

小麦抗叶锈基因 *Lr45* 的 SCAR 标记

闫红飞, 刘春燕, 高士刚, 杨文香, 刘大群

(河北农业大学植物病理系, 河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心, 河北保定 071001)

摘要: 【目的】建立小麦抗叶锈基因 *Lr45* SCAR (sequenced characterized amplified region 序列特征扩增区域) 标记。【方法】以小麦抗叶锈病基因材料 TcLr45 和感病材料 Thatcher 为亲本, 利用黑麦基因组特异的 RAPD 标记引物 OPH20 进行 PCR 扩增, 对获得的与预期大小相同的 1.5kb 的特异片段进行克隆测序, 并根据该序列设计一对特异 PCR 引物 LRYR 和 LRYF, 对 TcLr45 × Thatcher F₂ 代单株构建的分离群体进行扩增, 验证该标记与 *Lr45* 的连锁关系, Mapmaker 3.0 软件绘制遗传连锁图。【结果】该标记在 TcLr45 中扩增出单一条带, 片段大小为 1 272 bp (命名为 Ypsc20H₁₂₇₂), 而在感病亲本中则无扩增条带。F₂ 代分离群体进行连锁分析, 遗传距离为 8.2 cM, 该标记为与 *Lr45* 连锁的 SCAR 标记。【结论】将 *Lr45* 的 RAPD 标记转化成 SCAR 标记。

关键词: 黑麦; 抗小麦叶锈基因; *Lr45*; SCAR 标记

A SCAR Marker for Leaf Rust Resistance Gene *Lr45*

YAN Hong-fei, LIU Chun-yan, GAO Shi-gang, YANG Wen-xiang, LIU Da-qun

(Department of Plant Pathology, Agricultural University of Hebei, Biological Control Center of Plant Diseases and Plant Pests of Hebei Province, Baoding 071001, Hebei)

Abstract: 【Objective】The objective was to develop a SCAR(sequenced characterized amplified region) marker for wheat leaf rust resistance gene *Lr45*. 【Method】Wheat leaf rust resistance near isogenic lines of TcLr45 and its susceptible control Thatcher were employed. PCR was carried out with the OPH20, which is a specific RAPD primer of rye. The amplified 1.5kb fragment from TcLr45 was cloned and sequenced. Subsequently a pair of specific primers (LRYR, LRYF) were designed for the amplifying F₂ population derived from TcLr45×Thatcher, and then linkage was analyzed between the marker and *Lr45*. 【Result】A unique band was obtained only in TcLr45 with a length of 1 272 bp. And the marker was named as Ypsc20H₁₂₇₂. The linkage distance of the SCAR marker with *Lr45* was 8.2 cM. 【Conclusion】The RAPD marker was successfully converted into a SCAR marker for *Lr45*.

Key words: *Secale cereale*; leaf rust resistance gene; *Lr45*; SCAR marker

0 引言

【研究意义】由小麦叶锈菌 (*Puccinia triticina*) 引起的小麦叶锈病是世界性的一种真菌病害, 严重发生时可造成 10%~65% 的产量损失^[1]。培育小麦抗叶锈品种被认为是防治小麦叶锈病害的最为经济有效和环境安全的方法。因此, 寻找与小麦抗叶锈性基因紧密连锁的稳定的 PCR 分子标记是一项重要的工作, 它

将为抗叶锈基因的快速鉴定及品种筛选提供依据。【前人研究进展】黑麦属 (*Secale cereale*) 作为小麦的第三级基因源^[2], 是改良小麦抗病性、品质和产量等性状的重要外源基因供体, 通过染色体工程方法结合常规育种可以将黑麦基因导入小麦, 丰富小麦的遗传变异。Flavell^[3]等报道在谷类作物中黑麦重复序列的含量最高, 高达 92%, 其中 30% 为黑麦基因组特异重复序列^[4]。目前, 已有用 RAPD 标记来鉴定小麦中的黑

收稿日期: 2008-01-22; 接受日期: 2008-03-27

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (c2006000438); 高校博士基金 (20050086002)

作者简介: 闫红飞 (1976—), 男, 河北高阳人, 博士研究生, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: hongfeiyuan2006@163.com。通信作者刘大群 (1958—), 男, 河北灵寿人, 教授, 研究方向为分子植物病理学与生物防治。E-mail: ldq@hebau.edu.cn; 杨文香 (1966—), 女, 河北清县人, 教授, 研究方向为分子植物病理学。E-mail: wenxiangyang2003@163.com

麦成分的报道。Iqbal 等^[5]用 RAPD 来鉴定 1RS/1BL 易位系, Brunell 等^[6]用 RAPD 来鉴定 2RS/2BL 2RL/2BS 易位系, Gallego 等^[7]用 RAPD 来鉴定小麦-黑麦的附加系, Ko 等^[8]建立了黑麦特异重复序列的 RAPD 标记。小麦抗叶锈病基因 *Lr45* 发现于日本小麦与黑麦 (*Secale cereale*) 的杂交后代中, 为 T2AS-2RS-2RL 易位, 其短臂为普通小麦 2A 染色体和黑麦 2RS 易位, 长臂为黑麦 2RL^[9]。到目前为止, 该基因仍表现出优越的抗叶锈性, 是具有应用潜力的抗叶锈基因。【本研究切入点】关于该基因的分子标记, 张娜等分别利用 AFLP^[10]与 SSR^[11]技术获得了该基因的分子标记, 但这两个标记所获得片段具有片段小的共同缺点, 均未能转化成更为稳定、使用简便的 SCAR 或 STS 标记。本研究即利用 Ko 等^[8]建立的黑麦特异重复序列的 RAPD 标记引物对含有由黑麦向小麦转移的抗叶锈基因 *Lr45* 的外源染色质的 TcLr45 材料进行扩增, 以期获得 TcLr45 的 RAPD 标记, 并将该标记转化为更为稳定的 SCAR 标记。【拟解决的关键问题】建立小麦抗叶锈基因 *Lr45* 的稳定地 SCAR 标记, 使该标记不仅用于检测小麦-黑麦杂合体中的异源染色质成分, 证实黑麦含有的抗叶锈基因向小麦转移的事实。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小麦材料和叶锈菌 采用的 47 个小麦抗叶锈近等基因系 (TcLr1、TcLr2a、TcLr2b、TcLr2c、TcLr3、TcLr3a、TcLr3b、TcLr3ka、TcLr9、TcLr10、TcLr11、TcLr12、TcLr13、TcLr14a、TcLr14b、TcLr14ab、TcLr15、TcLr16、TcLr17、TcLr18、TcLr19、TcLr20、TcLr21、TcLr22a、TcLr22b、TcLr23、TcLr24、TcLr25、TcLr26、TcLr28、TcLr29、TcLr30、TcLr32、TcLr33、TcLr34、TcLr33+34、TcLr36、TcLr35、TcLr37、TcLr38、TcLr39、TcLr40、TcLr41、TcLr44、TcLr45、TcLr46、TcLr47) 材料由美国明尼苏达大学提供, TcLr45 × Thatcher F₂ 代分离群体, 接种小麦叶锈菌菌株 02-5-18 (1) 均由河北农业大学小麦锈病研究室提供; 7 个中国春-Imperial 黑麦附加系 CSDA1R-7R 的 DNA 由电子科技大学生命科学与技术学院杨足君先生惠赠。

1.1.2 引物 根据 Ko 等^[8]所筛选出的黑麦 10 mer RAPD 引物 OPH20 (5'-GGGAGACATC-3') 由上海 Sangon 生物公司合成, 用于 PCR 扩增。

1.1.3 主要生化试剂 CTAB、RNaseA、10×PCR

Buffer、Tag DNA 聚合酶、dNTPs、琼脂糖、DL2000 Marker、DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒和 DH5 α 感受态细胞等购自上海 Sangon 生物公司和大连宝生物公司。

1.2 方法

1.2.1 小麦抗锈性鉴定 在小麦一叶期, 用撒粉法对 TcLr45、Thatcher 及 TcLr45 × Thatcher F₂ 代单株进行接菌。充分发病 (14 d) 后调查并按 Roelfs^[12]标准记载侵染型。

1.2.2 基因组 DNA 提取与抗感基因池构建 采用 CTAB 法提取上述植物材料的 DNA^[13], 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其浓度与质量。分别随机取 10 株 F₂ 代抗感单株的 DNA, 等量混合构建抗感基因池。

1.2.3 RAPD 分析 PCR 反应体系与 PCR 条件按 Ko 等^[8]的方法进行扩增。PCR 扩增产物经 1.2% (w/v) 琼脂糖凝胶, 0.5×TBE 100 v 电泳检测, 凝胶成像系统观察照相。

1.2.4 扩增产物的回收、克隆、测序及序列比对 利用琼脂糖凝胶回收 DNA 试剂盒 (TaKaRa 公司) 进行特异片段的回收, 并琼脂糖凝胶电泳检测。回收纯化片段连接 pMD18-T 载体 (Sangon 公司), 具体步骤按试剂盒说明书进行, 热激法转化 DH5 α 感受态细胞进行克隆。挑取白色菌落, 37°C LB 液体培养基培养 12 h。取菌液 1 ml, 利用 UNIQ-10 微量质粒提取试剂盒 (BBI 公司) 提取质粒, 溶于 20 μ l ddH₂O。取 1 μ l 质粒为模板按以上 PCR 扩增体系与程序进行扩增, 验证插入片段大小。取含有目的插入外源片段大小的克隆质粒交由 Sangon 公司测序, 并将测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性比对分析。

1.2.5 SCAR 分析 按 1.2.4 中所获得的序列, 利用 Primer3.0 软件设计一对特异引物, 摸索一套 PCR 反应体系及扩增程序, 建立特异的 SCAR 标记。在 1.2% (w/v) 琼脂糖凝胶, 0.5×TBE 100 v 电泳检测, 凝胶成像系统观察照相。

1.2.6 SCAR 标记的验证与连锁分析 利用该对引物在 47 个小麦近等基因系中进行 PCR 扩增, 以检测该标记的特异性; 以亲本以及 F₂ 代的分离群体进行 PCR 扩增, 用 Mapmaker 3.0 作图软件^[14]计算该标记与 *Lr45* 目的基因的遗传距离。

1.2.7 SCAR 标记扩增片段的克隆、测序 克隆和测序方法同步骤 1.2.4 进行。并将测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 同源性比对分析。

1.2.8 SCAR 标记在黑麦染色体上的定位 以该 SCAR

标记引物对“中国春”-Imperial 黑麦附加系 CSDA 1R-7R 进行 PCR 扩增,以检测其在黑麦染色体上的定位。

2 结果与分析

2.1 RAPD 引物扩增

RAPD 引物 OPH20 在小麦抗叶锈近等基因系材料 TcLr45 与其遗传背景材料 Thatcher 都有扩增条带出现,其中一条大约 750 bp 条带为二者共有条带,此外在抗病材料 TcLr45 中还扩增出一条约 1.5 kb 大小的条带,为 TcLr45 所特有,且与 OPH20 引物在黑麦材料中所报道的扩增结果一致(图 1)。

2.2 TcLr45 特有 RAPD 片段克隆、测序与序列比对

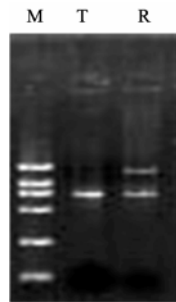
对 TcLr45 特有的 1.5 kb 的片段进行回收,然后克

隆测序,获得 1 495 bp 的全长序列(图 2)。将该序列在 NCBI GenBank 中进行序列比对,结果显示与已报道的序列 PSC20H (GenBank 编号 AF305943) 一致性达 96%,表明该序列与 PSC20H 为同一序列;另外该序列与已报道的 1 456 bp 的黑麦重复序列 PSC20H-1(GenBank 编号 EF165547.1)一致性达 97%,但二者长度不等;与圆锥小麦 (*Triticum turgidum*) 高分子量谷蛋白基因 (HMW glutenin A gene) 序列 (GenBank 编号 AY494981.1) 278899-280385 位点同源性达 81%;与普通小麦 (*Triticum aestivum*) BAC 文库序列 (DQ537335.1) 34125-32640 位点同源性达 80%;与乌拉尔图小麦 (*Triticum urartu*) BAC 文库序列 (EF081029.1) 20098-18613 位点同源性达 80%。

2.3 特异引物的设计与分子标记验证

为获得 TcLr45 更稳定的分子标记,根据以上序列设计了 1 对特异 PCR 引物 LRYR(5'-ATGACGGCAAGCATCGTGATT-3'), LRYF (5'-TCACTGATCACAA GAGCTTG-3'), 引物间序列长度 1 272 bp。

利用该对引物对 TcLr45 及其背景材料 Thatcher 进行 PCR 扩增,扩增体系及程序确定如下: SCAR 扩增反应总体系 20 μl,其中包括 6 mmol·L⁻¹ dNTPs, LRYR、LRYF 引物各 3.5 μmol·L⁻¹, 2.0 μl 10×PCR buffer, 0.3 U Taq DNA 聚合酶和 60 ng 模板 DNA。PCR 程序为: 94℃ 5 min, 1 个循环;然后 35 个循环包括 94℃ 1.5 min, 68℃ 1 min, 72℃ 1 min;最后 72℃ 延伸 8 min, 4℃ 保存。在 TcLr45 中获得单一扩增条带,而在其背景材料 Thatcher 中则无扩增结果。



M: DL2000 marker; T: Thatcher; R: TcLr45

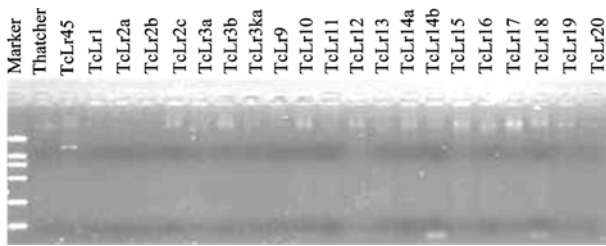
图 1 OPH20 在 Thatcher 与 TcLr45 中的扩增
Fig. 1 The amplification with the RAPD primer OPH20 for Thatcher and TcLr45

GGGAGACATCTGTTGTTGGGCAGAAAGGTCGACATCTTCACTGATCACAAAGAGCTTGAAGTACATCTTCACACAGCCGACCTGAACCTCCGCCAGA
CTCGTTGGGTCGAGATGATCCAAGAGTACAACCCAGCATTGAATACACTCCAAGCAAAGGCGAATGTGATTGCAGATGCTTTGAGCAGAAAGGCATAT
TGCAACAGCCTTCTTATCAAGCCACACCAGCCTGAGCTTTGTGAAGCATTGAGGAAGCTCAACCTCAAGTTGTTCCGAGGGTTTTCTTGCTAATCTC
CAAATTGCTCTACCTTGAAGATCAAGTCCGTGAGGCCAGCTCAGTGATACCATGGTGAAGAAGGTGAAACATGGGATTGCAAAGGGCACTCCAAA
ATACAAGTGCTTCCGTGTGATGAGAGAGATACCTTGTCTTCGAGGACAGACTCGTTGTTCCAAAGGTGATCTCAGGAAGCTCATAATGGAAGAAGC
TCATGATTCTCTCCTTTCCATTTCATCTGGCAGTTCAAAGATGTATCAAGATCTCAAGCAATCTTACTGGTGGACACGCATGAAAAGGGAGATTGCCAA
TTCGTGAATGAATGTGATGTATGCAGAAGAGCGAAAGCAGAACATCAACGTCCAGTCCGGTCTTCTCCAACCTCTTCTATTCAGTGGAAAGTTTCGAC
CACATTGAAATGGACTTCGTCAGTGGCTTTCTAAATCCAAGCGAGGAAATGATGCTATCTTTGTGGAGTTTGACAAGCTTACCAAAGTCGCTCACTTTC
TTCCAGTCAAAGAATCAATCAATGCAGCTCAACTTGCAGAGCTGTACACTTCCAGAATTGTGTCCTACATGGCATTCTCAAGTGATATCTCAGACCG
TGCGAGCTTGTTCACATCAAGGTTCTGGGACTCCTTTCAGTCCGCCATGGGCACGAAGATCAGGTTTCAGCAGTCCGATTCATCTCAGACTAGTGGTCAA
GTCGAGCGTGTGAATCAGATTCTAGAAGACATGCTCAGAGCCTGTGTCATCTCCTTCAGCATGAAATGGGAAGACTGCCTTCCATTTGCCGAGTTCTCTT
ACAACAACAGCTTTCAAGCAAGTGCAGGCAAAGCACCATTGAAATCTCTATGGCAGAAAGTGCCGTACCCCTCTCAACTGGTCTGAAACAGGCGAAC
GCCAACTTCTGGCGATGACTTGATCTCTGAAGCCGAAAAAATGTGCAAAGTCATACGTGAGAATCTCAAGGCCGCTCAGTCGCGTCAGAAGAGCTACT
ATGACGGCAAGCATCGTGATTTGGCTTTCGACATCGGTGATCATGTATATCTCCGAGTGTCTCCGATGAAAGGAACCCAAAGATTCCGGTATCAAAGGAAAA
CTTGCTCTAGATACGTCGGGCCCTTCAAGATCTTGGCAAAGAGGCGATCTAGCCTATCAGCTCGAGCTCCCTTCCAACCTTGCAAATGTTTCATGATGCTC
TCCC

下划线部分为 OPH20 的正、反向序列,方框部分为引物 LRYR、LRYF 的核苷酸序列
The forward and backward sequences of OPH20 are underlined, the primers LRYR and LRYF are framed

图 2 OPH20 在 TcLr45 中扩增特异片段的核苷酸序列
Fig. 2 The nucleotide sequence of specific band amplified with OPH20 primer in TcLr45

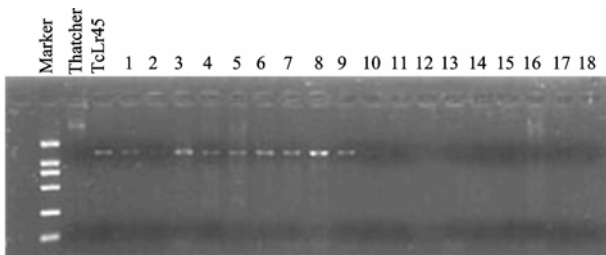
进一步利用该引物对 47 个小麦抗叶锈近等基因系进行扩增检测, 结果在近等基因系材料 TcLr26 中扩增出该特异条带, 部分小麦抗叶锈近等基因系材料扩增检测结果如图 3 所示。该标记引物对 169 株 TcLr45×Thatcher F₂ 代分离群体单株 DNA 材料进行扩增, 结果在 102 个抗病单株中有 7 株缺失该扩增条带, 在 67 个感病单株中有 9 株扩增出与抗病亲本相同的特异条带(图 4)。经 Mapmarker3.0 软件进行遗传连锁分析, 该标记与 *Lr45* 基因遗传距离为 8.2 cM, 表明该标记为 *Lr45* 连锁的 SCAR 标记。



Marker: DL2000

图 3 SCAR 标记部分近等基因系检测

Fig. 3 The amplified result of the SCAR marker with some wheat leaf rust near isogenic lines



Marker: DL2000, 1~9: 抗病 F₂ 代群体; 10~18: 感病 F₂ 代群体
Marker: DL2000, 1-9: The resistance F₂ populations; 10-18: The susceptible F₂ populations

图 4 SCAR 标记部分 F₂ 代群体检测

Fig. 4 The amplified result of the SCAR marker with some F₂ populations

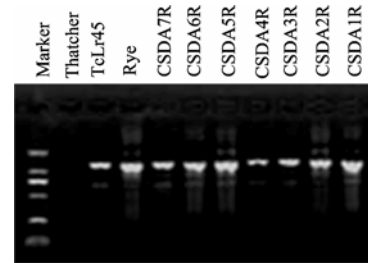
2.4 SCAR 标记扩增片段的克隆、测序与序列比对分析

对该特异引物扩增片段测序获得 1 272 bp 序列, 与预期片段大小一致(图 2), 将该 SCAR 标记命名为 Ypsc20H₁₂₇₂。在 NCBI 中利用 bl2seq 软件比对该序列与 RAPD 扩增获得序列, 相似性达 97%, 表明为相

同序列; 利用 Blastn 在 GenBank 数据库中比对结果与所获得的 RAPD 标记特异片段的比对结果基本一致, 但与普通小麦 (*Triticum aestivum*) BAC 文库序列 (DQ537335.1) 序列未发现同源性, 表明该特异引物对扩增所获得片段与 OPH20 在 TcLr45 中获得的序列为黑麦染色质特异序列, 可用于区分黑麦与普通小麦染色质。

2.5 SCAR 标记的黑麦染色体定位分析

利用该特异引物组合对“中国春”-Imperial 黑麦附加系 CSDA1R-7R 以及黑麦亲本材料进行扩增, 发现在该附加系 7 个材料中, 都有扩增产物, 且与黑麦亲本材料扩增条带一致, 表明该 SCAR 标记分布于黑麦 1R 至 7R 的 7 条染色体上(图 5)。



Marker: DL2000

图 5 SCAR 标记黑麦染色体上的定位

Fig. 5 The SCAR marker location on the 1R to 7R chromosome of rye

3 讨论

Flavell 等^[3]报道在谷类作物中, 黑麦重复序列的含量最高, 高达 92%。其中, 26%的黑麦重复序列是与小麦和大麦共有, 18%与小麦共有, 30%是黑麦基因组特异的^[4]。Appel 等^[15]报道在小麦基因组中, 重复序列约占 75%以上, 而大部分的重复序列为小麦和黑麦所共有, 仅 16%的重复序列为小麦基因组所特有。本研究利用黑麦的特异重复序列的 RAPD 标记对 TcLr45 与 Thatcher 进行 PCR 扩增, 获得了两条扩增条带, 一条为 1.5 kb 序列, 为 TcLr45 所特有且与 Ko^[8]报道一致的片段, 表明为黑麦特有的重复序列, 并证实了 TcLr45 含有黑麦的染色体易位片段成分, 也证实 *Lr45* 是从黑麦导入普通小麦的事实; 另一扩增片段约 750 bp, 为 TcLr45 与 Thatcher 共有序列, 推测该 RAPD

引物可能在小麦中还有其它结合位点, 该片段是否为黑麦与小麦共有的重复序列有待进一步证实。

RAPD 标记多为显性标记, 且具有稳定性、重复性差等缺点^[16]。SCAR 标记与 RAPD 相比采用了一对更长引物序列和严格的 PCR 条件, 扩增条带大为减少且重复性更好, 扩增结果易于判断且它们对反应条件不敏感。因此, 该标记更有利于对大量样品进行快速筛选和鉴定, 从而进一步提高其应用价值; 此外, SCAR 片段为基于 PCR 技术的标记 (PCR-based marker), 可作为物理图谱与遗传图谱的锚定点, 对基于图谱的重叠克隆具有很高的实用价值^[17-19]。本研究利用 Ko^[8]获得的 RAPD 标记设计了一对特异引物并建立了 TcLr45 的 SCAR 标记, 仅在 TcLr45 中获得单一扩增条带, 揭示了 TcLr45 与 Thatcher 间的多态性, 并利用该标记对 TcLr45×Thatcher 的 F₂ 代群体进行检测, 检测速度快且都获得了稳定性、重复性好的显性结果。此外, 该 SCAR 标记的转化成功也将为 Lr45 基因的克隆奠定一定的基础。

RAPD 标记 OPH20 在黑麦中扩增片段经原位杂交方法证实为分布于黑麦 1R 至 7R 染色体的除端部和核仁组织区域的所有部位, 是一个高拷贝重复序列片段^[20]。本研究利用中国春-Imperial 染色体 1R 至 7R 的 7 个小麦易位系材料进行扩增, 在分别含有 1R 至 7R 的材料中也均获得了扩增结果, 表明在含有 1R 至 7R 的黑麦染色体上都有该标记存在, 从而利用 PCR 方法证实了周建平等^[20]的结论, 表明该 SCAR 标记序列与 RAPD 标记 OPH20 序列的一致性, 即也为分布于黑麦染色体组的一个高拷贝的重复序列片段。另外, 该 SCAR 标记与 Lr45 遗传连锁距离为 8.2 cM, 遗传距离较远为非紧密连锁的遗传标记。可能与 SCAR 标记片段为重复序列且在每条染色体上的广泛分布以及拷贝数较高有关。因此, Nagy 等^[21]、Lee 等^[22]、Hsam^[23]、Seo 等^[24]、张文俊等^[25]在开发特定染色体重复序列标记的成功报道, 将为标记与开发特异染色上所含的基因提供了有力的途径。

该标记对小麦抗叶锈近等基因系 TcLr26 也扩增出与 TcLr45 相同的条带。Lr26 来源于黑麦, 为 1B/1R 易位系, 而所获得的 SCAR 标记为黑麦染色体组的分子标记, 该标记序列在黑麦染色体组中广泛分布, 在黑麦 1R 染色体的除端部和核仁组织区域的所有部位都有分布^[20], 因此, 在 Lr26 所在的 1B/1R 易位片段上获得该高拷贝重复序列的片段可能性极大, 本实验的结果也证实了这一点。因此, 初步确定该 SCAR 标

记序列可能为黑麦染色体组共有的重复序列。Iqbal 等^[5]、Brunell 等^[6]、Gallego 等^[7]已成功的应用 RAPD 技术来鉴定小麦中的黑麦染色质成分。本研究所用材料 TcLr45 为由黑麦 2R 染色体易位而来, 利用黑麦的 RAPD 标记来标定该材料中的黑麦染色质成分, 获得了成功, 并进一步将标记转化为了 SCAR 标记。该 SCAR 标记在 TcLr45 中扩增出与预期片段大小一致的片段, 表明该标记可以用于 TcLr45 中黑麦异源染色体的检测, 也证实了将黑麦重复序列的 RAPD 标记转化为 SCAR 标记以及应用于检测小麦中与 Lr45 基因相关的异源黑麦染色体的可行性。

4 结 论

本研究获得了含有黑麦染色体成分的小麦抗叶锈近等基因系材料 TcLr45 特异的 RAPD 标记, 并将该标记成功转化为了 SCAR 标记。应用该 SCAR 标记对 TcLr45×Thatcher F₂ 代群体进行检测, 遗传距离 8.2 cM, 为与小麦抗叶锈基因 Lr45 连锁的分子标记。该标记与 Lr45 遗传距离较远, 与该标记片段为黑麦重复序列且在黑麦整套染色体上的广泛分布有关。经小麦 47 个近等基因系材料进行 PCR 扩增, 结果表明该标记还可用于小麦中异源染色体黑麦成分的检测。

致谢: 杨足君先生慷慨惠赠中国春-Imperial 黑麦附加系 CSDA1R-7R 材料, 在此表示诚挚的谢意。

References

- [1] Saari E E, Prescott J M. World distribution in relation to economic losses. In: Roelfs A P, Bushnell W R. *The Cereal Rusts*, vol. II, 259-298. Academic Press, Orlando, FL, USA, 1985.
- [2] 董玉琛. 小麦的基因源. 麦类作物学报, 2000, 20(3): 78-81.
Dong Y C. Gene pools of common wheat. *Journal of Triticeae Crops*. 2000, 20(3): 78-81. (in Chinese)
- [3] Flavell R B, Bennett M D, Smith J B, Smith D B. Genome size and the proportion of repeated sequence DNA in plants. *Biochemistry Genetics*, 1974, 12: 257-269.
- [4] Flavell R B, Rimpau J, Smith D B. Repeated sequence DNA relationships in four cereal genomes. *Chromosome*, 1977, 63: 205-222.
- [5] Iqbal M J, Rayburn A L. Identification of the 1RS rye chromosomal segment in wheat by RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 91: 1048-1053.
- [6] Brunell M S, Lukaszewski A J, Whitkus R. Development of arm

- specific RAPD marker for rye chromosome 2R in wheat. *Crop Science*, 1999, 39: 1702-1706.
- [7] Gallego F J, Lopez-Solanilla, Figueiras A M, Benito C. Chromosomal location of PCR fragments as a source of DNA markers linked to aluminium tolerance genes in rye. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 96: 426-437.
- [8] Ko J M, Do G S, Suh D Y, Seo B B, Shin D C, Moon H P. Identification and chromosomal organization of two rye genome-specific RAPD products useful as introgression markers in wheat. *Genome*, 2002, 45: 157-164.
- [9] McIntosh R A, Friebe B, Jiang J, Gill B S. Cytogenetical studies in wheat: X VI. Chromosome location of a new gene for resistance to leaf rust in a Japanese-rye translocation line. *Euphytica*, 1995, 82: 141-147.
- [10] 张娜, 杨文香, 李亚宁, 张汀, 刘大群. 小麦抗叶锈病基因 *Lr45* 的 SSR 分子标记. 作物学报, 2007, 33(4): 657-662.
Zhang N, Yang W X, Li Y N, Zhang T, Liu D Q. Developing molecular markers for leaf rust resistance gene in wheat based on SSR. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(4): 657-662. (in Chinese)
- [11] 张娜, 杨文香, 闫红飞, 刘大群, 褚栋, 孟庆芳, 张汀. 小麦抗叶锈病基因 *Lr45* 的 AFLP 分子标记. 中国农业科学, 2005, 38(7): 1364-1368.
Zhang N, Yang W X, Yan H F, Liu D Q, Chu D, Meng Q F, Zhang T. Molecular markers of wheat leaf rust resistance gene *Lr45* based on AFLP. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(7): 1364-1368. (in Chinese)
- [12] Roelfs A P. Race specificity and methods of study. In: Bushnell W R, Roelfs A P. *The Cereal Rust: Vol 1. Origins, Specificity, Structure and Physiology*. Orlando: Academic Press, 1984, 2: 131-164.
- [13] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [14] Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly M J, Lincoln S E, Newburg L. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987(1): 174-181.
- [15] Appel G B, Blum C B, Chien S, Kunis C L, Appel A S. The hyperlipidemia of the nephrotic syndrome relation to plasma albumin concentration, oncotic pressure, and viscosity. *New Engl and Journal of Medicine*, 1985, 312: 1544-1548.
- [16] Hallden C, Hansen M, Nilsson N O, Hjerdin A, Sall T. Competition as a source of errors in RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93: 1185-1192.
- [17] Kong L R, Tzeng D D, Yang C H. Generation of PCR-based DNA fragments for specific detection of *Streptomyces saraceticus* N45. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China, Part B, Life Sciences*, 2001, 25(2): 119-127.
- [18] Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 85: 985-993.
- [19] Kasai K, Morikawa Y, Sorri V A, Valkonen J P T, Gebhardt C, Watanabe K N. Development of SCAR markers to the PVY resistance gene *Ry_{adg}* based on a common feature of plant disease resistance genes. *Genome*, 2000, 43: 1-8.
- [20] 周建平, 杨足君, 冯娟, 唐宗祥, 任正隆. 黑麦特异 DNA 重复序列的分离与鉴定. 西南农业学报, 2005, 18(5): 598-602.
Zhou J P, Yang Z J, Feng J, Tang Z X, Ren Z L. Isolation and identification of rye special DNA sequences. *Southwest China Journal of Agricultural Science*, 2005, 18(5): 598-602. (in Chinese)
- [21] Nagy E D, Lelley T. Genetic and physical mapping of sequence specific amplified polymorphic (SSAP) markers on the IRS chromosome arm of rye in a wheat background. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 1271-1277.
- [22] Lee J H, Graybosch R A, Lee D J. Detection of rye chromosome 2R using the polymerase chain reaction and sequence specific DNA primers. *Genome*, 1994, 37: 19-22.
- [23] Hsam S L K, Mohler V, Hartl L, Wenzel G, Zeller F J. Mapping of powdery mildew and leaf rust resistance genes on the wheat-rye translocated chromosome 1BL. IRS using molecular and biochemical markers. *Plant Breeding*, 2000, 119: 87-89.
- [24] Seo Y W, Jang C S, Johnson J W. Development of AFLP and STS markers for identifying wheat-rye translocations possessing 2RL. *Euphytica*, 2001, 121(3): 279-287.
- [25] 张文俊, Snape J W. 分子标记技术定位黑麦 6R 染色体上的抗小麦白粉病基因. 科学通报, 1995, 40(24): 2274-2276.
Zhang W J, Snape J W. Mapping of a resistance to powdery mildew gene on rye chromosome 6R by molecular markers. *China Science Bulletin*, 1995, 40(24): 2274-2276. (in Chinese)