

## 小麦抗白粉病基因聚合体 DH 材料的分子标记鉴定

罗瑛皓<sup>1,2</sup> 陈新民<sup>1,\*</sup> 夏兰芹<sup>1</sup> 陈孝<sup>1</sup> 何中虎<sup>1</sup> 任正隆<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院作物育种栽培研究所, 国家小麦改良中心, 北京 100081; <sup>2</sup> 四川农业大学, 四川雅安 625014)

**摘要:** 小麦白粉病是由 *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* 引起的世界性病害, 利用分子标记辅助选择进行抗白粉病基因累加, 可延长品种抗病性寿命, 有利于提高育种效率。本研究利用 *Pm4b* 的 STS-PCR 标记, *Pm13* 和 *PmV* 的 SCAR-PCR 标记, 以及与 *Pm12* 共分离的同工酶标记 (-Amy-1), 对来自小麦与玉米杂交产生的双单倍体材料的 7 个株系和 9 个穗系的 49 个随机单株进行检测。分别筛选出含有 *Pm12 + Pm4b + PmV* 和 *Pm13 + Pm4b + PmV* 3 个抗病基因的植株 7 个和 1 个, 含有 *Pm12 + Pm4b*、*Pm4b + PmV*、*Pm12 + PmV* 和 *Pm13 + Pm4b* 2 个抗病基因的植株 3 个、6 个、2 个和 2 个。利用小麦与玉米杂交方法创造多基因聚合体 DH 材料时, 通过诱导愈伤组织, 可产生更多不同基因类型的聚合体。

**关键词:** 小麦; 白粉病; 双单倍体; 分子标记; 辅助选择; 抗性基因累加

中图分类号: S512

## Molecular Marker-Assisted Selection of DH Plants Conferring Genes Resistant to Powdery Mildew in Wheat (*Triticum aestivum* L.)

LUO Ying-Hao<sup>1,2</sup>, CHEN Xin-Min<sup>1,\*</sup>, XIA Lan-Qin<sup>1</sup>, CHEN Xiao<sup>1</sup>, HE Zhong-Hu<sup>1</sup>, REN Zheng-Long<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> National Wheat Improvement Center, Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

<sup>2</sup> Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, Sichuan, China)

**Abstract:** Powdery mildew, caused by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, is one of the most destructive wheat diseases worldwide. Using molecular markers to pyramid more effective resistance genes is one way to sustain the resistance of wheat cultivars. The objective of this study was to identify the resistance gene pyramided in DH plants by molecular markers. A total of 49 DH plants derived from wheat × maize crosses and potentially containing the multiple resistance genes were tested by the STS-PCR marker of *Pm4b*, SCAR-PCR marker of *Pm13* & *PmV*, and the -amylase isoenzyme marker of *Pm12*. The results showed that seven plants conferred with *Pm4b + Pm12 + PmV*, one plant with *Pm4b + Pm13 + PmV*, three plants with *Pm12 + Pm4b*, six plants with *Pm4b + PmV*, two plants with *Pm12 + PmV*, two plants with *Pm13 + Pm4b*, respectively (Table 1). When using wheat × maize crosses to produce resistance gene pyramided DH plants, it could produce more pyramided DH types through callus inducing.

**Key words:** Common wheat; Powdery mildew; Doubled haploid (DH); Molecular marker assisted selection; Pyramid resistance gene

白粉病是影响小麦生产的世界性病害, 选育和推广抗病品种是控制小麦白粉病为害既安全又经济的手段。由于小麦白粉病菌具有群体大、生理小种多且变异快等特点, 如果生产上大面积推广使用单一抗源的品种, 随着白粉菌生理小种变化, 会导致品种抗病性很快丧失。因此, 累加多个抗病基因是提高抗病广谱性和延长品种抗性寿命的有效手段之一。然而, 在育种实践中通过常规手段难以鉴定出多个基因在一起的材料。利用分子标记辅助选择

(molecular marker-assisted selection, MAS), 可快速、准确地鉴定出具体的抗性基因, 从而实现抗病基因的聚合。目前已发现的小麦主效抗白粉病基因中, 多数已有与其紧密连锁的分子标记, 包括目前在我国大部分麦区表现出高抗至免疫反应的抗病基因 *Pm4b*<sup>[1]</sup>、*Pm12*<sup>[2]</sup>、*Pm13*<sup>[3]</sup> 和 *Pm21*<sup>[4]</sup> 等。

本研究的目的是利用 *Pm4b*、*Pm13* 及 *Pm21* 的 PCR 标记和 *Pm12* 的同工酶标记, 对来自于小麦与玉米杂交产生的 49 株可能含有上述抗病基因的小

\*基金项目: 国家自然科学基金重点国际合作(30220140636)、863 重大专项(2002AA70030)和中国农科院院长基金资助项目。

作者简介: 罗瑛皓(1977 - ), 女, 硕士, 主要从事小麦遗传育种研究。\* 通讯作者: 陈新民。Tel: 010-68918741; E-mail: chenxm@mail.caas.net.cn

Received(收稿日期): 2004-04-26, Accepted(接受日期): 2004-09-11.

麦 DH 材料进行鉴定,以筛选累加 2 个和 3 个抗白粉病基因的植株,为培育持久抗病品种提供材料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料

从小麦与玉米杂交产生的双单倍体 DH 株系 WM17-1、WM17-2、WM42、WM30、WM1-21、WM1-22 和 WM1-23 中随机取 23 株以及 WM16a-WM16i 穗系中随机取 26 株,共计 49 株进行分子标记鉴定,其代号、品系名称和组合等见表 1。表 1 中除株号 N24~N49 是幼胚愈伤组织再生植株 WM16 的 9 个不同单穗自交后代外,其余均是幼胚培养一步成苗的后代。亲本材料 YW243 含 *Pm4b*, Pm97033 (具有来自前苏联的簇毛麦血源,其抗白粉病基因暂称为 *PmV*) 含 *PmV*, 70281 含 *Pm16*, 70283 含 *Pm13* 和 70286 含 *Pm12*。抗病对照为含 *Pm13* 的中国春 (CS-*Pm13*)、含 *Pm2 + Pm4b* 的 CA9550、含 *PmV* 的 C<sub>2</sub>62-6、含 *Pm12 + Pm1* 的 Line31、含 *Pm1* 的 Axminster/8<sup>+</sup>Cc 和 CI13838/8<sup>+</sup>Cc 以及感病对照中国春 (CS) 和 Chancellor (Cc)。

以上材料除 70281、70283 和 70286 由中国农业科学院品种资源研究所贾继增研究员提供外,其余均由中国农业科学院作物育种栽培研究所创制、收集或保存。

### 1.2 方法

1.2.1 DH 材料的创造 将上述含有不同抗病基因的亲本材料进行杂交,获得复交组合 70281/YW243//Pm97033、70286/YW243//Pm97033 和 YW243/70283//Pm97033 F<sub>1</sub> 代,单交组合 YW243/70283 F<sub>3</sub> 株系,采用陈新民等<sup>[5]</sup>小麦 × 玉米方法,分别用玉米花粉进行授粉,经幼胚培养一步成苗或诱导愈伤组织再培养获得单倍体幼苗。一步成苗采用 1/2 MS 培养基;由愈伤组织再分化成苗采用 1/2 MS + 2,4-D 2 mg/L 诱导愈伤组织,用 1/2 MS 培养基 + NAA 1 mg/L + KT 1 mg/L 分化培养成苗。采用 0.04% 秋水仙素 + 3% 二甲基亚砷溶液进行浸根加倍处理,获得染色体加倍的双单倍体植株。经连续 2 年的自交选择后,从中挑选农艺性状较好的 49 个株系进行抗病性和分子标记鉴定。

1.2.2 抗病性鉴定 2002 年在本所温室旁边的试验地秋播 DH 材料及抗病和感病对照,在麦苗长出一叶一心时,用华北地区优势白粉病菌 15 号生理小种进行人工接种,白粉病菌菌种由中国农业大学

杨作民教授提供。当感病对照发病充分时 (接种后 2 周),记载发病情况,有病菌孢子为感,反之为抗。

### 1.2.3 分子标记鉴定

1.2.3.1 基因组总 DNA 的提取 采用 Sharp 等<sup>[6]</sup>提出,后经改进的酚-氯仿法提取基因组总 DNA,并用 RNA 酶 A 和酚-氯仿法进行纯化。

1.2.3.2 引物的合成 PCR 特异性引物由上海生工生物技术公司合成,具体序列如下:

*Pm4b* 的 STS 引物:

P1 5'-ACGA GTGA TGCTCCA GGA TATGG-3'

P2 5'-GATCCACCTTTTCCTTGACAA GC-3'

*Pm13* 的 SCAR 引物:

*Pm13L* 5'-CGCCAGCCAATTTATCTCCATGA -3'

*Pm13R* 5'-AGCCATGCGCGGTGTCATGTGAA-3'

*PmV* 的 SCAR 引物:

*Pm21C* 5'-CACTCTCCTCAAACCTTGCAAG-3'

*Pm21D* 5'-CACTCTCCTCCACTAACA GAGG-3'

1.2.3.3 STS 分析 PCR 扩增反应体系为 25 μL,其中含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 μmol/L dNTP, 80 ng 模板 DNA, 1 U *Taq* DNA 聚合酶,引物 P1、P2 各 0.24 μmol/L。反应在 Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480 上进行。反应条件为 94 °C 预变性 5 min;以 94 °C 40 s, 60 °C 30 s, 72 °C 40 s 进行 35 个循环;72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色,紫外凝胶扫描仪上观察并照相。

1.2.3.4 SCAR 分析 PCR 扩增反应体系为 20 μL,其中含 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 μmol/L dNTP, 50 ng 模板 DNA, 1 U *Taq* DNA 聚合酶,上下游引物各 0.1 μmol/L。反应在 Perkin-Elmer DNA Thermal Cycler 480 上进行。反应条件为 94 °C 预变性 3 min;以 94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min 进行 40 个循环;72 °C 延伸 5 min, 4 °C 保存。扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶中电泳,溴化乙锭染色,紫外凝胶扫描仪上观察并照相。

1.2.4 同工酶分析 通过等电聚焦电泳检测是否含有与 *Pm12* 基因共分离的同工酶标记 -Amy-1,从而确定 *Pm12* 是否存在。-Amy-1 的分析方法参见 Gale<sup>[7]</sup>等。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦白粉病抗性鉴定

苗期鉴定结果表明,感病对照小麦品种 (系) 中

国春、Chancellor、Axminster/8<sup>\*</sup>Cc (Pm1) 和 CI13838/8<sup>\*</sup>Cc (Pm1) 高度感病,抗病对照 CA9550 (Pm2 + Pm4b)、C<sub>2</sub>62-6 (PmV)、Line31 (Pm12 + Pm1) 和 CS-Pm13 表现抗病。说明抗病基因

Pm4b、Pm12、Pm13 和 PmV 对华北地区流行的白粉菌 15 号生理小种仍然有效。49 份 DH 材料中,除序号为 N29 的单株 WM16-a-10 感病外,其余全部抗病,详见表 1。

表 1 DH 植株的抗病性鉴定以及分子标记和同工酶标记检测结果  
Table 1 Results of disease identification and molecular as well as isoenzyme maker analysis in DH population

| 序号 No.                      | 品系 Line   | 组合 Cross             | Pm4b | Pm12 | Pm13 | PmV | 抗病性 Disease reaction |          |
|-----------------------------|-----------|----------------------|------|------|------|-----|----------------------|----------|
|                             |           |                      |      |      |      |     | 苗期 Seedling          | 成株 Adult |
| N01                         | WM17-1-1  | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N02                         | WM17-1-2  | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N03                         | WM17-1-3  | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N04                         | WM17-1-4  | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N05                         | WM17-1-5  | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N06                         | WM17-1-6  | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N07                         | WM17-1-7  | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N08                         | WM17-1-8  | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N09                         | WM17-1-9  | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N10                         | WM17-1-10 | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N11                         | WM17-2-1  | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | S        |
| N12                         | WM17-2-2  | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | S        |
| N13                         | WM17-2-3  | 70281/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | S        |
| N14                         | WM42-1-1  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | +   | R                    | R        |
| N15                         | WM42-1-2  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | +   | R                    | R        |
| N16                         | WM30-1-1  | YW243/70283//Pm97033 | +    | -    | +    | +   | R                    | R        |
| N17                         | WM1-21-1  | YW243/70283          | +    | -    | +    | -   | R                    | R        |
| N18                         | WM1-21-2  | YW243/70283          | +    | -    | +    | -   | R                    | R        |
| N19                         | WM1-22-1  | YW243/70283          | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N20                         | WM1-22-2  | YW243/70283          | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N21                         | WM1-22-3  | YW243/70283          | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N22                         | WM1-22-4  | YW243/70283          | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N23                         | WM1-23-1  | YW243/70283          | +    | -    | -    | -   | R                    | R        |
| N24                         | WM16-a-3  | 70286/YW243//Pm97033 | -    | +    | -    | -   | R                    | R        |
| N25                         | WM16-a-6  | 70286/YW243//Pm97033 | -    | +    | -    | -   | R                    | R        |
| N26                         | WM16-a-7  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | +    | -    | -   | R                    | R        |
| N27                         | WM16-a-8  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | +    | -    | -   | R                    | R        |
| N28                         | WM16-a-9  | 70286/YW243//Pm97033 | -    | +    | -    | -   | R                    | R        |
| N29                         | WM16-a-10 | 70286/YW243//Pm97033 | -    | -    | -    | -   | S                    | S        |
| N30                         | WM16-b-1  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | +    | -    | +   | R                    | R        |
| N31                         | WM16-c-1  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | +   | R                    | R        |
| N32                         | WM16-c-3  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | +   | R                    | R        |
| N33                         | WM16-d-1  | 70286/YW243//Pm97033 | -    | +    | -    | +   | R                    | R        |
| N34                         | WM16-d-2  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | +    | -    | +   | R                    | R        |
| N35                         | WM16-d-6  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | +    | -    | +   | R                    | R        |
| N36                         | WM16-d-7  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | +   | R                    | R        |
| N37                         | WM16-d-8  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | +    | -    | +   | R                    | R        |
| N38                         | WM16-d-9  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | +    | -    | +   | R                    | R        |
| N39                         | WM16-d-10 | 70286/YW243//Pm97033 | -    | +    | -    | +   | R                    | R        |
| N40                         | WM16-e-1  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | +   | R                    | R        |
| N41                         | WM16-f-1  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | S        |
| N42                         | WM16-g-1  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | +    | -    | +   | R                    | R        |
| N43                         | WM16-g-2  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | +    | -    | +   | R                    | R        |
| N44                         | WM16-lr-6 | 70286/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | S        |
| N45                         | WM16-lr-7 | 70286/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | S        |
| N46                         | WM16-lr-8 | 70286/YW243//Pm97033 | +    | +    | -    | -   | R                    | R        |
| N47                         | WM16-F-1  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | S        |
| N48                         | WM16-F-2  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | S        |
| N49                         | WM16-F-3  | 70286/YW243//Pm97033 | +    | -    | -    | -   | R                    | S        |
| Chinese Spring              |           |                      |      |      |      |     | S                    | S        |
| CS-Pm13                     |           |                      |      |      | +    |     | R                    | R        |
| Chancellor                  |           |                      |      |      |      |     | S                    | S        |
| Axminster/8 <sup>*</sup> Cc |           |                      |      |      |      |     | S                    | S        |
| CI13838/8 <sup>*</sup> Cc   |           |                      |      |      |      |     | S                    | S        |
| CA9550                      |           |                      | +    |      |      |     | R                    | S        |
| C <sub>2</sub> 62-6         |           |                      |      |      |      | +   | R                    | R        |
| Line31                      |           |                      |      | +    |      |     | R                    | R        |

注:“+”和“-”分别表示有和没有某一特异标记,空白则表示该材料的组合不包含此基因。

Notes: Plus and minus marker indicate that the plant possessed or absented a special band, respectively. Blank space indicates that the crosses didn't include the gene.

成株期对病害进行了调查,发现抗病对照 CA9550(*Pm2* + *Pm4b*)感病,这可能是由于气流传播不能克服 *Pm2*、*Pm4b* 的白粉菌接种体所致。在 DH 材料中除不含任何抗病基因的材料 N29 感病外,还有 9 株感病,序号为 N11、N12、N13、N41、N44、N45、N47、N48 和 N49,它们均含有 *Pm4b* 一个抗病基因,详见表 1。

## 2.2 分子标记鉴定

2.2.1 *Pm4b* 的 STS 检测 刘金元等<sup>[1]</sup>将 *Pm4* 的 RFLP 标记转化成 STS-PCR 标记,谢皓等<sup>[8]</sup>证明

此标记可作为 *Pm4a* 和 *Pm4b* 共同的特异 PCR 标记。本试验用 *Pm4* 基因的特异引物 P1 和 P2,对含有 *Pm4b* 的材料 CA9550、感病对照中国春以及 49 份 DH 材料进行 PCR 扩增。结果表明,在抗病对照材料 CA9550 和 43 份 DH 材料中扩增出一条 1.7 kb 的特异带,这正是谢皓报道的与 *Pm4b* 抗性基因紧密连锁的特异带,表明这些材料含有抗病基因 *Pm4b*;感病对照 CS 和 6 份 DH 材料未检测出该条带,表明它们不含 *Pm4b* 抗病基因。详见表 1 和图 1。



图 1 *Pm4*-STS 引物 PCR 扩增结果

Fig. 1 Result of PCR amplification with *Pm4*-STS primer

1: 1 kb DNA ladder; 2: CA9550 (*Pm2* + *4b*); 3: CS; 4 - 20: N1, N2, N3, N4, N5, N6, N7, N33, N23, N24, N25, N17, N18, N19, N20, N21, N22.

2.2.2 *Pm13* 的 SCAR 检测 Cenci 等<sup>[3]</sup>将与 *Pm13* 基因紧密连锁的 RAPD 标记转化成稳定的 SCAR 标记。本试验用引物 *Pm13L* 和 *Pm13R*,扩增含有抗病基因 *Pm13* 的中国春、感病对照中国春以及 8 份 DH 材料。结果表明,在抗性对照材料

CS-*Pm13* 和 3 份 DH 材料中均扩增出一条 564 bp 的特异带,感病对照 CS 和 6 份 DH 材料未检测出该条带,详见表 1 和图 2。该条带大小与 Cenci 等报道的一致,表明是与 *Pm13* 抗性基因紧密连锁的特异带,具该条带者含有 *Pm13* 抗病基因,反之则无。



图 2 *Pm13*-SCAR 引物 PCR 扩增结果

Fig. 2 Result of PCR amplification with *Pm13*-SCAR primer

1: 1 kb DNA ladder; 2: CS-*Pm13*; 3: CS; 4: Cc; 5 - 12: N16, N17, N18, N19, N20, N21, N22.

2.2.3 *PmV* 的 SCAR 检测 Liu 等<sup>[4]</sup>将 *Pm21* 的 RAPD 标记转化成 SCAR 标记,张增艳等<sup>[9]</sup>认为 *Pm21* 的 SCAR 标记也可以作为来自前苏联簇毛麦的 *PmV* 的特异 PCR 标记。本试验用引物 *Pm21C* 和 *Pm21D* 扩增含有抗病基因 *PmV* 的材料 C<sub>2</sub>62-6、感病对照 CS 以及 42 份 DH 材料。结果表明,在

阳性对照材料 C<sub>2</sub>62-6 和 16 份 DH 材料中均扩增出一条 1.4 kb 的特异带,表明它们含有抗病基因 *PmV*;感病对照 CS 和 26 份 DH 材料未检测出该带,表明它们不具有抗病基因 *PmV*。该带即是 Liu 等报道的与 *Pm21* 抗性基因紧密连锁的特异标记 SCAR<sub>1400</sub>,详见表 1 和图 3。

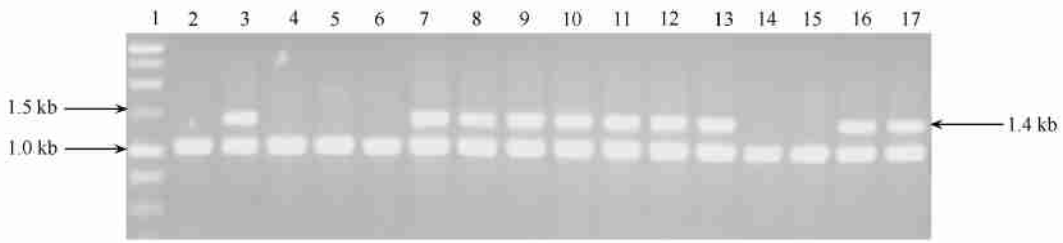


图 3 PmV-SCAR 引物 PCR 扩增结果

Fig. 3 Result of PCR amplification with PmV-SCAR primer

1: 1 kb DNA ladder; 2: CS; 3: C<sub>2</sub>62-6 (PmV); 4- 17: N46, N45, N44, N39, N38, N37, N36, N35, N43, N30, N14, N49, N41, N32, N31.

### 2.3 Pm12 的同工酶检测

对抗病对照材料 Line31 (Pm12 + 1), 感病对照材料 CS、Axminster/8\* Cc (Pm1)、CII13838/8\* Cc (Pm1) 以及 28 份 DH 材料进行 -Amy-1 的等电聚焦电泳分析。结果表明, 在等电点约为 6.2 处, 抗病对照材料 Line31 出现两条明显的带, 而感病对照材

料 CS、Axminster/8\* Cc 和 CII13838/8\* Cc 未出现这两条带。说明这是与 Pm12 共分离的同工酶标记 -Amy-1 的特征带型, 与贾继增等<sup>[2]</sup> 的报道一致。在 28 份 DH 材料中, 有 15 份具有此特征带, 13 份没有此特征带, 详见表 1 和图 4。

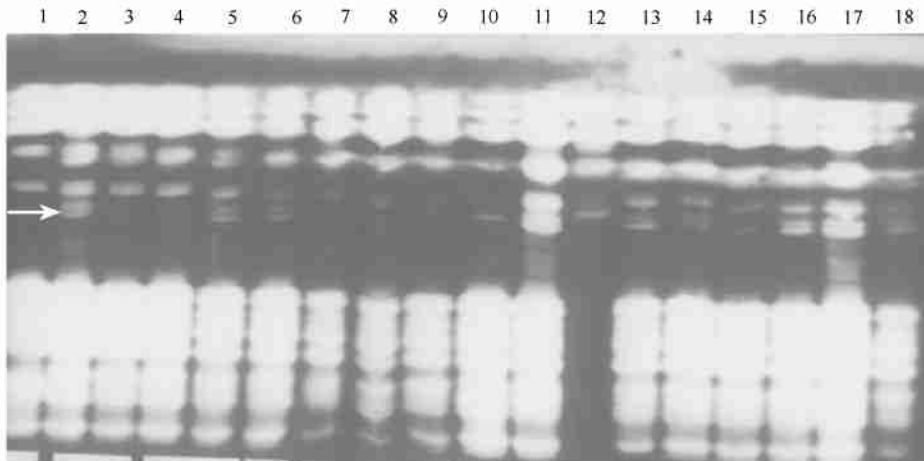


图 4 Pm12 的 -Amy-1 等电聚焦电泳检测结果

Fig. 4 Result of isoelectric focusing electrophoresis with -Amy-1

1 - 18: CS, N30, CII13838/8\* Cc, Axminster/8\* Cc, N42, N43, N1, N2, N3, N4, Line31 (Pm12 + 1), N5, N24, N25, N26, N27, Line31 (Pm12 + 1), N28. 箭头所示为抗病标志带. The arrow shows resistance bands.

通过 STS、SCAR 标记以及同工酶标记检测, 从 49 个 DH 植株中选出 7 株含有 3 个抗病基因 Pm12 + Pm4b + PmV, 其序号为 N30、N34、N35、N37、N38、N42 和 N43; N16 含有 Pm13 + Pm4b + PmV 3 个抗病基因; N26、N27 和 N46 3 株含有 2 个抗病基因 Pm12 + Pm4b; N14、N15、N31、N32、N36 和 N40 共 6 株含有 2 个抗病基因 Pm4b + PmV; N33 和 N39 共 2 株含有 2 个抗病基因 Pm12 + PmV; N17 和 N18 共 2 株含有 2 个抗病基因 Pm13 + Pm4b; N24 和 N25 共 2 株含有 1 个抗病基因

Pm12; N29 不含任一抗病基因, 与苗期白粉病抗性鉴定表现感病的结果一致; 其余 25 株均含 Pm4b, 详见表 1。同时分子标记结果表明, 在被检测的 49 个植株中有 44 株含有 Pm4b, 可见相对于其他 3 个抗病基因 Pm4b 在杂交后代中不易丢失。

### 3 讨论

与常规育种相比, 分子标记辅助育种不需要考虑选择目标的表型效应及生长环境, 可以提高选择效率和准确性, 实现多基因累加。本研究进一步证

明特异的 PCR 标记可以快速选择到含有 2 个以上抗病基因的聚合体,克服了常规表型鉴定难以确定抗病基因累加后代中抗病基因个数的局限性。相对 RFLP 而言,以 PCR 为基础的分子标记具有 DNA 用量少、操作简便的优点,是辅助育种的有效手段,而目前的分子遗传连锁图谱大多数是用 RFLP 构建的,标记基因的数目有限,对技术条件要求较高,操作烦琐,花费较大,另外还需使用放射性同位素技术,不便于在辅助选择育种中应用。因此,将 RFLP 标记转化为以 PCR 为基础的 STS 标记,或是先选出 RAPD 标记并将其转化为稳定性较好的 SCAR 标记,从而便于在分子标记辅助育种中使用。

本试验田间苗期抗病性鉴定结果,凡检测到具有 *Pm4b*、*Pm12*、*Pm13* 和 *PmV* 抗性基因的植株,苗期对白粉菌 15 号小种均表现出抗性,而未检测到有抗性基因的植株均表现感病,说明上述基因对华北地区优势白粉菌 15 号生理小种均表现有效抗性。而成株期仅含有 *Pm4b* 一个基因的部分植株表现感病,这可能是试验田中成株期有其他白粉病菌毒性菌株发展所致。后来经过温室混合白粉病菌鉴定证实,凡单独含有 *Pm4b* 的植株苗期和成株期均表现感病,表明白粉病混合菌种中有克服 *Pm4b* 的菌株存在,这与中国农业科学院植保所监测到小麦白粉菌对 *Pm4b* 毒性频率上升的结果一致;而 *Pm12*、*Pm13* 和 *PmV* 的抗性仍然有效;多基因聚合体的抗病性明显优于单个基因的材料。由此可见创制多基因聚合体,是提高品种抗病广谱性、延长抗病性有效手段之一。

试验中还发现在 WM17-1 等 7 个不同株系中,同一株系的不同植株所含的基因相同;而在 WM16a~WM16i 8 个穗系中,除 2 个穗系只鉴定了 1 株外,其余 6 个穗系中有一半穗系的不同植株所含抗病基因差别较大。其原因是前者为小麦与玉米杂交后一步成苗所得,而后者为小麦与玉米杂交后经 2,4-D 诱导幼胚愈伤组织分化成苗,增加了染色体重组几

率。由此可见,创制多基因聚合体 DH 材料时,采用愈伤组织分化成苗,可提高聚合不同基因类型的频率。

## References

- [1] Liu J-Y(刘金元), Liu D-J(刘大钧), Tao W-J(陶文静), Li W-L(李万隆), Chen P-D(陈佩度). Study on the conversion of RFLP markers co-segregated with *Pm4a* to sequenced-tagged-site markers. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 1999, 7(2): 113 - 116 (in Chinese with English abstract)
- [2] Jia J-Z(贾继增). The RFLP marker of powdery mildew resistance gene *Pm12* in wheat. *Science in China* (Series B) (中国科学 B 辑), 1993, 23(6): 589 - 594 (in Chinese)
- [3] Cenci A, DOvidio R, Tanzarella O A, Ceoloni C, Porceddu E. Identification of molecular markers linked to *Pm13*, an *Aegilops longissima* gene conferring resistance to powdery mildew in wheat. *Theor Appl Genet*, 1999, 98: 448 - 454
- [4] Liu Z, Sun Q, Ni Z, Yang T. Development of SCAR markers linked to the *Pm21* gene conferring resistance to the powdery mildew in common wheat. *Plant Breeding*, 1999, 118: 215 - 219
- [5] Chen X-M(陈新民), Xu H-J(徐惠君), Zhou J-F(周俊芳), Liu J-X(刘俊秀), Zhang H-Z(张宏哲). Study on the increasing frequencies of plant production during embryo culture in crosses between wheat and maize. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 1996, 29(4): 29 - 32 (in Chinese with English abstract)
- [6] Sharp P J, Kreis M, Shewry P R, Gale M D. Location of beta-amylase sequences in wheat and its relatives. *Theor Appl Genet*, 1988, 75: 286 - 290
- [7] Gale M D, Law C N, Chojecki A J, Kempton R A. Genetic control of  $\alpha$ -amylase production in wheat. *Theor Appl Genet*, 1983, 64: 309 - 316
- [8] Xie H(谢皓), Chen X(陈孝), Sheng B-Q(盛宝钦), Xin Z-Y(辛志勇), Kong F-J(孔凡晶), Lin Z-S(林志珊), Ma Y-Z(马有志). Identification of a wheat line YW243 resistant to powdery mildew and genetic analysis. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2001, 27(6): 715 - 721 (in Chinese with English abstract)
- [9] Zhang Z-Y(张增艳), Chen X(陈孝), Zhang C(张超), Xin Z-Y(辛志勇), Chen X-M(陈新民). Selecting the pyramids of powdery mildew resistance genes *Pm4b*, *Pm13* and *Pm21* in wheat assisted by molecular marker. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2002, 35(7): 789 - 793 (in Chinese with English abstract)