豆疫病病菌活性检测方法	行业标准
SN/T 3581-2013	美澳型核果褐腐病菌实时荧光 PCR 检测方法	行业标准
SN/T 3752-2013	苹果星裂壳孢果腐病菌检疫鉴定方法	行业标准
DB44/T 2220-2019	柑橘黄龙病菌数字 PCR 检测	地方标准
DB36/T 1370-2020	番茄缩疫病病菌抗药性检测技术规程	地方标准
DB36/T 1373-2020	马铃薯晚疫病病菌生理小种鉴定技术规程	地方标准
DB43/T 1957-2020	稻曲病菌分子检测技术规程	地方标准
DB43/T 1959-2020	辣椒炭疽病菌检测技术规程	地方标准
DB12/T 1006—2020	茄子黄萎病菌土壤带菌 PCR 检测技术规程	地方标准
DB6111/T 149-2020	猕猴桃花粉溃疡病菌活菌检测技术规程	地方标准
DB33/T 2408-2021	甘薯茎腐病菌检疫鉴定方法	地方标准
DB32/T 4139-2021	小麦赤霉菌抗药性监测技术规程	地方标准

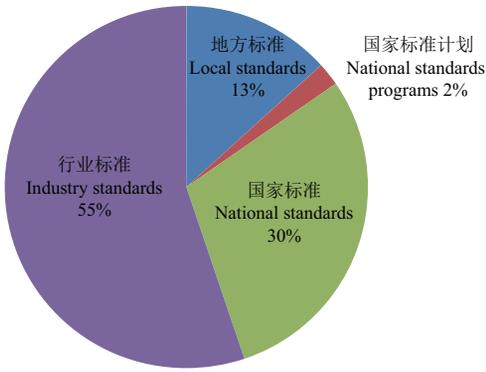
注：表中信息来源于全国标准信息公共服务平台（<https://std.samr.gov.cn>）

Note: The information in this table was obtained from the national public service platform for standards information (<https://std.samr.gov.cn>)

病菌检测工作开展^[24]。罗金燕等^[25]通过将田间分离出来的病原菌与水稻细菌性谷枯病菌标准品进行生理特性、菌落特性等 25 项比较，以确定该田间病菌为水稻细菌性谷枯病菌。小麦赤霉病是由多种镰刀属真菌感染小麦，导致小麦产量减少的病害，小麦赤霉菌标准品的成功研制有助于该病的检测工作开展^[26]。武爱波等^[27]利用标准菌株，建立了用于检测赤霉菌及其毒素的 PCR 检测方法。赵丽红等^[28]利用标准菌株 Vd076 建立了鉴定棉花黄萎病抗性品种的 qPCR 方法。标准菌株的应用为作物病菌的检

测工作提供了阳性标准品，保证检测结果的可靠性和溯源性，增加了检测结果的公信力。

与标准品相比，有证标准物质（certified reference material, CRM）在检测工作中能作为量值溯源的依据，可以对检测结果进行准确定量，使结果更加精确。为此，我们通过国家标准物质资源共享平台（National Sharing Platform for Reference Materials, China）查询相关标准物质的研制情况，但未查询到作物病菌类有证标准物质。生物标准物质可以分为基体标准物质、质粒 DNA 标准物质、基因组 DNA



图中信息来源于全国标准信息公共服务平台 (<https://std.samr.gov.cn>)

The information in this figure was obtained from the national public service platform for standards information (<https://std.samr.gov.cn>)

图1 我国作物病菌检测标准的类型

Fig. 1 Types of detection standards for crop pathogens in China

标准物质及蛋白质标准物质这四种^[29]。质粒 DNA 标准物质是现有的生物标准物质中较为常见的一种，其优势在于研制成本低，是解决病菌检测中量值溯源问题的主要方法之一^[30]。基因组 DNA 分子标准物质的运用范围和质粒 DNA 标准物质类似，仅能用于核酸水平上的检测，其优点在于研制难度较低，可以长期保存，在进行实时荧光定量 PCR 时使用起来比较简便，但其对待测样品 DNA 的质量要求相对要求较高，会受检测样品 DNA 质量的影响。基体标准物质也是所有标准物质研制中较多的一种标准物质，在其制备过程中，候选物的纯度与基体标准物质的准确性直接相关，因此候选物的选择十分重要^[31]。蛋白质标准物质与上述几种标准物质不同，由于其生物学特性易受环境因素的影响，其制备与标准化生产难度较大，我国暂未有病菌蛋白质标准物质的报道^[32]。

在制备流程上，标准物质与标准品的研制流程大体一致，主要包括候选物的制备、均匀性检验、稳定性检验等，但标准物质的制备要求更高^[29-30]。在制备病菌标准物质时，可以根据候选物的特性以及检测工作的需求，选择适当的类型。作物病菌标准物质的研制，有利于满足作物病菌检测中准确量值的需要，从而及时对感染病菌的作物进行防治。

表3 部分作物病菌标准品信息

Table 3 Information of selected crop pathogen standards

标准品名称	病菌类型	规格
Name of standard product	Type of pathogen	Specifications
尖镰孢西瓜专化型	真菌	斜面培养物；菌液；平板
尖镰孢葫芦专化型	真菌	斜面培养物；菌液；平板
尖镰孢萎蔫专化型	真菌	斜面培养物；菌液；平板
水稻纹枯病（立枯丝核菌）	真菌	斜面培养物；菌液；平板
立枯丝核菌	真菌	斜面培养物；菌液；平板
苹果黑腐皮壳菌	真菌	斜面培养物；菌液；平板
核果褐腐病菌	真菌	斜面培养物；菌液；平板
美澳型核果褐腐病菌	真菌	斜面培养物；菌液；平板
腐皮镰孢	真菌	斜面培养物；菌液；平板
小麦赤霉菌	真菌	冻干粉；斜面培养物；菌液；平板
芭蕉链丝孢	真菌	冻干粉
菊异茎点霉	真菌	斜面培养物
根异茎点霉	真菌	斜面培养物
鹰嘴豆枯萎镰刀菌	真菌	斜面培养物
接骨木镰孢原变种	真菌	斜面培养物
水稻肠杆菌	细菌	冻干粉
水稻细菌性谷枯病菌	细菌	株
洋葱伯克霍尔德氏菌	细菌	冻干粉
番木瓜环斑病毒（PRSV）重组蛋白	病毒	1 mg
芜菁花叶病毒（TuMV）重组蛋白	病毒	1 mg
南方水稻黑条矮缩病毒（SRBSDV）重组蛋白	病毒	1 mg

注：表中信息来源于标准信息网 (<http://www.gbwh.org.cn>)、国家标准样品网 (<http://www.crmch.com>) 及标物中心网 (<http://www.gjwbzx.cn>)

Note: The information in this figure was obtained from the standards information website (<http://www.gbwh.org.cn>), national standards samples website (<http://www.crmch.com>) and standards centre website (<http://www.gjwbzx.cn>)

3 作物病菌标准品面临的问题与展望

我国是世界上人口数量最多的国家之一，粮食需求量大，为满足人民日益增长的农产品需求，保证农产品绿色、安全生产极为重要。作物病菌标准品可以在尽早发现作物病菌感染，促使建立更好更快的防治方法方面发挥积极作用，为生产更安全更优质的农产品保驾护航。

在作物病菌检测工作中，标准品可以作为对照样品，为结果提供依据，保证结果的可信度，但仍

存在以下问题：首先，现有标准品品种和数量较少，无法完全满足作物病菌检测中的需求。为此，国家应统筹规划加大相关项目的启动、落实和发展，使更多学者投身到病菌标准品的研制中，为作物病菌标准品的研制提供更多机遇^[33]。其次，在检测工作中，标准品的使用无法做到对作物感病情况准确量值。而在分子检测工作中，标准物质尤其是有证标准物质可以作为定值参照，对检测结果准确定量^[34]。但由于我国标准物质整体的发展时间短，作物病菌标准物质的研制在我国鲜有报道，为此，还需加大力度研制作物病菌的标准物质。同时，在标准物质的研制与应用过程中，也面临着原材料来源不一与质量不稳定、标准物质制备方式不同导致测量误差、定值方法复杂且成本较高等问题。针对这个问题，可通过建立联合实验室共同制备，或建立实验室网络，共享研究方法和成果加以解决^[21]。总体来说，从国家层面对标准品的规范管理和体系的不断完善，我国作物病菌标准品和标准物质的研制工作将迎来更快的发展。

参考文献

- [1] 徐银, 佟庆龙, 黄海娟, 等. 国内外分析检测标准品市场现状与趋势 [J]. 化学试剂, 2021, 43 (12): 1657-1667.
Xu Y, Tong QL, Huang HJ, et al. Status and trends of domestic and oversea markets of reference materials [J]. Chem Reag, 2021, 43 (12): 1657-1667.
- [2] Popescu IL, Tanase IG, Aboul-Enein HY. The role of reference materials and equipment qualification in method validation [J]. Anal Lett, 2002, 35 (7): 1107-1116.
- [3] Olson ND, Zook JM, Samarov DV, et al. PEPR: pipelines for evaluating prokaryotic references [J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408 (11): 2975-2983.
- [4] Wise SA. What is novel about certified reference materials? [J]. Anal Bioanal Chem, 2018, 410 (8): 2045-2049.
- [5] Rottstock T, Joshi J, Kummer V, et al. Higher plant diversity promotes higher diversity of fungal pathogens, while it decreases pathogen infection per plant [J]. Ecology, 2014, 95 (7): 1907-1917.
- [6] Syed Ab Rahman SF, Singh E, Pieterse CMJ, et al. Emerging microbial biocontrol strategies for plant pathogens [J]. Plant Sci, 2018, 267: 102-111.
- [7] Delgado-Baquerizo M, Guerra CA, Cano-Díaz C, et al. The proportion of soil-borne pathogens increases with warming at the global scale [J]. Nat Clim Change, 2020, 10 (6): 550-554.
- [8] Oerke EC. Remote sensing of diseases [J]. Annu Rev Phytopathol, 2020, 58: 225-252.
- [9] 周佩, 姜培, 罗金燕, 等. 瓜类果斑病菌胶体金试纸条的检测应用 [J]. 中国植保导刊, 2021, 41 (2): 96-99.
Zhou P, Jiang P, Luo JY, et al. Application of gold immunochromatography assay strip for detection of *Acidovorax citrulli* [J]. China Plant Prot, 2021, 41 (2): 96-99.
- [10] 冯黎霞, 魏霜, 余辛, 等. 重组酶聚合酶扩增技术 (RPA) 快速检测玉米褪绿斑驳病毒 [J]. 植物保护学报, 2020, 47 (1): 217-218.
Feng LX, Wei S, Yu X, et al. Detection of maize chlorotic mottle virus by recombinase polymerase amplification [J]. J Plant Prot, 2020, 47 (1): 217-218.
- [11] Dyussebayev K, Sambasivam P, Bar I, et al. Biosensor technologies for early detection and quantification of plant pathogens [J]. Front Chem, 2021, 9: 636245.
- [12] Ray M, Ray A, Dash S, et al. Fungal disease detection in plants: traditional assays, novel diagnostic techniques and biosensors [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 87: 708-723.
- [13] Khater M, de la Escosura-Muñiz A, Merkoçi A. Biosensors for plant pathogen detection [J]. Biosens Bioelectron, 2017, 93: 72-86.
- [14] 李兴红, 严红, 郭京泽, 等. 种传辣椒轻斑驳病毒病 DAS-ELISA 的检测 [J]. 植物保护, 2005, 31 (3): 66-68.
Li XH, Yan H, Guo JZ, et al. Detection of seed-borne pepper light mottle virus disease by DAS-ELISA [J]. Plant Prot, 2005, 31 (3): 66-68.
- [15] 谯天敏, 张静, 麻文建, 等. 桉树焦枯病菌巢式聚合酶链反应快速检测方法的建立与应用 [J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2015, 41 (5): 497-504.
Qiao TM, Zhang J, Ma WJ, et al. Development and application of nested polymerase chain reaction for rapid detection of *Cylindrocladium scoparium* on *Eucalyptus* [J]. J Zhejiang Univ Agric Life Sci, 2015, 41 (5): 497-504.
- [16] Dupas E, Legendre B, Olivier V, et al. Comparison of real-time PCR and droplet digital PCR for the detection of *Xylella fast* in plants [J]. J Microbiol Methods, 2019, 162: 86-95.
- [17] 高艳玲, 范国权, 程胜群, 等. 苜蓿花叶病毒 RT-PCR 和 RT-qPCR 检测技术体系的建立与应用 [J]. 植物保护学报, 2022, 49 (2): 515-527.
Gao YL, Fan GQ, Cheng SQ, et al. Development and application of RT-PCR and RT-qPCR for detection of alfalfa mosaic virus [J]. J Plant Prot, 2022, 49 (2): 515-527.

- [18] 李辉, 姜锋, 杨春光等. 微滴式数字 PCR 技术快速精准检测苹果牛眼果腐病原多年明孢盘菌 [J/OL]. 菌物学报, 2023: 1-15.
Li H, Jiang F, Yang CG, et al. Rapid and accurate detection of *neofabraea perennans* by droplet digital PCR [J/OL]. *Mycosystema*, 2023: 1-15.
- [19] Cao JJ, Wu QM, Wan FH, et al. Reliable and rapid identification of glyphosate-resistance in the invasive weed *Amaranthus palmeri* in China [J]. *Pest Manag Sci*, 2022, 78 (6) : 2173-2182.
- [20] Wouters Y, Dalloyaux D, Christenhusz A, et al. Droplet digital polymerase chain reaction for rapid broad-spectrum detection of bloodstream infections [J]. *Microb Biotechnol*, 2020, 13 (3) : 657-668.
- [21] 吕丽兰, 陈琦, 徐勇, 等. 柑橘果实中的微生物多样性与黄龙病症状的相互关系研究 [J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41 (1) : 148-158.
Lv LL, Chen Q, Xu Y, et al. Relationship between endophytic microbial diversity and symptoms of huanglongbing in the fruits of *Citrus reticulata* [J]. *Genom Appl Biol*, 2022, 41 (1) : 148-158.
- [22] 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.
Zhang JN, Wang YM, Zhang JJ, et al. Detection and identification of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola* using quantitative real-time PCR and digital PCR [J]. *J Zhejiang Univ Agric Life Sci*, 2023, 49 (1) : 55-64.
- [23] 罗丽珠, 陈婉娃. 标准菌株在微生物检测中的作用 [J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12 (8) : 3281-3286.
Luo LZ, Chen WW. Function of standard strain in microbial detection [J]. *J Food Saf Qual*, 2021, 12 (8) : 3281-3286.
- [24] 莫瑾, 王哲, 周慧平, 等. 利用多重 PCR 技术快速检测 4 种水稻病原细菌 [J]. 植物保护, 2021, 47 (3) : 160-164.
Mo J, Wang Z, Zhou HP, et al. A multiplex PCR method for rapid detection of four rice pathogenic bacteria [J]. *Plant Prot*, 2021, 47 (3) : 160-164.
- [25] 罗金燕, 徐福寿, 王平, 等. 水稻细菌性谷枯病原菌的分离鉴定 [J]. 中国水稻科学, 2008, 22 (1) : 82-86.
Luo JY, Xu FS, Wang P, et al. Isolation and identification of the causal organism of bacterial grain rot from rice [J]. *Chin J Rice Sci*, 2008, 22 (1) : 82-86.
- [26] Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, et al. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology [J]. *Mol Plant Pathol*, 2012, 13 (4) : 414-430.
- [27] 武爱波, 李和平, 张静柏, 等. 小麦和玉米籽粒赤霉菌产毒类型的 PCR 检测 [J]. 麦类作物学报, 2005, 25 (5) : 1-4.
Wu AB, Li HP, Zhang JB, et al. PCR identification of mycotoxin-chemotypes from grains of wheat and maize associated with head blight [J]. *Acta Tritical Crops*, 2005, 25 (5) : 1-4.
- [28] 赵丽红, 冯自力, 冯鸿杰, 等. 基于标准菌株 Vd076 的棉花黄萎病抗性快速分子评价方法初报 [J]. 中国棉花, 2019, 46 (3) : 16-21.
Zhao LH, Feng ZL, Feng HJ, et al. Rapid molecular evaluation of *Verticillium* wilt resistance in cotton based on the standard strain Vd076 [J]. *China Cotton*, 2019, 46 (3) : 16-21.
- [29] 尹全, 李忆, 宋君, 等. 用于转基因植物及其产品检测的标准物质概述 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39 (30) : 18430-18431, 18442.
Yin Q, Li Y, Song J, et al. Overview of reference materials for the detection of transgenic plants and their products [J]. *J Anhui Agric Sci*, 2011, 39 (30) : 18430-18431, 18442.
- [30] 许丽, 梁文, 李妍, 等. 一种质粒 DNA 标准物质的定值数据统计及不确定度评定 [J]. 中国测试, 2014, 40 (S1) : 9-13.
Xu L, Liang W, Li Y, et al. The data statistic and uncertainty assessment for the quantification of a plasmid DNA reference material [J]. *China Meas Test*, 2014, 40 (S1) : 9-13.
- [31] 李俊, 李亮, 李夏莹, 等. 转基因玉米 MIR604 基体标准物质研制 [J]. 作物学报, 2020, 46 (4) : 473-483.
Li J, Li L, Li XY, et al. Development of genetically modified maize MIR604 matrix reference materials [J]. *Acta Agron Sin*, 2020, 46 (4) : 473-483.
- [32] 邱昌将, 周桐, 吴志华, 等. 蛋白质标准物质的制备概况 [J]. 食品工业科技, 2014, 35 (19) : 384-387.
Qiu CJ, Zhou T, Wu ZH, et al. Development of protein reference materials [J]. *Sci Technol Food Ind*, 2014, 35 (19) : 384-387.
- [33] Sinha R, Abnet CC, White O, et al. The microbiome quality control project: baseline study design and future directions [J]. *Genome Biol*, 2015, 16: 276.
- [34] 李达, 王军, 杨忠, 等. 核酸标准物质定值的实验体系研究 [J]. 计量学报, 2020, 41 (11) : 1436-1442.
Li D, Wang J, Yang Z, et al. Experimental design analysis of developing quantitative nucleic acid reference materials [J]. *Acta Metrol Sin*, 2020, 41 (11) : 1436-1442.

(责任编辑 朱琳峰)