

小麦种质 N9134 抗白粉病基因的染色体臂定位

王长有,王亚娟,张宏,刘新伦,蔡东明,吉万全

(西北农林科技大学 农学院,陕西 杨凌 712100)

摘要:明确来源于野生二粒小麦的抗白粉病基因 *PmAS846* 所在的染色体臂。采用端体和 SSR 标记对普通小麦种质 N9134 携带的 *PmAS846* 基因进行了遗传分析。中国春(Chinese Spring,CS)、CS5BL 双端体系与 N9134 杂交 F_1 高抗白粉病 CS/N9134 的 F_2 和 CS5BL 双端体系/N9134//CS BC₁F₁ 抗病植株和感病植株比例分别符合期望比例 3:1 和 1:1。CS 5BL 双端体系/N9134//CS BC₁F₁ 64 个植株的根尖染色体核型和白粉病抗性鉴定发现,12 个植株在 5B 染色体着丝点和抗性基因间发生了交换。*PmAS846* 的 SSR 标记 *Xgwm67* 在 CS 第五部分同源群的缺体-四体系和双端体系的扩增,该标记在 CSN5BT5D 系中缺失,而在 CSDt5BL 系中存在。结果表明:*PmAS846* 位于小麦 5B 染色体长臂上,该基因距 5B 染色体着丝点 18.75 个交换单位。

关键词:野生二粒小麦;抗白粉病基因;染色体臂定位;SSR 标记

中图分类号:Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)06-0037-04

Chromosome Arm Location of Powdery Mildew Resistance Gene of Common Wheat Germplasm N9134

WANG Chang-you, WANG Ya-juan, ZHANG Hong, LIU Xin-lun, CAI Dong-ming, JI Wan-quan
(Agronomy of College, Northwest of Agriculture and Forestry University, Yangling 712100, China)

Abstract: A powdery mildew resistance gene *PmAS846* derived from *Triticum dicoccoides* accession As846 and was located on 5B chromosome. The aim of this research was to locate this gene to chromosome arm. Genetic analysis of *PmAS846* transferred to common wheat line N9134 was done by ditelocentric line and SSR markers. F_1 progeny between common wheat CS(Chinese Spring) disomics, CSDt5BL(CS 5BL ditelocentric line) and N9134 were highly resistant to powdery mildew. The ratio of the resistant and susceptible plants in CS/N9134 F_2 progeny and CSDt5BL/N9134//CS BC₁F₁ progeny fitted the expected 3:1 and 1:1, respectively. The karyotype analysis of root tip cell and powdery mildew resistance for 64 CS5BL/N9134//CS BC₁F₁ plants was done, and the crossover types had frequencies of 12. The analysis results of SSR marker *Xgwm67* in CSN5AT5D, CSN5BT5D, CSN5DT5A, CS-Dt5AL, CSDt5BL and CSDt5DL indicated that the marker was absent in CSN5BT5D and present in CS Dt5BL. The results showed that *PmAS846* was located on 5BL and the distance of *PmAS846* and the 5B centromere was 18.75 map units.

Key words: *Triticum dicoccoides*; Powdery mildew resistance gene; Chromosome arm location; SSR marker

由小麦白粉菌(*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*)所引起的白粉病是世界许多地区危害小麦的主要病害之一。培育抗病品种是防治小麦白粉病经济、环保的有效途径。然而,由于白粉菌小种的变异,抗病基因会逐渐丧失抗性,这就需要不断发掘新的白粉病抗性基因。小麦的近缘种是小麦白粉病抗性基因的

基因源之一,例如野生二粒小麦,发掘和利用其蕴藏的抗性基因是多样化小麦白粉病抗源的途径之一。

野生二粒小麦(*Triticum turgidum* var. *dicoccoides* $2n=4x=28$,染色体组为 AABB)是普通小麦(*Triticum aestivum* L., $2n=6x=42$,染色体组为 AABBDD)的古老祖先之一,它具有抗白粉病和条锈

收稿日期:2011-06-30

基金项目:国家自然科学基金(31071409);陕西省农业科技创新项目(2010NKC-01);西北农林科技大学唐仲英育种基金

作者简介:王长有(1973-),男,陕西泾阳人,助理研究员,博士,主要从事小麦种质创新及其分子生物学研究。

通讯作者:吉万全(1963-),男,陕西合阳人,教授,博士,博士生导师,主要从事小麦遗传育种和小麦分子生物学研究。

病等优良性状,是进行普通小麦遗传改良的重要基因资源。已发现的来源于野生二粒小麦的抗白粉病基因包括正式命名的 *Pm16*、*Pm26*、*Pm30*、*Pm36*、*Pm41* 和 *pm42*^[1-4] 以及暂定名的 *MLZec1*、*Pmtd1055*、*MLIW72*、*PmAS846*、*MLWE18*、*MLIW3*、*MLIW10*、*MLWE29*、*MLWE27*、*ML3D232* 和 *PmG16*^[5-14], 这些基因为小麦抗白粉病育种源提供了丰富的基因资源。

N9134 来源于阿勃非整倍体与野生二粒小麦 As846 杂交后代,对陕西关中地区白粉病菌表现高抗至免疫^[15],该种质携带的抗白粉病基因 *PmAS846* 来源于野生二粒小麦 As846,已定位于小麦 5B 染色体上^[8,16]。本研究采用端体分析以及分子标记对中国春第五部分同源群染色体缺体-四体系和双端体系的分析相结合,定位该基因所在的染色体臂,以期为 *PmAS846* 在小麦抗白粉病遗传改良中的研究和利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

野生二粒小麦 As846、N9134、阿勃和中国春二体,中国春第五部分同源群的缺体-四体系 CS N5AT5D、CS N5BT5D 和 CS N5DT5A 以及双端体系 CS Dt5AL、CS Dt5BL 和 CS Dt5DL,材料均由西北农林科技大学农学院生物室提供。

1.2 白粉病抗性鉴定

苗期鉴定在室内进行,白粉病菌采用陕西关中地区白粉病菌流行菌系。将待鉴定材料的种子播种在营养钵,在对试验材料接种前,在感病对照品种陕优 225 幼苗的繁殖盆中接种并繁殖白粉菌。当待鉴定材料长至二叶一心期时,采用人工抖落孢子的方法进行接种。接种 15 d,当感病对照材料充分发病时记载反应型,3 d 后复查 1 次。苗期抗性鉴定反应型按照 6 级标准^[17]。

1.3 细胞学鉴定

种子在蒸馏水中浸泡 8~10 h 后,置于垫有湿润滤纸的培养皿中 25℃ 暗培养。种子萌发露白后,于 4℃ 冰箱中放置 24 h,重新放在 25℃ 温箱中,待根长至 1.5 cm 时,截取根尖于冰水中预处理 24 h,卡诺液($V_{乙醇}:V_{醋酸}=3:1$)固定 1~2 d,1% 醋酸洋红染色 2 h 以上,45% 醋酸压片,鉴定体细胞染色体核型。截取了根尖的种子种于营养钵中,用于单株的白粉病抗性鉴定。

1.4 SSR 标记分析

将参试材料种植在营养钵内,当幼苗长至三、四叶期时,采用微量 CTAB 法进行基因组 DNA 提取,

具体步骤参照文献[18]进行。SSR 分析的引物采用 WMS67,具体操作步骤参照文献[8]进行。

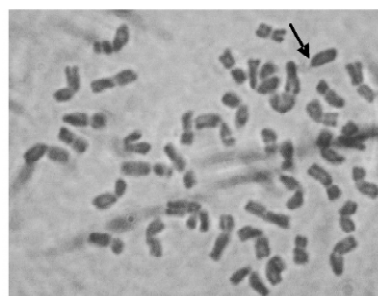
2 结果与分析

2.1 N9134 白粉病抗性的常规遗传分析

N9134 苗期对白粉病的反应型为 0~1 型,表现高抗白粉病,中国春对白粉病的反应型为 4,表现高感白粉病。中国春与 N9134 杂交组合 F_1 对白粉病表现高抗, F_2 鉴定的 101 个植株中,75 株表现抗病,26 株表现感病,符合 3 抗:1 感的期望比例($\chi^2=0.030$, $P=0.75\sim0.90$),表明 N9134 苗期的白粉病抗性由 1 对完全显性基因控制,与以前研究结果一致^[8,16]。

2.2 N9134 白粉病抗性基因的端体分析

为了确定 N9134 的白粉病抗性基因是否位于小麦 5B 染色体长臂上,用 CS 5BL 双端体系与 N9134 杂交, F_1 对白粉病表现高抗, F_1 的根尖染色体组成为 $2n=41+t$ 。 F_1 再用 CS 二体回交,鉴定 BC_1F_1 的根尖染色体核型及其白粉病抗性。在鉴定的 64 个植株中,35 株表现抗病,29 株表现感病,符合 1 抗:1 感的期望比例($\chi^2=0.563$, $P=0.25\sim0.50$),表明 N9134 苗期的白粉病抗性由 1 对完全显性基因控制,与 F_2 分析结果相吻合。 BC_1F_1 的根尖染色体核型包括 2 种 $2n=41+t$ (图 1) 和 $2n=42$ (图 2),其中 $2n=42$ 的个体中,表现抗病的 28 株



箭头示端体染色体。

Arrow indicates telomere chromosome.

图 1 CS 5BL/N9134//CS BC_1F_1 $2n=41+t$

Fig. 1 CS 5BL/N9134//CS BC_1F_1 $2n=41+t$



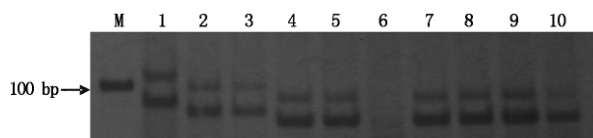
图 2 CS 5BL/N9134//CS BC_1F_1 $2n=42$

Fig. 2 CS 5BL/N9134//CS BC_1F_1 $2n=42$

(亲本型) 感病的 5 株(重组型); $2n = 41 + t$ 的个体中, 表现感病的 24 株(亲本型), 抗病的 7 株(重组型) 表明 N9134 的白粉病抗性基因位于 5B 染色体的长臂上。根据发生交换植株的个数, 抗病基因与 5B 染色体着丝点间的距离为 18.75 个遗传单位。

2.3 N9134 白粉病抗性基因连锁标记的遗传分析

为了确定 *PmAS846* 及其连锁 SSR 标记 *Xgwm67* 所在的染色体和染色体臂, 根据 *Xgwm67* 在 SSR 连锁图谱的染色体位置^[19] 和 *PmAS846* 的非整倍体定位结果^[16], 选用了中国春第五部分同源群的缺体-四体系和双端体系。根据扩增结果(图 3), *Xgwm67* 在 N5AT5D 系和 N5DT5A 系存在, 而在 N5BT5D 系中缺失, 因此, 将 *Xgwm67* 定位于小麦 5B 染色体, *PmAS846* 与 *Xgwm67* 连锁, 因而 *PmAS846* 也位于 5B 染色体上, 与非整倍体分析结果吻合^[16]。*Xgwm67* 在 5BL 双端体系中存在, 表明 *Xgwm67* 位于小麦 5BL 染色体臂, 因此 *PmAS846* 位于小麦 5BL 臂上, 与端体分析结果相吻合。



M. GeneRuler™ 100 bp; 1. 阿勃; 2. 野生二粒小麦 As846; 3. N9134; 4. 中国春; 5. CS N5AT5D; 6. CS N5BT5D; 7. CS N5DT5A; 8. CS Dt5AL; 9. CS Dt5BL; 10. CS Dt5DL。

M. GeneRuler™ 100 bp; 1. Abbondanza; 2. *T. dicoccoides* accession As846; 3. N9134; 4. Chinese Spring; 5. CS N5AT5D; 6. CS N5BT5D; 7. CS N5DT5A; 8. CS Dt5AL; 9. CS Dt5BL; 10. CS Dt5DL。

图 3 WMS67 在中国春缺体-四体系和双端体系的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplification of WMS67 in Chinese Spring nullisomic-tetrasomic and ditelosomic lines

3 讨论

野生二粒小麦是普通小麦的古老祖先之一, 它具有抗白粉病和条锈病等优良性状, 是进行普通小麦遗传改良的重要基因资源。在正式命名的抗白粉病基因中, *Pm16*、*Pm26*、*Pm30*、*Pm36*、*Pm41* 和 *pm42* 来源于野生二粒小麦, 分别定位于小麦染色体 4A、2BS、5BS、5BL、3BL 和 2BS 上^[1-4]。暂命名的抗白粉病基因 *MLZec1*、*Pmtd1055*、*MLIW72*、*pmAs846*、*MLWE18*、*MLIW3* 和 *MLIW10*、*MLWE29*、*MLWE27*、*ML3D232* 以及 *PmG16* 也来源于野生二粒小麦, 分别定位于小麦染色体 2BL、2A、7AL、5B、7AL、3BL、5BL、2BS、5BL 以及 7AL 上^[5-14]。在缺(单)体分析和分子标记分析定位 *PmAS846* 在小麦 5B 染色体的基础上^[8, 16, 20, 21], 本研究通过端体分析结合 *PmAS846* 连锁标记 *Xgwm67* 在中国春第五部分同源

群缺体-四体系和端体系的分析结果, 明确了该基因位于小麦 5BL 染色体上。*PmAS846* 与已定位在染色体 5BL 的抗白粉病基因 *Pm36*、*MLWE29* 和 *ML3D232* 的关系需要进行基因间的等位性测验才能确定。

对于普通小麦而言, 在通过遗传分析确定白粉病抗性由单基因控制的基础上, 可以通过两种方法进行抗性基因的染色体定位。第一种方法, 利用单(缺)体分析确定基因所在的染色体, 定位到特定染色体后, 利用该染色体的端体对抗性基因进行分析, 确定基因所在的染色体臂, 并获得基因与着丝点的遗传距离, 利用这种方法已定位了多个抗白粉病基因^[1, 21]。本研究采用这种方法将 *PmAS846* 定位到小麦 5BL 染色体上。第二种方法, 首先获得与抗性基因连锁的分子标记, 进而利用连锁标记对中国春缺体-四体系、双端体系和缺失系的分析确定标记所在的染色体、染色体臂和染色体区段, 从而确定基因所在的染色体臂或染色体区段, 采用这种方法 *Pm36*、*MLWE29* 和 *ML3D232* 被定位在小麦 5BL 染色体区段上^[2, 11, 13]。两种方法相互印证, 确保了研究结果的可靠性。

参考文献:

- [1] Huang X Q, Röder M S. Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: a review [J]. Euphytica 2004, 137: 203 - 223.
- [2] Blanco A, Gadaleta A, Cenci A, et al. Molecular mapping of the novel powdery mildew resistance gene *Pm36* introgressed from *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* in durum wheat [J]. Theor Appl Genet 2008, 117: 135 - 142.
- [3] Li G Q, Fang T L, Zhang H T, et al. Molecular identification of a new powdery mildew resistance gene *Pm41* on chromosome 3BL derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*) [J]. Theor Appl Genet 2009, 119: 531 - 539.
- [4] Hua W, Liu Z J, 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: 223 - 230.
- [5] Mohler V, Zeller F J, Wenzel G, et al. Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.). 9. Gene *MLZec1* from the *Triticum dicoccoides*-derived wheat line Zecoi-1 [J]. Euphytica 2005, 142: 161 - 167.
- [6] Ahmadi H, Moore K. Inheritance and chromosomal location of powdery mildew resistance gene in wild wheat *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* [J]. Plant Pathology

- Journal(Faisalabad) 2007 6(2) : 164 – 168.
- [7] Ji X L ,Xie C J ,Ni Z F *et al.* Identification and genetic mapping of a powdery mildew resistance gene in wild emmer (*Triticum dicoccoides*) accession IW72 from Israel [J]. Euphytica 2008 ,159: 385 – 390.
- [8] 王长有 ,吉万全 ,张改生 ,等. 小麦种质 N9134 抗白粉病基因的 SSR 标记和染色体初步定位 [J]. 作物学报 , 2007 33(1) : 163 – 166.
- [9] 韩 俊 ,张连松 ,李根桥 ,等. 从野生二粒小麦导入普通小麦的抗白粉病基因 *MIWE18* 分子标记定位 [J]. 作物学报 2009 35(10) : 1791 – 1797.
- [10] 李根桥 ,房体麟 ,张宏涛 ,等. 来自野生二粒小麦 IW3 和 IW10 的两个抗白粉病基因的鉴定及 SSR 标记定位 [J]. 作物学报 2009 35(5) : 761 – 767.
- [11] 张连松 ,华 为 ,关海英 ,等. 野生二粒小麦导入普通小麦的抗白粉病基因 *MIWE29* 分子标记定位 [J]. 作物学报 2009 35(6) : 998 – 1005.
- [12] 华 为 ,郭 霞 ,朱 婕 ,等. 野生二粒小麦导入普通小麦抗白粉病基因 *MIWE27* 的鉴定和分子标记 [J]. 农业生物技术学报 2010 18(1) : 3 – 9.
- [13] Zhang H T ,Guan H Y ,Li J T *et al.* Genetic and comparative genomics mapping reveals that a powdery mildew resistance gene *ML3D232* originating from wild emmer co-segregates with an NBS-LRR analog in common wheat(*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet , 2010 121(8) : 1613 – 1621.
- [14] Ben-David R ,Xie W L ,Peleg Z *et al.* Identification and mapping of *PmG16* ,a powdery mildew resistance gene derived from wild emmer wheat [J]. Theor Appl Genet , 2010 121: 499 – 510.
- [15] 吉万全 ,王秋英 ,薛秀庄 ,等. 野生二粒小麦抗白粉病基因的转移及其 RAPD 分析 [J]. 西北植物学报 , 1999 19(6) : 31 – 36.
- [16] 王秋英 ,吉万全 ,王长有 ,等. 小麦抗白粉病种质 “N9134”的抗性遗传分析 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版 2004 32(2) : 14 – 16.
- [17] 盛宝钦. 用反应型记载小麦苗期白粉病 [J]. 植物保护 ,1988(1) : 49.
- [18] 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.
- [19] Röder M S ,Korzun V ,Wendekhake K *et al.* A microsatellite map of wheat [J]. Genetics ,1998 ,149: 2007 – 2023.
- [20] 桑利群 ,王长有 ,王秋英 ,等. 小麦种质 N9659 抗白粉病基因 SSR 标记研究 [J]. 华北农学报 2008 23(3) : 166 – 169.
- [21] 王长有 ,王秋英 ,刘志立 ,等. 小麦新种质 N95175 抗白粉病基因的染色体定位 [J]. 华北农学报 2010 25(1) : 217 – 220.