

小麦抗白粉病基因 *Pm13* 的 SSR 标记筛选

张军刚, 董 娜, 闫文利, 茹振钢*

(河南科技学院 小麦中心/河南省高等学校作物分子育种重点开放实验室, 河南 新乡 453003)

摘要: 为筛选与抗白粉病基因 *Pm13* 紧密连锁的分子标记, 以携带 *Pm13* 的抗病品系中大 01 与感病品系金光 588 为亲本进行杂交, 获得 F_1 、 F_2 分离群体和 $F_{2:3}$ 家系, 利用分离群体分组分析法 (BSA) 进行 SSR 标记分析。结果表明, 中大 01 携带的 *Pm13* 基因位于 3BS 染色体, 5 个 SSR 标记 BE398268、wmc674、cfa2226、gwm533.1 和 BE471274 与 *Pm13* 连锁, 遗传距离分别为 0.5、0.8、1.6、13.2、52.1 cM, 其中紧密连锁的标记 BE398268、wmc674 和 cfa2226 可用于该基因的分子标记辅助选择。

关键词: 小麦; 白粉病; 抗病基因; *Pm13*; SSR 分子标记

中图分类号: S435.121 S512.1 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)10-0062-05

Screening for SSR Markers Linked to Wheat Powdery Mildew Resistance Gene *Pm13*

ZHANG Jun-gang, DONG Na, YAN Wen-li, RU Zhen-gang*

(Center of Wheat Breeding, Henan Institute of Science and Technology/Henan Key Laboratory for Crop Molecular Breeding in Universities, Xinxiang 453003, China)

Abstract: To detect molecular markers closely linked to wheat powdery mildew resistance gene *Pm13*, bulked segregant analysis (BSA) was used to identify microsatellite (simple sequence repeats, SSR) markers in the F_2 population from the cross Zhongda 01 (resistant) \times Jinguang 588 (susceptible). The results indicated that *Pm13* in Zhongda 01 was located in the 3BS region, linked to five SSR markers BE398268, wmc674, cfa2226, gwm533.1 and BE471274 with the genetic distances of 0.5 cM, 0.8 cM, 1.6 cM, 13.2 cM and 52.1 cM respectively. The molecular markers BE398268, wmc674, and cfa2226 closely linked to *Pm13* can be used in marker-assisted selection (MAS) in wheat breeding program for powdery mildew resistance.

Key words: wheat; powdery mildew; disease resistance gene; *Pm13*; SSR marker

小麦白粉病是由专性活体寄生真菌小麦白粉菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) 引起的一种世界性小麦病害。近年来, 随着肥水条件的改善和高产田群体密度增大, 小麦白粉病已发展成我国小麦生产上发病面积最广的病害, 造成的产量损失达 13%~34%^[1]。化学杀菌剂可以防治小麦白粉病, 但增加了生产成本, 还会引起环境污染等问题, 因此, 培育抗病品种是防治该病最经济、有效和环保的措施。

传统抗病育种主要通过田间接种病菌, 根据表型进行筛选, 不仅鉴定周期长、操作繁琐, 有时还会因接种不够充分或发病条件不适宜等因素而影响选择效率。分子标记技术的发展与应用为小麦抗病育种提供了有效的工具, 通过与抗病基因紧密连锁的分子标记可以从基因组水平检测抗病基因, 极大地提高抗病基因种质资源评价和抗病单株选择的效率, 从而加速育种进程^[2-3]。在众多的分子标记中,

收稿日期: 2014-03-12

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2011BAD07B02); 河南省教育厅科学技术研究重点项目 (12B210003)

作者简介: 张军刚 (1989-), 男, 河南濮阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 小麦遗传育种。E-mail: jungang39@163.com

* 通讯作者: 茹振钢 (1958-), 男, 河南沁阳人, 教授, 主要从事作物遗传育种研究。E-mail: rzgh58@sohu.com

基于 PCR 技术的 SSR 标记具有多态性高,稳定性强,共显性,操作简便、快速等特点,在小麦抗病基因的精细定位和辅助育种中得到广泛应用。目前,研究者已经对 *Pm2*^[4]、*Pm16*^[5]、*Pm35*^[6]、*Pm40*^[7]、*Pm42*^[8]、*Pm43*^[9] 和 *Pm47*^[10] 等小麦抗白粉病基因进行了 SSR 标记分析和遗传图谱构建等研究。

小麦抗白粉病基因 *Pm13* 来源于高大山羊草^[11],被定位于小麦染色体 3BS 或 3DS 上^[12],该基因对我国小麦白粉病表现出良好的抗性。由于携带 *Pm13* 基因的外源染色体与普通小麦重组率极低,而且此片段在普通小麦背景下遗传不稳定,容易在后代中丢失,所以在生产中没有大量应用^[13]。同时由于单一抗病基因的脆弱性,为防止 *Pm13* 抗性丧失,进行抗性基因累加可获得持久抗性。通过寻找与抗病基因紧密连锁的分子标记,不仅能够检测抗病基因的有无,而且有利于将多个抗病基因聚合到同一个品种中,加快 *Pm13* 基因的应用进程,从而提高品种的持久抗性和使用年限。Donini 等^[14]利用重组近交系材料获得 2 个与 *Pm13* 连锁的 RFLP 标记 Xpsr305 和 Xpsr1196。随后,Cenci 等^[12]获得与 *Pm13* 连锁的 RFLP 标记 Xcd0460, RAPD 标记 Xopv1380 和 Xopx12570, STS 标记 Xutv13、Xutv14 和 Xutv135。但与 *Pm13* 连锁的 SSR 标记尚未见报道。由于 RFLP 标记操作繁琐、成本高, RAPD 标记结果重复性差,因而限制了 *Pm13* 在标记辅助育种中的有效应用。为此,本研究利用 F_2 分离群体分组分析法 (bulk segregant analysis, BSA) 对 *Pm13* 进行 SSR 标记分析,筛选与 *Pm13* 紧密连锁的分子标记,以期对 *Pm13* 的分子标记辅助育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

携带 *Pm13* 的抗病品系中大 01 和感病品系金光 588 由河南科技学院小麦中心育成并保存,利用中大 01 与金光 588 杂交,创制 F_1 、 F_2 分离群体及 $F_{2,3}$ 家系。

小麦白粉菌采自河南科技学院智能温室,为新乡地区流行小种。

引物序列来自 <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>,由北京鼎国生物技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 白粉病菌接种及抗性鉴定

588、 F_1 代、 F_2 代单株及 $F_{2,3}$ 家系均种植于智能温室,苗期采用弹拂法接种白粉病菌,当感病对照金光 588 充分发病时,调查发病情况,每隔 2 d 重复调查一次。病级划分按照盛宝钦^[15]提出的 0~4 级法,其中 0、0;、1、2 级为抗病,3、4 级为感病。

1.2.2 小麦基因组 DNA 提取、PCR 扩增及产物检测 采用 CTAB 法^[16]提取亲本中大 01、金光 588 及其 F_2 代单株叶片基因组 DNA。PCR 扩增均在 ABI Veriti™ 96-Well Thermal Cycler 上进行。反应体系为 10.0 μ L,包括 $2\times$ Taq Master Mix (北京康为世纪生物科技有限公司) 5.0 μ L、10 μ mol/L 特异引物 0.5 μ L、模板 DNA 50~100 ng, ddH₂O 补足。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min、50~60 $^{\circ}$ C (根据具体引物的退火温度而定) 退火 50 s、72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,进行 38 个循环; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物经 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳后,银染显色,进行带型统计。

1.2.3 分子标记分析 用 BSA 法^[17]筛选与 *Pm13* 连锁的 SSR 标记。在 F_2 代分离群体中随机选取抗病和感病单株各 10 株,分别取等量 DNA 混合构建抗病池 (B_R) 和感病池 (B_S)。查找小麦 3BS 和 3DS 染色体区段的 SSR 引物,首先筛选在抗、感亲本及抗、感池间具有多态性的标记,然后将这些具有多态性的标记在 F_2 代单株中进行检测,分析与 *Pm13* 的连锁关系。

1.2.4 数据统计及遗传分析 利用 χ^2 测验对 F_2 分离群体及 $F_{2,3}$ 家系的抗感分离比例进行适合性检验。利用 Mapmaker 3.0 软件^[18]计算分子标记与抗病基因之间的遗传距离, LOD 值为 3.0。利用 MapDraw V2.1 软件^[19]绘制遗传连锁图谱。

2 结果与分析

2.1 白粉病抗性鉴定与遗传分析

白粉病抗性鉴定结果表明,中大 01 对白粉病表现为过敏性坏死反应(病级:0;),而金光 588 表现为高感(病级:4), F_1 表现为抗病。 F_2 代 384 个单株中 281 株抗病、103 株感病,经 χ^2 检验,符合 3:1 的分离比例 ($\chi^2=0.6806$, $\chi^2_{0.05,1}=3.84$)。分单株收获后,对 220 个 $F_{2,3}$ 家系进行苗期抗病性鉴定,有 58 个表现纯合抗病,103 个表现抗病性分离,59 个表现纯合感病,其抗性分离符合 1:2:1 的分离比例 ($\chi^2=0.9000$, $\chi^2_{0.05,2}=5.99$) (表 1)。因此,抗病品系中大 01 携带的 *Pm13* 为显性单基因。

表 1 中大 01 和金光 588 及其杂交后代对小麦白粉菌的反应

小麦材料	抗病株数	感病株数	总株数	χ^2	$\chi^2_{0.05}$
中大 01	15	0	15		
金光 588	0	15	15		
(中大 01×金光 588) F ₁	15	0	15		
(中大 01×金光 588) F ₂	281	103	384	0.680 6	3.84
(中大 01×金光 588) F _{2:3}	58(A)+103(H)	59(B)	220	0.900 0	5.99

注:A. 纯合抗病家系; H. 杂合抗病家系; B. 纯合感病家系。

2.2 多态性标记筛选与连锁性分析

为筛选与 *Pm13* 连锁的 SSR 标记,利用位于小麦 3BS 和 3DS 染色体上的 SSR 标记,首先在抗病亲本中大 01、感病亲本金光 588、抗病池和感病池 DNA 之间进行多态性标记筛选。在筛选的 35 对引物中有 8 对能在抗、感亲本和抗、感池间稳定地表现多态性,分别为 *cfa2226*、*gwm533.1*、*gwm389*、*gwm493*、*cfdf79*、*wmc674*、*BE398268* 和 *BE471274*。

然后将筛选到的多态性标记在中大 01×金光 588 的 F₂ 代小群体中进行验证,结果显示,*cfa2226*、*gwm533.1*、*wmc674*、*BE398268* 和 *BE471274* 这 5 个标记与抗白粉病基因 *Pm13* 表现连锁。其中 *cfa2226*、*gwm533.1* 为共显性标记,*wmc674* 为显性标记,*BE398268*、*BE471274* 为互斥相标记(图 1)。初步验证的 5 个标记均位于 3BS 染色体,因此推断抗病品系中大 01 携带的 *Pm13* 位于 3BS 染色体上。

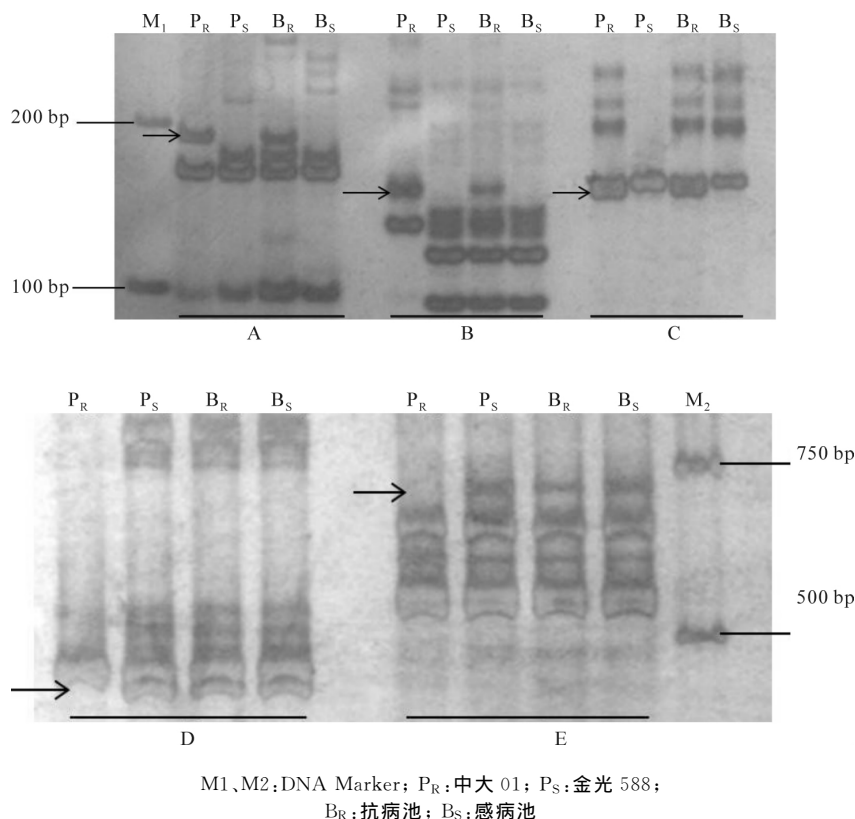


图 1 SSR 引物 *cfa2226* (A)、*gwm533.1* (B)、*wmc674* (C)、*BE471274* (D)和 *BE398268* (E)在双亲、抗病池(B_R)和感病池(B_S)间的多态性

为进一步明确上述 5 个标记与 *Pm13* 的遗传距离,利用中大 01×金光 588 的 F₂ 代分离群体的 220 个单株进行连锁性分析。5 个标记均能在群体单株中稳定地扩增出特异性条带,*wmc674* 和 *BE398268* 的部分扩增结果见图 2。经 Mapmaker 3.0 软件计

算,标记 *BE398268*、*wmc674*、*cfa2226*、*gwm533.1*、*BE471274* 与 *Pm13* 之间的遗传距离分别为 0.5、0.8、1.6、13.2、52.1 cM(图 3),其中紧密连锁的标记 *BE398268*、*wmc674* 和 *cfa2226* 可用于该基因的分子标记辅助选择。

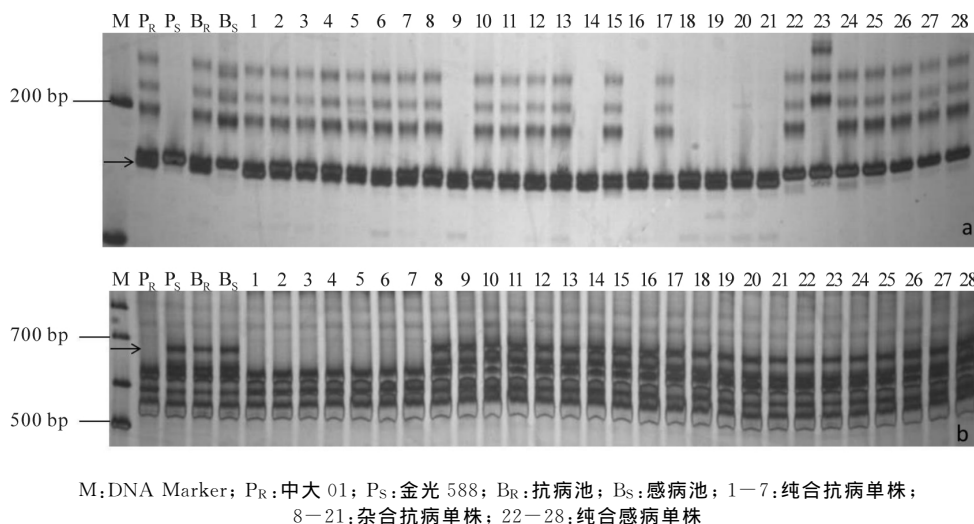


图 2 SSR 引物 wmc674 (a) 和 BE398268 (b) 对中大 01 × 金光 588 F₂ 部分单株的扩增结果

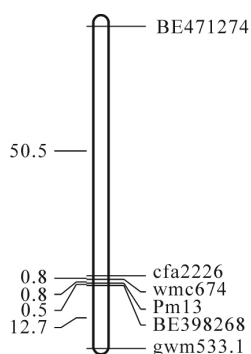


图 3 抗白粉病基因 *Pm13* 的分子标记遗传连锁图谱

3 结论与讨论

在小麦抗白粉病育种方面,除大力挖掘新抗源外,还要加强对现有有效抗病基因的利用。*Pm13* 对多数白粉病生理小种具有良好的抗性,由于其载体是高大山羊草,表现与不良农艺性状基因的连锁累赘现象,因此在小麦白粉病抗性育种中利用较少。筛选与 *Pm13* 紧密连锁的分子标记是有效利用该基因的基础。本研究对小麦抗白粉病基因 *Pm13* 进行了 SSR 分子标记筛选,将抗白粉病品系中大 01 携带的 *Pm13* 定位在 3BS 上,并筛选出 5 个与其连锁的 SSR 标记,标记 BE398268、wmc674、cfa2226、gwm533.1、BE471274 与 *Pm13* 之间的遗传距离分别为 0.5、0.8、1.6、13.2、52.1 cM。

与目标基因紧密连锁的分子标记由于与目标基因遗传交换等因素的影响,单独检测分子标记的有无还不足以判断抗病基因是否存在,限制了其在标记辅助选择中的应用。Peng 等^[20]系统地论述了在 F₂ 代利用主基因分子标记辅助选择纯合抗病基因型的有效性和准确性,认为仅使用 1 个标记情况下,

当使用的标记与主基因距离小于 2 cM 时,检测的准确性及有效性均 $\geq 90\%$,当使用的标记与主基因距离为 5 cM 时,检测的准确性及有效性也超过 85%;使用目标基因两侧的 2 个标记情况下,当使用的标记与主基因距离小于 20 cM 时,检测的准确性 $\geq 90\%$,有效性 $\geq 70\%$,即使 2 个标记的距离达 81.9 cM,检测的准确性也能达到 70%。因此与目标基因紧密连锁的分子标记仍然可以作为遗传背景选择工具,提高分子标记辅助选择效率,缩短育种年限。目前已有效应用于 *Pm13* 的辅助选择标记是 SCAR564^[21-22],由 Cenci 等^[12]开发的 RAPD 标记转化而来,与 *Pm13* 共分离。然而 SCAR564 为显性标记,仅能检测供试材料中 *Pm13* 基因的有无,而不能辨别出其基因型是纯合还是杂合,因此在辅助育种中有一定的局限性。本研究筛选的 wmc674 和 BE398268 与 *Pm13* 紧密连锁,wmc674 为显性标记,BE398268 为互斥相标记,联合使用这 2 个标记,不仅可以有效地检测 *Pm13* 基因的存在,而且可以辨别出其基因型,在育种的早期阶段便可实现对纯合抗病单株的检测,从而提高育种效率。

此外,图位克隆是抗病基因克隆的主要方法之一,而建立高密度的遗传图谱是图位克隆的基础,利用该方法,小麦抗白粉病基因 *Pm3* 已被成功克隆。本研究获得的与 *Pm13* 基因紧密连锁的分子标记丰富了 *Pm13* 的遗传图谱,为 *Pm13* 基因的精细定位及最终目标基因的克隆奠定了基础。

参考文献:

- [1] Griffey C A, Das M K, Stromberg E L. Effectiveness of adult-plant resistance in reducing grain yield loss to

- powdery mildew in winter wheat[J]. Plant Disease, 1993, 77(6): 618-622.
- [2] 刘润堂, 白建荣, 温琪汾. 小麦抗白粉病基因导入的研究[J]. 山西农业科学, 2002, 30(1): 13-16.
- [3] 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): 162-165.
- [4] 王黎明, 朱玉丽, 李兴锋, 等. 小麦抗白粉病基因 *Pm2* 的 SSR 标记筛选[J]. 植物保护学报, 2011, 38(3): 216-220.
- [5] Chen X M, Luo Y H, Xia X C, et al. Chromosomal location of powdery mildew resistance gene *Pm16* in wheat using SSR marker analysis[J]. Plant Breeding, 2005, 124(3): 225-228.
- [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]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 114(8): 1451-1456.
- [7] Luo P G, Luo H Y, Chang Z J, et al. Characterization and chromosomal location of *Pm40* in common wheat: A new gene for resistance to powdery mildew derived from *Elytrigia intermedium* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 118(6): 1059-1064.
- [8] Hua W, Liu Z, 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]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 119(2): 223-230.
- [9] He R, Chang Z, Yang Z, et al. Inheritance and mapping of powdery mildew resistance gene *Pm43* introgressed from *Thinopyrum intermedium* into wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 118(6): 1173-1180.
- [10] Xiao M, Song F, Jiao J, et al. Identification of the gene *Pm47* on chromosome 7BS conferring resistance to powdery mildew in the Chinese wheat landrace Hongyanglazi [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126(5): 1397-1403.
- [11] Ceoloni C, Signore G, Pasquini M, et al. Transfer of mildew resistance from *Triticum longissimum* into wheat by *ph1* induced homoeologous recombination [C]// Proceedings of the seventh international wheat genetics symposium. Cambridge, UK: Institute of Plant Science Research, 1988: 221-226.
- [12] Cenci A, D'ovidio R, Tanzarella O A, et al. Identification of molecular markers linked to *Pm13*, an *Aegilops longissima* gene conferring resistance to powdery mildew in wheat [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98(3/4): 448-454.
- [13] Cenci A, D'ovidio R, Tanzarella O A, et al. Genetic analysis of the *Aegilops longissima* 3S chromosome carrying the *Pm13* resistance gene [J]. Euphytica, 2003, 130(2): 177-183.
- [14] Donini P, Koebner R M, Ceoloni C. Cytogenetic and molecular mapping of the wheat-*Aegilops longissima* chromatin breakpoints in powdery mildew-resistant introgression lines [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91(5): 738-743.
- [15] 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.
- [16] Wang M, Na D C, Ji H T, et al. A simple and quick method of extracting genomic DNA from wheat leaves [J]. Agricultural Science & Technology, 2009, 10(5): 34-35, 75.
- [17] Michelmore R W, Paran 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 by using segregating populations [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1991, 88(21): 9828-9832.
- [18] Lincoln S, Daly M, Lander E. Constructing genetic maps with MAPMAKER/EXP3. 0 [M]. 3rd ed. Cambridge, USA: Whitehead Institute, 1992.
- [19] 刘仁虎, 孟金陵. MapDraw, 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏 [J]. 遗传, 2003, 25(3): 317-321.
- [20] Peng J H, Fahima T, Röder M S, et al. Microsatellite high-density mapping of the stripe rust resistance gene *YrH52* region on chromosome 1B and evaluation of its marker-assisted selection in the F_2 generation in wild emmer wheat [J]. New Phytologist, 2000, 146(1): 141-154.
- [21] 张增艳, 陈孝, 张超, 等. 分子标记选择小麦抗白粉病基因 *Pm4b*, *Pm13* 和 *Pm21* 聚合体 [J]. 中国农业科学, 2002, 35(7): 789-793.
- [22] 曾祥艳, 张增艳, 杜丽璞, 等. 分子标记辅助选育兼抗白粉病、条锈病、黄矮病小麦新种质 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(12): 2380-2386.