



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105838812 B

(45)授权公告日 2019.09.27

(21)申请号 201610341936.X

C12N 15/11(2006.01)

(22)申请日 2014.08.06

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 105838812 A

CN 101240342 A, 2008.08.13,  
林肖剑. “黄瓜抗白粉病染色体片段导入系的SSR鉴定”. 《园艺学报》. 2012, 第39卷(第3期), 第485-492页.

(43)申请公布日 2016.08.10

(62)分案原申请数据  
201410382306.8 2014.08.06

N. Fukino等. “Identification and validation of powdery mildew(*Podosphaera xanthii*)-resistant loci in recombinant inbred lines of cucumber (*Cucumis sativus* L.)”. 《Mol Breeding》. 2013, 第32卷(第2期),

(73)专利权人 上海交通大学  
地址 200240 上海市闵行区东川路800号

张圣平. “黄瓜白粉病抗性基因QTL定位”. 《中国农业科学》. 2011, 第44卷(第17期), 第3584-3593页.

(72)发明人 何欢乐 聂京涛 蔡润 潘俊松  
杨俊俊 彭佳林

审查员 杜娟

(74)专利代理机构 上海科盛知识产权代理有限公司 31225

代理人 杨元焱

(51) Int. Cl.

C12Q 1/6895(2018.01)

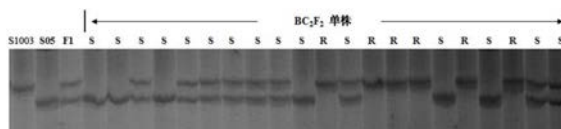
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

与黄瓜白粉病抗性主效QTL共分离的SSR分子标记

(57)摘要

本发明提供了一个与黄瓜白粉病抗性主效QTL共分离的SSR分子标记,命名为SSR-N2。SSR-N2的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。本发明的SSR分子标记具有高稳定性,可以简便、快速地应用于黄瓜苗期白粉病抗性单株的辅助筛选,为白粉病抗性的分子标记辅助育种奠定了基础,这将大大加快黄瓜白粉病抗性分子育种的进程。同时,这个共分离的分子标记也为黄瓜白粉病抗性主效QTL的克隆奠定基础。



1. 一个与黄瓜白粉病抗性主效QTL共分离的SSR分子标记,命名为SSR-N2,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

2. 根据权利要求1所述的与黄瓜白粉病抗性主效QTL共分离的SSR分子标记,其特征在于,所述SSR-N2由上游引物SSR-N2-F和下游引物SSR-N2-R PCR扩增得到,所述上游引物SSR-N2-F的序列为5'-CTTCATTGTTGATTCCAGGC-3',所述下游引物SSR-N2-R的序列为5'-TGTTACGACCTATAACCACAAAAT-3'。

## 与黄瓜白粉病抗性主效QTL共分离的SSR分子标记

[0001] 本发明是发明名称为“与黄瓜白粉病抗性主效QTL共分离的SSR分子标记”，申请号为2014103823068，申请日为2014-8-6的在先申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及基因工程技术，具体涉及与黄瓜白粉病抗性主效QTL共分离的SSR分子标记。

### 背景技术

[0003] 黄瓜(*Cucumis sativus* L.)为葫芦科(Cucurbitaceae)甜瓜属一年生草本蔓生攀缘植物。黄瓜作为世界十大重要的蔬菜作物之一，也是我国主栽蔬菜作物之一，占全国蔬菜面积的10%左右。黄瓜不仅作为重要的蔬菜作物历来备受育种家的重视，并且黄瓜染色体数目较少 $2n=2x=14$ ，基因组较小，特别在2009年，黄瓜基因组的成功测序为黄瓜作为葫芦科的模式植物进行分子生物学研究提供了极大便利。

[0004] 在黄瓜生产中，面临许多疾病的危害，其中白粉病是最为严重的病害之一。黄瓜白粉病是由专性寄生菌(*Podosphaera xanthii*)引起的真菌病害，能在整个黄瓜生育期发病，主要危害叶片，严重时可危害茎蔓，特别是在生长中后期发病严重，使植株提早拉秧，造成严重的产量损失。田间施药，造成农药残留，影响果实品质，危及食品安全，并且会污染环境。长期施药还会促进白粉病菌生理小种产生抗性，从而增加防治难度，增加种植户生产成本。培育抗病的黄瓜品种是解决白粉病危害的最好方法。常规的抗病育种耗时长，需要经过多代杂交和回交过程；病害发生和环境条件密切相关，需要专门的病圃进行接种鉴定；这些都增加了培育黄瓜抗病品种的难度。

[0005] 分子育种可以大大加快育种进程，显著缩短育种周期。现代生物技术的迅猛发展，为抗病育种开辟了新的途径，利用生物技术培育抗病品种已成为目前的热点。分子育种的前提是获得相关性状的功能基因或与其紧密连锁的分子标记。利用分子标记分析体系，在遗传群体上鉴定抗病遗传规律，同时结合分子标记遗传连锁图谱，定位和克隆白粉病抗性基因，研究其功能和抗性的分子调控机制，可以为黄瓜抗性基因的分子标记辅助育种及分子设计育种提供理论依据。利用与抗病基因紧密连锁的分子标记，开展分子标记辅助选择育种，可将多个抗病基因整合到一个品种，显著提高育种效率，缩短育种时间，而且大幅度提高了抗病的力度和持久性，这对于培育出满足种植者需求的黄瓜抗病新品种具有重要意义。

[0006] 虽然葫芦科作物黄瓜白粉病的发生比较普遍和严重，但是关于其白粉病抗性基因定位的研究相对较薄弱，尚未找到与白粉病抗性基因/QTL共分离的标记，更不用说基因的克隆及抗性分子机制的研究，目前停留在主效基因/QTL定位的阶段。由于诸多报道表明黄瓜白粉病抗性由多个隐性基因控制，研究者对其进行了QTL的分析。2006年，Sakata等利用97株黄瓜抗感组合的重组自交系群体，首次定位了黄瓜抗白粉病性状的QTL；在4个连锁群上检测到6个与温度相关的QTL，其中在LGII上的一个主效QTL在20℃和26℃下均表现出抗

性。Liu等(2008a)利用黄瓜高感白粉病自交系S94和高抗白粉病自交系S06构建的F<sub>2:3</sub>家系进行了QTL定位,共检测到5个白粉病抗性QTL,分布于连锁群1、2、5上,单个QTL的贡献率介于3.4%~45%之间;还通过这两亲本构建的重组自交系共检测到4个白粉病抗性QTL,分别位于连锁群1、2、4、6上,单个QTL的贡献率介于5.2%~21.0%之间(Liu et al.,2008b)。沈丽平(2009)应用ISSR(inter-simple sequence repeats)和SRAP(sequence-related amplified polymorphism)标记技术,以高感白粉病黄瓜品种D8和高抗白粉病黄瓜品种JIN5的F<sub>2</sub>群体检测到控制黄瓜白粉病抗性的2个QTL,均位于第3连锁群上,贡献率为7.6%和13.5%。张圣平等(2011)以K8(抗病)×K18(感病)组合的F<sub>2</sub>和F<sub>2:3</sub>家系为研究对象,共检测到4个白粉病抗性的QTL。最近,Fukino等(2013)利用重组自交系检测到9个QTL,分别位于染色体1、3、4、5、6上,单个QTL的贡献率介于5%~44%之间,其中4个位点的效应通过剩余杂合体(residual heterozygous lines,RHLs)得到了证实。He等(2013)利用F<sub>2:3</sub>家系对黄瓜下胚轴、子叶和真叶的白粉抗性同时进行了QTL分析,结果在1、3、4、5号染色体上检测到6个QTL,单个QTL的贡献率介于6.1%~74.5%之间;其中2个主效QTL位于5号染色体的40cM的区间内,解释21.0-74.5%的贡献率,下胚轴抗性QTL对黄瓜白粉抗性起到了最重要的作用。

[0007] 上述多数研究表明,黄瓜对白粉病的抗性由多个基因共同作用,而且抗性基因表现为隐性效应,这些因素增加了抗病基因精细定位和分离的难度。由于黄瓜白粉病对黄瓜生产影响很大,对黄瓜白粉病抗性基因的研究很多,但是目前尚未有该抗病基因克隆和分子机制研究的报道,已获得的连锁标记遗传距离较远,不利于分子标记辅助育种的开展,阻碍了抗病品种分子育种的进程。因此,寻找与黄瓜白粉病抗性基因/QTL紧密连锁、共分离的分子标记,对其进行精细定位、分离与克隆,这不但能够为其抗病分子育种提供良好的技术支撑,也为揭开黄瓜白粉病抗性的分子机制奠定基础。

## 发明内容

[0008] 本发明是申请号为2014103823068,申请日为2014-8-6的在先申请的分案申请。

[0009] 本发明的目的,在于克服QTL定位难度大的问题,提供一个与黄瓜白粉病抗性主效QTL pm5.1共分离的共显性SSR分子标记。本发明利用BSA(Bulked Segregant Analysis)和QTL定位法,找到一个控制白粉病抗性的主效QTL。为了精细定位此主效QTL,我们构建了含主效QTL的染色体片段代换系(Chromosome Segment Substitution Lines,CSSL)及其回交分离群体。通过精细定位及标记的开发,得到三个与黄瓜白粉病抗性主效QTL共分离的SSR标记,以便分子标记辅助育种体系的建立。本发明的分子标记可简便、快速、高通量地应用于育种实践。

[0010] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0011] 一个与黄瓜白粉病抗性主效QTL共分离的SSR分子标记,命名为SSR-N2,其核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0012] 上述SSR-N2由上游引物SSR-N2-F和下游引物SSR-N2-R PCR扩增得到,所述上游引物SSR-N2-F的序列为5'-CTTCATTGTTGATTCCAGGC-3',所述下游引物SSR-N2-R的序列为5'-TGTTACGACCTATAACCACAAAAT-3'。

[0013] 本发明用BSA和QTL定位法,利用F<sub>2</sub>群体找到一个控制白粉病抗性的主效QTL。为了

精细定位此主效QTL,利用不断回交的方法构建了含主效QTL的染色体片段代换系(Chromosome Segment Substitution Lines, CSSL)及其回交分离群体。通过对回交分离群体BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>, BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>的抗性鉴定分析,白粉病抗性已变为单孟德尔因子遗传,即由单基因控制,抗性为隐性遗传。通过精细定位,抗性基因定位到标记UW065021与UW065094之间,物理距离170kb。通过黄瓜基因组序列,在其中间开发SSR标记,最后得到三个与黄瓜白粉病抗性主效QTL共分离的SSR标记,分别被命名为SSR-N1, SSR-N2, SSR-N3。3个共分离SSR分子标记为共显性标记,能够区分纯合体和杂合体,将有利于白粉病抗性育种的分子标记辅助体系的建立,可简便、快速、高通量地应用于育种实践。

[0014] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:常规传统的抗病育种耗时长,需要经过多代杂交和回交过程;病害发生和环境条件密切相关,需要专门的病圃进行接种鉴定;这些都增加了培育黄瓜抗病品种的难度。由于白粉病菌为专性寄生菌,抗性鉴定需要接种,且发病后植株容易死掉;而且白粉病抗性基因多表现为隐性效应,常规方法回交育种需要回交一代后再自交一代来确认抗性基因的渗入,这些因素都增加了白粉病抗性育种的周期和难度。本发明的共分离SSR分子标记为共显性,可在黄瓜苗期鉴定植株,并能够区分纯合子和杂合子,回交渗入过程中省去了每代自交的步骤,用分子标记来跟踪抗性基因,既省时也准确,所以可用于黄瓜白粉病抗性的分子标记辅助育种,大大加速黄瓜白粉病抗性育种的进程。同时共分离标记也将促进白粉病抗性QTL/基因的克隆,从而为揭示白粉病抗性形成的分子机制奠定基础。

## 附图说明

[0015] 图1是分子标记SSR-N1的聚丙烯酰胺凝胶电泳效果;

[0016] 图2是分子标记SSR-N2的聚丙烯酰胺凝胶电泳效果;

[0017] 图3是分子标记SSR-N3的聚丙烯酰胺凝胶电泳效果。

[0018] 图中所示,S1003为抗病亲本;S05为感病亲本;F<sub>1</sub>代表两亲本杂交后代;R和S分别代表BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>回交分离群体中随机挑选的抗病和感病植株的检测结果。

## 具体实施方式

[0019] 一、黄瓜白粉病抗性主效QTL/基因的鉴定

[0020] 1. 群体构建与抗性鉴定

[0021] 初步的抗性QTL定位用的是F<sub>2</sub>群体,抗病亲本是S1003,感病亲本是S1001,它们都属于华北类型的黄瓜自交系。两亲本杂交产生的F<sub>1</sub>代自交产生F<sub>2</sub>代群体。白粉病抗性鉴定所使用的菌种是从上海交通大学温室发病的黄瓜植株上分离得到的。随机选择148株F<sub>2</sub>代个体在苗期进行抗性鉴定。从感病幼苗上采集纯化的白粉病菌,用无菌水制成孢子悬浮液,调至浓度为 $1 \times 10^5$ 个 $\cdot$  mL<sup>-1</sup>。在黄瓜第三片真叶刚展开时把调配好的孢子悬浮液均匀喷到真叶上,以不成水滴状为准。接种培养12d后调查发病情况。植株的发病情况根据Morishita等(2003)划分为5个等级。0级和1级视为抗病,2级以上视为感病。

[0022] 根据发病调查,S1003为高抗,S1001为高感,F<sub>1</sub>为感病,偏向于感病亲本;F<sub>2</sub>群体抗病性呈现双峰分布,且发病趋势偏向于感病,中间类型较少,说明存在隐性的主效基因控制白粉的抗病性。

[0023] 2. BSA法和QTL分析确定主效基因的染色体位置

[0024] 因此我们采取BSA法先对抗性主效基因所在的染色体区域进行了分析。从F<sub>2</sub>分离群体中分别随机选取高抗和高感个体各10株,建立抗、感基因池。用780对在染色体上平均分布的SSR引物对两个亲本及两个基因池进行筛选。

[0025] SSR反应体系为基因组DNA 30ng,引物0.2 $\mu$ mol/L,200 $\mu$ mol/L dNTPs,2mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1 $\mu$ l 10 $\times$ PCR reactions buffer,0.5U TaqDNA聚合酶,总反应体系为10 $\mu$ l。PCR扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 5min;35个循环:94 $^{\circ}$ C 30s,55-60 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 30s;72 $^{\circ}$ C 5min。扩增产物用6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电泳缓冲液为1 $\times$ TBE,45W恒功率,电泳1.5h-2h。

[0026] 电泳后进行银染。银染方法为:将带胶的玻璃板放入固定液中,在摇床上轻轻摇动至指示剂颜色褪去,其中固定液的组成为:冰醋酸、无水乙醇、蒸馏水的体积比为1:10:100;用超纯水洗1min-3min;将冲洗后的胶板放入染色液中摇动半小时,其中染色液的组分为2g/L硝酸银;将染色后的胶板放入超纯水中漂洗5s后放入装有显影液的塑料盒中,轻轻摇动至条带清晰,放入自来水中冲洗3min;室温下干燥,干燥后拍照,其中显影液是在1L蒸馏水中加入15g NaOH和3ml甲醛混匀得到的。

[0027] 通过BSA筛选,在第五染色体长臂末端的连续7个SSR标记在池间表现为多态性,因此白粉病抗性主效基因位于这个区域内。为了进一步确定抗性主效基因的位置,我们进行了QTL分析。从黄瓜7条染色体上平均的选择了73个多态性SSR标记对148株F<sub>2</sub>代个体进行了电泳分析。使用JoinMap 3.0构建连锁图谱,其中LOD $\geq$ 5.0,采用Kosambi函数将重组率转化为遗传图距。将F<sub>2</sub>群体单株三个叶片等级的均值作为植株抗病的病情指数进行QTL作图。QTL分析使用QTL Cartographer 2.5,采用复合区间作图法(CIM)进行QTL作图。通过QTL分析的结果,在第五染色体的长臂末端找到一个主效QTL pm5.1,这与BSA法得出的位置吻合,因此我们确定这个位置存在一个控制白粉病抗性的主效QTL。

[0028] 二、回交分离群体的构建和主效QTL的精细定位

[0029] 由于亲本S1003与S1001都为华北类型黄瓜,亲缘关系近,多态性标记少,因此构建回交分离群体时采用了高感白粉病的欧洲温室类型黄瓜自交系S05作为供体亲本。结合MAS通过多代回交后自交,构建了仅主效QTL pm5.1区域分离的回交群体BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>,BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>。分别对2个BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub>群体(114株,480株)和BC<sub>2</sub>F<sub>2</sub>群体(483株)的抗性鉴定,抗、感比例经过卡方分析符合1:1和1:3,因此,抗性QTL已经转化为单孟德尔因子,即单基因控制,且抗病为隐性遗传。通过主效QTL区域已开发的分子标记对这1074个单株进行连锁分析,结果将抗病基因精细定位到SSR标记UW065021与UW065094之间,物理距离170kb。通过黄瓜基因组序列,在其中间开发了15对SSR标记,结果只有3对在亲本间有多态性,即分子标记SSR-N1,SSR-N2,SSR-N3。通过群体连锁分析,最后得出这三个SSR分子标记与黄瓜白粉病抗性主效QTL共分离,即群体的抗病植株带型全部和抗病亲本带型一致,而感病植株带型全部为感病亲本或者F<sub>1</sub>的带型。

[0030] 图1是分子标记SSR-N1的聚丙烯酰胺凝胶电泳效果,图2是分子标记SSR-N2的聚丙烯酰胺凝胶电泳效果,图3是分子标记SSR-N3的聚丙烯酰胺凝胶电泳效果。

## 序列表

&lt;110&gt; 上海交通大学

&lt;120&gt; 与黄瓜白粉病抗性主效 QTL 共分离的 SSR 分子标记

&lt;160&gt; 3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 196

&lt;212&gt; DNA

<213> 黄瓜 (*Cucumis sativus* L.)

&lt;400&gt; 1

cttcattggt gattccagg caagatgaag aaaagaaaa agaagcaatc gtaggtaa 60

ttaatgtatg tatttgatat gtatatgtgt gtgtgtggag actttaagt agaagttat 120

caaatttctc ttaactaca tctcaacg gtagatggt gcactaagtg attatttgtg 180

gtagtaggtc gtaaca 196

[0031]

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt;人工序列

&lt;400&gt; 2

cttcattggt gattccagg c 21

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt;人工序列

&lt;400&gt; 3

tgttacgacc tataaccaca aaat 24。

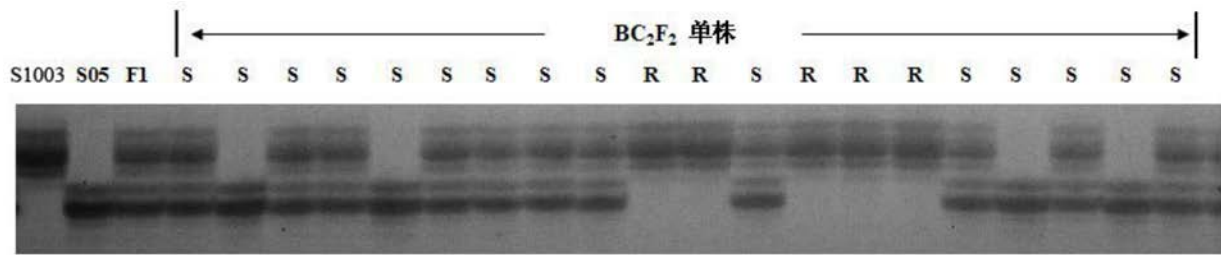


图1

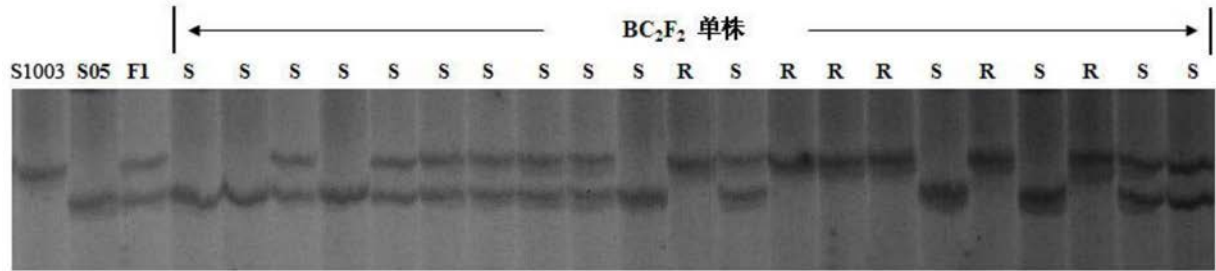


图2

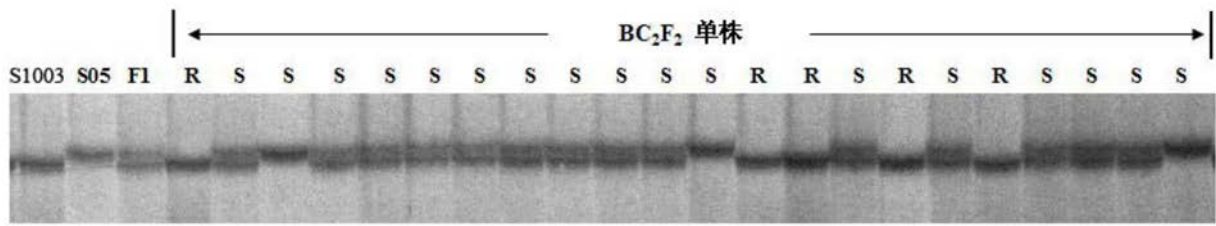


图3