

小麦河农 6251 苗期抗叶锈病基因的鉴定

任晓娣¹, 杜冬冬¹, 张河山¹, 姚宏鹏¹, 赵 赛¹, 杨文香^{1,2}, 刘大群^{1,2,3}

(1. 河北农业大学 植物病理学系, 河北 保定 071001; 2. 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北 保定 071001;
3. 国家北方山区农业工程技术研究中心, 河北 保定 071001)

摘要:为明确河农 6251 含有的抗叶锈基因并对其进行分子定位,以抗病品种河农 6251 与感病品种 Thatcher 的杂种 F₁、F₂、F₃ 群体为材料,对河农 6251 的苗期抗叶锈基因进行定位。分子标记辅助鉴定结果表明,河农 6251 中含有抗叶锈基因 *Lr26* 和 *LrZH84*,可能含有 *Lr2c* 和 *Lr17a*;遗传分析表明,河农 6251 对叶锈菌 PBGP 的抗性由 1 对显性抗病基因决定,暂命名为 *LrH6*;用 SSR 技术和分离群体分组法(BSA)分析河农 6251 F₂ 群体和 F₃ 家系,结果位于 1B 染色体的 3 个 SSR 标记 wmc419、wms582 和 barc120 与 *LrH6* 连锁,遗传距离分别为 21.6、25.8、27.9 cM。河农 6251 中含有 *Lr26*、*LrZH84* 等多个抗叶锈基因,其对 PBGP 的抗性由一对位于 1BL 染色体上的显性抗叶锈基因决定。

关键词:小麦叶锈病;抗病基因;SSR 标记;遗传分析;遗传作图

中图分类号:S435.121 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)03-0192-08

doi:10.7668/hbxb.2015.03.033

Identification of Wheat Leaf Rust Resistance Gene in Henong 6251 at Seedling Stage

REN Xiao-di¹, DU Dong-dong¹, ZHANG He-shan¹, YAO Hong-peng¹,
ZHAO Sai¹, YANG Wen-xiang^{1,2}, LIU Da-qun^{1,2,3}

(1. Department of Plant Pathology, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China; 2. Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, China; 3. National Engineering Research Center for Agriculture in Northern Mountainous Areas, Baoding 071001, China)

Abstract: Preliminary research showed that they all contributed higher disease resistance level to *Puccinia triticina*. Detecting and mapping wheat leaf rust resistance gene were significance for application of the resistance in the wheat production. Resistant parents Henong 6251, susceptible parent Thatcher and their F₂, F₃ populations were employed to map the wheat leaf rust resistance genes in Henong 6251 based on SSR technique. Molecular marker-assisted identification results showed that Henong 6251 contained wheat leaf rust resistance genes *Lr26* and *LrZH84*, and probably contained *Lr2c* and *Lr17a*. Henong 6251, Thatcher, and their F₁, F₂ populations and F₃ families were tested for detecting the wheat leaf rust resistance with single strain of Chinese *P. triticina* pathotype PBGP in greenhouse. The results showed that the wheat leaf rust resistance in Henong 6251 to PBGP was controlled by one dominant resistance gene, temporarily designated as *LrH6*. SSR molecular markers and BSA were used to test Henong 6251 and their resistant and susceptible bulks of F₂ and F₃ populations for mapping the leaf rust resistance gene. Results indicated that Henong 6251 carried a single dominant resistance gene *LrH6* to PBGP, and was preliminary located on chromosome 1B. The resistance gene *LrH6* was linked to the three known SSR loci (wmc419, wms582 and barc120) on the 1BL with genetic distance ranging 21.6, 25.8, 27.9 cM respectively. Henong 6251 contained more than one leaf rust resistance genes including *Lr26* and *LrZH84* and the wheat leaf rust resistance to PBGP was controlled by one dominant and new resistance gene.

Key words: Wheat leaf rust; Resistance gene; SSR marker; Genetic analysis; Genetic mapping

收稿日期:2015-02-20

基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(2013CB127700);河北省现代农业产业体系小麦产业创新团队建设项目

作者简介:任晓娣(1987-),女,河北邯郸人,硕士,主要从事分子植物病理学研究。任晓娣、杜冬冬为同等贡献作者。

通讯作者:杨文香(1966-),女,河北沧州人,教授,博士,博士生导师,主要从事分子植物病理学及植物病害生物防治研究。

刘大群(1958-),男,河北石家庄人,教授,博士,博士生导师,主要从事分子植物病理学及植物病害生物防治研究。

小麦叶锈病是由小麦叶锈菌(*Puccinia triticina*)引起的一种世界性小麦重要病害,严重发生会造成小麦 40% 以上的产量损失。近年来由于全球气候变暖,气候条件更适合小麦叶锈病的发生和蔓延,使小麦叶锈病发生日益严重^[1]。抗病品种的利用是控制该病害最经济有效的方法。但目前定名的抗叶锈基因中大多数具有生理专化抗性,随着小麦叶锈菌新毒性基因的产生及劣势小种上升为优势小种,很快“丧失”抗性。因此,不断发掘新的抗病基因和培育新的抗病品种对病害的防治具有重大意义。

目前仅有 *Lr9*、*Lr19*、*Lr24*、*Lr34*、*Lr38*、*Lr42* 和 *Lr46* 等少数抗叶锈基因表现出对中国流行小种很强的抗叶锈性^[2-4]。为不断鉴定、发掘抗叶锈基因,了解生产与育种资源中抗叶锈基因的含有情况,我国科技工作者在该领域做了很多工作^[5-7],对于一些育种资源和不同时期生产品种的抗叶锈性有了一定的了解,为生产提供了重要信息。近年来,随着分子生物学的不断发展和抗叶锈基因分子标记的不断开发,科技工作者利用基因推导和分子标记对近年来的育种资源和生产品种开展了更为深入的研究,明确了一些品种的抗叶锈基因。Li 等^[8]对 12 个小麦主产区省份广泛种植的 102 个小麦品种进行了检测,分析其所携带的抗叶锈病基因的情况,在 65 个品种发现了 *Lr1*、*Lr2a* 和 *Lr14a* 等基因,在 44 个品种发现了 *Lr26*,5 个品种可能含有 *Lr16*。师丽红等^[9]对 10 个小麦新品种进行了抗叶锈评价,河农 6245 和河农 9206 含有抗病基因 *Lr1* 和 *Lr26*,河农 825、河农 826、河农 827、河农 6049 和河农 6251 含有 *Lr26*。丁艳红等^[10]对 28 份微核心种质进行综合抗叶锈分析,发现中优 9507、敦化春麦、新克旱 9 号、欧柔、兴义 4 号、成都光头、红冬麦为近免疫到高抗类型。赵丽娜等^[11]对中国小麦其他 23 种微核心种质进行抗叶锈评价时确定其含有抗叶锈基因 *Lr1*、*Lr10*、*Lr26*、*Lr34*、*Lr37*,其中,云麦 34、木宗卓嘎在苗期和成株期均对叶锈表现良好的抗性。Zhao 等^[12]在周 8425B 中定位了一个新的抗叶锈病基因,并命名为 *LrZH84*,与位于 1B 染色体上的 SSR 标记 gwm582 和 barc8 紧密连锁,周 8425B 中除了含有 *LrZH84*,还含有 *Lr26*。Zhang 等^[13]在毕麦 16 发现了一个新的抗叶锈基因,并暂时命名为 *LrBi16*,与 7BL 染色体上的 SSR 标记 cfa2257 和 wms344 紧密连锁。经研究还发现,毕麦 16 中不仅含有 *LrBi16*,还含有 *LrZH84*。陈现朝^[14]和李星等^[15]分别对贵州 98-18 和西农 1163-4 进行了抗叶锈鉴定和分子定位,把 2 个品种中抗叶锈基因 *LrG98* 和 *LrXi* 定位在 1B 染色体上与

LrZH84 相近的位置上。

虽然前人已经在该领域做了很多工作,但由于每年都有新的小麦品种不断育成,而且由于大多育种材料的遗传背景尚不明确,对于这些新育成品种的抗病性特别是遗传基础尚不明确,因此,需要对这些品种抗叶锈基因的情况进行分析。本试验采用的河农 6251 为河北农业大学新培育的小麦品种,而且丰产性能好、品质优秀,在抗叶锈性上表现中抗,前期师丽红等^[9]曾经对该材料进行过初步研究,但其含有的抗叶锈基因尚不十分清楚,在当今叶锈病逐年加重的环境下,加强对新品种抗叶锈基因的鉴定,对于该品种的推广与应用、小麦叶锈病的高效防控具有重要意义。

本试验以抗病亲本河农 6251、感病品种 Thatcher 及其杂种 F_2 群体及 F_3 家系为材料,对前期的结果进行验证并利用分离群体分组法(BSA)和 SSR 分子标记技术对该抗病品种的抗叶锈基因进行分析,旨在明确其抗叶锈性,分析其含有的抗叶锈基因,并对其含有的新的抗叶锈基因进行染色体定位,将为小麦品种的推广和抗病基因的合理利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

38 个小麦近等(单)基因系、抗病亲本河农 6251、济南 17(亲本)、周 8425B(亲本)、感病亲本 Thatcher 及其 F_1 、 F_2 群体及 F_3 家系,均由河北农业大学小麦叶锈病研究中心提供。

所用的叶锈菌生理小种单胞菌系 PBGP、THJR、THSP、FHJT、SHJP、THSR 由河北农业大学小麦叶锈病研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 苗期抗病性鉴定及遗传分析 将抗病亲本河农 6251、感病亲本 Thatcher 及 F_1 、156 个 F_2 单株种植于塑料盆中,每盆种植 20 株苗和一株感病对照;102 个 F_3 家系,每个家系 30 株,单粒点播均匀种植在一盆中,每盆种一株感病对照。在麦苗生长至第一叶完全展开时,用扫苗法对鉴定材料接种叶锈菌小种 PBGP 单胞菌系,接种后的鉴定材料放入保湿桶内,18 ℃ 下喷雾、黑暗保湿 16 h。然后置于温室内(20 ± 2) ℃ 培养,待感病对照充分发病时按照 6 级标准(0 ~ 4 级)进行调查并记载反应型^[16]。根据 F_1 、 F_2 和 F_3 植株的抗感分离比例,确定河农 6251 中所含抗叶锈基因的遗传方式,抗病基因数目,用卡方值检验其适合度。

1.2.2 叶片总 DNA 的提取及检测 CTAB 法提取

小麦叶片基因组 DNA,用紫外分光光度计测定 DNA 浓度和相对纯度。1% 的琼脂糖凝胶检测 DNA 的完整性。

1.2.3 抗叶锈病基因的分子辅助鉴定 由于前期已对河农 6251 进行了 *Lr1*-WR003、*Lr9*-SCS5-550、*Lr9*-J13、*Lr10*-Fl. 2245/*Lr10*-6/r2、*Lr19*-SCS265、*Lr19*-SCS253736、*Lr20*-STS638、*Lr21*-STS669、*Lr24*-J9/1/2、*Lr24*-S1302-609、*Lr26*-ω-secalin、*Lr26*-Glu-B3、*Lr28*-Xgwm160、*Lr28*-SCS421570、*Lr29*-OPY10/1/2、*Lr34*-csLv34、*Lr35*-Sr39R3/F2、*Lr37*-P42-530、*Lr38*-P3/P4 和 *Lr47*-PS10R/L 的分子标记检测^[9],本试验在此基础上增加了一个 STS 标记和 15 个与抗叶锈基因连锁或共分离的 SSR 分子标记,进行进一步的抗叶锈基因分子辅助鉴定,PCR 体系和反应程序根据参考文献[17~32]进行,分子标记的引物序列及类型见表 1。

扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,UVItec 凝胶成像系统检测结果。

1.2.4 SSR 标记筛选及电泳分析 用分离群体分组分析法,即在 F₂ 分离群体中分别取 10 个抗病单株和 10 个感病单株的等量 DNA,分别混合组成抗病池(Br)和感病池(Bs)。用于亲本间和抗感池间筛选的 SSR 引物共 1 504 对,所有引物由上海生工生物工程技术有限公司和华大基因合成。

SSR 标记筛选的反应总体积 10 μL,包括 10 × PCR Buffer 1 μL,dNTP (10 mmol/L) 0.2 μL,引物 (4 μmol/L)1 μL,模板 DNA 30 ng,*Taq* 酶 1 U。反应程序为:94 ℃ 预变性 5 min;然后每个循环 94 ℃ 变性 1 min,50 ~65 ℃ (取决于不同引物)退火 1 min,72 ℃ 延伸 1 min,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。扩增结果用 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

1.2.5 连锁分析和遗传作图 用在抗感池间表现多态性的标记检测 156 个 F₂ 单株和 102 个 F₃ 家系,将表现型数据与 PCR 扩增带型结合进行连锁分析,用 MapManager QTXb20 软件计算标记与抗病基因的遗传距离并构建遗传连锁图谱。

表 1 试验用分子标记的引物序列
Tab.1 Sequences for primer combinations used in the test

<i>Lr</i> 基因 <i>Lr</i> Gene	标记名称 Marker name	标记类型 Marker type	引物序列 Primer sequence	参考文献 Reference
<i>Lr2c</i>	gwm261	SSR	CTCCCTGTACGCCTAAGGC CTCGCGCTACTAGCCATTG	张娜等 ^[17]
<i>Lr14a</i>	gwm344	SSR	CAAGGAAATAGGCGGTAAC T ATTTGAGTCTGAAGTTTGCA	Herrera-Foessel <i>et al</i> ^[18]
<i>Lr16</i>	wmc764	SSR	CCTCGAACCTGAAGCTCTGA TTCGCAAGGACTCCGTAACA	Mccartney <i>et al</i> ^[19]
<i>Lr17a</i>	barc212	SSR	GGCAACTGGAGTGATATAAATACCG CAGGAAGGGAGGAGAACAGAGG	Bremenkamp-Barrett <i>et al</i> ^[20]
<i>Lr22a</i>	wms296	SSR	AATTC AACCTACCAATCTCTG GCCTAATAAACTGAAAACGAG	Hiebert <i>et al</i> ^[21]
<i>Lr25</i>	wms251	SSR	CAACTGGTTGCTACACAAGCA GGGATGTCTGTTCCATCTTAG	Singh <i>et al</i> ^[22]
<i>Lr32</i>	barc135	SSR	ATCGCCATCTCCTCTACCA GCCAACCCATGTGCTAAGT	Thomas <i>et al</i> ^[23]
<i>Lr52</i>	wms443	SSR	GGGTCTTCATCCGGAAC TCT CCATGATTTATAAAATTCCACC	Hiebert <i>et al</i> ^[24]
<i>Lr53</i>	cf d1	SSR	ACCAAAGAACTTCCTGGTG AAGCCTGACCTAGCCCAAAT	Dadkhodaie <i>et al</i> ^[25]
<i>Lr60</i>	barc149	SSR	ATTCACTTGCCCTTTTAAACTCT GAGCCGTAGGAAGGACATCTAGTG	Hiebert <i>et al</i> ^[26]
<i>Lr63</i>	barc321	SSR	TGCACTTCCCACAACACATC TTGCCACGTAGGTGATT TATGA	Kolmer <i>et al</i> ^[27]
<i>Lr65</i>	gwm614	SSR	GATCACATGCATGCGTCATG TTTTACCGTTCCGGCCTT	Mohler <i>et al</i> ^[28]
<i>Lr67</i>	cf d71	SSR	CAATAAGTAGGCCGGGACAA TGTGCCAGTTGAGTTTGCTC	Herrera-Foessel <i>et al</i> ^[29]
<i>Lr68</i>	gwm146	SSR	CCAAAAAACTGCCTGCATG CTCTGGCATTGCTCCTTGG	Herrera-Foessel <i>et al</i> ^[30]
<i>Lr71</i>	Xgwm18	SSR	TGGCGCCATGATTGCATTATCTTC GGTTGCTGAAGAACCTTATTAGG	Singh <i>et al</i> ^[31]
<i>LrZH84</i>	Hsbf-1	STS	GTCTGCAAAC TGAAGGAAG GCAGATTT CAGTTCATCCTC	Zhou <i>et al</i> ^[32]

2 结果与分析

2.1 河农 6251 苗期抗叶锈性遗传分析

河农 6251 与 Thatcher 杂交的 F₁ 在苗期对叶锈菌菌株 PBGP 表现“;1”的低侵染型,F₂ 群体中 114

株表现抗病,42 株表现感病。经卡方检测其抗感分离比例符合 3 抗:1 感的比例(标准值 $\chi^2_{0.05,1} = 3.84$, 表 2),表明河农 6251 对叶锈菌 PBGP 的抗性在苗期是由一对显性抗病基因决定的,暂命名为 *LrH6*。

表 2 河农 6251 与 Thatcher 及其杂交组合后代对叶锈菌 PBGP 的苗期抗病性测定

Tab.2 Seedling resistance of Henong 6251,Thatcher and its generation against the pathotype PBGP of *P. triticina*

亲本及其后代 Parents and generation	抗病株 Resistant plants	感病株 Susceptible plants	总株数 Total	实际比例 Actual ratio	理论比例 Theoretical ratio	χ^2 value
河农 6251 Henong 6251	15	0	15			
Thatcher	0	15	15			
F ₁	10	0	10			
F ₂	114	42	156	114:42	3:1	0.308 < $\chi^2_{0.05,1} = 3.84$

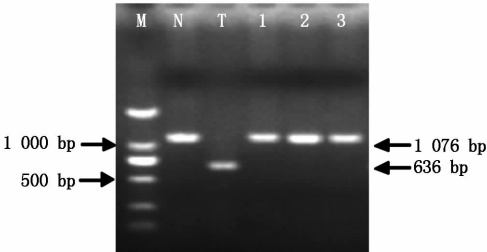
2.2 河农 6251 的分子标记辅助检测结果

2.2.1 *Lr26* 的分子标记验证 用 *Lr26* 特异的分子标记 ω -secalin 和 Glu-B3 对 TcLr26、Thatcher、河农 6251 进行检测,结果在河农 6251 中扩增出与阳性对照 TcLr26 相同的 1 076 bp 大小的目的片段,而感病亲本 Thatcher 中扩增出 636 bp 的特异性片段(图 1)。表明河农 6251 中含有抗叶锈基因 *Lr26*。

病亲本河农 6251 中扩增出与周 8425B 中一致的大小为 1 006 bp 的特异条带,感病亲本 Thatcher 没有此特异条带(图 2)。表明河农 6251 中含有抗病基因 *LrZH84*。

2.2.3 15 个小麦抗叶锈基因 SSR 分子标记检测 用 15 个已报道的小麦抗叶锈基因的 SSR 标记 *Lr2c-wms261*、*Lr14a-wms344*、*Lr16-wmc764*、*Lr17a-barc212*、*Lr22a-wms296*、*Lr25-wms251*、*Lr32-barc135*、*Lr52-wms443*、*Lr53-cfd1*、*Lr60-barc149*、*Lr63-barc321*、*Lr65-wms614*、*Lr67-cfd71*、*Lr68-wms146*、*Lr71-wms18* 对河农 6251、Thatcher 及其杂交 F₂ 构建成的抗感池进行检测,发现 *Lr2c-wms261*、*Lr14a-wms344*、*Lr16-wmc764*、*Lr17a-barc212*、*Lr22a-wms296*、*Lr25-wms251*、*Lr52-wms443*、*Lr53-cfd1*、*Lr63-barc321*、*Lr67-cfd71*、*Lr68-wms146*、*Lr71-wms18* 在亲本河农 6251 和 Thatcher 间有差异,但在抗感池间均无多态性。*Lr32-barc135*、*Lr60-barc149* 和 *Lr65-wms614* 在亲本间不存在差异。将有差异的 SSR 标记用 F₂ 群体检验,结果显示,标记 *Lr2c-wms261* 和 *Lr17a-barc212* 与河农 6251 中抗病基因交换程度很高(图 3,4),遗传距离较远,上述基因不决定对叶锈菌致病类型单胞菌系 PBGP 的抗病性,但很可能该品种含有上述基因。

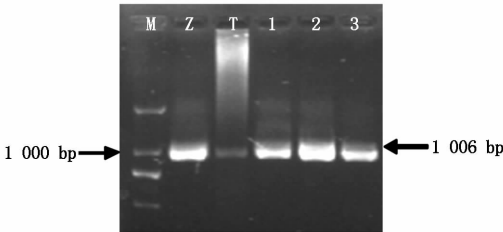
2.2.4 *Lr26* 和 *LrZH84* 的分子标记对河农 6251 F₂ 群体的连锁检测 为判定河农 6251 对 PBGP 的抗性是否由 *Lr26* 和 *LrZH84* 决定,利用 *Lr26* 的连锁标记 ω -secalin、Glu-B3 和 *LrZH84* 的 STS 标记 Hsbf-1 对由 PBGP 菌系与河农 6251 的 F₂ 群体互作后的抗感群体单株进行检测,结果发现 *Lr26* 的连锁标记 ω -secalin 和 Glu-B3 在 F₂ 抗感单株中并不与抗感紧密连锁(图 5),同样 Hsbf-1 在 F₂ 抗感单株中的结果也存在较多的交换(图 6),说明河农 6251 对叶锈菌 PBGP 的抗性不是由 *Lr26* 或 *LrZH84* 决定的。



M. DL2000 Marker;N. TcLr26;T. Thatcher;1~3. 河农 6251。
M. DL2000 Marker;N. TcLr26;T. Thatcher;1~3. Henong 6251.

图 1 *Lr26* 标记引物 ω -secalin 和 Glu-B3 在测试材料中的扩增结果

Fig.1 The amplification of the specific primer linked to *Lr26* in Henong 6251

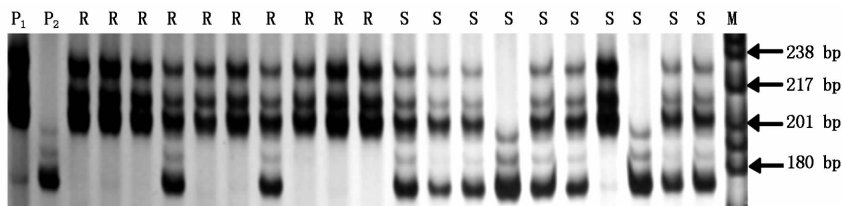


M. DL2000 Marker;Z. 周 8425B;T. Thatcher;1~3. 抗病亲本河农 6251。
M. DL2000 Marker;Z. Zhou 8425B;T. Thatcher;
1~3. Resistant parents Henong 6251.

图 2 *LrZH84* 标记引物 Hsbf-1 在测试材料中的扩增结果

Fig.2 The amplification of the specific primer of molecular marker linked to *LrZH84* in Henong 6251

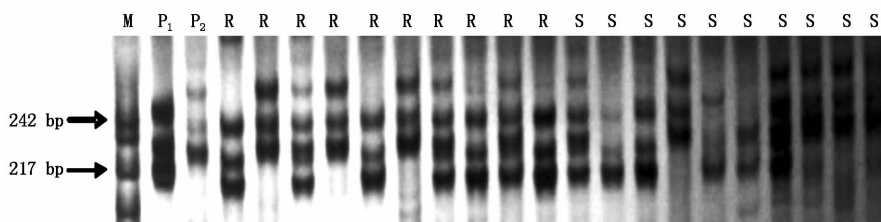
2.2.2 *LrZH84* 分子标记检验 用与 *LrZH84* 紧密连锁的 STS 标记 Hsbf-1 对周 8425B、抗病亲本河农 6251 和感病亲本 Thatcher 进行 PCR 扩增,结果在抗



M. pBR322; P₁. 河农 6251; P₂. Thatcher; R. 抗病单株; S. 感病单株。
M. pBR322; P₁. Henong 6251; P₂. Thatcher; R. Resistant F₂ plants; S. Susceptible F₂ plants.

图 3 *Lr2c* 连锁的 SSR 标记 wms261 在 F₂ 中的扩增结果 (部分)

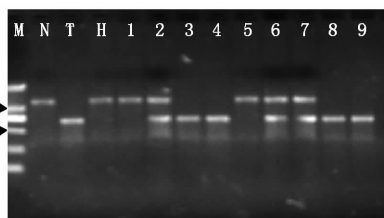
Fig. 3 The amplification of the specific primer of SSR marker linked to *Lr2c* in F₂ partial population



M. pBR322; P₁. 河农 6251; P₂. Thatcher; R. F₂ 抗病单株; S. F₂ 感病单株。
M. pBR322; P₁. Henong 6251; P₂. Thatcher; R. Resistant F₂ plants; S. Susceptible F₂ plants.

图 4 *Lr17a* 连锁的 SSR 标记 barc212 在 F₂ 中的扩增结果 (部分)

Fig. 4 The amplification of the specific primer of SSR marker linked to *Lr17a* in F₂ partial population



M. DL2000 Marker; N. TcLr26; T. Thatcher; H. 河农 6251; 1 ~ 4. 河农 6251 F₂ 抗病单株; 5 ~ 9. 河农 6251 F₂ 感病单株。

M. DL2000 Marker; N. TcLr26; T. Thatcher; H. Henong 6251; 1 ~ 4. F₂ resistant individual plants of Henong 6251; 5 ~ 9. F₂ susceptible individual plant of Henong 6251.

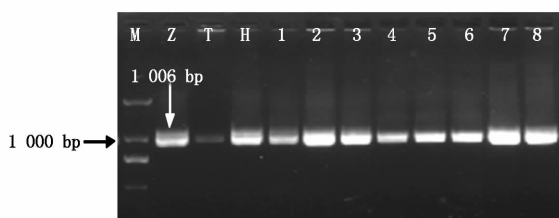
图 5 *Lr26* 标记特异引物 ω-secalin 和 Glu-B3

在河农 6251 及其 F₂ 部分群体中扩增结果

Fig. 5 Amplification of the specific primers of ω-secalin and Glu-B3 linked to *Lr26* in Henong 6251 and partial of F₂

2.3 河农 6251 中未知抗叶锈基因的分子标记

选用分布于小麦 21 条染色体上的 1 504 对 SSR 引物在抗病亲本河农 6251、感病亲本 Thatcher 及抗感池间进行多态性筛选,发现位于 1BL 染色体上的引物 wms582、wmc419 和 barc120 在双亲和抗感池间

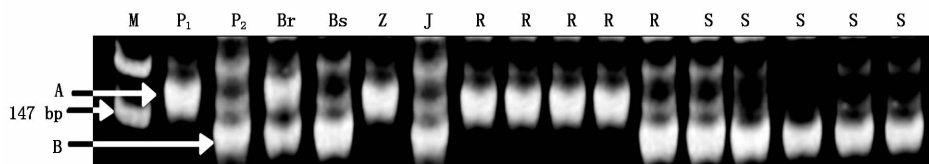


M. DL2000 Marker; Z. 周 8425B; T. Thatcher; H. 河农 6251; 1 ~ 4. F₂ 抗病单株; 5 ~ 8. F₂ 感病单株。
M. DL2000 Marker; Z. Zhou 8425B; T. Thatcher; H. Henong 6251; 1 ~ 4. F₂ resistant individual plant; 5 ~ 8. F₂ susceptible individual plant.

图 6 *LrZH84* 标记特异引物 Hsbf-1 在河农 6251 及其 F₂ 部分群体中扩增结果

Fig. 6 Amplification of the specific primer of molecular marker Hsbf-1 linked to *LrZH84* in Henong 6251 and partial of F₂

扩增出稳定的多态性片段(图 7)。连锁分析结果表明,SSR 标记 wmc419、wms582 和 barc120 距抗病基因 *LrH6* 的遗传距离分别为 21.6, 25.8, 27.9 cM (图 8)。



M. pBR322; P₁. 河农 6251; P₂. Thatcher; Br. 抗池; Bs. 感池; Z. 周 8425B (河农 6251 的亲本); J. 济南 17 (河农 6251 的亲本); R. 抗病单株; S. 感病单株。

M. pBR322 Marker; P₁. Resistant parent Henong 6251; P₂. Susceptible parent Thatcher; Br. Resistant bulk; Bs. Susceptible bulk; Z. Zhou 8425B (parent of Henong 6251); J. Jinan17 (parent of Henong 6251); R. Resistant F₂ plants; S. Susceptible F₂ plants.

图 7 wmc419 在河农 6251、Thatcher 及其后代中扩增结果

Fig. 7 PCR products amplified with SSR marker wmc419

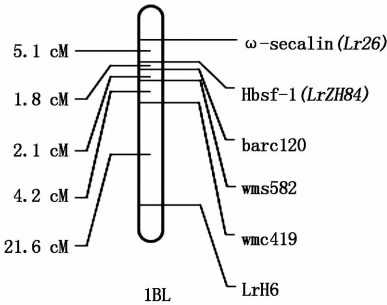


图 8 河农 6251 中抗病基因与 2 个 STS 标记 (Hbsf-1 和 ω -secalin) 和 3 个 SSR 标记 wmc419、wms582 和 barc120 的遗传连锁图

Fig. 8 Linkage map of leaf rust resistance gene *LrH6* in Henong 6251 with STS markers (Hbsf-1 and ω -secalin) and SSR markers wmc419, wms582 and barc120

表 3 F₂ 群体及 F₃ 家系对 PBGP 的苗期抗性鉴定

Tab. 3 Segregation for responses of F₂ plants and the corresponding F₃ lines to PBGP

F ₂ F ₂ plants	F ₃ 家系 F ₃ lines				卡方测验 Chi-square tests
	纯合抗病/株 Home resistant	杂合抗病/株 Segregated	纯和感病/株 Home susceptible	总计/株 Total	
抗病 Resistant	16	62		78	
感病 Susceptible			24	24	
总计 Total	16	62	24	102	$\chi^2 = 0.118 < \chi^2_{0.05,1} = 3.84$

表 4 三个 SSR 标记 wmc419、wms582 和 barc120 检测 F₃ 家系的带型

Tab. 4 The corresponding alleles at three SSR loci wmc419, wms582 and barc120 to F₃ families

标记位点 Marker loci	F ₃ 家系 F ₃ families	标记带型 Type of markers		
		A/D	H	B
wmc419	RR (16)	9	6	1
	Rr (62)	4	44	14
	rr (24)	0	4	20
wms582	RR (16)	14	0	2
	Rr (62)	50	0	12
	rr (24)	10	0	14
barc120	RR (16)	12	0	4
	Rr (62)	46	0	16
	rr (24)	8	0	16

注:RR. 纯合抗病基因;Rr. 杂合基因型;rr. 纯合感病基因型;A/D. 河农 6251 中出现的带型;B. Thatcher 中出现的带型;H. 杂合带型。

Note: RR. Homozygous resistant; Rr. Segregating; rr. Homozygous susceptible; A/D. Homozygous for the Henong 6251; B. Homozygous for the Thatcher allele; H. Heterozygous.

3 讨论

河农 6251 的亲本为济南 17 (临汾 5064/鲁麦 13 号)/豫麦 51 (周 8425B/豫麦 17)。Zhao 等^[12] 2008 年从周 8425B 中发现了新的抗叶锈基因

2.4 F₃ 家系验证

用同一叶锈菌小种 PBGP 接种 102 个 F₃ 家系幼苗,其中 16 个家系表现纯合抗病,24 个家系表现出纯合感病,62 个家系表现分离。经检验符合 1:2:1 的分离比例(表 3)。

用 wmc419、wms582 和 barc120 检测 F₃ 家系,扩增带型与 F₂ 结果基本一致(表 4)。

2.5 河农 6251 及其亲本的抗叶锈性分析

河农 6251 的系谱为济南 17 (临汾 5064/鲁麦 13 号)/豫麦 51 (周 8425B/豫麦 17)。用 5 个叶锈菌生理小种 THJR、THSR、FHJT、SHJP 和 THSR 接种河农 6251、济南 17、周 8425B 和 Thatcher,结果发现河农 6251 与其亲本周 8425B 的抗叶锈性基本一致,对目前毒力较强的小种不表现抗病 (ITs 为 3 或 4),推测河农 6251 的抗病性可能来源于周 8425B。

LrZH84, 用与 *LrH6* 连锁的标记检测济南 17 和周 8425B,结果在周 8425B 中检测到了该标记,推测河农 6251 抗病性可能来源于周 8425B。本试验中仅有 1B 上的 3 个标记在河农 6251 与 Thatcher 杂交 F₂ 群体中检测到多态性。SSR 连锁分析结果显示,位于 1B 染色体上的标记 wmc419、wms582、barc120 与河农 6251 中抗病基因 *LrH6* 连锁,初步定位于 1BL 染色体上。

目前,已知的位于 1B 染色体上的基因有 *Lr26*、*Lr33*、*Lr44*、*Lr46*、*Lr51*、*Lr55*、*LrZH84*、*LrXi*、*LrG98* 和 *Lr71*。*Lr26* 对测试小种 PBGP 表现感病,但河农 6251 对 PBGP 表现抗病,试验利用 *Lr26* 的连锁标记 ω -secalin 和 Glu-B3 对由 PBGP 菌系和河农 6251 的 F₂ 群体互作后的抗感群体单株进行检测,结果 *Lr26* 的标记在抗感群体中均有存在,且交换率很高,因此确定 *LrH6* 与 *Lr26* 不同。前期的研究发现,*LrZH84* 来源于山前麦,位于 1B 染色体上^[17],与 SSR 标记 wms582 紧密连锁,遗传距离为 3.9 cM。本研究发现,*LrH6* 与 SSR 标记 wms582 的遗传距离为 25.8 cM,距离较远,说明 *LrH6* 不同于 *LrZH84*。而且用 *LrZH84* 的 STS 标记 Hbsf-1 检测由 PBGP 菌系和河农 6251 的 F₂ 群体互作后的抗感群体单株,结果交

换率也很高,再次说明 *LrH6* 与 *LrZH84* 不同。*Lr33* 与 1BL 上 *Lr26* 的遗传距离为 2.6 cM^[33],可能与 *LrZH84* 位点临近,但本试验中 *LrH6* 与 *Lr26* 和 *LrZH84* 遗传距离较远,所以认为 *LrH6* 与 *Lr33* 不同。*Lr44* 距 *Lr33* 的遗传距离为 5.4 cM^[34],*Lr33* 与 *Lr26* 遗传距离为 2.6 cM,而 *LrH6* 与 *Lr26* 遗传距离较远,说明 *LrH6* 与 *Lr44* 不是同一基因。*Lr46* 是成株抗病基因,具有慢锈性,位于 1BL 染色体臂末端。*LrH6* 是苗期抗病基因,从苗期反应型结果也可发现,*LrH6* 不同于 *Lr46*。*LrXi*^[14] 和 *LrG98*^[15] 都与 *wms582* 紧密连锁,遗传距离分别为 2.3,3.8 cM,而 *wms582* 与 *LrH6* 的遗传距离为 25.8 cM,因此,*LrH6* 不同于 *LrXi* 和 *LrG98*。虽然没有含有 *Lr51*、*Lr55* 和 *Lr71* 基因的小麦材料,但由于 *Lr51*、*Lr55* 和 *Lr71* 分别来源于斯卑尔脱山羊草和粗碱披碱草的外源染色体片段和 Altgold Rotkorn,而 *LrH6* 来源于普通小麦。用与这些基因连锁的分子标记进行检测,发现其与该抗叶锈基因并不连锁。由此可知,*LrH6* 不同于 *Lr51*、*Lr55* 和 *Lr71*。

由于 *LrH6* 与 1B 染色体上的已知基因 *Lr26*、*Lr33*、*Lr44*、*Lr46*、*Lr51*、*Lr55*、*LrZH84* 和 *Lr71* 都不同,所以推测可能是一个新的抗叶锈病基因。试验中并没有获得 *Lr51*、*Lr55*、*Lr66*、*Lr68*、*Lr71* 等近等基因系材料,因此未能对它们与供试材料进行苗期鉴定。虽然得到 3 个与目的基因连锁的标记,但遗传距离较远,下一步计划利用其他分子标记技术筛选更近的标记;用 EST 标记进行进一步定位。

新培育的小麦品种河农 6251 含有小麦抗叶锈基因 *Lr26*、*LrZH84*,还可能含有 *Lr2c*、*Lr17a* 和位于 1BL 染色体的新的抗叶锈基因 *LrH6*。

参考文献:

- [1] Singh D, Mohler V, Park R F. Discovery, characterisation and mapping of wheat leaf rust resistance gene *Lr71* [J]. Euphytica, 2013, 190(1): 131–136.
- [2] 陈万权, 秦庆明. 国际上已知小麦抗叶锈病基因在中国的可利用性研究 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(7): 794–801.
- [3] 杨文香, 孟庆芳, 冯圣东, 等. 1999 年我国小麦叶锈菌毒性监测 [J]. 植物保护学报, 2004, 31(1): 45–50.
- [4] 陈万权, 秦庆明, 王奎荣, 等. 江苏省重要小麦品种抗叶锈病和秆锈病基因初步分析 [J]. 植物保护学报, 1997, 24(3): 225–234.
- [5] 陈万权, 王剑雄. 76 个小麦种质资源抗叶锈及秆锈基因初步分析 [J]. 作物学报, 1997, 23(6): 655–663.
- [6] 陈万权, 秦庆明, 陈扬林, 等. 我国 40 个小麦品种抗叶锈性研究 [J]. 植物病理学报, 2001, 31(1): 16–25.
- [7] 刘颖超, 郭爱国, 朱之培, 等. 中国三麦区小麦抗叶锈基因部署研究 [J]. 植物病理学报, 1996, 26(1): 21–25.
- [8] Li Z F, Xia X C, He Z H, et al. Seedling and slow rusting resistance to leaf rust in Chinese wheat cultivars [J]. Plant Disease, 2010, 94(1): 45–53.
- [9] 师丽红, 张娜, 胡亚亚, 等. 10 个小麦新品种(系)抗小麦叶锈性评价 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(14): 2900–2908.
- [10] 丁艳红, 刘欢, 师丽红, 等. 28 个小麦微核心种质抗叶锈性分析 [J]. 作物学报, 2010, 36(7): 1126–1134.
- [11] 赵丽娜, 任晓娣, 胡亚亚, 等. 23 份中国小麦微核心种质抗叶锈性评价 [J]. 中国农业科学, 2013, 46(3): 441–450.
- [12] Zhao X L, Zheng T C, Xia X C, et al. Molecular mapping of leaf rust resistance gene *LrZH84* in Chinese wheat line Zhou 8425B [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 117(7): 1069–1075.
- [13] Zhang H, Xia X C, He Z H, et al. Molecular mapping of leaf rust resistance gene *LrBi16* in Chinese wheat cultivar Bimai 16 [J]. Molecular Breeding, 2011, 28(4): 527–534.
- [14] 陈现朝, 李星, 李在峰, 等. 中国小麦贵州 98-18 中抗叶锈基因的分子定位 [J]. 植物病理学报, 2010, 40(5): 489–494.
- [15] 李星, 李在峰, 李亚宁, 等. 小麦品系西农 1163-4 抗叶锈病基因的遗传分析和分子作图 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(12): 2397–2402.
- [16] Roelfs A P, Singh R P, Saari E E. Rust diseases of wheat: concepts and methods of disease management [J]. Mexico, DF: CIMMYT, 1992: 7–14.
- [17] 张娜, 闫红飞, 张英春, 等. 小麦抗叶锈病基因 *Lr2c* 的 SSR 标记 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(1): 148–152.
- [18] Herrera-Foessel S A, Djurle A, Yuen J, et al. Identification and molecular characterization of leaf rust resistance gene *Lr14a* in durum wheat [J]. Plant Disease, 2008, 92(3): 469–473.
- [19] McCartney C A, Somers D J, McCallum B D, et al. Microsatellite tagging of the leaf rust resistance gene *Lr16* on wheat chromosome 2BSc [J]. Molecular Breeding, 2005, 15(4): 329–337.
- [20] Bremenkamp-Barrett B, Faris J D, Fellers J P. Molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr17a* in wheat [J]. Crop Science, 2008, 48(3): 1124–1128.
- [21] Hiebert C W, Thomas J B, Somers D J, et al. Microsatellite mapping of adult-plant leaf rust resistance gene *Lr22a* in wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115(6): 877–884.

- [22] Singh A, Pallavi J K, Gupta P, *et al.* Identification of microsatellite markers linked to leaf rust resistance gene *Lr25* in wheat[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2012, 53 (1): 19 – 25.
- [23] Thomas J, Nilmalgoda S, Hiebert C, *et al.* Genetic markers and leaf rust resistance of the wheat gene *Lr32* [J]. *Crop Science*, 2010, 50(6): 2310 – 2317.
- [24] Hiebert C, Thomas J, McCallum B. Locating the broad-spectrum wheat leaf rust resistance gene *Lr52* (LrW) to chromosome 5B by a new cytogenetic method[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 110 (8): 1453 – 1457.
- [25] Dadkhodaie N A, Karaoglou H, Wellings C R, *et al.* Mapping genes *Lr53* and *Yr35* on the short arm of chromosome 6B of common wheat with microsatellite markers and studies of their association with *Lr36* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122(3): 479 – 487.
- [26] Hiebert C W, Thomas J B, Callum B C. Genetic mapping of the wheat leaf rust resistance gene *Lr60* (LrW2) [J]. *Crop Science*, 2008, 48(3): 1020 – 1026.
- [27] Kolmer J A, Anderson J A, Flor J M. Chromosome location, linkage with simple sequence repeat markers, and leaf rust resistance conditioned by gene *Lr63* in wheat [J]. *Crop Science*, 2010, 50(6): 2392 – 2395.
- [28] Mohler V, Singh D, Singruen C, *et al.* Characterization and mapping of *Lr65* in spelt wheat Altgold Rotkorn [J]. *Plant Breeding*, 2012, 131(2): 252 – 257.
- [29] Herrera-Foessel S A, Lagudah E S, Huerta-Espino J, *et al.* New slow-rusting leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr67* and *Yr46* in wheat are pleiotropic or closely linked [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 122 (1): 239 – 249.
- [30] Herrera-Foessel S A, Singh R P, Huerta-Espino J, *et al.* *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, 124(8): 1475 – 1486.
- [31] Singh D, Mohler V, Park R F. Discovery, characterisation and mapping of wheat leaf rust resistance gene *Lr71* [J]. *Euphytica*, 2013, 190(1): 131 – 136.
- [32] Zhou Y, Xia X, He Z H, *et al.* Fine Mapping of leaf rust resistance gene *LrZH84* using expressed sequence tag and sequence-tagged site markers, and allelism with other genes on wheat chromosome 1B [J]. *Phytopathology*, 2013, 103(2): 169 – 174.
- [33] Dyck P L, Kerber E R, Lukow O M. Chromosome location and linkage of a new gene (*LR33*) for reaction to *puccinia-recondita* in common wheat [J]. *Genome*, 1987, 29(3): 463 – 466.
- [34] Dyck P L, Sykes E E. Genetics of leaf-rust resistance in three spelt wheats [J]. *Can J Plant Science*, 1994, 74 (2): 231 – 233.