



研究简报

# 利用小种标记分析云南省两个县的小麦条锈菌群体

李进斌<sup>1</sup>, 兰茗清<sup>2</sup>, 陈梦琪<sup>2</sup>, 毕云青<sup>1</sup>, 杨进成<sup>3</sup>, 陈向东<sup>4</sup>,  
李月秋<sup>5</sup>, 刘林<sup>2</sup>, 刘太国<sup>6</sup>, 朱有勇<sup>2</sup>, 李成云<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>云南省农业科学院农业环境资源研究所, 昆明 650205; <sup>2</sup>云南农业大学农业生物多样性与病虫害控制教育部重点实验室, 昆明 650201;

<sup>3</sup>云南省玉溪市农业科学研究所, 玉溪 653100; <sup>4</sup>易门县农业技术推广站, 易门 651100; <sup>5</sup>大理州植保植检站, 大理 671000;

<sup>6</sup>中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

Population analysis with race-specific-markers of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* from two counties of Yunnan Province LI Jin-bin<sup>1</sup>, LAN Ming-qing<sup>2</sup>, CHEN Meng-qi<sup>2</sup>, BI Yun-qing<sup>1</sup>, YANG Jin-cheng<sup>3</sup>, CHEN Xiang-dong<sup>4</sup>, LI Yue-qiu<sup>5</sup>, Liu Lin<sup>2</sup>, LIU Tai-guo<sup>6</sup>, ZHU You-yong<sup>2</sup>, LI Cheng-yun<sup>2</sup> (<sup>1</sup>Agricultural Environment and Resources Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650205, China; <sup>2</sup>The Ministry of Education Key Laboratory for Agricultural Biodiversity and Pest Management, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China; <sup>3</sup>Yuxi City Institute of Agricultural Sciences, Yuxi 653100, China; <sup>4</sup>Yimen County Extension Station of Agricultural Technologies, Yimen 651100, China; <sup>5</sup>Quarantine and Plant Protection Station of Dali Prefecture, Dali 671000, China; <sup>6</sup>Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China)

**Abstract:** In order to understand the population structure of wheat stripe rust (*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*), five race-specific-markers were used to investigate 251 diseased samples collected from Dali and Yimen, two counties where rust disease occurred frequently. The most frequently detected races were CY32 and CY29 in both Dali and Yimen counties, with a detection frequency of 82.2% and 51.1% in Dali, and 42.2% and 57.1% in Yimen respectively. The reliability of the results was confirmed by resampling of diseased leaves with the infection of race identified by differential varieties method. Several race-combinations were detected in single infected leaf. Two or more races infection occurred in 44.6% single infected leaves. The results indicated that many leaves were infected by two or more races of the fungus.

**Key words:** *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*; race; race-specific-marker; population structure

文章编号: 0412-0914(2013)06-0643-04

小麦条锈病是由小麦条锈菌(*Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*)引起的气流传播病害,在世界各主要麦区均有发生,也是我国小麦生产上危害最严重的病害之一。小麦条锈菌毒性变异频繁,易产生新毒性小种,导致小麦品种的抗病基因失效,引起小麦条锈病周期性流行。因此,了解小麦种植区的条

锈菌群体结构组成及变异,对于制定更为有效的条锈病控制方法具有重要的意义。

小麦条锈菌为专性寄生菌,常规的生理小种的鉴定及监测均基于病菌在鉴别寄主上的致病反应。我国已对小麦条锈菌群体的致病性进行了大量的研究,并开发出用于检测条中 23 号、水源类型、条

收稿日期: 2012-12-20; 修回日期: 2013-09-10

基金项目: 农业部小麦条锈病行业专项(200903035-7); 云南省重点基金(2009CC004); 国家自然科学基金(31160355); 云南省自然科学基金(2010ZC173)

通讯作者: 李成云,教授,主要从事植物病菌致病机制研究; Tel:0871-5227552, E-mail:li.chengyun@gmail.com。

中 29 号、条中 31 号、中条 32 号和条中 33 号小种的 6 个小种特异分子标记<sup>[1]</sup>。本研究利用已报道的小麦条锈病菌 5 个小种特异的分子标记对云南省两个县的罹病叶片标本进行检测,以期快速地了解这两个重病区的小麦条锈菌生理小种的组成和分布。

## 1 材料与方法

### 1.1 小麦条锈菌群体标样的采集

本研究于 2009 年在云南省大理市(样品采集地海拔高度 1 900 m)和易门县(样品采集地海拔高度 1 600 m)进行了小麦条锈菌标样的采集,分别获得 161 和 90 份有效标样。用吸水纸将标样分单叶包装后,带回实验室,置于 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

### 1.2 基因组 DNA 提取方法

基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法。取叶片中部约 8 cm 长的罹病叶片,并放入研钵中加入液氮进行研磨,研磨细后分装于 1.5 mL 的 eppendorf 离心管中,加入 DNA 提取液 300  $\mu\text{L}$ 。提取 DNA 后用 70% 乙醇清洗 2 次,室温干燥;加 30  $\mu\text{L}$  TE,置  $4^{\circ}\text{C}$  溶解, $-20^{\circ}\text{C}$  保存。采用 GeneQuant pro 蛋白核酸分析仪测定 DNA 浓度后,稀释为 50  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  待用。

### 1.3 小麦条锈菌特异的小种分子标记

选取我国及云南省主要流行的 5 个生理小种条中 32 号、条中 31 号、条中 29 号、条中 23 号、水

源类型的小种特异标记,引物序列和扩增产物大小等见表 1。

### 1.4 PCR 检测

PCR 反应体系为 20  $\mu\text{L}$ : 10 $\times$  reaction buffer 2  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  (25  $\text{mmol} \mu\text{L}^{-1}$ ) 1.6  $\mu\text{L}$ , dNTPs (10  $\text{mmol} \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA (25  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ , 引物 (10  $\mu\text{M}$ ) 各 0.5  $\mu\text{L}$ , *Taq* 酶 (5  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.3  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 12.9  $\mu\text{L}$ 。每次反应均设立 ddH<sub>2</sub>O 阴性对照。扩增在 Eppendorf Mastercycle PCR 仪上进行,反应程序为:  $94^{\circ}\text{C}$  5 min;  $94^{\circ}\text{C}$  45 s,  $36^{\circ}\text{C} \sim 57^{\circ}\text{C}$  45 s(根据引物退火温度),  $72^{\circ}\text{C}$  2 min, 35 个循环;  $72^{\circ}\text{C}$ , 10 min。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离,用 Imagequant300 胶凝成像系统进行拍照及带型分析。引物由上海捷瑞生物工程公司合成,其余试剂购自上海生工有限公司。

## 2 结果与分析

### 2.1 云南省大理市和易门县小麦条锈菌生理小种的检测结果

利用无病叶片作为对照,结果均未检测到条锈病菌小种特异性产物。以鉴定过的病原菌为对照,均检测到了与预期大小一致的产物,表明结果是可信的。在此基础上,对 251 份从感条锈病的小麦叶片中直接提取的 DNA 进行小种特异性标记的分子检测,其中 90 份标本采集自大理,161 份标本采集自易门。在两个地区均检测出 5 个小种特异标

Table 1 Primer sequences, annealing temperature and product size in race-specific marker detection study

Marker	Primer sequence (5'-3')	Tm/ $^{\circ}\text{C}$	Product size/bp	Race	Reference
CY32SP-1	CGCTATGTGCGGACAGAAGG	57	240	CY32	[2]
CY32SP-2	TGAGGATCGAGGCTATGAGG				
CY31SP-1	GCTACGTCAAGATGCGATACACC	50	909	CY31	[3]
CY31SP-2	TGTCAGAAGCAAGTGGTAAACTAGG				
P29-1	CAGGTCTTTCAAACCAACC	60	137	CY29	[4]
P29-2	ATTCTTCTAGCTGCACCCG				
S360	AAGCGGCCTC	36	1 100	CY23	[5]
S413	GGTGGTCAAG		1 540		
S65	GATGACCGCC	36	1 100	Shuiyuan pathotype	[5]

Table 2 Detection frequency of race of *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici* in Dali and Yimeng county by 5 race-specific-markers

Location	Race				
	CY32	CY29	CY31	Shuiyuan pathotype	CY23
Dali	74(82.2%)	46(51.1%)	4(4.4%)	2(2.2%)	1(1.1%)
Yimen	68(42.2%)	92(57.1%)	10(6.2%)	12(7.5%)	6(3.7%)

记,其中,条中 32 和条中 29 小种特异标记在两个主产区的检出率高,其余 3 小种特异标记的检出率均低于 10%。在大理市的标本中,条中 32 小种特异标记的检出率为 82.5%,占据绝对的优势,条中 29 小种特异标记的检出率为 51.1%,居于次位。在易门种植区,条中 32 和条中 29 小种标记的检出率分别为 42.2%和 57.1%,条中 29 号小种特异标记的检出率居于首位,条中 32 号小种特异标记的检出率居第二位(表 2)。

## 2.2 同一个罹病叶片中含有的小麦条锈菌小种特异标记数

对所有供试样品的 DNA 均同时用 5 个小种特异的分子标记进行检测,结果表明,在许多单个罹病叶片中都能检测出多个小种标记,其中,近 0.4%的罹病叶片中能够检测出 5 个小种标记,近 1.2%的单个叶片中能够检测出 4 个小种标记,近 3.2%的叶片中能够检测出 3 个小种标记,39.8%的叶片中能够检测出 2 个小种标记,29.5%的叶片中只检测出 1 个小种标记;而 25.9%的叶片中未能检测出标记(表 3)。在罹病叶片中仅检测出一个小种的有 3 个小种标记,分别为条中 32、条中 29 和 水源类型小种标记,它们所占比例分别为 55.4%、43.2%和 1.4%。而单个叶片检测出两个小种标记的共有 7 种小种标记组合,在这 7 种标记组合中,含有 CY32 和 CY29 小种标记的组合占 2 个标记

组合的 88%,是主要的小种标记组成类型。以上结果表明,在田间普遍存在多个小种侵染一个叶片的现象。

## 2.3 小麦条锈菌生理小种鉴定与 PCR 检测结果比较

为了验证分子标记检测结果的准确性,选取了经中国农业科学院植物保护研究所用鉴别品种鉴定为条中 32 号、条中 29 号、条中 31 小种侵染的叶片标样各 6 份,提取罹病叶片的 DNA,用上述标记进行检测。结果在 18 份样品中检测到阳性标记,检测出的阳性标记与生理小种鉴定结果一致,表明分子标记检测方法是可信的。

## 3 结论

使用从罹病叶片中直接提取的 DNA 为模板,可以缩短小麦条锈病菌群体分析的工作周期,提高群体分析的效率,加大分析群体的样本量,使结果能够更加及时、全面地反映田间群体动态和趋势。对于小麦条锈病菌这样的专性寄生菌来说,把握越夏、越冬菌源的种群、致病性变异的时间和空间动态,对于制定有效防治措施,是十分重要的。可以预期,随着小种特异性标记数量的增加和特异性的提高,这一技术在小麦条锈病的群体分析和病害管理中可发挥重要作用。

Table 3 Number of race-specific-markers detected in single infected leaf

	No. of race-specific-markers detected in single infected wheat leaf					
	5	4	3	2	1	0
No. of samples	1	3	8	100	74	65
Detection frequency/%	0.4	1.2	3.2	39.8	29.5	25.9

## 参考文献

- [1] Wang B T, Hu X P, Li Q, *et al.* Development of race-specific SCAR markers for detection of Chinese races CYR32 and CYR33 of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *Plant Disease*, 2010, 94(2): 221-228.
- [2] Zhang B, Hao B J, Wang B T, *et al.* Establishment of SCAR detection marker of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* race CY32 in China (in Chinese) [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)* (西北农林科技大学学报自然科学版), 2009, 37(1): 177-181.
- [3] Cao L H, Kang Z S, Zheng W M, *et al.* The development of SCAR detection marker of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* race CY31 in China (in Chinese) [J]. *Mycosystema* (菌物学报), 2005, 24(1): 98-103.
- [4] Kang Z S, Cao L L, Zheng W M, *et al.* Selection and foundation of a race specific molecule marker for wheat stripe rust race CY29 in China (in Chinese) [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)* (西北农林科技大学学报自然科学版), 2005, 33(5): 53-56.
- [5] Cao L H, Kang Z S, Zhao J, *et al.* RAPD markers of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in China (in Chinese) [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)* (西北农林科技大学学报自然科学版), 2004, 32(7): 37-40.

责任编辑:李晖