

结球甘蓝根肿菌鉴定和种质抗性评价

王神云¹, 吴强², 王红¹, 于利¹, 李建斌¹, 丁万霞¹

(¹江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 南京 210014;

²江苏中江种业股份有限公司, 南京 211500)

摘要:采集湖北省长阳县火烧坪乡根肿病重发区的病土和病根,通过病原菌形态和 PCR 鉴定,确定是芸薹根肿菌,然后利用欧洲 ECD 鉴别系统确定生理小种为 ECD17/31/13,此病原菌致病力极强。采用田间苗期人工接种鉴定,与田间成株期自然诱发鉴定相结合,对 88 份甘蓝种质进行抗性评价和筛选,结果表明:苗期获得 1 份高抗,7 份抗病,17 份耐病材料;成株期获得 4 份高抗,4 份抗病,15 份耐病材料。2 个时期 88 份材料群体抗性鉴定级别基本一致,93.18% 材料成株期病指比苗期高。CR21 在 2 个时期均为高抗,抗性最强,表现稳定;CR55 在苗期发病最严重,病指达到 76.19,成株期为 74.10;CR54 在成株期发病最严重,病指达到 81.54,苗期为 75.97,2 个时期发病率均达到 100%。根肿菌的鉴定和致病力的确定,及甘蓝种质抗性评价为抗病品种选育和抗病机理的研究奠定基础。

关键词:结球甘蓝;根肿菌;种质资源;抗性评价

Identification of *Plasmodiophora brassicae* Wor. and Resistance Assessment of Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) Germplasm

WANG Shen-yun¹, WU Qiang², WANG Hong¹, YU Li¹, LI Jian-bin¹, DING Wan-xia¹

(¹Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014; ²Jiangsu Zhongjiang Seed Co. LTD, Nanjing 211500)

Abstract: Morphological identification and PCR confirmed that the *Plasmodiophora brassicae* is the pathogen caused cabbage clubroot. Using European ECD identification system, the pathogen was further identified as a physiological strain coded as ECD17/31/13. Field trial of 88 cabbage germplasm artificially inoculated by ECD17/31/13 was conducted in village Huoshaoping (HShP), Hubei Province, to assess their resistance nature to the clubroot. After evaluation, their resistant phenotypes were leveled as highly resistant (HR), resistant (R), tolerant (T) and susceptible (S). The results showed that among the 88 cabbage germplasm engaged, one HR, seven R and seventeen T in seedling stage, and four HR, four R, fifteen T in plant stage. Germplasm CR21 was the HR material which performed the best in both stages stably. Materials CR55 and CR54 were found as the most susceptible. The disease index of CR55 and CR54 were 76.19 and 75.97 in seedling stage, and 74.10 and 81.54 in plant stage respectively, when the incidence rates of CR55 and CR54 were both 100%. The taxonomic and virulence evaluation on the pathogen of clubroot disease, and screening resistant germplasm in cabbage would provide clue to further understand the phytopathological mechanism underlying and material for plant breeding.

Key words: *Brassica oleracea* var. *capitata* L.; *Plasmodiophora brassicae* Woron; germplasm resources; resistance assessment

收稿日期: 2016-01-25 修回日期: 2016-03-17 网络出版日期: 2016-10-12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20161012.0917.026.html>

基金项目: 农业部国家现代农业产业技术体系项目 (CARS-25); 江苏省科技支撑项目 (BE2013429); 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX (13)2004]

第一作者研究方向为甘蓝种质资源创新与新品种选育。E-mail: wsyfair@163.com

通信作者: 李建斌, 研究方向为甘蓝种质资源创新与新品种选育。E-mail: jbli0518@163.com

结球甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata* L., 俗称甘蓝) 根肿病是由芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woron) 引起的一种世界范围内毁灭性的土传病害。植株感病后根部细胞异常增殖、形成肿瘤, 阻碍水分和营养元素的吸收, 导致植株萎蔫, 甚至死亡^[1]。近年来, 甘蓝根肿病在我国发展迅猛, 给生产带来严重的危害^[2], 已经成为湖北省长阳县高山蔬菜产业以及农民增收面临的巨大问题^[3]。根肿菌休眠孢子在土壤中存活可长达 15~20 年之久, 土壤一经污染, 将不再适宜甘蓝等其他十字花科作物的栽培^[4]。研究者们通过土壤改良、加强管理、化学防治、生物防治等防控技术防治根肿病的研究与利用, 发现存在残留问题和推广应用限制等其他问题, 抗病品种的选育是防治根肿病最有效的措施之一, 因此, 准确而快速地鉴定资源的抗病性特别关键, 获得抗性资源尤为重要。

获得抗性资源首先要明确抗源对不同生理小种或不同地区根肿菌的抗性表现。芸薹根肿菌存在生理小种分化, 国际上通用的有 Williams 和 ECD 两套欧洲鉴别系统, 全世界已经鉴定出逾 24 个生理小种^[5]。我国除了谢文瑞和黄一修采用 ECD 系统鉴定了台湾省桃园、香山、新竹、蔗竹等 7 个地区的十字花科根肿菌生理小种为 ECD16/0/0 和 ECD16/0/31 菌系^[6], 其他学者均通过 Williams 鉴别系统鉴定此病原菌致病力的分化。我国侵染白菜、油菜、甘蓝等主要芸薹属蔬菜作物的芸薹根肿菌有 1 号、2 号、5 号、6 号、7 号、9 号、10 号、11 号、12 号、13 号等生理小种, 其中云南生理小种分布最丰富, 有 9 个小种, 其中优势种群是 4 号小种, 即对 Williams 系统中 4 个鉴别寄主都致病, 湖北长阳火烧坪芸薹根肿菌也属 4 号生理小种^[7-12]。本研究通过 ECD 系统对火烧坪甘蓝根肿菌进行鉴定, 进一步明确病原菌对其他鉴别寄主致病力的强弱, 为 4 号小种是否存在分化研究奠定基础。

病原菌生理小种的鉴定, 是为筛选抗性资源提供支持^[13]。现已有大量的 *B. oleracea* L. 种质进行了根肿病抗性检测。P. Crisp 等^[14]鉴定了约 1000 个甘蓝类材料的抗病性, 发现羽衣甘蓝和结球甘蓝对根肿病具有一定的抗性, 而孢子甘蓝和欧洲南方的白菜、花椰菜、青花菜等都易感染。M. J. Manzanares-Dauleux 等^[15]鉴定了 404 份甘蓝、花椰菜和青花菜品种对 2 个法国根肿菌的抗性, 其中 38 份甘蓝抗病性表现为中到高感, 抗性弱。C. Malin 等^[16]鉴定了 42 份甘蓝类材料对 1 个瑞典南部根肿菌的抗

性, 其中 1 份材料免疫, 其他材料均感病, 而且感病性强。司军等^[17]进行了 19 份甘蓝材料对重庆根肿菌抗性的鉴定和评价, 其中 3 份抗病、4 份耐病、12 份感病, 抗性材料为‘日本甘蓝’、‘皱叶甘蓝’和‘大楠木’。陈欣等^[18]采集黑龙江根肿菌, 采用不同接种方法对东北大学提供的 20 份甘蓝材料进行抗性鉴定, 筛选到 3 份抗病材料, 病指都超过 10%, 抗性也不是特别强。经研究, 尽管有大量甘蓝类材料和品种对根肿病进行了抗性鉴定, 但具有完全抗性的品种或材料较少, 且抗性水平不高, 抗性范围较窄, 再加上不同生态选育的材料和品种存在显著差异。因此, 本研究对甘蓝根肿病严重地区湖北省宜昌市长阳县火烧坪乡甘蓝根肿菌进行形态鉴定和 PCR 鉴定, 进一步确定其生理小种; 采用苗期人工菌土接种法和田间成株期自然诱导接种法, 将江苏省农业科学院蔬菜研究所新育成的甘蓝资源材料进行抗性鉴定和筛选, 以期筛选抗性水平高的材料, 为甘蓝抗根肿病品种选育和研究提供物质基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 病原菌 带有根肿菌的菌土和甘蓝根肿病病根均来自湖北省宜昌市长阳县火烧坪乡 (30°28'43"N, 110°39'7.4"E), 病土自然条件保存, 病根组织于 -20℃ 保存。

1.1.2 生理小种鉴别寄主 欧洲根肿菌鉴别寄主体系为 ECD01~ECD15 (表 1), 其中 ECD01~ECD05 为芸薹种鉴别寄主, ECD01~ECD04 为芜菁亚种, ECD05 为白菜亚种; ECD06~ECD10 为甘蓝型油菜类鉴别寄主; ECD11~ECD15 为甘蓝类鉴别寄主。上述鉴别寄主均受赠于英国 Reading 大学的 Dixon 教授, 其种子由本课题组保存。

1.1.3 植物材料 试验所需 88 份高代自交甘蓝种质资源为江苏省农业科学院蔬菜所引进搜集国内外甘蓝品种, 通过基因聚合而育成, 材料来源、球形、熟性信息见表 2。

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌鉴定

1.2.1.1 根肿菌休眠孢子的分离及观察 土壤中和肿根组织中根肿菌休眠孢子的分离方法参照杨佩文等^[19]的分离方法, 分离过程中离心转速为 2500 r/min, 分离后, 取 1 滴休眠孢子提取液于载玻片上, 盖上盖玻片, 于 600 倍光学显微镜下观察形态特征, 并用镜台尺测量其大小。

表 1 欧洲根肿病菌鉴别寄主 (ECD) 及寄主对应的二进制、十进制值

Table 1 The European clubroot differential set of *P. brassicae* and the binary system and decimal system of the parasitical host

鉴别序号	鉴别寄主	二进制值	十进制值
No.	Identification host	Binary system 2	Decimal system 2 ⁰
染色体数为 20 的类群 (<i>B. rapa</i> L. Sensu lato)			
01	subsp. <i>rapifera</i> Metzger line aaBBCC	2	1
02	subsp. <i>rapifera</i> Metzger line AAbbCC	2	2
03	subsp. <i>rapifera</i> Metzger line AABBcc	2	4
04	subsp. <i>rapifera</i> Metzger line AABBCC	2	8
05	subsp. <i>pekinensis</i> cv. Granaat	2	16
染色体数为 38 的类群 (<i>B. napus</i> L.)			
06	var. <i>napus</i> cv. Nevin line Dc101	2	1
07	var. <i>napus</i> cv. Giant line Dc119	2	2
08	var. <i>napus</i> L. line Dc128	2	4
09	var. <i>napus</i> cv. Clubroot Resistant Dc129	2	8
10	var. <i>napus</i> cv. Wilhelmsburger Dc130	2	16
染色体数为 18 的类群 (<i>B. oleracea</i> L.)			
11	var. <i>capitata</i> cv. Badger Shipper	2	1
12	var. <i>capitata</i> cv. Bindsachsener	2	2
13	var. <i>capitata</i> cv. Jersey Queen	2	4
14	var. <i>capitata</i> cv. Septa	2	8
15	var. <i>fimbriata</i> cv. Verheul	2	16

ECD 按特定顺序排列,每个品种对应一个十进制值(1,2,4,8,16)和二进制值(2,2,2,2,2)。根据这些值命名小种(病情指数>10%定为感病,≤10%为抗病,记为0)。如小种 16/0/31,又可用二进制记为 0+0+0+0+2/0+0+0+0+0/2+2+2+2+2,即该小种感 ECD 的 05、11、12、13、14、15 号寄主

Each ECD, ranging from 01 to 15, was corresponding to a specific cultivar which was represented by a decimal value(1,2,4,8,16) or binary value(2,2,2,2,2). The pathotype was determined according to disease index on each cultivar(marked values as specified if disease index > 10% , or rather marked 0 if disease index ≤ 10%). For example, pathotype ECD 16/0/31, was translated into 0+0+0+0+2/0+0+0+0+0/2+2+2+2+2 by binary, meaning that this pathogen was susceptible for hosts denoted as 05, 11, 12, 13, 14, 15

1.2.1.2 根肿菌的 PCR 检测 CR21 和 CR54 未感病及 CR54 感病根组织,采用 CTAB 法分别提取根组织总 DNA, -20 ℃ 冰箱保存备用。用已发表检测根肿菌 6 对引物(表 3)进行 PCR 扩增,反应体系:50 ng DNA, 0.5 μL 上下游引物, 10 mmol/L 的 dNTPs, 10 × PCR buffer 和 5U DNA 聚合酶;扩增程序:94 ℃ 预变性 4 min; 94 ℃ 30 s, 56 ℃ 1 min, 72 ℃ 1 min, 经 35 个

循环后,于 72 ℃ 延伸 5 min, 4 ℃ 保温。

1.2.1.3 根肿菌生理小种鉴定 菌土接种: 肿根磨碎确定孢子浓度, 和无菌土(土:基质为 1:1)混合, 使菌土孢子含量达到 1 × 10⁶ 个/g, pH 值调至 5.5 ~ 6.5, 装入 32 穴穴盘(规格:长 × 宽 × 高 = 54 cm × 28 cm × 8 cm), 种子播在菌土中, 穴盘置于约 2 cm 厚的基质上, 随机排放, 3 次重复。

表 2 结球甘蓝种质材料基本信息

Table 2 Cabbage germplasm and their basic information

编号	来源	球形	熟性	编号	来源	球形	熟性	编号	来源	球形	熟性
Code	Origin	Shape	Maturity	Code	Origin	Shape	Maturity	Code	Origin	Shape	Maturity
CR01	韩国	尖	中	CR13	日本	扁	晚	CR25	意大利	圆	中
CR02	中国	圆	早	CR14	日本	扁	中	CR26	荷兰	圆	早
CR03	日本	扁	晚	CR15	日本	圆	晚	CR27	韩国	尖	早
CR04	日本	扁	晚	CR16	日本	扁	中	CR28	韩国	尖	早
CR05	日本	扁	中	CR17	日本	扁	中	CR29	美国	尖	中
CR06	日本	扁	中	CR18	日本	扁	中	CR30	意大利	扁	中
CR07	美国	圆	中	CR19	荷兰	圆	中	CR31	中国	扁	中
CR08	日本	扁	晚	CR20	荷兰	圆	中	CR32	中国	尖	早
CR09	日本	圆	晚	CR21	荷兰	圆	晚	CR33	中国	尖	早
CR10	中国	扁	晚	CR22	日本	扁	中	CR34	中国	尖	早
CR11	荷兰	圆	晚	CR23	荷兰	圆	中	CR35	日本	圆	晚
CR12	日本	扁	晚	CR24	荷兰	扁	中	CR36	日本	扁	中

表 2(续)

编号	来源	球形	熟性	编号	来源	球形	熟性	编号	来源	球形	熟性
Code	Origin	Shape	Maturity	Code	Origin	Shape	Maturity	Code	Origin	Shape	Maturity
CR37	日本	扁	中	CR55	中国	圆	早	CR73	日本	扁	中
CR38	日本	扁	中	CR56	中国	圆	早	CR74	日本	扁	中
CR39	日本	扁	中	CR57	中国	尖	早	CR75	日本	圆	中
CR40	日本	扁	中	CR58	日本	圆	早	CR76	韩国	圆	中
CR41	中国	扁	晚	CR59	中国	尖	早	CR77	荷兰	圆	中
CR42	泰国	圆	晚	CR60	日本	尖	早	CR78	韩国	圆	中
CR43	日本	扁	早	CR61	日本	尖	早	CR79	荷兰	圆	中
CR44	荷兰	扁	中	CR62	日本	圆	早	CR80	日本	圆	晚
CR45	荷兰	扁	晚	CR63	荷兰	尖	中	CR81	荷兰	圆	中
CR46	日本	扁	中	CR64	荷兰	尖	中	CR82	意大利	扁	中
CR47	日本	扁	中	CR65	荷兰	尖	中	CR83	意大利	扁	中
CR48	日本	扁	早	CR66	日本	尖	早	CR84	意大利	扁	中
CR49	中国	扁	中	CR67	中国	尖	早	CR85	日本	尖	中
CR50	中国	尖	中	CR68	中国	圆	中	CR86	日本	圆	中
CR51	中国	尖	中	CR69	中国	圆	早	CR87	日本	圆	中
CR52	中国	尖	中	CR70	日本	圆	早	CR88	丹麦	圆	中
CR53	中国	扁	中	CR71	韩国	圆	早				
CR54	意大利	圆	中	CR72	日本	扁	中				

熟性指幼苗定植到 90% 植株达到采收程度的时间。<60 d,早熟;60~70 d 为中熟;>70 d,晚熟
Maturity indicated the time when 90% of the heading cabbages were ready to be harvested after being planted. Denoted as early if maturity <60 d,denoted as middle if maturity was between 60-70 d,denoted as late if maturity >70 d

表 3 用于根肿菌检测的 PCR 引物

Table 3 PCR primers used for detecting *Plasmodiophora brassicae*

引物名称	序列(5'→3')	参考文献
Primer name	Sequence	Reference
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCCG	[20]
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	[20]
YPWprimer 3	AGGTGAACCTGCCGAAGGAT	[20]
YPWprimer 4	TTCAGCGGGTAATCCTACCT	[20]
PbITS1	ACTTGCATCGATTACGTCCC	[21]
PbITS2	GGCATTCTCGAGGGTATCAA	[21]
PbITS6	CAACGAGTCAGCTTGAATGC	[21]
PbITS7	TGTTTCGGCTAGGATGGTTC	[21]
Plasmo-3	ATTTTCGAACCATCCTAGCC	[22]
Plasmo-4	GGTCGCTTCGTTCAAGCTAT	[22]
YPWprimer 1	GAAGATGCCCCACGCCGTCGT	[23]
YPWprimer 2	ATCTGTTTCAGCAAAGCGTCGA	[23]

培养条件:白天温度控制在 25 ℃ 左右,夜间温度控制在 15 ℃ 左右,土壤湿度控制在 90 % 左右,水及营养液(Hongland)用硝酸调 pH 值到 5.5~6.5,培养的前 2 d 不给光照。

抗性鉴定:培养约 2 个月后拔出幼苗,洗净根部杂质,观察发病情况,计算病情指数。根据病情严重程度划分为 4 个标准^[19](图 1):

0 级:根部无任何肿大现象,生长正常;

1 级:主根肿大,其直径小于 2 倍基茎,或侧根、须根有小肿瘤;

2 级:主根肿大,其直径为茎基大于 2 倍,或侧根、须根有较大、较多肿瘤,须根、侧根少;
3 级:主侧根都有较大肿瘤或主根已腐烂,侧根消失。



图 1 苗期根肿病抗性的分级标准
Fig. 1 Grading standards of the clubroot resistance in seedling stage

发病率(DR) = 发病株数/总株数 × 100%

病情指数(DI) = (0 × 0 级株数 + 1 × 1 级株数 + 2 × 2 级株数 + 3 × 3 级株数)/3 × 总株数 × 100

群体抗性分类标准:免疫:DI = 0;高抗(HR):0 < DI ≤ 5;抗病(R):5 < DI ≤ 15;耐病(T):15 < DI ≤ 25;感病(S):DI > 25。

1.2.2 根肿抗性鉴定及筛选

1.2.2.1 苗期人工鉴定 苗期人工鉴定方法和标准同生理小种鉴定。

1.2.2.2 田间成株期自然鉴定 在湖北省长阳县火烧坪乡甘蓝根肿病重病区田地对 88 份甘蓝种质资源进行自然诱发鉴定。定植前,深翻土地,斡旋,使混匀土壤。2014 年 5 月 24 日播种,6 月 14 日定植,20 株一个小区,随机排列,3 次重复,8 月 24 日进行病害调查,调查单株病级划分标准(图 2)如下。

0 级:根系生长正常、无肿瘤;

1 级:根系的主根不发病,部分侧根、须根上有较小的肿瘤;

2 级:根系的主根发病较轻,微微膨大,部分侧根、须根上有明显的肿瘤;

3 级:根系的主根发病较重,异常膨大、龟裂,大部分侧根、须根上有明显的肿瘤;

4 级:根系上几乎无须根,主根异常膨大、龟裂。

群体抗性分类标准(参考国家“九五”甘蓝育种攻关项目组制定,免疫:DI=0;高抗(HR): $0 < DI \leq 10$;抗病(R): $10 < DI \leq 20$;耐病(T): $20 < DI \leq 30$;感病(S): $DI > 30$ 。



图 2 成株期根肿病抗性的分级标准

Fig.2 Grading standards of the clubroot resistance in adult stage

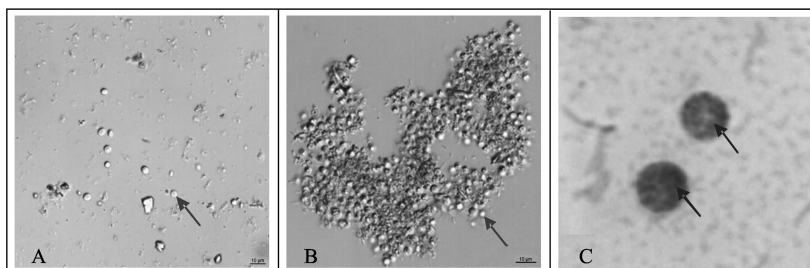
2 结果与分析

2.1 根肿病原菌鉴定

2.1.1 土壤根肿菌和病根根肿菌镜检 甘蓝根肿病发病严重地域收集病土和病根后分离得到根肿菌休眠孢子,在 600 倍的光学显微镜下观察,发现从根瘤组织和从土壤中分离的休眠孢子都呈现近球形,单核(图 3C),部分孢子间有絮状物连接成团的孢子囊。经测量,休眠孢子的直径约为 $2.0 \sim 3.5 \mu\text{m}$ 。从根瘤组织中分离的休眠孢子的含量较高,孢子数目较大(图 3B),但从土壤中分离的休眠孢子数量较少,零星分布了一些孢子(图 3A)。从根瘤组织和从土壤中分离的休眠孢子在外形、大小方面相似,与

芸薹根肿菌休眠孢子外形和大小相吻合,结合病害病症,初步判断病原菌为芸薹根肿菌。

2.1.2 根肿菌分子鉴定 利用已发表检测根肿菌的 6 对引物(表 3)进行 PCR 扩增,对 CR21 和 CR54 未感染根肿菌的根组织和 CR54 感染根肿菌的根组织进行检测。ITS1-4 在感染和未感染材料中均可扩增出大小相同的片段,不存在差异,YPWprimer1-2、YPWprimer3-4、PbITS1-2、PbITS6-7、Plasmo-3-4 这 5 对引物未感染和感染材料 PCR 扩增存在差异(图 4)。YPWprimer1-2 在感染材料中 600 bp 左右扩增出 2 条片段,1 条特异带比非特异带大些,而且条带较淡,会影响检测结果,不作为此菌种的检测;PbITS6-7 在 500 bp 左右处在 CR54 感染根组织中扩

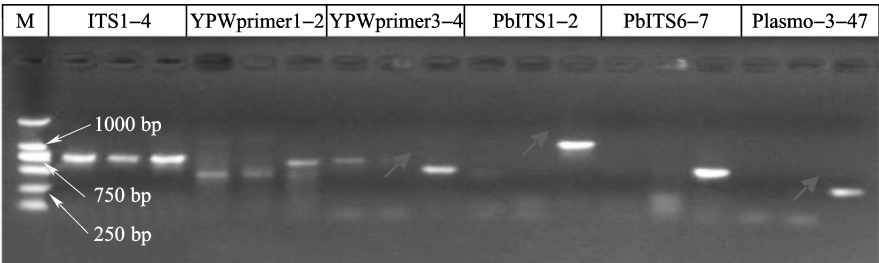


A:从土壤中分离;B:从根瘤组织分离;C:单休眠孢子

A:Separated from soil,B:Separated from the nodule organization,C:Single spore

图 3 根肿菌休眠孢子在 600 倍光学显微镜下的观察结果(标尺:10 μm)

Fig.3 Microscopy of clubroot resting spores in 600x optical microscope(scale is 10 μm)



泳道 M:600 bp Marker;泳道 2~4:ITS1-4,2 和 3 是 CR21 和 CR54 未侵染根组织,4 是 CR54 侵染病根组织(所有引物点样顺序同);
泳道 5~7:YPWprimer1-2;泳道 8~10:YPWprimer3-4;泳道 11~13:PbITS1-2;泳道 14~16:PbITS6-7;泳道 17~19:Plasmo-3-4

M denotes 600 bp Marker;Lane 2 and lane 3 denotes samples from noninoculated roots of CR21 and CR54 respectively while lane 4 denotes sample from *Pb*-inoculated roots of CR54,and all PCR products from lanes 2-4 were conducted with primer ITS1-4. Samples from Lane 5-7,lane 8-10,lane 11-13,lane 14-16,lane 17-19 were the same as Lane 2-4,different primers were used as indicated YPWprimer1-2,YPWprimer3-4,PbITS1-2,PbITS6-7,Plasmo-3-4

图 4 6 对引物在 CR21、CR54 未侵染和 CR54 侵染病根组织总 DNA 的 PCR 检测结果
Fig. 4 Electrophoresis of PCR products amplified from noninoculated roots and roots inoculated with *Plasmodiophora brassicae*

增多 1 条特异片段,CR54 未感染根组织扩增出同样大小的 1 条模糊带,存在量的差异,影响检测结果,也不适宜此菌种检测;YPWprimer3-4、PbITS1-2、Plasmo-3-4 这 3 对引物未感染和感染根肿菌的根组织中 PCR 扩增结果存在明显差异(图 4),说明除甘蓝基因组 DNA 外还存在根肿菌基因组 DNA,可以鉴定和检测此菌种的存在。
2.1.3 病原菌生理小种鉴定 采用欧洲 ECD 鉴别系统对湖北长阳火烧坪采集的芸薹根肿菌进行生理小种鉴定。染色体 2n=20 的材料中 ECD01 芜菁和

ECD05 白菜易感病,而且 ECD05 病情指数高达 91.40,ECD03 芜菁病情指数为 4.55,为抗病材料;染色体 2n=38 的材料 ECD06-10 甘蓝型油菜全部易感病;染色体 2n=18 的甘蓝材料,ECD11、ECD13、ECD14 结球甘蓝易感病,ECD12 结球甘蓝有 2 株感病,病情指数为 7.58,为抗病,ECD15 羽衣甘蓝没有发病现象(表 4)。结果表明此芸薹根肿菌生理小种为 ECD17/31/13(或 ECD2+0+0+0+2/2+2+2+2+2/2+0+2+2+0),致病力极强。

表 4 利用 ECD 体系鉴定宜昌火烧坪根肿病生理小种

Table 4 Identification of HSP *Plasmodiophora brassicae* pathotypes by ECD system

鉴别寄主 Identification host	各级株数 No. of plants				总株数 Total	病情指数 Disease index	抗/感鉴定 R/S	二进制 Binary system2	十进制 Decimal system2 ⁰
	0 级	1 级	2 级	3 级					
ECD01	18	0	0	5	23	21.74	S	2	2 ⁰ = 1
ECD02	22	0	0	0	22	0	R	0	0
ECD03	21	0	0	1	22	4.55	R	0	0
ECD04	23	0	0	0	23	0	R	0	0
ECD05	1	0	5	25	31	91.40	S	2	2 ⁴ = 16
ECD06	2	2	2	18	24	75.00	S	2	2 ⁰ = 1
ECD07	9	2	5	11	27	55.56	S	2	2 ¹ = 2
ECD08	4	0	4	7	15	74.36	S	2	2 ² = 4
ECD09	5	4	5	3	17	45.10	S	2	2 ³ = 8
ECD10	10	2	3	7	22	43.94	S	2	2 ⁴ = 16
ECD11	12	0	4	2	18	25.93	S	2	2 ⁰ = 1
ECD12	18	3	1	0	22	7.58	R	0	0
ECD13	9	9	3	6	27	40.74	S	2	2 ² = 4
ECD14	18	1	2	2	23	15.94	S	2	2 ³ = 8
ECD15	25	0	0	0	25	0	R	0	0

2.2 不同材料根肿病抗性鉴定及筛选
人工苗期接种和火烧坪成株期自然诱发抗性鉴

定结果表明,此芸薹根肿菌生理小种对甘蓝的致病力极强,88 份材料中没有免疫材料,抗性资源少。

苗期,仅 1 份高抗材料,7 份抗病材料,17 份耐病材料,共占 28.41% (表 5)。1 份高抗材料属于中熟圆球材料;7 份抗病材料,其中 3 份扁球材料,均属于中、晚熟类型;4 份圆球材料也均属于中、晚熟类型,参试材料中尖球型没有抗性材料,早熟类型也没有抗性材料;17 份耐病材料,7 份扁球属于中、晚熟类型,4 份圆球也属于中、晚熟类型,另外 6 份尖球材料包括早、中、晚类型(表 2)。CR21 是抗性

最强的材料,发病率 5.76%,病情指数只有 2.29;抗性最弱的材料是 CR54,发病率达到 100%,病情指数达到 75.97(表 5),严重影响植株的正常生长,2 个材料都是圆球型,分别来自日本和意大利,甘蓝对根肿病抗性的强弱与球型没有关系。CR15 和 CR43 来自日本,CR54 来自意大利,发病率都达到 100%,抗性的强弱和材料的来源也没有关系。

表 5 甘蓝苗期和成株期自然抗性鉴定

Table 5 Resistant evaluation of cabbage to *Plasmidiophora brassica* in seedling stage and adult stage

材料 Material	发病率(%)		病情指数		抗性级别		材料 Material	发病率(%)		病情指数		抗性级别	
	Disease rate		Disease index		Resistance grade			Disease rate		Disease index		Resistance grade	
	苗期	成株期	苗期	成株期	苗期	成株期		苗期	成株期	苗期	成株期	苗期	成株期
CR01	55.71	66.70	30.34	40.40	S	S	CR45	67.78	79.21	41.11	50.35	S	S
CR02	68.89	78.65	51.48	58.11	S	S	CR46	77.55	87.19	54.73	55.63	S	S
CR03	62.49	63.33	39.02	37.92	S	S	CR47	81.52	96.48	42.91	61.38	S	S
CR04	20.48	22.94	8.31	9.69	R	HR	CR48	91.58	100.00	75.09	76.81	S	S
CR05	74.44	76.23	41.11	41.86	S	S	CR49	81.11	94.81	48.52	49.26	S	S
CR06	57.13	65.53	25.56	28.88	S	T	CR50	48.15	45.79	19.37	22.98	T	T
CR07	80.92	76.51	51.34	52.88	S	S	CR51	54.15	55.19	39.25	42.69	S	S
CR08	26.13	32.16	12.11	12.94	R	R	CR52	53.58	56.34	25.20	33.95	S	S
CR09	75.08	86.82	38.17	44.83	S	S	CR53	94.44	98.25	63.70	68.90	S	S
CR10	85.22	88.33	59.73	66.67	S	S	CR54	100.00	100.00	75.97	81.54	S	S
CR11	72.95	74.13	38.45	45.44	S	S	CR55	94.06	94.82	76.19	74.10	S	S
CR12	50.00	49.89	19.39	22.03	T	T	CR56	82.22	86.23	61.48	64.65	S	S
CR13	42.20	48.15	15.27	28.79	T	T	CR57	73.07	82.70	38.60	47.46	S	S
CR14	57.90	68.33	38.17	39.58	S	S	CR58	72.22	68.79	39.63	41.73	S	S
CR15	100.00	98.33	65.87	67.50	S	S	CR59	70.95	87.19	35.32	39.07	S	S
CR16	89.65	96.48	45.89	47.92	S	S	CR60	63.21	69.63	34.40	38.52	S	S
CR17	24.58	38.08	9.08	17.57	R	R	CR61	66.68	65.64	39.52	44.66	S	S
CR18	90.94	93.07	45.81	55.15	S	S	CR62	51.86	73.17	24.85	35.81	T	S
CR19	24.02	30.93	12.20	13.24	R	R	CR63	42.87	62.57	16.44	31.68	T	S
CR20	34.57	44.54	18.40	20.03	T	T	CR64	37.52	67.11	15.95	44.76	T	S
CR21	5.76	11.84	2.29	4.23	HR	HR	CR65	53.86	61.18	22.60	26.74	T	T
CR22	43.34	47.17	16.45	17.69	T	R	CR66	59.29	69.10	29.62	35.01	S	S
CR23	21.72	23.58	8.49	7.76	R	HR	CR67	62.42	79.39	25.32	54.06	S	S
CR24	86.52	86.91	46.92	60.08	S	S	CR68	78.03	82.72	53.62	57.26	S	S
CR25	55.76	67.36	20.76	47.16	T	S	CR69	80.03	86.67	63.96	66.67	S	S
CR26	29.15	38.48	11.84	22.41	R	T	CR70	86.67	100.00	68.15	72.37	S	S
CR27	55.71	60.72	31.83	38.84	S	S	CR71	76.67	88.33	49.26	57.08	S	S
CR28	43.20	50.88	19.33	29.82	T	T	CR72	64.44	75.00	34.44	45.65	S	S
CR29	57.78	60.37	34.44	34.03	S	S	CR73	53.33	58.33	21.11	30.00	T	T
CR30	63.33	81.05	54.81	63.33	S	S	CR74	53.23	63.55	21.20	25.39	T	T
CR31	80.48	94.74	57.84	59.21	S	S	CR75	65.04	75.88	34.52	41.84	S	S
CR32	53.33	67.28	34.67	34.54	S	S	CR76	69.40	78.33	58.99	62.08	S	S
CR33	52.22	73.18	34.81	37.20	S	S	CR77	65.56	70.86	32.22	43.62	S	S
CR34	58.88	57.54	32.25	36.45	S	S	CR78	52.30	62.04	26.16	35.79	S	S
CR35	60.00	61.67	37.78	38.33	S	S	CR79	60.04	69.27	38.53	39.66	S	S
CR36	82.63	94.64	56.47	74.07	S	S	CR80	56.02	71.23	28.03	41.97	S	S
CR37	74.44	86.71	51.11	63.99	S	S	CR81	45.48	64.44	19.53	29.95	T	T
CR38	78.49	87.23	45.50	56.31	S	S	CR82	50.67	62.04	19.19	28.80	T	T
CR39	63.33	74.56	38.89	46.09	S	S	CR83	50.71	58.33	21.75	20.83	T	T
CR40	82.22	93.06	59.63	61.80	S	S	CR84	56.06	63.33	26.00	26.25	S	T
CR41	93.10	98.15	60.61	63.91	S	S	CR85	51.04	56.67	22.04	25.00	T	T
CR42	79.97	94.53	37.26	65.92	S	S	CR86	70.77	75.93	55.81	56.53	S	S
CR43	100.00	98.33	59.35	68.06	S	S	CR87	74.36	94.34	46.81	66.61	S	S
CR44	72.22	79.01	40.74	44.43	S	S	CR88	15.56	21.09	5.93	9.64	R	HR

成株期获得高抗材料 4 份,抗病材料 4 份,耐病材料 15 份,其余 65 份为感病材料(表 5),感病材料占总数的 73.86%,病情指数超过 50 的材料 30 份。感病材料植株生长严重受到影响,大部分材料甚至没有经济产量;耐病材料对根肿菌有一定的耐病性,可以结球,但产量大幅下降;抗病材料,有一定的经济产量,产量降幅小。高抗材料 CR21 发病率 11.84%,病情指数最低,为 4.23(表 5),几乎不影响植株生长,其他 3 份抗病材料生长受影响很小。感病材料 CR48、CR54 和 CR70 发病率达到 100%,病情指数分别是 76.81、81.54、72.37(表 5),存在差异,CR54 受病害影响明显,植株无法正常生长,无法形成叶球;CR48 和 CR70,一个扁球中熟类型和一个圆球早熟类型,病情比 CR54 轻,但也严重影响生长,不同材料抗性级

别相同,但受害程度存在一定差异。

2.2.3 不同生育期抗性鉴定比较

2.2.3.1 苗期和成株期发病率比较 88 份材料采用田间苗期人工接种方法和田间成株期自然接种方法进行抗性鉴定,相同材料不同的抗性鉴定方法,发病情况反应基本一致,个别材料差异大些(图 5)。8 份材料苗期发病率比成株期高,其中差异最大的材料是 CR07,其他 80 份材料成株期发病率都比苗期发病率高,其中差异最大的材料是 CR64,成株期发病率为 67.11%,比苗期发病率高达 29.59%,其次 CR62 和 CR63 成株期比苗期高达 21.31% 和 20.96%,CR54 在 2 个时期的发病率均达到 100%,CR21 在 2 个时期的发病率均是最低,苗期比成株期低 6.08%(图 5,表 5)。

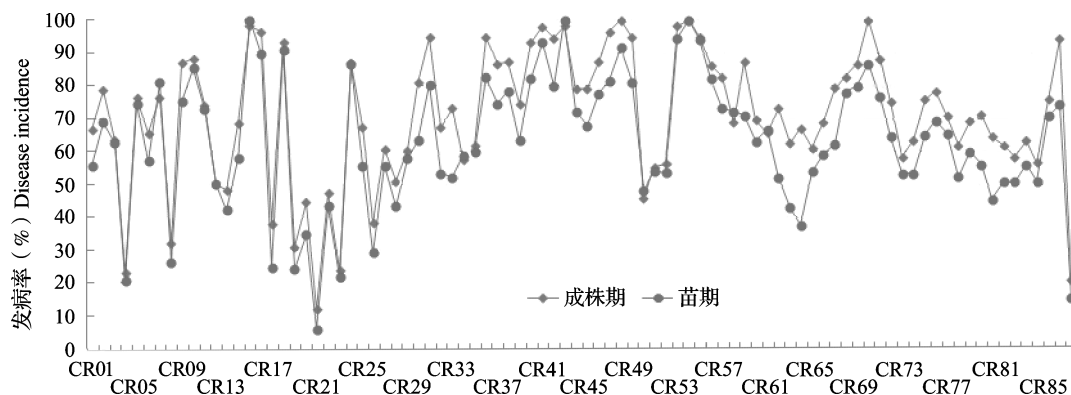


图 5 甘蓝材料苗期和成株期发病率比较

Fig. 5 The comparison of disease incidence in seedling stage and adult stage

2.2.3.2 苗期和成株期病情指数比较 88 份材料通过苗期和成株期抗性鉴定和筛选,苗期高抗(HR)材料只有 1 份,CR21,成株期有 4 份,CR04、CR21、CR23、CR88,其中 CR21 抗性最强;苗期抗病材料有 7 份,成株期有 4 份,其中 CR8、CR17、CR18 2 个时期都是抗病材料;苗期耐病材料有 17 份,成株期有 14 份,其中 CR12、CR13、CR20、CR28、CR50、CR65、CR73、CR74、CR81、CR82、CR83、CR85 共 12 份,2 个时期都属于耐病。苗期感病材料有 63 份,成株期有 65 份,其中 61 份材料 2 个时期都属于感病(表 5)。2 个时期 88 份材料群体抗性鉴定级别基本一致,大部分材料成株期发病指数比苗期高一些,个别材料差异大些,其中差异最大的材料是 CR64,成株期病情指数为 44.76,比苗期病情指数高达 28.81,其次 CR67 和 CR42,成株期比苗期高达 28.73 和 28.66。苗期发病最严重的材料是 CR55,病情指数达到 76.19,成株期病情指数达到 74.10;

成株期发病最严重的材料是 CR54,病情指数达到 81.54,苗期病情指数也高达 75.97(图 6,表 5)。

3 讨论与结论

3.1 根肿病原菌鉴定

芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae*)属原生动物界根肿菌门(*Plasmodiophoromycota*)^[24]。本研究通过光学显微镜观察采自湖北长阳火烧坪甘蓝根肿病重发区病土和病根中休眠孢子的形态特征,呈近球形,单核,无色或略带灰色,孢子直径约为 2.0 ~ 3.5 μm ,与肖崇刚等^[25]的研究结果相吻合。利用已报道的 6 对引物进行 PCR 检测,其中 YPWprimer3-4、PbITS1-2 和 Plasm-3-4 这 3 对引物可以检测此甘蓝根肿菌,而且特异条带大小与前人研究结果^[20-22]一致。ITS1-4 是真菌核糖体基因 ITS 区段通用引物,杨佩文等^[19]利用此对引物在白菜、花椰菜和甘蓝根肿菌中扩增出 1 条 500 bp 左右的特异

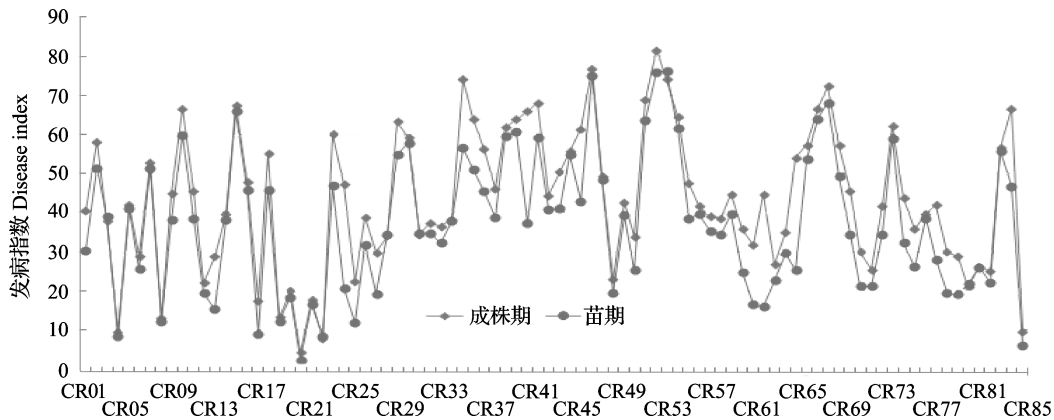


图6 甘蓝材料苗期和成株期发病指数比较

Fig. 6 The comparison of disease index in seedling stage and plant stage

条带,本研究发现此对引物在甘蓝基因组中也可以扩出相应大小的条带;PbITS6-7 也存在此现象,两对引物不适宜此芸薹根肿菌的检测,或者进一步分析序列是否存在差异^[20-21],YPWprimer1-2 虽然存在特异带,但大小与非特异带容易混淆^[23],这对引物也不适宜检测此芸薹根肿菌,可能与根肿菌生理小种不同相关。采用 PCR 检测菌种,利用 2~3 对引物同时扩增,或者利用 1 对引物扩增,并进行特异片段序列分析,结果才稳定可靠。

芸薹根肿菌易变异,存在分化现象,致病力存在差异。本研究利用欧洲 ECD 鉴别系统,鉴定湖北火烧坪甘蓝根肿菌的生理小种是 ECD17/31/13,致病力极强。15 个鉴别寄主中 ECD12 (Bindsachsener) 是抗性强的结球甘蓝品种,本研究甘蓝根肿菌对它的致病力也较弱,病指仅达到 7.58,表现为抗病;ECD15 (Verherul) 为荷兰选育的抗根肿的羽衣甘蓝,抗性表现为免疫^[26],其中 ECD13、ECD11 和 ECD1 分别是 Williams 鉴别系统中的 2 个结球甘蓝 (Jersey Queen、Badger Shipper) 和 1 个芜菁 (Wilhelmsburger),抗性表现均为感病。各 ECD 鉴别寄主的抗性表现,表明此芸薹根肿菌对白菜的致病力最强,甘蓝型油菜次之,甘蓝第三,芜菁最弱,目前,生产上抗病白菜品种的抗性大多来源于芜菁^[27]。汪维红等^[3]利用 Williams 鉴别系统,对湖北长阳火烧坪大白菜、甘蓝和萝卜田块里的根肿菌进行鉴定,生理小种为 4 号,4 个鉴别寄主均感病,致病力强,病情指数达到 56.0~100;利用 Williams 鉴别系统,鉴定此地域芸薹根肿菌生理小种也为 4 号种群^[8,28],本研究 3 个 Williams 鉴别寄主的抗病性与以上结果一致,吴健雄^[12]发现长阳地区芸薹根肿菌是复合种群,由 1 号、4 号、7 号小种构成,优势种群仍然是 4 号小种。

研究者们主要利用 Williams 鉴别系统鉴定,4 个鉴别寄主易搜集,简单,容易操作^[12],但中国芸薹根肿菌主要的优势种群是 4 号生理小种,而且容易变异,将存在继续分化现象,ECD 鉴别系统,15 个鉴别寄主,可以进一步细化生理小种,但存在难以收集齐全 15 个鉴别寄主,增加工作量,应用受限。因此,科学系统地鉴定芸薹根肿菌还需进一步的完善和改进,从分子水平上划分生理小种将是发展的趋势。

3.2 抗性鉴定

通过苗期人工接种和成株期田间自然诱发抗性鉴定,88 份甘蓝材料中 CR21 均表现高抗,7 份材料苗期为抗病,成株期为高抗或抗病,病情指数稍有差异,成株期 CR54 抗性最差,苗期 CR55 抗性最差。抗性鉴定方法是资源材料抗性评价和筛选的关键,陈欣等^[18]研究了根肿病不同的接种方法,发现菌土接种法的效果最佳,鉴定出 3 份抗病甘蓝材料;季海雯等^[9]采用菌土法鉴定油菜对根肿病的抗性;沈向群等^[7]采用菌土法对白菜资源进行评价和筛选;李向东等^[29]采用菌土接种法,筛选十字花科主要蔬菜作物抗根肿病资源;张小丽等^[28]采用伤根菌土法鉴定了 531 份十字花科蔬菜根肿病抗性水平;借鉴前人经验,本研究也采用人工菌土接种方法,方法可靠,同时结合田间自然诱发鉴定,鉴定结果可相互参考。司军等^[17]利用室内和田间人工接种及田间自然诱发 3 种鉴定方法比较,19 份甘蓝材料中只有 6 份材料抗性结果比较稳定;材料发病情况与发病条件密切相关,同一品种在不同的栽培季节抗性表现存在差异^[12],本研究大部分材料苗期鉴定群体抗性级别与成株期田间自然诱发一致,但病情指数偏低,与司军等^[30]发现苗期的抗病能力强一致。根肿病属土传病害,成株期植株须根发达,易被侵染,或者

因为植株生长时间长,根瘤形成和发育的时间长有关;张植敏等^[31]调查田间自然发病的甘蓝,4个品种前期没有发病现象,后期却感病,又或者因为成株期鉴定时期选择在病害易爆发时段,孢子萌发和感染的条件最适宜,病害严重些,再加上田间自然环境发病受诸多环境因子影响,多重病原菌共同侵染并协同互作,生长环境不稳定^[12],可能几个因素共同作用造成自然诱发病害严重的结果。个别材料在2个时期群体抗性级别表现不一致,可能因为植株在2个时期生长状态区别较大,又可能因为人工操作或记录误差有关。田间自然诱发抗性鉴定,能真实代表植株在生产中的抗性水平,也是评价植物种质资源抗病性的主要方法之一^[12],本研究采用2种接种鉴定方法相结合,大大增加了鉴定的可靠性,苗期群体抗性级别鉴定比田间群体抗性级别严格,通过苗期人工接种方法准确反应材料在田间的抗性表现情况,经济方便、易操作,给抗病育种和研究工作提供线索。

参考文献

- [1] 吴琼,沈向群,徐硕,等.大白菜抗根肿病“临时保持系”的选育方法研究[J].江西农业大学学报,2010,32(2):289-294
- [2] 杨丽梅,方智远,刘玉梅,等.“十一五”我国甘蓝遗传育种研究进展[J].中国蔬菜,2011(2):1-10
- [3] 汪维红,余阳俊,丁云花,等.湖北省长阳县十字花科蔬菜根肿病菌生理小种鉴定及抗源筛选[J].中国蔬菜,2013(12):55-60
- [4] Howard R J, Strelkov S E, Harding M W. Clubroot of cruciferous crops-new perspectives on an old disease[J]. Can J Plant Pathol, 2010,32(1):43-57
- [5] 孙保亚,沈向群,郭海峰,等.十字花科植物根肿病及抗病育种研究进展[J].中国蔬菜,2005(4):34-37
- [6] 谢文瑞,黄一修.台湾十字花科蔬菜根瘤病菌的病原性生理分化[J].植物保护学会会刊(台湾省),1988,30(4):393-398
- [7] 沈向群,聂凯,吴琼,等.大白菜根肿病主要生理小种群分化鉴定初报[J].中国蔬菜,2009(8):59-62
- [8] 丁云花,简元才,余阳俊,等.我国8省市十字花科蔬菜根肿病菌生理小种的鉴定[J].中国蔬菜,2013(16):85-88
- [9] 季海雯,任莉,陈坤荣,等.油菜根肿病病原主要生理小种和品种抗病性鉴定[J].中国油料作物学报,2013,35(3):301-306
- [10] 彭沙沙,任佐华,黄小莉,等.湖南十字花科作物根肿病菌生理小种鉴定[J].长江蔬菜,2013(6):46-49
- [11] 刘峰,张丽辉,姬广海.云南和西藏十字花科蔬菜根肿病菌生理小种[J].中国蔬菜,2013(20):77-81
- [12] 吴健雄.湖北省十字花科根肿病菌生理小种鉴定及遗传多样性分析[D].武汉:华中农业大学,2013
- [13] 刘成,闫红飞,宫文萍,等.小麦叶锈病新抗源筛选[J].植物遗传资源学报,2013,14(5):936-944
- [14] Crisp P, Crute I R, Sutherland R A, et al. The exploitation of genetic resources of *Brassica oleracea* in breeding for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) [J]. Euphytica, 1989, 42(3):215-226
- [15] Manzanares-Dauleux M J, Divaret I, Baron F, et al. Evaluation of French *Brassica oleracea* landraces for resistance to *Plasmodiophora brassicae* [J]. Euphytica, 2000, 113(3):211-218
- [16] Malin C, RoLand V B, Arnulf M. Screening and evaluation of resistance to downy mildew (*Plasmodiophora brassicae*) in genetic resources of *Brassica oleracea* [J]. Hereditas, 2004, 141:293-300
- [17] 司军,李成琼,宋洪元,等.结球甘蓝对根肿病的抗性鉴定与评价[J].西南大学学报:自然科学版,2009,31(6):26-30
- [18] 陈欣,王超,张晓烜,等.甘蓝根肿病的人工接种体系与抗源材料筛选[J].植物保护,2015,41(5):121-126
- [19] 杨佩文,李家瑞,杨勤忠,等.十字花科蔬菜根肿病菌休眠孢子的分离与检测[J].云南农业大学学报,2002,17(3):301-302
- [20] 杨佩文.根肿病菌核糖体基因 ITS 区段的克隆测序及其在检测中的应用[J].云南农业大学学报,2003,18(3):228-233
- [21] 杨佩文,杨勤忠,王群,等.十字花科蔬菜根肿病菌的 PCR 检测[J].云南农业大学学报,2002,17(2):137-139
- [22] Faggian R, Bulman S R, Lawrie A C, et al. Specific polymerase chain reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water [J]. Phytopathology, 1999, 89(5):392-397
- [23] Kageyama K, Komatsu T, Suga H. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil [J]. J Gene Plant Pathol, 2003, 69(3):153-160
- [24] Schwelov A, Fogelqvist J, Knaust A. The *Plasmodiophora brassicae* genome reveals insights in its life cycle and ancestry of chitin synthases [J]. Sci Rep, 2015, 5, Doi:10.1038/srep11153
- [25] 肖崇刚,郭向华.甘蓝根肿病菌的生物学特性研究[J].菌物系统,2002,21(4):597-603
- [26] Buczack S T, Toxopeus H, Mattusch P, et al. Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach [J]. Trans Br Mycol Soc, 1975, 65(2):295-303
- [27] Diederichsen E, Frauen M, Linders E G A, et al. Status and perspectives of clubroot resistance breeding in Crucifer Crops [J]. J Plant Growth Regul, 2009, 28(3):265-281
- [28] 张小丽,刘玉梅,方智远,等.十字花科蔬菜根肿病生理小种鉴定及抗源筛选[J].园艺学报,2015,42(S1):2682
- [29] 李向东,孙道旺,曹继芬,等.十字花科蔬菜根肿病抗性水平筛选研究[J].西南农业学报,2013,26(1):171-173
- [30] 司军,李成琼,肖崇刚,等.甘蓝根肿病接种方法的研究[J].西南农业大学学报,2003,25(3):216-219
- [31] 张植敏,覃拥军,向玉蓉,等.不同品种对根肿病抗性大田试验[J].湖北植保,2015(3):17-19