

徐彦刚, 姚协丰, 李良俊, 等. 西瓜品种(品系) 对蔓枯病的抗性鉴定与评价[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(1): 106-115.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.01.014

西瓜品种(品系) 对蔓枯病的抗性鉴定与评价

徐彦刚^{1,2}, 姚协丰¹, 李良俊², 徐锦华¹, 任润生¹, 张 曼¹, 刘 广¹, 娄丽娜¹,
朱凌丽¹, 侯 茜¹, 徐 建¹, 羊杏平¹

(1. 江苏省农业科学院蔬菜研究所, 江苏 南京 210014; 2. 扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009)

摘要: 为探究不同西瓜种质资源对蔓枯病的抗性特性, 试验通过对 80 份不同地域来源的西瓜种质资源进行蔓枯病抗性鉴定, 并利用 SSR 标记技术对该材料群体进行基因分型和群体结构分析。结果表明, 供试 80 份材料对亚隔孢壳菌(*Stagonosporopsis citrulli*) 均无免疫性, 但不同西瓜品种(品系) 间对蔓枯病抗性却存在较大差异, 采用欧式距离进行病情指数聚类分析, 可将供试西瓜材料依据蔓枯病病情指数分为高抗材料、抗性材料、中抗材料、感病材料和高感材料 5 组, 其中筛选到高抗材料 2 份, 平均病情指数分别为 7.13 和 8.01; 抗性材料 19 份, 平均病情指数 23.04~40.10; 中抗材料 21 份, 平均病情指数 41.56~57.74; 感病材料 24 份, 平均病情指数 59.14~72.33; 高感材料 14 份, 平均病情指数 75.03~84.46。基于贝叶斯统计划分的遗传群体构成分析结果可知, 4 个不同亚群在病级类型和病情指数这 2 个特性上存在一定差异, 其中亚群 POP4 整体抗病性水平最高, 且抗性材料的占比达到 33.34%, 而亚群 POP2 抗性材料占比最低。

关键词: 西瓜; 蔓枯病; 亚隔孢壳菌(*Stagonosporopsis citrulli*); 抗性评价

中图分类号: S651 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021) 01-0106-10

Identification and evaluation of the resistance to gummy stem blight caused by *Stagonosporopsis citrulli* of some watermelon varieties (strains)

XU Yan-gang^{1,2}, YAO Xie-feng¹, LI Liang-jun², XU Jin-hua¹, REN Run-sheng¹, ZHANG Man¹,
LIU Guang¹, LOU Li-na¹, ZHU Ling-li¹, HOU Qian¹, XU Jian¹, YANG Xing-ping¹

(1. Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China; 2. College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou, 225009, China)

Abstract: To explore the resistant characteristics of different watermelon germplasm resources to gummy stem blight caused by *Stagonosporopsis citrulli*, 80 watermelon germplasm resources from different regions were used to evaluate their resistance, and simple sequence repeat (SSR) was used to analyze the genotypes and population structure of the samples. The results showed that none of the 80 materials showed immunity to *Stagonosporopsis citrulli*, but there was difference of the resistance to gummy stem blight between different watermelon varieties (strains). The testing watermelon materials could be divided into five groups, consisting of highly resistant material, resistant material, medium resistant material, susceptible material and highly susceptible material based on the disease index of gummy stem blight, using Euclidean distance in cluster analysis of disease index. Two highly resistant materials were identified with the average disease index of 7.13 and 8.01 respectively, 19 resistant materials

收稿日期: 2020-05-24

基金项目: 国家西甜瓜产业技术体系建设项目(CARS-NO.25-8)

作者简介: 徐彦刚(1992-), 男, 甘肃平凉人, 硕士研究生, 主要从事西瓜抗病育种技术研究。(E-mail) 1340111782@qq.com

通讯作者: 羊杏平, (E-mail) xingping@jaas.ac.cn

ceptible material and highly susceptible material based on the disease index of gummy stem blight, using Euclidean distance in cluster analysis of disease index. Two highly resistant materials were identified with the average disease index of 7.13 and 8.01 respectively, 19 resistant materials

were identified with the average disease index distributed between 23.04 and 40.10, 21 medium resistant materials were identified with the average disease index distributed between 41.56 and 57.74, 24 susceptible materials were identified with the average disease index distributed between 59.14 and 72.33, 14 highly susceptible materials were identified with the average disease index distributed between 75.03 and 84.46. The analysis results of the genetic population structure divided by Bayesian statistics showed that there were some differences in disease level types and disease indices in the four different subgroups. The overall disease resistant level of POP4 subgroup was the highest and resistant materials accounted for 33.34%, but the proportion of resistant materials in POP2 subgroup was the lowest.

Key words: watermelon; gummy stem blight; *Stagonosporopsis citrulli*; resistance evaluation

西瓜[*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsum.]是世界上重要的园艺经济作物,其生产规模仅次于葡萄、香蕉、柑橘、苹果,位居第5位^[1]。自21世纪以来,中国西瓜产量就一直居世界第一,其中栽培面积达到世界西瓜总面积的60%以上,且产量占据全球西瓜总产量的70%左右^[2-3]。近年来随着中国西瓜栽培产区的东移及高效农业的快速发展,设施瓜类栽培已成为中国西瓜生产的重要形式。然而,设施环境的高温高湿条件极易诱发瓜类蔬菜各种病害的发生,其中毁坏植株地上部分致使植株萎蔫枯死的西瓜蔓枯病(Gummy stem blight)已成为影响中国设施瓜类栽培中最为严重的病害之一,严重影响到中国乃至世界西瓜产业的发展^[4-6]。

西瓜蔓枯病是由亚隔孢壳属(*Stagonosporopsis*)病菌侵染引起的一种世界性真菌病害,其中 Stewart等^[7]首次明确危害西瓜的亚隔孢壳菌为*S. caricae*及其演化生成的姊妹种*S. citrulli*和*S. cucurbitacearum*,其中*S. citrulli*是诱发该病害的优势菌。2018年Huang和Lai^[8]对中国台湾地区西瓜蔓枯病害进行了鉴定统计,发现*S. citrulli*同样是引发西瓜蔓枯病害的主要病原菌。同时Rennberger等^[9]对美国主要西瓜产区的西瓜病害进行了调查统计,发现*Stagonosporopsis* spp. 是引发西瓜流行病害的主要病原,其中*S. citrulli*被鉴定为是造成西瓜流行病害的主要致病菌。本项目组前期对中国安徽省、浙江省、江苏省及江西省主要西瓜产区蔓枯病害调查研究发现,*S. citrulli*同样是引发中国华东地区西瓜产区蔓枯病害的主要病原。

控制西瓜蔓枯病害最有效经济的途径是选育抗病品种,其抗病种质资源的筛选与鉴定是品种合理利用及抗病育种工作的基础^[10]。因此,确定准确可靠的抗病性鉴定指标是筛选西瓜抗蔓枯病害种质资源的前提。然而,目前国内对瓜类蔓枯病害种质的鉴定多采用苗期接种法,再根据植株苗期接种

后叶片的侵染程度分级进行病情的统计评估^[11-12],但部分研究结果表明,瓜类苗期叶片和茎蔓对蔓枯病的抗性表现出不同的遗传特点^[13-15],而仅仅依靠植株苗期叶片的侵染程度不能准确反应出材料的综合抗性等级。因此,为全面了解西瓜种质抗蔓枯病害的综合分级标准,掌握西瓜不同品种(品系)间群体的抗蔓枯病遗传关联结构,本研究通过对80份西瓜种质材料进行蔓枯病害综合抗性评估分析,并依据不同种质材料间的病情指数和聚类分析结果,探索西瓜对蔓枯病害抗性分级的评估标准及筛选优良抗蔓枯病种质资源,以期挖掘西瓜抗蔓枯病基因和开展西瓜抗病品种选育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料选用国际通用鉴别寄主PI189225、PI482276和78份西瓜核心种质资源(表1),在播种前将供试种子用温水浸泡24 h后,放置于28℃的环境下催芽,待50%的种子出现露白后,将其播种于50孔穴盘(蛭石、珍珠岩和泥炭混合基质填装)内,并保持每份材料种植25株,重复3次,水肥管理与日常管理保持相同,在植株生长至3~4片真叶时用于接种鉴定。

本研究接种鉴定所用蔓枯病菌株DBZJNB4收集于中国华东地区的西瓜生产重病区,其致病性强、稳定性好^[16]。

1.2 病原菌培养

取25℃平板培养7 d的病原菌,参照Li等^[16]的方法诱导*S. citrulli*菌株产生分生孢子。挑选新鲜无伤口的黄瓜,将表面进行消毒处理,采用0.7 cm灭菌打孔器分离菌块,放置于略微削去表皮的黄瓜表面,28℃恒温培养,7~10 d后产生分生孢子。用无菌水洗脱病原菌分生孢子,然后使用4层无菌纱布过滤,在显微镜下用血球计数板测定孢子含量

(1 ml 1×10^5 个)后备用。

1.3 植株苗期抗性鉴定

采用喷雾法接种 3~4 叶期西瓜幼苗,接种后置于黑暗条件下 18~24 h,且相对湿度保持 95% 以上,设无菌水作为对照。7 d 后开始每隔 1 d 进行病害调查,计算病情指数。

病情指数(DI)=病级株数代表级数/调查总株数最高病级 $\times 100\%$

相对抗病指数(I)=1-所测品种病情指数/发病最重品种病情指数

植株的病害分级参照张宁等^[17]的甜瓜蔓枯病病害分级标准,同时依据《瓜蔓枯病菌检疫鉴定方法 SN/T 4649-2016》的发病分级程度进行划分,对接种的西瓜种质材料茎叶发病程度进行调查统计,并采用病情指数(DI)和相对抗病指数(I)对供试的西瓜种质资源进行抗(感)病性评价。

1.4 SSR 标记分析

采用宝生物技术(大连)有限公司的植物 DNA 试剂盒(TaKaRa)进行基因组 DNA 提取,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测所提取的植物基因组 DNA 质量。并根据本课题组前期筛选的 28 对扩增效果较好的 SSR 引物进行供试材料基因型的检测,且所用引物均由南京擎科生物技术有限公司合成。SSR-PCR 反应体系:2 \times TSINGKE™的 Master Mix 12.5 μ l,正向和反向引物(10 μ mol/L)各取 1.0 μ l,模板 DNA(约 25 ng/ μ l)取 2.0 μ l,最后用灭菌超纯水补充至 25.0 μ l。SSR-PCR 反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,28 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。将 PCR 产物通过高通量 ZAG™ DNA 仪器进行毛细管电泳分型分析。

1.5 数据处理与分析

试验数据首先进行病情指数的相关计算,再利用 SPSS 19.0 软件进行聚类分析、显著性差异等统计处理。

根据各软件要求整理 SSR 标记检测的西瓜种质基因型数据的相应格式,利用 Structure 2.3.4 进行群体结构分析,其中 K 值的设定范围为 1~10,设定不作迭代数的 Markov chain monte carlo 为 200 000,且每个 K 值重复运行 10 次。根据 STRUCTURE HARVESTER 基于连续 K 值间对数概率的变化率分析,根据所产生的 ΔK 值确定该群体组内亚群,并绘

制基于模型的种质群体遗传结构图。

2 结果与分析

2.1 西瓜品种(品系)对蔓枯病的抗性表现

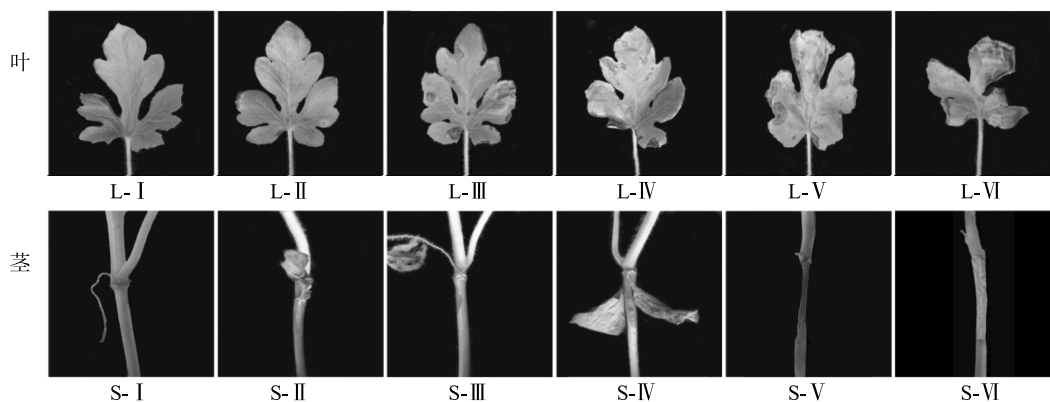
西瓜不同品种(品系)在接种蔓枯病病菌后植株的抗病性表型存在显著差异,当接种病原菌分生孢子后植株幼苗的生长发育受到了严重阻碍,其中植株幼苗的发病症状主要以叶片和茎蔓受害最为严重,但植株的茎基部危害最为突出。

2.1.1 苗期植株叶片蔓枯病抗性特征 不同西瓜品种(品系)植株叶片存在着不同的抗蔓枯病特征,由图 1 可以看出,当西瓜植株苗期接种蔓枯病病原菌孢子约 7 d 后,仅 PI482276 和 PI189225 品种的植株部分叶片未出现任何发病症状,与对照组植株一样保持着正常生长。其余品种(品系)植株叶片多由叶缘或叶内出现水渍状小点后并扩展,最终在植株的叶部形成不同程度的病斑类型。当植株叶缘内部受害时,起初表现为青灰色水渍状小斑,后逐渐扩展为直径约 1~2 cm 的近圆形或不规则形的黑褐色大斑,其中大部分供试西瓜叶片的坏死面积表现为 5%~50%(图 1);当植株叶片的叶缘受害时,则呈现出弧形或楔形的黑褐色大斑,病部表现干枯,易破碎且表面有时散生许多小黑点,通常大病斑周围组织易发黄,甚至部分可扩散到整个叶片,造成整个叶片的枯萎死亡(图 1)。

2.1.2 苗期茎基部蔓枯病抗性特征 当西瓜不同品种(品系)植株在接种蔓枯病病原菌分生孢子 10 d 左右,不同西瓜种质植株的茎蔓对蔓枯病抗性表现出不同的抗病类型,其中不同种质植株的茎基部最先出现发病症状同时危害性也最为突出,后逐渐在整株茎蔓出现类似病症。且不同西瓜抗(感)性种质间植株的茎基部的病斑呈现出差异性(图 1),仅 PI482276、PI189225、WM047、WM066 和 WM115 品种的植株茎基部未出现任何发病症状,与对照组植株一致保持着正常生长。而大部分接种蔓枯病病原菌分生孢子的西瓜种质材料茎基部出现清晰可辨的发病病斑,该病斑主要为亲和性与非亲和性 2 种病斑类型,亲和性病斑呈现水浸状不规则形,且能够沿着病斑边缘向周围扩展蔓延,其病斑中心通常表现为凹陷软腐,如 WM012、WM030、WM050、SW082-3、MW103-5 品种的植株茎蔓上形成的发病病斑;而非亲和性病

斑则呈梭形、椭圆形或短条形褐色状,病斑中心表现为灰色,该病斑主要为植株诱导超敏反应产生的干枯斑,如 WM025、WM033、WM044、WM062、SW116 品种的植株茎蔓上形成的发病病斑,这种

能够激发诱导使植株局部侵染位点细胞迅速死亡形成的屏障,能够有效阻碍病原菌在植株体内的快速蔓延。



L-I、S-I:正常植株叶和茎;L-II:植株叶为零星感染;L-III、L-IV:植株叶坏死面积为5%~50%;L-V、L-VI:植株叶坏死面积>50%;S-II、S-VI:茎基部出现非亲和性病斑;S-III、S-IV、S-V:茎基部出现亲和性病斑。

图1 西瓜蔓枯病不同抗(感)品种主要症状

Fig.1 Major symptoms of gummy stem blight in different resistant (sensitive) watermelon varieties

根据不同抗性西瓜种质材料苗期感染蔓枯病菌后发病症状的观察发现,当西瓜植株幼苗接种蔓枯病菌后,西瓜植株起初表现出叶片自下向上不同程度的病症,后在茎基部分枝处生成水浸状凹陷斑或黑褐干枯斑,最终造成全株出现蔓枯病病害症状。因此,基于不同抗(感)性西瓜种质资源植株叶片及茎蔓的发病症状表现特征,通过大量观察、比对和分析不同西瓜抗(感)性种质材料间对蔓枯病害的抗性表现,我们发现西瓜植株苗期茎蔓、叶片对蔓枯病害表现出不同的抗病特征。依据植株苗期的发病症状表现,我们将西瓜植株苗期蔓枯病发生等级划分为0级、1级、3级、5级和7级,共5个等级。0级:全株无病,植株生长正常;1级:老叶出现零星发病症状,但新叶、茎蔓无任何发病症状;3级:大部分叶片表现出发病症状,或茎蔓出现零星发病症状;5级:叶片出现大面积发病症状,同时茎蔓出现环茎大病斑;7级:整株死亡,植株倒伏。

2.2 植株苗期蔓枯病抗性水平的聚类分析

不同西瓜种质资源苗期接种鉴定结果表明,供试西瓜品种(品系)对蔓枯病的抗性存在着显著差异(表1),其中种质 MW013、MW033、Y71-2、

MW049、MW124 的病情指数较高且均达到了80以上,而种质 PI482276、PI189225 的病情指数较低,仅为7.13和8.01。按照西瓜蔓枯病相对抗性的评价标准划分可知,其中高抗材料有2份,占鉴定总数的2.50%,抗病材料12份,占鉴定总数的15.00%;中抗材料16个,占鉴定总数的20.00%;感病材料31个,占鉴定总数的38.75%;高感材料19个,占鉴定总数的23.75%。未鉴定出免疫品种。在供试的80份西瓜种质资源中,其中来源于美国不同地域的7份材料,表现出抗病、高感和感病材料分别有2份、1份和2份;同时源于日本的6份材料,表现为中抗、感病和高感材料分别有2份、2份和2份;而来源于中国不同地域的67份材料,表现出抗病、中抗、感病和高感材料分别有10份、14份、27份和16份。因此,本试验80份西瓜种质资源中,表现为抗病($0.40 \leq I < 1.00$)的品种(品系)有28份,占供试种质资源的35.0%,而感病($0 \leq I < 0.40$)的种质资源有52份,占供试种质资源的65.0%,说明该供试西瓜种质资源绝大多数不抗蔓枯病,而不同地域来源的种质资源间的抗(感)性存在着较大差异,同时相同区域内的不同种质间的抗(感)性也存在着较大差异。

表 1 不同西瓜品种(品系)对蔓枯病的抗性表现

Table 1 Resistance of different watermelon varieties (strains) to gummy stem blight

| 编号 | 材料名称 | 病情指数 | 相对抗病指数 | 地理来源 | 亚群 | 抗性水平 |
|----|-------|------------|-----------|------|---------|------|
| 1 | MW002 | 69.98±5.16 | 0.17±0.06 | 中国 | POP1 | HS |
| 2 | MW004 | 40.10±3.79 | 0.53±0.05 | 中国 | Mixture | MR |
| 3 | MW005 | 30.47±4.61 | 0.64±0.05 | 中国 | POP2 | R |
| 4 | MW007 | 50.17±3.41 | 0.41±0.04 | 中国 | Mixture | MR |
| 5 | MW008 | 38.83±3.24 | 0.54±0.04 | 中国 | POP4 | MR |
| 6 | MW010 | 61.28±5.77 | 0.27±0.07 | 中国 | POP3 | S |
| 7 | MW012 | 38.70±4.50 | 0.54±0.05 | 中国 | POP3 | MR |
| 8 | MW013 | 81.66±4.77 | 0.03±0.06 | 中国 | Mixture | HS |
| 9 | MW014 | 66.13±5.10 | 0.22±0.06 | 中国 | POP3 | S |
| 10 | MW015 | 50.26±3.36 | 0.40±0.04 | 中国 | POP3 | MR |
| 11 | MW016 | 59.14±5.10 | 0.30±0.07 | 中国 | POP3 | S |
| 12 | MW025 | 23.04±4.35 | 0.73±0.05 | 中国 | Mixture | R |
| 13 | MW027 | 48.19±3.92 | 0.43±0.05 | 中国 | POP3 | MR |
| 14 | MW028 | 41.56±5.28 | 0.51±0.06 | 中国 | Mixture | MR |
| 15 | MW029 | 56.72±3.46 | 0.33±0.04 | 中国 | POP4 | S |
| 16 | MW030 | 65.53±2.77 | 0.22±0.03 | 中国 | POP4 | S |
| 17 | MW031 | 78.20±1.78 | 0.07±0.02 | 中国 | POP4 | HS |
| 18 | MW032 | 53.83±1.22 | 0.36±0.01 | 中国 | POP1 | S |
| 19 | MW033 | 82.10±3.82 | 0.03±0.05 | 中国 | POP4 | HS |
| 20 | MW035 | 47.69±3.40 | 0.44±0.04 | 中国 | POP4 | MR |
| 21 | MW036 | 29.07±2.82 | 0.66±0.03 | 中国 | POP1 | R |
| 22 | MW037 | 76.04±3.29 | 0.10±0.04 | 中国 | POP1 | HS |
| 23 | MW038 | 72.33±2.45 | 0.14±0.03 | 中国 | Mixture | HS |
| 24 | MW039 | 70.36±2.37 | 0.17±0.03 | 中国 | POP2 | HS |
| 25 | MW040 | 55.17±2.24 | 0.35±0.03 | 中国 | POP3 | S |
| 26 | MW041 | 62.31±2.45 | 0.26±0.03 | 中国 | POP3 | S |
| 27 | MW043 | 43.22±3.06 | 0.49±0.04 | 中国 | POP4 | MR |
| 28 | MW044 | 36.33±5.61 | 0.57±0.07 | 中国 | POP4 | MR |
| 29 | MW045 | 65.02±2.53 | 0.23±0.03 | 中国 | POP4 | S |
| 30 | MW046 | 32.52±3.55 | 0.61±0.04 | 中国 | POP1 | R |
| 31 | MW047 | 52.31±4.60 | 0.38±0.05 | 中国 | POP3 | S |
| 32 | MW048 | 77.63±4.03 | 0.08±0.05 | 中国 | POP1 | HS |
| 33 | MW049 | 84.46±4.45 | 0±0.05 | 中国 | POP1 | HS |
| 34 | MW050 | 59.88±5.38 | 0.29±0.06 | 中国 | POP4 | S |
| 35 | MW051 | 67.82±5.22 | 0.20±0.06 | 中国 | POP1 | S |
| 36 | LW025 | 24.40±5.18 | 0.71±0.06 | 美国 | POP1 | R |
| 37 | LW035 | 23.20±4.15 | 0.73±0.05 | 美国 | POP1 | R |
| 38 | MW055 | 57.52±1.31 | 0.32±0.02 | 中国 | POP1 | S |
| 39 | MW056 | 77.24±5.78 | 0.09±0.07 | 中国 | POP1 | HS |
| 40 | MW057 | 30.91±3.52 | 0.63±0.04 | 中国 | POP1 | R |
| 41 | MW058 | 32.03±3.22 | 0.62±0.04 | 中国 | POP1 | R |
| 42 | MW059 | 66.75±4.20 | 0.21±0.05 | 中国 | POP1 | S |
| 43 | MW062 | 31.66±4.71 | 0.63±0.06 | 中国 | POP1 | R |
| 44 | MW066 | 63.46±1.53 | 0.25±0.02 | 中国 | Mixture | S |
| 45 | MW067 | 55.51±5.93 | 0.34±0.07 | 中国 | POP1 | S |
| 46 | MW068 | 29.54±3.82 | 0.65±0.05 | 中国 | POP3 | R |

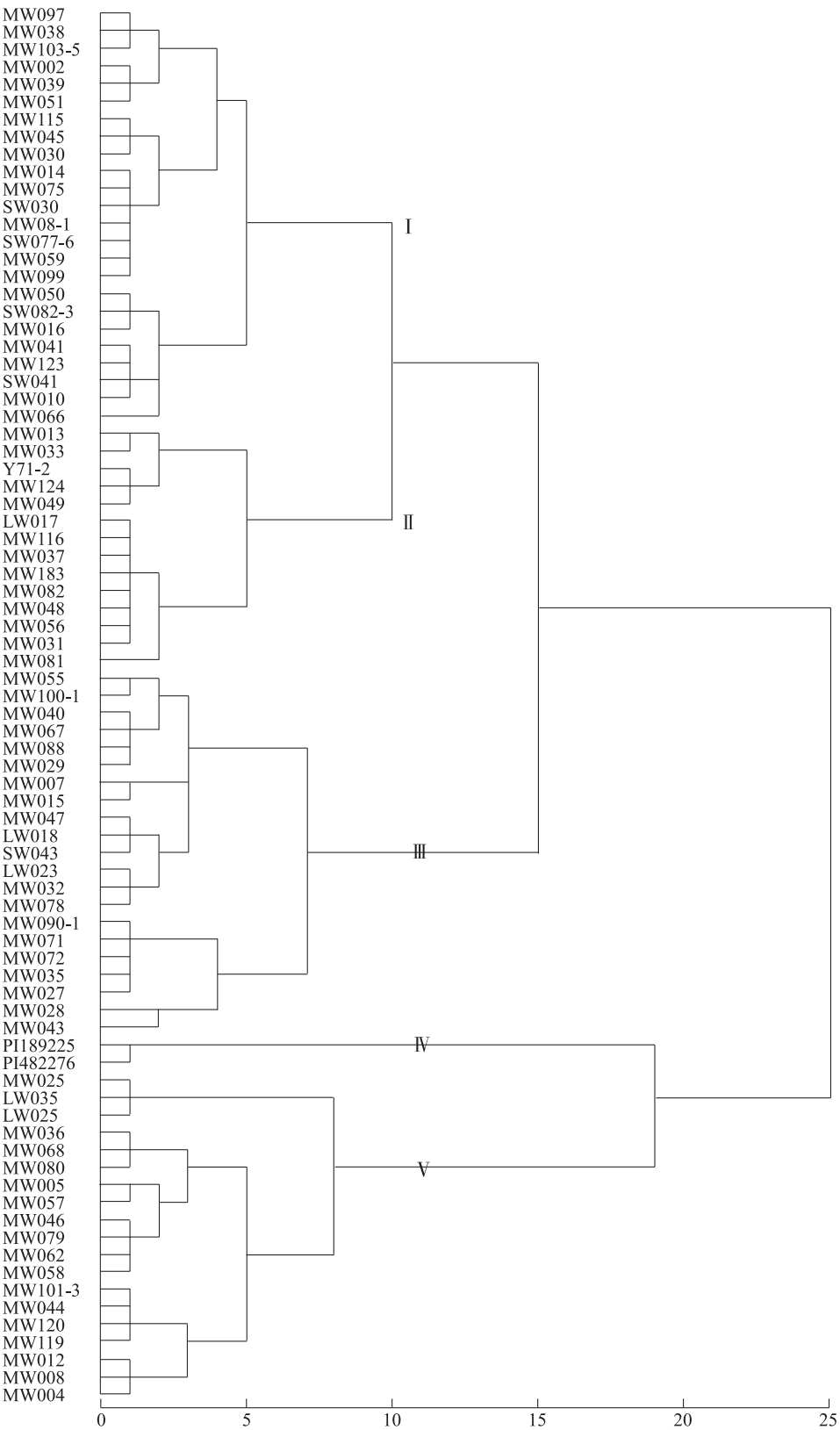
续表1 Continued1

| 编号 | 材料名称 | 病情指数 | 相对抗病指数 | 地理来源 | 亚群 | 抗性水平 |
|----|----------|------------|-----------|------|---------|------|
| 47 | MW071 | 46.66±3.53 | 0.45±0.04 | 中国 | POP4 | MR |
| 48 | MW072 | 47.27±2.54 | 0.44±0.03 | 中国 | POP4 | MR |
| 49 | MW075 | 66.23±5.00 | 0.22±0.06 | 中国 | POP3 | S |
| 50 | MW078 | 54.40±4.46 | 0.36±0.05 | 中国 | POP4 | S |
| 51 | MW079 | 32.73±4.66 | 0.61±0.06 | 中国 | POP4 | R |
| 52 | MW080 | 28.21±4.15 | 0.67±0.05 | 中国 | POP4 | R |
| 53 | MW081 | 75.03±4.59 | 0.11±0.05 | 中国 | POP4 | HS |
| 54 | MW082 | 77.47±3.30 | 0.08±0.04 | 中国 | POP4 | HS |
| 55 | MW084 | 67.08±4.14 | 0.21±0.05 | 中国 | POP4 | S |
| 56 | MW088 | 56.06±5.98 | 0.34±0.07 | 中国 | POP4 | S |
| 57 | MW090-1 | 46.41±4.53 | 0.45±0.05 | 日本 | POP4 | MR |
| 58 | MW097 | 72.31±1.30 | 0.14±0.02 | 中国 | POP4 | HS |
| 59 | MW099 | 66.91±4.26 | 0.21±0.05 | 中国 | POP1 | S |
| 60 | MW100-1 | 57.74±3.37 | 0.32±0.04 | 日本 | POP4 | S |
| 61 | MW101-3 | 36.00±3.48 | 0.57±0.04 | 日本 | POP4 | MR |
| 62 | MW115 | 64.96±4.16 | 0.23±0.05 | 中国 | POP3 | S |
| 63 | MW116 | 76.67±1.18 | 0.09±0.01 | 中国 | POP3 | HS |
| 64 | MW119 | 35.14±5.60 | 0.58±0.07 | 中国 | Mixture | MR |
| 65 | MW120 | 36.91±5.04 | 0.56±0.06 | 中国 | Mixture | MR |
| 66 | MW123 | 62.57±2.90 | 0.26±0.03 | 中国 | Mixture | S |
| 67 | MW124 | 83.40±3.53 | 0.01±0.04 | 中国 | POP2 | HS |
| 68 | LW017 | 76.53±5.13 | 0.09±0.06 | 美国 | POP1 | HS |
| 69 | LW018 | 52.62±3.74 | 0.38±0.04 | 美国 | POP1 | S |
| 70 | LW023 | 53.54±5.08 | 0.37±0.06 | 美国 | POP1 | S |
| 71 | SW041 | 61.87±4.78 | 0.27±0.06 | 中国 | POP2 | S |
| 72 | SW043 | 51.86±3.26 | 0.39±0.04 | 中国 | POP2 | S |
| 73 | SW030 | 65.94±3.88 | 0.22±0.05 | 中国 | POP2 | S |
| 74 | SW077-6 | 67.10±5.90 | 0.21±0.07 | 中国 | POP2 | S |
| 75 | Y71-2 | 82.97±5.82 | 0.02±0.07 | 日本 | POP2 | HS |
| 76 | SW082-3 | 60.04±1.74 | 0.29±0.02 | 日本 | POP2 | S |
| 77 | MW103-5 | 71.36±4.34 | 0.16±0.05 | 日本 | POP2 | HS |
| 78 | MW183 | 76.27±3.81 | 0.10±0.05 | 中国 | Mixture | HS |
| 79 | PI482276 | 7.13±1.65 | 0.92±0.02 | 美国 | POP2 | HR |
| 80 | PI189225 | 8.01±1.58 | 0.91±0.02 | 美国 | POP2 | HR |

HR:高抗($0.8 \leq I < 1.0$); R:抗病($0.6 \leq I < 0.8$); MR:中抗($0.4 \leq I < 0.6$); S:感病($0.2 \leq I < 0.4$); HS:高感($I < 0.2$)。

病情指数是反映不同西瓜品种抗病性的重要指标,依据 80 份西瓜种质资源苗期蔓枯病病情指数的差异,进行供试种质材料对蔓枯病抗性能力的聚类分析。结果(图 2)显示,在欧式距离为 9.0 的水平上,80 份西瓜种质资源可以划分为 5 类,第 I 类有 24 份资源,病情指数介于 59.14~72.33,属于感蔓枯病的资源类型;第 II 类有 14 份资源,平均病情指数介于 75.03~84.46,属于高感类型;第 III 类有 21 份资源,平均病情指数介于 41.56~57.74,属于中抗蔓

枯病的资源类型;第 IV 类有 2 份资源,平均病情指数介于 7.13~8.01,属于高抗类型;第 V 类有 19 份资源,平均病情指数介于 23.04~40.10,属于抗蔓枯病的资源类型,以聚类分析谱系将 80 份材料划分成高抗、抗病、中抗、感病和高感 5 个类型。因此,西瓜对蔓枯病的抗性评价标准为:免疫(I) $DI = 0$;高抗(HR) $0 < DI \leq 10.0$;抗病(R) $10.0 < DI \leq 40.0$;中抗(MR) $40.0 < DI \leq 60.0$;感病(S) $60.0 < DI \leq 75.0$;高感(HS) $DI > 75.0$ 。



I :感病(S) ; II :高感(HS) ; III :中抗(MR) ; IV :高抗(HR) V :抗性(R)。

图 2 80 份西瓜种质资源对蔓枯病抗性的聚类分析

Fig.2 Cluster analysis on 80 watermelon germplasm resources according to their resistance to gummy stem blight

2.3 种群遗传结构及不同亚组种质蔓枯病抗性变异分析

使用高通量 SSR 仪进行毛细管电泳检测各标记在 80 份种质资源中存在的等位位点,其中 28 对 SSR 引物共检测出 124 个变异位点,且各引物间检测到的变异位点数目变化范围为 2.0~9.0,平均变异位点数为 4.4;同时以衡量基因变异程度高低的多态信息量(PI)变幅为 0.344 8~0.852 4,其平均值为 0.525 8。表明所选引物存在较高的多态性信息,能够用于群体遗传多样性分析,且一定程度上反映了西瓜资源所蕴藏的丰富基因信息。

利用基于贝叶斯统计模型的 STRUCTURE 软件对 80 份西瓜品种资源进行重复 10 次的亚群($K=1,2,3,\dots,10$)划分测试,结果发现,当以自然对数后的似然值 $\ln[P(D)]$ 为纵坐标时,设定亚群数 K 值随着 $\ln[P(D)]$ 呈现持续增大的趋势,难以确定该群体的最优群体数,因此采用 Evanno 等^[18]认为最大 ΔK 值对应的 K 值是最佳类群数目的原则。本研究分析发现,当 K 值随 ΔK 值的变化呈现明显峰值时则具有最优群体数($K=4$,图 3),因此群体结构分析结果可以将供试 80 份西瓜材料划分到 4 个稳定的亚群中(图 4),将其分别命名为 POP1、POP2、POP3 和 POP4。 Q 值(第 i 份材料 SSR 位点变异源于第 K 群体的概率)大于或等于 0.6 的种质资源的亚群归类结果表明,检验后的 69 份材料(Q 值 ≥ 0.6)遗传结构相对单一,11 份材料存在着混合来源,因此被归于混合类群。其中 POP1 亚群包含 21 份种质资源(26.25%);POP2 亚群包含 12 份种质资源(15.00%),POP3 亚群包含 13 份种质资源(16.25%),POP4 亚群包含 23 份种质资源(28.75%),混合类群包含 11 份种质资源(13.75%)。4 个亚群中的 69 份西瓜品种(品系)并未完全按照种质资源地域分布而聚类,说明来自不同地域的样本存在着遗传分化,同时也表明各群体之间也存在着基因的相互渗透。

对 POP1、POP2、POP3 和 POP4 亚群的西瓜种质资源蔓枯病病情进行分析,其中高抗品种(品系)均来源于亚群 POP2;抗病品种(品系) 19 份,其中亚群 POP1 中抗性品种(品系)占比为 8.75%,亚群 POP4 中抗性品种(品系)占比为 6.25%,混合类群中抗性品种(品系)占比为 5.00%,亚群 POP3 中抗性品种(品系)占比为 2.50%,亚群 POP2 中抗性品

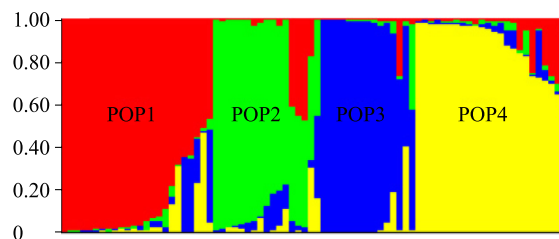


图 3 80 份西瓜种质资源的 K 估计隶属度分数图

Fig.3 K -estimation membership scores for 80 germplasm resources of watermelon

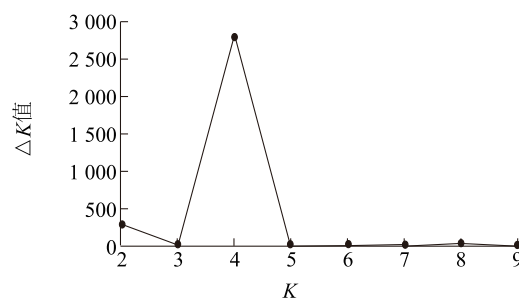


图 4 80 份西瓜种质的群体结构

Fig.4 Population structure map of 80 germplasm resources of watermelon

种(品系)占比为 1.25%,而亚群 POP4 中抗性品种(品系)的数量最多,POP2 中占比较少。而亚群 POP2 的变异系数最高,变异幅度为 7.13~83.40,变异系数为 45.53%,其次是亚群 POP1,变异系数 36.45%,变异幅度为 23.20~84.46,混合类群的变异系数 34.67%,变异幅度为 23.04~81.66,亚群 POP4 的变异系数为 27.85%,变异幅度为 28.21~82.09,变异系数最小的亚群 POP3,变异系数为 21.50%,变异幅度处于 29.54~76.67。亚群 POP1、亚群 POP2、亚群 POP3、亚群 POP4 和混合类群的平均变异系数为 33.20%(表 2)。由于变异系数是反映偏离平均值的变化幅度,因此亚群 POP2 中各品种(品系)对蔓枯病抗性的波动最大,即该群体的抗病性指标的变异偏离程度最大,抗病特性分布比较离散;而 POP3 中各品种(品系)的抗性变异偏离程度最小,其抗病特性分布比较集中。

基于所有参试材料蔓枯病的病情指数分布,对来源于亚群 POP1、POP2、POP3、POP4 和混合类群的 80 份材料的蔓枯病抗性鉴定进行交流分析发现(图 5),其中抗病品种(品系)共有 19 份,占鉴定总数的 23.75%(8.75%来源于亚群 POP1, 1.25%来源于亚群 POP2,2.50%来源于亚群 POP3,6.25%来源于亚群

POP4, 5.00% 来源于杂合类群); 中抗品种 (品系) 21 份, 占鉴定总数的 26.25% (6.25% 来源于亚群 POP1, 1.25% 来源于亚群 POP2, 5.00% 来源于亚群 POP3, 11.25% 来源于亚群 POP4, 2.50% 来源于杂合类群); 感病品种 (品系) 为 24 份, 占鉴定总数的 30.00% (5.00% 来源于亚群 POP1, 7.50% 来源于亚群 POP2, 7.50% 来源于亚群 POP3, 6.25% 来源于亚群 POP4, 3.75% 来源于杂合类群); 高感品种 (品系) 有 14 份, 占到供试种质资源总数的 17.50%, 其中主要来源于类群 POP1 和 POP4, 而源于类群 POP3 的相对较少。因此, 亚群 POP1 和 POP4 中抗性材料占比与其他亚群相比比较高, 抗性材料的占比分别达到 28.57% 和 33.34%; 其次为亚群 POP3 和混合类群, 其抗性材料的占比均为 14.29%, 而亚群 POP2 中抗性材料占比最低。

表 2 供试西瓜种质资源各亚群的变异情况

Table 2 Variation differences of different subgroups of tested watermelon germplasm resources

| 亚群类型 | 最小值 | 最大值 | 变异量数 | 平均值 | 标准差 | 变异系数 (%) |
|---------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| 亚群 POP1 | 23.20 | 84.46 | 61.26 | 54.29 | 19.79 | 36.45 |
| 亚群 POP2 | 7.13 | 83.40 | 76.27 | 55.04 | 25.06 | 45.53 |
| 亚群 POP3 | 29.54 | 76.67 | 47.13 | 56.22 | 12.09 | 21.50 |
| 亚群 POP4 | 28.21 | 82.09 | 53.88 | 55.26 | 15.39 | 27.85 |
| 混合类群 | 23.04 | 81.66 | 58.62 | 53.02 | 18.38 | 34.67 |
| 平均 | 22.22 | 81.65 | 59.43 | 54.77 | 18.14 | 33.20 |

3 讨论

西瓜蔓枯病是世界设施西瓜栽培中最为严重的病害之一, 选育和栽培抗蔓枯病品种是解决该病害最安全、经济和有效的途径, 其中筛选、发掘和创新抗蔓枯病种质资源是瓜类进行抗性育种的重要基础, 而系统准确的蔓枯病抗性鉴定评价标准则是西瓜蔓枯病防治的重要前提, 无论是抗性种质资源筛选、后代抗性选择还是品种推广都离不开抗病性的鉴定评价^[19]。目前国内瓜类蔓枯病抗性鉴定多采取苗期接种法, 再对叶片侵染程度进行病情分级^[20-21], 但部分研究结果表明, 瓜类植株的叶片和茎蔓对蔓枯病的抗性具有不同的遗传特点^[22]。本试验研究发现, 部分西瓜种质苗期叶片对蔓枯病抗性表现较强, 但植株茎蔓对蔓枯病却具有高感特性,

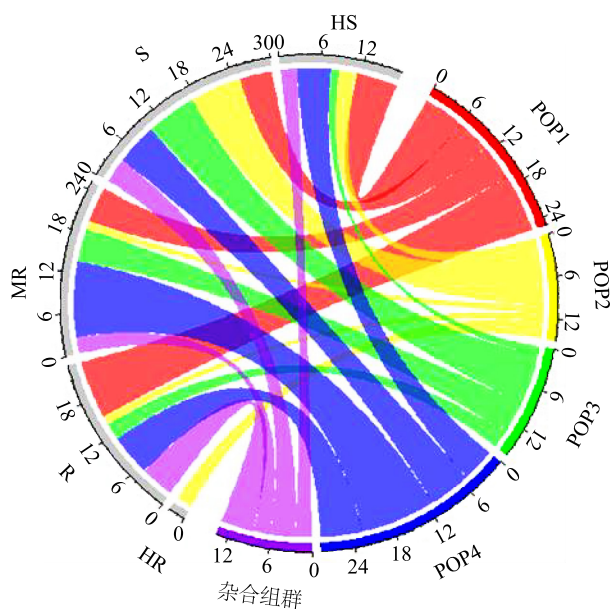


图 5 西瓜种质资源各亚群抗 (感) 材料的分布

Fig.5 Distribution of resistant (susceptible) materials among subgroups of watermelon germplasm resources

最终导致植株随着茎蔓的死亡而萎蔫枯死, 因此西瓜植株叶片和茎蔓组织对蔓枯病的抗性表现不同, 且不同组织部位的发病症状也存在较大或略微差异, 其中筛选出 PI189225 和 PI482276 2 种高抗材料, 19 份抗病材料和 21 份中抗材料。根据本研究筛选鉴定的抗性材料可为今后发掘西瓜蔓枯病抗性基因和抗蔓枯病新品种的选育工作奠定基础。

特别近些年来随着中国西瓜产区的东移及高效设施农业的快速发展, 西瓜蔓枯病抗病育种工作已越来越受到重视, 其中发掘和筛选抗病种质资源是其选育的物质基础, 但中国对西瓜抗蔓枯病育种研究起步较晚, 且缺乏抗蔓枯病的西瓜种质资源^[23]。本研究通过对不同地域来源的 80 份优良种质资源进行蔓枯病抗性评价及种群结构分析发现, 不同地理环境的差异和自然选择压力的存在致使不同来源的西瓜种质资源存在一定的群体结构, 继而造成群体内出现多个亚群。基于贝叶斯统计划分的遗传群体构成分析结果表明, 4 个不同亚群在病级类型和病情指数这 2 个性状上存在一定差异, 且这 2 个性状的变异系数也具有一定差异, 其中亚群 POP2 病情分布离散程度最大, 亚群 POP1 变异波动幅度略大于亚群 POP4, 而亚群 POP3 抗病性离散程度最小, 这可能是由于种质进化过程中存在极端亲本的杂交, 并且在后代中出现了超亲遗传的特点。

在整体抗病性水平上,亚群 POP1 和 POP4 中抗性材料占比与其他亚群相比较,且抗性材料的占比分别达到 28.57% 和 33.34%,其次为亚群 POP3 和混合类群,抗性材料的占比均为 14.29%,而亚群 POP2 中抗性材料占比最低,这可能是由于不同亚群材料间的遗传背景不同,所以抗病性表现有所差异。

参考文献:

- [1] 杜少平,马忠明,薛亮. 氮磷钾配施对砂田西瓜产量和品质的影响[J]. 植物营养与肥料学报, 2016, 22(2): 468-475.
- [2] 马艳,赵江涛,常志州,等. 西瓜内生枯草芽孢杆菌 BS211 的拮抗活性及盆栽防效[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(4): 388-393.
- [3] 王琛,吴敬学,杨艳涛. 世界西瓜生产和贸易分析及对中国的启示[J]. 农业展望, 2015(2): 71-76.
- [4] LI H X, GOTTILLA T M, BREWER M T, et al. Organization and evolution of mating-type genes in three *Stagonosporopsis* species causing gummy stem blight of cucurbits and leaf spot and dry rot of papaya[J]. Fungal Biology, 2017, 121(10): 849-857.
- [5] LI H X, BREWER M T. Spatial genetic structure and population dynamics of gummy stem blight fungi within and among watermelon fields in the southeastern United States [J]. Phytopathology, 2016, 106(8): 900-908.
- [6] ZHAO Q, WU J Z, ZHANG L Y, et al. Identification and characterization of *Cucurbita* gummy stem blight fungi in Northeast China [J]. Journal of Phytopathology, 2018, 2: 1-9.
- [7] STEWART J E, TURNER A N, BREWER M T. Evolutionary history and variation in host range of three *Stagonosporopsis* species causing gummy stem blight of cucurbits [J]. Fungal Biology, 2015, 119: 370-382.
- [8] HUANG C J, LAI Y R. First report of *Stagonosporopsis citrulli* causing gummy stem blight of watermelon in Taiwan[J]. Journal of Plant Pathology, 2018, 101(2): 417.
- [9] RENNERBERGER G, CLEMSON U, COASTAL R, et al. Occurrence of foliar pathogens of watermelon on commercial farms in south carolina estimated with stratified cluster sampling[J]. Plant Disease, 2018, 102: 2285-2295.
- [10] GUSMINI G, SONG R H, WEHNER T C. New sources of resistance to gummy stem blight in watermelon [J]. Crop Science, 2005, 45(2): 582-588.
- [11] 毕研飞,徐兵划,郭静,等. 分子标记辅助甜瓜抗蔓枯病基因聚合及白皮脆品种改良[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(3): 375-380.
- [12] 马华,程春燕,徐建,等. 黄瓜-酸黄瓜渐渗系的验证及其抗蔓枯病筛选[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(3): 369-374.
- [13] LIU S L, SHI Y X, MIAO H, et al. Genetic analysis and QTL mapping of resistance to gummy stem blight in *Cucumis sativus* seedling stage [J]. Plant Disease, 2017, 101(7): 1-8.
- [14] FRANTZ J D, JAHN M M. Five independent loci each control monogenic resistance to gummy stem blight in melon (*Cucumis melo* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(6): 1033-1038.
- [15] ZHANG S P, LIU S L, MIAO H, et al. Inheritance and QTL mapping of resistance to gummy stem blight in cucumber stem [J]. Molecular Breeding, 2017, 37(4): 49.
- [16] LI P F, REN R S, YAO X F, et al. Identification and characterization of the causal agent of gummy stem blight from muskmelon and watermelon in East China [J]. Journal of Phytopathology, 2015, 163: 314-319.
- [17] 张宁,毕研飞,郭静,等. 不同抗性甜瓜接种蔓枯病菌后 PAL、PPO 与 POD 活性的变化[J]. 植物生理学报, 2016, 52(8): 1169-1175.
- [18] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J, et al. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. Molecular Ecology, 2005, 14: 2611 - 2620.
- [19] 赵卫星,常高正,徐小利,等. 西瓜主要病害及抗病育种研究进展[J]. 江西农业学报, 2010, 22(7): 75-78.
- [20] 马华,程春燕,徐建,等. 黄瓜-酸黄瓜渐渗系的验证及其抗蔓枯病筛选[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(3): 369-374.
- [21] LIU S L, SHI Y X, MIAO H, et al. Genetic analysis and QTL mapping of resistance to gummy stem blight in *Cucumis sativus* seedling stage [J]. Plant Disease, 2017, 101(7): 1-8.
- [22] ZHANG S P, LIU S L, MIAO H, et al. Inheritance and QTL mapping of resistance to gummy stem blight in cucumber stem [J]. Molecular Breeding, 2017, 37(4): 49.
- [23] 顾卫红,杨红娟,马坤,等. 西瓜种质资源的抗蔓枯病性鉴定及其利用[J]. 上海农业学报, 2004, 20(1): 65-67.

(责任编辑:陈海霞)