

小麦抗病基因 *Lr46/Yr29/Pm39*、 *Sr2/Yr30* 和 *Lr68* 的遗传特性及其 与主要农艺性状的关联分析

阳霞, 刘路平, 孙道杰, 张玲丽*

(西北农林科技大学 农学院, 陕西杨陵 712100)

摘要: 利用与抗病基因 *Lr46/Yr29/Pm39*、*Sr2/Yr30* 和 *Lr68* 等紧密连锁的分子标记, 对小麦品种(系)‘RL6077’和‘西农 979’构建的 BC₁F₁ 和 F₂ 群体进行抗病基因遗传分析, 结合主要农艺性状分析, 探究小麦抗病基因 *Lr46/Yr29/Pm39*、*Sr2/Yr30* 和 *Lr68* 的遗传特性及其与主要农艺性状的关联性; 并对检测的聚合有 3 个抗慢锈病基因 (*Lr68*+*Sr2/Yr30*+*Lr46/Yr29/Pm39*) 位点的聚合体进行 SSR 标记遗传背景回复率检测。结果表明: (1) F₂ 群体中 *Lr68* 基因的传递率 (65.41%) 比理论值 (75%) 偏低, *Lr46/Yr29/Pm39* 基因和 *Sr2/Yr30* 基因的传递率 (分别为 75.83%、74.53%) 与理论值 (75%) 相符合; BC₁F₁ 群体中 *Lr68* 基因的传递率 (44.27%) 比理论值 (50%) 偏低, *Lr46/Yr29/Pm39* 基因和 *Sr2/Yr30* 基因的传递率 (分别为 56.64%、55.11%) 均比理论值 (50%) 偏高。(2) *Lr46/Yr29/Pm39* 和 *Sr2/Yr30* 基因位点均与株高、穗长、穗下茎长、穗下节长呈极显著正相关关系; *Lr68* 和 *Sr2/Yr30* 基因位点均与穗粒数呈显著或极显著正相关关系; *Lr46/Yr29/Pm39* 基因位点与千粒重呈显著负相关、与单株成穗数呈显著正相关关系。(3) 对 BC₁F₁ 群体中聚合有 *Lr68*+*Sr2/Yr30*+*Lr46/Yr29/Pm39* 基因位点的 92 个聚合体的遗传背景回复率检测发现, 轮回亲本‘西农 979’遗传背景回复率最高达 91.67%, 其中遗传回复率达 90% 以上的聚合体有 3 株, 占回交群体 (655 株) 总体的 0.46%。该研究结果为优异抗病基因资源‘RL6077’的进一步利用提供了理论参考, 对创制小麦多种抗病新种质具有重要意义。

关键词: 小麦; 抗病基因; 遗传特性; 农艺性状; 关联分析

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Genetic Characteristics of Wheat Resistance Gene *Lr46/Yr29/Pm39*, *Sr2/Yr30* and *Lr68* and Association Analysis of Main Agronomic Traits

YANG Xia, LIU Luping, SUN Daojie, ZHANG Lingli*

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shannxi 712100, China)

Abstract: We used close linkage molecular markers of resistance genes *Lr46/Yr29/Pm39*, *Sr2/Yr30* and *Lr68* to analysis the genetic characteristics of the resistance genes in the BC₁F₁ and F₂ descendant populations. The BC₁F₁ and F₂ descendant populations both came from ‘RL6077’ and ‘Xinong 979’. Combined with the main agronomic traits, we could deeply comprehend the gene heredity rule of wheat disease resistance genes as well as the correlation with agronomic traits. We also evaluated the background response rates of 92 plants in the BC₁F₁ population who have three kinds of resistance genes at the same time. The

收稿日期: 2013-11-14; 修改稿收到日期: 2014-01-30

基金项目: “十二五”农村领域国家科技计划 (2012AA101105); 美国唐仲英育种基金; “十二五”国家科技支撑计划 (2013BAD01B02)

作者简介: 阳霞 (1987—), 女, 在读硕士研究生, 主要从事小麦遗传育种和分子生物学研究。E-mail: tianshiyangxia@163.com

* 通信作者: 张玲丽, 博士, 副教授, 主要从事小麦遗传育种研究。E-mail: zhanglingli@126.com

result showed that: (1) In the F_2 population the transfer rate of gene *Lr68* (65.41%) is lower than theory, but the transfer rate of *Lr46/Yr29/Pm39* (75.83%) and *Sr2/Yr30* (74.53%) is consistent with the theoretical, respectively. In the BC_1F_1 population, the transfer rate of gene *Lr68* (44.27%) transferred lower than theory, while the transfer rate of *Lr46/Yr29/Pm39* (56.64%) and *Sr2/Yr30* (55.11%) gene delivered higher than theory, respectively. (2) All these three kinds of resistance genes have extremely significant positive correlation with the plant height, spike length, spike-stalk and spike-internode. The *Lr68* gene and *Sr2/Yr30* gene have significant or extremely significant positive correlation with the spike grain number. The *Lr46/Yr29/Pm39* gene has significantly negative correlation with the thousand kernel weight and significantly positive correlation with the ear number per plant. (3) In the evaluate of the background response rates of plants in the BC_1F_1 population which have *Lr46/Yr29/Pm39*, *Sr2/Yr30* and *Lr68* genes. Meanwhile, we can find that the biggest response rate of recurrent parent ‘Xinong 979’ was up to 91.67%. There were three plants whose response rates exceed 90% and they take 0.46% of the BC_1F_1 population. This study provided an important theoretical reference to using the excellent genetic resources of ‘RL6077’. It also has important significance to create a variety of new disease-resistant wheat germplasm.

Key words: wheat; disease-resistance gene; genetic characteristic; agronomic traits; association analysis

小麦是全球重要的粮食作物之一,在人们的膳食结构中具有重要地位。在小麦的生产过程中面临多种病害的侵害,其中最主要的病害有由小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)引起的条锈病、小麦叶锈菌(*Puccinia triticina*)引起的叶锈病、小麦禾柄锈菌(*Puccinia graminis* Pers. f. sp. *tritici*)引起的秆锈病、布氏白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)引起的白粉病以及禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum* Schw)引起的赤霉病等^[1],这些病害遍及世界各主要麦区,严重影响小麦高产稳产。在中国,小麦条锈病主要分布在西北地区冬、春麦区,华北、淮北等冬麦区^[2];小麦叶锈病在华北、黄淮海区经常发生^[3];小麦秆锈病主要发生在长江流域冬麦区及东北、华北的内蒙古、西北春麦区^[4]。小麦白粉病在中国山东沿海及湿润多雨的西南地区发生普遍,近年来在东北、华北、西北等麦区的危害日趋严重^[5]。这些病害传播速度快,发病范围广,已严重威胁到中国小麦生产安全。国内外研究和生产实践证明,选育抗病品种是预防和控制小麦病害最经济、安全、有效的途径。因此,优异抗源基因资源的研究与利用是目前小麦抗病育种的主要任务之一。

小麦的抗病性主要有2类:一类是垂直抗性,又称生理小种专化抗性;另一类是水平抗性,又称非小种专化抗性、成株抗性、慢性病或部分抗性^[6]。已有研究认为,小麦的成株抗病性由若干个微效基因所控制^[7],因此,聚合4~5个效应相对较大的微效基因即可培育出接近免疫的成株抗病性材料^[8]。国际上多数研究机构已将成株抗病性基因资源的发掘和利用作为小麦抗病育种的主要方向^[9]。成株抗病性的研究已取得重大进展,如在小麦1BL、3BS、7DS、

4DL等染色体上已发现了抗多种小麦病害的成株抗性基因簇^[10-11],并找到与这些基因簇紧密连锁的分子标记。Lagudah^[12]研究指出抗叶锈病/条锈病/白粉病基因 *Lr46/Yr29/Pm39* 位于1BL上,对小麦均表现为成株抗性,与其紧密连锁的SSR标记是WMC44^[13],距离 *Lr46/Yr29/Pm39* 基因5~15 cM;该基因的克隆工作已取得一定的进展,研究表明其除对以上3种病害表现成株抗性外,常伴随叶尖坏死现象,可作为田间选择的形态标记^[13-14]。Crossa等^[15]研究发现抗秆锈病 *Sr2* 和抗条锈病 *Yr30* 为非小种专化抗性基因,均位于3BS染色体上,且在不同环境下均表达中度抗性,*Sr2* 和 *Yr30* 可能是同一基因或者是紧密连锁的2个基因,其作用方式类似一个基因。现已开发有与 *Sr2/Yr30* 基因紧密连锁的标记WMS533^[16],该标记距离 *Sr2/Yr30* 基因2.0 cM。*Lr68* 基因是一个新发掘的带有抗慢叶锈病基因的成株抗性基因,位于7BL上,最初由CIMMYT命名为 *LrP*;Herrera-Foessel SA等^[17]于2012年将其命名为 *Lr68*,与其紧密连锁的是STS标记 *csGS*^[17],与基因间距离1.2 cM。此外,位于7DS上的 *Lr34/Yr18/Pm38* 基因对小麦多种锈病和白粉病具有重要抗性^[18],其特点是表现为成株抗性和非小种专化性,且抗性持久稳定。*Lr67/Yr46/Pm46* 基因由Herrera-Foessel等^[19]在成株抗性小麦品系‘RL6077’与感病品种Avocet构建的后代群体中检测发现,定位于小麦基因组的4DL染色体上,与Lan等^[20]在中国小麦品种‘百农64’中检测到的白粉病成株抗性QTL *Qpm.caas-4DL* 位于同一位置。

小麦抗病基因分子标记的开发与利用将加速育种效率,尤其是提高对抗几种病害的多个抗性基因

的聚合效率。基因聚合育种是利用分子标记辅助选择技术,结合传统育种方法,将多个分散于不同材料中的有利基因聚合到同一个材料中,使其在多个性状上同时得到改良,获得更有价值的育种材料^[21]。聚合品种一方面避免了单一抗性品种抗性丧失带来的较大危险,另一方面可获得持久抗性,通过交叉聚合还可达到多抗、兼抗和广抗等效果^[22]。‘RL6077’是从墨西哥引进的一个聚合有多种抗病基因的小麦品系,研究表明,其含有 *Lr46/Yr29/Pm39*、*Sr2/Yr30*、*Lr68*、*Lr67/Yr46/Pm46* 等多种抗慢锈病基因和抗白粉病基因^[23],是一个优异的小麦抗病和抗基因资源。‘西农 979’是由西北农林科技大学培育的一个高产优质小麦新品种^[24],但中感条锈病和赤霉病。本研究构建了‘RL6077’/‘西农 979’//‘西农 979’回交 BC₁F₁ 群体(以下简称 BC₁F₁ 群体)和‘RL6077’/‘西农 979’自交 F₂ 群体(以下简称为 F₂ 群体),利用与 *Lr46/Yr29/Pm39*、*Sr2/Yr30* 和 *Lr68* 等基因紧密连锁的分子标记,结合农艺性状分析,探究这些基因位点的遗传特性及其与农艺性状的关联性,并辅助选择聚合 3 个以上抗慢锈病基因和抗白粉病基因位点的聚合体,以期加速育种进程,为小麦抗病品种改良提供新种质。

1 材料和方法

1.1 材料

国外抗病小麦品系‘RL6077’由 CIMMYT 驻中国办事处何中虎博士提供,‘西农 979’由西北农林科技大学小麦育种中心提供。亲本‘RL6077’含有 *Lr46/Yr29/Pm39*、*Lr68* 和 *Sr2/Yr30* 等 3 种抗病基因,亲本‘西农 979’不含有这 3 种抗病基因。2011 年配制‘RL6077’/‘西农 979’杂交组合,获 F₁ 代。2012 年在自交获 F₂ 代同时,以‘西农 979’为轮回亲本与 F₁ 回交(‘RL6077’/‘西农 979’//‘西农 979’),获 BC₁F₁。2012 年 10 月在西北农林科技大学小麦育种试验地分别播种 F₂、BC₁F₁,行长 2 m,株距 13 cm,其中 F₂ 群体 691 株,BC₁F₁ 群体 655 株。亲本‘RL6077’和‘西农 979’分别种植 3 行。

1.2 基因组 DNA 提取

按王关林等^[25-26] CTAB 法,在小麦苗期(5 叶期)分别提取上述 F₂、BC₁F₁ 及其亲本的基因组 DNA,其中 F₂ 和 BC₁F₁ 群体按单株分别提取 DNA,干燥后溶于 TE 缓冲液。

1.3 PCR 扩增及标记检测

对 F₂ 和 BC₁F₁ 群体,用 SSR 标记 WMC44(WMC44-

F:5'-GGTCTTCTGGGCTTTGATCCTG-3'和 WMC44-R:5'-TGTTGCTAGGGACCCGTAGTGG-3')检测抗病基因 *Lr46/Yr29/Pm39*,含有该基因的单株可扩增出 260 bp 条带,不含此基因的单株扩增出的条带大于 260 bp^[13];用特异性 STS 标记 *csGS*(*csGS*-F:5'-AAGATTGTTTCACAGATCCATGTCA-3'和 *csGS*-R:5'-GAGTATTCCGGCTCAAAAAGG-3')检测抗病基因 *Lr68*,仅在含有 *Lr68* 基因的植株中可扩增出 385 bp 条带^[17];用特异性 SSR 标记 WMS533(WMS533-F:5'-AAGGCGAATCAAACGGAATA-3'和 WMS533-R:5'-GTTGCTTTAGGGGAAAAGCC-3')检测抗病基因 *Sr2/Yr30*,在含有 *Sr2/Yr30* 基因的植株中可扩增出 120 bp 条带,不含此基因的植株中扩增出的条带为 105 bp^[16]。

上述各引物由上海生物工程技术公司合成。PCR 总反应体系^[25]为 15 μ L,包括 7 μ L 2 * Mix 混合液,2 μ L 引物,2 μ L 模版,4 μ L ddH₂O,退火温度为 50~62 $^{\circ}$ C。两对抗病 SSR 标记(WMC44 和 WMS533)扩增产物在 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳检测,银染后照相观察并记录;抗病 STS 标记 *csGS* 扩增产物在 1.5% 的琼脂糖凝胶上电泳分离,溴化乙锭染色后用 Gel Doc XR System 扫描成像存入计算机。

1.4 SSR 分子标记分析

筛选分布于小麦 A、B 和 D 基因组的 12 对多态性 SSR 引物(表 1),对 BC₁F₁ 回交群体中聚合有 3 个抗慢锈病基因位点和抗白粉病基因位点(*Lr68*+*Sr2/Yr30*+*Lr46/Yr29/Pm39*)的聚合体进行全基因组扫描,引物由上海生物工程技术公司合成。PCR 扩增检测同上述抗病基因检测方法。

1.5 遗传背景回复率计算方法

根据 12 对多态性 SSR 标记分析结果,参考夏军红等^[27]的方法计算,对 BC₁F₁ 群体中聚合有 3 个抗慢锈病基因和抗白粉病基因的聚合体,进行‘西农 979’遗传背景回复率的检测。采用公式:

$$G(g) = [L + X(g)] / (2L) = 1/2 + (1/2) [X(g)/L]$$

式中, $G(g)$ 指在 g 代的遗传背景回复率; $X(g)$ 指在回交 g 代表现为轮回亲本‘西农 979’带型的分子标记数量; L 指所分析的分子标记数量。

1.6 农艺性状调查

在小麦生长发育的不同阶段,分别考察‘RL6077’、‘西农 979’及其 F₂ 和 BC₁F₁ 群体的分蘖数、旗叶长、旗叶宽、株高、穗下茎长、穗下节长、有

表 1 用于 BC₁F₁ 群体单株背景回复率检测的 12 对 SSR 标记名称及序列
Table 1 The name and sequence of 12 pair SSR primers used for background selection in BC₁F₁ population

引物 Primer	引物序列 Primer sequence(5'→3')		所在染色体 Chromosome	变性温度 Annealing temperature/℃
	正向 Forward	反向 Reverse		
Xbarc213	GCGTAGATTCTCGGTTTGTGGCTTGC	CCGTCCCTCCTTCTGGTCT	1A	52
Xwmc329	ACAAAGGTGCATTTCGTAGA	AACACGCATCAGTTTCAGT	1B,1D	56
Xgwm294	GGATTGGAGTTAAGAGAGAACCG	GCAGAGTGATCAATGCCAGA	2A	55
Xgwm429	TTGTACATTAAGTCCCATTA	TTTAAGGACCTACATGACAC	2B	50
Xgwm261	CTCCCTGTACGCCTAAGGC	CTCGCGCTACTAGCCATTG	2D	55
Xbarc71	GCGCTGTTCCTCACCTGCTCATA	GCGTATATTCTCTCGTCTTCTTGTGGTT	3D	55
Xksum62	GGAGAGGATAGGCACAGGAC	GAGAGCAGAGGGAGCTATGG	4B	62
Xcwem40	TAGCACCAGGCTTGACCAGT	GGACCAAAGCCAAAAACAAA	5A,5B,5D	55
Xcfd29	GGTTGTCAGGCAGGATATTTG	TATTGATAGATCAGGGCGCA	5D	60
Xgwm427	AAACTTAGAACTGTAATTCAGA	AGTGTGTTCAATTGACAGTT	6A	50
Xbarc134	CCGTGCTGCAATGAACAC	AGTTGCCGGTCCCATTGTCA	6B	52
Xgwm437	GATCAAGACTTTTGTATCTCTC	GATGTCCAACAGTTAGCTTA	7D	50

效穗数、穗粒数、穗长、千粒重等农艺性状。其中,F₂ 和 BC₁F₁ 两群体按单株分别调查,亲本材料设 3 个重复调查。

1.7 数据统计分析

根据对 F₂ 群体和 BC₁F₁ 群体不同抗病基因的分子检测结果,结合农艺性状考察,用 SPSS 15.0 软件进行数据的相关性分析。

2 结果与分析

2.1 抗病基因的分子鉴定及其在不同杂交后代群体中的分布

用 *Lr46/Yr29/Pm39* 基因的特异性标记 WMC44、*Lr68* 基因的特异性标记 *csGS* 和 *Sr2/Yr30* 基因的特异性标记 WMS533,分别对 F₂ 群体的 691 个单株和 BC₁F₁ 群体的 655 个单株进行检测(图 1~3)。结果发现,F₂ 群体中含 *Lr46/Yr29/Pm39* 基因的有 524 株,含 *Lr68* 基因的有 452 株,含 *Sr2/Yr30* 基因的有 515 株,分别占检测植株的 75.83%、65.41%、74.53%。BC₁F₁ 群体中含 *Lr46/Yr29/Pm39* 基因的有 371 株,含 *Lr68* 基因的有 290 株,含 *Sr2/Yr30* 基因的有 361 株,分别占检测单株的 56.64%、

44.27%、55.11%。在 F₂ 群体中检测到兼有 2 种抗病基因位点(*Lr68*+*Sr2/Yr30*、*Lr68*+*Lr46/Yr29/Pm39* 和 *Sr2/Yr30*+*Lr46/Yr29/Pm39*) 的单株(338 株、332 株、414 株)占检测植株的 48.91%、48.05%、59.91%,兼有 3 种抗病基因位点(*Lr68*+*Sr2/Yr30*+*Lr46/Yr29/Pm39*) 的单株(263 株)占检测单株的 38.06%。在 BC₁F₁ 群体中,检测到的兼有 2 种抗病基因位点(*Lr68*+*Sr2/Yr30*、*Lr68*+*Lr46/Yr29/Pm39* 和 *Sr2/Yr30*+*Lr46/Yr29/Pm39*) 的单株(155 株、175 株、205 株)占检测植株的 23.66%、26.72%、31.30%,兼有 3 种抗病基因位点(*Lr68*+*Sr2/Yr30*+*Lr46/Yr29/Pm39*) 的单株(92 株)占 14.06%。由此可知,抗病基因(*Lr46/Yr29/Pm39*、*Lr68* 和 *Sr2/Yr30*) 在 F₂ 和 BC₁F₁ 群体中广泛存在,但因杂交方式不同,抗病基因在杂交后代群体中的分布差异明显。

2.2 抗病基因在不同杂交后代群体中的传递频率

由表 2 可知,含抗病基因植株不仅在后代群体中分布广泛,且各基因的传递频率差异明显。对于 F₂ 群体,单个基因传递时,*Lr68* 基因的传递频率(65.41%)比理论(75%)偏少,卡方检验显示其不符

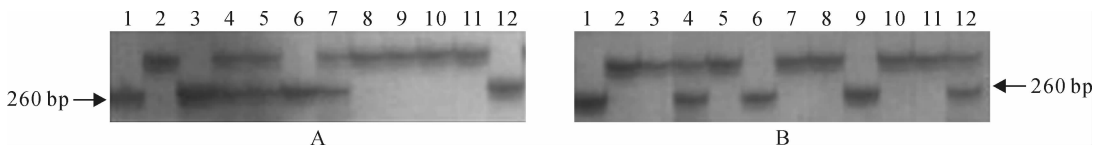


图 1 标记 WMC44 在 F₂ (A) 和 BC₁F₁ (B) 群体中的扩增

1. RL6077; 2. 西农 979; 3~12. 后代群体单株

Fig. 1 Amplification with WMC44 in F₂ (A) and BC₁F₁ (B) populations

1. RL6077; 2. Xinong 979; 3~12. Individual plants of progeny

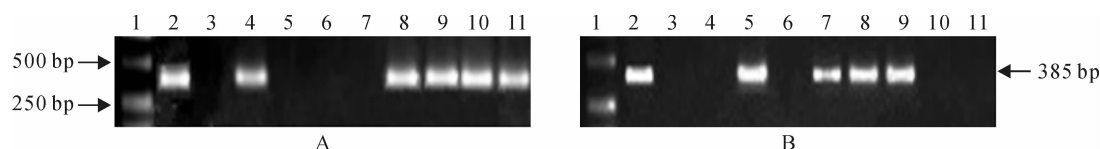


图2 标记 *csGS* 在 F_2 (A) 和 BC_1F_1 (B) 群体中的扩增

1. RL6077; 2. 西农 979; 4~11. 后代群体单株

Fig. 2 Amplification with *csGS* in F_2 (A) and BC_1F_1 (B) populations

1. Marker DL2000; 2. RL6077; 3. Xinong 979; 4~11. Individual plants of progeny

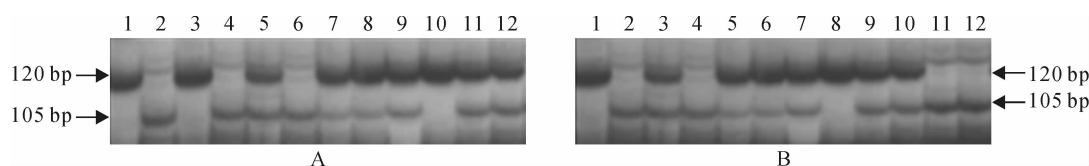


图3 标记 *WMS533* 在 F_2 (A) 和 BC_1F_1 (B) 群体中的扩增

1. RL6077; 2. 西农 979; 3~12. 后代群体单株

Fig. 3 Amplification with *WMS533* in F_2 (A) and BC_1F_1 (B) populations

1. RL6077; 2. Xinong 979; 3~12. Individual plants of progeny

合一对显性基因的遗传规律 ($\chi^2_{[3:1]} > \chi^2_{0.05,1} = 3.84$), *Sr2/Yr30* 基因和 *Lr46/Yr29/Pm39* 基因的传递频率 (分别为 74.53% 和 75.83%) 均与理论 (75%) 差别不大, 由 ($\chi^2_{[3:1]} < \chi^2_{0.05,1} = 3.84$) 可知其符合孟德尔遗传规律; 兼有 2 种抗病基因位点 (*Lr68* + *Sr2/Yr30*、*Lr68* + *Lr46/Yr29/Pm39* 和 *Sr2/Yr30* + *Lr46/Yr29/Pm39*) 组合传递时, 含有 *Lr68* 基因的传递频率 (48.91%、48.05%) 均比理论 (56.25%) 明显偏少, *Sr2/Yr30* + *Lr46/Yr29/Pm39* 基因组合传递 (59.91%) 与理论一致。对于 BC_1F_1 群体, 单基因传递时, *Lr68* 基因传递频率 (44.27%) 比理论 (50%) 偏少, *Sr2/Yr30* 基因和 *Lr46/Yr29/Pm39* 基因传递 (55.11%、56.64%) 均比理论 (50%) 偏多, 3 基因均不符合一对显性基因的遗传规律; 组合传递时, *Lr68* + *Sr2/Yr30*、*Lr68* + *Lr46/Yr29/Pm39* 传递正常, 与理论 (25%) 相当, *Sr2/Yr30* + *Lr46/Yr29/Pm39* 比理论 (25%) 偏多。两群体中兼有 3 种抗病基因位点 (*Lr68* + *Sr2/Yr30* + *Lr46/Yr29/Pm39*) 的均正常传递。由此可知, 两群体抗病基因在向后代转移过程中, *Lr68* 基因不按单显性基因遗传, *Lr46/Yr29/Pm39* 和 *Sr2/Yr30* 基因在自交群体中比回交群体中稳定, 这可能由于雌雄配子分配异常, 基因间产生了连锁交换所致。

2.3 抗病基因与农艺性状的关联分析

根据分子标记对 F_2 群体和 BC_1F_1 群体检测的结果, 结合田间农艺性状调查, 综合分析 F_2 和 BC_1F_1 群体中抗病基因与其主要农艺性状的相关性

(表 3)。由表 3 可以看出, 基因位点 *Lr68*、*Sr2/Yr30* 和 *Lr46/Yr29/Pm39* 与小麦部分农艺性状间存在显著或极显著相关性。其中 3 个抗病基因位点均与株高、穗下茎、穗下节及穗长等性状呈极显著正相关, *Lr68* 和 *Sr2/Yr30* 基因位点均与穗粒数呈显著或极显著正相关。 *Lr46/Yr29/Pm39* 基因位点与千粒重呈显著负相关, 而 *Lr68* 和 *Sr2/Yr30* 基因位点与千粒重负相关、但不显著。 *Lr46/Yr29/Pm39* 基因位点还与单株成穗数显著正相关, 而 *Lr68* 和 *Sr2/Yr30* 基因位点与单株成穗数相关性不显著。可见, 在抗病基因导入的同时, ‘RL6077’/‘西农 979’ 后代群体产生了连锁补益或连锁累赘, 一些优良的或不良的性状均带入后代群体中。在品种选育过程中, 可采用连续回交的方式打破基因间的连锁, 创制优良的变异类型。

2.4 分子标记辅助遗传背景的选择

选用分布于小麦 A、B、D 基因组的 12 对多态性 SSR 引物, 对 BC_1F_1 群体 (‘RL6077’/‘西农 979’//‘西农 979’) 中聚合有 3 个抗病基因位点 (*Lr46/Yr29/Pm39* + *Sr2/Yr30* + *Lr68*) 的 92 个聚合体进行全基因组扫描分析。结果发现, 在 92 个聚合体中, 通过一代分子标记辅助选择, 遗传背景回复率达 80% 以上的共 21 株, 占检测植株的 22.83%; 遗传背景回复率达 90% 以上的有 3 株, 占检测植株的 3.26%; 其中单株遗传背景与轮回亲本 ‘西农 979’ 最高相似程度已达到 91.67%。

表 2 抗病基因的分布及传代频率
Table 2 The distribution and transfer rate of resistance genes and gene combination

检测的基因 Detection gene	F ₂					BC ₁ F ₁				
	有特异带株数 With specific band number	无特异带株数 Without specific band number	传代频率 Transfer rate/%	χ^2	有特异带株数 With specific band number	无特异带株数 Without specific band number	传代频率 Transfer rate/%	χ^2	$\chi^2_{0.05}$	$\chi^2_{0.01}$
<i>Lr68</i>	452	239	65.41	33.36	290	365	44.27	8.36	3.84	6.63
<i>Sr2/Yr30</i>	515	176	74.53	0.06	361	294	55.11	6.65	3.84	6.63
<i>Lr46/Yr29/Pm39</i>	524	167	75.83	0.21	371	284	56.64	11.29	3.84	6.63
<i>Lr68+Sr2/Yr30</i>	338	353	48.91	15.11	155	500	23.66	0.62	7.81	11.34
<i>Lr68+Lr46/Yr29/Pm39</i>	332	359	48.05	18.90	175	480	26.72	1.03	7.81	11.34
<i>Sr2/Yr30+Lr46/Yr29/Pm39</i>	414	277	59.91	3.76	205	450	31.30	13.86	7.81	11.34
<i>Lr68+Sr2/Yr30+Lr46/Yr29/Pm39</i>	263	428	38.06	4.82	92	563	14.06	1.43	14.07	18.08

表 3 不同抗病基因与小麦主要农艺性状的相关性
Table 3 Correlation among different resistance genes and important wheat agronomic traits

基因 Gene	总分蘖数 Total tiller	旗叶长 Leaf length	旗叶宽 Leaf width	单株成穗数 The ear number per plant	株高 Plant height	穗下茎长 Spike-stalk	穗下节长 Spike-internode	穗长 Spike length	单穗有效小穗数 Effective spikelet number per plant	穗粒数 Spike grain number	千粒重 Thousand seed weight
<i>Lr68</i>	0.05	0.10**	-0.03	0.03	0.11**	0.16**	0.18**	0.17**	0.03	0.06*	-0.04
<i>Sr2/Yr30</i>	0.02	0.06*	-0.03	0.04	0.14**	0.16**	0.17**	0.17**	0.07*	0.08**	-0.02
<i>Lr46/Yr29/Pm39</i>	0.03	0.06*	0	0.07*	0.08**	0.13**	0.13**	0.13**	-0.01	0.01	-0.05*

注：*、*、* 分别表示在 0.05 和 0.01 水平(双侧)上显著相关。
Note: *, * and * * indicate significant correlation at the levels(double side) of 0.05 and 0.01, respectively.

3 讨 论

3.1 ‘RL6077’抗病基因的传递规律及其与重要农艺性状的关联性

研究小麦遗传背景中外源优良基因的遗传频率,对外源基因的利用和小麦品种的改良有重要意义。Yang^[28]、Sun^[29]等研究指出,利用远缘材料为亲本,通过自交和回交,能够将 1~2 个抗病基因传递给杂种后代,再通过后代的分离比,可评价外源染色体在小麦背景中的传递情况。本试验以‘RL6077’作为抗病基因的供体亲本,研究了‘RL6077’中 3 个成株抗性基因位点 *Lr46/Yr29/Pm39*、*Lr68* 和 *Sr2/Yr30* 单独及组合传递时的传代频率。通过比较抗病基因的传递频率、与理论差异和卡方检验结果可知,3 个基因位点在向后代传递过程中,抗病基因的遗传规律各不相同。F₂ 群体,单个基因位点传递时,由于 *Lr68* 基因分离比理论偏低明显,尽管 *Sr2/Yr30* 和 *Lr46/Yr29/Pm39* 基因分离正常 ($\chi^2_{[3, 1]} < \chi^2_{0.05, 1} = 3.84$),当 2 个基因位点同时传递时,含 *Lr68* 基因的组合 (*Lr68* + *Sr2/Yr30*、*Lr68* + *Lr46/Yr29/Pm39*) 均比理论偏低,说明 *Lr68* 基因的影响大于另 2 个基因。BC₁F₁ 群体,单个基因位点传递时,*Lr68* 基因的分离比理论略低,*Sr2/Yr30* 和 *Lr46/Yr29/Pm39* 基因分离比理论略高,当 2 个基因位点同时传递时,高低组合 (*Lr68* + *Sr2/Yr30*、*Lr68* + *Lr46/Yr29/Pm39*) 均正常传递,高高组合 (*Sr2/Yr30* + *Lr46/Yr29/Pm39*) 比理论偏高,说明 3 个基因在传递过程中可互相协调。同时,当 3 个基因位点一同传递时,后代均传递正常。由此推测,抗病基因在向后代传递过程中可能存在连锁交换作用,3 个基因位点在两群体中传递时均能充分发挥各自作用,且相互协调。‘RL6077’作为小麦抗病基因供体亲本,可以将抗病基因向不同小麦基因型中转移,我们可根据需要选出侧重的目的基因。

由于不同的抗病基因关联着不同的农艺性状,目标基因在转移过程中往往带入了非轮回亲本上的染色体片段,这些染色体片段上通常携带有不利性状的基因^[30],在回交育种过程中,我们应根据实际情况综合选择。‘RL6077’最大的优点是带有抗病基因,相应缺点是植株偏高。通过分析可知,‘RL6077’的 3 种兼抗基因与几个主要农艺性状均有显著相关性。例如,*Lr46/Yr29/Pm39*、*Lr68* 和 *Sr2/Yr30* 基因均与株高、穗下茎、穗下节极显著正相关,说明随着抗病基因的导入,这些植株在茎秆部

性状上受到很大影响,这将严重影响植株的抗倒伏性,会导致小麦生长后期遇风雨倒伏,籽粒发芽霉变等,对小麦的品质和产量以及安全成熟都有负作用。*Lr46/Yr29/Pm39*、*Lr68* 和 *Sr2/Yr30* 基因又与叶长、穗长和穗粒数等性状显著正相关,这些性状关系着小麦的光合能力或产量指标,说明随着‘RL6077’抗病基因的介入,后代群体继承了其强光合、粒大穗长的特征。同时,因不同的抗病基因与不同性状之间的关联性不一致,3 种抗病基因又分别影响某些性状。*Lr68* 和 *Sr2/Yr30* 基因都与穗粒数显著正相关,区别为 *Lr68* 基因可能通过增加叶长积累生物量来增多穗粒数,*Sr2/Yr30* 基因则通过增加有效小穗数来增多穗粒数。*Lr46/Yr29/Pm39* 基因与千粒重显著负相关,其可能原因是植株生长前期成穗数过多,由于同一群体中各植株的生物学产量相差不大,成穗数过多导致每穗的有效小穗数减少,穗粒变小,对应千粒重减少。总之,随着抗病基因的导入,这些好的或不好的性状均带入后代群体,产生了连锁补益或连锁累赘,回交有利于打破基因间的连锁,连续回交是性状改良的好方法。

3.2 分子标记辅助选择

传统的抗病育种不仅依赖于抗性鉴定和表型选择,且受发病条件的制约,难以育成多个抗病基因聚合体。分子标记辅助选择育种有助于突破常规育种的局限性,利用与目标基因紧密连锁的标记,可在早期分离世代进行选择,从而缩短育种周期,提高育种效率^[31]。另外,将多个抗性基因聚合时,传统的育种需要对每个基因进行鉴定,费时且达不到预期的目的,尤其当一个基因对另一个基因的遗传效应具有上位性或掩盖作用时,传统的育种方法要鉴定被掩盖的基因几乎是不可能^[32]。Huang 等^[33]、Singh 等^[34]利用分子标记成功对水稻白叶枯病基因 *Xa21*、*Xa4*、*xa13* 和 *xa5* 的 2 个、3 个或 4 个不同基因进行聚合,得到抗性明显提高的累加系。因此,利用分子标记辅助选择能很容易鉴定含有多个抗性基因的植株。本实验充分利用分子标记辅助选择的优点,选用与 *Lr46/Yr29/Pm39*、*Lr68* 和 *Sr2/Yr30* 等 3 个抗病基因位点紧密连锁的分子标记 *WMC44*、*csGS*、*WMS533* 分别对 F₂ 群体的 691 个单株和 BC₁F₁ 群体的 655 个单株进行抗性鉴定,在早期世代获得了同时含有 2 个或者 3 个基因位点的累加系植株。这对抗病新种质创制具有重要参考意义。

3.3 分子标记辅助选择与常规育种方法的结合

分子标记虽然有诸多优点,但必须与传统的常

选育方法结合,才能达到加速育种进程和提高育种效率。本研究利用分子标记选择在 F_2 和 BC_1F_1 群体早期世代进行抗病基因单株鉴定的同时,还进行了田间农艺性状的选择。由于目的基因和标记之间有可能发生交换,而且抗性表现是基因存在与否的直接证明^[35],本试验后续研究将对 F_2 和 BC_1F_1 群体中选单株后代进行进一步分子标记选择,在结合田间优良农艺性状选择的基础上,同时将对分子标记所选的聚合单株进行抗病接种及验证分析,以期选育出优异的抗锈病兼高产优质的小麦新种质。在对含抗病标记植株的后代进行检测时,标记选择的准确性是分子标记辅助选择的一个重要方面。一般而言,各标记与目标基因间均有一定的重组率,同一标记和目的基因在不同的遗传背景下也有一定的差异^[35],因此,分子标记的选择效果取决于分子标记与目标基因的重组频率和它们之间连锁的相引或相斥关系。分子标记辅助选择是辅助手段,在低世代中要选择大量的单株和株系,随着世代的增加逐渐淘汰非目标材料,且经分子标记辅助选择选得的材料,最终要经过田间的鉴定,这样在多世代的选择中,可以逐步剔除由于分子标记辅助选择的不准确性而混进的非目标材料,同时也不至于丢失目标基因,所以,对选择准确性可允许的范围较大。

3.4 遗传背景选择

回交育种的目标是从中选出除目标基因外与轮回亲本相似的单株,这就要进行背景选择。在进行背景分析时,要求用来选择的标记能够覆盖整个基因组^[36]。用覆盖整个基因组的标记对回交后代进行背景分析时,可以推测个体的染色体组成,选出除了目标位点外,其它位点均与轮回亲本相似的个体。

本试验初步筛选了12对均匀分布于小麦A、B、D染色体组的多态性SSR标记对获得的 BC_1F_1 群体中同时含有3种抗病基因位点的92个聚合体系进行了背景分析。结果表明,特异位点回复率超过80%的有21株,特异位点回复率超过90%的只有3株,这些在传递过程中被很好地保留下来的基因位点可能成为骨干亲本的遗传基础。同时,从入选植株统计数量上可知,回复率在70%~80%之间株数显著多于回复率低于70%的株数,说明这些检测植株在某些位点回复后其他位点也很好回复到轮回亲本的基因型,这与夏军红等^[27]、乔岩等^[30]的研究结论相似。由此设想,通过选择合适的标记,可以通过对有限数目基因位点进行背景选择达到对整个基因组进行背景选择的类似效果,即在利用分子标记对外源基因进行转移的过程中,可以选用少量的分子标记先对轮回亲本上的特异位点进行选择,从而尽可能从后代群体中淘汰大量无用的个体,减少后续世代群体的数量,提高回交育种的效率。

虽然种间杂种后代的广泛分离可以使我们从中选出各种各样的材料,也可以通过品种杂交创造新类型,但被高频保留下来的位点不多,所以在回交选育早期世代,应选择合适数量的标记进行背景选择,否则会导致很多优良种质资源丢失。本试验不足之处为进行背景选择时所用标记数量略微偏少,尽管选择的标记均匀分布于各染色体组,但分子标记与目标基因的重组频率和它们之间连锁距离还有待进一步确定。另外,检测的位点与小麦基因组相比,毕竟是很小的一部分,且控制许多性状的基因大多为数量性状位点(QTLs),因此,背景选择还应该与田间表型选择相结合,才能收到较好的效果。

参考文献:

- [1] 李振岐,曾士迈. 中国小麦锈病[M]. 北京:中国农业出版社,2002:41—50,164—173.
- [2] ZHANG Y J(张跃进),JIANG Y Y(姜玉英),FENG X D(冯晓东),*et al.* The national trend of the major crop diseases and insect pests occurrence in 2009[J]. *China Plant Protection*(中国植保导刊),2009,29(3):33—35(in Chinese).
- [3] TAR M,PUMHAUSER L,CS6SZ L,*et al.* Identification of molecular markers for an efficient leaf rust resistance gene *Lr29* in wheat[J]. *Acta Biologica Szegediensis*,2002,46(3—4):133—134.
- [4] HE ZH H(何中虎),XIA X CH(夏先春),CHEN W Q(陈万权). Breeding for resistance to new race Ug99 of stem rust pathogen[J]. *Journal of Triticeae Crops*(麦类作物学报),2008,28(1):170—173(in Chinese).
- [5] ZHANG H Q(张海泉). Research advances in molecular breeding of powdery mildew resistance of wheat[J]. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*(中国生态农业学报),2008,16(4):1 060—1 066(in Chinese).
- [6] CHEN X M,LINE R F. Gene action in wheat cultivars for durable high-temperature adult-plant resistance and interactions with race-specific,seedling resistance to stripe rust caused by *Puccinia striiformis*[J]. *Phytopathology*,1995,85(5):567—572.
- [7] CHEN X M,LINE R F. Inheritance of stripe rust resistance in wheat cultivars used to differentiate races of *Puccinia striiformis* in North America[J]. *Phytopathology*,1992,82(6):633—637.
- [8] LU Y M,LAN C X,LIANG S S,*et al.* QTL mapping for adult -plant resistance to stripe rust in Italian common wheat cultivars Libellula and Strampelli[J]. *Theoretical and Applied Genetics*,2009,119(8):1 349—1 359.

- [9] HE ZH H(何中虎), XIA X CH(夏先春), LUO J(罗 晶), *et al.* Trend analysis of international wheat breeding[J]. *Journal of Triticeae Crops*(麦类作物学报), 2006, **26**(2): 154—156(in Chinese).
- [10] HE ZH H(何中虎), LAN C X(兰彩霞), CHEN X M(陈新民), *et al.* Progress and perspective in research of adult-plant resistance to stripe rust and powdery mildew in wheat[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2011, **44**(11): 2 193—2 215(in Chinese).
- [11] HAO ZH N(郝中娜), ZHANG H ZH(张红志), LI Y G(李永刚), *et al.* Study on mechanism of adult plant resistance[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*(浙江农业学报), 2007, **19**(6): 457—462(in Chinese).
- [12] EVANS S, LAGUDAH. Molecular genetics of race non-specific rust resistance in wheat[J]. *Euphytica*, 2011, **179**(1): 81—91.
- [13] ROSEWAME G M, SINGH R P, HUERTA-ESPINO J, *et al.* Leaf tip necrosis, molecular markers and β 1-proteasome subunits associated with the slow rusting resistance genes *Lr46/Yr29*[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, **112**(3): 500—508.
- [14] LILLEMOM, 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]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, **116**(8): 1 155—1 166.
- [15] CROSSA J, BURGUENO J, DREISIGACKER S, *et al.* Association analysis of historical bread wheat germplasm using additive genetic covariance of relatives and population structure[J]. *Genetics*, 2007, **177**(3): 1 889—1 913.
- [16] HAYDEN M J, KUCHEL H, CHALMERS K J. Sequence tagged microsatellites for the Xgwm533 locus provide new diagnostic markers to select for the presence of stem rust resistance gene *Sr2* in bread wheat (*Triticum aestivum* L)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, **109**(8): 1 641—1 647.
- [17] SYBIL A H, RAVI P S, LAGUDAH E S, *et al.* *Lr68*: a new gene conferring slow rusting resistance to leaf rust in wheat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2012, **124**(8): 1 475—1 486.
- [18] WU L(伍 玲), XIA X CH(夏先春), ZHU H ZH(朱华忠), *et al.* Molecular characterization of *Lr34/Yr18/Pm38* in 273 CIMMYT wheat cultivars and lines using functional markers[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2010, **43**(22): 4 553—4 561(in Chinese).
- [19] HERRERA-FOESEL S A, LAGUDAH E S, HUERTA-ESPINO J, *et al.* New slow-rusting leaf rust and stripe rust resistance gene *Lr67* and *Yr46* in wheat are pleiotropic or closely linked[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, **122**(1): 239—249.
- [20] LAN C X, LIANG S S, WANG Z L, *et al.* Quantitative trait loci mapping for adult-plant resistance against powdery mildew in Chinese wheat cultivar Bainong64[J]. *Phytopathology*, 2009, **99**(10): 1 121—1 126.
- [21] XU X W(徐小万), LEI J J(雷建军), LUO SH B(罗少波), *et al.* Crop gene pyramiding molecular breeding[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*(植物遗传资源学报), 2010, **11**(3): 364—368(in Chinese).
- [22] PEI Q L(裴庆利), WANG CH L(王春连), LIU P Q(刘丕庆), *et al.* Marker-assisted selection for pyramiding disease and insect resistance genes in rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science*(中国水稻科学), 2011, **25**(2): 119—129(in Chinese).
- [23] COLIN W H, JULIAN B T, BRENT D M, *et al.* An introgression on wheat chromosome 4DL in ‘RL6077’ (Thatcher \times PI250413) confers adult plant resistance to stripe rust and leaf rust (*Lr67*)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2010, **121**(6): 1 083—1 091.
- [24] YU H T(俞洪涛), SUN R J(孙瑞建), WANG H J(王红军). The good quality and high yield cultivation techniques of the new wheat variety Xinong 979[J]. *China Seed Industry*(中国种业), 2009, S1: 98—99(in Chinese).
- [25] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第2版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 533—535.
- [26] WANG M L, BARKLEY N A, YU J K, *et al.* Transfer of simple sequence repeat(SSR) marker from major cereal crops to minor grass species for germplasm characterization and evaluation[J]. *Plant Genetic Resources*, 2005, **3**(1): 45—47.
- [27] XIA J H(夏军红), ZHENG Y L(郑用琰). Molecular marker-assisted backcross breeding of maize Rf3 NIL and its efficient analysis[J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2002, **28**(3): 339—344(in Chinese).
- [28] YANG CH H(杨昌河). Genetic research of emmer Khapli resistance to powdery mildew[J]. *Guizhou Agronomy Journal*(贵州农学院学报), 1987, **12**(2): 64—69(in Chinese).
- [29] SUN Q X(孙其信), HUANG T CH(黄铁城), NI ZH F(倪中福), *et al.* Wheat heterosis group of research I. Genetic differences between wheat varieties are studied by using RAPD markers[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 1996, **4**(2): 103—110(in Chinese).
- [30] QIAO Y(乔 岩), WANG H N(王汉宁), ZHANG CH(张 成), *et al.* The linkage drag analysis by SSR markers in maize endosperm mutant *ae* gene[J]. *Acta Prataculturae Sinica*(草业学报), 2011, **20**(1): 140—147(in Chinese).
- [31] XU L(许 丽), LI Y Y(李玥莹), LIN F(林 风). DNA molecular markers and its application in crop genetic breeding[J]. *Journal of Shenyang Normal University*(Nat. Sci. Edi.)(沈阳师范大学学报·自然科学版), 2006, **24**(4): 466—469(in Chinese).
- [32] LI Y(黎 裕), WANG J K(王健康), QIU L J(邱丽娟), *et al.* Crop molecular breeding in China: Current status and perspectives[J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2010, **36**(9): 1 425—1 430(in Chinese).
- [33] HUANG N, ANGELES E R, DOMINGO J, *et al.* Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, **95**(3): 313—320.
- [34] SINGH S, SIDHU J S, HUANG N, *et al.* Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13* and *Xa21*) using marker-assisted selection into indica rice cultivar PR106[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, **102**(6—7): 1 011—1 015.
- [35] GAO A L(高安礼), HE H G(何华纲), CHEN Q ZH(陈全战), *et al.* Pyramiding wheat powdery mildew resistance genes *Pm2*, *Pm4a* and *Pm21* by molecular marker-assisted selection[J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2005, **31**(11): 1 400—1 405(in Chinese).
- [36] FANG M J(方明镜), DING D(丁 冬), YANG W P(杨文鹏), *et al.* The linkage drag analysis of flanked opaque2 by SSR markers in two maize BC₁F₁ population[J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2005, **31**(10): 1 359—1 364(in Chinese).