

小麦新品系 2-26 中抗白粉病基因的遗传分析和 RAPD 标记

赵勤 白罗 傅体华

(四川农业大学农学院,四川 成都 611130)

摘要:由小麦白粉病菌引起的白粉病是世界上很多小麦种植区的主要病害之一。本研究对稳定抗白粉病新品系 2-26 中的抗病基因采用常规遗传方法进行了分析。结果表明,2-26 中存在一对显性抗白粉病基因,暂命名为 *Pm2-26*。运用 RAPD 方法对白粉病抗感亲本和抗感池进行 DNA 多态性分析,获得 2 个紧密连锁的 RAPD 标记(SBSC2 和 SBSI20),为进一步转化为稳定可靠的 SCAR 标记提供了基础。

关键词:小麦;白粉病;抗性基因;分子标记

GENETIC ANALYSIS AND RAPD MARKERS OF POWDERY MILDEW RESISTANCE GENE IN WHEAT LINE 2-26

ZHAO Qin BAI Luo FU Ti-hua

(Agronomy College, Sichuan Agricultural University, Chengdu, Sichuan 611130)

Abstract: Powdery mildew, caused by *Blumeria Graminis* f. sp. *tritici*, is one of the most important damaging diseases in many regions of the world. In present study, genetic analysis of resistance for powdery mildew in a stable wheat line 2-26, which was derived from the hybrid progeny between *Triticum durum* - *Dasypyrum villosum* amphiploid and common wheat, was carried out. The result indicated the powdery mildew resistance in line 2-26 is controlled by a single dominant gene and temporarily named *Pm2-26*. Molecular markers and bulked segregant analysis were used to characterized the powdery mildew resistance gene. Two RAPD markers (SBSC2 and SBSI20) were found tightly linked to the resistance gene in line 2-26. These results provided a basis to further transfer into stable SCAR marker in future. In addition, the gene origin in line 2-26 and relationships with other resistance genes were also discussed in this paper.

Key words: wheat; powdery mildew; resistance gene; molecular marker

小麦是世界第一粮食作物,在中国是仅次于水稻的第二大粮食作物。小麦白粉病(*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*)是严重影响小麦生产的主要病害之一,随着矮秆品种的推广,种植密度的加大,肥料施用量也在增加,该病害发生面积逐年增加,现已成为中国 20 多个省市麦田的常发病害。病害发生可使小麦减产达 5%~19%,严重年份达 30%^[1,2]。培育和推广抗病品种

是持续控制病害流行最为经济安全有效的措施,寻找和鉴定优异的小麦抗源及抗病基因是获得小麦抗病品种的基础。目前,已有 40 多个小麦白粉病抗病基因位点被命名并定位于特定的染色体上,包含近 60 个等位基因^[3],但这些基因绝大多数已丧失抗性或与不良性状紧密连锁,能够在育种上应用的基因数量很少^[4]。因此挖掘新的小麦白粉病抗病基因,可拓宽小麦遗传的基础,对中国小麦育种有重要的意义。

收稿日期:2011-02-21 接受日期:2011-05-25

基金项目:四川省教育厅重点项目(09ZA085)

作者简介:赵勤(1958-),女,山东矩野人,实验师,主要从事遗传学实验教学及研究。Tel:028-86290978;E-mail:z654321q@163.com

通讯作者:傅体华(1965-),男,四川安岳人,教授,主要从事植物遗传与育种学研究。Tel:028-86290866;E-mail:futihua@yahoo.com.cn

分子标记技术是根据广泛存在于不同植物种及品种之间的重复 DNA 序列多态性和核酸分子电泳图谱建立起来以生物大分子多态性为基础的遗传标记技术。利用 RFLP、SSR、RAPD、AFLP 等分子标记技术对大量的包括白粉病抗病基因在内的基因进行了定位^[5-7],为其在育种上运用及其抗病基因的分析克隆等奠定了基础。

小麦新品系 2-26 对现在生产上流行的白粉病免疫,该品系来源于硬粒小麦-簇毛麦双二倍体×普通小麦远缘杂交,用普通小麦作为轮回亲本回交 2 次,再自交;并对第 1 次自交获得的种子采用⁶⁰Co γ 射线诱变处理,然后对辐射后代群体通过多年连续选择而成。绵阳 26 曾是上世纪九十年代西南地区广泛推广的良种,现在已严重感染条锈和白粉病,本试验将 2-26 与其进行杂交,然后对后代利用分离分组群体法结合分子标记技术,对小麦品系 2-26 的抗白粉病基因进行了抗性遗传分析和 RAPD 分子标记筛选,并希望将其标记转化为 SCAR 标记,为其在生产上快速利用或多个抗病基因在一个品种中的累积提供可靠的标记。

1 材料与方 法

1.1 材 料

所用材料为抗白粉病小麦新品系 2-26 和小麦品种绵阳 26 (MY26),及其 MY26 × 2-26 的杂种 F₁ 和 F₂ 代。诱发材料 SY95-71 为四川农业大学小麦研究所育成的高代品系,对条锈和白粉病表现出高感特性。

1.2 方 法

1.2.1 材料种植 所有材料于 2007-2008 年秋播种于四川农业大学教学农场,2-26、绵阳 26、2-26 和绵阳 26 的杂种 F₁ 各播种 2 行;F₂ 分单株播种,每行播种 15 株,并每隔 2 行播种诱发行材料 SY95-71。为了验证 F₂ 世代的抗病性结果,所有的 F₂ 世代按照单株收获脱粒,次年种植株行,形成 F_{2,3} 株系,每一株系中至少保证 15 株以上,每隔 2 个株系播种 1 行诱发材料 SY95-71,同时种植抗病和感病亲本各 2 行为对照,播种方法同前。

1.2.2 抗病性鉴定 在幼苗时期接种西南地区流行的白粉病菌于诱发材料 SY95-71 上,待诱发材料发病充分时(抽穗期)进行抗病性观察和鉴定,记载各材料抗病(R)和感病(S)情况;其中的 F_{2,3} 家系按照抗病、感病和分离等情况记载。对鉴定结果抗感分离比例进行卡方(X²)测验。

1.2.3 DNA 的提取 采用 CTAB 的提取方法提取小

麦的总 DNA,略作调整^[8]。除亲本外,所有 MY26 × 2-26 的 F₂ 代分单株于分蘖旺期采集叶片提取其 DNA。同时按 Michelmores 等^[9]集团分离分析法(BSA),在 F₂ 群体中选取 10 株极抗单株和 10 株极感单株的 DNA,分别以等量混合提取 DNA 建立抗病池 R_B 和感病池 S_B,与双亲一起进行特异引物的筛选。

1.2.4 RAPD 分析 本研究所用 RAPD 引物为 SBS 系列,由赛百胜生物公司合成,编号为 A~Q。

对 RAPD 扩增反应中的 Mg²⁺、dNTP、DNA 模板、TaqDNA 聚合酶以及引物的最适浓度和用量,合适的退火温度和扩增循环次数等因子进行筛选,建立了本实验的反应条件和扩增程序。25 μ l RAPD-PCR 反应体系包括 10 × Buffer 2.5 μ l, Mg²⁺ (25mol/L) 2 μ l, dNTPs (10mol/L) 0.5 μ l, TaqDNA 聚合酶 (2.5U) 0.4 μ l,引物 (10 μ mol/L) 0.6 μ l, DNA 模板 48ng。扩增条件为 94℃ 下变性 5min,然后 94℃ 40s, 36℃ 40s, 72℃ 50s, 进行 45 个循环,在 72℃ 下延伸 10min,4℃ 冷却。反应产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离、电极缓冲液为 0.5 × TBE,以 4~5V/cm 的电压电泳 2.5h,溴化乙锭染色。

采用上述程序,用抗病和感病亲本作对照,对构建的 DNA 抗感池进行 RAPD 多态性分析。用 Mapmaker3.0 软件计算不同的 RAPD 标记之间及其与目的基因的遗传距离,用 Mapdraw 软件绘制目的基因及 RAPD 标记的遗传连锁图。

2 结果与分析

2.1 白粉病的抗性鉴定与遗传分析

白粉病田间调查结果列于表 1。从表 1 中可以看出,2-26 以及 MY26 × 2-26 的杂种 F₁ 代植株上未发现有白粉病菌的产生,表现为完全免疫;MY26 表现为高感白粉病,标记所用群体 MY26 × 2-26 F₂ 代的 136 株个体中,发现抗病植株有 108 株,感病植株有 28 株,经卡方测验符合 3:1 的显性单基因孟德尔分离比例(X² = 1.19)。F₂ 收获时有 7 株籽粒较少,次年未种植,在种植的 129 个 F_{2,3} 家系中,表现完全抗病的株系有 34 株,感病的株系 31 株,其余的表现出抗病和感病分离,符合 1:2:1 的一对基因分离比例(X² = 0.19),而且 2-26 在连续多年种植中表现出稳定的对流行白粉病的抗性。这些结果表明小麦品系 2-26 中存在一对显性抗白粉病基因,本研究将其暂命名为 Pm2-26。

表 1 MY26 × 2-26 的 F₂ 群体对白粉病的抗性分离
Table 1 Segregation analysis of MY26 × 2-26 F₂ populations for reaction to powdery mildew

材料 material	统计株数 No. of plants	抗病株数 resistant	感病株数 susceptible	理论分离比 expected ratio	X ²
2-26	45	45			
MY26	60		60		
MY26 × 2-26F ₁	31	31			
MY26 × 2-26F ₂	136	108	28	3:1	1.19

2.2 RAPD 多态性分析

2.2.1 RAPD 标记筛选 运用 RAPD 方法对抗病亲本 2-26, 感病亲本 MY26 及 MY26 × 2-26 的 F₂ 代单株构建的抗病池和感病池进行了 DNA 多态性分析。总共筛选了 340 条 SBS 系列引物, 其中大多数引物能扩增出 3~10 条清晰可辨的条带。在进行筛选时, 有 17 条引物能在抗病亲本与感病亲本之间扩增出多态性。加入白粉病抗感池以及随机选取 F₂ 分离群体中的抗、

感病单株各 6 株, 以初步验证多态性 RAPD 扩增片段与抗病基因的连锁性。经 3 次以上重复, 其中 2 条 RAPD 引物 SBSC2 和 SBSI20 能在抗感亲本, 抗感池以及小群体之间稳定地扩增出不同的特征带, 表明这 2 条引物与 2-26 所携带的白粉病抗性基因存在连锁关系, 而其余 15 条引物未在群体中表现出一致的多态性。

2.2.2 抗白粉病标记 SBSC2 与抗白粉病基因遗传连锁性分析和遗传距离测定 用标记 SBSC2 对 F₂ 群体 136 个单株进行检测, 108 个抗病单株全部扩增出 438bp 的抗病特征带(图 1, 箭头所示), 28 个感病单株中有 3 个扩增出抗病特征带, 说明 28 个感病单株中有 3 株发生了标记位点的交换。用 Mapmaker3.0 软件处理 136 个 F₂ 代单株与引物 SBSC2 的扩增带型, 确定标记 SBSC2 与 *Pm2-26* 白粉病抗性基因的遗传距离为 6.3cM。

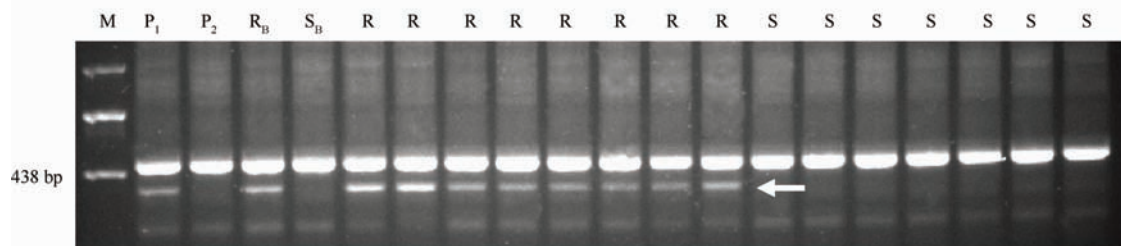


图 1 RAPD 引物 SBSC2 对亲本、抗感池及部分 F₂ 单株的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification products between parents, gene bulks and partial F₂ plants by the primer SBSC2

M: 分子量; P₁: 2-26; P₂: MY26; R_B: 抗病池; S_B: 感病池; R: 抗病单株; S: 感病单株。箭头示 438bp 的抗病植株带
M: molecular marker; P₁: resistant parent; P₂: susceptible parent; R_B: resistant bulk; S_B: susceptible bulk;
R: resistant plant; S: susceptible plant. arrow shows the 438bp band of resistance plant.

2.2.3 抗白粉病标记 SBSI20 的抗白粉病遗传连锁性分析和遗传距离测定 用 SBSI20 对 F₂ 群体 136 个单株进行检测, 108 个抗病单株全部扩增出 410bp 的抗病特征带(图 2, 箭头所示), 28 个感病单株中 1 个扩增出抗病特征带, 说明 28 个感病单株中有 1 株发生了标记位点的交换。用 Mapmaker3.0 软件处理 136 个 F₂ 单株与引物 SBSI20 的扩增带型, 确定标记 SBSI20 与 *Pm2-26* 白粉病抗性基因的遗传距离为 1.5cM。

根据以上结果, 应用 Mapdraw 软件绘出了抗白粉病基因 *Pm2-26* 的遗传连锁图(图 3), 此 2 个标记分别位于抗病基因的两侧。

3 讨论

在已研究的白粉病抗性基因中, 绝大多数为显性基因, 本试验采用常规杂交分析方法对小麦新品系 2-26 中白粉病抗性基因的研究也表明 2-26 中存在的抗性基因为一对显性基因, 为其进一步利用奠定了基础。

RAPD 标记作为一种常用的标记技术, 尽管具有重复性和稳定性较差的缺点, 但由于其快速简便, DNA 用量少, 被广泛用于遗传作图、亲缘关系研究、外源染色体追踪、目标基因标记等方面^[10]。本研究利用 BSA 方法对 *Pm2-26* 进行了 RAPD 多态性分析, 筛选到了 2 个与 *Pm2-26* 紧密连锁的标记 SBSC2 和 SBSI20, 遗传

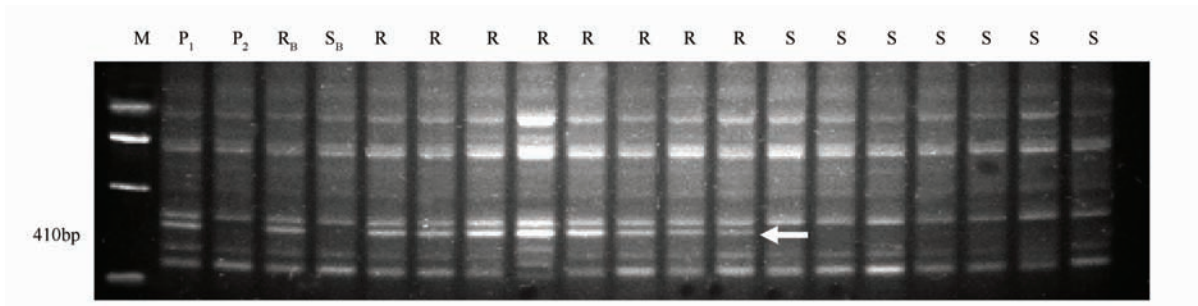


图2 RAPD引物 SBSI20 对亲本、抗感池及部分 F₂ 抗感单株的扩增结果

Fig. 2 PCR amplification products between parents, gene bulks and partial F₂ plants by the primer SBSI20

M:分子量;P₁:2-26;P₂:MY26;R_B:抗病池;S_B:感病池;R:抗病单株;S:感病单株。箭头示 410bp 的抗病植株带。

M: molecular marker, P₁: resistant parent, P₂: susceptible parent, R_B: resistant bulk,

S_B: susceptible bulk, R: resistant plant and S: susceptible plant. arrow shows the 410bp band of resistance plant.

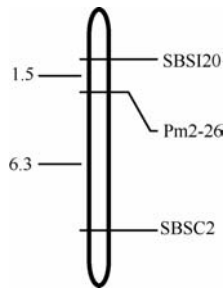


图3 抗病基因 *Pm2-26* 与 SBSI20 和 SBSC2 的连锁图谱

Fig. 3 Linkage map of powdery mildew resistant gene *Pm2-26* in line 2-26 with SBSI20 and SBSC2 markers

距离分别为 6.3cM 和 1.5cM。

由 2-26 的选育过程来看,其所含抗白粉病基因 *Pm2-26* 可能来自于簇毛麦。已报道的 50 多个主效抗白粉病或其等位基因,只有 *Pm21* 来源于簇毛麦。*Pm21* 是现已发现抗性最强、抗谱最广的抗白粉病基因,且在受体亲本中能够稳定表达^[11,12]。目前已有许多学者对 *Pm21* 开展了有关分子标记筛选、鉴定,标记辅助育种等方面的研究。Qi^[13] 等首先对 *Pm21* 进行了分子标记研究,筛选到与 *Pm21* 共分离的 RAPD 标记 OPH17₁₉₀₀ 和 OPH17₁₄₀₀,可作为 *Pm21* 的选择标记。王振英^[14] 等用 6AL/6VS × 京 411 的 F₂ 分离群体进行连锁分析,结果发现 OPK08₉₁₀ 与 *Pm21* 呈共分离现象,并且该标记只存在与含 6V 染色体和 6VS 易位系中,而在普通小麦和硬粒小麦中不存在,表明该标记存在于 6VS 上,因此确定 OPK08₉₁₀ 是 *Pm21* 的 RAPD 新标记。本试验选用 OPH17 和 OPK08 对亲本和抗感池进行扩增,但并无多态性差异。由此看来,2-26 中存在

的抗白粉病基因并不是 *Pm21*,有可能是一个新的抗白粉病基因,其来源有可能是簇毛麦的抗病基因插入到小麦染色体的某一其他位点,如黑麦的 *Pm17* 基因,也有可能是辐射诱导产生的新基因^[15],具体原因还有待于进一步确定。

SBSC2₄₃₈ 和 SBSI20₄₁₀ 与 *Pm2-26* 的遗传距离较近,且位于 *Pm2-26* 两侧,能有效追踪和鉴定 *Pm2-26*。我们正在进一步将这 2 个 RAPD 标记产物转化为更加稳定的 SCAR 标记,并将结合非整倍体技术确定染色体的归属,阐释产生抗病基因的具体原因,同时也为分子标记辅助育种或者克隆提供更好的基础。

参考文献:

- [1] Wan A M, Zhao Z H, Chen X M, et al. Wheat stripe rust epidemic and virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China in 2002 [J]. Plant Disease, 2004, 88: 896 - 904
- [2] Evens K L, Leath S. Effect of early season powdery mildew on development, survival, and yield contribution of tillers of winter wheat [J]. Phytopathology, 1992, 82: 1273 - 1278
- [3] He R L, Chang Z J, Yang Z J, et al. Inheritance and mapping of Powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 118(6): 1173 - 1180
- [4] 熊恩惠,薄元家,朱伟,肖庆璞,吴志风. 小麦近缘种属及其衍生种对白粉病的抗性利用评价 [J]. 中国农业科学, 1994, 19(5): 32 - 37
- [5] 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]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 117: 135 - 142
- [6] Huang X Q, Röder M S. Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: a review [J]. Euphytica, 137: 203 - 223
- [7] 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
- [8] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Reseach, 1980, 8(19):4321-4325
- [9] Michelmore R W, Param I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregation population [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 9828-9832
- [10] 王心宇, 元增军, 马正强, 陈佩度, 刘大钧. 小麦抗白粉病基因 Pm6 的 RAPD 标记[J]. 遗传学报, 2000, 27(12):1072-1079
- [11] Chen X, Shi A N, Shang L M. Response of *Haynaldia villosa* to various powdery mildew isolates and the express of the resistance gene in different wheat backgrounds [J]. Acta Phytopathol Sin, 1997, 27(1): 17-22
- [12] Liu D J, Qi L L, Chen P D. Precise identification of alien chromosome segment introduced in wheat and the stability of its resistance gene[J]. Acta Genet Sin, 1996, 23(1): 18-23
- [13] Qi LL, Cao MS, Chen PD, et al. Identification, mapping and application of polymorphic DNA associated with resistance gene *Pm21* of wheat[J]. Genome, 1996, 39: 191-197
- [14] 王振英, 赵红梅, 洪敬欣, 陈丽媛, 朱婕, 李刚, 彭永康, 解超杰, 刘志勇, 孙其信, 杨作民. 簇毛麦 6VS 上 4 个新分子标记的鉴定及抗白粉病基因 *Pm21* 的连锁分析[J]. 作物学报, 2007, 33(4):605-611
- [15] 祁鲁, 刘 晓, 陈佳颖, 林冬枝, 董彦君, 徐建龙. 一个新的水稻温敏感叶色突变体基因定位分析[J]. 核农学报, 2010, 24: 220-224
- (责任编辑 王媛媛)

第六届核农学青年科技工作者学术交流会暨中国核学会 2011 年学术年会核农学分会将于 10 月召开

中国原子能农学会“第六届核农学青年科技工作者学术交流会”将在 2011 年 10 月 11-14 日中国核学会 2011 年学术年会期间举办, 并作为核农学分会会议的主要内容之一。会上, 我国新老核农学科研工作者将共同围绕核辐射与空间诱变育种技术、现代核素示踪技术、辐照加工技术、核辐射应用基础研究及昆虫辐射不育技术 5 个核农学专业进行报告与交流。

一、会议时间/地点

会议时间: 2011 年 11-14 日(11 日报到, 12 日为中国核学会年会主会场邀请报告, 13 或 14 日为分会会议)。

会议地点: 贵州省贵阳市

二、会议形式

(1) 核农学分会会议 邀请资深专家介绍各专业前沿进展; 从投稿于中国核学会 2011 年学术年会的论文中选择部分作口头报告, 其他安排为张贴报告。

(2) 青年科技工作者交流会 从投稿于中国核学会 2011 年学术年会的论文中评选部分第一作者在 45 周岁(含)以下的论文, 作青年工作者交流会报告。

三、会议征稿工作

请参会代表请登录中国核学会网站 <http://xshy.ns.org.cn> 进行在线投稿, 所有投稿文章将被收录至中国核学会 2011 年学术年会论文集《中国核科学技术进展报告(第二卷)》核农学分卷。

四、参会人员

全国从事核技术农业应用研究领域的科研人员, 尤其鼓励青年科技人才积极参会。原则上要求所有投稿论文的第一作者均需出席会议。

五、优秀论文评选

中国核学会 2011 年学术年会将选出优秀学术论文一、二、三等奖和青年优秀科技论文奖; 原子能农学会也将从青年科技论文中评选出优秀论文一、二、三等奖, 并颁发证书, 优秀论文将在学会会刊《核农学报》上优先发表。

六、会务组联系方式

中国原子能农学会秘书处

联系人: 裴颖

电话: 010-62815876 15901315049

邮箱: yznnxh@263.net

传真: 010-62833881