

小麦黄花叶病抗性鉴定及抗性亲本简单重复序列 多态性分子标记的筛选

魏 玮¹, 李俊敏², 孙丽英³, 戎均康¹, 周 伟¹

(1. 浙江农林大学 农业与食品科学学院 浙江省农产品品质改良技术研究重点实验室, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省农业科学院 浙江省植物有害生物防控重点实验室, 浙江 杭州 310021; 3. 西北农林科技大学 植物保护学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 小麦梭条斑花叶病毒(wheat spindle streak mosaic virus, WSSMV)又名小麦黄花叶病毒(wheat yellow mosaic virus, WYMV)是造成小麦 *Triticum aestivum* 减产的重要病害。不同的小麦品种对 WYMV 病害的抗性表现相当复杂。推广抗性品种是防止 WYMV 大面积田间发病的有效措施。以从国内外收集到的 527 个小麦品种/系为材料, 对其 WYMV 抗性进行了病圃鉴定, 筛选抗性稳定的品种/系, 并以其中推广面积较大的 WYMV 抗性和敏感品种为亲本筛选在抗性和敏感亲本间具有多态性的简单重复序列(SSR)标记。结果表明: 527 个候选材料中只有 10 个品种/系的抗性相对比较稳定。以其中 3 个推广面积较大的 WYMV 抗性品种‘丰抗 1 号’ *T. aestivum* ‘Fengkang 1’, ‘石家庄 72’ *T. aestivum* ‘Shijiazhuang 72’, ‘郑麦 9023’ *T. aestivum* ‘Zhengmai 9023’ 以及 2 个推广面积较大的 WYMV 敏感型品种‘扬麦 158’ *T. aestivum* ‘Yangmai 158’ 和‘烟农 22’ *T. aestivum* ‘Yangnong 22’ 为亲本, 筛选在抗性和敏感亲本间具有多态性的 SSR 标记。结果表明: ‘丰抗 1 号’/‘扬麦 158’ 和‘石家庄 72’/‘扬麦 158’ 间的简单重复序列多态性最大, 分别为 64.0% 和 63.3%。因此, 以 WYMV 抗性品种‘丰抗 1 号’和‘石家庄 72’, 以及 WYMV 敏感品种‘扬麦 158’ 为亲本材料构建作图群体更有利于利用分子标记对控制 WYMV 抗性数量性状位点(QTLs)进行精细定位和目标基因的图位克隆。图 2 表 3 参 17

关键词: 植物保护学; 小麦; 分子标记; 黄花叶病毒; 抗性

中图分类号: S435.121; S432.21 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-0756(2016)01-0071-09

Selection of wheat having resistance to yellow mosaic virus and screen out SSR molecular markers having polymorphism between resistant and sensitive parents

WEI Wei¹, LI Junmin², SUN Liying³, RONG Junkang¹, ZHOU Wei¹

(1. The Key Laboratory for Quality Improvement of Agricultural Products of Zhejiang Province, School of Agriculture and Food Science, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Key Laboratory of Pest and Disease Control Zhejiang Province, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, Zhejiang, China; 3. College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

Abstract: Wheat yellow mosaic virus (WYMV), one of the most devastating diseases of cereals, also called wheat spindle streak mosaic virus (WSSMV), has different effects on different cultivars of wheat. Breeding and

收稿日期: 2015-03-27; 修回日期: 2015-06-01

基金项目: 浙江省科技创新活动计划(新苗人才计划)项目(2014R412048); 浙江省植物有害生物防控重点实验室开放基金资助项目(2010DS700124-KF1103); 浙江省早粮农业新品种选育重大科技专项(2012C12902-2-6); 浙江省科技创新团队项目(2011R50026-23); 浙江省自然科学基金资助项目(LQ12C13003)

作者简介: 魏玮, 从事植物种质资源创新研究。E-mail: 1187374847@qq.com。通信作者: 周伟, 副教授, 博士, 从事植物分子遗传与种质资源创新研究。E-mail: zhouwei19810501@163.com

growing resistant cultivars is one of the most effective method to defense WYMV. Selection of suitable parents for the formation of mapping population for QTLs mapping involved in WYMV is a basic work to breed new WYMV resistant cultivars. In this study, 527 different cultivars / lines of wheat from different districts at home and abroad were introduced and identified in disease plots with three different experimental plots and three replications each plot. Then polymorphic simple sequence repeats (SSRs) markers were screened out between resistant and sensitive parents which had a larger planting area than other wheat cultivars. Results showed that only ten of the 527 candidate materials had a relatively more stable WYMV disease resistance. Three WYMV resistant wheat cultivars out of ten resistant materials including 'Fengkang 1' 'Shijiazhuang 72' and 'Zhengmai 9023' and two sensitive wheat cultivars with a wider planting area, 'Yangmai 158' and 'Yan-nong 22', were selected for further comparison. Higher polymorphic rates were obtained with the parental group of 'Fengkang 1' and 'Yangmai 158' (64.0%) and the parental group of 'Shijiazhuang 72' and 'Yangmai 158' (63.3%) than other groups. Therefore, using WYMV resistant cultivars 'Fengkang 1' and 'Shijiazhuang 72', along with WYMV sensitive parent 'Yangmai 158' to form mapping populations would be more opportune for fine mapping of quantitative trait locus (QTLs) involved in WYMV resistance and map-based gene cloning. [Ch, 2 fig. 3 tab. 17 ref.]

Key words: plant protection; *Triticum aestivum*; molecular marker; yellow mosaic virus; resistance

小麦黄花叶病(wheat spindle streak mosaic virus, WSSMV)是由土壤习居性真菌——禾谷多黏菌 *Polymyxa graminis* 传播的一类病毒病害。其主要病原物为小麦黄花叶病毒(wheat yellow mosaic virus, WYMV)隶属于马铃薯Y病毒科 Potyviridae 大麦黄花叶病毒属 *Bymovirus*^[1]。目前,小麦黄花叶病广泛分布于中国长江中下游、西南四川盆地、黄淮以及陕西渭河流域等冬小麦 *Triticum aestivum* 种植区。近年来,由于中国农业机械化及大型农机具跨区作业的推广,使得土传病毒病原迅速蔓延,小麦黄花叶病发生面积不断扩大。加之生产中缺乏品种抗病性分析,无法避免感病品种大面积种植,导致病害发生程度逐年增加,对中国小麦的安全生产造成极大的危害。由于禾谷黏多菌 *Polymyxa graminis* 产生的休眠孢子菌团具有极强的抗逆性,能够持久性携带和传播病毒,使得此病害难以采用常规的物理、化学和生物的方法进行防控,对小麦生产构成了严重的威胁。目前,世界各地对小麦病毒病的防治主要是通过选育抗病良种并辅以栽培管理,但是生产中缺乏优质高(稳)产多抗的品种,单一抗病品种的大面积种植容易增大选择压力,加快了抗性丧失。特别是在气候、栽培耕作变化时容易引起次要病害大流行。如何得到广谱抗(耐)病良种仍然是今后小麦抗病育种的重点。小麦对黄花叶病的抗性表现复杂,先前研究表明:小麦对黄花叶病的抗性表现为显性核遗传,是由一到多对基因控制的^[2-3]。不同来源的材料之间遗传背景各异,同时病害的发生又与环境因素密切相关^[4-7]。因此,不同研究之间的可比性相对较差。本研究以从国内外收集的 527 份小麦品种/系为材料,分别在山东烟台、河南驻马店和江苏高邮的 WYMV 病圃进行鉴定,期望筛选获得 WYMV 抗性稳定的抗原材料。在此基础上以鉴定出的推广面积相对较大的抗性和敏感型小麦为亲本,筛选在所选材料间具有最大比率多态性的 SSR 分子标记信息,为利用简单重复序列(SSR)分子标记对 WYMV 抗性数量性状位点(QTLs)进行精细定位以及选育 WYMV 抗性品种奠定工作基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

从国内外收集到的 527 个普通小麦品种(系)。包括:北京 6 号,临优 2069,京双 16,西农 2208,邯 6172,小偃 5 号,郑麦 9023,丰抗 1 号,石家庄 72,京红 4 号,山西平遥小白麦,华北 672,金光麦,中育 6 号,有芒红 18 号,有芒 448,有芒白 4 号,陕麦 150,淮麦 20,长 6359,有芒红 8 号,石品 83,小偃 168,太原 567,临农 1 号,临农 2 号,郑麦 366,陕优 225,烟农 15,皖麦 52,新麦 20,北京 5 号,晋麦 10 号,陕 229,鲁农 116,代 179,丰抗 5 号,徐州 15,京花 1 号,北京 11,北京 841,双丰收,北京 14,北京 13,济南 14,丰抗 3 号,丰麦 2 号,湘农 3099,良星 99,郑州 24,济南

4 号, 农大 198, 鄂麦 25, 矮秆早, 丰抗 8 号, 丰抗 9 号, 丰抗 10 号, 蜀万 8 号, 北京 10 号, 旱选 1 号, 豫麦 70-36, 洲元 936, 陕 627, 济麦 21, 尤皮 1 号, 德选 1 号, 丰抗 4 号, 鲁麦 2 号, 京 411, 绵阳 4 号, 许跃 6 号, 商洛 76-8715, 濮优 938, 烟农 21, 郑农 16, 泛麦 5 号, 衡 7228, 郑州 15, 济南 2 号, 丰抗 2 号, Rieti 75, 郑引 4 号, 小偃 54, 南农大 96C076, 山东 95519, 长武 134, 洛夫林 13, 尤皮 2 号, 青春 1 号, 丰强 7 号, 陕麦 175, 蒲临 5 号, 凤麦 13, 鲁麦 17, 临农 11, 西安实心麦, 衡观 136, 有芒红 7 号, 郑麦 98, 昌乐 5 号, 科冬 81, 京冬 1 号, 安徽 3 号, 冀麦 24, 荆麦 66, 科农 199, 京作 278, 鄂麦 11, 临麦 4 号, 庆选 15, 京作 236, 长丰 1 号, 京旺 9 号, 北京 8694, 卫东 4 号, 宁麦 3 号, 石家庄 407, 泗麦 2 号, 绵麦 1403, 新麦 9817, 山农 189, 欧柔, Heine Hvede, 青春 2 号, 邢选 7 号, 徐州 14, 温麦 8 号, 望麦 15, 苏州 7829, 宁麦 13, 淮麦 8 号, 烟 5158, 农大 45, 豫麦 10 号, 皖麦 18, 陕 8242, 波苏 1 号, 黔欢 2, 商洛 76-08710, 商洛 76-8718, 鄂 26046, 绵麦 185, 绵麦 37, 绵麦 45, 皖麦 36, 豫麦 25, 豫麦 52, 郑农 17, 周麦 19, 鄂麦 16, 洛早 6, 太空 6 号, 温麦 18, 有芒白 2 号, 南原 1 号, 云麦 25, 南大 8 号, 陕 7587, 湘 1445, 高优 505, 小偃 803, 豫麦 41, 郑麦 9405, 陕 159, 昌淮 18, 望麦 17, 百农 878, 百农 9904, 北京 0045, 科麦 10 号, 扬 06G86, 镇麦 4 号, 中育 10 号, 鄂麦 17, 温麦 7 号, 许科 1 号, 北京 8 号, 西农 6028, 碧玉麦, 北京 16, 荆州 66 号, 视察 15, 镇麦 1 号, 宁麦 9 号, 南大 2419, 苏麦 1 号, 淮麦 16 科麦 13, 漯麦 4 号, 绵麦 46, 宁糯 1 号, 平安 3 号, 新麦 9 号, 豫麦 34, 豫麦 49, 豫优 1 号, 豫麦 49-168, 江东门, 碧玛 2 号, 西峰 9 号, 丰抗 15, 安徽 9 号, 敌锈早, 百农 3217, 扬麦 10 号, 小偃 4 号, 临农 5 号, 川 578, 临农 12, 农 14, 荆州 7561, 郑州 6811, 陕 76, 陕兴 336, 宁麦资 32, 凡 415, 花培 2 号, 淮麦 18, 连麦 1 号, 连麦 2 号, 陕麦 229, 同舟麦 916, 西农 2000, 豫麦 47, 豫麦 70, 豫农 201, 镇麦 5 号, 鲁麦 21 号, 陕农 138, 优麦 8004, 郑育麦 958, 小偃 6 号, 临汾 5064, 华中 6 号, 石家庄 34, 晋麦 21, 偃大 26, 苏麦 2 号, 矮 73, 中梁 11, 白芒麦, 商洛 76-8712, 商洛 76-0879, 商洛 76-0872, 西客 108D6, 阜麦 936, 旱抗 4118, 洪育 2 号, 淮麦 17, 新原 958, 衡观 35, 襄麦 55, 陕农 78, 碧玛 4 号, 阿勃, 洛夫林 10 号, Virgilio, Etoile de Choisy, 陕农 17, 济南 8 号, 卫东 7 号, 京红 8 号, 内麦 14, 宁丰小麦, 豫麦 17, 万年 2 号, 小偃 96, 临麦 7 号, 临 5507, 泗麦 6 号, 陕 8242-1, 黔欢 3, 高优 503, 宁麦 14, 新麦 208, 偃展 4110, 豫麦 18, 豫麦 36, 金丰 3 号, 兰考矮早 8, 山东 664, 西农 9871, 小偃 216, 烟 5286, 烟农 24, 墨巴 66, 冀麦 36, 京红 9 号, 华麦 7 号, 郑州 17, 郑 6 辐, 郑州 6 号, 偃大 24, 偃大 25, 豫麦 7 号, 偃师 4 号, 内乡 19, 信阳 1 号, 苏麦 3 号, 选 7, 湘麦 10 号, 花培 726, 福农 60112, 福农 50002, 苏州 8332, 郑州 9285, 鄂 34963, 鉴 37, 宁矮 8606, 商洛 76(57)22-8-1, 矮抗 58, 洛新 998, 绵麦 39, 绵麦 42, 双抗 7438, 温优 1 号, 烟农 19, 豫麦 49-198, 豫麦 49-986, 豫麦 58, 周麦 22, 周麦 23, 洛麦 21, 石 H06-402, 西农 3517, 蚂蚱麦, 蚰子麦, 苏联早熟 1 号, 济南 5 号, 鲁沾 1 号, 泰山 1 号, 甘麦 7 号, 香农 3 号, 科春 5 号, 信阳 12, 778, 香农 3 号, 万雅 2 号, 陕 6801-3-1-1, 毕麦 6 号, 尕海 1 号, 淮阴 69-6, 陕 62(9)10-4, 咸农 151, 加 35, 鄂 31846, 科优 1 号, 新麦 18, 华麦 8 号, 临早 51329, 郑州 742, 花培 126, 皖麦 38, 新麦 11, 镇麦 6 号, 武农 148, 9987, 扬麦 5, 扬麦 17, 豫麦 38, 石家庄 54, 京作 208, 有芒白 15, 石 4414, 鄂麦 9 号, 郑引 1 号, 郑州 743, 浙农大 85, 新麦 19, 荆州 1 号, 郑州 683, 襄麦 5 号, 新郑 1 号, 鄂恩 1 号, 鄂麦 18, 藁城 8901, 旱麦 111, 济麦 19, 开麦 18, 科麦 2 号, 科农 9204, 宁麦 11, 宁盐 1 号, 濮麦 9 号, 泰山 23, 温麦 19, 西科麦 2 号, 西科麦 4 号, 西科麦 5 号, 徐麦 27, 徐麦 29, 徐麦 856, 烟农 22, 闫麦 8911, 扬 05-117, 扬 06-164, 扬麦 13, 扬麦 15, 扬麦 158, 豫麦 60, 豫农 035, 豫农 202, 豫农 949, 郑麦 004, 郑麦 9094, 众麦 2 号, 周麦 12, 周麦 16, 周麦 18, 03 中 16, 西农 979, 04 中 36, 百农 160, 科大 9612, 洛早 2, 洛早 7, 濮麦 10 号, 陕麦 139, 陕农 757, 项麦 969, 小偃 22, 扬麦 11, 豫麦 48, 燕大 1817, 五一麦, 阿夫, 早洋麦, 矮孟牛, 繁 6, 农大 139, 碧玛 1 号, 碧玛 5 号, 碧玛 6 号, 鲁 54405, 济宁 3 号, 冀麦 23, 济南 12, 济南 10, 向阳 4 号, 北京 12, 京作 210, 科冬 83, 科春 14, 临汾 10 号, 京 437, 冀麦 30, 安徽 10 号, 绵阳 62, 南农大黑芒, 群众 42, 日喀则 7 号, 日喀则 8 号, 晋麦 20, 晋麦 33, 临麦 6 号, 宁麦 1 号, 扬麦 4 号, 钟山 2 号, 福繁 16, 福繁 17, 绵阳 12, 扬麦 9 号, 鄂 1161, 鄂麦 6 号, 宁麦 8 号, 扬麦 12, 扬麦 13, 扬麦 14, 扬麦 16, 扬麦 18, 扬 85, 扬

92, 冀麦 26, 华北 187, 农大 183, 农大 311, 旱选 10 号, 太原 566, 太原 116, 遂农 3 号, 郑州 722, 内乡 173, 咸农 68, 郑州 721, 叶青(白), 竹叶青(红), 陕 5860, 陕农 21, 云石 1 号, 云麦 35, 开封 10 号, 许昌 26, 宁麦 6 号, 坡川丰, 友谊麦, 川 533, 东白塔 1 号, 郑州 741, 新丰 13, 开中 70, 临农 13, 云麦 27, 平凉 32, 陕 6815, 百泉 565, 京春 70, 陕 62(9)2-1, 克珍, 孟县 2 号, 合春 12, 苏州 7906, 镇 7495, 于城 851, 南召 76144, 陕 76, 南农大 96C181, 黑 86-30, 苏州 7946, 宁矮 8628, 金陵 1 号, 陇春 7 号, 莆麦 1 号, 川 80-466, 川 78001, 多抗 893, 郑麦 982, 济麦 22。

1.2 田间试验设计

所有小麦材料分别于 2009 年, 2010 年和 2011 年的 10 月分别播种于山东省烟台、河南省驻马店和江苏省高邮 WYMV 病圃。播种种子时按行均匀播种 40~50 粒种子·材料⁻¹, 行宽 0.3 m, 行长 1.2 m, 设置重复 3 个·播种地点⁻¹。小麦生长期间进行常规的田间管理, 均匀施肥, 于翌年 3 月进行 WYMV 田间抗性鉴定。

1.3 WYMV 的抗性鉴定方法

参照刘伟华等^[8]和 LIU 等^[9]小麦 WYMV 抗性鉴定的分级方法对参试材料进行鉴定。分级标准为 0 级: 无症状; 1 级: 轻度花叶且叶片不产生梭状条纹症状, 植株不矮化; 2 级: 花叶明显, 梭条或黄花叶症状占叶面积的 1/2 左右, 植株轻度矮化; 3 级: 严重花叶, 梭条或黄花叶症状占叶面积的 3/4 左右, 植株明显矮化。0 级为免疫类型, 1, 2, 3 级为感病类型^[8-10]。

1.4 SSR 多态性分析

3 个 WYMV 抗性品种(‘郑麦 9023’ ‘丰抗 1 号’ 和 ‘石家庄 72’)和 2 个 WYMV 敏感品种(‘烟农 22’ 和 ‘扬麦 158’)分别取叶片组织 0.2 g, 采用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取总 DNA^[11]。所提取的总 DNA 稀释 20 倍后用做 SSR 多态性分析的模板。751 对 SSR 引物参照 Graingene 2.0(<http://wheat.pw.usda.gov>)小麦 SSR 分子标记数据库的信息进行合成。聚合酶链式反应(PCR)扩增反应体系为: 2.5 μL 10×PCR 缓冲液, 0.5 μL 三磷酸碱基脱氧核苷酸(dNTPs), 0.5 μL 上游引物, 0.5 μL 下游引物, 1.0 μL DNA 样品, 0.5 μL *rTaq* 酶, 19.5 μL 无菌水。PCR 反应程序为: 94 ℃ 5 min, 30 个循环(94 ℃ 45 s, 55 ℃ 45 s, 72 ℃ 45 s), 72 ℃ 10 min。采用 80.0 g·L⁻¹ 聚丙烯酰胺凝胶电泳分析 PCR 反应产物, 并用银染法进行 PCR 产物显色分析^[12]。

2 结果与分析

2.1 527 个普通六倍体小麦黄花叶病的抗性鉴定

从国内外收集的 527 个小麦品种分别种植在山东烟台、河南驻马店和江苏高邮等地进行 3 a 3 点的 WYMV 田间抗性鉴定。试验发现: 小麦发病的主要田间症状为: 发病初期, 心叶上出现淡绿色或橙黄色梭形或椭圆形斑点, 然后斑点逐步扩大合并, 发展成为黄绿相间的斑驳或是不规则条纹, 植株生长受到抑制; 发病严重时, 心叶严重失绿, 细弱皱缩或扭曲成畸形, 茎上也出现褪绿线状条斑, 植株生长严重受抑制; 随着气温回升, 植株起身拔节, 花叶病症逐步消失, 新叶无病症。经过鉴定试验共发现在 3 个地点都呈 WYMV 抗性反应的小麦品种共 10 个, 分别为 ‘有芒白 4 号’ ‘陕麦 150’ ‘临优 2069’ ‘京双 16’ ‘西农 2208’ ‘郑麦 366’ ‘陕优 225’ ‘郑麦 9023’ ‘丰抗 1 号’ 和 ‘石家庄 72’, 占有参试小麦品种的 1.90%(表 1); 而在 3 个地点都呈 WYMV 敏感反应的小麦品种共 203 个, 占有参试小麦品种的 38.52%(表 1 仅列出了在山东烟台和江南地区先前推广面积相对较大的 2 个 WYMV 敏感品种)。

表 1 3 个试验点都呈 WYMV 抗性的小麦品种
Table 1 WYMV resistant wheat cultivars in three different experimental plots

品种	3 个试验点 MYMV 抗性		
	山东烟台	河南驻马店	江苏高邮
‘有芒白 4 号’	中抗 MR	高抗 R	中抗 MR
‘陕麦 150’	中抗 MR	高抗 R	中抗 MR
‘临优 2069’	高抗 R	高抗 R	中抗 MR
‘京双 16’	高抗 R	高抗 R	中抗 MR
‘西农 2208’	高抗 R	高抗 R	中抗 MR
‘郑麦 366’	中抗 MR	高抗 R	高抗 R
‘陕优 225’	中抗 MR	高抗 R	高抗 R
‘郑麦 9023’	高抗 R	高抗 R	中抗 MR
‘丰抗 1 号’	高抗 R	高抗 R	高抗 R
‘石家庄 72’	高抗 R	高抗 R	高抗 R
‘烟农 22’	高度敏感 S	高度敏感 S	高度敏感 S
‘扬麦 158’	高度敏感 S	高度敏感 S	高度敏感 S

2.2 不同小麦品种 WYMV 抗性表现的不稳定性分析

分析 527 个小麦品种 3 a 3 点的 WYMV 抗性鉴定结果表明：不同的小麦品种对 WYMV 的抗病反应受地域影响比较大。在冬季和早春雨水相对比较少的河南驻马店地区，3 a 都呈 WYMV 抗性的小麦品种/系为 245 个，占有参试材料的 46.49%(其中高抗占 36.05%，中抗占 10.44%)；而在雨水相对较多，气温能稳定在 10~20 ℃的范围时间相对较长的山东烟台和江苏高邮地区，3 a 都呈 WYMV 抗性的品种/系分别为 32 个和 147 个，分别占参试材料的比率仅为 6.08%和 27.89%。山东烟台地区适宜发病的气温维持相对最长，多雨潮湿的气候特征使得在此地区感病的小麦品种/系达到了 495 个，远多于其他 2 个地区(表 2)。另外，以上 3 个地区 WYMV 致病株也存在一定程度的遗传变异。这些小麦品种对 WYMV 的抗性反应具有地域性特点，使得建立小麦品种抗病性标记显得尤为重要。

表 2 527 个普通小麦品种在 3 个地点 WYMV 抗性的总体鉴定结果

Table 2 Overall appraisal result of 527 wheat cultivars in three different experimental plots

播种地点	WYMV 抗性品种(系)数量和比例/%			
	高抗 R	中抗 MR	高度敏感 S	中度敏感 MS
山东烟台	13(2.47)	19(3.61)	410(77.80)	85(16.13)
河南驻马店	190(36.05)	55(10.44)	203(38.52)	79(15.00)
江苏高邮	77(14.61)	70(13.28)	271(51.42)	109(20.68)

2.3 抗性亲本 SSR 多态性分子标记的筛选

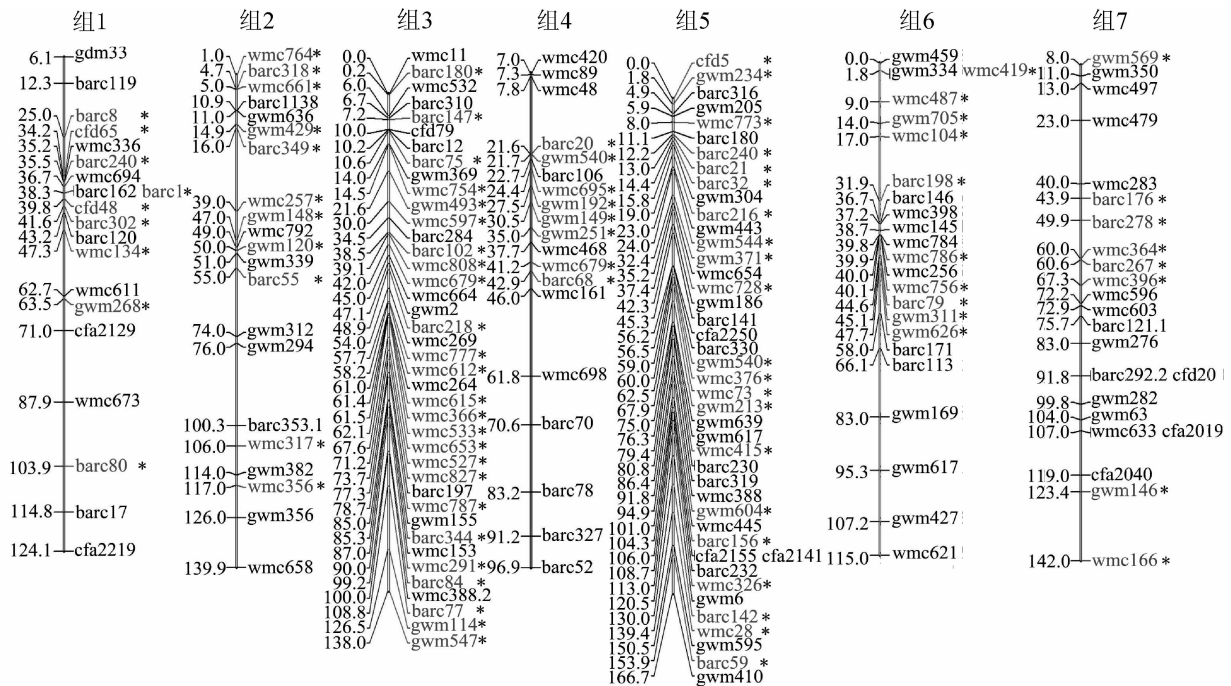
为了对小麦 WYMV 抗性 QTL 进行遗传定位，我们选取种植面积相对较大的 3 个 WYMV 抗性品种(‘郑麦 9023’ ‘丰抗 1 号’和 ‘石家庄 72’)和 2 个 WYMV 敏感品种(‘烟农 22’和 ‘扬麦 158’)分别为抗性和感性材料进行 SSR 多态性分子标记的筛选。参照 Graingene 2.0 小麦分子标记遗传图谱的数据信息，共设计了 751 对覆盖小麦 7 个染色体组的 SSR 引物分别在抗性和感性材料之间进行 SSR 多态性的筛选。研究发现：抗性材料 ‘丰抗 1 号’和感性材料 ‘扬麦 158’之间的 SSR 多态性比率最高，为 64.0%(图 1 和表 3)；其次是 ‘石家庄 72’和 ‘扬麦 158’之间的 SSR 多态性为 63.3%(图 2 和表 3)；‘郑麦 9023’和 ‘扬麦 158’间的 SSR 多态性比率最低为 53.9%(表 3)。

表 3 WYMV 抗病品种和感病品种间 SSR 多态性分析

Table 3 Polymorphic SSR markets analysis of WYMV resistant and sensitive cultivars

染色体	测试数	有效数	①/④		①/⑤		②/④		②/⑤		③/④		③/⑤	
			Y	N	Y	N	Y	N	Y	N	Y	N	Y	N
1A	40	14	6	8	8	6	8	6	10	4	8	6	7	7
1B	40	12	6	6	7	5	8	4	10	2	9	3	6	6
2A	65	21	15	6	15	6	10	11	10	11	10	11	10	11
2B	50	24	13	11	13	11	10	14	11	13	10	14	16	8
3A	46	19	9	10	8	11	16	3	15	4	8	11	13	6
3B	66	36	13	23	23	13	22	14	25	11	26	10	27	9
4A	52	17	9	8	10	7	9	8	11	6	10	7	11	6
4B	43	14	7	7	7	7	11	3	8	6	7	7	9	5
5A	72	33	22	11	16	17	17	16	23	10	17	16	24	9
5B	72	33	23	10	17	16	22	11	21	12	17	16	16	17
6A	41	17	14	3	10	7	13	4	13	4	10	7	12	5
6B	47	18	8	10	8	10	7	11	10	8	12	6	13	5
7A	56	21	13	8	10	11	14	7	15	6	9	12	13	8
7B	61	18	9	9	8	10	8	10	8	10	11	7	11	7
总和	751	297	167	130	130	137	175	122	190	107	164	133	188	109
多态性比率/%		39.5	56.2		53.9		58.9		64.0		55.2		63.3	

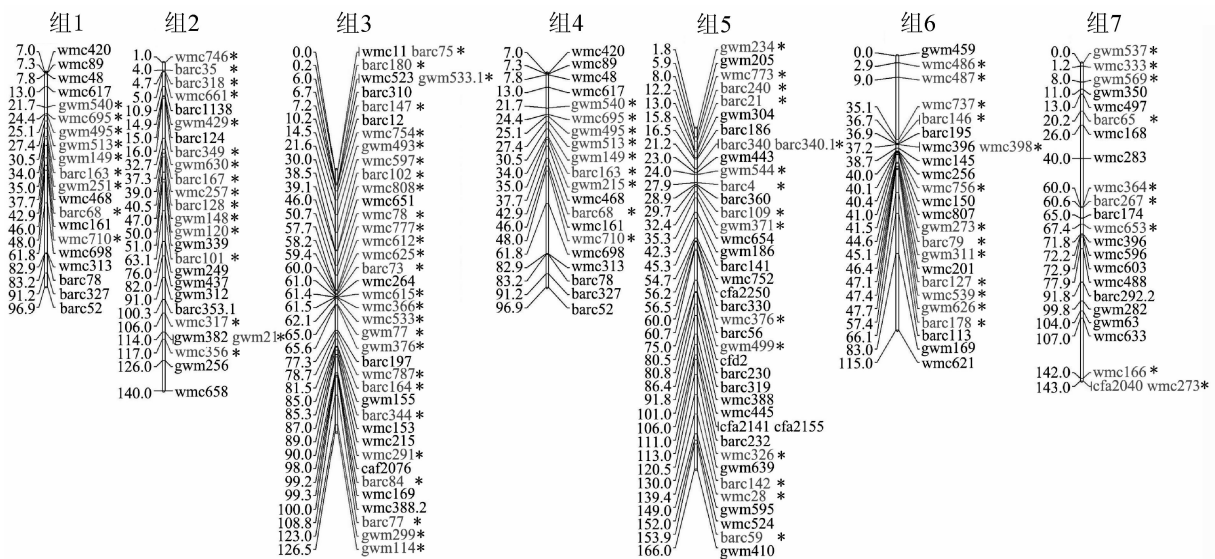
说明：① ‘郑麦 9023’，② ‘丰抗 1 号’，③ ‘石家庄 72’，④ ‘烟农 22’，⑤ ‘扬麦 158’。Y 具多态性，N 不具有多态性。



左边数字参照Graingene 2.0遗传图谱上的遗传距离信息(centi morgem, cM)。
右边未带*号表示小麦A基因组的标记名称,带*号表示B基因组的标记名称。

图1 ‘丰抗1号’和‘扬麦158’之间的多态性SSR标记

Figure 1 Polymorphic SSR markets between ‘Fengfang 1’ and ‘Yangmai 158’



左边数字参照Graingene 2.0遗传图谱上的遗传距离信息(centi morgem, cM)。
右边未带*号表示小麦A基因组的标记名称,带*号表示B基因组的标记名称。

图2 ‘石家庄72’和‘扬麦158’之间多态性SSR标记

Figure 2 Polymorphic SSR markets between ‘Shijiazhuang 72’ and ‘Yangmai 158’

3 结论与讨论

3.1 小麦黄花叶病发病受环境和遗传的双重影响

在田间通过连续3 a对527个小麦材料的抗病性进行鉴定,共筛选获得10个WYMV抗性稳定的品种(系)。试验中还发现:①不同小麦材料对WYMV表现相当复杂,极容易受环境的影响。张宗英等^[13]对国内3个地区(河南潢川、江苏扬州、四川雅安)WYMV病毒核酸和蛋白序列进行了分析,发现不同地区的WYMV病毒核酸和蛋白序列存在着一定的差异,这可能是各地WYMV病害轻重不一的重要因

素。因此, 本试验中同一年份中的同一品种在不同地区的抗病性表现存在较大差异, 推测不同地区的毒株在致病能力方面可能存在较大的差异。烟台地区的毒株致病能力可能更强一些, 使得本来在其他 2 个地区(河南驻马店和江苏高邮)抗病的品种(系)种植在山东烟台病圃时变得容易感病。②不同的栽培条件也会影响到病症的表现。例如施肥过少造成土壤贫瘠或施肥过多、土壤肥力过大都会影响感病品种的发病程度^[14]。③小麦的播种期也会影响病症的表现。早播土温较高, 适合真菌对小麦根系的侵入, 并且可以在小麦发病期赶上低温; 晚播则造成发病期气温回升, 以致影响病症的表现。总体而言小麦发病的过程对气温较为敏感, 早春发病期要求气温在 12℃ 以下的时间持续较长, 尤其是连续的低温阴雨天气, 病症表现更加明显; 因此在春季气温偏高或气温回升较快的年份, 会严重影响发病。尽管小麦 WYMV 抗性鉴定极容易受环境的干扰, 但现今对小麦 WYMV 抗性的鉴定通常都在田间病圃里进行, 一般不适宜采用人工摩擦接种的方法在可控的室内条件下完成鉴定。小麦 WYMV 对人工接种发病较难奏效, 究其原因因为小麦黄花叶病毒为线状粒子, 容易断裂, 加之小麦黄花叶病毒的外壳蛋白极不稳定, 人工接种方法不利于病毒外壳蛋白的稳定^[8,14]。因此, 接下来对我们构建的 F₂ 作图群体的 WYMV 抗病性鉴定将在田间病圃里进行。

小麦 WYMV 抗病性为显性核基因控制的性状, 抗性可能受 2 对致病显性基因(*S1S1*, *S2S2*)和 1 对拟制基因(*II*)所控制^[14]。刘伟华等^[8]用抗病性强的小麦品种‘扬辐 9311’‘宁麦 7 号’‘宁麦 9 号’与不同感病品种通过杂交和测交配制组合来分析此 3 个抗病品种的抗性遗传规律。结果表明: 品种‘扬辐 9311’和‘宁麦 7 号’对小麦 WYMV 的抗性是由一对显性基因控制的; ‘宁麦 9 号’对小麦 WYMV 的抗性由一对作用力较强的显性主效基因所控制, 个别组合 F₂ 群体的抗、感分离比偏离 3:1 的比率, 推测 WYMV 抗性可能受环境影响的微效基因或不完全显性的基因所控制。LIU 等^[9]用 WYMV 高抗品种‘宁麦 9 号’与高感品种‘扬麦 10 号’杂交建立了 F₂ 分离群体, 将 WYMV 抗病基因(*YmNM*)定位在 2A 染色体上, 与其最近的 SSR 标记 Xgwm328 的遗传距离为 17.6 cm。LIU 等^[9]用高抗品种‘扬辐 9311’作母本与高感品种‘扬麦 10 号’作父本杂交建立了 F₂ 分离群体, 经连锁分析发现, 抗病基因(*YmYF*)定位在 2DL 染色体臂上, 并且与 4 个 SSR 标记 Xwmc41, Xwmc181, Xpsp3039 和 Xgwm349 紧密连锁^[10]。Nishio 等^[15]用高抗品种‘Ibis’作母本与高感品种‘Münstertaler’作父本进行杂交, 构建了 DH 作图群体, 将 WYMV 抗病基因(*Ym1b*)定位在 2DL 染色体臂上, 此基因与 4 个 SSR 标记 Xcfd16, Xwmc41, Xcfd168 和 Xwmc181 紧密连锁。WYMV 抗病基因 *YmYF* 和 *Ym1b* 都被定位在 2DL 染色体臂上, 都与 Xwmc41 和 Xwmc181 紧密连锁。可见 WYMV 抗病基因是由定位于 2 号染色体上的一对基因控制的, 此结果与刘伟华等^[8]于 WYMV 的抗性是由一对显性基因控制的研究结果相一致。但是 Zhu 等^[14]利用高抗品种‘西风’与高感品种‘镇 9523’所创建的重组易位系(recombinant inbred lines, RIL)为材料, 分别在 3BS, 5AL 和 7BS 染色体臂上定位了 3 个 WYMV 抗性 QTLs 位点。可见小麦 WYMV 抗性并不是简单的单基因控制的性状, 而是由多基因控制的数量性状, 其抗性 QTLs 的遗传定位结果会受作图群体亲本的选择差异以及群体类型的影响。我们已以父母本间 SSR 多态性最大且在江浙地区推广面积比较大的 WYMV 感病小麦品种‘扬麦 158’为母本, WYMV 抗性品种‘丰抗 1 号’‘石家庄 72’为父本配制了 F₂ 作图群体。接下来将对 F₂ 分离群体的抗、感分离比进行分析, 以及利用筛选获得的多态性 SSR 标记对 F₂ 分离群体的基因型进行分析, 以明确不同的 WYMV 抗性品种的抗性遗传规律和抗性 QTLs 的遗传定位稳定性。

3.2 SSR 多态性标记在 WYMV 抗性和感性亲本染色体上分布不均匀

为了利用 SSR 分子标记对 WYMV 抗性 QTLs 进行精细定位以及为选育 WYMV 抗性新品种奠定工作基础, 我们选取推广面积较大的 WYMV 抗性品种(‘丰抗 1 号’‘石家庄 72’和‘郑麦 9023’)和 WYMV 敏感型品种(‘扬麦 158’和‘烟农 22’)为亲本, 筛选在抗性和感性亲本间具有多态性的 SSR 标记, 发现‘丰抗 1 号’/‘扬麦 158’和‘石家庄 72’/‘扬麦 158’间的 SSR 多态性最大(分别为 64.0%和 63.3%), 并依据 Graingene 2.0 数据库 SSR 标记的遗传距离信息, 构建了抗性和感性亲本的多态性 SSR 标记遗传图谱。SSR 标记是产生的原理是: DNA 复制或修复过程中 DNA 滑动、错配或有丝分裂和减数分裂期姐妹染色单体不均等交换而产生的简单序列重复。SSR 标记数量丰富, 均匀分布于全基因组, 且重复性高, 稳定性好, 适合于自动化分析, 是目前使用最广泛的一种标记。分析多态性 SSR 标记在

WYMV 抗性和感性亲本不同染色体上的分布特点发现第 3 号和第 5 号染色体上多态性 SSR 标记的比率要明显高于其他染色体上。Justin 等曾在 5B 长臂上的基因富集高重组区建立了一个饱和物理图谱, 这个区段占 5B 长臂 4% 的物理距离, 却占整个染色体 30% 的重组, 多重交叉发生在这一热点区段, 重组率是整个染色体的 11 倍^[16]。因此, 我们推测第 3 号和第 5 号染色体较其他染色体具有更加活跃的染色体重排、易位或是滑动等现象, 可能是导致 WYMV 抗性和感性亲本多态性 SSR 标记在不同染色体分布不均一的重要原因。Liu 等^[17]分析先前已构建的小麦遗传图发现, 50% 以上的 SSR 标记位点成簇分布在着丝粒附近, 其扩展的遗传距离低于 30 cm。本研究中 WYMV 抗性和感性小麦亲本多态性 SSR 标记在同一染色体组的不同染色体区段分布也不均匀, 主要集中在着丝粒的附近区段, 这与 Liu 等^[17]总结出的 SSR 分子标记分布规律相一致。

4 参考文献

- [1] 于嘉林, 晏立英, 苏宁, 等. 小麦黄花叶病毒基因组核苷酸序列分析[J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 1999, **29**(6): 639 – 644.
YU Jialin, YAN Liying, SU Ning, *et al.* Analysis of genome nucleotide sequence of wheat yellow mosaic virus [J]. *Sci China Ser C Life Sci*, 1999, **29**(6): 639 – 644.
- [2] 程兆榜, 侯庆树, 周益军, 等. 小麦梭条花叶病抗性的遗传研究[J]. 作物学报, 2000, **26**(3): 360 – 364.
CHENG Zhaobang, HOU Qingshu, ZHOU Yijun, *et al.* Genetic studies on the resistance of winter wheat varieties to wheat spindle streak mosaic disease [J]. *Acta Agron Sin*, 2000, **26**(3): 360 – 364.
- [3] 秦家中, 陶家凤, 秦芸. 小麦品种(系)对小麦黄花叶病抗性的研究[J]. 西南农业大学学报, 1990, **12**(1): 27 – 29.
QIN Jiazhong, TAO Jiafeng, QIN Yun. Study on the resistance of wheat varieties (lines) to wheat yellow mosaic virus (WYMV) [J]. *J Southwest Agric Univ*, 1990, **12**(1): 27 – 29.
- [4] 岳绪国, 景德道, 陈爱大, 等. 小麦抗梭条花叶病品种的田间筛选及抗性遗传研究初报[J]. 麦类作物学报, 2001, **21**(3): 22 – 25.
YUE Xuguo, JING Dedao, CHEN Aida, *et al.* Primary study on WSSM resistance and field screening of wheat [J]. *J Tritic Crops*, 2001, **21**(3): 22 – 25.
- [5] 姚金保, 杨学明, 姚国才, 等. 小麦梭条花叶病抗源宁麦 9 号的抗性遗传及利用策略[J]. 麦类作物, 1999, **19**(5): 28 – 29.
YAO Jinbao, YANG Xueming, YAO Guocai, *et al.* Analysis of resistant genetics of wheat spindle streak mosaic virus in wheat varieties ‘Ningmai 9’ and its application [J]. *Tritic Crops*, 1999, **19**(5): 28 – 29.
- [6] 姚金保, 杨学明, 姚国才, 等. 小麦品种抗梭条花叶病性的遗传研究[J]. 江苏农业研究, 1999, **20**(3): 12 – 15.
YAO Jinbao, YANG Xueming, YAO Guocai, *et al.* Inheritance of resistance to wheat spindle streak mosaic virus in wheat varieties [J]. *Jiangsu Agric Res*, 1999, **20**(3): 12 – 15.
- [7] von KOEVERING M, HAUFLE K Z, FULBRIGHT D W, *et al.* Heritability of resistance in winter wheat to wheat spindle streak mosaic virus [J]. *Phytopathology*, 1987, **77**(5): 742 – 744.
- [8] 刘伟华, 何震天, 耿波, 等. 小麦对黄花叶病的抗性鉴定及典型品种的遗传分析[J]. 植物病理学报, 2004, **34**(6): 542 – 547.
LIU Weihua, HE Zhentian, GENG Bo, *et al.* Identification of resistance to yellow mosaic disease of wheat and analysis for its inheritance of some varieties [J]. *Acta Phytopathol Sin*, 2004, **34**(6): 542 – 547.
- [9] LIU Weihua, NIE Huan, HE Zhentian, *et al.* Mapping of a wheat resistance gene to yellow mosaic disease by amplified fragment length polymorphism and simple sequence repeat markers [J]. *J Integr Plant Biol*, 2005, **47**(9): 1133 – 1139.
- [10] LIU Weihua, NIE Huan, WANG Shibo, *et al.* Mapping a resistance gene in wheat cultivar Yangfu 9311 to yellow mosaic virus, using microsatellite markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, **111**(4): 651 – 657.
- [11] KHAVKIN E, COE E H. Mapped genomic locations for developmental functions and QTLs reflect concerted groups in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, **95**(3): 343 – 352.

- [12] BASSAM B J, CAETANO-ANOLLÈS G, GRESSHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. *Anal Biochem*, 1991, **196**(1): 80 – 83.
- [13] 张宗英, 徐建美, 韩成贵, 等. 小麦黄花叶病毒河南驻马店分离物的鉴定与全序列分析[J]. 华北农学报, 2010, **25**(2): 5 – 11.
- ZHANG Zongying, XU Jianmei, HAN Chenggui, *et al.* Detective and complete sequence analysis of wheat yellow mosaic virus from Zhumadian in Henan Province [J]. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2010, **25**(2): 5 – 11.
- [14] 朱晓彪. 小麦黄花叶病抗性及其 3 个农艺性状的 QTL 分析和抗性主效 QTL QYm.nau-5A.1 的精细定位[D]. 南京: 南京农业大学, 2011: 14 – 15.
- ZHU Xiaobiao. *QTL Analysis of Wheat Yellow Mosaic Resistance and Three Agronomic Traits and Fine Mapping of the Major Wymv Resistance QTL QYm.nau-5A.1* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011: 14 – 15.
- [15] NISHIO Z, KOJIMA H, HAYATA A, *et al.* Mapping a gene conferring resistance to wheat yellow mosaic virus in European winter wheat cultivar ‘Ibis’ (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Euphytica*, 2010, **176**(2): 223 – 229.
- [16] JFARIS J D, HAEN K M, GILL B S. Saturation mapping of a gene-rich recombination hot spot region in wheat [J]. *Genetics*, 2000, **154**(2): 823 – 835.
- [17] LIU Chunji, AFKINSON M D, CHINOY C N, *et al.* Nonhomoeologous translocations between group 4, 5 and 7 chromosomes within wheat and rye [J]. *Theor Appl Genet*, 1992, **83**(3): 305 – 312.