

研究论文

An Article

野生二粒小麦导入普通小麦抗白粉病基因 *MIWE27* 的鉴定和分子标记

华为^{1,2*} 郭霞^{1*} 朱婕¹ 刘子记¹ 崔钰¹ 吴海彬¹ 肖颖妮¹ 解超杰¹ 杨作民¹ 孙其信¹ 刘志勇^{1**}

1 中国农业大学农业生物技术国家重点实验室, 农业部作物基因组学与遗传改良重点开放实验室, 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; 2 浙江省农科院作物与核技术利用研究所, 杭州, 300021

* 同等贡献作者

** 通讯作者, zhiyongliu@cau.edu.cn

摘要 由白粉病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) 引起的小麦白粉病是严重影响小麦安全生产的主要病害之一。本研究将来自以色列的野生二粒小麦 (*Triticum dicoccoides*) WE27 的抗白粉病基因通过杂交和连续回交, 导入普通小麦遗传背景中, 育成高抗白粉病小麦新品系 3D256 (其系谱为燕大 1817/WE27// 农大 015/3/941, F₆)。将 3D256 和高感小麦白粉病的普通小麦品系薛早配制杂交组合, 对其 F₁、F₂ 分离群体和 F₃ 家系进行白粉病抗性鉴定和遗传分析。结果表明, 3D256 携带抗白粉病显性单基因, 暂命名为 *MIWE27*。利用集群分离分析法 (BSA) 和分子标记分析, 发现 3 个 SSR 标记 (*Xwmc243*、*Xwmc154* 和 *Xbarc318*)、1 个 EST-SSR 标记 (*Xdp357*)、1 个 AFLP 转化的 SCAR 标记 (*XCAUG1*) 和 1 个 RFLP 探针转化的 STS 标记 (*XWG516-1*) 与抗白粉病基因 *MIWE27* 连锁, 在连锁图上的顺序为 *Xdp357-MIWE27-XCAUG1-XWG516-1-Xwmc243-Xwmc154-Xbarc318*。利用中国春缺体-四体系、双端体系和缺失系将抗白粉病基因 *MIWE27* 定位于染色体 2B 短臂的末端 Bin 0.84-1.00 上。这一普通小麦抗白粉病种质资源的创制及其连锁分子标记的建立为小麦抗病基因分子标记辅助选择、基因积聚和分子育种提供了新的物质基础。

关键词 普通小麦品系 3D256, 野生二粒小麦, 抗白粉病基因 *MIWE27*, 分子标记

Identification and Genetic Mapping of Powdery Mildew Resistance Gene *MIWE27* in Common Wheat Introgressed from *Triticum dicoccoides*

Hua Wei^{1,2*} Guo Xia^{1*} Zhu Jie¹ Liu Ziji¹ Cui Yu¹ Wu Haibin¹ Xiao Yingni¹ Xie Chaojie¹ Yang Zuomin¹ Sun Qixin¹ Liu Zhiyong^{1**}

1 State Key Laboratory for Agrobiotechnology, Key Laboratory of Crop Genomics and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Beijing Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Key Laboratory of Crop Heterosis Research & Utilization, Ministry of Education, China Agricultural University, Beijing, 100193; 2 Institute of Crop and Nuclear Technology Utilization, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou, 310021

* The authors who contribute equally

** Corresponding author, zhiyongliu@cau.edu.cn

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2010.01.002

Abstract Powdery mildew, caused by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, is one of the most important wheat diseases worldwide. The common wheat (*Triticum aestivum*) line 3D256, a derivative of wild emmer (*Triticum dicoccoides*) with pedigree Yanda1817/WE27//Nongda015/3/941, is highly resistant to prevailing local wheat powdery mildew isolate E09 in Beijing area. Genetic analysis of the F₂ population and their F₃ lines, developed from 3D256 and a susceptible common wheat line Xuezao, indicated that the powdery mildew resistance in 3D256 was controlled by a single dominant gene, designated temporarily *MIWE27*. Molecular markers and the bulked segregant analysis

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7968.2010.01.002

基金项目: 本研究由国家 863 项目 (2006AA100102; 2006AA10Z1E9; 2006AA10Z1C4; 2006BAD01A02)、国家自然科学基金项目 (30425039; 30771341)、教育部长江学者和创新团队发展计划项目和高等学校学科创新引智计划项目 (111-2-03) 共同资助

收稿日期: 2009-01-05 接受日期: 2009-03-05

were used to characterize the powdery mildew resistance gene *MIWE27*. Three SSR markers (*Xwmc243*、*Xwmc154* and *Xbarc318*), one EST-SSR marker (*Xdp358*), one AFLP-derived SCAR markers (*XCAUG1*) and one RFLP-derived STS marker (*XWG516-1*) were found to be linked to the powdery mildew resistance gene *MIWE27*, with an order of *Xdp357-MIWE27-XCAUG1-XWG516-1-Xwmc243-Xwmc154-Xbarc318* in the genetic linkage map. Using Chinese Spring nullisomic-tetrasomics, ditelosomics and deletion lines, *MIWE27* was physically mapped on chromosome 2BS terminal bin 0.84-1.00. The new developed common wheat powdery mildew resistance line 3D256 and its resistance gene linked molecular markers provide useful germplasm and tool in disease resistance genes pyramiding and marker-assisted selection (MAS) in wheat breeding program.

Keywords Common wheat line 3D256, Wild emmer (*Triticum dicoccoides*), Powdery mildew resistance gene *MIWE27*, Molecular markers

小麦白粉病 (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, *Bgt*) 是严重影响小麦安全生产的主要病害之一, 选育抗病品种是控制小麦白粉病危害的一种经济、安全、有效的方法。由于小麦白粉病菌具有生理小种多、变异速度快等特点, 新的毒力型很容易产生并迅速积累起来, 导致品种的抗性丧失, 实现抗源多样化、进行抗病基因聚合可在一定程度上保证抗病育种的持久性。这就需要不断发掘新的抗白粉病基因, 为小麦抗病育种提供充足的抗病资源。目前, 已经正式命名的小麦抗白粉病基因位点有 39 个, 它们当中有一部分来自小麦的近缘种属(Huang et al., 2004; McIntosh et al., 2008)。

野生二粒小麦(*Triticum dicoccoides*, $2n=4x=28$, AABB)是普通小麦的二级基因源(Dong, 2000), 对小麦叶锈病、秆锈病和白粉病具有良好的抗性(Moseman et al., 1985; Nevo et al., 1991; Moseman et al., 1984; 解超杰等, 2003), 在小麦抗病性遗传改良中有着巨大的应用潜力。野生二粒小麦是普通小麦的四倍体祖先种, 与普通小麦杂交容易成功, 其抗病性可以通过杂交和回交等方法便捷地转移到普通小麦中。目前来自野生二粒小麦的抗白粉病基因 *Pm16*; *Pm26*; *Pm30* 和 *MIZec1* 已经成功的导入了普通六倍体小麦中(Reader and Millet, 1991; Rong et al., 2000; Liu et al., 2002; Mohler et al., 2005); 而 *MIW72* 和 *Pm36* 也通过常规育种的方法导入了四倍体栽培小麦中(Ji et al., 2008; Blanco et al., 2008)。

分子标记技术已经成为小麦抗病新基因发掘和定位的主要技术手段之一。小麦抗白粉病基因的研究中经常使用的分子标记技术有限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)和微卫星标记(simple sequence repeat, SSR) 等。SSR 标记随机分布于小麦的基因组

中, 具有多态性高、稳定性好、共显性等特点, 广泛应用于小麦重要性状基因定位和连锁图谱构建。RFLP 和 AFLP 标记由于程序比较复杂, 费时、费力, 通常可以将多态性 RFLP 和 AFLP 标记转化为相应的 STS(sequence-tagged-site)和 SCAR(sequence-characterized amplified regions)标记, 应用于连锁图谱构建和分子标记辅助育种中。

中国农业大学通过对从以色列引进的野生二粒小麦资源进行鉴定, 开展了普通小麦与部分高抗白粉病野生二粒小麦材料杂交和回交转育工作, 育成了一系列农艺性状优良、便于育种利用的抗白粉病新品系。为了明确这些抗病材料中所含的抗病基因, 更好的利用这些抗病资源, 本研究选取了农艺性状优良, 抗病性表现较为突出的品系 3D256, 对其进行了抗白粉病鉴定、遗传分析和分子标记研究, 以期为该抗病材料的应用提供依据。

1 结果与分析

1.1 抗白粉病基因的遗传分析

用小麦白粉病菌 E09 小种分别在苗期接种 3D256、薛早、薛早/3D256 F_1 、 F_2 分离群体和 F_3 家系, 接种后 15 d 薛早完全感病(IT=4), 3D256 未受白粉病菌的感染, 表现高抗(IT=0, 0;), 薛早/3D256 F_1 也表现高抗(IT=0, 0; 1), F_2 群体抗、感病单株分别为 123 和 46, 符合 3: 1 的分离比例($\chi^2=0.44$, $df=1$, $P=0.51$), F_2 单株鉴定后移栽到大田, 部分单株死亡, 导致 F_3 家系数减少。共收获 118 个 F_3 家系, 经抗病性鉴定发现, 纯合抗病(RR): 杂合抗病(Rr): 纯合感病(rr)的分离比率为 29:68:21, 符合预期的 1: 2:1 ($\chi^2=3.83$, $df=2$, $P>0.1$)分离比率(表 1)。综合 F_1 、 F_2 分离群体和 F_3 家系鉴定结果, 推断 3D256 的苗期白粉病抗性是由显性单基因控制的, 暂定名为

表 1 3D256、薛早、薛早 /3D256 F₁、F₂ 分离群体和 F₃ 家系对小麦白粉病菌 E09 的反应

Table 1 Reactions of 3D256, Xuezhao, Xuezhao/3D256 F₁、F₂ population and F₃ lines to powdery mildew isolate E09

品系 Lines	抗病株数 No. of resistant plants	感病株数 No. of susceptible plants	总数 Total No.	χ^2
3D256	19	0	19	
薛早	0	20	20	
Xuezhao				
薛早 /3D256 F ₁	17	0	17	0.44
Xuezhao/3D256 F ₁				
薛早 /3D256 F ₂	123	44	167	
Xuezhao/3D256 F ₂				
薛早 /3D256 F ₃ *	29 (RR)	21 (rr)	118	3.83
Xuezhao/3D256 F ₃ *	68 (Rr)			

注: *: F₂ 代群体在苗期白粉病抗性鉴定后移栽到大田, 存活率降低, 故 F₃ 家系数减少

Note: No. of F₃ lines decreased because of lower survival rate of F₂ plants during transplantation

MIWE27。

1.2 抗白粉病基因 *MIWE27* 的分子标记和染色体定位

利用位于 A、B 染色体组上的 SSR 引物筛选薛早 /3D256 F₃ 家系 DNA 构建的抗、感池, 发现引物 BARC318 在 DNA 抗、感池中扩增出了多态性片段。将引物 BARC318 在薛早 /3D256 的 F₃ 代家系 10 个 DNA 样品(包括 5 个纯合抗病和 5 个纯合感病家系)上进行检测, 结果表明, 引物 BARC318 扩增产生的多态性 DNA 片段与抗白粉病基因 *MIWE27* 连锁(图 1)。

SSR 标记 *Xbarc318* 只在小麦 2B 染色体上有位点(www.graingenes.org), 因此, 继续在 DNA 抗、感池间筛选小麦 2B 染色体上的微卫星引物, 并对多态性引物进行小群体验证。发现另外 3 个 SSR 标记: *Xwmc243*、*Xwmc154* 和 *Xdp357* 与抗白粉病基因 *MIWE27* 连锁。

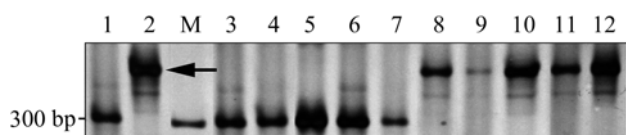


图 1 SSR 引物 BARC318 在亲本 3D256、薛早、薛早 /3D256 F₃ 纯合抗病、感病家系 DNA 上的扩增

注: 1: 3D256; 2: Xuezhao; 3~7: 纯合抗病家系; 8~12: 纯合感病家系; M: 100 bp DNA ladder; 箭头所示为多态性片段

Figure 1 Amplification patterns of SSR marker *Xbarc318* in 3D256, Xuezhao, Xuezhao/3D256 F₃ homozygous resistant and susceptible lines

Note: 1: 3D256; 2: Xuezhao; 3~7: Homozygous resistant lines; 8~12: Homozygous susceptible lines; M: 100 bp DNA ladder; Arrows indicate the polymorphic bands

WE27 连锁。经在 118 个薛早 /3D256 的 F₃ 家系的 DNA 样品进行检测, 构建了抗白粉病基因 *MIWE27* 的遗传连锁图谱(图 2)。抗病基因 *MIWE27* 位于标记 *Xwmc243* 和 *Xdp357* 之间, 与 *Xwmc243* 和 *Xdp357* 的遗传距离分别为 12.6 cM 和 11.2 cM。

之后利用中国春第 2 部分同源群缺体 - 四体系(N2AT2B, N2AT2D, N2BT2A, N2BT2D, N2DT2A 和 N2DT2B)、双端体系(Dt2BL 和 Dt2DL)和 4 个缺失系对 4 个与 *MIWE27* 连锁的 SSR 标记进行了染色体物理定位。结果表明, *Xbarc318*、*Xdp357*、*Xwmc154* 和 *Xwmc243* 均位于 2B 染色体上, 而且都被定位到了短臂最末端的 Bin 2BS3-0.84-1.00 上(图 2; 图 3)。

1.3 与抗白粉病基因 *MIWE27* 连锁的 SCAR 和 STS 标记筛选

为进一步加密抗白粉病基因 *MIWE27* 分子标记连锁图谱, 继续筛选了本实验室由 AFLP 标记转化而来的 30 对 SCAR 标记。结果发现 SCAR 标记 *XCAUG1* 在抗、感 DNA 池间扩增出多态性, 为与抗白粉病基因 *MIWE27* 互斥, 与感病位点连锁的标记(图 4)。

目前定位于 2BS 染色体上的抗白粉病基因只有 *Pm26*, 与 RFLP 标记 WG516 共分离(Rong et al., 2000)。为此, 利用 RFLP 标记 WG516 转化的 STS 标记 *XWG516-1* 在 118 个薛早 /3D256 的 F₃ 家系的 DNA 样品上进行检测。结果表明 STS 标记 *XWG516-1* 与 *MIWE27* 呈连锁关系, 二者的遗传距离是 10.0 cM(图 2)。

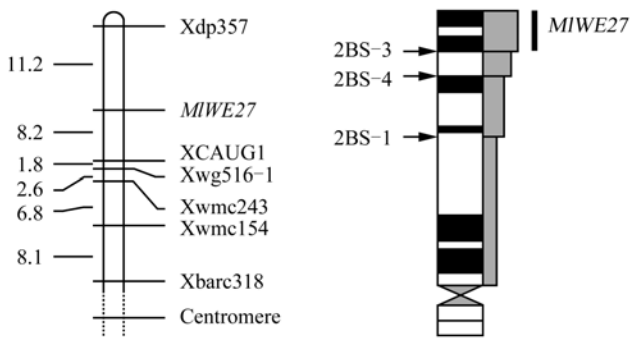


图2 抗白粉病基因 *MIWE27* 分子标记遗传连锁图谱和染色体物理图谱

注: 左边的数字表示 2 个相邻位点之间的遗传距离(cM)

Figure 2 Linkage and physical bin maps of powdery mildew resistance gene *MIWE27*

Note: Figures in the left indicate the genetic distance between two adjacent loci (cM)

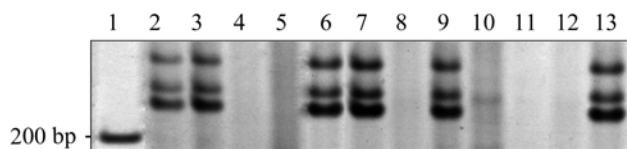


图3 EST-SSR 标记 *Xdp357* 在中国春第 2 部分同源群缺体-四体、双端体、缺失系上的扩增

注: 1: Marker; 2: N2A-T2B; 3: N2A-T2D; 4: N2B-T2A; 5: N2B-T2D; 6: N2D-T2A; 7: N2D-T2B; 8: Dt2BL; 9: Dt2DL; 10: d2BS-1; 11: d2BS-3; 12: d2BS-4; 13: d2BL-6

Figure 3 Amplification pattern of EST-SSR marker *Xdp357* on Chinese Spring nullisomic-tetrasomics, ditelosomics and deletion lines

Note: 1: Marker; 2: N2A-T2B; 3: N2A-T2D; 4: N2B-T2A; 5: N2B-T2D; 6: N2D-T2A; 7: N2D-T2B; 8: Dt2BL; 9: Dt2DL; 10: d2BS-1; 11: d2BS-3; 12: d2BS-4; 13: d2BL-6

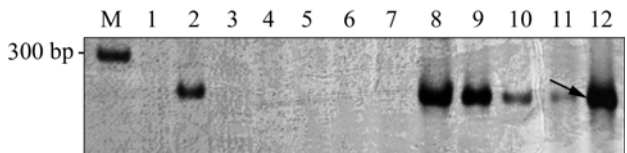


图4 SCAR 引物 *XCAUG1* 在亲本 3D256、薛早、薛早 /3D256 F_3 纯合抗病、感病家系 DNA 上的扩增

注: M: 100 bp DNA ladder; 1: 3D256; 2: Xuezao; 3~7: 纯合抗病家系; 8~12: 纯合感病家系; 箭头所示为多态性片段

Figure 4 Amplification patterns of SCAR marker *XCAUG1* in 3D256, Xuezao, Xuezao/3D256 F_3 homozygous resistant and susceptible lines

Note: M: 100 bp DNA ladder; 1: 3D256; 2: Xuezao; 3~7: Homozygous resistant lines; 8~12: Homozygous susceptible lines; Arrow indicates the polymorphic band

2 讨论

2.1 小麦品系 3D256 中抗白粉病基因的鉴定和染色体定位

野生二粒小麦是小麦遗传改良的次级基因库, 蕴含丰富的对多种生物和非生物逆境胁迫的抗性基因, 目前已经从中发掘出多个抗小麦锈病和白粉病基因 (Huang and Röder, 2004; McIntosh et al., 2008; Nevo et al., 1991)。利用引自以色列的高抗白粉病野生二粒小麦 WE27 与普通小麦品种连续杂交, 已经成功将 WE27 中的抗白粉病基因导入普通小麦遗传背景中, 育成具有优良农艺性状的抗白粉病普通小麦新品系 3D256。经多年温室和田间抗病性鉴定, 燕大 1817、农大 015 和 941 均为高感白粉病的普通小麦品种 (系), 3D256 的白粉病抗性来源于野生二粒小麦 WE27。抗病性遗传分析结果表明普通小麦新品系 3D256 对白粉病菌 E09 生理小种的抗性受显性单基因 *MIWE27* 控制。

分子标记已经广泛应用于小麦抗白粉病基因定位。SSR 标记由于位点丰富, 染色体定位信息明确, 多态性高, 共显性等, 通常被首先用来定位未知基因。本研究利用 BSA 法和 SSR 标记分析, 筛选出 4 个与抗白粉病基因 *MIWE27* 连锁的 SSR 标记, 初步将 *MIWE27* 定位到小麦 2BS 染色体上, 并构建了初步的遗传连锁图谱。

通过利用中国春缺体-四体系、双端体系和缺失系对与抗白粉病基因 *MIWE27* 连锁的多态性 SSR 标记 *Xbarc318*、*Xdp357*、*Xwmc154*、*Xwmc243* 进行染色体物理定位, 这些标记都被定位到 2B 染色体的短臂末端 Bin 2BS3-0.84-1.00 上。由于抗病基因 *MIWE27* 和这 4 个 SSR 标记连锁, 并且 *MIWE27* 位于标记 *Xdp357* 和 *Xwmc243* 之间, 因此推断该抗白粉病基因也位于 2BS 染色体臂末端 Bin 0.84-1.00 上 (图 2)。

2.2 抗白粉病基因 *MIWE27* 和其它已知抗白粉病基因的关系

在已经定名的小麦抗白粉病基因中, 来源于野生二粒小麦的有 *Pm16*、*Pm26*、*Pm30*、*MLZec1*、*MLIW72*、*PmAS846* 和 *Pm36*, 分别被定位于染色体 4A 或 5BS, 2BS, 5BS, 2BL, 7AL, 5BL 和 5BL 上 (Reader and Miller, 1991; Chen et al., 2005; Rong et al., 2000; Liu et al., 2002; Mohler et al., 2005; Ji et al., 2008; Wang et al., 2007; Blanco et al., 2008), 其中位于染色体 2B 上的只有 *MLZec1* 和 *Pm26*。抗白粉病基因 *MLZec1* 与位于 2BL 染色体上的 SSR 标记 *Xwmc356*

的遗传距离为 2.0 cM, 并且位于标记 *Xwmc356* 靠近长臂末端的一侧, 因此 *MIWE27* 被定位到 2B 染色体长臂末端的 Bin 2BL6-0.89-1.00 上(Mohler et al., 2005)。抗病基因 *Pm26* 是一个隐性基因, 通过 RFLP 标记分析, *Pm26* 和 RFLP 标记 *Xwg516* 共分离, 位于染色体 2BS 上(Rong et al., 2000)。为了明确基因 *MIWE27* 和 *Pm26* 的位置关系, 我们将由 RFLP 探针 *WG516* 转化而来的 STS 标记 *XWG516-1* 在薛早 /3D256 作图群体上进行检测, 发现 *MIWE27* 和 *XWG516-1* 的遗传距离为 10.0 cM, *MIWE27* 位于标记 *XWG516-1* 靠近 2B 染色体短臂末端的一侧。由于 *Pm26* 基因已经转让给以色列的私人育种公司, 无法获得该种质资源(Feldman 个人交流), 因此尚不能与 *MIWE27* 进行等位性测验或多小种鉴定, 以进一步区分 *Pm26* 与 *MIWE27* 的异同。但遗传分析结果和分子标记的定位结果可能表明抗白粉病基因 *MIWE27* 不同于来自野生二粒小麦的抗白粉病基因 *Pm26*。本研究从野生二粒小麦发掘出的抗白粉病基因 *MIWE27* 已经成功导入六倍体普通小麦遗传背景中, 并通过多代连续回交具有优良的农艺性状, 可以较为容易地被国内各育种单位利用。所建立的与 *MIWE27* 连锁的分子标记为该基因的分子标记辅助选择和基因积聚提供了重要工具。

此外, 定位于小麦 2B 染色体上的抗白粉病基因还有 *Pm6* 和 *Pm33*。抗白粉病基因 *Pm6* 来源于提莫菲维小麦, 定位于 2B 染色体的长臂上, 与 3 个 RFLP 标记 *Xbcd135*、*Xbcd307* 和 *Xbcd266* 之间的遗传距离分别是 1.6 cM、1.6 cM 和 4.8 cM(Tao et al., 2000); 抗白粉病基因 *Pm33* 来源于波斯小麦品系 PS5, 也被定位于 2B 染色体的长臂上, 位于分子标记 *Xgwm526* 和 *Xwmc317* 之间(Zhu et al., 2005)。由此可见, *MIWE27* 也不同于已知的其它位于 2B 染色体上的抗白粉病基因。

3 材料和方法

3.1 材料

本实验所用的小麦感白粉病亲本为普通小麦(*T.*

aestivum) 品系薛早, 抗白粉病亲本为小麦品系 3D256, 是通过普通小麦品种燕大 1817 与野生二粒小麦(*T. dicoccoides*) WE27 杂交, 杂交后代用普通小麦品系农大 015 和 941 连续多次杂交选育成的高抗小麦白粉病新品系, 系谱为燕大 1817/WE27// 农大 015/3/941, F₆。利用薛早和 3D256 配制杂交组合, 对薛早 /3D256 的 F₁、F₂ 分离群体及 F₃ 家系进行抗白粉病鉴定, 分析抗病基因的遗传特性。

中国春第 2 部分同源群缺体-四体系、双端体系和缺失系定位材料由美国堪萨斯州立大学小麦遗传资源中心 WJ Raupp 博士和 BS Gill 博士惠赠, 其中缺体-四体系、双端体系用于分子标记的染色体和染色体臂定位, 缺失系用于分子标记的染色体 Bin 物理定位, 缺失系的信息见表 2。

3.2 抗病性鉴定

用于白粉病抗性鉴定的白粉病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) 为北京地区流行的生理小种 E09, 由中国农业科学院植物保护研究所段霞瑜研究员惠赠。该小种对 *Pm1*、*Pm3b*、*Pm3c*、*Pm3e*、*Pm5*、*Pm6*、*Pm7*、*Pm8*、*Pm17* 和 *Pm19* 有毒性, 但对小麦品系 3D256 无毒性。白粉病的抗性鉴定采用温室苗期接种鉴定的方法。用白粉病菌生理小种 E09 对抗病亲本 3D256、感病亲本薛早、薛早 /3D256 的 F₁、F₂ 抗感分离群体和 F₃ 家系进行苗期白粉病菌接种并进行抗性鉴定。每个 F₃ 家系鉴定至少 20 棵幼苗的抗病性, 用于推导 F₂ 单株的抗病基因型。当待鉴定的材料生长至 1 叶 1 心期时, 将繁菌盆置于待鉴定幼苗培养盘的 4 周, 通过自然传播和人工拂掸等方法进行接种。接种后 15 d, 当对照感病品系薛早充分发病时进行抗病性鉴定和记载。鉴定按 6 级标准: 免疫(0)、过敏性坏死(0⁺)、高抗(1)、中抗(2)、中感(3)和高感(4), 并用“+”和“-”表示轻重程度。0~2 级为抗病, 3~4 级为感病。

3.3 基因组 DNA 提取和抗、感池构建

参照 Saghai-Maroo 等(1984) CTAB 法提取薛早、

表 2 中国春 2B 染色体缺失系

Table 2 Deletion lines of chromosome 2B in Chinese Spring (CS)

中国春缺失系	描述	片段长度
CS deletion line	Description	Fragment length
d2BS-1	20“+1” [del2BS-1]	0.53
d2BS-3	20“+1” [del2BS-3]	0.84
d2BS-4	18“+1” [Tdel2BS-4 del2BL-4]+1“ [del3DL-2]+” [3B]	0.75
d2BL-6	19“+1” [del2BL-6]+1“ [del5AS-6]+1” [5A], 19“+1” [del2BL-6]+1” [5A]	0.89

3D256、薛早 /3D256、F₁ 和 F₂ 抗感分离群体单株基因组 DNA。根据 F₃ 家系的鉴定结果,从 F₃ 家系中随机选取 10 个纯合抗病家系和 10 个纯合感家系的 DNA,等量混合建立抗病池(BR)和感病池(BS) (Michelmore et al., 1991),以抗病和感病池为模板进行 PCR 扩增,寻找抗病池之间有多态性引物,进一步将多态性引物在 F₃ 家系中分析验证,检测分子标记与抗病基因连锁程度。

3.4 SSR 分子标记分析

选用已经发表的定位于 A、B 染色体组上 SSR 引物,这些引物主要包括 2 大类,一类是基因组 SSR 引物,其中包括 GWM (Röder et al., 1998a; 1998b)、BARC (Song et al., 2002)和 WMC (Gupta et al., 2002)系列引物;另一类是 EST-SSR 引物,其中包括 PK (Gupta et al., 2003)和 DuPw(dp) (Eujayl et al., 2002)系列引物。

PCR 反应体系为 10 μ L, 其中包括 1 μ L 10 \times Buffer, 1 μ L 15 mmol/L MgCl₂, 1 μ L 2 mmol/L dNTP, 1 μ L 20 ng/ μ L 引物, 1 U *Taq* DNA 聚合酶, 4.75 μ L 去离子水, 1 μ L 20 ng/ μ L 基因组 DNA。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 50~60 $^{\circ}$ C (依引物 T_m 值而定)退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物加入 3 μ L 上样缓冲液(含 98% 甲酰胺, 10 mmol/L EDTA (pH=8.0), 0.25% 溴酚蓝, 0.25% 二甲苯青)。取 5 μ L 样品在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上以恒定电压 100~150 V, 电泳 4 h 左右。经硝酸银染色后观察,照相。

3.5 SSR 标记的染色体物理定位

用中国春缺体-四体系、双端体系和缺失系对与抗病基因连锁的 SSR 标记进行染色体、染色体臂和染色体 Bin 物理定位。通过比较中国春定位材料的扩增带型,将每个连锁标记定位到某个特定的染色体 Bin 上。

3.6 SCAR 标记的筛选

筛选本实验室通过 AFLP 转化而来的 30 对位于 2BS 染色体臂的 SCAR 标记(未发表数据)。SCAR 引物的 PCR 反应体系同 3.4。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 以后每个循环依次递减 1 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C 延伸 35 s, 11 个循环; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 35 s, 25 个循环。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。使用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶检测,具体方法与 3.4 相同。

3.7 STS 标记 XWG516-1 的检测

根据与抗病基因连锁的 SSR 标记染色体定位结果,确定了所研究的抗病基因在染色体上的相对位置,根据定位结果,我们检测了本实验室设计的,定位在相应区段的由 RFLP 探针 WG516 (与抗病基因 *Pm26* 共分离)转化而来的 STS 标记 XWG516-1,引物 WG516-1 的序列为:正向引物 5'-AAGAAGAAGCAAAGC GT-3',反向引物 5'-AGAGAAGAGAAAGAGATAG C-3'。标记 XWG516-1 的扩增反应体系和扩增程序及聚丙烯酰胺凝胶电泳检测与 3.4 相同。

3.8 数据分析

对于小麦品系 3D256 中抗病基因的遗传分析,采用卡方值(χ^2)进行适合性检测。

将在 DNA 抗病、感病池中筛选到的多态性标记在薛早 /3D256 F₃ 118 个家系上进行检测,用 MAPMAKER/EXP3.0 软件(Lincoln et al., 1992)计算标记与抗病基因之间的遗传距离,LOD 值为 3.0。Mapdraw V2.1 软件(刘仁虎和孟金陵, 2003)绘制该抗病基因的标记连锁图,确定所筛标记与该抗病基因的连锁关系。

参考文献

- Blanco A., Gadaleta A., Cenci A., Carluccio A.V., Abdelbacki A. M., and Simeone R., 2008, Molecular mapping of the novel powdery mildew resistance gene *Pm36* introgressed from *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* in durum wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 116: 417-425
- Chen X.M., Luo Y.H., Xia X.C., Xia L.Q., Chen X., Ren Z.L., He Z.H., and Jia J.Z., 2005, Chromosome location of powdery mildew resistance gene *Pm16* in wheat using SSR marker analysis, *Plant Breeding*, 124: 225-228
- Dong Y.C., 2000, Genepools of common wheat, *Mailei Zuowu Xuebao* (Journal of Triticeae Crops), 20(3): 78-81 (董玉琛, 2000, 小麦的基因源, 麦类作物学报, 20(3): 78-81)
- Eujayl I., Sorrells M.E., Baum M., Wolters P., and Powell W., 2002, Isolation of EST derived microsatellite markers for genotyping the A and B genomes of wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 104: 399-407
- Gupta P.K., Balyan H.S., Edwards K.J., Isaac P., Korzun V., Röder M.S., Gautier M.F., Joudrier P., Schlatter A.R., Dubcovsky J., Dela Pena R.C., Khairallah M., Penner G., Hayden M.J., Sharp P., Keller B., Wang R.C.C., Hardouin J.P., Jack P., and Leroy P., 2002, Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 105: 413-422
- Gupta P.K., Rustgi S., Sharma S., Singh R., Kumar N., and

- Balyan H.S., 2003, Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat, *Molecular Genetics and Genomics*, 270: 315-323
- Huang X.Q., and Röder M.S., 2004, Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: a review, *Euphytica*, 137: 203-223
- Ji X.L., Xie C.J., Ni Z.F., Yang T.M., Nevo E., Fahima T., Liu Z.Y., and Sun Q.X., 2008, Identification and genetic mapping of a powdery mildew resistance gene in wild emmer (*Triticum dicoccoides*) accession IW72 from Israel, *Euphytica*, 159: 385-390
- Lincoln S., Daly M., and Lander E., 1992, Constructing genetic maps with Mapmaker/EXP3.0. Whitehead Institute Techn Rep, 3rd Edition, Whitehead Institute, Cambridge, Massachusetts, USA,
- Liu R.H., and Meng J.L., 2003, MapDraw: a Microsoft excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data, *Yichuan(Hereditas)*, 25 (3): 317-321(刘仁虎, 孟金陵, 2003, MapDraw, 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏, *遗传*, 25 (3): 317-321)
- Liu Z.Y., Sun Q.X., Ni Z.F., Nevo E., and Yang T., 2002, Molecular characterization of a novel powdery mildew resistance gene *Pm30* in wheat originating from wild emmer, *Euphytica*, 123: 21-29
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Somers D.J., Appels R., and Devos K.M., 2008, Catalogue of gene symbols for wheat, Appels R., Eastwood R., Lagudah E., et al., (eds) Proc 11th Int Wheat Genet Symp (c), Sydney University Press, Sydney, Australia,
- Michelmore R.W., Paran I., and Kesseli R.V., 1991, Identification of markers closely linked to disease-resistance genes by bulk segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 88: 9828-9832
- Mohler V., Zeller F.J., Wenzel G., and Hsam S.L.K., 2005, Chromosomal location of genes for resistance to powdery mildew in common wheat (*Triticum aestivum* L. em Thell.) 9 gene *MIZec1* from the *Triticum dicoccoides*-derived wheat line Zecoi-1, *Euphytica*, 142: 161-167
- Moseman J.G., Nevo E., EL-Morshidy M.A., and Zohary D., 1984, Resistance of *Triticum dicoccoides* to infection with *Erysiphe graminis tritici*, *Euphytica*, 33: 41-47
- Moseman J.G., Nevo E., Gerechter-Amitai Z.K., El-Morshidy M.A., and Zohary D., 1985, Resistance of *Triticum dicoccoides* collected in Israel to infection with *Puccinia recondita tritici*, *Crop Science*, 25: 262-265
- Nevo E., Gerechter-Amitai Z.K., and Beiles A., 1991, Resistance of wild emmer wheat to stem rust: ecological, pathological and allozyme associations, *Euphytica*, 53: 121-130
- Reader S.M., and Miller T.E., 1991, The introduction into bread wheat of a major gene for resistance to powdery mildew from wild emmer wheat, *Euphytica*, 53: 57-60
- Röder M.S., Korzun V., Gill B.S., and Ganal M.W., 1998a, The physical mapping of microsatellite markers in wheat, *Genome*, 41: 278-283
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., and Ganal M.W., 1998b, A microsatellite map of wheat, *Genetics*, 149: 2007-2023
- Rong J.K., Millet E., Manisterski J., and Feldman M., 2000, A new powdery mildew resistance gene: introgression from wild emmer into common wheat and RFLP-based mapping, *Euphytica*, 115: 121-126
- Saghai-Marooif M.A., Soliman K.M., Jorgensen R.A., and Allard R.W., 1984, Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal locations and population dynamics, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 81: 8014-8018
- Song Q.J., Fickus E.W., and Cregan P.B., 2002, Characterization of trinucleotide SSR motifs in wheat, *Theor. Appl. Genet.*, 104: 286-293
- Tao W., Liu D., Liu J., Feng Y., and Chen P., 2000, Genetic mapping of the powdery mildew resistance gene *Pm6* in wheat by RFLP analysis, *Theor. Appl. Genet.*, 100: 564-568
- Wang C.Y., Ji W.Q., Zhang G.S., Wang Q.Y., Cai D.M., and Xue X.Z., 2007, SSR markers and preliminary chromosomal location of powdery mildew resistance gene in common wheat germplasm N9134, *Zuowu Xuebao (Acta. Agron. Sin.)*, 33 (1): 163-166 (王长有, 吉万全, 张改生, 王秋英, 蔡东明, 薛秀庄, 2007, 小麦种质 N9134 抗白粉病基因的 SSR 标记和染色体初步定位, *作物学报*, 33(1): 163-166)
- Xie C.J., Sun Q.X., and Yang Z.M., 2003, Resistance of wild emmers from Israel to wheat rusts and powdery mildew at seedling stage, *Mailei Zuowu Xuebao (Journal of Triticeae Crops)*, 23(2): 39-42 (解超杰, 孙其信, 杨作民, 2003, 以色列野生二粒小麦苗期抗病性鉴定, *麦类作物学报*, 23(2): 39-42)
- Zhu Z.D., Zhou R.H., Kong X.Y., Dong Y.C., and Jia J.Z., 2005, Microsatellite markers linked to 2 powdery mildew resistance genes introgressed from *Triticum carthlicum* accession PS5 into common wheat, *Genome*, 48: 585-590