

# CIMMYT 小麦 Pavon 76 和 PBW 343 叶锈成株抗性 QTL 分析

郑嫚嫚, 王翠芬, 李 欢, 李在峰\*, 刘大群\*

(河北农业大学 植物保护学院, 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)

**摘要:** CIMMYT(墨西哥国际玉米小麦改良中心)小麦多数携带成株慢锈基因, Pavon 76 和 PBW 343 在田间对我国叶锈菌种表现为抗病, 其可能携带有多个成株慢锈 QTL 位点。为了检测和定位 Pavon 76 和 PBW 343 中的成株慢锈 QTL 位点, 以 Pavon 76 和 PBW 343 杂交、多次自交获得的包含有 178 个家系的重组自交系(RIL)群体为材料, 将其种植在河北农业大学试验田和 CIMMYT 的 Obregon 小麦试验田, 分别接种不同的小麦叶锈菌混合小种进行田间抗叶锈鉴定, 获得群体的表现型数据, 同时利用 480 个在亲本间有多态性的 DArT(多样性序列芯片技术)标记检测 178 个家系, 获得群体的基因型数据。结合表现型数据和基因型数据, 利用 Map Manager QTXb20 和 QTL Ici-Mapping 软件, 进行复合区间作图法分析, 在 2 个环境共检测到 4 个 QTL 位点。其中位于 1BL 染色体上来源于亲本 Pavon 76 的 QTL 位点解释 5.5% 的表型变异, 另外 3 个 QTL 位点都来源于亲本 PBW 343, 其中的 2 个 QTL 位点位于 1AL 和 2DL 染色体上且只在墨西哥试验点检测到, 分别解释 7.0% 和 4.3% 的表型变异, 另外 1 个 QTL 位点只在保定试验点检测到, 位于 3AL 染色体上, 解释 5.7% 的表型变异。位于 1A 和 3A 染色体上的 QTL 可能为新的成株抗叶锈 QTL, 其丰富了现有的小麦成株慢锈基因库, 与其紧密连锁的分子标记可以用于标记辅助育种、培育持久抗病品种。

**关键词:** 小麦叶锈病; 成株慢锈基因; QTL 作图

**中图分类号:** S435.121.4<sup>+</sup>3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2014)01-0074-05

## QTL Mapping of Adult-plant Resistance Genes to Leaf Rust in CIMMYT Wheat Pavon 76 and PBW 343

ZHENG Man-man, WANG Cui-fen, LI Huan, LI Zai-feng\*, LIU Da-qun\*

(Biological Control Center of Plant Disease and Plant Pests of Hebei Province, College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** Most of CIMMYT wheat lines carry adult-plant slow rusting genes. Pavon 76 and PBW 343 show high resistance to Chinese *Puccinia triticina* pathotypes in the field and may carry several slow rusting genes. A total of 178 recombinant inbred lines(RILs) derived from the cross Pavon 76 and PBW 343 were planted in Agricultural University of Hebei and Obregon, CIMMYT to score disease severity for leaf rust with mixed *Puccinia triticina* pathotypes of China and Mexico, respectively. A total of 480 DArT markers with polymorphism between parents were used to test 178 RILs of the population for making genetic map. Phenotype data and genotype data were used to map slow rusting QTLs in the population by softwares Map Manager QTXb20 and QTL IciMapping with composite interval mapping strategy. The results showed that 4 adult-plant resistance QTLs were identified in two environments. One QTL located on 1BL deriving from

收稿日期: 2013-09-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971772)

作者简介: 郑嫚嫚(1988-), 女, 山东泰安人, 在读硕士研究生, 研究方向: 分子植物病理学。E-mail: 504207924@qq.com

\* 通讯作者: 李在峰(1975-), 男, 河南卫辉人, 教授, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: lzf7551@yahoo.com.cn

刘大群(1958-), 男, 河北灵寿人, 教授, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: ldq@hebau.edu.cn

Pavon 76 explained 5.5% of the phenotypic variance. Two QTLs on 1AL and 2DL deriving from PBW 343 were detected in Mexico and explained 7.0% and 4.3% of the phenotypic variance, respectively. The last QTL on 3AL deriving from PBW 343 was detected in Baoding and explained 5.7% of phenotypic variance. The QTLs on 1A and 3A might be new adult-plant resistance QTLs to wheat leaf rust, which enriched the wheat slow rusting gene pool, and their closely linked markers could be used for marker-assisted breeding of durable resistant cultivars.

**Key words:** wheat leaf rust; adult-plant slow rusting genes; QTL mapping

由小麦叶锈菌(*Puccinia triticina*)引起的小麦叶锈病是一种重要的小麦病害,在全球小麦种植区包括北美、欧洲、亚洲、澳洲、非洲等许多国家均有发生,在流行年份会造成巨大的经济损失<sup>[1]</sup>。我国在1969、1973、1975、1979年共发生了4次小麦叶锈病大流行<sup>[2]</sup>,对小麦生产造成了很大危害。小麦叶锈病发生的严重程度与种植的小麦品种、叶锈菌毒性强度以及环境条件密切相关(病害三角关系)。因此,培育并合理利用抗叶锈病的小麦品种,在时间和空间上科学地布局含不同抗性基因的小麦品种,避免单一品种在同一区域连续多年种植,是防止叶锈病大暴发的经济环保有效的措施。检测和定位小麦中的抗叶锈新基因,可以丰富小麦抗叶锈遗传资源,为培育抗性品种提供理论依据和分子检测手段,同时为小麦品种科学合理布局提供理论依据。

小麦抗叶锈基因分为2种:一种是主效单基因,通常在苗期或全生育期表现抗性,符合基因对基因假说<sup>[3]</sup>,即具有小种专化性,因此常因叶锈菌变异而失去抗性;另一种是微效多基因,呈数量性状遗传,又称数量性状位点(QTL),一般在成株期表现抗性,又叫成株抗性基因或慢锈性基因,对叶锈菌的抗性没有明显的生理小种分化现象,不会因为叶锈菌小种的变异而失去抗性,表现为持久抗性<sup>[4]</sup>。研究小麦持久抗叶锈性对防治小麦叶锈病更具有应用价值。然而,近年来对小麦抗叶锈基因方面的研究主要是针对主效单基因,在已经正式命名的71个<sup>[5-6]</sup>小麦抗叶锈基因中,大部分都是主效单基因,而微效基因即数量性状位点的数量相对较少,因此很有必要加强小麦抗叶锈数量性状位点的检测与定位等相关方面的研究。

目前,有4个表现慢锈的微效基因已正式命名,它们分别是 *Lr34*、*Lr46*、*Lr67* 和 *Lr68*<sup>[7-10]</sup>。*Lr34* 是最早发现的小麦慢锈性基因,位于7DS染色体上,至今仍有良好的田间抗锈性,表现抗性时间长达50 a之久<sup>[7]</sup>,并且在我国许多小麦品种中也检测到*Lr34*的存在<sup>[11]</sup>。1998年, Singh等<sup>[8]</sup>在小麦品种Pavon 76中定位了第2个成株慢锈基因*Lr46*,其位于1BL染色体上。小麦成株抗叶锈基因一般会和其他的抗性基因紧密连锁,呈现出一因多效的作用,比如*Lr34*和*Yr18*、*Pm38*基因紧密连锁,并伴随叶尖

坏死表现型,同时该基因还对小麦秆锈病和大麦黄矮病毒病表现抗性<sup>[7,12-16]</sup>。同样,*Lr46*对小麦条锈病和白粉病均表现抗性,即*Yr29*、*Pm39*和*Lr46*是紧密连锁的<sup>[7-8,17-18]</sup>。Herrera-Foessel等<sup>[9-10]</sup>分别于2010年在小麦品系RL6077中和2012年在小麦品种Parula中发现了小麦成株慢锈基因*Lr67/Yr46*和*Lr68*,分别定位在4DL和7BL染色体上,这是目前正式命名的第3个和第4个慢锈基因。

CIMMYT(墨西哥国际玉米小麦改良中心)小麦Pavon 76和PBW 343在田间对叶锈病表现很好的抗性,前人研究表明,Pavon 76携带有*Lr46*和另外几个未知慢锈基因<sup>[17]</sup>,本研究利用Pavon 76和PBW 343杂交获得的重组自交系(RIL)群体在CIMMYT和中国分别进行田间鉴定,利用分子标记构建遗传图谱,进而对Pavon 76和PBW 343的慢锈基因进行QTL分析,定位其中的慢锈基因,同时比较不同环境条件下微效基因抗性表达的差异,为持久抗病机制研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

利用CIMMYT小麦品种PBW 343和Pavon 76杂交并连续自交获得的178个重组自交系进行田间叶锈菌接种和抗性鉴定。所用菌种分别为CIMMYT和中国本地毒性小种的混合菌种,分别由CIMMYT和河北农业大学小麦锈病研究室提供。

### 1.2 田间试验

将小麦亲本PBW 343和Pavon 76及178个重组自交系于2009年度种植于墨西哥CIMMYT的Obregon小麦试验田,2012年度种植于河北保定河北农业大学试验田,采用完全随机区组设计<sup>[19]</sup>,重复2次,单行区,行长1.5 m,每行点播100粒,每9行种植1行当地高感品种作为对照,在河北保定种植感病对照品种郑州5389,在CIMMYT种植Thatcher作为感病对照。与试验小麦垂直种植感病对照品种作为诱发行用于田间人工接种。按当地正常小麦播种季进行播种,非试验环节正常管理。

### 1.3 叶锈菌接种和病害调查

分别在两地的小麦拔节后,对田间小麦接种当

地毒性菌种的混合小种。接种时将混合的叶锈菌孢子配制成 0.05% 的吐温-20 孢子悬浮液,于傍晚对试验田里的诱发行进行均匀喷雾接种,保证小麦叶片上有一层均匀的水膜覆盖,同时对接种过的诱发行小麦盖塑料薄膜保持湿度,以保证叶锈菌的顺利侵染,次日早晨揭开薄膜,另外接种前后多浇水,创造叶锈菌侵染的湿度条件<sup>[20]</sup>。大约在接种后 1 个月,当感病对照的病害严重度达到 50% 以上时,对各家系在田间的病害严重度进行调查记录,严重度按照叶锈菌病斑面积占叶片总面积的百分率进行鉴定<sup>[11]</sup>。一般调查 3 次,每次间隔 7 d,到严重度不再变化为止。最后一次调查的严重度最大的作为最终严重度(FDS),用于统计分析和 QTL 作图<sup>[21]</sup>。

#### 1.4 遗传图谱的构建

取亲本 PBW 343 和 Pavon 76 及其 178 个重组自交系的叶片,利用 CTAB 法提取基因组 DNA<sup>[22]</sup>。利用 480 对 DArT(diversity arrays technology,多样性序列芯片技术)引物对试验材料进行分析,获得亲本及 178 个重组自交系的基因型数据,利用 Map Manager QTXb20 软件进行连锁作图,按 Kosambi 函数将标记间的重组交换率换算为遗传图距单位(cM)<sup>[19]</sup>。

#### 1.5 QTL 分析

用 SAS 8.0 软件对重组自交系的 FDS 进行基本统计分析,用 QTL IciMapping 软件以复合区间作图法<sup>[23]</sup>进行小麦成株抗叶锈 QTL 分析,LOD 值设为 2.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 各家系成株抗性鉴定结果

鉴定结果表明,两地田间小麦发病严重度均较低,PBW 343 和 Pavon 76 在 Obregon 的严重度分别为 10% 和 5%,两亲本在保定的严重度均为 1%,后代中严重度为 0~10% 的家系在保定试验点有 155 个,在 Obregon 试验点有 133 个(图 1),说明大多数家系有较好的成株抗性。

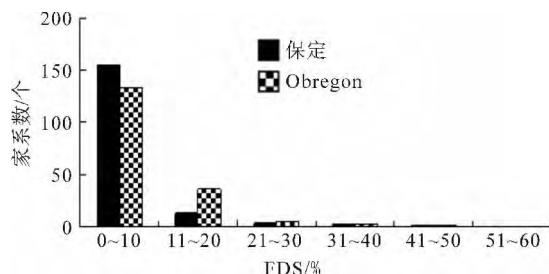


图 1 供试小麦家系两试验点的 FDS 分布

### 2.2 群体叶锈成株抗性 QTL 分析

根据墨西哥和河北保定 2 个试验点的 FDS 数据,用 QTL IciMapping 采用复合区间作图法进行 QTL 分析,共发现 4 个控制小麦锈病成株抗性的 QTL 位点,分别位于 1AL、1BL、2DL 和 3AL 染色体上(图 2,表 1)。以 FDS 为鉴定指标,河北保定试验点检测到 1 个 QTL 位点,在 3AL 染色体上,来自

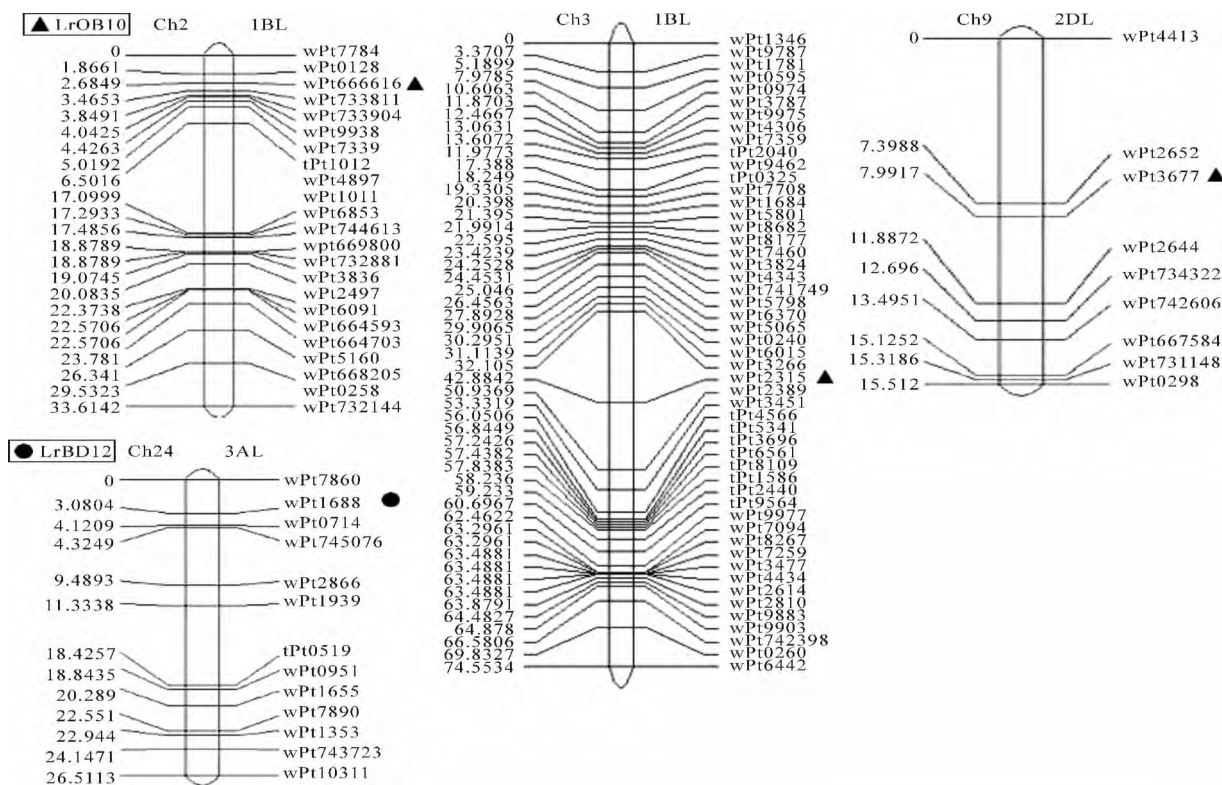


图 2 小麦成株抗叶锈 QTL 分布

亲本 PBW 343, 标记区间范围是 wPt7860—wPt1688, 解释 5.7% 的表型变异; 在墨西哥试验点检测到 3 个 QTL 位点, 分别位于 1AL、2DL 和 1BL 染色体上, 1AL 上的标记区间是 wPt666616—wPt733811, 2DL 上的标记区间是 wPt3677—wPt2644, 1BL 上的标记

区间是 wPt2389—wPt2315, 分别解释 7.0%、4.3%、5.5% 的表型变异, 其中只有 1BL 上的位点加性效应是正值, 为 2.108 9, 来自亲本 Pavon 76, 该基因为已知的慢锈基因 *Lr46/Yr29*, 另外 1AL 和 2DL 染色体上的 2 个位点来源于亲本 PBW 343。

表 1 区间作图法检测 FDS 的 QTL

试验点	染色体	亲本	标记区间	位置/cM	LOD 值	加性效应	贡献率/%
墨西哥	1AL	PBW 343	wPt666616—wPt733811	3.0	3.431 6	-2.388 6	7.0
	1BL	Pavon 76	wPt2389—wPt2315	19.0	2.370 0	2.108 9	5.5
	2DL	PBW 343	wPt3677—wPt2644	8.0	2.314 9	-1.908 0	4.3
河北保定	3AL	PBW 343	wPt7860—wPt1688	3.0	2.236 8	-2.343 5	5.7

### 3 结论与讨论

本试验结合 DArT 分子标记和两地田间调查数据, 在 CIMMYT 小麦品种 Pavon 76 中检测到 1 个 QTL 位点, 位于 1BL 染色体的末端, 该位置与先前报道的 *Lr46* 的位置接近, 同时在之前的研究中也证明 Pavon 76 中检测到 *Lr46* 位点<sup>[8]</sup>, 所以检测到的 1BL 位点即为 *Lr46*。此外, *Lr46* 位点只在墨西哥 Obregon 试验点检测到, 在河北保定试验点效应微弱, 表明小麦成株慢锈性基因 *Lr46* 在不同环境条件下的表现有一定的差异, 这与以前的报道相一致<sup>[17]</sup>。

本试验在另外一个亲本 PBW 343 中发现了 3 个 QTL 位点, 有 2 个分别位于 1AL 染色体的远端 (在 1AL 位点附近的 wPt0128 标记和 gwm99 靠近, 而 gwm99 在 1AL 染色体的最末端) 和 2DL 染色体 (在 2DL 位点附近的 wPt4413 靠近 2DL 远端上的 gwm539) 上, 仅在墨西哥试验点检测到, 另一个 QTL 位于 3AL 染色体上, 只在河北保定检测到, 这些位点均表现为在一个环境下效应明显, 在另一个环境下效应微弱, 表明它们对环境敏感。目前在 1A 染色体上尚未发现抗叶锈性的 QTL 位点, 表明本试验中发现的 1AL 染色体上的 QTL 位点是新的, 该位点的稳定性还需要进一步验证, 从而可用于持久抗病品种的培育。Chu 等<sup>[24]</sup> 于 2009 年在 3A 染色体上发现了一个成株抗性 QTL 位点, 该位点与 WMS666 相距较近, 而 WMS666 位于 3A 染色体着丝粒附近。本试验发现的 3A 染色体上的 QTL 位点位于 3AL 染色体的远端, 所以可能为新的抗叶锈 QTL, 同样其稳定性也需要进一步验证。本试验检测到的在 2DL 染色体上的 QTL 位点位于 2DL 染色体远端 gwm539 的附近, 而 Schnurbusch 等<sup>[25]</sup> 2004 年在 Arina 中发现了一个抗叶锈 QTL, 也在

gwm539 位置处, 并且效应值在 10 左右, 所以本试验在 PBW 343 中检测到的 QTL 和 Schnurbusch 等在 Arina 中发现的 QTL 为同一个成株抗叶锈 QTL。

本研究中定位的 QTL 位点较少, 这与 2 个亲本在田间表现高水平的抗性不一致, 分析原因可能主要有 2 个方面, 一是 2 个亲本对国内小种表现高抗, 可能是由于携带有主效抗病基因, 掩盖了微效基因的表达, 同时后代群体多为高抗家系, 对微效基因不能进行精确定位; 二是 2 个亲本携带有部分共同的 QTL 位点, 导致在后代群体中不能出现抗感分离, 故无法对这些 QTL 位点进行定位。

本研究在墨西哥 Obregon 和河北保定试验田检测到的 QTL 位点相差很大, 在墨西哥 Obregon 检测到 3 个 QTL 位点, 而在河北保定只检测到 1 个 QTL 位点, 证明了 QTL 位点对环境条件的依赖性, 同时也表明墨西哥 Obregon 和河北保定两地的叶锈菌种有着明显的差异。

#### 参考文献:

- [1] Komer J A. Genetics of resistance to wheat leaf rust [J]. Annual Review of Phytopathology, 1996, 34: 435-455.
- [2] Dong J G. Agricultural Plant Pathology [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2001.
- [3] Flor H H. Current status of the gene-for-gene concept [J]. Annu Rev Phytopathol, 1971, 9: 275-296.
- [4] Ribeiro Do Vale F X, Parlevliet J E, Zambolim L. Concepts in plant disease resistance [J]. Fitopatologia Brasileira, 2001, 26: 577-589.
- [5] McIntosh R A, Dubcovsky J, Rogers W J, et al. Catalogue of gene symbols for wheat: 2011 Supplement [EB/OL]. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2011.pdf>.

- [6] McIntosh R A, Dubcovsky J, Rogers W J, *et al.* Catalogue of gene symbols for wheat: 2012 Supplement [EB/OL]. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2012.pdf>.
- [7] Krattinger S G, Lagudah E S, Spielmeyer W, *et al.* A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat[J]. *Science*, 2009, 323:1360-1363.
- [8] Singh R P, Mujeeb-Kazi A, Huerta-Espino J. *Lr46*: A gene conferring slow-rusting resistance to leaf rust in wheat[J]. *Phytopathology*, 1998, 88:890-894.
- [9] 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]. *Theor Appl Genet*, 2011, 122: 239-249.
- [10] Herrera-Foessel S A, Singh R P, Huerta-Espino J. *Lr68*: A new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat[J]. *Theor Appl Genet*, 2012, 124:1475-1486.
- [11] 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.
- [12] Dyck P L. Genetics of leaf rust resistance in three introductions of common wheat[J]. *Can J Genet Cytol*, 1977, 19:711-716.
- [13] Dyck P L. The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat[J]. *Genome*, 1987, 29:467-469.
- [14] Singh R P. Genetic association of leaf rust resistance gene *Lr34* with adult plant resistance to stripe rust in bread wheat[J]. *Phytopathology*, 1992, 82:835-838.
- [15] Singh R P. Genetic association of gene *Bdv1* for tolerance to barley yellow dwarf virus with genes *Lr34* and *Yr18* for adult plant resistance to rusts in bread wheat[J]. *Plant Disease*, 1993, 77:1103-1106.
- [16] Spielmeyer W, McIntosh R A, Kolmer J, *et al.* Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat[J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111:731-735.
- [17] Lillemo M, Asalf B, Singh R P, *et al.* The adult plant rust resistance loci *Lr34/Yr18* and *Lr46/Yr29* are important determinants of partial resistance to powdery mildew in bread wheat line Saar[J]. *Theor Appl Genet*, 2008, 116:1155-1166.
- [18] Singh R P, Huerta-Espino J, William H M. Genetics and breeding for durable resistance to leaf and stripe rusts in wheat[J]. *Turk J Agric For*, 2005, 29: 121-127.
- [19] 张利军, 李在峰, Morten Lillemo, 等. CIMMYT 小麦品种 Saar 的叶锈成株抗性 QTL 分析[J]. *中国农业科学*, 2009, 42(2):388-397.
- [20] 葛君, 赵敬领, 张福娟, 等. 小麦锈病的发生与防治[J]. *现代农业科技*, 2011(13):169.
- [21] 邢丽芳, 李在峰, 刘大群. CIMMYT 小麦 PBW343 和 Muu 中条锈和叶锈成株抗性 QTL 分析[J]. *河北农业大学学报*, 2012, 35(5):45-50.
- [22] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002:742-744.
- [23] 王建康. 数量性状基因的完备区间作图方法[J]. *作物学报*, 2009, 35(2):239-245.
- [24] Chu C G, Friesen T L, Xu S S, *et al.* Identification of novel QTLs for seedling and adult plant leaf rust resistance in a wheat doubled haploid population[J]. *Theor Appl Genet*, 2009, 119:263-269.
- [25] Schnurbusch T, Paillard S, Schori A, *et al.* Dissection of quantitative and durable leaf rust resistance in Swiss winter wheat reveals a major resistance QTL in the *Lr34* chromosomal region[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108:477-484.