

DOI:10.11937/bfyy.201622030

大白菜抗根肿病基因 *Crr3* 的 PCR 快速检测与种质资源筛选

孙朝辉¹, 马安峰¹, 程 斐¹, 曹丹丹¹, 任平平¹, 高建伟²

(1. 青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109; 2. 山东省农业科学院 蔬菜花卉研究所, 山东 济南 250100)

摘 要:以抗根肿病大白菜自交系‘YM-7’和感病自交系“冠 291”及其杂交 F_1 、 F_2 代和 24 份国内外引进的大白菜种质资源为试材, 采用人工接种和分子标记方法, 研究了 2 对与抗根肿病基因 *Crr3* 紧密连锁分子标记的稳定性及 24 份新材料中 *Crr3* 基因的情况。结果表明: 引物 OPC11-2S 在‘YM-7’中扩增出 1 条 1.3 kb 片段, 在“冠 291”中扩增出 1 条 1.0 kb 片段, 在其 F_1 代中同时扩增出 1.3 kb 和 1.0 kb 的片段, 该分子标记在 F_2 代中的鉴定结果与人工接种鉴定结果一致, 利用引物 OPC11-2S 能准确标记出大白菜种质资源中 *Crr3* 基因, 而且能够区分出 *Crr3* 基因的纯合性和杂合性, 共选出 2 份含有杂合 *Crr3* 基因的新种质资源。

关键词:大白菜; 根肿病; *Crr3* 基因; 分子标记; 种质资源

中图分类号:S 634.102.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)22-0120-04

大白菜根肿病是由芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woron.) 侵染引起的土传性病害, 严重危害十字花科蔬菜的生产^[1]。大白菜根肿病最早于 1737 年在英国地中海西岸和欧洲南部发现, 目前世界范围内均有分布, 在我国云南、四川、山东等地大白菜根肿病发生面积已经超过种植面积的 65%, 部分田块的损失超过了 50%, 严重制约了大白菜的生产^[2]。实践证明, 培育抗根肿病品种是防治大白菜根肿病的重要措施。目前已鉴定出 8 个抗根肿病基因位点, 包括位于 A03 染色体上的 *CRa*, *CRb*, *CRk* 和 *Crr3*, 以及分别位于 A08, A01, A06, A02 染色体上的 *Crr1*, *Crr2*, *Crr4* 和 *CRC*^[3-7]。*Crr3* 是

一个重要的抗根肿病基因, 但目前国内对其研究报道较少。该研究利用抗根肿病纯合系‘YM-7’、感病纯合系“冠 291”及其杂交 F_1 代对已发表的 2 对紧密连锁分子标记 OPC11-1S 和 OPC11-2S^[5] 进行验证, 以期筛选出稳定准确的分子标记方法, 并利用分子标记的方法对大白菜种质资源进行筛选, 以期获得含有抗性基因 *Crr3* 的种质资源, 从而为抗性基因 *Crr3* 的研究以及抗根肿病的大白菜品种培育提供理论依据和种质资源基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

抗根肿病纯合系‘YM-7’、感病纯合系“冠 291”“YM-7×冠 291”杂交 F_1 代, F_1 代自交得到 F_2 代。国内外引进大白菜种质资源 24 份, 其中 8 份为国外种子公司正在测试尚未推广的新组合。每个自交系和品种选取最典型的生长良好的单株进行测试, 大白菜育种材料品种信息见表 1。

接种所用根肿菌病根采自青岛崂山地区发病严重的大白菜田块。试验所用的引物(表 2)和试剂购买于生

第一作者简介:孙朝辉(1968-), 女, 硕士, 副教授, 研究方向为植物营养的基因型差异与育种。E-mail: zhsun163@163.com.

责任作者:程斐(1969-), 男, 博士, 副教授, 研究方向为十字花科蔬菜杂种优势利用。E-mail: chengfei246246@163.com.

基金项目:山东省良种工程资助项目(鲁科字[2014]96 号); 山东省现代农业产业技术体系资助项目(SDAIT-02-022-01)。

收稿日期:2016-07-25

Abstract: Wine grape ‘Cabernet Sauvignon’ was used as test material, tissue culture method was used, the effect of different basic culture medium with different concentration of IBA combination and different culture containers on ‘Cabernet Sauvignon’ grape growth was studied, in order to enhance the growth potential of ‘Cabernet Sauvignon’ grape *in vitro* and improve the survival rate of transplanting. The results showed that the $1/2B_5$ containing $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ IBA + $30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ sucrose + $7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ agar + $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ activated carbon was suitable for ‘Cabernet Sauvignon’ grape *in vitro* culture. ‘Cabernet Sauvignon’ grape seedlings grew strongly in the bottle with breathable film diameter of 3.0 cm and light transmission rate 90%. The transplanting survival rate was the highest 96.67%.

Keywords: wine grape; tissue culture; optimization of culture conditions

表 1 大白菜育种材料品种信息

Table 1 Information of Chinese cabbage used in the experiment

编号 Number	品种 Variety	来源 Source	编号 Number	品种 Variety	来源 Source
1	‘DF031’	山东	13	“花の和大”	日本
2	‘DF033’	山东	14	“新抗根”	山东
3	‘DF036’	山东	15	“快菜”	山东
4	‘DF005’	山东	16	“绿秀”	山东
5	‘DF006’	山东	17	“纳宝”	山东
6	‘CF071’	日本	18	“夏娃”	山东
7	‘CF072’	日本	19	“韩秀”	韩国
8	‘CF008’	日本	20	“金峰”	韩国
9	‘CF011’	日本	21	“金钻”	韩国
10	‘CF012’	日本	22	“黄崎”	韩国
11	‘CF013’	日本	23	“新天津绿”	河北
12	‘CF014’	日本	24	“抗大 3 号”	云南

表 2 引物信息

Table 2 Information of primers used in the experiment

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Primer sequences	退火温度 Annealing temperature /℃	产物大小 Fragment length/kb
OPC11-1S	TTACAGCTGGACCAAGAACATAG ATCGATGTTTGTGAGTCTCTACT	60	1.4
OPC11-2S	GTAACCTGGTACAGAACAGCATAG ACTTGTCTAATGAATGATGATGG	60	1.0

工生物工程(上海)股份有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 根肿菌接种方法及抗性鉴定 采用注射法^[8]进行人工接种。将适量感病的大白菜肿根加少量无菌水后用组织打碎机打碎成匀浆,静置 2 h 使游动孢子充分释放后用 8 层纱布过滤,用血球计数板观察滤液中游动孢子浓度,并用无菌水调整游动孢子浓度至 1×10^8 个 $\cdot L^{-1}$ 。4℃条件下保存备用。用移液枪注射 5 mL 接种液于出苗 2 d 的幼苗根际周围,在 24℃左右的日光温室中培养,40 d 后观察发病情况。主根和侧根均无肿块或者侧根有轻微小肿块均计为抗病,侧根和主根上有较大肿瘤甚至更严重时计为感病。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 取植株幼嫩叶片,采用改良 CTAB 法^[9]提取基因组 DNA,采用 Nanodrop 检测 DNA 浓度并调整浓度至 $50\text{ ng} \cdot \mu L^{-1}$ 。调整浓度后的基因组 DNA 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。

1.2.3 PCR 扩增及产物检测 PCR 反应体系总体积 $20\text{ }\mu\text{L}$: $50\text{ ng} \cdot \mu L^{-1}$ 模版 DNA $2\text{ }\mu\text{L}$, $2.5\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 的 dNTP $1.6\text{ }\mu\text{L}$, $5 \times$ PCR buffer $4\text{ }\mu\text{L}$, $25\text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 的 MgCl_2 $1\text{ }\mu\text{L}$, $5\text{ U} \cdot \mu L^{-1}$ 的 Taq DNA 聚合酶 $0.2\text{ }\mu\text{L}$, $10\text{ }\mu\text{mol} \cdot L^{-1}$ 的正反向引物各 $1\text{ }\mu\text{L}$, 不足部分用 ddH₂O 补齐。PCR 反应程序: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min , $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min , 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min ; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶 $5\text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 条件下电泳 1 h , BIO-RAD 凝胶成像仪观察并记录结果。

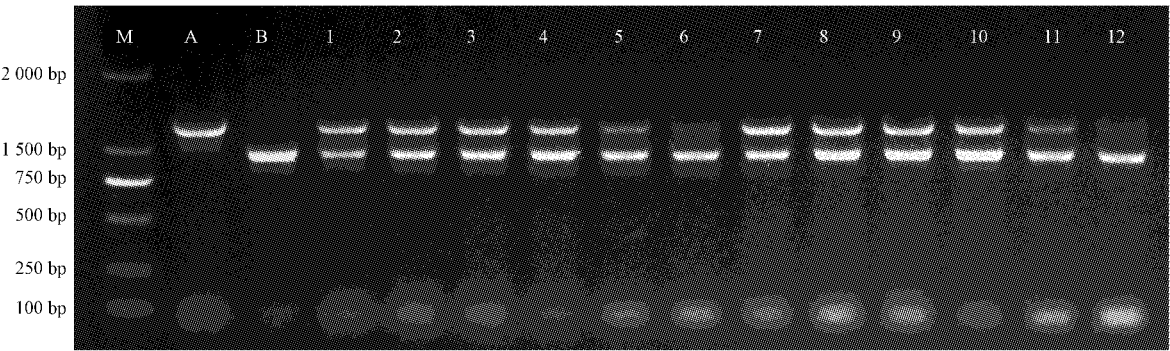
2 结果与分析

2.1 引物筛选

利用抗根肿病纯合系‘YM-7’、感病纯合系‘冠 291’及其杂交 F₁ 代对已发表的 2 对紧密连锁分子标记进行筛选。由图 1 可知,引物 OPC11-2S 在‘YM-7’中扩增出 1 条 1.3 kb 的扩增片段,在“冠 291”中扩增出 1 条 1.0 kb 的扩增片段,在其 F₁ 代中同时扩增出 1.3 kb 和 1.0 kb 的扩增片段。

2.2 利用引物 OPC11-2S 对“YM-7×冠 291”自交 F₂ 代的 Crr3 基因标记

随机选取 24 株“YM-7×冠 291”的自交 F₂ 代单株,利用引物 OPC11-2S 对其 Crr3 抗病基因进行鉴定。由图 2 可知,单株 1、6、11、17 和 23 扩增出 1.3 kb 的片段,单株 4、8、9、12、16、19 和 20 扩增出 1.0 kb 的片段,单株 2、3、5、7、10、13、14、15、18、21、22 和 24 扩增出同时含有 1.3 kb 和 1.0 kb 的扩增片段,进一步验证了引物 OPC11-2S 的准确性和稳定性。

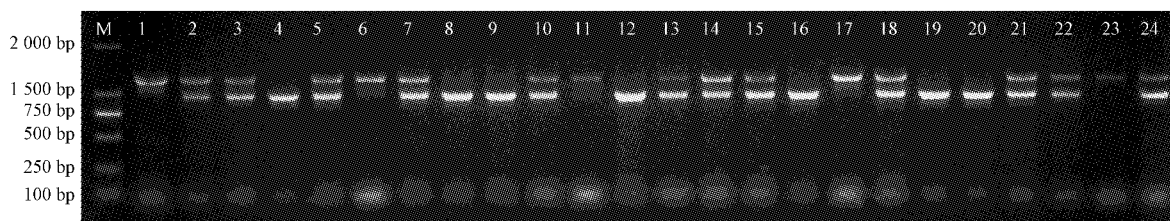


注: M. DL 2 000 Marker; A. ‘YM-7’; B. ‘冠 291’; 1~12. “YM-7×冠 291”杂交 F₁ 代。

Note: M. DL 2 000 Marker; A. ‘Yuan 291’; B. ‘Guan 291’; 1~12. F₁ generation of ‘YM-7×Guan 291’.

图 1 OPC11-2S 扩增结果

Fig. 1 Amplification result of OPC11-2S



注: M. DL 2 000 Marker; 1~24. “YM-7 × 冠 291” F₂ 代。

Note: M. DL 2 000 Marker; 1~24. F₂ generation of ‘YM-7 × Guan 291’.

图 2 OPC11-2S 在 “YM-7 × 冠 291” F₂ 代扩增结果

Fig. 2 Amplification result of OPC11-2S in F₂ generation of ‘YM-7 × Guan 291’

2.3 利用人工接种鉴定方法对“YM-7 × 冠 291”自交 F₂ 代进行抗病性鉴定

人工接种试验表明(表 3), ‘YM-7’表现抗病, ‘冠 291’表现感病, “YM-7 × 冠 291”杂交 F₁ 代均表现抗病。F₂ 代出现抗感分离, 其中 1、2、3、5、6、7、10、11、13、14、15、17、18、21、22、23 和 24 等 17 株表现抗病, 4、8、9、12、16、19 和 20 等 7 株表现感病。人工接种的试验结果与 2.2 中的分子标记检测结果一致。

2.4 利用引物 OPC11-2S 对含 *Crr3* 抗病基因的新种质资源筛选

利用引物 OPC11-2S 对国内外引进的 24 份种质资源进行检测, 由图 3 可知, 其中 7 号和 9 号 2 份种质资源均扩增出 1 条 1.3 kb 和 1 条 1.0 kb 的扩增片段, 其余 22 份种质资源仅扩增出 1 条 1.0 kb 的扩增片段。说明 7 号和 9 号种质资源中含有杂合抗病基因 *Crr3*。

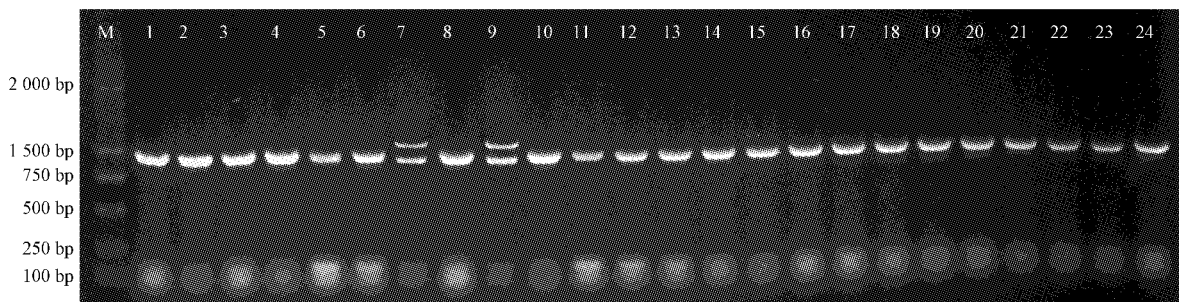
表 3 OPC11-2S 在 “YM-7 × 冠 291” F₂ 代扩增结果

Table 3 Amplification result of OPC11-2S in F₂ generation of ‘YM-7 × Guan 291’

编号 Number	扩增片段 Fragment length/kb	基因型 Genotype	接种鉴定结果 Inoculation result	编号 Number	扩增片段 Fragment length/kb	基因型 Genotype	接种鉴定结果 Inoculation result
1	1.3	+	R	13	1.3/1.0	±	R
2	1.3/1.0	±	R	14	1.3/1.0	±	R
3	1.3/1.0	±	R	15	1.3/1.0	±	R
4	1.0	—	S	16	1.0	—	S
5	1.3/1.0	±	R	17	1.3	+	R
6	1.3	+	R	18	1.3/1.0	±	R
7	1.3/1.0	±	R	19	1.0	—	S
8	1.0	—	S	20	1.0	—	S
9	1.0	—	S	21	1.3/1.0	±	R
10	1.3/1.0	±	R	22	1.3/1.0	±	R
11	1.3	+	R	23	1.3	+	R
12	1.0	—	S	24	1.3/1.0	±	R

注: +. 纯合抗病条带; —. 纯合感病条带; ±. 杂合抗病条带; R. 抗病; S. 感病。下同。

Note: +, Homozygous resistant band; —, Homozygous susceptible band; ±, Heterozygous resistant bands; R. Resistant; S. Susceptible. The same below.



注: M. DL 2 000 Marker; 1~24. 国内外引进的新种质资源。

Note: M. DL 2 000 Marker; 1~24. New germplasms introduced from domestic and foreign companies.

图 3 OPC11-2S 在 24 份种质资源中扩增结果

Fig. 3 Amplification result of OPC11-2S in 24 germplasms

2.5 利用人工接种鉴定方法对 24 份新种质资源进行抗病性鉴定

人工接种试验表明(表 4), 24 份国内外引进的新种质资源中 7 号和 9 号表现抗病。与 2.4 中的分子标记检测结果一致。

3 讨论

早期研究认为根肿病抗性由一个单显性位点控制,

简单回交将一个抗性基因转入大白菜品种中即可使其具有抗性^[10]。一些情况下, 植株单一的抗性位点或基因能完全免疫不同种的根肿病菌^[11]。但近期研究表明, 根肿菌变异多种多样, 致病性各有不同, 单一的抗性基因并不能很好的防治根肿病^[12]。实践证明, 在大白菜抗根肿病育种中, 防止大白菜抗性退化的有效方法是将多个抗性基因聚合到一个品种中, 另一种方法是含不同抗性

表4 OPC11-2S在24份种质资源中扩增结果

Table 4 Amplification result of OPC11-2S in 24 germplasms

编号 Number	扩增片段 Fragment length/kb	基因型 Genotype	接种鉴定结果 Inoculation result	编号 Number	扩增片段 Fragment length/kb	基因型 Genotype	接种鉴定结果 Inoculation result
1	1.0	—	S	13	1.0	—	S
2	1.0	—	S	14	1.0	—	S
3	1.0	—	S	15	1.0	—	S
4	1.0	—	S	16	1.0	—	S
5	1.0	—	S	17	1.0	—	S
6	1.0	—	S	18	1.0	—	S
7	1.3/1.0	±	R	19	1.0	—	S
8	1.0	—	S	20	1.0	—	S
9	1.3/1.0	±	R	21	1.0	—	S
10	1.0	—	S	22	1.0	—	S
11	1.0	—	S	23	1.0	—	S
12	1.0	—	S	24	1.0	—	S

基因的品种轮作^[5]。

Crr3 基因对芸薹根肿菌数个生理小种具有抗性,可用于培育新的大白菜品种,从而克服现有抗根肿病栽培品种的退化^[5]。该研究筛选出了与 *Crr3* 基因紧密连锁的分子标记 OPC11-2S,建立了基于 PCR 扩增的快速检测方法,能够快速准确地鉴定出大白菜中 *Crr3* 基因的有无和纯合与杂合性,为大白菜抗根肿病育种中有效而便捷利用 *Crr3* 基因验证了一个新方法。同时利用该方法在 24 份种质资源中检测到了 2 份含有 *Crr3* 基因的新种质,为今后大白菜抗根肿病育种提供了新的抗源。

参考文献

- [1] HOWARD R J, STRELKOV S E, HARDING M W, et al. Clubroot of cruciferous crops new perspectives on an old disease[J]. Histopathology, 2010, 32(1): 35-42.

- [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] 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.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [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: 1458-1465.
- [7] SAKAMOTO K, SAITO A, HAYASHIDA N, et al. Mapping of isolate-specific QTL for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J]. Theor Appl Genet, 2008, 117: 759-767.
- [8] 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): 29-31.
- [9] WANG X W, LOU P, BONNEMA G, et al. Linkage mapping of a dominant male sterility gene *Ms-cdl* in *Brassica oleracea* [J]. Genome, 2005, 48: 848-854.
- [10] YOSHIKA W. Studies on breeding of clubroot resistance in cole crops [J]. Bull Natl Res Inst Veg Ornament Plants Tea Jpn Ser A, 1993(7): 1-165.
- [11] CRUTE I R, PINK D A C. Genetic and utilization of pathogen resistance in plants[J]. Plant Cell, 1996, 8: 1747-1750.
- [12] 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.

Rapid Detection of *Crr3* Gene Against Clubroot Disease by PCR and Selection of Corresponding Germplasm in Chinese Cabbage (*Brassica pekinensis* L.)

SUN Zhaohui¹, MA Anfeng¹, CHENG Fei¹, CAO Dandan¹, REN Pingping¹, GAO Jianwei²

(1. Horticultural College, Qingdao Agriculture University, Qingdao, Shandong 266109; 2. Vegetable and Flower Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100)

Abstract: The resistant line ‘YM-7’ and the susceptible line ‘Guan 291’, their F_1 , F_2 generations and other 24 germplasms from foreign and domestic companies were used as test materials. Molecular marking method and artificial inoculation method were applied to select effective molecular marker to screen *Crr3* gene from two published candidates. The results showed that 1.3 kb amplification fragment in ‘YM-7’, 1.0 kb fragment in ‘Guan 291’ and both 1.3 kb and 1.0 kb fragments in their F_1 generation were amplified with primer OPC11-2S. The results of artificial test and molecular marker screening for F_2 generation of ‘YM-7 × Guan 291’ were consistent. The primer OPC11-2S could not only identify the existence of *Crr3* gene, but also could test the homozygosis or heterozygosis of *Crr3* gene in germplasms accurately. Two germplasms with heterozygous *Crr3* resistant gene were manifested.

Keywords: Chinese cabbage; clubroot disease; *Crr3* gene; molecular markers; germplasm