

# 甜瓜抗白粉病候选基因片段克隆与序列分析

韩 瑞, 王 贤 磊, 李 冠

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘 要:**以 2 个高感白粉病的甜瓜品种“K413”、“JS”和 3 个高抗品种“H70”、“AN”、“H74”为试材,采用 PCR 方法,对第 V 连锁群的 *Pm-AN* 片段进行克隆分析。结果表明:从“K413”、“JS”、“H70”、“AN”和“H74”中克隆出 *Pm-AN-N/C* 2 个片段分别得到 830 bp 和 610 bp 2 个碱基,分别编码氨基酸 286 个和 192 个,同源性分别为 99.74%和 94.00%。cDNA 扩增结果表明,5 个甜瓜品种分别出现 5 种不同的带型,在“JS”、“H70”、“AN”中还出现了 2 种不同的带型,而且所有带型都有一定的差异。

**关键词:**甜瓜;抗白粉病基因;基因克隆;序列分析

**中图分类号:**S 652 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2013)19-0110-04

白粉病是一种世界病害,主要发生在南瓜、丝瓜、甜瓜和黄瓜等葫芦科作物上。新疆作为中国重要的甜瓜种植区,随着种植面积的扩大,白粉病逐渐成为新疆甜瓜绿色生产的重要病害。在西班牙、以色列、美国、法国等甜瓜种植国家,白粉病早已成为甜瓜商业生产的瓶颈<sup>[1-2]</sup>。甜瓜白粉病主要由真菌子囊菌亚门白粉菌属的二孢白粉菌(*Erysiphe cichoracearum* DC.)和瓜类单囊壳属的专性寄生菌单丝壳白粉菌(*Sphaerotheca fulginea* (Schl. ex. Fr.) Poll)感染引发。在我国境内这 2 种致病菌都有广泛分布,但以单丝壳白粉菌较多<sup>[3-6]</sup>。由于甜瓜白粉病严重影响甜瓜品质和产量,世界各国对甜瓜白粉病抗病性的研究以及育种工作都非常重视<sup>[6]</sup>。

法国 Pitrat<sup>[7]</sup>分析了甜瓜抗病的多个性状基因的遗传连锁关系,发现甜瓜材料 WMR 29 中,抗蚜虫蚜传病毒基因(*Vat*)和抗白粉病基因(*Pm-w*)与抗枯斑病基因(*Fn*)三者具有连锁关系。抗白粉病基因(*Pm-x*)与雄花两性花同株(*a*)具有连锁关系,抗白粉病基因(*Pm-y*)与抗甜瓜坏死斑点病毒基因(*nsu*)具有连锁关系。法国 Perin 等<sup>[8]</sup>完成了由甜瓜品种 Védrañtais×PI161375 和 Védrañtais×PI 414723 杂交组合形成的重组自交系进行遗传图谱的整合,并将 *Pm-x* 定位于第 II 连锁群,*Pm-w* 定位于第 V 连锁群,*nsu* 与 *Pm-y* 因定位于第 VII 连锁群。法国 Perchepey 等<sup>[9]</sup>完成了由 PI 124112×Védrañtais 杂交产生的群体,对甜瓜霜霉病与白粉病进行数量性状作图,

结果表明这 2 个独立的基因对甜瓜白粉病均具有抗性,分别位于第 II、V 连锁群,并且可能与 *Pm-x* 和 *Pm-w* 一致。日本 Fukino 等<sup>[10]</sup>绘成了 AR5×Earl's Favourite 遗传群体的抗白粉病基因的 QTL 遗传图,分别在第 II 与第 VII 连锁群发现抗白粉病位点,也可能与 *Pm-x* 和 *Pm-y* 一致。该课题组前期已利用抗病材料 AN 分别与新疆甜瓜感病品种“皇后”、“K413”建立杂交遗传群体,并将该抗白粉病基因定位在第 V 连锁群,位于 2 个共显性分子标记 AF 与 CA 之间,这个区域与黄瓜 2 号染色体长臂末端区域同源,这个抗病基因可能与 Pitrat<sup>[7]</sup>发现的第 V 连锁群的 *Pm-w* 相同<sup>[11]</sup>。前期研究发现,甜瓜 RGA 序列 RPW、MRGH5、MRGH63、NBS5 和 *Vat* 位于该区域,该区域在黄瓜与甜瓜中具有明显的共显性,这些信息都为抗白粉病基因 *Pm-AN* 的克隆奠定了基础。2012 年 7 月西班牙 Garcia-Masa 等<sup>[12]</sup>完成甜瓜基因组的测序,分析发现,在上述区域包含 3 个抗病基因同源序列,抗白粉病基因 *Pm-AN* 位于该区域。该试验针对第 V 连锁群的 *Pm-AN* 片段进行克隆分析,验证了植物抗病基因的基因结构存在较大的种间差异,这不仅可以为甜瓜抗白粉病分子标记辅助育种和进一步克隆甜瓜抗白粉基因奠定基础,而且对甜瓜抗病机理的研究和基因的发掘有重要的指导意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试新疆甜瓜品种为“K413”、“JS”2 个高感品种和“H70”、“AN”、“H74”3 个高抗品种,种子由国家瓜类工程技术研究中心提供。

菌株:pMD18-T Vector 购自宝生物(大连)有限公司;大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5α 为该实验室保存。

试剂:植物总 RNA 提取试剂盒购自 Thermo 公司;反转录试剂盒购自 Fermentas 公司;pMD18-T Simple

**第一作者简介:**韩瑞(1987-),女,硕士研究生,现主要从事植物分子生物学研究工作。E-mail:hanrui1009@sina.com

**责任作者:**李冠(1949-),男,硕士,教授,现主要从事植物生理生化与分子生物学研究工作。E-mail:guanli@xju.edu.cn

**基金项目:**新疆自治区高技术研究发展资助项目(201111120);国家自然科学基金资助项目(31060148)。

**收稿日期:**2013-05-20

Vector、PCR 相关试剂购自宝生物(大连)有限公司(TaKaRa);DNA 凝胶回收试剂盒、氨苄青霉素(Amp)购自上海生工生物有限公司;质粒提取试剂盒购自康为生物有限公司;其余试剂为国产分析纯试剂。

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 甜瓜抗白粉病基因 N/C 端序列分析

甜瓜幼苗培养:固体培养基质为蛭石:珍珠岩:花土 $\approx$ 3:1:1,用 PNS 营养液润湿培养基质;每盆培养基质中播种 5 粒甜瓜种子;置于光照培养箱中培养,光照强度 2 000 lx,25℃ 16 h;黑暗 19℃ 8 h。甜瓜基因组 DNA 的提取:

参照 Porebski 等<sup>[13]</sup>改进的 CTAB 法提取基因组 DNA,用 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 的纯度和完整性。保存于-20℃ 冰箱备用。引物设计及 PCR 扩增:以甜瓜抗病基因同源序列为模板,用 Primer Premier 5 软件设计特异引物。引物由北京华大生物工程有限公司合成。N-1:TCACATT-GCGTTGGGGAC, N-2: TGGACCAAATAGGTG-GAACA;C-1:GCAAAAGGNAGTAGTGTA, C-2: GATTCTGACCTTTTCCTTGT。PCR 体系为:10 $\times$  PCR Buffer(1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ )2  $\mu$ L, *Taq* 酶(5 U/ $\mu$ L)0.2  $\mu$ L,引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L,DNA(100 ng)1  $\mu$ L,dNTP (10 mmol/L each)各 0.3  $\mu$ L,反应总体积为 20  $\mu$ L。PCR 程序为 94℃ 变性 30 s,52℃ (N/C)退火 40 s,72℃ 延伸 1 min,进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳。回收及测序:扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,回收纯化,将回收的 N/C 片段连接于 pMD18-T Vector 上,转化至感受态 DH5 $\alpha$  中,接种到含 100 mg/L Amp+LB 培养基,37℃ 过夜培养。菌落 PCR 法筛选阳性克隆,将重组质粒送北京华大生物工程有限公司测序。测序结果用 DNAMAN 软件分析同源性。

### 1.2.2 甜瓜抗白粉病基因候选基因全长序列分析

甜瓜总 RNA 的提取:采用 Thermo 公司植物 RNA 提取试剂盒提取甜瓜 RNA,保存于-80℃ 冰箱备用。利用 Fermentas 公司的反转录试剂盒,合成 cDNA 第 1 条链。引物设计及 RT-PCR:以甜瓜抗病基因同源序列为模板,用 Primer Premier 5 软件设计特异引物。引物由北京华大生物工程有限公司合成。QC-1:CAAGCTCAAGAA-CAGAGGAT, QC-2: GATTCTGACCTTTTCCTTGT。PCR 体系为:10 $\times$  LA PCR Buffer (1.5 mmol/L  $Mg^{2+}$ )5  $\mu$ L,LA *Taq* 酶(5 U/ $\mu$ L)0.3  $\mu$ L,引物(10  $\mu$ mol/L)各 2  $\mu$ L,cDNA(100 ng)1  $\mu$ L,dNTP(10 mmol/L each)各 5  $\mu$ L,反应总体积为 50  $\mu$ L。PCR 程序为 94℃ 变性 30 s,57℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 5 min,进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳。

## 2 结果与分析

### 2.1 甜瓜基因组 DNA 质量和总 RNA 质量检测

提取新疆甜瓜“K413”、“JS”、“H70”、“AN”、“H74”基因组 DNA 和总 RNA,经琼脂糖凝胶电泳检测,由图 1、2

可知,基因组 DNA 主带清晰,纯度较高;总 RNA 条带清晰,且无降解。

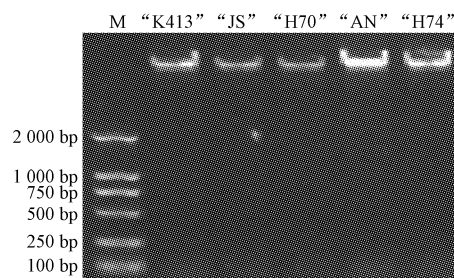


图 1 甜瓜基因组 DNA

Fig. 1 The genomic DNA of melon

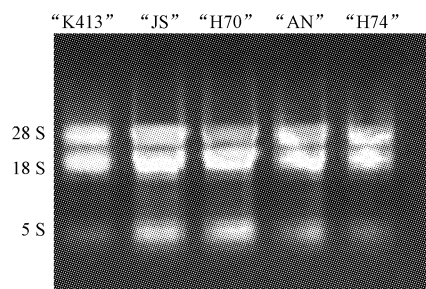


图 2 甜瓜总 RNA

Fig. 2 Total RNA of melon

### 2.2 甜瓜基因组 DNA PCR 扩增 N/C 2 个片段

根据设计的特异性引物对 5 个甜瓜品种进行 PCR 扩增,产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳。由图 3 可知,N/C 2 个片段的 PCR 产物分别约为 830 bp 和 610 bp,条带特异性强,与预期的结果相符。将这 2 个片段分别连接到克隆载体 pMD18-T 后,用特异性引物进行 PCR 鉴定,分别得到 830 bp 和 610 bp 左右的扩增片段,试验结果与预期结果一致,证明 5 个甜瓜品种甜瓜 *Pm*-AN-N/C 片段已经成功克隆到 pMD18-T 载体上。

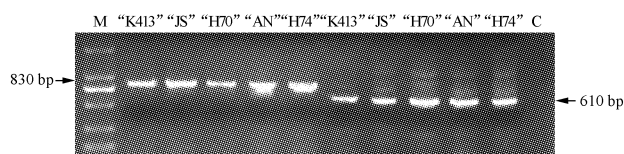


图 3 N/C PCR 扩增结果

注:C 为阴性对照。下同。

Fig. 3 N/C amplified by PCR

Note: C mean negative control. The same below.

### 2.3 测序分析

分别选取来自 5 个甜瓜品种 *Pm*-AN-N/C 2 个片段的阳性单克隆质粒经过北京华大生物公司测序并进行序列分析。分别对甜瓜 *Pm*-AN 候选基因 N/C 2 个片段进行分析。

#### 2.3.1 *Pm*-AN-N 端

5 个甜瓜品种中的 *Pm*-AN-N 端阳性克隆片段经测序分析,其长度为 830 bp(图 4),与甜瓜抗病基因同源性为 99.74%(图 6)。其中,“K413”、“JS”、“H70”、“H74”的序列相似性很高,均与“AN”存在

一定差异。通过同源树和 N/C 片段碱基含量分析(表 1)发现“AN”与其它 4 个甜瓜品种的同源关系相对远一些,这也印证了序列比对的差异性。

2.3.2 *Pm*-AN-C 端 5 个甜瓜品种中的 *Pm*-AN-C 端阳性克隆片段经测序分析,其长度为 610 bp(图 5),与甜

瓜抗病基因同源性为 94.00%(图 7)。其中,“K413”、“H70”相似度较高,并与已报道的甜瓜抗病基因同源序列较为接近;“JS”、“AN”的相似度较高;“H74”则与其它 4 个品种的甜瓜相似度较低一些。经过同源树和 N/C 片段碱基含量分析(表 1)也充分印证了序列比对的结果。

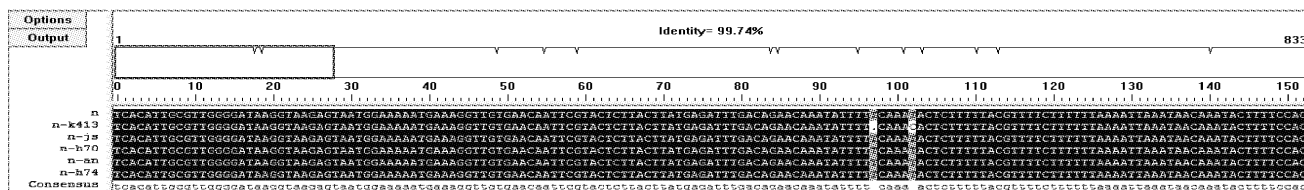


图 4 *Pm*-AN-N 基因序列对比图(同源性 99.74%)

Fig. 4 Sequence alignment of *Pm*-AN-N(Identity=99.74%)

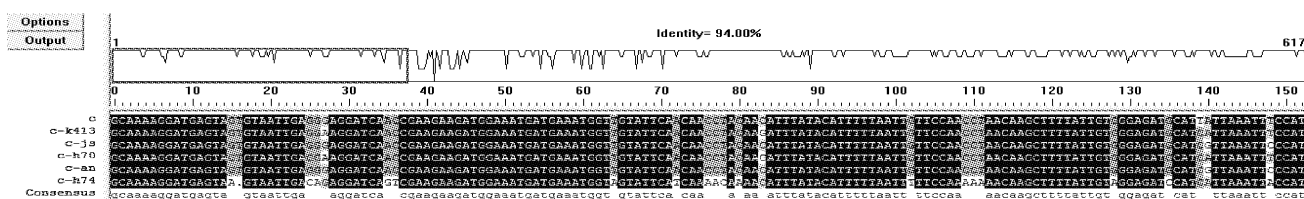


图 5 *Pm*-AN-C 基因序列对比图(同源性 94.00%)

Fig. 5 Sequence alignment of *Pm*-AN-C(Identity=94.00%)

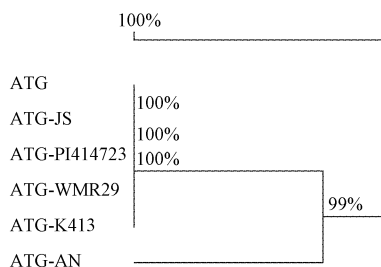


图 6 *Pm*-AN-N 同源树分析

Fig. 6 Homologous tree analysis of *Pm*-AN-N

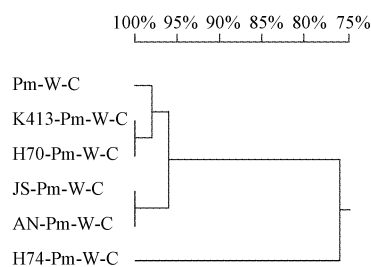


图 7 *Pm*-AN-C 同源树分析

Fig. 7 Homologous tree analysis of *Pm*-AN-C

表 1

N/C 片段碱基含量

Table 1

Average levels of the bases sequence of N/C

品种	N 端碱基含量/%				品种	C 端碱基含量/%			
	A	T	C	G		A	T	C	G
“K413”	28.2	37.9	18.4	15.5	“K413”	34.7	33.9	11.9	19.5
“JS”	28.2	38.1	18.4	15.4	“JS”	34.7	33.9	12.3	19.0
“H70”	28.2	38.1	18.2	15.5	“H70”	34.8	34.0	11.7	19.5
“AN”	28.2	37.9	18.2	15.5	“AN”	34.7	33.9	12.2	19.2
“H74”	28.2	38.1	18.2	15.5	“H74”	36.8	26.7	13.4	23.1

## 2.4 PCR 扩增 *Pm*-AN 候选基因全长

通过设计的特异性引物对 5 个甜瓜品种的 *Pm*-AN 候选基因全长进行 PCR 扩增,并对所设计的引物进行筛选,扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳。结果显示,以总 RNA 为模板的 PCR 扩增产物(图 8)以及将总 RNA 扩增的 PCR 产物稀释 10 倍,改用 0.7% 琼脂糖凝胶电泳(图 9)。由图 8 可知,总 RNA 的扩增产物约为 5 300 bp,条带特异性强,与预期结果相符。但各品种之间出现基因片段大小差异;将 PCR 产物稀释 10 倍,0.7% 琼脂糖

凝胶电泳后发现 5 个品种均出现不同的带型。

## 3 讨论

随着分子生物学的迅猛发展,基因克隆技术在作物遗传改良中起着重要的作用。目前,已从多种植物中克隆到一些抗病基因,但只对特定病原体或小种具有抗性<sup>[14]</sup>,广谱抗性的抗病基因还很少。另外,病害的种类多,新的病害不断发生,因此,研究植物抗病基因的基因结构的种间差异对于抗病基因的研究非常必要。



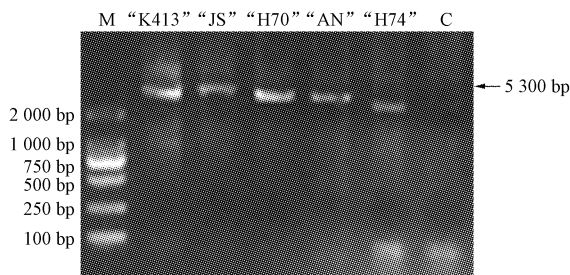
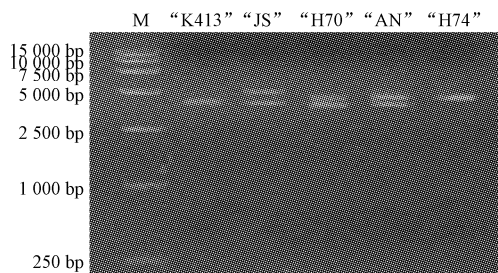
图8 甜瓜总 RNA 扩增 *Pm-AN*Fig. 8 PCR amplification *Pm-AN* of melon total RNA

图9 PCR 产物稀释 10 倍

Fig. 9 Diluted 10 times of PCR products

该研究从 2 个感病甜瓜材料、3 个抗病材料中克隆抗病基因同源片段。对 5 个甜瓜品种基因组 DNA 中克隆到甜瓜抗白粉病基因 N/C 端的抗病基因同源序列进行核苷酸序列聚类分析发现,N 端同源率为 99.74%,同源分析发现,“AN”与其它 4 个甜瓜品种的同源性相对较远,同时“K413”也与 3 个甜瓜品种具有同源差异;C 端同源率为 94.00%,同源分析表明“K413”、PI414723 和 *Vat/Pm-W* 同源性较高,“JS”和“AN”同源性一致,“H74”明显与其它 4 个品种同源性较远的。对于基因碱基的差异可能未引起氨基酸位点的改变,对基因本身的功能未发生改变,同时,该位点存在多个基因,扩增测序的基因可能并非同一个基因,因此,对于基因的分离和功能的鉴定将是后期试验的重点。

从 5 个甜瓜品种 cDNA 中得到的 *Pm-W* 全长结果发现,5 个甜瓜品种分别得到 5 种不同的基因带型,而且所有带型均显著差异。其中,“JS”、“H70”、“AN”中分别出现 2 种不同的基因条带。该试验多品种抗白粉病基因

同源序列的差异分析,充分映证了该实验室前期研究结果,结合国内外的研究更加肯定该位点基因多态性丰富,较高的基因同源性也表明基因进化水平较快。同时,对于 *Vat/Pm-W* 功能的变化、抗性基因的抗性差异以及是否存在一因多效的研究将成为下一步研究的目标。

在此研究基础上,可以根据甜瓜基因组序列在目标区域设计 SSR 引物进行精细定位,对于不同抗病品种抗病基因的差异与抗病性的关系进行研究。同时为抗病基因的克隆和培育抗病甜瓜新品种奠定良好的基础。

### 参考文献

- [1] 臧全宇,汪炳良,王毓洪. 甜瓜白粉病抗性遗传育种研究进展[J]. 北方园艺,2007(9):58-60.
- [2] 崔琦,崔崇士. 瓜类白粉病抗性育种研究进展[J]. 东北农业大学学报,2005,36(6):794-798.
- [3] 中国园艺学会西瓜专业委员会. 中国西瓜甜瓜[M]. 北京:中国农业出版社,2000.
- [4] 马德伟. 厚皮甜瓜东移研究[J]. 中国蔬菜,1985(4):10-13.
- [5] 吕佩珂,李明远,吴钜文. 中国蔬菜病虫害原色图谱[M]. 北京:中国农业出版社,1996.
- [6] 王娟,邓建新,宫国义. 甜瓜抗白粉病育种研究进展[J]. 中国瓜菜,2006(1):33-36.
- [7] Pitrat M. Linkage groups in *Cucumis melo* L[J]. J Hered, 1991, 82: 406-411.
- [8] Perin C, Hagen L S. A reference map of *Cucumis melo* based on two recombinant inbred line populations[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104: 1017-1034.
- [9] 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.
- [10] Fukino N, Ohara T, Monforte A J, et al. Identification of QTLs for resistance to powdery mildew and SSR markers diagnostic for powdery mildew resistance genes in melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2008, 118(1): 165-175.
- [11] Wang X L, Li G. Powdery mildew resistance gene (*Pm-AN*) located in a segregation distortion region of melon LGV [J]. Euphytica, 2011, 180: 421-428.
- [12] Garcia-Masa J, Benjak A, Sanseverino W. The genome of melon (*Cucumis melo* L.) [J]. PNAS, 2012, 109: 11872-11877.
- [13] Porebski S, Baley L G, Baum B R. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1997, 15(1): 8-15.
- [14] 郑先武,翟文学,李晓兵. 水稻 NBS-LRR 类 R 基因同源序列[J]. 中国科学, 2001, 31(1): 43-51.

## Cloning and Analysis of Partial Sequence of Resistance to Powdery Mildew Candidate Gene from *Cucumis melon* L.

HAN Rui, WANG Xian-lei, LI Guan

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

**Abstract:** Taking two high sensitive melon powdery mildew varieties ‘K413’, ‘JS’ and three high resistant varieties ‘H70’, ‘AN’, ‘H74’ as test materials, using PCR method, part V linkage group *Pm-AN* was cloned and analyzed. The results showed that the cloned *Pm-AN*-N/C two pieces were 830 bp and 610 bp respectively from ‘K413’, ‘JS’, ‘H70’, ‘AN’ and ‘H74’, encoding amino acids 286 and 192 respectively, homology of 99.74% and 94.00% respectively. cDNA amplification results showed that the five melon varieties appeared five different band type, respectively, appearing in two different type from ‘JS’, ‘H70’, ‘AN’, and all model had difference.

**Key words:** melon; powdery mildew candidate gene; gene cloning; sequence analysis