

与瓠瓜品系 J083 白粉病抗性基因连锁的 SCAR 分子标记

王玲平, 吴晓花, 汪宝根, 徐沛, 李国景

(浙江省农业科学院 蔬菜研究所, 浙江 杭州 310021)

摘要:以瓠瓜抗白粉病品系 J083 和感病品系 J73 及它们的 F₁ 代和 F₂ 代分离群体为试验材料, 经接种鉴定和抗性遗传规律分析表明:瓠瓜品系 J083 对白粉病的抗性受单隐性基因控制;从 100 对扩增片段长度多态性(AFLP)引物组合中获得稳定的多态性引物组合 1 对, 即 E-ATG/M-CTC;经回收、测序, 特异片段全长为 105 bp, 并成功将其转化为序列特征性扩增区域(SCAR)标记;经连锁分析, 该 SCAR 标记与白粉病抗性基因的连锁距离为 9.6 cM, 将其命名为 GPDS_{ATG/CTC75}。此标记可用于瓠瓜抗白粉病品种的辅助选育。

关键词:瓠瓜;白粉病;序列特征性扩增区域;分子标记

中图分类号:Q 78;S 652.9 文献标志码:A

WANG Ling-ping, WU Xiao-hua, WANG Bao-gen, XU Pei, LI Guo-jing (*Institute of Vegetables, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China*)

SCAR marker linked to resistance gene of powdery mildew in bottle gourd [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] breeding line J083. Journal of Zhejiang University (Agric & Life Sci), 2011, 37(2):119-124

Abstract: The genetic analysis of bottle gourd [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] resistance to powdery mildew was evaluated with a highly resistant breeding line J083 and a highly susceptible breeding line J73 and their F₁, F₂ populations. The results showed that the resistance to powdery mildew in J083 was controlled by a single recessive gene. From 100 amplified fragment length polymorphism (AFLP) primer pair combinations, a pair of stable polymorphic AFLP markers (E-ATG/M-CTC), 105 bp in size was obtained. The AFLP fragment was then converted to a sequence-characterized amplified region (SCAR) marker, named as GPDS_{ATG/CTC75}. This SCAR marker could be used effectively for molecular marker-assisted selection (MAS) in breeding programs to develop bottle gourd cultivars resistance to powdery mildew.

Key words: bottle gourd; powdery mildew; sequence-characterized amplified region; molecular marker

瓠瓜为我国重要的瓜类蔬菜作物之一,在我国长江流域及以南地区广泛栽培。瓠瓜白粉病是瓠瓜生产上 2 大主要病害之一,危害十分严重,自苗期至收获期均可发生。瓠瓜白粉病由瓜类白粉菌(*Sphaerotheca fuliginea*)侵害所致,在连作田块发病更盛^[1]。目前生产上应用的瓠子类品种

均不抗白粉病,只能依靠施用药剂或实行轮作换茬来防治,但防治效果不理想。选育和应用抗白粉病品种是最经济、安全和有效的途径。

传统的抗病育种依赖于抗性鉴定和植株表型选择,要求有丰富的经验和长达数年甚至十几年的时间,并需要创造特殊环境进行筛选鉴定,

收稿日期:2010-08-03

基金项目:浙江省科技厅优先主题资助项目(2007C12003)。

作者简介:王玲平(1975—),女,山西洪洞人,助理研究员,从事蔬菜育种研究。E-mail:zjq2006@163.com。

通信作者:李国景,男,研究员,从事蔬菜育种研究。Tel:0571-86403050;E-mail:guojing_li@yahoo.com.cn。

且常受病害发病条件的限制,尤其是如白粉病菌这类专性寄生菌,鉴定时期常受季节限制.如何提高选择效率、减小育种进程中的盲目性是未来抗病育种的关键.分子标记辅助选择(molecular marker-assisted selection, MAS)是结合现代分子生物学与传统遗传育种学,借助分子标记对育种材料从 DNA 水平上进行选择,从而快速选择得到具有目的基因后代的方法.分子标记辅助育种研究在瓜类蔬菜如黄瓜、甜瓜、南瓜等上面都得到了广泛的应用^[2-4],如张桂华等^[2]利用黄瓜抗感白粉病杂交组合的 F₂ 代群体为材料,应用分离群体分组分析(bulked segregant analysis, BSA)法,获得了图距为 5.56 cM 的 AFLP 分子标记 P18M47.但是目前我国对瓠瓜的研究远远落后于其他蔬菜作物.大部分的研究集中在不同栽培方式的标准化栽培技术、白粉病危害症状、防御措施和生理特性上.魏国强等^[5]研究了硅对瓠瓜白粉病的抗性作用,认为硅酸盐有助于提高酚类代谢的酶活性,一定浓度的硅可以显著降低瓠瓜白粉病的病情指数.美国康奈尔大学园艺系的 Robinson 等^[6]对瓠瓜也有一定的研究,曾指出瓠瓜对白粉病的抗性受 1 对隐性基因控制.而国内有关利用分子标记技术进行瓠瓜分子标记辅助育种、分子遗传图谱构建、重要农艺性状基因的定位分析等方面的研究均未见报道.

本研究以高抗白粉病瓠瓜种质 J083 为供体亲本,与高感白粉病自育优系 J73 为受体亲本杂交,通过对杂交后代进行自交,构建具有不同基因型的分离群体;应用 BSA 法获得与瓠瓜抗白粉病基因连锁的 AFLP 分子标记,并将其转化为序列特征性扩增区域(SCAR)标记;经实践验证,该 SCAR 标记可用于标记辅助抗白粉病种质资源的发掘、鉴定与杂交新组合的选择.本研究的开展对提高我国瓠瓜种质创新与利用水平具有重要意义.

1 材料与方法

1.1 植物材料和白粉病抗性分离群体的构建

本实验供试瓠瓜材料由浙江省农业科学院蔬菜研究所提供.以瓠瓜高抗白粉病种质 J083 和高感白粉病种质 J73 为双亲,构建

F₁、F₂ 代群体.瓠瓜白粉病接种与分级鉴定在浙江省农业科学院蔬菜研究所试验用地进行,父母本、F₁ 和 F₂ 代均播于装有经灭菌的营养土的育苗钵内,于瓠瓜幼苗 3 叶 1 心期进行,采用小孢子悬浮液接种法接种,孢子浓度为 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$,接种后常规管理,接种处理 10~12 d 后调查病情指数^[7].

病情分级标准为:0 级:无症状;1 级:病斑面积占叶面积的 1/3 以下,白粉模糊不清;2 级:病斑面积占叶面积的 1/3~2/3,白粉较为明显;3 级:病斑面积占叶面积的 2/3 以上,白粉层较厚、连片;4 级:白粉层浓厚,叶片开始变黄、坏死;5 级:叶片坏死斑面积占叶面积的 2/3 以上.

病情指数 = $\sum(\text{病级代表值} \times \text{该病发病株数}) / (\text{调查总株数} \times \text{划分病情的最高代表值}) \times 100$.

抗性分级标准:抗病(病情指数为 0~35),中抗(35~55),感病(55~75),高感(大于 75).

AFLP 分析所需 *EcoRI*、*MseI*、T4 DNA 连接酶、TaqE、dNTPs、接头和 PCR 引物均购自上海生物工程有限公司,其他的分子生物学试剂购自 Promega、Takara、Sigma 等公司.所用的菌株为 *Escherichia coli* DH5 α ;载体为 pGEM-T-easy-vector.凝胶电泳系统为英国 C. B. S 公司的测序电泳槽,PCR 仪为 Biometra 公司的 T-gradient PCR 仪.

1.2 基因组 DNA 的提取和 DNA 池的构建

采用 CTAB 法^[8]提取基因组 DNA.应用 BSA 法,各取 7 株高抗和高感单株 DNA 等量混合,构建成白粉病抗、感 DNA 池用于 AFLP 多态性引物的筛选.

1.3 AFLP 分析和多态性标记的克隆、测序

AFLP 分析主要参考 Vos 等^[9]的方法进行.酶切采用 *EcoRI* 和 *MseI* 一步法,选用无选择性碱基进行预扩增,选择性扩增引物选择含有 3 个选择性碱基的引物,选择性扩增产物在 6% 聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离.用 70 W 恒功率电泳 1.5 h 左右.采用简易银染法^[10]染色.将多态性差异片段用刀片从变性聚丙烯酰胺凝胶上切下,加入 40 μL TE, 60 $^{\circ}\text{C}$ 温育 30 min.以此为模板,用原来的 AFLP 引物组合进行 PCR 扩增,PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进

行电泳,扩增产物经回收纯化后,连接到 pGEM-T-easy 载体上,重组阳性质粒送上海生物工程技术有限公司测序.

1.4 连锁分析

利用 Mapmaker (version 3.0)^[11] 软件对 F₂ 代分离群体单株的标记和性型表现数据进行连锁分析,并利用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传图距(cM)^[12].

1.5 AFLP 标记转化为 SCAR 标记

将差异片段克隆测序后,根据2端序列设计特异引物,对双亲和 F₂ 代单株及部分自选品种进行 PCR 扩增验证.反应程序为:先 94 °C 预变性 4 min, 然后进行 94 °C 30 s, 48 °C (根据设计的引物确定) 30 s, 72 °C 1 min 的 30 个循环扩增;最后 72 °C 延伸 7 min. 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳检测.

2 结果与分析

2.1 瓠瓜白粉病抗性的遗传规律分析

对抗病亲本 J083、感病亲本 J73 及其 F₁、F₂ 代群体进行苗期抗病接种鉴定,结果(表1)表明, J083、J73 和 F₁ 代分别表现为抗病、感病和感病,说明瓠瓜 J083 对白粉病的抗性由隐性基因控制.对 117 株 F₂ 代群体的抗性鉴定结果表明:抗病单株共 24 株,感病单株 93 株,抗病:感病为 1:3.875. 经 χ^2 适合性测验, $\chi^2 = 1.2563$, 小于 $\chi^2_{0.05}$ 的值 3.841, 符合 3:1 的分离比例,说明瓠瓜 J083 对白粉病的抗性由单基因控制.综合双亲和 F₁ 代、F₂ 代株系的苗期鉴定结果,说明瓠瓜 J083 对白粉病的抗性由单隐性基因控制.

表 1 不同瓠瓜群体白粉病抗性田间接种鉴定结果
Table 1 Result of field inoculation with *S. fuliginea* of different bottle gourd populations

群体	总株数	抗性					
		I	HR	R	MR	S	HS
J083	52	47	5	0	0	0	0
J73	46	0	0	0	0	39	7
F ₁	50	0	0	0	5	39	6
F ₂	117	0	15	8	1	78	15

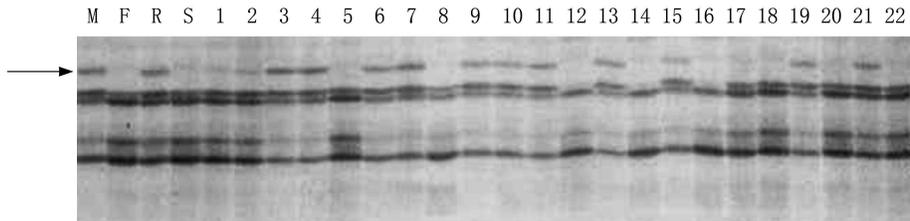
注: J083: 抗病亲本; J73: 感病亲本; F₁: J083 × J73 的 F₁ 代群体; F₂: J083 × J73 的 F₂ 代群体; I: 免疫; HR: 高抗; R: 抗病; MR: 中抗; S: 感病; HS: 高感.

2.2 AFLP 引物筛选

采用 100 对 AFLP 引物组合,共扩增出 2 516 条带,各引物组合间差异较大,多的可扩增出 50 条,少的仅有 11 条,平均每对引物组合为 25.16 条;多态性条带共 102 条,其中 32 对引物组合未出现多态性条带,平均每对引物组合扩增的多态性条带为 1.02 条.筛选出在抗病池、感病池和双亲 DNA 池间稳定表现多态的引物组合 1 对: E-ATG/M-CTC.

2.3 多态性引物组合在 F₂ 代单株中的验证及连锁距离的确定

对 F₂ 代 117 个单株进行 PCR 验证.结果表明,引物组合 E-ATG/M-CTC 与瓠瓜白粉病抗性表型存在连锁关系,在 93 株感病单株中有 9 株出现该条带,在 24 株抗病单株中均出现该条带(图1).利用 Mapmaker (version 3.0) 软件对 F₂ 代分离群体单株的标记和性型表现数据进行连锁分析,标记 E-ATG/M-CTC 与瓠瓜白粉病抗性基因的连锁距离为 9.6 cM.



M: 抗病亲本; F: 感病亲本; R: 抗病池; S: 感病池; (1~22): 依次为 F₂ 代的 1~22 号单株. 箭头示抗病单株中出现的特异带.

图 1 引物组合 E-ATG/M-CTC 对部分 F₂ 代单株的验证结果

Fig. 1 Identification result of E-ATG/M-CTC for part of F₂ individual

2.4 SCAR 标记的转化和单株验证

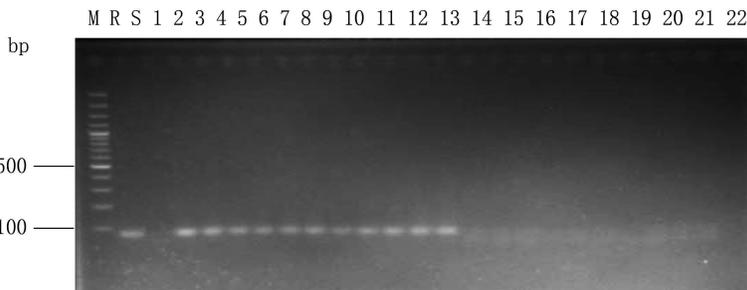
对 E-ATG/M-CTC 标记进行回收、纯化、克隆和测序. 测序结果为 GACTGCGTACCAATTCATGAAAGAAAATCGGCTTGGTGAAATATCGGAGATGCTTTTTGTCTTGAATAATGGGAAGGGAGTGCTGGAGTTACTCAGGACTCATC, 片段长度为 105 bp. 根据 E-ATG/M-CTC 片段测序结果应用软件 Primer Premier 5.0 设计引物. 设计的引物序列为: 引物 1: CATGAAAGAAAATCGGCTTGG; 引物 2: TAACTCCAGCACTCCCTTCCC. 预期扩增产物为 75 bp.

应用针对 E-ATG/M-CTC 差异片段设计的 SCAR 引物对双亲基因组和 F₂ 代单株进行

扩增, 结果与 AFLP 分析一致, 在抗病亲本中扩增出 1 条约 75 bp 的条带, 而感病亲本中则无此条带(图 2). 经统计分析表明, 在 24 株抗病单株中均出现该条带, 在 93 株感病单株中有 9 株出现该条带. PCR 结果与 AFLP 结果一致, 说明此 SCAR 标记转化成功, 将其命名为 GPDS_{ATG/CTC75}.

2.5 SCAR 标记在抗白粉病分子标记辅助选择中的应用

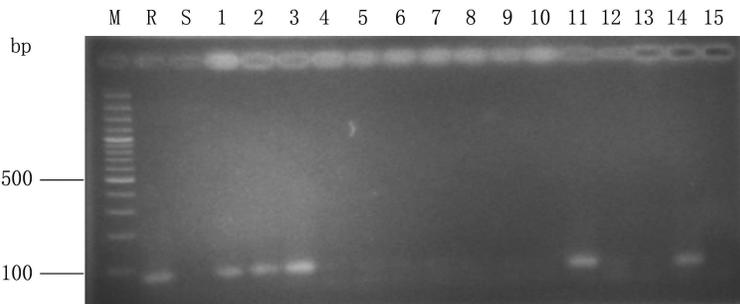
选取不同的瓠瓜地方品种和不同的瓠瓜组合材料, 应用 GPDS_{ATG/CTC75} 标记通过 PCR 扩增, 对瓠瓜不同种质材料进行白粉病抗性鉴定(图 3)表明, 在几种抗性品种和一些组合中均出现该目的条带, 与田间鉴定结果基本相符, 符合率约 91%.



M: 100 bp DNA 分子量梯度标记; R: 高抗白粉病亲本 J083; S: 高感白粉病亲本 J73; (1~11): F₂ 代抗病单株; (12~22): 感病单株.

图 2 SCAR 标记 GPDS_{ATG/CTC75} 在亲本和部分 F₂ 代单株中的扩增结果

Fig. 2 PCR-amplified results of GPDS_{ATG/CTC75} marker in parents and 22 bottle gourd samples



M: 100 bp DNA 分子量梯度标记; R: 高抗白粉病亲本 J083; S: 高感白粉病亲本 J73; (1~2): 分别为地方抗病品种腰葫芦、牛腿蒲; (3, 11, 14): 自选抗病株系; (4~10, 12~13, 15): 自选感病株系.

图 3 SCAR 标记 GPDS_{ATG/CTC75} 在部分瓠瓜品种中的验证结果

Fig. 3 PCR-amplified results of SCAR marker GPDS_{ATG/CTC75} in some cultivars of bottle gourd

3 讨 论

白粉病是甜瓜、黄瓜和南瓜等葫芦科作物上广泛发生的一种世界性病害,为我国瓜类绿色生产的主要障碍。对瓜类白粉病的抗性鉴定和遗传分析,由于所用材料和方法以及白粉病生理小种的不同研究结果也有所不同^[13-16]。Cohen 等^[4]报道南瓜白粉病由 1 对不完全显性基因控制;Barnes 等^[17]早在 1956 年报道黄瓜白粉病抗性由 1~2 对主效基因和 1~2 对微效基因共同控制;Zhang 等^[18]2007 年采用 3 个不同黄瓜杂交群体研究黄瓜白粉病认为黄瓜白粉病抗性的最好模式是由 2 个主效基因和多基因控制的,在主效基因作用下,黄瓜的感病性为部分显性,2 个主效基因的遗传力很高。而目前对瓠瓜白粉病的研究很少,还没有有关瓠瓜白粉病的抗性机制和分子标记方面的报道。本研究通过对瓠瓜 F₁ 和 F₂ 代群体抗白粉病情况调查表明瓠瓜白粉病抗性由 1 对隐性基因控制,与黄瓜等的抗白粉病模式不同,这可能与瓠瓜白粉病所用材料和生理小种不同有关,但具体的原因还需进一步研究。本实验中还发现由于群体中个体间生长有一定的差异,特别是个体生长较弱小单株的抗性较难以辨别,可能会影响接种鉴定结果的准确性,因此,如何准确鉴定个体较小单株的抗性,将直接影响标记分析结果的准确性。扩大单株群体,在鉴定时剔除生长较弱小的个体,将有利于提高研究结果的准确性。

引起葫芦科白粉病的病原菌目前有 3 个属 6 个种, *S. fuliginea* 和 *Erysiphe cichoracearum* 是主要病原菌。但是由于白粉病病原菌只能采用活体保存,不能进行离体保存,而且白粉病孢子萌发的主要影响因素是温湿度,要求不冷不热(20~25℃),不干不湿(35%~45%),导致瓠瓜白粉病抗性鉴定受到很大程度的制约,成为瓠瓜抗白粉病育种的一个关键点。而通过分子标记技术筛选与瓠瓜抗白粉病紧密连锁的分子标记,可以不受环境、季节限制,在苗期就可对瓠瓜种质、组合等进行抗性鉴定,从而为瓠瓜抗白粉病育种提供切实可行的解决方法。目前, AFLP 已广泛应用于分子遗传作图和分子标记

辅助育种以及目的基因的图位克隆,但应用于实践中的分子标记技术普遍要求稳定性好、操作简单。SCAR 标记是一种十分稳定的分子标记,在应用上具有快速、简便、成本低廉等优点,适用于大量样品的快速鉴定、分析,因而,在利用分子标记进行性状鉴定、资源研究和分子标记辅助育种中,常将得到的 RFLP 和 AFLP 等标记转化为可以直接选择利用的 SCAR 标记^[19,21],如杜胜利等^[21]研究获得黄瓜抗白粉病的 SCAR 分子标记 SCPM197/195,王神云等^[22]获得了与甘蓝抗霜霉病基因紧密连锁的 SCAR 标记 BORSAAG/CTC113,这些标记的获得为促进黄瓜、甘蓝等的抗病育种提供了重要的帮助,而有关瓠瓜抗白粉病分子标记方面还未见相关的报道。本实验成功将与瓠瓜紧密连锁的 AFLP 标记转化为 SCAR GPDS_{ATG/CTC75} 标记,这是国际上首个瓠瓜白粉病标记,同时应用所获得的标记对 F₂ 代单株进行验证表明,在 93 株感病单株中有 9 株扩增出特异条带,在全部抗病单株中均扩增出特异条带,经分析该 SCAR 标记与白粉病抗性基因的遗传距离为 9.6 cM。研究表明,该标记在瓠瓜株系和部分种质检测中的白粉病抗性符合率达 91%,虽然鉴定效率有待提高,但已完全可用于瓠瓜种质对白粉病抗性的辅助鉴定和抗白粉病育种。

References:

- [1] Kousik C, Levi A, Ling K S, et al. Potential sources of resistance to cucurbit powdery mildew in U. S. plant introductions of bottle gourd [J]. *HortScience*, 2008, 43(5):1359-1364.
- [2] ZHANG Gui-hua, DU Sheng-li, WANG Ming, et al. (张桂华, 杜胜利, 王鸣, 等). AFLP markers of cucumber powdery mildew resistance-related gene [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2004, 31(2):189-192. (in Chinese)
- [3] ZHANG Hai-ying, SU Fang, GUO Shao-gui, et al. (张海英, 苏芳, 郭绍贵, 等). Genetic analysis and specific fragments linked to powdery mildew resistant gene *Pm-2F* in melon [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), 2008, 35(12):1773-1780. (in Chinese)
- [4] Cohen R, Hanan A, Paris H S. Single-gene resistance to powdery mildew in zucchini squash (*Cucurbita pepo*) [J]. *Euphytica*, 2003, 130:433-441.
- [5] WEI Guo-qiang, ZHU Zhu-jun, QIAN Qiong-qiu, et

- al.* (魏国强, 朱祝军, 钱琼秋, 等). Influences of silicon on phenolic metabolism in Chinese white-flowered gourd and its relation to resistance to powdery mildew [J]. **Journal of Plant Protection** (植物保护), 2004, 31 (2): 185-189. (in Chinese)
- [6] Robinson R W, Decker-Walters D S. **Cucurbits** [M]. New York: CAB International Press, 1997: 300-302.
- [7] 沈锦, 李锡香. 苦瓜种质资源描述规范和数据标准 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 54-55.
- [8] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. **Nucleic Acids Research**, 1980, 8(19): 4321-4326.
- [9] Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* AFLP: a new technique for DNA fingerprinting [J]. **Nucleic Acids Research**, 1995, 23: 4407-4414.
- [10] XU Shao-bin, TAO Yu-fen, YANG Zhao-qing, *et al.* (许绍斌, 陶玉芬, 杨昭庆, 等). A simple and rapid methods used for silver staining and gel preservation [J]. **Hereditas** (遗传), 2002, 24(3): 335-336. (in Chinese)
- [11] Lander E S, Green P, Abrahamson J, *et al.* MAP-MAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations [J]. **Genomics**, 1987, 1: 174-181.
- [12] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values [J]. **Annals of Eugenics**, 1944, 12: 172-175.
- [13] Keinath A P, DuBose V B. Evaluation of pumpkin cultivars for powdery and downy mildew resistance, virus tolerance and yield [J]. **HortScience**, 2000, 35: 281-285.
- [14] ZHANG Gui-hua (张桂华). Studies on molecular markers of powdery mildew resistance related gene in cucumber (*Cucumis sativus* L.) (与黄瓜白粉病抗性相关基因紧密连锁的分子标记研究) [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A & F University, 2003. (in Chinese)
- [15] Sakata Y, Kubo N, Morishita M, *et al.* QTL analysis of powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. **Theoretical and Applied Genetics**, 2006, 112: 243-250.
- [16] Fukino N, Ohara T, Monforte A J, *et al.* Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.) [J]. **Theoretical and Applied Genetics**, 2008, 118: 165-175.
- [17] Barnes W C, Epps W M. Powdery mildew resistance in south Carolina cucumbers [J]. **Plant Disease Reporter**, 1956, 40: 1093.
- [18] ZHANG Su-qin, GU Xing-fang, ZHANG Sheng-ping, *et al.* Inheritance of powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and development of an AFLP marker for resistance detection [J]. **Agricultural Sciences in China**, 2007, 6(11): 1336-1342.
- [19] Kelly J D, Gepts P, Miklas P N, *et al.* Tagging and mapping of genes and QTL and molecular marker-assisted selection for traits of economic importance in bean and cowpea [J]. **Field Crops Research**, 2003, 82: 135-154.
- [20] Li G J, Liu Y H, Ehlers J D, *et al.* Identification of an AFLP fragment linked to rust resistance in asparagus bean and its conversion to a SCAR marker [J]. **HortScience**, 2007, 42(5): 1153-1156.
- [21] DU Sheng-li, ZHANG Gui-hua, LI Shu-ju, *et al.* (杜胜利, 张桂华, 李淑菊, 等). Development of a SCAR marker linked to cucumber powdery mildew resistance gene from an AFLP marker [J]. **Acta Horticulturae Sinica** (园艺学报), 2005, 32(6): 1095-1097. (in Chinese)
- [22] WANG Shen-yun (王神云). AFLP study on downy mildew resistance of cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) (结球甘蓝霜霉病抗性的 AFLP 分子标记的研究) [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2006. (in Chinese)