

小麦抗白粉病基因 SRAP 标记的鉴定及序列分析

伊艳杰^{1,2}, 胡楠³, 刘红彦², 安黎哲¹, 刘新涛², 王勋陵¹

(1. 兰州大学 干旱与草地生态教育部重点实验室, 甘肃 兰州 730000;

2. 河南省农业科学院 植物保护研究所, 河南 郑州 450002; 3. 南阳理工学院, 河南 南阳 473004)

摘要: 利用 240 对 SRAP 引物组合, 扩增普通小麦 SF42 (高感白粉病) 和 ZB90 (对白粉病免疫)。40% 的引物组合能在感抗材料中扩增出稳定的多态性条带。进一步用这些引物分析 SF42×ZB90 的 F₂ 分离群体, 发现有 4 对引物组合 Me5+Em5, Me8+Em7, Me8+Em16, Me12+Em7 扩出的 5 个 SRAP 标记与小麦品种 ZB90 所含的抗白粉病基因连锁。对这些标记进行回收、克隆、测序。序列分析发现, 这些标记均含有 ORF, 并且有 4 个标记含有信号肽和跨膜区等保守结构域。

关键词: 小麦; 抗白粉病基因; SRAP 标记; 序列分析

中图分类号: S435.121.4⁺6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)03-0060-03

Identification and Analysis of the SRAP Markers Linked with Powdery Mildew Resistance Gene in Wheat

YI Yan jie^{1,2}, HU Nan³, LIU Hong yan², AN Li zhe¹, LIU Xin tao², WANG Xun ling¹

(1. Key Laboratory of Arid and Grassland Ecology of Ministry of Education,

Lanzhou University, Lanzhou 730000, China; 2. Henan Academy of Agricultural

Sciences, Zhengzhou 450002, China; 3. Nanyang Institute of Technology, Nanyang 473004, China)

Abstract: 240 SRAP primer combinations were applied to amplify wheat cultivar SF42 (highly susceptible to powdery mildew) and ZB90 (immune to powdery mildew). Forty percent of primer combinations could amplify the stable polymorphic bands. Further analyzing the F₂ segregating populations from the cross of SF42 and ZB90 using these primers, there are five SRAP markers produced by four primer combinations Me5+Em5, Me8+Em7, Me8+Em16 and Me12+Em7, which were linked with the powdery mildew resistance gene in ZB90. These markers were recovered, cloned and sequenced. Sequence analysis showed these markers contained ORFs and four of ones had conserved motifs such as signal peptide and transmembrane regions.

Key words: Wheat; Powdery mildew resistance gene; SRAP marker; Sequence analysis

由专性寄生菌 *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* 引起的小麦白粉病是世界性病害, 为了有效地利用品种的抗病性, 达到控制该病害的目的, 国内外学者在利用 DNA 分子标记构建小麦抗白粉病基因的遗传图谱和分子检测方面做了大量的工作^[1]。在小麦抗白粉病基因研究中, 常用的 DNA 分子标记有限

制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性 DNA(RAPD)、简单序列重复(SSR)和扩增片段长度多态性(AFLP)等。这些标记有不同的优缺点, 如 RFLP 标记, 呈共显性遗传, 分析结果稳定可靠, 但 DNA 用量大, 检测方法技术难度大, 多态性较低; RAPD 方法简单, 成本低, 但重复性较差, 检测位

收稿日期: 2006-03-08

基金项目: 河南省杰出青年科学基金项目(04120001400);

作者简介: 伊艳杰(1978-), 女, 河南许昌人, 在读博士研究生, 主要从事分子遗传学研究。

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。E-mail: liuhy1219@163.com

点不多;SSR 多为共显性,重复性好,但位点较少; AFLP 谱带多,但分析程序复杂,成本高^[2,3]。

SRAP 标记(sequence related amplified polymorphism, 序列相关扩增多态性)是一种新型的基于 PCR 的标记系统。2001 年由美国加州大学蔬菜作物系 Li 与 Quiros 博士提出后^[4],因具有方法简便、结果稳定、多态性高、序列多为外显子区域等特点,已经在小麦、马铃薯、水稻、苹果等植物的遗传图谱构建、基因定位与克隆等方面得到应用^[5,6]。本文介绍了小麦抗白粉病基因 SRAP 标记的鉴定及序列分析结果。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试材料包括高感白粉病的普通小麦品种 SF42 和白粉病免疫品种 ZB90,以及由这 2 个品种杂交产生的 F₂ 代分离群体。

1.2 引物序列

本试验所用引物根据相关文献合成^[2,8-10],上游引物 15 条,下游引物 16 条。

1.3 PCR 扩增

PCR 反应总体积为 25 μL,其中包括 40 ng 左右的基因组 DNA,0.4 μmol/L 引物,150 μmol/L dNTP(上海生物工程有限公司),2.5 mmol/L MgCl₂,10 × PCR Buffer,1U Taq 酶(TakaRa 公司)。使用 MJ PTC-200PCR 仪扩增,反应程序为:94 °C 变性 1 min,36 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 20 s,5

个循环;然后,94 °C 1 min,50 °C 1 min,72 °C 20 s,38 个循环后,72 °C 延伸 5 min。PCR 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶(1.0 mm 厚)电泳检测,室温下 40W 电泳 1~2 h,固定银染后照相。

1.4 克隆测序及序列分析

在紫外灯下切出特异性片段,用 DNA 凝胶回收试剂盒(U-GENE 公司)回收纯化,用 pMD18-T 载体(TakaRa 公司)于 16 °C 连接,然后转化入大肠杆菌 JM109 菌株感受态细胞,涂布平板培养,挑白色菌落进行 PCR 鉴定后,取阳性菌过夜培养,送由北京三博远志公司测序。利用 ORF finder, BLAST, InterProScan、GENSCAN 和 DNAMAN 软件进行序列比较分析。

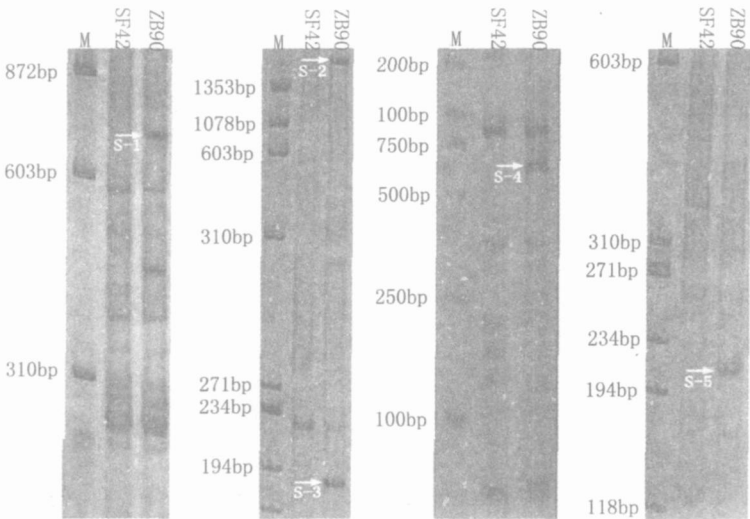
2 结果和分析

2.1 小麦抗白粉病基因 SRAP 标记的筛选

以小麦感白粉病品种 SF42 和抗病品种 ZB90 的基因组 DNA 为模板,利用 240 对 SRAP 引物组合进行 PCR 扩增。40% 的引物组合能在感、抗品种中扩增出稳定的多态性条带。进一步用这些引物分析 SF42 和 ZB90 的 F₂ 分离群体,发现有 4 对引物组合 Me5+ Em5, Me8+ Em7, Me8+ Em16, Me12+ Em7 扩增产生的 5 条多态性片段 S1-S5 与小麦 ZB90 所含的抗白粉病基因连锁(图 1、表 1)。

2.2 SRAP 标记的序列分析

对 5 个 SRAP 标记片段进行回收、克隆、测序,标记长度分别为 654 bp, 1540 bp, 217 bp, 601 bp,



M: DNA marker; 箭头所示为抗性相关带

图 1 SRAP 引物组合 SF42 和抗病品种 ZB90 的 PCR 扩增结果

202bp(表 1)。应用 ORF finder 软件进行序列的 ORF 查找分析,发现这 5 个 SRAP 标记都具有完整的阅读框。Blast 分析结果表明,S-2,S-4,S-5 与 GenBank 中已登录的小麦功能基因序列(GenBank No: A Y485644. 1, AF325196. 1, A Y682834. 1 和 AF378035)有较高的同源性。其中 S-2 与 S-4 经

GENSCAN 预测有外显子的存在。运用 DNAMAN 软件进行序列比较分析,发现 S-2 与一粒小麦磷脂酰丝氨酸脱羧酶基因(A Y485644)的同源性达 85%。经 InterProScan 软件预测发现,有 4 个标记的氨基酸序列含有信号肽、跨膜区等蛋白质的特征保守域(表 1)。

表 1 用于 SRAP 分析的引物组合及克隆的片段

引物名称	序列(5'-3')	标记名称	标记大小	保守域
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	S-1	654bp	信号肽,跨膜区域
Em5	GACTGCGTACGAA TTAA C			
Me8	TGAG TCCAAACCGGTGC	S-2	1540bp	信号肽,跨膜区域,丝氨酸蛋白酶抑制因子,半胱氨酸蛋白酶
Em7	GACTGCGTACGAA TTCAA			
		S-3	217bp	无
Me8	TGAG TCCAAACCGGTGC	S-4	601bp	信号肽,跨膜区域
Em16	GGCTTGAACGAGTGACTGA			
Me12	TGAG TCCAAACCGGCAT	S-5	202bp	信号肽,跨膜区域
Em7	GACTGCGTACGAA TTCAA			

3 讨论

SRAP 标记是根据基因外显子里 GC 含量丰富,而启动子和内含子里 AT 含量丰富的特点来设计引物,针对 ORF(开放阅读框架)进行扩增,因不同个体的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性,因而 SRAP 标记的序列多数为外显子区域^[2,4],这有助于直接发现目的基因序列,提高基因克隆的效率。本试验筛选出 5 个与小麦品种 ZB90 抗白粉病基因连锁的 SRAP 标记,测序发现这些标记均含有 ORF,这正确认了 SRAP 标记是对 ORFs 进行的扩增。

经软件预测发现,本研究得到的多数 SRAP 标记序列具有氨基酸保守结构域,但与已克隆的抗病基因无同源性,因此下一步可尝试将上游引物换成 RGA 引物与 SRAP 的下游引物配对进行 PCR 扩增,或对引物进行标记,提高扩增产物分辨率,以期获得与抗病基因完全连锁并含有抗病基因保守结构域的 SRAP 标记,为克隆抗病基因奠定基础。

参考文献:

[1] 刘红彦,何文兰,杨共强,等.小麦抗白粉病基因的分子标记及标记辅助育种研究进展[J] .河南农业大学学报,2001,35(1):26-31.
[2] 柳李旺,龚义勤,黄浩,等.新型分子标记-SRAP 与

TRAP 及其应用[J] .遗传,2004,26(5):777-781.
[3] 许红星,刘红彦,李锁平,等.小麦抗白粉病基因 *Pm6* 的 RAPD 标记[J] .河南农业科学,2004(4):25-28.
[4] Li G, Quiros C F. Sequence related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction; its application to mapping and gene tagging in Brassica[J] .Theor Appl Genet, 2001, 103: 455-461.
[5] 任羽,王得元,张银东.相关序列扩增多态性(SRAP)一种新的分子标记技术[J] .中国农学通报,2004(6):11-13.
[6] 张书芬,傅廷栋,李媛媛,等.SRAP 标记分析甘蓝型油菜多态性[J] .华北农学报,2006,21(1):50-54.
[7] 武志朴,杨文香,刘大群,等.小麦基因组 SRAP 扩增体系的初步研究[J] .河北农业大学学报,2005,28(3):66-69.
[8] Ruiz JJ, Pico B, Li G, *et al.* Identification of markers linked to a celery mosaic virus resistance gene in celery [J] .J AMER SOC HORT SCI, 2001, 126(4):432-435.
[9] 潘俊松,王刚,李效尊,等.黄瓜 SRAP 遗传连锁图的构建及始花节位的基因定位[J] .自然科学通讯,2005,15(2):167-172.
[10] 刘红彦,武予清,宋玉立.应重视小麦抗病虫基因的开发研究[J] .河南农业科学,2001(1):20-21.