

# 抗白粉病基因 *PmCH1302* 的遗传分析及染色体定位

张晓军<sup>1</sup>, 马原丽<sup>2</sup>, 郭慧娟<sup>1</sup>, 张小辉<sup>2</sup>, 乔麟轶<sup>1</sup>, 李欣<sup>1</sup>, 詹海仙<sup>1</sup>, 畅志坚<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>山西省农业科学院作物科学研究所/作物遗传与分子改良山西省重点实验室, 太原 030031;

<sup>2</sup>山西大学研究生院, 太原 030006; <sup>3</sup>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)

**摘要:** CH1302 是以来源于中间偃麦草的八倍体小偃麦 TAI7047 为桥梁亲本选育的高抗白粉病的小麦新品系, 对白粉菌多个流行小种均表现出良好抗性。为了解其抗白粉病基因来源及其在染色体上的位置, 对绵阳 11 × CH1302 的 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub> 及 F<sub>2:3</sub> 家系进行了遗传分析, 推断其抗白粉病基因可能来源于中间偃麦草, 暂将其命名为 *PmCH1302*。利用 iSelect 90K SNP 芯片对抗、感病池进行扫描, 发现位于 2AL 染色体上的多态性位点最多, 为 313 个, 占全部多态性位点的 9.79%, 且集中于 2AL 染色体 100 ~ 105 cM 和 150 ~ 155 cM 两个区域附近。在上述位点选取 SSR 标记, 筛选出 3 对与 *PmCH1302* 连锁的分子标记, *Xwmc522*、*Xgwm356* 和 *Xgwm526*, 其中 *Xgwm356* 和 *Xgwm526* 位于 *PmCH1302* 两侧, 连锁距离分别为 3.1 cM 和 7.8 cM。利用遗传图谱以及中国春缺体、双端体将 *PmCH1302* 定位于小麦 2AL 染色体上。进一步与位于 2AL 上的 *Pm4*、*Pm50* 比较发现, *PmCH1302* 可能是位于 2AL 上的一个新基因或等位基因。

**关键词:** 中间偃麦草; 白粉病抗性; SNP; SSR; 连锁图谱

## Genetic Analysis and Chromosomal Localization of Powdery Mildew Resistance Gene *PmCH1302*

ZHANG Xiao-jun<sup>1</sup>, MA Yuan-li<sup>2</sup>, GUO Hui-juan<sup>1</sup>, ZHANG Xiao-hui<sup>2</sup>,

QIAO Lin-yi<sup>1</sup>, LI Xin<sup>1</sup>, ZHAN Hai-xian<sup>1</sup>, CHANG Zhi-jian<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Crop Science, Shanxi Academy of Agricultural Sciences/Shanxi Key Laboratory of Crop Genetics and Molecular Improvement, Taiyuan 030031; <sup>2</sup>Graduate School of Shanxi University, Taiyuan 030006; <sup>3</sup>Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau of Ministry of Agriculture, Taiyuan 030031)

**Abstract:** CH1302, a new wheat germplasm crossing common wheat (Jintai170) and wheat-*Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D. R. Dewey partial amphidiploids (TAI7047), possesses resistance to the powdery mildew. To disclose the genetic mechanisms behind this resistance, the CH1302 cultivar was crossed with a susceptible genotype Mianyang 11. Segregation of resistance race Bgt E09 was assessed in the F<sub>2</sub> population and F<sub>2:3</sub> lines under controlled conditions. Results indicated that CH1302 carried a dominant gene (therefore named *PmCH1302*) for powdery mildew resistance. ISelect 90K SNP chip was used to develop a mapping population with F<sub>2</sub> individuals analysis the disease resistance and susceptible pools of F<sub>2</sub> population Mianyang11 × CH1302, and detected 313 polymorphism SNP locus in wheat chromosome arm 2AL. Then three codominant SSR markers around the polymorphism SNP locus, *Xwmc522*, *Xgwm356* and *Xgwm526*, were identified to be linked with *PmCH1302*. Finally, *PmCH1302* was mapped between SSR markers *Xgwm356* and *Xgwm526* on chromosome 2AL, and the map distance was 3.1 cM and 7.8 cM, respectively. Furthermore, our results also showed *PmCH1302* may be a new powdery mildew resistance gene.

**Key words:** *Thinopyrum intermedium*; resistance to powdery mildew; SNP; SSR; linkage map

收稿日期: 2016-06-27 修回日期: 2016-07-27 网络出版日期: 2017-02-17

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170217.1414.024.html>

基金项目: 国家重点研发计划(2016YFD0102004-07); 山西省自然科学基金(201601D102051, 201601D011001); 山西省农科院重点项目(YZD1501); 山西省农业攻关项目(20150311001-1); 国家青年基金(31601303)

第一作者研究方向为小麦种质创新与新基因发掘。E-mail: zxjemail@163.com

通信作者: 畅志坚, 研究方向为小麦种质创新和外源基因导入。E-mail: wrczj@126.com

小麦白粉病是由 *Blumeria graminis* f. sp. *Triticici* 引起的真菌性病害,在全世界小麦种植区普遍发生,一般可使小麦减产 13% ~ 34%,重灾年份减产可达 50%<sup>[1]</sup>。培育和种植抗病品种是防治小麦白粉病为害的有效措施,但是由于小麦大规模产业化发展,一些麦区长期种植单一品种,加速了白粉菌生理小种的变异,现有抗病品种很快丧失抗性<sup>[2]</sup>。因此,在小麦抗病品种选育中,急需发掘与利用新的抗病基因,做到抗白粉病基因的合理布局,延长抗病品种的“寿命”。

利用远缘杂交从近缘种中导入新的抗病基因,可以有效拓宽小麦的遗传基础<sup>[3]</sup>,从而实现小麦抗病育种中抗源多样化。经过国内外学者多年研究开发,小麦的野生近缘种已成为抗病基因的重要来源。抗白粉病基因 *Pm16*、*Pm26*、*Pm30*、*Pm31*、*Pm36*、*Pm41*、*Pm42*、*Pm49* 来源于野生二粒小麦<sup>[4-5]</sup>,*Pm6*、*Pm27*、*Pm37*、*Pm33* 来源于提莫菲维小麦<sup>[6-7]</sup>,*Pm1b*、*Pm4d* 来源于栽培一粒小麦<sup>[5]</sup>,*Pm1d*、*Pm12*、*Pm32*、*Pm53* 来源于拟斯卑尔脱山羊草<sup>[8]</sup>,*Pm21* 来源于簇毛麦<sup>[9]</sup>,*Pm7*、*Pm8*、*Pm17*、*Pm20* 来源于黑麦属<sup>[10]</sup>,*Pm40*、*Pm43* 来源于中间偃麦草<sup>[11-12]</sup>,*Pm51* 来源于长穗偃麦草<sup>[13]</sup>。

多年生野生草本植物中间偃麦草 (*Thinopyrum intermedium* (Host) Barkworth & D. R. Dewey) 完全免疫小麦白粉、叶锈、条锈、秆锈等病害,还高抗黑穗病、叶枯病等多种小麦病害<sup>[14]</sup>。近年来,中间偃麦草已在小麦遗传改良中得到广泛应用,选育出高抗白粉病、条锈病甚至兼抗多种病害的八倍体小偃麦和小偃麦附加系、代换系及其易位系<sup>[15]</sup>,并将抗白粉病基因 *Pm40* 和 *Pm43* 分别定位于小麦的 7BS 和 2DL 染色体上。本研究利用来源于中间偃麦草的小偃麦 TAI7047 与普通小麦晋太 170 进行杂交,并用晋太 170 回交 1 次,在其自交  $F_6$  株系中选育出高抗白粉病的小麦品系 CH1302,并对其白粉病抗性进行了遗传分析与染色体定位,旨在为利用其抗白粉病基因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 CH1302、感病亲本绵阳 11 及其  $F_1$  杂交种、CH1302 的亲本八倍体小偃麦 TAI7047 和普通小麦晋太 170,以及 TAI7047 的亲本中间偃麦草和太原 768、晋春 5 号,用于白粉病苗期抗病鉴定。使用的白粉菌菌株分别为 E09、E20、E21、E23、E26、

Bg1 和 Bg2,由中国农业科学院植物保护研究所段瑕瑜、周益林研究员提供,保存于作物遗传与分子改良山西省重点实验室。感病对照 SY95-71 由电子科技大学杨足君教授惠赠。

CH1302 和绵阳 11 的杂交组合  $F_2$  群体共 194 个单株,用于成株期抗病鉴定,所用白粉菌为 E09。

CH1302 和绵阳 11 的 194 个  $F_{2:3}$  家系进行苗期抗病鉴定,所用白粉菌为 E09。

### 1.2 白粉病抗性鉴定

苗期抗病鉴定在山西省农业科学院作物科学研究所人工气候培养室中进行,在 72 穴育苗盘中装入适量育苗基质,充分湿润后每穴播入 5 粒种子进行发芽,重复 3 次。人工气候箱中光照强度为 10000 lx,光照时间为 12 h/d,温度为有光照条件下 22 °C,无光照条件下 16.8 °C,湿度控制在 70% 左右。待第 2 片叶子完全展开,用喷雾器喷湿幼苗,再用新鲜白粉菌孢子进行人工扫抹,第 2 天重复 1 次。接种约 2 周后,当对照品种 SY95-71 充分发病时,进行苗期抗病调查。

成株期抗病鉴定在山西省农业科学院科技创新基地日光温室内进行,于 11 月中旬分行播种,行距 25 cm,行长 120 cm,每行 15 粒,单粒均匀点播,每隔 10 行种植 1 行感病对照,每行两端种植诱发材料。次年 2 月小麦拔节时接种 E09,接种方法同苗期。当对照品种充分发病时,分别于抽穗及开花期分 2 次进行抗病调查,以发病最重的一次作为最终抗病评价依据。

抗病反应型参照叶部病斑 0 ~ 4 级法<sup>[12]</sup>进行记录,其中 0 ~ 2 级为抗病型,3 ~ 4 级为感病型。使用 SPSS 13.0 进行  $\chi^2$  分离比适合度测验,推断抗病基因的数目及显隐性。

### 1.3 GISH 及 FISH 鉴定

以地高辛标记的中间偃麦草基因组总 DNA 做探针对 CH1302 进行 GISH 鉴定,以确定 CH1302 中是否含有来源于中间偃麦草的染色体或片段,并利用重复序列 pSc119.2 和 Oligo-pTa535 作探针对 CH1302 进行了多色荧光原位杂交 (mc-FISH),以鉴定 CH1302 染色体组成。

### 1.4 SNP 芯片扫描

根据  $F_2$  及  $F_{2:3}$  家系抗病鉴定结果,从  $F_2$  群体中选择 25 个反应型为 0 或 0<sub>0</sub> 的纯合单株和 25 个反应型为 4 的纯合单株,取其 DNA 等量混合,构建抗病池和感病池,送往北京中玉金标记公司进行 iSelect 90K SNP (共 81587 个 SNP 标记) 芯片扫描。

## 1.5 SSR 标记筛选

根据 SNP 芯片扫描结果,选取富集 SNP 标记的染色体区域内的 SSR 标记在抗、感病池之间筛选多态性,筛选出的多态性标记进一步在  $F_2$  群体内分别选择抗、感病单株进行小群体验证,挑选出在所有抗感株间存在多态性的 SSR 标记,扩增  $F_2$  全部单株进行确定。

## 1.6 染色体定位及其连锁图谱构建

利用分子标记检测结果,结合田间抗病调查数据,用 Mapmaker Exp 3.0 软件和 Kosambi 作图函数计算抗白粉病基因与筛选到的多态性 SSR 标记之间的遗传距离,并用 MapDraw V2.1 绘制遗传连锁图。根据上述所选到的与抗性基因连锁的分子标记在中国春缺体-四体及双端体材料上的扩增条带,并结合已经发表的分子标记连锁图谱,确定该抗白粉病基因在染色体上的具体位置。

表 1 供试材料苗期对不同白粉菌小种抗性反应

Table 1 Infection types of materials to wheat powdery mildew at seeding stage

材料 Material	染色体数 Number	染色体组型 Karyotype	白粉菌小种 <i>Bgt</i> pathotypes						
			E09	E20	E21	E23	E26	Bg1	Bg2
中间偃麦草	42	SJJ <sup>s</sup>	0	0	0	0	0	0	0
太原 768	42	ABD	4	4	3	4	4	3	4
晋春 5 号	42	ABD	4	3	4	4	3	4	4
TAI7047	56	ABD + St + St/J <sup>s</sup> + J <sup>s</sup>	0	0	0	0	0	0	0
晋太 170	42	ABD	4	4	4	4	3	4	4
CH1302	42	ABD	0	0;	0	0;	0	0	0;
$F_1$ (绵阳 11 × CH1302)	42	ABD	0	0;	0	0;	0	0	0;
绵阳 11	42	ABD	4	4	4	3	4	4	3
SY95-71	42	ABD	4	4	4	4	4	4	4

## 2.2 成株期抗性遗传分析

成株期抗性鉴定在日光温室内进行,对抗、感病亲本 CH1302、绵阳 11 及其  $F_1$  群体、 $BC_1$  群体、 $F_2$  群体接种白粉菌小种 E09。结果如表 2 所示,CH1302 与绵阳 11 的所有正反交  $F_1$  群体对 E09 均表现为免疫或近免疫 ( $IT = 0$  或  $0;$ ),与 CH1302 表现出相同或相似的抗病反应,说明 CH1302 对白粉病的抗性由显性基因控制。

对“绵阳 11 × CH1302”的  $F_2$  群体进行抗性鉴定,其中表现为抗病类型的植株有 148 株 ( $IT = 0 \sim 2$ ),感病类型的植株有 46 株 ( $IT = 3 \sim 4$ ),经卡方测验,抗、感株分离比符合 3R:1S 的理论比例 ( $\chi^2 = 0.17, P > 0.05$ );对“CH1302/绵阳 11//绵阳 11”

## 2 结果与分析

### 2.1 苗期抗性遗传分析

苗期鉴定分别使用白粉菌生理小种 E09、E20、E21、E23、E26、Bg1 和 Bg2 对 CH1302、感病亲本绵阳 11 及其  $F_1$  杂交种、TAI7047 和 CH1302 的小麦亲本晋太 170,以及 TAI7047 的亲本中间偃麦草和太原 768、晋春 5 号接菌进行抗病性鉴定。感病对照为高感白粉病小麦品种 SY95-71。

结果表明,CH1302、八倍体小偃麦 TAI7047 及中间偃麦草对上述 7 个白粉菌小种均表现为免疫或近免疫 ( $IT = 0$  或  $0;$ ),其小麦亲本太原 768、晋春 5 号以及晋太 170 全部高感白粉病 ( $IT = 3$  或  $4$ ) (表 1)。可知,CH1302 的亲本晋太 170 及 TAI7047 的小麦亲本太原 768 和晋春 5 号不含该抗白粉病基因,其抗病基因可能来源于中间偃麦草。

$BC_1$  群体进行抗性鉴定,其中包含的抗病植株为 51 株 ( $IT = 0 \sim 2$ ),感病植株为 47 株 ( $IT = 3 \sim 4$ ),卡方检验抗感分离比值符合 1R:1S 的理论比例 ( $\chi^2 = 0.16, P > 0.05$ )。

由以上分析可知: $F_2$  群体及  $BC_1$  群体抗感分离比均符合孟德尔遗传规律,为了进一步证实这一分析结果并确定  $F_2$  植株的基因作用方式,用同一白粉菌株 E09 接种由上述  $F_2$  植株产生的  $F_{2:3}$  家系,其中纯合抗病家系 53 个,抗、感分离家系 95 个,纯合感病家系 46 个,卡方测验抗感分离比值符合 1:2:1 的理论比例 ( $\chi^2 = 0.59, P > 0.05$ )。上述结果表明,CH1302 对白粉菌小种 E09 的成株期抗性由 1 对显性核基因控制,暂将其命名为 *PmCH1302*。

表 2 绵阳 11/CH1302 杂交组合各世代群体对白粉菌株 E09 的成株期抗性表现

Table 2 Resistant reaction of generations from cross of Mianyang11/CH1302 to Bgt isolates E09 at adult stage

亲本/组合 Parents/cross	抗病植株数目 Number of resistant plants					感病植株数目 Number of susceptible plants			预期分离比 Expected ratio of segregation	$\chi^2$	P
	0	0;	1	2	合计 Total	3	4	合计 Total			
	CH1302 (P <sub>1</sub> )	13	2			15					
绵阳 11 (P <sub>2</sub> )							15	15	—		
SY95-71							15	15	—		
F <sub>1</sub> (P <sub>2</sub> /P <sub>1</sub> )	9	6			15				—		
F <sub>2</sub> (P <sub>2</sub> /P <sub>1</sub> )	21	13	98	16	148	21	25	46	3:1	0.17	0.68
F <sub>1</sub> (P <sub>1</sub> /P <sub>2</sub> )	14	4			18				—		
BC <sub>1</sub> (P <sub>2</sub> /P <sub>1</sub> //P <sub>2</sub> )	15	10	15	11	51	23	24	47	1:1	0.16	0.69

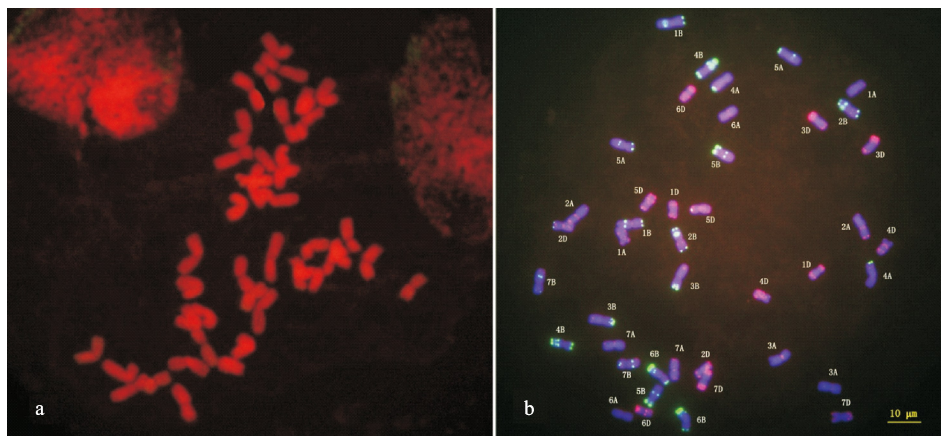
P<sub>1</sub>: 抗亲 CH1302; P<sub>2</sub>: 感亲绵阳 11; SY95-71; 感病对照; —: 不分离

P<sub>1</sub>: Resistant parent CH1302, P<sub>2</sub>: Susceptible parent Mianyang 11, SY95-71; Disease contrast, —: No separation

### 2.3 GISH 鉴定分析

根据苗期鉴定结果, CH1302 的抗白粉病基因可能来源于中间偃麦草, 为了确定 CH1302 中是否含有来源于中间偃麦草的染色体片段, 以地高辛标记的中间偃麦草基因组 DNA 作探针, 中国春基因组 DNA 作封阻对 CH1302 有丝分裂中期染色体进行基因组原位杂交 (GISH) 鉴定。结果表明, CH1302 的染色体数目为 42 条, 且全部呈现红色信号, 并未发现黄绿色的外源染色体或片段信号 (图 1a)。为了

进一步明确 CH1302 染色体组成, 以重复序列 pSc119.2 和 Oligo-pTa535 为探针对 CH1302 进行多色荧光原位杂交 (mc-FISH), 可以看出, CH1302 中包含普通小麦 A、B、D 基因组的所有染色体 (图 1b)。表明, CH1302 染色体组成完整, 其中未发现外源染色体片段, 或者其所含的外源染色体片段可能太小, 以目前的 GISH 和 FISH 技术还无法检测到其外源染色物质。这表明, CH1302 可能是一个小麦-中间偃麦草的异源隐形渗入系。



a: 以中间偃麦草 DNA 作探针, 以中国春 DNA 作封阻的 GISH 核型; b: 以重复序列 pSc119.2 (绿色信号) 和 Oligo-pTa535 (红色信号) 作探针的 mc-FISH 核型

a: GISH pattern of CH1302 using Th. intermedium genomic DNA as probe, b: The mc-FISH pattern with the labeled pSc119.2 (green) and Oligo-pTa535 (red) as probes

图 1 CH1302 的 GISH 及 mc-FISH 核型

Fig. 1 GISH and mc-FISH patterns of CH1302

### 2.4 基于 SNP 分子标记分析

在 iSelect 90K SNP 芯片扫描结果中, 从分布于小

麦全基因组的 81587 个 SNP 标记位点中, 扫描到 3198 个 SNP 位点在抗、感病池间具有多态性, 多态性比率

为 3.92%, 其中, 2844 个位点已有相应染色体位置信息(表 3, 图 2a)。其中分布于 A 基因组上多态性 SNP 标记位点为 1516 个, 占全部多态性位点的 53.3%。由表 3 可知, 分布于 2A 染色体上的多态性 SNP 位点最多, 为 384 个, 同时多态性 SNP 所占比例也最高, 为该染色体上 SNP 总数的 18.37%。其中 313 个标记位于 2AL 上, 47 个标记位于 2AS 上, 24 个标记位于

着丝粒位置。对差异 SNP 标记的染色体位置进行统计, 进一步确定富集多态性 SNP 标记的染色体区域。图 2b 显示在 2A 染色体 100 ~ 105 cM 和 150 ~ 155 cM 区域内 SNP 标记数量存在 2 个峰值, 即在这两个染色体区域内分布的差异 SNP 位点最多。因此, 初步推测抗白粉病基因 *PmCH1302* 位于小麦 2A 染色体的 100 ~ 105 cM 和 150 ~ 155 cM 两个区域附近。

表 3 多态性 SNP 位点在整个染色体组中的分布

Table 3 Distribution of polymorphic SNP locis on the entire genome

同源染色体 Homologous chromosomes	基因组 A Genome A			基因组 B Genome B			基因组 D Genome D			总数 Total
	总标 记数目 No. of raw SNPs	多态 标记数目 No. of discrepant SNPs	差异率 (%) Ratio of discrepancy	总标 记数目 No. of raw SNPs	多态标 记数目 No. of discrepant SNPs	差异率 (%) Ratio of Discrepancy	总标 记数目 No. of raw SNPs	多态 标记数目 No. of discrepant SNPs	差异率 (%) Ratio of discrepancy	
1	2072	181	8.74	3471	136	3.92	1024	75	7.32	392
2	2090	384	18.37	3250	157	4.83	1491	80	5.37	621
3	1800	199	11.06	2491	145	5.82	883	36	4.08	380
4	1928	186	9.65	1444	113	7.83	296	40	13.51	339
5	2454	189	7.70	2964	124	4.18	1004	64	6.37	377
6	2133	176	8.25	2528	126	4.98	571	72	12.61	374
7	2662	201	7.55	2461	147	5.97	1250	13	1.04	361
总计 Total	15139	1516	10.01	18609	948	5.09	6519	380	5.83	2844
所占比例 (%) Proportion		53.3			33.3			13.3		

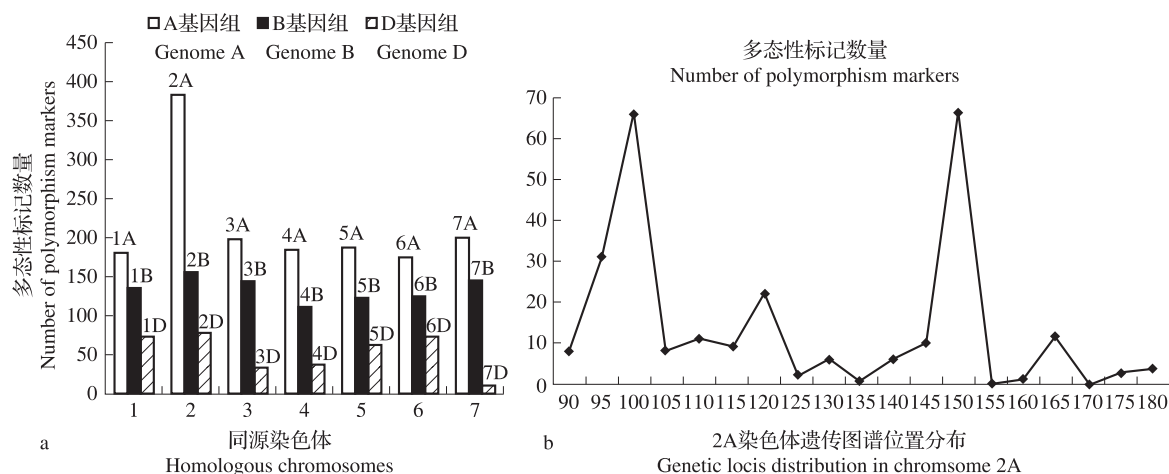


图 2 SNP 多态性位点在染色体上的分布

Fig. 2 Distribution of polymorphic SNP locis on the chromosome

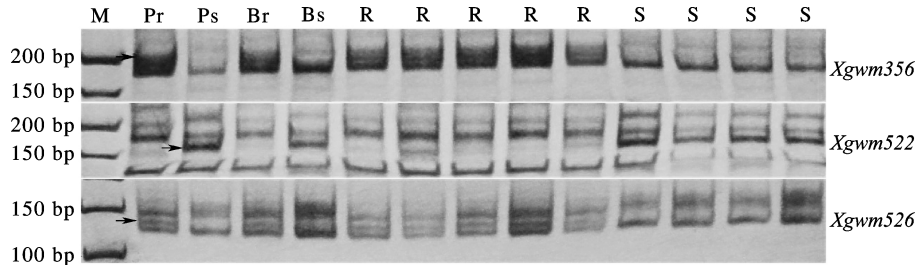
## 2.5 *PmCH1302* 的 SSR 染色体定位

根据 iSelect 90K SNP 芯片数据分析, 从小麦 2A 染色体 100 ~ 105 cM 和 150 ~ 155 cM 两个区域附近

选择了 63 对 SSR 引物对 CH1302、绵阳 11 及抗、感病池进行 PCR 扩增, 发现 *Xgwm356*、*Xwmc522* 和 *Xgwm526* 在抗、感亲本和抗、感病池间可以扩增出

一致的多态性条带(图 3)。将上述 3 个标记对“绵阳 11 × CH1302” $F_2$ 群体的 194 个单株及其 $F_{2:3}$ 家系进行检测,证实这 3 个标记与 *PmCH1302* 存在遗传连锁关系,其两侧标记 *Xgwm356* 和 *Xgwm526* 的遗传距离分别为 3.1 cM 和 7.8 cM(图 4a)。利用中国春缺体-四体和双端体 Dt2AS 进行 PCR 扩增,结果

显示,与中国春相比,3 个连锁标记在中国春缺体-四体 N2AT2B 上没有扩增出特异性条带,但在中国春缺体-四体 N2BT2A、N2DT2B 上扩增出特异性条带,在双端体 Dt2AS 上也未扩增出相应特异性条带,由此可知抗白粉病基因 *PmCH1302* 位于 2AL 染色体上(图 4b)。

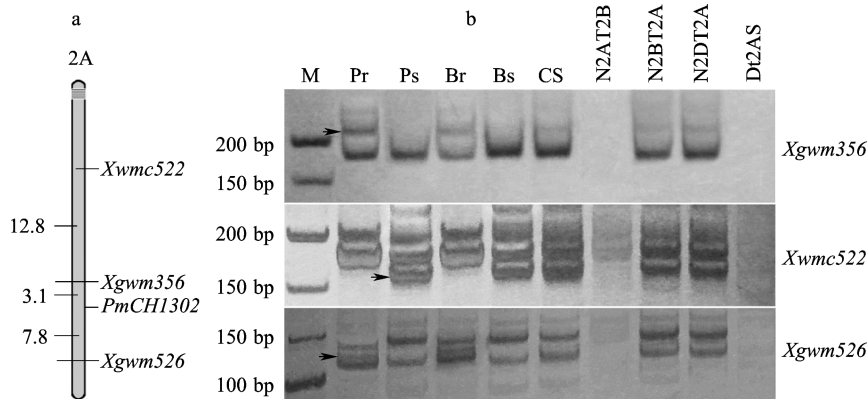


M:500 bp DNA ladder;Pr:抗病亲本 CH1302;Ps:感病亲本绵阳 11;Br:抗病池;Bs:感病池;R:纯合抗病株;S:纯合感病株。箭头指示为多态性条带

M:500 bp DNA ladder,Pr:Resistant parent CH1302,Ps:Susceptible parent Mianyang11,Br:Resistant bulk,Bs:Susceptible bulk,R:Homozygous resistant strains,S:Homozygous susceptibility strains. Arrows indicate the polymorphic bands

图 3 *PmCH1302* 连锁 SSR 标记在“绵阳 11 × CH1302” $F_2$ 群体中的扩增结果

Fig. 3 Amplification result of SSR markers linking with *PmCH1302* in  $F_2$  population from “Mianyang11 × CH1302”



M:500 bp DNA ladder;Pr:抗病亲本 CH1302;Ps:感病亲本绵阳 11;Br:抗病池;Bs:感病池;CS:中国春。箭头指示为特异性条带

M:500 bp DNA ladder,Pr:Resistant parent CH1302,Ps:Susceptible parent Mianyang11,Br:Resistant bulk,Bs:Susceptible bulk,CS:Chinese Spring,Arrows indicate the critical bands

图 4 抗白粉病基因 *pmCH1302* 的连锁图谱和染色体定位

Fig. 4 Linkage map and chromosomal location of *pmCH1302* resistant to Bgt

### 3 讨论

CH1302 是以八倍体小偃麦 TAI7047 作为桥梁亲本,与高感白粉病的普通小麦杂交后代中选育出的高代品系。苗期接种鉴定表明,CH1302 对白粉病的 7 个小种均表现出良好抗性,具有与其亲本 TAI7047 和中间偃麦草较为一致的抗病反应型,而 CH1302 及 TAI7047 的小麦亲本则全部高感,不含有抗白粉病基因,因此,推测其抗白粉病基因可能来源于中间偃麦草。但 GISH 和 mcFISH 并未检测到

CH1302 中含有可以观察到的中间偃麦草染色体片段。利用筛选到的抗病连锁 SSR 标记对中间偃麦草、TAI7047、感病亲本(太原 768、晋春 5 号、晋太 170)以及绵阳 11 进行 PCR 扩增,结果也未观察到 CH1302 与其野生亲本中间偃麦草一致的特异性条带。未能为其抗病基因来源于中间偃麦草提供分子证据,究其原因可能由于这些标记与抗病基因的连锁距离较远,导致无法在中间偃麦草中扩增到相应的特异片段。在普通小麦与中间偃麦草的远缘杂交过程中常常用到组培技术,而组培也可能

产生无性系变异。因此关于 *PmCH1302* 的来源尚需要获得数量更多、遗传距离更近的连锁标记进行深入验证。

迄今为止,国际上已正式命名的抗白粉病基因(*Pm1*~*Pm54*)已有近70个,分布在小麦除4D染色体外的其他20条染色体上。其中来源于中间偃麦草且已获得正式命名的有2个,分别为位于7BS染色体的*Pm40*和位于2DL染色体的*Pm43*,未正式命名抗病基因有4个,分别为位于7BS、2DL、2BS和4BL上的*PmE*、*PmYU25*<sup>[16]</sup>、*PmL962*<sup>[17]</sup>和*PmCH83*<sup>[18]</sup>。*PmCH1302*同样来源于中间偃麦草,本课题组利用iSelect 90K SNP芯片扫描和SSR标记将其定位到小麦2AL染色体上,从染色体位置看,其不同于来源于中间偃麦草的其他抗白粉病基因。在已发现且获得正式命名抗白粉病基因中,只有*Pm4*<sup>[19-21]</sup>和*Pm50*<sup>[22]</sup>位于2AL染色体上,其中*Pm4*位点上的*Pm4a*~*4d*分别来源于栽培二粒小麦、野生二粒小麦、波斯小麦和栽培一粒小麦,本研究采用的7个白粉菌小种中,CH1302对7个小种都表现出良好的抗病性(表1),E20、E21和E26对*Pm4a*、*Pm4b*和*Pm4c*都具有毒力<sup>[23-24]</sup>,位于染色体bin 2AL 1~0.85~1.00区域的*Pm4d*<sup>[21]</sup>两翼连锁标记*Xgwm526*和*Xbarc122*的遗传距离分别为3.4 cM和10.0 cM。而*Pm50*则源于普通小麦,与连锁的SSR标记*Xgwm294-2A*的遗传距离是3.2 cM<sup>[23]</sup>,而*PmCH1302*两翼连锁SSR标记*Xgwm356*和*Xgwm526*的遗传距离分别3.1 cM和7.8 cM(图4a)。抗谱、来源及连锁标记位点分析表明,*PmCH1302*与*Pm4*位点上的抗白粉病基因*Pm4a*~*Pm4d*以及*Pm50*并不相同,因此*PmCH1302*很可能是一个新的小麦抗白粉病基因。由于*PmCH1302*与*Pm4*和*Pm50*采用不同的遗传群体进行定位,作图时其遗传距离的计算可能会有所差异,由于*PmCH1302*与*Pm4*的位置较近,其是否在*Pm4*位点上尚有待于筛选更多与其遗传距离更小、连锁更紧密的分子标记,并与*Pm4*、*Pm50*进行等位性验证,以获得更加有力的证据。

小麦为异源六倍体植物,基因组庞大,在目标基因作图和定位中可利用的多态性SSR标记相对有限,因此会对作图和定位的精度和准确性产生一定的影响<sup>[25]</sup>。本研究采用iSelect 90K SNP芯片,从分布于小麦21条染色体的81587个SNP标记位点中,扫描出3198个SNP位点在抗、感病池间具有多态性,多态性比率为3.92%。在所有染色体中2A染

色体包含的多态性SNP位点最多,进一步分析发现,2AL上的多态性位点远远多于2AS。对差异SNP标记的染色体位置的分析显示,在100~105 cM和150~155 cM两个区域附近分布的多态性SNP位点最多。因此,将研究的重点放在这2个区域,并选择该区域附近的SSR标记进行筛选,更易于获得与目标基因连锁的分子标记。与传统的SSR、RFLP等分子标记相比较,SNP标记密度更大更稳定且容易实现大规模自动化检测,更容易获得高密度的遗传连锁图谱。本研究的下一步工作就是结合染色体定位、SSR连锁标记以及SNP芯片扫描结果,继续开发和补充更多标记,以期精确定位抗白粉病基因*PmCH1302*的染色体位置,并绘制目标基因区域高饱和的遗传图谱,为未来的小麦抗白粉病育种工作提供理论支持。

#### 参考文献

- [1] Alam M A, Mandal M, Wang C, et al. Chromosomal location and SSR markers of a powdery mildew resistance gene in common wheat line N308[J]. Afr J Microbiol Res, 2013, 7(6): 477-482
- [2] 杨作民,唐伯让,沈克全,等.小麦抗病育种的战略问题——小麦对锈病、白粉病第二线抗源的建立和应用[J].作物学报, 1994, 20(4): 385-394
- [3] 李欣,张晓军,张丛卓,等.兼抗白粉、条锈病小麦偃麦渗入系CH7124抗性遗传及细胞学鉴定[J].植物遗传资源学报, 2012, 13(4): 577-582
- [4] Hua W, Liu Z, Zhu J, et al. Identification and genetic mapping of *pm42*, a new recessive wheat powdery mildew resistance gene derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*) [J]. Theor Appl Genet, 2009, 119(2): 223-230
- [5] Piarulli L, Gadaleta A, Mangini G, et al. Molecular identification of a new powdery mildew resistance gene on chromosome 2BS from *Triticum turgidum*, ssp. *dicoccum* [J]. Plant Sci, 2012, 196(11): 101-106
- [6] Tao W, Liu D, Liu J, et al. Genetic mapping of the powdery mildew resistance gene *Pm6* in wheat by RFLP analysis. [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100(3-4): 564-568
- [7] Zhu Z, Zhou R, Kong X, et al. Microsatellite markers linked to 2 powdery mildew resistance genes introgressed from *Triticum carthlicum* accession PS5 into common wheat [J]. Genome, 2005, 48(4): 585-590
- [8] Petersen S, Lyerly J H, Worthington M L, et al. Mapping of powdery mildew resistance gene *Pm53* introgressed from *Aegilops speltoides* into soft red winter wheat. [J]. Theor Appl Genet, 2015, 128(2): 303-312
- [9] Chen P D, Qi L L, Zhou B, et al. Development and molecular cytogenetic analysis of wheat-*Haynaldia villosa*, 6VS/6AL translocation lines specifying resistance to powdery mildew [J]. Theor Appl Genet, 1995, 91(6-7): 1125-1128
- [10] Friebe B, Heun M, Tuleen N, et al. Cytogenetically monitored transfer of powdery mildew resistance from Rye into wheat [J]. Crop Sci, 1994, 34(3): 621-625
- [11] 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(6): 1059-1064

(下转 331 页)