

小麦条锈菌 MFLP 分子标记体系的建立与优化

曹丽华^{1,2}, 孟颢光¹, 宗现昭^{1,2}, 刘太国², 陈万权²

(1 河南农业大学 植物保护学院, 河南 郑州 450002; 2 中国农业科学院 植物保护研究所/植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094)

[摘要] **【目的】**建立并优化小麦条锈菌的 MFLP 技术体系。**【方法】**以小麦条锈菌混合菌种为材料, 通过对 DNA 提取、限制性内切酶 2 次酶切、PCR 双重扩增等试验因素的选择优化, 建立适用于小麦条锈菌的 MFLP 分析体系。**【结果】**改良的 CTAB/SDS 法有较好的破壁效果, 所提取的 DNA 品质良好, 完全符合 MFLP 的操作要求。优化确定的最佳 *Mse* I 酶切反应时间为 4 h, 预扩增最适退火温度为 55 ℃, 选择性扩增使用的模板为预扩增产物的 100 倍稀释物, 其最适退火温度为 58 ℃。**【结论】**建立的 MFLP 技术体系可提供清晰、稳定的 MFLP 指纹图谱, 为小麦条锈菌等专性寄生菌的群体遗传学与流行病学研究提供了新的技术手段和方法。

[关键词] 小麦条锈菌; MFLP; 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(2010)12-0179-06

Establishment and optimization of the MFLP analysis of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*

CAO Li-hua^{1,2}, MENG Hao-guang¹, ZONG Xian-zhao^{1,2},

LIU Tai-guo², CHEN Wan-quan²

(1 College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, He'nan 450002, China;

2 State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, CAAS, Beijing 100094, China)

Abstract: **【Objective】**This study was intended to establish the MFLP reaction system special for *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. **【Method】**Mixed uredospores of wheat stripe rust was used as the test material. Several main factors such as the genomic DNA preparation, restriction enzyme digestion and PCR amplification were studied and optimized. **【Result】**The improved CTAB/SDS method was so effective at cell-wall breaking that the DNA product was qualified enough for later MFLP analysis. The optimal digestion time of *Mse* I was 4 h. The best annealing temperature of the preamplification was 55 ℃. As for the selective amplification, a 100-times dilution of the preamplification product was used as template and the preferable annealing temperature was 58 ℃. **【Conclusion】**The MFLP reaction system established in this study always gave the clear and stable MFLP fingerprint, which would provide a new research method for the obligate fungi, such as *P. striiformis* f. sp. *tritici*, in the field of population genetics and epidemiology.

Key words: *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*; MFLP; molecular marker

小麦条锈病是由小麦条锈菌 (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) 引起的一种世界性小麦叶部病害, 发生范围广、流行成灾率高、危害程度大。小麦

条锈病的大区综合防治以培育和使用抗病品种为主^[1], 但由于条锈菌新毒性小种的不断产生和发展, 在生产实践中抗病品种的抗性丧失现象十分严

* [收稿日期] 2010-04-29

[基金项目] 河南省科技攻关计划项目(082102170024; 092300410092); 国家“863”高新技术研究与发展计划项目(2006AA10Z429); 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD08A14)

[作者简介] 曹丽华(1971—), 女, 山西临汾人, 教授, 主要从事小麦锈病分子流行病学研究。E-mail: caolihua@hotmail.com

重^[2]。小麦条锈菌寄生专化性强,无法人工培养,常规的小种鉴定及监测均基于鉴别寄主来进行,方法繁杂、费工费时。与其他真菌相比,小麦条锈菌的群体生物学、遗传学与流行病学研究相对滞后。

近年来,迅速发展的分子生物学技术为深入认识寄主与病原物相互作用的本质提供了新途径^[3],分子标记技术已广泛应用于病原菌的群体遗传和流行特征等各个研究领域。对于小麦条锈菌的群体遗传结构及毒性变异、进化规律,国内外学者进行了大量研究,但研究结论存在一定分歧。如 Newton 等^[4]以同工酶和双链 RNA 为切入点,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。而单卫星等^[5]通过对中国小麦条锈菌 13 个生理小种的 16 个模式菌的 RAPD 分析,检测到了小种间和小种内丰富的 DNA 多态性,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。郑文明等^[6]采用 AFLP 技术,分析了我国小麦条锈菌流行小种的 DNA 指纹特征,发现 AFLP 所揭示的遗传多态性明显高于毒性分析,避免了毒性分析的一些缺陷。曹丽华等^[7-9]建立了以 β -微管蛋白相关序列为基础的小麦条锈菌特异性分子诊断检测技术,并采用 RAPD 技术获得了“条中 29”和“条中 31”的 SCAR 标记。

微卫星锚定片段长度多态性(Microsatellite-anchored fragment length polymorphism, MFLP)技术是 2001 年由 Yang 等^[10]建立的。该技术结合利用了 AFLP 和 SSR 锚定引物技术的双重原理,以特异性引物扩增为基础,充分发挥了 AFLP 和 SSR 锚定引物技术的高效性、安全性和方便性等优点,仅需少量的 DNA 样品,即可充分探查供试样品整个基因组内与微卫星序列相关的限制性片段的遗传变异,产生多态性高、序列特异性强的分子标记,因此开发潜力大、应用前景广阔^[11]。目前,MFLP 已在羽扇豆的遗传连锁图谱构建、目的基因定位和分子标记辅助育种等方面得到应用^[12-14],但在植物病原真菌的研究中尚未见报道。鉴于小麦条锈菌的群体结构、毒性组成复杂多变,遗传背景尚不清晰,且菌种繁殖困难、分子水平的相关研究基础薄弱,本研究拟以小麦条锈菌夏孢子为材料,通过对酶切、预扩增、选择性扩增等试验参数的选择和优化,规范实验操作流程,建立小麦条锈菌专用的 MFLP 反应体系,以期对锈菌、白粉菌等专性寄生菌的遗传变异、群体特性与流行病学研究提供一种新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 供试菌种

在低温自控温室内扩繁条锈菌混合菌系,菌种繁殖所用的小麦寄主为“铭贤 169”。

1.2 基因组 DNA 的提取

小麦条锈菌基因组 DNA (genomic DNA, gDNA) 的提取采用改良 CTAB/SDS 法^[15]:称取 10 mg 小麦条锈菌夏孢子、25 mg 硅藻土、250 mg 直径 1 mm 的灭菌玻璃珠,装入 2.5 mL 灭菌螺口离心管中;将离心管置于 MP FastPrep-24 快速核酸提取仪中,以 6.5 m/s 的振荡速度研磨破壁 15 s。加入 600 μ L 预热的 CTAB 缓冲液、60 μ L 质量分数 20% 的 SDS 缓冲液,混匀后,65 $^{\circ}$ C 恒温水浴 1.5 h;然后以氯仿-异戊醇(体积比 24:1)抽提去除杂质、蛋白质;异丙醇沉淀后,复溶;加适量 RNase 彻底清除 RNA;再以 2 倍体积无水乙醇于 -40 $^{\circ}$ C 沉淀 DNA,以体积分数 70% 乙醇清洗,室温干燥;最后溶于 30 μ L ddH₂O 中,-40 $^{\circ}$ C 保存备用。用 ND-1000 UV-Vis 微量紫外可见分光光度计(NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer)与 Gel DOC-1000 凝胶分析系统进行 gDNA 的品质检测。

1.3 酶切连接与预扩增模板 DNA 的制备

本研究采用的 *Mse* I 酶切反应体系为 50 μ L:小麦条锈菌 gDNA 600 ng, *Mse* I (10 U/ μ L) 1 μ L, 10 $\times$ Buffer R 5 μ L,加 ddH₂O 至 50 μ L。试验设 1, 2, 4 和 6 h 4 个酶切时间梯度,用以筛选最佳 *Mse* I 酶切时间。65 $^{\circ}$ C 酶切处理结束后,80 $^{\circ}$ C、20 min 钝化灭活 *Mse* I。以 NaAc、无水乙醇沉淀并用体积分数 70% 乙醇充分洗涤第 1 次的 *Mse* I 酶切产物,干燥后,复溶于 20 μ L ddH₂O 中。

添加 *Mse* I 特异性接头的连接反应体系为 50 μ L:*Mse* I 酶切产物 20 μ L, *Mse* I 特异性接头(20 pmol/ μ L) 10 μ L, 10 $\times$ T4 DNA Ligase Buffer 5 μ L, T4 DNA Ligase (1 U/ μ L) 10 μ L, ddH₂O 5 μ L;连接反应于 22 $^{\circ}$ C 处理 3 h,继而于 16 $^{\circ}$ C 过夜;最后 65 $^{\circ}$ C、10 min 钝化灭活 T4 DNA 连接酶。

以 NaAc、无水乙醇沉淀并用体积分数 70% 乙醇充分洗涤连接反应产物,再将其复溶于 20 μ L ddH₂O 中,进行第 2 次的 *Hae* III 酶切。*Hae* III 酶切反应体系为 30 μ L:连接反应产物 20 μ L, *Hae* III (10 U/ μ L) 1 μ L, 10 $\times$ Buffer R 3 μ L, ddH₂O 6 μ L;37 $^{\circ}$ C 酶切处理 2 h 后,80 $^{\circ}$ C、20 min 钝化灭活 *Hae* III,即可获得 MFLP 预扩增的模板 DNA。

1.4 PCR 扩增

选用 AFLP 选择性引物 I / II (*Mse* + C/*Mse* + CAA)与 SSR 锚定引物(RJ3f、RJ3r 和 RJ4f)组成扩

增引物对(表 1),分别对 2 轮 MFLP-PCR 的退火温度和模板浓度进行摸索,以求达到最佳的扩增效果。

表 1 PCR 扩增的引物序列
Table 1 Nuclear sequence of the MFLP primers

引物 Primer		序列 Sequence	Tm/℃
AFLP 选择性引物 I AFLP-selective primer I	<i>Mse</i> + C	5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC-3'	50
AFLP 选择性引物 II AFLP-selective primer II	<i>Mse</i> + CAA	5'-GAT GAG TCC TGA GTA ACA A-3'	54
SSR 锚定引物 SSR-anchor primer	RJ3f	5'-GCA GCA CTG GCA GGT GG-3'	58
	RJ3r	5'-GAT GAA TCA GGA TGG CTC C-3'	58
	RJ4f	5'-GTG GGT TGG GCT GGA GTC-3'	60

从理论上讲,PCR 扩增时适宜的退火温度应低于引物 *T_m* 值 5 ℃ 左右^[16],因此本试验选择 50,55 和 60 ℃ 3 个退火温度进行第 1 轮预扩增。其 PCR 反应体系为 10 μL:酶切连接产物 1 μL,10×PCR Buffer (*Mg*²⁺ plus)1 μL,dNTPs(10 mmol/L) 0.8 μL,AFLP 选择性引物I(10 μmol/L) 0.75 μL,SSR 锚定引物(10 μmol/L) 0.75 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.2 μL,ddH₂O 5.5 μL。反应条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,50,55 或 60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 90 s,25 个循环;最后 72 ℃ 延长 5 min。

为了保证选择性扩增效率及反应的特异性,本试验将预扩增产物按照 1 : 50,1 : 100,1 : 200 的比例进行稀释,选择 55,58 和 60 ℃ 3 个退火温度进行第 2 轮选择性扩增。其 PCR 反应体系亦为 10 μL:预扩增稀释物 1 μL,10×PCR Buffer(*Mg*²⁺ plus)1 μL,dNTPs(10 mmol/L) 0.8 μL,AFLP 选择性引物 II (10 μmol/L) 0.75 μL,SSR 锚定引物 (10 μmol/L)0.75 μL, *Taq* DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,ddH₂O 5.5 μL。反应条件为:94 ℃ 预变性 5

min;94 ℃ 变性 30 s,55,58 或 60 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 90 s,35 个循环;最后 72 ℃ 延长 5 min。

1.5 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

扩增产物在 60 g/L 变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳检测。60 W 恒功率预电泳 30 min 后,按 6 μL/孔上样,65 W 恒功率电泳 2.5 h。随后对凝胶板进行银染观察与干胶扫描。

2 结果与分析

2.1 基因组 DNA 的提取

采用 MP FastPrep-24 对条锈菌夏孢子彻底破壁,用氯仿-异戊醇进行多次抽提,并经 2 次 DNA 沉淀,获得了高品质的 gDNA。经 8 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,结果(图 1)表明,该方法所提取的 gDNA 电泳条带清晰,无降解,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 为 1.8~2.0,完全可以达到 MFLP 对 DNA 的品质要求。

2.2 gDNA 的双酶切及与特异性 *Mse* I 接头的连接

不同 *Mse* I 酶切时间的电泳结果见图 2。

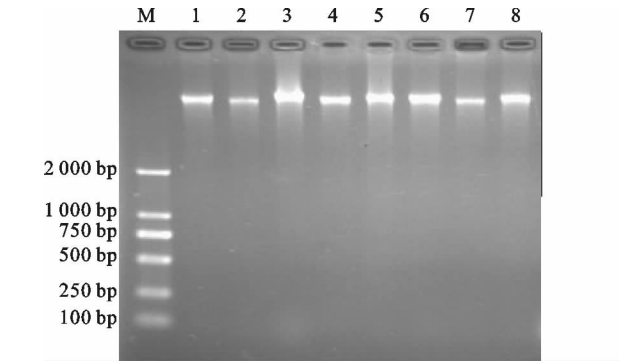


图 1 小麦条锈菌基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳检测
M. DNA Marker;1~8. 小麦条锈菌基因组 DNA
Fig.1 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from wheat stripe rust
M. DNA Marker;1—8. Genomic DNA

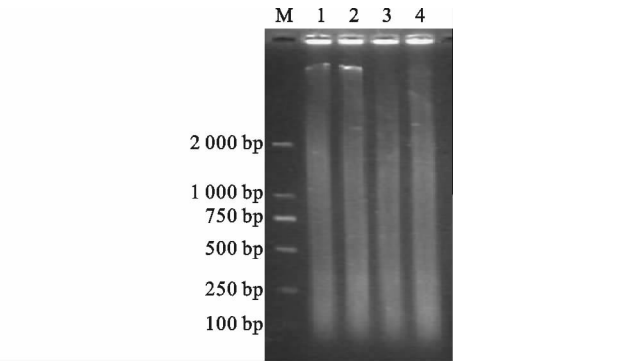


图 2 小麦条锈菌基因组 DNA 不同酶切时间的电泳图谱
M. DNA Marker;1~4. 酶切 1,2,4 和 6 h 的基因组 DNA
Fig.2 The electrophoresis pattern of the gDNA digested by *Mse* I at different time
M. DNA Marker;1—4. The genomic DNA digested for 1,2,4 and 6 h

图 2 表明,在试验设计的 4 个时间段中,4 和 6 h 的酶切效果比较理想。gDNA 酶切 1~2 h 后,酶切效果不完全,所得酶切片段仍然较大,会对后续 PCR 扩增的稳定性造成一定影响;而 4 与 6 h 的酶切结果没有明显差异。为了提高试验效率、缩短时间,本试验将 600 ng gDNA 的 *Mse*I 酶切时间定为 4 h。

2.3 PCR 扩增

2.3.1 预扩增 预扩增是 MFLP 分析过程中的一个重要环节,其对选择性扩增的效果有直接影响。本试验以 50,55 和 60 ℃ 3 个退火温度进行第 1 轮预扩增,结果(图 3)表明,3 对引物(*Mse*+C/RJ3f, *Mse*+C/RJ3r, *Mse*+C/RJ4f)在各退火温度下均有扩增产物出现,但以退火温度为 55 ℃ 时的扩增产物亮度最高,弥散分布也相对较好,因此本试验选择 55 ℃ 为预扩增的退火温度。

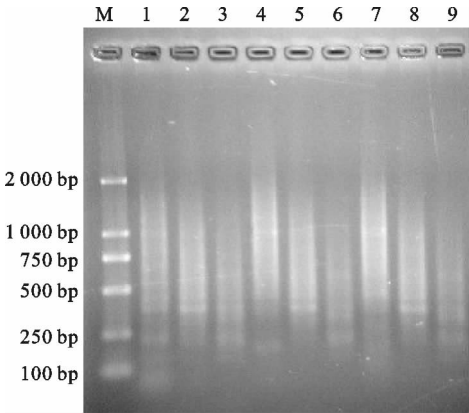


图 3 退火温度对预扩增反应的影响

M. DNA Marker;1~3. 退火温度为 50 ℃;
4~6. 退火温度为 55 ℃;7~9. 退火温度为 60 ℃;
1,4,7. *Mse*+C/RJ3f 引物组合;2,5,8. *Mse*+C/RJ3r
引物组合;3,6,9. *Mse*+C/RJ4f 引物组合

Fig. 3 The preamplification effect of different annealing temperatures

M. DNA Marker;1—3. Annealing temperature of 50 ℃;
4—6. Annealing temperature of 55 ℃;7—9. Annealing
temperature of 60 ℃;1,4,7. Primer combination of
Mse+C/RJ3f;2,5,8. Primer combination of *Mse*+C/RJ3r;
3,6,9. Primer combination of *Mse*+C/RJ4f

2.3.2 选择性扩增 对预扩增产物进行梯度稀释(1 : 50,1 : 100,1 : 200),使用相应的不同引物对(*Mse*+CAA/RJ3f, *Mse*+CAA/RJ3r, *Mse*+CAA/RJ4f),在不同退火温度(55,58,60 ℃)下进行第 2 轮 PCR 扩增,以优化确定选择性扩增的最佳模板浓度和退火温度。图 4 结果表明,不同 MFLP 引物对的扩增图谱差异明显;在 MFLP 引物对相同时,以模板稀释浓度和退火温度构成的不同组合在扩增效

果与谱型方面差异不大,其中以预扩增产物 1 : 100 稀释、退火温度 58 ℃ 组合的 MFLP 图谱清晰度最好、稳定性最佳。因此,本研究确定选择性扩增时使用的模板为稀释 100 倍的预扩增产物,退火温度为 58 ℃。

3 讨 论

在提取真菌类孢子的 gDNA 时,破壁是一个关键环节^[17-18]。化学药剂处理是目前普遍使用的破壁方法,但部分化学药剂具有较强的毒性,容易造成环境污染或危害操作人员健康。小麦条锈菌夏孢子的外壁厚、抗逆性强,一般化学处理难以有效提取其 gDNA。本试验使用的 MP FastPrep-24 快速核酸提取仪能够轻松裂解坚韧的细胞或组织材料,仅需振荡研磨十几秒,即可达到理想的破壁效果,且操作简便、快捷,有效地避免了样品研磨过程中的 DNA 降解或污染问题。

作为基于 PCR 的新一代分子标记,MFLP 分析仅需少量的 DNA 样品。但由于 MFLP 涉及限制性内切酶定点切割、接头连接、PCR 扩增等多个试验环节,因此高纯度、高品质的模板 DNA 是 MFLP 成功的重要保障。在 gDNA 的提取与制备过程中,应充分减少或清除核酸酶、蛋白质、多糖等杂质或抑制物质,保证 DNA 的纯度,方有利于后续酶切、连接、扩增等试验步骤的进行。

为获得清晰的凝胶电泳谱带,避免过多的非特异性条带与 *Mse* I -*Mse* I 的扩增,MFLP 模板的制备首先是用 *Mse* I 消化酶切目的 DNA,继而用 T4 DNA 连接酶将 *Mse* I 专用接头连接到限制性片段的两端,再以高频剪切酶 *Hae* III 进一步酶切处理附带人工接头的限制性 DNA 片段。因此,gDNA 的充分酶切,尤其是第一步 *Mse* I 对 gDNA 的充分酶切,是 MFLP 分析的关键。DNA 酶切完全与否直接影响 MFLP 指纹图谱的质量,酶切不充分时仅出现部分酶切片段,影响试验结果的稳定性、可重复性;过度酶切又不利于后续 *Mse* I 特异性接头的连接,导致出现非特异性扩增或 PCR 失败。

通过对 MFLP 分析体系各影响因素的摸索及优化,本研究建立了一套适用于小麦条锈菌的 MFLP 分析体系。经过多次反复试验,证明该体系的稳定性强、重复性好。每对引物组合可以得到 25~40 条扩增条带,这非常有利于特异性分子标记的筛选和多态性的分析比较。对于小麦锈菌、白粉菌等专性寄生菌而言,MFLP 必将成为其遗传变异、

群体特性与流行进化等相关研究的有效技术手段。

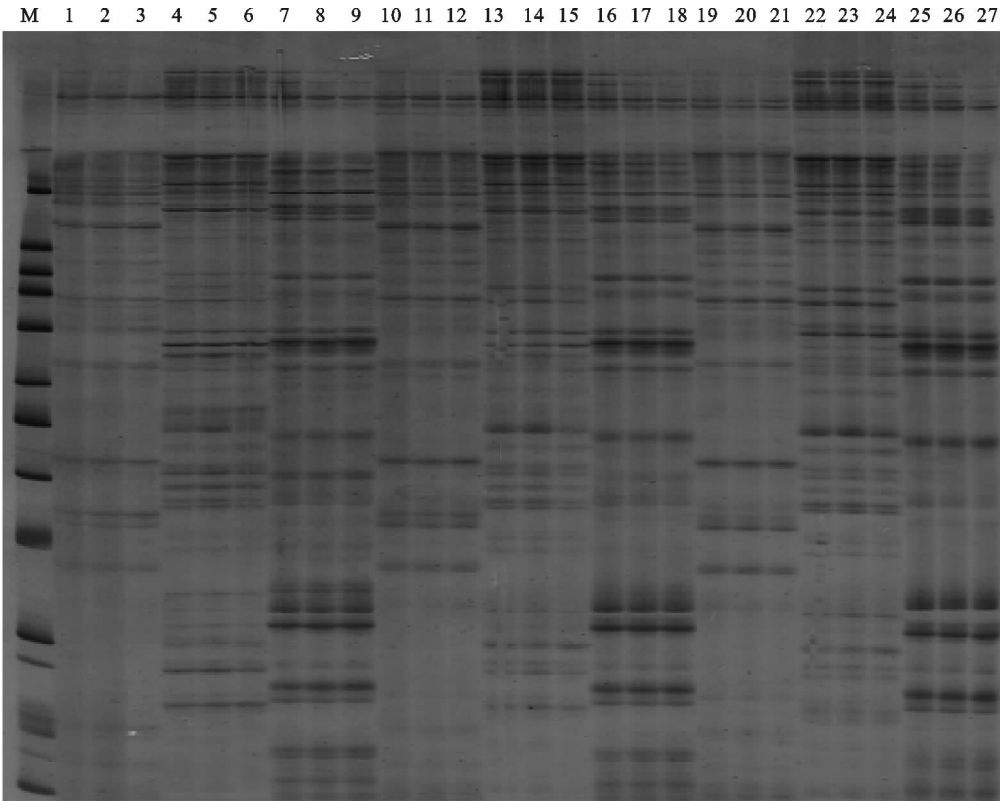


图 4 不同稀释倍数的预扩增产物及不同退火温度对选择性扩增的影响

M. DNA Marker;1,4,7,10,13,16,19,22,25. 模板为 1 : 50 的预扩增产物;2,5,8,11,14,17,20, 23,26. 模板为 1 : 100 的预扩产物;3,6,9,12,15,18,21,24,27. 模板为 1 : 200 的预扩增产物;
1~3,10~12,19~21. *Mse*+CAA/RJ3f 引物组合;4~6,13~15,22~24. *Mse*+CAA/RJ3r 引物组合;
7~9,16~18,25~27. *Mse*+CAA/RJ4f 引物组合;1~9. 退火温度为 55 ℃;10~18. 退火温度为 58 ℃;19~27. 退火温度为 60 ℃

Fig. 4 The selective-amplification effect of different combinations of preamplification dilution and annealing temperature

M. DNA Marker;1,4,7,10,13,16,19,22,25. Amplified template was 50×dilution of the preamplification product;
2,5,8,11,14,17,20,23,26. Amplified template was 100×dilution of the preamplification product;
3,6,9,12,15,18,21,24,27. Amplified template was 200×dilution of the preamplification product;
1-3,10-12,19-21. Primer combination of *Mse*+CAA/RJ3f; 4-6,13-15,22-24. Primer combination of *Mse*+CAA/RJ3r;
7-9,16-18,25-27. Primer combination of *Mse*+CAA/RJ4f;1-9. Annealing temperature of 55 ℃;
10-18. Annealing temperature of 58 ℃;19-27. Annealing temperature of 60 ℃

[参考文献]

[1] 李振岐,曾士迈. 中国小麦锈病 [M]. 北京:中国农业出版社, 2002.
Li Z Q, Zeng S M. Wheat rusts in China [M]. Beijing: China Agriculture 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. The breakdown of wheat resistance to stripe rust and its control strategy [J]. Scientia Agriculture Sinica, 1980(3): 72-76. (in Chinese)

[3] 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: China Agriculture Press, 1999. (in Chinese)

[4] 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.

[5] 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.
Shan W X, Chen S Y, Wu L R, et al. DNA fingerprinting of the reference strains of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China [J]. Science Bulletin, 1996, 41(15): 1427-1430. (in Chinese)

[6] 郑文明,刘 峰,康振生,等. 中国小麦条锈菌流行菌系的 AFLP 指纹分析 [J]. 自然科学进展, 2000, 10(6): 532-537.
Zheng W M, Liu F, Kang Z S, et al. AFLP fingerprinting of Chinese epidemic strains of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. Progress in Natural Science, 2000, 10(6): 532-537. (in Chinese)

[7] 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 *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* race 31 in China [J]. Mycosystema, 2005, 24(1): 98-103. (in Chinese)
- [8] 曹丽华, 康振生, 赵 杰, 等. 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, Kang Z S, Zhao J, et al. RAPD markers of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2004, 32(7): 37-40. (in Chinese)
- [9] Cao L H, Xu S C, Lin R M, et al. Early molecular diagnoses and detection of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China [J]. Letters in Applied Microbiology, 2008, 46(5): 501-506.
- [10] Yang H, Sweetingham M W, Cowling W A, et al. DNA fingerprinting based on microsatellite-anchored fragment length polymorphisms, and isolation of sequence-specific PCR markers in lupin (*Lupinus angustifolius* L.) [J]. Molecular Breeding, 2001, 7: 203-209.
- [11] 曹丽华, 宗现昭, 孟颢光. MFLP 分子标记技术及其实际应用 [J]. 麦类作物学报, 2008, 28(6): 1107-1112.
- Cao L H, Zong X Z, Meng H G. The microsatellite-anchored fragment length polymorphism [J]. Journal of Triticeae Crops, 2008, 28(6): 1107-1112. (in Chinese)
- [12] Boersma J G, Pallotta M, Li C, et al. Construction of a genetic linkage map using MFLP and identification of molecular markers linked to domestication genes in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) [J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2005, 10: 331-344.
- [13] You M P, Boersma J G, Buirchell B J, et al. A PCR-based molecular marker applicable for marker-assisted selection for anthracnose disease resistance in lupin breeding [J]. Cellular & Molecular Biology Letters, 2005, 10: 123-134.
- [14] Yang H, Shankar M, Buirchell B J, et al. Development of molecular markers using MFLP linked to a gene conferring resistance to *Diaporthe toxica* in narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105: 265-270.
- [15] 郑大勇, 张 敏, 刘太国, 等. 小麦锈菌夏孢子 DNA 提取方法研究 [C]//成卓敏. 植物保护科技创新与发展. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 507-514.
- Zheng D Y, Zhang M, Liu T G, et al. Research on isolating of wheat rust urediniopores genomic DNA [C]//Cheng Z M. Development and Innovation of Plant Protection Science and Technology. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2008: 507-514. (in Chinese)
- [16] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- Wang G L, Fang H J. Plant genetic engineering [M]. Beijing: Science Press, 2002. (in Chinese)
- [17] 唐 静, 蒲志刚, 张 敏, 等. 小麦锈菌 AFLP 分子标记技术体系的建立 [J]. 云南农业大学学报, 2005, 20(6): 753-757.
- Tang J, Pu Z G, Zhang M, et al. The establishment of AFLP markers technical system for wheat rust fungus [J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2005, 20(6): 753-757. (in Chinese)
- [18] 余仲东, 高爱琴, 曹之敏. 锈菌夏孢子 DNA 的微量快速提取方法 [J]. 生物技术通讯, 2005, 16(1): 48-50.
- Yu Z D, Gao A Q, Cao Z M. A minim and rapid method for DNA extraction from uredinium of rusts fungi [J]. Letters in Biotechnology, 2005, 16(1): 48-50. (in Chinese)