

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.01569

小麦抗白粉病基因 *pm42* 的 EST 连锁图谱构建和比较基因组学分析

刘子记 朱 婕 华 为 杨作民 孙其信 刘志勇*

中国农业大学植物遗传育种系 / 北京市作物遗传改良重点实验室 / 教育部作物杂种优势研究与利用重点实验室, 北京 100193

摘 要: 目的基因精细遗传连锁图谱的构建是图位克隆的基础, 小麦功能基因精细遗传连锁图谱的构建依赖于比较基因组学分析。水稻和短柄草(*Brachypodium distachyon*)基因组序列是小麦比较基因组学分析和功能基因精细遗传定位的重要工具。本研究利用小麦、短柄草和水稻的基因组共线性关系对小麦抗白粉病基因 *pm42* 进行比较基因组学分析, 明确了 *pm42* 基因所在 2BS 基因组区域与短柄草第 1 染色体和水稻第 3 染色体直系同源基因组区域的对应关系, 开发出与抗白粉病基因 *pm42* 连锁的 EST-SSCP (expressed sequence tag-single strand conformation polymorphism) 标记 *CD452782* 和 *BF201235*, 以及 EST-STS (expressed sequence tag-sequence tagged site) 标记 *CJ674042*、*EB513371* 和 *CV771633*, 构建了 *pm42* 基因 EST 标记遗传连锁图谱, *CJ674042*、*BF201235*、*CD452782* 和 *CV771633* 位于 *pm42* 近端粒侧, 距离 *pm42* 的遗传距离分别为 1.9、12.0、19.7 和 25.7 cM; *EB513371* 位于 *pm42* 近着丝粒侧, 与 *pm42* 的遗传距离为 14.6 cM。整合原有的作图数据, 构建了 *pm42* 基因的高密度比较基因组学遗传连锁图谱, *pm42* 被定位于 3.3 cM 的区间, 该区间对应于短柄草 66 kb 的基因组区域及水稻 69 kb 的基因组区域。该结果为抗白粉病基因 *pm42* 高密度精细遗传连锁图谱构建、分子辅助选择和基因聚合奠定了基础。

关键词: 小麦抗白粉病基因; *pm42*; 比较基因组学; 二穗短柄草; 共线性; EST-STS; EST-SSCP

Comparative Genomics Analysis and Constructing EST Markers Linkage Map of Powdery Mildew Resistance Gene *pm42* in Wheat

LIU Zi-Ji, ZHU Jie, HUA Wei, YANG Zuo-Min, SUN Qi-Xin, and LIU Zhi-Yong*

Department of Plant Genetics & Breeding, China Agricultural University / Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement / Key Laboratory of Crop Heterosis Research & Utilization, the Ministry of Education, Beijing 100193, China

Abstract: Constructing fine genetic linkage map of target gene provides a starting point for map-based cloning. Fine genetic mapping of functional genes in wheat has benefited greatly from comparative genomics analysis. The genome sequences of rice and *Brachypodium distachyon* provide powerful tools for comparative genomics analysis and fine genetic mapping of target gene in wheat. In the present study, comparative genomics analysis using wheat-*Brachypodium*-rice genomic colinearity showed that genomic region containing *pm42* in wheat 2BS was orthologous to *Brachypodium* chromosome 1 and rice chromosome 3. Two EST-SSCP markers, *CD452782* and *BF201235*, three EST-STS markers, *CJ674042*, *EB513371*, and *CV771633*, linked to *pm42* were developed and an EST marker-based genetic linkage map of *pm42* was constructed. *CJ674042*, *BF201235*, *CD452782*, and *CV771633* were distal to *pm42* with genetic distances of 1.9, 12.0, 19.7, and 25.7 cM, respectively. *EB513371* was proximal to *pm42* with a genetic distance of 14.6 cM. An integrated high-density comparative genomics genetic linkage map of *pm42* was constructed and the powdery mildew resistance gene was mapped in a 3.3 cM interval orthologous to 66 kb and 69 kb genomic regions in *Brachypodium* chromosome 1 and rice chromosome 3, respectively, providing useful information for the fine mapping, molecular assisted selection and gene pyramiding of *pm42*.

Keywords: Resistance gene to wheat powdery mildew; *pm42*; Comparative genomics; *Brachypodium distachyon*; Colinearity;

本研究由国家自然科学基金项目(30425039, 30771341, 30971780, 31030056), 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目, 高等学校学科创新引智计划(111 计划)项目(111-2-03), 教育部长江学者与创新团队发展计划和中国农业大学研究生创新专项资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 刘志勇, E-mail: zhiyongliu@cau.edu.cn

第一作者联系方式: E-mail: liuziji1982@gmail.com

Received(收稿日期): 2011-03-02; Accepted(接受日期): 2011-04-27; Published online(网络出版日期): 2011-06-28.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20110628.1006.005.html>

EST-STS; EST-SSCP

小麦是重要粮食作物,其产量和品质与国民经济的发展和人民生活水平的提高有着密切的关系。小麦白粉病是影响小麦产量和品质的一种世界性病害,培育抗病品种是防治小麦白粉病最为经济、有效和环保的措施。利用分子标记技术进行分子标记辅助选择和抗病基因累加,是提高抗病广谱性和持久性的有效途径。

普通小麦是异源六倍体作物,其基因组大小约为17 300 Mb^[1],重复序列达80%以上,这为小麦基因组学研究带来障碍。因此,构建小麦功能基因高密度遗传连锁图谱,需要借助于其他资源。小麦具有丰富的EST (expressed sequence tag)资源。Qi等^[2]利用中国春小麦缺失系材料将16 000多个EST位点定位到小麦不同染色体的特定物理区间,这些EST的序列及定位信息为构建目的基因的高密度饱和遗传连锁图谱提供了强有力的工具。

SSCP (single strand conformation polymorphism) 技术即单链构象多态性,是1989年由Orita等^[3]首次提出作为检测DNA多态性和序列变异的一种新方法。SSCP技术的基本原理是PCR产物经高温变性后产生单链DNA分子,该分子可折叠形成一定的空间构象,根据相同长度不同构象的DNA单链在非变性聚丙烯酰胺凝胶中的电泳速率可检测多态性。Lu等^[4]根据定位在小麦染色体5BL 0.75~0.76区段的小麦EST序列,利用SSCP技术开发了一系列EST标记,构建了覆盖*Tsn1*基因区域的高密度遗传连锁图谱。Bottley等^[5]利用SSCP技术研究了异源六倍体小麦部分同源基因的沉默情况。Delaunay等^[6]利用SSCP技术分析了大量黄矮病毒的生物学特征。

比较基因组学研究发现,禾本科植物基因组间存在很高的共线性关系。Draper等^[7]指出禾本科植物二穗短柄草(*Brachypodium distachyon*)与小麦的亲缘关系比水稻与小麦的亲缘关系更近,可作为一种新的模式植物应用于温带禾本科植物的比较基因组学研究。Bossolini等^[8]对小麦、短柄草和水稻的*Lr34*基因位点直系同源基因组区域的比较研究及Faris等^[9]对二倍体小麦、短柄草和水稻对应的*Q*基因位点的比较分析表明小麦跟短柄草的亲缘关系要比小麦跟水稻的亲缘关系更近一些。将短柄草基因组序列和小麦EST序列信息结合起来开发小麦EST基础上的分子标记,可以为加密目标基因

的分子标记提供一条有效的途径。

Hua等^[10]利用SSR (simple sequence repeat)、SCAR (sequence-characterized amplified region)和EST-STS (expressed sequence tag-sequence tagged site)分子标记技术,将来源于野生二粒小麦的抗白粉病基因*pm42*定位于小麦染色体2BS bin 0.75~0.84区段。为了进一步构建覆盖*pm42*基因区域高密度遗传连锁图谱,本研究利用SSCP技术及比较基因组学的原理开发一系列与小麦抗白粉病基因*pm42*连锁的EST-SSCP和EST-STS标记,构建*pm42*比较基因组学连锁图谱。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本研究所选用的材料同Hua等^[10]。抗病亲本为普通小麦品系P63,感病亲本为普通小麦品种薛早,作图群体为P63和薛早杂交产生F₂分离群体,共124个单株。遗传分析表明,普通小麦品系P63对白粉病的抗性是由隐性单基因控制的,该基因被正式命名为*pm42*^[10]。

1.2 分子标记分析

选取10株纯合抗病单株和10株纯合感病单株的DNA,分别取等量构建DNA抗病池和DNA感病池,进行抗白粉病基因*pm42*连锁标记的筛选。

PCR反应体系为10 μL,包括10 mmol L⁻¹ Tris-HCl (pH 7.5), 50 mmol L⁻¹ KCl, 1.5 mmol L⁻¹ MgCl₂, 0.2 mmol L⁻¹ dNTPs, 50 ng引物, 0.5 U *Taq* DNA聚合酶和60~120 ng模板DNA。扩增程序为94℃预变性5 min; 94℃变性40 s, 50~60℃ (根据具体引物的退火温度而定)退火40 s, 72℃延伸1 min, 35个循环; 72℃终延伸10 min。PCR产物保存于4℃。5 μL扩增产物与2 μL上样缓冲液混合经8%非变性聚丙烯酰胺(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=39:1)凝胶电泳,银染显色,统计带型。

1.3 EST-STS和EST-SSCP分析

选取小麦2BS bin 0.75~0.84染色体区段的EST引物 (http://avena.pw.usda.gov/SNP/new/pcr_primers.shtml) 进行扩增,在8%非变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=39:1)上筛选抗、感亲本间具有多态性的EST-STS标记。对于无多态性的引物组合进行SSCP分析寻找多态性,SSCP分析时用上样缓冲液(98%去离子甲酰胺, 10 mmol L⁻¹ EDTA,

pH 8.0, 0.05%二甲苯氰和 0.05%溴酚蓝)将 PCR 扩增产物稀释 3 倍, 在 PCR 仪上于 98℃变性 12 min, 取出后置冰上 6 min, 上样 5 μL 于 12%非变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:甲叉双丙烯酰胺=29:1), 以预冷的电泳缓冲液 0.5× TBE, 恒压 100 V 电泳 24 h, 银染显色, 统计带型。

1.4 比较基因组学分析

利用与 *pm42* 基因紧密连锁的 EST-STS 标记^[10]的序列比对水稻和短柄草的基因组序列, 确定水稻和短柄草基因组中对应的直系同源位点, 并将其附近的基因进行功能注释, 利用这些基因的序列比对小麦的 EST 数据库, 搜寻同源的小麦 EST 序列, 设计 PCR 引物。

1.5 数据分析

利用 Mapmaker3.0 软件^[11]计算分子标记与抗病基因之间的遗传距离, LOD 值为 3.0。利用 MapDraw V2.1 软件^[12]绘制抗白粉病基因 *pm42* 的遗传连锁

图谱。

2 结果与分析

2.1 利用 SSCP 技术开发与抗白粉病基因 *pm42* 连锁的 EST-SSCP 标记

筛选到 3 个与抗白粉病基因 *pm42* 连锁的 EST-STS 标记^[10], 对于无明显多态性的 EST-STS 引物进一步进行 SSCP 分析, 发现其中 4 对引物 (CD452782、CD453552、BF201235 和 BQ159450) 在抗病亲本和感病亲本间及抗病池和感病池间均能扩增出明显的多态性。经 F₂ 分离群体验证, EST-SSCP 标记, CD452782 和 BF201235 与小麦抗白粉病基因 *pm42* 存在连锁关系(表 1、图 1 和图 2)。CD452782 为与抗病性相斥的分子标记, BF201235 为共显性的分子标记, CD452782 和 BF201235 均位于 *pm42* 近端粒侧, 与 *pm42* 的遗传距离分别为 19.7 cM 和 12.0 cM。

表 1 与抗白粉病基因 *pm42* 连锁的 EST 标记
Table 1 EST markers linked to powdery mildew resistance gene *pm42*

EST 标记 EST marker	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
CD452782	TCACACCTTCCCCAAGTTTC	TCACACGCTTCTTCATTGTC
BF201235	GGAGTTTGAGAACGCCAGAG	AAAGCTTGGCAATCCTCTCA
CJ674042	CTGCATGCTGTATAAGGGAAC	GGTGAGGTGGATAGTTGTTGAG
EB513371	ATAGACGAACGGCAGTGCT	GTATTCGGAAGGCAAAGCGG
CV771633	AAAAGCAGGCTGGTACCGGTC	AGTTGAACTCCGCGTCGATGA

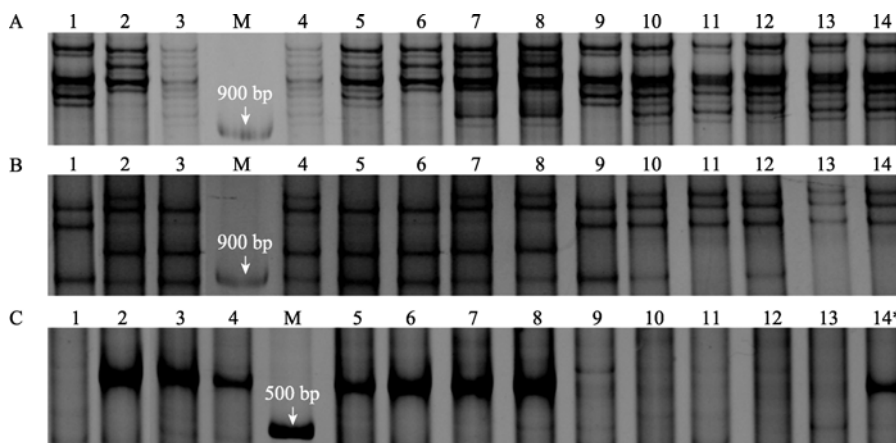


图 1 与抗白粉病基因 *pm42* 连锁的 EST 标记 CD452782 (A)、BF201235 (B)和 CV771633 (C)的扩增结果
Fig. 1 Amplification patterns of *pm42*-linked EST markers CD452782 (A), BF201235 (B), and CV771633 (C)
M: 100 bp DNA ladder; 1: P63; 2: Xueza0; 3-8: Homozygous susceptible plants; 9-14: Homozygous resistant plants; 14*: Recombinant plant.

2.2 比较基因组学分析

利用与 *pm42* 连锁的 EST 标记 CD452782、*Xcau516*、BF201235、BQ160080、BF146221 和

BQ160588 的序列^[10]比对短柄草和水稻的基因组序列。其中, CD452782 与短柄草第 5 染色体上的基因 *Bradi5g02160* 和水稻第 4 染色体上的基因 *Os04g-*

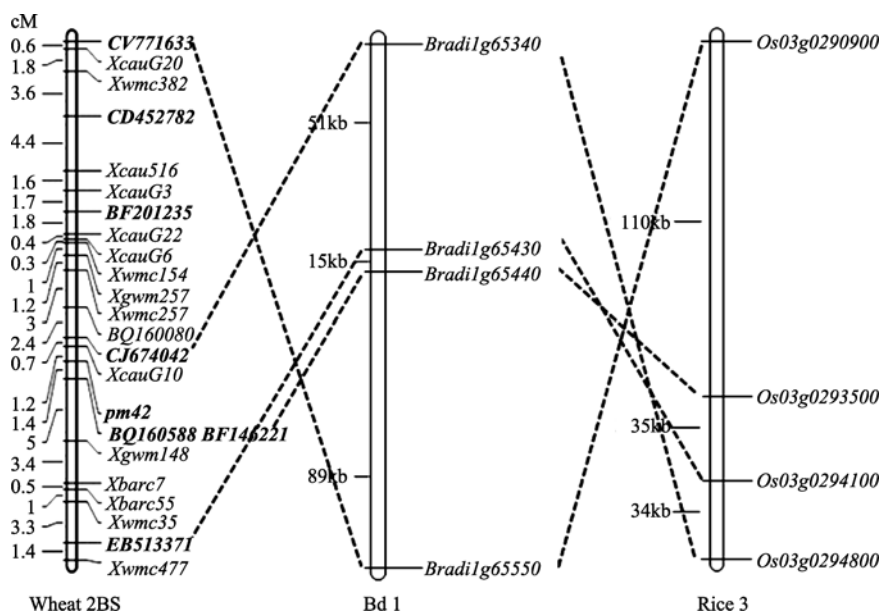


图 2 抗白粉病基因 *pm42* 比较基因组学连锁图谱

Fig. 2 Comparative genomics linkage map of powdery mildew resistance gene *pm42*

0106300 存在同源性关系; *Xcau516* 与短柄草第 5 染色体上的基因 *Bradi5g02400* 和水稻第 4 染色体上的基因 *Os04g0102500* 存在同源性关系; *BF201235* 与短柄草第 5 染色体上的基因 *Bradi5g-02890* 和水稻第 12 染色体上的基因 *Os12g0277500* 存在同源性关系; *BQ160080* 与短柄草第 3 染色体上的基因 *Bradi3g08420* 和水稻第 2 染色体上的基因 *Os02g0224400* 存在同源性关系; *BF146221* 与短柄草第 1 染色体上的基因 *Bradi1g65440* 和 *Bradi1g16660* 存在同源性关系, 与水稻第 3 染色体上的基因 *Os03g0293500*、第 5 染色体上的基因 *Os05g0469800* 和第 7 染色体上的基因 *Os07g0693100* 存在同源性关系。由于 *BQ160588* 和 *BF146221* 是来自于同一个基因的 EST 序列, 因此 *BQ160588* 与短柄草和水稻基因组序列的比对结果同 *BF146221* 的比对结果一致。表明 *pm42* 基因所在小麦 2BS 染色体区域在短柄草第 1 和第 5 染色体及水稻第 4 和第 3 染色体区域存在同源关系, 无法确定 *pm42* 基因在短柄草和水稻基因组中对应的直系同源区域。由于标记 *BF146221* 和 *BQ160588* 与 *pm42* 紧密连锁, 因此我们试图以 EST-STS 标记 *BF146221* 和 *BQ160588* 为起点, 在短柄草和水稻基因组中寻找其直系同源基因, 对这一基因附近的基因组区域进行比较基因组分析, 开发小麦 EST 标记。

NCBI 数据库 Blast 分析结果表明, 小麦 EST 序列 *BF146221* 和 *BQ160588* 与短柄草第 1 染色体上的

Bradi1g65440 基因和水稻第 3 染色体上的 *Os03g-0293500* 基因直系同源。对 *Bradi1g65440* 和 *Os03g-0293500* 基因附近的各约 30 个基因进行功能注释和比较分析结果表明, 短柄草第 1 染色体 241 kb 基因组区间(*Bradi1g65300*~*Bradi1g65590*)与水稻第 3 染色体 298 kb 基因组区间(*Os03g0295600*~*Os03g-0289800*)存在良好的微共线性关系。在短柄草该直系同源基因组区域预测到 30 个基因, 在水稻该直系同源基因组区域预测到 35 个基因, 其中 21 个基因在水稻和短柄草基因组间是直系同源的(表 2)。

2.3 开发与抗白粉病基因 *pm42* 连锁的 EST-STS 标记

利用 *Bradi1g65440* 附近的 30 个短柄草基因的序列(*Bradi1g65300*~*Bradi1g65590*)比对小麦 EST 数据库, 对每个短柄草基因同源的小麦 EST 序列进行拼接, 参考短柄草和水稻直系同源基因的内含子和外显子结构特征, 设计跨越内含子的小麦 EST 引物, 在抗、感亲本和抗、感混合池间筛选多态性的 EST-STS 标记。结果发现, 3 个 EST-STS 标记, *CJ674042*、*EB513371* 和 *CV771633* 在抗病亲本和感病亲本间及抗病池和感病池间均能扩增出多态性的 DNA 片段, 经 F_2 分离群体验证, 这 3 个 EST-STS 标记与小麦抗白粉病基因 *pm42* 存在连锁关系(表 1、图 1 和图 2)。其中 *CJ674042* 为共显性的分子标记, 位于 *pm42* 近端侧, 与 *pm42* 的遗传距离为 1.9 cM; *EB513371* 为与抗病性相引的分子标记, 位于 *pm42*

表 2 抗白粉病基因 *pm42* 基因组区域与短柄草和水稻基因组的直系同源关系Table 2 Orthologous relationships between *Brachypodium*, rice, and powdery mildew resistance gene *pm42* genomic region in wheat

小麦标记 Wheat marker	短柄草基因 <i>Brachypodium</i> gene	水稻基因 Rice gene	功能预测 Predicted function
CJ674042	<i>Bradi1g65300</i>	<i>Os03g0295600</i>	Kinase family protein
	<i>Bradi1g65310</i>	<i>Os03g0295500</i>	NADH-ubiquinone oxidoreductase
	<i>Bradi1g65320</i>	<i>Os03g0294900</i>	Ubiquitin activating enzyme
	<i>Bradi1g65330</i>	<i>Os03g0294900</i>	Ubiquitin activating enzyme
	<i>Bradi1g65340</i>	<i>Os03g0294800</i>	ATP binding protein
	<i>Bradi1g65350</i>	<i>Os03g0294700</i>	Ethylene-overproduction protein
	<i>Bradi1g65360</i>		Vacuolar protein sorting protein
	<i>Bradi1g65370</i>		Retrotransposon protein
	<i>Bradi1g65380</i>		Hypothetical protein
	<i>Bradi1g65390</i>		Importin beta-like protein
	<i>Bradi1g65400</i>	<i>Os03g0294500</i>	Hypothetical protein
	<i>Bradi1g65410</i>	<i>Os03g0294300</i>	6b-interacting protein
	<i>Bradi1g65420</i>	<i>Os03g0294200</i>	Fructose-6-phosphate 2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase
	<i>Bradi1g65430</i>	<i>Os03g0294100</i>	Pherophorin like protein
EB513371 BF146221, BQ160. 38	<i>Bradi1g65440</i>	<i>Os03g0293500</i>	Pyruvate decarboxylase
	<i>Bradi1g65450</i>	<i>Os03g0293400</i>	Basic helix-loop-helix family protein
	<i>Bradi1g65460</i>		Retrotransposon protein
	<i>Bradi1g65470</i>	<i>Os03g0293100</i>	Hypothetical protein
	<i>Bradi1g65480</i>	<i>Os03g0293000</i>	Heat shock protein binding protein
	<i>Bradi1g65490</i>	<i>Os03g0292800</i>	Ran-binding protein
	<i>Bradi1g65500</i>		Protein kinase domain containing protein
	<i>Bradi1g65510</i>	<i>Os03g0292200</i>	Mitochondrial carrier protein
	<i>Bradi1g65520</i>	<i>Os03g0292100</i>	Putative serine/threonine phosphatase
	<i>Bradi1g65530</i>	<i>Os03g0291800</i>	Leaf senescence related protein-like
CV771633	<i>Bradi1g65540</i>		Asparagine synthetase
	<i>Bradi1g65550</i>	<i>Os03g0290900</i>	AtPMR5 (POWDERY MILDEW RESISTANT)
	<i>Bradi1g65560</i>		PHD-type zinc finger protein-like
	<i>Bradi1g65570</i>	<i>Os03g0290500</i>	Transmembrane protein
	<i>Bradi1g65580</i>		Omega-3 fatty acid desaturase
	<i>Bradi1g65590</i>	<i>Os03g0289800</i>	Leucoanthocyanidin dioxygenase

近着丝粒侧, 与 *pm42* 的遗传距离为 14.6 cM; CV771633 为与抗病性相斥的分子标记, 位于 *pm42* 近端粒侧, 与 *pm42* 的遗传距离为 25.7 cM。基因功能注释及比较分析表明, 小麦 EST 标记 CJ674042、EB513371、BF146221、BQ160588 和 CV771633 覆盖的抗白粉病基因 *pm42* 基因组区域对应的短柄草第 1 染色体和水稻第 3 染色体基因组区域存在良好的共线性关系。小麦、短柄草和水稻对应基因组区域的比较分析发现, 水稻在基因顺序上存在倒位现象(表 2 和图 2)。位于直系同源区域的短柄草基因 *Bradi1g65550* 和水稻基因 *Os03g0290900* 是拟南芥抗白粉病基因 *PMR5* 的同源基因, 根据短柄草基因

Bradi1g65550 和同源的小麦 EST 序列开发了小麦 EST-STS 标记 CV771633, 经 F₂ 分离群体验证, 基因 *Bradi1g65550*、*Os03g0290900* 和 *PMR5* 不是 *pm42* 的直系同源基因。整合原有的作图数据, 构建了 *pm42* 基因的高密度比较基因组学遗传连锁图谱, *pm42* 被界定于 3.3 cM 的区间, 该区间对应于短柄草 66 kb 的基因组区域, 对应于水稻 69 kb 的基因组区域, 在短柄草该基因组区域预测到 9 个基因, 在水稻该基因组区域预测到 8 个基因。

3 讨论

小麦白粉病是由专性寄生的白粉病菌引起的危

害小麦生产的一种常见病害,合理利用抗病基因培育抗病品种是防治小麦白粉病最为有效的措施。构建覆盖抗病基因区域高密度的遗传连锁图谱是进行抗病基因分子辅助选择和基因聚合的有利条件。许多小麦重要功能基因(包括抗病基因)已经构建了 SSR 等分子标记基础上的遗传连锁图谱,但由于缺乏小麦基因组序列信息,对目标功能基因进行精确定位难度较大。

SSCP 技术即单链构象多态性,主要是由单链构象不同造成的。SSCP 技术具有高灵敏度,操作比较简单等优点,已被广泛应用于检测突变位点及基因定位等方面的研究。王翠亭等^[13]利用 SSCP 分析技术检测了小麦耐盐突变体,并结合测序技术确定了突变位点。Ujino-Ihara 等^[14]利用 SSCP 技术筛选多态性的 STS 标记,并将这些标记整合到日本柳杉的遗传连锁图谱中。本研究在初步进行 EST-STS 引物多态性筛选的基础上,对于没有检测到多态性的 EST-STS 引物组合进行 SSCP 分析,进一步筛选到 2 个与抗白粉病基因 *pm42* 连锁的 EST-SSCP 标记。

禾本科作物水稻基因组测序的完成^[15]以及小麦丰富的 EST 序列及定位信息^[2]为利用禾本科作物的基因组共线性关系进行比较基因组学分析奠定了基础。小麦功能基因 *VRN1*^[16]、*VRN2*^[17]、*Ph1*^[18]、*Gpc-B1*^[19] 和 *VRN3*^[20] 的克隆均利用了小麦和水稻的比较基因组学分析。然而, Guyot 等^[21]和 Yahiaoui 等^[22]对小麦抗叶锈病基因 *Lr10*^[23] 和抗白粉病基因 *Pm3* 位点与水稻的基因组比较分析表明,水稻基因组中存在 *Lr10* 和 *Pm3* 的同源基因,但并不位于 *Lr10* 和 *Pm3* 基因组区域的直系同源区域。这表明含抗病基因的基因组区域可能存在大量的基因组重排,破坏了小麦和水稻的共线性关系,直接利用水稻基因组中的抗病基因序列进行小麦的抗病基因定位不太可行。短柄草最近作为新的禾本科模式植物已经完成基因组测序^[24]。研究表明,小麦与短柄草的亲缘关系比小麦与水稻的亲缘关系更近,可作为小麦比较基因组学分析,开发小麦 EST 多态性标记,及小麦目标基因高密度精细遗传连锁图谱构建的有力工具。Zhang 等^[25]根据小麦-短柄草-水稻基因组的共线性,利用比较基因组学的方法构建了抗白粉病基因 *Ml3D232* 的高密度 EST-STS 标记连锁图谱。

短柄草与小麦比较基因组学分析表明,短柄草第 1 染色体和第 5 染色体与小麦 2B 染色体存在良好的共线性关系^[24],本研究中标记 *CD452782*、

Xcau516 和 *BF201235* 在短柄草基因组中对应的直系同源位点位于第 5 染色体,标记 *CJ674042*、*BQ160588*、*BF146221* 和 *EB513371* 在短柄草基因组中对应的直系同源位点位于第 1 染色体。利用小麦-短柄草-水稻的微观共线性进行比较基因组学分析表明,小麦抗白粉病基因 *pm42* 所在的基因组区域与短柄草的第 1 染色体和水稻的第 3 染色体存在良好的共线性关系(表 2 和图 2)。在水稻直系同源基因组区域预测到 35 个基因,在短柄草直系同源基因组区域预测到 30 个基因,其中 21 个基因在水稻和短柄草基因组间是直系同源的。通过对短柄草该基因组区域的功能基因注释和序列比对,利用小麦-短柄草-水稻的比较基因组学分析开发了 3 个与 *pm42* 连锁的 EST-STS 标记。*pm42* 被进一步定位于 3.3 cM 的区间,该区间对应于短柄草 66 kb 的基因组区域,对应于水稻 69 kb 的基因组区域,这为进一步开发与 *pm42* 紧密连锁的分子标记,构建抗白粉病基因 *pm42* 高密度精细遗传连锁图谱奠定了基础。为了构建抗白粉病基因 *pm42* 高密度精细遗传连锁图谱,我们将进一步利用小麦-水稻-短柄草的比较基因组学原理,开发与 *pm42* 紧密连锁的 EST 标记。比较小麦 EST-STS 标记在 2BS 遗传图谱上位置与其在短柄草、水稻基因组中所对应的基因顺序关系,可以发现短柄草与水稻在该基因组区域线性关系较好,而小麦基因组区域存在重排现象。这种基因组的重排可能是由于染色体片段的倒位、重复、插入和缺失引起的。大麦抗叶锈病基因 *Rph16*^[26] 及 *Rph7*^[27] 所在基因组区域均存在大麦和水稻共线性关系被打乱的现象。植物抗病基因在基因组中常成簇存在,进化速度较快,经常破坏基因组间的共线性。

4 结论

开发了与小麦抗白粉病基因 *pm42* 连锁的 2 个 EST-SSCP 标记和 3 个 EST-STS 标记,构建了覆盖抗白粉病基因 *pm42* 基因组区域高密度的遗传连锁图谱。*pm42* 被界定在 3.3 cM 的区间,该区间对应于短柄草 66 kb 的基因组区域及水稻 69 kb 的基因组区域。

References

- [1] Bennett M D, Leitch I J. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Ann Bot*, 1995, 76: 113-176
- [2] Qi L L, Echalié B, Chao S, Lazo G R, Butler G E, Anderson O D, Akhunov E D, Dvořák J, Linkiewicz A M, Ratnasiri A, Dub-

- covsky J, Bermudez-Kandianis C E, Greene R A, Kantety R, La Rota C M, Munkvold J D, Sorrells S F, Sorrells M E, Dilbirligi M, Sidhu D, Erayman M, Randhawa H S, Sandhu D, Bondareva S N, Gill K S, Mahmoud A A, Ma X F, Miftahudin, Gustafson J P, Conley E J, Nduati V, Gonzalez-Hernandez J L, Anderson J A, Peng J H, Lapitan N L V, Hossain K G, Kalavacharla V, Kianian S F, Pathan M S, Zhang D S, Nguyen H T, Choi D W, Fenton R D, Close T J, McGuire P E, Qualset C O, Gill B S. A chromosome bin map of 16,000 expressed sequence tag loci and distribution of genes among the three genomes of polyploid wheat. *Genetics*, 2004, 168: 701–712
- [3] Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 1989, 5: 874–879
- [4] Lu H J, Fellers J P, Friesen T L, Meinhardt S W, Faris J D. Genomic analysis and marker development for the *Tsn1* locus in wheat using bin-mapped ESTs and flanking BAC contigs. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 1132–1142
- [5] Bottley A, Xia G M, Koebner R M D. Homoeologous gene silencing in hexaploid wheat. *Plant J*, 2006, 47: 897–906
- [6] Delaunay A, Lacroix C, Morliere S, Riault G, Chain F, Trottet M, Jacquot E. A single-stranded conformational polymorphism (SSCP)-derived quantitative variable to monitor the virulence of a *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV) isolate during adaptation to the *TC14* resistant wheat line. *Mol Plant Pathol*, 2010, 11: 651–661
- [7] Draper J, Mur L A J, Jenkins G, Ghosh-Biswas G C, Bablak P, Hasterok R, Routledge A P M. *Brachypodium distachyon*: a new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1539–1555
- [8] Bossolini E, Wicker T, Knobel P A, Keller B. Comparison of orthologous loci from small grass genomes *Brachypodium* and rice: implications for wheat genomics and grass genome annotation. *Plant J*, 2007, 49: 704–717
- [9] Faris J D, Zhang Z, Fellers J P, Gill B S. Micro-colinearity between rice, *Brachypodium*, and *Triticum monococcum* at the wheat domestication locus *Q*. *Funct Integr Genomics*, 2008, 8: 149–164
- [10] Hua W, Liu Z J, Zhu J, Xie C J, Yang T M, Zhou Y L, Duan X Y, Sun Q X, Liu Z Y. Identification and genetic mapping of *pm42*, a new recessive wheat powdery mildew resistance gene derived from wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*). *Theor Appl Genet*, 2009, 119: 223–230
- [11] Lincoln S, Daly M, Lander E. Constructing genetic maps with Mapmaker/EXP3.0. Whitehead Institute Technical Report, 3rd edn. Cambridge, Massachusetts, USA: Whitehead Institute, 1992
- [12] Liu R-H(刘仁虎), Meng J-L(孟金陵). MapDraw: a Microsoft Excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data. *Hereditas* (遗传), 2003, 25(3): 317–321 (in Chinese with English abstract)
- [13] Wang C-T(王翠亭), Huang Z-J(黄占景), He C-F(何聪芬), Bei C-L(秘彩莉), Shen Y-Z(沈银柱). Detection of the wheat salt-tolerant-mutant using PCR-SSCP combining with direct sequencing. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2001, 28(9): 852–855 (in Chinese with English abstract)
- [14] Ujino-Ihara T, Matsumoto A, Iwata H, Yoshimura K, Tsumura Y. Single-strand conformation polymorphism of sequence-tagged site markers based on partial sequences of cDNA clones in *Cryptomeria japonica*. *Genes Genet Syst*, 2002, 77: 251–257
- [15] Yu J, Hu S, Wang J, Wong G K, Li S, Liu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Lin W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni P, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui P, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li P, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L ssp. *indica*). *Science*, 2002, 296: 79–92
- [16] Yan L, Loukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J. Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 6263–6268
- [17] Yan L L, Loukoianov A, Blechl A, Tranquilli G, Ramakrishna W, SanMiguel P, Bennetzen J L, Echenique V, Dubcovsky J. The wheat *VRN2* gene is a flowering repressor down-regulated by vernalization. *Science*, 2004, 303: 1640–1644
- [18] Griffiths S, Sharp R, Foote T N, Bertin I, Wanous M, Reader S, Colas I, Moore G. Molecular characterization of *Ph1* as a major chromosome pairing locus in polyploid wheat. *Nature*, 2006, 439: 749–752
- [19] Uauy C, Distelfeld A, Fahima T, Blechl A, Dubcovsky J. A *NAC* gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science*, 2006, 314: 1298–1301
- [20] Yan L, Fu D, Li C, Blechl A, Tranquilli G, Bonafede M, Sanchez A, Valarik M, Yasuda S, Dubcovsky J. The wheat and barley vernalization gene *VRN3* is an orthologue of *FT*. *Proc Natl Acad*

- Sci USA*, 2006, 103: 19581–19586
- [21] Guyot R, Yahiaoui N, Feuillet C, Keller B. In silico comparative analysis reveals a mosaic conservation of genes within a novel colinear region in wheat chromosome 1AS and rice chromosome 5S. *Funct Integr Genomics*, 2004, 4: 47–58
- [22] Yahiaoui N, Srichumpa P, Dudler R, Keller B. Genome analysis at different ploidy levels allows cloning of the powdery mildew resistance gene *Pm3b* from hexaploid wheat. *Plant J*, 2004, 37: 528–538
- [23] Feuillet C, Travella S, Stein N, Albar L, Nublát A, Keller B. Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 15253–15258
- [24] The International Brachypodium Initiative. Genome sequencing and analysis of the model grass *Brachypodium distachyon*. *Nature*, 2010, 463: 763–768
- [25] Zhang H T, Guan H Y, Li J T, Zhu J, Xie C J, Zhou Y L, Duan X Y, Yang T, Sun Q X, Liu Z Y. Genetic and comparative genomics mapping reveals that a powdery mildew resistance gene *ML3D232* originating from wild emmer co-segregates with an NBS-LRR analog in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2010, 121: 1613–1621
- [26] Perovic D, Stein N, Zhang H, Drecsher A, Prasad M, Kota R, Kopahnke D, Graner A. An integrated approach for comparative mapping in rice and barley with special reference to the *Rph16* resistance locus. *Funct Integr Genomics*, 2004, 4: 74–83
- [27] Brunner S, Keller B, Feuillet C. A large rearrangement involving genes and low-copy DNA interrupts the microcollinearity between rice and barley at the *Rph7* locus. *Genetics*, 2003, 164: 673–683

欢迎订阅 2012 年《中国生态农业学报》

《中国生态农业学报》由中国科学院主管，中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国生态经济学会共同主办，科学出版社出版。系中国期刊方阵双效期刊、中国科技核心期刊、中文核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊，为中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊文摘、中国科学引文数据库、中国科技论文与引文数据库、CNKI 中国期刊全文数据库源刊，并被国际农业生物学文摘(CABI)、美国化学文摘(CA)、哥白尼索引(IC)、美国乌利希国际期刊指南等国际数据库及检索单位收录。荣获第三届、四届全国农业优秀期刊一等奖和首届北方优秀期刊奖，被评为 2009 年中国北方优秀期刊，连续多届获得河北省优秀期刊奖。

《中国生态农业学报》主要报道全球环境变化与农业、农业生态系统与生态农业理论基础、农田生态系统与农业资源、生态农业模式和技术体系、农业生态经济学、农业环境质量及环境保护、农业有害生物的综合防治等领域创新性研究成果。适于从事农业生态学、生态学、生态经济学以及环境保护等领域科技人员、高等院校有关专业师生，农业及环境管理工作者和基层从事生态农业建设的技术人员阅读与投稿。

《中国生态农业学报》为月刊，每期 128 页，国内外公开发行，国内刊号 CN13-1315/S，国际刊号 ISSN1671-3990。每期定价 35 元，全年 420 元。邮发代号：82-973，全国各地邮局均可订阅。漏订者可直接汇款至编辑部补订，需另加邮资 50.00 元。

地址：050022 河北省石家庄市槐中路 286 号，中国科学院遗传发育所农业资源中心《中国生态农业学报》编辑部

电话：(0311) 85818007；传真：(0311) 85815093

网址：<http://www.ecoagri.ac.cn>；E-mail: editor@sjziam.ac.cn