

小麦种质 N9659 抗白粉病基因 SSR 标记研究

桑利群, 王长有, 王秋英, 吉万全

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:采用 SSR 技术对含有野生二粒小麦 AS846 抗白粉病基因的 N9659 进行了分子标记研究。用高感小麦白粉病的普通小麦品种陕 160 与 N9659 杂交, F_1 表现高抗, F_2 苗期抗病和感病植株的分离比例符合 3:1, 表明 N9659 苗期白粉病抗性由 1 对完全显性基因控制; 采用 208 对小麦 SSR 引物对“陕 160 \times N9659” F_2 抗感池分析, 筛选出 3 个在抗感池间存在多态性引物 WMS67, WMS408 和 WMS604; 经分离群体验证, 该抗病基因与小麦染色体 5B 上的微卫星位点 *Xgwm67*, *Xgwm408* 和 *Xgwm604* 连锁, 遗传距离分别为 6.7, 9.0 和 17.3 cM, 该抗病基因可能来源于母本即野生二粒 AS846, 此基因不同于已有抗白粉病基因, 可能为新基因。

关键词: 普通小麦; 白粉病; 抗性基因; 染色体定位; SSR 标记

中图分类号: S512.1.02 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)03-0162-04

SSR Markers of a Common Wheat Germplasm N9659 with Powdery Mildew Resistance Gene

SANGLi-qun, WANG Chang-you, WANG Qiu-ying, JI Wan-quan

(Agronomy College, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: A powdery mildew resistance gene, originating from wild emmer (*Triticum dicoccoides* Thell.) accession AS846, was transferred to a common wheat line N9659. N9659 was highly resistant to the prevailing *Erysiphegraminis* sp. *tritici* Race in Shaanxi Province. The genetic analysis of N9659 was done in order to determine the inheritance of powdery mildew resistance in N9659. The reciprocal crosses F_1 between N9659 and the susceptible cultivar Shaan160 was highly resistant to the powdery mildew, the ratio of resistant plants and susceptible plants in F_2 progeny fitted the expected 3 to 1. 127 F_2 plants of the crosses Shaan 160 \times N9659 were used for SSR analysis, 3 of 208 wheat SSR primer pairs WMS67, WMS408 and WMS604 generated polymorphic DNA fragments between the resistant plants DNA pools and susceptible plants DNA pools. By analyzing the polymorphic markers in these segregating populations, the SSR locus *Xgwm67*, *Xgwm408*, and *Xgwm604* located on chromosome 5B were found to be linked to Powdery mildew resistance gene with the estimated genetic distance of 6.7, 9.0 and 17.3 cM. The resistance gene derived from the mother *Aegilops umbellata* AS846, was different from the resistant genes reported now, so it was probably a new gene.

Key words: *Triticum aestivum*; Powdery mildew; Resistance gene; Chromosomal location; SSR marker

白粉病是由专性寄生真菌 *Blumeria graminis* D C f. sp. *tritici* 引起的世界性小麦病害^[1], 也是影响我国小麦生产的主要病害之一。近二十年来, 随着矮秆、半矮秆品种的大面积推广种植和栽培水平的提高、栽培条件的改变, 其危害日益严重, 给我国的小麦生产造成严重的损失^[2]。目前已正式命名了 34 个小麦抗白粉病性基因, 采用端体、单体、缺体 - 四

体和分子标记等分析方法, 已将这 34 个不同来源的小麦白粉病抗病基因进行了染色体定位, 它们分别被定位于 A、B 和 D 组共 16 条染色体上^[3,4], 但由于大多数抗病基因抗性已丧失或与不良性状连锁, 在育种上的应用十分有限^[5], 因此必须发掘新的抗病基因, 培育新的抗病品种, 持续有效地控制小麦白粉病的发生。由于普通小麦中缺乏对白粉病表现抗性

收稿日期: 2008-03-27

基金项目: 陕西省重大专项 (2006KZD5-C8)

作者简介: 桑利群 (1983-) 女, 安徽亳州人, 在读硕士, 主要从事作物遗传育种的研究工作。

通讯作者: 吉万全 (1963-) 男, 陕西河阳人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种研究。

的基因,目前外源抗病基因已成为培育新的抗小麦白粉病品种的主要来源。本实验室利用引自四川农业大学资源室对小麦白粉病免疫^[6]的野生二粒小麦 AS846 与白粉病高感品种超大 84(+)79-3-1 杂交,杂交后代 N9227B 再与白粉病高感品种陕优 225 杂交获得了对陕西关中地区白粉病流行小种免疫的新种质 N9659。

SSR 标记(Simple Sequence Repeats)又称微卫星 DNA 或短串联重复序列,微卫星标记具有多态性高、稳定性好、共显性等特点^[7],非常适于在普通小麦这类遗传基础相对狭窄的物种中应用。目前,SSR 标记已被成功应用于小麦重要性状如白粉病、条锈病的抗性基因的定位。

本试验利用 SSR 标记技术,结合缺(单)体分析对 N9659 进行了抗白粉病基因染色体定位和标记研究,为评价和利用该抗源,以及该抗病基因进一步的深入研究和应用提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料

材料包括 N9659、普通小麦品种陕 160、陕 160 × N9659 的 F₁ 和 F₂。以上材料均由西北农林科技大学农学院小麦所生物室提供。白粉病菌种陕西关中地区优势小种由西北农林科技大学植保学院提供。

1.2 方法

1.2.1 白粉病抗性鉴定 本研究中所有苗期抗性鉴定均在温室内进行。当幼苗长至三叶期时,采集病菌,室内人工弹拂接种。接种后 15 d 左右,待感病品种陕 160 充分发病后,根据盛宝钦^[8]的四级鉴定标准进行抗病性记载,0~2 级为抗病,3~4 级为感病,5 d 后重复调查 1 次。

1.2.2 DNA 提取和 SSR 分析 将参试材料种植在营养钵,当幼苗长至四叶期时,采用 stein 等微量 CTAB 法进行基因组总 DNA 提取,具体步骤参考文献^[9]的方法进行。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳估测 DNA 含量。试验共采用位于小麦微卫星图谱^[10]42 条染色体臂上的 208 个 SSR 引物对,根据 R öder 发表的引物序列,由上海生物工程技术有限责任公司合成。扩增反应在 Perkin Elmer 480 型热循环仪上进行。反应混合液总体积为 10 μL,其中包括 0.25 U TaqDNA 聚合酶(东盛),1 × Buffer(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.3,50 mmol/L KCl,1.5 mmol/L MgCl₂),2 mmol/L MgCl₂,每个 dNTP 0.2 mmol/L,每个引物 250 nmol/L,40~60 ng 基因组总 DNA。反应程序为:

95 预变性 2 min;前 5 个循环,94 变性 1 min,46,50,55 或 60 (根据引物选择)退火 1.5 min,72 延伸 1 min;后 30 个循环,92 变性 30 s,46,50,55 或 60 (根据引物选择)退火 50 s,72 延伸 30 s;最后 72 延伸 5 min,保持在 4 结束。PCR 产物在体积分数 8.0% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行,向扩增产物加入 2 μL 点样缓冲液(10 mol/L EDTA,pH 8.0;10 mmol/L Tris-HCl,pH 7.5;质量分数 5%聚蔗糖 400;质量分数 0.05%溴酚兰;质量分数 0.05%二甲苯青 FF)混匀后点样,同时以 DL2000 为标准分子量对照,电泳缓冲液为 1 × TBE,恒压电泳 3~4 h,用银染法进行凝胶显色,OLYMPUS C-5050 数码相机照相。

1.2.3 标记和连锁分析 用分离群体分组分析法(Bulked segregation analysis,BSA)鉴定与抗白粉病基因连锁的 SSR 标记,在 F₂ 分离群体中分别取 10 个抗、感单株 DNA 等量混合建立抗感池,用亲本 N9659、陕 160 和抗感池对 SSR 引物进行筛选。筛选出的引物进一步用 F₂ 群体进行连锁标记分析。根据 Allard 最大似然法计算抗病基因与特异性标记之间的重组率^[11],按 Kosambi 公式将重组率转化为遗传距离(cM)^[12]。

2 结果与分析

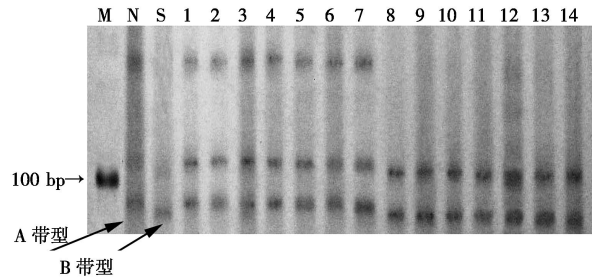
2.1 N9659 抗白粉病基因的遗传分析

采用白粉病菌系关中地区优势小种对 N9659 与陕 160 组合 F₁ 的 20 个单株和 F₂ 的 127 个单株进行接种鉴定,F₁ 表现高抗;F₂ 的 127 个单株中 92 株抗病,35 株感病。卡平方测验($\chi^2 = 0.447 < \chi^2_{0.05} = 3.84$),抗感比例符合 3:1。结果表明,N9659 苗期白粉病抗性由 1 对完全显性基因控制。

2.2 N9659 抗白粉病基因的 SSR 标记

采用 208 对小麦 SSR 引物对 N9659、陕 160 和构建的抗感池进行 PCR 扩增,产物经电泳分析,筛选出 3 个引物 WMS67, WMS408 和 WMS604 在双亲以及抗感池之间存在与抗性相关的特征带,初步推断这 3 对引物对应的微卫星位点与抗性基因有连锁关系。用筛选的 3 个引物对陕 160 × N9659 组合 F₂ 127 个单株进行扩增和电泳,结果显示 3 个引物扩增的多态性片段均与抗白粉病基因连锁(图 1~3)。电泳结果(表 1)经 Kosambi 公式计算,微卫星位点 Xgwm67, Xgwm408 和 Xgwm604 与抗病基因的遗传距离分别为 6.7,9.0 和 17.3 cM,将抗病基因暂命名为 PmAS846。由于 3 个 SSR 引物所对应的微卫星位点 Xgwm67, Xgwm408 和 Xgwm604 均位于小麦 5B

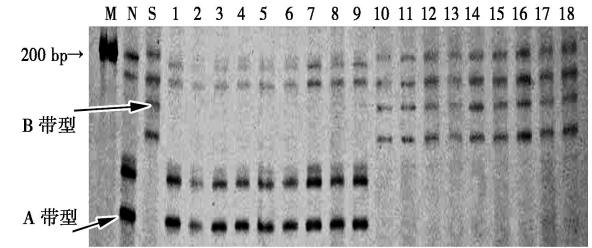
染色体上,并且其他染色体上的引物在 N9659、陕 160 和构建的抗感池之间未扩增出与抗性相关的条带,表明该抗性基因位于 5B 染色体。



M. DL2000; N. N9659; S. 陕 160; 1~7. 抗病单株; 8~14. 感病单株; A 带型. 抗病亲本的特异带; B 带型. 感病亲本的特异带
M. DL2000; N. N9659; S. Shaan160; 1~7. Resistant plants; 8~14. Susceptible plants; A type. Specific band from resistant parent; B type. Specific band from susceptible parent

图 1 WMS67 的扩增结果

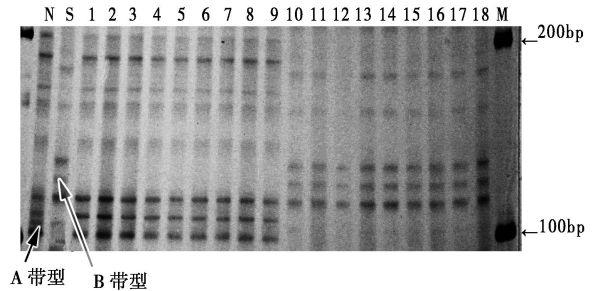
Fig. 1 Amplification results of SSR primer WMS67



M. DL2000; N. N9659; S. 陕 160; 1~9. 抗病单株; 10~18. 感病单株; A 带型. 抗病亲本的特异带; B 带型. 感病亲本的特异带
M. DL2000; N. N9659; S. Shaan160; 1~9. Resistant plants; 10~18. Susceptible plants; A type. Specific band from resistant parent; B type. Specific band from susceptible parent

图 2 WMS408 的扩增结果

Fig. 2 Amplification results of SSR primer WMS408



M. DL2000; N. N9659; S. 陕 160; 1~9. 抗病单株; 10~18. 感病单株; A 带型. 抗病亲本的特异带; B 带型. 感病亲本的特异带
M. DL2000; N. N9659; S. Shaan160; 1~9. Resistant plants; 10~18. Susceptible plants; A type. Specific band from resistant parent; B type. Specific band from susceptible parent

图 3 WMS604 的扩增结果

Fig. 3 Amplification results of SSR primer WMS604

3 讨论

小麦的抗白粉病基因一般来自于普通小麦及其近缘种、属。1930 年,澳大利亚学者 Waterhorse 首次报道小麦品种 Thew 携带一对显性抗病基因^[13]。此后,各国科学家对小麦白粉病抗性基因遗传及染色

表 1 SSR 标记在陕 160 × N9659 F₂ 群体中的分离

Tab. 1 SSR makers related to resistance in F₂

population from Shaan 160 × N9659				
SSR 标记 SSR marker	抗病单株 Resistance plant		感病单株 Susceptible plant	
	A 带型 A type	B 带型 B type	A 带型 A type	B 带型 B type
Xgwm67	83	9	0	35
Xgwm408	81	11	1	34
Xgwm604	76	16	7	28

注: A 带型. 抗病亲本的特异带; B 带型. 感病亲本的特异带。

Note: A type. Specific band from resistant parent; B type. Specific band from susceptible parent.

体定位、分子标记进行了广泛而深入的研究^[14]。迄今,已经正式确定 34 个基因(*Pm1* - *Pm34*), 49 个主效基因被正式命名^[3,4,6,15]。采用端体、单体、缺体 - 四体和分子标记等分析方法,已将这 34 个不同来源的小麦白粉病抗病基因进行了染色体定位,它们分别被定位于 A、B 和 D 组共 16 条染色体上,其中来自野生二粒小麦的 *Pm16*, *Pm26*, *Pm30*, *Pm31* 分别被定位在 4B, 2BS, 5BS, 6A 染色体上^[16-18], *Pm26* 为隐性基因, *Pm16*, *Pm30* 和 *Pm31* 为显性基因。N9659 的抗白粉病基因来自于野生二粒小麦,由一对显性基因控制。通过 SSR 标记分析,将抗性基因定位于 5B 染色体上。同时由于 WMS67, WMS408, WMS604 均位于 5BL 上,因此该抗病基因有可能位于 5BL 上。根据对 N9659 的 3 个相关亲本的白粉病抗性分析,超大 84(+) 79 - 3 - 1 和陕优 225 高感白粉病, AS846 对白粉病免疫,抗性基因只可能来源于 AS846。本研究用与显性基因 *Pm16*, *Pm30* 和 *Pm31* 连锁的微卫星标记对抗感池进行分析,结果都没有扩增出特异条带,表明 N9659 的抗性基因与已有抗白粉病基因都不同,并且目前还未见抗白粉病基因位于 5BL 上的报道,可能是一个新的抗白粉病基因,因此将 N9659 所携带的抗白粉病基因暂命名为 *PmAS846*。

由于所获得的标记与抗性基因的遗传距离较远,应用于分子标记辅助育种比较困难,需要利用其他分子标记技术筛选与该抗性基因紧密连锁或共分离的标记,使该抗性基因的标记利用更可行。同时该抗病基因是否位于 5BL 上还需要进一步验证。

参考文献:

[1] 庄巧生. 中国小麦品种改良及系谱分析[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 469.
[2] 金善宝. 中国小麦学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 48 - 7489.
[3] 张海泉, 符晓棠, 郝晨阳. 小麦白粉病抗性基因的研

- 究进展[J]. 沈阳农业大学学报. 2003, 31(1): 68 - 71.
- [4] Miranda L M, Murphy J P, Marshall D. Pm34: a new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops tauschii* Coss to common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2006, 113(8): 1497 - 1504.
- [5] 张海泉. 粗山羊草 Y189 抗小麦白粉病基因 SSR 标记[J]. 河南大学学报: 自然科学学报, 2007, 37(2): 177 - 180.
- [6] 吉万全, 薛秀庄, 王秋英, 等. 野生二粒小麦抗白粉基因的转移及其 RAPD 分析[J]. 西北植物学报, 1999, 19(6): 31 - 36.
- [7] 解超杰, 杨作民, 孙其信. 小麦抗白粉病基因[J]. 西北植物学报, 2003, 23(5): 822 - 829.
- [8] 盛宝钦. 用反应型记载小麦苗期白粉病[J]. 植物保护, 1988(1): 49.
- [9] 鲁玉柱, 薛秀庄, 王长有, 等. 应用 RAPD 标记检测导入普通小麦的 *Elymus rectisetus* 遗传物质[J]. 西北植物学报, 2002, 22(1): 51 - 55.
- [10] Rder M S, Körzun V, Wendekhake K, et al. A microsatelitemap of wheat[J]. Genetics, 1998, 149: 2007 - 2023.
- [11] Allard R W. Formulas and table to facilitate the calculation of recombination values in heredity[J]. Hilgardia, 1956, 24: 235 - 278.
- [12] 荣廷昭, 潘光堂, 黄玉碧. 数量遗传学[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 2003: 299 - 343.
- [13] 刘金元, 刘大均. 小麦白粉病抗性基因研究进展[J]. 植物病理学报, 2000, 30(4): 289 - 295.
- [14] 桑大军, 许为钢, 胡琳, 等. 河南省小麦品种白粉病抗性基因的分子鉴定及分子标记辅助育种[J]. 华北农学报, 2006, 21(1): 86 - 91.
- [15] Reader S M. Transferring Powdery mildew resistance gene to common wheat from *Triticum dicoccoides*[J]. Overseas Agronomy - *Triticeae Crops*, 1992, 13(2): 1 - 3.
- [16] Rong J K, Millet E, Manisterski J. A new powdery mildew resistance gene: introgression from wild emmer into common wheat and RFLP-based mapping[J]. Euphytica, 2000, 115: 121-126.
- [17] Liu Zh Y, Sun Q X, Ni Zh F, et al. Molecular characterization of a novel powdery mildew resistance gene Pm30 in wheat orig - inating from wild emmer[J]. Euphytica, 2002, 123: 21 - 29.
- [18] 解超杰, 倪中福, 孙其信, 等. 利用小麦微卫星标记定位一个来自野生二粒小麦的抗白粉病基因[J]. 遗传学报, 28(11): 1034 - 1039, 2001.