

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

于海龙 方智远 杨丽梅 刘玉梅 庄木 李占省 吕红豪 张扬勇*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 为筛选芥蓝 × 甘蓝型油菜种间杂交后代的遗传背景, 加速回交转育进程, 采用蕾期授粉结合胚挽救手段进行远缘杂交, 获得芥蓝和甘蓝型油菜的种间杂种 F_1 和 BC_1 群体。利用已有的 220 对 SSR 引物对双亲进行多态性筛选, 获得多态性引物 51 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 33 对多态性 SSR 引物, 对 3 株 F_1 单株和 35 株 BC_1 单株进行遗传背景筛选。NTSYSpc2.11a 分析结果表明: F_1 植株的遗传背景与亲本甘蓝型油菜更为接近, 遗传相似系数为 0.74; 而 BC_1 植株的遗传背景差异较大, 与亲本芥蓝的遗传相似系数在 0.26~0.65 之间。在 35 株 BC_1 植株中, 单株 14Y1 与芥蓝的遗传背景最为相近, 形态观察结果进一步验证了该单株的遗传背景与回交亲本芥蓝更相似, 可用于下一步回交转育。

关键词: 芥蓝; 甘蓝型油菜; 种间杂种; 遗传背景; SSR 标记

芥蓝 (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*, CC, $2n=2x=18$) 属十字花科芸薹属甘蓝种的一个变种, 以花薹为主要食用器官, 是芸薹属中重要的蔬菜作物之一。相对于大白菜和结球甘蓝, 芥蓝种质资源较少, 遗传背景比较狭窄。远缘杂交是丰富芸薹属植物种质资源的重要手段之一 (林超等, 2007)。通过远缘杂交可以打破种、属间的生殖隔离, 有效地进行不同种、属间杂交, 创造植物新类型、获得新种质资源, 因此远缘杂交可以作为拓宽芥蓝遗传背景的有效途径之一。此外, 由于芥蓝的生长周期短, 1 a 可繁殖 2~3 代, 因此利用芥蓝进行远缘杂交可快速实现目的性状的转移和改良。乔海云 (2012) 利用蕾期授粉结合胚挽救技术获得了芥蓝与菜薹的种间杂种, 并研究了菜薹与芥蓝种间杂交

的亲本性。韩甫 (2011) 利用芥菜型油菜与芥蓝进行种间杂交, 获得异源三倍体种间杂种, 并对影响种间杂交的因素、杂种性状特征及种间杂种小孢子培养进行了研究。陈洪高 (2006) 通过萝卜与白花芥蓝杂交, 合成了萝卜-芥蓝异源四倍体, 该异源四倍体可用作向甘蓝型油菜转移萝卜优异性状的桥梁材料。满红等 (2007) 利用四倍体菜薹和四倍体芥蓝杂交, 获得了菜薹和芥蓝的异源四倍体种间杂种。

甘蓝型油菜 (*Brassica napus*, AACCC) 是由甘蓝 (*B. oleracea*, CC) 和白菜 (*B. rapa*, AA) 杂交后自然加倍获得的, 属于十字花科芸薹属, 19 世纪 30 年代从欧洲引进, 是我国重要的油料作物之一。甘蓝型油菜作为甘蓝类蔬菜的近缘种之一, 具有一些控制特异性状的优异基因, 如抗根肿病基因 (季海雯, 2013)、Ogura 细胞质雄性不育育性恢复基因 (Primard-Brisset et al., 2005) 等, 这正是甘蓝类蔬菜所缺乏的。利用芥蓝和甘蓝型油菜远缘杂交可以有效地拓宽芥蓝的遗传背景, 可作为创制芥蓝新种质的一条途径。但到目前为止, 关于芥蓝和甘蓝型油菜种间杂交的研究较少, 且甘蓝型油菜与甘蓝类蔬菜远缘杂交困难, 后代育性低, 很难获得

于海龙, 男, 硕士研究生, 专业方向: 蔬菜遗传育种, E-mail: yuhailongnet@163.com

* 通讯作者 (Corresponding author): 张扬勇, 男, 副研究员, 硕士生导师, 专业方向: 蔬菜遗传育种, E-mail: zhangyangyong@caas.cn

收稿日期: 2015-03-15; 接受日期: 2015-04-29

基金项目: 国家“863”计划项目 (2012AA100202), 创新能力专项资金项目 (2014EG134236), 农业部大宗蔬菜产业技术体系项目 (CARS-25), 农业部园艺作物遗传改良重点开放实验室项目

种间杂种。

21 世纪初, 分子标记技术就已经应用于甘蓝类蔬菜的遗传育种 (王晓武和方智远, 2001), 随着甘蓝基因组测序与重测序的完成 (Liu et al., 2014) 以及生物信息学技术的发展, 越来越多的分子标记得以开发, 并用于甘蓝亲缘关系和遗传背景多样性分析 (刘基生等, 2014), 以及品种指纹图谱构建和种子纯度鉴定 (王庆彪等, 2014) 等研究。

本试验采用蕾期授粉结合胚挽救手段进行远缘杂交, 获得芥蓝和甘蓝型油菜的种间杂种 F_1 和 BC_1 群体, 利用多态性 SSR 引物对杂交后代及回交后代的遗传背景进行聚类分析, 筛选出遗传背景接近于亲本芥蓝的回交后代, 作为下一步回交转育的花粉供体, 提高杂交后代回交育种效率。

1 材料与方法

1.1 试验材料

芥蓝高代自交系 2 份, 其中 1 份由华南农业大学雷建军老师提供, 编号 K1; 1 份由中国农业科学院蔬菜花卉研究所甘蓝课题组提供, 编号 JL6。甘蓝型油菜高代自交系 4 份, 其中 2 份由中国农业科学院油料作物研究所李云昌老师提供, 编号 Y6、Y7; 另外 2 份由中国农业科学院油料作物研究所王汉中老师提供, 编号 Y8、Y9。

1.2 种间杂交和胚挽救

各材料均于 2012 年 9 月下旬播种, 待幼苗 6~7 片叶时挑选长势一致的健壮植株定植在温室中, 常规栽培管理。以 1 份芥蓝材料为母本、4 份甘蓝型油菜材料为父本, 配制 4 个杂交组合 ($K1 \times Y6$ 、 $K1 \times Y7$ 、 $K1 \times Y8$ 和 $K1 \times Y9$), 获得种间杂种 F_1 。在盛花期采用人工剥蕾去雄重复授粉的方法: 取父本新鲜花粉, 涂抹在母本去雄花蕾的柱头上, 每天早晚重复授粉 2 次。为了进一步提高远缘杂交的成功率, 授粉后 20 d 进行胚挽救处理。子房表面消毒方式为: 用 75% 乙醇消毒 30 s, 然后用 8% 次氯酸钠消毒 12 min, 再用无菌水冲洗 3 次, 每次 5 min, 以洗净残留的次氯酸钠。离体培养环境条件为: 温度 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, 光照时间 $16 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$, 光照强度 2 000 lx。胚培养采用 MS 固体培养基。利用芥蓝材料 K1、JL6 与 F_1 种间杂种进行大量回交, 并

结合胚挽救方法获得 BC_1 群体。

1.3 多态性 SSR 标记的筛选与背景标记的确定

利用王庆彪等 (2014) 设计开发的甘蓝 20 对指纹图谱 EST-SSR 核心引物, 以及选取本所甘蓝课题组设计开发的均匀分布在甘蓝 9 条染色体上的 200 对 SSR 引物, 对双亲 (芥蓝、甘蓝型油菜) 进行多态性筛选, 选取扩增稳定、条带清晰、在双亲间有多态性的引物用于杂交、回交后代的遗传背景分析。

植物基因组 DNA 提取采用改良 CTAB 法 (Saghai-Marooof et al., 1984), PCR 反应体系 (20 μL): $10 \times \text{Buffer}$ (含 Mg^{2+}) 2 μL , dNTP (2.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) 1.6 μL , 上下游引物 ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 0.8 μL , *Taq* 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , 模板 DNA ($20 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 5 μL , ddH₂O 9.6 μL , 本步骤所用试剂均购于北京迪宁生物科技发展公司。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 合适的退火温度 (退火温度根据引物的 T_m 值设定) 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 恒压 160 V、1.5 h, 快速银染法染色。

1.4 数据处理

针对引物扩增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。

1.5 杂种后代的形态学性状调查

观察、记录杂交、回交后代植株成熟期的形态学特征, 如叶形、花大小、叶裂数、叶耳数和花色等, 调查标准参照《芥蓝种质资源描述规范和数据标准》(李锡香和方智远, 2008)。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记筛选结果

从 220 对 SSR 引物中筛选得到多态性引物 51 对, 引物多态率为 23.18%。挑选均匀分布在甘蓝 9 条染色体上的扩增稳定、条带清晰、带型差异明显、易于识别的多态性引物 33 对用于遗传背景分析 (表 1、图 1)。

表 1 33 对多态性 SSR 引物信息

引物编号	正向引物序列 (5'-3')	反向引物序列 (5'-3')	等位变异数	多态性信息含量 (PIC)
SSR9	CGGTGTTTTAAGAGAGGGC	GCTTGGCCACAATCTCATTCA	2	0.29
SSR13	TCATCCTCCATACCTCTCCG	CCGGTTCAGGTTGAAGAAAA	4	0.28
SSR53	ATGGCGTTTCATCAACTCCT	TGCGAACGCTACAGAAAATG	5	0.41
SSR81	GTCTCGCCATGTCTCTCTC	TGGCATCACACTAGCTACGC	5	0.28
SSR94	GCGAAACCAAGAGAGGAGAG	CAGAGGAAGGGGAGGAAGAG	8	0.19
SSR112	TTGCCACACTATTGGCATGT	ACAAGAACCAGGGAAGTCCA	2	0.19
SSR132	CCAGAAGGAACCAGCAAGAG	AAATGTCAATGCCACTGCAA	2	0.31
SSR180	TGAATATGATACGGGAGGGG	AACGGGGGAACGTTTAGATT	4	0.17
SSR188	AGACAGCGGAGACGGTAATG	CGATAGACAGATGGGCAACG	5	0.16
SSR284	TTGCCTTTGTCTCTCTCTG	TTGGCTAATGTACAATGCAGG	5	0.14
SSR304	AAACGAACCACFTTGTGCC	CTTCTGTTTCTTCTTCGCCG	3	0.14
SSR340	GCGACTTCCACTCCTCACTC	GAAGACAGCAAAGGACCAGC	5	0.26
SSR364	GTCGGGTCTCTAGCGAATGA	CAGACACACTCCACCGACAC	2	0.41
BoE450	TCTCGCCATGGCTGATAAG	TCGGGGCGTTGATTCTCGTCTCT	2	0.28
SSR372	TTGGAACGGAGTTTAAAAGC	GCAACAAAGCCTGTTGGTIT	4	0.19
SSR412	AGCTCCACCTCCTGAAGACA	AATTGCAAAAATCGAGAACCG	8	0.11
SSR448	GAAAATCGAAAATTATGTTGAACTG	TAGAGTTGAGGGGGGACTA	2	0.32
SSR484	AAACCAGAGCCAAAAGCAAA	GTGTTATGGAAGTGCTGGG	5	0.13
SSR544	CGGGGGTTTATTAGGGAAAA	AGACTGTGGCGCTTTTTGTT	3	0.13
SSR572	TCGCTAGACATTCCCAATC	CAGTTGGTGAAGGGCGTATT	4	0.25
SSR584	GCCACCGTTGTAAGAGTGCT	TCATCATCATCGTCCCTTGA	4	0.32
SSR596	AGGCTTCCCTTTCTCACTC	GGCTGCTTCTTCATACGCTT	2	0.27
SSR606	TGGAGAAGCACCAAAAGTGTG	TCGAAATTTCGCCTCCATATC	3	0.23
SSR646	AATGCAGGAATCGATCAAGG	CCTCCTCGATTGTGATCGTT	4	0.56
SSR680	AGTCGGCGATGGACTAGAGA	ATGTCCGCCAATAGAGAAA	4	0.22
SSR688	ATTTTCATGCGGTGTGCCA	ACCACCCCAATCTCGTTACA	5	0.26
SSR696	CCCATCTTTTCCCTCTCTC	TGTGTTCCATCGTCAGTGCT	3	0.13
SSR712	GGATTGGTAATGGTTGGTCTG	AAGCATCCGTGGTCGTTAAG	4	0.23
BoE134	CTCTTATTTCTTGTAGGGCTTTTA	CCGTTGGAGATGACTGACTG	2	0.36
SSR773	AAACCAGATCCACATGCTCC	TCGGCGATACCTTTGATTTT	2	0.24
SSR785	TCAAGGCAACTGTGAACCAA	GTGATCGCCTTATCCTTTTCG	4	0.27
SSR805	TTTCTTGTGGGGTTTATGC	TTCTGTGTTCAAAGCTTTGG	4	0.38
SSR833	ATGGTCCACCTCTCAAAAAGG	GTGCTCTGGAAGTACGCTC	4	0.28

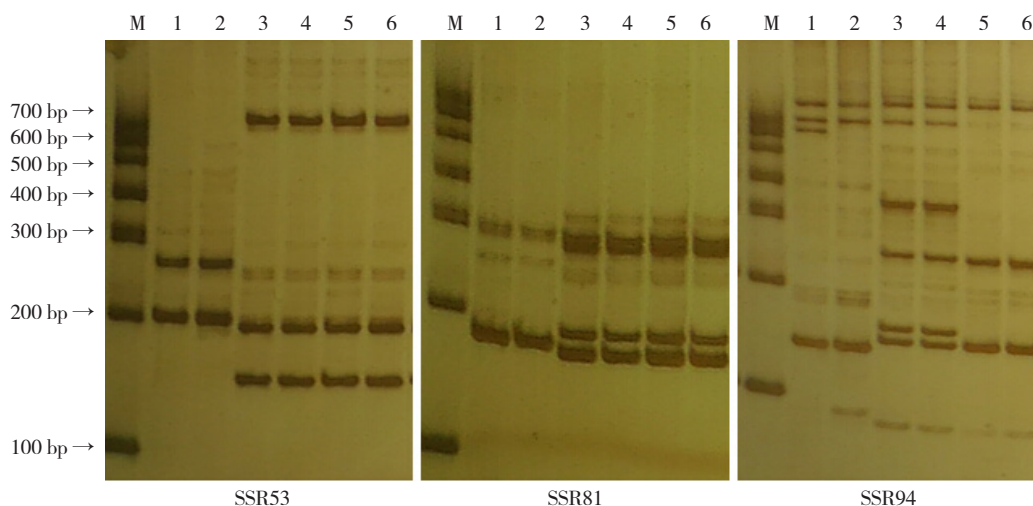


图 1 引物 SSR53、SSR81、SSR94 在亲本中的扩增结果

1, 芥蓝 K1; 2, 芥蓝 JL6; 3, 甘蓝型油菜 Y6; 4, 甘蓝型油菜 Y7; 5, 甘蓝型油菜 Y8; 6, 甘蓝型油菜 Y9; M, Marker I。

33 对多态性引物在双亲中共扩增得到 125 个等位变异, 每对引物产生的等位变异数不等, 变幅为 2~8, 平均每对引物扩增出 3.79 个等位变异。33 对引物的多态性信息含量 (PIC) 在 0.11~0.56 之间, 具有较好的鉴别能力, 且它们均匀分布在甘蓝的 9 条染色体上。

2.2 种间杂种的获得及遗传背景分析

利用蕾期授粉结合胚挽救方法, 共获得种间杂种 F_1 植株 7 株, 编号 YL1、YL2-1、YL3、YL4、YL5、YL6、YL7; 其中 YL1、YL7 由 $K1 \times Y7$ 获得, YL2-1、YL6 由 $K1 \times Y8$ 获得, YL4、YL5 由 $K1 \times Y6$ 获得, YL3 由 $K1 \times Y9$ 获得。开花期观察发现 7 株单株中只有 YL2-1 和 YL6 花粉较多。以 YL2-1、YL2-3 (YL2-3 为 YL2-1 分化后经加倍处理获得的植株)、YL6 为父本, 与芥蓝回交获得 BC_1 植株 45 株, 编号 14Y1~14Y45; 经形态观察和倍性鉴定, 其中 35 株为真杂种, 10 株为假杂种。

利用获得的 33 对多态性 SSR 引物对亲本、 F_1 和 BC_1 植株进行 PCR 扩增, 采用 NTSYSpc2.11a 软件计算单株间的遗传相似系数, 并进行聚类分析。结果在遗传相似系数约为 0.6 处分为 2 个类群, 亲本芥蓝和 BC_1 单株 14Y1 聚为一支, 亲本甘蓝型油菜、 F_1 植株及除 14Y1 之外的 BC_1 植株聚为一支; 在遗传相似系数约为 0.7 处分为 4 个类群, 亲本甘蓝型油菜、亲本芥蓝、 BC_1 植株 14Y1、 F_1 植株和除 14Y1 之外的 BC_1 植株各自聚为独立的一支 (图 2)。

其中 F_1 植株和亲本芥蓝 K1 间的遗传相似系数为 0.26, 与亲本甘蓝型油菜的相似系数为 0.74, 这表明 F_1 植株的遗传背景与亲本甘蓝型油菜较为接近。 BC_1 植株和亲本芥蓝 K1、JL6 间的遗传相似系数在 0.26~0.65 之间, 说明不同回交后代的遗传背景差异较大 (表 2)。35 株 BC_1 植株中, 14Y1、14Y7、14Y37 和亲本芥蓝间的遗传相似系数较大,

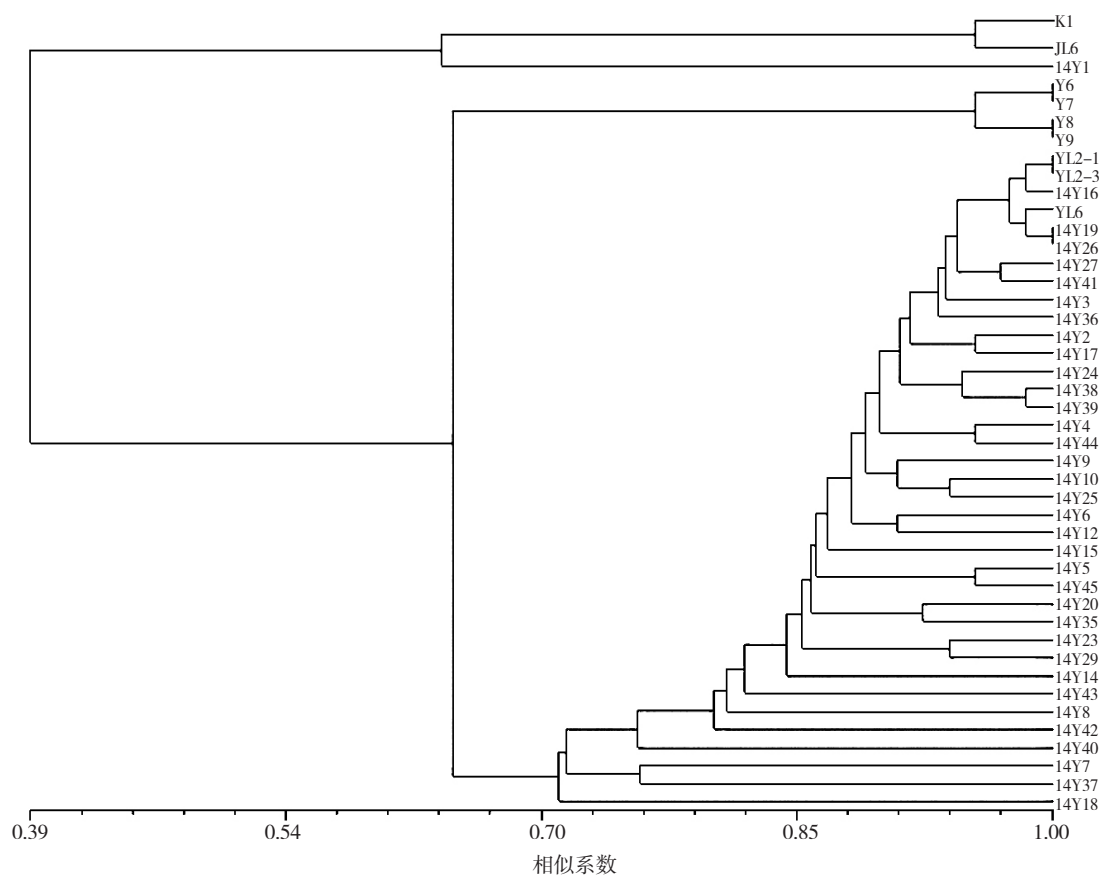


图 2 亲本、种间杂种 F_1 和 BC_1 群体的 SSR 聚类结果

K1、JL6, 亲本芥蓝; Y6、Y7、Y8、Y9, 亲本甘蓝型油菜; YL2-1、YL2-3、YL6, F_1 植株; 14Y1、14Y2、14Y3、14Y4、14Y5、14Y6、14Y7、14Y8、14Y9、14Y10、14Y12、14Y14、14Y15、14Y16、14Y17、14Y18、14Y19、14Y20、14Y23、14Y24、14Y25、14Y26、14Y27、14Y29、14Y35、14Y36、14Y37、14Y38、14Y39、14Y40、14Y41、14Y42、14Y43、14Y44、14Y45, BC_1 植株。

表2 种间杂交后代 (F_1 、 BC_1) 植株和亲本间的遗传相似系数

材料	芥蓝	甘蓝型油菜	F_1	BC_1
芥蓝	1.00			
甘蓝型油菜	0.09	1.00		
F_1	0.26	0.74	1.00	
BC_1	0.26 ~ 0.65	0.35 ~ 0.74	0.62 ~ 0.98	1.00

分别为 0.65、0.54、0.57，表明这 3 株 BC_1 单株与芥蓝的遗传背景更相似。

对 33 对多态性标记在 BC_1 植株中的分布情况进行统计 (表 3)，发现在 35 株回交后代中，不同染色体上的标记呈现出亲本芥蓝带型的频率不同，其中染色体 C8 上的标记比其他染色体呈现亲本芥蓝带型的频率更高，而 C4 染色体上的标记和 C9 染色体靠前端标记 (SSR773、SSR785) 的频率较低。总体而言，绝大多数标记在 35 株回交后代中呈现亲本芥蓝基因型的频率低于 50%；其中只有 1 个例外，标记 SSR572 容易回交后呈现亲本芥蓝基因型，35 株中有 30 株回交后该标记带型与芥蓝基因型相同。

2.3 种间杂交后代的形态特征

由图 3 可见， F_1 单株形态特征总体介于两亲本之间，植株营养生长旺盛，呈现超亲优势，株型偏向于父本甘蓝型油菜；叶基部有纵向排列的 1~3 对翅状小叶，叶色较亮，蜡粉较少，有叶裂和叶耳，叶缘有锯齿 (图 3-a)，叶表面和叶柄都具有刺毛 (图 3-c)，这些性状特征均与父本甘蓝型油菜相近，但不如父本明显。在花色和花蕾形态方面， F_1 花色淡黄，介于两亲本之间；花冠较大，均大于两亲本 (图 3-d)；花蕾饱满细长，呈现两亲本中间形态 (图 3-b)。

BC_1 植株营养生长的超亲优势总体不如 F_1 植株明显，如最大外叶长和宽、叶柄长均小于 F_1 植株 (表 4)。 BC_1 植株间形态分离明显，不同单株的叶裂数、叶耳数、花色、花大小各不相同； F_1 植株花色全部为淡黄色， BC_1 植株花色分离，部分单株呈现白色 (图 3-f)。 BC_1 植株中部分单株株型接近亲本芥蓝 (图 3-g)。

2.4 BC_1 植株中重点单株的选择

对 BC_1 植株中携带亲本芥蓝的背景标记情况进行统计，单株 14Y1 携带亲本芥蓝的背景标记数最

表3 SSR 标记在 BC_1 植株中呈现亲本芥蓝基因型的情况

引物编号	染色体位置	呈现亲本芥蓝基因型 ¹⁾ 的植株数/株	呈现亲本芥蓝基因型的频率/%	14Y1 植株 SSR 标记扩增情况
SSR9	1	7	20.0	-
SSR13	1	6	17.1	-
SSR53	1	2	5.7	+
SSR81	1	2	5.7	+
SSR94	2	0	0.0	-
SSR112	2	8	22.9	+
SSR132	2	6	17.1	+
SSR180	3	2	5.7	-
SSR188	3	8	22.9	+
SSR284	4	0	0.0	-
SSR304	4	0	0.0	-
SSR340	4	3	8.6	+
SSR364	4	5	14.3	+
BoE450	4	6	17.1	+
SSR372	5	3	8.6	+
SSR412	5	3	8.6	-
SSR448	5	5	14.3	-
SSR484	6	1	2.9	-
SSR544	6	4	11.4	-
SSR572	7	30	85.7	+
SSR584	7	1	2.9	-
SSR596	7	3	8.6	+
SSR606	7	3	8.6	+
SSR646	8	14	40.0	+
SSR680	8	6	17.1	+
SSR688	8	2	5.7	+
SSR696	8	10	28.6	+
SSR712	8	0	0.0	-
BoE134	8	10	28.6	+
SSR773	9	0	0.0	-
SSR785	9	0	0.0	-
SSR805	9	3	8.6	+
SSR833	9	7	20.0	+

注：1) 呈现亲本芥蓝基因型是指与亲本芥蓝带型完全一致；+ 表示采用该标记扩增呈现芥蓝基因型，- 表示采用该标记扩增呈现杂合形态或者甘蓝型油菜基因型。

多 (19 个)，其中染色体 C7、C8 上的标记基本都呈现亲本芥蓝形态，而这些标记在 F_1 植株中均呈现杂合形态 (表 3)。结合其植物学性状观察，其株型 (小) (图 3-g)、叶形 (圆)、叶色 (深绿)、叶面蜡粉 (中等) (图 4-a)、花色 (白) (图 4-b) 等性状均偏向于回交亲本芥蓝。该单株可作为重点回交对象，用于下一步的回交转育。



图3 种间杂交后代植株的形态学特征

a、b、c、d, 依次为芥蓝(左侧)、甘蓝型油菜(右侧)和 F_1 植株YL2-1(中间)的叶片、花蕾形态、叶面及叶柄、花朵形态比较;e、f, BC_1 植株叶形、花色比较, 从左到右依次为14Y10、14Y35、14Y15、14Y12; g, BC_1 植株14Y1; 彩图见《中国蔬菜》网站: www.cnveg.org, 下图同。

表4 种间杂交后代(F_1 、 BC_1)植株部分农艺性状调查结果

材料	最大外叶长/cm	最大外叶宽/cm	叶柄长/cm	叶裂数/个	叶耳数/个	花直径/mm	花色
芥蓝	29~35 (32.8)	21~26 (25.2)	11~16 (13.4)	0	1~2	27~35 (31.3)	白
甘蓝型油菜	26~33 (31.2)	19~24 (22.1)	23~28 (25.5)	3~4	4~8	24~29 (27.7)	黄
F_1	33~39 (34.3)	26~32 (27.8)	21~26 (23.4)	2~3	2~4	32~39 (34.6)	淡黄
BC_1	25~37 (32.5)	16~29 (26.6)	13~24 (18.7)	2~3	2~7	25~38 (31.4)	白、黄、淡黄

注: 括号内为平均值。

图4 BC_1 单株14Y1和双亲叶形、花形态比较结果

a, 叶形比较, 从左到右依次为芥蓝、14Y1、甘蓝型油菜; b, 花形态比较, 上方花朵为芥蓝, 下方花朵为 BC_1 单株14Y1。

3 结论与讨论

在芸薹属作物中, 利用种间或属间远缘杂交已逐渐成为种质创新和优良性状转移的一种重要方法, 通过远缘杂交获得的种间杂种由于其亲本亲缘

关系较远, 有可能产生比品种间或亚种间更大的杂种优势; 该种间杂种也可作为桥梁亲本将优良性状转移到目的作物中。Hagimori等(1992)以花椰菜、萝卜为材料, 利用体细胞杂交获得了抗性与萝卜基本一致的抗根肿病杂种; 获得的这些属间杂种花粉可育, 可作为桥梁亲本与芸薹属其他作物杂交, 将抗根肿病性状转移到芸薹属栽培种中。Ayotte等(1987)利用远缘杂交结合胚挽救手段成功将甘蓝型油菜的抗除草剂性状转移到甘蓝中。Choudhary等(2000)通过*B. tournefortii*与*Raphanus candatus*杂交, 获得异源双二倍体*Rapha-nofortii*; 该异源双二倍体花粉活力高、种子生育力强, 且这种特性随着世代推进而增强, 因此具有潜力开发成新的经济作物; 此外, 该异源双二倍体可用作桥梁亲本将两亲本的优良性状转移到芸薹属其他作物中。本试验通过远缘杂交结合胚挽救技术获得了芥蓝和甘蓝型油菜种间杂种, 有利于创新芥蓝种质资源和拓宽遗

传背景,这在前人的研究中鲜见报道。同时,由于芥蓝无需低温春化过程,可大大缩短育种时间,因此该种间杂种可作为桥梁材料从甘蓝型油菜中导入优良特异性状,如油菜的 *Ogura CMS* 恢复基因 *Rfo* (Primard-Brisset et al., 2005)、油菜抗根肿病基因 (季海雯, 2013)。下一步将利用分子标记鉴定本试验中获得的 35 株 BC₁ 植株是否携带有甘蓝型油菜的重要优异基因,这对于芥蓝和其他甘蓝类蔬菜的种质创新具有重要意义。

背景选择是指对基因组中除了目标基因之外的其他部分的选择,即遗传背景的选择。背景选择的对象几乎包括了整个基因组,这就要求用来选择的标记能够覆盖整个基因组。随着基因组测序的完成,基于基因组重测序可开发大量的 SNP、SSR 和 InDel 标记,它们在基因组内分布广、密度高、变异稳定、多态性强、检测容易,均可用作背景选择标记。而 SSR 标记与其他标记相比,特异性好;数量丰富、覆盖整个基因组;扩增稳定、多态性较好;材料间通用性较强 (周延清, 2005)。SSR 标记已成功应用于大豆 (段红梅等, 2003)、小麦 (董冬, 2011)、玉米 (周洪昌等, 2011)、甘蓝 (刘基生等, 2014)、番茄 (苏晓梅, 2014)、中国李 (左立辉等, 2015) 等多种作物的背景选择。与传统育种相比,利用分子标记可以大大提高回交育种筛选效率,在 2~3 代完全恢复成轮回亲本的基因型 (Young & Tanksley, 1989; 岳效飞, 2011)。本试验中,利用 SSR 标记结合形态学观察对 BC₁ 植株进行背景筛选,获得了遗传背景和形态最接近亲本芥蓝的植株 14Y1,作为下一步回交育种的花粉供体。本试验在对 SSR 标记恢复成轮回亲本基因型的频率调查时还发现,不同染色体不同区段恢复成轮回亲本基因型的频率不同,如在 14Y1 单株 C8 染色体上的连续 4 对标记 SSR646、SSR680、SSR688、SSR696 均呈现亲本芥蓝形态,这初步表明回交后该染色体大部分区段已呈现轮回亲本基因型,但整条染色体是否全部与轮回亲本基因型一致,仍需进一步扩大标记数量进行验证。

参考文献

陈洪高. 2006. 萝卜-芥蓝异源四倍体的结实性和可交配性研究 [博士学位论文]. 武汉: 华中农业大学.

- 董冬. 2011. 小麦 SSR 标记辅助遗传背景选择技术研究 [硕士学位论文]. 北京: 中国农业科学院.
- 段红梅, 王文秀, 常汝镇, 张梦臣, 邱丽娟. 2003. 大豆 SSR 标记辅助遗传背景选择的效果分析. 植物遗传资源学报, 4 (1): 36-42.
- 韩甫. 2011. 芥菜型油菜与芥蓝种间杂交初步研究 [硕士学位论文]. 重庆: 西南大学.
- 季海雯. 2013. 油菜根肿病原主要生理小种和品种抗病性鉴定 [硕士学位论文]. 北京: 中国农业科学院.
- 李锡香, 方智远. 2008. 芥蓝种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社.
- 林超, 孙萍, 程斐, 王磊, 高建伟. 2007. 芸薹属植物的远缘杂交. 山东农业科学, (4): 27-31.
- 刘基生, 苗雯雯, 王冬梅, 庄木, 方智远, 刘玉梅, 杨丽梅, 张扬勇, 李占省. 2014. 甘蓝自交系背景选择标记的建立. 园艺学报, 41 (8): 1620-1630.
- 满红, 张成合, 王新娥, 张广华. 2007. 4x 菜薹与 4x 芥蓝种间杂交获得异源四倍体及其鉴定. 园艺学报, 34 (5): 1163-1168.
- 乔海云. 2012. 芸薹种与甘蓝种杂交获得新种质的研究 [博士学位论文]. 北京: 中国农业科学院.
- 苏晓梅. 2014. 番茄前景标记和背景标记的开发与应用研究 [硕士学位论文]. 北京: 中国农业科学院.
- 王庆彪, 张扬勇, 庄木, 杨丽梅, 刘玉梅, 吕红豪, 方智远. 2014. 中国 50 个甘蓝代表品种 EST-SSR 指纹图谱的构建. 中国农业科学, 47 (1): 111-121.
- 王晓武, 方智远. 2001. 分子标记在甘蓝类作物研究中的应用. 园艺学报, 28 (s): 637-643.
- 岳效飞. 2011. 分子标记辅助选择在回交育种中的两种数学模型及其原理剖析. 中国农学通报, 27 (9): 265-267.
- 周洪昌, 宋伟, 王凤格, 赵久然, 易红梅. 2011. 玉米丝黑穗病分子标记辅助选择育种中前景引物与背景引物的筛选. 分子植物育种, 9 (4): 450-456.
- 周延清. 2005. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用. 北京: 化学工业出版社.
- 左力辉, 韩志校, 梁海永, 杨敏生. 2015. 不同产地中国李资源遗传多样性 SSR 分析. 园艺学报, 42 (1): 111-118.
- Ayotte R, Hamey P M, Machado V S. 1987. The transfer of triazine resistance from *Brassica napus* L. to *B. oleracea* L. I. production of F₁ hybrids through embryo rescue. Euphytica, 36 (2): 615-624.
- Choudhary B R, Joshi P, Singh K. 2000. Synthesis, morphology and cytogenetics of *Raphanofortii* (TTRR, 2n=38): a new amphidiploid of hybrid *Brassica tournefortii* (TT, 2n=20) × *Raphanus caudatus* (RR, 2n=18). Theor Appl Genet, 101: 990-999.
- Hagimori M, Nagaoka M, Kato N, Yoshikawa H. 1992. Production and characterization of somatic hybrids between the Japanese radish and cauliflower. Theor Appl Genet, 84: 819-824.
- Liu S Y, Liu Y M, Yang X H, Tong C B, Edwards D, Parkin A P,

- Zhao M X, Ma J X. 2014. The *Brassica oleracea* genome reveals the asymmetrical evolution of polyploid genomes. *Nature Communications*, 5: 3940.
- Primard-Brisset C, Poupard J P, Horvais R, Eber F, Pelletier G, Remard M, Delourme R. 2005. A new recombined double low restorer line for the Ogu-INRA cms in rapeseed (*Brassica napus* L.). *Theor Appl Genet*, 111: 736-746.
- Saghai-Marouf M A, Soliman K M, Jorgensen R A, Allard R W. 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81: 8014-8018.
- Young N D, Tanksley S D. 1989. RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the *Tm-2* locus of tomato during backcross breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 77 (3): 353-359.

Genetic Background Screen of Inter-specific Hybrids between SSR Marker Assisted Chinese Kale and Rapeseed

YU Hai-long, FANG Zhi-yuan, YANG Li-mei, LIU Yu-mei, ZHUANG Mu, LI Zhan-sheng, LYU Hong-hao, ZHANG Yang-yong*

(*Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China*)

Abstract: To screen the genetic background and increase the back-cross breeding efficiency of the interspecific hybrids and their back-cross offsprings between Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*, CC, $2n=2x=18$) and rapeseed (*Brassica napus*, AACC), the F_1 inter-specific hybrids and their BC_1 backcross offsprings between Ogu-CMS Chinese kale and rapeseed were obtained through hand pollination combined with embryo rescue technology. A total of 220 SSR primers were used to detect polymorphisms between the parents, in which 51 pairs of SSR primers showed polymorphism. 33 pairs of primers were selected to analyze the genetic background of 3 F_1 plants and 35 BC_1 plants, with even distribution on 9 chromosomes and stable amplifications. The results of analysis by software NTSYSpc2.11a showed that the similarity coefficients between F_1 plants and rapeseed was 0.74, which indicated that the genetic background of F_1 plants was closer to rapeseed than to Chinese kale, while the similarity coefficients between BC_1 plants and Chinese kale varied from 0.26-0.65, with big genetic background differences among BC_1 plants. In all 35 BC_1 plants, the genetic background of individual 14Y1 was the closest to Chinese kale, which was further confirmed by morphological observation. Thus, the individual 14Y1 could be used as donor plant for further backcross.

Key words: Chinese kale; Rapeseed; Inter-specific hybrid; Genetic background; SSR markers

· 封面说明 ·

樱桃番茄—粉贝贝[®] (TY)

无限生长型粉圆果小番茄品种, 长势旺盛, 花穗长, 产量高, 果实色泽亮丽, 单果质量 25 g 左右, 抗裂耐贮运, 萼片美观, 且不易脱落, 品质上乘, 商品性超好。抗病性: TY、TMV、叶霉病、线虫。适合试种成功地区日光温室越冬、早春栽培。该品种长势很旺盛, 前期需控秧栽培, 双干整枝, 每 667 m² (1 亩) 定植 1 800 株左右。

北京中农绿亨种子科技有限公司

地址: 北京市海淀区上庄镇东马坊路口西绿亨种子分公司 邮编: 100094

电话: 010-82470383 82470384 传真: 010-62477801

http://www.luhengseed.com E-mail: luhengseed@126.com