

基于远缘杂交法的抗根肿病甘蓝新种质创制研究

曾爱松¹, 李家庆¹, 夏鹏飞², 宋立晓¹, 许园园¹, 邢苗苗¹, 严继勇^{1*}

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014;

2. 南京新创蔬菜分子育种研究院有限公司, 江苏 南京 211880)

摘要:以3份携带 *CRb* 基因的抗根肿病大白菜抗源 CCR1、CCR2 和 CCR3 为母本, 与15份不同类型的甘蓝纯系进行远缘杂交, 以获得抗根肿病甘蓝新种质。胚胎拯救法获得的平均成苗率分别是常规田间直接授粉的19.25倍、5倍和35倍。筛选出含有 *CRb* 基因的双二倍体, 以 CCR1、CCR2 和 CCR3 为母本获得的种间杂种的自然加倍率分别为18.5%、48.3%和12.6%。对43株 BC2 单株进行遗传背景筛选等, 表明单株 17B14 和 17B15 与甘蓝的遗传背景最为相近, 且遗传背景与回交亲本甘蓝相似度更高, 可用于下一步回交转育。通过远缘杂交及前景+背景选择快速获得抗根肿病甘蓝渐渗系, 为甘蓝新品种的改良和培育提供了重要材料基础。

关键词: 甘蓝; 根肿病; 种间杂种; 背景选择; 种质

中图分类号: S635.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-755X(2021)01-0074-08

Research on Creation of Cabbage Germplasm Resources with Clubroot Resistance Based on Distant Hybridization Method

ZENG Ai-song¹, LI Jia-qing¹, XIA Peng-fei², SONG Li-xiao¹,

XU Yuan-yuan¹, XING Miao-miao¹, YAN Ji-yong^{1*}

(1. Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for

Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China;

2. Nanjing Xinchuang Vegetable Molecular Breeding Research Institute Co. Ltd., Nanjing 211880, China)

Abstract: Three Chinese cabbage CCR1, CCR2, and CCR3 were used as female parent containing *CRb* gene, and fifteen cabbage pure lines were used to select the new resources of resistance to clubroot disease in cabbage. In the hybrid combinations the average seedling rate obtained by embryo rescue was 19.25 times, 5 times, and 35 times that of conventional field direct pollination, respectively. The double diploid containing the *CRb* gene was screened, and the natural doubling rate of interspecific hybrids obtained by CCR1, CCR2, and CCR3 was 18.5%, 48.3%, and 12.6% respectively. The genetic background of 43 BC2 plants was analysed, the result showed that 17B14 and 17B15 were closest to cabbage. The genetic background of 17B14 and 17B15 are more similar to the backcross parent cabbage, and they can be used for the next step of backcrossing. The results showed it was an effective way to transfer *CRb* gene from Chinese cabbage by foreground + background selection, and this lays the material foundation for the improvement and cultivation of new cabbage varieties.

Key words: cabbage; clubroot disease; inter-specific hybrid; background selection; resource

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, 每年有

收稿日期: 2020-08-25

基金项目: 江苏省农业科技自主创新资金项目(CX(20)2017)

作者简介: 曾爱松(1977—), 女, 山东郓城人, 副研究员, 博士, 主要从事甘蓝类蔬菜遗传育种与种质创新研究。

通信作者: 严继勇(1963—), 男, 江苏姜堰人, 研究员, 博士, 主要从事蔬菜遗传育种研究。

320 万~400 万公顷的十字花科作物被根肿病危害,造成 20%~30%的减产,严重的甚至绝产^[1-3]。目前,在十字花科植物病害中,根肿病已成为研究者最关注的病害之一。结球甘蓝(简称甘蓝,*Brassica oleracea* L. var. *capitata*, $2n=2x=18$, CC)是受其危害严重的寄主之一^[4]。近年来,在中国地区甘蓝生产中该病发病面积急剧增加,南方的云南、四川、湖南等省份,以及北方的河南、山东、甘肃等省份都陆续出现了此种病害。该病害一旦发生,甘蓝从苗期就开始发病死亡,很难形成商品叶球,给生产者造成严重经济损失。轮作栽培和化学防治等方法均难以克服该种病害,栽培抗根肿病品种是最行之有效的办法^[5]。在中国甘蓝生产中,根肿病尚属一种新型病害,抗根肿病资源贮备不足,研究基础较弱。而且,研究表明甘蓝对根肿病抗性属于数量性状遗传,主要由几个隐性基因控制^[6-10],这就使得创制抗根肿病的优良甘蓝资源存在较大困难并且进展缓慢。

大白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*, $2n=2x=20$, AA)与甘蓝同属十字花科芸薹属。大白菜抗根肿病的研究开展较早,抗源材料较多,对其抗根肿病基因的研究也更为深入;目前生产上已选育出多个单抗或多抗根肿病大白菜品种。报道的大白菜抗根肿病基因主要有 8 个,分别定位于大白菜不同连锁群,其中 *CRb* 基因对根肿菌生理小种 2、4 和 8 均具有良好抗性,并表现为单基因显性遗传特性^[11-16]。在中国甘蓝生产中出现的根肿病害,以 4 号生理小种为主且致病力最强。大白菜是甘蓝的一个近缘物种,白菜 A 基因组与甘蓝 C 基因组之间具有部分同源关系,为引进大白菜有益基因提供了机会^[17-18]。因此,为了改良甘蓝的抗根肿病性状,可以利用远缘杂交技术将大白菜的抗根肿病基因转移到甘蓝中。

本研究室从韩国以及中国的青岛和云南各引进了 1 份携带 *CRb* 基因的大白菜抗源,分别为 CCR1、CCR2 和 CCR3,经接种鉴定,以及在云南、湖南等根肿病高发病区的生产鉴定,以上 3 份材料对两地的 4 号小种均表现免疫。为了在甘蓝中迅速引入优良抗根肿病基因,利用 CCR1、CCR2 和 CCR3 与甘蓝不同基因型进行远缘杂交,通过胚胎拯救、*CRb* 基因的背景选择,以及与轮回亲本基因组的前景选择相结合的技术体系,开展了抗根肿病甘蓝渐渗系的快速创制和鉴定,为培育抗根肿病甘蓝杂交品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试大白菜抗源和甘蓝材料,由江苏省农业科学院蔬菜研究所叶菜研究室提供。大白菜抗源为携带 *CRb* 基因的大白菜材料 CCR1、CCR2 和 CCR3,对根肿病表现为高抗;甘蓝为本研究室拥有的 15 份高代自交系或 DH 系材料,编号分别为 C1~C15。

供试根肿菌:甘蓝肿根来自云南楚雄,由本实验室分离获得根肿菌,经过 Williams 鉴定系统将其鉴定为 4 号生理小种。肿根存于-20℃冰箱内备用。

1.2 试验方法

1.2.1 种间杂交及胚胎拯救

甘蓝材料于 2017 年 8 月中旬播种,大白菜材料于 9 月中旬播种,分别于苗龄 25 d 左右定植于江苏省农业科学院六合试验基地露地,12 月选取种株移栽于塑料大棚,常规管理。翌年春季开花后分别以 3 份大白菜抗源材料作为母本,15 份甘蓝材料作为父本,配制 45 个杂交组合。在开花期人工剥蕾去雄重复授粉,取父本新鲜花粉涂在母本柱头上,每天早晚重复授粉 2 次,连续涂抹 3 d。胚胎拯救是取授粉后 10 d 的子房经消毒灭菌后接入固体 MS 培养基,培养 20 d 后剥胚接入固体 B5 培养基,形成幼苗后移到分化培养基($MS+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}+1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ 6-BA}$)中进行分化扩繁,获得足够多的幼苗后,将其移到生根培养基($1/2MS+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NAA}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{ IBA}$)生根处理后,移栽到穴盘中,常规管理。每对组合通过蕾期重复授粉,花蕾数为 100 个,通过胚胎拯救接种子房数为 100 个。

其中,人工授粉杂种成苗率=获得杂种幼苗数/授粉花蕾数 $\times 100\%$,子房培养杂种成苗率=获得杂种幼苗数/子房培养数 $\times 100\%$ 。

1.2.2 杂种植株形态学性状调查及倍性鉴定

观察、记录杂种植株处于营养生长期和生殖生长期不同生长发育阶段的形态学特征;然后对通过分子标记筛选和形态学特征介于双亲间的种间杂种,利用流式细胞仪对待测杂种细胞 DNA 相对含量进行测定。流式细胞仪鉴定参照于海龙的方法^[19],具体步骤如下:取待测样品叶片 200 mg,分别加入 1.5 mL 细胞裂解液,用刀片切碎组织,混合匀浆,利用 400 目滤网将匀浆过滤到 1.5 mL 离心管中,滤液体积应大于 500 μ L,弃上清,加入 DAPI 染液(工作浓度 4 μ g $\cdot$ mL⁻¹)对核进行染色,避光处理 30 min 后,上机测量。以亲本甘蓝 2C DNA 相对含量为参照,将亲本甘蓝 G1 期对应峰值调整到 200 通道处,对杂种细胞 DNA 相对含量进行测定,样品 CV 值小于 5%表示结果可靠。

1.2.3 根肿病抗性鉴定和前景选择

通过抗根肿病基因 *CRb* 的分子标记和菌土法接种鉴定相结合的方法鉴定根肿病抗性。其中分子标记验证方法为:利用与大白菜抗根肿病 *CRb* 基因紧密连锁的引物 TCR05 对后代植株进行分子标记鉴定^[20],当后代材料的扩增谱带中出现抗根肿病大白菜所具有的特异条带时,即可判定其为携带 *CRb* 基因的真杂种。菌土法为:将基质灭菌后,每克灭菌土中接种 0.001 g 病根,然后将直接将鉴定材料播于菌土中,于 25~28 $^{\circ}$ C 下培养,2 个月后拔出幼苗,洗净根部杂质,观察发病情况。

TCR05 引物序列为:

F:AGAATCATGACCGGGGAAAT R:GCAGCTAAGTCATCGACCAA

1.2.4 分子标记的筛选及回交杂种植株初步筛选

利用设计开发的 284 对甘蓝 SSR 引物及 16 对 InDel 引物对大白菜、甘蓝双亲进行基因组扩增多态性筛选,选择双亲中表现稳定、清晰并且有多态性的引物对杂种后代 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 扩增产物用 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,用快速银染法染色。

1.2.5 数据统计和背景分析

针对引物产生的每个等位变异,不同材料在该等位变异处,有带记为“1”,无带记为“0”,最终整理得到一个由 0/1 构成的数据矩阵。利用 NTSYSpc2.11a 软件,计算亲本和杂种单株间的遗传相似系数,采用非加权类平均法(UPGMA)进行聚类分析,并构建 NJ 聚类树。

2 结果与分析

2.1 大白菜×甘蓝种间杂种 F₁ 的获得

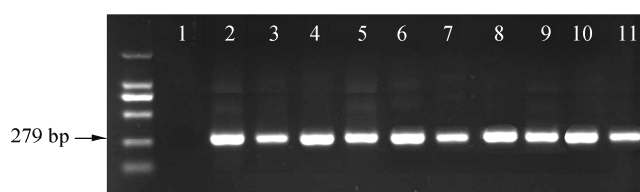
大白菜与甘蓝进行种间杂交,共对 9 000 个花蕾进行杂交授粉,其中田间直接授粉和子房培养各 4 500 个花蕾。由表 1 可知:以大白菜抗源 CCR1、CCR2 和 CCR3 做母本的杂交组合中,胚胎拯救获得的平均成苗率分别是常规田间直接授粉的 19.25 倍、5 倍、35 倍(表 1),表明利用胚胎拯救方法获得的种间杂种比例显著高于常规人工授粉方法。其中在以 CCR2 做母本的杂交组合中,通过胚胎拯救和常规人工授粉分别获得了 9.67%和 1.93%的较高成苗率,这表明不同大白菜基因型对于杂种成苗率具有非常重要的影响,同时,在同一个大白菜抗源中,不同甘蓝基因型与大白菜之间的杂交率也存在较大差异,最高成苗率为最低成苗率的 4 倍。

表 1 不同大白菜×甘蓝组合在不同情况下的胚胎成苗率

抗源	方法	杂种成苗率/%															成苗株数	平均成苗率/%
		C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15		
CCR1	人工授粉	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0	4	0.27
	子房培养	2	6	8	4	6	3	6	4	6	5	5	5	6	7	4	77	5.13
CCR2	人工授粉	2	3	3	1	3	0	3	0	3	2	1	1	3	2	2	29	1.93
	子房培养	8	12	10	14	12	12	9	4	6	10	8	8	10	13	9	145	9.67
CCR3	人工授粉	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0.13
	子房培养	4	7	3	5	6	8	6	2	4	5	6	2	4	5	3	70	4.67

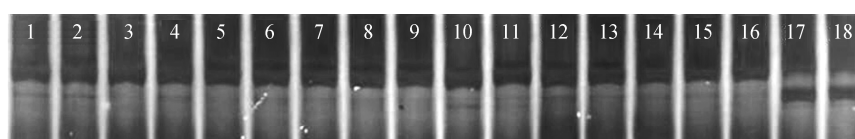
2.2 大白菜×甘蓝种间杂种 F_1 双二倍体特征特性

利用与大白菜抗根肿病 *CRb* 基因紧密连锁的标记 TCR05 对获得杂交种 F_1 进行验证,筛选含有 *CRb* 抗性基因的幼苗,结果表明 309 株(共获得 327 株成苗,其中 18 株移栽后未成活)幼苗全部含有抗性基因条带(图 1)。从杂种 F_1 营养生长期植株性状表现看出有 8 棵幼苗未杂交成功,初步鉴定为大白菜自交株系。同时,为了进一步鉴定杂种 F_1 杂合性,从 20 对核心引物中筛选出 1 对引物 Bra012525,该引物在 2 份甘蓝材料 C1、C2 和 3 份亲本大白菜中均表现出稳定、清晰的扩增多态性,在亲本间表现为共显性单一条带。利用该引物对其获得的 40 株(共获得 44 份成苗,其中 4 株移栽后未成活)成苗进行 PCR 扩增,结果(图 2)显示:有 37 株单株扩增到两亲本特异条带,鉴定为真杂种;其余 3 株单株只扩增到大白菜特异性条带,鉴定为假杂种,与田间鉴定结果一致。



1:甘蓝;2~4:大白菜;5~11:杂交种

图 1 引物 TCR05 对部分远缘杂种 F_1 鉴定的结果



1~3:大白菜;4~9 和 12~16:真杂种;10~11:假杂种;17~18:甘蓝

图 2 引物 Bra012525 对部分远缘杂种 F_1 鉴定的结果

生殖生长期杂交种有可育株与不育株之分,不育株花蕾小而瘦长,可育株花蕾大而饱满。利用流式细胞仪对种间杂种可育植株和亲本 DNA 相对含量进行了测定。以甘蓝(2C)为标准,杂种单株 G1 期荧光强度峰高于两亲本荧光峰,峰值近双亲峰值的 2 倍,推测可育株杂种植株为四倍体植株,符合 AACC 染色体组成(图 3)。其中,以 CCR1、CCR2、CCR3 为母本获得的种间杂种的自然加倍率分别为 18.5%、48.3%、12.6%。除了双二倍体,还存在部分嵌合体:整棵植株中,1~2 枝的枝条花瓣大,有正常花粉,其余枝条花瓣小,无花粉。从与甘蓝杂交的亲合性以及杂种的自然加倍率方面来看,CCR2 是一个理想的远缘杂交的材料。从本试验的结果推断,远缘杂交亲和性和杂交种自然加倍率与特殊材料的基因型有相关性。

由图 4、图 5 可知,在营养生长期和生殖生长期,种间杂种双二倍体生长势旺盛,开展度大,在叶片、花蕾、花朵、种子等的大小,以及植株高度等方面具有明显的超亲优势,亲本甘蓝种子千粒重为 3.3~4.5 g,亲本大白菜种子千粒重为 2.5~4.5 g,双二倍体种子千粒重为 4.8~6.5 g,叶片颜色、厚度以及蜡粉量偏向亲本甘蓝,花朵、种子颜色(褐色至深褐色)偏向亲本大白菜,叶表面及叶柄刺毛的量介于双亲之间。大部分双二倍体不包心,不结球,或松散包球,花期和蕾期自交亲和指数均较高。

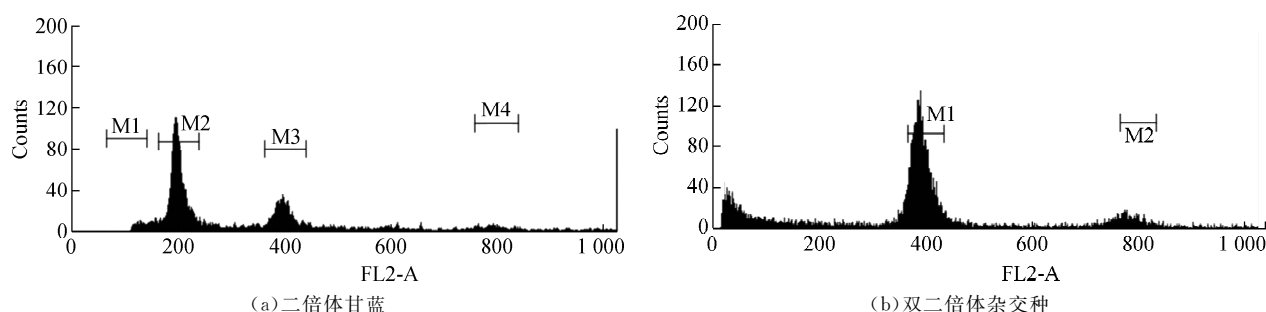


图 3 远缘杂种 F_1 植株流式细胞仪鉴定结果



a:大白菜;b:甘蓝;c~i:双二倍体不同株系

图 4 远缘杂种 F_1 营养生长期形态特征



a:从左至右分别为甘蓝、远缘杂种双二倍体(AACC)、大白菜、远缘杂种单二倍体(AC)的花形态;

b~d:分别为甘蓝、远缘杂种双二倍体、大白菜的种子形态

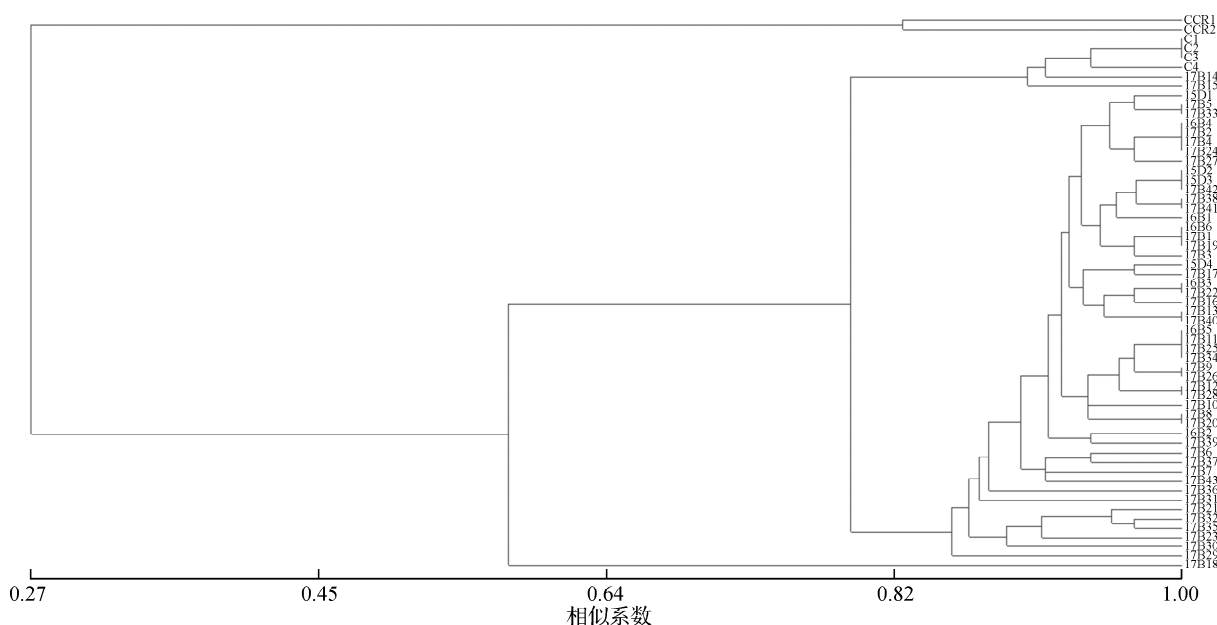
图 5 远缘杂种 F_1 生殖生长期形态特征

2.3 大白菜×甘蓝种间杂种渐渗系的选择

选择以 CCR1、CCR2 做母本, C1、C2、C3、C4 做父本获得的部分双二倍体继续与甘蓝进行回交, 利用胚胎拯救共获得 BC1 代株系 40 个, 经鉴定其中有 20 个株系含有 CRb 基因。选择含有 CRb 基因的 BC1 株系继续与甘蓝进行回交, 获得 85 个 BC2 株系, 经鉴定其中有 43 个株系含有 CRb 基因。BC1 和 BC2 的不同株系间农艺性状差异较大, 大部分株系在植株形态上仍介于两亲本之间, 不同单株的生长势、开展度、叶色、花朵大小、开花期等不同, 部分单株株型接近亲本甘蓝。BC2 代均能正常开花散粉, 但人工授粉杂交结籽率较低, 平均为 1.96%。

为了加速回交转育进程, 对大白菜×甘蓝种间杂交后代的遗传背景进行分析。利用 284 对 SSR 引物

及 16 对 InDel 引物对双亲进行多态性筛选,获得多态性引物 48 对。挑选均匀分布在甘蓝 9 条染色体上、扩增稳定、条带清晰的 32 对多态性引物,对经鉴定含有 *CRb* 基因的 BC2 单株进行遗传背景筛选。NTSYSpc2.11a 分析结果(图 6)表明: F_1 植株的遗传背景与亲本甘蓝更为接近,遗传相似系数为 0.74;而 BC2 植株的遗传背景差异较大,与亲本甘蓝的遗传相似系数为 0.26~0.65。在 43 株 BC2 植株中,单株 17B14 和 17B15 与甘蓝的遗传背景最为相近,田间农艺性状结果进一步验证了两个单株的遗传背景与回交亲本甘蓝更相似,可用于下一步回交转育。同时,取 17B14 和 17B15 的生殖生长期的幼芽进行再生,扩繁后进行根肿病抗性接种鉴定,2 份材料发病率均为 0。



CCR1、CCR2 为亲本大白菜;C1、C2、C3、C4 为亲本甘蓝;15D1、15D2、15D3、15D4 为 F_1 双二倍体植株;16B1~16B6 为 BC1 植株;17B1~17B43 为 BC2 植株

图 6 亲本、种间杂种 F_1 、BC1 及 BC2 群体的 SSR 聚类图

3 结论与讨论

不同作物间的远缘杂交是进行种质创新的重要方法,在芸薹属作物间通过胚胎拯救技术已成功获得了多个种间杂种^[21-24]。在本试验中,利用胚胎拯救技术获得种间杂种比例最高为常规人工授粉方法的 35 倍,该结果进一步证明了胚胎拯救手段可大大提高远缘杂交的成功率。同时,研究结果表明,不同甘蓝基因型与同一个大白菜抗源之间的杂交成苗率存在差异,但不同大白菜抗源基因型对于杂交成苗率的影响更大。当 CCR2 作为抗源时,人工授粉和胚胎拯救 2 种杂交方式均获得了较高的杂交成苗率,而且在与 15 份甘蓝基因型杂交中表现出较稳定的杂交率,表明大白菜抗源基因型显著影响甘蓝与大白菜杂交的成苗率。同时,以 CCR2 为母本获得的种间杂种的自然加倍率为 48.3%,显著高于以 CCR1 和 CCR3 为母本获得的自然加倍率,表明不同大白菜做亲本获得杂交种的自然加倍率也主要由大白菜基因型决定。因此,从与甘蓝杂交的亲合性以及获得杂种的自然加倍率两方面来看,CCR2 是一个理想的远缘杂交材料。本试验的结果推断,远缘杂交亲和性以及杂交种自然加倍率与特殊材料的基因型有相关性,这可能与不同来源的细胞质对异源核基因组的忍耐能力不同有关,这种差异在已有研究中也有报道^[24-25]。因此,选用远缘杂交亲本间亲和性高的材料可显著提高实验的成功率,这为大白菜和甘蓝之间亲缘性关系研究筛选出了非常好的试验材料。

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^[26]。Melchinger 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^[27]。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^[13]。利用

与根肿病抗性基因相关的分子标记辅助育种是一种高效的育种技术。研究发现 *CRb* 基因的侧翼标记 TCR01、TCR05、TCR09、TCR13 能够有效应用于分子标记辅助选择^[12,28-29]。任平等对多份大白菜抗根肿病基因 *CRb* 的分子标记验证表明,TCR05 能够对 *CRb* 基因进行准确鉴定和跟踪,具有较强的通用性,适用于 MAS^[20]。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。BC2 群体的苗期接菌试验证明 TCR05 的前期选择是有效而准确的。

在远缘杂交中,同一个杂交后代内不同株系间农艺性状分离较显著。在本试验获得的 85 个 BC2 株系中,不同株系间的形态差异基本上呈正态分布,即大部分在株型大小、开展度、颜色等方面仍具有明显的杂种优势特征,少部分分别具有与父本或母本更为相近的特征。研究的最终目标是要排除大白菜的其他基因,除了回交之外,同时可以采用自交、缺体单体代换等方式。随着基因组测序的完成,基于基因组重测序开发的大量的 SNP、SSR 和 InDel 标记,因在基因组内具有分布广、密度高、变异稳定、多态性强、检测容易等优点,均可用做背景选择标记。而 SSR 标记与其他标记相比,具有特异性好、实验技术难度低、位点数量丰富且分布均匀等优点。利用 SSR 标记进行背景辅助选择在多种作物中得到成功应用^[30-33]。在本研究中,利用回交育种技术及 *CRb* 分子标记技术,获得了 43 株含有 *CRb* 基因的 BC2 代种间杂种,利用 SSR 标记结合形态学观察对 BC2 代植株进行背景筛选,获得了遗传背景和形态最接近亲本甘蓝的 *CRb* 阳性植株,表明通过抗性基因和回交后代的遗传背景分析,可加速渐渗系的鉴定和创制速度。

参考文献:

- [1] 刘卹洲,杜艳,乔俊卿,等. 甘蓝根肿病生防细菌的筛选、鉴定及评价[J]. 南京农业大学学报,2014,37(4):83-90
- [2] CHAI A L, XIE X W, SHI Y X. Special issue: research status of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on cruciferous crops in China[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2014, 36: 142-153
- [3] 江莹芬,战宗祥,朴钟云,等. 油菜抗根肿病资源创新与利用的研究进展与展望[J]. 作物学报,2018,44(11):1592-1599
- [4] DIEDERICHSEN E, FRAUEN M, LINDERS E G A, et al. Status and perspectives of clubroot resistance breeding in crucifer crops[J]. Plant Growth Regulation, 2009, 28: 265-281
- [5] 彭宇龙,黄云,杨辉. 四川省根肿菌的分布和生理小种及品种抗性评估[J]. 植物保护学报,2018,45(2):299-306
- [6] WERNER S, DIEDERICHSEN E, FRAUEN M, et al. Genetic mapping of clubroot resistance genes in oilseed rape[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 116: 363-372
- [7] NAGAOKA T, DOULLAH M A U, MATSUMOTO S. Identification of QLTs that control clubroot resistance in *Brassica oleracea* and comparative analysis of clubroot resistance genes between *B. rapa* and *B. oleracea*[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2010, 120: 1335-1346
- [8] 司军,李成琼,任雪松,等. 结球甘蓝抗根肿病 SSR 分子连锁图谱的构建[J]. 植物病理学报,2011,41(3):305-309
- [9] HIROYA T, MOTOKI S, DOULLAH A D, et al. Accumulation of quantitative trait loci conferring broad-spectrum clubroot resistance in *Brassica oleracea*[J]. Molecular Breeding, 2013, 32: 889-900
- [10] 司军,李成琼,肖崇刚,等. 甘蓝根肿病抗性遗传规律的研究[J]. 园艺学报,2003(6):658-662
- [11] 王超楠,张斌,张红,等. 大白菜抗根肿病基因定位及连锁标记挖掘[J]. 华北农学报,2019,34(3):203-208
- [12] PIAO Z Y, DENG Y Q, CHOI S R, et al. SCAR and CAPS mapping of *CRb*, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108: 1458-1465
- [13] SAKAMOTO K, SAITO A, HAYASHIDA N, et al. Mapping of isolate-specific QTLs for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 117: 759-767
- [14] 宋莹,张清霞,张淑霞,等. 大白菜抗根肿病基因定位及分子标记研究进展[J]. 分子植物育种,2019,17(21):7130-7137
- [15] SUWABE K, TSUKAZAKI H, IKETANI H, et al. Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: the genetic origin of clubroot resistance[J]. Genetics, 2006, 173: 309-319
- [16] 李宗芸,栗茂腾,黄荣桂. 基因组原位杂交辨别芸薹属异源四倍体 AA、BB、CC 基因组研究[J]. 中国油料作物学报, 2002, 24(1): 102-104

- [17] MASON A S, YAN G J, COWLING W A, et al. A new method for producing allohexaploid *Brassica* through unreduced gametes[J]. *Euphytica*, 2012, 186(2): 277–287
- [18] 毛清云, 轩淑欣, 顾爱侠, 等. 大白菜-结球甘蓝易位系‘AT9-1’和‘AT9-2’的获得及其遗传稳定性分析[J]. *园艺学报*, 2017, 44(5): 871–880
- [19] 于海龙. 通过远缘杂交创制甘蓝 *Ogura* 细胞质雄性不育的恢复材料[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015
- [20] 任平平, 马安峰, 程斐, 等. 大白菜抗根肿病基因 *CRb* 的分子标记验证与种质资源筛选[J]. *山东农业科学*, 2016, 48(6): 7–10
- [21] YU H L, FANG Z Y, LIU Y M, et al. Development of a novel allelespecific *Rfo* marker and creation of *ogura* CMS fertilityrestored interspecific hybrids in *Brassica oleracea*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2016, 129: 1625–1637
- [22] SHARMA B B, KALIA P, SINGH D, et al. Introgression of black rot resistance from *Brassica cartinata* to cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* group) through embryo rescue[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1–16
- [23] 顾爱侠, 申书兴, 陈学平, 等. 大白菜与结球甘蓝杂交获得异源三倍体及其生殖特性的研究[J]. *园艺学报*, 2006, 33(1): 73–77
- [24] 乔海云, 李菲, 张淑江, 等. 大白菜与诸葛菜属间杂交及 GISH 鉴定[J]. *园艺学报*, 2009, 36(10): 1473–1478
- [25] 邢少辰, 周开达, 蔡玉红. 植物远缘杂交的研究[J]. *吉林农业科学*, 2000, 25(4): 18–21
- [26] TANKSLEY S D, YOUNG N D, PATTERSON A H, et al. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science [J]. *Bio/Technology*, 1989, 7: 257–263
- [27] MELCHINGER A E. Use of molecular markers in breeding for oligo genic disease resistance[J]. *Plant Breeding*, 1990, 104: 1–19
- [28] 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
- [29] 陈慧慧, 张腾, 梁珊, 等. 大白菜抗根肿病 *CRb* 基因紧密连锁标记的开发与定位[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(17): 3551–3557
- [30] VARDARELI N, DOGAROGLU T, DOGAC E, et al. Genetic characterization of tertiary relict endemic *Phoenix theophrasti* populations in Turkey and phylogenetic relations of the species with other palm species revealed by SSR markers[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2019, 305: 415–429
- [31] WANG L Y, LI H W, SUN P, et al. Genetic diversity among wild androecious germplasms of *Diospyros kaki* in China based on SSR markers[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 292: 1–9
- [32] 刘基生, 苗雯雯, 王冬梅, 等. 甘蓝自交系背景选择标记的建立[J]. *园艺学报*, 2014, 41(8): 1620–1630
- [33] 于海龙, 方智远, 杨丽梅, 等. SSR 标记辅助芥蓝×甘蓝型油菜种间杂交后代的遗传背景筛选[J]. *中国蔬菜*, 2015(8): 14–21

(责任编辑: 湛 江)