

## 小麦抗叶锈病基因 *LrAlt* 的比较基因组学分析

唐华山 彭福祥 王艳洁 沈红霞 伊黛舒 李保云

彭惠茹 刘志勇 解超杰\* 孙其信

(中国农业大学农学与生物技术学院/农业生物技术国家重点实验室/农业部作物基因组学与遗传改良重点开放实验室/  
北京市作物遗传改良重点实验室/教育部作物杂种优势研究与利用重点实验室,北京 100193)

**摘要** 斯卑尔脱小麦材料 Altgold 含有小麦抗叶锈病基因 *LrAlt*。该基因被定位于小麦 2A 染色体短臂末端。本研究基于小麦与短柄草和水稻基因组良好的共线性关系,对小麦抗叶锈病基因 *LrAlt* 进行比较基因组学分析,发现该基因所在基因组区域对应于短柄草第 5 染色体和水稻第 4 染色体的直系同源基因组区域,据此开发出与 *LrAlt* 连锁的 EST-STS 标记 BE498683、BE471132.1、BG605273 和 CD454629,并构建了 *LrAlt* 的遗传连锁图谱,这 4 个 EST-STS 标记与 *Xbarc212* 共分离,位于 *LrAlt* 近着丝粒侧,距离 *LrAlt* 1.9 cM。同时,通过筛选 Graingenes 2.0 公布的位于 *LrAlt* 附近的 SSR 标记,发现 *Xbarc124*、*Xgwm614* 与 *LrAlt* 紧密连锁,均与 *Xbarc212* 共分离。本研究通过比较基因组学的策略和筛选 Graingenes 2.0 公布的 SSR 标记,共得到与 *LrAlt* 紧密连锁的 9 个新的分子标记,为构建 *LrAlt* 的高密度精细遗传连锁图谱、分子标记辅助选择和基因聚合奠定了基础。

**关键词** 小麦叶锈病; *LrAlt*; 比较基因组学; EST-STS; SSR

中图分类号 S 512.1

文章编号 1007-4333(2013)04-0001-06

文献标志码 A

## Comparative genomics analysis of the wheat leaf rust resistance gene *LrAlt*

TANG Hua-shan, PENG Fu-xiang, WANG Yan-jie, SHEN Hong-xia, YI Dai-shu,

LI Bao-yun, PENG Hui-ru, LIU Zhi-yong, XIE Chao-jie\*, SUN Qi-xin

(College of Agronomy and Biotechnology/State Key Laboratory of AgroBiotechnology/Key Laboratory of Crop Genomics and Genetic Improvement of Ministry of Agriculture/Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement/Key Laboratory of Crop Heterosis Research & Utilization of Ministry of Education, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract** Wheat leaf rust resistance gene *LrAlt* was identified in spelt wheat (*Triticum spelta* L.) accession Altgold and located on the distal part of the short arm of wheat chromosome 2A. Comparative genomics analysis showed that the genomic region containing *LrAlt* on 2AS was orthologous to *Brachypodium* (*Brachypodium distachyon*) chromosome 5 and rice (*Oryza sativa* L.) chromosome 4. Based on wheat-*Brachypodium*-rice genomic colinearity, EST-STS markers, BE498683, BE471132.1, BG605273, and CD454629 were linked to *LrAlt*. These four EST-STS markers cosegregating with *Xbarc212* were proximal to *LrAlt* with a genetic distance of 1.9 cM. According to Graingenes 2.0, additional SSRs neighbouring the locus *LrAlt* were tested. *Xbarc124* and *Xgwm614* were confirmed to be linked to *LrAlt*, both of which were congregated with *Xbarc212*. By comparative genomics analysis and screening of SSRs, 9 markers linked to *LrAlt* were established, which provide invaluable information for fine mapping, molecular assisted selection, and gene pyramiding of *LrAlt*.

**Key words** wheat leaf rust; *LrAlt*; comparative genomics; EST-STS; SSR

收稿日期: 2013-03-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31271708); 国家“973”计划项目(2009CB118300)

第一作者(并列): 唐华山, 硕士研究生, E-mail: thswheat@163.com; 彭福祥, 博士研究生, E-mail: pengfuxiangsw@163.com

通讯作者: 解超杰, 教授, 主要从事小麦抗病遗传育种研究, E-mail: xiejc127@126.com

小麦是世界上最重要的粮食作物之一,对全球粮食安全具有举足轻重的作用。小麦叶锈病是由小麦叶锈菌(*Puccinia triticina*)引起的一种病害,对小麦的产量和品质构成重大威胁。目前防治小麦叶锈病最经济、有效和环保的措施是选育抗病品种。借助分子标记技术进行分子标记辅助育种,将多个抗病基因聚合到同一个体中,不仅可以加快育种进程,也有助于实现对病害的广谱抗性和持久抗性。

目前,在小麦抗叶锈病的研究中有关主效基因的报道较多,正式命名的有60多个<sup>[1]</sup>。然而,其中许多基因已经被小麦叶锈菌变异的毒性生理小种克服,“丧失”了抗性,在育种上应用价值有限。因此,挖掘新的小麦抗叶锈病基因势在必行。最近,新兴的分子标记技术如SSR、AFLP和EST-STS(Expressed Sequence Tag-Sequence Tagged Site)等为抗叶锈病基因的挖掘和建立与之紧密连锁的分子标记提供了巨大的帮助。*Lr16*、*Lr17a*、*Lr19*、*Lr22a*、*Lr34*、*Lr35*、*Lr39*、*Lr47*和*Lr52*等大量已定位的基因均得以成功建立与之紧密连锁的分子标记<sup>[1-2]</sup>。Wang等<sup>[2]</sup>利用SSR将来源于斯卑尔脱小麦Altgold的抗叶锈病基因*LrAlt*定位于小麦染色体2AS5-0.78-1.00区段<sup>[3]</sup>,与*Xbarc212*、*Xwmc382*、*Xgwm636*和*Xwmc407*紧密连锁,这4个SSR均定位于*LrAlt*的近着丝粒侧,与*LrAlt*分别相距1.8、1.8、3.8和5.8 cM。在此基础上,本研究利用比较基因组学策略开发与*LrAlt*紧密连锁的STS标记,同时筛选Graingenes 2.0(<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>)公布的位于*LrAlt*附近的SSR标记,以期构建覆盖*LrAlt*所在基因组区域的高密度遗传连锁图谱,为*LrAlt*通过MAS应用于生产提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究利用的材料同Wang等<sup>[2]</sup>。由农大3338/Altgold经单粒传法构建F<sub>6</sub>重组自交系(182个RILs)。其中农大3338为中国农业大学选育的小麦品种,为感叶锈亲本;Altgold属于斯卑尔脱小麦,为抗叶锈亲本。用于接种鉴定的叶锈菌生理小种为PHT和THT。本研究的表型鉴定结果与Wang等<sup>[2]</sup>一致:182个RILs中,83个家系纯合抗病,90个家系纯合感病,9个家系抗感分离,在计算遗传距离时未利用抗感分离家系的信息。2个生理

小种的鉴定结果一致。Wang等<sup>[2]</sup>已证明Altgold对叶锈病的抗性由显性单基因控制,该基因被命名为*LrAlt*。

### 1.2 引物来源

为建立与*LrAlt*遗传距离更近的分子标记,本研究从3方面入手:筛选Graingenes 2.0(<http://wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml>)公布的位于*LrAlt*所在染色体区段的SSR标记;利用定位于*LrAlt*所在bin区段(2AS5-0.78-1.00)的EST设计引物,然后进行抗感池筛选;筛选Gadaleta等<sup>[4]</sup>定位于*LrAlt*所在bin区段的EST-SSR标记。

在已建立的EST-STS和EST-SSR标记基础上,采用比较基因组学策略,开发新的EST-STS标记。首先,利用与*LrAlt*紧密连锁的EST-STS或EST-SSR标记所对应的EST序列来比对水稻和短柄草的基因组序列,确立其在水稻和短柄草基因组中对应的直系同源位点<sup>[5-6]</sup>。然后利用相应直系同源位点附近基因的编码区序列搜索小麦的EST数据库,获取同源的小麦EST序列,设计PCR引物<sup>[7-8]</sup>。

### 1.3 分子标记检测与分析

采用BSA(Bulked Segregated Analysis)方法,选取8株纯合抗病和8株纯合感病单株的DNA,分别取等量构建DNA抗病池和DNA感病池,利用抗感池和亲本筛选与*LrAlt*连锁的标记。

PCR反应体积为10 μL,含10×buffer 1 μL,15 mmol/μL MgCl<sub>2</sub> 1 μL,2 mmol/μL dNTP 1 μL,20 ng/μL引物 1 μL,1.5 U Taq酶,去离子水 4 μL,20~100 ng/μL基因组DNA 2 μL。扩增程序为94℃变性5 min;94℃变性30 s,50~60℃(根据引物的退火温度)复性30 s,72℃延伸45 s,40个循环;72℃延伸10 min。PCR产物保存于4℃。

PCR扩增产物检测采用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶(Acr:Bis=39:1)电泳<sup>[9]</sup>。银染显色,统计带型。利用Mapmaker 3.0软件计算分子标记与抗病基因间的遗传距离(LOD值取3.0)<sup>[10]</sup>。利用MapDraw V2.1软件绘制抗病基因的遗传连锁图谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 与*LrAlt*连锁的SSR和EST-STS的筛选

通过抗感池筛选Graingenes 2.0公布的位于*LrAlt*所在染色体区段的SSR标记,发现*Xbarc124*和*Xgwm614*与*LrAlt*在抗感池间表现出多态性。

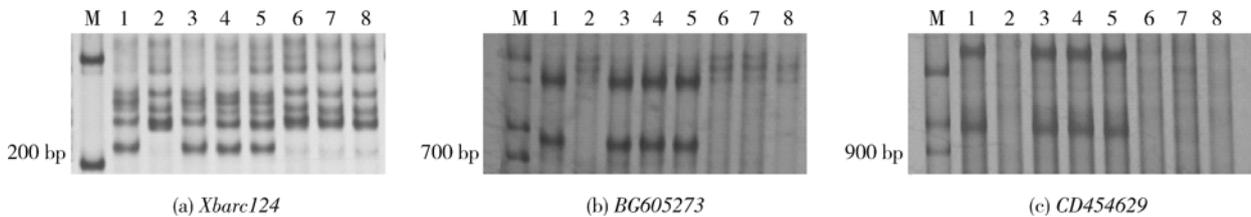
同时利用定位于 *LrAlt* 所在 bin 区段(2AS5-0.78-1.00)的 EST 设计引物,然后利用抗感池对这些引物进行筛选,发现 BG605273、CD454629、BQ903719 和 BE498358 表现出多态性(表 1)。此外,Gadaleta 等<sup>[4]</sup>定位于 *LrAlt* 所在 bin 区段的 EST-SSR 标记

TC90641 也表现出多态性。进一步利用 Altgold、农大 3338、3 个抗病单株和 3 个感病单株对这些在抗感池上有多态性的标记进行检测,结果表明这些标记与抗病表现相关联,Xbarcl24、BG605273 和 CD454629 的结果如图 1 所示。

表 1 与抗叶锈病基因 *LrAlt* 连锁的标记

Table 1 Markers linked to leaf rust resistance gene *LrAlt*

EST-STS	左引物 Forward primer(5'-3')	右引物 Reverse primer(5'-3')
BG605273	ACGACACGCCATTTTCCTACTA	GAACCCTTCCGGGACTTT
CD454629	GTAAACTGCCGAATAACCATC	CGACACGCCATTTTCCTAC
BQ903719	CTCGAGTCCCAGATCGTCTC	TTGAGCATCAATGCAGCAG
BE498358	TAATAGGACACCGAGCGACC	GCGTCAGCCAGCTACTCG
TC90641	GCTTTTGTGCCAGATGATGA	CATCCAGATCCAGGAGCACT
BE498683	ATTGCCATTACTTCCTTTGC	TTAGCGACCTGTGCTCCTT
BE471132.1	CGTGATGATAGGCAGAAAC	AAGCCAAACTTCAATGTTC



M, 100 bp DNA ladder; 1, Altgold; 2, 农大 3338; 3~5, 纯合抗病单株; 6~8, 纯合感病单株。

M, 100 bp DNA ladder; 1, Altgold; 2, Nongda3338; 3-5, Homozygous resistant plants; 6-8, Homozygous susceptible plants.

图 1 与抗叶锈病基因 *LrAlt* 连锁的分子标记 *Xbarcl24*、*BG605273* 和 *CD454629* 的扩增结果

Fig. 1 Amplification patterns of *LrAlt*-linked markers *Xbarcl24*, *BG605273*, and *CD454629*

经过 RIL 群体验证,利用 Mapmaker 3.0 软件计算分子标记与抗病基因间的遗传距离,发现 *Xbarcl24* 和 *Xgwm614* 位于目的基因的近着丝粒侧,与 *LrAlt* 相距 1.9 cM,这与 Volker 等<sup>[1]</sup>的结果一致(图 2)。BG605273、CD454629、BQ903719、TC90641 和 BE498358 均定位于 *LrAlt* 的近着丝粒侧,其中 BG605273 与 CD454629 共分离,与 *LrAlt* 相距 1.9 cM; BQ903719、BE498358 和 TC90641 共分离,与目的基因相距 3.7 cM(图 2)。从图 2 可以看出,*Xbarcl212*、*Xwmc382*、*Xgwm636* 和 *Xwmc407* 与抗病基因的相对遗传位置关系与 Wang 等<sup>[2]</sup>的结果一致。

## 2.2 *LrAlt* 的比较基因组学定位

利用与 *LrAlt* 连锁的 EST-STS 标记

BG605273、CD454629、BQ903719 和 BE498358 所对应的 EST 序列比对短柄草和水稻的基因组序列(图 2)。其中,BE498358 所对应的 EST 序列与短柄草第 5 染色体上的基因 *Bradi5g01130.1* 和水稻第 4 染色体上的基因 *Os04g0137100* 存在同源性关系;BQ903719 所对应的 EST 序列与短柄草第 5 染色体上的基因 *Bradi5g01180.1* 和水稻第 4 染色体上的基因 *Os04g0136700* 存在同源性关系;BG605273 和 CD454629 所对应的 EST 序列可能源自同一个小麦基因,均与短柄草第 5 染色体上的基因 *Bradi5g01730.1* 和水稻第 4 染色体上的基因 *Os04g0117600* 存在同源性关系。此外,在 Graingenes 2.0 上 *Xcd0456.2* 与 *Xmag4271.2* 定



### 3 讨论

小麦的近缘属、种是小麦抗病基因的重要来源,对小麦的抗病育种具有重要的意义。斯卑尔脱小麦(AABBDD)是普通小麦的近缘种。目前,已经定位的源自斯卑尔脱小麦的抗叶锈病基因有 *LrAlt* 和 *Lr65*<sup>[1-2]</sup>。*Lr65* 被定位于 *Xbarc212* 和 *Xgwm614* 的近端粒侧,与之相距 2.0 cM,从 *Lr65* 的来源和遗传位置推测,它很可能与 *LrAlt* 是同一个基因,但更准确的结论还需要进一步进行这 2 个基因的等位性测试<sup>[1]</sup>。此外,与 *LrAlt* 和 *Lr65* 一样,定位在小麦 2AS 染色体上的抗叶锈病基因有 *Lr17*(*Lr17a* 和 *Lr17b*)、*Lr37* 和 *Lr45*。其中,*Lr37*<sup>[12]</sup> 源自偏凸山羊草(*Aegilops ventricosa* Tausch),*Lr45*<sup>[13]</sup> 源自黑麦(*Secale cereale*),与 *LrAlt* 和 *Lr65* 来源不同。*Lr17a*<sup>[14]</sup> 定位于 *Xgwm614*(位于基因的近端粒侧)与 *Xgwm407*(位于基因的近着丝粒侧)之间,与其分别相距 0.7 和 2.5 cM,与 *LrAlt* 和 *Lr65* 位于不同的染色体区段。

SSR 由于其具有多态性好、共显性和便于检测等诸多优点已被广泛应用于分子遗传学研究<sup>[15]</sup>。目前,确认与 *LrAlt* 连锁的多态性 SSR 标记已达 6 个。本研究筛选到 2 个与 *LrAlt* 紧密连锁并与 *Xbarc212* 共分离的 SSR 标记 *Xbarc124* 和 *Xgwm614*,这与 Volker 等<sup>[1]</sup> 的结果一致。据 Graingenes 2.0 的定位结果,*Xbarc124* 位于 *Xbarc212* 的近端粒侧,与其相距 2.7 cM。在本研究中 *Xbarc124* 与 *Xbarc212* 未发生遗传交换,但其物理位置可能位于 *Xbarc212* 的近端粒侧,距离 *LrAlt* 更近。

小麦的基因组庞大,为异源六倍体(AABBDD),且基因组中含有大量高度重复序列(>80%)。因此,在小麦中进行精细遗传作图和图位克隆比较复杂。由于禾本科作物的基因组间存在高水平的共线性(比如小麦和短柄草),利用比较基因组学策略对基因进行精细遗传作图成为可能<sup>[16-18]</sup>。*M13D232* 和 *Pm6* 等基因均通过该策略构建了高密度的分子标记连锁图谱<sup>[19-20]</sup>。本研究利用比较基因组学策略新开发了 4 个与 *LrAlt* 紧密连锁的 EST-STS 标记(*BE498683*、*BE471132.1*、*BG605273* 和 *CD454629*)。这也充分证实了比较基

因组学策略在小麦基因的精细作图中具有重要应用价值。

本研究共建立与 *LrAlt* 紧密连锁的 9 个分子标记(*Xbarc124*、*Xgwm614*、*BE498683*、*BE471132.1*、*BG605273*、*CD454629*、*BQ903719*、*BE498358* 和 *TC90641*),其中 2 个 SSR 标记(*Xbarc124* 和 *Xgwm614*)和 4 个 EST-STS 标记(*BE498683*、*BE471132.1*、*BG605273* 和 *CD454629*)在本实验中共分离,定位于基因的近着丝粒侧,与 *LrAlt* 相距 1.9 cM,与 Wang 等<sup>[2]</sup> 和 Volker 等<sup>[1]</sup> 建立的与抗叶锈病基因最紧密连锁的分子标记 *Xbarc212* 和 *Xwmc382*(等)共分离。这些研究结果对 MAS (Marker Assisted Selection) 和抗病基因聚合具有重要意义。

### 参 考 文 献

- [1] Volker M, Davinder S, Charlotte S, et al. Characterization and mapping of *Lr65* in spelt wheat 'Altgold Rotkorn' [J]. Plant Breed, 2012, 131: 252-257
- [2] Wang Y J, Peng H R, Liu G, et al. Identification and molecular mapping of a leaf rust resistance gene in spelt wheat landrace Altgold [J]. Euphytica, 2010, 174: 371-375
- [3] Sourdille P, Singh S, Cadalen T. Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L) [J]. Funct Integr Genomics, 2004, 4: 12-25
- [4] Gadaleta A, Giancaspro A, Giove S L, et al. Genetic and physical mapping of new EST-derived SSRs on the A and B genome chromosomes of wheat [J]. Theor Appl Genet, 2009, 118(5): 1015-25
- [5] Bossolini E, Wicker T, Knobel P A, et al. Comparison of orthologous loci from small grass genomes *Brachypodium* and rice: implications for wheat genomics and grass genome annotation [J]. Plant J, 2007, 49: 704-717
- [6] Devos K M. Updating the 'crop circle' [J]. Curr Opin Plant Biol, 2005, 8: 155-162
- [7] Moore C, Devos K M, Wang Z, et al. Cereal genome evolution: Grasses, line up and form a circle [J]. Curr Biol, 1995, 5: 737-739
- [8] Talbert L E, Blake N K, Chee P W. Evaluation of 'sequence-tagged-site' PCR products as molecular markers in wheat [J]. Theor Appl Genet, 1994, 87: 789-794
- [9] 刘子记, 朱婕, 华为, 等. 小麦抗白粉病基因 *pml2* 的 EST 连锁图谱构建和比较基因组学分析 [J]. 作物学报, 2011, 37(9): 1569-1576
- [10] Lincoln S, Daly M, Lander E. Constructing Genetic Maps with

- Mapmaker/EXP3. 0 [M]. 3 ed. Whitehead Institute, Cambridge, Massachusetts, USA; Whitehead Institute Techn Rep, 1992
- [11] Faris J D, Zhang Z C, Fellers J P, et al. Micro-colinearity between rice, *Brachypodium*, and *Triticum monococcum* at the wheat domestication locus Q[J]. *Funct Integr Genomics*, 2008, 8:149-164
- [12] Blaszczyk L, Goyeau H, Huang X Q, et al. Identifying leaf rust resistance genes and mapping gene *Lr37* on the microsatellite map of wheat[J]. *Cell Mol Bio*, 2004, 9(4B):869-78
- [13] Soliman A S, Heyne E G, Johnston C O. Genetic analysis of leaf rust resistance in eight differential varieties of wheat[J]. *Crop Sci*, 1964, 4:246-248
- [14] Bremenkamp-Barrett B, Faris J D, Fellers J P. Molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr17a* in wheat[J]. *Crop Sci*, 2008, 48:1124-1128
- [15] Hua W, Liu Z J, Zhu J, et al. Identification and genetic mapping of *pm2*, a new recessive wheat powdery mildew resistance gene derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var *dicoccoides*) [J]. *Theor Appl Genet*, 2009, 119:223-230
- [16] Qi L L, Echaliier B, Chao S, et al. A chromosome bin map of 16,000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat [J]. *Genetics*, 2004, 168:701-712
- [17] Kumar S, Mohan A, Balyan H S, et al. Orthology between genomes of *Brachypodium*, wheat and rice [J]. *BMC Res Notes*, 2009, 2:93
- [18] The International *Brachypodium* Initiative. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon* [J]. *Nature*, 2010, 463:763-768
- [19] Qin B, Cao A Z, Wang H Y, et al. Collinearity-based marker mining for the fine mapping of *Pm6*, a powdery mildew resistance gene in wheat [J]. *Theor Appl Genet*, 2011, 123:207-218
- [20] Zhang H T, Guan H Y, Li J T, et al. Genetic and comparative genomics mapping reveals that a powdery mildew resistance gene *MLD232* originating from wild emmer co-segregates with an NBS-LRR analog in common wheat (*Triticum aestivum* L) [J]. *Theor Appl Genet*, 2010, 121:1613-1621

责任编辑: 袁文业