

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.00491

来自粗山羊草抗条锈病基因的 SSR 标记

张海泉¹, 贾继增², 杨虹¹, 张宝石³

1. 河北经贸大学生物科学与工程学院, 石家庄 050061;
2. 中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081;
3. 沈阳农业大学农学院, 沈阳 110161

摘要: 从粗山羊草 [*Aegilops tauschii* (Coss.) Schmal] Y201 中鉴定出 1 个显性抗小麦条锈病基因, 暂定名为 YrY201。应用分离群体分组法(BSA) 筛选到 Xgwm273b、Xgwm37 和 wmc14 标记, 与该基因之间的遗传距离分别为 11.9、5.8 和 10.9 cM。根据连锁标记所在小麦微卫星图谱的位置, YrY201 被定位在 7DL 染色体上。分析基因所在染色体的位置及抗病性特征, 认为 YrY201 是一个新的抗小麦条锈病基因, 并可用于分子标记辅助选择。

关键词: 粗山羊草; 小麦条锈病; 基因定位

SSR mapping of stripe rust resistance gene from *Ae. tauschii*

ZHANG Hai-Quan¹, JIA Ji-Zeng², YANG Hong¹, ZHANG Bao-Shi³

1. College of Biology Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050021, China;
2. Institute of Crop Sciences/The National Key Facilities for Crop Genetic Resources and Improvement, CAAS, Beijing 100081, China;
3. College of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

Abstract: A dominant wheat stripe rust resistance gene, temporarily designated as YrY201, was identified in an accession Y201 of *Aegilops tauschii*. By bulk segregation analysis, three microsatellite markers Xgwm273b, Xgwm37 and Wmc14 were found to be linked to YrY201 with genetic distance of 11.5, 5.8 and 10.9 cM, respectively. According to the locations of the linked markers, the resistance gene was located on chromosome 7DL. Based on the chromosomal location and the resistance pattern of the gene, we proposed that YrY201 was a novel stripe rust resistance gene, and could be selected by marker-assisted selection.

Keywords: *Aegilops tauschii*; wheat stripe rust; gene mapping

条锈病是影响我国小麦生产的第一大病害, 具有发生区域广、暴发性强、流行频率高、危害损失严重等特点, 严重威胁着我国小麦生产安全。选育和推广抗条锈病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

收稿日期: 2007-09-25; 修回日期: 2008-01-14

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: G1998010205)资助[Supported by National Basic Research Program of China (973 Program) (No.G1998010205)]

作者简介: 张海泉(1964-), 男, 辽宁省义县人, 副研究员, 博士, 研究方向: 分子生物学。Tel: 0311-87655680; E-mail: hqzhang188@126.com

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, 其中抗秆锈 *Sr33* 和 *Sr41* 基因, 抗叶锈的 *Lr21*、*Lr22a*、*Lr32*、*Lr39*、*Lr42* 和 *Lr43* 基因, 抗条锈 *Yr24* 和 *Yr28*^[1,2] 与抗白粉病 *Pm2* 和 *Pm19* 基因都来自于粗山羊草^[3]。张海泉等^[4,5]用抗病粗山羊草与感病粗山羊草杂交, 成功将抗小麦白粉病基因定位在 2D 和 5DL 染色体上, Miranda 等^[6,7]从粗山羊草发现的 *Pm34*、*Pm35* 基因定位在 5D 染色体上。胡英考等^[8]利用遗传分析与基因推导法, 从 99 份硬粒小麦-粗山羊草双二倍体中发现 2 个来源于粗山羊草的抗小麦白粉病的显性基因。

本研究通过粗山羊草间的杂交, 确定粗山羊草抗病基因的显隐性。利用 Y201/Y2272 的 F_2 代群体, 对条锈病抗病性进行遗传分析, 并利用 SSR 分子标记对该抗病基因标记定位, 以明确抗病基因的数量、类型和在染色体上的位置以及已知抗条锈病基因间的关系, 这对抗条锈病新基因的挖掘、已知抗性基因的合理利用和为小麦育种提供优良抗病新种质具有积极意义。

1 材料和方法

1.1 植物材料和条锈病菌

对小麦条锈病免疫的粗山羊草 Y201 和高度感病的粗山羊草 Y2272, 由中国农科院作物所提供; 北京地区流行的条锈病混合菌株, 由西北农林科技大学提供。

1.2 抗病性鉴定

采用大田混合菌种鉴定方法, 以高度感病的小麦铭贤 169 为对照, 待铭贤 169 充分发病后(约 14 d 以后), 记载供试材料的抗病性, 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。检测亲本及 F_1 和 F_2 代条锈病抗感分离情况。

1.3 SSR 分子标记分析

按 CTAB 法^[9]提取粗山羊草基因组 DNA, 用 0.8%

琼脂糖凝胶和紫外分光光度计检测样品的浓度和纯度。

SSR 引物根据 <http://www.gramene.org/microsat/> 以及 Röder 等^[10]发表的序列合成。采用分离群体分组分析法^[11] (Bulked Segregant Analysis, BSA) 鉴定与抗病基因连锁的微卫星标记。在 F_2 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 (Rp)、感病池 (Sp), 用亲本和抗病池、感病池对微卫星引物进行筛选。筛选在抗、感池间出现稳定差异的引物, 进而比较其在两亲本及 F_2 代个体中表现出的多态性, 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% 变形聚丙烯酰胺凝胶电泳分离和银染显示。

1.4 遗传图谱的构建

用 Mapmaker/exp 3.0^[12] 软件对 F_2 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)^[13], 用 Mapdraw 软件绘制连锁图。实验的抗病性鉴定和粗山羊草间杂交部分在中国农科院作物所实验地中进行, 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 抗病鉴定与遗传分析

选取抗病材料 Y201 和感病 Y2272 杂交后代进行遗传分析和抗病鉴定, F_1 单株全部抗病, 且表现为免疫, F_2 群体 194 个单株发生抗、感分离, 其中 150 株抗病, 44 株感病, 经卡方测验, $\chi^2 = 0.557 < \chi^2_{0.05} = 3.85$, 符合 3:1 的显性单基因分离规律(表 1)。说明该分离群体中含有 1 个来自抗病粗山羊草 Y201 的显性抗小麦条锈病单基因, 暂命名为 *YrY201*。

2.2 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 40 对引物具有多态性。用 F_2 作图群体进一步筛选, 记录扩增带型, 在 7D 染色体上获得 5 对引物与 *YrY201* 连锁的 SSR 标记, 利用 Mapmaker/exp 3.0 进行分析, 结果表明 *Xgwm273b*、*Xgwm37* 和 *Wmc14* 与 *YrY201* 处于一个连锁群中, 与抗病基因的遗传距离分别是 11.9、5.8 和 10.9 cM, *YrY201* 位于 *Xgwm37* 和 *Wmc14* 之间(图 1, 图 2), 定位在 7DL 染

表 1 苗期和成株期 Y201/Y2272 F₂ 群体对条锈病混和菌株抗性测试
Table 1 Resistance of the Y201/Y2272 Spring F₂ population infected by mixed physiological race in seedling stage and adult stage

材料 Material	侵染型 Infection type						总株数 Total number of plants	期望值 Expected	χ^2 value	P 值 P value
	0	0;	1	2	3	4				
Y201/Y2272 F ₂	144	3	2	1	4	40	194	3:1	0.557	0.500~0.250

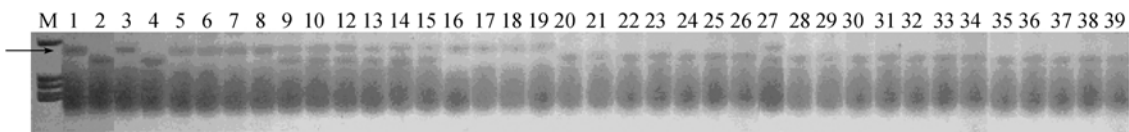


图 1 SSR 标记 *wmc14* 在 F₂ 作图群体部分单株中的分布
M: pBR322 DNA/*Msp* markers; 1: Y201; 2: 铭贤 169; 3: 抗病池 Rp; 4: 感病池 Sp; 5~22: 抗病单株; 23~39: 感病单株。箭头示抗病特异带。
Fig. 1 Distribution of SSR marker *wmc14* in the F₂ segregation population
M: pBR322 DNA/*Msp* markers; 1: Y201; 2: Mingxian 169; 3: Resistant bulk Rp; 4: Susceptible bulk Sp; 5~22: Phenotypically resistant individuals; 23~39: Phenotypically susceptible individuals. The arrow shows the specific amplification bands associated with *YrY201*.

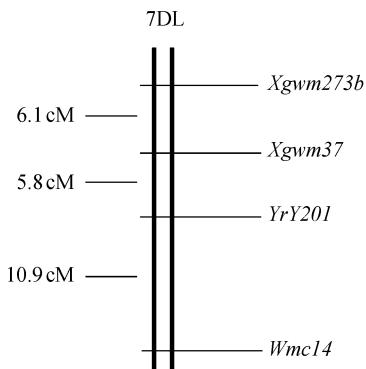


图 2 抗条锈病基因 *YrY201* 的遗传连锁图(7DL)
Fig. 2 Linkage map of stripe rust resistance gene *YrY201* on chromosome 7DL

染色体上, 另外两对引物与 *YrY201* 不在一个连锁群中。标记的排列顺序与已经建立小麦整合图谱一致。在 7DS 上, Spielmeyer 等^[14]用 *Xgwm1220* 和 *Xgwm295* 标记出 *Yr18* 基因, 为了验证是否与本研究中的 *YrY201* 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

目前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。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^[1,2,14~21]。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的作用, 陈佩度等^[20]用硬粒小麦和簇毛麦杂交, 选育获得小麦-簇毛麦 6V 代换系和 6VL/6AS 易位系, 高抗目前流行的条锈菌强毒性小种, 并稳

定遗传。Kuraparthi 等^[18]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*。来自于粗山羊草的抗病基因陆续被发现和命名。如抗秆锈 *Sr33* 和 *Sr41* 基因, 抗叶锈的 *Lr21*、*Lr22a*、*Lr32*、*Lr39*、*Lr42* 和 *Lr43* 基因, 抗条锈 *Yr24* 和 *Yr28* 与抗白粉病 *Pm2*、*Pm19*、*Pm34* 和 *Pm35* 基因都来自于粗山羊草, 来自于小麦 D 基因组供体的粗山羊草上的抗病基因正成为小麦抗病育种来源和补充。

来自于粗山羊草的抗条锈病基因有 *Yr24* 和 *Yr18*, 分别定位在 1BS 和 4DS 染色体上^[1,21], 而本研究发现来自粗山羊草的抗小麦条锈病的基因 *YrY201* 定位在 7D 染色体上, 与上述两个基因在不同的染色体上, 因此可以认定二者不是相同的基因。定位在 7D 染色体上的抗条锈病基因有 *Yr18*, 并与 *Lr34* 基因紧密连锁, 标记引物是 *Xgwm1220* 和 *Xgwm295*, 定位在 7DS^[17]。本研究发现的基因 *YrY201* 标记引物是 *Xgwm273b*、*Xgwm37* 和 *wmc14*, 且 *Yr18* 基因连锁标记引物 *Xgwm295* 在 Y201/Y2272 F₂ 分离群体的单株上没有出现多态性, *YrY201* 基因定位在 7DL 上, 与 *Yr18* 处于 7D 染色体的不同臂上。*Yr18* 是成株期抗病, 而 *YrY201* 是全生育期抗病, 因此可以认定 *YrY201* 与 *Yr18* 抗病基因不是相同的基因, *YrY201* 是新的抗病基因。

YrY201 经过多年连续实验, 证明对我国条锈病优势小种条锈 29、条锈 30、条锈 31 和条锈 32 具有持久抗病性。抗病粗山羊草 Y201 中 *YrY201* 基因作为条锈病优良主效抗病基因, 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。

通过普通小麦与含有抗病基因 *YrY201* 的粗山羊草 Y201 远缘杂交, 已经获得一系列抗条锈病育种材料, 抗目前流行条锈病生理小种, 将应用于小麦抗病育种中。

参考文献(References):

- [1] McIntosh RA, Lagudah ES. Cytogenetical studies in wheat. XVIII. Gene *Yr24* for resistance to stripe rust. *Plant Breeding*, 2000, 119 (1): 76–81.
- [2] Singh RP, Nelson JC, Sorrells ME. Mapping *Yr28* and other genes for resistance to stripe rust in wheat. *Crop Science*, 2000, 40: 1148–1155.
- [3] ZHANG Hai-Quan, FU Xiao-Tang, HAO Chen-Yang. Progress of studies on powdery mildew resistance genes in wheat. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2003, 34(1): 68–71.
张海泉, 符晓棠, 郝晨阳. 小麦白粉病抗性基因研究进展. 沈阳农业大学学报, 2003, 34(1): 68–71.
- [4] ZHANG Hai-Quan, JIA Ji-Zeng, ZHANG Bao-Shi, ZHOU Rong-Hua. Chromosomal localization of powdery mildew resistance gene *PmAeY1* from *Ae. tauschii* Y219. *Review of China Agricultural Science and Technology*, 2006, 8(4): 19–22.
张海泉, 贾继增, 张宝石, 周荣华. 染色体定位粗山羊草抗小麦白粉病基因 *PmAeY1*. 中国科技导报, 2006, 8(4): 19–22.
- [5] ZHANG Hai-Quan. SSR markers linked to a powdery mildew resistance gene in *Aegilops tauschii* Y189. *Journal of Henan University (Natural Science)*, 2007, 37(2): 177–180.
张海泉. 粗山羊草 Y189 抗小麦白粉病基因 SSR 标记. 河南大学学报(自然科学版), 2007, 37(2): 177–180.
- [6] Miranda LM, Murphy JP, Marshall D, Leath S. *Pm34*: a new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops tauschii* Coss to common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 113(8): 1497–1504. [\[DOI\]](#)
- [7] Miranda LM, Murphy JP, Marshall D, Cawger C, Leht S. Chromosomal location of *Pm35*, a novel *Aegilops tauschii* derived powdery mildew resistance gene introgressed into common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2007, 114(8): 1451–1456. [\[DOI\]](#)
- [8] HU Ying-Kao, XIN Zhi-Yong, CHEN Xiao, ZHANG Zeng-Yan, DUAN Xia-Yu. Genetic analysis and gene deduction of powdery mildew resistance in *T. durum*-*Ae. squarrosa* amphidiploids. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(2): 152–157.
胡英考, 辛志勇, 陈孝, 张增艳, 段霞瑜. 硬粒小麦-粗山羊草双二倍体白粉病抗性的遗传分析与基因推导. 遗传学报, 2001, 28(2): 152–157.
- [9] Aldrich C. CTAB DNA extraction from plant tissues. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 128–141. [\[DOI\]](#)
- [10] Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, Leroy P, Ganal MW. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 1998, 149: 2007–2023.
- [11] Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV. 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. *Proc Natl Acad Science USA*, 1991, 88: 9828–9832. [\[DOI\]](#)
- [12] Lander ES, Green P, Abrahamson J. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic map of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1: 174–181. [\[DOI\]](#)
- [13] Kosambi DD. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen*, 1994, 12: 172–175.
- [14] Spielmeyer W, McIntosh RA, Kolmer J. 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. *Theor Appl Genet*, 2005, 111(4): 731–735. [\[DOI\]](#)
- [15] Bai D, Knot DR. Suppression of rust resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by 2D genome chromosomes. *Genome*, 1992, 35: 276–282.
- [16] Gill BS, Raupp WJ. Direct genetic transfer from *Aegilops squarrosa* L. to hexaploid wheat. *Crop Science*, 1987, 27: 445–450.
- [17] Li GQ, Li ZF, Yang WY. Molecular mapping of stripe rust resistance gene *YrCH42* in Chinese wheat cultivar Chuanmai 42 and its allelism with *Yr24* and *Yr26*. *Theor Appl Genet*, 2006, 112(8): 1434–1440. [\[DOI\]](#)
- [18] Kuraparthi V, Chhuneja P, Dhaliwal HS. Characterization and mapping of cryptic alien introgression from *Aegilops geniculata* with new leaf rust and stripe rust resistance genes *Lr57* and *Yr40* in wheat. *Theor Appl Genet*, 2007, 114(8): 1379–1389. [\[DOI\]](#)
- [19] Yan GP, Chen XM. Molecular mapping of a recessive gene for resistance to stripe rust in barley. *Theor Appl Genet*, 2006, 113(3): 529–537. [\[DOI\]](#)
- [20] CHEN Pei-Du, LIU Da-Jun, QI Li-Li, ZHOU Bo, ZHANG Sou-Zhong, SHENG Bao-Qin, DUAN Xia-Yu, WANG Bao-Tong, JIN Xin-Zhao, LIU Zheng-De, HUANG Guang-Ming, JIANG Bin. A new resistance resource of wheat yellow rust and its spectrum preliminary test for resistance. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2001, 31(1): 31–36.
陈佩度, 刘大钧, 齐莉莉, 周波, 张守忠, 盛宝钦, 段霞瑜, 王保通, 金欣藻, 刘正德, 黄光明, 蒋滨. 小麦条锈病新抗源的抗谱鉴定初析. 植物病理学, 2001, 31(1): 31–36.
- [21] DAI Jun-Li, NIU Yong-Chun. Inheritance of stripe rust resistance in the native wheat variety dazicao from China. *Hereditas(Beijing)*, 2006, 25(3): 311–313.
代君丽, 牛永春. 小麦农家品种大籽糙抗条锈性的遗传分析. 遗传, 2006, 25(3): 311–313.