

四川凉山苦荞种子携带细菌多样性

白凯红[#], 阿别小兵[#], 陈 星, 蒋 娜, 李健强, 罗来鑫^{*}

(中国农业大学植物病理学系, 农业农村部有害生物监测与绿色管理重点实验室,
种子病害检验与防控北京市重点实验室, 北京 100193)

摘要 苦荞 *Fagopyrum tataricum* 是四川省凉山彝族自治州主要的粮食作物之一, 作为近年来新兴的保健食品, 其种子携带的细菌种群鲜有报道。本研究从凉山州 7 个县的苦荞主产区共采集了 46 份苦荞种子样品, 通过分离培养法及基于 16S rRNA 基因的扩增子测序法, 对苦荞种子携带的主要细菌类群进行了研究。结果显示: 分离培养法从 46 份样品中共获得 618 株细菌分离物, 隶属于 10 个属, 其中泛菌属 *Pantoea* 和短小杆菌属 *Curtobacterium* 分离频率最高, 分别为 52.5% 和 20.7%, 是种子携带的优势菌群。扩增子测序法从 13 份样品中共获得 279 个属的细菌, 其中泛菌属为优势菌群。通过样本层级聚类分析, 发现来自冕宁县的苦荞种子样品 MNCQ-4 携带的细菌丰富度与多样性最大, 而来自昭觉县的样品 ZJ-5 最小。研究结果表明, 同一个地区的不同样品, 菌群多样性也存在差异。本研究丰富了荞麦种带细菌的研究, 为种子处理、病害防治提供了依据。

关键词 苦荞种子; 细菌; 分离鉴定; 扩增子测序

中图分类号: S517 文献标识码: A DOI: 10.16688/j.zwbh.2021474

Bacterial diversity of the tartary buckwheat seeds from Liangshan, Sichuan province

BAI Kaihong[#], A'BIE Xiaobing[#], CHEN Xing, JIANG Na, LI Jianqiang, LUO Laixin^{*}

(Department of Plant Pathology, China Agricultural University, Key Laboratory of Pest Monitoring and Green Management, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing Key Laboratory of Seed Disease Testing and Control, Beijing 100193, China)

Abstract The tartary buckwheat, *Fagopyrum tataricum*, is one of the staple food crops in Liangshan Yi autonomous prefecture, Sichuan province. As a new healthy food in recent years, there have been few reports on the bacterial population carried by tartary buckwheat seeds. Here, 46 tartary buckwheat seed samples were collected from the main tartary buckwheat producing areas in seven counties of Liangshan prefecture. The main bacterial populations carried by tartary buckwheat seeds were studied by agar plating and using 16S rRNA amplicon sequencing method. The results showed that a total of 618 bacterial isolates belonging to 10 genera were obtained from 46 seeds samples by agar plating. Among them, *Pantoea* and *Curtobacterium* had the highest isolation frequency (52.5% and 20.7%, respectively), which were the dominant microflora carried by seeds. A total of 279 genera were identified from the 13 tested seed samples by 16S rRNA amplicon sequencing method, and the dominant genus was *Pantoea*. Through sample hierarchy clustering analysis, it was found that MNCQ-4 from Mianning county had the highest community richness and diversity, while ZJ-5 from Zhaojue county had the lowest community richness and diversity. Moreover, the results showed that samples from the same area had different bacterial diversities. This study could enrich our understanding of buckwheat diseases and provide a reference for seed treatment and disease control.

Key words tartary buckwheat seed; bacteria; isolation and identification; amplicon sequencing

苦荞 *Fagopyrum tataricum* 是蓼科 Polygonaceae 荞麦属 *Fagopyrum* 的一年生作物, 其营养丰富, 含有

收稿日期: 2021-08-30 修订日期: 2021-10-29

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0201601)

* 通信作者 E-mail: luolaixin@cau.edu.cn

为并列第一作者

丰富的蛋白质、纤维素、碳水化合物、微量元素等^[1-2],还可以提高人体免疫力^[3-4]、抗衰老^[5]等,享有“五谷之王”的美誉。四川省凉山地区是我国荞麦起源中心之一,拥有全国乃至全世界最丰富的苦荞资源,也是种类最多样、种植最广泛、分布最集中的地区^[6-8]。作为当地的主要粮食之一,凉山州的 17 个县均有苦荞种植,其中越西、昭觉、喜德、冕宁、美姑等县是苦荞的主产区^[9-10]。凉山地区特殊的地理环境与独特的气候有利于荞麦的产量与品质,全州常年种植面积上百万亩,约占全国总种植面积的一半以上^[6, 11]。

真菌、细菌、病毒、线虫等病原物均可引起荞麦病害^[12],其中真菌病害报道较多,而细菌性病害报道却很少,仅见丁香假单胞菌 *Pseudomonas syringae* 和铜绿假单胞菌 *P. aeruginosa*^[13-14]引起的细菌性叶斑病,而关于荞麦种子携带细菌的报道更少。种子上携带的病原菌是田间病害发生的重要初侵染来源,种子携带的有益微生物也会对作物生长起到促进作用。加强对种子携带微生物的检测,有利于

明确种子健康状况,挖掘有益微生物群体。种子带菌检测的技术主要有直接检测、洗涤检测、琼脂培养检测、免疫学检测、分子生物学检测等,近年来高通量测序技术也陆续应用在种子带菌检测中,但在荞麦种子健康检测中还未见报道。

本研究运用传统的分离培养和基于 16S rRNA 基因的扩增子测序方法,对凉山主要产区的苦荞种子携带的细菌进行了检测,旨在明确凉山州苦荞种子携带细菌的多样性,并为种子健康检测提供新的技术手段和方向。

1 材料与方法

1.1 材料

荞麦种子样品:采自四川省凉山州越西县、昭觉县、喜德县、冕宁县、普格县、美姑县和盐源县不同乡村的 46 份苦荞种子(表 1)用于种子携带细菌的检测,其中选取不同地点的 13 份种子用于 16S rRNA 基因扩增子测序。

表 1 来自四川省凉山苦荞种子样品信息¹⁾

Table 1 Information of tartary buckwheat seeds from Liangshan, Sichuan province

种子样品 Seed sample	种植地点 Source	海拔/m Altitude	测序的样品 Sequenced sample
YX-1	四川凉山州越西县尔赛乡依达村	2 394.1	—
YX-2	四川凉山州越西县尔赛乡依达村	2 458.4	—
YX-3	四川凉山州越西县尔赛乡依达村	2 521.3	—
YX-4	四川凉山州越西县尔赛乡洪洛村	2 520.6	—
YX-5	四川凉山州越西县尔赛乡洪洛村	2 603.9	—
YX-6	四川凉山州越西县尔赛乡洪洛村	2 620.4	—
YX-7	四川凉山州越西县尔赛乡洪洛村	2 515.2	+
YX-8	四川凉山州越西县尔赛乡花古村	2 489.2	—
YX-9	四川凉山州越西县尔赛乡花古村	2 413.6	—
YX-10	四川凉山州越西县尔赛乡花古村	2 234.7	—
ZJ-1	四川凉山州昭觉县谷曲乡新凉村	2 107.9	+
ZJ-2	四川凉山州昭觉县谷曲乡新凉村	2 110.6	—
ZJ-3	四川凉山州昭觉县洒拉地坡村	2 476.6	—
ZJ-4	四川凉山州昭觉县洒拉地坡村	2 589.1	—
ZJ-5	四川凉山州昭觉县洒拉地坡村	2 650.4	+
ZJ-6	四川凉山州昭觉县洒拉地坡村	2 787.5	—
ZJ-7	四川凉山州昭觉县解放沟镇	2 743.2	—
ZJ-8	四川凉山州昭觉县解放沟镇	2 845.6	—
ZJ-9	四川凉山州昭觉县解放沟镇	2 912.3	—
ZJ-10	四川凉山州昭觉县解放沟镇	3 124.7	+
XD-1	四川凉山州喜德县博洛拉达乡博洛村	2 795.6	—
XD-2	四川凉山州喜德县博洛拉达乡博洛村	2 645.2	—
XD-3	四川凉山州喜德县博洛拉达乡博洛村	2 535.3	—
XD-4	四川凉山州喜德县博洛拉达乡火普村	2 583.7	—
XD-5	四川凉山州喜德县博洛拉达乡火普村	2 454.4	—
XD-6	四川凉山州喜德县博洛拉达乡火普村	2 458.1	—
XD-7	四川凉山州喜德县博洛拉达乡博洛村	2 448.5	—

续表 1 Table 1(Continued)

种子样品 Seed sample	种植地点 Source	海拔/m Altitude	测序的样品 Sequenced sample
XD-8	四川凉山州喜德县博洛拉达乡博洛村	2 453.1	—
XD-9	四川凉山州喜德县博洛拉达乡博洛村	2 432.5	—
XD-10	四川凉山州喜德县博洛拉达乡博洛村	2 408.7	+
MNCQ-1	四川凉山州冕宁县回坪乡庙高山村	2 286.4	+
MNCQ-3	四川凉山州冕宁县回坪乡庙高山村	2 286.4	—
MNCQ-4	四川凉山州冕宁县回坪乡庙高山村	2 286.4	+
PGEL-1	四川凉山州普格县五道箐乡采洛洛博村	2 015.6	+
KQ-2008	四川凉山州冕宁县回坪乡庙高山村	2 286.4	—
MN1707-893	四川凉山州冕宁县回坪乡庙高山村	2 286.4	—
MGYE	四川省凉山州美姑县觉洛乡地莫村	2 450.6	—
MGQK-6	四川省凉山州美姑县觉洛乡地莫村	2 450.6	—
MGCQ-2	四川省凉山州美姑县觉洛乡地莫村	2 450.6	+
MGXQ-2	四川省凉山州美姑县觉洛乡地莫村	2 450.6	+
MGYQ-2	四川省凉山州美姑县觉洛乡地莫村	2 450.6	+
YYEL-1	四川省凉山州盐源县干海乡滑泥村	2 608.2	—
YYYQ-2	四川省凉山州盐源县干海乡滑泥村	2 608.2	—
YYCQ-3	四川省凉山州盐源县干海乡滑泥村	2 608.2	+
YY1707-893	四川省凉山州盐源县干海乡滑泥村	2 608.2	—
YYQK-6	四川省凉山州盐源县干海乡滑泥村	2 608.2	+

1) 表中“+”表示用于分离培养和扩增子测序的苦荞种子样品,“—”表示只进行分离培养的苦荞种子样品。
“+”, tartary buckwheat seed samples for isolation and culture and 16S rDNA amplicon sequencing; “—”, tartary buckwheat seed samples for isolation and culture alone.

1.2 试剂与仪器

LBA 培养基:5 g/L 酵母浸粉、5 g/L 氯化钠、10 g/L 胰蛋白胨、16 g/L 琼脂。

供试试剂:1% NaClO;AxyPrepDNA 凝胶回收试剂盒,AXYGEN;Omega-soil DNA Kit, Omega Bio-Tek;TruSeqTM DNA Sample Prep Kit, Trans-Gen。

供试仪器:K30 型金属浴,干式恒温器,Alpha-mager HP 凝胶成像仪,H1650R 离心机(cence® 湘仪),ABSON MiFly-6 小型离心机(合肥艾本森科学仪器有限公司),球磨仪(Retsch MM400),MyCycler580BR 型 PCR 仪(Bio-Rad),ABI GeneAmp® 9700 型 PCR 仪(ABI),DYY-12 型电泳仪与 DYY-6C 电泳仪(北京市六一仪器厂),粉碎研磨仪 TL-48R(上海万柏生物科技有限公司),NanoDrop 2000 (Thermo Scientific),微型荧光计 TBS380(Turner-BioSystems),MISEQ 测序仪 Illumina Miseq(Illumina)。

1.3 分离培养结合 16S rRNA 基因序列鉴定

分离培养:从每一份供试的苦荞种子中随机选取 100 粒,放入灭菌的 50 mL 锥形瓶中,加入 10 mL 无菌水,置于摇床中振荡培养 30 min(120 r/min),之后吸取 2 mL 培养液,用无菌水进行 10 倍梯度稀释,稀释

液均匀涂布于 LBA 培养基上,将培养皿置于 28℃ 培养箱中黑暗培养,2 d 后开始观察、记录、计算分离频率(分离频率=某分离物总数/分离物的总数×100%),并进行细菌的纯化分离培养。

形态学鉴定:观察菌落颜色、大小、形状、边缘特征、有无分泌物等。

分子生物学鉴定:挑取 1 个单菌落置于 10 μL 无菌水中,在金属浴 100℃ 加热 10 min 破壁获得总 DNA。利用细菌通用引物 27F/1492R (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3'/5'-GGTTAC-CTTGTTACGACTT-3')^[15] 扩增 16S rRNA 基因序列。PCR 体系(25 μL)为:16.89 μL ddH₂O、2.5 μL 10×*rTaq* DNA 聚合酶缓冲液、2.4 μL dNTPs (2.5 mmol/L)、1 μL 上游引物(10 μmol/L)、1 μL 下游引物(10 μmol/L)、0.25 μL *rTaq* DNA 聚合酶(2.5 U/uL)、1 μL DNA 模板。PCR 反应程序为:95℃预变性 10 min;95℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 1 min 30 s,35 个循环;72℃延伸 10 min。最后将符合目标条带的样品进行测序(北京博迈德科技发展有限公司),并将所得序列在 NCBI(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)数据库中进行同源性比对。

1.4 基于 16S rRNA 基因扩增子测序的多样性分析

样本预处理:在 50 mL 离心管里加入种子至 10 mL 刻度线,再加入 10 mL 灭菌水,涡旋振荡 5 min,种子洗脱液转移至新管中备用。

DNA 提取、文库构建、数据分析:利用 Omega-soil DNA Kit 对基因组 DNA 进行抽提,利用扩增 16S rRNA V3-V4 区域通用引物 385F/806R (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'/5'-GGACTA-CHVGGGTWTCTAAT-3')进行 PCR 扩增,以检测是否满足后续扩增子测序要求。满足要求后,通过文库构建,进行 Miseq 测序,对数据进行质控过滤处理以及去嵌合体后获得最终的有效数据(effective tag),之后进行物种注释和分析,包括 OTU(operational taxonomic units)分析、Alpha 多样性分析、Beta 多样性分析。

2 结果与分析

2.1 分离培养结合 16S rRNA 基因序列鉴定苦荞种子携带细菌

对 46 份苦荞种子携带的细菌进行分离培养,共获得 618 株细菌分离物。经形态学和分子生物学鉴定,获得的细菌分离物隶属于 10 个属,分别为

赖氨酸芽胞杆菌属 *Lysinibacillus*、节杆菌属 *Arthrobacter*、芽胞杆菌属 *Bacillus*、假单胞菌属 *Pseudomonas*、微杆菌属 *Microbacterium*、泛菌属 *Pantoea*、短小杆菌属 *Curtobacterium*、鞘氨醇单胞菌属 *Sphingomonas*、类芽胞杆菌属 *Paenibacillus*、根瘤菌属 *Rhizobium*,具体分离物的菌落形态如图 1 所示,上述细菌的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 上已知对应属的细菌序列的比对结果相似性均在 97% 以上。通过对苦荞种子细菌分离物的分离频率计算与分析,泛菌属的分离频率最高,为 52.5%,短小杆菌属、假单胞菌属、微杆菌属分别为 20.7%、16.5%、5.5%,其他菌群占比为 4.8% (图 2)。

2.2 基于 16S rRNA 基因扩增子测序多样性分析的苦荞种子携带细菌的检测

2.2.1 OTU 分析

对选取的 13 份苦荞种子携带的细菌进行高通量测序,基于 16S rRNA 基因扩增子测序获得的细菌被划分为 19 个门(phylum)、40 个纲(class)、81 个目(order)、151 个科(family)、279 个属(genus)、430 个种(species),共 624 个 OTUs。

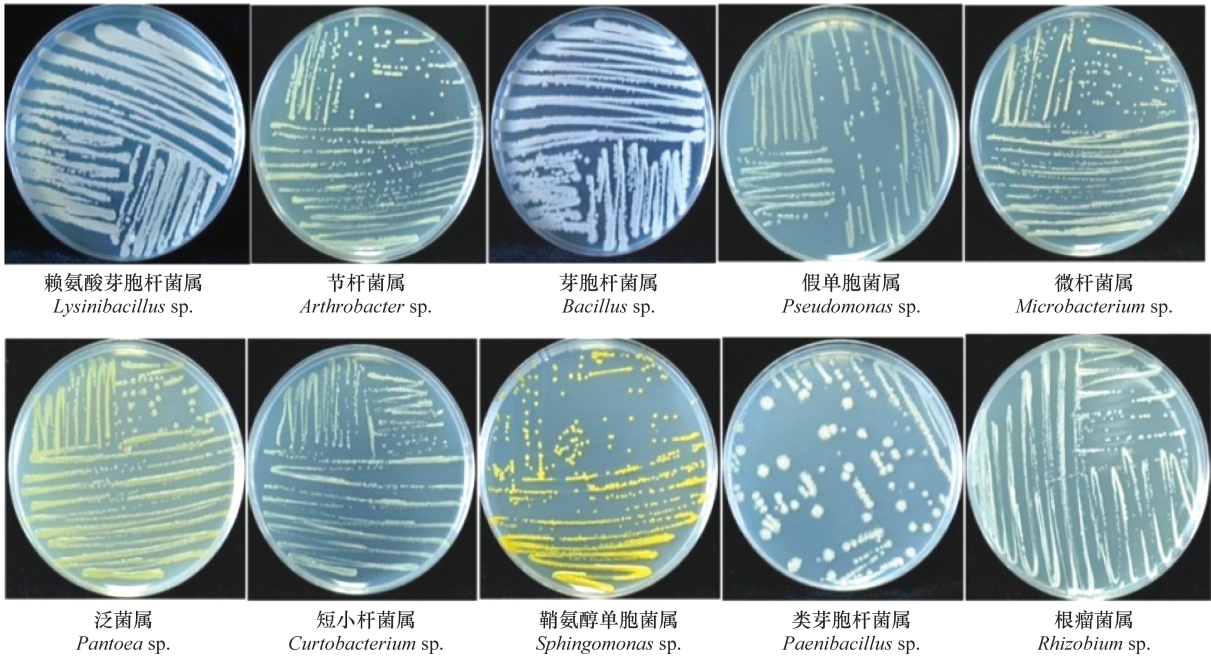


图 1 来自于苦荞种子的细菌分离物在 LBA 培养基上的菌落形态

Fig. 1 Colony morphology of bacterial isolates from tartary buckwheat seeds on LBA medium

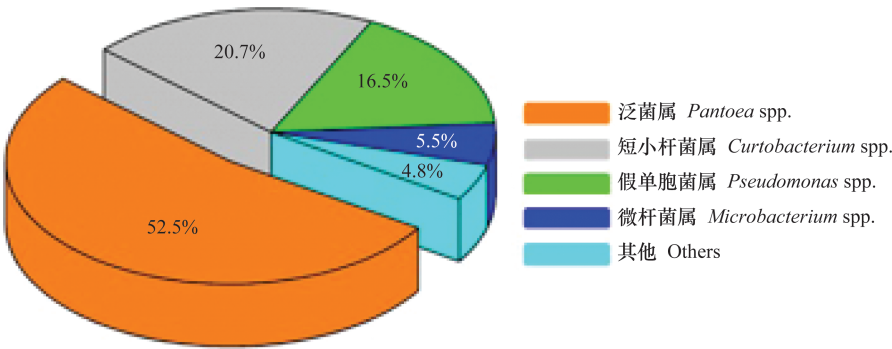


图 2 基于分离培养法对供试苦荞种子携带细菌的优势菌群分析结果

Fig. 2 Analysis of dominant microflora from tartary buckwheat seeds based on agar plating

2.2.2 Alpha 多样性分析

Alpha 多样性分析结果表明(表 2),13 份苦荞种子样品文库的覆盖率(coverage)均在 99%以上,说明测序深度高,样本中序列均能被测出,能反映种子真实的带菌情况。Alpha 多样性分析中,ACE、Chao、Sobs 的数值越大,表明菌群中所含有的 OTU 数目越多,菌群的丰富度(community richness)越大;另外,Shannon 的值越大、Simpson 的值越小,说明菌群的多样性(community diversity)越高。表 2 的结果说明,来自冕宁县的样品 MNCQ-4 的 ACE(497.85)、Chao(501.70)、Sobs(483)、Shannon(4.3048)的数值最大,Simpson(0.0436)的值最小,说明 MNCQ-4 菌群的丰富度与多样性在 13 份种子样品中最大。而来自昭觉县的样品 ZJ-5 的 ACE(162.22)、Chao

(130.40)、Sobs(107)的数值最小,Simpson(0.2727)的值最大,表明 ZJ-5 的丰富度与多样性最小。其余 11 份样品的细菌菌群丰富度与多样性介于 MNCQ-4 和 ZJ-5 之间。

对苦荞种子携带细菌的物种组成进行分析(图 3),结果表明,种带细菌主要有泛菌属、甲基杆菌属 *Methylobacterium*、鞘氨醇单胞菌、马赛菌属 *Mas-silia*、薄层菌属 *Hymenobacter*、假单胞菌属、蓝细菌属 *Cyanobacteria*、短小杆菌属、伯克氏菌属-副伯克氏菌属 *Burkholderia-Paraburkholderia*、葡萄球菌属 *Staphylococcus*、肠杆菌属 *Enterobacter*、贪噬菌属 *Variovorax*,其中泛菌属、甲基杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、马赛菌属、薄层菌属、假单胞菌属在 13 份苦荞种子样品中均能被大量检测到。泛菌属所占比率最高,为最主要的优势菌群。

表 2 基于 16S rRNA 基因扩增子测序对供试的 13 份苦荞种子携带细菌的 Alpha 多样性的评估结果统计

Table 2 Alpha diversity estimators of 13 tartary buckwheat seeds carrying bacteria by 16S rRNA amplicon sequencing

种子样品 Seed sample	覆盖率 Coverage	Sobs	ACE	Chao	Shannon	Simpson
YYQK-6	0.9987	202	251.85	242.18	2.6886	0.1168
MGCQ-2	0.9988	229	288.44	299.38	2.7178	0.1168
MGXQ-2	0.9983	266	323.97	329.00	3.2285	0.0944
YX-7	0.9990	225	278.40	282.65	2.4433	0.2095
ZJ-1	0.9995	178	192.27	188.50	3.4924	0.0528
MNCQ-1	0.9983	246	342.70	325.57	3.3981	0.0601
ZJ-10	0.9993	109	214.83	147.15	1.9454	0.2655
YYCQ-3	0.9978	337	429.67	452.18	3.3363	0.0759
ZJ-5	0.9994	107	162.22	130.40	2.1048	0.2727
XD-10	0.9989	201	248.56	285.00	3.0866	0.0801
MNCQ-4	0.9990	483	497.85	501.70	4.3048	0.0436
MGYQ-2	0.9990	243	268.92	268.16	2.8431	0.1475
PGEL-1	0.9990	243	280.65	284.40	3.4388	0.0627

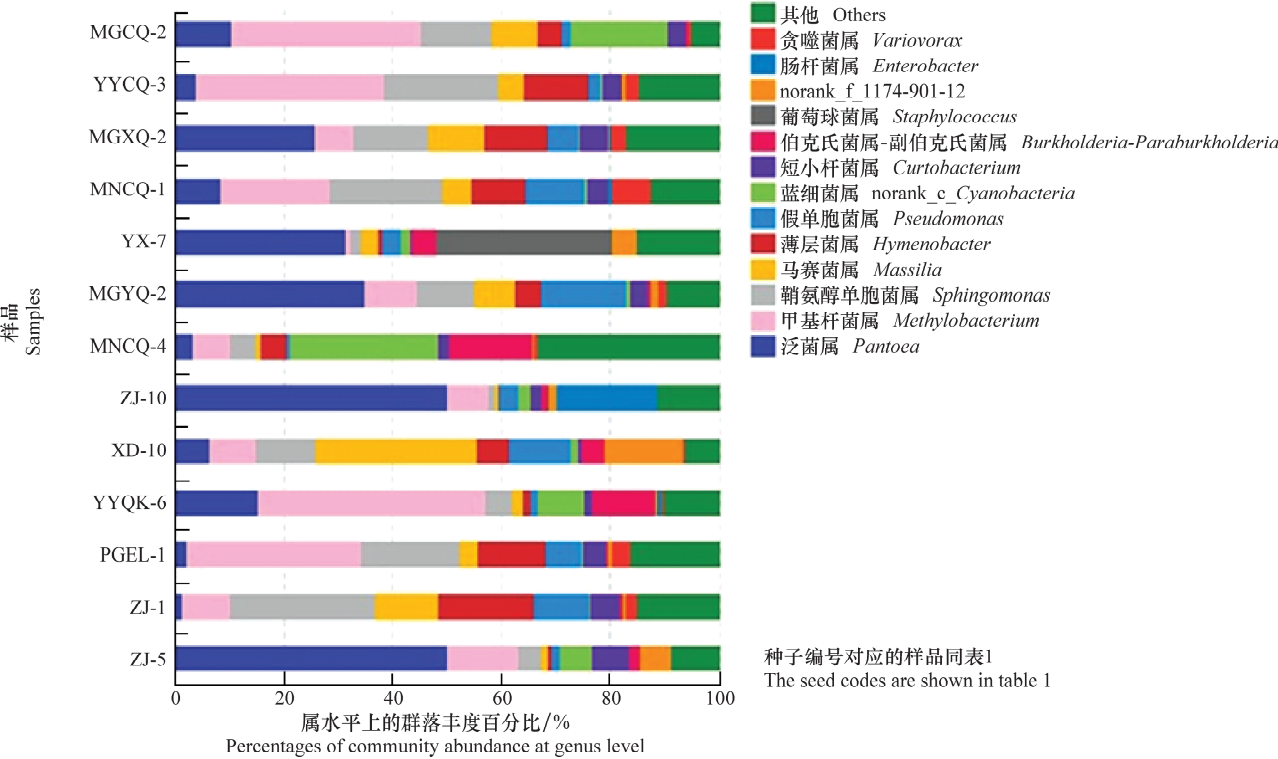


图 3 基于 16S rRNA 扩增子测序对供试的 13 份苦荞种子携带细菌的物种组成分析结果
Fig. 3 Community analysis of 13 tartary buckwheat seeds carrying bacteria by 16S rRNA amplicon sequencing

2.2.3 Beta 多样性分析

2.2.3.1 样本层级聚类分析

13 份苦荞种子携带的细菌聚类分析结果如图 4 所示,来自同一个县的样品有的能聚在一支,有的却相距很远。例如,来自昭觉县的样品 ZJ-10 与 ZJ-5 聚在一起,而另一个采自昭觉县的样品 ZJ-1 却与来自冕宁县样品 MNCQ-1 聚在一支;来自美姑县的样品 MGXQ-2 与 MGYQ-2 聚在一支,而采自美姑县的样品 MGCQ-2 却与来自盐源县的 YYQK-6 聚在一支。其中菌群多样性最相近的两个样品为来自盐源县的 YYCQ-3 与来自普格县的 PGEL-1,来自冕宁县的 MNCQ-4 与其他样品的差异性最大,且与同是冕宁县的 MNCQ-1 差异性也很大。

2.2.3.2 PCA 分析

对苦荞种子携带细菌进行 PCA 分析,结果表明(图 5),来自同一个地区的种子样品菌群多样性的差异性小,来自不同地区的种子样品差异性大,但其中来自冕宁县(MN)的种子与来自喜德县(XD)的种子携带细菌多样性相似,且冕宁县(MN)和喜德县(XD)种子与普格县(PG)种子、盐源县(YY)种子相

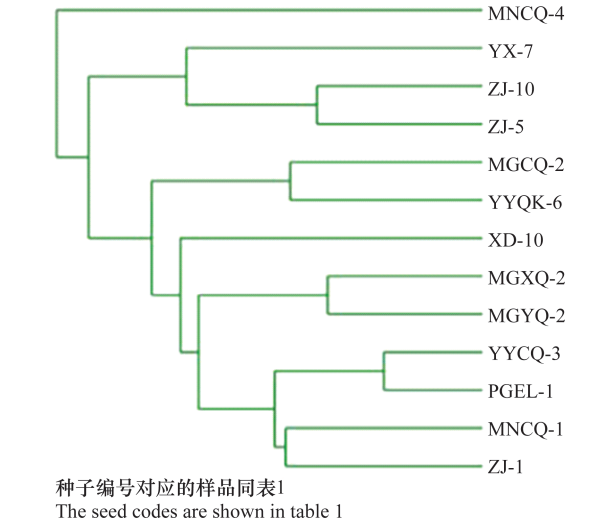
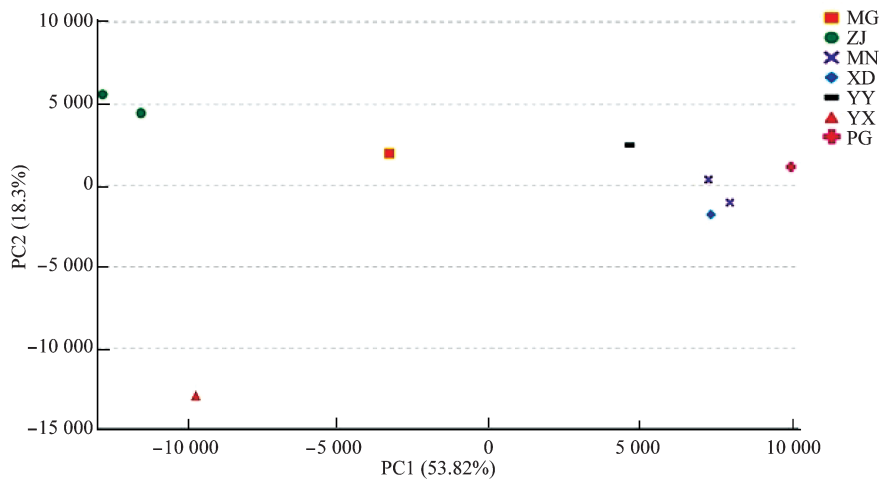


图 4 基于 16S rRNA 扩增子测序对供试的 13 份苦荞种子携带细菌的样本层级聚类树分析结果
Fig. 4 Sample hierarchy clustering tree analysis of 13 tartary buckwheat seeds carrying bacteria by 16S rRNA amplicon sequencing

似性大。在 13 份种子样品中,来自越西县(YX)种子样品与来自普格县(PG)种子样品的菌群多样性的差异性最大。



MG: 美姑县种子样品; ZJ: 昭觉县种子样品; MN: 冕宁县种子样品; XD: 喜德县种子样品; YY: 盐源县种子样品; YX: 越西县种子样品; PG: 普格县种子样品

MG, ZJ, MN, XD, YY, YX, and PG indicate the seed samples from Meigu county, Zhaojue county, Mianning county, Xide county, Yanyuan county, Yuexi county, and Puge county, respectively

图5 基于16S rRNA扩增子测序对供试的13份苦荞种子携带细菌的PCA分析结果

Fig. 5 PCA analysis of 13 tartary buckwheat seeds carrying bacteria by 16S rRNA amplicon sequencing

3 结论与讨论

本研究通过分离培养法从46份供试苦荞种子中共鉴定到10个属的细菌,其中泛菌属为苦荞种子携带的优势细菌菌群。泛菌属部分种是重要的病原细菌,其寄主范围广,广泛分布在土壤、植物、动物上,其中成团泛菌 *Pantoea agglomerans* 能够引起稻谷内颖褐变^[16],是藜麦叶斑病^[17]和烟草细菌性叶枯病的病原菌^[18],并能影响紫花苜蓿种子的萌发及幼苗生长^[19]等,因此本研究分离得到的泛菌属细菌是否能引起苦荞病害,还需进一步鉴定到种,并进行致病性试验后确认。

基于16S rRNA基因扩增子测序法仅从13份种子样品中就检测得到了279个属的细菌,表明其检测效率远高于传统的分离培养方法,其中泛菌属为优势菌群,与分离培养法的结果一致,说明泛菌属在苦荞种子中的丰度最高,推测苦荞所在的环境有利于泛菌属细菌生存。然而,两种方法都有彼此未检测和鉴定到的菌群,如分离培养法未鉴定到高通量测序中菌群丰度高的甲基杆菌属,16S rRNA基因扩增子测序未鉴定到分离培养法中分离频率较高的微杆菌属,可能由于专性厌氧的甲烷细菌属生长极其缓慢,分离培养比较困难,而16S rRNA基因扩增子测序法在扩增时丰度极高的泛菌属等其他优势菌群可能掩盖了丰度极低的菌群(如微杆菌属)。因此,想要准确了解种子携带细菌的多样性,还需要分离培养法与高通量测序相结合。

在PCA分析中,来自冕宁县(MN)的种子和来自喜德县(XD)、盐源县(YY)的种子所携带细菌多样性相近,推测是因为地理上冕宁县与喜德县、盐源县相邻,苦荞品种有交叉使得菌群丰度相似。昭觉县虽然与喜德县、普格县相邻,但菌群多样性却相差很大,可能由于其独特的地形、环境温湿度、海拔或品种的原因等引起,不同地点样品携带细菌的多样性结果还需要通过对更多样本的检测进行深入分析。

本研究从苦荞种子中鉴定到大量菌群,虽然大部分细菌目前还不确定是否是荞麦的致病菌,但仍有侵染荞麦或其他作物的可能,因此在荞麦播种前,要加强种子检疫和种子处理、选用抗病品种,以提高荞麦的品质与产量。

参考文献

- [1] 苟君波, 胡洪利, 吴琦, 等. 荞麦中金属元素的主成分和聚类分析[J]. 食品科学, 2011, 32(16): 318-321.
- [2] BAI Chongzhi, FENG Mali, HAO Xuliang, et al. Rutin, quercetin, and free amino acid analysis in buckwheat (*Fagopyrum*) seeds from different locations [J]. Genetics & Molecular Research, 2015, 14(4): 19040-19048.
- [3] GIMÉNEZ-BASTIDA J A, ZIELINSKI H, PISKULA M, et al. Buckwheat bioactive compounds, their derived phenolic metabolites and their health benefits [J/OL]. Molecular Nutrition & Food Research, 2016, 61(7): 1600475. DOI: 10.1002/mnfr.201600475.
- [4] KREFT M. Buckwheat phenolic metabolites in health and disease [J]. Nutrition Research Reviews, 2016, 29(1): 30-39.

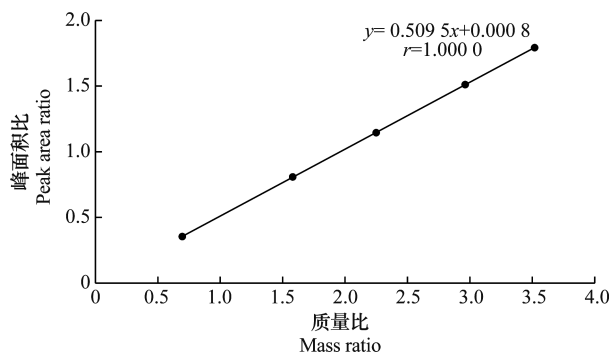


图2 异硫氰酸烯丙酯与内标物峰面积比与质量比线性关系
Fig. 2 Linear relationship between peak area ratio and mass ratio of allyl isothiocyanate and internal standard

3 结论与讨论

试验结果表明,采用 HP-5 毛细管柱时,得到了很好的分离效果。在内标筛选方面,壬烷和癸烷均可作为内标,但壬烷有效成分与内标保留时间相隔比较近,选用癸烷与异硫氰酸烯丙酯分离效果较好。在进行样品检测时,每做一个样节约 15 min,提高了效率。由于异硫氰酸烯丙酯有很强的挥发性,在称取样品时,由于样品瓶中量很少,有一定的损失,因此,在进行室内检测时应控制检测室温度。在称取好样品后,立即加入 2 mL 溶剂,减少样品损失。利用所建立的气相色谱分析方法对异硫氰酸烯丙酯可溶液剂和异硫氰酸烯丙酯水乳剂进行定量分析,该方法的平均回收率分别为 99.01%、100.85%,具有较高的准确度和精密度,线性关系良好,符合《农药产品质量分析

方法确认指南》^[11]的要求,并且操作简便、快速,是异硫氰酸烯丙酯可溶液剂和异硫氰酸烯丙酯水乳剂产品进行质量检测的理想方法。

参考文献

- [1] 李迎宾,曹永松,罗来鑫,等. 异硫氰酸烯丙酯的农用活性与应用研究进展[J]. 植物保护, 2018, 44(5): 108-119.
- [2] 王泽荟. 4 种药剂处理土壤防治设施黄瓜根结线虫的效果[J]. 中国植保导刊, 2019, 39(5): 67-69.
- [3] 刘晓漫. 三七种子带菌检测与根腐病快速分子检测方法的建立及防治[D]. 北京:中国农业科学院, 2019.
- [4] 曹银,汪电雷,陶秀华,等. 超高效液相色谱法测定大鼠血浆中异硫氰酸烯丙酯含量及药动学参数[J]. 中国医院药学杂志, 2013, 33(4): 264-266.
- [5] 陈浩华,何海坚,卢泽鎔,等. 水体中异硫氰酸烯丙酯高效液相色谱分析方法的建立[J]. 科技创新导报, 2017, 14(10): 107-108.
- [6] 曹银,李曼,汪电雷,等. 气相色谱法测定白芥子挥发油中异硫氰酸烯丙酯的含量[J]. 安徽中医药大学学报, 2013, 32(3): 78-80.
- [7] 王翠萍,王山,张欢,等. 顶空固相萃取/表面增强拉曼法对挥发性农药的快速检测研究[J]. 分析测试学报, 2021, 40(8): 1158-1163.
- [8] 陈正毅,李运达,张卓旻,等. 微热助吹扫描集-超高压液相色谱-串联质谱法快速测定蔬菜中 12 种半挥发性农药残留[J]. 色谱, 2020, 38(1): 120-126.
- [9] 刘雁雨,魏京华,田建利,等. 80% 异硫氰酸烯丙酯母药 HPLC 法分析[J]. 农药科学与管理, 2019, 40(8): 50-53.
- [10] 赵锡锋,胡陈春,严纲,等. 农药中挥发性溶剂的气体检测方法研究[J]. 现代化工, 2020, 40(6): 243-246.
- [11] 农业部种植业管理司. 农药产品质量分析方法确认指南: NY/T 2887-2016 [S]. 北京:中国农业出版社, 2016.

(责任编辑:田 喆)

(上接 196 页)

- [5] SUNG D E, LEE J, HAN Y, et al. Effects of enzymatic hydrolysis of buckwheat protein on antigenicity and allergenicity [J]. Nutrition Research & Practice, 2014, 8(6): 278-283.
- [6] DURAZZO A, ZACCARIA M, POLITO A, et al. Lignan content in cereals, buckwheat and derived foods [J]. Foods, 2013, 2(1): 53-63.
- [7] 王安虎,谢平. 凉山地区荞麦资源、营养价值及其发展前景[J]. 园艺与种苗, 2006, 26(2): 147-149.
- [8] 向达兵,彭镰心,邹亮,等. 荞麦栽培研究进展[J]. 作物杂志, 2013(3): 1-6.
- [9] 范小君. 凉山州苦荞麦产业发展研究[D]. 雅安:四川农业大学, 2009.
- [10] 林巧,惠广萍,肖诗明,等. 凉山苦荞产业发展状况探究[J]. 南方农业, 2018(2): 105-109.
- [11] 王滨. 凉山:世界苦荞之都[J]. 黑龙江粮食, 2019(5): 41-44.
- [12] 齐杨菊,陈振江,李振霞,等. 荞麦病害研究进展[J]. 草业科学, 2020, 37(1): 75-86.
- [13] AJIEKCEBA E C, 李森,卢瑞芳. 提高荞麦的抗病性[J]. 国

外农学: 杂粮作物, 1992(5): 46-49.

- [14] 梁宇. 荞麦细菌性叶斑病病原鉴定[C]//中国植物病理学会. 中国植物病理学会 2014 年学术年会论文集. 北京:中国农业科学技术出版社, 2014.
- [15] LANE D J. 16S/23S rRNA sequencing [C]//STACKEBRANDT E, GOODFELLOW M. Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Chichester, UK: Wiley, 1991: 115-175.
- [16] 谢关林,徐传雨,任小平. 稻谷病原细菌 *Pantoea agglomerans* 的特征化研究[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2001, 27(3): 317-320.
- [17] 廖映凯,罗吉,许芮涵,等. 四川地区藜麦叶斑病病原菌的分离及鉴定[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(1): 60-66.
- [18] 王大会,蒋承耿,王忠宇,等. 一种烟草细菌性叶枯病病原鉴定及防治药剂筛选[J]. 中国烟草科学, 2021, 42(3): 65-70.
- [19] 黄荣,姚博,张玉娟,等. 成团泛菌 CQ10 脂多糖对紫花苜蓿种子萌发及苗期生长的影响[J]. 草地学报, 2021, 29(5): 965-971.

(责任编辑:杨明丽)