

研究报告

Research Report

大白菜抗根肿病近等基因系的选育及其评价

张腾[✉], 吴迪[✉], 赵卓[✉], 王哲[✉], 朴钟云[✉]

沈阳农业大学园艺学院, 沈阳, 110866

✉ 通讯作者: zypiao@syau.edu.cn ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 72 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0072

收稿日期: 2012 年 12 月 17 日

接受日期: 2012 年 12 月 19 日

发表日期: 2012 年 12 月 21 日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012 年第 10 卷第 6 期 722-730 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

张腾等, 2012, 两份贵州早稻种质的苗期根系特征与耐旱生理特性测定, 分子植物育种(online) Vol.10 No.72 pp.1526-1534 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0072)

引用格式(英文):

Zhang et al., 2012, Development of Near Isogenic Lines for Clubroot Resistance in Chinese Cabbage and Their Assessment, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.72 pp.1526-1534 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0072)

摘要 本研究以具有抗根肿病基因 *CRb* 的大白菜 ‘CR Shinki DH’ 系为供体亲本, 大白菜自交系 ‘91-12B’ 为轮回亲本, 通过回交和 4 个阶段的分子标记辅助选择, 选育出 7 个携带 *CRb* 基因的抗根肿病近等基因系。通过 *CRb* 基因所在大白菜 A3 染色体的分子标记检测和抗病性鉴定, 筛选出抗根肿病、并插入有供体亲本最短染色体片段的 3 个近等基因系 B1S1、B2S2 和 B3S1。表型分析表明这 3 个近等基因系的结球相关性状与轮回亲本无显著差异, 而且保持了 ‘91-12B’ 的配合力。所选育的近等基因系不仅能应用于育种实践, 也为通过转录组分析研究根肿病的抗病机理提供了材料。

关键词 大白菜; 根肿病; *CRb* 基因; 分子标记辅助选择; 近等基因系; 轮回亲本基因组

Development of Near Isogenic Lines for Clubroot Resistance in Chinese Cabbage and Their Assessment

Zhang Teng[✉], Wu Di[✉], Zhao Zhuo[✉], Wang Zhe[✉], Piao Zhongyun[✉]

College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang, 110866, P.R. China

✉ Corresponding author, zypiao@syau.edu.cn ✉ Authors

Abstract The clubroot resistance gene *CRb* from donor parent ‘CR Shinki DH line’ was introgressed into Chinese cabbage inbred line ‘91-12B’ as recurrent parent by advanced backcross program and four-stage of marker-assisted selection. Totally, 7 near isogenic lines (NILs) carrying the *CRb* gene were selected. Analysis of the 7 NILs with additional molecular markers distributed on A3 of Chinese cabbage chromosome, where *CRb* was located, and clubroot resistant assay, we found that 3 NILs, including B1S1, B2S2 and B3S1, contained the minimum genetic composition of donor parent, and showed resistance to clubroot disease. Phenotypic analysis of heading related traits indicated that there were no significant difference between these NILs and ‘91-12B’, but the combining ability was remained. These NILs might be useful for developing clubroot resistant cultivars in breeding program as well as for being a material to study the mechanism of the *CRb* gene though transcriptome analysis.

Keywords Chinese cabbage; Clubroot disease; *CRb* gene; Marker-assisted selection; Near isogenic line; Recurrent parent genomet

大白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)是芸薹属芸薹种中广泛栽培的蔬菜作物之一。近年来, 根肿病日益成为影响大白菜生产的最为严重病害之一。根肿病是由芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woron.)引起的危害芸薹属作物的世界性病害。患病植株根部出现肿瘤, 导致植株水分及养分吸收受阻, 进而使植株萎蔫、叶片发黄, 造成作物大幅减产, 甚至绝收(Dixon, 2009)。由于根肿菌能够以休眠孢子

在土壤中存活时间长, 而且利用田间作业和化学药剂处理的方法很难控制, 因此土壤一旦受到污染将长期带菌, 不再适宜种植芸薹属作物(Voorrips, 1995)。培育抗根肿病品种是防治根肿病的最为有效的方法之一。但利用传统育种方法进行新品种培育具有周期长、受环境条件因素的影响。

近等基因系(near isogenic line, NIL)是通过多次回交和选择而选育出的遗传背景相近, 目标基因不同的一组品系(Young et al., 1988)。NIL不仅可以应用于育种实践, 而且广泛应用于基因多效性分析、

目标基因分离、基因精细定位和克隆等研究(田清震等, 2004; 张毅等, 2006)。分子标记辅助选择(marker assisted selection, MAS)是现代分子生物学与传统遗传育种的结合, 可以利用分子标记在植物发育的任何时期从DNA分子水平上进行选择(Tanksley et al., 1989)。其基本原理是首先对具有目标区域的单株, 利用与目标基因紧密连锁或呈共分离关系的分子标记进行前景选择, 再对已选出的植株利用覆盖全基因组的分子标记进行背景选择, 从而获得期望个体(Frischa et al., 1999)。该方法具有周期短, 效率高等特点(Melchinger, 1990)。因此, MAS技术已广泛应用于水稻、小麦、大豆(金旭炜等, 2007; 张荣等, 2010; Kim et al., 2008)等作物近等基因系的构建。大白菜抗根肿病基因CRb对根肿菌生理小种2、4和8表现出显性抗性(Piao et al., 2002)。Piao等(2004)利用F_{2,3}分离群体将CRb基因定位于2.9 cM区域内, 其两侧的侧翼标记分别为TCR01和TCR09。CRb位于大白菜连锁群A3的一端(Suwabe et al., 2006)。Piao等(2007)进一步证实了CRb的连锁标记与大白菜抗根肿病性状的高度相关性。随着大白菜SSR标记的大量开发和定位(Suwabe et al., 2006; Choi et al., 2007; Kim et al., 2009; Li et al., 2010; Ge et al., 2011; Ramchiary et al., 2011), 使全基因组背景选择成为可能。

朴钟云等(2010)利用CRb的两个侧翼标记通过5个世代的前景选择和背景选择, 选育出抗大白菜根肿病NILs。但未对转育效果进行评价通过MAS技术选育的NILs能否应用于杂种一代的生产, 取决于这些NILs的杂种优势表现。本研究在选育NILs的基础上, 从分子水平、抗病性和园艺学性状对其进行评价。通过CRb基因的前景和背景选择, 在探索更为有效的大白菜MAS体系的同时, 选育出可用于育种实践的大白菜抗根肿病NILs。

1 结果与分析

1.1 亲本间多态性标记的筛选

CRb连锁的2个侧翼标记TCR01和TCR09在‘CR Shinki DH’系和‘91-12B’间存在多态性, 表明这两个标记可用于各回交世代的前景选择。

在分布于大白菜10条连锁群的120个SSRs标记中, 有59个表现出多态性, 多态性比率为49.2%。标记在大白菜连锁群分布情况如下: A1的有6个SSRs标记, 分布于A2的有4个, A3的有13个, A4、A5、

A6、A7、A8和A10的各5个, A9的有6个SSRs标记。这些具有多态性的SSRs标记覆盖的遗传距离为872.4 cM, 平均间隔为16.4 cM。从59个多态性标记中选择53个均匀分布于大白菜基因组的分子标记, 对BC₃F₁代的进行全基因组背景分析。其余分布于A3的6个SSR用于进一步分析NILs的遗传背景。

1.2 各世代CRb基因的前景选择和全基因组背景选择

1.2.1 BC₁F₁的选择

在52株BC₁F₁代群体中, 筛选获得32株($\chi^2=2.327$, $\chi_{0.05}^2=3.84$)具有TCR01抗病带型的植株, 27株($\chi^2=0.019$, $\chi_{0.05}^2=3.84$)具有TCR09抗病带型植株。结合TCR01和TCR09的筛选结果, 筛选出兼具TCR01和TCR09抗病带型的植株25株(图1)。从这些植株中, 选择10株BC₁F₁代个体与轮回亲本‘91-12B’回交, 得到BC₂F₁代。

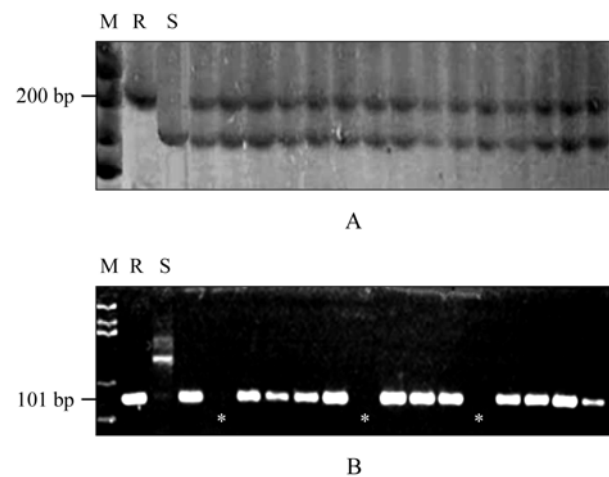


图1 部分BC₃F₁个体的TCR01 (A)和TCR09 (B)的基因型
注: M: DL1500 marker; R: ‘CR Shinki DH’系; S: ‘91-12B’;
*: 重组体; 箭头所示为与CRb基因连锁的抗病带型
Figure 1 Genotypes of TCR01 (A) and TCR09 (B) in part of BC₃F₁ individuals.

Note: M: DL1500 marker; R: ‘CR Shinki DH’ line; S: ‘91-12B’;
Note: *: Recombinants; The markers linked to the CRb gene are shown by arrows

1.2.2 BC₂F₁的选择

为了验证群体大小与选择效率的关系, 分别从源于10株BC₁F₁代个体的BC₂F₁群体中随机选择5~20株进行CRb前景选择(表1)。结果表明在回交群体中, 随机选择7株即能筛选出2株兼具TCR01和TCR09抗病带型的植株。在114株BC₂F₁代个体中,

筛选出具有TCR01抗病带型的植株56株, 从中筛选出具有TCR09抗病带型的植株43株(图1)。

表1 不同BC₂F₁代群体大小中选择的兼具TCR01和TCR09抗病带型的株数

Table 1 The number of selected plants with resistant banding pattern of TCR01 and TCR09 from different backcross population size of BC₂F₁

BC ₂ F ₁ 选择植株数 No. of BC ₂ F ₁ plants	兼具抗病带型植株的数量 No. of plants with marker genotype
10	6 (T1, T2)
20	7 (T3, T4)
10	4 (T5)
15	7 (T6, T7)
15	7 (T8, T9)
20	8 (T10~T12)
7	2
5	0
5	0
7	2

1.2.3 BC₃F₁ 的选择

根据群体数量的大小与选择效果的关系, 从12个(编号为T1~T12) BC₂F₁的下一代回交群体中随机选取10株, 共120株作为BC₃F₁代的供试群体进行前景选择。依次利用TCR01和TCR09鉴定120株BC₃F₁个体的基因型(图2), 分别筛选出有抗病带型的植株68株($\chi^2=1.875$, $\chi_{0.05}^2=3.84$)和55株($\chi^2=0.675$, $\chi_{0.05}^2=3.84$)。该结果说明13株个体在TCR01和TCR09之间发生了重组。兼具TCR01和TCR09抗病带型的55个植株应用于‘91-12B’的基因组背景选择。

‘91-12B’的基因组背景选择进行2次。首先选用27个SSR标记鉴定入选的55株BC₃F₁个体基因型(表2)。鉴定结果, 10株基因组含量与‘91-12B’一致, 12株有1个杂合位点, 2株有2个, 5株有3个, 杂合位点超过7个的有26株。淘汰这26株杂合位点多的个体, 另选用26个SSR标记对29株个体进行背景选择。筛选出完全恢复轮回亲本‘91-12B’基因组的2株(编号为B1和B2)个体, 有4株(编号为C1~C4)存在1个SSR杂合位点(RPG=98.1%), 4株(编号为D1~D4)存在2个杂合位点(RPG=96.3%), 7株的RPG含量为94.3%。这29株植株的平均RPG含量为94.6%。C1、C2和C4含有相同的杂合位点cnu_m327, 自CRb基因所在的A3染色体。

B1和B2、C1和D4源于T10的回交后代, C2、D1和D3源于T4的回交后代, C3、C4和D2源于T12的回交后代(表1)。T4、T10和T12分别是20株BC₂F₁群体中筛选出的个体(表1), 说明适当扩大BC₂F₁供B1、B2以及C1~C4进行自交, 得到BC₃F₂代。

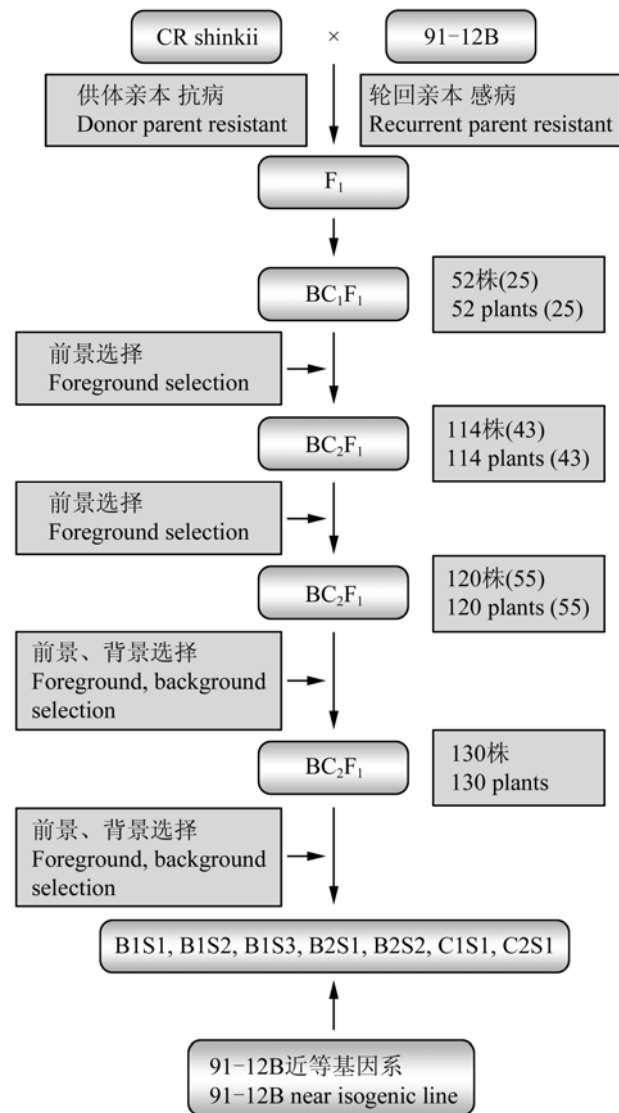


图2 大白菜抗根肿病近等基因系的选育程序
 注: 括号中的数字代表每代经前景选择后选出的植株数
 Figure 2 Schematic diagram of construction clubroot resistant near isogenic lines of Chinese cabbage
 Note: The numeral in the bracket stand for the number of selected plants through the foreground selection

1.2.4 BC₃F₂ 的选择

从B1和B2的自交后代中分别选择25株, C1~C4的各选择20株, 共130株作为BC₃F₂代的供试群体进行前景选择(表2)。TCR01的前景选择结果, 从B1

的自交后代中获得TCR01位点纯合的3株个体(编号为B1S1, B1S2和B1S3), 即为NILs; 从B2的自交后代中, 获得2个NILs (编号为B2S1和B2S2); 从C1~C4的自交后代中筛选出15株纯合个体。

为获得所有SSR位点与‘91-12B’一致的近等基因系, 对C1~C4的自交后代15株个体进行基因组背景分析。分析结果只有2株个体恢复了‘91-12B’基因组(图1), 即2个NILs (编号为C2S1和C3S1)。

表2 BC₃F₁代55株个体的前景和背景选择以及BC₃F₂代植株的选择

Table 2 Background selection of the foreground-selected 55 BC₃F₁ and their BC₃F₂ plants

BC ₃ F ₁ 代个体的第一次背景选择		BC ₃ F ₁ 代个体的第二次背景选择		选择的BC ₃ F ₁ 个体	BC ₃ F ₂ 的背景选择以及选出的近等基因系	
First background selection of BC ₃ F ₁ individuals		Second background selection of BC ₃ F ₁ individuals		Selected BC ₃ F ₁ individual	Selection of BC ₃ F ₂ and selected NILs	
植株数	轮回亲本基因组含量(%)	植株数	轮回亲本基因组含量(%)		植株数	选出的近等基因系
Number of plants	RPG content (%)	Number of plants	RPG content (%)		Number of plants	Selected NILs
10	100	2	100	B1	25	B1S1, B1S2, B1S3
12	96.3	4	98.1	B2	25	B2S1, B2S2
2	92.6	4	96.3	C1	20	
5	85.2	7 ^a	94.3	C2	20	C2S1
26 ^a	<74.1	12 ^a	<92.4	C3	20	C3S1
		平均	94.6	C4	20	
		Average				

注: a: 淘汰的植株数; RPG: 轮回亲本基因组

Note: a: The number of the discarded plants; RPG: Recurrent parent genome

1.3近等基因系的评价

为了筛选出抗根肿病的最优近等基因系, 对所获得的7个NILs从抗病性、分子水平、主要农艺性状进行了鉴定。

1.3.1分子评价

除了用于前景和背景选择的位于A3染色体的9个标记以外, 另选用*CRb*基因所在A3染色体的6个SSR标记进行了遗传背景分析(图3)。这些标记覆盖了A3染色体的135.4 cM。分析表明所有NIL在*CRb*基因附近区域均插入有‘CR Shinki DH’系的约6.9~7.4 cM长度。此外, B1S2和B1S3还含有‘CR Shinki DH’系的sau_nm235。因此, 选择插入目标基因区域最少的B1S1、B2S2和C3S1进行了抗病性和大白菜结球相关性状的测定。

1.3.2抗病性鉴定

在根肿菌接种6周后, 观察根肿病发病情况。供试的25株‘91-12A’和‘91-12B’均表现为3级感病, ‘CR Shinki DH’系25株均表现为抗病。B1S1、B2S2和C3S1及其与‘91-12A’配制的杂交组合均表现为抗病, 未发生分离。该结果证明这些NILs中插

入的抗根肿病基因*CRb*达到了纯合。因此, 与*CRb*的侧翼标记TCR01和TCR09能够在前景选择中发挥准确且高效的作用。

1.3.3主要农艺性状鉴定

以‘91-12B’和‘91-12B×91-12A’为对照, 对主要农艺性状进行考察, 结果表明: B1S1、B2S2和3S1‘91-12B’, 以及各杂交组合与‘91-12B×91-2A’之间在接球相关性状上差异不显著(表3)。说明通过MAS方法选育的NILs不仅恢复了轮回亲本‘91-12B’的主要农艺性状, 而且其杂交组合与原组合‘91-12B×91-12A’亦无显著差异。

2讨论

与传统育种方法选育抗病材料相比, 抗病基因连锁标记的应用不仅可以避免错误选择感病个体的可能性, 也可以在植物生长发育的任何时期进行选择。有研究证明人工接菌的外界环境, 如水分、光照、pH、温度等, 易影响根肿病抗病性的鉴定(Hamilton and Crete, 1978)。本试验在没有接菌的条件下, 利用*CRb*的两个侧翼标记在苗期对各世代进行了前景选择。结果证明所选育的NILs均表现出对根肿菌生理

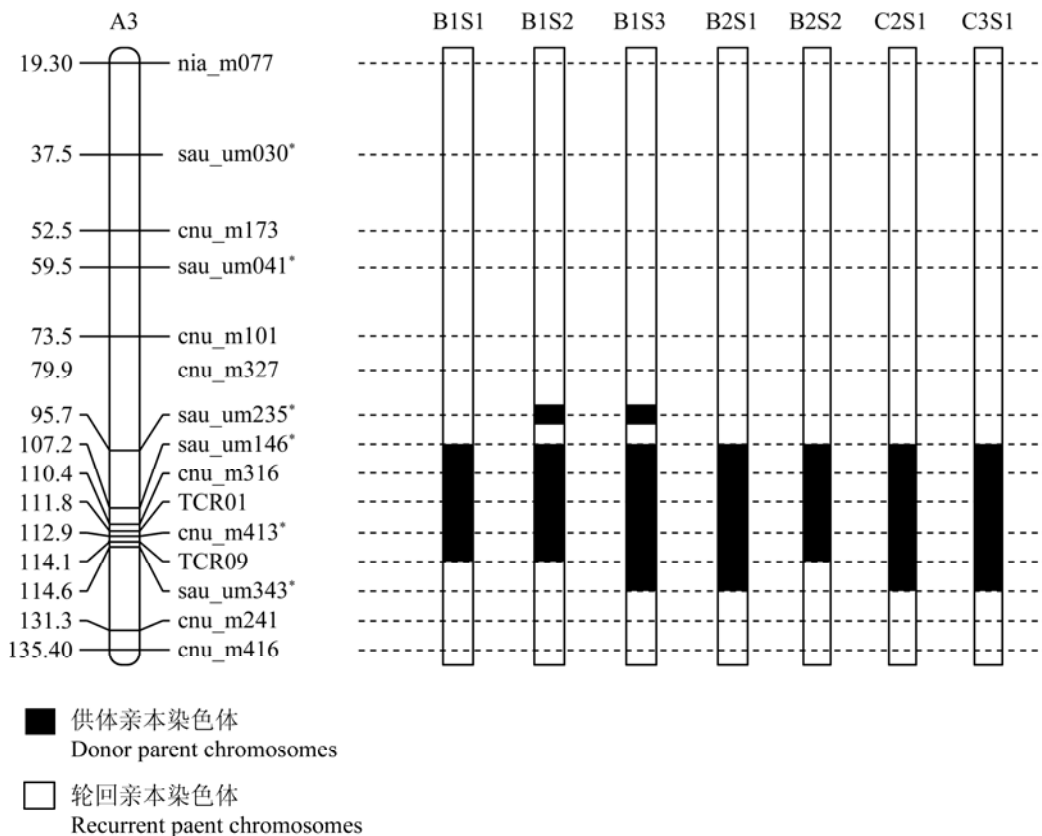


图3 7个近等基因系在大白菜A3染色体中的的遗传组成

注: *: 选育出近等基因系后, 用于遗传背景分析的SSR标记; 遗传距离(cM): 依据芸薹种A3连锁群(Ramchiary et al., 2011)

Figure 3 Genetic composition of 7 near isogenic lines on chromosome A3 of Chinese cabbage

Note: *: SSR markers used for genetic background analysis after near isogenic lines were selected; Genetic distances (cM): based on the A3 linkage group of *Brassica rapa* (Ramchiary et al., 2011)

表3 近等基因系结球相关性状比较

Table 3 Comparison of the heading related traits among the near isogenic linest

试群体	全株质量 (kg)	外叶数	内叶数	叶球质量 (kg)	叶球高 (cm)	叶球直径 (cm)	茎高 (cm)	茎直径 (cm)
Population tested	Total weight of plant (kg)	No. of outer leaves	No. of inner leaves	Heading we- ight (kg)	Heating heig- ht (cm)	Heading diam- eter (cm)	Stem height (cm)	Stem diamet- er (cm)
91-12B	3.47±0.28A	16±0.72A	44±0.92A	1.59±0.07A	27.19±0.39A	18.16±0.30A	5.73±0.11A	3.47±0.08A
B1S1	3.50±0.67A	15±1.12A	45±0.98A	1.60±0.15A	24.11±1.27A	18.70±0.56A	6.38±0.17A	3.50±0.19A
B2S2	3.43±0.32A	14±1.17A	42±1.01A	1.17±0.10A	23.35±1.22A	16.91±0.62A	5.70±0.24A	3.43±0.08A
C3S1	3.68±0.42A	16±0.76A	43±1.02A	1.65±0.16A	27.00±0.76A	19.68±0.69A	6.42±0.36A	3.68±0.12A
91-12A×91-12B	4.05±0.36A	15±0.45A	44±0.92A	2.88±0.28A	36.28±0.94A	19.10±0.62A	4.62±0.17A	4.44±0.18A
91-12A×B1S1	4.21±0.28A	14±0.51A	45±1.23A	3.01±0.22A	35.20±0.54A	19.67±0.63A	4.64±0.14A	4.98±0.17A
91-12A×B2S1	3.59±0.32A	14±0.59A	46±1.28A	2.44±0.24A	34.21±0.81A	19.56±0.65A	4.43±0.21A	4.69±0.16A
91-12A×C3S1	3.78±0.84A	14±0.60A	46±0.37A	2.64±0.17A	33.15±0.85A	17.40±0.45A	4.33±0.15A	4.65±0.18A

小种4的高抗。同时, 通过在苗期的前景选择保证了1年进行2个世代的选育。

NILs兼具供体和轮回亲本的优良性状, 但需要保留有轮回亲本的更多优异性状。因此, 选择轮回亲本基因组(recurrent parent genome, RPG)含量高的个体是提高NIL选育质量的保证。回交次数、各回交世代供试群体数量以及用于背景分析的标记数量与RPG的含量有着密切的关系。Frischa等(1999)通过MAS比较了转育单个基因时的3种选择方法, 即在每个世代进行4个阶段的选择包括: (1)选择含有目标基因的个体(前景选择); (2)选择侧翼标记位点纯合的个体; (3)选择目标基因所在染色体的其他位点与轮回亲本一致的纯合体(背景选择); (4)选择其他染色体的标记位点达到最大纯合的个体(背景选择)等4个步骤, 或2个阶段的选择包括以上的(1)和(4), 或3个阶段的选择包括(1)、(2)和(4)。研究结果表明, 增加各世代供试群体的数量以及增加选择的次数, 可减少用于背景选择的标记数。而且4次回交即可使RPG含量达到97.8%。

本研究通过在最后回交世代(BC_3F_1)进行的4个阶段选择, 利用分布于大白菜基因组的53个SSR标记, 分2次从55株 BC_3F_1 个体中获得了2株完全恢复'91-12B'基因组的个体, 并从 BC_3F_2 中筛选出5个NILs。结果表明即使供体亲本'CR Shinki'与轮回亲本'91-12B'间的标记多态性比例高达49.2%, 通过MAS即可在 BC_3F_2 中选育出符合目标的近等基因系。本研究结果与Tanksley等(1989)和Hospital等(1992)的结论一致。Tanksley等(1989)认为通过MAS可在回交3代获得充分恢复RPG的个体。Hospital等(1992)认为如采用单个回交世代的背景选择, 选用最后一个回交世代进行的更为有效。而通过传统的回交育种方法, 在不同的大白菜类型间转育单个基因至少需要5次或6次的回交才能选育出高质量的NIL (王玉刚等, 2005)。Frischa等(1999)认为每个世代至少筛选15~20株才能获得携带目标基因的1株个体。而本研究结果表明, 在 BC_2F_1 代群体中选择7株即可筛选出2个抗病个体。但通过背景选择从20株回交群体中获得RPG含量高的NILs机率更高。这可能与玉米(Frischa et al., 1999)和大白菜基因组大小不同有关。

朴钟云等(2010)从 BC_2F_1 世代起采用4个阶段的选择方法进行了CRb基因的转育研究。结果表明,

BC_2F_1 群体的RPG平均含量仅为77.5%, 远低于回交2代的期望值(87.5%); 选取RPG含量为91.7%的1株回交后, BC_3F_1 的RPG平均含量为93.3%, 但未获得全部恢复的个体; 直至从 BC_3F_3 获得了9个抗根肿病的NILs。本研究同样采用了4个阶段的选择方法, 但对 BC_3F_1 进行了背景选择。发现RPG平均含量为94.6%, 高于该世代的期望值(93.8%), 并获得了全部恢复RPG的个体。因此, 在各回交世代进行前景选择的基础上, 并适当扩大 BC_2F_1 入选株数, 选择最后1个回交世代进行RPG的背景分析比在 BC_2F_1 起进行背景分析不仅能节省经费的投入, 也能提高MAS的效率。

通过对7个NILs的遗传背景分析发现, 这些NIL保留有供体亲本提供的CRb基因所在A3染色体的SSR位点。这种现象是由连锁累赘而引起的。Tanksley和Nelson (1996)认为连锁累赘现象可通过利用更为紧密的连锁标记和扩大分离群体的数量得以克服。通过对3个NILs结球相关性状和配合力测定发现, 所选育的NIL不仅在大白菜主要农艺性状上与轮回亲本无显著差异, 而且配制的杂交组合与原有组合也无显著差异。说明MAS的应用很好保留了轮回亲本原有的配合力。

3材料和方法

3.1试验材料

以对根肿菌生理小种2、4和8具有抗性的大白菜'CR Shinki DH'系为供体亲本。以易感根肿病、性状优良的大白菜自交系'91-12B'为轮回亲本。以易感根肿病的'91-12A'为亲本与选育出的抗根肿病'91-12B'近等基因系(Near isogenic lines, NILs)配制杂交组合。'91-12A'和'91-12B'为东北三省主要栽培品种'91-12'的亲本, 由辽宁省水师营蔬菜研究所提供。含CRb基因的'CR Shinki DH'由沈阳农业大学蔬菜分子生物学课题组提供。

供试根肿病菌种为单孢子, 经'Williams'方法鉴定为生理小种4 (Williams, 1966), 保存于沈阳农业大学蔬菜分子生物学课题组-40℃冰箱。

3.2抗根肿病'91-12B'近等基因系的选育

以'91-12B'为轮回亲本, 'CR Shinki DH'系为供体亲本杂交得到F1, 连续回交3次。利用CRb基因的侧翼标记TCR01和TCR09, 从各回交世代群体中选择具有CRb的单株进行回交。筛选出的 BC_3F_1 代个体通过基因组背景选择, 获得'91-12B'基因组恢复率

高的植株, 并自交1次(图1)。将选育出纯合抗病的‘91-12B’NILs与‘91-12A’配制杂交组合, 并对其进行田间农艺性状调查和抗病性鉴定。

3.3 基因组DNA的提取

采集亲本以及各世代幼嫩叶片, 采用改良SDS法微量提取DNA (Pierre and Maréchal-Drouard, 1992)。用Thermo NanoDrop 2 000超微量分光光度计测定DNA浓度

3.4 多态性标记筛选

用*CRb*基因连锁的侧翼标记TCR01和TCR09检测亲本‘91-12B’与‘CR Shinki DH’系间的多态性。根据芸薹种遗传连锁图谱(Kim et al., 2009), 选择覆盖全基因组的120个SSR标记用于亲本间多态性筛选。多态性标记用于基因组背景选择。TCR01和TCR09的PCR扩增反应体系采用Piao等(2004)方法。TCR01和SSR标记扩增采用10 μ L反应体系, 包括15 ng 模板DNA、1 \times PCR缓冲液、0.25 mmol/L dNTP、5 pmol/L上下游引物、2.5 U *Taq*酶。PCR程序采用Kim等(2009)方法。PCR产物用6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 并用银染方法显色。TCR09采用20 μ L反应体系, 扩增产物用1.5%琼脂糖电泳分离, 溴化乙锭显色。

3.5 *CRb*基因前景选择

各世代的前景选择, 先后用TCR01和TCR09筛选各世代植株, 选择兼具TCR01和TCR09抗病带型(‘CR Shinki DH’系带型)的植株用于回交或自交。

为确定用于各回交世代的最小供试群体数, 在10个BC₁F₁的回交群体中, 分别选择5、7、10、15和20株进行BC₂F₁的前景选择, 重复2次。

3.6 回交世代基因组背景选择

选择均匀分布于大白菜10个连锁群上的53个多态性SSR标记, 对具抗病带型的BC₃F₁个体进行‘91-12B’基因组背景选择。在每一连锁群选择2~3个遗传距离大、覆盖全基因组的27个SSR标记, 通过基因型鉴定淘汰轮回亲本基因组含量低的个体, 然后选用其它26个SSR标记对选出的单株做进一步背景选择。

RPG表示单株基因组恢复到轮回亲本的程度。 $RPG = \text{SSR标记纯合位点数} / \text{SSR标记总数} \times 100\%$ 。平均基因组含量为相同世代群体内各个体基因组含量的平均值。 $RPG \text{期望值} = (1 - 1/2^{r+1}) \times 100\%$, 式中r

为回交次数。

选择RPG高于其期望值的单株自交, 获得纯合抗病的NILs。NILs的纯合抗性采用共显性标记TCR01的基因型和抗病性鉴定相结合的方法。选用*CRb*所在A3染色体的SSR标记(Ramchiary et al., 2011)分析抗根肿病NILs中供体亲本染色体片段的插入。

3.7 杂交组合的配制

以‘91-12A’为杂交亲本, 分别与‘91-12B’以及抗根肿病NILs包括B1S1、B2S2和C3S1进行杂交, 得到F1种子, 用于抗病性鉴定和田间农艺性状调查。

3.8 抗病性鉴定

将‘91-12A’、‘91-12B’、‘CR Shinki DH’系、B1S1、B2S2、C3S1以及这些NILs与‘91-12A’的杂交种子播种于50孔穴盘, 每份材料播种25粒种子。出苗后3 d, 利用灌根法接菌(接种根肿菌孢子浓度为 1×10^7 /mL)。接菌期间保持土壤湿润、温度20 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C。接菌后6周, 清洗根部泥土, 调查发病情况。根据Buczacki等(1975)方法, 发病程度按0~3级进行分类, 标准为: 0级, 主侧根均无肿瘤; 1级, 侧根有微小肿瘤; 2级, 侧根有较大瘤或主根有节状小瘤; 3级, 主侧根有明显肿瘤。抗病性鉴定在沈阳农业大学试验基地进行。

3.9 结球相关性状调查

将‘91-12B’、‘91-12A \times 91-12B’、近等基因系B1-S1、B2S2、C3S1以及各NILs与‘91-12A’的杂交种子播种于穴盘中。20 d后在沈阳农业大学蔬菜分子生物学试验基地进行定植。各家系和杂交组合定植25株, 设置3次重复。收获期随机抽取12株, 对大白菜结球相关性状进行调查, 包括: 全株质量、外叶数、叶球重、叶球高度、叶球直径、内叶数、营养茎茎高以及茎基部直径等(朴钟云等, 2010)。利用DPS软件分析差异显著性。

作者贡献

张腾是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 并完成论文初稿的写作; 吴迪、赵卓及王哲参与实验设计, 试验结果分析; 朴钟云是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(31171967)、辽宁省自然科学基金项目(20102199)和教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20092103110006)共同资助。

参考文献

- Buczacki S.T., Toxopeus H., Mattusch P., Johnston T.D., Dixon G.R., and Hobolth L.A., 1975, Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: proposals for attempted rationalisation through an international approach., *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 65(2): 295-303 [http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536\(75\)80013-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0007-1536(75)80013-1)
- Choi S.R., Teakle G.R., Plaha P., Kim J.H., Allender C.J., Beynon E., Piao Z.Y., Soengas P., Han T.H., King G.J., Barker G.C., Hand P., Lydiat D.J., Batley J., Edwards D., Koo D.H., Bang J.W., Park B.S., and Lim Y.P., 2007, The reference genetic linkage map for the multinational *Brassica rapa* genome sequencing project, *Theor. Appl. Genet.*, 115(6): 777-792 <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-007-0608-z> PMID:17646962
- Dixon G.R., 2009, The Occurrence and Economic Impact of *Plasmodiophora brassicae* and Clubroot Disease, *J. Plant Growth Regul.*, 28(3): 194-202 <http://dx.doi.org/10.1007/s00344-009-9090-y>
- Frischa M., Bohna M., and Melchinger A.E., 1999, Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of gene, *Crop Sci.*, 39(5): 1295-1301 <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1999.3951295x>
- Ge Y., Ramchiary N., Wang T., Liang C., Wang N., Wang Z., Choi S.R., Lim Y.P., and Piao Z.Y., 2011, Mapping quantitative trait Loci for leaf and heading-related traits in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*), *Hort. Environ. Biotechnol.*, 52(5): 494-501 <http://dx.doi.org/10.1007/s13580-011-0031-x>
- Hamilton H.A., and Crete R., 1978, Influence of soil moisture, soil pH, and liming sources on the incidence of clubroot, the germination and growth of cabbage produced in mineral and organic soils under controlled conditions, *Can. J. Plant Sci.*, 58(1): 45-53 <http://dx.doi.org/10.4141/cjps78-010>
- Hospital F., Chevalet C., and Mulsant P., 1992, Using markers in gene introgression breeding programs, *Genetics*, 132(4): 1119-1210
- Jin X.W., Wang C.L., Yang Q., Jiang Q.X., Fan Y.L., Liu G.C., and Zhao K.J., 2007, Breeding of near-isogenic line CBB30 and molecular mapping of *Xa30(t)*, a new resistant gene to bacterial blight in rice, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 40(6): 1094-1100 (金旭炜, 王春连, 杨清, 江祺祥, 樊颖伦, 刘古春, 赵开军, 2007, 水稻抗白叶枯病近等基因系CBB30的培育及*Xa30(t)*的初步定位, *中国农业科学*, 40(6): 1094-1100)
- Kim H.R., Choi S.R., Bae J.N., Hong C.P., Lee S.Y., Hossain M.J., Nguyen D.V., Jin M.N., Park B.S., Bang J.W., Bancroft I., and Lim Y.P., 2009, Sequenced BAC anchored reference genetic map that reconciles the ten individual chromosomes of *Brassica rapa*, *BMC Genomics*, 10: 432 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-10-432> PMID:19751531 PMCID:2761421
- Kim K.H., Kim M.Y., Van K., Moon J.K., Kim D.H., and Lee S.H., 2008, Marker-assisted foreground and background selection of near isogenic lines for bacterial leaf pustule resistant gene in soybean, *J. Crop Sci. Biotech.*, 11(4) : 263-268
- Li X., Ramchiary N., Choi S.R., Van Nguyen D., Hossain M.J., Yang H.K., and Lim Y.P., 2010, Development of a high density integrated reference genetic linkage map for the multinational *Brassica rapa* genome sequencing project, *Genome*, 53(11): 939-947 <http://dx.doi.org/10.1139/G10-054> PMID:21076509
- Melchinger A.E., 1990, Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance, *Plant Breeding*, 104(1): 1-19 <http://dx.doi.org/10.1111/j.1439-0523.1990.tb00396.x>
- Piao Z.Y., Park Y.J., Choi S.R., Hong C.P., Park J.Y., Choi Y.S., and Lim Y.P., 2002, Conversion of AFLP marker linked to clubroot resistance gene into SCAR marker, *J. Kor. Soc. Hortic. Sci.*, 43(6): 653-659
- Piao Z.Y., Deng Y.Q., Choi S.R., Park Y.J., and Lim Y.P., 2004, SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*), *Theor. Appl. Genet.*, 108(8): 1458-1465 <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-003-1577-5> PMID:14997298
- Piao Z.Y., Choi S.R., Lee Y.M., Kim H.G., and Lim Y.P., 2007, The use of molecular markers to certify clubroot resistant cultivars of Chinese cabbage, *Hort. Environ. Biotechnol.*, 48(3): 148-154
- Piao Z.Y., Wu D., Wang M., and Zhang T., 2010, Marker-assisted selection of near isogenic lines for clubroot resistant gene in Chinese cabbage, *Yuanyi Xueao (Acta Horticulturae Sinica)*, 37(8): 1264-1272 (朴钟云, 吴迪, 王淼, 张腾, 2010, 大白菜抗根肿病近等基因系的分子标记辅助选育, *园艺学报*, 37(8): 1264-1272)
- Pierre G., and Maréchal-Drouard L., 1992, Isolation of plant DNA: A fast, inexpensive, and reliable method, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 10(1): 60-65 <http://dx.doi.org/10.1007/BF02669265>
- Ramchiary N., Nguyen V.D., Li X.N., Hong C.P., Dhandapani V., Choi S.R., Yu G., Piao Z.Y., and Lim Y.P., 2011, Genic microsatellite markers in *Brassica rapa*: development, characterization, mapping, and their utility in other culti-

- vated and wild Brassica relatives, *DNA Rea.*, 18(5): 305-320 <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/dsr017> PMID:21768-136 PMID:3190952
- Suwabe K., Tsukazaki H., Iketani H., Hatakeyama K., Kondo M., Fujimura M., Nunome T., Fukuoka H., Hirai M., and Matsumoto S., 2006, Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: the genetic origin of clubroot resistance, *Genetics*, 173(1): 309-319 <http://dx.doi.org/10.1534/genetics.104.0-38968> PMID:16723420 PMID:1461432
- Tanksley S.D., Young N.D., Patterson A.H., and Bonierbale M.W., 1989, RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science, *Nat. Biotechnol.*, 7(3): 257-264 <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0389-257>
- Tanksley S.D., and Nelson J.C., 1996, Advanced backcross QTL analysis: a method for the simultaneous discovery and transfer of valuable QTLs from unadapted germplasm into elite breeding lines, *Theor. Appl. Genet.*, 92(2): 191-203 <http://dx.doi.org/10.1007/BF00223376>
- Tian Q.Z., Zhou R.H., and Jia J.Z., 2004, Molecular evaluation on the background of wheat near isogenic lines for powdery mildew resistance, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 30(3): 205-209 (田清震, 周荣华, 贾继增, 2004, 小麦抗白粉病近等基因系遗传背景分子标记检测, *作物学报*, 30(3): 205-209)
- Voorrips R.E., 1995, *Plasmodiophora brassicae*: aspects of pathogenesis and resistance in Brassica oleracea, *Euphytic*, 83(2): 139-146 <http://dx.doi.org/10.1007/BF0167-8041>
- Wang Y.G., Feng H., Lin G.R., Xu S.F., Yang K.Y., and Zhang N.J., 2005, The transfer of genetic male sterile lines in *Brassica campestris* L. ssp. *pekiensis* (L.) Makino, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 32(4): 628-631 (王玉刚, 冯辉, 林桂荣, 徐书法, 杨昆艳, 张乃嘉, 2005, 白菜核基因雄性不育系转育研究, *园艺学报*, 32(4): 628-631)
- Williams P.H., 1966, A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga, *Phytopathology*, 56: 624-626
- Young N.D., Zamir D.G., Ganai M.W., and Tanksley S.D., 1988, Use of isogenic lines and simultaneous probing to identify DNA markers tightly linked to the *Tm-2a* gene in tomato, *Genetics*, 120: 579-585 PMID:17246482 PMID:1203534
- Zhang R., Wang Y., Liu X.Y., Wang Z.Y., Peng Y.K., Xie C.J., and Yang Z.M., 2010, Molecular evaluation on the background of wheat Brock near isogenic lines for powdery mildew resistant, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 43(15): 3059-3066 (张荣, 王轶, 刘晓颖, 王振英, 彭永康, 解超杰, 杨作民, 2010, 小麦Brock抗白粉病基因近等基因系的培育与分子检测, *中国农业科学*, 43(15): 3059-3066)
- Zhang Y., Li Y.F., Xie R., Yang Z.L., Zhong B.Q., Shen F.C., Tan Z.J., and He G.H., 2006, Development of NILs with Cl-gene of rice restorer and evaluation on the near isogenic level, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 32(3): 397-401 (张毅, 李云峰, 谢戎, 杨正林, 钟秉强, 沈福成, 谭自俊, 何光华, 2006, 水稻小穗簇生性近等基因系的构建及其近等性评价, *作物学报*, 32(3): 397-401)