

96 个大白菜品种根肿病抗性鉴定及位点检测

魏小春^{1,2}, 原玉香¹, 赵艳艳¹, 杨双娟¹, 王志勇¹,
苏贺楠¹, 李军党^{1,2}, 李林¹, 牛刘静¹, 张晓伟¹

(1. 河南省农业科学院园艺研究所 郑州 450002; 2. 郑州大学农学院 郑州 450001)

摘要: 为了明确大白菜抗根肿病基因类型和品种抗性特征之间的关系, 利用同为 4 号生理小种的新野老菌和新野新菌, 采用灌根法对 96 个大白菜品种进行抗病性鉴定, 并利用 *CRa*、*CRb*、*CRc*、*Crr1*、*Crr2*、*Crr3* 等 6 个抗根肿病位点标记检测不同品种所含有的抗性位点。结果表明, 农科一号、山地王 1 号、春美一号等 31 个品种对新野老菌和新野新菌均表现出抗性, 且这些材料大多含有 *CRa* 和 *CRb* 抗病位点, 个别品种含有 *Crr1*、*Crr2* 或 *Crr3* 抗病位点。只含有 *Crr2* 和 *CRb* 抗病位点的大白菜品种如 Chiifu、德高荣耀、吉红娃娃、玲珑二号对新野老菌或新菌却表现出感病症状, 笔者推测 *Crr2* 和 *CRb* 可能不是主要的抗病位点。此外, 笔者发现只含有 *CRb* 位点的山地王 2 号 B 型对新野老菌和新菌均表现出抗性, 说明该品种可能含有新的抗病基因。研究结果为大白菜抗根肿病种质资源鉴定及新品种选育奠定了基础。

关键词: 大白菜; 根肿病; 抗性基因; 生理小种

中图分类号: S634.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2022)08-027-08

Identification and detection of clubroot resistance loci of 96 Chinese cabbage cultivars resistance to *Plasmodiophora brassicae*

WEI Xiaochun^{1,2}, YUAN Yuxiang¹, ZHAO Yanyan¹, YANG Shuangjuan¹, WANG Zhiyong¹, SU Henan¹, LI Jundang^{1,2}, LI Lin¹, NIU Liuqing¹, ZHANG Xiaowei¹

(1. Institute of Horticulture, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, Henan, China; 2. School of Agricultural Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, Henan, China)

Abstract: In order to clarify the relationship between resistance gene types and resistance characteristics of Chinese cabbage cultivars, 96 Chinese cabbage cultivars were identified for resistance by root dipping method using new and old isolates of Xinye *Plasmodiophora brassicae* race 4 and six resistance loci including *CRa*, *CRb*, *CRc*, *Crr1*, *Crr2* and *Crr3* were used to detect the resistance loci of different varieties. The results showed that, 31 varieties, including Nongke 1, Shandiwang 1 and Chunmei 1, showed resistance to both new and old fungus Xinye isolates, and most of these varieties had *CRa* and *CRb* resistance genes, while some varieties had *Crr1*, *Crr2*, or *Crr3* resistance genes. However, Chinese cabbage varieties having only *Crr2* and *CRb* resistance loci, such as Chiifu, Degaorongyao, Jihongwawa and Linglong 2, showed susceptible symptoms to new or old Xinye isolates. we speculated that *Crr2* and *CRb* may not be the main resistance loci. In addition, we found that Shandiwang 2 typeB having only *CRb* loci showed resistance to both new and old Xinye isolates, indicating that there may be new resistance genes in Shandiwang 2 typeB. The results laid a foundation for the identification of germplasm resources and breeding of Chinese cabbage resistant to the disease.

Key words: Chinese cabbage; Clubroot; Resistance gene; Pathotype

大白菜原产于中国北方, 是我国重要的露地蔬菜, 素有菜中之王的美称^[1]。根肿病是由鞭毛菌亚门芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woron.) 感染引起的土传病害, 在许多国家都有发生^[2]。根肿菌通过感染十字花科植物的根部, 使之形成肿瘤或

腐烂, 最终导致整株植物枯萎甚至死亡^[3]。

随着大白菜根肿病逐年加重, 化学、生物及农业措施在防治根肿病中的效果呈下降趋势。从生态环境方面考虑, 培育抗病品种将是解决根肿病的有效方法^[4]。目前, 在大白菜和欧洲芜菁上已定位

收稿日期: 2022-03-25; 修回日期: 2022-05-12

基金项目: 国家自然科学基金(31801874); 河南省农业科学院杰出青年基金(2021JQ03); 河南省农业科学院科技创新团队(2022TD06)

作者简介: 魏小春, 男, 副研究员, 主要从事大白菜细胞工程遗传育种的研究。E-mail: jweixiaochun@126.com

通信作者: 张晓伟, 男, 研究员, 主要从事大白菜细胞工程遗传育种的研究。E-mail: xiaowei5737@163.com

了 32 个抗根肿病位点：*Crr1a*、*Crr2*、*Crr3*、*CRa*、*CRb*、*CRc*、*CRd*、*CRk*、*CRs* 等^[5]。研究较多的是 *CRa*^[6]、*CRb*^[7]、*CRc*^[8]、*Crr1*^[9]、*Crr2*^[9]、*Crr3*^[10] 位点。其中，*CRa*、*Crr1a* 和 *CRb^{kato}* 抗病基因已成功克隆且都为 TIR-NB-LRR 类抗病基因。抗病基因的克隆和抗病位点的鉴定为培育更好的大白菜抗病品种提供了依据^[5]。河南省新野县大白菜种植面积较大，其面临根肿病的困扰日益严重，目前主要的根肿病菌株是 4 号生理小种新野新菌和新野老菌^[11]。在本研究中，笔者利用新野老菌及新野新菌病原菌对 96 个大白菜材料进行接菌鉴定，同时，利用已报道的 *CRa*、*CRb*、*CRc*、*Crr1*、*Crr2*、*Crr3* 等 6 个标记对大白

菜品种进行抗性位点检测，明确不同位点与根肿病抗性的关系，进而为选育抗根肿病大白菜资源提供分子标记基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2020 年 9—11 月在河南省新野县河南省农业科学院园艺研究所叶类蔬菜研究室根肿病原圃开展试验，根肿病菌株分为新野老菌 4 号生理小种和新野新菌 4 号生理小种，96 份大白菜材料由河南省农业科学院园艺研究所叶类蔬菜生物育种课题收集保存(表 1)。

表 1 供试的 96 个大白菜品种

序号	编号	品种名称	来源
1	抗病对照 1	AKIMEKI	河南省农业科学院园艺研究所引进资源
2	感病对照 2	Chiifu	河南省农业科学院园艺研究所引进资源
3	感病对照 3	ECD05	河南省农业科学院园艺研究所引进资源
4	Y635	秋利皇	四川方圆种业科技有限公司(从日本引进)
5	Y636	四季皇	北京高思顿种子有限公司(从韩国引进)
6	Y638	农科一号	福建农科农业良种开发有限公司(从韩国引进)
7	Y643	山地王 1 号	武汉文鼎农业生物技术有限公司(从韩国引进)
8	Y664	春美一号	湖北鄂蔬农业科技有限公司
9	Y665	春美二号	湖北鄂蔬农业科技有限公司
10	Y669	希望白菜 F ₁	厦门市文兴蔬菜种苗有限公司
11	Y670	金锦	福州农播王种苗有限公司(日本东北种苗生产)
12	Y671	CR-启航	山东金种子进口,武汉市九头鸟种苗有限公司
13	Y672	CR 福将	北京中联韩种子有限公司生产,武汉桑田农业科技开发公司经销
14	Y673	健将 101	北京中联韩种子有限公司生产,武汉桑田农业科技开发公司经销
15	Y674	CR 高冷地	武汉华晨种子有限公司(从韩国引进)
16	Y675	山地王 2 号	武汉文鼎农业生物技术有限公司(从韩国引进)
17	Y676	山地王 2 号 B 型	武汉文鼎农业生物技术有限公司(从韩国引进)
18	Y677	灿光 CR-65	圣尼斯种子北京有限公司
19	Y684	CR 中宝黄	中国种子集团公司试种
20	Y685	CR 中秋	中国种子集团公司试种
21	Y686	CR 白菜 12-101	中国种子集团公司试种
22	Y687	CR-元春	北京百欧通种子有限公司
23	Y699	宝根王	北京大一种苗有限公司试种
24	Y700	BDA202	北京大一种苗有限公司试种
25	Y701	CR 美丽特	北京世邦佳和种子有限公司生产销售
26	Y702	CR 青春	北京世邦佳和种子有限公司生产销售
27	Y703	CR 三伏	北京世邦佳和种子有限公司生产销售
28	Y716	余庆	日本泷井种苗株式会社
29	Y736	新傲尔良	武汉文鼎农业生物技术有限公司
30	Y749	春盛 CRR	日本泷井种苗株式会社
31	Y752	LS1202	云南春喜集团昆明喜得种子有限公司
32	Y759	CR 兴春	北京春奥种子科技有限公司
33	Y794	冬福春宝	河南豫艺种业科技发展有限公司
34	Y811	福娃娃菜	北京华耐农业发展有限公司
35	Y825	春之都	青岛国际种苗有限公司
36	Y832	春福黄	青岛金脉农业发展有限公司
37	Y842	CR 鸣春	北京春奥种苗有限公司
38	Y843	凯春	北京大久韩日种业有限公司
39	Y844	CR 相春	北京大久韩日种业有限公司

续表 1

序号	编号	品种名称	来源
40	Y894	金童四季	北京百欧通种子有限公司
41	Y895	改良金童春秋	北京百欧通种子有限公司
42	Y905	BCC-518	北京百欧通种子有限公司试种
43	Y906	BCC-515	北京百欧通种子有限公司试种
44	Y960	新观春	北京中联韩种子有限公司
45	Y961	宝根王	韩国比亚久种业有限公司
46	Y962	CR 根宝	青岛南北种业有限公司(青硕)
47	Y965	天香 65	湖北宜昌比亚久种业有限公司
48	Y967	寒玉 90	日本株式会社大和农园
49	Y968	珍美黄	北京井田农业科技有限公司
50	Y969	德高荣耀	山东德高蔬菜种苗研究所
51	Y970	申荣 8 号	青岛申荣农业发展有限公司
52	Y971	CR 春泰	广东省良种引进服务公司
53	Y972	CR 春福	广东省良种引进服务公司
54	Y984	胜根 CR1	石家庄市腾运种业贸易有限公司
55	Y985	吉红娃娃	中国农业科学院蔬菜花卉研究所
56	Y988	CR-黄心 F ₁	北京绿亨种子科技有限公司(从韩国引进)
57	Y991	春鸣	北京绿亨种子科技有限公司(从韩国引进)
58	Y992	CR 寒春大白菜	青岛官明天成种业有限公司(从日本引进)
59	Y993	CR 春美	湖北楚天新科农业有限公司代理(从韩国引进)
60	Y994	CR 帝王 3 号	北京春奥种苗有限公司(从韩国引进)
61	Y995	胜春 CR	北京春奥种苗有限公司(从韩国引进)
62	Y996	CR 农家玉黄心	北京春奥种苗有限公司(从韩国引进)
63	Y997	CR-578	北京春奥种苗有限公司(从韩国引进)
64	Y998	CR 鼎盛	湖山(北京)农业技术有限公司
65	Y1006	根白金	青岛胶州市东茂蔬菜研究所
66	Y1009	冬锦 CR	络芙特蔬卉(北京)农业有限公司
67	Y1011	CR 皇春 3 号	北京四海中叶优先责任公司
68	Y1013	胜根 1 号	石家庄市腾运种业贸易有限公司
69	Y1014	胜根 2 号	石家庄市腾运种业贸易有限公司
70	Y1015	胜根 3 号	石家庄市腾运种业贸易有限公司
71	Y1016	CR 秋状元	日本山田雄一种苗株式会社
72	Y1017	靓根 CR1	青岛胶州市东茂蔬菜研究所
73	Y1026	CC04CR	河南省农业科学院园艺研究所
74	Y1027	早春の大将	成都良庆园农业开发有限公司(从日本引进)
75	Y1028	屠龙 CR	成都良庆园农业开发有限公司(从日本引进)
76	Y1029	CR 春美 609	成都良庆园农业开发有限公司(从日本引进)
77	Y1030	韩峰	北京育正泰种子有限公司(从韩国引进)
78	Y1031	怀春	成都良庆园农业开发有限公司
79	Y1034	天籁	北京慕兰多国际农业科技有限公司
80	Y1041	春锦	北京思倍奇种子有限公司(从日本引进)
81	Y1044	奇山抗根 56	烟台奇山种业有限责任公司生产,四川盛琪蔬菜种子销售有限公司销售
82	Y1048	文鼎春宝	武汉市文鼎农业生物技术有限公司
83	Y1055	西由铁根 605	山东莱州市西由大白菜服务中心
84	Y1076	CR 金奖	北京丰桥国际种子有限公司
85	Y1080	胶研 CR65	青岛胶研种苗有限公司
86	Y1084	秋玲娃娃菜	北京丰桥国际种子有限公司
87	Y1086	西由铁根秋宝	山东莱州市西由大白菜服务中心
88	Y1087	西由铁根 705	山东莱州市西由大白菜服务中心
89	Y1088	西由铁根 CR108	山东莱州市西由大白菜服务中心
90	Y1089	西由铁根	山东莱州市西由大白菜服务中心
91	Y1112	CR 冬圣	日本泷井种苗株式会社
92	Y1117	CR 悦冬	北京春奥种苗科技有限公司
93	Y1118	CR 开拓 16 号	北京春奥种苗科技有限公司
94	Y1119	德高 CR69	山东德高蔬菜种苗研究所
95	Y1178	玲珑二号	新疆富蕴县奥瑞德农业有限公司
96	Y1179	小黄龙	北京东方九龙种业有限公司

1.2 方法

试验材料的种植及鉴定均在河南省农科院园艺所新野县根肿菌病原圃进行,其中 AKIMEKI 为抗病对照,Chiifu 和 ECD05 为感病对照,每份大白菜品种种植 36 棵。笔者采用苗期穴盘人工接种鉴定方法,设置了 3 次重复,制备 1×10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的根悬浮液,并使用灌根法^[12]在播种当天及播种后第 3 天进行接菌处理。30 d 后,开始对每株材料根部发病程度进行分级调查记录发病情况,并利用 *CRa*、*CRb*、*CRc*、*Crr1*、*Crr2*、*Crr3* 等 6 个抗根肿病位点标记进行基因型鉴定。

1.3 根肿病抗病性鉴定及病情分级

试验材料接菌处理 30 d 后调查发病情况,计算病情指数,评价品种的抗性。大白菜根肿病的鉴定标准如下^[13](表 2)。

病情指数(DI)和病株率的计算公式如下:

病情指数= $[\sum(\text{各级病株数} \times \text{相应级别}) / (\text{调查总株数} \times \text{发病最高级别代表值})] \times 100$ 。

病株率=(病株数/调查株数) $\times 100\%$ 。

病情指数的划分标准为:高抗 ≤ 30.0 ; $30.0 <$ 抗病 ≤ 40.0 ; $40.0 <$ 低抗/低感 ≤ 50.0 ; $50.0 <$ 感病 ≤ 80.0 ; 高感 > 80.0 。

表 2 大白菜根肿病发病级别鉴定标准

发病等级	根部表型
0	根系正常无肿瘤,无病害症状。
1	侧根、须根有小肿瘤,主根未发生病害。
3	主根肿大,直径大于茎基部的 1~2 倍,主根症状较轻,须根和侧根有较多肿瘤。
5	主根肿大明显,直径大于茎基部的 2~4 倍,须根和侧根大部分有肿瘤
7	主根异常肿大,直径大于茎基部的 4 倍,侧根与须根肿大十分严重并与主根粘连形成肿瘤。

1.4 根肿病抗病基因检测

使用改良后的 CTAB 法提取大白菜基因组 DNA,PCR 反应总体积为 20 μL ,根肿病抗病位点 *CRa*、*CRb*、*CRc*、*Crr1*、*Crr2*、*Crr3* 引物、PCR 体系及反应条件见表 3。

表 3 各个引物 PCR 反应程序要求

抗性位点	引物	序列(5'-3')	参考文献	片段大小/bp
<i>CRa</i>	CRa-F	CAGACGATTAGAAATCTGAAATTG	[6]	350
	CRa-R1	GAGTAGTGACATTTCCATAGAAG		160
<i>CRb</i>	(B0902)-F	AGCCTTGCCTAAAAGCAACTAC	[7]	170
	(B0902)-R	GTTTGGAATCCGACAAATACATCCAT		240
<i>CRc</i>	(m6r_CRc)-F	CCTCTTGAAAACCCATGAA	[8]	Non-amp
	(m6r_CRc)-R	GCAATTATTGGCCTGTTCGT		800
<i>Crr1a</i>	(Crr1a-F-1)-F	GATTACCACTATGTACTGAACT	[9]	900
	(Crr1a-R-1)-R	CTTTCAAAAACGATTGAAATTCAT		700
<i>Crr2</i>	(BRMS-0960)-F	AGTCGAGATCTCGTTCGTGTCTCCC	[9]	200/220
	(BRMS-0960)-R	TGAAGAAGGATTGAATCTGTTGTTG		180
<i>Crr3</i>	(OPC11-2F)-F	GTAACCTGGTACAGAACAGCATAG	[10]	1200
	(OPC11-2R)-R	ACTTGTCTAATGAATGATGATGG		950

2 结果与分析

2.1 大白菜品种抗病性鉴定

根据苗期接菌发病情况,将 96 份大白菜划分为 3 种不同的抗性类型:抗新野老菌和新野新菌类型,抗新野老菌不抗新野新菌类型,不抗新野老菌和新野新菌类型。其中抗新野老菌不抗新菌品种的比例高达 61.46%,分别为秋利皇、金锦、CR-启航等 59 个品种;抗新野老菌和新野新菌品种比例为 33.33%,分别为山地王 2 号、灿光 CR-65、冬福春宝等 32 个品种;不抗新野老菌和新野新菌品种比例为 5.21%,分别为吉红娃娃、德高荣耀、玲珑二号等 5 个品种(表 4)。

2.2 大白菜品种抗病基因型鉴定

利用 *CRa*、*CRb*、*CRc*、*Crr1*、*Crr2*、*Crr3* 等 6 个根肿病抗病位点分子标记对 96 个大白菜品种进行抗病基因型鉴定,琼脂糖凝胶检测结果如下(表 4):*CRa*:57 个品种检测到 *CRa* 抗性位点,占全部材料的 59.38%;*CRb*:60 个品种检测到 *CRb* 抗性位点,占全部材料的 62.50%;*CRc*:20 个品种检测到 *CRc* 抗性位点,占全部材料的 20.83%;*Crr1*:14 个品种检测到 *Crr1* 抗性位点,占全部材料的 14.58%;*Crr2*:50 个品种检测到 *Crr2* 抗性位点,占全部材料的 52.08%;*Crr3*:4 个品种检测到 *Crr3* 抗性位点,占全部材料的 4.17%。部分琼脂糖电泳结果见图 1 所示。

不同大白菜品种的抗病位点存在较大差异,供

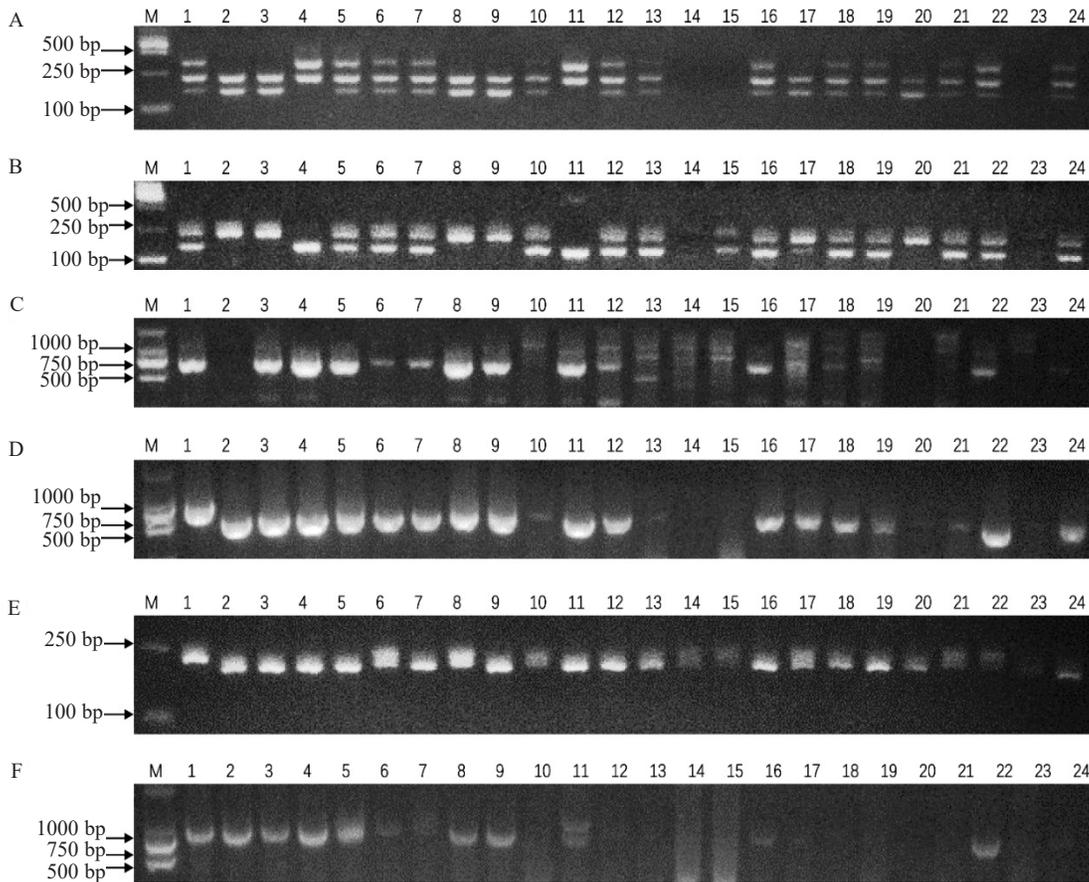
表4 96个大白菜品种分子标记鉴定及病情指数分析

序号	编号	<i>CRA</i>	<i>CRb</i>	<i>CRc</i>	<i>Crr1</i>	<i>Crr2</i>	<i>Crr3</i>	新野老菌	DI(老菌)	新野新菌	DI(新菌)
1	AKIMEKI	H	H	S	R	R	S	+	0	+	0
2	Chiifu	S	S	R	S	S	S	-	92	-	76
3	ECD05	S	S	S	S	S	S	-	100	-	99
4	Y635	R	R	S	S	S	S	+	0	-	63
5	Y636	H	H	S	S	S	S	+	1	-	75
6	Y638	H	H	S	S	H	/	+	0	+	0
7	Y643	H	H	S	S	S	/	+	0	+	0
8	Y664	S	S	S	S	H	S	+	0	+	0
9	Y665	S	S	S	S	S	S	+	0	+	3
10	Y669	H	H	R	/	H	/	+	0	-	100
11	Y670	R	R	S	S	S	H	+	0	-	75
12	Y671	H	H	S	S	S	/	+	0	-	100
13	Y672	H	H	R	/	S	/	+	0	-	100
14	Y673	/	/	R	/	H	/	+	0	-	76
15	Y674	/	H	S	/	H	/	+	0	-	100
16	Y675	H	H	S	S	S	S	+	0	+	0
17	Y676	S	H	S	S	S	/	+	0	+	0
18	Y677	H	H	S	S	S	/	+	0	+	0
19	Y684	H	H	S	S	S	/	+	0	-	100
20	Y685	S	S	S	/	S	/	+	0	-	100
21	Y686	H	H	R	/	H	/	+	0	-	100
22	Y687	H	H	S	S	H	S	+	0	-	100
23	Y699	/	/	R	/	/	/	+	0	+	0
24	Y700	H	H	R	S	S	/	+	0	+	0
25	Y701	R	H	R	R	S	/	+	0	-	77
26	Y702	H	H	S	S	S	S	+	0	-	95
27	Y703	H	H	S	S	H	S	+	0	-	97
28	Y716	H	H	S	R	S	S	+	0	+	0
29	Y736	H	H	S	S	H	S	+	0	-	67
30	Y749	R	H	S	R	S	S	+	0	+	0
31	Y752	S	S	R	S	H	S	+	0	-	100
32	Y759	H	H	S	S	H	S	+	0	-	100
33	Y794	H	H	S	S	H	H	+	0	+	0
34	Y811	S	S	R	S	H	S	+	0	-	98
35	Y825	S	S	S	S	H	/	+	0	-	100
36	Y832	H	H	S	S	H	S	+	0	-	100
37	Y842	H	H	S	S	/	S	+	0	-	100
38	Y843	H	H	S	S	H	S	+	1	-	100
39	Y844	S	S	S	S	S	S	+	7	-	100
40	Y894	S	S	S	S	H	S	+	0	+	0
41	Y895	R	H	S	S	H	S	+	0	+	0
42	Y905	H	H	S	S	S	S	+	0	-	79
43	Y906	H	H	S	S	S	S	+	0	+	0
44	Y960	H	H	S	S	S	S	+	0	-	67
45	Y961	S	S	S	S	R	S	+	0	-	100
46	Y962	S	S	S	R	S	S	+	0	-	90
47	Y965	S	S	S	S	S	S	+	0	-	75
48	Y967	H	H	S	S	S	S	+	0	+	0
49	Y968	R	R	S	S	S	S	+	0	-	74

续表 4

序号	编号	<i>CRa</i>	<i>CRb</i>	<i>CRc</i>	<i>Crr1</i>	<i>Crr2</i>	<i>Crr3</i>	新野老菌	DI(老菌)	新野新菌	DI(新菌)
50	Y969	S	S	S	S	S	S	-	100	-	100
51	Y970	S	S	S	S	H	S	+	0	+	0
52	Y971	H	H	S	S	R	S	+	0	+	0
53	Y972	R	R	S	R	H	H	+	0	+	0
54	Y984	/	/	R	/	/	/	+	0	+	0
55	Y985	S	S	R	S	H	S	-	56	-	89
56	Y988	H	H	R	S	/	S	+	0	-	100
57	Y991	H	H	S	S	H	S	+	3	-	86
58	Y992	H	H	S	S	S	S	+	1	-	84
59	Y993	H	H	S	S	S	S	+	2	-	67
60	Y994	H	H	S	S	S	S	+	0	-	72
61	Y995	H	H	S	S	H	S	+	0	-	71
62	Y996	H	H	S	S	H	S	+	0	-	83
63	Y997	S	S	S	S	H	S	+	0	-	100
64	Y998	H	H	S	S	H	S	+	0	-	86
65	Y1006	S	S	R	S	S	S	+	0	+	0
66	Y1009	H	H	S	S	S	H	+	0	-	79
67	Y1011	H	H	S	S	R	S	+	0	+	0
68	Y1013	S	S	S	S	S	S	+	0	-	72
69	Y1014	H	H	S	S	H	S	+	0	-	100
70	Y1015	S	S	S	S	H	S	+	0	-	100
71	Y1016	H	H	S	S	H	S	+	0	-	71
72	Y1017	H	H	S	S	H	S	+	0	-	67
73	Y1026	H	H	S	S	H	S	+	0	-	72
74	Y1027	R	R	S	S	H	S	+	0	+	0
75	Y1028	R	R	S	S	H	S	+	0	+	0
76	Y1029	R	R	S	S	H	S	+	0	+	1
77	Y1030	S	S	S	S	H	S	+	0	+	0
78	Y1031	H	H	S	R	H	S	+	0	+	2
79	Y1034	S	S	S	R	S	S	+	0	+	0
80	Y1041	S	S	S	S	H	S	+	0	+	0
81	Y1044	S	S	S	R	H	S	+	0	+	0
82	Y1048	S	S	S	R	S	S	+	0	-	89
83	Y1055	S	S	R	S	S	S	+	0	-	52
84	Y1076	H	H	R	S	S	S	+	0	-	75
85	Y1080	S	S	S	R	S	S	+	0	-	65
86	Y1084	R	H	R	S	H	S	+	0	-	75
87	Y1086	S	S	R	R	S	S	+	0	-	100
88	Y1087	S	S	S	R	H	S	+	0	-	100
89	Y1088	S	S	R	S	H	S	+	0	-	100
90	Y1089	S	S	S	R	H	S	+	0	-	100
91	Y1112	S	H	S	S	S	S	+	0	-	100
92	Y1117	H	H	S	S	H	S	+	0	-	100
93	Y1118	H	H	S	S	H	S	+	0	-	100
94	Y1119	S	S	S	S	H	S	+	0	-	100
95	Y1178	S	S	R	S	H	S	-	100	-	100
96	Y1179	H	H	S	S	S	S	+	0	+	0

注:1.“R”表示抗病位点的 PCR 带型;2.“S”表示感病位点的 PCR 带型;3.“H”表示杂合位点的条带带型;4.“/”表示未检测到位点;“+”表示抗病;“-”表示感病。



注:A. *CRa* 位点检测,抗病位点 PCR 片段大小 350 bp,感病位点 PCR 片段大小 160 bp,附加带 PCR 片段大小 220 bp;B. *CRb* 位点检测,抗病位点 PCR 片段大小 170 bp,感病位点 PCR 片段大小 240 bp;C. *CRc* 位点检测,抗病位点无条带,感病位点 PCR 片段大小 800 bp;D. *Crr1a* 位点检测,抗病位点 PCR 片段大小 900 bp,感病位点 PCR 片段大小 700 bp;E. *Crr2* 位点检测,抗病位点 PCR 片段大小 200~220 bp,感病位点 PCR 片段大小 180 bp;F. *Crr3* 位点检测,抗病位点 PCR 片段大小 1200 bp,感病位点 PCR 片段大小 950 bp。M 表示 marker,材料 1~24 同表 1。

图 1 24 个大白菜品种基因位点的琼脂糖凝胶电泳结果

试的 96 个品种中 CR 相春、春美二号、天香 65 未检测到抗病位点;Chiifu、宝根王(北京)、胜根 CR1、根白金、西由铁根 605 检测到 *CRc* 抗病位点;CR 根宝、天籁、文鼎春宝、胶研 CR65 检测到 *Crr1* 抗病位点;春美一号、金童四季、宝根王(韩国)、申荣八号、CR-578、韩峰、春锦检测到 *Crr2* 抗病位点;山地王 2 号 B 型,CR 冬圣检测到 *CRb* 抗病位点,这类只检测到单一抗病位点或者未检测到抗病位点的材料约占全部材料的 21.88%。AKIMEKI、CR 白菜 12-101、CR-元春等 57 个品种同时含有 *CRa*、*CRb* 抗病位点,约占全部材料的 59.38%。同时这 57 个品种的一部分又检测到 *CRc* 抗病位点(如希望白菜 F₁),*Crr2* 抗病位点(如农科一号),*Crr3* 抗病位点(如金锦);另有 18.74% 的品种同时包含 *CRc*、*Crr2* 抗病位点(如西由铁根 CR108)或者 *Crr1*、*Crr2* 抗病位点(如西由铁根 705)。96 个大白菜品种大多能检测到 2 至 4 个抗病位点,其中 CR 春福含有的

抗病位点最多,包含 5 个,分别是 *CRa*、*CRb*、*Crr1*、*Crr2*、*Crr3*(表 4)。笔者推测含有较多抗病位点的品种在理论上会对多个根肿病生理小种表现抗性,对单一生理小种的抗性也会更强。

3 讨论与结论

大白菜抗病与感病性状与所含抗病基因具有一定的对应关系^[4],目前,在大白菜和欧洲芜菁上已定位 32 个抗根肿病位点:*Crr1*、*CrrA5*、*Crr2*、*Crr3*、*Crr4*、*CRa*、*CRb*、*CR6a*、*CRc*、*CRd*、*CRk*、*CRs*、*CR6b*、*Rcr1*、*Rcr2*、*Rcr3*、*Rcr4*、*Rcr5*、*Rcr8*、*Rcr9*、*Rcr9^{wa}*、*PbBa1.1*、*PbBa3.1*、*PbBa3.2*、*PbBa3.3*、*PbBa8.1*、*qBr-CR38-1*、*qBrCR38-2*、*Bra.CR.a*、*Bra.CR.c*、*Bra.CR.b*、*CRb^{kato}*。虽然已经发现了几十个抗病位点,但是目前研究较深入的就只有 *Crr1*、*Crr2*、*Crr3*、*CRa*、*CRb* 和 *CRc* 这 6 个抗病位点。其中,*Crr1*、*Crr2*、*Crr3*、*CRb* 这 4 个抗性位点对 4 号生理小种具有抗性^[15]。

本次试验中农科一号、山地王1号、春美一号、春美二号、山地王2号、山地王2号B型、灿光CR-65(原名星光白菜)、宝根王、BDA202、余庆、春盛CRR、冬福春宝、金童四季、改良金童春秋、BCC-515、寒玉90、申荣8号、CR春泰、CR春福、胜根CR1、根白金、CR皇春3号、早春の大将、屠龙CR、CR春美609、韩峰、怀春、天籁、春锦、奇山抗根56、小黄龙等31个品种对新野老菌和新菌均表现出抗性,这些材料大多含有CRa和CRb抗病位点,个别品种含有Crr1、Crr2、或CRc抗病位点。可以看出CRa和CRb基因对于品种抵抗新野老菌和新菌很重要。而含有Crr2抗病位点的大白菜品种如Chiifu、德高荣耀、吉红娃娃、玲珑二号对新野老菌和新菌却表现出感病症状,笔者推测Crr2基因可能不是主要的抗病基因。前人研究发现,由于田间存在多致病型生理小种,且随着生理小种菌源的变异,很多具有抗性位点的抗病大白菜品种的抗性也在迅速丢失^[6]。在本次试验中秋利皇、金锦、CR-启航等59个品种只抗新野老菌而不抗新菌,发生抗性丢失的现象,且所占比例高达61.46%。对品种进一步检测发现只含有CRb位点的山地王2号B型却对新野老菌和新菌都表现出抗性,说明在该材料中可能含有新的抗病基因。

分子标记检测结果可以从理论上揭示品种抗病的原因。笔者通过对96个大白菜品种进行苗期抗性鉴定和抗性位点检测,发现大白菜品种中含有较多抗性位点的品种,如AKIMEKI、冬福春宝、改良金童春秋等对新野老菌和新菌都表现出抗病,笔者推测含有较多抗病位点的品种在理论上会对多个根肿病生理小种表现抗性,对单一生理小种的抗性也会更强。下一步,笔者将进一步利用已报道的根肿病抗病位点,依据现有的种质资源,进一步鉴定出具有多根肿病抗性位点的品种,筛选出具有高抗病性,对生理小种抗性持久的育种材料。

笔者通过对96个大白菜品种进行根肿病抗性鉴定和抗根肿病位点检测,发现含有CRa、CRb和Crr2抗病位点的材料对新野老菌和新菌均表现出抗性,但只含有Crr2和CRb抗病位点的大白菜品种对新野老菌或新菌却表现出感病症状,笔者推测Crr2和CRb或许不是主要的抗病位点。另外笔者发现只含有CRb位点的山地王2号B型却对新野老菌和新菌表现出抗性,说明其可能含有新的抗病基因。研究结果为大白菜抗根肿病种质资源鉴定以及大白菜抗根肿病育种奠定了材料基础。

参考文献

- [1] 朱明钊,张淑江,张慧,等.大白菜抗根肿病的抗源筛选和分子标记鉴定[J].中国蔬菜,2018(3):40-45.
- [2] 曾令益,任莉,刘凡,等.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[J].中国油料作物学报,2017,39(4):532-539.
- [3] 王丽丽,王鑫,吴海东,等.我国主要抗根肿病大白菜品种抗性鉴定及评价[J].中国蔬菜,2022(8):46-50.
- [4] 杨征.大白菜抗根肿病品种鉴定与抗病基因定位研究[D].山东青岛:青岛农业大学,2015.
- [5] YU F Q, ZHANG Y, WANG J H, et al. Identification of two major QTLs in *Brassica napus* lines with introgressed clubroot resistance from turnip cultivar ECD01[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 12(12):785989.
- [6] MATSUMOTO E, HAYASHIDA N, SAKAMOTO K, et al. Behavior of DNA markers linked to a clubroot resistance gene in segregating populations of Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2005, 74(5):367-373.
- [7] PIAO Z, DENG Y, CHIO, et al. SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to *Plasmiodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(8):1458-1465.
- [8] 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]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 117(5):759-767.
- [9] 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(1):309-319.
- [10] HIRAI M, HARADA T, KUBO N, et al. A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(4):639-643.
- [11] 原玉香,张晓伟,赵艳艳,等.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.
- [12] 赵艳艳,毛立霞,原玉香,等.大白菜苗期根肿病抗性快速鉴定方法[J].中国瓜菜,2020,33(8):27-31.
- [13] 贾豪.大白菜抗根肿病基因CRq的精细定位及克隆[D].郑州:郑州大学,2018(12):62.
- [14] ZHANG B, SU T B, LI P R, et al. Identification of long non-coding rnas involved in resistance to downy mildew in Chinese cabbage [J]. *Horticulture Research*, 2021, 8(1):44.
- [15] WANG Y Y, XIANG X Y, HUANG F, et al. Fine mapping of clubroot resistance loci CR48.1 and candidate gene analysis in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13:898108.
- [16] 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]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2017, 292(2):397-405.