

陈丽潇,刘鑫,王跃华,等.抗根肿病大白菜小孢子培养及分子鉴定[J].江苏农业科学,2019,47(10):141-143.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.10.031

# 抗根肿病大白菜小孢子培养及分子鉴定

陈丽潇<sup>1</sup>,王跃华<sup>1</sup>,刘鑫<sup>1</sup>,惠麦侠<sup>1</sup>,赵利民<sup>1</sup>,赵小平<sup>2</sup>

(1.西北农林科技大学园艺学院,陕西杨凌 712100; 2.陕西省杂交油菜研究中心,陕西杨凌 712100)

**摘要:**以 10 个抗根肿病大白菜品种为试材,研究影响小孢子出胚的因素,并对 DH 植株进行根肿抗性分子检测。结果表明,基因型是影响出胚的最主要因素,参试的 10 个品种中仅有 3 个出胚,其中 15CR82 出胚率最高,为 3.36 个/蕾。基因型还决定了胚状体的类型及大小,胚的大小对于转绿成苗率有一定影响。一般直径大于 2 mm 的胚状体容易转绿成苗。用根肿抗性基因 *CRa* 的特异分子标记 *CRaEXON4-3* 筛选 DH 群体,获得 27 个携带抗性基因植株。

**关键词:**大白菜;抗根肿病;游离小孢子培养

**中图分类号:** S634.103 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)10-0141-03

大白菜(*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)属于十字花科芸薹属芸薹种大白菜亚种,是一种起源于我国的重要蔬菜作物。根肿病是由芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woron)侵染引起的一种世界性病害<sup>[1-2]</sup>,主要感病植物有大白菜、青菜、芥菜等十字花科蔬菜<sup>[3]</sup>。根肿病病菌被归为原生界根肿菌门,其通过侵染十字花科植物根毛导致根部薄壁细胞增生而形成肿瘤<sup>[4]</sup>,从而影响植物吸水功能<sup>[5]</sup>,使地上部分生长迟缓、缺水萎蔫<sup>[6]</sup>。该病最初于 1737 年被发现在地中海西岸(英国)和欧洲南部(前苏联列宁格勒),由于该病传染力强,传播途径多,感病植物根部释放的休眠孢子在土壤中存活可达 10 年<sup>[7]</sup>,随后在世界各地的十字花科蔬菜种植区域蔓延扩散。又由于发病初期蔬菜地上部分的症状不明显,不易被发现,使得发病地区减产严重,根肿病又有“根癌”之称,已成为一种世界性难题。

近年来,根肿病的防治方法主要有农业防治、生物防治、化学防治及抗病育种等。而从环境保护、成本、管理难易程度

等方面考虑,选用抗病品种是目前防治根肿病的最佳方案<sup>[8]</sup>。游离小孢子培养(isolated microspore culture,简称 IMC)技术是由 Nitsch 在进行花药培养的同时创建和发展的,1982 年德国的 Lichter 率先在甘蓝型油菜上成功地进行了游离小孢子培养,并发现小孢子胚胎及其再生植株的产量远高于花药培养<sup>[9]</sup>,这引起了育种工作者的浓厚兴趣,此后小孢子培养技术在农作物,尤其是芸薹属蔬菜作物中得到了迅速发展。利用游离小孢子培养技术,可以快速纯化含有抗病基因的植株,并从大量的抗病双单倍体(doubled haploid,简称 DH)群体中,寻找具有优良生物性状的植株作为亲本进行下一步的育种工作。本研究以 10 份市售的抗根肿病大白菜品种为材料,筛选易出胚的基因型材料,并利用根肿抗性基因 *CRa* 分子标记对种质进行筛选,以期为大白菜抗根肿病新品种的选育奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试抗根肿病大白菜材料为 15CR37、15CR38、15CR53、15CR82、15CR104、15CR121、15CR122、15CR128、15CR132、15CR136,均由西北农林科技大学十字花科蔬菜研究室提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 试材准备 材料于 2016 年 10 月 15 日播种于陕西省油菜杂交中心大田,自然条件下春化,常规田间管理,于 2017 年 3 月 26 日始花期至 4 月 22 日终花期取材培养。

1.2.2 游离小孢子培养 在大白菜初花期和盛花期,于每天 08:00—11:30 摘取健壮花序上未开的花蕾,花蕾长度为

收稿日期:2018-03-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31372062);国家重点研发计划(编号:2017YFD0101802);西北农林科技大学科技推广项目(编号:TGZX2017-8);国家大宗蔬菜技术产业体系(编号:CARS-23-G-22)。

作者简介:陈丽潇(1992—),女,湖北十堰人,硕士研究生,主要从事蔬菜生物技术与遗传育种研究。E-mail:chenlixiao920417@163.com。

通信作者:惠麦侠,博士,副教授,主要从事蔬菜生物技术与遗传育种研究。E-mail:maixiahui@163.com。

[6]王麒然,吴菊香,张茹琴,等.花生叶腐病菌分泌的细胞壁降解酶活性测定及致病性分析[J].植物生理学报,2016,52(3):269-276.

[7]高增贵,陈捷,高洪敏,等.玉米茎腐病菌产生的细胞壁降解酶种类及其活性分析[J].植物病理学报,2000,30(2):148-152.

[8]Lalaoui F, Halama P, Dumortier V, et al. Cell wall-degrading enzymes produced *in vitro* by isolates of *Phaeosphaeria nodorum* differing in aggressiveness[J]. Plant Pathol, 2000, 49(6): 727-733.

[9]陈晓林,牛程旺,李保华,等.苹果树腐烂病菌产生细胞壁降解酶

的种类及其活性分析[J].华北农学报,2012,27(2):207-212.

[10]Kang Z, Buchenauer H. Ultrastructural and cytochemical studies on cellulose, xylan and pectin degradation in wheat spikes infected by *Fusarium culmorum*[J]. J Phytopathol, 2000, 148(5): 263-275.

[11]Thorsten H. Plant cell wall integrity maintenance as an essential component of biotic stress response mechanisms[J]. Frontiers in Plant Science, 2012, 3: 1-5.

[12]张大智,詹儒林,柳凤,等.杧果细菌性角斑病菌细胞壁降解酶的致病作用[J].果树学报,2016,33(5):585-593.

2.0~3.5 mm。用镊子挑开花蕾,小心挤出花粉,利用显微镜挑选细胞为圆球形,小孢子发育处于单核靠边期,且细胞有一定透光度的花蕾。如细胞为三角形及其他不规则形状,并且细胞颜色极浅则是时期过早,花蕾过小;如细胞成椭圆形且中部较暗透光较差,则是花粉已成熟,花蕾过大。挑选好的花蕾先用 75% 乙醇消毒 1 min,再用 0.1% 氯化汞消毒 15 min,无菌水冲洗 3 遍。加入 6~10 mL 的 B5 洗涤培养基(含 13% 蔗糖),用玻璃棒碾压花蕾使花蕾破碎,小孢子游离于 B5 培养基中,用 50 μm 孔径的尼龙网过滤,收集滤液于离心管中。1 200 r/min 离心 5 min,弃去上清液后加入 B5 培养基悬浮花粉,再次离心,重复 3 次后弃去上清液,加入含有 100 mg/L 秋水仙碱的 NLN-13 液体培养基(含 13% 蔗糖)悬浮小孢子。将小孢子悬浮液稀释后分装于 4 个 60 mm 的培养皿中,每个皿的培养基体积约为 5 mL,用封口膜封口,放于 32 ℃ 培养箱中,暗培养 48 h。取出未污染的样品,将悬浮液加入离心管中,1 200 r/min 离心 5 min,弃去上清,加入 10 mL NLN-10 液体培养基(含 10% 蔗糖)悬浮花粉,将悬浮液加入到 90 mm 培养皿中,封口后放入 25 ℃ 条件下进行暗培养。经过 10~15 d 出现肉眼可见的白色细小颗粒,将出现白色细小颗粒的培养皿放到室温下的摇床上避光振荡培养,15 d 后统计出胚率及胚胎类型。胚状体的直径小于 1 mm 时,不统计在内。

1.2.3 基因型对小孢子胚胎发生的影响 10 份大白菜材料进行游离小孢子培养,暗培养 10 d,振荡培养 15 d 后统计出胚率及胚胎类型。每个品种各挑取 100 个花蕾分装于 4 个培养皿中,每个培养皿 25 个花蕾。

1.2.4 胚状体种类对转绿成苗的影响 所有胚状体均统一转入 MS 固体培养基(MS+0.2 mg/L KT+30 g/L 蔗糖+8 g/L 琼脂),放到光—暗周期为 12 h—12 h,光照度为 1 500 lx,温度为 24 ℃ 的培养间,2 周后分别统计其转绿率。

1.2.5 DH 群体分子筛选 所有获得的小孢子植株,剪取少量叶片组织,用简化 CTAB 法提取 DNA,用笔者所在课题组开发的根肿病抗性基因 *CRa* 特异分子标记进行筛选,统计条带类型。

2 结果与分析

2.1 基因型对大白菜游离小孢子出胚率的影响

不同基因型的抗根肿病大白菜小孢子的胚胎发生能力差异很大。由表 1 可知,10 个供试材料有 3 个得到了胚状体,成功率为 30%。其中 15CR82 出胚率最高,为 3.36 个/蕾,其次为 15CR136,出胚率为 1.32 个/蕾,15CR53 的出胚率最低,为 0.84 个/蕾。

2.2 基因型对大白菜游离小孢子胚状体类型的影响

胚状体的形状和大小与基因型也存在很密切的关联。材料 15CR82 的胚状体主要为子叶型胚与球形胚,且数量多体积小,直径一般为 0.5~3.0 mm,直径小于 1 mm 的胚数量较多。材料 15CR53 和 15CR136 的胚状体则主要为子叶型胚与畸形胚,且体积较大,直径一般为 1~8 mm(图 1)。

2.3 胚状体类型对大白菜胚状体转绿的影响

由表 2 可知,当胚状体的体积达到一定大小时,有助于其转绿。子叶胚相对于其他类型胚状体更容易成苗,子叶胚宽度小于 2 mm 时,一般很难转绿,也就无法成苗。15CR53 和

表 1 抗根肿病大白菜不同基因型小孢子出胚数

材料	花蕾数 (个)	出胚数 (个)	出胚率 (个/蕾)
15CR37	25	0	0
15CR38	25	0	0
15CR53	25	21	0.84
15CR82	25	84	3.36
15CR104	25	0	0
15CR121	25	0	0
15CR122	25	0	0
15CR128	25	0	0
15CR132	25	0	0
15CR136	25	33	1.32

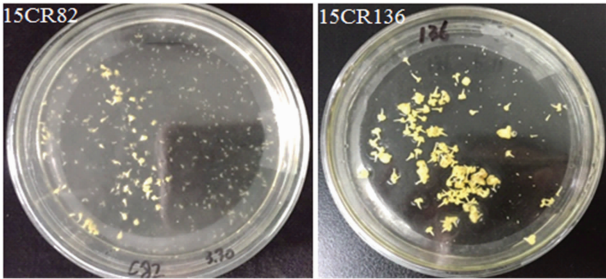


图 1 大白菜游离小孢子胚状体发育情况

表 2 大白菜小孢子胚状体转绿率

材料	转胚数 (个)	转绿数 (个)	转绿率 (%)
15CR53	159	107	67.3
15CR82	444	88	19.8
15CR136	251	175	69.7

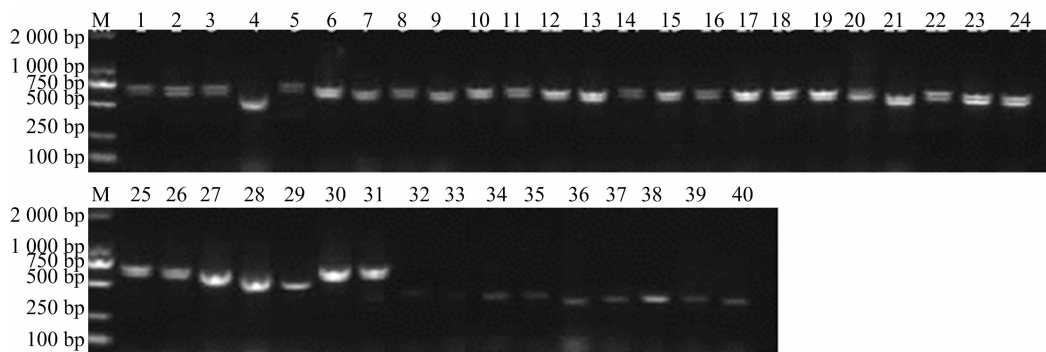
15CR136 的子叶胚较大,容易转绿,其转绿率分别为 67.3%、69.7%,15CR82 的胚状体数量最多,体积小,大部分直接白化、褐化,转绿的胚状体数量较少,转绿率极低,只有 19.8%。

2.4 DH 群体分子鉴定

由图 2 可知,对获得的 40 个 DH 植株进行 *CRa* 基因的分子检测,植株间表现多态性,扩增条带大小为 705 bp 的有 27 株,含抗性基因 *CRa*,表现为纯合抗病,扩增条带大小为 413 bp 的有 9 株,不含抗性基因 *CRa*,表现为感病。由结果可知,纯合抗病植株与感病植株比为 3:1。4、27、28、29 号样品条带大小为 500 bp,与其他材料的大小不一致,表现为材料间多态性。

3 结论与讨论

基因型对游离小孢子培养的胚状体发生来说是最关键的因素之一,Bhatia 等利用 30 个印度花椰菜品种进行研究,其中 13 个品种得到了胚状体<sup>[10]</sup>。卢松等用 3 个微型结球白菜品种进行试验,有 1 个品种得到了胚状体<sup>[11]</sup>。本试验以 10 个抗根肿病大白菜品种进行游离小孢子培养,其中有 3 个品种得到了胚状体。15CR82 的出胚率最高(3.36 个/蕾),而材料 15CR53 的出胚率相对较低(0.84 个/蕾)。胚状体的发生不仅受到基因型的影响,而且还受一些外部条件的影响,同一品种胚状体的发生具有很大的偶然性,可能某一天出胚率极



M 为 DNA marker; 条带 1~40 对应 40 个 DH 植株

图2 小孢子植株分子检测结果

高,也可能没有发生胚状体。在这个未知条件还没有解决之前,由于花期时长有限,试验中尽量保证每天有足够的花蕾是获得较多 DH 植株的一个简单直接的方式。

除了基因型对小孢子培养的影响外,如何高效利用已经形成的胚状体是一个亟待解决的问题。本试验发现,胚状体的大小对于转绿率的影响比较大,子叶胚宽度小于 2 mm 时,一般很难转绿,推测由于出胚率较高的品种、有限的空间及培养基限制了胚状体生长空间及获得较多营养物质。笔者尝试将较大的胚状体转出后,换成新的 NLN-10 培养基继续避光振荡培养,结果显示该方法可促进胚状体的生长,提高转绿率。归因于增加胚状体生存空间及可用营养物质,同时置换掉培养基中胚状体产生的一些有害代谢产物。同一品种在不同时期的出胚率也不一样,说明外在环境条件对胚状体发生也会产生一定影响,探究利于出胚的环境条件,也是一个可以有效提高易出胚品种出胚数的方法。

利用抗根肿病基因特异分子标记可以快速检测大白菜材料含有的抗病基因,本研究利用 *CRa* 特异分子标记检测获得的 40 个 DH 植株,有 27 个携带抗病基因 *CRa*,纯合抗病植株与感病植株比为 3:1。所用供试母株材料为杂合植株,根据孟德尔遗传定律中的分离定律,预测试验结果纯合抗病植株与纯合感病植株比为 1:1,与本次试验结果相差较大。由于成苗过程中胚状体有大量损耗,所以无法判断是含有抗根肿病 *Cra* 基因的花粉更容易形成胚状体,还是含有抗病基因的胚状体更容易成苗。在后续试验中,可以通过拓宽供试材料基因型,增加出胚率、提高成苗率等有效方法来获取更多抗根

肿病纯合种质资源,进而应用于抗根肿病育种实践当中。

#### 参考文献:

- [1] 田雅琳. 十字花科根肿病研究现状及未来趋势[J]. 天津农业科学, 2015, 21(4): 123-126.
- [2] 索欢, 陈龙正, 徐海, 等. 十字花科根肿病研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(14): 115-117, 126.
- [3] 张红, 张斌, 闻凤英, 等. 大白菜根肿病的遗传规律及抗病基因定位研究[J]. 华北农学报, 2017, 32(4): 60-66.
- [4] 原玉香, 赵艳艳, 魏小春, 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.
- [5] 杨征. 大白菜抗根肿病品种鉴定与抗病基因定位研究[D]. 青岛: 青岛农业大学, 2015.
- [6] 黄元贵. 十字花科作物根肿病综合防治技术[J]. 现代农业科技, 2017(3): 111-111.
- [7] Kageyama K, Asano T. Life cycle of *Plasmidiophora brassicae*[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2009, 28(3): 203-211.
- [8] 罗延青, 李劲峰, 俎峰, 等. 芸薹属作物根肿病抗性遗传研究进展[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(31): 19162-19163.
- [9] Lichter R. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*[J]. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 1982, 105(5): 427-434.
- [10] Bhatia R, Dey S, Sood S, et al. Efficient microspore embryogenesis in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) for development of plants with different ploidy level and their use in breeding programme[J]. Scientia Horticulturae, 2017, 216: 83-92.
- [11] 卢松, 陶莲, 吴康云, 等. 微型结球白菜小孢子的培养及植株再生[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(8): 30-33.
- [8] 邓振山, 马娜娜, 徐文梅, 等. 大蒜鳞茎中抗番茄灰霉病内生菌的筛选及其防治效果[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2012, 40(5): 50-56.
- [9] 韦巧婕, 郑新艳, 邓开英, 等. 黄瓜枯萎病拮抗菌的筛选鉴定及其生物防效[J]. 南京农业大学学报, 2013, 36(1): 40-46.
- [10] 贾凤安, 陈亮, 陈立, 等. 大棚甜瓜三种主要真菌病害拮抗菌的筛选与鉴定[J]. 植物保护学报, 2010, 37(6): 505-510.
- [11] 孙卓. 人参病害生防细菌的筛选及其防病作用研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [12] 马凤茹, 邢云章, 王韵秋. 人参锈腐病调查方法初探[J]. 中药材, 1983(5): 12-15.
- [13] Weyens N, Lelie D V D, Taghavi S, et al. Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20(2): 248-254.
- [14] 权春善, 王军华, 徐洪涛, 等. 一株抗真菌解淀粉芽孢杆菌的分离鉴定及其发酵条件的初步研究[J]. 微生物学报, 2006, 46(1): 7-12.
- [15] Alvindia D G. Enhancing the bioefficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 with inorganic salts for the control of banana crown rot[J]. Crop Protection, 2013, 51: 1-6.
- [16] Chen D, Liu X, Li C, et al. Isolation of *Bacillus amyloliquefaciens* S20 and its application in control of eggplant bacterial wilt[J]. Journal of Environmental Management, 2014, 137(1): 120-127.
- [17] 贾斌, 赵贞丽, 沈国娟, 等. 人参黑斑病生防用内生拮抗菌分离鉴定及发酵浓缩液的性质[J]. 中国森林病虫, 2014, 33(3): 5-10, 17.

(上接第 137 页)