

彭 琦,张椿雨,费维新,等. 江苏省主栽油菜品种根肿病抗性鉴定及分子标记检测[J]. 江苏农业科学,2019,47(12):149-151.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.12.032

# 江苏省主栽油菜品种根肿病抗性鉴定及分子标记检测

彭 琦<sup>1</sup>,张椿雨<sup>2</sup>,费维新<sup>3</sup>,陈 松<sup>1</sup>,陈 锋<sup>1</sup>,张 维<sup>1</sup>,张洁夫<sup>1</sup>

(1. 国家油菜改良中心南京分中心/农业部长江下游棉花与油菜重点实验室/江苏省农业科学院经济作物研究所,江苏南京 210014;

2. 国家油菜工程技术研究中心/华中农业大学植物科学技术学院,湖北武汉 430070;

3. 国家油料作物改良中心合肥分中心/安徽省农业科学院作物研究所,安徽合肥 230031)

**摘要:**在安徽省休宁县田间病圃内,利用根肿菌 4 号生理小种,对江苏省主栽的 30 个油菜品种进行根肿病抗性鉴定。同时,利用已报道的与抗 4 号生理小种位点 *PbBa8.1* 紧密连锁的分子标记 A08-300 对这 30 个品种进行分子检测。结果显示,30 个品种的病情指数均在 47 及以上,都属于感病或高感品种。此外,分子检测结果表明,这 30 个品种中都不含有抗根肿菌 4 号生理小种的分子标记。目前江苏省主栽油菜品种中没有抗根肿病品种,各品种极易受到根肿菌的侵染,应引起生产者 and 育种者的高度重视。

**关键词:**江苏省;油菜;根肿病;抗性鉴定;分子标记

**中图分类号:** S435.654 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)12-0149-03

根肿病是由芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) 侵染引起的一种重要土传病害,它主要在十字花科植物间进行传播。根肿病最早发现于地中海西岸和欧洲南部,现在全世界均有分布,尤以温带地区发生较严重<sup>[1]</sup>。根肿病的蔓延速度很快,在澳大利亚的每个州根肿病都已上升为严重的病害问题;在加拿大阿尔伯特省 2003 年仅仅发现 800 hm<sup>2</sup> 的油菜地感染根肿病,到 2010 年就有 3.5 万 hm<sup>2</sup> 土地受到根肿病菌的侵染,其中严重发病地块油菜产量损失达到 30% 以上,有的田块甚至造成绝收<sup>[2]</sup>。由于该病原菌在土

壤中可以存活 10 年以上,并借助农业机械跨区作业、风媒、水媒以及种子等途径进行传播。近年来,在我国长江流域冬油菜主要产区,油菜根肿病发生危害逐年加重,尤其是在我国四川、云南、湖北及安徽等地,油菜根肿病危害严重<sup>[3-4]</sup>,仅四川省发病面积就已超过 20 万 hm<sup>2</sup>。江苏省局部地区已在油菜和其他十字花科蔬菜上发现根肿病,并存在扩展趋势。江苏省属于长江下游油菜主产区,油菜的常年种植面积在 30 万 hm<sup>2</sup> 以上,因此开展油菜品种抗根肿病的评价与鉴定对江苏省油菜产业的发展具有重要的科学意义与应用价值。

本研究拟对江苏地区主要栽种的 30 个油菜品种进行田间根肿病抗性鉴定,同时利用已报道的与抗 4 号生理小种位点 *PbBa8.1* 紧密连锁的分子标记 A08-300<sup>[5]</sup> 对这 30 个品种进行分子检测,以期了解江苏省目前主栽油菜品种抗根肿病现状,并为江苏省抗病油菜品种选育提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

30 个油菜品种均保存于江苏省农业科学院种质资源圃,

收稿日期:2018-04-01

基金项目:国家重点研发计划(编号:2018YFD0200905-6);国家自然科学基金(编号:31771834);现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-12)。

作者简介:彭 琦(1981—),男,湖南祁东人,博士,副研究员,主要从事油菜分子育种研究。Tel:(025)84390364;E-mail:cookee1981@126.com。

通信作者:张洁夫,博士,研究员,主要从事油菜遗传育种研究。E-mail:jjiefu\_z@163.com。

[12] 袁梦思,李建文,刘梦华,等. 1 株不动杆菌发酵液对水稻纹枯病菌的抑菌作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(2):164-165.

[13] 孙建广,周 欣,肖佳雷,等. 一种便于丝状真菌显微观察的培养方法[J]. 植物生理学报,2014,50(2):229-232.

[14] 张 穗,许文霞,薛银根,等. 郑州郊区水稻纹枯病菌对井冈霉素敏感性的初步研究[J]. 中国生物防治,1995,11(4):171-173.

[15] Bahuguna R N, Joshi R, Shukla A, et al. Thiamine primed defense provides reliable alternative to systemic fungicide carbendazim against sheath blight disease in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 57: 159-167.

[16] Peng D, Li S D, Wang J X, et al. Integrated biological and chemical control of rice sheath blight by *Bacillus subtilis* NJ-18 and jinggangmycin [J]. Pest Management Science, 2014, 70(2): 258-263.

[17] 杨 媚,杨迎青,李明海,等. 井冈霉素对水稻纹枯病菌生长发育的影响[J]. 华中农业大学学报,2012,31(4):445-449.

[18] Shibata M, Mori K, Hamashima M. Inhibition of hyphal extension factor formation by validamycin in *Rhizoctonia solani* [J]. The Journal of Antibiotics, 1982, 35(10): 1422-1423.

[19] 张 科,方中义,周永力. 井冈霉素和蜡质芽孢杆菌混剂防治水稻曲病试验[J]. 种子世界,2016(4):38-39.

[20] Hu F, Su W H, Li C C, et al. Control efficacy of validamycin A (0.2 billion spores/mL) *Paenibacillus polymyxa* DN-13 AS for rice sheath blight [J]. Agricultural Science & Technology, 2016, 17(11): 2615-2618.

[21] 彭双强,张 亚,廖晓兰,等. 拮抗细菌发酵提取物与井冈霉素混配对水稻纹枯病的毒力研究[J]. 湖南农业科学,2015(9): 20-23.

含江苏品种 16 个、安徽品种 2 个、浙江品种 2 个、上海品种 2 个、湖北品种 1 个、上游区品种 4 个、黄淮区品种 2 个和加拿大品种 1 个;病圃鉴定感病对照中核杂 488 和抗病对照 F4010-4 由安徽省农业科学院费维新课题组提供;分子标记检测抗病品种 ZHE-226 由华中农业大学张椿雨课题组提供。

1.2 油菜品种病圃(根肿菌 4 号小种)的鉴定

2015 年,品种鉴定试验安排在安徽休宁根肿病鉴定试验病圃,病圃生理小种经 Williams 系统鉴定为 4 号小种。品种共 30 份,感病对照为中核杂 488,抗病对照为 F4010-4。1 个品种种 5 行,1 行 20 株苗,行宽 2 m,3 次重复,按照随机区组排列。油菜出苗后 1 周可在水沟灌溉 1 次保持田间有充足的水分。油菜苗期保持病圃土壤的含水量充足,以保证油菜根肿病的发病稳定性。出苗 90 d 后,拔出植株,洗净根部的泥土,调查记载油菜根肿病的发病情况。调查标准采用 0~3 级来分级,苗期油菜根肿病分级标准如下:0 级为根部无病;1 级为根部有细小肿瘤,体积少于根的 1/3;2 级为根部有中等肿瘤,体积是根的 1/3~2/3;3 级为根部有异常大肿瘤,体积超过根的 2/3<sup>[6]</sup>。分别计算病株率及病情指数:

病株率 = 发病株数/调查总株数 × 100% ;

病情指数 = Σ (病株数 × 相应病害级别)/(调查总株数 × 最高级别) × 100;

校正系数  $K = 50 / \text{对照品种的实际病情指数}$ ;

相对病情指数 =  $K \times \text{鉴定材料的病情指数}$ 。

品种资源的抗病性差异根据相对病情指数进行分类:免疫( $I$ ) = 0;0 < 高抗( $HR$ ) ≤ 5;5 < 抗病( $R$ ) ≤ 10;10 < 中抗( $MR$ ) ≤ 20;20 < 中感( $MS$ ) ≤ 30;30 < 感病( $S$ ) ≤ 50;50 < 高感( $HS$ ) ≤ 100<sup>[7]</sup>。

1.3 分子标记检测

合成 InDel(碱基缺失标记)A08-300 标记引物<sup>[5]</sup>,引物序列如下:

正向引物(Rcr4F):5'-CTAGTGCGGGCCACAAAAT-3';

反向引物(Rcr4R):5'-CACAATGGAGTGTGTGAAATTCAC T-3'。

利用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取 30 个主栽品种及华农抗病品种 ZHE-226 幼嫩叶片 DNA,10 μL 的 PCR 反应体系为 0.5 μL DNA 模板,正向/反向引物(10 μmol/L)各 0.2 μL,0.5 μL dNTP(0.25 nmol/L),1 μL *Taq* 酶,加 H<sub>2</sub>O 补齐到 10 μL。PCR 反应条件为:94 ℃ 预变性 4 min;94 ℃ 变性 40 s,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 30 s,35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min,结束后 10 ℃ 保存。PCR 产物在 6% 变性聚丙烯酰胺中进行凝胶电泳,银染显影。

2 结果与分析

2.1 油菜品种病圃(根肿菌 4 号小种)的鉴定评价结果

2015 年在安徽休宁病圃鉴定了江苏主栽品种及资源材料 30 份,鉴定结果表明,这 30 份材料对安徽休宁的根肿病 4 号小种都不具有抗性。由表 1 可知,田间病圃鉴定根肿病病株率为 57%~100%;病情指数为 47~100。相对病情指数分析结果表明,30 个品种中有 13 个品种对根肿菌 4 号小种感病(S),其他 17 个品种都达到了高感(HS)。

表 1 江苏省油菜主栽品种抗根肿病病圃鉴定结果

品种	病株率 (%)	病情指数	相对病情指数	抗性分级
F4010-4(抗病对照)	8 ± 0	3 ± 0	2 ± 0	HR
中核杂 488(感病对照)	100	81 ± 0	50 ± 0	S
宁油 12 号	96 ± 1	89 ± 4	55 ± 3	HS
苏油 4 号	92 ± 8	81 ± 19	50 ± 12	S
皖油 20	68 ± 11	59 ± 12	37 ± 7	S
川油 20	78 ± 16	64 ± 18	40 ± 11	S
宁杂 1818	95 ± 5	81 ± 6	50 ± 4	S
苏油 6 号	96 ± 4	93 ± 7	58 ± 4	HS
宁油 16 号	89 ± 2	70 ± 6	43 ± 4	S
浙油 51	97 ± 3	88 ± 1	55 ± 1	HS
恩油 73-1-2	88 ± 0	74 ± 3	46 ± 2	S
盐油 2 号	96 ± 4	84 ± 9	52 ± 6	HS
扬油 9 号	96 ± 0	88 ± 1	55 ± 1	HS
盐油杂 3 号	99 ± 2	92 ± 3	57 ± 2	HS
镇油 5 号	93 ± 7	78 ± 16	48 ± 10	S
浙油 50	96 ± 4	86 ± 4	53 ± 2	HS
扬油 4 号	97 ± 3	91 ± 4	56 ± 2	HS
宁 RS-1	95 ± 0	89 ± 5	55 ± 3	HS
秦优 10 号	98 ± 0	88 ± 8	54 ± 5	HS
宁油 22	97 ± 3	81 ± 9	50 ± 6	S
沪油 18	99 ± 1	84 ± 2	52 ± 1	HS
红油 3 号	95 ± 0	87 ± 5	54 ± 3	HS
淮油 12 号	88 ± 0	71 ± 2	44 ± 1	S
沪油 039	99 ± 1	84 ± 11	52 ± 7	HS
中油 821	85 ± 5	74 ± 8	46 ± 5	S
宁杂 27	93 ± 5	87 ± 7	54 ± 4	HS
皖油 29	89 ± 3	78 ± 9	48 ± 6	S
CY12PXW-4	93 ± 7	85 ± 6	53 ± 4	HS
苏油 8 号	95 ± 1	84 ± 8	52 ± 7	HS
Westar	91 ± 9	80 ± 12	50 ± 7	S
P120 油研 10	92 ± 1	73 ± 5	45 ± 3	S
宁油 18 号	98 ± 2	83 ± 4	51 ± 3	HS

注:病情指数校正系数  $R = 0.62$ 。

2.2 抗性标记检测结果

聚丙烯酰胺凝胶电泳结果(图 1)表明,利用 InDel 标记 A08-300 引物进行分子标记检测时,抗病对照目的片段序列比待检测品种的目的片段都要小,也就是说待检测的 30 个品种中都不含有抗根肿菌 4 号生理小种的分子标记。

2.3 抗性标记测序结果

为了更直观看出分子标记的序列差异,笔者对抗病品种和感病品种的 A08-300 标记的测序结果进行比对分析(图 2)。结果发现,抗性标记序列全长 132 bp,而在感病品种中的标记序列长度为 139 bp。差异序列位于 49 bp 处,抗性标记缺失了 7 个碱基,即 CTGTTGC。

3 讨论与结论

根肿病是近年来从欧洲、澳洲、加拿大等地迅速蔓延至我国的一种非常严重的十字花科植物病害,已经严重影响我国大部分地区油菜产业的发展。江苏省地处长江下游,是我国油菜的重要产区之一。与之相邻的安徽、浙江省均已有了对油菜根肿病的大量报道。因此,了解江苏地区现有油菜品

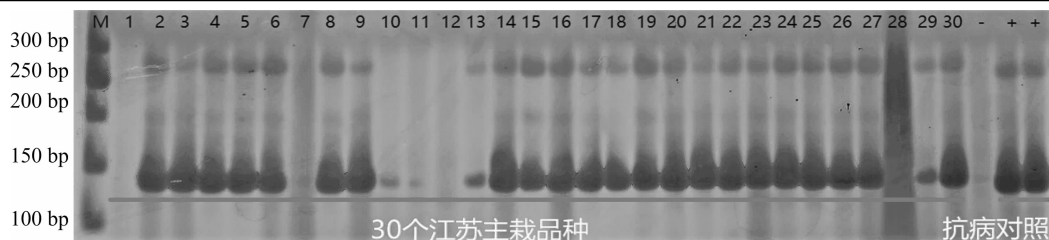
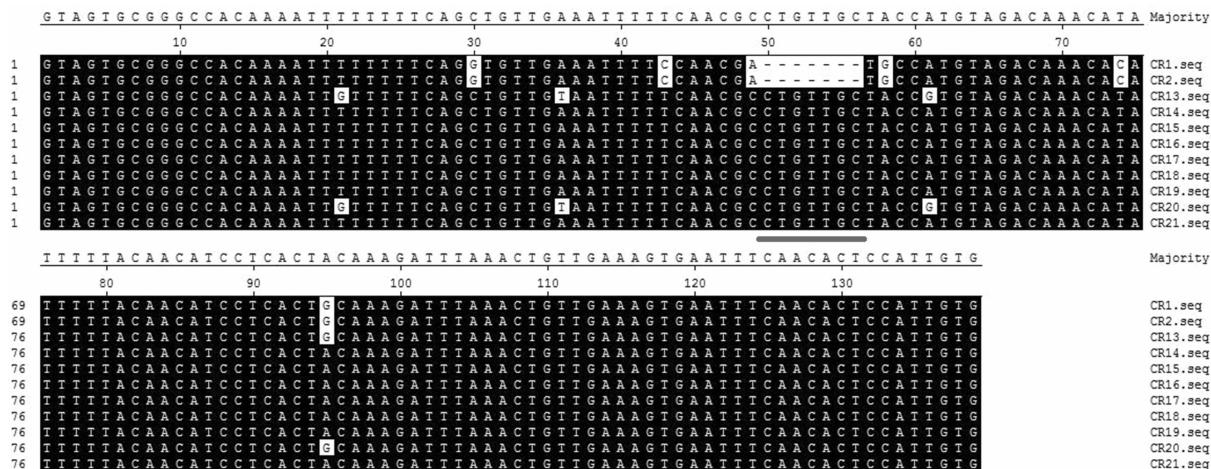


图1 分子标记 A08-300 引物的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果



CR1 和 CR2—抗病材料的标记序列, CR13-CR21—感病材料的标记序列

图2 分子标记 A08-300 测序结果的比对

种的根肿病抗性将有助于应对根肿病的蔓延。

我国目前发现的油菜根肿菌生理小种类型主要有 2、4、5、7、9、13 号 6 种<sup>[1,8-9]</sup>。其中,以 4 号生理小种存在的范围最广,造成的危害最大。在 Williams 鉴定系统中,4 个鉴别寄主对 4 号生理小种均表现为感病。因此,在本研究中主要利用 4 号小种来鉴定江苏油菜主栽品种的根肿病抗性。遗憾的是,病菌鉴定结果表明,江苏目前的栽培种都不具备对根肿菌 4 号生理小种的抗性,大部分品种甚至对根肿菌高感病,说明应当加快开展抗根肿病油菜品种选育。

目前,战宗祥等通过种间杂交和分子标记辅助选择,已经在国内率先育成一系列抗根肿病油菜新品系和品种,并已开发了相关分子标记<sup>[5]</sup>。为了将这些抗病材料用于江苏等地区抗根肿病油菜品种改良,本研究首先对江苏油菜品种进行分子标记检测,结果发现江苏品种不具备根肿病抗性的原因在于不含有相关抗性分子标记。通过杂交,可以使江苏的品种带上抗性标记,而通过分子标记辅助选择则可以加快育种进程。为此,本研究对抗性标记进行测序和序列比对分析,并发现抗性标记序列缺少了 7 个碱基。研究结果将有助于开发新的标记用于油菜根肿病抗性品种选育。

#### 参考文献:

[1] 费维新, Hwang S F, 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, 2016(5): 626 -

639.

- [2] Strelkov S E, Hwang S F, Howard R J, et al. Progress towards the sustainable management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) of canola on the Canadian prairies[J]. *Prairie Soils Crops*, 2011(4): 114 - 121.
- [3] 马淑青, 黄云, 王铮一, 等. 油菜根肿病菌形态及生物学特性研究[J]. *四川农业大学学报*, 2006, 24(2): 161 - 165.
- [4] Ren L, Jia J G, Li M, et al. Distribution of rapeseed clubroot disease in Hubei Province and evaluation of yield loss [J]. *Agricultural Science & Technology*, 2012, 13(4): 775 - 777.
- [5] 战宗祥, 江莹芬, 朱紫媛, 等. 与位点 PbBa8.1 紧密连锁分子标记的开发及甘蓝型油菜根肿病抗性育种[J]. *中国油料作物学报*, 2015, 37(6): 766 - 771.
- [6] Rahman H, Shakir A, Jakir H M. 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]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2011, 91(3): 447 - 458.
- [7] 四川省农业科学院植物保护研究所. 油菜根肿病抗性鉴定技术规程: DB51/T 1192—2011 [S]. 成都: 四川省质量技术监督局, 2011.
- [8] 汪春, 李凯旋, 彭衍彪, 等. 安徽油菜根肿病菌生理小种鉴定及品种抗病性评价[J]. *安徽农业大学学报*, 2014, 41(5): 772 - 776.
- [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性鉴定[J]. *中国油料作物学报*, 2013, 35(3): 301 - 306.