

## 4 种主要黄瓜病害的遗传分析

张海英, 毛爱军, 张 峰, 王永健, 许 勇

(国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100089)

**摘要:** 番木瓜环斑病毒西瓜株系( PRSV- W)、小西葫芦黄花叶病毒( ZYMV)、西瓜花叶病毒( WMV) 和黑星病( *Cladosporium cucumerinum*) 是为害黄瓜的主要病害。以欧洲八号×秋棚为亲本构建的 RIL 群体为材料, 以病情指数为指标, 对群体和亲本进行了小西葫芦黄花花叶病毒( ZYMV)、番木瓜环斑病毒西瓜株系( PRSV- W)、西瓜花叶病毒( WMV) 株系和黑星病的抗病性鉴定。结果表明: 上述抗性基因的病情指数在黄瓜 RIL 群体呈双峰分布, 表明对 ZYMV, PRSV 和 WMV 的抗性是受主基因控制的性状, 但也存在微效基因的修饰作用。连锁分析表明, ZYMV, PRSV 与 WMV 连锁, 3 个抗病基因的排列顺序和遗传距离是 ZYMV- 10cM- PRSV- 22 cM- WMV。抗黑星病基因与上述三种抗病毒基因不连锁。

**关键词:** 黄瓜; 病害; 遗传分析

中图分类号: S436. 421. 1 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2005) 03- 0100- 04

## Genetic Analysis of 4 Major Cucumber Diseases

ZHANG Hai-ying, MAO Ai-jun, ZHANG Feng, WANG Yong-jian, XU Yong

(National Engineering Research Center for Vegetable, Beijing 100089, China)

**Abstract:** The watermelon strain of papaya ringspot virus ( PRSV- W), zucchini yellow mosaic virus ( ZYMV), watermelon mosaic virus ( WMV) and scab( *cladosporium cucumerinum*) are major diseases that cause significant disease losses in cucumber. Based on a RIL population ( No. 8 European × Qiupeng), disease evaluations are identified. The frequency distribution in cucumber RIL population for DI traits involving resistance to the PRSV- W, WMV, ZYMV and scab show two peaks. This indicate that resistance to these diseases are controlled by main gene, but some minor gene also have moderate effect. The linkage analysis results showed that ZYMV, PRSV- W and WMV are linked, the sequence is ZYMV- 10cM- PRSV- 22 cM- WMV.

**Key words:** Cucumber; Disease; Genetic analysis

小西葫芦黄花叶病毒( Zucchini yellow mosaic virus, ZYMV)、西瓜花叶病毒、番木瓜环斑病毒西瓜株系( Papaya ringspot virus watermelon strain, PRSV- W) 是为害黄瓜的主要病毒, 也是侵染葫芦科作物的主要病毒<sup>[1]</sup>。近年来, 日光温室中, 尤其越冬茬黄瓜病毒病发生非常严重, 甚至造成大面积绝产。黄瓜黑星病( *Cladosporium cucumerinum*) 是世界性的毁灭性病害<sup>[2]</sup>。黄瓜植株若同时进行多种病毒的接种后, 由于不同病毒的表型是相似的, 因此很难准确区分该病症是由何种病毒引起的。因

此, 进行各种主要病害的遗传规律研究是进行黄瓜复合抗病育种的基础。

目前, 各国学者在病毒病的病毒种类、鉴定和遗传规律研究方面开展了大量的基础研究工作, 并取得了不少成果。Provvidenti<sup>[3]</sup> 最早对 ZYMV 的遗传规律进行了研究, 他认为 ZYMV 抗性基因受一对隐性基因控制, Kabelka 等<sup>[4]</sup> 的研究结果也表明该基因受一对隐性基因控制。Wang 等<sup>[5]</sup> 报道 PRSV- W 受隐性基因( Prsv- 1) 控制, 而 Wai 和 Grument<sup>[6]</sup> 却认为该性状受一显性基因( Prsv- 2) 控制。许多研

收稿日期: 2004- 09- 18

基金项目: 北京市科技新星计划( 954812800); 北京市自然科学基金( 5012006); 国家 863 计划( 2002AA244021, 2002AA207012- 3)

作者简介: 张海英( 1960- ), 女, 辽宁锦州人, 副研究员, 主要从事黄瓜抗病遗传育种研究工作。

究表明, TMG1 品种可以抗 PRSV、ZYMV、WMV、MWMV 等多种病毒<sup>[4,7]</sup>。本实验室研究结果表明, 我国华北露地型黄瓜品种秋棚也可以同时抗多种病毒。Park 等<sup>[8]</sup>曾利用分子标记对 PRSV-W 和 ZYMV 基因进行了遗传分析和定位研究, 发现二者紧密连锁, 并获得了与两种抗病基因紧密连锁的分子标记。在黑星病研究方面, 我国学者先后对黑星病的人工接种鉴定方法<sup>[9,10]</sup>、致病机理<sup>[11]</sup>、抗病机制<sup>[12]</sup>、防治方法<sup>[13]</sup>等进行了深入研究, 但目前关于 PRSV-W、WMV、ZYMV 和黑星病 4 种抗性基因的连锁关系还尚未见报道。在原有工作基础上, 研究黄瓜 ZYMV、PRSV-W、WMV 和黑星病的抗性遗传规律, 以期为黄瓜抗病育种提供理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 作图群体的构建

材料来自蔬菜研究中心黄瓜课题。以不同生态型的耐弱光自交系欧洲八号和光敏自交系秋棚为亲本, 从它们的杂交后代 F<sub>2</sub> 材料中随机抽样自交, 通过单粒传获得 F<sub>6</sub> 重组自交系构成 RIL 群体。母本欧洲八号, 经鉴定对 ZYMV、PRSV-W 和 WMV 感病; 父本秋棚抗上述 3 种病毒。

### 1.2 病毒的繁殖

ZYMV、PRSV-W、WMV 毒源由康奈尔大学纽约州农业试验站 Provvidenti 教授提供。采用有代表性的毒原, 在西葫芦上繁殖, 温度为 22~29℃, 发病后采集病叶。用 0.2 mol/L (pH 7.0) 的磷酸缓冲液稀释, 质量浓度为 0.33 g/mL。

### 1.3 RIL 群体抗病毒病性状调查

供试的黄瓜材料种子用纱布包好, 55℃温汤消毒后, 再浸泡 4 h, 置于 28℃恒温培养箱中催芽 1 夜, 播于装有灭菌营养土的 72 孔穴盘中。每个株系重复 3 次, 每重复 10 株苗。生长于防虫网室内。当黄瓜子叶展平时, 在子叶上撒少量 0.04~0.03 mm 金刚砂后采用摩擦接种法进行人工摩擦接种, 再用清水冲洗, 并用缓冲液摩擦接种健康黄瓜幼苗作无病对照, 接种当天可用湿报纸适当遮荫。接种后 7 d 和 20 d 分别调查局部症状和系统症状, 计算病情指数(DI)并划分株系材料的抗病类型。0 级: 无症状; 1 级: 1~2 片叶明脉; 3 级: 少数叶片轻花叶, 形态正常; 5 级: 多数叶片花叶, 形态正常; 7 级: 多数叶片严重花叶, 新叶畸形; 9 级: 几乎所有叶片严重花叶、畸

形或植株矮化。

$$DI = (\sum \text{级别} \times \text{株数}) \times 100 / (\text{总株数} \times 9)$$

用卡平方  $\chi^2$  检验重组自交系对 ZYMV、PRSV 和 WMV 的抗性是否符合 1:1 的比例。  $\chi^2 = \sum (O - E)^2 / E$ , O 为观察值, E 为理论值。

### 1.4 RIL 群体抗黑星病性状调查

供试的黄瓜材料种子用纱布包好, 55℃温汤消毒后, 再浸泡 4 h, 置于 28℃恒温培养箱中催芽 1 夜, 播于装有 2 层滤纸的培养皿中。每个株系重复 3 次, 每一重复 100 粒种子。采用许勇等的方法<sup>[9]</sup>进行人工苗期接种以及病情指数调查。

$$DI = (\sum \text{级别} \times \text{株数}) \times 100 / (\text{总株数} \times 5)$$

用卡平方  $\chi^2$  检验重组自交系对黑星病的抗性是否符合 1:1 的比例。  $\chi^2 = \sum (O - E)^2 / E$ , O 为观察值, E 为理论值。

3 种病毒病的病情指数小于 50 记为 A, 病情指数大于 50 记为 B。黑星病的病情指数小于 50 记为 B, 病情指数大于 50 记为 A。

连锁分析: 采用 JoinMap 3.0 分析抗性基因间的连锁关系。

## 2 结果与分析

### 2.1 黄瓜 RIL 群体对 ZYMV、PRSV-W、WMV 抗病性鉴定结果

分别选用 115、120 个黄瓜重组自交系株系和 2 个亲本进行了 ZYMV、PRSV-W、WMV 抗病基因的抗病性鉴定。表 1 显示了黄瓜重组自交系群体经过人工接种 ZYMV、PRSV-W、WMV 3 种病毒后的抗病鉴定结果。结果表明, 亲本秋棚抗 3 种病毒, 而欧洲八号则感上述 3 种病毒。重组自交系群体接种后, 其抗感株系分离比基本符合 1:1 的理论比例, 抗性受一对基因控制, 与前人的研究结果一致。

但 RIL 群体抗 ZYMV、PRSV-W、WMV 3 种病毒的病情指数在群体中有很大的差异, 变动于 0~90.0% 之间, 为此, 我们采用 SAS 统计分析软件进行统计分析, 并获得了 3 种病毒抗性的柱形分布图。图 1 显示, 病情指数在 RIL 群体中呈双峰连续分布, 但在双峰之间也有小峰存在。由此可以推测, 在本试验中, 双亲间抗 ZYMV、PRSV-W、WMV 的差异可能各由一个主效基因控制, 并存在多个微效 QTL 的修饰。由于微效 QTL 的修饰作用, 使得本应在 10% 和 50% 的峰值移至中间 35%~45%。

表 1 黄瓜重组自交系群体 ZYMV, PRSV-W, WMV, 黑星病抗病性鉴定结果

Tab. 1 The resistance evaluation of cucumber RIL population to ZYMV, PRSV- W, WMV virus and Scab

项目	欧洲八号	秋棚	RIL		$\chi^2$	P
	No. 8 European	Qiupeng	R	S	(R S= 1: 1)	
ZYMV	S	R	52	63	1. 1	> 0. 25
PRSV- W	S	R	69	51	2. 7	> 0. 1
WMV	S	R	64	56	0. 5	> 0. 45
黑星病( <i>Cladosporium cucumerinum</i> )	R	S	70	50	3. 2	> 0. 09

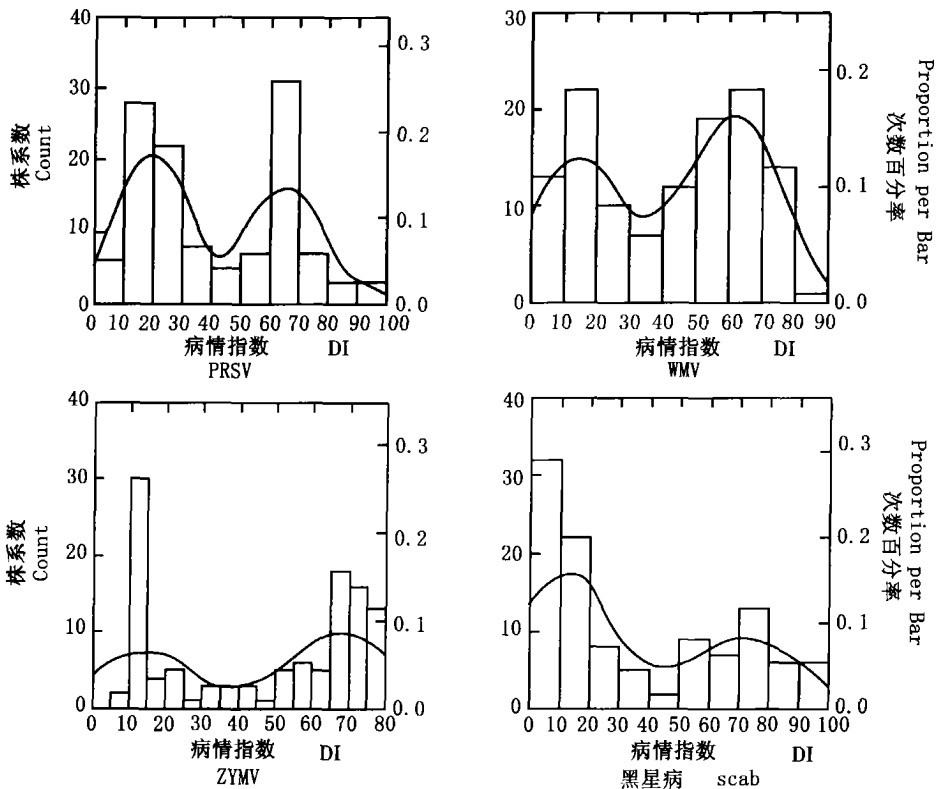


图 1 抗 ZYMV, PRSV- W, WMV 与黑星病病情指数在黄瓜重组自交系中的柱型分布

Fig. 1 The frequency distribution in cucumber RIL population for DI traits involving resistance to the watermelon of PRSV- W, WMV, ZYMV and Scab

2.2 黄瓜 RIL 群体对黑星病抗病性鉴定结果

选用 120 个黄瓜重组自交系株系和 2 个亲本进行了群体抗黑星病的抗病性鉴定。表 1 显示了黄瓜重组自交系群体经过人工接种黑星病后的抗病鉴定结果。结果表明, 亲本秋棚感黑星病, 而欧洲八号则抗黑星病。重组自交系群体接种后, 其抗感株系分离比基本符合 1: 1 的理论比例, 抗性受一对基因控制, 与前人的研究结果一致。与 3 种病毒的病情指数分布一样, 抗黑星病病情指数在 RIL 群体中呈双峰连续分布, 在双峰之间存在明显的小峰( 图 1)。

2.3 ZYMV-CH, PRSV-W, WMV, 黑星病连锁关系分析

运用 Joinmap 软件进行连锁分析表明, 黄瓜抗小西葫芦黄化花叶病毒(ZYMV)、番木瓜环斑病毒

(PRSV-W) 和西瓜花叶病毒(WMV) 的 3 种抗性基因是相互连锁的, 两两之间的遗传距离为 10 cM 和 12 cM, 排列顺序如图 2 所示。而抗黑星病基因与他们没有连锁关系。

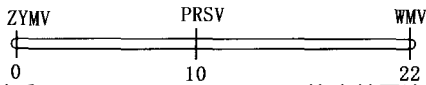


图 2 黄瓜 ZYMV, PRSV-W, WMV 抗病基因连锁图

Fig. 2 Linkage between cucumber ZYMV, PRSV- W, WMV resistance gene

3 讨论

已往的研究结果表明, 黄瓜对 ZYMV, PRSV- W, WMV 的抗性分别由一对隐性基因控制。本研究对黄瓜重组自交系的病情指数按通常采用的方法

进行抗、感界定并进一步进行遗传分析的结果也符合上述模式。但是, 根据 RIL 各株系的抗病性表现, 以下现象值得进行进一步讨论。

抗病亲本植株和 RIL 群体的抗病株系植株在接种上述病毒后, 基部第一片叶片常出现叶脉黄化现象, 而其上的叶片不再出现任何症状, 即不形成系统侵染。这一现象似乎表明, 病毒的侵染诱导了抗病基因的表达。

从整体看, RIL 各株系对 3 种病毒的抗病性水平的分布呈现双峰分布的特点, 但是在两高峰之间存在过渡类型, 在感病群体一侧, 各株系的病情指数或多或少地带有连续分布的特点。至于对黑星病的抗病性水平的分布, 上述偏离双峰分布的趋势更为明显, 出现这一现象的原因可能有两个方面。一是供试 RIL 群体为  $F_6$ , 少部分株系仍存在抗病基因的分离。对 3 种病毒的抗性均主要由隐性单基因控制, 由于分离, 在感病株系内部出现少数抗病株系(其理论分离比例为 1: 4), 使得病情指数的平均数有不同程度的降低。黄瓜对黑星病的抗性主要由显性单基因控制, 出现分离时, 抗病株系内部出现少数感病植株(其理论分离比例为 1: 4), 使病情指数不同程度的升高, 产生偏离双峰分布的现象。其二, 除了主基因控制外, 还存在调节基因或微效基因。调节基因可能加强或削弱了抗病主基因的作用, 微效基因的作用常被控制基因的作用掩盖。然而, 当植株为感病基因型时, 能够发挥数量型基因的作用, 调控抗病性。其在 RIL 的感黑星病株系一侧表现更为明显, 相关株系病情指数出现了数量性状分布的特点。

目前许多学者认为, 生物对病害的抵抗能力是多因子在时间和空间上综合作用的结果, 受到包括主效基因在内的多基因的控制, 按照单个质量性状基因进行分析无法真实反映出抗病基因的本质。今后, 我们将对上述抗性基因进行 QTL 定位的探索研究, 以反映其真实的抗病情况。

Park 等<sup>[8]</sup>曾对 ZYMV, PRSV-W 的抗病毒基因进行了基因定位研究, 其研究结果表明 ZYMV, PRSV-W 的抗病毒基因紧密连锁, 连锁距离仅为 2.2 cM, 本文的研究结果与之不同, 二者的遗传距离较大, 为 10 cM。原因可能在于使用的病毒株系不同。但本文的研究表明, 3 个抗黄瓜病毒基因呈现连锁关系, 说明黄瓜对 ZYMV, PRSV-W, WMV

的抗性基因是成簇存在的, 并且这些抗性基因存在于一个主要的连锁群 2 中, 这与前人的研究结果相类似<sup>[7]</sup>。这种现象在别的作物中也存在, 如 Ashfield<sup>[14]</sup>等曾发现大豆抗细菌性斑点病, 抗大豆花叶病毒和抗花生斑驳病毒基因出现在分子连锁图谱的 F 连锁群的标记 K644 和 B12 之间, 这种抗病基因的成簇出现为进一步利用 RGA 技术克隆抗病基因打下了良好基础。

#### 参考文献:

- [1] 古勤生, 范在丰, 李怀方, 等. 葫芦科作物病毒名录 [J]. 中国西瓜甜瓜, 2002, (1): 45-47.
- [2] 刘元明. 蔬菜危险性病害-黄瓜黑星病 [J]. 湖北植保, 1994, (5): 27-29.
- [3] Provventi R, Gonsalves D, Humaydan H. Occurrence of zucchini yellow mosaic virus in cucurbits from connecticut, new York, Florida, and California [J]. Plant Dis, 1984, 68: 443-446.
- [4] Kabelka E, Ullah Z, Grumet R. Multiple alleles for Zucchini yellow mosaic virus resistance at the zym locus in cucumber [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 997-1004.
- [5] Wang Y, Provvident R, Robinson R. Inheritance of resistance to watermelon mosaic virus 1 in cucumber [J]. HortScience, 1984, 19: 587-588.
- [6] Wai T, Grumet R. Inheritance of resistance to the watermelon strain of papaya ringspot virus in the cucumber line TMG I [J]. HortScience, 1995, 30: 338-340.
- [7] Wai T, Staub J E, Grumet R. Linkage analysis of potyvirus resistance alleles in cucumber [J]. J Hered, 1997, 88: 454-458.
- [8] Park Y H, Sensoy S, Wye C, *et al.* A genetic map of cucumber composed of RAPDs, RFLPs, AFLPs, and loci conditioning resistance to papaya ringspot and zucchini yellow mosaic viruses [J]. Genome, 2000, 43 (6): 1003-1010.
- [9] 许勇, 朱其杰, 张旭, 等. 黄瓜黑星病抗病性离体子叶接种鉴定方法 [J]. 北京农业大学学报, 1994, (1): 30-34.
- [10] 李宝栋, 冯东昕. 黄瓜品种抗黑星病筛选初报 [J]. 植物保护, 1994, (1): 20-23.
- [11] 李保聚, 李凤云, 苗则彦, 等. 黄瓜黑星病菌致病性研究 [J]. 辽宁农业科学, 1997, (5): 21-23.
- [12] 李淑菊, 吕淑珍, 马德华, 等. 黄瓜对黑星病的抗性机理 [J]. 华北农学报, 1997, 12(2): 121-124.
- [13] 李凤云, 李保聚, 苗则彦, 等. 黄瓜黑星病防治技术研究 [J]. 辽宁农业科学, 1998, (1): 8-10.
- [14] Ashfield T, Danzer J R, Held D, *et al.* Rpg1, a soybean gene effective against races of bacterial blight, maps to a cluster of previously identified disease resistance genes [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 1013-1021.