

小麦品系 5R618 抗叶锈病基因的初步定位

王佳真, 李在峰, 李 星, 刘大群

(河北农业大学植物病理系/河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 保定 071001)

摘要: 5R618 是高抗叶锈病小麦品系。为了确定该品系所携带的抗叶锈基因, 以 5R618 与感病小麦品种郑州 5389 杂交获得 F_1 , 自交获得 F_2 分离群体以及 $F_{2,3}$ 家系, 用叶锈菌生理小种 THJP 对亲本、 F_2 分离群体以及 $F_{2,3}$ 家系进行叶锈抗性鉴定, 然后进行分子标记分析。结果显示, 5R618 对生理小种 THJP 的抗病性由 1 对显性基因控制, 该基因暂命名为 *Lr5R*。经过亲本和抗感池间分子标记筛选以及 $F_{2,3}$ 家系的标记检测, *Lr5R* 定位于染色体 3DL 上, *barc71* 和 *STS24-16* 是 *Lr5R* 最近的 2 个标记, 遗传距离分别为 0.9 cM 和 2.1 cM。

关键词: 小麦抗叶锈病基因; 遗传分析; 分子标记

Genetic Analysis of Leaf Rust Resistance Gene in Wheat Line 5R618

WANG Jia-zhen, LI Zai-feng, LI Xing, LIU Da-qun

(Department of Plant Pathology, Agricultural University of Hebei/Biological Control
Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: The wheat (*Triticum aestivum* L.) line 5R618 showed low infection types to most of Chinese current leaf rust pathotypes in the seeding stage. In order to identify the resistance genes in 5R618, F_2 segregating populations and $F_{2,3}$ families from a cross between 5R618 and Zhengzhou 5389 (susceptible to leaf rust) were inoculated with pathotype THJP in greenhouse. The infection types were investigated after inoculation for 15 d and molecular markers were also used for mapping the resistance genes. The results indicated that 5R618 carried a single dominant resistance gene, temporarily designated as *Lr5R*. Using molecular marker methods, *Lr5R* was located on chromosome 3DL and closely linked to *barc71* and *STS24-16*, with genetic distances of 0.9 cM and 2.1 cM, respectively.

Key words: resistance gene to wheat leaf rust; molecular marker; molecular mapping

小麦叶锈病是影响我国小麦生产的主要病害之一, 发生于全国大部分麦区。我国平均每年种植小麦 2370 万 hm^2 , 总产量约为 1.093 亿 t, 而小麦叶锈病平均每年发生约 1500 万 hm^2 , 尤其在我国的西南和西北部, 造成严重的产量损失^[1]。种植抗叶锈病小麦品种可有效降低叶锈病造成的损失。我国抗叶锈病小麦品种丰富, 但大多数都是通过杂交培育而成, 其所含的抗病基因尚不清楚。所以, 从抗病品种中发掘定位抗病基因有助于今后抗叶锈病小麦的分

子育种。目前, 正式命名的小麦抗叶锈基因已有 71 个^[2], 但由于叶锈菌生理小种的不断变异以及含单基因抗性小麦品种大面积种植, 许多抗叶锈病基因已丧失抗性, 因此需要不断发掘新的抗叶锈病基因, 并对其进行基因定位。

分子标记是 DNA 水平遗传多态性的直接反映, 广泛应用于基因定位、遗传育种、物种亲缘关系鉴别等方面。多种分子标记技术已在抗叶锈病基因研究中应用, 并且进行优化, 不断地用更稳定简便的分子

收稿日期: 2014-03-27 修回日期: 2014-05-06 网络出版日期: 2014-10-13

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141013.2013.003.html>

基金项目: 河北省教育厅优秀青年项目 (YQ2013024); 国家自然科学基金 (31361140367)

第一作者主要从事分子植物病理学研究。E-mail: 858189486@qq.com

通信作者: 李星, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: lixing@hebau.edu.cn;

刘大群, 主要从事分子植物病理学研究。E-mail: ldq@hebau.edu.cn

标记代替操作复杂、重复性差的标记。在 1999 年, J. Gold 等^[3]将与抗叶锈病基因 *Lr35* 连锁的 ISSR 标记转化为 SCAR 标记。2001 年, R. Prins 等^[4]利用 AFLP 成功标记 *Lr19*, 并将其转化为 STS 标记。2006 年, S. K. Gupta 等^[5]将 RAPD 标记转化为 3 个与 *Lr24* 共分离的 SCAR 标记。2013 年, Y. Zhou 等^[6]开发了一个可检测 *LrZH84* 和 *Lr26* 的 STS 标记 *Hbsf-1*。SSR 标记是分子标记的一种, 其优点是可鉴别杂合子和纯合子, 所需 DNA 量少, 可重复性高。SSR 标记连锁图谱在小麦抗病基因研究中被越来越多地作为骨干标记使用^[7], 李星等^[8]、X. L. Zhao 等^[9]、H. Zhang 等^[10]、周悦等^[11]都利用 SSR 分子标记成功对抗叶锈病基因进行了基因定位。

小麦品系 5R618 在苗期高抗叶锈病。其子粒饱满, 农艺性状良好, 迄今为止未见关于小麦品系 5R618 抗叶锈病遗传基础研究的报道, 本试验应用经典遗传学方法结合 SSR 标记技术, 对 5R618 中抗叶锈病基因进行遗传分析和分子作图, 为小麦抗叶锈病分子育种提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

苗期基因推导所用的抗病小麦品系 5R618 由中国农业大学杨作民教授培育、感病品种郑州 5389 和 36 个含已知抗叶锈病基因的近等基因系由河北农业大学小麦叶锈病研究室提供。抗病亲本 5R618 与感病亲本郑州 5389 杂交、自交获得 F_2 分离群体以及 $F_{2:3}$ 家系用于抗叶锈病基因的遗传分析和基因定位。苗期基因推导用的 15 个小麦叶锈菌生理小种由河北农业大学小麦免疫研究室提供。小麦叶锈菌生理小种的致病类型按 D. L. Long 等^[12]的密码命名系统(Prt-code System)命名。

1.2 苗期抗叶锈病鉴定

当供试小麦长到 1 叶 1 心, 采用扫抹法接种新鲜小麦叶锈菌生理小种。接种后 14 d, 待郑州 5389 发病充分时按 0、;、1、2、X、3、4 等 7 级标准进行抗叶锈性鉴定; 根据双亲及杂交后代的侵染型级别及各级侵染型数目, 将 0-X 级划为低侵染型, 即抗病; 3-4 级划为高侵染型, 即感病。按照 H. J. Dubin 等^[13]提出的基因推导原则进行基因推导。

1.3 基因组 DNA 提取及抗、感池构建

参照 P. J. Sharp 等^[14]提供的 CTAB 法提取小麦叶片基因组 DNA, 并用 ddH₂O 稀释成扩增所用浓度。根据 R. W. Michelmore 等^[15]提出的分离群体分

组分析法(BSA, bulked segregation analysis)从 $F_{2:3}$ 家系单株中选取 10 株抗病单株 DNA 等量混合组成抗病池(Br), 选取 10 株感病单株 DNA 等量混合组成感病池(Bs)。

1.4 SSR、STS、SCAR 引物扩增及电泳

1021 对分布于小麦 21 条染色体的 SSR 引物用于筛选在亲本及抗感池间表现多态性的分子标记, 并用与 *Lr24* 共分离的 STS 标记 *STS24-16*^[16] (*STS24-16F*: 5'-CTTCGGACAGGAGGTTATGA-3', *STS24-16R*: 5'-GGACAGCTGTAAACGGGTTTC-3'), SCAR 标记 *SI302-609*^[5] (*SI302-609F*: 5'-CGCAG-GTTCCAAATACTTTTC-3', *SI302-609R*: 5'-CGCAG-GTTCTACCTAATGCAA-3') 检测 $F_{2:3}$ 群体。SSR 引物参考 M. S. Roder 等^[17]提供的序列, 引物由上海生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系为 10 uL, 包括 10 × buffer 1 μL、10 mmol/L dNTP 0.2 μL、4 μmol/L 引物 1 μL、30 ng/μL 模板 DNA 1 μL 和 *Taq* 酶 1 U。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 s; 55℃ (依据不同引物温度稍有变化) 退火 45 s; 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 保存。PCR 结束后将其扩增产物进行电泳分析。依据扩增产物的分子量大小选择 10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳或琼脂糖凝胶电泳。

1.5 遗传距离估算和连锁性分析

整理 5R618 苗期 $F_{2:3}$ 家系的抗感及分离鉴定结果, 并将其与分子标记基因型数据综合统计, 导入 MapManager QTXb20 作图软件, 计算抗病基因与其连锁的分子标记之间的遗传距离, 绘制连锁图谱。

2 结果与分析

2.1 遗传分析

苗期叶锈病抗性鉴定表明, 小麦品系 5R618 在接种叶锈菌生理小种 THJP 后表现为高抗(IT:;), 郑州 5389 表现为感病(IT:4)。在其 254 株 F_2 分离群体单株中, 183 株表现抗病, 71 株表现感病。卡方检测 $\chi^2_{3:1} = 1.03$ ($\chi^2_{0.05,1} = 3.84$) 符合 3R:1S 的理论比例。在 236 个 $F_{2:3}$ 家系中, 59 个表现纯合抗病, 107 个表现抗感分离, 70 个表现纯合感病。卡方检验 $\chi^2_{1:2:1} = 2.86$ ($\chi^2_{0.05,2} = 5.99$) 符合 1:2:1 的理论分离比例(表 1)。结合 F_2 分离群体、 $F_{2:3}$ 家系鉴定结果, 表明 5R618 对 THJP 的抗性由 1 对显性基因控制。

表 1 5R618、郑州 5389 以及 F₂ 分离群体、F_{2:3} 家系苗期对 THJP 抗感反应Table 1 Segregation of seedling reactions to the pathotype THJP in the 5R618, zhengzhou5389, their F₂ segregating population and F_{2:3} family

材料 Material	总数 Total	抗感反应 Infection types			卡方检测 Chi-square tests
		抗 Resistant	感 Susceptible	分离 Separate	
5R618	20	20			
郑州 5389	20		20		
F ₂ 分离群体	254	183	71		$\chi^2_{3:1} = 1.03 < \chi^2_{0.05,1} = 3.84$
F _{2:3} 家系	236	59	70	107	$\chi^2_{1:2:1} = 2.86 < \chi^2_{0.05,2} = 5.99$

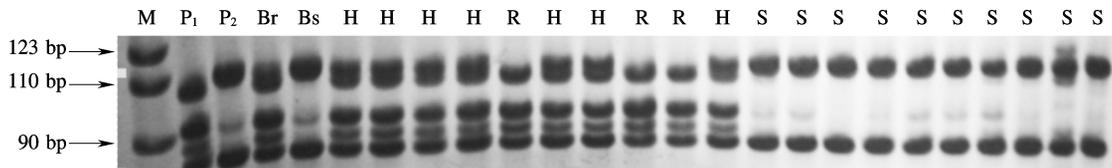
2.2 苗期抗病基因推导

用 15 个叶锈菌生理小种对 5R618 及 36 个含已知抗叶锈基因品系进行抗性鉴定,比较反应型。鉴定结果表明: *Lr9*、*Lr24*、*Lr19*、*Lr28*、*Lr39*、*Lr42*、*Lr47*、*Lr51*、*Lr53* 对所有供试生理小种表现高抗,5R618 对所有的生理小种也表现为高抗,初步推测 5R618 可能含有 *Lr9*、*Lr24*、*Lr19*、*Lr28*、*Lr39*、*Lr42*、*Lr47*、*Lr51*、*Lr53* 基因或基因组合,需进一步利用分子标记验证。

2.3 5R618 中抗叶锈基因的分子定位

F₂ 分离群体、F_{2:3} 家系苗期抗性鉴定结果表明,5R618 中含有 1 个显性抗叶病锈基因,暂命名为

Lr5R。随机分布于小麦 21 条染色体的 1021 对 SSR 引物在亲本及抗感池间筛选多态性,结果位于 3DL 染色体上的 SSR 标记 *Xbarc71* 在 2 个亲本及抗感池间均扩增出差异片段。利用 *Xbarc71* 检测 F_{2:3} 家系(图 1),发现 *Xbarc71* 与 *Lr5R* 连锁。*STS24-16*(图 2)、*S1302-609* 是 2 个与位于 3DL 染色体上抗叶锈基因 *Lr24* 共分离的分子标记,在 2 个亲本及抗感池间表现多态性,经 F_{2:3} 家系检测都与 *Lr5R* 连锁。用 MapManager QTXb20 作图软件分析,*Xbarc71*、*STS24-16*、*S1302-609* 与 *Lr5R* 的遗传距离如图 3 所示,其中距离 *Lr5R* 最近的标记为 *Xbarc71* 和 *STS24-16*,遗传距离分别为 0.9 cM 和 2.1 cM。



M: PBR322 Marker; P₁: 抗病亲本 5R618; P₂: 感病亲本郑州 5389; Br: 抗病池; Bs: 感病池; R: 抗病 F_{2:3} 家系; S: 感病 F_{2:3} 家系; H: 抗病杂合基因型 F_{2:3} 家系。下同。

M: PBR322 marker, P₁: The resistant parent 5R618, P₂: The susceptible parent zhengzhou5389, Br: The resistant bulk, Bs: The susceptible bulk, R: The resistant plants in F_{2:3} families, S: The susceptible plants in F_{2:3} families, H: Resistant plants with heterozygous genotype. The same as below.

图 1 SSR 标记 *Xbarc71* 在亲本、抗感池和 F_{2:3} 家系中扩增出的特异性条带

Fig. 1 The specific PCR fragments amplified from parents, resistant and susceptible bulks, and F_{2:3} families with SSR marker *Xbarc71*



图 2 SCAR 标记 *STS24-16* 在亲本、抗感池和 F_{2:3} 家系单株中扩增出的特异性条带

Fig. 2 The specific PCR fragments amplified from parents, resistant and susceptible bulks, and F_{2:3} families with SCAR marker *STS24-16*

3 讨论

研究者们依据各自的研究目的和试验条件选择不同的小麦抗叶锈基因的研究方法,如传统杂交法、

基因推导法、分子标记法等。以上这些方法可单独使用,也可以几个方法结合起来使用。传统杂交法可准确分析供试材料中抗病基因的显隐性以及所含基因个数,但该方法周期长、工作量大。而基因推导

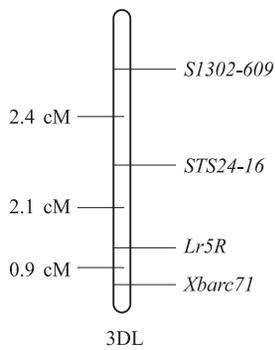


图 3 抗叶锈基因 *Lr5R* 的遗传连锁图

Fig. 3 Linkage map of leaf rust resistance gene *Lr5R*

法可在短时间内同时对大量供试材料进行鉴定,但准确性不够,易受温度及小种毒性影响。分子标记法不受环境条件及基因表达的影响,但是分子标记也有其局限性,如受标记的数目及标记特异性的影响。本试验将传统杂交法、基因推导法以及分子标记法结合起来使用,弥补了各自的不足,使结果更加准确可靠。

通过基因推导推测 5R618 可能含有 *Lr9*、*Lr24*、*Lr19*、*Lr28*、*Lr39*、*Lr42*、*Lr47*、*Lr51*、*Lr53*, 通过分子标记检测最终将 *Lr5R* 定位在 3DL 染色体上。3DL 染色体上已报道的抗病基因有抗条锈病基因 *Yr45*^[18]、抗秆锈病基因 *Sr24*^[19] 和抗叶锈病基因 *Lr24*, 由于小麦抗叶锈病基因 *Lr9*、*Lr19*、*Lr28*、*Lr39*、*Lr42*、*Lr47*、*Lr51*、*Lr53* 均不位于 3DL 染色体上,所以 *Lr5R* 不可能是这些抗叶锈病基因。研究表明分子标记 *STS24-16*^[16]、*S1302-609*^[5] 都与 *Lr24* 共分离,而在 5R618 与郑州 5389 杂交自交得到的 $F_{2:3}$ 家系中,2 个分子标记都检测出与目的基因之间有不同的交换;遗传连锁图显示 *STS24-16*、*S1302-609* 与 *Lr5R* 的遗传距离分别为 2.1 cM 和 4.5 cM,所以推测 *Lr5R* 与 *Lr24* 不同,可能是一个新的抗叶锈病基因,其与 *Lr24* 之间的关系,还需要进一步进行等位性检测来验证,同时 *Lr5R* 与相同染色体上其他抗病基因的关系也需深入研究。

参考文献

[1] Huerta E J, Singh R P, German S, et al. Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina* [J]. Euphytica, 2011, 179: 143-160

[2] Singh D, Mohler V, Park R F. Discovery, characterization and mapping of wheat leaf rust resistance gene *Lr71* [J]. Euphytica, 2013, 190(1): 131-136

[3] Gold J, Harder D, Townley-Smith F, et al. Development of a molecular marker for rust resistance genes *Sr39* and *Lr35* in wheat breeding lines [J]. Electron J Biotechnol, 1999, 2(1): 1-2

[4] Prins R, Groenewald J Z, Marais G F, et al. AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103(4): 618-624

[5] Gupta S K, Charpe A, Koul S, et al. Development and validation of SCAR markers co-segregating with an *Agropyron elongatum* derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat [J]. Euphytica, 2006, 150: 233-240

[6] Zhou Y, Xia X C, He Z H, et al. Fine mapping of leaf rust resistance gene *LrZH84* using expressed sequence tag and sequence-tagged site markers and allelism with other genes on wheat chromosome 1B [J]. Phytopathology, 2013, 103(2): 169-174

[7] 李丹,袁成国,吴海彬,等. 普通小麦品种农大 399 抗白粉病基因 SSR 和 AFLP-SCAR 分子标记 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(1): 104-108

[8] 李星,李在峰,李亚宁,等. 小麦品系西农 1163-4 抗叶锈病基因的遗传分析和分子作图 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(12): 2397-2402

[9] Zhao X L, Zheng T C, Xia X C, et al. Molecular mapping of leaf rust resistance gene *LrZH84* in Chinese wheat line Zhou8425B [J]. Theor Appl Genet, 2008, 117: 1069-1075

[10] Zhang H, Xia X C, He Z H, et al. Molecular mapping of leaf rust resistance gene *LrBil6* in Chinese wheat cultivar Bimail6 [J]. Mol Breed, 2011, 28: 527-534

[11] 周悦,吴娱,李星,等. 两个中国小麦品种中抗叶锈基因的遗传分析和基因定位 [J]. 中国农业科学, 2012, 45(16): 3273-3380

[12] Long D L, Kolmer J A. A North American system of nomenclature for *Puccinia triticina* [J]. Phytopathology, 1989, 79: 525-529

[13] Dubin H J, Johnson R, Stubbs R W. Postulated genes for resistance to strip rust in selected CIMMYT and related wheats [J]. Plant Dis, 1989, 73(6): 472-475

[14] Sharp P J, Kreis M, Shewry P R, et al. Location of β -amylase sequences in wheat and its relatives [J]. Theor Appl Genet, 1988, 75: 286-290

[15] 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]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(21): 9828-9832

[16] 张娜,陈玉婷,李亚宁,等. 小麦抗叶锈病基因 *Lr24* 的一个新 STS 标记 [J]. 作物学报, 2008, 34(2): 212-216

[17] Roder M S, Korzun V, Wendehake K, et al. A microsatellite map of wheat [J]. Genetics, 1998, 149: 2007-2023

[18] Li Q, Chen X M, Wang M N, et al. *Yr45*, a new wheat gene for stripe rust resistance on the long arm of chromosome 3D [J]. Theor Appl Genet, 2011, 122: 189-197

[19] Kokhmetova A M, Atishova M N. Identification of sources of resistance to wheat stem rust using molecular markers [J]. Russ J Genet Appl Res, 2012, 2(6): 486-493