

# 小麦品种潍麦 8 号成株抗叶锈 QTL 定位

王佳真, 师令智, 朱琳, 任志宽, 康占海, 李星, 刘大群

(河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心/河北农业大学, 保定 071001)

**摘要:** 小麦品种潍麦 8 号是一个良好的抗叶锈病资源, 为了解其抗叶锈基因在染色体上的位置, 对潍麦 8 号 × 郑州 5389 杂交组合的 179 个  $F_{2,3}$  家系进行了抗叶锈病 QTL 分析。在染色体 2AS 上检测到一个主效的 QTL, 暂命名为 *Q<sub>Lr</sub>. hbau-2AS*。*Q<sub>Lr</sub>. hbau-2AS* 由抗病亲本潍麦 8 号提供, 位于 SSR 标记 *Xcfd36* 和 *Xbarc1138* 之间, 区间长度为 2.58 cM, 2010–2011 年度、2011–2012 年度和 2012–2013 年度, *Q<sub>Lr</sub>. hbau-2AS* 分别解释了 25.79%、71.55% 和 60.72% 表型变异。本研究筛选出与 *Q<sub>Lr</sub>. hbau-2AS* 连锁的 13 个分子标记。

**关键词:** 小麦; 抗叶锈病基因; 遗传分析; QTL 位点; 分子作图

## Molecular Mapping of QTL for Leaf Rust Resistance in Chinese Wheat Cultivar Weimai 8

WANG Jia-zhen, SHI Ling-zhi, ZHU Lin, REN Zhi-kuan, KANG Zhan-hai, LI Xing, LIU Da-qun

(Biological Control Center of Plant Diseases and Pests of Hebei Province/Agricultural University of Hebei, Baoding 071001)

**Abstract:** Wheat cultivar ‘Weimai 8’ is a good source of adult plant resistance to leaf rust. To understand the chromosomal position of its leaf rust resistance genes, 179  $F_{2,3}$  lines from the cross Weimai 8 × Zhengzhou 5389 (susceptible to leaf rust) were used to map leaf rust resistance QTL. The results showed that there was a major QTL on chromosome 2AS, temporarily named *Q<sub>Lr</sub>. hbau-2AS*. This QTL provided by the resistant parent Weimai 8 and was located between SSR markers *Xcfd36* and *Xbarc1138* with the interval length of 2.58 cM. In 2010–2011, 2011–2012 and 2012–2013 cropping seasons, *Q<sub>Lr</sub>. hbau-2AS* explained 25.79%, 71.55% and 60.72% of the phenotypic variation, respectively. A total of 13 molecular markers linked to *Q<sub>Lr</sub>. hbau-2AS* were identified.

**Key words:** wheat (*Triticum aestivum* L.); leaf rust resistance gene; genetic analysis; QTL; molecular mapping

小麦叶锈病是由小麦叶锈菌 (*Puccinia triticina*) 引起的真菌性病害, 全世界小麦种植区均有叶锈病发生, 在中国的西南和西北部造成的产量损失最为严重<sup>[1-2]</sup>。种植抗病品种是防治小麦叶锈病的有效措施, 但是一些麦区由于长期种植一种抗病品种, 加速了对叶锈菌变异的选择, 导致部分抗病品种丧失了抗性。所以急需探明抗病小麦品种中所具有的抗病基因, 了解抗源的遗传多样性, 做到抗病基因的合理布局。

小麦对叶锈病的抗性分为两种, 一种是小种专化抗性 (race-specific resistance), 也是目前研究最多的防卫体系, 由单基因控制, 抗性不稳定, 常因病原菌变异而丧失; 另一种是非小种专化抗性 (race non-specific resistance), 又称成株抗性或慢锈性, 由多个数量性状位点 (QTL, quantitative trait loci)<sup>[3]</sup>, 表现持久性 (durable resistance)<sup>[4]</sup>。慢锈性小麦品种对生理小种抗性具有广谱性, 但不是完全免疫, 这样一来降低了

收稿日期: 2015-01-07 修回日期: 2015-02-02 网络出版日期: 2015-06-10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150610.1606.008.html>

基金项目: 河北省教育厅优秀青年项目 (YQ2013024); 国家自然科学基金 (31361140367); 高等学校博士学科重点专项科研基金联合资助课题 (20131302120004)

第一作者研究方向为分子植物病理学。E-mail: 858189486@qq.com

通信作者: 李星, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: lixing@hebau.edu.cn

刘大群, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: ldq@hebau.edu.cn

对生理小种的选择压力,病原菌发生变异的频率也随之降低,因而,慢锈性品种的抗性更持久。

目前已知的慢叶锈性基因只有 *Lr34*<sup>[5]</sup>、*Lr46*<sup>[6]</sup>、*Lr67*<sup>[7]</sup> 和 *Lr68*<sup>[8]</sup>, 在田间均表现出了良好抗性。1977 年, P. L. Dyck<sup>[5]</sup> 最早在加拿大品种 PI58548 叶锈病的鉴定中报道了 *Lr34*, 最先将 *Lr34* 定位在小麦 7D 染色体上<sup>[9]</sup>。该位点同时抗条锈病 (*Yr18*) 和白粉病 (*Pm38*)<sup>[10]</sup>, 同时这个具有多种抗性的基因被更精确地定位在 7DS 染色体上<sup>[11]</sup>。R. P. Singh 等<sup>[6]</sup> 将慢叶锈基因 *Lr46* 定位在 1B 染色体上。M. William 等<sup>[12]</sup> 发现了一个与 *Lr46* 连锁的 AFLP 标记 *PstAAgMseCTA-1*, 并将 *Lr46* 定位到 1B 染色体长臂的末端, 同时发现 *Lr46* 与慢条锈基因 *Yr29* 是同一基因。慢叶锈基因 *Lr67* 与抗条锈基因 *Yr46* 紧密连锁或是同一基因<sup>[13]</sup>。最新发现的慢叶锈基因 *Lr68* 被定位在 7D 染色体长臂上<sup>[8]</sup>。与质量抗病基因比, 目前所发现的抗叶锈 QTL 很有限, 所以有必要发掘更多更有效的 QTL 及其紧密连锁的分子标记。

中国小麦品种潍麦 8 号是由山东省潍坊市农科院作物所于 2005 年选育出的小麦新品种, 父本是 Aus621108, 母本是 88-3149, 该品种高抗白粉病和叶锈病, 是一个很好的小麦抗锈性资源<sup>[14]</sup>。潍麦 8 号在苗期对多数生理小种表现感病, 成株期表现为慢锈性。本研究旨在对潍麦 8 号中叶锈病成株抗性 QTL 进行定位, 为改良小麦对叶锈病的成株抗性提供理论依据及分子标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

抗病亲本潍麦 8 号, 感病亲本郑州 5389 及其杂交组合的 179 个  $F_{2,3}$  家系用于叶锈病成株抗性鉴定。用于成株期田间接种鉴定的小麦叶锈菌为混合菌, 包括 THTT、THTS、THTQ。小麦叶锈菌生理小种的致病类型按 D. L. Long 等<sup>[15]</sup> 的密码命名系统 (Prt-code System) 命名。

### 1.2 田间鉴定

2010-2013 连续 3 年将亲本潍麦 8 号、郑州 5389 以及 179 个家系于 10 月上旬种植到河北农业大学试验地 (河北省保定市), 采取完全随机区组设计, 3 次重复, 每一行为一个家系, 行长 1.5 m, 行距 0.25 m, 每行种 50 粒左右, 每 10 行种植 1 行感病对照品种郑州 5389, 在与试验材料垂直的方向种植诱发 (郑州 5389)。每年 4 月中旬进行田间叶锈菌接种, 将 THTT、THTS、THTQ 等量混合的叶锈菌配

制成 0.05% 吐温 20 (Tween-20) 的孢子悬浮液, 下午 17 时左右用喷雾器均匀喷洒在诱发行的麦苗上, 然后盖上地膜, 周围用土压盖, 黑暗保湿, 第 2 天上午 9 时左右揭开地膜。田间在接菌后需要多次浇水, 一般到收获期浇水 3~4 次为宜, 以保持田间湿度, 为发病创造有利条件。

### 1.3 成株期抗叶锈鉴定

待感病亲本和对照郑州 5389 的发病严重度达到 50% 以上 (锈菌的发病面积占到整个叶片的一半以上) 时, 进行第一次严重度调查, 每隔一周调查一次, 直到感病对照发病达到 100%。最后一次在发病高峰时所达到的严重度称为最终严重度 (FDS, final disease severity), 作为最终 QTL 分析的表型数据。

### 1.4 小麦基因组 DNA 的提取及 PCR

小麦叶片基因组总 DNA 的提取方法参考 P. J. Sharp 等<sup>[16]</sup> 的 CTAB 法, 并用 ddH<sub>2</sub>O 稀释成扩增所用浓度。PCR 反应体系为 10  $\mu$ L, 包括 10  $\times$  buffer 1  $\mu$ L、10 mmol/L dNTP 0.2  $\mu$ L、4  $\mu$ mol/L 引物 1  $\mu$ L、30 ng/ $\mu$ L 模板 DNA 1  $\mu$ L 和 *Taq* 酶 1 U。PCR 反应条件: 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94  $^{\circ}$ C 变性 45 s; 55  $^{\circ}$ C (依据不同引物温度稍有变化) 退火 45 s; 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4  $^{\circ}$ C 保存。PCR 结束后将其扩增产物进行电泳分析。依据扩增产物的分子量大小选择 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳或琼脂糖电泳。

### 1.5 抗感小群体的建立及分子标记的筛选

参考分离群体分组分析法<sup>[17]</sup>, 计算最终严重度 3 次重复的平均值, 分别选出最终严重度最低的 5 个家系和最高的 5 个家系, 作为初步筛选分子标记的抗、感小群体。

利用分布于小麦 21 条染色体上的 1240 对 SSR 标记和 2 对 SCAR 标记对亲本潍麦 8 号、郑州 5389 之间的多态性进行筛选, 筛选出的分子标记进一步用小群体进行验证, 挑选出 10 株小群体中交换个数在 3 个以下的分子标记, 最后扩增全部群体进行确定。结合表型数据及分子标记数据可确定 QTL 位点。

### 1.6 构建连锁图和成株抗性 QTL 分析

利用分子标记技术获得了小麦杂交群体的基因型, 结合田间调查得到的表型数据即最终严重度, 使用 Map Manager QTXb20 做连锁图, QTL Ici mapping 3.2 做 QTL 检测, 设置 LOD 阈值为 2.5。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦品种潍麦 8 号叶锈病成株期抗锈性鉴定

2010-2013 年, 对小麦品种潍麦 8 号进行了连续

3年的田间接种鉴定,记录最终严重度(图1)。感病对照郑州5389发病充分,最终严重度达到100%,小麦慢叶锈品种潍麦8号的最终严重度为10%。对田间鉴定结果进行统计分析可得,3年的田间调查数据均呈现连续分布,符合数量遗传的特征,可能存在若干控制小麦叶锈病的抗性QTL位点。2011-2012年的发病程度较2010-2011年和2012-2013年严重,但总体发病趋势较为一致。对这3年重复鉴定的179个家系进行最终严重度的相关分析,2010-2011年与2011-2012年和2012-2013年的相关系数分别为0.67和0.66,2011-2012年和2012-2013年相关系数高达0.86,表明该群体的抗病鉴定数据较为可靠。

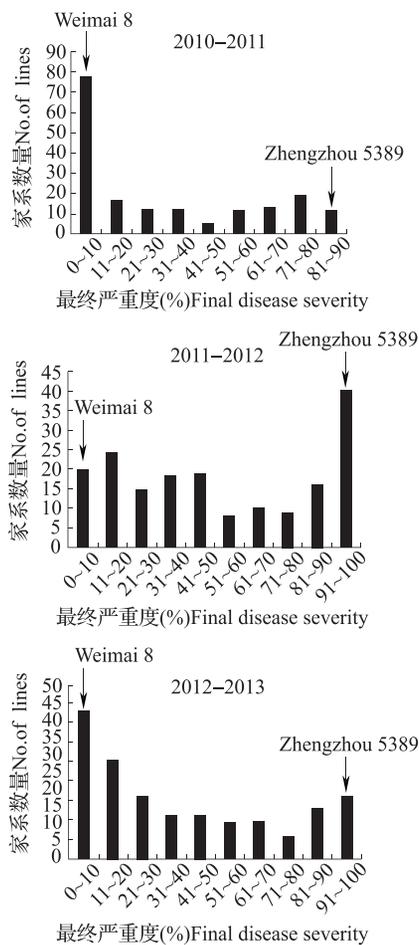


图1 潍麦8号、郑州5389及其 $F_{2,3}$ 家系田间3年最终严重度分布图

Fig. 1 Distribution for FDS in the Weimai 8/Zhengzhou 5389  $F_{2,3}$  lines in three cropping seasons

## 2.2 抗叶锈QTL的定位

根据小麦品种潍麦8号与郑州5389的杂交群体连续3年的田间抗叶锈性鉴定所获得的表型数据,对群体进行分子标记的筛选。最终共筛选出13

个分子标记与潍麦8号抗叶锈性连锁,分别为:*Xbarc124*、*Xwmc382*、*Xwmc407*、*Xbarc212*、*Xgwm512*、*Xgwm614*、*Xbarc1114*、*Xgwm210*、*Xcfd36*、*Xgwm400*、*Xbarc1138*、*SC372*和*SC385*,这些分子标记均位于2A染色体。利用Map Manager QTXb20和QTL Ici mapping 3.2进行分析,发现13个分子标记处于同一连锁群,长度为20.5 cM(图2),显示存在一个小麦成株抗叶锈QTL位点,位于2AS染色体,暂命名为 $Q_{Lr}.hbau-2AS$ 。距离QTL位点最近的两个标记分别为*Xbarc1138*和*Xcfd36*,区间长度为2.58 cM。田间鉴定的3年中,该位点分别解释了25.79%、71.55%和60.72%的表型变异(表1)。在2010-2011年检测到另外一个位于*Xwms400*和*SC385*之间的QTL,因为距 $Q_{Lr}.hbau-2AS$ 的距离远小于20 cM,所以这2个位点应该是同一个QTL。

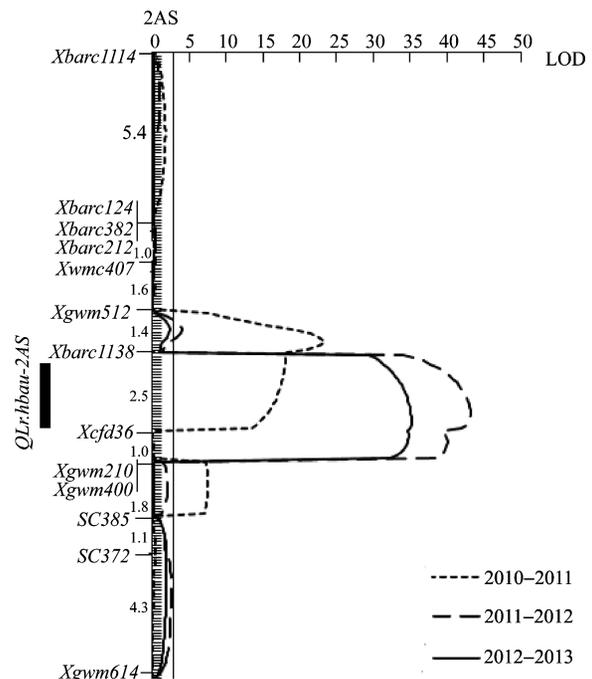


图2 位于2AS染色体上控制小麦成株抗叶锈QTL的位置  
Fig. 2 The positions of the quantitative trait loci (QTLs) conferring adult-plant resistance to leaf rust on chromosome 2AS

## 3 讨论

本研究对中国小麦品种潍麦8号中可能含有的成株抗叶锈QTL位点进行分析,在3年田间鉴定结果中均检测到一个QTL位点 $Q_{Lr}.hbau-2AS$ 。利用QTL Ici mapping 3.2软件分析显示3年中 $Q_{Lr}.hbau-2AS$ 的LOD值均较大,证明存在 $Q_{Lr}.hbau-2AS$ 位点的可信度很高。分析3年田间鉴定的最终严重度,

表 1 复合区间作图法在 3 年中检测到的 QTL

Table 1 QTL for FDS based on the composite interval mapping analysis

年度 Year	染色体 Chromosome	左侧标记 Left marker	右侧标记 Right marker	LOD 值 LOD score	加性效应 Additive effect	显性效应 Dominant effect	表型变异 (%) Phenotypic variation
2010—2011	2A	<i>barc1138</i>	<i>efd36</i>	18.11	-21.45	-2.59	25.79
2010—2011	2A	<i>wms400</i>	<i>SC385</i>	7.49	-10.56	26.83	9.45
2011—2012	2A	<i>barc1138</i>	<i>efd36</i>	43.11	-37.98	-6.43	71.55
2012—2013	2A	<i>barc1138</i>	<i>efd36</i>	35.17	-34.88	-7.69	60.72

任意 2 年的相关系数都高于 0.60, 并且 *QLr. hbau-2AS* 在 3 年所解释的表型变异分别为 25.79%、71.55% 和 60.72%, 证明 QTL 位点 *QLr. hbau-2AS* 在田间的抗叶锈性受环境影响较小、较稳定。

目前位于 2AS 染色体上已知的小麦抗叶锈基因有 *Lr37*<sup>[18]</sup>。*Lr37* 具有优异的成株期抗性, 来自于偏凸山羊草 (*Aegilops ventricosa*) 的 2N 染色体。法国科学家最早将 *Lr37* 基因转移到小麦背景中<sup>[19]</sup>, 育成了具有 2NS/2AS 易位系 VPM1。澳大利亚悉尼大学研究发现, VPM1 带有 3 个抗锈基因, 即抗叶锈基因 *Lr37*、抗秆锈基因 *Sr38* 和抗条锈基因 *Yr17*, 三者在小麦染色体 2AS 上紧密连锁<sup>[18]</sup>, 这些优异基因已被世界各地的育种者广泛使用<sup>[20]</sup>。M. Helguera 等<sup>[21]</sup> 运用 RFLP 标记 *cmwg682* 将 *Lr37-Yr17-Sr38* 连锁群定位在 2AS 上 10 cM 左右。根据 2004 年, D. J. Somers 等<sup>[22]</sup> 绘制的国际公认的面包小麦高密度 SSR 标记图谱, *QLr. hbau-2AS* 定位在 2A 染色体短臂末端, 与 *Lr37* 有一定距离。虽然利用距离 *QLr. hbau-2AS* 最近的 2 个标记 (*Xbarc1138* 和 *Xefd36*) 扩增近等基因系 TcLr37, 其特异性条带的大小与抗病亲本潍麦 8 号均不同, 但是该 QTL 位点与 *Lr37* 的关系还不能确定, 需进一步试验验证。本试验筛选出与 *QLr. hbau-2AS* 连锁的 13 个分子标记, 为今后分子标记辅助育种提供理论基础。

#### 参考文献

- [1] Huerta-Espino J, Singh R P, German S, et al. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina* [J]. *Euphytica*, 2011, 179:143-160
- [2] 刘成, 闫红飞, 宫文萍, 等. 小麦叶锈病新抗源筛选研究 [J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(5):936-944
- [3] Das M K, Rajaram S, Mundt C C, et al. Inheritance of slow rusting resistance in wheat [J]. *Crop Sci*, 1992, 32:1452-1456
- [4] Bjarko M E, Line R F. Heritability and number of genes controlling leaf rust resistance in four cultivars of wheat [J]. *Phytopathology*, 1988, 78:457-461
- [5] Dyck P L. Genetics of leaf rust reactions in three introductions of common wheat [J]. *Can J Genet Cytol*, 1977, 19:711-716
- [6] 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
- [7] McIntosh R A, Dubcovsky J, Rogers W J, et al. Catalogue of gene symbols for wheat; 2011 supplement [J]. *Ann Wheat Newsl*, 2011, 57:303-321
- [8] 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]. *Theor Appl Genet*, 2012, 124:1475-1486
- [9] Dyck P L. Genetics 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
- [10] 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
- [11] Schnurbusch T, Bossolini E, Messmer M, et al. Tagging and validation of a major quantitative trait locus for leaf rust resistance and leaf tip necrosis in winter wheat cultivar Forno [J]. *Phytopathology*, 2004, 94:1036-1044
- [12] William M, Singh R P, Huerta-Espino J, et al. Molecular marker mapping of leaf rust resistance gene *Lr46* and its association with stripe rust resistance gene *Yr29* in wheat [J]. *Phytopathology*, 2003, 93:153-159
- [13] 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
- [14] 陈香芝, 张其鲁. 小麦新品种—潍麦 8 号 [J]. *农技服务*, 2005(8):25
- [15] Long D L, Kolmer J A. A North American system of nomenclature for *Puccinia triticina* [J]. *Phytopathology*, 1989, 79:525-529
- [16] Sharp P J, Kreis M, Shewry P R, et al. Location of amylase sequence in wheat and its relatives [J]. *Theor Appl Genet*, 1988, 75:286-290
- [17] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:9828-9832
- [18] Bariana H S, McIntosh R A. Location of rust resistance genes in VPM1 and their genetic linkage with other disease resistance genes in chromosome 2A [J]. *Genome*, 1993, 36:476-482
- [19] Maia N. Obtention des blés tendres résistants au piétin-verse par croisements interspécifiques blés X *Aegilops* [J]. *Comptes Rendus des Séances de l'Académie d'Agriculture de France*, 1967, 53:149-154
- [20] McIntosh R A, Wellings C, Park R F. Wheat rusts: an atlas of resistance genes [M]. Melbourne, Australia: CSIRO Publications, 1995:245-247
- [21] Helguera M, Khan I A, Kolmer J, et al. PCR assays for the *Lr37-Yr17-Sr38* cluster of rust resistance genes and their use to develop isogenic hard red spring wheat lines [J]. *Crop Sci*, 2003, 43:1839-1847
- [22] Somers D J, Isaac P, Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109:1105-1114