

# 与黄瓜抗黑斑病基因连锁的 SCAR 标记 及抗病资源筛选

王惠哲, 李淑菊, 杨瑞环, 管 炜, 邓 强, 曹明明

(天津科润黄瓜研究所, 天津 300192)

**摘要:** 为建立黄瓜抗黑斑病分子标记辅助育种体系, 以黄瓜感黑斑病母本 L 63 和抗黑斑病父本 L 9 及其  $F_1$ 、 $F_2$  分离群体为试材, 将与黑斑病抗性相关基因连锁的一个共显性 AFLP 标记 E-CC/M-CAT 进行了测序, 根据序列特点设计了特异的 SCAR 引物 SCEM126/122, 成功地转换成了简单实用的共显性 SCAR 标记, 经验证该标记与黄瓜抗黑斑病相关基因连锁遗传距离为 4.4 cM, 可以作为黄瓜抗黑斑病辅助选择的标记。且该标记具有迅速、简便、成本低、不受环境条件限制的优点, 扩增条带清晰, 无杂带和拖尾现象, 适用于大量样本分析。利用引物 SCEM126/122 对 290 份材料进行抗病性检测, 结果表明有 64 份抗病材料, 为进行抗黑斑病黄瓜新品种的选育奠定了基础。

**关键词:** 黄瓜; 黑斑病; SCAR; 资源

**中图分类号:** S642.2    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1000-7091(2014)01-0208-05

## SCAR Marker Resistance-related to Cucumber Alternaria Leaf Spot and Resistance Identification of Cucumber Germplasm

WANG Hui-zhe, LI Shu-ju, YANG Rui-huan, GUAN Wei, DENG Qiang, CAO Ming-ming

(Tianjin Kernel Cucumber Research Institute, Tianjin 300192, China)

**Abstract:** In order to establish molecular marker-assisted selection system of cucumber alternaria leaf spot with  $F_1$ ,  $F_2$  and  $BC_1$  population between a susceptible parent (L 63) and a resistant parent (L 9), a co-dominant AFLP marker was successfully converted into a simple, applied and co-dominant SCAR marker. Special marker SCEM 126/122 were designed according to the sequence information of AFLP (E-CC/M-CAT) 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 4.4 cM. The marker could be useful in marker-assisted selection in cucumber breeding. The acquired SCAR marker had many advantages including fast, accurate, low cost, free from an environmental influence et. 64 resistant germplasm were obtained from total 290. Application of the acquired marker will enhance cucumber alternaria leaf spot disease resistant germplasm evaluation.

**Key words:** Cucumber; Alternaria leaf spot; SCAR; Germplasm

黄瓜黑斑病 (*Alternaria cucumerina*) 是近几年发展起来的一种由瓜链格孢菌引起、为害严重的真菌性病害, 目前已成为危害保护地、露地黄瓜栽培的重要病害<sup>[1-3]</sup>。黄瓜黑斑病菌可在 PDA 培养基上人工培养产孢, 因此, 可采用苗期人工接种抗病性鉴定技术对黄瓜材料进行筛选。但该菌致病力相对较弱, 发病条件较为严格, 需要在光照培养箱或人工气候室内进行, 大量材料的抗性鉴定会受到一定程度的限制, 并且存在鉴定准确性差、周期长的弊病。分子标记辅助选择 (Molecular marker-assisted selec-

tion, MAS) 技术目前已成为育种研究的热点和重要手段, 将分子遗传技术应用于蔬菜抗病遗传育种的研究上, 为材料的选择提供了全新的手段<sup>[4-13]</sup>, 可在早代对表现优良的基因型进行鉴定, 苗期即可在 DNA 水平上对目标性状进行选择, 抗病性鉴定可在室内完成, 鉴定周期缩短到 2 d, 而且稳定可靠, 不受季节、环境条件等因素的影响, 可提高选择速度, 增强选择的准确性和可靠性, 加快育种进程, 因此具有广阔的应用前景。

笔者研究获得了一个与黄瓜抗黑斑病基因紧密

收稿日期: 2013-10-16

基金项目: 天津市自然科学基金项目 (11JCYBJC09000)

作者简介: 王惠哲 (1978-), 女, 河北定州人, 副研究员, 硕士, 主要从事黄瓜病害及抗病育种研究。

连锁的 AFLP 标记,经过对扩增产物进行测序,又得到了与黄瓜抗、感黑斑病基因紧密连锁的基因片段的全序列,并成功转换成 SCAR 标记 SCEM126/122。本研究的目的在于利用该标记对黄瓜育种资源进行抗病性检测,以期获得一批抗病黄瓜资源并应用于抗病品种选育,加快抗病育种进程。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试材料为感黑斑病母本 L 63,抗黑斑病父本 L 9,及其  $F_1$ 、 $F_2$  和  $BC_1$  群体共 290 份黄瓜资源,均由天津科润黄瓜研究所育种一室提供。黄瓜黑斑病菌 086 为田间自然发病叶分离、鉴定并保存。*Taq* DNA 聚合酶、dNTP 等试剂均购自大连宝生物公司。引物在上海生工生物工程公司合成。

### 1.2 试验方法

抗病性鉴定方法及抗性评价指标参照文献[14-15]。

黄瓜基因组 DNA 提取采用 CTAB 小量提取法<sup>[7-11,16]</sup>,略有改动,0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度,然后将纯化后的 DNA 稀释到 25 ng/ $\mu$ L 备用。

SCAR-PCR 扩增体系 (20  $\mu$ L) 包括:基因组 DNA (25 ng/ $\mu$ L) 1.0  $\mu$ L, 100 ng/ $\mu$ L 上下游引物各 0.3  $\mu$ L, *Taq*E (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  (25 mmol/L)

1.2  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 0.4  $\mu$ L, 10  $\times$  PCR Buffer 2.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu$ L。扩增程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 48 ~ 55  $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72  $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 35 个循环;最后再 72  $^{\circ}$ C 延伸 7 min。扩增产物采用 5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。

## 2 结果与分析

### 2.1 与黄瓜抗黑斑病基因紧密连锁的 SCAR 标记及特异片段

SCAR 标记 SCEM126/122 为 AFLP 标记 E16M50 转化而来,测序结果表明,抗病带大小为 122 bp,感病带为 126 bp,差异在于 4 个碱基 (TT-TA) 的插入和缺失。经  $F_2$  群体验证,其遗传连锁距离为 4.4 cM,抗病单株只具有 122 bp 的抗病带,感病单株只具有 126 bp 的感病带,中间类型单株同时具有抗病带和感病带,表明该标记仍为一共显性标记。在 76 个已知感病材料中有 4 个产生了相同的抗病带型,符合率达到 93.42%,可以用于黄瓜抗黑斑病的分子标记辅助育种。引物 E16M50 (E-CC/M-CAT) 的序列为: E16: 5'-GACTGCGTACCAATTCCC-3', M50: 5'-GATGAGTCCTGAGTAACAT-3'。与黄瓜抗、感黑斑病基因紧密连锁的特异片段见图 1, 2, 引物 SCEM122/126 序列如图 1 阴影部分 (已申请国家发明专利)。

```

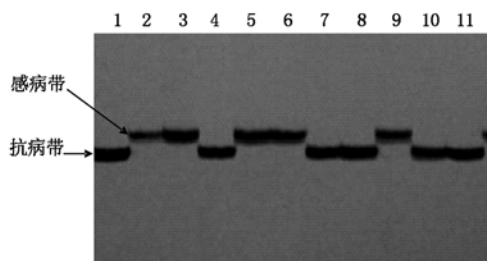
S 5' -CCCATCGTAA GAAGCAAGTA GTTTAGTTGAAAATTTTCGG TTTAGTTTAG -3'
R 5' -CCCATCGTAA GAAGCAAGTA GTTTAGTTGAAAATTTTCGG TTTAGTTTAG -3'
S 5' -TTTATTTGTC TACCGTTTTG AATCAAATTA TGACCACCCC TACACGTTAT -3'
R 5' -...TTTGTG TACCGTTTTG AATCAAATTA TGACCACCCC TACACGTTAT -3'
S 5' -AAAACATTTA GCCGAAACAC GACTAA-3' 126 bp
R 5' -AAAACATTTA GCCGAAACAC GACTAA-3' 122 bp
  
```

阴影部分为 SCAR 引物 SCEM126/122 区域。

Locations of SCAR primer SCEM126/122 are in the shadow.

图 1 与黄瓜抗黑斑病基因连锁的 SCAR 标记片段的碱基全序列

Fig. 1 Base sequence of the SCAR marker fragment of alternaria leaf spot-resistant gene



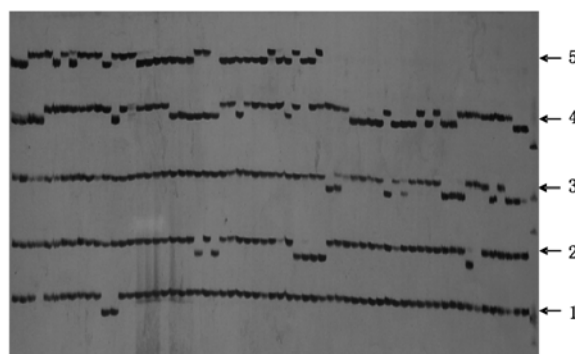
1, 4, 7, 8, 10, 11. 抗病单株; 2, 3, 5, 6, 9. 感病单株。  
1, 4, 7, 8, 10, 11. Resistant plants; 2, 3, 5, 6, 9. Susceptible plants.

图 2 获得的 SCAR 标记 SCEM126/122

Fig. 2 SCAR marker SCEM126/122

### 2.2 SCAR 标记用于黄瓜育种材料的抗性检测

利用引物 SCEM126/122 对 290 份黄瓜种质资源进行了黑斑病的抗性检测,结果见图 3、表 1。可



1, 2, 3, 4, 5. 代表共点样 5 批次。

1, 2, 3, 4, 5. Stand for 5 batches.

图 3 SCAR 标记 SCEM126/122 对育种材料的抗性检测

Fig. 3 SCAR amplification by primer SCEM126/122

以看出,有 64 份抗病资源占检测总数的 22.07%,3 份杂合型资源,说明我们现有的黄瓜种质资源中有丰富的抗黑斑病资源,为进行抗黑斑病黄瓜新品种的选育奠定了基础。

### 2.3 SCAR 标记检测与人工接种抗性鉴定结果比较

通过 32 份自交系材料的人工接种鉴定,其中高抗材料有 9 份,抗病材料 2 份,感病材料 6 份,高感

材料 15 份(表 2)。与 SCAR 标记 SCEM126/122 的检测结果相比较,其中人工接种鉴定为感病的材料 P9、W3 标记检测为抗病,由此计算二者的符合率为 93.75%。

另外,通过对 76 份田间表现为感黑斑病的材料进行标记检测,有 5 个产生了与抗病相同的带型,符合率达 93.42%。

表 1 290 份用于抗性检测的黄瓜材料

Tab.1 Cucumber germplasm used in identification of SCAR marker

材料 Germplasm	抗性 Resistance	材料 Germplasm	抗性 Resistance	材料 Germplasm	抗性 Resistance	材料 Germplasm	抗性 Resistance	材料 Germplasm	抗性 Resistance	材料 Germplasm	抗性 Resistance
L1	S	L50	S	P9	R	P58	S	W19	S	W68	S
L2	S	L51	S	P10	R	P59	S	W20	S	W69	S
L3	S	L52	S	P11	R	P60	S	W21	S	W70	S
L4	S	L53	S	P12	S	P61	S	W22	S	W71	S
L5	S	L54	S	P13	S	P62	S	W23	S	W72	S
L6	S	L55	S	P14	S	P63	S	W24	R	W73	R
L7	S	L56	S	P15	S	P64	S	W25	S	W74	R
L8	S	L57	S	P16	S	P65	S	W26	S	W75	R
L9	S	L58	S	P17	S	P66	S	W27	S	W76	R
L10	S	L59	S	P18	S	P67	S	W28	S	W77	S
L11	S	L60	S	P19	S	P68	S	W29	S	W78	S
L12	R	L61	S	P20	S	P69	S	W30	S	W79	S
L13	R	L62	S	P21	S	P70	S	W31	R	W80	R
L14	S	L63	S	P22	S	P71	S	W32	R	W81	S
L15	S	L64	S	P23	S	P72	S	W33	R	W82	M
L16	S	L65	S	P24	S	P73	S	W34	R	W83	S
L17	S	L66	S	P25	S	P74	S	W35	R	W84	S
L18	S	L67	S	P26	S	P75	R	W36	R	W85	S
L19	S	L68	S	P27	S	P76	M	W37	S	W86	R
L20	S	L69	S	P28	S	P77	S	W38	S	W87	S
L21	S	L70	S	P29	R	P78	S	W39	R	W88	S
L22	S	L71	S	P30	S	P79	S	W40	S	W89	S
L23	S	L72	S	P31	S	P80	S	W41	S	W90	R
L24	S	L73	S	P32	S	P81	S	W42	S	W91	R
L25	S	L74	S	P33	S	P82	R	W43	S	W92	R
L26	S	L75	S	P34	S	P83	S	W44	S	W93	R
L27	S	L76	S	P35	S	P84	M	W45	R	W94	R
L28	S	L77	S	P36	S	P85	S	W46	S	W95	R
L29	S	L78	S	P37	S	P86	S	W47	S	W96	R
L30	S	L79	S	P38	S	P87	S	W48	S	W97	S
L31	S	L80	S	P39	S	P88	S	W49	S	W98	S
L32	S	L81	S	P40	S	W1	R	W50	S	W99	S
L33	S	L82	S	P41	S	W2	R	W51	S	W100	R
L34	S	L83	S	P42	S	W3	R	W52	S	W101	R
L35	S	L84	S	P43	S	W4	S	W53	R	W102	R
L36	S	L85	S	P44	S	W5	S	W54	R	W103	R
L37	S	L86	R	P45	S	W6	S	W55	R	W104	R
L38	S	L87	S	P46	S	W7	R	W56	R	W105	R
L39	S	L88	R	P47	S	W8	S	W57	S	W106	S
L40	S	L89	S	P48	S	W9	R	W58	R	W107	R
L41	S	L90	S	P49	S	W10	R	W59	R	W108	R
L42	S	P1	S	P50	S	W11	R	W60	R	W109	S
L43	S	P2	S	P51	S	W12	R	W61	S	W110	R
L44	S	P3	S	P52	S	W13	R	W62	R	W111	R
L45	S	P4	S	P53	S	W14	R	W63	S	095-1	S
L46	S	P5	S	P54	S	W15	R	W64	R		
L47	S	P6	S	P55	S	W16	S	W65	R		
L48	S	P7	S	P56	S	W17	S	W66	S		
L49	S	P8	R	P57	S	W18	S	W67	S		

表 2 36 份材料人工接种和标记抗病性鉴定

Tab.2 Identification results of seedling inoculation and SCAR marker

材料 Germplasm	人工接种鉴定 Seedling inoculation		标记检测 Scar	材料 Germplasm	人工接种鉴定 Seedling inoculation		标记检测 Scar
	病情指数 Disease index	抗病性 Resistance	抗病性 Resistance		病情指数 Disease index	抗病性 Resistance	抗病性 Resistance
L5	80	HS	S	P82	10	HR	R
L10	80	HS	S	P87	100	HS	S
L12	5	HR	R	W3	60	S	R
L23	90	HS	S	W11	0	HR	R
L29	80	HS	S	W15	0	HR	R
L71	78	HS	S	W58	30	R	R
L84	90	HS	S	W61	70	S	S
L86	0	HR	R	W65	6.67	HR	R
P5	100	HS	S	W75	10	HR	R
P9	65	S	R	W79	60	S	S
P10	15	HR	R	W84	80	HS	S
P18	93	HS	S	W88	80	HS	S
P29	16.33	R	R	W91	6.33	HR	R
P63	100	HS	S	W97	60	S	S
P69	100	HS	S	W98	78	HS	S
P77	100	HS	S	W106	60	S	S

3 结论与讨论

本研究首次将获得的 2 个与黄瓜抗、感黑斑病基因连锁的片段序列予以公开,2 个标记片段的差异在于 4 个碱基的插入或缺失,同源性较高。SCAR 标记 SCEM126/122 仍为共显性标记,琼脂糖凝胶电泳检测要求多态性片段差别在 20 bp 以上,因此扩增产物需借助于变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。虽然在操作上不如琼脂糖凝胶电泳简便,但如果一块变性聚丙烯酰胺凝胶能点样 5 批甚至更多批次(图 3 点样 5 批),则能同时检测几百个样品,检测效率要比琼脂糖凝胶电泳大大提高,并且电泳条带清晰好辨,可起到事半功倍的效果,同时又避免了琼脂糖凝胶中 EB 对人体的伤害。通过对 SCAR-PCR 扩增体系、退火温度等条件进行优化,建立了高效的黄瓜黑斑病抗性检测技术体系,由图 2、3 可知,该体系扩增条带清晰,无杂带和拖尾现象,适合大量样本的检测。

利用 AFLP、SSR、SCAR 等常规分子标记方法只能进行分子标记与抗病性的简单连锁分析、QTL 初步定位等,并且获得的标记大多连锁遗传距离较远,因此准确性就较差,在应用上受到一定程度的限制。可利用近期发展起来的简化基因组深度测序技术对黄瓜进行全基因组水平的 SNP 标记高密度扫描,对黄瓜抗黑斑病基因进行精细定位,将候选基因精细定位于 <1 cM 的基因组区域内,获得的标记可直接

应用于育种材料及品种的抗性检测,应用于中间材料及抗性基因的转育过程。

笔者对 290 份黄瓜种质资源利用获得的共显性 SCAR 标记 SCEM126/122 进行了黑斑病抗性评价,有 64 份高度抗病资源,由于该标记与黄瓜黑斑病抗性基因连锁遗传距离较远(4.4 cM),仍需对这些资源进行人工接种鉴定以验证其真实性。抗黑斑病种质资源的获得为黄瓜黑斑病抗性改良、实现骨干亲本抗性遗传改良提供了重要的前提条件。总之,将分子标记和人工接种抗性鉴定相结合应用于育种材料的选育,将使育种周期大大缩短,育种效率极大提高,加速黄瓜抗病育种的进程。

参考文献:

[1] 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海:上海科学技术出版社,1979.

[2] 梁金兰. 黄瓜黑斑病的发生与防治[J]. 河南农业科学,1992(1):30-31.

[3] Yacoub Batta. *Alternaria* leaf spot disease on cucumber: Susceptibility and control using leaf disk assay[J]. An-Najah Univ J Res. (N Sc), 2003, 17(2):269-279.

[4] Witkowicz J, Urbanczyk-Wochniak E, Przybecki Z. AFLP marker polymorphism in cucumber (*Cucumis sativus* L.) near isogenic lines differing in sex expression[J]. Cell Mol Biol Lett, 2003, 8(2):375-381.

[5] 张海英. 黄瓜重要抗病基因的分子标记研究及遗传图谱的构建[D]. 北京:中国农业科学院,2006.

- [6] 王惠哲,李淑菊,刘秀峰,等. 与黄瓜抗炭疽病相关基因连锁的 AFLP 标记的筛选[J]. 园艺学报,2007,34(1):213-216.
- [7] 王惠哲,李淑菊,管 炜,等. 与黄瓜抗黑星病相关基因紧密连锁的 SSR 标记[J]. 分子植物育种,2009,7(3):550-554.
- [8] 张海英,王振国,毛爱军,等. 与黄瓜白粉病抗病基因紧密连锁的 SSR 分子标记[J]. 华北农学报,2008,23(6):77-80.
- [9] 李亚丽. 与黄瓜果皮绿色性状相关的 SRAP 分子标记[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2008.
- [10] 任 毅. 黄瓜高密度 SSR 遗传图谱构建及其应用[D]. 北京:中国农业科学院,2009.
- [11] 康厚祥. 黄瓜抗黑星病基因 *Ccu* 的精细定位与图位克隆及黄瓜与黑星菌互作的表达谱分析[D]. 北京:中国农业科学院,2011.
- [12] 王惠哲,李淑菊,管 炜. 与黄瓜抗炭疽病相关基因连锁的基因片段及 SCAR 标记[J]. 华北农学报,2011,26(1):200-203.
- [13] 宋 建,金凤媚,薛 俊,等. 分子标记在植物雄性不育研究中的应用进展[J]. 天津农业科学,2013,19(10):19-21.
- [14] 李淑菊,王惠哲,杨瑞环,等. 黄瓜黑斑病苗期抗病性鉴定方法及品种抗病性评价[J]. 中国蔬菜,2012(2):72-74.
- [15] 王惠哲,李淑菊,杨瑞环,等. 黄瓜抗黑斑病相关 AFLP 标记筛选及 SCAR 转化[J]. 分子植物育种,2011,11(9):1626-1631.
- [16] 赵 新,贺长征,兰青阔,等. 应用正交设计对大白菜纯度鉴定中 EST-SSR 反应体系的优化[J]. 天津农业科学,2013,19(3):1-4.