

# 抗根肿病大白菜小孢子培养优化条件研究

胡靖锋<sup>1</sup> 戴永娟<sup>2</sup> 汪 骞<sup>1</sup> 杨红丽<sup>1</sup> 吴丽艳<sup>1</sup> 钟 利<sup>1</sup> 和江明<sup>1\*</sup>

(1. 云南省农业科学院 园艺作物研究所, 云南 昆明 650205; 2. 云南大学 生命科学学院, 云南 昆明 650091)

**摘要:** 为选育出抗根肿病 DH 材料, 本研究通过菌土接种法筛选出对根肿病具有较好抗性的白菜王后代 C08384、C08385 病情指数分别为 4.18 和 7.67。采用小孢子培养技术培养出 DH 系并对该体系进行优化。当离心转速 1 200 r/min、热激温度 32.5 °C 处理 1 d 时 最有利于胚状体的诱导; 培养基中琼脂质量浓度为 1.2% 时, 有利于诱导胚再生成幼苗; 当培养基中激素质量浓度是 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 时, 有利于不定芽的诱导。

**关键词:** 大白菜; 菌土法; 根肿病; 小孢子培养技术

中图分类号: S634.1; S332.2 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)05-0893-06

## A Study on Optimization of Microspore Culture of Clubroot-resistant Chinese Cabbage

HU Jing-feng<sup>1</sup>, DAI Yong-juan<sup>2</sup>, WANG Qian<sup>1</sup>, YANG Hong-li<sup>1</sup>,  
WU Li-yan<sup>1</sup>, ZHONG Li<sup>1</sup>, HE Jiang-ming<sup>1\*</sup>

(1. Horticultural Institute of Yunnan Academy of Agricultural Science, Kunming 650205, China; 2. School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091, China)

**Abstract:** In order to breed DH materials with resistance to clubroot, with bacterium soil inoculation method of root C08384, C08385 of the cabbage queen generation with strong resistance against clubroot were developed by selection. Their disease indices were 4.18 and 7.67 respectively. Using the microspore culture technology the DH system was developed and optimized. The conducive conditions for cultivation of cabbage microspore embryo were centrifugal speed, 1 200 r/min, heat-shock temperature, 32.5 °C and treating time one day. 1.2% of AGAR concentration of medium was conducive to inclusion of embryos into seedlings. 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L of medium hormone concentration was conducive to seedling induction.

**Key words:** cabbage; soil bacteria inoculation; club-root; microspore culture

随着十字花科根肿病发病情况日趋严重 特别是结球白菜对根肿病几乎没有抗性 导致其发病更为严重。使其产量严重下降 甚至绝收<sup>[1]</sup>。在我国多个省份根肿病爆发严重, 云南土壤以红壤为主, 酸性较强, 有利于根肿病发生, 成为全国根肿病最重的省份<sup>[2-3]</sup>。大白菜是人们日常生活必不可少的蔬菜,

收稿日期: 2011-06-27 修回日期: 2011-09-01

基金项目: 农业部公益性行业(农业)科研专项(201003029)、云南省科技创新强省计划(2009AB002)、云南省技术人才培养计划(2007PY02-20)、云南省国际合作科技计划(2009EE002)和云南省重点新产品开发计划项目(2010BB013)

作者简介: 胡靖锋(1982—)男, 研究实习员, 硕士, 主要从事蔬菜抗病遗传育种研究, E-mail: good\_mf\_13@163.com;

\* 通讯作者: 和江明, 研究员, E-mail: hejiangming666@yahoo.com.cn。

由于根肿病的危害,昆明附近许多大白菜传统产区,被迫改种其它作物,严重影响大白菜的市场供给和价格波动。根肿病已成为制约云南十字花科蔬菜产业发展的一大障碍,目前对根肿病的防治方法:一是在定植前使用熟石灰粉调节土壤酸碱度;二是停种十字花科作物五年以上;三是利用化学农药进行有限地防治。这样做的结果,一是土壤酸化严重;二是化学农药产生的农残影响产品质量安全;三是增加了生产成本。抗病育种是最安全而又十分经济的一种方法,本文阐述了利用小孢子培养技术选育抗根肿病 DH 系的相关研究,选育抗根肿病新品种,解决十字花科根肿病的危害和蔓延问题提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

接种用的病菌采自昆明附近的双龙、阿子营、大板桥、小板桥等根肿病重灾区的菌土和病根;小孢子培养材料来自抗根肿病品种“白菜王”自交 M3 代材料 C08384、C08385、C08292、C08293,对照品种采用高感根肿病的 83-1。

### 1.2 方法

1.2.1 材料的抗性筛选 以抗根肿病品种“白菜王”自交 M3 代材料 C08384、C08385、C08292、C08293 作为供试材料,以高感病品种 83-1 作为对照,采用菌土法筛选材料。将不同地方采集的菌土充分混匀,不同地方采集的菌根等量混合,打成粉末后加蒸馏水配成孢子悬浮液,用孢子悬浮液将菌土浇透。菌土中孢子浓度按杨佩文等<sup>[4]</sup>的方法分离与检测,使菌土中孢子含量在  $1 \times 10^8$  个/g 以上。将供试材料种子播于装有菌土的方框中,株行距按  $10 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$ ,每个材料 3 次重复,45 d 后调查发病情况。统计方法:参考司军等<sup>[5-6]</sup>的接种病情等级分类方法和病情指数统计方法,将病情等级分为 4 级:0 级,不发病;1 级,侧根有肿块,主根无肿块;2 级,主根有肿块,侧根无肿块;3 级,主、侧根均有肿块。统计病情指数,病情指数 0.00~0.10,为免疫(I);病情指数 0.11~5.55,为高抗(HR);病情指数 5.56~11.11,为抗病(R);病情指数 11.12~33.33,为耐病(T);病情指数 33.34~55.55,为感病(S);病情指数 55.56~100.00,为高感(HS)。病情指数采用的公式为:

$$\text{病情指数} = \frac{\sum(\text{各级发病株数} \times \text{各级代表数值})}{\text{调查总数} \times \text{最高病情级数}} \times 100 \quad (1)$$

1.2.2 材料的小孢子培养 将病情指数小于 11.11 的材料根部消毒杀菌后重新定植,开花后取单核晚期和双核早期的材料花蕾进行游离小孢子培养。每个材料 30 个花蕾,将花蕾研磨后,用  $B_5$  培养基洗涤 3 次,用 NLN-13 培养液稀释,将小孢子浓度调至  $1 \times 10^5$  个/mL,用直径 6 cm 的培养皿进行培养,每皿 2 mL 培养液,用无菌封口膜封口。高温热激后,放入 25 °C 培养箱,静置暗培养 2~3 周,观察出胚情况。

1.2.3 离心转速研究 以 C08384 为供试材料,离心机转速分别设为 1 200、1 500、2 000、2 500 r/min,观察不同转速对材料小孢子分离和培养的情况。

1.2.4 热激温度和时间的研究 以 C08385 作为供试对材料,分别设定热激温度为 30、32.5、35、40 °C,处理时间设定为 24、48、72 h,之后放入 25 °C 暗培养至出胚,观察统计出胚情况。

1.2.5 琼脂浓度对小孢子成胚的影响 以 C08384 和 C08385 小孢子培养子叶型胚作为供试材料,转入琼脂浓度分别为 0%、0.8%、1.0%、1.2%、1.5% 的 MS 培养基上,每个浓度转胚 20 个,40 d 后统计成苗的情况。

1.2.6 不同激素配比培养基研究 以 C08384、C08385 小孢子培养苗作为供试材料,分别转接在 a: MS + 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L; b: MS + 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L; c: MS 培养基上,每个材料转苗 30 株在不同培养基上,30 d 后调查统计不定芽发生情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗性结果

2.1.1 材料的抗性筛选 通过用菌土法对 C08384、C08385、C08292、C08293 和对照进行接种鉴定,其病情指数见表 1。C08384 病情指数 4.18,表现高抗根肿;C08385 病情指数 7.67,表现抗根肿病;C08292 病情指数 28.47,表现耐病;C08293 病情指数 39.87,表现感病。

表 1 菌土法接种鉴定结果

Tab. 1 The results of three times soil inoculum infection on five samples

材料 Material	病情指数 Disease index			平均病情指数 Average disease index
	重复一 Repeat 1	重复二 Repeat 2	重复三 Repeat 3	
C08384	4.38	2.57	5.61	4.18
C08385	8.25	9.14	5.63	7.67
C08292	24.69	31.81	28.23	28.24
C08293	35.4	40.75	43.46	39.87
83-1(CK)	87.34	90.16	85.93	87.81

2.1.2 方差分析 各材料抗性经 SSR 检验见表 2。材料 C08384、C08385 对根肿病的抗性与材料 C08292、C08293 和 83-1 相比差异极显著,对根肿病有很高的抗性,C08384 与 C08385 之间抗性差异不显著。

表 2 不同材料病情指数的 SSR 检验

Tab. 2 SSR analysis of different materials disease index

材料 Material	平均病情指数 Average disease index	5% 显著水平 5% significance level	1% 极显著水平 1% significant level
C08384	4.18	d	D
C08385	7.67	d	D
C08292	28.24	c	C
C08293	39.87	b	B
83-1(CK)	87.81	a	A

2.2 不同转速对材料小孢子质量的影响

材料 C08384 为供试材料,设四个试验对比梯度分别为 1 200、1 500、2 000、2 500 r/min。实验结果见表 3。4 个转速中,1 200 r/min、1 500 r/min 已出胚,而 2 000 r/min、2 500 r/min 的未出胚。离心转速为 1 200 r/min 时,镜检观察沉淀为淡黄色,无杂质,小孢子悬浊液孢子密度适中,出胚数为 0.23 个/蕾,效果最好;转速为 1 500 r/min 出胚数为 0.13 个/蕾;转速为 2 000 r/min 时,离心后沉淀中有绿色杂质,有的细胞出现破裂,出胚数为 0.03 个/蕾;转数为 2 500 r/min 时,有大量的绿色沉淀于管底,出胚数为 0.01 个/蕾。由此说明,当离心转数为 1 200 r/min 时,最适宜小孢子的分离和培养。

表 3 不同转速的离心效果

Tab. 3 Centrifugal effect of different speed

转速/(r·min <sup>-1</sup> ) Revolving speed	现象 Phenomenon	出胚数/蕾 The number of embryo
1 200	沉淀为淡黄色,无杂质,小孢子悬浊液孢子密度适中,出胚效果最好	0.23
1 500	沉淀为淡黄色,孢子发育大小有差异,出胚次之	0.13
2 000	离心后沉淀中有绿色杂质,有的细胞出现破裂,出胚的效果很差	0.03
2 500	有大量的绿色沉淀于管底,出胚效果很差	0.01

2.3 不同热激温度和天数处理对材料出胚的影响

由表 4、5 可知,不同热激温度和天数对小孢子胚状体再生有不同的影响,经方差分析,不同热激温度处理间差异显著。当热激温度在 32.5 °C 时,出胚效果最好为 0.377 个/蕾,与其它处理温度相比差异显著。不同热激培养时间的差异也很显著,当处理为 1 d 时,出胚效果最好为 0.248 个/蕾,与其它处理相比差异显著。由此可见,当热激培养温度为 32.5 °C,时间为 1 d 时,对结球白菜的出胚效果最好。

2.4 琼脂浓度对胚再生成苗的影响

由表 6 成苗率的结果及 SSR 检验可以看出,琼脂含量是 1.2% 时,C08384 的成苗率为 90%,C08385 的成苗率为 86.7%,极显著的高于其它琼脂含量的成苗率。说明琼脂含量为 1.2% 时,较适宜小孢子胚状体成苗。由表 7、表 8 对再生苗率的方差分析,不同琼脂含量下,C08384 中  $F=89.2$   $p=0.0001 < 0.01$ ;

表4 高温处理和天数二因素对出胚的影响结果

Tab.4 High temperature treatment and the number of days out of two factors on the impact of embryo

热激温度/℃ Heat-shock temperature	天数/h Hours			合计 Total	平均值 Average
	24	48	72		
30	0.2	0	0	0.2	0.067bAB
32.5	0.66	0.4	0.07	1.13	0.377aA
35	0.13	0	0	0.13	0.043bB
40	0	0	0	0	0bB
合计 Total	0.99	0.4	0.07		
平均值 Average	0.248aA	0.1abA	0.018bA		

表5 高温处理和天数二因素对出胚的影响方差分析

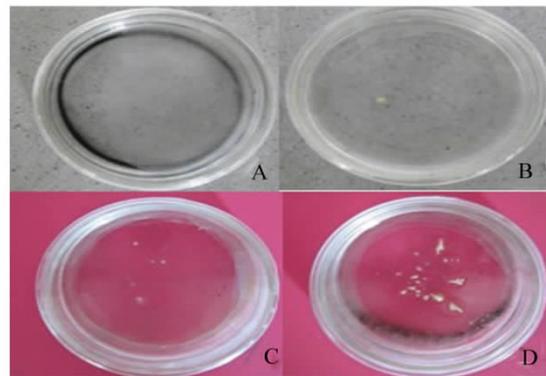
Tab.5 Variance analysis of High temperature treatment and the number of days out of two factors on the impact of embryo

变异来源 Source of variation	SS	DF	MS	F 值	P 值
热激温度间 Temperature between the heat shock	0.267 0	3	0.089	5.125	0.043
天数间 Days	0.108 6	2	0.054 3	3.128	0.117 3
误差 Deviation	0.104 2	6	0.017 4		
总变异 Total variation	0.479 8	11			

C08385 中  $F = 80.771$   $p = 0.0001 < 0.01$  , 说明不同琼脂含量间再生苗率差异极显著。即说明培养基中琼脂含量差异对胚状体再生苗有很大影响。

### 2.5 激素对胚状体植株再生不定芽的影响

以结球白菜 C08384、C08385 为供试材料进行激素对胚状体植株再生不定芽的影响研究,筛选出适合材料增殖培养的诱导培养基,由表 9 可知,材料 C08384 的诱导培养中,a、b、c 三个培养基的诱导率分别为 70%、50% 和 0% ,a 的诱导效果明显优于 b 的诱导效果,c 无诱导效果;材料 C08385 中,同样 a 的诱导效果优于 b、c 的诱导效果。另外,b 培养基即能诱导增殖且能诱导生根,用于增殖诱导效果不佳。由此可见,a 培养基适宜植株的增殖诱导培养。



A: 24 h, 40 °C 的出胚情况; B: 24 h, 35 °C 的出胚情况; C: 24 h, 30 °C 的出胚情况; D: 24 h, 32.5 °C 的出胚情况。

A: The number of embryo with 24 h 40 °C; B: The number of embryo with 24 h 35 °C; C: The number of embryo with 24 h 30 °C; D: The number of embryo with 24 h 32.5 °C.

图1 出胚情况

Fig.1 The number of embryo

## 3 讨论

根肿病是发生在寄主根部,使根系膨大形成肿瘤,许多研究者多采用根部接种进行材料的抗性鉴定,Williams<sup>[7]</sup>认为浸蘸法最好,郭向华等<sup>[8]</sup>认为菌土法的效果较好,李晓鸥等<sup>[9]</sup>对大白菜苗期进行人工接种认为用病菌孢子悬浮液侵根接种此法可行。通过以前的比较试验结果,本研究采用菌土接种法对结球白菜材料 5 份进行抗根肿病的筛选(表 1),C08384 和 C08385 对根肿病有很高的抗性,病情指数分别为 4.18、7.67,其余材料对根肿病的抗性很差。

表6 琼脂浓度对胚状体再生苗的影响结果

Tab.6 Effect of agar concentration on embryogenesis seedlings

琼脂含量/% Agar content	C08384		C08385	
	成苗数/株 Number of seedlings	成苗率/% Planting percent	成苗数/株 Number of seedlings	成苗率/% Planting percent
	0	0	0eD	0
0.8	12	60cB	10	50cC
1.0	14.7	73.3bAB	13.7	68.3bB
1.2	18	90 aA	17.3	86.7aA
1.5	7	35dC	7.7	38.3dC

表7 琼脂浓度对 C08384 胚状体再生苗率方差分析

Tab.7 Variance analysis of agar concentration on embryogenesis seedlings of C08384

变异来源 Source of variation	SS	DF	MS	F 值	P 值
处理间 Different treatments	14 866.666 7	4	3 716.666 7	89.2	0.000 1
误差 Deviation	416.666 7	10	41.666 7		
总变异 Total variation	15 283.333 3	14			

表8 琼脂浓度对 C08385 胚状体再生苗率方差分析

Tab.8 Variance analysis of agar concentration on embryogenesis seedlings of C08385

变异来源 Source of variation	SS	DF	MS	F 值	P 值
处理间 Different treatments	12 923.333 3	4	3 230.833 3	80.771	0.000 1P
误差 Deviation	400	10	40		
总变异 Total variation	13 323.333 3	14			



图2 激素浓度为 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L , 植株再生不定芽的情况

Fig.2 Hormone concentration for 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L ,the number of plant regeneration of adventitious buds



图3 激素浓度为 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L , 植株再生不定芽的情况

Fig.3 Hormone concentration for 6-BA 0.5 mg/L + NAA 0.2 mg/L ,the number of plant regeneration of adventitious buds

小孢子培养的最适转速,未见有相关的报道。本研究认为在转速为 1 200 r/min 时,有利于小孢子培养,不同处理间出胚效果最好。耿建峰等<sup>[10]</sup>对白菜游离小孢子培养因素研究表明,高温诱导在 12 ~ 60 h 内差异不大,但是超过此范围,小孢子胚诱导率明显降低;赵俊等<sup>[11]</sup>研究发现,高温(33 ± 2) °C 预处理 1 ~ 3 d 有利于胚状体的生成;路翠玲等<sup>[12]</sup>研究发现,材料经高温 33 °C 处理 1 ~ 3 d,有利于胚状体的产生。本研究发现在 4 个高温处理中,高温 32.5 °C 预处理 1 d 最有利于胚状体的诱导,当预处理温度大于 35 °C 时,无胚状体生成。究其原因可能是预处理温度过高,使小孢子大量死亡,从而使胚状体诱导失败。培养基中琼脂浓度的高低也会对胚再生成苗产生影响。培养基中琼脂浓度过高或过低,会

表9 不同激素配比的培养基对分化芽的诱导

Tab.9 Inducement of bud differentiation on different hormone combinations

材料 Material	培养基 medium	6-BA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	NAA/ (mg·L <sup>-1</sup> )	苗数 Inoculation number	诱导苗数 Inducement number	诱导率/% Inducement number
C08384	a	1.0	0.1	30	21	70
	b	0.5	0.2	30	15	50
	c	0	0	30	0	0
C08385	a	1.0	0.1	30	17	57
	b	0.5	0.2	30	13	43
	c	0	0	30	0	0

严重影响胚生长发育。王超楠等<sup>[13]</sup> 研究认为小孢子胚成苗培养基的适宜琼脂浓度为 1.0%；韩阳等<sup>[14]</sup>、方淑桂等<sup>[15]</sup> 研究发现,1.2% 琼脂的固体培养基最有利于小孢子胚成苗；在本研究中培养基琼脂浓度为 1.2% 时,最适宜诱导胚状体再生成苗,与韩阳等<sup>[14]</sup> 的研究相同。当琼脂浓度很低时,胚会停止生长并最终大量褐化死亡。究其原因,可能是琼脂浓度过低,培养基中水分过多,与胚再生成苗的环境相悖,抑制了胚的生长。最终导致胚的死亡。在芽体诱导方面,张亚丽等<sup>[16]</sup> 研究发现,胚状体在添加 0.1 mg/L GA<sub>3</sub> 的 B<sub>5</sub> 培养基中芽分化较快,且出芽率高；蒋武生等<sup>[17]</sup> 认为将幼苗转入 B<sub>5</sub> + 6-BA 0.2 mg/L + NAA 0.02 mg/L 的固体培养基中继代,能形成较多幼苗。在本研究中,当培养基中激素浓度是 6-BA 1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L 时,有利于不定芽的诱导,能促进不定芽的大量分化,效果明显优于 b 培养基。本研究结果与前人的研究有所不同。

本研究采用小孢子培养技术培育出抗根肿病材料的 DH 系,对于此研究的相关报道还比较少,具有一定的新颖性。对 DH 植株的鉴定采用根部注射法,对于植株的鉴定既简单又方便,对于该方法的使用,在今后的研究中有待进一步的深入。

参考文献:

[1] Kim D W, Oh J H. Incidence, pathogenicity of clubroot fungus (*Plasmodiophora brassicae*) and varietal resistance in chinese cabbage [J]. Korean Journal of Plant Pathol, 1997, 13(2): 95-99.

[2] 梁谊, 张爱芳, 王文相, 等. 十字花科蔬菜根肿病研究现状 [J]. 安徽农业科学, 2001, 29(6): 746-749.

[3] 严位中, 杨家鸾, 孙道旺, 等. 云南十字花科蔬菜根肿病发生规律及防治技术研究 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2004, 22(Sup.): 118-122.

[4] 杨佩文, 李家瑞. 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): 301-303.

[5] 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.

[6] 司军, 李成琼, 宋洪远, 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, 13(6): 26-30.

[7] Willams P H. Screening crucifers for multiple disease resistance [M]. Crucifer Wordshop, September, University of Wisconsin. Madison, 1981.

[8] 郭向华, 肖崇刚, 曾艳. 甘蓝根肿病菌的生物学特性 [J]. 西南农业大学学报, 2001, 23(1): 7-9.

[9] 李晓鸥, 吴飞燕, 钟惠宏, 等. 大白菜根肿病苗期人工接种抗病性鉴定技术初报 [J]. 中国蔬菜, 1990(6): 9-10.

[10] 耿建峰, 侯喜林, 张晓伟, 等. 影响白菜游离小孢子培养关键因素分析 [J]. 园艺学报, 2007, 34(1): 111-116.

[11] 赵俊, 巫东堂, 赵军良, 等. 影响大白菜游离小孢子培养若干因素的研究 [J]. 山西农业科学, 2008, 36(8): 26-28.

[12] 路翠玲, 刘卫红, 龚攀, 等. 影响大白菜游离小孢子培养的因素 [J]. 长江蔬菜, 2004(12): 42-43.

[13] 王超楠, 冯辉, 姜凤英, 等. 小白菜小孢子胚状体诱导成苗及利用 [J]. 中国蔬菜, 2007(8): 18-21.

[14] 韩阳, 叶雪凌, 冯辉. 提高大白菜小孢子植株获得率的研究 [J]. 园艺学报, 2005, 32(6): 1092-1094.

[15] 方淑桂, 陈文辉, 曾小玲, 等. 大白菜游离小孢子培养技术研究初报 [J]. 福建农业学报, 2003, 18(2): 123-126.

[16] 张亚丽, 张鲁刚. 早熟大白菜游离小孢子胚诱导及植株再生的研究 [J]. 甘肃农业大学学报, 2009, 44(3): 45-49.

[17] 蒋武生, 原玉香, 张晓伟, 等. 提高大白菜游离小孢子胚诱导率的研究 [J]. 华北农学报, 2005, 20(6): 34-37.