

朱雪梅, 郭广君, 潘宝贵, 等. 辣椒抗 PMMoV 基因 *L4* 连锁标记的验证分析[J]. 江苏农业学报, 2022, 38(6): 1627-1636.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2022.06.022

辣椒抗 PMMoV 基因 *L4* 连锁标记的验证分析

朱雪梅^{1,2}, 郭广君², 潘宝贵², 刁卫平², 刘金兵², 高长洲², 王述彬²

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院蔬菜研究所/江苏省高效园艺作物遗传改良重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 近年来, 辣椒轻斑驳病毒 (Pepper mild mottle virus, PMMoV) 病的发生日趋严重, 已严重危害中国辣椒生产。 *L* 系列等位基因 (*L1*、*L2*、*L3*、*L4*) 是抗烟草花叶病毒属的主要抗性基因, 其中 *L4* 基因抗性最强且具有广谱性。为加速 *L4* 基因的转育应用, 本研究对前人报道的 3 对与 *L4* 基因紧密连锁的分子标记进行检验分析。结果显示, 标记 *LASC340* 退火温度不稳定, 极易造成假阳性, 不适用于 *L4* 抗性基因的辅助筛选。标记 *087H3T7* 和 *L4-SCAR* 可以筛选出携带 *L3* 和 *L4* 抗性基因的辣椒种质, 但无法区分携带 *L3* 和 *L4* 基因的抗性材料, 同时 *087H3T7* 存在杂合基因型过高的问题。二者比较来说, *L4-SCAR* 标记的筛选准确度高于 *087H3T7*, 但是 *L4-SCAR* 为显性标记, 无法区分杂合基因型。因此上述 3 对标记均不能用于筛选携带 *L4* 抗性基因的种质材料, 但是在明确抗性材料基因型的情况下, *L4-SCAR* 标记结合 *087H3T7* 可用于 *L3* 和 *L4* 抗性基因转育后代抗性单株的辅助筛选。本研究结果可为加速辣椒抗 PMMoV 育种提供更实用的分子标记。

关键词: 辣椒; 辣椒轻斑驳病毒; 分子标记辅助筛选

中图分类号: S641.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2022)06-1627-10

Test analysis of *L4*-linked markers for PMMoV resistant gene in pepper

ZHU Xue-mei^{1,2}, GUO Guang-jun², PAN Bao-gui², DIAO Wei-ping², LIU Jin-bing²,
GAO Chang-zhou², WANG Shu-bin²

(1. College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Jiangsu Key Laboratory for Efficient Horticultural Crop Genetic Improvement, Nanjing 210014, China)

Abstract: In recent years, disease caused by pepper mild mottle virus (PMMoV) has become more and more serious and has harmed pepper production in China severely. *L*-series allelic genes (*L1*, *L2*, *L3*, *L4*) are the main resistant genes against tobamovirus, and *L4* gene was reported to show the strongest resistant to tobamovirus with a broad spectrum. In order to accelerate the application of transgenic breeding of the *L4* gene, three pairs of reported molecular markers closely linked to *L4* gene were examined and analyzed in this study. The results showed that, the annealing temperature of marker *LASC340* was unstable and could easily cause false positives, so *LASC340* was unsuitable for the assisted screening of *L4* resistant gene. Markers *087H3T7* and *L4-SCAR* could be used to screen pepper germplasms carrying *L3* and *L4* resistant genes, but they could not be used to distinguish resistant materials carrying *L3* and *L4* genes. Meanwhile, *087H3T7* had the problem of excessive heterozygous genotypes. In comparison, the screening accuracy of *L4-SCAR* marker was higher than that of *087H3T7*, but *L4-SCAR* was a dominant marker that could not distinguish heterozygous genotype. Therefore, none of the three pairs of markers could be used to screen the germplasm material carrying *L4* resistant gene. However, through clarifying the genotype of the resistant materials, *L4-SCAR* marker combined with *087H3T7* could be used for assisted

收稿日期: 2022-04-07

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (32072597); 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目 [JBGS (2021) 065]; 国家现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-23-G42)

作者简介: 朱雪梅 (1996-), 女, 山东滨州人, 硕士研究生, 主要研究方向为辣椒遗传育种和分子生物学。(E-mail) 1668178637@qq.com。郭广君为共同第一作者。

通讯作者: 王述彬, (E-mail) wangsbpep@163.com

screening of resistant individuals in the breeding of transgenic progeny with *L3* and *L4* resistant genes. Results of the study can provide more practical molecular markers for accelerated breeding of PMMoV resistant pepper.

Key words: pepper; pepper mild mottle virus; molecular marker assisted selection

中国是世界上辣椒、甜椒 (*Capsicum* spp.) 种植面积最广、消费量最多的国家, 常年播种面积在 2.2×10^6 hm^2 , 约占世界辣椒播种面积的 40%^[1]。随着中国辣椒种植面积的扩大、种植模式多样化及气候影响, 辣椒病害发生日益严重和多样。病毒病是辣椒生产上的主要病害之一, 部分病毒病会严重影响果实品质, 导致 30%~70% 的减产甚至绝收^[2]。近年来烟草花叶病毒属的辣椒轻斑驳病毒 (Pepper mild mottle virus, PMMoV) 在国内大部分辣椒主产区发生, 逐步成为常发性病害, 在江苏地区, 其检出率高达 62.28%^[3]。

1964 年 PMMoV 在美国被发现^[4], 随后扩散至欧洲、澳洲及亚洲等地, 成为一种世界性病害。1994 年中国新疆石河子地区首次报道发现 PMMoV^[5], 目前全国多个地区均有该病毒的报道^[6]。PMMoV 侵染后, 辣椒叶片症状不明显, 严重时出现褪绿斑驳和花叶症状, 在果实上症状明显, 表现为果小、果面有褪绿斑驳、凹凸斑点, 甚至出现畸形与坏死现象^[7]。该病毒主要为种子传毒、花粉带毒和汁液摩擦传毒, 其中种子传毒和花粉带毒是远距离传播的主要途径^[8]。

L 基因座位于辣椒 11 号染色体的端粒附近, 目前发现 5 个等位基因 (*L0*、*L1*、*L2*、*L3* 和 *L4*), 其中 *L1*~*L4* 是辣(甜)椒抗烟草花叶病毒属病毒的主要抗性基因。根据烟草花叶病毒 (TMV) 在携带不同 *L* 等位基因的宿主上产生的不同症状, 该病毒属病毒可划分成 P_0 、 P_1 、 $P_{1,2}$ 、 $P_{1,2,3}$ 、 $P_{1,2,3,4}$ 5 个致病基因型^[9-11]。其中 $P_{1,2}$ 是目前辣椒大田和温室生产中最常见的致病基因型, *L3* 基因对其具有很强的抗性, 通过杂交等方法将 *L3* 基因转育至商业品种中可很好地控制该致病基因型^[11]。而 $P_{1,2,3}$ 致病性强于 $P_{1,2}$, 且可克服 *L3* 的抗性, 目前在中国多个省份已有发现。据报道, 在枸杞辣椒 (*Capsicum chacoense* cv.) PI260429 中发现的 *L4* 等位基因对 $P_{1,2,3}$ 具有抗性^[12], 并对其他致病基因型具有广谱抗性^[9]。中国农业科学院蔬菜花卉研究所辣椒课题组通过回交结合分子标记辅助选择获得了携带 *L4* 抗性基因、早熟、大果型甜椒自交系 PT83-163^[13]。

目前针对 *L4* 基因定位的研究已有较多报道并开发出多个与 *L4* 抗性基因紧密连锁的分子标记。

2003 年 Matsunaga 等^[14] 利用抗病材料 AP-PM04 和感病材料 Mie-midori 构建 F_2 群体, 鉴定出 1 个随机扩增多态性 DNA (Random amplified polymorphism DNA, RAPD) 标记 WA31-1500。根据扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP) 标记 *L4-c* 开发出的序列特异性扩增区域 (Sequence characterized amplified regions, SCAR) 标记 *L4SC340* 距离 *L4* 基因 1.8 cM, 该标记为 1 个显性标记^[15]。通过对细菌人工染色体 (Bacterial artificial chromosome, BAC) 文库 082F03 测序开发出的共显性酶切扩增多态性序列 (Cleaved amplified polymorphism sequences, CAPS) 标记 087H03T7 距离 *L4* 基因 1.5 cM^[16]。Yang 等^[17] 在 2012 年鉴定出 1 个 *L4* 的候选基因, 根据该候选基因的富含亮氨酸的重复序列 (LRR) 区间开发出 *L4segF&R* 标记, 但是该标记与 *L4* 基因无法实现完全的共分离, 说明该候选基因并不是 *L4* 基因。Lee 等^[18] 通过分析 2 个 BAC 克隆 (GenBank 登录号: FJ597539、FJ597541) 设计出 8 对引物。比较 ECW (*L0*)、Tisana (*L1*)、CM334 (*L2*)、PI159236 (*L3*) 和 PI260429 (*L4*) 5 个基因型用引物 L-V0-4 扩增出的核苷酸序列, 发现 *L4* 基因型的扩增序列中存在 1 个 34 bp 的序列缺失, 据此开发出 1 个 *L4-SCAR* 标记用于 *L4* 基因的筛选。

综上所述, 目前开发出的与 *L4* 连锁的标记中, *L4SC340*、087H03T7 及 *L4-SCAR* 3 个标记具有操作方法简单、价格低廉等优点, 适用于抗病材料大批量筛选。因此, 本研究对上述 3 对标记进行验证以期筛选出准确性最高且可用于辅助筛选携带 *L4* 抗性基因种质材料的分子标记。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的辣椒种质材料共 103 份, 包括从国家蔬菜种质资源库引种的辣椒地方品种、江苏省农业科学院蔬菜研究所辣椒创新团队高代育种材料和引种自美国农业部 (United States Department of Agriculture, USDA) 的种质资源。鉴于一年生辣椒中基本没有携带 *L3* 和 *L4* 2 个抗性基因的种质材料, 因此

选择携带有 *L3* 基因的抗性材料 *C. chinense* cv. PI159236 和携带有 *L4* 基因的抗性材料 *C. chacoense* cv. PI260429 作为抗病对照,7 份感病育种材料作为感病对照。

1.2 辣椒 DNA 的提取

采用简化的十六烷基三甲基溴化铵法 (Hexadecyltrimethyl ammonium bromide, CTAB) 提取辣椒 DNA,本研究参考 Loraine 等^[19]的方法。用 1% 琼脂糖凝胶和超微量分光光度计检测 DNA 的质量和浓度,统一调整 DNA 质量浓度为 50 ng/ μ l,保存于 -20 °C 备用。

1.3 引物序列及反应程序

PCR 扩增体系总体积为 20.0 μ l;DNA 模板 2.0 μ l,2 \times TSINGKE[®] Master Mix 10.0 μ l,上下游引物(表 1)各 0.4 μ l,用 ddH₂O 补充至 20.0 μ l。

表 1 3 对与 *L4* 基因紧密连锁的分子标记的引物序列

Table 1 Sequences of three pairs of primers for molecular markers closely linked to *L4* gene

引物名称	引物序列 (5'→3')	参考文献
<i>L4SC340</i>	AAGGGCGTCTTGAGCCAA TCCATGGAGTTGTTCTGCAT	[15]
<i>087H3T7</i>	CCTTTGCCTGCATTATTCTTG GCCCAAATTTATCCCAAATGC	[16]
<i>L4-SCAR</i>	ATCGATGCACCCCTCGTTTAAATC GAGCAGTGTGGAGTGTCTATTGCTCA	[18]

引物 *L4SC340* 的 PCR 扩增程序为:98 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 20 s,50~65 °C (选择合适的退火温度)退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,35 个循环;72 °C 延伸 7 min;4 °C 保存。鉴于该标记为显性标记,为避免由于退火温度导致的假阳性,对其最适退火温度进行筛选,分别设置 50 °C、53 °C、56 °C、59 °C、62 °C、65 °C 6 个退火温度。

引物 *087H3T7* 的 PCR 扩增程序为:98 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 20 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,35 个循环;72 °C 延伸 7 min;4 °C 保存。

引物 *087H3T7* 的酶切扩增多态性序列 (CAPS) 反应体系为 10.0 μ l,包括 5.0 μ l PCR 产物,0.2 μ l *Ssp* I 内切酶,1.0 μ l Buffer,用 ddH₂O 补足至 10.0 μ l,37 °C 下孵化 3 h。

用 2% 的琼脂糖凝胶检测 *L4SC340* 和 *087H3T7* 的 PCR 产物。

L4-SCAR 的 PCR 扩增程序为:98 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 20 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 40 s,30 个循环;72 °C 延伸 7 min;4 °C 保存。PCR 产物检测:10% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (180 V, 150 min) 分离 PCR 扩增产物。电泳结束后,银染法染色,观察并记录扩增结果。

2 结果与分析

2.1 辣椒育种材料田间 PMMoV 发病情况

2021 年秋季,江苏省农业科学院六合动物科学基地的辣椒育种材料在自然条件下部分表现出被 PMMoV 侵染后的状况。其中 7 份育种材料在转色期果面表现出明显的褪绿斑驳、凹凸斑点、畸形与坏死等症状,因此选择上述 7 份材料作为 PMMoV 感病对照。

2.2 标记 *L4SC340* 引物序列最佳退火温度的确定

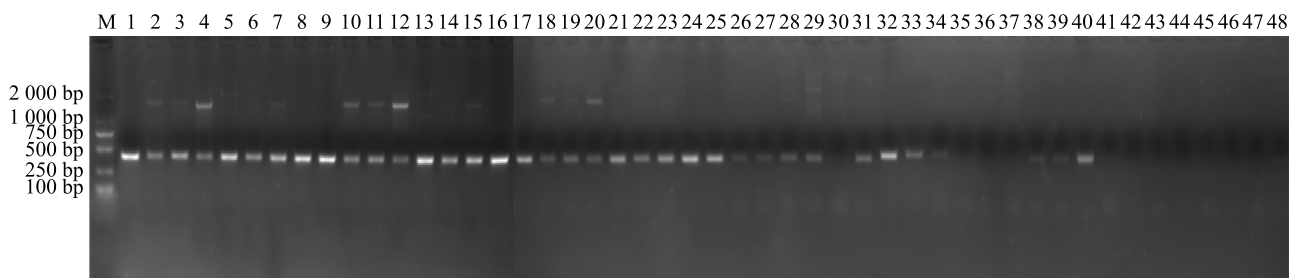
L4SC340 为 1 个显性标记,为明确 PCR 过程中引物的最佳退火温度,避免假阳性,以携带 *L4* 基因的抗性材料 PI260429 和 7 份种质材料为试验材料,设置 6 个退火温度。结果(图 1)显示,在 50 °C、53 °C 和 56 °C 的退火温度下,8 份材料全部能扩增出目的条带;在 59 °C 退火温度下,8 份材料中有 7 份可扩增出条带;在 65 °C 的退火温度下,包括 *L4* 抗源 PI260429 在内的 8 份材料全部无法扩增出目的条带;只有在 62 °C 下,8 份材料扩增差异最为明显。据此说明,62 °C 为 *L4SC340* 的最优退火温度。

2.3 *L4SC340*、*087H3T7* 和 *L4-SCAR* 标记的准确性分析

以携带 *L3* 基因的 PI159236 和携带 *L4* 基因的 PI260429 2 份抗病材料和 7 份田间症状明显的感病材料为试验材料,验证 *L4SC340*、*L4-SCAR* 和 *087H3T7* 3 个标记的准确性。结果(图 2)显示,*L4SC340* 在携带 *L3* 和 *L4* 基因的 2 份材料中均可扩增出 340 bp 的条带,在 7 份感病材料中的 6 份中同样扩增出 340 bp 的目的条带(图 2A)。*087H3T7* 在携带 *L3* 和 *L4* 的抗性材料中扩增出 440 bp 的条带且无法被 *Ssp* I 内切酶酶切。7 份感病材料中,5 份材料的 PCR 产物可被酶切为 300 bp 和 140 bp,与 *L0* 基因型一致,2 份材料的 PCR 产物则被酶切为 440 bp、300 bp 和 140 bp(图 2B),呈现杂合状态。利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 *L4-SCAR* 标记的 PCR 产物,结果并不理想,无法清晰地分辨抗感材料间的差异(图 2C)。针对上述问题,我们采用 10% 非变性聚丙烯

烯酰胺凝胶电泳进行检测,结果显示,*L4-SCAR* 为一个显性标记,*L3* 和 *L4* 抗性材料可扩增出 102 bp、136 bp

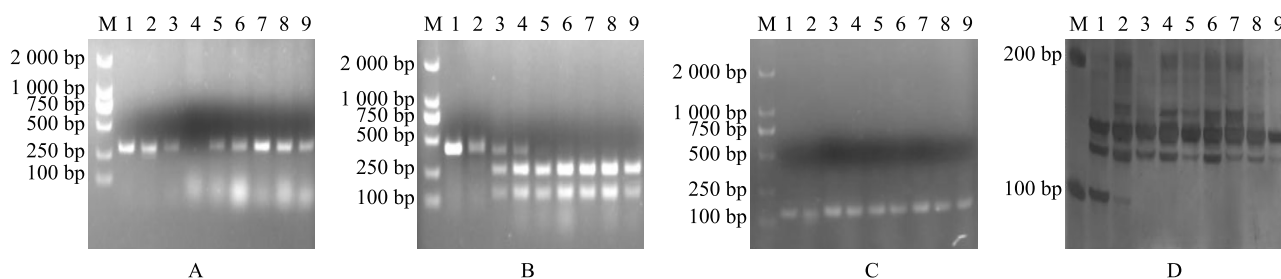
和 150 bp 3 条目的条带,而 7 份感病材料中只扩增出 136 bp 和 150 bp 2 条目的条带(图 2D)。



M: DL2000 marker; 1~8: 退火温度为 50 ℃, 其中 1 为抗病材料 PI260429, 2~8 分别为感病材料 CQ009、CQ011、PQ215、PQ224、PQ261、LB122、LB125; 9~16: 退火温度为 53 ℃, 其中 9 为抗病材料 PI260429, 10~16 分别为感病材料 CQ009、CQ011、PQ215、PQ224、PQ261、LB122、LB125; 17~24: 退火温度为 56 ℃, 其中 17 为抗病材料 PI260429, 18~24 分别为感病材料 CQ009、CQ011、PQ215、PQ224、PQ261、LB122、LB125; 25~32: 退火温度为 59 ℃, 其中 25 为抗病材料 PI260429, 26~32 分别为感病材料 CQ009、CQ011、PQ215、PQ224、PQ261、LB122、LB125; 33~40: 退火温度为 62 ℃, 其中 33 为抗病材料 PI260429, 34~40 分别为感病材料 CQ009、CQ011、PQ215、PQ224、PQ261、LB122、LB125; 41~48: 退火温度 65 ℃, 其中 41 为抗病材料 PI260429, 42~48 分别为感病材料 CQ009、CQ011、PQ215、PQ224、PQ261、LB122、LB125。

图 1 标记 *L4SC340* 引物序列退火温度的优化

Fig.1 Optimization of annealing temperature for primer sequence of *L4SC340*



M: DL2000 marker; 1: PI 159236; 2: PI 260429; 3: CQ009; 4: CQ011; 5: PQ215; 6: PQ224; 7: PQ261; 8: LB122; 9: LB125。1、2 对应抗病材料, 3~9 对应感病材料。

图 2 标记 *L4SC340* (A)、*087H3T7* (B) 和 *L4-SCAR* (C 和 D) 在 9 份抗感材料中的 PCR 产物

Fig.2 PCR products of markers *L4SC340* (A), *087H3T7* (B) and *L4-SCAR* (C and D) in nine resistant materials

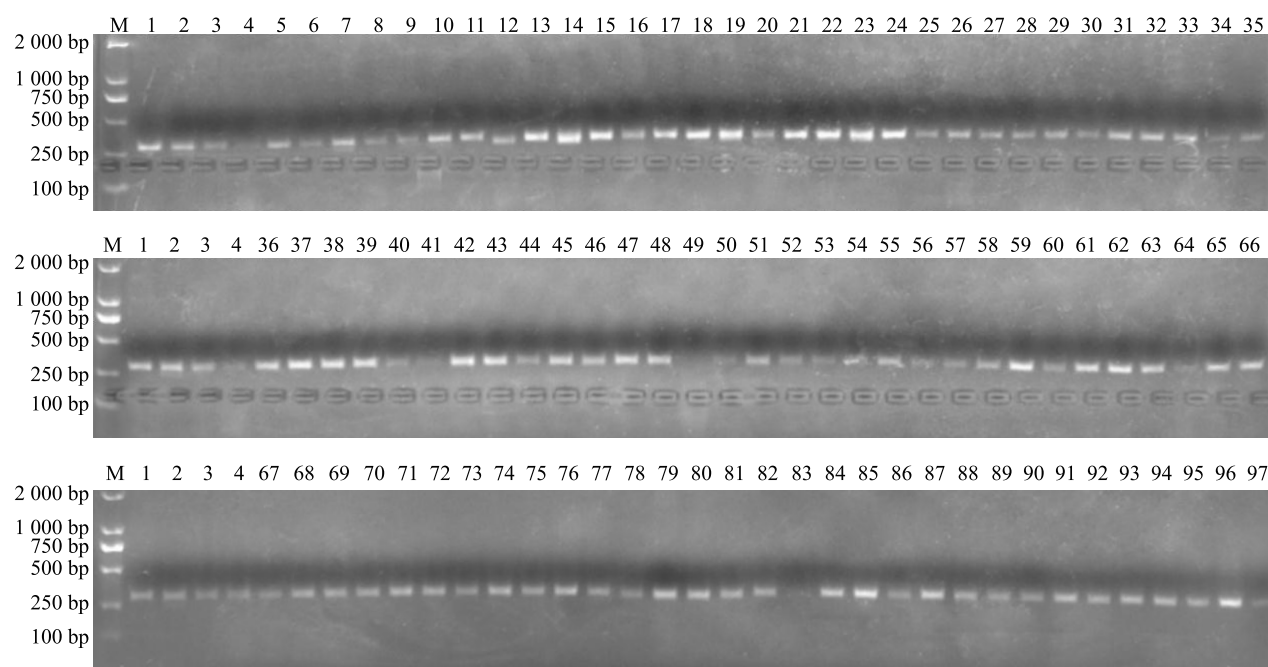
2.4 *L4SC340*、*L4-SCAR* 和 *087H3T7* 标记筛选抗 PMMoV 材料

利用 *L4SC340* 对 93 份辣椒种质材料进行筛选时发现,携带 *L3* 和 *L4* 基因的抗性材料可扩增出清晰的目的条带,但是 2 份感病材料同样能扩增出较为微弱的目的条带。而 93 份种质材料中只有 7 份材料未扩增出目的条带,其他材料均扩增出了目的条带(图 3、表 2)。

087H3T7 标记在 *L3* 和 *L4* 2 份抗性材料中扩增出的目的条带为 440 bp,在 2 份感病材料中扩增出的条带为 440 bp、300 bp 和 140 bp,表现为杂合状态。93 份种质材料中 23 份种质材料扩增后酶切条带为 440 bp,与抗性材料的扩增条带大小一致;58 份种质扩增后酶切条带为 3 条,表现为杂合基因型;10 份种质扩增后酶切条带为 2 条,表现为纯合感病

基因型;此外,还有 6 份种质材料未扩增出目的条带,怀疑为操作误差(图 4、表 2)。

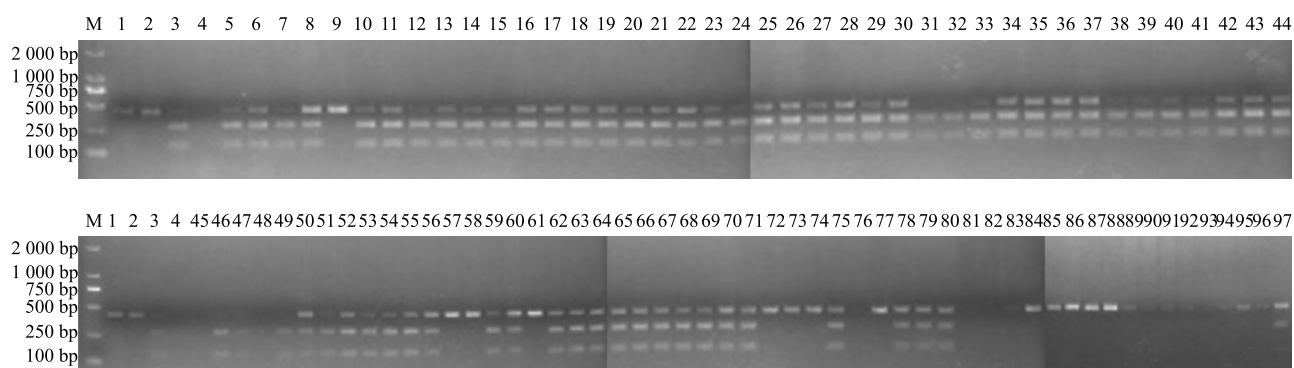
L4-SCAR 标记在携带 *L3* 和 *L4* 基因的抗性材料中可扩增出 102 bp、136 bp 和 150 bp 的目的条带,而从 2 份感病材料中不能扩增出 102 bp 的目的条带,说明利用该标记可明显区别抗病材料和感病材料,但无法区分携带 *L3* 和 *L4* 抗性基因的种质资源。93 份种质材料中 14 份可扩增出 102 bp 的目的条带,而 79 份材料中未扩增出 102 bp 的目的条带。14 份抗性材料中 1 份为国内地方品种关口田辣椒;其余 13 份则全部为从美国农业部(USDA)引种的材料且均属于 *C. baccatum* 种。携带 *L3* 抗性基因的 PI159236 属于 *C. chinense* 种,但是 93 份种质材料中的 4 份 *C. chinense* 种的材料中均未扩增出 102 bp 的目的条带(图 5、表 2)。



M:DL2000 marker;1: PI 159236;2: PI 260429; 3: CQ009;4:CQ011;5~97;93 份辣椒种质材料。

图3 标记 *LASC340* 在 97 份辣椒种质材料中的扩增情况

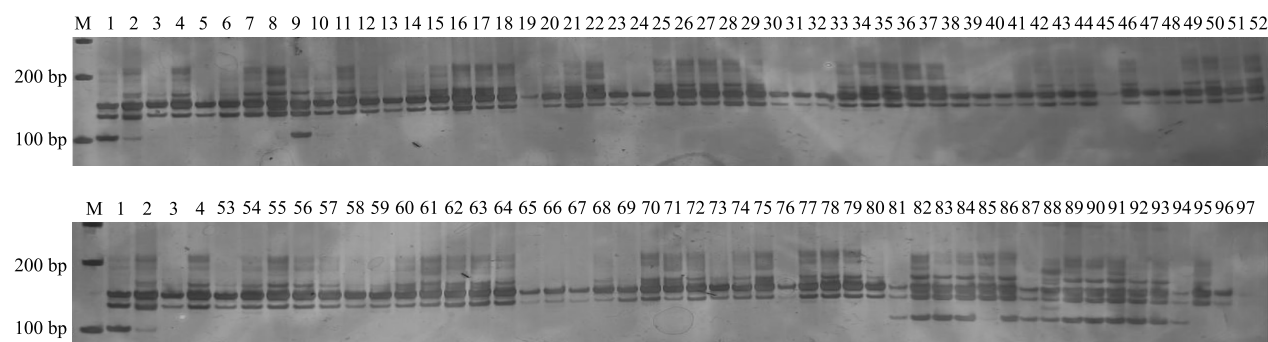
Fig.3 PCR results of marker *LASC340* in 97 pepper germplasm materials



M:DL2000 marker;1: PI 159236;2: PI 260429; 3: CQ009;4:CQ011;5~97;93 份辣椒种质材料。

图4 标记 *087H3T7* 在 97 份辣椒种质材料中的扩增情况

Fig.4 PCR results of marker *087H3T7* in 97 pepper germplasm materials



M:DL2000 marker;1: PI 159236;2: PI 260429; 3: CQ009;4:CQ011;5~97;93 份辣椒种质材料。

图5 标记 *L4-SCAR* 在 97 份辣椒种质材料中的扩增情况

Fig.5 PCR results of marker *L4-SCAR* in 97 pepper germplasm materials

表 2 97 份辣椒种质材料信息及基因型

Table 2 Information and genotypes of 97 pepper germplasm materials

序号	种质编号	种质名称	种属	来源	L4SC340 标记的 基因型	087H3T7 标记的 基因型	LA-SCAR 标记的 基因型
1	PI 159236 *	30040	<i>Capsicum chinense</i>	美国农业部(USDA)	+	+	+
2	PI 260429 *	189	<i>C. chacoense</i>	USDA	+	+	+
3	CQ009 **	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
4	CQ011 **	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
5	CQ001	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
6	CQ003	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
7	V06C0113	大海椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
8	V06C0154	南平钝角指天椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
9	V06C0244	关口田辣椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	+	+
10	V06C0272	小捉角椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
11	V06C0299	尖椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
12	V06C0302	柿子辣椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
13	V06C0360	魏县尖辣椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
14	V06C0385	云阳椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
15	V06C0404	延津甜椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
16	V06C0441	小辣椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
17	V06C0445	哈椒一号	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
18	V06C0463	小青椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
19	V06C0488	矮脚黄辣椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
20	V06C0490	朝天椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
21	V06C0652	灯笼椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
22	V06C0694	小辣椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
23	V06C0696	大尖椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
24	V06C0703	抚顺椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
25	V06C0787	三道筋	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
26	V06C0817	乐都线辣子	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
27	V06C0870	猪嘴椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
28	V06C0896	兖州灯笼皮	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
29	V06C0959	大荔老鸭窝	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
30	V06C0970	大黄椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
31	V06C1024	大桩长辣子	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	-	-
32	V06C1055	辣椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	-	-
33	V06C1110	花县辣椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	-	-
34	V06C1164	五色椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	-	2	-
35	V06C1185	羊角椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
36	V06C1220	系 12	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
37	V06C1223	特大牛角椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-

续表2 Continued2

序号	种质编号	种质名称	种属	来源	<i>L4SC340</i> 标记的 基因型	<i>087H3T7</i> 标记的 基因型	<i>L4-SCAR</i> 标记的 基因型
38	V06C1290	辣椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	-	-
39	V06C1291	小七姊妹	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	-	-
40	V06C1297	长阳菜椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	-	-	-
41	V06C1309	大牛角	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	-	-	-
42	V06C1390	伏地早	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
43	V06C1429	菜牛角	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
44	V06C1449	羊角椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
45	V06C1493	晚辣椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	/	-
46	V06C1523	牛角椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	-	-
47	V06C1577	菜椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	-	-
48	V06C1720	上海甜椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	/	-
49	V06C1763	PBC066	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	-	-	-
50	V06C0603	敦化三道筋	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	-	2	-
51	V06C0846	即墨马嘴辣椒	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
52	V06C0882	掖县一串铃	<i>C. annuum</i>	国家种质资源库	+	2	-
53	CA0146-X	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
54	CA0172-X	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
55	2020B 022	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
56	2020B 030	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
57	2020B 035	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	+	-
58	2020B 043	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	+	-
59	2020B 045	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
60	2020B 066	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
61	2020B 073	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	+	-
62	2020B 095	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
63	2020B 104	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
64	2020B 111	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	-	2	-
65	2020B 130	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
66	2020B 131	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
67	2020B 138	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
68	2020B 146	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
69	2020B 147	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
70	2020B 153	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
71	2020B 160	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
72	2020B 169	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	+	-
73	2020B 311	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	+	-
74	2020B 344	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	+	-
75	2020B 353	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-

续表2 Continued2

序号	种质编号	种质名称	种属	来源	L4SC340 标记的 基因型	087H3T7 标记的 基因型	L4-SCAR 标记的 基因型
76	2020B 366	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	/	-
77	2020B 380	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	+	-
78	2020B 396	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
79	2020B 462	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
80	2020B058	育种材料	<i>C. annuum</i>	辣椒创新团队	+	2	-
81	Grif 9196	Costa Rica	<i>C. baccatum</i>	USDA	+	/	+
82	PI 241674	Ecuador	<i>C. baccatum</i>	USDA	+	/	+
83	PI 257151	Peru	<i>C. baccatum</i>	USDA	-	+	+
84	PI 281307	Bolivia	<i>C. baccatum</i>	USDA	+	+	+
85	PI 159241	United States, Georgia	<i>C. chinense</i>	USDA	+	+	-
86	PI 686914	Sri Lanka	<i>C. baccatum</i>	USDA	+	+	+
87	PI 199506	Guyana	<i>C. baccatum</i>	USDA	+	+	+
88	PI 260589	Bolivia	<i>C. baccatum</i>	USDA	+	+	+
89	PI 370010	India	<i>C. baccatum</i>	USDA	+	+	+
90	PI 439409	Uruguay	<i>C. baccatum</i>	USDA	+	+	+
91	PI 441523	Brazil	<i>C. baccatum</i>	USDA	+	+	+
92	PI 441549	Brazil, Minas Gerais	<i>C. baccatum</i>	USDA	+	+	+
93	PI 441551	Brazil, Minas Gerais	<i>C. baccatum</i>	USDA	+	/	+
94	PI 594138	Russian Federation	<i>C. baccatum</i>	USDA	+	+	+
95	Grif 9271	Costa Rica	<i>C. chinense</i>	USDA	+	+	-
96	PI 152222	Peru	<i>C. chinense</i>	USDA	+	+	-
97	PI 209590	Cuba	<i>C. chinense</i>	USDA	+	2	-

*:抗病对照; **:感病对照; +:与抗病基因型一致; 2:杂合基因型; /:未扩增出条带; -:与感病基因型一致。辣椒创新团队指江苏省农业科学院辣椒创新团队。

3 讨论

L4SC340 标记开发人员给出的退火温度为 65 ℃^[15],但本研究在 65 ℃退火温度下,包括携带 L4 基因的抗性材料 PI260429 的 8 份材料中均未扩增出目的条带。退火温度设定为 62 ℃时,PI260429 可扩增出 340 bp 的目的条带,其他 7 份随机材料中有 1 份材料可扩增出目的条带。据此,后续研究中以 62 ℃作为最佳退火温度。但是后续研究中,携带 L3 和 L4 基因的 2 份抗病材料和 7 份感病材料中仅有 1 份材料未扩增出目的条带,无法区分抗病材料和感病材料;而 93 份种质材料中 86 份材料均能扩增出目的条带。以上结果说明标记 L4SC340 退火温度的稳定性不足,很容易造成假阳性,无法用于筛选携带 L4 抗性基因的种质材料。标记开发人员也

发现该标记除了不能在携带 L1 等位基因的材料中扩增出目的条带外,在携带其他 L 等位基因(L0、L2、L3 和 L4)的种质材料中均可扩增出目的条带。此局限性导致该标记无法用于筛选携带 L4 抗性基因的种质资源,但是在 L4 抗性基因回交转育过程中此标记可用于抗性单株的筛选^[15]。于海龙等^[13]以引进材料 200375(抗 PMMoV,含 L4 基因)为抗源,以甜椒自交系 83-163 为回交亲本,进行多代回交并自交,利用 L4SC340 分子标记辅助选择结合苗期抗病性鉴定、形态选择,选育了携带 L4 抗性基因、早熟、大果型甜椒自交系 PT83-163。在本研究中标记 L4SC340 退火温度的稳定性不足,假阳性率很高。

据报道,087H3T7 为共显性标记,在所有辣椒材料中均能够扩增出大小约 440 bp 的目的片段,L⁴L⁴基因型的材料不能被 Ssp I 内切酶切开,L⁰L⁰基因型

的材料能够被酶切为大小约 300 bp 和 140 bp 的 2 个片段, L^4L^0 基因型的材料酶切后有 440 bp、300 bp 和 140 bp 3 条目的条带^[16]。本研究中携带 *L3* 和 *L4* 基因的 2 份抗性材料酶切后目的片段大小均为 440 bp, 而 7 份感病材料中有 5 份材料的 PCR 产物酶切后大小为 300 bp 和 140 bp, 另外 2 份材料的 PCR 产物酶切后的大小则为 440 bp、300 bp 和 140 bp。标记开发人员认为该标记的一大优势是可以区分 *L3* 和 *L4* 基因型材料, 但是本研究中携带 *L3* 基因的 PI159236 和携带 *L4* 基因的 PI260429 的目的条带完全一致。李宁等^[20]利用该标记筛选携带有 *L4* 抗性基因的种质材料时认为 L^4L^4 基因型的纯合抗病材料 11 份, L^4L^0 基因型的杂合抗病材料 1 份。但是该研究所用的抗性对照为携带 *L3* 抗性基因的 PI 159236, 这一结果同样证明该标记不能区分 *L3* 和 *L4* 基因型材料。本研究利用该标记筛选出与 *L3* 和 *L4* 抗病材料条带一致的种质材料 23 份, 杂合材料 62 份。以上结果说明, *087H3T7* 标记可以筛选出携带 *L3* 和 *L4* 抗性基因的种质材料, 但不能区分 *L3* 和 *L4* 基因型材料, 同时筛选出的杂合基因型的种质材料过多且不一定具有抗性。综上分析, 用标记 *087H3T7* 筛选携带 *L4* 抗性基因的种质材料, 其准确性存在很大的问题。

Kim 等^[15]认为鉴于 *L* 等位基因附近的基因序列是已知的, 那么通过比较携带 *L4* 基因的种质材料与携带 *L0* 基因的种质材料间的序列差异即可开发出与 *L4* 抗性基因连锁的分子标记。Lee 等^[18]基于此种设想, 开发出 1 个与 *L4* 基因连锁的 *L4-SCAR* 标记。该标记为显性标记, 携带 *L4* 抗性基因的材料可特异扩增出 102 bp 的目的条带, 携带其他等位基因的种质材料无法扩增出此目的条带。本研究根据 Lee 等^[18]的研究结果, 利用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 *L4-SCAR* 标记的 PCR 产物, 但无法清晰地分辨抗病材料和感病材料间的差异。改用 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 结果显示携带 *L4* 和 *L3* 基因的抗性材料均可扩增出 102 bp、136 bp 和 150 bp 的目的条带, 而 7 份感病材料中只扩增出 136 bp 和 150 bp 2 条目的条带。利用该标记筛选出与抗性材料具有相同目的条带的种质材料 14 份, 且 14 材料均包含在 *087H3T7* 标记筛选出的 23 份抗性种质材料中。这一结果说明该标记可以筛选出携带 *L3* 和 *L4* 抗性基因的种质材料, 但是无法明确区分

L3 和 *L4* 基因型, 同时该标记为显性标记, 无法区分杂合基因型。除标记开发人员, 该标记还未被其他科研人员应用及验证。本研究认为, 该标记对 *L3* 和 *L4* 抗性基因筛选的准确性要高于标记 *L4SC340* 和 *087H3T7*。

整体来说本研究检测的 3 个与 *L4* 连锁的分子标记均不能准确地用于筛选携带 *L4* 抗性基因的种质材料。其中标记 *L4SC340* 退火温度不稳定, 很容易造成假阳性, 所以其筛选结果的准确性无法保障。标记 *087H3T7* 和 *L4-SCAR* 可以筛选出携带 *L3* 和 *L4* 抗性基因的辣椒种质, 但无法区分携带 *L3* 和 *L4* 基因的抗性材料, 同时 *087H3T7* 存在杂合基因型过高的问题。二者比较来说, *L4-SCAR* 筛选的准确度高于 *087H3T7*, 但是 *L4-SCAR* 为显性标记无法区分杂合基因型。因此在明确抗性材料基因型的情况下, *L4-SCAR* 标记结合 *087H3T7* 更有利于 *L3* 和 *L4* 抗性基因转育后代抗性单株的辅助筛选。

参考文献:

- [1] 王立浩, 张正海, 曹亚从, 等. “十二五”我国辣椒遗传育种研究进展及其展望 [J]. 中国蔬菜, 2016(1): 1-7.
- [2] 张宝玺, 王立浩, 张正海, 等. 甜椒 L^3 应对辣椒轻斑驳病毒及中椒系列新品种的选育 [J]. 中国农业科学, 2020, 53(18): 3846-3855.
- [3] 刘勇, 李凡, 李月月, 等. 侵染我国主要蔬菜作物的病毒种类、分布与发生趋势 [J]. 中国农业科学, 2019, 52(2): 55-77.
- [4] GREENLEAF W H, COOK A A, HEYN A. Resistance to tobacco mosaic virus in *Capsicum*, with reference to the Samsun latent strain [J]. Phytopathology, 1964, 54: 1367-1371.
- [5] 向本春, 谢浩, 崔星明, 等. 新疆辣椒轻斑驳病毒的分离鉴定 [J]. 病毒学报, 1994, 10(3): 240-245.
- [6] 杨中周, 邓竹根, 李曼, 等. 辣椒轻斑驳病毒研究的回顾与展望 [J]. 中国瓜菜, 2021, 34(9): 1-6.
- [7] DEMSKI J W. Tobacco mosaic virus is seedborne in pimiento peppers [J]. Plant Disease, 1981, 65: 723-724.
- [8] BROADBENT L, FLETCHER J T. The epidemiology of tomato mosaic: sources of TMV in commercial tomato crops under glass [J]. Annals of Applied Biology, 2010, 57(1): 113-120.
- [9] BOUKEMA I W. Allelism of genes controlling resistance to TMV in *Capsicum* L [J]. Euphytica, 1980, 29(2): 433-439.
- [10] BOUKEMA I W. Resistance to a new strain of TMV in *Capsicum chacoense* Hunz [J]. Capsicum Newslett, 1982, 1: 49-51.
- [11] BOUKEMA I W. Resistance to TMV in *Capsicum chacoense* Hunz. is governed by an allele of the *L*-locus [J]. Capsicum Newsl, 1984, 3: 47-78.

- [12] TOMITA R, SEKINE K T, MIZUMOTO H, et al. Genetic basis for the hierarchical interaction between *Tobamovirus* spp. and *L* resistance gene alleles from different pepper species [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2011, 24(1): 108-117.
- [13] 于海龙,王立浩,张宝玺,等. 分子标记辅助选育聚合烟草花叶病毒属病毒抗性基因(*L4*)及马铃薯Y病毒抗性基因(*Pvr4*)的甜椒自交系 [J]. *中国蔬菜*, 2021(1): 41-47.
- [14] MATSUNAGA H, SAITO T, HIRAI M, et al. DNA Markers linked to pepper mild mottle virus (PMMoV) resistant locus (*L4*) in *Capsicum* [J]. *Engei Gakkai Zasshi*, 2003, 72(3): 218-220.
- [15] KIM J H, JUNG-HEON H, HYOUNG Y J, et al. Development of a sequence characteristic amplified region marker linked to the *L4* locus conferring broad spectrum resistance to tobamoviruses in pepper plants [J]. *Molecules and Cells*, 2008, 25(2): 205-210.
- [16] YANG H B, LIU W Y, KANG W H, et al. Development of SNP markers linked to the *L* locus in *Capsicum* spp. by a comparative genetic analysis [J]. *Molecular Breeding*, 2009, 24(4): 433-446.
- [17] YANG H B, LIU W Y, KANG W H, et al. Development and validation of *L* allele-specific markers in *Capsicum* [J]. *Molecular Breeding*, 2012, 30(2): 819-829.
- [18] LEE J D, HAN J H, YOON J B. A Set of Allele-specific markers linked to *L* locus resistant to tobamovirus in *Capsicum* spp. [J]. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology*, 2012, 30(3): 286-293.
- [19] LORAIN A E, BLAKLEY I C, JAGADEESAN S, et al. Analysis and visualization of RNA-Seq expression data using RStudio, bioconductor, and integrated genome browser [M]. USA: Humana Press, 2015.
- [20] 李 宁,宫丽媛,高升华,等. 辣椒种质的抗性基因分子标记检测 [J]. *中国蔬菜*, 2020(8): 19-32.

(责任编辑:陈海霞)