

河南省小麦条锈菌特异性 SSR 标记的筛选

代君丽¹, 刘珂¹, 于思勤², 李洪连¹

(1. 河南农业大学植物保护学院, 河南郑州 450002; 2. 河南省植保植检站, 河南郑州 450002)

摘要: 为了简便地进行小麦条锈菌的早期检测, 在前期工作的基础上, 以小麦条锈病、叶锈病、白粉病的病叶和健康叶片为实验材料, 采用来自条锈菌的 SSR 引物进行河南省小麦条锈菌的分子检测。结果表明, 在所用的条锈菌特异性 SSR 引物中, 发现有 4 对引物能够将条锈菌和其他的病原菌区分开来。通过对来自河南省不同地区的小麦条锈病和叶锈病病叶的鉴定, 其中 2 对引物 RJ3、RJ21 的稳定性和可重复性均较好, 表明这 2 对引物可以用于小麦条锈菌的分子检测。

关键词: 小麦; 条锈菌; SSR

中图分类号: S512.1; S332.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-1041(2011)01-0166-04

Screening of the SSR Markers Specific to *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* from Henan Province

DAI Jun-li¹, LIU Ke¹, YU Si-qin², LI Hong-lian¹

(1. College of Plant Protection, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002, China;

2. Henan plant protection and Quarantine Station, Zhengzhou, Henan 450002, China)

Abstract: Based on the previous research, diseased leaves with wheat stripe rust, wheat leaf rust, wheat powdery mildew and normal leaves were used as experimental materials to detect *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in Henan province using SSR technique. The results showed that 4 pairs of SSR primers could identify *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* from others. The detection with primers RJ3 and RJ21 to the materials from different regions of Henan province was stable and repeatable, and could be used to distinguish *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* from *Puccinia recondite* f. sp. *tritici*.

Key words: Wheat; *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*; SSR

条锈病是小麦生产上危害最严重的病害之一, 曾在我国多次大面积爆发流行, 给小麦生产造成巨大损失^[1]。过去小麦条锈病田间早期诊断主要采取肉眼观察方法, 由于诊断时间偏晚, 给防治工作带来不利影响, 而且该病在苗期和叶锈病症状相似, 不易区分。如果能在早期对小麦条锈病做出快速准确的识别和鉴定, 及时进行药剂防治就可以极大地减轻对小麦的危害, 降低产量损失。近几年来, 对小麦条锈菌和叶锈菌的快速分子检测已有了相关研究报道。Wang^[2]采用基于小麦

条锈菌 PSR 序列获得了快速高效灵敏检测小麦条锈菌的方法; Cao^[3-4]根据真菌 β -微管蛋白基因的保守序列设计引物获得了条锈菌和叶锈菌特异性的扩增片段, 并且已经获得了条锈菌和叶锈菌特异性的 SCAR 标记, 可以准确灵敏地检测小麦条锈菌和叶锈菌。孟颖光等^[5]将根据 β -微管蛋白基因的保守序列设计的引物和 Cao^[3-4]获得的条锈菌、叶锈菌 SCAR 标记引物结合起来进行了小麦锈菌的复合 PCR 检测, 结果发现通过一次 PCR 扩增可以同时检测条锈菌和叶锈菌。SSR

* 收稿日期: 2010-09-05 修回日期: 2010-10-30

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划重大项目粮食丰产科技工程(2006BAD02A07-1)

作者简介: 代君丽(1977-), 女, 博士, 讲师, 主要从事小麦病害及病原的分子生物学研究。E-mail: daijl666@yahoo.com.cn

通讯作者: 李洪连(1963-), 男, 博士, 教授, 主要从事小麦病害研究。E-mail: honglianli@sina.com

标记技术是近年发展起来的一种新型分子检测技术,具有多态性水平高、检测到的信息量大,操作简单、方便和结果易于分析统计等优点,此外,DNA 质量的高低对 SSR 扩增影响不大,这些特点使 SSR 标记技术越来越受到重视。目前已经开发出小麦条锈菌和叶锈菌特异性的 SSR 引物^[6-7]。以往对小麦条锈菌的分子检测方法都是在获得大量的条锈菌的夏孢子之后再提取条锈菌的基因组 DNA 以用于后期研究,本研究拟采用 SSR 技术直接从叶片上检测是否存在条锈菌,以期为病害测报和防治工作提供理论依据,并为小麦条锈菌的早期检测提供一条方便快捷的途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

实验材料:以采自田间病圃的条锈病、叶锈病、白粉病病叶以及小麦纹枯病菌培养物作为标准样品,以健康叶片作为对照以排除植物本身的影响;以采自河南省淅川、新野、安阳、卢氏等地的条锈病病叶和采自安阳、卢氏的叶锈病病叶作为检测样品。材料采集后立即放入冰盒中带回实验室备用。

SSR 引物:引物及其序列来源于文献^[6],由上海生工生物工程公司合成。

1.2 感病叶片中条锈菌基因组 DNA 的提取

采用 CTAB/SDS 法^[8](略有改进)。

1.3 SSR 反应体系

SSR 反应体系为 20 μL : 2.0 μL 10 \times PCR Buffer ; 1.6 μL MgCl_2 (25 mmol \cdot L⁻¹); 1.5 μL 模板 DNA (35 ng \cdot μL^{-1}); 3.0 μL 引物(2 $\mu\text{mol} \cdot$ L⁻¹); 1.0 μL Taq 酶 (5 U \cdot μL^{-1}); 0.4 μL dNTP (25 mmol \cdot L⁻¹); 10.67 μL ddH₂O。

1.4 基因组 DNA 检测和 PCR 产物检测

采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,每孔上样量为样品 2 μL , 6 \times loading buffer 2 μL 。电泳时电压控制在 5 V \cdot cm⁻¹, 整个电泳过程大约需要 2~3 h, 当溴酚兰染料距离凝胶底部 1 cm 左右时停止电泳,在紫外凝胶成像系统下观察电泳结果。

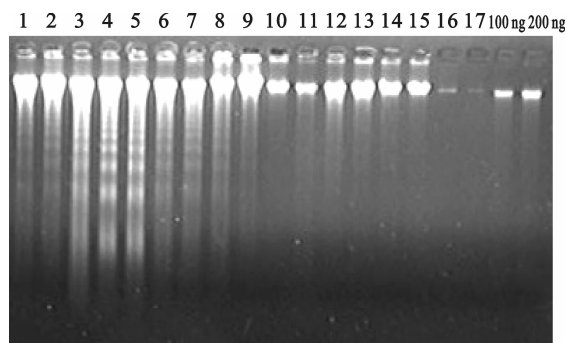
2 结果与分析

2.1 DNA 检测结果

采用 CTAB/SDS 法提取 DNA 的结果见

图 1。从图 1 中可以看出,1~9 号样品中的 DNA 有降解现象,主要是由于所用的提取缓冲液未经预冷(保存在室温下)造成,10~17 号样品采用经过 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷之后的提取缓冲液,所提取的 DNA 完整性较好,未见有降解,而且 DNA 质量较高,蛋白含量非常少, RNA 已去除干净。同时图 1 的结果也说明了采用预冷之后的提取缓冲液可以获得更高质量的病原菌基因组 DNA 用于后期研究。

对比 λ -DNA 质量,可以估算被检测 DNA 1~9 号样品的大概质量为标准 λ -DNA(200 ng) 的 5~6 倍,10~15 号样品是标准 λ -DNA(200 ng) 的 3~4 倍,16、17 号样品大概是 20 ng 左右。所提取 DNA 的量足以用于后期的 PCR 扩增。



1:白粉-1; 2:白粉-5; 3:条锈-1; 4:条锈-4; 5:条锈-5; 6:条锈-8; 7:叶锈-2; 8:叶锈-4; 9:CK-3; 10:白粉-6; 11:CK-4; 12:条锈-1; 13:条锈-8; 14:叶锈-1; 15:叶锈-5; 16:纹枯-1; 17:纹枯-5。

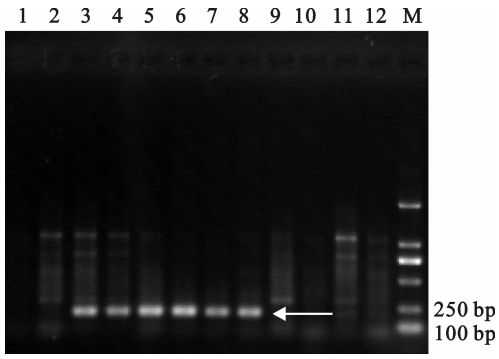
1:BGT-1; 2:BGT-5; 3:PST-1; 4:PST-4; 5:PST-5; 6:PST-8; 7:PRT-2; 8:PRT-4; 9:CK-3; 10:BGT-6; 11:CK-4; 12:PST-1; 13:PST-8; 14:PRT-1; 15:PRT-5; 16:RC-1; 17:RC-5。

图 1 采用 CTAB/SDS 法提取 DNA 的检测结果

Fig. 1 Detection results of DNA extracted by CTAB/SDS protocol

2.2 河南省小麦条锈病菌 SSR 标记检测结果

共采用 12 对来自条锈菌的 SSR 引物:RJ3、RJ4、RJ12、RJ13、RJ15、RJ17、RJ18、RJ20、RJ21、RJ22、RJ24、RJ27,其中 RJ3、RJ21、RJ27、RJ12 在条锈菌、叶锈菌、白粉菌、纹枯病菌及对照中存在差异。利用这 4 对多态性引物对采自河南省不同地区的小麦条锈病叶和小麦叶锈病叶的检测结果显示,引物 RJ3 和 RJ21 可以稳定地扩增出小麦条锈菌特异性条带(图 2、图 3),RJ3 扩增出的条锈菌特异性条带大小大概是 250 bp, RJ21 扩增出的条锈菌特异性条带大小大概是 150 bp。

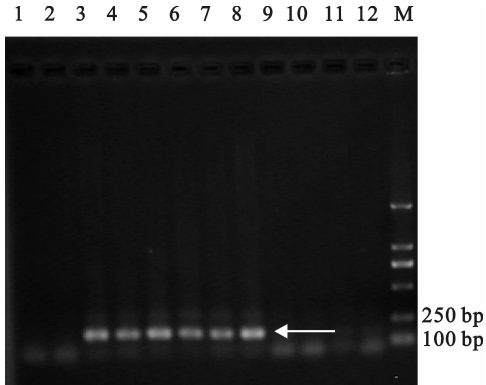


1:CK;2:白粉-1;3:条锈-1;4:条锈-2;5:浙川-条锈;6:新野一条锈;7:安阳-条锈;8:卢氏-条锈;9:安阳-叶锈;10:卢氏-叶锈;11:叶锈-1;12:叶锈-2

1:CK; 2:BGT-1; 3:PST-1; 4:PST-2; 5:PST from Xichuan; 6:PST from Xinye; 7:PST from Anyang; 8:PST from Lushi; 9:PRT from Anyang; 10:PRT from Lushi; 11:PRT-1; 12:PRT-2. Arrow notes polymorphic bands.

图2 RJ3对河南省不同地区标样的检测结果

Fig. 2 Detection of materials from different regions of Henan province with primer RJ3



1:CK;2:白粉-1;3:条锈-1;4:条锈-2;5:浙川-条锈;6:新野一条锈;7:安阳-条锈;8:卢氏-条锈;9:安阳-叶锈;10:卢氏-叶锈;11:叶锈-1;12:叶锈-2

1:CK;2:BGT-1;3:PST-1;4:PST-2;5:PST from Xichuan; 6:PST from Xinye; 7:PST from Anyang; 8:PST from Lushi; 9:PRT from Anyang; 10:PRT from Lushi; 11:PRT-1; 12:PRT-2. Arrow notes polymorphic bands.

图3 RJ21对河南省不同地区标样的检测结果

Fig. 3 Detection of materials from different regions of Henan province with primer RJ21

3 讨论

一般情况下,针对小麦条锈病菌的分子生物学研究首先是要提取条锈菌的基因组DNA,以前的研究多是直接从条锈菌夏孢子中提取基因组DNA,在提取过程中DNA很容易降解,而且需要

繁殖大量的夏孢子^[9]。获得大量的病原菌后,再进行DNA的提取,无疑增加了工作量和难度,而直接从感病叶片中提取病原菌的基因组DNA,则大大加快了DNA提取的速度并降低了难度。一般来说,新鲜组织中的DNA完整性较好,而且DNA的提取也比较容易。在本研究中发现,对于从感病组织中提取病原菌DNA来说,所提取的DNA的产量和完整性与组织的新鲜与否关系不大,这就为采用分子生物学技术进行小麦条锈病菌的检测和生理小种的鉴定提供了一条更加方便快捷而且可靠的途径。

Wang^[2]和Cao^[4]等分别采用基于小麦条锈菌PSR序列和真菌β-微管蛋白基因的保守序列获得了可以准确灵敏检测小麦条锈菌的特异性分子标记。但这两种方法均不能确定条锈菌生理小种。曹丽华等^[10-12]对目前中国小麦条锈菌的主要优势菌系进行了RAPD片段的筛选,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,并分别获得了条中29、条中31号生理小种的特异性SCAR标记。张勃等^[13]和郝保军等^[14]采用RAPD标记技术获得了条中32号和水源11类群14致病类型的特异性RAPD片段,并将RAPD标记转化成了可以稳定扩增的SCAR标记。贾瑞祥^[15]采用SSR标记技术和AFLP技术对中国小麦条锈菌主要流行小种进行了DNA多态性分析,结果发现采用来自条锈菌的SSR引物分别获得了CY24、CY31和水源11类群特异性的SSR标记RJ17、RJ21和RJ3,获得了CY29特异性的AFLP标记。本研究采用SSR标记技术对河南省小麦条锈病菌进行了分子检测,发现引物RJ3和RJ21可以稳定获得条锈菌特异性的扩增片段,因此这两个引物可以用于小麦条锈菌的分子检测,另外本研究结果也说明了在河南省存在条中31号和水源11致病类群。本研究所采用的SSR标记技术对DNA质量要求不高,操作简单方便,实验结果易于分析统计,获得的标记丰富了小麦条锈菌的分子鉴定手段,对于快速进行条锈菌的鉴定具有一定意义。此外,SSR标记技术、RAPD标记技术和AFLP技术还可以特异性检测条锈菌不同的生理小种,可以为小麦条锈病菌的早期鉴定以及条锈菌生理小种的鉴定提供一条方便快捷的途径。

参考文献:

- [1] Wan A M, Zhao Z H, Chen X M, *et al.* Wheat stripe rust epidemic and virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *Plant Disease*, 2004, 88: 896-904.
- [2] Wang X J, Zheng W M, Buchenauer H, *et al.* The development of a PCR-based method for detecting *Puccinia striiformis* latent infections in wheat leaves [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2008, 120: 241-247.
- [3] 曹丽华, 徐世昌, 陈万权, 等. 小麦叶锈菌的特异性分子诊断检测技术 [J]. *植物保护学报*, 2007, 34(6): 561-566.
- [4] Cao L H, Xu S C, Liu T G, *et al.* Early molecular diagnosis and detection of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 46(5): 501-506.
- [5] 孟颖光, 曹丽华, 宗宪昭, 等. 小麦条锈菌和叶锈菌的复合 PCR 检测 [J]. *河南农业大学学报*, 2010, 44(1): 74-77, 90.
- [6] Enjalbert J, Duan X, Giraud T, *et al.* Isolation of twelve microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2002, 2: 563-565.
- [7] Duan X, Enjalbert J, Vautrin D, *et al.* Isolation of 12 microsatellite loci, using an enrichment protocol, in the phytopathogenic fungus *Puccinia triticina* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2003, 3: 65-67.
- [8] Chen X M, Line R F, Leung H. Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis* [J]. *Phytopathology*, 1993, 83: 1489-1497.
- [9] Shan W X, Chen S Y, Kang Z S, *et al.* Genetic diversity in *Puccinia striiformis* Westend. f. sp. *tritici* revealed by pathogen, genome-specific repetitive sequence [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1998, 76: 587-595.
- [10] 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.
- [11] 康振生, 曹丽华, 郑文明, 等. 小麦条锈菌条中 29 号生理小种 SCAR 检测标记的建立 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2005, 33(5): 53-56.
- [12] 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.
- [13] 张勃, 郝保军, 王保通, 等. 小麦条锈菌条中 32 号生理小种 SCAR 检测标记的建立 [J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2009, 37(1): 177-181.
- [14] 郝保军, 王保通, 李强, 等. 小麦条锈菌水源 11 类群的 RAPD 分析及 SCAR 标记的建立 [J]. *植物病理学报*, 2010, 40(1): 1-6.
- [15] 贾瑞祥. 中国小麦条锈菌主要流行小种分子标记多态性分析 [D]. 北京: 中国农业大学硕士学位论文, 2005.

