

青藏高原青稞抗白粉病 SSR 标记分析

杨春葆^{1,2}, 刘仁健^{1,2*}

(1. 省部共建青稞和牦牛种质资源与遗传改良国家重点实验室, 西藏拉萨 850002; 2. 西藏自治区农牧科学院农业研究所, 西藏拉萨 850002)

摘要 [目的]研究青藏高原青稞抗白粉病机制。[方法]以青稞基因组数据为基础 www.ncbi.nlm.nih.gov/sra (accession no. SRA201388)设计 200 对 SSR 引物, 标记关于抗白粉病基因位点并定位染色体。[结果]QK019 和 QK072 两个 SSR 引物与抗白粉病基因 HvNEWENTRY 标记遗传距离较近, 分别为 58.2, 81.4 cM, 该基因位于 6H 染色体上。[结论]该研究可为青稞抗白粉病机制研究提供科学依据。

关键词 青稞; 青藏高原; 白粉病; SSR; 遗传距离; 染色体

中图分类号 S512.3 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)23-0137-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2021.23.037



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Mapping of Resistance Gene to Powdery Mildew in Highland Barley on Tibetan Plateau Using SSR Markers

YANG Chun-bao^{1,2}, LIU Ren-jian^{1,2} (1. State Key Laboratory of Barley and Yak Germplasm Resources and Genetic Improvement, Lhasa, Tibet 850002; 2. Research Institute of Agriculture, Tibet Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Lhasa, Tibet 850002)

Abstract [Objective] In order to study the resistance mechanism of Tibetan Plateau highland barley to powdery mildew. [Method] Based on the highland barley genome data submitted by this project www.ncbi.nlm.nih.gov/sra (accession no. SRA201388), 200 pairs of SSR primer markers related to powdery mildew resistance gene locus were designed and locate the chromosome. [Result] The results showed that the genetic distance between QK019 and QK072SSR primers and the powdery mildew resistance gene HvNEWENTRY marker was 58.2 and 81.4 cM, respectively, and the gene was located on chromosome 6H. [Conclusion] This study can provide a scientific basis for the study of resistance mechanism of highland barley to powdery mildew.

Key words Highland barley; Tibetan Plateau; Powdery mildew; SSR; Genetic distance; Chromosome

青藏高原青稞(*Hordeum vulgare* var. *nudum*), 禾本科, 大麦属, 一年生草本植物, 主要分布于西藏、青海、四川省甘孜藏族自治州和阿坝藏族自治州、甘肃省甘南藏族自治州以及云南、贵州的部分地区, 适宜生长在高原清凉气候^[1], 耐寒性强, 生长期短, 高产早熟, 适应性广。青稞白粉病是由布氏白粉菌大麦专化型(*Blumeria graminis* f. sp. *Hordei* L., Bgh)引起的真菌病害, 其病原菌是专性的活体寄生菌, 可引起青稞减产 10%~20%, 严重时可达 30% 以上, 亦影响着青稞品质^[2], 也是制约青稞优质、高产、稳产的因素之一。因此, 筛选抗白粉病青稞品种(系)尤为重要。育种过程中, 选育抗白粉病青稞品种(系)是防治白粉病最有效的途径。与白粉病抗性相关基因在小麦等作物中已得到功能验证, *MLO*、*PBZ017*、*RPW8*、*MIEL1-V*、*CMPG1-V*、*PM15/21*、*M11W6*、*SCL* 在麦类作物抗白粉病研究中得到功能验证^[3]。小麦对白粉病的抗性存在单基因或者寡基因决定的质量抗性与由多基因控制的数量抗性 2 种形式, 1 粒小麦抗白粉病基因由 1 个隐性主效数量遗传性状(QTL)控制, 被定位在 Xcfd39/Xmag1491-Xmag1493 区间, 该基因与大麦 *MOL* 基因同源位点紧密连锁^[4-6]。有研究发现, *MOL* 基因隐性突变可提高大麦的抗白粉病能力, 同时该基因对白粉病菌抗性具有广谱性^[7]。lncRNA 全谱解析青稞白粉病菌差异表达模式发现, 钙依赖蛋白激酶、谷胱甘肽 S-转移酶、纤溶酶原激活物抑制

剂 1、丝氨酸型内肽酶和 MADS-box 转录因子的编码基因表达水平较高, 与青稞抗白粉病密切相关^[8]。利用二粒小麦-普通小麦导入系, 定位到来源于二粒小麦的抗白粉病主效 QTL 在普通小麦的 4A 染色体, 同时该基因解释表型达 54% 以上。由此可见, 麦类作物抗白粉病基因是一个复杂的主效基因控制的 QTL^[9]。随着青稞基因组测序^[10]的完成, 已经筛选到与青稞抗白粉病相关基因, 但相关基因定位的研究相对较少。该研究以青藏高原青稞为试验材料, 用 200 对 SSR 引物初步定位抗白粉病相关基因位点, 旨在为西藏抗白粉病青稞育种及栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 抗白粉病品系 WDM03744 与敏感品种藏青 13 号均来源于西藏自治区农牧科学院农业科学研究所, 同时用于构建 WDM03744×藏青 13 号杂交 F2 代群体, 并用于 QTL 定位。

1.2 基因组 DNA 提取 将亲本及 F2 群体材料种植于每穴 4 cm×4 cm 的 72 穴长方形穴盘中。三叶一心取样期提取亲本及 F2 群体基因组 DNA, CTAB 法提取基因组 DNA, 并检测 DNA 含量, OD260/OD280 为 1.7~1.9 为合格, -20℃ 存储备用。

1.3 引物选择合成 根据提交的青稞基因组数据设计 200 对 SSR 引物, 与大麦耐盐性相关性状紧密连锁的标记对供试材料进行扩增。引物由 Invitrogen 公司合成, 引物序列及 PCR 扩增程序见表 1。

1.4 PCR 扩增及银染 PCR 扩增在 PE9600(Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA) PCR 仪上运行。反应体系为 12.5 μL, 内含 DNA 模板 10~20 ng, 引物各 2.5 pmol, dNTPs 2.5 nmol,

基金项目 西藏自然科学基金项目(XZ2019ZRG-87(Z))。

作者简介 杨春葆(1985—), 男, 黑龙江海伦人, 助理研究员, 硕士, 从事青稞遗传育种研究。* 通信作者, 副研究员, 硕士, 从事青稞遗传育种研究。

收稿日期 2021-03-16

MgCl₂ 18.7 nmol, 0.2 U Taq DNA 聚合酶与 1×PCR 缓冲液。反应程序: 95 °C 1 min, 然后按照 94 °C 30 s, 50~60 °C (视引物而定) 30 s, 74 °C 30 s 进行 35 个循环, 最后 72 °C 延伸 5 min。PCR 产物在 9% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 然后 0.2% 银染, 0.15% NaOH 显影 (使用时加入 5 mL/L 甲醛)。

1.5 数据统计及遗传图谱构建 采用 MAPMAKER/EXP 3.0b 计算分子标记与抗病基因之间的遗传距离, 用 Mapdraw V2.1 和 MAPCHART2.2 绘制抗病基因的分子标记连锁图。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物多态性检测 利用 www.ncbi.nlm.nih.gov/sra (accession no. SRA201388) 设计多态性抗白粉病 SSR 引物共 200 对, 并对双亲藏青 13 号 (P1) 与 WDM03744 (P2) 进行多态性筛选, 其中 25 对引物在双亲之间存在多态性, 占引物

总数的 25%, 部分引物的筛选结果见图 1。

表 1 与 HvNEWENTRY 连锁 SSR 引物序列
Table 1 SSR primer sequence linked to HvNEWENTRY

序号 No.	编号 Code	引物序列 Sequence
1	QK19	F-5' CATGCACCCGTGCAAAAATG 3' R-3' TCGTCCCCTCAAAGATTTTC 5'
2	QK25	F-5' AAAACCTTTACACACGGAACG 3' R-3' GCGGCTGGGATTATCTCTTT 5'
3	QK72	F-5' TTGCTGAGAGGAGACCAAT 3' R-3' AAGTGAGTGTGACACGAGCG 5'
4	QK79	F-5' CCTAGATAAGGAACATAGCCA 3' R-3' CAAAGACCCCTAACTCATGTTC 5'
5	QK155	F-5' TACGACAATTTGAATGCGGA 3' R-3' CCTGGTTGCGTCCTGTAAAT 5'

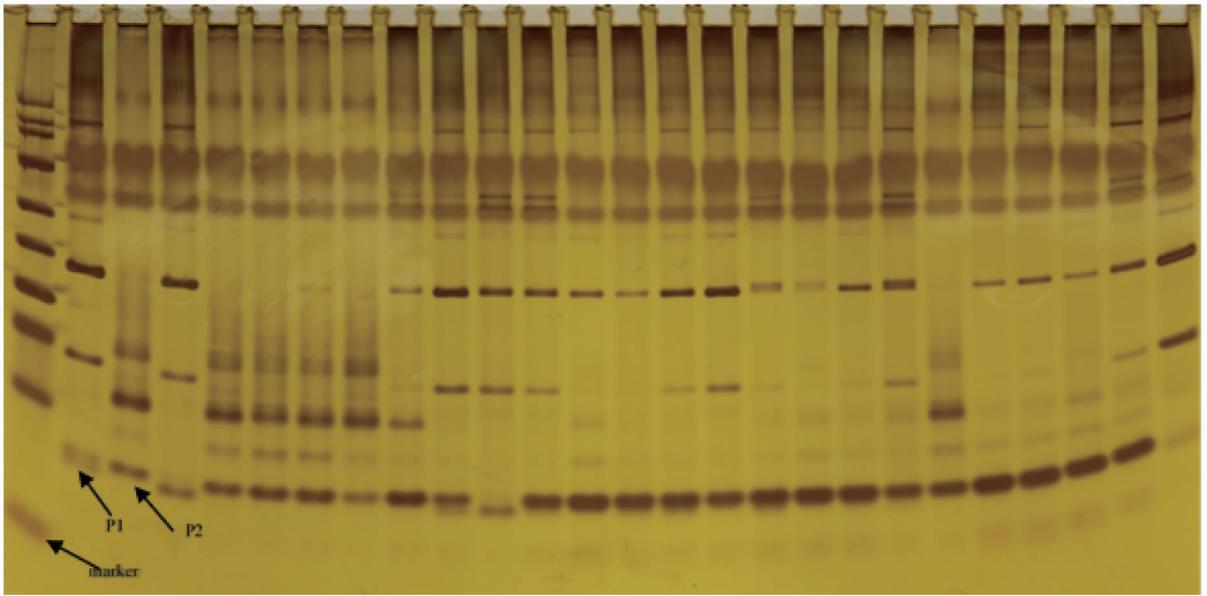


图 1 部分 SSR 引物在亲本间的扩增结果

Fig. 1 The amplification results of SSR primers between two parents

2.2 SSR 标记遗传连锁图谱构建 抗、感亲本筛选表明, 200 对 SSR 引物中, 有 25 对引物在亲本 WDM03744 与藏青 13 号表现出多态性。进一步利用这 25 对引物在抗、感池中进行筛选, 其中有 5 对 (QK155、QK025、QK019、QK079 和 QK072) 引物具有丰富的多态性。这 5 对引物在抗感小群体进行验证后发现, 它们可以在抗病小群体和抗病亲本之间与感病小群体和感病亲本之间分别扩增出相同的特异条带, 说明这 5 对引物相互连锁。根据 NCBI 提交青稞基因组数据, 比对发现 5 对引物与 *HvNEWENTRY* 相互连锁。*HvNEWENTRY* 基因位于 6H 染色体上, 这 5 对引物标记该基因在 6H 染色体。

利用 Mapmaker Exp 3.0 计算遗传距离和 MapDraw v2.1 绘制遗传连锁图谱, 结果显示, *HvNEWENTRY* 及其连锁标记的位置顺序为 QK155、QK025、QK019、*HvNEWENTRY*、QK079 和 QK072, 其遗传距离见图 2, *HvNEWENTRY* 两侧连锁标记 QK019 和 QK072 的遗传距离分别为 58.2、81.4 cM, 遗传距离

相较于其他较近。

3 讨论

麦类作物白粉病菌株具有群体大、变异快等特点, 在单一抗源下, 一旦出现新型病毒植株, 抗病基因丧失, 引起该种类型白粉病的广泛流行, 造成作物减产^[11]。国内外已鉴定出 100 余个抗小麦白粉病基因或 QTL, 其中已被正式命名的基因位点有 100 余个^[12]。*Pm4d*、*Mlm2033*、*Mlm80*、*Pm1b* 及 *pm2026* 是小麦主要的抗性基因, 并在小麦中已得到定位。麦类作物中抗白粉病基因多为显性遗传, 同时为主效基因控制^[13]。目前虽然定位到的抗病性基因较多, 但可有效用于生产上的抗病基因甚少。因此, 不断挖掘新的抗白粉病基因, 保持抗病基因抗源的多元化至关重要^[14]。

抗白粉病种质资源的利用与发掘是提高作物抗病的主要途径及基本途径^[15]。筛选到抗病性品种 (系) 是青稞抗白粉病研究的基础, 以此构建群体, 筛选更多的抗病材料有利于青稞产量栽培及推广。该试验定位到了与青稞抗白

粉病基因 *HvNEWENTRY* 的位点,为后续开展抗白粉病机制研究奠定基础,设计的 SSR 引物较少,难以精细定位该基因,因此,后续需继续加强对抗白粉病基因的研究与定位。

西藏是青稞的主产地,不仅要加强对白粉病的防治力度,更要注重青稞产业发展,同时青稞也是藏族人民基本的粮食来源,研究青稞抗白粉病机制及提高青稞产量也是解决部分贫困地区粮食缺乏的一种有效方法。

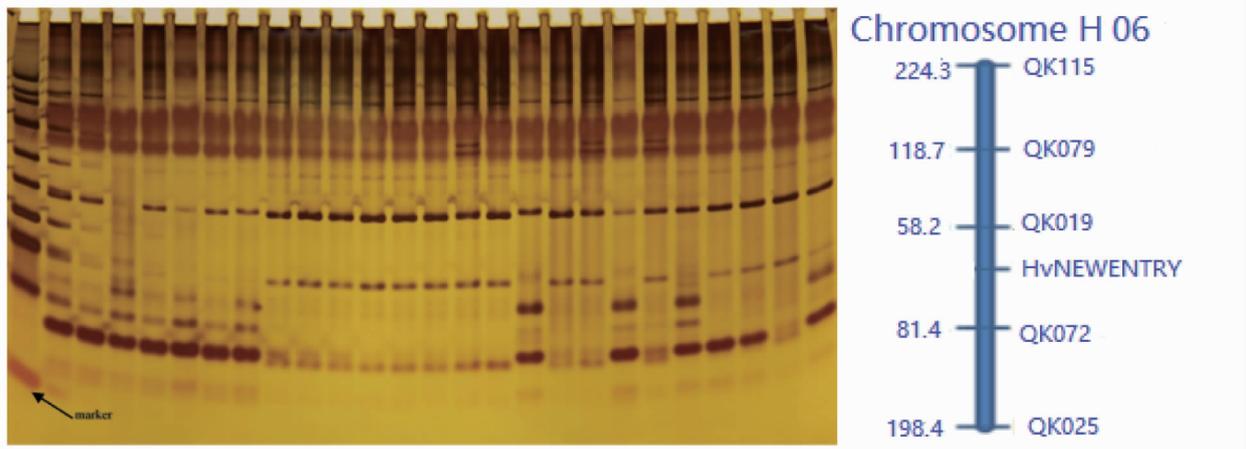


图2 QK019 引物在 F2 群体间扩增结果及 *HvNEWENTRY* 遗传图谱构建

Fig.2 The amplification results of the primer QK019 in F2 population and genetic linkage map of *HvNEWENTRY*

4 结论

通过构建抗感池,检测 200 对抗白粉病基因 SSR 引物的多态性,其中只有 25 对引物具有丰富的多态性,以此为基础对青稞 F2 群体采用 Mapmaker Exp 3.0 计算遗传距离和 MapDraw v2.1 绘制遗传连锁图谱,其中 QK155、QK025、QK019、QK079 和 QK072 定位在 *HvNEWENTRY* 的两侧,该基因位于 4H 染色体上,其中 QK019 和 QK072 定位 *HvNEWENTRY* 基因遗传距离最近,初步可认为是该基因的粗定位 SSR 引物。

参考文献

- [1] 郭慧娟,贾举庆,李欣,等. 小麦种质 CH7015 中抗白粉病基因的 SSR 定位[J]. 华北农学报,2019,34(6):203-208.
- [2] 侯丽媛,董艳辉,张春芬,等. SSR 分子标记技术在苹果种质资源及遗传育种研究中的应用[J]. 山西农业科学,2019,47(6):1107-1114.
- [3] 孙洪宝,许勇,张春秋,等. 比较基因组学在甜瓜白粉病抗病基因 *Pm-2F* 连锁标记开发中的应用[J]. 中国瓜菜,2019,32(8):187-188.
- [4] 马超,董振杰,田修斌,等. 来自西尔斯山羊草的抗小麦白粉病基因 *Pm57* 抗性丧失突变体的筛选与鉴定[J]. 植物遗传资源学报,2020,21(2):386-393.
- [5] 陈芳,乔麟轶,李锐,等. 小麦新种质 CH1357 抗白粉病遗传分析及染色

体定位[J]. 作物学报,2019,45(10):1503-1510.

- [6] 王掌军,刘妍,张双喜,等. 宁春 4 号与河东乌麦杂交 F₂ 代抗病性及分子标记鉴定[J]. 浙江农业学报,2019,31(5):677-687.
- [7] 费新茹,朱娟,郭晖,等. 大麦白粉病抗性的遗传分析与 QTL 定位[J]. 核农学报,2019,33(5):888-893.
- [8] 叶卫军,杨勇,周斌,等. 分子标记在绿豆遗传连锁图谱构建和基因定位研究中的应用[J]. 植物遗传资源学报,2017,18(6):1193-1203.
- [9] ZENG X Q, LONG H, WANG Z, et al. The draft genome of Tibetan hulless barley reveals adaptive patterns to the high stressful Tibetan Plateau[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, 112(4):1095-1100.
- [10] 李思怡,卢浩,赵莉,等. 利用紧密连锁抗白粉病基因的 SSR 标记鉴定甜瓜种质[J]. 分子植物育种,2016,14(9):2435-2440.
- [11] 付必胜,刘颖,张巧凤,等. 与小麦抗白粉病基因 *Pm48* 紧密连锁分子标记的开发[J]. 作物学报,2017,43(2):307-312.
- [12] 徐志,章振羽,姬红丽,等. 四川小麦品种的遗传多样性及其对条锈病和白粉病的抗性[J]. 麦类作物学报,2017,37(2):258-267.
- [13] 刘婉辉,董宏图,李映辉,等. 栽培一粒小麦 3AA30 中抗白粉病基因的鉴定及分子标记定位[J]. 植物遗传资源学报,2016,17(3):536-540.
- [14] PANSTRUGA R, KUHN H. Mutual interplay between phytopathogenic powdery mildew fungi and other microorganisms[J]. Mol Plant Pathol, 2019, 20(4):463-470.
- [15] BOURRAS S, PRAZ C R, SPANU P D, et al. Cereal powdery mildew effectors: A complex toolbox for an obligate pathogen[J]. Curr Opin Microbiol, 2018, 46:26-33.

(上接第 132 页)

- [11] 王华,杜立业,李华. 微生物液氮超低温保存研究进展[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(1):1-5.
- [12] 刘代艳,于泊洋,孔群芳,等. 海藻酸微囊替代 DMSO 和 FBS 的 STO 细胞冷冻保存研究[J]. 现代生物医学进展,2012,12(33):6413-6418.
- [13] 陈袁,赵丽华,杨宁,等. 建立稳定表达猪 LIF 蛋白的小鼠 STO 细胞系

[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2016,36(8):897-904.

- [14] PEGG D E. The history and principles of cryopreservation[J]. Semin Reprod Med, 2002, 20(1):5-13.
- [15] 李洁,刘斌,李焰,等. 不同条件下细胞冻存效果比较[J]. 临床口腔医学杂志,2004,20(2):84-85.
- [16] 徐振波,李彦媚,弓松伟,等. 新型冷冻保存剂在细胞低温冻存中的选择[J]. 制冷,2004,23(4):19-24.