

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.00998

野生二粒小麦导入普通小麦的抗白粉病基因 *MIWE29* 分子标记定位

张连松 华 为 关海英 李根桥 张宏涛 解超杰 杨作民 孙其信
刘志勇*

中国农业大学植物遗传育种系 / 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

摘 要: 小麦白粉病(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)是严重影响小麦生产的重要病害之一, 培育和应用抗病品种是有效控制和减少病害的最经济有效的方法。野生二粒小麦是硬粒小麦和普通小麦的四倍体野生祖先种, 是小麦抗病性遗传改良的重要基因资源。本研究利用来自以色列的野生二粒小麦 WE29 与普通小麦杂交, 再用普通小麦连续回交和自交, 育成高抗白粉病小麦新品系 3D258(系谱为燕大 1817/WE29//5*87-1, BC₄F₆)。将 3D258 和高感小麦白粉病的普通小麦品种薛早配制杂交组合, 对其 F₁、F₂ 代分离群体和 F₃ 代家系进行白粉病抗性鉴定和遗传分析。结果表明 3D258 携带抗白粉病显性单基因, 暂命名为 *MIWE29*。利用集群分离分析法(BSA)和分子标记分析, 发现 6 个 SSR 标记(*Xgwm335*、*Xgwm213*、*Xgwm639*、*Xwmc415*、*Xwmc289* 和 *Xwmc75*)和 5 个 EST-STS 标记(*BE494426*、*BE442763*、*CD452476*、*BE445282* 和 *BE407068*)与抗白粉病基因 *MIWE29* 连锁。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 *MIWE29* 及其连锁标记物理定位于 5BL 染色体的 0.59–0.79 区域。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: 白粉病; 野生二粒小麦; 抗白粉病基因; 分子标记

Molecular Mapping of Powdery Mildew Resistance Gene *MIWE29* in Wheat Originated from Wild Emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*)

ZHANG Lian-Song, HUA Wei, GUAN Hai-Ying, LI Gen-Qiao, ZHANG Hong-Tao, XIE Chao-Jie, Yang Zuo-Min, SUN Qi-Xin, and LIU Zhi-Yong*

Department of Plant Genetics & Breeding, China Agricultural University / 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, Beijing 100193, China

Abstract: Powdery mildew, caused by *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, is one of the most important wheat diseases in many regions in the world. Breeding for resistance is the most economical and effective method for controlling this disease. Wild emmer (*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*) is the immediate progenitor of cultivated tetraploid and hexaploid wheats and has been proven to be an important resource of disease resistance improvement. In this study, a common wheat line 3D258 with powdery mildew resistance was developed by crossing wild emmer accession WE29 with common wheat landrace Yanda1817 and backcrossing with common wheat line 87-1 (Yanda 1817/WE29//5*87-1, BC₄F₆). Genetic analysis of the F₂ population and their F₃ families, developed from 3D258 and a susceptible common wheat cultivar Xuezaoyao, indicated that the powdery mildew resistance in 3D258 was controlled by a single dominant gene, designated temporarily as *MIWE29*. Molecular markers and the bulked segregant analysis were used to characterize the powdery mildew resistance gene *MIWE29*. Six SSR markers (*Xgwm335*, *Xgwm213*, *Xgwm639*, *Xwmc415*, *Xwmc289*, and *Xwmc75*) and five EST-STS markers (*BE494426*, *BE442763*, *CD452476*, *BE445282*, and *BE407068*) were found to be linked to *MIWE29*. Using Chinese Spring nullisomic-tetrasomics, ditelosomics and deletion lines,

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2006AA100102, 2006AA10Z1E9, 2006AA10Z1C4, 2006BAD01A02), 国家自然科学基金项目(30425039 和 30771341), 教育部长江学者和创新团队发展计划项目, 高等学校学科创新引智计划项目(111-2-03)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: zhangliansong2000@163.com

Received(收稿日期): 2008-12-22; Accepted(接受日期): 2009-01-05.

MIWE29 was physically mapped on chromosome 5BL bin 0.59–0.79. The common wheat line 3D258 and its resistance gene linked molecular markers could be used in disease resistance genes pyramiding and marker-assisted selection in wheat breeding program.

Keywords: *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*; *Triticum turgidum* var. *dicoccoides*; Powdery mildew resistance gene; Molecular markers

小麦白粉病是由专性寄生的白粉病菌(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)引起的世界性病害,是我国发生范围最广、危害程度最重的小麦病害之一。培育抗病品种是防治白粉病危害最经济有效且又环保的举措。寻找新抗源和种质创新是抗病育种的基础工作,也是解决抗源单一化问题的有效途径。迄今为止,已经正式命名的小麦抗白粉病基因分布在 39 个位点上(*Pm1*~*Pm39*),其中 *Pm1*、*Pm3*、*Pm4*、*Pm5* 和 *Pm8* 等位点上具有多个等位基因^[1]。

随着分子标记技术的发展,目前已经出现的分子标记有 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、SCAR、STS 等。在常用的分子标记中,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。自 Röder 等^[2]1998 年构建了包含 279 个标记位点的小麦微卫星遗传图谱后, Somers 等^[3]、Pestsova 等^[4]、Song 等^[5]、Gupta 等^[6]在此基础上进一步饱和了小麦的遗传图谱,已成为小麦遗传作图和基因发掘与定位的重要工具。多个小麦抗白粉病基因的分子标记已经建立起来^[1,7],为小麦抗病基因分子标记辅助选择和基因积聚奠定了基础。

近年来,随着小麦部分 EST (expressed sequence tagged)测序的完成, Yao 等^[8]利用比较基因组学的方法根据小麦 EST 的序列信息设计了一批 EST-STS (site-tagged-sequence)标记,找到了与抗白粉病基因 *Mlm80* 和 *Mlm2033* 连锁的分子标记,丰富了抗白粉病基因的分子标记连锁图。基于小麦 EST 序列的 EST-STS 标记已经越来越多地用于基因组作图与标记辅助选择中。

野生二粒小麦(*Triticum turgidum* var. *dicoccoides*, $2n = 4x = 28$, AABB)是栽培小麦的四倍体祖先种,与硬粒小麦和普通小麦很容易杂交,杂种后代与普通小麦回交的结实率较高^[9]。野生二粒小麦的遗传多样性很高^[10],形态学变异非常丰富,且含有许多优良的农艺性状,特别是对小麦白粉病的抗性。Moseman 等^[11]鉴定了 650 份以色列野生二粒小麦材料,发现近一半材料抵抗小麦白粉病。解超杰等^[12]对来自以色列 16 个不同地区的 151 份野生二粒小麦材料进行了白粉病苗期抗性鉴定。结果表明,

86.8%的材料对小麦白粉菌 15 号生理小种表现高抗。在已知的小麦抗白粉病基因中,来源于野生二粒小麦的部分抗白粉病基因/位点已经转移到了普通小麦的遗传背景中,为这些抗病基因在抗病育种中的利用提供了便利。由于野生二粒小麦还含有优质、抗逆等许多其他的优良农艺性状^[13-15],因此,在利用野生二粒小麦提高普通小麦抗病性的同时还能改善小麦的其他性状,丰富小麦的遗传多样性,达到一举多得的效果。

1993—1994 年间,中国农业大学从以色列引进了多份野生二粒小麦材料,并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,育成了一批农艺性状优良、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,更好地利用这些抗病资源,本研究选取农艺性状优良,抗病性表现较突出的品系 3D258,对其进行抗白粉病鉴定、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 材料与方 法

1.1 材料

小麦感白粉病亲本为普通小麦品种薛早,抗白粉病亲本为小麦品系 3D258,是通过普通小麦品种燕大 1817 与野生二粒小麦 WE29 杂交,杂交后代用普通小麦品系 87-1 多次回交育成的高抗小麦白粉病新品系,其系谱为燕大 1817/WE29//5*87-1, BC₄F₆。利用薛早和 3D258 配制杂交组合,对薛早/3D258 的 F₁ 代, F₂ 代分离群体及 F₃ 代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 5 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 Raupp W J 博士和 Gill B S 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 1。

1.2 小麦白粉病抗性鉴定

用于抗性鉴定的白粉病菌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

表 1 中国春染色体 5BL 缺失位点的分布情况
Table 1 Distribution of deletion breakpoints on 5BL in Chinese Spring

中国春缺失系 CS deletion line	缺失种类 Description	片段长度 Fragment length
D5BL-6	19"+1"[del5BL-6]+1""[5A]	0.29
D5BL-9	18"+1"[del5BL-9]+1"[del7AL-11]+1"[7A]+t[del5BS-9L]	0.76
D5BL-11	20"+1"[d5BL-11]	0.59
D5BL-12	19"+1"[d5BL-12]	0.08
D5BL-13	17"+1"[d5BL-13]	0.82
D5BL-14	18"+1"[d5BL-14]	0.75
D5BL-16	19"+1"[del5BL-16]+1"[del2DL-12]+1"[2D]	0.79

霞瑜研究员惠赠。该小种对 *Pm1*、*Pm3b*、*Pm3c*、*Pm3e*、*Pm5*、*Pm6*、*Pm7*、*Pm8*、*Pm17* 和 *Pm19* 等小麦抗白粉病基因有毒性, 但对小麦品系 3D258 中的抗白粉病基因无毒性。用白粉病菌生理小种 E09 对抗病亲本 3D258、感病亲本薛早、薛早/3D258 的 F₁ 代、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。对每个 F₃ 家系至少鉴定 20 株幼苗的抗病性, 用于推导 F₂ 单株的抗病基因型。当待鉴定的材料生长至一叶一心期时, 将繁菌盆置于待鉴定幼苗培养盘的四周, 通过自然传播和人工拂掸等方法进行接种。接种后 15 d 后, 当对照感病品种薛早充分发病时进行抗病性鉴定和记载。采用温室苗期接种鉴定白粉病的抗性, 按 6 级标准, 即免疫(0)、过敏性坏死(0₁)、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^[16]。

1.3 基因组 DNA 提取和抗、感池构建

参照 Saghai-Marooof 等^[17]的 CTAB 法提取试验材料的基因组 DNA, 其中 F₂ 代按单株提取 DNA。根据 F₃ 家系的鉴定结果, 从 F₂ 代抗感分离群体中随机选取 10 株纯合抗病株和 10 株纯合感病株的 DNA, 等量混合建立抗病池(B_R)和感病池(B_S), 以抗病和感病池 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 寻找抗感池之间有多态性的引物, 进一步用多态性引物在 F₂ 代分离群体中分析验证, 检测分子标记与抗病基因的连锁程度。

1.4 分子标记筛选和 PCR 扩增

小麦 SSR 引物选自 Röder^[2]等开发的 WMS 引物, Somers 等^[3]报道的 WMC 引物和 GrainGene 网站 (<http://wheat.pw.usda.gov>)上公布的小麦 EST 引物。首先从合成的引物中选取随机分布在每一条染色体上的 200 对 SSR 引物, 用于多态性标记的初步筛选。待确定抗病基因所在染色体位置后, 再选取位于其

所在基因组区域的其他 SSR 和 EST 标记进一步筛选多态性。

在 Applied Biosystems GeneAmp PCR System 9700 上进行 PCR, 参照 Röder 等^[2]的参数和程序, 略有改动。反应体系 10 μL (含 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol L⁻¹ KCl, 1.5 mmol L⁻¹ MgCl₂, 0.2 mmol L⁻¹ dNTP, 每个引物各 25 ng, 50~100 ng 基因组 DNA 和 0.75 U *Taq* DNA 聚合酶)。扩增程序为 94℃ 变性 5 min; 94℃ 变性 45 s, 55~60℃ (根据不同引物的退火温度)退火 45 s, 72℃ 延伸 1.5 min, 40 个循环; 72℃ 延伸 10 min。扩增产物加入 3 μL 的上样缓冲液, 取 5 μL 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, 大约 4 h, 经硝酸银染色后进行带型统计或扫描记录。

1.5 连锁分析

用 χ^2 测验对 F₂ 代群体抗感分离比例进行适合性检验。根据 F₃ 家系的鉴定结果将 F₂ 分离群体各单株划分为纯合抗病, 杂合抗病和纯合感病 3 种类型, 采用 MAPMAKER/EXP 3.0b 软件计算分子标记与抗白粉病基因之间的距离^[18]。用 MapdrawV2.1 软件^[19]绘制连锁图谱。

1.6 抗白粉病基因及其连锁的多态性标记染色体物理定位

用中国春第 5 部分同源群的缺体-四体系、双端体系和染色体片段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。通过比较中国春与其缺失系的扩增带型, 将每个连锁标记定位到某个特定的染色体 Bin 上。

2 结果与分析

2.1 抗白粉病基因 *MIWE29* 遗传分析

苗期接种鉴定表明, 3D258 表现高抗(IT 0₁), 而薛早表现高度感病(IT 4), 薛早/3D258 杂交 F₁ 代全

部抗病(IT 0; -1), 薛早/3D258 的 F_2 群体 166 个单株中, 125 株表现抗病(IT 0; -2), 41 株表现感病(IT 4), 符合 3 : 1 的分离比例($\chi^2_{3:1} = 0.004$, $\chi^2_{0.05} = 3.84$)(表 2)。 F_2 单株鉴定后移栽到大田, 部分高度感病单株死亡, 共收获 136 个 F_2 单株。经 F_3 家系鉴定, 其中纯

合抗病(RR)、杂合抗病(Rr)和纯合感病(rr) F_2 单株分别为 31、82 和 23 株, 偏离预期的 1 : 2 : 1 ($\chi^2_{1:2:1} = 6.85$, $\chi^2_{0.05} = 5.99$)分离比率(表 2)。综合 F_2 和 F_3 家系鉴定结果, 推断 3D258 的苗期白粉病抗性是由显性单基因控制的, 暂定名为 *MIWE29*。

表 2 小麦品系 3D258 中抗白粉病基因 *MIWE29* 的遗传分析
Table 2 Genetic analysis of powdery mildew resistance gene *MIWE29* in wheat line 3D258

世代 Generation	抗病株数 No. of resistant plants	感病株数 No. of susceptible plants	总数 Total	χ^2	$\chi^2_{0.05}$
3D258	25	0	25		
薛早 Xuezaao	0	25	25		
薛早/3D258 F_1 Xuezaao/3D258 F_1	20	0	20		
薛早/3D258 F_2 Xuezaao/3D258 F_2	125	41	166	0.004	3.84
薛早/3D258 $F_{2:3}$ Xuezaao/3D258 $F_{2:3}$	32(RR) + 83(Rr)	23 (rr)	138	6.850	5.99

2.2 与抗白粉病基因 *MIWE29* 连锁的 SSR 分子标记筛选及其染色体定位

在 200 对候选 SSR 引物中, 筛选出扩增产物在薛早/3D258 的 F_2 抗病池和感病池之间存在多态性的引物 GWM213。进一步将 GWM213 在 F_2 代抗病性分离群体上进行检测, 结果表明, 该引物扩增产生的多态性片段与抗病基因 *MIWE29* 位点连锁。

由于 *Xgwm213* 已被定位于小麦 5B 染色体上着丝粒附近^[2], 因此, 继续在小麦第 5 同源群上筛选引物。结果发现 GWM639、WMC415、GWM335、

WMC289 和 WMC75 可扩增出多态性 DNA 片段, 且与 *MIWE29* 连锁。在筛选到的共 6 个与 *MIWE29* 基因连锁的 SSR 标记中, *Xgwm639* 和 *Xwmc415* 是显性标记, 在纯合抗病单株上和杂合抗病单株上均能扩增出多态性条带, 而在纯合感病单株上扩增不出多态性条带。另外 4 个标记 *Xgwm335*、*Xgwm213*、*Xwmc289*、*Xwmc75* 是共显性标记(图 1)。根据这 6 个 SSR 标记在 F_2 分离群体上的扩增结果, 构建了抗白粉病基因 *MIWE29* 的分子标记连锁图谱。

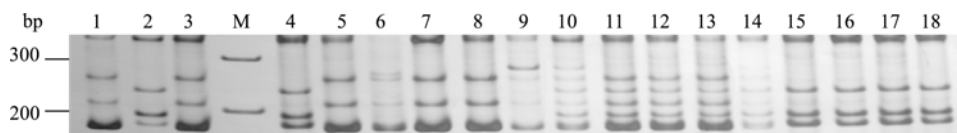


图 1 SSR 标记 *Xwmc75* 在薛早/3D258 F_2 群体抗、感单株上的扩增结果

Fig. 1 Amplification pattern of SSR primer pair *Xwmc75* on Xuezaao/3D258 F_2 individual plants of segregation population
M: 1 kb DNA 分子标记; 1: 3D258; 2: Xuezaao; 3: 抗病池; 4: 感病池; 5~9: 纯合抗病单株; 10~14: 杂合抗病单株; 15~18: 纯合感病单株。
M: 1 kb DNA ladder; 1: 3D258; 2: Xuezaao; 3: resistant pool; 4: susceptible pool; 5~9: homozygous resistant plants; 10~14: heterozygous resistant plants; 15~18: homozygous susceptible plants.

Xgwm213、*Xgwm335* 和 *Xwmc75* 只定位在 5B 染色体上, *Xwmc415* 在 5A 和 5B 染色体上都有位点, *Xwmc289* 在 5B 和 5D 染色体上均有位点, 而 *Xgwm639* 在 5A、5B 和 5D 染色体上都有位点。为确定抗白粉病基因 *MIWE29* 所在的染色体位置, 用 6 个与 *MIWE29* 连锁的 SSR 标记在中国春及其第 5 部分同源群染色体的缺体-四体系 (N5AT5D、N5BT5A 和 N5DT5A) DNA 上扩增。结果表明, 与 *MIWE29* 连锁的多态性标记位点均位于 5B 染色体上。进一步在 5B 染色体双端体系 (Dt5AL、Dt5BL 和 Dt5DL) 和 5BL 的 7 个缺失系 DNA 上扩增, 结果

Xgwm335 和 *Xgwm213* 被定位在染色体 5BL Bin 0.29~0.59 间, *Xwmc415* 和 *Xgwm639* 被定位在染色体 5BL Bin 0.59~0.75 间(图 2), 而标记 *Xwmc289* 和 *Xwmc75* 被定位在染色体 5BL Bin 0.76~0.79 间(图 2)。抗白粉病基因 *MIWE29* 位于标记 *Xwmc75* 和 *Xwmc415* 之间, 因此可将 *MIWE29* 定位于 5BL 染色体长臂 Bin 0.59~0.79 间(图 3)。

2.3 与抗白粉病基因 *MIWE29* 连锁的 EST-STS 分子标记筛选

为了加密 *MIWE29* 遗传连锁图谱, 又筛选了 19 对物理定位于目标基因染色体区间的小麦 EST 引物,

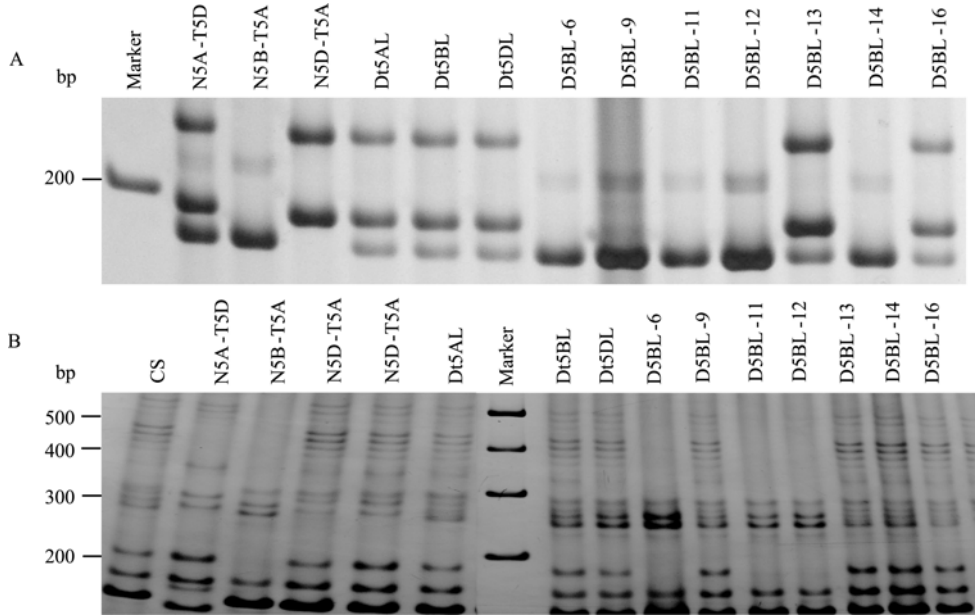


图 2 SSR 标记 *Xwmc75* (A)和 *Xwmc415* (B)在中国春第 5 部分同源群缺体-四体材料的扩增结果
 Fig. 2 Amplification pattern of *Xwmc75* (A) and *Xwmc415* (B) in Chinese Spring homoelogenous group 5 nulli-tetrasomics, ditelosomics, 5BL deletion lines

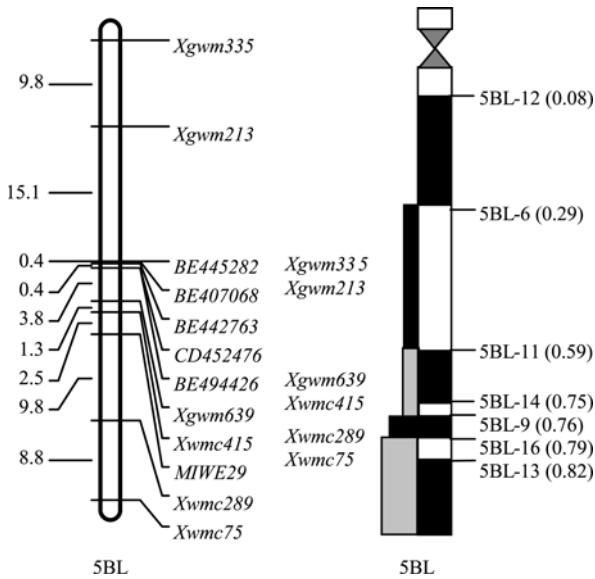


图 3 抗白粉病基因 *MIWE29* 分子标记连锁图谱和染色体物理图谱

Fig. 3 Linkage and physical bin map of powdery mildew resistance gene *MIWE29*

左图的右侧是标记, 左图的左侧为两标记之间的遗传距离(cM); 右图的右侧括号的数字表示片段长度比。

Locus names are indicated on the right side of the left map. Kosambi map distances (cM) are shown on the left side.

The numbers in the brackets of the right map are fragment lengths.

共发现 5 对 EST-STS 标记(表 3)可以在抗病、感病池上扩增出多态性片段(图 4)。利用薛早/3D258 F₂ 代分离群体将这 5 对标记(*BE494426*、*BE442763*、*CD452476*、*BE445282* 和 *BE407068*)整合到 *MIWE29*

分子标记连锁图谱上(图 3)。

3 讨论

3.1 小麦品系 3D258 中抗白粉病基因的鉴定和染色体定位

野生二粒小麦蕴含丰富的抗白粉病基因, 对我国白粉病菌表现优良抗性^[12]。将引自以色列的野生二粒小麦 WE29 与普通小麦品种杂交, 再进行连续回交, 已经将其抗白粉病基因导入普通小麦遗传背景中, 育成抗白粉病小麦新品系 3D258。经多年温室和田间抗病性鉴定, 燕大 1817 和 87-1 均为高感白粉病的普通小麦品种(系), 3D258 的白粉病抗性来源于野生二粒小麦 WE29。抗病性遗传分析结果表明 F₂ 代分离群体的分离比例符合 3 : 1 的显性单基因孟德尔分离比例, 表明小麦品系 3D258 对小麦白粉病菌 E09 生理小种的抗性受显性单基因控制, 暂时命名为 *MIWE29*。

分子标记定位可以快速确定目标基因所在的染色体位置, 在小麦重要农艺性状功能基因, 尤其是抗病基因的发掘和鉴定上应用广泛。在常用的分子标记中, SSR 标记具有位点多、数量丰富, 覆盖整个染色体组; 每个位点均有许多等位形式, 多态性高; 是共显性标记, 能够区分纯合、杂合基因型, 从而提供单个位点上较完整的遗传信息; 易于利用 PCR 技术分析, 对模板 DNA 的质量要求不高, DNA 用量少;

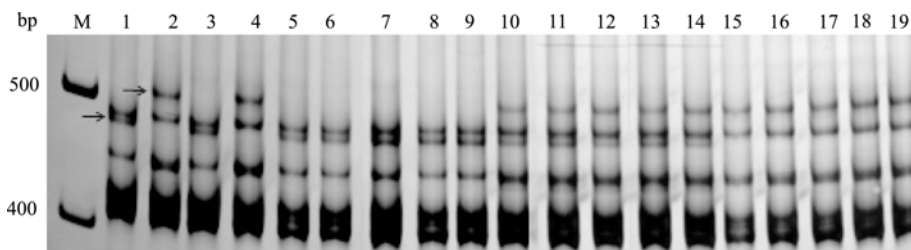


图 4 EST 标记 *BE494426* 在薛早/3D258 F_2 群体抗、感单株上的扩增结果

Fig. 4 Amplification pattern of EST primer pair *BE494426* on Xuezhao/3D258 F_2 individual plants of the segregation population
M: 1 kb DNA 分子标记; 1: 3D258; 2: Xuezhao; 3: 抗病池; 4: 感病池; 5~9: 纯合抗病单株; 10~14: 纯合感病单株。箭头示抗、感间的多态性片段

M: 1 kb DNA ladder; 1: 3D258 2: Xuezhao; 3: resistant pool; 3: susceptible pool; 5~9: homozygous resistant plants; 10~14: heterozygous resistant plants; 15~19: homozygous susceptible plants. Arrows show the polymorphic bands between resistant and susceptible.

表 3 与抗白粉病基因 *MIWE29* 连锁的 EST 引物序列

Table 3 EST primer sequences linked with powdery mildew resistance gene of *MIWE29*

标记 Marker	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
BE494426	TCCATCAATAAGAGAGATGGCTG	GAATTGGCTCAAAGACGGA
BE442763	AAGAGAATGCTATTGCGCGT	ATGCATCTCTAGGTTGCGCT
CD452476	AAGAGAATGCTATTGCGCGT	GGCATAAGCAGAAGACGGAG
BE445282	GAGGCGGTGCCTATCATAAA	CAATGCCAGGAATTCGATCT
BE407068	ACGCTTAGACTTGGCAAGGA	TACATCGCCAAGTTGTCCTG

操作简单, 结果重复性好; 多数标记染色体位置已知, 可以方便地应用到基因定位、外源遗传物质鉴定等研究中等特点, 通常被用来作为定位未知基因的首选分子标记。本研究利用 BSA 法和 SSR 标记分析, 筛选出 6 个与抗白粉病基因 *MIWE29* 连锁的 SSR 标记, 初步将 *MIWE29* 定位到小麦 5BL 染色体上, 在连锁图上的顺序关系为 *Xgwm335-Xgwm213-Xgwm639-Xwmc415-MIWE29-Xwmc289-Xwmc75*。

中国春染色体片段缺失系在确定目标基因及其紧密连锁的分子标记所在的染色体物理区间上有重要意义, 小麦的 SSR 标记位点和众多的 EST 位点都已经定位到小麦 7 个部分同源群的染色体不同区间上^[2-6,20]。利用中国春 5BL 不同的染色体片段缺失系, 可以将抗白粉病基因 *MIWE29* 定位到 5BL Bin 0.59~0.79 区间, 为进一步筛选多态性标记, 构建精细遗传连锁图谱奠定了基础。在此基础上, 利用已经物理定位于 5BL 染色体 Bin 0.59~0.79 区间的小麦 EST 序列信息, 进一步筛选多态性 EST-STS 标记, 将来源于 5 个小麦 EST 的 EST-STS 标记定位到 *MIWE29* 遗传连锁图谱上。Sorrells 等^[21]通过小麦 EST 序列和水稻基因组序列的比较, 证实水稻和小麦基因组部分区域存在良好的宏观和微观共线性。小麦第 5 部分同源群长臂 Bin 0.59~0.79 区间与水稻

9 号染色体具有共线性关系, 利用这些与 *MIWE29* 连锁的 EST 序列, 可以开展与水稻同源基因组区间的比较分析, 进一步开发与 *MIWE29* 连锁的分子标记。二穗短柄草由于具有基因组小、植株个体小、生育期短等特点^[22], 被作为禾本科模式植物进行了基因组测序研究。系统进化研究发现二穗短柄草小麦的亲缘关系比水稻更近。因此, 利用与 *MIWE29* 连锁的小麦 EST 序列信息, 开展与水稻和二穗短柄草的共线性关系分析, 有望对 *MIWE29* 进行精细遗传定位。

3.2 *MIWE29* 和其他已知抗白粉病基因的关系

本文研究的抗白粉病基因 *MIWE29* 来源于野生二粒小麦 WE29, 被定位到 5BL 染色体 Bin 5BL 0.59~0.79 区间。在已经发现的小麦抗白粉病基因中, 来源于野生二粒小麦的有 *Pm16(4A 或 5BS)*^[23-24]、*Pm26(2BS)*^[25]、*Pm30(5BS)*^[26]、*MIWec1(2BL)*^[27]、*MIW72(7AL)*^[28]、*PmAS846(5BL)*^[29]和 *Pm36(5BL)*^[30]。抗白粉病基因 *PmAS846* 来源于野生二粒小麦 AS846, 目前只发现一个与其连锁的 SSR 标记 *Xgwm67*, 遗传距离为 20.6 cM^[29]。*Xgwm67* 位于 5B 染色体的着丝粒附近靠近长臂一端, 因此, *PmAs846* 也可能位于 5BL 上, 但还需要有更多的标记确定其在染色体上的准确位置。SSR 标记 *Xgwm67* 在 3D258 分离群

体上未检测到多态性。抗白粉病基因 *Pm36* 来源于野生二粒小麦 MG29896, 是一个导入到硬粒小麦中的显性基因, 通过与之连锁的分子标记将该基因也定位到了染色体 Bin 5BL (0.29~0.76) 上。*Pm36* 与 EST 标记 *BJ261635* 紧密连锁, 遗传距离为 0.4 cM^[30], 但根据该 EST 设计的 PCR 引物在薛早/3D258 分离群体上未检测到多态性。比较抗白粉病基因 *MIWE29* 和 *Pm36* 的遗传连锁图, 只在近末端方向有共同的分子标记 *Xwmc75*。*Xwmc75* 距 *Pm36* 约 10 cM, 但距 *MIWE29* 约 18.6cM。由于作图群体的不同, 单纯通过遗传距离的差异尚不能确定 *Pm36* 与 *MIWE29* 的关系。其他定位于 5B 染色体上的抗白粉病基因有 *Pm16* 和 *Pm30*。但均定位于 5BS 染色体上。因此, *MIWE29* 是不同于 *Pm16* 和 *Pm30* 的抗白粉病基因。*Pm36* 目前只导入意大利的硬粒小麦中, 国内尚无这一遗传资源。本研究所用的抗白粉病基因 *MIWE29* 则已经导入六倍体普通小麦遗传背景中, 并通过多代连续回交已经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 *MIWE29* 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。

4 结论

成功将野生二粒小麦 WE29 抗白粉病基因导入普通小麦新品系 3D258, 3D258 携带一个位于 5BL 染色体 Bin 0.59~0.79 间的显性抗白粉病基因 *MIWE29*, 建立了与 *MIWE29* 连锁的微卫星和 EST-STS 标记, 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。

References

- [1] McIntosh R A, Yamazaki Y, Dubcovsky J, Rogers J, Morris C, Somers D J, Appels R, Devos K M. Catalogue of gene symbols for wheat. In: Appels R, Eastwood R, Lagudah E, Langridge P, Mackay M, McIntyre L, Sharp P, eds. Proc 11th Intl Wheat Genet Symp Sydney. Australia: Sydney University Press, 2008
- [2] Röder M S, Korzun V, Wendehake K. A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 1998, 149: 2007–2023
- [3] Somers D J, Isaac P, Edwards K. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2004, 109: 1105–1114
- [4] Pestsova E, Ganal M W, Röder M S. Isolation and mapping of microsatellite markers specific for the D genome of bread wheat. *Genome*, 2000, 43: 689–697
- [5] Song Q J, Shi J R, Singh S, Fickus E W, Costa J M, Lewis J, Gill B S, Ward R, Cregan P B. Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 550–560
- [6] Gupta P K, Balyan H S, Edwards K J, Isaac P, Korzun V, Röder M, Gautier M F, Joudrier P, Schlatter A R, Dubcovsky J, De la Pena R C, Khairallah M, Penner G, Hayden M J, Sharp P, Keller B, Wang R C C, Hardouin J P, Jack P, Leroy P. Genetic mapping of 66 new microsatellite (SSR) loci in bread wheat. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 413–422
- [7] Huang X Q, Röder M S. Molecular mapping of powdery mildew resistance genes in wheat: A review. *Euphytica*, 2004, 137: 203–223
- [8] Yao G Q, Zhang J L, Yang L L, Xu H X, Jiang Y M, Xiong L, Zhang C Q, Zhang Z Z, Ma Z Q, Sorrells M E. Genetic mapping of two powdery mildew resistance genes in einkorn (*Triticum monococcum* L.) accessions. *Theor Appl Genet*, 2007, 114: 351–358
- [9] Feldman M, Millet E. Methodologies for identification, allocation and transfer of quantitative genes from wild emmer into cultivated wheat. In: Li Z S, Xin Z Y, eds. Proc 8th Intl Wheat Genet Symp. Beijing: China Agricultural Scientific and Technology Press, 1993. pp 19–27
- [10] Nevo E, Beiles A. Genetic diversity of wild emmer wheat in Israel and Turkey: Structure, evolution, and application in breeding. *Theor Appl Genet*, 1989, 77: 421–455
- [11] Moseman J G, Nevo E, El-Morshidy M A, Zohary D. Resistance of *Triticum dicoccoides* collected in Israel to infection with *Erysiphe graminis tritici*. *Euphytica*, 1984, 33: 41–47
- [12] Xie C-J(解超杰), Sun Q-X(孙其信), Yang Z-M(杨作民). Resistance of wild emmers from Israel to wheat rusts and powdery mildew at seedling stage. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2003, 23(2): 39–42 (in Chinese with English abstract)
- [13] Levy A A, Feldman M. Increase in grain percentage in high-yielding common wheat breeding lines by genes from wild tetraploid wheat. *Euphytica*, 1987, 36: 353–359
- [14] Levy A A, Galili G, Feldman M. Polymorphism and genetic control of high molecular weight glutenin subunits in wild tetraploid wheat *Triticum turgidum* var. *dicoccoides*. *Heredity*, 1988, 61: 63–72
- [15] Nevo E, Payne P I. Wheat storage proteins: Diversity of HMW glutenin subunits in wild emmer from Israel. *Theor Appl Genet*, 1987, 74: 827–836
- [16] Wang Z L, Li L H, He Z H, Duan X Y, Zhou Y L, Chen X M, Lillemo M, Singh R P, Wang H, Xia X C. Seedling and adult plant resistance to powdery mildew in Chinese bread wheat cultivars and lines. *Plant Dis*, 2005, 89: 457–463
- [17] Saghai-Marooof M A, Soliman K M, Jorgensen R A, Allard R W. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal locations and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81: 8014–8018
- [18] Lincoln S, Daly M, Lander E. Constructing Genetic Maps with

- Mapmaker/EXP3.0. Whitehead Institute Techn Rep, 3rd edn. Cambridge, Massachusetts, USA: Whitehead Institute, 1992
- [19] 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)
- [20] Sourdille P, Singh S, Cadalen T, Brown, Guedira G L, Gay G, Qi L L, Gill B S, Dufour P, Murigneux A, Bernard M. Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funt Integr Genomics*, 2004, 4: 12–25
- [21] Sorrells M E, LaRota M, Bermudez-Kandianis C E. Comparative DNA sequence analysis of wheat and rice genomes. *Genome Res*, 2003, 13: 1818–1827
- [22] Draper J, Mur L A J, Jenkins G. *Brachypodium distachyon*: A new model system for functional genomics in grasses. *Plant Physiol*, 2001, 127: 1539–1555
- [23] Reader M, Miller T E. The introduction into bread wheat of a major gene for resistance to powdery mildew from wild emmer wheat. *Euphytica*, 1991, 53: 57–60
- [24] Chen X M, Luo Y H, Xia X C, Xia L Q, Chen X, Ren Z L, He Z H, Jia J Z. Chromosomal location of powdery mildew resistance gene *Pm16* in wheat using SSR marker analysis. *Plant Breed*, 2005, 124: 225–228
- [25] Rong J K, Millet E, Manisterski J, Feldman M. A new powdery mildew resistance gene: Introgression from wild emmer into common wheat and RFLP-based mapping. *Euphytica*, 2000, 115: 121–126
- [26] Liu Z Y, Sun Q X, Ni Z F, Nevo E, Yang T M. Molecular characterization of a novel powdery mildew resistance gene *Pm30* in wheat originating from wild emmer. *Euphytica*, 2002, 123: 21–29
- [27] Mohler V, Zeller F J, Wenzel G, Hsam S L K. 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*, 2005, 142: 161–167
- [28] Ji X L, Xie C J, Ni Z F, Yang T M, Nevo E, Fahima T, Liu Z Y, Sun Q X. Identification and genetic mapping of a powdery mildew resistance gene in wild emmer (*Triticum dicoccoides*) accession IW72 from Israel. *Euphytica*, 2007, 159: 385–390
- [29] Wang C-Y(王长有), Ji W-Q(吉万全), Zhang G-S(张改生), Wang Q-Y(王秋英), Cai D-M(蔡东明), Xue X-Z(薛秀庄). SSR markers and preliminary chromosomal location of a powdery mildew resistance gene in common wheat germplasm N9134. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(1): 163–166 (in Chinese with English abstract)
- [30] Blanco A, Gadaleta A, Cenci A, Carluccio A V, Abdelbacki A M M, Simeone R. Molecular mapping of the novel powdery mildew resistance gene *Pm36* introgressed from *Triticum turgidum* var. *dicoccoides* in durum wheat. *Theor Appl Genet*, 2008, 116: 417–425