

萝卜种质资源对芜菁花叶病毒的抗性鉴定与评价

杨好慧, 邱 杨, 宋江萍, 张晓辉, 王鸿娜, 王超楠, 王海平, 李锡香

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所/农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100081)

摘要: 病毒病是危害萝卜作物的主要病害之一, 芜菁花叶病毒(TuMV)作为萝卜病毒病的主要毒源, 给萝卜生产造成严重经济损失。由于缺乏精准鉴定, 萝卜育种中缺乏稳定可靠的抗 TuMV 材料。本研究就国家蔬菜种质资源中期库提供的来自中国 25 个省份 125 个县市和其他 3 个国家的 150 份代表性萝卜种质资源对 TuMV 的抗性进行了苗期鉴定和 ELISA 检测, 筛选出 23 份抗病材料, 其中 1 份表现免疫。这些材料对萝卜抗病病毒基因定位和新品种培育具有重要意义。

关键词: 萝卜种质; 芜菁花叶病毒; 抗性鉴定; ELISA

Identification and Evaluation for The Resistance of Radish (*Raphanus sativus* L.) Germplasm Resources to Turnip Mosaic Virus

YANG Hao-hui, QIU Yang, SONG Jiang-ping, ZHANG Xiao-hui, WANG Hong-na,
WANG Chao-nan, WANG Hai-ping, LI Xi-xiang

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Beijing Research Station of Vegetable Crop Gene Resource and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture, Beijing 100081)

Abstract: Virus disease is one of the major diseases of radish (*Raphanus sativus* L.). Turnip mosaic virus (TuMV) which is the most important causative virus causes great economical loss in radish. The virus-resistant materials are less in radish due to lacking of precision identification. In this study, the resistance to TuMV was identified among 150 accessions of representative radish germplasm, coming from 125 counties of 25 provinces in China and 3 countries outside of China. As a result, one immune material and twenty-two resistant materials were screened out by combing phenotyping and ELISA detection. These materials would be useful for resistant gene mapping and new radish variety development in the future.

Key words: radish germplasm; TuMV; resistant phenotyping; ELISA

芜菁花叶病毒 (TuMV, turnip mosaic virus) 为马铃薯 Y 病毒科 (Potyviridae) 马铃薯 Y 病毒属 (*Potyvirus*) 病毒, 是一种世界性病害^[1]。芜菁花叶病毒在世界范围内分布广泛, 能够侵染十字花科的许多作物, 包括萝卜、白菜、甘蓝、油菜等^[2]。芜菁花叶病毒引起的病毒病是十字花科蔬菜的三大病害之一^[3], 严重影响蔬菜的产量和品质。在我国, 包括 TuMV 在内的病毒病每年导致十字花科蔬菜减产

20% ~ 30%^[4]。

萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 在我国栽培历史悠久, 是我国的第二大蔬菜作物^[5]。近年来, 由于集约化栽培和连作以及环境气候变化, 病毒病对萝卜作物的危害日益严重。芜菁花叶病毒作为主要毒源, 通过蚜虫以非持久的方式传播, 给病毒病的防治带来很大困难。因此, 传统的化学方法很难达到好的防治效果, 最经济有效的方法是培育抗病新

收稿日期: 2017-02-13 修回日期: 2017-04-12 网络出版日期: 2017-08-14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170814.0929.004.html>

基金项目: “十三五”国家重大研发项目 (2016YFD0100204-02); “十二五”国家科技支撑项目 (2013BAD01B04-1); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS)

第一作者研究方向为蔬菜种质资源。E-mail: yanghaohui127@163.com

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

品种^[6]。

抗病种质资源的鉴定与筛选是抗病毒病育种的基础。国外从 20 世纪 70 年代末开始陆续有关于十字花科作物 TuMV 抗性材料鉴定与筛选的报道。J. A. Walsh 等^[7]对 13 份油菜进行鉴定筛选到一份免疫材料 Rafal, 通过重复接种和蚜虫感染进一步证实该材料对 TuMV 分离物 UK 免疫^[8]。S. L. Hughes 等^[9]利用欧洲主要的 3 种致病型(1、3 和 4)对 26 份大白菜、10 份芜菁甘蓝和 6 份油菜进行抗性鉴定,发现 14 份大白菜对所有致病型都有抗性,7 份芜菁甘蓝对分离物 UK1(致病型 1)具有极端抗性,6 份油菜对致病型 1 具有抗性,其中 4 份对 UK1 具有极端抗性。B. A. Coutts 等^[10]鉴定了加拿大的 43 份油菜和 2 份芥菜,发现 33 份油菜抗性材料在接种 TuMV 分离物 WA-Ap(致病型 8)后,表现局部坏死或黄色斑点,但是没有系统感染。国内也相继开展了十字花科作物对 TuMV 抗性的鉴定与筛选。国家 TuMV 研究协作组在“六五”和“七五”期间对 3000 多份大白菜进行人工接种 TuMV,从中筛选出 28 份抗病材料^[11]。刘佳等^[12]对 349 份甘蓝材料进行接种鉴定,筛选出 5 份对 TuMV 免疫的材料。李丽丽^[13]采用田间诱发和人工接种鉴定 3510 份油菜种质资源,筛选出高抗品种 42 份。李经略等^[14]对 249 份甘蓝材料进行抗病鉴定,筛选出兼抗病毒病和黑腐病的材料 30 份。刘玉梅等^[15]采用苗期人工接种和田间鉴定的方法从 80 份青花菜材料中筛选出 1 份抗 TuMV 兼抗黑腐病的材料和 1 份抗 TuMV 耐黑腐病的材料。徐立彬^[16]对 56 份大白菜进行人工接种鉴定,筛选出高抗材料 10 份。陈坤荣等^[17]对 13 个油菜双低和杂交品种以及 14 份种质资源进行了 TuMV 抗性鉴定,筛选出 1 份高抗种质资源。任锡亮等^[18]利用田间自然发病鉴定 367 份芥菜种质资源,从中筛选出免疫材料 20 份、高抗材料 30 份、抗病材料 29 份。石磊^[19]对 667 大白菜种质资源接种鉴定,筛选出高抗材料 26 份。王晓伟等^[20]利用人工接种鉴定结合 ELISA 检测方法鉴定了 127 份不结球白菜种质资源,从中筛选到高抗材料 4 份、抗病材料 13 份。

然而,国内外对十字花科作物抗 TuMV 的鉴定与筛选主要集中在白菜、甘蓝和油菜上,萝卜抗病毒病材料的鉴定报道相对较少。国外对萝卜抗病毒病的鉴定通常是在鉴定芸薹属蔬菜时附带鉴定数量不多的材料。I. Fujisawa^[21]分别对 11 份日本萝卜、11 份卷心菜和 11 份大白菜进行了抗 TuMV 特性的鉴

定,筛选到较抗 TuMV 的日本萝卜 5 份。E. P. Nyalugwe 等^[22]通过接种 TuMV 分离物 WA-Ap1(致病型 8),对 69 份芥菜、11 份芥蓝、11 份甘蓝、5 份白菜和 3 份萝卜进行鉴定,结果显示 3 份萝卜材料都表现抗病,其中 2 份免疫。国内对萝卜种质资源抗病毒病性能的鉴定主要集中在 20 世纪。汪隆植等^[23]收集我国夏秋萝卜资源 269 份,通过田间鉴定初选出 53 份抗性较好的材料,然后进行苗期接种鉴定,获得对 TuMV(N-100)高抗的材料 1 份(R-7)、抗的材料 3 份(R-40, R-41, R-42)。李焯等^[24]对 11 份萝卜品种进行苗期鉴定,获得 3 份高抗材料、4 份抗病材料。早期的鉴定工作主要以研究者从当地收集的 TuMV 的分离物为毒源,并没有对其进行分类鉴定,而且自然条件下的表型目测鉴定易受环境因素影响。因此,开展萝卜种质资源对病毒病抗性的精准鉴定是获得稳定遗传抗源的前提。

我国萝卜种质资源十分丰富,本研究以国家蔬菜种质资源中期库保存的萝卜种质资源为基础,从中选取 150 份代表性萝卜种质,以我国萝卜生产中主流株系 TuMV-C4 为毒源,通过采用苗期人工接种鉴定与 ELISA 检测相结合的方法,以期筛选优异抗病毒材料,为后续的抗病毒病遗传和基因定位研究以及抗病育种提供材料基础。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用试验材料为来自我国 25 个省份的 125 个县市以及朝鲜、西班牙、俄罗斯的 150 份萝卜种质资源,名称和来源地信息详见表 1,由国家蔬菜种质资源中期库提供。

本研究所使用毒源为 TuMV-C4,由中国农业科学院蔬菜花卉研究所病理课题组提供,TuMV-C4 毒源扩繁材料选用易感 TuMV 菜心材料‘765’。

TuMV-ELISA 检测试剂盒及阳性对照购自美国 Agdia 公司。

1.2 抗性鉴定

1.2.1 材料培养 菜心和所有萝卜材料的种子在 25 °C 催芽,播种于 10 cm × 10 cm 营养钵中,放置于中国农业科学院蔬菜花卉研究所所区农场防虫网室内,育苗期间温度白天 23 ~ 26 °C,夜间 15 ~ 18 °C。待植株长到 2 叶 1 心时,移到人工气候室。设置 3 个重复,每个重复 10 株。人工气候室温度设置为白天 28 °C,夜间 25 °C;光照设置为每天 12 h。定期浇水和防治蚜虫。

表1 试验材料信息

Table 1 Basic information of radish materials in this study

编号 Accession	材料名称 Material name	来源地 Source	编号 Accession	材料名称 Material name	来源地 Source
1	博爱早萝卜	中国河南博爱县	54	鹅令白萝卜	中国山东梁山县
2	清化圆缨萝卜	中国河南博爱县	55	春萝卜	中国山东青州市
3	邓县露头青	中国河南邓县	56	乳山大红袍	中国山东乳山县
4*	漯河油罐萝卜	中国河南漯河市	57	弯腰白萝卜	中国山东莘县
5	民权竹杆青	中国河南民权县	58	泗水五缨萝卜	中国山东泗水县
6	宁陵露头青	中国河南宁陵县	59	范镇青萝卜	中国山东泰安市
7	杞县大青萝卜	中国河南杞县	60	大红袍	中国山东新泰市
8	商城青头萝卜	中国河南商城县	61	车头红	中国山东新泰市
9	上蔡圆头萝卜	中国河南上蔡县	62	红皮	中国山东济宁市
10	社旗竹杆青	中国河南社旗县	63	沂水大尖嘴萝卜	中国山东沂水县
11	西平露头青	中国河南石平县	64	诸城红萝卜	中国山东诸城市
12	唐河半截红	中国河南唐河县	65	露头青	中国湖北保康县
13	舞钢罐萝卜	中国河南舞钢市	66	红萝卜	中国湖北恩施市
14*	西华大青萝卜	中国河南西华县	67	红萝卜	中国湖北恩施市
15*	襄县牛腿萝卜	中国河南襄县	68	白萝卜	中国湖北恩施市
16	永城大红袍	中国河南永城县	69	花台萝卜	中国湖北恩施市
17	郑州金花台	中国河南郑州市	70	菜萝卜	中国湖北房县
18	红皮红肉心里美	中国四川	71	热萝卜	中国湖北房县
19*	花缨子满身红萝卜	中国四川成都市	72	系马桩	中国湖北房县
20	红皮萝卜	中国四川大足县	73	白萝卜	中国湖北神农架
21	圆萝卜	中国四川丰都县	74	青头萝卜	中国湖北武昌县
22	团萝卜	中国四川丰都县	75	红皮萝卜	中国湖北仙桃市
23	红皮萝卜	中国四川丰都县	76	黄金萝卜	中国湖北咸丰县
24	园头萝卜	中国四川丰都县	77	白萝卜	中国湖北宜昌市
25	圆萝卜	中国四川丰都县	78	耐热白	中国湖北云梦县
26	梅子萝卜	中国四川奉节县	79	小红萝卜	中国湖北竹山县
27	青萝卜	中国四川奉节县	80	长条萝卜	中国湖北竹溪县
28	琪县萝卜	中国四川琪县	81	青头萝卜	中国安徽阜南县
29	粉团萝卜	中国四川汉源县	82	一线红萝卜	中国安徽怀远县
30	红沙锅萝卜	中国四川江津县	83*	五月红	中国安徽淮南市
31	迟萝卜	中国四川梁平县	84	粉浆萝卜	中国安徽霍邱县
32	红泡萝卜(金条子)	中国四川泸州市	85	恨地钻	中国安徽霍邱县
33*	枇杷缨红皮萝卜	中国四川绵阳市	86	朱港大萝卜	中国安徽霍邱县
34	红皮萝卜	中国四川彭山县	87	定地白萝卜	中国安徽六安市
35*	铁杆子枇杷缨萝卜	中国四川郫县	88	青头嫩	中国安徽六安市
36	青皮瓜儿萝卜	中国四川渠县	89	大青萝卜	中国安徽寿县
37	红皮圆形萝卜	中国四川渠县	90	太平白萝卜	中国安徽太平县
38	冬萝卜	中国四川巫山县	91	宿县青萝卜	中国安徽宿县
39	红萝卜	中国四川巫溪县	92	小红萝卜	中国江苏常州市
40	大园萝卜	中国四川兴文县	93	早紫白萝卜(紫头)	中国江苏常州市
41*	半头红萝卜	中国四川雅安市	94*	伏白萝卜	中国江苏句容县
42	白大萝卜	中国四川酉阳县	95	中秋红萝卜	中国江苏南京市
43	翠雪	中国重庆歌乐山	96	六十日子萝卜	中国江苏如东县
44	SJ10Q	中国山东	97	春白萝卜	中国江苏泰州市
45	大红袍	中国山东单县	98*	大头红萝卜	中国江苏扬州市
46	即墨刀把萝卜	中国山东即墨市	99	圆萝卜	中国湖南宁远县
47	青圆脆	中国山东济南市	100	砂罐子萝卜	中国湖南邵阳县
48	济宁大红袍	中国山东济宁市	101	湘西红皮萝卜	中国湖南湘西
49	五缨寒萝卜	中国山东嘉祥县	102*	新田大白萝卜	中国湖南新田县
50	嘉祥大红袍	中国山东嘉祥县	103	圆萝卜	中国湖南长沙市
51	莱西望城萝卜	中国山东莱西市	104*	系马桩萝卜	中国陕西安康县
52	崂山青萝卜	中国山东崂山区	105	宝鸡红圆蛋萝卜	中国陕西宝鸡市
53	利津青萝卜	中国山东利津县	106	红皮冬萝卜	中国陕西宁强县

表 1(续)

编号 Accession	材料名称 Material name	来源地 Source	编号 Accession	材料名称 Material name	来源地 Source
107*	西乡山萝卜	中国陕西西乡县	129*	白玉晚萝卜	中国广东澄海县
108	兰州红热萝卜	中国陕西引自兰州	130	蒲县水萝卜	中国山西蒲县
109	青丰冬萝卜	中国陕西西北农大	131	曲沃花叶白姑娘	中国山西曲沃县
110	细皮白	中国河北保定市	132	长治水萝卜	中国山西长治市
111	白皮长萝卜	中国河北高邑县	133*	安顺胭脂	中国贵州安顺市
112	六缨萝卜	中国河北围场县	134	红皮马桩萝卜	中国贵州金沙县
113	武强青萝卜	中国河北武强县	135	长白萝卜	中国内蒙古赤峰市
114	浙大长	中国浙江杭州市	136	象牙白	中国内蒙古杭锦旗
115	太湖晚萝卜	中国浙江湖州市	137	新生 1 号	中国新疆石河子市
116	沙埠萝卜	中国浙江黄岩县	138	通园青	中国吉林东丰县
117	白石萝卜	中国浙江临海市	139	大红袍	中国吉林长春市
118*	春籽萝卜	中国云南个旧市	140	闽候 100 天萝卜	中国福建闽候县
119	春籽萝卜	中国云南个旧市	141*	上杭萝卜	中国福建上杭县
120	象牙萝卜	中国云南会泽县	142*	狗头罐	中国甘肃平凉市
121	昆明四季白萝卜	中国云南昆明市	143	大红萝卜	中国辽宁营口市
122	水萝卜	中国云南弥渡县	144	固原牛角花叶萝卜	中国宁夏固原县
123	冬萝卜	中国云南宣威县	145	格尔木长水萝卜	中国青海格尔木市
124*	南桥萝卜	中国江西赣州市	146	拉萨大萝卜	中国西藏拉萨市
125	胭脂萝卜	中国江西吉安县	147	ZYZ-819	西班牙
126	涂洲萝卜	中国江西南昌市	148	Hukyopkuwolmun	朝鲜
127	白沙短叶 13-2	中国广东澄海县	149	托赫夫	俄罗斯
128*	南畔洲晚萝卜	中国广东澄海县	150	4 俄	俄罗斯

* 标志的材料未进行 ELISA 检测

The materials marked with * are not detected by ELISA

1.2.2 TuMV 接种 TuMV 接种的具体方法参考钱伟等^[25]的方法。在易感 TuMV 的菜心的 2 叶期接种 TuMV-C4 株系,接种 21 d 后,采集新鲜的病叶供接种萝卜幼苗使用。

在萝卜 2 叶 1 心时,进行人工摩擦接种。接种前,称取一定质量的新鲜病叶放入高温灭菌过的研钵中,加入 5 倍体积的磷酸缓冲液(0.05 mol/L, pH = 7)研磨成匀浆,两层纱布过滤,立即用于接种;接种时,先在植株的 2 片真叶的正面洒少许金刚砂,然后用手指蘸取病毒汁液在叶面上来回摩擦 2~4 次,摩擦后用蒸馏水立即冲洗叶面;接种后,遮荫 24 h,间隔 1 d 后重复接种。接种完成后,正常管理,接种 21 d 后进行抗性调查。

TuMV 单株抗性调查的级别划分及病情指数 DI 计算均依据《萝卜种质资源描述规范和数据分级标准》^[26]。单株抗性分级标准如下:

0 级:无任何病症;1 级:接种叶出现少数褪绿斑或心叶明脉;3 级:心叶及中部叶片轻花叶;5 级:心叶及中部叶片花叶,心叶叶片皱缩成畸形;7 级:心叶及中、外部叶片重花叶,2~3 片叶畸形、皱缩或有坏死斑,植株轻度矮化;9 级:多数叶片重花叶、畸形、皱缩或有坏死斑,植株严重矮化,甚至

死亡;

采用病情指数 DI 进行群体抗病性评价: $DI = \sum (\text{病级数值} \times \text{该病级株数}) \times 100 / (\text{病级最高值} \times \text{调查株数})$ 。

免疫: $DI = 0$; 高抗 HR: $0 < DI \leq 5$; 抗病 R: $5 < DI \leq 15$; 中抗 MR: $15 < DI \leq 30$; 感病 S: $30 < DI \leq 45$; 高感 HS: $45 < DI$ 。

1.2.3 ELISA 检测 人工摩擦接种 21 d 后,对其中的 130 份种质进行检测。每份材料 3 个重复,每个重复随机取 5 株的心叶混样。ELISA 检测详细步骤及过程参考试剂盒内的说明书。利用酶标仪在 405 nm 下进行样品吸光度(OD_{405})测定, $P/N = \text{被测样品的 } OD_{405} / \text{阴性对照 } OD_{405}$ 。 $P/N \geq 2.0$ 时,植物表现为阳性; $P/N < 2.0$ 时,植物表现为阴性^[27]。

1.2.4 统计分析 利用 SAS9.3 软件完成 DI、P/N 值及其标准误的计算。利用 EXCEL2010 软件进行次数分布图及折线图的绘制。

2 结果与分析

2.1 萝卜种质资源对 TuMV 抗性的鉴定结果

采用苗期人工接种鉴定方法对 150 份萝卜种质进行 TuMV 抗性鉴定,结果见表 2 和图 1。由表中数

表2 萝卜种质资源对 TuMV 的抗性鉴定结果

Table 2 The identification result of resistance of radish germplasm resources to TuMV

编号 Accession	病情指数 DI	抗性 Resistance	编号 Accession	病情指数 DI	抗性 Resistance	编号 Accession	病情指数 DI	抗性 Resistance
1	37.04 ± 3.70	S	51	46.27 ± 11.24	HS	101	46.53 ± 4.58	HS
2	49.30 ± 3.14	HS	52	35.39 ± 3.50	S	102	46.50 ± 8.11	HS
3	8.38 ± 3.68	R	53	32.72 ± 3.40	S	103	44.44 ± 3.39	S
4	5.06 ± 3.89	R	54	43.62 ± 2.88	S	104	19.34 ± 4.36	MR
5	4.94 ± 3.27	HR	55	50.62 ± 2.85	HS	105	39.26 ± 8.25	S
6	17.28 ± 2.85	MR	56	60.00 ± 6.67	HS	106	4.44 ± 3.39	HR
7	27.69 ± 2.89	MR	57	46.30 ± 5.63	HS	107	51.23 ± 2.23	HS
8	6.67 ± 1.70	R	58	6.30 ± 0.98	R	108	62.26 ± 0.35	HS
9	10.37 ± 5.96	R	59	1.85 ± 0.98	HR	109	8.89 ± 1.28	R
10	8.23 ± 2.88	R	60	30.04 ± 3.29	S	110	3.33 ± 1.11	HR
11	34.77 ± 7.94	S	61	36.42 ± 5.25	S	111	31.79 ± 2.28	S
12	42.22 ± 3.85	S	62	45.58 ± 5.07	HS	112	37.96 ± 6.52	S
13	1.67 ± 0.56	HR	63	39.40 ± 3.07	S	113	24.07 ± 2.06	MR
14	31.17 ± 5.67	S	64	30.76 ± 8.90	S	114	53.70 ± 3.34	HS
15	7.82 ± 1.09	R	65	20.32 ± 8.56	MR	115	40.74 ± 2.96	S
16	48.46 ± 8.82	HS	66	37.04 ± 4.99	S	116	43.33 ± 2.53	S
17	40.12 ± 7.15	S	67	37.24 ± 8.24	S	117	15.07 ± 7.27	MR
18	11.11 ± 0.00	R	68	23.33 ± 2.94	MR	118	44.97 ± 6.44	S
19	30.25 ± 6.68	S	69	62.55 ± 3.52	HS	119	50.62 ± 4.94	HS
20	12.22 ± 8.34	R	70	42.39 ± 2.18	S	120	65.29 ± 4.92	HS
21	21.24 ± 10.10	MR	71	45.93 ± 3.92	HS	121	57.78 ± 1.28	HS
22	57.14 ± 5.10	HS	72	48.89 ± 5.59	HS	122	51.44 ± 5.40	HS
23	53.09 ± 2.85	HS	73	30.37 ± 4.86	S	123	62.96 ± 7.41	HS
24	53.44 ± 2.12	HS	74	31.69 ± 3.29	S	124	10.13 ± 4.88	R
25	42.22 ± 3.39	S	75	54.81 ± 8.54	HS	125	54.63 ± 0.93	HS
26	89.63 ± 2.67	HS	76	45.93 ± 1.48	HS	126	29.22 ± 3.59	MR
27	52.59 ± 7.73	HS	77	46.67 ± 1.28	HS	127	42.96 ± 2.96	S
28	44.44 ± 6.42	S	78	33.33 ± 4.63	S	128	30.35 ± 2.50	S
29	7.41 ± 4.67	R	79	22.22 ± 5.78	MR	129	34.16 ± 0.82	S
30	40.00 ± 2.57	S	80	35.24 ± 3.03	S	130	51.98 ± 4.14	HS
31	54.07 ± 1.48	HS	81	43.70 ± 0.74	S	131	26.85 ± 7.23	MR
32	49.79 ± 7.32	HS	82	44.27 ± 4.81	S	132	42.70 ± 2.90	S
33	34.98 ± 3.59	S	83	16.40 ± 5.29	MR	133	21.81 ± 10.11	MR
34	15.56 ± 5.59	MR	84	41.98 ± 2.57	S	134	7.78 ± 7.23	R
35	32.51 ± 4.36	S	85	47.44 ± 1.59	HS	135	14.44 ± 2.80	R
36	58.23 ± 0.10	HS	86	11.85 ± 0.98	R	136	31.17 ± 3.22	S
37	54.27 ± 0.71	HS	87	18.72 ± 1.25	MR	137	11.85 ± 3.03	R
38	47.41 ± 2.67	HS	88	30.86 ± 9.88	S	138	5.56 ± 3.21	R
39	30.74 ± 3.03	S	89	32.92 ± 6.06	S	139	23.87 ± 1.09	MR
40	55.56 ± 3.21	HS	90	30.74 ± 2.59	S	140	57.72 ± 6.24	HS
41	20.58 ± 5.44	MR	91	38.52 ± 1.96	S	141	28.81 ± 2.50	MR
42	45.68 ± 1.43	HS	92	53.91 ± 8.11	HS	142	28.40 ± 7.94	MR
43	7.41 ± 3.70	R	93	15.62 ± 0.88	MR	143	30.69 ± 4.33	S
44	37.86 ± 1.03	S	94	51.03 ± 7.49	HS	144	58.52 ± 12.85	HS
45	51.85 ± 4.90	HS	95	25.56 ± 12.52	MR	145	42.22 ± 5.13	S
46	41.15 ± 2.26	S	96	41.45 ± 3.47	S	146	17.28 ± 7.02	MR
47	30.45 ± 0.41	S	97	30.76 ± 1.43	S	147	8.52 ± 2.43	R
48	4.78 ± 2.40	HR	98	23.56 ± 8.97	MR	148	2.59 ± 0.74	HR
49	51.23 ± 2.23	HS	99	0	HR	149	33.33 ± 3.39	S
50	44.03 ± 8.11	S	100	48.06 ± 1.15	HS	150	48.15 ± 10.45	HS

' ± ' 后面的数值为该 DI 值的标准误;HR:高抗,R:抗病;MR:中抗;S:抗病;HS:高感

The value after ' ± ' means the stand error of DI,HR:Highly resistant,R:Resistant,MR:Middle resistant,S:Susceptible,HS:Highly susceptible

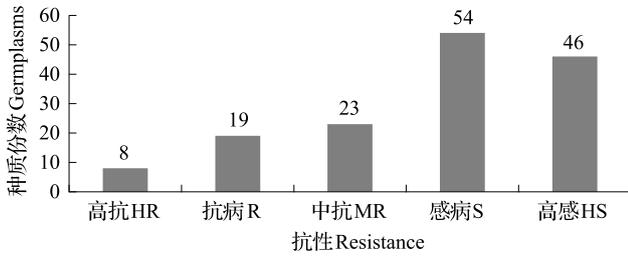


图1 萝卜种质资源对 TuMV 抗性级别的次数分布图

Fig. 1 Distribution plot for resistance of different radish germplasm to TuMV

据可以看出,不同萝卜种质对 TuMV 的抗性差异明显。病情指数(DI)分布在 0 ~ 89.63 之间。在 150 份种质中,高抗(HR)材料 8 份,其中 1 份无发病症状,抗病(R)材料 19 份,有 23 份材料表现中抗(MR),54 份材料表现感病(S),46 份材料表现高感(HS)。根据不同种质的抗性级别绘制的次数分布图

表 3 萝卜种质资源对 TuMV 抗性的 ELISA 检测结果

Table 3 Detection result of the resistance of radish germplasm to TuMV by ELISA

编号 Accession	P/N 值 P/N value	抗性 Resistance	编号 Accession	P/N 值 P/N value	抗性 Resistance	编号 Accession	P/N 值 P/N value	抗性 Resistance
PC	20.29	—	36	4.39 ± 1.54	HS	68	3.23 ± 1.18	MR
NC	1.00	—	37	4.32 ± 1.22	HS	69	2.12 ± 0.05	HS
1	1.36 ± 0.02	S	38	3.85 ± 1.06	HS	70	1.28 ± 0.03	S
2	1.54 ± 0.16	HS	39	3.08 ± 1.14	S	71	3.03 ± 0.63	HS
3	1.17 ± 0.04	R	40	3.03 ± 0.30	HS	72	1.64 ± 0.19	HS
5	1.57 ± 0.14	HR	42	1.47 ± 0.10	HS	73	4.26 ± 0.61	S
6	2.89 ± 0.38	MR	43	1.30 ± 0.43	R	74	2.43 ± 0.14	S
7	2.85 ± 0.51	MR	44	13.53 ± 6.56	S	75	2.16 ± 0.42	HS
8	1.17 ± 0.19	R	45	1.48 ± 0.06	HS	76	2.73 ± 0.46	HS
9	0.93 ± 0.20	R	46	4.16 ± 1.49	S	77	1.79 ± 0.35	HS
10	1.46 ± 0.04	R	47	3.76 ± 1.02	S	78	3.03 ± 0.89	S
11	4.40 ± 1.25	S	48	10.95 ± 3.84	HR	79	3.94 ± 1.15	MR
12	2.49 ± 0.50	S	49	1.41 ± 0.05	HS	80	5.19 ± 1.51	S
13	0.69 ± 0.02	HR	50	2.93 ± 0.65	S	81	3.71 ± 1.62	S
16	1.55 ± 0.17	HS	51	2.09 ± 0.68	HS	82	3.01 ± 0.85	S
17	1.53 ± 0.05	S	52	2.78 ± 0.24	S	84	3.19 ± 0.38	S
18	2.04 ± 0.32	R	53	2.40 ± 0.73	S	85	13.00 ± 1.73	HS
20	2.06 ± 0.56	R	54	1.52 ± 0.12	S	86	1.00 ± 0.57	R
21	6.96 ± 0.62	MR	55	3.56 ± 1.80	HS	87	18.18 ± 0.64	MR
22	1.36 ± 0.01	HS	56	2.04 ± 0.38	HS	88	18.56 ± 0.02	S
23	1.38 ± 0.03	HS	57	1.45 ± 0.03	HS	89	4.82 ± 2.30	S
24	1.58 ± 0.03	HS	58	1.45 ± 0.23	R	90	1.78 ± 0.14	S
25	5.96 ± 0.44	S	59	0.66 ± 0.00	HR	91	3.98 ± 1.88	S
26	4.39 ± 0.54	HS	60	4.18 ± 0.76	S	92	11.22 ± 0.18	HS
27	4.79 ± 0.61	HS	61	1.15 ± 0.02	S	93	5.39 ± 2.10	MR
28	1.67 ± 0.12	S	62	2.13 ± 0.07	HS	95	4.64 ± 1.64	MR
29	1.96 ± 0.88	R	63	2.35 ± 0.38	S	96	6.23 ± 2.51	S
30	5.16 ± 0.77	S	64	18.04 ± 0.31	S	97	2.36 ± 0.43	S
31	1.89 ± 0.36	HS	65	3.08 ± 0.38	MR	99	0.43 ± 0.12	HR
32	3.53 ± 1.18	HS	66	9.42 ± 2.09	S	100	1.73 ± 0.06	HS
34	5.80 ± 0.56	MR	67	6.90 ± 1.90	S	101	9.32 ± 2.37	HS

(图 1)。可以看出,萝卜种质的抗性级别基本符合正态分布,峰值稍偏向感病区域。在全部材料中,中抗和感病、高感的材料占总份数的 82%,表明大部分的萝卜种质易受病毒病的危害。供试萝卜种质感病后,植株多表现为花叶症状,少数受病毒侵染严重的植株表现为叶片皱缩,植株矮化。

2.2 ELISA 检测结果

抗性鉴定后,对其中 130 份种质进行了 ELISA 检测(表 3)。结果显示:不同种质携带病毒的情况不同。供试种质的 P/N 值分布在 0.29 ~ 18.56 之间。在携带病毒的 77 份种质中,63 份种质的 P/N 值分布在 2.1 ~ 6.0 之间,占 82%,说明大多数带毒种质所携带的病毒含量较低。将所有种质按照病情指数从小到大的顺序排列,绘制 DI 和 P/N 值的折线图(图 2),发现两者并没有明显的相关性。虽然总体上大多数种质的病毒含量较低,但是供试材料的病情指数却较高。

表3(续)

编号 Accession	P/N 值 P/N value	抗性 Resistance	编号 Accession	P/N 值 P/N value	抗性 Resistance	编号 Accession	P/N 值 P/N value	抗性 Resistance
103	2.24 ± 0.60	S	119	2.26 ± 0.77	HS	136	2.16 ± 0.25	S
105	1.18 ± 0.25	S	120	1.28 ± 0.01	HS	137	0.30 ± 0.01	R
106	1.04 ± 0.06	HR	121	3.14 ± 0.81	HS	138	1.11 ± 0.27	R
108	1.38 ± 0.13	HS	122	2.51 ± 0.65	HS	139	9.19 ± 2.90	MR
109	2.00 ± 0.08	R	123	2.39 ± 0.61	HS	140	10.24 ± 0.71	HS
110	0.29 ± 0.04	HR	125	1.43 ± 0.05	HS	143	1.41 ± 0.04	S
111	11.52 ± 2.16	S	126	13.14 ± 3.33	MR	144	2.45 ± 0.36	HS
112	1.39 ± 0.07	S	127	3.38 ± 1.22	S	145	1.46 ± 0.07	S
113	4.92 ± 0.32	MR	130	2.94 ± 0.25	HS	146	2.54 ± 0.44	MR
114	1.51 ± 0.07	HS	131	2.29 ± 0.09	MR	147	0.93 ± 0.00	R
115	3.36 ± 1.42	S	132	4.17 ± 0.29	S	148	0.98 ± 0.21	HR
116	5.68 ± 2.63	S	134	1.06 ± 0.17	R	149	3.37 ± 1.15	S
117	18.35 ± 0.13	MR	135	0.58 ± 0.13	R	150	4.97 ± 1.51	HS

P/N 值为被测样品孔吸光度值与阴性对照孔吸光度平均值之比; ‘±’ 后面的数值为该 P/N 值的标准误; PC 值为阳性对照; NC 值为阴性对照。
P/N value: Ratio between absorbance of measurement sample and the mean of the negative controls, the value after ‘±’ means the stand error of P/N Value, PC: Positive control, NC: Negative control

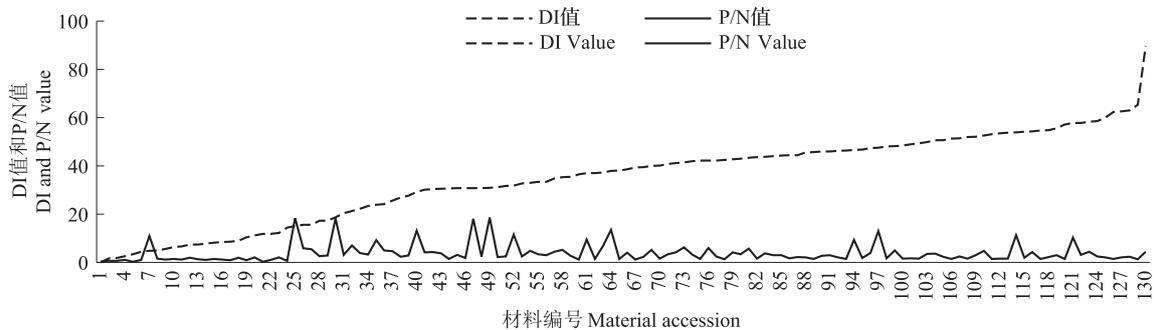


图2 萝卜的DI和P/N值的折线图

Fig. 2 The line chart of DI and P/N value of radish

对表型高抗的8份种质和抗病的16份种质的ELISA检测显示,其中23份种质的检测结果与抗性鉴定结果相符。其中,9份材料(9、13、59、99、110、135、137、147、148)病毒含量低于阴性对照,99号萝卜种质在表型鉴定中无任何病症,经确认为免疫材料;1份高抗种质(48号)的P/N值大于2.0,可能为无症状带毒抗源。同时,在对47份感病和43高感种质的检测中,分别发现11份和17份种质的P/N值偏低,而这部分种质的DI值主要集中在40以上,发病比较严重,推测可能是由于材料对病毒比较敏感,在病毒含量较低的情况下,叶片就会表现出明显的症状。

2.3 抗病资源的地理分布与主要特性

供试萝卜种质来自中国25个省份的125个县市以及朝鲜、西班牙、俄罗斯,其中表型抗以上的资源共27份。抗病资源主要来自中国的河南(8份)、山东(3份)、四川(3份)、重庆(1份)、陕西(2份)、河北(1份)、安徽(1份)、贵州(1份)、湖南(1份)、

吉林(1份)、江西(1份)、内蒙古(1份)、新疆(1份),以及朝鲜(1份)、西班牙(1份),具体分布情况见表4。总的来说,我国的萝卜抗病资源主要分布在华中以北地区。此外,通过对27份抗病资源进行农艺性状调查,发现抗病资源表现一定的多样性(表5)。如根色涉及绿皮(10份)、浅绿(6份)、红皮(5份)、白皮(6份);根型包括扁圆(1份)、倒短圆锥(1份)、倒长圆锥(1份)、短弯号角(1份)、短圆锥(1份)、近圆(1份)、短圆柱(6份)、长圆柱(15份);叶色有黄绿(6份)、绿色(9份)、浅绿(7份)、深绿(5份);叶柄色为红色(4份)、绿色(9份)、浅绿(12份)、浅紫(2份)。同时,在另一些性状上又表现一定的集中。如肉质根的根肉颜色主要为白肉(23份),叶型主要为花叶(19份),叶裂刻主要表现为全裂(14份)和深裂(5份)。总之,我国萝卜抗病资源的多样性,为我们培育遗传背景丰富的抗病品种提供了材料基础。

表 4 抗病资源的地理分布

Table 4 The geographical distribution of resistant radish germplasm resource

来源地	参试资源数	抗性资源数	来源地	参试资源数	抗性资源数
Source	Total resources	Resistant resources	Source	Total resources	Resistant resources
中国河南	17	8	中国重庆	1	1
中国四川	24	3	中国新疆	1	1
中国山东	21	3	中国河北	4	1
中国安徽	11	1	中国吉林	2	1
中国陕西	5	2	中国江西	3	1
中国贵州	2	1	朝鲜	1	1
中国湖南	5	1	西班牙	1	1
中国内蒙古	2	1	合计 Total		27

表 5 抗病资源的主要性状

Table 5 The main characteristics of resistant radish germplasm resource

编号	品种名称	根色	根肉色	根形	叶型	叶色	叶柄色	叶裂刻	抗性级别
Accession	Variety name	Color of fleshy root	Color of fresh	Fleshy root shape	Leaf type	Leaf color	Petiole color	Division of outer leaf	Resistance
13	舞钢罐萝卜	绿	白肉	长圆柱	花叶	绿色	绿	深裂	HR
59	范镇青萝卜	绿	白肉	长圆柱	花叶	绿色	绿	全裂	HR
99	圆萝卜	白	白肉	长圆柱	花叶	绿色	浅绿	全裂	HR
110	细皮白	白	白肉	长圆柱	花叶	浅绿	浅绿	深裂	HR
135	长白萝卜	浅绿	白肉	长圆柱	花叶	浅绿	浅绿	全裂	R
147	ZYZ-819	白	白肉	长圆柱	花叶	黄绿	浅绿	深裂	R
148	Hukyopkuwolmun	绿	白肉	长圆柱	花叶	浅绿	绿	全裂	HR
9	上蔡圆头萝卜	绿	白肉	长圆柱	板叶	绿色	浅绿	浅裂	R
137	新生 1 号	绿	白肉	长圆柱	板叶	浅绿	浅绿	深裂	R
5	民权竹杆青	浅绿	白肉	长圆柱	花叶	绿色	浅绿	全裂	HR
48	济宁大红袍	红	红	近圆	花叶	黄绿	红	全裂	HR
106	红皮冬萝卜	红	红	短圆柱	板叶	黄绿	红	浅裂	HR
3	邓县露头青	浅绿	白肉	长圆柱	花叶	浅绿	浅绿	全裂	R
4	漯河油罐萝卜	绿	白肉	短圆锥	花叶	深绿	绿	全裂	R
8	商城青头萝卜	绿	白肉	长圆柱	板叶	绿色	绿	浅裂	R
10	社旗竹杆青	浅绿	白肉	短圆柱	花叶	绿色	浅绿	全裂	R
15	襄县牛腿萝卜	绿	白肉	短圆柱	花叶	绿色	绿	全裂	R
18	红皮红肉心里美	红	红	倒短圆锥	板叶	黄绿	红	无裂	R
20	红皮萝卜	白	粉红	倒长圆锥	板叶	浅绿	浅紫	浅裂	R
29	粉团萝卜	浅绿	白肉	长圆柱	花叶	浅绿	浅绿	全裂	R
43	翠雪	白	白肉	扁圆	板叶	黄绿	浅绿	浅裂	R
58	泗水五缨萝卜	红	白肉	长圆柱	板叶	深绿	浅紫	浅裂	R
86	朱港大萝卜	绿	白肉	长圆柱	花叶	深绿	绿	全裂	R
109	青丰冬萝卜	浅绿	白	短弯号角	花叶	深绿	绿	深裂	R
124	南桥萝卜	白	白肉	短圆柱	花叶	深绿	浅绿	全裂	R
134	红皮马桩萝卜	红	白肉	短圆柱	花叶	黄绿	红	浅裂	R
138	通园青	绿	白肉	短圆柱	花叶	绿色	绿	全裂	R

3 讨论

我国作为萝卜的起源演化中心之一,萝卜种质资源丰富多样。本研究获得的 27 份表型抗病资源有 25 份分布于我国的 13 个省份,虽然各省份鉴定的资源基数不同,但在一定程度上反映出我国萝卜抗病资源分布的多样性。从地域分布上来看,抗病资源主要分布在我国华中以北地区,2 份来自朝鲜和西班牙的抗病资源从地域上来说,和我国中部以北地区基本上在近似纬度范围内,这种分布特点是否与高纬度地区干

燥气候条件下蚜虫高发相关值得研究。萝卜抗病资源的多样性同样表现在其性状上,不仅包括了叶色、叶型和叶裂刻的全部类型,还包括了其他性状的大部分类型。抗病资源的地理分布和性状的多样性,为以后的抗病毒病育种提供了丰富的遗传材料。

汪隆植等^[23]曾对 269 份夏秋萝卜材料进行抗 TuMV 鉴定,并将鉴定获得的材料分为 4 类:感病带毒量高的材料、抗病不带毒的材料、感病带毒量低的材料、抗病带毒量高的材料。本次试验也获得了相似的结果,8 份高抗材料中有 1 份高抗材料带毒量高;90

份感病材料中有 28 份材料带毒量低。对于抗病但带毒量高的材料,大家普遍认为该类材料属于隐症或者耐病类型。相似的现象也出现在其他作物中。许文博等^[28]对 21 份加工番茄坏死条斑病毒进行 ELISA 检测时,发现抗、感材料的 P/N 整体偏高。施曼玲等^[29]等对 53 份雪菜中的芜菁花叶病毒进行 ELISA 检测时,发现 11 份抗病材料表现为阳性。王晓伟等^[20]在对 127 份不结球白菜种质抗 TuMV 的鉴定中,发现部分抗病种质的 P/N 值偏高。至于感病带毒量低的材料,发现其病情指数偏高,发病比较严重,一方面可能是由于不同材料对病毒的敏感性不同,而这些材料对病毒比较敏感,在病毒量较低的情况下就可以使植株表现出较严重的发病症状。另一方面可能是因为芜菁花叶病毒为严格寄生物,而这些植株发病比较严重,导致病叶的细胞大量死亡或生命力偏低,从而使病毒量降低。汪隆植等^[23]鉴定的夏秋萝卜材料中,4 类中有 1 类即为感病带毒量低的材料,与本试验结果一致。同样,在其他作物中也检测到了这种现象。李巧云等^[30]利用 ELISA 检测大白菜高感亲本时,发现其带毒量偏低。马伟伟^[31]利用 ELISA 方法检测 29 份芥菜中的芜菁花叶病毒,发现 1 份感病材料的病毒量偏低,表现为阴性。王晓伟等^[20]利用 ELISA 检测检测不结球白菜上的芜菁花叶病毒,发现部分高感种质的病毒量偏低。总之,虽然利用 ELISA 技术能够检测到植株叶片提取液中的病毒含量,而且有报道称植物的病毒含量与抗病性相关^[32-33],但是,显然 ELISA 检测也有与表型鉴定不一致的情况。因此在对 TuMV 的抗性鉴定中,ELISA 检测并不能作为唯一的检测标准,仅可以作为表型鉴定的辅助手段。

参考文献

- Lehmann P, Petzik K, Jenner C E, et al. Nucleotide and amino acid variation in the coat protein coding region of Turnip mosaic virus isolates and possible involvement in the interaction with the brassica resistance gene *TuRBO1* [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1997, 51: 195-208
- Green S K, Deng T C. Turnip mosaic-virus strains in cruciferous hosts in Taiwan [J]. *Plant Dis*, 1985, 69: 28-31
- 董金泉. 农业植物病理学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 361-364
- 李红双, 李锡香, 沈镛, 等. 萝卜优异种质对芜菁花叶病毒抗性的遗传分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(2): 152-156
- 汪隆植, 何启伟. 中国萝卜 [M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2005: 13-18
- Walsh J A, Sharpe A G, Jenner C E. Characterisation of resistance to Turnip mosaic virus in oilseed rape (*Brassica napus*) and genetic mapping of *TuRBO1* [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 1149-1154
- Walsh J A, Tomlinson J A. Viruses infecting winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) [J]. *Ann App Biol*, 1985, 107(3): 485-495
- Walsh J A. Genetic control of immunity to turnip mosaic virus in winter oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) and the effect of foreign isolates of the virus [J]. *Ann Appl Biol*, 1989, 115: 89-99
- Hughes S L, Green S K, Lydiate D J. 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
- Coutts B A, Walsh J A, Jones R A. Evaluation of resistance to Turnip mosaic virus in Australian *Brassica napus* genotypes [J]. *Crop Pasture Sci*, 2007, 58(1): 67-74
- 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展 [M]. 北京: 科学出版社, 1995: 5, 6, 22-25, 583-584, 624-626
- 刘佳, 冯兰香, 蔡少华, 等. 结球甘蓝对 TuMV 和黑腐病的抗性鉴定 [J]. *植物保护*, 1988(6): 3
- 李丽丽. 油菜病毒病. 中国农作物病虫害及其防治 [M]. 北京: 农业出版社, 1996: 869-873
- 李经略, 赵晓明, 李惠兰. 甘蓝苗期黑腐病菌致病性分化研究 [J]. *陕西农业科学*, 1990(3): 26-27
- 刘玉梅, 孙培田, 方智远, 等. 青花菜抗源材料的筛选和利用 [J]. *中国蔬菜*, 1996(6): 23-26
- 徐立彬. 大白菜对芜菁花叶病毒 (TuMV) 抗病性鉴定 [J]. *北方园艺*, 1996(6): 21-23
- 陈坤荣, 蔡丽, 许泽永, 等. 油菜品种和资源材料对芜菁花叶病毒的抗性鉴定 [J]. *中国油料作物学报*, 2006, 28(3): 350-353
- 任锡亮, 王毓洪, 孟秋峰, 等. 芥菜类蔬菜对芜菁花叶病毒病抗病性材料的鉴定及筛选 [J]. *中国瓜菜*, 2008(1): 25-26
- 石磊. 大白菜种质资源的病毒病 (TuMV) 抗性筛选鉴定及其 SSR 分子指纹技术的研究与应用 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2007
- 王晓伟, 李锡香, 张晓辉, 等. 不结球白菜种质资源对 TuMV 的抗性鉴定与评价 [J]. *植物遗传资源学报*, 2016, 17(2): 387-394
- Fujisawa I. Turnip mosaic virus strains in cruciferous crops in Japan [J]. *JARQ*, 1990, 23: 289-293
- Nyalugwe E P, Barbeti M J, Jones R A C. Studies on resistance phenotypes to Turnip mosaic virus in five species of Brassicaceae, and identification of a virus resistance gene in *Brassica juncea* [J]. *Eur J Plant Pathol*, 2015, 141: 647-666
- 汪隆植, 刘卫东, 李鸿渐. 夏秋萝卜抗芜菁花叶病毒品种资源的研究 [J]. *南京农业大学学报*, 1988, 11(3): 32-38
- 李焯, 罗玉明. 不同萝卜品种对 TuMV 抗性的苗期鉴定 [J]. *长江蔬菜*, 2000(12): 24-26
- 钱伟, 张淑江, 章时蕃, 等. 大白菜 TuMV 抗性的主基因 + 多基因混合遗传分析 [J]. *中国蔬菜*, 2012(12): 16-21
- 李锡香, 沈镛, 王海平, 等. 萝卜种质资源描述规范和数据标准 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2008
- 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
- 许文博, 黄家凤, 阮涛. 石河子地区加工番茄坏死条斑病毒原的 ELISA 检测及品种抗病性鉴定 [J]. *中国蔬菜*, 2009(10): 41-45
- 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 年华东植物病理学学术研讨会论文集. 杭州: 浙江省植物病理学会, 2005: 129-137
- 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, 27(1): 42-45
- 马伟伟. 芥菜抗芜菁花叶病毒种质鉴定与抗性基因定位研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2015
- Barker H, Solomon-Blackburn R M, McNicol J W. Resistance to potato leaf roll virus multiplication in potato is under major gene control [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 88(6-7): 754-758
- 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