

# 甘蓝种质资源根肿病抗性鉴定及 *CRa*、*Crr1a* 同源基因分析

孙超<sup>1,2</sup>, 马建<sup>2</sup>, 雷蕾<sup>1,2</sup>, 刘洁<sup>1,2</sup>, 颉建明<sup>1</sup>, 康俊根<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>甘肃农业大学园艺学院, 兰州 730070; <sup>2</sup>北京市农林科学院蔬菜研究中心/  
农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100097)

**摘要:** 利用来源于湖北长阳、陕西太白、河南新野 3 个地方的根肿病菌对 22 份不同甘蓝材料进行抗病性鉴定。采用同源比对的方法, 对甘蓝基因组中的大白菜抗根肿病同源基因 *CRa* 和 *Crr1a* 进行分析; 同时对不同抗、感根肿病甘蓝材料中的 *CRa* 和 *Crr1a* 同源基因序列进行了扩增、测序和比对分析。结果表明: 供试 22 份甘蓝材料对 3 份根肿病菌存在较大的抗性差异, 推测来源于 3 个地区的菌种可能不是同一个生理小种; 筛选出的抗性品种 BDH3、Chou hybride Tekila、SW-110、CGL-8、先正达品种、SW-109 将来可用作根肿病抗源和抗性基因挖掘; 在甘蓝 7 号染色体上存在 3 个预测基因为 *CRa* 的同源基因, 分别是 *Bo7g107710*、*Bo7g107730* 和 *Bo7g107740*, 其中, *Bo7g107730* 基因在抗病材料 SW-110 存在较大的序列变异, 推测可能与根肿病抗性相关; 在甘蓝 3 号染色体上存在 1 个预测基因 *Bo3g164040* 为 *Crr1a* 的同源基因, 所分析的抗、感病材料中 *Bo3g164040* 基因序列一致性极高, 没有发现与抗根肿病有关的位点, 说明甘蓝中 *Bo3g164040* 基因可能没有根肿病抗性功能。

**关键词:** 甘蓝; 根肿病; 同源比对; 抗性基因

## Identification of Cabbage Germplasm Resources with Resistance to Clubroot and Sequence Analysis of *CRa* and *Crr1a* Homologous Genes from Cabbage

SUN Chao<sup>1,2</sup>, MA Jian<sup>2</sup>, LEI Lei<sup>1,2</sup>, LIU Jie<sup>1,2</sup>, XIE Jian-ming<sup>1</sup>, KANG Jun-gen<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Horticulture, Gansu Agriculture University, Lanzhou 730070; <sup>2</sup>Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture/Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

**Abstract:** Three pathogenic samples of *Plasmodiophora brassicae* from Changyang in Hubei province, Taibai in Shanxi province, and Xinye in Henan province were used for inoculation to evaluate the clubroot disease resistance of 22 cabbage materials, respectively. The homologous genes of *CRa* and *Crr1a* in *Brassica oleracea* genome were analyzed by sequence homology analysis and then were amplified, sequenced and alignment for analysis. The results showed that 22 cabbage materials showed different resistance spectrum to three *P. brassicae* samples, indicating that three pathogenic samples were different physiological races. Screened resistant materials BDH3, Chou hybride Tekila, SW-110, CGL-8, Syngenta varieties, SW-109 could be used as clubroot-resistant breeding materials and mining new resistance gene in the future. Three genes (*Bo7g107710*, *Bo7g107730* and *Bo7g107740*) on chromosome 7 of *B. oleracea* genome were identified as homologues of *CRa*, and the DNA sequence of *Bo7g107730* gene showed relatively high variation in resistant material SW-110, which may be related to clubroot resistance. In addition, only one

收稿日期: 2016-01-25 修回日期: 2016-02-26 网络出版日期: 2016-10-12

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20161012.0917.022.html>

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(2016YFD0101702); “十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD02B01, 2014BAD01B08); 北京市科委项目(Z141105002314020)

第一作者主要从事蔬菜分子育种研究。E-mail: sc\_sunchao123@163.com

通信作者: 颉建明, 主要从事园艺设施教育研究。E-mail: xiejianming@gsau.edu.cn

康俊根, 主要从事蔬菜遗传育种及分子生物学研究。E-mail: kangjungen@nrcv.org

gene *Bo3g164040* homologue to *Crr1a* were identified on chromosome 3 of *B. oleracea* genome, and we speculated that this gene was not resistant to clubroot disease because of this gene showed high sequence identity between resistant and susceptible material.

**Key words:** *Brassica oleracea*; clubroot disease; homology alignment; resistance gene

十字花科植物根肿病是由根肿菌属芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) 侵染引起的一种世界性土传病害,对芸薹属植物具有毁灭性的危害<sup>[1]</sup>。甘蓝属于十字花科 (Cruciferae, = Brassicaceae) 芸薹属 (*Brassica*) 野甘蓝种 (*Brassia oleracea* L.), 是我国栽培面积仅次于大白菜的叶用蔬菜作物。根肿病对甘蓝的危害相当严重,在我国重庆、云南通海、四川彭州、湖北长阳、陕西太白、河南新野等商品甘蓝种植基地根肿病的发生日趋严重<sup>[2-6]</sup>。受根肿病侵染的甘蓝表现为根部组织异常肿大,形成膨大的肿瘤,导致地上部萎蔫、发育迟缓等症状,在环境条件有利于病害发生的情况下可导致甘蓝产量严重下降,甚至绝收。根肿病属于土传病害,发生过根肿病的田间、土壤将长期带菌,其休眠孢子可在土壤中存活 10 ~ 15 年<sup>[7]</sup>,导致该地区不再适宜栽培甘蓝。由于传统的病害防治措施对甘蓝根肿病防治效果较差,因此,培育种植抗病品种是防治甘蓝根肿病最经济、有效的途径<sup>[8-10]</sup>。

前人对芸薹属种质资源抗根肿病基因的挖掘和鉴定进行了大量的研究。H. Yoshikawa 等<sup>[11]</sup>在源于欧洲的饲用芜菁中鉴定出对根肿病具有高度抗性的基因,随后成功地将该基因导入大白菜,并基于此培育出大量的白菜、油菜、芜菁甘蓝等抗病新品种<sup>[12-15]</sup>。目前,在大白菜中已经鉴定出了 8 个抗根肿病基因,分别是 *CRa*、*CRb*、*CRc*、*CRk*、*Crr1*、*Crr2*、*Crr3* 和 *Crr4*<sup>[16-22]</sup>,其中 *CRa* 和 *Crr1* 基因已经被成功克隆<sup>[23-24]</sup>,这 2 个基因分别编码 1325 个氨基酸和 1224 个氨基酸的 TIR-NBS-LRR 类蛋白。

虽然白菜抗根肿病研究取得了一定进展,但由于甘蓝抗性资源极度匮乏,导致其抗性研究相对缓慢。另外,甘蓝的根肿病抗性遗传背景复杂,且芸薹根肿菌分化类型容易克服所有甘蓝 ECD 鉴别寄主,导致生产上的主栽甘蓝品种大多不抗或低抗根肿病。迄今为止在甘蓝中共鉴定出位于不同连锁群上的 CR-QTL 超过 20 个<sup>[11]</sup>,但由于已发表的研究中所用抗源、生理小种不同,缺乏共同的分子标记,且大部分的 QTL 没有绘制在标准图谱上,给这些 QTL 的鉴定和利用带来了较大的困难。随着甘蓝全基因组测序的完成,利用比较基因组学的方法,根据已克隆的大

白菜 *CRa* 和 *Crr1a* 基因的序列,鉴定出甘蓝基因组中的同源基因并克隆,辅以抗性表型鉴定,对于发掘甘蓝中的抗根肿病基因不失为一种相对快捷的途径。

本研究利用来源于湖北长阳、陕西太白、河南新野的根肿病菌为接种病原菌,采用菌液注射法<sup>[25]</sup>,对 22 份来源于世界各地的推测具有根肿病抗性的甘蓝种质资源进行了抗性评价,以期筛选出抗不同地区生理小种的抗源材料。另外,通过对大白菜抗根肿病基因 *CRa* 和 *Crr1a* 的同源比对,鉴定出甘蓝中的同源基因并比对分析其在抗、感材料中的序列差异,试图鉴定出与根肿病抗性有关的位点,为甘蓝抗根肿病新品种的选育提供实际参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

22 份甘蓝材料见表 1,其中感病对照为 CA163,均由北京市农林科学院蔬菜研究中心提供。所有甘蓝材料于 2015 年 8 月 12 日播种于本中心抗病鉴定温室内,每份材料播种 10 株,设 2 次重复。

### 1.2 接种方法

**1.2.1 菌种来源及孢子悬浮液制备方法** 3 份根肿病肿根分别采自湖北长阳、陕西太白、河南新野。采用丁云花等<sup>[25]</sup>和龚振平等<sup>[26]</sup>的方法并稍作改动制备孢子悬浮液。将保存于 -20 ℃ 的根肿组织室温解冻,剪成小块称重,用榨汁机搅碎,8 层纱布过滤后 3100 r/min 离心 15 min,弃上清液;用无菌水悬浮沉淀后再次离心,并重复 2 次;弃上清液,用无菌水悬浮沉淀,制成根肿菌休眠孢子悬浮液,利用血球计数板测定孢子浓度,并调至  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$  个/mL,4 ℃ 保存备用。

**1.2.2 根肿病接种方法** 采用菌液注射法<sup>[25-26]</sup>接种:将甘蓝种子播于装有灭菌基质(蛭石和草炭比例为 1:1)并浇透水的育苗杯(10 cm × 10 cm)中;用移液枪吸取 1 mL 配制好的孢子悬浮液注射于种子表面;种子表面覆盖一层蛭石,保持苗床温度为  $25 \pm 2$  ℃,正常管理。接种 60 d 后进行根肿病病情调查。

**1.2.3 病情调查** 甘蓝根肿病苗期室内人工接种鉴定病害分级标准:0 级,根部无肿瘤;1 级,侧根有

表 1 22 个供试材料名称及来源

Table 1 The name and origin of the 22 *Brassica oleracea* materials

编号 No.	品种名称 Name	品种来源 Origin	世代 Generation
1	沃尔 19 号	荷兰	F <sub>1</sub>
2	先正达品种	美国	F <sub>1</sub>
3	G1428	日本	F <sub>1</sub>
4	G1429	日本	F <sub>1</sub>
5	Chou hybride Tekila	美国	F <sub>1</sub>
6	丸美 2 号	日本	F <sub>1</sub>
7	SW-109	日本	F <sub>1</sub>
8	SW-110	日本	F <sub>1</sub>
9	Lodero	荷兰	F <sub>1</sub>
10	Pac1F1Ko	荷兰	F <sub>1</sub>
11	CA163 (CK)	中国	F <sub>1</sub>
12	buhamor waldicoke	德国	F <sub>1</sub>
13	CA2835	中国	F <sub>1</sub>
14	CA2832	中国	F <sub>1</sub>
15	CA2831	中国	F <sub>1</sub>
16	CGL-8	中国	F <sub>1</sub>
17	BDH3	中国	不结球甘蓝自交系
18	R4P1	中国	不结球甘蓝自交系
19	753	中国	F <sub>1</sub>
20	CA189	中国	F <sub>1</sub>
21	CA124	中国	F <sub>1</sub>
22	INCLINE CAULIFLOWER	日本	花椰菜 F <sub>1</sub>

小肿瘤;3 级,主根肿大,其直径小于 2 倍茎基部;5 级,主根肿大,其直径是茎基部的 2~3 倍;7 级,主根肿大,其直径是茎基部的 3~4 倍;9 级,主根肿大,其直径是茎基部的 4 倍以上或肿瘤龟裂<sup>[27]</sup>。病情指数(DI, disease index)按以下公式进行计算:病情指数(DI) =  $\Sigma$ (各级发病株数 × 各级代表数值) / (调查总株数 × 最高病情级数) × 100。抗性评价分级标准<sup>[28-29]</sup>为免疫 I: DI = 0;高抗 HR: 0 < DI < 10;抗病 R: 10 ≤ DI < 20;中抗 MR: 20 ≤ DI < 30;感病 S: 30 ≤ DI < 50;高感: DI ≥ 50。

### 1.3 基因组 DNA 提取及 PCR 检测

采用改良的 CTAB 法<sup>[30]</sup>提取所用材料的基因组 DNA。用 Nano Drop2000 测定 DNA 的纯度和浓度,调整 DNA 浓度为 50 ng/μL,用于 PCR 扩增。PCR 混合物反应体积为 20 μL,扩增体系包括基因组 DNA 2 μL,引物 1 μL(F + R, 1 μM),PrimmerStar

Max DNA polymerase 10 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min; 98 °C 变性 10 s, 59 °C 退火 10 s、72 °C 延伸 2 min, 35 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 最后 4 °C 保存。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,有条带的 PCR 产物交予奥科鼎盛生物科技有限公司测序。引物序列见表 2,由北京博迈德科技发展有限公司合成。

表 2 本研究所用的引物序列

Table 2 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	片段大小(bp) Expected size
Bo7g107730F	ATCCAACCTGGTTTGTCCGCTT	1965
Bo7g107730R	CAACTCCGCTCTCCAACCTTTCT	
Bo3g164040F	CATCTTTGGTGTGCAACAGG	1628
Bo3g164040R	AACCTCCAGAGCAAGGTCCC	

## 1.4 序列分析

利用大白菜抗根肿病基因 *CRa* (登录号: AB751516)<sup>[23]</sup>和 *Crr1a* (登录号: AB605024)<sup>[24]</sup>序列在 Gramene 网站 (<http://www.gramene.org/>) 上甘蓝基因组数据库中进行同源比对,找到其在甘蓝中的同源基因,并设计特异引物对甘蓝基因组进行 PCR 扩增、测序,采用 DNAMAN 和 ClustalW 软件对所获得的测序序列进行拼接、比对分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 22 份甘蓝材料根肿病抗性差异分析

由供试的 22 份甘蓝材料接种根肿菌后调查结果可以看出,不同材料对 3 份根肿病菌的抗性差异明显(表 3)。22 份供试甘蓝材料中,湖北长阳菌种的病情指数介于 33.33~72.23 之间,有 9 份材料表现为高感,分别是先正达品种、SW-109、Lodero、Pac1F1Ko、CA163、CA2835、CA2832、CA2831、CGL-8,平均病情指数为 58.70;其余 13 份材料均表现为感病,平均病情指数为 41.10,没有免疫、高抗品种。陕西太白菌种的病情指数介于 9.86~72.23 之间,有 1 份材料(BDH3)表现为高抗,病情指数为 9.86;3 份材料表现为抗病,分别是 SW-109、SW-110 和 INCLINE CAULIFLOWER,平均病情指数为 13.29;2 份材料表现为中抗,分别是先正达品种和 CGL-8,平均病情指数为 25.30;9 份材料均表现为感病,分别是沃尔 19 号、G1428、Chou hybride Tekila、丸美 2 号、Lodero、buhamor waldicoke、CA2835、R4P1 和 CA124,平均病情指数为 39.97;其余 7 份材料表现

为高感,平均病情指数为 56.25;没有免疫材料。河南新野菌种的病情指数介于 0~70.79 之间,有 3 份材料表现为免疫,分别是 Chou hybride Tekila、SW-110、CGL-8;有 2 份材料表现为高抗,分别是先正达品种和 SW-109,平均病情指数为 1.62;2 份材料表现为抗病,分别是 Pac1F1Ko 和 CA124,平均病情指数为 12.84;1 份材料表现为中抗,为 BDH3,病情指数为 27.27;3 份材料表现为感病,分别是沃尔 19 号、Lodero 和 INCLINE CAULIFLOWER,平均病情指

数为 38.44;其余 11 份材料均表现为高感,平均病情指数为 62.89。

另外,从表 3 也可以看出,22 份供试材料中对来自湖北长阳、陕西太白、河南新野的根肿病菌表现免疫或高抗的材料分别有 0 份、1 份和 5 份;从个体上看,Chou hybride Tekila、Pac1F1Ko、CA124、INCLINE CAULIFLOWER 对陕西太白菌种和河南新野菌种抗性表现相反,这些数据表明 3 份根肿病菌生理小种存在差异,其根肿病抗性也可能由不同的基因控制。

表 3 22 份供试材料对 3 个地区根肿病菌的抗性鉴定结果  
Table 3 Screening results of 22 *Brassica oleracea* materials against three pathogenic samples of *P. brassicae*

编号 No.	材料名称 Name	湖北长阳 Hubei Changyang		陕西太白 Shanxi Taibai		河南新野 Henan Xinye	
		病情指数	抗病类型	病情指数	抗病类型	病情指数	抗病类型
		Disease index	Resistant type	Disease index	Resistant type	Disease index	Resistant type
1	沃尔 19 号	36.11 ± 3.93	S	38.20 ± 2.95	S	40.88 ± 2.81	S
2	先正达品种	50.00 ± 1.57	HS	24.66 ± 0.83	MR	1.85 ± 0.62	HR
3	G1428	35.65 ± 4.23	S	33.14 ± 11.50	S	57.78 ± 15.71	HS
4	G1429	45.93 ± 7.33	S	54.77 ± 1.12	HS	70.79 ± 3.59	HS
5	Chou hybride Tekila	44.45 ± 15.72	S	46.30 ± 13.10	S	0 ± 0	I
6	丸美 2 号	39.50 ± 5.56	S	39.68 ± 7.67	S	55.68 ± 11.61	HS
7	SW-109	58.34 ± 3.92	HS	11.11 ± 5.71	R	1.39 ± 0.97	HR
8	SW-110	46.30 ± 2.62	S	16.67 ± 3.57	R	0 ± 0	I
9	Lodero	51.86 ± 5.24	HS	32.41 ± 9.16	S	33.33 ± 0	S
10	Pac1F1Ko	66.05 ± 9.60	HS	72.23 ± 23.57	HS	14.82 ± 1.05	R
11	CA163 (CK)	51.12 ± 6.29	HS	59.10 ± 7.86	HS	59.72 ± 1.97	HS
12	buhamor waldicoke	45.93 ± 7.33	S	49.26 ± 12.05	S	64.29 ± 3.37	HS
13	CA2835	62.04 ± 1.31	HS	40.37 ± 15.19	S	66.67 ± 0	HS
14	CA2832	55.56 ± 0.00	HS	55.56 ± 0.00	HS	66.67 ± 15.71	HS
15	CA2831	61.12 ± 7.86	HS	50.00 ± 7.86	HS	70.37 ± 10.48	HS
16	CGL-8	72.23 ± 7.86	HS	25.93 ± 5.24	MR	0 ± 0	I
17	BDH3	33.33 ± 0.00	S	9.86 ± 0.85	HR	27.27 ± 7.14	MR
18	R4PI	36.67 ± 4.72	S	43.95 ± 2.45	S	56.49 ± 1.31	HS
19	753	42.27 ± 0.84	S	51.24 ± 0.87	HS	56.95 ± 5.89	HS
20	CA189	49.21 ± 2.45	S	50.84 ± 11.29	HS	66.35 ± 2.69	HS
21	CA124	40.00 ± 3.14	S	36.39 ± 0.40	S	10.85 ± 3.27	R
22	INCLINE CAULIFLOWER	38.89 ± 7.86	S	12.08 ± 2.60	R	41.12 ± 2.43	S

2.2 甘蓝 *CRa* 同源基因鉴定及序列分析

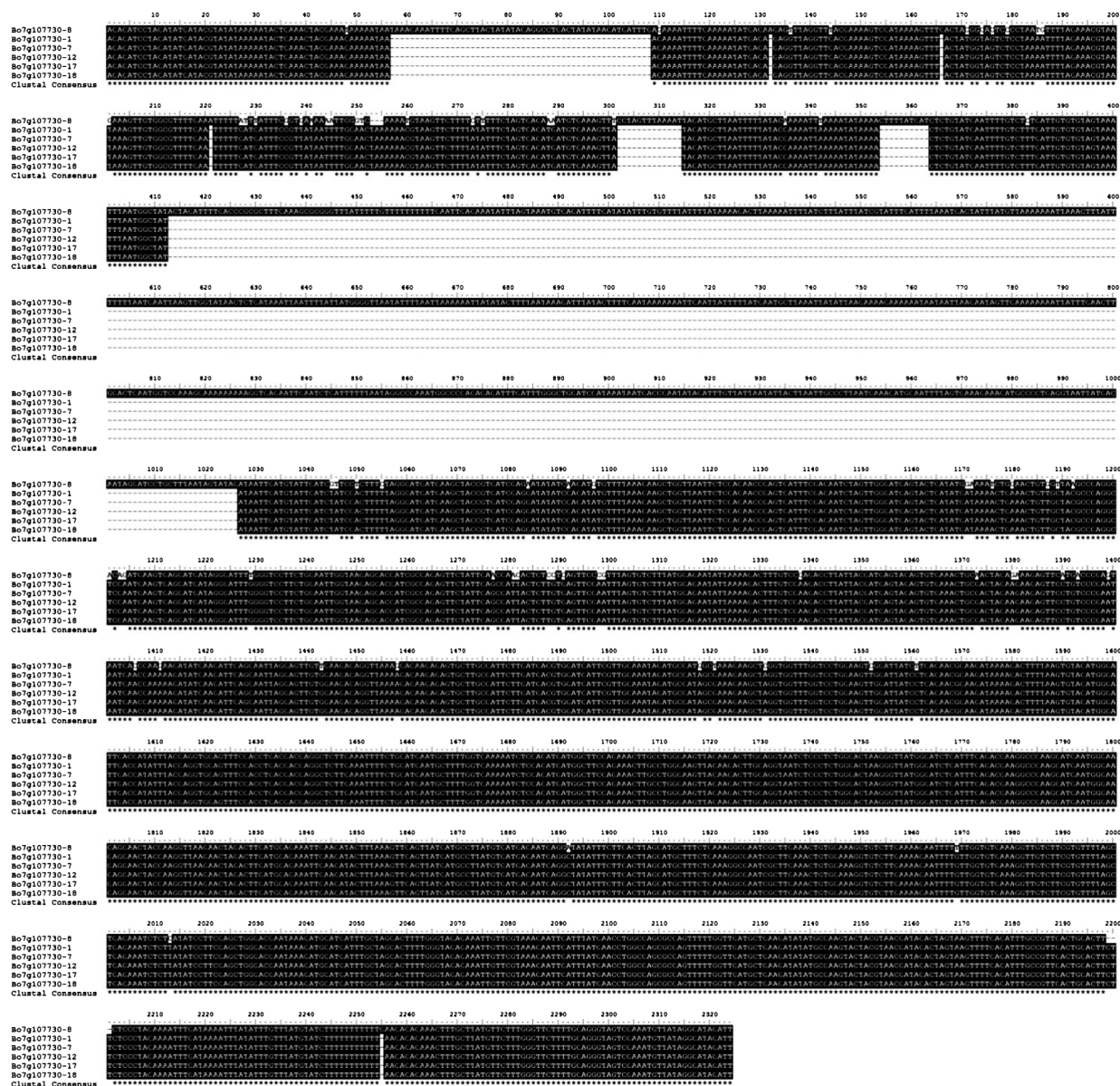
利用大白菜抗根肿病基因 *CRa* 的基因组 DNA 序列为参考序列进行同源比对,比对结果表明在甘蓝 7 号染色体上存在 3 个预测的 *CRa* 同源基因,分别是 *Bo7g107710*、*Bo7g107730* 和 *Bo7g107740*。这 3 个基因分别编码 1185、1230、1353 个氨基酸的 TIR-NBS-

LRR 蛋白,3 个基因之间具有较高的序列相似性,组成一个抗病基因簇,其中 *Bo7g107710* 和 *Bo7g107730* 氨基酸序列一致性为 66.69%,*Bo7g107710* 和 *Bo7g107740* 的为 58.78%,*Bo7g107730* 和 *Bo7g107740* 的为 58.64%。3 个基因与 *CRa* 的氨基酸序列一致性分别为 67.15%、69.35%、63.62%。为了解甘蓝中这



些同源基因是否可能具有抗性功能,本研究挑选其中一个与 *CRa* 具有最高相似性的同源基因 *Bo7g107730*,在该基因的 N 端设计引物 Bo7g107730-F/R(表 2),分别对 3 个抗病材料 SW-109、SW-110、BDH3 和 3 个感病材料沃尔 19 号、buhamor waldi-

coke、R4P1 进行特异扩增并测序。结果表明:3 份抗病材料和 3 份感病材料均可扩增出约 2.0 kb 大小的条带,序列比对结果如图 1 所示。其中,测序所得序列中抗病材料 SW-109、BDH3 与 3 份感病材料序列完全一致,SW-110 与 3 份感病材料一致性为 70.41%。



Bo7g107730-7、Bo7g107730-8、Bo7g107730-17 分别为抗病材料 SW-109、SW-110、BDH3;Bo7g107730-1、

Bo7g107730-12、Bo7g107730-18 分别为感病材料沃尔 19 号、buhamor waldicoke、R4P1,下同

Bo7g107730-7、Bo7g107730-8 and Bo7g107730-17 represent the resistant materials of SW-109,SW-110 and BDH3, respectively;Bo7g107730-1, Bo7g107730-12 and Bo7g107730-18 represent the susceptible materials of woer19,buhamor waldicoke and R4P1, respectively, the same as below

图 1 抗、感材料中 *Bo7g107730* 基因部分序列比对

Fig. 1 Sequence alignment of *Bo7g107730* between resistant and susceptible materials

### 2.3 甘蓝 *Crr1a* 同源基因鉴定及序列分析

利用大白菜抗根肿病基因 *Crr1a* 的基因组 DNA 序列为参考序列进行同源比对,比对结果表明在甘蓝 3 号染色体上存在预测的 1 个与 *Crr1a* 同源的基

因 *Bo3g164040*,该基因编码 890 个氨基酸的 TIR-NBS-LRR 蛋白,与 *Crr1a* 的氨基酸序列一致性为 52.65%。本研究以 *Bo3g164040* 的基因组序列为模板,在该基因的 N 端设计特异引物 Bo3g164040-F/R

(表 2), 分别对挑选的 3 个抗病材料 SW-109、SW-110、BDH3 和 3 个感病材料沃尔 19 号、buhamor waldicoke、R4P1 进行特异扩增并测序。3 份抗病材料和 3 份感病材料均可扩增出 1.6 kb 大小的条带, 序列比对结果如图 2 所示。6 份材料具有高度的序列一致性, 其中 3 份抗病材料的一致性为 98.57%, 3 份感病材料的一致性为 97.61%。抗陕西太白菌种

材料 BDH3 与 3 份感病材料序列一致性高达 97.84%, 共存在 45 处 SNP 和 3 处 Indel 变异; 抗河南新野菌种材料 SW-109、SW-110 与 3 份感病材料序列一致性为 98.18%, 同样存在 45 处 SNP 和 3 处 Indel 变异。3 份抗病材料与 3 份感病材料在位点 1 有 2 个碱基的差异, 其中抗病材料为 AA, 感病材料为 CC(图 2)。



图 2 抗感材料中 *Bo3g164040* 基因部分序列比对

Fig. 2 Sequence alignment of *Bo3g164040* between resistant and susceptible materials

### 3 讨论

#### 3.1 根肿病抗性鉴定

虽然本试验并没有对来源于 3 个地区的菌种进行生理小种鉴定, 但根据抗性鉴定结果, 3 个地区根肿病菌对 22 份甘蓝材料存在较大的抗、感差异, 推测来自湖北长阳、陕西太白和河南新野的根肿病菌可能不是一个生理小种, 这与以往研究报道中这些地区小种均为 4 号生理小种的结论不一致<sup>[2-4]</sup>, 可能是由于根肿病菌存在自然变异导致同一地区不同采样地点根肿菌的生理小种不同, 或者所用菌源不纯, 也可能是由于目前所用的 Williams 鉴别寄主系统中所用品种太少而不能区分更多的生理小种等原因所致。

本试验供试的 22 份甘蓝材料中未发现对 3 种根肿菌均表现抗性的材料, 说明这些材料中没有广

谱抗源的材料。另外, 全部材料对湖北长阳根肿病菌表现感病, 没有鉴定出抗源; 而对陕西太白及河南新野根肿病菌, 所筛选出的抗源较多, 其中对陕西太白根肿病菌高抗品种 BDH3、对河南新野根肿病菌表现抗病的品种 Chou hybride Tekila、SW-110、CGL-8、先正达品种和 SW-109 可用于将来的根肿病抗性研究。由于甘蓝中可利用的抗源较少且抗性单一, 根肿病菌的致病力强, 且多样的致病型分化及比较复杂的群体结构, 根肿病基因的小种专化性抗性等问题, 致使培育的抗病品种很快丧失抗性。因此, 在未来的研究中不仅要继续在我国传统育种材料中筛选抗源, 还应在更广的范围内进行抗源筛选, 加强从日本、韩国、北美、欧洲等抗根肿病育种较为先进的国家引进抗性种质, 为下一步的抗性育种提供更多的抗性资源。



### 3.2 同源基因序列分析

利用同源比对的方法,本研究也对已克隆的两个大白菜根肿病抗性基因 *CRa* 和 *Crr1a* 在甘蓝中的同源基因进行了分析。在甘蓝 7 号染色体上存在 3 个预测基因为 *CRa* 基因的同源基因,分别是 *Bo7g107710*、*Bo7g107730* 和 *Bo7g107740*,这表明甘蓝中此位点可能是一个新的抗性基因位点,极有可能在进化中产生新的抗病基因。通过对其中与 *CRa* 最相似的 *Bo7g107730* 基因在抗、感材料中的序列进行分析,发现抗病材料 BDH3、SW-109 与 3 个感病材料在测序片段中序列完全一致,表明 BDH3 和 SW-109 中的 *Bo7g107730* 基因可能没有抗性功能,或者 2 个材料中该段序列没有与抗根肿病相关的位点;但抗病材料 SW-110 与感病材料在 57 ~ 1026 bp 处存在较大序列变异,有一些较大的 Indel 插入,推测 SW-110 中该位点可能具有根肿病抗性功能。通过序列分析也发现在甘蓝 3 号染色体上存在 1 个预测基因 *Bo3g164040* 为 *Crr1a* 的同源基因。通过对抗、感材料中该基因的部分序列进行分析,发现在位点 1 抗、感材料中存在 2 个碱基的变异,但是抗病材料 BDH3 对河南新野菌种表现中抗,而材料 SW-109、SW-110 对该菌种表现抗病,另外,基于所测序序列中其他 4 处位点的变异发现所测序序列在抗感材料中并不具有特异性,因此,推测甘蓝中 *Bo3g164040* 基因可能没有抗根肿病功能。另外,本研究中并没有测通 *Bo7g107730* 和 *Bo3g164040* 的基因组全长序列,不排除这 2 个基因在抗性材料中具有抗性功能,在将来的试验中,拟通过对 *Bo7g107730* 和 *Bo3g164040* 基因组全长序列进行测序、比对分析,以及通过转基因手段进一步验证这 2 个基因是否具有抗性功能,这将对鉴定新的甘蓝根肿病抗性基因具有重要意义。

### 参考文献

- [1] Dixon G R. The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease[J]. J Plant Growth Regul, 2009, 28: 194-202
- [2] 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
- [3] 汪维红,余阳俊,丁云花,等. 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
- [4] 薛银鸽. 大白菜根肿病抗性基因分子标记与定位[D]. 郑州: 郑州大学, 2014
- [5] 宋小慧,赵利民,陈红红,等. 8 种药剂防治大白菜根肿病田间药效试验比较[J]. 长江蔬菜, 2014(16): 63-65
- [6] 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
- [7] Wallenhammar A C. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels[J]. Plant Pathol, 1996, 45(4): 710-719
- [8] Dixon G R. Vegetable brassicas and related crucifers[M]. Wallingford: CABI Pub, 2007: 183-242
- [9] Dixon G R. *Plasmodiophora brassicae* in its environment[J]. J Plant Growth Regul, 2009, 28: 212-228
- [10] 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]. Eur J Plant Pathol, 1999, 105: 327-332
- [11] Yoshikawa H, Talekar N S, Griggs T D, et al. Breeding for clubroot resistance in Chinese cabbage [C]//Tsukuba: Proceeding of the 1st International Symposium, 1981: 405-414
- [12] Piao Z Y, Ramchiary N, Lim Y P. Genetics of clubroot resistance in *Brassica* species[J]. J Plant Growth Regul, 2009, 28: 252-264
- [13] Bradshaw J E, Gemmell D J, Wilson R N. Transfer of resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) to swedes (*Brassica napus* L. var. *napobrassica* Peterm) from *B. rapa* [J]. Ann Appl Biol, 1997, 130(2): 337-348
- [14] Hirai M. Genetic analysis of clubroot resistance in *Brassica* crops [J]. Breed Sci, 2006, 56(3): 223-229
- [15] Diederichsen E, Frauen M, Linders E G, et al. Status and perspectives of clubroot resistance breeding in crucifer crops[J]. J Plant Growth Regul, 2009, 28(3): 265-281
- [16] 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
- [17] Suwabe K, Ysukazaki 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] 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, 2004, 108: 639-643
- [19] Masumoto E, Yasui C, Ohi M, et al. Linkage analysis of RELP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. Euphytica, 1998, 104: 79-86
- [20] 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
- [21] Piao Z Y, Park Y J, Choi S R, et al. Conversion of AFLP marker linked to clubroot resistance gene into SCAR marker [J]. J Am Soc Hortic Sci, 2002, 43: 653-659
- [22] 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: 1458-1465
- [23] Matsumoto E, Ueno H, Aruga D, et al. Molecular characterization of the *CRa* gene conferring clubroot resistance in *Brassica rapa* [J]. Plant Mol Biol, 2012, 80: 621-629
- [24] Hatakeyama K, Suwabe K, Tomita R N, 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(1): e54745
- [25] 丁云花,简元才. 十字花科蔬菜根肿病菌生理小种及接种方法[J]. 中国蔬菜, 2005(8): 3
- [26] 龚振平,于拴仓,苏同兵,等. 大白菜骨干自交系的苗期抗病性评价[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(6): 1194-1205
- [27] 吴道军,陈国康,杨晓琴,等. 4 种甘蓝根肿病分级标准的应用评价[J]. 西南农业学报, 2013, 26(2): 591-594
- [28] 胡靖峰,吴丽艳,林良斌,等. 用菌土接种法鉴定云南省主要十字花科作物对根肿病的抗性[J]. 中国蔬菜, 2010(14): 71-74
- [29] 李向东,孙道旺,曹继芬,等. 十字花科蔬菜根肿病抗性水平筛选研究[J]. 西南农业学报, 2013, 26(1): 171-173
- [30] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321-4325