

# 甜瓜抗白粉病基因 SRAP 分子标记

张学军<sup>1,2</sup> 季娟<sup>1</sup> 李霖华<sup>1,2</sup> 王豪杰<sup>1,2</sup> 伊鸿平<sup>1,2</sup>

(1. 新疆农业科学院哈密瓜研究中心 新疆 乌鲁木齐 830052; 2. 海南省甜瓜西瓜遗传育种重点实验室 海南 三亚 572014)

**摘要:** 以抗病资源收集一号和感病农家品种皇后杂交的  $F_1$ 、 $BC_s$ 、 $BC_r$ 、 $F_2$  以及双亲为材料, 苗期进行白粉病抗性鉴定, 分析了白粉病抗源收集一号的抗性遗传规律, 并利用集团分离分析法结合 SRAP 标记进行连锁分析。结果表明, 收集一号对白粉病 *Podosphaera xanthii* 生理小种 1 的抗性由显性单基因控制, 同时对 1 600 对 SRAP 引物进行筛选, 引物 me4em37 扩增出的多态性条带与抗病基因表现连锁关系, 该多态性片段大小为 100 bp, 与抗病基因遗传连锁距离为 17.0 cM。

**关键词:** 甜瓜; 白粉病; 抗病基因; SRAP 分子标记

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)02-0073-05

## SRAP Markers Linked to Powdery Mildew Resistance Gene in Melon

ZHANG Xue-jun<sup>1,2</sup> JI Juan<sup>1</sup> LI Mei-hua<sup>1,2</sup> WANG Hao-jie<sup>1,2</sup> YI Hong-ping<sup>1,2</sup>

(1. The Research Center of Hami-melon, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830052, China;

2. Key Laboratory of Melon and Watermelon Genetic Breeding in Hainan, Sanya 572014, China)

**Abstract:** Parental lines and( No. 1Shouji × Huanghou)  $F_1$ ,  $F_2$  and backcross populations were scored for response to inoculation with *Podosphaera xanthii* race 1. The sequence related amplified polymorphism( SRAP) technique and bulk segregant analysis( BSA) were used to identify molecular markers linked to the resistance of melon powdery mildew. The resistance to *P. xanthii* race 1 in No. 1 Shouji was controlled by one single dominant gene. A total 1 600 pairs SRAP primers could detect the polymorphism between the resistant pool and susceptible pool. An unique 100 bp fragment was amplified with the primer me4em37. It was identified that is linked to resistance gene of No. 1 Shouji at a distance of 17.0 cM.

**Key words:** *Cucumis melo* L.; Powdery mildew; Disease resistance gene; SRAP marker

白粉病是甜瓜(*Cucumis melo* L.) 主要病害, 从世界范围来看, 甜瓜白粉病菌主要为瓜单囊壳白粉菌 *Podosphaera xanthii* (原称 *Sphaerotheca fuliginea*) 和二孢白粉菌 *Golovinomyces cichoracearum* (原称 *Erysiphe cichoracearum*) [1]。危害瓜类白粉病的生理小种多、分化快, 仅单囊壳白粉菌就包含很多生理小种, 目前已经发现的有 11 个生理小种, 分别是: 小种 0、1、2 U、S(2U)、2 France(2F)、3、4、5、N1、N2、N3 和 N4; 二孢白粉菌有 2 个生理小种, 分别是小种 0 和 1 [2]。目前我国甜瓜白粉病的主要病原菌是瓜单囊壳菌(*P. xanthii*) [3]。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, 是瓜类绿色食品生产的主要障碍。因此, 发掘、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。

世界上对甜瓜白粉病抗性遗传的研究较早, 关于甜瓜白粉病抗性的遗传分析报道较多, 研究比较深入。目前, 关于甜瓜对白粉病抗性的遗传存在着不同的观点, 其主要集中在单显性基因控制 [4-6]、2 个基因控制 [7-8]、多个显性基因、隐性基因和修饰基因共同控制 [9] 等几个方面。迄今为止, 已经发现的甜瓜白粉病抗性基因有 *Pm-1*、*Pm-2*、*Pm-3*、*Pm-4*、*Pm-5*、*Pm-6*、*Pm-7*、*Pm-A*、*Pm-B*、*Pm-C*<sup>1</sup>、*Pm-C*<sup>2</sup>、*Pm-D*、*Pm-E*、*Pm-F*、*Pm-G*、*Pm-H*、*Pm-W*、*Pm-X* 和 *Pm-Y* [10]。近些年, 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 [11] 发现一个与甜瓜白粉病抗病位点相连锁的 RAPD 标记; 王怀松等 [12] 利用 AFLP 获得了一个与甜瓜白粉病抗性基

收稿日期: 2013-01-14

基金项目: 国家西甜瓜产业技术体系项目(CARS-26-04); 新疆自治区高技术研究与发展项目(201111119)

作者简介: 张学军(1980-), 男, 吉林四平人, 助理研究员, 硕士, 主要从事甜瓜西瓜抗病育种研究。

通讯作者: 伊鸿平(1962-), 男, 福建武夷山人, 研究员, 硕士, 主要从事甜瓜西瓜遗传育种研究。

因紧密连锁的分子标记;赵光伟等<sup>[13]</sup>也获得了2个与白粉病抗性基因相连锁的SRAP标记;但是都未明确其白粉病菌的生理小种,这对于有多个小种分化的甜瓜白粉病来说,缺陷十分明显。张海英等<sup>[14]</sup>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。国外已经报道了与*P. xanthii*生理小种1抗性基因连锁的RAPD标记<sup>[15]</sup>和AFLP标记<sup>[16]</sup>,并进行了生理小种1、2、3、5的抗性基因QTL定位<sup>[17]</sup>。因此,在明确生理小种的基础上,开展甜瓜白粉病抗性遗传规律的研究,并建立甜瓜抗白粉病育种分子标记辅助选择技术非常必要。

本研究在明确新疆地区甜瓜白粉病生理小种的基础上(相关研究将会报道),研究新疆厚皮甜瓜收集一号对*P. xanthii*白粉病生理小种1抗性遗传规律,并采用SRAP技术寻找与之连锁的分子标记,以期为我国新疆厚皮甜瓜抗白粉病病育种、遗传图谱构建及抗性基因定位分析等研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

母本P<sub>1</sub>为收集一号:高抗*P. xanthii*白粉病生理小种1;父本P<sub>2</sub>优质常规品种皇后:高感*P. xanthii*白粉病生理小种1,由新疆农业科学院哈密瓜研究中心提供。以杂交组合收集一号×皇后的F<sub>1</sub>、BCs、BCr、237个F<sub>2</sub>单株以及双亲为材料,进行苗期抗性鉴定,分析抗源基因的抗性遗传规律。甜瓜白粉病病原菌(*P. xanthii*)从甜瓜种植区病株进行单孢分离、保存、扩繁,最后鉴定生理小种后用于苗期接种试验。SRPA引物参照Li等<sup>[18]</sup>和桂琴等<sup>[19]</sup>发表的文献,选择了32个正向引物和50个反向引物,共得到1600对SRAP引物,引物序列由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.2 病原准备、接种及病情调查

2010年11月,在新疆农科院哈密瓜研究中心(三亚)大棚内,将高温消毒的种子播种于消毒营养钵中(P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>和F<sub>1</sub>各30株;BCs和BCr各60株;237个F<sub>2</sub>单株),苗期接种采用刷叶法<sup>[20]</sup>略加改进,在第2片真叶展开时,用特制的软毛刷将扩繁的白粉病新鲜孢子刷入无菌水中,加入一滴“不怕雨”(上海永通化工有限公司),混匀后用血球计数板进行计数,配成浓度为5×10<sup>3</sup>个/mL的孢子悬浮液均匀地刷到甜瓜植株叶片上,20~25℃黑暗保湿12h,然后在温室内正常管理。2周后进行植株抗感鉴

定,本研究采用中国农业科学研究院蔬菜花卉研究所植保室病情分级标准,将病情分为6个级别:0级,无病症;1级,病斑面积占叶面积的1/3以下,白粉模糊不清;2级,病斑面积占叶面积的1/3~2/3,白粉较为明显;3级,病斑面积占叶面积的2/3以上,白粉层较厚,连片;4级,白粉层浓厚,叶面开始变黄,坏死面积占叶面积的2/3以下;5级,叶片坏死面积占叶面积的2/3以上。病害级别为0~2的个体记录为抗病,病害级别为3~5的个体记录为感病,χ<sup>2</sup>测验分析。

### 1.3 SRAP分子标记分析

基因组DNA提取采用改进CTAB法提取基因组DNA,将DNA的浓度调整至约100mg/L备用。F<sub>2</sub>抗感基因池的构建取抗病(0级)和感病(5级)的F<sub>2</sub>单株各10株等量的DNA,混合构建抗感基因池。

PCR反应体系及反应程序,SRAP-PCR反应体系为优化的反应体系(20μL)中含有:模板DNA 36ng, *Taq* DNA聚合酶 2.5U, dNTPs 2.25mmol/L,引物 0.6μmol/L, Mg<sup>2+</sup> 1.75mmol/L, 2μL 10×PCR Buffer。扩增反应在TC-512(TECHNC)PCR仪上进行,反应程序参照Li的程序:95℃预变性5min;95℃变性1min,35℃退火1min,72℃延伸1min,5个循环;95℃变性1min,51℃退火1min,72℃延伸1min,35个循环;最后72℃延伸10min,4℃保存。6%聚丙烯酰胺胶进行电泳,恒电压85V,电泳2~3h。电泳结束后,采用银染方法进行染色来检测条带。

### 1.4 数据记录与连锁分析

使用JoinMap 4.0软件分析F<sub>2</sub>群体扩增的SRAP条带和白粉病抗性基因之间的遗传关系,同抗病亲本的带型一致的标记命名为a,同感病亲本的带型一致的标记命名为b,杂合的带型则记为h,缺失或者模糊不清楚的带型记作-。

## 2 结果与分析

### 2.1 抗源收集一号的遗传分析

2010年11月,在新疆农科院哈密瓜研究中心(三亚)大棚内,将高温消毒的种子播种于消毒营养钵中(P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>和F<sub>1</sub>各30株;BCs和BCr各60株;237个F<sub>2</sub>单株),进行抗白粉病苗期接种鉴定。鉴定结果(表1):30株母本收集一号表现为抗病,30株父本皇后均表现为感病,30株F<sub>1</sub>均表现抗病,60株BCr(F<sub>1</sub>×P<sub>1</sub>)都均表现抗病,60株BCs(F<sub>1</sub>×P<sub>2</sub>)在抗病接种鉴定中抗病株:感病株为34:26,抗感分离比基本符合1:1的期望分离比例(χ<sup>2</sup>=0.82);237株F<sub>2</sub>

群体 抗病性接种鉴定抗病株: 感病株为 167: 70, F<sub>2</sub> 的抗感分离比基本符合 3: 1 的期望分离比例(  $\chi^2 = 2.36$ );  $\chi^2$  测验均达到了显著水平(  $\chi_{0.05, 1}^2 = 3.84$ ) 结

果表明 抗源收集一号对甜瓜白粉病( *P. Xanthii*) 生理小种 1 的抗性是由单个显性基因控制的。

表 1 甜瓜六世代群体分离情况

Tab. 1 The situation of segregation of 6 generations of melon groups

亲本或杂交组合 Parent or cross	株数 Number		期望比率 Expected ratio	$\chi^2$	
	R <sup>a</sup>	S <sup>b</sup>		数值 Value	概率 Prob
收集一号 No. 1 Shouji( P <sub>1</sub> )	30	0	1; 0		
皇后 Huanghou( P <sub>2</sub> )	0	30	0; 1		
收集一号 × 皇后 No. 1 Shouji × Huanghou( F <sub>1</sub> )	30	0	1; 0		
收集一号 × 皇后 No. 1 Shouji × Huanghou( F <sub>2</sub> )	167	70	3; 1	2.36	0.25 ~ 0.10
BCr( F <sub>1</sub> × P <sub>1</sub> )	60	0	1; 0		
BCs( F <sub>1</sub> × P <sub>2</sub> )	34	26	1; 1	0.82	0.50 ~ 0.25

注: R<sup>a</sup>. 抗病( 病害级别为 0 ~ 2); S<sup>b</sup>. 感病( 病害级别为 3 ~ 5)。

Note: R<sup>a</sup>. Resistant( stem damage rating 0 - 2); S<sup>b</sup>. Susceptible( stem damage rating 3 - 5) .

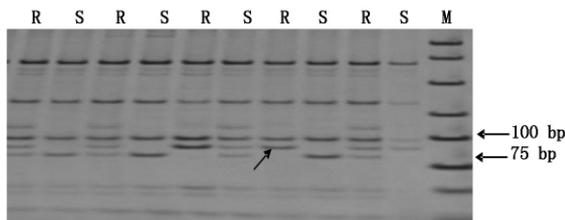
2.2 多态性及特异性 SRAP 引物的筛选

参照 Li 等<sup>[18]</sup> 和桂琴等<sup>[19]</sup> 发表的文献, 选择了 32 个正向引物和 50 个反向引物, 共得到 1 600 对 SRAP 引物, 分别对抗、感池进行 PCR 扩增, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 初步筛选出在抗、感池间具有多态性的引物 75 对, 多态性比率为 4. 8%, 多态性条带 1 ~ 3。经过多次重复后, 其中有 5 组引物在抗感基因池之间扩增出稳定的多态性条带( 图 1), 引物编号及其碱基序列见表 2。用这 5 组引物分别对 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>、F<sub>1</sub>、感病 DNA 池、抗病 DNA 池和抗感 F<sub>2</sub> 单株进行 SRAP 扩增验证, 引物 me4em37 在抗感基因池上的多态性产物稳定, 重复性好, 多态性条带清晰( 图 2)。

表 2 抗感基因池间表现多态性的引物

Tab. 2 Primers showed polymorphisms between two bulks

编号 Code	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
me4em37	TGAGTCCAAACCGGAAG	GACTGCGTACCAATTCTGA
me6em36	TGAGTCCAAACCGGACA	GACTGCGTACCAATTCTCC
me9em29	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACGAATTCAAT
me12em32	TGAGTCCAAACCGGAGG	GACTGCGTACCAATTCGAG
me8em35	TGAGTCCAAACCGGACC	GACTGCGTACCAATTCTCA



M. DNA Marker-A; R. 抗池; S. 感池。

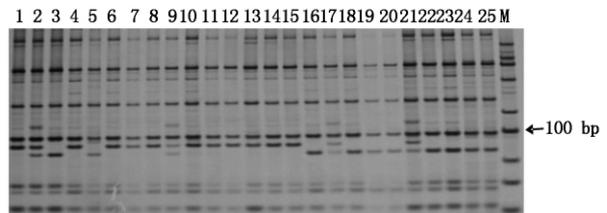
M. DNA Marker-A; R. Resistant pool; S. Susceptible pool.

图 1 SRAP 引物对抗感基因池的扩增

Fig. 1 The polymorphism of SRAP primer in resistant and susceptible gene pool

用引物 me4em37 在双亲和 F<sub>2</sub> 分离群体上进行

SRAP 扩增的多态性验证, 多态性扩增产物与收集一号抗白粉病基因具有连锁关系, 扩增结果见图 3, 长度约为 100 bp。

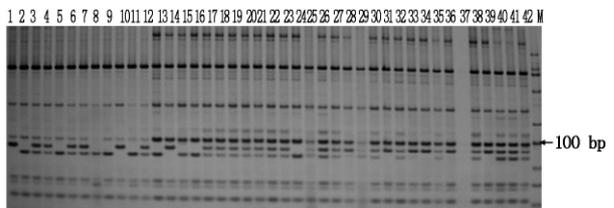


M. DNA Marker-A; 1. 收集一号; 2. F<sub>1</sub>; 3. 皇后; 4. 抗病 DNA 池; 5. 感病 DNA 池; 6 ~ 15. 抗病 F<sub>2</sub> 单株; 16 ~ 25. 感病 F<sub>2</sub> 单株。

M. DNA Marker-A; 1. No. 1 Shouji; 2. F<sub>1</sub>; 3. Huanghou; 4. Resistant pool; 5. Susceptible pool; 6 - 15. Resistant F<sub>2</sub> individuals; 16 - 25. Susceptible F<sub>2</sub> individuals.

图 2 引物 em4me37 对双亲、F<sub>1</sub>、抗感 F<sub>2</sub> 单株和抗感基因池的扩增

Fig. 2 SRAP profiles generated by primer em4me37 in No. 1 Shouji Huanghou F<sub>1</sub> resistant and susceptible gene pool resistant and susceptible F<sub>2</sub> individuals



M. DNA Marker-A; 1 ~ 42. F<sub>2</sub> 单株。

M. DNA Marker-A; 1 - 42. F<sub>2</sub> individuals.

图 3 引物 em4me37 对 F<sub>2</sub> 单株的扩增

Fig. 3 SRAP profiles generated by primer em4me37 in a part of F<sub>2</sub> individuals

2.3 与抗白粉病基因连锁的 SRAP 标记

对条带和抗感表型的统计结果表明, 在 167 株抗病植株中, 150 株扩增出该多态性条带, 2 株无扩增条带, 15 株没有扩增出该多态性条带, 即发生重组; 在 70 株感病植株中, 60 株无带, 2 株无扩增条带, 8 株扩增出该多态性条带, 即表现重组( 表 3)。

采用 JoinMap 4.0 软件对获得的 SRAP 标记和抗白粉病基因之间的遗传关系进行连锁分析,结果表明:该

标记与抗性基因存在连锁关系,遗传距离为 17.0 cM。

表 3 抗感表型与 me4em37-100 在 F<sub>2</sub> 群体中的分布

Tab. 3 Distribution of genotypes and me4em37-100 in F<sub>2</sub> population

F <sub>2</sub> 群体基因型 Phenotype of individual of F <sub>2</sub>	植株数量 Number of plant	有条带株数 Number of plants with bands	无条带株数 Number of plants without bands	重组株数 Number of recombination	缺失株数 Number of deficiency
抗病 Resistant	167	150	15	15	2
感病 Susceptible	70	8	60	8	2
总数 Total	237	158	75	23	4

### 3 讨论

相关序列扩增多态性(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP),由美国加州大学蔬菜作物系 Li 等<sup>[18]</sup>于 2001 年在芸薹属植物中开发出来,是一种基于 PCR 的新型分子标记技术,又称为基于序列扩增多态性(Sequence-based amplified polymorphism, SBAP)<sup>[21]</sup>。SRAP 分子标记技术有操作简单、多态性高、重复性好、共显性高、费用低等优点,是比较理想的分子标记技术。在植物遗传多样性、图谱构建及重要性状基因标记研究等方面具有重要的应用价值。本研究中所用的抗性资源收集一号来自新疆厚皮甜瓜,品质好、具有哈密瓜风味,对白粉病 *P. xanthii* 生理小种 1 具有很高的抗性。本研究利用 SRAP 技术,获得了与新疆哈密瓜收集一号抗白粉病基因连锁的 SRAP 分子标记 me4em37,遗传连锁距离为 17.0 cM。me4em37 标记的获得,为利用我国新疆厚皮甜瓜抗白粉病基因进行厚皮甜瓜白粉病分子育种奠定了坚实的基础。

与国外相比,我国甜瓜作物白粉病的研究起步较晚、基础较差,对瓜类白粉病菌的种类与生理小种鉴定还不完善,因此,明确甜瓜白粉病多个生理小种的抗病遗传规律,是目前开展甜瓜抗病遗传育种理论研究的重要基础。我国之前关于甜瓜白粉病抗性遗传规律和分子标记的研究大多是在没有明确生理小种的基础上开展,其缺陷极其明显。本试验在鉴定了材料所侵染的白粉病为 *P. xanthii* 小种 1 的基础上,通过 SRAP 标记找到了与抗病基因连锁的特异片段。这是在明确白粉病生理小种基础上报道的新疆厚皮甜瓜抗白粉病连锁 SRAP 标记。但目前结果是在初级作图群体的基础上进行的研究,遗传连锁距离比较大,对甜瓜抗白粉病基因不能精确定位,制约了分子标记辅助育种的应用。为了更好地发掘利用新疆地区的抗病基因资源,将进一步构建抗性资源收集一号次级作图群体—染色体单片段代换系,利用本研究得到的引物 me4em37 进行分子标记

筛选,对抗白粉病基因进行精确定位,以期利用精确定位的连锁标记筛选甜瓜 BAC 文库,构建目的基因区域的物理图谱,用染色体步移的方法分离甜瓜白粉病抗性基因。

### 参考文献:

- [1] Kuzuya M, Yashiro K, Tomita K, et al. Powdery mildew (*Podosphaera xanthii*) resistance in melon is categorized into two types based on inhibition of the infection processes [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57: 2093 - 2100.
- [2] Kuzuya M, Hosoya K, Yashiro K, et al. Powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) resistance in melon is selectable at the haploid level [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54: 1069 - 1074.
- [3] 王建设, 陈杭. 甜瓜白粉病鉴定 [J]. 华北农学报, 2000, 15(1): 125 - 128.
- [4] Jagger I C, Whitaker T W, Porter D R. A new biotic form of powdery mildew on muskmelon in the imperial Valley of California [J]. Plant Dis Repr, 1938, 22: 275 - 276.
- [5] 王建设, 宋曙辉, 孟淑春. 两个甜瓜品种对白粉病菌的抗性遗传分析 [J]. 华北农学报, 2003, 18(2): 63 - 65.
- [6] 臧全宇. 网纹甜瓜白粉病的抗性遗传研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [7] Pryor D E. The influence of vitamin B1 on the development of cantaloupe powdery mildew [J]. Phytopath, 1942, 32: 885 - 895.
- [8] Fujin 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 melon* L.) [J]. Theor Appl Genet, 2008, 118(1): 165 - 175.
- [9] Bardin M, Nicot P C, Norm P, et al. Virulence variation and DNA polymorphism in *Sphaerotheca fuliginea*, causal agent of powdery mildew of cucurbits [J]. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103(6): 545 - 554.
- [10] Michel Pitra. 2002 gene list melon [J]. Cucurbit Genetics Cooperative Report, 2002, 25: 76 - 93.
- [11] 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.
- [12] 王怀松, 贺超兴, 程振家. 甜瓜白粉病抗性 AFLP 连锁标记的初步研究[J]. 中国瓜菜, 2009(2): 4 - 6.
- [13] 赵光伟, 徐永阳, 徐志红, 等. 甜瓜抗白粉病基因 SRAP 分子标记筛选[J]. 西北植物学报, 2010, 30(6): 1105 - 1110.
- [14] 张海英, 苏芳, 郭绍贵, 等. 甜瓜白粉病抗性基因 *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.
- [15] Fukino N, Taneishi M, Saito T *et al.* Construction of a linkage map and genetic analysis for resistance to cotton aphid and Powdery mildew in melon [J]. *Acta Horti*, 2001, 588: 283 - 286.
- [16] Yuste-Lisbona F J, Capel C, Capel J *et al.* Conversion of an AFLP fragment into one dCAPS marker linked to powdery mildew resistance in melon [J]. *Cucurbitaceae*, 2008: 143 - 148.
- [17] 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.
- [18] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. *Theor Appl Genet* 2001, 103: 455 - 461.
- [19] 桂琴, 王嘉璐, 伍晓明, 等. SRAP-cDNA 方法在植物基因差异表达分析中的应用 [J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(4): 497 - 502.
- [20] 王迪, 田丽美, 李德泽, 等. 甜瓜白粉病苗期接种方法和接种浓度的研究 [J] 北方园艺, 2010(11): 185 - 186.
- [21] Ferriol M, Picó M B, Nuez F. Genetic diversity of some accessions of *Cucurbita maxima* from Spain using RAPD and SBAP markers [J]. *Genet Resour Crop Evol* 2003, 50: 227 - 228.