



李巧云, 张志刚, 许念芳, 王树彬, 刘栓桃, 王荣花, 赵智中. 大白菜抗 TuMV 近等基因系的分子标记辅助选育[J]. 中国农业大学学报, 2026, 31(02): 82-91.
LI Qiaoyun, ZHANG Zhigang, XU Nianfang, WANG Shubin, LIU Shuantao, WANG Ronghua, ZHAO Zhizhong. Marker-assisted selection of TuMV resistant near-isogenic lines in Chinese cabbage[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2026, 31(02): 82-91.
DOI: 10.11841/j.issn.1007-4333.2026.02.07

大白菜抗 TuMV 近等基因系的分子标记辅助选育

李巧云 张志刚 许念芳 王树彬 刘栓桃 王荣花 赵智中*

(山东省农业科学院 蔬菜研究所/农业农村部黄淮设施园艺工程重点实验室/山东省大宗露地蔬菜育种
重点实验室, 济南 250100)

摘要 为探究大白菜芜菁花叶病毒病(Turnip mosaic virus, TuMV)基因 *TuRBCS01* 的功能, 丰富大白菜种质资源, 以大白菜感 TuMV 的骨干亲本材料‘冠 291’为轮回亲本, TuMV 抗源材料‘8407’为供体亲本, 利用 BrID10723 和 mBr4055 为前景选择标记, 49 对在两亲本间多态性好、染色体分布相对均匀的 InDel 或 SSR 共显性标记为背景标记, 构建抗 TuMV 的‘冠 291’近等基因系。结果表明: 1) BC_2 代背景恢复率最高达 94.44%, BC_3F_1 代背景恢复率最高为 97.96%; 2) 在 BC_3F_2 代获得全部恢复‘冠 291’基因组的单株, 再经过一代自交筛选, 可获得纯合抗 TuMV ‘冠 291’近等基因系; 3) 部分近等基因系的结球相关性状与‘冠 291’无显著差异。这些近等基因系的获得为 *TuRBCS01* 基因的克隆及功能研究奠定了基础, 同时为大白菜抗 TuMV 新品种的培育提供了优良种质材料。

关键词 大白菜; TuMV; *TuRBCS01* 基因; 分子标记辅助选择; 近等基因系

中图分类号 S634.1

文章编号 1007-4333(2026)02-0082-10

文献标志码 A

Marker-assisted selection of TuMV resistant near-isogenic lines in Chinese cabbage

LI Qiaoyun, ZHANG Zhigang, XU Nianfang, WANG Shubin, LIU Shuantao,
WANG Ronghua, ZHAO Zhizhong*

(Institute of Vegetables/Ministry of Agriculture and Rural Affairs Key Laboratory of Huang Huai Protected Horticulture Engineering /Shandong Key Laboratory of Bulk Open-field Vegetable Breeding, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract To explore the function of Turnip mosaic virus gene *TuRBCS01* in Chinese cabbage, and to enrich the germplasm resources, the TuMV resistant ‘Guan 291’ near-isogenic line was constructed using 49 pairs of InDel or SSR codominant markers as the background makers which with good polymorphism and relatively uniform distribution on chromosomes, BrID10723 and mBr4055 as the foreground selection markers, Chinese cabbage TuMV susceptible backbone parental material ‘Guan 291’ as the reincarnation parent, TuMV-resistant source material ‘8407’ as the donor parent. The results showed that 1) the highest background recovery rate of BC_2 generation reached 94.44%, the highest background recovery rate of BC_3F_1 generation was 97.96%; 2) In the BC_3F_2 generation, individuals could be obtained that fully recover the ‘Guan 291’ genome. After one more generation of self-pollination selection, a homozygous TuMV-resistant ‘Guan 291’ near-isogenic line could be obtained; 3) No significant difference in bolting-related traits existed compared ‘Guan 291’ to some near-

收稿日期: 2025-04-22; 接受日期: 2025-07-21

基金项目: 山东省农业良种工程项目(2022LZGCQY005, 2022LZGC008); 济南市“新高校 20 条”资助项目(202228092); 山东省农业科学院创新工程项目(CXGC2025B20)

第一作者: 李巧云(ORCID: 0009-0000-6403-1031), 研究员, 主要从事蔬菜生物技术研究, liqiaoyun0606@126.com

通讯作者: 赵智中(ORCID: 0000-0003-2651-0837), 研究员, 主要从事大白菜遗传育种研究, zhaozhizhong454@163.com

isogenic lines. The acquisition of these near-isogenic lines has laid the foundation for the cloning and functional study of the gene *TuRBCS01*. At the same time, it provides excellent germplasm materials for breeding of new TuMV resistant varieties in Chinese cabbage.

Keywords Chinese cabbage; TuMV; *TuRBCS01* gene; marker-assisted selection; near-isogenic line

病毒病是危害我国大白菜生产的重要病害,常年发病率为10%~30%,个别地块可高达80%~90%,严重影响我国大白菜的产量和品质。该病防治困难,培育抗病品种是最有效且可持续的防治措施^[1]。我国大白菜病毒病主要是由3种病毒单独或复合浸染所致,即芜菁花叶病毒病(Turnip mosaic virus, TuMV)、黄瓜花叶病毒病(Cucumber mosaic virus, CMV)和烟草花叶病毒病(Tobacco mosaic virus, TMV),其中, TuMV 是主要毒源^[2]。因此,建立高效大白菜 TuMV 抗性基因转育和鉴定技术体系,对大白菜种质创新和抗病育种具有重要意义。

‘冠291’是骨干的大白菜自交不亲和系,具有广义配合力好、杂种优势强、制种纯度高优点,利用其先后育成了‘鲁白一号’‘山东四号’‘山东六号’‘鲁白六号’和‘丰抗70’等多个在全国各地大面积推广的优良品种,其中一些品种目前仍在大面积种植。但该系易感病毒病,应用受到了较大限制,急需通过遗传改良,提高其抗病毒能力。常规的改良方法周期长、效率低、准确性差。利用分子标记辅助选择(Marker-assisted selection, MAS),可实现对育种材料的快速、精准改良。

分子标记辅助选择是在DNA标记基础上的育种策略,利用与目标性状紧密连锁的DNA标记对研究对象进行选择,包括对目标基因跟踪的前景选择(Foreground selection)和对非目标基因的遗传背景选择(Background selection)^[3]。到目前为止,芸薹属中发现的TuMV抗性基因主要集中在白菜类作物的A基因组中^[4]。已经鉴定到的抗性基因有 *retr01* 和 *ConTR01*^[5]、*TuRBCH01*^[6]、*retr02*^[7]、*trs*^[8]、*TuRB01b*^[9]、*TuRB07*^[10]、*TuMV-R*^[11]、*retrcs03*^[12]、*TuRBCS01*^[13-14] 和 *BcTFIIIA*^[15]。Li等^[13]以国家级大白菜TuMV抗源材料‘8407’和大白菜核心种质材料‘冠291’为亲本构建分离群体,将大白菜TuMV抗性基因 *TuRBCS01* 定位于A04染色体上的2个标记 BrID10723 (3.3 cM) 和 mBr4055 (2.6 cM) 之间 1.98 Mb 的区域。李巧云等^[16]的研究表明,利用上述2个标记对纯合抗病单株的鉴定

准确率可达90%以上。此外,芸薹属数据库(BRAD, <http://brassicadb.cn/>)中丰富的SSR与InDel标记,为白菜的基因组背景选择提供了重要基础。

近等基因系(Near-isogenic lines, NIL)是指除了特定性状之外,其他遗传背景均相同或相近的一组品系。近年来,近等基因系在蔬菜育种中的应用越来越广泛,主要用于基因定位、基因功能分析和品种改良等方面^[17]。王丽丽等^[18]以含不育基因 *Ms* 的大白菜细胞核复等位基因型雄性不育两用系‘AB01’的可育株(*Ms/Ms*)为供体亲本,以高代自交系‘a20’(*msms*)为轮回亲本,利用与不育基因 *Ms* 连锁的 SCAR 标记 syau_scr01 (0.8 cM) 辅助不育基因 *Ms* 选择,成功将不育基因转育到可育品系‘a20’中,育成了不育度和不育株率均为100%、植物学性状与自交系‘a20’相近的新核不育系‘GMS4’。朴钟云等^[19]以具有抗根肿病基因 *CRb* 的大白菜‘CR Shinkii DH’系为抗源,通过 *CRb* 基因侧翼标记 TCR01 (1.97 cM) 和 TCR09 (0.43 cM) 的前景选择,以及51个SSR标记的基因组背景选择,选育出大白菜优良自交系‘BJN3’的9份抗根肿病近等基因系,且这些近等基因系的结球相关性状与‘BJN3’无显著差异。张腾等^[20]以具有抗根肿病基因 *CRb* 的大白菜‘CR Shinkii 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。刘港运等^[21]以甜瓜自交系‘TopMark’为轮回亲本,矮化自交系‘M406’为供体亲本,利用 *Cmerecta-dCAPS2* 为前景选择标记,102对在亲本间多态性好、染色体上分布相对均匀的SSR标记为背景选择标记,选育出矮化的‘TopMark’近等基因系。上述研究充分证明了利用分子标记辅助选择快速选育大白菜近等基因系是可行的。

本研究通过目标基因的前景选择和轮回亲本基因组的背景选择,选育出抗TuMV的大白菜‘冠291’的优良近等基因系,旨在为培育大白菜抗病毒

病新品种或改良现有品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供体亲本‘8407’和轮回亲本‘冠291’均由山东省农业科学院蔬菜研究所大白菜课题组提供。‘8407’是直筒型,开黄花,对绝大部分TuMV株系表现免疫的广谱抗源材料。‘冠291’是叠抱型,开白花,对TuMV表现感病的高代自交不亲和系。

接种所用TuMV毒源为C4株系,引自中国农业科学院蔬菜花卉研究所植保室,接种前一个月,在感病材料上繁毒培养。

1.2 近等基因系选育方法

试验在山东省农业科学院蔬菜研究所试验基地进行。以感病亲本‘冠291’为母本,抗病亲本‘8407’为父本配制杂交组合,获取杂交种F₁的种子。以‘冠

291’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,根据基因*TuRBCS01*两侧标记BrID10723和mBr4055的前景选择及‘冠291’的开白花性状,选择开白花且具有基因*TuRBCS01*的单株,用于与轮回亲本回交。从BC₂起进行基因组背景选择,筛选‘冠291’背景恢复率高且在两前景标记位点均扩增为杂合抗病条带的单株用于回交。对BC₃F₁代群体,继续进行上述筛选后,获得的单株自交构建BC₃F₂群体。继续对BC₃F₂群体进行前景和背景选择,筛选背景标记全部恢复‘冠291’基因组,但前景标记仍为杂合抗病或前景选择为纯合抗病,个别背景标记仍未恢复‘冠291’基因型的单株,自交构建BC₃F₃群体。利用两前景标记或杂合背景标记对BC₃F₃群体进行筛选,获得前景选择为纯合抗病,背景选择全部恢复‘冠291’基因组的单株,进一步自交获得‘冠291’近等基因系。

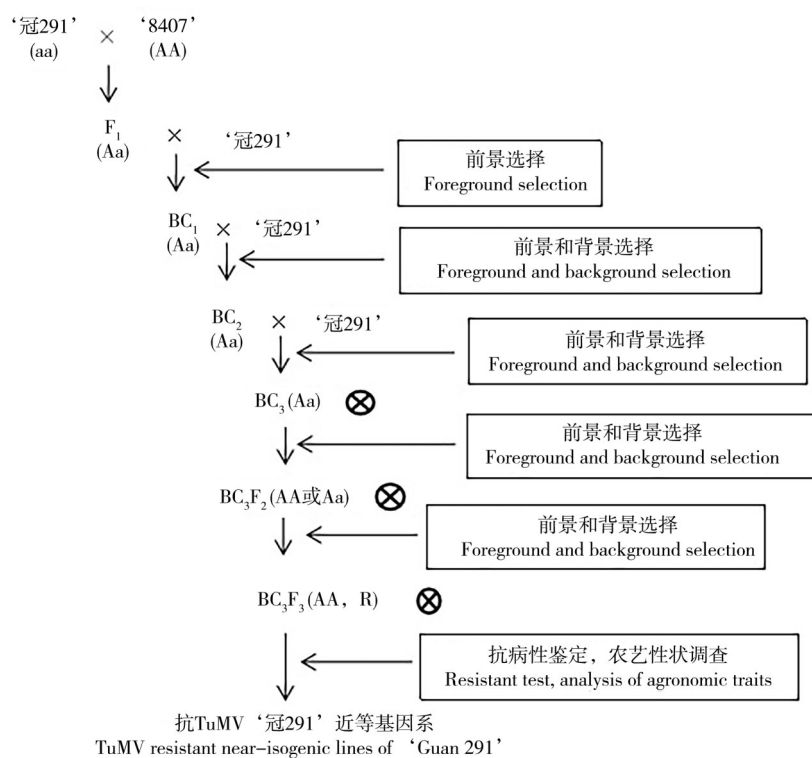


图1 分子标记辅助选育抗TuMV大白菜近等基因系的技术路线图

Fig. 1 Technical roadmap of marker-assisted selection breeding for TuMV resistant near-isogenic lines of Chinese cabbage

1.3 基因组DNA的提取

大白菜基因组DNA的提取采用天根(TIANGEN)生化科技(北京)有限公司的快捷型植物基因组DNA提取试剂盒。使用1%的琼脂糖凝胶对所提取的基因组DNA进行电泳检测。

1.4 前景选择

利用基因*TuRBCS01*的两侧标记BrID10723和mBr4055作为前景标记,选择开白花且在两标记位点均扩增为杂合抗病条带的单株,用于回交。BrID10723和mBr4055的PCR反应体系采用

Li 等^[13]的方法。PCR 扩增产物采用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶 (29:1) 进行检测, 每个胶孔的上样量是 2 μ L。使用美国 Labnet International 公司 Power Station200 型电泳仪, DYCZ-24B 型电泳槽, 175~190 V 恒压条件下, 电泳 1.5~3 h, 银染显色。

1.5 背景选择

从芸薹属基因组网站上均匀选择白菜 10 条染色体上的 SSR 或 InDel 标记 204 个, 以两亲本基因组 DNA 为模板进行扩增, 筛选在两亲本间扩增共显多态性的 49 对标记用于背景选择。结合前景选择的结果, 从每个世代的杂合抗病单株中选择‘冠 291’背景恢复率高且开白花的单株用于回交或自交, 直至筛选出抗性基因纯合且背景标记与‘冠 291’完全一致的株系, 即为抗 TuMV 的‘冠 291’近等基因系。

BC_g 世代轮回亲本背景恢复率 (Proportion of recurrent parent genome, PRPG) 的计算根据 Hospital 等^[22]的公式进行:

$$\text{PRPG}_g = \frac{L + X_g}{2L} \times 100\% \quad (1)$$

式中: PRPG_g 为 BC_g 世代的轮回亲本背景恢复率; g 为回交次数; X_g 为 BC_g 世代中背景选择标记带型与轮回亲本一致的标记数量; L 为全部背景选择标记。回交 g 次的理论背景恢复率计算公式如下:

$$G_g = 1 - \frac{1}{2^{(g+1)}} \quad (2)$$

式中: G_g 为 BC_g 世代的理论背景恢复率, 假定各标记

位点间相互独立。

1.6 TuMV 抗性接种鉴定

对‘冠 291’及入选的 BC₃F₂ 家系各 25 株以上, 采用摩擦接种法^[23]进行 TuMV 接种, 每克鲜病叶加 4 mL 磷酸盐缓冲液, 研磨成汁液后进行接种, 接种后置于人工气候室中培养, 温度 25 $^{\circ}$ C, 湿度 50%, 3 周后采用生物学观察法进行抗病性鉴定, 连续鉴定 3 次, 间隔 1 周, 鉴定标准参照 GB/T 19557.5—2017^[24]。

1.7 主要农艺性状调查

将‘冠 291’及其近等基因系进行育苗, 待植株长至 4~5 片叶子时定植于山东省农业科学院蔬菜研究所试验基地, 各家系及‘冠 291’分别定植 25 株, 正常栽培与管理。收获期随机选取 6 株, 调查毛重、球重、外叶数、内叶数、球高、球粗、短缩茎长和短缩茎宽等结球相关性状。利用 DPS 软件分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 亲本间背景标记的筛选

从分布于白菜 10 条染色体上的 SSR 或 InDel 标记中选择 204 个, 以两亲本基因组 DNA 为模板进行扩增, 有 49 个标记在两亲本间扩增多态性, 多态性比率为 24%。用于背景分析的 49 对多态性引物详细信息见表 1, 其中, 位于白菜 1~10 号染色体上的多态性标记数量依次为 5、2、7、4、5、6、7、1、8 和 4 个。

表 1 大白菜背景选择标记在染色体上的分布

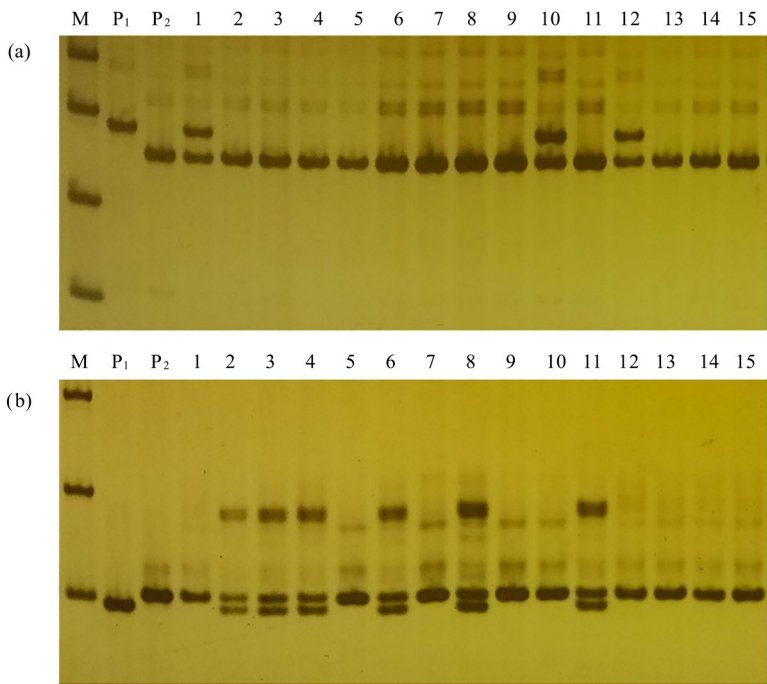
Table 1 Distribution of background markers on Chinese cabbage chromosomes

染色体 Chromosome	多态性标记数量 Number of polymorphic markers	平均距离/Mb Average distance	标记间最大距离/Mb Maximum distance between markers
Chr1	5	4.2	17.7
Chr2	2	8.9	8.9
Chr3	7	3.9	8.4
Chr4	4	1.3	3.3
Chr5	5	4.1	13.3
Chr6	6	3.1	8.9
Chr7	7	3.0	11.4
Chr8	1		
Chr9	8	3.6	14.6
Chr10	4	3.4	7.5

2.2 BC₁群体分析

利用基因 *TuRBCS01* 的两端标记 BrID10723 和 mBr4055 对 157 株 BC₁ 群体单株进行 PCR 扩增检测,部分扩增结果如图 2 所示。在 BrID10723 位点扩增为杂合抗病条带的有 69 株($\chi^2=2.30$, $\chi_{0.05}^2=$

3.84),在 mBr4055 位点扩增为杂合抗病条带的有 70 株($\chi^2=1.84$, $\chi_{0.05}^2=3.84$),在两标记位点均扩增为杂合抗病条带的有 68 株。进一步分析这 68 株的开花颜色,其中有 60 株开白花,从中选择 10 株进行回交,获得 BC₂。



M:Marker;P1:‘8407’;P2:‘冠 291’;1~15:BC₁群体的不同单株。
M:Marker; P1: ‘8407’; P2: ‘Guan291’; 1-15: Different individual plants of BC₁ population.

图 2 部分 BC₁ 单株的 BrID10723 (a) 和 mBr4055 (b) 前景选择

Fig. 2 Foreground selection of some BC₁ individuals by using BrID10723 (a) and mBr4055 (b) makers

2.3 BC₂群体分析

对来自于 10 株 BC₁ 回交后代的 128 个单株,利用标记 BrID10723 和 mBr4055 进行扩增,其中有 50 株在两标记位点均扩增为杂合抗病条带,继续利用白花性状选择,有 40 株开白花。从上述 49 个多态性标记中,均匀选择 36 个,对上述 40 个单株进行背景分析,结果见表 2。其中 1 株(编号为 BC₂-35)背景恢复率最高,达 94.44%,只有 4 个杂合位点;其次是 BC₂-9 和 BC₂-12,背景恢复率均为 93.06%,均存在 5 个杂合位点。选择 BC₂-35 用于回交,构建 BC₃F₁。

2.4 BC₃F₁群体分析

对 BC₂-35 的回交后代 BC₃ 群体的 102 个单株进行前景选择,有 40 株在两标记位点均扩增为杂合抗病条带(表 2)。选择植株形态与‘冠 291’相近的 38 株进行基因组背景分析。利用在 BC₂ 表现杂

合的 4 个标记进行背景选择,筛选出标记位点达到纯合的 BC₃ 个体 9 株。再选用剩余的 13 个标记对这 9 株进行背景分析,有 3 个单株(BC₃F₁-1、BC₃F₁-2、BC₃F₁-3)只在 2 个位点(BrID10321 和 BrID90277)表现杂合,背景恢复率最高,达 97.96%,其余单株的杂合位点均在 ≥3 个。选择性状与‘冠 291’最接近的单株 BC₃F₁-2 自交构建 BC₃F₂ 群体。

2.5 BC₃F₂群体分析

对含有 99 个单株的 BC₃F₂ 群体进行前景选择,其中 78 株扩增为纯合或杂合抗病条带,继续利用 2 个杂合位点标记 BrID10321 和 BrID90277 对这 78 个单株进行背景选择,有 3 株(BC₃F₂-55,BC₃F₂-58,BC₃F₂-77)全部恢复‘冠 291’基因组,但前景选择的结果是杂合抗病;有 4 株(BC₃F₂-12,BC₃F₂-33,BC₃F₂-44,BC₃F₂-59)前景选择为纯合抗病类型,背景选择在 2 个位点 BrID10321 和 BrID90277 仍扩增

表 2 各回交世代的分子标记辅助选择结果

Table 2 Results of marker-assisted selection for each backcross generation

世代 Generation	前景选择 Foreground selection		背景选择 Background selection			选择 株数 Number of selected plants	用途 Purpose
	检测株数 Number of plants tested	兼具抗病带 型株数 Number of plants with both markers	检测株数 Number of plants tested	标记数 Number of markers	杂合标记最 少株数 Number of plants with minimal heterozygous marker loci		
BC ₁	157	68				10	回交
BC ₂	128	50	40	36	1(3)	1	回交
BC ₃ F ₁	102	40	38	4	9(0)	1	自交
			9	13	3(2)	1	
BC ₃ F ₂	99	78	78	2	3(0) 4*(2)	7	自交
BC ₃ F ₃	226	33*	375	2	112(0)	145	近等基因系

注：括号中的数字表示背景选择后尚未恢复‘冠 291’基因型的标记数。*表示前景选择为纯合抗病的单株。
Note: Numbers in parentheses indicate the number of markers that have not yet restored the ‘Guan 291’ genotype after background selection. * indicates the pure disease-resistant plants after foreground selection.

为杂合条带,将上述 7 个单株自交构建 BC₃F₃群体。

2.6 BC₃F₃群体分析

抗病位点纯合的单株自交获得‘冠 291’的抗 TuMV 近等基因系(表 2),编号为 GTR-1~GTR-145。

2.7 近等基因系的主要农艺性状鉴定

利用 2 个杂合位点标记分别对 BC₃F₃-12、BC₃F₃-33、BC₃F₃-44 和 BC₃F₃-59 群体的 90、108、72 和 105 个单株基因组 DNA 进行背景分析,分别有 0、22、68 和 22 个全部恢复‘冠 291’基因组;利用前景标记 BrID10723 和 mBr4055 分别对 BC₃F₃-55、BC₃F₃-58 和 BC₃F₃-77 株系的 78、90 和 58 个单株基因组 DNA 进行分析,分别有 9、17 和 7 个单株全部扩增为纯合抗病条带。对上述 145 个背景选择全部恢复、

以‘冠 291’为对照,随机选取 18 份近等基因系进行 TuMV 抗性鉴定及结球性状分析,结果表明,接种单株数在 27~32 株的 18 份近等基因系均表现抗病,且呈现免疫级别,病级均为 0 级(图 3);有 7 份材料的结球性状与‘冠 291’没有明显差异(表 3,图 4),表明这些近等基因系恢复了‘冠 291’主要农艺性状。

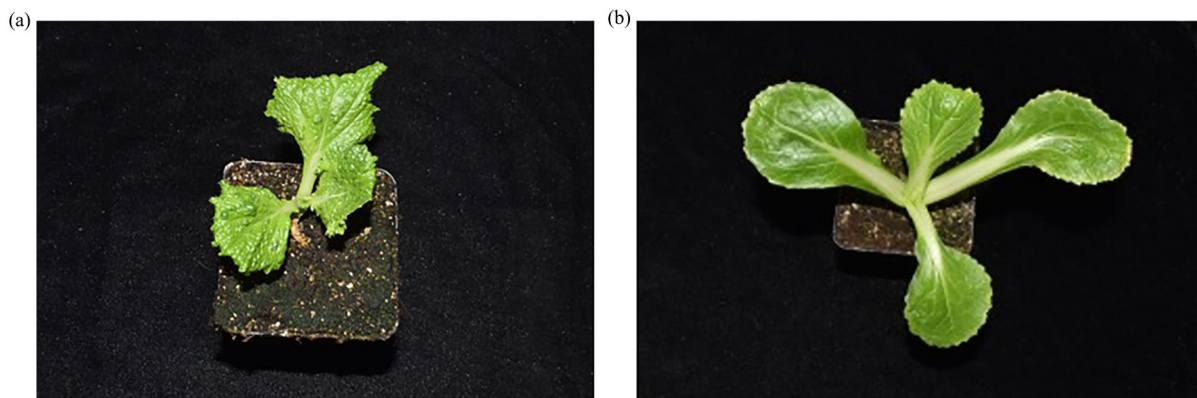


图 3 ‘冠 291’(a)及其近等基因系(b)接种 TuMV 后的抗性表现

Fig. 3 TuMV resistance manifestation of ‘Guan291’ (a) and the near-isogenic lines (b) after being inoculated with TuMV

表3 ‘冠291’及其近等基因系结球性状对比
Table3 Comparison of the heading related traits between ‘Guan291’ and its near-isogenic lines

供试群体 Test population	全株质量/ kg Total weight of plant	叶球质量/ kg Heading weight	外叶数 Number of outer leaves	内叶数 Number of inner leaves	叶球高度/ cm Heading height	叶球直径/ cm Heading diameter	短缩茎长/ cm Shortened stem length	短缩茎宽/ cm Shortened stem width
‘冠291’ ‘Guan291’	3.24± 0.11 A	1.72± 0.05 A	9.00± 0.45 A	26.00± 0.86 A	35.33± 0.49 A	22.17± 1.11 A	3.75± 0.15 A	3.30± 0.05 A
‘GTR-69’	3.29± 0.27 A	1.76± 0.10 A	10.67± 0.99 A	28.50± 0.15 A	35.18± 0.73 A	23.60± 0.24 A	4.52± 0.18 A	3.70± 0.15 A
‘GTR-73’	3.11± 0.18 A	1.84± 0.11 A	10.17± 0.70 A	29.33± 1.52 A	34.95± 0.89 A	21.42± 1.09 A	4.27± 0.08 A	3.35± 0.08 A
‘GTR-86’	3.04± 0.17 A	1.91± 0.13 A	9.00± 0.45 A	28.67± 0.56 A	35.67± 0.46 A	23.42± 0.65 A	3.70± 0.21 A	3.42± 0.10 A
‘GTR-90’	3.00± 0.12 A	1.95± 0.07 A	9.83± 0.31 A	28.83± 0.70 A	35.42± 0.40 A	22.13± 0.22 A	4.70± 0.18 A	3.50± 0.03 A
‘GTR-99’	3.12± 0.19 A	1.87± 0.11 A	10.17± 0.60 A	29.50± 1.02 A	33.42± 0.79 A	23.25± 0.59 A	4.45± 0.27 A	3.30± 0.08 A
‘GTR-111’	3.49± 0.21 A	1.75± 0.07 A	11.00± 0.32 A	25.83± 0.48 A	33.67± 1.22 A	25.17± 1.33 A	3.87± 0.06 A	3.45± 0.06 A
‘GTR-118’	3.78± 0.15 A	2.01± 0.08 A	10.50± 0.85 A	27.33± 0.42 A	35.80± 1.14 A	23.18± 1.27 A	3.83± 0.11 A	3.43± 0.13 A

注:表中数据为平均值±标准误。数据采用单因素方差分析,同列数据后相同大写字母表示差异不显著(P>0.01)。
Note: The data are means ± standard errors. One-way ANOVA was performed, data in the same column with the same uppercase letters indicate no significant difference (P>0.01).

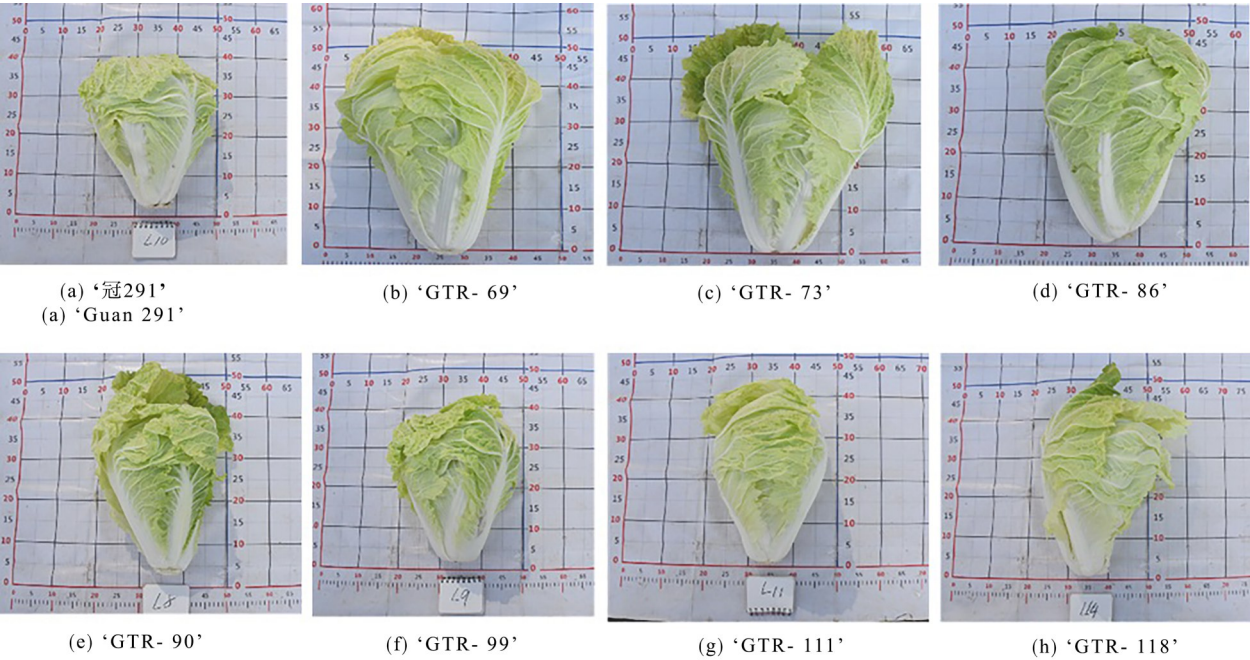


图4 ‘冠291’及其近等基因系叶球图
Fig. 4 Leaf ball diagram of ‘Guan291’ and its near-isogenic lines

3 讨 论

近等基因系因其具有遗传背景简单的特点,在作物种质改良、基因定位、基因效应和生理机制研究以及农艺性状鉴别等方面具有重要作用,是理想的研究材料。传统的近等基因系构建方法周期长、效率低,通常需要回交5代以上^[25],对于纯合隐性基因的近等基因系构建则需要回交和自交8~10代^[26]。利用分子标记辅助选择,则可以大大缩短近等基因系构建时间,提高构建效率。Tanksley等^[27]研究表明,通过分子标记辅助选择进行3次回交后可获得较高的背景恢复率。朴钟云等^[19]采用分子标记辅助选择的方法,经过3次回交和2次自交获得了9个携带 *CRb* 基因的大白菜优良自交系‘BJN3’的抗根肿病近等基因系。张腾等^[20]同样采用分子标记辅助选择的方法,经过3次回交和1次自交即获得了7个携带 *CRb* 基因的大白菜优良自交系‘91-12B’的抗根肿病近等基因系。刘港运等^[21]通过分子标记前景和背景辅助选择相结合的方法,经过2次回交和1次自交构建了甜瓜矮化基因 *Cmreecta* 近等基因系。本研究通过利用前景和背景分子标记辅助选择,结合白花性状的筛选,经过3次回交和2次自交获得了携带抗病基因 *TuRBCS01* 的大白菜骨干种质材料‘冠291’的抗 TuMV 近等基因系,为研究该基因提供了理想材料,同时也为大白菜抗病毒病新品种的培育提供了新的种质材料。进一步证明利用分子标记辅助选择构建近等基因系可大大提高选择效率,加快转育进程。

本研究中所用的轮回亲本‘冠291’开白花,而供体亲本‘8407’开黄花。张宁^[28]研究表明,大白菜控制花色的基因位于A01和A09上。因此,定位于A04上的 *TuRBCS01* 基因与控制花色的基因不存在连锁关系,证明本研究中利用白花性状进行单株选择是可行的,是分子标记辅助选择的一个较好的补充。本研究在BC₁、BC₂和BC₃F₁代前景选择之后又进行了白花性状的选择,然后再进行背景选择,理论上提高了选择效率,但是否把轮回亲本基因组含量较高的黄花植株漏选,还有待进一步验证。

本研究在BC₂代,经过前景选择、背景选择以及白花性状的选择,即可筛选出‘冠291’背景恢复率为94.44%的个体,高于回交2代的期望值

(87.5%);在BC₃F₁代,经过上述筛选,即可获得‘冠291’背景恢复率为97.96%的个体,同样高于回交3代的期望值(93.75%)。Ellur等^[29]和Sagar等^[30]的研究表明,通过严格的表型选择与分子标记辅助背景选择相结合,经过3次回交可获得背景恢复率高的PB1121和PB6近等基因系。因此,如果没有合适的前景标记,只进行背景选择,再配合严格的表型选择,也是高效获得近等基因系的一种途径。此外,各世代背景恢复率高于理论值的其他原因也不能完全排除,如基因组中并不均匀的重组率、单倍型区块结构的存在,以及对重要农艺性状的过度关注等。

本研究所获得的抗 TuMV 的‘冠291’近等基因系与‘冠291’相比,除 TuMV 抗性外,其他性状并未完全相同,还存在一些差异,原因可能有以下3个方面:一是背景选择的局限性。本研究虽已对204对引物进行筛选,但相对于整个基因组来说,标记密度和覆盖度仍不足以完全排除轮回亲本基因组中未被标记追踪的区域,可能残留有供体亲本‘8407’的遗传片段。二是重组事件的随机性。回交过程中染色体重组是随机的,即使标记附近区域重组,远离标记的基因组区域可能因连锁不平衡保留供体基因,导致背景差异。三是供体片段的导入。由于本研究中目标性状基因与分子标记还存在一定距离,回交时目标区段附近的供体染色体片段会随标记一同导入,引入供体额外基因。但本研究所获得的近等基因系在重要结球性状方面与‘冠291’无显著性差异,表明仍具有较大的理论和应用价值。

4 结 论

本研究以感 TuMV 的骨干亲本材料‘冠291’为轮回亲本, TuMV 抗源材料‘8407’为供体亲本,利用大白菜 TuMV 抗性基因 *TuRBCS01* 两侧紧密连锁标记 BrID10723 和 mBr4055 为前景标记,49对在两亲本间多态性好、染色体分布相对均匀的 InDel 或 SSR 共显性标记为背景标记,通过3次回交和2代自交,获得了7份抗 TuMV 的‘冠291’近等基因系。这些近等基因系在49个多态性背景标记位点上已全部恢复‘冠291’基因组,且在全株质量、叶球质量、外叶数、内叶数、叶球高度、叶球直径、短缩茎长和短缩茎宽等结球性状方面与‘冠291’无显著差异,说明近等基因系基本保持了‘冠291’的优良农艺性状。

参考文献 References

- [1] Hughes S L, Green S K, Lydiate D J, Walsh J A. Resistance to Turnip mosaic virus in *Brassica rapa* and *B. napus* and the analysis of genetic inheritance in selected lines[J]. *Plant Pathology*, 2002, 51(5): 567-573
- [2] 刘勇, 李凡, 李月月, 张松柏, 高希武, 谢艳, 燕飞, 张安盛, 戴良英, 程兆榜, 丁铭, 牛颜冰, 王升吉, 车海彦, 江彤, 史晓斌, 何自福, 吴云锋, 张德咏, 青玲, 严婉荣, 杨学辉, 汤亚飞, 郑红英, 唐前君, 章松柏, 章东方, 蔡丽, 陶小荣. 侵染我国主要蔬菜作物的病毒种类、分布与发生趋势[J]. *中国农业科学*, 2019, 52(2): 239-261
- Liu Y, Li F, Li Y Y, Zhang S B, Gao X W, Xie Y, Yan F, Zhang A S, Dai L Y, Cheng Z B, Ding M, Niu Y B, Wang S J, Che H Y, Jiang T, Shi X B, He Z F, Wu Y F, Zhang D Y, Qing L, Yan W R, Yang X H, Tang Y F, Zheng H Y, Tang Q J, Zhang S B, Zhang D F, Cai L, Tao X R. Identification, distribution and occurrence of viruses in the main vegetables of China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(2): 239-261 (in Chinese)
- [3] Hospital F, Charcosset A. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci[J]. *Genetics*, 1997, 147(3): 1469-1485
- [4] 吕善武, 张昌伟, 侯喜林, 邓书林. 白菜类作物抗 TuMV 研究进展[J]. *植物学报*, 2023, 58(2): 335-346
- Lü S W, Zhang C W, Hou X L, Deng S L. Research progress of TuMV resistance for *Brassica rapa*[J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2023, 58(2): 335-346 (in Chinese)
- [5] Rusholme R L, Higgins E E, Walsh J A, Lydiate D J. Genetic control of broad-spectrum resistance to turnip mosaic virus in *Brassica rapa* (Chinese cabbage)[J]. *The Journal of General Virology*, 2007, 88(Pt 11): 3177-3186
- [6] Xinhua W, Yang L, Huoying C. A linkage map of pak-choi (*Brassica rapa* ssp. *chinensis*) based on AFLP and SSR markers and identification of AFLP markers for resistance to TuMV[J]. *Plant Breeding*, 2011, 130(2): 275-277
- [7] Qian W, Zhang S J, Zhang S F, Li F, Zhang H, Wu J, Wang X W, Walsh J A, Sun R F. Mapping and candidate-gene screening of the novel Turnip mosaic virus resistance gene *retr02* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2013, 126(1): 179-188
- [8] Kim J, Kang W H, Yang H B, Park S, Jang C S, Yu H J, Kang B C. Identification of a broad-spectrum recessive gene in *Brassica rapa* and molecular analysis of the *eIF4E* gene family to develop molecular markers[J]. *Molecular Breeding*, 2013, 32(2): 385-398
- [9] Lydiate D J, Pilcher R L R, Higgins E E, Walsh J A. Genetic control of immunity to Turnip mosaic virus (TuMV) pathotype 1 in *Brassica rapa* (Chinese cabbage)[J]. *Genome*, 2014, 57(8): 419-425
- [10] Jin M N, Lee S S, Ke L, Kim J S, Seo M S, Sohn S H, Park B S, Bonnema G. Identification and mapping of a novel dominant resistance gene, TuRB07 to Turnip mosaic virus in *Brassica rapa*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2014, 127(2): 509-519
- [11] Chung H, Jeong Y M, Mun J H, Lee S S, Chung W H, Yu H J. Construction of a genetic map based on high-throughput SNP genotyping and genetic mapping of a TuMV resistance locus in *Brassica rapa*[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2014, 289(2): 149-160
- [12] 曾强, 张志刚, 赵智中, 刘栓桃, 裴玉贺, 刘贤嫻, 徐文玲, 任瑛, 宋希云, 李巧云. 大白菜芜菁花叶病毒病抗性遗传及分子标记筛选[J]. *华北农学报*, 2014, 29(2): 75-79
- Zeng Q, Zhang Z G, Zhao Z Z, Liu S T, Pei Y H, Liu X X, Xu W L, Ren Y, Song X Y, Li Q Y. Inheritance of resistance and screening of molecular markers for turnip mosaic virus in Chinese cabbage[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2014, 29(2): 75-79 (in Chinese)
- [13] Li Q Y, Zhang X L, Zeng Q, Zhang Z G, Liu S T, Pei Y H, Wang S F, Liu X X, Xu W L, Fu W M, Zhao Z Z, Song X Y. Identification and mapping of a novel Turnip mosaic virus resistance gene *TuRBCS01* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.)[J]. *Plant Breeding*, 2015, 134(2): 221-225
- [14] 高会超, 曾强, 张志刚, 赵智中, 裴玉贺, 刘栓桃, 李溢真, 刘贤嫻, 宋希云, 李巧云. 与大白菜 TuMV 抗病基因 *TuRBCS01* 紧密连锁的分子标记开发[J]. *农业生物技术学报*, 2016, 24(2): 196-205
- Gao H C, Zeng Q, Zhang Z G, Zhao Z Z, Pei Y H, Liu S T, Li Y Z, Liu X X, Song X Y, Li Q Y. The development of molecular markers closely linked to TuMV resistance gene *TuRBCS01* in Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(2): 196-205 (in Chinese)
- [15] Zhang R J, Zhang C W, Lyu S W, Wu H Y, Yuan M G, Fang Z Y, Li F F, Hou X L. BcTFIIIA negatively regulates turnip mosaic virus infection through interaction with viral CP and VPg proteins in pak choi (*Brassica campestris* ssp. *chinensis*)[J]. *Genes*, 2022, 13(7): 1209
- [16] 李巧云, 张志刚, 赵智中, 刘栓桃, 王立华, 高会超, 李溢真, 徐文玲, 刘贤嫻, 刘辰. 大白菜抗 TuMV 分子标记辅助选择技术研究[J]. *山东农业科学*, 2017, 49(2): 10-14
- Li Q Y, Zhang Z G, Zhao Z Z, Liu S T, Wang L H, Gao H C, Li Y Z, Xu W L, Liu X X, Liu C. Molecular marker-assisted selection for resistance to Turnip mosaic virus in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*)[J]. *Shandong Agricultural Sciences*, 2017, 49(2): 10-14 (in Chinese)
- [17] 张红, 王超楠, 黄志银, 李梅, 闻凤英, 刘晓晖, 张斌. 近等基因系构建及其在育种中应用综述[J]. *中国园艺文摘*, 2018, 34(6): 54-56
- Zhang H, Wang C N, Huang Z Y, Li M, Wen F Y, Liu X H, Zhang B. Near isogenic lines construction and application in breeding [J]. *Chinese Horticulture Abstracts*, 2018, 34(6): 54-56 (in Chinese)
- [18] 王丽丽, 魏鹏, 刘志勇, 李承彧, 王玉刚, 冀瑞琴, 冯辉. 利用分子标记辅助选育大白菜核基因雄性不育系[J]. *分子植物育种*, 2010, 8(2): 312-318
- Wang L L, Wei P, Liu Z Y, Li C Y, Wang Y G, Ji R Q, Feng H. Genetic male sterile line of Chinese cabbage developed by using molecular marker assisted selection[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2010, 8(2): 312-318 (in Chinese)
- [19] 朴钟云, 吴迪, 王森, 张腾. 大白菜抗根肿病近等基因系的分子标记辅助选育[J]. *园艺学报*, 2010, 37(8): 1264-1272
- Piao Z Y, Wu D, Wang M, Zhang T. Marker-assisted selection of near isogenic lines for clubroot resistant gene in Chinese cabbage [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2010, 37(8): 1264-1272 (in Chinese)
- [20] 张腾, 吴迪, 赵卓, 王哲, 朴钟云. 大白菜抗根肿病近等基因系的选育及其评价[J]. *分子植物育种*, 2012, 10(6): 722-730
- Zhang T, Wu D, Zhao Z, Wang Z, Piao Z Y. Development of near isogenic lines for clubroot resistance in Chinese cabbage and their assessment[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2012, 10(6): 722-730 (in Chinese)
- [21] 刘港运, 段世享, 许娜娜, 郭姚森, 豆峻岭, 杨森, 牛欢欢, 刘东明, 杨路明, 胡建斌, 朱华玉. 分子标记辅助构建甜瓜矮化基因 *Cmrecta* 近等基因系[J]. *园艺学报*, 2024, 51(9): 2048-2062
- Liu G Y, Duan S X, Xu N N, Guo Y M, Dou J L, Yang S, Niu H H, Liu D M, Yang L M, Hu J B, Zhu H Y. Molecular markers assisted construction of *Cmrecta* near-isogenic line of melon dwarfing gene[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2024, 51(9): 2048-2062 (in Chinese)
- [22] Hospital F, Chevalet C, Mulsant P. Using markers in gene introgression breeding programs[J]. *Genetics*, 1992, 132(4): 1199-1210
- [23] 满卫萍. 大白菜 TuMV 抗性基因 *retrcs03* 的定位[D]. 济南: 山东师范大学, 2020

- Man W P. Mapping of TuMV resistance gene *retcrs03* in Chinese cabbage[D]. Jinan: Shandong Normal University, 2020 (in Chinese)
- [24] GB/T 19557. 5—2017. 植物品种特异性、一致性和稳定性测试指南 大白菜[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- GB/T 19557. 5—2017. Guidelines for the conduct of tests for distinctness, uniformity and stability-Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson)[S]. Beijing: Standards Press of China, 2017 (in Chinese)
- [25] 李希锋, 董娜. 小麦近等基因系的构建及应用进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(5): 2577-2579, 2617
- Li X F, Dong N. Progress in construction and application of near-isogenic line in wheat[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(5): 2577-2579, 2617 (in Chinese)
- [26] 程思源. 分子标记辅助构建小叶基因在黄瓜不同遗传背景下的近等基因系[D]. 郑州: 河南农业大学, 2018
- Cheng S Y. Marker-assisted development of near-isogenic lines for little leaf introgression into different genetic backgrounds of cucumber *Cucumis sativus* L[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2018 (in Chinese)
- [27] Tanksley S D, McCouch S R. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild[J]. *Science*, 1997, 277(5329): 1063-1066
- [28] 张宁. 大白菜橙花和白花基因克隆及其形成的分子机理研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019
- Zhang N. Genes cloning and molecular mechanisms of orange flower and white flower formation in Chinese cabbage *Brassica rapa* L[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2019 (in Chinese)
- [29] Ellur R K, Khanna A, Yadav A, Pathania S, Rajashekara H, Singh V K, Gopala Krishnan S, Bhowmick P K, Nagarajan M, Vinod K K, Prakash G, Mondal K K, Singh N K, Vinod Prabhu K, Singh A K. Improvement of Basmati rice varieties for resistance to blast and bacterial blight diseases using marker assisted backcross breeding[J]. *Plant Science*, 2016, 242: 330-341
- [30] Sagar V, Krishnan S G, Dwivedi P, Mondal K K, Prakash G, Nagarajan M, Singh A K. Development of Basmati rice genotypes with resistance to both bacterial blight and blast diseases using marker assisted restricted backcross breeding[J]. *Indian Journal of Genetics & Plant Breeding*, 2018, 78(1): 36-47

责任编辑: 申青苗



第一作者简介: 李巧云, 博士, 山东省农业科学院蔬菜研究所研究员。主要从事大白菜抗病与抗逆辅助育种研究。主持国家自然科学基金青年科学基金项目、山东省自然科学基金面上项目和山东省重点研发计划各1项, 参与“十三五”“十四五”国家重点研发计划子课题、山东省农业良种工程项目、山东省农业重大应用技术创新项目和山东省重点研发计划等多个项目的研究。以第一作者或通讯作者在国内外期刊发表学术论文19篇, 其中SCI论文2篇; 以第一完成人授权国际发明专利1项, 国家发明专利3项。获山东省农业科技转化促进会科技兴农奖一等奖、山东省农业科学院技术发明奖二等奖和山东省农业科学院科技进步奖各1项。



通讯作者简介: 赵智中, 博士, 山东省农业科学院蔬菜研究所研究员, 大白菜育种团队学术带头人。主要从事大白菜育种与生物技术研究。先后主持或参与完成了国家科技支撑计划、国家重点研发计划、国家自然科学基金、山东省农业良种工程、山东省农业重大应用技术创新等项目20余项。带领团队开展大白菜单倍体培养、种质创新与鉴定、分子标记开发与利用、新品种选育等研究, 构建了抗病分子育种和不依赖基因型的DH育种技术体系; 创制出一批抗病、早熟、耐热、耐抽薹、黄心大白菜优异种质; 育成了一批大白菜新品种, 获得植物新品种权4个, 登记和鉴定大白菜品种9个, 先后有4个大白菜品种成功转让并实现大面积推广。编制山东省农学会团体标准3个, 发表学术论文40余篇, 授权国家发明专利20项。获山东省农业科学院科学技术奖一等奖和二等奖各1项、山东省农业科技转化促进会科技兴农奖一等奖1项。