

## 分子标记辅助选择小麦抗白粉病基因 *Pm2*、*Pm4a* 和 *Pm21* 的聚合体

高安礼 何华纲 陈全战 张守忠 陈佩度\*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏南京 210095)

**摘要:** 利用与小麦抗白粉病基因 *Pm2*、*Pm4a* 和 *Pm21* 紧密连锁的 PCR 标记,对含有 *Pm2*、*Pm4a* 和 *Pm21* 的小麦品系复合杂交后代经 3 轮分子标记选择,得到了一批聚合有 *Pm2* + *Pm4a* + *Pm21* 3 个基因的抗病植株,以及若干株 *Pm2* + *Pm21*、*Pm4a* + *Pm21* 和 *Pm2* + *Pm4a* 2 个基因聚合的植株。同时,还对中选植株进行了抗病性人工接种鉴定。结果表明,含有 *Pm21* 的聚合体与 *Pm21* 基因单独存在时抗性相当,均对白粉病免疫,聚合体 *Pm2* + *Pm4a* 的抗性好于 *Pm2* 或 *Pm4a* 单独存在时的抗性。为降低分子标记选择成本,将检测 *Pm4a* 和 *Pm21* 的 2 种 PCR 放在一个反应体系中进行,扩增产物经 1 次电泳,可同时检测出 *Pm4a* 和 *Pm21*,不同引物之间没有明显交叉扩增现象。

**关键词:** 小麦白粉病;基因聚合;分子标记选择;表型选择

中图分类号: S512

## Pyramiding Wheat Powdery Mildew Resistance Genes *Pm2*, *Pm4a* and *Pm21* by Molecular Marker-assisted Selection

GAO An-Li, HE Hua-Gang, CHEN Quan-Zhan, ZHANG Shou-Zhong, CHEN Pei-Du\*

(National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, Jiangsu, China)

**Abstract:** Pyramiding resistance genes has been supposed as one of the most effective methods for preventing breakdown of major gene conferring resistance to powdery mildew within a short period. It is difficult to select pyramids containing more than two resistance genes by common methods. Marker-assisted selection(MAS) is an ideal technology to select target gene in different genetic backgrounds. Pyramiding resistant genes by MAS has been reported. So far, DNA markers linked to wheat powdery mildew resistance genes had been found. In this study, PCR markers tightly linked or co-segregated with *Pm2*, *Pm4a* and *Pm21* genes were confirmed to be applicable under different genetic backgrounds, and used to identify *Pm2*, *Pm4a* and *Pm21* genes in breeding practice. Using these tested markers, a hybrid population with three powdery mildew resistance genes was screened and 100 plants containing *Pm2*, *Pm4a* and *Pm21* were identified after three-cycle MAS. In addition, dozens of plants with two *Pm* genes were also obtained. The results of inoculation test indicated that the plants pyramiding *Pm21* and other genes showed immunity to powdery mildew, as well as the plants possessing only *Pm21*. The plants with single *Pm2* had lower resistance, while those with *Pm4a* showed middle resistance to powdery mildew. Notably, the plants with *Pm2* + *Pm4a* showed much better resistance than those with single *Pm2* or *Pm4a*. To reduce the cost of MAS, two PCRs were performed in one mixture, in which *Pm4a* and *Pm21* were identified respectively. MAS was compared with phenotypic selection also, from which more comprehensive information was provided.

**Key words:** Wheat powdery mildew; Gene pyramiding; Marker-assisted selection; Phenotypic selection

小麦白粉病是由小麦白粉菌 (*Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*) 引起的一种病害,随着矮秆和半矮秆品种的推广及氮素施肥水平的提高,白粉病已成为小麦生产中的一种重要病害。药剂防治不仅成本高,而且会给环境造成污染,因此,培育和推广抗病品种被公认为安全、经济、有效的防治方法。由于小麦白

粉病菌具有群体大、适应范围广、生理小种变异快等特点,具有单个抗病基因的品种容易丧失抗性<sup>[1]</sup>。因此,培育含有多个抗白粉病基因的小麦品种是拓宽抗谱、提高抗性和维持抗性的有效途径之一。传统的表型鉴定和分小种接种鉴定对试验条件和技术要求较高,难以准确、快速选择具有 2 个以上抗性基

基金项目: 国家“863 计划”(2001AA211051, 2003AA207100)资助。

作者简介: 高安礼(1979-),男,硕士,现在河南大学生命科学学院工作。\* 通讯作者: 陈佩度。E-mail: pdchen@njau.edu.cn

Received(收稿日期): 2004-10-13, Accepted(接受日期): 2005-02-13.

因的个体。随着分子生物学技术的发展,已开发出可用于遗传作图的多种分子标记,寻找与抗病基因紧密连锁的 RFLP、RAPD、STS、SCAR 和 SSR 等分子标记,并应用分子标记辅助选择方法在不同世代、不同发育阶段对抗病性进行选择鉴定,为作物抗病性鉴定提供了新的手段<sup>[2-3]</sup>。

南京农业大学细胞遗传研究所在国内较早开展小麦抗白粉病育种的分子标记辅助选择研究,利用分子标记辅助选择方法和“滚动回交法”相结合,育成了携有不同抗白粉病基因的小麦新品系和新品种,并已育成了同时携有 *Pm2* + *Pm4a*、*Pm4a* + *Pm21* 基因的新品系<sup>[6,7]</sup>。本文在此基础上,利用与小麦抗白粉病基因 *Pm2*、*Pm4a*、*Pm21* 紧密连锁的 PCR 标记<sup>[8-11]</sup>,辅助选择聚合 3 个或 3 个以上 *Pm* 基因的新一代抗白粉病小麦品系,以期小麦生产提供抗谱更广、抗性较持久的育种材料。

## 1 材料和方法

### 1.1 聚合杂交及亲本组配方式

先进行分别含有 *Pm2*、*Pm4a*、*Pm21* 基因且遗传背景接近扬麦 158 的不同株系间相互杂交,然后再进行复交。含有 *Pm2* 的亲本为 94-143,含有 *Pm4a* 的亲本为 93-111,含有 *Pm21* 的亲本为 92R137。其中 94-143 的系谱为扬 158<sup>3</sup> × [(TP114 × 扬 5)F<sub>1</sub> × 扬 85-85<sup>4</sup>],93-111(现已定名为扬麦 10 号)的系谱为扬 158<sup>3</sup> × [(Yuma/Cc × 扬 5)F<sub>1</sub> × 扬 85-85<sup>4</sup>],92R137 为含有 *Pm21* 基因的小麦-簇毛麦 6VS/6AL 易位系,其遗传背景为扬麦 5 号,由南京农业大学细胞遗传研究所育成。94-143 和 93-111 由江苏里下河地区农科所提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 方法见参考文献[12]。

1.2.2 PCR 扩增检测 与 *Pm2* 基因连锁的 STS 标记<sup>[10]</sup>引物序列为 Whs350-1: 5'-AGCTGTTGGGTA CAAGTC-3' 和 Whs350-Res: 5'-GCCATCGTTTTCTAC TAG-3'; 与 *Pm4a* 基因共分离的 STS 标记<sup>[11]</sup>引物序列为 R1: 5'-GTGGTGTATCAATGTCATCAGTACTAC-3' 和 C1: 5'-TCCAGTGACCCATCTGCTCATAC-3'; *Pm21* 基因的 SCAR 标记<sup>[9]</sup>引物序列为 RD: 5'-CACCTCCTCCACTAACAGAGG-3' 和 RE: 5'-GTTTGT TCACGTTGAATGAATTC-3'。上述引物由上海捷思基因有限公司合成。

PCR 扩增于 PTC-200 Thermal Cycler 上进行。检

测 *Pm2*、*Pm4a*、*Pm21* 的 3 种 PCR 反应体系一样,其中含有 1 × buffer(终浓度为 10 mmol/L Tris-HCl, 50 μmol/L KCl), 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTP, 每条引物各 0.4 μmol/L, 1 U DNA *Taq* 聚合酶, 25 ~ 50 ng 的模板 DNA, 最后加 ddH<sub>2</sub>O 补至总体积 20 μL。检测 *Pm2* 的 PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 40 s, 60℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 50 s, 循环 20 次, 接着 72℃ 延伸 10 min, 最后 10℃ 保存。检测 *Pm4a* 的 PCR 反应条件只是退火温度变为 56℃ 1 min, 25 个循环, 其余同上。检测 *Pm21* 基因的 SCAR-PCR 反应条件为 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 50 s, 56℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 1.2 min, 循环 30 次, 接着 72℃ 延伸 10 min, 最后 10℃ 保存。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察拍照。

1.2.3 在一个反应中同时加入 2 对引物进行 PCR 扩增 由于检测 *Pm4a* 和 *Pm21* 的 PCR 退火温度相同, 而且所扩出的目的片段大小差异明显, 本研究将这 2 种 PCR 在一个体系中进行。反应体系含有 25 ~ 50 ng 模板 DNA, 1 × buffer(10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl), 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mmol/L dNTP, 每条引物各 0.4 μmol/L, 1 U *Taq* 聚合酶, 最后加 ddH<sub>2</sub>O 补至总体积 20 μL。反应条件为 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 40 s, 56℃ 50 s, 72℃ 1.2 min, 循环 30 次, 最后 72℃ 延伸 10 min, 10℃ 保存。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 溴化乙锭染色, 紫外灯下观察拍照。

1.2.4 抗性鉴定 杂种 F<sub>2</sub>、F<sub>3</sub> 代在大田自然发病条件下进行抗白粉病鉴定, 选择抗病株。从 F<sub>4</sub> 代开始, 在温室条件下, 以南京地区流行的白粉病混合病菌进行人工接种, 当感病对照品种苏麦 3 号发病充分时, 分别在苗期和成株期记载发病情况, 叶片上有白粉菌孢子堆者为感病, 反之为抗病。

## 2 结果和分析

### 2.1 分子标记辅助选择聚合 *Pm2*、*Pm4a* 和 *Pm21* 基因

首先分别用与 *Pm2*、*Pm4a* 连锁的 STS 标记和与 *Pm21* 连锁的 SCAR 标记检测抗、感亲本, 结果表明这些标记可以检测不同遗传背景中相应 *Pm* 基因。

为了得到抗性稳定的多基因聚合体, 进行了 3 轮分子标记选择。在第一轮分子标记选择中, 总共

检测了 86 个单株,选出聚合有 *Pm2* + *Pm4a* + *Pm21* 的单株 34 株。每个中选单株在下一代形成 1 个株行。每个株行随机选出 2 个单株,总共 68 株,构成第二轮分子标记选择群体。经分子标记检测得到聚合有 *Pm2* + *Pm4a* + *Pm21* 的单株共 46 株,其中 13 个株行的被选个体(26 株)全部含有 *Pm2* + *Pm4a* + *Pm21* 基因。继续种植这 26 个单株,每个单株在下一代形成 1 个株行,每个株行再次随机选 5 株共 130 株作为第 3 轮分子标记选择群体。在这一轮分子标记筛选中,选出了 100 株含 3 个基因的个体,其中 18

个株行(每行 5 株)全部都含有 *Pm2* + *Pm4a* + *Pm21* 基因。

图 1 是用与 *Pm2* 基因紧密连锁的 STS 标记的引物,以聚合杂交后代的单株基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增产物的电泳图。从图中可以看出,群体中的大部分植株扩增出了 1 条和亲本 94-143 大小一致的片段。根据已发表文献,这是 *Pm2* 基因的特异条带<sup>[10]</sup>,据此推测所有扩增出这条片段的植株可能都含有 *Pm2* 基因,而没有扩增出这条片段的则不含 *Pm2* 基因。

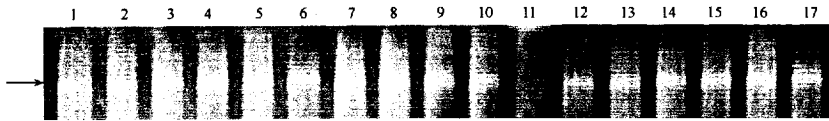


图 1 聚合体 *Pm2* 基因检测结果

Fig.1 Identification of *Pm2* in pyramids

1:94-143;2-17:J1701-J1716,其中11泳道(J1710)未扩增出特异条带。  
1:94-143;2-17:J1701-J1716,but Lane 11(J1710) has no specific band.

图 2 是用与 *Pm4a* 基因共分离的 STS 标记的引物对聚合杂交后代植株 DNA 进行 PCR 后的扩增产物电泳图。从图中可以看出,群体中的大部分植株都扩出了一条和亲本扬麦 10 号大小一致的片段。

根据已发表文献,这是 *Pm4a* 基因的特异条带<sup>[11]</sup>,据此推测所有扩增出这条带的植株可能都含有 *Pm4a* 基因,而没有扩增出这条片段的则不含 *Pm4a* 基因。

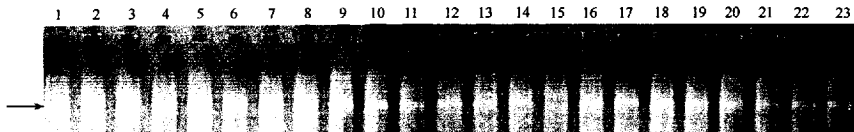


图 2 聚合体 *Pm4a* 基因检测结果

Fig.2 Identification of *Pm4a* in pyramids

1:扬麦10号;2-23:J1701-J1722,其中15泳道(J1714)未扩增出特异带。  
1:Yangmai 10; 2-23:J1701-J1722, but Lane 15(J1714) has no specific band.

图 3 是用 *Pm21* 的 SCAR 引物对聚合杂交后代植株 DNA 进行 PCR 后的扩增产物电泳图。从图中可以看出,群体中大部分植株扩增出了 1 条大小为 1 265 bp 的条带,根据已发表文献,这是与 *Pm21* 基

因共分离的特异条带<sup>[9]</sup>,据此推测所有扩增出这条带的植株可能都含有 *Pm21* 基因,而没有扩增出这条带的则不含有 *Pm21* 基因。

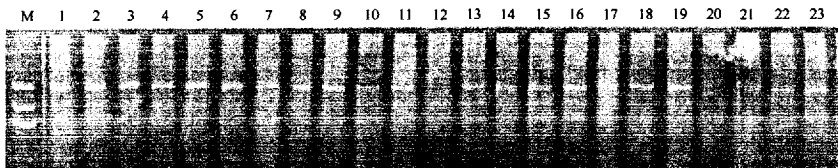


图 3 聚合体 *Pm21* 基因检测结果

Fig.3 Identification of *Pm21* in pyramids

M:  $\phi$ X174; 1: *H. villosa*; 2-23: J1701-J1722, 其中 12 泳道(J1714)和 20 泳道(J1719)未扩增出特异带。  
M:  $\phi$ X174; 1: *H. villosa*; 2-23: J1701-J1722, but Lane 12(J1714) and 20(J1719) have no specific bands.

上述 3 种 PCR 标记的检测结果列于表 1。通过分子标记辅助选择,不仅得到了同时聚合 *Pm2*、*Pm4a* 和 *Pm21* 3 个基因的植株,而且还得到了分别

聚合有 *Pm2* + *Pm21*、*Pm4a* + *Pm21* 和 *Pm2* + *Pm4a* 的若干植株(表未全部列出)。

表 1 分子标记选择的聚合体及其抗病性鉴定结果  
Table 1 Pyramids identified by molecular markers and results of inoculation

Plant code	<i>Pm2</i>	<i>Pm4a</i>	<i>Pm21</i>	Disease resistance	Plant code	<i>Pm2</i>	<i>Pm4a</i>	<i>Pm21</i>	Disease resistance
J1701	+	+	+	R	J1754	+	+	+	R
J1702	+	+	+	R	J1755	+	+	+	R
J1703	+	+	+	R	J1756	+	+	+	R
J1704	+	+	+	R	J1757	+	+	+	R
J1705	+	+	+	R	J1758	+	+	+	R
J1706	+	+	+	R	J1759	+	+	+	R
J1707	+	+	+	R	J1760	+	+	+	R
J1708	+	+	+	R	J1761	+	+	+	R
J1709	+	+	+	R	J1762	+	+	+	R
J1710	-	+	+	R	J1763	+	+	+	R
J1711	+	+	-	LS	J1764	+	+	+	R
J1712	+	+	+	R	J1765	+	+	+	R
J1713	+	+	+	R	J1766	+	-	+	R
J1714	+	-	+	R	J1767	+	+	+	R
J1715	+	+	+	R	J1768	+	+	+	R
J1716	+	+	+	R	J1769	+	+	+	R
J1717	+	+	+	R	J1770	+	+	+	R
J1718	+	+	+	R	J1771	+	+	+	R
J1719	+	+	-	LS	J1772	+	+	+	R
J1720	+	+	+	R	J1773	+	+	+	R
J1721	+	+	+	R	J1774	+	+	+	R
J1722	+	+	+	R	J1775	+	+	+	R
J1723	+	+	+	R	J1776	+	+	+	R
J1724	+	+	+	R	J1777	+	+	+	R
J1725	+	+	+	R	J1778	+	+	+	R
J1726	+	+	+	R	J1779	+	-	+	R
J1727	+	+	+	R	J1780	+	+	+	R
J1728	+	+	+	R	J1781	+	+	+	R
J1729	+	+	+	R	J1782	+	+	+	R
J1730	+	+	+	R	J1783	+	+	+	R
J1731	+	+	+	R	J1784	+	+	+	R
J1732	+	+	+	R	J1785	+	+	+	R
J1733	+	+	+	R	J1786	+	+	+	R
J1734	+	+	+	R	J1787	+	+	+	R
J1735	+	+	+	R	J1788	+	+	+	R
J1736	+	+	+	R	J1789	+	+	+	R
J1737	+	+	+	R	J1790	+	+	+	R
J1738	+	+	+	R	J1791	+	+	+	R
J1739	+	+	+	R	J1792	+	+	+	R
J1740	+	+	+	R	J1793	+	+	+	R
J1741	+	+	+	R	J1794	+	+	+	R
J1742	+	+	+	R	J1795	+	+	+	R
J1743	+	+	+	R	J1796	+	-	+	R
J1744	+	+	+	R	J1797	+	+	+	R
J1745	+	+	+	R	J1798	+	+	+	R
J1746	+	+	+	R	J1799	+	+	+	R
J1747	+	+	+	R	J1800	+	+	+	R
J1748	-	+	+	R	J1801	+	-	+	R
J1749	+	+	+	R	J1802	+	+	+	R
J1750	+	+	+	R	J1803	+	+	+	R
J1751	+	+	+	R	J1804	+	+	+	R
J1752	+	-	+	R	J1805	+	+	+	R
J1753	+	+	+	R	J1806	+	+	+	R

注:“+”表示特异性标记存在;“-”表示特异性标记不存在;LS表示轻度感病。

Note:“+” indicates specific marker is detected;“-” indicates specific marker is not detected;“LS” means light sensitive.

## 2.2 两种 PCR 在一个体系中

图 4 是检测 *Pm4a* 和 *Pm21* 的 2 个反应在 1 个

体系中进行 PCR 扩增后的产物电泳图。作为对照,电泳时在同一块胶上点了单个 PCR 的产物。1~5

泳道是只加入 *Pm21* 的 SCAR 引物扩增的电泳结果, 18~23 泳道是只加入 *Pm4a* 的 STS 引物的 PCR 产物电泳结果, 6~17 泳道是 2 个反应同时进行后扩增产物的电泳结果。从图中可以看出, 在一个管

子中同时进行 2 个 PCR 的体系中, 可同时扩出 *Pm4a* 的特异条带和 *Pm21* 的特异条带, 2 条带大小差异明显, 互不影响。

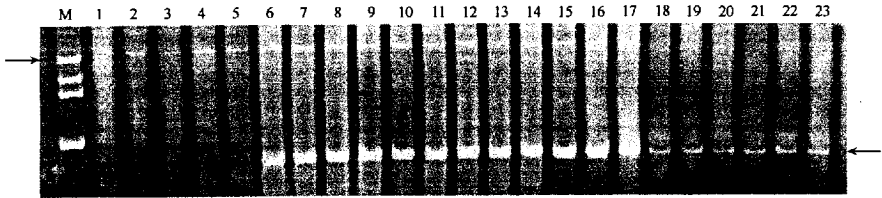


图4 在一个反应体系中同时进行 2 种 PCR 的产物电泳图

Fig. 4 PCR pattern amplified by two pairs of primers

M:  $\phi$ X174; 1: 92R137; 2: J1701; 3: J1702; 4: J1703; 5: J1704; 6: J1701; 7: J1702; 8: J1703; 9: J1704; 10: J1705; 11: J1706; 12: J1707; 13: J1708; 14: J1709; 15: J1710; 16: J1711; 17: J1712; 18: Yangmai 10; 19: J1701; 20: J1702; 21: J1703; 22: J1704; 23: J1705.

1~5 为只加入 *Pm21* 引物; 6~17 为同时加入 2 对引物; 18~23 只加入 *Pm4a* 引物。

From Lanes 1 to 5, only primers of *Pm21* are added; From Lanes 6 to 17, two pairs of primers are added;

From Lanes 18 to 23, only primers of *Pm4a* are added.

### 2.3 聚合多个抗性基因植株的抗性表现

在用分子标记选择聚合多个抗性基因同时, 还对分子标记选出的植株进行了抗病性人工接种鉴定。各种聚合体的抗性表现如图 5、图 6 所示。

从图 5 可以看出, 含有单个 *Pm2* 基因时, 植株感病较重, 表明 *Pm2* 基因已丧失抗性。当 *Pm4a* 基因单独存在时, 叶片上只有少量菌斑, 植株表现为轻度感病。值得注意的是, *Pm4a* + *Pm2* 的植株抗性好于单个 *Pm2* 基因或 *Pm4a* 基因存在时的抗性, 表现为叶片上只有非常少量的菌斑。含有 *Pm21* 的聚合体抗性表现和单个 *Pm21* 存在时的抗性表现相当, 都为免疫(如图 6)。

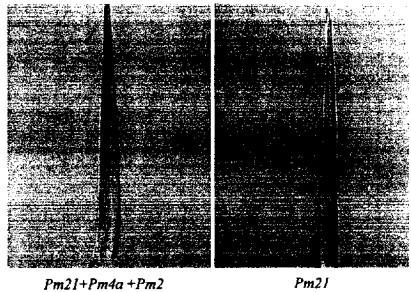


图6 含有 *Pm21* 的抗性表现

Fig. 6 The resistance of plant pyramiding *Pm21*

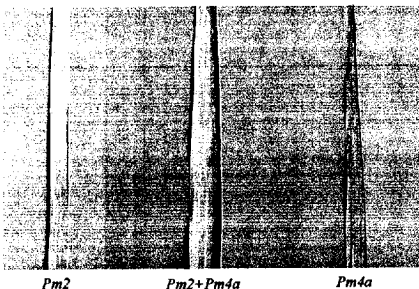


图5 聚合体 *Pm2* + *Pm4a* 植株的抗性表现

Fig. 5 The resistance of plant pyramiding *Pm2* and *Pm4a*

### 3 讨论

在抗病育种中, 含有单个抗性基因的优良品种曾发挥过重要作用, 如小麦中广泛使用的来自黑麦 1R 的抗白粉病基因 *Pm8* 及水稻中抗白叶枯病基因 *Xa-4*, 但长期大规模种植含某单个抗性基因的品种会导致病原菌毒性小种频率迅速增加, 病害大发生。为了培育抗性稳定而又持久的品种, 一般需要将 2 个或 2 个以上不同抗性基因聚合到一个品种中, 以减缓某一毒性生理小种频率的快速增长, 延长抗病品种的使用年限。利用混合菌接种鉴定, 可选出抗多个小种的抗病材料, 但难以判断抗病基因的数目和基因组成; 用分小种人工接种鉴定, 可获得其抗谱和推导所含抗病基因组成, 但对接种鉴定条件和技术要求较高, 对分离世代早期鉴定还受同一单株

难以同时用多个小种接种鉴定的限制。因此,传统的抗病鉴定方法难以准确区分和鉴定抗性基因的个数和具体归属,借助与相应抗病基因紧密连锁的分子标记则可准确鉴定抗性基因的个数和具体归属。本研究利用与 *Pm2*、*Pm4a* 和 *Pm21* 紧密连锁的分子标记对聚合杂交后代群体经过 3 轮分子标记选择,就筛选到了一批含有 *Pm21* + *Pm4a* + *Pm2* 的单株,表明在抗病基因聚合育种中,分子标记选择具有表型选择不可比拟的优越性。目前,多个小麦白粉病抗性基因已找到了紧密连锁的 PCR 标记,利用这些标记进行辅助选择,将大大加快育种步伐,选育出抗谱广、抗性强而持久的新品种。

本研究结果表明,在用白粉菌混合菌种接种鉴定时,含单个 *Pm2* 基因的植株已不抗白粉病,只含 *Pm4a* 的植株有少量白粉菌孢子堆,但是将这 2 个基因聚合在一起时,抗性明显好于只含单个基因的植株,这说明抗性基因聚合后抗性得到了提高。含有 *Pm21* 的聚合体和 *Pm21* 单独存在时抗性相当,均达到了免疫水平。这是由于 *Pm21* 基因对现有的白粉菌生理小理均表现为免疫<sup>[13]</sup>,它的存在遮盖了其他抗性基因的表现。如果不用分子标记辅助选择,就难以选出同时含有其他 *Pm* 基因的植株。利用分子标记辅助选择,可以方便地选出聚合有 *Pm2* + *Pm4a* + *Pm21* 的植株,预期其抗性将比只有单个 *Pm21* 基因的植株更为持久。

尽管分子标记技术在辅助选择育种方面已显示了巨大的优势和潜力,但到目前为止,成功地将分子标记运用于大规模育种选择并最终选育出优良品种的报道很少,其中一个重要原因是分子标记选择的成本和费用较高,一般的育种单位很难开展这方面的工作。所以,寻找一种经济、实用的分子标记检测手段是解决这一问题的有效途径。本研究在利用以 PCR 技术为基础的 STS 标记和 SCAR 标记基础上,尝试了将检测 *Pm4a* 和 *Pm21* 的 2 种 PCR 反应在一个管体系中进行,相比一个反应而言,只是多加了 1 对引物,检测结果只需要 1 次电泳,这样大大节省了人力、物力和时间。但是这种实验方法的前提是 2 种 PCR 反应的退火温度要相同,2 对引物间无相互干扰,目的条带大小差异明显,在电泳时易于分开。

考虑到目的基因和标记之间有可能发生交换,而且抗性表现是基因存在与否的直接证明,本研究对分子标记所选的聚合单株还进行了抗病接种鉴定来加以验证。由于所用标记均为显性标记,凭当代分子标记的有无尚难区分目标基因是否纯合,所以

还须通过下一代单株间是否有分离来判断。本试验所获得的 100 株三基因聚合体中,来自于 18 个株行的 90 个单株在 3 个位点均已纯合。

本研究在  $F_2$ 、 $F_3$  代田间发病条件下初筛,从  $F_4$  代开始用分子标记辅助选择,由于  $F_4$  代后纯合位点的比例大大增加,因而可减少分子标记选择的工作量。在  $F_2$ 、 $F_3$  代,对其他农艺性状进行田间初筛,可使分子标记选出的抗病株的农艺性状总体水平有较大提高,这些株系的中选率将明显提高。

## References

- [1] Chen X-M(陈新民). Opinions on breeding wheat varieties resistant to powdery mildew. *Journal of Triticeae crops* (麦类作物学报), 1999, 19(5):7-9 (in Chinese)
- [2] Huang R, Angeles R, Domingo J, Magpantay G, Singh S, Zhang G, Kumarababel N, Bennet J, Khush C S. Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor Appl Genet*, 1997, 95:313-320
- [3] Liu J, Liu D, Tao W, Li W, Wang S, Chen P, Cheng S, Gao D. Molecular marker-facilitated pyramiding of different genes for powdery mildew resistance in wheat. *Plant Breeding*, 2000, 119:21-24
- [4] Tar'an B, Buchwaldt L, Tullu A, Banniza S, Warkentin T D, Vandenberg A. Using molecular markers to pyramiding genes for resistance to ascochyta blight and anthracnose in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Euphytica*, 2003, 134:223-230
- [5] Zhang Z-Y(张增艳), Chen X(陈学), Zhang C(张超), Xin Z-Y(辛志勇), Chen X-M(陈新民). Selecting the pyramids of powdery mildew resistance genes *Pm4b*, *Pm13* and *Pm21* in wheat assisted by molecular marker. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 2002, 35:789-793 (in Chinese with English abstract)
- [6] Liu J-Y(刘金元), Liu D-J(刘大钧), Chen P-D(陈佩德), Qi L-L(齐莉莉), Cheng S-H(程顺和), Gao D-R(高得荣), Wu R-L(吴荣林). A preliminary practice of powdery mildew molecular marker assisted breeding: breeding wheat for powdery mildew resistance using RFLP markers tightly linked to *Pm2* and *Pm4a* genes. *Journal of Nanjing Agricultural University* (南京农业大学学报), 1997, 20(2):1-5 (in Chinese with English abstract)
- [7] Wang X-Y(王心宇), Chen P-D(陈佩德), Zhang S-Z(张守忠). Pyramiding and marker-assisted selection for powdery mildew resistance genes in common wheat. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 2001, 28:640-646 (in Chinese with English abstract)
- [8] Qi L, Cao M, Chen P, Li W, Liu D. Identification, mapping and application of polymorphic DNA associated with resistance gene *Pm21* of wheat. *Genome*, 1996, 39:191-197
- [9] Liu Z, Sun Q. Development of SCAR markers linked to the *Pm21* gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat. *Plant Breeding*, 1999, 118:215-219
- [10] Mohler V, Jahoor A. Allele-specific amplification of polymorphic sites for the detection of powdery mildew resistance loci in wheat. *Theor Appl Genet*, 1996, 93:1 078-1 082
- [11] Ma Z Q, Wei J B, Cheng S H. PCR-based markers for the powdery mildew resistance gene *Pm4a* in wheat. *Theor Appl Genet*, 2004, 109:140-145
- [12] Gu H-Y(顾红雅), Qu L-J(瞿礼嘉). *Plant Molecular Biology: A Laboratory Manual* (植物分子生物学——实验手册). Beijing: High Education Press, 1998 (in Chinese)
- [13] Qi L-L(齐莉莉), Chen P-D(陈佩德), Liu D-J(刘大钧), Zhou B(周波), Zhang S-Z(张守忠), Sheng B-Q(盛宝伙), Xiang Q-J(向齐君), Duan X-Y(段晓楠), Zhou Y-L(周益林). The gene *Pm21*: A new source for resistance to wheat powdery mildew. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1995, 21(3):257-261 (in Chinese with English abstract)
- [14] Jia J-Z(贾继增). Advance in wheat molecular marker research. *Biotechnology Bulletin* (生物技术通报), 1997, (2):1-5