

SSR 标记定位一个新的小麦白粉病抗性基因

唐媛, 傅体华, 贾明娟

(四川农业大学 农学院, 四川 雅安 625014)

摘要:来源于簇毛麦与普通小麦杂交后代的稳定小麦品系 101-3 含有 1 个新的抗白粉病显性基因, 暂命名为 *PmX*, 用单体分析的方法已定位于染色体 6B 上。以感白粉病小麦品种中国春与 101-3 杂交后代 F_2 为材料, 用 65 对 6B 染色体上和 9 对 6A 染色体上小麦微卫星引物, 进行连锁分析, 发现小麦微卫星标记 Xgwm570 与基因的遗传距离为 (9.72 ± 2.40) cM, 该结果表明, 该基因位于小麦染色体 6BL 上, 同时也为分子标记辅助育种上利用该基因提供了初步的选择标记。

关键词:小麦; 白粉病; 抗性基因; SSR

中图分类号: S435.121 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2008)05-0127-04

SSR Marker of a Novel Wheat Powdery Mildew Resistance Gene

TANG Yuan, FU Ti-hua, JIA Ming-juan

(College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Ya an 625014, China)

Abstract: Wheat powdery mildew, caused by *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* is important fungal diseases of wheat in many regions in the world. A novel dominant powdery mildew resistance gene, temporarily named *PmX*, in wheat line 101-3 derived from the progeny of the cross between common wheat and *Dsypyrum villosum* Candery L. was located on chromosome 6B by monosomic analyses. In the present study, SSR primers mapped in the chromosome 6B and 6A of common wheat were used for PCR amplification using the genomic DNA of resistant and susceptible bulks comprising of F_2 individuals and their parents, 101-3 and Chinese Spring, to tag the powdery mildew resistance gene in line 101-3. No polymorphic products were observed in most primers. However, one primer Xgwm570, mapped on 6BL amplified polymorphic among resistant and susceptible bulks and their parents. The primer Xgwm570 was then used to amplify the F_2 population from the cross 101-3/ Chinese Spring. The result indicate that primer Xgwm 570 was linked to the resistance gene *PmX* with the genetic distance (9.72 ± 2.40) cM and suggesting the *PmX* was located in the chromosome 6BL of common wheat. The marker could be used in MAS of *PmX* in wheat breeding programs for powdery mildew resistance.

Key words: Wheat; Powdery mildew; Resistance gene; SSR

小麦白粉病是由专性寄生菌 (*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*) 所引起的世界性小麦病害, 该病害在我国发生较为普遍, 目前随着氮肥和单一抗性基因材料的运用有加重趋势, 利用抗病新品种控制白粉病是最经济、安全和有效的途径。迄今为止, 小麦白粉病抗性基因至少已在 34 个位点上发现了 50 个以上抗白粉病主效基因^[1-3], 并定位于特定的染色体上。这些基因中, 有的来源于普通小麦, 有的来源于小麦的近缘物种。而且这些抗病基因绝大多数为小种专

化性基因。但由于小麦白粉病菌具有群体大、适应范围广、生理小种变异快等特点, 含有专化性抗病基因的品种容易丧失抗性^[4]。目前, 对我国小麦白粉病有效的抗性基因主要为 *Pm4*, *Pm12*, *Pm13*, *Pm16*, *Pm20*, *Pm21*^[5,6]。因此, 寻找和创造新抗源是抗病育种的基础工作, 是控制白粉病的有效途径。

寻找与抗病基因连锁的分子标记, 将有助于对这些抗源进行有效利用。小麦抗白粉病基因的分子标记研究始于 20 世纪 90 年代初。在小麦抗白粉病

收稿日期: 2008-04-11

基金项目: 国家自然科学基金 (30370770); 四川省青年科技基金 (05ZQ026-032)

作者简介: 唐媛 (1982-), 女, 四川泸州人, 在读硕士, 主要从事小麦抗病研究工作。

通讯作者: 傅体华 (1965-), 男, 四川安岳人, 教授, 主要从事麦类遗传育种工作。

基因分子标记研究中,常用的 DNA 分子标记有 RFLP(Restriction fragment length polymorphism,限制性片段长度多态性),RAPD(Random amplified polymorphic DNA,随机扩增的多态性 DNA),AFLP(Amplified fragment length polymorphism,扩增片段长度多态性),SCAR(Sequence characterized amplified region,序列特异性扩增区),STS(Sequence tagged sites,序列标志位点)等。微卫星 SSR(Simple sequence repeats,简单重复序列)又称 Microsatellite DNA(微卫星 DNA),在小麦基因组中广泛分布,微卫星标记具有多态性高、稳定性好、共显性等特点^[7,8]。目前已构建了多个覆盖小麦 21 个连锁群的 SSR 标记图谱^[9]。微卫星标记已广泛用于小麦遗传多样性,重要性状如抗条锈病、抗白粉病等基因的标记定位^[10-12]。

101-3 是从簇毛麦与小麦栽培品种绵阳 11 杂交后代中选育出的一个小麦新品系,含有一个显性抗白粉病基因。该基因已用单体分析的方法定位于 6B 染色体上^[13]。本研究用 SSR 的方法寻找与品系 101-3 抗白粉病基因相连锁的标记的初步结果。

1 材料和方法

1.1 试验材料

抗病小麦新品系 101-3,是簇毛麦与普通小麦品种绵阳 11 杂交,然后以绵阳 11 为轮回亲本回交 3 次,并自交,从自交群体中选育的一个抗病稳定品系。连续多年的鉴定发现它对现在流行的白粉病表现出免疫的特性。中国春为常见的小麦遗传研究品种,对现在流行的白粉病表现高感特性。101-3 × 中国春的 F₂ 用于抗性鉴定和标记分析。诱发材料为 SY95-71,是由四川农业大学农学院小麦所培育的一个高感白粉病和条锈病的稳定品系。

1.2 试验方法

1.2.1 小麦白粉病的抗性鉴定 将供试材料 101-3、中国春(CS)、101-3 × 中国春的 F₁,F₂ 种植于四川农业大学滨江农场。亲本和 F₁ 种植 1 行,F₂ 分单粒播种。行长 2.5 m,行距 0.33 m。每隔 2 行种植诱发材料 SY95-71,便于白粉病在田间发病充分。在接近拔节期接种西南地区流行的白粉病混合菌种,混合菌种收集于四川屏山。待诱发材料 SY95-71 充分发病时,记录抗病和感病情况。亲本和 F₁ 按行观察记载,F₂ 群体按单株观察记载。侵染型按照 Zhu 等^[14]提出的 0~4 级标准记载,该标准分为 0,0,1,2,3 和 4 等 6 级,其中 0~2 级视为抗病;3~4 级视为感病。

1.2.2 DNA 提取及抗、感池的建立 试验所用的

DNA 取自 101-3、中国春、101-3 × 中国春 F₂ 群体的幼嫩叶片。DNA 提取参照 Rogers 等^[15]的 CTAB 法,略做修改。从 F₂ 群体随机选取 10 株极端抗病单株的 DNA 等量混合构成抗病池,10 株极端感病单株的 DNA 等量混合构成感病池。

1.2.3 SSR 分析 从 F₂ 群体随机选取 156 株单株进行 SSR 分析。根据 Röder 等^[9]及 <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/quickquery.shtml> 公布的 6B 上的 65 对和部分 6A 上 SSR 引物序列合成引物,引物由 Invitrogen 公司合成。PCR 反应体积为 20 μL,含有 10 × Buffer 2 μL,2.0 mmol/L MgCl₂,200 μmol/L dNTPs,50~100 ng DNA,60 ng 引物,1 U Taq DNA 聚合酶。PCR 反应在 BIO-RAD PCR 扩增仪上进行。反应程序为:94 预变性 5 min;然后 94 变性 45 s,50 或 55 或 60 (引物不同而异)复性 45 s,72 延伸 45 s,40 个循环;72 延伸 10 min,4 保存。PCR 产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶分离,每个点样孔点样 4~6 μL,80 W 电压电泳 1.5 h 后硝酸银显色。

1.2.4 数据分析 通过卡方检验估测 F₂ 群体观察值与预期值间分离比的适合度。根据最大似然法计算重组率,按照 Kosambi 公式^[16]将重组率转化为遗传距离。

2 结果与分析

2.1 抗性鉴定与遗传分析

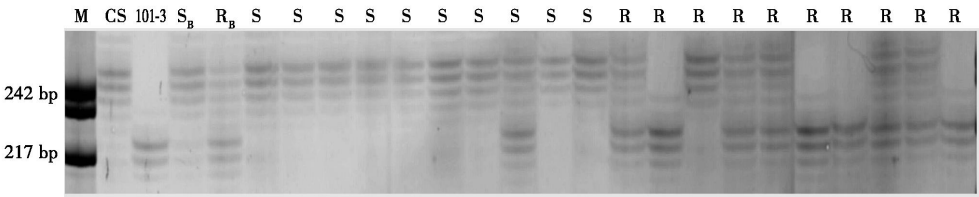
在田间对亲本 101-3、中国春及其杂种 F₁ 和 F₂ 群体进行了抗性鉴定。101-3 及 101-3 × 中国春 F₁ 的白粉病抗性表现为完全免疫,反应型为 0 级;中国春表现为高感白粉病;101-3 × 中国春 F₂ 群体共 734 株中,表现出明显的抗感分离现象。遗传分析表明 F₂ 单株抗感分离符合 3:1 的比例(表 1)。说明小麦品系 101-3 中确实存在 1 对显性抗白粉病基因,本研究将其暂命名为 *PmX*。

2.2 SSR 结果分析

选用 21 对 SSR 引物对亲本和抗感池同时扩增,每个引物都有扩增产物。其中,Xgwm311,Xgwm88,Xgwm273,Xgwm570,WMC105,WMC417 等 12 对引物能在两个亲本间扩增产生稳定的多态性,其中 Xgwm570 能在随机选择的 156 株 F₂ 抗病和感病个体中扩增出分子量明显不同的两条微卫星标记带,经卡方检验该位点的扩增结果符合 1:2:1 的孟德尔分离比例(表 2),分别与抗病基因和感病等位基因连锁(图 1)。

表 1 101-3 ×中国春 F₂ 对白粉病的抗性分离

Tab.1 Segregation analysis of 101-3 × Chinese Spring F ₂ for reaction to powdery mildew					
材料 Material	鉴定株数 No. of plants	抗病株数 Resistant	感病株数 Susceptible	分离比 Expected ratio	²
101-3	53	53	0		
Chinese Spring (CS)	62	0	62		
101-3 ×CS F ₁	22	22	0		
101-3 ×CS F ₂	734	549	185	3 1	0.052



M. 分子量;CS. 中国春;S_B. 感病池;R_B. 抗病池;S. 感病单株;R. 抗病单株。
M. Molecular marker;CS. Chinese Spring;S_B. Susceptible bulk;R_B. Resistant bulk S. Susceptible plants;R. Resistant plants.

图 1 微卫星引物 Xgwm570-6B 对亲本、抗感池及部分抗感单株的扩增结果
Fig.1 Microsatellite DNA products amplified by the primer WMS570

表 2 101-3 ×中国春的 F₂ 抗病基因与 Xgwm570 位点的连锁分析

Tab.2 Linkage analysis of the powdery mildew resistance gene and the microsatellite locus Xgwm570 in 101-3 ×Chinese Spring F ₂ plants				
抗病性 Resistance	株数 No. of plants	Xgwm570-6B 位点标记基因型 Marker Xgwm570-6B genotype		
		AA	AB	BB
抗病 Resistant	117	29	81	7
感病 Susceptible	39	1	7	31

注:AA. 纯合抗病标记基因型;BB. 纯合感病标记基因型;AB. 杂合抗病标记基因型。
Note:AA. homozygous resistant markers genotype;BB. homozygous susceptible markers genotype;AB. heterozygous markers genotype.

从表 2 可以看出,按照最大似然法及 Kosambi 公式计算出微卫星位点 Xgwm570 与抗白粉病基因呈共分离遗传,连锁距离为 (9.72 ±2.40) cM。WMS570 在小麦微卫星图上,Xgwm570 位于 6AL 和 6BL 上,用 6A 上的其他临近 Xgwm570 的引物(如 WMC553,WMC 179,Xgwm132 等)分析,未发现有任何引物与该抗病基因存在连锁。结合单体分析^[13],该抗白粉病基因 *PmX* 应该位于小麦染色体 6BL 上,距离 6BL 上的 Xgwm570 位点 9.72 cM。

3 讨论

单体分析的方法是普通小麦进行质量基因定位的经典方法,前人已将 *PmX* 用单体分析的方法定位于 6B 染色体上^[13],但随着定位在同一染色体上的基因越来越多,该方法无法确定同一染色体上的基因位点间的遗传连锁关系。目前,覆盖整个小麦基因组的微卫星图谱已经建立,根据引物在图谱中的位置可以很方便的把与该点连锁的基因定位。本研究发现,引物 Xgwm570 在 217 bp 扩增出特异性片

段。由于该抗白粉病基因用单体分析的方法定位在 6B 染色体上,引物 Xgwm570 存在 6B 长臂上,因此我们初步判断该基因位于 6BL 染色体臂上。

现在已知有 5 个抗白粉病基因被定位于 6B 染色体上。其中 *Pm11* 来自中国春^[17]、*Pm14* 来自日本小麦^[18],这两个基因对小麦白粉病不具有抗性。*Pm12* 来自拟斯卑尔脱山羊草,用 RFLP 定位于 6BS,与 RFLP 探针 Xpsr551 连锁^[19]。*Pm20* 来自于黑麦 6RL 和 6BS 的易位,该基因存在黑麦的 6RL 染色体臂上^[20]。*Pm27* 来自于提莫非维小麦 6G 和 6B 的易位,与微卫星标记 Xpsp3131 共分离^[21]。*Pm12*、*Pm20*、*Pm27* 都位于 6BS 染色体臂上,与位于 6B 长臂上的 Xgwm570 位点距离较远,因此 *PmX* 不会是上述基因。另外,从基因的来源分析,101-3 是从簇毛麦与小麦栽培品种绵阳 11 杂交后代中选育出的小麦品系,通过细胞学检测没有发现染色体失常,已知的抗白粉病基因中只有 *Pm21* 与之相似,是簇毛麦和普通小麦 6VL/6AL 异位产生,位于 6VS 上^[22]。因此,101-3 含有的抗白粉病基因 *PmX* 是不同于已知抗白粉病基因的新基因。

本研究通过 SSR 分子标记将 101-3 的抗白粉病基因 *PmX* 定位于 6BL 染色体臂上,但是得到的这个标记位点 Xgwm570 与抗病基因间的连锁距离较大。在抗白粉病基因的定位中,往往一种分子标记不能实现一个基因的精细定位,所以,我们准备采用多种分子标记相结合的方法对该抗白粉病基因做进一步研究。

参考文献:

[1] Hsam S L K,Lapochkina I F,Zeller F J. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common

- wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.) gene *Pm32* in a wheat *Aegilops speltoides* translocation line [J]. *Euphytica*, 2003, 133(3): 367 - 370.
- [2] 邱永春, 张书绅. 小麦抗白粉病基因及其分子标记研究进展[J]. 麦类作物学报, 2004, 24(2): 127 - 132.
- [3] Miranda L M, Murphy J P, Marshall D, et al. *Pm34*: a new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops trauschii* Coss. to common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 1497 - 1504.
- [4] Duan X Y, Sheng B Q, Zhou Y L, et al. Monitoring of the virulence population of *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. [J]. *Acta Phytopythologica*, 1998, 25: 31 - 36.
- [5] 曹乃倩, 刘桂茹, 杨学举. 小麦抗白粉病基因定位及分子标记辅助育种综述[J]. 中国农学通报, 2007(23): 482 - 486.
- [6] 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, 20(1): 86 - 91.
- [7] Röder M S, Plaschke J, König S U, et al. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat [J]. *Mol Gen Genet*, 1995, 246: 327 - 333.
- [8] Wang Z, Weber J L, Zhong G, et al. Survey of plant short tandem DNA repeat [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 1 - 6.
- [9] Röder M S, Korzun V, Wendehake K, et al. A microsatellite maps of wheat [J]. *Genetics*, 1998, 149: 2007 - 2023.
- [10] Xie C J, Sun Q X, Ni Z F. Chromosomal location of a *Triticum dicoccoides*-derived powdery mildew resistance gene in common wheat by using microsatellite markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 341 - 345.
- [11] Liu Z Y, Sun Q X, Ni Z F, et al. Development of SCAR markers linked to the *Pm21* gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat [J]. *Plant Breeding*, 1999, 118: 215 - 219.
- [12] Ma J X, Zhou R H, Dong Y S, et al. Molecular mapping and detection of the yellow rust resistance gene *Yr26* in wheat transferred from *Triticum turgidum* L. using microsatellite markers [J]. *Euphytica*, 2001, 120: 219 - 226.
- [13] Zhu Zeng, Fu Ti hua, Yuan Tang, et al. Identification and chromosomal locations of novel genes for resistance to powdery mildew and stripe rust in a wheat line 101-3 [J]. *Euphytica*, 2007, 156: 89 - 94.
- [14] Zhu Zhen-dong, Zhou Rong-hua, Kong Xiu-ying, et al. Microsatellite markers linked to 2 powdery mildew resistance genes introgressed from *Triticum carthlicum* accession PS5 into common wheat [J]. *Genome*, 2005, 48: 585 - 590.
- [15] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues [J]. *Plant Mol Biol*, 1985, 5: 69 - 76.
- [16] Kosambi D D. The estimation of map distance from recombination values [J]. *Ann Eugen*, 1944, 12: 172 - 175.
- [17] Tosa Y, Tsujimoto H, Ogura H. Identification of a gene for resistance to wheatgrass powdery mildew fungus in the common wheat cultivar Chinese Spring [J]. *Genome*, 1988, 30: 612 - 616.
- [18] Tosa Y, Sakai K. The genetics of resistance of hexaploid wheat to the wheatgrass powdery mildew fungus in the common wheat cultivar Chinese Spring [J]. *Genome*, 1990, 30: 612 - 614.
- [19] Jia J Z. RFLP-based maps of the homoeologous group-6 chromosomes of wheat and their in the tagging of *Pm12*, powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops speltiodes* to wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 559 - 565.
- [20] Friebe B, Heun M, Tuleen N, et al. Cytogenetically monitored transfer of powdery mildew resistance from rye to wheat [J]. *Crop Sci*, 1994, 34: 621 - 625.
- [21] Jarve K, Peusha H O, Tsymbalova J, et al. Chromosomal location of a *Triticum timopheevii*-derived powdery mildew resistance gene transferred to common wheat [J]. *Genome*, 2000, 43: 377 - 381.
- [22] Qi L L, Cao M S, Chen P D, et al. Identification, mapping and application of polymorphic DNA associated with resistance gene *Pm21* of wheat [J]. *Genome*, 1995, 39: 191 - 197.