

普通小麦-奥地利黑麦抗条锈病 衍生系 NR1121 的鉴定

曾兴权^{1,2}, 王长有¹, 刘新伦¹, 吉万全¹

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100; 2 西藏自治区农牧科学院 农业研究所, 西藏 拉萨 850002)

[摘要] 【目的】检测从普通小麦(*Triticum aestivum* L.)与奥地利黑麦杂交后代选育出的、形态学稳定的抗条锈病衍生系 NR1121 的黑麦遗传物质。【方法】在室内条锈病抗性鉴定的基础上,采用细胞学方法、基因组原位杂交、SCAR(Sequence characterized amplified region)标记以及 SSR(Simple sequence repeat)标记、A-PAGE 等方法,对普通小麦-奥地利黑麦衍生系 NR1121 进行分子细胞遗传学鉴定。【结果】NR1121 和奥地利黑麦对条中 32 号生理小种(CY32)免疫,陕麦 611 和携带 Yr9 基因的洛夫林 10、洛夫林 13、秦麦 9 号、丰抗 8 号、陕 229 和偃师 9 号均高感,表明 NR1121 携带的抗条锈病基因来源于奥地利黑麦。NR1121 细胞学稳定,根尖细胞染色体数 $2n=42$,花粉母细胞减数分裂期 $2n=21\text{ II}$;以奥地利黑麦总基因组 DNA 为探针的原位杂交结果显示,NR1121 含有 2 条奥地利黑麦染色体。SCAR 和 SSR 标记(Xgwm 131-1B)检测结果表明,NR1121 携带黑麦 1R 染色体的遗传物质。A-PAGE 结果显示,NR1121 在 ω 区的 *Gli-B1* 位点具有黑麦特征带,说明 NR1121 含有黑麦 1R 染色体短臂上的遗传物质。【结论】NR1121 为农艺性状优良的小麦-黑麦 1R 异代换系,对 CY32 免疫,其抗病基因来源于奥地利黑麦,可能是一个不同于 Yr9 基因的新抗条锈病基因。该种质可作为条锈病抗源用于小麦抗病育种。

[关键词] 奥地利黑麦;基因组原位杂交;SCAR 标记;SSR 标记;异代换系

[中图分类号] S512.034

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)02-0063-06

Identifications of wheat-*Secale cereale* derivative NR1121 resistant to stripe rust

ZENG Xing-quan^{1,2}, WANG Chang-you¹, LIU Xin-lun¹, JI Wan-quan¹

(1 College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Agricultural, Tibet Academy of Agricultural and Animal husbandry, Lhasa, Tibet 850002, China)

Abstract: 【Objective】The aim of this research was to identify the genetic chromatin transferred to NR1121 from *S. cereale*. 【Method】The resistance to stripe rust pathogens of NR1121 was identified. Chromosome analysis, genomic *in situ* hybridization (GISH), A-PAGE, SSR and SCAR were used to detect *S. cereale* chromatin in NR1121. 【Result】NR1121 and Austrian rye were immune to isolate CY32 of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*. Shaanmai 611 and six cultivars (Lovrin 10, Lovrin 13, Qingmai No. 9, Fengkang No. 8, Shaan229 and Yanshi No. 9) with Yr9 were susceptible to CY32. The results indicated stripe rust resistance gene in NR1121 was derived from Austrian rye. NR1121 was stable in cytology with chromosome numbers $2n=42=21\text{ II}$. GISH analysis with Austrian rye genomic DNA as a probe showed that the two chromosomes of NR1121 were transferred from *S. cereale*. SCAR and SSR marker (Xgwm131-1B) detection indicated that NR1121 possessed chromatin of Austrian rye 1R. A-PAGE indicated that *Gli-B1* in

* [收稿日期] 2009-06-12

[基金项目] 国家“973”重大基础研究规划项目(2006CB708208);西北农林科技大学人才基金项目

[作者简介] 曾兴权(1975—),男,四川巴中人,助理研究员,在读博士,主要从事小麦抗病育种研究。

[通信作者] 吉万全(1963—),男,陕西合阳人,教授,博士,博士生导师,主要从事小麦遗传育种研究。

E-mail:jiwanquan2003@126.com

ω region of NR1121 had the specific band of Austrian rye. The result showed NR1121 had chromatin of Austrian rye 1RS.【Conclusion】NR1121 was a wheat-*S. cereale* 1R disomic substitution line and immune to CY32. The resistant gene in NR1121 was derived from Austrian rye and probably a new gene different from *Yr9*. NR1121 could be used as resistant resource of stripe rust for wheat breeding.

Key words: Austria rye(*Secale cereale*); GISH; SCAR; SSR; alien disomic substitution line

小麦条锈病(*Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*)一直是威胁我国西北、华北、长江中下游和西南等地冬、春麦区的重要病害^[1],其大面积爆发流行对小麦生产具有全局性的影响,在流行严重的年份,小麦减产幅度可以达到 60%^[2]。随着世界气候条件的变化、新毒性小种的不断出现以及抗病品种的断层,致使我国小麦条锈病出现了发生早、发展快和发病重等特点^[2-3]。同时,小麦条锈病生理小种的易变性,使得抗性品种在应用几年之后丧失抗病性。因此,创制、引进和鉴定对条锈病新小种具有抗性的新种质资源和基因,是防治小麦条锈病的长期策略。

小麦远缘杂交是导入外源有益基因、创制新的种质资源、丰富小麦遗传基础、对栽培品种进行遗传改良的重要手段之一^[4-7]。外源基因的有效转移与利用,在很大程度上依赖于对导入小麦背景中的外源染色体或染色体片段的准确鉴定。小麦背景下,外源遗传物质的鉴定主要有形态学标记、细胞学、生化标记鉴定(包括同工酶和蛋白质分析等)及原位杂交和分子标记鉴定,在实际工作中常采用多项技术进行综合鉴定。

黑麦(*Secale cereale*)是小麦的近缘属之一,也是小麦的三级基因源。黑麦具有大穗、多小穗、耐寒、耐旱、耐瘠薄、耐盐碱和耐干热风以及抗白粉病、抗锈病、抗麦蚜病和抗麦二叉蚜等优良性状,国内外学者将其广泛应用于小麦的遗传改良,并已取得了显著成效^[8-10]。在已命名的条锈病抗性基因中,只有 *Yr9* 来源于黑麦^[11],携带该基因的洛夫林 10 和洛夫林 13 小麦品种已丧失了对我国当前流行的条锈菌小种 CY32 的抗性^[12],但是经鉴定奥地利黑麦对 CY32 和多个条锈菌生理小种表现免疫,这提示其可能携带有不同于 *Yr9* 的抗性基因。

NR1121 是利用普通小麦(*Triticum aestivum* L.)陕麦 611 与奥地利黑麦杂交,通过对自交后代进行条锈病抗性定向选择培育而获得的形态学稳定、抗条锈病的衍生系。为了利用奥地利黑麦的抗条锈病基因,本研究对 NR1121 进行条锈病抗性、细胞学、基因组原位杂交、SCAR 标记和 SSR 分析,以明晰其遗传组成,鉴定其所含的黑麦遗传物质,为该

材料的进一步研究及在小麦抗病性改良中的利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 小麦 普通小麦-黑麦衍生系 NR1121 及其亲本陕麦 611 和奥地利黑麦,携带抗条锈病基因 *Yr9* 的洛夫林 10、洛夫林 13、秦麦 9 号、丰抗 8 号、陕 229 和偃师 9 号,铭贤 169(作为条锈菌接种成功与否和发病程度的参照),中国春(酸性聚丙烯酰胺凝胶电泳(A-PAGE)对照材料),以上材料均由西北农林科技大学农学院生物技术研究室提供。

1.1.2 条锈菌小种 我国当前流行的条锈菌小种 CY32,由西北农林科技大学植物保护学院提供。

1.2 方法

1.2.1 抗条锈病鉴定 将待鉴定材料和感病对照铭贤 169 盆栽种于温室中,待其生长至一叶一心时接种 CY32,在对照铭贤 169 充分发病时,按 0,0; , 1,2,3 和 4 6 级标准记载反应型,其中 0~2 级判为抗病,3~4 级判为感病。

1.2.2 细胞学鉴定 将待鉴定材料室内发根,当根生长约 1.5 cm 时切取根尖,冰浴 20~24 h,卡诺液固定 48 h,质量分数 1%醋酸洋红染色,体积分数 45%醋酸压片,显微镜下进行染色体计数并照相。4 月上旬,田间取待鉴定材料幼穗,卡诺液固定,质量分数 1%醋酸洋红压片,显微镜下观察染色体的构型并照相。

1.2.3 基因组原位杂交(GISH) 采用 CTAB 法提取奥地利黑麦总基因组 DNA。参照 Han 等^[13]、武军等^[14]的方法进行 GISH,以缺口转移法标记的黑麦基因组 DNA 为探针,以陕麦 611 基因组 DNA 为封阻 DNA,探针与封阻 DNA 用量比例为 1:50。探针杂交信号用荧光素(FITC)检测。经 PI 复染后,在 450~490 nm 波长下观察,杂交信号呈黄绿色,小麦染色体呈红棕色。用 Nikon Eclipse E600(日本)显微镜在 Spot 系统下照相。

1.2.4 SCAR 标记 试验所用引物为黑麦基因组特异引物,AF1:5'-GGAGACATCATGAAACATT

TG-3';AF4: 5'-CTGTTGTTGGGCAGAAA G-3',引物均由上海生物工程有限公司合成。PCR 扩增反应在 S1000 Thermal Cycler 上进行,反应体系及反应程序参照 Dou 等^[15]的方法进行。

1.2.5 SSR 标记 利用 Röder 等^[16]发表的 275 对简单重复序列(SSR) 标记位点引物,进行 SSR 分析。PCR 反应在 S-1000 Thermal Cycler 上进行,PCR 反应体系为 20 μL: Taq DNA 聚合酶(TaKa-Ra,5 U/μL) 0.2 μL,10×PCR 反应缓冲液(Taka-ra) 2 μL,dNTP(10 mmol/L)1.6 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 0.8 μL ,40 ng 模板 DNA 2 μL,灭菌水 12.6 μL。反应条件:94 ℃变性 3 min;94 ℃变性 45 s,50 ℃(或 55,60 ℃,取决于引物)退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,35 循环;最后 72 ℃充分延伸 10 min。PCR 产物采用 80 g/L 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,160 V 恒压电泳 3.5 h,银染显影。

1.2.6 A-PAGE 分析 取单粒种子,研碎后按 1 mg 样品加 5 μL 提取液的比例加入提取液,室温浸

提过夜,10 000 r/min 离心 10 min^[17],点样电泳。电泳采用 DYY-10C 型电泳仪和 DYCZ-4A 型电泳槽进行,凝胶溶液质量浓度(T)100 g/L,1 倍体积的冰醋酸-甘氨酸电极缓冲液在 500 V 条件下恒压电泳,电泳时间为甲基绿前沿指示剂迁移至板底所需时间的 3 倍。最后用质量分数 1%考马斯亮蓝和 10%三氯乙酸染色过夜,自来水脱色,凝胶成像仪照相。

2 结果与分析

2.1 NR1121 的条锈病抗性鉴定

条锈病抗性鉴定结果(表 1)显示,在参照铭贤 169 充分发病时,奥地利黑麦和 NR1121 对 CY32 免疫,陕麦 611 表现高感;携带 Yr9 基因的 6 份材料均表现为高感,丧失了对 CY32 的抗性。结果表明,奥地利黑麦的抗条锈病基因已转移到 NR1121 中,而且该基因不同于 Yr9 基因,可能是一个来源于黑麦的新抗条锈病基因。

表 1 供试小麦对 CY32 小种的抗性鉴定结果

Table 1 Identification result of resistance to CY32 of materials

材料 Material	反应型(苗期) Infection type(Seedling)	材料 Material	反应型(苗期) Infection type(Seedling)
洛夫林 10 Lovrin 10	4	偃师 9 号 Yanshi No. 9	4
洛夫林 13 Lovrin 13	3	奥地利黑麦 Austrian rye	0
秦麦 9 号 Qingmai No. 9	3	NR1121	0
丰抗 8 号 Fengkang No. 8	4	陕麦 611 Shaanmai 611	4
陕 229 Shaan 229	4	铭贤 169 Mingxian 169	4

2.2 NR1121 的细胞学鉴定

细胞学鉴定结果表明,奥地利黑麦的根尖细胞染色体数为 $2n=14$ (图 1)。NR1121 根尖细胞染色

体数为 $2n=42$ (图 2),花粉母细胞减数分裂期染色体构型为 $2n=21 \text{ II}$ (图 3)。



图 1 奥地利黑麦根尖细胞染色体数($2n=14$)
Fig.1 Chromosome number of root tip cell
of Austria rye ($2n=14$)



图 2 NR1121 根尖细胞染色体数($2n=42$)
Fig.2 Chromosome number of root tip cell
of NR1121 ($2n=42$)

2.3 NR1121 的 GISH 分析

在 NR1121 根尖体细胞染色体原位杂交制片

中,清楚地显示出 2 条被标记的带黄绿色荧光的染色体,其余染色体均无黄绿色荧光(图 4),表明

NR1121 中含有 2 条奥地利黑麦染色体。结合细胞学鉴定结果认为, NR1121 为普通小麦-奥地利黑麦

二体异代换系。

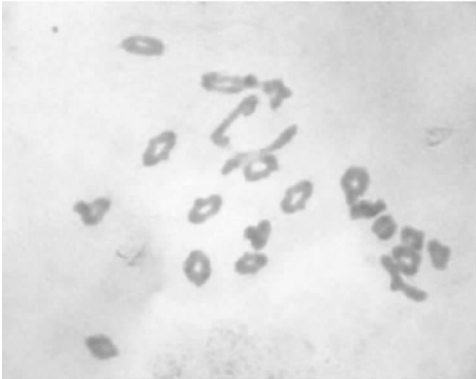


图 3 NR1121 花粉母细胞染色体构型($2n=21\text{ II}$)
Fig. 3 Chromosome configuration of NR1121($2n=21\text{ II}$)

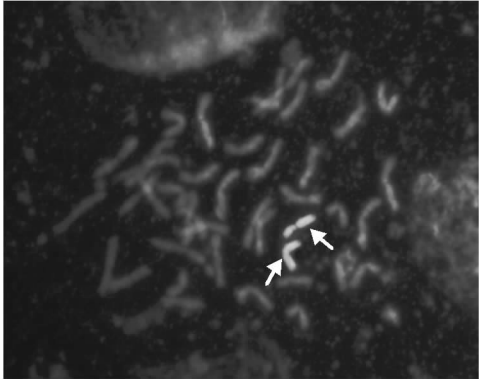


图 4 NR1121 基因组原位杂交结果
箭头示黑麦染色体
Fig. 4 GISH result of NR1121
Arrow;Chromosome of Austria rye

2.4 NR1121 的 SCAR 和 SSR 分析

用奥地利黑麦基因组特异引物 AF1 和 AF4 对 NR1121 进行 SCAR 标记分析, 结果表明, 从 NR1121 中能够扩增出预期的 1 500 bp 的特异性条带(图 5-A), 进一步证实 NR1121 含有奥地利黑麦遗传物质。利用 275 对 SSR 引物, 对陕麦 611、

NR1121 和奥地利黑麦进行分析, 结果显示, 引物 Xgwm131-1B 从 NR1121 中扩增出奥地利黑麦 120 bp 的特异性条带(图 5-B)。SSR 分析表明, 奥地利黑麦的遗传物质已经转移到了 NR1121 中, 根据这些 SSR 位点所在染色体位置, 推断 NR1121 携带有奥地利黑麦 1R 染色体上的遗传物质。

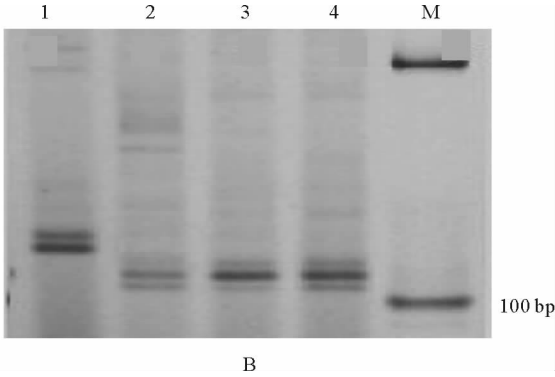
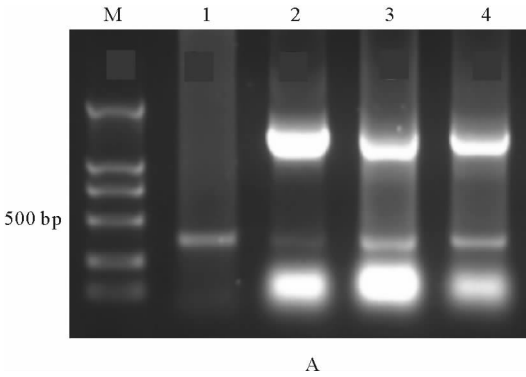


图 5 NR1121 的 SCAR(A)和 SSR(B,引物为 Xgwm131)标记分析
M, marker(DL2000);1. 陕麦 611;2. 奥地利黑麦;3、4. NR1121

Fig. 5 SCAR (A)and SSR(B,Primer is Xgwm131) marker analysis of NR1121
M, marker(DL2000);1. Shaanmai 611;2. Austria rye;3,4. NR1121

2.5 NR1121 的 A-PAGE 分析

NR1121 的 A-PAGE 结果见图 6。根据中国春醇溶蛋白的 A-PAGE 电泳图谱(图 7)及其 6 个主要位点的等位基因组成^[18], 并结合 NR1121 和黑麦醇溶蛋白的 6 个主要位点的等位基因分布可知, NR1121 在 ω 区的 *Gli*-B1 位点具有黑麦特征带, 由此证实 NR1121 含有黑麦 1R 染色体短臂(1RS)上的遗传物质。

3 讨 论

黑麦属是许多重要的抗病和抗逆基因的来源, 尤其是其 1R 染色体短臂上所携带的抗病基因, 对世界范围内的小麦增产和抗病性提高产生了积极影响。

小麦近缘种属遗传物质导入到普通小麦后, 常用的检测手段包括表型观察、细胞学鉴定、原位杂交、生化和分子标记技术等。表型观察能够初步推

断外源遗传物质是否导入到普通小麦中,但要确认外源遗传物质的导入以及获得更多关于导入遗传物质的信息,还需要借助其他手段。后 4 种方法都能用来鉴定小麦近缘属遗传物质是否导入普通小麦,其中原位杂交可以检测到整个染色体或染色体臂,甚至很小的染色体片段;SSR 多态性丰富,随机分布

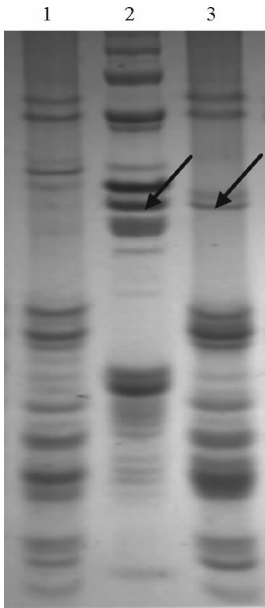


图 6 NR1121 的 A-PAGE 电泳结果
1. 陕麦 611;2. 奥地利黑麦;3. NR1121;
箭头示黑麦特异带

Fig. 6 A-PAGE analysis of NR1121
1. Shaanmai 611;2. Austria rye;3. NR1121;
Arrow;Band of Austria rye

本研究发现,从 NR1121 中可以扩增出奥地利黑麦特异性条带的 SSR 引物 Xgwm131 对应的位点位于小麦 1B 染色体上^[16]。麦醇溶蛋白是单体蛋白,主要是由位于第 1、第 6 部分同源群染色体短臂上的 *Gli-1* (*Gli-A1*、*Gli-B1*、*Gli-D1*) 和 *Gli-2* (*Gli-A2*、*Gli-B2*、*Gli-D2*) 位点编码的。醇溶蛋白电泳结果显示,NR1121 在 ω 区的 *Gli-B1* 位点具有黑麦特征带,而在该位点陕麦 611 没有谱带,由此进一步证实 NR1121 含有黑麦 1RS 的遗传物质。研究表明,SSR 标记 Xgwm582 与 *Yr9* 基因的遗传距离为 3.7 cM^[21]。而目前含有 *Yr9* 基因的小麦品种对小麦条锈菌 CY32 小种已经完全丧失了抗性,本研究对携带有 *Yr9* 基因的洛夫林 10、洛夫林 13、秦麦 9 号、丰抗 8 号、陕 229 和偃师 9 号抗病性的检测结果进一步证实,其对 CY32 小种已经完全丧失了抗性。目前,已报道的定位在小麦 1B 染色体上的抗条锈病基因有 10 个^[11]。所有携带 *Yr3* 或 *Yr10* 的小麦品

于小麦整个基因组中,为小麦细胞学遗传材料的鉴别提供了有力的工具。通过小麦现有的 SSR 标记和 RFLP 标记遗传连锁图谱,根据标记所在的染色体位置,可以进行外源遗传物质的分子标记及同源群归属等方面的研究^[19-20]。

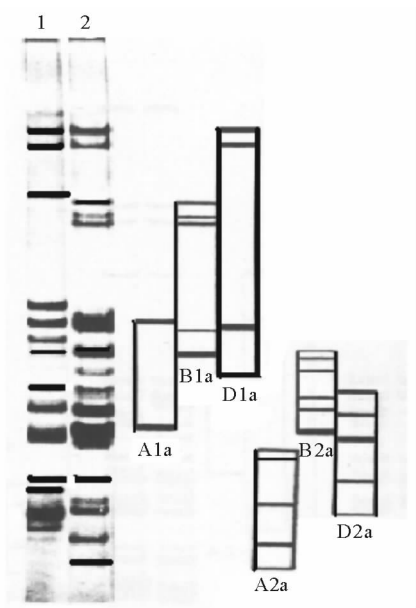


图 7 中国春醇溶蛋白的 A-PAGE 电泳图谱及其 6 个主要位点的等位基因组成
1. NR1126;2. 中国春

Fig. 7 A-PAGE patterns of the gliadin alleles in CS
1. NR1126;2. Chinese spring

种对 CY32 小种已经完全丧失了抗性^[22-23],*Yr10* 来源于斯卑尔脱小麦^[24],*Yr21* 是一个苗期和成株期抗条锈病基因^[11],*Yr29* 基因是具有中等抗性水平的成株期抗性基因,其与叶锈抗性基因 *Lr46* 紧密连锁^[25],*YrAlp* 基因是存在于地方品种 Alpowa 中的部分显性抗性基因^[26],*YrXu* 存在于 PI31^[27],*Yr24* 和 *Yr26* 来自硬粒小麦,均与 Xgwm11 标记位点连锁^[11,28];图谱分析 *Yr15* 位于 Xgwm413-1B 位点附近,来自野生二粒小麦品系 G25^[29]。*Yr9* 及与其连锁的基因 *Lr26*、*Sr31* 起源于黑麦^[11],定位于 1BL/1RS,已丧失对 CY31 和 CY32 的抗性。综上所述,依据抗病性鉴定结果,小麦新种质 NR1121 携带的可能是一个新的抗条锈病基因。

小麦异代换系的选育既具有实际意义,又具有理论价值,异代换系可以把供体种属的一些优良基因导入到受体小麦中。品种间的染色体代换可以用于鉴定被代换染色体所载基因的位置及其遗传效

应,研究新的遗传背景对被代换基因的影响方式;属间的染色体代换可以用于亲缘种属的基因定位,探讨亲缘种属染色体在小麦背景下的遗传作用,研究小麦及其亲缘种属间的进化关系,还可作为向小麦转移外源有益基因的基本材料^[30]。本研究综合运用细胞学、基因组原位杂交、分子标记等方法对 NR1121 进行检测,结果表明, NR1121 为农艺性状优良的小麦-黑麦 1R 异代换系,其抗病基因来源于奥地利黑麦,可作为培育小麦抗条锈病种质的抗源,这对生产实践和理论研究均有一定的利用价值。

[参考文献]

[1] 李振岐,曾士迈. 中国小麦锈病 [M]. 北京:中国农业出版社, 2002.
Li Z Q, Zeng S M. Wheat rust in China [M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2002. (in Chinese)

[2] 许喜堂,赵惠青. 控制小麦条锈病的现状与设想 [J]. 北京农学院学报, 1999, 14(2): 8-12.
Xu X T, Zhao H Q. Present stage and assumption of controlling wheat yellow rust [J]. Journal of Beijing Agricultural College, 1999, 14(2): 8-12. (in Chinese).

[3] 万安民,赵中华,吴立人. 2002 年我国小麦条锈病发生回顾 [J]. 植物保护, 2003, 29(2): 5.
Wan A M, Zhao Z H, Wu L R. Reviews of occurrence of wheat stripe rust disease in 2002 in China [J]. Plant Protection, 2003, 29(2): 5. (in Chinese)

[4] 李振声,容 珊,陈淑阳. 小麦远缘杂交 [M]. 北京:科学出版社, 1985.
Li Z S, Rong S, Chen S Y. Distance species source hybrid in wheat [M]. Beijing: Science Press, 1985. (in Chinese)

[5] Sears E R. Transfer of alien material to wheat [G]//Evans L T, Peacock W J. Wheat Science-Today and Tomorrow. Cambridge: Cambridge University Press, 1981: 75-89.

[6] Sharma H C, Gill B S. Current status of wide hybridization in wheat [J]. Euphytica, 1983, 32: 17-31.

[7] Friebe B, Jiang J, Raupp W J. Characterization of wheat-alien translocations conferring resistance to diseases and pests; current status [J]. Euphytica, 1996, 91: 59-87.

[8] 王 静,王献平,纪 军,等. 小麦-黑麦 1RS/1BL 新易位系的创制和分子细胞遗传学鉴定 [J]. 作物学报, 2006, 32(1): 30-33.
Wang J, Wang X P, Ji J, et al. Creation of novel wheat-rye 1RS/1BL translocation lines and characterization by molecular cytogenetics [J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(1): 30-33. (in Chinese).

[9] Friebe B, Kynast R G, Hatchett J H, et al. Transfer of wheat-rye translocation chromosomes conferring resistance to hessian fly from bread wheat into durum wheat [J]. Crop Science, 1999, 39: 1692-1696.

[10] 吴金华,王新茹,王长有,等. 含抗白粉病新基因普通小麦-黑

麦 1R 二体异附加系的遗传学鉴定 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(1): 153-158.

Wu J H, Wang X R, Wang C Y, et al. Genetic identification of wheat-rye 1R alien disomic additional line with novel resistant gene to powdery mildew [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2009, 17(1): 153-158. (in Chinese)

[11] Chen X M. Epidemiology and control of stripe rust *puccinia striiformis* f. sp. *Triticum* wheat [J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2005, 27: 314-337.

[12] 王保通. 中国小麦条锈菌优势种群预测及主要流行菌系的 AFLP 指纹分析 [D]. 陕西 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
Wang B T. Forecasting for the dominant population of *puccinia striiformis* west and analyzing of AFLP fingerprint to the major epidemic strains in China [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2007. (in Chinese)

[13] Han F P, Liu B, Fedak G, et al. Genomic constitution and variation in five partial amphiploids of wheat-*Thinopyrum intermedium* as revealed by GISH, multicolor GISH and seed storage protein analysis [J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 1070-1076.

[14] 武 军,李立会,王 辉,等. 普通小麦-冰草衍生后代中抑制成穗新种质的外源物质检测与遗传分析 [J]. 中国农业科学, 2007, 40(4): 850-854.
Wu J, Li L H, Wang H, et al. Characterization of spike inhibition wheat germplasm derived from wheat *Agropyron cristatum* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2007, 40(4): 850-854. (in Chinese)

[15] Dou Q W, Chen P D, Xie J F. Cytological and molecular identification of alien chromosome in giant spike wheat germplasm [J]. Acta Botanica Sinica, 2003, 45(9): 1109-1115.

[16] Röder M S, Korzun V, Wendehake K, et al. A microsatellite map of wheat [J]. Genetics, 1998, 149: 2007-2023.

[17] 郝小燕,王红玲,刘 春,等. 改进的 ISTA 麦醇溶蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳方法在小麦品种真实性和纯度鉴定中的应用 [J]. 种子, 2006, 25(2): 10-12, 16.
Hao X Y, Wang H L, Liu C, et al. A improved PAGE electrophoresis method by ISTA gliadin applied to the reality and purity of identification of wheat variety [J]. Seed, 2006, 25(2): 10-12, 16. (in Chinese)

[18] 王海燕. 云南、西藏与新疆小麦的遗传多样性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2005.
Wang H Y. Research on the genetic diversity of Yunnan, Tibetan and Xinjiang wheat [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005. (in Chinese)

[19] Peil A, Schumann E, Schubert V, et al. Molecular markers for *Aegilops markgrafii* chromosomes [C]//Proceedings of the 9th International Wheat Genetics Symposium. Canada: University Extension Press, University of Saskatchewan, 1998, 3: 140-141.