

李灵慧, 吴然然, 陈景斌, 等. 基于 PARMS 技术的绿豆抗叶斑病基因 *VrTAF5* 分子标记的开发[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(6): 1386-1392.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.06.004

## 基于 PARMS 技术的绿豆抗叶斑病基因 *VrTAF5* 分子标记的开发

李灵慧<sup>1,2</sup>, 吴然然<sup>2</sup>, 陈景斌<sup>2</sup>, 崔晓艳<sup>2</sup>, 袁星星<sup>2</sup>, 朱月林<sup>1</sup>, 陈新<sup>2</sup>

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 叶斑病是绿豆生产上主要的真菌性病害, 利用抗性品种是防治该病害最经济、安全、有效的途径。为筛选抗病资源, 根据抗性基因 *VrTAF5* 的突变位点, 利用五引物扩增受阻突变体系 (Penta-primer amplification refractory mutation system, PARMS) 开发分子标记。并利用抗病性具有差异的 164 份绿豆资源对所开发的分子标记的可靠性进行检验和评价。结果表明, *VrTAF5-1517* 分子标记在 7 个分子标记中的检出率最高, 基因分型为 AA、AC、CC, 可以有效区分基因碱基序列的 SNP 差异。根据叶斑病抗性评价结果, 该标记对抗病材料的选择效率为 75.00%、感病材料的选择效率为 93.42%。*VrTAF5-1517* 分子标记对抗病资源中检出抗病基因型的比例、对高感和感病资源中检出感病基因型比例均为 100%, 说明本研究开发的分子标记可用于绿豆抗叶斑病分子标记辅助育种。

**关键词:** 绿豆; 叶斑病; *VrTAF5* 基因; SNP 分子标记; PARMS 技术

**中图分类号:** S522.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)06-1386-07

## Development of molecular markers of mung bean leaf spot disease resistance gene *VrTAF5* based on PARMS technology

LI Ling-hui<sup>1,2</sup>, WU Ran-ran<sup>2</sup>, CHEN Jing-bin<sup>2</sup>, CUI Xiao-yan<sup>2</sup>, YUAN Xing-xing<sup>2</sup>, ZHU Yue-lin<sup>1</sup>, CHEN Xin<sup>2</sup>

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** *Cercospora* leaf spot (CLS) disease is the main fungal disease in mung bean production. Using resistant varieties is the most economical, safest and effective way to control CLS disease. For selection of disease-resistant resources, molecular markers were developed based on the mutation sites of the resistance gene *VrTAF5* by penta-primer amplification refractory mutation system (PARMS) technology. In addition, 164 mung bean resources with different disease resistance were used to test and evaluate the reliability of the developed molecular markers. The results showed that the detection rate of *VrTAF5-1517* was the highest among the seven molecular markers, and the genotypes were AA, AC and CC. Moreover, SNP differences in gene base sequences could be effectively distinguished. According to the evaluation of leaf spot resistance, the selection efficiency of *VrTAF5-1517* for resistant and susceptible accessions was 75% and 93.42%, respectively. The proportions of resistant genotypes detected in resistant resources and susceptible genotypes detected in highly susceptible and susceptible resources by *VrTAF5-*

收稿日期: 2020-03-25

**基金项目:** 国家重点研发计划项目 (2019YFD1001301、2019YFD100-1300); 国家食用豆产业技术体系生物防治与综合防控岗位科学家项目 (CARS-08-G15); 江苏特粮特经产业技术体系集成创新中心项目 [JATS(2019)399]; 江苏高校优势学科建设工程资助项目

**作者简介:** 李灵慧 (1995-), 男, 山东德州人, 硕士研究生, 从事植物分子育种研究。 (E-mail) 2582355776@qq.com

**通讯作者:** 朱月林, (E-mail) ylzhu@njau.edu.cn; 陈新, (E-mail) cx@jaas.ac.cn

*TAF5-1517* was the highest among the seven molecular markers, and the genotypes were AA, AC and CC. Moreover, SNP differences in gene base sequences could be effectively distinguished. According to the evaluation of leaf spot resistance, the selection efficiency of *VrTAF5-1517* for resistant and susceptible accessions was 75% and 93.42%, respectively. The proportions of resistant genotypes detected in resistant resources and susceptible genotypes detected in highly susceptible and susceptible resources by *VrTAF5-*

1517 were 100%, suggesting that the molecular markers developed in this study could be used in molecular marker-assisted breeding for resistance to CLS disease of mung bean.

**Key words:** mung bean; *Cercospora* leaf spot disease; *VrTAF5* gene; SNP molecular marker; PARMS technology

叶斑病是中国绿豆生产上的主要真菌性病害,其病原菌为变灰尾孢菌(*Cercosporacanesceus* Ell. et Martin),为害植株的叶片,以开花结荚期为害严重,可导致叶片早落、豆荚数目减少及种子变小<sup>[1-3]</sup>。该病害在高温高湿环境下发生与传播迅速,造成严重的产量损失,绿豆减产可超过 50%<sup>[4]</sup>。

叶斑病抗性品种能够有效减轻病害的发生<sup>[5]</sup>,但抗病育种的效率受到抗病种质资源较少的制约。Hartman 等对近 4 000 份绿豆资源进行抗病性鉴定,得到的抗叶斑病资源不足 4%<sup>[6]</sup>,李怡琳和李淑英对 200 份绿豆资源进行田间抗病性鉴定,表现抗性的资源仅占 6%<sup>[7]</sup>。由于绿豆叶斑病的抗病性鉴定费时费力,田间鉴定还易受到环境的影响,因此相较于表型鉴定,分子标记具有准确、经济、快速的优势。

抗性基因的发掘为分子标记的开发提供了理论依据。南海洋等通过大豆胞囊线虫病抗性候选基因 *rhg1* 开发 InDel 标记,对抗病资源与感病资源的选择效率分别为 88.2% 和 100.0%<sup>[8]</sup>。在绿豆叶斑病抗性基因的研究中,Chankaew 等利用抗病品种 V4718 与感病品种 KPS1 杂交,在所得的 F<sub>2</sub> 与 BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 群体中发现了 1 个主效 QTL——*qCLS*,可以解释 65.5%~80.5% 的抗病表型变异<sup>[9]</sup>。在本实验室的前期工作中,Yundaeng 等通过 F<sub>2</sub> 群体与 BC<sub>8</sub>F<sub>2</sub> 群体将该 QTL 精细定位到绿豆 6 号染色体上,候选基因 *VrTAF5* [编码 TATA 结合蛋白相关因子 5 (TAF5),注释基因 ID 为 LOC106765332],是转录起始因子 IID (Transcription initiation factor IID, TFIID) 和 Spt-Ada-Gcn5 乙酰转移酶 (SAGA) 复合物的亚基<sup>[10]</sup>。通过抗病亲本 V4718 与感病亲本 KPS1 的 *VrTAF5* 基因碱基序列比对发现,这两份材料在外显子区域存在 7 个单核苷酸的突变<sup>[10]</sup>。五引物扩增受阻突变体系 (Penta-primer amplification refractory mutation system, PARMS) 是一种新型 SNP 分型技术,属于第三代分子标记<sup>[11]</sup>,具有准确性高、成本低廉、高通量等优势,近年来在农学和医学领域被广泛应用<sup>[12-13]</sup>。

目前,将 PARMS 技术应用于绿豆抗叶斑病资源筛选的分子标记开发尚未见报道。本研究中,基

于定位亲本 V4718 和 KPS1 在 *VrTAF5* 基因外显子上 7 个单核苷酸的差异,利用 PARMS 技术开发分子标记,并对 164 份绿豆种质资源进行抗性检测,以期绿豆抗叶斑病分子标记辅助育种提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试的绿豆 [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] 资源共 164 份,均来自江苏省农业科学院经济作物研究所,其中 V4718 与 KPS1 分别作为抗病对照和感病对照。接种所用的变灰尾孢菌为江苏省农业科学院经济作物研究所保存。

### 1.2 接种方法及抗病性评价标准

接种于 2020 年 6 月至 10 月在江苏省农业科学院光温可控的温室进行,采用菌丝块微伤法接种复叶期绿豆植株,接种后保湿 36 h,之后于温度 25 ℃、湿度 60% 的环境中正常生长,接种 15 d 后统计发病情况。每份绿豆资源 3 次重复,每个重复 6 株,抗感评价方法参考刘振兴等的方法<sup>[14]</sup>。病情分级标准为:0 级:叶片上无病斑;1 级:叶片上仅有小点状病斑,病斑面积占叶面积不足 2%;3 级:病斑直径 1.0~2.0 mm,无褪绿晕圈,病斑面积占叶面积 2%~25%;5 级:病斑较大,直径 2.1~5.0 mm,有褪绿晕圈,病斑面积占叶面积 26%~50%;7 级:病斑直径 5.1 mm 以上,病斑面积占叶面积 51%~75%;9 级:病斑相连成片,病斑面积占叶面积 76% 以上,严重落叶。根据病情指数划分抗病等级:高抗 (HR):病情指数 0~2.0;抗病 (R):病情指数 2.1~20.0;中抗 (MR):病情指数 20.1~40.0;中感 (MS):病情指数 40.1~60.0;感病 (S):病情指数 60.1~80.0;高感 (HS):病情指数 80.1~100.0。

病情指数 =  $\sum (\text{各级病株数} \times \text{该病级值}) / (\text{调查总株数} \times \text{最高病级值}) \times 100$

### 1.3 绿豆 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法提取 164 份绿豆资源的 DNA,利用 KAIAO 超微量分光光度计检测 DNA 浓度和质量, DNA 于 -20 ℃ 保存备用。

### 1.4 PARMS 引物设计与反应

利用 Primer 5.0 软件根据 7 个 SNP 位点的侧翼

序列信息设计 PARMS 引物,采用高通量 SNP 检测平台 GeneMatrix 进行样品检测,两次重复。PCR 反应体系为 10.00  $\mu\text{l}$ :5.00  $\mu\text{l}$  2 $\times$ PARMSmaster mix, Allele X primer (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 与 Allele Y primer (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 0.15  $\mu\text{l}$ , 0.40  $\mu\text{l}$  Common primer (10  $\mu\text{mol/L}$ ), 1.00  $\mu\text{l}$  模板 DNA (50 ng/ $\mu\text{l}$ ), 3.30  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O。PCR 反应扩增程序:94  $^{\circ}\text{C}$  热激活 15 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s, 57~65  $^{\circ}\text{C}$  退火和延伸 1 min, 10 个循环; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s, 57  $^{\circ}\text{C}$  退火和延伸 1 min, 30 个循环。使用 TECAN infinite M1000 酶标仪读取荧光信号,在软件 Snpdecoder (<http://www.snpway.com/snpdecoder/>) 中解析转换荧光信号,得到清晰直观的分型图,并根据颜色不同,输出基因型结果。

### 1.5 PARMS 标记的验证

选择 4 份绿豆材料对 PARMS 分型结果进行测序验证,PCR 扩增体系为 50  $\mu\text{l}$ :25  $\mu\text{l}$  2 $\times$ Phanta Max Buffer, 1  $\mu\text{l}$  dNTP Mix, 正、反向引物各 2  $\mu\text{l}$ , 1  $\mu\text{l}$  模板 DNA, 1  $\mu\text{l}$  Phanta Max Super-Fidelity DNA Pol-

ymerase, 18  $\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O。反应程序:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 15 s, 56~60  $^{\circ}\text{C}$  退火 15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  终延伸 5 min, 35 个循环。扩增产物切胶回收,送至上海生工生物工程有限公司南京部测序(测序引物参照参考文献[10])。

### 1.6 数据分析

采用 Excel 2019 进行数据分析与制表作图,采用 SPSS 22.0 进行聚类分析与方差分析,Chromas2 输出测序峰图,BioXM 2.6 进行序列拼接与比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 VrTAF5 分子标记开发

通过抗病对照 V4718 和感病对照 KPS1 中 VrTAF5 基因碱基序列比对,对得到的 7 个 SNP 及侧翼序列设计了 7 组 PARMS 引物(表 1)。每组引物包含 2 条携带不同荧光信号的等位基因特异引物,1 条通用反向引物。抗病对照 V4718 与感病对照 KPS1 均可被 7 个标记明确区分,表明标记开发成功。

表 1 PARMS 标记引物序列

Table 1 The primer sequences of PARMS markers

引物	序列(5'→3')
VrTAF5-1517	F1:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGTTCTGCTAGATACCACGATGGA F2:GAAGGTGCGAGTCAACGGATTTTCTGCTAGATACCACGATGGC R:GACCTATATGCCCATGATCTCAG
VrTAF5-1739	F1:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAATTACTGCGTGTGCTTTATCCA F2:GAAGGTGCGAGTCAACGGATTATTACTGCGTGTGCTTTATCCG R:CCACAAGATCCATGAAGCAATG
VrTAF5-4932	F1:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCGATTTTAATAACAGATGTACCTTAC F2:GAAGGTGCGAGTCAACGGATTGCGATTTTAATAACAGATGTACCTTAG R:GAAGGCCGAAGGCAAAGAGG
VrTAF5-9548	F1:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTAGACAAAATCATACTTCTATGACCAATA F2:GAAGGTGCGAGTCAACGGATTGACAAAATCATACTTCTATGACCAATG R:AACTACATTGCTACTGGCTCCAG
VrTAF5-9884	F1:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTCTTGAACCTTTATACCCGTAGTC F2:GAAGGTGCGAGTCAACGGATTCTTGAACCTTTATACCCGTAGTT R:GATCTGCTGATTGCACCGTC
VrTAF5-10010	F1:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTTTTAATGATCTGAGTCTGTTAGCATT F2:GAAGGTGCGAGTCAACGGATTTTAAATGATCTGAGTCTGTTAGCATT R:TCTTTAGGAATTTCTTTTCTAATGG
VrTAF5-10228	F1:GAAGGTGACCAAGTTCATGCTGCCACTTCAAAATTTGTTGACATAC F2:GAAGGTGCGAGTCAACGGATTGCCACTTCAAAATTTGTTGACATAT R:CAGTTTCTCGCAGGAATCTTC

2.2 *VrTAF5* 分子标记的通用性

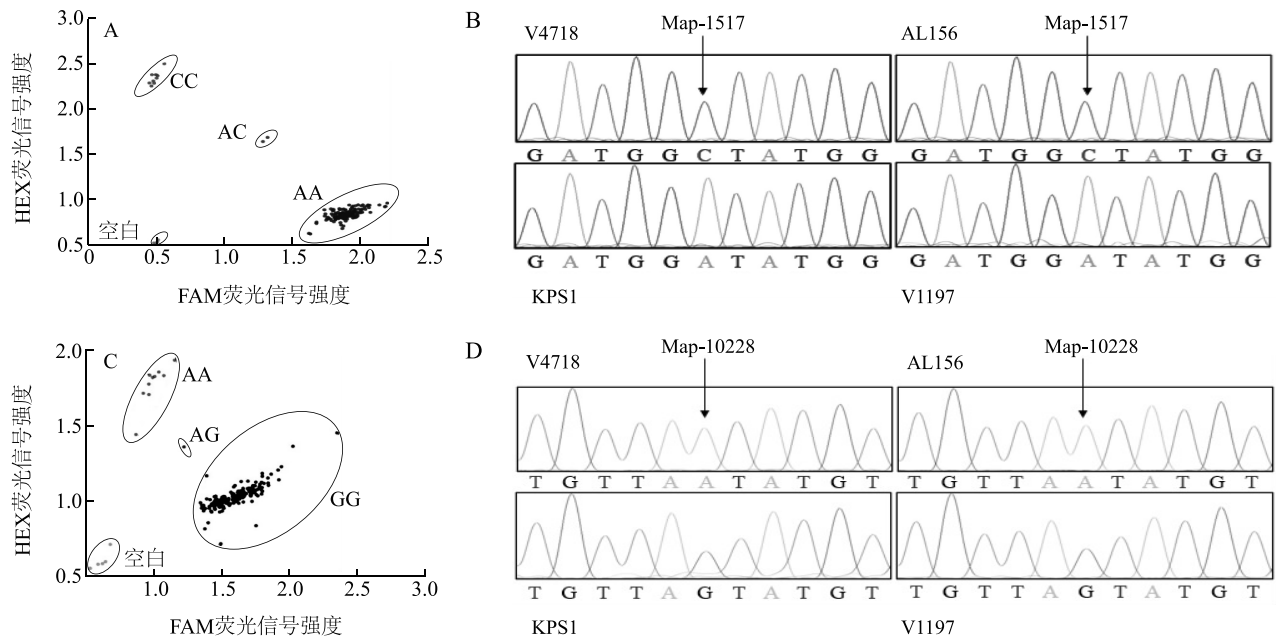
为验证分子标记的通用性与准确性,将开发的标记对 164 份绿豆资源进行基因分型,并通过测序方法验证其可靠性。表 2 结果显示,在供试绿豆资源中 7 个分子标记均能有效区分对应的 SNP 差异。*VrTAF5-1517* 分型结果:10 份绿豆资源为抗病基因型,2 份为杂合基因型,152 份为感病基因型;*VrTAF5-10228* 分型结果:10 份绿豆资源为抗病基因型,1 份为杂合基因型,153 份为感病基因型;*VrTAF5-9884* 分型结果:152 份感病基因型,1 份杂合基因型,11 份抗病基因型。*VrTAF5-9548* 与 *VrTAF5-*

*10010* 的分型结果:11 份为抗病基因型,151 份为感病基因型,2 份杂合基因型。而在 *VrTAF5-1739* 和 *VrTAF5-4932* 分型结果中,只有抗性对照 V4718 显示出与其他资源不同的基因分型,结合抗感情况,这两个标记的分型效率极低。同时取 10 份绿豆材料测序验证 *VrTAF5-1517* 分子标记的特异性及准确性,取 4 份材料测序验证剩余 6 个分子标记,测序结果与分型结果完全吻合,说明 7 个分子标记的分型结果可靠。以 *VrTAF5-1517* 和 *VrTAF5-10228* 分子标记为例,基因分型图与部分品种的测序峰图见图 1。

表 2 7 个分子标记的分型结果

Table 2 The genotyping results of seven molecular markers

基因分型	<i>VrTAF5-1517</i>	<i>VrTAF5-1739</i>	<i>VrTAF5-4932</i>	<i>VrTAF5-9548</i>	<i>VrTAF5-9884</i>	<i>VrTAF5-10010</i>	<i>VrTAF5-10228</i>
抗病基因型资源数(核苷酸类型)	10(CC)	1(GG)	1(CC)	11(CC)	11(AA)	11(GG)	10(AA)
杂合基因型资源数(核苷酸类型)	2(AC)	0	0	2(TC)	1(GA)	2(AG)	1(GA)
感病基因型资源数(核苷酸类型)	152(AA)	163(AA)	163(GG)	151(TT)	152(GG)	151(AA)	153(GG)
合计	164	164	164	164	164	164	164



A: *VrTAF5-1517* 分型结果; B: *VrTAF5-1517* 测序结果; C: *VrTAF5-10228* 分型结果; D: *VrTAF5-10228* 测序结果。图内每个点表示 1 份绿豆资源。

图 1 *VrTAF5-1517* 与 *VrTAF5-10228* 分子标记分型与部分测序结果

Fig.1 Typing and partial sequencing results of *VrTAF5-1517* and *VrTAF5-10228* markers

2.3 *VrTAF5* 分子标记评价

根据 7 个分子标记基因分型结果与抗病性鉴定结果的比对,发现 *VrTAF5-1517* 分子标记最佳,可以作为

叶斑病抗性资源的筛选分子标记。*VrTAF5-10228* 分子标记次之,可作为 *VrTAF5-1517* 分子标记的补充。具体结果如表 3 所示, *VrTAF5-1517* 对抗病材料的选择效率



为 75.00%, 对感病材料的选择效率为 93.42%, 感病基因型与剩余基因型(杂合及抗病)在病情指数上存在极显著差异( $F=37.928, P<0.01$ )。从不同抗性群体的基因型来看, 抗病、中抗绿豆资源中抗病基因型的比例分别为 100.00%、37.50%, 高感、感病、中感绿豆资源中

感病基因型比例分别为 100.00%、100.00%、94.64%。*VrTAF5-10228* 对抗病材料的选择效率为 72.73%, 对感病材料的选择效率为 92.81%。以 *VrTAF5-1517* 和 *VrTAF5-10228* 分子标记为例, 它们能够准确对绿豆抗病材料(R)与高感材料(HS)进行分型(图 2)。

表 3 绿豆种质资源基因型与抗性评价

Table 3 Genotyping and resistance evaluation of mung bean germplasm resources

抗性等级	<i>VrTAF5-1517</i> 基因分型			<i>VrTAF5-10228</i> 基因分型			总计
	AA	AC	CC	GG	GA	AA	
抗病	0	0	3	0	0	3	3
中抗	10	2	4	11	1	4	16
中感	53	0	3	53	0	3	56
感病	66	0	0	66	0	0	66
高感	23	0	0	23	0	0	23
总计	152	2	10	153	1	10	164

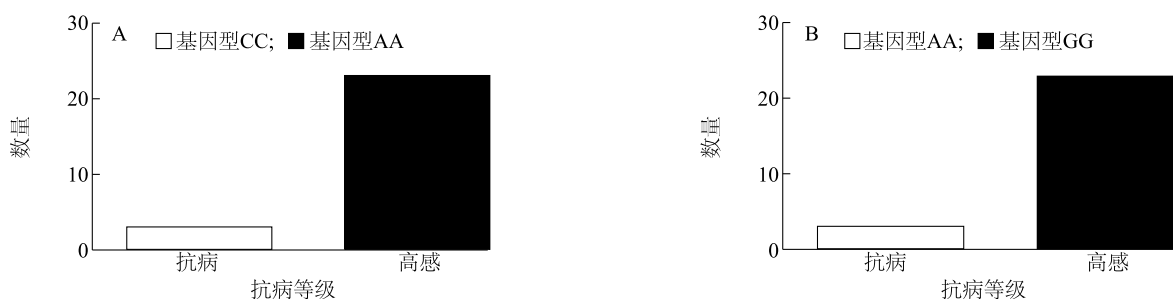


图 2 利用 *VrTAF5-1517* (A) 与 *VrTAF5-10228* (B) 分子标记检测到的不同等位变异在抗病 (R) 和高感 (HS) 绿豆材料中的分布

Fig.2 The distribution of different allelic variants detected by *VrTAF5-1517* and *VrTAF5-10228* markers in resistant (R) and highly-susceptible (HS) mung bean materials

在本实验室的前期工作中, Yundaeng 等发现在定位群体 ( $F_2$  群体与  $BC_8F_2$  群体) 内 *VrTAF5\_InDel* 标记 (F: 5'-CTCATGAAACCTGGAGAACT-3', R: 5'-CCCAGTGTACTCAGTTTGA-3') 与叶斑病抗性完全连锁<sup>[10]</sup>。在本研究中的供试材料中选取 48 份绿豆资源, 利用 *VrTAF5\_InDel* 标记进行检测, 结果显示 *VrTAF5\_InDel* 分子标记与 *VrTAF5-1517*、*VrTAF5-10228* 分子标记得到的结果完全一致(表 4、图 3), 进一步验证了所开发的分子标记的准确性。

### 3 讨论

绿豆叶斑病的主要致病菌为尾孢菌属的变灰尾孢菌<sup>[3]</sup>, 感染的最佳温度为 25~30℃<sup>[15]</sup>。同时由于变灰尾孢菌为死体营养型<sup>[16]</sup>, 需要穿过叶片表皮的物理屏障才可以引发叶斑病。故本研究在人工接

种前, 利用无菌牙签对叶片的表皮造成微伤口, 有效规避了由于不同绿豆资源的表皮硬度差异引起的表型鉴定偏差, 适用于抗病绿豆资源的筛选<sup>[17]</sup>。

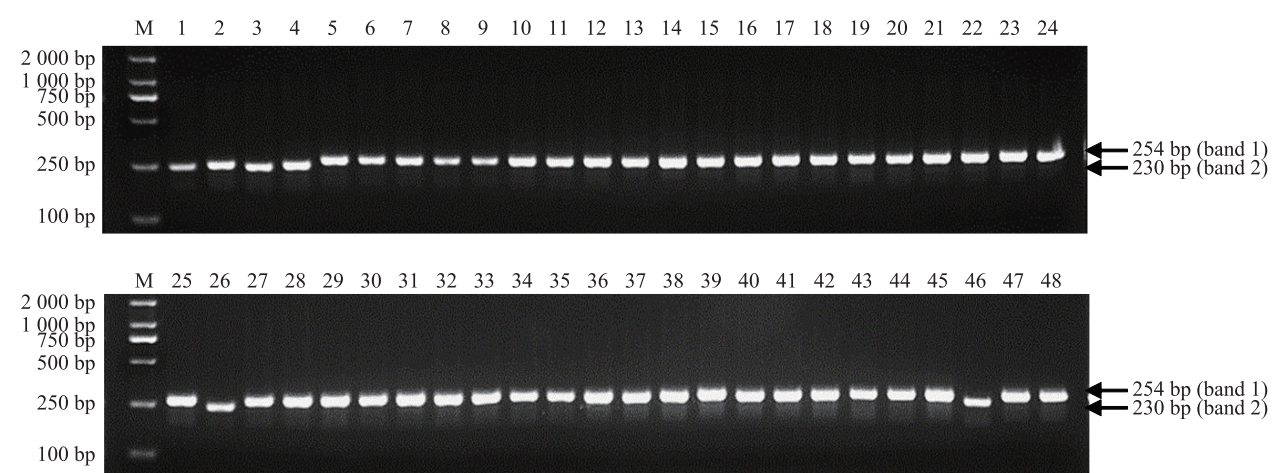
分子标记技术不仅在基因定位方面有着重要作用, 同时可以作为优良品种的选育工具<sup>[18-20]</sup>。如魏广辉等在小麦富硒基因 QTL 定位基础上开发出 AX-1 标记, 该标记显示高硒基因型在高硒材料中占比 81%<sup>[21]</sup>; 卿冬进等开发出水稻抗稻瘟病基因 *Pigm* 的分子标记, 该分子标记显示的 1 份抗病基因型材料表现为抗病, 47 份感病基因型材料中有 36 份表现为感病<sup>[22]</sup>。王文辉等开发出 1 个 SSR 标记 *Satt309*, 与抗大豆胞囊线虫病的主效基因 *rhg1* 紧密连锁, 该分子标记对抗病材料的鉴定效率达 72.5%<sup>[23]</sup>。PARMS 技术为新型的 SNP 分型技术<sup>[24]</sup>, 被广泛应用在油菜<sup>[25]</sup>、小麦<sup>[26]</sup>、水稻<sup>[27]</sup>等研

表 4 48 份绿豆资源分型结果与电泳结果的比较

Table 4 Comparison of typing results and electrophoresis results of 48 mung bean accessions

编号	绿豆资源名称	分型结果 a	分型结果 b	电泳结果	编号	绿豆资源名称	分型结果 a	分型结果 b	电泳结果
1	米脂 6 号	CC	AA	band 2	25	新育 L13015	AA	GG	band 1
2	AL156	CC	AA	band 2	26	V2272AG	CC	AA	band 2
3	JP240386	CC	AA	band 2	27	KPS1	AA	GG	band 1
4	V4718	CC	AA	band 2	28	B69	AA	GG	band 1
5	L67-1	AA	GG	band 1	29	22172	AA	GG	band 1
6	AL68	AA	GG	band 1	30	V2066BG	AA	GG	band 1
7	AL81	AA	GG	band 1	31	P24029	AA	GG	band 1
8	三峡 4 号	AA	GG	band 1	32	V1948AG	AA	GG	band 1
9	三峡 5 号	AA	GG	band 1	33	AL009	AA	GG	band 1
10	米脂绿豆	AA	GG	band 1	34	AL028	AA	GG	band 1
11	KPS2	AA	GG	band 1	35	AL152 * 1	AA	GG	band 1
12	JP78938	AA	GG	band 1	36	L158	AA	GG	band 1
13	V1586BG	AA	GG	band 1	37	AL090 * 1	AA	GG	band 1
14	中绿 8 号	AA	GG	band 1	38	AL152 * 2	AA	GG	band 1
15	B49	AA	GG	band 1	39	AL160	AA	GG	band 1
16	JP202271	AA	GG	band 1	40	AL154	AA	GG	band 1
17	V2709BG	AA	GG	band 1	41	AL158 * 1	AA	GG	band 1
18	JP229130	AA	GG	band 1	42	IS0018	AA	GG	band 1
19	JP240384	AA	GG	band 1	43	JP240342	AA	GG	band 1
20	中绿 11 号	AA	GG	band 1	44	V2007BG	AA	GG	band 1
21	通绿 918	AA	GG	band 1	45	JP98811	AA	GG	band 1
22	JP229193	AA	GG	band 1	46	V3726BG	CC	AA	band 2
23	V1188	AA	GG	band 1	47	V1476AG	AA	GG	band 1
24	V22T8AG	AA	GG	band 1	48	V4908AB	AA	GG	band 1

分型结果 a 指 *VrTAF5*-1517 分子标记分型结果,分型结果 b 指 *VrTAF5*-10228 分子标记分型结果,电泳结果见图 3。



M 表示 Marker,1-24 与 25-48 分别代表不同绿豆资源,具体绿豆资源名称见表 4。

图 3 48 份绿豆资源的 *VrTAF5*\_InDel 分子标记检测图

Fig.3 The electrophoretic band patterns detected by the *VrTAF5*\_InDel marker in 48 mung bean accessions

究中,在绿豆中应用此技术的研究鲜有报道。且绿豆叶斑病抗性基因研究难度较大,在很大程度上限制了抗绿豆叶斑病优良品种的选育。本研究开发的 *VrTAF5-1517* 分子标记为绿豆叶斑病抗性相关的高通量分子标记,从操作便捷程度和经济成本上均优于传统分子标记。在实际应用中,可以利用该标记先筛选出抗病基因型材料,再结合抗病性鉴定筛选出叶斑病抗性资源,可有效减少抗病性鉴定的工作量。值得注意的是 *VrTAF5-1517* 分型结果,152 份感病基因型的绿豆种质资源中,有 10 份绿豆资源表现为抗叶斑病,暗示了绿豆叶斑病的抗性机制非常复杂,可能存在其他抗病途径。因此,在后续研究工作中仍需进一步挖掘绿豆抗叶斑病的其他基因。

### 参考文献:

- [1] ABBAS H, IQBAL M A, KAMRAN M, et al. Evaluation of advanced mungbean germplasm against *Cercospora* leaf spot and its *in-vitro* management by different fungicides[J]. Pakistan Journal of Agricultural Research, 2020, 33(4): 872-877.
- [2] CHAND R, SINGH V, PAL C, et al. First report of a new pathogenic variant of *Cercospora canescens* on mungbean (*Vigna radiata*) from India[J]. New Disease Reports, 2012, 26: 6.
- [3] 刘昌燕,肖炎农,吴小微,等. 绿豆叶斑病原鉴定及生物学特性研究[J]. 植物保护, 2015, 41(6): 83-87.
- [4] KUMAR N, KUMAR S, PRAJAPATI S, et al. *Cercospora* leaf spot disease of green gram and its management: a review[J]. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry, 2020, 9(1): 1574-1576.
- [5] YADAV D L, PANDEY R N, JAISANI P, et al. Sources of resistance in mungbean genotypes to *Cercospora* leaf spot disease and its management[J]. African Journal of Agricultural Research, 2014, 9(41): 3111-3114.
- [6] HARTMAN G L, WANG T C, KIM D. Field evaluation of mungbeans for resistance to *Cercospora* leaf spot and powdery mildew[J]. International Journal of Pest Management, 1993, 39(4): 418-421.
- [7] 李怡琳,李淑英. 绿豆品种抗叶斑病鉴定研究[J]. 作物品种资源, 1987, 8(4): 12-14.
- [8] 南海洋,李英慧,常汝镇,等. 基于大豆胞囊线虫病抗性候选基因 *rhg1* 的 InDel 标记开发与鉴定[J]. 作物学报, 2009, 35(7): 1236-1243.
- [9] CHANKAEW S, SOMTA P, SORAJJAPINUN W, et al. Quantitative trait loci mapping of *Cercospora* leaf spot resistance in mungbean, *Vigna radiata* (L.) Wilczek[J]. Molecular Breeding, 2011, 28(2): 255-264.
- [10] YUNDAENG C, SOMTA P, CHEN J B, et al. Fine mapping of QTL conferring *Cercospora* leaf spot disease resistance in mungbean revealed *TAF5* as candidate gene for the resistance[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2020, 134(2): 701-714.
- [11] YE S, DHILLON S, KE X, et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms[J]. Nucleic Acids Research, 2001, 29(17): e88.
- [12] LIJAVETZKY D, CABEZAS J A, IBANEZ A, et al. High throughput SNP discovery and genotyping in grapevine (*Vitis vinifera* L.) by combining a re-sequencing approach and SNPlex technology[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 424.
- [13] SIMS D, SUDBERY I, ILOTT N E, et al. Sequencing depth and coverage: key considerations in genomic analyses[J]. Nature Reviews Genetics, 2014, 15(2): 121-132.
- [14] 刘振兴,周桂梅,陈健,等. 几种生物农药对绿豆叶斑病的防治效果[J]. 作物杂志, 2018, 6(187): 154-157.
- [15] WINDELS C E, LAMEY H A, HILDE D, et al. A *Cercospora* leaf spot model for sugar beet: in practice by an industry[J]. Plant Disease, 1998, 82(7): 716-726.
- [16] 张海涛. 绿豆响应变灰尾孢菌侵染的防卫酶活性变化及抗性基因表达模式分析[D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学, 2017.
- [17] 贺闽,尹俊杰,冯志明,等. 水稻稻瘟病和纹枯病抗性鉴定方法[J]. 植物学报, 2020, 55(5): 577-587.
- [18] 孙正文,黄兴奇,李维蛟,等. 分子标记技术及其在水稻基因定位上的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2011, 30(1): 78-86.
- [19] 黄其椿,卢东长城,陈东奎,等. 沃柑 SSR 分子标记筛选及其在品种鉴定上的应用[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(1): 75-79.
- [20] 田孟祥,张时龙,何友勋,等. 水稻耐低温基因 *bZIP73* 分子标记的开发与验证[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1265-1270.
- [21] 魏广辉,李执,陈强,等. 人工合成小麦 SHW-L1 高硒含量 KASP 分子标记开发及其应用[J]. 中国农业科学, 2020, 53(20): 4103-4112.
- [22] 卿冬进,刘开强,杨燕宇,等. 基于 PARMS 技术的抗稻瘟病基因 *Pigm* 分子标记的开发[J]. 西南农业学报, 2018, 31(8): 1617-1621.
- [23] 王文辉,邱丽娟,常汝镇,等. 中国大豆种质抗 SCN 基因 *rhg1* 位点 SSR 标记等位变异特点分析[J]. 大豆科学, 2003, 22(4): 246-250.
- [24] LU J, HOU J, OUYANG Y D, et al. A direct PCR-based SNP marker-assisted selection system (D-MAS) for different crops[J]. Molecular Breeding, 2020, 40(1): 9.
- [25] CHAI L, FENG B, LIU X, et al. Fine mapping of a locus underlying the ectopic blade-like outgrowths on leaf and screening its candidate genes in rapeseed (*Brassica napus* L.)[J]. Frontiers in Plant Science, 2021, 11: 616844.
- [26] JIA M J, YANG L J, ZHANG W, et al. Genome-wide association analysis of stripe rust resistance in modern Chinese wheat[J]. BMC Plant Biology, 2020, 20(1): 491.
- [27] 卿冬进,刘开强,邓国富,等. 基于 PARMS 技术的水稻粒形基因 *GW8* 分子标记的开发[J]. 西南农业学报, 2019, 32(3): 463-469.

(责任编辑:蒋永忠)