

· 园艺作物 ·

“海蜜”系列甜瓜蔓枯病抗性来源分子标记初步评价

孙亚亭¹ 陈 静¹ 孙博文¹ 包卫红² 钱春桃^{1*}

(¹南京农业大学园艺学院作物遗传与种质创新国家重点实验室,江苏省南京市 210095;

²海门市农业科学研究所,江苏省南通市 226100)

摘 要:通过对6份“海蜜”系列甜瓜材料进行蔓枯病菌接种和蔓枯病抗性基因Gsb-1、Gsb-4分子标记检测,初步分析了“海蜜”系列甜瓜的蔓枯病抗性来源。田间鉴定结果显示,“海蜜6号”对蔓枯病表现出明显的抗性,其他“海蜜”品种表现为中抗。6份“海蜜”系列甜瓜均未得到与Gsb-1分子标记相同的190 bp条带;“海蜜2号”“海蜜6号”扩增出了与Gsb-4分子标记相同的120 bp、180 bp两条带,而“海蜜4号”“海蜜5号”“海蜜8号”“海蜜10号”均只扩增出一条带。研究初步确定“海蜜2号”“海蜜6号”的抗病基因与Gsb-4具有等位性。基于此研究,建议“海蜜”系列甜瓜均用携带抗性基因Gsb-1的抗源材料来改良其对蔓枯病的抗性。

关键词:“海蜜”甜瓜;蔓枯病;抗病性;分子标记

中图分类号:S652

“海蜜”系列甜瓜因抗逆性强、口感好,在江苏省及其周边地区得到了广泛栽植;但在其生产过程中发现,“海蜜”系列甜瓜有感染蔓枯病的现象,尤其在设施连作条件下,蔓枯病发生风险较大。蔓枯病是一种在葫芦科瓜类植物上常见的病害,甜瓜生产上患病植株可高达25%以上,严重时可造成瓜类减产80%^[1-2]。目前,化学防治是甜瓜生产上防治蔓枯病常用的方法,但易造成环境污染。因此,筛选抗病资源、培育抗病品种是防御甜瓜蔓枯病发生既生态又经济的措施。但是,甜瓜蔓枯病病原菌存在致病性分化,甜瓜品种仅携带单个抗病基因,在生产过程中抗性会减弱甚至完全丧失^[3-5],而不同抗性基因的聚合有助于提高作物的抗性和抗谱^[6-8],且国际上先后报道了多种甜瓜蔓枯病抗源,包括PI140471、PI157082、PI511890、PI482398、PI482399和PI420145等,抗性基因分别为Gsb-1、Gsb-2、Gsb-3、Gsb-4、gsb-5和Gsb-6^[9-10],这为“海蜜”系列甜瓜利用不同抗性基因聚合改良对蔓枯病的抗性提供了可能。

开展抗性聚合改良,首先需进行人工接种鉴定和遗传群体构建,以考察抗性分离情况,确定抗性基因是非等位基因,这是一个周期较长的过程。而分

子标记辅助选择可以提高育种效率。前人研究显示,大多数甜瓜品种的抗性来源于PI140471(Gsb-1)^[8],实验室前期研究也发现,抗源PI482398(Gsb-4)的抗性高于Gsb-1^[11]。因此,笔者拟采用Gsb-1和Gsb-4已有的分子标记对“海蜜”系列甜瓜的蔓枯病抗性来源进行分子标记快速鉴定,从而为“海蜜”系列甜瓜利用不同蔓枯病抗性基因进行聚合改良提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 甜瓜材料和接种菌株

6份“海蜜”系列甜瓜材料(“海蜜2号”“海蜜4号”“海蜜5号”“海蜜6号”“海蜜8号”“海蜜10号”)由江苏省南通市海门市农业科学研究所提供,甜瓜单基因抗源材料PI140471(Gsb-1)(CK₁)、PI482398(Gsb-4)(CK₂)由美国康乃尔大学Molly John教授提供,感病品种“白皮脆”(CK₃)由新疆农业科学院提供。

蔓枯病菌为本实验室分离纯化并保存的A1型菌株,菌株的分生孢子在PDA培养基上经25℃暗培养7 d后,再进行4 d间歇紫外灯(每天12 h紫外/12 h黑暗)处理产生^[12],在显微镜下利用血球计数板将分生孢子悬浮液配成5×10⁵个/mL备用。

1.2 田间接种鉴定

试验于2019年秋季在南京农业大学白马基地进行。所有甜瓜材料采用50孔穴盘播种育苗,每个品种种植30株,重复3次。7月25日播种,8月10日待幼苗长至3叶1心后定植于塑料拱棚,采用地膜覆

收稿日期:2020-03-19

基金项目:江苏省农业重大新品种创制项目(编号:PZCZ201718)

*为通信作者

盖栽培,田间管理正常。11月2日采用喷雾法^[3]接种病菌,用喷雾器向功能叶反复喷洒制备好的菌液,直至叶面滴水,2周后观察植株发病情况。

甜瓜蔓枯病病情分级标准:0级,无病斑;1级,老叶上边缘坏死或斑点 < 10 mm,新叶无病斑;2级,新叶上边缘坏死或斑点 < 10 mm,老叶边缘坏死;3级,多数叶片有感染,叶坏死面积 < 25%;4级,25% < 叶坏死面积 < 50%;5级,叶坏死面积 > 50%。

平均病级计算公式: $RI = (\text{级值} \times \text{株数}) \div \text{总株数}$ 。

根据平均病级(RI)确定蔓枯病抗性级别:高抗(HR), $RI < 1.0$;抗(R), $1.0 \leq RI < 2.0$;中抗(MR), $2.0 \leq RI < 3.0$;感(S), $3.0 \leq RI < 4.0$;

表1 抗病基因与对应分子标记

基因	引物	扩增片段长度 / bp	引物序列	连锁距离 / cM
Gsb-1	CMCT505	190	F : 5' - GACAGTAATCACCTCATCAAC - 3' R : 5' - GGAATGTAAATTGGATATG - 3'	5.20
Gsb-4	CMAT170a	120、180	F : 5' - TTAAATCCCAAAGACATGGCG - 3' R : 5' - TTTTCGATTGGCAGGAAGCAGA - 3'	5.14

PCR产物经聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.4 数据分析

利用 Microsoft Excel 2010和SPSS 20.0软件对试验数据进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 对蔓枯病的田间抗性表现

自然发病鉴定有时发病较轻,不能代表品种或材料的真实抗病程度。由表2可知,两种抗源材料PI140471和PI482398对蔓枯病均表现为高抗;感病对照“白皮脆”发病较重,表现为感病;“海蜜6号”对蔓枯病表现为抗病,其余品种对蔓枯病均表现为中抗。

表2 蔓枯病田间抗性评价

供试材料	平均病级(RI)	抗性
PI140471(Gsb-1)	0.67d	H R
PI482398(Gsb-4)	0.45d	H R
白皮脆	3.40a	S
海蜜2号	2.80a	M R
海蜜4号	2.83a	M R
海蜜5号	2.71b	M R
海蜜6号	1.90c	R
海蜜8号	2.85a	M R
海蜜10号	2.75b	M R

注:同一列内不同小写字母表示各品种间病级差异显著($P < 0.05$);HR为高抗,R为抗,MR为中抗,S为感病

2.2 抗蔓枯病基因分子标记的鉴定

通过对“海蜜”系列甜瓜进行抗蔓枯病基因Gsb-1、Gsb-4分子标记的PCR检测,发现6份“海

高感(HS), $RI = 4.0$ 。

1.3 DNA提取及分子标记检测

DNA提取参照CTAB法。用于检测抗病基因Gsb-1和Gsb-4的分子标记为本课题组设计^[11,13],由南京金斯瑞生物科技有限公司合成,见表1。

PCR总反应体积为20 μ L: ddH₂O 12.1 μ L, 10 \times PCR Buffer 2.0 μ L, 2 mmol/L dNTP 1.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.2 μ L, 10 μ mol/L引物各1.0 μ L, 5U/ μ L Taq聚合酶 0.2 μ L, 30 ng/ μ L模板DNA 1.0 μ L。

扩增反应条件:94 $^{\circ}$ C 反应5 min;94 $^{\circ}$ C 反应30 s, 55 $^{\circ}$ C 反应30 s, 72 $^{\circ}$ C 反应80 s, 35个循环;72 $^{\circ}$ C 反应5 min;保持4 $^{\circ}$ C。

“海蜜”系列甜瓜均未得到与Gsb-1分子标记相同的190 bp条带;“海蜜2号”“海蜜6号”扩增出了与Gsb-4分子标记相同的120 bp条带和180 bp条带,而“海蜜4号”“海蜜5号”只扩增出Gsb-4标记的180 bp条带,“海蜜8号”“海蜜10号”只扩增出120 bp条带。见表3。

表3 抗蔓枯病基因分子标记检测

供试材料	Gsb-1 标记扩增 片段长度 / bp	Gsb-4 标记扩增 片段长度 / bp
海蜜2号	220	120、180
海蜜4号	220	180
海蜜5号	220	180
海蜜6号	220	120、180
海蜜8号	220	120
海蜜10号	220、170	120

3 结论及讨论

田间抗性鉴定结果表明,“海蜜6号”对蔓枯病的抗性表现达到抗病等级,“海蜜2号”“海蜜4号”“海蜜5号”“海蜜8号”“海蜜10号”均只达到中抗等级。其中,“海蜜2号”对蔓枯病的抗性水平与以前报道的结果一致^[14],表明本研究采取的田间接种鉴定是可靠的。至于“海蜜6号”比其它“海蜜”系列甜瓜对蔓枯病抗性强的原因,则需对它们的抗性基因结构和表达调控的异同进行比较研究。

结合抗病基因分子标记PCR检测结果,发现“海蜜2号”“海蜜6号”可以扩增出Gsb-4分子标记的两条带,但不能扩增出Gsb-1的目标片段。因

此,本研究初步判断“海蜜2号”“海蜜6号”的染色体中具有与Gsb-4相同的抗性位点,但不具有与Gsb-1相同的抗性位点。结合前期研究结果,聚合抗原对不同浓度的蔓枯病病菌均表现为抗,而单一抗原对不同浓度蔓枯病病菌表现出选择性抗性且抗性水平低于聚合抗原。因此,对于“海蜜2号”“海蜜6号”(含有Gsb-4),可用PI140471(Gsb-1)来提高其抗性;其余“海蜜”系列甜瓜只扩增出一条Gsb-4的片段,还不能判断其抗性来源与Gsb-4是否相同,需进一步鉴定,但它们均未扩增出Gsb-1的目标产物,也可采用PI140471(Gsb-1)进行抗性改良。

参考文献

- [1] 郑文娟,赵增寿,史亮,等.甜瓜蔓枯病发生与防治技术[J].蔬菜,2014(5):67.
- [2] ZHANG YP, KYLE M, ANAGNOSTOU K, et al. Screening melon (*Cucumis melo* L.) for resistance to gummy stem blight in the greenhouse and field[J]. Hortscience A Publication of the American Society for Horticultural Science, 1997, 32(1): 117-121.
- [3] JOSEPH W, ZHOU XH, LI Y, et al. Resistance to Gummy Stem Blight in Melon (*Cucumis melo* L.) Germplasm and Inheritance of Resistance from Plant Introductions 157076, 420145, and 323498[J]. Hortscience A Publication of the American Society for Horticultural Science, 2007, 42(2): 215-221.
- [4] KEINATH AP, HOLMES GJ, EVERTSK L, et al. Evaluation of combinations of chlorothalonil with azoxystrobin, harpin, and disease forecasting for

- control of downy mildew and gummy stem blight on melon[J].Crop Protection Guildford,2007(26):83-88.
- [5] 许勇,张海英,康国斌,等.西瓜抗枯萎病育种分子标记辅助选择的研究[J].遗传学报,2000(2):151-157.
- [6] MATSUMOTO Y, WATANABE N, KUBOYAMA T. Cross-species transferability of 86 cucumber (*Cucumis sativus* L.) microsatellite markers to gherkin (*C. anguria* L.)[J].scientia horticulturae,2012,136(4):110-114.
- [7] 毕研飞,徐兵划,钱春桃,等.甜瓜抗蔓枯病育种研究进展[J].中国蔬菜,2013(20):10-16.
- [8] JOSEPH NW, ZHOU XH, CHEN JF. Identification of amplified fragment length polymorphism markers linked to gummy stem blight(*Didymella bryoniae*) resistance in melon(*Cucumis melo* L.)PI420145[J]. HortScience, 2009, 44(1): 32-34.
- [9] FRANTZ JD, JAHN MM. Five independent loci each control monogenic resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.)[J].Theoretical & Applied Genetics,2004,108(6):1033-1038.
- [10] 王红英,钱春桃,姜丽娜,等.甜瓜抗蔓枯病基因Gsb-4的分子标记[J].园艺学报,2012,39(3):574-580.
- [11] 李英,张永兵,JOSEPH N W,等.甜瓜蔓枯病菌子实体法分离及A型菌株产孢条件研究[J].果树学报,2007,24(1):84-88.
- [12] 刘文睿,张永兵,周晓慧,等.甜瓜抗蔓枯病基因Gsb-1的分子标记及其与抗源PI 420145中抗病基因的关系[J].中国瓜菜,2009,22(5):1-4.
- [13] 俞圣平,陆慧.“海蜜”系列厚皮甜瓜保护地栽培常见病害及防治措施[J].上海农业科技,2012(6):79.
- [14] 毕研飞,徐兵划,郭静,等.分子标记辅助甜瓜抗蔓枯病基因聚合及‘白皮脆’品种改良[J].南京农业大学学报,2015(3):375-380.

(上接第49页)

莉丝苗”“美香占2号”4个品种比CK增产,说明这4个品种具有良好的经济性状和产量水平。

在4个比CK增产的品种中,“粤禾丝苗”“桂农占”“合莉丝苗”的茎秆较粗壮,植株矮,抗倒能力强,后期转色好,有效穗数充足,其中,“桂农占”除穗型稍小外,还表现出结实率高、千粒重高的特点,且产量比CK增加达10%以上,再加上生育期适宜,故该品种可作为桐城市优质晚籼水稻种植的首选品种。同时,“美香占2号”是香型优质稻,在本试验中表现出生育期适中、后期转色好、有效穗数多、穗型不大、结实率高、植株偏高但抗倒、抗寒能力强等特点,产量比CK增加8.06%,该品种适合在桐城市作为香型优质晚籼水稻推广种植。

在4个比CK减产的水稻品种中,“玉针香”虽然生育期较短、米质优,但易感恶苗病、极易倒伏、产量低,故该品种不适合在桐城市作晚籼水稻大面

积推广种植。“玉香油占”虽然生育期适宜,有效穗数适中,穗型大,但结实率低,抗寒力弱,该品种也不适合在桐城市作为晚籼水稻推广种植。“Basmati-385”虽为香型优质品种,生育期与CK相近,茎秆细软,抗寒力较强,有效穗数多,穗粒数中等,千粒重低,但从田间长势和长相看,该品种不适合在较高肥力田块种植,宜选择在中低肥力的田块进一步进行试验验证。“五山丝苗”的生育性状和经济性状与CK相似,但抗倒能力比CK差,故该品种作为晚籼水稻种植时要采用健身栽培,以防倒伏。

参考文献

- [1] 李葆华.大米品牌哈尔滨论道[N].中国食品报,2018-10-19.
- [2] 张玉屏,姜薪琳,朱德峰,等.早稻氮高效利用主栽品种的筛选[J].中国稻米,2019,25(4):44-46.
- [3] 唐茂艳,王强,陈雷,等.适合稻鱼系统的水稻品种筛选研究[J].中国稻米,2019,25(3):129-131.