

张晓玲,张换换,徐新玉,杨华丽,段振盈,姚占军

(河北农业大学农学院/华北作物种质资源研究与利用教育部重点实验室,保定071001)

摘要: 为明确河北省 12 个小麦主栽品种(系)的抗叶锈性及抗叶锈基因,在苗期选用 20 个不同毒性谱的小麦叶锈菌菌系接种 12 个小麦品种(系)以及 37 个含有已知抗叶锈病基因的载体品种以进行基因推导,同时利用 11 个与已知抗叶锈病基因紧密连锁的分子标记对 12 个品种(系)进行标记检测。为进一步鉴定成株期抗性,2014-2015 年和 2015-2016 年连续 2 年分别在河北保定和河南周口对供试材料进行田间严重度调查。结果表明,在 12 个品种(系)中检测到 LrI、Lr26、LrB 和 Lr46 共 4 个抗叶锈病基因,其中 8 个品种(系)推测含有 Lr26,石新 618 可能含有 Lr1,藁优 2018 可能含有 LrB,冀5265 可能含有 Lr46。 2 年 2 点的田间鉴定结果表明,石新 733、藁优 2018 和石优 17 为侵锈品种(系),可作为抗源材料加以利用。

关键词:小麦叶锈病;基因推导;分子检测;成株抗性

Identification and Analysis of Leaf Rust Resistance Genes in 12 Main Wheat Cultivars (Lines) from Hebei Province

ZHANG Xiao-ling, ZHANG Huan-huan, XU Xin-yu, YANG Hua-li, DUAN Zhen-ying, YAO Zhan-jun

(College of Agronomy, Agricultural University of Hebei / North China Key Laboratory for Germplasm Resources of China Education Ministry, Baoding 071001)

Abstract: In order to identify the resistance and leaf rust resistance genes of 12 wheat cultivars from Hebei province, we conducted tests for leaf rust resistance using 20 *Puccinia triticina* Erikss. pathotypes at the seedling stage of 12 wheat cultivars (lines) as well as 37 cultivars (lines), which are the resistant donors with known leaf rust resistance genes. Meanwhile, marker-assisted identification using 11 molecular markers closely linked were performed. In order to identify the adult plant leaf rust resistance, the diseases severity of the tested materials was investigated by field trails in 2014-2015 and 2015-2016 cropping seasons at Zhoukou, Henan Province and Baoding, Hebei Province. Four leaf rust resistance genes including *Lr1*, *Lr26*, *LrB* and *Lr46*, were detected in 12 wheat cultivars (lines), and eight cultivars (lines) may carry *Lr26*. These cultivars Shixin 618, Gaoyou 2018 and Ji 5265 may carry *Lr1*, *LrB*, *Lr46* respectively. As indicated by field identification in two field growing seasons, Shixin 733, Gaoyou 2018 and Shiyou 17 showed slow delayed establishment of leaf rust disease symptom rusting, and they can be used as the resistance donors for breeding.

Key words: wheat leaf rust; gene postulation; molecular detection; adult-plant resistance

收稿日期: 2018-11-08 修回日期: 2018-12-04 网络出版日期: 2018-12-25

URL: http://www.doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20181108001

第一作者主要从事小麦抗锈病遗传, E-mail: m15931833996@163.com

通信作者:姚占军,主要从事小麦抗病遗传育种,E-mail:yzhj201@aliyun.com

基金项目: 国家重点研发计划 (2017YFD300901)

Foundation project: The National Key Research and Development Program (2017YFD300901)

小麦叶锈病是由小麦叶锈菌(Puccinia triticina Erikss.)引起的气传真菌病害,在华北、黄淮海地区时常发生,病害流行年份可造成 5%~15% 甚至更大产量的损失^[1-2],而且近年来有加重的趋势。叶锈菌毒性变异和抗病品种大面积单一种植,是导致品种抗性丧失的主要原因。随着全球气候变暖,适宜的气温条件将更有利于小麦叶锈病的发生和流行。选育和利用抗病品种是防治小麦叶锈病最经济、有效、环保的途径。

以往研究认为,小麦抗叶锈性主要分为垂直抗性和水平抗性,垂直抗性由主效基因控制,属单基因控制的小种专化抗性,表现在全生育期,常因叶锈菌的变异而丧失抗性;水平抗性由微效多基因控制,主要表现在植物成株期,具体表现为潜育期长,产孢量少,孢子堆小,严重度低,侵染率低,抗性相对稳定,不易丧失,有的抗性可长达数十年之久^[34]。目前,已发现100多个小麦叶锈病抗性基因,正式命名至*Lr79*^[5],其中大部分为苗期抗性基因,成株抗性基因只有12个^[6],分别为*Lr12、Lr13、Lr22a、Lr22b、Lr34、Lr35、Lr37、Lr46、Lr48、Lr49、Lr67、Lr68*,已确定的慢锈基因为*Lr34*^[7]、*Lr46*^[8]、*Lr67*^[9]和*Lr68*^[10]。

抗病基因的研究方法有多种,其中基因推导法和分子标记检测方法多用于大量试材的抗源筛选和重要基因的鉴定。基因推导法以 Flor^[11]提出的基因对基因假说为原理,推导供试材料可能携带的抗病基因。Ren等^[12]利用基因推导法在84份冬小麦材料中推导出 *Lr1、Lr3* 和 *Lr3bg* 等12个小麦抗叶锈病基因。Takele等^[13]对我国推广的83份小麦材料进行苗期基因推导,共推导出 *Lr1、Lr26* 和 *Lr3ka* 等9个小麦抗叶锈病基因。相较于基因推导法,分子标记检测通过利用特异性强、多态性高的标记,可快速检测供试材料所携带的抗病基因。闫晓翠等^[14]在30份小麦材料中检测到可能携带抗叶锈病基因 *Lr1、Lr26* 和 *Lr46*。张林等^[15]在16份河南省小麦材料中检测到可能携带抗叶锈病基因 *Lr1、Lr16* 和 *Lr26*。

本研究采用苗期基因推导与成株期抗性鉴定相结合、分子标记检测和系谱分析相结合的方法,对来自河北省的12份小麦主栽品种(系)进行抗叶锈性鉴定及基因分析,以期明确待测品种(系)所含的抗叶锈病基因并筛选具有慢锈性特点的品种,不仅为本省小麦种质库的抗叶锈性评价提供基础信息,也为小麦抗病育种提供新抗源。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的 12 个小麦主栽品种(系)均来自河北省小麦主产区,其名称及系谱见表 3。37 个含有已知抗叶锈病基因的载体品种、感病对照品种郑州5389 和成株慢锈对照品种 Saar 均由河北农业大学小麦叶锈病研究室提供。基因推导所用的 20 个叶锈菌系以及田间接种所用的混合生理小种(THTS、THTQ、PHPS 和 THTT)均由单孢分离纯化所得,保存于河北农业大学小麦叶锈病研究室。小种命名根据 Long 等[16]提出的方法。

1.2 苗期抗叶锈性鉴定及基因推导

将供试的12个小麦品种(系)、37个含有已知抗锈病基因的载体品种及感病对照郑州5389共50份材料,编号后播于温室的育苗穴盘中,每份材料种5~7粒,共播种20套。当小麦长到1心1叶时,采用人工扫抹法分别将20个小麦叶锈菌菌种均匀地接种到小麦叶片上,黑暗保湿24h后,将其移入光照温室内培养12~14d,待感病对照品种郑州5389充分发病后,按照Roelfs等[17]的分级标准进行侵染型鉴定,其中0~2+级划为抗病类型,3~4级划为感病类型。根据Dubin等[18]提出的原则对12个品种(系)进行基因推导。

1.3 成株期抗叶锈性鉴定

2014年和2015年11月上旬将12份小麦供试材料、慢锈对照品种Saar和感病对照品种郑州5389分别种在河北农业大学试验田(115.47°E,38.85°N)和河南周口试验田(114.53°E,33.80°N)。采用条播法种植,行长1.5m,行距0.2m,每10行种植1行感病品种郑州5389作为对照,两侧垂直种植感病品种郑州5389作为诱发行,四周种植黑麦保护行。次年4月上旬开始田间接种,将菌种(THTS、THTQ、PHPS和THTT)等量混合,制成0.3~0.5g/L孢子悬浮液(加入0.03%吐温20),喷雾接种于诱发行,黑暗保湿12~16h后,待其发病。当感病对照品种充分发病时,参照Li等[19]的方法进行田间调查,同时记载侵染型、严重度和普遍率,并计算病情指数,病情指数=严重度×普遍率。

1.4 目的基因的分子鉴定

采用 CTAB 法[20]提取小麦幼叶基因组 DNA,利用分光光度计检测样品 DNA 的浓度和纯度,再用 ddH_2O 将 DNA 原液稀释成浓度为 40 $ng/\mu L$ 的 PCR 工作液备用。选用 11 个已知且与抗叶锈病

基因紧密连锁的分子标记进行检测,其反应程序见表 1。PCR 体系为 20 μ L,包括 2 μ L 40 ng/μ L DNA 模板、2 μ L 4 mol/μ L 引物、10 μ L 2 × Tap PCR Mix

和 6 μL ddH₂O,根据扩增产物分子量的大小分别用 1.5% 琼脂糖或 12% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进 行检测。扩增试验均独立重复 2 次。

表 1 分子标记的引物序列及 PCR 扩增程序

Table 1 Primer sequences and PCR amplification procedures

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 $(5' \rightarrow 3')$ Sequence of primer $(5' \rightarrow 3')$	反应程序 Cycle condition	标记类型 Marker type	参考文献 Reference
Lrl	WR003 F WR003 R	GGGACAGAGACCTTGGTGGA GACGATGATGATTTGCTGCTGG	94 °C 5 min; 35cycles (94 °C 1 min; 65 °C 1 min; 72 °C 1 min); 72 °C 10 min; 10 °C, forever	STS	[21]
Lr9	J13/1 J13/2	TCCTTTTATTCCGCACGCCGG CCACACTACCCCAAAGAGACG	94 °C 6 min; 35cycles (94 °C 1 min; 68.5 °C 1 min; 72 °C 2 min); 72 °C 10 min; 10 °C , forever	STS	[22]
Lr10	Fl.2245 Lr10-6/r2	GTGTAATGCATGCAGGTTCC AGGTGTGAGTGAGTTATGTT	94 °C 3 min; 35cycles (94 °C 45s; 60 °C 45s; 72 °C 30s); 72 °C 3 min; 10 °C , forever	STS	[23]
Lr19	SCS265 F SCS265 R	GGCGGATAAGCAGAGCAGAG GGCGGATAAGTGGGTTATGG	94 °C 5 min; 35cycles (94 °C 1 min; 65 °C 1 min; 72 °C 2 min); 72 °C 10 min; 10 °C, forever	SCAR	[24]
Lr19	SCS253 F SCS253 R	GCTGGTTCCACAAAGCAAA GGCTGGTTCCTTAGATAGGTG	94 °C 5 min; 35cycles (94 °C 1 min; 60 °C 1 min; 72 °C 2 min); 72 °C 10 min; 10 °C, forever	SCAR	[24]
Lr20	STS638 L STS638 R	ACAGCGATGAAGCAATGAAA GTCCAGTTGGTTGATGGAAT	94 °C 5 min; 35cycles (94 °C 1 min; 60 °C 1 min; 72 °C 2 min); 72 °C 10 min; 10 °C, forever	STS	[25]
Lr24	J9/1 J9/2	TCTAGTCTGTACATGGGGGC TGGCACATGAACTCCATACG	94 °C 5 min; 35cycles (94 °C 1 min; 60 °C 1 min; 72 °C 2 min); 72 °C 10 min; 10 °C, forever	STS	[26]
Lr26	ω-secalin F $ω$ -secalin R	ACCTTCCTCATCTTTGTCCT CCGATGCCTATACCACTACT	94 °C 5 min; 35cycles (94 °C 1 min; 65 °C 1 min; 72 °C 2 min); 72 °C 10 min; 10 °C, forever	STS	[27]
Lr26	Glu-B3 F Glu-B3 R	GGTACCAACAACAACAACCC GTTGCTGCTGAGGTTGGTTC	94 °C 5 min; 35cycles (94 °C 1 min; 65 °C 1 min; 72 °C 2 min); 72 °C 10 min; 10 °C, forever	STS	[28]
Lr34	csLV34 F csLV34 R	GTTGGTTAAGACTGGTGATGG TGCTTGCTATTGCTGAATAGT	94 °C 5 min; 35cycles (94 °C 1 min; 55 °C 1 min; 72 °C 2 min); 72 °C 10 min; 10 °C, forever	STS	[29]
Lr46	csLV46G22 F csLV46G22 R	TCGACTTTGGAATGGAGTTGC GGCGAAGATGCCATCATCCACCG	94 °C 5 min; 35cycles (94 °C 1 min; 60 °C 1 min; 72 °C 2 min); 72 °C 10 min; 10 °C, forever	STS	[30]

2 结果与分析

2.1 苗期抗叶锈性鉴定和基因推导

37个含有已知抗叶锈病基因的载体品种,12份待测品种(系)及感病对照郑州5389在苗期侵染型鉴定结果见表2。结果显示,37个载体品种中,携带 Lr9、Lr24、Lr15、Lr19、Lr20、Lr28、Lr29、Lr42、Lr47和 Lr51的10个载体品种对所有小种均表现为抗病,而携带 Lr2c、Lr3和 Lr11的载体品种对所有小种均表现为感病,故这13个载体品种所携带的抗叶锈病基因无法通过基因推导确定,其余24个携带有不同抗叶锈病基因的载体品种对20个叶锈菌系均表现出不同的抗病性。其中,石新618、石新733、衡观35、河农827、衡136、石麦16、冀5265、冀麦26及 Lr26 载体品种对PBJN、PBGB、PGGJ、

PGKN、PGGT、PGQT、TBGT 和 KGTT 这 8 个小种均表现抗病,且 8 个供鉴品种的抗性谱均包含 Lr26 载体品种的抗性谱,表明这些品种(系)可能含有 Lr26。石新 618 和 Lr1 载体品种均对 FHGN、FHJQ 和 KGTT 这 3 个小种表现抗病,且供鉴品种的抗性谱包含 Lr1 载体品种的抗性,推测石新 618 可能携带有 Lr1。而藁优 2018 和 LrB 均对 THTP、PGGJ、PHGJ 和 PHSS ②这 4 个小种表现抗病,且供鉴品种的抗性谱包含 LrB 载体品种的抗性谱,说明其可能含有 LrB。冀 6358 仅对 PGGJ 和 PHSS ①表现抗病,且载体品种中不含有与冀 6358 相一致的抗性谱;石优 17 和沧 6003 对供试的 20 个小种均表现感病,因此,推测冀 6358、石优 17 和沧 6003 这 3 个品种(系)不含有供试的抗病基因或可能携带其他未知的抗病基因。

Table 2 Seedlings infection types on 37 wheat lines with known leaf rust resistance genes, 12 wheat cultivars (lines) and Zhengzhou 5389 inoculated with 20 pathotypes of 表 2 37 个含有已知抗叶锈病基因载体品种、12 个小麦品种(系)和郑州 5389 对 20 个菌系相互作用的苗期侵染型 P. triticina Erikss.

r. trucina Erikss	KSS.																			
品系(基因)							对中级	属生理小	· 种的侵等 	对叶锈菌生埋小种的侵染型 Infection types to P. triticina Erikss. race	on types	to P. tritic.	ina Erikss	. race						
Line (gene)	THTP	PBJN	PBGB	PGGJ	FHGN	FHJQ	PHTT	THGS	PHGJ	PHQS	PHGR	PGKN	PGGT	PGQT	TBGT	PHKS	KGTT	PHGS	PHSS ^①	PHSS ®
RL6003 (LrI)	3	4	4	4	0	••	4	3	3	3	3+	3	3	4	4	4	-	3	4	3+
RL6016 (<i>Lr2a</i>)	3	-	; 1	_	-	-	+	3	1;	••	••	0	0	••	3	2	4	2	2+	;
RL6047 (Lr2c)	3	3	3	3	3+	3	4	3	3	3c	3	3	3	3	3	4	4	3	3+	4
RL6002 (Lr3)	3	3	3	3+	4	3	3+	3	3	3+	3+	33	4	3с	3	4	4	4	3+	4
RL6010 (Lr9)	0	-	0	0	0	0	0	0	0	;1	0	0	0	_	0	0	0	0	0	0
$\mathbb{RL}6005 (LrI6)$	3+	;1	_	3	3	3	4	3	3	3+	3	3	3	3	2+	4	4	3+	4	4
RL6064 (Lr24)	;	0	0	; 1	0	; 1	0	;	••	••	_	0	0	0	;	_	••	; 1	;	;
RL6078 (Lr26)	3	;1	0	2	33	3	4	3	3	33	4	0	; 1	0	0	4	2	3+	4	3+
RL6007 (Lr3ka)	3	7	5+	2	7	2	3+	_	7	3	+	0	; 1	3c	0	2+	4	2	3+	г
RL6053 (<i>LrII</i>)	3	3	3	33	3+	3	4	3	3	33	3	33	33	3	3	3	8	3+	3+	4
$\mathrm{RL6008}\left(LrI7\right)$	3	3	_	2	7	3	4	2	+	2+	2	3	2+	2	2	3	4	5+	3+	С
$\mathrm{RL}6049 \left(Lr3\theta\right)$	3	5+	_	2	; 1	2	3+	+	7	7	;1	33	2+	7	; 1	3+	4	2	-	7
RL6051 (LrB)	_	3	4	-	3	3	4	3	1	3+	3+	3	3	3	3	3+	4	4	3+	1
${\rm RL6004}(LrI\theta)$	0;	; 1	2	33	7	3	3	3	3	3	4	2	3	3	3	4	4	4	3	4
RL6013 (<i>Lr14a</i>)	3+	3	2+	3	3	2+	4	3	3с	3+	2+	3	3c	3	3	3+	3+	3	3	3+
RL6009 (Lr18)	3	5 +	5+	5+	7	_	4	2+	_	+	3	0	3	3	3	7	3	2	7	7
RL6019 (Lr2b)	-	+	<u>+</u>	2	4	5+	+	7	+	+	+	••	2	_	3	3+	4	ж	2+	4
RL6042 (Lr3bg)	3	3	5+	33	33	3	4	5 ⁺	3	3	3	3	3	2+	5+	4	4	4	3+	3+
RL4012 (Lr13)	3	3	2	0	3	3	4	3	-	3	4	8	3	3	3	3+	4	3+	3+	4
$RL6006 \left(LrI4b \right)$	3	••	5+	5+	••	3	3+	3	3	3+	3	;1	3	3	3	3+	8	4	4	4
RL6052 (<i>Lr15</i>)	7	;1	+	-		; 1	7		••	; 1	;1	5+	••	-	;1	-	2	1	;1	5+
$RL6040 \left(LrI9 \right)$	••	0;	0	0	;0	7	0	0	0	0	0;	0;	0	1	0	0	-	0	0	0
RL6092 (Lr20)		; 1	••	; 1		-1	••	0	1		••	0	7	••	:1	-	;1	;	+	1
RL6043 (<i>Lr21</i>)	3	3	5+	2	3	2	3	5 ⁺	+	2+	7	2	3	3	3	4	3	3+	3+	3
RL6012 (Lr23)	8	33	5+	5+	С	5+	3+	3	2	2+	5+	2	3	3	3	3+	4	3+	4	г
RL6079 (Lr28)	1;	0;	0	0	-	0;	••	••	0	0	+	0	0;	0		-	0	0	-	0

表 2(续)

品系(基因)							对叶锐	对叶锈菌生理小种的侵染型 Infection types to P. triticina Erikss. race	、种的侵落	沙型 Infect	ion types	to P. tritic	ina Erikss	. race						
Line (gene)	THTP	PBJN	PBGB	PGGJ	FHGN	FHJQ	PHTT	THGS	PHGJ	PHQS	PHGR	PGKN	PGGT	PGQT	TBGT	PHIKS	KGTT	PHGS	PHSS [®]	PHSS [®]
RL 6080 (Lr29)	;1	2	2	;	2	2	_	+	2	2	;	+	_	2	_	_	_	2+	2	;1
RL6057 (Lr33)	3+	3	1	2	3	3	3	3	3	3	3	3с	3	3	3	3+	3+	4	3+	3
E84018 (<i>Lr36</i>)	_	3	2	2+	5+	_	4	2+	2	2+	2	3	2+	+	2+	3+	4	5+	3	3
KS86NGRC02 (Lr39)	3	3	2+	5+	3	5+	4	3c	5+	5+	3	3+	2	3	3	3+	4	3	3+	4
KS91WGRC11 (Lr42)	••	; 1	;1	••	••	;1	5+	_	_	••	;1	••	;1	;	;	2	••	_	2	7+
RL6147 (Lr44)	;1	7	2+	2	4	2	_	2	<u>+</u>	-	2+	-	2	3с	2+	3+	••	5+	2	4
RL6144 (Lr45)	3	3c	3c	3	2	5+	3	7+	2	2	3	3с	3	2+	3	4	4	0	4	4
PAVON76 (<i>Lr47</i>)	0	; 1	-	0	2	0	••	0	<u>+</u>	0;	0	; 1	••	+	0	••	0	••	0	_
C78.5 (Lr51)	;1	; 1	••	••	0	;1	••	••	••	;1	::	••	••	••	. :	_	0	0	5+	••
98M71 (<i>Lr53</i>)	3+	0	0	3	; 1	3+	0	3+	3	0	3+	0	3+	0	3	4	3+	4	0	••
RL6144 (<i>Lr35</i>)	3	3	3	3	3	3	3+	3	5+	+	3	3	3	33	3	4	4	2	4	33
石新 618 Shixin 618	3c	;1	0	; 1	••	_	4	3	3+	3	3	1	;1	+	5+	3с	2	3+	3	8
石新 733 Shixin 733	3	2+	2+	2	3	3с	3+	3+	3	3	4	2	2	2+	5+	3+	2	3+	3	4
衡观 35 Hengguan 35	3	••	0	7+	3	3	4	3	3с	3с	3с	5+	2	+	5+	3+	5+	3с	_	8
河农 827 Henong 827	-	5+	;	7	3	3с	4	3	3	3	3с	5 ⁺	5+	7	5+	4	2	3+	3+	4
藁优 2018 Gaoyou 2018	2	3c	4	-	3	33	3+	3	-	3	3с	3	3	3+	3	4	3+	3c	-	-
石优 17 Shiyou 17	3	3	3c	3-	3	33	3+	3	3с	3	3	3	4	3c	3c	3+	3	3+	3	3+
衡 136 Heng 136	3	5+	;	7	3	3	3+	3	3	3	0	7+	7+	_	5+	4	5+	3c	3+	8
沧 6003 Cang 6003	3	3	3с	3	3	3	4	3	3	3+	3+	3	3	3с	3	3+	3	3+	3+	3+
石麦 16 Shimai 16	3	2	-	7+	3	3+	3+	3с	3	3с	3	5+	5+	2+	2+	3+	2	4	3	33
冀 6358 Ji 6358	3	3	3	2-	3	3с	3+	3	3	3	3с	3	3+	33	3	3+	4	3+	_	33
冀 5265 Ji 5265	3+	-	7	2	4	33	3	4	3	3	4	2	5+	1	2	3	-	3	3+	-
冀麦 26 Jimai 26	3	7	;1	7	3	3	8	8	3	8	3	5 ⁺	5 +	7	5 +	3+	7	3	3	3+
郑州 5389 Zhengzhou 5389	4	4	3+	4	4	4	4	4	4	4	4	3+	4	4	4	4	4	4	4	4
侵染型:0=免疫;";"=高抗无孢子堆;1=孢子堆小且有坏死斑;2=孢子	元孢子	€ ; 1= 孢	子堆小垣	[有坏死]	斑; 2= 狍-	子堆小且	有坏死政	子堆小且有坏死斑或伴随褪绿; 3= 孢子堆中等且伴随褪绿; 4= 孢子堆大且无坏死或褪绿; += 孢子堆比正常的大;	退绿;3=	孢子堆中	1等且伴	道褪绿;4	1 抱子堆	大且无	不死或褪	绿; += 孢	1子堆比1	正常的大	;——狍子	-= 孢子堆比正

· 尚ر元之他于难;1= 很子堆小且有坏死斑;2= 孢子堆小且有坏死斑或伴随褪绿;3= 孢子堆中等且伴随褪绿;4= 孢子堆大且无坏死或褪绿;+= 孢子堆比正常的大;——孢子堆比正常的重;①和②:命名相同的毒性不同的生理小种 常的小; c= 褪绿斑比正常的重; ①和②: 命名相同的毒性不同的生理小种

ITs: 0 = immune, ";" = hypersensitive fleck with no sportulation, 1 = small uredinia with necrosis, 2 = small uredinia with chlorosis, 3 = moderate size uredinia without chlorosis or necrosis, 4 = large uredinia

2.2 目的基因的分子检测

利用已知的 11 个与小麦叶锈病基因紧密连锁的 STS 和 SCAR 分子标记对 Lr1、Lr9、Lr10、Lr19、Lr20、Lr24、Lr26、Lr34、Lr46 进行分子检测(表 1、表 3)。结果显示,在供试品种中仅扩增出 Lr1、Lr26和 Lr46的特异性目的片段,未扩增出 Lr9、Lr10、Lr19、Lr20、Lr24和 Lr34的特异性目的片段。其中与 Lr1 连锁的标记引物 WR003 在石新 618 中可扩增出相应的特异性片段,表明石新 618 可能含有

Lr1;与Lr26连锁的正相关分子标记引物 ω-secalin 在石新 618、石新 733、衡观 35、河农 827、衡 136、石麦 16、冀 5265 和冀麦 26 中均能扩增出特异性片段,而这些品种在负相关分子标记(不能在含有目的基因的品种中扩增出目的片段的分子标记) Glu-B3 中均未扩增出特异性片段,表明这 8 个品种(系)可能存在抗病基因 Lr26;仅冀 5265 可扩增出 Lr46 的特异性片段,推测含有成株抗叶锈病基因 Lr46。

表 3 12 个小麦品种(系)的系谱及可能含有的抗叶锈性基因鉴定结果

Table 3 The pedigree and outcome of marker-assisted resistance genes for leaf rust resistance of 12 wheat cultivars (lines)

品种 Cultivar	系谱 Pedigree	基因推导结果 Lr gene based on gene postulation	标记检测结果 Lr gene based on gene marker detection	综合鉴定结果 Comprehensive result
石新 618 Shixin 618	(4512/523) /735-10	Lr1, Lr26	Lr1, Lr26	Lr1 , Lr26
石新 733 Shixin 733	大拇指矮 / 石新 163	Lr26	Lr26	Lr26
衡观 35 Hengguan 35	衡 84 观 749/ 衡 87-263	Lr26,+	Lr26	Lr26,+
河农 827 Henong 827	临远 95-3091/ 石 4185	Lr26, +	Lr26	Lr26,+
藁优 2018 Gaoyou 2018	9411/98172	LrB, $+$	-	LrB, $+$
石优 17 Shiyou 17	冀 935-352/ 鲁麦 21	+	-	+
衡 136 Heng 136	衡 4119/ 石家庄 1 号	Lr26, +	Lr26	<i>Lr26</i> , +
沧 6003 Cang 6003	临汾 6154/ 冀麦 32	+	-	+
石麦 16 Shimai 16	豫麦 31/ 石 96-4495	Lr26	Lr26	Lr26
冀 6358 Ji 6358	太谷核不育轮选	+	-	+
冀 5265 Ji 5265	冀 5006/ 科农 9204	Lr26,+	Lr26, Lr46	Lr26, Lr46, +
冀麦 26 Jimai 26	(矮秆早 × 洛夫林 10 号) F ₁ /津丰 1 号	Lr26	Lr26	Lr26

^{+:} 含有未知抗病基因; -: 未能检测出抗病基因

2.3 田间成株期抗病性鉴定

2014-2015 年度和 2015-2016 年度12个小麦品种(系),慢锈性对照品种 Saar 和感病对照品种郑州5389 在成株期对混合小种的抗性鉴定结果见表4。根据中华人民共和国行业标准(NY/ZB592.2-2007),侵染型为3~4型,且病情指数小于30%的品种为慢叶锈性品种。2年2点的田间鉴定结果表明,石新733、藁优2018和石优17在成株期对混合小种均表现为感病,在成株期病情指数分别为17.81%、3.13%和10.21%,为慢锈品种。

3 讨论

本试验在 12 个供试小麦品种(系)中共鉴定出可能携带 *Lr1、Lr26、LrB* 和 *Lr46* 等 4 个抗病基因,

其中 8 个品种(系)含有 Lr26, Lr26 基因出现频率 高达 66.67%,而 Lr26来源于含有 1RS 染色体的黑 麦,20 世纪 70 年代初,育种家鉴于其田间抗性良好 且综合农艺性状优良在我国迅速推广此类品种,但 因单一抗源的广泛普及,目前该基因已丧失抗病性。 Lr1 仅存在于石新 618 中, Cloutier 等[31]研究证明,虽然 Lr1 基因在我国的有效抗病性逐渐降低,但是由于其具有超敏反应,且与 Lr13a 等基因互作时可提高小麦的抗叶锈性。因此,石新 618 可通过基因聚合的方式加以利用。Lr34 和 Lr46 为慢锈性基因,具有持久抗病性,本试验中供试品种含有 Lr34 或 Lr46 的品种(系)所占比例较低,说明在河北省并未充分推广利用。目前 Lr34 已经被成功克隆[32],未来在抗病育种方面具有极高的应用潜力。

^{+:} unknown resistance genes, -: no resistance gene detected

表 4 在 2014-2015 年度和 2015-2016 年度 12 个小麦品种(系)、慢锈对照 Saar 和感病对照郑州 5389 成株期对混合小种的 侵染型、最终病害严重度和病情指数

Table 4 Infection types (IT) to *Puccinia triticina* Erikss. pathotype mixed species, final disease severity (FDS) and disease index in the field experiments in the 2014-2015 and 2015-2016 growing seasons for 12 wheat cultivars (lines), slow rusting cultivar Saar and susceptible cultivar Zhengzhou 5389

品种名称	成株期对混合小种 的侵染型		重度(%) ng FDS		重度 (%) ou FDS	严重度平 均值(%)	病情指数(%)
Cultivar name	Seedling IT to mixed pathotypes	2014-2015 年度 In 2014-2015	2015-2016 年度 In 2015-2016	2014-2015 年度 In 2014-2015	2015-2016 年度 In 2015-2016	Average FDS	Disease index
Saar	3	1.00	3.00	1.00	3.00	2.00	2.00
石新 618 Shixin 618	4	50.00	50.00	70.00	90.00	65.00	55.25
石新 733 Shixin 733	4	7.50	17.50	20.00	30.00	18.75	17.81
衡观 35 Hengguan 35	3	10.00	60.00	70.00	60.00	50.00	40.00
河农 827 Henong 827	4	30.00	90.00	80.00	60.00	65.00	57.20
藁优 2018 Gaoyou 2018	3^{+}	7.50	1.00	3.00	1.00	3.13	3.13
石优 17 Shiyou 17	4	15.00	3.00	15.00	10.00	10.75	10.21
衡 136 Heng 136	3 ⁺	35.00	80.00	80.00	90.00	71.25	65.55
沧 6003 Cang 6003	4	20.00	30.00	30.00	40.00	30.00	30.00
石麦 16 Shimai 16	4	20.00	45.00	70.00	30.00	41.25	39.60
冀 6358 Ji 6358	3	40.00	50.00	80.00	60.00	57.50	54.05
冀 5265 Ji 5265	4	10.00	80.00	90.00	90.00	67.50	58.05
冀麦 26 Jimai 26	3	20.00	60.00	80.00	80.00	60.00	58.80
郑州 5389 Zhengzhou 5389	4	80.00	95.00	95.00	95.00	91.25	83.95

冀麦 26 由(矮秆早/洛夫林 10号)F,与津丰 1号杂交选育而来,亲本洛夫林 10号是我国从罗马 尼亚引进的小麦一黑麦(1BL/1RS)易位系品种, 含有抗叶锈病基因 Lr26[33],推测冀麦 26 中携带的 Lr26来自于亲本洛夫林10号。河农827由亲本 组合临远 95-3091/石 4185 选育而来,其中石 4185 是由太谷核不育材料,依次与多个品种聚合杂交选 育而成,其中包含冀麦 26^[34],因此河农 827 含有的 Lr26可能实质上来源于石 4185。衡 136的亲本之 一为石家庄1号,石家庄1号由石91-5096和冀麦 38 杂交选育而成,经系谱查询可知,石 91-5096 和 冀麦 38 的遗传背景中均含有洛夫林 10 号[35],由此 推测, 衡 136 含有的 Lr26 可能来源于石家庄 1号。 冀 5265 的母本为冀 5006(石 4185/冀 6203),父本 为科农 9204(豫麦 38/SA502) [36],由上述可知石 4185 和豫麦 38 的遗传背景中均含有洛夫林 10 号, 因此无法确定冀 5265 中含有的 Lr26 是来源于父本 还是母本,或者是受两者共同影响。衡观35经系 谱分析未能推测出 Lr26 的来源, 杨玉双等[37]利用 STS 标记和 SSR 标记进行复合 PCR 检测,表明衡 观 35 含有 1BL/1RS 易位系染色体,即含有 Lr26,与本试验结果一致。

河农 827 经基因推导和标记检测都表明含有 Lr26,且结合系谱分析对其来源作了解释。师丽 红等^[38]采用与本试验相同的方法,除了证明河农 827 含有 Lr26 外,还推测可能含有 Lr33。但由于仅对 Lr33 进行了基因推导,而未作其他方面的鉴定,且鉴定的时期和所用的生理小种与本试验完全不同,故无法确定该品种是否含有 Lr33,有待于进一步的鉴定。冀麦 5265 经分子检测含有慢锈性基因 Lr46,但通过成株期抗性鉴定,没有发现冀麦 5265 具有慢锈性特点,这可能与所用分子标记与目的基因遗传距离较远,或可能该种质中存在抑制 Lr46 表达的因子,亦或者 Lr46 与其他基因聚合时才会表现出良好的抗性,具体原因尚需进一步的试验确认。在今后的育种工作中冀麦 5265 可作为聚合品种的中间抗源材料加以利用。

本研究利用 37 个含有已知抗叶锈病基因的载体品种进行基因推导,所使用的载体品种数量有限,对待测品种(系)中抗叶锈基因的推导可能不完全,

不能排除或断定是否含有这 37 个基因以外的其他抗叶锈基因。Liu 等^[39]通过对我国小麦叶锈菌生理小种进行研究,将 613 株菌株划分为 79 个生理小种,其中 PHT、THT、PHJ、THJ 为目前主要的优势生理小种。因此,本试验苗期所选用的 20 个叶锈菌菌株中 THTP 和 PHTT 为优势生理小种,因而可确定所鉴定的基因为有效基因。

通过2年2点的田间抗叶锈性鉴定,石新733、 藁优2018和石优17为慢锈品种(系)。其中藁 优2018仅基因推导出可能含有苗期抗叶锈病基 因 LrB,其结果的准确性有待于开发相应的分子标 记进行验证。虽然本试验未检测出石新733、藁优 2018和石优17可能携带的成株抗叶锈病基因,但 可以进一步通过常规杂交的方法,结合分子标记 技术对未知的成株抗叶锈基因位点进行定位。沧 6003和衡136虽然不具有慢锈性,但在抗旱性、抗 寒性及耐盐性方面具有很强的抗逆性^[35,40],可用于 抗逆育种的研究。

基因推导法不受环境因素限制,可在短时间内取得鉴定结果,但该方法主要用于苗期鉴定,不适用于成株期,且待测材料含有多个抗叶锈病基因时,易有失精确,一般需结合分子标记检测进行辅助验证。但目前用于小麦叶锈病鉴定所开发的分子标记数量有限,多数抗叶锈病基因的 RFLP、RAPD、AFLP 标记还未转化为稳定的 STS 或 SCAR 标记,因此基因推导法与分子标记检测相结合仍然是抗病性鉴定不可缺少的方法。

4 结论

苗期基因推导、成株期抗叶锈性鉴定和分子标记检测结果表明,在12份河北省小麦主栽品种(系)中共发现4个已知的抗叶锈病基因,分别为Lr1、Lr26、LrB和Lr46,其中石新618含有抗叶锈基因Lr1和Lr26,冀5265含有Lr26和Lr46,石新733、衡观35、河农827、衡136、石麦16和冀麦26含有Lr26,藁优2018可能含有LrB。经田间成株期抗叶锈性鉴定,石新733、藁优2018和石优17为慢锈品种(系),未来可作为抗源材料加以利用。

参考文献

[1] 彭红,吕国强,王江蓉.河南省 2015 年小麦主要病害发生特点及原因分析.中国植保导刊, 2016, 36(4): 29-33
Peng H, Lv G Q, Wang J R. Analysis on the occurrence characteristics and causes of main wheat diseases in Henan province in 2015. China Plant Protection, 2016, 36(4): 29-33

- [2] Kolmer J A. Genetics of resistance to wheat leaf rust. Annual Review of Phytopathology, 1996, 34: 435-455
- [3] 王佳真, 师令智, 朱琳, 任志宽, 康占海, 李星, 刘大群. 小麦品种潍麦 8 号成株抗叶锈 QTL 定位. 植物遗传资源学报, 2015, 16(4): 868-871 Wang J Z, Shi L Z, Zhu L, Ren Z K, Kang Z H, Li X, Liu D Q. Molecular mapping of QTL for leaf rust resistance in Chinese wheat cultivar Weimai 8. Journal of Plant Genetic Resources, 2015, 16(4): 868-871
- [4] Das M K, Rajaram S, Mundt C C, Kronstad W E, Singh R P. Inheritance of slow rusting resistance in wheat. Crop Science, 1992, 32 (6): 1452-1456
- [5] Qureshi N, Bariana H, Kumran V V, Muruga S, Forrest K L, Hayden M J, Bansal U. A new leaf rust resistance gene *Lr79* mapped in chromosome 3BL from the durum wheat landrace Aus26582. Theoretical and Applied Genetics, 2018, 131: 1091-1098
- [6] Li Z F, Lan C X, He Z H, Singh R P, Rosewarne G M, Chen X M, Xia X C. Overview and application of QTL for adult plant resistance to leaf rust and powdery mildew in wheat. Crop Science, 2014, 54: 1907-1925
- [7] Dyck P L. The association of gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. Genome, 1987, 29: 467-469
- [8] Singh R P, Mujeeb K A, Huerta E J. *Lr46*: A gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. Phytopathology, 1998, 88: 890-894
- [9] Herrera-Foessel S A, Lagudah E S, Huerta E J, Hayden M J, Bariana H S, Singh D, Singh R P. New slow-rusting leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr67* and *Yr46* in wheat are pleiotropic or closely linked. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122; 239-249
- [10] Herrera-Foessel S A, Singh R P, Huerta E J, Rosewarne G M, Periyannan S K, Viccars L, Calvo-Salazar V, Lan C, Lagudah E S. *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 124: 1475-1486
- [11] Flor H H. Host-parasite interaction in flax rust-its genetics and other implications. Phytopathology, 1955, 45 (12): 680-685
- [12] Ren X L, Liu T G, Liu B, Gao L, Chen W Q. Postulation of seedling leaf rust resistance genes in 84 Chinese winter wheat cultivars. Journal of Integrative Agriculture, 2015, 14(10): 1992-2001
- [13] Takele W G, Yao Z J, Yan X C, Gao P, Li Z F. Identification of leaf rust resistance genes in Chinese common wheat cultivars. Plant Disease, 2017, 101: 1729-1737
- [14] 闫晓翠,李在峰,杨华丽,张换换,Takele W G,姚占军,刘大群,周悦.30个重要小麦生产品种抗叶锈性基因分析.中国农业科学,2017,50(2):272-285 Yan X C, Li Z F, Yang H L, Zhang H H, Takele W G, Yao Z J, Liu D Q, Zhou Y. Analysis of wheat leaf rust resistance genes in 30 important wheat cultivars. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(2):272-285
- [15] 张林,王静,张梦雅,许换平,闫红飞,刘大群.河南省16个主栽小麦品种抗叶锈基因分析.植物遗传资源学报,2017,18(3):546-554
 Zhang L. Wang L. Zhang M.Y. Xu, H.P. Yan H.F. Liu D.O.

Zhang L, Wang J, Zhang M Y, Xu H P, Yan H F, Liu D Q. Analysis of wheat leaf rust resistance genes in 16 main wheat

- cultivars in Henan. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, $18\,(\,3\,)$: 546-554
- [16] Long D L, Kolmer J A. A North American system of nomenclature for *Puccinia triticina*. Phytopathology, 1989, 79: 525-529
- [17] Roelfs A P, Singh R P, Saari E E. Resistance to leaf and stem rusts of wheat: concepts and methods of disease management. Mexico: CIMMYT, 1992: 42-45
- [18] Dubin H J, Torres E. Causes and consequences of the 1976-1977 wheat leaf rust epidemic in northwest Mexico. Annual Review of Phytopathology, 1981, 19: 41-49
- [19] Li Z F, Xia X C, He Z H, Li X, Zhang L J, Wang H Y, Meng Q F, Yang W X, Li G Q, Liu D Q. Seedling and slow rusting resistance to leaf rust in Chinese wheat cultivars. Plant Disease, 2010, 94 (1): 45-53
- [20] Sharp P J, Kreis M, Shewry P R, Gale M D. Location of β-amylase sequence in wheat and its relatives. Theoretical and Applied Genetics, 1998, 75 (2): 286-290
- [21] Qiu J W, Schürch A C, Yahiaoui N, Dong L L, Fan H J, Zhang Z J, Keller B, Ling H Q. Physical mapping and identification of a candidate for the leaf rust resistance gene *Lr1* of wheat. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115 (2): 159-168
- [22] Schachermayr G, Siedler H, Gale M D, Winzeler H, Winzeler M, Keller B. Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 88 (1): 110-115
- [23] Schachermayr G, Feuillet C, Keller B. Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust resistance gene *Lr10* in diverse genetic backgrounds. Molecular Breeding, 1997, 39 (1): 65-74
- [24] Gupta S K, Charpe A, Prabhu K V, Haque Q M R. Identification and validation of molecular markers linked to the leaf rust resistance gene *Lr19* in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 113 (6): 1027-1036
- [25] Neu C, Stein N, Keller B. Genetic mapping of the *Lr20-Pm1* resistance locus reveals suppressed recombination on chromosome arm 7AL in hexaploid wheat. Genome, 2002, 45 (4): 737-744
- [26] Schachermayr G M, Messmer M M, Feuillet C, Winzeler H, Winzeler M, Keller B. Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 90 (7): 982-990
- [27] Chai J F, Zhou R H, Jia J Z, Liu X. Development and a new codominant PCR marker for detecting 1BL.1RS wheat-rye chromosome translocations. Plant Breeding, 2006, 125 (3): 302-304
- [28] Froidmont D D. A codominant marker for 1BL/1RS wheat-rye translocation via multiplex PCR. Journal of Cereal Science, 1998, 27; 229-232
- [29] Lagudah E S, Mcfadden H, Singh R P, Huerta E J, Bariana H S, Spielmeyer W. Molecular genetic of the *Lr34/Yr18* slow rusting resistance gene region in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 114(1): 21-30
- [30] Kazuhiro S, Singh R P, Manilal H M. Tagging of leaf rust resistance genes, *Lr34* and *Lr46*, using microsatellite markers in wheat. JIRCAS Research Highlights, 2001, 8-9

- [31] Cloutier S, McCallum B D, Loutre C. Leaf rust resistance gene *Lr1* isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large *psr567* gene family. Plant Molecular Biology, 2007, 65 (1-2): 93-106
- [32] Krattinger S G, Lagudah E S, Spielmeyer W, Singh R P, Huerta E J, Mcfadden H, Bossolini E, Selter L L, Keller B. A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogen in wheat. Science, 2009, 323: 1360-1363
- [33] 潘阳, 聂迎彬, 穆培源, 姚占军, 李星, 周悦, 李在峰, 刘大群. 新疆的小麦品种(系)苗期和成株期抗叶锈病鉴定. 植物遗传资源学报, 2011, 12(2): 203-210 Pan Y, Nie Y B, Mu P Y, Yao Z J, Li X, Zhou Y, Li Z F, Liu D Q. Seedling and slow rusting resistance to leaf rust of wheat cultivars in Xinjiang province. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(2): 203-210
- [34] 傅晓艺,郭进考,刘艳滨,史占良,单子龙,韩然,何明琦.利用石4185为骨干亲本培育高产小麦新品种.种子,2017,36(12):95-99 Fu XY, Guo J K, Liu Y B, Shi Z L, Shan Z L, Han R, He M Q. New wheat varieties with high yield of core parent breeding by

using Shi 4185. Seed, 2017, 36 (12): 95-99

- [35] 孟祥海, 陈秀敏, 鲍聪, 乔文臣, 魏建伟, 孙书变, 李丁, 李强, 赵明辉, 李慧敏, 赵凤梧. 抗旱节水冬小麦新品种衡 136 主要性状分析与评价. 河北农业科学, 2016, 20(1): 60-64
 Meng X H, Chen X M, Bao C, Qiao W C, Wei J W, Sun S B, Li D, Li Q, Zhao M H, Li H M, Zhao F W. Analysis and resistant and evaluation of main characters of winter wheat varieties Heng 136 with drought-water-saving. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2016, 20(1): 60-64
- [36] 刘玉平,王江浩,赵爱菊,李亚军,陈希勇.高产广适冬小麦新品种冀 5265 的选育.河北农业科学, 2009, 13(2):60-61 Liu Y P, Wang J H, Zhao A J, Li Y J, Chen X Y. Breeding of a new winter wheat variety Ji 5265 with high yield and wide adaptability. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2009, 13 (2):60-61
- [37] 杨玉双,李强,王道文,陈秀敏,张坤普. 国审小麦品种'衡观 35'中重要农艺性状控制基因的检测和分析. 中国农学通报, 2014, 30(9): 105-112

 Yang Y S, Li Q, Wang D W, Chen X M, Zhang K P. Detection and analysis of agronomically important genes in the national certified wheat variety 'Hengguan 35'. Chinese Agriculhiral Science Bulletin, 2014, 30(9): 105-112
- [38] 师丽红,张娜,胡亚亚,杨文香,刘大群.10个小麦新品种(系)抗小麦叶锈性评价. 中国农业科学,2011,44(14):2900-2908

 Shi L H, Zhang N, Hu Y Y, Yang W X, Liu D Q. Evaluation of wheat leaf rust resistance of 10 new wheat cultivars (lines). Scientia Agricultura Sinica, 2011,44(14):2900-2908
- [39] Liu T G, Chen W Q. Race and virulence dynamics of *Puccinia triticina* in China during 2000-2006. Plant Disease, 2012, 96: 1601-1607
- [40] 于亮,钮力亚,王奉芝,陆莉,王伟伟,赵松山,王连鹏. 临汾 6154/ 冀麦 32 小麦组合的育种利用. 作物研究,2017,31 (2):115-121
 - Yu L , Niu L Y , Wang F Z , Lu L , Wang W W , Zhao S S , Wang L P. Study on the breeding and usage of wheat combination of Linfen 6154 /Jimai 32. Crop Research , 2017 , 31 ($^\circ$ 2): 115-121