甜瓜 PMR5 抗白粉病基因的遗传定位

王贤磊，宁雪飞，高兴旺，谢丽琼，李　冠

(新疆大学 生命科学与技术学院，新疆 乌鲁木齐 830046)

摘　要：以甜瓜白粉病抗性品种 PMR5，感白粉病甜瓜伽师及杂交 F_1 以及 BC_1、BC_2 分离群体为试材，接种白粉菌生理小种 1，采用抗病遗传分析，并利用 BSA(Bulked Segregation Analysis)结合 SSR(Simple Sequence Repeat)分子标记方法，研究抗白粉病基因的遗传规律获得与其连锁的分子标记，利用获得的分子标记对抗白粉病基因进行遗传定位。结果表明：BC_1 中抗病与感病分离比为 64∶27，BC2 中分离比为 37∶27，推测 PMR5 在 BC_1 中表现 2 个显性基因，在 BC_2 中表现单显性基因遗传模式。用 BC_2 对抗病基因进行遗传定位发现，一共有 11 个位于 LGII 的 SSR 分子标记与抗白粉病基因连锁，抗病基因位于标记 CMGA36 和 SSR25208 之间约 104 113 bp。

关键词：甜瓜；白粉病；基因；BSA；SSR

中图分类号：Q 943.2　**文献标识码**：A　**文章编号**：1001－0009(2014)21－0118－05

甜瓜(*Cucumis melo* L.)是一种经济价值高的经济作物，在世界各地广泛种植。新疆甜瓜以其独特的风味享誉世界，深受人们喜爱。其中伽师瓜栽培历史悠久，果型大，果肉肉厚且质细，香甜清脆、糖分含量高，含有丰富的营养物质。然而伽师瓜易感白粉病，这对其生产量造成了严重的影响。近几年我国在甜瓜种植季节雨水增多，加之设施栽培日益推广，加剧了白粉病的传播。

甜瓜白粉病是一种广泛发生于甜瓜产区的真菌病害，在世界各主要栽植区都有报道[1]。西班牙、以色列、美国、法国等种植甜瓜的国家，白粉病早已成为甜瓜商

第一作者简介：王贤磊(1981-)，男，博士，讲师，研究方向为植物分子遗传。E-mail：wangxianlei2000@163.com.

基金项目：新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2012211B03)。

收稿日期：2014－06－10

Primary Study on Tissue Culture and Physiology Character of *Oncidium*

CAO Yun-ying, HOU Hai-tao, LIU Yu-jie, ZHOU Rong, ZHAO Hua

(College of Life Science, Nantong University, Nantong, Jiangsu 226019)

Abstract: Taking *Oncidium* test-tube tissue as materials, the culture medium which was suitable for protocorm; bud seedling proliferation, making seedlings stronger and promoting the root growth of seedlings were screened; some physiological and biochemical indexes of growth process of plantlet regeneration and rooting were also monitored. The results showed that suitable proliferation culture medium for protocorm-like bodies (PLBs) was MS+1.0 mg/L 6-BA+0.4 mg/L NAA+1.0 g/L activated-charcoal, MS+2.0 mg/L 6-BA+0.5 mg/L NAA+1.0 g/L activated-carbon was suitable for adventitious bud multiplication. MS+0.5 mg/L 6-BA+1.0 mg/L 2,4-D+1.0 g/L activated-carbon was better for raising strong plants. 1/2 MS+0.5 mg/L NAA+1.0 g/L casein hydrolysate was optimal for producing root. For the same sample, the activity and isozymes of superoxide dismutase and peroxidase because of different culture medium before transferring or the subculture time. SOD and POD activities of the differentiated seedlings sample which transferred from medium containing 0.1 mg/L NAA were higher than those transferred from 0.5 mg/L NAA. With the subculture times increased, its activities enhanced, the activity of sample from medium containing 0.5 mg/L 6-BA was higher than that from 2.0 mg/L 6-BA before transferring for PLBs, isozyme spectrum also proved this point. It suggested that medium containing 2.0 mg/L 6-BA were better than that containing 0.5 mg/L for PLBs proliferation, medium containing 0.5 mg/L NAA were better than that containing 0.1 mg/L for shoot multiplication.

Keywords: *Oncidium*; tissue culture; protective enzyme activity; isozyme analysis

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

业生产的瓶颈[2-3]。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 *Golovinomyces cichoracearum*[4] 和瓜类单囊壳属的专性寄生菌单丝壳白粉菌 *Podosphaera xanthii*[5] 侵染引发。在生产中，白粉病常在甜瓜生长中后期爆发，导致甜瓜叶片大面积枯死，严重影响甜瓜品质和产量。

现阶段甜瓜白粉病的防治仍主要依靠各类化学制剂[6]。然而，化学制剂的大量使用，不仅大面积污染环境，还使得病原菌产生耐药性，对防治工作造成了极大的困难[7]，对现有主栽品种进行改良，是甜瓜产业发展的当务之急。从抗性育种工作开展以来，科研工作者在甜瓜种质资源中发现对白粉病有抗性的甜瓜种质[8]，主要来源于印度野生资源。然而，目前的抗性品种选育仍旧依靠传统杂交育种，对表型选择有局限性，历时周期长，育种工作进展慢[9]。随着分子生物学的发展，甜瓜转基因技术日益成熟，但由于食品安全问题，依靠转基因技术培育抗性品种的方式还不被广大消费者认可。分子标记技术，作为基因定位和辅助育种的高效方法，能实现对子代基因型进行直接与准确地检测[8]，是一种甜瓜品种改良的安全且高效途径。

目前，分子标记技术辅助白粉病抗性育种的工作处于基因发掘和 QTL(quantitative trait loci)定位，已报道的抗白粉基因有 17 个[10-12]，QTL(quantitative trait loci)位点有 4 个[13]，其中只有少数抗性基因获得定位，精细定位和各基因序列的获得还需进一步研究。因此，筛选出抗病基因紧密的连锁分子标记，对白粉抗病基因的定位迫在眉睫。

该实验室前期工作中已完成了不同甜瓜抗病种质资源的筛选[14]，并在前期研究已将抗病甜瓜品种 Edisto47 中抗性基因定位于 LGII，筛选出部分与抗性基因连锁的分子标记[15]。在该研究中初步推断抗白粉病品种 PMR5 含有 2 个抗白粉病基因，根据抗病表现推测抗性基因之一位于 LGII。通过在 LGII 设计 SSR 分子标记，以伽师和 PMR5 为亲本构建的 BC_1、BC_2 分离群体为试验材料，利用 BSA 法并结合 SSR 分子标记技术，筛选获得了抗性紧密连锁的分子标记，并对抗白粉病基因进行遗传规律与基因定位研究，以期为进一步开展抗性基因定位克隆及伽师瓜抗白粉病分子标记辅助育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

抗病甜瓜亲本材料 PMR5 和感病甜瓜亲本材料伽师由国家瓜类工程技术研究中心提供。亲本材料进行杂交构建 F_1、BC_1、BC_2 为新疆大学植物生物技术实验室完成。白粉病病原菌 *P. xanthii* race 1 采自国家瓜类工程技术研究中心实验田，由新疆大学植物生物技术实验室通过鉴别寄主对其生理小种进行鉴定。

PCR 反应的相关试剂及 Marker 购自东盛公司，SSR 引物由上海生物工程有限公司合成。其余常规试剂购自上海生工。

1.2 试验方法

1.2.1 PMR5 白粉病抗性基因的遗传关系分析 分别种植抗性亲本材料 PMR5 和感病亲本材料伽师，及其 F_1、BC_1、BC_2 个体。病原菌接种及培养参照钟俐等[16]方法，单株接种白粉病病原菌 *P. xanthii* race 1，28°C 光照培养 14 d 后，统计发病情况。有白粉病病斑出现为感病，无病斑出现为抗病。

1.2.2 多态分子标记的筛选 分别从 BC_1 分离群体中选择抗病感病植株各 15 株，简化 CTAB 法提取叶片基因组。通过 BSA 法构建抗病池、感病池。即将抗病植株单株等量 DNA 混合，构建抗病池；感病植株单株等量 DNA 混合，构建感病池，以此消除个体差异，使得 2 个基因池中，主要区别位点为抗性基因。SSR 引物序列参考相关文献[15]和甜瓜基因组序列信息(https://melonomics.net)使用 SSRHunter 软件设计。SSR 扩增程序：94℃预变性 3 min；94℃变性 1 min；54℃退火 1 min；72℃延伸 1 min；35 个循环；72℃延伸 10 min；4℃保存。6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 产物，银染显色，记录分析。

1.2.3 PMR5 白粉病抗性基因的定位 利用筛选出的多态分子标记对 64 株 BC_1 分离群体单株 PCR 扩增，6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 产物，银染显色，出现单带记为 A，出现双带记为 H，统计分析结果。

1.3 数据分析

采用 χ^2 测验分析白粉病抗性基因的遗传规律，采用 Mapmaker 3.0 分析标记数据统计基因型，使用 QTL Cartographer v 2.5[17]绘制遗传连锁图。

2 结果与分析

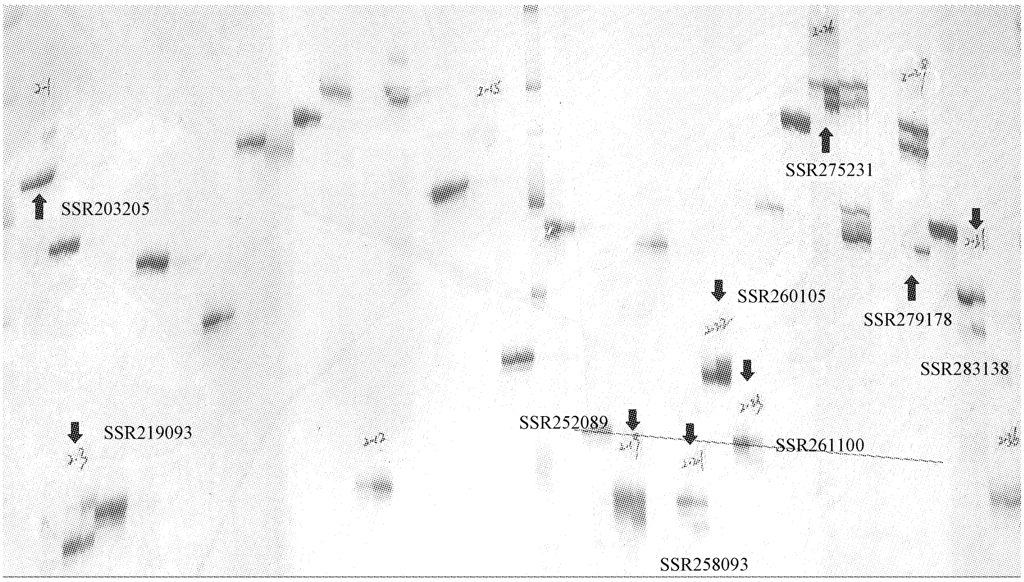
2.1 白粉病抗性基因遗传关系分析

试验结果表明 PMR5、F_1 表现抗病，伽师表现感病，BC_1 中抗病与感病分离比为 64∶27($\chi^2=0.824$，$\chi^2_{0.05}=3.841$)，符合双显性基因回交群体理论 3∶1 分离比，BC_2 中抗病与感病分离比为 37∶27($\chi^2=1.270$，$\chi^2_{0.05}=3.841$)，符合但显性基因 1∶1 分离比。

2.2 多态分子标记的筛选

从 64 个位于 LGII 的 SSR 分子标记中筛选在 BC_2 分离群体中体现多态的标记。从图 1 可以看出，在抗病感病池中均显示为双带的标记是与抗性基因有多态但不连锁，只有感病池和抗病池有单双带差异的标记是连锁标记。与抗性基因连锁的标记有 11 个(表 1)，多态比例为 17.2%。这 11 个标记分别是：SSR203205、SSR219093、

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn



注:SSR 分子标记扩增感病池(左)、抗病池(右);箭头表示多态标记。

Note:The amplifying result of SSR markers in susceptible (left) and resistant (right) pool,and the arrow point to the polymorphic markers.

图 1　与 BC_2 分离群体中白粉病抗性基因连锁的标记筛选

Fig. 1　The amplifying result of primers in resistant and susceptible pool of BC_2

表 1　多态分子标记的引物序列

Table 1　The primer sequence of polymorphic SSR markers designed from the melon genome

分子标记 Molecular marker	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
SSR203205	ATGAACCCAAAGAAAACAAA	TAAGAAAGTTCTGCATGAGA
SSR219093	CATTTTGCAGACAAGTTTTA	GATATGGTTTGGTTGGTCGT
CMGA36	TACATTATGGGTAAGGTAAG	CCATCTCTTAACTTTCTCTC
SSR252089	TCAAATCCTAAACCCTAAAC	ATGCACCTACTTGTTGTTGT
SSR258093	TGCCCAATGTTCATCTTTAA	CGAGCTAGTGTTTGCTGTCA
SSR260105	CCCTATTTTAGCATGGAAGA	TGCGTGCATAAGAATGAGTG
SSR261100	GTCAGTGGAACTACCAACCC	TACCAAAATAATGTCAAGAG
SSR275231	GGTTGGGTGTCAGGTTGGAG	ACGAGTTGGATTGGGTTGGA
SSR279178	GTCTTCATTGCCTTCCTCGTC	CATTCGTATTCTTACTCCCT
CMBR008	TTTCACTTTTTCCCGCCG	AATGGAAAAGGGAAGTGCAA
SSR283138	TTTATTTGTAACATCGTGGC	TCTCAAACTTACTGCATACT

CMGA36、SSR252089、SSR258093、SSR260105、SSR261100、SSR275231、SSR279178、CMBR008 和 SSR283138。

2.3　PMR5 白粉病抗性基因的定位

由图 2 和表 2 可知,与抗性基因连锁的标记在分离群体中,分离比大部分符合单基因分离比。Mapmaker

表 2　标记在分离群体中的分离比

Table 2　Markers segregation data in BC_2 population

分子标记 Molecular marker	A	H	总个数 Total number	$\chi^2(\chi^2_{0.05}=3.841)$
SSR203205	47	17	64	13.14
SSR219093	39	25	64	2.64
CMGA36	35	28	63	0.57
R	37	27	64	1.27
SSR252089	34	28	62	0.4
SSR258093	37	27	64	1.27
SSR260105	38	26	64	1.89
SSR261100	35	26	61	1.05
SSR275231	34	18	52	4.33
SSR279178	38	26	64	1.89
CMBR008	36	25	61	1.64
SSR283138	37	26	63	1.59

注:分子标记基因型:A 表示纯合伽师基因型,H 表示杂合;$P=0.05(\chi^2=3.84)$。

Note:Maker genotype designation:A shows homozygous for 'Jiashi';H shows heterozygous. $P=0.05(\chi^2=3.84)$.

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

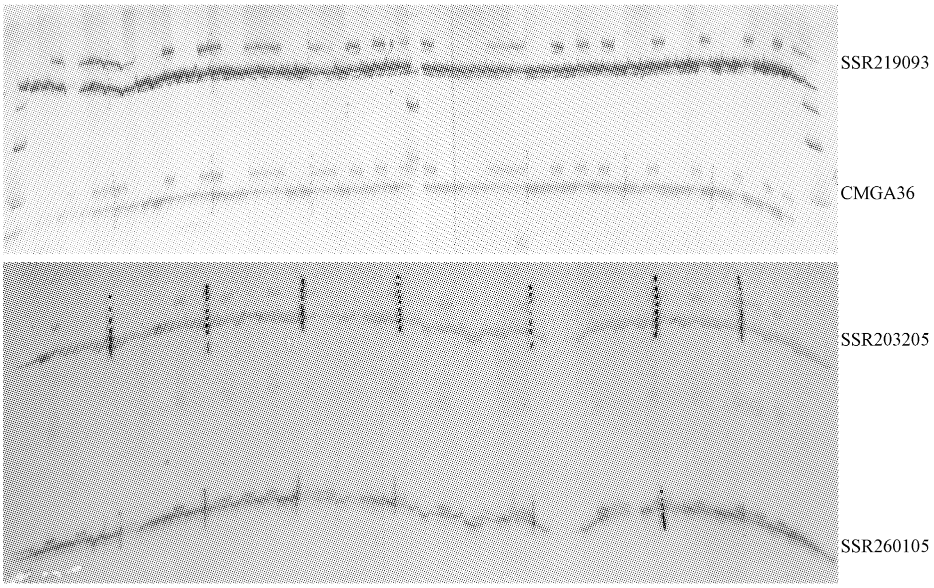
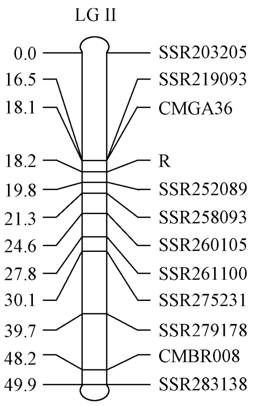


图 2　SSR 分子标记对 BC_2 分离群体个体检测

Fig. 2　The individual detection of BC_2 by LGII SSR markers



注：遗传距离在左侧，标记在右侧，抗性基因定位于 LG II。

Note: The distances between markers showed in centimorgans to the left, and markers showed the right of the linkage groups. R gene was located in LG II.

图 3　PMR5 和伽师 BC_2 分离群体的连锁图

Fig. 3　The Linkage map of BC_2 derived from PMR5 and Jiashi

3.0 分析标记数据，绘制遗传连锁图谱，由图 3 可知，11 个标记均与抗白粉病基因连锁，抗白粉病基因位于标记 CMGA36 和 SSR25208 之间，约 104 113 bp 范围内。

3　讨论

该研究选用的材料为 PMR5 与伽师回交 BC_1 与 BC_2 群体，目的在于将 PMR5 中的抗白粉病基因渗入到优质感病品种伽师中，BC_1 代遗传抗病与感病分离比为 64∶27，符合双显性基因在回交群体中的分离比，BC_2 分离比为 37∶27，基本符合单显性基因的分离比，进一步连锁标记分析分析发现连锁标记的分离比与抗白粉病基因分离比一致，均存在一定程度上的偏分离，即表现抗病等位基因多于感病等位基因，说明 BC_2 中由于连续回交，单一抗病基因被保留下来，可对其进一步精细定位，将该抗白粉病基因渗入至感病品种伽师中。

与抗性基因连锁的标记可以是甜瓜性状(蚜虫抗性 *Vat* 基因与白粉病抗性基因 *Pm-w* 连锁)、生化大分子以及 DNA 分子标记等标记，其中 DNA 分子标记在某些抗性基因连锁的更为紧密。从第 1 个发现的 RAPD 标记到目前应用较广的 SNP 标记，分子标记在构建遗传图谱和基因定位的研究中应用范围越来越广，相关技术越来越完善，为甜瓜白粉病抗性基因的研究奠定了很好的基础。SSR 标记作为共显性标记，能有效区别亲本和杂合子，可用于 F_2 和 BC_1 等分离群体的抗性基因定位的研究，该研究中筛选的 SSR 分子标记具有多态性好，连锁程度高等优势，可用于后续基因定位与抗病基因渗入的研究。

目前已被定位的甜瓜白粉病抗性基因主要在 LGII、LGV 和 LGXII 这 3 个连锁群上，前期研究发现位于甜瓜 LGII 的抗白粉病基因抗性较强，在新疆国家瓜类工程中心试验田及海南三亚试验田中均在甜瓜生长后期仍可保持抗性，而含有 LGV 或 LGXII 抗病基因的后期一般表现感病，因此该研究中 BC_2 中的抗病基因表现抗性较强，推测其抗病基因位于 LGII，使用位于 LGII 的分子标记筛选感病池与抗病池获得了与抗白粉病基因连锁的分子标记，将 PMR5 中的抗白粉病基因定位于 CMGA36 和 SSR25208 之间，约 104 113 bp 范围内，证实了 PMR5 含有一个抗性较强，位于 LGII 的抗白粉病基因。

在甜瓜白粉病抗性基因定位的研究中，标记的连锁

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn

程度决定了基因定位的精确性。2012 年 7 月甜瓜基因组测序完成,大大缩短了抗性基因定位过程,科研工作者只需要筛选到连锁足够紧密的标记就能够从基因组获得候选基因序列,并进行基因功能的研究。该研究中将候选 SSR 共显性标记不同等位基因扩增产物的可量化与 BSA 建池方法相结合,可快速有效定位抗白粉基因,且该研究利用回交群体获得的共显性标记有利于抗病基因渗入感病品种,从而在种质水平上引入抗白粉病基因,对于解决伽师瓜生产中面临的白粉病问题具有重要意义。

参考文献

[1] Aguiar B M, Vida J B, Tessmann D J, et al. Fungal species that cause powdery mildew in greenhouse-grown cucumber and melon in paraná state, brazil[J]. Acta Scientiarum Agronomy, 2012, 34(3): 247-252.

[2] 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.

[3] 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.

[4] Shishkoff N. The name of the cucurbit powdery mildew: *Podosphaera* (*sect. Sphaerotheca*) *xanthii* (Castag.) *U. Braun & N. Shish. comb. nov*[J]. Phytopathology, 2000, 90(6): 1077-1093.

[5] Sedla'rova' M, Lebeda A, Miksikova P, et al. Histological aspects of *Cucumis melo* PI 313970 resistance to *Podosphaera xanthii* and *Golovinomyces cichoracearum*[J]. Plant Dis Plant Prot, 2001, 4(116): 169-176.

[6] Yuste-Lisbona F J, Capel C, Sarria E, et al. Genetic linkage map of melon (*Cucumis melo* L.) and localization of a major QTL for powdery mildew resistance[J]. Mol Breeding, 2011, 27(2): 181-192.

[7] Hollomon D, Wheeler I. The powdery mildews: a comprehensive treatise[M]. In: Belanger R R, Bushnell W R, Dik A J, Carver T L W (eds). St. Paul: The American Phytopathological Society, 2002: 249-255.

[8] Cohen R, Burger Y, Katzir N. Monitoring physiological races of *Podosphaera xanthii* (syn. *Sphaerotheca fuliginea*), the causal agent of powdery mildew in cucurbits: factors affecting race identification and the importance for research and commerce[J]. Phytoparasitica, 2004, 32(2): 174-183.

[9] 林德佩. 甜瓜白粉病的抗病基因、鉴定寄主及种质资源[J]. 中国瓜菜, 2011, 24(4): 43-45.

[10] Perin C, Hagen L, de Conto V. A reference map of cucumis melo based on two recombinant inbred line populations[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(6): 1017-1034.

[11] Wang X, Li G, Gao X. Powdery mildew resistance gene (*Pm-An*) located in a segregation distortion region of melon LGV[J]. Euphytica, 2011, 180(3): 421-428.

[12] Yuste-Lisbona F J, Capel C, Gomez-Guillamon M L. Codominant PCR-based markers and candidate genes for powdery mildew resistance in melon (*Cucumis melo* L.)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2011, 122(4): 747-758.

[13] Fukino N, Ohara T, Monforte A J. 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.

[14] 宁雪飞,王贤磊,高兴旺,等. 甜瓜白粉病抗性基因遗传分析及定位[J]. 生物技术, 2013(23): 67-72.

[15] Ning X F, Gao X W, Zhang Z Q, et al. Inheritances and location of powdery mildew resistance gene in melon Edisto47[J]. Euphytica, 2014, 195(3): 345-353.

[16] 钟俐,李冠. 白粉病菌胁迫下甜瓜叶片中 Ca^{2+} 的细胞化学定位及外源 Ca^{2+} 对 POD,CAT 和 SOD 同功酶的影响[J]. 中国农业科学, 2012(19): 4040-4049.

[17] Wang S, Basten C J, Zeng Z B. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of statistics, North Carolina State University, Raleigh[EB/OL]. http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTL Cart.htm.

Mapping of Powdery Mildew Resistance Gene in Melon PMR5

WANG Xian-lei, NING Xue-fei, GAO Xing-wang, XIE Li-qiong, LI Guan

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

Abstract: Taking the powdery mildew resistance variety PMR5, susceptible variety Jiashi, F_1, BC_1 and BC_2 as materials, and the powdery mildew *Podosphaera xanthii* race 1 was inoculated. The method of resistance genetic analysis, Bulked Segregation Analysis (BSA) and Simple Sequence Repeat (SSR) markers were adopted to find the inheritance law of powdery mildew resistance, the markers linked to resistance gene, and then construct the genetic map the gene. The results showed that the resistant and susceptible separation ratio was 64 : 27 in BC_1, and 37 : 27 in BC_2, suggesting that PMR5 provided two dominant genes in BC_1, and single dominant gene in BC_2. A total of 11 SSR markers in LGII were found to linked powdery mildew resistance gene, and the gene was located in 104 113 bp between markers CMGA36 and SSR25208.

Keywords: melon; powdery mildew; gene; BSA; SSR

PDF 文件使用 "pdfFactory Pro" 试用版本创建 www.fineprint.cn