中国农业大学学报 1997,2(5):46,58,78
Journal of China Agricultural University

小麦白粉病抗性基因Pm2近等基因系的RAPD分析[①]

朴春根[②] 唐文华 曾士迈
(中国林科院森保所) (中国农业大学)

The Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD) Analysis of Near-Isogenic Lines Differring for Powdery Mildew Resistant Gene Pm2 in Wheat

Piao Chungen Tang Wenhua Zeng Shimai
(Chinese Academy of Forestry) (China Agricultural University)

白粉病(*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*)是小麦的主要病害之一，选育抗病品种目前依然是最为经济、安全和有效的防治途径之一。随着分子生物学研究手段的不断发展，已对小麦白粉病抗性基因Pm4A等进行了RAPD分子标记研究。同抗病基因紧密连锁的分子标记具有非常重要的理论和实际意义，如通过对分子标记的间接选择可以快速、有效地转移和组合抗性基因，从而有效地培育出抗病的优良品种；又如，通过RFLP与抗病基因的连锁分析，找出相应抗病基因的分子标记，可以为进一步的分离和克隆打下基础。本实验以小麦白粉病抗性基因Pm2的近等基因系为材料进行了RAPD分析，目的在于为获得与小麦白粉病抗性基因Pm2连锁的RAPD分子标记打下基础。

感病的普通小麦品种Chancellor(Cc)和以该品种为轮回亲本而转育出的白粉病抗性基因Pm2的近等基因系，即Chancellor(Cc)、Ulka/8 * Cc和CI12632/8 * Cc。这是由Pm2基因的抗源材料Ulka和CI12632同感病的Chancellor杂交，再经以Chancellor为回交亲本的七代回交和最后一代自交培育而成的，其中Pm2基因已被定位于5D染色体上(以上材料均由中国农科院植保所提供)。剪取小麦黄化苗约1 g，按改进的Liu和Doyle等的方法提取总DNA。

从美国Operon公司出产的随机引物A,B,C,D,E,F,G和O试剂盒中选取100个引物，再选用5个由本校国家农业生物技术重点实验室合成的引物，共105个引物。采用25 μL反应体系：0.2 mmol·L^{-1}四种dNTP(华美生物工程公司)，2 mmol·L^{-1} $MgCl^2$，1.5 U Taq DNA多聚酶和2.5 μL 10XTaqDNA多聚酶缓冲液(中国农业大学国家农业生物技术重点实

(下转第58页)

收稿日期： 1996-10-17
①国家自然科学基金资助项目
②朴春根，中国林科院森保所，北京 100091

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

（上接第46页）

验室），15 ng 引物和 5 ng 模板DNA。每次反应用无菌超纯水代替模板DNA作对照。扩增反应在PE公司出产的DNA Thermal Cycler 9600上进行：94℃ 2.5 min，1个循环；94℃ 15 s，36℃ 30 s，72℃ 1 min，45个循环；最后，72℃延长7.5 min。扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶上电泳分离，EB染色照相。

在试用的105个随机引物中，能在Chancellor、Ulka/8＊Cc和CI12632/8＊Cc的近等基因系中有效地扩增出RAPD片段的有98个，其中大多数引物的扩增产物没有多态性，扩增产物无多态性的随机引物占所用引物总数的98%。不同引物扩增出的RAPD片段数目及其分子量大小均不尽相同，少的只有1条，多的有9条，其分子量一般在0.43～3 kb。

在所试用的105个随机引物中，有2个引物的RAPD扩增片段在Pm2基因的近等基因系中显示出多态性，并且其多态性RAPD片段可能与Pm2基因是连锁的。这两个随机引物分别是，OPE-06(5′-AAGACCCCTC-3′)和OPE-09(5′-CTTCACCCGA-3′)，将各扩增片段描述如下：

OPE-06：在Chancellor中扩增出3条RAPD片段；在Ulka/8＊Cc和CI12632/8＊Cc中扩增出5条，其中有3条与Chancellor的相同，而另2条RAPD片段则是特有的，分子量分别约为0.92 kb和1.12 kb，依次命名为E06-02和E06-03。这两条RAPD片段带可能与Pm2基因是相连锁的。

OPE-09：在Chancellor中扩增出5条RAPD片段；在Ulka/8＊Cc和CI12632/8＊Cc中扩增出6条RAPD片段，其中的5条与Chancellor的相同，另一条带则不一致。这一条特异的RAPD片段在Ulka/8＊Cc和CI12632/8＊Cc中又显示出多态性，其分子量依次约为1.10 kb和1.03 kb，并依次命名为E09-04U和E09-04C。从理论上推测，显示多态性的这一条RAPD片段也可能同Pm2基因是相连锁的。

利用随机引物OPE-06扩增出的多态性RAPD片段E06-02和E06-03，来源于供体亲本Ulka和CI12632的外源片段，推测这两条RAPD片段可能与Pm2基因是相连锁的；利用随机引物OPE-09，在Ulka/8＊Cc和CI12632/8＊Cc中扩增出的且在这两个抗病系中显示多态性的RAPD片段E09-04U和E09-04C，也可能与Pm2基因是相连锁的。由于近等基因系中Pm2基因区域的外源片段来源不同，所以同Pm2基因相邻的侧翼序列是肯定有差异的。因为RAPD片段E09-04U和E09-04C扩增自这一外源的、与Pm2基因相邻的侧翼序列，所以这两条RAPD片段显示出多态性。

小麦白粉病抗性基因的定位研究从1930年Water House报道的Thew携带有一个显性抗病基因开始，目前已鉴定和定位的小麦白粉病抗性基因共有17个。其中的白粉病抗性基因Pm2来源于普通小麦，最早由Pugsley等在前苏联的地方品种Ulka上发现，后定位在5D染色体上。Briggle于1966年以Ulka为抗源，以Chancellor为回交亲本，培育出了Pm2基因的近等基因系，至于近等基因系CI12632/8＊Cc的来源目前尚不很清楚。从理论上推算，经回交8代后获得的近等基因系中，包括5D染色体在内的全部42条染色体都是来源于回交亲本Chancellor的，只是其中5D染色体上的Pm2基因区域则是来源于抗源品种Ulka或CI12632的。也就是说，在Pm2基因近等基因系的选育过程中，供体抗源品种中的Pm2基因

（下转第78页）

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

regimes. J Agronomy & Crop Science, 1994, 173:179～192

22 Mitchell R A C, et al. Effects of increased CO_2 concentration and temperature on growth and yield of winter wheat at two levels of nitrogen application. Plant, Cell and Environment, 1993, 16: 521～529

23 陆贵生,梁振兴,梅楠. 小麦熟相与粒重形成. 北京农业大学学报,1987, 13(3):263～287

24 李奇真. 氮磷配合施用对麦类作物的增产效果及其生理基础. 小麦生长发育规律与增产途径,河南科学技术出版社,1980, 29～47

25 沈成国,于振文,岳寿松等. 源-库比改变对田间冬小麦旗叶衰老、氮再分配和蛋白降解酶活性的影响. 全国第五次作物栽培生理学术讨论会论文集,中国作物学会,福州, 1995, 78

26 Moll R H, et al. Recurrent selection for maize grain yield ; dry matter and nitrogen accumulation and partitioning changes. Crop Sci, 1994, 34: 874～881

27 Pan, W L, et al. Altering source～sink relationships in prolific maize hybrids: Consequences for nitrogen uptake and remobilization. Crop Sci, 1995, 35: 836～845

28 Uhart S A, et al. Nitrogen and Carbon accumulation and remobilization during grain filling in maize under different source/sink ratios. Crop Sci, 1995, 35:183～190

29 罗鸿溪. 关中地区小麦高产育种与高产框架的探讨. 作物杂志, 1991, (3):1～2

30 Austin, R. B. Physiological limitations to cereal yields and ways of reducing them by breeding. In Opportunities for Increasing Crop Yield. R.G.Hurd et al.eds. 1980, 3～19

(上接第 58 页)

及其相邻 DNA 片段的插入必然会伴随轮回亲本 Chancellor 中相应区域 DNA 片段的缺失。一个不容忽视的事实是，如果说 Pm2 基因区域是在育种过程中的选择压力下通过交换保存下来的异源片段(对回交亲本而言)的话，那么在近等基因系中也存在有在非选择压力下通过交换保存下来的异源片段，如非编码区等。这些在染色体中随机分布的和具有一定存在概率的异源片段，同 Pm2 基因的相关性很小甚至没有，因而在近等基因系中这些异源片段可能对 Pm2 基因的分析带来假象。所以，对本实验中获得的可能与 Pm2 基因连锁的 RAPD 片段 E06-02、E06-03、E09-04U 以及 E09-04C，尚需要做对 ChancellorXUlka/8 * Cc 和 ChancellorXCI12632/8 * Cc 杂种的 F_2 代分离群体进行个体寄主植株的抗病性鉴定和 RAPD 对应分析，以证实这些 RAPD 片段是否确实与 Pm2 基因连锁及其连锁的紧密程度。另外，RAPD 方法的重复性较差，所以 RAPD 分子标记较 RFLP 分子标记不够稳定。本实验中的 RAPD 分子标记时隔 6 个月后仍具有较好的重复稳定性，认为严格保证 RAPD 扩增反应条件时其稳定性还是可靠的。

本研究得到中国农业大学孟安明副教授、杨作民教授、冯继东老师以及中国农科院植保所周益林同志的热心指导和帮助，谨致谢忱。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net