

黄瓜抗白粉病 QTL 分子标记定位

刘龙洲^{①②}, 蔡润^①, 袁晓君^①, 何欢乐^①, 潘俊松^{①*}

①上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240;

②上海市农业科学院园艺研究所, 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201106

* 联系人, E-mail: jspan71@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2007-12-17; 接受日期: 2008-07-07

上海市科委基础研究项目(批准号: 06JC14035)和上海市重点学科建设项目(批准号: B209)资助

摘要 利用黄瓜(*Cucumis sativus* L.)自交系S94(中国华北型, 感白粉病)和S06(欧洲温室型, 抗白粉病)及其由它们构建的224个F_{6,7}家系的重组自交系(RIL)群体, 分别在2005年秋和2006年春苗期温室喷雾接种, 进行白粉病抗性遗传分析; 并在已构建的相应分子标记遗传图谱上, 使用复合区间定位方法检测白粉病抗性数量基因座位(QTL)。结果显示, 在两种环境里共检测到黄瓜白粉病抗性的4个QTL(分别是pm1.1, pm2.1, pm4.1 和pm6.1), 分布于连锁群1, 2, 4 和6上, 单个QTL解释贡献率介于5.2%~21.0%之间。其中pm1.1, pm2.1 和pm4.1 在两种环境中被稳定重复检测到, pm6.1只在2005年秋被检测到。两种环境下检测的QTL解释表型变异总和分别是52.0%(2005年秋)和42.0%(2006年春)。与QTL紧密连锁的标记(<5 cM)为分子标记辅助选择(MAS)抗白粉病黄瓜品种和抗性基因的分离和克隆提供了技术支撑。

关键词

黄瓜 (*Cucumis sativus* L)
白粉病
数量性状基因座(QTL)
F_{6,7}家系
苗期

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)白粉病(powdery mildew, PM)是由专性活体寄生黄瓜白粉菌引起, 在温室和大田都普遍发生的叶部病害; 病原白粉菌主要包括瓜单囊壳菌(*Podosphaera xanthii*)和二孢白粉菌(*Golovinomyces cichoracearum*)两种; 中国以瓜单囊壳菌(*P. xanthii*)危害较为普遍^[1,2]。白粉病病原寄主广泛^[3], 成熟孢子可随空气气流传播; 干燥、凉爽季节易发生。黄瓜在开花期感染白粉病可减少产量20%~40%^[4]。在黄瓜白粉病防治中, 种植抗病品种是安全、环保和高效的控制策略^[5]。在抗白粉病常规育种中, 由于抗性鉴定和筛选困难, 效率低, 选育周期长, 造成抗性育种滞后。如果能找到与黄瓜白粉病抗性紧密连锁的分子标记, 利用分子标记辅助选择(marker-assisted selection, MAS)可以加快抗性品种的选育进程。

关于黄瓜白粉病抗性的遗传分析报道较多, 抗性的遗传规律比较复杂。毛爱军等人^[6]认为黄瓜白粉病抗性是由3对基因联合作用。Munger等人^[7]发现在品种Spartan Salad 77-717和PI197088存在白粉病显性抗性基因。但Morishita等人^[8]报道PI197088-5(PI197088的1个衍生系)抗性基因是由1对隐性基因和1对不完全显性基因控制。Sakata等人^[9]报道PI197088-5的白粉病抗性符合数量基因座位(quantitative trait loci, QTL)作用模式。可见黄瓜白粉病抗性的遗传机制非常复杂。

黄瓜白粉病抗性的连锁标记少有报道。张桂华等人^[10]在黄瓜Q9/Q10的F₂群体上鉴定出一个与白粉病抗性基因连锁的扩增片段长度多样性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记, 与抗性基

因的遗传距离为 5.56 cM. Sakata 等人^[9]用黄瓜重组自交系(recombinant inbred lines, RIL)群体共检测到 5 个抗性 QTL; 抗性与温度有关, 在 20 和 26℃, 分别检测到 3 个和 2 个抗性 QTL. 由于黄瓜白粉病抗性基因的复杂性, 所以有必要深入地研究在不同地区和不同黄瓜材料白粉病抗性的作用机制.

本研究使用的黄瓜自交系S06(欧洲温室型)对白粉病有较强抗性, 华北类型自交系S94 对白粉病易感对 S94 和 S06, 以及由它们构建的 F_{6,7} 家系群体, 在温室内条件下人工喷雾接种, 进行系统的白粉病抗性鉴定. 利用本实验室已构建的 S94×S06 RIL 分子标记连锁图, 对白粉病抗性性状进行 QTL 定位分析, 这是国内首次对黄瓜白粉病抗性 QTL 的定位研究, 通过实验获得与该性状紧密连锁的分子标记, 为后续的 MAS 提供研究基础.

1 材料与方法

1.1 群体及遗传图谱的构建

本实验中利用黄瓜自交系 S06 和 S94 杂交得到 F₁, F₁ 自交得到 252 个 F₂ 单株, F₂ 后代随机抽样自交, 通过单粒传(single-seed descent, SSD) 的方法最终获得 224 个家系的 F₆ 代 RIL 群体, 用来构建分子标记遗传连锁图谱.

采用了相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)、简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)、序列特异性扩增区(sequence characterized amplification region, SCAR) 和序列标签位点(sequence-tagged site, STS)^[11-13] 分子标记. 使用 MAPMAKER/EXP3.0^[14], 设定 LOD 3.0, 采用 Kosambi 函数构建连锁图谱. 该图谱全长 1005.9 cM, 包括 7 个连锁群, 含 257 个位点标记, 平均间距 3.9 cM^[15].

1.2 菌种的分离和纯化

从上海交通大学七宝校区温室自然发病的黄瓜幼苗叶片上, 剪取单个粉霉堆, 将其上孢子粉抖在黄瓜试管苗上, 回置 22℃, 16 h 光照培养箱培养. 待黄瓜试管苗出现新的粉霉堆后, 用湿润毛笔刷沾取单孢子堆刷到健康黄瓜试管苗上; 2 到 3 个星期转接 1 次, 共转接 5 次. 期间通过显微镜检查, 鉴定分离的

单孢后代为瓜单囊壳菌.

温室内隔离盘栽不同时期的黄瓜苗供菌种转接, 用湿润毛笔刷沾取黄瓜试管苗上单孢子堆刷到极易感病的黄瓜品种“长春密刺”幼苗上. 专门的培养箱进行隔离培养, 温度 18~23℃, 湿度 50%~75%.

1.3 白粉病抗性分析

分别于 2005 年秋季和 2006 年春季, 在上海交通大学农业与生物学院农场温室内种植 F_{6,7} 家系群体、亲本以及 F₁ 植株, 家系种植采用完全随机区组 3 次重复实验设计, 每重复 8 株; 亲本和 F₁ 各种植 30 株作为对照. 采用穴盘种植($d=12$ cm), 基质成分为 1 份泥炭+1 份煤渣+2 份蛭石. 当幼苗长至 2 叶 1 心时(约播种后 20 天), 对植株真叶人工喷雾接种病菌孢子悬液, 孢子悬液浓度在 5×10^4 个/mL^[16]. 温室中白天温度 22~28℃, 夜晚温度 15~18℃, 日照时间 17 h 左右, 接种后 24 h 内, 用加湿器喷雾保持相对湿度在 70% 左右.

接种 12 天后开始调查发病情况, 以第 1 片真叶感病面积 10% 为梯度, 病情级别划定为 0~10 级(0 级: 植株没有感病症状, 10 级: 植株真叶叶片布满了白粉菌丝).

根据病情分级结果, 计算出每个家系的病情指数(DI), 家系 3 次重复的 DI 的平均值用于统计分析和 QTL 定位.

$$\text{病情指数(DI)} = [\sum (\text{病叶数} \times \text{代表数值}) / \text{调查总叶片数} \times \text{发病最重级代表数值}] \times 100$$

为遗传分析的需要, 划定 DI > 20 为抗病, DI < 20 为感病.

1.4 统计分析及 QTL 定位

两种环境(2005 秋季、2006 春季)亲本、F₁ 和 RIL 家系之间和内部的病情指数的平均数、方差变异分析采用 Microsoft[®] Excel 2000^[17] 计算, 并用此软件绘制 RIL 群体病情指数频率分布图.

QTL 分析利用 WinQTLCart 2.5^[18] 软件, LOD 值 2.5. 以复合区间作图法进行白粉病抗性 QTL 定位. 以 1 cM 的速度进行全基因组扫描, 背景控制参数(control parameter)如下: 控制标记 (control marker) 数, 15; 窗口大小(window size), 3 cM; 回归方法(regression method), 正向.

QTL 命名方式如下:“性状名英文简称的小写斜体”+“连锁群编号”+“QTL 在连锁群上的编号”, 其中连锁群编号和 QTL 在连锁群上的编号之间用“.”隔开。QTL 在连锁群上的编号根据其在连锁群上所处的位置由上到下得来。

2 结果

2.1 发病情况调查分析

在 2005 年秋和 2006 年春两季, 亲本 S06 病情指数分别为 11.5 和 7.5, 表现为高抗; 亲本 S94 病情指数分别为 79.0 和 87.0, 表现为感病。 F_1 病情指数在 2005 年秋为 57.5, 2006 年春为 48.2, 表现为感病。在 2005 年秋和 2006 年春两季, $F_{6.7}$ 家系群体的病情指数都表现出从抗到感的连续分布(图 1), 按照 Shapiro-Wilk ($P > 0.05$) 正态分布检验方法统计, 符合正态分布, 有一些超亲类型存在, 符合 QTL 区间作图的要求。群体抗感植株的接种表现见图 2。

通过进一步方差分析发现, 实验的系统误差较小, 基因型(家系)差异对抗白粉病性状在群体中的变异起到了显著的作用; 环境(季节)因素也对该性状起到了显著的影响作用, 基因与环境互作影响也表现显著(表 1)。

2.2 抗性 QTL 定位分析

(1) 2005 年秋季。2005 年秋季在 $F_{6.7}$ 家系群体共定位到 4 个白粉病抗性 QTL($pm1.1$, $pm2.1$, $pm4.1$ 和 $pm6.1$)(图 3, 表 2), 分别位于第 1, 2, 4 和 6 连锁群上。其中第 2 和第 4 连锁群上 QTL($pm2.1$ 和 $pm4.1$)解释表型变异效应较大, 分别为 15.3% 和 20.5%, 分别位于标记 F 和 CSEPGN11(SCAR), 标记 e23m18f(SRAP) 和 ME11 EM9c (SRAP) 之间。第 1 和第 6 连锁群上各检测到 1 个 QTL($pm1.1$ 和 $pm6.1$), 它们分别位于标记 ME2EM 4a(SRAP) 和 c162(SSR), 标记 S_BC526_2 (SCAR) 和 ME11EM4f(SRAP) 之间, 解释表型变异分别为 7.0% 和 9.2%。所有 QTL 的解释表型变异总值为 52.0%。

(2) 2006 年春季。在 2006 年春季家系群体中定位到 3 个白粉病抗性 QTL(图 3, 表 2), 各自分布于第 1, 2 和 4 连锁群上。从它们分布在连锁群上的标记位置来看, 它们与 2005 年秋季分别在第 1, 2 和 4 连锁群上检测到的 QTL 位置区间重叠, 因此给予它们相同的命名为 $pm1.1$, $pm2.1$ 和 $pm4.1$, 解释表型变异分别为 5.2%, 15.8% 和 21.0%。2006 年春季检测到的所有 QTL 解释表型变异总值为 42%。

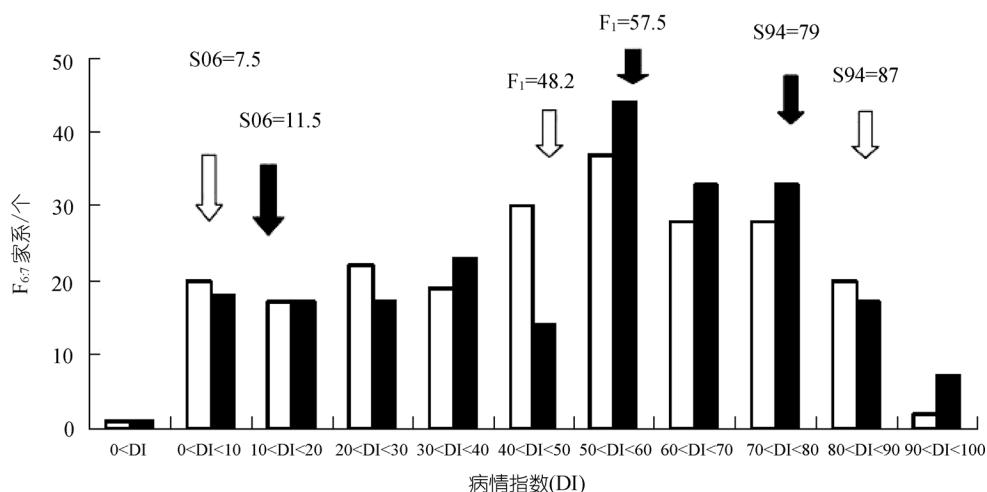


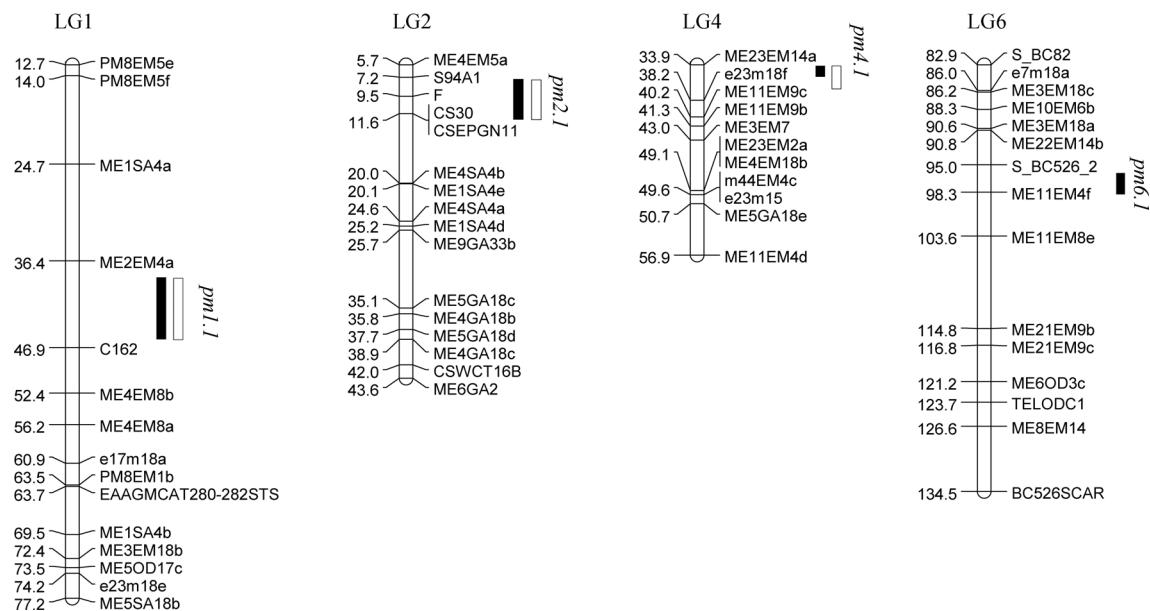
图 1 $F_{6.7}(S94/S06)$ 家系植株黄瓜白粉病情指数的频率分布

$F_{6.7}$ 家系植株由黄瓜自交系 S94 和 S06 为亲本构建; 横坐标为病情指数, 纵坐标为 $F_{6.7}$ 家系个数



图 2 抗感图片

左为感病亲本S94(病级 8), 右为抗病亲本S06(病级 0),
中间为感病F₁(病级 3)

图 3 黄瓜F_{6:7}(S94/S06)家系群体白粉病抗性QTL连锁群上的定位情况

只有包含 QTLs 的连锁群区段被显示; 标记之间的距离用 cM 表示; ■ □ 分别表示 2005 秋和 2006 春定位的 QTL

表 2 黄瓜F_{6:7}(S94/S06)家系群体白粉病抗性QTL定位(2005 秋、2006 年春)

季节	QTL ^{a)}	连锁群	LOD	标记区间	r ² (%)	加性效应
2005 秋	<i>pm1.1</i>	1	2.5	ME2EM4a~c162	7.0	-3.38
	<i>pm2.1</i>	2	3.7	F~CSEPGN11	15.3	3.82
	<i>pm4.1</i>	4	7.8	e23m18f~ME11EM9c	20.5	-3.30
	<i>pm6.1</i>	6	2.6	S_BC526_2~ME11EM4f	9.2	-1.59
2006 春	<i>pm1.1</i>	1	2.5	ME2EM4a~c162	5.2	-2.74
	<i>pm2.1</i>	2	3.5	F~CSEPGN11	15.8	2.89
	<i>pm4.1</i>	4	7.2	e23m18f~ME11EM9c	21.0	-2.90

a) QTL 命名: 性状名英文缩写小写斜体+连锁群号+QTL 在连锁群上的编号

3 讨论

病原小种的差异、植物生长时期、植株的基因型和复杂的环境因素等都会影响白粉病的发生和传播^[19,20]。黄瓜白粉菌的成熟孢子可以随风和气流传播, 因而使一个地区的白粉菌病原复杂性增加。黄瓜白粉菌是专性寄生真菌, 不能在培养基上保存, 在未发病季节很难开展研究工作。鉴于这些众多影响因素, 黄瓜白粉病抗性研究进展缓慢。本研究使用的中国上海地区优势黄瓜白粉菌生理种, 单孢分离后用于温室人工接种; 同时, 实验采用大样本多重复设计, 可以降低抽样误差, 易于检测紧密连锁基因座的交换, 有利于提高定位的准确性。

在本研究中, 共检测到 4 个 QTL, 其中 3 个 QTL(*pm1.1*, *pm2.1* 和 *pm4.1*)在两季(2005 秋, 2006 春)均能被检测到, 其中 *pm2.1* 解释的遗传效应在 10% 以上, *pm4.1* 的效应值超过 20%, 据此首先我们可以确定白粉病抗性属于数量遗传性状, 由至少 4 个基因座位调控; 其次, 的确存在白粉病抗性主效基因; 根据其季节 QTL 解释遗传变异总效应(52%, 2005 秋; 42%, 2006 春), 说明还存在其他微效基因作用。从加性效应上看, 白粉病抗性 QTL 分别来自 2 个亲本, 可见 QTL 的作用分散在两个亲本中间。其中 *pm1.1*, *pm4.1* 和 *pm6.1* 加性效应为负(表 2), 说明感病亲本也贡献了抗性作用, 这与很多植物抗病基因 QTL 研究报道相一致^[21~23]。

Sakata 等人鉴定的 5 个白粉病抗性 QTL, 分布在第 1, 2, 3 和 4 连锁群上^[9], 但是研究使用的图谱标记信息未完全公布, 还有黄瓜图谱上的 SSR 等固定标记的缺乏, 未能形成较好的整合图谱, 使彼此的 QTL 之间很难进行比较。根据 Sakata 等人^[9]提供的信息, 与抗性紧密相联的 8 个标记(SSR, STS)中, 只有 SSR 标记“c162”和STS标记“EAAGMCAT280-282STS”定位在我们实验室构建的连锁图第 1 连锁群上, 本实验在第 1 连锁群上定位的 QTL(*pm1.1*)与 c162 标记仅相距 0.1 cM。说明它们可能是等位基因的关系。我们与 Sakata 等人^[9]所用的遗传群体和病原菌方面存在一

定差异, 如果有可能, 可以与他们实验室交换病原菌或遗传群体, 使白粉病抗性 QTL 的分析更全面和准确, 同时也为现已定位 QTL 之间的相互比较提供可能。

大量的抗病研究表明很多抗病基因在连锁群上的分布不是随机的, 具有成簇分布的特点^[24~26]。Grumet 等人报道黄瓜对于番木瓜环斑病毒(papaya ringspot virus)西瓜株的抗性位点与马铃薯 Y 病毒组(potyvirus)其他成员的抗性基因共分离^[27]。Perche pied 等人报道, 在以亲本“PI 124112/ Védrantais”构建的 RIL 群体分子标记遗传图谱上同时定位甜瓜白粉病和霜霉病抗性 QTL, 发现在 XII 连锁群上甜瓜白粉病抗性 QTL 中, 某些 QTL 兼抗多个白粉病病菌小种; 一些白粉病抗性 QTL 与霜霉病抗性 QTL 位置重叠^[28]。根据本实验室对“S94/S06”组合的 F_{6·7} 群体霜霉病抗性 QTL 定位结果^[15], 抗霜霉病 QTL 在该群体的分子标记连锁图上主要分布在第 1 和第 6 连锁群上; 其中第 6 连锁群上定位的 1 个 QTL(*dm6.1*)位于标记 ME3EM18a(SRAP) 和 ME22EM14b(SRAP) 之间, 与本研究定位在该连锁群上的 1 个 QTL(*pm6.1*)距离临近, 距离约为 7.0 cM。在我们的研究中, 还未发现黄瓜白粉病抗性 QTL 与霜霉病抗性 QTL 位置有重叠的现象。由于黄瓜白粉菌病原小种研究很少, 国际和国内关于地区间病原小种的鉴定和分离工作未见报道, 也限制了黄瓜白粉菌遗传抗性的更深层次的研究。本文为黄瓜以及其他葫芦科作物相关病害的研究提供一定的参考。

本研究利用黄瓜 RIL 群体, 鉴定到 4 个白粉病抗性 QTL, 其中有 3 个 QTL 在年度间稳定存在, 并均有较近的连锁标记, *pm1.1* 距离 SSR 标记 c162 仅 0.1 cM; *pm2.1* 与两侧标记 F 和 SCAR 标记 CSEPGN11 的距离分别为 0.2 cM 和 0.9 cM; *pm4.1* 与左侧标记 e23m18f 距离为 0.2 cM, 与右侧标记 ME11EM9c 距离为 2.0 cM。与 QTL 紧密连锁标记的获得十分有利于 MAS 的开展^[9,29,30]。本实验进一步将 SRAP 等非固定标记转化为固定标记, 为黄瓜白粉病抗性品种培育中的 MAS 应用奠定坚实基础。

参考文献

- 1 呂佩珂, 李明远, 吳鉅文. 中国蔬菜病虫原色图谱. 北京: 中国农业出版社, 1996. 17—18
- 2 冯东昕, 李宝栋. 主要瓜类作物抗白粉病育种研究进展. 中国蔬菜, 1996, (1): 55—59
- 3 Morishita M, Sugiyama K, Saito T, et al. An improved evaluation method for screening and selecting powdery mildew resistant cultivars and lines of cucumber (*Cucumis sativus* L.). J Jpn Soc Horti Sci, 2002, 71: 94—100
- 4 侯峰, 吕淑贞, 马德华. 黄瓜. 天津: 天津科学技术出版社, 1999. 108—110
- 5 McGrath M T. Fungicide resistance in cucurbit powdery mildew: experiences and challenges. Plant Disease, 2001, 85(3): 236—245[\[DOI\]](#)
- 6 毛爱军, 张峰, 张海英, 等. 两个黄瓜品种对白粉病的抗性遗传分析. 中国农学通报, 2005, 21(6): 302—304
- 7 Munger H M. Dominant genes for resistance to powdery mildew in cucumber. Cucurbit Genet Coop Rpt, 1979, 2: 10—15
- 8 Morishita M, Sugiyama K, Saito T, et al. Powdery mildew resistance in cucumber. Jpn Agric Res Quarterly, 2003, 37(1): 7—14
- 9 Sakata Y, Kubo N, Morishita M, et al. QTL analysis of powdery mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Theor Appl Genet, 2006, 112(2): 243—250[\[DOI\]](#)
- 10 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. 园艺学报, 2004, 31(2): 189—192
- 11 Lander E S, Green P, Abrahamson J, et al. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural population. Genomics, 1987, 1: 174—181[\[DOI\]](#)
- 12 Yuan X J, Li X Z, Pan J S, et al. Genetic linkage map construction and location of QTLs for fruit-related traits in cucumber. Plant Breeding, 2008, 127(2): 180—188[\[DOI\]](#)
- 13 Kong Q, Xiang C, Yu Z. Development of EST-SSRs in *Cucumis sativus* from sequence database. Mol Ecol Notes, 2006, 6(4): 1234—1236
- 14 Robbins M D. Molecular marker development, QTL pyramiding, and comparative analysis of phenotypic and marker-assisted selection in cucumber. Doctor Dissertation. Madison: University of Wisconsin, 2006
- 15 Yuan X J, Pan J S, Cai R, et al. Genetic mapping and QTL analysis of fruit and flower related traits in cucumber (*Cucumis sativus* L.) using recombinant inbred lines. Euphytica, 2008, online DOI 10.1007/s10681-008-9722-5
- 16 Block C C, Reitsma K R. Powdery mildew resistance in the U. S. National plant germplasm system cucumber collection. HortScience, 2005, 40(2): 416—420
- 17 Levine D M, Ramsey P P, Smidt R K. Applied Statistics for Engineers and Scientists: Using Microsoft Excel and MINITAB. Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ, 2001
- 18 Zeng Z B. Theoretical basis of separation of multiple linked gene effects on mapping quantitative trait loci. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 10972—10976[\[DOI\]](#)
- 19 Epinat C, Pitrat M, Bertrand F. Genetic analysis of resistance of five melon lines to powdery mildews. Euphytica, 1993, 65(2): 135—144[\[DOI\]](#)
- 20 Cohen R. A leaf disk assay for detection of resistance of melons to *Sphaerotheca fuliginea* race 1. Plant Disease, 1993, 77(5): 513—517
- 21 Chen H, Wang S, Xing Y, et al. Comparative analyses of genomic locations and race specificities of loci for quantitative resistance to *Pyricularia grisea* in rice and barley. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(5): 2544—2549[\[DOI\]](#)
- 22 Cherif M, Harrabi M. Transgressive segregation for resistance to *Pyrenophora teres* in barley. Plant Pathol 1993, 42(4): 617—621[\[DOI\]](#)
- 23 Thomas W T B, Powell W, Waugh R, et al. Detection of quantitative trait loci for agronomic, yield, grain and disease characters in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor Appl Genet, 1995, 91(6-7): 1037—1047[\[DOI\]](#)
- 24 Darvishzadeh R, Poormohammad S, Dechamp G, et al. Quantitative trait loci associated with isolate specific and isolate nonspecific partial resistance to *Phoma macdonaldii* in sunflower. Plant Pathol, 2007, 56 (5): 855—861[\[DOI\]](#)
- 25 Crute I R, Pink D. Genetics and utilization of pathogen resistance in plants. Plant Cell, 1996, 8(10): 1745—1755
- 26 Miguel A B, Mark J C, Douglas EH, et al. Map position of 47 *Arabidopsis* sequence with sequence similarity to disease resistance genes. Plant J, 1997, 12(5): 1197—1211[\[DOI\]](#)
- 27 Grumet R, Kabelka E, McQueen S, et al. Characterization of sources of resistance to the watermelon strain of *Papaya ringspot virus* in cucumber: allelism and co-segregation with other potyvirus resistances. Theor Appl Genet, 2000, 101(3): 463—472[\[DOI\]](#)
- 28 Perchepled I, Bardin M, Dogimont C, et al. Relationship between loci conferring downy mildew and powdery mildew resistance in melon assessed by quantitative trait loci mapping. Phytopathology, 2005, 95 (5): 556—565[\[DOI\]](#)
- 29 Young N D. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. Annu Rev Phytopathol, 1996, 34: 479—501[\[DOI\]](#)
- 30 Fan Z, Robbins M D, Staub J E. Population development by phenotypic selection with subsequent marker-assisted selection for line extraction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Theor Appl Genet, 2006, 112(5): 843—855[\[DOI\]](#)