

# 与黄瓜抗枯萎病基因连锁的 RAPD 标记

张海霞<sup>1,2</sup>, 张海英<sup>2</sup>, 于广建<sup>1</sup>, 张峰<sup>2</sup>, 毛爱军<sup>2</sup>, 王永健<sup>2</sup>, 许勇<sup>2</sup>

(1. 东北农业大学 园艺系, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 北京蔬菜研究中心, 北京 100089)

**摘要:**以黄瓜抗枯萎病亲本 WIS2757 和感枯萎病亲本津研 2 号及其 F<sub>2</sub> 分离群体为试材, 采用分离群体分组分析法(BSA)进行了与黄瓜抗枯萎病基因连锁的分子标记研究。运用 RAPD 技术, 利用 780 条 RAPD 引物对抗、感亲本进行筛选, 其中有 113 条引物在两亲本之间表现多态性, 但仅有引物 S49 在两组间多态性标记与亲本的多态性标记相同。经 F<sub>2</sub> 单株分析, 引物 S49 扩增出的特异 DNA 片段与 WIS2757 抗黄瓜枯萎病基因连锁, 遗传距离为 14 cM。DNA 标记条带大约为 300 bp, 定名为 S49<sub>-300</sub>。

**关键词:** 黄瓜; 枯萎病; 抗性基因; RAPD

**中图分类号:** 642.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2006)02-0121-03

## Identification RAPD Markers Linked to *Fusarium* Wilt Resistance Gene in Cucumber

ZHANG Hai-xia<sup>1,2</sup>, ZHANG Hai-ying<sup>2</sup>, YU Guang-jian<sup>1</sup>,  
ZHANG Feng<sup>2</sup>, MAO Ai-jun<sup>2</sup>, WANG Yong-jian<sup>2</sup> XU Yong<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China;

2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089, China)

**Abstract:** Using RAPD primers with BSA technique screened the RAPD markers linked to *Fusarium* Wilt resistance gene in Cucumber. The results showed that 113 arbitrary primers can amplified different polymorphism bands between two parents, primer S49 can amplify a specific polymorphism band which is linked to *Fusarium* Wilt resistance in Cucumber, the genetic distance is 14 cM, and the band is named S49<sub>-300</sub>.

**Key words:** Cucumber; *Fusarium* Wilt; Resistance gene; RAPD

黄瓜枯萎病(*Fusarium* Wilt)是影响黄瓜的三大病害之一。是由尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)黄瓜专化型侵染引起的土传病害。一般年份可使黄瓜产量损失 25%~35%, 发病重的年份甚至造成绝产<sup>[1]</sup>。培育、栽培抗病品种是防治黄瓜枯萎病最经济、有效和环境安全的方法。快速、准确、实用的抗病鉴定方法是进行抗病育种的前提, 然而在常规抗病育种过程中, 必须在病害发生的条件下选择抗病后代, 费时费工, 而且常受到环境条件、病原菌毒力变异等因素的影响, 造成错误的选择。同时由于抗病基因的分离, 无法确定选择的单株所含抗病基因的归属, 而且连续人工选择易造成基因的丢失, 育成品种的抗病基因也难确定<sup>[2]</sup>。用与目标基因紧密连锁的分子标记对杂交后代进行鉴定能极大地缩短培育新品种的

时间<sup>[3,4]</sup>。2000 年 Thomas Horejsi<sup>[5]</sup>等人用 RAPD 标记法获得了黄瓜抗霜霉病连锁标记, 遗传距离为 22。张桂华<sup>[6]</sup>等人以黄瓜抗白粉病母本 Q9 和感白粉病父本 Q10 及组合(津春 3 号)的 F<sub>2</sub> 分离群体为试材, 采用 BSA 法和 AFLP 技术相结合, 找到了与白粉病连锁距离为 5.56 cM 的标记, 并成功的将其转为 SCAR 标记。但目前尚未见与黄瓜枯萎病相关基因连锁的分子标记有关的报道。

本研究以黄瓜抗枯萎病亲本 WIS2757 和感枯萎病亲本津研 2 号杂交获得的 F<sub>2</sub> 分离群体为材料, 通过苗期人工接种抗病性鉴定, 采用 BSA 法和 RAPD 技术相结合, 筛选与黄瓜抗枯萎病相关基因连锁的 RAPD 标记, 以期对黄瓜抗枯萎病分子标记辅助育种奠定基础。

收稿日期: 2005-10-11

基金项目: 北京市自然科学基金(5052001; 5062008); 国家自然科学基金资助(30471186)

作者简介: 张海霞(1982-), 女, 黑龙江人, 在读硕士, 主要从事蔬菜基因标记研究工作; 张海英为通讯作者。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

供试黄瓜材料 WIS2757 和津研 2 号及其杂交获得的 120 株  $F_2$  单株由北京市农林科学院蔬菜研究中心黄瓜育种课题提供,母本 WIS2757 抗枯萎病,父本津研 2 号感枯萎病。

### 1.2 黄瓜抗枯萎病苗期鉴定

接种方法为国际通用的浸根法。黄瓜枯萎病菌为尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)黄瓜专化型生理小种 4,采自北京通县。在小苗长至两叶一心时接种。病情分级标准按 Martyn 等<sup>[7]</sup>的标准进行分级,2 级以下为抗病植株,3 级以上为感病植株。接种存活的单株,再进行切根灌菌液处理,以进一步鉴定其抗病性,灌根处理 10~15 d 调查其死苗情况。

### 1.3 基因组 DNA 提取

参照 Bernatzky 和 Tanksley<sup>[8]</sup>的方法提取黄瓜幼叶基因组 DNA。DNA 浓度和质量用琼脂糖凝胶电泳检测,最后将纯化后的 DNA 部分稀释到 30 ng/ $\mu$ L 备用。

### 1.4 PCR 反应

PCR 反应体系包括:ddH<sub>2</sub>O 7.05  $\mu$ L;10 $\times$  buffer(已含 Mg<sup>2+</sup>) 1.25  $\mu$ L;dNTP(2.5 mmol/L) 1.0  $\mu$ L;Primer(15 ng/ $\mu$ L) 2.0  $\mu$ L;模板 DNA(30 ng/ $\mu$ L) 2.0  $\mu$ L;TaqE(2.5 U/ $\mu$ L) 0.4  $\mu$ L。RAPD 引物及 dNTP 购自上海生工生物工程公司,TaqDNA 聚合酶购自北京天为时代科技有限公司。反应程序如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,37 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,进行 35 个循环,在 72 $^{\circ}$ C 下保温 7 min,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 仪器是 DNAThermal 480(PERKIN ELMER,America)。扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳,利用 Kodak EDAS-120 凝胶分析仪进行成像分析,记录多态性片段。

### 1.5 连锁关系分析

用 JoinMap3.0 软件<sup>[9]</sup>分析  $F_2$  分离群体扩增的 RAPD 标记和枯萎病抗性基因之间的遗传关系,计算出所得 RAPD 标记与抗枯萎基因之间的遗传距离。

## 2 结果与分析

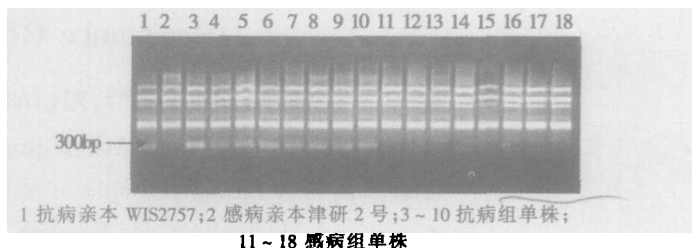
### 2.1 黄瓜抗枯萎病的遗传分析

在 120 株  $F_2$  单株中,抗病单株为 85 株,感病单株为 35 株,经  $\chi^2$  测验, $\chi^2 = 1.11 < \chi_{0.05}^2(3.84)$ ,符合 3:1 的分离比例,证明黄瓜抗枯萎病基因由显性单基因控制,与前人的研究结果一致。

### 2.2 与枯萎病抗性基因连锁的分子标记的筛选

用 780 条 RAPD 随机引物,对抗病亲本 WIS2757、感病亲本津研 2 号进行多态性扩增,大约 80% 引物扩增出 5~10 条清晰可辨的条带,13% 引物只扩增出 1~3 条带,7% 引物扩出 10 条以上的带或无带。其中有多态性差异的引物共有 113 条,多态率约为 14.5%。

在  $F_2$  中选取高抗、高感单株各 8 株,组成抗病组和感病组,用筛选出的在亲本间有多态性差异的 113 条引物对抗病组、感病组内单株进行 RAPD 扩增。结果表明,S49 在抗病亲本 WIS2757 及抗病组单株都出现了稳定可重复的 DNA 条带,此带为 300 bp,定名为 S49<sub>-300</sub>,而在感病亲本津研 2 号及感病组单株中均未出现此带(图 1)。该引物碱基序列:CTCTGGAGAC。



1 Resistance parent WIS2757;2 Susceptible parent Jinyan

No.2;3~10 Resistance individuals;11~18 Susceptible individuals

图 1 RAPD 引物 S49 对供试双亲、抗感池的扩增谱带

Fig.1 Rapid amplification with primer S49 in tested parents and resistance and susceptible gene bulk

### 2.3 特异片段的 $F_2$ 单株验证

用所得到的标记引物 S49 对其他 120 株  $F_2$  单株进行验证。结果显示,在 120 株  $F_2$  分离群体中有 15 株不符,其中抗病的单株中有 6 株无此条带(图 2),感病单株有 9 株出现了该条带(图 3)。即 120 个单株中有 15 株重组株,重组率为 12.5%。经多次验证,该扩增结果稳定重复。用 JoinMap3.0 软件分析计算,所筛选到的标记与抗枯萎病基因连锁,遗传距离为 14 cM。

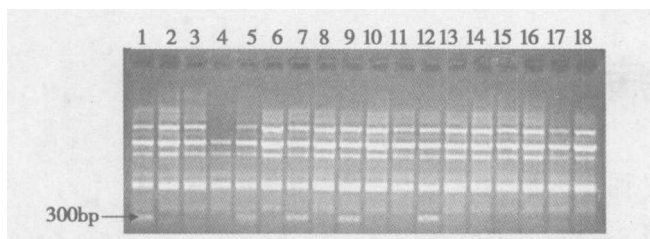


1 Resistance parent WIS2757;2 Susceptible parent Jinyan

No.2;3~17 Resistance individuals;12,15,16,17 are recombinant plants

图 2 引物 S49 在部分  $F_2$  单株中的验证

Fig.2 RAPD profiles generated by primer S49 in some  $F_2$  individuals



1 抗病亲本 WIS2757; 2 感病亲本津研 2 号; 3~18 抗病组单株;  
其中 5, 7, 9, 12 为重组株

1 Resistance parent WIS2757; 2 Susceptible parent Jinyan No. 2;  
3~18 Susceptible individuals; 5, 7, 9, 12 are recombinant plants

图 3 引物 S49 在部分 F<sub>2</sub> 单株中的验证

Fig. 3 RAPD profiles generated by primer S49 in some F<sub>2</sub> individuals

## 2.4 所得 RAPD 标记与黄瓜抗枯萎病基因的连锁关系分析

根据 S49<sub>-300</sub> 在各 F<sub>2</sub> 单株上的谱带表现以及 F<sub>2</sub> 单株的田间抗病性鉴定记录, 采用 JoinMap3.0 软件对所得 RAPD 标记 S49<sub>-300</sub> 和抗枯萎病基因进行连锁关系分析, 结果表明, 该标记与抗枯萎病基因存在连锁关系, 其连锁距离为 14 cM。

## 3 讨论

研究目标性状的连锁分子标记研究多采用近等基因系<sup>[10,11]</sup>和 BSA 方法。由于近等基因系需要多代回交才能获得, 周期很长。Michmore<sup>[12]</sup>提出的 BSA 方法解决了这一问题。其基本要点是将某等位基因的分离群体按基因的表型分成两个小群, 将每群内植株的 DNA 等量混合, 形成按表型区分的 DNA 池, 即“近等基因池”, 检测“近等基因池”的多态性可望发现与目的基因连锁的分子标记<sup>[13]</sup>。但对于单基因控制的质量性状, 若为不完全显性, 不易鉴别杂合子, 在 F<sub>2</sub> 后代可能发生划分错误<sup>[14]</sup>。由于黄瓜对枯萎病的抗病性状是由显性单基因控制的, 在组建感病池时, 很容易将中间类型的个体错误地划分为感病个体, 从而使感病池目标性状混杂, 在进行 BSA 分析时就很难找到在两池间表现多态的标记。因此本研究构建抗病组(8 个抗病 F<sub>2</sub> 单株单独扩增)和感病组(8 个感病 F<sub>2</sub> 单株单独扩增)进行标记筛选, 只要组中有 7 个单株带型一致, 即可初步认为该标记与抗病性有关。研究结果表明, 利用该方法可以迅速、准确地获得抗病连锁标记。

同时本研究表明, 780 条 RAPD 引物中有 113 条引物可在抗、感两亲本之间扩增出多态性, 多态率为 14.5%, 说明黄瓜是遗传基础狭窄的作物, 与前人的研究结果相同。

本研究采用 BSA 和 RAPD 技术相结合获得与抗黄瓜枯萎病基因连锁的标记, 通过此标记可以辅助选育优良的抗枯萎病黄瓜新品种, 提高选择效率, 对加速育种进程具有重要意义, 但由于 RAPD 技术本身的缺陷, 需要将 RAPD 标记转化为更稳定的 SCAR 标记, 目前我们正在进行该项工作。

## 参考文献:

- [1] 李传宝. 黄瓜枯萎病药剂防治试验[J]. 广西农业科学, 2003, (4): 40-41.
- [2] 朱振东, 周荣华, 贾继增. 小麦品系抗小麦白粉病基因分子标记鉴定[J]. 作物学报, 2005, (8): 977-982.
- [3] Gupta P K, Varshney R K, Sharma P C, et al. Molecular markers and their applications in wheat breeding[J]. Plant Breeding, 1999, 118: 369-390.
- [4] Young N D. A cautiously optimistic vision for marker-assisted breeding[J]. Molecular Breeding, 1999, 5: 505-510.
- [5] Thomas Horejsi, Jack E, Staub Claude Thomas. Linkage of random amplified polymorphic DNA markers to downy mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.)[J]. Euphytica, 2000, 115: 105-113.
- [6] 张桂华, 杜胜利, 王 鸣, 等. 与黄瓜抗白粉病相关基因连锁的 AFLP 标记的获得[J]. 园艺学报, 2004, 31(2): 189-192.
- [7] Martyn R D. An aggressive race of *Fusarium oxysporum* Fsp niveum new to the United States[J]. Plant Disease, 1985, 69: 1007.
- [8] Sasaki A. Green revolution: a mutant gibberellin synthesis gene in rice new insight into the rice variant that helped to avert famine over thirty years ago[J]. Nature, 2002, 416: 701-702.
- [9] Van Ooijen J W, Voorrips R E. JoinMap3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands. 2001.
- [10] Paran I, Kesseli R, Michmore R W. Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near isogenic lines[J]. Genome, 1991, 34: 1021-1027.
- [11] Martin G B, Williams J C K, Tanksley S D. Rapid identification of markers linked to *Pseudomonas* persistence gene in tomato by using random primers and near isogenic lines[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 2336-2340.
- [12] Michmore R W. Identification of marker linked to disease-resistance gene by bulked segregant analysis A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 9828-9832.
- [13] 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, (1): 89-92.
- [14] Schon C, Sanchez M, Blake T, et al. Segregation of Mendelian marker in double haploid and F<sub>2</sub> progeny of a barley of a barley cross[J]. Hereditas, 1990, 113: 69-72.