

与黄瓜抗白粉病相关基因连锁的 AFLP 标记的获得

张桂华^{1,2,3} 杜胜利^{1,3} 王 鸣² 马德华¹

(¹ 天津科润黄瓜研究所, 天津 300192; ² 西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100; ³ 天津市农业生物技术研究中心, 天津 300192)

摘 要: 以黄瓜抗白粉病母本 Q9 和感白粉病父本 Q10 及组合 (津春 3 号) 的 F₂ 分离群体为试材, 采用 BSA 法建立了对白粉病的抗病组和感病组, AFLP 引物组合 P18M47 在两组间表现多态, 且呈共显性。经 F₂ 单株分析, 在高抗个体和高感个体中分别仅扩增出约 238 bp 和 236 bp 的特异片段, 而在中间类型个体中同时扩增出了该两个特异片段 (238 bp/236 bp), 经连锁值测定, 表明该特异带与白粉病抗病相关基因紧密连锁, 连锁距离为 5.56 cM。测序结果显示, 目标片段的大小分别为 238 bp 和 236 bp, 且两个片段的差异仅为两个 “T” 碱基的插入或缺失。BLAST 查询表明该两个片段为新发现的黄瓜 DNA 序列。

关键词: 黄瓜; 白粉病; 抗性相关基因; 分子标记; AFLP

中图分类号: S 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2004) 02-0189-04

AFLP Markers of Cucumber Powdery Mildew Resistance-related Gene

Zhang Guihua^{1,2,3}, Du Shengli^{1,3}, Wang Ming², and Ma Dehua¹

(¹ Tianjin Kernel Cucumber Research Institute, Tianjin 300192, China; ² Department of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; ³ Tianjin Agricultural Biotechnology Research Center, Tianjin 300192, China)

Abstract: With a F₂ population between a highly resistant parent and a highly susceptible parent (Q9 × Q10) as materials, polymorphism between resistant and susceptible bulk of cucumber powdery mildew were studied using BSA method and AFLP technology. A co-dominant AFLP marker, P18M47 – 238 bp/236 bp, was screened. The resistant and susceptible F₂ plants possessed the 238 bp and the 236 bp fragment, respectively, and the mid-plants owned the two fragments. Linkage analysis indicated that the AFLP marker was tightly linked to the cucumber powdery mildew resistance related gene, and the genetic distance was 5.56 cM. Sequencing of the fragments of the co-dominant AFLP marker indicated that their lengths were 238 bp and 236 bp respectively. The difference of the two fragments lied in the insert-deletion (indel) of two “T” base. BLAST analysis revealed that the two fragments were new in the GeneBank.

Key words: Cucumber; Powdery mildew; Resistance-related gene; Molecular marker; AFLP

黄瓜白粉病 (Powdery mildew, *Sphaerotheca fuliginea*) 是一种广泛发生的世界性病害。常规抗病品种的选育主要依靠对病害的田间鉴定, 受环境影响较大, 同时又不可避免存在人为误差, 因此鉴定结果不够准确。加之黄瓜白粉病的病原为单丝壳白粉菌 (属子囊菌亚门真菌), 属于专性寄生菌, 只能在活体寄主上存活, 无法进行人工培养, 因此黄瓜白粉病的发生受季节限制, 在非发病季节对该病的田间鉴定工作则难以进行。RFLP、RAPD 和 AFLP 等分子标记技术, 为分子育种提供了一条新途径^[1-3], 但目前尚未见与黄瓜抗白粉病相关基因连锁的分子标记研究的报道。

本研究以黄瓜抗白粉病和感白粉病亲本组合的 F₂ 分离群体为试材, 通过苗期人工接种和田间抗病性鉴定, 采用 BSA 法和 AFLP 技术, 筛选与黄瓜抗白粉病相关基因连锁的 AFLP 标记, 为分子标记

收稿日期: 2003-06-10; 修回日期: 2003-08-26

基金项目: 天津市重大攻关项目 (003122011-1); 国家 863 重大专项资助项目 (2002AA244011-3)

致谢: 中国农科院品种资源研究所贾继增研究员, 中国农科院蔬菜花卉所王晓武副研究员对本研究予以热情指导与帮助, 特此致谢。

辅助黄瓜抗白粉病育种和抗白粉病相关基因的克隆奠定基础。

1 材料与方法

供试材料为黄瓜品种‘津春3号’的抗白粉病母本 Q9 和感白粉病父本 Q10 及其 F_2 自交群体。AFLP 引物在上海生工生物工程公司合成,所用 TaqDNA 聚合酶、dNTP 等试剂均购自该公司。试验于 2001 年 8 月~2002 年 12 月在天津科润黄瓜研究所完成,部分工作在中国农科院蔬菜花卉研究所国家重点开放实验室完成。

F_2 分离群体的构建及抗白粉病性鉴定:将亲本及其 F_2 播种于塑料温室中,正常管理。待长至 3 片真叶时采用喷雾法进行白粉病苗期接种鉴定。分别于接种后 10 d、20 d、30 d 调查发病情况。1 级(抗病):无病症或有少数抗病型病斑;2 级(中间类型):感病型病斑占叶面积的 1/3~2/3;3 级(感病):感病型病斑面积超过叶面积的 2/3,叶片黄化严重或干枯。

DNA 的提取和 AFLP 分析:选取高抗、高感单株各 5 株,组成抗病组和感病组。每组内单株提取 DNA,单株进行 AFLP 扩增。DNA 提取采用 CTAB 法^[4]。AFLP 分析参照 Vos^[5] 的方法。黄瓜基因组 DNA 的酶切采用 MseI 和 PstI 两种内切酶;预扩增引物采用不含选择性碱基的 M00 和 P00。选择性扩增结束后,扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,银染法进行染色。

分子标记筛选及特异片段的验证:对抗病组和感病组单株进行 AFLP 扩增,在两组间产生差异条带的引物组合即初步认为与黄瓜抗白粉病性相关基因连锁;然后利用该引物组合对 F_2 单株进行扩增,进一步确认所筛选到的标记。

特异片段的回收纯化参照文献[4],回收片段由大连宝生物公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 黄瓜白粉病的田间鉴定

分别在接种后 10 d、20 d 和 30 d 进行了白粉病发病情况调查,108 个 F_2 单株中高抗的 26 株,中间类型的(田间抗病性表现偏向于感病亲本)55 株,高感的 27 株,经适合性测验基本符合 1:2:1 的分离比例(表 1),说明黄瓜对白粉病的抗性由单隐性基因控制,感病相对抗病为不完全显性。这与已有报道^[6]1962 年日本的藤枝国光的研究结果一致。

2.2 抗白粉病相关基因分子标记的筛选

共采用在双亲间产生多态性的引物组合 73 组对两个亲本及抗病组和感病组单株进行了 PCR 扩增,获得了一个共显性标记 P18M47-238 bp/236 bp(图 1)。抗病亲本和抗病组单株只有 238 bp 的特异片段,感病亲本和感病组单株都具有 236 bp 的特异片段。所用选择性扩增引物 P18M47 的碱基序列如下: P18: 5'-GACTGCGTACATGCAGCT-3'; M47: 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAA-3'。

表 1 黄瓜白粉病田间鉴定结果

Table 1 Field identification of cucumber powdery mildew

材料	株数	高抗	中间类型	高感
Materials	No. of plants	High resistance	Medium	High susceptible
P_1 (Q9)	50	50	0	0
P_2 (Q10)	50	0	0	50
F_2	108	26	55	27

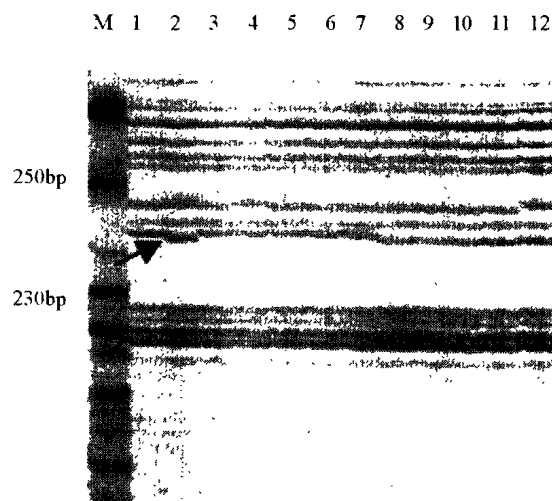


图 1 获得的共显性标记 P18M47-238 bp/236 bp

M. DNA ladder; 1. 抗病亲本 Q9; 2. 感病亲本 Q10; 3~7. 抗病池单株; 8~12. 感病池单株。

Fig. 1 Co-dominant marker P18M47-238 bp/236 bp

M. DNA ladder; 1. Resistant parent Q9; 2. Susceptible parent Q10; 3-7. Resistant plants; 8-12. Susceptible plants.

2.3 特异片段的 F₂ 单株验证

用所得到的共显性标记 P18M47 对组外其它 F₂ 单株进行了验证。结果显示, 仅在 82 个表现感病的单株中有 6 株发生了交换, 产生了与抗病单株相同的带型。由此计算, 所筛选到的标记与抗白粉病性相关基因紧密连锁, 遗传距离为 5.56 cM。图 2 为引物组合 P18M47 在部分 F₂ 单株中的验证。

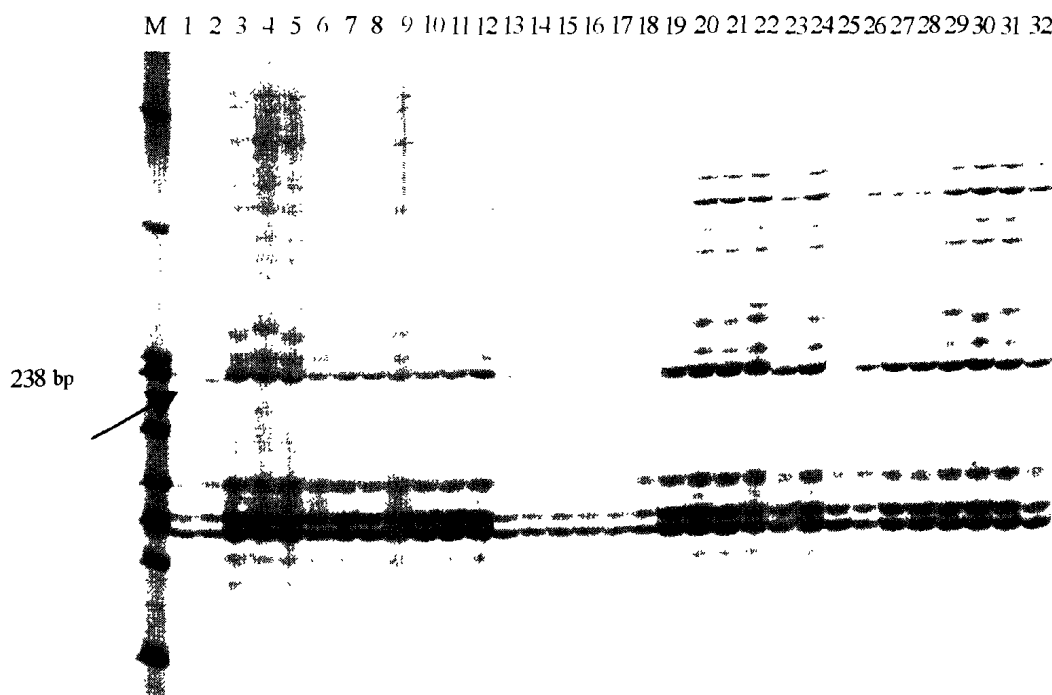


图 2 引物组合 P18M47 在部分 F₂ 单株中的验证

M. DNA ladder; 1. 抗病亲本 Q9; 2. 感病亲本 Q10; 3~12. 抗病单株; 13~22. 中间类型单株; 23~32. 感病池单株。

Fig. 2 Verification of primer P18M47 in F₂ plants

M. DNA ladder; 1. Resistant parent Q9; 2. Susceptible parent Q10; 3~12. Resistant plants; 13~22. Medium plants; 23~32. Susceptible plants.

2.4 目标条带的回收和测序

图 3 为目标条带回收、再扩增后在 1% 琼脂糖凝胶上的电泳分离结果。可以观察到, 回收的片段为单一条带, 且带型清晰, 分子量大小在 200~300 bp 之间。回收片段测序结果显示, 两个片段的大小分别为 238 bp 和 236 bp, 其差异仅为 2 个“T”碱基的插入或缺失。采用 Blast 软件对 GeneBank 中的非冗余数据库 (GeneBank + EMBL + DDBJ) 进行查询, 未发现与该两个标记片段同源性高于 30%

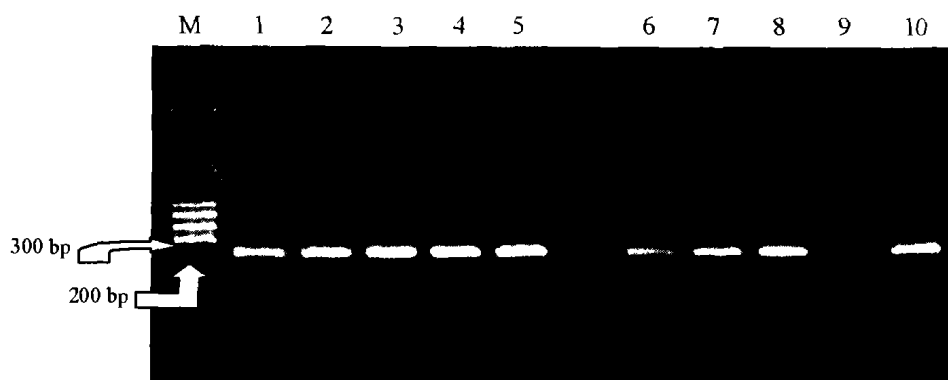


图 3 回收、扩增后目标片段的琼脂电泳分离

M: DNA 标准; 1~5: 238 bp 片段; 6~10: 236 bp 片段。

Fig. 3 Amplification of target fragment derived from silver-stained gel

M: DNA ladder; 1~5: Fragment of 238 bp; 6~10: Fragment of 236 bp.

的序列,说明该两个片段为新发现的黄瓜 DNA 序列。与所测序列有关的内容已申报国家发明专利(专利申请号为:03129978.4)。

3 讨论

遗传育种学家早就对黄瓜抗白粉病性的遗传进行了研究。前人研究结果^[6]为:黄瓜对白粉病的抗性受隐性多基因控制,但也有研究认为抗性受隐性单基因控制。笔者认为,得到以上不同研究结果可能与他们所采用材料的遗传背景有关。本试验也表明黄瓜对白粉病的抗性由单隐性基因控制。另外,本研究也发现,在田间表现为中间类型的单株,其抗病性表现均偏向于感病亲本,说明黄瓜对白粉病的感病性相对抗病性为不完全显性。

分离群体混合分析或分群分析法(BSA)是 Michelmore 等 1991 年建立起来的一种连锁标记分析方法^[7]。对于单基因控制的质量性状,若为不完全显性,不易鉴别杂合子,在 F_2 后代性状划分时很可能发生划分错误^[8]。由于黄瓜对白粉病的抗性是由隐性单基因控制的,且感病为部分显性,所以在组建感病池时,很容易将中间类型的个体错误地划分为感病个体,从而使感病池目标性状混杂,在进行 BSA 分析时就很难找到在两池间表现多态的标记。因此本研究构建抗病组(5 个抗病 F_2 单株单独扩增)和感病组(5 个感病 F_2 单株单独扩增)进行标记筛选,只要组中有 4 个单株带型一致,即可初步认为该标记与抗病性有关。目前已根据所测序列信息设计了 SCAR 引物,并成功地转化为了更为稳定的 SCAR 标记。

参考文献:

- 1 邵映田,牛永春,朱立煌,等. 小麦抗条锈病基因 $Yr10$ 的 AFLP 标记. 科学通报, 2001, 46 (8): 669 ~ 672
- 2 Seyfarth R, Feuillet C, Schachermayr G, et al. Molecular mapping of the adult-plant leaf rust resistance gene $Lr13$ in wheat (*Triticum aestivum* L.). J. Genet. & Breed, 2000, 54: 193 ~ 198
- 3 Yang W, Weaver D B, Nielsen B L, et al. Molecular mapping of a new gene for resistance to frogeye leaf spot of soya bean in 'Peking'. Plant Breeding, 2001, 120: 73 ~ 78
- 4 张桂华. 黄瓜白粉病抗性相关基因的分子标记研究: [博士学位论文]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003. 23 ~ 28
- 5 Vos P, Hongers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Res., 1995, 23 (21): 4407 ~ 4414
- 6 侯 锋. 黄瓜. 天津: 天津科学技术出版社, 1999. 69
- 7 Michellmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 9828 ~ 9832
- 8 Schön C, Sanchez M, Blake T, et al. Segregation of Mendelian markers in doubled haploid and F_2 progeny of a barley cross. Hereditas, 1990, 113: 69 ~ 72

新书推荐

《猕猴桃研究进展 (II) 》

《猕猴桃研究进展 (II) 》是第五届国际猕猴桃研讨会论文集,黄宏文博士主编,由科学出版社在 2003 年 12 月出版发行。该书收录了近年来国内外猕猴桃领域主要研究论文 65 篇(国外论文附有翻译)。全书 60 万字,16 开本,382 页,分 7 个专题:(1)猕猴桃产业化与市场;(2)遗传与育种;(3)果园管理;(4)采前与采后生理;(5)种质资源、分类及系统学;(6)病虫害防治;(7)分子生物学与生物化学。每册售价 60 元整,另加邮寄费 5 元,共 65 元。

购书者请汇款至:武汉市武昌磨山 中科院武汉植物园(430074)王圣梅收

电话:(027) 87510298 传真:(027) 87510331 E-mail: kiwi2002@public.wh.hb.cn