

## 白菜根肿病的接种方法

## The inoculation methods of Chinese cabbage clubroot

李 妍<sup>1,2</sup> 谢学文<sup>1</sup> 向文胜<sup>2</sup> 石延霞<sup>1</sup> 李宝聚<sup>1\*</sup> 王 平<sup>2</sup>

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

Li Yan<sup>1,2</sup> Xie Xuewen<sup>1</sup> Xiang Wensheng<sup>2</sup> Shi Yanxia<sup>1</sup> Li Baoju<sup>1\*</sup> Wang Ping<sup>2</sup>

(1 Institute of Vegetables and Flowers Chinese Academy of Agricultural Sciences Beijing 100081

China 2 Department of Life Sciences Northeast Agricultural University

Harbin 150030 Heilongjiang Province China)

根肿病是由芸薹根肿菌 *Plasmodiophora brassicae* Woronin 引起的土传性病害<sup>[1]</sup>。根肿菌属于专性寄生菌, 不能直接培养<sup>[1]</sup>, 所以对带菌植株活体的研究尤为重要, 而建立稳定的接种方法是带菌植株活体研究的基础。Asano 等<sup>[2]</sup>曾提出过浸蘸法、插入法和菌土法等接种技术, 但至今国内外对十字花科根肿病还没有统一且稳定的接种方法<sup>[3]</sup>。为此, 本试验对白菜根肿病的接种方法进行了研究。

## 1 材料与方 法

## 1.1 材 料

发病根肿病根于 2008 年 6 月采自湖北省宜昌市长阳县火烧坪镇黍子岭村, -20℃ 保存备用。黄美春白菜种子, 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所菜病综防组保存。

## 1.2 方 法

不同育苗方式和 pH 环境对接种效果的影响: 将 -20℃ 保存的带有根肿病菌的冻根组织打碎, 过滤, 放置 2h 后拌入灭菌土中接种。分别用直播和移栽的方式育苗, 保证两者接种时间一致。每处理各设 1 个空白对照, 每处理 10 株苗, 3 次重复。常规培养, 调查发病情况。不同 pH 环境对接种效果的影响试验分别用 pH 6 和 pH 7.2 水浇灌培养。

不同接种方法和接种浓度对接种效果的影响:

①密封菌土法: 将带有根肿病菌的根组织打碎, 拌入少量灭菌土中密封 48h 以上, 将菌土均匀拌入无菌土中接种。②普通菌土法: 将带有根肿病菌的根组织打碎, 过滤, 放置 2h 后拌入无菌土中接种。③灌菌法: 将带有根肿病菌的根组织打碎, 过滤, 放置 2h

后直接灌入移栽后的培养钵中接种。

制备 6 种不同浓度的病土: 每克灭菌土中接种 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0002 g 病根。对处理菌土进行菌量统计, 土壤中休眠孢子富集参照 Simens 等<sup>[3]</sup>。取 1 滴休眠孢子富集液于血细胞计数板上镜检计数, 统计各处理土样含菌量。

不同保存形式的病原菌对接种效果的影响: 分别将带菌的白菜鲜根和冻根接种, 每克灭菌土中接种 0.05 g 病根, 密封 48h 后使用。分级标准: 0 级: 无病; 1 级: 根肿只附着在侧根上, 数量占根系全部的 1% ~ 25%; 2 级: 主根上有根肿附着, 侧根上根肿数量占 25% 以上; 3 级: 根肿数量占 50% ~ 75% 的根系, 主根上有根肿附着; 4 级: 根肿数量占 75% 以上的根系, 主根上有根肿附着。病情指数计算公式如下:

$$PT = \frac{\sum (N_i \times I)}{N \times 4} \times 100$$

式中: PT: 病情指数;  $N_i$ : 各级发病株数;  $I$ : 相对级数值;  $N$ : 调查株数。

## 1.3 统 计 分 析

数据采用 SPSS 17.0 软件 Duncan 氏新复极差法进行差异显著性分析。

## 2 结 果 与 分 析

## 2.1 不同育苗方式和 pH 环境对接种效果的影响

植株在移栽后第 24 天时开始出现发病症状, 表现为主根肿大, 阳光下明显萎蔫; 而直播的植株在 33 天时才开始出现病状。在相同接菌压力下移栽

基金项目: 现代农业产业技术体系 (大宗蔬菜) 建设专项资金资助

作者简介: 李妍, 女, 1984 年生, 硕士研究生, 研究方向为生物化学与分子生物学, email: liyan86414048@126.com

\* 通讯作者 (Author for correspondence), email: L11@mail.caas.net.cn, Tel: 010-62197975, 收稿日期: 2010-04-02

的植株病情指数为 25.69 而直播的植株病情指数只有 20.83, 表明育苗方式采用移栽法更适合。

采用移栽育苗的植株在酸性 pH 环境下的病情指数为 49.02, 在微碱性 pH 环境下的病情指数为 44.17。虽然两种环境下的植株均可发病, 但相比之下, 酸性环境下植株的病情指数高于微碱性环境下植株。由此可见, 根肿菌更适合在偏酸性的环境中繁殖。

## 2.2 不同接种方法和接种浓度对接种效果的影响

三种接种方法中, 密封菌土法的病情指数为 31.25, 普通菌土法的病情指数为 25.00, 灌菌法的

病情指数为 22.92, 接种程度依次减弱。其中, 密封菌土法的接种效果最好。由此可见, 在患病肿根充分释放休眠孢子之后, 根肿菌在密闭遮光的环境中能够迅速的繁殖, 间接提高了根肿菌的接种浓度, 更有利于接种植株的发病。

试验中前 5 个浓度的菌土均可使植株发病, 随着接种浓度的降低, 病情指数逐渐下降。每克灭菌土中接种 0.0002 g 感病病根时植株不表现根肿病症状 (表 1)。经血细胞计数板统计获得了不同接种浓度对应的根肿菌休眠孢子浓度, 确定了  $1.6 \times 10^5$  个休眠孢子/g 灭菌土是根肿病接种的发病阈值。

表 1 不同接种浓度发病结果统计

Table 1 Effect of different inoculation concentrations on pathogenesis

接种浓度 (g/g) Inoculation concentration	孢子浓度 (休眠孢子数 /g 灭菌土) Spore concentration (spore/g soil)	平均病情指数 (mean ± SD) Average disease index
0.1	$1.6 \times 10^7$	84.85 ± 5.17 a
0.05	$8.0 \times 10^6$	58.58 ± 4.92 b
0.01	$1.6 \times 10^6$	19.53 ± 2.95 c
0.005	$8.0 \times 10^5$	11.67 ± 1.44 c
0.001	$1.6 \times 10^5$	5.83 ± 4.33 d
0.0002	$3.2 \times 10^4$	0
空白 Control	—	0

注: 数据后相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。Note: Data followed by the same letters are not significantly different at  $P > 0.05$  level.

## 2.3 不同保存形式的菌原对发病的影响

以新鲜感病肿根为材料的接种植株的病情指数为 52.98 而经  $-20^\circ\text{C}$  保存的感病肿根接种植株的病情指数只有 43.06。虽然两者均可使植株发病, 但新鲜感病肿根的致病力更强。由此推测, 根肿菌在  $-20^\circ\text{C}$  保存过程中有部分休眠孢子死亡或丧失了致病力。

## 3 讨论

本研究结果表明, 接种浓度是制约接种成功与否的关键因素。接种浓度越高, 病情指数越高, 这与生产上重病区孢子浓度较高的观点相一致。接种的临界发病浓度是根肿病的发病阈值, 可作为检测指标。在酸性 pH 条件下, 采用密封菌土法鲜根接种更适合根肿菌的生存和繁殖。另外, 本试验发现根

肿菌菌原在低温保存过程中会有部分休眠孢子死亡或者丧失致病力, 因此, 根肿菌菌种的保存方式还有待于进一步研究。

## 参考文献 (References)

- [1] Asano T, Kodama A, Kageyama K. Susceptibility of hairy root lines of *Brassica* species to *Plasmodiophora brassicae* and in an in vitro subculture system. *Journal of General Plant Pathology*, 2006, 72: 85–91.
- [2] Asano T, Kageyama K, Hyakumachi M. Surface disinfection of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* used to infect hairy roots of *Brassica* spp. *Phytopathology*, 1999, 89(4): 314–319.
- [3] Simons J, Graf H, Bulman S, et al. Monitoring expression of selected *Plasmodiophora brassicae* genes during clubroot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Pathology*, 2009, 58: 130–136.