

专论与综述

芸薹根肿菌生理小种鉴定与检测方法研究进展

余红瑞¹, 章艺¹, 张舒晴¹, HUSSAIN Iqbal¹, 董正中², 雷娜³, 门万杰³, 余小林^{*1}

1 浙江大学 蔬菜研究所, 浙江 杭州 310058

2 浙江大学 新农村发展研究院, 浙江 杭州 310058

3 哈尔滨市农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150086

余红瑞, 章艺, 张舒晴, HUSSAIN Iqbal, 董正中, 雷娜, 门万杰, 余小林. 芸薹根肿菌生理小种鉴定与检测方法研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3348-3371.

YU Hongrui, ZHANG Yi, ZHANG Shuqing, HUSSAIN Iqbal, DONG Zhengzhong, LEI Na, MEN Wanjie, YU Xiaolin. Research progress in pathotype identification and detection methods of *Plasmodiophora brassicae* Woronin[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3348-3371.

摘要: 根肿病是由芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woronin)引起的全球性土传病害, 对十字花科芸薹属作物的产量和质量构成了严重的威胁。根肿菌为专性活体寄生菌, 具有强烈的生理小种分化现象, 因此, 对不同地区的生理小种类型进行评估, 有利于芸薹属作物的抗性育种及作物栽培的整体规划。精确评估土壤中芸薹根肿菌休眠孢子的数量, 有助于准确预测田块中根肿病发生的风险水平, 可为后续防治方法的选择和防治效果的评估奠定基础。本文对芸薹根肿菌生理小种的鉴定以及土壤中根肿菌休眠孢子的检测和定量方法进行了简要综述, 同时提出了一种有望应用于根肿菌生理小种研究的单细胞测序技术, 并对重组酶聚合酶扩增技术(recombinase polymerase amplification, RPA)在根肿菌检测与定量方面的可行性进行了分析。本文旨在为根肿病的高效防控提供理论依据和方法参考, 同时为根肿菌鉴定与检测方法的研究提供新的研究思路 and 解决方案。

关键词: 根肿病; 芸薹根肿菌; 生理小种; 根肿病鉴别系统; 定量方法

资助项目: 浙江省基础公益计划(LTGN23C150008); 浙江省“三农九方”科技协作计划(2023SNJF009); 哈尔滨市农业科学院与浙江大学农学院合作项目(2021ZSZZNS03); 浙江省农业(蔬菜)新品种选育重大科技专项(2021C02065)

This work was supported by the Basic Public Welfare Research Program of Zhejiang Province (LTGN23C150008), the Zhejiang Provincial “SanNong JiuFang” Science and Technology Cooperation Project (2023SNJF009), the Harbin Academy of Agricultural Sciences and Zhejiang University Agricultural College Research Cooperation Project (2021ZSZZNS03), and the Breeding Project (Vegetables) of the Sci-tech Foundation of Zhejiang Province (2021C02065).

*Corresponding author. E-mail: xlyu@zju.edu.cn

Received: 2023-12-28; Accepted: 2024-03-01; Published online: 2024-04-09

Research progress in pathotype identification and detection methods of *Plasmodiophora brassicae* Woronin

YU Hongrui¹, ZHANG Yi¹, ZHANG Shuqing¹, HUSSAIN Iqbal¹, DONG Zhengzhong², LEI Na³, MEN Wanjie³, YU Xiaolin^{*1}

1 Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

2 The Rural Development Academy, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China

3 Harbin Academy of Agricultural Science, Harbin 150086, Heilongjiang, China

Abstract: Clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae* Woronin is a globally prevalent soil-borne disease posing a severe threat to the yield and quality of *Brassica* crops. Due to the violent physiological differentiation and biotrophic characteristics exhibited by *P. brassicae*, evaluating the pathotypes of *P. brassicae* in different regions is crucial for breeding *Brassica* crops with disease resistance and planning the crop cultivation pattern. Accurately assessing the number of *P. brassicae* resting spores in the soil is instrumental in predicting the risk levels of clubroot in the fields, laying a foundation for subsequent selection of control methods and evaluation of their effectiveness. This paper briefs the methods for identifying *P. brassicae* pathotypes and detecting and quantifying the resting spores in the soil. Additionally, we propose a single-cell sequencing technique with potential application in the study of *P. brassicae* pathotypes and analyze the feasibility of recombinase polymerase amplification (RPA) in the detection and quantification of *P. brassicae*. The aim of this paper is to offer a theoretical foundation and methodological reference for the effective control of clubroot while providing new insights and solutions for the identification and detection of *P. brassicae*.

Keywords: clubroot; *Plasmodiophora brassicae* Woronin; pathotype; clubroot differential set; quantitative method

全球十字花科植物(*Brassicaceae*)包括 321 属 3 660 种, 主要分布在北温带, 尤其在地中海区域。中国十字花科植物有 95 个属, 包括 425 个种、124 个变种和 9 个变型, 分布在全国各地^[1]。其中, 芸薹属(*Brassica*)是一个包括 39 个物种的重要经济属^[2], 该属植物是世界第二大植物油来源, 也是世界第三大蔬菜来源。目前, 由芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woronin)感染造成的根肿病对世界十字花科作物的生产构成严重威胁。全球已有多个国家报道了根肿病的发生, 其中包括亚洲的中国、日本、韩国、

印度和老挝; 北美洲的美国和加拿大; 南美洲的巴西、墨西哥和哥伦比亚; 欧洲的卢森堡、法国、捷克共和国和瑞典; 大洋洲的澳大利亚等^[3-12]。受根肿菌感染的植株由于其根组织膨大, 影响了根系对矿质元素和水分的吸收和运输, 因此, 植株地上部会表现出矮化和枯萎症状, 叶片发红、褪绿、坏死和脱落, 植物提早开花, 严重影响芸薹属作物的产量和质量(图 1); 田间实验结果表明, 根肿病可造成油菜产量减少 30%, 而在受害严重的情况下甚至会导致产量损失 80%–90%^[13]。



图 1 健康白菜及受芸薹根肿菌侵染的白菜表型
植物材料为感病白菜品种‘Granaat’; 图中标尺为 5 cm
Figure 1 Phenotypes of healthy Chinese cabbage and Chinese cabbage infected by *Plasmodiophora brassicae*. Plant material represents the susceptible Chinese cabbage cultivar ‘Granaat’; Bar=5 cm.

当前,根肿病的防治方法主要有化学、物理、生物和农业防治法,其中前 3 种方法分别通过杀菌剂、土壤日晒、生防菌和诱饵作物杀灭土壤中的根肿菌休眠孢子或抑制休眠孢子的活性,从而减少其对芸薹属作物的侵染,使作物的根肿病发病程度降低到经济损失允许的水平之下^[14]。研究表明,当土壤中休眠孢子浓度低于每克土壤 1.34×10^3 个时,田块根肿病发病概率较低^[15-16],这可作为判断各种防治方法是否有效的标准。农业防治的主要措施包括土壤 pH 的调节、轮作以及抗病品种的选用。使用抗性品种是根肿病防治的根本措施,然而有两个原因限制了它们的连续使用:一是目前大多数抗性品种表现出单基因抗性,并且通常只局限于某个特定的根肿菌生理小种类型^[17];二是由于土壤中存在许多未被发现的生理小种类型,抗性品种的连续种植会对其产生选择压力,导致新的致病型生理小种的出现,最终使得作物抗病性失效^[18]。

生理小种鉴定和休眠孢子检测是对根肿菌进行定性和定量研究的两种技术,两者为开展根

肿菌研究奠定了基础,在根肿病防治中起到相辅相成的作用。其中,明确各地区的根肿菌生理小种类型可以指导芸薹属作物的抗性育种工作和品种布局,而通过检测土壤中芸薹根肿菌休眠孢子的数量能够较为准确地预测田块中根肿病发生的风险程度,为后期根肿病防治方法的选择及防治效果的评估提供判定基础。截至目前,针对根肿病病原生物学及其病害形成影响因素、根肿病综合防治等已有部分综述^[14,19-21],但有关芸薹根肿菌鉴定与检测方法研究进展的综述文章却少见报道。本文就芸薹根肿菌的生活史、生理小种鉴别系统、检测与定量方法的研究进展等方面进行简要综述,以期今后芸薹根肿菌的生理小种鉴定及检测与定量提供方法参考。

1 芸薹根肿菌的生活史

芸薹根肿菌是一种专性、细胞内寄生的原生物^[22],在生物学分类上属于原生生物界芸薹根肿菌门芸薹根肿菌纲芸薹根肿菌目芸薹根肿菌属。芸薹根肿菌的主要形式是原生质体,其休眠孢子可以在土壤中越冬。有研究表明,在一定条件下,芸薹根肿菌休眠孢子可在大田土壤中存活 17 年以上^[21]。在适宜条件下,休眠孢子萌发并释放初级游动孢子,游动孢子通过一系列结构和物理变化,在寄主植株的根毛或表皮细胞中发生初级侵染^[23]。随后产生的单核原生质团立即进行有丝分裂,并发育成多核初级原生质团,最后发育成游动孢子囊,多核的游动孢子囊细胞质进行分裂产生单核游动孢子囊,每个单核游动孢子囊之后均进行连续的有丝分裂以产生更多的多核游动孢子囊;经过再一次细胞质分裂后,每个游动孢子囊内产生几个单核的次级游动孢子,成熟的次级游动孢子从游动孢子囊中排出,进入寄主植株的根毛或表皮细胞的管腔,在其根毛或表皮细胞内留下空的游动孢子囊;随后 2 个次级游动孢子在根表皮

进行细胞接合，产生双核的接合子；一般而言，芸薹根肿菌的次级侵染开始于接种后 7 d，第 8 天时会在皮层细胞里产生单核次级原生质团，经过连续的有丝分裂和营养生长后，单核次级原生质团发育为多核次级原生质团，细胞核数量较多；当其成熟时，多核次级原生质团经历减数分裂，产生单倍体多核休眠孢子囊，然后第 24 天在皮层细胞中进行细胞质分裂，产生大量的单核休眠孢子；在次级侵染过程中，次级原生质团的持续营养生长和细胞核分裂导致寄主皮层细胞过度膨胀，从而出现根肿病症状^[19]。

2 生理小种鉴定方法的建立与发展

人们最早推测芸薹根肿菌存在生理小种分

化现象是因为不同工作者在大田品种试验中得到不同的抗感性结果。随后，Macfarlane 通过系列田间实验再次证实了芸薹根肿菌包含不同的致病类型^[24]。现有的生理小种鉴定方法主要有系统鉴定法和分子生物学鉴定法，其中，鉴别系统所用的病原材料主要是肿根样品及单孢分离系菌株，而分子生物学鉴定法所用的材料为病原 DNA (表 1)。在生理小种鉴别系统中，芸薹根肿菌的致病类型是根据它们的毒力模式在与不同寄主进行的生物测定中区分出来的，其中，寄主的反应是基于根肿的发育来检测的^[25]。这些检测的目的是观察与比较病原体种群中生理特化的发生和程度。目前已经提出了多个鉴别系统来研究芸薹根肿菌的致病性分化(表 2)。

表 1 现有的芸薹根肿菌生理小种鉴定方法
Table 1 Present pathotype identification methods of *Plasmodiophora brassicae*

项目 Item	系统鉴定法 Systematic identification method	分子生物学法 Molecular biology method
鉴定材料	肿根样品	脱氧核糖核酸
Identification materials	Galls	DNA
	单孢分离系菌株 Single spore isolation strain	
优点	取样方法及操作流程简单	工作量小、在分子层面显示不同生理小种之间的差异、可获得与宿主反应相关的结果
Advantages	Simple sampling method and experimental procedure	Low workload, demonstrating differences between pathotypes at the molecular level, and results relevant to host response
	鉴定结果更加符合菌源的真实致病能力	
	The results are more consistent with the actual virulence level of the pathogen population	
缺点	鉴定结果仅显示其中优势生理小种的类型	现有的分子手段无法区分不同的生理小种类型
Disadvantages	The result only shows the predominant pathotype	Current molecular methods cannot distinguish different pathotypes
	操作烦琐、耗时耗力、专业技术水平要求较高	需要专业的仪器设备及技术人员
	Complex operation, time-consuming, labor-intensive, and demanding high levels of professional technical skills	Need professional equipments and technical personnels
难点	寄主基因型一致性的维持	有效的分子鉴定体系的建立
Challenges	Maintenance of host genotype consistency	The establishment of effective molecular identification systems
	寄主植株发病率及扩繁成功率的提高	
	Improvement of plant disease incidence and strain passaging	

表 2 主要的根肿菌生理小种鉴别系统

Table 2 Primary clubroot differential set

Item	Williams set	ECD set	CCD set	SCD set
寄主数量 Number of hosts	4	15	13	8
已鉴定的生理小种数目 Number of identified pathotypes	9	—	17	16
优点 Advantages	工作量小、具有世界通用性 Low workload and globally applicable	检测容量大、具有世界通用性 Large capacity and globally applicable.	检测容量大、命名规则简单、与其他系统互通 Large capacity, simple naming conventions, and interoperability with other systems	检测容量大、检测精度高、使用抗根肿病(clubroot-resistant, CR)寄主使鉴定结果稳定 Large capacity, high accuracy, and stable results
缺点 Disadvantages	检测容量小、检测精度差、寄主的遗传异质性会导致鉴定结果波动 Small capacity, poor accuracy, and fluctuating results due to host genetic heterogeneity	工作量大、命名系统复杂、寄主的遗传异质性导致结果波动 High workload, complex naming system, and fluctuating results due to host genetic heterogeneity	地域局限性、工作量大、自交系寄主可能存在异质性、商业品种寄主应用可能会受种子子公司限制 Regional limitation, high workload, potential heterogeneity in inbred line hosts, and potential constraints on the commercial cultivars application due to seed company restriction	CR 寄主遗传背景未公开导致维护困难、商业品种寄主应用可能会受种子子公司限制 Difficulties in maintaining hosts due to their undisclosed genetic background, and potential constraints on the commercial cultivars application due to seed company restriction
文献来源 References	[26]	[27]	[28]	[29]

—: 暂无数据

—: No data available.

2.1 早期生理小种鉴别系统的建立

1955 年, Macfarlane 等^[24]利用 11 个鉴别寄主对 3 份不同来源的芸薹根肿菌病原材料进行鉴定。随后, Ayers^[30]用栽培和野生的十字花科寄主鉴定出 6 种芸薹根肿菌生理小种,并确定了 5 种适合成为鉴定不同根肿菌生理小种的十字花科寄主植物。Lammerink^[31]使用了 6 个寄主及 2 份不同来源的芸薹根肿菌病原材料对新西兰根肿菌生理小种的特化进行了调查,结果表明,2 份不同来源的病原材料在某些寄主上产生了不同的感染情况,证明这 2 份病原材料属于不同

的生理小种。

Williams^[26]通过 2 个甘蓝型油菜(*Brassica napus*)材料 Laurentian 和 Wilhelmsburger, 以及 2 个甘蓝(*B. oleracea*)材料 Jersey Queen 和 Badger Shipper 对芸薹根肿菌的差异反应来区分 16 个不同的生理小种。由于 Williams 系统的生理小种检测容量有限, Buczacki 等^[27]开发出一个由 *B. campestris*、*B. napus* 以及 *B. oleracea* 各包括 5 个寄主的 3 组芸薹属作物组成的欧洲根肿菌生理小种鉴别系统(European clubroot differential set, ECD)。该鉴别系统所用到的 3 组芸薹属植物分

别采用了 Olsson、Nagaharu 及 Helm 提出的命名系统^[32-34], 其中, 鉴别寄主 01-04 和 06-10 是专门为开发鉴别系统而选择和培育的; 05 号寄主作为该系统内的阴性对照, 是唯一对所有供试的芸薹根肿菌种群普遍敏感的寄主; 11 号和 13 号寄主选自上述 Williams 所开发的鉴别系统; 12 号寄主是著名的抗根肿病亲本, 而 14 号寄主则是甘蓝中最感病的品种^[27]。目前, Williams 系统和 ECD 系统是世界上适用范围较广、接受程度较高的根肿菌生理小种鉴别系统。迄今为止, 中国超过 20 个省市报道了基于 Williams 系统鉴定出来的生理小种类型, 其中包括 1、2、4、5、6、7、8、9、10、11、12 和 13 号生理小种^[35-52]。相比之下, 由于 ECD 系统的使用相对烦琐, 因此该系统鉴定的生理小种类型在中国的报道较少, 仅有 ECD16/15/31、ECD21/31/31 和 ECD16/4/0^[46,53]。本实验室采用 ECD 系统对来自不同地区的根肿菌样本进行鉴定, 结果显示, 上海青浦区大盈镇、浙江省台州市温岭市、浙江省温州市鹿城区、浙江省丽水市缙云县、江苏省无锡市宜兴市、湖北省宜昌市长阳土家族自治县、湖北省恩施土家族苗族自治州利川市、湖北省恩施土家族苗族自治州双河镇及西藏林芝地区的生理小种类型分别为 ECD16/0/5、ECD16/15/15、ECD16/0/0、ECD24/16/30、ECD28/31/31、ECD17/31/31、ECD16/4/0、ECD16/0/及 ECD16/0/0, 这些结果极大地丰富了我国当前根肿菌的 ECD 生理小种类型的资料库^[52,54]。

2.2 区域特定的生理小种鉴别系统

研究发现, 由于芸薹根肿菌生理小种的分化存在地理差异, 前人用来划分生理小种类型的一些抗/感差异系统对有些地区并不适用, 因此, 研究人员开发出可以为当地芸薹根肿菌种群提供明确分类的鉴别系统。Somé 等^[3]在 Williams 和 ECD 系统的基础上进行改进, 以 3 个

甘蓝型油菜品种为材料, 在法国地区获得了较好的致病类型识别效果。Kuginuki 等^[55]利用日本抗根肿病(CR)的商业化白菜(*B. rapa*)品种和品系, 对日本芸薹根肿菌种群致病性的遗传多样性进行评估, 同时与 Williams 和 ECD 系统中的不同寄主进行比较。Kim 等^[56]根据寄主的抗病性将 22 个芸薹属作物品种(包括非 CR 品种)分为 4 个不同的寄主群, 根据致病性结果, 将韩国 12 份田间芸薹根肿菌病原材料重新划分为 4 个不同的致病类型群, 并提出了 4 个可以作为韩国田间根肿菌生理小种鉴定寄主的植物材料, 包括 3 个 CR 品种(‘CR-Cheongrok’ ‘DegaoCR1016’ 和 ‘Akimeki’)及 1 个非 CR 品种 ‘Noranggimjang’。Strelkov 等^[28]开发出加拿大根肿病生理小种鉴别系统(Canadian clubroot differential set, CCD); 该系统的寄主植物包括从 Williams 系统、ECD 系统及 Som 等所使用的寄主中选择出来的 13 个芸薹属植物、抗根肿病的甘蓝型油菜品种 ‘Mendel’、自由授粉的甘蓝型油菜品种 ‘Westar’ 以及抗根肿病杂交甘蓝型油菜品种 ‘45H29’。在 CCD 集合上产生独特毒力模式的芸薹根肿菌种群被分配一个字母(A、B、C 等)来区分不同的致病类型, CCD 中所有病理类型的命名都可以追溯到 Williams 和 Somé 系统中。

我国的芸薹根肿菌优势种群为使用 Williams 系统所鉴定出来的 4 号生理小种^[35]。然而, 由于 4 号生理小种发生的遗传变异使得生产上持久抗性 CR 品种的选育工作变得更加困难。因此, Pang 等^[29]使用一组具有已知或新的 CR 基因的 8 个大白菜差异自交系开发了一个中华根肿病生理小种鉴别系统(Sinitic clubroot differential set, SCD), 并使用开发的 SCD 系统表征由 4 号生理小种遗传变异产生的 11 种病理类型。由于 SCD 系统中所使用的鉴定材料大部分都具有已知的根肿病抗性基因或数量性状基

因座(quantitative trait loci, QTLs), 这为厘清根肿病抗病基因与芸薹根肿菌生理小种间的对应关系提供了可能, 同时, 也为抗病聚合育种奠定了基础。然而, 由于多份 SCD 系统的鉴定材料为当前生产上的育种骨干亲本, 因植物新品种权的保护及材料获得困难等原因, 客观上限制了该系统在科研和生产中的广泛应用。

2.3 基于单孢分离技术的根肿菌生理小种鉴定

目前, 国内外研究人员普遍使用肿根样品作为菌株来源, 以进行生理小种的鉴定。然而, 由于芸薹根肿菌田间分离株具有异质性, 即单个根肿块中存在多种不同的生理小种, 这导致了鉴别系统的结果仅显示其中优势生理小种的类型^[57-58]。为了使鉴定结果更加符合菌源的真实致病能力, 研究人员提出采用单孢分离系菌株代替肿根样品进行生理小种鉴定。已报道的芸薹根肿菌单孢分离的方法有水琼脂法、毛细管打孔法、稀释液滴法、印痕法和冷冻盒接菌法等^[44,59-62]。

高莹莹^[52]将水琼脂法与印痕法结合起来, 建立了一种琼脂平面分块印迹法, 并通过 PCR 技术在部分被根肿菌单孢侵染的植株中检测到病原菌的存在。然而, 由于该研究所获得的单孢接种材料的根肿体积较小, 因此未能成功进行生理小种鉴定。高青云使用琼脂糖凝层法对不同来源的根肿菌株进行单孢分离, 成功扩繁得到 205 株单孢系菌株, 并对其中 40 株进行了生理小种鉴定; Williams 鉴定结果表明, 共有 10 个不同的生理小种类型被识别出来^[50]。张晶使用冷冻盒接菌法对中国 9 个大白菜产区的根肿菌进行单孢分离, 共得到 281 个单孢菌株; 随后, 通过 Williams 系统鉴定出 15 个不同类型的生理小种^[63]。芮婷婷在传统水琼脂法的基础上加入亚基蓝, 并成功分离得到 79 株根肿菌单孢系菌株; Williams 系统鉴定结果显示, 这些菌株中共

存在 12 种不同类型的生理小种^[59]。值得注意的是, 上述研究均发现 4 号生理小种在所有单孢菌株中占比最大, 表明其为目前我国的优势生理小种。

芸薹根肿菌作为一种严格的专性寄生菌, 受其无法通过人工分离培养的制约, 再加上其休眠孢子粒径仅为 3–5 μm ^[64], 从而使得其单孢分离和扩繁过程面临巨大的挑战。目前所建立的单孢分离体系存在操作烦琐、耗时耗力、发病及扩繁成功率低等诸多缺点, 同时要求操作人员具备较高的专业技术水平, 这在很大程度上制约了该技术的推广和应用。

2.4 生理小种鉴定的分子生物学方法

分子生物学方法和技术的发展为芸薹根肿菌的生理小种分化研究提供了一种新手段, 其应用可以客观地估计生物体内和生物体之间的变异, 以这种方式获得的数据可能与宿主反应相关。1995 年, Buhariwalla 等^[65]开发出针对芸薹根肿菌的特异性 PCR 引物作为遗传变异的潜在标记。Möller 等^[57]使用随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 分析技术, 将多条随机 10 碱基对的引物应用于来自 3 个单孢分离株的芸薹根肿菌 DNA, 得到的结果与 ECD 系统中芸薹属寄主接种病原后所显示的芸薹根肿菌种群分类进行了比较。2000 年, Manzanares-Dauleux 等^[58]比较了 7 种不同致病型的 37 个单孢分离株的 RAPD 谱。在一种特定致病型(P1)的所有分离株的分子模式中发现了一个 RAPD 标记 OPL141200, 随后被转化为序列特定扩增区域(sequence characterized amplified regions, SCAR)。Klewer 等^[66]建立了 4 种具有不同毒力模式的芸薹根肿菌单孢分离物的指纹和限制性片段长度多态性标记(restriction fragment length polymorphism, RFLP)。张梅使用特异性引物对 12 个不同来源的病根样品的核糖体 DNA

(ribosomal DNA, rDNA)区域进行扩增,以探究在不同的根肿菌生理小种之间可能存在的核苷酸序列差异;然而,序列比对的结果显示,这12个样品的18S和28S区域表现出高度的保守性^[54]。上述结果表明,目前仅基于根肿菌rDNA区域的序列差异无法区分其生理小种的类型。由于在常规PCR中,引物易发生非特异结合,导致假阳性结果,因此,在2011年发展出了核糖核酸酶H依赖性聚合酶链反应(RNase H-dependent PCR, rhPCR),在常规PCR的基础上增加了核糖核酸酶(ribonuclease H2, RNase H2)和封闭式可切割 rhPCR 引物,消除了反应过程中引物二聚体的形成,可显著提高扩增反应的灵敏度和特异性^[67]。Fu等^[68]在加拿大西部阿尔伯塔省采集了79个病根样品,利用rhPCR进行扩增,发现其中有50个样品包含了多个根肿菌菌株,该结果也证实了根肿菌存在多个生理小种混合感染的现象。

虽然近年来在芸薹根肿菌分子研究方面有诸多进展,但仍未开发出一套可以区分芸薹根肿菌不同生理小种的成熟体系,因此,目前利用差异化寄主建立的Williams和ECD生理小种鉴别系统仍是主要的鉴定手段,而分子技术作为一种辅助工具也起到了一定的区分和甄别作用。

3 土壤中芸薹根肿菌休眠孢子的检测与定量方法

3.1 诱饵作物法

Samuel等^[69]开发出了利用诱饵作物来检测根肿菌休眠孢子的方法,该方法将白菜或甘蓝幼苗种植于待检测的土壤中,一周后利用醋酸洋红对植物根部进行染色,并在显微镜下观察根毛内是否有游动孢子囊的存在;该方法的检测下限为每克土壤1 000个孢子。Macfarlane^[70]进

一步将根毛中的孢子数量与植物的发病程度关联起来,这种利用诱饵作物的方法也同样被应用于其他病原体的检测^[71]。然而,使用诱饵作物对土壤中芸薹根肿菌休眠孢子数量进行检测不仅要求研究人员有较高的专业技术水平,而且费时费力,因此,这很难发展为一种常规便捷的检测方法。

3.2 显微镜观察法

1978年,Buczacki等^[72]通过胶溶作用后从土壤样品中过滤出粗矿物质,剩余物质与40%蔗糖混合,接着让混合物静置以利于让大多数矿物颗粒沉淀出来,使孢子处于悬浮状态;最后使用Nomarski干涉对比光学系统在显微镜上对孢子进行光学计数。随后,Botz等^[73]在此方法基础上进行了修改,并试图将几丁质浓度与检测到的孢子数量关联起来。Takahashi等^[74]开发了荧光检测法来检测芸薹根肿菌,土壤悬浮液用单一荧光染料荧光增白剂28染色后,在荧光显微镜下计数发荧光的休眠孢子。该方法经过修改后增加了一种可以穿透受损和无活力细胞的荧光染料溴化乙锭(ethidium bromide, EB)对孢子进行染色,而荧光增白剂28可以与未受损细胞中的几丁质(休眠孢子壁的主要成分)结合;这种方法能够对活休眠孢子(蓝色荧光)和非活休眠孢子(红色荧光)进行差异染色,随后的研究发现,蓝色荧光孢子与植物发病严重程度之间存在相关性^[64]。然而,由于土壤成分复杂,其中的荧光土壤颗粒和其他伪影会导致休眠孢子难以被识别出来。为了降低土壤杂质对根肿菌显微观察的干扰,张梅首先从土壤中提取根肿菌的休眠孢子,然后进行显微镜观察;观察结果显示,视野中土壤杂质显著减少,然而休眠孢子的数量相对较少,仅能观察到零星分布的孢子囊^[54]。因此,通过显微镜检查土壤中的根肿菌休眠孢子不太可能成为常规诊断分析方法。

3.3 血清学检测法

Arie 等^[75]首次尝试了基于血清学的芸薹根肿菌检测方法,开发了一种用于土壤样品的免疫荧光检测。然而,这项研究未测试抗血清与其他生物体的交叉反应性,也未讨论检测的上下限。Lange 等^[76]制备了一种多克隆抗血清,用于点免疫结合测定法检测芸薹根肿菌;由于包被于根肿菌休眠孢子表面的抗血清具有特异性,因此不会与其他常见的根部病原体发生交叉反应。Wakeham 等^[77]制备了3种抗芸薹根肿菌的多克隆抗血清,这些抗血清通过蛋白质印迹法、试纸法、斑点印迹法、免疫印迹实验、间接酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)以及间接免疫荧光测定的方式被应用于土壤中根肿菌的诊断;经测试,所用的抗血清与一系列土壤真菌显示出低交叉反应性,间接免疫荧光法能够快速检测土壤中低水平的芸薹根肿菌休眠孢子,其中,一种多克隆 PAb 15/2 的检测下限为每克土壤 100 个孢子(图 2)。

然而,针对植物病原体产生的抗血清之间的特异性差异很大,由于多克隆抗血清不能复制,因此其数量有限,并且抗体制作需要高昂的成本,所以它们作为诊断工具的用途受到较大的限制。

3.4 PCR 法

作为植物病原体诊断程序的常规组成部分,基于 PCR 的检测方法只需要病原体的 DNA 作为模板,因此,该方法非常适合检测专性病原体,如芸薹根肿菌。此外,PCR 法也适用于土壤和小组织样本,因此可以有效替代其他更受限制和耗时的检测方法。

Ito 等^[78]开发了一种半巢式 PCR,以纯化的芸薹根肿菌 DNA 为模板,用引物(PBTZS-2、PBTZS-3 和 PBTZS-4)扩增得到了根肿菌特异性

的单拷贝序列。这些引物后来被用于检测土壤中芸薹根肿菌的数量。目前已经开发出许多针对芸薹根肿菌 rDNA 或内部转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)的 PCR 测定方法,并在该区间内设计出了一些可用于检测的特异性引物(表 3)。Faggian 等^[79]利用两对引物(PbITS1/PbITS2 和 PbITS6/PbITS7)开发了针对芸薹根肿菌 rDNA 和 ITS 区域的嵌套 PCR 检测方法;该测定法用于人工接种的土壤和盆栽混合物、自然侵染的土壤和植物组织,能够检测低至每克盆栽混合物 1 000 个孢子水平的芸薹根肿菌 DNA。Cao 等^[80]开发了一种 rDNA 一步法 PCR 方法,该方法中的两对引物(TC1F/TC1R 和 TC2F/TC2R)都能够一

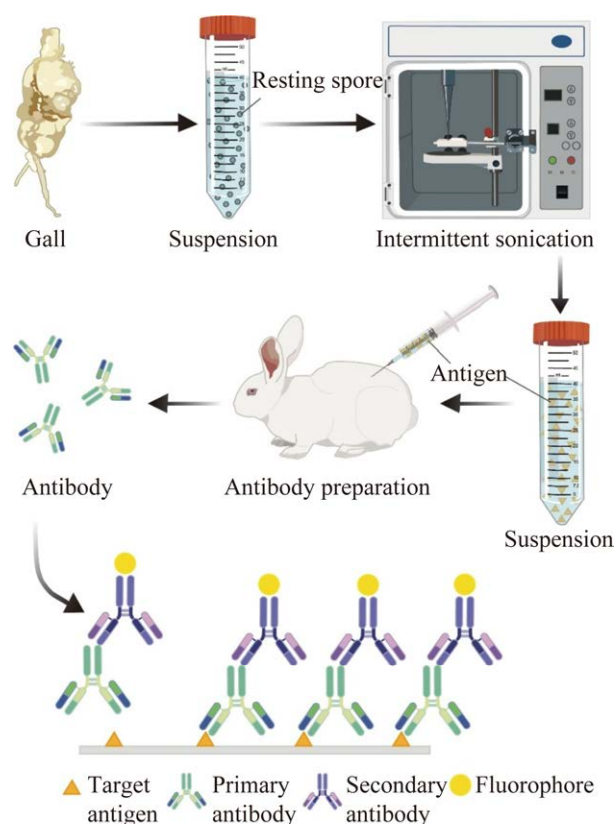


图 2 芸薹根肿菌休眠孢子间接免疫荧光法检测流程图

Figure 2 Flowchart of indirect immunofluorescence method for *Plasmodiophora brassicae* resting spores detection.

致地检测出自然侵染土壤中的芸薹根肿菌，并提高了检测结果与病情指数之间的相关性。张梅^[54]在根肿菌 rDNA 区域设计了两对引物(1RF 和 2RF)，其中 1RF 的扩增产物覆盖了 18S 部分序列、ITS1 和 5.8S 完整序列以及 ITS2 的部分序列，而 2RF 的扩增产物位于 18S 末端区域；这两对引物均被成功应用于芸薹根肿菌的早期定性检测。高莹莹使用前人设计的引物 Plasm0-3/Plasm0-4 对单孢接种的植物材料进行检测，结果表明，该引物能够有效检测到表现出轻微根肿表型的寄主中根肿菌的存在^[52,81]。关格格等^[82]利用根肿菌

ITS 序列，设计了一对特异性引物(PbITS1-F/PbITS1-R)，可以在每克土壤含菌量超过 1 000 个孢子的条件下特异性检测到根肿菌的存在。

基于 PCR 的土壤中芸薹根肿菌检测法不受土传病原真菌、细菌、线虫及寄主植物内生菌的 DNA 干扰，上述研究均未报告任何非特异性扩增，同时，检测灵敏度的逐步提高以及检测结果与病情指数相关性的提高表明，PCR 可以作为常规诊断检测的基础方法。然而，该方法不能对土壤中的芸薹根肿菌休眠孢子进行准确定量。

表 3 基于根肿菌核糖体 DNA 序列开发的特异性引物

Table 3 Specific primers developed based on *Plasmodiophora brassicae* ribosomal DNA (rDNA) sequences

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence (5'→3')	文献来源 Reference
PbITS1	ACTTGCATCGATTACGTCCC	[79]
PbITS2	GGCATTCTCGAGGGTATCAA	
PbITS6	CAACGAGTCAGCTTGAATGC	
PbITS7	TGTTTCGGCTAGGATGGTTC	
TC1F	GTGGTCGAACCTTCATTAAATTTGGGCTCTT	[80]
TC1R	TTCACCTACGGAACGTATATGTGCATGTGA	
TC2F	AAACAACGAGTCAGCTTGAATGCTAGTGTG	
TC2R	CTTTAGTTGTGTTTCGGCTAGGATGGTTCG	
1RF-F	TAGATAGCAGTGGGTGGC	[54]
1RF-R	CTGAGGGAATCCTTGTTAGT	
2RF-F	CGCCCGTCGCTCCTACTGAT	
2RF-R	TACGGAACGTGTATGTGCATGTGA	
Plasm0-3	ATTTTCGAACCATCCTAGCC	[81]
Plasm0-4	GGTCGCTTCGTTCAAGCTAT	
PbITS1-F	GAACGGGTTCACAGACTAGATAGCAGTG	[82]
PbITS1-R	TATGCCGCAGCAAAGCTCATTGTCT	
Pb4-1	TACCATACCCAGGGCGATT	[83]
PbITS6	CAACGAGTCAGCTTGAATGC	
PbF	AAACAACGAGTCAGCTTGAATGC	[84]
PbR	TTCGCGCACAAGCACTTG	
PbP	CGCGCCATGCGACACTGTAAATTG	
PBF1	GCTCCTGCGTGTGCTGTTATT	[85]
PBR1	CTGCGTTCTTCATCGTTGTGA	

3.5 实时荧光定量 PCR (real time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)法

RT-qPCR 是在反转录技术的基础上发展起来的一种方法,可以对基因表达水平进行常规和精确定量^[86](图 3)。近年来,科研人员将 RT-qPCR 技术应用于土壤中芸薹根肿菌的检测,为预测根肿病发展的风险和评估休眠孢子在田间的分布提供了一种强大而可靠的技术。

Sundelin 等^[83]通过全细胞脂肪酸(whole-cell fatty acid, WCFA)测量和 RT-qPCR 对植物体内芸薹根肿菌进行了评估,其中 RT-qPCR 所用到的引物为基于 ITS 区开发出来的 Pb4-1 和 PbITS6;虽然该研究未直接检测土壤中的芸薹根肿菌的数量,但所使用的 2 种方法的结果均与土壤中休眠孢子含量具有良好的相关性;因此,这 2 种方法都有可能用于估计自然侵染的土壤中休眠孢子

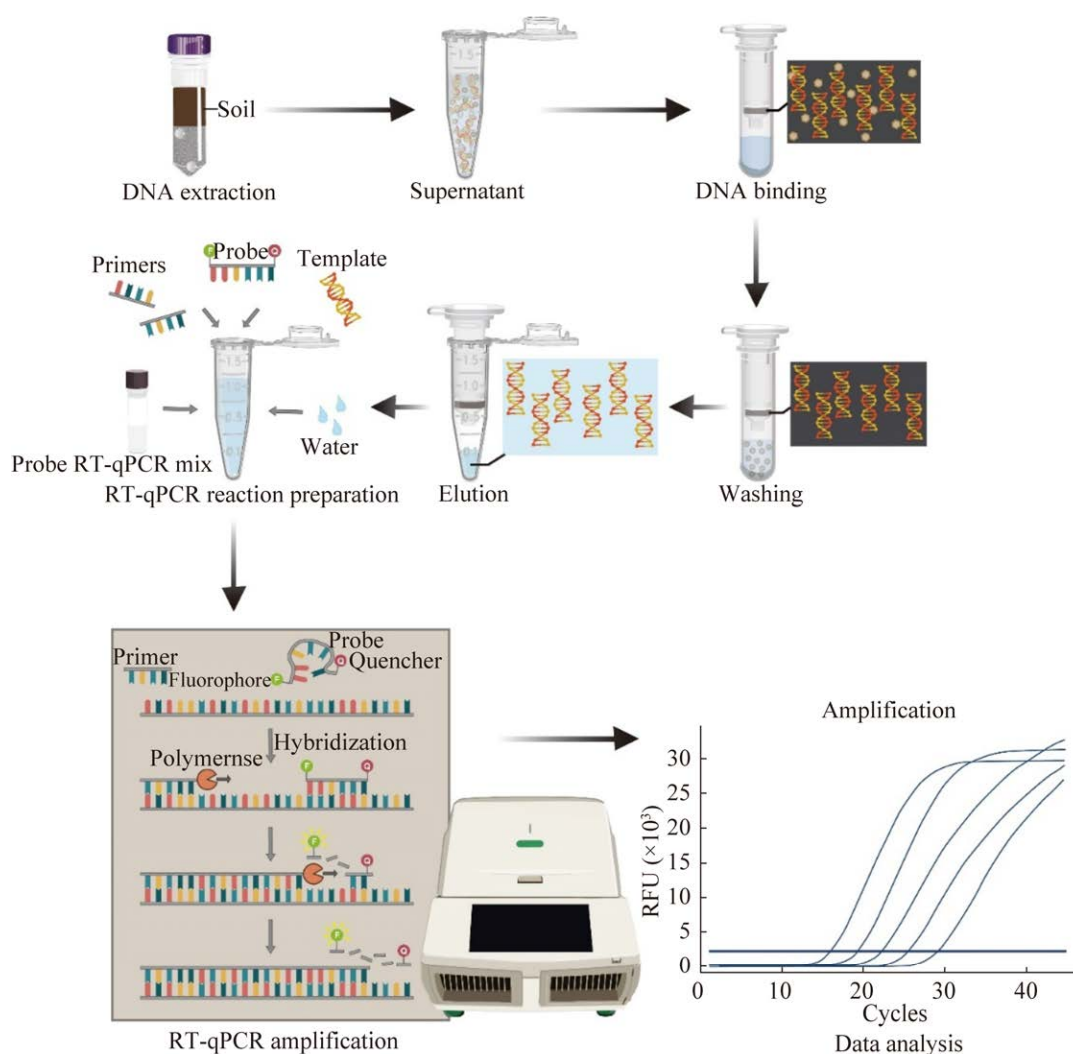


图 3 实时荧光定量 PCR 法检测流程图 实验材料为含有芸薹根肿菌休眠孢子的土壤样本

Figure 3 Flowchart of real time fluorescence quantitative PCR method. The experimental materials are soil samples containing resting spores of *Plasmodiophora brassicae*.

含量的标准化测定。Wallenhammar 等^[84]设计了一对特异性引物(PbF/PbR)和荧光探针(PbP),使用基于 TaqMan 技术的 RT-qPCR 方法用于直接检测和定量土壤样品中的芸薹根肿菌核糖体 DNA 的一段序列,结果显示,土壤样品中的检测下限为每克土壤中 500 个休眠孢子。随后, Li 等^[85]基于芸薹根肿菌 rDNA-ITS 的保守区设计了一对引物 PBF1/PBR1,开发了一种 SYBR Green I RT-qPCR 检测方法检测并量化芸薹根肿菌;使用该方法的检测下限为每克土壤中 1 000 个孢子。虽然 SYBR Green I RT-qPCR 检测的灵敏度不如基于 TaqMan 技术的 RT-qPCR 方法,但大大降低了检测成本^[84-85]。卢文斌等^[16]建立了油菜土壤芸薹根肿菌 RT-qPCR 定量检测技术,结果显示,对于湖南常德市油菜种植区而言,土壤中休眠孢子浓度低于每克土壤 1.34×10^3 个的田块根肿病发病概率较低,可种植非抗性油菜品种;而土壤中休眠孢子浓度高于每克土壤 1.34×10^3 个的田块则需要种植根肿病抗性品种,或及时进行防治。

黏土颗粒、腐殖酸、酚类化合物、重金属和各种污染物等土壤成分会抑制 PCR 并降低定量的可靠性,因此,PCR 测定通常会包含内部对照(internal control, IC),以量化每个样品中的抑制程度。大多数对芸薹根肿菌的 RT-qPCR 测定缺乏 IC。Deora 等^[87]开发了包括竞争性内部阳性对照(competitive internal positive control, CIPC)在内的多重 TaqMan RT-qPCR 测定,以识别和补偿土壤中芸薹根肿菌休眠孢子的定量抑制。此外,由于 RT-qPCR 无法区分有活力的孢子和无活力的孢子,因此,得到的测验结果数值通常会比实际情况偏高。目前已经开发出多种方法来排除 RT-qPCR 在无活力孢子中的扩增,其中,最有效的化学物质之一是叠氮溴化丙锭(propidium monoazide, PMA),它可以穿透细菌和真菌的无活力细胞的细胞膜,在光活化时与 DNA 结合,

并抑制无活力细胞的 RT-qPCR 扩增^[88]。Al-Daoud 等^[89]评估了 PMA 预处理对芸薹根肿菌的活性和非活性,以及成熟和未成熟休眠孢子的影响,结果显示,热处理之后对成熟孢子进行 RT-qPCR 的估计值几乎无变化,PMA-RT-qPCR 的估计值和生物测定中的根肿严重程度均大大降低,同时只有小部分未成熟孢子的 DNA 可以被 PMA-RT-qPCR 扩增出来。该方法显著提高了 RT-qPCR 应用于芸薹根肿菌检测的准确度。

3.6 微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR)法

ddPCR 是一种样本切割技术,它通过加入微孔板、毛细血管或油乳,将单个 DNA 分子稀释成更小的反应体系,PCR 在这些小的反应体系中单独运行;PCR 反应结束后,根据荧光信号的有和无将反应单元分别定义为阳性和阴性,检查并统计所有阳性反应单元数目;利用泊松定律,模板的数量与阳性反应系呈正相关,从而可以计算出模板的确切拷贝数^[90](图 4)。Wen 等^[91]同时使用 ddPCR 和 RT-qPCR 定量褐土、深褐土和黑土样品(具有不同的质地、pH 和有机物含量)中的芸薹根肿菌休眠孢子,结果显示,ddPCR 在不同土壤类型之间显示出类似的结果,而 RT-qPCR 在相同休眠孢子浓度下通常显示出更低的计数结果,而在黑土样品中 DNA 的扩增则完全受到抑制。

由此可见,RT-qPCR 检测法容易受到土壤中各种成分的干扰,尤其是在富含腐殖质的土壤中,RT-qPCR 可能会完全被抑制。ddPCR 通过将单个 DNA 样本分隔到成千上万个单独的反应中,显著降低了抑制物对反应的干扰,扩增基质效应减小,因此,该方法具有更高的抗干扰能力和稳定性。此外,由于 ddPCR 不依赖于标准样品和标准曲线,也不依赖荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数,因此相较于 RT-qPCR 法,该方法具有更高的重复性及通用性^[92]。然而,

ddPCR 法只适用于休眠孢子含量为每克土壤 10^2 – 10^7 个孢子的栽培基质或田间土壤样品, 当在每克土壤中的休眠孢子浓度超过 10^7 个时, 该方法准确性降低, 有过度估计的趋势^[91]。

随着科学技术的不断发展, 针对土壤中芸薹根肿菌休眠孢子的检测方法也不断地更新迭代。这些方法各自具有独特的优势和局限性, 通过全面比较这些方法, 我们可以更好地了解它们各自的特点和适用范围, 为未来根肿菌检测和定量方法的发展提供有益的启示(表 4)。

4 展望

中国是世界上最大的芸薹属作物种植国家^[93]。

1936 年在中国台湾省首次报道了芸薹属作物根肿病的发生, 随后该病逐渐蔓延至中国各地, 目前根肿病至少在中国 20 多个省份被发现, 对十字花科作物的产量和质量造成严重影响^[40-41,46,51,94]。抗病品种的选用是防治根肿病的根本措施。然而, 由于芸薹属作物通常仅对根肿菌的某个生理小种具有抗性, 这种抗性可能会被毒力更强的生理小种所克服, 导致寄主作物出现更严重的病害症状。因此, 对芸薹根肿菌的生理小种致病性比较分析具有重要意义。利用不同寄主对芸薹根肿菌田间菌株的致病型进行估计, 可以协助农民选择种植对目前地区的芸薹根肿菌优势生理小种不太敏感的作物品种, 从而减少预期的作物损

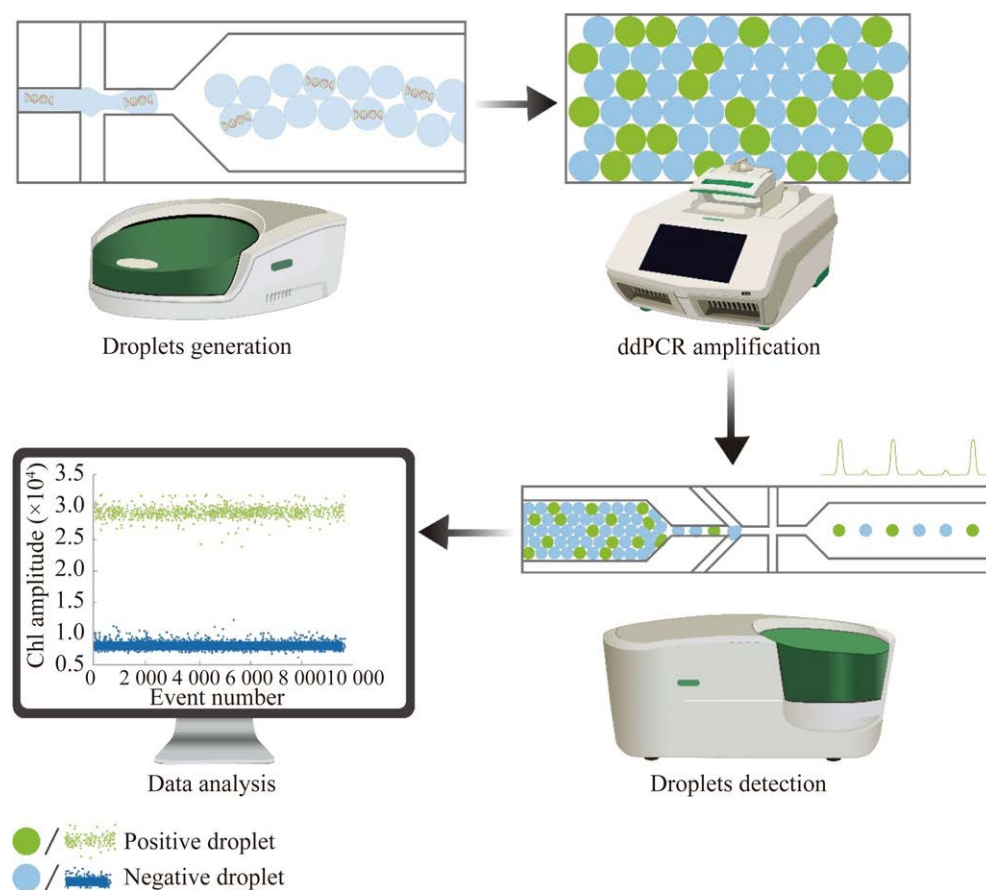


图 4 土壤中芸薹根肿菌休眠孢子微滴式数字 PCR 法检测流程图

Figure 4 Flowchart of droplet digital PCR (ddPCR) method for *Plasmodiophora brassicae* resting spores detection in soil.

表 4 土壤中芸薹根肿菌的检测与定量方法比较

Table 4 Comparison of detection and quantification methods for *Plasmodiophora brassicae* in soil

检测方法 Method		样本来源 Sample	检测上下限 Detection limit	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	文献来源 Reference
传统检测法 Conventional methods	诱饵作物法 Bait crop method	病土样本 Infected soil	检测下限： 每克土壤 10 ³ 个孢子 Detection lower limit: 10 ³ spores per gram of soil	样本制备无成本、周期短；检测不需仪器 Sample preparation: cost-free, short period; Detection: equipment-free	专业技术水平要求较高；检测周期长 High level of technical expertise required; Long detection period	[69]
	显微镜观察法 Microscopy	病土样本 Infected soil	—	样品制备成本低、周期短；检测过程仅需显微镜 Sample preparation: low-cost, short period; Detection: microscopy-based	专业技术水平要求较高；检测速度因人而异；结果受土壤成分伪影影响大 High level of technical expertise required; Detection speed varies among individuals; The results are affected by soil composition artifacts	[64]
分子检测法 Molecular methods	血清学检测法 Serology	抗原 Antigen	检测下限： 每克土壤 10 ² 个孢子 Detection lower limit: 10 ² spores per gram of soil	灵敏度高 High sensitivity	样品制备成本高、周期长、需使用超声波细胞破碎仪、抗血清特异性差异大、数量有限 Sample preparation: high-cost, long period, ultrasonic cell disruptor required, large specific differences and limited quantity of serum	[77]
	聚合酶链式反应法 Polymerase chain reaction (PCR)	病原 DNA Pathogen DNA	检测下限： 每克土壤 10 ³ 个孢子 Detection lower limit: 10 ³ spores per gram of soil	样品制备周期短；检测流程简单、快速、高效 Sample preparation: short period; Detection: simple, speedy, efficient	成本较高；样品制备需使用 DNA 提取试剂盒；检测需使用 PCR 仪；不能对休眠孢子进行定量 High-cost; Sample preparation: DNA extraction kit required; Detection: PCR machine required; Quantification of resting spores is not feasible	[82]

(待续)

(续表 4)

检测方法 Method	样本来源 Sample	检测上下限 Detection limit	优点 Advantage	缺点 Disadvantage	文献来源 Reference
实时荧光定量 PCR 法 Quantitative real-time PCR (RT-qPCR)	病原 DNA Pathogen DNA	检测下限: 每克土壤 500 个孢子 Detection lower limit: 500 spores per gram of soil	样品制备周期短; 检测灵敏、快速、精确度高 Sample preparation: short period; Detection: high sensitivity, speedy, high accuracy	成本较高; 样品制备需使用 DNA 提取试剂盒; 检测需使用 RT-qPCR 仪, 操作烦琐, 试剂成本较高, 容易受土壤其他成分干扰 High-cost; Sample preparation: DNA extraction kit required; Detection: RT-qPCR machine required, complex procedures, costly reagents, easily influenced by other soil components.	[84]
微滴式数字 PCR 法 Droplet digital PCR (ddPCR)	病原 DNA Pathogen DNA	检测上下限: 每克土壤 10^2-10^7 个孢子 Detection limit: 10^2-10^7 spores per gram of soil	样品制备时间短; 检测流程快、抗干扰能力强、稳定性强、重复性及通用性高 Sample preparation: short period; Detection: speedy, strong anti-interference capability, high stability, repeatability and generality	成本较高; 样品制备需使用 DNA 提取试剂盒及微滴生成仪; 检测需使用 PCR 仪和微滴读取仪; 不适用于每克土壤中休眠孢子数量超过 10^7 个的情况 High-cost; Sample preparation: DNA extraction kit and droplet generation machine required; Detection: PCR and droplet detection machines required; Not suitable for spore densities exceeding 10^7 per gram of soil	[91]

—: 暂无数据

—: No data available.

失。此外, 差异化寄主还将为抗根肿病育种提供重要材料, 以提高其抗病性^[29,95]。

综上所述, 我们对芸薹根肿菌的生理小种研究目前仍然相对滞后。在 Williams 和 ECD 系统被建立以来的 50 余年间, 科研人员尚未成功开

发出可以替代这 2 种系统且具有广泛应用潜力的其他鉴定方法。目前, 利用差异化寄主所建立的生理小种鉴别系统仅停留在观察宿主根部表型的层面, 这种方法存在着一些不容忽视的缺陷: 首先, 利用不同寄主进行致病性研究耗时且

劳动密集,而且容易受到不同环境条件的影响。其次,芸薹根肿菌生理小种的变异是相对于宿主的基因型来定义的,而十字花科植物作为异花授粉作物,其宿主基因型本身变化很大,这使得不同鉴别系统结果之间的比较变得困难。因此,为了推动芸薹根肿菌生理小种研究的进展,亟须发展新的鉴定方法,以克服当前系统的局限性并提高研究的效率和准确性。

近年来,单细胞测序技术的发展为根肿菌生理小种的研究提供了一个新思路。该技术包含了一套强大的新方法来研究生物异质性,过程涉及将采集的样品进行单个细胞的裂解与分离、遗传物质的扩增、文库的构建与测序以及数据的可视化分析等,其主要目标是将组织中的细胞划分为离散的类别(细胞类型或状态),确定每种细胞类型的独特转录谱,将它们与特定的细胞类型功能相关联,并定义细胞类型如何在功能或发育上相互关联(即早期与晚期发育阶段)^[96-98]。目前,单细胞测序技术在动物及植物研究中已取得一些进展,该技术在植物中的应用包括:植物细胞类型及功能研究、植物结构的时空发育轨迹、鉴定植物在生物及非生物胁迫下的表达基因、研究物种间的进化关系以及为作物育种筛选优质基因等^[99]。然而,目前尚无研究阐明单细胞分析将如何应用于微生物领域。

根肿病向来被称作“植物癌症”,根肿菌在侵染植物的过程中表现出一些与动物肿瘤细胞相似的特征,比如:维持增殖信号、组织侵染和转移以及避免免疫摧毁等^[100]。因此,我们可以从动物肿瘤细胞异质性的单细胞测序方法中汲取启示,探讨将该技术应用于根肿菌生理小种研究的可行性。Zhang 等^[101]对来自 9 个胃腺癌肿瘤和 3 个非肿瘤样本的 27 677 个细胞进行了单细胞转录组测序分析,结果首先通过聚类分析将细胞划分为 14 个簇,随后对恶性细胞进行亚聚类

分析,确定了 5 个具有不同表达谱的细胞亚组(C1-C5),其中,亚组 C1、C2 和 C3 符合 Lauren 分类(一种胃癌的分类方法,根据细胞形态与组织化学,将胃癌分为肠型、弥漫型和混合型 3 类)的 3 个典型亚型,而 C4 和 C5 是与前 3 个亚组具有不同分子特征的新的细胞亚群。该研究的方法和结果为根肿菌休眠孢子的单细胞测序提供了有力的参考。

目前,已经建立了一套成熟的分离体系,能够从受侵染的根组织中纯化出根肿菌的休眠孢子^[102],这为单细胞测序技术的应用奠定了基础。由于根肿菌具有混合侵染的特性,运用该技术或许能够有效区分出根肿菌中不同的细胞类型,并通过聚类分析将其划分为不同的亚组。通过将不同亚组类型与根肿菌不同生理小种的毒力水平联系起来,最终有望建立起一个基于分子水平的根肿菌生理小组鉴别系统。这一系统的建立将为深入理解根肿菌生理小种的多样性、分子生物学特性以及与宿主互作的分子机制提供有力工具。然而,单细胞测序技术在根肿菌研究中的应用可能会面临一些挑战:(1) 细胞壁的处理方法。相较于动物,植物、藻类和真菌物种具有复杂的多糖细胞壁,必须去除或使其通透以进行单细胞特征化^[97]。根肿菌休眠孢子的细胞壁主要由几丁质构成,未来需要摸索出一种既能有效去除其细胞壁,又不引起细胞产生意外转录或代谢变化的方法。(2) 流程的标准化。尽管单细胞转录组学在动物研究领域得到了常规和广泛的应用,但在微生物研究方向还处于起步阶段。因此,将单细胞测序技术应用于根肿菌研究的流程目前只能参考动物领域的标准,并需要在实验中随时进行调整和修改,以建立一套适用于根肿菌研究的标准化流程。该技术能够将生理小种研究从较落后的表型研究阶段推进到分子研究阶段,从分子水平研究各生理小种的差异,这将极大地提

高生理小种鉴定的效率和准确性。

当前,用于土壤中根肿菌检测和定量的传统方法包括 PCR、RT-qPCR 及 ddPCR。尽管这些方法具备高度的灵敏性和特异性,但 RT-qPCR 检测法易受到土壤中各种成分的抑制影响。虽然 ddPCR 法有效地解决了这一问题,但其检测范围存在一定的限制。此外,这 3 种方法均需要专业的操作人员和昂贵的设备,整个流程较为耗时,这决定了它们只能在实验室中应用,极大地限制了它们在基层应用的推广。蔬菜生产地点一般位于距离城市较远的农村地区,而针对田间土壤中根肿菌的检测则必须将样品运送至具备相应实验条件的实验室进行。这不仅增加了检测的经济成本,同时也耗费了宝贵的时间。因此,亟须开发出一种快速、低成本的根肿菌现场检测方法。

重组酶聚合酶扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA) 是近年来开发出的一种能替代 PCR 技术的等温扩增方法。该技术依赖于重组酶、单链 DNA 结合蛋白 (single-stranded DNA-binding protein, SSB) 和链置换 DNA 聚合酶这 3 种核心蛋白;重组酶与引物结合形成重组酶-引物复合物,随后在双链 DNA 中扫描同源序列并促进链交换,与此同时,SSB 结合在解离的单链 DNA 上形成 D 环,阻止了单链 DNA 复性为双链 DNA;随后,重组酶从引物上解离,链置换 DNA 聚合酶结合到引物的 3' 端进行链延伸,合成新的互补链^[103](图 5)。此外,可以通过电泳、侧流层析试纸条和荧光探针等方法对 RPA 扩增产物进行检测和可视化^[104-107]。

李华伟等^[104]使用 RPA 法检测到田间样品(植物、土壤、水体)的甘薯薯瘟病菌(*Ralstonia solanacearum*),并通过电泳法对结果进行可视化。鞠玉亮等^[105-106]将 RPA 和胶体金侧流层析试纸条(lateral flow dipstick, LFD)检测法结合起来,分别建立了棉花大丽轮枝菌(*Verticillium*

dahliae)和小麦纹枯病菌(*Rhizoctonia cerealis*)的 RPA-LFD 快速检测体系,并从田间土壤样品中成功检测到这两种病菌,检测结果与常规 PCR 检测结果具有一致性;该方法在 37 °C 条件下仅需 30 min 即可完成对病原菌的可视化检测,且无须依赖任何仪器辅助,可通过肉眼直接观测获得检测结果。然而,上述方法仅具备对土壤中病原菌的检测功能,而不能对其密度进行准确定量。DeShields 等^[107]在 RPA 的基础上加入了核酸外切酶 III (exonuclease III, *exo*)和 *exo* 荧光探针,开发出一种实时 RPA 法用于土壤中马铃薯粉痂菌

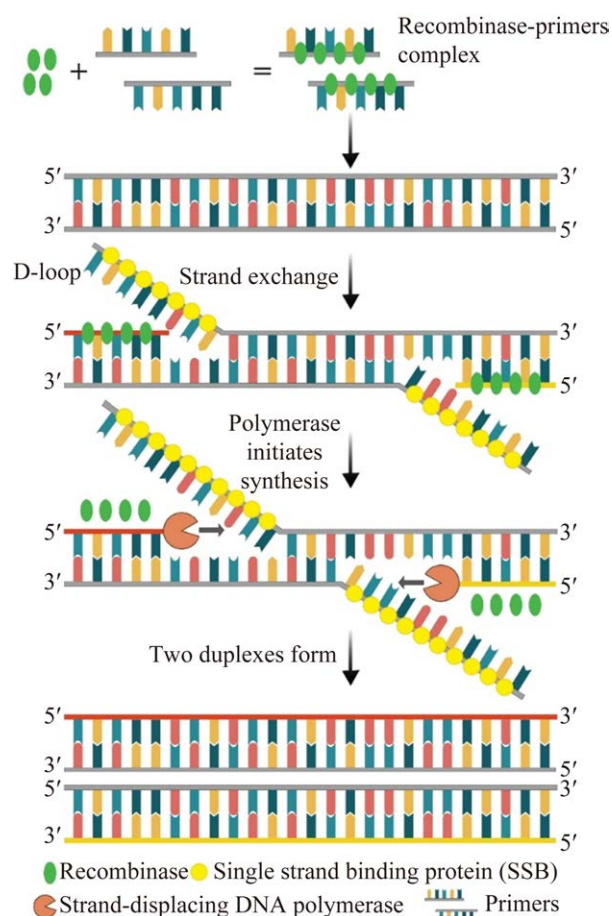


图 5 重组酶聚合酶扩增技术 (recombinase polymerase amplification, RPA) 流程图

Figure 5 Flowchart of recombinase polymerase amplification (RPA).

(*Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea*, Sss)的检测;结果表明,实时 RPA 法可在每克土壤中检测到低至 100 个 Sss 子囊孢子;在子囊孢子浓度范围为每克土壤 100–34 000 个,通过线性回归分析显示实时 RPA 法和 RT-qPCR 法的相关系数为 0.98,表明两种方法之间的检测可靠性相当。因此,RPA 方法具备替代 RT-qPCR 进行病原菌现场诊断的潜力。

目前尚无关于 RPA 技术在根肿菌研究中的应用报告,然而上述在其他病原体上的研究成果为该技术在土壤中进行根肿菌检测与定量的应用提供了研究思路和方法指导。相较于 PCR、RT-qPCR 及 ddPCR 检测法,RPA 技术的优势体现在两方面:(1) 样品制备方面,RPA 法不需要经过病原菌 DNA 提取过程,只需通过热或碱对样本进行预处理促进核酸释放即可;而 PCR、RT-qPCR 及 ddPCR 法则需要先从土壤样品中提取病原 DNA,该过程需要使用特定的试剂盒以及离心机等仪器。(2) 检测流程方面,RPA 法反应时间短,仅需 10–20 min,并且反应全程在恒温条件下进行(37–42 °C),不需要昂贵的仪器设备。此外,该方法对典型的 PCR 抑制剂如多糖、腐植酸、盐和离子清洁剂更具耐受性。PCR、RT-qPCR 及 ddPCR 法的检测流程较 RPA 法烦琐,需使用特定的仪器,如 PCR 仪、RT-qPCR 仪、微滴读取仪等,并且反应时间一般大于 30 min。综上所述,PCR、RT-qPCR 及 ddPCR 法更适合芸薹根肿菌的实验室检测,需要由专业人员进行操作。RPA 法操作简单、成本低廉,即使是未经专业培训的农民和基层工作人员也能进行该实验。因此,我们认为该技术具备更广泛的土壤病原体现场检测应用潜力。

REFERENCES

[1] AL-SHEHBAZ IA. A generic and tribal synopsis of the

- Brassicaceae* (*Cruciferae*)[J]. *Taxon*, 2012, 61(5): 931-954.
- [2] WARWICK SI, FRANCIS A, AL-SHEHBAZ IA. *Brassicaceae*: species checklist and database on CD-Rom[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2006, 259(2): 249-258.
- [3] SOMÉ A, MANZANARES MJ, LAURENS F, BARON F, THOMAS G, ROUXEL F. Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates[J]. *Plant Pathology*, 1996, 45(3): 432-439.
- [4] CUBETA MA, CODY BR, WILLIAMS PH. First report of *Plasmodiophora brassicae* on cabbage in eastern North Carolina[J]. *Plant Disease*, 1998, 82(1): 129.
- [5] PAZ LIMA ML, CAFÉ-FILHO AC, NOGUEIRA NL, ROSSI ML, SCHUTA LR. First report of clubroot of *Eruca sativa* caused by *Plasmodiophora brassicae* in Brazil[J]. *Plant Disease*, 2004, 88(5): 573.
- [6] DONALD EC, CROSS SJ, LAWRENCE JM, PORTER IJ. Pathotypes of *Plasmodiophora brassicae*, the cause of clubroot, in Australia[J]. *Annals of Applied Biology*, 2006, 148(3): 239-244.
- [7] DESOIGNIES N, EICKERMANN M, DELFOSSE P, KREMER F, GODART N, HOFFMANN L, LEGRÈVE A. First report of *Plasmodiophora brassicae* on rapeseed in the Grand Duchy of Luxembourg[J]. *Plant Disease*, 2009, 93(11): 1220.
- [8] BHATTACHARYA I, DUTTA S, MONDAL S, MONDAL B. Clubroot disease on *Brassica* crops in India[J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2014, 36(sup1): 154-160.
- [9] KIM WG, OH SK, SEMUNYANA M, HAN MJ, LEE GB, CHO WD. Occurrence of clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae* in Baechongchae[J]. *The Korean Journal of Mycology*, 2020, 48(4): 499-503.
- [10] STRELKOV SE, HWANG SF, MANOLII VP, TURNBULL G, FREDUA-AGYEMAN R, HOLLMAN K, KAUS S. Characterization of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) from canola (*Brassica napus*) in the Peace Country of Alberta, Canada[J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2021, 43(1): 155-161.
- [11] BOTERO RAMIREZ A, PADILLA-HUERTAS FL, GARCÍA C. Soil, climate, and management practices associated with the prevalence of clubroot in Colombia[J]. *Agronomía Colombiana*, 2022, 40(2): 228-236.

- [12] PADRÓN-RODRÍGUEZ L, CERDÁN CABRERA CR, SÁNCHEZ COELLO NG, LUNA-RODRÍGUEZ M, PÉREZ-LÓPEZ E. *Plasmodiophora brassicae* in Mexico: from anecdote to fact[J]. Plant Disease, 2022, 106(7): 1832-1836.
- [13] DIXON GR. The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2009, 28(3): 194-202.
- [14] 章艺, 马新焱, 余红瑞, 董正中, 雷娜, 余小林. 十字花科作物根肿病综合防治研究进展[J]. 中国蔬菜, 2022(10): 27-37.
- ZHANG Y, MA XY, YU HR, DONG ZZ, LEI N, YU XL. Research progress on integrated control of clubroot in cruciferous crops[J]. China Vegetables, 2022(10): 27-37 (in Chinese).
- [15] MURAKAMI H, TSUSHIMA S, SHISHIDO Y. Soil suppressiveness to clubroot disease of Chinese cabbage caused by *Plasmodiophora brassicae*[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2000, 32(11/12): 1637-1642.
- [16] 卢文斌, 郭诗芬, 徐定辉, 贺群华, 薛高尚, 张振乾, 刘忠松, 肖钢. 土壤根肿菌定量检测方法的建立及常德市油菜根肿病调查[J]. 中国油料作物学报, 2023: 1-7.
- LU WB, GUO SF, XU DH, HE QH, XUE GS, ZHANG ZQ, LIU ZS, XIAO G. Establishment of a detection method for soil *Plasmodiophora brassicae* and investigation of rapeseed clubroot in Changde[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2023: 1-7 (in Chinese).
- [17] DIEDERICHSEN E, FRAUEN M, LINDERS EGA, HATAKEYAMA K, HIRAI M. Status and perspectives of clubroot resistance breeding in crucifer crops[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2009, 28(3): 265-281.
- [18] SEDAGHATKISH A, GOSSEN BD, YU FQ, TORKAMANEH D, MCDONALD MR. Whole-genome DNA similarity and population structure of *Plasmodiophora brassicae* strains from Canada[J]. BMC Genomics, 2019, 20(1): 744.
- [19] LIU LJ, QIN L, ZHOU ZQ, HENDRIKS WGHM, LIU SY, WEI YD. Refining the life cycle of *Plasmodiophora brassicae*[J]. Phytopathology, 2020, 110(10): 1704-1712.
- [20] 刘勇, 赖佳, 孙小芳, 韦树谷, 曾华兰, 陈臣, 黄玲, 盛玉珍, 叶鹏盛. 根际微生态调控白菜根肿病发生的机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 381-401.
- LIU Y, LAI J, SUN XF, WEI SG, ZENG HL, CHEN C, HUANG L, SHENG YZ, YE PS. Research progress in the mechanism of rhizosphere micro-ecology in regulating the occurrence of clubroot disease in Chinese cabbage[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 381-401 (in Chinese).
- [21] HASAN J, MEGHA S, RAHMAN H. Clubroot in *Brassica*: recent advances in genomics, breeding, and disease management[J]. Genome, 2021, 64(8): 735-760.
- [22] BARR DJS. Evolution and kingdoms of organisms from the perspective of a mycologist[J]. Mycologia, 1992, 84(1): 1-11.
- [23] AIST JR, WILLIAMS PH. The cytology and kinetics of cabbage root hair penetration by *Plasmodiophora brassicae*[J]. Canadian Journal of Botany, 1971, 49(11): 2023-2034.
- [24] MACFARLANE I. Variation in *Plasmodiophora brassicae* Woron[J]. Annals of Applied Biology, 1955, 43(2): 297-306.
- [25] TSO HH, GALINDO-GONZÁLEZ L, STRELKOV SE. Current and future pathotyping platforms for *Plasmodiophora brassicae* in Canada[J]. Plants, 2021, 10(7): 1446.
- [26] WILLIAMS P. A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and Rutabaga[J]. Phytopathology, 1966, 56: 624-626.
- [27] BUCZACKI ST, TOXOPEUS H, MATTUSCH P, JOHNSTON TD, DIXON GR, HOBOLTH LA. Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: proposals for attempted rationalization through an international approach[J]. Transactions of the British Mycological Society, 1975, 65(2): 295-303.
- [28] STRELKOV SE, HWANG SF, MANOLII VP, CAO TS, FREDUA-AGYEMAN R, HARDING MW, PENG G, GOSSEN BD, MCDONALD MR, FEINDEL D. Virulence and pathotype classification of *Plasmodiophora brassicae* populations collected from clubroot resistant canola (*Brassica napus*) in Canada[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2018, 40(2): 284-298.
- [29] PANG WX, LIANG Y, ZHAN ZX, LI XN, PIAO ZY. Development of a Sinitic clubroot differential set for the pathotype classification of *Plasmodiophora brassicae*[J]. Frontiers in Plant Science, 2020, 11: 568771.
- [30] AYERS GW. Races of *Plasmodiophora brassicae*[J]. Canadian Journal of Botany, 1957, 35(6): 923-932.
- [31] LAMMERINK J. Pathologic specialisation of

- Plasmodiophora brassicae* Wor. in New Zealand[J]. New Zealand Journal of Agricultural Research, 1964, 7(1): 37-41.
- [32] OLSSON G. Crosses within the campestris group of the genus *Brassica*[J]. Hereditas, 1954, 40(3-4): 398-418.
- [33] NAGAHARU U. Genome analysis in *Brassica* with special reference to the experimental formation of *B. napus* and peculiar mode of fertilisation[J]. The Journal of Japanese Botany, 1935, 7: 389-452.
- [34] HELM J. Morphologisch-taxonomische gliederung der kultursippen von *Brassica oleracea* L.[J]. Die Kulturpflanze, 1963, 11(1): 92-210.
- [35] 丁云花, 简元才, 余阳俊, 汪维红, 耿丽华, 康俊根. 我国8省市十字花科蔬菜根肿病菌生理小种的鉴定[J]. 中国蔬菜, 2013(16): 85-88.
- DING YH, JIAN YC, YU YJ, WANG WH, GENG LH, KANG JG. Identification of pathotype of *Plasmodiophora brassicae* on crucifer vegetables in eight provinces of China[J]. China Vegetables, 2013(16): 85-88 (in Chinese).
- [36] 季海雯, 任莉, 陈坤荣, 徐理, 刘凡, 孙超超, 李俊, 刘胜毅, 方小平. 油菜根肿病病原主要生理小种和品种抗病性鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(3): 301-306.
- JI HW, REN L, CHEN KR, XU L, LIU F, SUN CC, LI J, LIU SY, FANG XP. Identification of physiological races of clubroot and resistance of rape cultivars to *Plasmodiophora brassicae*[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2013, 35(3): 301-306 (in Chinese).
- [37] 刘峰, 张丽辉, 姬广海. 云南和西藏十字花科蔬菜根肿病菌生理小种鉴定[J]. 中国蔬菜, 2013(20): 77-81.
- LIU F, ZHANG LH, JI GH. Identification of physiological race of *Plasmodiophora brassicae* in Yunnan and Xizang[J]. China Vegetables, 2013(20): 77-81 (in Chinese).
- [38] 汪维红, 余阳俊, 丁云花, 张凤兰, 于拴仓, 张德双, 赵岫云, 卢桂香. 湖北省长阳县十字花科蔬菜根肿病菌生理小种鉴定及抗源筛选[J]. 中国蔬菜, 2013(12): 55-60.
- WANG WH, YU YJ, DING YH, ZHANG FL, YU SC, ZHANG DS, ZHAO XY, LU GX. Physiological race identification of clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) from Changyang County, Hubei Province and resistant resource screening for Chinese cabbage breeding[J]. China Vegetables, 2013(12): 55-60 (in Chinese).
- [39] 赵杨, 白元俊, 苗则彦, 李颖, 赵奎华. 东北地区大白菜根肿病菌生理小种鉴定[J]. 湖南农业大学学报 (自然科学版), 2013, 39(2): 176-178.
- ZHAO Y, BAI YJ, MIAO ZY, LI Y, ZHAO KH. Identification of physiological races of *Plasmodiophora brassicae* causing club root in Chinese cabbage from Northeast China[J]. Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences), 2013, 39(2): 176-178 (in Chinese).
- [40] 汪春, 李凯旋, 彭衍彪, 檀根甲, 鲍周明, 方春华. 安徽油菜根肿病菌生理小种鉴定及品种抗病性评价[J]. 安徽农业大学学报, 2014, 41(5): 772-776.
- WANG C, LI KX, PENG YB, TAN GJ, BAO ZM, FANG CH. Identification of physiological races of *Plasmodiophora brassicae* and resistance of rape cultivars to clubroot in Anhui[J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2014, 41(5): 772-776 (in Chinese).
- [41] 杨华, 任佐华, 宋琼, 黄露, 刘二明. 湖南白菜和红菜薹根肿病菌生理小种鉴定[J]. 植物保护, 2015, 41(3): 143-148.
- YANG H, REN ZH, SONG Q, HUANG L, LIU EM. Identification of physiological race of *Plasmodiophora brassicae* that infect Chinese cabbage and red brassica sprouts in Hunan[J]. Plant Protection, 2015, 41(3): 143-148 (in Chinese).
- [42] 陈静, 任雪松, 宋洪元, 李成琼, 袁天成, 司军. 4个不同地区十字花科根肿病菌生理小种鉴定及甘蓝新组合的抗性鉴定[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2016, 38(1): 67-72.
- CHEN J, REN XS, SONG HY, LI CQ, YUAN TC, SI J. Identification of races of *Plasmodiophora brassicae* from four different regions and resistance identification of new cabbage cross combinations[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2016, 38(1): 67-72 (in Chinese).
- [43] 费维新, HWANG Sheau-fang, 王淑芬, 吴晓芸, 高智谋, 李强生, 侯树敏, 荣松柏, 江莹芬, 雷伟侠, 郝仲萍, 胡宝成. 根肿菌生理小种鉴定与甘蓝型油菜品种资源的抗性评价[J]. 中国油料作物学报, 2016, 38(5): 626-639.
- FEI WX, HWANG SF, WANG SF, WU XY, GAO ZM, LI QS, HOU SM, RONG SB, JIANG YF, LEI WX, HAO ZP, HU BC. Pathotype identification of *Plasmodiophora brassicae* and resistance of rapeseed variety resources to clubroot disease[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2016, 38(5): 626-639 (in Chinese).
- [44] 刘一凡, 王赛, 常虹, 高诗琪, 赵颖, 冀瑞琴, 冯辉. 芸薹根肿菌单孢分离技术体系构建及沈阳地区根肿

- 菌的鉴定[J]. 园艺学报, 2017, 44(12): 2383-2390.
- LIU YF, WANG S, CHANG H, GAO SQ, ZHAO Y, JI RQ, FENG H. Technical system construction of *Plasmodiophora brassicae* single-spore isolation and identification of *Plasmodiophora brassicae* in Shenyang area[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(12): 2383-2390 (in Chinese).
- [45] 王新月. 太白高山地区十字花科蔬菜根肿病菌生理小种鉴定及品种抗性筛选[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2017.
- WANG XY. Identification of clubroot resistant and physiological race of *Plasmodiophora brassicae* in Taibai Mountain region[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2017 (in Chinese).
- [46] 原玉香, 赵艳艳, 魏小春, 姚秋菊, 蒋武生, 王志勇, 李扬, 许茜, 杨双娟, 张晓伟. 河南省大白菜根肿病菌生理小种鉴定[J]. 河南农业科学, 2017, 46(7): 71-76.
- YUAN YX, ZHAO YY, WEI XC, YAO QJ, JIANG WS, WANG ZY, LI Y, XU Q, YANG SJ, ZHANG XW. Pathotype identification of *Plasmodiophora brassicae* Woron. collected from Chinese cabbage in Henan Province[J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2017, 46(7): 71-76 (in Chinese).
- [47] 彭宇龙, 黄云, 杨辉. 四川省根肿菌的分布和生理小种及品种抗性评估[J]. 植物保护学报, 2018, 45(2): 299-306.
- PENG YL, HUANG Y, YANG H. Distribution and pathotype of *Plasmodiophora brassicae* in Sichuan and cultivar resistance evaluation[J]. Journal of Plant Protection, 2018, 45(2): 299-306 (in Chinese).
- [48] 尹俊龙, 钱正益, 郑宇峰, 赵从新, 岳艳玲. 盈江县高山大白菜根肿菌生理小种鉴定及抗源筛选[J]. 中国蔬菜, 2018(8): 55-57.
- YIN JL, QIAN ZY, ZHENG YF, ZHAO CX, YUE YL. Physiological race identification of *Plasmodiophora brassicae* and screening of resistant source in Chinese cabbage at Yingjiang County[J]. China Vegetables, 2018(8): 55-57 (in Chinese).
- [49] 李倩. 中国芸薹根肿菌生理小种鉴别系统的构建及生理小种鉴定[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2018.
- LI Q. Building differential hosts system for *Plasmodiophora brassicae* Wor. in China and identification of the physiological races[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [50] 高青云. 十字花科根肿病菌单孢分离体系的建立及生理小种鉴定[D]. 张家口: 河北北方学院硕士学位论文, 2019.
- GAO QY. Establishment of a single-spore isolation system and physiological races identification of *Plasmodiophora brassicae*[D]. Zhangjiakou: Master's Thesis of Hebei North University, 2019 (in Chinese).
- [51] 黄蓉, 胡建坤, 黄瑞荣, 华菊玲, 檀根甲, 丁云花, 刘甫祥. 江西省油菜根肿菌小种鉴定与油菜品种抗性分析[J]. 中国油料作物学报, 2019, 41(4): 604-613.
- HUANG R, HU JK, HUANG RR, HUA JL, TAN GJ, DING YH, LIU FX. Race identification of *Plasmodiophora brassicae* and resistance of rape varieties in Jiangxi Province[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2019, 41(4): 604-613 (in Chinese).
- [52] 高莹莹. 芸薹根肿菌单孢分离及根肿病感病基因的功能分析[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2020.
- GAO YY. Single resting spore isolation of *Plasmodiophora brassicae* and function identification of clubroot susceptibility gene[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2020 (in Chinese).
- [53] 王神云, 向明艳, 王红, 于利, 李建斌, 江解增. 芸薹根肿菌生理小种鉴定和分子标记[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2016, 37(4): 91-96.
- WANG SY, XIANG MY, WANG H, YU L, LI JB, JIANG JZ. Identification of pathotype and development of molecular marker for *Plasmodiophora brassicae* causing clubroot[J]. Journal of Yangzhou University (Agricultural and Life Science Edition), 2016, 37(4): 91-96 (in Chinese).
- [54] 张梅. 芸薹根肿菌致病性及其生理小种分化的研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2014.
- ZHANG M. Study on pathogenicity and racial differentiation of *Plasmodiophora brassicae* Woronin[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2014 (in Chinese).
- [55] KUGINUKI Y, YOSHIKAWA H, HIRAI M. Variation in virulence of *Plasmodiophora brassicae* in Japan tested with clubroot-resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)[J]. European Journal of Plant Pathology, 1999, 105(4): 327-332.
- [56] KIM H, JO EJ, CHOI YH, JANG KS, CHOI GJ. Pathotype classification of *Plasmodiophora brassicae* isolates using clubroot-resistant cultivars of Chinese cabbage[J]. The Plant Pathology Journal, 2016, 32(5): 423-430.
- [57] MÖLLER M, HARLING R. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) profiling of

- Plasmodiophora brassicae*[J]. Letters in Applied Microbiology, 1996, 22(1): 70-75.
- [58] MANZANARES-DAULEUX MJ, BARRET P, THOMAS G. Development of a pathotype specific SCAR marker in *Plasmodiophora brassicae*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2000, 106(8): 781-787.
- [59] 芮婷婷, 高青云, 李晓菁, 石延霞, 谢学文, 李磊, 张红杰, 徐文娟, 柴阿丽, 李宝聚. 芸薹根肿菌单孢亚甲基蓝琼脂糖分离法及其对生理小种的鉴定[J]. 园艺学报, 2022, 49(6): 1290-1300.
- RUI TT, GAO QY, LI XJ, SHI YX, XIE XW, LI L, ZHANG HJ, XU WJ, CHAI AL, LI BJ. Methylene blue combined agarose assay for single-spore isolation of *Plasmodiophora brassicae* and pathotype differentiation[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(6): 1290-1300 (in Chinese).
- [60] 董娟华, 罗丽, 王彩霞, 冷伟锋, 李桂舫, 李保华. 一种强寄生病原真菌的分离方法: 毛细管打孔单孢分离法[J]. 中国农学通报, 2009, 25(3): 210-212.
- DONG JH, LUO L, WANG CX, LENG WF, LI GF, LI BH. Isolating strongly parasitic fungi by single-spore isolation aided with capillary stiletto[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(3): 210-212 (in Chinese).
- [61] 李茜, 沈向群, 耿新翠, 李林. 芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae*) 单孢分离接种及生理小种的鉴定[J]. 植物保护, 2012, 38(3): 95-101.
- LI Q, SHEN XQ, GENG XC, LI L. Separate inoculation of single resting spores and identification of *Plasmodiophora brassicae* races[J]. Plant Protection, 2012, 38(3): 95-101 (in Chinese).
- [62] 刘振林. 十字花科根肿病菌单孢系的建立[D]. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文, 2015.
- LIU ZL. Establishment of *Plasmodiophora brassicae* single-spore system[D]. Ya'an: Master's Thesis of Sichuan Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [63] 张晶, 武月, 冯辉, 葛文杰, 刘旭垚, 吕明灿, 王艺琰, 冀瑞琴. 根肿菌 Williams 系统中各单孢生理小种的获得与鉴定[J]. 园艺学报, 2019, 46(12): 2415-2422.
- ZHANG J, WU Y, FENG H, GE WJ, LIU XY, LÜ MC, WANG YL, JI RQ. Obtaining and identification of single-spore physiological races of *Plasmodiophora brassicae* in Williams system[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2019, 46(12): 2415-2422 (in Chinese).
- [64] TAKAHASHI K, YAMAGUCHI T. Assessment of pathogenicity of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil by fluorescence microscopy[J]. Japanese Journal of Phytopathology, 1989, 55(5): 621-628.
- [65] BUHARIWALLA H, GREAVES S, MAGRATH R, MITHEN R. Development of specific PCR primers for the amplification of polymorphic DNA from the obligate root pathogen *Plasmodiophora brassicae*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1995, 47(2): 83-94.
- [66] KLEWER A, LUERBEN H, GRAF H, SIEMENS J. Restriction fragment length polymorphism markers to characterize *Plasmodiophora brassicae* single-spore isolates with different virulence patterns[J]. Journal of Phytopathology, 2001, 149(3-4): 121-127.
- [67] DOBOSY JR, ROSE SD, BELTZ KR, RUPP SM, POWERS KM, BEHLKE MA, WALDER JA. RNase H-dependent PCR (rhPCR): improved specificity and single nucleotide polymorphism detection using blocked cleavable primers[J]. BMC Biotechnology, 2011, 11: 80.
- [68] FU HT, YANG YL, MISHRA V, ZHOU QX, ZUZAK K, FEINDEL D, HARDING MW, FENG J. Most *Plasmodiophora brassicae* populations in single canola root galls from Alberta fields are mixtures of multiple strains[J]. Plant Disease, 2020, 104(1): 116-120.
- [69] SAMUEL G, GARRETT SD. The infected root-hair count for estimating the activity of *Plasmodiophora brassicae* Woron. in the soil[J]. Annals of Applied Biology, 1945, 32(2): 96-101.
- [70] MACFARLANE I. Factors affecting the survival of *Plasmodiophora-brassicae* wor. in the soil and its assessment by a host test[J]. Annals of Applied Biology, 1952, 39(2): 239-256.
- [71] MELVILLE SC, HAWKEN RH. Soil testing for club root in Devon and Cornwall[J]. Plant Pathology, 1967, 16(4): 145-147.
- [72] BUCZACKI ST, OCKENDON JG. A method for the extraction and enumeration of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* from infested soil[J]. Annals of Applied Biology, 1978, 88(3): 363-367.
- [73] BOTZ T, MATTUSCH P, HILGENBERG W. Method for the demonstration of resting spores of the clubroot causing fungus *Plasmodiophora brassicae* in horticulture soil samples[J]. Journal of Phytopathology, 1988, 122(2): 135-142.
- [74] TAKAHASHI K, YAMAGUCHI T. An improved method for estimating the number of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil[J]. Japanese Journal of Phytopathology, 1987, 53(4): 507-515.

- [75] ARIE T, NAMBA S, YAMASHITA S, DOI Y. Detection of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* Woron. from soil and root by fluorescent-antibody technique[J]. Japanese Journal of Phytopathology, 1988, 54(2): 242-245.
- [76] LANGE L, HEIDE M, HOBOLTH L, OLSON LW. Serological detection of *Plasmodiophora brassicae* by dot immunobinding and visualization of the serological reaction by scanning electron microscopy[J]. Phytopathology, 1989, 79(10): 1066-1071.
- [77] WAKEHAM AJ, WHITE JG. Serological detection in soil of *Plasmodiophora brassicae* resting spores[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1996, 48(5): 289-303.
- [78] ITO S, MAEHARA T, TANAKA S, KAMEYA-IWAKI M, YANO S, KISHI F. Cloning of a single-copy DNA sequence unique to *Plasmodiophora brassicae*[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1997, 50(5): 289-300.
- [79] FAGGIAN R, BULMAN SR, LAWRIE AC, PORTER IJ. Specific polymerase chain reaction primers for the detection of *Plasmodiophora brassicae* in soil and water[J]. Phytopathology, 1999, 89(5): 392-397.
- [80] CAO T, TEWARI J, STRELKOV SE. Molecular detection of *Plasmodiophora brassicae*, causal agent of clubroot of crucifers, in plant and soil[J]. Plant Disease, 2007, 91(1): 80-87.
- [81] KAGEYAMA K, KOMATSU T, SUGA H. Refined PCR protocol for detection of plant pathogens in soil[J]. Journal of General Plant Pathology, 2003, 69(3): 153-160.
- [82] 关格格, 邢曼竹, 庞文星, 夏子豪, 杨新宇, 朴钟云, 吴元华, 梁月. 芸薹根肿菌及油菜根肿病分子检测与早期诊断[J]. 中国油料作物学报, 2019, 41(3): 409-414.
- GUAN GG, XING MZ, PANG WX, XIA ZH, YANG XY, PIAO ZY, WU YH, LIANG Y. Molecular detection and diagnosis of clubroot caused by *Plasmodiophora brassicae* in oilseed rape[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2019, 41(3): 409-414 (in Chinese).
- [83] SUNDELIN T, CHRISTENSEN CB, LARSEN J, MØLLER K, LÜBECK M, BØDKER L, JENSEN B. In planta quantification of *Plasmodiophora brassicae* using signature fatty acids and real-time PCR[J]. Plant Disease, 2010, 94(4): 432-438.
- [84] WALLENHAMMAR AC, ALMQUIST C, SÖDERSTRÖM M, JONSSON A. In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR[J]. Plant Pathology, 2012, 61(1): 16-28.
- [85] LI JP, LI Y, SHI YX, XIE XW, CHAI AL, LI BJ. Development of a real-time PCR assay for *Plasmodiophora brassicae* and its detection in soil samples[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2013, 12(10): 1799-1806.
- [86] 纪冬, 辛绍杰. 实时荧光定量 PCR 的发展和数据分析[J]. 生物技术通讯, 2009, 20(4): 598-600.
- JI D, XIN SJ. Development and data analysis of real-time fluorescent quantitative PCR[J]. Letters in Biotechnology, 2009, 20(4): 598-600 (in Chinese).
- [87] DEORA A, GOSSEN BD, AMIRSADEGHI S, MCDONALD MR. A multiplex RT-qPCR assay for detection and quantification of *Plasmodiophora brassicae* in soil[J]. Plant Disease, 2015, 99(7): 1002-1009.
- [88] AGUSTÍ G, FITTIPALDI M, MORATÓ J, CODONY F. Viable quantitative PCR for assessing the response of *Candida albicans* to antifungal treatment[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(1): 341-349.
- [89] AL-DAOUD F, GOSSEN BD, ROBSON J, MCDONALD MR. Propidium monoazide improves quantification of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* with RT-qPCR[J]. Plant Disease, 2017, 101(3): 442-447.
- [90] HINDSON BJ, NESS KD, MASQUELIER DA, BELGRADER P, HEREDIA NJ, MAKAREWICZ AJ, BRIGHT IJ, LUCERO MY, HIDDESEN AL, LEGLER TC, KITANO TK, HODEL MR, PETERSEN JF, WYATT PW, STEENBLOCK ER, SHAH PH, BOUSSE LJ, TROUP CB, MELLEN JC, WITTMANN DK, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(22): 8604-8610.
- [91] WEN R, LEE J, CHU MG, TONU N, DUMONCEAUX T, GOSSEN BD, YU FQ, PENG G. Quantification of *Plasmodiophora brassicae* resting spores in soils using droplet digital PCR (ddPCR)[J]. Plant Disease, 2020, 104(4): 1188-1194.
- [92] 周玉麟, 刘妍, 夏勇, 郭旭光. 微滴式数字聚合酶链反应在病原体检测中的研究进展[J]. 中国临床新医学, 2022, 15(10): 914-920.
- ZHOU YL, LIU Y, XIA Y, GUO XG. Research progress of droplet digital PCR in pathogen detection[J]. Chinese Journal of New Clinical Medicine, 2022, 15(10): 914-920 (in Chinese).

- [93] 邱翠金, 黄海裙, 余小林. 世界芸薹属作物生产与贸易分析[J]. 世界农业, 2014(5): 111-118, 127.
QIU CJ, HUANG HQ, YU XL. Production and trade analysis of *Brassica* crops in the world[J]. World Agriculture, 2014(5): 111-118, 127 (in Chinese).
- [94] 彭丽莎, 袁天成, 李成琼, 任雪松, 宋洪元, 司军. 十字花科作物根肿病生防菌研究进展[J]. 植物保护, 2015, 41(4): 16-22.
PENG LS, YUAN TC, LI CQ, REN XS, SONG HY, SI J. Research progresses in biocontrol bacteria of the clubroot disease of the Cruciferae[J]. Plant Protection, 2015, 41(4): 16-22 (in Chinese).
- [95] SCHWELM A, LUDWIG-MÜLLER J. Molecular pathotyping of *Plasmodiophora brassicae*-genomes, marker genes, and obstacles[J]. Pathogens, 2021, 10(3): 259.
- [96] LIANG JL, CAI WS, SUN ZS. Single-cell sequencing technologies: current and future[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2014, 41(10): 513-528.
- [97] COLE B, BERGMANN D, BLABY-HAAS CE, BLABY IK, BOUCHARD KE, BRADY SM, CIOBANU D, COLEMAN-DERR D, LEIBOFF S, MORTIMER JC, NOBORI T, RHEE SY, SCHMUTZ J, SIMMONS BA, SINGH AK, SINHA N, VOGEL JP, O'MALLEY RC, VISEL A, DICKEL DE. Plant single-cell solutions for energy and the environment[J]. Communications Biology, 2021, 4: 962.
- [98] JOVIC D, LIANG X, ZENG H, LIN L, XU FP, LUO YL. Single-cell RNA sequencing technologies and applications: a brief overview[J]. Clinical and Translational Medicine, 2022, 12(3): e694.
- [99] 张在宝, 赵紫微, 张佩欣, 叶凡, 罗天. 单细胞测序技术在植物中的应用研究进展[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2023, 36(2): 330-337.
ZHANG ZB, ZHAO ZW, ZHANG PX, YE F, LUO T. Research progress of single-cell sequencing technology in plants[J]. Journal of Xinyang Normal University (Natural Science Edition), 2023, 36(2): 330-337 (in Chinese).
- [100] HANAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.
- [101] ZHANG M, HU SF, MIN M, NI YL, LU Z, SUN XT, WU JQ, LIU B, YING XM, LIU Y. Dissecting transcriptional heterogeneity in primary gastric adenocarcinoma by single cell RNA sequencing[J]. Gut, 2021, 70(3): 464-475.
- [102] 杨佩文, 李家瑞, 杨勤忠, 王群. 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): 301-302, 306.
YANG PW, LI JR, YANG QZ, WANG Q. Isolation and detection of resting spore, a pathogen of *Cruciferae* vegetable clubroot [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2002, 17(3): 301-302, 306 (in Chinese).
- [103] 沈方园, 葛萧, 张晓宇, 张郁勃, 周慧姿, 李恒. 重组酶聚合酶扩增技术的研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(5): 1-21.
SHEN FY, GE X, ZHANG XY, ZHANG YB, ZHOU HZ, LI H. Research progress on recombinase polymerase amplification[J]. Microbiology China, 2023, 51(5): 1-21 (in Chinese).
- [104] 李华伟, 林志坚, 张鸿, 刘中华, 李国良, 汤浩, 邱思鑫. 甘薯薯瘟病菌 RPA 检测方法的建立及应用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2020, 49(5): 583-588.
LI HW, LIN ZJ, ZHANG H, LIU ZH, LI GL, TANG H, QIU SX. Establishment and application of RPA detection for bacterial wilt of sweet potato caused by *Ralstonia solanacearum*[J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition), 2020, 49(5): 583-588 (in Chinese).
- [105] 鞠玉亮, 沈鹏飞, 冯艳娟, 羊国根, 刘文成, 郭文华, 潘月敏. 小麦纹枯病菌 Rc-RPA-LFD 快速检测方法的建立及应用[J]. 植物病理学报, 2020, 50(5): 618-621.
JU YL, SHEN PF, FENG YJ, YANG GG, LIU WC, GUO WH, PAN YM. Development and application of Rc-RPA-LFD for the rapid detection of *Rhizoctonia cerealis*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2020, 50(5): 618-621 (in Chinese).
- [106] JU YL, LI CF, SHEN PF, WAN N, HAN WB, PAN YM. Rapid and visual detection of *Verticillium dahliae* using recombinase polymerase amplification combined with lateral flow dipstick[J]. Crop Protection, 2020, 136: 105226.
- [107] DESHIELDS JB, MOROZ N, BRALEY LE, MORA-ROMERO GA, TANAKA K. Recombinase polymerase amplification (RPA) for the rapid isothermal detection of *Spongospora subterranea* f. sp. *subterranea* and potato mop-top virus[J]. American Journal of Potato Research, 2019, 96(6): 617-624.