小麦条锈菌条中 29 号生理小种 SCAR 检测标记的建立*

康振生, 曹丽华, 郑文明, 黄丽丽, 李振岐
(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] 用 210 条随机引物对中国小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*) 5 个主要生理小种进行了 RAPD 分析, 寻找到了 2 个条中 29 号特异性的 RAPD 标记。根据其中一个特异片段的测序结果, 设计了特异 PCR 引物, 成功获得了条中 29 号小种专化的 SCAR 标记。

[关键词] 小麦条锈菌; 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(2005)05-0053-04

小麦条锈病(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)是我国小麦生产上的重要病害之一, 种植抗病品种是小麦条锈病综合防治中的重要措施。抗病品种应用中的一个突出问题是品种抗条锈性的丧失, 大量研究证明, 小麦品种抗条锈性的丧失主要是由于条锈菌毒性新小种的产生和发展引起的[1]。因此, 小麦条锈菌生理小种监测及流行预报已成为防治小麦条锈病、指导小麦抗病品种选育和布局的重要环节[2]。从 1957 年开始, 全国小麦条锈菌生理小种监测协作组就在全国范围内进行了系统的连续监测[1,3~5], 但由于小麦条锈菌的寄生专化性高, 无法进行人工培养, 而生理小种的常规鉴定与监测方法繁杂、费工费时, 准确性也易受到鉴定条件的影响, 因此, 需寻找一种简便、快速、准确性高的新方法。

近年来, DNA 标记技术已广泛用于真菌的群体生物学、流行学研究。对锈菌、白粉菌、植原体这些难以人工培养的专性寄生菌或韧皮部病原物的研究而言, DNA 标记更是提供了一个前景广阔的新思路[6]。与其他真菌相比, 目前对群体毒性结构复杂、多变的小麦条锈菌的研究明显滞后。Newton 等[7]以同工酶和双链 RNA 研究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变异, 小种间的差异却不明显; Zambino 等[8]通过研究核糖体 DNA 内部转录间隔区(ITS)序列也报道了种间差异的存在; Chen 等[9]研究了北美不同地域 23 个小麦条锈菌分离系 115 个单孢菌系的 RAPD 谱型, 认为 RAPD 聚类组与地域及毒力聚类不相关; Shan 等[10]对中国小麦条锈菌 13 个分离系进行了 RAPD 分析, 检测到小种间及小种内的遗传变异, 得到了分离系特异的 RAPD 图谱, 但未找到小种特异性的分子标记。

条中 29 号生理小种在 1991~1995 年的出现频率为 13.6%~32.2%, 居于小麦条锈菌群体首位[3]; 在 1996~2001 年的出现频率呈逐年下降趋势, 为 5.2%~2.7%[4,5]。但由于该小种相对寄生适合度较高, 可侵染鲁麦、豫麦、扬麦、冀麦、洛夫林 13 等主要小麦品种, 仍是威胁我国小麦生产的主要类群。因此, 本研究采用优化的 RAPD 分析体系, 通过筛选随机引物, 寻找条中 29 号生理小种的特异性 RAPD 片段, 并将其转化为更稳定的 SCAR (Sequence-Characterized Amplified Region)标记, 以便对该小种进行快速鉴定、监测, 从而为建立具有实用价值的中国小麦条锈菌生理小种的分子检测技术体系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验菌种的繁殖与常规鉴定

供试菌种条中 23 号、条中 25 号、条中 28 号、条中 29 号、条中 31 号、条中 32 号、水源 11-4 和杂种 46-5 类型均由西北农林科技大学植保学院植物免疫室提供。条锈菌单孢系的分离、鉴定按常规方法进行[1]; 夏孢子的繁殖在感病小麦品种铭贤 169 上进

* [收稿日期] 2004-07-20
[基金项目] 国家"973"计划资助项目(G200016201)
[作者简介] 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。

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

行,菌种经抽真空后,封存于-70 ℃,以备gDNA提取。

1.2 小麦条锈菌gDNA的提取

采用Chen等[9]的方法,并略作改动: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,随后加入60 μL 20% SDS,置65 ℃水浴1 h,加150 μL 5 mol/L NaCl与130 μL CTAB/NaCl(1 g CTAB溶于10 mL 0.7 mol/L NaCl中)后继续65 ℃水浴1 h;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倍体积乙醇于-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

10 bp随机引物购自上海生工生物工程公司;dNTPs与*Taq*酶,$MgCl_2$,10×Reaction Buffer均购自华美生物工程公司。RAPD反应体系为25 μL,其中10×Reaction Buffer 2.5 μL,$MgCl_2$(25 mmol/L)2 mmol/L,dNTPs(2.5 mmol/L)0.15 mmol/L,模板DNA(20 ng/μL)40 ng,引物(10 ng/μL)10 ng,*Taq*(3 U/μL)1 U,ddH_2O 15.67 μL。每次反应均设无菌去离子水为阴性对照。扩增在PT-100热循环仪(MJRESEARCH,Inc.)上进行:94 ℃ 5 min,1个循环;94 ℃ 30 s,36 ℃ 40 s,72 ℃ 90 s,45个循环;72 ℃ 7 min,1个循环。扩增产物用1.5%琼脂糖凝胶、1×TAE电泳缓冲液电泳分离,以ULTRA-URLET PRODUCTS凝胶成像系统记录分析RAPD谱型。

1.4 特异片段的回收、克隆和测序

在长波紫外光下切取小种特异性条带,用Roche公司的Agarose Gel Extraction Kit回收、纯化。采用pGEM-T Easy质粒为克隆载体,反应体系为10 μL,其中含5 μL 2×Rapid Ligation Buffer,1 μL T_4DNA连接酶,3 μL目的DNA片段,1 μL pGEM-T Easy质粒载体,4 ℃连接12 h。

以大肠杆菌DH5α为宿主菌,制备感受态,转化及蓝、白斑筛选重组质粒按常规方法进行,用无菌牙签挑选白色重组菌落,按碱法提取质粒[11]。重组质粒酶切鉴定的反应体系为25 μL:4 μL质粒,2.5 μL 10×Buffer H,BSA 0.25 μL,1.0 μL *Eco*RⅠ(10 U),17.25 μL无菌水,37 ℃酶切2 h。用1.5%琼脂糖凝胶、1×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,由上海生工生物工程公司测序。

1.5 SCAR标记的转化与鉴定

根据测序结果,从序列两端设计PCR特异引物,交上海生工生物工程公司合成。

优化确立特异引物的最佳PCR反应条件,以条中29号生理小种单孢系进行验证,并设立其他生理小种及空白对照,明确SCAR标记的应用价值。

2 结果与分析

2.1 条中29号小种特异性条带的筛选

本试验共计筛选10碱基随机引物200条,其中以S239(GGG TGT GCA G)和S23(AGT CAG CCA C)分别扩增得到条中29号生理小种的2条特异条带,其片段大小约为1 700 bp(见图1箭头所指)及232 bp(见图2箭头所指)。

2.2 条中29号SCAR标记的转化与验证

由于条中29号以S239扩增所得特异性片断较长,且扩增强度较弱,本研究仅对S23扩增得到的特异性片断进行回收、克隆和测序,其结果为:

```
000  AGTCAGCCAC  CATAATAAAT  AATTGATTAT
     AAGATTCCTT  ACATATTTGT  ATAGTACTCA
061  GAGGGGCAGG  TCTTTCAAAC  CACCCTTAAG
     TTGTAATAGC  TTTTCACCTT  TTGCAATTTA
121  TATTTCCCCC  TCAGGGAACC  TTCACCAAAT
     ATATTATAAC  ATTTGTCCCA  CAGGAGTCCT
181  ACACCGGGTG  CAGCTAGAAG  AATACCAGTT
     CTTGGCTACA  CTGTGGCTGA  CT 232
```

该序列已提交GENE BANK,其登录号为AY336109。

通过分析上述序列,设计1对19 bp/19 bp的PCR引物(命名为CY29SP),其碱基序列为:

P29-1 5′CAG GTC TTT CAA ACC ACCC 3′;

P29-2 5′ATT CTT CTA GCT GCA CCC G 3′。

经试验优化得到PCR反应条件为:10×Reaction Buffer 2.5 μL,$MgCl_2$(25 mmol/L)2 mmol/L,dNTPs(2.5 mmol/L)0.15 mmol/L,模板DNA(20 ng/μL)60 ng,引物P29-1(10 ng/μL)10 ng,引物P29-2(10 ng/μL)10 ng,*Taq*(3 U/μL)1 U,ddH_2O 13.7 μL。扩增在PTC-100热循环仪(MJRESEARCH,Inc.)上进行:94 ℃ 5 min,1个循环;94 ℃ 30 s,60 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,30个循环;72 ℃ 7 min,1个循环。

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

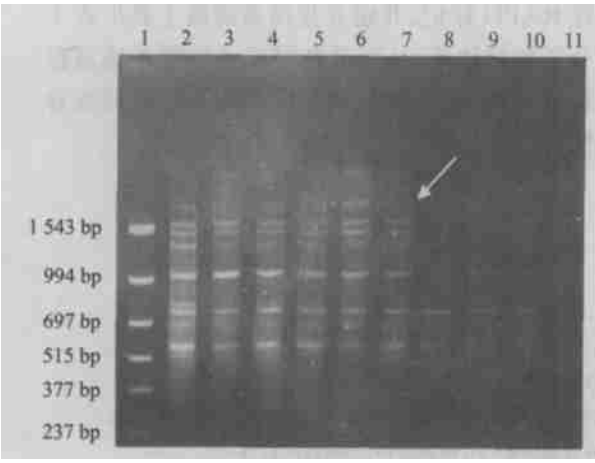

图 1　引物 S239 对条中 29 号进行 RAPD 扩增的结果

1. PCR 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 11-4、杂种 46-5

Fig. 1　RAPD patterns generated by primer S239

1. PCR marker; 2-7. RAPD patterns of different single-spore isolates of CY29; 8-11. RAPD patterns of CY31, CY23, pathotype Shuiyuan 11-4, pathotype Hibridy 46-5

图 2　引物 S23 对条中 29 号进行 RAPD 扩增的结果

1. PCR 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 11-4、杂种 46-5

Fig. 2　RAPD patterns generated by primer S23

1. PCR marker; 2-7. RAPD patterns of different single-spore isolates of CY29; 8-11. RAPD patterns of CY31, CY23, pathotype Shuiyuan 11-4, pathotype Hibridy 46-5

条中 29 号不同单孢系 SCAR 标记的验证结果见图 3。图 3 表明, 引物 CY29SP 可以在供试条中 29 号各单孢菌系 gDNA 中扩增到目标片段, 而在对照菌系及健康叶片中均未扩增到该条带。

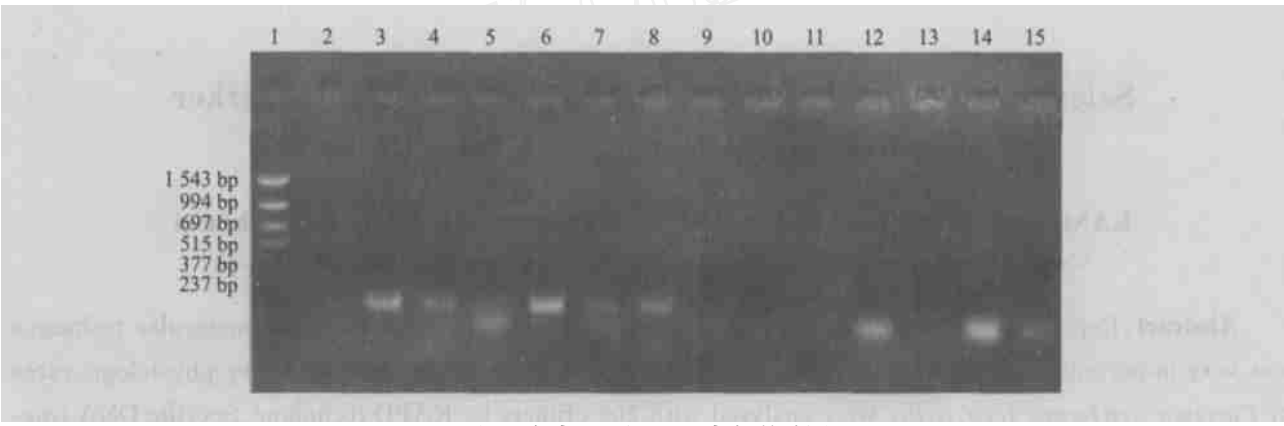

图 3　条中 29 号 SCAR 标记的验证

1. PCR marker; 2. 空白对照; 3～8. 条中 29 号单孢菌系 1～6; 9～15. 条中 31 号、条中 23 号、水源 11-4、杂种 46-5、条中 25 号、条中 28 号、条中 32 号

Fig. 3　The SCAR patterns generated by CY29SP

1. PCR marker; 2. SCAR patterns of CK; 3-8. SCAR patterns of different single-spore isolates of CY29; 9-15. CY31, CY23, pathotype Shuiyuan 11-4, pathotype Hibridy 46-5, CY25, CY28, CY32

3　讨　论

小麦条锈菌群体变异大、组成复杂, 常多个生理小种并存, 混合发生。研究[1]表明, 流行小种及优势小种的类型变异和数量变化是导致小麦品种抗锈性变异的主要因素。多年来, 小麦条锈菌生理小种监测一直是小麦安全生产及指导抗病育种的重要环节。由于小麦条锈菌为活体营养寄生菌, 其常规小种鉴定需以鉴别寄主上的反应型来判断, 方法繁杂、周期长、工作量大, 准确性也易受到人员、鉴定条件等外界因素的影响。

本研究在建立优化 RAPD 分析体系的基础上, 利用随机引物对小麦条锈菌 5 个主要致病小种进行分析, 获得了大量的 RAPD 标记, 并分别以引物 S239 和 S23 筛选得到了条中 29 号生理小种特异的 RAPD 条带。将引物 S23 扩增得到的 RAPD 条带转化为 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 29 号生理小种进

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

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 29 号生理小种的分子检测奠定了基础。本研究结果同时表明,通过扩大随机引物的筛选规模,有可能找到中国小麦条锈菌主要生理小种的特异性 RAPD 标记,并建立我国条锈菌主要生理小种的分子检测体系,从而可及时准确监测条锈菌群体的组成,为小麦品种合理布局和抗病品种的选育及条锈病的控制提供科学依据。

[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.

[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.

[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, (1): 15-21.

[4] 全国小麦条锈菌生理小种监测协作组. 1998 年我国小麦条锈病发生情况和生理小种监测结果[J]. 植物保护, 1999, 25(5): 15-17.

[5] 万安民,吴立人,金社林,等. 2000~2001 年我国小麦条锈病发生和生理小种监测结果[J]. 植物保护, 2002, 28(3): 5-9.

[6] Goodwin S. The population genetics of *Phytopathora*[J]. Phytopathology, 1997, 87: 462-473.

[7] 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.

[8] Zambino P, Roelfs A, Szabo L. Phylogenetic relatedness among species and formae specials 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.

[9] Chen X, Line R, Leung H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*[J]. Phytopathology, 1993, 83: 1489-1497.

[10] Shan W, Chen S, Kang Z, et al. Genetic diversity in *Puccinia striiformis* westend. f. sp. *Triici* revealed by pathogen genome-specific repetitive sequence[J]. Can J Bot, 1998, 76: 587-595.

[11] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第 2 版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999.

Selection and foundation of a race specific molecule marker for wheat stripe rust race CY29 in China

KANG Zhen-sheng, CAO Li-hua, ZHENG Wen-ming, HUANG Li-li, LI Zhen-qi

(*College of Plant Protection and Biotech Center, Northwest A & F University, 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 physiologic races of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* were analysed with 200 primers by RAPD technique. Specific DNA fragments of CY29 were found and cloned. Based on the sequencing results, specific PCR primers were designed and a SCAR marker of CY29 was obtained successfully.

Key words: wheat stripe rust; RAPD; SCAR; molecule marker

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