

大白菜抗根肿病近等基因系的分子标记辅助选育

朴钟云*, 吴迪, 王淼, 张腾

(沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110866)

摘要: 以具有抗根肿病基因 *CRb* 的大白菜 ‘CR Shinkii DH’ 系为抗源, 通过分子标记辅助选择选育出大白菜优良自交系 ‘BJN3’ 的 9 份抗根肿病近等基因系。通过 *CRb* 基因侧翼标记 TCR01 和 TCR09 的前景选择, 以及 51 个 SSR 标记的基因组背景选择, 筛选出 ‘BJN3’ 基因组含量为 98% 的 10 株纯合抗性 BC₃F₂ 个体。苗期的根肿病接菌试验证明这些 BC₃F₂ 植株均表现出抗性。从 10 株纯合抗性 BC₃F₂ 个体自交后代中, 筛选出全部恢复 ‘BJN3’ 基因组的 9 株近等基因系。这些近等基因系的结球相关性状与 ‘BJN3’ 无显著差异。

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

中图分类号: S 634.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 08-1264-09

Marker-assisted Selection of Near Isogenic Lines for Clubroot Resistant Gene in Chinese Cabbage

PIAO Zhong-yun*, WU Di, WANG Miao, and ZHANG Teng

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: Clubroot disease is one of the most serious diseases in Chinese cabbage. In this study, nine near isogenic lines (NILs) were developed from backcross of clubroot susceptible ‘BJN3’ × clubroot resistant ‘CR Shinkii DH’ line through marker-assisted selection (MAS). Based on the foreground selection with TCR01 and TCR09 flanking the *CRb* gene and genomic background selection with 51 SSRs, 10 homozygous resistant BC₃F₂ individuals recovering 98% of ‘BJN3’ genome were obtained. Results from inoculation of these BC₃F₂ individuals indicated that they were resistance to clubroot disease. By further selfing of BC₃F₂ individuals, nine BC₃F₃ individuals with full genome content of ‘BJN3’ were developed. Evaluation of heading related traits showed that there were no significant difference between the NILs and ‘BJN3’.

Key words: Chinese cabbage; clubroot disease; *CRb* gene; marker-assisted selection; near isogenic line

收稿日期: 2010-05-12; 修回日期: 2010-06-30

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771468); 辽宁省博士启动基金项目 (20051052); 辽宁省教育厅科学技术研究项目 (2008S208)

* E-mail: zypiao@syau.edu.cn

根肿病是由芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woron.) 侵染引起的一种专性寄生的世界性病害。根肿病引起大白菜等十字花科植物根部出现肿瘤, 并进而导致植株萎蔫、叶片发黄等症状 (Karling, 1968)。由于根肿菌的寿命长达 7 年以上 (Wallenhammar, 1996), 严重影响到大白菜的栽培。随着我国大白菜根肿病侵染面积的急剧增加, 迫切需要选育出适合我国大白菜产区的抗根肿病品种。

分子标记辅助选择 (marker-assisted selection, MAS) 不受环境条件的限制, 可在植物发育的任何时期从 DNA 分子水平上进行 (Tanksley, 1989)。它克服了传统植物抗病育种周期长、不确定性、受环境条件限制等缺陷。Melchinger (1990) 指出将基于分子标记的前景选择和背景选择应用于回交育种, 可以显著提高育种效率。前景选择是指利用目标基因紧密连锁分子标记跟踪选择具有目标区域的单株, 而背景选择则是应用覆盖全基因组的分子标记选择在多个标记位点上具有轮回亲本相同基因型的单株 (Matthias et al., 1999)。

迄今, 共有 8 个抗根肿病基因定位于大白菜不同连锁群 (Hirai et al., 2004; Piao et al., 2004; Suwabe et al., 2006; Hayashida et al., 2008; Sakamoto et al., 2008)。Piao 等 (2004) 利用两个侧翼标记 TCR01 和 TCR09, 将对根肿病菌生理小种 2、4 和 8 表现抗性的 *CRb* 基因定位于 A3 连锁群, 标记间的遗传距离为 2.9 cM。Piao 等 (2007) 证实共显性标记 TCR01 能够准确鉴定出纯合抗性植株。此外, 大量 SSR 锚定标记的开发和定位为进行基因组背景选择奠定了基础 (Suwabe et al., 2006; Choi et al., 2007)。

本研究旨在通过目标基因的背景选择和轮回亲本基因组的前景选择, 选育出抗根肿病的大白菜 ‘BJN3’ 的优良近等基因系, 为培育大白菜抗根肿病杂交品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供体亲本 ‘CR Shinkii DH’ 系和轮回亲本 ‘BJN3’ 由沈阳农业大学大白菜课题组提供。‘CR Shinkii DH’ 系叶面具有毛刺, 晚抽薹, 对根肿菌生理小种 2、4 和 8 表现为抗性 (Piao et al., 2004)。“BJN3” 叶片无毛刺, 早抽薹, 对根肿病表现为感病。

供试所用根肿菌为单孢子, 保存于沈阳农业大学大白菜课题组 -20℃ 冰箱。该菌经 ‘Williams’ 方法鉴定为生理小种 4 (Williams, 1966)。

1.2 技术路线

试验在沈阳农业大学百草园日光温室进行。以感病亲本 ‘BJN3’ 为母本, 抗病亲本 ‘CR Shinkii DH’ 系为父本配制杂交组合, 收取杂交种 F_1 。以 ‘BJN3’ 为轮回亲本连续回交, 获得回交后代群体。

在以上各世代群体中, 根据 *CRb* 基因侧翼标记 TCR01 和 TCR09 的前景选择, 选择具有 *CRb* 的杂合单株。从 BC_2 起进行基因组背景选择, 筛选 ‘BJN3’ 基因组含量高且具有 *CRb* 基因的单株用于回交。

整个改良过程包括 1 次杂交获得 F_1 , 3 次回交和 2 次自交, 最后获得抗根肿病的 ‘BJN3’ 近等基因系。在 BC_3F_2 代进行抗病性鉴定, 对 BC_3F_3 代进行农艺性状调查。

MAS 选育技术路线如图 1。

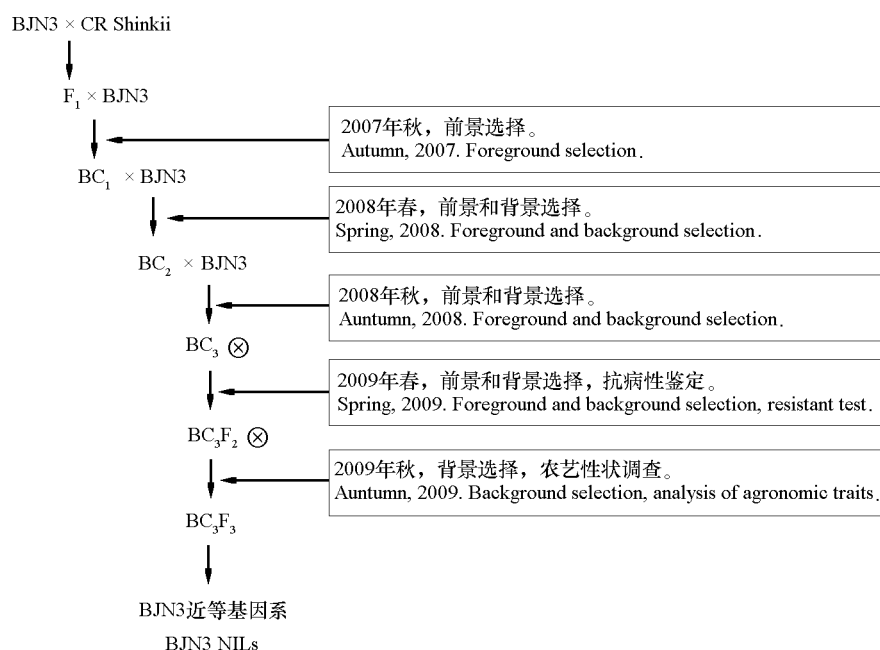


图 1 分子标记辅助选择选育抗根肿病大白菜近等基因系的技术路线图

Fig. 1 Schematic diagram of MAS to develop clubroot resistant near isogenic lines of Chinese cabbage

1.3 基因组 DNA 的提取

采集亲本、BC₁ 94 株、BC₂ 65 株、BC₃ 159 株、BC₃F₂ 104 株以及 BC₃F₃ 180 株的幼嫩叶片, 采用改良 SDS 法微量提取单株 DNA。用分光光度计测定 DNA 浓度。

1.4 *CRb* 基因的前景选择

利用 *CRb* 基因的侧翼标记 TCR01 和 TCR09 分析亲本间的多态性。多态性的 TCR01 和 TCR09 应用于各世代的前景选择, 选择兼具抗病带型 (‘CR Shinkii DH’ 系带型) 的植株用于回交。TCR01 和 TCR09 的 PCR 反应体系采用 Piao 等 (2004) 的方法。TCR09 扩增产物用 1.5% 琼脂糖电泳分离, 溴化乙锭显色。TCR01 扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染显色。

1.5 回交世代的 ‘BJN3’ 基因组背景选择

根据大白菜框架遗传图谱 (Choi et al., 2007), 选择分布于大白菜 10 条连锁群上的 202 个 SSR 标记进行亲本间的多态性分析。SSR 扩增采用 10 μL 反应体系, 包括 15 ng 模板 DNA、5 pmol · L⁻¹ 上下游引物、0.25 mmol · L⁻¹ dNTP、1 × PCR 缓冲液、0.5 U *Taq* (北京天根生化生物科技有限公司)。PCR 程序采用 Choi 等 (2007) 方法。扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染检测。

从多态性标记中, 筛选出均匀分布于大白菜基因组的 51 个 SSR 标记, 应用于 BC₂ 及其以后世代的基因组背景分析。根据基因组背景分析, 在每个世代选择 ‘BJN3’ 基因组含量高的单株用于回交或自交。具体过程是首先选择遗传距离大、覆盖全基因组的 24 个 SSR 标记分析 BC₂ 单株的基因组背景, 然后利用在 BC₂ 单株中表现为杂合的 SSR 标记以及其余的 27 个 SSR 标记分析 BC₃ 单株, 最后通过 BC₃ 单株的自交筛选出与 ‘BJN3’ 基因组完全相同的个体, 即为抗根肿病的 ‘BJN3’ 近等基因系。

基因组含量 (%) = SSR 标记位点纯合数 / SSR 标记总数 × 100。平均基因组含量是指群体中各个体的基因组含量的平均值。轮回亲本基因组含量期望值 = (1 - 1/2^{r+1}) × 100%, 式中 r 为回交次

数。

1.6 根肿病抗性鉴定

2009 年 1 月 25 日, 将 ‘BJN3’ 和 ‘CR Shinkii DH’ 系各 25 粒种子, 2 株 BC₃ 代自交种子各 57 和 79 粒播种于 50 孔穴盘。出苗后 3 d 采用灌根法 (接种根肿病菌孢子浓度为 $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$) 进行抗性鉴定。土壤保持湿润, 温度不低于 10℃。接菌 6 周后, 洗净根部泥土, 按 0~3 级标准调查单株发病情况。0 级为抗病, 其他均为感病。分级标准为: 0 级, 根部无肿瘤; 1 级, 侧根有轻微肿瘤; 2 级, 侧根有较大肿瘤或主根有节状小瘤; 3 级, 主侧根有明显肿瘤 (Buczacki et al., 1975)。抗病性鉴定在沈阳农业大学百草园温室进行。

1.7 主要农艺性状调查

2009 年 8 月 10 日, 将 BC₃F₃ 家系和 ‘BJN3’ 发芽种子在 4℃ 下进行低温春化处理。20 d 后定值于沈阳农业大学百草园温室。调查近等基因系从播种到抽薹后主茎上第 1 朵花开放所需要的天数, 即开花期。

2009 年 7 月 26 日, 将 BC₃F₃ 家系和 ‘BJN3’ 播种于 50 孔穴盘。20 d 后定值于沈阳农业大学试验基地, 正常种植和管理。每个家系和 ‘BJN3’ 定值 25 株, 收获期随机选取 5 株, 调查全株质量, 外叶数, 叶球质量、直径和高度, 内叶数, 营养茎的茎高和基部直径等结球相关性状。叶片向内弯曲未达到球宽一半的叶片数计为外叶数。利用 DPS 软件分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 亲本间多态性标记的筛选

抗根肿病基因 *CRb* 的 2 个侧翼连锁标记 TCR01 和 TCR09 在 ‘BJN3’ 和 ‘CR Shinkii DH’ 间表现出多态性, 表明这 2 个标记可以应用于 *CRb* 的前景选择 (图 2)。

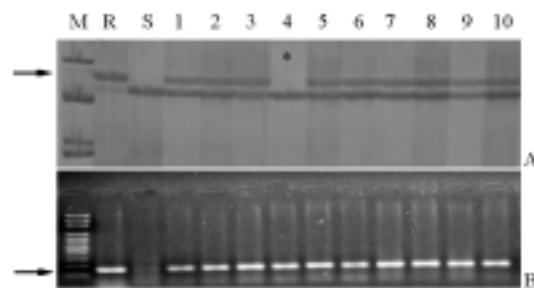


图 2 部分 BC₂ 个体的 TCR01 (A) 和 TCR09 (B) 基因型

M: DL 1500; R: CR Shinkii DH 系; S: BJN3; 1~10: BC₂ 群体的不同个体;
星号所示为重组体; 箭头所示为与 *CRb* 基因连锁的抗病带型。

Fig. 2 Genotypes of TCR01 (A) and TCR09 (B) in part of BC₂ individuals

M: DL 1500; R: CR Shinkii DH line; S: BJN3; 1–10: Ten individuals of BC₂ population. Asterisk indicates the recombinant. The markers linked to the *CRb* gene are shown by arrows.

在分布于大白菜 10 条连锁群的 202 个 SSR 标记中, 筛选出亲本间多态性标记 100 个, 多态性比率为 49.5%。根据标记在每条连锁群的位置, 选择分布均匀、覆盖大白菜基因组的 51 个 SSR 标记用于基因组背景分析。其中分布于连锁群 A1 的有 6 个, A2 的 4 个, A3 的 5 个, A4 的 4 个, A5、A6 和 A7 的各 5 个, A8 的 6 个, A9 的 7 个, A10 的 4 个。这些 SSR 标记覆盖的遗传距离为 981.1 cM,

平均间隔为 12.96 cM。51 个 SSR 标记中,选择 24 个用于 BC₂ 的背景选择,其余 27 个用于 BC₃ 的选择。

2.2 *CRb* 基因的前景选择和各世代的基因组背景选择

2.2.1 BC₁ 的选择

从 BC₁ 代 94 株个体中,筛选出具有 TCR01 抗病带型的 56 株,TCR09 带型的 54 株,选择出兼具 TCR01 和 TCR09 抗病带型的 52 株个体(表 1)。随机选择其中的 10 株个体进行回交,获得 BC₂ 代种子。

表 1 各回交世代的分子标记辅助选择结果
Table 1 Marker-assisted selection in different backcross generations

世代 Generation	前景选择 Foreground selection			背景选择 Background selection			选择株数及用途 Number of selected plants and their utility
	检测株数 Number of plants tested	鉴定标记 Markers screened	兼具抗病带型株数 Number of plants with both markers	检测株数 Number of plants tested	SSR 标记数 Number of SSRs	杂合标记最少株数 Number of plants with minimal heterozygous marker loci	
BC ₁	94	TCR01 TCR09	52	—	—	—	10, 回交 10, Backcross
BC ₂	65	TCR01 TCR09	22	22	24	1 (2)	1, 回交 1, Backcross
BC ₃	159	TCR01	78	44	2	12 (0)	2, 自交、抗病性鉴定
		TCR09		12	27	4 (2)	2, Selfing, resistant test
BC ₃ F ₂	104	TCR01	35	20	2	3 (1)	10, 自交、性状分析
		TCR09		15	2	7 (1)	10, Selfing, trait analysis
BC ₃ F ₃	—	—	—	180	1	9 (0)	9, 近等基因系 9, Near isogenic lines

注:括号中数字表示杂合标记数;—:未分析。

Note: The number in parentheses is the number of heterozygous marker loci; —: Not analyzed.

2.2.2 BC₂ 的选择

为提高选择效率,以与 *CRb* 独立遗传的毛刺性状为形态学标记进行选择。调查源于 10 株 BC₁ 回交后代的 201 个单株,发现有 65 株叶面表现为无毛刺(表 1)。利用 *CRb* 的连锁标记 TCR01 和 TCR09 对这 65 株植株依次进行前景分析,筛选出兼具两个抗病带型的 BC₂ 植株 22 株(表 1)。

部分 BC₂ 单株的 TCR01 和 TCR09 基因型检测结果如图 2 所示。图 2 中植株 4 在 TCR01 和 TCR09 位点分别扩增出感病和抗病带型。该个体可能是由于 TCR09 与 *CRb* 基因间交换而成的重组体。Piao 等(2004)的研究结果表明在 143 株 F₂ 群体中未检测出 TCR01 与 *CRb* 基因间发生重组的感病植株。

选用 24 个 SSR 标记对 22 株 BC₂ 植株的基因组背景进行分析,1 株(编号为 B1)存在两个杂合位点,‘BJN3’的基因组含量为 91.7%;有 3 株(B2, B3, B4)在 3 个 SSR 位点表现杂合,基因组含量达到 87.5%;有 1 株(B0)达到纯合,但早期死亡(图 3)。

供试 BC₂ 代群体的平均基因组含量为 77.5%,低于回交 2 次的期望值(87.5%);‘BJN3’基因组含量超过 87.5%的个体占供试群体数的 22.7%。选择 B1 用于回交,并对其回交后代进行了前景和背景分析(表 1)。

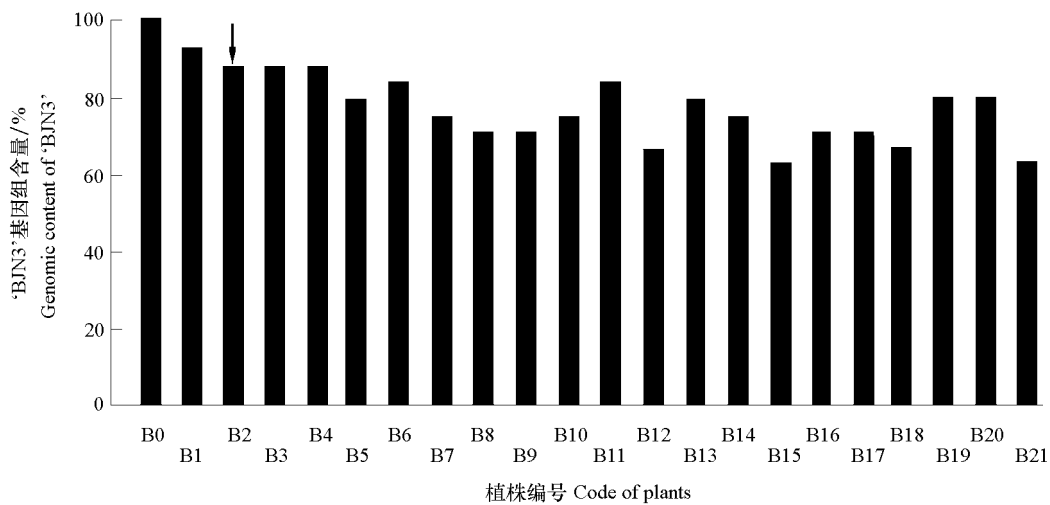


图3 BC₂代22个单株的‘BJN3’基因组含量

箭头所示为回交两次轮回亲本基因组含量期望值。

Fig. 3 ‘BJN3’ genomic content of 22 BC₂ plants

The arrow indicates the expected value of genome content of recurrent parent in BC₂ generation.

2.2.3 BC₃的选择

调查B1的回交后代BC₃个体159株,发现所有个体均表现为无毛刺。该结果与Zhang等(2009)无毛刺对有毛刺为隐性性状的结论一致。依次利用*CRb*基因连锁标记TCR01和TCR09鉴定159株个体基因型,筛选出兼具两个抗病带型的78个植株(表1)。选择开花期和植株形态与‘BJN3’相近的44株进行基因组背景分析。

利用在BC₂表现杂合的两个SSR标记进行背景选择,筛选出标记位点达到纯合的BC₃个体12株(表1)。

另选用27个SSR标记对这12株BC₃个体基因组背景进行分析,有4个单株(编号为J1~J4)在25个SSR位点恢复了轮回亲本‘BJN3’基因组,而在2个位点表现为杂合(表1);有4个单株在3个SSR位点为杂合,4个个体存在3个以上的杂合位点;‘BJN3’基因组平均含量为93.31%,‘BJN3’基因组含量超过回交3次期望值(93.8%)的个体占供试群体数的66.7%。

为获得*CRb*以及两个SSR标记位点纯合的近等基因系,选择‘BJN3’基因组含量最高的J1和J2进行自交获得BC₃F₂。J1在大白菜连锁群A3的cnu_117和A10的cnu_35两个SSR位点表现出杂合,J2在A3的cnu_117和A4的NA10D09两个SSR位点存在杂合。

2.2.4 抗病性鉴定及*CRb*基因前景选择的验证

BC₃F₂的单株选择是在根肿菌抗感性鉴定基础上进行的。

在根肿病菌接种6周后,观察根肿病发病情况。

供试‘BJN3’25株全部感病,发病程度均为3级。供试‘CR Shinkii DH’系25株全部抗病。

BC₃代单株J1的自交群体,46株表现为抗病,11株为感病,其中1株表现为1级感病;BC₃代单株J2的自交后代,抗病植株58株,感病植株21株,其中1株为1级感病(表2)。1级感病植株可能是由于后期染病而引起的。经适合性测验均符合3:1的分离比例,进一步证明抗根肿病基因*CRb*为显性单基因。

表 2 BC_3F_2 分离群体根肿病抗性鉴定分析Table 2 Segregation analysis of clubroot resistance in the BC_3F_2 populations

自交群体 Selfed Population	株数 Number of plants	抗病株数 Number of resistant plants	感病株数 Number of susceptible plants	标记 Marker	具有标记基因型的 BC_3F_2 个体数 Number of BC_3F_2 plants with the marker genotype		
					纯合抗病带型 Homozygous resistant banding pattern	杂合抗病带型 Heterozygous resistant banding pattern	纯合感病带型 Homozygous susceptible banding pattern
J1	57	46	11	TCR01	20	23	3
				TCR09	46		0
J2	79	58	21	TCR01	15	43	0
				TCR09	58		0

注：具有标记基因型的 BC_3F_2 个体数是指 BC_3F_2 群体中具有纯合和杂合 TCR01 标记基因型的植株数量。TCR09 基因型的数量为具有纯合和杂合抗病带型的个体数。

Note: The number of BC_3F_2 plants showing homozygosis and heterozygosis for the marker genotype. The numbers for TCR09 are the total number of individuals with homozygous and heterozygous banding pattern.

CRb 基因的前景分析结果, 所有抗病植株的 TCR09 标记位点基因型与接菌试验结果一致(表 2)。通过 TCR01 标记的前景分析, 从 J1 和 J2 的抗病植株中, 分别筛选出 20 和 15 株具有纯合抗病带型的个体(表 2, 图 4)。J2 自交群体的抗病性鉴定结果与 TCR01 的一致。在 J1 自交群体中, 3 株的 TCR01 基因型与接菌试验结果相反。这些个体可能是抗病性鉴定时没有发病的感病个体, 或者是交换而引起的重组体。Piao 等(2004)发现 TCR01 检测为感病的单株后代, 根肿病抗性鉴定为全部感病的现象。

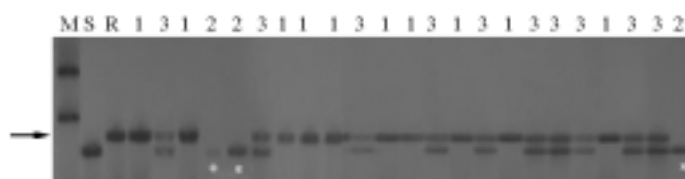


图 4 部分 J1 自交群体的 TCR01 基因型

M: DL 1500; S: BJN3; R: CR Shinkii DH 系; 1: 抗病带型; 2: 感病带型; 3: 杂合带型。

箭头所示为与 *CRb* 基因连锁的抗病带型。星号表示具有感病带型, 但表现为抗性的个体。

Fig. 4 Genotypes of TCR01 in part of J1 selfed individuals

M: DL 1500; S: BJN3; R: CR Shinkii DH line; 1: Resistant banding pattern; 2: Susceptible banding pattern;

3: Heterozygous banding pattern. The markers linked to the *CRb* gene are shown by arrow.

Asterisks indicate the individuals showing susceptible banding pattern, but resistant to clubroot disease.

2.2.5 BC_3F_2 和 BC_3F_3 的选择

为获得所有 SSR 位点与 ‘BJN3’ 一致的近等基因系, BC_3 代植株 J1 和 J2 进行自交, 并利用两个杂合位点 SSR 标记对自交群体进行基因组背景分析。用于基因组背景分析的自交群体为具有纯合抗病带型的抗病植株, J1 的自交群体有 20 株, J2 的有 15 株(表 1, 表 2)。分析表明 J1 和 J2 的所有植株均未达到纯合, J1 中有 3 株(编号为 N1 ~ N3)在 SSR 标记 *cnu_117* 或 *cnu_35* 的 1 个位点表现为杂合, J2 中有 7 株(编号为 N3 ~ N10)在 *cnu_117* 或 NA10D09 的 1 个位点表现为杂合(表 1)。这些植株自交分别获得 BC_3F_3 代种子。

利用存在 1 个杂合位点的 SSR 标记对 N1 ~ N10 的自交群体 BC_3F_3 代 180 株进行背景检测, 从 N2、N7 和 N9 自交后代中筛选获得 9 个全部恢复 ‘BJN3’ 基因组的纯合抗病近等基因系(表 1), 分别编号为 CR ‘BJN3-1’ ~ CR ‘BJN3-9’。

2.3 近等基因系的主要农艺性状

调查 9 株近等基因系和对照 ‘BJN3’ 的开花期表明，近等基因系的开花期为 77 ~ 79 d，比对照延迟 5 ~ 7 d。这可能是 ‘CR Shinkii DH’ 系的控制晚抽薹性状的基因转入了近等基因系。

从存在 1 个 SSR 标记杂合位点的 10 个 BC₃F₂ 株系中，选择获得纯合抗病近等基因系最多的编号为 N2、N7 和 N9 的自交后代种植。以 ‘BJN3’ 为对照，考察结球相关性状，结果见表 3。N2、N7 和 N9 的自交后代除全株质量外，各性状与对照无显著差异，表明通过 MAS 选育的近等基因系恢复了轮回亲本 ‘BJN3’ 的主要农艺性状。

表 3 ‘BJN3’ 与 BC₃F₃ 个体的结球相关性状的比较
Table 3 Comparison of the heading related traits between ‘BJN3’ and BC₃F₃ generation

供试群体 Population tested	全株质量/ kg Total weight of plant	外叶数 Number of outer leaves	内叶数 Number of inner leaves	叶球质量/ kg Heading weight	叶球高度/ cm Heading height	叶球直径/ cm Heading diameter	茎高/ cm Stem height	茎直径/ cm Stem diameter
BJN3	2.47 ± 0.46A	21 ± 0.56A	31 ± 0.77A	1.12 ± 0.21A	34.60 ± 0.91A	15.30 ± 1.11A	3.82 ± 0.70A	1.76 ± 0.23A
N2	1.98 ± 0.32AB	25 ± 0.49A	35 ± 0.97A	1.16 ± 0.31A	29.00 ± 0.87A	13.50 ± 1.04A	3.95 ± 0.83A	1.91 ± 1.17A
N7	1.98 ± 0.35AB	22 ± 0.59A	34 ± 0.86A	1.03 ± 0.11A	29.60 ± 0.82A	14.00 ± 1.01A	4.15 ± 0.91A	1.98 ± 0.15A
N9	2.92 ± 0.47AB	20 ± 0.47A	33 ± 1.01A	1.26 ± 0.21A	35.00 ± 0.91A	13.90 ± 1.32A	3.90 ± 0.82A	1.88 ± 0.19A

注：供试群体为 N2、N7 和 N9 的自交群体。表中数据为平均值 ± 标准误，同列数据后不同大写英文字母表示差异极显著 ($P = 0.01$)。
Note : Population tested are from selfed progeny of N2 , N7 and N9. The data are means ± standard errors. Values followed by a different capital letter are significantly different at 1% probability level.

3 讨论

十字花科植物根肿病的人工接菌抗病性鉴定受外界条件影响较大 (Piao et al., 2004)。Piao 等 (2007) 利用来自韩国和日本的大白菜抗根肿病品种，发现 *CRb* 的两个侧翼标记 TCR01 和 TCR09 能够有效应用于分子标记辅助选择。本研究应用该标记在未进行抗病性鉴定的前提下，对各回交世代进行了前景选择。BC₃F₂ 群体的苗期接菌试验证明 TCR01 和 TCR09 的前期选择是有效而准确的。

本研究中所用的轮回亲本 ‘BJN3’ 叶片无毛刺，而 ‘CR Shinkii DH’ 系有毛刺。有研究证明大白菜控制叶片毛刺有无的基因定位于 A6 (Zhang et al., 2009)。因此，定位于 A3 连锁群的 *CRb* 基因 (Piao et al., 2009) 与叶片毛刺基因是独立遗传的两个位点。这就为利用该形态学标记进行单株选择提供了理论依据。本研究首先利用毛刺形态学标记对回交 2 代群体进行单株选择，然后在同一世代通过 MAS 的进一步选择，实现了提高选择效率的目的。

Kim 等 (2008) 发现在各回交世代只进行前景选择，最后对 BC₃F₃ 进行背景选择，轮回亲本的基因组含量最高达到 93.3%。本研究在前景选择的基础上，从回交 2 代起进行了 ‘BJN3’ 的基因组背景选择。结果证明通过前景选择的 BC₂ 群体的 ‘BJN3’ 基因组平均含量为 77.5%，远低于回交 2 代的期望值 (87.5%)。但通过轮回亲本基因组的背景选择，即可筛选出基因组含量为 91.7%，甚至达到 100% 的个体。选择高基因组含量的 BC₂ 单株用于回交，并用其他 SSR 标记进行 BC₃ 群体的背景分析，发现最高基因组含量达到 96.1%，接近于回交 4 代的个体。24 个 SSR 以及 51 个 SSR 分别应用于 BC₂ 和 BC₃ 群体的背景分析结果表明，BC₂ 群体中 ‘BJN3’ 基因组含量超过期望值的个体只占供试群体数的 22.7%，但 BC₃ 群体中基因组含量超过期望值 (93.8%) 的个体占供试群体数的 66.7%。该结果证明在每个回交世代选择高基因组含量的个体，用于下个世代可以显著提高轮回亲本的基因组含量 (Frisch et al., 1999)。此外，随着世代的进展，分批利用标记进行背景选择可以有

效的提高选择效率。

References

- Buczacki S T , Toxopeus H , Mattusch P , Johnston T D , Dixon G R , Hobolth G R. 1975. Study of physiological specialization in *Plasmodiophora brassicae* : Proposals for attempted rationalisation through an international approach. *Trans Br Mycol Soc* , 65 : 295 – 303.
- 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 , Lydiate D J , Batley J , Edwards D , Koo D H , Bang J W , Park B S , Lim Y P. 2007. The reference genetic linkage map for the multinational *Brassica rapa* genome sequencing project. *Theor Appl Genet* , 115 : 777 – 792.
- Frisch M , Bohn M , Melchinger A E. 1999. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of a gene. *Crop Sci* , 39 : 1295 – 1301.
- Hayashida N , Takabatake Y , Nakazawa N , Aruga D , Nakanishi H , Taguchi G , Sakamoto K , Matsumoto E. 2008. Construction of a practical SCAR marker linked to clubroot resistance in Chinese cabbage with intensive analysis of *HC352b* genes. *J Jpn Soc Hortic Sci* , 77 : 150 – 154.
- Hirai M , Harada T , Kubo N , Tsukada M , Suwabe K , Matsumoto S. 2004. A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers. *Theor Appl Genet* , 108 : 639 – 643.
- Karling J S. 1968. *The Plasmodiophorales*. New York : Hafner Publishing : 239.
- Kim K H , Kim M Y , Van K , Moon J K , Kim D H , 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.
- Matthias F , Martin B , Melchinger A E. 1999. Comparison of selection strategies for marker-assisted backcrossing of gene. *Crop Sci* , 39 : 1295 – 1301.
- Melchinger A E. 1990. Use of molecular markers in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breed* , 104 : 1 – 19.
- Piao Z Y , Deng Y Q , Choi S R , Park Y J , 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 : 1458 – 1465.
- Piao Z Y , Choi S R , Lee Y M , Kim H G , Lim Y P. 2007. The use of molecular markers to certify clubroot resistant(CR)cultivars of Chinese cabbage. *Hort Environ Biotechnol* , 48 (3) : 148 – 154.
- Piao Z Y , Ramchiary N , Lim Y P. 2009. Genetics of clubroot resistance in *Brassica* species. *Plant Growth Regul* , 28 : 252 – 262.
- Sakamoto K , Saito A , Hayashida N , Taguchi G , Matsumoto E. 2008. Mapping of isolate-specific QTLs for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) . *Theor Appl Genet* , 117 : 759 – 767.
- Suwabe K , Tsukazaki H , Iketani H , Hatakeyama K , Kondo M , Fujimura M , Nunome T , Fukuoka H , Hirai M , Matsumoto S. 2006. Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana* : The genetic origin of clubroot resistance. *Genetics* , 173 : 309 – 319.
- Tanksley S D , Young N D , Patterson A H , Bonierbale M W. 1989. RFLP mapping in plant breeding : New tools for an old science. *Bio/Technology* , 7 : 257 – 263.
- Wallenhammar A C. 1996. Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. *Plant Pathol* , 45 : 710 – 719.
- Williams P H. 1966. A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. *Phytopathology* , 56 : 624 – 626.
- Zhang J , Lu Y , Yuan Y , Zhang X , Geng J , Chen Y , Cloutier S , McVetty P B E , Li G. 2009. Map-based cloning and characterization of a gene controlling hairiness and seed coat color traits in *Brassica rapa*. *Plant Mol Biol* , 69 : 553 – 563.