

AFLP, SSR 在黄瓜黑星病抗感材料上的多态性比较

孙小红¹, 杜胜利², 张桂华², 王葆利¹, 郭蔼光¹, 裴国亮¹

(1. 西北农林科技大学 生命学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 天津科润黄瓜研究所, 天津 300192)

摘要: 用 AFLP 和 SSR 2 种分子标记技术对黄瓜抗感黑星病材料 Q₆ 和 Q₁₂, 及其 F₂ 极性基团和 F₂ 群体进行了分析, 比较了它们的多态性。结果表明, AFLP 和 SSR 2 种分子标记的多态性比率分别为 36.5%, 9.6%; 阳性比率分别为 22%, 0。在 F₂ 群体中找到了 1 个 AFLP 标记 E20/M64, 与目的基因的遗传距离是 4.83 cM; 1 个 SSR 标记 CSWCT02B, 与目的基因的遗传距离是 28.7 cM。AFLP 的多态性比率要比 SSR 的多态性比率高。分析探讨了 2 种分子标记技术的优缺点及其在目的基因连锁标记筛选、基因定位等研究中的应用。

关键词: 黄瓜; 黑星病; 分子标记; AFLP; SSR

中图分类号: S436.421.1⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)03-0105-03

Polymorphism Comparison of AFLP and SSR Between Scab Resistant Cucumber Materials

SUN Xiao-hong¹, DU Sheng-li², ZHANG Gui-hua²,
WANG Bao-li¹, GUO Ai-guang¹, PEI Guo-liang¹

(1. College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China; 2. Tianjin Kernel Cucumber Research Institute, Tianjin 300192, China)

Abstract: AFLP and SSR analysis were performed among scab resistant parents, F₂ plants and their bulked extremes. Their rates of polymorphism and positive marker linked to target gene was compared. The results indicated that the rates of polymorphism of AFLP, SSR were 36.5% and 22% respectively; the positive rates were 9.6% and 0. AFLP primer pair E20M64 was found closely linked to target gene, genetic distance was 4.83 cM. SSR primer CSWCT02B was linked to target gene with genetic distance of 28.7 cM. Polymorphism and positive marker rates of AFLP was higher than that of SSR. The advantages and disadvantages, and application of two kinds of molecular marker system in selection of linkage markers to target gene and gene tagging were also discussed.

Key words: Cucumber; Scab; Molecular marker; AFLP; SSR

由黄瓜黑星病菌 (*Cladosporium cucumerinum* Ell et Arth.) 所导致的黄瓜黑星病是一种世界性病害, 对保护地黄瓜的为害十分严重。培育抗病新品种是防治黄瓜黑星病的根本途径。与常规育种相比, 分子标记辅助育种技术具有快捷、高效的优点。综合国内外文献报道, 目前尚未见与黄瓜黑星病抗性相关基因连锁的分子标记研究。

本研究以黄瓜抗黑星病亲本 Q₆ 和感黑星病亲

本 Q₁₂, 及其 F₂ 极性基团和 F₂ 子代群体为试材, 比较 AFLP 和 SSR 2 种技术在该亲本组合中的多态性比率及其与目的基因连锁的阳性标记比率, 探讨 2 种方法的优缺点。

1 材料和方法

1.1 植物材料及试剂

供试黄瓜材料为 Q₆ (抗黑星病)、Q₁₂ (感黑星

收稿日期: 2005-09-26

基金项目: 国家 863 计划项目 (2003AA207110); 天津市农业科学院院长基金项目 (04012)

作者简介: 孙小红 (1981-), 女, 陕西咸阳人, 在读硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究; 王葆利为通讯作者。

病), 及以二者为亲本杂交的 F_2 后代单株 145 个, 由天津科润黄瓜研究所提供。

AFLP 和 SSR 引物在上海生物工程公司合成, 所采用的 SSR 引物是根据已有资料上公布的黄瓜 SSR 引物序列合成而来^[1]。所用 TaqDNA 聚合酶、dNTP 等试剂均购自大连宝生物工程公司。

1.2 试验方法

1.2.1 F_2 分离群体黑星病抗性鉴定 将亲本及其 F_2 分离群体播种于温室中, 正常管理。待长至 3 片真叶时, 采用喷雾法进行黑星病苗期接种鉴定。于接种后 30 d 调查发病情况^[2]。

1.2.2 黄瓜基因组 DNA 的提取 对亲本及其群体各单株编号挂牌, 然后按株采集嫩叶, 采用优化了的 CTAB^[3] 法提取单株 DNA。

1.2.3 F_2 极性集团的构建 根据 F_2 单株的鉴定结果, 构建了极端感病集团 BS (Bulk of Extreme susceptible Plants) 和极端抗病集团 BR (Bulk of Extreme resistant Plants), 分别是 F_2 中随机选取的 10 株极端感病或 10 株极端抗病植株 DNA 构建的。

1.2.4 AFLP 分析 AFLP 分析参照 Vos^[4] 的方法进行, 选用 2 种限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Mse* I。选择性扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳上电泳分离, 银染法进行染色。

1.2.5 SSR 分析 SSR 分析参照文献[5]的方法。20 μ L 反应体系: 黄瓜基因组 DNA 50 ng, $1 \times$ PCR Buffer (含 Mg^{2+}), dNTPs 4 nmol/L, TaqE 1U, 上游引物和下游引物各 25 ng。反应程序: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 适宜温度退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 7 min。扩增产物在 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳上电泳分离, 银染法进行染色。

2 结果与分析

2.1 黄瓜黑星病的田间鉴定结果

在接种后 30 d 进行黑星病发病情况调查, 在 145 个 F_2 单株中, 30 株完全表现感病, 115 株表现为抗黑星病。卡平方检验符合 3: 1 的孟德尔分离比例, 适合度检验 $\chi^2 = 1.33$, $P < 0.05$ 。说明在本试验所用试材的遗传背景下, 黄瓜 Q₆ 对黑星病的抗性由单显性基因控制。

2.2 AFLP 分析结果

选用 285 对 *EcoRI* + 2 和 *MseI* + 3 的引物进行 AFLP 分析, 其中 276 对引物得到了清晰可读的带型, 比率为 96.84%。图 1 为 AFLP 扩增结果, 平均

每对引物扩增出可读带型 39 条。共有 104 对引物表现多态性, 扩增出的多态性带的比率为 36.5%。其中有 10 对引物分别在抗病亲本和感病亲本、极性抗病集团和极性感病集团得到了相同的多态性条带。分别为: E13/M36, E13/M61, E14/M75, E18/M51, E19/M37, E19/M58, E19/M59, E19/M63, E20/M61, E20/64, 比率为 9.71% (表 1)。其中 E20/M64 在 F_2 子代验证中与 F_2 的鉴定结果符合率高达 95%。经推算, 该标记位点与目的基因的连锁距离为 4.83 cM。该标记现已转化为 SCAR 标记, 并申请了国家发明专利(2005 1001 4669.7)。

表 1 阳性 AFLP 引物

引物 Primer	碱基组成 Base composition (5' - 3')
E13/M36	E13 GAC TGC GTA CCA ATT CAG M36 GAT GAG TCC TGA GTA AAC C
E13/M61	E13 GAC TGC GTA CCA ATT CAG M61 GAT GAG TCC TGA GTA ACT G
E14/M75	E14 GAC TGC GTA CCA ATT CAT M75 GAT GAG TCC TGA GTA AGT A
E18/M51	E18 GAC TGC GTA CCA ATT CCT M51 GAT GAG TCC TGA GTA ACC A
E19/M37	E19 GAC TGC GTA CCA ATT CGA M37 GAT GAG TCC TGA GTA AAC G
E19/M58	E19 GAC TGC GTA CCA ATT CGA M58 GAT GAG TCC TGA GTA ACGT
E19/M59	E19 GAC TGC GTA CCA ATT CGA M59 GAT GAG TCC TGA GTA ACT A
E19/M63	E19 GAC TGC GTA CCA ATT CGA M63 GAT GAG TCC TGA GTA AGA A
E20/M61	E20 GAC TGC GTA CCA ATT CGC M61 GAT GAG TCC TGA GTA ACT G
E20/M64	E20 GAC TGC GTA CCA ATT CGC M64 GAT GAG TCC TGA GTA AGA C

表 2 AFLP 和 SSR 比较

分子标记 Molecular markers	引物数 No. of primers	多态性标记数和比率 No. & rate of polymorphism	阳性标记数和比率 No. & rate of positive makers
AFLP	285	104(36.5%)	10(9.6%)
SSR	172	38(22%)	0

2.3 SSR 分析结果

用已有的 172 对多态性好的 SSR 引物对本研究的材料做多态性分析, 其中有 152 对得到了清晰可读的带型, 比率为 88.4%。图 2 为 SSR 扩增结果, 每条引物平均可扩出 2~5 条可读的带, 其中共有 38 对引物得到了多态性条带, 扩增出的多态性带的比率为 22%。但未发现在极性集团中表现多态性的

引物。用在亲本中有多态性的引物在 F_2 子代验证中,发现引物 CSWCT02B 与 F_2 的鉴定结果符合率达 72%。经推算,该标记位点与目的基因的连锁距离为 27.8 cM。

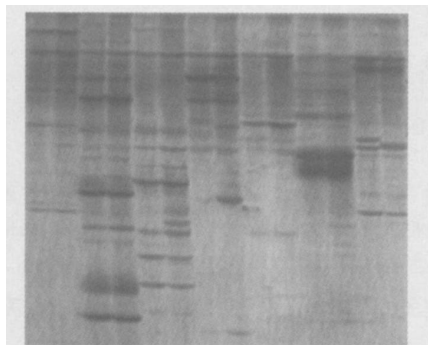


图 1 部分 AFLP 引物对亲本的扩增结果

Fig. 1 Some of AFLP makers amplific of parents

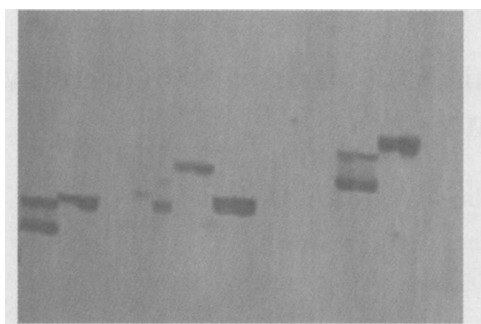


图 2 部分 SSR 引物对亲本的扩增结果

Fig. 2 Some of SSR makers amplification of parents

3 讨论

不同的分子标记技术的原理和检测手段不同^[6,7],因而所揭示的 DNA 水平上的遗传变异也不一样,稳定性和重现性也各不相同,各种标记所揭示的遗传信息量和产出效率也有很大的差异。从本试验可以看出,在检测黄瓜 DNA 多态性方面,AFLP 比 SSR 多态性比率更大。AFLP 检测基因组的区域涵盖整个基因组,其多态性类型主要是碱基突变、插入、缺失、易位和倒位;AFLP 技术在遗传特性上表现为显性或共显性,不受基因来源和复杂度的影响,没有种属特异性。SSR 检测基因组的区域是重复序列区,其多态性类型主要是重复序列的长度与次数的差异,通常表现为共显性^[8]。SSR 技术具有种族特异性,必须在知道某个物种 DNA 序列的前提下,才能设计引物进行 PCR 扩增,因而存在引物开发的问题。黄瓜遗传背景狭窄,基因组序列还不清楚,对其引物的开发就更增加了难度,在一定程度上限制了 SSR 标记的应用。所以本试验所采用的 SSR 分子标记方法在一定程度上就受到影响,没有找到紧密连

锁的标记。

Bradeen 等^[9]利用黄瓜栽培种与野生种之间的杂交后代构建了具有 188 个 AFLP 标记的黄瓜遗传图谱,Fazio 等^[10]利用黄瓜的重组近交系和 F_2 群体,构建了 1 个 131 个位点的遗传连锁图。在本试验中,我们获得了与黄瓜抗黑星病基因紧密连锁的分子标记 E20, M64,二者之间的遗传图距为 4.83 cM。下一步笔者将利用更多的引物组合和更多的 F_2 单株进行分析,希望找到更紧密连锁的分子标记,并结合已有的黄瓜遗传图谱进行遗传定位。

Abul-Hayja 等^[11]研究认为,黄瓜黑星病是由 1 对显性基因 *Ccu* 控制的,这个结果被广大研究者所认可,至今没有疑议。本研究用黄瓜抗黑星病亲本 Q₆ 和感黑星病亲本 Q₁₂ 杂交组合,分析 F_2 群体的抗感分离,证明 Q₆ 对黑星病的抗性是受 1 个显性基因控制。

参考文献:

- [1] Gennaro Fazio, Jack E Staub, Sang Min Chung. Development and Characterization of PCR Markers in Cucumber[J]. AMER Soc HORT Sci, 2002, 127(4): 545-557.
- [2] 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展[M]. 北京: 科学出版社, 1995.
- [3] 张桂华. 与黄瓜白粉病抗性相关基因紧密连锁的分子标记研究[D]. 杨陵: 西北农林科技大学, 2003.
- [4] Vos P, Hongers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [5] Zietkie Wicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simply sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20: 176-183.
- [6] 王 斌. AFLP 的原理及其在植物分子生物学研究中的应用[A]. 林忠平. 走向 21 世纪的植物分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [7] 唐荣华, 张君诚. SSR 分子标记的开发技术研究进展[J]. 西南农业学报, 2002, 15(4): 106-109.
- [8] Wu K S, Jones R, Danneberger L, et al. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning[J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22: 3257-3258.
- [9] Bradeen J M, Staub J E, Wye C, et al. Towards an expanded and integrated linkage map of cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Genome, 2001, 44: 111-119.
- [10] Fazio G, Staub J E, Stevens M R. Genetic mapping and QTL analysis of horticultural traits in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using recombinant inbred lines[J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 864-874.
- [11] Abul-Hayja Z, Williams P H. Inheritance of two seedling markers in cucumber[J]. HortScience, 1976, 11: 145.