

小麦抗叶锈病基因 *Lr19* 的 SSR 标记

李 星, 杨文香, 李亚宁, 刘大群, 闫红飞, 孟庆芳, 张 汀

(河北农业大学植物保护学院植物病理系/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: 选取小麦感叶锈病亲本 Thatcher、6 个以 Thatcher 为遗传背景的小麦抗叶锈近等基因系及 TcLr19 与 Thatcher 杂交 F₂ 代为材料, 开展了小麦抗叶锈基因 *Lr19* 的微卫星分子标记研究; 从 13 对微卫星引物中筛选出了 1 对在亲本及 TcLr19 × Thatcher F₂ 抗感群体间揭示多态性的引物 Xgwm44, 并获得了 1 个与小麦抗叶锈基因 *Lr19* 紧密连锁的 SSR 标记 Xgwm44_{139bp}, 此标记位点与 *Lr19* 基因之间的遗传距离为 0.9cM。该研究可为分子标记辅助育种及构建遗传图谱、物理图谱和基因克隆奠定了基础。

关键词: 小麦叶锈病; *Lr19*; 微卫星分子标记

A SSR Marker for Leaf Rust Resistance Gene *Lr19* in Wheat

LI Xing, YANG Wen-xiang, LI Ya-ning, LIU Da-qun, YAN Hong-fei, MENG Qing-fang, ZHANG Ting

(Department of Plant Pathology, College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei,

Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001)

Abstract: Microsatellite was carried out in Thatcher, six near-isogenic lines and F₂ progeny of TcLr19 × Thatcher to develop molecular markers for leaf rust resistance gene *Lr19*. Thirteen primer pairs were screened, of which one primer pair Xgwm44 displayed polymorphism in the population of TcLr19, Thatcher, and their F₂ generation. One marker closely linked to *Lr19* resistance trait was obtained, and was named as Xgwm44_{139bp} with the genetic distance 0.9 cM. The research shows that *Lr19* has more potential in marker-assisted breeding programs in wheat and has laid a foundation for mapping genetic map, physical map and the eventual cloning.

Key words: Wheat leaf rust; *Lr19*; Microsatellite

利用抗叶锈品种是减轻叶锈病害的最经济、安全、有效的方法。目前, 人们已就小麦抗叶锈基因遗传和抗病性进行了多方面的研究。国际上已发现近 90 个抗叶锈基因, 其中正式定名的有 56 个, 已有 51 个已被定位在特定染色体上^[1], 有 28 个抗叶锈基因借助于 RFLP、RAPD、ISSR 和 AFLP 技术获得了紧密连锁或完全连锁的分子标记。*Lr19* 是一个有效的抗叶锈病基因, 自 1966 年首次将该基因从长穗偃麦草转到普通小麦中之后, 直到 1994 年才首次报道在墨西哥有对 *Lr19* 有毒性的菌株, 但至今在南非、中国等地只有少数几个菌株对之表现毒力, *Lr19* 是一个应用潜力很大的抗病基因。

微卫星 DNA, 又称简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)或短串联重复(short tandem repeat, STR), 在小麦基因组中广泛分布^[2]。微卫星标记具有多态性高、稳定性好、共显性等特点^[3], 非常适于在普通小麦这类遗传基础相对狭窄的物种中应用。目前, 微卫星标记已成功用于小麦重要性状如抗条锈病、抗白粉病等基因的标记定位研究^[4-9], 但尚未有对 *Lr19* 开展 SSR 标记的报道。笔者采用 SSR 标记技术开展小麦抗叶锈基因 *Lr19* 的分子标记研究, 旨在找到与 *Lr19* 抗叶锈基因紧密连锁的分子标记, 为实现该抗病基因分离, 与其他抗病基因聚合培育抗病品种, 进行种质资源基因型鉴定以及抗病基因合理利用奠定基础。

收稿日期: 2005-01-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30170602)

作者简介: 李 星(1980-), 女, 河北滦南人, 硕士研究生, 主要从事分子植物病理学研究。Tel: 0312-7528502; E-mail: L XKZH@163.com。刘大群为通讯作者, Tel: 0312-7521286; E-mail: ldq@mail.hebau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 6 个小麦抗叶锈近等基因系 TcLr13、TcLr19、TcLr21、TcLr37、TcLr38、TcLr44 和小麦感病亲本 Thatcher 及其杂交所获得的 F₂ (TcLr19×Thatcher) 分离世代的种子均来自河北农业大学小麦叶锈病研究室; 对供试小麦叶锈菌株 02-5-17, Thatcher 表现高侵染型, TcLr19 表现为免疫。

1.2 抗性鉴定

供试材料的抗叶锈性鉴定按 Seyfarth 的方法^[10]进行。种植 TcLr19 与 Thatcher 杂交 F₂ 代小麦幼苗, 以感病亲本 Thatcher 为对照, 幼苗生长 1 叶 1 心时, 采用撒粉法接种对 *Lr19* 抗病基因无毒力的小麦叶锈菌株 02-5-17, 黑暗条件下保湿 24 h, 移入温度为 (24±5) °C 的温室内培养, 接种 14 d 后按 Roelfs^[11]的标准记载单株小麦叶片的侵染型, 用 χ^2 测验法计算所得实际结果是否符合 3:1 抗感分离规律。

1.3 小麦 DNA 的提取

参照 Gill^[12]等人提供的 CTAB 法稍作修改后提取小麦叶片基因组 DNA, 然后用 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。

1.4 微卫星扩增及电泳分析

根据 Roder 等^[13]报道的位于小麦 7D 染色体上的 13 对微卫星引物序列, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成引物。PCR 反应体积为 25 μ l, 含有 5 μ l· μ l⁻¹ 10×buffer 2.5 μ l; 0.2 mmol·L⁻¹ dNTP; 0.3 mmol·L⁻¹ 引物; 40 ng 模板 DNA; 1.75U DNA 聚合酶。PCR 反应在 T-gradient Thermal Cycler PCR 扩增仪 (Bio-metra) 上进行。扩增程序为 94°C 变性 3 min, 接着 94°C 变性 1min, 50~60°C (因引物不同而异) 复性 1 min, 72°C 延伸 2 min, 共 35 个循环, 最后 72°C 延伸 10 min。

1.5 电泳及银染

扩增结果在 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 65W 恒定功率电泳至第一条 loading buffer 溴酚蓝带到达胶板的另一边缘, 银染显色检测 DNA 的多态性。

1.6 特异性 DNA 片段的回收、测序

扩增产物在 PAGE 胶上电泳, 经过银染、显色后, 用手术刀片切下特异性片段移至干净的 2 ml 离心管中, 用 Omega 试剂盒进行回收, 回收液的再扩增产物由上海生工生物工程技术服务有限公司进行 DNA 克隆序列测定。

2 结果及分析

2.1 抗性鉴定结果及遗传分析

以感病亲本 Thatcher 和抗病亲本 TcLr19 为对照, 对其 F₁ 代接种无毒力菌株 02-5-17, 发现 F₁ 代全部表现抗病 (侵染型 IT 为 0-); 当对 F₂ 代群体进行接种试验时, 在 120 株 F₂ 代单株中, 84 株表现抗病 (IT 为 0-), 36 株表现感病 (IT 为 4), 经适合性测验 F₂ 群体的抗感比符合 3:1 分离模式, 表明 TcLr19 对叶锈菌株 02-5-17 的抗性由 1 对显性基因控制。

2.2 抗病基因分子标记

2.2.1 微卫星扩增结果 以抗感亲本为材料摸索分布于小麦 7D 染色体上的 13 对微卫星引物的最佳退火温度, 然后在抗感亲本间进行扩增筛选, 其中引物 Xgwm37 和 Xgwm44 在抗感亲本间扩增出多态性条带。

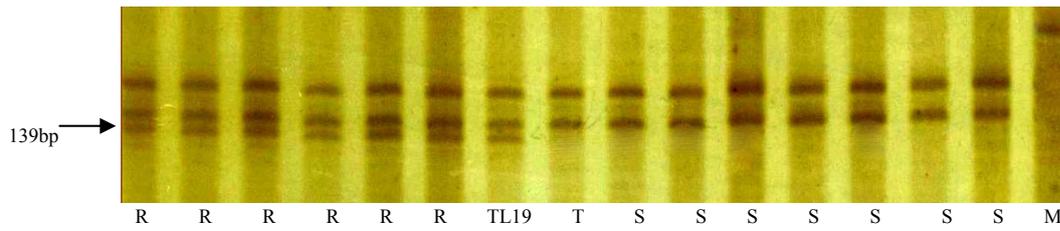
采用初筛出的 2 对引物 (表), 在 F₂ 代群体中选取的 10 株抗病材料和 10 株感病材料单株进行小群体扩增, 其中引物 Xgwm37 在 F₂ 代抗感群体之间没有扩增出差异常条带, 引物 Xgwm44 在这两个群体间扩增出差异常条带, 且与抗病亲本扩增结果一致, 此异常条带的长度为 139 bp, 初步表明这个 SSR 标记与小麦抗叶锈基因 *Lr19* 存在连锁关系 (图 1)。

表 从 13 对引物中初筛出的 2 对揭示 TcLr19 多态性引物
Table Two pairs of primers selected from 13 pairs of primers showing polymorphism to TcLr19

引物编号 Primer	引物碱基序列 Sequence (5'-3')
Xgwm37	ACTTCATTGTGATCTTGATG CGACGAATCCCAAGCTAAAC
Xgwm44	ACTGGCATCCACTGAGCTG GTTGAGCTTTTCAGTTCGGC

2.2.2 遗传连锁性分析 用引物 Xgwm44 对 120 株 F₂ 代进行 SSR 扩增及电泳分析, 在 84 株抗病材料中均扩增出含有 139 bp 的特异性带, 而在 36 株感病材料中, 有 1 株含有该条带。数据用 MAPMAKER 3.0b 软件进行连锁分析, 结果 Xgwm44 扩增出的 139 bp 的片段与 *Lr19* 的遗传距离为 0.9cM, 表明该标记位点与目的基因紧密连锁。

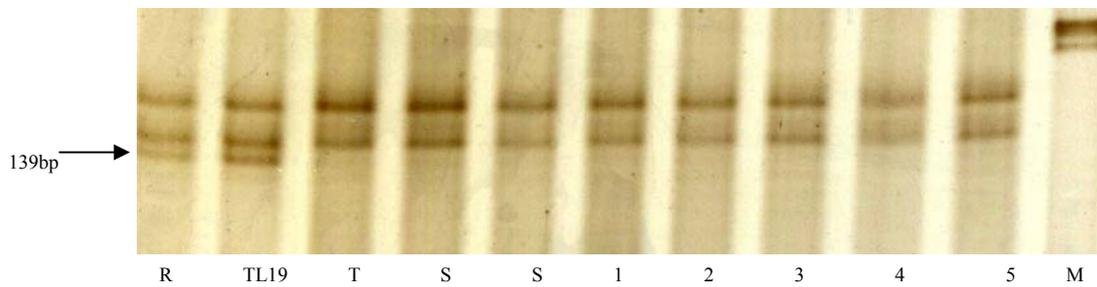
2.2.3 品种验证 用引物 Xgwm44 对感病亲本 Thatcher 和抗病亲本 TcLr19 及以 Thatcher 为背景的近等基因系: TcLr13、TcLr21、TcLr37、TcLr38、TcLr44 进行了 PCR 扩增。可以看出, 在抗病亲本 TcLr19 中



M 为 PBR322/*Msp*I marker, S 代表 F₂ 代感病材料条带, R 代表 F₂ 代抗病材料条带, T 代表感病亲本 Thatcher 条带, TL19 为抗病亲本 TcLr19 条带, 下同。箭头表示在 F₂ (TcLr19×Thatcher) 代抗病材料中含有的 139bp 特异条带
 “M” means PBR322/*Msp*I marker, “S” means the bands from the materials susceptible to wheat leaf rust in F₂ population. “R” means the bands from the materials resistant to wheat leaf rust in F₂ population, “T” means the bands from Thatcher, “TL19” means the bands from TcLr19, The same as below. Arrowhead indicated the 139bp specific band present in population resistant to the pathogen

图 1 引物 Xgwm44 在 F₂ (TcLr19×Thatcher) 代中扩增出的特异性条带

Fig.1 The specific band of TcLr19×Thatcher F₂ population amplified with Xgwm44



1. 代表 TcLr13 条带, 2. TcLr21 条带, 3. TcLr37 条带, 4. TcLr38 条带, 5. TcLr44 条带, 箭头表示在抗病材料中含有的 139 bp 特异条带
 1. Means the bands from TcLr13, 2. Means the bands from TcLr21, 3. Means the bands from TcLr37, 4. Means the bands from TcLr38, 5. Means the bands from TcLr44. Arrowhead indicated the 139bp specific band present in resistant lines

图 2 微卫星引物 Xgwm44 对不同小麦材料的扩增结果

Fig.2 The PCR amplification results of different wheat materials with primer Xgwm44

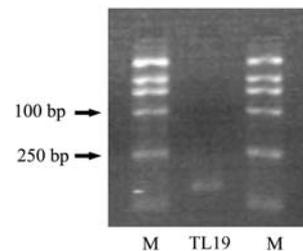
扩增出 139 bp 的抗性标记带, 而在其他不含有 *Lr19* 的个测试材料中均未扩增出抗病标记带 (图 2), 因此 Xgwm44_{139bp} 可作为 *Lr19* 基因的特异性分子标记。

2.2.4 特异性 DNA 片段的回收测序 该特异性 DNA 片段经回收后再扩增所得条带大小与该特异带大小一致 (图 3), 并由上海生工生物工程技术服务有限公司测序得出了特异带的序列 (图 4), 此序列长度为 139 bp, 经 BLAST 同源性序列比较发现该片段与 GeneBank 中的记录不具同源性, 为一新的片段。

3 结论与讨论

小麦叶锈病严重影响小麦生产, 培育抗病品种是减轻病害的有效方法, 所以找到与抗叶锈基因连锁的分子标记并将其应用于抗病育种是本研究的最终目的。微卫星标记普遍存在于真核生物基因组中, 已被证明它是一种非常有效的分子标记, 由于 SSR 标记在

小麦基因组中多态性极高, 并具有染色体组特异性, 相对 RFLP、RAPD 等分子标记而言, 有操作简便, 稳定性高, 花费低等优点^[2,13], 目前它已成为研究小麦最有



“M” 为 DL2 000 marker, “TL19”代表回收的特异性条带
 “M” means DL2 000 marker, “TL19” means specific band reclaimed

图 3 特异性片段回收的结果

Fig.3 The pattern of the specific band reclaimed

*GTGAGCTTTTCAGTTCGGCACACTGAGCAATTA*ACTTCCAAATCCTGGAACAAGTAGAAGTATCGCATAGCTGT
GGAGAGAAAGAGAGAGAGAAACCAACCTGCAGTCGATGTCCGGAGCAGCTCAGTGGATGCCAGT

图中斜体字母为引物序列 Italic letters indicate the primer sequence

图 4 特异带序列

Fig.4 The sequence of the specific band

效的分子标记技术之一^[14]。

本研究以小麦叶锈抗病亲本 TcLr19 和感病亲本 Thatcher 为材料, 从 13 对 SSR 引物中筛选出 2 对能揭示出抗感亲本间多态性的引物, 多态性引物出现率达 16%, 用此两对引物对它们的 F₂ 代抗感群体进行扩增并最终获得了一个与小麦抗叶锈基因 *Lr19* 紧密连锁的分子标记 Xgwm44_{139bp}, 遗传距离为 0.9cM。经品种验证, Xgwm44_{139bp} 作为 *Lr19* 基因的特异性分子标记可用于抗病育种的辅助选择。研究获得的 139 bp 的特异性片段经 BLAST 分析未能找到同源性的序列, 表明这是一个目前尚未记载的不含 ORF 的片段。按该序列设计引物, 利用 Race 方法扩增全序列, 可进一步克隆 *Lr19*, 为小麦抗叶锈病基因工程奠定基础。

References

- [1] Yang W X, Liu D Q. Advances in localization and molecular markers of wheat leaf rust resistance genes. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 3 (10): 770 - 779.
- [2] Roder M S, Plaschke J, Konig S U, Borner A, Sorrells M E, Tanksley S D, Ganal M W. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Molecular and General Genetics*, 1995, 246: 327 - 333.
- [3] Wang Z, Weber J L, Zhong G, Tanksley S D. Survey of plant short tandem DNA repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 88: 1-6.
- [4] Peng J H, Fahima T, Roder M S, Li Y C, Dahan A, Grama A, Ronin Y I, Korol A B, Nevo E. Microsatellite tagging of the stripe-rust resistance gene *YrH52* derived from wild emmer wheat, *Triticum dicoccoides*, and suggestive negative crossover interference on chromosome 1 B. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 98: 862-872.
- [5] Liu Z Y, Sun Q X, Ni Z F, Nevo E, Yang T. Molecular characterization of a novel powdery mildew resistance gene *Pm30* in wheat originating from wild emmer. *Euphytica*, 2002, 123: 21-29.
- [6] Chagué V, Fahima T, Dahan A, Sun G L, Korol A B, Ronin Y I, Grama A, Roder M S, Nevo E. Isolation of microsatellite and RAPD markers flanking the *Yr15* gene of wheat using NILs and bulked segregant analysis. *Genome*, 1999, 42: 1 050-1 056.
- [7] 马渐新, 周荣华, 董玉琛, 王晓鸣, 贾继增. 用微卫星标记定位一个未知的小麦抗条锈病基因. 科学通报, 1999, 44 (14): 1 513 - 1 517.
- Ma J X, Zhou R H, Dong Y C, Wang X M, Jia J Z. Mapping of a new stripe rust resistance gene in wheat using SSR markers. *Chinese Science Bulletin*, 1999, 44 (14): 1 513-1 517. (in Chinese)
- [8] Jarve K, Peusha H O, Tsymbalova J, Tamm S, Devos K M, Enno T M. Chromosomal location of a *Triticum timopheevii*-derived powdery mildew resistance gene transferred to common wheat. *Genome*, 2000, 43(2): 377-381.
- [9] Huang X Q, Hsam S L K, Zeller F J, Wenzel G, Mohler V. Molecular mapping of the wheat powdery mildew resistance gene *Pm24* and marker validation for molecular breeding. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101: 407-414.
- [10] Seyfarth R, Feuillet C, Schachermayr G, Winzeler M, Keller B. Development of a molecular marker for the adult plant leaf rust resistance gene *Lr35* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99: 554-560.
- [11] Roelfs A P. Race specificity and methods of study. In: Bushnell W R, Roelfs A P. *The Cereal Rust*. Vol 1. Origins, Specificity, Structure and Physiology. Orlando: Academic Press, 1984, 2: 131-164.
- [12] Gill K S, Lubbers E L, Gill B S, Raupp W J, Cox T S. A genetic linkage map of *Triticum tauschii*(DD) and its relationship to the D genome of bread wheat(AABBDD). *Genome*, 1991, 34: 362-374.
- [13] Roder M S, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M H, Leroy P, Ganal M W. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 1998, 149: 2 007-2 023.
- [14] Plaschke J, Borner A, Wendehake K, Ganal M W, Roder M S. The use of wheat aneuploids for the chromosomal assignment of microsatellite loci. *Euphytica*, 1996, 89: 33-40.

(责任编辑 王红艳)