

研究报告

A Letter

黄瓜抗黑斑病相关 AFLP 标记筛选及 SCAR 转化

王惠哲[✉], 李淑菊[✉], 杨瑞环[✉], 管炜[✉]

天津科润黄瓜研究所, 天津, 300192

✉ 通讯作者: wanghui zhe@126.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第87篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0087

收稿日期: 2010年06月07日

接受日期: 2011年06月27日

发表日期: 2011年06月30日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

王惠哲等, 2011, 黄瓜抗黑斑病相关 AFLP 标记筛选及 SCAR 转化, 分子植物育种 Vol.9 No.87 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0087)

摘要 为筛选与黄瓜抗黑斑病相关基因连锁的分子标记, 探讨黄瓜抗病材料鉴定和选择的分子方法。以黄瓜感黑斑病母本 L63 和抗黑斑病父本 L9 及其 F₂ 代分离群体为试材, 人工接种抗病性鉴定结果表明, 一对隐性基因控制黄瓜黑斑病的抗病性, 感病性为不完全显性。通过 BSA 法和 AFLP 分子标记建立了黄瓜对黑斑病的抗病组和感病组, 应用 1 024 对引物组合 EcoR I -NN/Mse I -NNN 对抗、感组进行筛选, 筛选到了 1 个与黄瓜抗、感黑斑病相关基因连锁的共显性标记 E-AT/M-TCT。测序结果表明, 片段长度分别为 246 bp 和 251 bp, 为发生插入/缺失突变的同源序列; 经组外其它 F₂ 单株分析, 在抗病个体中扩增出了 246 bp 的特异片段, 而感病个体中扩增出了 251 bp 的特异片段, 中间类型单株则同时扩增出这两个特异片段, 该特异标记与黄瓜黑斑病抗性相关基因紧密连锁, 遗传距离为 4.96 cM; 根据测序结果, 将其成功转化为 1 对 SCAR 标记。

关键词 黄瓜; 黑斑病; 分子标记; AFLP; SCAR

Screening of the AFLP Markers Associated to the Resistance Locus of Cucumber alternaria leaf spot and Its Conversion to SCAR Marker

Wang Hui zhe [✉], Li Shu ju [✉], Yang Rui huan [✉], Guan Wei [✉]

Tianjin Cucumber Research Institute, Tianjin, 300192, P.R. China

✉ Corresponding author, wanghui zhe@126.com; ✉ Authors

Abstract The study screened the molecular marker linked to the cucumber alternaria leaf spot resistant gene, and discussed the molecular method for identification and selection of resistant materials. With a F₂ population derived from F₁ of L63 (susceptible female) and L9 (resistant male) was used as materials, their resistance to alternaria leaf spot of cucumber were identified through seedling inoculation. The results indicated that the resistance to alternaria leaf spot was controlled by a pair of recessive gene, and the susceptible was in the mode of incomplete dominant inheritance. The polymorphism between resistant and susceptible bulk of cucumber alternaria leaf spot were studied using BSA method and AFLP technology. 1 024 AFLP markers were screened, and a co-dominant marker E-AT/M-TCT was obtained. Sequencing of the polymorphic fragment indicated that their lengths were 246 bp and 251 bp, respectively, and they were orthologous sequences with an insertion/deletion of five nucleotides. The resistant and susceptible F₂ plants possessed the 246 bp and the 251 bp fragments, the mid-plants possessed both two fragments. The marker was closely linked to the cucumber alternaria leaf spot resistance-related gene, and the genetic distance between the marker and the gene was 4.96 cM. According to its sequencing result, the AFLP marker was further converted into SCAR marker.

Keywords Cucumber; Alternaria leaf spot; Molecular marker; AFLP; SCAR

研究背景

黄瓜黑斑病 [*Alternaria cucumerina* (Ell et Ev.) Elliott.] 是由瓜链格孢菌引起的真菌性病害 (吕佩珂等, 1992)。该病近几年又卷土重来, 在各地普遍发生, 成为黄瓜生产上的重要病害。该病主要危害叶片, 一般先从黄瓜的中、下部叶片开始发生, 而后

逐渐向上蔓延, 大约在4月中旬至5月上、中旬发生, 发病率高达60%以上, 减产10%~20% (梁金兰, 1992)。而生产上所采用的很多材料、品种多不抗黑斑病, 因此抗黑斑病又成为培育黄瓜新品种的一个重要指标。常规的抗病材料筛选及抗病品种选育方法存在费时、费力、效率低、病菌扩散等问题, 分

并测序。测序结果显示, 抗病带大小为246 bp, 感病带为251 bp, 二者的差异在于5个碱基“ATGGG”的插入和缺失(图2)。并将该标记成功转化为1对更为稳定的SCAR标记, 上游引物: 5'-GCCGGCGACT

AATAATCA-3'; 下游引物: 5'-CCTGAGTAATCTATAAAGCGTCG-3' (已申报国家发明专利, 申请号为: 201010197951.4)。

```

S 5'- GACTGCGTAC CAATTCATGG GGACGCCGGC GACTAATAAT CACCTCATTG CTCTCTGTTA
R 5'- GACTGCGTAC CAATTCATGG GGACGCCGGC GACTAATAAT CACCTCATTG CTCTCTGTTA
S 5'- TTGTTTATTG GTGAAATGAA AATGGATTGT TTCATCAAAT ATACAATTAT TTATAGAGCC
R 5'- TTGTTTATTG GTGAAATGAA AATGGATTGT TTCATCAAAT ATACAATTAT TTATAGAGCC
S 5'- CTCCTTATGA ATAAATTATT GGAAGCCACC TCACAAATAT CTCTATACAT ATACATATAT
R 5'- CTCCTTATGA ATAAATTATT GGAAGCCACC TCACAAATAT CTCTATACAT ATACATATAT
S 5'- AAAATATGGC TTGTATGGGG TCACAAATAG AGAAATTTTA TCGACGCTTT ATAGATTACT
R 5'- AAAATATGGC TTGT.....G TCACAAATAG AGAAATTTTA TCGACGCTTT ATAGATTACT
S 5'- CAGGACTCAT C
R 5'- CAGGACTCAT C
    
```

-3' 251 bp
-3' 246 bp

图2 与黄瓜抗黑斑病相关基因连锁的AFLP标记片段的碱基序列

注: 阴影部分为差异片段

Figure 2 Sequence of the AFLP marker fragments associated to the resistance locus of cucumber alternaria leaf spot

Note: The different fragment are in the shadow

利用所设计的SCAR引物对部分抗、感病单株进行扩增, 扩增产物经5%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 可以看出原来的多态性仍然存在(图3)。

在抗病单株、感病单株中分别扩增出200 bp、205 bp长的片段, 表明该标记仍然为共显性标记, 可以用于黄瓜黑斑病的分子鉴定。该共显性的SCAR标记是黄瓜黑斑病分子标记研究中的第一个, 因此将该标记命名为SA861。表明已成功地将该AFLP标记转化为SCAR标记。图4为引物861在部分F₂单株中的验证。

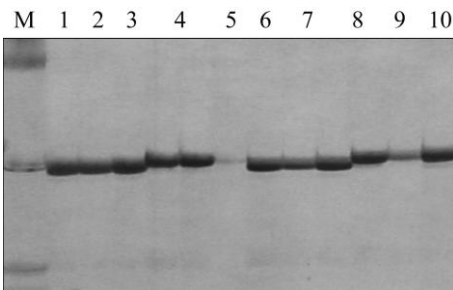


图3 SCAR标记861的扩增产物

注: 1~3, 7~9: 抗病单株; 4~6, 10~12: 感病单株

Figure 3 SCAR amplification by primer 861

Note 1~3, 7~9: resistant plants; 4~6, 10~12: susceptible plants

2讨论

本研究利用AFLP技术和BSA法明确了黄瓜对黑斑病的抗性由一个隐性基因控制, 可为亲本选配和杂交组合配制提供可靠依据; 并获得了与黄瓜黑斑病抗性相关基因紧密连锁的分子标记E-AT/M-TCT, 遗传距离为4.96 cM, 表明该标记可用于黄瓜抗黑斑病辅助育种; 根据序列特点将该标

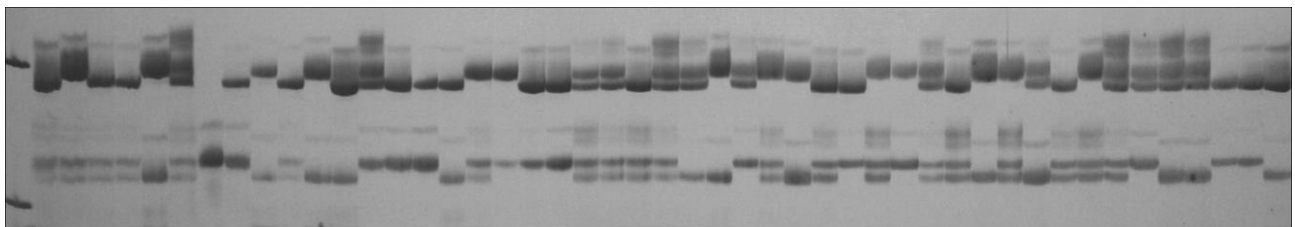


图4 SCAR标记861在部分F₂单株中的扩增

注: 下带: 抗病单株; 上带: 感病单株; 上下带均有: 中间类型单株

Figure 4 Amplification of SCAR marker 861 in some of F₂ plants

Note: Lower band: resistant plants; upper band: susceptible plants; Lower and upper band coexist: medium plants

记成功转化为1对SCAR标记, SCAR引物扩增产物原来的多态性仍然存在, 但ATGGG五个碱基的差别仍需借助PAGE (变性聚丙烯酰胺凝胶电泳)进行分离, 虽然不如琼脂糖凝胶电泳简单, 但PAGE可同时将抗病株、感病株和杂合株检测出来, 利于大量材料的抗性鉴定, 大大降低了AFLP技术相关操作的繁琐性。

本研究获得的分子标记, 为黄瓜抗黑斑病育种材料的筛选和抗病品种选育提供了一种新的方法, 可在早代对表现优良的基因型进行鉴定, 而且稳定可靠, 不受环境因素及季节的限制, 提高鉴定的准确性; 可以实现黄瓜材料黑斑病抗性的快速、准确鉴定, 加快抗病品种选育速度, 大大提高育种效率。结合白粉病、霜霉病、炭疽病、褐斑病和黑星病的相关标记可以快速实现黄瓜苗期多抗材料的筛选以及多抗基因的聚合, 快速培育出市场前景良好的优质、多抗的黄瓜新品种。兼抗多种病害黄瓜良种的应用, 可以降低农药用量, 减轻环境污染, 因此, 本项研究具有较大的实践与理论意义, 并会带来可观的社会、经济效益。

3材料与方法

3.1材料

供试材料为黄瓜高代自交系L63 (高感黑斑病)和L9 (高抗黑斑病)及其自交群体(F₂) 242个单株。黄瓜黑斑病菌086为田间自然发病叶分离、鉴定并保存。在上海生工生物工程公司合成AFLP引物, *Taq* DNA酶、dNTP等试剂购自大连宝生物公司。

于2008~2011年在天津科润黄瓜研究所内完成试验。

3.2方法

3.2.1抗病性鉴定

将抗、感病亲本、及F₁、F₂、BC_{1a}、BC_{1b}六世代群体播种于装有灭菌蛭石的育苗钵中, 放置于光照培养箱中, 正常管理。采用第一真叶喷雾接种法(孢子浓度1~2×10⁷孢子/mL)进行黑斑病菌接种鉴定。采用如下分级标准(0级: 无病症; 1级: 接种叶出现少数病斑; 2级: 叶柄有轻微症状, 病斑占叶面积的1/3以下; 3级: 叶柄变色, 病斑占叶面积的1/3~1/2; 4级: 叶柄干枯, 病斑占叶面积的1/2~2/3; 5级: 叶柄干枯并下垂, 病斑占叶面积的2/3以上)

3.2.2抗病、感病组构建及AFLP分析

采用改良的CTAB法分别提取各单株基因组DNA, 经紫外分光光度计检测合格后稀释至50 ng/μL。根据BSA法的原理, 在抗病、感病群体中选取症状明显的高度抗病、感病单株各5株组成抗病组和感病组。

AFLP分析参照Vos (Vos et al., 1995)的方法。PCR产物经5% PAGE (变性聚丙烯酰胺凝胶电泳)分离, 然后银染检测。

3.2.3 AFLP标记筛选、验证

先在抗病、感病亲本间进行引物筛选, 利用在双亲间表现多态性的引物对抗病组和感病组单株进行扩增, 在抗病组和感病组间表现多态性的引物组合可初步入选。筛选到的标记与抗性基因的连锁关系经组外其余F₂单株验证可进一步得到确认。用筛选出的标记对生产上已知黑斑病抗性的品系分别进行分析, 计算扩增带型与黑斑病抗性的实际表现型的符合度。

3.2.4特异片段的回收、测序及SCAR转化

采用煮沸法回收特异片段, 扩增产物送至北京三博远志生物公司测序。

根据DNA序列特点, 遵循引物设计的一般原则进行特异性SCAR引物的设计(上海生工公司合成), SCAR扩增体系、程序及检测参照王惠哲等(王惠哲等, 2008)的方法。

作者贡献

王惠哲、李淑菊、杨瑞环和管炜是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 王惠哲、李淑菊完成数据分析, 论文初稿的写作; 杨瑞环和管炜参与实验设计, 结果分析。李淑菊是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由天津市自然科学基金课题(09JCZDJC18900和11JCYBJC09000)资助。

参考文献

- Chandler, L.D., and Thomas, C.E., 1991, Effect of leaf miner feeding activity on the incidence of *Alternaria* blight lesions on muskmelon leaves, *Plant Dis.*, 75: 938-940
- Gu X.F., Zhang S.Q., and Zhang S.P., 2006, The AFLP Markers Linked with the Bitter Fruit Gene (*Bt*) in Cucumber,

- Yuanyi Xuebao (*Acta Horticulturae Sinica*), 33(1): 140-142 (顾兴芳, 张素勤, 张圣平, 2006, 黄瓜果实苦味*Bt*基因AFLP分子标记, 园艺学报, 33(1): 140-142)
- Latin, R.X., 1992, Modeling the relationship between *Alternaria* leaf blight and yield loss in muskmelon, *Plant Dis.*, 76: 1013-1017
- Li S.J., Wang H.Z., Huo Z.R., and Guan W., 2008, Development of SCAR Marker Linked to Cucumber Anthracnose Resistance-related Gene from an AFLP Marker, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 35(1): 123-126 (李淑菊, 王惠哲, 霍振荣, 管炜, 2008, 黄瓜抗炭疽病相关基因AFLP标记的SCAR转换, 园艺学报, 35(1): 123-126)
- Liang J. L., 1992, Occurrence and control of alternaria leaf spot disease on cucumber, *Henan Nongye Kexue (Henan Agricultural Sciences)*, 1: 30-31 (梁金兰, 1992, 黄瓜黑斑病的发生与防治, 河南农业科学, 1: 30-31)
- Liao Y., Sun B.J., Sun G.W., Liu H.C., Li Z.L., Li Z.X., Wang G.P., and Chen R.Y., 2009, AFLP and SCAR Markers Associated with Peel Color in Eggplant, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 42(11): 3996-4003 (廖毅, 孙保娟, 孙光闻, 刘厚诚, 李植良, 黎振兴, 汪国平, 陈日远, 2009, 与茄子果皮颜色相关联的AFLP及SCAR标记, 中国农业科学, 42(11): 3996-4003)
- Lv P.K., Li M.Y., Wu J.W., Yi Q., Zhang B.L., Jiang K.Y., Wen Q., Li M.Z., and Wang R.C., eds., 1992, *Atlas of Insect Pests and Diseases of Vegetable Crops in China*, Agricultural Publishing House, Beijing, China, pp.18-19 (吕佩珂, 李明远, 吴钜文, 易齐, 张宝禄, 姜克英, 文奇, 李明周, 王润初, 著, 中国蔬菜病虫原色图谱, 农业出版社, 中国, 北京, pp.18-19)
- Meng S.C., Liu Y.M., Zheng X.Y., and Wang Y.J., 2008, Studies on Genetic Relationships among Chinese Cabbage, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 24(7): 307-313 (孟淑春, 刘玉梅, 郑晓鹰, 王永健, 2008, 大白菜亲缘关系研究, 中国农学通报, 24(7): 307-313)
- Tanksley S.D., Ganai M.W., Prince J.P., de-Vicente M.C., Bonierbale M.W., Broun P., Fulton T.M., Giovannoni J.J., Grandillo S., Martin G. B., Messeguer R., Miller J.C., Miller L., Paterson A.H., Pineda O., Roder M.S., Wing R.A., Wu W., and Young N.D., 1992, High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes, *Genet.*, 132: 1141-1160
- Thomas C.E., McCreight J.D., and Jourdain E.L., 1990, Inheritance of resistance to *Alternaria cucumerina* in *cucumis melo* line MR-1, *Plant Dis.*, 74: 868-870
- Vos P., Hongers R., Bleeker M., Reijans M., Van de Lee T., Hornes M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res.*, 23(21): 4407-4414
- Wang H.Z., Li S.J., and Guan W., 2009, SSR Marker Linked to Cucumber Scab Resistance-Related Gene, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 7(3): 550-554 (王惠哲, 李淑菊, 管炜, 2009, 与黄瓜抗黑星病相关基因紧密连锁的SSR标记, 分子植物育种, 7(3): 550-554)
- Wang H.Z., Li S.J., Liu X.F., Li P, Huo Z.R., and Guan W., 2007, AFLP Markers of Cucumber Anthracnose Resistance-related Gene, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica.)*, 34(1): 213-216 (王惠哲, 李淑菊, 刘秀峰, 李平, 霍振荣, 管炜, 2007, 与黄瓜抗炭疽病相关基因连锁的AFLP标记的筛选, 园艺学报, 34(1): 213-216)
- Wang H.Z., Li S.J., Yang R.H., and Guan W., 2010, EST-SSR Marker Linked to Cucumber Target Leaf Spot Resistance-related Gene, *Acta Horticulturae*, 871: 49-55
- Yacoub B., 2003, *Alternaria* leaf spot disease on cucumber: Susceptibility and control using leaf disk assay, *An-Najah Univ. J. Res. (N. Sc.)*, 17(2): 269-279
- Yi K., Xu Y., Lu X.Y., Xiao L.T., Xu X.L., Gong G.Y., and Zhang H.Y., 2004, Construction of AFLP Molecular Genetic Map for RIL Population of Watermelon *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 31(1): 53-58 (易克, 许勇, 卢向阳, 肖浪涛, 徐向利, 宫国义, 张海英, 2004, 西瓜重组自交系群体的AFLP分子图谱构建, 园艺学报, 31(1): 53-58)
- Zhang G.H., Du S.L., Wang M., Ma D.H., 2004, AFLP Markers of Cucumber Powdery Mildew Resistance-related Gene, *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 31(2): 189-192 (张桂华, 杜胜利, 王鸣, 马德华, 2004, 与黄瓜抗白粉病相关基因连锁的AFLP标记的获得, 园艺学报, 31(2): 189-192)
- Zhang H.Y., 2006, Identification of Molecular-markers Linked to Important Resistant genes and Construction of Genetic Map in Cucumber, Dissertation for Ph.D., Biotechnology Research Institute CAAS, Supervisor: Fang Z.Y., and Wang Y.J., pp.68-86 (张海英, 2006, 黄瓜重要抗病基因的分子标记研究及遗传图谱的构建, 博士学位论文, 中国农业科学院研究生院, 导师: 方智远, 王永健, pp.68-86)
- Zhang S.Q., Gu X.F., Zhang S.P., Wang X.W., and Zou Z.R., 2010, Tagging a Downy Mildew Resistance Related Gene in Cucumber Using AFLP Marker, *Xibei Zhiwu Xuebao*

(Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.), 30(7): 1320-1324 (张素勤, 顾兴芳, 张圣平, 王晓武, 邹志荣, 2010, 黄瓜霜霉病抗性相关基因的AFLP标记, 西北植物学报, 30(7): 1320-1324)

Zhang T.M., Qu D.Y., Wang C.L., Wang Y.J., and Liu Y.S., 2006, Relationships Analysis of Cucurbita by AFLP, Zhongguo Shucai (China Vegetables), 1: 11-14 (张天明, 屈冬玉, 王长林, 王迎杰, 刘宜生, 2006, 南瓜属4个栽培种亲缘关系的AFLP分析, 中国蔬菜, 1: 11-14)



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>