

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2023.09.007

刘霄芸, 杨志强, 朱运, 等. 结球甘蓝黑腐病抗性评价及鉴定方法比较研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2023, 45(9): 67-75.

结球甘蓝黑腐病抗性评价及鉴定方法比较研究

刘霄芸, 杨志强, 朱运, 彭奥,
任雪松, 司军, 宋洪元, 李勤菲

西南大学 园艺园林学院/重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400715

摘要: 黑腐病是由野油菜黄单胞菌野油菜致病变种引起的细菌性病害, 是为害结球甘蓝的产量与品质的主要病害之一。尽管黑腐病的病原菌有多个生理小种, 但是世界上黑腐病的发生主要是由 *Xcc1* 和 *Xcc4* 引起的, 而甘蓝中抗 *Xcc1* 和 *Xcc4* 的种质资源相对较少。为了明确重庆地区的黑腐病病原菌, 筛选抗黑腐病的甘蓝种质, 本研究首先利用分子标记辅助鉴定重庆地区病原菌, 然后采用离体整叶喷雾接种法评价 30 份甘蓝资源的抗病性, 对筛选出的抗病种质采用离体叶片打孔喷雾法和滴接法复检, 以及分子标记辅助鉴定。结果发现, 重庆地区黑腐菌为 *Xcc1* 生理小种; 离体整叶喷雾接种法接种 16 d 后, 1 份甘蓝材料(S18)表现为抗病, 6 份为耐病(S18S, S232, S23S, 165, 167, 169); 相比离体叶片打孔喷雾法, 打孔滴接法能更准确区分抗病材料(S18)和耐病材料(S232); 抗病材料(S18)和耐病材料(S232)均不含来自埃塞俄比亚芥抗黑腐病标记, 但是它们同时具有 BR6-InDel 分子标记。该研究结果确定了重庆地区黑腐病病原菌生理小种为 *Xcc1*, 筛选出了抗该生理小种的甘蓝种质, 明确了快速鉴定黑腐病抗性的方法, 可为甘蓝抗黑腐病的种质创新和新品种选育提供技术支撑。

关键词: 甘蓝; 黑腐病; 生理小种 *Xcc1*; 抗病性; 鉴定方法

中图分类号: S635.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2023)09-0067-09

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Evaluation Black Rot Resistance and Comparison Identification Methods in Cabbage

LIU Xiaoyun, YANG Zhiqiang, ZHU Yun, PENG Ao,
REN Xuesong, SI Jun, SONG Hongyuan, LI Qinfei

College of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University/Chongqing Key Laboratory of
Olericulture, Chongqing 400715, China

Abstract: Black rot is one of the main bacterial diseases decreasing the yield and quality of cabbage, which

收稿日期: 2023-03-23

基金项目: 川渝联合实施重点研发项目(cstc2021jscx-cylh0001); 四川省科技计划资助项目(2022YFQ0031).

作者简介: 刘霄芸, 硕士研究生, 主要从事甘蓝分子育种研究.

通信作者: 李勤菲, 副教授.

is caused by *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. Among the multiple races of black rot disease pathogen, *Xcc1* and *Xcc4* are two main races in the world. However, only a few resources resistant to *Xcc1* and *Xcc4* have been found in cabbage. To investigate the black rot pathogen in Chongqing and found black rot resistant germplasm in cabbage, the race of black rot pathogen in Chongqing was identified by molecular marker-assisted identification. The resistance of 30 cabbage lines was identified by in vitro whole leaf spraying inoculation. Then, the resistant line was re-identified by in vitro punching dripping and spraying inoculation, and molecular marker-assisted identification. The results showed that the race of black rot in Chongqing was *Xcc1*. S18 was resistant, and S18S, S232, S23S, 165, 167, 169 were tolerant to black rot identified after 16 days of investigation via in vitro whole leaf spraying inoculation. Compared to in vitro punching spraying inoculation, the punching dripping inoculation can more accurately distinguish the resistant material. Neither the resistant line (S18) nor the tolerance line (S232) owned the black rot resistant marker derived from *Brassica carinata*, but both them had the BR6-InDel molecular marker. These results indicated that the race of the black rot pathogen in the Chongqing area was *Xcc1*, cabbage germplasm resistant to *Xcc1* was screened, and a rapid method for identifying black rot resistant lines was evaluated, which would provide technical support for germplasm innovation and breeding new varieties resistant to black rot in cabbage.

Key words: cabbage; black rot; physiological race *Xcc1*; disease resistance; identification methods

结球甘蓝在我国广泛种植,是十字花科芸薹属重要的蔬菜作物之一^[1].黑腐病是为害甘蓝生产的主要细菌性病害之一,病原菌为野油菜黄单胞菌野油菜致病变种(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*),简称为“*Xcc*”^[2].黑腐病病原菌为水孔侵入,侵染子叶时呈水浸状,然后迅速蔓延至真叶^[3];侵染真叶时,病菌多从叶缘侵入,病斑从叶缘的褪绿斑点逐渐向叶片的主脉扩张,形成“V”形病斑,颜色从黄色逐渐变为褐色^[3-4].黑腐病病菌也可从伤口侵入,在叶侵染部位形成不规则的淡褐色病斑^[5].近年来,黑腐病在我国甘蓝主产区普遍发生,直接为害甘蓝的叶片和叶球,对甘蓝生产造成严重为害^[6].尽管可通过轮作换茬、喷施药物防护等方式加强田间管理以预防黑腐病的发生,但通过农业措施防治黑腐病效果微弱且会增加管理成本,而药物防治又具有容易产生抗药性、增加环境污染和农药残留等问题^[7].因此,种植抗黑腐病甘蓝品种成为防治该病最经济有效的措施.

黑腐病病原菌有 11 个生理小种^[8-9],其中,*Xcc1* 和 *Xcc4* 是世界上黑腐病发生的主要生理小种^[4, 10-11].甘蓝中存在少量抗 *Xcc1* 的种质^[12-13],但是抗 *Xcc1* 和 *Xcc4* 的资源相对较少^[14-15].然而,甘蓝的野生种和近缘种中存在大量抗黑腐病的资源.研究发现,甘蓝野生种 *Brassica montana* “UNICT5169”和 *Brassica balearica* “PI435896”高抗 *Xcc4*,与花椰菜杂种 F_2 的抗性表现为数量性状遗传^[16].埃塞俄比亚芥“NPC-9”抗 *Xcc1*,“PI199947”抗 *Xcc1* 和 *Xcc4*,At1g70610 标记可以用于其与花椰菜杂种的黑腐病抗性辅助鉴定^[10, 15, 17-18].Bhatia 等^[19]发现埃塞俄比亚芥 *Xcc1* 和 *Xcc4* 生理小种的抗性存在多基因遗传,在 *Brassica oleracea* $\times$ *Brassica carinata* 的小孢子培养后代中,所有连锁群为 B7 和 B5 的植株均具有对 *Xcc1* 的抗性,连锁群为 B6 和 B2 的杂种后代则具有对 *Xcc4* 的抗性,而缺乏这两个连锁群的株系对 *Xcc4* 表现为易感.Tonguç 等^[20]在芥菜中也发现抗 *Xcc1* 和 *Xcc4* 的种质“A19182”和“A19183”,其与甘蓝的杂种 F_1 和 BC_1 抗 *Xcc1* 和 *Xcc4*.在抗黑腐病甘蓝(“SCNU-C-3470”)C08 染色体上发现了抗病基因 *Bol031422*,BR6-InDel 标记可用于 *Xcc6* 和 *Xcc7* 的抗性辅助选择^[14].这些丰富的资源和分子标记为甘蓝黑腐病的抗性鉴定和改良提供了重要的支撑.

翟文慧^[21]曾通过鉴别寄主法对我国 11 个地区的十字花科蔬菜黑腐病菌的生理小种分化进行了研究,发现我国黑腐病病原菌大部分为 *Xcc1* 和 *Xcc4*,西南地区的十字花科黑腐病病原菌主要是 *Xcc1*,但尚未发现利用分子标记辅助鉴定重庆地区黑腐病病原菌生理小种的相关研究.另外,抗性鉴定是筛选抗黑腐病材

料十分重要的环节,甘蓝黑腐病抗性鉴定体系主要采用苗期接种法和离体整叶接种法.针对种子量极少或植株长势差的材料,苗期接种法和离体整叶接种法的操作性受限,可是采用离体叶片滴接法和喷雾法能快速实现甘蓝黑腐病的苗期鉴定^[22].本研究首先采用分子标记辅助鉴定重庆地区黑腐病病原菌生理小种,再将其用离体叶片喷雾法接种于 30 份结球甘蓝材料上^[23],筛选出抗黑腐病的甘蓝材料,然后利用叶片打孔滴接法和打孔喷雾法,对甘蓝黑腐病抗性进行验证,以期建立一套高效快捷的甘蓝黑腐病抗性鉴定方法,为甘蓝抗黑腐病的种质创新和新品种选育提供技术保障.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌种来源

甘蓝黑腐病菌(*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*),为黄单胞杆菌属,甘蓝黄色杆菌,是重庆菌株,由西南大学植物保护学院提供.

1.1.2 甘蓝材料来源

由西南大学十字花科蔬菜研究所提供的 30 份结球甘蓝材料,以感病品种“西园四号”作为对照.

1.2 试验方法

1.2.1 菌种纯化与菌悬液制备

用平板划线法将甘蓝黑腐病菌株接种于 NA 培养基上,在 28 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h 后取出,挑选其中的单菌落用平板划线法再次接种于新的 NA 培养基上,置于 28 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h,重复 3 次.挑选最后一次得到的平板上的单菌落转管并封装,放置于-80 ℃ 冰箱中保存备用.进行接种试验之前,将封装保存于-80 ℃ 冰箱中的甘蓝黑腐病菌株取出,用 NA 培养液培养并在摇床上摇菌 24 h,后利用血球计数板将菌株制备成浓度为 1.0×10^8 cfu/mL 的菌悬液,放置在 4 ℃ 冰箱中保存备用^[23].

1.2.2 整叶喷雾法

于甘蓝莲座期前,选取 30 份结球甘蓝和对照植株从里到外数的第 3 片叶,贴上标签,其中每份材料选取 30 个单株,用于整叶喷雾法鉴定^[24].在培养架上放置湿毛巾,将离体叶片置于湿毛巾上,将提前准备好的菌液装入喷壶中,均匀喷施于叶片表面,然后用塑料薄膜覆盖,四周用夹子和砖块固定,使其内部保持高湿状态,防止水分蒸发.调节接种室内温度至 25 ℃,给予材料最佳的发病环境.每隔 2 d 观察一次并拍照,至叶片完全枯萎时统计病斑大小,筛选抗性材料.

1.2.3 打孔喷雾法

根据整叶喷雾法筛选出极端抗黑腐病的结球甘蓝材料,随机选取 3 个单株的 3 片叶片,使用直径 1.4 cm 孔径的打孔器在每片叶子上对称打孔 20 个,形成叶盘.将 90 mm 培养皿洗净并垫上滤纸保湿,每皿放置 10 个叶盘.用装有菌液的喷壶均匀喷施叶盘,盖好培养皿,放置于保鲜盒中,置于 25 ℃ 接种箱中,5 d 后统计病斑大小.

1.2.4 打孔滴接法

将每片叶片剩下的 10 个叶盘放置于培养皿中,使用移液枪滴 20 μ L 菌液于叶片中央.盖好培养皿,放置于保鲜盒中,置于 25 ℃ 接种箱中,5 d 后统计病斑大小.

1.2.5 抗性鉴定

1) 测量整叶或叶盘长度,病斑的发病点到病斑末端的长度,病斑大小=病斑长度/叶片长度 $\times$ 100%.同时按黑腐病抗性分级标准^[23-25]进行分级.

I 病情分级标准.

- 0 级: 没有病斑;
- 1 级: 叶片有黑色枯死点,无扩展;
- 3 级: 枯死点向外扩展,25% 以下;

5 级：枯死点向外扩展，25%~50%；
7 级：枯死点向外扩展，50%~75%；
9 级：枯死点向外扩展，75%以上。

病情指数=100×Σ(各级病叶数×各级代表值)/(调查总叶数×最高级代表值)。

II 抗性分级标准.

免疫(I)：病情指数 0.00；
高抗(HR)：0<病情指数≤11.11；
抗病(R)：11.11<病情指数≤33.33；
耐病(T)：33.33<病情指数≤55.55；
感病(S)：55.55<病情指数≤67.77；
高感(HS)：67.77<病情指数≤100.

考虑到离体整叶喷雾法发病条件极端，需要对其抗性分级标准进行调整，以便适应株系的真实抗性，调整后如下。

免疫(I)：病情指数 0.00；
高抗(HR)：0<病情指数≤22.22；
抗病(R)：22.22<病情指数≤44.44；
耐病(T)：44.44<病情指数≤77.77；
感病(S)：77.77<病情指数≤100.

2) 分子标记辅助选择

重庆本土黑腐菌的分子标记鉴定采用 Rubel 等^[26]以及 Afrin 等^[27]的方法，略作修改。其中，Xcc-47R1 (1 089 bp)鉴定 *Xcc1* 生理小种，XccR3-49(867 bp)和 XccR3-52(1 889 bp)鉴定 *Xcc3* 生理小种，Xcc1-46R4 (462 bp)和 Xcc2-46R4(578 bp)鉴定 *Xcc4* 生理小种。甘蓝黑腐病抗性采用来自埃塞俄比亚芥的黑腐病抗性标记(Black rot 3, Black rot 6)(本实验室开发)^[28]和甘蓝中的分子标记(BR6-InDel^[14])进行分子标记辅助选择。具体引物信息见表 1。

表 1 黑腐病标记引物序列

引物名称	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Black rot 3	ACAAATTGTGTACAATGGTGGCT	GGATGAGCCTGCTGTCACTT
Black rot 6	GTGCGTGGCTTCTTCCTTTT	ACAGCGTTTCCTCATTCGT
BR6-InDel	TGGGGTGA CTGAAACTCCTAT	TCATTCTGATTATCCTCGTCATCT
Xcc_47R1	CCTCCTGAGTCATGGCAATGGC	TAGCAGGGGAGTGCTGCTTGC
Xcc1_46R4	GGCATGGGGAATGATCGTTGAC	ATGCGGGCGATGGGATGGCCA
Xcc2_46R4	GCGTAGCGAAA CTGGTAGTTC	GCACAGGCGCACCAGCATATGGC
XccR3-49	AAAGAGCCAATGAAGGGCGAACA	TATGTCAGGCGCATAATCCGCAA
XccR3-52	GACAGTGGCGTTGGTGGA	TTGTGCGCTGATGATCTGTAACCT

1. 2. 6 数据分析

本研究所用的 t-test 和相关性分析均采用 SPSS 软件进行处理。

2 结果与分析

2.1 黑腐病病原菌分子标记鉴定

前期研究发现黑腐病的主要流行病原菌是 *Xcc1* 和 *Xcc4* 生理小种^[10]，本研究采用的黑腐菌是重庆本地菌种，为了明确使用的黑腐病病原菌生理小种，本研究利用能够区分黑腐菌 *Xcc1* (Xcc-47R1, 1 089 bp)，*Xcc3* (XccR3-49, 867 bp；XccR3-52, 1 889 bp)和 *Xcc4* (Xcc1-46R4, 462 bp；Xcc2-46R4, 578 bp)生理小种的分子标记对黑腐菌进行分子标记辅助鉴定。结果发现，除了 Xcc-47R1 能够扩增出约 1 089 bp 的特异条带，其他引物扩增均无条带，表明使用的重庆本地黑腐病病原菌是 *Xcc1* 生理小种(图 1)。

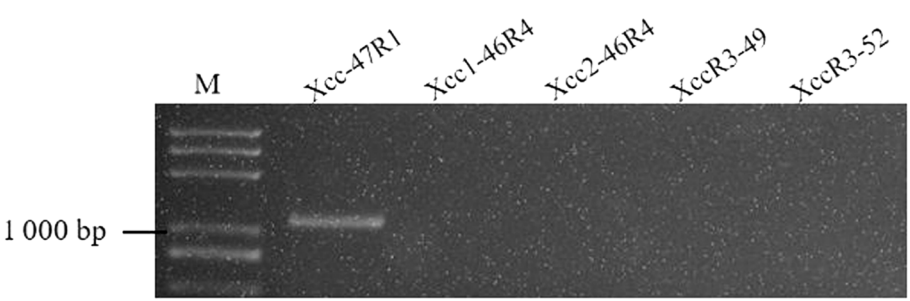


图 1 重庆黑腐菌生理小种的分子标记鉴定

2.2 利用离体叶片整叶喷雾法鉴定抗黑腐病材料

离体叶片喷雾法是甘蓝黑腐病抗性鉴定广泛使用的方法之一，本研究首先采用离体叶片整叶喷雾法对 30 份结球甘蓝材料和对照进行黑腐病抗性鉴定. 为了更有效地筛选出抗黑腐病的结球甘蓝材料，本研究采用极端抗性筛选法，对接种后 16 d 的叶片进行黑腐病发病情况的统计. 结果发现，2 份材料的平均病斑大小低于 30%，3 份材料的平均病斑大小介于 30% 和 60% 之间，其余 25 份材料的平均病斑大小都高于 60%. 其中，S18(24.80±19.70%)，S18S(28.57±0.01%)和 S232(43.18±9.64%)的平均病斑大小显著小于对照(87.04±18.33%)，其余材料与对照没有显著性差异. S18 的病情指数为 38.89，表现为抗病. S18S(55.55)，S232(66.67)，S23S(71.72)，167(74.91)，165(76.30)和 169(76.30)表现为耐病，其余 23 份材料与对照一样为感病材料(图 2、表 2).



图 2 离体叶片整叶喷雾法筛选出的抗性材料

表 2 结球甘蓝黑腐病抗性离体整叶喷雾鉴定

材料	平均病斑大小/%	病情指数	抗性	材料	平均病斑大小/%	病情指数	抗性
S18	24.80±19.70**	38.89	R	21LQ146	100	100	S
S18S	28.57±0.01*	55.55	T	21LQ148	100	100	S
S232	43.18±9.64*	66.67	T	21LQ156	100	100	S
S23S	58.57±25.78	71.72	T	21LQ157	100	100	S
167	59.33±20.76	74.91	T	21LQ158	100	100	S
165	63.45±27.96	76.30	T	21LQ159	100	100	S
169	63.63±30.85	76.30	T	21LQ185	100	100	S
S19S	70.00±10.02	77.78	S	21LQ186	100	100	S
187	73.16±17.24	85.19	S	21LQ187	100	100	S
166	74.63±20.32	86.21	S	21LQ188	100	100	S
S231	77.97±22.76	87.88	S	21LQ189	100	100	S
170	81.16±20.81	88.53	S	21LQ190	100	100	S
S22	86.19±16.78	91.45	S	21LQ191	100	100	S
168	94.02±10.74	97.70	S	S181	100	100	S
S19	100.00	100	S	S191	100	100	S
CK	87.04±18.33	92.60	S				

注：* 表示 $p<0.05$ ，** 表示 $p<0.01$.

2.3 利用离体叶片打孔法鉴定抗黑腐病材料

尽管采用离体叶片喷雾法，极端处理 16 d 可筛选出抗黑腐病的材料，但是该过程周期长，所需叶片多，针对植株少的材料无法准确地鉴定。因此，本研究试图比较打孔喷雾法和打孔滴接法，快速有效地鉴定出抗黑腐病的材料。本研究根据黑腐病极端抗性鉴定结果，挑选 1 份抗病材料(S18)、1 份耐病材料(S232)和 2 份感病材料(S19、S22)与对照(西园四号)一起比较离体叶片打孔喷雾法和打孔滴接法的鉴定效果。每个材料选取 3 片大小一致的叶片，每个叶片打孔产生 20 个叶盘，其中 10 个叶盘进行喷雾接菌，10 个叶盘进行滴接接菌，5 d 后统计发病情况。滴接法显示 S18(DI=31.11)为抗病，S232(DI=44.44)为耐病，S19、S22 和对照均表现高感，并且打孔滴接法与离体叶片整叶喷雾法病情指数显著正相关($r=0.96$ ， $p=0.011$)。喷雾法显示 S18(DI=39.68)和 S232(DI=53.97)为耐病，S19、S22 和对照均表现高感(图 3、表 3)。尽管打孔喷雾法无法区分出抗病和耐病的材料，但是打孔喷雾法与离体叶片整叶喷雾法显著正相关($r=0.97$ ， $p=0.006$)，与打孔滴接法的病情指数也显著正相关($r=0.99$ ， $p=0.002$)。该结果说明 3 种方法都能进行黑腐病的抗性鉴定，打孔滴接法能更准确地区分抗病材料和耐病材料。

表 3 利用打孔法鉴定黑腐病抗性

材料	喷雾法			滴接法		
	病斑大小/%	病情指数	抗性	病斑大小/%	病情指数	抗性
S18	21.67±20.93	39.68	T	15.48±12.55	31.11	R
S232	33.44±28.52	53.97	T	24.11±16.17	44.44	T
S22	89.52±25.22	96.83	HS	95.71±16.42	97.04	HS
S19	100	100.00	HS	100	100.00	HS
CK	96.19±11.97	97.04	HS	92.14±21.98	84.13	HS

注：R,T 和 HS 分别表示抗病、耐病和高感。

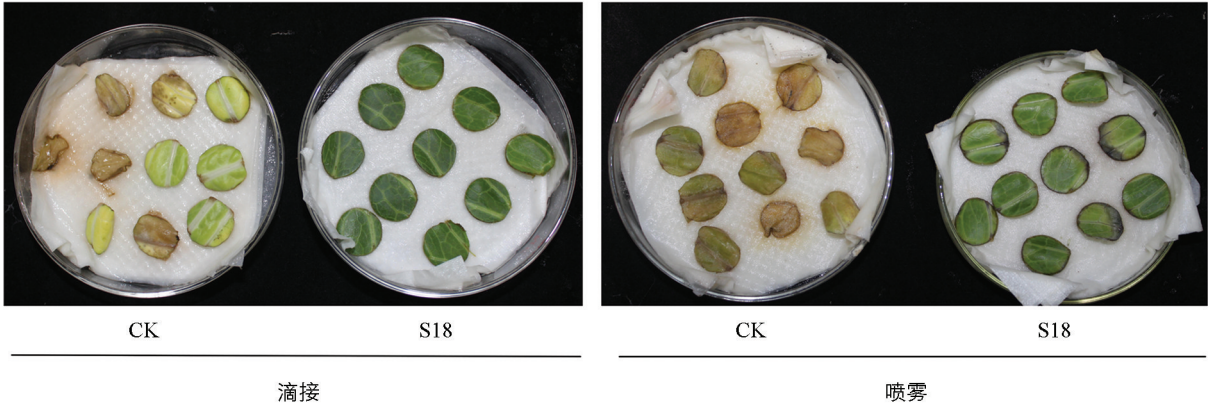
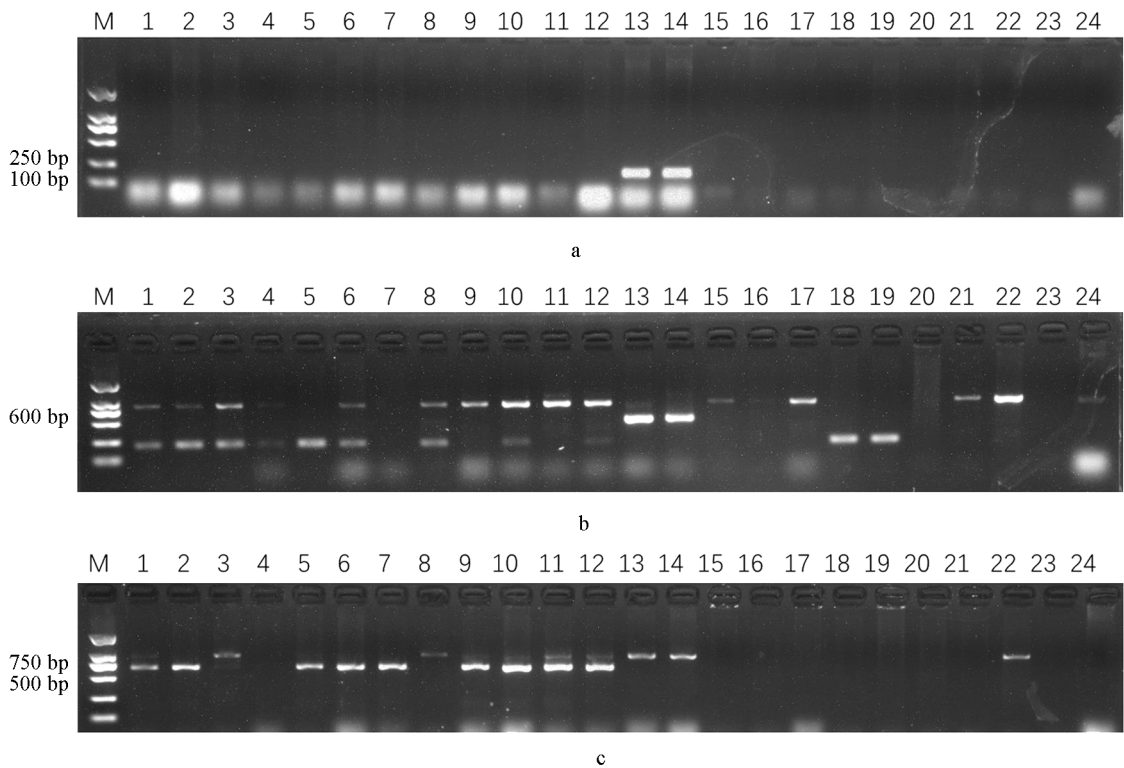


图 3 离体叶片打孔接种鉴定 S18 的黑腐病抗性

2.4 黑腐病分子标记辅助鉴定

由于前期研究发现大量利用埃塞俄比亚芥与甘蓝杂交的相关研究，本研究筛选出的甘蓝种质是否含有埃塞俄比亚芥的黑腐病抗性成分尚不明确。为了探究筛选出甘蓝种质黑腐病抗性标记，本研究利用前期从抗黑腐病埃塞俄比亚芥(PI199947 和 PI199949)中鉴定的抗黑腐病连锁标记(Black rot 3, 250 bp 和 Black rot 6, 500 bp)对抗病材料 S18 的 6 个后代和耐病材料 S232 的 6 个后代以及 10 个感病甘蓝材料进行分子标记辅助选择。结果发现，除了埃塞俄比亚芥抗性材料(PI199947 和 PI199949)外，其余材料均无目标条带。但是，利用与 *Xcc6*/*Xcc7* 连锁的分子标记 BR6-InDel(抗病条带 724 bp，感病条带 1 013 bp)进行鉴定，发现尽管所有感病材料中均不含有抗性标记，但是 S18 的后代中有 3 个单株只含有抗性条带，1 个单株含有抗/感条带；S232 的后代中有 1 个单株只含有抗性条带，4 个单株含有抗/感条带(图 4)，说明该标记可能对于耐病材料能够进行分子辅助选择，但是无法区分抗病和耐病材料。该研究结果表明 S18 的黑腐病抗性

可能不同于埃塞俄比亚芥, 需要开发新的分子标记.



从 a-c 分别是引物 Black rot 3、Black rot 6 和 BR6-InDel 的分子标记; M: marker; 1-6: S18 的后代; 7-12: S232 的后代; 13: PI199947; 14: PI199949; 15-24: 感病甘蓝

图 4 S18 和 S232 后代的黑腐病抗性分子标记辅助鉴定

3 结论与讨论

3.1 结论

3.1.1 结球甘蓝黑腐病抗性鉴定

本研究利用黑腐菌喷施离体整叶极端处理 16 d 后筛选出抗黑腐病材料 1 份(S18), 耐病材料 6 份(S18S, S232, S23S, 165, 167, 169). 选取 1 份抗病(S18)、1 份耐病(S232)和 2 份感病材料用于比较离体叶片打孔滴接法和喷雾法, 结果发现, 打孔滴接法可快速进行结球甘蓝的黑腐病抗性鉴定, 筛选出抗黑腐病的材料.

3.1.2 结球甘蓝黑腐病分子标记辅助选择

本研究采用分子标记进行黑腐菌 PCR 鉴定, 发现重庆本土菌种为 *Xcc1* 生理小种. 抗病甘蓝材料不含埃塞俄比亚芥黑腐病抗性连锁标记(Black rot 3 和 Black rot 6), 但是在抗病和耐病甘蓝后代中均存在 BR6-InDel 标记.

3.2 讨论

要建立高效的甘蓝抗病性筛选鉴定方法, 既要符合田间发病期病原菌的适宜发病环境, 也要考虑甘蓝植株自身生长状况与抗病性关系; 并要进行接种鉴定选用致病力较强的病原菌, 在甘蓝幼苗的旺盛生长期进行接种试验, 才能真实地表现出甘蓝资源的抗感性能. 对黑腐病抗性鉴定常用接种方法有幼苗期喷雾接种、幼苗期剪叶接种、针刺接种、叶脉接种、水孔接种、吐水法和离体叶片法等 10 余种接种方法^[29]. 不同的接种方法, 由于叶片侵染时的状态、环境温湿度的不同, 造成发病时间呈现较大的差异. 种子侵染接种较受国外学者青睐, 但此法条件难以控制, 受影响因素也较多. 陈果等^[30]采用幼苗期喷雾接种, 发现绝大多数材料的抗病性鉴定结果与田间抗性鉴定结果一致, 但种质种子量较少的情况下该方法不适用. 幼苗期剪叶接种和喷雾接种使病原菌在水孔处繁殖, 通过水孔侵入, 不仅能鉴定寄主抗扩展能力, 还能反映抗侵

入特性,较剪叶法更能全面地反映寄主所具有的抗病性,但常出现菌体不能进入水孔的现象,造成感病品种也不发病。吐水法接种可以避免漏接现象,而且鉴定结果较为准确,但费时费力,接种难度比较大^[24]。离体叶片接种易操作,不受季节时间限制和外界环境影响,但发病时间较长。王超等^[31]在甘蓝黑腐病研究中对比了 5 种接种方法,认为离体剪叶法更适用于甘蓝黑腐病的苗期鉴定。本研究首先采用离体整叶喷施法进行极端处理,这种方法可同时筛选多份材料,在不损伤叶片的情况下得到的结果也更符合甘蓝的田间栽培环境,筛选出的一定为抗黑腐病材料,但是该方法耗时长,工程量大,筛选出来的结果比较极端,可能会筛掉一部分高抗和耐病品种。因此,在总结以上接种方法后,本研究筛选出了一套简单迅速且鉴定准确的甘蓝黑腐病抗性鉴定方法——打孔接种法,分别为打孔喷雾接种法和打孔滴接法。两种接种方法统计时间一致,共性在于同一方法不同材料之间的发病状况差异均较大,可以明显比较不同材料抗病性大小;而两种方法之间平行比较存在发病状态的差异。在叶片破坏程度与叶片自身抗性等同的情况下,打孔喷雾法相较于打孔滴施法发病更快,但是这两种方法与整叶喷雾法的发病趋势均一致。接种 5 d 后统计发病情况,打孔滴接法能区分抗感材料;打孔喷雾法可能适合提前统计。因此,采用离体叶片打孔滴接法接种 5 d 后进行黑腐病发病情况的统计,可快速并可靠地进行结球甘蓝的黑腐病抗性鉴定。

挖掘和筛选抗源材料是开展甘蓝黑腐病育种工作的基础,国内外许多育种工作者已经在抗源筛选及新品种的选育上取得了一定的进展^[32]。但由于黑腐病生理小种分化较为复杂,单个抗性品种/品系并不能为 *Xcc* 所有的生理小种提供抗性。因此,在分子水平上正确鉴定 *Xcc* 小种抗性位点对于黑腐病抗性育种以及利用现有抗性种质是必要的。本研究利用 *Xcc1* (*Xcc*-47R1, 1 089 bp), *Xcc3* (*Xcc*R3-49, 866 bp; *Xcc*R3-52, 1 888 bp) 和 *Xcc4* (*Xcc*1-46R4, 462 bp; *Xcc*2-46R4, 578 bp) 的分子标记对重庆本土病菌鉴定后,发现重庆本土黑腐菌为 *Xcc1*。研究认为,十字花科 A 基因组抗 *Xcc4*, B 基因组抗 *Xcc1* 和 *Xcc4*^[15], 含有 BBCC 基因组的埃塞俄比亚芥可以同时高抗 *Xcc1* 和 *Xcc4*^[17]。近年来,在甘蓝中也发现了抗 *Xcc1* 的种质^[12-13]。本研究从甘蓝资源中筛选出抗 *Xcc1* 的材料,并利用前期从抗黑腐病埃塞俄比亚芥中筛选出的连锁标记 Black rot 3 和 Black rot 6,对筛选出的抗黑腐病甘蓝材料后代进行分子标记辅助选择,发现在所有材料中均不含有埃塞俄比亚芥抗 *Xcc1* 的抗性位点,说明这些结球甘蓝存在不同于埃塞俄比亚芥的新 *Xcc1* 抗性位点;该研究对甘蓝黑腐病抗性基因的挖掘和抗性改良提供了重要的种质资源。Hong 等^[14]通过分析油菜芽孢杆菌中 157 个编码 NBS-LRR 的 R 基因,筛选到一个可能与 *Xcc6* 的黑腐病抗性紧密关联的基因 *Bol031422*,从而开发了相关的 InDel 标记 BR6-InDel,并且发现将接种 *Xcc6* 或 *Xcc7* 获得的表型结果与 BR6-InDel 标记的基因型结果进行比较,显示 BR6-InDel 标记适应性的预测能力为 83.9%。本研究将该标记应用到筛选出的抗病、耐病材料后代和感病材料中,结果发现在抗病和耐病材料中均能扩增出抗性条带,但是感病材料中无抗性条带,说明该标记并不能对 S18 进行黑腐病的抗性辅助选择,但是抗病材料(S18)和耐病材料(S23)可能具有 *Xcc6* 或 *Xcc7* 抗性。

参考文献:

- [1] 方智远. 我国甘蓝产销变化与育种对策 [J]. 中国蔬菜, 2008(1): 1-2.
- [2] JENSEN B D, MASSOMO S M S, SWAI I S, et al. Field Evaluation for Resistance to the Black Rot Pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Cabbage (*Brassica oleracea*) [J]. European Journal of Plant Pathology, 2005, 113(3): 297-308.
- [3] BURLAKOTI R R, CHEN J R, HSU C F, et al. Molecular Characterization, Comparison of Screening Methods, and Evaluation of Cross-Pathogenicity of Black Rot (*Xanthomonas campestris* pv. *campestris*) Strains from Cabbage, Choy Sum, Leafy Mustard and Pak Choi from Taiwan [J]. Plant Pathology, 2018, 67(7): 1589-1600.
- [4] VICENTE J G, HOLUB E B. *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Cause of Black Rot of Crucifers) in the Genomic Era is still a Worldwide Threat to Brassica Crops [J]. Molecular Plant Pathology, 2013, 14(1): 2-18.
- [5] 张杨, 李金萍, 周慧敏, 等. 十字花科蔬菜细菌性黑腐病的发生规律及防治 [J]. 中国蔬菜, 2011(17): 23-25, 65.
- [6] 孔枫枫, 刘星, 邢苗苗, 等. 甘蓝黑腐病和枯萎病兼抗材料的鉴定筛选 [J]. 中国蔬菜, 2018(6): 22-31.
- [7] 许园园, 邢苗苗, 严继勇, 等. 甘蓝黑腐病致病菌分离与种质资源抗性鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2022, 50(10): 98-103.

- [8] CRUZ J, TENREIRO R, CRUZ L. Assessment of Diversity of *Xanthomonas campestris* Pathovars Affecting Cruciferous Plants in Portugal and Disclosure of Two Novel *X. campestris* pv. *campestris* races [J]. Journal of Plant Pathology, 2017, 99(2): 403-414.
- [9] FARGIER E, MANCEAU C. Pathogenicity Assays Restrict the Species *Xanthomonas campestris* into Three Pathovars and Reveal Nine Races within *X. Campestris* pv. *campestris* [J]. Plant Pathology, 2007, 56(5): 805-818.
- [10] VICENTE J G, CONWAY J, ROBERTS S J, et al. Identification and Origin of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Races and Related Pathovars [J]. Phytopathology®, 2001, 91(5): 492-499.
- [11] SHARMA B B, KALIA P, YADAVA D K, et al. Genetics and Molecular Mapping of Black Rot Resistance Locus Xcalbc on Chromosome B-7 in Ethiopian Mustard (*Brassica carinata* A. Braun) [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0152290.
- [12] KONG C C, CHEN G, YANG L M, et al. Germplasm Screening and Inheritance Analysis of Resistance to Cabbage Black Rot in a Worldwide Collection of Cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) Resources [J]. Scientia Horticulturae, 2021, 288: 110234.
- [13] SAHA P, KALIA P, SHARMA M, et al. New Source of Black Rot Disease Resistance in *Brassica oleracea* and Genetic Analysis of Resistance [J]. Euphytica, 2016, 207(1): 35-48.
- [14] HONG J E, AFRIN K S, RAHIM M A, et al. Inheritance of Black Rot Resistance and Development of Molecular Marker Linked to Xcc Races 6 and 7 Resistance in Cabbage [J]. Plants, 2021, 10(9): 1940.
- [15] TAYLOR J D, CONWAY J, ROBERTS S J, et al. Sources and Origin of Resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* in Brassica Genomes [J]. Phytopathology®, 2002, 92(1): 105-111.
- [16] SHENG X, BRANCA F, ZHAO Z Q, et al. Identification of Black Rot Resistance in a Wild Brassica Species and Its Potential Transferability to Cauliflower [J]. Agronomy, 2020, 10(9): 1400.
- [17] SHARMA B B, KALIA P, SINGH D, et al. Introgression of Black Rot Resistance from Brassica Carinata to Cauliflower (*Brassica oleracea* Botrytis Group) through Embryo Rescue [J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1255.
- [18] TONGUÇ M, EARLE E D, GRIFFITHS P D. Segregation Distortion of Brassica Carinata Derived Black Rot Resistance in *Brassica oleracea* [J]. Euphytica, 2003, 134(3): 269-276.
- [19] BHATIA R, SHARMA K, PARKASH C, et al. Microspore Derived Population Developed from an Inter-Specific Hybrid (*Brassica oleracea* × *B. carinata*) through a Modified Protocol Provides Insight into B Genome Derived Black Rot Resistance and Inter-Genomic Interaction [J]. Plant cell, tissue and organ culture (PCTOC), 2021, 145: 417-434.
- [20] TONGUÇ M, GRIFFITHS P D. Development of Black Rot Resistant Interspecific Hybrids between *Brassica oleracea* L. Cultivars and Brassica Accession a 19182, Using Embryo Rescue [J]. Euphytica, 2004, 136(3): 313-318.
- [21] 翟文慧. 我国十字花科蔬菜黑腐病菌生理小种的鉴定及优势种群分析 [D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.
- [22] 胡燕, 郑阳, 周娜, 等. 重庆市甘蓝黑腐病苗期抗病性鉴定试验初报 [J]. 南方农业, 2019, 13(34): 26-28.
- [23] 黄德芬, 李成琼, 司军, 等. 甘蓝抗黑腐病离体鉴定方法的研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2011, 33(8): 5-9.
- [24] 肖崇刚. 一种甘蓝黑腐病接种新方法 [J]. 植物保护, 1994, 20(5): 35.
- [25] 崔瑞峰. 甘蓝黑腐病苗期抗病性鉴定研究 [D]. 太谷: 山西农业大学, 2004.
- [26] RUBEL M H, ROBIN A H K, NATARAJAN S, et al. Whole-Genome Re-Alignment Facilitates Development of Specific Molecular Markers for Races 1 and 4 of *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, the Cause of Black Rot Disease in *Brassica oleracea* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(12): 2523.
- [27] AFRIN K S, RAHIM M A, RUBEL M H, et al. Development of Race-Specific Molecular Marker for *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* Race 3, the Causal Agent of Black Rot of Crucifers [J]. Canadian Journal of Plant Science, 2018, 98(5): 1119-1125.
- [28] 白玉莲. 利用埃塞俄比亚芥与芥蓝杂交创制抗黑腐病种间杂种 [D]. 重庆: 西南大学, 2019.
- [29] 张黎黎, 刘玉梅, 田自华, 等. 十字花科蔬菜抗黑腐病育种研究进展 [J]. 园艺学报, 2012, 39(9): 1727-1738.
- [30] 陈果, 孔枫枫, 马洪雪, 等. 甘蓝黑腐病田间病害分级标准的建立与抗源筛选 [J]. 中国蔬菜, 2022(8): 42-48.
- [31] 王超, 吴世昌, 秦智伟, 等. 甘蓝苗期多抗性鉴定技术研究 [J]. 东北农业大学学报, 2000, 31(2): 152-159.
- [32] 杨丽梅, 方智远, 张扬勇, 等. “十三五”我国甘蓝遗传育种研究进展 [J]. 中国蔬菜, 2021(1): 15-21.