

小麦品种 SARKA 抗白粉病基因遗传分析及 SSR 标记初选

吴伟刚^{1,2}, 刘桂茹^{2*}, 沈凤英¹ (1. 河北北方学院, 河北张家口 075000; 2. 河北农业大学农学院, 河北保定 071001)

摘要 [目的] 对小麦品种 SARKA 的抗白粉病基因进行遗传分析。[方法] SARKA(抗) × 河农 822(感)的 F₁ 代表现为感病, 对其 F₂ 代分离群体 300 株进行抗病、感病鉴定; 利用 χ^2 测验进行统计分析; 采用集团分离分析法(BSA)对 F₂ 代群体建立抗病 DNA 池和感病 DNA 池, 选取均匀分布于小麦 21 个连锁群上的 165 对引物对抗感 DNA 池以及双亲进行 SSR 引物筛选。[结果] 经过 χ^2 测验符合 1:3 一对等位基因的分离规律, 抗性分析表明, SARKA 的抗病性是由一对隐性基因控制。[结论] 位于 1A 染色体上的 SSR 标记 Xgwm99、Xgwm357 与 SARKA 的抗白粉病基因连锁程度较高, 遗传距离分别为 34.7 和 29.9 cM。

关键词 小麦; 白粉病; BSA; 遗传分析

中图分类号 S512.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2009)28-13524-02

Research on the Genetic Analysis of the Wheat Variety SARKA Gene Resisting Powdery Mildew and SSR Marker Selection

WU Wei-gang et al (Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei 075000)

Abstract [Objective] The genetic analysis of wheat variety SARKA gene resisting the powdery mildew was done. [Method] F₁ from SARKA (anti) × Henong 822 (sensitive) was sensitive to the powdery mildew and the disease-resistant of 300 plants from its F₂ generation was identified and analyzed with χ^2 Test Method. The nursery of DNA susceptible plant and DNA resistant plant of the F₂ generation would be established with Group Segregation and Analysis Method (BSA) and 165 pairs of primers that were uniformly distributed in 21 linkage groups of wheat were used to do the selection of the SSR primer of the nursery of DNA resistant plant and its parents. [Results] The resistance of SARKA was controlled by a pair of recessive gene, which separation was 1:3 of a pair of allele genes after χ^2 Test. [Conclusion] The SSR marker: Xgwm 99 and Xgwm 357, in chromosome 1A was highly linked with the resistance gene to powdery mildew of SARKA, which genetic distance were 34.7 and 29.9 cM, respectively.

Key words Wheat; Powdery mildew; BSA; Genetic analysis

小麦白粉病(*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*)在世界主要麦区由次要病害上升为主要病害, 成为影响小麦高产稳产的重要因素之一^[1]。小麦对白粉病的抗性可分为 2 种类型: 由主效基因控制的质量抗性和由微效多基因控制的数量抗性。质量抗性由显性或隐性单基因控制, 这种类型的抗性表现为对某一确定的白粉菌生理小种有效, 而对别的小种无效, 即符合 Flor 的“基因对基因”假说。目前, 已定位在小麦 7 个部分同源染色体上, 24 个位点, 共 35 个抗白粉病基因(*Pm1* ~ *Pm25*)均属于这种类型的抗性基因, 抗白粉病基因绝大多数为显性基因, 仅来自于栽培二粒小麦的 *Pm5* 和来自于野生二粒小麦的 *Pm26* 为隐性抗性基因^[2-4]。除已命名的 *Pm* 基因外, 还报道了一些尚未明确的抗白粉病基因, *Mld* 基因在小麦品系 Hallel3471, H8810/47, MarisDove 的 4B 染色体上, 来源于 *T. durum*^[5]; 抗德国白粉菌 2 号小种的 Abo, Aristide, Courtot 中含有 *Mlar* 基因; 在小麦品种 Kenguial 的 6A 染色体上含有 *KG* 基因; Randhawa 等发现, 小麦品系 CPAN1946 含有 2 个隐性抗白粉病基因; Robe 和 Doussinault 发现, 法国的一个重要小麦抗病品系 RE714 除含有 *Pm4b* 外, 还含有一个隐性基因 *MIRE*^[6]。我国鉴定的几个重要抗病农家品种, 如红卷芒、萃三月黄、小白冬麦、游白兰和复壮 30 对白粉病的抗性均受隐性基因控制^[7]。小麦对白粉病的数量抗性又称为慢粉性、部分抗性、田间抗性或成株抗性, 由微效多基因控制。

笔者通过田间调查对 SARKA 进行抗病感病鉴定, 利用 SSR 分析技术并结合抗感池分析(Bulked segregation analysis, BSA), 筛选与 SARKA 抗白粉病基因连锁的分子标记, 并

根据 SSR 标记的位置, 以期对 SARKA 的白粉病抗性基因进行染色体定位, 为该种质在育种中的利用和抗性基因分子标记辅助选择奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料。小麦品种 SARKA、河农 822 及 SARKA × 河农 822 的 F₁、F₂ 代, 由河北农业大学小麦遗传育种组提供。

1.1.2 引物。选用均匀分布于小麦染色体的微卫星引物共 165 对, 引物序列来源于 www.wheat.pw.usda.gov, 由上海生物工程合成。

1.2 方法

1.2.1 白粉病菌接种与抗性鉴定。在田间条件下于小麦苗期采用扫拂法对 SARKA 进行白粉病菌人工接种, 于小麦抽穗期和灌浆期各调查 1 次白粉病的发病情况, 记载反应型及划分病级。白粉病病级等级为: 0 级为免疫, 植株无病斑; 0 级为近免疫, 叶片产生坏死反应, 有枯死斑; 1、2、3 和 4 级分别代表高抗、抗、感和高感 4 种类型。0 ~ 2 级为抗病; 3 ~ 4 级为感病^[8-9]。用 χ^2 测验进行适合性检测。

1.2.2 小麦基因组 DNA 提取。采用改良 CTAB 法^[10] 分别提取 SARKA、河农 822 及其 F₂ 代分离群体 300 个单株的基因组 DNA。

1.2.3 小麦抗病感病群体的建立。根据田间抗病感病调查结果, 采用集团分离分析法(BSA), 在 F₂ 群体中选取 10 株对小麦白粉病免疫的单株和 10 株对小麦白粉病高感的单株, 分别以等量 DNA 混合建立抗病池 B_R 和感病池 B_S^[11]。

1.2.4 PCR 扩增。PCR 反应总体积 15 μ l, 含有 1.5 μ l 10 × PCR Buffer, 1.2 μ l dNTP (2.5 mmol/ml), 1.08 μ l Mg²⁺ (15 mmol/ml), 0.8 μ l Primer F (25 ng/ μ l), 0.8 μ l Primer R (25 ng/ μ l), 5 μ l DNA (10 ng/ μ l), 0.15 μ l *Taq* 酶 (5 U/ μ l), 4.47 μ l dd H₂O。其中 10 × PCR Buffer 由 100 mmol/ml Tris (pH

作者简介 吴伟刚(1980 -), 男, 河北张家口人, 硕士, 助教, 从事小麦遗传育种研究。* 通讯作者。

收稿日期 2009-06-08

值 8.3) 和 500 mmol/ml KCl 组成。

PCR 反应程序为 94 °C 变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 复性 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 34 个循环; 72 °C 延伸 20 min。

1.2.5 扩增产物检测。对 PCR 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 经硝酸银染色后观察照相。

1.2.6 遗传连锁分析。用 MAPMAKER/EXP 3.0 b 软件计算微卫星标记与抗病基因间的重组率^[12], 用 Kosambi 作图方程将重组率转换成遗传距离^[13]。

2 结果与分析

2.1 小麦 SARKA × 河农 822 的 F₂ 代苗期白粉病抗性鉴定与遗传分析结果 SARKA × 河农 822 的 F₂ 代群体白粉病鉴定结果为: 杂交组合, SARKA × 河农 822; 株数共 300 株, 抗病单株 85 株, 感病单株 215 株; 观察比例 2.529 4:1; $\chi^2_{3:1}$ 为 1.60 ($\chi^2_{0.05} = 3.84$)。

SARKA × 河农 822 的 F₂ 群体感抗白粉病分离比例经 χ^2 检验 ($\chi^2_{3:1} < 3.84$) 符合孟德尔遗传 3:1 分离比例。因此, 可以推断该群体中的白粉病抗性是由隐性主效单基因控制的。

2.2 抗白粉病基因的 SSR 分子标记 根据小麦的微卫星标记图谱^[14], 选取平均分布于小麦每条染色体上的 4~9 对 SSR 引物对 SARKA、河农 822、抗病 DNA 池、感病 DNA 池进行 PCR 扩增, 筛选多态性 SSR 标记引物, 初步发现引物 *Xgwm357*、*Xgwm99*、*Xgwm126*、*Xgwm304* 在抗感亲本及抗病 DNA 池、感病 DNA 池之间均能扩增出稳定的多态性片段(表 1)。

表 1 小麦 SSR 位点及其序列

Table 1 The SSR marker and sequence of wheat

微卫星标记 Microsatellite marker	染色体 Chromosome	引物序列 Sequence of primer	退火温度 /°C Temperature
<i>Xgwm357</i>	1A	TAT GGT CAA AGT TGG ACC TCG	55
		AGG CTG CAG CTC TTC TTC AG	
<i>Xgwm99</i>	1A	AAG ATG GAC GTA TGC ATC ACA	60
		GCC ATA TTT GAT GAC GCA TA	
<i>Xgwm126</i>	5A	CAC ACG CTC CAC CAT GAC	60
		GTT GAG TTG ATG CCG GAG G	
<i>Xgwm304</i>	5A	AGG AAA CAG AAA TAT CGC GG	55
		AGG ACT GTG GGG AAT GAA TG	

通过 SARKA × 河农 822 的 F₂ 代分离群体的验证, 发现位于小麦 5A 染色体上的微卫星标记 *Xgwm126*、*Xgwm304* 与白粉病抗性基因的连锁性较低, 而位于小麦 1A 染色体上的微卫星标记 *Xgwm357*、*Xgwm99* 与白粉病抗性基因具有较高的连锁性, 与白粉病抗性基因的遗传距离分别为 34.7 和 29.9 cM。

3 讨论

小麦抗白粉病品种 SARKA 的抗性基因与小麦 1A 染色体上的 2 个 SSR 标记连锁, 初步可以认为该抗性基因位于小麦 1A 染色体上。已知的位于小麦 1A 染色体上的抗白粉病

基因有 *Pm3a*、*Pm3b*^[15-16]、*Pm3c*、*Pm3d*、*Pm3e*、*Pm3f*、*Pm4a*^[16-17]、*Pm4b*^[18]、*Pm9*、*Pm17*、*Pm25*^[19]。这些抗性基因均为显性抗病基因^[20], 而 SARKA 的抗性基因遗传表现为隐性, 该抗性基因与上述基因不同。后续工作是合成小麦 1A 染色体上的 *Xgwm357*、*Xgwm99* 标记附近区域的引物, 对该隐性抗病基因进行精确定位。

参考文献

[1] BENNET F G A. Resistance to powdery mildew in wheat: a review of its use in agriculture and breeding programmes [J]. *Plant Pathol*, 1984, 32: 279-300.

[2] LAW C N, WOLFE M S. Location of genetic factors for mildew resistance and ear emergence time on chromosome 7B of wheat [J]. *Can J Plant Sci*, 1966, 8: 462-470.

[3] LEBSOCK K L, BRIGGLE L W. Gene *Pm5* for resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* in Hope wheat [J]. *Crop Sci*, 1974, 14: 561-563.

[4] RONG J K, MILLET E, MANISSTERSKI J, et al. A new powdery mildew resistance gene: introgression from wild emmer in to common wheat an RFLP-based mapping [J]. *Euphytica*, 2000, 115 (2): 121-126.

[5] MCINTOSH R A, HART G E, GALE M D. Catalogue of gene symbols for heat [C]. Beijing, China: Proc. The 8th Intl. Wheat Symp, 1993: 1333-1500.

[6] MCINTOSH R A, HART G E, DEVOS K M, et al. Catalogue of gene symbols for wheat [C]. Proceedings of the 9th Intl. Wheat Symp. (Vols). Saskatoon, Saskatchewan, Canada, 1998.

[7] HUANG X Q, HSAM S L K, ZELLER F J. Molecular mapping of the wheat Powdery mildew resistance gene *Pm24* and maker validation for molecular breeding [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 407-414.

[8] 盛宝钦. 用反应型记载小麦苗期白粉病 [J]. *植物保护*, 1988 (1): 49-50.

[9] 盛宝钦, 向齐君, 段霞瑜, 等. 1991~1992 年我国小麦白粉病生理小种的变异动态 [J]. *植物病理学报*, 1995, 25 (2): 116.

[10] SAGHAI-MAROOF M A, SOLIMAN K M, JORGENSEN R A, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics [J]. *Proc Nati Acad Sci USA*, 1984, 81: 8014-8018.

[11] MICHELMORE R W, PARAN I. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregate analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. *Process Natual Academic Science USA*, 1991, 88: 9828-9832.

[12] LANDER E S, GREEN P, ABRAHAMSON J, et al. MAPMAICER: an interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations [J]. *Genomics*, 1987, 1: 174-181.

[13] KOSAMBI D D. The estimation of map distance from recombination value [J]. *Ann Eugen*, 1944, 12: 172-175.

[14] RÖDER M S, KORZUN V, WENDEHAKE K, et al. A microsatellite map of wheat [J]. *Genetics*, 1998, 149: 2007-2023.

[15] HARTL L, WEISS H, ZELLER F J, et al. Use of RFLP markers for the identification of alleles of the *Pm3* locus conferring powdery mildew resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 86 (8): 959-963.

[16] MA Z Q, SORRELLS M E, TANKSLEY S D. RFLP markers linked to powdery mildew resistance genes *Pm1*, *Pm2*, *Pm3* and *Pm4* in wheat [J]. *Genome*, 1994, 37: 871-875.

[17] 刘金元, 刘大钧, 陶文静, 等. 小麦抗白粉病基因 *Pm4* 的 RFLP 标记转化为 STS 标记的研究 [J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7 (2): 113-116.

[18] SLINKARD A E. Proc 9th int wheat genet symp [C]. Sakatoon: Univ Extension Press, Univ of Saskatchewan, 1998.

[19] SHI A N, LEATHS, MURPHY J P. A major gene for powdery mildew resistance transferred to common wheat from wild einkorn wheat [J]. *Phytopathology*, 1998, 88: 144-147.

[20] 刘红彦, 何文兰, 杨共强, 等. 小麦抗白粉病基因的分子标记及标记辅助育种研究进展 [J]. *河南农业大学学报*, 2001 (1): 27-32.