

不结球白菜种质资源对 TuMV 的抗性鉴定与评价

王晓伟, 李锡香, 张晓辉, 邱 杨, 董洪霞, 宋江萍, 王海平, 沈 镡
(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 分别利用苗期人工接种鉴定及 ELISA 检测方法, 对 127 份不结球白菜种质资源进行芜菁花叶病毒(TuMV)的抗性鉴定。结果显示, 苗期人工接种鉴定的病情指数(DI)分布在 3.55~95.68 之间, 不同种质间表现出较大的抗性差异。不同抗性级别的次数分布图基本符合正态分布, 略向感病区域偏离。基于病情指数的聚类分析结果与抗病性分级基本一致。通过苗期鉴定共筛选获得高抗 TuMV 的不结球白菜种质 6 份, 抗病种质 13 份, 其主要农艺性状表现出一定的多样性。其中叶面皱缩和具有刺毛的抗病材料所占比例较高, 可能与 TuMV 抗性存在一定的相关性。ELISA 检测结果显示, 117 份供试种质的 P/N 值分布在 3.10~25.37 之间, 不同种质间表现出病毒含量的差异, 但与 DI 值未呈现明显相关性, 可作为抗病材料筛选的辅助指标。

关键词: 不结球白菜; TuMV 抗性; ELISA 检测

Identification and Evaluation of Resistance to TuMV of *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Germplasm Resources

WANG Xiao-wei, LI Xi-xiang, ZHANG Xiao-hui, QIU Yang,
DONG Hong-xia, SONG Jiang-ping, WANG Hai-ping, SHEN Di
(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: Identification of the resistance to TuMV of 127 *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* germplasm was conducted with the method of artificial inoculation identification and ELISA test respectively. The result showed that the DI value ranged between 3.55 and 95.68, which expressed significant difference of resistance to TuMV among accessions. Distribution plot for different resistance level to TuMV basically corresponds to normal distribution and the peak was slightly partial to susceptible region. The result of cluster analysis based on DI value was similar to that of the grading levels. 6 accessions highly resistant to TuMV and 13 accessions resistant to TuMV were screened by seedlings inoculation identification. Their main agronomic characters demonstrated abundant diversity. The number of resistance accessions with the characters of having wrinkling or pubescence on leaf surface taken a relatively higher ratio, which demonstrated that the leaf character might have a certain correlation with TuMV resistance. The result of ELISA test showed that the amount of virus in 117 materials was significantly different with P/N value ranging between 3.10 and 25.37, but it had no significant correlation with DI value. ELISA test could be used as a supplementary identification method in screening resistance materials.

Key words: *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*; TuMV resistance; ELISA detection

不结球白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino)为十字花科(Cruciferae)芸薹属芸薹种中的一个亚种, 俗称青菜、小白菜、油菜, 古名“菘”, 起源于中国, 始种于约公元 5 世纪^[1-2]。不结球白菜具

收稿日期: 2016-01-28 修回日期: 2015-03-16 网络出版日期: 2016-01-28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160128.1550.042.html>

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划课题(2013BAD01B04-2); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

第一作者研究方向为蔬菜种质资源。E-mail: wangxiaowei9011@126.com

通信作者: 沈镡, 研究方向为蔬菜种质资源。E-mail: shendi@caas.cn

有营养丰富、生长快速、适应性强、适应性广等特点,占长江中下游各大、中城市蔬菜总产量的 30% ~ 40%,北方也大量引种栽培^[3]。近年来,东南亚、日、美及欧洲一些国家也广泛引种,已逐渐成为世界性蔬菜^[4]。病毒病是不结球白菜生产中的重要病害,芜菁花叶病毒(TuMV, Turnip mosaic virus)是主要病原,其寄主范围广,周年侵染,严重影响其产量和品质^[5]。目前,在生产上主要采用覆膜等物理方法或施用杀虫剂等化学方法来防治蚜虫,以切断病毒传播途径,以及通过抗病毒制剂诱导植物抗性增强或者在一定程度上抑制病毒活性。但这些方法存在操作不便、效果有限且污染环境等缺点^[6-7]。因而,选育抗病品种仍是防治病毒病最经济、有效和安全的解决途径^[8]。

近年来,关于不结球白菜 TuMV 抗性基因定位和抗性差异表达基因的分离等内容有报道^[9-13],但抗 TuMV 种质资源鉴定工作相对较少,并且集中于国内,距今时间较长。表型精准鉴定仍是种质资源深入挖掘利用的基础,对病毒病抗性鉴定评价及优异种质的筛选是不结球白菜抗病育种的前提。曹寿椿等^[14]1984—1988 年以 87 个不结球白菜自(近)交系为原始材料,进行了 TuMV 抗性鉴定,并选留无症或轻症单株进行了 4 轮系谱选择获得 15 个抗芜菁花叶病毒的株系,作为抗源加以保存和有效利用。刘克钧等^[15]发现短白梗最抗病毒,是用来研究不结球白菜抗病毒的良好材料。王述彬等^[16]在 1996—2000 年对我国 982 份不结球白菜种质资源进行 TuMV 抗性鉴定,共筛选 9 份高抗材料和 49 份抗病材料。但早期抗病性鉴定多采用当地 TuMV 分离物作为毒源,存在分类不清导致重复性差的问题。TuMV-C4 是北京地区的主要株系^[17],目前已广泛应用于研究和鉴定中^[10,18-19]。

我国不结球白菜资源十分丰富,已保存于国家蔬菜种质资源中期库中的种质资源共 1443 份。进一步精准化和规模化地开展病毒病抗性鉴定评价是不结球白菜种质资源抗病毒病研究的前提。本试验以国家库中保存的不结球白菜种质资源为基础,从中选取 127 份初步纯化的材料,分别利用苗期人工接种鉴定及 ELISA 检测方法进行 TuMV-C4 株系抗性的鉴定评价,筛选抗病基因源,为进一步深入挖掘抗病毒优异基因和不结球白菜抗病品种育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

以国家蔬菜种质资源中期库保存的 1443 份不

结球白菜种质为基础,选取 127 份经初步纯化的种质作为供试材料,分别进行 TuMV 苗期人工接种鉴定和 ELISA 检测,材料的名称和来源地详见表 1。供试材料包括国内种质 126 份,主要来源于江苏、安徽、浙江、河南、上海、湖北等 21 个省、市、自治区,1 份国外种质来自澳大利亚。设‘中脚奶白菜’为感病对照。供试材料的株型、叶形、叶面、叶色、叶柄色 5 个表型性状的数据主要由国家蔬菜种质资源中期库提供,叶面刺毛、叶缘和叶裂刻为苗期调查数据。

1.2 试验方法

1.2.1 育苗 于 2014 年 9 月 25 日将 127 份不结球白菜供试材料的种子在 25 ℃ 催芽,播种于 10 cm × 10 cm 的育苗钵中,育苗基质的配比为草炭:蛭石 = 1:1,放置于中国农业科学院蔬菜花卉研究所育苗温室。育苗期间控制白天温度 20 ~ 30 ℃,夜间温度 15 ~ 19 ℃,正常田间管理。3 次重复,每重复 8 株。于 2 叶 1 心期放置人工气候室准备接种鉴定。

1.2.2 TuMV 人工苗期接种鉴定方法 TuMV 鉴定毒源采用我国北方地区主流的 TuMV-C4 株系,由中国农业科学院蔬菜花卉研究所蔬菜病理课题组提供。在易感 TuMV 的奶白菜上进行毒源扩繁。接种的具体方法参考刘琳^[20]和钱伟^[21]。2014 年 10 月 13 日进行第 1 次接种。接种时,采集症状明显的病叶,取鲜叶 1 份加入 5 倍于鲜叶的 0.02 mol/L 磷酸缓冲液(pH 值 7.0)研磨成匀浆,用双层纱布滤出病毒汁液,立即用于人工摩擦接种。将 600 目金刚砂均匀撒布于叶面,左手托住叶背,右手食指沾病毒汁液在叶面上沿叶脉方向摩擦 3 次,随后立即用清水冲洗叶面,遮荫 24 h。每株接种 2 片叶,间隔 1 d 重复接种。接种后正常管理,控制白天温度约 26 ℃,夜间温度 23 ℃。20 d 后进行 TuMV 抗性鉴定。

TuMV 单株抗性调查的级别划分及病情指数 DI 计算等均依据《不结球白菜种质资源描述规范和数据标准述分级标准》^[22]。 $DI = \Sigma(\text{病级数值} \times \text{该病级株数}) \times 100 / (\text{病级最高值} \times \text{调查株数})$ 。

1.2.3 ELISA 病毒检测方法 采用美国 Agdia 公司的 TuMV-ELISA 试剂盒,对 117 份种质(表 1 中无 * 标记材料)进行 ELISA 病毒含量检测。每个重复内随机选取 5 个单株心叶的混样,3 次重复。为了避免因自交纯化代数不高导致基因型背景不纯以及混合取样数据偏高的情况,另外从 13 份

表 1 试验材料信息

Table 1 Basic information of test materials

编号	材料名称	来源地	编号	材料名称	来源地	编号	材料名称	来源地
No	Name	Origin	No	Name	Origin	No	Name	Origin
1	黄心乌	安徽淮南市	48	济宁小油菜	山东济宁市	92	罗店冬常菜	上海市
2	黄心乌	安徽合肥市	49	五月慢油菜	宁夏银川市	93	迟四叶青	安徽合肥市
3	阜阳乌白菜	安徽阜阳县	50	矮脚黄油菜	宁夏银川市	94	苏州青	江苏苏州
4	黄心乌	安徽寿县	51	香青菜(青种)	江苏吴江县	95	寿宁大青菜	福建寿宁
5	广饶白帮油菜	山东广饶县	52	黑油冬菜	浙江舟山市	96	大头青	安徽铜陵市
6	黑叶青大头	浙江宁波市	53	开封黑白菜	河南开封市	97	早油冬菜	江西上饶市
7	迟油冬	浙江余杭县	54	绿帮油菜	山西太原市	98	南京白	安徽铜陵市
8	黑白菜	河南省	55	油白菜	山西运城市	99	高脚白	安徽歙县
9	广饶黑帮油菜	山东广饶县	56	早油冬	安徽歙县	100	小白菜	四川平武县
10	广饶青帮油菜	山东广饶县	57	四月慢	安徽歙县	101	红青菜	上海市
11	J78-09(冬常青)	上海市	58	黑色毛白菜	湖北汉川县	102	邓县黄勺	河南邓县
12	矮抗青 E78-04	上海市	59	四月白	江苏无锡市	103	南召绿油菜	河南南召县
13	宁波四月慢	上海市	60	矮脚白	湖南湘潭市	104	青邦油菜	河北省
14	中八叶塌菜	上海嘉定县	61	调羹白菜	湖南平江县	105	社旗黑白菜	河南社旗县
15	早三月白	江苏常州市	63	汤阴油菜	河南汤阴县	106	下谷白	湖北神农架林区
16	四月塘菜	江苏溧阳县	64	郑州瓢菜	河南郑州市	107	建南小白菜	湖北利川市
17	五河菊花心	安徽五河县	65	沈丘黑白菜	河南沈丘县	108	新华白菜	湖北神农架林区
18	马儿朵	江苏南通市	66	高脚(腿)早菜	江苏泰州市	109	高乐山白菜	湖北咸丰县
20	黑菜	江苏南通市	67	早瓢儿白菜	四川彭水县	111	瓢儿菜	四川巫溪县
22	中禾青菜	江苏太州市	68	黑叶油塌菜	上海市	112	黑牯牛	安徽繁昌县
23	五月慢	江苏南通市	69	荷花白菜	安徽庐江县	113	勺子头	山东莒南县
24	粉青	江苏南通市	71	四月慢	湖北武汉市	114	乌叶矮脚白	浙江金华市
25	癭疤菜	江苏南通市	72	乌叶油菜	浙江金华县	115	小白菜	湖北宣恩县
26	冬冻青	江苏南通市	73	火白菜	浙江杭州市	116	银川白油菜	宁夏银川市
27	黑太湖	江苏常熟县	74	荷叶白	浙江杭州市	117	勺白菜	河北赵县
28	雪里青	江苏太仓县	75	厚帮油冬菜	浙江仙居县	118	青帮菜	湖北秭归县
29	横槽大菜	江苏昆山县	76	开封黄心菜	河南开封县	119	澳大利亚白菜	澳大利亚
30	大青菜	江苏常熟县	77	淡青色半早儿	浙江杭州市	120	白帮油菜	甘肃白银市
31	大头矮	江苏扬州市	78	小头青	安徽铜陵市	121	高脚白	湖北长阳县
32	青梗菜	江苏常州市	79	五月慢	上海市	122	瓢儿白菜	重庆酉阳
33	矮脚青菜	浙江湖州市	80	矮脚黄油菜	内蒙包头市	124	中脚奶白菜	香港
34	四月白	江苏南京市	81	605 青菜	上海市	127	四月齐	安徽五河县
35	矮脚黄	江苏南京市	82	临泉黑白菜	安徽临泉县	128 *	青大头	浙江舟山
37	上海油菜	甘肃兰州市	83	黑壳青	安徽黄山	129 *	瓢儿菜	江苏南京
38	(香港)奶白菜	香港	84	白菜 VS-2	台湾	130 *	黑油筒	浙江舟山
39	许昌黄心菜	河南许昌市	85	后洋白菜	广东湛江市	131 *	耐热小白菜	江苏省
40	南阳黑勺	河南南阳市	86	春不老	安徽颖上县	132 *	凤山白	台湾
41	信阳头转窝	河南信阳市	87	三月白	重庆市	133 *	矮抗 1 号	江苏省
43	塌古菜	天津东郊区	88	四月蔓	四川珙县	134 *	矮抗 3 号	江苏省
44	黑叶四月慢	上海市	89	乌鸡白白菜	四川成都市	135 *	四倍体矮脚黄	江苏省
45	四季青	安徽歙县	90	三月瓢儿菜	四川巫山县	136 *	夏冬青	上海农科院
46	早青菜	浙江杭州市	91	矮箕常菜	上海市	137 *	瓢儿菜	江苏南京
47	仙居四季青菜	浙江仙居县						

具有 * 标志的材料未进行 ELISA 检测
The materias with * are not detected by ELISA

材料中(5、14、20、22、24、26、40、53、56、72、83、103、134)随机选取无病症或轻微病症的 27 个单株进行检测,了解 ELISA 检测结果与表型症状的关系。ELSIA 检测详细

步骤及过程参考钱伟^[21] 及试剂盒内的说明书。利用酶标仪在 405 nm 下进行样品孔吸光度测定 OD₄₀₅, P/N = 被测样品的 OD₄₀₅/阴性对照平均 OD₄₀₅。P/N≥

2.0 时,表现为阳性;P/N <2.0 时,表现为阴性^[21]。

1.2.4 统计分析 利用 SPSS 19.0 软件完成 *DI*、P/N 值及其标准误计算,采用组内联接方法及欧式距离算法进行聚类分析作图。利用 EXCEL 2010 软件进行次数分布图及折线图的绘制。

2 结果与分析

2.1 不结球白菜对 TuMV 抗性的人工接种鉴定结果

采用苗期人工接种鉴定方法,对 127 份不结球白菜进行 TuMV 抗性鉴定,其病情指数(*DI*)和抗性分级见表 2。从表 2 中数据可以明显看出,供试群体材料的 *DI* 指数分布在 3.55~95.68 之间,不同材料对 TuMV 的抗性表现出明显差异。按照病情指数进行抗性分级划分,在 127 份供试材料中,中抗(MR)和感病(S)材料共 92 份,占鉴定总份数的 72.44%,这部分材料基本表现出植株多数叶片呈花

叶或心叶畸形的症状。6 份高抗(HR)和 13 份抗病(R)材料的叶片无症状或仅有轻微症状,二者占鉴定总份数的 14.96%。表现为严重花叶或畸形的高感(HS)材料 16 份,占总数的 12.60%,未发现免疫材料。根据不同抗性级别的种质份数绘制次数分布图(图 1),从分布特征看,供试材料的抗性级别基本符合正态分布的特点,峰值略向感病区域偏离。

利用 SPSS 软件,根据病情指数对 127 份不结球白菜进行聚类分析(图 2)。在欧式距离 10 的位置,127 份种质可分为 5 大类群。第Ⅰ类群包括全部的高抗种质和 4 份抗病种质,第Ⅱ类群包括 9 份抗病种质,1 份抗病种质和 37 份中抗种质构成了第Ⅲ类群。第Ⅳ类群包括 2 份中抗和 51 份感病种质。第Ⅴ类群集中了所有的高感种质和 2 份感病种质。上述分类结果与根据病情指数进行抗病级别划分的结果基本一致,仅少数材料略有不同。

表 2 不结球白菜对 TuMV 的抗性鉴定结果

Table 2 The identification result of resistance to TuMV in non-heading Chinese cabbages

编号 No.	病情指数 <i>DI</i>	抗性 Resistance	编号 No.	病情指数 <i>DI</i>	抗性 Resistance	编号 No.	病情指数 <i>DI</i>	抗性 Resistance	编号 No.	病情指数 <i>DI</i>	抗性 Resistance
1	32.10 ± 2.47	R	35	48.41 ± 4.37	MR	71	25.19 ± 4.12	R	103	9.79 ± 1.66	HR
2	27.41 ± 0.86	R	37	75.31 ± 1.23	S	72	37.50 ± 0.80	MR	104	68.52 ± 1.07	S
3	45.83 ± 0.80	MR	38	67.20 ± 2.44	S	73	95.06 ± 2.47	HS	105	22.75 ± 1.06	R
4	47.69 ± 0.27	MR	39	47.94 ± 0.73	MR	74	37.99 ± 0.92	MR	106	41.59 ± 0.97	MR
5	10.49 ± 0.62	HR	40	38.27 ± 4.94	MR	75	44.24 ± 3.39	MR	107	59.66 ± 2.83	S
6	56.79 ± 2.47	S	41	60.56 ± 0.32	S	76	59.88 ± 2.23	S	108	58.34 ± 3.64	S
7	86.24 ± 4.61	HS	43	39.9 ± 1.99	MR	77	79.44 ± 2.43	HS	109	50.62 ± 0.62	MR
8	46.91 ± 2.47	MR	44	80.00 ± 4.63	HS	78	58.85 ± 2.18	S	111	56.25 ± 1.93	S
9	91.60 ± 5.16	HS	45	51.15 ± 2.77	MR	79	68.15 ± 2.67	S	112	77.78 ± 1.43	S
10	72.22 ± 2.80	S	46	73.58 ± 1.31	S	80	68.83 ± 2.53	S	113	55.56 ± 0	S
11	68.52 ± 1.07	S	47	61.01 ± 2.83	S	81	60.19 ± 0.93	S	114	35.68 ± 5.18	MR
12	67.90 ± 4.94	S	48	39.75 ± 0.99	MR	82	47.94 ± 0.68	MR	115	29.41 ± 4.31	R
13	72.49 ± 1.22	S	49	48.89 ± 1.28	MR	83	15.68 ± 0.54	R	116	47.84 ± 4.48	MR
14	23.17 ± 2.86	R	50	55.56 ± 2.14	S	84	66.67 ± 2.75	S	117	58.99 ± 5.85	S
15	69.14 ± 3.27	S	51	48.15 ± 4.28	MR	85	67.83 ± 4.25	S	118	54.16 ± 2.73	MR
16	57.28 ± 2.72	S	52	67.90 ± 1.23	S	86	42.59 ± 0.93	MR	119	79.01 ± 3.27	HS
17	46.91 ± 2.78	MR	53	3.55 ± 0.41	HR	87	57.04 ± 1.48	S	120	33.33 ± 3.21	MR
18	57.41 ± 1.85	S	54	61.73 ± 3.27	S	88	52.38 ± 1.83	MR	121	68.52 ± 1.07	S
20	55.52 ± 0.04	MR	55	78.13 ± 3.35	HS	89	46.67 ± 1.28	MR	122	72.72 ± 4.94	S
22	4.63 ± 0.93	HR	56	10.49 ± 0.62	HR	90	79.66 ± 2.23	HS	124	63.58 ± 5.49	S
23	60.32 ± 0.92	S	57	66.73 ± 2.51	S	91	88.48 ± 2.78	HS	127	27.16 ± 3.27	R
24	15.81 ± 4.02	R	58	78.52 ± 5.79	HS	92	65.26 ± 3.43	S	128	45.44 ± 2.18	MR
25	48.61 ± 2.41	MR	59	76.46 ± 4.40	S	93	56.61 ± 1.06	S	129	15.88 ± 1.44	R
26	10.37 ± 0.74	HR	60	74.81 ± 2.96	S	94	82.96 ± 3.23	HS	130	56.94 ± 0.80	S
27	51.16 ± 0.69	MR	61	58.02 ± 3.08	S	95	45.00 ± 3.53	MR	131	79.01 ± 1.23	HS
28	57.85 ± 4.17	S	63	41.87 ± 0.72	MR	96	78.84 ± 1.06	HS	132	22.66 ± 2.18	R
29	67.74 ± 3.93	S	64	60.73 ± 1.23	S	97	59.26 ± 2.14	S	133	44.36 ± 1.15	MR
30	45.68 ± 1.23	MR	65	78.84 ± 1.06	HS	98	79.63 ± 1.85	HS	134	26.67 ± 1.54	R
31	72.85 ± 2.30	S	66	36.23 ± 3.15	MR	99	27.26 ± 3.07	R	135	49.17 ± 2.17	MR
32	72.13 ± 1.94	S	67	55.56 ± 3.67	S	100	55.56 ± 0	S	136	73.12 ± 0.92	S
33	54.25 ± 2.53	MR	68	60.32 ± 3.30	S	101	33.70 ± 0.37	MR	137	35.8 ± 2.47	MR
34	95.68 ± 2.23	HS	69	60.21 ± 2.75	S	102	47.37 ± 2.41	MR			

HR:高抗;R 抗病;MR:中抗;S:感病;HS:高感

HR:highly resistant,R:resistant,MR:middle-resistant,S:susceptible,HS:highly susceptible

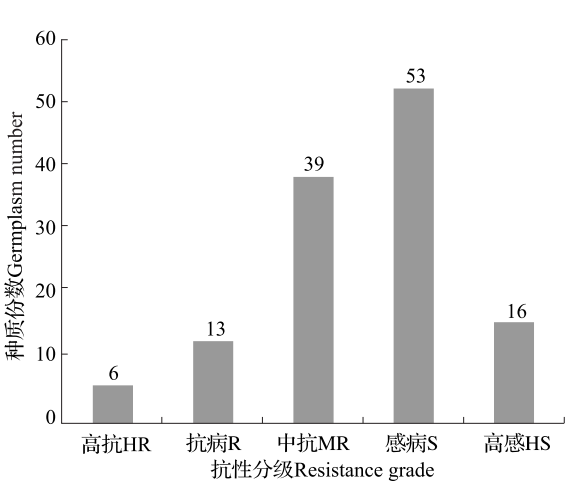


图1 不结球白菜对 TuMV 抗性级别的次数分布图

Fig.1 Distribution plot for different resistance to TuMV in non-heading Chinese cabbage

2.2 抗 TuMV 不结球白菜种质的筛选

基于苗期人工接种鉴定结果,从 127 份不结球白菜的供试材料中,共筛选获得高抗和抗病材料 19 份,主要来源于安徽(6 份)、江苏(5 份)、河南(3 份)、湖北(2 份)、上海(1 份)、山东(1 份)和台湾(1 份),基本分布于我国中部地区(表 1)。抗 TuMV 种质的主要农艺性状表现出一定的多样性(表 3),如株型涉及了直立(7 份)、半直立(7 份)、开展(4 份)和塌地(1 份)4 种类型,叶色包括绿(11 份)、深绿(6 份)、浅绿(1 份)和黄绿(1 份)4 种颜色。叶形包括除倒卵和披针形以外的 6 种叶形,以卵圆的份数最多。5 种叶柄色在鉴定中均获得了抗病种质,其中以白和绿白为主要类型。叶裂刻以无裂刻为主,叶缘以全缘和波状为主。在抗病种质中,叶面皱缩和具刺毛的种质份数分别占 42. 11% 和 30. 77%,均高于各自占鉴定总份数的 28. 35% 和 15. 75%。2 个性状可能与不结球白菜 TuMV 抗性有一定相关性。

2.3 ELISA 检测

117 份不结球白菜种质的 ELISA 检测结果显示,不同材料间的 P/N 值差异明显,其变化范围在 3. 10 ~ 25. 37 之间,表明不同种质在接种后 20 d,植株携带的病毒量产生明显的差异。P/N 值的种质份数次数分布图显示(图 3),其分布特征基本符合正态分布并略向高值区域偏离。多数种质的 P/N 值集中在 15 ~ 25 之间,占总份数的 82. 9%。按 DI 值从低到高的顺序绘制 DI 和 P/N 值折线图,从图中可以明显看出,二者的变化趋势没有明显的相关性(图 4)。

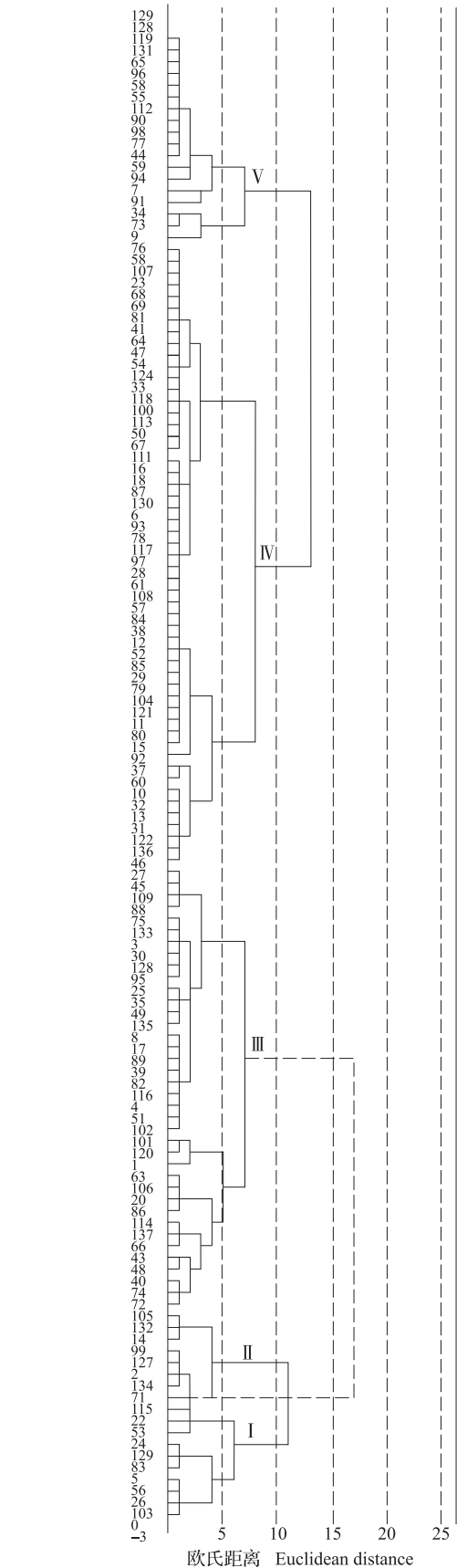


图2 127 份不结球白菜的 DI 聚类图

Fig.2 The dendrogram of 127 non-heading chinese cabbages based on DI value

表 3 抗 TuMV 不结球白菜种质的主要特性

Table 3 The main characteristics of non-heading Chinese cabbages with high resistance and resistance to TuMV

编号	品种名称	株型	叶形	叶面	叶色	叶柄色	叶面刺毛	叶缘	叶裂刻	病情指数	抗性
No.	Name	Plant type	Leaf shape	Leaf surface	Leaf color	Petiole color	Leaf pubescence	Leaf margin	Leaf division	DI	Resistance
5	广饶白帮油菜	半直立	卵圆	平滑	绿	紫	无	波状	耳状裂刻	10.49 ± 0.62	高抗
22	中禾青菜	直立	椭圆	平滑	绿	浅绿	多	单锯齿	浅裂	4.63 ± 0.93	高抗
26	冬冻青	直立	近圆	平滑	深绿	绿	无	全缘	无裂刻	10.37 ± 0.74	高抗
53	开封黑白菜	半直立	卵圆	微皱	深绿	绿白	无	全缘	无裂刻	3.55 ± 0.41	高抗
56	早油冬	直立	椭圆	平滑	深绿	绿白	无	波状	无裂刻	10.49 ± 0.62	高抗
103	南召绿油菜	半直立	卵圆	平滑	绿	绿白	无	全缘	无裂刻	9.79 ± 1.66	高抗
1	黄心乌	开展	卵圆	中皱	绿	白	少	波状	无裂刻	32.1 ± 2.47	抗
2	黄心乌	半直立	倒卵圆	中皱	绿	白	中	波状	无裂刻	27.41 ± 0.86	抗
14	中八叶塌菜	塌地	近圆	微皱	深绿	绿白	无	全缘	无裂刻	23.17 ± 2.86	抗
24	粉青	直立	卵圆	平滑	绿	浅绿	无	全缘	无裂刻	15.81 ± 4.02	抗
71	四月慢	直立	椭圆	平滑	绿	浅绿	少	波状	无裂刻	25.19 ± 4.12	抗
83	黑壳青	开展	长卵	微皱	深绿	绿白	无	全缘	无裂刻	15.68 ± 0.54	抗
99	高脚白	直立	长椭圆	平滑	绿	白	无	波状	无裂刻	27.26 ± 3.07	抗
105	社旗黑白菜	半直立	长卵	皱	深绿	白	中	波状	无裂刻	22.75 ± 1.06	抗
115	小白菜	半直立	长卵	平滑	浅绿	白	无	波状	无裂刻	29.41 ± 4.31	抗
127	四月齐	直立	近圆	微皱	绿	白	无	波状	无裂刻	27.16 ± 3.27	抗
129	瓢儿菜	开展	卵圆	微皱	绿	绿白	无	波状	无裂刻	15.88 ± 1.44	抗
132	凤山白	半直立	卵圆	平滑	黄绿	白	无	波状	无裂刻	22.66 ± 2.18	抗
134	矮抗 3 号	开展	长卵	平滑	绿	白	无	全缘	无裂刻	26.67 ± 1.54	抗

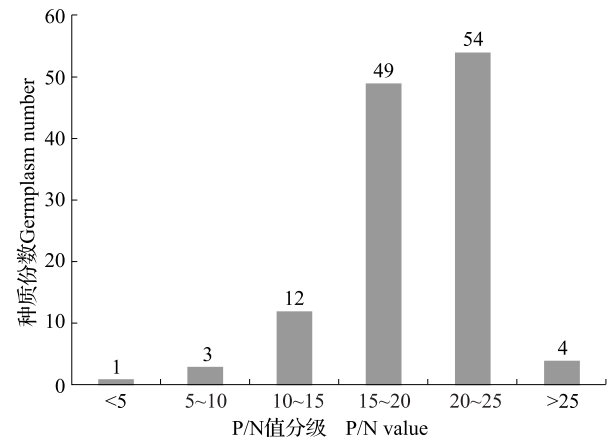


图 3 不结球白菜 P/N 值的次数分布图
Fig. 3 Distribution plot for different P/N value in non-heading Chinese cabbage

为了进一步了解 ELISA 检测结果与人工接种鉴定表型观测结果的关系,避免因自交纯化代数不高导致基因型背景不纯引起混合取样数据偏高的情况,本试验从 13 份材料中选取无病症或轻微病症的 27 个单株进行检测(表 4),发现 P/N 值在 0.82 ~ 18.72 之间,仍存在较大差别。其中 9 株的 P/N 值

小于 2,达到通用病毒检测为阴性的标准。上述检测分析结果表明,利用 ELISA 方法的病毒量检测不能作为抗病种质鉴定的唯一指标,但可作为表型鉴定的辅助指标,能够更快捷、有效地筛选获得抗病种质。另外,本试验中同一份种质单株间 P/N 值检测呈现差异,可能是不同重复引起的试验误差,或同一份种质内基因型背景未能纯合一致导致。

3 讨论

目前,有关不结球白菜种质对 TuMV 抗性鉴定评价的报道较少。曹寿椿等^[14]、刘克钧等^[15]在 20 世纪 90 年代通过不结球白菜对南京地区 TuMV 分离物的抗性鉴定,筛选出一批抗性材料,在以后的研究中得以培育和利用。后来,王述彬等^[16]对我国 982 份不结球白菜种质资源(均来源于国家蔬菜种质资源中期库)进行苗期 TuMV 抗性鉴定,筛选出高抗材料 9 份,抗病材料 49 份。在本试验中,基于国家蔬菜种质资源中期库中保存种质的背景信息,挑选部分种质进行田间表型评价,筛选出商品性较好且初步自交纯化的材料作为供试种质,经人工接种鉴定评价,

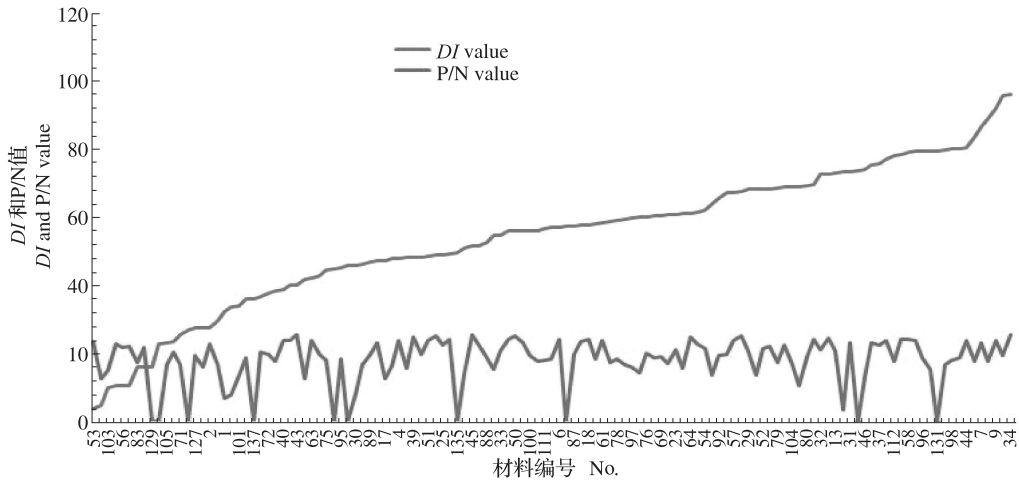


图 4 不结球白菜的 DI 及 P/N 值折线图

Fig. 4 The line chat of DI and P/N value of non-heading Chinese cabbages

表 4 不结球白菜无症状单株 TuMV 带毒情况的 ELISA 检测结果

Table 4 Detection of TuMV from asymptomatic plant non-heading Chinese cabbages by ELISA

编号	病级	P/N 值	编号	病级	P/N 值	编号	病级	P/N 值
No.	Disease degree	P/N value	No.	Disease degree	P/N value	No.	Disease degree	P/N value
24-2	0	0.82	14-3	0	3.80	14-2	0	12.82
24-1	0	0.88	40-1	0	3.93	5-2	0	14.26
103-1	0	0.89	129-1	0	4.45	53-3	0	18.72
103-3	0	0.98	24-4	0	5.38	22-1	1	1.08
103-2	0	1.17	56-3	0	5.67	83-1	1	4.35
53-2	0	1.17	56-2	0	6.49	56-1	1	4.72
26-1	0	1.45	56-4	0	7.56	72-1	1	7.47
30-1	0	1.48	24-3	0	8.31	20-1	1	9.00
5-1	0	2.22	53-1	0	12.60	14-1	1	11.75

在 127 份材料中共筛选获得高抗材料 6 份,抗病材料 13 份。比较上述试验材料的来源和鉴定结果,在来源一致的 72 份种质中,2 份材料的抗性级别划分结果完全一致,来源于河南省的社旗黑白菜均表现为抗病,上海的矮箕常菜均表现为高感。另外 38 份材料的划分结果比较一致,其余材料差异较大。分析其原因可能有以下几方面:同一份材料对病毒不同株系的抗性不同^[23],本试验鉴定所用毒源是 TuMV-C4 株系,王述彬等^[16]所用毒源为 TuMV 南京分离物;试验材料虽然来源一致,但由于国家库保存种质基本为地方品种,具有一定的多样性,本试验对保存种质进行了初步纯化,导致 2 次试验材料的遗传背景可能存在一定差异;幼苗长势、温光等鉴定环境条件的差异均可能对鉴定结果产生影响。

植物病毒必须通过微伤口或昆虫介体传播,进入植物组织单个细胞,然后穿过细胞壁侵染相邻细胞,再到达维管束组织,随光合作用产物流运输,重复细胞到细胞运动,只有在以上各个环节中病毒与

植物完全亲和,才能实现系统侵染^[24]。基于抗原—抗体特异性反应这一原理的 ELISA 方法,能确定欲检测植株提取液中病毒的含量^[25],具有灵敏、客观、准确的优点,多应用于病毒有无^[26]和病毒种类的检测^[27]。当接种病毒后,抗病单株就会通过各种机制阻止病毒的复制、运输或感染^[28-29]。据报道,植株的病毒量与其抗感呈明显的相关性。H. Barker 等^[25]发现抗病品种植株内的病毒量皆显著少于感病品种,即抗病品种内病毒的增殖受到抑制。张俊华等^[30]对大白菜 F₂分离群体 TuMV 抗性检测中,发现 0 级植株在检测时表现为阴性,1 级至 9 级植株均表现为阳性。但也有报道指出,ELISA 检测结果与表型鉴定结果存有差异。许文博等^[31]利用 ELISA 方法对田间自然发病的番茄进行检测,P/N 值都较高,但品种之间却表现出一定的抗病性差异。李巧云等^[32]利用 ELISA 方法对大白菜 F₂分离群体进行检测,发现高感单株的 ELISA 检测结果为阴性。施曼玲等^[33]利用 ELISA 方法对雪菜花叶病毒

进行检测,发现至 20 d 时,全部抗感品种 100% 呈阳性反应,并且品种发病率及病情指数高低与各品种病毒含量多少之间不存在相关关系。在本试验中,117 份不结球白菜种质的 ELISA 检测结果显示,部分未出现病症的抗病种质的 P/N 值较高,一些高感材料的 P/N 值却较低,P/N 值和 *DI* 值之间没有明显相关性。这与施曼玲等^[33]的结果一致。可能由于表现抗病的材料虽未发生明显病症,但病毒仍在体内增殖和系统转移,即寄主和病原共生,其抗病机制不是由于抑制了病毒繁殖所致。而植株感病后期生命力已明显衰弱,细胞大量死亡,病毒已无法生存,ELISA 检测值会降低。因而,ELISA 的病毒检测方法不宜作为种质鉴定的唯一指标,但可作为表型鉴定的辅助指标,能够更快捷、有效地筛选获得抗病种质。

据报道,叶面的皱缩度与抗虫性存在一定的相关性^[34]。叶面刺毛与植物对病虫害、紫外线、极端温度及过度失水等有机障碍作用^[35]。但也有报道指出,植物抗病性与叶面刺毛的多少并没有直接关系,可能对病毒传播媒介的蚜虫产生抗性,进而减少病毒病的发生。如芥菜和大白菜的一些多毛品种,其叶面蚜虫明显少于毛少的品种^[36]。本试验结果显示,叶面具刺毛和叶面皱缩的种质在抗病种质中所占比例相对较高,上述性状可能与不结球白菜抗 TuMV 具有一定的相关性。

参考文献

- Vaughan J G, Hemingway J S. The utilization of mustards [J]. *Econ Bot*, 1959, 13(3): 196-204
- 李家文. 白菜起源和进化问题的探讨[J]. *园艺学报*, 1962, 1(3): 197-304
- 曹寿椿. 不结球白菜的研究及进展(上)[J]. *长江蔬菜*, 1989(2): 5-8
- 侯喜林. 不结球白菜育种研究新进展[J]. *南京农业大学学报*, 2003, 26(4): 111-115
- 朱玉英, 姚文岳, 曹寿椿, 等. 不结球白菜抗病育种的研究 I. 南京地区病毒病原种类鉴定[J]. *南京农业大学学报*, 1990, 13(1): 25-294
- 蔡丽, 许泽永, 陈坤荣, 等. 芜菁花叶病毒研究进展[J]. *中国油料作物学报*, 2005, 27(1): 104-110
- 吕印谱, 丁征宇, 宋宝安, 等. 抗植物病毒剂作用机制研究进展[J]. *中国植保导刊*, 2007, 27(10): 14-16
- 张志刚. 大白菜抗芜菁花叶病毒(TuMV)遗传规律及过氧化氢等保护酶与抗病性关系的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011
- 王新华. 不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因分子标记与遗传定位[D]. 上海: 上海交通大学, 2010: 43-47
- 彭海涛, 宋小明, 侯喜林, 等. 不结球白菜抗芜菁花叶病毒基因的遗传分析及 SSR 标记[J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(2): 396-401
- 王彦华, 侯喜林, 申书兴, 等. 不结球白菜抗病基因同源序列的克隆机分析[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(12): 2621-2626
- Ma J, Hou X, Xiao D, et al. Cloning and characterization of the *BcTuR3* gene related to resistance to turnip mosaic virus(TuMV) from non-heading Chinese cabbage [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 2010, 28(4): 588-596
- Peng H, Li S, Wang L, et al. Turnip mosaic virus induces expression of the *LRR II* subfamily genes and regulates the salicylic acid signaling pathway in non-heading Chinese cabbage [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2013, 82: 64-72
- 曹寿椿, 朱月林, 黄保健, 等. 不结球白菜抗病育种的研究 II. TuMV 抗源鉴定与筛选[J]. *南京农业大学学报*, 1990, 13(2): 28-32
- 刘克钧, 朱月林, 侯喜林, 等. 不结球白菜抗病育种的研究[J]. *南京农业大学学报*, 1997, 20(3): 31-35
- 王述彬, 袁希汉, 苏小俊, 等. 中国不结球白菜种质资源对芜菁花叶病毒的抗病性鉴定[J]. *中国蔬菜*, 2002(1): 11-13
- 冯兰香, 徐玲, 刘佳, 等. 北京地区大白菜芜菁花叶病毒株系的鉴定[J]. *中国蔬菜*, 1988(4): 11-13
- Jin M, Lee S S, Ke L, et al. Identification and mapping of a novel dominant resistance gene, *TuRB07* to Turnip mosaic virus in *Brassica rapa* [J]. *Theor Appl Genet*, 2014, 127(2): 509-519
- Qian W, Zhang S J, Zhang H, et al. Mapping and candidate-gene screening of the novel Turnip mosaic virus resistance gene *retr02* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2012, 126: 179-188
- 刘琳. 不结球白菜芜菁花叶病毒病抗性机制及其遗传规律研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008: 77-80
- 钱伟. 大白菜 TuMV 抗性基因 *retr02* 的克隆与抗性机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013
- 李锡香, 沈镒, 王海平, 等. 不结球白菜种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京: 中国农业出版社, 2008
- 吴俊杰. 烟草花叶病毒和番茄花叶病毒在烟草上致病性差异的分子机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2001
- Hughes S L, Green S K, Lydiat D J, et al. Resistance to Turnip mosaic virus in *Brassica rapa* and *B. napus* and the analysis of genetic inheritance in selected lines [J]. *Plant Pathol*, 2002, 51(5): 567-573
- Barker H, Solomon-Blackburn R M, McNicol J W, et al. Resistance to potato leaf roll virus multiplication in potato is under major gene control [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 88(6-7): 754-758
- Jenner C E, Nellist C F, Barker G C, et al. Turnip mosaic virus (TuMV) is able to use alleles of both *eIF4E* and *eIF(iso)4E* from multiple loci of the diploid *Brassica rapa* [J]. *Mol Plant-Microbe Interac*, 2010, 23(11): 1498-1505
- 杨会房, 阮涛, 包凌云, 等. 四川省攀西地区南瓜、甜菜和辣椒部分病毒种类的 ELISA 检测[J]. *中国蔬菜*, 2011(16): 91-94
- Fraser R S S, Van Loon L C. Genes for resistance to plant viruses [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1986, 3(3): 257-294
- Fraser R S S. The genetics of plant-virus interactions: implications for plant breeding [J]. *Euphytica*, 1992, 63: 175-185
- 张俊华, 潘春清, 张耀伟, 等. 大白菜抗芜菁花叶病毒基因 EST-PCR-RFLP 分子标记的研究[J]. *植物病理学报*, 2007, 36(6): 523-527
- 许文博, 黄家凤, 阮涛. 石河子地区加工番茄坏死斑病毒病原的 ELISA 检测及品种抗病性鉴定[J]. *中国蔬菜*, 2009(10): 41-45
- 李巧云, 张志刚, 成文华, 等. 利用 ELISA 方法鉴定大白菜 TuMV 抗性[J]. *科技导报*, 2009(1): 42-45
- 施曼玲, 周雪平. 浙江雪菜花叶病病原鉴定及雪菜品种的抗病性测定[C]//2005 年华东植物病理学术研讨会论文集. 杭州: 浙江省植物病理学会, 2005: 129-137
- 王海平, 李锡香, 杨峰山, 等. 小白菜种质资源对小菜蛾的抗性评价[J]. *植物遗传资源学报*, 2006, 6(2): 191-194
- Werker E. Trichome diversity and development [J]. *Adv Bot Res*, 2000, 31: 1-35
- 刘会宁, 曹国先. 园艺植物的抗病机制[J]. *特产研究*, 2005, 26(3): 51-55