

# 芸薹根肿菌及油菜根肿病分子检测与早期诊断

关格格<sup>1</sup>, 邢曼竹<sup>2</sup>, 庞文星<sup>2</sup>, 夏子豪<sup>1</sup>, 杨新宇<sup>1</sup>, 朴钟云<sup>2</sup>, 吴元华<sup>1</sup>, 梁月<sup>1\*</sup>

(1. 沈阳农业大学植物保护学院, 辽宁 沈阳, 110866; 2. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁 沈阳, 110866)

**摘要:**近年来芸薹根肿菌引起的根肿病已成为我国油菜的主要病害,严重影响油菜及其它十字花科作物的产量及品质。为建立一套在土壤、植物组织和种子中精准检测根肿菌的高效分子方法,利用根肿菌 ITS(internal transcribed spacer)序列,设计一对特异性引物(PbITS1),通过PCR反应优化体系进行根肿菌的分子检测及病害评估。结果表明,该引物及方法能够特异性检测根肿菌DNA,不受土传病原真菌、细菌、线虫及寄主植物内生菌的DNA干扰。灵敏性检测表明,模板DNA最低浓度达 $1\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,土壤带菌量最低为 $1 \times 10^3$ 个孢子/g土,种子带菌量最低 $1 \times 10^5$ 个孢子/g种子。此外,该体系能够用于检测油菜及其它十字花科寄主植物(如组织、种子)和土壤类型。同时,可用于田间油菜不同生长阶段油菜根部及周围土壤的根肿菌检测。本研究建立的检测体系操作简便、适用范围广、灵敏度高、特异性强,可检测样品种类丰富,可为油菜及其它十字花科根肿病的早期诊断、流行监测与预警、综合防控等提供科学依据。

**关键词:**芸薹根肿菌;分子检测;根肿病

中图分类号:S435.654;S432.4 文献标识码:A 文章编号:1007-9084(2019)03-0409-06

## Molecular detection and diagnosis of clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae* in oilseed rape

GUAN Ge-ge<sup>1</sup>, XING Man-zhu<sup>1</sup>, PANG Wen-xing<sup>2</sup>, XIA Zi-hao<sup>1</sup>, YANG Xin-yu<sup>1</sup>,  
PIAO Zhong-yun<sup>2</sup>, WU Yuan-hua<sup>1</sup>, LIANG Yue<sup>1\*</sup>

(1. College of Plant Protection, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China;

2. College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

**Abstract:** Clubroot has recently become one of the main diseases of oilseed rape and cruciferous crops in China, which seriously affected the yield of cruciferous crops. Therefore, an efficient method with a high efficiency for molecular detection of *P. brassicae* was developed for accurate diagnosis in various samples using a pair of specific primers (PbITS1) designed on ITS (internal transcribed spacer) sequence, and the molecular detection of *P. brassicae* and disease assessment were carried out by PCR procedure. The results indicated that PCR system could specifically detect *P. brassicae* without any amplification product from representative soil-borne pathogenic fungi, bacteria, nematodes and endophytes. Sensitivity assay showed that the minimum concentration of template DNA was  $1 \times 10^{-3}\text{ng}/\mu\text{L}$ , the minimum number of spores in the contaminated soil was  $1 \times 10^3$  spores/g soil, and the minimum level of spore with seeds was  $1 \times 10^5$  spores/g seeds. Moreover, rape and other cruciferous plants (e.g., tissues and seeds) and soils could be applied in this detection system, meanwhile roots and surrounding soils collected from the different growth stages could be used for disease assessment. The benefit of this detection system was convenient, sensitive and specific with a wide range of detectable samples, which provided insights on detection of *P. brassicae* as well as the diagnosis, monitoring epidemic pattern, and integrated management of clubroot.

**Key words:** *Plasmodiophora brassicae*; molecular detection; clubroot

收稿日期:2018-09-08

基金项目:国家油菜产业技术体系(CARS-12);辽宁省“兴辽英才计划”项目(XLYC1807242);沈阳农业大学引进人才科研启动费项目(20153040)

作者简介:关格格(1995-),女,硕士研究生,主要从事植物病理学及土传病害研究,E-mail:guangege1995@163.com

\*通讯作者:梁月(1978-),男,博士,教授,主要从事真菌学与植物病理学及土传病害研究,E-mail:liangyue@126.com

油菜根肿病是由芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) 引起的一种世界性土传病害。据报道,根肿病最早发生在欧洲南部和地中海西岸,1878年首次在俄国发现和报道;随后逐年蔓延,在全球十字花科作物产区每年造成 10% ~ 15% 的经济损失<sup>[1]</sup>。我国四川、湖南、江西、云南、安徽、辽宁等地区均有发生<sup>[2]</sup>。芸薹根肿菌属于原生动物界 (Protozoa) 根肿菌门 (Cercozoa) 植物寄生黏菌纲 (Phytophyxea) 根肿菌属 (*Plasmodiophora*)<sup>[3]</sup>。根肿菌属于专性寄生菌,在土壤含水量较高且偏酸性、适宜温度等环境下易于侵染并引起病害发生<sup>[4]</sup>。此外,根肿菌形成的休眠孢子能够在土壤中存活长达 7 年以上<sup>[5]</sup>。根肿菌主要危害寄主植物根部,侵染初期根部肿大且表面平滑,后期根部表面开裂,易与其它腐生菌一起造成腐烂并伴有腥臭味<sup>[6]</sup>。随着根肿病的发生日趋严重,建立一种高效、精准且易于操作推广的 PCR 检测体系,对根肿病菌的早期诊断、流行监测和病害防控等具有重要意义。

目前,国内外相继开展了根肿病诊断及病原菌检测技术研究,传统的植物测定、荧光显观察、血清学等检测方法因各自的技术局限性均未得到广泛应用<sup>[7]</sup>。目前,国内外普遍采用基于靶标核酸片段的分子扩增技术进行根肿病的常规诊断<sup>[7]</sup>。国外早期利用核酸多态性方法尝试发掘特异性靶标片段,但是由于扩增产物中存在大量寄主植物核酸片段,使其无法进行准确诊断<sup>[8]</sup>。其后,通过设计特异性引物并结合 PCR 技术,能够检测土壤及罹病样品中的根肿菌<sup>[9]</sup>,而我国早期研究主要集中在利用 PCR 方法初步定性检测单一样品 (寄主植物或土壤) 中的病菌<sup>[10, 11]</sup>。因此,建立一套操作简便、高效、精准,且能够广泛用于评估不同样品类型 (如土壤、植物组织及种子等) 的特异性 PCR 检测体系具有重要意义。PCR 与其他分子检测技术相比,具有快速、准确、成本低的特点。本研究通过设计特异性引物并优化建立一套 PCR 检测体系,达到对芸薹根肿菌高效、精准检测目的,易于推广,为油菜及其它十字花科根肿病的早期诊断及病害流行预警等提供科学依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

植物材料:健康及罹病植株油菜 (*Brassica napus*, 安徽绩溪), 大白菜 (*B. rapa* var. *pekinensis*, 河南新野), 茼蒿芥 (*B. juncea*, 重庆涪陵)。种子包括油菜 (*B. napus*, 浙平 4 号, 合肥丰乐)、大白菜 (*B. rapa*,

91-12, 大连水师营)、甘蓝 (*B. oleracea*, 中甘 11, 北方甘蓝研究所)、青梗白菜 (*B. rapa* subsp. *chinensis*, 美惠, 北京硕源,)、小白菜 (*B. campestris*, 四季青梗, 金宇盛辉)、萝卜 (*Raphanus sativus*, 南韩小白萝卜, 鑫东方农业)。

植物病原物及内生菌:选取部分土传植物病原物及罹病寄主植物体内分离的内生菌,真菌包括链格孢菌 (*Alternaria alternata*)、灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*)、毁灭炭疽菌 (*Colletotrichum destructivum*)、燕麦镰孢菌 (*Fusarium avenaceum*)、大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*)、丝核菌 (*Rhizoctonia solani*)、核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*);细菌包括土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*)、果胶杆菌 (*Pectobacterium carotovorum*)、青枯雷尔氏菌 (*Ralstonia solanacearum*)、柑橘黄单胞菌 (*Xanthomonas citri*);大豆胞囊线虫 (*Heterodera glycines*) 和罹病油菜根部分离的内生细菌肠杆菌 (*Enterobacter hormaechei*)、芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)。供试菌株保藏于沈阳农业大学植物保护学院真菌学研究室。

土壤及根组织样品:采自安徽绩溪 (N30.08°, E118.67°)、湖北宜昌 (N30.43°, E111.76°)、辽宁新民 (N41.83°, E123.02°) 的病田土壤样品作为南北方代表土壤类型,同时采集处于不同生长阶段油菜 (播种后 15、30 和 45d) 的根组织及周围土壤。

### 1.2 方法

1.2.1 PCR 模板制备 供试真菌在马铃薯葡萄糖培养基 (马铃薯 200g, 葡萄糖 20g, ddH<sub>2</sub>O 1000mL) 培养 4d 后,利用 CTAB 法提取真菌基因组 DNA。细菌 28℃ 液体摇培 12h 后利用细菌试剂盒 (Bacteria Genomic DNA Kit, CWBio) 提取 DNA。线虫采用单条线虫 DNA 制备法<sup>[12]</sup>。根肿菌 DNA 采用真菌试剂盒提取 (FastDNA Spin Kit, CWBio)<sup>[9]</sup>。

1.2.2 引物设计 根据芸薹根肿菌 *P. brassicae* 基因组 (accession number GCA\_001049375.1) 中 ITS 序列,利用软件 Primer 5.0 并人工修正设计引物 PbITS1 - F (5' - GAACGGGTTACAGACTAGATAGCAGTG - 3') 和 PbITS1 - R (5' - TATGCCGCAGCAAAGCTCATTGTCT - 3')。

1.2.3 PCR 反应条件 以 10ng DNA 作为模板,PCR 反应体系 20μL。反应条件:预变性 95℃ 2min;变性 95℃ 30s,退火梯度 50 ~ 70℃ (间隔 2℃) 30s,72℃ 延伸 30s,35 个循环;72℃ 延伸 10min;4℃ 保存。PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.4 引物特异性检测 选取芸薹根肿菌和其它

真菌、细菌、线虫及内生菌 DNA 作为模板,同时以 ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照,检测引物的特异性。

**1.2.5 引物灵敏性检测** 将定量后根肿菌 DNA 按梯度稀释,终浓度分别为 10ng · μL<sup>-1</sup>、1ng · μL<sup>-1</sup>、100pg · μL<sup>-1</sup>、10pg · μL<sup>-1</sup>、8pg · μL<sup>-1</sup>、5pg · μL<sup>-1</sup>、2pg · μL<sup>-1</sup>、1pg · μL<sup>-1</sup>、100fg · μL<sup>-1</sup>,以 ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照,用于检测 PCR 反应的 DNA 模板灵敏度。另外,为检测 PCR 反应体系对土壤中根肿菌孢子含量的灵敏性,将 2.5 × 10<sup>8</sup> 个休眠孢子混入 0.25g 土中,制成初始样品 1 × 10<sup>9</sup> 孢子/g 土,利用土壤 DNA 核酸提取试剂盒(DNeasy PowerSoil Pro Kit, QIAGEN)提取土壤 DNA 并梯度稀释成 1 × 10<sup>8</sup>、1 × 10<sup>7</sup>、1 × 10<sup>6</sup>、1 × 10<sup>5</sup>、1 × 10<sup>4</sup>、1 × 10<sup>3</sup>、1 × 10<sup>2</sup> 个孢子/g 土壤样品,以 ddH<sub>2</sub>O 作为阴性对照,以评估 PCR 反应体系对土壤中根肿菌孢子含量的检测灵敏性。

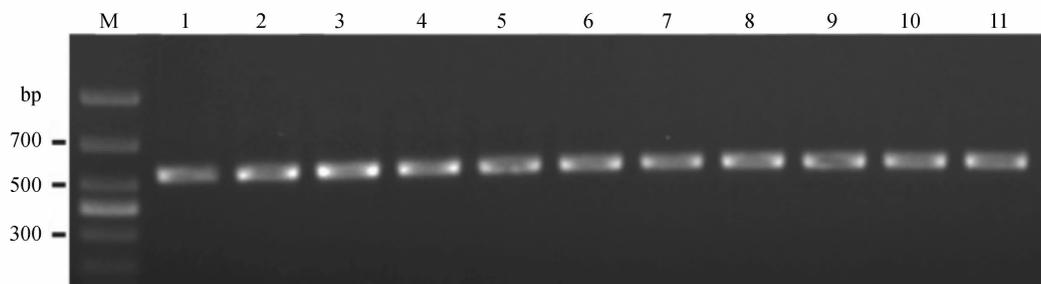
**1.2.6 不同类型样品的带菌检测** 通过对不同类型样品进行带菌检测,包括寄主植物(健康及自然发病的油菜、白菜、甘蓝、茎瘤芥和萝卜)及种子(油菜、大白菜、甘蓝、青梗白菜、小白菜、萝卜),将根肿

菌休眠孢子与种子混合,制备 1 × 10<sup>5</sup> 个休眠孢子/g 种子样品)<sup>[9,13]</sup>,不同生长阶段油菜田的土壤及油菜根组织(如播种后 15d、30d 和 45d),发病田土(采自辽宁新民发病白菜田块及安徽绩溪发病油菜田块、湖北宜昌发病油菜田块),通过植物基因组 DNA 提取试剂盒(DNAsecure Plant Kit, TIANGEN)和土壤 DNA 提取试剂盒提取 DNA 并进行 PCR 检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 PCR 扩增与优化

比较芸薹根肿菌数据库中不同登录号 ITS 序列,设计特异性引物,PCR 扩增靶标核酸片段大小为 539bp。通过 PCR 产物回收并连接载体后进行测序,结果表明 PCR 扩增产物序列与数据库中靶标片段序列一致。另外,通过优化 PCR 反应退火温度发现,退火温度在 50 ~ 70℃ 之间均能够扩增专一性条带(图 1),表明该 PCR 体系中引物特异性高,且对反应条件及仪器设备的控温条件要求不高,易于操作。



注: M; Marker; 1 - 11 分别为退火温度为 50、52、54、56、58、60、62、64、66、68 和 70℃ 时 PCR 扩增产物

Note: M; Marker; 1 - 11: Amplification products at the anneal temperature of 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68 and 70℃

图 1 PCR 反应条件(退火温度)优化

Fig. 1 Optimization of annealing temperature in PCR reaction

### 2.2 引物特异性

以供试病原物等样品 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,结果表明特异性引物只对芸薹根肿菌 *P. brassicae* 模板 DNA 进行有效扩增,而其它真菌、细菌、

线虫、内生菌及阴性对照均未出现扩增产物(图 2),说明 PCR 检测中利用的引物对芸薹根肿菌 *P. brassicae* 具有较高的特异性。



注: M; Marker; 1: 芸薹根肿菌; 2: 核盘菌; 3: 灰葡萄孢菌; 4: 毁灭炭疽菌; 5: 丝核菌; 6: 燕麦镰孢菌; 7: 格孢菌; 8: 大豆疫霉菌; 9: 土壤杆菌; 10: 丁香假单胞菌; 11: 柑橘黄单胞菌; 12: 果胶杆菌; 13: 青枯雷尔氏菌; 14: 肠杆菌; 15: 芽孢杆菌; 16: 大豆胞囊线虫; 17: ddH<sub>2</sub>O

Note: M; Marker; 1: *Plasmodiophora brassicae*; 2: *Sclerotinia sclerotiorum*; 3: *Botrytis cinerea*; 4: *Colletotrichum destructivum*; 5: *Rhizoctonia solani*; 6: *Fusarium avenaceum*; 7: *Alternaria alternata*; 8: *Phytophthora sojae*; 9: *Agrobacterium tumefaciens*; 10: *Pseudomonas syringae*; 11: *Xanthomonas citri*; 12: *Pectobacterium carotovorum*; 13: *Ralstonia solanacearum*; 14: *Enterobacter hormaechei*; 15: *Bacillus megaterium*; 16: *Heterodera glycines*; 17: ddH<sub>2</sub>O

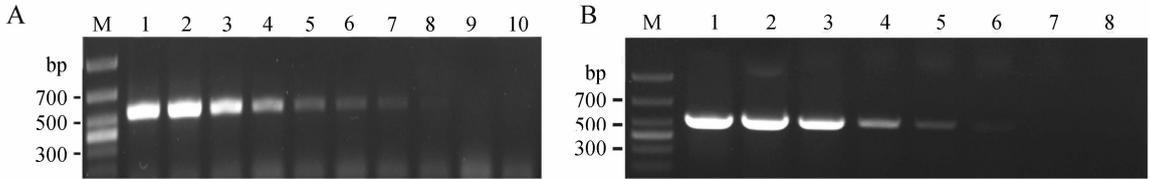
图 2 引物特异性

Fig. 2 Specific detection of *Plasmodiophora brassicae*

### 2.3 引物灵敏度

将提取的芸薹根肿菌 DNA 定量后,分别稀释成不同浓度进行 PCR 扩增。PCR 反应的模板 DNA 浓度下限为  $1\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,同时扩增条带亮度随模板浓度降低呈由强渐弱(图 3A),模板 DNA 浓度在  $100\text{fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  及阴性对照无法进行有效扩增。此外,将含有不同浓度根肿菌孢子土壤样品中提取的 DNA 作

为模板进行 PCR 检测,进一步评估 PCR 反应体系检测土壤中根肿菌孢子含量的灵敏性。该反应体系检测的土壤中根肿菌孢子含量下限为  $1 \times 10^3$  个孢子/g 土样(图 3B),而土壤孢子含量在  $1 \times 10^2$  个孢子/g 土样及阴性对照的模板未出现扩增条带,表明 PCR 检测体系对根肿菌 DNA 及土壤中病原菌孢子具有较高灵敏性。



注:A:以不同浓度 DNA 为模板进行检测;B:以含不同浓度根肿菌孢子的土样中提取的 DNA 作为模板进行检测

Note: A: Sensitivity of DNA template; M: Marker; 1:  $10\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; 2:  $1\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; 3:  $100\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; 4:  $10\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; 5:  $8\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; 6:  $5\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; 7:  $2\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; 8:  $1\text{pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; 9:  $100\text{fg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ; 10: ddH<sub>2</sub>O. B: Sensitivity of spores in soil. M: Marker; 1:  $1 \times 10^8$  spores/g; 2:  $1 \times 10^7$  spores/g; 3:  $1 \times 10^6$  spores/g; 4:  $1 \times 10^5$  spores/g; 5:  $1 \times 10^4$  spores/g; 6:  $1 \times 10^3$  spores/g; 7:  $1 \times 10^2$  spores/g; 8: ddH<sub>2</sub>O

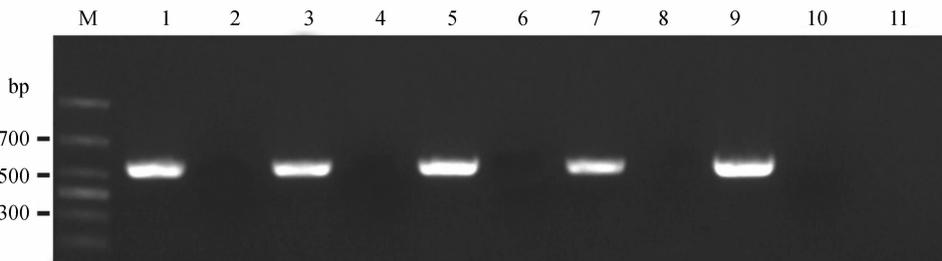
图 3 PCR 反应模板 DNA 及土壤带菌检测灵敏度

Fig. 3 Sensitivity of PCR detection from template DNA and soil containing *Plasmodiophora brassicae*

### 2.4 不同类型样品的带菌检测

对罹病及健康的油菜及其它十字花科寄主植物根部组织样品进行 PCR 检测,罹病寄主植物均能够扩增出特异性条带,而健康植株及阴性对照则未出现扩增条带(图 4),表明特异性引物及 PCR 反应体系不受寄主植物影响。同时,对混有根肿菌孢子的油菜及其它十字花科寄主植物种子样品进行 PCR 检测(图 5),该特异性引物也不受寄主植物种子的影响,能够用于油菜及其它十字花科寄主植物的种

子带菌检测。此外,对南北方不同类型病田土壤样品进行带菌检测,发现不同类型土壤中均能够扩增特异性条带(图 6),表明不同土壤中均含有根肿菌且 PCR 反应不受土壤类型影响,能够广泛用于不同土壤类型的根肿菌检测。不同生长阶段油菜种植田的土壤及根组织进行检测,结果表明特异性引物及 PCR 体系能够用于不同发病阶段的常规检测,其中土壤中根肿菌群体数量减少而寄主组织中的数量却不断增多(图 7)。



注:M: Marker; 1-11 扩增模板 DNA 分别来自于,1:感病油菜;2:健康油菜;3:感病白菜;4:健康白菜;5:感病甘蓝;6:健康甘蓝;7:感病茎瘤芥;8:健康茎瘤芥;9:感病萝卜;10:健康萝卜;11: ddH<sub>2</sub>O

Note: M: Marker; 1: Diseased rape; 2: Health rape; 3: Diseased Chinese cabbage; 4: Health Chinese cabbage; 5: Diseased cabbage; 6: Health cabbage; 7: Diseased tumorous stem mustard; 8: Health tumorous stem mustard; 9: Diseased radish; 10: Health radish; 11: ddH<sub>2</sub>O

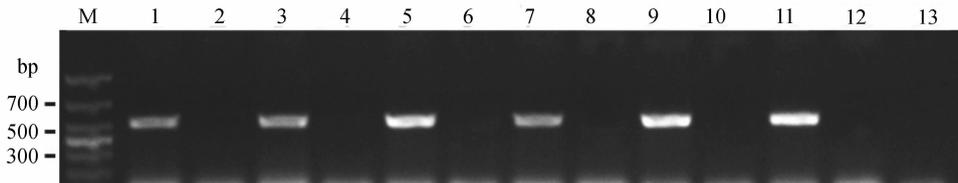
图 4 油菜及其它十字花科寄主植物带菌检测

Fig. 4 Detection of *Plasmodiophora brassicae* from oilseed rape and other cruciferous plants

## 3 讨论与结论

随着分子生物学研究发展,PCR 技术因其快速、简便、准确的特点,已被广泛用于植物病害诊断、病原物鉴定与检测、生态监测等方面<sup>[14]</sup>。本研究针对芸薹根肿菌设计特异性引物并建立一套优化的 PCR 检测系统,具有易于操作、特异性强、检测样品

类型丰富的特点,可实现对不同土壤、种子及寄主植物的早期病害诊断及带菌检测,为根肿病的早期预警、流行监测及病害防控奠定技术基础。尽管国外初步实现利用 PCR 技术对白菜、萝卜的罹病根组织的带菌检测,但未开展土壤检测<sup>[15]</sup>。国内学者也曾探索利用 ITS 通用引物,通过 PCR 反应对部分十字花科蔬菜进行根肿菌带菌检测,但未能尝试评估

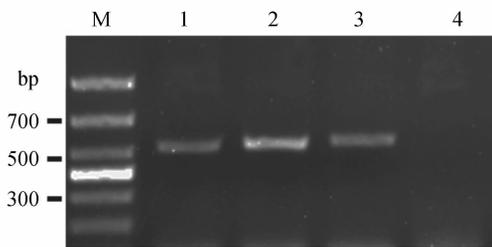


注: M; Marker; 1~13 为将根肿菌休眠孢子与种子混合, 制备  $1 \times 10^5$  个体休眠孢子/g 种子样品。1, 2: 分别为感病、健康的油菜种子; 3, 4: 分别为感病、健康的大白菜种子; 5, 6: 分别为感病、健康的萝卜种子; 7, 8: 分别为感病、健康的甘蓝种子; 9, 10 分别为感病、健康的白菜种子; 11, 12: 分别为感病、健康的小白菜(四季青梗); 13: ddH<sub>2</sub>O

Note: M; Marker; 1, 2: Diseased and health rape; 3, 4: Diseased and health napa cabbage; 5, 6: Diseased and health radish; 7, 8: Diseased and health cabbage; 9, 10: Diseased and health Bok - choy; 11, 12: Diseased and health non-heading Chinese cabbage; 13: ddH<sub>2</sub>O

图 5 油菜及其它十字花科寄主植物种子带菌检测

Fig. 5 Detection of *Plasmodiophora brassicae* from oilseed rape and cruciferous plant seeds



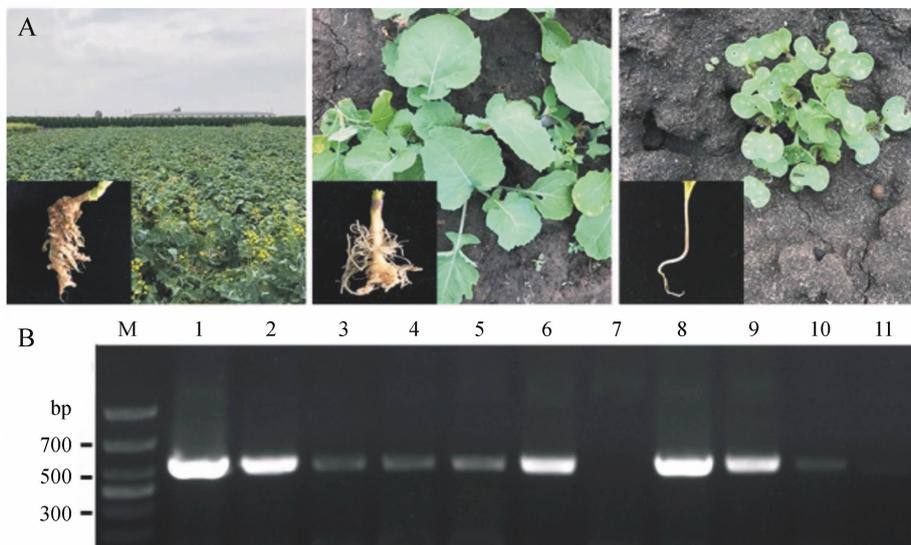
注: M; Marker; 1: 辽宁辽宁新民发病白菜田块; 2: 安徽绩溪发病油菜田块; 3: 湖北宜昌发病油菜田块; 4: ddH<sub>2</sub>O

Note: M; Marker; 1: Xinmin, Liaoning Province; 2: Jixi, Anhui Province; 3: Yichang, Hubei Province; 4: ddH<sub>2</sub>O

图 6 不同类型病田土壤带菌检测

Fig. 6 Detection of *Plasmodiophora brassicae* from different types of the contaminated soil samples

种子、土壤及田间的带菌检测<sup>[10]</sup>。本研究 PCR 反应灵敏性评估表明, 根肿菌模板 DNA 的最低浓度可达  $1 \text{ pg} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ , 土壤中根肿菌孢子最低浓度为  $10^3$  个孢子/g 土样。目前, 根肿菌土壤孢子检测灵敏度国外报道为  $1 \times 10^3$  个孢子/g 土<sup>[9]</sup>, 而国内则为  $1 \times 10^4$  个孢子/g 土<sup>[11]</sup>。同时, 国内外研究表明田间土壤中孢子浓度在  $1 \times 10^3$  个孢子/g 土水平时, 寄主植物根部不表现根部肿大等症<sup>[16]</sup>, 但当土壤中孢子浓度达到  $1 \times 10^5$  个孢子/g 土或者以上时, 建议采取相应防控措施<sup>[17]</sup>。此外, 根肿菌存在不同生理小种现象, 本研究基于 ITS 保守序列建立的检测体系可能适用于不同生理小种的根肿菌检测<sup>[18]</sup>。土



注: A: 从左到右依次为播种后 45、30、15d 田间生长及罹病根组织; B: PCR 扩增。M; Marker; 1, 4: 分别以播种后 45d 油菜根组织和土壤中提取的 DNA 为模板的扩增产物; 2 和 5 分别以播种后 30d 油菜根组织和土壤中提取的 DNA 为模板的扩增产物; 3 和 6 为分别以播种后 15d 油菜根组织和土壤中提取的 DNA 为模板的扩增产物; 7: ddH<sub>2</sub>O; 8-11: Amount of  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  spores/g soil

Note: A: Different growth stages (45, 30, 15 days after seeding from the left to right) with rape roots; B: PCR assay. M; Marker; 1, 4: Root and soil sample collected at 45 day after seeding; 2, 5: Root and soil sample collected at 30 day after seeding; 3, 6: Root and soil sample collected at 15 day after seeding; 7: ddH<sub>2</sub>O; 8-11: Amount of  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^3$  spores/g soil

图 7 不同生长阶段油菜种植田的土壤及根组织带菌检测

Fig. 7 Assessment of rape at different growth stages and soil contaminated with *Plasmodiophora brassicae*

壤及寄主植物中病原菌的快速可靠检测及定量分析是芸薹根肿菌研究及根肿病防控的关键之一<sup>[19]</sup>,包括组织荧光染色、血清学检测、定量 PCR 及环介导等温扩增(LAMP)技术等。本研究利用芸薹根肿菌 ITS 序列设计特异性引物,优化并建立 PCR 检测体系,具有操作简便、特异性强、灵敏度高、适用范围广(不同土壤类型)、样品种类丰富(如土壤、植物组织、种子等)等特点,为芸薹根肿菌引起的油菜及其它十字花科根肿病的早期诊断、流行监测与预警、综合防控等提供科学依据。

### 参考文献:

- [1] Dixon G R. The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease [J]. J Plant Growth Regul, 2009, 28(3): 194 – 202.
- [2] Chai A L, Xie X W, Shi Y X, et al. Research status of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on cruciferous crops in China [J]. Can J Plant Pathol, 2014, 36(sup1): 142 – 153.
- [3] Cavalier – Smith T, Chao E Y. Phylogeny and classification of phylum cercozoa (Protozoa) [J]. Protist, 2003, 153(3/4): 341 – 358.
- [4] Dixon G R. *Plasmodiophora brassicae* in its environment [J]. J Plant Growth Regul, 2009, 28(3): 212 – 228.
- [5] Karling J S. The Plasmodiophorales [J]. Science, 1968, 99(2572): 299 – 301.
- [6] Dixon G R. The biology of *Plasmodiophora brassicae* Wor. – a review of recent advances [J]. Acta Hort, 2006(706): 271 – 282.
- [7] Faggian R, Strelkov S E. Detection and measurement of *Plasmodiophora brassicae* [J]. J Plant Growth Regul, 2009, 28(3): 282 – 288.
- [8] Buhariwalla H, Greaves S, Magrath R, et al. Development of specific PCR primers for the amplification of polymorphic DNA from the obligate root pathogen *Plasmodiophora brassicae* [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1995, 47(2): 83 – 94.
- [9] Cao T S, Tewari J, Strelkov S E. Molecular detection of *Plasmodiophora brassicae*, causal agent of clubroot of crucifers, in plant and soil [J]. Plant Dis, 2007, 91(1): 80 – 87.
- [10] 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.
- [11] 尹全,宋君,刘勇,等. 土壤根肿病菌休眠孢子 PCR 快速检测方法的建立 [J]. 西南农业学报, 2010, 23(2): 390 – 392.
- [12] 王江岭,张建成,顾建锋. 单条线虫 DNA 提取方法 [J]. 植物检疫, 2011, 25(2): 32 – 35.
- [13] Rennie D C, Manolii V P, Cao T, et al. Direct evidence of surface infestation of seeds and tubers by *Plasmodiophora brassicae* and quantification of spore loads [J]. Plant Pathol, 2011, 60(5): 811 – 819.
- [14] 杨佩文,杨勤忠,王群,等. 十字花科蔬菜根肿病菌的 PCR 检测 [J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(2): 137 – 139, 157.
- [15] Chee H Y, Kim W G, Cho W D, et al. Detection of *Plasmodiophora brassicae* by using polymerase chain reaction [J]. Kor J Plant Pathol, 1998, 14: 589 – 593.
- [16] 杨华. 湖南十字花科蔬菜品种抗根肿病鉴定、病菌小种及 qPCR 土壤病菌检测技术研究 [D]. 长沙: 湖南农业大学, 2014.
- [17] 杜艳,刘邮洲,李建斌,等. 十字花科根肿病研究现状及展望 [J]. 江苏农业科学, 2014, 42(10): 122 – 126.
- [18] 刘勇,罗一帆,黄小琴,等. 芸薹根肿菌生理小种鉴别方法研究进展 [J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(4): 420 – 426.
- [19] Hwang S F, Strelkov S E, Feng J, et al. *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop [J]. Mol Plant Pathol, 2012, 13(2): 105 – 113.

(责任编辑:王丽芳)