

魔芋软腐病病原菌 TaqMan 荧光探针 PCR 技术的建立及应用

卢美欢^{1,2} 李利军^{1*} 马英辉¹ 王晓兵³ 郭邦利⁴ 王晓娥⁵

(1. 陕西省微生物研究所, 西安 710043; 2. 西北农林科技大学植物保护学院, 陕西 杨凌 712100;

3. 安康市岚皋县魔芋局, 陕西 岚皋 725400; 4. 安康市农业科学研究所, 陕西 安康 725021;

5. 汉中市农业科学研究所, 陕西 汉中 723000)

摘要: 为实现对田间土壤软腐病病原菌的定量检测, 基于魔芋软腐病优势病原菌胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种 *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* 的 *FyuA* 基因序列, 设计特异性引物 PCC1/PCC2/PCC3, 建立 TaqMan 荧光探针实时荧光定量 PCR 技术, 并对魔芋根系土壤中软腐病病原菌进行动态监测。结果显示: 基于 *FyuA* 基因序列设计的引物特异性好, 仅能特异性检出胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种; 当模拟带菌土壤中病原菌浓度低至 1.88 CFU/g 时也能检出, 灵敏度高; 发病魔芋根际土壤中软腐病病原菌检出率为 100.00%, 病原菌 DNA 浓度最高达到了 7.52×10^7 ng/ μ L, 健康魔芋根际土壤中也存在病原菌, 检出率为 40.00%; 不同种植模式中, 林下魔芋土壤中软腐病病原菌数量较少; 连作时间与病原菌数量、病情指数存在正相关关系, 连作时间越长, 病原菌积累越多, 魔芋病情指数也越高, 魔芋连作 4 年土壤中病原菌 DNA 浓度最高达到 4.03×10^4 ng/ μ L; 对魔芋土壤软腐病病原菌进行全年监测, 病原菌数量随着月份增长逐渐上升, 在 8—10 月达到峰值 543.20 ng/ μ L 后下降, 病原菌数量与魔芋病情指数变化规律一致, 但田间魔芋软腐病的发生相对滞后。表明建立的 TaqMan 荧光探针实时荧光定量 PCR 技术可用于田间魔芋软腐病的监测。

关键词: 魔芋; 软腐病; 胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种; PCR; 监测

Establishment and application of TaqMan fluorescence probe real-time PCR detection for the pathogen of konjac soft rot

Lu Meihuan^{1,2} Li Lijun^{1*} Ma Yinghui¹ Wang Xiaobing³ Guo Bangli⁴ Wang Xiao'e⁵

(1. Microbiology Institute of Shaanxi, Xi'an 710043, Shaanxi Province, China; 2. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 71200, Shaanxi Province, China; 3. Konjac Bureau of Langao County, Ankang City, Langao 725400, Shaanxi Province, China; 4. Ankang Municipality Agricultural Science Research Institute, Ankang 725021, Shaanxi Province, China; 5. Hanzhong Agricultural Science Institute, Hanzhong 723000, Shaanxi Province, China)

Abstract: In order to quantify the pathogen of konjac soft rot in field soils, a TaqMan fluorescent probe PCR detection system was established. The specific primers PCC1/PCC2/PCC3 were designed based on *FyuA* gene sequence of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. The results showed that the dominant pathogen of konjac soft rot *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* could be detected specifically and sensitively, with a threshold as low as 1.88 CFU/g. The detection rate of the pathogen of soft rot in the rhizosphere soil of konjac was 100.00% by real-time fluorescence quantitative PCR, and the DNA concentration of the pathogen was up to 7.52×10^7 ng/ μ L. Moreover, the pathogen was found in the rhi-

zosphere soil of healthy konjac, with a detection rate of 40.00%. The number of soft rot pathogen was lower when konjac was planted under the trees. There were positive correlations between the continuous cropping time and the disease index as well as the number of pathogen. Longer cropping period caused more pathogenic bacteria accumulated and higher incidence rate. Furthermore, the pathogen DNA concentration was as high as 4.03×10^4 ng/ μ L in the soil where konjac had been continuously cropped for four years. The pathogen of soft rot in konjac soils was monitored in the whole year, showing that the pathogen gradually increased from January, reached the peak (543.20 ng/ μ L) from August to October, and then decreased after October. The number of pathogen was consistent with the disease index, but the incidence of the disease was relatively delayed in the field. It indicated that this method was suitable for monitoring and preventing the konjac soft rot in the field.

Key words: konjac; soft rot; *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*; PCR; monitoring

魔芋又名鬼芋、蒟蒻等,被子植物天南星科魔芋属,块茎内含丰富的葡甘露聚糖、果胶、生物碱及17种氨基酸和多种微量元素(刘佩瑛,2004)。魔芋精粉可广泛用于食品、医疗、化工、造纸、纺织、石油等行业,被称为“东方魔粉”(牛义等,2005)。由于魔芋经济价值较高,是陕西、贵州、云南、四川等省山区的优势经济作物,也是近年来精准扶贫重点推广种植作物。然而,软腐病的频繁暴发严重影响了魔芋种植业的发展。随着魔芋种植面积不断扩大,软腐病的发病率越来越高,产量损失达30%~50%,甚至绝收,造成了很大的经济损失(丁自立等,2014)。魔芋软腐病为土传性病害,病原菌广泛分布在土壤中,对土壤中病原菌进行定量检测和动态监测,可对病害进行早期预报预警,因此建立简单、快速、灵敏的检测方法,掌握魔芋种植地的土壤病原菌情况,进行针对性的有效预防对于魔芋种植业的健康持续发展具有重要意义。

目前对土壤病原菌的检测方法常用传统培养法和常规PCR技术,传统培养法耗时长、难以对病原菌单独计数,而常规PCR技术所用引物特异性弱、灵敏度低,无法进行准确定量检测。实时荧光定量PCR技术具有反应快、重复性好、灵敏度高、特异性强、结果清晰等优点,在动植物基因工程和检疫、微生物鉴定与分类、食品安全检测和医学等领域中得到广泛应用(Filion et al., 2003; 吴静等, 2007; 李凤兰等, 2010)。TaqMan荧光探针PCR技术是实时荧光定量PCR技术中常用的检测方法,通过在扩增时加入1对引物的同时加入1个荧光标记的特异性探针,可以实现PCR产物形成与荧光信号累积完全同步(Klein, 2002)。相比SYBR Green I等荧光染料PCR技术, TaqMan荧光探针PCR技术特异性更好、灵敏度更高(伊望和蔡雪凤, 2013)。实时荧光定量

PCR技术于1999年首次应用于植物病理的相关研究(Böhm et al., 1999),目前已应用于马铃薯真菌和细菌病害(Cullen et al., 2001; 杨松, 2009; 陈恩发, 2011)、根结线虫(赵伟, 2005)、辣椒疫霉 *Phytophthora capsici* (程颖超等, 2018)、十字花科细菌性黑斑病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* (王道泽等, 2016)等的检测。采用实时荧光定量PCR技术可实现对土壤中病原菌的限量检测,高苇等(2014)建立的土壤中多主棒孢 *Corynespora cassiicola* 实时荧光定量PCR技术,检测下限为1个孢子/g土壤;葛波等(2018)建立的禾谷镰孢菌 *Fusarium graminearum* 实时荧光定量PCR技术,检测下限为1 pg/ μ L病原菌DNA。在魔芋软腐病菌检测方面,张小芳等(2017)建立的血清学检测方法灵敏度仅为 10^3 CFU/mL。

软腐病主要由软腐果胶杆菌属 *Pectobacterium* 真菌引起,包括胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种 *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* 和菊果胶杆菌 *P. chrysanthemi* (何煜波等, 2007),其中前者出现频率最高,是魔芋软腐病的优势病原菌。本课题组前期在陕西省南部采集分离的病原菌经鉴定均属于胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种(卢美欢等, 2018)。在此基础上,本研究拟通过建立魔芋软腐病病原菌TaqMan荧光探针PCR检测体系,对魔芋土壤软腐病优势病原菌胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种进行检测,旨在实时监测土壤中病原菌的变化,实现病害的早期检测,并根据土壤中病原菌变化与魔芋软腐病发生的关系,明确魔芋软腐病的发生规律,以期为该病害的早期防控提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株:供试阳性菌株魔芋软腐病菌有6株,

即胡萝卜软腐果胶菌胡萝卜亚种菌株 M1、M12、M13、M15、M20、M26, 阴性对照菌株包括胡萝卜软腐果胶菌黄檀亚种 *P. carotovorum* subsp. *odoriferum* 菌株 K34、胡萝卜软腐果胶菌黑腐亚种 *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum* 菌株 H14、菊果胶杆菌 *P. chrysanthemi*、魔芋白绢病菌(齐整小核菌 *Athelia rolfsii* 菌株 BJ-1)、烟草青枯病菌(雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 菌株 Q2-1)、甘蓝黑腐病菌(黄单胞菌 *Xanthomonas campestris* 菌株 A150), 上述病菌均由陕西省微生物研究所菌种中心提供。

供试魔芋及培养基: 魔芋品种均为花魔芋, 魔芋块茎由安康市农业科学研究院提供, 在各种植基地正常播种栽培, 常规管理。LB (Luria-Bertani) 液体培养基: 胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、氯化钠 10 g、蒸馏水 1 000 mL, pH 7.2。

试剂: *Taq* DNA 聚合酶、10×PCR Buffer、dNTP、10×TAE (400 mmol/L Tris-acetate、10 mmol/L EDTA, pH 8.0)、pMD[®] 18-T 载体、SK8191 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、真菌基因组 DNA 抽提试剂盒、琼脂糖柱式 DNA 胶回收试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; MP 土壤 DNA 抽提试剂盒, 美国 Mpbio 公司; 其它试剂均为国产分析纯。

仪器: HC-2518R 高速冷冻离心机, 安徽中科中佳仪器有限公司; DYY-6C 型稳压稳流电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; H6-1 微型电泳槽, 上海精益有机玻璃制品仪器厂; FR-980A 凝胶成像系统, 上海复日科技有限公司; TU-1901 紫外分光光度计, 北京普析通用仪器有限公司; GeneAmp PCR System 9700 基因扩增仪、ABI 7500 Real-Time PCR System, 美国 ABI 公司; PHS-3C 型精密酸度计, 上海精密科学仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及 *TaqMan* 荧光探针引物特异性检测

所有供试菌株分别参照细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书、真菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书提取菌株各自的基因组 DNA; 土壤 DNA 参照 MP 土壤 DNA 抽提试剂盒说明书提取。

根据软腐病原菌胡萝卜软腐果胶菌胡萝卜亚种的 *FyuA* 基因序列, 利用 Primer Premier 5.0 软件设计 *TaqMan* 荧光探针特异性引物, 分别为 PCC1 (5'-CTCTCTTCTTATGCCTTTG-3')、PCC2 (5'-GTGG-AAGAGAYGTTATTG-3') 及 PCC3 (FAM-ATACGC-TTGTTGTCACCGCC-BHQ1), 探针引物委托生工

生物工程(上海)股份有限公司合成。以 6 株不同来源的胡萝卜软腐果胶菌胡萝卜亚种菌株 M1、M12、M13、M15、M20、M26 的 DNA 为阳性对照, 以胡萝卜软腐果胶菌黄檀亚种、胡萝卜软腐果胶菌黑腐亚种、菊果胶杆菌、魔芋白绢病菌、烟草青枯病菌、甘蓝黑腐病菌的 DNA 为阴性对照, 同时以灭菌水为模板作空白对照, 用 *TaqMan* 荧光探针特异性引物 PCC1/PCC2/PCC3 在同样条件下进行实时荧光定量 PCR 扩增, 检测引物的特异性。28 μL 反应体系: DNA 4 μL、10×PCR Buffer 4 μL、25 mmol/L Mg²⁺ 3.2 μL、10 mmol/L dNTP 0.8 μL、20 pmol/μL 引物 PCC1/PCC2 各 1.2 μL、20 pmol/μL 探针 PCC3 0.2 μL、*Taq* DNA 聚合酶 0.4 μL、无菌水 13 μL。反应程序: 37℃ 预热 2 min; 94℃ 预变性 2 min; 93℃ 变性 15 s; 50℃ 退火 60 s, 共 45 个循环。单点荧光检测温度 50℃, 采用 FAM 通道监测扩增数据。PCR 扩增结果采用 SLAN 全自动医用 PCR 分析系统进行分析。

1.2.2 魔芋软腐病原菌质粒构建及标准曲线建立

采用细菌基因组 DNA 抽提试剂盒提取魔芋软腐病原菌菌株 M1 的 DNA 进行 PCR 扩增。25.5 μL 反应体系: 模板 DNA 0.5 μL、10 μmol/L 引物 PCC1/PCC2/PCC3 各 0.5 μL、10 mmol/L dNTP 0.5 μL、10×PCR Buffer 2.5 μL、25 mmol/L MgCl₂ 2 μL、5 U/μL *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL、ddH₂O 18.3 μL。反应程序: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 57℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72℃ 修复延伸 8 min。经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR。回收魔芋软腐病原菌 PCR 扩增产物, 与 pMD[®] 18-T 载体连接, 连接反应体系: 10×TAE 缓冲液 5 μL、pMD[®] 18-T 载体 10 ng、PCR 产物 5 μL, 终体积 10 μL。4℃ 过夜连接, 转化。提取并检测带有目的片段的质粒。使用 SK-8191 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒 DNA。构建好的质粒经过测序鉴定无误后, 检测质粒浓度。将已知浓度为 5.00×10⁷ copies/mL 的质粒标定为标准品 I, 然后对其进行 10 倍稀释, 共稀释 3 个梯度, 标定为标准品 II、III、IV, 用于制定标准曲线。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 方法灵敏度检测

将软腐病原菌菌株 M1 接种至 LB 液体培养基中, 30℃、150 r/min 培养 2 d, 采用平板计数法测定发酵液的病原菌菌落数为 1.88×10¹⁰ CFU/mL, 加入无菌水稀释成浓度分别为 1.88×10⁶、1.88×10⁵……1.88×10⁰ CFU/mL 的菌悬液。将菌悬液分别加入到 100 g 灭菌土中, 制备成浓度为 1.88×10⁶、1.88×10⁵……

1.88×10⁰ CFU/g的带菌土壤,每个浓度3次重复。分别在每个浓度的带菌土壤中随机抽取1 g土样,采用MP土壤DNA抽提试剂盒提取带菌土壤的总DNA,参照1.2.1反应体系及程序进行实时荧光定量PCR检测,确定该引物对土壤中魔芋软腐病病原菌的检测灵敏度。

1.2.4 TaqMan 荧光探针PCR技术检测土壤含菌量

不同来源的魔芋土壤中病原菌的检测:于2016年7—8月分别从陕南的安康市、汉中市、商洛市、周至县选取10个魔芋种植样地,大小在600~1 400 m²之间,分别采集健康和发病魔芋,首先用铁锹将魔芋根系挖出,抖落外围土壤,然后收集粘在魔芋根系的土壤,采用五点取样法在每个样地分别取5株魔芋根际土壤合并为1个样品,作为1个样地的代表土样。健康魔芋根际土壤编号分别为JG1、JG2、JG3、JG4.....JG10,发病魔芋根际土壤编号分别为BG1、BG2、BG3、BG4.....BG10。利用MP土壤DNA抽提试剂盒分别提取这些土壤的总DNA,参照1.2.1反应体系及程序进行魔芋软腐病病原菌的实时荧光定量PCR检测。

不同种植方式的魔芋土壤中病原菌的检测:于2016年7—8月分别从安康市、汉中市、商洛市、周至县选择不同种植方式的魔芋地块采集非根际土壤,包括林下种植、玉米套种、果蔬套种、大棚种植魔芋,每种种植方式选1~4块样地,大小在600~1 400 m²之间。首先除去地面植被和落叶,铲除表面5 cm左右的表土,采集魔芋根系周围5~20 cm耕层土样,采用五点取样法在每种种植方式大田的5个不同地点分别采集0.5 kg土壤,将5份土样混匀作为1个样地的代表土样,剔除石子或植被残根等杂物后装袋带回实验室。土壤过1 mm筛后放入4℃冰箱保存,采用MP土壤DNA抽提试剂盒提取土壤微生物DNA,参照1.2.1反应体系及程序进行魔芋软腐病病原菌的实时荧光定量PCR检测。

不同连作年限的魔芋土壤中病原菌的检测:于2017年10月魔芋收获前期,在安康市农业科学研究所魔芋种植基地,选择连作年限分别为1、2、3、4年及不种植魔芋的地块采集非根际土壤,由于当地地形的限制,连作1、4年地块选2块,连作2、3年地块选3块,不种植魔芋的地块选择常与魔芋套种的玉米地2块和湿度较大的沼泽地1块,所有样地大小在600~1 400 m²之间,采样方法同上。利用MP土壤DNA抽提试剂盒提取土壤微生物DNA,参照1.2.1反应体系和程序进行魔芋软腐病病原菌含量的实时

荧光定量PCR检测,并结合病情指数进行分析。病情指数=Σ(各级病株数×该病级值)/(调查总株数×最高级值)×100。软腐病病情调查方法:4月初播种后,直至10月收获前期,每半个月调查统计1次魔芋软腐病发病情况,病情分级标准为:0级:无病害;1级:叶梢发黄;2级:叶片部分发黄;3级:叶片全部发黄,萎蔫,植株不倒伏;4级:植株倒伏,茎中空腐烂,有腐臭味。

全年魔芋种植期内土壤中病原菌的检测:于2017年魔芋生长期,对安康市岚皋县魔芋局城关镇梨树村魔芋基地中林下(板栗)种植和玉米套种2种植方式地块的魔芋非根际土壤病原菌进行全年定时监测,取样方法与不同种植方式魔芋土壤采集方法相同,检测方法同1.2.1,同时测定土壤pH和水分含量,并结合病情指数进行分析。土壤类型为偏砂壤黄泥土,地块较背阴,海拔720 m。玉米套种地为第2年种植,前茬作物为玉米和红薯,播种时间为3月26日,11月7日收获。土壤pH测定:称取过20目筛的风干土壤10 g,置于100 mL烧杯中,加入50 mL蒸馏水,搅拌均匀,静置30 min,澄清后用酸度计测定pH,每个样品测3个平行。水分测定:取10 g土样于100℃烘干至恒重,称重,测定水分损失率,计算土壤水分含量,每个样品测3个平行。

1.3 数据分析

采用Origin 2018软件对试验数据进行统计分析,应用Duncan氏新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 实时荧光定量PCR检测引物的特异性

TaqMan 荧光探针PCR扩增结果显示,只有以魔芋软腐病原菌胡萝卜软腐果胶菌胡萝卜亚种6株菌株的DNA为模板扩增时出现阳性反应,采集获得荧光增长曲线,而对其它6株阴性对照菌株的DNA以及空白对照进行扩增时均未获得荧光累积(图1)。表明设计的引物PCC1/PCC2/PCC3具有很好的特异性。

2.2 定量标准曲线的建立

用已知质粒浓度标准品制作标准曲线,质粒DNA浓度的对数(x)与对应的Ct值(y)具有良好的线性关系,标准曲线为 $y=-3.577x+45.235$,相关系数R²为0.999 8,大于0.990 0,扩增效率为90.36%,表明标准曲线满足要求。

2.3 实时荧光定量PCR检测的灵敏度

当土壤中魔芋软腐病病原菌数量低至1.88 CFU/g

时,通过实时荧光定量PCR检测出对应病原菌DNA浓度为8.17 ng/ μ L(图3),表明该方法灵敏度非常高,能对土壤中病原菌含量进行有效监测。

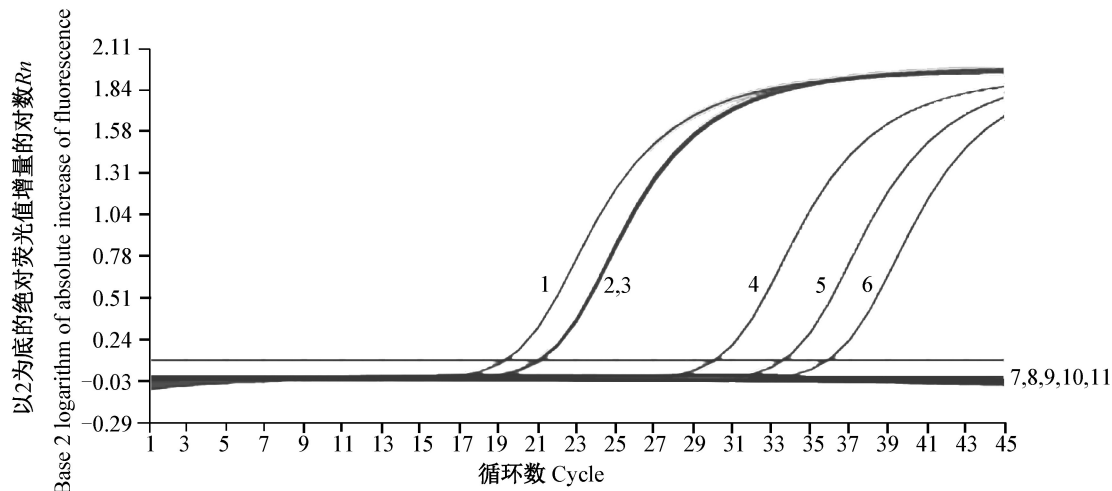


图1 实时荧光定量PCR检测引物的特异性

Fig. 1 Primer-specific detection by real-time quantitative PCR

1~6: 分别为胡萝卜软腐果胶菌胡萝卜亚种 M20、M1、M15、M26、M13、M13 菌株; 7: 胡萝卜软腐果胶菌黄檀亚种; 8: 胡萝卜软腐果胶菌黑腐亚种; 9: 菊果胶杆菌; 10: 魔芋白绢病菌; 11: 烟草青枯病菌; 12: 甘蓝黑腐病菌; 13: 无菌水对照。1~6: *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* strains M20, M1, M15, M26, M13, M13; 7: *P. carotovorum* subsp. *odoriferum*; 8: *P. carotovorum* subsp. *atrosepticum*; 9: *Pectobacterium chrysanthemi*; 10: *Athelia rolfsii*; 11: *Ralstonia solanacearum*; 12: *Xanthomonas campestris*; 13: sterile water (CK).

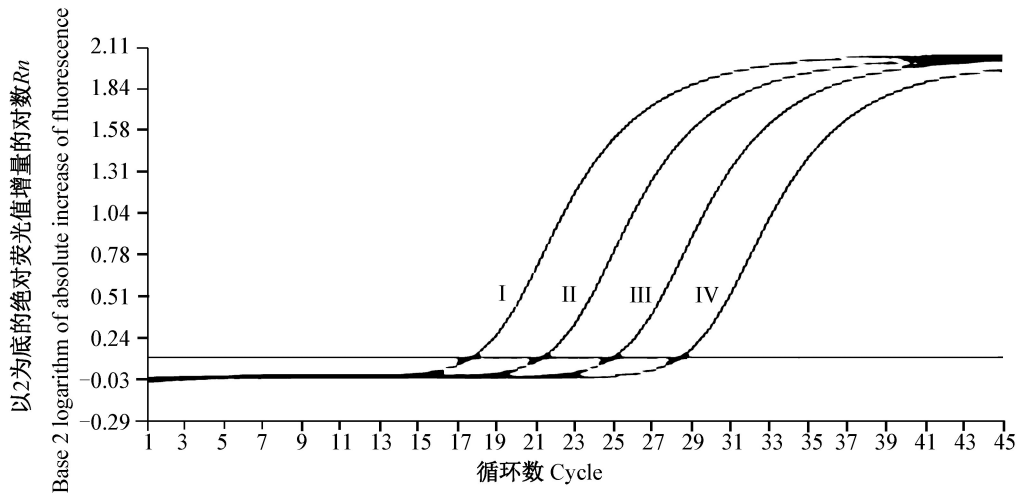


图2 魔芋软腐病病原菌10倍梯度稀释质粒DNA的TaqMan探针PCR扩增曲线

Fig. 2 TaqMan probe PCR amplification curve of $10\times$ gradient dilution of konjac soft rot pathogen plasmid DNA

I~IV: 质粒浓度分别为 5.00×10^7 、 5.00×10^6 、 5.00×10^5 、 5.00×10^4 copies/mL。I~IV: The plasmid concentrations were 5.00×10^7 , 5.00×10^6 , 5.00×10^5 , 5.00×10^4 copies/mL.

2.4 不同来源魔芋根际土壤中软腐病病原菌的检测

不同来源的健康和发病魔芋根际土壤中软腐病病原菌DNA浓度检测结果显示,健康魔芋根际土壤中也存在病原菌,检出率为40.00%,软腐病病原菌DNA浓度分别为 2.21×10^2 、 2.28×10^2 、 3.38×10^2 、 12.82 ng/ μ L(表1)。但在根际土壤中检出病原菌的健康魔芋并没有发病,可能原因是根际土壤中病原

菌的浓度较低,加上魔芋植株健壮,不容易发病。发病魔芋根际土壤软腐病病原菌检出率为100.00%,病原菌DNA浓度最高达到了 7.52×10^7 ng/ μ L,本研究10个样本中有7个样本的病原菌DNA浓度达到了 10^3 ng/ μ L以上,分别为 5.62×10^4 、 7.52×10^7 、 1.61×10^4 、 9.25×10^4 、 1.20×10^3 、 1.30×10^3 、 1.99×10^5 ng/ μ L,其中DNA最低浓度也达到51.60 ng/ μ L,表明病原菌浓

度处于较高水平。可见土壤中病原菌浓度高是软腐病发病的重要原因。

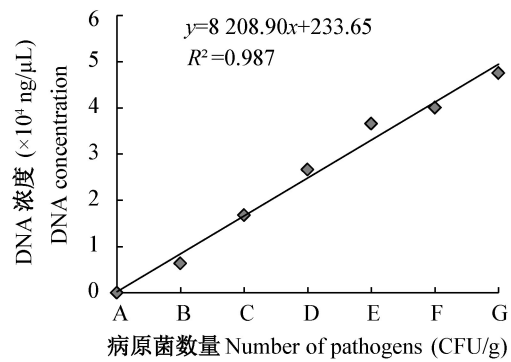


图3 不同浓度模拟带菌土壤中魔芋软腐病病原菌的检测结果

Fig. 3 Detection of konjac soft rot pathogen in simulated soils at different concentrations
A-G: 1.88×10⁰, 1.88×10¹, 1.88×10², 1.88×10³, 1.88×10⁴, 1.88×10⁵, 1.88×10⁶ CFU/g.

表1 不同来源魔芋根际土壤中软腐病病原菌 DNA 浓度的检测结果

Table 1 Detection of DNA concentration of soft rot pathogens in healthy and diseased konjac rhizosphere soils

来源 Source	编号 No.	Ct	病原菌 DNA 浓度 DNA concentration of pathogen (ng/μL)	来源 Source	编号 No.	Ct	病原菌 DNA 浓度 DNA concentration of pathogen (ng/μL)
健康魔芋 根际土壤 Healthy konjac rhizosphere soil	JG1	36.85±2.14 AB	2.21×10 ² ±11.32 B	发病魔芋 根际土壤 Diseased konjac rhizosphere soil	BG1	28.25±1.51 C	5.62×10 ⁴ ±87.33 D
	JG2	—	阴性 Negative		BG2	17.06±1.47 D	7.52×10 ⁷ ±547.34 A
	JG3	36.65±1.45 AB	2.28×10 ² ±9.68 B		BG3	30.19±2.68 C	1.61×10 ⁴ ±319.80 E
	JG4	41.09±2.78 A	12.82±1.36 C		BG4	27.47±1.95 C	9.25×10 ⁴ ±140.48 C
	JG5	—	阴性 Negative		BG5	34.22±2.47 B	1.20×10 ³ ±53.21 F
	JG6	32.49±2.82 C	3.38×10 ² ±54.72 A		BG6	34.10±1.95 B	1.30×10 ³ ±42.67 F
	JG7	—	阴性 Negative		BG7	26.28±3.67 C	1.99×10 ⁵ ±321.79 B
	JG8	—	阴性 Negative		BG8	39.11±2.46 A	51.60±5.74 H
	JG 9	—	阴性 Negative		BG 9	34.82±2.71 B	8.18×10 ² ±24.35 G
	JG10	—	阴性 Negative		BG10	36.07±1.38 AB	3.33×10 ² ±12.45 B

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.01$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.01$ level by Duncan's new multiple range test.

2.5 种植方式对魔芋非根际土壤中软腐病病原菌的影响

不同种植方式下魔芋非根际土壤中软腐病病原菌 DNA 浓度检测结果显示,林下种植魔芋非根际土壤中软腐病病原菌检出量最少,仅汉中市宁强县林下魔芋非根际土壤中检测出少量病原菌,DNA 浓度为 2.26 ng/μL,其余林下魔芋非根际土壤中均未检测到病原菌 DNA(表 2)。玉米套种、大棚种植魔芋非根际土壤中均能检出病原菌 DNA,安康市恒口镇大棚种植魔芋非根际土壤中病原菌 DNA 浓度最高,达 3.52×10² ng/μL。蔬菜套种魔芋非根际土壤中未检出病原菌 DNA。

2.6 连作年限对魔芋土壤软腐病病原菌的影响

不同连作年限魔芋土壤中软腐病病原菌 DNA 浓度检测结果显示,连作时间与病原菌数量、病情指数存在正相关关系,连作时间越长,病原菌积累越多,病情指数也越高。连作 4 年的 2 个不同地块土壤

中魔芋软腐病病原菌 DNA 浓度分别达到 1.14×10⁴、4.03×10⁴ ng/μL,病情指数高达 68.21 和 67.06(表 3)。表明随着连作年限减少,病原菌数量也呈现下降趋势。未种植魔芋地块也存在少量病原菌,玉米地(地块 1、2)和沼泽地土壤中软腐病病原菌 DNA 浓度分别是 7.68、2.68、9.83 ng/μL,说明软腐病病原菌在土壤中广泛存在。

2.7 全年种植期内魔芋软腐病病原菌的监测

2.7.1 林下种植非根际土壤中魔芋软腐病病原菌监测

林下种植非根际土壤中魔芋软腐病病原菌在播种后至 7 月检测结果为阴性,8 月开始检测出病原菌,DNA 浓度为 51.40 ng/μL,9 月达到峰值 279.40 ng/μL,之后逐渐下降,直到 12 月 20 日检测结果再次为阴性(图 4)。林下种植魔芋田中软腐病也在 8 月份开始发生,但病情指数维持在较低水平。10 月份岚皋县出现连阴雨,土壤水分含量达到 28.24%,软腐病病

情指数此时继续上升,表明魔芋软腐病病原菌受土壤水分含量的影响较大,土壤中水分含量高时有利于软腐病病原菌繁殖扩散,但与土壤pH的变化关系不大。

表2 不同种植方式下魔芋非根际土壤中软腐病病原菌DNA浓度的检测结果

Table 2 Detection of DNA concentration of pathogen of soft rot in non-rhizosphere soils of konjac under different planting patterns

种植方式 Planting pattern	地点 Location	Ct	病原菌DNA浓度 DNA concentration of pathogen (ng/μL)
林下种植 Forest planting	岚皋县 Langao County	—	阴性 Negative
	商洛市商州区 Shangzhou District, Shangluo City	—	阴性 Negative
	汉中市宁强县 Ningqiang County, Hanzhong City	43.76±3.20 A	2.26±0.14 D
	周至农家乐果蔬合作社 Zhouzhi Farmhouse Fruit and Vegetable Cooperative	—	阴性 Negative
玉米套种 Corn intercropping	岚皋县 Langao County	37.14±1.49 BC	1.66×10 ³ ±15.97 C
	商洛市商州区 Shangzhou District, Shangluo City	42.53±4.19 A	5.02±0.45 D
	安康市恒口镇 Hengkou Town, Ankang City	36.35±2.67 BC	3.05×10 ² ±31.22 B
		37.57±1.65 B	1.39×10 ² ±17.43 C
	汉中市宁强县 Ningqiang County, Hanzhong City	37.40±3.31 B	1.40×10 ² ±26.69 C
蔬菜套种 Vegetable interplanting	周至县农家乐果蔬合作社 Zhouzhi Farmhouse Fruit and Vegetable Cooperative	—	阴性 Negative
大棚种植 Greenhouse planting	安康市恒口镇 Hengkou Town, Ankang City	33.25±1.58 BC	3.38×10 ² ±17.10 AB
		32.40±2.17 C	3.52×10 ² ±34.23 A

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.01$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.01$ level by Duncan's new multiple range test.

表3 不同连作年限魔芋地块土壤中软腐病病原菌DNA浓度与发病情况

Table 3 DNA concentrations of pathogen and incidences of soft rot in konjac planting areas in different continuous cropping years

连作年限 Continuous cropping year	采样点 Sampling site	Ct	病原菌DNA浓度 DNA concentration of pathogen (ng/μL)	病情指数 Disease index
魔芋连作4年 Konjac continuous cropping for four years	1	30.62±2.56 EF	1.14×10 ⁴ ±74.85 B	68.21±2.84 A
	2	28.67±1.78 F	4.03×10 ⁴ ±49.29 A	67.06±3.65 A
魔芋连作3年 Konjac continuous cropping for three years	1	37.39±3.69 BCD	1.41×10 ² ±36.53 F	58.41±7.80 B
	2	34.96±2.31 CDE	6.82×10 ² ±9.86 D	66.59±2.67 A
	3	33.47±2.84 DE	1.79×10 ³ ±57.80 C	51.43±5.54 C
魔芋连作2年 Konjac continuous cropping for two years	1	33.50±1.77 DE	1.76×10 ³ ±41.62 C	46.25±2.32 CD
	2	35.32±3.32 CDE	5.42×10 ² ±23.62 E	58.52±5.78 B
	3	37.53±1.45 BCD	1.29×10 ² ±47.94 F	49.45±1.97 CD
魔芋连作1年 Konjac continuous cropping for one year	1	39.07±2.55 ABC	47.49±3.77 GH	44.83±3.64 D
	2	37.25±3.27 BCD	1.55×10 ² ±1.89 F	34.71±1.99 E
	3	38.66±2.89 BC	62.04±5.84 G	—
玉米地 Corn field	1	41.88±4.11 AB	7.68±0.34 GH	—
	2	43.50±3.28 A	2.68±0.22 I	—
沼泽地 Wetland		41.50±2.81 AB	9.83±0.78 GH	—

表中数据为平均数±标准差。同列数据后不同字母表示经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P<0.01$ 水平差异显著。Data are mean±SD. Different letters in the same column indicate significant difference at $P<0.01$ level by Duncan's new multiple range test.

2.7.2 玉米套种非根际土壤中魔芋软腐病病原菌监测

玉米套种非根际土壤中魔芋软腐病病原菌在4—6月底检测结果为阴性,7月检测结果始为阳性,病原菌出现时间比林下种植早。玉米套种非根际土壤中软腐病病原菌在7—12月均能检测到,存活时

间长,且病原菌DNA浓度更高,峰值达543.20 ng/μL,相应的病情指数也高,7月为2.00,8月上升到8.00,到10月阴雨期达到最高值15.00(图5)。软腐病病原菌DNA浓度在9—11月仍缓慢上升,跟该段时间雨水充足有关,与林下种植非根际魔芋土壤中病原

菌发生趋势一致。12月后病原菌数量快速下降。

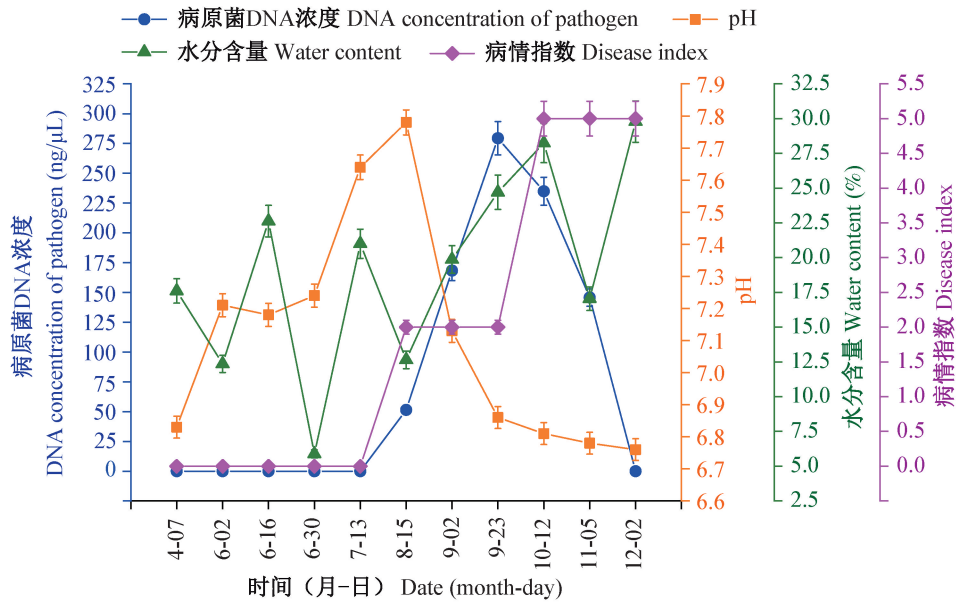


图4 岚皋县城关镇梨树村林下魔芋基地非根际土壤中软腐病病原菌监测曲线

Fig. 4 Surveillance curve of pathogenic bacteria of soft rot in non-rhizosphere soils of the forest konjac base in Lishu Village, Chengguan Town, Langao County

图中数据为平均数±标准差。Data are mean±SD.

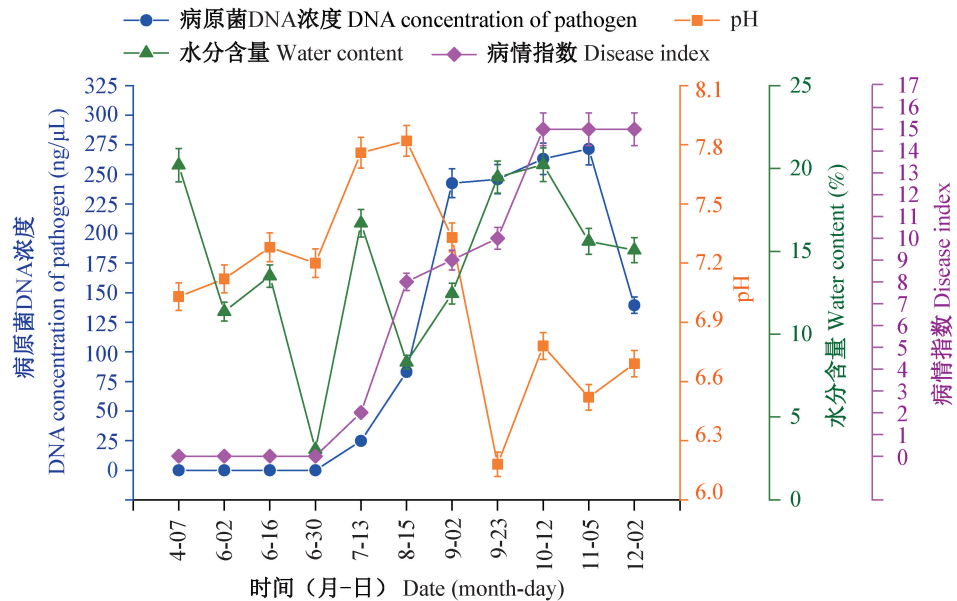


图5 岚皋县城关镇梨树村玉米套种魔芋基地非根际土壤中软腐病病原菌监测曲线

Fig. 5 Surveillance curve of pathogenic bacteria of soft rot in non-rhizosphere soils of the corn-covered konjac base in Lishu Village, Chengguan Town, Langao County

图中数据为平均数±标准差。Data are mean±SD.

3 讨论

在胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种的PCR检测方面,现有研究大部分是基于*Pel*、*pmrA*基因(Wu et al., 2011; Kettani-Halabi et al., 2013; Ranjan et al.,

2016)进行引物设计。本研究利用胡萝卜软腐果胶杆菌胡萝卜亚种的*FyuA*基因序列设计特异性引物PCC1/PCC2/PCC3,成功建立了魔芋软腐病优势病原菌TaqMan荧光探针法PCR检测技术。*FyuA*基因是强毒力岛基因检测的标志性基因,是一种负责编

码合成、调节和运输铁转运系统相关受体蛋白的基因,可显著提高细菌的毒力(Schubert et al., 1998)。本研究所建立的魔芋软腐病病原菌检测方法特异性好、灵敏度高,当土壤中病原菌低至 1.88 CFU/g 时也能检测出,且该检测体系不仅可以用于土壤中病原菌的检测,也可以用于魔芋种芋和植株中软腐病病原菌的检测,特别是种芋中病原菌的检测,可以实现病害的源头控制。

本试验通过对魔芋健康和发病根际土壤中软腐病病原菌的检测,发现根际土壤病原菌含量高是魔芋软腐病发生的重要原因,降低土壤病原菌含量是减少魔芋发病的有效途径。不同种植方式对魔芋土壤软腐病病原菌含量也有较大影响,林下种植是有效减少软腐病病原菌及魔芋病情指数的有效方式。推测原因为林下魔芋田由于树林遮挡,地表升温慢,温度较低不利于病原菌繁殖生长,因此林下种植整体病原菌出现晚,发病也晚。这与何斐等(2015)研究结论一致,该研究认为林下魔芋健康高产与其根区、根表及根外土壤中特有的有益优势微生物数量多、有害微生物数量少以及土壤有机质含量高密切相关。林下种植模式在云南、湖北、陕西等省多地被推广,并取得了较好的经济效益(崔鸣, 2012)。值得注意的是,在周至农家乐果蔬合作社林下魔芋和蔬菜套种魔芋土壤中均没有检测出软腐病病原菌,当地魔芋软腐病发病率也较低,可见将魔芋北移至秦岭北麓种植,可以作为有效减少软腐病发生的一种探索。

不同连作年限魔芋土壤中软腐病病原菌的检测结果显示,连作种植会增加土壤中软腐病病原菌的积累,最终导致软腐病高发。这与彭金波等(2007)的调查结果一致,即魔芋连作田块一直是软腐病病害高发区,发病率比非连作田平均要高出 35%~50%,产量减少达 50%~80%,有的地块甚至绝收,极大地打击了农民种植魔芋的积极性。连作土壤病原菌积累的原因可能是魔芋病残体遗留,随着耕种翻作、雨水流淌,病原菌不断扩散繁殖,导致叠加积累,当达到一定量后,很容易暴发软腐病。

本研究通过对全年种植期内魔芋软腐病病原菌的动态监测,掌握了土壤中魔芋软腐病病原菌含量的变化规律,软腐病病原菌含量受季节、湿度影响较大,这与田间魔芋软腐病容易在 7—9 月大规模暴发的现象相吻合。由于魔芋软腐病前期表现症状不明显,目前尚无明确监测数据可以用于病害预警,运用本研究建立的 TaqMan 探针实时荧光定量 PCR 技术

能有效检测出田间魔芋软腐病病原菌,通过借助土壤病原菌的数量指标,实时掌握土壤病原菌动态变化,对可能的病害发生进行预警判别,实现及早用药和差异化用药。该检测方法能有效应用于田间土壤中病原菌动态监测,但本研究中动态监测点仅有 2 个,受地域、气候、环境等条件影响,不同区域病原菌数量可能存在差异,后期可开展大规模土壤病原菌普查监测,为魔芋软腐病的及时防治提供数据依据和技术支撑。

参 考 文 献 (References)

- Böhm J, Hahn A, Schubert R, Bahnweg G, Adler N, Nechwatal J, Oehlmann R, Obszward W. 1999. Real-time quantitative PCR: DNA determination in isolated spores of the mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* and monitoring of *Phytophthora infestans* and *Phytophthora citricola* in their respective host plants. *Journal of Phytopathology*, 147(7/8): 409–416
- Chen EF. 2011. Detecting pathogenic fungus and bacteria of main potato diseases by multiplex real-time PCR. Master Thesis. Hohhot: Inner Mongolia University (in Chinese) [陈恩发. 2011. 多重实时定量 PCR 检测马铃薯主要的真细菌病原菌. 硕士学位论文. 呼和浩特: 内蒙古大学]
- Cheng YC, Kang HJ, Shi YX, Chai AL, Zhang HJ, Xie XW, Li BJ. 2018. Development and application of real-time fluorescent quantitative PCR for detection of *Phytophthora capsici*. *Acta Horticulturae Sinica*, 45(5): 997–1006 (in Chinese) [程颖超, 康华军, 石延霞, 柴阿丽, 张红杰, 谢学文, 李宝聚. 2018. 辣椒疫霉菌 RT-PCR 检测技术的建立及应用. *园艺学报*, 45(5): 997–1006]
- Cui M. 2012. Practice and understanding of planting under konjac forest. *Shaanxi Journal of Agricultural Sciences*, 58(3): 157–159 (in Chinese) [崔鸣. 2012. 魔芋林下种植实践与认识. *陕西农业科学*, 58(3): 157–159]
- Cullen DW, Lees AK, Toth IK, Duncan JM. 2001. Conventional PCR and real-time quantitative PCR detection of *Helminthosporium solani* in soil and on potato tubers. *European Journal of Plant Pathology*, 107(4): 387–398
- Ding ZL, Wan ZY, Jiao ZB, Zhou R, Tan XH, Zhang KK, Wu JP. 2014. Progress and countermeasures for soft rot disease of *Amorphophallus konjac*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 30(4): 238–241 (in Chinese) [丁自立, 万中义, 矫振彪, 周容, 谭旭辉, 张抗抗, 吴金平. 2014. 魔芋软腐病研究进展和对策. *中国农学通报*, 30(4): 238–241]
- Filion M, Starnaud M, Jabaji-Hare S. 2003. Quantification of *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* in mycorrhizal bean plants and surrounding mycorrhizosphere soil using real-time polymerase chain reaction and direct isolations on selective media. *Phytopathology*, 93(2): 229–235
- Gao W, Li BJ, Wang WL, Hao YJ, Shi YX. 2014. Detection of *Corynespora cassicola* in soil with real-time quantitative PCR. *Ac-*

- ta Agriculturae Boreali-Sinica, 29(2): 71–74 (in Chinese) [高菁, 李宝聚, 王万立, 郝永娟, 石延霞. 2014. 土壤中黄瓜棒孢叶斑病病原菌实时荧光定量 PCR 检测技术研究. 华北农学报, 29(2): 71–74]
- Ge B, Yang Y, Zhang SP, Wang XM, Chen GK, Duan CX. 2018. Development of fluorescent quantitative detection system for fungal pathogen *Fusarium graminearum* and its application in maize seedling blight. Journal of Plant Protection, 45(3): 409–415 (in Chinese) [葛波, 杨洋, 张申萍, 王晓鸣, 陈国康, 段灿星. 2018. 禾谷镰孢荧光定量检测体系的建立及其在玉米苗枯病上的应用. 植物保护学报, 45(3): 409–415]
- He F, Zhang ZL, Liu LP, Cui M, Xue QH. 2015. Microecological mechanism for healthy growth and higher yield of *Amorphophallus konjac* under acacia forest. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 35(2): 364–372 (in Chinese) [何斐, 张忠良, 刘列平, 崔鸣, 薛泉宏. 2015. 刺槐林魔芋健康高产的土壤微生态机制. 西北植物学报, 35(2): 364–372]
- He YB, Hu XF, Chen HM, Chen JS, Gao BD, Ying FX. 2007. Isolation and identification of a bacterial pathogen causing soft-rot on *Pinnellia ternate*. Acta Phytopathologica Sinica, 37(4): 337–342 (in Chinese) [何煜波, 胡秀芳, 陈海敏, 陈集双, 高必达, 应飞翔. 2007. 半夏细菌性软腐病原菌的分离及鉴定. 植物病理学报, 37(4): 337–342]
- Kettani-Halabi M, Terta M, Amdan M, El Fahime el M, Bouteau F, Ennaji MM. 2013. An easy, simple inexpensive test for the specific detection of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* based on sequence analysis of the *pmrA* gene. BMC Microbiology, 13: 176
- Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. Trends in Molecular Medicine, 8(6): 257–260
- Li FL, Li XZ, Min FX, Han F, Wei Q, Feng YZ, Guo M. 2010. Application of real-time quantitative PCR on detection of fungal plant disease. Journal of Northeast Agricultural University, 41(4): 151–155 (in Chinese) [李凤兰, 李学湛, 闵凡祥, 韩峰, 魏琪, 冯艳忠, 郭梅. 2010. 实时定量 PCR 在植物真菌病原体定量检测中的应用. 东北农业大学学报, 41(4): 151–155]
- Liu PY. 2004. Konjac. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [刘佩琪. 2004. 魔芋学. 北京: 中国农业出版社]
- Lu MH, Li LJ, Ma YH, Guo BL, Zheng JF, Zhang BR. 2018. Isolation and identification of pathogen causing soft-rot on konjac. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 64(2): 59–62, 78 (in Chinese) [卢美欢, 李利军, 马英辉, 郭邦利, 郑建芳, 张百忍. 2018. 陕南地区魔芋软腐病病原菌的鉴定及生长特性研究. 陕西农业科学, 64(2): 59–62, 78]
- Niu Yi, Zhang SL, Wang ZM, Li C, Sun YH. 2005. Research and utilization of konjac (*Amorphophallus*) resources in China. Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science), 27(5): 69–73 (in Chinese) [牛义, 张盛林, 王志敏, 李川, 孙远航. 2005. 中国魔芋资源的研究与利用. 西南农业大学学报(自然科学版), 27(5): 69–73]
- Peng JB, Fei FH, Liao WY, Feng DP, Li JH, Cheng YG, Xu XY, Li GJ. 2007. Causes and control measures of high incidence of continuous disease in konjac field. Plant Doctor, 20(2): 14 (in Chinese) [彭金波, 费甫华, 廖文月, 冯德品, 李九慧, 程雨贵, 徐小燕, 李光巨. 2007. 魔芋连作田病害高发原因及防治对策. 植物医生, 20(2): 14]
- Ranjan RK, Singh D, Baranwal VK. 2016. Simultaneous detection of brown rot and soft rot causing bacterial pathogens from potato tubers through multiplex PCR. Current Microbiology, 73(5): 652–659
- Schubert S, Rakin A, Karch H, Carniel E, Heesemann J. 1998. Prevalence of the “high-pathogenicity island” of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. Infection and Immunity, 66(2): 480–485
- Wang DZ, Zhang LL, Tao ZY, Xie GL. 2016. Development of a real-time quantitative PCR assay for the specific detection of *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* in crucifers. Journal of Plant Protection, 43(4): 559–566 (in Chinese) [王道泽, 张莉丽, 陶中云, 谢关林. 2016. 实时荧光定量 PCR 法检测十字花科细菌性黑斑病菌. 植物保护学报, 43(4): 559–566]
- Wu J, Wu MS, He CY. 2007. Principles of real-time quantitative PCR and its application in plant pathology. Plant Protection, 33(6): 123–128 (in Chinese) [吴静, 吴茂森, 何晨阳. 2007. 实时定量 PCR 的原理及其在植物病理学研究中的应用. 植物保护, 33(6): 123–128]
- Wu JP, Diao Y, Gu YC, Hu ZL. 2011. Molecular detection of *Pectobacterium* species causing soft rot of *Amorphophallus konjac*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 27(3): 613–618
- Yang S. 2009. Detection of potato blackleg by real-time quantitative PCR. Master Thesis. Harbin: Northeast Agricultural University (in Chinese) [杨松. 2009. 马铃薯黑胫病菌实时定量荧光 PCR 检测. 硕士学位论文. 哈尔滨: 东北农业大学]
- Yi J, Cai XF. 2013. Application of Taqman-based real-time PCR for detection genes of food-borne pathogens. Science and Technology of Food Industry, 34(7): 374–377 (in Chinese) [伊璽, 蔡雪凤. 2013. Taqman 荧光探针技术在食源性致病菌检测中的应用. 食品工业科技, 34(7): 374–377]
- Zhang XF, Zhang HY, Wang YJ, Wei LF, Ji GH. 2017. Establishment of serological detection method against soft rot pathogen of *Amorphophallus konjac*. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 30(7): 1576–1581 (in Chinese) [张小芳, 张海燕, 王永吉, 魏兰芳, 姬广海. 2017. 魔芋软腐病菌血清学检测方法的建立. 西南农业学报, 30(7): 1576–1581]
- Zhao W. 2005. Using real-time PCR measurements for detection of carbendazim resistance in *Sclerotinia sclerotiorum*. Master Thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [赵伟. 2005. 实时定量 PCR 技术在油菜菌核病菌对多菌灵抗药性监测中的应用研究. 硕士学位论文. 南京: 南京农业大学]

(责任编辑: 李美娟)