

甜瓜‘WMR-29’品系白粉病抗性基因连锁的 SSR 分子标记

陈 静, 王 贤 磊, 宁 雪 飞, 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‘WMR-29’抗病品系和感病品系‘伽师’(JS)、感病品系‘皇后’(HH)的回交群体 BC₁ 为试材,采用 BSA 和 SSR 分子标记辅助选择的方法,研究甜瓜‘WMR-29’品系对白粉病抗病基因的影响。结果表明:甜瓜‘WMR-29’品系对白粉病 *Podosphaera xanthii* race 1 的抗性受 2 个显性抗病基因控制,分别位于 LGII、LGXII 连锁群上,并且找到与甜瓜抗白粉病基因紧密连锁的标记。

关键词:甜瓜;‘WMR-29’;白粉病;SSR

中图分类号:Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)22-0089-05

甜瓜(*Cucumis melo* L.)属葫芦科(Cucurbitaceae)黄瓜属(*Cucumis* L.)的一种重要经济作物,在国内外已广泛种植,并且因其果实营养丰富,品味独特而深受人们的喜爱^[1]。然而,白粉病作为危害甜瓜生产的主要病害之一,在露地和温室栽培均有发生^[2]。在发病期,白粉病菌呈指数增长,植株叶片大面积枯死导致甜瓜产量和品质急剧下降造成很大的经济损失^[3]。白粉病主要由瓜单囊壳白粉菌 *Sphaerotheca fuliginea* (Syn. *Podosphaera xanthii*)和二孢白粉菌 *Erysiphe cichoracearum* (Syn. *Golovinomyces cichoracearum*) 2 种病原菌引起^[4]。*Podosphaera xanthii* 是我国甜瓜白粉病主要病害菌^[5-7]。在新疆分布范围较广的是 *P. xanthii* 生理小种 1,也存在其它病原菌^[8]。尽管白粉病可以采用化学防治,但是化学药剂不是十分有效且难保证瓜类无公害生产,这是目前瓜类绿色食品生产的主要障碍^[9]。因此,发掘和利用抗病资源,培育高抗白粉病新品种是切实有效的根本途径^[10]。

近年来,随着分子生物学研究的不断深入,利用分子标记辅助育种显出巨大潜力,也为抗病育种提供了一项方便、快捷、高效的方法^[11]。通过研究发现,甜瓜不同抗性材料中含有的白粉病抗性基因在不同的遗传位点,

生理小种的抗性、遗传机制和抗病机理等方面都有所差异^[12]。甜瓜抗白粉病的遗传模式也存在不同的观点,包括单显性基因、不完全显性基因^[13]、主效基因和微效基因^[14]、多基因^[15]等。近年来的报道大部分支持单显性基因控制这一理论,部分不符合单基因孟德尔遗传的抗病分离群体,是由于存在偏分离现象或受到环境等因素的影响^[16]。

国内所报道的与瓜类白粉病抗性连锁的分子标记逐渐增多。王建设等^[17]发现 1 个与甜瓜白粉病抗病位点相连锁的 RAPD 标记;王怀松等^[18]利用 AFLP 获得了 1 个与甜瓜白粉病抗性基因紧密连锁的分子标记;赵光伟等^[19]也获得了 2 个与白粉病抗性基因相连锁的 SRAP 标记;张海英等^[20]针对北京地区白粉病病原菌瓜单囊壳菌(*P. xanthii*)优势小种 2F,应用 SSR 获得了 2 个与甜瓜白粉病抗性基因紧密连锁的分子标记。

目前已定位的抗性基因主要集中在甜瓜 LGII、LG V、LGXII 连锁群上。该研究在明确新疆地区甜瓜白粉病生理小种的基础上,进行不同甜瓜抗病种质资源筛选,从而进行抗病基因研究。分析不同新疆甜瓜品种对 *P. xanthii* 白粉病生理小种 1 抗性遗传规律,采用 BSA 法和 SSR 分子标记技术可以快速找到与抗病基因相连锁的标记,用来对抗感品种进行早期的筛选,对白粉病抗病基因进行定位并快速发现抗病材料,从而达到加快育种进程,选育出综合经济性状优良且高抗多种病害的优良品种^[21]。以期为我国不同甜瓜品种所含的抗病基因、进一步开展甜瓜白粉病抗性基因定位克隆和抗性甜瓜选育奠定基础。

第一作者简介:陈静(1988-),女,硕士研究生,研究方向为植物生物技术。E-mail:1022chenjing@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等研究工作。E-mail:guanli@xju.edu.cn.

基金项目:新疆维吾尔自治区高技术发展资助项目(201111120);国家自然科学基金资助项目(31260258;31060148)。

收稿日期:2014-07-16

1 材料与方法

1.1 试验材料

用于构建分离群体的抗病亲本材料‘WMR-29’和感病亲本材料‘伽师’(JS)、“皇后”(HH)均由国家瓜类工程研究技术中心提供。白粉病病原菌 *P. xanthii* race 1 采自国家瓜类工程技术研究中心试验田(新疆昌吉)。

1.2 试验方法

1.2.1 分离群体的抗性鉴定 分别种植分离群体 WMR-29×JS×JS、WMR-29×HH×HH, 单株接种白粉病病原菌 *P. xanthii* race 1, 接种后置于人工气候箱内, 保持 28℃/20℃(昼温/夜温), 相对湿度 80%~85%, 交替进行光照 16 h/黑暗 8 h, 于接种后 7 d 和 14 d 进行植株的抗感鉴定。

1.2.2 基因组 DNA 的提取和 DNA 池的构建 分别从 WMR-29×JS×JS、WMR-29×HH×HH 这 2 个分离群体中选择抗病感病植株各 20 株, 采用 CTAB 法提取叶片基因组 DNA。应用 BSA 法构建抗病池、感病池。即将抗病植株与感病植株 DNA 分别等量混合, 构建抗感病池, 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。

1.2.3 SSR 分析方法 SSR 扩增引物购于上海生物工程有限公司。PCR 扩增反应总体积为 20 μL, 含 DNA 100 ng, dNTPs 0.2 mmol/L, Mg²⁺ 1.5 mmol/L, 上下游引物各 0.2 μmol/L, Taq DNA polymerase 1 U, 10×PCR buffer 2 μL, 补足超纯水 20 μL。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。

1.2.4 白粉病抗病基因的初步定位 在 WMR-29×JS×JS 分离群体中, 选择位于 LGII 连锁群上的 SSR 分子标记, 分别对抗病池和感病池进行 PCR 扩增和电泳检测。在 WMR-29×HH×HH 分离群体中, 选择位于 LGII、LGV、LGXII 连锁群体上的 SSR 标记, 分别对抗病池和感病池进行 PCR 扩增和电泳检测。

1.2.5 数据记录与连锁分析 利用筛选出的在 LGII、LGV、LGXII 连锁群上的多态分子标记对 2 个分离群体进行单株 PCR 扩增, 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 产物, 银染显色, 记录分析。

2 结果与分析

2.1 分离群体抗性鉴定结果

对 WMR-29×JS×JS 和 WMR-29×HH×HH 2 个回交分离群体, 进行苗期抗病接种鉴定。总共种植 64 株苗, 抗病植株 50 株, 感病植株 14 株, 回交后代中, 抗感比为 3:1, 说明甜瓜 WMR-29 对白粉病的抗病基因符合

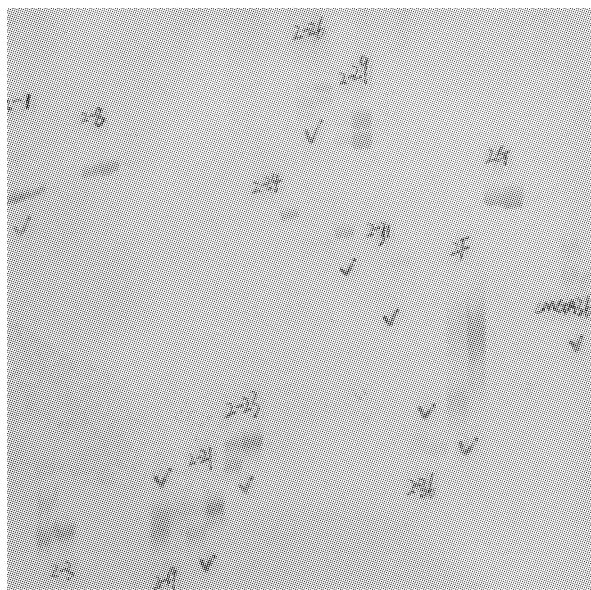
双基因遗传控制规律。

2.2 抗白粉病基因的初步定位

选取位于 LGII、LGV、LGXII 连锁群上的标记, 初步发现 WMR-29×JS×JS BC₁ 分离群体中在 LGII 连锁群上具有多态性, WMR-29×HH×HH BC₁ 分离群体在 LGII 连锁群上具有多态性。

2.3 多态分子标记的筛选

在初步定位中, 发现在 LGII、LGV、LGXII 连锁群上, 标记具有多态性, 继而扩大在该连锁群上标记的数目。结果在 WMR-29×JS×JS 分离群体中, 选择位于 LGII 的 SSR 分子标记中筛选在 BC₁ 分离群体中体现多态的标记。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, 只有抗病池感病池有单双带区别的标记是连锁标记。与抗性基因连锁的标记有 11 个, 由图 1 可知, 分别为: SSR203205、SSR219093、SSR252089、SSR258093、SSR261100、SSR275231、SSR283138、CMBR008、SSR250112、CMGA36、SSR279178。



注: SSR 分子标记扩增抗病池(左)、感病池(右); 对勾表示多态标记, 下同。

Note: The amplifying result of SSR markers in resistant(left) and susceptible(right) pool, check mark indicates the polymorphism, the same below.

图 1 与 WMR-29×JS×JSBC₁ 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 BC₁

在 WMR-29×HH×HH 分离群体中, 分别选择位于 LGII、LGV、LGXII 连锁群上的 SSR 分子标记筛选 BC₁ 中表现多态的标记。在 LGXII 连锁群上发现与抗性基因相连锁的标记有 3 个, 由图 2 可知, 分别为: CMN01-01、CMTCN34、DE1851。

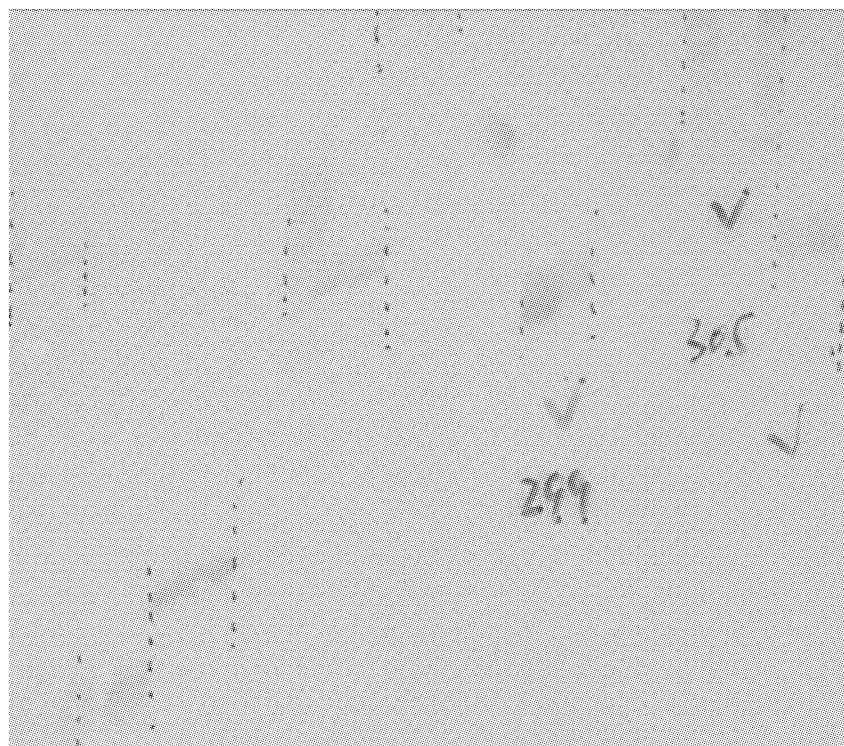


图2 与 WMR-29×HH×HHBC₁ 分离群体中白粉病抗性基因连锁的标记筛选

Fig. 2 The amplifying result of primers in resistant and susceptible pool of BC₁

2.4 白粉病抗病基因的定位

在 WMR-29×JS×JS 分离群体中,用筛选出与抗性基因连锁的分子标记对 BC₁ 分离群体中的个体进行扩增,

由图 3 可知,在电泳检测中,出现单带记为“A”,出现双带记为“H”,缺失或模糊的带型记为“—”统计分析结果。与抗性基因连锁的标记在分离群体中,符合双基因分离比。

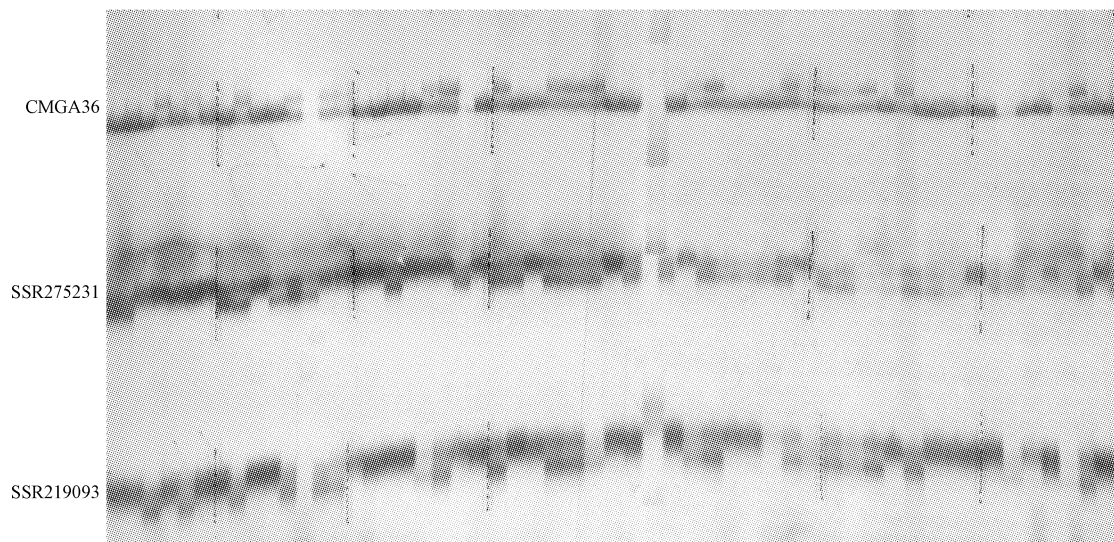


图3 SSR 分子标记对 WMR-29×JS×JSBC₁ 分离群体个体检测

Fig. 3 The individual detection of BC₁ by LGII SSR markers

3 讨论

白粉病是广泛存于葫芦科植物中的一种世界性病害,严重威胁到瓜类的产量和品质。通常,人们采用药物防治方法控制白粉病发生,但随着药物防治的有限性

逐渐提高,培育和推广抗病品种是防治甜瓜白粉病的最有效的措施。由于所用甜瓜品种及白粉病生理小种的不同,故研究结果也有所不同^[22-23]。

该研究利用相同抗病材料‘WMR-29’与不同感病材

料‘伽师’(JS)、“皇后”(HH)回交后组合。通过研究发现,该抗病材料‘WMR-29’是受 2 个显性基因控制,这与 Epinat 等^[24]研究一致。但 Epinat 未说明这 2 个基因位于哪个连锁群上,而该研究发现这 2 个抗病基因分别位于 LGII、LGXII 连锁群上。

在 WMR-29×JS×JS 回交群体中,在 LGII 连锁群上找到与白粉病抗病基因相连锁的 11 个标记,分别为: SSR203205、SSR219093、SSR252089、SSR258093、SSR261100、SSR275231、SSR283138、CMBR008、SSR250112、CMGA36、SSR279178,这一结论与 Ning 等^[25]找到的标记部分一致,并且该研究新发现了 SSR275231 标记,与 Ning 发现相同的具有多态的标记,说明在 LGII 连锁上的标记具有通用性,筛出不同的标记,说明分离群体的不同会导致多态标记的不同。

在 WMR-29×HH×HH BC₁ 回交群体中,并未在 LGII 连锁群体上发现与白粉病抗病基因相连锁的标记,而是在 LGXII 连锁群体上发现与白粉病抗病基因相连锁的标记。这表明,“WMR-29”这种抗病材料中,是由 2 个基因控制白粉病抗性基因的,分别位于 LGII、LGXII 连锁群体上,并且找到与之紧密连锁的标记为以上 14 个标记。该研究为今后“WMR-29”中白粉抗性基因精细定位奠定基础,并对将这些抗性种质资源应用于甜瓜品种改良有一定的理论指导意义。

参考文献

- [1] 王坚,蒋有条,林德佩,等. 中国西瓜甜瓜[M]. 北京:中国农业出版社,2000:612-614.
- [2] James D, Mc Creight. Melon-Powdery Mildew Interactions Reveal Variation in melon Cultigens and *Podosphaera xanthii* Race 1 and 2[J]. Sci, 2006, 131(1):59-65.
- [3] 臧全宇,汪炳良,王毓洪,等. 甜瓜白粉病抗性遗传育种研究进展[J]. 北方园艺,2007(9):58-60.
- [4] Cohen R, Burger Y, Katzir N. Monitoring physiological races of *Podosphaera xanthii* (Syn. *Podosphaera xanthii*), 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.
- [5] 王娟,邓建新,宫国义,等. 甜瓜抗白粉病育种研究进展[J]. 中国瓜菜,2006(1):33-36.
- [6] 包海清,许勇,杜永臣,等. 海南三亚地区葫芦科作物白粉病菌生理

小种分化的鉴定[J]. 长江蔬菜,2008(1):49-51.

- [7] 刘东顺,程鸿,孔维萍,等. 甘肃甜瓜主产区白粉病菌生理小种的鉴定[J]. 中国蔬菜,2010(6):28-32.
- [8] 王强. 甜瓜抗白粉病基因的 SSR 标记及生理小种鉴定研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2009.
- [9] 王玲平,吴晓花,汪宝根,等. 与瓠瓜品系 J083 白粉病抗性基因连锁的 SCAR 分子标记[J]. 浙江大学学报,2011,37(2):119-124.
- [10] 张学军,季娟,李寐华,等. 甜瓜抗白粉病基因 SRAP 分子标记[J]. 华北农学报,2013,28(2):73-77.
- [11] Kuzuya M, Hosoya K, Yashiro K. Powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) resistance in melon is selectable at the haploid level[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(384):1069-1074.
- [12] 宁雪飞,高兴旺,李冠. 甜瓜抗白粉病分子育种研究进展[J]. 北方园艺,2013(2):180-184.
- [13] Cohen R, Hanan A, Paris H S. Single-gene resistance to powdery mildew in zucchini squash (*Cucurbita pepo*) [J]. Euphytica, 2003, 130: 433-441.
- [14] Barnes W C, Epps W M. Powdery mildew resistance in south Carolina cucumbers[J]. Plant Disease Reporter, 1956, 40:1093.
- [15] Zhang S Q, Gu X F, Zhang S P, et al. Inheritance of powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) and development of an AFLP marker for resistance detection[J]. Agricultural Sciences in China, 2007, 6(11):1336-1342.
- [16] Wang X, Li G, Gao X, et al. Powdery mildew resistance gene (*Pm-AN*) located in a segregation distortion region of melon LGV[J]. Euphytica, 2011, 180(3):421-428.
- [17] 王建设,宋曙辉,唐小伟,等. 甜瓜白粉病抗性基因的遗传与分子标记[J]. 华北农学报,2005,20(1):89-92.
- [18] 王怀松,贺超兴,程振家,甜瓜白粉病抗 AFLP 连锁标记的初步研究[J]. 中国瓜菜,2009(2):4-6.
- [19] 赵光伟,徐永阳,徐志红,等. 甜瓜抗白粉病 SRAP 分子标记筛选[J]. 西北植物学报,2010,30(6):1105-1110.
- [20] 张海英,苏芳,郭绍贵,等. 甜瓜白粉病基因 PM-2F 的遗传特性及其紧密连锁的特异片段[J]. 园艺学报,2008,35(12):1773-1780.
- [21] 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.
- [22] Keinath A P, DuBose V B. Evaluation of pumpkins cultivars for powdery and downy mildew resistance, virus tolerance, and yield[J]. Hort Science, 2000, 35:281-285.
- [23] Sakata Y, Kubo N, Morishita M, et al. QTL analysis of powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2006, 112:243-250.
- [24] Epinat C M, Pitrat, Bertrand F. Inheritance of resistance of five melon lines to Powdery mildews[J]. Euphytic, 1993, 65:135-144.
- [25] Ning X F, Wang X L, Gao X W. Inheritance and location of powdery mildew resistance gene in melon Edisto47 [J]. Euphytica, 2014, 195: 345-353.

Powdery Mildew Resistance Gene of SSR Molecular Markers Linked to the ‘WMR-29’ Strains of Melon

CHEN Jing, WANG Xian-lei, NING Xue-fei, LI Guan

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

枣转录因子 *ERF* 3'端序列克隆及生物信息学分析

陈莹莹¹, 苑 赞¹, 赵 锦², 刘孟军¹

(1. 河北农业大学 中国枣研究中心, 河北 保定 071001; 2. 河北农业大学 生命科学学院, 河北 保定 071001)

摘 要:以枣为试材, 根据 GenBank 中登录的苹果、拟南芥等植物 *ERF* 保守序列设计引物, 采用同源克隆法克隆出该基因 3'端序列并对其编码的蛋白进行了生物信息学分析。结果表明: 该试验克隆获得 1 条长度为 959 bp 的条带; 经过序列分析, 该序列包含典型的 AP2/EREBP 保守结构域, 与桑树、欧洲山毛榉和欧洲栗 *ERF* 基因序列相似度分别为 79%、78%、77%; 系统进化树分析显示, 枣的 *ZjERF* 与可可树、陆地棉和海岛棉的 AP2/EREBP 亲缘关系较近, 属于 *ERF* 家族的 B2 亚群; 此外, 还用 Swiss Model 程序(<http://au.expasy.org/tools/>)预测了 *ZjERF* 基因编码蛋白的三维结构。

关键词:枣; *ZjERF*; 3'端序列克隆; 生物信息学分析

中图分类号:Q 785; S 665 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)22-0093-05

AP2/EREBP 转录因子在植物的生长、发育以及多种生理生化反应的信号转导中发挥重要的作用, 分为 5 个分支: DREB、ERF、AP2、RAV 和其它类别^[1]。近年来已经从拟南芥^[2]、烟草^[3]、番茄^[4]、大豆^[5]等植物中分离出了 AP2/EREBP 类转录因子。参与植物发育的 AP2/EREBP 蛋白, 如 AP2 主要参与花器官特性的特化, 花分生组织特性的确立以及对花分生组织不确定性的抑制和胚珠与种皮的发育^[6]。而且还发现 AP2 对种子的质量有调控作用^[7]。另外, *ERF* 类蛋白也参与调节植物的生长发育。Shen 等^[8]利用酵母单杂交方法从水稻中克隆的 *ERF* 类蛋白 OsEBP-89 基因在胚乳、维管束韧皮部有表达, 在靠近茎节和居间分生组织部分表达水

平比较高。在植物体中, *ERF* 能够受到病原菌的诱导表达, 并且在转录因子基因超表达时, 不仅能够提高转基因植物对病原真菌的抗性, 还能提高其抗病毒以及抗菌的能力^[9-11], 超表达 *GbERF2* 转录因子, 增强了转基因烟草对假单胞菌的抗性^[12]; 转基因辣椒中 *Tsi1* 基因的异位表达增强了辣椒对病毒和细菌的抗性^[13]。

枣(*Ziziphus jujuba* Mill.) 是我国特色优势果树和第一大干果树种, 目前还没有枣树 AP2/EREBP 基因的报道。枣疯病(Jujube witches' broom)是由植原体引起的, 是在枣树生产上发生最普遍、危害最严重的传染性病害^[14-15]。课题组前期构建了高抗枣疯病品种‘星光’在植原体胁迫下的 SSH 文库, 获得了一条 AP2/EREBP 同源片段^[16], 在此基础上, 该试验利用同源序列克隆方法, 进行该基因的 3'端序列克隆, 并通过生物信息学方法分析该基因的序列特征, 以期为今后深入研究 *ERF* 在枣生长发育中的功能提供数据参考, 同时也为枣抗逆分子育种提供基因资源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自河北省赞皇县试验点, 品种为该课题组选育品种‘星光’, 采样时间为 2013 年 6 月。在田间采

第一作者简介:陈莹莹(1987-), 女, 河北石家庄人, 硕士研究生, 研究方向为果树活性物质与功能性食品。E-mail: wanying-1202@163.com.

责任作者:刘孟军(1965-), 男, 河北保定人, 博士, 教授, 研究方向为干果种质资源与分子辅助育种。E-mail: lmj1234567@aliyun.com.

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2013BAD14B030106); 河北省科技支撑计划资助项目(11230606D-6)。

收稿日期:2014-07-16

Abstract: Taking the resistant lines ‘WMR-29’ and the susceptible strain ‘Jiashi’ (JS), ‘Queen’ (HH) of the backcross population as experiment materials. The location of *Podosphaera xanthii* race 1 resistance gene was performed by BSA (Bulked Segregation Analysis) and linked SSR (Simple Sequence Repeat) makers technology. The results showed that the resistance gene to powdery mildew in melon ‘WMR-29’ strains was controlled by two dominant genes, and it was located on LGII, LGIII, and also found one marker was linked to powdery mildew resistant gene of melon.

Keywords: melon; ‘WMR-29’; powdery mildew; SSR