

粗山羊草抗条锈病鉴定及抗病基因 YrY212 SSR 标记

张海泉,郎 杰,马同锁,张翠茹,高志华
(河北经贸大学 生物科学与工程学院,河北 石家庄 050061)

【摘 要】 【目的】粗山羊草是小麦野生近缘属种,是 D 基因组的供体,蕴含大量的抗病资源,是进行小麦遗传改良的重要遗传资源,明确其抗病基因的数量、类型、在染色体上的位置以及其与已知抗条锈病基因间的关系,挖掘抗条锈病新基因,为小麦育种提供优良抗病新种质。【方法】用离体叶和田间鉴定方法鉴别来自不同产地的 38 份粗山羊草的抗条锈病情况,对条锈病抗病性进行遗传分析,并利用 SSR 分子标记定位粗山羊草中的抗病基因。【结果】离体叶鉴定发现,有 9 份材料对条中 29 和条中 31 菌株免疫,占供试材料的 23.68%;有 6 份材料高感或中感,占供试材料的 15.79%,其余材料抗病等级不一致。田间混合菌种鉴定结果表明,有 19 份材料免疫,其中 10 份材料苗期感病但成株期抗病,占供试材料的 26.32%。从粗山羊草(*Aegilops tauschii* (Coss.) Schmal) Y212 中鉴定出 1 个显性抗小麦条锈病基因,暂定名为 YrY212。应用分离群体分组法(BSA)筛选到 *Wmc506*、*Barc184*、*Wmc450* 和 *Cfd41* 标记,其与 YrY212 之间的遗传距离分别为 3.0、4.0、7.0 和 20.0 cM,位于 *Wmc506* 和 *Barc184* 之间。【结论】根据连锁标记所在小麦微卫星图谱的位置,YrY212 被定位在 7DS 染色体上,分析基因所在染色体的位置、抗病性特征认为,YrY212 是一个新的抗小麦条锈病基因。

【关键词】 粗山羊草;小麦条锈病;抗病基因;基因定位;SSR 标记
【中图分类号】 Q755 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-9387(2008)09-0156-05

Identification and SSR mapping of stripe rust resistance gene in *Ae. tauschii*

ZHANG Hai-quan, LANG Jie, MA Tong-suo, ZHANG Cui-ru, GAO Zhi-hua
(College of Biology Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang, Hebei 050061, China)

Abstract: 【Objective】 As the wild relatives of wheat and the D genome donor of wheat, the *Aegilops tauschii* has many resistant resources, and it is an important genetic resource in wheat breeding. 【Method】 Thirty-eight specimens of *Aegilops tauschii* originated from different regions by inoculation of fragments of leaves *in vitro* were identified, and in field with mixed physiological method the stripe rust resistance gene was located in *Ae. tauschii* with SSR marker. 【Result】 The results were detected with 2 physiological race of wheat stripe rust (tiaozhong 29 & 31) by inoculation of fragments of leaves *in vitro* (detached leaves). Nine of them were found immunity to all of wheat stripe rust, five were susceptible to both of the two physiological race. The results from inoculation on seedling and adult plants in field with mixed physiological race were similar to that from the above method, just as below, nineteen of them were immunity to wheat stripe rust (tiaozhong 29 & 31), ten of them were susceptible at seedling and resistance at adult stage

* [收稿日期] 2007-10-18
[基金项目] 河北省科学技术研究与发展指导计划项目“微卫星标记小麦野生资源抗病基因及抗病基因的利用”(05225510);河北省教育厅科学研究计划项目“微卫星标记小麦抗白粉病基因”(Z2006103)
[作者简介] 张海泉(1964—),男,辽宁锦州人,副研究员,博士,主要从事分子生物学研究。E-mail: hqzhang188@126.com

to wheat stripe rust. A dominant wheat stripe rust resistance gene, temporarily designated as YrY212, was identified in an accession Y212 of *Aegilops tauschii*. By bulk segregation analysis, four microsatellite markers Wmc506, Barc184, Wmc450 and Cfd41 were found to be linked to YrY212 with genetic distances of 3.0, 4.0, 7.0 and 20.0 cM, respectively. 【Conclusion】 According to the locations of the linked markers, the resistance gene was located on chromosome 7DS. Based on the chromosomal location and the resistance pattern of the gene, YrY212 is proposed to be a novel stripe rust resistance gene.

Key words: *Aegilops tauschii*; wheat stripe rust; resistance gene; gene location; SSR marker

由气传真菌引起的小麦条锈病,是影响我国小麦生产的第一大病害,其具有发生区域广、爆发性强、流行频率高、危害损失严重等特点,严重威胁着我国的小麦生产安全。选育和推广抗条锈病小麦品种是防止条锈病危害、保证小麦稳定增产最经济有效的手段。但由于条锈病菌生理小种和抗病品种抗病基因的协同进化,以及生产上小麦品种抗源的单一化,导致新的条锈病菌生理小种出现并成为流行优势小种,使原有抗锈品种“丧失”抗性成为感病品种。因此,发掘、筛选、鉴定和改良新的抗条锈病资源,并对其遗传特点进行深入研究,对于培育新的抗条锈小麦品种,实现抗源轮换、抗源合理布局、抗源多样化和抗源积累,延缓品种抗锈性“丧失”具有重要意义。

粗山羊草(*Aegilops tauschii*)隶属于禾本科(Poaceae)小麦族(Triticeae)山羊草属(*Aegilops* L. $2n=14, DD$),是小麦 D 基因组的供体,也是许多 D 染色体组多倍体种的亲本。粗山羊草是野生杂草,有遗传基础丰富、抗逆性强的特点。粗山羊草蕴含了很多抗病基因,包括抗秆锈病的 *Sr33* 和 *Sr41* 基因,抗叶锈病的 *Lr21*、*Lr22a*、*Lr32*、*Lr39*、*Lr42* 和 *Lr43* 基因,抗条锈病的 *Yr24* 和 *Yr28*^[1-2] 基因,以及抗白粉病的 *Pm2*、*Pm19*、*Pm34* 和 *Pm35* 基因等^[3-6]。

本研究通过田间和离体叶相结合的方法对粗山羊草抗条锈病进行鉴定,确定粗山羊草抗感情况;利用 Y212/Y2272 的 F₂ 代群体,对条锈病抗病性进行遗传分析,并利用 SSR 分子标记对抗病基因进行标记定位,以明确抗病基因的数量、类型、在染色体上的位置以及其与已知抗条锈病基因间的关系,挖掘抗条锈病新基因,以期小麦育种提供优良抗病新种质。

1 材料与方法

1.1 材料

38 份不同产地的粗山羊草,由中国农业科学院

作物研究所提供;条锈菌生理小种条中 29、条中 31 和条中 32,由西北农林科技大学植保学院提供。

1.2 粗山羊草抗病性的鉴定

采用室内离体叶鉴定和大田鉴定相结合的方法。

1.2.1 室内离体叶鉴定 (1)离体叶培养基的配制。用苯骞咪唑 50 mg/L 作保绿剂,琼脂粉 5 g/L 作保湿剂和浮载剂。先加水将琼脂粉加热完全溶解,然后加入苯骞咪唑,搅拌均匀后冷却至 60 ℃ 左右,倒入大号培养皿,每个培养皿约 10 mL,紫外灯下消毒 1 h。

(2)抗病性鉴定。将无菌的 38 份粗山羊草叶片剪成 2 cm 的叶段,叶面朝上,均匀插在离体叶培养基上,设 4 个重复,以感病的铭贤 169 为对照。每个培养皿用抖落病株孢子法分别接种条中 29 和条中 31 小种。用保鲜膜封闭好,置于 25 ℃、光照强度 3 000 lx、光照时间 12 h/d 的光温培养箱中培养。待对照品种铭贤 169 充分发病后(约 14 d 后),记载抗病性,分免疫(0)、近免疫(0₊)、高度抗病(1)、中度抗病(2)、中度感病(3)、高度感病(4)6 级,并加用“+”、“-”表示轻重程度。

1.2.2 大田鉴定 在田间用铭贤 169 作诱发行,于小麦幼苗期接种北京地区流行的条锈菌条中 29、条中 31 和条中 32 混合小种,全生育期观察抗病性,鉴定标准同 1.2.1(2)。

1.3 粗山羊草间杂交

在抗病性鉴定的基础上,选取对条锈病免疫的材料 Y212 与高度感病材料 Y2272 杂交,获得的 F₁ 代再自交得到 F₂ 代。在田间用 1.2.2 的条锈病混合小种鉴定 F₁ 和 F₂ 单株侵染型等级。

1.4 SSR 分子标记的分析

(1)粗山羊草基因组 DNA 的提取。按文献[7]的方法提取粗山羊草基因组 DNA,用 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度。

(2)引物的合成。SSR 引物根据 <http://www.>

gramene.org/microsat/以及 <http://wheat.pw.us-da.gov> 发表序列合成。采用分离群体分组分析法^[8](Bulked Segregant Analysis,BSA)鉴定与抗病基因连锁的微卫星标记。在 F₂ 代分离群体中,分别选取 10 个高抗单株 DNA 和 10 个高感单株 DNA 等量混合,分别组成 DNA 抗病池、感病池,用亲本和抗病池、感病池对微卫星引物进行筛选。比较其在两亲本及 F₂ 代个体中的多态性,验证 SSR 标记与小麦白粉病抗性基因的连锁关系。扩增产物用 5%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和银染显示。

1.5 遗传图谱的构建

用 Mapmaker/exp 3.0^[9] 软件对 F₂ 代分离群体的抗病性和分子标记的分离数据进行连锁分析,利用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传距离(centimorgan,cM)^[10],用 Mapdraw 软件绘制连锁图。

试验的抗病性鉴定和粗山羊草间杂交部分在中国农业科学院作物研究所试验地进行,后期的分子标记工作在河北经贸大学生物科学与工程学院实验

室完成。

2 结果与分析

2.1 粗山羊草抗条锈病的鉴定结果

经过离体叶和田间混合菌株鉴定发现,粗山羊草对小麦条锈病菌株的反应结果基本一致。用条中 29 菌株接种 38 份粗山羊草的离体叶,发现有 17 份材料为免疫或近免疫,占供试材料的 44.74%;高抗和中抗为 7 份,占供试材料的 18.42%;其余 14 份材料为高感和中感材料,占供试材料的 36.84%。用条中 31 菌株接种 38 份粗山羊草的离体叶,发现有 18 份材料为免疫和近免疫,占供试材料的 47.37%;有 8 份材料为高抗和中抗,占供试材料的 21.05%;其余 12 份材料为高感和中感,占供试材料的 31.58%。在 38 份粗山羊草材料中,有 9 份材料对条中 29 和条中 31 菌株免疫,占供试材料的 23.68%;有 6 份材料高感或中感,占供试材料的 15.79%,其余材料抗病等级不一致(表 1)。

表 1 粗山羊草抗条锈病的鉴定

Table 1 Identification of resistance to wheat stripe rust of *Ae. tauschii*

材料 Accession	离体叶侵染型 Infectiontype of detached leaves		田间侵染型 Infectiontype of wheat stripe rust in the field
	条中 29	条中 31	
	Tiaozhong 29	Tiaozhong 31	
Y121	4	4	4
Y122	0;	2	2
Y124	2	3	3
Y125	0	0	0
Y126	3	3	3
Y168	4	4	4
Y169	3	2	3
Y176	4	2	4
Y178	4	4	4
Y186	1	2	2
Y199	3	0	0(APR)
Y205	0	3	0(APR)
Y207	2	4	4
Y208	2	0	2
Y220	3	2	0(APR)
Y223	3	0	0(APR)
Ae34	0;	1	2
Ae35	0;	2	2
Ae38	3	0	0(APR)
Ae40	2	0;	2

材料 Accession	离体叶侵染型 Infectiontype of detached leaves		田间侵染型 Infectiontype of wheat stripe rust in the field
	条中 29	条中 31	
	Tiaozhong 29	Tiaozhong 31	
Ae43	2	0;	2
Ae48	2	0	2
Y204	0	4	0(APR)
Y218	0	2	2
Y219	0	3	0(APR)
Y221	3	0	0(APR)
Y222	3	0	0(APR)
Y225	0	3	0(APR)
Y170	0	0	0
Y189	0	0	0
Y192	0	0	0
Y201	0	0	0
Y206	0	0	0
Y212	0	0	0
Y214	0	0	0
Y215	0	0	0
Y185	3	4	4
Y2272	4	4	4
铭贤 169(CK)	4	4	4
Mingxian 169	4	4	4

注:APR 为成株期抗病。

Note:APR was susceptible at seedling but resistant at adult plant period.

在田间接种条中 29、条中 31 和条中 32 混合菌株,发现有 19 份材料免疫,占供试材料的 50%,其中 10 份材料苗期感病但成株期抗病,占供试材料的

26.32%,全生育期抗条锈病的材料占供试材料的 23.68%;感条锈病的材料占 50%(表 1)。

2.2 抗病鉴定与遗传分析

抗病材料 Y212 与高度感病材料 Y2272 杂交后,获得 15 株 F₁,在田间经条锈病混合菌株检测,发现 F₁ 单株全部抗病,且表现为免疫。F₁ 自交后获得 589 粒种子,随机种植 175 粒获得 F₂ 单株,对

表 2 苗期和成株期 Y212/Y2272 F₂ 群体条锈病混合菌株的抗性测试结果

材料 Material	侵染型 Infection type						总株数 Total number of plants	期望值 Expected value	χ^2	P 值 P value
	0	0;	1	2	3	4				
Y212/Y2272 F ₂	121	9			8	37	175	3 : 1	1.34	0.90~0.75

从表 2 可见,在 F₂ 单株中,130 株抗病,其中 121 株免疫,9 株近免疫;45 株感病,其中有 8 株中度感病,有 37 株高度感病。

2.3 SSR 标记分析及连锁作图

利用 BSA 法,用 766 对小麦微卫星引物在抗病亲本、感病亲本、抗病池和感病池之间进行多态性分析,对筛选到的多态性引物进行小群体验证,最终获得具有多态性的引物 40 对。用 F₂ 单株进一步筛

其进行抗病性鉴定,F₂ 单株出现抗、感分离,其中 130 株抗病,45 株感病,经 χ^2 测验, $\chi^2=1.34<\chi^2_{0.05}=3.85$,符合 3 : 1 的显性单基因分离规律(表 2)。说明该分离群体中含有 1 个来自抗病粗山羊草 Y212 的显性抗小麦条锈病单基因,暂命名为 YrY212。

选,记录扩增带型,在 7D 染色体上获得 5 对引物与 YrY212 连锁的 SSR 标记,利用 Mapmaker/exp 3.0 软件进行分析,结果表明,Wmc506、Barc184、Wmc450 和 Cfd41 与 YrY212 处于一个连锁群中,与抗病基因的遗传距离分别为 3.0,4.0,7.0 和 20.0 cM,YrY212 位于 Wmc506 和 Barc184 之间(图 1,图 2),定位在 7DS 染色体上,另外两对引物与 YrY212 不在一个连锁群中。



图 1 SSR 标记 Wmc506 在 F₂ 群体部分单株中的分布

M. PBR322 DNA/MSP Marker;1. 抗病亲本;2. 感病亲本;3~38. 抗病单株;39~46. 感病单株

Fig. 1 Distribution of SSR marker Wmc506 in the F₂ segregation population

M. PBR322 DNA/MSP Marker;1. Resistance parent;2. Susceptible parent;3—38. Phenotypically resistant individuals; 39—46. Phenotypically susceptible individuals

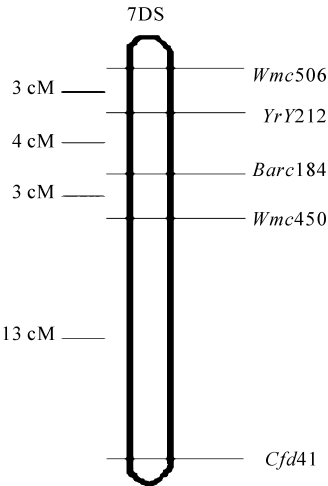


图 2 抗条锈病基因 YrY212 的遗传连锁图(7DS)

Fig. 2 Linkage map of stripe rust resistance gene YrY212 on chromosome 7DS

标记的排列顺序与已经建立的小麦整合图谱一致。在 7DS 上,Spielmeyer 等^[11]用 Xgwm1220 和 Xgwm295 标记出 Yr18 基因,为了验证是否与本研究中的 YrY212 基因相同,用 Xgwm295 引物对 F₂ 代群体单株进行了 SSR 分析,没有出现多态性。

3 讨论

要充分、合理、有效地利用粗山羊草,必须对要利用的材料进行鉴定。现有的鉴定方法分为田间鉴定和离体叶鉴定两种方法。从本文的鉴定结果看,离体叶和田间混合小种鉴定虽各有优缺点,但都比较准确。离体叶鉴定不受场地和发育时期的限制,一次可以鉴定多个菌种,能够快速检测材料对病害的反应,但鉴定时应做好灭菌处理,否则易发生离体叶段霉变,影响鉴定结果,鉴定条件要求也比较严

格,技术比较复杂。混合小种田间鉴定在自然条件下能够发病完全,鉴定准确,但不能反应材料对病菌单个生理小种的反应,鉴定周期较长。所以可先进行田间鉴定,在田间抗病的材料再在室内进行分小种离体鉴定,可能会收到更好的效果。

国际上已经发现并正式命名的抗小麦条锈病基因有 40 个,还有 70 多个暂时命名的抗病基因,也分别定位在不同的染色体上(<http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=10342>; <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClass-List.jsp>)。抗病基因绝大多数来自于小麦,其余来自小麦的野生近缘属种^[1-2,11-15]。来源于小麦野生近缘属种的抗病基因,在小麦生产上发挥了巨大作用,Kuraparthi 等^[15]从小伞山羊草的卵穗山羊草中鉴定出抗小麦条锈病和叶锈病基因 *Yr40* 和 *Lr57*,何名召等^[16]从硬粒小麦-粗山羊草人工合成小麦材料中鉴定出抗小麦条锈病基因 *YrC108*。

抗小麦条锈病基因的定位分子标记方法主要有 RAPD(*Yr5*、*Yr8*、*Yr15*、*Yr17*、*YrLee*)、SSR(*Yr5*、*Yr10*、*Yr15*、*Yr18*、*Yr33*)、STSS(*Yr5*)、RFLP(*Yr15*)、AFLP(*Yr10*、*Yr29*)(http://www.ars.usda.gov/SP2UserFiles/ad_hoc/36400500Cerealrusts/stripe_rust_control.pdf)等。SSR 标记因多态性好、引物序列公开、无专利纠纷日益受到研究者的重视。在小麦染色体图谱上,密布已知引物的标记且具有专一性的特点,通过分离群体分组分析法可一次性将基因定位在染色体上,准确可靠。

到目前为止,正式被命名的定位在 7D 染色体上的抗条锈病基因只有 *Yr18*,*Yr18* 与 *Lr34* 基因紧密连锁,标记引物是 *Xgwm1220* 和 *Xgwm295*,定位在 7DS^[12]。其中 *Yr18* 与本研究发现的基因 *YrY212* 都定位在 7DS 上,但 *YrY212* 标记引物是 *Wmc506*、*Barc184*、*Wmc450* 和 *Cfd41*,且 *Yr18* 特异性引物 *Xgwm295* 在 *Y212/Y2272* *F*₂ 分离群体的单株上没有出现多态性,*Yr18* 距短臂端点的遗传距离约为 69.48 cM,而 *YrY212* 距短臂端点的遗传距离为 20.88 cM,因此可以认定,*YrY212* 与 *Yr18* 抗病基因不是相同的基因。因此可以判断,*YrY212* 是新的抗病基因。抗病粗山羊草 *Y212* 中,*YrY212* 作为条锈病优良的主效抗病基因,为小麦抗条锈病基因分子标记辅助选择和抗病育种奠定了基础。

[参考文献]

[1] McIntosh R A, Lagudah E S. Cytogenetical studies in wheat. XVIII. Gene *Yr24* for resistance to stripe rust [J]. Plant Breeding, 2000, 119(1): 76-81.

[2] Singh R P, Nelson J C, Sorrells M E. Mapping *Yr28* and other genes for resistance to stripe rust in wheat [J]. Crop Science, 2000, 40: 1148-1155.

[3] 张海泉,符晓棠,郝晨阳,等. 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.
Zhang H Q, Fu X T, Hao C Y, et al. Progress of studies on powdery mildew resistance genes in wheat [J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2003, 31(1): 68-71. (in Chinese)

[4] 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: 自然科学版, 2007, 37(2): 177-180.
Zhang H Q. SSR Markers linked to a powdery mildew resistance gene in *Aegilops tauschii* *Y189* [J]. Journal of Henan University: Natural Science Edition, 2007, 37(2): 177-180. (in Chinese)

[5] Miranda L M, Murphy J P, Marshall D, et al. *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.

[6] Miranda L M, Murphy J P, Marshall D, et al. Chromosomal location of *Pm35*, a novel *Aegilops tauschii* derived powdery mildew resistance gene introgressed into common wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2007, 114(8): 1451-1456.

[7] Aldrich C. CTAB DNA extraction from plant tissues [J]. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 128-141.

[8] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by using segregating analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. Proc Natl Acad Science USA, 1991, 88: 9828-9832.

[9] Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic map of experimental and natural populations [J]. Genomics, 1987, 1(2): 174-181.

[10] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values [J]. Ann Eugen, 1994, 12: 172-175.

[11] Spielmeier W, McIntosh R A, Kolmer J, et al. Powdery mildew resistance and *Lr34/Yr18* genes for durable resistance to leaf and stripe rust cosegregate at a locus on the short arm of chromosome 7D of wheat [J]. Theor Appl Genet, 2005, 111(4): 731-735.