

部分小麦种质中抗秆锈病基因 *Sr22* 的初步分子检测

马 勇

(黑龙江省农业科学院 克山分院, 黑龙江 克山 161606)

摘要:抗病基因 *Sr22* 不仅抗国内流行的主要小麦秆锈病生理小种, 而且对新型秆锈菌生理小种 Ug99(TTK-SK)及其变异种 TTKST 和 TTKS 具有很好的抗性。利用与抗病基因 *Sr22* 紧密连锁的 SSR 引物 Xcfa2019, 对从国内外搜集的抗 Ug99 的小麦种质以及黑龙江省主栽小麦品种进行 SSR 分子检测。结果表明: 从国内外引进的 58 份抗 Ug99 小麦种质中未检测到抗病基因 *Sr22*; 黑龙江省 18 份主栽春小麦品种中有 3 份材料中含有抗病基因 *Sr22*, 占检测材料的 4%。表明抗病基因 *Sr22* 在黑龙江省主栽小麦品种中占有一定的比例, 今后要进一步加强 *Sr22* 在小麦抗病育种中的应用。

关键词: *Sr22*; 小麦秆锈病; Ug99; 分子检测

中图分类号: S512.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-2767(2013)01-0007-04

小麦秆锈病是由 *Puccinia graminis* Pers. f. *sp. tritici* 引起的, 对小麦生产造成严重损害的真菌病害, 在小麦种植国家和地区均发生过。小麦秆锈病在我国历史上曾对生产造成较严重影响, 每次流行都造成巨大损失, 部分地区甚至绝收^[1-2]。20 世纪 70 年代以来, 小麦多抗性品种资源的利用和抗性基因的布局使小麦秆锈病得到了有效的控制, 为我国的高产、高效、优质小麦发展提供了一个良好的生产环境^[3]。但优良抗源的集中利用造成的抗源单一化、新致病类型小种的出现、抗性基因随环境变化而产生的抗性水平下降和抗性的消失, 是当前小麦秆锈病流行区所面对的新问题^[4-5], 新型秆锈菌生理小种 Ug99 的出现就是一个例证。

Ug99 于 1999 年在非洲的乌干达首次发现, 该小种对 *Sr31* 具有毒力, 按照北美秆锈菌小种命名法则为小种 TTKS^[6], 或按照现在新的鉴别寄主的体系命名为 TTKSK^[7], 2006 和 2007 年分别观察到了对抗病基因 *Sr24* 和 *Sr36* 新变异株 TTKST 和 TTTSK^[8]。Ug99(TTKSK) 及其致病谱不断扩大的变异株能够克服 *Sr5*、*9e*、*11*、*21*、*30*、*31*、*36* 和 *38* 等基因的抗性, 而这些抗病基因

均是对我国优势小种致病类型具有优良抗性的, 特别是 *Sr31*。对我国优势小种致病类型和 Ug99 及其变异株兼有良好抗性的基因有 *Sr22*、*26*、*33*、*35* 和 *37* 等。今后在小麦抗秆锈病育种中应该有针对性地选择这些抗病基因, 并将多个抗病基因聚合使用, 使小麦品种对秆锈病具有持久的抗病性^[9]。国际锈病协作网已经通过对秆锈病圃和分析生理小种进行全球范围病原菌检测, 已确定 Ug99 的可能传播路线, 即东非—西亚—南亚—东亚, Ug99 随气流传至我国的可能性很大^[10-12]。

现利用 SSR 标记技术, 利用与抗病基因 *Sr22* 紧密连锁的 SSR 引物 Xcfa2019 对小麦种质进行分子检测, 以期初步了解抗病基因 *Sr22* 在小麦种质中的分布状况, 为小麦抗秆锈病育种提供抗源基因, 从而更科学有效地控制小麦秆锈病。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为 55 份从国外引进的经肯尼亚检测抗 Ug99 的春小麦品种(黑龙江省农业科学院作物育种研究所张春利研究员提供), 3 份经肯尼亚检测抗 Ug99 的国内春小麦品种, 18 份黑龙江省当前主栽春小麦品种, 以及阴性对照小密穗、中国春、克华和 McNair701, 阳性对照单抗基因系 *Sr22*(沈阳农业大学植物保护学院提供)。供试材料于 2011 年 4 月在黑龙江省农业科学院克山分院试验区种植。

1.2 方法

1.2.1 小麦基因组 DNA 的提取、PCR 反应和变

收稿日期: 2012-12-03

基金项目: 国家小麦现代产业技术体系东北综合试验站资助项目(nycyt-x-03); 黑龙江省科技攻关专项资助项目(GA09B101-4)

作者简介: 马勇(1967-), 女, 黑龙江省克山县人, 硕士, 高级农艺师, 从事小麦遗传育种研究。E-mail: mayong000@sina.com。

性聚丙烯酰胺凝胶电泳 采集新鲜的小麦芽,参照 Aldrich 等^[13] 的 CTAB 法提取小麦基因组 DNA,干燥后溶于 TE 缓冲液。

根据已报道的微卫星引物序列,选取位于小麦染色体 7AL 上的引物 Xcfa2019 进行 *Sr22* 的分子检测,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。扩增反应体系为 15 μL ,含 $10\times$ buffer(含 Mg^{2+})1.5 μL ,10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTPs 0.3 μL ,10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的引物 0.75 μL ,2.5 $\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 *Taq* 酶 0.15 μL ,30 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的模板 DNA 2 μL 。反应条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,57 $^{\circ}\text{C}$,复性 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。扩增循环在 DNA Engine PTC-100 进行。

取 3 μL 甲酰胺凝胶载样缓冲液与 PCR 产物混合,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 5 min 后,置于冰水混合物上冷却。将 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶在 80 W 恒功率下预电泳 30 min,上样,保持恒功率 80 W 电泳时

间 1.5 h。变性聚丙烯酰胺凝胶电泳银染色显色分析参照 Bassam 等^[14] 的方法进行,观察照相。

1.2.2 成株期抗秆锈病鉴定 田间接种小麦秆锈菌生理小种 21C3CTH,在成株期对试验材料进行抗秆锈性鉴定。采用注射法接种,大约接种后 15 d,即发病充分后,按照 Roelfs^[15] 的标准记载侵染型。

2 结果与分析

2.1 Xcfa2019 标记 PCR 多态性检测

Xcfa2019 在阳性对照单基因系 *Sr22* 和阴性对照小密穗中分别扩增出大小不同的片段,在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳中可区分开,扩增的条带清晰,重复性好,说明该标记在抗感品种中具有多态性(见图 1)。其中在单抗基因系 *Sr22* 扩增出 217 bp 的片段,经检测证明是抗病基因 *Sr22* 的特异带,该标记可用于检测抗病基因 *Sr22*。

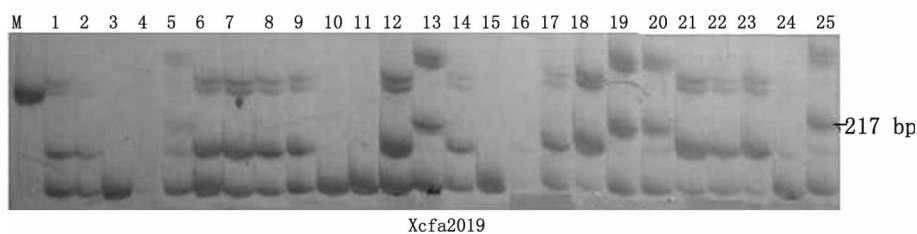


图 1 部分小麦种质抗病基因 *Sr22* Xcfa2019 标记的多态性检测结果

1~25 依次为龙辐 02-0667、宁春 37、中国春、克华、McNair701、克丰 10 号、克丰 11、克丰 12、克丰 13、克春 1 号、克春 3 号、春早 16、克早 20、克早 21、龙辐 16、龙辐 17、龙辐 18、垦九 10 号、垦大 8 号、北麦 4 号、龙麦 26、龙麦 30、龙麦 33、小密穗和 *Sr22*

Fig. 1 Polymorphic detection of PCR fragments amplified by SSR marker Xcfa2019 in some wheat germplasm

1~25 means Longfu 02-0667; Ningchun 37; China spring; Kehua; McNair 701; Kefeng No. 10; Kefeng 11; Kefeng 12; Kefeng 13; Kechun No. 1; Kechun No. 3; Kehan 16; Kehan 20; Longfu 16; Longfu 17; Longfu 18; Kenjiu No. 10 Kenda No. 8; Beimai No. 4; Longmai 26; Longmai 30; Longmai 33; Xiaomisui; *Sr22*

2.2 部分小麦种质中 *Sr22* 的分布状况

58 份国内外引进的抗 Ug99 材料中,未检测到抗病基因 *Sr22*;黑龙江省 18 份主栽小麦品种中,有 3 个品种含有抗病基因 *Sr22*,分别是克早 20、垦九 10 号和垦大 8 号。表明抗病基因 *Sr22* 在小麦种质中分布少(见表 1)。

2.3 田间鉴定结果

田间调查结果表明,含有抗病基因 *Sr22* 的品种,反应型、严重度和普遍率都是 0,对小麦秆锈

病免疫,田间调查结果与室内分子检测结果相同。从国内外引进的 58 份抗 Ug99 材料中,除农品 5 号的抗性级别为中感,反应型为 3,严重度为 30%,普遍率为 30%外,其余品种对秆锈病的抗性强,反应型为 0 或 0;达到免疫或高抗水平。黑龙江省主栽的 18 个小麦品种对秆锈病的抗性强,反应型均为 0,对小麦秆锈病免疫(见表 1)。表明这些品种虽不含抗病基因 *Sr22*,但由于含有别的抗病基因,对秆锈病表现抗性强。

表 1 部分小麦种质抗秆锈病田间调查结果
Table 1 The identification result of stem rust resistance of wheat germplasm in field

材料 Materials	反应型 Infection type	严重度/ % Severity	普遍率/% Prevalence rate	材料 Materials	反应型 Infection type	严重度/ % Severity	普遍率/% Prevalence rate
StemRstRtsisqnt-1(B)	0	0	0	StemRstRtsisqnt-44(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-2(B)	0	0	0	StemRstRtsisqnt-45(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-3(B)	0	0	0	StemRstRtsisqnt-46(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-5(B)	0	0	0	StemRstRtsisqnt-47(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-7(B)	0	0	0	StemRstRtsisqnt-48(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-8(B)	0	0	0	StemRstRtsisqnt-49(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-9(B)	0	1	5	StemRstRtsisqnt-50(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-10(B)	0	0	0	StemRstRtsisqnt-51(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-11(B)	0	1	5	StemRstRtsisqnt-52(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-12(B)	0	0	0	StemRstRtsisqnt-53(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-13(B)	0	0	0	StemRstRtsisqnt-54(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-14(B)	0	0	0	StemRstRtsisqnt-55(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-15(B)	0	0	0	StemRstRtsisqnt-56(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-16(B)	0	0	0	StemRstRtsisqnt-57(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-17(B)	0	0	0	农品 5 号(B)	3	30	30
StemRstRtsisqnt-18(B)	0	0	0	龙辐 02-0667(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-19(B)	0	0	0	宁春 37(B)	1	0	10
StemRstRtsisqnt-20(B)	0	0	0	中国春(B)	3	80	80
StemRstRtsisqnt-21(B)	0	0	0	克华(B)	1	0	30
StemRstRtsisqnt-22(B)	0	0	0	McNair701(B)	3	80	100
StemRstRtsisqnt-23(B)	0	0	0	克丰 10 号(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-24(B)	0	0	0	克丰 11(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-25(B)	0	0	0	克丰 12(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-26(B)	0	0	0	克丰 13(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-27(B)	0	0	0	克春 1 号(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-28(B)	0	0	0	克春 3 号(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-29(B)	0	0	0	克早 16(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-30(B)	0	0	0	克早 20(A)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-31(B)	0	0	0	克早 21(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-32(B)	0	0	0	龙辐麦 16(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-33(B)	0	0	0	龙辐麦 17(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-34(B)	0	0	0	龙辐麦 18(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-35(B)	0	0	0	垦九 10 号(A)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-36(B)	0	0	0	垦大 8 号(A)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-37(B)	0	0	0	北麦 4 号(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-38(B)	0	0	0	龙麦 26(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-39(B)	0	0	0	龙麦 30(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-40(B)	0	0	0	龙麦 33(B)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-41(B)	0	0	0	小密穗(B)	4	90	100
StemRstRtsisqnt-42(B)	0	0	0	<i>Sr22</i> (A)	0	0	0
StemRstRtsisqnt-43(B)	0	0	0				

注:括号中字母 A 表示含 *Sr22* 基因;B 表示不含 *Sr22* 基因。
Note: A and B in the brackets reference the *Sr22* gene in or not in the cultivar.

3 结论与讨论

该研究利用 SSR 标记 Xcfa2019 在单抗基因系 *Sr22*、克早 20、垦九 10 号和垦大 8 号中扩增出 217 bp 的目的基因片段,在感病对照小密穗中未扩增出目的基因片段,该研究验证了该标记的有效性,可用于抗病基因 *Sr22* 的分子检测。

抗病基因 *Sr22* 最早在野生一粒小麦(*Triticum boeoticum*) G-21^[16] 和栽培一粒小麦(*Triticum monococcum*) LRL5244^[17] 中被发现,通过杂交转移到普通六倍体小麦,单体分析表明,*Sr22*

位于小麦染色体 7AL 上^[18]。遗传学和病理学试验表明,源自 *Triticum boeoticum* 和 *Triticum monococcum* 的六倍体小麦含有相同的小麦抗秆锈病基因^[19]。抗病基因 *Sr22* 对小麦秆锈菌表现为中等程度以上抗性,在不同的小麦遗传背景下其侵染型可能有所不同,兼抗新小种 Ug99 和中国大多数小麦秆锈菌生理小种,与其它抗病基因一起使用可实现小麦的持久抗性。韩建东等选用 7A 染色体上的 73 对 SSR 引物共筛选到 2 个与 *Sr22* 紧密连锁的分子标记 Xwmc790 和 Xwmc633,与 *Sr22* 的遗传距离分别为 2.8 cM 和

10.8 cM^[20]。Khan等筛选到2个与Sr22紧密连锁的分子标记Xcfa2019和Xcfa2123,与Sr22的遗传距离分别为5.9 cM和6.0 cM^[21]。Olson等研究表明,Xcfa2019在含抗病基因Sr22的单抗基因系中扩增出217 bp的特异带^[22]。

目前该研究只利用Xcfa2019对部分小麦种质进行了抗病基因Sr22的分子检测,今后有条件时可利用与抗病基因Sr22紧密连锁的微卫星标记Xwmc790、Xwmc633和Xcfa2123对试验材料进行抗病基因Sr22的分子检测,以进一步验证试验结果的准确性。

参考文献:

- [1] 李振岐,曾士迈.中国小麦锈病[M].北京:中国农业出版社,2002:191-310.
- [2] 何中虎,夏先春,陈万权.小麦对秆锈病菌新小种Ug99的抗性研究进展[J].麦类作物学报,2008,28(1):170-173.
- [3] 姚平,曹远银,刘维志,等.全国小麦秆锈菌生理小种群动态分析(1990~1994)[J].植物保护学报,1997,24(4):297-302.
- [4] 陈万权,王剑雄.76个小麦品种资源抗叶锈及秆锈基因初步分析[J].作物学报,1997,23(6):655-662.
- [5] 尹静,王广金,张宏纪,等.小麦秆锈抗性遗传及抗性基因研究进展[J].植物遗传资源学报,2007,8(1):106-112.
- [6] Pretorius Z A, Singh R P, Wagore W W, et al. Detection of virulence to wheat stem rust resistance gene Sr31 in *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici* in Uganda[J]. Plant Diseases, 2000, 84: 203.
- [7] Wanyera R, Kinyua M G, Kenya. The Spread of stem rust caused by *Puccinia graminis* f. sp. *Tritici* with virulence on Sr31 in wheat in Eastern Africa[J]. Plant Diseases, 2006, 90: 113.
- [8] Jin Y, Singh R P, Ward R W, et al. Characterization of seedling infection types and adult plant infection responses of monogenic Sr gene lines to race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*[J]. Plant Disease, 2007, 91: 1096-1099.
- [9] 王广金,赵远玲,王永斌.小麦秆锈病的危害与防治研究综述[J].黑龙江农业科学,2010(12):169-171.
- [10] 王曦,陈万权,刘太国,等.小麦秆锈菌新小种U99的研究进展[J].中国植保导刊,2011,35(5):12-15.
- [11] Cimmyt. Dangerous wheat disease jumps Red Sea-devastating fungal pathogen spreads from Eastern Africa to Yemen, following path scientists predicted[EB/OL]. [2007-01-16]. <http://huliq.com>.
- [12] Cimmyt E P. Sounding the alarm on global stem rust[EB/OL]. [2006-06-01]. <http://www.globalrust.org/documents/Sounding Alarm Global Rust.pdf>.
- [13] Aldrich J, Cullis C A. RAPD analysis in flax: optimization of yield and reproducibility using Klen Taq I DNA polymerase, Chelex 100, and gel purification of genomic DNA[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2): 128-141.
- [14] Bassam B J, Caetano-Anollés G, Gresshoff P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels[J]. Analytical Biochemistry, 1991, 196: 80-83.
- [15] Roelfs A P. Race specificity and methods of study[J]. The Cereal Rust, 1985(1): 131-164.
- [16] Gerechter-Amitaj Z K, Wahl I, Vardi A, et al. Transfer of stem rust seedling resistance from wild diploid einkorn to tetraploid durum wheat by means of a triploid hybrid bridge[J]. Euphytica, 1971, 20: 281-285.
- [17] Kerber E R, Dyck P L. Inheritance of stem rust resistance transferred from diploid wheat (*Triticum monococcum*) to tetraploid and hexaploid wheat and chromosome location of the gene involved[J]. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 1973, 15: 397-409.
- [18] The T T, McIntosh R A. Cytogenetical studies in wheat VIII. Telocentric mapping and linkage studies involving Sr22 and other genes in chromosome 7AL[J]. Australian Journal of Biological Sciences, 1975, 28: 531-538.
- [19] The T T. Chromosome location of genes conditioning stem rust resistance transferred from diploid to hexaploid wheat[J]. Nature New Biology, 1973, 241: 256.
- [20] 韩建东,朱桂清,李伟华,等.小麦抗秆锈病基因Sr22的SSR新标记[J].中国农业科学,2010,43(15):3244-3250.
- [21] Khan R, Bariana H S, Dholakia B B, et al. Molecular mapping of stem and leaf rust resistance in wheat[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111: 846-850.
- [22] Olson E L, Brown-Guedira G, Marshall D, et al. Development of wheat lines having a small introgressed segment carrying stem rust resistance gene Sr22[J]. Crop Science, 2010, 50: 1823-1830.

Molecular Detection of the Resistance Gene Sr22 to Stem Rust in Wheat Germplasm

MA Yong

(Keshan Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Keshan, Heilongjiang 161606)

Abstract: Sr22 is an important stem rust resistant gene, not only resistant to the domestic main stem rust races, but also to the new virulent pathogen Ug99 (TTKSK) and its variants races TTKST and TTTKS. The microsatellite markers closely linked to Sr22 were screened to be gene diagnose for resistant germplasm and varieties. Sr22 gene in wheat cultivars was identified by using a SSR marker Xcfa2019, the marker with good repeatability and high accuracy and could be therefore used for the identification of Sr22 in wheat breeding programs. The results indicated that 0 genotype carried the resistance gene among the 58 improved resistant Ug99 wheat cultivars from abroad and domestic, and 3 genotypes carried the resistance gene among the 18 main cultivars of Heilongjiang, with a frequency of 4.0%. It reflected that Sr22 occupied a certain proportion in Heilongjiang main plant cultivars and it should be continue to strengthen use of Sr22 in wheat breeding program in the future.

Key words: Sr22; wheat stem rust; Ug99; molecular detection