

中国小麦条锈菌4个流行小种的RAPD标记*

曹丽华, 康振生, 赵杰, 黄丽丽, 魏国荣

(西北农林科技大学 植保学院 生物技术中心, 陕西 杨凌 712100)

[摘要] 以210条随机引物,对目前中国小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *Tritici*)的主要优势菌系进行了RAPD片段的规模筛选,寻找到了条中31号、条中29号、条中23号、水源类型4个流行生理小种的特异性RAPD标记。此结果表明,通过寻找小麦条锈菌生理小种的特异性RAPD片段,能够建立起中国小麦条锈菌生理小种的分子检测体系。

[关键词] 小麦条锈菌; RAPD; 分子标记

[中图分类号] S435.121.4⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)07-0037-04

小麦条锈病是我国小麦生产上的重要病害之一。使用抗病品种,进行品种的合理布局与轮换是防治小麦条锈病经济而有效的措施。然而,品种抗锈性的丧失是抗病品种应用中最突出的问题,大量研究^[1,2]表明,条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)新小种的产生和发展是导致小麦抗病性丧失的主要原因。因而,监测小麦条锈菌生理小种的类型及小种组成的变化,对小麦抗病品种的选育及合理利用具有重要的实际意义。

作为活体营养寄生菌,小麦条锈菌常规的生理小种鉴定及监测,借助于一整套鉴别寄主及辅助鉴别寄主上的反应型来进行,其方法繁杂,工作量大,耗时长,准确性也易受鉴定条件等诸多因素的影响。近年来,分子生物学技术的迅速发展,为深入认识寄主和病原物相互作用的本质提供了新途径^[3]。RAPD技术可以在DNA序列未知的情况下,检测基因组的多个位点,便于快速寻找多个DNA样品间的多态性。RAPD标记是反映自然变异的中性遗传标记,不受环境变化、生理因素、发育阶段的影响,不依赖基因表达与基因互作,因此不为寄主的强烈选择作用所干扰,特别适合于无法人工培养的小麦条锈菌遗传分化的研究^[4]。

采用RAPD技术,Smith等^[5]区分了*P. shordei*与*P. hordei*,以及小麦上的*P. graminis*,*P.*

recondite,*P. striiformis*。Chen等^[6]研究了北美不同地域115个小麦条锈菌菌株,发现小种间及小种内单孢菌系间均存在DNA多态性;然而,2001年Steele等^[7]利用RAPD和AFLP技术分析澳大利亚和新西兰的条锈菌群体时,却未发现小种间及小种内的遗传多态性,因此他们推测澳大利亚和新西兰的各条锈菌小种是由单一菌系渐进突变而成的。在中国小麦条锈菌的研究方面,单卫星等^[8]对13个生理小种的16个模式菌系进行了RAPD分析,检测到了小种间和小种内丰富的DNA多态性,得到了分离系特异的RAPD图谱,并从分子水平证实小麦条锈菌群体存在远距离的菌源交流,但该研究并未找到小种特异性的分子标记。

鉴于中国小麦条锈菌RAPD研究所筛选的随机引物数较少,难以全面反映小麦条锈菌的遗传多样性,本研究拟以优化的RAPD分析体系,规模化筛选随机引物,寻找中国小麦条锈菌流行小种的相关分子标记,以便快速鉴定及检测相应小种,为小麦条锈病的综合防治和抗病育种提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌种的繁殖与常规鉴定

供试菌种由西北农林科技大学植物保护学院植物免疫室提供,条锈菌单孢系的分离、鉴定见文献

* [收稿日期] 2003-06-09

[基金项目] 国家“973”计划项目(G200016201)

[作者简介] 曹丽华(1971-),女,山西临汾人,讲师,在读博士,主要从事植物免疫学研究。

[通讯作者] 康振生(1957-),男,四川安岳人,教授,博士生导师,主要从事植物免疫学研究。

[1]; 夏孢子的繁殖在铭贤 169(对所有已知小种均感染)上进行,菌种真空封存于-70 备用。

1.2 小麦条锈菌基因组DNA(gDNA)的提取

采用Chen等^[6]的方法,并略作改良。取25mg夏孢子,加适量灭菌石英砂、液氮,反复研磨至粉状,转入离心管中,加1mL预冷的提取缓冲液(100mmol/L Tris-HCl pH8.0; 150mmol/L NaCl, 100mmol/L EDTA)充分混匀,随后加入60μL质量分数20%的SDS,置65℃水浴1h,加150μL 5mol/L NaCl与130μL CTAB/NaCl(1gCTAB溶于10mL 0.7mol/L NaCl中)后继续65℃水浴1h;加等体积酚-氯仿-异戊醇与氯仿分别抽提纯化,再加适量Rnase消化RNA后,以2倍体积无水乙醇-20℃沉淀DNA。采用紫外分光光度法测定gDNA的质量与浓度。

1.3 小麦条锈菌的RAPD分析

10bp随机引物购自上海生工生物工程公司;dNTPs与Taq酶,MgCl₂,10×Reaction Buffer均购自华美生物工程公司。RAPD反应体系为25μL,其中10×Reaction Buffer 2.5μL,MgCl₂(25mmol/L) 2.0mmol,dNTPs(2.5mmol/L) 0.15mmol,模板DNA(20ng/μL) 40ng,引物(10ng/μL) 10ng,Taq(3U/μL) 1.5U,ddH₂O

15.50μL。每次反应均设无菌去离子水阴性对照。扩增在PTC-100热循环仪(MJRESEARCH, Inc)上进行:94℃,5min,1个循环;94℃,30s,36℃,40s,72℃,90s,45个循环;72℃,7min,1个循环。扩增产物用质量分数1.5%琼脂糖凝胶,1×TAE电泳缓冲液电泳分离,以ULTRA-UULET PRODUCTS凝胶成像系统记录分析RAPD谱型。

2 结果与分析

通过对中国小麦条锈菌5个流行生理小种的RAPD分析,共计筛选出了10碱基随机引物210条。研究表明,各生理小种间存在着丰富的遗传变异,多数随机引物的扩增谱型在小种间存在差异。其中以S1114(TGGTTGCGGA)扩增得到条中31号长度约1040bp的特异条带(图1);以S239(GGGTGTGCA G)、S23(AGTCA GCCAC)扩增得到条中29号长度约1700bp(图2)及230bp的特异条带(图3);以S360(AAGCGCCTC)、S413(GGTGGTCAA G)扩增得到条中23号长度约1100,1540bp的特异RAPD谱带(图4、图5);以S65(GATGACCGCC)扩增得到水源类型长度约1100bp的特异RAPD谱带(图6)。

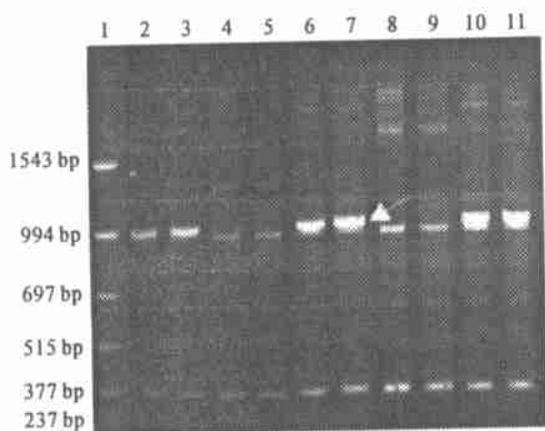


图1 条中31号S1114的RAPD谱型

1,2,5,7,10,11.条中31号单孢菌系1~6;
3,4,8,9.条中29号、条中23号、水源类型、杂46类型;
6. DNA marker

Fig.1 The RAPD patterns of CY31 with primer S1114
1,2,5,7,10,11. were RAPD patterns of different single-spore isolations of CY31;3,4,8,9. RAPD patterns of Cy29,CY23, pathotype Shuiyuan,pathotype Za46; Lane 6. DNA markers

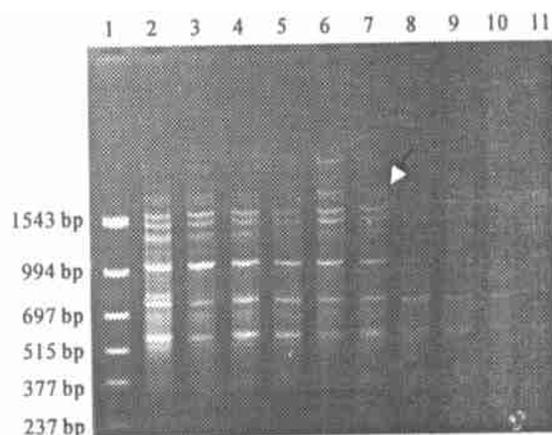


图2 条中29号S239的RAPD谱型

1. DNA marker;2~7.条中29号单孢菌系1~6;
8~11.条中31号、条中23号、
水源类型、杂46类型

Fig.2 The RAPD patterns generated by primer S239
1. DNA maker;2~7. RAPD patterns of different single-spore isolations of CY29;8~11. were RAPD patterns of Cy31,CY23,pathotype Shuiyuan,pathotype Za46

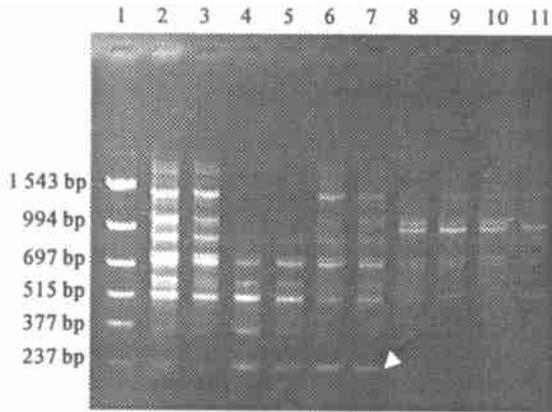


图 3 条中 29 号 S23 的 RAPD 谱型
 1. DNA marker; 2~7. 条中 29 号单孢菌系 1~6;
 8~11. 条中 31 号、条中 23 号、水源类型、杂 46 类型;
 Fig. 3 RAPD patterns generated by primer S23
 1. DNA marker; 2~7. RAPD patterns of different single-spore isolations of CY29; 8~11. RAPD patterns of CY31, CY23, pathotype Shuiyuan, pathotype Za46

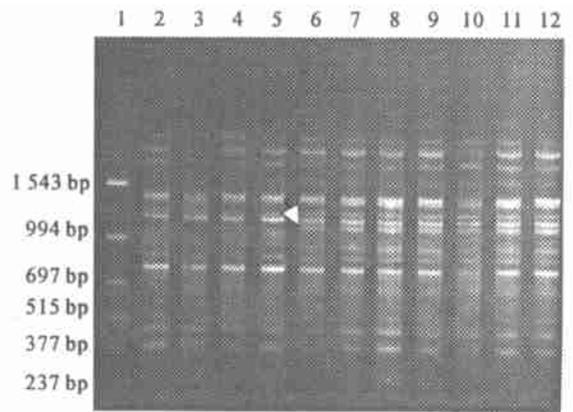


图 4 条中 23 号 S360 的 RAPD 谱型
 1. DNA marker; 2~5. 条中 31、条中 29 号、水源类型、杂 46 类型; 6~12. 条中 23 号单孢菌系 1~7
 Fig. 4 RAPD patterns generated by primer S360
 1. DNA marker; 2~5. RAPD patterns of CY31, CY29, pathotype Shuiyuan, pathotype Za46; 6~12. RAPD patterns of different single-spore isolations of CY23

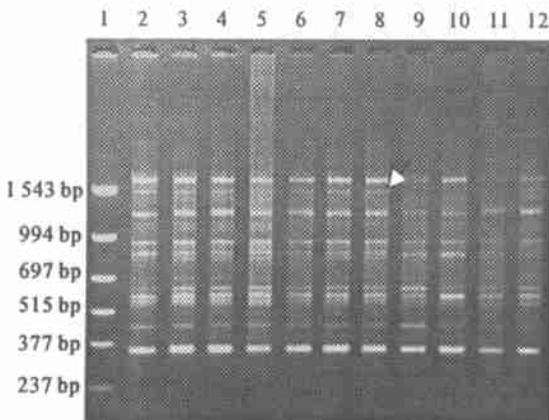


图 5 条中 31 号 S413 的 RAPD 谱型
 1. DNA marker; 2~8. 条中 23 号单孢菌系 1~7;
 9~12. 条中 31 号、条中 29 号、水源类型、杂 46 类型
 Fig. 5 RAPD patterns of CY31 with primer S413
 1. DNA marker; 2~8. RAPD patterns of different single-spore isolations of Cy23; 9~12. RAPD patterns of CY31, CY29; pathotype Shuiyuan, pathotype Za46

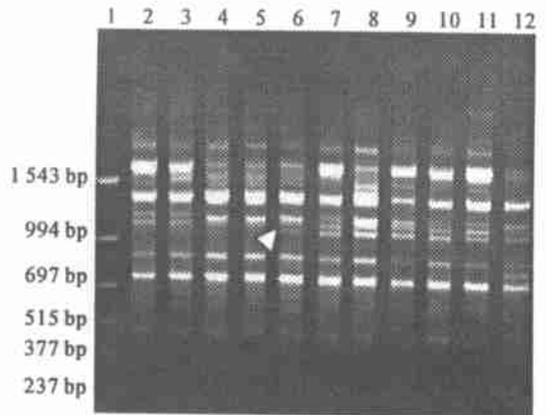


图 6 水源类型 S65 的 RAPD 谱型
 1. DNA marker; 2~5. 条中 31 号、条中 29 号、条中 23 号、杂 46 类型; 6~12. 水源类型单孢菌系 1~7
 Fig. 6 RAPD patterns generated by primer S65
 1. DNA marker; 2~5. RAPD patterns of CY31, CY29, CY23, pathotype Za46; 6~12. RAPD patterns of different single-spore isolations of pathotype Shuiyuan;

3 讨论

小麦条锈菌群体组成复杂,常多个小种并存,混合发生。小种之间由于适应性不同而竞争力各异,加之不同抗性小麦品种、环境生态等因素的选择作用,新的小种不时出现,小种的发生频率也不断变化。多年来,小麦条锈菌生理小种监测一直是小麦安全生产及抗病育种的重要环节^[1,2]。应用现代分子标记技术进行小麦条锈菌的分类、鉴定,改变了过去常规鉴定程序繁琐、周期长及受环境条件限制人员判断误差大的状况,可以快速处理大量条锈菌标样,全面了

解病菌群体的遗传结构与动态变化^[9]。

本文在大量筛选随机引物的基础上,对小麦条锈菌 5 个主要致病小种进行了 RAPD 分析,获得了条中 31、条中 29、条中 23、水源类型特异性的 RAPD 标记。多批次扩增分析发现,这些 RAPD 标记稳定性强、重复性好。这表明规模筛选随机引物,可以找到中国小麦条锈菌相应生理小种的特异性 RAPD 标记。在此基础上,进一步将其转化为 SCAR 标记或合成相应的 DNA 探针,就可以初步建立小麦条锈菌流行生理小种的分子鉴定、检测体系,简化

常规鉴定的繁琐程序,使鉴定周期从几个月缩短到几天,这对准确、客观地监测小麦条锈菌群体组成,控制锈病流行及抗病育种具有重要意义。

[参考文献]

- [1] 李振歧,曾士迈. 中国小麦锈病[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002
- [2] 李振歧. 我国小麦品种抗条锈性丧失原因及其解决途径[J]. 中国农业科学, 1980, 13(3): 72- 76
- [3] 王金生. 分子植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999
- [4] 王和勇, 陈敏, 廖文华, 等. RFLP, RAPD, AFLP 分子标记及其在植物生物技术中的应用[J]. 生物学杂志, 1999, 16(4): 24- 25
- [5] Smith J M, Newton A C, Buck K W. DNA Polymorphism as genetic markers in cereal rust fungi[J]. Eur Mediterr Cereal Rust Powdery Mildew, 1992, 8: 22- 24
- [6] Chen X M, Line R F, Leung H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis* [J]. Phytopathology, 1993, 83: 1489- 1497
- [7] Steele K A, Humphreys E, Welling C R, et al. Support for a stepwise mutation model for pathogen evolution in Australasian *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* by use of molecular markers[J]. Plant Pathology, 2001, 50: 174- 180
- [8] 单卫星, 陈受宜, 吴立人, 等. 我国小麦条锈菌模式菌系的 DNA 指纹分析[J]. 科学通报, 1996, 41(15): 1427- 1430
- [9] 单卫星, 李振歧. PCR 技术在植物病原物和植物抗病研究中的应用[J]. 植物生理通讯, 1995, 31: 137- 143

RAPD markers of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China

CAO Li-hua, KANG Zheng-sheng, ZHAO Jie, HUANG Li-li, WEI Guo-rong

(Biotech Center, College of Plant Protection, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Rapid identification of the races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* by molecular technique was very important to monitor and control wheat stripe rust in China. In this paper, five physiological races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* were analysed with 210 primers by RAPD technique. The special RAPD fragments of CY31, CY29, CY23 and Shuiyuan pathotype were founded successfully. The results here indicates that a molecular identification system for the races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China could be established through cosmically searching special RAPD fragments of different races.

Key words: wheat stripe rust; RAPD; molecular marker

· 简 讯 ·

“砂地柏杀虫作用研究”通过教育部组织的成果鉴定

由教育部组织、委托西北农林科技大学主持,于2004年4月27日在陕西杨凌对西北农林科技大学无公害农药研究服务中心博士生导师张兴教授主持的“砂地柏杀虫作用研究”进行了技术成果鉴定。鉴定委员会认为:(1)该项目在国内外首次发现并报道了砂地柏杀虫活性;(2)测试并鉴定出松油烯-4-醇、鬼臼毒素及脱氧鬼臼毒素等为砂地柏的主要杀虫活性物质;(3)率先开展了鬼臼毒素衍生物结构与杀虫活性关系研究,首次确定具有杀虫活性的结构单元;(4)初步阐明砂地柏粗提物及主要活性物质对昆虫的致毒机理;(5)研制出砂地柏系列杀虫制剂样品,对多种农业害虫防效优良。

该成果申请国家发明专利6项,其中2项已获专利授权。鉴定专家一致认为,该项研究立题符合国际农药发展方向,研究方法和路线科学合理,技术资料齐全,数据翔实可靠,研究手段先进,试验工作扎实、细致,科研成果易与产业化相结合。该项研究成果居国际领先水平。建议课题组进一步深入研究砂地柏活性物质的杀虫作用机理、活性物质分离及构效关系,加快成果转化,使其尽早服务于农产品的安全生产。

(温晓平 供稿)