

# 黄瓜霜霉病及其分子标记辅助育种研究

白智龙 周鸿飞 (沈阳农业大学, 辽宁沈阳110161)

**摘要** 综述黄瓜霜霉菌特征特性、生理小种、霜霉菌种的保存方法以及黄瓜霜霉病抗性遗传规律、抗病育种等方面的研究进展,并分析了当前生产和研究中存在的问题,提出了今后研究方向。

**关键词** 黄瓜; 霜霉病; 分子标记; 抗病育种

中图分类号 S436.421.1<sup>+1</sup> 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)07-02814-02

## Study on Cucumber Downy Mildew and Its Molecular Assisted Breeding

BAI Zhi-long et al (Shenyang Agricultural University, Shenyang, Liaoning 110161)

**Abstract** The research progress on the characteristic and physiological races of cucumber downy mildew, the preservation methods of downy mildew strains, and the genetic resistance regulation and resistance breeding against cucumber downy mildew were summarized, the questions in present production and studies were analyzed and the research direction in future were presented.

**Key words** Cucumber; Downy mildew; Molecule marker; Resistance breeding

黄瓜霜霉病是由古巴假霜霉菌[Pseudoperonospora cubensis (Berk. & Curt.) Rostov]引起的,属鞭毛菌亚门霜霉菌目假霜霉属,是国内外黄瓜产区主要叶部病害之一<sup>[1]</sup>。黄瓜霜霉病已受到各国科学工作者的关注。国内外对黄瓜霜霉病病原菌、抗病遗传和分子标记辅助育种等方面的研究已取得了明显进展。

### 1 黄瓜霜霉病病原菌

**1.1 病原菌生物学特性** 黄瓜霜霉菌营养体为无隔菌丝体,在寄主细胞间隙中蔓延,产生卵形或指状吸器伸入寄主细胞内吸收养分。孢囊梗由叶面气孔伸出,单生或1~3根丛生,无色,基部稍膨大,3~4次假二叉分枝,分枝不对称,分枝与主枝成锐角,分枝末端尖细,孢子囊着生于分枝的顶端。孢子囊卵形或椭圆形,顶端有乳头状突起,单胞,淡褐色。空气相对湿度在50%以下时病菌不能产生孢子囊,相对湿度在80%以上时44 h可产生,饱和湿度时6~24 h可大量产生。卵孢子球形,黄色,表面有瘤状突起<sup>[2]</sup>。

**1.2 病原菌侵染规律** 黄瓜霜霉菌的越冬和病害的初侵染源在不同地区有所不同。在我国南方霜霉病能够终年发生,在华中、华北地区冬季病菌亦能以孢子囊的形式在保护地黄瓜植株上继续危害。病菌对温度的适应范围较广。湿度是决定病害轻重的主要因素。在5~30℃时病菌均可发育,以15~25℃最适宜,20~25℃时潜育期最短,仅3 d。在有水滴的适温条件下,孢子囊只要1.5 h就可萌发,2~3 h就可完成侵入。在气温达16℃时,田间病害开始发生,日平均气温18~24℃、相对湿度在80%以上时,病情直线上升。在多雨、多露、多雾和昼夜温差大或阴雨天和晴天交替时,病害易流行<sup>[2]</sup>。

**1.3 病原菌生理小种** 根据病菌与转化寄主亲和力的程度不同,Thomas认为该病原菌有5种致病型<sup>[3]</sup>。Shetty等研究发现,病菌存在着亚洲、波兰和美洲小种分化,并且根据植物内抗性基因对数推测有1~8个生理小种<sup>[4]</sup>。傅俊范等根据地区生态特点在黄瓜主要种植区采集病株,从致病性和形态特征上进行分析,发现我国黄瓜霜霉菌不存在生理小种分

化<sup>[5]</sup>。总之,学术界对古巴假霜霉菌是否存在小种分化尚有争议。

**1.4 病原菌保存方法** 霜霉菌是一种专性寄生菌,所以保存时与其他病原菌相比较为复杂,给霜霉病的研究带来一定不便。下面着重介绍几种霜霉菌常用的保存方法。

**1.4.1 寄主活体保存。**在适宜环境条件下,定期将病菌接种到新的寄主上,可较长时间保存病菌。

**1.4.2 离体叶保存。**Parkash等用含有5%蔗糖液或一定浓度激动素溶液的棉花保湿,在-5℃条件下,可保存病叶30 d<sup>[6]</sup>。

**1.4.3 低温冷冻保存。**Shi等研究表明,离体叶片冷冻保存10个月的霜霉菌仍然具有致病力,但致病力下降,病情指数仅为1.60,而对照病情指数达96.2;低温(-20℃)可降低霜霉菌孢子囊的致病力,低温时间越长,孢子囊的致病力越低,同时低温使得潜育期延长<sup>[7]</sup>。

**1.4.4 超低温冷冻保存。**张艳菊等报道,将孢子囊在10%二甲基亚砷、5%脱脂乳混合液中预先-20℃冷冻24 h,然后放入-70℃冰箱保存<sup>[8]</sup>。采用该方法保存的孢子囊12个月后仍具有较高的致病力,从根本上解决了黄瓜霜霉菌不能长期离体保存且致病力下降的问题,对黄瓜霜霉菌的深入研究具有重要价值。

**1.5 接菌浓度** 许启新等所用接种孢子囊浓度为75 000个/ml<sup>[9]</sup>,云兴福等所用浓度为546 000个/ml<sup>[10]</sup>,所用接种浓度均偏高。翁祖信等报道,孢子囊浓度以1 500~4 500个/ml为宜<sup>[11]</sup>。这是因为如果接种浓度过高,则抗感品种会产生大块死斑,抗感品种抗性差异减小,造成试验误差;同样,如果接种浓度过小,则抗感品种产生病斑少,抗性差异也减小,造成试验误差。

### 2 苗期与成株期抗病性的相关性

Jenkins发现,抗病、感病品种苗期抗性与成株期达到相关水平<sup>[12]</sup>。许启新等对黄瓜9个品种进行黄瓜霜霉病苗期与成株期抗病性相关性分析,亦得到同样结果<sup>[9]</sup>。为了进一步了解苗期与成株期抗病性的相关性,还应深入探讨黄瓜不同生态型品种群体间的相关性,也应验证我国黄瓜霜霉菌是否存在生理小种分化现象。

### 3 寄主抗性的生理生化反应研究

云兴福对抗感品种的叶内叶绿素含量测定结果表明,叶

**作者简介** 白智龙(1981-),男,辽宁抚顺人,硕士研究生,研究方向:植物分子育种。

收稿日期 2007-10-12

内叶绿素含量与植株抗病性呈正比<sup>[13]</sup>。刘庆元等研究表明,不同黄瓜品种叶内含糖量与抗病性有关,表现为含糖量愈高则发病愈轻,并且认为黄瓜霜霉病是一种低糖病害<sup>[14]</sup>。丁九敏等研究表明,在接种侵染前,健康黄瓜叶片中可溶性糖含量、叶绿素含量与其对霜霉病的抗性成正相关;接种后,叶片中 POD、PPO、CAT 和 SOD 活性变化与其对霜霉病的抗性成正相关<sup>[15]</sup>。李靖等对感染霜霉病的黄瓜叶片中相关酶活性也进行了一系列的研究<sup>[16-18]</sup>。Kortekamp 研究表明,接菌后黄瓜抗病品种(Gdrc)和感病品种(Riesling)蛋白 PR2、PR3、PR4、PGP、DFR、LDOX 和 FS 的表达量有明显的差别,证明这些蛋白可能在黄瓜对霜霉病菌抗性表现中发挥作用<sup>[19]</sup>。

#### 4 黄瓜霜霉病抗性遗传规律及分子标记辅助育种研究

目前,国内外对黄瓜霜霉病抗性机制的研究已经深入到分子水平。Cochran 以抗病黄瓜品种 Bangalore 和感病品种杂交,遗传分析证明黄瓜抗病性由数个基因决定<sup>[20]</sup>。吕淑珍等利用高代自交系进行杂交和回交试验,认为所采用的材料对霜霉病的抗性至少由3对基因控制,感病性具有部分显性,其广义遗传力为62.33%,狭义遗传力为47.74%,属于遗传力较高的性状,容易稳定<sup>[21]</sup>。Jenkins 用2个抗病材料 Chinese long、Puerto Rico 分别与感病品种杂交,表明上述材料抗性是由1个或2个主效基因和1个或多个微效多基因控制的<sup>[12]</sup>。田波利用生化标记和分子标记技术鉴定出抗病基因,分别命名为 dm、dm-1、dm-2、dm-3<sup>[22]</sup>。Doruchowski 等利用抗病材料 W4783 和感病材料 Wisconsin SMR18 证明抗性是由3对隐性基因 dm-1、dm-2、dm-3 决定的<sup>[22]</sup>。而 Van-Viet 等认为,抗病品种 Poinsett 的抗性是由一个隐性单基因 dm 控制的,并且认为这个基因与黄瓜抗白粉病基因连锁<sup>[23-24]</sup>。同时,Fanourakis 也发现抗霜霉病基因是由1个单隐性基因控制<sup>[25-26]</sup>。Hrejsi 等找到了5个与 dm 基因连锁的 RAPD 标记,分别为 G14<sub>800</sub>、X15<sub>1100</sub>、AS5<sub>800</sub>、BC519<sub>1100</sub>、EC526<sub>1000</sub><sup>[27]</sup>,其中,只有 BC519<sub>1100</sub> 与 dm 的连锁最为紧密,遗传距离仅为9.9 cm。这为该性状在今后的分子标记辅助育种提供了可能。

Chen 等对野生种酸黄瓜(*Cucumis hystrix*)进行抗病鉴定,结果表明该物种高抗蔓枯病、霜霉病和病毒病等<sup>[28-29]</sup>。曹清河等将普通栽培黄瓜(*Cucumis sativus*)和酸黄瓜杂交,合成了人工异源双二倍体新种,并以此为桥梁种与普通黄瓜回交、自交,选育出黄瓜抗霜霉病异源易位系 CT-01<sup>[31]</sup>。进一步对该异源易位系进行了研究,以高代抗霜霉病异源易位系 CT-01R 和感病突变系 CT-01S 为抗感对照材料,在抗病材料中获得了与抗霜霉病相关基因序列 cpc-1<sup>[32]</sup>。另外,上海交通大学农业与生物学院植物科学系以华北类型黄瓜自交系 S94(抗病品种)和欧洲温室型自交系 S06(感病品种)为亲本得到性状稳定的永久群体(F<sub>6</sub>)。遗传分析结果表明,该群体的霜霉病抗性性状呈现出数量性状的特征。因此,通过该永久群体构建的黄瓜分子标记遗传图谱,最终对抗霜霉病性状进行了 QTL 定位。

#### 5 结语

由于受环境因素以及黄瓜抗性材料等的影响,各国专家学者对抗霜霉病有着不同的结论,黄瓜霜霉病抗性遗传规律

尚无定论。因此,黄瓜抗霜霉病的遗传规律不明确,仍需要进一步的研究。另外,分子标记研究与育种程序相脱节,大多数的研究者只把工作目标确定在鉴定、定位抗病的基因上。在设计研究方案时,选材往往只考虑基因定位的便利而不考虑育种的需要。因此,在完成目标基因的定位后,并不能直接应用于育种。如果选用的试验材料是目前推广的优良品系或品种,那么目标基因定位的结果就可以直接指导育种实践。目前,利用抗病基因同源序列克隆抗病基因是普遍认同克隆基因的方法,还可以使用图位克隆方法分离出与抗病基因紧密连锁的 RGA(抗病基因同源序列)探针,并且用于基因组文库筛选。随着试验技术的发展,更多、连锁更紧密的分子标记将会被开发出来,在标记辅助选择研究领域发挥重要的作用,成为加快植物抗病育种进程更加可行和实用的新途径。

#### 参考文献

- LEBEDA A. Screening of wild cucurbit species against downy mildew(*Pseudoperonospora cubensis*) isolates from cucumbers[J]. *Phytoparasitica*, 1992, 20(3): 203-210.
- 石延霞,李保聚,刘学敏. 黄瓜霜霉病研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2002, 33(4): 391-395.
- THOMAS C E. Downy and powdery mildew resistant muskmelon breeding line MR-1[J]. *Hort Science*, 1986, 21: 329.
- SHETTY NV, WEHNER TC, THOMAS C E. Evidence for downy mildew races in cucumber tested in Asia, Europe and North America[J]. *Scientia Horticulturae*, 2002, 94: 231-239.
- 傅俊范,付淑云. 黄瓜霜霉菌生理分化研究[J]. 沈阳农业大学学报, 1986, 17(3): 22-32.
- PARKASH V, SOKH S S. Detached leaf method for mass screening of cultures of *Pseudoperonospora cubensis*[J]. *Indian Phytopathology*, 1989, 42(4): 575-576.
- SHI Y X, LI B J, LIU X M. Several infection factors of *Pseudoperonospora cubensis* (in Chinese)[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(2): 257-261.
- 张艳菊,秦智伟,周秀艳,等. 黄瓜霜霉菌保存方法[J]. 植物病理学报, 2007, 37(4): 438-441.
- 许启新,陆世钧. 黄瓜霜霉病苗期抗性与成株抗性相关性的研究[J]. 上海农业科技, 1994(1): 25.
- 云兴福,杨文秀. 不同黄瓜品种对霜霉病免疫性能的鉴定[J]. 内蒙古农业科技, 1994(6): 25-28.
- 翁祖信,冯东昕,李宝栋. 黄瓜霜霉病苗期抗病性鉴定技术研究初报[J]. 中国蔬菜, 1991(4): 7-9.
- JENKINS J M. Studies on the inheritance of downy mildew resistance and of other characters in cucumbers[J]. *J Hered*, 1946, 37: 267-271.
- 云兴福. 黄瓜组织中氨基酸、糖和叶绿素含量与其对霜霉病抗性的关系[J]. 华北农学报, 1993, 8(4): 52-58.
- 刘庆元,张穗,李久禄. 黄瓜品种对霜霉病的抗性机理[J]. 华北农学报, 1993, 8(1): 70-75.
- 丁九敏,高洪斌,刘玉石. 黄瓜霜霉病抗性与叶片中生理生化物质含量关系的研究[J]. 辽宁农业科学, 2005(1): 11-13.
- 李靖,利容千,袁文静. 黄瓜感染霜霉病菌叶片中一些酶活性的变化[J]. 植物病理学报, 1991, 21(4): 279-283.
- 潘汝谦,黄旭明,古希昕. 活性氧清除酶类在黄瓜感染霜霉病过程中的活性变化[J]. 植物病理学报, 1998(29): 287-288.
- 云兴福,崔世茂,霍秀文. 黄瓜组织中几种酶活性与其对霜霉病抗性的关系[J]. 华北农学报, 1995, 10(1): 92-98.
- KORTEKAMP A. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen[J]. *Hort Physiology and Biochemistry*, 2006, 44: 58-67.
- COCHRAN F D. Breeding cucumbers for resistance to downy mildew[J]. *Proc Amer Soc Hort Sci*, 1938, 35: 541-543.
- 吕淑珍,陈正武. 黄瓜抗病性遗传研究初报[J]. 天津农林科技, 1990(2): 22-24.
- DORUCHOWSKI R W, LAKOWSKA RYK E. Inheritance of resistance to downy mildew(*Pseudoperonospora cubensis*) in *Cucumis sativus*[M]. *Warsaw: Proc. 5th EUCARPIA Cucurbitaceae Symp*, 1992: 66-69.

表2 不同土壤剖面玉米耗水量与土壤调节关系

Table 2 Relationship between water consumption of corn and soil water adjustment

玉米生育期 Corn growth period	时间 Time d	阶段降水 Precipitation mm	玉米耗水量		土壤水分调节量	
			Water consumption of corn mm		Water adjustment of soil mm	
			平面型 Flat type	波浪型 Wavy type	平面型 Flat type	波浪型 Wavy type
播种—出苗 Sowing-Seedling emergence	11	18	24	24	6	6
出苗—拔节 Seedling emergence-Jointing	28	59	65	66	6	7
拔节—抽穗 Jointing-Heading	24	72	54	59	- 18	- 13
抽穗—乳熟 Heading-Milky	51	241	246	254	5	13
乳熟—成熟 Milky-Mature	21	48	42	46	- 6	- 2
全生育期 Whole growth period	135	438	431	449	- 7	11

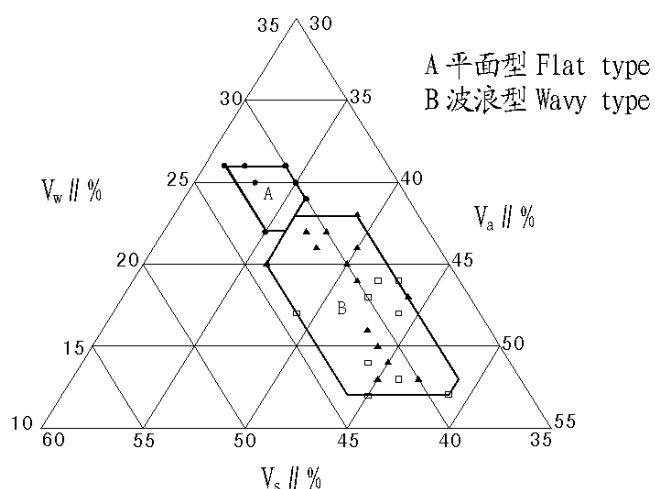


图4 不同剖面构型黑土耕层的三相组成

Fig. 4 Composition of three phases in black soil with different profile morphological characteristics

玉米带是典型的雨养农业区,限制玉米产量的主要因子是墒情不足。因此,衡量一种耕作制度是否合理,首要的衡量标准就是看其能否充分利用自然降水。

对于耕作土壤来说,耕层的厚度及性质既是衡量土壤质量优劣的重要标志,又反映出人们对土壤的管理水平。也正是因为平面型剖面构型的耕层深厚,有效土壤量多,土壤向作物供应养分和水分的能力强,土壤接纳大气降水的能力强,春季墒情好,苗齐苗壮,夏季肥力平稳,土壤和作物的抗逆性强,秋季后劲强,作物的产量相对较高。而波浪型剖面构型的有效土壤量少,土壤向作物供应养分和水分的能力有

限,加之犁底层坚硬,作物根系下扎受阻,并且根系在下扎的过程中需要消耗能量,影响作物生长发育,同时土壤接纳大气降水的能力弱,容易形成径流,造成水土流失。土壤消耗水量较大导致出现春季土壤易干旱;夏季作物生长易脱水、脱肥等肥力退化现象。因此,平面型剖面构型与波浪型剖面构型比较,更有利于玉米的抗逆生长,对不良自然环境的抵抗能力将会大大提高。因此,研究认为松辽平原玉米带现行的以小四轮拖拉机为主要动力耕作制是不合理的,应以增强土壤保水性能为主要目标,创建适合区域经济发展水平新型耕作制。

## 参考文献

- [1] 吉林省土壤肥料总站. 吉林土壤[M]. 北京: 中国农业出版社,1998:145-160.
- [2] 刘孝义, 依艳丽. 土壤物理学基础及其研究法[M]. 沈阳: 东北大学出版社,1998:1-114.
- [3] 姚贤良, 程云生. 土壤物理学[M]. 北京: 农业出版社,1986:20-46.
- [4] 华孟, 王坚. 土壤物理学附实验指导[M]. 北京: 北京农业大学出版社,1998.
- [5] 孟凯, 张兴义. 农田黑土水分调节能力分析[J]. 中国生态农业学报, 2001,9(1):46-48.
- [6] 孔学夫, 晋小军. 旱地农田土壤水分动态变化规律及其应用[J]. 甘肃农业科技,2001(1):18-20.
- [7] 刘会青. 吉林玉米带黑土土壤理化环境特征研究[D]. 长春: 吉林农业大学,2003:11-25.
- [8] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [9] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [10] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [11] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [12] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [13] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [14] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [15] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [16] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [17] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [18] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [19] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [20] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [21] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [22] 熊毅, 徐琪, 姚贤良, 等. 耕作制度对土壤肥力的影响[J]. 土壤学报, 1980,17(2):101-119.
- [23] Van VIET G J A, MEYSING W D. Inheritance of resistance to *Pseudoperonospora cubensis* Rost and in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Euphytica*, 1974,23:251-255.
- [24] Van VIET G J A, MEYSING W D. Relation in the inheritance of resistance to *Pseudoperonospora cubensis* Rost and *Sphaerotheca Fuliginea* Pfl. in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Euphytica*, 1977,26:793-796.
- [25] FANOURAKIS N E, SIMONP W. Analysis of genetic linkage in the cucumber [J]. *J Hered*, 1987,78:238-242.
- [26] HERCEL W, WEHNER T C. Review of genes and linkage groups of cucumber [J]. *Hort science*, 1990,25(6):605-615.
- [27] HORESI T, STAUB J, THOMAS C. Linkage of random amplified polymorphic DNA marker to downy mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. *Euphytica*, 2000,115:105-113.
- [28] CHEN J F, ZHANG S. The xishuangbanna gourd, a traditional cultivated part of the Hani people, Xishuangbanna, Yunnan, China [J]. *Cucurbit Genet Coop Rpt*, 1994,17:18-20.
- [29] CHEN J F, MORIARTY G, JAHN M. Some disease resistance tests in *Cucumis hystrix* and its progenies from interspecific hybridization with cucumber, *Proceedings of Cucurbitaceae [C] // EUCARHIA. The 8th EUCARHIA Meeting on Cucurbit Genetics and Breeding. Comoc: Palacky University, 2004:189-196.*
- [30] CHEN J F, STAUB J E, QIAN C. Reproduction and cytogenetic characterization of interspecific hybrids derived from *Cucumis hystrix* Clark. × *C. sativus* L. [J]. *Theor Appl Genet*, 2003,106:688-695.
- [31] 曹清河, 陈劲枫, 钱春桃. 黄瓜抗霜霉病异源易位系CT-201的筛选与鉴定[J]. 园艺学报, 2005,32(6):1098-1101.
- [32] 曹清河. 黄瓜抗霜霉病异源易位系选育、相关基础研究及育种应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2006:83-99.

(上接第2815页)