

瓠瓜和野生西瓜在西瓜抗病育种中的利用

肖光辉 吴德喜 肖兰异

(湖南省园艺研究所·长沙)

许 勇

(国家蔬菜系统工程技术研究中心·北京)

郑素秋

(湖南农业大学·长沙)

第一作者简介:肖光

辉,1964年2月生,沈阳

农业大学硕士研究生毕

业,现在湖南省园艺研

究所工作。主要从事果

蔬的良繁、育种和食用

菌栽培生理以及西瓜抗

病育种研究。主持湖南

省科委课题《西瓜遗传工

程育种及野生资源利用

研究》,负责湘研系列辣

椒和茄子的良繁制种。

曾获长沙市星火科

技二等奖,湖南省星火

科技成果四等奖,湖南

省农业科技进步一等

奖,湖南省农科院科技

开发经营成果特等

奖,一等奖,科技进步

二等奖各一次。先后

发表论文20余篇,其

中《园艺学报》、《食

用菌学报》等学报级

杂志5篇。

摘要 为了创造西瓜新的种质资源,用DNA浸胚法将瓠瓜的总DNA导入西瓜,在D₃代选育出了4份抗性材料;用常规育种方法,将野生西瓜的抗枯萎病性状转到栽培西瓜中,后代在病圃中经7代自交纯化和抗性选择,选育出了4份抗性材料。苗期接种鉴定和疫土自然接种鉴定的结果都表明,选育出的8份材料中,对西瓜枯萎病有2份高抗,6份中抗,对炭疽病的抗性均较强。

关键词 西瓜 瓠瓜 DNA 野生西瓜 抗病育种

西瓜枯萎病是西瓜生产上的主要病害之一,在某些地区枯萎病已经成为制约西瓜生产的限制因子,抗枯萎病育种是育种学家急待解决的一大难题。西瓜原产南非,我国为西瓜次生地,西瓜种质资源比较贫乏,抗枯萎病品种资源更为稀少^[1],利用栽培品种资源进

行常规育种研究,很难有大的突破。瓠瓜对西瓜枯萎病具有高度抗性或免疫,瓠瓜DNA导入西瓜已获得了性状变异^[2]。采用遗传工程育种方法将瓠瓜DNA导入西瓜有可能选育出高抗西瓜枯萎病的新材料。有研究表明,野生西瓜中不仅存在抗枯萎病基因,同时还存在一般栽培品种中少见的有利性状^[3],利用常规育种手段有可能将野生西瓜的有利性状转到栽培西瓜上来,获得新的种质资源。于是对瓠瓜和野生西瓜在西瓜抗病育种中的利用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 供体瓠瓜 品种为长瓠子,果实圆柱形,老熟果果皮白色,对西瓜枯萎病免疫。

1.1.2 野生西瓜与非洲西瓜 高抗西瓜枯萎病的野生西瓜材料^[3] S₁₄₃ S₁₄₃ S₁₄₄ S₁₄₈,引自新疆八一农学院。高抗西瓜枯萎病的非洲西瓜与栽培西瓜的杂交后代^[3] 069-1(18), L-6-3, L-5-2H-3引自西北农业大学。

1.1.3 栽培西瓜品种 新青、春蜜、蜜宝、查理斯顿、灰卡红和从土耳其引进的一西瓜常规品种,该品种果实圆球形,深绿色皮,综合性状优良。

1.1.4 西瓜枯萎病菌株 由中国农业科学院郑州果树研究所张学炜提供的1强致病性菌株。

1.2 抗性材料选育方法

1.2.1 分子育种方法 以从土耳其引进的一综合性状优良的常规西瓜品种为DNA受体,瓠瓜为DNA供体,采用DNA浸胚法将瓠瓜的总DNA导入西瓜^[2]。变异后代在连作西瓜3年以上,前茬西瓜枯萎病发病率在30%以上的病圃中直播,人工自交,选留抗病单株或株系,进行多代选择,自交纯化。

1.2.2 常规育种方法 以栽培西瓜为母本,野生西瓜

* 本研究系湖南省科委和湖南省自然科学基金资助项目。

为父本杂交。后代在连作西瓜 3 年以上,前茬西瓜枯萎病发病率 30% 以上的病圃中直播,人工自交,淘汰感病单株或株系,进行多代选择,自交纯化。

1.3 抗病性鉴定方法

1.3.1 疫土自然接种鉴定 以连作西瓜 3 年,枯萎病发病率约为 30%,土壤带菌量为 2.16×10^3 个/克干土的病圃作试验地。各材料在病圃中直播,以蜜宝作对照,整个生长期不施用防病药剂。每个处理 20 株,设 3 次重复。

1.3.2 苗期接种鉴定 在子叶平展期,采用浸根法^[1]进行枯萎病抗性的苗期接种鉴定。孢子液浓度约为 1×10^5 个孢子/ml,浸根时间为 10 分钟。分别以蜜宝、查里斯顿、灰卡红作感病,中抗和高抗对照品种。同时以蜜宝作不接种对照。从接种后第 10 天开始第一次调查,以后每隔 5 天调查一次,每次记录新增加的病株数,分别统计第 15 天和 20 天的枯萎病病株率。每个处理 20 株,设 3 次重复。抗性分级标准按全国西瓜抗病育种协作组统一规定^[1],即高抗 (HR):病株率为 0~20%;中抗 (MR):病株率为 21%~50%;轻抗 (SR):病株率为 51%~80%;感病 (S):病株率为 81%~100%。

2 结果与分析

2.1 利用瓠瓜选育西瓜抗性材料

西瓜干种子于 1993 年 4 月 19 日直接用浓度为 500g/ml 的 DNA 溶液浸种,以未加 DNA 的 SSC 溶液为对照,每个处理 500 粒种子。在室温下浸种 15 小时,然后倒掉多余的溶液,拌入少量砂子,放入 25℃ 温

箱中催芽,4 月 22 日直播于试验田。用对照溶液浸胚处理的种子经 3 代种植没有出现变异现象,表明 SSC 溶液处理西瓜种子不能引起性状变异。用 DNA 浸胚处理的西瓜当代 (D_0)植株外部形态果实形状和皮色均无明显变异。1993 年收获 D_0 代单株自交果 16 个,1994 年 D_1 代成苗 308 株。 D_1 代有 1 株的果形由圆球形变成高圆形,种子由黑褐色变成黄褐色,变异率为 0.32%。该变异株在 D_2 代的性状变异特别大,植株外部性状,果皮颜色,果实形状,种子形状和色泽等营养器官和生殖器官都有较大变异。变异株的生长势明显增强,主要表现为叶片增大,叶色变深,叶柄变长,主蔓增长,节间长度增加,开花延迟,第一雌花着生节位提高。果实的变异非常明显,有 22.7% 的果实皮色由深绿色变成了白色或白皮绿网纹,接近供体瓠瓜的皮色。有 31.0% 的果实形状发生变异,出现了 5 种类型的变异株(表 1)。果实种子的变异也很明显,有 33.3% 的果实种子发生变异,出现了 6 种类型的变异种子(表 2)。其中以种子变大、变长和变小,颜色变浅 3 种类型(表 2 中 A B C)为主。A B C 3 种类型的种子变异率分别为 10.7%、8.3% 和 7.1%。

瓠瓜 DNA 导入西瓜 D_2 代获得的 5 种类型的变异 D_3 代在连作西瓜 3 年,前茬西瓜枯萎病发病率 30% 以上,土壤带菌量为 4.3×10^3 个孢子/克干土的病圃中直播,表现高抗西瓜枯萎病,对炭疽病和叶枯病的抗性也明显比对照品种蜜宝强。经过了 3 代自交纯化,有些变异后代的性状已趋于稳定,在 D_3 代选育出了 GE-1 GE-4 4 种抗性材料(见表 3)。

表 1 瓠瓜 DNA 导入西瓜 D_2 代变异株与供、受体性状的比较

试样	主蔓长 (m)	叶柄长 (cm)	节间长 (cm)	第一雌花 着生节位	果实 形状	果实大小 长×宽 (cm)	果皮颜色	变异株	变异率 (%)
供体	7.8	11.4	12.6	29.2	圆柱形	39.6×9.4	白色	0	0
受体	3.9	7.3	9.8	5.4	圆球形	15.0×15.6	深绿	0	0
D_2 -I	5.1	10.2	11.1	9.7	长椭圆	22.8×13.2	白皮绿网纹	6	7.1
D_2 -II	5.0	10.5	10.8	9.8	长椭圆	24.0×13.8	白色	4	4.8
D_2 -III	4.7	10.1	11.0	9.0	椭圆	20.3×15.2	白皮绿网纹	4	4.8
D_2 -IV	4.9	9.8	10.6	8.6	椭圆	21.7×16.1	白色	5	6.0
D_2 -V	4.4	9.5	10.5	8.3	高圆	17.9×14.5	深绿	7	8.3

注:表中数据为 4~7 株的平均值

表 2 D_2 代 6 种类型变异种子与供、受体种子比较

种子类型	受体西瓜	种子变异类型						供体瓠瓜
		A	B	C	D	E	F	
长度 (mm)	7.54	9.09 *	8.22 *	7.31*	8.73 *	9.07 *	7.40	15.83 *
宽度 (mm)	4.77	5.45 *	4.53 *	4.61*	4.46 *	4.95 *	4.43 *	6.96 *
千粒重 (g)	33.0	48.4	33.9	27.9	32.3	43.3	27.5	127.7
种子色泽	黑褐色	黄褐色带 黑色麻点	黄褐色带 黑色麻点	黄褐色	淡黄褐色带 黑色麻点	深黄褐色带 黑色麻点	褐色	黄白色

注: * 表示与受体西瓜相比差异达 5% 显著水平

** 表示与受体西瓜相比差异达 1% 显著水平

表 3 抗性材料的主要性状比较

材 料	果形	皮色	果形指数	瓢色	可溶性固形物含量(%)	生长势	抗性
供体瓠瓜	圆柱形	白 色	3. 98	白色	3. 1	很强	很强
受体西瓜	圆球形	深绿色	1. 00	红色	10. 5	中等	较差
GE- 1	长椭圆	白 色	1. 79	红色	10. 2	强	强
GE- 2	长椭圆	白皮绿网纹	1. 74	红色	9. 9	强	强
GE- 3	圆球形	白皮绿网纹	1. 02	红色	9. 8	强	强
GE- 4	圆球形	深绿色	1. 01	红色	10. 1	强	强
W- 1	圆球形	白皮绿网纹	1. 02	红色	10. 7	中等	强
W- 2	圆球形	深绿色	1. 01	红色	10. 5	中等	强
W- 3	圆球形	淡绿色有条纹	1. 02	红色	10. 8	中等	强
W- 4	长椭圆	绿色有网纹	1. 72	红色	10. 8	中等	强

2. 2 利用野生西瓜选育抗性材料

分别以综合性状优良的栽培西瓜品种新青、春蜜、蜜宝作母本,以高抗西瓜枯萎病的野生西瓜 S₄₃、S₄₃、S₄₄和 S₁₄₈作父本进行杂交的后代,以及高抗西瓜枯萎病的非洲西瓜与栽培西瓜的杂交后代在土壤带菌量为 2. 4× 10²~ 4. 3× 10³个孢子/克干土的病圃中直播,单株自交留种。在自交纯化的同时,淘汰感病单株或感病株系,抗病单株或株系下一年在病圃中分株系直播。从 1990~ 1996年经过连续 7代的疫土自然接种选择,选育出了 W- 1~ W- 4 4份性状稳定的抗性材料(见表 3)。

2. 3 抗病性鉴定

2. 3. 1 疫土自然接种鉴定:疫土自然接种鉴定的结果表明,枯萎病发病率和炭疽病病情指数都是受体西瓜和对照西瓜(蜜宝)的最高,极显著的高于选育出的 8 个抗性材料(表 4)。供体瓠瓜的炭疽病病情指数和枯萎病发病率都为 0,高抗西瓜枯萎病和炭疽病。瓠瓜 DNA导入西瓜所选育出的 4份抗性材料中,GE- 1和 GE- 2的枯萎病发病率为 0,对枯萎病高抗。GE- 3和 GE- 4的枯萎病发病率分别为 1. 7%和 3. 3%,对枯萎病中抗。采用栽培西瓜与野生西瓜杂交所选育出的 4 份抗性材料 W- 1~ W- 4的枯萎病发病率为 5. 0%~ 8. 3%,对西瓜枯萎病中抗。GE- 1~ GE- 4的炭疽病病情指数为 11. 3~ 17. 9,W- 1~ W- 4的炭疽病病情指数为 20. 5~ 24. 2,而受体西瓜和对照西瓜(蜜宝)的炭疽病病情指数分别为 52. 5和 53. 4,极显著的高于 8 份抗性材料(表 4)。试验结果表明,所选育出的 8份材料有 2份对枯萎病高抗,6份中抗,对炭疽病的抗性都较强。

2. 3. 2 苗期接种鉴定:苗期接种鉴定结果见表 5。按全国西瓜抗病育种协作组统一规定的抗性分级标准^[1],栽培西瓜与野生西瓜杂交后代在病圃中经多代自交选择选育出的 W- 1~ W- 4 4份抗性材料接种后 20天的病株率为 36. 7%~ 46. 7%,对西瓜枯萎病均属中抗。采用分子育种方法将瓠瓜 DNA导入西瓜选育出的 GE- 1和 GE- 2接种后 20天的病株率分

表 4 抗性材料疫土自然接种鉴定结果

材料	枯萎病发病率(%)	差异显著性		炭疽病病情指数	差异显著性	
		$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$		$\alpha=0.05$	$\alpha=0.01$
蜜宝(CK)	53.3	a	A	53.4	a	A
西瓜(受体)	51.7	a	A	52.5	a	A
瓠瓜(供体)	0	f	E	0	f	G
GE- 1	0	f	E	11.3	e	F
GE- 2	0	f	E	12.5	de	EF
GE- 3	1.7	ef	DE	16.3	cd	DE
GE- 4	3.3	de	CDE	17.9	C	CD
W- 1	8.3	b	B	20.5	bc	BCD
W- 2	6.7	bc	BC	23.4	b	B
W- 3	8.3	b	B	22.5	b	BC
W- 4	5.0	cd	BCD	24.2	b	B

别为 16. 7%和 18. 3%,对西瓜枯萎病高抗。GE- 3和 GE- 4的病株率分别为 38. 3%和 45. 0%,对西瓜枯萎病中抗。感病品种蜜宝不接种对照的病株率为 0,接种对照的病株率为 83. 3%,中抗品种查理斯顿和高抗品种灰卡红接种后 20天的病株率分别为 48. 3%和 13. 3%,3个对照品种接种后的反应,灰卡红表现为典型的高抗,查理斯顿表现为典型的中抗,蜜宝表现为典型的感病品种,较准确地反应出了它们的抗感类型。说明这次接种鉴定是较为可靠的,所得的结果比较准确。

表 5 西瓜枯萎病抗性的苗期接种鉴定结果

材料	病株率(%)		抗性级别	材料	病株率(%)		抗性级别
	15天	20天			15天	20天	
GE- 1	5.0	16.7	HR	W- 1	11.7	38.3	MR
GE- 2	6.7	18.3	HR	W- 2	10.0	36.7	MR
GE- 3	16.7	38.3	MR	W- 3	18.3	41.7	MR
GE- 4	21.7	45.0	MR	W- 4	23.3	46.7	MR
瓠瓜(供体)	0	0	HR	蜜宝	36.7	83.3	S
西瓜(受体)	38.3	85.0	S	查理斯顿	13.3	48.3	MR
不接种对照	0	0		灰卡红	3.3	13.3	HR

3 讨论

疫土自然接种鉴定和苗期接种鉴定的结果基本一致。试验结果都表明,选育出的 8份材料中,GE- 1和 GE- 2高抗西瓜枯萎病,GE- 3和 GE- 4和 W- 1~ W- 4中抗西瓜枯萎病。说明所选育出的抗性材料对西瓜枯萎病的抗性确实较强,是西瓜抗病育种较好的

种质资源或亲本材料。

外源 DNA 导入可以在亲缘关系远的物种之间进行基因转移,性状稳定快,育成一个新品种只需要 3~4 代^[4]。在许多植物上已经证实,种子吸收的标记 DNA 能进入幼苗的细胞核与染色体 DNA 整合,随着生长进入茎和生殖器官。幼苗植株分生细胞可作为外源 DNA 的直接受体^[5],采用 DNA 浸胚法将瓠瓜的 DNA 导入西瓜在 D₂ 代已获得了丰富的遗传变异类型^[2],外源 DNA 导入技术可作为西瓜育种的一条新途径。在棉花和小麦上,成功地转移了不同来源的抗病或其它性状基因,并已应用于生产^[4,6]。西瓜生产上的主要病害之一是西瓜枯萎病,而瓠瓜对西瓜枯萎病高抗或免疫。本研究将瓠瓜 DNA 导入西瓜的后代变异材料在病圃中通过疫土自然接种选择,在 D₃ 代选育出了 GE-1-GE-4 4 份抗性材料,其中 GE-1 和 GE-2 对枯萎病高抗,GE-3 GE-4 对枯萎病中抗,4 份材料对炭疽病的抗性都较强。说明外源 DNA 导入西瓜是进行西瓜抗病育种的一条有效途径。

有研究表明,抗枯萎病的西瓜种质资源较少,对西瓜枯萎病具中抗反应的种质材料仅占 5.66%^[1]。但野生西瓜中却存在高抗西瓜枯萎病的种质资源^[3],本研究采用常规育种方法,将野生西瓜的抗枯萎病性状转育到栽培品种,选育出了 W-1-W-4 4 份中抗西瓜枯萎病的新材料,这 4 份材料对炭疽病的抗性也较强,说明利用野生西瓜进行抗病育种是一种有效的方法。参考文献 6 篇略(邮编 410125)

在权衡利弊时间上都优于其它棚膜,可大大改善温室内的光照和温度条件。聚氯乙烯地膜适用于茄果类菜的生产;聚乙烯地膜多用于叶菜类。扣膜时间在育苗播后 15 天开始。定植适期、方法、密度 根据各地情况自行确定。小气候科学调控技术 光:在温室的前排地方,直射光线透入较多;靠近后墙走道,则直射光就少,加上前排、中排植物遮阴,光线就更弱了;在东西两边墙地方,由于光照时间短,光线也不足。改变光照条件的办法,一是要经常清洗棚膜,防止透光率下降,二是张挂反光幕,调节后部温光条件。温:在温室同一天内,日出前温度最低,中午 12~14 点最高;晴天气温高于阴天;同一温室内,中部气温较高,后部气温较低。一天内最高地温在 15~17 时,最低在 7~8 时。对温室内的温度调节可采用①控温放风。调节室内气温及气体成分。②增施有机肥、起高垄栽培,进行地膜覆盖,采用滴灌等办法来调节。肥水促控技术 灌溉科学化 为调节土壤湿度与空气湿度之间的平衡,可采取以下三条措施①改传统的明水灌溉为膜下软管滴灌②用地膜将温室内土壤全封闭,尽可能减少湿气透入室内;③加强温室内的通风管理。施肥多样化:冬茬黄瓜的施肥采用施足农家热性肥料、慢性肥与速效肥搭配,氮、磷、钾搭配,不同生育期按需供应的施肥方法。病虫害生态防治技术 危害黄瓜生长的主要病害是霜霉病,根据其发生发展规律,可采取培本壮源,改善生态,化学防治三条措施:①培本壮源。用 10kg 见方的营养钵培育成具有较高抗病性的壮苗,定植后施完全肥。要注意补充磷钾肥,使黄瓜生长茁壮。②改善生态。通过封闭土壤加强通风减少空气湿度的方法,抑制病菌繁殖。③定期化学防治。从苗子即将定植开始,一周用药一次,用药量掌握防治重的原则。反光幕应用技术 科学应用反光幕技术的一般可比对照增产 2~3 成或更多。反光幕的张挂应在定植缓苗后,一般在 4 月下旬即可撤除。张挂方式有两种:一是把反光幕张挂在中柱上;二是把反光幕张挂在后墙上。张挂时应将下沿固定,使上沿可以前后活动。以便在苗期把上沿前倾,促进小苗的光合作用,有效提高地温。二氧化碳施放技术 温室中 CO₂ 的施放技术有两种:①碳酸氢铵加硫酸法。用 2kg 碳酸氢铵加 1.2kg 硫酸反应可获得 1kg CO₂ 气体。温室 10m 间隔放一个罐头瓶或非金属器皿,悬挂在 1.2m 处,早上揭苫时不放风,一次性施放。②液态二氧化碳(干冰)施放法。把内装 25kg 地二氧化碳钢瓶放于温室一端,每 666.7m² 温室施放 15 天左右。施放在作物定植后 20 天开始,最好选在晴天放。植株调整技术 ①拉蔓吊绳采用垂直方向向北倾斜 5°的措施,以减少行间的植株遮阴,提高温室作物整体光合强度;②茄子采用仿单蔓整枝法 形成一根主杆,多个枝挂一果的短侧枝的特殊株形,以便增强株内株间的光照。

山西省农业技术推广站 吴丽琴

日光温室高效节能关键技术

选择适宜的品种 根据各地情况自行选择。嫁接换根培育壮苗技术 营养土的配制:无菌园土 20%,充分腐熟的马粪 30%,腐熟的有机肥 50%,再加适量速效氮磷钾肥,充分混合均匀,然后用农抗 120 加双效灵的混合液(200 倍)均匀喷洒在下面,用薄膜盖严,密封 15 天后再使用。浸种催芽:用 55~60℃ 水烫种 10~15 分钟,再浸泡 1~2 小时,搓洗用水冲净种子粘液,用干净布包裹放在 30℃ 左右环境下催芽,芽长到 0.5cm 即可播种。黑籽南瓜选用已打破休眠的种子,也用 55~60℃ 水烫种 15 分钟,然后浸泡 8~12 小时,搓洗干净种子粘液,用湿毛巾包好放在 28~35℃ 处催芽,经过 48 小时催芽即可。黄瓜籽和南瓜籽播种方法:黄瓜籽在育苗盘内播种,先把细炉渣或细砂装入盘内,然后浇透水,即可播种。播种时按 3×3cm 排放种子。南瓜籽是在营养钵内播种,先把营养土装入钵内,再浇透水,浇水后即可播种。黄瓜籽最好要比南瓜籽提前 3~5 天播种。播种后的温度管理 播种到出苗温度宜高些,一般气温 30~35℃,地温 25℃ 以上,出苗后温白天 20~25℃,夜间 15~20℃。地温 20~22℃。靠接法嫁接:先用刀片在南瓜幼苗上部距生长点下 0.5~2cm 处向下斜切一刀,然后将黄瓜幼茎生长点下 1.2~1.5cm 处向上斜切一刀,把两株幼苗在切口处接合,使黄瓜子叶压在上面,用嫁接夹子固定,摆在准备好的苗床内,及时浇水并扣小拱棚。优型覆盖材料及最佳盖期 高效节能日光温室的性能与保温覆盖物有很大关系。实践证明:无滴防老化膜无论在增温透光作用上,还是