

菜豆抗炭疽病基因 SCAR 标记在品种抗性鉴定中的应用

古 瑜, 韩启厚, 王武台, 李素文, 孙德岭*, 吴 锋

(天津科润蔬菜研究所, 天津 300382)

摘 要: 利用 5 个来自于普通菜豆抗炭疽病基因 SCAR 标记 (SCA₁₀₀₀、SH18₁₁₀₀、SAB3₄₀₀、SB12₃₅₀ 和 SCF10₁₀₇₂) 引物组, 对 143 份荚用菜豆资源进行 DNA 水平的鉴定。同时使用苗期接种方法, 验证了 143 份资源的抗病性。结果表明: 共有 61 份资源检测到 SCAR 标记。在这些资源中, 有 40 份具有 SCA₁₀₀₀ 标记, 40 份具有 SCF10₁₀₇₂ 标记, 19 份兼有 SCA₁₀₀₀ 和 SCF10₁₀₇₂ 标记, 其余的 82 份未检测到 SCAR 标记。这 143 份资源中均未检测到 SAB3₄₀₀、SB12₃₅₀ 和 SH18₁₁₀₀ 扩增带。群体抗性鉴定结果显示: 143 份资源中, 抗病的有 16 份。其中含有 2 个 SCAR 标记, 群体抗性结果表现抗病的有 5 份, 含有 1 个 SCAR 标记, 并且群体抗性结果表现抗病的有 3 份。通过本研究明确了: 荚用菜豆中 *Co-2* 和 *Co-10* 基因含量比较丰富, 除扁圆荚类型紫荚菜豆中 *Co-2* 基因含量多于 *Co-10* 基因外, 这两个抗病基因在其它类型的菜豆中分布比较均匀。在油豆类型和扁圆荚类型绿荚菜豆资源中, 同时含有此两个抗病基因标记的较多。在油豆类型资源中, 含有两个抗病标记, 并且群体抗性表现抗病的最多。

关键词: 荚用菜豆; 菜豆炭疽病; 抗病基因; SCAR 标记; 群体抗性

中图分类号: S 634.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 05-0911-10

Application of Common Bean Anthracnose Resistance Gene SCAR Markers in Snap Bean Disease Resistance Identification

GU Yu, HAN Qi-hou, WANG Wu-tai, LI Su-wen, SUN De-ling*, and WU Feng

(Tianjin Kernel Vegetable Research Institute, Tianjin 300382, China)

Abstract: Five SCAR primer combinations (SCA₁₀₀₀, SH18₁₁₀₀, SAB3₄₀₀, SB12₃₅₀ and SCF10₁₀₇₂) of common bean anthracnose resistance gene were used to check the genome DNA of 143 snap bean germplasms. Meanwhile, their anthracnose resistance was identified by seedling inoculation method. The results indicated that the SCAR markers were found in 61 out of 143 germplasms, 40 germplasms were detected having marker SCA₁₀₀₀, 40 germplasms were detected having marker SCF10₁₀₇₂, 19 germplasms were detected having both marker SCA₁₀₀₀ and SCF10₁₀₇₂. SCAR markers, SAB3₄₀₀, SB12₃₅₀ and SH18₁₁₀₀, were not detected in all germplasms. Population resistance results revealed that 16 germplasms out of 143 tested germplasms were disease resistant. Among them, 5 germplasms possessed two SCAR

收稿日期: 2010-01-14; **修回日期:** 2011-04-11

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术研究计划重点项目 (10JCZDJC18100); 天津市经济技术开发区企业博士后工作站科润公司分站专项

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: sundeling1961@163.com)

markers and disease resistance, 3 germplasms possessed only one of the two SCAR markers with disease resistance. The results also showed that the content of *Co-2* and *Co-10* are very rich and distribute evenly in snap bean germplasms, except that the *Co-2* content of is higher than *Co-10* in purple bean pod. There are more resistance gene in green pods and You Dou. Numbers of owning both resistance gene and disease resistance are the most in You Dou.

Key words: snap bean; anthracnose; resistance gene; SCAR marker; seedling inoculation

菜豆炭疽病是由菜豆炭疽菌 [*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. et Magn.) Br. et Cav.] 引起的一种真菌性病害。我国菜豆生产中因炭疽病每年可使其减产 20%~30%, 甚至绝产 (赵晓彦 等, 2006)。已有 20 几个省市及地区发生炭疽病 (王晓鸣 等, 1989)。

20 世纪 90 年代初, 国外许多研究机构开展了普通菜豆 (特别是粒用菜豆) 抗炭疽病分子标记研究。迄今已经发现了 13 个抗炭疽病基因 (*Co-1* ~ *Co-13*)。有 11 个被确认为是独立显性基因, *Co-3*³/*Co-9* 和 *Co-7*/*Co-3* 是等位基因, *co-8* 为隐性基因, 并且发现: *Co-1*, *Co-3*, *Co-4* 和 *Co-5* 基因具有多个等位基因。目前有 8 个抗病基因 (*Co-2*, *Co-4*, *Co-4*², *Co-5*, *Co-6*, *Co-9*, *Co-3*³/*Co-9* 和 *Co-10*) 已经转化得到 13 个 SCAR 标记。它们分别为: *Co-2* 的 2 个 SCAR 标记 SCAreoli₁₀₀₀ (Adam-Blondon et al., 1994; Geffroy et al., 1998) 和 SQ4₁₄₄₀ (Young & Kelly, 1996; Awale et al., 2008); *Co-4*² 有 3 个 SCAR 标记, 分别为 SH18₁₁₀₀ (Awale & Kelly, 2001; Kelly et al., 2003)、SAS13₉₅₀ (Young et al., 1998; Kelly et al., 2003) 和 SBB14_{1150/1050} (Awale & Kelly, 2001; Kelly et al., 2003); *Co-4* 有 2 个 SCAR 标记, 分别为 SY20₈₃₀ 和 SC08₉₁₀ (Kelly et al., 2003; Queiroz et al., 2004); *Co-5* 的 SCAR 标记为 SAB3₄₀₀ (Vallejo & Kelly, 2001; Campa et al., 2005); *Co-9* 的 SCAR 标记为 SB12₃₅₀ (Mendez et al., 2002); *Co-10* 的 SCAR 标记为 SCF10₁₀₇₂ (Alzate-Marin et al., 2003); *Co-6* 的 2 个 SCAR 标记为 SZ20₈₄₅ 和 SZ04₅₆₇ (Kelly et al., 2003; Queiroz et al., 2004); 等位基因 *Co-3*³/*Co-9* 的 SCAR 标记为 SW12₇₀₀ (Miklas et al., 2000; Rodríguez-Suárez et al., 2008)。

近几年, 我国在粒用菜豆抗炭疽病的分子水平研究领域也取得了一定进展。赵晓彦等 (2007) 用 12 个鉴别寄主检测了 7 个 SCAR 标记的可靠性和实用性。王坤等 (2009) 用分离群体分组分析法 (BSA) 和微卫星多态性分析 (SSR) 技术对中国粒用菜豆地方品种中的抗炭疽病基因进行分子标记鉴定, 发现了我国特有的一个抗炭疽病基因 *Co-F2533*。然而, 我国荚用菜豆抗炭疽病的研究比较滞后。李梅 (2008) 报道了抗病品种与感病品种杂交后代抗炭疽病基因遗传规律的研究。荚用菜豆抗炭疽病分子水平的研究还未见报道。本研究中利用 5 个来自于普通菜豆抗炭疽病基因的 SCAR 标记 (SCA₁₀₀₀、SH18₁₁₀₀、SAB3₄₀₀、SB12₃₅₀ 和 SCF10₁₀₇₂) 引物组, 对 143 份荚用菜豆资源进行了分子水平的鉴定, 同时还利用苗期接种炭疽菌的方法评价了资源的抗性。本研究的目的: 1. 探究粒用菜豆炭疽病抗病基因在荚用菜豆资源中存在的情况及抗病基因在不同类型资源中的分布; 2. 粒用菜豆抗炭疽病基因 SCAR 标记在荚用菜豆抗病育种中的可靠性和实用性; 3. 通过群体抗性鉴定, 对 143 份资源的抗性进行评价, 为有效、合理地利用资源, 进一步开展抗病育种研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

荚用菜豆资源 143 份, 除 4 份引自英国外, 其余 139 份为我国各地的主栽品种。143 份资源中地豆类型 18 份, 无筋豆类型 17 份, 油豆类型 22 份, 扁荚菜豆类型 22 份, 扁圆荚类型 56 份, 眉豆

1 份，刀豆 1 份，饭豆 1 份，红花菜豆 5 份。荚色表现有绿色、白绿色、白色、紫色、花皮、黄色等（表 2）。

菜豆炭疽病致病菌，由中国农业科学院作物科学研究所王晓鸣研究员提供。本研究使用的炭疽病致病菌株为我国流行毒力型炭疽菌 81 号生理小种，是目前主要侵染我国普通菜豆资源的优势炭疽病生理小种。

1.2 SCAR 引物序列

采用的5个SCAR标记引物组：SCA₁₀₀₀、SH18₁₁₀₀、SAB3₄₀₀、SB12₃₅₀和SCF10₁₀₇₂分别是普通菜豆中5个抗炭疽病基因*Co-2*、*Co-4*²、*Co-5*、*Co-9*和*Co-10*的特异标记（表1）。

表 1 来自普通菜豆抗炭疽病基因的SCAR引物序列
Table 1 SCAR primer sequences of anthracnose resistance gene derive from common bean

名称 Name	基因 Gene	序列（5′-3′） Primer Sequences（5′-3′）	目的片段长度/bp Size	引用文献 References
SCA ₁₀₀₀	<i>Co-2</i>	GGGAGACATCCATCAGACAACTCC GTATCCATTGTAAGGAGCT	1 000	Geffroy et al., 1998; Adam-Blondon et al., 1994
SH18 ₁₁₀₀	<i>Co-4</i> ²	CCAGAAGGAGCTGATAGTACTCCACAAC GGTAGGCACACTGATGAATCTCATGTTGGG	1 100	Awale & Kelly, 2001; Kelly et al., 2003
SAB3 ₄₀₀	<i>Co-5</i>	TGGCGCACACATAAGTTCTCACGG TGGCGCACACCATCAAAAAAGGTT	400	Vallejo & Kelly, 2001; Campa et al., 2005
SB12 ₃₅₀	<i>Co-9</i>	CCTTGACGCACCTCCATG TTGACGCATGGGTTGGCC	350	Mendez et al., 2002
SCF10 ₁₀₇₂	<i>Co-10</i>	GGAAGCTTGGTGAGCAAGGA GGAAGCTTGGCTATGATGGT	1 072	Alzate-Marin et al., 2003

1.3 方法

1.3.1 苗期抗病性鉴定

病原菌在 MA 培养基上，于 23 ℃ 黑暗条件下培养 15 d，收集菌落中产生的分生孢子，用无菌水配制为 2.0×10^6 个 · mL⁻¹ 孢子浓度的接种液。当菜豆第 1 片真叶展开时，用消毒毛刷沾菌液，在叶片的正反两面接种，每面刷 3 次菌液，以保证接菌量基本一致。接菌后在 100% 相对湿度条件下保湿 2 d，于接种 15 d 充分发病后进行病级调查。对照为使用消毒毛刷沾无菌水接种。每份资源接种 10 株幼苗，每株幼苗一片真叶接菌，另一片真叶接无菌水作对照。重复试验 3 次。参照吴全安(1991)的单株抗感分级，以 6 级划分，0、1、3 级为抗病，5、7、9 级为感病。具体为：0 级，高抗（HR），叶片上无病斑；1 级，抗（R），叶片上有零星点状病斑；3 级，中抗（MR），叶片上病斑较小，长 1~2 mm；5 级，中感（MS），叶片上病斑较大，长 2.1~5 mm；7 级，感（S），病斑大，长 5.1 mm 以上；9 级，高感（HS），病斑多数相连，叶片萎蔫。在此基础上，计算病情指数 [病情指数 = Σ （各级病株数 × 相对级数值）/（最高病级数 × 调查总株数）× 100]。根据病情指数将群体抗病性划分为 4 级：病情指数小于 25 为高抗（HR），25.1~50 为中抗（MR），50.1~75 为中感（MS），大于 75 为高感（HS）（韩利芳 等，2006）。

1.3.2 DNA 提取方法

DNA 提取方法参考冯国军等（2007）的 SDS 法，但略有修改。DNA 的纯度和浓度用 0.8% 琼脂糖凝胶和 ND-1000 分光光度仪（NanoDrop）检测。将已测浓度的 DNA 样品稀释至工作浓度 100 ng · μL⁻¹，用于 PCR 反应。提取的基因组 DNA 在 -20 ℃ 保存备用。

1.3.3 SCAR 标记特异性扩增检测

PCR 反应在 25 μL 的体系中进行，使用 eppendorf 的 PCR 仪进行扩增。反应体系中包括 100 mmol · L⁻¹ 的引物（上海生工）各 0.5 μL，10 mmol · L⁻¹ dNTP（上海生工）0.5 μL，10 × PCR Buffer 2.5

μL, 5 U · μL⁻¹ TaqDNA 聚合酶 (TaKaRa) 0.1 μL, 以及 100 ng 的模板 DNA 1 μL, 最后用灭菌水补至 25 μL。反应程序为: 95 °C 变性 3 min; 94 °C 1 min, 58 °C、65 °C 或 62 °C 1 min, 72 °C 2 min, 循环 35 次, 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存备用。

将 PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶在缓冲液中电泳, 电泳指示剂溴酚蓝至凝胶的 2/3 处时停止电泳。取出凝胶置凝胶成像仪 (GeneGenius) 下观察并照相, 统计扩增有目标带的材料。

2 结果与分析

2.1 群体抗性鉴定结果

根据群体抗性结果 (表 2), 2 份抗病 (R), 14 份中抗 (MR), 10 份中感 (MS), 其余 117 份为高感 (HS)。在抗病和中抗的 16 份资源中, 有 2 份地豆, 1 份绿色扁圆荚类型, 13 份油豆类型, 分别占供试扁圆荚类型绿荚菜豆资源 (56 份) 的 1.78%和油豆资源 (22 份) 的 59.1%。其中 12 份油豆和 2 份地豆为中抗。

表 2 引物对 SCA₁₀₀₀ 和 SCF10₁₀₇₂ 检测及群体抗性结果
Table 2 The results of SCA₁₀₀₀ and SCF10₁₀₇₂ primer combination identification and seedling inoculation

品种名称 Variety	SCA ₁₀₀₀	SCF10 ₁₀₇₂	病情指数 (群体抗性) Disease index (Population resistance)	品种名称 Variety	SCA ₁₀₀₀	SCF10 ₁₀₇₂	病情指数 (群体抗性) Disease index (Population resistance)
林丰宽荚地油豆 Linfeng Kuanjia Diyoudou	-	-	89	连农 97-5 Liannong 97-5	-	+	90
哈菜豆六号 Hacaidou 6	-	-	78	黑籽四季豆 Heizi Sijidou	+		88
绿优早地油豆 Lüyouzao Diyoudou	+	-	80	83-A 架芸豆 83-A Jiayundou	-	+	78
西星早熟地豆王 Xixing Zaoshu Didouwang	-	+	65 (中感) (Middle sensitive)	全兴架豆一号 Quanxing Jiadou 1	+	+	82
绿棒豆 Lübangdou	-	-	79	朝研 926 架豆 Chaoyan 926 Jiadou	+	-	84
矮生老来少 Aisheng Laolaishao	-	-	91	特长白荚王 Techang Baijiawang	-	-	93
矮生双丰一号 Aisheng Shuangfeng 1	-	-	80	河南老来少 Henan Laolaishao	-	+	92
云南地豆 Yunnan Didou	-	-	85	遵义老来少 Zunyi Laolaishao	-	-	79
地豆王 2 号 Didouwang 2	-	-	85	赤裕五号 Chiyu 5	+	-	84
新研地豆王 Xinyan Didouwang	+	-	83	赤裕六号 Chiyu 6	-	-	90
美国兰湖 Meiguo Lanhu	-	+	85	老来少 10 号 Laolaishao 10	-	+	91
美国供豆王 Meiguo Gongdouwang	-	+	58 (中感) (Middle sensitive)	老来少 12 号 Laolaishao 12	+	+	91
供豆 86-1 Gongdou 86-1	-	-	83	万农特嫩芸豆 Wannong Tenen Yundou	-	-	83
精选 618 矮生地豆 Jingxuan 618 Aisheng Didou	-	-	98	山东小白粒 Shandong Xiaobaili	-	-	82
宽荚地油豆 Kuanjia Diyoudou	-	-	60 (中感) (Middle sensitive)	红花白荚四季豆 Honghua Baijia Sijidou	+	-	78
无筋绿地豆 Wujin Lüdidou	-	-	35 (中抗) (Middle resistant)	精选 10 号 Jingxuan 10	-	-	92

续表2

品种名称 Variety	SCA ₁₀₀₀	SCF10 ₁₀₇₂	病情指数 (群体抗性) Disease index (Population resistance)	品种名称 Variety	SCA ₁₀₀₀	SCF10 ₁₀₇₂	病情指数 (群体抗性) Disease index (Population resistance)
矮生一棵树 Aisheng Yikeshu	-	-	90	老来少 Laolaishao	-	-	92
地金钩 Dijingou	+	+	40 (中抗) (Middle resistant)	白荚扁豆 Baijia Biandou	-	-	79
玉豆 Yudou	+	+	89	大连 851-923 Dalian 851-923	-	+	85
广玉一号玉豆 Guangyu Yudou 1	+	-	82	新育红花白荚 Xinyu Honghua Baijia	-	-	88
精选双青 12 号玉豆 Jingxuan Shuangqing Yudou 12	+	+	88	改良 851-923-8 Gailiang 851-923-8	-	-	87
散籽 11 号 Sanzi 11	+	-	95	98-6 架豆 98-6 Jiadou	-	-	85
散籽 12 号 Sanzi 12	-	+	92	意大利玉豆 Yidali Yudou	-	-	85
双丰一号 Shuangfeng 1	-	-	91	金贵 39 号 Jingui 39	+	-	87
双丰二号 Shuangfeng 2	+	+	78	龙剑 35 Longjian 35	-	-	89
双丰三号 Shuangfeng 3	-	-	76	散籽 10 号 Sanzi 10	-	-	91
丰菜豆四号 Fengcaidou 4	+	+	79	冀芸六号架芸豆 Jiyun Jiayundou 6	+	+	98
台湾高产双青 12 号架豆 Taiwangaochan Shuangqing Jiadou 12	+	+	82	特选绿丰王中王 Texuan Lüfeng Wangzhongwang	-	-	89
红花青荚四季豆 Honghua Qingjia Sijidou	-	+	81	散籽 9 号 Sanzi 9	-	-	81
红花四季豆 Honghua Sijidou	-	+	83	绿龙 Lulong	-	-	78
双青 11 号 Shuangqing 11	-	-	81	特选绿龙 Texuan Lulong	+	-	77
丰菜豆四号(单株) Fengcaidou 4 (Single plant)	+	-	77	碧龙 Bilong	-	-	65 (中感) (Middle sensitive)
新育红花青荚 Xinyu Honghua Qingjia	-	-	85	天马架龙王 Tianma Jialongwang	-	+	79
王中王架豆 Wangzhongwang Jiadou	-	-	13 (抗) (Resistant)	丰菜豆六号 Fengcaidou 6	-	-	78
特早八寸嫩架豆 Tezao Bacunnen Jiadou	+	+	88	金盛达精选架豆 王 Jinshengda Jingxuan Jiadouwang	+	+	85
架豆王中王 Jiadou Wangzhongwang	+	-	87	绿龙 1 号 Lulong 1	-	+	85
十号架豆 Jiadou 10	-	-	96	绿龙 4 号 Lulong 4	-	+	85
菜豆 Caidou	-	-	91	精选绿冠龙 Jingxuan Luguanlong	-	-	84
丰菜豆九号 Fengcaidou 9	-	-	91	龙冠绿丰王 Longguan Lufengwang	-	-	72 (中感) (Middle sensitive)
851 架豆 851 Jiadou	-	-	98	泰科六号 Taike 6	-	-	65 (中感) (Middle sensitive)
连农特长 8 号 Liannong Techang 8	-	-	99	西宁二号 Xining 2	-	-	71 (中感) (Middle sensitive)

续表2

品种名称 Variety	SCA ₁₀₀₀	SCF10 ₁₀₇₂	病情指数 (群体抗性) Disease index (Population resistance)	品种名称 Variety	SCA ₁₀₀₀	SCF10 ₁₀₇₂	病情指数 (群体抗性) Disease index (Population resistance)
江西南昌本地架豆 Jiangxi Nanchang Bendi Jiadou	-	-	90	日本大紫袍 Riben Dazipao	+	-	87
丰菜豆七号 Fengcaidou 7	-	-	91	将军 Jiangjun	-	-	41 (中抗) (Middle resistant)
八号架豆 Jiudou 8	-	-	84	哈优一号 Hayou 1	+	-	68 (中感) (Middle sensitive)
唐丰泰国架豆王 Tangfeng Taiguo Jiadowang	+	-	82	哈优二号 Hayou 2	+	-	71 (中感) (Middle sensitive)
丰菜豆五号 Fengcaidou 5	-	-	82	春秋绿丰 Chunqiu Lüfeng	-	-	45 (中抗) (Middle resistant)
瑞丰架豆王 Ruifeng Jiadowang	-	-	81	超早三叶紫花架 油豆 Chaozao Sanye Zihua Jiayoudou	-	-	10 (抗) (Resistant)
泰国无筋架豆王 Taiguo Wujin Jiadowang	-	-	98	黄金架油豆一号 Huangjin Jiayoudou 1	-	-	81
泰国无筋架豆 Taiguo Wujin Jiadou	-	+	95	中华压趴架油豆 Zhonghua Yapajia Youdou	-	-	81
天马 95-33 架豆王 Tianma 95-33 Jiadowang	-	-	95	太空大油豆 Taikong Dayoudou	-	-	31 (中抗) (Middle resistant)
天马王中王 Tianma Wangzhongwang	-	-	92	正宗将军豆 Zhengzong Jiangjundou	+	+	38 (中抗) (Middle resistant)
巨丰 99-33 架豆王 Jufeng 99-33 Jiadowang	+	+	92	长春 60 大油豆 Changchun Dayoudou 60	+	+	35 (中抗) (Middle resistant)
富韩泰国架豆王 Fuhan Taiguo Jiadowang	-	-	89	早熟紫花油豆王 Zaoshu Zihua Youdouwang	+	+	95
泰国架豆王一号 Taiguo Jiadowang 1	+	-	88	神州翠绿 Shenzhou Cuilü	-	-	95
泰国架豆王二号 Taiguo Jiadowang 2	-	-	87	东北油豆王 Dongbei Youdouwang	-	-	94
荷兰超级无筋架豆 王 Helan Chaoji Wujin jiadowang	-	-	86	高产八月绿 Gaochan Bayuelü	-	+	33 (中抗) (Middle resistant)
连农无筋 1 号 Liannong Wujin 1	-	-	82	太空大将军油豆 TaikongDajiangjun Youdou	-	-	26 (中抗) (Middle resistant)
无筋豆 1 号 Wujindou 1	-	-	78	黑龙江小油豆 Heilongjiang Xiaoyoudou	-	+	95
无筋豆 2 号 Wujindou 2	-	-	79	总统豆一点红 Zongtongdou Yidianhong	-	+	27 (中抗) (Middle resistant)
精选天马 95-33 Jingxuan Tianma 95-33	+	-	83	摘不完小油豆 Zhaibuwan Xiaoyoudou	-	+	28 (中抗) (Middle resistant)
紫花无筋豆 Zihua Wujindou	-	-	83	极早架油豆 Jizao Jiayoudou	+	+	35 (中抗) (Middle resistant)
秋紫豆 Qiuzidou	-	-	68 (中感) (Middle sensitive)	黄金架油豆二号 Huangjin Jiayoudou 2	+	+	94
红玉架豆王 Hongyu Jiadowang	+	+	84	日本黄金豆 Ribin Huangjindou	-	-	94
九粒宽架豆 Jiulikuan Jiadou	-	-	84	金满架 Jinmanjia	+	+	42 (中抗) (Middle resistant)
春秋紫袍 Chunqiu Zipao	-	-	83	眉豆 Meidou	-	+	96

续表2

品种名称 Variety	SCA ₁₀₀₀	SCF10 ₁₀₇₂	病情指数（群体抗性） Disease index (Population resistance)	品种名称 Variety	SCA ₁₀₀₀	SCF10 ₁₀₇₂	病情指数（群体抗性） Disease index (Population resistance)
台湾抗热架豆 Taiwan Kangre Jiadou	-	-	83	赣洪刀豆 Ganhong Daodou	-	-	95
日本花皮豆一号 Riben Huapidou 1	-	-	81	饭豆 Fandou	-	-	35（中抗） (Middle resistant)
十粒长架豆 Shilichang Jiadou	+	-	76	英国一号 Britain 1	-	-	78
73-8-9 芸豆 73-8-9 Yundou	-	-	79	英国二号 Britain 2	-	-	79
改良大紫袍 Gailiang Dazipao	-	-	81	英国三号 Britain 3	+	-	78
美国大紫袍 Meiguo Dazipao	-	+	82	英国四号 Britain 4	-	-	77
日本花皮豆二号 Riben Huapidou 2	+	-	91		-	-	84

注：“SCA₁₀₀₀”和“SCF10₁₀₇₂”两栏中“-”表示没有检测到该目标带；“+”表示检测到该目标带。“群体抗性”中未标明者为“高感（High Sensitive）”类型，病情指数 > 75。

Note: In “SCA₁₀₀₀” and “SCF10₁₀₇₂” columns, “-” means no aim band; “+” means aim band. There is no display in “population resistance” are “high sensitive” type. Disease index > 75.

2.2 抗炭疽病基因 SCAR 标记的检测及抗病基因标记在荚用菜豆中的分布

5 对引物中，只有 2 对引物（SCA₁₀₀₀ 和 SCF10₁₀₇₂）检测得到了扩增带，另外 3 对特异性引物 SB12₃₅₀，SAB3₄₀₀，SH18₁₁₀₀ 在 143 份资源中未得到扩增带。引物对 SCA₁₀₀₀ 检测出 40 份资源具有该抗性标记，引物对 SCF10₁₀₇₂ 检测出 40 份资源具有此抗性标记，其中有 19 份资源兼有两个抗性标记（表 2）。图 1 为引物对 SCA₁₀₀₀ 在 10 个样品中的扩增电泳检测图。

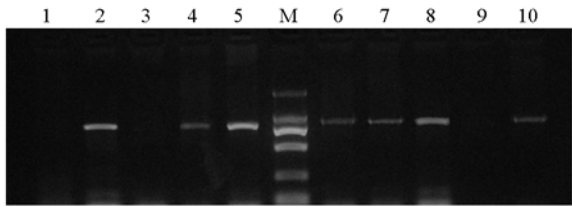


图 1 引物对 SCA₁₀₀₀ 在 10 个样品中的扩增结果

M: 分子量标准 DL2000。1 ~ 10: 表示 1 ~ 10 号样品。其中 1 号、3 号和 9 号没有扩增出条带。

Fig. 1 The amplification result of SCA₁₀₀₀ primer combination in 10 common bean samples

M: Molecular weight marker DL2000. 1 - 10: Means No. 1 to No. 10 common bean samples;

No. 1, No. 3 and No. 9 were not amplified any band.

考虑到荚用菜豆资源应用于育种，是以商品荚的特征为主要的育种目标，因此根据资源的形态特征，特别是荚型特征，将 143 份资源分成 6 大类型：18 份地豆；56 份扁圆荚型菜豆，其中 24 份白色或白绿色荚菜豆，20 份绿色或浅绿色荚菜豆，12 份紫色或紫色花纹菜豆；22 份扁荚菜豆；22 份油豆类型菜豆；17 份无筋豆类型菜豆；其他类型 8 份。根据分类，统计了各类资源含特异性标记的情况（表 3）。

表 3 的结果表明含 Co-2 基因的数量由多到少依次为：扁圆荚类型绿荚菜豆，油豆，扁圆荚类型紫荚菜豆，无筋豆，扁荚菜豆，扁圆荚类型白荚菜豆，地豆，其他类型。含有 Co-10 基因的数量由多到少依次为：扁圆荚类型绿荚菜豆，油豆，扁荚菜豆，扁圆荚类型白荚菜豆，地豆，无筋豆，扁圆荚类型紫荚菜豆，其他类型。从 2 个抗病基因分布的均匀程度来分析：将同一类型中 2 个抗病基因含量相差 5% 以内认为是分布均匀的，分布均匀的类型包括：其他类型、扁圆荚类型绿荚菜豆、

油豆、无筋豆、扁荚菜豆和扁圆荚类型白荚菜豆。此外，地豆类型 2 个基因含量只相差 5.6%。只有在扁圆荚类型紫荚菜豆（*Co-2* 基因比 *Co-10* 基因含量多 50%）中含 *Co-2* 基因较多，而 *Co-10* 基因较少。同时含有 2 个抗病基因在不同类型菜豆中的分布由多到少依次为：扁圆荚类型绿荚菜豆，油豆，扁荚菜豆，扁圆荚类型白荚菜豆，扁圆荚类型紫荚菜豆，无筋豆，地豆，其他类型。

表 3 SCAR 标记在不同类型荚用菜豆中的分布
Table 3 The distributions of SCAR markers in different snap bean types

类型 Type	荚色 Pod color	总份数 Total	SCA ₁₀₀₀		SCF10 ₁₀₇₂		SCA ₁₀₀₀ + SCF10 ₁₀₇₂	
			份数 Number	百分率/% Ratio	份数 Number	百分率/% Ratio	份数 Number	百分率/% Ratio
地豆 Dwarf bean	绿荚菜豆 Green pod bean	18	3	16.67	4	22.22	1	5.56
扁圆荚类型 Oblate pod bean	白荚菜豆 White pod bean	24	5	20.83	6	25.00	2	8.33
	绿荚菜豆 Green pod bean	20	10	50.00	9	45.00	6	30.00
	紫荚菜豆 Purple pod bean	12	4	33.33	2	16.67	1	8.33
扁荚类型 Flat pod bean	绿荚菜豆 Green pod bean	22	5	22.73	6	27.27	3	13.64
无筋豆类型 King of beans	绿荚菜豆 Green pod bean	17	4	23.53	3	17.65	1	5.88
油豆类型 Oil bean	绿荚菜豆 Green pod bean	22	8	36.36	9	40.91	5	22.73
其他类型 Others	绿荚菜豆 Green pod bean	8	1	12.50	1	12.50	0	0
合计 Total		143	40	27.97	40	27.97	19	13.29

在 143 份资源中，群体抗性鉴定表现为抗病或中抗的资源有 16 份（表 2）。其中含有 2 个 SCAR 标记，并且群体抗性又表现抗病的资源有 5 份；含有 SCF10₁₀₇₂ 标记，同时群体抗性也抗病的资源有 3 份。

综合表 2 和表 3 的结果发现：在这 6 大类型的菜豆中，只有油豆和地豆 2 种类型中包含既具有抗病基因，苗期抗性鉴定也表现抗病的资源。并且油豆中抗病基因最丰富，苗期抗病性最强。

3 讨论

3.1 我国菜豆炭疽菌的遗传变异趋势

从20世纪70年代开始，国外就已经开始了对菜豆炭疽病的研究。我国普通菜豆种质资源对炭疽病的抗性研究工作在80年代已经展开（王晓鸣 等，1989），但对菜豆炭疽菌的研究却是从90年代末才开始的。王晓鸣等（1999）和王坤等（2008）均对从我国各省（自治区、直辖市）菜豆栽培地区的炭疽菌进行了生理分化和遗传变异的研究，确定“81号生理小种”为我国的优势菌系。

从前面的研究结果可以看出：从1999年到2008年的10年间，“81号生理小种”一直是我国菜豆炭疽菌的优势菌株，分布的地区和频率虽然有减弱的趋势，但总体变化不大。究其原因，作者认为虽然菜豆炭疽菌是一类致病性遗传变异较大的病原菌，但由于多年来我国荚用菜豆抗炭疽病育种工作一直处于停滞状态，几乎没有人为的选择压力，病原菌的遗传变异主要依靠自然胁迫，变异速度比较缓慢。

3.2 粒用菜豆抗炭疽病基因在荚用菜豆资源中的分布特点

赵晓彦等（2007）研究了 5 个已知炭疽病抗性基因的 SCAR 标记在我国粒用菜豆中的分布，结

果认为: 我国粒用菜豆种质中含 *Co-2* 基因资源较多, 而含其他 4 个抗病基因标记资源较少, 缺乏 *Co-5* 基因的资源。本研究中使用相同的 SCAR 标记, 在荚用菜豆中的检测结果显示: 含有 *Co-2* 和 *Co-10* 基因较多, 而缺乏 *Co-4*², *Co-5* 和 *Co-9* 基因。除紫荚菜豆资源中含 *Co-2* 基因资源较多, 而含 *Co-10* 基因资源较少外, 这 2 种抗病基因在其余各类型菜豆中分布较均匀。此外, 作者还观察到: 有些资源(如表 2 “美国供豆王”)能检测到已知抗病基因的 SCAR 标记, 但苗期抗性鉴定结果却为“中感”; 有些资源(如表 2 中“王中王架豆”)虽缺乏抗病基因的标记, 群体抗性却表现为抗病; 还有一些资源既可以检测出具有抗性基因标记, 群体抗性也表现抗病。这些结果, 应该与我国菜豆由粒用向荚用方向漫长演化的过程中, 病原物(炭疽菌)与寄主(菜豆)之间的协同进化有关。

菜豆自 15 世纪从美洲引入中国后, 粒用菜豆的豆荚产生了失去硬质层基因的突变, 从而产生了以嫩荚供食用的软荚(荚用)菜豆, 由此中国也被公认是菜豆的次级起源中心(严小龙和卢永根, 1994)。与此同时, 炭疽菌与其寄主菜豆之间也在进行着长期不断的竞争和进化。植物病理学家 Flor (1942) 提出了“基因对基因”假说。其基本观点认为: 植物对大多数病害的抗性取决于病原物所携带的无毒基因和植物所携带的抗性基因, 二者相对应缺一不可。然而, 随着研究的不断深入, 研究者意识到: 植物的进化水平还不能只依靠一种基本机制就能对抗多种病原物, 而是需要多种结构和生化防卫机制的协同作用才勉强与一种病原物抗衡。

荚用菜豆的抗炭疽病机制不仅与抗性基因有关, 还是多种防御机制综合作用的结果。能检测到已知抗病基因的标记, 但苗期抗性鉴定结果却为“中感”的资源, 其虽然具有抗病基因, 但其不能识别“81 号生理小种”携带的无毒基因, 尽管其他防御机制较强, 结果还是表现为“中感”。缺乏抗病基因的资源, 群体抗性却表现为抗病的现象提示: 荚用菜豆中不仅含有已知的抗性基因, 还应该含有一种未知的抗性基因, 这可能是荚用菜豆含有的特异抗炭疽病基因。这个推测还有待于进一步研究。而既含有抗性基因的 SCAR 标记, 又表现抗病的资源应该具有复合抗性基因。王坤等(2008) 研究结果证明: 中国粒用菜豆中含 *Co-2* 基因以及聚合基因 *Co-4*²/*Co-5/Co-7* 及 *Co-4*³/*Co-9* 的种质资源表现抗病。这与本试验结果一致。这提示在今后抗病育种工作中应注意利用 *Co-2* 抗性基因, 并聚合不同的抗病基因, 将具有复合抗病基因的资源作为抗病基因的供体, 在育种中重点考虑使用。

References

- Adam-Blondon A F, Seignac M, Bannerot H, Dron M. 1994. SCAR, RAPD and RFLP markers linked to the dominant gene (*Are*) conferring resistance to anthracnose. *Theor Appl Genet*, 88: 865 - 870.
- Alzate-Marin A L, Costa M R, Arruda K M, Barros E G, Moreira M A. 2003. Characterization of the anthracnose resistance gene present in Ouro Negro (Honduras 35) common bean cultivar. *Euphytica*, 133: 165 - 169.
- Awale H E, Kelly J D. 2001. Development of SCAR markers linked to *Co-4*² gene in common bean. *Annu Rept Bean Improv Coop*, 44: 119 - 120.
- Awale H E, Ismail S M, Vallejo V A, Kelly J D. 2008. SQ4 SCAR marker linked to the *Co-2* gene on B11 appears to be linked to the *Ur-11* gene. *Annu Rept Bean Improv Coop*, 51: 174 - 175.
- Campa A, Rodríguez-Suárez C, Paneda A, Giraldez R, Ferreira J J. 2005. The bean anthracnose resistance gene *Co-5* is located in linkage group B7. *Annu Rept Bean Improv Coop*, 48: 68 - 69.
- Feng Guo-jun, Xu Qi-jiang, Li Yu-hua, Liu Da-jun. 2007. Optimal condition for simple sequence repeat in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Journal of Northeast University*, 38 (1): 27 - 34. (in Chinese)
- 冯国军, 徐启江, 李玉花, 刘大军. 2007. 普通菜豆 SSR 反应条件的优化. *东北农业大学学报*, 38 (1): 27 - 34.
- Flor H H. 1942. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathology*, 32: 653 - 669.
- Geffroy V, Creusot F, Falquet J, Sévignac M, Adam-Blondon A F, Bannerot H, Gepts P, Dron M. 1998. A family of LRR sequences at the *Co-2* locus for anthracnose resistance in *Phaseolus vulgaris* and its potential use in marker-assisted selection. *Theor Appl Genet*, 96: 494 - 502.

- Han Li-fang, Cao Zhi-ping, Dong Dao-feng, Wang Xiu-hui. 2006. Resistance evaluation of tomato rootstocks and cultivars (*Lycopersicon esculentum*) to southern root-knot nematodes (*Meloidogyne incognita*). *Acta Horticulturae Sinica*, 33 (5): 1099 – 1102. (in Chinese)
- 韩利芳, 曹志平, 董道峰, 王秀徽. 2006. 番茄砧木及品种对南方根结线虫的抗性鉴定. *园艺学报*, 33 (5): 1099 – 1102.
- Kelly J D, Gepts P, Miklas P N, Coyne D P. 2003. Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea. *Field Crops Research*, 82: 135 – 154.
- Li Mei. 2008. Preliminary study on anthracnose resistance breeding in common bean. *Journal of Tianjin Agricultural Sciences*, 14 (6): 73 – 75. (in Chinese)
- 李 梅. 2008. 菜豆抗炭疽病育种抗病基因分析初报. *天津农业科学*, 14 (6): 73 – 75.
- Méndez de Vigo, Rodríguez-Suárez B C, Pañeda A, Giraldez R, Ferreira J J. 2002. Development of a SCAR marker linked to *Co-9* in common bean. *Annu Rept Bean Improv Coop*, 45: 116 – 117.
- Miklas P N, Stone V, Daly M J, Stavely J R, Steadman J R, Bassett M J, Delorme R, Beaver J S. 2000. Bacterial, fungal, and viral disease resistance loci mapped in a recombinant inbred common bean population ('Dorado'/XAN 176). *J Am Soc Hort Sci*, 125: 476 – 481.
- Queiroz V T, Sousa C S, Costa M R, Sanglad D A, Arruda K M A, Souza T L P O, Ragagnin V A, Barros E G, Moreira M A. 2004. Development of SCAR markers linked to common bean anthracnose resistance genes *Co-4* and *Co-6*. *Annu Rep Bean Improv Coop*, 47: 249 – 250.
- Rodríguez-Suárez C, Ferreira J J, Campa A, Paneda A, Giraldes R. 2008. Molecular mapping and intra-cluster recombination between anthracnose race-specific resistance genes in the common bean differential cultivars Mexico 222 and Widusa. *Theor Appl Genet*, 116: 807 – 814.
- Vallejo V, Kelly J D. 2001. Development of a SCAR marker linked to *Co-5* in common bean. *Annu Rept Bean Improv Coop*, 44: 121 – 122.
- Wang Kun, Wang Xiao-ming, Zhu Zhen-dong, Zhang Xiao-yan, Wang Shu-min. 2008. Identification of *Colletotrichum lindemuthianum* races and bean germplasm evaluation for anthracnose resistance. *Journal of Plant Genetic Resources*, 9 (2): 168 – 172. (in Chinese)
- 王 坤, 王晓鸣, 朱振东, 张晓艳, 王述民. 2008. 菜豆炭疽菌生理小种鉴定及普通菜豆种质的抗性评价. *植物遗传资源学报*, 9 (2): 168 – 172.
- Wang Kun, Wang Xiao-ming, Zhu Zhen-dong, Zhao Xiao-yan, Zhang Xiao-yan, Wang Shu-min. 2009. Mapping of a novel anthracnose resistance gene using SSR markers in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 35 (3): 432 – 437. (in Chinese)
- 王 坤, 王晓鸣, 朱振东, 赵晓彦, 张晓艳, 王述民. 2009. 以 SSR 标记对普通菜豆抗炭疽病基因定位. *作物学报*, 35 (3): 432 – 437.
- Wang Xiao-ming, Li Yi-lin, Li Shu-ying. 1989. Identification of anthracnose resistant genes in common bean germplasm. *Crop Germplasm Resources*, 2: 18 – 19. (in Chinese)
- 王晓鸣, 李怡琳, 李淑英. 1989. 菜豆种质资源对菜豆炭疽病抗性鉴定研究. *作物品种资源*, 2: 18 – 19.
- Wang Xiao-ming, Li Yi-lin, Wu Xiao-fei, Yu Shan-li, Li Mei, Guo Jian-hua. 1999. Pathogenic variation of Chinese isolates *Colletotrichum lindemuthianum*. *Journal of Shandong Agricultural University*, 30 (supplement): 125 – 129. (in Chinese)
- 王晓鸣, 李怡琳, 武小菲, 于善丽, 李 梅, 郭建华. 1999. 中国菜豆炭疽病菌的致病性变异. *山东农业大学学报*, 30 (增刊): 125 – 129.
- Wu Quan-an. 1991. Identification of crops germplasm resources resistant to diseases and insect pests. Beijing: Agriculture Press: 60 – 61. (in Chinese)
- 吴全安. 1991. 粮食作物种质资源抗病虫鉴定方法. 北京: 中国农业出版社: 60 – 61.
- Yan Xiao-long, Lu Yong-gen. 1994. Origin, evolution and genetic resources of common bean. *J South China Agr Univ*, 15 (4): 110 – 115. (in Chinese)
- 严小龙, 卢永根. 1994. 普通菜豆的起源, 进化和遗传资源. *华南农业大学学报*, 15 (4): 110 – 115.
- Young R A, Kelly J D. 1996. RAPD markers flanking the *Are* gene for anthracnose resistance in common bean. *J Amer Soc Hort Sci*, 121: 37 – 41.
- Young R A, Melotto M, Nodari R O, Kelly J D. 1998. Marker-assisted dissection of the oligo genic anthracnose resistance in the common bean cultivar 'G2333'. *Theor Appl Genet*, 96: 87 – 94.
- Zhao Xiao-yan, Wang Xiao-ming, Zhu Zhen-dong, Wang Shu-min. 2006. Identification and molecular marker for the resistance genes to anthracnose in common bean. *Journal of Plant Genetic Resources*, 7 (1): 95 – 99. (in Chinese)
- 赵晓彦, 王晓鸣, 朱振东, 王述民. 2006. 普通菜豆抗炭疽病基因鉴定与分子标记. *植物遗传资源学报*, 7 (1): 95 – 99.
- Zhao Xiao-yan, Wang Xiao-ming, Wang Shu-min. 2007. Identification of anthracnose resistant genes based on SCAR markers in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Agronomica Sinica*, 33 (11): 1815 – 1821. (in Chinese)
- 赵晓彦, 王晓鸣, 王述民. 2007. 普通菜豆抗炭疽病基因 SCAR 标记鉴定. *作物学报*, 33 (11): 1815 – 1821.