

辣椒抗南方根结线虫基因的定位及标记辅助选择

张维 方源 沈火林*

(中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193)

摘要 用对南方根结线虫具有稳定抗性的辣椒材料 09C649 与感病材料 09C108 杂交并构建 F_2 分离群体,遗传分析表明,09C649 中对南方根结线虫的抗性由一对显性基因控制,将其暂命名为 *Me8*。用 236 对 SSR 标记、1 对 SCAR 标记、1 对 SSCP 标记、8 对 EST-SSR 标记及 2 对 COSII 标记对 *Me8* 进行基因定位。该基因被定位在辣椒第 9 号染色体上,与其距离最近的 4 个标记 SSCP_B322、COS710、SCAR_315 和 COS970,分别与该基因相距 0、0.1、1.3 和 3.3 cM。抗南方根结线虫基因 *N*、*Me1*、*Me3* 及 *Me7* 也都位于这一染色体区域,因此这 4 个分子标记可运用于对目前已发现的所有抗南方根结线虫基因的辅助选择中。用标记 SCAR_315 对 37 份辣椒材料进行辅助选择,结果表明标记鉴定结果与抗性鉴定结果具有高度的一致性。

关键词 辣椒; 南方根结线虫; 基因定位; 标记辅助选择(MAS)

中图分类号 S 432.4⁺5

文章编号 1007-4333(2012)02-0102-06

文献标志码 A

Mapping of a southern root-knot nematode resistance gene in pepper and marker-assisted selection

ZHANG Wei, FANG Yuan, SHEN Huo-lin*

(College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract A southern root-knot nematode resistant inbred line 09C649 was crossed with a susceptible line 09C108. The F_2 segregating population was obtained. Disease investigation and heredity analysis revealed that the resistance to southern root-knot nematode in 09C649 was controlled by a dominant gene, tentatively named as *Me8*. Two hundreds and thirty six pairs of SSR markers, 1 pair of SCAR marker, 1 pair of SSCP marker, 8 pairs of EST-SSR markers and 2 pairs of COSII markers were used to map *Me8*. It was located on the chromosome 9 of pepper. The four molecular markers SSCP_B322, COS710, SCAR_315 and COS970, were the nearest markers away from *Me8* with genetic distances of 0, 0.1, 1.3 and 3.3 cM respectively. Southern root-knot nematode resistance genes *N*, *Me1*, *Me3* and *Me7* were also located in this genomic region. These markers could thus be used in marker-assisted selection for all the southern root-knot nematode resistance genes that were found currently. The SCAR_315 was used in marker-assisted selection of 37 pepper lines. And the molecular identification was well in agreement with the southern root-knot nematode resistance tests.

Key words pepper; southern root-knot nematode; gene mapping; marker-assisted selection (MAS)

根结线虫(*Meloidogyne* spp.)是危害农作物的重要病原生物之一,它广泛分布于世界各地,温带、亚热带和热带地区的植物受害尤其严重。目前国际上报道的根结线虫有 80 多种^[1],其中最常见有种有南方根结线虫(*M. incognita*)、花生根结线虫(*M.*

arenaria)、爪哇根结线虫(*M. javanica*)及北方根结线虫(*M. hapla*)。据报道,由根结线虫引起的农作物损失中 90%以上是由这 4 个种引起的^[2],其中又以南方根结线虫的影响最大。目前生产中采用的南方根结线虫防治方法主要是利用化学杀线虫剂和熏

收稿日期: 2011-03-14

基金项目: “十一五”支撑计划项目(编 2008BADB1B04); 现代农业产业体系北京市果类蔬菜创新团队项目

第一作者: 张维,硕士研究生, E-mail: zhangwei1720@163.com

通讯作者: 沈火林,教授,主要从事蔬菜遗传育种与生物技术研究, E-mail: SHL1606@cau.edu.cn

蒸剂。化学杀线虫剂比较有效,但容易污染环境。熏蒸剂常用的是溴甲烷,但是溴甲烷对大气臭氧层具有破坏作用,而被许多国家禁止使用。而选育抗南方根结线虫的品种成为防治南方根结线虫的最直接有效的途径。

在辣椒属中存在多个抗根结线虫基因,这些基因的来源、抗谱、抗病机制和对温度的稳定性以及连锁状况等不同。其中抗南方根结线虫的基因主要有 $N^{[3]}$ 、 $Me1$ 、 $Me3$ 和 $Me7^{[4]}$ 。1957年, Hare^[3]首次报道了辣椒对南方根结线虫的抗性是由单显性基因控制的,并将他发现的第1个抗根结线虫的基因命名为 N 。该基因抗南方根结线虫、爪哇根结线虫和花生根结线虫,但在 28 °C 以上会丧失部分抗性^[5]。2009年,王立浩等^[6]用 AFLP 分子标记技术开发了1对与 N 基因紧密连锁的分子标记 SCAR_315,该标记与 N 基因相距 6.3 cM,但没有进行基因定位。2007年, C. Djian-Caporalino 等^[7]对 PM687、PM217 及 PM702 共3份材料中的6个 Me 基因 ($Me1$ 、 $Me3$ 、 $Me4$ 、 $Me7$ 、 $Mech1$ 和 $Mech2$) 进行等位性测试并用 BSA-AFLP 法对其进行精细定位。结果表明:这些基因各不相同但连锁,重组率在 0.02~0.18 之间。用 CarthaGene 软件比较作图显示,6个基因在 P9 染色体上 28 cM 的间距内成簇排列。

为了寻找新的抗源和抗病基因,本研究对90多份辣椒材料进行抗性鉴定,从中筛选出一份在常温和高温下对南方根结线虫具有稳定抗性的辣椒自交系 09C649,并用 09C649 与感病自交系 09C108 杂交的 F_2 群体对 09C649 中的抗南方根结线虫基因进行定位,为该基因的克隆及分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 辣椒群体及其抗病性鉴定

用 09C649 作抗病亲本,与感病自交系 09C108 杂交并构建 F_2 群体。将抗病亲本、感病亲本各 30 株, F_2 单株 225 株种植于中国农业大学科学园温室中。

试验所用南方根结线虫来源于中国农业大学植病系。用感病番茄品种农大1号进行繁殖。接种前,从感病番茄根部挑取卵块,并将其置于 28 °C 培养箱中,使其孵化成二龄幼虫。

辣椒植株定植后1周(4~5片叶时)进行接种。在植株根附近插2个深2cm左右的小孔,将南方根

结线虫二龄幼虫悬浮液接于孔中,每株3000条幼虫。接种6周后进行抗性鉴定。统计每株根结数及卵块数,分级标准为:0级为无根结或卵块;1级为1~2个根结或卵块;2级为3~10个根结或卵块;3级为11~30个根结或卵块;4级为31~100个根结或卵块;5级为100个以上根结或卵块。级数小于或等于2为抗病,大于2为感病^[6]。

1.2 与 09C649 中抗南方根结线虫基因连锁标记的筛选

用 CTAB 法,取辣椒幼嫩叶片提取植物基因组总 DNA。采用分离体分组混合分析法(BSA法),根据抗病性鉴定结果,随机选取10株抗病单株及10株感病单株,每株取等量的 DNA 分别混合成抗、感基因池。用 236 对 SSR 引物(其中 99 对来源于 Yasuhiro Minamiyama 等^[8];76 对来源于 J. M. Lee 等^[9];61 对来源于 SGN (<http://solgenomics.net/>))及与 N 基因连锁的标记 SCAR_315^[6] 和与 $Me1$ 、 $Me3$ 、 $Me7$ 基因连锁的标记 SSCP_B322^[7],在亲本及抗、感基因池中筛选具有多态性的分子标记。并根据与抗病基因连锁的分子标记的位置信息寻找更多的分子标记,用以定位抗病基因。

SSR 扩增采用 20 μ L 反应体系,包括 25 ng DNA,1 \times 缓冲液,0.1 mmol/L dNTP,0.1 μ mol/L 引物,0.5 U *Taq* 酶。反应程序参照 Yasuhiro Minamiyama 等^[8],扩增产物用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染检测。

1.3 09C649 中抗南方根结线虫基因的定位

用在亲本及抗、感基因池中表现多态性的分子标记检测 F_2 单株的基因型,并结合 F_2 单株的抗性鉴定结果,利用 JoinMap4.0 软件分析分子标记与抗病基因的连锁关系,并进行连锁图谱的构建。

1.4 分子标记辅助选择

用 1.1 中所描述的方法对 37 份辣椒材料进行南方根结线虫的接种和鉴定,并根据基因定位的结果,用与 09C649 中抗南方根结线虫基因紧密连锁的分子标记进行辅助选择。

2 结果与分析

2.1 抗性鉴定及遗传分析

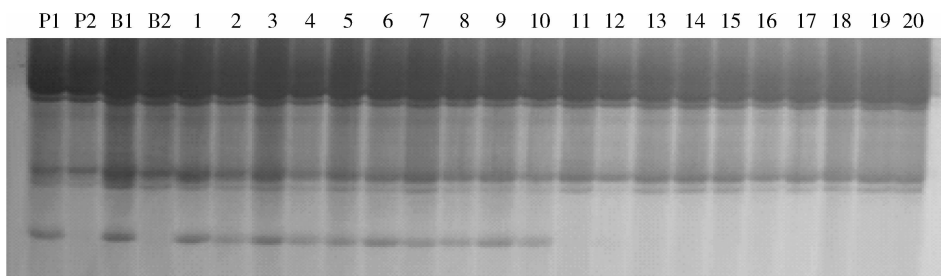
30 株抗病亲本均表现为抗病,病情指数为 0;30 株感病亲本均表现为感病,病情指数为 80;225 株 F_2 单株中,抗病单株为 173 株,感病单株为 52 株, χ^2 测验结果($\chi^2=0.43 < \chi_{0.05,1}^2$)表明,抗、感单株分

离比符合 3 : 1 的孟德尔遗传分离比的期望值,说明辣椒 09C649 对南方根结线虫的抗性由一对显性基因控制,将其暂命名为 *Me8*。

2.2 与 *Me8* 基因连锁标记的筛选

236 对 SSR 引物中,仅一对引物 Hpms 2-24 在抗、感基因池之间表现多态性,标记 SCAR_315 和

SSCP_B322 在亲本及抗、感基因池中均表现多态性。用构建抗、感基因池的 20 个单株验证 Hpms 2-24、SCAR_315 及 SSCP_B322,结果显示 Hpms 2-24、SCAR_315 及 SSCP_B322 均与 *Me8* 基因具有连锁关系。其中 SSCP_B322 在本研究中表现为显性标记(图 1)。



P1 为抗病亲本;P2 为感病亲本;B1 为抗病基因池;B2 为感病基因池;
1~10 为抗病单株;11~20 为感病单株。

图 1 SSCP_B322 在亲本、基因池及基因池单株上的扩增结果

Fig. 1 The amplification result of primer SSCP_B322 in parents, gene bulks and F_2 individuals

根据 Yasuhiro Minamiyama 等^[8]及 C. Djian-Caporalino 等^[7], Hpms 2-24 和 SSCP_B322 均位于辣椒第 9 染色体上,故在辣椒第 9 染色体上挑选了

8 对 EST-SSR 标记(Byung-Dong Kim 等^[9-11])及 2 对 COSII 标记(SGN),用以筛选在亲本及基因池中具有多样性的分子标记(表 1)。

表 1 用于定位 09C649 中抗南方根结线虫基因的辣椒第 9 染色体上的分子标记

Table 1 Markers on the P9 chromosome that used to locate the southern root-knot nematode resistance gene in 09C649

引物名称	引物类型	PCR 产物 大小/bp	正向引物序列	反向引物序列
HpmsE128	EST-SSR	226	TGGATCCCAAAAGACTCAGAACA	TATTTCCCTCAGTCGAGGTCGT
HpmsE054	EST-SSR	219	GCCACCCCTCACCTCTCTCTCT	GTTGTTCGCTGGGCTCTTTCTC
HpmsE025	EST-SSR	213	TGAGCATCCCGTTATCTCAAATCA	CCCAATTCTTCAGGCAATCTCC
HpmsE150	EST-SSR	219	CCCTCTCCCCGACTCTCTCTT	AAGCCAATGACTGCATGACCAC
HpmsE024	EST-SSR	212	CGAGCCTAACCCCAAATCAG	AAGGGAACGGAGGGACGACTAC
HpmsE051	EST-SSR	262	TGGCCAGCTTACACAGAGGTA	TGTCACAATATTGGAGGCCAGAA
HpmsE143	EST-SSR	107	CCATTCAGCTAGGGTTCAGTCCA	CGACCAAATCGAATCTTCGTGA
HpmsE084	EST-SSR	220	GCCAGAAGATCCATACTCTCATCA	GGAATGAGCAAAAACAAGAGTCC
C2At5g57970	CAPS	800	TCAAAGAAAAGATGTGCTGGGTG	TGCCCCGCAAAGGACAAGGAG
C2At4g16710	CAPS	1200	AGTTTTTGTGACCGTGGGGACAAC	TGAACCTGCGTGGCTGATAACAAG

在挑选的 10 对分子标记中,2 对 EST-SSR 标记,HpmsE051 及 HpmsE143 在抗、感基因池之间表现多态性,且用构建基因池的单株验证表明其均与 *Me8* 基因存在连锁关系。2 对 COSII 标记扩增

片段过长,在抗、感亲本上难以检测到多态性。故将抗、感亲本上的扩增产物测序,利用 Primer3(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)在具有核苷酸差异的位置附近重新设计引物,使扩增片段缩短到 100~

300 bp, 并利用 CAPS Designer (http://solgenomics.net/tools/caps_designer/caps_input.pl) 及 dCAPS Finder (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>) 设计 CAPS 或 dCAPS 标记, 得到的标记 COS970 及 COS710 (表 2) 在抗、感基因池之间均表现多态性, 用构建基因池的单株验证表明 2 对标记

均与 *Me8* 基因存在连锁关系。

表 2 2 对 COSII 标记转换成的 CAPS 或 dCAPS 标记

Table 2 CAPS/dCAPS markers converted from the 2 COSII markers

引物名称	引物类型	PCR 产物大小/bp	原始引物	引物序列	酶切
COS970	dCAPS	140	C2At5g57970	F AGAATGGGGAGTTCAGTCCATGT R TGCCCCGCAAAGGACAAGGAG	Taq I
COS710	CAPS	244	C2At4g16710	F CCCTCGTTAAGGAAAATATAGA R ACTTCATTAAGCAACTCAACCT	Taq I

均与 *Me8* 基因存在连锁关系。

2.3 *Me8* 基因的定位

用上述与 *Me8* 基因连锁的 7 对分子标记检测 F_2 单株的基因型, 并结合 F_2 单株的抗性鉴定结果, 利用 JoinMap4.0 软件进行连锁分析, 结果显示这 7 对分子标记与 *Me8* 基因位于同一连锁群上 (图 2)。 *Me8* 基因位于 COS710 和 COS970 之间, 分别相距 0.1 和 3.3 cM, 与 SSCP_B322 共分离, 与 SCAR_315 相距 1.3 cM。 Hpms 2-24、HpmsE051 及 HpmsE143 与 *Me8* 基因距离相对较远, 分别为 37.9、33.3 和 5.8 cM。

2.4 分子标记辅助选择

对 36 份辣椒材料的抗性鉴定结果表明, 37 份辣椒材料中有 10 份材料对南方根结线虫表现抗性, 27 份材料表现为感病 (表 3)。 用与 *Me8* 紧密连锁的标记 SCAR_315 检测 37 份辣椒材料的标记基因型, 10 份抗病材料的带型均为 A 或 H, 即与抗病亲本 09C649 一致的带型或杂合带型, 27 份感病材料的带型均为 B, 即与感病亲本 09C108 一致的带型, 仅材料 58 抗性鉴定结果为感病, 而标记 SCAR_315

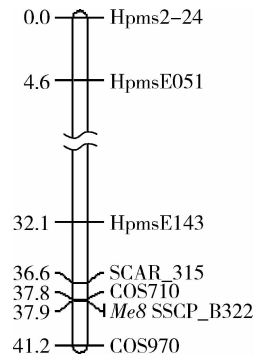


图 2 09C649 中抗南方根结线虫基因 *Me8* 在辣椒第 9 染色体上的遗传连锁图

Fig. 2 The linkage map of the southern root-knot nematode resistance gene *Me8* in 09C649 on pepper chromosome 9

的带型为 A, 这可能是因为该材料在抗病基因和标记 SCAR_315 之间发生了交换所致。 标记基因型鉴定结果与抗性鉴定结果具有较高的一致性, 表明利用标记 SCAR_315 可有效地对抗南方根结线虫这一性状进行辅助选择。

表 3 37 份辣椒材料的抗病性鉴定及分子标记检测

Table 3 Resistance tests and molecular identification of the 37 pepper lines

编号	果形	抗病性	SCAR_315	编号	果形	抗病性	SCAR_315
22	长羊角	R	H	62	灯笼形甜椒	S	B
43	灯笼形甜椒	R	H	64	灯笼形甜椒	S	B
103	灯笼形微辣	R	A	68	灯笼形甜椒	S	B
104	灯笼形微辣	R	A	106	灯笼形微辣	S	B
105	灯笼形微辣	R	H	117	羊角	S	B

续表

编号	果形	抗病性	SCAR_315	编号	果形	抗病性	SCAR_315
144	羊角	R	H	123	羊角	S	B
259	线椒	R	H	135	羊角	S	B
273	线椒	R	H	137	羊角	S	B
347	朝天椒	R	A	190	牛角	S	B
372	线椒	R	A	251	小羊角	S	B
32	灯笼形甜椒	S	B	252	球形	S	B
40	灯笼形甜椒	S	B	254	线椒	S	B
50	灯笼形甜椒	S	B	270	羊角	S	B
52	灯笼形甜椒	S	B	275	线椒	S	B
53	灯笼形甜椒	S	B	288	线椒	S	B
55	灯笼形甜椒	S	B	327	线椒	S	B
58	灯笼形甜椒	S	A	350	朝天椒	S	B
59	灯笼形甜椒	S	B	370	羊角	S	B
61	灯笼形甜椒	S	B				

3 讨论

N 基因是辣椒上最早被发现的抗南方根结线虫基因,但却一直未被定位。本试验将与 *N* 基因连锁的分子标记 SCAR_315 定位于辣椒第 9 染色体上,与分子标记 COS710 相距 1.2 cM,由此可知,*N* 基因也位于辣椒第 9 染色体上,与分子标记 COS710 紧密连锁。这是首次实现对 *N* 基因的定位。

在 C. Djian-Caporalino 等^[7]的研究中,SSCP_B322 为共显性标记,但在本研究中,由于所用的感病亲本不同,SSCP_B322 在本研究中的感病亲本上未扩增出相应的差异带,故 SSCP_B322 表现为显性标记。根据定位结果,SSCP_B322 与 *Me8* 共分离,但本试验分离群体较小,有待扩大群体进一步筛选,从而检测到交换事件,获得更加精确的标记连锁距离。

SSCP_B322 与 *Me8* 基因共分离,SCAR_315 也与 *Me8* 基因紧密连锁,相距 1.3 cM。据此可推测 *Me8* 基因与 *N* 及 *Me1*、*Me3* 和 *Me7* 基因连锁,也可能与其中的某个基因为同一个基因。根据 C. Djian-Caporalino 等^[7]的结果,SSCP_B322 与 *Me1*、*Me3* 和 *Me7* 的距离分别为 4.2、2.7 和 9.4 cM,而在本研究中,SSCP_B322 与 SCAR_315 相距 1.3 cM,与 *Me8* 基因共分离,但由于 2 个图谱所用的作图群体不同,不能由此确定 *Me1*、*Me3*、*Me7* 与 *N* 基因及

Me8 基因之间的关系。Judy A. Thies 等^[12]用 HDA 149(含 *Me3* 基因)×‘Charleston Belle’(含 *N* 基因)及 HDA 149 ×‘Carolina Wonder’的 F₂ 群体对 *Me3* 基因及 *N* 基因进行等位性验证,结果表明二者为非等位基因。但 *N* 基因与 *Me1*、*Me7* 基因的关系目前还未有人研究。要验证 *N* 基因与 *Me1*、*Me7* 基因以及 *Me8* 与 *N*、*Me1*、*Me3*、*Me7* 基因之间的关系还需进行等位性测定才能确定,所以把 09C649 中的抗南方根结线虫基因暂命名为 *Me8*。

对 *Me8* 基因的定位为下一步的基因克隆奠定了基础,同时在基因定位过程中筛选出的与抗南方根结线虫基因连锁的分子标记还可应用于辅助育种工作。有效的分子标记辅助育种要求分子标记与目标基因紧密连锁,它们之间的遗传距离越小,辅助选择的准确率越高^[13]。郑康乐等^[14]认为用于 MAS 的分子标记与目标基因的遗传距离最好小于 5.0 cM。本研究中 COS710、COS970、SCAR_315 和 SSCP_B322 分别与 *Me8* 基因相距 0.1、3.3、1.3 和 0 cM,均可有效地应用于对 *Me8* 基因的辅助选择中,且由于 *N*、*Me1*、*Me3*、*Me7* 基因也都位于这一染色体区域,因此这 4 个分子标记也可同时运用于对 *N*、*Me1*、*Me3* 和 *Me7* 基因的辅助选择中,从而实现目前已发现的所有抗南方根结线虫基因的辅助选择。4 个标记中 SSCP_B322 为显性标记,无法区分

出杂合和纯合的抗病基因,故应用范围有一定的限制。COS710、COS970 和 SCAR_315 均为共显性标记,可有效地区分出杂合和纯合的抗病基因。其中 SCAR_315 需采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,工作量较大;而 COS710、COS970 只需采用琼脂糖凝胶电泳技术,工作量较小,但由于要使用酶切技术,费用较高。育种时可根据不同的需要选择合适的分子标记应用于辅助选择。

参 考 文 献

- [1] Birgit S, Wolfgang B, Helen B. Molecular genetic classification of central european meloidogyne chitwoodi and *M. fallax* populations[J]. Nachrichtenbl Deut Pflanzenschutz, 1998, 50 (12):310-317
- [2] 赵鸿,彭德良,朱建兰. 根结线虫的研究现状[J]. 植物保护, 2003, 29(6):6-9
- [3] Hare W W. Inheritance of resistance to root-knot nematodes in pepper[J]. Phytopathology, 1957, 47:455-459
- [4] Hendy H, Pochard E, Dalmasso A. Transmission héréditaire de la résistance aux nématodes *Meloidogyne Chitwood* (Tylenchida) portée par deux lignées de *Capsicum Annuum* L. :étude de descendances homozygotes issues d'androgenèse [J]. Agronomie, 1985, 5:93-100
- [5] Thies J A, Fery R L. Modified expression of the *N* gene for southern root-knot nematode resistance in pepper at high soil temperatures [J]. Journal of the American Society of Horticultural Science, 1998, 123:1012-1015
- [6] Wang L H, Gu X H, Hua M Y, et al. A SCAR marker linked to the *N* gene for resistance to root-knot nematodes[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 122:318-322
- [7] Djian-Caporalino C, Fazari A, Arguel M, et al. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 114(3):473-486
- [8] Minamiyama Y, Tsuru M, Hirai M. An SSR-based linkage map of *Capsicum annuum*[J]. Mol Breeding, 2006, 18:157-169
- [9] Lee J M, Nahm S H, Kim Y M, et al. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108:619-627
- [10] Yi G, Lee J M, Lee S, et al. Exploitation of pepper EST-SSRs and an SSR-based linkage map[J]. Theor Appl Genet, 2006, 114:113-130
- [11] Lee H R, Bae I H, Park S W, et al. Construction of an integrated pepper map using RFLP, SSR, CAPS, AFLP, WRKY, rRAMP, and BAC end sequences[J]. Mol Cells, 2008, 27:21-37
- [12] Thies J A, Ariss J J. Comparison between the *N* and *Me3* genes conferring resistance to the root-knot nematode (*Meloidogyne incognita*) in genetically different pepper lines (*Capsicum annuum*) [J]. European Journal of Plant Pathology, 2009, 125: 545-550
- [13] 曹士亮. 分子标记辅助选择在玉米育种中的应用进展[J]. 作物杂志, 2008(6):107-109
- [14] 郑康乐, 黄宁. 标记辅助选择在水稻改良中的应用前景[J]. 遗传, 1997, 19(2):40-44

责任编辑: 王燕华