

刘 广,黄晓云,徐锦华,等. 西瓜枯萎病抗性分子标记筛选与应用[J]. 江苏农业科学,2022,50(18):279-283.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2022.18.043

西瓜枯萎病抗性分子标记筛选与应用

刘 广¹,黄晓云²,徐锦华¹,张 曼¹,姚协丰¹,娄丽娜¹,徐 建¹,侯 茜¹,朱凌丽¹,羊杏平¹

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室,江苏南京 210014;

2. 苏州农业职业技术学院环境工程学院,江苏苏州 215008)

摘要:西瓜是一种重要的园艺作物,经济效益显著,但枯萎病的发生严重限制了西瓜的生产。为了解决这一难题,利用简单、方便、实用性强的分子标记技术辅助选育抗性强的西瓜品种对于西瓜产业的优质发展具有重要意义。以父本 sugarlee、母本伊选、F₁ 代、F₂ 代及 F₃ 代遗传群体为材料,通过苗期接种鉴定,对父本的抗性遗传规律进行研究,发现父本 sugarlee 对枯萎病生理小种 1 的抗性遗传为单基因显性性状遗传;然后利用 CAPS、InDel、SCAR、dCAPS 和 RAPD 等多种分子标记技术,筛选了 22 个与西瓜枯萎病抗性基因相关的分子标记,获得了与西瓜枯萎病紧密连锁的抗性标记 3 个,分别为 indel04、indel05、indel06,位于抗病基因的一侧,连锁距离分别为 7.5、10.7、13.7 cM,将这 3 个分子标记对 20 份西瓜材料进行分子检测,结果与实验室接种鉴定的结果基本一致。结果表明,分子标记 indel04、indel05、indel06 可应用于西瓜材料枯萎病抗性的分子辅助选择,这对于西瓜的抗性育种具有重要意义。

关键词:西瓜;枯萎病;分子标记;抗性基因;抗性鉴定

中图分类号:S651.035.3

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2022)18-0279-05

西瓜枯萎病,别称萎蔫病、死藤病、枯苗病,是由于西瓜的特异专化型病菌尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)入侵根部感染而引起的可发生在西瓜植株整个生长期的病害,尤其是在西瓜

膨大期更易发生,表现为早期植株出现类似失水的症状,叶子有点萎蔫,慢慢地整株枯死^[1]。枯萎病对西瓜产量的影响很大,会导致减产甚至绝收,给农民带来极大的经济损失。因此西瓜不能在同一地块连作。但是由于土地资源的贫乏及温室、大棚等保护地设施的大面积应用,枯萎病发生日益严重,而针对枯萎病选育抗性强的西瓜新品种是解决这一难题最环保有效的措施之一。

一般采用枯萎病接种及田间检测的方法来鉴定西瓜品种的抗性,耗时长且需要大量的人力、物力。分子标记是一种可以连续遗传且在后代中能检测到的 DNA 序列,可以反映植株个体之间或群体之间基因组差异的特异性 DNA 片段,已成功应用于

收稿日期:2021-10-18

基金项目:国家西瓜产业技术体系建设专项(编号:CARS-26);江苏现代农业(西甜瓜)产业技术体系建设项目(编号:JATS[2021]422);江苏省农业重大新品种创制项目(编号:PZCZ201716)。

作者简介:刘 广(1982—),女,湖南沅江人,博士,副研究员,主要从事西甜瓜及砧木遗传育种与生物技术研究。E-mail:liuguang_gj@163.com。

通信作者:羊杏平,博士,研究员,主要从事西瓜甜瓜遗传育种研究。E-mail:xingping@jaas.ac.cn。

- [6] Barboza K, Salinas M C, Acuña C V, et al. Assessment of genetic diversity and population structure in a garlic (*Allium sativum* L.) germplasm collection varying in bulb content of pyruvate, phenolics, and solids[J]. *Scientia Horticulturae*, 2020, 261: 108900.
- [7] Barboza K, Beretta V, Kozub P C, et al. Microsatellite analysis and marker development in garlic: distribution in EST sequence, genetic diversity analysis, and marker transferability across Alliaceae[J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2018, 293(5): 1091-1106.
- [8] Gimenez M D, García Lampasona S. Before-after analysis of genetic and epigenetic markers in garlic: a 13-year experiment[J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 240: 23-28.
- [9] 尚小红,严华兵,曹 升,等. 葛根 SCoT-PCR 反应体系优化及

- 引物筛选[J]. *南方农业学报*, 2018, 49(1): 1-7.
- [10] 梁玉琴,李芳东,傅建敏,等. 柿属植物基因组 DNA 提取方法比较[J]. *中南林业科技大学学报*, 2012, 32(4): 170-173.
- [11] 王 茜,廖惠红,黄宏明,等. 柑橘黄龙病病原 DNA 提取方法比较[J]. *南方农业学报*, 2013, 44(2): 225-229.
- [12] 郑道君,谢良商,曾建华,等. 海南龙血树 ISSR-PCR 反应体系建立与有效引物筛选[J]. *热带亚热带植物学报*, 2011, 19(2): 177-183.
- [13] 王东娜,牟长城,冯富娟. 胡桃楸 ISSR-PCR 反应体系的建立及优化[J]. *实验室研究与探索*, 2010, 29(11): 18-22, 37.
- [14] 李房英,黄彦晶,吴少华. 三角梅 ISSR 反应体系的建立和优化[J]. *海峡科学*, 2010(10): 216-219.

作物的抗性辅助选择、指纹图谱构建、纯度检测等方面^[2-4]。本研究利用西瓜遗传群体筛选与西瓜枯萎病抗性基因紧密连锁的分子标记,并将筛选得到的分子标记应用于西瓜材料的枯萎病抗性选择,从而得到抗性好的西瓜材料,用于后期的育种工作,这对于西瓜的抗性育种具有重要作用。

1 材料与方法

1.1 试验材料

用 1 个杂交后代的抗感单株群体以及 20 个西瓜材料作为本次的试验材料。伊选作为母本,高感枯萎病生理小种 1;sugarlee 作为父本,高抗枯萎病生理小种 1,2017 年春季杂交后获得 F₁,2017 年秋季进行自交后,获得 49 个单株 F₂ 群体,2018 年春季进一步自交后,获得 F_{2:3} 家系。20 个西瓜材料及来源见表 1。试验材料种植于江苏省农业科学院六合试验基地塑料大棚中。

表 1 西瓜材料及来源

编号	西瓜材料	来源
1	LW022 × MW116	中国江苏
2	LW023 × MW116	中国江苏
3	LW023 - 2	美国
4	Sg	美国
5	Y110	美国
6	LW022	中国
7	LW018	美国
8	LW024	美国
9	苏蜜 1 号	中国江苏
10	Y111	美国
11	SB	美国
12	E	中国
13	K3	中国
14	MW022	中国
15	MW097	中国
16	MW116	中国
17	AS	美国
18	Y71 - 2 - 3 - 1	中国
19	P3	中国
20	LW017	美国

1.2 试验方法

1.2.1 苗期人工接种枯萎病病菌的抗性鉴定 利用尖孢镰刀菌西瓜专门型生理小种 1 对西瓜幼苗进行人工接种鉴定。参照吉加兵的方法^[5]进行接种。当西瓜幼苗培养到 2 叶 1 心时,取叶片用于 DNA 提取,然后用配制好的孢子悬浮液(孢子浓度为 5 ×

10⁶ 个/mL)进行根部接种。接种后保持环境温度为 18 ~ 26 ℃。约 1 周后开始发病,间隔 2 d 调查发病率以及病情指数。随机提取病样,分离病原物并进行培养,用显微镜观察病原。症状的分类基于 Martyn 的标准^[6],高感(HS)病株率为 81% ~ 100%,感病(S)病株率为 61% ~ 80%,中抗(MR)病株率为 41% ~ 60%,抗病(R)病株率为 21% ~ 40%,高抗(HR)病株率为 0 ~ 20%。其中感病型包括 S 和 HS,病株率在 61% 及以上;抗病型包括 HR、R、MR,病株率在 60% 及以下。感病对照(Sugar Baby)、中抗对照(Charleston Gray)、高抗对照(Calhoun Gray)来自美国,均由笔者所在实验室繁育。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 当西瓜品种生长到 2 叶 1 心时,取幼嫩西瓜叶片 1.5 ~ 3.5 g,利用液氮快速磨成粉末,加入十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)裂解液,65 ℃水浴 0.5 ~ 1.0 h,冷却后加入同等体积的三氯甲烷与异戊醇的混合物(体积比为 24 : 1),轻轻摇晃 25 min 左右,在 12 000 r/min 条件下离心 10 min,取上清液,抽提 1 ~ 2 次,然后加入 10% 醋酸钠和预冷的异丙醇,在 4 ℃冰箱中静置 3 h 以上,收集的絮状 DNA 用 70% 乙醇进行洗涤,干燥后溶解于 TE 缓冲液中,4 ℃保存备用。

1.2.3 引物合成 参考国内外与西瓜枯萎病抗性相关的文献^[7-11],合成 22 个/对引物,其中 2 对切割扩增多态性序列(CAPS)引物,6 对插入/缺失(InDel)引物,5 对序列特征扩增区(SCAR)引物,2 对衍生切割扩增多态性序列(dCAPS)引物,7 个随机扩增多态性 DNA(RAPD)引物(表 2)。

1.2.4 PCR 扩增与产物检测 随机扩增多态性 DNA 聚合酶链式反应(RAPD - PCR)的体系为 25 μL,其中引物 2 μL,DNA 2 μL,ddH₂O 8 μL,Mix buffer 13 μL。PCR 扩增程序为 94 ℃ 2 min;94 ℃ 30 s,37 ℃ 45 s,72 ℃ 90 s,40 个循环;72 ℃ 10 min。扩增样品在 1.0% 的琼脂糖凝胶中(加入 10% GoldView)进行检测。InDel/SCAR/CAPS/dCAPS - PCR 反应体系为 25 μL,其中包含 DNA 1 μL,上游引物 1.25 μL,下游引物 1.25 μL,ddH₂O 8.5 μL,Mix buffer 13 μL。PCR 扩增过程为 94 ℃ 5 min;94 ℃ 40 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 45 s,共 36 个循环;72 ℃ 10 min,4 ℃ 保存。CAPS/dCAPS 产物的酶切反应体系为 15 μL:10 × buffer 1.5 μL,限制内切酶 *Taq* I (来源于 Thermo Fisher Scientific 公司) 0.5 μL,PCR 产物 5 μL,ddH₂O 8.0 μL。65 ℃ 保持

表 2 22 个与西瓜枯萎病抗性基因相关的引物

标记名称	类型	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
RAPD01	RAPD	GTAGCACTCC	
RAPD02	RAPD	CTGAGACGGA	
RAPD03	RAPD	GGGCCAATGT	
RAPD04	RAPD	ACAGGGCTCA	
RAPD05	RAPD	CCGGGGAAAA	
RAPD06	RAPD	TTCCCGGAGC	
RAPD07	RAPD	CTCCCTGAGC	
indel01	InDel	TTCCAAAAGTCGAGATTTTC	CACATGGGGATTGACTAAG
indel02	InDel	GAGCGCAAGGTAAGATCCAT	AAGAACTATACGTGGTCATT
indel03	InDel	CACAATTATAGCCTAGCCAAG	CGTATCAACTCGAAGGAAGAT
indel04	InDel	TAAGCATGGTGAATGGAAG	CCAATAGTCCGTCATTTGTG
indel05	InDel	CAGAGGTCGTGTTCTTCAGG	TACTCAGTCAGTAATCCCAC
indel06	InDel	TATGTTCCCTTTCTTCCACCC	ACCTCCGACTACAACCACCTC
CAPS01	CAPS	TTAAAAATCATCTCCTCTTTAAAACTATT	ATATATTTGGTCTCCGAGTGTTCAA
CAPS02	CAPS	TTAAGTTTCTAACCTTTAAAAATTGATCTCT	CCTACCTTGAAAAACTTGAGGGATA
CAPS03	dCAPS	AAATGGGTACTGGTGGTCGCCTC	TTCTCTTCTTCTGTTTCTCCACAA
SCAR01	SCAR	CTGAGACGGAGCAA	CTGAGACGGAGTGT
SCAR02	SCAR	CTGAGACGGAGCAAA	CTGAGACGGAGTGTT
SCAR03	SCAR	CTGAGACGGAGCAAAA	CTGAGACGGAGTGTTT
SCAR04	SCAR	CTGAGACGGAGCAAAAC	CTGAGACGGAGTGTTTC
SCAR05	SCAR	AGGCTCACCCATAAAGAAGG	GGTCAACACAAGGATCTTACT
dCAPS 01	dCAPS	AACACCACCCACTTTGGAGCTTCG	TTTTAGGCTGAAAATGGGTATTGTA

12 h,80 ℃ 保持 20 h 进行酶切反应,反应产物于 4 ℃ 保存。扩增样品采用 8.0% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,在 120 V 恒压条件下电泳 1~2 h,银染染色。

1.2.5 数据分析 通过 Joinmap 4.0 软件进行枯萎病抗性性状连锁的遗传分析。

2 结果与分析

2.1 西瓜父母本、F₁、F₂ 三代对枯萎病生理小种 1 的抗病性鉴定

采用西瓜枯萎病生理小种 1 菌液对父本 sugarlee、母本伊选、F₁ 代及 F₂ 代植株进行了接种鉴定,通过植株苗期发病情况调查及统计,分析其抗感性。根据表 3 可知,伊选与 sugarlee 杂交后,F₁ 代植株发病率为 4.00%,表现为高抗;F₂ 代植株发病率为 24.49%,表现为中抗。以发病率 60% 为分界线把 F₂ 群体分为感病和抗病 2 种类型,F₂ 代群体

中有 37 个植株表现为抗病,12 个植株表现为感病。卡平方检验结果显示, $\chi^2=0.007<\chi^2_{0.05,1}=3.840$,F₂ 代群体抗感分离比例用 χ^2 测验符合 3:1 理论值。从父母本、F₁ 代和 F₂ 代群体植株苗期的抗病鉴定结果来看,父本 sugarlee 对枯萎病生理小种 1 的抗性遗传是存在基因互作的单基因显性性状遗传。

2.2 西瓜枯萎病生理小种 1 抗性基因 Fon1 标记的定位分析

根据伊选 × sugarlee F_{2,3} 群体苗期枯萎病生理小种 1 的抗病性检测结果,从 F₂ 单株中取检测结果表型为抗病性及表型为感病性的单株各 5 个,利用它们的基因组 DNA 进行混合构建抗、感基因池。利用集团混合分析(BSA)法对 22 个 CAPS、dCAPS、InDel、RAPD、SCAR 分子标记进行多态性筛选,发现 3 个与西瓜抗性基因紧密连锁的分子标记(indel04、indel05、indel06)。分子标记 indel04 产生了 1 个

表 3 西瓜群体对枯萎病生理小种 1 的抗性鉴定结果

群体	植株数 (株)	感病植株数 (株)	抗病植株数 (株)	发病率 (%)	抗感分离比例	χ^2	$\chi^2_{0.05,1}$
伊选	50	50	0	100.00			
sugarlee	37	1	36	2.70			
F ₁ 代(伊选 × sugarlee)	25	1	24	4.00			
F ₂ 代(伊选 × sugarlee)	49	12	37	24.49	3.08:1	0.007	3.84

210 bp 与西瓜枯萎病抗性基因相连锁的特异标记 indel04210;分子标记 indel05 产生了 1 个 225 bp 与西瓜枯萎病抗性基因相连锁的特异标记 indel05225;分子标记 indel06 产生了 1 个 365 bp 与西瓜枯萎病抗性基因相连锁的特异标记 indel06365(图 1)。

然后利用 Joinmap 4.0 软件对 F₂ 代群体的单株进行研究,通过对 49 个 F₂ 代分离群体单株的抗感表型和分子基因型进行分析,发现 indel04、indel05、indel06 这 3 个分子标记位于 *Fon1* 的一侧,连锁距离分别为 7.5、10.7、13.7 cM(图 2)。

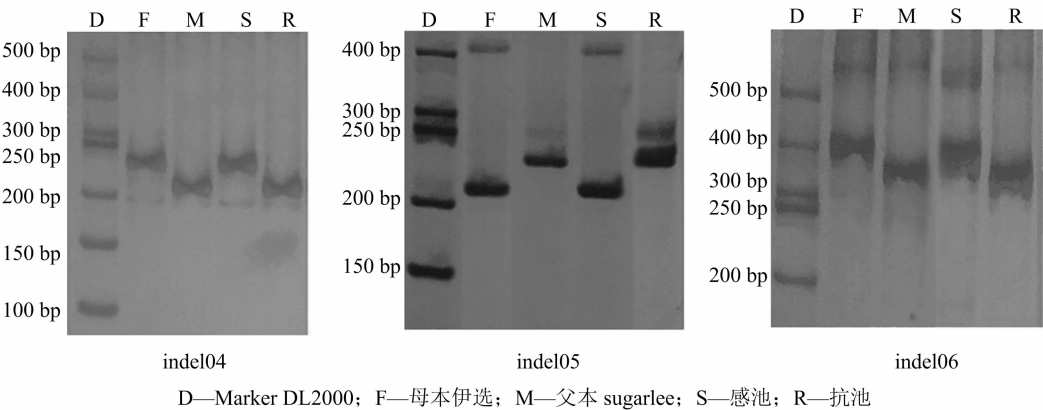


图1 与西瓜枯萎病生理小种 1 抗性基因紧密连锁的分子标记 indel04、indel05、indel06

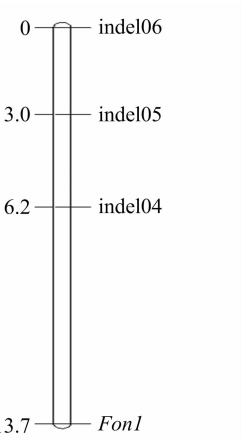


图2 西瓜枯萎病抗性基因的连锁图

2.3 西瓜枯萎病抗性分子标记在种质资源中的鉴定

利用筛选得到的与西瓜枯萎病抗性基因紧密连锁的 indel04、indel05、indel06 等 3 个分子标记对 20 份西瓜材料进行分子检测(图 3)。这 20 份西瓜

材料的抗性性状已经通过苗期接种鉴定确定其西瓜枯萎病抗感性,共有 9 个抗枯萎病的品种和 11 个感枯萎病的品种。试验结果显示,indel04、indel05、indel06 与苗期接种鉴定结果的符合率分别为 85%、90%、90%(图 3,表 4)。说明 indel04、indel05、indel06 这 3 个分子标记可以应用于西瓜材料针对枯萎病生理小种 1 的抗性鉴定,对西瓜的抗性育种具有重要作用。

3 讨论

枯萎病是西瓜栽培中的一种灾难性土传真菌病害,严重影响了西瓜的产量和品质^[12]。选育抗枯萎病的西瓜新品种是解决这一生产难题的有效措施。传统的抗性品种筛选耗时费力,开发利用与西瓜枯萎病抗性基因相连锁的分子标记进行辅助选择,可有效提升育种时效,推进抗性育种的进程,对我国重茬严重的保护地栽培具有重要意义。

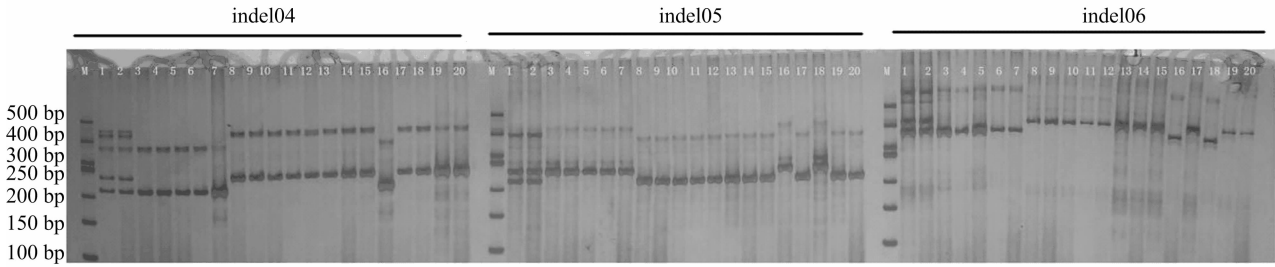


图3 indel04、indel05、indel06 分子标记对 20 份西瓜材料的分子检测结果

表 4 20 个西瓜材料接种鉴定与分子鉴定结果

编号	西瓜材料	苗期接种鉴定		分子鉴定的抗性		
		病株率(%)	抗感性	indel04	indel05	indel06
1	LW022 × MW116	6.5	R	R	R	R
2	LW023 × MW116	11.5	R	R	R	R
3	LW023 - 2	9.1	R	R	R	R
4	Sg	15.6	R	R	R	R
5	Y110	5.6	R	R	R	R
6	LW022	0.0	R	R	R	R
7	LW018	3.6	R	R	R	R
8	LW024	62.4	S	S	S	S
9	苏蜜 1 号	94.4	S	S	S	S
10	Y111	63.8	S	S	S	S
11	SB	84.2	S	S	S	S
12	E	94.4	S	S	S	S
13	K3	40.9	S	S	S	S
14	MW022	89.1	S	S	S	S
15	MW097	75.6	S	S	S	S
16	MW116	32.5	R	R	R	R
17	AS	42.3	R	S	S	S
18	Y71 - 2 - 3 - 1	0.0	R	S	R	R
19	P3	79.6	S	S	S	S
20	LW017	38.9	R	S	S	S

注:“R”代表抗病,“S”代表感病。

为了攻克这一难题,国内外科研人员在西瓜抗枯萎病分子标记的辅助育种中做了大量工作,获得了一些与西瓜枯萎病抗性性状紧密连锁的分子标记^[7-11],但是由于遗传群体不同,标记类型不同,有的标记重复性不佳,不能应用于西瓜品种的抗性育种辅助选择。本研究以父本 sugarlee、母本伊选、F₁ 代、F₂ 代及 F₃ 代为试验材料,研究了父本 sugarlee 对西瓜枯萎病的抗性遗传规律,并在前人研究的基础上,利用已发表的 22 个/对引物对遗传群体亲本及抗感池进行了分析,筛选得到 3 个与西瓜枯萎病抗性基因紧密连锁的分子标记(indel04、indel05、indel06),并利用这 3 个标记对 20 份西瓜材料进行了分子检测,与苗期枯萎病抗性鉴定结果基本一致,可应用于之后的西瓜抗性育种辅助选择,对推进西瓜的抗性育种进程及西瓜产业的优质高效发展具有重要意义。

参考文献:

[1]张屹,魏林,许勇,等.西瓜枯萎病的研究进展[J].湖南农业科学,2013(5):67-70.

[2]杨青,郝俊杰,王新涛.玉米粗缩病抗病基因定位和抗病育种研究进展[J].分子植物育种,2020,18(12):4021-4028.

[3]徐彦刚,姚协丰,李良俊,等.西瓜核心种质遗传多样性分析及指纹图谱构建[J].分子植物育种,2021,19(1):305-317.

[4]卢霞,邓志军,刘梦华,等.辣椒基因组 SSR 引物的开发及品种纯度分子鉴定[J].江苏农业科学,2020,48(7):65-68.

[5]吉加兵.西瓜枯萎病苗期抗性鉴定方法的探讨[J].中国西瓜甜瓜,1992,5(1):35-39.

[6]Martyn R D. An aggressive race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* new to the United States[J]. Plant Disease,1985,69(11):1007.

[7]李娜,王吉明,尚建立,等.西瓜枯萎病生理小种 1 抗性 QTL 精细定位与 InDel 标记开发[J].中国农业科学,2017,50(1):131-141.

[8]张屹,张海英,郭绍贵,等.西瓜枯萎病菌生理小种 1 抗性基因连锁标记开发[J].中国农业科学,2013,46(10):2085-2093.

[9]许勇,欧阳新星,张海英,等.与西瓜野生种质抗枯萎病基因连锁的 RAPD 标记[J].植物学报,1999,41(9):952-955.

[10]Lin Y H,Chen K S,Liu T D,et al. Development of a molecular method for rapid differentiation of watermelon lines resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*[J]. Botanical Studies,2009,50(3):273-280.

[11]焦获,任毅,宫国义,等.四倍体西瓜抗枯萎病生理小种 1 分子标记辅助选择技术研究[J].园艺学报,2015,42(6):1112-1120.

[12]张娟琴,李双喜,郑宪清,等.蚯蚓防控西瓜枯萎病的效果及其机理探索[J].江苏农业学报,2020,36(1):70-76.