

文章编号:1003-8701(2009)02-0043-04

十字花科蔬菜根肿病生物学特性 及分子生物学研究进展

商 桑,黄绵佳,田丽波*

(海南大学园艺园林学院,海南 儋州 571737)

摘 要:根肿病俗称根癌病,是一种世界性病害,对十字花科植物危害极大。本文介绍了十字花科根肿病目前的基本研究概况,详细讨论了根肿病的生物学特性和分子生物学研究进展,并对今后的研究方向提出了展望。

关键词:十字花科蔬菜;根肿病;生物学特性;分子生物学

中图分类号:S43

文献标识码:A

Progress of Studies on Biological Characters and Molecular Biology of Club Root Disease on Cruciferous Crops

SHANG Sang, HUANG Mianjia, TIAN Li-bo*

(College of Horticulture and Gardening, Hainan University, Danzhou 571737, China)

Abstract: Club root disease, which was also called club root cancer, is a kind of world wide disease and has great harm on cruciferous crops. The base research overview about cruciferous club root disease at present was introduced in the paper. Research progress of biology characters and molecular biology of club root disease was discussed in detail. Direction of future studies was also put forward.

Key words: Cruciferous vegetable; Club root disease; Biology characters; Molecular biology

十字花科根肿病俗称根癌病,是由芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woronin)侵染引起的一种世界性病害,寄主范围很广,可危害大白菜、小白菜、甘蓝、萝卜、芥菜、花椰菜、芥菜和油菜等 100 多种栽培的和野生的十字花科植物^[1]。在环境条件适合的情况下可导致十字花科作物根和茎吸收传导养分受阻,生长不良,萎蔫、矮化,产量和质量受损,以致减产,造成经济损失;而且受到根肿病菌污染的土地将长期带菌,不再适宜栽培十字花科植物,因此,该病严重威胁着十字花科作物的可持续生产^[2]。

本病为世界性病害,造成的经济损失极大,所以相关研究颇多,但至今仍是一难题。关于根肿病

的研究早期主要集中在传统的遗传育种方面,20 世纪 90 年代中后期,相关的分子生物学研究逐渐增加。现将十字花科蔬菜根肿病的生物学特性及分子生物学研究进展介绍如下,旨在为根肿病的研究提供一定的理论依据。

1 十字花科根肿病生物学特性研究进展

1.1 病原菌分类

此病由芸薹根肿菌(*plasmodiophora brassica*)侵染所致。Woronin (1975 年)鉴定并命名为“*plasmodiophora brassica* Woronin”。属鞭毛菌亚门根肿菌属真菌^[4]。Ainsworth(1995 年)将此病原重新分类为:原生动物界根肿菌门根肿菌纲根肿菌目根肿菌科根肿菌属芸苔根肿菌^[5]。

1.2 根肿菌的生物学特征

据李惠明等^[9]研究,该病发生的土壤温度为

收稿日期:2009-03-17

作者简介:商 桑(1977-),男,在读博士,讲师,现从事农业生物技术方向研究。

通讯作者:田丽波,E-mail:faiy7play@163.com

10~30℃(适宜温度为 19~25℃);土壤相对湿度为 40%~98%(适宜相对湿度为 70%~90%),而杨明英等^[10]认为,土壤持水量 60%时白菜根肿病发病率最高,达到 55.2%。

肖崇刚^[11]等研究认为,甘蓝根肿病菌休眠孢子在 4~40℃ 范围内均可萌发,最适萌发温度 24℃,其平均萌发率高达 73.76%;随着温度的升高或降低,萌发率均逐渐下降。当温度上升到 40℃ 时,萌发率仅为 5.52%;而温度降到 4℃ 时,萌发率则为 7.04%。研究培养基对孢子萌发的影响时发现过滤灭菌和未灭菌的根分泌物溶液、2%蔗糖及 Hoagland 营养液对孢子萌发均有刺激作用;5%葡萄糖、湿热灭菌的根分泌物、0.2%及 0.4%组织榨汁对孢子萌发有抑制作用。其中以过滤灭菌的根分泌物溶液萌发率最高,达 75.01%,而未灭菌的根分泌物与之相比有差异,且实验观察到未灭菌的根分泌物中含有许多杂菌,说明孢子萌发受到其它杂菌抑制。耐病甘蓝品种和非十字花科番茄的根分泌物对休眠孢子萌发均有促进作用。根肿病菌休眠孢子在弱酸性溶液中萌发较好,以 pH 值为 6.3 时平均萌发率最高,在碱性及中强酸溶液中萌发受抑制,致死温度可能为 45℃。

Buczacki 等^[6]在研究光照和土壤温度对根肿病的影响时发现,播种后第 2 和第 3 周的光照水平对根肿病的严重度影响最大;温度对发病率影响最大(其中第 2 周的温度可能起到最重要作用);可能导致最大严重度的第 2、第 3 周的最佳光照为 600W·hm⁻²·d⁻¹,若日均温≥19.5℃,则近 100%植株发病。肖崇刚等则认为,光照对休眠孢子萌发有明显抑制作用^[11]。

目前就病菌孢子萌发的最适温度、pH 值及培养基质等生物学特性研究尚未见报道。主要原因可能是由于休眠孢子萌发要求条件严格。Chupp(1917)和 Honig(1931)认为,光抑制休眠孢子萌发^[7]。有些研究者还发现其休眠孢子萌发需要来自十字花科植物根部渗出物—烯丙基异硫氰酸的刺激。Hooker 等(1945)研究报道苯甲醛同寄主组织片段一样能刺激休眠孢子萌发。

1.3 根肿菌的侵染方式

十字花科根肿菌是一种低等生物。病菌以休眠孢子(Resting spores)残存土中,大小为 36μm(23~42 μm),圆形,无色,单核,表面具刺状突起。可用荧光染色法^[8]鉴定休眠孢子是否存活。病菌靠流水、雨水和土壤中的线虫、昆虫的活动以及

农事操作在田间传播。远距离传播则主要通过带病菌的菜苗、植株的调运或带菌泥土、种子的转移。待发芽产生具 2 条长短不等之前生鞭毛为第 1 游走子(Zoospore),大小 24~60 μm。静止后由鞭毛侵入寄生,并形成无细胞壁第 1 次原生质体(Plasmodia),不定形,多核,扩大侵害,分化成游走孢子囊(Zoosporangium),无色,能释出 4~16 个第 2 次游走子,大小同第 1 次者,释出土中后,再侵入寄主根部皮层细胞,形成第 2 次原生质体,同时使寄主细胞增生肿大成根瘤^[9],维管束组织受增生细胞的挤压,发育不正常,输导系统不能连贯,致使植株吸收水分和养料困难。因此,病株表现生长迟缓和叶片萎垂,直至整株死亡。待被害根部腐烂后,释出在病根内已形成的大量休眠孢子,渡过逆境而侵害寄主,存活期可达 7 年之久,从而轮生不息。

1.4 侵染症状

根肿病主要危害十字花科蔬菜的根部,引起主根或侧根形成数目和大小不等、形似指状、短棒状或球形的肿瘤。由于根部受害,植株地上部会出现明显的症状,发病初期地上部危害症状一般不明显,植株生长缓慢,明显矮小,晴天高温时叶片表现下垂、萎蔫(似缺水状),开始时晚间尚可恢复,以后叶片由下而上逐渐发黄,最后发展成永久性萎蔫,植株枯死^[12]。拔出病株,在根部可见到根部肿大,形成瘤状。在某些严重的地块,肿瘤甚至长出地面。初期瘤体表面平滑,后逐渐变粗糙并龟裂,因有其它杂菌混生,最后使肿瘤腐烂发臭。受害根瘤体的形状、大小与着生的位置有关,主根上比较大,呈球形或近球形,数量比较少;在侧根上比较小,呈手指状或圆筒状,但数量比较多。

2 根肿病的分子生物学研究进展

2.1 根肿菌基因组的克隆及其分子检测

随着分子生物学技术的不断进展,使 PCR 技术在根肿病菌检测上得到了广泛应用。HeeYoun(1998 年)和 SITO(1999 年)相继报道了利用 PCR 进行 DNA 扩增,对根肿病病原体进行特异性检测,并提出了从土壤中直接提取根肿病菌的方法。试验证明单管巢式 PCR 和两轮 PCR 是检测田间土壤中根肿病菌孢子的有效方法^[13-14]。杨佩文等^[15]应用 ITS 区段通用引物 ITS1 和 ITS4 对十字花科蔬菜根肿病菌(*Plasmodiophora brassicae*) rDNA 进行 PCR,并将得到的目的片段克隆到 pGEM-T 载体上。对重组克隆进行测序和碱基编码结构特点分

析后,设计了一对根肿病菌特异性寡聚核苷酸引物,此引物能从十字花科蔬菜根肿病菌上扩增到长度 500 bp 的特异性片段。马淑青利用 PCR 技术对来自不同地区的十字花科根肿菌的 DNA 进行了特异性扩增,患病植株均获得了 600 bp 左右的特异性片断,而健康植株未获得任何扩增产物。

2.2 根肿病抗病基因的分子生物学研究

防治根肿病,除了使用化学药剂外,种植抗病品种是最安全而又经济的一种方法。进行十字花科抗根肿病育种,有必要弄清楚根肿病的抗性遗传规律,这样就能为抗病育种提供理论依据,加速育种过程和改进育种方法。国外在根肿病的抗病遗传方面做了不少研究。一般认为,甘蓝对根肿病的抗性是数量遗传抗性。J·D·Vriesenga 等曾报道甘蓝对根肿病的抗性受两个基因控制,一个为隐性,另一个为不完全显性。

20 世纪 90 年代中后期,随着分子生物学的快速发展,对根肿病抗性基因的研究上升到了分子学水平,并逐步在抗病育种方面得到了广泛应用。目前对根肿病多个生理小种的抗性基因进行了定位,例如 pb2、pb7 分别位于连锁群 6、2 上。Moriguchi 等利用 RAPD 及 RFLP 等标记确定了甘蓝的一个与抗性有关的数量性状位点(QTL)^[17]。Landry 等在利用 RFLP 标记构建甘蓝基因图谱的同时,对甘蓝根肿病抗性基因进行了定位分析,确定了 2 个对根肿病小种 2 具有抗性的数量性状位点(QTLs)。Grand clement 等用抗病的羽衣甘蓝为父本、感病的花椰菜为母本进行杂交,对杂交种的 F₂ 代群体的抗性进行了研究^[18]。Voorrip 等(1999)利用 RFLP 和 AFLP 标记定位了甘蓝的 2 个与抗性有关的基因,并命名为 pb-3 和 pb-4,为多个生理小种的深入研究提供了依据^[16]。通过 RAPD 标记进行 QTL 检测,QTL 分析表明,抗性特征至少存在两种遗传机制。Kikuchi 等找到了一个根肿抗性标记 RA12-75A,认为有利于大白菜的抗根肿病育种^[16]。Kuginuki 等利用单倍体加倍后获得的双倍体绘制了大白菜根肿病抗病基因图谱,得到了 3 个与一抗病位点有关的 RAPD 标记,并认为这 3 个标记在育种中对于促进选择应该是有用的^[20]。Matsumoto 等利用 RFLP 标记构建了包括抗性基因在内的大白菜连锁图^[21]。所用的亲本品系 T136-8 对当前小种 2 具有抗性,该抗性显著地由一个来源于欧洲芜菁的显性基因控制,抗性位点被绘制在连锁群 3 上。Manzanares 等绘制了芜菁甘蓝的抗性基因图谱^[22]。在研究中发现,对根肿病菌 Pb137-522

具高水平抗性的一个亲本主要由一个主效基因控制,并命名为 Pb-Bn1,定位在连锁群 DY4 上,该亲本对根肿病菌 K92-16 所表现出的数量抗性是由于至少两个加性的 QTLs 的联合作用,并且这两个位点被定位在连锁群 DY4 和 DY15 上。

韩国从 20 世纪末开始进行根肿病研究,在常规抗病育种的同时进行分子学研究。Piao ZY 等完成大白菜抗根肿病基因位点的确定和基因图谱的绘制^[23]。LimYong-Pyo 等申请了抗根肿病基因 DNA marker 在韩国的专利^[24]。Piao ZY 等正在进行 AFLP BAC map-based cloning 方法克隆根肿病抗性基因的研究。

3 结 语

目前,世界各国关于根肿病的研究越来越多,而我国对根肿病的研究较少,发表的文章大部分集中于报道各地的发病情况和防治方法的探讨,而报道的防治方法简单、粗放,没有从根本上解决根肿病的危害,即治标不治本,对于根肿病的认识还不够全面,研究方法也比较落后。深入了解根肿菌的生物学特性并积极采用分子生物学手段对十字花科根肿病的基因组进行研究,寻找抗性基因,通过转基因、分子标记辅助育种等手段,培育出对根肿病具有抗性的十字花科蔬菜品种,对于降低甚至消除根肿病造成的农业损失必将起到极为积极的作用。

参考文献:

- [1] 徐瑞英,徐瑞芹.十字花科根肿病的发生与防治[J].吉林蔬菜,2006(2):41-42.
- [2] 孙保亚,沈向群,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.
- [3] 唐文华.北京十字花科蔬菜根肿病的发生和鉴定[J].植物保护学报,1990,16(1):17-18.
- [4] 裘维蕃.农业植物病理学[M].北京:农业出版社,1982:426-430.
- [5] AINSWORTH G C. Ainsworth and Bisbys Dictionary of the Fung 8thEd [M]. London Common wealth Mycological Institute 1995,616.
- [6] BUCZACKI S T,OCKENDON J G,FREEMAN G H. An analysis of some effects of light and soil temperature on club root disease[J].Ann App Boi,1978,88:229-238.
- [7] INGRAM DC,TOMMERUP IC. The life history of Plasmodiophora brassicae[J].Proc R Soc Lond,1972,180:103-112.
- [8] TAKAHASHI K,YAMAGUCHI T. A method of a assessing the pathogenic activity of resting spores of Plasmodiophora brassicae by fluorescence microscopy [J]. Ann. phytopath, Soc. Japan,1988,54:466-475.
- [9] 吕理棧.十字花科蔬菜根肿病[J].云南农业大学学报,

- 2002 ,17(2) :134- 136 .
- [10] 杨明英 ,杨家鸾 ,孙道旺 ,等 . 土壤含水量对白菜根肿病发生的影响研究[J] . 西南农业学报 ,2004 ,17 (4) :482- 283 .
- [11] 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 .
- [12] 何玉科 . 芸苔属作物 RiT- DNA 转化根对根肿菌 (Plas- modiophorabrassicae) 的侵染反应[J] . 中国科学 B 辑 ,1991(4) :382- 387 .
- [13] HEE YOUN CHEE, WAN GYU KIM, WEON DAE CHO. De- tection of Plasmodiophora brassicae by Using Polymerase Chain Re- action [J]. Korean Journal of Plant Pathol ,1998 ,14 (6) :58- 593 .
- [14] IOTS, MAEHARA T, MARUND E. Development of a PCR- base Assay for the Detection of Plasmodiophora brassi- cae in Soil [J]. Journal of phytopathology ,1999 ,147 ,83- 88 .
- [15] 杨佩文 ,李家瑞 ,杨勤忠 ,等 . 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 .
- [16] VOORRIPS- RE ,JONGERIUS- MC ,KANNE- HJ. Mapping of two genes for resistance to clubroot t (Plasmodiophora brassicae) in a population of doubled haploidlines of Brassi- ca oleracea by means of RFLP and AFLP markers [J]. Theo- retical- and- Applied- Genetics. 1997,94(1) :75- 82 .
- [17] MORGUCHI- K ,KIMIZUKA- TAKAGI- C ,ISHII- K ,et al. A genetic map based on RAPD, RFLP, isozyme, morphological markers and QTL analysis for clubroot resistance in Brassi- caoleracea [J]. BreedingScience. 1999,49(4): 257- 265 .
- [18] GRANDCLEMENT- C ,THOMAS- G. Detection and analysis of QTLs based on RAPD markers for polygenic resistance to Plasmodi- ophora brassicae Woron in Brassica oleraceaL [J].
- Theoreti- cal- and Applied Genetics. 1996,93(1- 2):86- 90 .
- [19] KIKUCHI- M ,AJISAKA- H ,KUGINUKI- Y ,et al. Conver- sion of RAPD markers for a clubroot resistance gene of Bras- sicara- pinto sequence tagged sites (STSs) [J]. Breeding- Sci- ence. 1999,49(2): 83- 88 .
- [20] KUGINUKI- Y ,AJISAKA- H ,YUI- M ,et al. RAPA markers linked to a club root resistance locus in BrassicarapaL[J]. E- uphytica. 1997,98(3): 149- 154 .
- [21] MATSUMOTO- E ,YASUI- C ,OHI- M ,et al. Linkage analysis of RFLP markers for club root resistance and pigmentation in Chinese cabbage (Brassicarapassp. pekinensis) [J]. Eu- phytica. 1998,104(2): 79- 86 .
- [22] MANZANARES-DAULEUX -MJ ,DELOURME -R ,BARON - F ,et al. Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to club root in Brassicanapus [J]. Theoretical and Applied Genetics. 2000,101(5-6): 885-891 .
- [23] PIAO ZY ,PARK YJ ,DENG YQ ,et al. Molecular map of club root resistance gene in Chinese cabbage (Brassicara- passp. pekinensis) [A]. In : Plant & Animal Genomes XI Conference [C], San Diego, CA, 2003 ,30 .
- [24] LIM YONGPYO ,PIAO ZHONGYUN ,JANG CHANGSOON. (2002.8.3). DNA marker, primer kits, and method for effec- tive detection of club root disease resistant plant [P]. 韩国专 利 :10- 2001- 0006352 .
- [25] LANDRY- BS ,HUBERT- N ,CRETE- R ,et al. A genetic map for Brassica oleracea based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and map- ping of resistance genest or ace2 of Plasmodiophora brassi- cae (Woronin) [J]. Genome. 1992,35(3): 409- 420 .

(上接第 42 页) 500 倍液的抑菌率均达 74% 以上 , 较好地抑制了菌片上菌丝的生长。

Syu- 1 的各个处理抑菌效果大体相同 , 经高温离心后的 500 倍、1 000 倍处理抑菌效果较高一些。

S11 菌株的各处理抑菌效果在 46%~57% 之间 , 圆菌株的抑菌效果在 48%~67% 之间 , 不如其他处理的抑菌效果明显 , 但观察基内菌丝仍能看出受到抑制。

Syu 菌株的混合菌液 250 倍处理的抑菌率最高达 76%。

上述 9 种菌株中 Syu 的混合菌液 250 倍液 , 园 5 的高温离心上清液 250 倍、500 倍液 , S11t- 2 的混合菌液 1 000 倍液和高温离心上清液的 250 倍液的抑菌率均达 70% 以上 , 表现出明显的抑菌效果。

3 讨 论

本试验结果表明 , 室内分离出的 4 个双标记菌株 Syu、S11t- 2、S11b- 1'、S11b- 2' 对镰刀病菌

均有较好的抑菌效果。平皿抑制作用下抑菌的强弱是生防菌筛选的重要指标 , 但皿内抑菌实验一般只能检测微生物是否能够抑制目的菌的生长 , 而这种抑菌作用能否在自然条件下表达 , 以及在实践中是否发挥作用 , 还需进一步对更多的田间试验来验证。下一步可继续对上述菌株的培养发酵条件、田间药效稳定性进行研究 , 为新型生物制剂研制提供理论依据。

参考文献 :

- [1] 李怀方 , 刘凤权 , 郭小密 , 等 . 园艺植物病理学[M] . 北京 : 中国农业大学出版社 , 2001.1, 218 .
- [2] 孔 建 , 赵白鸽 , 王文夕 , 等 . 枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis* (Cohen)]B- 903 菌株抗菌物质对植物病原菌的抑制作用 [J] . 植物病理学报 , 1993 , 25(1) :69- 72 .
- [3] 司美茹 , 薛泉宏 , 余 博 , 等 . 辣椒疫霉生防菌的双重筛选[J] . 植物保护学报 , 2006 , 33 , 41- 46 .
- [4] 尹敬芳 , 张文华 , 李健强 , 等 . 辣椒疫病生防菌的筛选及其抑菌机制初探[J] . 植物病理学报 , 2007, 37(1) :88- 94 .
- [5] 杨晓凡 , 花日茂 , 吴祥为 , 等 . 抗烟草黑叶病菌的植物源杀菌剂的筛选研究[J] . 安徽农业大学学报 , 2006 , 33(2) :189- 191 .