

# 分子标记技术在黄瓜育种上的应用

刘剑辉

(黑龙江省农科院园艺分院, 哈尔滨 150069)

中图分类号: S63; S604<sup>+</sup>.3 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2006)03-0038-02

分子标记是指以生物大分子的多肽性为基础的遗传标记。分子标记技术的出现, 使黄瓜育种中的间接选择成为可能, 大大提高了遗传分析的准确性和选育的有效性, 因而分子育种技术在黄瓜的遗传育种领域越来越受到重视。

黄瓜是重要的蔬菜作物之一, 分子标记技术作为一项非常有希望的新技术, 已开始广泛应用于包括黄瓜在内的许多作物的遗传育种研究。以下综述了分子标记技术在黄瓜遗传育种中应用的几个主要方面。

## 1 亲缘关系和遗传多样性的研究

分子标记是进行种质亲缘关系分析和检测种质资源多样性的有效工具。对玉米、大麦、小麦等作物的研究表明, 利用分子标记可以确定亲本之间的遗传差异和亲缘关系, 从而确定亲本间遗传距离, 并进而划分杂交优势群, 提高杂种优势潜力。

分子标记用于黄瓜系谱分析在国内外已有多篇报道。Dijkhuizen 等利用 RFLP 标记评价两组黄瓜种质的遗传多样性。在第一组 16 个品系中, RFLP 标记反映了与同工酶分析一致的品种间的亲缘关系; 在第二组 35 个栽培品种中, RFLP 分析揭示了与形态(果形)及实际系谱关系相一致的品种间的亲缘关系, 认为 RFLP 可用于黄瓜分类鉴定和品种保护。Staub 等用同工酶和 RAPD 标记评价了 38 个黄瓜品系的多态性。Katzir 等用简单序列重复长度多态性(SSR)试验了不同葫芦科蔬菜品系的长度多态性, 7 个 SSR 中的 4 个可检测出 11 个黄瓜品系的多态性。张海英等利用 RAPD 技术对国内外多个生态型的 34 份黄瓜品种资源进行遗传亲缘关系分析, 从 200 个 10 碱基的随机引物中筛选出 20 个用于 PCR 反应, 39.2% 的扩增条带表现多态性; 每个生态型品种都具有其特有的扩增(缺失)条带以区别其它生态型品种; 聚类分析将供试材料分为 3 大类群。从分子水平上验证了传统的黄瓜地域分类标准及黄瓜是遗传基础狭窄的蔬菜作物。我国黄瓜种质资源丰富, 由于长期定向遗传改良, 目前生产上推广利用的品种其遗传基础日益狭窄, 应用分子标记分析目前主要推广杂交种的亲本及将来有利用价值的优良亲本的亲缘关系, 从而为现阶段黄瓜育种实践中减少杂交组合数目、有效划分杂交优势群、提高品种质量及育种效率提供依据。应用分子标记鉴定黄瓜种质, 也将为利用国外优良种质资源, 利用黄瓜的地方种、野生种、近缘种丰富我国黄瓜品种的遗传基础提供依据。

## 2 分子标记遗传图谱的建立

遗传图谱的构建是基因组研究中的重要环节, 可为基因定位与克隆及基因组结构和功能的研究打下基础。随着以

RFLP 为代表的分子标记的出现, 遗传作图在许多物种中得到了飞速发展。在植物中已分别发表了番茄、玉米、水稻、小麦等许多种植物的分子图谱, 其中有些图谱包含了上千个分子标记。构建遗传图谱的主要步骤包括: 根据遗传材料之间的多态性确定亲本组合, 建立作图群体; 群体中不同植株或品系的标记基因型的分析; 标记间连锁群的确定。其中构建永久性分离群体是作图成功和高效率的关键。

近年来, 分子标记已用于黄瓜的遗传作图。Kennard 等利用 RFLP、RAPD、同工酶、形态和抗病性所产生的标记, 进行了黄瓜遗传图谱的构建, 得到 58 个位点的遗传图谱, 分属 10 个连锁群, 该图谱覆盖的基因组总长度约为 766 cM, 标记间平均距离约为 21 cM。Lee 等利用 RAPD 在黄瓜的杂交 F<sub>2</sub> 群体中发展分子标记, 获得具有 28 个 RAPD 标记的黄瓜分子连锁图谱。Serquen 等利用重组近交系构建了由 77 个 RAPD 标记和三个基因组成的 80 个位点的黄瓜遗传图谱, 分属 9 个连锁群, 覆盖约 600 cM。在连锁图的绘制上, 今后的主要工作有两项, 一是填补连锁图上较大间隙, 使其更加“饱和”。二是用更为育种家们接受的经济、实用的分子标记(如 RAPD、SSR 等), 或者利用 STS-PCR 的方法, 将 RFLP 标记转化为育种上容易利用的 PCR 标记。

## 3 利用分子标记可以对基因进行定位

标记目标性状基因的方法目前主要有两种: 一是利用近等基因系或 Michelson 等(1991)提出的分离群体分组分析法(Bulked Segregant Analysis, BSA), BSA 是将 F<sub>2</sub> 分离群体中研究的性状根据其表型(如抗病、感病)分成两组, 将每组内的一定数量的植株的 DNA 混合, 形成按表型区分的 DNA 池, 也称近等基因池(isogenic DNA pools), 并用作模板进行 RAPD 分析。近等基因系和近等基因池的共同特点是被比较的两系或两池间除了目标基因所在的染色体区域外, 染色体的其它任何部位的基因组成几乎是一样的。Martin 等(1991)通过比较两个番茄近等基因系 RAPD 的多态性, 鉴定出与抗 *Pseudomonas* 的基因(Pto)紧密连锁的 DNA 片段(S47、R110 和 RS120), 并将该基因定位在番茄的第五号染色体的连锁图中。二是利用已有的连锁图进行标记。一旦发现某一目标基因被定位在某一染色体上, 就可以选择分散在染色体不同位点的标记, 逐渐逼近, 找到该基因的分子标记。这些与目标基因紧密连锁的分子标记的发现, 使进一步克隆目标基因, 进行基因转移成为可能。

## 4 分子标记辅助选择

植物育种中分子标记辅助选择是通过分析与目标基因紧密连锁的分子标记来判断目标基因是否存在。利用分子标记

不仅可定位目标基因,也可利用与目标基因紧密连锁的分子标记追踪目标基因,进而进行分子标记辅助选择,其快速、准确的优越性已在实践中表现。Hallden 等找到了与抗病基因紧密连锁的 PCR 标记,并设计了自动化操作设备,每天可对4 800个样品进行分析。张海英等用 RAPD 技术获得了欧洲温室类型黄瓜材料的特征谱带,拟以此建立分子标记辅助选择系统,从而对杂交后代进行定向选择。利用分子标记技术对单基因控制的性状进行辅助选择将在黄瓜遗传育种中大有应用。

5 品种纯度鉴定

鉴定作物品种纯度的常规方法是根据田间表型性状进行鉴定,后来发展为利用同工酶的方法,但二者都有一定的缺

陷。近年来应用分子标记建立品种的指纹图谱已用于品种纯度的鉴定,该方法快速(数小时或数天)、准确、简便、成本也不太高,在幼苗或种子阶段就可鉴定出品种的纯度。Matsuura 等发现利用 RFLP 分析可快速检测黄瓜杂交一代 F1 品种的纯度。Truksa 等利用 3 个黄瓜亲本材料,分析了其 RAPD 多态性,发现多态性程度较差,认为 RAPD 分析不适于验证黄瓜杂交种纯度。

综上所述,分子标记技术的进一步发展和在黄瓜上的应用,将促使对黄瓜遗传基础的更深入了解,促进目标基因在品种间的转移,使得黄瓜种质资源的管理、利用和新品种的选育变得更加有效,将极大地推动黄瓜的育种进程。

辽东地区首次发现越橘叶斑病

冯 璐<sup>1</sup>, 栾雨时<sup>1</sup>, 马 强<sup>2</sup>

(1. 大连理工大学环境与生命学院, 大连 116023;  
2. 大连越橘科技开发有限公司, 庄河 116411)

越橘俗称蓝莓,属于杜鹃花科越橘属(*Vaccinium. spp.*)植物,它不仅是一种果品,更是一种保健和功能食品。正因为如此,越橘已成为美国、欧洲、日本等发达国家和地区需求量急速增加的水果,国际粮农组织甚至将其列为人类五大健康保健食品之一。在国际市场上越橘果的价格一直居高不下。在美国主产区,越橘鲜果大量收购价格为 3 美元/kg,零售价为 10 美元/kg。日本从美国和加拿大进口越橘鲜果价格高达 6~8 美元/kg,只有 20% 的富有人群才能消费越橘。越橘鲜果在香港地区售价高达 120 港币/kg;我国外贸部门收购的野生越橘冷冻果的出口价位也高达 2 000 美元/t。但是,目前我国主要在大兴安岭、小兴安岭及长白山地区有少量野生资源(笃斯越橘)可以利用,果实始终处于供不应求的状态。

我国的吉林农业大学和中国科学院植物研究所(江苏省)率先进行野生资源的利用和引种工作。近年来,在辽宁、吉林、黑龙江、山东等地正在开始大面积栽培生产,未曾遇到较严重的病害。然而,2005 年夏季辽宁省东部地区的气候条件异常,阴雨连绵、日照甚少,在大连(庄河)、丹东等地的越橘种苗繁育圃场发现了一种为害严重的病害,给越橘种苗生产带来了巨大损失。对此进行了调查和研究,现将主要结果报告如下。

1 症状

该病主要为害幼苗的叶片,病症表现为整个叶片零星分布红褐色圆斑,圆心灰褐色,边缘紫褐色,最终整个叶片枯萎死亡。出现症状到植株枯死,少则两周,多则一个月。

2 病害调查

自从 7 月中旬在大连(庄河)的种苗繁育圃场发现患病株后,查阅国内所有越橘方面的著作和文献,未曾发现相关的报道。经进一步检索国外文献,发现这种病害与美国北卡罗莱纳州 W. O. Cline 报道的越橘叶斑病害相似,该病害感染了当时整个北美卡罗莱纳州的越橘商业种植园,为害严重。且发

病时的气候条件与我们今年遇到的完全一致,同为高温多雨。

据 P. s. Oiiambo 报道,该病原菌可以侵染不同叶龄的叶片,通过雨水传播,其菌丝体或孢子寄居在叶片组织内越冬,当温度达到 24℃~28℃时即可萌发,继续侵染新叶。

对该病的跟踪调查发现,8 月份是发病高峰,为害严重。受害程度与苗木所处的小气候条件及品种(系)等有很大的关系,同一品种,在排水及通风透光良好的条件下,受害较轻;反之,则受害严重。小苗的发病情况明显比大苗严重。高丛类型的越橘品种(系)受害很少,矮丛类型的受害最重,半高丛类型的居中。2005 年 9 月,对 5 个土栽品种的发病率和病情指数进行了调查,每个品种调查 20 株,每株 5 片叶,按以下分级标准统计:0 级:叶片上无病斑;1 级:叶片上有个别病斑;2 级:病斑面积占叶面积的 1/3 以下;3 级:病斑面积占叶面积的 1/3~1/2;4 级:病斑面积占叶面积的 1/2 以上。经统计计算后的数据整理于下表。

不同越橘品种受叶斑病为害的程度表

品种	美登	斯维克	北空	北青	蓝丰
发病率(%)	100	90	75	50	0
病情指数	61±4.1A	35±7.0B	26±12.1B	6±7.7C	0 D

可见,被调查的 5 个品种中,矮丛的美登品种发病率最高,属于易染品种;高丛的蓝丰品种抗病能力最强,没有染病;其它品种的受害程度也各有差异;被调查的 5 个品种之间病情指数的差异达到了极显著水平。仅在大连(庄河)越橘种苗繁育圃场的 2 000 m<sup>2</sup> 面积上,2005 年 7~8 月间的主要发病期内,共死亡 6 000 余株,染病数万株。按每株苗 5 元(RMB)计算,损失数万元。加上其他地块以及丹东苗圃的损失,估计可达数十万元。根据蔓延情况,如果不及时采取有效措施,损失将更加惨重。

3 病害防治

病情出现后,我们交叉使用甲基托布津 1 000 倍液和多菌灵 800 倍液喷施叶面,每周一次,叶斑病得到适当的控制。上述两种杀菌剂在日照较强和空气相对湿度较低时效果显著。

我国东北地区,由于无霜期较短,大面积栽培的越橘以半高丛和矮丛为主,它们都属于易染病类型,如不尽早防范,很可能造成巨大损失。但是由于该病在我国首次被发现,尚缺乏完善的综合防治措施,暂且须参考国外的经验。结合美国对叶斑病的报道,建议最好在夏季到来之前进行一次大规模的枝叶修剪,随后焚烧;发现病情后尽早喷施广谱性的杀菌剂。