

实验方法与技术

Experimental Method & Technology

抗黄矮病小麦新品系的分子标记检测研究

王红梅¹, 王浩瀚², 岳维云³, 张正英¹, 欧巧明¹, 陈玉梁^{1*}

(1. 甘肃省农业科学院生物技术研究所, 兰州 730070; 2. 甘肃省张掖市农业科学研究所, 张掖 734000;
3. 甘肃省天水市农业科学研究所中梁试验站, 天水 741000)

摘要 本研究对以小麦-中间偃麦草异附加系 L1 和小麦-中间偃麦草部分双二倍体‘无芒中 4’为抗源选育出的抗黄矮病小麦新品系进行分子检测和抗病性鉴定。通过应用 RAPD、SSR、SCAR 3 种分子标记 OPF15、Xgwm37、SC-W37 进行分子检测,并采用人工接种和大田自然感病的方式进行抗黄矮病鉴定,筛选到了‘93646’、‘2003-2’等高抗黄矮病的小麦新品系。分子检测抗黄矮病基因与田间抗病鉴定结果基本一致,应用的 3 种 PCR 标记都可以检测出抗病材料,但 SCAR 标记 SC-W37 特异性强、稳定性好,可在小麦抗黄矮病育种早代选择过程中发挥重要作用。

关键词 小麦黄矮病; 分子标记; 检测; 抗病鉴定

中图分类号: S 435.121.49 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2012.03.019

Detection of wheat lines with resistance to *Yellow dwarf virus* by molecular markers

Wang Hongmei¹, Wang Haohan², Yue Weiyun³, Zhang Zhengying¹, Ou Qiaoming¹, Chen Yuliang¹

(1. Institute of Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China;

2. Zhangye Institute of Agricultural Sciences, Gansu 734000, China;

3. Zhongliang Station of Agricultural Sciences, Tianshui Institute of Agriculture, Gansu 741000, China)

Abstract Some BYDV translocation lines were studied by using wheat-*Thinopyrum* intermedium the addition line L1 and a partial amphiploid ‘Zhong 4 awnless’ as the resistance parents. This translocation lines were used to screen molecular markers and identification of disease resistance. A RAPD marker OPF15, SSR marker Xgwm37 and SCAR marker SC-W37 were developed for the BYDV resistance. Some new strains with excellent BYDV resistance were selected by identification of disease resistance and molecular marker, including ‘2003-2’ and ‘93646’. The results showed that the BYDV resistant materials could be detected by PCR markers. The SCAR marker SC-W37 had high specificity and good reliability, which might play an important role in early-generation selection in wheat breeding.

Key words Barley yellow dwarf virus (BYDV); molecular marker; detection; identification of disease resistance

小麦黄矮病是小麦主要病害之一,由蚜虫传播大麦黄矮病毒(*Barley yellow dwarf virus*, BYDV)引起,有“黄色瘟疫”之称^[1],世界上许多小麦主产国常因黄矮病而遭受巨大损失。近年来随着干旱、暖冬现象的发生,麦长管蚜、麦二叉蚜越冬基数明显上升,由于其较强的传毒能力,导致小麦黄矮病在部分区域频繁流行,造成小麦减产 20%~

40%,局部严重地块高达 60%以上^[2-4]。小麦近缘种属中的中间偃麦草是小麦黄矮病的重要抗源,许多学者用它育成了抗 BYDV 的双二倍体、二体附加系和易位系等抗源材料^[5-7],现已成为国内外小麦育种的重要种质资源,也有采用辐射诱变、单倍体育种、转基因技术等创造了许多抗病新种质^[8-9]。

在 BYDV 抗性基因向优良小麦品种的转育过程

收稿日期: 2011-06-22

修订日期: 2011-08-28

基金项目: 甘肃省农业生物技术与应用开发项目(GNSW-2004-03, GNSW-2011-07)

* 通信作者 E-mail: chenyl925@163.com

中,一般通过抗病性鉴定来跟踪抗病基因的遗传性。传统的表型鉴定要经过多年田间自然发病或接毒蚜鉴定,常受到饲毒蚜虫、发病条件、季节和经验等因素的限制,而且在田间一年只能鉴定一次抗病材料,严重制约着抗 BYDV 小麦育种的进程。基于 PCR 技术的 DNA 分子标记,则可克服上述局限,具有操作简便、灵敏、快速,更适于对田间育种群体的早代选择^[10-11],因此,建立稳定的特异 PCR 标记非常必要。

本研究应用分子标记技术对近年来以‘无芒中 4’和‘L1’为抗源育成的品种(系)做了研究,并结合田间黄矮病鉴定分析,辅助筛选到了高抗黄矮病小麦新品系。

1 材料和方法

1.1 材料

植物材料包括天水市农科所以‘无芒中 4’(2n=56)为抗源育成的品种(系)‘中梁 22’、‘90304’、‘93646’、‘远中’、‘87300’、‘81995’和张掖市农科所以‘L1’(2 n=44)为抗源育成的品种(系)‘张春 11 号’、‘张春 17 号’、‘张春 20 号’、‘2003-2’、‘2003-3’、‘2003-4’、‘2003-5’等;黄矮病鉴定以上述材料中的新品系为主,包括‘2003-2’、‘2003-3’、‘2003-4’、‘2003-5’、‘81995’、‘90304’、‘93646’以及小麦常规品种‘陇辐 2 号’、‘张春 20 号’。分子标记以‘无芒中 4’为抗性对照,抗病鉴定以‘无芒中 4’和‘定蓓 4 号’为抗病对照和感病对照。

1.2 方法

1.2.1 抗病基因的分子标记

小麦 DNA 提取采用 CTAB 法,PCR 反应体系 25 μ L,其中包含 10 mmol/L Tris-HCl pH8. 3, 1. 8 mmol/L MgCl₂, 0. 2 μ mol/L dNTP, 0. 25 μ mol/L 引物, 1 U *Taq* 酶, 约 30 ng 基因组 DNA。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 3 min, 35 个循环(94 $^{\circ}$ C 45 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s), 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。引物的退火温度范围为 50~63 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C 反应结束。RAPD 的 PCR 反应为 45 个循环, 退火温度为 36 $^{\circ}$ C。扩增产物用 2%~3% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果用凝胶成像扫描仪拍照并保存。试验中所用生化试剂均为分析纯, 引物由大连宝生物技术有限公司合成, DNA *Taq* 酶和电泳试剂购自上海生工。参照文献报道^[12], Xg-wm37 和 SC-W37 标记与抗黄矮病基因紧密连锁,

目标片段为 450 bp; RAPD 标记 OPF15^[13] 的扩增产物在 880、650bp 和 500 bp 处出现 3 条与抗黄矮病基因相关的谱带。

1.2.2 小麦黄矮病抗性鉴定

1.2.2.1 鉴定方法

苗期鉴定试验由甘肃省农科院植保所在甘谷试验站完成, 采用了人工接种和自然感病两种方式进行。人工接种在小麦拔节期开始, 首先将塑料棚内在燕麦上扩繁的麦二叉蚜、禾谷缢管蚜和麦长管蚜(主要传播黄矮病 GAV、GPV 株系)从寄主上分离, 放入大培养皿盖严, 饥饿 12 h 后, 再将经过大量扩繁的具有大麦黄矮病典型症状的燕麦叶片剪成 1~2 cm 的小段, 放入大培养皿盖严, 饲毒 24 h, 最后将上述带有蚜虫的病叶用镊子轻轻接到被鉴定的材料和对照材料上, 接种时每株确保接种混合蚜虫 10 头, 之后放入防虫网罩内, 在适当的水肥条件下生长。自然感病指在大田条件下自发黄矮病, 在试验结束之前不喷药杀虫。

1.2.2.2 病情调查、病害分级及抗性评价标准

病情调查在小麦扬花期和灌浆期进行, 对每份材料逐株记载发病情况, 并进行群体的病害分级和平均严重度计算。分级标准参照国家农业行业标准小麦抗病虫害性评价技术规范 NY/T 1443. 6-2007(表 1、表 2)。

表 1 小麦黄矮病成株期病害分级标准	
严重度分级	划分标准
0 级	所有叶片无黄化
1 级	部分叶片尖端黄化
2 级	旗叶下 1~2 片叶叶尖黄化
3 级	旗叶黄化面积占旗叶总面积的 1/2 以下, 其他叶片黄化面积占总叶面积 1/2 以下
4 级	旗叶黄化面积占旗叶总面积的 1/2 以上, 其他叶片黄化面积占总叶面积 1/2 以上
5 级	几乎所有叶片完全黄化, 植株矮化显著, 穗变小甚至不抽穗

抗性评价标准是依据成株期鉴定材料的平均严重度分级来评价其抗性水平, 具体评价标准见表 2。

表 2 小麦成株期对黄矮病的评价标准	
平均严重度分级	抗性
0	免疫(I)
0<平均严重度<1. 0	高抗(HR)
1. 0≤平均严重度<2. 0	抗病(R)
2. 0≤平均严重度<3. 0	中抗(MR)
3. 0≤平均严重度<4. 0	感病(S)
4. 0≤平均严重度	高感(HS)

计算公式: $\bar{S}(\%) = \sum_{i=1}^n (X_i \cdot S_i) / \sum_{i=1}^n X_i$,式中: $\bar{S}$ —平均严重度; i —病级数(1~ n); X_i —病情为*i*级的单元数; S_i —病情为*i*级的严重度值。

2 结果与分析

2.1 抗病基因检测

采用 RAPD、SSR 和 SACR 分子标记,对抗病对照‘无芒中 4’及各供试材料进行检测,结果如图 1~图 3 所示。RAPD 标记 OPF15 在‘无芒中 4’和大多供试材料中,可扩增出 3 条大约 880、650bp 和 500 bp 与抗黄矮病基因相关^[12]的条带,而春小麦品系‘2003-4’例外,没有此 3 条特异条带。试验经 3 次重复,结

果稳定。SSR 标记 Xgwm37 的扩增产物中,‘无芒中 4’和‘93646’有 1 条约 450 bp 的特异带,‘2003-2’有 1 条约 300 bp 的条带,该 DNA 片段与抗病基因相关^[6,12],‘远中’等材料 PCR 扩增产物电泳谱带模糊不清,难以分辨。采用由 Xgwm37 转化而来的 SACR 标记 SC-W37 的扩增产物中,同样除春小麦品系‘2003-4’无扩增以外,‘无芒中 4’和所有检测品种(系)都有 450 bp 左右的清晰条带,尤其‘无芒中 4’、‘93646’、‘2003-2’、‘张春 17 号’、‘张春 20 号’和‘陇辐 2 号’都出现了强带,则证明了这些材料携带抗黄矮病基因。因此,通过分子标记检测可以确定,春小麦品系‘2003-4’为感病材料,其余供试材料携带与抗黄矮病相关的基因。

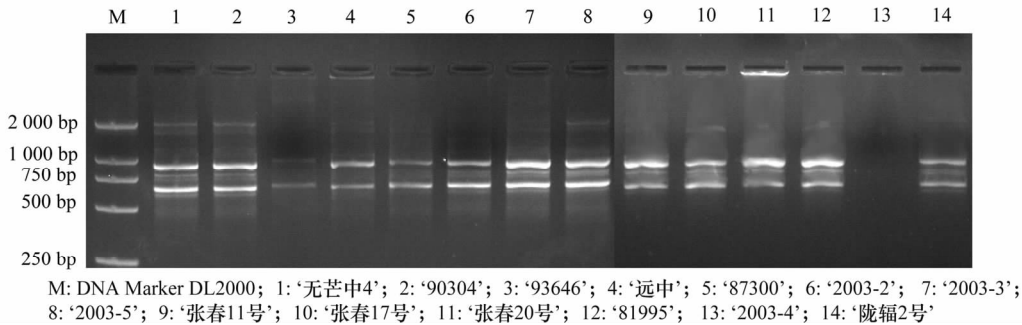


图 1 RAPD 标记 OPF15 分子检测

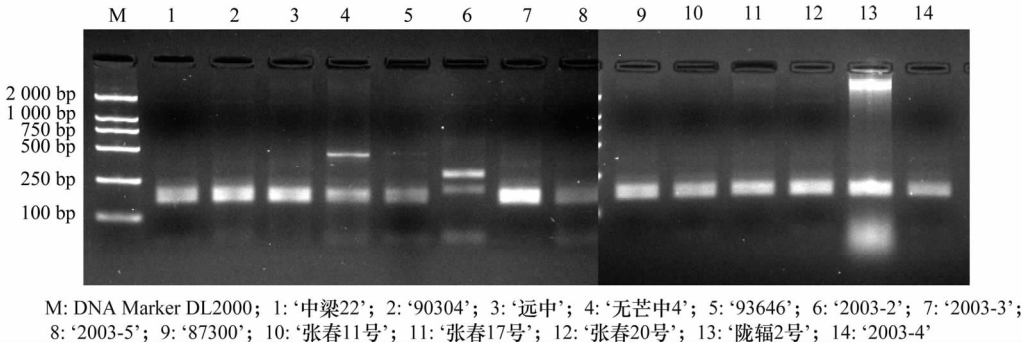


图 2 SSR 标记 Xgwm37 分子检测

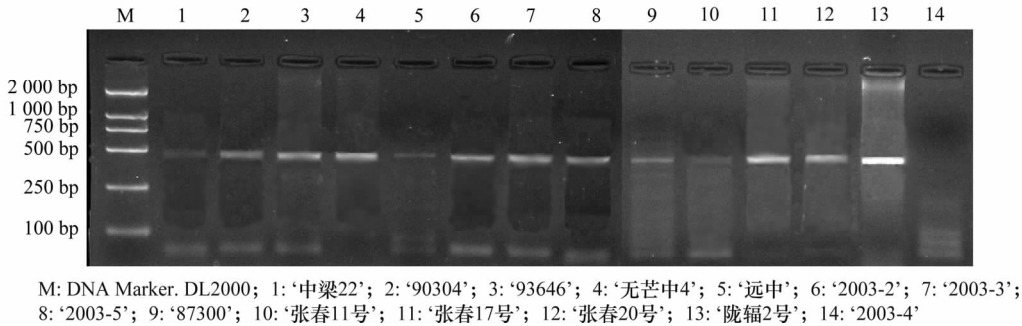


图 3 SCAR 标记 SC-W37 检测结果

2.2 小麦抗黄矮病鉴定结果

将人工接种和自然感病两种方式下的发病情况作了详细观察,进行了群体病害分级,记录了抗、感病株数,依据平均严重度分级标准对鉴定材料作了抗性评价,结果如表 3 所示。从中可以看出,与对照‘无芒中 4’相比,9 份供鉴材料在整体上抗病性较强,高抗材料占 67%,高抗新品系占 56%,说明这些品系对甘肃地区流行的黄矮病株系表现出有效抗性。其中春小麦新品系有‘2003-2’、‘2003-5、和‘81995’表现较好,抗性水平优于常规抗病品种‘张春 20 号’。冬小麦品系‘90304’、‘93646’均表现为高抗,抗性水平接近对照‘无芒中 4’。从人工接种毒蚜和自然感病两种鉴定方式来看,结果高度一致,相同检出率 72.7%,但自然感病条件下平均

严重度普遍高于人工接种,这与复杂的自然生态环境条件有关。

2.3 分子检测与抗病鉴定比较

供试材料在室内分子检测和田间抗病性鉴定中,对于感病和抗病材料的判定其结果非常一致,同时确定春小麦品系‘2003-4’为感病材料,其余的全部为抗病材料,但抗病能力的高低不是分子标记所能检测出来的,还是要通过田间抗病表现来确定。一般分子标记检测的灵敏性非常高,它能快速准确地检测到供试材料中抗病基因的有无,甚至能辨别出纯合的或杂合的基因型,因此,对育种中的大量早代分离群体采用分子标记进行辅助选择具有常规育种不可比拟的优越性。

表 3 鉴定材料成株期黄矮病抗性

品种/系	人 工 接 种			自 然 感 病			总体抗性
	抗株/感株	平均严重度	抗 性	抗株/感株	平均严重度	抗性	
陇辐 2 号	71/10	0.25	HR	68/28	0.77	HR	HR
张春 20	72/8	0.30	HR	15/70	2.80	MR	MR
2003-5	78/6	0.18	HR	46/30	0.97	HR	HR
2003-3	72/10	0.42	HR	44/31	1.01	R	R
2003-4	19/61	2.53	MR	11/117	3.84	S	S
2003-2	76/5	0.10	HR	75/21	0.55	HR	HR
81995	77/8	0.22	HR	55/31	0.84	HR	HR
93646	78/11	0.29	HR	70/25	0.38	HR	HR
90304	76/11	0.44	HR	100/15	0.52	HR	HR
无芒中 4(抗病对照)	93/2	0.02	HR	68/8	0.25	HR	HR
定莠 4 号(感病对照)	31/89	3.60	S	10/125	3.63	S	S

3 讨论

在本研究中利用 OPF15 标记在除‘2003-4’之外的所有材料中检测到了 880、650、500 bp 的与抗病基因相关的目标片段,3 次重复结果稳定一致。Xgwm37 标记引物特异性强,对试验要求非常严格,PCR 扩增效率低,只在‘无芒中 4’和‘93646’两个材料中有可分辨出的 450 bp 的目标条带,而由其转化而来的 SCAR 标记 SC-W37 标记在除‘2003-4’之外的其他材料中检测到了抗性基因。因此,要更准确、快捷地进行抗病基因的检测和筛选,发掘与抗性基因紧密连锁或共分离的共显性 PCR 标记尤为必要。

利用分子标记技术从基因型进行抗病基因的检测和筛选,表现出了灵敏、快速、高效等优点,但抗病能力的高低仍要通过常规鉴定才能得以确定,将分子标记技术与常规育种紧密结合,才能更有效地对农作物进行定向改良。

在大田条件下的病害严重度大于人工接种,原因是

在土壤、风媒、大量虫媒等综合复杂因素影响下感染的病毒种类和数量远大于人为控制因素,因此产生的病害更为严重,相应的其鉴定结果更准确。但在育种的早代选择阶段,采用人工接种方式在小范围内进行抗病虫鉴定无疑会提高选择的高效性和加快选择进程。

参考文献

[1] Burnett P A, Comeau A, Quatset C O. Host plant tolerance or resistance for control of barley yellow dwarf[R]//D'Arcy C J, Burnett P A, eds. Barley yellow dwarf: 40 years of progress. APS Press, 1995, 321 - 343.

[2] 冯崇川. 小麦黄矮病对冬小麦产量损失的分析估计[J]. 植物保护, 1984, 10(3): 2 - 4.

[3] Schoeny A, Jeuffroy M H, Lucas P. Influence of take-all epidemics on winter wheat yield formation and yield loss[J]. Phytopathology, 2001, 91(7): 694 - 701.

[4] McKirdy S J, Jones R A C. Quantification of yield losses caused by Barley yellow dwarf virus in wheat and oats[J]. Plant Disease, 2002, 86(7): 769 - 773.

- [7] Se Jeong Jangs, Seung Hwan Heo, Chang Soon Jang, et al. Races and Dominant population of Chinese cabbage clubroot pathogen, *Plasmodiophora brassicae* in Korea [J]. Research in Plant Disease, 2007, 13(1): 45 - 49.
- [8] Koji Kageyama, Yoriko Kamimura, Mitsuro Hyakumachi. A simple inoculation method with a single resting spore of *Plasmodiophora brassicae* [J]. 日植病报, 1996, 61: 415 - 418.
- [9] Xue S, Cao T. Isolation and variation in virulence of single-spore isolates of *Plasmodiophora brassicae* from Canada [J]. Plant Disease, 2008, 92(3): 456 - 462.
- [10] 杨佩文, 李家瑞, 杨勤忠, 等. 十字花科蔬菜根肿病菌休眠孢子的分离与检测 [J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(3): 301 - 303.
- [11] Föhling M, Graf H, Siemens J. Characterization of a single-spore isolate population of *Plasmodiophora brassicae* resulting from a single club [J]. Journal of Phytopathology, 2004, 152(7): 438 - 444.
- [12] Williams P H. A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga [J]. Phytopathology, 1966, 56: 624 - 626.
- [13] 沈向群, 聂凯, 吴琼, 等. 大白菜根肿病主要生理小种群分化鉴定初报 [J]. 中国蔬菜, 2009(8): 59 - 62.
- [14] 肖崇刚, 郭向华. 十字花科蔬菜根肿病菌的生物学特性研究 [J]. 菌物系统, 2002, 21(4): 597 - 603.
- [15] 孙保亚, 沈向群, 郭海峰, 等. 十字花科植物根肿病及抗病育种研究进展 [J]. 中国蔬菜, 2005(4): 34 - 37.
- [16] 吉川宏昭. アブラナ科野菜の根こぶ病抵抗性育种に関する研究 [J]. 野菜、茶业试验场研究报告 (野菜、花卉), 1993, A7: 61 - 68.
- [17] 唐文华. 北京十字花科蔬菜根肿病的发生和鉴定 [J]. 植物保护, 1990, 16(1): 17 - 18.
- [18] 章元寿. 植物病理生理学 [M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1993.
- [19] 吕理乐. 十字花科蔬菜根肿菌 [J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(2): 134 - 136.
- [20] Lammmerink J. Physiological specialization of *Plasmodiophora brassicae* Wor. New Zealand [J]. Agriculture Research, 1964, 7: 37 - 41.
- [21] Castlebury L A, Maddox J V, Glawe D A. A technique for the extraction and purification of viable *Plasmodiophora brassicae* resting spores from host root tissue [J]. Mycologia, 1994, 86: 458 - 460.
- [22] Rarisawa K, Kageyama K, Hashiba T. Efficient root infection with single resting spores of *Plasmodiophora brassicae* [J]. Mycological Research, 1996, 100(7): 855 - 858.
- ~~~~~
- (上接 89 页)
- [5] 贾继增. 小麦抗黄矮病的基因及抗源 [J]. 国外农学-麦类作物, 1991(3): 44 - 46.
- [6] Ayala L, Van Ginkle M, Khairallah M, et al. Expression of *Thinopyrum intermedium*-derived barley yellow dwarf virus resistance in elite bread wheat background [J]. Phytopathology, 2001, 91(1): 55 - 62.
- [7] 武东亮, 辛志勇, 陈孝, 等. 抗黄矮病普通小麦—偃麦草异附加系、异代换系的选育和鉴定 [J]. 中国科学 (C 辑), 1999, 29(1): 62 - 67.
- [8] 辛志勇, 徐惠君, 陈孝, 等. 应用生物技术向小麦导入黄矮病抗性的研究 [J]. 中国科学 (B 辑), 1991, 21(1): 36 - 42.
- [9] 成卓敏, 何小源, 陈彩层, 等. 应用基因工程创造抗黄矮病毒转基因小麦新种质 [J]. 植物保护, 1996, 19(3): 8 - 20.
- [10] 马有志, 徐琼芳, 辛志勇, 等. 抗黄矮病小麦种质的分子标记 [J]. 作物学报, 1999, 25(4): 433 - 436.
- [11] 张增艳, 辛志勇, 马有志, 等. 用分子标记定位源于中间偃麦草的小麦抗黄矮病基因 [J]. 中国科学 (C 辑), 1999, 29(4): 413 - 417.
- [12] 张增艳, 辛志勇, 陈孝, 等. 源于 L1 的小麦抗黄矮病基因的特异 PCR 标记及辅助育种的研究 [J]. 作物学报, 2002, 28(4): 486 - 491.
- [13] 孙光祖, 李忠杰, 李希臣, 等. 抗大麦黄矮病小麦新品系选育及其 RAPD 分子验证 [J]. 核农学报, 2000, 14(2): 72 - 75.