

# 利用小麦单染色体代换系研究赤霉病抗性和抑制毒素产生的基因

郑 直<sup>1</sup>, LIU Chun - ji<sup>3</sup>, 刘大群<sup>1</sup>, 马 平<sup>1,2</sup>

(1. 河北农业大学 植物保护学院, 河北 保定 071001; 2. 河北省农林科学院 植物保护研究所, 河北 保定 071001;

3. CSIRO Plant Industry, Brisbane, Australia)

**摘要:**由赤霉菌引起的小麦赤霉病是小麦生产的主要病害之一,小麦赤霉病抗源十分贫乏,而且多数表现为多基因遗传,在小麦育种中较难应用。从小麦近缘属种中寻求赤霉病抗性基因并把它引入栽培品种中,有重要的学术意义和经济价值。本研究以抗病小麦材料 PI481521 和栽培小麦 Langdon 杂交得到的 14 个 4 倍体小麦单条染色体代换系为试验材料,进行室内赤霉病的抗性鉴定,同时用脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)试剂盒来测定接种后籽粒中的毒素含量。表型鉴定结果表明,14 个代换系的抗病性存在较大的差异,其中代换系 LDN(PI481521 - 3A)和 LDN(PI481521 - 7B)分别在感染小穗数和小穗感染百分率上与抗性亲本无显著性差异,不存在抗病性高于抗性亲本的类型;毒素含量分析表明,2 个亲本的毒素含量没有显著差异,各代换系的毒素含量均高于抗性亲本 PI481521、LDN(PI481521 - 1A)、LDN(PI481521 - 2A)及 LDN(PI481521 - 6A)的毒素含量较高,与 2 个亲本存在显著差异。这一鉴定结果为下一步抗性基因和毒素基因的定位研究提供了基础材料,对赤霉病抗性指标进行相关性分析,发现小穗感染百分率与麦粒毒素含量呈显著正相关。因此,在田间进行抗赤霉病种质筛选及抗病育种后代选择时,可以小穗感染百分率作为衡量指标以简化操作程序。

**关键词:**小麦;单染色体代换系;赤霉病;抗性鉴定;毒素

**中图分类号:**S512.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1000 - 7091(2008)02 - 0155 - 05

## Identification of Chromosomes Responsible for FHB and Mycotoxin Production in Durum Wheat

ZHENG Zhi<sup>1</sup>, LIU Chun - ji<sup>3</sup>, LIU Da - qun<sup>1</sup>, MA Ping<sup>1,2</sup>

(1. College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China;

2. Institute of Plant Protection, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences,

Baoding 071001, China; 3. CSIRO Plant Industry, Brisbane, Australia)

**Abstract:**Wheat Fusarium head blight (FHB), caused mainly by *Fusarium graminearum* and *Fusarium culmorum*, is a serious disease problem. The resistance resource to FHB, however, is very poor. USDA geneticist Steven Xu produced a set of lines [LDN(PI481521)]. Each line had a different pair of chromosome from PI481521 substituted for the corresponding Langdon durum chromosomes. The purpose of this study was to determine if any of the LDN(PI481521) lines showed useful level of resistance of FHB. We test these lines for response by inoculating with *Fusarium graminearum* in the greenhouse. Inoculation was accomplished via the single spikelet method. In the test, some lines differed significantly. Two lines, LDN(PI481521 - 3A) and LDN(PI481521 - 7B), were consistently less susceptible and another two, LDN(PI481521 - 2A) and LDN(PI481521 - 6A), were more susceptible than the parent Langdon durum, which itself showed an intermediate FHB reaction. Also, these inoculated spikelets were detected by using Beacon Analytical Systems DON plate kit to analysis the mycotoxin. The results showed two lines LDN(PI481521 - 3A) and LDN(PI481521 - 7B) were the lowest amount of mycotoxin among the substitution lines, So there is a strong correlation between FHB severity and Don contents. Consequently, the genes responsible for or resistant to FHB and inhibition of mycotoxin production was preliminary localization.

**Key words:**Wheat; Wheat substitution lines; *Fusarium graminearum*; Resistance identification; Mycotoxin

小麦是世界上最重要的粮食作物之一,病原真菌是影响其稳产、高产和品质的重要生物灾害,由赤霉病菌 (*Fusarium graminearum* Schwabe) 侵染引起赤霉病已成为当前小麦生产上重要的世界性病害<sup>[1]</sup>。该病不仅造成产量损失,而且由于籽粒饱满度低,品质下降,使种子出苗率降低。更为严重的是病麦粒中含有毒素 DON(脱氧雪腐镰刀菌烯醇),人畜食用后会造成中毒<sup>[2,3]</sup>。由于赤霉病主要是在抽穗-扬花期进行隐性侵染,穗部发病后喷药为时已晚,化学防治效果不理想<sup>[4]</sup>,因此,挖掘和利用小麦赤霉病抗性基因的研究具有重要意义。

许多学者利用赤霉病抗病品种与感病品种的杂交分离后代进行了抗性研究,陈建莉<sup>[5]</sup>认为,苏麦 3 号对赤霉病的抗扩展遗传除受一对主效基因作用外,还受感病亲本所含微效多基因影响。周朝飞等<sup>[6]</sup>估计苏麦 3 号的抗性由 2 个基因控制。Bai<sup>[7]</sup>则认为有 3 个主要的赤霉病抗性基因。也有学者利用单体分析法对小麦赤霉病基因进行了定位,余毓君<sup>[8]</sup>将平湖剑子麦抗赤霉病基因定位于染色体 6D, 7A, 3B, 5B 和 6B 上,Buerstm<sup>[9]</sup>将小麦 u-136.1 的抗赤霉病基因定位于 6B, 5A, 6D 上。

由于赤霉病抗性由几个效应不等的显性或不完全显性基因支配,发病受环境影响较大,分离世代分类困难,因而采用单体分析进行抗赤霉病基因定位具有局限性。采用单个染色体代换系法则可弥补上述不足之处,由于单染色体代换系小麦比较容易被感染,因而更有利于试验的进行,并且可以最终确定抗病基因所在的染色体。

本研究以来自抗病小麦材料 PI481521 和栽培小麦 Langdon 杂交得到的 4 倍体小麦单条染色体代换系为试验材料,通过赤霉病表型鉴定和穗部毒素分析,来鉴定单染色体代换系小麦对赤霉病的抗性,同时推测赤霉病抗性基因及控制毒素产生的基因所在的染色体,旨在为抗性基因和毒素基因的挖掘和利用提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

单染色体代换系小麦是一组 4 倍体小麦,由抗病材料 PI481521 分别替换感病品种 Langdon 的单条染色体而组成。小麦单染色体代换系由 Steven Xu (USDA, Fargo, USA) 提供。

寄主材料:供体亲本 PI481521、受体亲本 Langdon、PI478742 及 14 个不同的 4 倍体小麦单条染色体代换系。

病原菌:小麦赤霉病菌 (*Fusarium graminearum*) 孢子悬浮液。

### 1.2 试验方法

1.2.1 赤霉菌培养基的制备 选择培养好的一代小麦赤霉菌菌株,用直径 5 mm 打孔器取 2~3 片于 1/4 PDA 培养基(成分包括 Difco - potato Dextrose Agar 7.5 g、Amyl Media Agar technical 11 g 和 750 mL 水),赤霉菌的培养共分 2 个阶段进行,前 7 d 放置在 25℃ 培养箱中黑暗培养,后 7 d 转入光照培养箱中室温培养,用以增加孢子的产量。

1.2.2 赤霉菌分生孢子悬浮溶液的制备 将培养好的小麦赤霉菌培养基在大烧杯中捣碎、搅拌,加入一定量的蒸馏水,用纱布过滤出孢子悬浮液,取 1 μL 用显微镜观察并计数,当孢子含量  $10^6$  个/μL 时,悬浮液可以用于接种;再加入少许的 Tween-20,以利于孢子的附着,放入 -80℃ 冷藏备用。

1.2.3 小麦人工接种 取 17 个供试材料的种子,催芽 2~3 d 后种入花盆中,每盆 2~3 棵苗为 1 个重复,每个材料 4 次重复放置于温室中培养。待到花期时,取 10 μL 已配制好的孢子悬浮液接种在第 3 或第 4 个小穗上,为有利于病菌的侵入而导致发病,接种时要用枪头破坏小穗内的胚部,然后用塑料袋套住穗部保湿 7 d,21 d 后取穗,观察并记录穗部的侵染情况。将病穗放入 60℃ 干燥箱中干燥 7~14 d 后脱粒。

1.2.4 麦粒提取液的制备 采用自动加速溶液提取系统(ACE system)制备麦粒提取液,用 86% 乙腈做反应溶液。反应是在 24 个不锈钢可拆卸密封的小管中进行,放入麦粒后再加入一定量的细沙来填满后拧紧。ACE 系统是在高温高压条件下获取热的液体反应液,在加热样品后,随着乙腈的注入,每个样品经过 3 次循环,每个循环包括在 1500 P 的压力和 40℃ 的温度下加热 5 min,5 min 的静止状态和 5 min 的乙腈洗涤。用小玻璃管收集的提取液,用于以后的毒素分析,提取液称量记录后在 4℃ 保存备用。

1.2.5 毒素的检测 将麦粒提取液在氮气下挥发,根据需要用水将提取液稀释到一定的浓度,常温放置 1~2 h。取 50 μL 提取液放入脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)试剂盒中,留下 6 个小孔作对照,对照浓度分别为 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2.5 μg/mL,由试剂盒提供,再按照顺序依次加入试剂盒提供的相应的反应底物和缓冲液,最后用分光光度计读取麦粒提取液中镰刀菌毒素的含量。

1.2.6 毒素含量的计算方法 用分光光度计读取

试剂盒中各处理的分光光度值,根据提取物的重量(g)、提取液和玻璃小管的总重量(g)、玻璃小管的重量(g)、用于氮气干燥的提取物的体积(g)、悬浮液的体积(g)、稀释度,可根据计算公式计算出麦粒中镰刀菌毒素的含量,公式如下:

单位重量内毒素含量 = 稀释度 × 样本中 Don 的含量。

1.2.7 统计分析 小麦单条染色体代换系赤霉病抗性的聚类:根据被感染的小穗数目、小穗感染率及麦粒中赤霉菌毒素的含量,计算不同供试材料之间的表型相似系数,利用 Ntsys2.1 软件对表型相似系数进行聚类<sup>[10]</sup>。

基因型间的方差分析及显著性检验由 SAS 9.0 完成。

2 结果与分析

2.1 小麦单条染色体代换系的赤霉病抗性鉴定

17 个供试材料感染小穗数目的变异范围为 7.33~18.17(表 1),平均感染小穗数为分析 11.88。供体亲本 PI481521 感染的小穗数目最少,除代换系

LDN(PI481521 - 3A)外,与其他代换系均呈显著性差异;代换系 LDN(PI481521 - 2A)和 LDN(PI481521 - 6A)感染的小穗数目较多,与其他材料呈显著差异。

供试材料被感染小穗数的百分比的变异范围在 35.56%~86.99%之间(表 1),平均小穗感染率为 58.89%。亲本 PI481521 小穗感染率最少,除代换系 LDN(PI481521 - 7B)外,与其他代换系均呈显著性差异;代换系 LDN(PI481521 - 2A)和 LDN(PI481521 - 6A)的小穗感染较高,与其他的代换系呈显著差异。

供试材料麦粒中的赤霉素毒素含量的变异范围为 0.74~12.11(表 1),平均毒素含量为 3.94。供体亲本 PI481521 的毒素含量最低,代换系 LDN(PI481521 - 6A)的毒素含量最高;17 个供试材料根据差异显著性结果可分为两类,LDN(PI481521 - 1A)、LDN(PI481521 - 2A)及 LDN(PI481521 - 6A)与其他代换系呈显著差异。

以上三个鉴定指标总体变化趋势一致(图 1),综合上述抗性指标的鉴定结果,发现各代换系的抗病性存在较大的差异,其中不存在抗病性高于抗性亲本的类型,但存在感病性高于感病亲本的类型。

表 1 小麦单条染色体代换系的赤霉病抗性鉴定

Tab.1 Experimental condition of substitution lines

材料 Sample	被感染的小穗数量 Infected spikelet	被感染的占全部 数量的百分比/ % Proportion of infected spikelets	麦粒中赤霉菌 毒素的含量/(μg/mL) PPm in tissue
PI481521	7.33 <sup>f</sup>	35.56 <sup>h</sup>	0.74 <sup>b</sup>
LDN(PI481521 - 7B)	9.86 <sup>cd</sup>	43.07 <sup>gh</sup>	0.95 <sup>b</sup>
LDN(PI481521 - 3A)	8.73 <sup>ef</sup>	48.20 <sup>gf</sup>	2.20 <sup>b</sup>
LDN(PI481521 - 4A)	9.16 <sup>e</sup>	48.81 <sup>gf</sup>	2.06 <sup>b</sup>
LDN(PI481521 - 3B)	9.32 <sup>e</sup>	49.66 <sup>gf</sup>	1.12 <sup>b</sup>
LDN(PI481521 - 6B)	10.04 <sup>cd</sup>	52.25 <sup>gef</sup>	3.81 <sup>b</sup>
LDN(PI481521 - 5A)	9.90 <sup>cd</sup>	54.99 <sup>efd</sup>	1.39 <sup>b</sup>
LDN(PI481521 - 7A)	11.33 <sup>cd</sup>	56.35 <sup>cefd</sup>	3.92 <sup>b</sup>
PI478742	12.00 <sup>cb</sup>	56.58 <sup>cefd</sup>	2.12 <sup>b</sup>
Langdon	12.04 <sup>cefd</sup>	57.58 <sup>cefd</sup>	3.52 <sup>b</sup>
LDN(PI481521 - 4B)	13.49 <sup>b</sup>	59.63 <sup>cefd</sup>	1.67 <sup>b</sup>
LDN(PI481521 - 1B)	12.72 <sup>cb</sup>	62.47 <sup>cebd</sup>	2.31 <sup>b</sup>
LDN(PI481521 - 2B)	12.83 <sup>cb</sup>	66.12 <sup>cbd</sup>	2.01 <sup>b</sup>
LDN(PI481521 - 5B)	13.33 <sup>b</sup>	67.28 <sup>cb</sup>	1.73 <sup>b</sup>
LDN(PI481521 - 1A)	13.73 <sup>b</sup>	71.65 <sup>b</sup>	13.41 <sup>a</sup>
LDN(PI481521 - 2A)	17.94 <sup>a</sup>	84.00 <sup>a</sup>	11.94 <sup>a</sup>
LDN(PI481521 - 6A)	18.17 <sup>a</sup>	86.99 <sup>a</sup>	12.11 <sup>a</sup>

2.2 小麦单条染色体代换系的赤霉病抗性分类

将这三个鉴定指标进行综合性分析,用 UPGMA 法对三种鉴定数据进行聚类(图 2),以遗传距离 12.15 为界,将 17 个代换系分为两大类。第一类为供体亲本 PI481521 及 LDN(PI481521 - 7B)等 13 个代换系,鉴定结果为感病程度较低;第二类为代换系 LDN(PI481521 - 1A)、LDN(PI481521 - 2A)、LDN(PI481521 - 6A),鉴定结果为感病程度高。以遗传距离 4.58 为界,将供试材料分为四大类,第一类为供体亲本

PI481521 及 LDN(PI481521 - 7B)、LDN(PI481521 - 5A)、LDN(PI481521 - 3B)、LDN(PI481521 - 3A)和 LDN(PI481521 - 4A);LDN(PI481521 - 6B)感病轻的 6 个代换系,第二类为 LDN(PI481521 - 6B)、LDN(PI481521 - 7A)、受体亲本 Langdon、LDN(PI481521 - 4B)、LDN(PI481521 - 5B)、LDN(PI481521 - 1B)及 LDN(PI481521 - 2B)感病较重的 7 个代换系;第三类为感病程度重的代换系 LDN(PI481521 - 1A),第四类为感病程度最重的代换系 LDN(PI481521 - 2A)、LDN

(PI481521 - 6A)。以遗传距离 2.59 为界,将以上代换系进一步进行分类,可以分为 6 类,第一类为感病最轻的供体亲本 PI481521,第二类为感病轻的代换系 LDN (PI481521 - 7B)、LDN (PI481521 - 5A)、LDN

(PI481521 - 3B)、LDN(PI481521 - 3A)和 LDN(PI481521 - 4A);第三类为感病较轻的代换系 LDN(PI481521 - 6B)、LDN(PI481521 - 7A)

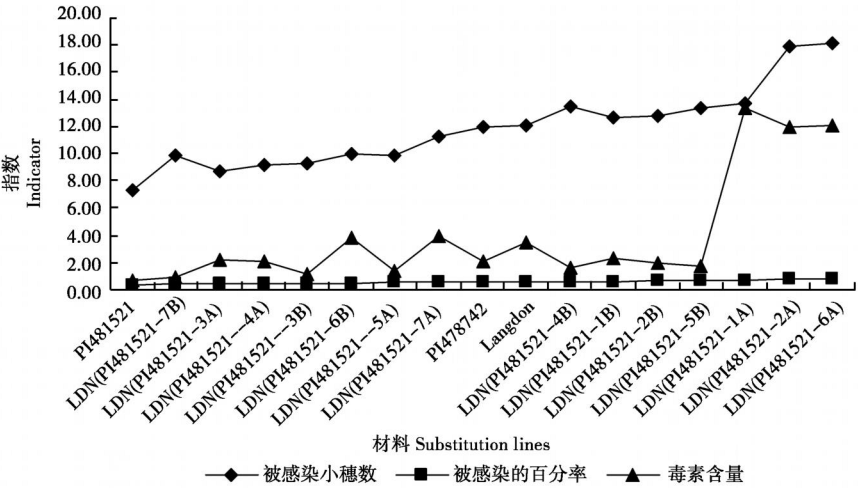


图 1 三种小麦赤霉病鉴定指标的变化趋势图

Fig. 1 Trend for identifying the changes of three indicators

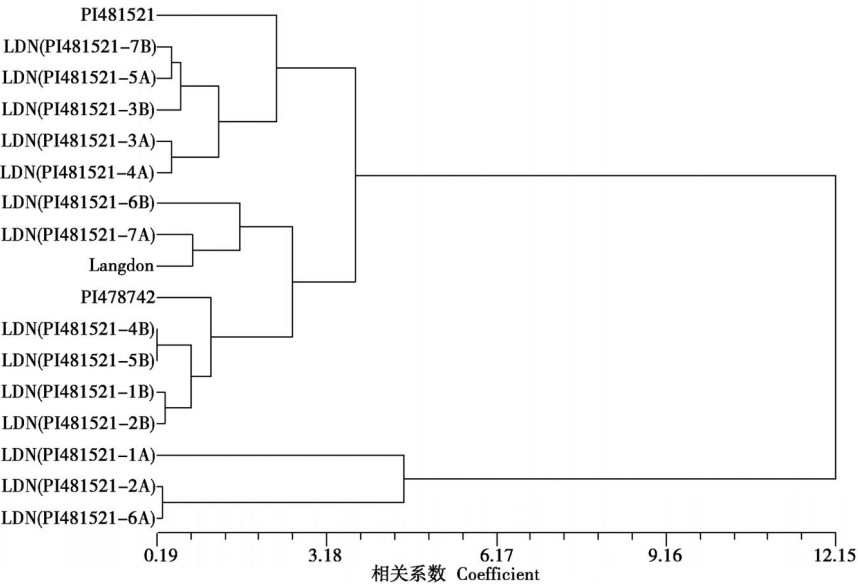


图 2 小麦单条染色体代换系的赤霉菌鉴定结果聚类

Fig. 2 The identification results of wheat chromosome substitution lines

及 Langdon;第四类为感病较重的材料 PI478742 及代换系 LDN (PI481521 - 4B)、LDN (PI481521 - 5B)、LDN(PI481521 - 1B)、LDN(PI481521 - 2B);第五类为感病重的代换系 LDN (PI481521 - 1A);第六类为感病最重的代换系 LDN (PI481521 - 2A) 和 LDN (PI481521 - 6A)。

2.3 小麦单条染色体代换系赤霉病抗性指标的相关性分析

根据 17 个供试材料的赤霉病抗性鉴定结果和三种小麦赤霉病鉴定指标的变化趋势图(表 1,图 1)可以看出,三种鉴定方法具有一定的相关性,如毒素

含量最低的品种在感染时的病症最不明显,且被感染的小穗数量也最少;相反,毒素含量最高的品种在感染时的病症最明显,且被感染的小穗数量最高。将感染的小穗数和小穗感染百分率分别与麦粒毒素含量作相关分析,结果表明感染的小穗数与麦粒毒素含量呈正向关,相关系数为 0.754 5,在 P = 0.01 水平极显著相关;小穗感染百分率与麦粒毒素含量也呈正相关,相关系数为 0.790 8,在 P = 0.01 水平极显著相关,因此认为在一定程度上小穗感染百分率可以替代麦粒毒素含量。由于小穗感染赤霉病这一鉴定指标较易获得,而麦粒的毒素含量在测定上

花费较大,建议在田间进行抗赤霉病种质筛选及抗病育种后代选择时,以小穗感染百分率作为衡量指标以简化操作程序。

### 3 讨论

#### 3.1 抗病基因及毒素积累基因所在染色体的初步研究

在小麦赤霉病基因定位方面,前人做了大量的研究,由于所用试验群体及定位方法的不同也导致结论存在很大的差异。本研究利用一组 4 倍体单染色体代换系进行赤霉病鉴定,结果表明,代换系 LDN (PI481521 - 3A), LDN (PI481521 - 7B) 是除抗性亲本外感染小穗的数量最少的材料,因此推测抗性基因在 3A 和 7B 上;同时代换系这 2 个代换系毒素含量最低,可能 3A 和 7B 上存在抑制 DON 毒素产生的基因,廖玉才和余毓君曾用单体分析方法对望水白的赤霉病抗扩展性进行了鉴定,认为抗性受 5~6 对基因控制,其中在 7B 染色体上存在抗病基因<sup>[11]</sup>,这与本研究的结果相同。吴纪中构建了望水白和南大 2419 的重组自交系群体进行赤霉病的 QTL 定位,研究结果表明在 3A 上存在抗性基因,与本研究结果相吻合<sup>[12]</sup>。因此,代换系 LDN (PI481521 - 3A) 和 LDN (PI481521 - 7B) 为下一步抗性基因的挖掘和利用提供了基础材料。

代换系 LDN (PI48521 - 2A) 及 LDN (PI48521 - 6A) 是感染小穗数量最多的 2 个材料,因此推测感病基因在 2A 和 6A 这 2 个染色体上。根据试验测出的毒素,而代换系 LDN (PI48521 - 2A) 及 LDN (PI48521 - 6A) 在所有材料中的毒素含量最高,因此代换片段 2A 和 6A 上可能存在有利毒素产生的基因。有关毒素基因的定位研究未见报道。

#### 3.2 小麦赤霉病小穗感病率与麦粒毒素关系的初步研究

赤霉菌毒素的检测方法很多,主要有生物检测、免疫检测和物理化学检测。理化检测中的薄层色谱、高效液体色谱荧光检测、气相色谱、液相色谱、气-质联用和液-质联用等,各方法的检测极限相差很大<sup>[13]</sup>。对于赤霉毒素的检测可根据不同的研究目的采用相应的检测方法。本试验用 DON 试剂盒测定毒素的含量,使麦粒中的毒素得以量化。

张匀华<sup>[14]</sup>采用人工接种的方法,对 3 个抗感不同品种的小麦赤霉病发病率与病情指数之间关系进行了初步研究,得出了 3 个小麦品种赤霉病发病率与病情指数间的关系符合  $y = ax \cdot e^{bx}$  模型。本研究对被感染小穗数百分率与麦粒毒素含量进行了相关性分析,结果表明两者间存在显著正相关。因此可以通过被感染小穗数百分率间接地估计麦粒毒素含量,从而为田间抗性材料的筛选提供直接、简便的检测手段。

致谢:USDA 得 Steven Xu 为试验提供了材料,并感谢王志民对文章检阅和提供的宝贵意见。

#### 参考文献:

- [1] 何中虎,张爱民主编. 中国小麦育种研究进展 [M]. 北京:中国科学技术出版社,2002:3 - 7.
- [2] 侯永翠,郑有良. 抗赤霉病小麦地方品种的贮藏蛋白质分析[J]. 麦类作物学报,2002,22(4):23 - 27.
- [3] 陆维忠. 小麦赤霉病研究[M]. 北京:科学出版社,2001.
- [4] 张从宇,王家义. 小麦品种对赤霉病的抗性研究[J]. 种子,2003,6:38 - 39.
- [5] 陈建莉. 小麦赤霉病抗源苏麦三号的抗性遗传育种策略陕西[J]. 农业科学,1989,2(12):2 - 5.
- [6] 周朝飞,夏穗生. 关于小麦抗赤霉病育种问题的探讨[J]. 中国农业科学,1987,21(2):19 - 25.
- [7] Bai G H. Identification of AHP markers linked to one major QTL controlling scab resistance [C]// Wheat Proceeding of the 9<sup>th</sup> International Wheat Genetics Symposium. 1989,3:51 - 53.
- [8] 余毓君. 小麦品种苏麦三号抗赤霉病性及其产量因素的单体分析[J]. 华中农学院学报,1982,12:70 - 77.
- [9] Buerstmayr H. Chromosome location of Fusarium head blight resistance genes in wheat [J]. Cereal Res Commun,1997,25:731 - 732.
- [10] Rohlf F J. NTSYS: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2. 1 [M]. New York: State University of New York, 2000.
- [11] 廖玉才,余毓君. 小麦品种望水白的抗赤霉病基因分析[J]. 华中农学院学报,1985,4(2):6 - 14.
- [12] 吴纪中. 望水白和南大 2419 群体抗赤霉病 QTL 的初步分析[D]. 南京:南京农业大学,2003.
- [13] 韩青梅,曹丽华,康振生. 小麦赤霉病毒素研究进展[J]. 西安联合大学学报,2003,6(4):2003.
- [14] 张均华. 小麦赤霉病发病率与病情指数关系初步研究[J]. 黑龙江农业科学,2000(3):3 - 5.