·中药研究·

附子病原微生物 qRT－PCR 检测方法的建立及定量分析

涂然[1]，袁萍莉[1]，冯正平[2]，刘章平[2]，陈佳阳[3]，崔浪军[3*]

（1. 荆门市人民医院，荆楚理工学院附属荆门市人民医院，湖北 荆门 448000；2. 延安市中医医院，北京大学第三医院延安分院，陕西 延安 716000；3. 西北濒危药材资源开发国家工程实验室，药用资源与天然药物化学教育部重点实验室，陕西师范大学，陕西 西安 710062）

摘要　目的：本研究拟建立附子病原微生物卷枝毛霉（*Mucor circinelloides*）、罗耳阿太菌（*Athelia rolfsii*）、铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）、黏质沙雷氏菌（*Serratia marcescens*）的实时荧光定量 PCR（qRT－PCR）检测方法，并定量分析附子样本和根际土壤中各病原微生物的丰度。方法：针对卷枝毛霉、罗耳阿太菌 ITS 区，铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌 16S 区的特异性区域，设计引物并通过 PCR 扩增及凝胶电泳检测引物特异性。制备质粒标准品构建定量检测标准曲线，并检测灵敏度。运用建立的 qRT－PCR 检测方法对全国 21 个附子种植地附子样本及根际土壤中的卷枝毛霉、罗耳阿太菌、铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌含量进行定量检测。结果：引物均有较高特异性；得到卷枝毛霉定量标准曲线为 $Y=-2.62X+29.40$，（$R^2=0.97$）；罗耳阿太菌定量标准曲线为 $Y=-3.85X+43.01$，（$R^2=0.99$）；铜绿假单胞菌定量标准曲线为 $Y=-3.00X+34.43$，（$R^2=0.98$）；黏质沙雷氏菌定量标准曲线为 $Y=-2.23X+26.95$，（$R^2=0.99$）；21 个产地根际土壤样本与对应附子样本中卷枝毛霉、罗耳阿太菌、铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌 4 种病原微生物的丰度并不一致。结论：基于 qRT－PCR 建立的附子病原微生物卷枝毛霉、罗耳阿太菌、铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌的检测方法可靠。卷枝毛霉、罗耳阿太菌可能主要来源于根际土壤，而铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌除根际土壤外推测还有其他重要来源。

关键词　附子；病原微生物；根际土壤

中图分类号：R282.5　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：1002－2392（2025）12－0024－07

DOI：10.19664/j.cnki.1002－2392.250248

附子（*Aconiti lateralis* Radix Praeparata）是毛茛科（Ranunculaceae）乌头属（*Aonitum*）植物乌头（*Aonitum carmichaeli*）的子根[1]，在中医学中应用广泛，有“回阳救逆第一品药”之称，被历版《中国药典》收录[2]，具有祛风除湿、温经止痛的功效[3]。生物碱是其主要生理活性物质，还含有多糖、黄酮、有机酸等化学成分，主要有镇痛抗炎、免疫调节和强心作用[4]。附子是我国大宗中药材，四川江油和陕西汉中是附子的道地产区[5]，同时在河北、云南、甘肃、宁夏、山西、湖北、湖南等地也有广泛种植[6]。

附子生长期内采收前病害和采收后腐生病害是限制附子生产的两大类主要病害。生长期内主要是乌头霜霉菌（*Peronospora aconiti*）引起的霜霉病、齐整小核菌（*Sclerotium rolfsii*）引起的白绢病、腐皮镰饱（*Fusarium solani*）和尖孢镰刀菌（*Fusarium oxysporum*）引起的根腐病、乌头壳针孢（*Septoria aconiti*）引起的叶斑病等[7]。附子由于采收后生理状态下降和抗性减弱等因素，更易因病原微生物的存在而造成腐烂。前期的研究从陕西城固、四川绵阳、云南丽江 3 个产地 150 个腐烂附子样品中分离鉴定出 4 种导致附子腐烂的病原微生物菌株，分别为两种病原细菌：铜绿假单胞菌、黏

收稿日期：2024－07－29　　**修回日期**：2025－03－13

基金项目：陕西省重点研发计划（2019ZDLSF04－01－01，2020SF－326，2022SF－591）；陕西省中医药管理局科研项目（2021－ZZ－ZY012）；荆门市科技计划项目（2024YFYB002）

作者简介：涂然（1988－），男，硕士，主管技师，主要从事分子生物学检验研究。

*通信作者：崔浪军（1977－），男，博士，教授，主要从事药用植物内生菌及高品质中药材规模化生产研究。

质沙雷氏菌;两种病原真菌:罗耳阿太菌、卷枝毛霉。宋旭红等[8]通过分析黄连根腐病病株和健康株根际土壤真菌种群丰度关系,推测黄连根腐病病原菌及其来源。同样可以通过对比附子内生及根际土壤之间病原微生物的丰度来推测引起附子腐烂的病原微生物主要来源。

本研究以全国 21 个附子种植地的附子及根际土壤为材料,对铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌、罗耳阿太菌、卷枝毛霉这 4 种病原物生物进行定量分析,并探讨其主要来源,从而为解决附子病害提供思路和解决办法。

1 材料

1.1 附子及根际土壤样品

2017 年 8 月,从中国附子种植地贵州贵阳、贵州六盘水、四川广元青川、云南丽江玉龙、山西夏县、云南保山隆阳区、云南曲靖沾益、云南大理云龙、四川宁蒗温泉村、云南玉龙鲁甸、陕西汉中留坝、河北保定安国、湖北襄阳红塔镇、陕西户县玉蝉镇、湖北恩施、四川绵阳、陕西汉中城固、陕西汉中南郑、陕西西安长安区、云南迪庆维西、云南祥云米甸、陕西蓝田方新庄等地,采集附子及根际土壤样品,所有附子样品经西北濒危药材资源开发国家工程实验室/药用资源与天然药物化学教育部重点实验室/陕西师范大学生命科学学院崔浪军教授鉴定。

1.2 试剂与药品

细菌基因组 DNA 提取试剂盒、植物基因组 DNA 提取试剂盒、土壤基因组 DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒,购自天根生化科技(北京)有限公司;真菌基因组 DNA 提取试剂盒、T4 DNA 连接酶、JM109 感受态细胞、异丙基 - β - D - 硫代半乳糖苷(isopropyl - beta - D - thiogalactopyranoside,IPTG)、5 - 溴 - 4 - 氯 - 3 - 吲哚 - β - D - 半乳糖苷(5 - bromo - 4 - chloro - 3 - indolyl - beta - D - galactopyranoside,X - gal)、氨苄青霉素、琼脂糖、TAE 缓冲液、胰蛋白胨、酵母提取物、牛肉膏,购自北京索莱宝生物科技有限公司;葡萄糖、氯化钠,购自国药集团化学试剂有限公司;Premix Taq 预混液、DL2,000 DNA 分子量标准品、上样缓冲液(含 EB),购自日本 TaKaRa 公司;限制性内切酶 EcoRI、Q5© High Fidelity DNA 聚合酶,购自美国 New England Biolabs 公司;pGEM© - T Easy 载体系统购自美国 Promega 公司;qPCR SYBR Green Master 预混液购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;Quant - iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 购自美国Thermo 公司。

1.3 供试菌株

卷枝毛霉、罗耳阿太菌、铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)、黄曲霉(*Aspergillus flavus*)、白囊耙齿菌(*Irpex lacteus*)、尖孢镰刀菌、大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)、伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)均由陕西师范大学生命科学学院崔浪军教授实验室分离纯化保存;丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae pv*,DC3000)由武汉大学保存;深红沙雷氏菌(*Serratia rubidaea*,1.10839)由中国科学院微生物研究所保存;冻土毛霉(*Mucor hiemalis*,BNCC147484)、季也蒙毛霉(*Mucor guilliermondii*,BNCC144884)由北京北纳创联生物技术研究院保存。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.4 仪器

5810R 型台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);ND2000 型超微量分光光度仪(美国 Thermo 公司);ZXSD - B1090 型生化培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司);TC - XP - G 型聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR);核酸扩增仪(杭州博日科技有限公司);CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪(美国 Bio - Rad 公司);BCL - 1360B 型超净工作台(北京亚泰科隆仪器技术有限公司);GI54DS 型高压灭菌锅(美国 ZEALWAY 公司);DYY - 8C 型电泳仪(北京六一仪器厂);ZF - 206 型凝胶成像分析系统(郑州万博仪器设备有限公司);ZWY - 103D 摇床(上海智城分析仪器制造有限公司)。

2 方法

2.1 样本处理

附子样本尽快送回实验室,先用流动的自来水冲洗除去附着的土壤,再用蒸馏水冲洗 3 遍,依次用 70% 乙醇浸泡 1 min、2% 次氯酸钠洗涤 3 min、70% 乙醇冲洗 3 次(每次持续 30 s)、无菌蒸馏水洗涤 3 次、灭菌滤纸进行表面干燥后,-80 ℃保存,用于宏基因组 DNA 提取。土壤样本过 40 目筛,-80 ℃储存,用于基因组 DNA 提取。

2.2 菌株培养

菌株冻土毛霉、季也蒙毛霉、卷枝毛霉、罗耳阿太菌、黄曲霉、白囊耙齿菌、尖孢镰刀菌采用马铃薯葡萄糖琼脂(Potato dextrose agar,PDA)培养基,30 ℃培养 5 d,备用;铜绿假单胞菌、大肠埃希氏菌、丁香假单胞菌、恶臭假单胞菌采用 LB 培养基,37 ℃培养 1 d,备用;深红沙雷氏菌、黏质沙雷氏菌采用营养肉汁琼脂培养基 30 ℃培养 1 d,备用。

2.3 DNA 提取及质量检测

按照细菌、真菌及植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌、真菌及附子块根基因组 DNA；按照土壤基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取土壤总 DNA。使用超微量分光光度仪测量 DNA 浓度。

2.4 特异性引物设计及特异性检测

卷枝毛霉特异性引物，MC - F5′ - TGGTATTCCAATGAGCACGCCT - 3′；MC - R5′ - TATTTGGGAGGCCCCAGCA - 3′；罗耳阿太菌特异性引物，AR - F5′ - GAACCATCTGTAGTCAGGAGAAATC - 3′；AR - R5′ - GCCGTAAGGTTGAGAATTTAATGA C - 3′；黏质沙雷氏菌特异性引物，SM - F5′ - GATCCCGCTTAGCTCCAC - 3′；SM - R5′ - CAACCCGAAGATGTTTCC - 3′；铜绿假单胞菌特异性引物，PA - F5′ - TGGTGTGCTGCGTGATCCGA - 3′；PA - R5′ - CAATGTTCATTCACGAACAT - 3′。DNA 样品稀释到 30 ng/μL，引物稀释至 10 mmol/L，PCR 反应体系为 20 μL：Premix Taq 10 μL，首尾引物各 1 μL，模板1 μL，加去离子水补足至 20 μL。卷枝毛霉扩增程序如下：94 ℃ 4 min，94 ℃ 1 min、67 ℃ 30 s、循环 35 次，72 ℃ 5 min。卷枝毛霉特异性检测对照菌株为尖孢镰刀菌、冻土毛霉、季也蒙毛霉。罗耳阿太菌的扩增程序如下：94 ℃ 4 min，94 ℃ 30 s、58 ℃ 30 s、72 ℃ 15 s 循环 35 次，72 ℃ 5 min。罗耳阿太菌特异性检测对照菌株为尖孢镰刀菌、黄曲霉、白囊耙齿菌。黏质沙雷氏菌和铜绿假单胞菌扩增程序如下：94 ℃ 4 min，94 ℃ 30 s、60 ℃ 30 s、72 ℃ 15 s 循环 35 次，72 ℃ 7 min。黏质沙雷氏菌特异性检测对照菌株为大肠埃希氏菌、深红沙雷氏菌、伯克霍尔德氏菌；铜绿假单胞菌特异性检测对照菌株为大肠埃希氏菌、丁香假单胞菌，恶臭假单胞菌。阴性对照均为去离子水。琼脂糖凝胶电泳检测。

2.5 质粒标准品的制备、标准曲线建立及灵敏度检测

回收上述菌株 DNA 样本的扩增产物，严格按照各试剂盒说明书操作，通过连接、转化以 pGEM - T - easy 为载体构建质粒 DNA，并用限制性内切酶 EcoRI 鉴定。

测定上述质粒浓度，根据公式(1)计算拷贝数。

$$\text{拷贝数} = \frac{\text{DNA 浓度} \times 10^{-9} \times 6.02 \times 10^{23}}{(\text{质粒长度} + \text{目标片段长度}) \times 660} \quad (1)$$

将已知浓度的质粒进行 10 倍梯度稀释，作为标准品。荧光定量 PCR 反应体系为 20 μL，含 qPCR SYBR Green Master 预混液 10 μL，首尾引物各 0.5 μL，DNA 模板 2 μL，加去离子水补足至 20 μL。程序如下：95 ℃ 60 s，95 ℃ 10 s、60 ℃ 30 s 循环 35 次，95 ℃ 10 s，65 ℃ 60 s，97 ℃ 1 s，37 ℃ 30 s。以质粒拷贝数对数值为 X 轴，以 Ct 值为 Y 轴，构建标准曲线。将已知浓度的质粒进行 10 倍梯度稀释，作为待测样品，检测灵敏度。

2.6 病原菌检测

利用构建的定量方法，测量 21 个附子种植地的采收后附子及根际土壤样品中的卷枝毛霉、罗耳阿太菌、铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌的 ITS DNA、16S rDNA 特异性区域拷贝数。

2.7 统计分析

统计分析使用 SPSS 18.0 完成，计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示，将病原体拷贝数用于主成分分析(principal component analysis，PCA)。

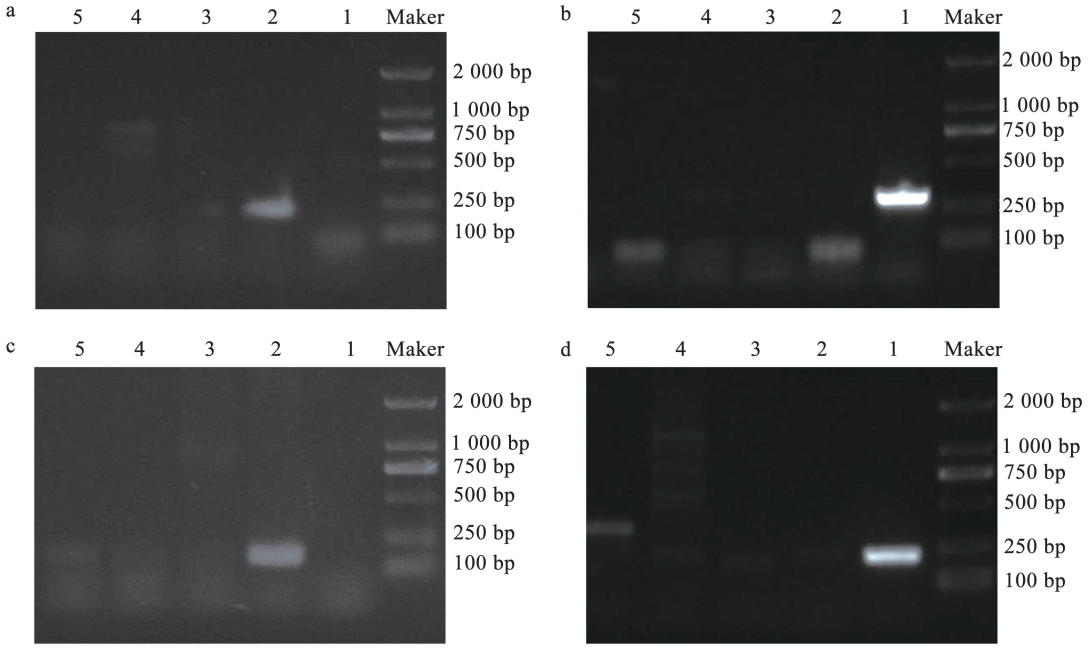
3 结果与分析

3.1 引物特异性检测

电泳结果显示引物 MC - F/MC - R 对卷枝毛霉有较高特异性，208 bp 处有特异扩增产物(图 1a)。引物 AR - F/AR - R 对罗耳阿太菌有较高特异性，354 bp 处有特异扩增产物(图 1b)。引物 PA - F/PA - R 对铜绿假单胞菌有较高特异性，125 bp 处有特异扩增产物(图 1c)。引物 SM - F/SM - R 对黏质沙雷氏菌有较高特异性，195 bp 处有特异扩增产物(图 1d)。

3.2 标准曲线构建及灵敏度检测

卷枝毛霉：质粒标准品梯度稀释 1.06×10^{-9} ~ 10.6 ng/μL(3.01×10^{-1} ~ 3.01×10^{9} copy/μL)，qRT - PCR 检测得到标准曲线：$Y = -2.62X + 29.40$，相关系数 $R^2 = 0.97$。对低浓度质粒标准品继续梯度稀释并检测，得到检测下限为 1.06×10^{-10} ng/μL(3.01×10^{-2} copy/μL)。罗耳阿太菌：质粒标准品梯度稀释 1.19×10^{-8} ~ 11.9 ng/μL ($3.25 \sim 3.25 \times 10^{9}$ copy/μL)，qRT - PCR 检测得到标准曲线：$Y = -3.85X + 43.01$，相关系数 $R^2 = 0.99$。对低浓度质粒标准品继续梯度稀释并检测，得到检测下限为 1.19×10^{-10} ng/μL(3.25×10^{-2} copy/μL)。铜绿假单胞菌：质粒标准品梯度稀释 1.11×10^{-8} ~ 11.1 ng/μL($3.25 \sim 3.25 \times 10^{9}$ copy/μL)，qRT - PCR 检测得到标准曲线：$Y = -3.00X + 34.43$，相关系数 $R^2 = 0.98$。对低浓度质粒标准品继续梯度稀释并检测，得到检测下限为 1.11×10^{-8} ng/μL(3.25 copy/μL)。黏质沙雷氏菌：质粒标准品梯度稀释 1.01×10^{-10} ~ 10.1 ng/μL(2.88×10^{-2} ~ 2.88×10^{9} copy/μL)，qRT - PCR 检测，得到标准曲线为：$Y = -2.23X + 26.95$，相关系数 $R^2 = 0.99$。对低浓度质粒标准品继续梯度稀释并检测，得到检测下限为 1.01×10^{-10} ng/μL(2.88×10^{-2} copy/μL)。



注：a. 引物 MC－F/MC－R 的特异性检验电泳图，1. ddH_2O；2. 卷枝毛霉 DNA；3. 尖孢镰刀菌 DNA；4. 冻土毛霉 DNA；5. 季也蒙毛霉 DNA；b. 引物 AR－F/AR－R 的特异性检验电泳图，1. 罗耳阿太菌 DNA；2. 尖孢镰刀菌 DNA；3. ddH_2O；4. 黄曲霉 DNA；5. 白囊耙齿菌 DNA；c. 引物 PA－F/PA－R 的特异性检验电泳图，1. ddH_2O；2. 铜绿假单胞菌 DNA；3. 大肠埃希氏菌 DNA；4. 丁香假单胞菌 DNA；5. 恶臭假单胞菌 DNA；d. 引物 SM－F/SM－R 的特异性检验电泳电泳图，1. 黏质沙雷氏菌 DNA；2. ddH_2O；3. 大肠埃希氏菌 DNA；4. 深红沙雷氏菌 DNA；5. 伯克霍尔德氏菌 DNA。其中 1，2，3，4，5 为泳道标号，注明各泳道的上样物质。

图 1 琼脂糖凝胶电泳检引物的特异性

3.3 附子样本和根际土壤病原菌检测

根据建立的卷枝毛霉、罗耳阿太菌、铜绿假单胞菌和黏质沙雷氏菌的 qRT－PCR 检测体系，进行附子样本和根际土壤病原微生物定量检测，结果如表 1 所示，在贵阳、六盘水、青川、玉龙、夏县、隆阳区、沾益、云龙、温泉村、鲁甸、留坝、安国、玉蝉镇、恩施、方新庄、城固、绵阳等产地的根际土壤样品和附子样本中均检测到卷枝毛霉，其中恩施产地的附子样品中卷枝毛霉含量最高，温泉村根际土壤样品中卷枝毛霉含量最高。在红塔镇、维西、米甸等产地的根际土壤样品中没有检测到，但附子样本中检测到了卷枝毛霉。丽江产地的附子样品、根际土壤样品中均未检测到卷枝毛霉。在所有产地的根际土壤样品中罗耳阿太菌均被检测出来，其中城固产地的根际土壤样品中罗耳阿太菌含量明显高于其他产地，玉龙、鲁甸、安国、红塔镇、玉蝉镇、恩施、米甸等产地的根际土壤样品中罗耳阿太菌含量较低。各个产地的附子样品中只有丽江产地的样品中没有被检测出罗耳阿太菌，安国附子样品中罗耳阿太菌含量最高。在贵阳、六盘水、青川、夏县、隆阳区、沾益、云龙、鲁甸、方新庄、城固等 10 个产地的根际土壤样品中均检测到铜绿假单胞菌，剩余 11 个产地的根际土壤样品中没有检测到铜绿假单胞菌。其中在六盘水和城固等产地的根际土壤样品中检测到铜绿假单胞菌含量较高。在各个产地的附子样品中只有丽江附子样品没有检测到铜绿假单胞菌，而夏县附子样品中铜绿假单胞菌含量最高。在贵阳、六盘水、青川、隆阳区、沾益、云龙、温泉村、留坝、维西、方新庄、城固、绵阳等 12 个产地的根际土壤样品中检测到黏质沙雷氏菌，其余 9 个产地的根际土壤样品中未检测到黏质沙雷氏菌。城固土壤中黏质沙雷氏菌含量最高。在各产地的附子样品中只有丽江和绵阳等产地的附子样品中未检测到黏质沙雷氏菌，而六盘水产地的附子样品中黏质沙雷氏菌含量最高。

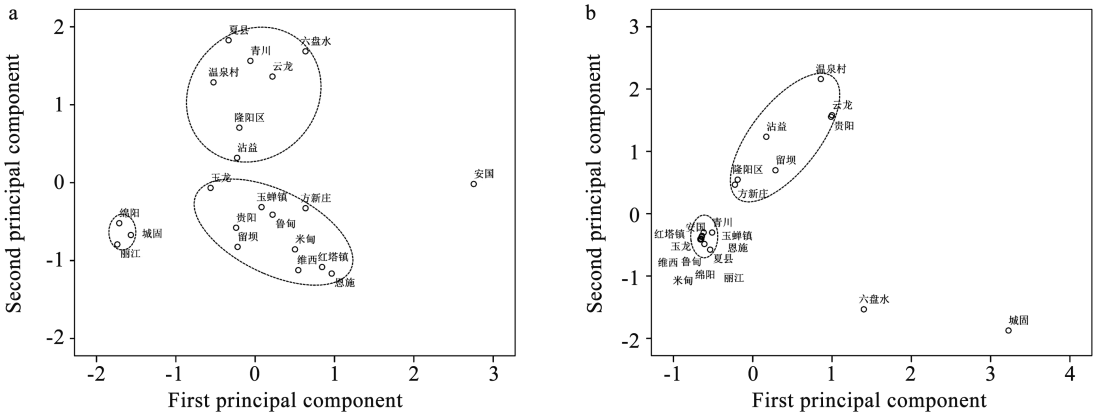
3.4 附子样本和根际土壤病原微生物的主成分分析

基于附子样本和根际土壤病原微生物拷贝数进行 PCA 分析。附子样本的 PCA 结果显示 21 个产地聚成 4 类，第一类由恩施、维西、红塔镇、米甸、鲁甸、留坝、贵阳、玉蝉镇、方新庄、玉龙组成。第二类由沾益、隆阳区、温泉村、云龙、青川、六盘水、夏县组成。第三类由绵阳、丽江、城固组成。第四类由安国单独组成（图 2a）。根际土壤 PCA 结果显示 21 个产地聚成 4 类，第一类由恩施、维西、红塔镇、米甸、鲁甸、玉蝉镇、玉龙、青川、夏县、安国、绵阳、丽江组成。第二类由沾益、隆阳区、温泉村、云龙、方新庄、留坝、贵阳组成。第三类由六盘水单独组成。第四类由城固单独组成（图 2b）。

表 1 附子样本和根际土壤中病原微生物的 qRT – PCR 检验结果($\bar{x} \pm s$, $n = 3$, copies/g)

序号	地点	类型	卷枝毛霉	罗耳阿太菌	铜绿假单胞菌	黏质沙雷氏菌
			拷贝数	拷贝数	拷贝数	拷贝数
1	贵阳	土壤	303 920 ± 23 789	437 ± 109	23 713 ± 2 540	18 735 ± 2 672
		附子	190 611 ± 21 326	1 625 ± 152	7 342 ± 507	13 964 ± 2 361
2	六盘水	土壤	82 887 ± 4 133	158 ± 52	157 960 ± 5 921	15 939 ± 873
		附子	168 332 ± 2 248	225 ± 75	31 805 ± 1 305	63 112 ± 5 226
3	青川	土壤	34 851 ± 35 454	12 ± 2	8 689 ± 2 110	4 ± 1
		附子	118 760 ± 9 245	195 ± 112	32 369 ± 804	42 210 ± 8 261
4	玉龙	土壤	564 ± 129	3 ± 2	nd	nd
		附子	118 099 ± 12 877	999 ± 107	12 123 ± 1 297	16 733 ± 7 412
5	夏县	土壤	3 072 ± 1 741	23 ± 8	14 955 ± 11 912	nd
		附子	89 922 ± 8 272	315 ± 285	37 448 ± 331	32 288 ± 4 907
6	隆阳区	土壤	169 521 ± 12 868	179 ± 130	7 997 ± 94	378 ± 328
		附子	233 756 ± 10 399	83 ± 11	26 450 ± 1 085	26 667 ± 1 461
7	沾益	土壤	264 072 ± 156 132	380 ± 205	5 977 ± 935	4 262 ± 1 241
		附子	229 711 ± 13 347	1 411 ± 198	23 680 ± 105	9 526 ± 3 613
8	云龙	土壤	259 198 ± 17 954	880 ± 74	8 350 ± 981	24 417 ± 2 133
		附子	82 284 ± 30 509	1 409 ± 117	27 768 ± 1 102	42 286 ± 10 174
9	温泉村	土壤	360 770 ± 27 696	516 ± 25	nd	16 809 ± 558
		附子	75 293 ± 9 009	108 ± 57	28 787 ± 1 326	31 017 ± 1 779
10	鲁甸	土壤	531 ± 40	5 ± 1	6 378 ± 446	nd
		附子	302 664 ± 10 626	218 ± 127	9 517 ± 1 152	36 781 ± 17 201
11	留坝	土壤	125 818 ± 6 300	46 ± 29	nd	16 160 ± 1 265
		附子	261 279 ± 19 440	132 ± 6	3 624 ± 288	26 730 ± 2 645
12	安国	土壤	8 793 ± 1 382	2 ± 2	nd	nd
		附子	434 199 ± 12 527	4 454 ± 272	14 492 ± 620	64 152 ± 8 321
13	红塔镇	土壤	nd	2 ± 1	nd	nd
		附子	440 453 ± 49 423	1 439 ± 47	5 291 ± 387	30 579 ± 4 651
14	玉蝉镇	土壤	1 526 ± 18	3 ± 1	nd	nd
		附子	293 388 ± 26 157	28 ± 1	11 156 ± 179	34 572 ± 5 774
15	恩施	土壤	6 253 ± 1 107	1 ± 1	nd	nd
		附子	490 110 ± 50 646	444 ± 178	3 385 ± 452	42 856 ± 4 972
16	维西	土壤	nd	27 ± 26	nd	268 ± 206
		附子	447 619 ± 79 855	104 ± 10	4 006 ± 78	35 659 ± 4 329
17	米甸	土壤	nd	1 ± 1	nd	nd
		附子	362 157 ± 58 672	66 ± 47	3 257 ± 311	44 220 ± 3 725
18	方新庄	土壤	147 089 ± 15 151	12 ± 5	5 072 ± 472	1 390 ± 841
		附子	347 866 ± 21 929	35 ± 17	9 774 ± 536	50 012 ± 31 987
19	城固	土壤	179 506 ± 5 551	252 901 ± 1 943	100 617 ± 1 546	30 843 ± 2 957
		附子	10 748 ± 664	179 ± 28	1 695 ± 1 380	2 732 ± 1 417
20	绵阳	土壤	17 617 ± 1 058	26 ± 4	nd	6 ± 3
		附子	82 ± 14	6 ± 2	4 243 ± 250	nd
21	丽江	土壤	nd	246 ± 323	nd	nd
		附子	nd	nd	nd	nd

注：nd 表示未检出。



注：a. 附子样本病原微生物的 PCA 分析；b. 根际土壤病原微生物的 PCA 分析。

图 2 附子样本和根际土壤病原微生物的主成分分析

4 结论与讨论

植物病原细菌和真菌是造成植物病害的主要病原微生物，是农业生产、粮食安全的重要威胁。利用分子生物学方法对植物病原菌进行早鉴别有重要的防治意义。而基于细菌或真菌特异性序列的荧光定量 PCR 法用于病原菌的检测技术已经十分成熟。例如：利用 ITS 基因序列建立针对长喙壳属（*Ceratocystis*）的几种植物病原体（引起广泛植物种类的枯萎病和溃疡病）的荧光定量 PCR 检测方法，能够有效检测感染的无症状茎组织中的长喙壳属病原体，并在疾病爆发的情况下快速追踪[9]。MILNER 等[10] 基于实时荧光定量 PCR 技术测定土壤中普通真菌和齐整小核菌的 DNA 含量，用于检测并量化齐整小核菌在土壤中的丰度，以评估土壤中病原体的致病潜力。本研究建立了附子腐烂病原微生物卷枝毛霉、罗耳阿太菌、铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌的荧光定量 PCR 检测方法，并对方法的引物特异性和最低检出限完成初步验证。但在该方法中对照菌株虽然能够证明引物的特异性，但对近缘种的区分能力有待进一步验证。

不同产地附子样本病原菌受根际土壤病原菌丰度影响较大。PCA 分析结果显示第一类群中的恩施、维西、红塔镇、米甸、鲁甸、玉蝉镇、玉龙等地与第二类群中的沾益、隆阳区、温泉村、云龙等地，附子样本的病原菌丰度与根际土壤病原菌丰度呈现相似的集聚态。其原因可能为，一方面病原真菌卷枝毛霉和罗耳阿太菌是土传病原菌。这与 CER 等[11] 关于引起向日葵茎基部腐烂的病原菌鉴定为罗耳阿太菌，是一种土传病原菌的研究结论一致，和 GAO 等[12] 关于卷枝毛霉是乌头土传病原菌的研究结果相吻合。另一方面，病原细菌铜绿假单胞菌和黏质沙雷氏菌是常见于土壤中能够引起宿主植物感染的机会性病原菌。从蔬菜根际分离到铜绿假单胞菌[13]，从菠菜根际分离到黏质沙雷氏菌[14] 也从侧面证实了铜绿假单胞菌和黏质沙雷氏菌的土壤来源。土壤因素不同往往带来的病原菌组成和定殖条件不同，从而导致病原微生物的传播差异[15-16]。但不同产地的环境因素，除土壤因素外，还包括海拔、地理位置等，也是导致微生物差异的重要因素[17]。在根际土壤 PCA 结果中同处于第一类的青川、夏县、安国、绵阳和丽江产地，其附子样本 PCA 结果则是青川和夏县处于第二类，绵阳和丽江处于第三类，安国单独为第四类。表明不同产地地理位置的改变带来的变化可能通过多种方式影响植物感染，包括改变病原体的进化、改变宿主 - 病原体相互作用以及改变病原体侵染宿主所用载体的生理状态等[18-19]。

病原微生物菌卷枝毛霉、罗耳阿太菌、铜绿假单胞菌和黏质沙雷氏菌在附子的主要种植区域广泛分布。但对中药材根际土壤微生态的研究表明，同一宿主物种在不同产地的疾病（例如根腐病）病原菌可能不同，同一产地或地区的主要病原菌在种植年限内也不相同[20]。本研究结果显示卷枝毛霉、罗耳阿太菌可能主要来源于根际土壤，同时根际土壤也是铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌的来源之一。但土壤环境可能通过限制病原微生物的生长和存活，直接改变病原微生物菌落组成[21]。例如在黄连根腐病病株和健康株根际土壤真菌种群丰度对比研究中，发现黄连根际土壤致病性较强属的真菌相对丰度增高，直接导致了黄连根腐病的发生[8]。总体来看，植株的健康状态是植株本身、土壤环境（包含物理环境和化学环境）以及土壤微生物（包含病原微生物、有益微生物和其他微生物）之间相互作用的结果[22]，这也可能是导致 21 个产地根际土壤与对应附子样本中 4 种病原微生物丰度不一致原因。

与传统的 PCR 相比，基于 qRT - PCR 技术建立的病原微生物卷枝毛霉、罗耳阿太菌、铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌的检测方法是可量化的，也更快捷灵敏。其在上述病原微生物的早期检测中十分有用，可以为指导杀菌剂的使用提供具体信息。但是该检测方法依赖于专业设备和训练有素的人员，尤其对于铜绿假单

胞菌、黏质沙雷氏菌等潜在致病菌的处理上需要二级或二级以上生物实验室，这在一定程度上限制了该方法的推广运用。综上所述，据附子样本和根际土壤的病原微生物定量分析结果，罗耳阿太菌、卷枝毛霉可能主要来源于根际土壤，而铜绿假单胞菌、黏质沙雷氏菌除根际土壤外还有其他重要来源。在针对上述病原微生物的防治上区别对待可能更为合理。

参考文献：

[1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志 - 第二十七卷[M]. 北京：科学出版社，1979：114 - 116.
[2] 国家药典委员会. 中国药典[M]. 北京：化学工业出版社，2005：38，149，189.
[3] 张贵鑫，宋凤瑞，朱禹奇，等. 蒙药草乌炮制减毒及质量标准的研究进展[J]. 世界科学技术 - 中医药现代化，2022，24(6)：2418 - 2425.
[4] 唐梅，赵立春，徐敏，等. 附子化学成分和药理作用研究进展[J]. 广西植物，2017，37(12)：1614 - 1627.
[5] 张定堃，韩雪，李瑞煜，等. UPLC - Q - TOF - MS 分析不同产地泥附子化学成分的差异[J]. 中国中药杂志，2016，41(3)：463 - 469.
[6] 侯大斌. 附子资源与遗传多样性研究[M]. 成都：四川大学出版社，2008：168 - 169.
[7] 唐莉，梁丽娟，叶华智，等. 附子常见病害的调查研究[J]. 现代中药研究与实践，2004，18(6)：29 - 32.
[8] 宋旭红，谭均，李隆云，等. Illumina 高通量测序揭示黄连根腐根际土壤真菌群落组成及多样性[J]. 中草药，2018，49(22)：5396 - 5403.
[9] DHARMARAJ K，MERRALL A M，PATTEMORE J A，et al. A new real - time PCR assay for detecting fungi in genus *Ceratocystis*[J]. Plant Dis，2022，106(2)：661 - 668.
[10] MILNER H，JI P S，SABULA M，et al. Quantitative polymerase chain reaction (Q - PCR) and fluorescent in situ hybridization (FISH) detection of soilborne pathogen *Sclerotium rolfsii*[J]. Appl Soil Ecol，2019，136：86 - 92.
[11] CER C，MORCA A U. First report of *Athelia rolfsii* (*Sclerotium rolfsii Sacc.*) causing collar rot disease on sunflower in Turkey[J]. J Plant Pathol，2020，102(3)：931.
[12] GAO H，HUANG Z H，LI M Z，et al. Quantitative assays of two soil - borne pathogens of *Aconitum carmichaelii* Debx.，*Sclerotium rolfsii* and *Mucor circinelloides*，in the main cultivation areas of China[J]. J Appl Res Med Aromat Plants，2021，25：100343.
[13] KASZAB E，RADÓ J，KRISZT B，et al. Groundwater，soil and compost，as possible sources of virulent and antibiotic - resistant *Pseudomonas aeruginosa*[J]. Int J Environ Health Res，2021，31(7)：848 - 860.
[14] AMINISARTESHNIZIM. Molecular characters of *Serratia marcescens*，a bacterium associated with spinach rhizosphere in Limpopo Province，South Africa，using 16S rDNA[J]. Res Crops，2022，23(2)：437 - 441.
[15] 曾文，李强，马毅楠，等. 北京草莓种植区土壤微生物群落结构解析[J]. 生物资源，2024，46(1)：1 - 10.
[16] OTTEN W，GILLIGAN C A. Soil structure and soil - borne diseases：using epidemiological concepts to scale from fungal spread to plant epidemics[J]. Eur J Soil Sci，2006，57(1)：26 - 37.
[17] DENG Z S，ZHANG B C，QI X Y，et al. Root - associated endophytic bacterial community composition of *Pennisetum sinese* from four representative provinces in China[J]. Microorganisms，2019，7(2)：47.
[18] VELÁSQUEZ A C，CASTROVERDE C D M，HE S Y. Plant - pathogen warfare under changing climate conditions[J]. Curr Biol，2018，28(10)：R619 - R634.
[19] COHEN S P，LEACH J E. High temperature - induced plant disease susceptibility：more than the sum of its parts[J]. Curr Opin Plant Biol，2020，56：235 - 241.
[20] 高芬，任小霞，王梦亮，等. 中草药根腐病及其微生物防治研究进展[J]. 中国中药杂志，2015，40(21)：4122 - 4126.
[21] ZHANG D，MENG K X，HAO Y H，et al. Comparative proteomic analysis of cucumber roots infected by *Fusarium oxysporum* f. sp. cucumerium Owen[J]. Physiol Mol Plant Pathol，2016，96：77 - 84.
[22] XU L H，RAVNSKOV S，LARSEN J，et al. Soil fungal community structure along a soil health gradient in pea fields examined using deep amplicon sequencing[J]. Soil Biol Biochem，2012，46：26 - 32.

Establishment and Quantitative Analysis of a qRT - PCR Detection Method for Pathogenic Microorganisms in Aconiti Lateralis Radix Praeparata

TU Ran[1]，YUAN Pingli[1]，FENG Zhengping[2]，LIU Zhangping[2]，CHEN Jiayang[3]，CUI Langjun[3]

(1. *Jingmen People's Hospital*，*Jingchu University of Technology Affiliated Jingmen People's Hospital*，*Jingmen* 448000，*China*；2. *Yan'an Hospital of Traditional Chinese Medicine*，*Peking University Third Hospital Yan'an Branch*，*Yan'an* 716000，*China*；3. *National Engineering Laboratory for Resource Development of Endangered Crude Drugs in Northwest China*，*Key Laboratory of Medicinal Resources and Natural Pharmaceutical Chemistry of the Ministry of Education*，*Shaanxi Normal University*，*Xi'an* 710062，*China*)

Abstract Objective：This study aimed to establish a real - time fluorescence quantitative PCR (qRT - PCR) detection method for pathogenic microorganisms in Aconiti Lateralis Radix Praeparata，including Mucor circinelloides，Athelia rolfsii，Pseudomonas aeruginosa，and Serratia marcescens，and to quantitatively analyze the abundance of these pathogens in Aconiti Lateralis Radix Praeparata samples and rhizosphere soil. Methods：Specific primers were designed for the ITS region of Mucor circinelloides and Athelia rolfsii，and the 16S region of Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens. The specificity of the primers was verified by PCR amplification and gel electrophoresis. Plasmid standards were prepared to construct standard curves for quantitative detection，and sensitivity was assessed. The established qRT - PCR method was applied to quantitatively detect the content of Mucor circinelloides，Athelia rolfsii，Pseudomonas aeruginosa，and Serratia marcescens in Aconiti Lateralis Radix Praeparata samples and rhizosphere soil from 21 cultivation sites across China. Results：The primers exhibited high specificity. The quantitative standard curves obtained were as follows：Mucor circinelloides：$Y = -2.62X + 29.40$ ($R^2 = 0.97$)；Athelia rolfsii：$Y = -3.85X + 43.01$ ($R^2 = 0.99$)；Pseudomonas aeruginosa：$Y = -3.00X + 34.43$ ($R^2 = 0.98$)；Serratia marcescens：$Y = -2.23X + 26.95$ ($R^2 = 0.99$). The abundance of the four pathogenic microorganisms in rhizosphere soil and corresponding Aconiti Lateralis Radix Praeparata samples from the 21 sites was inconsistent. Conclusion：The qRT - PCR - based detection method for Mucor circinelloides，Athelia rolfsii，Pseudomonas aeruginosa，and Serratia marcescens in Aconiti Lateralis Radix Praeparata is reliable. Mucor circinelloides and Athelia rolfsii may primarily originate from rhizosphere soil，while Pseudomonas aeruginosa and Serratia marcescens likely have other significant sources besides rhizosphere soil.

Key words Aconiti Lateralis Radix Praeparata；Pathogenic microorganisms；Rhizosphere soil