

张胜利,李东方,何文博. 小麦条锈病不同抗性材料中 *Yr10* 基因第 1 外显子功能标记的初步研究[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):20-22.

小麦条锈病不同抗性材料中 *Yr10* 基因第 1 外显子功能标记的初步研究

张胜利, 李东方, 何文博

(河南科技学院/河南省高等学校作物分子育种重点学科开放实验室,河南新乡 453003)

摘要:小麦抗条锈病基因 *Yr10* 是目前尚未被大面积应用的优良抗性基因,为了探索 *Yr10* 抗性基因新的筛选方法及其有效的利用方式,以具有不同抗性的 28 个小麦品种为材料,采用 PCR 扩增技术对 *Yr10* 基因的第 1 外显子进行了功能标记的初步研究。结果表明:所用的小麦材料中可能不含 *Yr10* 基因,其抗性可能由其他抗性基因决定;所用的部分小麦抗性材料可能是含有抗性基因或者抗性相关基因较多的抗性良好的材料,在条锈病的抗病育种上具有较高的利用价值;在利用抗性基因较少抗性材料时应该注意选择不同抗性来源的材料进行组配组合,从而提高育成品种的抗性持久性。

关键词:小麦;条锈病;*Yr10*;功能标记

中图分类号:S512.101;Q756 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)09-0020-02

小麦条锈病是分布最广、危害最重的小麦病害之一^[1-2]。积极开发新抗源、进行不同来源抗病基因的聚合,或者将水平抗性基因和垂直抗性基因进行综合利用从而提高育成品种的抗性持久性是防治小麦条锈病的最基本和最重要的途径之一。功能标记是伴随着基因组学的发展而最新出现的一种分子标记,来源于控制表型的基因序列内部^[3],由于具有遗传效应值的普适性、可靠性高、能准确地被检测、能跟踪功能位点的目标基因等多方面的优点,使其成为分子标记开发的新目标^[4]。功能标记将为基因资源的挖掘和利用、分子标记辅助选择、分子设计育种等提供高效的工具。

*Yr10*为来源于小麦品种Moro中的一个抗病基因^[5],可

抵抗目前在我国出现的所有条锈菌生理小种^[6],是目前尚未被大面积应用的优良抗性基因。因此,笔者所在课题组以抗性不同的 28 个小麦品种为试验材料,采用 PCR 扩增技术对 *Yr10* 基因的第 1 外显子进行功能标记的初步研究,从而探索条锈病抗病基因新的筛选方法及其有效的利用方式,以期为加快小麦新型抗病品种的培育、提高育成品种的抗性持久性提供一定的参考价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的小麦材料及其条锈病抗性情况见表 1。

表 1 供试的小麦材料及其条锈病抗性

序号	品种	抗性	序号	品种	抗性	序号	品种	抗性
1	潍麦 7 号	免疫	11	抗白 3 号	高抗	21	周麦 18	高抗
2	04 中 77	免疫	12	陕 253-3	高抗	22	矮抗 58	高抗
3	抗条温 6	免疫	13	川育 40109	高抗	23	山农 015189	感病
4	墨 S139	免疫	14	内 2836	高抗	24	连 0366	感病
5	CMT-3	高抗	15	TMA35	高抗	25	贵才(抗白粉)	高抗
6	02G13	高抗	16	内乡 188	高抗	26	百农 64	高抗
7	生选 4 号	高抗	17	新麦 19	高抗	27	中国春	感病
8	农大 3659	高抗	18	周 11	高抗	28	周 8425B	免疫
9	CP02-9-2-2-1	高抗	19	郑 9023	高抗			
10	小偃 22	高抗	20	郑 366	高抗			

1.2 试验方法

不同小麦材料的 DNA 提取均采用 CTAB 法。
根据小麦条锈病抗性基因 *Yr10* (GenBank accession No.

AF149112.1) 的基因组序列与其 CDS 序列的比对结果,采用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,相关引物见表 2。

表 2 *Yr10* 第 1 外显子区的引物

编号	引物名称	序列(5'→3')	<i>T_m</i> (°C)
1	<i>Yr10</i> -E1P764S	ACGCTCCTGCCCTTGCTT	60.5
2	<i>Yr10</i> -E1P764A	GTTTCGCTCCACGCTGACTC	60.5

PCR 扩增体系 (10 μL): 1 μL DNA 模板、各 0.5 μL 上下游引物、1 μL 10 × buffer、1 μL dNTP (2.5 mmol/L)、0.15 μL

收稿日期:2013-02-06

基金项目:河南省教育厅自然科学基础研究项目(编号:2009B180007);河南科技学院博士启动基金(编号:7004)。

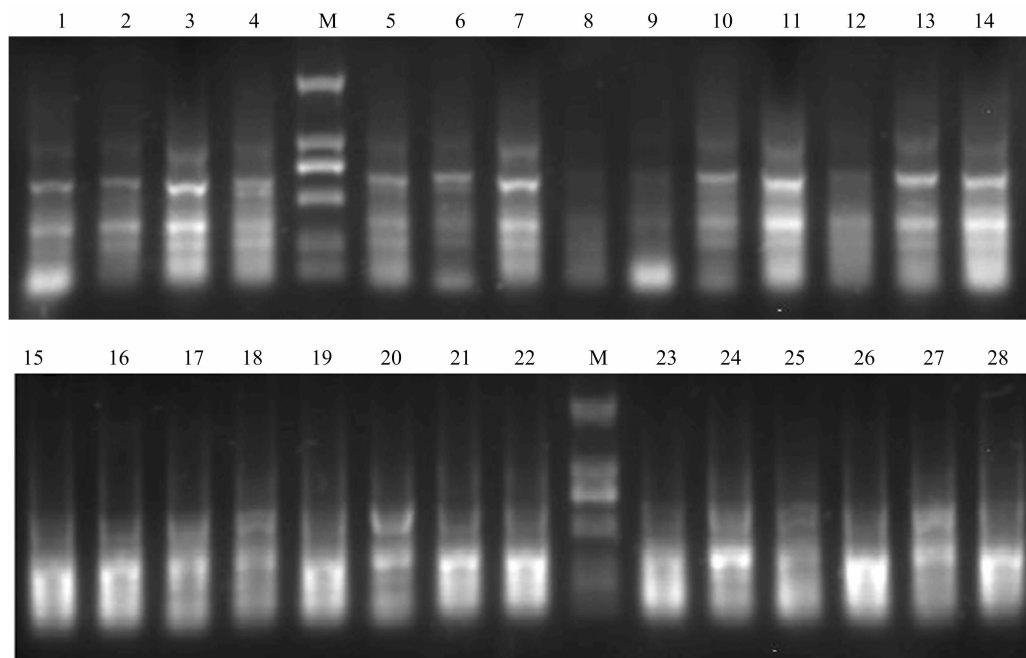
作者简介:张胜利(1976—),男,博士,副教授,主要从事禾本科植物比较基因组学研究。E-mail:slzhang2008@163.com。

Taq 酶(2.5 U/ μ L)、5.85 μ L ddH₂O。扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,62 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物的检测采用 1% 琼脂糖凝胶进行,应用凝胶成像系统对电泳结果进行拍照并保存。

2 结果与分析

小麦条锈病抗病基因 *Yr10* 第 1 外显子的特异性扩增引物(*Yr10* - E1P764S、*Yr10* - E1P764A)在含有 *Yr10* 基因的小

麦材料中的预期扩增片段大小为 764 bp。图 1 的电泳结果表明:764 bp 的目标扩增带在所有材料中都没有出现;从非目标条带(500 ~ 600 bp)的扩增结果来看,除 8、9、12、15、16、19、21、22、23、26、28 号材料无扩增结果,17、18、24、25 号材料有很弱的扩增条带外,其余 13 个材料中均能扩增出比较明显的条带;从 300 bp 左右非目标条带的扩增结果来看,1、2、3、4、5、7、10、11、12、13、14、20、24、27 号等 14 个材料中均有明显的扩增带;从引物二聚体的产生情况看,1、3、4、9、11、14、15、23、26 号等 9 个材料的扩增结果中均含有引物二聚体。



M为Marker (D2000),由上而下的大小依次为2 000、1 000、750、500、250、100 bp;泳道1至28分别为表1中序号对应的材料

图1 特异性引物 *Yr10*-E1P764在供试材料中的扩增结果

由于 25 个抗性材料中均没有扩增出明显的目标条带,暗示了本研究所用的小麦抗性材料中可能不含有 *Yr10* 基因,其抗性可能是由其他抗性基因决定的;从非目标条带(500 ~ 600 bp)的扩增结果来看,25 个抗性材料中有 10 个(8、9、12、15、16、19、21、22、26、28 号)没有扩增产物,2 个(17、25 号)的扩增条带较弱,其余 13 个材料均有明显的扩增产物出现,扩增效率为 52% (13/25);3 个感病材料中有 1 个(27 号)有较为明显的扩增条带;25 个抗性材料中有 5 个(1、2、4、5、14 号)扩增出了 2 条明显的条带,另外 5 个材料(3、7、10、11、13 号)均扩增出了 3 条较为明显的条带。这 10 个具有多条扩增带的抗性材料的基因组 DNA 特定区域与引物 *Yr10* - E1P764S、*Yr10* - E1P764A 序列间应该存在一定相似性,但由于引物结合区之间的序列有一定的差异而导致了大小不同的明显扩增带的出现。推测其可能含有至少 2 种抗性相关基因,但该扩增带是否与材料的抗病性相关,还需要通过扩增产物的测序、分离群体验证等下游工作来进一步证明。分析结果表明,本研究所用的小麦抗性材料中有些可能是含有较多抗性基因或抗性相关基因的抗性良好的材料,因此在条锈病的抗病育种上具有一定的利用价值,而在利用抗性基因较少的抗性材料时,应该注意选择不同抗性来源的材料组配组合

以提高育成品种的抗性持久性。

3 讨论

功能标记是伴随着基因组学的发展而出现的新型分子标记,将为基因资源的挖掘和研究、有利基因的跟踪、分子标记辅助选择、分子设计育种等提供高效的工具。目前已经开发出了许多基因的功能标记,例如水稻广亲和基因 *S5-N*、香味基因的功能标记,杂草稻红色果皮基因的功能标记等。夏先春等对 *PPO18*、*PPO16*、*PPO29* 等基因的功能标记研究表明:*Ppo* - *Al* 基因标记 *PPO18* 扩增的 685、876 bp 片段分别与高、低 PPO (多酚氧化酶) 活性相关;*Ppo* - *DI* 基因标记 *PPO16* 扩增的 713 bp 条带与低 PPO 活性相关;而 *PPO29* 扩增的 490 bp 条带与高 PPO 活性相关^[7]。王丰等根据水稻香型品种与非香型品种的香味基因(即 *BAD2* 基因)序列之间存在的差异而设计出香味基因的功能标记 GRFM04^[8]。*Yr10* 基因首次被发现于普通小麦 *Moro* 品种中^[9],可以抵抗我国目前出现的所有条锈菌生理小种,是目前尚未被大面积应用的优良抗性基因。笔者所在课题组以抗性不同的 28 个小麦品种为材料,采用 PCR 扩增技术对 *Yr10* 基因的第 1 外显子进行了功能标记研究,结果表明,本研究所用的小麦材料中可能不

梁 燕. 非淹涝与淹涝环境对水稻和陆稻幼根乙醇脱氢酶 3 表达的影响[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 22–23.

非淹涝与淹涝环境对水稻和陆稻幼根乙醇脱氢酶 3 表达的影响

梁 燕

(南通高等师范学校, 江苏南通 226001)

摘要: 研究淹涝与非淹涝处理对水稻和陆稻幼根中乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase 3, ADH3)表达的影响, 结果表明, 水稻非淹涝组 ADH3 表达变化不显著, 淹涝组 ADH3 表达在 48 h 后急剧升高; 而陆稻不论是淹涝组还是淹涝组, 12、24、48、96 h ADH3 表达变化不显著。水稻幼根 ADH3 的表达对水环境变化的敏感性高于陆稻, 水稻与陆稻对水/旱逆境的适应性机制存在差异。

关键词: 水稻; 陆稻; 淹涝; ADH3

中图分类号: S511.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)09–0022–02

世界上近一半人口都以稻米为食。按照栽培方式和生长期需水量的不同, 稻可分为水稻和陆稻。水稻种植在水田里。陆稻也称旱稻, 一般种植于旱地, 依赖雨水生长或辅以少量灌溉, 一生灌水量仅为水稻的 1/4 ~ 1/10。水稻和陆稻是同属同种的不同品系, 二者形态差异较小, 生理差异较大。水稻和陆稻在解剖、生理、根系发育以及根系蛋白质含量等方面都存在差别。水稻和陆稻在不同水分处理下产量变化及其构成因子不同^[1]。乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)是乙醇代谢的主导酶, 能催化乙醛和乙醇的氧化还原反应, 在植物无氧呼吸中起着重要作用。研究表明, 乙醇脱氢酶与植物的抗逆性相关^[2]。本研究比较了同一种属的 2 个不同品系——水稻嘉花 1 号和陆稻旱优湘晴在不同水环境下 ADH3 表达的变化, 旨在为水稻和陆稻抗逆机理研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2013–03–18

作者简介: 梁 燕(1971—), 女, 副教授, 主要从事分子遗传学研究。

E-mail: lian8888@163.com。

含有 *Yr10* 基因, 这些抗性材料中的抗性可能由其他抗性基因或抗性相关基因所决定。

参考文献:

- [1] Line R F. Stripe rust of wheat and barley in North America: a retrospective historical review[J]. Annual Review of Phytopathology, 2002, 40: 75–118.
- [2] Li Z Q, Zeng S M. Wheat rust in China[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2002: 1–3.
- [3] Andersen J R, Lübberstedt L. Functional markers in plants[J]. Trends in Plant Science, 2003, 8(11): 554–560.
- [4] 贺道华, 雷忠萍, 邢宏宜. 功能标记的开发、特点和应用研究进展[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2009, 37(1): 110–116, 121.

将嘉花 1 号水稻种子(江苏沿江地区农业科学研究所提供)与旱优湘晴陆稻种子(上海农业生物基因中心提供)分别置于培养皿内的滤纸上, 加入 1/2 Hoagland 营养液, 室温下促发芽。待幼根长至 1 cm 时, 将幼苗移植于花盆中, 随机分为淹涝组和非淹涝组。2 组均置于室温下, 淹涝组为常规湿润土壤条件, 淹涝组将花盆淹没于水中, 水面高出土壤表面 1 cm。各组分别在试验开始后 0、12、24、48、96、192 h 取 10 根 0.5 cm 长根尖进行研究。

1.2 主要试剂与仪器

RNAiso Plus 总 RNA 提取试剂盒, SYBR® PrimeScript™ RT–PCR Kit (TaKaRa 公司), 引物由上海英骏公司合成, ABI 7500 Realtime–PCR System(美国应用生物系统公司), 其他化学试剂均为进口或国产分析纯, 水由 Millipore 纯水仪制备。

1.3 方法

1.3.1 总 RNA 提取 取 10 根长约 0.5 cm 根尖置于研钵中, 加入 1 mL RNAiso Plus, 充分研磨, 至裂解液呈透明状。转入离心管中, 室温下静置 5 min, 加入 0.2 mL 氯仿, 振荡混匀, 室温下静置 5 min, 12 000 r/min 离心 15 min 后吸取上清液, 加入等体积异丙醇, 混匀后室温下静置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 用 75% 乙醇洗涤沉淀, 12 000 r/min

- [5] Metzger R J, Silbaugh B A. Inheritance of resistance to stripe rust and its association with brown glume color in *Triticum aestivum* L., ‘P. I. 178383’[J]. Crop Science, 1970, 10(5): 567–568.
- [6] Wang F L, Wu L R, Xu S C. The discovery and studies on new races CYR30 and CYR31 of wheat stripe rust in China[J]. Journal of Plant Protection, 1996, 23(1): 39–44.
- [7] 夏先春, 何心尧, 孙道杰, 等. 小麦品质基因功能标记的开发与应用[C]//2009 年全国植物分子育种学术研讨会, 2009: 59–61.
- [8] 王 丰, 李金华, 柳武革, 等. 一种水稻香味基因功能标记的开发[J]. 中国水稻科学, 2008, 22(4): 347–352.
- [9] Fulon T M, Van der Hoeven R, Eannetta N T, et al. Identification, analysis, and utilization of conserved ortholog set markers for comparative genomics in higher plants[J]. Plant Cell, 2002, 14(7): 1457–1467.