

28 个大白菜品种对根肿菌不同菌株的 抗性反应及抗病基因位点检测

曾令益,任 莉,刘 凡,陈 旺,陈坤荣,徐 理,方小平*

(中国农业科学院油料作物研究所/农业部油料作物生物学与遗传育种重点实验室,湖北 武汉,430062)

摘要:为了解白菜品种抗性特征和抗病基因类型之间的关系,以我国油菜主产区存在的 2、4 和 13 号小种,以及来自湖北恩施、四川德阳、河北唐山、河南南阳 4 个地点的未知小种为病原,采用温室人工接种方法,鉴定了 28 个大白菜品种对 8 个不同根肿菌菌株抗病性,同时利用已知的 7 个抗根肿病基因(*Crr1*、*Crr2*、*Crr3*、*CRA*、*CRb*、*CRc*、*CRk*)分子标记检测不同品种所含的抗病基因位点。研究表明:供试的 28 个大白菜品种,27 个品种对不同菌株表现出一定的抗病性,品种根王 F1 对所有菌株表现感病。CR 春福等 10 个品种对所有菌株表现抗性;CR – 凉春等 12 个品种只对一个菌株感病,其中 9 个品种只对恩施菌株感病。分子标记检测结果显示,感病品种根王 F1 中未检测到抗病基因位点,其余 27 个大白菜品种共检测到 *Crr2*、*Crr3*、*CRA*、*CRb*、*CRk* 五个抗病位点,*CRk* 在抗病品种中普遍存在,但 *Crr3* 仅在 CR 春福中检测到杂合抗病位点。总体而言,抗病位点较多的品种对不同地方菌株抗性强,少数品种存在例外,包括含有多个位点仍表现感病(含有 4 个抗病位点的 CR – 黄心 F1 对 4 号、2 号、13 号生理小种表现感病)和仅含有 1 个位点但表现抗病(德高 CR117 和荣耀只检测到 *CRk* 抗病位点但对所有菌株都表现出抗性)两类情形。说明大白菜对根肿病抗性及植物病原互作的复杂性,有待深入研究。

关键词:大白菜(*Brassica rapa* L.);芸薹根肿菌;根肿病;抗病基因;生理小种

中图分类号:S4350654 **文献标识码:**A **文章编号:**1007 – 9084(2017)04 – 0532 – 08

Reaction and resistant gene loci detection of 28 Chinese cabbage cultivars to different *Plasmodiophora brassicae* strains

ZENG Ling – yi, REN Li, LIU Fan, CHEN Wang, CHEN Kun – rong, XU Li, FANG Xiao – ping*

(Oil Crops Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of
Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China)

Abstract:To better understand cabbage resistance and gene loci on clubroot disease, clubroot resistance (CR) of 28 Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) were evaluated in green house. The clubroot pathgen (*Plasmodiophora brassicae*) samples were collected from 8 different locations, including the main races in the major production areas of rapeseed (race 2, 4 and 13) and strains from Enshi, Deyang, Tangshan and Nanyang. CR loci (*Crr1*, *Crr2*, *Crr3*, *CRA*, *CRb*, *CRc* and *CRk*) were detected using 7 reported CR markers. Results indicated that 27 cultivars showed resistance to some strains, while Genwang F1 was susceptible to all strains. The best 10 cultivars (including CR Chunfu) showed resistance to all strains. 12 cultivars were susceptible to only 1 strain, 9 of which was susceptible to the strain from Enshi. *CRk* were detected commonly in resistant cultivars. *Crr3* hybrid resistant locus was detected only in CR Chunfu. No CR loci were found in susceptible cultivar Genwang F1. In general, cultivars with more CR loci resisted to more strains. The exception was that one cultivar had 4 loci, but was susceptible to most of the strains (e. g. 4 CR loci in CR – huangxin F1 were susceptible to race 2, 4 and 13). And, the other exceptional cultivar had 1 locus but resisted to all strains (e. g. only one locus *CRk* was detected).

ted in Degao CR117 and Rongyao which showed resistance to all strains). It suggested the complexity of cabbage resistance to clubroot.

Key words: Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.); *Plasmodiophora brassicae* Woronin.; clubroot; resistant gene; physiological race

根肿病是由芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woronin.) 侵染植物根部引起的根部肿大病害, 最初发现于地中海西岸, 后逐步扩散至世界各地, 现已成为世界十字花科作物上最重要的土传病害之一^[1]。自从 1955 年我国首次发现并报道该病害以来, 根肿病对我国十字花科作物的危害日益严重, 每年平均减产 20% ~ 30%^[2], 严重地块甚至绝收。甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.) 是我国最主要的油料作物, 菜籽油产量在植物油中居首^[3]。近年来, 随着种子跨区域流通、农业生产机械化进程加快, 根肿病在我国油菜主产区为害越来越严重, 已成为我国油菜产业发展的重要威胁因子, 阻碍菜籽油产量和品质的提高。

由于根肿菌在土壤中存活时间长, 传统防治方式收效甚微。种植抗病品种是防治根肿病最经济有效的方式。通过国内外育种工作者长期的努力, 目前已经培育出一系列抗根肿病白菜、油菜等品种。但是由于芸薹根肿菌生理小种(简称小种)类型多, 变异较大^[4], 且对特定小种的抗性通常是由一个主基因控制^[5,6], 长期种植单一的抗病品种会使得品种抗病性丧失, 比如抗根肿病油菜 Mendel 已出现抗性丧失问题^[7]。因此针对不同小种, 需要有不同的抗病基因, 聚合不同抗病基因可获得持久抗病性。明确病原的小种类型和寄主的抗病基因类型是抗病育种的基础。当前根肿菌小种鉴定主要有 Williams^[8] 鉴别寄主系统和 ECD(European clubroot differential set) 鉴别寄主系统, 其中 Williams 系统在我国普遍应用。利用 Williams 系统, 我国油菜产区已鉴定出 1、2、4、5、7、8、9、10、11 和 13 号等多个小种类型, 以 4 号小种为优势小种^[9,10]。但这两套系统的鉴别寄主中均有部分寄主冬性较强, 在我国的气候条件下很难繁殖。更为重要的是, 这两套鉴别寄主系统中, 不同的鉴别寄主抗病基因尚不明确, 且对不同生理小种的抗病机制也不清楚。此外, 利用这两套鉴别系统鉴定出的同一个小种也存在致病力分化^[10~11]。根据基因对基因假说^[12], 植物的抗病基因和病原菌的无毒基因是抗病反应的核心, 因此建立一套抗病基因明确的根肿菌鉴别寄主系统意义重大。抗病近等基因系是只存在抗病基因差别的近等基因系, 近年来, 水稻抗稻瘟病近等基因系的育成极

大地减轻了稻瘟病菌小种鉴定的工作量, 并且试用范围广(粳稻区、籼稻区)、鉴别能力高^[13]。小麦抗条锈病近等基因系的创立不仅用于鉴定条锈病菌小种, 更用于抗病精细分子图谱的构建^[14]。目前还没有鉴定根肿菌小种的近等基因系报道。

目前, 在大白菜和芜菁上已定位了 11 个抗根肿病(CR) 位点^[6,15~21], 研究和报道较多的是 *Crr1*、*Crr2*、*Crr3*、*Crr4*、*Cra*、*CRb*、*CRc*、*CRk* 这 8 个位点, 其中 *Crr4* 是微效位点^[17]。*Cra*、*Crr1* 抗病位点的抗病基因已经克隆完成, 分别为 *Cra* 基因和 *Crr1a* 基因, 这两个基因均为 TIR - NB - LRR 类抗病基因^[22,23]。这些抗病位点和抗病基因的鉴定为明确抗病白菜(*Brassica rapa* L.) 品种的抗病基因类型提供依据, 进而为利用甘白杂交, 将大白菜抗根肿病位点转育至甘蓝型油菜中培育抗根肿病油菜品种和抗根肿病油菜近等基因系奠定基础。但目前的抗根肿病大白菜品种对不同小种的抗病性以及抗病位点类型并不清楚, 不便于直接利用。本研究以我国油菜产区存在的 2、4、13 号小种^[9]和部分根肿病重发区的未知类型生理小种为病原, 利用已报道的 7 个主要 CR 分子标记对生产上广泛使用的 28 个大白菜品种进行抗病性和抗病位点类型鉴定, 为培育抗根肿病油菜和建立含有单抗病位点的鉴别寄主近等基因系奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

芸薹根肿菌菌株采自国内 8 个根肿病重发区, 包括湖北枝江、山东青岛、河北唐山、黑龙江哈尔滨、湖北恩施、安徽休宁、四川德阳、河南南阳(表 1), 寄主为油菜或大白菜。收集形成明显瘤的根, -20℃ 冷冻保存备用。

种子市场购买的 28 个大白菜品种(表 2)。高感根肿病的大白菜品种北京新 3 号为感病对照。

1.2 大白菜品种对根肿病抗性鉴定

1.2.1 人工接种鉴定方法 将营养土和蛭石按 1.5: 1(V/V) 的比例混匀后装入白色塑料钵(规格为高 9 cm, 口径 10 cm, 下底直径 6 cm), 每钵装土 100g, 根据种子的发芽率分别均匀撒入 20 ~ 30 粒待测种子, 出苗后每钵保留 15 株。每钵栽种一棵催芽

3d 的北京新 3 号做对照,以北京新 3 号的发病来确
保适宜的根肿病发生条件。每个品种 3 个重复。将
所有塑料钵移置人工培养室,昼温 20 ~ 22℃,夜温
12 ~ 15℃,光周期 16L/8D,3d 浇水一次,土壤含水
量保持在 60% ~ 80%。

表 1 菌株来源、寄主及小种类型
Table 1 Sampling sites, hosts and pathotypes of 8 *P. brassicae* field populations

采样点 Sampling site	寄主 Host	生理小种 Pathotype	参考文献 Reference
湖北枝江 ZJ (Zhijiang, Hubei)	油菜 <i>Brassica napus</i>	4	[9]
山东青岛 QD (Qingdao, Shandong)	大白菜 <i>B. rapa</i>	4	[24]
河北唐山 TS (Tangshan, Hebei)	大白菜 <i>B. rapa</i>	UN	
黑龙江哈尔滨 HB (Harbin, Heilongjiang)	大白菜 <i>B. rapa</i>	2	[10]
湖北恩施 ES (Enshi, Hubei)	油菜 <i>B. napus</i>	UN	
安徽休宁 XN (Xiuning, Anhui)	油菜 <i>B. napus</i>	13	[9]
四川德阳 DY (Deyang, Sichuan)	油菜 <i>B. napus</i>	UN	
河南南阳 NY (Nanyang, Henan)	大白菜 <i>B. rapa</i>	UN	

注/Note:UN 表示小种类型未知 UN denotes pathotype unknown

表 2 供试的 28 个大白菜品种
Table 2 Selected 28 Chinese cabbage cultivars

编号 Code	品种名称 Cultivar	来源 Origin	编号 Code	品种名称 Cultivar	来源 Origin
1	CR 春福 CR chunfu	日本 Japan	15	金圣 Jinsheng	中国 China
2	CR 春丽 CR chunli	日本 Japan	16	德高 CR117 Degao CR117	中国 China
3	宝根王 Baogenwang	韩国 Korea	17	根王 F1 Genwang F1	中国 China
4	怀春 Huaichun	韩国 Korea	18	靛根 CR1 Lianggen CR1	中国 China
5	玲珑黄 515 Linglonghuang 515	韩国 Korea	19	胜根 CR1 Shenggen CR1	中国 China
6	余庆 Yuqing	日本 Japan	20	荣耀 Rongyao	中国 China
7	福春 Fuchun	韩国 Korea	21	德高 CR95 Degao CR95	中国 China
8	秋冠 Qiuguan	韩国 Korea	22	亚非四号 Yafei 4	韩国 Korea
9	春福黄 Chunfuhuang	韩国 Korea	23	春秋双丰 Chunqiu S. F.	韩国 Korea
10	维多星 Weiduoxing	韩国 Korea	24	楚天 CR 高冷地 Chutian CR gaolengdi	韩国 Korea
11	春鸣 Chunming	韩国 Korea	25	改良新观春 Gailiang xinguanchun	韩国 Korea
12	CR - 黄心 F1 CR - huangxin F1	韩国 Korea	26	CR - 启航 CR - qihang	韩国 Korea
13	T1 - 147 T1 - 147	日本 Japan	27	根白金 Genbaijin	中国 China
14	皇童 Huangtong	韩国 Korea	28	CR - 凉春 CR - liangchun	韩国 Korea

将采自全国 8 个根肿病重发区的根瘤洗净,参
考季海雯^[9]等改良的休眠孢子提取方法提取根肿
菌休眠孢子,用血球计数板计数孢子悬浮液浓度,待
大白菜幼苗子叶展开(播种后第 5d)后接种,将制备
好的休眠孢子悬浮液稀释后每钵均匀浇菌液 50mL,
使营养土中根肿菌休眠孢子浓度为 1.0 × 10⁶/g,各
地菌源制备和接种方式一致。

1.2.2 调查方法 待接种 40d 后拔出大白菜苗,冲
洗干净根部泥土后调查所有植株发病情况,计算发
病率和病情指数,以 3 个重复的平均值作为最终结
果。发病率和病情指数的计算方法如下:

发病率 =
$$\frac{n(\text{发病株数})}{N(\text{调查总株数})} \times 100\%$$

病情指数 =
$$\frac{\sum(\text{发病级代表值} \times \text{各级病株数})}{\text{调查总株数} \times \text{最高发病级代表值}} \times 100$$

1.2.3 大白菜抗、感病性划分标准 大白菜品种抗

性等级划分标准参考季海雯^[9]等,略做修改。病情
指数 DI ≤ 10 为抗病(R),10 < DI ≤ 30 为低感(LS),
DI > 30 为高感(HS)。

1.3 抗病基因检测

利用 DNA 提取试剂盒提取大白菜叶片的基因
组 DNA,每个品种选取 15 株催芽 3 d 后的子叶提取
基因组 DNA。试剂盒购自天根生化科技(北京)有
限公司,PCR 反应所用试剂均购自该公司。

PCR 反应总体积为 25μL:10 × buffer、dNTP 各
2.5μL,r - Taq 酶 0.5μL,上游引物和下游引物各
1μL,DNA 模板 2μL,ddH₂O 补齐至 25μL。PCR 反
应程序、凝胶电泳参考已发表过的结果^[15,16,25,26],无
菌水作为阴性对照进行 PCR 扩增和凝胶电泳。抗
根肿病位点 *Crr1*、*Crr2*、*Crr3*、*CRA*、*CRb*、*CRc*、*CRk* 分
子标记引物及其序列见表 3。

表 3 大白菜抗根肿病基因的引物序列

Table 3 List of primers used for detection of clubroot resistant genes in Chinese cabbages

位点 Loci	引物名称 Primer name	序列(5′-3′) Primer sequences	目的片段大小/bp Product size	参考文献 Reference
<i>Crr1</i>	BRMS-088-FW	TATCGGTACTGATTGCGTCTTCAAC	R263/S233	[15]
	BRMS-088-RV	ATCGGTTGTTATTTGAGAGCAGATT		
<i>Crr2</i>	BRMS-096-FW	AGTCGAGATCTCGTTCGTGTCTCCC	R220/S189	[15]
	BRMS-096-RV	TGAAGAAGGATTGAAGCTGTTGTTG		
<i>Crr3</i>	OPC11-2F	GTAAC TTGGTACAGAACAGCATAG	R1300/S1000	[16]
	OPC11-2R	ACTTGTCTAATGAATGATGATGG		
<i>CRa</i>	SC2930-T-FW	TAGACCTTTTTTTTGTCTTTTTTTTTTAC	R800	[25]
	SC2930-Q-FW	CAGACTAGACTTTTTTGTCATTTAGA	S800	
	SC2930-RV	CTAAGGCCATAGAAATCAGGTC		
<i>CRb</i>	KBrH129J18R-FW	AGAGCAGAGTGAAACCAGAACT	R254/S194	[26]
	KBrH129J18R-RV	GTTTCAGTTCACTCAGGTTTTTGCAG		
<i>CRc</i>	B50-C9-FW	GATTCAATGCATTTCTCTCGAT	R800	[25]
	B50-6R-FW	AATGCATTTTCGCTCAACC	S800	
	B50-RV	CGTATTATATCTCTTTTCTCCATCCC		
<i>CRk</i>	HC688-4-FW	TCTCTGTATTGCCGTTGACTG		[25]
	HC688-6-RV	ATATGTTGAAGCCTATGTCT	R1000	
	HC688-7-RV	AAATATATGTGAAGTCTTATGATC	S1000	

2 结果与分析

2.1 大白菜品种抗病性鉴定结果

8 个菌株接种的北京新 3 号均发病,病情指数均为 100,并在主根上形成大的根瘤,证实接种和培养条件适合根肿病的发生。28 个大白菜品种中,仅根王 F1 对 8 个地方的菌源都表现感病,其余 27 个品种均对测试的根肿菌表现出一定程度的抗性,其中 10 个品种对所有菌源都表现抗病甚至免疫,即 CR 春福、CR 春丽、楚天 CR 高冷地、春福黄、德高 CR117、改良新观春、金圣、玲珑黄 515、荣耀和亚非四号。12 个品种只对一个地方菌源感病,其中福春等 9 个品种只对采自湖北恩施地区菌源感病,宝根王和春鸣只对安徽休宁地区菌源感病,怀春只对黑龙江哈尔滨地区菌源感病。CR-黄心 F1 对湖北枝

江、黑龙江哈尔滨、黄山休宁三个地方菌源感病,德高 CR95 对枝江、青岛、恩施三个地方菌源感病。根白金则对枝江、唐山、哈尔滨、休宁等四个地方菌源表现感病(表 4)。

从病原的致病力强弱来看,四川德阳和河南南阳采集的病菌致病力较差,其中南阳的菌源只对根王 F1 强致病,德阳的菌株仅能引起根王 F1 和 CR-启航的少量发病。致病力最强的菌株为恩施采集的病原菌,可引起 12 个大白菜品种发病;其次为休宁的菌源 13 号小种。同为 4 号小种的枝江和青岛的病原菌,对供试的不同抗根肿病白菜品种的致病情况基本相似,但对个别品种的致病力仍存在一定差异。比如,枝江的菌源对根白金的致病力较强(发病率为 36.4%),而青岛的菌源对根白金则不致病(发病率为 0)。

表 4 大白菜品种室内接种抗病反应

Table 4 Resistant reaction of Chinese cabbages inoculated with *P. brassicae* in green house

编号 Number	品种名 Cultivars	品种抗性 Cultivars resistance							
		枝江 Zhijiang	青岛 Qingdao	唐山 Tangshan	哈尔滨 Harbin	恩施 Enshi	休宁 Xiuning	德阳 Deyang	南阳 Nanyang
1	CR 春福 CR Chunfu	R	R	R	R	R	R	R	R
2	CR 春丽 CR Chunli	R	R	R	R	R	R	R	R
3	宝根王 Baogenwang	R	R	R	R	R	LS	R	R
4	怀春 Huaichun	R	R	R	LS	R	R	R	R
5	玲珑黄 515 Linglonghuang 515	R	R	R	R	R	R	R	R
6	余庆 Yuqing	R	R	R	HS	R	HS	R	R
7	福春 Fuchun	R	R	R	R	LS	R	R	R
8	秋冠 Qiuguan	R	R	R	R	LS	R	R	R
9	春福黄 Chunfuhuang	R	R	R	R	R	R	R	R
10	维多星 Weiduoxing	R	R	R	R	LS	R	R	R
11	春鸣 Chunming	R	R	R	R	R	LS	R	R
12	CR-黄心 F1 CR-Huangxin F1	LS	R	R	HS	R	LS	R	R

续表 4

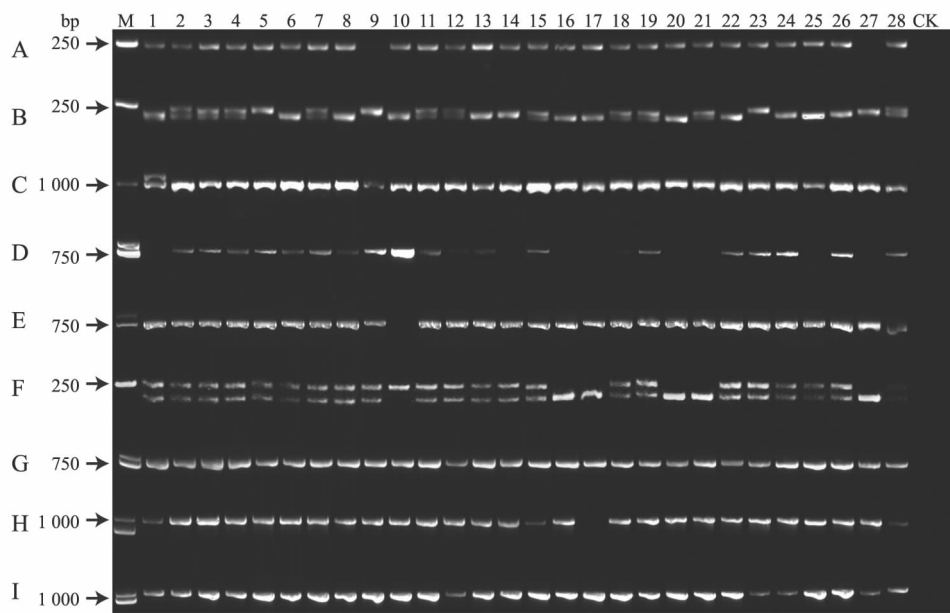
编号 Number	品种名 Cultivars	品种抗性 Cultivars resistance							
		枝江 Zhijiang	青岛 Qingdao	唐山 Tangshan	哈尔滨 Harbin	恩施 Enshi	休宁 Xiuning	德阳 Deyang	南阳 Nanyang
13	T1 - 147 T1 - 147	R	R	R	R	HS	R	R	R
14	皇童 Huangtong	R	R	R	R	HS	R	R	R
15	金圣 Jinsheng	R	R	R	R	R	R	R	R
16	德高 CR117 Degao CR117	R	R	R	R	R	R	R	R
17	根王 F1 Genwang F1	HS	HS	HS	HS	HS	HS	LS	HS
18	靓根 CR1 Lianggen CR1	R	R	R	R	LS	R	R	R
19	胜根 CR1 Shenggen CR1	R	R	R	R	LS	R	R	R
20	荣耀 Rongyao	R	R	R	R	R	R	R	R
21	德高 CR95 Degao CR95	HS	LS	R	R	LS	R	R	R
22	亚非四号 Yafei sihao	R	R	R	R	R	R	R	R
23	春秋双丰 Chunqiu S. F.	R	R	R	R	LS	R	R	R
24	楚天 CR 高冷地 Chutian CR gaolengdi	R	R	R	R	R	R	R	R
25	改良新观春 Gailiang xinguan Chun	R	R	R	R	R	R	R	R
26	CR - 启航 CR - qihang	R	R	R	R	HS	R	LS	R
27	根白金 Genbaijin	HS	R	HS	HS	R	HS	R	R
28	CR - 凉春 CR - liangchun	R	R	R	R	LS	R	R	R

注/Note: R 抗病 Resistant; LS 低感 Low susceptible; HS 高感 High susceptible

2.2 大白菜品种抗病基因型鉴定

利用已有的 7 个位点的分子标记对 28 个大白菜品种进行 PCR 扩增,共检测到 *Crr2*、*Crr3*、*CRa*、*CRb*、*CRk* 五个抗病位点(图 1),其中 *Crr3* 仅在 CR 春福中检测到杂合抗病位点,供试的 28 个品种中均未检测到 *Crr1* 和 *CRc* 抗病位点。检测的 7 个抗病位点中,*CRk* 在抗病品种中普遍存在,仅根王 F1 中

未检测到,这与抗性鉴定的结果相吻合(表 3)。*CRk* 抗病位点在这些抗病品种中均为杂合位点。抗病位点 *CRa* 和 *CRb* 也广泛存在于这些抗病品种中,分别在 22 和 23 个品种中检测到,且大多为杂合位点,仅在维多星中检测到纯合抗病位点。抗病位点 *Crr2* 在 14 个抗病品种中检测到,其中玲珑黄 515、春福黄和春秋双丰为纯合抗病位点。



注:M: 分子量标准 DL2000;1 ~ 28 为品种编号;A,B,C,(D,E), F,G,(H,I)分别对应的是引物 BRMS - 088(*Crr1*),BRMS - 096(*Crr2*),OPC11 - 2(*Crr3*),SC2930 - T 和 SC2930 - Q(*CRa*),KBrH129J18R(*CRb*),B50 - 6R(*CRc*),HC688 - 6 和 HC688 - 7(*CRk*)在不同样品中扩增结果;CK 为阴性对照
Note:M;Marker DL2000; 1 ~ 28;sample No. 1 to No. 28; A,B,C,(D,E), F,(G,H), (I,J) ;amplification results of BRMS - 088(*Crr1*), BRMS - 096(*Crr2*), OPC11 - 2(*Crr3*), SC2930 - T and SC2930 - Q (*CRa*), KBrH129J18R(*CRb*), B50 - 6R(*CRc*), HC688 - 6 and HC688 - 7 (*CRk*) primers on No. 1 to No.28 samples respectively; CK; negative control

图 1 不同抗病基因在 28 个大白菜品种中的扩增结果
Fig. 1 Amplification results of different resistant genes in 28 Chinese cabbage cultivars

不同品种抗病位点数量存在较大差异。CR 春福等 14 个大白菜品种含有 4 个抗病位点,余庆等 6 个大白菜品种含有 3 个抗病位点,德高 CR95、改良新观春含有两个抗病位点,德高 CR117 等 3 个品种只含有 *CRk* 杂合抗病位点,根王 F1 中未检测到抗病位点(表 5)。

表 5 28 个大白菜品种分子标记鉴定
Table 5 Identification results of markers in 28 Chinese cabbages

编号 Code	品种名称 Cultivar	<i>Crr1</i>	<i>Crr2</i>	<i>Crr3</i>	<i>CRa</i>	<i>CRb</i>	<i>CRc</i>	<i>CRk</i>
1	CR 春福 CR Chunfu	—	—	±	—	±	—	±
2	CR 春丽 CR Chunli	—	±	—	±	±	—	±
3	宝根王 Baogenwang	—	±	—	±	±	—	±
4	怀春 Huaichun	—	±	—	±	±	—	±
5	玲珑黄 515 Linglonghuang 515	—	+	—	±	±	—	±
6	余庆 Yuqing	—	—	—	±	±	—	±
7	福春 Fuchun	—	±	—	±	±	—	±
8	秋冠 Qiuguan	—	—	—	±	±	—	±
9	春福黄 Chunfuhuang	/	+	—	±	±	—	±
10	维多星 Weiduoxing	—	—	—	+	+	—	±
11	春鸣 Chunming	—	±	—	±	±	—	±
12	CR - 黄心 F1 CR - Huangxin F1	—	±	—	±	±	—	±
13	T1 - 147 T1 - 147	—	—	—	±	±	—	±
14	皇童 Huangtong	—	—	—	±	±	—	±
15	金圣 Jinsheng	—	±	—	±	±	—	±
16	德高 CR117 Degao CR117	—	—	—	—	—	—	±
17	根王 F1 Genwang F1	—	—	—	—	—	—	—
18	靓根 CR1 Lianggen CR1	—	±	—	±	±	—	±
19	胜根 CR1 Shenggen CR1	—	±	—	±	±	—	±
20	荣耀 Rongyao	—	—	—	—	—	—	±
21	德高 CR95 Degao CR95	—	±	—	—	—	—	±
22	亚非四号 Yafei sihao	—	—	—	±	±	—	±
23	春秋双丰 Chunqiu S. F.	—	+	—	±	±	—	±
24	楚天 CR 高冷地 Chutian CR gaolengdi	—	—	—	±	±	—	±
25	改良新观春 Gailiang xinguanchun	—	—	—	—	±	—	±
26	CR - 启航 CR - qihang	—	—	—	±	±	—	±
27	根白金 Genbaijin	/	—	—	—	—	—	±
28	CR - 凉春 CR - Liangchun	—	±	—	±	±	—	±

注:“+”表示纯合抗病位点;“—”表示纯合感病位点;“±”表示杂合抗病位点;“/”表示未检测到位点
Note: “+” means homozygous resistant site; “—” means homozygous susceptible site; “±” means heterozygous resistant site; “/” means no site

3 讨论

在明确各地根肿菌小种类型的基础上开展抗病材料对不同小种的抗性和抗病位点的鉴定工作,有助于抗病品种的合理布局,同时提高抗病育种的针对性。本研究以已知的 2,4 和 13 号小种以及未知类型的小种对供试的 28 个大白菜品种在室内重复接种鉴定发现,绝大多数品种对部分地区根肿菌都表现出抗病性,其中 10 个品种对供试的 8 个菌源都表现抗性,只有少数品种对多个地方菌源感病,这一结果表明,生产上所使用的大白菜品种对根肿菌还是具有一定抗性,抗性较好的 10 个品种可以用于后续甘白杂交培育抗病甘蓝型油菜品种。从接种的菌源上看,湖北枝江、山东青岛为 4 号小种,Williams 鉴别系统的 4 号小种在我国分布最广,是我国根肿菌的优势小种^[4],也是致病力最强的小种,对 Wil-

liams 系统的 4 个鉴别寄主均致病。抗性鉴定结果显示,对枝江、青岛地区的 4 号小种感病的品种只有 4 个和 2 个,表明目前我国可种植的抗病白菜品种相对丰富。但根肿菌小种的变异大,很多地方存在多个小种,比如恩施的同一块田中就发现有 4、7、10 三个小种^[27]。长期种植单一抗性的品种容易导致抗性丧失。因此,监测根肿菌小种类型的变化是一项需要长期坚持的重要工作。本研究中河南南阳等 4 个地区菌源的小种类型尚不清楚,但抗性鉴定结果表明,不同菌株对同一个大白菜品种的致病力不一致,例如 CR - 启航对唐山、南阳两地菌株表现抗病,但是对恩施、德阳两地菌株则分别表现高感和低感,表明这些地区的菌株致病型不一致。进一步开展这些未知菌源的小种鉴定,为在小种水平上探讨不同根肿菌对不同抗病位点的白菜品种的致病性奠定基础。

抗病位点 *CRa* 和 *CRb* 均被定位于 A03 染色体上,研究证明它们可能是等位基因或者紧密连锁的两个抗病位点^[26,28]。本研究发现,在 CR 春福和改良新冠春中只检测到 *CRb* 而未检测到 *CRa*。采用同样的分子标记,杨征等^[29]也发现这两个位点在不同材料中的检测结果并不完全一致,表明 *CRa* 和 *CRb* 可能是紧密连锁的两个抗病位点。Sakamoto 等人研究发现,*CRk* 与 *Crr3* 是定位在 A03 染色体上很近的两个独立的抗病位点^[19],遗传距离为 7cM。在本研究中这两个基因位点差异很大,前者在 27 个抗病材料中都可以检测到,而后者仅在 CR 春福中存在。*CRa* 是从 ECD 鉴别系统的鉴别寄主 ECD02 中定位,对 Williams 系统的 2 号小种抗病^[18]; *CRb* 是从抗病材料 CR Shinki 中定位,对 Williams 系统的 4 号小种抗病^[6]。本研究中,含有 *CRa* 抗病位点的品种余庆和怀春,对来自哈尔滨的 2 号小种仍然感病,这可能是由于哈尔滨的菌源中还混杂有其他类型的小种。

本研究发现,同为 Williams 鉴别系统 4 号小种的两个病原,分别接种这些抗病品种,二者的致病力仍然存在一定差异(表 4)。Williams 鉴别系统的局限性已有相关报道^[10,11]。根据基因对基因假说^[12],单抗病基因的一套鉴别品种具有最高的鉴别能力。本研究以从市面购买的 28 个大白菜品种为研究对象,通过已发表的标记对除微效基因位点 *Crr4* 以外的 7 个研究报道较多的抗病位点进行鉴定,发现大多数白菜品种中只检测到 *CRa*、*CRb*、*CRk* 三个抗病位点,*Crr2* 抗病位点只有少部分品种中含有,*Crr3* 的抗病位点仅存在于 CR 春福中,另外所有供试的 28 个大白菜品种中都没能检测到 *Crr1*、*CRc* 抗病位点,这两个抗病位点分别在芜菁 G004^[19] 和芜菁 ECD04^[15] 上定位。因此,在构建已有抗病位点的近等基因系的同时,需要进一步扩大资源搜集面,整合更多资源,创建一套精度更高、方便实用的近等基因系生理小种鉴别寄主系统。

分子标记检测结果从理论上揭示品种抗病的原因,含有较多抗病位点的品种理论上而言会对多个小种表现抗性,对某一个小种的抗性也会更强^[24,30]。本研究多数材料抗性符合这一规律,即品种的抗病性与其含有的抗病位点数量正相关。28 个品种中有 *Crr2*、*CRa*、*CRb* 和 *CRk* 四个抗病位点的品种共 13 个,其中 CR - 春丽等 4 个品种对供试的 8 个地点的菌株均表现出抗性,怀春等 8 个品种只对某一个地方的菌表现出低感。本研究中,未检测到抗病位点的根王 F1 对所有菌源都感病。有趣的

是,CR - 黄心 F1 含有 4 个杂合抗病位点,却对枝江、哈尔滨、休宁三个地方的菌感病,而德高 CR117 和荣耀只检测到 *CRk* 一个抗病位点,但对所有地方的菌都表现出抗性,这一现象前人并无报道。我们推测出现这种现象的可能原因是由于只检测了已知的 7 个抗病位点,在抗多个根肿菌菌株的白菜品种中可能还含有其他未检测或未知的抗病位点亦或位点之间的互作关系尚待明确。因此抗病位点的挖掘及功能研究有待深入。本研究还发现,纯合抗病位点与杂合抗病位点表现出的抗性不完全一致,比如维多星含有纯合 *CRa* 和 *CRb* 抗病位点,与含有杂合 *CRa* 和 *CRb* 抗病位点的秋冠抗性一致,但与同样含有杂合 *CRa* 和 *CRb* 抗病位点的皇童抗性不同,前者对恩施菌源感病,后者高抗恩施菌源。

研究发现 *CR* 基因和根肿菌之间是菌株特异性互作^[21],在后期的研究工作中,我们有必要开展不同根肿菌菌株的小种类型鉴定和抗病品种中其他抗病基因的分子标记鉴定,进一步明确 *CR* 基因和根肿菌小种之间的对应关系,为采用多基因聚合育种培育抗根肿病油菜和创建单抗病基因的根肿菌小种鉴别系统奠定理论基础。

参考文献:

[1] 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.

[2] 王 靖,黄 云,李小兰. 十字花科根肿病研究进展[J]. 植物保护,2011,36(6):153 - 158.

[3] 王汉中. 我国油菜产业发展的历史回顾与展望[J]. 中国油料作物学报,2010,36(2):300 - 302.

[4] 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.

[5] Voorrips R E, Visser D L. Examination of resistance to clubroot in accessions of *Brassica oleracea* using a glass-house seedling test[J]. Neth J Plant Pathol,1993,99(5 - 6):269 - 276.

[6] Piao Z Y, Deng Y Q, Choi S R, et al. SCAR and CAPS mapping of *CRb*, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)[J]. Theor Appl Genet,2004,108:1 458 - 1 465.

[7] Rahman H, Shakir A, Hasan M J. 2011. Breeding for clubroot resistant spring canola (*Brassica napus* L.) for the Canadian prairies: Can the European winter canola

- cv. Mendel be used as a source of resistance? [J]. Can J Plant Sci, 2011, 91(3): 447–458.
- [8] Williams P H. A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga [J]. Phytopathology, 1966, 56: 624–626.
- [9] 季海雯, 任莉, 陈坤荣, 等. 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.
- [10] 费维新, HWANG Sheau-fang, 王淑芬, 等. 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.
- [11] Mananares-Dauleu M J. Assessment of biological and molecular variability between and within field isolates of *Plasmodiophora brassicae* [J]. Plant Pathol, 2001, 50: 165–173.
- [12] Flor H H. Current status of the gene-for-gene concept[J]. Ann Rev Phytopathol, 1971, 9: 275–296.
- [13] 凌忠专, Mew T, 王久林, 等. 中国水稻近等基因系的育成及其稻瘟病菌生理小种鉴别能力[J]. 中国农业科学, 2000, 33(4): 1–8.
- [14] 刘亚萍. 小麦抗条锈病近等基因系的抗条锈性分析及 Yr24 的 SSR 标记[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2005.
- [15] Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, et al. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 997–1002.
- [16] Hirai M, Harada T, Kubo N, et al. A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers[J]. Theor Appl Genet, 2003, 108: 639–643.
- [17] Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, et al. Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: the genetic origin of clubroot resistance [J]. Genetics, 2006, 173: 309–319.
- [18] Matsumoto E, Yasui C, Ohi M, et al. Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. Euphytica, 1998, 104: 79–86.
- [19] Sakamoto K, Saito A, Hayashida N, et al. Mapping of isolate-specific QTLs for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J]. Theor Appl Genet, 2008, 117: 759–767.
- [20] Chu M, Song T, Falk K C, et al. Fine mapping of *Rcr1* and analyses of its effect on transcriptome patterns during infection by *Plasmodiophora brassicae* [J]. BMC Genom, 2014, 15: 166.
- [21] Chen J, Jing J, Zhan Z, et al. Identification of novel QTLs for isolate-specific partial resistance to *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica rapa* [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e85307.
- [22] Ueno H, Matsumoto E, Aruga D, et al. Molecular characterization of the *Cra* gene conferring clubroot resistance in *Brassica rapa* [J]. Plant Mol Biol, 2012, 80: 621–629.
- [23] Hatakeyama K, Suwabe K, Tomita RN, et al. Identification and characterization of *Crr1a*, a gene for resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. [J]. PLoS One, 2013, 8: e54745.
- [24] 丁云花, 简元才, 余阳俊, 等. 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.
- [25] Matsumoto E, Ueno H, Aruga D, et al. Accumulation of three clubroot resistance genes through marker-assisted selection in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. J Jpn Soc Hort Sci, 2012, 81(2): 184–190.
- [26] Kato T, Hatakeyama K, Fukino N, et al. Identification of a clubroot resistance locus conferring resistance to a *Plasmodiophora brassicae* classified into pathotype group 3 in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) [J]. Breed Sci, 2012, 62(3): 282–287.
- [27] 吴健雄. 湖北省十字花科根肿病菌生理小种鉴定及遗传多样性分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.
- [28] Hatakeyama K, Niwa T, Kato T, et al. The tandem repeated organization of NB-LRR genes in the clubroot-resistant *CRb* locus in *Brassica rapa* L. [J]. Mol Genet Genom, 2017, 29(2): 397–405.
- [29] 杨征, 杨晓云, 张清霞, 等. 大白菜抗根肿病基因位点 *CRA* 和 *CRb* 的分子标记鉴定[J]. 华北农学报, 2015, 30(2): 87–92.
- [30] Chisholm S T, Coaker G, Day B, et al. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response[J]. Cell, 2006, 124(4): 803–814.

(责任编辑: 郭学兰)