

小麦条锈菌条中 32 号生理小种 SCAR 检测标记的建立

张 勃^{1,2}, 郝保军¹, 王保通¹, 李 强¹, 李高宝¹, 郭海鹏³, 王 芳¹, 康振生¹

(1 西北农林科技大学 植保学院 陕西省农业分子生物学重点实验室, 陕西 杨凌 712100;
2 甘肃省农业科学院 植物保护研究所, 甘肃 兰州 730070; 3 陕西省植物保护工作站, 陕西 西安 710003)

【摘 要】 【目的】建立具有应用价值的小麦条锈菌条中 32 生理小种的 SCAR 检测标记。【方法】用 100 条随机引物对我国目前主要流行的 12 个小麦条锈菌生理小种进行 RAPD 筛选, 寻找特异性片断, 并对其进行克隆、测序, 将该特异性片段转化成条中 32 号小种的 SCAR 专化型标记。设计并合成 SCAR 特异性引物, 对不同来源的条中 32 号进行 SCAR 检测。【结果】引物 S1271 从条中 32 号生理小种中扩增出长度为 320 bp 的特异片段, 该片段可作为条中 32 号的 SCAR 标记。从不同来源的条中 32 号生理小种中扩增出了筛选到的 SCAR 标记。【结论】成功建立了条中 32 号专化 SCAR 标记。

【关键词】 小麦条锈菌; 条中 32 号; RAPD; SCAR; 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(2009)01-0177-05

Establishment of scar detection marker of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* race CY32 in China

ZHANG Bo^{1,2}, HAO Bao-jun¹, WANG Bao-tong¹, LI Qiang¹, LI Gao-bao¹,
GUO Hai-peng³, WANG Fang¹, KANG Zhen-sheng¹

(1 College of Plant Protection and Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Institute of Plant Protection, Gansu Academy of Agriculture Science, Lanzhou, Gansu 730070, China; 3 Plant Protection Station in Shaanxi Province, Xi'an, Shaanxi 710003, China)

Abstract: 【Objective】The research was to establish a useful SCAR marker of CY32 examination about strip rust. 【Method】The special fragment of 12 strip rust races from 100 random primers in China were sifted and cloned. The sequence results were tested and design scar marker was made. Special PCR primer of scar was designed, and CY32 from different areas about scar was tested. 【Result】A special fragment of the length is 320 bp by RAPD sifting from primer S1271. It can be used as the CY32 SCAR marker. SCAR marker from different CY32 was amplified. 【Conclusion】Special SCAR marker about CY32 was established successfully.

Key words: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*; CY32; RAPD; SCAR; molecular marker

小麦条锈病(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) 是我国小麦生产中最重要 的病害之一, 其发生面积广、流行性强、危害十分严重。目前, 防治小麦条锈病的主要途径是以培育抗病品种为主的综合防治^[1]。在小麦抗病品种应用中, 突出的问题是品种抗条锈性的丧失。大量研究证明, 小麦品种抗条锈

* [收稿日期] 2008-01-18
[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD08A05); 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2006K02-G10-01); 教育部长江学者和创新团队发展计划项目(200558); 教育部“高等学校学科创新引智计划项目”(No. B07049)
[作者简介] 张 勃(1980—), 男, 陕西西安人, 在读硕士, 主要从事小麦条锈菌分子监测研究。E-mail: zbo29@nwsuaf.edu.cn
[通信作者] 王保通(1964—), 男, 陕西合阳人, 教授, 主要从事小麦病害研究。E-mail: wangbt@nwsuaf.edu.cn

性的丧失,主要是由条锈菌毒性新小种的产生和发展引起的^[2]。小麦条锈菌体积小、繁殖快、群体大、毒性变异频率高。目前,我国正式命名的小麦条锈菌生理小种有 32 个^[3],其中条中 32 号生理小种是造成我国自 1999 年以来小麦条锈病连续流行的主要优势小种。

小麦条锈菌是不完全锈菌,仅靠双核的夏孢子传播完成周年循环,具有典型的无性系繁殖特征,但其群体却表现出很强的抗锈基因突破能力,引起条锈病的周期性爆发流行,给农业生产造成了严重损失^[4]。小麦条锈菌寄生专化性强,目前还无法人工培养,且尚未发现有性世代。常规的小种鉴定及监测均是基于鉴别寄主进行的,操作方法繁杂、费工时,因而限制了田间小麦条锈菌标样的大规模鉴定。近年来,随着分子生物学技术的迅速发展,分子标记技术已广泛用于病原菌分类及毒性变异、致病性分化及演变、群体遗传学及遗传育种研究中,为深入认识寄主和病原物相互作用的本质提供了新的途径^[5]。在对小麦条锈菌的研究中,Newton 等^[6]以同工酶和双链 RNA 为手段,探讨了英国小麦条锈菌专化型及小种间的关系,发现专化型间存在明显差异,但小种间的差异不明显。Zambino 等^[7]对禾谷类锈菌核糖体 DNA 内部转录间隔区(ITS)进行了序列分析,发现 ITS 存在种间差异。Shan 等^[8]分析了中国小麦条锈菌 13 个分离系的 RAPD 谱型,认为小种间及小种内存在遗传变异。康振生等^[9]对目前中国小麦条锈菌的主要优势菌系进行了 RAPD 片段的规模筛选,找到了条中 31 号、条中 29 号、条中 23 号和水源类型 4 个流行生理小种的特异性 RAPD 标记,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。曹丽华等^[10-11]分别获得了条中 29、条中 31 小麦条锈菌生理小种的特异条带,并建立了 SCAR 标记。根据 2001~2005 年度我国小麦条锈菌生理小种监测结果,条中 32 号在全国出现的频率一直居于首位,分别达到 28.79%,34.6%,29.7%,29.23%和 29.97%^[12],是造成我国近年来小麦条锈病连续流行的主要优势小种。当前,我国小麦抗条锈病育种主要以抗条中 32 号生理小种为主,所以建立条中 32 号快速检测的 SCAR 标记尤为必要。本研究以小麦条锈菌多个单孢菌系为对象,对大量随机引物进行了筛选,利用 RAPD 技术揭示不同生理小种间的差异,寻找条中 32 号生理小种的 PCR 特异性 RAPD 片段,并将其转化为

更稳定的 SCAR 检测标记,以期建立具有实用价值条中 32 号生理小种分子检测技术奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种 供试菌种为水源 11-1(Su11-1)、水源 11-3(Su11-3)、水源 11-4(Su11-4)、水源 11-5(Su11-5)、水源 11-6(Su11-6)、水源 11-7(Su11-7)、水源 11-10(Su11-10)、水源 11-14(Su11-14)、条中 29(CY29)、条中 31(CY 31)、条中 32(CY 32)、Hybrid46-8 等的单孢菌系,均由西北农林科技大学植物病理研究所太白条锈病试验站提供。各生理小种采用常规方法在鉴别寄主上进行鉴定,并在感病品种辉县红上大量繁殖,收集新鲜夏孢子用于试验。

1.1.2 试剂 所用的 100 条 10 bp 碱基随机引物购自上海生工生物工程公司;dNTPs、*Taq* 酶、 $MgCl_2$ 、 $10\times$ Reaction Buffer 均购自华美生物工程公司;Agarose Gel Extraction Kit 回收盒,Roche 公司产品;T4 DNA 连接酶,上海捷瑞生物工程有限公司产品;感受态大肠杆菌 GM-109,由西北农林科技大学生物中心第 7 工作室提供;U-Gene 微量质粒提取盒。

1.2 小麦条锈菌基因组 DNA 的提取

小麦条锈菌 DNA 的提取参考韩冰^[13]的方法进行。取 25 mg 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 1 mL 预冷的提取缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0),150 mmol/L NaCl,100 mmol/L EDTA)充分混匀,置 65℃水浴 2 h。依次加等体积 $V(\text{酚}):V(\text{氯仿}):V(\text{异戊醇})=25:24:1$ 的混合物和氯仿抽提纯化,再加 2 倍体积预冷(-20℃)的异丙醇混匀,静置后提取。最后用体积分数 70%乙醇洗涤后干燥,加入适量 TE 溶液溶解。

1.3 小麦条锈菌的 RAPD 分析

RAPD 反应体系为 25 μL : $10\times$ Reaction Buffer 2.5 μL , $MgCl_2$ (25 mmol/L) 2 μL , dNTPs (10 mmol/L) 1.5 μL ,模板 DNA(50 ng/ μL) 1 μL ,引物 (10 ng/ μL) 1 μL ,*Taq* 酶(5 U/ μL) 0.2 μL ,ddH₂O 16.8 μL 。每次反应均设立 ddH₂O 阴性对照。扩增在 PCR 仪上进行,反应程序为:94℃,10 min;94℃ 30 s,36℃ 30 s,72℃ 90 s,43 个循环;72℃ 7 min。扩增产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶、 $1\times$ TAE 电泳缓冲液电泳分离,用凝胶成像系统记录分析 RAPD 谱型。

1.4 特异片段的回收、克隆与测序

在 ULTRA-URLET PRODUCTS 凝胶成像仪的紫外光下,切取小种特异性条带,用 Agarose Gel Extraction Kit 回收、纯化。将回收产物克隆入 pGEM-T Easy 质粒,反应体系为 10 μ L:5 μ L 2 $\times$ Rapid Ligation Buffer,1 μ L T4 DNA 连接酶,3 μ L 目的 DNA 片段,1 μ L pGEM-T Easy 质粒载体,4 $^{\circ}$ C 连接 12 h。将连接产物转化大肠杆菌 GM-109 感受态细胞中,蓝、白斑筛选重组质粒^[14]。用 U-Gene 微量质粒提取盒提取白色重组菌落的质粒,进行酶切鉴定,反应体系为 20 μ L:10 $\times$ Buffer H 2.0 μ L, *Eco*R I (10 U/ μ L)1.0 μ L,1.0 μ g 质粒,100 $\times$ BSA 0.20 μ L,补水至 20 μ L,37 $^{\circ}$ C 酶切 2.5~3 h。用 10 g/L 琼脂糖凝胶、1 $\times$ TAE 电泳缓冲液电泳分析酶切产物。

酶切鉴定出目的 DNA 片段后,将其送交上海捷瑞生物工程公司进行双向测序,测序引物为: SP6: 5'-CATACGATTTAGGTGACACTATAG-3'; T7: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGCGA-3'。测序反应体系为 10 μ L:质粒 DNA 200 ng, Sequencing Buffer 1.8 μ L,Big Dye 0.5 μ L,引物 T7 和 SP6(3.2 pmol/ μ L)各 1.0 μ L, ddH₂O 补至 10 μ L。PCR 反应程序为:96 $^{\circ}$ C 1 min; 96 $^{\circ}$ C 10 s,50

$^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 4 min,25 个循环。

1.5 SCAR 标记的转化与鉴定

根据 1.4 节测序结果,从序列两端设计 1 对 PCR 特异引物:

CY32SP-1: 5'-CGC TAT GTG CGG ACA GAA GG-3';CY32SP-2: 5'-TGA GGA TCG AGG CTA TGA GG-3'。引物由上海捷瑞生物工程公司合成。

参考文献[14]的方法,确立该引物对的优化 PCR 反应条件。用优化的 PCR 方法检测相应生理小种的不同单孢系,分别以 1.1.1 节中除条中 32 号外的 11 个其他生理小种及超纯水为对照,获得条中 32 号生理小种的专化 SCAR 标记。为明确该 SCAR 标记的应用价值,对来自四川和陕西宝鸡、太白、杨凌等地区的条中 32 号菌株进行检测。

2 结果与分析

2.1 小麦条锈菌生理小种特异性条带的筛选

共计筛选 10 碱基随机引物 100 条,其中引物 S1271(CTTCTCGGTC)从条中 32 号生理小种中扩增出 1 条长度约为 320 bp 的特异性条带(图 1),多次 RAPD 分析表明,该条带扩增量 大 且 稳 定,在 供 试 的 其 他 条 锈 菌 菌 系 中 均 无 此 扩 增 产 物。

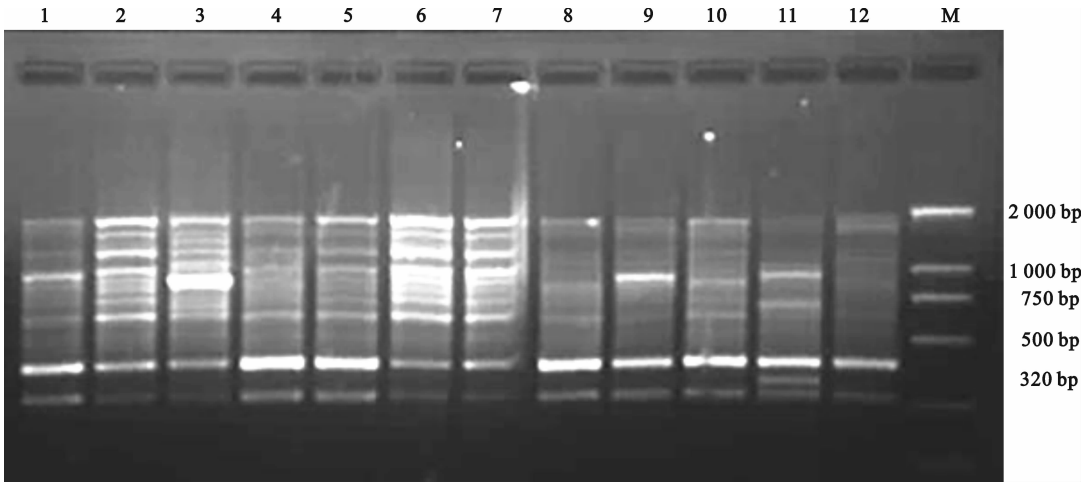


图 1 小麦条锈菌的 RAPD 图谱(引物 S1271)

1~12. 分别为 Su11-1、Su11-3、Su11-4、u11-5、Su11-6、Su11-7、Su11-10、Su11-14、CY29、CY31、CY32 和 Hybrid46-8 扩增产物;M. DL-2000 Marker;泳道 11 中约 320 bp 片段为特异性条带。

Fig.1 RAPD figure of the wheat strip rust (the figure was amplified by S1271) (special band was marked by an arrow point)
1-12. Su11-1, Su11-3, Su11-4, Su11-5, Su11-6, Su11-7, Su11-10, Su11-14, CY29, CY31, CY32, Hybrid46-8;
M. DL-2000 Marker;11 is the special band about 320 bp.

2.2 条中 32 号特异性 RAPD 片段的序列分析

用 T7 和 SP6 引物进行双向测序,对测序结果

用 DNAMAN 软件进行整合,获得 RAPD 片段的全长序列(图 2)。

1	CTGATCGCGG	CAAGGCTCAT	TTTCGCAATC	GCTATGTGCG	GACAGAAGGA	TATTTAGCCG
61	AACAACAGGC	AGGAAAAGATT	CTCTATCGTG	GCGTATTTGG	TACGGAAAAA	TCAGGAGGAT
121	GGTTAAACAA	CGCCTTGGAC	TTTAAGCTTA	AAAATGTTGC	CAACACCAAC	GTTGTTTATT
181	GGGGCGGTCA	ATTATTGGCA	CTATGGGAAG	CTTCCCATCC	TCATAGCCTC	GATCCTCATA
241	CCTTAGAGAC	TCAAGGTATT	GCGACTTTTA	ATGGCGTATT	GTCTGAGAAT	ACACCTTTT
301	CTGCTCATCC	CGCGATCAGA				

图 2 小麦条锈菌条中 32 号 RAPD 片段的全长序列

Fig. 2 RAPD sequence of CY32 of the wheat strip rust

由图 2 可知,获得的小麦条锈菌条中 32 号 RAPD 序列全长 320 bp,经 NCBI 检索未见较长同源序列(所有同源序列均小于 22 bp),该序列已在 GenBank 上登录,登录号为 EU404159。

2.3 条中 32 号 SCAR 检测标记的转化与验证

CY32SP-1 与 CY32SP-2 引物组合的优化 PCR 反应条件如下:PCR 反应体系为:10 × Reaction Buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 2 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.25 μL, 模板 DNA (50 ng/μL) 1 μL, 引物 CY32SP-1 (100 μmol/L) 0.05 μL, 引物

CY32SP-2 (100 μmol/ L) 0.05 μL, *Taq* 酶 (5 U/μL) 0.4μL, ddH₂O 14.75 μL。扩增在 PCR 仪上进行,程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 45 s, 57 ℃ 45 s, 72 ℃ 2 min, 32 个循环;72 ℃ 10 min。

利用上述优化试验体系对不同来源的条中 32 号 SCAR 标记进行验证,结果表明,用 CY32SP-1/ CY32SP-2 可以从不同来源的条中 32 菌中扩增到 SCAR 检测标记,长度为 240 bp,而对照菌系及超纯水中均未扩增出条带(图 3)。

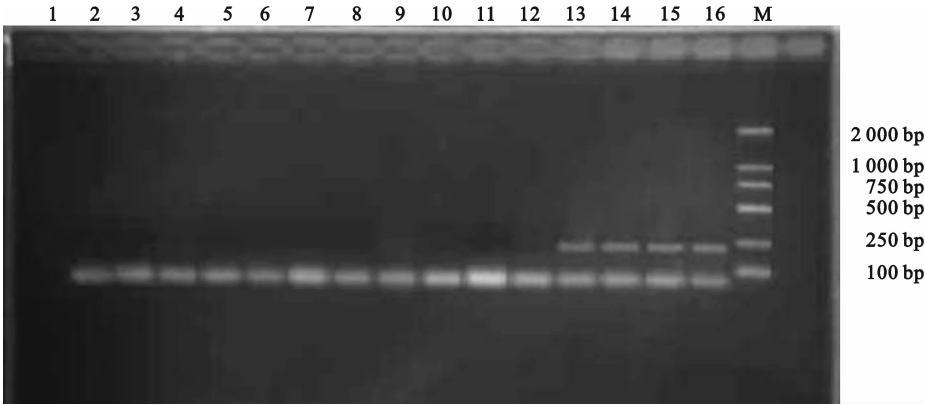


图 3 不同来源条中 32 的 SCAR 标记检测结果

1. 超纯水对照(CK);2~12. 分别为 Su11-1、Su11-3、Su11-4、Su11-5、Su11-6、Su11-7、Su11-10、Su11-14、CY29、CY 31、Hybrid46-8;13. 太白 CY32;14. 宝鸡 CY32;15. 四川 CY32;16. 杨凌 CY32;M. DL-2000 Marker

Fig. 3 SCAR figure of CY32

1. Ultrapure water;2-12 Su11-1, Su 11-3, Su11-4, Su 11-5, Su 11-6, Su 11-7, Su 11-10, Su 11-14, CY2, CY31, Hybrid46-8;13. Taibai CY32;14. Baoji CY32;15. Sichuan CY32;16. Yangling CY32;M. DL-2000 Marker

3 讨 论

小麦条锈菌生理小种类型繁多,变异大,组成复杂,常多个生理小种并存,混合发生。研究表明,流行小种及优势小种的数量变化和类型变异,是导致小麦品种抗锈性减弱的主要因素。多年来,小麦条锈菌生理小种的鉴定一直采用传统方法,操作繁杂,周期长,工作量大,准确性也易受人员、鉴定条件等外界因素的影响。

本研究参考条中 29^[9],条中 31^[10] SCAR 标记的筛选方法,用随机引物对小麦条锈菌 12 个主要致病

小种进行分析,获得了大量的 RAPD 标记,用引物 S1271 筛选得到了条中 32 号生理小种的特异性 RAPD 条带,并将其转化为 SCAR 标记,避免了 RAPD 技术对实验程序和条件变化敏感的缺陷,能够对条中 32 号生理小种进行准确的鉴定。该标记的获得为我国小麦条锈菌自然群体中条中 32 号生理小种的快速分子检测奠定了基础。

[参考文献]

[1] 李振岐,曾士迈. 中国小麦条锈病 [M]. 北京:中国农业出版社,2002.

Li Z Q, Zeng S M. Wheat rusts in China. Beijing: Chinese Agri-

- culture Press,2002 (in Chinese)
- [2] 李振岐. 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(3):72-76.
- Li Z Q,1980. The breakdown of wheat resistance to stripe rust and its control strategy [J]. Scientia Agricultura Sinica,1980 (3):72-76 (in Chinese)
- [3] 万安民,牛永春,吴立人,等. 1991~1996 年我国小麦条锈菌生理专化研究 [J]. 植物病理学报,1999,29(1):15-721.
- Wan A M,Niu Y C,Wu L R,et al. Physiologic specialization of stripe rust of wheat in China during 1991-1996[J]. Acta phytopathologica Sinica,1999 29(1):15-721. (in Chinese)
- [4] Bayles R A,Flath K,Hovmiller M S,et al. Breakdown of the Yr17 resistance to yellow rust of wheat in northern Europe-A case study by the yellow rust sub-group of COST 817[J]. Agronom ie,2000,20:805-811.
- [5] 王金生. 分子植物病理学 [M]. 北京:中国农业出版社,1999.
- Wang J S. Molecular Plant Pathology [M]. Beijing: Chinese Agriculture Press. (in Chinese)
- [6] Newton A,Caten C,Johnson R. Variation for isozyme and double-stranded RNA among isolates of *Puccinia striiformis* and two other cereal rusts [J]. Plant Pathology,1985,34:235-247.
- [7] Zambino P,Roelfs A,Szabo L. Phylogenetic relatedness among species and formae special of cereal rust fungi by DNA sequence analysis of the rDNA internal transcribed spacer(ITS) region [J]. Proc Eur Mediterr Cereal Rusts&Powdery Mildew,1992,8:60-62.
- [8] Shan W,Chen S,Kang Z,et al. Genetic diversity in *Puccinia striiformis* westend. f. sp. Tritici revealed by pathogen-specific repetitive sequence [J]. Can J Bot,1998,76:-587-595.
- [9] 康振生,曹丽华,郑文明,等. 小麦条锈菌条中 29 号生理小种 SCAR 监测标记的建立 [J]. 西北农科技大学学报:自然科学版,2004,33(5):53-56.
- Kang Z S,Cao L H,Zeng W M,et al The development of scar detection marker of *n Puccinia striiformis* f. sp. tritici race CY29 in china [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2004,33(5):53-56. (in Chinese)
- [10] 曹丽华,康振生,郑文明,等. 小麦条锈菌条中 31 号生理小种 SCAR 检测标记的建立 [J]. 菌物学报,2005,24(1):98-103.
- Cao L H,Kang Z S,Zheng W M,et al. The development of scar detection marker of *n Puccinia striiformis* f. sp. tritici race CY31 in china [J]. Mycosystema,2005,24(1):98-103. (in Chinese)
- [11] 曹丽华. 中国小麦条锈菌 4 个流行小种的 RAPD 标记 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2004,32(7):37-40.
- Cao L H,RAPD markers of *Puccinia striiformis* f. sp. tritici in China [J]. Journal of Northwest A&F University: Natuaial Science Edition,2004,32(7):37-40. (in Chinese)
- [12] 王保通,李高定,李 强,等. 2001-2005 年陕西省小麦条锈菌生理小种变化动态 [J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2007,3(35):209-216.
- Wang B T,Li G B,Li Q,et al. Population changes of stripe rust fungus of wheat in Shaanxi province during 2001-2005 [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition,2007,3(35):209-213. (in Chinese)
- [13] 韩 冰. 小麦条锈菌提取方法的比较 [J]. 中国农学通报,2005,22(4):81-83.
- Han B. Comparision of the methods of isolating Wheat Yellow Rust genomic DNA [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2005,22(4):81-83. (in Chinese)
- [14] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术 [M]. 北京: 中国协和医科大学出版社,1999.
- Lu S D,1999. Modern Technique of molecular biological experiment [M]. Beijing:Peking Union Medical College Press,1999. (in Chinese)