DOI: 10.3724/SP.J.1006.2021.04086

抗根肿病甘蓝型油菜新品种华油杂 62R 的选育

李倩¹ Nadil Shah¹ 周元委² 侯照科¹ 龚建芳¹ 刘珏³ 尚政伟¹
张磊¹ 战宗祥¹ 常海滨⁴ 傅廷栋¹ 朴钟云^{5,*} 张椿雨^{1,*}

¹ 华中农业大学植物科学技术学院, 湖北武汉 430070; ² 宜昌市农业科学研究院, 湖北宜昌 443000; ³ 德宏傣族景颇族自治州农业技术推广中心, 云南德宏 678400; ⁴ 黄冈市农业科学研究院, 湖北黄冈 438000; ⁵ 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁沈阳 110000

摘要: 我国油菜根肿病发病面积在 66.7 万公顷左右, 约占总生产面积的 10%, 已严重威胁到油菜的安全生产。基于此, 本研究以含有 *CRb* 抗根肿病位点的大白菜材料 CR Shinki 为供体亲本, 以甘蓝型油菜国审杂交种华油杂 62 的父本 Pol.CMS 恢复系 Bing409 为受体亲本, 通过杂交、回交及自交等育种程序, 结合前景和遗传背景筛选, 将 *CRb* 抗病位点导入到 Bing409 中。在 BC₃F₂ 代获得了遗传背景高度接近 Bing409 且含 *CRb* 抗病位点的抗根肿病新恢复系 Bing409R, 进而成功选育了我国首个抗根肿病杂交油菜新品种华油杂 62R。*CRb* 抗病位点在甘蓝型油菜背景中表现为单基因显性遗传, 根肿病抗性遗传改良的同时并未对 Bing409R 及由其配制的杂交种华油杂 62R 的产量、品质造成不良影响, Bing409R 及华油杂 62R 对我国四川、湖北、安徽等地区根肿菌生理小种具有免疫抗性。本研究的开展为我国油菜抗根肿病育种提供了宝贵资源, 为我国抵抗油菜根肿病的威胁提供了重要保障。

关键词: 甘蓝型油菜; 根肿病; *CRb* 抗病位点; 恢复系; 分子改良; 华油杂 62R

Breeding of a novel clubroot disease-resistant *Brassica napus* variety Huayouza 62R

LI Qian¹, Nadil Shah¹, ZHOU Yuan-Wei², HOU Zhao-Ke¹, GONG Jian-Fang¹, LIU Jue³, SHANG Zheng-Wei¹, ZHANG Lei¹, ZHAN Zong-Xiang¹, CHANG Hai-Bin⁴, FU Ting-Dong¹, PIAO Zhong-Yun^{5,*}, and ZHANG Chun-Yu^{1,*}

¹ College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei, China; ² Yichang Academy of Agricultural Sciences, Yichang 443000, Hubei, China; ³ Dehong Dai Jingpo Autonomous Prefecture Agricultural Technology Extension Center, Dehong 678400, Yunnan, China; ⁴ Huanggang Academy of Agricultural Sciences, Huanggang 438000, Hubei, China; ⁵ College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110000, Liaoning, China

Abstract: The rapeseed clubroot disease incidence in China is about 0.67 million hectare, accounting for 10% of the canola production area, which become a serious threat for the safety of *Brassica napus* industry. Based on this, we used CR Shinki, a Chinese cabbage material containing *CRb* clubroot disease resistance locus, as the donor parent, and Pol.CMS restorer line Bing409, the parent of *Brassica napus* national approved varieties Huayouza 62, as the recipient parent, and the *CRb* resistance locus was introduced into Bing409 by breeding programs such as crossing, backcrossing, self-cross with the foreground and genetic background selection. In the BC₃F₂ generation, a new restorer line Bing409R with a genetic background close to Bing409 containing *CRb* resistance locus was obtained, and Huayouza 62R, the first rapeseed hybrid resistant to clubroot disease in China was successfully developed. The results were as follows: *CRb* disease resistance locus appeared as a dominant single-gene inheritance in *B. napus* background, and the genetic improvement of resistance to clubroot disease did not at the expense of yield and quality losses for new restorer line Bing409R and its hybrid Huayouza 62R. Bing409R and Huayouza 62R were showed immune-resistance to physiological races of *Plasmodiophora brassicae* in Sichuan, Hubei, and Anhui provinces in China. This study

本研究由国家重点研发计划项目(2016YFD0101300)和国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-12)资助。

This study was supported by the National Key Research and Development Program of China (2016YFD0101300) and the China Agriculture Research System (CARS-12).

* 通信作者(Corresponding authors): 张椿雨, E-mail: zhchy@mail.hzau.edu.cn, Tel: 027-87287563; 朴钟云, E-mail: zypiao@gmail.com

第一作者联系方式: E-mail: 2455302842@qq.com

Received (收稿日期): 2020-04-02; Accepted (接受日期): 2020-07-02; Published online (网络出版日期): 2020-07-11.

URL: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20200710.1721.002.html>

will provide valuable resources for the breeding of rapeseed in China, and supplemented important support to overcome the threat of rapeseed clubroot disease.

Keywords: *Brassica napus*; clubroot disease; *CRb* resistance locus; restorer line; genetic improvement; Huayouza 62R

根肿病是由芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woron)侵染引起的一种世界性土传病害。该病原菌专性侵染十字花科植物, 包括油菜、大白菜、小白菜、甘蓝、萝卜、花椰菜、芥菜等在内的多种栽培和野生种^[1]。被该病原菌侵染后, 植物根系细胞经过非正常扩增和分裂, 从而产生肿瘤, 导致营养与水分的吸收被限制, 地上部分植株发黄并枯萎, 生长发育不良, 作物产量和品质均受到严重影响。根肿菌休眠孢子在土壤中存活时间长(可长达 15 年以上), 其传染性强、传播途径广、传播速度快、防治难度大^[2-4]。十字花科油菜是我国最重要的油料作物, 长江流域常年种植面积约 667 万公顷, 所产优质菜籽油占国产植物油的 50%以上。近年, 我国油菜生产受根肿病影响较大, 据不完全统计发病面积约在 66.7 万公顷(约占总种植面积的 10%), 并且随着机械化程度的不断提高, 油菜根肿病在我国有大面积爆发的趋势, 特别是我国所有甘蓝型油菜品种均不抗根肿病, 因此油菜产业面临严重威胁。

已有研究表明, 选育并种植抗病品种是防治根肿病最经济、最有效的途径。目前应用最广泛的根肿病抗源材料主要为欧洲饲用芜菁(*Brassica rapa* ssp. *rapifera*, AA, $2n=20$), 包括‘ECD01-04’、‘Gelria R’、‘Siloga’、‘Debra’以及‘Milan White’等^[5-6]。日韩等国研究人员以芜菁为抗源材料, 培育出一些抗根肿病的大白菜品种。进一步在白菜中 QTL 定位了多个抗病位点, 主要包括 *Crr1*、*Crr2*、*Crr3*、*Crr4*、*CRa*、*CRb*、*CRc*、*CRk* 等^[7-9], 这些位点分布在不同的染色体上。目前已成功分离克隆的位点有 *CRa* 与 *Crr1a*, 这 2 个基因均编码 TIR-NB-LRR 结构蛋白, 能够识别病原菌并引起植物的免疫反应^[10-11]。*CRa* 与 *CRb* 均定位于 A03 染色体, 物理位置紧密连锁, 最新研究认为 *CRa* 和 *CRb* 是同一个抗病位点^[12]。

由于国外油菜根肿病发生较早, 在抗病育种方面也率先取得了一些进展。Diederichsen 等^[13]利用抗病芜菁和抗病甘蓝材料进行种间杂交, 人工合成了抗病甘蓝型油菜品种 Mendel, 经室内和田间抗病性鉴定均表现抗病, 并发现该抗性至少由 2 个不连锁的显性基因控制。加拿大在油菜抗根肿病育种方面也开展了一些工作, 培育出了油菜抗病新品种^[14]。我国油菜抗根肿病的育种工作起步较晚, 主要集中在

对现有主栽品种或资源材料的抗病性筛选方面^[15-18], 而利用芜菁等高抗资源材料改良我国油菜品种的工作还鲜有报道。本实验室战宗祥博士等人以含多个抗病位点的芜菁 ECD04 为父本与优良甘蓝型油菜常规品种华双 5 号杂交, 结合回交育种策略及分子标记辅助选择手段, 成功将 ECD04 中的抗病位点 *PbBa8.1* 转育到优良油菜常规品种华双 5 号中, 育成了我国首个抗根肿病甘蓝型油菜常规新品系^[19]。

本研究以含有 *CRb* 抗病位点, 对多种生理小种(2、4、7、10 号)均具较好抗性的大白菜 CR Shinki 为供体父本, 与国审甘蓝型油菜优良杂交种华油杂 62 的波里马恢复系 Bing409 为母本, 通过杂交、回交以及分子标记辅助选择和抗病性鉴定等策略, 将 *CRb* 抗病位点精准导入到 Bing409 中, 创建了抗根肿病的新恢复系 Bing409R, 并在此基础上配制了抗根肿病杂交油菜新品种华油杂 62R, 为抵抗油菜根肿病, 稳定和保障我国油菜产业持续健康发展提供有力保障。

1 材料与方法

1.1 材料

供体亲本(父本)为含有 *CRb* 位点(位于 A03 染色体)的抗根肿病大白菜材料 CR Shinki (AA, $2n=20$), 根据威廉姆斯寄主鉴别系统鉴定结果, 该位点对根肿菌 2 号、4 号、7 号和 10 号生理小种具有优异抗性; 感病轮回亲本(母本)为波里马细胞质雄性不育(Pol.CMS)三系杂交种华油杂 62 (国审)的恢复系 Bing409, 同时在本研究作为感病对照材料。

1.2 方法

1.2.1 技术路线 亲本材料于 2013 年 10 月种植于沈阳农业大学日光温室, 2014 年 2 月完成授粉获得 F_1 , 并利用 4 号生理小种进行室内接菌鉴定。2014 年 5 月于沈阳农业大学播种, 8 月完成 F_1 代植物的回交, 10 月获得含有 492 株单株的 BC_1 群体。为加快育种进程, 从 BC_1 代开始, 利用与抗病位点 *CRb* 紧密连锁的分子标记进行前景选择筛选含有 *CRb* 位点的单株, 淘汰无 *CRb* 的植株; 再利用均匀覆盖甘蓝型油菜 A 基因组的 123 个多态性标记(附表 1), 对含 *CRb* 抗病前景位点的植株进行遗传背景筛选, 保留背景回复率高的植株。经过 3 次回交 1 次自交后, 于 2016 年春获得 *CRb* 位点纯合、背景恢复率在 95%以

上的抗病植株, 命名为 Bing409R。2016 年夏繁, 利用华油杂 62 的不育系与 Bing409R 配制了抗病新组合(命名为华油杂 62R), 于 2016 年秋将 Bing409R 和华油杂 62R 种植在不同病区(枝江、黄山等)进行田间抗病性鉴定。技术路线如图 1 所示。

图 1 华油杂 62 恢复系 Bing409 根肿病抗性遗传改良的技术路线
Fig. 1 Genetic improvement route of Huayouza 62 restorer line Bing409 for resistance against clubroot disease

1.2.2 根肿病温室接种体系 温室接种采用菌土法接种。取出-20℃保存的油菜病根, 室温下解冻称量并用匀浆机磨碎, 与风干的草炭土按照 1:20 的比例混匀, 25℃密封保存 48 h 以上^[20]。将培养土装到 50 孔穴盘中并灌足底水, 少量菌土放到穴盘中后, 在菌土上播种 1~2 粒种子, 25℃培养, 6 周后进行表型鉴定并分级。0 级为没有根瘤, 1 级在侧根处有小根瘤, 2 级在主根侧根处有较小根瘤, 3 级在主根侧根有较大根瘤, 4 级在主根侧根有较大的明显根瘤^[21]。

1.2.3 根肿病田间接种及表型鉴定 田间表型鉴定通过选取近几年发病严重且相对比较均一的田块

为病圃, 直接分成不同的小区进行直播, 一般在 9 月下旬播种, 并于 6~10 周后或在感病对照组有明显受害表型时开始进行表型鉴定, 发病等级划分标准与室内接种相同。

1.2.4 病情指数 病株率(%) = 发病株数/调查总株数×100; 病情指数 = $\sum(\text{病株数} \times \text{相应病害级别}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高级别}) \times 100$ 。校正系数 $K = 50 / \text{对照品种的实际病情指数}$; 相对病情指数 = $K \times \text{鉴定材料的病情指数}$ 。品种资源的抗病性差异根据相对病情指数进行分类: 免疫(I) = 0; 0<高抗 HR 5; 5<抗 R 10; 10<中抗 MR 20; 20<中感 MS 30; 30<感病 S 50; 50<高感 HS 100^[21]。

1.2.5 DNA 提取及 PCR 程序 利用改良 CTAB 法提取亲本和各世代单株幼嫩叶片 DNA, 10 μL 的 PCR 的反应体系, 包含 2 ng 的 DNA 模板、正向反向引物各 250 nmol L⁻¹、0.25 nmol L⁻¹ dNTP、1 μL Taq 酶。PCR 反应条件为 94℃预变性 3 min; 94℃1 min, 55℃30 s, 72℃1 min, 35 个循环; 72℃10 min; 10℃保存。PCR 产物在 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳, 结束后进行银染、显影。

1.2.6 前景选择 用于 CRb 抗病位点前景选择的标记由沈阳农业大学朴钟云教授课题组提供或本实验室开发, Pol.CMS 恢复基因前景选择标记由华中农业大学易斌教授提供。经过两亲本间多态性检测, 选择具有多态性的分子标记进行前景选择(表 1), 其中 CRb_ssr541、CRb_ssr01 和 CRb_ssr413 是位于 CRb 抗病位点两侧的连锁标记, Rfp_ssr52 和 Rfp_rt5 标记分别是与甘蓝型油菜 Pol.CMS 恢复基因 *Rfp* 的连锁的分子标记和功能标记^[22]。需要说明的是, 每一代回交分离群体中含有前景抗病位点 CRb 的个体, 其恢复基因 *Rfp* 都需要进行标记选择, 保留同时具有 CRb 及 *Rfp* 的个体, 继续进行遗传背景筛选, 故本文将 *Rfp* 位点的筛选归在前景选择中。

表 1 CRb 抗病位点及 Rfp 恢复基因连锁标记
Table 1 Linkage markers of CRb resistant locus and Pol.CMS restore gene Rfp

标记名称 Marker name	标记类型 Marker type	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')	物理位置 Physical location (Mb)
CRb_ssr541	SSR	TGCTTGAGCAGAAACAATATCAA	TGCGCATCTCTGTTTAGCTT	A03: 23693689
CRb_ssr413	SSR	ATTGTGCCGTCGGAATTAAA	GATGATTAGAAAAGGTGTCTATTGC	A03: 23762587
CRb_ssr01	SSR	TCGAGGTGTTTACAATCCAA	CAATGCGGATCTACCTCTCA	A03: 24031219
Rfp_ssr52	SSR	TCAACAACAACAGCCTTTCG	GGAAGAAGTCGCTTCCTGTG	A09: 34418209
Rfp_rt5	功能标记 FM	GGGATGCGATCCTGATATTTG	GAGAGAGGCTACAGAACAAACT	A09: 34485601

FM: functional marker.

1.2.7 背景选择 在亲本材料 Bing409 与 CR Shinki 中筛选出了 225 对多态性标记, 通过本地 BLAST, 筛选得到物理位置均匀分布于油菜 A 基因组的 124 对标记, 且相邻标记间平均物理距离 2 Mb 左右, 用于回交群体背景回复率鉴定(表 2, 附表 1)。

遗传背景回复率 = 基因型恢复到轮回亲本背景
的标记数/总共标记数。

表 2 均匀覆盖甘蓝型油菜 A 基因组的标记统计
Table 2 Uniformly covered markers on genome A of *B. napus*

染色体 Chr.	标记数目 Marker numbers	标记间平均间距 Average distance of adjacent markers (Mb)
A01	10	2.95
A02	11	2.30
A03	22	2.01
A04	10	2.07
A05	13	1.92
A06	14	1.83
A07	11	2.11
A08	11	2.02
A09	14	2.69
A10	8	1.83
总数 Total	124	—

1.2.8 农艺性状测定与测验 2017—2018 年度, 在黄冈市农业科学院梅家墩试验农场(非根肿病发病区)进行油菜品种产量及主要农艺性状分析试验。供试品种为根肿病抗病品种华油杂 62R, 对照品种为长江中游优异品种华油杂 12, 每个品种各种植 3 个重复, 小区面积 20 m²。考察的主要产量性状包括株高、有效分枝数、单株有效角果、每角粒数、千粒重及单株产量等, 每一性状每个重复调查植株 15 株, 最后实测小区产量。采用近红外分析仪检测的方法测定含油量、芥酸及硫苷含量等油菜品质。

2 结果与分析

2.1 F₁ 及 BC₁ 的获得、分子标记检测及抗病性鉴定

以国审甘蓝型油菜杂交种华油杂 62 的 PoL CMS 恢复系 Bing409 为母本与含 *CRb* 抗病位点的 CR shinki 为父本, 杂交获得 F₁, 以 Bing409 为轮回亲本回交获得了 BC₁ 代材料。先后对 F₁、BC₁ 及两亲本以根肿菌 4 号生理小种在温室进行接种鉴定, 接种 40 d 后调查上述材料的根部受侵染情况, 不同发病等级株数统计见附表 2。

对 F₁ 表型鉴定发现, F₁ 对 4 号生理小种表现出

100%抗病, 病情指数为 0, 与抗病父本 CR shinki 表型一致, 而轮回亲本材料 Bing409 则表现出极度感病, 发病指数高达 93.6% (图 2-a, b)。表明 CR shinki 中所含的 *CRb* 抗病位点对根肿菌 4 号生理小种表现为显性抗病。

对 BC₁ 群体各单株的表型鉴定时发现, 发病等级呈现出两极分布, 分别为抗病(0 级, 24 株)以及感病(4 级, 19 株)(图 2-c, d)。卡方测验结果显示, BC₁ 群体抗病、感病分离比符合 1 : 1 分离($N=43$, $\chi^2 = 0.58 < \chi^2_{0.05(1)} = 3.84$), 符合理论预期。用连锁标记 CRb_{-ssr413}(表 1)对以上植株进行基因型鉴定(图 2-e), 其中 A、H、B 分别代表 Bing409 基因型、杂合基因型、抗病 CR Shinki 基因型。表明 BC₁ 群体中所有感病植株的基因型均为 A, 抗病植株基因型均为 H, 基因型鉴定结果与表型一致。F₁ 及 BC₁ 代群体分子鉴定和接种鉴定的结果都表明, *CRb* 抗病位点对我国油菜疫区的 4 号优势生理小种为显性抗病遗传。

2.2 利用分子标记对 BC₁F₁~BC₃F₁ 各世代株系的前景和背景筛选

利用与抗病位点连锁标记, 对 BC₁F₁~BC₃F₁ 群体进行前景选择, 筛选出含 *CRb* 抗病位点的植株, 然后利用附表 1 中所列的分子标记对这些单株进行遗传背景分析, 根据每一个标记基因型计算并统计遗传背景回复率, 每一代保留遗传背景回复率较高的株系继续进行回交。图 3 是 BC₁F₁~BC₃F₁ 代含抗病位点的入选株系的遗传背景回复率从低到高排列的柱形图。本试验中 BC₁ 群体背景回复率在 0.29~0.71 之间, 均值为 0.49, 低于 BC₁ 群体的理论恢复率 75%。BC₂F₁ 入选单株背景回复率在 0.73~0.93 之间, BC₃F₁ 在 0.87~0.97 之间。

表 3 列出了 BC₁~BC₃ 代各群体单株数、含 *CRb* 位点的株数及最后保留的较高遗传背景的单株数。BC₁ 选择轮回亲本基因组回复率>60%的 5 个单株编号分别为 438A、65B、128C、464D、94E, 继续进行下一代回交。由 438A 回交群体(含 46 株)、65B 回交群体(含 68 株)、128C 回交群体(含 118 株)组成的 BC₂ 群体共 232 株, 经过前景和背景筛选获得了含有 *CRb* 位点、轮回亲本基因组回复率>90%的 4 个株系, 编号分别为 438A1、65B1、65B2 和 65B3, 各自对应的背景回复率分别为 92%、92%、91%和 91%。其中, 编号 464D 和 94E 的回交后代只进行了抗病位点前景选择, 未进行背景筛选。438A1、65B1、65B2

图 2 F₁ 及 BC₁ 抗病性鉴定

Fig. 2 Clubroot disease resistance identification of F₁ and BC₁

a: F₁ 接菌表型鉴定; b: F₁ 病情指数; c: BC₁ 接菌表型鉴定; d: BC₁ 病情指数; e: BC₁ 基因型鉴定。A 表示 Bing409 基因型, B 表示 CR Shinki 基因型, H 表示杂合基因型; S 表示感病表型, R 表示抗病表型。

a: phenotypic identification of F₁ generation after *P. brassicae* pathotype inoculation; b: disease index of F₁ generation; c: phenotypic identification of BC₁ generation after inoculation; d: disease index of BC₁ generation; e: genotypic identification of BC₁ generation. A represents genotype of Bing409, B represents genotype of CR Shinki, and H represents heterozygous genotype; S represents susceptibility phenotype, and R represents resistance phenotype.

和 65B3 这 4 个株系继续回交, 获得了 BC₃ 后代总共 267 株, 经过同样的筛选, 获得含 *CRb* 位点、轮回亲本基因组背景回复率高达 97% 的 2 个单株, 分别为 438A1-1 和 65B2-2。

2.3 高世代当选株系抗病性鉴定、分子标记分析及主要品质性状检测

2.3.1 高世代分离群体抗病性鉴定及恢复基因的分子检测 本研究在对 BC₃F₁ 回交后代进行分子标记检测之前, 随机抽取了编号为 65B2 的 BC₃F₁ 回交后代用 4 号生理小种进行了接种鉴定。抗病性鉴定结果显示, BC₃F₁ 分离群体中含 *CRb* 杂合抗病位点的 (H 基因型) 材料对 4 号生理小种表现出免疫抗病性 (R, 24 株), 不含 *CRb* 位点的材料 (A 基因型) 的均为

感病表型 (S, 19 株), 抗感基因型与表型相对应 (图 4-a, b, c), BC₃F₁ 抗感表型分离比符合 1 : 1 分离 ($N = 43$, $\chi^2 = 0.58 < \chi^2_{0.05(1)} = 3.84$), 这一结果与 BC₁ 群体的鉴定结果相吻合。由此可见, 该连锁标记能够准确鉴定抗病位点, 不用每一代都进行抗病性鉴定, 以有效节省时间。

随后, 利用与波里马恢复基因连锁标记 Rfp-ssr52^[22], 对 65B2 的 BC₃F₁ 回交后代中分离出的部分抗病单株 (30 株) 的基因型进行检测。结果如图 4-d 所示, 这些单株的基因型均与轮回亲本 Bing409 的基因型一致 (A)。最后将经过抗病性鉴定及恢复基因位点鉴定、遗传背景回复率高的抗病单株 65B2-2 经自交获得了纯合抗病株系, 并正式命名为 Bing409R。

图 3 BC_1F_1 ~ BC_3F_1 前景入选单株遗传背景回复率统计
Fig. 3 Genetic background recovery rates of the resistant plants selected from BC_1F_1 to BC_3F_1 generations
图中括号里面的数字表示当代经过前景选择入选的含有前景抗病位点的单株数。
The numbers in parentheses represent the total plants containing resistant locus after foreground selection.

表 3 BC_1 ~ BC_3 各世代前景及背景选择概况
Table 3 Detail of foreground and background selection in BC_1 to BC_3

世代 Generation	抗病位点前景选择 Foreground selection			背景筛选标记数 No. of markers used to background selection	最终保留株数 No. of selected plants	背景回复率 Genetic background recovery rates (%)	用途 Application
	检测株数 No. of plants tested	筛选标记数 No. of markers	入选株数 No. of selected plants				
BC_1F_1	492	5	256	118	5	64~71	回交 Backcross
BC_2F_1	232	5	107	36	4	73~93	回交 Backcross
BC_3F_1	267	5	139	5	6	87~97	回交、自交 Backcross, self-cross

2.3.2 抗病近等基因系材料 Bing409R 对不同生理小种的抗性评价 本研究在选育 Bing409R 的过程中, 主要选取了根肿菌 4 号生理小种进行抗性鉴定, 为了增加结果的可靠性, 还选取了我国油菜根肿病发病较为严重地区的根肿菌, 包括云南、四川、湖北、安徽等省, 对 Bing409R 进行接菌鉴定。接种我国不同地区根肿菌株数统计见附表 3, 表型调查结果见表 4。Bing409R 对湖北宜昌和枝江、安徽黄山以及四川省不同地区的根肿菌均表现出免疫抗性(I); 对云南不同地区根肿菌的抗性存在较大差异, 分别表现为免疫抗性(I)、抗(R)、中抗(MR)、中感(MS)和高感(HS)等表型; 对湖北恩施巴东的根肿菌表现为高感(HS)。说明我国根肿病生理小种的类型是多样的, 四川地区根肿菌生理小种比较单一, 而云南地区生理小种种类复杂多样。这一结果的获得可为

抗病品种的合理应用提供重要依据。

2.3.3 Bing409R 不同株系的籽粒品质检测 随机选取 65B2-2 自交后代衍生出的 BC_3F_2 纯合抗病株系自交种子(共 9 个系, 编号分别为 622-22、622-37、622-30、624-04、625-17、630-11、18ZP06、18ZP07 和 18ZP08), 利用近红外分析仪进行品质检测。由表 5 可知, 所有被检测株系含油量均与未改良的轮回亲本 Bing409 (409S01、409S02 和 409S03 为 Bing409 不同株系的 3 个重复)相当, 芥酸及硫苷含量都符合我国“双低油菜”的生产标准。

2.4 华油杂 62R 的田间根肿病抗性鉴定

2016 年夏, 将华油杂 62 的不育系与 Bing409R 配制了杂交组合, 正式命名为华油杂 62R。收获在华油杂 62R 分别于 2016 年秋种植于湖北枝江和安徽黄山病区进行抗病性鉴定。苗期(播种后约 2 个月)田间

图 4 BC₃ 抗病性鉴定及恢复基因 *Rfp* 位点检测

Fig. 4 Clubroot disease resistance evaluation and restore gene *Rfp* identification of BC₃ plants

a: BC₃ 接菌表型鉴定; b: BC₃ 病情指数; c: BC₃ 基因型鉴定; d: BC₃ 抗病植株恢复基因 *Rfp* 位点检测。A 表示 Bing409 基因型, B 表示 CR Shinki 基因型, H 表示杂合基因型, S 表示感病表型, R 表示抗病表型。
a: phenotypic identification of BC₃ after clubroot pathogen inoculation; b: disease index of BC₃ generation; c: genotypic identification of BC₃ generation; d: identification of restore gene *Rfp* of resistant plants in BC₃ generation. A represents genotype of Bing409, B represents genotype of CR Shinki, and H represents heterozygous genotype; S represents susceptibility phenotype, and R represents resistance phenotype.

表 4 Bing409R 抗病材料对我国不同地区根肿菌的抗性评价

Table 4 Evaluation of resistance of Bing409R to *P. brassica* in different regions of China

根肿菌编号 No. of <i>P. brassica</i>	收集地点 Collection locations	409R 相对病情指数 Relative disease index of 409R			抗性评价 Resistance evaluation
		重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	
Y-TC	云南腾冲 Tengchong, Yunnan	40	40	40	S (40±0)
Y-XC	云南楚雄 Xiongchu, Yunnan	8	12	8	R (9±1)
Y-BS	云南保山 Baoshan, Yunnan	40	38	41	S (40±1)
Y-LC	云南临沧 Lincang, Yunnan	23	20	19	MS (23±1)
Y-DH	云南德宏 Dehong, Yunnan	40	38	40	S (39±1)
H-ES	湖北恩施 Enshi, Hubei	38	38	43	S (40±1)
H-YC	湖北宜昌 Yichang, Hubei	0	0	0	I (0±0)
H-ZJ	湖北枝江 Zhijiang, Hubei	0	0	0	I (0±0)
S-DY	四川德阳 Deyang, Sichuan	0	0	0	I (0±0)
S-PZ	四川彭州 Pengzhou, Sichuan	0	0	0	I (0±0)
S-GH	四川广汉 Guanghan, Sichuan	0	0	0	I (0±0)
S-CD	四川成都 Chengdu, Sichuan	0	0	0	I (0±0)
A-HS	安徽黄山 Huangshan, Anhui	0	0	0	I (0±0)

表中 I 表示免疫, R 表示抗病, MS 表示中感, S 表示感病。

I, R, MS, and S in the table represent immune, resistance, moderate susceptibility, and susceptibility, respectively.

表 5 BC₃F₃ 不同抗病株系品质测定
Table 5 Seeds quality determination of different resistant lines derived from BC₃F₃ generation

抗病株系 Resistant lines	含油量 Oil content (%)	芥酸 Erucic acid (%)	硫甙 Glucosinolate (μmol g ⁻¹)
622-22	41.81	0.17	21.76
622-37	40.05	0	24.61
623-30	40.99	0	23.49
624-04	43.63	0.34	26.54
625-17	41.11	0	24.32
630-11	40.65	0	23.33
18ZP06	42.66	0	23.69
18ZP07	42.44	0	30.05
18ZP08	41.99	0.08	28.61
409S01 (CK)	41.06	0	22.76
409S02 (CK)	40.38	0	24.31
409S03 (CK)	43.78	0	23.78

抗性调查发现, Bing409R 及华杂 62R 在黄山地区表现出全抗(各调查 60 株), 而对照材料 Bing409 发病率 100% (调查 40 株); Bing409R 及华油杂 62R 在枝江地区也表现全抗(各调查 80 株); 进一步基因型分析表明, F₁ 植株(随机检测 12 株)及 Bing409R 植株(随机检测 7 株)均含有 *CRb* 抗病位点, 而感病对照 Bing409 (随机检测 12 株)均不含有该位点(图 5)。苗后期(播种后约 3 个半月), 在枝江病区华杂 62R 与当地不抗病主推对照品种相比, 表现出极强抗性且田间长势强, 明显优于对照(图 6)。

2.5 抗根肿病新品种华油杂 62R 的产量及农艺性状测试

2017—2018 年度, 在黄冈市农业科学院梅家墩

图 5 F₁ 枝江病区表型鉴定
Fig. 5 Phenotypic identification of F₁ in Zhijiang diseased fields
华油杂 62R (F₁) 的抗病性明显优于其感病亲本 Bing409S。
The disease resistance of Huayouza 62R (F₁) was significantly better than its parent Bing409S.

试验农场进行了根肿病抗病新品种华油杂 62R 的产量及主要农艺性状考察, 以长江中游优良品种华油杂 12 号为对照, 每个品种各种植 3 个重复, 小区面积 20 m², 考察主要与产量相关的农艺性状并测定小区产量, 每一性状调查植株 15 株。株高、有效分枝数、单株有效角果、每角粒数、千粒重、单株产量等主要产量性状的考察结果如表 6 所示, 其中株高、每角粒数均低于对照华油杂 12, 单株有效角果数及千粒重均高于对照华油杂 12, 单株产量与对照相比无差异。华油杂 62R 的小区产量与对照品种华油杂 12 相比基本相当, 折合单产 3183.5 kg hm⁻²。由此可见, 华油杂 62R 不仅对根肿菌 4 号生理小种表现出免疫抗性, 并且还表现出较高的产量生产能力。

图 6 华杂 62R 新品种在枝江根肿病区的田间表现
Fig. 6 Huayouza 62R new lines were integrated and demonstrated in Zhijiang infested fields

表 6 抗根肿病杂交种华油杂 62R 主要产量性状考察及小区产量测定

Table 6 Examination of main yield characteristics and determination of yield of clubroot resistant hybrid Huayouza 62R

品种 Variety	株高 Plant height (cm)	有效分枝数 Effective branch number	单株有效角果数 Silique number per plant	每角粒数 Seeds per silique	千粒重 Thousand-seed weight (g)	单株产量 Yield per plant (g)	小区产量 Yield per plot (kg)
华油杂 12 Huayouza 12	170.8	5.6	162.2	20.9	3.41	11.6	6.367
华油杂 62R Huayouza 62R	161.2	5.8	176.8	18.1	3.62	11.6	6.267

3 讨论

本研究以抗根肿病大白菜 CR Shinki 为供体, 通过远缘杂交和分子标记筛选, 成功地将甘蓝型油菜国审三系杂交种华油杂 62 的恢复系 Bing409 进行了抗性改良(命名为 Bing409R)。在改良过程中, 从 BC₁ 代开始采用对抗病位点和遗传背景筛选, 并结合适当表型鉴定的策略, 极大缩短了育种时间, 显著提高了育种效率。然后, 以此为基础利用 Bing409R 与华油杂 62 的波里马不育系配制杂交组合, 成功选育了甘蓝型油菜抗根肿病杂交新品种华油杂 62R, 并完成了品种登记(GDP 油菜(2018) 420213), 为我国选育的第一个抗根肿病油菜杂交种。近年来, 我国油菜根肿病的发生面积逐年扩大, 重灾区主要分布在四川、湖北、安徽等地^[23], 室内及病区接菌鉴定结果表明, 华油杂 62R 对我国油菜主产区四川、湖北、安徽等地的根肿菌具免疫或高抗抗性。因此该品种应用范围较大, 产量水平较高, 如在安徽绩溪发病田块产量可达 3000 kg hm⁻² 以上, 因此其应用前景广阔。近年来, 虽然华油杂 62R 年推广面积在 30,000~50,000 hm² 左右, 但仍远远不能满足油菜生产的需要, 目前全国主要油菜育种单位利用这个抗源正在加紧抗病新品种的选育工作, 这对保障我国油菜产业免受油菜根肿病的威胁具有重要意义。

根肿病菌是十字花科专性寄生菌, 生理小种多样, 长期种植含单一抗病基因的品种容易造成抗性丧失^[24]。因此, 未来将不同的抗病位点如 *CRb* 与 *PbBa8.1*^[19] 进行聚合, 可培育出对根肿病多个生理小种同时具有抗性的优良油菜品种, 以降低品种抗性丧失的风险。今后, 还需要加大不同抗源材料的创制力度, 以增加抗病基因的遗传多样性, 为抗病位点聚合育种奠定坚实基础。

4 结论

通过对杂交、回交及自交等育种程序, 结合前景和遗传背景分子标记辅助筛选, 将 *CRb* 根肿病

抗病位点导入到甘蓝型油菜国审品种华油杂 62 的父本 Pol CMS 恢复系 Bing409 中; 在改良了波里马恢复系 Bing409 根肿病抗性的基础上, 选育了我国第一个抗根肿病油菜杂交新品种华油杂 62R。根肿病抗病性遗传改良并未对抗病新恢复系 Bing409R 及其配制的杂交种华油杂 62R 的产量、品质造成不良影响; Bing409R 及华油杂 62R 对我国四川、湖北、安徽等地区根肿菌生理小种具有免疫抗性。本研究的开展, 为我国油菜抗根肿病育种提供了宝贵的资源, 为我国抵抗油菜根肿病的威胁提供了重要支撑。

References

- [1] Howard R J, Strelkov S E, Harding M W. Clubroot of cruciferous crop-new perspectives on an old disease. *Histopathology*, 2010, 32: 35–42.
- [2] 孙保亚, 沈向群, 郭海峰, 周永红. 十字花科植物根肿病及抗病育种研究进展. *中国蔬菜*, 2005, (4): 34–37.
Sun B Y, Shen X Q, Guo H F, Zhou Y H. Research progress in clubroot of crucifers and resistance breeding. *China Veget*, 2005, (4): 34–37 (in Chinese with English abstract).
- [3] Donald C, Porter I. Intergrated control of clubroot. *J Plant Growth Regul*, 2009, 28: 289–303.
- [4] 王靖, 黄云, 李小兰, 黎怀忠. 十字花科根肿病研究进展. *植物保护*, 2011, 37(6): 153–158.
Wang J, Huang Y, Li X L, Li H Z. Research progress in clubroot of crucifers. *Plant Protect*, 2011, 37(6): 153–158 (in Chinese with English abstract).
- [5] Diederichsen E, Frauen M, Linders E G A, Hatakeyama K, Hirai M. Status and perspectives of clubroots resistance breeding in crucifer crops. *J Plant Growth Regul*, 2009, 28: 265–281.
- [6] Yoshikawa H. Studies on breeding of clubroot resistance in cole [Cruciferae] crops. *Bull Natl Res Inst Veg Ornam Plants Tea*, 1993, A7: 1–165.
- [7] Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, Hatakeyama K, Fujimura M, Nunome T, Fukuoka H, Matsumoto S, Hirai M. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in C L. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 997–1002.
- [8] Sakamoto K, Saito A, Hayashida N, Taguchi G, Matsumoto E. Mapping of isolate-specific QTLs for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Theor Appl Genet*, 2008, 117: 759–767.

- [9] Piao Z Y, Deng Y Q, Choi S R, Park Y J, Lim Y P. SCAR and CAPS mapping of *CRb*, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1458–1465.
- [10] Hatakeyama K, Suwabe K, Tomita R N, Kato T, Nunome T, Fukuoka H, Matsumoto S. Identification and characterization of *Crr1a*, a gene for resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *PLoS One*, 2013, 8: e54745.
- [11] Ueno H, Matsumoto E, Aruga D, Kitagawa S, Matsumura H, Hayashida N. Molecular characterization of the *Cra* gene conferring clubroot resistance in *Brassica rapa*. *Plant Mol Biol*, 2012, 80: 621–629.
- [12] Hatakeyama K, Niwa T, Kato T, Ohara T, Kakizaki T, Matsumoto S. The tandem repeated organization of *NB-LRR* genes in the clubroot-resistant *CRb* locus in *Brassica rapa* L. *Mol Genet Genomics*, 2017, 292: 397–405.
- [13] Diederichsen E, Beckmann J, Schondelmeier J, Dreyer F. Genetics of clubroot resistance in *Brassica napus* ‘Mendel’. *Acta Horti*, 2006, 706: 307–312.
- [14] Hwang S F, Strelkov S E, Feng J, Gossen B D, Howard R J. *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop. *Mol Plant Pathol*, 2012, 13: 105–113.
- [15] 符明联, 杨玉珠, 李根泽, 罗延青, 奚俊玉, 徐海燕, 张晓兰, 原小燕, 杨卫国. 不同油菜品种对根肿病的抗性分析. *华中农业大学学报*, 2011, 30: 443–447.
- Fu M L, Yang Y Z, Li G Z, Luo Y Q, Xi J Y, Xu H Y, Zhang X L, Yuan X Y, Yang W G. Analysis of clubroot resistance of different rapeseed varieties. *J Huazhong Agric Univ*, 2011, 30: 443–447 (in Chinese with English abstract).
- [16] 季海雯, 任莉, 陈坤荣, 徐理, 刘凡, 孙超超, 李俊, 刘胜毅, 方小平. 油菜根肿病病原主要生理小种和品种抗病性鉴定. *中国油料作物学报*, 2013, 35: 301–306.
- Ji H W, Ren L, Chen K R, Xu L, Liu F, Sun C C, Li J, Liu S Y, Fang X P. Identification of physiological races of club root and resistance of rape cultivars to *Plasmodiophora brassicae*. *Chin J Oil Crop Sci*, 2013, 35: 301–306 (in Chinese with English abstract).
- [17] 刘勇, 黄小琴, 柯绍英, 刘红雨. 四川主栽油菜品种根肿病抗性研究. *中国油料作物学报*, 2009, 31: 90–93.
- Liu Y, Huang X Q, Ke S Y, Liu H Y. Evaluation of resistance of rapeseed varieties to club root infected by *Plasmodiophora brassicae* in Sichuan. *Chin J Oil Crop Sci*, 2009, 31: 90–93 (in Chinese with English abstract).
- [18] 余青青, 田露申, 牛应泽, 郭世星. 人工合成甘蓝型油菜抗根肿病遗传研究初报. *西南农业学报*, 2008, 21: 1313–1315.
- Yu Q Q, Tian L S, Niu Y Z, Guo S H. Preliminary study on inheritance of clubroot resistance in a resynthesized *Brassica napus* line. *Southwest China J Agric Sci*, 2008, 21: 1313–1315 (in Chinese with English abstract).
- [19] 战宗祥, 江莹芬, 朱紫媛, 张春沙, 杨庆勇, 李倩, 侯照科, 龚建芳, 程雨贵, 吴江生, 傅廷栋, 周永明, 朴钟云, 张椿雨. 与位点 *PbBa8.1* 紧密连锁分子标记的开发及甘蓝型油菜根肿病抗性育种. *中国油料作物学报*, 2015, 37: 766–771.
- Zhan Z X, Jiang Y F, Zhu Z Y, Zhang C S, Yang Q Y, Li Q, Hou Z K, Gong J F, Cheng Y G, Wu J S, Fu T D, Zhou Y M, Piao Z Y, Zhang C Y. Development of close linked marker to *PbBa8.1* conferring canola resistance to *Plasmodiophora brassicae*. *Chin J Oil Crop Sci*, 2015, 37: 766–771 (in Chinese with English abstract).
- [20] 周永红, 孙保亚, 沈向群. 大白菜根肿病抗病接种浓度的研究. *辽宁农业科学*, 2007, (3): 34–35.
- Zhou Y H, Sun B Y, Shen X Q. Study on inoculation concentration of clubroot resistance in Chinese cabbage. *Liaoning Agric Sci*, 2007, (3): 34–35 (in Chinese with English abstract).
- [21] 汪春, 李凯旋, 彭衍彪, 檀根甲, 鲍周明, 方春华. 安徽油菜根肿病菌生理小种鉴定及品种抗病性评价. *安徽农业大学学报*, 2014, 41: 772–776.
- Wang C, Li K X, Peng Y B, Tan G J, Bao Z M, Fang C H. Identification of physiological races of *Plasmodiophora brassicae* and resistance of rape cultivars to club root in Anhui. *J Anhui Agric Univ*, 2014, 41: 772–776 (in Chinese with English abstract).
- [22] 杨宗辉. 甘蓝型油菜波里马细胞质雄性不育恢复基因的图位克隆和功能研究. 华中农业大学博士学位论文, 湖北武汉, 2016.
- Yang Z H. Map-based Cloning and Function Analysis of the Restorer Gene of *Polima cytoplasmic* Male Sterility in *Brassica napus*. PhD Dissertation of Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei, China, 2016 (in Chinese with English abstract).
- [23] Chai A L, Xie X W, Shi Y X, Li B J. Research status of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on cruciferous crops in China. *Can J Plant Pathol*, 2014, 36: 142–153.
- [24] Zheng J, Wang X L, Li Q, Yuan S, Wei S Q, Tian X Y, Huang Y, Wang W M, Yang H. Characterization of five molecular markers for pathotype identification of the clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Phytopathology*, 2018, 108: 1486–1492.

附表 1 用于遗传背景筛选的多态性分子标记

Table S1 Polymorphic molecular markers used for genetic background screening

染色体 Chr.	标记名称 Marker name	物理位置 Physical location (Mb)	正向引物 Forward primer (5'–3')	反向引物 Reverse primer (5'–3')
A01	niab_ssr113	366,648	CAAAAAGTTGCGGTCAATCT	CCTCCAAAGCTCAATCACTG
	sau_um356	2,137,110	CATCTTCGTCTCTCCATCACCT	GTATGGTAGGAGGAGAGTTTCGCT
	cnu_ssr134	4,481,886	TCTCTTTGCCATCGTCGTTTC	CCCCTCAAAGTACGAGAGTCAA
	niab_ssr032	7,684,077	TTCTCCCCATCCTCTCATCTTA	ACCCACAACCAACAAAATCTTC
	cnu_mBRPGM0190	9,861,961	GAGATCCAATAGCGAGCACA	TGTGTTATCGGGTGAAGTGG

(续附表 1)

染色体 Chr.	标记名称 Marker name	物理位置 Physical location (Mb)	正向引物 Forward primer (5'–3')	反向引物 Reverse primer (5'–3')
A01	ACMP00456	13,955,674	CTCTACAAGCCGCAGAGAGA	CATCCACCACAGAGATTGCT
	ACMP00617	15,044,996	AACTCAATGCTCTTCGCTCA	CCTTCTGCTGCTTCCAAGAT
	ACMP00297	16,999,515	CAGATATTGCCCAAACACCA	CTTCGCTTCTGAGCTTTCCT
	sau_um586	20,719,752	AGGGTGATGATGATGTACAGGAG	CTTCGTTAATTCTTCCACCCAG
	cnu_ssr125	26,899,174	TCCAAGTGAAGGATAATGCTCGT	TGTACAATGGGGATGTTGTGG
A02	sau-um619	1,404,160	GAGAGCTCACTTGTGCTTCTTGT	CCGATCAAGTTATTCGCTCTCT
	cnu_ssr116	3,025,687	GCCATGGTGGTGGGATTAGA	TGGTCGAACGTGTGTCGATAAT
	niab_ssr143	5,142,784	GATATGTTTCCAAACAAGTCAA	AAATTCGACCCCTTTTCG
	sau_um434	7,390,390	AGCTAGGGATGAGAAGAAGACCG	TCTTTGTGTCCGTCAAGAGTCC
	cnu_ssr036	10,214,155	AGCACAGTCAAACTCAGAATGA	AGGCATGCGCTCTCTATCTC
	cnu_mBRPGM1391	11,315,073	GGTTTAGAGTGGTGCGGAAT	CCGGGCCTAAAGTAATCAAAA
	cnu_mBRPGM0182a	14,588,355	TGGAGTAGAAGCGTCGTCTG	CCTTCCTCTCTCAGTTCCA
	cnu_mBRPGM1527a	16,911,280	GCAAGCACGGAGACTAAACA	GACGGTGAAGCTGTACGAAG
	cnu_mBRPGM0813	18,824,804	GTTCCATAGGGCGTTCACAT	CCGATGATTCTCTCAATCAGG
	cnu_ssr447	21,870,396	TGGTGTCAAACGGACAGAAA	ATACTCGGCTCAAAACCGTCA
A03	CB10416	23,408,087	GCTGTTGCTGTAGGTTTGA	GAGCCAGCGTTGATAAGA
	niab_ssr115	1,049,474	CGGTGTATACCGAACGAGAA	AAACCCAATCAACCCCTTTA
	ACMP00292	2,920,902	GGGTTGCTGGTTAGCTGTT	TGAATCCGCTGAACTCTCTG
	cnu_mBRPGM0240	5,317,208	GAGGGAAGAGGACAATACGA	TCATCGAGAAACGAAGGGTA
	cnu_ssr173	8,444,756	TGTATTCCATTATTTCCGACTAACCT	CCGATTTTAAAAACGTGAGAAA
	cnu_ssr290	9,860,984	CGATTTTGCCATTGTCTAAGC	TGAAGACACGTTGGTTGAACA
	ACMP00755	11,006,524	GTCATCGCAAGAGGACAAGA	AAAGCTCCATCAAAGCACCT
	cnu_ssr098	14,357,780	TGCGACCCAAGTAGGTGAAAC	TGTCTCTCGCTCATTCATCCAA
	cnu_ssr327	17,867,509	TTCTTGACCAAAAAGAATCATGG	CTAACACGGGGAAAAGCAGA
	ACMP00186	19,379,932	GCCTCCCTGACTTGTACCTC	TTCAATGCGCCAGTTAAGAC
	ACMP00410	20,585,363	CTCAAAGCATGAACGTGGAC	CCTCCCTTGATTTGTGGAGT
	sau_um146	22,875,333	CTCGCAAAATCCCTTCTTCG	CATATCGCTCGAGTTGCAGA
	cnu_ssr526	23,351,679	TCCGAGAAGCACACAAAGAA	TGACCATTTTCTGCCATTCA
	TCR079	23,692,426	TGACGTTCAATCAAAGCCTGA	TTTAGCAATCAAATGCAAATTCAA
	cnu_ssr492	23,747,774	TCGAGGTGGTTACAATCCAA	CAATGCGGATCTACCTCTCA
	cra_id011	24,345,511	GTCGGATTTCTTTCTACACG	TGAACCTATCTTCTCAACG
	cra_ssr015	24,345,899	CGGCCTCCGGAATTTATTA	TGGGAGGACCTCTCTTCTT
	Cra_RT1	24,351,487	ACGTAAAGAAGCTGACCGGAGAC	AGGCTTAACAACAGTTCCAGATT
	cra_ssr017	24,355,996	GTGTGACCGCACTGTTGTTT	AGTTTGACCCAAACGCATAA
	sau_um026	25,648,956	AGTGGCTCCCAGGAGGATAATA	CTTGGAGAAGAGAACTTGGGC
	cnu_ssr241	27,414,883	AATGCTGTGTCCATGACCAA	CGGGCATCCACCTAATTTGT
	At2g35530	29,980,641	CAGAGTAACTGGTTATGCCCGTC	CAATAGGGATAAACCTGGAGACAG
	ACMP00563	31,183,993	CGGAGATGGGATTAAGGAGA	AAAGATCGTGTGGGTGGAAT
A04	BrID10929	251,988	CAATTTGGGAAGACAGTTCT	GATTCTGTGATATAAGGCCA
	BrID10321	2,417,875	TGTGTTTCCTAGTGTGTTGG	ATCAGTCTGAGGGTTCATCA
	BrID101249	3,990,390	TTGCATAGCACATGTAGGAG	GAACGTCTACTTATGGAGAACA
	BrID10645	7,441,204	GCAGAGGAAAACAATCAGAC	AAGCGTCGACTTGAAATCT
	ACMP00073	8,674,696	TTCAACCACACCGACAAACT	CTGACGGAGTCCCTGTACCT
	ACMP00356	11,811,660	TGAGGTCTACAGCCCAAGTG	AATGGAGATCGTGTGCAAAG

(续附表 1)

染色体 Chr.	标记名称 Marker name	物理位置 Physical location (Mb)	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
A04	ACMP00744	12,860,981	CCTGTTCCAATCCCATTCTT	AGATCCCTGACGGGTTTATG
	ACMP00281	15,028,874	TCGACTTTGACGAAGACTGG	AGTCCTCATGGCATCAAACC
	hri_Mbrms195	17,105,559	AATACTTTCTGAAGTTGTCCGCTAA	AACCTACGCAAGATGCTTCTACTT
	cnu_ssr005	18,776,905	AGGAGTCTCGTTCCGTGAGA	TTGAAATTAAGTCGAGCAAACAA
A05	cnu_ssr387	236,456	ACTCGAACCATTCTGGCAAA	GGAACGACTTCCTCCCGTAT
	niab_ssr017	2,501,334	GGTTAAGCAGACGATGGAAGTAA	TATAGGGGAAATCATCTCAAGCA
	cnu_ssr381	4,003,395	TGCTTTTAACCAAACTCAAACG	TGCAGAGAGGCAAGTTTCAA
	sau_um392	5,882,422	GCCAGTTTCGTCTTCTTCTCTG	GAAGTCACACCCCATCTCTATC
	BrID90500	6,762,400	ATGGGCTTTGTTTGGGTAAA	TGAAAGAGACAAGCTGGCAA
	BrID10825	9,949,084	CAATGTGTTTCGATGGAATG	TAGTGTGCGAACAGATTTCAG
	ACMP00841	13,132,010	CAGTGGCAACAACATCAACA	CTTCACATCGTCTCCACCAC
	BrID101239	13,226,921	TCCACACAGAAGATAACTGGT	GAGATGACATTTTCGTGAC
	cnu_ssr458	16,415,511	GGGGTGAATCTTGGATGAGG	CTGACGGATTCCCAACGAAT
	sau_um366	18,549,687	TTCTCCTCGTATCACCACCTCT	GCCTACGTCTTCTACAGCGAGAT
	niab_ssr082	20,079,421	CATTTCCCCGTGACTATCTG	CGTCTTCATCTCAATCTCGC
	sau_um551	21,619,807	GTCCATCTCTACCTGCTCCA	GTTTTGAGCCGAATAATGGTTG
	hri_mBRMS007	23,268,922	AAATTGTTTCTCTTCCCCAT	GTGTTAGGGAGCTGGAGAAT
A06	BrID10395	1,513,120	GCTGACATGTACCTTTTGAA	CATCTAAGACCGAGTCAAGC
	sau_um278	3,092,702	GAGAACAAAGAGGAGGACGCTT	CCGGAGGCAAGTATCCATAAG
	niab_ssr134	5,621,445	CGCAGCCTTTTGCTTCT	TTGCTCTCCTGCAGCTTG
	cnu_mBRPGM1016a	6,689,917	TGGAGATGGCTGTTGTTGAT	AGCAGATGTCGGAATAAACC
	niab_ssr049	7,659,576	GAGGAATTAACGGCGTCTTG	CAGTCGCCACTACCTGGTTT
	ACMP00739	10,965,852	GGTGACTGTTCCATCATCAGC	ATCCCTATCCAAACCTCTCG
	BrID10847	14,198,854	TCATTGCCTTACTTTGTGAC	CTGACACAGGTGAATCAACA
	BrID10849	14,265,494	AAAGATCTGTGGAATCATGG	GGCAAACATGGGTTGATA
	BrID10627	15,630,795	AACACAGATCCAATCTAGCG	GTCCTTAGGCCAAGCATT
	ACMP00692	17,268,545	CGAGTTGCAGAGCCAAGTAG	AACGTAACGCTTCTCTTCC
	sau-um121	18,555,402	GAACCTAACGAAAGGCACCAC	AGTGAGGGTAGACAGGGAGAGAG
	cnu_ssr220	21,896,695	ATCAGAACCGAATCCGACCA	CAATGGTTGCAATGTTATTTGGA
	sau-um415	22,971,940	ACGCAAAGAGAGCGAAAGAGTC	GGTCTTAATCGCATGGAATCCG
	sau-um616	23,447,329	ATTACCTATTGACCCACACCAC	GACGTAGAACAAGTGAGAAGGGA
A07	ACMP00261	1,018,274	AAGCCTCGACTTTGGAAGAT	ATCTCCGTCTGGTCTCGTCT
	At2g06510	2,516,307	GATCGGGTTAAGTCAGGACA	ATGGTCTCCATGTTTCAGCAC
	ACMP00785	4,675,451	TGGCTCTGTTCTCTTCTCTCT	AAGGGATTGATCGGAACCTTG
	BrID10283	8,743,728	CGGTTAGGTCGTAACCTCGTA	CTCTTCATACGCAAGTCTTT
	BrID10487	11,667,757	TCCCTTACAAGTTCATGGAT	ATGGTAGCAACAAAACCACT
	nia_m063	12,010,219	GAAGAACTCGGTGGGGAGT	AAAGAGTTCCGAAAATGGGC
	cnu_ssr511	14,701,383	TGTGGACGAGAACTGAGGA	TGAGATACTGGTGCCTGTGG
	cnu_ssr044	16,404,302	TGTTTTGATCTTTACTGTTTTTGG	AATGTTTTTATATCACTATTGCCAAAT
	cnu_ssr048	18,226,238	TTCTCCATGCTGTTCAATTCAC	CATGAAAAATCGACCTTATTCCA
	cnu_ssr516	20,127,600	ACTTGCCTTAGCCAGCAGCG	AAGATTTTGTGTTGTGGTCTGGTGA
	cnu_ssr1566	22,103,544	GTCAGACTCGGATGGCTTG	TAGGAGCAGTTGGTTCAGCA
A08	ACMP00659	1,364,408	CCGCCTCAATCTCTAGCTTT	CTCGTTCACCACCTCTGCTA
	ACMP00551	2,716,097	CAGCAATGGTGGACATCTCT	AACAAGACCGGAACCATCTC

(续附表 1)

染色体 Chr.	标记名称 Marker name	物理位置 Physical location (Mb)	正向引物 Forward primer (5'–3')	反向引物 Reverse primer (5'–3')
A08	BrID90197	4,203,640	TGTTCAAACCTCCACCCTC	GTGAGCCCAAAAGTTCCTGA
	BrID10839	6,657,012	AGGAACAATACCCATTGTG	GGTGTGTGTGTGTTTCGGTA
	BrID101199	7,356,083	ATGATGGAGATGGACATTG	TGTATCGGCAGAAGAATCTC
	sau_um192	10,064,084	TCCCTCCTCTCTACGTCTTCTC	CTTCTCTGTAACGGGCTTTGAC
	sau_um044	14,603,121	CGATTCATCCATCCATCACC	CTATAGGACCGATCCCGTCTTT
	cnu_ssr432	16,431,751	CAAACCTCGTCTTAAGCAGAA	ACCTGAAGATGACCCAGACG
	sau_um077	17,469,120	CTGATCCTCGAAGAAGACAGTGC	CTTCATGCACTTGAGGAGTCG
	cnu_ssr176	18,202,437	TGTAAGTCACGTTTCGGTTTGCT	AGGCATGTATGGAGATGTAGAGTGA
	BRMS-198	21,521,373	CGAGAGCAGTTAGGAAGCTTAGA	AGAGATACTCTGTCTCCACCTCTT
A09	nia_m010	1,815,031	GGTTGACGTCTCATTGTGTTCTT	TAGCTTTGCTCACTTTTCACTCC
	sau_um219	3,482,038	CGCAGCTTCCTCTGTATTGCTA	GGCTCTCACCAGAGTCAAGTCTA
	cnu_ssr157	5,671,382	CCGCAGTTGATCCATTAGCC	ACGCTGCATCCACATGAAAC
	sau_um368	6,944,590	AGCCCCGTCTCTTTCACGTAT	GATCTAGGGTCTCGTCGACTTTG
	nia_m022	10,330,441	CTCTCGTCTCGGAGGATCTAAA	GTGAGAGTGGTTGCTGAGTGAG
	sau_um019	13,593,016	GGTCCTGCCATTCTCTATTCTCT	CATGCCACGTCAGCAATATG
	sau_um138	16,538,853	CGCACACCATTTCACAAAC	GAGATGAATGTGCGTCTCCTG
	ACMP00188	18,078,993	GATTCTCTCCACGACCATT	TCTCCCAAATCGGTTCTTTC
	sau_um101	21,178,401	GATCTTATCGTGCCCATTCG	CTCCTCATAGGGCTCCTTTTTC
	cnu_ssr598	24,440,145	TTCACCGTCTGCTCTTATCG	CTGCTCCCATACGATCCACT
	cnu_ssr016	27,461,366	GGTGAATGGAATCTTGCTTTGA	CCCAACAATCCCAGAAACAC
	cnu_ssr119	30,057,081	ACACCTACTTGTTTCCATCCAAAT	CGGGTATTGCGTTGTTTCC
	sau_um187	33,166,753	GTCCTCCTCAACCTCATCATCA	AGTCGAGAGTAACGGGAAGAGAG
	sau_um105	36,739,828	CCTTTCTAATGGGAAGCGGTAG	CTCCCTCTTCGAATTGACTCAC
	sau_um126	2,528,134	AGAACACGCTCCTAACCATCAG	TAGCTACGAGGCCTTAGAGGGTA
A10	niab_ssr034	4,065,070	GTGCAAGTCAGTGCCAAAGA	CTCGGTGGTTGAGTGAAGGT
	sau_um433	7,037,138	AAGAGTCCACAGCAGGAGATTG	GGGATGAGAAAAAGACAGGTGG
	sau_um216	10,127,674	CTTTCTTCTCTCCGTCGTTCC	AAGGTTAGGGTTAGAGAAGCCG
	niab_ssr123	11,313,024	GGATCTAGAAACCCCTTCACA	ATCTTGTTGTCGGGCAGATAA
	Nniab_ssr122	12,936,001	ACTTCTCCGGCTGGATACTC	CCGTTTAACTTGCGTTTGT
	niab_ssr009	15,004,910	TTCCAAGCTTGCTGGTACT	GAGATTTCCCTCGCTTGATG
	sau_um310	15,341,225	TCTTTTCCATCTCTTACCATCATC	CCTATGAGAGGAAGACCGAGACT

附表 2 F₁、BC₁ 及两亲本的发病率统计
Table S2 Number of plants of F₁, BC₁, and two parents at different disease resistant levels

发病等级 Disease level	调查株数 Number of plants investigated			
	F ₁	BC ₁	CR Shinki	Bing409
4 级 Level 4	0	19	0	35
3 级 Level 3	0	0	0	12
2 级 Level 2	0	0	0	0
1 级 Level 1	0	0	0	0
0 级 Level 0	31	24	30	0

附表 3 Bing409R 抗病材料接种我国不同地区根肿菌株数统计

Table S3 Number of resistant materials Bing409R inoculated with *P. brassica* in different areas of China

根肿菌 <i>P. brassica</i>	收集地点 Collection place	Bing409R 接菌株数 Number of inoculated Bing409R plants (R/S)			对照 Control (R/S)
		重复 1 Repeat 1	重复 2 Repeat 2	重复 3 Repeat 3	
Y-TC	云南腾冲 Tengchong, Yunnan	15 (3/12)	24 (5/19)	26 (5/21)	19 (0/19)
Y-XC	云南楚雄 Xiongchu, Yunnan	19 (16/3)	25 (19/6)	25 (21/4)	25 (0/25)
Y-BS	云南保山 Baoshan, Yunnan	24 (5/19)	26 (6/20)	23 (4/19)	20 (0/20)
Y-LC	云南临沧 Lincang, Yunnan	20 (11/9)	25 (15/10)	26 (16/10)	21 (0/21)
Y-DH	云南德宏 Dehong, Yunnan	20 (4/16)	26 (6/20)	24 (5/19)	25 (0/25)
H-ES	湖北恩施 Enshi, Hubei	17 (4/13)	26 (6/20)	20 (3/17)	22 (0/22)
H-YC	湖北宜昌 Yichang, Hubei	23 (23/0)	22 (22/0)	26 (26/0)	22 (0/22)
H-ZJ	湖北枝江 Zhijiang, Hubei	22 (22/0)	21 (21/0)	19 (19/0)	20 (0/22)
S-DY	四川德阳 Deyang, Sichuan	26 (26/0)	22 (22/0)	24 (24/0)	22 (0/22)
S-PZ	四川彭州 Pengzhou, Sichuan	27 (27/0)	22 (22/0)	23 (23/0)	20 (0/20)
S-GH	四川广汉 Guanghan, Sichuan	25 (25/0)	23 (23/0)	23 (23/0)	25 (0/22)
S-CD	四川成都 Chengdu, Sichuan	24 (24/0)	20 (20/0)	19 (19/0)	25 (0/22)
A-HS	安徽黄山 Huangshan, Anhui	17 (17/0)	19 (19/0)	23 (23/0)	21 (0/22)

表中 R 表示抗病表型的植株数, S 表示感病表型的植株数。

R and S in the table represent number of plants with resistance phenotype and number of plants susceptibility phenotype, respectively.