

# 兼抗白粉、条锈病小偃麦渗入系 CH7124 抗性遗传及细胞学鉴定

李欣<sup>1</sup>, 张晓军<sup>1</sup>, 张丛卓<sup>1</sup>, 詹海仙<sup>1</sup>, 杨足君<sup>2</sup>, 畅志坚<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>山西省农业科学院作物科学研究所/农业部黄土高原作物基因资源与种质创制重点实验室, 太原 030031;

<sup>2</sup>电子科技大学生命科学与技术学院, 成都 610054)

**摘要:** CH7124 是通过八倍体小偃麦 TAI8335 与感病小麦杂交、回交育成的兼抗白粉病、条锈病的小偃麦种质系。利用抗性接种鉴定、细胞学和基因组原位杂交 (GISH) 技术相结合的方法, 对 CH7124 的抗性来源、遗传方式及细胞学特征进行了分析和鉴定。结果表明, CH7124 在苗期和成株期对条锈菌系 CYR29、CYR31、CYR32、CYR33 和白粉菌系 E09、E20、E21、E26 表现为免疫或近免疫, 其抗性来自中间偃麦草, 受 1 对显性核基因控制; CH7124 的根尖细胞染色体数目为  $2n = 42$ , 花粉母细胞减数分裂中期 I (PMC MI) 绝大多数细胞内可观察到 21 个二价体, 平均配对构型为  $2n = 0.30 \text{ I} + 20.79 \text{ II} + 0.04 \text{ III}$ ; 与普通小麦中国春、绵阳 11 的杂种  $F_1$  中, 有 80% 以上的花粉母细胞可观察到  $2n = 21 \text{ II}$  的染色体构型, 其平均配对构型均为  $2n = 21 \text{ II}$ 。说明 CH7124 具有与普通小麦相似的染色体结构和规则的配对构型。由于利用以中间偃麦草总 DNA 为标记探针的原位杂交未观察到可见的外源 DNA 杂交信号, 进一步证明 CH7124 是一个小麦-中间偃麦草的隐形异源渗入系。

**关键词:** 小麦; 中间偃麦草; 抗病异源渗入系; 白粉病; 条锈病

## Cytological Characterization and Resistance Inheritance in Alien Introgression CH7124 from *Thinopyrum intermedium*

LI Xin<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-jun<sup>1</sup>, ZHANG Cong-zhuo<sup>1</sup>, ZHAN Hai-xian<sup>1</sup>, YANG Zu-jun<sup>2</sup>, CHANG Zhi-jian<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> key Laboratory of crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau, Ministry of Agriculture/Institute of

Crop Science, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031; <sup>2</sup> School of Life Science and Technology,

University of Electronic Science and Technology of China, Chengdu 610054)

**Abstract:** Stripe rust and powdery mildew, caused respectively by *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (*Pst*) and *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* (*Bgt*), are globally important diseases of wheat. Genes transferred to wheat from wild species are often associated with deleterious traits. In this study, a wheat-*Thinopyrum intermedium* germplasm line CH7124 was characterized by a combination of resistance evaluation, cytological observation and genomic *in situ* hybridization (GISH). Disease screening demonstrated this line was highly resistant to both *Pst* races CYR29, CYR31, CYR32 and CYR33 and *Bgt* isolates E09, E20, E21 and E26, which are the most widely virulent pathotypes in China and virulent to most of the known resistance genes and the resistance derived from *Th. intermedium*. Genetic analysis of the  $F_1$ ,  $F_2$ ,  $F_3$  and  $BC_1$  populations from resistant line CH7124 revealed that the resistance to powdery mildew and stripe rust was controlled by a single dominant allele. Mitotic observation showed that CH7124 had 42 chromosomes, and the chromosomes in most pollen mother cells of its  $F_1$ s involved wheat genotypes Chinese Spring and Mianyang 11 at PMC MI formed 21 bivalents, averaging respectively 20.73 in 102 cells and 20.74 in 87 cells, suggesting stability of CH7124 in cytology and regular pairing with common wheat. As no signal could be detected when using genomic *Th. intermedium* DNA as a probe in the GISH experiment, the introgressed alien chromatin in this line was very small.

收稿日期: 2011-10-14 修回日期: 2011-11-23

基金项目: 国家自然科学基金(31171839, 30671299); 山西省国际科技合作计划(2012081006-2); 山西省回国留学人员科研资助项目(2012-402)

作者简介: 李欣, 助理研究员, 从事小麦遗传育种研究。E-mail: 52518178@163.com

通讯作者: 畅志坚, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事小麦种质创新和外源基因导入研究。E-mail: wrczj@126.com

and cytologically undetectable further indicating that CH7124 is a cryptic wheat-alien introgression line. This study showed that CH7124 appears to serve as a novel resistance source for wheat breeding.

**Key words:** Wheat; *Thinopyrum intermedium*; Alien resistant introgression; Powdery mildew; Stripe rust

培育抗病品种是防治小麦白粉病和条锈病的有效途径。但由于白粉菌、条锈菌的生理小种变异快、菌量大,加之品种或抗源的单一化常导致小麦白粉病、条锈病大量发生和流行<sup>[1]</sup>,直接威胁着我国小麦的安全生产。因此,发掘、鉴定新的抗病基因,创造兼抗多种病害的新种质对小麦抗病育种具有重要意义。

利用远缘杂交和染色体异源重组,从近缘种属导入新的抗病基因是实现小麦抗源多样化及培育多抗性新品种的重要途径。目前,已在一些小麦的稀有种和近缘种属中发现了新的抗条锈病基因和抗白粉病基因<sup>[2-4]</sup>。中间偃麦草(*Thinopyrum intermedium*  $2n = 6x = 42$ , JJ<sup>S</sup>)是小麦的一个多年生野生近缘植物,由于其蕴含着许多对改善小麦品质、增强小麦抗性的有益基因,已成为小麦遗传改良的重要基因资源之一<sup>[5]</sup>。近年来,已有学者育成兼抗白粉病和条锈病的八倍体小偃麦<sup>[6-7]</sup>和抗白粉病或条锈病的小偃麦附加系、代换系<sup>[8-9]</sup>,但鲜见兼抗上述两种病害、且不含大的外源染色体片段的小偃麦渗入系的研究报道。

小麦与其近缘属的小片段染色体易位具有重要的理论意义和潜在的应用价值<sup>[10]</sup>。近年来,已鉴定出几个涉及黑麦和山羊草属的小片段抗病易位系<sup>[10-11]</sup>。偃麦草与小麦具有一定的同源性,其 J/J<sup>S</sup>基因组与小麦之间能发生较高水平的染色体配对<sup>[12]</sup>。因而在以八倍体小偃麦为桥梁导入外源基因的过程中,载有目的基因的 J/J<sup>S</sup>组染色体更容易与相应的小麦部分同源染色体发生交换和重组,且重组后的染色体在其结构上更接近于小麦。为导入偃麦草的抗病基因,以小偃 7430 和自育的多抗性八倍体小偃麦 TAI7045、TAI7047、TAI8335 为抗源,与感病的小麦品种杂交、回交,现已育成 CH7124 等一批兼抗白粉和条锈病的小麦新种质<sup>[13-17]</sup>。本研究旨在分析、鉴定小麦新种质 CH7124 抗病基因的来源、抗性遗传方式和细胞学特征,为更好地利用这一来自偃麦草的小麦多抗性抗源提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

CH7124 选自普通小麦×八倍体小偃麦“TAI8335”的 BC<sub>2</sub>F<sub>6</sub> 世代,由本实验室育成,其系谱为晋麦 33/TAI8335//冀麦 26\* 2; TAI8335 是源于普通小麦与中间

偃麦草杂交后代的八倍体新类型,由畅志坚等<sup>[7]</sup>育成,其杂交系谱为晋麦 33/中间偃麦草//晋麦 33。CH7124、TAI8335 及其亲本由本实验室提供并保存。

CH7124 及其亲本晋麦 33、冀麦 26 和八倍体小偃麦 TAI8335 及其亲本中间偃麦草、晋麦 33、晋麦 33、晋麦 33 号用于白粉病和条锈病的苗期抗性鉴定,所用白粉菌系为 E09、E20、E21、E26,由中国农科院植保所段霞瑜研究员提供。条锈菌种为 CYR29、CYR31、CYR32、CYR33,由电子科技大学杨足君教授提供;同时,将 CH7124 分别与感病品种(系)苏麦 3 号、绵阳 11、SY95-71 杂交或回交,所获 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、BC<sub>1</sub> 群体和 F<sub>2,3</sub> 家系及其双亲用于成株抗性的遗传分析,所用条锈菌种为 CYR32,白粉菌系为 E20,上述菌系为我国麦区的流行小种或强毒力小种,它们对大多数已知的抗性基因均有毒性<sup>[18-20]</sup>;用于细胞学鉴定的材料包括 CH7124、中国春、绵阳 11 及其杂交 F<sub>1</sub>。

### 1.2 方法

**1.2.1 苗期抗性鉴定** 为分析抗性基因的来源,于 2008-2010 年在山西省农业科学院作物研究所温室分别对 CH7124 及其杂交亲本 TAI8335、晋麦 33、冀麦 26 和 TAI8335 的亲本中间偃麦草、晋麦 33 和晋麦 33 号进行白粉病和条锈病的苗期抗性鉴定,高感品种铭贤 169 作为感病对照。幼苗期用单小种接种,待第 1~2 片叶充分展开后,用扫抹法接种预先繁殖好的新鲜菌种。条锈菌系接种后的幼苗置于保湿桶中 10℃ 结露保湿 24h,温室温度控制在 18℃/12℃(白天/晚上)、光照 12~14h/d,光强大于 10000 lx<sup>[18-21]</sup>。白粉病抗性鉴定是当待鉴定材料生长至 1 叶 1 心期时,将繁菌盆置于待鉴定幼苗培养盘的四周,通过自然传播和人工拂掸等方法进行接种<sup>[19]</sup>。接种后 15~18d,当感病对照充分发病时,按 0(免疫)、0<sub>1</sub>(过敏性坏死)、1(高抗)、2(中抗)、3(中感)和 4(高感)的 6 级分级标准分别调查、记载其白粉病<sup>[19]</sup>和条锈病<sup>[21]</sup>的侵染型,其中 0~2 的侵染型为抗病,3~4 的侵染型为感病。

**1.2.2 成株抗性遗传分析** 2008-2010 年分别在山西省农业科学院作物研究所温室和电子科技大学邛崃试验场进行白粉病和条锈病的成株抗性遗传分析,所用菌系为 E20 和 CYR32。双亲、F<sub>1</sub> 各播 14 粒,BC<sub>1</sub> 播 100 粒, F<sub>2</sub> 播 140 粒, F<sub>2,3</sub> 家系及亲本种植 1 个

重复, 行长 1.0m, 每行点播 14 粒, 行距 0.25m。为确保发病充分, 每 10 行种植 1 行感病对照铭贤 169 或京双 16 并且试验材料四周种植感病对照作为诱发。接种所用白粉菌系为 E20, 在拔节期, 将繁殖于感病对照上的白粉病菌抖撒在待鉴材料上, 并将带菌麦苗均匀移栽在感病对照之间。接种后, 灌水保湿以利发病。于灌浆期调查病害的侵染型, 分级标准参照盛保钦<sup>[22]</sup>修改的 CIMMYT 的叶部病害评价 9 级分级标准, 其中 0~0; 为免疫, 1~2 为高抗, 3~4 为中抗, 5~6 为中感, 7~9 为高感。条锈病成株抗性鉴定所用菌系为 CYR32, 孕穗期将其接种于感病对照和诱发品种, 待感病品种铭贤 169 充分发病时调查侵染型。侵染型分级根据刘孝坤<sup>[23]</sup>的 6 级分类法进行, 其中 0~0; 为免疫, 1 为高抗, 2 为中抗, 3 为中感, 4 为高感。对抗性分离群体 F<sub>2</sub>、F<sub>2,3</sub>、BC<sub>1</sub> 用卡方检验进行分离比适合度测验, 确定 CH7124 所含抗白粉基因、抗条锈病基因的数目及互作方式。

**1.2.3 细胞学观察** CH7124、中国春、绵阳 11 及其杂交 F<sub>1</sub> 根尖细胞的染色体计数和花粉母细胞减数分裂中期 I 的染色体配对观察参照文献 [16-17] 的方法进行。

**1.2.4 基因组原位杂交 (GISH)** 染色体标本制备: 种子在垫有湿滤纸的培养皿中置 22℃ 培养箱中

萌发, 待根长 1~2cm 时剪取根尖, 在冰水中预处理 22~24h 后, 用卡诺氏固定液(乙醇:冰醋酸 = 3:1) 固定至少 24h, 45% 醋酸中压片, 液氮冷冻揭片, -80℃ 超低温冰箱保存备用; 荧光原位杂交参照 Chang 等<sup>[7]</sup>的程序。用缺刻平移法标记上 Fluorescent-12-dUTP 的中间偃麦草基因组总 DNA 作探针, 普通小麦中国春 (CS) 基因组 DNA 作封阻。杂交液中探针、封阻 DNA 的浓度比率为 1:120, 杂交后的载玻片用碘化丙锭 (PI) 套染, 用抗退色剂 (Anti-fading agent) 封片, 在安装有 CCD 相机的莱卡 RA-2 型荧光显微镜下观察杂交信号并拍照。

## 2 结果与分析

### 2.1 CH7124 对小麦白粉病和条锈病的抗性鉴定及其抗性来源

以铭贤 169 为感病对照, 用白粉菌系 E09、E20、E21、E26 和条锈菌系 CYR29、CYR31、CYR32、CYR33 对源于中间偃麦草的小偃麦渗入系 CH7124 进行苗期抗性鉴定。结果表明, CH7124 对我国当前白粉病和条锈病的流行菌系或强毒力菌系均表现免疫 (表 1), 而且成株期也免疫白粉病和条锈病的强毒力菌系 E20 和 CYR32 (表 2, 表 3)。因此, CH7124 是一个兼抗小麦白粉病和条锈病的有效抗源。

表 1 CH7124、八倍体小偃麦 TAI8335 及其亲本对白粉病和条锈病的抗性表现

Table 1 Reactions of CH7124 and partial amphiploid TAI8335 and their parents to powdery mildew and stripe rust

测试材料 Genotype	2n	基因组 Genomic formula	白粉病 Powdery mildw				条锈病 Stripe rust			
			E09	E20	E21	E26	CYR29	CYR31	CYR32	CYR33
CH7124	42	ABD	0	0 ρ;	0 ρ;	0	0	0	0 ρ;	0 ρ;
中间偃麦草	42	SJJ <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0
晋麦 33 <sup>a, b</sup>	42	ABD	4	4	4	4	4	4	4	4
冀麦 26 <sup>a</sup>	42	ABD	3 ρ	4	4	3 <sup>+</sup> ρ	4	4	4	4
TAI 8335	56	W <sup>c</sup> + J <sup>a</sup> + J + S	0	0	0 ρ;	0	0	0	0 ρ;	0 ρ;
晋春 5 号 <sup>b</sup>	42	ABD	4	4	4	3 <sup>+</sup> ρ	4	4	4	4
绵阳 11	42	ABD	4	4	4	4	4	4	4	4
SY95-71	42	ABD	4	4	4	4	4	4	4	4
苏麦 3 号	42	ABD	4	4	4	4	d			
铭贤 169	42	ABD	4	4	4	4	4	4	4	4

a. CH7124 的小麦亲本; b. 八倍体小偃麦 TAI8335 的小麦亲本; c. 小麦基因组; d. 未检测

a. wheat parents of CH7103 b. wheat parents of *Th. intermedium* partial amphiploid TAI8335 c. wheat genome d. not tested with the corresponding pathotype

为明确 CH7124 对小麦白粉病和条锈病的抗性来源, 以铭贤 169 作为感病对照, 用上述白粉菌系和条锈菌系共 8 个小种对 CH7124、TAI8335 及其各自的亲本进行了苗期接种鉴定。结果显示, CH7124 的抗性表现与 TAI8335 及其野生亲本中间偃麦草相

同, 均为免疫, 其侵染型为 0 或 0; 级; 而 CH7124 和 TAI8335 的小麦亲本晋麦 33、冀麦 26 和晋春 5 号均高感白粉病和条锈病, 其侵染型为 4 级 (表 1)。据此推断, CH7124 对白粉病和条锈病的抗性均来自中间偃麦草。

表 2 抗 × 感杂交组合各世代接种白粉菌系 E20 的成株抗性分离

Table 2 Adult resistance segregation for reaction to powdery mildew pathotype E20 in the F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub> populations

亲本及组合 Parent or cross	对白粉菌系 E20 的侵染型 Infection type to race E20						预期分离比 Expected ratio	χ <sup>2</sup> 测验 χ <sup>2</sup> test	P 值 P - value
	0	0;	1~2	3~4	5~6	7~9	R:S		
CH7124 (P <sub>1</sub> )	10	4							
绵阳 11 (P <sub>2</sub> )						12			
苏麦 3 号 (P <sub>3</sub> )						11			
P <sub>1</sub> /P <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	8	5					—	—	—
F <sub>2</sub>	45	22	27	12	7	21	3:1	1.204	0.273
P <sub>3</sub> /P <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	10	3					—	—	—
F <sub>2</sub>	43	26	19	6	13	24	3:1	0.735	0.391
P <sub>3</sub> /P <sub>1</sub> //P <sub>3</sub> BC <sub>1</sub>	26	5	15	4	8	31	1:1	1.360	0.244

表 3 抗 × 感杂交组合各世代接种条锈小种 CYR32 的成株抗性分离

Table 3 Adult resistance segregation for reaction to stripe rust race CYR32 in the F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub> populations

亲本及组合 Parent or cross	对条锈小种 CYR32 的侵染型 Infection type to race CYR32						预期分离比 Expected ratio	χ <sup>2</sup> 测验 χ <sup>2</sup> test	P 值 P - value
	0	0;	1	2	3	4	R:S		
CH7124 (P <sub>1</sub> )	9	4							
SY95-71 (P <sub>2</sub> )						13			
绵阳 11 (P <sub>3</sub> )						12			
P <sub>1</sub> /P <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	12	2					—	—	—
F <sub>2</sub>	46	24	18	9	6	29	3:1	0.162	0.688
P <sub>3</sub> /P <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	10	3					—	—	—
F <sub>2</sub>	51	31	13	5	4	25	3:1	0.437	0.509
P <sub>3</sub> /P <sub>1</sub> //P <sub>3</sub> BC <sub>1</sub>	29	10	8	2	10	32	1:1	0.538	0.463

## 2.2 白粉病成株抗性遗传分析

2009 - 2010 年在山西省农科院作物科学研究所温室,用白粉菌系 E20 对 CH7124 与 2 个感病品种绵阳 11 和苏麦 3 号的杂交后代群体 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>2:3</sub>、BC<sub>1</sub> 进行接种鉴定。结果显示(表 2),所有杂交组合的 F<sub>1</sub> 植株均抗病,其侵染型为 0~0; 级。来自 CH7124/绵阳 11 杂交 F<sub>2</sub> 的 134 个单株中,106 株抗病(侵染型为 0~0; 级 67 株、1~2 级 27 株、3~4 级 12 株)、28 株感病(5~6 级 7 株、7~9 级 21 株),其  $\chi^2 = 1.204$ 、 $P = 0.273$ ,表明抗、感的分离比符合 3:1。来自苏麦 3 号/CH7124 组合 F<sub>2</sub> 的 131 个单株中,抗病的 94 株(0~0; 级 69 株、1~2 级 19 株、3~4 级 6 株)、感病的 37 株(5~6 级 13 株、7~9 级 24 株),其  $\chi^2 = 0.735$ 、 $P = 0.391$ ,抗感分离比亦符合 3:1。同时,89 个 BC<sub>1</sub> (苏麦 3 号/CH7124//苏麦 3 号)单株中,50 株抗病(0~0; 级 31 株、1~2 级 15 株、3~4 级 4 株)、39 株感病(5~6 级 8 株、7~9 级 31 株),其  $\chi^2 = 1.360$ 、 $P = 0.244$  符合 1:1 的分离比。

翌年,在温室对 CH7124 × 绵阳 11 的 F<sub>3</sub> 杂种群体同样用白粉菌系 E20 进行了苗期接种鉴定。结果显示,134 个 F<sub>2:3</sub> 家系中,35 个抗病但不发生抗性

分离,70 个家系发生抗性分离,29 个表现感病且不分离。经卡方检验 ( $\chi^2 = 0.806$ 、 $P = 0.668$ ),表明其抗性分离符合 1:2:1 的显性单基因分离模式。综合上述结果,衍生于中间偃麦草的抗病种质系 CH7124 对白粉病 E20 菌系的抗性受 1 对显性核基因所控制。

## 2.3 条锈病成株抗性遗传分析

2009 - 2010 年在四川邛崃电子科技大学试验农场,用条锈菌小种条中 32 号(CYR32)对 CH7124 与 2 个感病品种(系)SY95-71、绵阳 11 的杂交后代群体 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、F<sub>2:3</sub>、BC<sub>1</sub> 进行接种鉴定。结果表明(表 3),所有杂交组合的 F<sub>1</sub> 植株均抗病,其侵染型为 0~0; 级。来自 CH7124/SY95-71 杂交 F<sub>2</sub> 的 132 个单株中,97 株抗病(0~0; 级 70 株、1~2 级 27 株)、35 株感病(3 级 6 株、4 级 29 株),其  $\chi^2 = 0.162$ 、 $P = 0.688$ ,表明抗、感的分离比符合 3:1。来自绵阳 11/CH7124 杂交 F<sub>2</sub> 的 129 个单株中,抗病的 100 株(0~0; 级 82 株、1~2 级 18 株)、感病的 29 株(3 级 4 株、4 级 25 株),其  $\chi^2 = 0.437$ 、 $P = 0.509$ ,抗感分离比亦符合 3:1。同时,91 个绵阳 11/CH7124//绵阳 11 的 BC<sub>1</sub> 单株中,49 株抗病(0~0; 级 39 株、1~2 级 10 株)、42 株感病(3 级 10 株、4 级 32 株),其  $\chi^2 = 0.538$ 、 $P = 0.463$  符合

1:1 的分离比。

翌年,对 CH7124/SY95-71 的 132 个  $F_{2,3}$  家系用条锈菌系 CYR32 接种鉴定。调查结果显示,不发生抗性分离的抗病家系 35 个,抗性分离的家系 68 个,感病家系 29 个。经卡方测验,  $\chi^2 = 0.667$ 、 $P = 0.717$  符合 1:2:1 的显性单基因分离模式。因此,上述结果表明,CH7124 对条锈病 CYR32 菌系的抗性也受 1 对显性核基因所控制。

#### 2.4 染色体配对与细胞学特征

经鉴定,CH7124 根尖细胞的染色体数目为  $2n = 42$ ,且 GISH 分析没有检测到中间偃麦草 DNA 的杂交信号。同时,对 CH7124 及其与中国春、绵阳 11 杂种  $F_1$  PMCM 中期 I 的染色体配对进行了统计分析。结果表明(表 4),CH7124 观察了 94 个花粉母细胞,其中  $2n = 21\text{II}$  的 79 个、 $2n = 20\text{II} + 2\text{I}$  的 10 个、 $2n = 19\text{II} + 1\text{I} + 1\text{III}$  的 4 个、 $2n = 19\text{II} + 4\text{I}$  的 1 个,其平均配对构型为  $2n = 0.30\text{I} + 20.79\text{II} + 0.04\text{III}$ ,  $2n = 21\text{II}$  的细胞占 84%; 中国春、绵阳 11 的平均配对构型分别为  $2n = 0.22\text{I} + 20.85\text{II} + 0.02\text{III}$  和  $2n = 0.29\text{I} + 20.81\text{II} + 0.03\text{III}$ 。同时,CH7124 与中国春、绵阳 11 杂种  $F_1$  的染色体数目均为  $2n = 42$ ,其 PMC MI 的平均配对构型分别为  $0.37\text{I} + 20.73\text{II} + 0.06\text{III}$  和  $0.39\text{I} + 20.74\text{II} + 0.05\text{III}$ 。而且在观察的 102 个和 87 个花粉母细胞中, $2n = 21\text{II}$  的细胞分别占 80.4% 和 81.6%。同时,在其四分体时期均未观察到微核及后期 I 有落后染色体存在或者染色体提早分离的现象。说明 CH7124 的染色体与小麦染色体完好配对,其染色体组成与中国春、绵阳 11 等小麦品种基本相同,并且在细胞学上具有良好的遗传稳定性。CH7124 及其与小麦杂交  $F_1$  的染色体数目、配对构型详见表 4。

表 4 CH7124、中国春、绵阳 11 及其  $F_1$  的染色体数目和 PMCM - I 染色体配对构型

Table 4 Chromosome number and meiotic configuration of CH7124, CS, Mianyang 11 and their  $F_1$  hybrids

材料/杂交 Lines/Cross	$2n$	细胞数 No. of cell	21 II PMC 比 率(%) tested $2n = 21\text{II}$	染色体配对构型 Pairing configuration		
				单价体 Univalent	二价体 Bivalent	三价体 Trivalent
CH7124	42	94	84.043	0.298	20.787	0.043
中国春(CS)	42	82	89.024	0.220	20.854	0.024
绵阳 11(MY 11)	42	87	86.207	0.287	20.805	0.034
$F_1$ (CS/CH7124)	42	102	80.392	0.373	20.725	0.059
$F_1$ (CH7124/MY 11)	42	87	81.609	0.391	20.736	0.046

为进一步明确渗入系 CH7124 是否含有外源染色体片段,用中间偃麦草总 DNA 作探针,中国春总 DNA 为封阻进行了基因组原位杂交(GISH)。结果显示,CH7124 含有完整的 42 条小麦染色体,均呈现 PI 套染的红色,未发现有任何呈现黄绿色的外源 DNA 杂交信号(图 1)。这表明 CH7124 不可能含有来自中间偃麦草的染色体或大的染色体片段,是一个源于中间偃麦草的隐形小麦-异源渗入系。

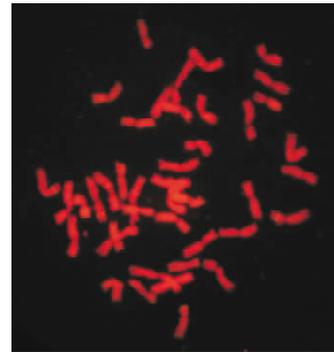


图 1 用中间偃麦草总 DNA 作探针, CH7124 根尖细胞 ( $2n = 42$ ) 的 GISH 检测结果  
Fig. 1 GISH pattern of wheat-alien introgression line CH7124 ( $2n = 42$ ) using *Th. intermedium* DNA as a probe

### 3 讨论

#### 3.1 CH7124 兼抗白粉病和条锈病的基因来源及抗性遗传

抗源多样化是抗病育种的基础,也是解决抗性丧失的重要途径。本研究的抗性鉴定结果表明(表 1),CH7124 的抗病亲本八倍体小偃麦 TAI8335 及选育 TAI8335 的野生亲本中间偃麦草免疫所有测试的条锈小种和白粉菌系,而 CH7124 和 TAI8335 的小麦亲本晋麦 33、冀麦 26、晋春 5 号均为高感。由此推断,CH7124 所含的抗白粉基因和抗条锈病基因均来自中间偃麦草。同时,在 CH7124 与感病品种(系)杂交的  $BC_1$ 、 $F_2$ 、 $F_{2,3}$  杂种群中,其抗、感的分离比例分别符合 1:1、3:1 和 1:2:1 的单显性基因分离模式,说明衍生于中间偃麦草的小麦新抗源 CH7124 对白粉病和条锈病的抗性均由 1 对显性核基因控制。但 CH7124 兼抗性的遗传机制、同一小麦背景中抗白粉基因与抗条锈基因之间的遗传关系以及抗性基因在小麦染色体上的具体位置有待进一步确定。

#### 3.2 CH7124 的细胞学特征

染色体易位是接近缘种、属的有用基因导入小麦的主要途径。但由于大多数异源易位系在导入目标基因的同时,附带了较多外源染色质或不利基因

而影响了它们在育种中的利用价值<sup>[24]</sup>。配对分析是研究染色体同源性的经典方法。本研究所鉴定的 CH7124 是通过感病品种与抗病八倍体小偃麦杂交、回交选育而成的抗病品系,其性状稳定,各遗传群体的抗病基因均能按照孟德尔遗传定律正常分离。细胞学分析表明,CH7124 与普通小麦杂种 F<sub>1</sub> 的各同源染色体均能正常配对(表 4)。而且经 GISH 分析亦未观察到任何偃麦草染色体的杂交信号(图 1)。说明 CH7124 不可能含有较大的外源染色体片段,属于含偃麦草抗病基因的隐形异源渗入系(Cryptic alien introgression)。事实上,在小麦与山羊草的杂种后代中,这种既含有外源有利性状但又没有发生明显的细胞学和遗传学改变的隐形异源渗入系已有报道<sup>[25]</sup>,但 CH7124 外源染色体的渗入方式及其抗性基因整合到小麦染色体上的位置尚需进一步研究。

### 3.3 CH7124 在小麦抗病育种和抗性遗传学研究中的利用价值

白粉病和条锈病是我国小麦生产上的重要病害,其流行范围之广、成灾频率之高居小麦病害之首。病原菌新毒性小种的产生和发展是导致小麦品种丧失抗性的主要原因。条锈菌小种 CYR32、CYR33(Su-14)和白粉菌系 E20、E21 是我国当前最主要的毒性小种,除少数抗病基因,如 Yr5、Yr10、Yr15、Yr24/Yr26<sup>[18]</sup> 和 Pm12、Pm13、Pm16、Pm21、Pm24、Pm43、M13D232<sup>[14,19-20]</sup> 外,绝大多数对其缺乏抗性。中间偃麦草对条锈、叶锈、秆锈及白粉等多种小麦真菌病害具有良好抗性<sup>[5,7]</sup>。CH7124 是以八倍体小偃麦 TAI8335 为抗源,与普通小麦品种杂交、回交的后代选系,兼抗白粉菌系 E09、E20、E21、E26 和条锈菌系 CYR29、CYR31、CYR32、CYR33(表 1)。说明 CH7124 是一个兼抗白粉病和条锈病的有效抗源,对于丰富我国小麦抗病育种的遗传基础和抗病新品种选育均有重要的利用价值。

获得与目的基因紧密连锁的分子标记是成功进行植物基因图位克隆的关键。源于野生近缘物种有益基因的定位、克隆及其在植物转基因研究中的应用已成为当前作物遗传改良的有效方法。但由于野生植物与其栽培物种的部分同源染色体缺乏高频率的配对和重组,使得外源目标基因的标记定位及其图位克隆相当困难<sup>[26]</sup>。本研究所鉴定的小偃麦抗病渗入系 CH7124,既不含有大的外源染色体片段(图 1),又能与小麦染色体正常配对(表 4)。因而用此材料可避免因易位片段过长而造成双亲间染色体的配对和重组受到抑制,从而实现外源抗病基因

的分子标记定位。目前,正在进行 CH7124 抗白粉基因和抗条锈基因的染色体定位和分子作图。

### 参考文献

- [1] 杨作民,唐伯让,沈克全,等.小麦育种的战略问题——锈病和白粉病第二线抗源的建立和利用[J].作物学报,1994,20(4):385-394
- [2] 邱永春,周荣华,孙秀英,等.一粒小麦抗白粉病和条锈病基因的分析[J].植物遗传资源学报,2005,6(4):400-404
- [3] 周新力,胡茂林,邵军民,等.小麦-簇毛麦易位系的抗条锈性遗传分析[J].植物遗传资源学报,2008,9(1):51-54
- [4] 王金平,王洪刚.兼抗白粉和条锈病小偃麦种质系山农 6343 的细胞学和 SSR 鉴定[J].植物遗传资源学报,2009,10(1):46-50
- [5] Li H J, Wang X M. *Thinopyrum ponticum* and *Th. intermedium*: the promising source of resistance to fungal and viral diseases of wheat [J]. J Genet Genomic, 2009, 36: 557-565
- [6] Bao Y, Li X, Liu S, et al. Molecular cytogenetic characterization of a new wheat-*Thinopyrum intermedium* partial amphiploid resistant to powdery mildew and stripe rust [J]. Cytogenet Genome Res, 2009, 126: 390-395
- [7] Chang Z J, Zhang X J, Yang Z J, et al. Characterization of a partial wheat-*Thinopyrum intermedium* amphiploid and its reaction to fungal diseases of wheat [J]. Hereditas, 2010, 147: 304-312
- [8] Liu S B, Wang H G. Characterization of a wheat-*Thinopyron intermedium* substitution line with resistance to powdery mildew [J]. Euphytica, 2005, 143: 229-233
- [9] Hu L J, Li G R, Zeng Z X, et al. Molecular cytogenetic identification of a new wheat-*Thinopyrum* substitution line with stripe rust resistance [J]. Euphytica, 2011, 177: 169-177
- [10] 任正隆,张怀琼.小麦-黑麦染色体小片段的诱导[J].中国科学: C 辑,1997,27(3):258-263
- [11] 符书兰,唐宗祥,张怀琼,等.含有抗白粉病基因的黑麦染色体小片段向小麦的转移[J].遗传,2006,28(11):1396-1400
- [12] Chen Q, Conner R L, Laroche A, et al. Molecular cytogenetic evidence for a high level of chromosome pairing among different genomes in *Triticum aestivum*-*Thinopyrum intermedium* hybrids [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 847-852
- [13] 王建荣,杨志坚,郭秀荣,等.在小麦育种中利用偃麦草抗病特性的研究[J].山西农业科学,2004,32(3):3-7
- [14] He R, Chang Z, Yang Z, et al. Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene Pm43 introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat [J]. Theor Appl Genet, 2009, 118: 1173-1180
- [15] Luo P G, Luo H Y, Chang Z J, et al. Characterization and chromosomal location of Pm40 in common wheat: a new gene for resistance to powdery mildew derived from *Elytrigia intermedium* [J]. Theor Appl Genet, 2009, 118: 1059-1064
- [16] 闫金龙,杨志坚,孙美荣,等.小麦新抗源 CH223 抗条锈性的遗传分析及细胞学鉴定[J].植物保护学报,2010,37(5):419-424
- [17] 白云,李欣,张丛卓,等.小麦新抗源 CH7103 抗条锈基因的遗传及其与已知基因的关系[J].麦类作物学报,2011,31(2):364-369
- [18] Wan A M, Zhao Z H, Chen X M, et al. Wheat stripe rust epidemic and virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China in 2002 [J]. Plant Dis, 2004, 88: 896-904
- [19] Wang Z L, Li L H, He Z H, et al. Seedling and adult plant resistance to powdery mildew in Chinese bread wheat cultivars and lines [J]. Plant Dis, 2005, 89: 457-463
- [20] Zhang H, Guan H, Li J, et al. Genetic and comparative genomics mapping reveals that a powdery mildew resistance gene M13D232 originating from wild emmer co-segregates with an NBS-LRR analog in common wheat [J]. Theor Appl Genet, 2010, 121: 1613-1621

(下转第 588 页)

半岛 Malaysian peninsula ( Penang , Kepong )、缅甸 泰国北部和南部、婆罗洲、印度尼西亚的苏门答腊岛和阿鲁群岛、菲律宾的巴拉望岛,以及新几内亚西部 ( Manokwasi district , Vogelkop peninsula ) 等。

植物分类学既是一门古老的学科,又是一门在不断发展中的学科。从时间上看,划分印楝属的时间在分类学历史上属于自然分类学时期——自然分类阶段。当时分类工具比较简单,手段比较原始,方法也仅限于描述和绘图而已。植物分类学在 20 世纪 20 年代以来已发生了根本性的变化,特别是学科观念和研究手段上。由于植物学各分支学科的发展,给植物分类提供了更多分类和证实亲缘关系的证据。这对分类学的许多工作方法、步骤和概念产生了很大的影响,对物种的认识、种间关系、变异、分化与适应有了新的认识。现在,分类学已进入到了系统发育分类时期——分子分支分类阶段。从揭示印楝属生物多样性、资源的合理开发利用出发,当前印楝属分类首要任务是印楝属植物的分类修订。按物种生物学的方法,以居群概念为指导,在野外观察、居群取样、大量标本室材料观察的基础上进行分析,进而再进行进化层次研究。

#### 参考文献

- [1] 赵喜欢,张业光,蔡德智,等. 印楝引种试验初报[J]. 华南农业大学学报,1989,10(2): 34-39
- [2] Tewari D N. Monograph on neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) [M]. Dehradun, India: International Book Distributors, 1992: 1-21
- [3] National Research Council. Neem — A Tree for Solving Global Problems [M]. Washington DC: National Academy Press, 1992: 141
- [4] Schmutterer H. The Tree and Its Characteristics [C] // Schmutterer H. The Neem Trees *Azadirachta indica* A. Juss. and Other Meliaceae Plants. Weinheim ( Federal Republic of Germany ): VCH Verlagsgesellschaft, 1995: 1-34
- [5] Opende K, Seema W. Neem: Today and in the New Millennium [M]. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 2004
- [6] Hooker J D. The Flora of British India I [M]. Dhera Dun. India: Bishen Sing Mahendra Pal Singh, 1973
- [7] Puri H S. Classification of drugs in ancient India [J]. Everyday Sci, 1969, 24: 41-43
- [8] Dhilon R S, Ahlawat K, Pundir J S. Botany of Neem [C] // Singh K K, Phogat S, Tomar A, et al. Neem: A Treatise. New Delhi, India: I. K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2008: 30-43
- [9] Tomar A, Singh K K. Neem: An Introduction [C] // Singh K K, Phogat S, Tomar A, et al. Neem: A Treatise. New Delhi, India: I. K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2008: 3-45
- [10] Schmutterer H. The Neem Trees *Azadirachta indica* A. Juss. and Other Meliaceae Plants [C]. Weinheim ( Federal Republic of Germany ): VCH Verlagsgesellschaft, 1995: 585-597
- [11] Chowdhary A, Singh V. Geographical Distribution, Ethnobotany and Indigenous Uses of Neem [C] // Singh K K, Phogat S, Tomar A, et al. Neem: A Treatise. New Delhi, India: I. K. International Publishing House Pvt. Ltd., 2008: 16-29
- [12] Schmutterer H, Ermel K. The Sentang or Marrango Tree: *Azadirachta excelsa* ( JACK) [C] // Schmutterer H. The Neem Trees *Azadirachta indica* A. Juss. and Other Meliaceae Plants. Weinheim ( Federal Republic of Germany ): VCH Verlagsgesellschaft, 1995: 598-604.
- [13] Schmutterer H, Doll M. The Marrango or Philippine neem tree, *Azadirachta excelsa* (= *A. integrifoliola*): A new source of insecticides with growth-regulating properties [J]. Phytoparasitica, 1993, 21: 79-86
- [14] 祁承经,汤庚国. 树木学(南方本) [M]. 北京: 中国林业出版社, 2005: 377
- [15] 陈邦余. 楝科 ( Meliaceae ) 的地理分布 [J]. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(3): 12-22
- [16] Jacobs M. The genetic identity of *Melia excelsa* Jack [J]. The Gardens Bulletin, 1961, 18(1): 71-75.
- [17] Jack W. Description of Malaysian plants I-III [M]. Leiden: Boncoolen Reproduct, 1820: 1820-1822
- [18] Germplasm Resources Information Network (GRIN). Taxon: *Azadirachta indica* A. Juss. var. *siamensis* Valetton [DB/OL]. ( 2010-02-20 ) [2011-01-12] <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/html/taxon.pl?457196>
- [19] 赖永祺. 印楝栽培 [M]. 昆明: 云南科技出版社, 2003: 39-40.
- [20] Thomsen A, Graudal L, Hansen P. Description of Neem Seed Sources in the International Neem Network [EB/OL]. ( 1998-08-16 ) [2011-01-21] <http://www.fao.org/DOCREP/005/AC618E/AC618E01.htm>
- [21] Freter P, Moser G. Status Report on Global Neem Usage [R]. Eschborn Germany, Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH. 2000.
- [22] 张兴,赵喜欢. 国产印楝树皮中印楝素测试初报 [J]. 西北农业大学学报, 1992, 20(4): 90-94
- [23] 赖永祺. 中国印楝种植的研究与推广简述 [J]. 农药, 2001, 40(9): 46-47
- [24] 张燕平,赖永祺,彭兴民,等. 印楝的世界地理分布与引种栽培概况 [J]. 林业调查规划, 2002, 27(3): 98-101
- [25] 彭兴民,张燕平,赖永祺,等. 印楝生物学特性及引种栽培 [J]. 林业科学研究, 2003, 16(1): 75-80
- [26] Lauridsen E B, Kanchanaburagura C, Boonsermsuk S. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) in Thailand [EB/OL]. ( 2009-08-16 ) [2011-01-21] <http://www.fao.org/DOCREP/006/U5380E/U5380E08.htm>
- [27] Oo H T. Neem Tree Research [R]. Burmese-German Plant Protection and Rodent Control Project, Bangkok, Thailand: Tana Press. 1987: 105
- [28] Orwa. Agroforestry Database 4. 0. 2009. *Azadirachta excelsa* ( Jack ) Jacobs [DB/OL]. ( 2009-06-23 ) [2011-02-14] [http://www.worldagroforestry.org/treedb2/AFTPDFS/Azadirachta\\_excelsa.pdf](http://www.worldagroforestry.org/treedb2/AFTPDFS/Azadirachta_excelsa.pdf)
- [29] Res 2007, 15: 3-49
- [25] Kuraparthi V, Chhuneja P, Dhaliwal H S, et al. Characterization and mapping of cryptic alien introgressions from *Aegilops geniculata* with new leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr57* and *Yr40* in wheat [J]. Theor Appl Genet 2007, 114: 1379-1389
- [26] Cao A Z, Xing L P, Wang X Y, et al. Serine/threonine kinase gene *Stpk-V*, a key member of powdery mildew resistance gene *Pm21*, confers powdery mildew resistance in wheat [J]. Proc Natl Acad Sci USA 2011, 108(19): 7727-7732

(上接第 582 页)

- [21] 李振岐,曾士迈. 中国小麦锈病 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 294-296
- [22] 盛宝钦. 粮食作物种质资源抗病虫鉴定方法 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1991: 13-15
- [23] 刘孝坤. 小麦抗源对条锈病的抗性遗传研究初报 [J]. 植物保护学报, 1988, 15(1): 33-39
- [24] Qi L, Friebe B, Zhang P, et al. Homoeologous recombination, chromosome engineering and crop improvement [J]. Chromosome