

不结球白菜抗根肿病渐渗系的分子辅助选育

陈龙正,徐海,宋波,袁希汉*

(江苏省农业科学院 蔬菜研究所,南京 210014)

摘要:该研究基于与大白菜抗根肿病连锁的分子标记,设计特异引物,获得简便实用的 SCAR 标记,并用于分子标记辅助选择,创制不结球白菜抗根肿病新材料。结果发现,在设计的 8 对特异引物中,有 1 对特异引物在抗、感亲本间表现出多态性。 F_2 群体验证发现,该标记与已有 SSR 标记及根肿病抗性共分离,能够用于抗根肿病鉴定,定名为 CRb-R-25。通过亚种间杂交并回交,利用标记 CRb-R-25 辅助选择将大白菜根肿病抗性转入不结球白菜中,获得抗根肿病不结球白菜渐渗系材料 TQ14-1-15。

关键词:不结球白菜;抗根肿病;SCAR 标记;辅助选择

中图分类号:Q789 文献标志码:A

Marker-assisted Breeding of Clubroot Resistant Introgression Line in Non-heading Chinese Cabbage

CHEN Longzheng, XU Hai, SONG Bo, YUAN Xihan*

(Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: We designed SCAR markers according to the markers linked to clubroot resistant gene in Chinese cabbage, in order to develop the new clubroot resistant materials of non-heading Chinese cabbage through marker-assisted selection (MAS). The results indicated that one pair primer among 8 showed polymorphism between parents of resistant and susceptible, and co-segregation with reported SSR marker and resistant characterization of F_2 , suggested that it could be used to identify the clubroot resistance, named CRb-R-25. Based on the inter-subspecies hybrid, backcross and selection of CRb-R-25, TQ14-1-15 with clubroot resistance of non-heading Chinese cabbage was bred by introgression of resistance gene in Chinese cabbage.

Key words: non-heading Chinese cabbage; clubroot resistance; SCAR; marker assisted-selection

不结球白菜 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*) 起源于中国,是国内尤其是南方重要的绿叶菜之一。根肿病是由芸薹根肿菌 (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) 侵染引起的一种世界性病害。以往关于抗根肿病的研究主要集中在大白菜和甘蓝上^[1-2],近年来,由于不结球白菜栽培效益好,复种指数高,土传病害逐渐成为制约不结球白菜发展的重要因素,根肿病由过去不常见的病害逐渐显露出来,并呈蔓延趋势。然而,由于不结球白菜抗根肿病相关研究起步较晚,目前国内外还未发现不结球白菜根

肿病抗源。通过种间或亚种间渐渗杂交可以为育种提供新的种质资源,目前已在多种作物上建立起了不同类型的渐渗系,如小麦^[3]、棉花^[4]、水稻^[5]、玉米^[6]等主要大田作物,在这些作物上已经获得能够直接用于作物品种改良的遗传稳定的渐渗系。

大白菜与不结球白菜之间的亚种间杂交亲和性较高,因此,可通过将大白菜抗根肿病基因导入不结球白菜,提高不结球白菜根肿病抗性。但是,一方面种间杂交往往导致性状的剧烈分离而不易选择,另一方面由于根肿病为土传病害,易受环境影响,不易

收稿日期:2015-05-05;修改稿收到日期:2015-06-10

基金项目:江苏省自然科学基金(BK20130715);农业部公益性行业(农业)科研专项(201403032)。

作者简介:陈龙正(1980—),男,博士,副研究员,主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail: lzchen@jaas.ac.cn

* 通信作者:袁希汉,研究员,主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail: xhyuan258@163.com

控制,接种鉴定比较困难。因此,开发抗根肿病特异分子标记,对提高育种效率,开展分子标记辅助育种具有重要意义。Piao 等^[7]利用 SSR 标记 TCR01 和 TCR09,将抗根肿病 *CRb* 基因定位在大白菜 A3 连锁群并且标记间遗传距离为 2.9 cM。陈慧慧等^[8]根据 Piao 等^[7]的研究开发了 2 个大白菜 SSR 标记,分别为 TCR13 和 TCR74,标记间遗传距离为 0.18 cM,这些研究为大白菜抗根肿病分子标记辅助育种提供了理论基础。本研究利用携带 *CRb* 基因的大白菜种质,与不结球白菜进行亚种间杂交和回交,通过已有的 SSR 标记设计特异引物,以期获得更为简便快速的 SCAR 标记应用于分子标记辅助选择,同时结合大白菜与不结球白菜亚种间杂交创制不结球白菜抗根肿病新种质。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供体母本为携带 *CRb* 基因的大白菜材料 CCR13025,对根肿病表现为高抗,从云南省农业科学院蔬菜研究所引进。父本材料‘T 青’,为江苏省农业科学院蔬菜研究提供。2011 年春,将双亲及 F_1 代种植于江苏省农业科学院蔬菜研究所实验田。 F_1 代自交获得 F_2 ,用于标记准确性鉴定。以‘T 青’为轮回亲本连续回交,从 BC_1 代开始,根据分子标记进行选择,选择性状接近轮回亲本并且含有 *CRb* 基因的单株用于回交,获得回交后代群体 BC_3 。

1.2 方法

1.2.1 各世代植株抗性鉴定 ‘T 青’、CCR13025、 F_1 、 F_2 及 BC_1 ~ BC_3 。每个材料每次 30 株,3 次重复,随机排列,播种于 50 孔穴盘。接种方法及评价分级标准同张慧等^[9]。

1.2.2 多态性标记开发 在大白菜基因数据 http://brassicadb.org/cgi-bin/gbrowse/Brassica_v1.5 中定位 2 个 SSR 标

v1.5 中定位已报道的 2 个 SSR 标记 TCR13(上游 0.09 cM)和 TCR74(下游 0.09 cM)^[8],获得物理区域为 A3 染色体 Bra23787138~Bra23847142 之间,在该区间中间设计了 8 对特异引物(表 1),委托上海生物工程公司进行引物的合成。

1.2.3 PCR 扩增 采用 CTAB 法提取幼嫩叶片 DNA。利用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测其完整性和纯度,用紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度,并稀释至 15 ng/ μ L。

20 μ L 反应体系中含 1×PCR 缓冲液、2.0 mmol/L MgCl₂、2.0 mmol/L dNTP、15 ng DNA、2 条引物各 0.5 μ mol/L,1U *Taq* 酶,用 ddH₂O 补足。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 30 s,53 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 2 min;40 个循环,72 °C 保温延伸 5 min,4 °C 下保存。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,在培清凝胶图像分析系统中拍照记录。扩增反应在 PTC-100 PCR 仪上进行。

2 个 SSR 标记 TCR13 和 TCR74 反应体系及扩增程序参考陈慧慧等^[8],扩增产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染色。

2 结果与分析

2.1 抗根肿病 SCAR 分子标记的开发

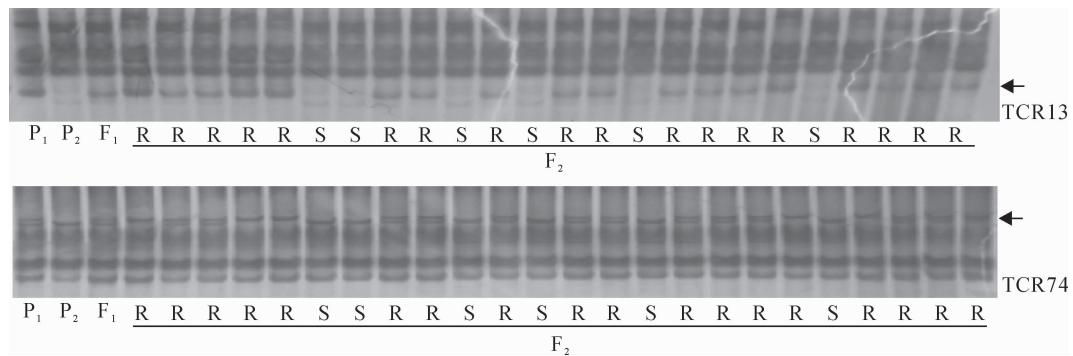
利用 2 个标记 TCR13 和 TCR74 的 SSR 引物进行双亲及杂交、自交分离后代鉴定,发现在大白菜抗源 CCR13025 和杂种 F_1 中分别携带 2 个标记,不结球白菜‘T 青’未检到。该标记在 78 个 F_2 代分离群体中按照 3:1(59:19) 的分离比例进行分离(图 1),并且 2 个标记表现出严格的共分离现象,标记与实际接种鉴定结果相吻合,表明该标记能够用于抗根肿病材料的分子标记辅助选择。

在大白菜基因数据库 http://brassicadb.org/cgi-bin/gbrowse/Brassica_v1.5 中定位 2 个 SSR 标

表 1 基于 TCR13 和 TCR74 设计的特异引物

Table 1 Specific primers designed according to TCR13 and TCR74

| 引物 Primer | 引物序列 Sequence of primer(5'→3') | | 退火温度 Tm/°C |
|-----------|--------------------------------|----------------------|------------|
| | 正向 Forward | 反向 Reverse | |
| 1 B12523 | ACCTGGACATTGGATTGA | AGATGGTGACGGCGAAGA | 55 |
| 2 B12524 | CGTGTCAAAGAACCTCATC | TGCTACTATTAGAACCTC | 55 |
| 3 B12525 | CTTTGGATTGTTGACCTT | ATGTTGATGCTACTGAGAC | 50 |
| 4 B12526 | CGCAAAGAGCCATCCTAC | ATCCCAAATCAGAACGC | 55 |
| 5 B12527 | TCAGTTGTTCTTGAGGG | TGAAGGTATGGGTTATGG | 50 |
| 6 B12528 | TAACGGGAAGTAAGCAAT | AAAGTCAGTAGCCCAAAG | 55 |
| 7 B12529 | GCACTTGCTCATTGGTA | CACGAGACTCCCTCCTAA | 50 |
| 8 B12530 | CGTAAACCTCGTCAAATC | TGGTGCTAAGAGTGTAAAGA | 55 |

图1 大白菜抗根肿病连锁分子标记 TCR13 和 TCR74^[8]

P₁. CCR13025; P₂. T青; F₁. CCR13025×T青; F₂. F₁自交分离后代; R. 抗根肿病后代;

S. 感根肿病后代; TCR13、TCR74. 抗根肿病基因连锁 SSR 分子标记; 箭头所示为差异位点; 下同。

Fig. 1 TCR13 and TCR74 linked to clubroot resistance in Chinese cabbage^[8]

P₁. CCR13025; P₂. TQ; F₁. CCR13025×TQ; F₂. Self separating progeny of F₁;

R. Clubroot resistant offspring; S. Clubroot susceptible offspring; TCR13, TCR74. SSR marker linked to clubroot resistance. Arrows showed the specific sites; The same as below.

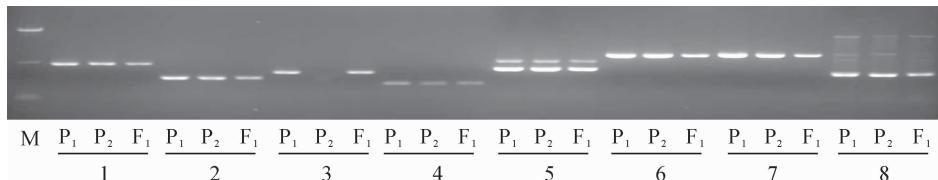


图2 抗根肿病特异 SCAR 引物扩增结果

1~8. 特异引物编号同表1; M. DL2000

Fig. 2 Results of SCAR markers linked to clubroot resistance

1~8. The code of primer are same as Table 1; M. DL2000

记,发现其分别位于大白菜 A3 染色体 Bra23787138 ~Bra23847142 之间,物理距离 10006bp,在该区间设计了 8 对特异引物(表 1),进行扩增。结果发现,在 8 对特异引物中,有 7 对在双亲和 F₁ 中没有多态性,1 对引物 B12525 在双亲和 F₁ 之间有多态性(图 2)。将该多态性引物用 F₂ 群体进行验证,结果发现,该标记与 TCR13 和 TCR74 共分离,并且与田间接种鉴定一致(图 3),在所有表现抗性的单株中均能扩增到该标记,在感病单株中表现缺失。表明该 SCAR 标记能够用于抗根肿病分子标记辅助选择,命名为 CRb-R-25。

2.2 不结球白菜抗根肿病回交后代分子选择

利用该标记进行辅助选择,以不结球白菜‘T青’为轮回亲本,进行回交并用 CRb-R-25 进行选择,每代选取 10 株表型性状最接近‘T青’并且携带标记 CRb-R-25 的单株作为种株留种,在每个回交世代中做自交分离,淘汰自交后代 CRb-R-25 标记发生分离的单株(其回交后代抗性位点为杂合的 Aa 类型),选择纯合的进行回交转育(抗性位点纯合 AA 类型)。回交 3 代后,BC₃ 表型性状为典型的不

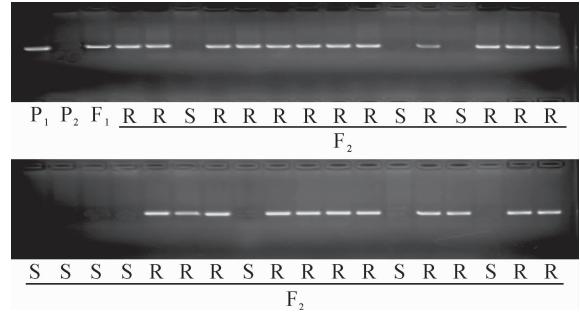


图3 根肿病特异连锁分子标记 CRb-R-25 扩增图谱

Fig. 3 Results of CRb-R-25 marker linked to clubroot resistance

结球白菜性状,大白菜原有的叶翼、叶片绒毛、白梗、包心等性状均已改良,综合性状基本接近轮回亲本‘T青’,渐渗系与轮回亲本理论遗传物质相似度为 96.9%。将轮回亲本‘T青’和 BC₃ 接种根肿病菌 35 d 后检测,结果表明,‘T青’在根部形成肿瘤,为典型的根肿病病症,而携带 CRb-R-25 条带的 BC₃ 单株 TQ14-1-15 表现抗病,根部发育正常(图 4)。

3 讨 论

利用分子标记进行辅助选择具有操作简便、速

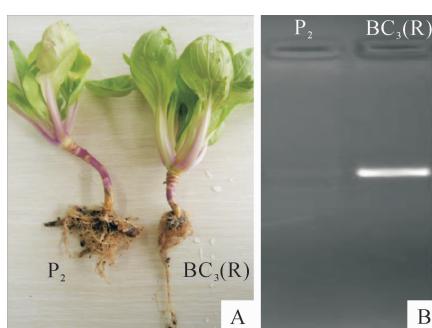


图 4 回交后代接种试验(A)及 CRb-R-25 特异条带(B)的检测

BC₃(R), 回交后代抗病单株 TQ14-1-15。

Fig. 4 Inoculation test of backcross generation(A) and check of CRb-R-25 marker(B)

BC₃(R), Resistant individual TQ14-1-15 of backcross generation 度快、不受环境影响等优势,十字花科根肿病为十字花科重要的土传病害,在接种鉴定中受温度、湿度、pH 值等环境因素的影响较大^[10]。Piao 等^[7]开发了 2 个与大白菜抗根肿病 CRb 基因连锁的分子标记,TCR05 和 TCR09 连锁距离为 2.71cM。陈慧慧等^[8]根据 TCR05 和 TCR09 等 2 个连锁标记,结合大白菜基因组序列信息,开发了 TCR13(上游 0.09cM)和 TCR74(下游 0.09cM)2 个 SSR 标记,并将遗传距离定位在 0.18 cM 内。在本研究中,基于大白菜基因组数据库,将 2 个 SSR 标记 TCR13

参考文献:

- [1] WANG F ZH (王芳展), LIU Y P (刘亚培), et al. Development of physiological, biochemical characteristics and resistant genetics during clubroot disease in crucifer crops [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences* (中国油料作物学报), 2012, **34**(2): 215-224 (in Chinese).
- [2] CHEN Y (陈 瑶), WANG H X (王火旭). Research progress of cruciferous root disease [J]. *Tianjin Agricultural Sciences* (天津农业科学), 2014, **20**(3): 77-79, 85 (in Chinese).
- [3] SILKOVA O G, DOBROVOLSKAYA O B, DUBOVETS N I, et al. Production of wheat-rye substitution lines and identification of chromosome composition of karyotypes using C-banding, GISH, and SSR marker [J]. *Russian Journal of Genetics*, 2006, **42** (6): 645-653.
- [4] PANG CH Y (庞朝友), DU X M (杜雄明), MA ZH Y (马峙英). Cluster analysis of the introgressed lines from interspecific hybridization in cotton based on SSR markers and phenotype traits [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2006, **32**(9): 1 371-1 378 (in Chinese).
- [5] BRAR D S, KHUSH G S. Alien introgression in rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, **35**(1/2): 35-47.
- [6] SHEN L, COURTOIS B, MCNALLY K L, et al. Evaluation of near-isogenic lines of rice introgressed with QTLs for root depth through marker-aided selection [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, **103**: 75-83.
- [7] PIAO Z Y, CHOI S R, LEE Y M, et al. The use of molecular markers to certify clubroot resistant (CR) cultivars of Chinese cabbage [J]. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2007, **48**(3): 148-154.
- [8] CHEN H H (陈慧慧), ZHANG T (张 腾), et al. Development and mapping of molecular markers closely linked to CRb gene resistance to clubroot disease in Chinese cabbage [J]. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2012, **45**(17): 3 551-3 557 (in Chinese).
- [9] ZHANG H (张 慧), XU H (徐 海), KUANG Y Y (况媛媛), et al. Molecular marker of club root resistance genes in *Brassica campestris* ssp. *Chinensis* [J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* (江苏农业学报), 2013, **29**(3): 633-636 (in Chinese).
- [10] PIAO Z Y, PARK Y J, CHOI S R, et al. Conversion of AFLP marker linked to clubroot resistance gene into SCAR marker [J]. *Journal of the Korean Society Horticultural Science*, 2002, **43**: 653-659.
- [11] PIAO ZH Y (朴钟云), WU D (吴 迪), WANG M (王 森), et al. Marker-assisted selection of near isogenic lines for clubroot resistant gene in Chinese cabbage [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2010, **37**(8): 1 264-1 272 (in Chinese).

和 TCR74 定位在大白菜 A3 染色体 Bra23787138~Bra23847142 之间。在本区间中设计了 8 条特异引物,其中 1 对引物与 SSR 标记 TCR13 和 TCR74 共分离,表明将其成功转化为 SCAR 标记,命名为 CRb-R-25。经接种鉴定验证发现,该标记能够用于分子标记辅助选择。

在分子标记辅助选择进行抗根肿病性状转育方面,朴钟云等^[11]利用 Piao 等^[7]开发的 2 个与大白菜抗根肿病 CRb 基因连锁的分子标记 TCR01 和 TCR09,进行大白菜与大白菜之间的抗性转育,获得 9 个‘BJN3’的近等基因系。目前在不结球白菜研究中未发现根肿病抗源,本研究利用抗根肿病大白菜与不结球白菜进行亚种间杂交和回交,经过 3 代,利用分子标记进行辅助选择,在回交过程中大白菜典型性状如叶毛、叶翼、包心等逐渐在各世代丢失,回交后代综合性状趋于轮回亲本,最终获得了携带根肿病抗性的不结球白菜种质资源 TQ14-1-15,实现了提高育种效率的目的。

本研究中,通过对大白菜基因组数据库检索,在 A3 染色体 Bra23787138~Bra23847142 之间,共计有 9 个功能基因,这些基因既有编码细胞膜组分蛋白,也有编码蛋白质合成调控蛋白,下一步根据结合抗性鉴定,分析这些基因与根肿病抗性之间的关系,将有利于根肿病抗性基因的分离和克隆。