

小麦抗条锈病基因的生物学研究方法综述

葛昌斌 廖平安 郭春强 秦素研 (河南省漯河市农业科学院, 河南漯河 462000)

摘要 小麦条锈病是直接影响小麦高产、稳产的关键性病害之一,也是世界性病害。概述了小麦抗条锈病基因的常用研究方法。

关键词 小麦; 条锈病; Yr 基因

中图分类号 S435.121.4⁺2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)15-06189-01

Summary of the Research on the Biology Technique of Wheat Stripe Rust Resistance Gene

Ge Chang-bin et al (Luoh Academy of Agricultural Sciences, Luoh, Henan 462000)

Abstract Wheat stripe rust was one of world-wide main diseases, which affected high and stable yield of wheat. In this article the commonly research methods for the wheat anti-stripe rust gene were outlined.

Key words Wheat; Stripe rust; Yr gene

小麦条锈病是由小麦条锈菌引起的世界性传染病害。该病通过气流在高空远距离传播,冷凉和高海拔地区发生尤为严重。1905年Biffen的实验揭开了小麦抗条锈性遗传乃至植物抗病性遗传研究的序幕。此后,国际上在小麦抗条锈性遗传方面开展了大量的工作,取得了很大的进展^[1]。

1 小麦抗条锈病基因遗传研究方法

1.1 常规杂交法 小麦抗锈性遗传研究中发现,小麦的抗锈性遗传同样遵循孟德尔经典遗传学法则。应用杂交方法,使某一抗病品种与不含任何抗性基因的品种杂交(配对法),或两个抗病品种(双列法)杂交得到杂交后代(F₁),再使其自交生成F₂、F₃、F₄、F₅代群体,或与感病亲本回交形成BC₁F₁植株,F₂和BC₁F₁植株自交分别形成F₃和BC₁F₂家系。通过分析其抗病分离比来确定抗病遗传规律。应用配对法可确定待测品种中抗病基因数目,而应用双列法可确定品种之间抗病基因关系及基因之间的连锁距离。20世纪初毕芬(Biffen)在剑桥用硬粒小麦Rivet和普通小麦Red King杂交,得出田间成株抗性由单隐性基因控制^[2]。

1.2 基因推导法 自从Hor提出“基因对基因”假说后,人们很快就把它应用到了抗病遗传研究中。Browder提出了初步的抗病基因推导方法,并应用13个抗叶锈近等基因系在5个重要品种中推导出Lr1和Lr10两个基因。Loefering等利用该方法对69个品种的抗病基因进行了推导并指出结果对育种有用。但随后Reddy指出,这种方法不能鉴定出互补基因,反而会引起品种中含有累加基因而造成混乱;Johnson指出该方法必须结合系谱进行分析,否则容易出错。Dubin等在前人工作基础上完善了基因推导原则,提出了抗病基因推导的6条原则:如果一种单基因系和测试品种对一系列菌株表现的高侵染型和低侵染型,则测试品种具有与已知基因系的相同抗病基因;如果一个单基因系对某菌株表现低侵染型,而某测试品种对这一菌株表现高侵染型,则这一测试品种不含有该单基因系所含的抗病基因;如果一个单基因系和测试品种对某菌株表现不同的低侵染型,则他们含的抗病基因不同,但必须注意抗病基因的表达可能受到遗传背景的影响;如果测试品种比单基因系表现的侵染型还低,则

他可能具有与单基因系相同的基因,还可能含有另外一个对单基因系基因上位的抗病基因,也可能测试品种中含有与单基因系根本不同的抗病基因;如果一个单基因系在适当的环境条件下表现特征性的低侵染型,这可用来说明所推导的抗病基因的存在;在测试品种中,推导出的抗病基因,可以通过系谱或亲本中是否含有该基因来验证^[4]。

1.3 非整倍体法 1954年,Sears创制了所有可能的21种单体、缺体、三体 and 四体小麦非整倍体材料,为小麦抗病基因的研究提供了特殊的遗传材料。单体分析是普通小麦基因定位的常用方法,步骤为:分别以21个单体为母本,与被检测的抗病品种杂交,用对抗病品种无毒性的病原菌单孢菌系接种鉴定各杂交组合的杂种F₁单体植株和来自F₁单体植株的F₂代群体,根据其抗性分离表现确定抗性基因所在的染色体。1959年印度的Swaminathan首次通过单体分析将小麦品种Klein.corneta的3个隐性基因分别定位在第4、6、9条染色体上^[5]。到目前为止,业已发现并命名(或定位)了60多个抗秆锈病基因,60多个抗叶锈病基因,30多个抗条锈病基因^[6]。Sears继续创建了整套的小麦双端体,通过端体分析可将基因进一步定位在某一染色体臂上,并测定基因与着丝粒的遗传距离。人们采用单体、端体分析,已对35个主效基因中的31个基因(除Yr11~Yr14外)进行了染色体定位。单体分析法费时费工,有时会因为单体漂移而造成误差,而且随着定位在同一条染色体上的基因越来越多,仅靠单体分析难以确定同一条染色体(臂)上的基因位点间的遗传连锁关系。

2 分子标记技术

目前小麦上应用最多的标记技术是DNA标记技术。小麦抗锈病的分子标记筛选始于20世纪90年代,应用较多的是RFLP、RAPD、SSR、AFLP和SCAR等标记技术。

2.1 近等基因系(Near-isogenic lines, NIL)法标记基因 近等基因系是用连续回交法创造的在目标基因位点间有差异而其他基因位点均一致的一对品系。近等基因系经常产生于从野生种向栽培种回交转育某一优异性状的过程中。例如将野生种中某一抗病基因转育到缺乏此抗性基因的栽培品种,可采用以下途径:首先将栽培品种与野生种(供体亲本)杂交产生F₁,再用栽培品种与F₁回交,在回交后代中选抗病植株继续用栽培品种(轮回亲本)回交,以后连续进行这种选择与回交

基金项目 河南省重大科技攻关计划项目(0520010101)。

作者简介 葛昌斌(1978-),男,河南泌阳人,硕士,助理研究员,从事小麦分子抗病育种研究。

收稿日期 2008-03-21

(下转第6191页)

表2 CTAB 法正交试验结果

Table 2 The results of orthogonal design associated with CTAB extraction method

处理组合 Treatment combination	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	处理组合 Treatment combination	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀
c6	1.823 5 Aa	c8	1.456 5 BCDbcd
c9	1.649 0 ABab	c7	1.415 5 BCDcd
c2	1.565 0 ABCc	c1	1.288 5 CDde
c5	1.549 0 ABCc	c3	1.194 0 D
c4	1.480 0 BCDcd		

注:大小写字母分别表示在0.01 和0.05 水平差异显著。

Note: Lowercases and capital letters mean significant difference at 0.05 level and 0.01 level, respectively.

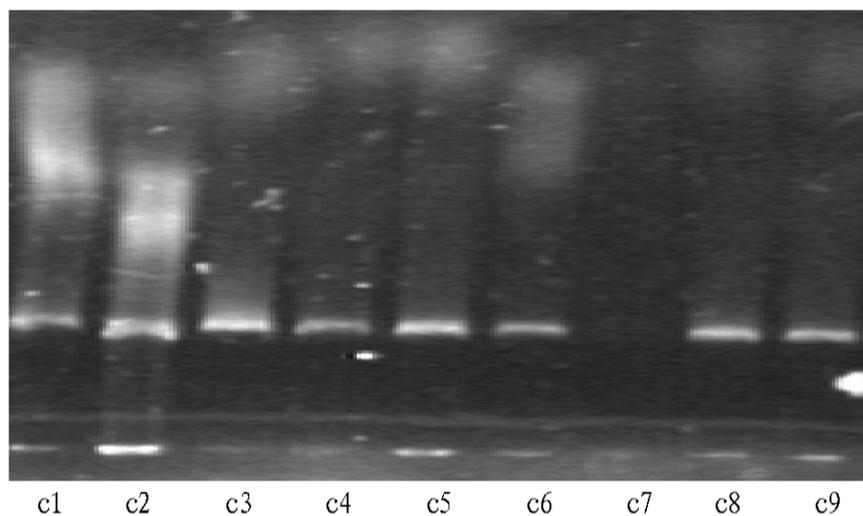


图1 CTAB 法凝胶电泳图谱

Fig.1 The gel electrophoresis patterns of products extracted by CTAB method

完整性、高分子量,无明显降解现象; 高纯度,尽量去除酚类、糖类等严重干扰酶作用的杂质; 高获取效率,能够达到试验要求。在保证高质量的前提下,兼顾低成本运作,操作简易,耗时少^[4]。目前已报道了多种提取植物基因组DNA的方法,但没有哪一种方法是普遍适用的,不同的植物材料中多糖、多酚、蛋白质、单宁、色素等次生代谢产物的种类和数

量不同,需要对各组分进行优化。因为芍药中多糖、多酚、单宁、脂质等含量较高,这些次生物质常与核酸形成复合物,DNA 埋在粘稠的胶状物中难以溶解且产生不同程度的褐变,影响 DNA 质量。因此,对其提取组分进行优化是必要的。

(2) CTAB 是一种阳离子表面活性剂。它既可以裂解细胞,又可以与 DNA 形成复合物而溶于高盐溶液中。当盐浓度降低时,此复合物将析出,同时 CTAB 可有效沉淀多糖。NaCl 浓度对试验结果影响较大。在 CTAB 存在条件下,将提取液中 NaCl 浓度提高到 1.4 mol/L 可除去多糖;同时,在高盐缓冲条件下,在乙醇或异丙醇中 DNA 会优先沉淀,从而达到 DNA 与多糖分离的目的。而该试验的 2 种提取方法中的 NaCl 用量与邹喻苹等^[5] 研究结果相一致。EDTA 可螯合 Mg²⁺、Ca²⁺ 等金属离子,抑制脱氧核糖核酸酶对 DNA 的降解作用(Dnase 作用时需要一定的金属离子作辅基);另外,EDTA 的存在,有利于溶菌酶的作用,因为溶菌酶的反应要求有较低的离子强度的环境,该试验结论与邹喻苹等^[5] 结论也比较一致。Tris-HCl (pH 值 8.0) 在抽提 DNA 过程中,用于裂解细胞;选择 pH 值 8.0 是因为 DNA 在此条件下比较稳定。在中性或碱性条件下(pH 值 5~7),RNA 比 DNA 更容易游离到水相,所以可获得 RNA 含量较少的 DNA 样品。CTAB 法提取芍药基因组 DNA 的电泳图,除了 c7 以外都能得到完整的 DNA,电泳后的条带较清晰,可以得到较纯的 DNA。

参考文献

- [1] 李嘉珏. 中国芍药与芍药 M. 北京:中国林业出版社,1999:68-69.
- [2] 金飏,何小弟,吴建华,等. 芍药花粉的形态特征及其与品种演化的关系 J. 江苏农业学报,2005,21(1):63-68.
- [3] 张国防,陈存及,邢建宏. 樟树干叶 DNA 提取方法的研究 J. 江西农业大学学报,2006,28(1):111-114.
- [4] 李登科,黄丛林,田建保,等. 高质量枣树基因组 DNA 提取方法的研究 J. 分子植物育种,2005,3(4):579-583.
- [5] 邹喻苹,葛颂,王晓东. 系统与进化植物学中的分子标记 M. 北京:科学出版社,2001.

(上接第6189页)

过程,即可获得在目标基因区域含野生种染色质而其他区域均为栽培品种染色质的品系—栽培品种的近等基因系。用分子标记在这对近等基因系之间进行多态性分析,即可找到与目标性状紧密连锁的分子标记。

2.2 用分离群体分组分析法(Bulked segregant analysis, BSA) 标记基因 该方法是 Michelmore 等^[7] 提出的,具体做法是从一对具有表型差异的亲本所产生的任何一种分离群(F₂, BC, DH 群体等)中按表型(如抗病、感病)分成两组,并将每组中一定数量的单株 DNA 等量混合,形成按表型区分的 DNA 池(DNA pool)。由于对等 DNA 池内的基因组仅在某一等位基因所在染色体区域有区别,因而可迅速找到与该目标区域连锁的分子标记。Robert 等找到一个与 Yr17 连锁的 RAPD 标记,然后将这一 RAPD 标记转换成序列特异性扩增片段(SCAR)^[8]。SCAR 标记 SG-Y15 与抗病基因 Yr17 的连锁距离为(8.0 ± 0.7) cM。马渐新等用 SSR 标记和 F₂ 分离群体分组分析法,筛选到两个与抗条锈病基因 YrR 紧密连锁、遗传距离为 1.9 cM 的 SSR 标记 WMS11-193 和 WM18-184,并将

该基因定位于小麦 1B 染色体短臂上^[9]。

参考文献

- [1] 王凤乐,吴立人. 陕甘川重要小麦品种抗条锈基因分析 J. 植物学报,1994,20(5):549-594.
- [2] 何家泌. 植物抗病遗传学 M. 北京:中国农业出版社,1994.
- [3] BROWDER L E, PROBABLY. Genotype of some triticum aestivum ager derivatives for reaction to Puccinia recondita f. sp. tritici J. Gop Science, 1973, 13: 203.
- [4] DUBIN H J, JOHNSON R, STUBBS R W. Postulated genes for resistance to stripe rust in selected CIMMYT and related wheat J. Hart Dis, 1989, 73: 472-475.
- [5] 曹张军. 小麦抗条锈性遗传研究进展 J. 麦类作物学报,2001,21(3):80-83.
- [6] MINICOSH R A. Catalogue of gene symbols for wheat J. Wheat Information Service, 2001, 93: 40-60.
- [7] MICHELMORE R W, PARANI, KESSELI R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked Segregation analysis a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations J. Proc Natl Acad USA, 1991, 88: 9828-9832.
- [8] ROBERT O, CHRISTINE A. Identification of molecular markers for the detection of the yellow rust resistance gene Yr17 in wheat J. Molecular Breeding, 1999, 5(2): 167-175.
- [9] 马渐新,周荣华,董玉琛,等. 来自长穗偃麦草的抗小麦条锈病基因的定位 J. 科学通报,1999,44(1):65-69.