

# 小麦抗白粉病基因 *Pm23* 分子标记的初步鉴定

柴春月<sup>1,2</sup>, 刘红彦<sup>1\*</sup>, 伊艳杰<sup>1</sup>, 王振军<sup>1</sup>, 王瑞<sup>1</sup>, 鄧玉宝<sup>3</sup>

(1. 河南省农业科学院植物保护研究所, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学植物保护学院, 河南 郑州 450002;

3. 河南省农作物新品种重点实验室, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 根据植物抗病基因的保守结构, 合成 7 对特异引物, 用感病品种 Chancellor 作对照, 对 12 个含不同抗白粉病基因的小麦品系进行 PCR 分析, 结果只有 1 对引物(3LR+3LF)在 *Pm23* 的载体品系中扩增出稳定的多态性片段, 对该片段进行回收、克隆、测序, 全长为 253bp。经同源性分析发现, 该特异性片段与大麦 Ty3—gypsy 类反转录转座子基因部分序列有 87% 的同源性, 属于反转录转座子类标记。

**关键词:** 小麦; 白粉病; 抗病基因; 分子标记

**中图分类号:** S435.12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004—3268(2006)05—0047—04

## Identification of Molecular Marker of Powdery Mildew Resistance Gene *Pm23* in Wheat

CAI Chun-yue<sup>1,2</sup>, LIU Hong-yan<sup>1\*</sup>, YI Yan-jie<sup>1</sup>, WANG Zhen-jun<sup>1</sup>, WANG Rui<sup>1</sup>, ZHI Yu-bao<sup>3</sup>

(1. Institute of Plant Protection, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

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

3. Henan Key Lab for Crop Improvement, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Based on the conserved domains of the resistance genes, 7 pairs of primers were synthesized and used to amplify the genomic DNAs of 12 wheat lines carrying different powdery mildew resistant genes (*Pm* genes) and one susceptible control Chancellor. The analysis of PCR products showed that only one pair of primers 3LR+3LF amplified polymorphic fragments in the line carrying *Pm23* gene. Sequence similarity analysis indicated that the special amplified fragments with 253 bp in full length was 87% similar to *Hordeum vulgare* Ty3—gypsy retrotransposon—like gene, which was belonged to a retrotransposon-like marker.

**Key words:** Wheat; Powdery mildew; Resistant gene; Molecular marker

自 1992 年利用转座子标签 (Transposon tagging) 技术克隆抗玉米圆斑病菌 (*Cochliobolus carbonum*) 的 *HMI* 基因以来, 已有 48 个抗病基因从 12 种植物中克隆出来。经氨基酸序列分析发现, 抗病基因存在保守结构域, 如核苷酸结合位点 (Nucleotide-binding site, NBS), 富含亮氨酸重复序列 (Leucine-rich repeats, LRR), 丝氨酸/苏氨酸蛋白

激酶类似受体 (Receptor-like serine/threonine kinases), 以及与果蝇 Toll 蛋白及哺乳动物白细胞介素-1 受体 (Toll and interkin-1 receptor, TLR) 的胞外域相似的区域<sup>[1]</sup>。利用抗病基因的保守序列设计引物, 进行 PCR 扩增, 筛选与抗病基因连锁的 RGAP (Resistance gene analog polymorphism) 标记, 已成为一种非常有效的, 基于 PCR 技术的分子标记

收稿日期: 2005—12—15

基金项目: 河南省杰出青年科学基金项目 (004012100)

作者简介: 柴春月 (1979—), 女, 河南西峡人, 在读硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。

通讯作者: 刘红彦 (1964—), 男, 河南嵩县人, 研究员, 博士, 主要从事植物病理学研究。

鉴定方法。利用该方法鉴定发现了 16 个与抗条锈病基因 *Yr9* 连锁、6 个与 *Yr5* 连锁的 RGAP 标记, 并已用于抗条锈病基因的分子检测和图谱克隆<sup>[2-4]</sup>。本研究报道了小麦抗白粉病基因 *Pm23* 分子标记的鉴定。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究选择在河南省麦区具有良好抗病性、含不同抗白粉病基因的 11 个小麦品系(表 1), 以感病品种 Chancellor 作为对照。

表 1 供试抗白粉病小麦品系及携带的抗病基因

品系名称	抗病基因
Ulka/ 8 *Chancellor	<i>Pm2</i>
Yuma/ 8 *Chancellor	<i>Pm4a</i>
VPM	<i>Pm4b</i>
Timgalen	<i>Pm6</i>
96—282	<i>Pm13</i> *
96—287	<i>Pm20</i> *
6VS/ 6AL	<i>Pm21</i>
81—7241	<i>Pm23</i> *
齿牙糙	<i>Pm24</i>
小白冬麦(红粒)	<i>MLxbd</i>
红蚰麦	<i>Pm</i> ?

注: \* 由中国农科院品质所朱振东博士馈赠

1.2 引物合成

由上海生工生物工程有限公司合成 7 对引物<sup>[4-9]</sup>:

S3: 5'—GGNATGGNGGNTTNGGNAARACNCAN—3'  
AS3: 5'—TCNCGNATNATNTTNACNACNCGN—3'  
NF: 5'—TAGGGCCTCTTGCTACGT—3'  
NR: 5'—TATAAAAAAGTGCGGACT—3'  
OF: 5'—CTCGATGCAATAACTAAAATTT—3'  
OR: 5'—TCTGTTTGCATCATCAATGT—3'  
R11F: 5'—AACCCAATTCCACCTCTTTTACA—3'  
R11R: 5'—TTCCCCTTGCAATAGTCACCATAG—3'  
3LF: 5'—CCTT(G/T)CCTT(C/A)GAGCTTTGTAT—3'  
3LR: 5'—GGCTTCCTTTGCCTCCCC(A/C)AC—3'  
F: 5'—GGNATGGGNGGNTTNGGNAA(A/G)CANAC—3'  
R: 5'—NCA(T/A)TTNAGNGCNAGNGGNAGNCC—3'

R2F: 5'—CTATGGTGA CTATTGCAAGGGGAA—3'  
R2R: 5'—ATTGTGATTGATGGCATGTCTACG—3'

1.3 DNA 提取

供试小麦品系在室温下, 长至三至四叶期时, 采集叶片, 用 CTAB 法提取 DNA, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳估测其含量。

1.4 PCR 扩增

PCR 反应体积为 25  $\mu$ l, 其中含 80ng 左右的基因组 DNA, 0.4  $\mu$ mol/L 引物对, 每种 dNTP 150  $\mu$ mol/L, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 10 $\times$  Buffer, 1.25U Taq 酶(购自宝生物公司大连有限公司)。扩增用的热循环仪为 PTC—200—D(MJ Research 公司), 扩增程序为 94  $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 退火 1 min(温度依引物而定), 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 扩增 35 个循环后, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 溴化乙锭染色, 电泳结果在 UVP 紫外凝胶成像系统上观察。

1.5 克隆测序

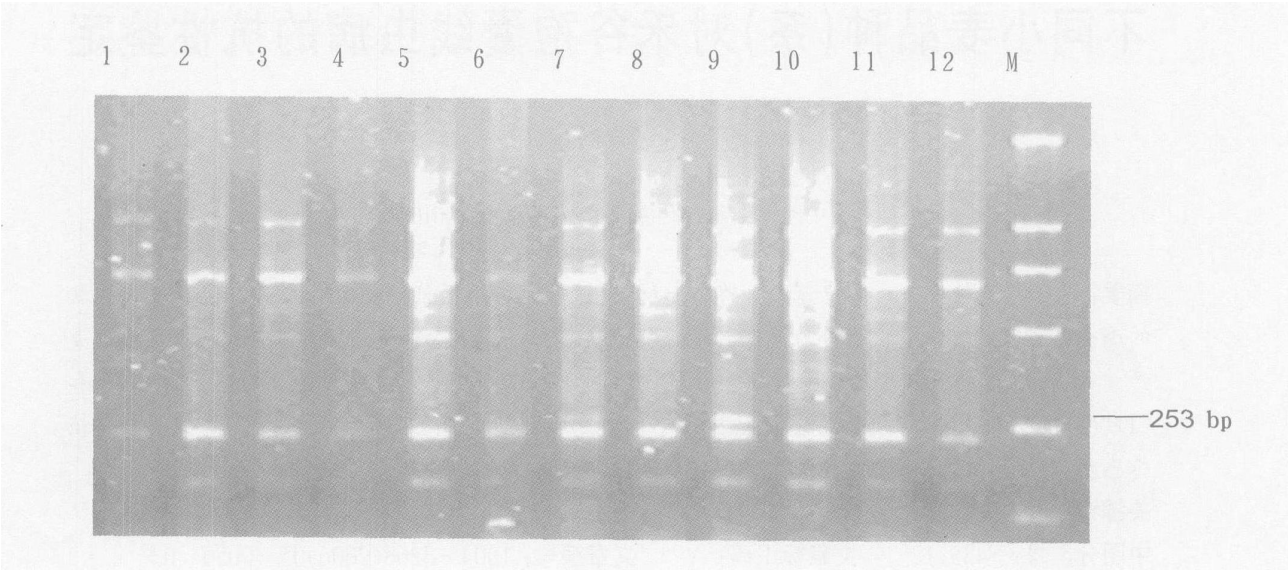
扩增的多态性片段, 用 DNA 试剂盒 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0(购自宝生物公司大连有限公司)回收纯化, 再用 PMD18—T Vector(购自宝生物公司大连有限公司)进行连接; 转化大肠杆菌 GM 109, 阳性克隆由北京三博远志生物技术有限责任公司进行测序。

1.6 序列分析

将测序结果与 GenBank 中的序列用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行比较。并用 cdd.v2.05 数据库分析蛋白质的同源性和保守结构域(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>)。

2 结果与分析

参试的 7 对引物中, 只有 3LF+3LR 1 对引物, 在携带 *Pm23* 基因的 81—7241 中扩增出较强的多态性片段, 在 *Pm20* 基因载体品系中该片段很弱, 在感病品种 Chancellor 和其他抗白粉病基因载体品系中未出现该片段(图 1)。进一步的测序结果表明, 该片段长度为 253bp。经序列同源性分析发现, 标记 3L253 与大麦 Ty3—gypsy 类反转录转座子(Genbank No: AY040832.1 和 AY040833.1)的核心蛋白基因(Group—specific antigen, gag)和酶基因区域(Polyprotein, pol)的部分序列同源性达 87% (图 2), 但不含抗病基因的保守结构域。



1. Chancellor; 2. Ulka/ 8 \* Chancellor(*Pm2*); 3. Yuma/ 8 \* Chancellor(*Pm4a*); 4. VPM(*Pm4b*); 5. Timgalen(*Pm6*); 6. 96—282(*Pm13*); 7. 96—287(*Pm20*); 8. 6VS/ 6AL(*Pm21*); 9. 81—7241(*Pm23*); 10. 齿牙糙(*Pm24*); 11. 红蚰麦(*Pm?*); 12. 小白冬麦(红粒)(*Pm*); M. Marker.

图 1 引物 3LR+3LF 对供试品种的 PCR 检测结果

3L <sub>253</sub>	17	CCACCACCTTATTAGTAGTCTGTAGGATCATATTCTTGCTGTTTCTATTGCTGCTAACCA	76
AY040832.1	9160	CCACCACCTCCTAGTAGTCTGTAGGGTCATATTTTGCTGTGTTCTMTTGCTGCTAACCA	9219
3L <sub>253</sub>	77	TGCCAGGATCACAAGTCGACGAGACTGACTAGGAGAACTTGACGAACAAGGAGCTTCATG	136
AY040832.1	9220	TGCCAGGATCACACGACGAGGAGATCGACTGGGAGAACTTGACCAACCAGGAGCTTTATG	9279
3L <sub>253</sub>	137	ATAAGTTTCAGCAAATGATG	156
AY040832.1	9280	ATAAATTCAGCAAATGATG	9299

图 2 DNA 同源性分析结果

3 讨论

利用抗病基因的保守区域设计引物, 进行 PCR 扩增, 已成为筛选抗病基因的候选序列和 RGAP 标记的有效手段。在本研究中, 这些引物在供试的材料中扩增出多条片段, 但仅对与目的基因有特异性的片段进行克隆测序, 以期筛选既含抗病基因保守区域, 又与目的基因连锁的分子标记。经同源性分析发现, 标记 3L253 不含抗病基因的保守区域, 但可能是小麦 Ty-3-gypsy 类反转录转座子基因的一部分。前人研究报道

在玉米基因组中, 几乎所有基因的两端都存在反转录转座子的序列<sup>[11]</sup>, 小麦反转录转座子的表达与植物的防御反应可能具有一定的联系<sup>[12]</sup>。基于反转录转座子的分子标记已成为基因作图的方法之一<sup>[13]</sup>。例如用反转录转座子分子标记系统 REMAP 和 IRAP, 已将大麦抗网斑病基因定位于染色体 6H 上<sup>[14]</sup>。因此, 可以推测一些反转录转座子可能与抗病基因相毗邻。引物 3LR+3LF 对抗白粉病基因 *Pm23* 的标记属于反转录转座子, 初步研究结果表明, 此标记对抗白粉病基因 *Pm23* 具有特异性, 但其连锁程度需要进一步分析。

# 不同小麦品种(系)对禾谷孢囊线虫病的抗性鉴定

王振跃<sup>1</sup>, 高书峰<sup>1</sup>, 李洪连<sup>1</sup>, 沙广乐<sup>2</sup>, 余懋群<sup>3\*</sup>

(1. 河南农业大学植物保护学院, 河南 郑州 450002; 2. 郑州市植保植检站, 河南 郑州 450006;  
3. 中国科学院成都生物研究所, 四川 成都 610041)

**摘要:** 为了筛选抗小麦禾谷孢囊线虫的小麦材料, 通过大田小区试验, 对 10 个具有优良农艺性状的小麦品种(系)抗孢囊线虫病性能及产量进行了鉴定, 结果表明: 各供试品种(系)抗病程度和小麦产量存在明显差异, 但未发现免疫品种。其中 CD01 最为抗病, 平均病指为 19.3; 豫展 1 号和 CD992005 发病最重, 平均病指分别高达 41.6 和 40.0。且产量明显低于其他品种。株孢囊数与植株感病程度和产量高低之间的关系并不完全一致。

**关键词:** 禾谷孢囊线虫; 抗病性; 小麦; 品种; 鉴定; 产量

**中图分类号:** S435.12      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1004—3268(2006)05—0050—03

孢囊线虫病是小麦的重要病害, 分布于澳大利亚、加拿大、意大利、日本等 32 个国家。在一些国家, 因其危害产量损失达 23%~50%, 重者达 71%~89%, 年损失约 7 亿美元。我国自 1987 年首次在

湖北天门县矮黄的麦株上发现此线虫。1992 年, 陈品三等将其鉴定为燕麦孢囊线虫(*Heterodera avenae*), 以后相继在河北、河南、山西、北京、内蒙古、湖北、青海、山东、甘肃、安徽、陕西等地均有发现。我

收稿日期: 2006—02—16

基金项目: 国家自然科学基金项目(3937044)

作者简介: 王振跃(1958—), 男, 河南南召人, 副教授, 主要从事植物病理学的教学与科研工作。

通讯作者: 余懋群(1958—), 男, 四川成都人, 研究员, 博士生导师, 主要从事小麦品种改良工作。

## 参考文献:

[ 1 ] 李春来, 张怀渝. 植物抗病基因同源序列(RGA)研究进展[ J ]. 分子植物育种, 2004, 2(6): 853—860.

[ 2 ] Shi Z X, Chen X M, Line R F, *et al.* Development of resistance gene analog polymorphism markers for the *Yr9* gene resistance to wheat stripe rust[ J ]. *Genome*, 2001, 44: 509—516.

[ 3 ] Yan G P, Chen X M, Line R F, *et al.* Resistance gene analog polymorphism markers cosegregating with the *Yr5* gene for resistance to wheat stripe rust have homology with plant disease resistance genes[ J ]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 636—643.

[ 4 ] Ling P, Chen X M. Construction of a hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L) bacterial artificial chromosome library for cloning genes for stripe rust resistance[ J ]. *Genome*, 2005, 48(6): 1028—1036.

[ 5 ] Li L A, Ying K X, Hua Z R, *et al.* Isolation and characterization of Mlo and NBS-LRR-Like gene sequences in wheat[ J ]. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(4): 472—478.

[ 6 ] 陈夕军, 周益军, 徐敬友, 等. 利用 RGA-PCR 方法进行水稻抗瘟基因分子标记[ J ]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2004, 25(3): 55—59.

[ 7 ] He C S, Wan Ping, Qi Z X. Solation and characterization of Mla—like genes of wheat[ J ]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46(6): 744—750.

[ 8 ] 姜 丽, 郑先武, 张小红, 等. 一个水稻重复序列的分析与定位[ J ]. 遗传, 2003, 25(6): 691—694.

[ 9 ] 刘卫东, 王石平. 水稻中大麦 Mlo 和玉米 Hm1 抗病同源序列的分析和定位[ J ]. 遗传学报, 2002, 29(10): 875—879.

[ 10 ] 丁海, 宛煜嵩, 朱美霞, 等. 大豆抗病基因同源序列的克隆与分析[ J ]. 分子植物育种, 2003, 1(2): 217—223.

[ 11 ] 王石平, 张启发. 高等植物基因组中的反转录转座子[ J ]. 植物学报, 1998, 40(4): 291—297.

[ 12 ] 唐益苗, 马有志, 李连城, 等. 小麦反转录转座子家族鉴定及其转录活性分析[ J ]. 科学通报, 2005(5): 546—551.

[ 13 ] 王子成, 李忠爱, 邓秀新. 植物反转录转座子及其分子标记[ J ]. 植物学通报, 2003, 20(3): 287—294.

[ 14 ] Manninen Q, Kalendar R, Robinson J, *et al.* Application of Bare—1 retrotransposon markers to the mapping of a major resistance gene for net blotch in barley[ J ]. *Mol Gen Genet*, 2000, 264: 325—334.