

与辣椒抗蚜性基因连锁的 RAPD 标记

陈 青¹ 张银东²⁽¹⁾ 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 儋州 571737; ⁽²⁾ 中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘 要: 运用 RAPD 技术, 在 F₂ 代群体中采用混合分组分析法 (bulk segregant analysis, BSA) 进行分子标记研究, 找到一个与辣椒抗蚜性基因连锁的 RAPD 标记 OPA18₆₀₀, 并在杂种后代 F₂ 群体和供试抗、感品种中得到了验证。

关键词: 辣椒; 抗虫性; 蚜虫; RAPD

中图分类号: S 641 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 06-0737-02

1 目的、材料与方法

本试验就与辣椒抗蚜性基因连锁的 RAPD 标记进行了研究, 以期为辣椒抗蚜育种材料的鉴定与筛选及定位、克隆该基因奠定基础。供试辣椒品种选用对桃蚜 [*Myzus persicae* (Sulzer)] 表现高抗的凉椒一号、猪大肠、都椒一号和新丰五号, 表现抗性的苗丰三号和中椒六号, 表现高感的大羊角椒、砭椒一号、湘研 9402 和渝椒五号, 表现感性的保椒二号和泰国正椒三号^[1]。F₁ 代群体由猪大肠 (♀) 与大羊角椒 (♂) 单株杂交结实获得。F₂ 代群体由 F₁ 代杂种单株自交结实获得。随机引物为 Operon 公司产品, dNTPs 和 TaqDNA 聚合酶购自上海生工生物工程公司, 其它试剂为国产分析纯试剂和 Sigma 公司产品。抗蚜性鉴定采用温室苗期人工接蚜鉴定方法与分级标准^[1]。依据平均每株蚜量分级: 0 级为 0~1.0 头, 为高抗; 1 级 1.1~5.0 头, 为抗; 2 级 5.1~10.0 头, 为中抗; 3 级 10.1~15.0 头, 为感; 4 级 > 15.0 头, 为高感。PCR 仪为 PE480 型。总 DNA 提取参照周群初等^[2]方法。辣椒抗蚜性基因的 RAPD 标记筛选与验证采用 Michelmore^[3] 的 BSA 方法, 根据 F₂ 代表现型分为抗与感两类, 从两类中各选取 10 个症状明显的单株的 DNA 等量混合, 构成一对抗蚜和感蚜基因池。以这两池 DNA、两亲本、F₁ 代以及 F₂ 代抗、感各一个单株 DNA 为模板, 应用同一随机引物同时进行 PCR 扩增初步筛选引物, 扩增产生多态性的 RAPD 引物经 2~3 次重复后, 再对用以构建抗、感 DNA 混合池的 20 个 F₂ 代单株和其它供试抗、感品种进行 PCR 扩增, 以进一步确证。

2 结果与分析

2.1 杂种后代 F₁、F₂ 的抗蚜性鉴定结果

以猪大肠 (♀) 与大羊角椒 (♂) 进行杂交, 杂交后代 F₁ 对桃蚜的反应表现为高抗, 表明辣椒抗蚜性属显性遗传。在 F₂ 代植株中, 398 株对桃蚜的反应表现为抗, 135 株表现为感, 经适合性检验, $\chi^2 = 0.016 < \chi^2_{0.05, 1} = 3.84$, 抗与感植株分离符合 3:1 (表 1)。

2.2 与辣椒抗蚜性基因连锁的 RAPD 标记筛选与验证

以 F₂ 代抗感两混合 DNA 池为模板, 从 Operon 公司的 A、D、E、F、G、O 共 7 组 140 个随机引物中筛选出有多态性差异的引物 7 个。对这 7 个引物进一步筛选, 最终筛选出一个重复性好、扩增条带

表 1 辣椒抗蚜性的苗期鉴定结果

Table 1 Results of identification of *Myzus persicae* (Sulzer) resistance in *Capsicum* cultivar seedling

品种 Cultivars	调查株数 No. plants	抗性株 Resistance	感性株 Susceptibility	抗感比 Expected ratio (R:S)
猪大肠 Zhudachang	100	100		
大羊角椒 Dayangjiaojiao	100		100	
F ₁	100	100		
F ₂	533	398	135	3:1

清晰可辨、片段大小约为 600 bp 的一条差异带, 在抗蚜 DNA 池中存在而在感蚜 DNA 池中不存在, 将其命名为 OPA18₆₀₀ (图 1)。再用引物 OPA18 对用以构建抗感 DNA 混合池的 20 个 F₂ 代单株和包括杂交亲本在内的供试抗、感品种进行 PCR 扩增, 结果表明, 10 个 F₂ 抗蚜单株和 6 个抗蚜品种 DNA 池均能扩增出而 10 个 F₂ 感蚜单株和 6 个感蚜品种 DNA 池均未能扩增出 OPA18₆₀₀ 差异带 (图 2、3), 重复 3 次结果一致, 由此可确定 OPA18₆₀₀ 是与辣椒抗蚜性基因连锁的 RAPD 标记。

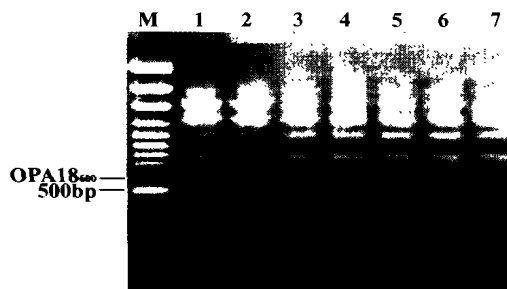


图 1 引物 OPA18 筛选时的扩增结果

1. F₂ 抗蚜混合 DNA 池; 2. 抗蚜亲本猪大肠; 3. F₁; 4. F₂ 抗蚜单株; 5. F₂ 感蚜混合 DNA 池; 6. 感蚜亲本大羊角椒; 7. F₂ 感蚜单株; M. 分子量标准 (100 bp DNA ladder)。

Fig. 1 PCR analysis of OPA18 during primer selection

1. F₂ resistant DNA pool; 2. Resistant parent Zhudachang; 3. F₁; 4. F₂ resistant individual; 5. F₂ susceptible DNA pool; 6. Susceptible parent Dayangjiaojiao; 7. F₂ Susceptible individual; M. 100 bp DNA ladder.

参考文献:

- 1 陈 青. 几种生化物质与辣椒抗蚜性的相关性. 园艺学报, 2002, 29 (6): 533 ~ 536
- 2 周群初, 马艳青, 张竹青, 等. 利用 RAPD 技术进行辣椒杂种纯度鉴定的研究. 湖南农业大学学报, 1999, 25 (2): 95 ~ 98
- 3 Michelmore R W. Identification of marker linked to disease resistance gene by bulked segregant analysis: A rapid method detect markers in specific genomic regions by using segregating population. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1991, 88: 9828 ~ 9832

A RAPD Marker Linked to Aphid Resistant Gene in *Capsicum annuum*

Chen Qing¹ and Zhang Yindong²

(¹ Plant Protection Research Institute, CATAS, Danzhou 571737, China; ² National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, CATAS, Haikou 571101, China)

Abstract: Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) was employed to detect a molecular marker linked to aphid resistant gene in *Capsicum* cultivars. A RAPD marker OPA18₆₀₀ was proved to be linked aphid resistant gene by bulked segregant analysis (BSA) with F₂ population. OPA18₆₀₀ was also tested with F₂ population, resistant and susceptible *Capsicum* cultivars.

Key words: *Capsicum annuum* L.; Pest resistance; *Myzus persicae* (Sulzer); RAPD

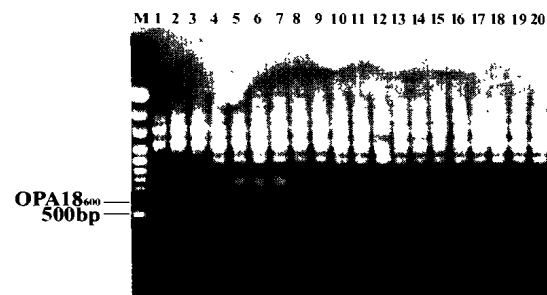


图 2 引物 OPA18 在 F₂ 代抗、感单株中的扩增结果
1 ~ 10 为抗蚜单株; 11 ~ 20 为感蚜单株。

Fig. 2 PCR analysis of F₂ individuals
amplified with primer OPA18

1 ~ 10: F₂ resistant individual; 11 ~ 20: F₂ susceptible individual.

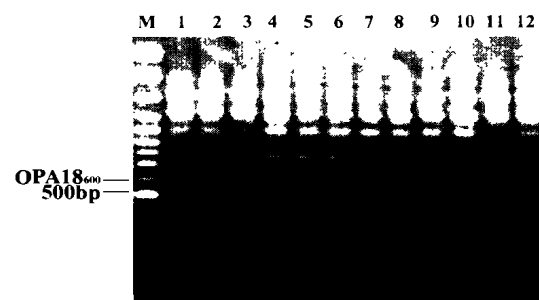


图 3 引物 OPA18 在 12 个供试抗、感品种中的扩增结果

1 ~ 6 分别为抗蚜品种凉椒一号、猪大肠、都椒一号、新丰五号、苗丰三号、中椒六号; 7 ~ 12 分别为感蚜品种大羊角椒、殒椒一号、湘研 9402、渝椒五号、保椒二号、泰国正椒三号。

Fig. 3 PCR analysis of 12 resistant and susceptible
amplified with primer OPA18

1 ~ 6: Resistant cultivars: Liangjiao 1, Zhudachang, Doujiao 1, Xinfeng 5, Miaofeng 3, Zhongjiao 1; 7 ~ 12: Susceptible cultivars: Dayangjiaojiao, Dangjiao 1, Xiangyan 9402, Yujiao 5, Baojiao 2, Taiguozhengjiao 3.