

贺玉花,徐永阳,徐志红,等.甜瓜霜霉病抗性基因的 SSR 标记[J].江苏农业科学,2014,42(7):54-55.

甜瓜霜霉病抗性基因的 SSR 标记

贺玉花,徐永阳,徐志红,赵光伟,孔维虎,张健

(中国农业科学院郑州果树研究所,河南郑州 450009)

摘要:为了研究与甜瓜抗霜霉病基因紧密连锁的 SSR 分子标记,以甜瓜抗病品种 PI414723 和感病品种 DF4 的杂交 F_2 群体 156 个单株为试验材料,利用人工鉴定方法,根据 F_2 抗、感病单株分离比例组建抗感池,用 SSR 技术寻找与抗病基因连锁的分子标记。从 211 个 SSR 引物组合中筛选出 3 个与抗病基因紧密连锁的标记 DE1887、DE1320、DM0854,遗传距离分别为 26、26、13.69 cM。

关键词:甜瓜;霜霉病;SSR;遗传距离;抗性基因

中图分类号:S436.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)07-0054-02

霜霉病(*Pseudoperonospora cubensis*)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。该病害在温室种植的瓜类上全年发生,在露地条件适宜时也不断发生。此病一旦发生,病情扩展很快,通常控制不住,成片病叶迅速枯焦,导致果实不能成熟,严重影响甜瓜的经济价值。为了减轻病害的发生,长期施用农药不仅污染环境,威胁到人们的身体健康,而且还会导致病原菌产生抗药性,因此培育抗霜霉病的优良品种是防治瓜类霜霉病的根本途径;但传统的育种方法所需时间较长,不能满足甜瓜生产对新品种的需求。随着分子生物学的日益发展,利用 RFLP、AFLP、RAPD 和 SSR 等分子标记技术寻找与抗病基因紧密连锁的分子标记,从而进行抗性鉴定和标记辅助选择育种。在印度发现了很多抗霜霉病的优良材料,例如 PI124111、PI124112 和 PI414723。PI124111 和 PI124112 成为了美国抗霜霉病育种的背景材料,许多学者对这 2 个材料的抗病遗传规律和抗霜霉病相关基因进行了相关研究^[1-4]。2005 年,Perchepped 等构建了第一张也是目前为止唯一一张关于甜瓜霜霉病的遗传图谱,他们利用 PI124112 × Védrañtais 获得的 120 个 RIL 株系为材料,构建的图谱长度为 1 150 cM,包含 465 个 AFLP 标记、17 个 SSR 标记、26 个 IMA 标记和 2 个重要的形态标记(雌雄同株和抗番木瓜环斑病),分 36 个连锁群,平均标记间距 4.2 cM,标记最大间距 26.5 cM,该图谱定位了 11 个与霜霉病抗性基因相关的 QTL^[4]。2012 年,杨柳燕等利用抗病品系 DM3 × 感病品系 DF4 获得的 F_2 和 BC 群体为材料,利用软件对田间调查和分子标记结果进行连锁分析,结果显示 1 个 SRAP 标记 me8em11 与甜瓜霜霉病抗性基因的连锁距离为 9.8 cM^[5-6]。本研究以抗性品系 PI414723 为材料,利用 BSA 方法筛选与甜瓜抗霜霉病紧密连锁的 SSR 分子标记,为甜瓜抗霜霉病的分

子辅助育种提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以中国农业科学院郑州果树研究所西甜瓜资源课题组提供的甜瓜抗霜霉病品种 PI414723 为母本,甜瓜育种课题组提供的感病自交系 DF4(在田间和人工接种鉴定时表现为高感甚至死亡)为父本,及其 F_2 代的 156 个单株为试验材料。2012 年 11 月,将试验材料在三亚基地种植:PI414723 为 10 株,DF4 为 10 株, F_2 代为 156 株。

1.2 抗病鉴定方法

病原菌由三亚基地田间感病黄瓜病叶上采集得到,接种方法借鉴杨柳燕的方法^[5]。在傍晚,于植株下部随机选择 3 张叶片,将准备好的霜霉菌悬液喷洒在叶片背面,直到菌液在叶片上可以成股流下。接种 3 d 后进行病情鉴定,参照翁祖信等的分级标准^[7],以叶片背面霉层的覆盖面积为统计标准,最终以单株上的 3 张叶片病情的平均值作为这个单株的病情级数。

1.4 DNA 提取方法

DNA 提取采用改良的 CTAB 法,并用核酸蛋白质检测仪进行检测。取 $D_{280\text{ nm}}/D_{260\text{ nm}}$ 比值和 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 比值在 1.80~2.00 之间(杂质较少)的 DNA 稀释至 50 ng/ μL 。

1.5 建立抗感池

从 F_2 代群体中选取 6 株病害级别为 0 的单株和 6 株病害级别为 5 的单株,提取 DNA 检测后进行等量混合,建立高抗池和高感池。

1.6 PCR 程序

SSR 引物来源于 Cucurbit Genomics Database 网站(网址: <http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/index.cgi>),由上海生工生物工程公司合成。

反应体系(15.0 μL)包含:1.5 μL 10 × PCR buffer, 0.4 μL DNA(50 ng/ μL),1.0 μL dNTP(2.5 mmol/L),1.5 μL Mg^{2+} (10 mmol/L),各 1 μL 引物(50 $\mu\text{mol/L}$),0.2 μL Taq DNA 聚合酶(5 U/ μL),8.4 μL 无菌去离子水。试验过程中,所用试剂由上海生工公司提供。扩增程序:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,59 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s,3 个循

收稿日期:2014-03-09

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-26-01);国家科技支撑计划(编号:2012BAD02B03)。

作者简介:贺玉花(1989—),女,河南焦作人,硕士研究生,主要从事蔬菜遗传育种研究。E-mail:heyuhua2007@126.com。

通信作者:徐永阳,研究员,硕士生导师,主要从事蔬菜遗传育种等方面的研究。Tel:(0371)65330930;E-mail:xuyongyang@caas.cn。

环;94℃变性30 s,57℃退火1 min,72℃延伸90 s,3个循环;94℃变性30 s,55℃退火1 min,72℃延伸90 s,29个循环;72℃延伸7 min。扩增产物保存温度为4℃。

1.7 电泳

PCR反应产物加3 μL 6×loading buffer上样,用8%聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,230 V恒电压电泳1 h,采用快速银染法进行检测。

1.8 数据记录和连锁分析

用QTL IciMapping软件分析F₂分离群体扩增的SSR标记和霜霉病基因之间的遗传关系。抗病记为a,感病记为b,父母本杂合记为h,缺失或模糊的带型记为-,计算标记与抗病基因的连锁距离,连锁的最低阈值(LOD)为3.0。

2 结果与分析

2.1 DNA提取与多态性引物鉴定

所提取的DNA经过核酸蛋白仪检测, $D_{280\text{ nm}}/D_{260\text{ nm}}$ 比值和 $D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$ 比值均在1.80~2.00之间。经凝胶电泳检测(图

1),带型整齐一致,无降解现象,满足PCR反应的要求。

本试验用211个SSR引物分别对抗、感亲本进行筛选,其中136个引物在抗、感亲本之间显示出多态性。用在亲本中筛选出多态性的136对引物分别在抗、感池中进行筛选,发现了6个引物在抗感池中表现出多态性。图2为9对在亲本中具有多态性的引物在抗感池间的扩增电泳图,其中斜箭头所指引物为DE1320,抗病池带型与抗病亲本一致,感病池与感病亲本的带型一致,表示该引物在抗感池中有差异的引物。

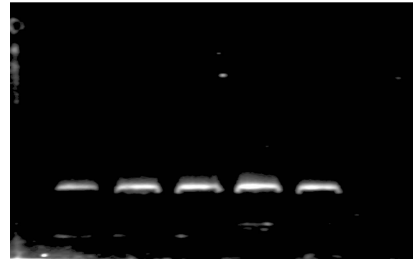
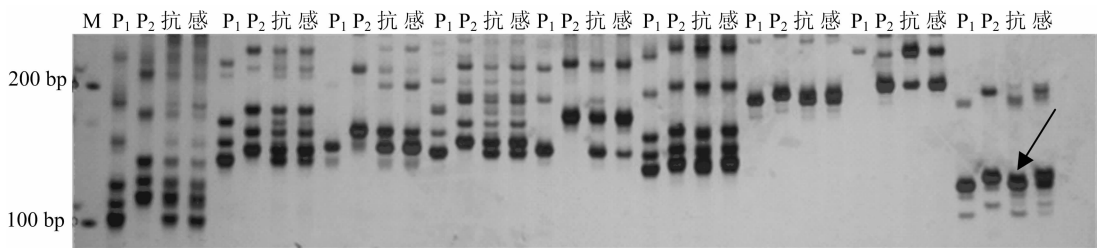


图1 甜瓜基因组DNA的琼脂糖电泳图



M为DNA分子量标记;P₁为抗病亲本PI414723;P₂为感病亲本DF4;抗为抗病池;感为感病池;从左至右9对引物分别为CMBR052、NR38、MU9175-1、MU5544-1、SSR00398、ECM150、DE1360、DE1272、DE1320;箭头表示在抗感池中有差异的引物

图2 9对引物在抗池和感池之间的扩增情况

2.2 甜瓜抗霜霉病基因与SSR标记的连锁分析

用筛选出的6个引物对PI414723×DF4的F₂代群体的156个单株进行SSR扩增,通过QTL IciMapping软件对分离群体单株的抗病性和分子标记的分离数据进行连锁分析,结果表明:DE1887、DE1320、DM0854与抗霜霉病基因的遗传距离分别26、26、13.69cM。

3 结语

世界上对甜瓜霜霉病的抗病遗传研究较早,迄今为止,已报道的甜瓜霜霉病抗性基因有Pc-1、Pc-2、Pc-3、Pc-4、Pc-5^[1-3,8]。其中,本试验中所用的抗性亲本材料PI414723的抗霜霉病性状由单显性基因控制,命名为Pc-3^[8]。本研究发现了3对SSR引物与PI414723中抗霜霉病基因连锁,期望通过这些引物获得更多的关于基因Pc-3的信息,为以后的甜瓜抗霜霉病遗传育种提供理论基础。

参考文献:

[1] Thomas C E, Cohen Y, McCreight J D, et al. Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo* [J]. Plant Disease, 1988, 72:

33-35.

- [2] Kenigsbuch D, Cohen Y. Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo* PI124112 and commonality of resistance genes with PI124111F [J]. Plant Disease, 1992, 76(6): 615-617.
- [3] Cohen Y, Cohen S, Eyal H, et al. Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo* PI124111 [J]. Cucurbit Genet Coop Rep, 1985, 8: 36-38.
- [4] Perchepe L, Bardin M, Dogimont C, et al. Relationship between loci conferring downy mildew and powdery mildew resistance in melon assessed by quantitative trait loci mapping [J]. Phytopathology, 2005, 95(5): 556-565.
- [5] 杨柳燕. 甜瓜霜霉病(*Pseudoperonospora cubensis*)抗性遗传研究及SRAP分子标记[D]. 北京:中国农业科学院, 2012.
- [6] 杨柳燕, 徐永阳, 徐志红, 等. 甜瓜霜霉病抗性遗传及SRAP分子标记[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1200-1202.
- [7] 翁祖信, 冯东昕, 李宝栋. 黄瓜霜霉病抗病性鉴定技术研究初报[J]. 中国蔬菜, 1991(4): 7-9.
- [8] Epinat C, Pitrat M. Inheritance of resistance of three lines of muskmelon (*Cucumis melo*) to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) [C]. Proceedings of Cucurbitaceae, 1989: 133-135.