

西瓜抗枯萎病种质资源的分子标记筛选研究

王吉明, 李楠楠, 尚建立, 李娜, 徐永阳, 马双武* (中国农业科学院郑州果树研究所, 河南郑州 450009)

摘要 [目的]探索利用分子标记技术筛选西瓜抗枯萎病种质资源的方法。[方法]以国家西瓜甜瓜中期库中挑选的130份不同类型西瓜种质为研究材料,利用Caps标记“fon_7716”对这些西瓜种质资源进行抗枯萎病基因型分析。[结果]在130份种质资源中,有45份种质资源表现为抗病基因型(+),80份种质资源为感病基因型(-),5份种质资源为抗/感病杂合基因型(+/-),抗性种质偏多,如在34份我国地方西瓜品种中,有21个品种表现为抗病基因型。[结论]为西瓜抗枯萎病抗原筛选和分子辅助育种提供参考。

关键词 西瓜;种质资源;分子标记

中图分类号 S602.4 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2015)32-200-03

Screening on Molecular Markers Lingked with *Fusarium Wilt* Resistance in Watermelon (*Citrullus lanatus* L.) Germplasm

WANG Ji-ming, LI Nan-nan, SHANG Jian-li, MA Shuang-wu* et al (Zhengzhou Fruit Research Institute, CAAS, Zhengzhou, Henan 450009)

Abstract [Objective] In order to develop the method of using molecular markers to screen the *Fusarium wilt* resistant watermelon germplasm. [Method] Caps “fon_7716” was used for screening *Fusarium wilt* resistant genotypes in 130 accessions watermelon germplasm which was from the National Mid-term Germplasm Bank for Watermelon&Melon. [Result] The results showed that 45 accessions watermelon germplasm were resistant genotypes(+), 80 accessions watermelon germplasm were susceptible genotypes(-), and 5 accessions watermelon germplasm were heterozygous genotype of resistance and susceptible(+/-) and the proportion of resistant germplasm was significantly higher, e.g., in the 34 accessions local watermelon varieties, there were 21 accessions local watermelon varieties identified as resistant genotypes. [Conclusion] The study provided the reference for watermelon *Fusarium wilt* disease resistance source screening and molecular assisted breeding.

Key words Watermelon; Germplasm; Molecular marker

西瓜枯萎病是由半知菌亚门镰孢属尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveurn*)寄生引起的一种世界性真菌土传病害,严重制约西瓜的生产^[1-4]。目前西瓜抗枯萎病育种主要采用人工接种鉴定技术进行抗性选择,易受环境和接种技术的影响,存在鉴定时间长、准确性差、鉴定效率低等缺点,分子标记技术鉴定具有不易受环境影响,鉴定时间短,准确性高,鉴定效率高等优点,可作为分子辅助选择的重要工具,随着分子生物学的发展,研究者已对西瓜枯萎病菌1号生理小种的抗病基因(Fon-1)进行定位^[5-8]。笔者采用张屹等^[8]发表的西瓜枯萎病生理小种1抗性基因紧密连锁Caps标记“fon_7716”对130份不同类型西瓜种质进行抗性基因分子检测分析,以期对西瓜抗枯萎病抗原筛选和分子辅助育种提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 供试材料为国家西瓜甜瓜中期库(河南,郑州)提供的西瓜种质资源,包括地方品种、育成品种(系)和野生种质,共计130份(表1),具有较为广泛的代表性。

1.2 试验方 法

1.2.1 DNA 提取。于西瓜果实膨大期取蔓上幼嫩真叶用于基因组DNA的提取,采取CTAB法提取基因组DNA^[9]。

1.2.2 PCR 反应体系。扩增反应体系25 μl,包括12.5 μl 2 × Taq Master Mix, 2 μl 模板DNA, 10 μmol/μl 上、下游混合引物2 μl, ddH₂O 8.5 μl。扩增反应程序:94 °C 预变性5 min; 94 °C 20 s, 55 °C 20 s, 72 °C 30 s, 34个循环; 72 °C 延伸5

min; 4 °C 保存。2 × Taq Master Mix 购自北京百泰客生物技术有限公司。引物7716_fon为张屹等^[8]已发表的西瓜抗枯萎病基因分子标记,由铂尚生物技术(上海)有限公司合成。7716_fon引物序列为:5'-TTAAAAATCATCTCTCTTTTAAACTATT-3', 5'-ATATATTTGGTCTCCGACTGTTCAA-3'。

1.2.3 CAPS 反应与分析。PCR产物采用Taq I进行酶切,酶切识别位点为T'CGA,酶切体系为15 μl,含有1.5 μl 10 × Buffer; 1.0 μl 限制内切酶Taq I; 5 μl PCR产物, 7.5 μl H₂O。酶切程序:65 °C 酶切16 h, 80 °C 变性20 min, 4 °C 保存。限制性内切酶购自Fermentas公司。

扩增/酶切产物采用8.0%聚丙烯酰胺电泳,280 V 恒定电压下电泳50 min,银染显色后拍照分析;PCR产物酶切后电泳出单条带170 bp判定为抗病基因型,出现单条带104 bp为感病基因型,同时出现170和104 bp 2条带为抗/感病杂合基因型。

2 结果与分析

2.1 PCR 及 Caps 酶切结果 130份西瓜种质资源的总DNA提取后均扩增出170 bp条带,但条带较浅;采用Taq I酶切后部分种质的PCR产物出现104 bp条带和一条70 bp左右的条带,将170 bp和104 bp条带判定为抗病和感病基因型(图1)。

2.2 种质资源基因型鉴定 在130份种质资源中,45份种质资源表型为抗病基因型(+),80份种质资源为感病基因型(-),5份种质资源为抗/感病杂合基因型(+/-)(表1)。

2.2.1 地方品种基因型鉴定。在34份地方品种类型种质资源中,21份种质鉴定为抗病基因型,占供试地方品种总数的61.8%。抗病基因型种质包括著名的地方品种三白瓜、抚州瓜、马铃薯瓜、喇嘛瓜、陕西白、黑崩筋等食用西瓜,以及郑州籽瓜、大板红籽瓜、皋兰籽瓜、宁夏红籽瓜、大安子瓜等籽瓜。

基金项目 中国农业科学院科技创新工程(CAAS-ASTIP-2015-ZFR1-06)。

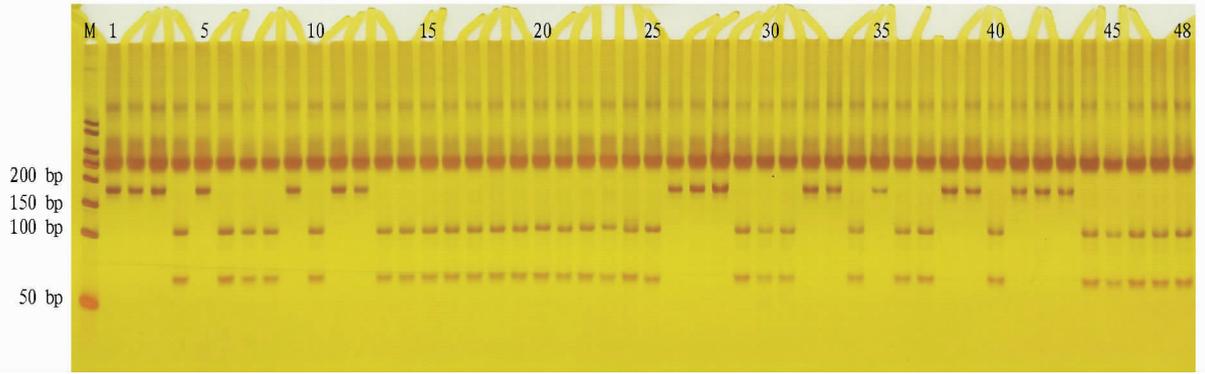
作者简介 王吉明(1974-),男,河南信阳人,副研究员,从事西瓜甜瓜种质资源研究。*通讯作者,研究员,从事西瓜甜瓜种质资源研究。

收稿日期 2015-09-30

2.2.2 野生种质资源基因型鉴定。选用 13 份野生种质进行了抗性基因型鉴定,结果鉴定出 3 份抗病基因型种质,分别为 PI 494530、PI 494528、PI 595203,占供试野生种质总数的 23.1%,其余均为感病基因型种质。

2.2.3 育成品种基因型鉴定。在 82 份育成品种(系)类型种质资源中,鉴定出 21 份抗病基因型种质,主要为久比例、SmokyLee、SugarLee 等国外育成品种,以及红 1 号、中育 10 号、

中育 1 号和 96B41 等国内育成品种(系),占供试育成品种(系)种质总数的 25.6%;另鉴定出 5 份杂合基因型种质,分别为 Jan-06、All Sweet、Dixielee、开杂 5 号-1、AB 系;其余为感病基因型种质,主要为查理斯顿、Black Stone、Calhoun Gray、Black diamond、Crimson Sweet 等国外育成品种和中育 9 号、兴城红、火洲 1 号、无权早、苏蜜 1 号、中汴一号等国内育成品种。



注: M. Marker; 1~10. 三白瓜、抚州瓜、马铃瓜、Moon and Star、久比例、T1f、克伦生、石红 1 号、三义、石红 2 号; 11~20. 匈牙利一号、中育 10 号、桂引 6 号、SBD 黑、长蜜宝、菜西瓜、PI 296341、吉庆野西瓜、PI 482246、PI 632751; 21~30. PI 482322、Grif16135、PI 374216、PI 386014、PI 537277、PI 494530、PI 494528、PI 595203、阿克柯孜外、阿拉克孜外; 31~40. 恰儿塔吾孜、喇嘛瓜、黑油皮、梨皮、宁县西瓜、卡拉塔吾孜、核桃纹、黑皮、宿县小籽、兰州黑皮; 41~48. 尉氏西瓜、青抱筋、陕西白、早密矮、偃师一号、金瓜、苏联 2 号、美丽托夫斯基。

图 1 Caps 标记“fon_7716”筛选的部分西瓜种质

表 1 西瓜种质资源抗枯萎病生理小种 1 基因型鉴定

种质名称	种质类型	基因型	种质名称	种质类型	基因型	种质名称	种质类型	基因型
三白瓜	地方品种	+	PI 482322	野生种质	-	Calhoun Gray	育成品种(系)	-
抚州瓜	地方品种	+	PI 494528	野生种质	+	Crimson Sweet	育成品种(系)	-
马铃瓜	地方品种	+	PI 595203	野生种质	+	Dixielee	育成品种(系)	+/-
阿克柯孜外	地方品种	-	PI 537277	野生种质	-	Tohona Oóðhamn	育成品种(系)	+
阿拉克孜外	地方品种	-	Moon and Star	育成品种(系)	-	火洲 1 号	育成品种(系)	-
恰儿塔吾孜	地方品种	-	久比例	育成品种(系)	+	无权早	育成品种(系)	-
喇嘛瓜	地方品种	+	T1f	育成品种(系)	-	早花	育成品种(系)	+
黑油皮	地方品种	+	克伦生	育成品种(系)	-	汴梁 1 号	育成品种(系)	+
梨皮	地方品种	-	石红 1 号	育成品种(系)	-	中育 1 号	育成品种(系)	+
宁县西瓜	地方品种	+	三义	育成品种(系)	+	苏蜜 1 号	育成品种(系)	-
卡拉塔吾孜	地方品种	-	石红 2 号	育成品种(系)	-	中汴一号	育成品种(系)	-
核桃纹	地方品种	-	匈牙利一号	育成品种(系)	+	开杂 5 号-1	育成品种(系)	+/-
黑皮	地方品种	+	中育 10 号	育成品种(系)	+	华东 26 号	育成品种(系)	-
宿县小籽	地方品种	+	桂引 6 号	育成品种(系)	-	小籽一号	育成品种(系)	-
兰州黑皮	地方品种	-	SBD 黑	育成品种(系)	-	金露	育成品种(系)	-
尉氏西瓜	地方品种	+	长蜜宝	育成品种(系)	-	香久山	育成品种(系)	-
青抱筋	地方品种	+	Sugar Baby	育成品种(系)	-	小西瓜-4	育成品种(系)	+
陕西白	地方品种	+	早密矮	育成品种(系)	-	无权西瓜	育成品种(系)	-
郑州籽瓜	地方品种	+	偃师一号	育成品种(系)	-	黄皮小西瓜	育成品种(系)	-
道县红籽瓜	地方品种	-	金瓜	育成品种(系)	-	朱小黑小子	育成品种(系)	-
白瓜籽	地方品种	-	苏联 2 号	育成品种(系)	-	长灰	育成品种(系)	-
大板红籽瓜	地方品种	+	美丽托夫斯基	育成品种(系)	-	AB 系	育成品种(系)	+/-
皋兰籽瓜	地方品种	+	斯拉夫拍卡	育成品种(系)	-	琼露	育成品种(系)	-
北瓜	地方品种	-	美丽	育成品种(系)	+	小西瓜-2	育成品种(系)	-
红瓜子	地方品种	+	PI 502316	育成品种(系)	-	洛菲林	育成品种(系)	-
宁夏红籽瓜	地方品种	+	中石红	育成品种(系)	-	都 3 号	育成品种(系)	-

接下表

续表 1

种质名称	种质类型	基因型	种质名称	种质类型	基因型	种质名称	种质类型	基因型
平湖马铃	地方品种	+	中育9号	育成品种(系)	-	法国西瓜	育成品种(系)	-
广州花皮	地方品种	-	郑州1号	育成品种(系)	+	红1号	育成品种(系)	+
黑崩筋	地方品种	+	板叶2号	育成品种(系)	-	都1号	育成品种(系)	-
信白91-2	地方品种	+	中育3号	育成品种(系)	+	旭大和	育成品种(系)	-
金包银	地方品种	-	5506-1	育成品种(系)	+/-	美国短蔓	育成品种(系)	-
大安子瓜	地方品种	+	2000B57板	育成品种(系)	+	连小-5	育成品种(系)	-
平湖西瓜	地方品种	+	148	育成品种(系)	+	三伞	育成品种(系)	-
予枚小籽	地方品种	-	郑州2号	育成品种(系)	+	Market midget	育成品种(系)	+
菜西瓜	野生种质	-	兴城红	育成品种(系)	-	黄金	育成品种(系)	-
PI 296341	野生种质	-	板叶1号	育成品种(系)	-	乙女	育成品种(系)	-
吉庆野西瓜	野生种质	-	墨西哥黑皮	育成品种(系)	+	香小瓜	育成品种(系)	-
PI 482246	野生种质	-	查理斯顿	育成品种(系)	-	黄小玉	育成品种(系)	-
PI 632751	野生种质	-	Black Stone	育成品种(系)	-	Tomato seed	育成品种(系)	-
Grif16135	野生种质	-	All Sweet	育成品种(系)	+/-	新大和	育成品种(系)	-
PI374216	野生种质	-	Black diamond	育成品种(系)	-	短蔓	育成品种(系)	-
PI386014	野生种质	-	Mpamophbiu	育成品种(系)	-	96B41	育成品种(系)	+
PI 494530	野生种质	+	Smokylee	育成品种(系)	+	Sugarlee	育成品种(系)	+

3 讨论

该研究采用 Caps 标记“Fon_7716”对我国部分西瓜种质资源包括地方品种、野生种质、育成品种(系)3种不同类型的种质资源进行了抗枯萎病生理小种1的基因型鉴定,结果表明抗性基因型种质比例偏高,如我国地方西瓜品种通常认为不抗枯萎病,但在34份我国地方西瓜品种中,有21个品种表现为抗病基因型,抗性种质比例高达61.8%,表明抗性基因型和表型抗性性状之间出现一定的偏差,推测不同类型的种质资源之间存在较大的抗性背景遗传差异,有待进一步研究;此外一些公认的抗性种质如PI296341是目前认为兼抗枯萎病生理小种0、1、2的材料,而Calhoun Gray则是开发“Fon_7716”标记的抗性亲本材料,这些种质在该研究中均表现为感病基因型,出现这种情况可能与采用的试验材料与之前报道用的材料来源不同,或在繁殖更新过程中抗性基因丢失有关。在育成品种(系)中,Sugarlee、Smokylee、红1号等是抗枯萎病育种中较为常用的抗性材料,该研究鉴定为抗病基因型,与表型抗性性状相符。

不同西瓜种质资源材料其抗病基因可能各不相同,抗性遗传和表型规律也相差很大,枯萎病抗性遗传可能受多个基因协同控制^[10-18],采用单一分子标记难以全面从整个种质资源角度筛选和鉴定抗性种质,因此十分有必要继续从分子水平开展枯萎病的抗性遗传和抗性机理研究,并开发更多紧密连锁的分子标记。

参考文献

- [1] 徐润芳,杨鼎新.我国西瓜抗枯萎病育种的进展与前景[J].中国西瓜甜瓜,1992(1):2-5.
- [2] 周凤珍,康国斌.西瓜部分抗枯萎病材料的抗性遗传研究[J].中国西

瓜甜瓜,1996(2):17-18.

- [3] ZHANG Z G,ZHANG J Y,WANG Y C, et al. Molecular detection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* and *Mycosphaerella melonis* in infected plant tissues and soil[J]. FEMS microbiol lett, 2005, 249(1): 39-47.
- [4] 徐瑞富,刘钦林,刘起丽,等.西瓜枯萎病菌的生物学特性研究[J].河南科技学院学报(自然科学版),2013(2):36-40.
- [5] XU Y, OU Y X, ZHANG H Y, et al. Identification of a RAPD marker linked to *Fusarium* wilt resistant gene in wild watermelon germplasm (*Citrullus lanatus* var. *citroides*)[J]. Acta botanica sinica, 1999, 41(9): 952-955.
- [6] 许勇,张海英,康国斌,等.西瓜抗枯萎病育种分子标记辅助选择的研究[J].遗传学报,2000,27(2):151-157.
- [7] LEIGH K,FENNY D. Draft of RAPD map of watermelon [J]. American society for horticultural science, 2001, 126(3):344-350.
- [8] 张屹,张海英,郭绍贵,等.西瓜枯萎病菌生理小种1抗性基因连锁标记开发[J].中国农业科学,2013,46(10):2085-2093.
- [9] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic acids research, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [10] GRALL J M. History and present status of watermelon improvement by breeding[J]. Soil Sci, 1953,13:71-74.
- [11] HENDERSON W R. The inheritance of *Fusarium* wilt resistance in watermelon[J]. J Am Soc Hort Sci,1970,95:276-282.
- [12] NETZER D. Inheritance of resistance in watermelon to races of *Fusarium oxysporum*[J]. Plant disease,1980,164(9):853-854.
- [13] 黄学森,张学炜,焦定量,等.西瓜部分品种抗枯萎病特性在F1代中遗传表现的初步探讨[J].中国西瓜甜瓜,1991(2):11-15.
- [14] ZHANG X P, RHODES B. Inheritance of resistance to race 0, 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* in Watermelon (*Citrullus* sp. PI296341)[J]. CGC report,1993,16:77-78.
- [15] 周凤珍,康国斌.西瓜抗枯萎病品种“卡红”的抗病遗传研究[J].植物病理学,1996,26(3):261-262.
- [16] 张国良,崔广海.西瓜枯萎病抗性材料的转育及遗传规律的研究[J].安徽农业科学,1999,27(6):616-618.
- [17] 于利,徐润芳,赵有为.西瓜品种抗枯萎病遗传研究[J].江苏农业学报,1995,11(1):45-48.
- [18] 羊杏平,姚莲蓬,刘广,等.西瓜品种枯萎病抗性的遗传研究[J].江苏农业学报,2008,24(6):882-887.