

## 研究报告

### A Letter

# 小麦抗叶锈基因 *Lr1*、*Lr9*、*Lr10*、*Lr19* 的 STS 标记在近等基因系(NILs)上的特异性验证

刘莉<sup>1</sup>, 陈云芳<sup>2</sup>, 杨文香<sup>3</sup>, 刘大群<sup>3</sup>

1. 河北省植保植检站, 石家庄, 050011

2. 苏州出入境检验检疫局, 苏州, 215126

3. 河北农业大学植物保护学院植物病理系, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 保定, 071001

✉ 通讯作者: [ldq@mail.hebau.edu.cn](mailto:ldq@mail.hebau.edu.cn); ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 21 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0021

收稿日期: 2010 年 11 月 12 日

接受日期: 2011 年 02 月 11 日

发表日期: 2011 年 02 月 25 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

刘莉等, 2011, 小麦抗叶锈基因 *Lr1*、*Lr9*、*Lr10*、*Lr19* 的 STS 标记在近等基因系(NILs)上的特异性验证, 分子植物育种 Vol.9 No.21 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0021)

**摘要** 内本研究利用一套分别含有不同抗叶锈基因的 54 个以 Thatcher 为遗传背景的近等基因系(near-isogenic lines, NILs)对已报道的分别与抗叶锈基因 *Lr1*、*Lr9*、*Lr10* 和 *Lr19* 连锁的 STS 标记进行特异性验证。结果分别扩增出片段大小依次为 560 bp、1 100 bp、310 bp、130 bp 的条带, 与报道片段大小一致。同时试验发现与抗病基因 *Lr9*、*Lr10*、*Lr19* 连锁的 STS 分子标记在 NILs 中特异性较好, 但 *Lr1* 的 PCR-STSP TAG 扩增产物不仅在其亲本中, 而且在除 *TcLr3*、*TcLr28*、和 *TcLr27+31* (有芒)之外的其它几乎所有的近等基因系中也可以检测到。验证结果表明与抗病基因 *Lr9*、*Lr10*、*Lr19* 连锁的 STS 分子标记可方便地用于小麦抗叶锈的分子标记辅助选择育种, 而 *Lr1* 的 STSP TAG 分子标记没有特异性, 不可用于分子标记辅助选择育种。

**关键词** 小麦叶锈; 抗叶锈病基因; STS 分子标记; 近等基因系

## Verification of STS Molecular Markers for Leaf Rust Resistance Genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr10* and *Lr19* in Near-isogenic Lines of Wheat cv. Thatcher

Liu Li<sup>1</sup>, Chen Yunfang<sup>2</sup>, Yang Wenxiang<sup>3</sup>, Liu Daqun<sup>3</sup>

1. Hebei Station of Plants Protection and Plants Quarantine, Shijiazhuang, 050011, P.R. China

2. SuZhou Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Suzhou, 215126; P.R. China

3. Department of Plant Pathology, College of Plant Protection, Hebei Agricultural University/ Biological Control Center of Plant Diseases and Pests of Hebei Province, Baoding, 071001, P.R. China

✉ Corresponding author, [ldq@mail.hebau.edu.cn](mailto:ldq@mail.hebau.edu.cn); ✉ Authors

**Abstract** Sequence tag site (STS) markers for genes *Lr1*, *Lr9*, *Lr10* and *Lr19* against *Puccinia triticina* had been used to screen a set of near-isogenic lines (NILs) of wheat cv. Thatcher containing in total 54 different *Lr* genes and their alleles. Polymerase chain reaction (PCR) analysis was carried out using STS primers specific for these leaf rust resistance genes. The sizes of the amplified marker fragments were 560 bp, 1 100 bp, 310 bp and 130 bp, same as the reported in fragment size. The result show the markers STS<sub>Lr9-J13</sub>, STS<sub>Lr10</sub> and STS<sub>Lr19-Gb</sub> were unique and specific and can be used for molecular marker-assisted selection. But the amplification product of the STS<sub>Lr1-PTAG</sub> marker for *Lr1* was detected in almost all the near-isogenic lines used in this study examined except for the lines of *TcLr3*, *TcLr28* and *TcLr27+31*. This indicates that the markers STS<sub>Lr1-PTAG</sub> are not specific, and can not be used for molecular marker-assisted selection and molecular breeding.

**Keywords** Wheat leaf rust; Resistance genes; STS molecular marker; Near-isogenic lines

## 研究背景

由小麦隐柄锈菌(*Puccinia triticina*)引起的小麦叶锈病是小麦生产中的主要病害之一, 选育并合理利用抗叶锈品种是控制该病害流行最经济有效的

措施。但由于小麦叶锈菌的高度变异性, 特别是大面积种植单一抗性品种, 加速了对该病原菌定向选择, 促进优势生理小种的形成, 最终导致抗锈品种丧失抗性。因此, 深入研究小麦抗叶锈性遗传, 为

抗病育种提供遗传信息, 同时科学利用抗病基因, 对于该病害的持久控制、安全生产具有十分重要的指导意义。到目前为止, 小麦抗叶锈基因遗传和抗病性已经进行了多方面的研究, 国际上已发现了 90 多个抗叶锈病基因, 其中有 66 个抗叶锈基因已被正式命名, 统一编号到 *Lr66* (McIntosh et al., 2009)。

分子标记能够稳定遗传, 可反映生物的群体和个体特征, 随着现代生物科学的不断发展, 一些分子标记技术如 RAPD、RFLP、ISSR、SSR 和 AFLP 等已在动植物遗传研究中得到应用。为了更加方便有效的将分子标记应用于作物种质资源和育种研究, 人们将筛选到的与目的基因紧密连锁的分子标记转化为更加稳定的 STS (sequence-tagged sites) 标记、SCAR (sequence-characterized amplified regions) 标记或 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) 标记。1994 年 Schachermayr 等人 (Schachermayr et al., 1994) 首先将与抗叶锈基因 *Lr9* 共分离的 RAPD 分子标记转化成了 STS 标记, Feuillet 等人 (Feuillet et al., 1995) 于 1995 年分别将与 *Lr1* 共分离的 RFLP 分子标记及与 *Lr10* 紧密连锁的 RFLP 分子标记转化成了 STS 标记; 2001 年 Prins 等人 (Prins et al., 2001) 将 *Lr19* 的 AFLP 分子标记也转化成了更为稳定的 STS 标记。

分子标记辅助选择 (molecular marker-assisted selection, MAS) 是利用与抗病基因紧密连锁的分子标记追踪抗病基因。其最大的应用方面是将分散在不同抗病材料中的有利基因累加到一个品种中, 在基因聚合工程中能对每代植株开展早期和大范围的选择, 进而减少育种代次, 促进和加速育种过程。刘志勇等 (刘志勇, 2000) 已利用 PCR 方法对抗叶锈基因 *Lr9* 和 *Lr24* 进行了分子标记的诊断, 证明了 PCR

标记在小麦抗病基因的标记辅助选择和基因累加中有很好的潜力。本人前期研究 (刘莉, 2008) 验证了 *Lr24*<sub>STS-J9-310</sub> bp, *Lr35*<sub>Sr39-900</sub> bp 这两个分子标记在 54 个近等基因系中的稳定性及特异性。魏新燕等 (魏新燕, 2004) 分别用试验表明了 *Lr24*<sub>STS-J9-310</sub> bp, *Lr35*<sub>Sr39-900</sub> bp 分子标记在不同的遗传背景下仍能作为稳定可靠的辅助标记。因此寻找与验证出更多的与抗病基因紧密连锁的具有较好特异性的分子标记, 在育种实践中开展标记辅助选择和抗病基因累加, 对于促进抗源材料农艺性状的不断改进, 实现小麦抗叶锈病的抗源多样化, 具有十分重要的意义。

本实验选用了以 Thatcher 为背景的 54 个 NILs 为材料, 对已筛选到的与抗病基因 *Lr1*、*Lr9*、*Lr10* 和 *Lr19* 连锁的 STS 标记进行检测和验证, 进一步确定这几个分子标记可用于辅助选择的准确性, 从而为抗病品种的筛选和抗病品种的改良及培育奠定基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 *Lr1* 的 PCR-STS 结果

将与 *Lr1* 连锁的 STS<sub>*Lr1*-PTAG</sub> 引物对 Thatcher 和以 Thatcher 为遗传背景的小麦抗叶锈病近等基因系植株 DNA 进行 PCR 扩增, 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳 (图 1)。从图中可以看出, 除了泳道 5、31 和泳道 34 以外, 其他泳道所对应的植株 DNA 中均扩增出了片段大小为 560bp 的条带, 说明引物 STS<sub>*Lr1*-PTAG</sub> 除未在 TcLr3、TcLr28 和 TcLr27+31 (有芒) 中表达外, 在其他 50 个不含有 *Lr1* 植株 DNA 中全得到表达, 如果用此引物进行 *Lr1* 基因筛选, 结果将不能说明被检测植株确切含有 *Lr1* 抗叶锈基因。

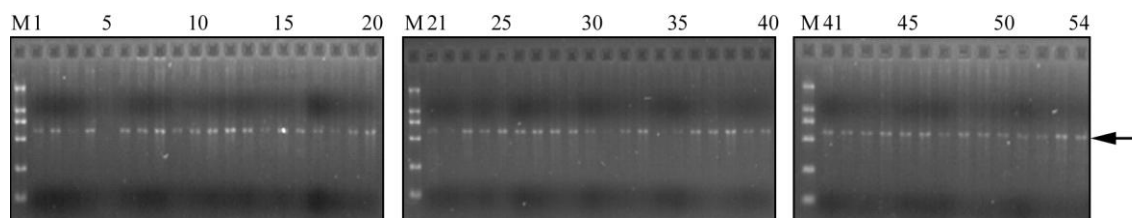


图 1 *Lr1* 的 PCR-STS 扩增结果

Figure 1 Amplification products of marker STS specific to *Lr1* gene

注: M: DL2000 marker; 1-54: 顺序为表 1 所示顺序, 箭头所指的是 560 bp

Note: M: DL2000 marker; 1-54: reforent Thatcher near-isogenic lines (from No. 1 to No. 54 showing in Table 1), Arrow shows the 560 bp band

### 1.2 Lr9 的 PCR-STS 结果

用与春小麦 Thatcher 为背景的 54 个近等基因系材料对 Lr9 的 STS<sub>Lr9-J13</sub> 标记进行检测, 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶进行电泳(图 2), 结果表明与 Lr9 连锁的 STS<sub>Lr9-J13</sub> 标记成功地从近等基因系中扩增

出与报道大小相同的 1 100 bp 的 DNA 片段, 且该片段仅在含有 Lr9 植株 DNA 中得到表达, 重复试验结果相同, 证明与 Lr9 紧密连锁的 STS<sub>Lr9-J13</sub> 标记的稳定可靠, 且特异性较好, 可作为分子辅助选择标记用于分子育种。

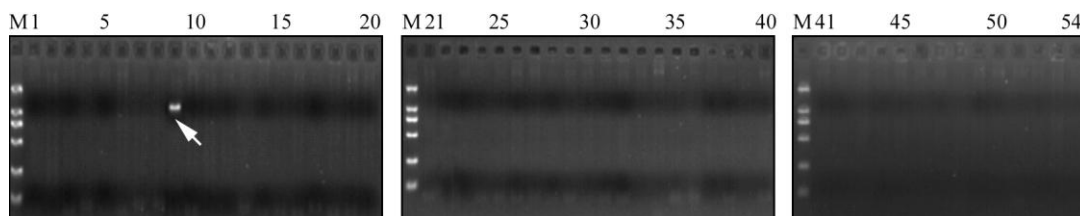


图 2 Lr9 的 PCR-STS 扩增结果

Figure 2 Amplification products of marker STS specific to Lr9 gene

注: M: DL2000 marker; 1-54: 顺序为表 1 所示顺序, 箭头所指为 1 100 bp

Note: M: DL2000 marker; 1-54: reforent Thatcher near-isogenic lines (from No1 to No54 showing in Table1), Arrow shows the 1 100 bp band

### 1.3 Lr10 的 PCR-STS 结果

用与 Lr10 连锁的 STS 引物在以春小麦 Thatcher 为背景的 54 个近等基因系材料 DNA 中进行扩增, 扩增结果琼脂糖凝胶电泳监测表明(图 3), 第 10 泳

道的 TcLr10 植株 DNA 中扩增出了一条片段大小为 310 bp 的条带, 在其他 52 个近等基因系材料和春小麦 Thatcher 中未扩增出任何片段, 且该片段大小与报道相同, 证明该 STS 标记具有选择特异性。

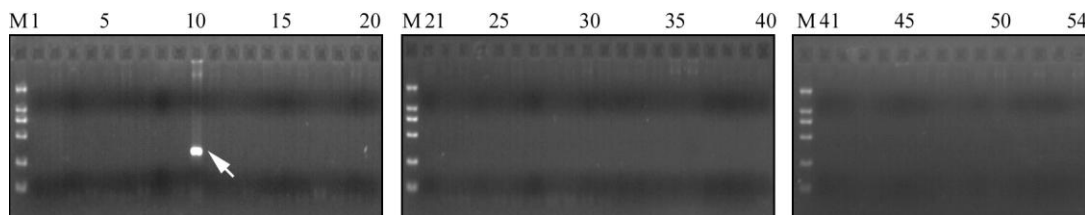


图 3 Lr10 的 PCR-STS 扩增结果

注: M: DL2000 marker; 1-54: 顺序为表 1 所示顺序, 箭头所指为 310 bp

Figure 3 Amplification products of marker STS specific to Lr10 gene

Note: M: DL2000 marker; 1-54: reforent Thatcher near-isogenic lines (from No1 to No54 showing in Table1), Arrow shows the 310 bp band

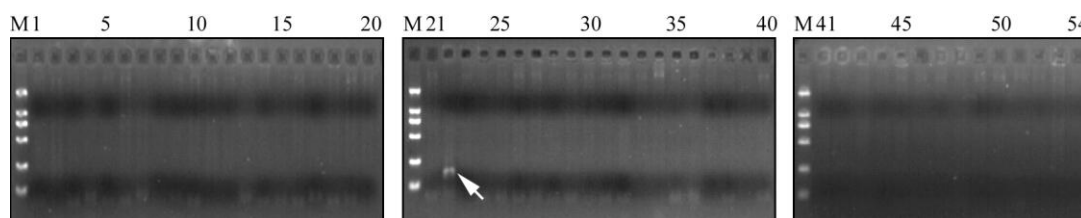
### 1.4 Lr19 的 PCR-STS 结果

用 54 个供试小麦基因组 DNA 作为模板, 用与 Lr19 连锁的 STS<sub>Lr19-Gb</sub> 引物在 Bio-metraPCR 扩增仪中进行扩增, 重复试验三次, 扩增结果如图 4 所示, 在 54 个基因组 DNA 中, 只有位于 22 泳道的 TcLr19 植株 DNA 中扩增出了一条 130 bp 的片段, 片段大小同报道相同, 说明 STS<sub>Lr19-Gb</sub> 标记具有单一连锁特异性, 可作为分子辅助选择标记用于目的基因的选择。

析基因定位、抗谱分析、寄主与病原互作产生的侵染型分析等方法, 技术要求较高, 影响因素多, 实际操作有局限性, 尤其在亲本遗传背景不清楚或鉴定和筛选含两个以上基因的材料时尤为复杂。利用与特定基因紧密连锁的分子标记追踪基因, 可使目的基因的鉴定摆脱上述因素带来的困难且结果更加准确可靠。分子标记辅助育种可在种子或幼苗期鉴定, 利用与目的基因紧密连锁、稳定单一诱到的分子标记进行品种的筛选及聚合育种, 能够大大缩短世代间隔及育种年限, 提高基因回交转移速度的效率。

## 2 讨论

传统小麦基因鉴定方法如系谱推导、单体分

图4 *Lr19* 的 PCR-STS 扩增结果

注: M: DL2000 marker; 1-54: 顺序为表 1 所示顺序, 箭头所指为 130 bp

Figure 4 Amplification products of marker STS specific to *Lr19* gene

Note: M: DL2000 marker; 1-54: reforent Thatcher near-isogenic lines (from No1 to No54 showing in Table1), Arrow shows the 130 bp band

本研究将近等基因系材料扩大到 54 个, 从而在更广单一抗性品种范围内验证了 STS 标记的稳定性与特异性。验证结果表明与小麦抗叶锈基因 *Lr9*、*Lr10*、*Lr19* 连锁的 STS 标记特异性较好且稳定可靠, 扩增产物片段大小分别为 *Lr9* 1 100 bp、*Lr10* 310 bp、*Lr19* 130 bp。验证结果说明了 *Lr9* 1 100 bp、*Lr10* 310 bp 和 *Lr19* 130 bp 分子标记可以用于小麦抗叶锈基因的分子标记辅助选择育种, 为分子标记辅助选择和抗病育种提供了理论和技术支持, 进一步说明特异 PCR 产物的扩增是可用于自动筛选抗叶锈基因的简便且稳定可靠的方法之一。

*Lr1* 的 STS<sub>PTAG</sub> 分子标记的扩增产物除在其亲本出现外, 在其它的 53 个近等基因系中也都扩增出了与亲本同样大小的条带, 说明抗叶锈基因 *Lr1* 的 STS<sub>PTAG</sub> 分子标记无特异性, 不能用于分子标记辅助选择育种, 需要寻找与其连锁的其它特异性引物或寻找更好的其它方法来研究。

表 1 STS 或 SCAR 的引物序列

Table1 Primer sequences of STS or SCAR markers for leaf rust resistance genes

基因	引物代号	引物序列(5'-3')	参考文献
Gene	Marker set.	Sequence of primer (5'-3')	Reference
<i>Lr1</i>	PTAG621-5	GGG TCA CGT ACT ACT ATA TA	Feuillet et al., 1995
	PTAG621-3	CCT TGC CAG CCC AAA AGA AG	
<i>Lr9</i>	J13/1	TCC TTT TAT TCC GCA CGC CGG	Schachermayr et al., 1994
	J13/2	CCA CAC TAC CCC AAA GAG ACG	
<i>Lr10</i>	Fl.2245	GTG TAA TGC ATG CAG GTT CC	Feuillet et al., 1995
	Lr10-6/r2	AGG TGT GAG TGA GTT ATG TT	
<i>Lr19</i>	GbF	CAT CCT TGG GGA CCT C	Prins et al., 2001
	GbR	CCA GCT CGC ATA CAT CCA	

### 3.2.3 PCR 扩增

PCR 扩增所用仪器、试剂、反应体系及琼脂糖

## 3 材料与方法

### 3.1 实验材料

供试的 53 个以春小麦 Thatcher 为遗传背景的近等基因系及品种 Thatcher 种子提供单位及扩增、电泳排序参照(刘莉, 2008, 私人通讯)。

### 3.2 实验方法

#### 3.2.1 DNA 提取

参照(刘莉, 2008, 私人通讯)一文中所用方法进行 DNA 提取及 PCR 扩增、扩增产物电泳。

#### 3.2.2 引物序列

根据报道, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成与 *Lr1*、*Lr9*、*Lr10*、*Lr19* 连锁的 STS 标记的引物序列(表 1)。

凝胶电泳所用仪器、试剂等参照(刘莉, 2008, 私人通讯)。不同引物组合的 PCR 反应程序见表 2。

表 2 不同引物组合的 PCR 反应程序

Table 2 PCR amplification programs for different primer combinations used in analyses

基因	反应程序
Gene	Cycle condition
<i>Lr1</i>	94°C-5 min; 30 cycles (94°C-1 min; 55°C-1 min; 72°C-2 min);72°C-10 min; 4°C, pause
<i>Lr9</i>	94°C-6 min; 40 cycles (92°C-1 min; 66°C-1 min; 72°C-2 min);72°C-10 min; 4°C, pause
<i>Lr10</i>	94°C-3 min; 35 cycles (94°C-45s; 62°C-45s; 72°C-30s ); 72°C-3 min; 4°C, pause
<i>Lr19</i>	94°C-5 min; 35 cycles (94°C-1 min; 57°C-1 min; 72°C-2 min); 72°C-10 min; 4°C, pause

## 作者贡献

刘莉和陈云芳是本研究的实验设计和实验研究的执行人, 完成数据分析, 论文初稿的写作; 杨文香参与实验设计, 试验指导及试验结果分析; 刘大群是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

## 致谢


本研究由国家公益性行业(农业)科研专项(200903035)和国家自然科学基金(30771391)资助。作者感谢河北农业大学张汀老师及闫红飞老师在本实验过程中的技术支持和有益的建议。

## 参考文献

- Feuillet C., Schachermayr G, and Keller B., 1995, Molecular cloning of a new receptor-like kinase gene encoded at the *Lr10* disease resistance locus of wheat, *The Plant Journal*, 11(1): 45-52
- Feuillet C., Messer M., and Schacheermayr G, 1995, Genetic and physical characterisation of the *Lr1* leaf rust resistance locus in wheat, *Mol. Genet*, 248: 553-562
- Liu L., Chen Y.F., and Liu H.L., Yang W.X., Zhang T., and Liu D.Q., 2008, Verification of sts molecular markers for leaf rust resistance genes *Lr24* and *Lr35* in near-isogenic lines of wheat cv. thatcher, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 6(3): 471-474 (刘莉, 陈云芳, 刘华梁, 杨文香, 张汀, 刘大群, 2008, 小麦抗叶锈基因 *Lr24*、*Lr35* 的 STS、SCAR 标记在近等基因系(NILs)上的特异性验证, 分子植物育种, 6(3): 471-474)
- Liu Z.Y., Wang X.L., and Ni Z.F., 2000, Molecular marker assisted selection (MAS) of leaf rust (*Puccinia recondita* f. sp. *tritici*) resistance genes, *Lr9* and *Lr24*, in wheat, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 8(1): 13-16 (刘志勇, 王晓玲, 倪中福等,

2000, 小麦抗叶锈基因 *Lr9*、*Lr24* 的分子标记辅助选择研究, *农业生物技术学报*, 8(1): 13-16)

- McIntosh R.A., Dubcovsky J., Rogers W.J., Morris C., Appels R., and Xia X.C., 2009, Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 supplement, <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/macgene/supplement2009>
- Prins R.J., Groene W.Z., and Marais G.F., 2001, AFLP and STS tagging of *Lr19*, a gene conferring resistance to leaf rust in wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 103(4): 618-624
- Schachermayr G, Siedler H., and Gale M.D., 1994, Identification and localization of molecular markers linked to the *Lr9* leaf rust resistance gene of wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 88: 110-115
- Wei X.Y., Yang W.X., and Liu D.Q., 2004, MAS for leaf rust resistance gene *Lr35* in 150 wheat cultivars, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultural Sinica)*, 37(12): 1951-1954 (魏新燕, 杨文香, 刘大群等, 2004, 150 个小麦品种(系)抗叶锈基因 *Lr35* 分子检测, *中国农业科学*, 37(12): 1951-1954)



**5<sup>th</sup>Publisher**是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5<sup>th</sup>Publisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>