

# 分子标记辅助选择辣椒抗疫病新种质研究

马寿宾, 孙 艳, 王 琛, 刘倩倩, 李 敏, 刘维信

(青岛农业大学 园艺学院, 山东 青岛 266109)

**摘 要:**以野生辣椒‘12-16’和甜椒‘三道筋’、‘12-1’、‘12-19’为试材,选用与辣椒疫病抗性相关的 4 对引物,对 4 份辣椒材料的疫病抗性进行了快速鉴定。结果表明:4 份辣椒材料中,‘12-16’中能够扩增出抗病特异性条带,推断其为抗病材料;其它 3 份材料均未扩增出抗病特异性条带,表明其为感病材料;供试的 4 对引物中仅有 1 对引物的稳定性和重复性较高。

**关键词:**辣椒;疫病;分子标记;育种

**中图分类号:**S 641.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)10-0107-04

辣椒疫病是一种由辣椒疫霉菌(*Phytophthora capsici*)引起的土传病害,1918 年在美国墨西哥洲首先被发现。在国内,在江苏省首先发现辣椒疫病<sup>[1]</sup>,戚佩坤等<sup>[2]</sup>报道该病曾在长春大范围爆发,20 世纪 70~80 年代在我国新疆,辣椒疫病成为毁灭性病害。近年来,国内外研究者对辣椒疫病发病机理及抗病机制进行了广泛的研究。大量试验结果证明,不同辣椒材料的疫病抗性遗传模式呈现多样性,Polach 等<sup>[3]</sup>和 Smith 等<sup>[4]</sup>认为辣椒的疫病抗性是由寡基因控制的,Pochard 等<sup>[5]</sup>的研究指出,辣椒‘PM217’对疫病的抗性是由多基因控制,而 Kim<sup>[6]</sup>的研究表明,部分辣椒材料的抗病性是由单基因控制。辣椒疫病抗性遗传规律的多样化可能是由于不同材料携带的抗病基因所处的位点不同,或者不同辣椒材料的抗病遗传方式不同。此外,辣椒疫霉菌菌株群体内不同交配型的同宗或异宗配合可能会导致菌体的遗传变异,也可能造成同种辣椒抗性基因位点的变化<sup>[7]</sup>。

目前国内外对于甜椒的疫病分子标记研究报道较少,张晓芬等<sup>[8]</sup>以高抗疫病的甜椒育种材料‘N1345’与高感疫病辣椒材料‘N1308’为双亲建立的群体世代中筛选到 2 个 EST-SSR 标记 E73、E318,这 2 个标记与疫病抗性基因紧密连锁,与疫病抗性等级均呈显著负相关,这 2 个标记与疫病抗性基因紧密连锁。Sugita 等<sup>[9]</sup>利用抗病品系材料‘AC2258’构建 DH 群体,经分析获得了 2 个 AFLP 连锁标记,为以‘AC2258’为抗原的抗疫

病标记辅助育种奠定了基础。国内外学者通过构建辣椒的遗传图谱和 QTL 分析研究,已开发出了与辣椒疫病抗性基因紧密连锁的一系列分子标记,并且应用于分子辅助育种<sup>[10-12]</sup>。

目前,辣椒特别是甜椒类的抗疫病材料较为缺乏<sup>[13-14]</sup>,有必要利用分子标记手段对材料进行广泛的抗病性鉴定。因此,该研究采用已经报道的 4 对与辣椒疫病抗性相关的引物,验证其稳定性和适用性,旨在为进一步利用分子标记鉴定抗疫病材料,加快辣椒抗疫病育种进程提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的 1 份野生辣椒材料‘12-16’和 3 份甜椒材料‘三道筋’、‘12-1’、‘12-19’均由青岛农业大学园艺学院提供。

### 1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取及检测 采用 SDS 法提取辣椒总 DNA<sup>[15]</sup>略有改进,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,用微量紫外分光光度计 SMA4000 检测 DNA 纯度和浓度,并稀释为 100 ng/ $\mu$ L, -20℃ 冰箱保存备用。

1.2.2 引物 根据 Quirin 等<sup>[10]</sup>公布的与辣椒疫病抗性紧密连锁的引物序列合成引物 FQ01/RQ01(引物 1)。引物由上海生物工程有限公司合成,下同。FQ01: CCATAAGGGTTGGTAAATTTACAAA; RQ01: TCGAGAGATAATTCAGATAGTATAATC; 抗病材料可扩增出 717 bp 大小的特异条带,感病材料不能扩增出该条带。根据张晓芬等<sup>[8]</sup>公布的与甜椒疫病抗性紧密连锁的引物序列合成引物 E73tj02F/E73tj02R(引物 2)和 E318tjF/E318tjR(引物 3)。E73tj02F: CAAC-CAAGGTGGAGGAAC; E73tj02R: CGCTGGCTCTACT-GTTTCT; E318tj03F: CGCTGGCTCTACTGTTTCT;

**第一作者简介:**马寿宾(1987-),男,在读硕士,研究方向为蔬菜育种与生物技术。E-mail:mashoubin1987@163.com.

**责任作者:**刘维信(1965-),男,博士,副教授,硕士生导师,研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。E-mail:liuweixin2006@163.com.

**基金项目:**2010~2012 年山东省现代农业产业技术体系蔬菜创新团队建设资助项目。

**收稿日期:**2013-01-18

E318tj03R;CAACCAAGGTGGAGGAAC;抗病材料可在100~150 bp 之间扩增出特异条带。根据王得元等<sup>[12]</sup>公布的与甜椒疫病抗性紧密连锁的引物序列合成引物Tjwang04F/Tjwang04R(引物4)。Tjwang04F: AAAGCTGCGGATTTAGACCT; Tjwang04R: AAAGCTGCG-GTTGAATCGG,抗病材料可扩增出520 bp大小的特异条带,感病材料则没有该特异条带。

**1.2.3 PCR 扩增** 引物1扩增反应在Bio-RAD mycycler thermal cycle PCR 仪上进行,反应体系为25  $\mu$ L,包括2.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR buffer( $Mg^{2+}$ ),0.2  $\mu$ mol/L dNTP 1.0  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L Primer 2.0  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L Taq 酶0.25  $\mu$ L、模板DNA 1.0  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 18.25  $\mu$ L。PCR的反应程序为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,57 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,共36个循环;72 $^{\circ}$ C延伸5 min,4 $^{\circ}$ C保存。引物2、引物3和引物4扩增反应在Bio-RAD mycycler thermal cycle PCR 仪上进行,反应体系为25  $\mu$ L,包括2.5  $\mu$ L 10 $\times$ PCR buffer( $Mg^{2+}$ ),0.2  $\mu$ mol/L dNTP 1.0  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L Primer 2.0  $\mu$ L、5 U/ $\mu$ L Taq 酶0.25  $\mu$ L、模板DNA 1.0  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 18.25  $\mu$ L。PCR的反应程序为:94 $^{\circ}$ C预变性4 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,58 $^{\circ}$ C复性1 min,72 $^{\circ}$ C延伸2 min,共35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min,4 $^{\circ}$ C保存。

**1.2.4 扩增产物检测** PCR扩增产物在1.5%的琼脂糖凝胶上检测,每孔点样5~8  $\mu$ L,所用电泳仪为北京六一电泳仪厂的DYY-10c型电泳仪,溴化乙锭(EB)染色,Bio-RAD自动凝胶成像系统观察照相,并记录电泳结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒基因组 DNA 电泳结果

采用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA条带完整性,由图1可知,DNA条带完整清晰,可以用于PCR扩增。

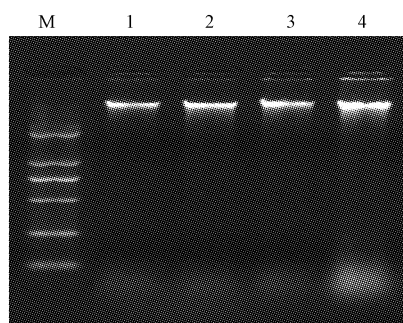


图1 辣椒基因组DNA电泳结果

注:M;D 2 000 Marker;泳道1~4 自左向右分别是:‘12-16’、‘三道筋’、‘12-1’、‘12-19’。

Fig. 1 Pepper genome DNA electrophoresis results

Note:M;D 2 000 Marker;line 1~4 from left to right are ‘12-16’, ‘Sandaojin’, ‘12-1’, ‘12-19’.

### 2.2 分子标记鉴定结果

选用已报道的4对引物对4份材料进行PCR扩增,FQ01/RQ01(引物1)的扩增结果显示,辣椒材料‘12-16’扩增出抗病性相关的目标条带,甜椒材料‘三道筋’、‘12-1’、‘12-19’没有扩增出特异条带(图2)。4份材料中E73tj02F/E73tj02R(引物2)和E318tjF/E318tjR(引物3)的PCR扩增结果均为非特异性条带(图3、4)。Tjwang04F/Tjwang04R(引物4)在4份材料中均扩增出特异条带(图5),其在该试验材料中的选择性不强。这可能与辣椒疫病遗传模式多样性有关。综合上述试验结果,4对引物中引物1和引物4的PCR扩增结果显示,辣椒材料‘12-16’均能扩增出抗病特异性条带,推测可能为抗病材料;甜椒材料‘三道筋’、‘12-1’和‘12-19’在4对引物扩增下结果不同,只有在引物4的PCR扩增中出现目的条带。在试验过程中,引物FQ01/RQ01的可靠性和重复性较好。

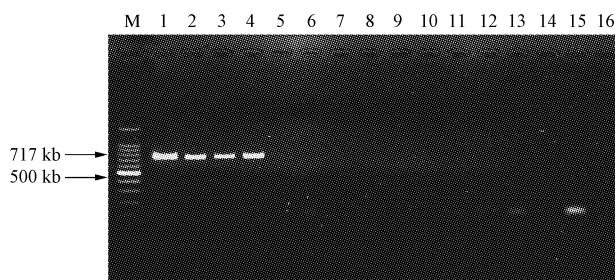


图2 引物1 FQ01/RQ01电泳结果

注:M;DL 100 Maker;泳道1~4:‘12-16’;5~8:‘三道筋’;泳道9~12:‘12-1’;泳道13~16:‘12-19’。

Fig. 2 Primer 1:FQ01/RQ01 electrophoresis results

Note:M;DL 100 Maker;lines 1~4:‘12-16’;5~8:‘Sandaojin’;lines 9~12:‘12-1’;lines 13~16:‘12-19’.

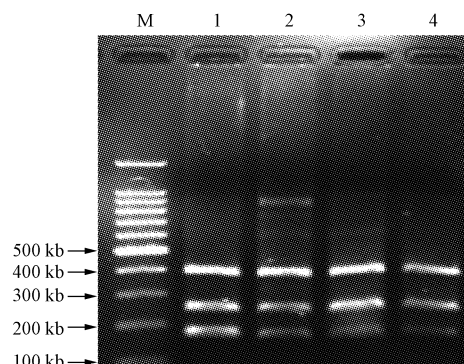


图3 引物2 E73tj02F/E73tj02R电泳结果

注:M;DL 100 Maker;泳道1:‘12-16’;泳道2:‘三道筋’;泳道3:‘12-1’;泳道4:‘12-19’。

Fig. 3 Primer 2:E73tj02F/E73tj02R electrophoresis results

Note:M;DL100 Maker;line 1:‘12-16’;line 2:‘Sandongjin’;line 3:‘12-1’;line 4:‘12-19’.

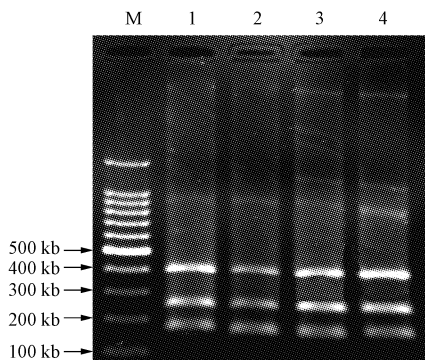


图4 引物3 E318tjF/E318tjR 电泳结果

注:M;DL 100 Maker;泳道1:‘12-16’;泳道2:‘三道筋’;泳道3:‘12-1’;泳道4:‘12-19’。

Fig. 4 Primer 3 E318tjF/E318tjR electrophoresis results

Note:M;DL100 Maker;line 1:‘12-16’;line 2:‘Sandongjin’;line 3:‘12-1’;line 4:‘12-19’.

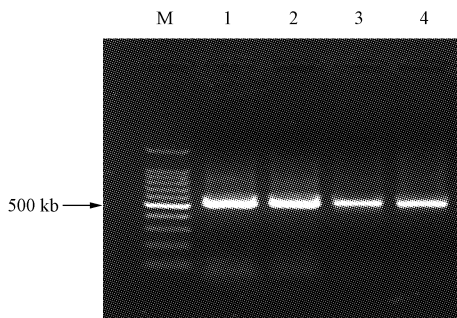


图5 引物4 Tjwang04F/Tjwang04R 电泳结果

注:M;DL 100 Maker;泳道1:‘12-16’;泳道2:‘三道筋’;泳道3:‘12-1’;泳道4:‘12-19’。

Fig. 5 Primer 4 Tjwang04F/Tjwang04R electrophoresis results

Note:M;DL100 Maker;line 1:‘12-16’;line 2:‘Sandongjin’;line 3:‘12-1’;line 4:‘12-19’.

### 3 结论与讨论

目前国内外辣椒疫病常规的鉴定方法有田间抗病性调查和人工接种鉴定。但是常规鉴定抗病性的方法有一定缺点,试验周期长,过程繁琐,某些抗病材料受环境因素的影响可能引起疫霉菌株基因的变异,也可能影响抗病材料的抗病性。而利用分子标记辅助选择技术能有效减少连锁累赘现象,增加了目标性,在回交的低世代即可找到其目标材料,受环境影响较小,快速而准确。

该试验选用已报道的4对与辣椒疫病抗性相关的引物,对4份辣椒材料进行抗病性鉴定,结果显示只有引物1(FQ01/RQ01)的标记效果好、稳定性强,这与郭爽等<sup>[16]</sup>鉴定辣椒抗疫病材料的研究结果一致。由张晓芬等<sup>[8]</sup>开发的引物2和3可能只适用于以甜椒材料‘N1345’为抗原材料进行疫病抗性标记。甜椒材料‘N1345’的疫病抗性由2对加性-显性-上位性主基因控制,2对主基因效应相等,无微效基因作用,且抗病对感

病表现为显性。引物2(E73tj02F/E73tj02R)和引物3(E318tjF/E318tjR)可能对与‘N1345’遗传模式相同的甜椒材料也能够标记,但不适用于该试验中的4份材料。李智军等<sup>[17]</sup>研究指出,辣椒材料‘Bang chang’对广东辣椒疫霉菌菌株‘ZLT0566’的抗性遗传符合1对不完全显性基因控制模式,而辣椒材料‘P038’的抗性遗传符合2对相互独立的不完全显性互补基因控制模式。该试验结果也验证显示不同辣椒品种材料的疫病抗性不同。引物4(Tjwang04F/Tjwang04R)的PCR扩增结果显示该试验材料均出现特异性普条带。因此,该引物的可靠性,有待进一步验证。辣椒分子标记在应用上有一定的困难,很多已经报道的辣椒疫病相关的特异性引物在实际运用中缺乏普遍适用性,这可能由于辣椒疫病遗传模式的复杂性和多样性有关<sup>[18-19]</sup>。

该研究验证的4对引物中引物FQ01/RQ01对标记辣椒材料‘12-16’抗病性鉴定的稳定性和可靠性较强,为以后试验选用辣椒分子标记引物提供了依据,为以辣椒材料‘12-16’为抗原进行辣椒新品种育种奠定了基础。

### 参考文献

- [1] 戴芳澜,相望年,郑儒永. 中国经济植物病原目录[M]. 北京:科学出版社,1958:63.
- [2] 戚佩坤,白金凯,朱桂香. 吉林省栽培植物真菌病害志[M]. 北京:科学出版社,1966:140.
- [3] Polach F J, Webster R K. Identification of strains and inheritance of pathogenicity in *Phytophthora capsici*[J]. Phytopathology, 1972, 62: 20-26.
- [4] Smith P G, Kimble K A, Grogan R G, et al. Inheritance of resistance in pepper to *Phytophthora root rot*[J]. Phytopathology, 1967, 57: 377-379.
- [5] Pochard E, Molot P M, Dominguez G, et al. Etude de deux nouvelles sources de resistance a *Phytophthora capsici* Leon. Chez le piment; Confirmation del'existence de trois composants distinctes dans le resistance [J]. Agronomie, 1983(3): 333-342.
- [6] Kim B S. Inheritance of resistance to bacterial spot and *Phytophthora* blight in peppers[J]. Journal of Korean Society for Horticultural Science, 1990, 31: 350-357.
- [7] 孙文秀,张修国,贾永健,等. 不同地区辣椒疫霉菌遗传多样性的RAPD分析[J]. 植物病理学报, 2005, 35(4): 340-344.
- [8] 张晓芬,韩华丽,陈斌,等. 甜椒疫病抗性遗传及相关基因分子标记研究[J]. 园艺学报, 2011, 38(7): 1325-1332.
- [9] Sugita T, Yanaguchi K, Kinoshita T. QTL analysis for resistance to *Phytophthora blight* (*Phytophthora capsici* Leon.) using an intraspecific doubled-haploid population of *Capsicum annuum*[J]. Breeding Science, 2006, 56: 137-145.
- [10] Qirir E A, Ogundiwin E A, Prince J P, et al. Development of sequence characterized amplified region (SCAR) primers for the detection of Phyto. 5. 2, a major QTL for resistance to *Phytophthora capsici* Leon. in pepper[J]. Theor Appl Genet, 2005, 110: 605-612.
- [11] 巩振辉,李大伟,黄炜,等. 中国专利[P]. CN101487048, 2009-7-22.
- [12] 王得元,安康,李颖,等. 一种辣椒抗疫病育种的分子标记辅助选择方法[P]. 中国专利: CN1970790, 2007-05-30.
- [13] 张宝玺,王立浩,毛胜利,等. 优质抗疫病甜椒种质资源的选育[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(3): 295-299.



# “贝吉佳”草莓脱毒苗增殖的研究

郭朋伟, 高晔华, 高 日, 吴荣哲

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

**摘 要:**以“贝吉佳”草莓脱毒苗为外植体,研究了培养基种类、激素种类及浓度、糖源种类及浓度、光照强度等对组培苗增殖的影响。结果表明:在 MS 培养基、BA 浓度为 2.0 mg/L、糖源为 30 g/L 的蔗糖、光照强度在 1 600 lx 条件下附加 0.1 mg/L NAA 的培养基最适合脱毒苗的增殖,增殖系数可达 12.0。

**关键词:**脱毒苗;增殖;培养基;激素;糖源

**中图分类号:**S 668.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)10-0110-04

草莓(*Fragaria ananassa* Duch.)属蔷薇科草莓属多年生草本植物,是当今世界七大水果之一,全球大约有 2 000 多个品种,在我国有大面积的栽培<sup>[1]</sup>。草莓色泽鲜艳、果实香嫩多酸甜适口,富含多种微量元素、维生素和有机酸。它既可以鲜食也可以加工成果浆、果汁、果酒、罐头<sup>[2]</sup>。草莓栽培简单,适应性广,产量高,经济效益

高<sup>[3]</sup>。草莓传统的繁殖方法有匍匐茎繁殖、母株分株繁殖和种子繁殖,匍匐茎繁殖的繁殖系数小,产生的苗质量差;母株分株繁殖的繁殖系数低,伤口易感染病菌;种子繁殖易产生变异,不利于原品种性状的保存<sup>[4]</sup>。这 3 种方法繁殖的苗多年种植后病毒感染积累,导致草莓的果实植株长势减弱、个体矮化、含糖量变低、畸形果多、产量降低<sup>[5-7]</sup>,而采用组培苗脱毒则可以克服以上缺点。草莓茎尖、匍匐茎尖、子房、花药等均可通过组织培养获得再生植株<sup>[8]</sup>。草莓匍匐茎尖容易获得,脱毒后不发生变异,因此选其为外植体。“贝吉佳”草莓是由日本引进的品种,因其结果早、产量高、抗病性强、货架期长,

**第一作者简介:**郭朋伟(1988-),男,硕士研究生,研究方向为生物工程及栽培生理。

**责任作者:**吴荣哲(1966-),男,博士,副教授,现主要从事生物工程及栽培生理等研究工作。

**收稿日期:**2013-01-18

- [14] Kimble K A, Grogan K G. Resistance to Phytophthora root rot in peppers[J]. Plant Dis Rep, 1960, 44: 872-873.
- [15] 王得元, 彭世清, 刘志昕, 等. 辣椒基因组 DNA 提取与 RAPD 分析[J]. 江西农业大学学报, 1998, 20(2): 180-183.
- [16] 郭爽, 黄贞, 常绍东, 等. 利用分子标记鉴定辣椒抗病材料[J]. 中国农学通报, 2012, 28(13): 163-166.
- [17] 李智军, 龙卫平, 郑锦荣, 等. 2 个辣椒疫病抗性资源的抗性遗传分析

[J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(2): 30-33.

[18] Thabuis A, Lefebvre V, Bernard G, et al. Phenotypic and molecular evaluation of a recurrent selection program for a polygenic resistance to *Phytophthora capsici* in pepper[J]. Theor Appl Genet, 2004, 109: 342-351.

[19] Pflieger S, Palloix A, Caranta C, et al. Defense response genes co-localize with quantitative disease resistance loci in pepper[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 920-929.

## Molecular Marker Assisted Selection of Pepper Materials with Resistance to Phytophthora Blight

MA Shou-bin, SUN Yan, WANG Chen, LIU Qian-qian, LI Min, LIU Wei-xin  
(College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109)

**Abstract:** Taking pepper ‘12-16’, ‘Sandojin’, ‘12-1’, ‘12-19’ as materials, their resistance to phytophthora blight were rapidly identified by using 4 molecular markers related to resistance genes and field surveys. The results showed that phytophthora blight resistance specificity band could be amplified from hot pepper materials, namely ‘12-16’. The other 3 hot pepper materials, ‘Sandojin’, ‘12-1’, and ‘12-19’, with no specificity band found, were regarded as susceptible materials. Only one pair of primers of the 4 pairs of primers reported was stable repeated.

**Key words:** hot pepper; phytophthora blight; molecular markers; breeding