

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2021.09.002

生姜青枯病病原菌的鉴定与 PCR 检测方法的建立

张玲玲¹, 周洁¹, 秦曼丽¹,
周弦¹, 吴林², 刘奕清³

1. 长江大学园艺园林学院, 湖北荆州 434000; 2. 重庆市幅沅农业生物技术研究院有限公司, 重庆永川 402160;
3. 重庆文理学院特色植物研究院, 重庆永川 402160

摘要: 青枯病是一种严重危害生姜种植的毁灭性土传细菌病害, 明确引起生姜青枯病的病原菌并对其进行快速检测, 对生姜青枯病早期诊断与有效防控具有重要意义。本研究采用组织分离法, 对湖北省恩施生姜病样上的病菌进行分离纯化, 通过形态学特征、致病性测定和分子生物学的方法对其进行鉴定; 筛选并验证了生姜青枯病菌的特异性引物, 优化生姜青枯病病原菌的 PCR 检测方法, 并对该方法进行特异性和灵敏度验证, 运用该方法对生姜植株和土壤的病原菌进行检测。结果表明, 试验分离纯化得到了 10 株培养性状一致的菌株, 从形态学特征、致病性测定和分子生物学方面, 将代表菌株 ES202023 鉴定为青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*); 引物 21F/21R 从所获菌株中扩增出长度为 125 bp 的特异性目的条带; 通过优化后的 PCR 体系(25 μL : 2 $\times$ Taq Master PCR Mix 12.5 μL , 21F/21R 0.5 μL , 退火温度 61.1 $^{\circ}\text{C}$, 30 个循环), 使病原菌的检测灵敏度达到 10^{-2} ng/ μL , 且可以在感病植株及土壤中检测到病原菌。本研究建立的特异性 PCR 快速检测方法, 对生姜青枯病的田间早期预警、姜种带菌检测和绿色防控具有指导作用。

关键词: 生姜; 青枯病; 分离鉴定; PCR 检测方法

中图分类号: S632.5; S436.412.1⁺5

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)09-0010-11

Isolation and Identification of the Pathogen of Ginger Bacterial Wilt and Establishment of a PCR Detection System

ZHANG Lingling¹, ZHOU Jie¹, QIN Manli¹,
ZHOU Xian¹, WU Lin², LIU Yiqing³

收稿日期: 2021-04-29

基金项目: 湖北省重点研发项目(2020BBA037); 重庆调味品产业体系重大专项项目((2017-2021)-7); 重庆英才计划创新创业团队项目(CQYC201903201)。

作者简介: 张玲玲, 硕士研究生, 主要从事生姜病害综合防治研究。

通信作者: 吴林, 博士, 副教授; 刘奕清, 博士, 教授, 博士研究生导师。

1. College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou Hubei 434000, China;
2. Fuyuan Agricultural Biotechnology Research Institute Co. LTD. of Chongqing City, Yongchuan Chongqing 402160, China;
3. Institute of Special Plants, Chongqing University of Arts and Sciences, Yongchuan Chongqing 402160, China

Abstract: Bacterial wilt is a destructive soil borne disease which is highly harmful to ginger cultivation. Accurate identification and quick detection of the pathogen is of great significance for the early diagnosis and effective control of the disease. In this study, the pathogen of ginger bacterial wilt from Enshi in Hubei Province was isolated and purified with the tissue isolation method, and was identified through morphological observation, pathogenicity determination and molecular biological approaches. First, the specific detection primers of *Ralstonia solanacearum* were screened and verified, and the PCR amplification system involved was optimized. Then, the specificity and sensitivity of the system were verified. Finally, the optimal PCR system was applied in detection of pathogen on ginger and rhizosphere soil. Ten strains with similar culture characters were isolated and purified. The representative strain ES202023 was identified as *R. solanacearum* on the basis of morphological characteristics, pathogenicity verification and molecular biology. The primer 21F/21R amplified a 125 bp specific band from the obtained strain. The optimized PCR reaction system (25 μL : $2 \times \text{Taq master PCR mix}$ 12.5 μL , 21F/21R 0.5 μL , annealing temperature 61.1 $^{\circ}\text{C}$, 30 cycles) gave a pathogen-detecting sensitivity of 10^{-2} ng/ μL , and is recommended for pathogen detection in diseased ginger plants and the rhizosphere soil.

Key words: ginger; bacterial wilt; isolation and identification; PCR detection system

生姜(*Zingiber officinale* Rosc.)为姜科(Zingiberaceae)多年生宿根性草本植物,是主要香辛保健蔬菜之一,也是医药及化工产品的重要原料^[1].我国生姜栽培历史悠久,是世界上生姜生产、出口、消费第一大国^[2].近年来,我国生姜种植面积不断增大,但生姜产区连年重茬,各种病害日益严重.其中,生姜青枯病又称姜瘟病,是一种世界性的土传细菌病害,严重制约了生姜产业的发展^[3].

青枯病是一种严重危害作物种植生产的毁灭性土传细菌病害,其病原菌寄主范围广,可侵染包括生姜、番茄、辣椒、茄子、马铃薯等 50 个科的 400 多种植物^[4-5].生姜青枯病的病原菌形态结构、种内分化和致病机理复杂^[6],其发生与流行受土壤湿度、温度和种植方式等多种因素的影响^[7],目前尚无理想的防治手段和生姜抗病品种^[8].前人采用组织分离法已对安徽^[9]、四川^[10]、海南^[11]等地的生姜青枯病病原菌进行过鉴定.湖北省作为生姜的重要种植地区,近年来青枯病频发,田间发病率在 30%~50%,严重时甚至绝收.然而,关于湖北生姜青枯病病原菌的研究仍鲜有报道.为此,明确湖北生姜青枯病的病原菌,可为该病有效防治提供基础.

为防止带菌姜种和带菌土壤引起的生姜青枯病的传播,建立快速准确的生姜青枯病菌检测方法对生姜种植过程重大土传病害的早期检测与预警防控有重要意义.传统的青枯病病原菌检测包括症状观察、分离纯化等手段,操作复杂且时效性差,还极易与其他病害混淆,难以快速准确鉴定,不能满足生产实际的需要^[12].分子检测方法已成为当前主要的病原菌检测手段,不仅能应用于田间病害的早期诊断预警,而且还能满足种子潜伏期检疫的要求^[13].PCR 检测技术是最常用的植物病原菌分子检测方法,具有成本低、灵敏度高、特异性强、稳定性好等优点,已在植物组织及土壤病原菌检测方面得到了广泛运用^[14].例如,钟鑫等运用普通 PCR 技术分子体系在抗病品种接种 1~5 d 后检测出西瓜枯萎病病菌^[15],

Martínez-Espinoza 等利用 PCR 技术在玉米染病早期或者无症状感染时检测玉米瘤黑粉病病菌^[16], 张凯东等采用 PCR 和序列测定技术对柑桔叶样进行了黄龙病菌检测等^[17]. 迄今为止, 生姜青枯病的 PCR 检测技术尚未见报道.

为了明确引起湖北恩施地区生姜青枯病的病原菌以及建立快速准确的检测方法, 以取自湖北恩施地区的生姜病样进行分离纯化, 基于形态学特征、致病性测定和分子生物学的方法对其进行鉴定. 检索查询国内外关于青枯菌的分子检测报道, 筛选了青枯雷尔氏菌的特异性扩增引物, 优化了 PCR 快速检测方法, 旨在为生姜青枯病害的田间早期预警、姜种检疫诊断及绿色防控提供技术依据.

1 材料与方法

1.1 材料

疑似生姜青枯病病株采自湖北恩施(109°41'48"E, 30°03'30"N), 健康生姜植株种于长江大学玻璃温室中. 生姜青枯雷尔氏菌(*Ralstonia solanacearum*)标准菌株由中国农业科学院植物保护研究所提供; 番茄青枯菌(*R. solanacearum*)、土豆青枯菌(*R. solanacearum*)、藿香青枯菌(*R. solanacearum*)、烟草青枯菌(*R. solanacearum*)、变黄假单胞菌(*Pseudomonas flavescens*)、台湾假单胞菌(*Pseudomonas taiwanensis*)、谷关假单胞菌(*Pseudomonas entomophila*)、大黄鱼致病性香鱼假单胞菌(*Pseudomonas plecoglossicida*)、胡萝卜软腐果胶杆菌(*Pectobacterium aroidearum*)、路氏肠杆菌(*Enterobacter ludwigii*)、蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)、鲍曼不动杆菌(*Acinetobacter seifertii*)、成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)、解鸟氨酸拉乌尔菌(*Raoultella ornithinolytica*)均由长江大学香辛作物研究院实验室保存.

1.2 方法

1.2.1 生姜病样采集与病原菌分离

2019 年 8 月于湖北省恩施土家族苗族自治州宣恩县生姜种植基地采集具有典型青枯病症状的生姜植株, 将病样带回实验室进行病原菌分离.

生姜青枯病病原菌的分离参照任欣正等^[18]的方法, 略有改进. 用无菌手术刀截取生姜病株根茎部的病健交界处组织, 剥去外表皮, 置于装有 50 mL 无菌水的三角瓶中, 37 °C、150 r/min 振荡, 待无菌水稍有浑浊后, 用接种环蘸取少量液体, 在 TTC 培养基平板上划线培养, 放置于 30 °C 恒温培养箱中培养 48 h, 长出的菌落用于后续的致病力测定.

1.2.2 致病力测定

将分离得到的病菌在 TTC 培养基平板上重新划线, 30 °C 培养 36 h 后挑取单菌落在 TTC 液体培养基中, 30 °C、200 r/min 条件下培养 24 h, 调整细菌浓度为 10^7 cfu/mL 后进行致病力测定试验. 选取生长 60 d 且长势一致的盆栽生姜苗, 用无菌的 4 号注射器吸取 1 mL 菌液, 采用茎基部注射接种法在生姜植株的茎基部进行接种, 以无菌水为阴性对照, 每个处理重复接种 20 盆. 在接种第 3 d 后调查发病情况, 在接种第 15 d 后计算病情指数. 青枯病病情共分成 5 个等级^[19]. 0 级: 植株长势健康; 1 级: 1 个叶片枯萎; 2 级: 2 至 3 个叶片枯萎; 3 级: 3 片(含)以上叶片枯萎; 4 级: 植株死亡. 统计病株率及病情指数, 判定致病力强弱. 根据柯赫氏法则重新对接种发病的生姜植株进行病原分离鉴定, 观察与原分离病菌是否一致. 选取致病力强的菌株进行病原菌的下一步鉴定.

$$\text{病株率} = \text{发病株数} / \text{接种总株数} \times 100\%$$

$$\text{病情指数} = \sum (\text{各级病株数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高级代表值}) \times 100$$

1.2.3 生姜青枯病病原菌鉴定

形态学鉴定: 参照《常见细菌系统鉴定手册》^[20], 将平板上菌落颜色和形状与青枯雷尔氏菌相似的单菌落重新接到 TTC 平板上, 观察菌落的形态特征, 并进行革兰氏染色, 在光学显微和扫描电镜下观测其形态特征.

分子生物学鉴定: 采用 CTAB/NaCl 法提取菌株基因组 DNA, 以提取的 DNA 为模板, 通过细菌 16S rDNA 通用引物 16S-F/16S-R(16S-F: 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 16S-R: 5'-TCGGCTACCTTGTTACGACAC-3', 由武汉华大基因科技服务有限公司合成)进行 PCR 扩增, 标准菌株为阳性对照, 无菌去离子水为阴性对照. PCR 扩增程序为: 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 72 ℃ 补齐 10 min, 循环 30 次. 扩增后的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳纯化回收后, 送武汉华大基因科技服务有限公司进行双向测序, 并对测序的结果进行拼接, 得到菌株的 16S rDNA 扩增片段的序列信息, 并将其在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析. 另外, 在 NCBI 上选取不同细菌的 16S rDNA 序列, 使用 MEGA7.0 软件, 通过邻接法(neighbor-joining method)来构建分离菌株的系统发育树.

生理小种和生物型鉴定: 根据菌株对不同寄主的致病性确定所属的生理小种^[21]. 选取生长 10 d 的生姜、番茄、茄子、马铃薯、烟草和辣椒的健康植株, 采用茎基部接种法, 在植株茎基部注射浓度为 10⁷ cfu/mL 的菌液, 以注射无菌水为阴性对照, 每种植物重复接种 10 盆. 在接种后的第 7 d 记录发病植株数量, 并以发病率为指标来统计青枯菌对不同植物的致病力. 参考吕志强等^[22]的青枯雷尔氏菌生物型划分标准, 分别以乳糖、麦芽糖、纤维二糖、甘露醇、山梨醇和甜醇作为培养基的碳源, 根据菌株对碳源的利用情况来确定生物型.

1.2.4 生姜青枯病病原菌 PCR 检测方法的建立及优化

根据国内外关于生姜青枯病病原菌的分子检测报告, 筛选出特异性引物 21R/21F(21F: 5'-CGACGCTGACGAAGGGACTC-3'; 21R: 5'-CTGACACGGCAAGCGCTCA-3')^[23], 引物由武汉华大基因科技服务有限公司合成. 对影响 PCR 方法的退火温度、延伸时间及循环次数重要因素进行优化. 选用不同的退火温度 58.8 ℃ 设计 PCR 反应程序, 共设计 58 ℃, 58.2 ℃, 58.8 ℃, 59.8 ℃, 61.1 ℃, 62.8 ℃, 64.8 ℃, 66.6 ℃, 67.9 ℃, 69.0 ℃, 69.6 ℃, 70 ℃ 12 个温度梯度, 3 个延伸时间分别设为 30 s, 45 s 和 1 min, 3 个循环次数分别设为 30, 35, 40 次, 每个因素设置 3 个重复. 结果按照病原菌扩增的特异性和敏感性, 即条带的强弱、杂带的有无, 并结合 Alphasoft 2200 软件进行综合评价^[24].

1.2.5 PCR 反应特异性和灵敏度检测

特异性检测: 对分离得到的生姜青枯菌基因组 DNA, 分别以番茄青枯菌、土豆青枯菌、藎香青枯菌等 12 株菌株基因组 DNA 为对照, 利用优化好的 PCR 反应方法进行扩增. 根据电泳条带的有无检测生姜青枯菌引物的特异性, 并且对阳性样品的扩增产物进行双向测序, 测序结果进行 BLAST 比对分析. 试验设置 3 次重复.

灵敏度检测: 利用超微量紫外分光光度计测定青枯菌模版 DNA 纯度及浓度, 将模板浓度稀释至 10, 1, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ 和 10⁻⁶ ng/ μ L 共 8 个浓度梯度, 使用优化后的 PCR 方法进行 PCR 扩增, 取 5 μ L 扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统照相. 试验设置 3 次重复.

1.2.6 植株组织和土壤的病原菌检测

田间采集具有典型生姜青枯病症状的病株及其根际土壤样本(表 1), 提取生姜病株组织和土壤基因组 DNA 后用建立的 PCR 方法进行病原菌检测. 同时, 对采集的样本进行病原菌分离培养鉴定, 以验证该 PCR 检测方法的准确性. 试验设置 3 个重复.

表 1 发病植株和土壤样本信息

序号	采样地点	样本数量	序号	采样地点	样本数量
1	恩施宣恩	8	11	重庆江津	9
2	恩施来凤	8	12	重庆永川	10
3	荆州马山镇	10	13	重庆荣昌	10
4	荆州江陵	10	14	重庆潼南	10
5	荆州公安	10	15	四川南充	10
6	荆州松滋	10	16	四川开江	8
7	山东莱芜	8	17	四川绵阳	8
8	山东潍坊	12	18	四川乐山	8
9	山东安丘	8	19	河南焦作	10
10	山东平度	5	20	河南上蔡	10

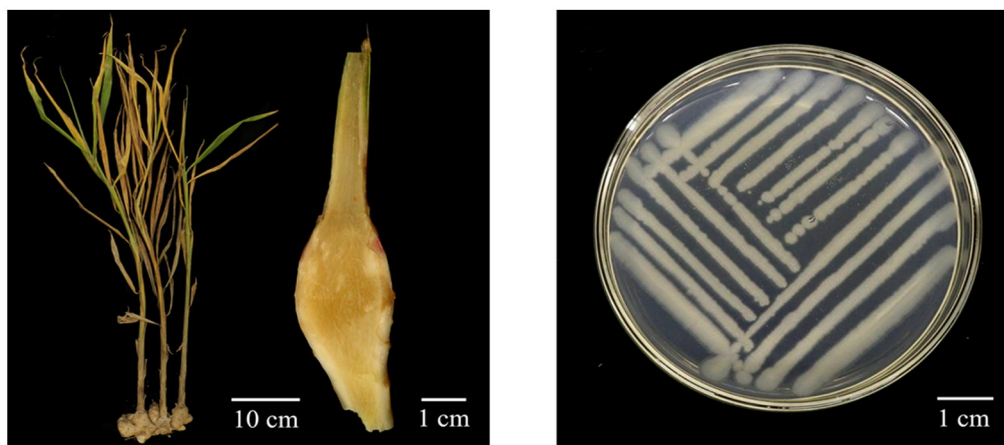
1.3 数据分析

采用 SPSS 软件对试验数据进行分析($p < 0.05$), 绘图采用 sigma plot 软件.

2 结果与分析

2.1 生姜青枯病病原菌的分离

从采集具有典型青枯病症状的生姜植株(图 1a)中分离得到了 10 株培养性状一致的菌株,菌落为圆形或梭形,菌体乳白色,表面光滑,略有隆起(图 1b). 选取 3 个典型菌株 ES202021, ES202022 和 ES202023 作为代表菌株进行后续致病力测定.



a. 生姜青枯病的发病症状

b. 病原菌ES202023菌落形态

图 1 生姜青枯病的发病症状及病原菌菌落形态

2.2 致病性测定

以活化 1 d 的 ES202021, ES202022 和 ES202023 菌悬液接种到培养 60 d 的健康生姜苗, 以接种无菌水为空白对照, 观察并记录生姜植株的发病情况。结果显示, 接种菌株后生姜叶片边缘开始内卷下垂、叶尖变成黄色, 然后扩展至整个叶片, 导致叶片逐渐枯萎, 最后整个植株死亡, 这与所采集的生姜发病植株的发病症状表现一致, 而对照植株完全不发病(图 2)。15 d 后调查病情指数, 结果显示, 接种菌株 ES202021, ES202022 和 ES202023 的生姜苗病情指数分别为 35.2, 34.1 和 38.2, 平均病情指数超过 30.0。3 个菌株

均具有强致病力, 其中 ES202023 致病力最强, 选取其为代表菌株进行下一步的鉴定. 分别收集接种菌株 ES202023 和无菌水培养 5 d 后的生姜植株组织, 进行重新分离纯化鉴定, 其试验结果表明, 在接种菌株的生姜植株组织中分离纯化获得的病菌与接种菌株 ES202023 相同, 而接种无菌水的空白对照组织样本中没有分离到接种病原菌, 符合柯赫氏致病性验证法则.

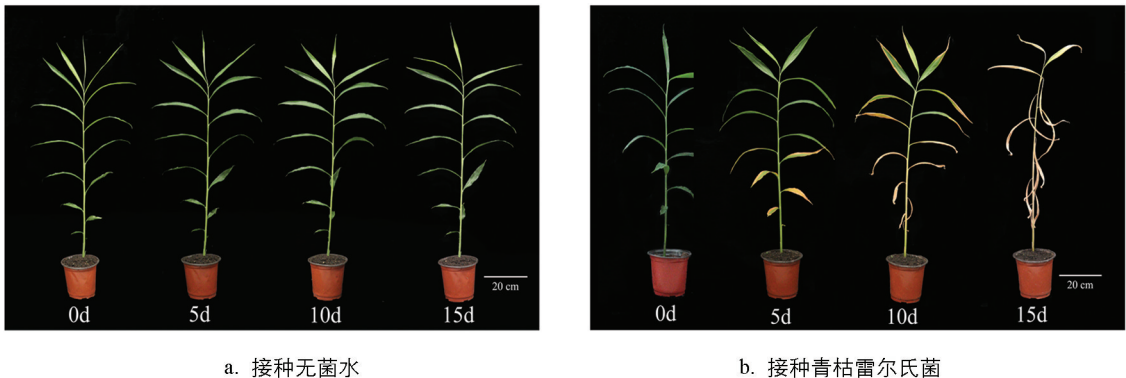


图 2 生姜接种无菌水及病菌后的生长状况

2.3 形态学鉴定

ES202023 在培养基上单菌落为圆形或梭形, 菌体乳白色, 表面湿润有光泽, 流动性极强, 生长到第 3 d 时, 菌落中间出现粉红色. 革兰氏染色结果显示, 该菌株为革兰氏阴性菌(图 3a). 扫描电镜结果显示, 菌体为单胞, 呈短杆状, 大小为 $(0.5\sim0.7)\mu\text{m}\times(1.5\sim2.0)\mu\text{m}$ (图 3b).

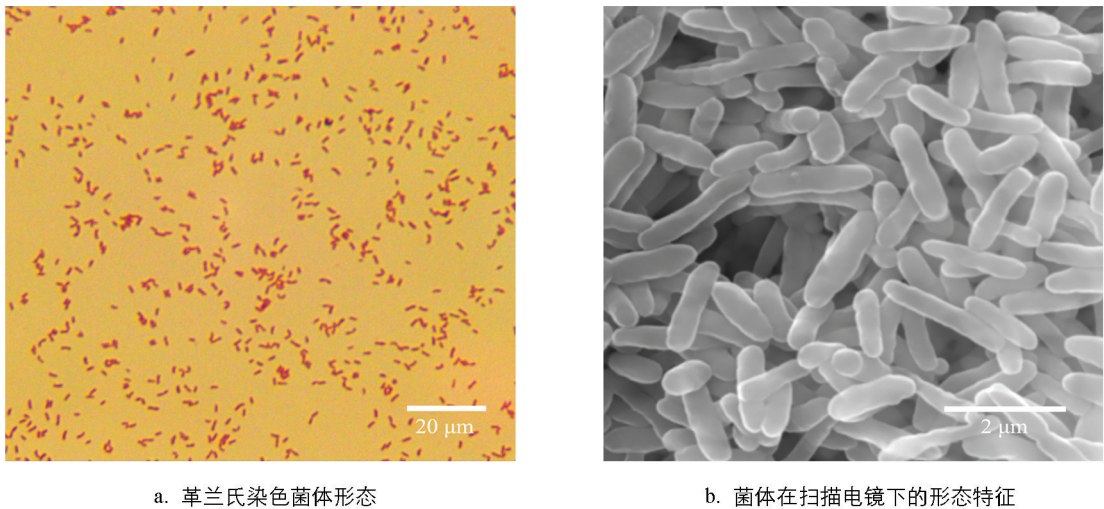


图 3 生姜青枯病病原菌形态特征

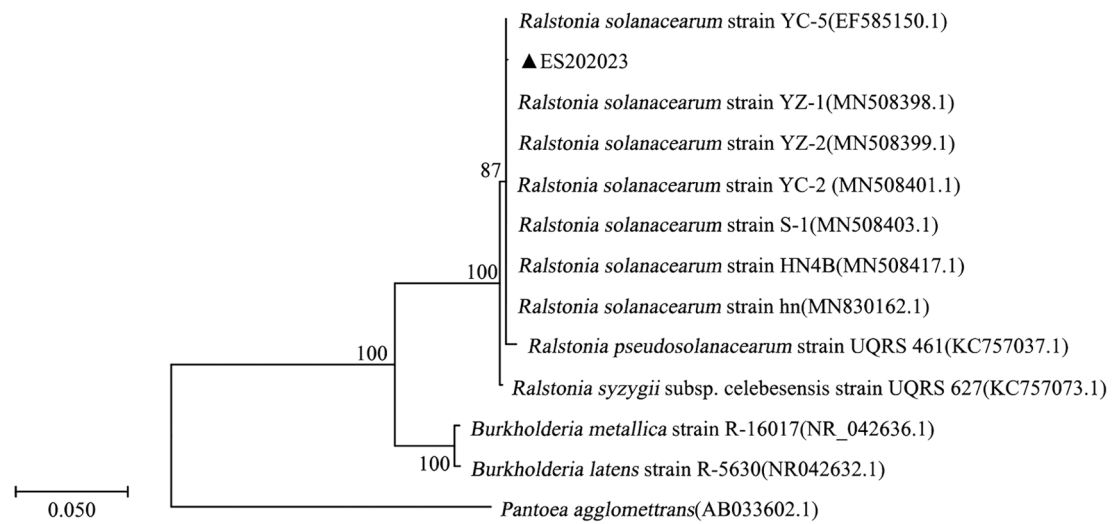
2.4 分子生物学鉴定

以提取的病原菌基因组为模板, 通过通用引物 16S-F/16S-R 进行 PCR 扩增其 16SrDNA 序列, 得到约 1 400 bp 的特异扩增片段. 将片段测序结果在 NCBI 数据库进行 BLAST 对比, 如表 2 所示, ES202023 与已经报道的青枯雷尔氏菌序列相似性为 99.9%. 下载相似度较高的多条序列、同属序列和外群序列的 16SrDNA 序列, 构建菌株 ES202023 的系统进化树(图 4). 结果表明, 菌株 ES202023 与多条青枯雷尔氏菌聚类在同一分支上. 结合形态学特征、致病性测定与分子生物学鉴定, 证明菌株 ES202023 为青枯雷尔氏菌 (*R. solanacearum*).

表 2 菌株 ES202023 的 16SrDNA 序列 NCBI 比对结果

比对序列登录号	拉丁学名	匹配分值	覆盖率/%	E 值	相似度/%	序列长度/bp
MN830162.1	<i>R. solanacearum</i>	2 586	100	0.0	99.9	1 417
MN508417.1	<i>R. solanacearum</i>	2 586	100	0.0	99.9	1 436
MN508403.1	<i>R. solanacearum</i>	2 586	100	0.0	99.9	1 433
MK696210.1	<i>R. solanacearum</i>	2 586	100	0.0	99.9	1 406
MG266201.1	<i>R. solanacearum</i>	2 586	100	0.0	99.9	1 407
MN524140.1	<i>R. solanacearum</i>	2 586	100	0.0	99.9	1 406

注：本表只选取了排名前 6 的序列。



MEGA7.0 软件中邻近距离法建树，自举数据集 1 000 次。

图 4 ES202023 16S r RNA 基因系统发育分析

2.5 生理小种和生物型鉴定

菌株对不同寄主的致病性结果显示，分离获得的青枯雷尔氏菌 ES202023 对生姜和番茄具有强致病力，发病率为 100%，对马铃薯具有弱致病力，发病率 30%，不能感染茄子、烟草和辣椒。根据 Hayward^[25]的生理小种划分标准，ES202023 菌株属于 4 号生理小种。菌株对碳源的利用结果显示，分离获得的青枯雷尔氏菌 ES202023 对麦芽糖、纤维二糖、乳糖、甘露醇、山梨醇和甜醇 6 种碳源的利用结果均呈阳性反应，依据 Hayward^[25]的生物型划分标准，ES202023 菌株属于生物型Ⅲ。

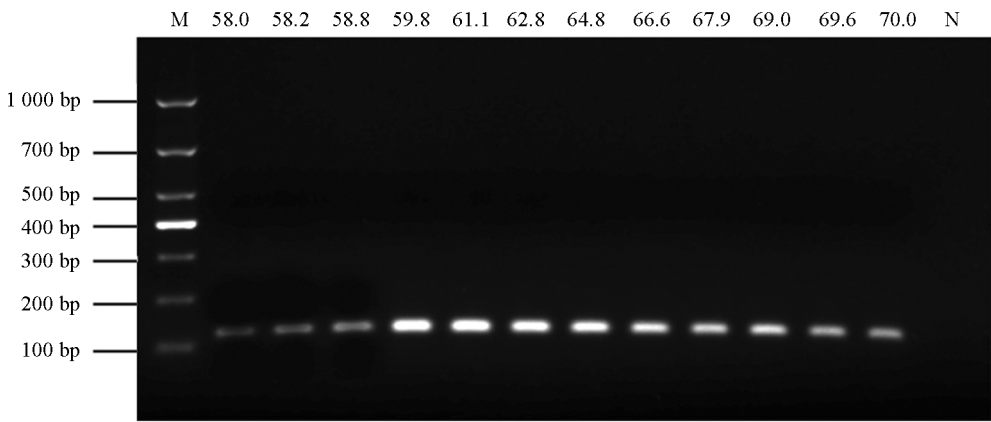
2.6 PCR 检测方法的建立及优化

设计优化退火温度等条件，并应用 Alphamahir TM 2200 软件对扩增结果进行分析，结果表明，在 58~70 ℃ 的退火温度下，引物 21F/21R 对生姜青枯菌 DNA 模板均可扩增出单一条带(图 5)。当退火温度为 61.1 ℃ 时，相对 PCR 效率最高(图 6)。结合不同延伸时间、循环次数的 PCR 扩增检测条件的试验结果，定 PCR 最优反应条件(总体积为 25 μL)为：2×Taq Master PCR Mix 12.5 μL，引物 21F/21R 0.5 μL，模板 1 μL，补加 dd H₂O 至 25 μL。反应程序为：94 ℃ 预变性 5 min；94 ℃ 变性 30 s，61.1 ℃ 退火 30 s，72 ℃ 延伸 30 s，30 个循环；72 ℃ 延伸 10 min。

2.7 PCR 反应特异性及灵敏度检测

特异性检测：按照优化后的反应条件，用引物 21F/21R 对不同种属来源的菌株基因组 DNA 模板进行 PCR 扩增，仅生姜青枯菌基因组 DNA 能扩增出 1 条 125 bp 的特异性条带，而其他菌株及阴性对照均无扩增条带(图 7)。通过对扩增产物进行测序，并经 GenBank 数据库中 BLAST 比对，扩增出

的特异性片段与青枯雷尔氏菌的同源性高达 99%，因此，引物 21F/21R 能够特异地检测青枯雷尔氏菌菌株。



M: DL 1000 DNA Marker; N: 空白对照; 58.0~70.0 单位均为℃.

图 5 不同延伸温度对引物 21F/21R 检测青枯雷尔氏菌效果的影响

灵敏度检测：利用优化后的 PCR 反应条件对 8 个不同浓度梯度的模板 DNA 进行扩增，扩增结果如图 8 所示。随模板 DNA 浓度的降低条带亮度也在下降，引物 21F/21R 对供试菌株基因组的最低检测浓度为 10^{-2} ng/ μ L。

2.8 发病植株和土壤的青枯病菌检测

通过生姜青枯病特异性引物 21F/21R 对不同地区的病姜组织和土壤进行检测，结果显示，20 份从不同地区采集的病株组织中有 2 份病样组织未检测到目标菌（图 9）。

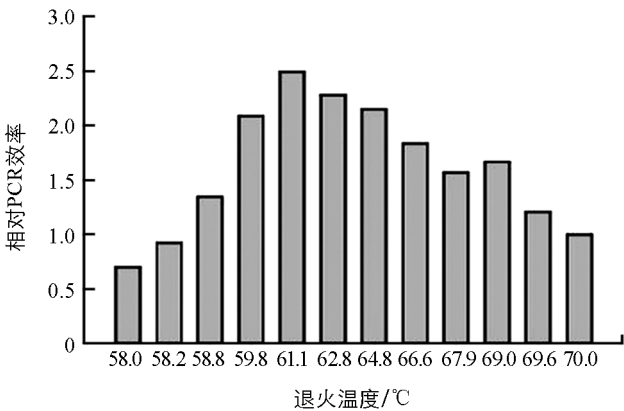


图 6 PCR 不同退火温度条件下的 PCR 效率



M: DL 1000 DNA Marker; 1: 青枯雷尔氏菌; 2: 番茄青枯菌; 3: 土豆青枯菌; 4: 藿香青枯菌; 5: 烟草青枯菌; 6: 变黄假单胞菌; 7: 台湾假单胞菌; 8: 谷关假单胞菌; 9: 大黄鱼致病性香鱼假单胞菌; 10: 胡萝卜软腐果胶杆菌; 11: 路氏肠杆菌; 12: 蜡样芽孢杆菌; 13: 鲍曼不动杆菌; 14: 成团泛菌; 15: 解鸟氨酸拉乌尔菌; 16: 阴性对照(ddH₂O).

图 7 病原菌 PCR 特异性检测

土壤样本中, 20 份从不同地区采集的病株根际土壤中有 2 份病样组织未检测到目标菌, 病菌检出率为 90%(图 10). 此外, 通过常规方法对病样组织和带菌土壤进行了病原菌分离培养和鉴定, 其鉴定结果与 PCR 分子检测结果相吻合, 由此可见, 此方法可以检测感病生姜植株和土壤中的病原菌.

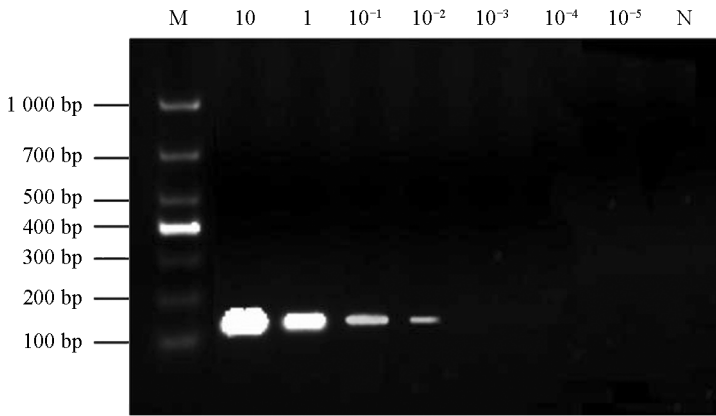
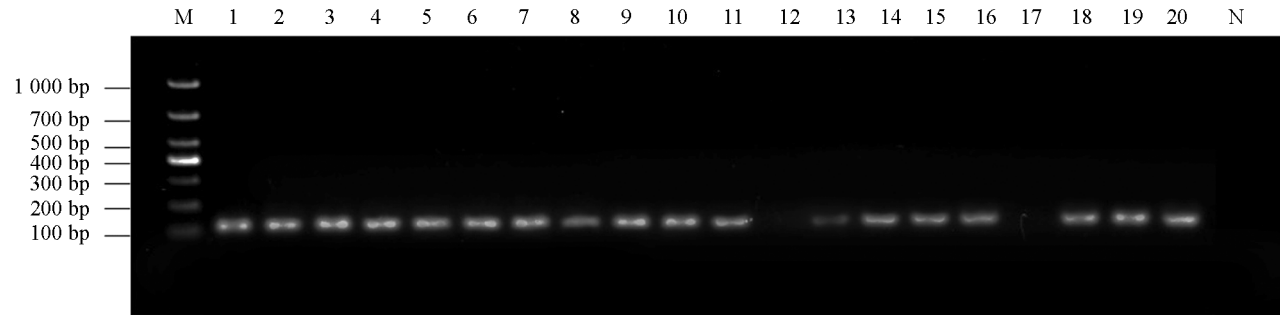
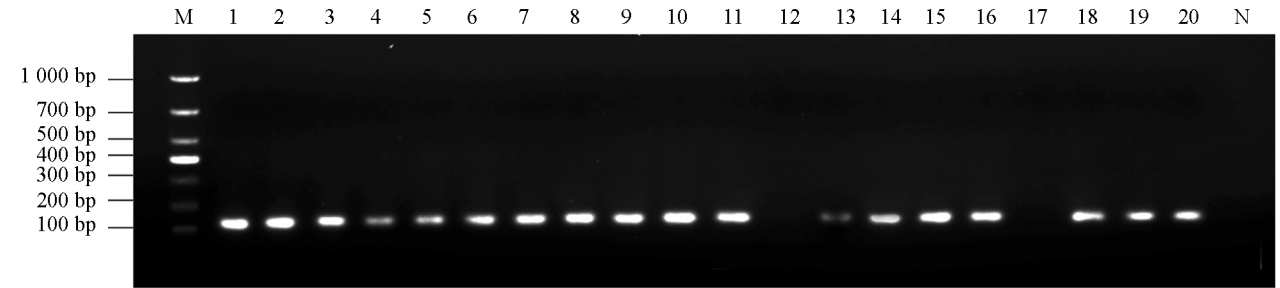


图 8 PCR 灵敏度检测



M: DL 1000 DNA Marker; 1: 恩施宣恩病株组织; 2: 恩施来凤病株组织; 3: 荆州马山镇病株组织; 4: 荆州江陵病株组织; 5: 荆州公安病株组织; 6: 荆州松滋病株组织; 7: 山东莱芜病株组织; 8: 山东潍坊病株组织; 9: 山东安丘病株组织; 10: 山东平度病株组织; 11: 重庆江津病株组织; 12: 重庆永川病株组织; 13: 重庆荣昌病株组织; 14: 重庆潼南病株组织; 15: 四川南充病株组织; 16: 四川开江病株组织; 17: 四川绵阳病株组织; 18: 四川乐山病株组织; 19: 河南焦作病株组织; 20: 河南上蔡病株组织; N: 阴性对照(ddH₂O).

图 9 发病植株的 PCR 检测



M: DL 1000 DNA Marker; 1: 恩施宣恩根际土壤; 2: 恩施来凤根际土壤; 3: 荆州马山镇根际土壤; 4: 荆州江陵根际土壤; 5: 荆州公安根际土壤; 6: 荆州松滋根际土壤; 7: 山东莱芜根际土壤; 8: 山东潍坊根际土壤; 9: 山东安丘根际土壤; 10: 山东平度根际土壤; 11: 重庆江津根际土壤; 12: 重庆永川根际土壤; 13: 重庆荣昌根际土壤; 14: 重庆潼南根际土壤; 15: 四川南充根际土壤; 16: 四川开江根际土壤; 17: 四川绵阳根际土壤; 18: 四川乐山根际土壤; 19: 河南焦作根际土壤; 20: 河南上蔡根际土壤; N: 阴性对照(ddH₂O).

图 10 土壤病菌的 PCR 检测

3 结论与讨论

生姜因长期采用无性繁殖的方式重茬种植, 导致多种土壤病原菌不断积累, 包括生姜青枯病在内的重大土传病害普遍发生, 严重威胁广大姜农的经济收入^[26]. 尽管自 20 世纪 60 年代开始, 陈莉等^[9]、戢俊臣等^[10]和赵志祥等^[11]对不同地区生姜青枯病病原菌进行了研究, 但是有关湖北省内的生姜青枯病病原菌的研究却鲜有报道. 本研究从湖北省恩施土家族苗族自治州的生姜青枯病病株中分离得到了菌株 ES202023, 经致病性测定、形态学特征和分子生物学的鉴定, 证明湖北恩施生姜青枯病的病原菌为青枯

雷尔氏菌(*R. solanacearum*), 与前人研究结果一致.

随着病原菌检测技术的不断发展, PCR 分子检测技术已经较为成熟, 在植物病原菌的检疫和田间预警中得到广泛的应用, 为植物病害的有效防控提供了技术支持. 在植物病原菌的快速分子检测上, 李华伟等^[27]根据甘薯薯瘟病菌的特异基因(orf428)序列设计了重组酶聚合酶等扩增(RPA)引物, 建立了能够快速检测甘薯薯瘟病菌的 RPA 方法. 李得铭等^[28]对番茄青枯菌进行分离, 并通过筛选 3 对特异性引物, 建立三重 PCR, 检测番茄植株和土壤中的青枯菌. 张丽芳等^[29]以烟草青枯菌和其他 2 个烟草病原菌的基因组 DNA 为模板, 分别设计 3 对特异性引物, 建立了能同时检测 3 种病害的多重 PCR 方法. 以上研究表明, 利用单一或多重的 PCR 技术方法能有效检测病原菌的存在. 本研究构建的生姜青枯菌 PCR 快速分子检测技术, 其 PCR 快速检测技术方法特异性强, 能排除番茄青枯菌、土豆青枯菌、藿香青枯菌等不同生理小种的干扰. 通过优化检测引物 PCR 反应条件, 灵敏度达到 10^{-2} ng/ μ L, 可以满足生姜生产中青枯菌检测的需求. 该方法不仅能检测植株的带菌情况, 还可用于田间土壤青枯菌的检测, 有助于生姜青枯病田间早期预警检测, 为生姜青枯病的绿色防控提供科学依据.

参考文献:

- [1] 吴中军, 陈泽雄, 刘奕清. 不同移栽基质对生姜试管苗生长的影响 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2010, 32(4): 57-60.
- [2] 吴 曼, 赵帮宏, 宗义湘. 世界生姜生产布局与贸易格局分析 [J]. 北方园艺, 2019(10): 141-150.
- [3] SINGH R. Integrated Management of Bacterial Wilt of Ginger Incited by *Ralstonia solanacearum* [J]. International Journal of Plant Sciences, 2020, 15(2): 86-91.
- [4] DA SILVA XAVIER A, DE ALMEIDA J C F, DE MELO A G, et al. Characterization of CRISPR-Cas Systems in the *Ralstonia solanacearum* Species Complex [J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(2): 223-239.
- [5] LUO Y, VALKONEN M, JACKSON R E, et al. Modification of Transcriptional Factor ACE3 Enhances Protein Production in *Trichoderma Reesei* in the Absence of Cellulase Gene Inducer [J]. Biotechnology for Biofuels, 2020, 13: 137.
- [6] KUMAR A, PRAMEELA T P, BHAIRAV S, et al. Small Cardamom (*Elettaria cardamomum* Maton.) and Ginger (*Zingiber officinale* Roxb) Bacterial Wilt is Caused by Same Strain of *Ralstonia solanacearum*: a Result Revealed by Multilocus Sequence Typing (MLST) [J]. European Journal of Plant Pathology, 2012, 132(4): 477-482.
- [7] JIANG Y, HUANG M, ZHANG M, et al. Transcriptome Analysis Provides Novel Insights into High-Soil-Moisture-Elevated Susceptibility to *Ralstonia solanacearum* Infection in Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe cv. Southwest) [J]. Plant Physiology & Biochemistry, 2018, 132: 547-556.
- [8] 李路军, 李世国, 李 娜, 等. 姜瘟病致病菌的研究进展 [J]. 山东农业科学, 2009, 41(7): 95-99.
- [9] 陈 莉, 高智谋, 杨自保, 等. 安徽省姜瘟病病原细菌鉴定及有效药剂筛选 [J]. 安徽农业科学, 2007, 35(18): 5479, 5516.
- [10] 戢俊臣, 张 敏, 刘 铭, 等. 四川省姜瘟病菌生物型鉴定初报 [J]. 四川农业大学学报, 2004, 22(4): 391-394.
- [11] 赵志祥, 严婉荣, 陈 圆, 等. 海南生姜青枯病病原菌鉴定 [J]. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(4): 763-768.
- [12] 黄 灿, 陈 沁. 现代生物技术在植物病原菌检测中的应用 [J]. 2016, 37(13): 215-219.
- [13] KIHARA J, UENO M, ARASE S. PCR-Mediated Detection of Endophytic and Phytopathogenic Fungi from Needles of the Japanese Black Pine, *Pinus thunbergii* [J]. Open Journal of Forestry, 2015, 5(4): 431-442.
- [14] HARIHARAN G, PRASANNATH K. Recent Advances in Molecular Diagnostics of Fungal Plant Pathogens: a Mini

- Review [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10: 600234.
- [15] 钟 鑫, 赵 静, 吴晓蕾, 等. 西瓜枯萎病菌 PCR 分子检测方法研究 [J]. 果树学报, 2019, 36(12): 1771-1779.
- [16] MARTÍNEZ-ESPINOZA A D, LEÓN-RAMÍREZ C G, SINGH N, et al. Use of PCR to Detect Infection of Differentially Susceptible Maize Cultivars Using *Ustilago maydis* Strains of Variable Virulence [J]. International Microbiology, 2003, 6(2): 117-120.
- [17] 张凯东, 强 遥, 鄢明峰, 等. 江西省吉水县柑桔黄龙病菌检测 [J]. 中国南方果树, 2021, 50(1): 8-10.
- [18] 任欣正, 方中达. 姜瘟病病原细菌的鉴定 [J]. 植物病理学报, 1981(1): 51-56.
- [19] 史秀娟, 刘振伟, 李立国, 等. 生姜品种资源对姜瘟病的抗病性鉴定 [J]. 植物保护, 2011, 37(2): 124-126, 132.
- [20] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [21] 邹 阳, 肖崇刚. 重庆地区烟草青枯病菌生理小种的初步鉴定 [J]. 烟草科技, 2008(5): 60-64.
- [22] 吕志强, 王汉荣, 周 勤, 等. 浙江省桑树青枯病菌生理小种及生化型的测定 [J]. 浙江农业学报, 2007(4): 306-309.
- [23] HORITA M, YANO K, TSUCHIYA K. PCR-Based Specific Detection of *Ralstonia solanacearum* Race 4 Strains [J]. Journal of General Plant Pathology, 2004, 70(5): 278-283.
- [24] 刘芮池, 程有普, 柴阿丽, 等. 蔬菜土传病原菌三重 PCR 检测体系的建立与应用 [J]. 中国农业科学, 2019, 52(12): 2069-2078.
- [25] HAYWARD A C. Characteristics of *Pseudomonas solanacearum* [J]. Journal of Applied Bacteriology, 1964, 27(2): 265-277.
- [26] 吴嘉斓, 王笑园, 王坤立, 等. 生姜营养价值及药理作用研究进展 [J]. 食品工业, 2019, 40(2): 237-240.
- [27] 李华伟, 林志坚, 张 鸿, 等. 甘薯薯瘟病菌 RPA 检测方法的建立及应用 [J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2020, 49(5): 583-588.
- [28] 李得铭, 翟子翔, 邓 涛, 等. 番茄青枯菌分离与三重 PCR 体系建立 [J]. 分子植物育种, 2020, 18(11): 3655-3661.
- [29] 张丽芳, 陈海如, 方敦煌, 等. 烟草青枯病、黑胫病和猝倒病的多重 PCR 检测 [J]. 华北农学报, 2013(z1): 22-26.

责任编辑 王新娟