

# 黄瓜抗霜霉病的分子标记及相关基因的研究进展

张志, 王琪琪, 贺东 (齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 黑龙江齐齐哈尔 161601)

**摘要** 从黄瓜霜霉病的病原菌和发病特点、发病规律、影响发病的因素、分子标记、抗霜霉病基因相关的分离、鉴定等方面综述了黄瓜抗霜霉病的相关分子生物学领域的研究进展, 并对今后的研究方向进行了展望。

**关键词** 黄瓜霜霉病; 基因; 分子标记; 克隆

**中图分类号** S436.421.1<sup>+</sup>1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)18-120-03

## New Progress in Molecular Markers and Related Genes of Cucumber Downy Mildew

ZHANG Zhi, WANG Qi-qi, HE Dong (College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, Qiqihar university, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

**Abstract** Research progress of the molecular biology of cucumber downy mildew was reviewed from the aspects of the characteristics, occurrence regularity, molecular marker, pathogen of cucumber downy mildew, related isolation and identification of downy mildew gene. The direction of future research was forecasted.

**Key words** Cucumber downy mildew; Gene; Molecular marker; Cloning

霜霉病是世界上危害瓜类作物的主要叶部病害之一, 黄瓜霜霉病(Cucumber downy mildew)是危害 70 多个国家黄瓜生产的一种世界性病害。霜霉病是包括白粉病、枯萎病在内的三大病害之一。黄瓜霜霉病是由真菌门鞭毛菌亚门古巴假霜霉菌侵染引起的一种世界性病害, 在适宜条件下, 叶片发黄、枯死, 病情发展迅速, 产量亏损严重, 给黄瓜生产带来巨大威胁。近年来, 关于黄瓜抗霜霉病的分子生物学研究日益增多, 在抗病基因分离、鉴定、分子标记等方面取得了一定进展。笔者对黄瓜抗霜霉病的分子标记及相关基因的研究进展进行综述, 并对今后的研究方向进行了展望。

## 1 霜霉病的病原菌和发病特点

**1.1 病原菌** 古巴假霜霉菌(*Pseudoperonospora cubensis* (berk. et Curt.) Rostov)是一种专性寄生菌, 属于鞭毛菌亚门霜霉菌目和假霜霉属。病菌的孢子囊梗无色, 从气孔伸出, 单生或 2~4 根束生, 上部呈 3~5 次锐角分枝, 分枝末端着生一个柠檬形或卵形孢子囊, 孢子囊可释放出游动孢子或萌发长出芽管, 变为圆形休止孢子, 萌发芽管, 侵入寄主, 产生孢子囊适宜温度 15~20℃, 萌发适宜温度 15~22℃<sup>[1]</sup>。

**1.2 发病特点** 霜霉病侵染以叶片为主。苗期发病, 子叶上起初出现褪绿斑, 不规则形状, 且病斑逐渐呈黄色, 随着病情发展子叶很快变黄, 枯干; 成株期发病, 叶片上初现浅绿色水浸斑, 扩大后黄绿色转淡褐色, 呈多角形, 后期病斑汇合成片, 由叶缘向上卷缩, 全叶干枯, 严重时全株叶片枯死<sup>[2]</sup>。2 个时期潮湿时均生出灰黑色霉层于叶背面病斑上。

## 2 发病规律

气流和风雨是霜霉病菌孢子进行传播的主要媒介, 且对空气湿度要求较高, 棚内有结露, 叶面有水滴是发病的必要因素。叶片上有水滴, 15℃下孢子囊经 1.5 h 即可萌发, 游动孢子 2.0 h 即可萌发侵入引起发病, 在形成病斑后, 空气湿

度与孢子囊形成的速度和数量成正比, 在叶面有水滴和饱和湿度的条件下, 随着寄主叶组织充水, 病斑发展加剧, 可产生大型的孢子囊, 否则孢子囊不能萌发, 且 2~3 d 后即丧失萌发能力, 霜霉病发病的适宜温度是 15~24℃, 低于 15℃或高于 28℃不易发病, 温度越高, 越不易发病<sup>[3]</sup>。

## 3 影响发病的因素

**3.1 品种间抗病性、种植环境** 黄瓜品种间发病有差异。一般情况下, 较为感病的品种熟性较早、耐低温, 相对较抗病的品种较晚熟、耐热性强。地势较高、排水良好的地块适宜黄瓜种植, 同时施足底肥, 合理追施氮、磷、钾肥, 可降低霜霉病的发病概率。

**3.2 光照、温度和湿度** 在光照与黑暗交替的环境条件下产生孢子最多, 而在持续光照下, 几乎无孢子囊产生<sup>[4]</sup>。黄瓜霜霉病属于高湿病害, 孢子囊在叶面有水滴或水膜时才能萌发, 石延霞等<sup>[5]</sup>研究表明, 叶片接种病菌后保湿 2 h 可引起发病, 病菌侵入寄主后, 环境湿度条件对病害的发展影响不大。Cohen 等<sup>[6]</sup>研究发现, 孢子囊产生和侵染的适宜温度为 15~20℃。

**3.3 显症天数与产孢潜能的关系** 研究发现, 显症后天数与累积孢子囊量之间呈抛物线型相关, 活体叶片单位面积上产生的孢子囊量比离体叶片多<sup>[7]</sup>。且显症后天数与累积孢子囊量、病斑面积间存在较高相关性<sup>[6-9]</sup>。

## 4 黄瓜抗霜霉病基因分子标记的研究

黄瓜基因组较小, 约为  $3 \times 10^5$  kb。Kennard 等<sup>[10]</sup>报道了 2 个与黄瓜抗霜霉病基因连锁的 RFLP 标记 CsC230/*EcoRI* 和 CsC593/*DraI*, 与抗性基因的遗传距离分别为 9.5 和 17.7 cM。Horejsi 等<sup>[11]</sup>鉴定出一个与控制霜霉病基因 dm 紧密连锁的 RAPD 标记 BC5191100, 遗传距离为 9.9 cM。丁国华等<sup>[12]</sup>以 L18-10-2(感霜霉病黄瓜)和 129(抗霜霉病黄瓜)为亲本构建 F<sub>2</sub> 代分离群体, 获得了一个与霜霉病抗病基因紧密连锁的 RAPD 标记 SBSP18561, 其与抗性基因的遗传距离为 7.85 cM, 并将该 RAPD 标记转化成 SCAR 标记 SSB-SP18494。但上述研究的分子标记与黄瓜霜霉病抗性基因间

**基金项目** 黑龙江省教育厅科学技术研究项目“钾对高寒地区设施黄瓜生长影响的研究”(11551538)。

**作者简介** 张志(1966-), 男, 黑龙江海伦人, 副教授, 硕士, 从事生物遗传学方面的研究。

**收稿日期** 2016-05-26

的遗传连锁距离均较远,刘苗苗<sup>[13]</sup>构建了 8 个连锁群,包括 39 个标记,总长度为 287.4 cM,平均图距为 7.37 cM,每个连锁群的标记数为 2~11 个,共定位到 5 个 QTLs (dml. 1、dm3. 1),贡献率最大为 19.6%。赵振国<sup>[14]</sup>获得了与 ILDM10-4 抗性基因 (*ILdm*) 连锁的 3 个 SSR 标记: SSR00772、SSR03529、SSR15321,它们与目标基因的遗传距离分别为 3.8、6.0、16.7 cM,其中,标记 SSR00772 的遗传距离小于 5 cM,可用于分子标记辅助选择育种,3 个标记位于抗霜霉病基因两侧,为其精细定位及图位克隆奠定了基础。孟攀奇等<sup>[15]</sup>采用 BSA 法筛选到 1 个 AFLP 引物组合 P11M70,其在抗病池和感病池间表现为多态性,抗病池和抗病亲本均具有大小约 304 bp 的特异谱带,感病池和感病亲本均扩增出大小约为 301 bp 的特异片段,经 F<sub>2</sub> 单株验证及连锁分析,该特异片段与霜霉病抗病相关基因相连锁,连锁距离为 5.22 cM。

## 5 黄瓜抗霜霉病相关基因的研究

对于抗霜霉病基因的克隆,目前通常以获得抗病基因同源序列 (RGA) 为入口,根据抗病基因间相似序列设计简并引物,从植物基因组中得到的扩增产物与抗病基因紧密连锁,有较高的同源性<sup>[16]</sup>。

李建武<sup>[17]</sup>采用 SSH 技术构建了富集黄瓜霜霉病抗性相关基因的正、反向差减文库,应用反向 Northern 斑点杂交技术进行筛选,从正、反向差减文库中分别得到了 60 和 26 个非重复序列片段 (singleton ESTs),其中,正向差减文库的 singleton ESTs 涉及 12 种功能类别和未知功能,比较分析发现,反向差减文库与正向差减文库相比,下调显著表现在有更多的能量代谢和次级代谢相关基因,说明在霜霉病病原菌胁迫下,黄瓜参与次级代谢和能量代谢基因的表达更多地受到了抑制或破坏。

刘大军<sup>[18]</sup>利用 SSH 技术构建抗病黄瓜材料接种霜霉病菌和未接种差异表达的消减 cDNA 文库。经反向 Northern blot 杂交检测,共得到 48 个阳性克隆、14 个 UniESTs,包括 8 个 singletons 和 6 个 contigs,找到了与之匹配的同源序列有 10 个 EST 片段,推测其余未找到同源序列的 EST 片段可能是新基因,RT-PCR,试验和实时定量 RT-PCR,结果表明,Csa001907 和 Csa002921 在抗病品种中有可能是黄瓜抗霜霉病的 R 基因,证明了大部分 R 基因是组成型表达的,且在抗病品种中存在下调表达现象,通过实时定量 RT-PCR 试验表明,Csa001907 和 Csa002921 在感病品种中不存在下调表达现象。刘大军等<sup>[19]</sup>研究发现,在黄瓜基因组中与拟南芥抗霜霉病基因存在 185 个同源 R 基因,有 2 个与甜瓜的抗霜霉病基因 At1 和 At2 同源的 R 基因,通过聚类分析将这些基因分为 6 类,初步认定 Csa001907 和 Csa002921 为黄瓜抗霜霉病的 R 基因,且在叶片组织中有一定表达量,其表达量减少可引发黄瓜品种的抗病反应。

李佩芳<sup>[20]</sup>采用实时荧光定量 PCR,以 *EF1- $\alpha$*  和 *UBI-ep* 为内标基因,探讨黄瓜抗霜霉过程与相关抗性基因的关系,发现抗病自交系 HNAU-0023 防御基因 *PR-1*、*MT*、*PIP*、*Danj* 和 *CAT*,信号转导因子 *MAPK1*,转录因子 *TR*、*WRKY60*、

*TF* 和 *WRKY30* 相较于感病自交系 IL112,表现为上调表达,表明这些基因在一定时间段可能参与了黄瓜过敏性抗病反应,GNRF 可能未参与黄瓜过敏性抗病反应,喷施胍胍质抑制剂 DDG 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 抑制剂 DPL/DMTU 6 h 后接种霜霉病菌,相较于清水对照,抗病自交系 HNAU-0023 的防御基因 *PR-1*、*PIP* 和 *MT*,转录因子 *TR*、*TF*、*WRKY60*、*WARKY30* 和 *MYC*,信号转导因子 *RBOH* 和 *MAPK1* 表现为下调表达,说明抑制剂 DPL/DMTU/DDG 可有效地抑制前期高效上调表达抗性基因下调表达,同时证实这些抗性基因参与了过敏性抗病反应,可能是黄瓜抗霜霉病过程中的关键调控基因。

刘大军等<sup>[21]</sup>分析了 SSH-EST 代表的基因功能,发现叶绿体的重建和保护机制和抗氧化胁迫能力与抗病品种抗病能力密切相关,同时,提出可能参与了 R 基因介导的防御反应有 SSH-EST 代表的 *clpb*、*HSP70*、*HSP22* 和 肽脯氨酰顺反异构酶,R 蛋白的“保卫靶”可能是 *smHSP*,负责监测细胞内的异常,该发现提供了关于揭示活性氧机制和 R 基因介导的防卫机制之间关系的关键证据。李晓辉<sup>[22]</sup>通过 qRT-PCR 分析结果表明,黄瓜抗病品种 HNAU-0023 离体叶片在接种霜霉病菌 48 和 72 h 后 *CsFBXL* 基因的表达量显著下调,而在诱导 24 h 时感病自交系 112 显著上调表达,这暗示 *CsFBXL* 基因具有组织特异性表达的同时可能对黄瓜霜霉病过敏性抗病反应存在负调控,在不同激素 (ABA、SA、JA) 诱导下,前期表达量均较弱,*CsFBXL* 基因在 24 h 时在 ABA、SA 诱导下显著表达,JA 的表达量次于二者,因此,推测 ABA、SA、JA 激素诱导的信号转导调控可能有黄瓜泛素 *CsFBXL* 基因的参与。

目前,实时荧光定量 PCR 应用广泛,定量极微量的基因表达或 DNA 拷贝数通过此技术与其他分子生物学技术相结合成为可能,且荧光定量 PCR 技术、荧光标记核酸化学技术和寡核苷酸探针杂交技术的应用发展,使定量 PCR 技术在临床疾病的诊断和治疗方面可能有帮助。SSH 是结合了抑制性 PCR 和消减杂交技术的快捷、有效的差异基因筛选方法,比传统的 DD-PCR、SAGE 及 cDNA-RNA 等技术假阳性低、低丰度 mRNA 富集效率高、灵敏度高、重复性好等,广泛应用于动植物发育与分化、微生物基因分型差异、疾病易感性差异、病理和正常样本方面的抗药性差异和组织差异的研究。

## 6 问题与展望

**6.1 增加分子标记类型,加速优良新品种的选育进程** 在抗病基因的分子标记方面虽达到了理想距离,但目前用于黄瓜遗传与育种研究中的分子标记主要是 SSR、AFLP 和 RAPD 标记,与其他植物相比,获得的分子标记类型相对较少。为加速黄瓜优良新品种的选育进程,扩展黄瓜种质资源的遗传多样性和重视黄瓜基因表达及调控等方面的研究,克隆主要经济性状基因并开发相关廉价快捷的分子标记方法非常必要。

**6.2 培育高抗黄瓜霜霉病品种应用于实际生产** 在黄瓜抗霜霉病基因方面,对于抗霜霉病相关基因的功能验证方面相

对复杂,研究相对较少,筛选更为精确的黄瓜抗霜霉病相关基因,利用其优化黄瓜遗传转化体系是黄瓜抗霜霉病研究的重点和难点,分离黄瓜抗霜霉病相关基因,利用分子育种手段培育高抗黄瓜霜霉病品种,打破效率和成本因素,应用于实际生产中,是黄瓜霜霉病分子生物学研究的实际目标。

### 参考文献

[1] 杨景娟. 保护地黄瓜霜霉病发生特点及综合防治措施[J]. 安徽农学通报, 2012(4): 47-48.

[2] 高屹. 黄瓜霜霉病与靶斑病发生原因及防治措施[J]. 农民致富之友, 2014(1): 49.

[3] 张耀莉. 黄瓜霜霉病及其综合防治[J]. 园艺与种苗, 2015(4): 62-63.

[4] COHEN Y, ROTEN J. The relationship of sporulation photosynthesis in some obligatory and facultative parasites[J]. Phytopathology, 1970, 60(1): 1600-1603.

[5] 石延霞, 李宝聚, 刘学敏. 黄瓜霜霉病菌侵染若干因子的研究[J]. 应用生态学报, 2005, 16(2): 257-261.

[6] COHEN Y, ROTEN J. Field and growth chamber approach to epidemiology of *Pseudoperonospora cubensis* cucumbers[J]. Phytopathology, 1971, 61(6): 736-737.

[7] SALEHI F, LACROIX R, WADE K M. Effects of learning parameters and data preset ation on the performance of backpropagation networks in milk yield prediction[J]. Trans ASAE, 1998, 41(1): 253-259.

[8] 石延霞, 李宝聚, 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.

[9] SURVILLEN E, SIDLAUSKIENC A. Investigation of fungicides efficiency to control downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis* (Bert. et Curt.) Rostow.) in cucumber[J]. Hort Veg Growing, 1999, 18(3): 250-255.

[10] KENNARD W C, POETTER K, DIJKHUIZEN A, et al. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber[J]. Theor appl genet, 1994, 89: 42-48.

[11] HOREJSI T, STAUB J E, THOMAS C. Linkage of random amplified polymorphic DNA markers to downy mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) [J]. Euphytica, 2000, 115(2): 105-113.

[12] 丁国华, 秦智伟, 周秀艳, 等. 黄瓜霜霉病抗病基因的 RAPD 及 SCAR 标记[J]. 西北植物学报, 2007, 27(9): 1747-1751.

[13] 刘苗苗. 黄瓜霜霉病、白粉病抗病基因的 QTL 定位[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2010.

[14] 赵振国. 黄瓜-酸黄瓜抗霜霉病渐渗分子标记的筛选及细胞程序性死亡相关基因的表达分析[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.

[15] 孟攀奇, 蔡丽静, 张桂华, 等. 与黄瓜霜霉病抗性相关基因连锁的分子标记研究[J]. 长江蔬菜, 2014(8): 12-14.

[16] 丁国华. 黄瓜抗病基因同源序列的克隆及其对霜霉病抗病基因标记的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2004.

[17] 李建武. 黄瓜霜霉病抗性相关基因筛选及过敏性抗病机制[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.

[18] 刘大军. 黄瓜霜霉病抗病基因鉴定及其表达分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2013.

[19] 刘大军, 秦智伟, 周秀艳, 等. 黄瓜基因组中抗霜霉病候选基因的生物信息学及其表达特异性[J]. 中国农业科学, 2013, 46(19): 4066-4074.

[20] 李佩芳. 黄瓜霜霉病过敏性反应的研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2013.

[21] 刘大军, 秦智伟, 周秀艳, 等. 利用 SSH 技术鉴定黄瓜抗霜霉病相关基因[J]. 中国蔬菜, 2014(1): 17-23.

[22] 李晓辉. 黄瓜泛素 E3 连接酶基因的克隆及表达分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2014.

(上接第 92 页)

表 4 六堡茶感官审评结果

Table 4 Sensory evaluation results of Liupao tea

样品名 Sample name	外形 Shape	汤色 Colour of tea	香气 Aroma	滋味 Taste	叶底 Leaf bottom
冷发酵特级茶 Premium tea by cold fermentation	紧细、匀整、有毫、有金花	深红	有陈香	醇厚、甜	红褐柔软、匀齐
冷发酵 1 级茶 I grade tea by cold fermentation	紧细、匀整、有毫	深红	有陈香	陈味醇厚	黑褐柔软、匀齐
双蒸双压特级茶 Premium tea by double steam by double compaction	紧细、匀整、有毫	尚深红	陈香明显	陈味醇浓	红褐柔软、尚匀齐
双蒸双压 1 级茶 I grade tea by double steam by double compaction	紧结、匀整、显毫	尚深红	陈香明显	陈味醇、浓、稍涩	黄褐柔软、尚匀齐

冷发酵将拼堆好的茶叶加水至含水量 25% 左右, 渥堆、翻堆交替进行 4~5 次, 依照发酵情况持续 1 个月左右的时间, 蒸压入篓晾置陈化。产品滋味醇和, 优点是能耗低, 利用物质转化产生的热, 促进物质转化, 利于掌握发酵程度, 发酵过程中产生丰富的益生菌, 利于六堡茶品质的形成; 缺点是发酵时间长, 占用场地时间长。

### 参考文献

[1] 衣艳芳, 苏淑梅, 张兴勇, 等. 广西六堡茶生产工艺“渥堆”法的分析比较[J]. 广西农学报, 2011, 26(4): 61-63.

[2] 何梅珍, 黄达勤, 石荣强, 等. 六堡茶渥堆发酵自动控制技术研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(24): 10136-10138.

[3] 王登良, 张均伟, 龙志荣, 等. 六堡茶加工工艺探讨[J]. 广东茶业, 2009(6): 36-38.

[4] 温志杰, 石荣强, 何勇强, 等. 六堡茶渥堆过程中微生物种群变化的研

究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(2): 1009-1011.

[5] 陈椽. 制茶学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 267.

[6] 梁燕妮, 田春林, 俸雪. 六堡茶研究的现状及发展前景[J]. 农业与技术, 2014, 34(11): 10-11.

[7] 张正竹. 茶叶生物化学实验教程[M]. 北京: 中国农业出版社, 2009: 33.

[8] 周卫龙, 徐建峰, 陆小磊, 等. 茶水浸出物测定: GB/T8305—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

[9] 周卫龙, 孙安华, 钟萝, 等. 茶多酚测定: GB/T8313—2002[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003.

[10] 徐建峰, 周卫龙, 陆小磊, 等. 茶游离氨基酸总量测定: GB/T8314—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

[11] 陆小磊, 周卫龙, 徐建峰, 等. 茶咖啡碱测定: GB/8312—2013[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.

[12] 黄意欢. 茶学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.

[13] 连文钦, 蔡值凌, 凌荔银, 等. 进出口茶叶感官审评室条件: SN/T0917—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2014.