

粗山羊草抗条锈病新基因 *YrY206* 遗传分析和微卫星标记

张海泉¹, 郎杰¹, 马淑琴², 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 云南省农科院粮作所, 昆明 650205

3 沈阳农业大学农学院, 沈阳 110161

摘要: 从小麦野生近缘属——粗山羊草中挖掘小麦条锈病抗病基因, 拓展小麦抗病性的遗传基础。利用抗小麦条锈病与感小麦条锈病的粗山羊草间杂交, 从粗山羊草 [*Aegilops tauschii* (Coss.) Schmal] Y206 中鉴定出 1 个显性抗小麦条锈病基因, 暂定名为 *YrY206*。应用分离群体分组法 (Bulked segregant analysis, BSA) 筛选到 *Wmc11a*、*Xgwm71c*、*Xgwm161* 和 *Xgwm183* 标记, 与该基因之间的遗传距离分别为 4.0、3.3、1.5 和 9.3 cM。根据连锁标记所在小麦微卫星图谱的位置, *YrY206* 被定位在 3DS 染色体上。分析基因所在染色体的位置、抗病性特征, 认为 *YrY206* 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, 基因定位

Genetic Analysis and SSR Mapping on an New Stem Stripe Rust Resistance Gene *YrY206* in *Aegilops tauschii*

Haiquan Zhang¹, Jie Lang¹, Shuqin Ma², and Baoshi Zhang³

1 College of Biology Engineering, Hebei University of Economics and Business, Shijiazhuang 050061, China

2 Food Crops Research Institute, Yunnan Academy Of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China

3 College of Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

Abstract: A wheat stripe rust resistance gene was screened out from *Aegilops tauschii* which is relative genera of wheat species, broadening the genetic basis of the anti-disease character of wheat species. By hybridizing diversified *Ae. Tauschii* species, which is either resistant or susceptible to wheat stripe rust, a dominant wheat stripe rust resistance gene was detected from *Ae. Tauschii* (Coss.) Schmal Y206. The novel gene was temporarily designated as *YrY206*. By bulk segregation analysis, four microsatellite markers *Wmc11a*, *Xgwm71c*, *Xgwm161* and *Xgwm183* were found to be linked to *YrY206* with genetic distances of 4.0, 3.3, 1.5 and 9.3 cM, respectively. According to the locations of the linked markers, the resistance gene was located on chromosome 3DS. Based on the chromosomal location and the resistance pattern of the gene, *YrY206* should be a novel stripe rust resistance gene.

Keywords: *Aegilops tauschii*, wheat stripe rust, gene location

由条锈病菌(*Puccinia striiformis* Westend f. sp. *tritici*)引起的小麦条锈病是我国小麦的第一大病害,

Received: March 3, 2008; Accepted: May 5, 2008

Supported by: Science and Technology Research and Development Program of Hebei Province (No. 05225510).

Corresponding author: Baoshi Zhang. Tel: +86-24-88487635; Fax: +86-24-88487635; E-mail: baoshizhang@163.net
河北省科学技术研究与发展指导计划(No. 05225510)资助。

严重影响小麦产量和品质。培育抗病品种是最经济、最有效和最环保的方法。由于病原菌生理小种变异较快,导致小麦抗源逐渐丧失抗性。因此,拓展小麦的遗传基础,发掘、筛选、鉴定新的抗条锈病基因资源,并对其遗传特点进行研究,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。

迄今国际已正式编号命名了 40 个小麦抗条锈病主效基因位点(*Yr1~Yr40*),暂时定名的有 70 多个,除部分来自普通小麦外,其余都来源于小麦近缘属种 (<http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=10342>)^[1-5]。来自小麦野生资源通过远缘杂交和生物工程方法应用到育种实践中。

粗山羊草是小麦的野生近缘属种,是 D 基因组的供体。因起源于高湿地区,至今仍保持野生性,蕴含大量的抗病基因,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* 基因^[2-3]与抗白粉病 *Pm2* 和 *Pm19* 基因都来自于粗山羊草^[6]。张海泉等^[7]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 5DL 染色体上, Miranda 等^[8-9]将粗山羊草发现的 *Pm34* 和 *Pm35* 基因定位在 5D 染色体上; Sun 等利用类似方法将抗小麦白粉病基因 *PmY170* 和 *PmY212* 定位在 5DL 上^[10]。

本研究利用粗山羊草 Y206/Y121 的 F₂ 代分离群体,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和为小麦抗病育种提供优良抗病新种质具有积极的意义。

1 材料与方法

1.1 植物材料和条锈病菌

对华北地区小麦条锈病流行小种免疫的粗山羊草 Y206 和高度感病的粗山羊草 Y121,由中国农科院作物所提供;条中 29、条中 31 和条中 32 小种,由西北农林科技大学馈赠。

1.2 抗病性鉴定

条锈病免疫材料 Y206 和感病材料 Y121 杂交,

获得 10 粒 F₁ 种子, F₁ 套袋自交, 共获得 150 粒自交种子。用小麦条锈病混合菌株, 检测杂交后代 F₁ 抗病等级和 F₂ 抗感分离情况。

抗病性鉴定: 以高度感病的铭贤 169 小麦作诱发行, 接种条中 29、条中 31 和条中 32 混合菌株, 待对照铭贤 169 充分发病后(约 14 d 以后)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。

1.3 PCR 反应体系与扩增

反应总体积为 25 μ L, 其中 10 \times Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L dNTPs 0.2 μ L, 5 u/L Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L, 2 mol/L 的上下游引物各 1.5 μ L, DNA 模板 4 μ L, 灭菌 ddH₂O 补足体积。

94.0 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94.0 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 45.0 $^{\circ}$ C~60.0 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72.0 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环。72.0 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 SSR 分子标记分析

按 CTAB 法提取粗山羊草总 DNA, 用 8 g/L 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://wheat.pw.usda.gov/>、<http://www.gramene.org/microsat/> 数据库以及 Röder 等^[11]发表的序列合成。采用分离群体分组分析法(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, 选取 10 个高抗单株 DNA 等量混合, 组成抗病池(PR), 选取 10 个高感单株 DNA, 等量混合后组成感病池(PS), 用亲本和抗病池、感病池对微卫星引物进行筛选。筛选出在抗、感池间出现稳定差异的引物, 继续在双亲本及 F₂ 代群体筛选, 验证 SSR 标记与小麦条锈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 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), 用 Mapdraw 软件绘制连锁图。

抗病性鉴定在中国农科院作物所试验地中进行, 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

对 Y206 和 Y121 杂交后代进行遗传分析和抗病性鉴定,发现 10 株 F1 个体全部抗小麦条锈病,且表现为免疫,F2 代群体共获得 194 个单株,发生抗、感分离。在苗期,有 148 株抗病,其中有 138 株表现免疫和近免疫,10 株表现高抗或中抗;另外 46 株表现中度感病和高度感病;在成株期,有 150 株抗病,其中免疫和近免疫有 146 株,4 株表现为高抗和中抗。经卡方测验,苗期卡方值为 $0.11 < \chi^2_{0.05} = 3.85$,成株期为 $0.44 < \chi^2_{0.05} = 3.85$,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 Y206 的显性抗小麦条锈病单基因,暂命名为 *YrY206*。

2.2 SSR 标记分析及连锁作图

利用 BSA 法和 756 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,用筛选出的多态引物进一步进行 F2 小群体验证,最终获得 38 对引物具有多态性。用 194 株 F2 作图群体进一步筛选,记录扩增带型,在 3D 染色体上获得 7 对引物与 *YrY206* 连锁的 SSR 标记,利用 Mapmaker/exp3.0 软件进行分析,结果表明 *Wmc11a*、*Xgwm71c*、*Xgwm161* 和 *Xgwm183* 与 *YrY206* 处于一个连锁群中,与抗病基因的遗传距离分别为 4.0 cM、3.3 cM、1.5 cM 和 9.3 cM, *YrY206* 位于 *Xgwm161* 和 *Xgwm183* 之间(图 1、图 2、图 3),定位在 3DS 染色体上,另外 3 对引物与 *YrY206* 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。

表 1 苗期和成株期 Y206×Y121 F2 群体对条锈病混和菌株抗性测试
Table 1 Resistance of the Y206×Y121 F2 population infected by mixed physiological race in seedling and adult stages

Materials	Infection type						Total plants	Expected ratio	χ^2 value	P value
	0	0	1	2	3	4				
Y206/Y121 F2 seedling stage	130	8	5	5	10	36	194	3:1	0.11	0.500~0.250
Y206/Y121 F2 adult-plant	144	2	3	1	3	41	194	3:1	0.44	0.500~0.250

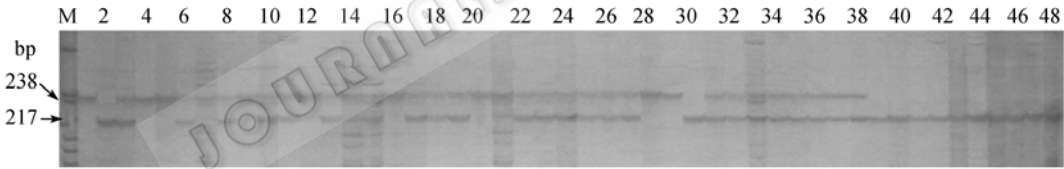


图 1 引物 *Wmc11a* 对 Y206×Y121 F2 部分单株的扩增结果分布

Fig. 1 Amplification of *Wmc11a* Y206×Y121 F2 generationg

M: marker; 1: resistance parent Y206; 2: susceptible parent Y121; 3~38: resistance individuals from Y206×Y121 F2 generation; 39~48: susceptible individuals from Y206×Y121 F2 generation

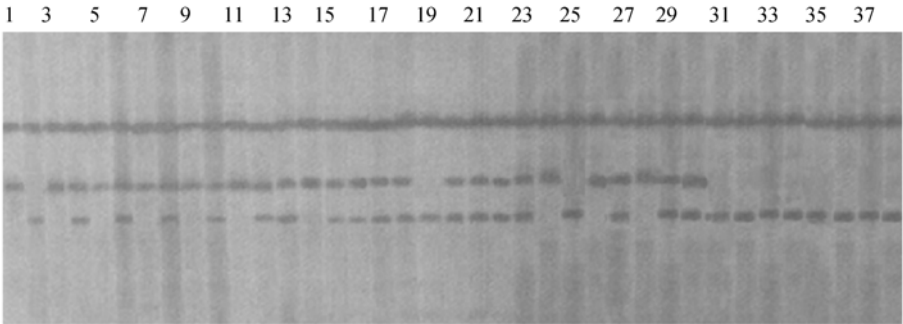


图 2 引物 *Xgwm161* 对 Y206×Y121 F2 部分单株的扩增结果分布

Fig. 2 Amplification of *Xgwm161* Y206×Y121 F2 generationg

1: resistance parent Y206; 2: susceptible parent Y121; 3~30: resistance individuals from Y206 × Y121 F2 generation; 31~38: susceptible individuals from Y206 × Y121 F2 generation

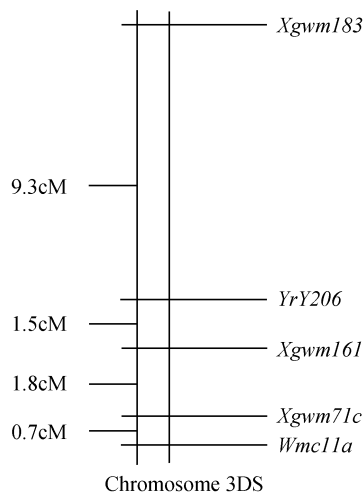


图3 抗小麦条锈病基因 *YrY206* 的遗传连锁图(3D)

Fig. 3 Linkage map of stripe rust resistance gene *YrY206* on chromosome 3D

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, 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/symbolClassList.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^[1-6,9,10,12-15]。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的作用, 何名召等^[16]从硬粒小麦-粗山羊草人工合成小麦材料鉴定出抗小麦条锈病基因 *YrC108*。Kuraparthi V 等从小伞山羊草组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*^[4], 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*^[2,3]与抗白粉病 *Pm2*、*Pm19*、*Pm34* 和 *Pm35* 基因^[6,8,9]。

目前为止, 来源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^[2,3], 而本研究中来自粗山羊草的抗小麦条锈病基因 *YrY206* 定位在 3DS 染色体上, 与上述 2 个基因在不同的染色体组上, 显然三者不是相同的基因; 在 3D 染色体上, 目前还没有发现抗小麦条锈病基因。根据杂交后代 F1 和 F2 抗病表现分析, 可以认定来源于粗山羊草 Y206 的抗小麦条锈病的基因 *YrY206* 是一对新的显性抗病基因。

新发现的抗小麦条锈病基因 *YrY206* 经过几年试验鉴定, 证明对我国现在流行的条锈病优势小种条中 29、条中 30、条中 31 和条中 32 具有持久抗病性, 且全生育期抗病。抗病粗山羊草 Y206 中含有的 *YrY206* 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 *YrY206* 的粗山羊草 Y206 远缘杂交, 已经获得一系列抗条锈病育种材料, 为小麦抗条锈病提供了遗传资源。

REFERENCES

- [1] McIntosh RA, Hart GE, Devos KM, *et al.* Catalogue of gene symbols for wheat: 2005-2007 supplement. <http://shigen.lab.nig.ac.jp/wheat/komugi/top/top.jsp>.
- [2] McIntosh RA, Lagudah ES. Cytogenetical studies in wheat. XVIII. Gene *Yr24* for resistance to stripe rust. *Plant Breed*, 2000, **119**(1): 76-81.
- [3] Singh RP, Nelson JC, Sorrells ME. Mapping *Yr28* and other genes for resistance to stripe rust in wheat. *Crop Sci*, 2000, **40**: 1148-1155.
- [4] Kuraparthi V, Chhuneja P, Dhaliwal HS, *et al.* 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.
- [5] Spielmeier W, McIntosh RA, 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. *Theor Appl Genet*, 2005, **111**(4): 731-735.
- [6] Zhang HQ, Fu XT, Hao CY, *et al.* Progress of studies on powdery mildew resistance genes in wheat. *J Shenyang Agri Univ*, 2003, **34**(1): 68-71.
张海泉, 符晓棠, 郝晨阳, 等. 小麦白粉病抗性基因的研究进展. 沈阳农业大学学报, 2003, **34**(1): 68-71.
- [7] Zhang HQ. SSR markers linked to a powdery mildew resistance gene in *Aegilops tauschii* Y189. *J Henan Univ (Nat Sci)*, 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.
- [8] Miranda LM, Murphy JP, Marshall D, *et al.* *Pm34*: a new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops tauschii* cross to common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, **113**(8): 1497-1504.
- [9] Miranda LM, Murphy JP, Marshall D, *et al.* 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.
- [10] Sun XL, Liu D, Zhang HQ, *et al.* Identification and

- mapping of two new genes conferring resistance to powdery mildew from *Aegilops tauschii* (Coss). *Schmal. Plant Biol*, 2006, **48**(10): 1204–1209.
- [11] Röder MS, Korzum V, Wendehake K, *et al.* A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 1998b, **149**: 2007–2023.
- [12] Bai D, Knot DR. Suppression of rust resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by 2D genome chromosomes. *Genome*, 1992, **35**: 276–282.
- [13] Gill BS, Raupp WJ. Direct genetic transfer from *Aegilops squerrosa* L. to hexaploid wheat. *Crop Sci*, 1987, **27**: 445–450.
- [14] Li GQ, Li ZF, Yang WY, *et al.* 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.
- [15] 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.
- [16] He MZ, Wang LM, Zhang ZY, *et al.* Identification and molecular mapping of a novel stripe rust resistance gene in a triticum durum-*Aegilops tauschii* amphiploid CI108. *Acta Agron Sin*. 2007, **33**(7): 1045–1050.
- 何名召, 王丽敏, 张增艳, 等. 硬粒小麦-粗山羊草人工合成小麦 CI108 抗条锈病新基因的鉴定、基因推导与分子标记定位. 作物学报, 2007, **33**(7): 1045–1050.

科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

内蒙古野生蔬菜资源及其民族植物学研究

哈斯巴根 苏亚拉图 编著

978-7-03-020409-7 ¥48.00 2008年5月30日 出版

本书介绍了内蒙古野生蔬菜资源及其民族植物学研究的内容, 共分六章。第一章论述了野生蔬菜资源及其食用价值; 第二章介绍了内蒙古野生蔬菜资源的特性, 包括种类组成及其可食用部位、内蒙古植被与野生蔬菜植物资源以及野生蔬菜资源植物的分布; 第三章探讨了内蒙古野生蔬菜资源的分类; 第四章介绍了内蒙古野生蔬菜资源的民族植物学研究案例; 第五章探讨了内蒙古野生蔬菜资源的开发利用; 第六章借助彩色图片, 简要介绍了内蒙古常见野生蔬菜资源植物。

本书可供从事农业、传统医药、植物资源开发利用和食品科学的人员参考。



水稻超高产育种理论与方法

陈温福 徐正进 著

978-7-03-020014-3 ¥78.00 2008年5月30日 出版

本书在系统分析水稻产量潜力的基础上, 具体估算了我国主要稻区理论生产力和现实生产力, 综合评述了水稻超高产研究历史与现状, 论述了水稻超高产育种的生理基础、遗传基础, 以及超高产育种亲本和杂交后代选择技术。

本书适合高等院校农学专业研究生和本科高年级学生使用, 同时也可供科研单位、相关技术推广和生产单位的工作人员参考。



昆虫生理系统(第二版)

原著: Marc J. Klowden

导读: 王琛柱

978-7-03-021475-1 ¥138.00 2008年5月 出版

作为世界上数量最多、最成功的物种之一, 昆虫对人类健康和农业生产都具有重要而深远的意义。本书综述了昆虫取得如此巨大成功的生理机制。大量的参考文献、丰富的图表, 以及对最新进展的讨论, 为读者理解昆虫整个生理系统的工作机制提供了必要的基础知识。通过对昆虫模式系统的研究, 也为研究哺乳动物的生理学和行为学提供参考和基本依据。

本书的前言、目录、术语表、图表注解和各章摘要均已翻译成中文, 正文部分保留英文原版, 另附中国科学院动物研究所王琛柱研究员为本书所做中文导读一篇。

