

甜瓜蔓枯病抗性鉴定及 *PAL* 基因表达分析

毕研飞¹, 郭 静¹, 徐兵划¹, 张永兵², 伊鸿平², 钱春桃^{1*}, 陈劲枫¹

(1 南京农业大学 园艺学院作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095; 2 新疆农业科学院 哈密瓜研究中心, 乌鲁木齐 830000)

摘 要:以甜瓜感病品种‘白皮脆’、单基因抗源(PI140471、PI157082、PI511890、PI482398、PI420145)和聚合抗源(145-082、082-890、082-398、145-471、145-890 和 890-398)为材料, 采用梯度浓度蔓枯病菌孢子液接种鉴定以及 RT-PCR 技术, 研究不同材料蔓枯病抗性表现以及抗蔓枯病基因(苯丙氨酸解氨酶基因, *PAL*)在不同材料及不同组织中的表达情况。结果显示: 当接种蔓枯病菌孢子液浓度为 5×10^9 个/mL 时, 单基因抗源已开始出现感病现象, 而聚合基因抗源仍表现为高抗或抗, 其中 145-471(PI420145 $\times$ PI140471)抗性显著高于单基因抗源亲本和其它聚合抗源材料, 表现为高抗($RI < 1.0$)。抗蔓枯病基因 *PAL* 在不同抗性材料根、茎、叶中的表达均呈先上调而后下降并趋于稳定的变化趋势, 但变化快慢和幅度均不同。研究表明, 甜瓜抗蔓枯病基因的聚合能够提高其对蔓枯病的抗性, 但不同抗病基因聚合后的抗性表现存在一定差异; 抗蔓枯病基因 *PAL* 的表达与甜瓜蔓枯病抗性有密切关系, 其表达时间与表达量差异可能是影响不同材料抗病能力差异的重要因素; 该研究鉴定筛选的高抗蔓枯病材料 145-471 可用于甜瓜的抗蔓枯病聚合育种。

关键词:甜瓜; 聚合基因; 抗性鉴定; 苯丙氨酸解氨酶基因; 表达分析

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Resistance Evaluation of Melon(*Cucumis melo* L.) to Gummy Stem Blight and Expression of *PAL* Gene

BI Yanfei¹, GUO Jing¹, XU Binghua¹, ZHANG Yongbing²,

YI Hongping², QIAN Chuntao^{1*}, CHEN Jinfeng¹

(1 College of Horticulture, State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2 Center of Hami Melon Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, China)

Abstract: With the susceptible variety ‘Baipicui’, single-sources(PI140471, PI157082, PI511890, PI482398, PI420145) and pyramided genes materials(145-082, 082-890, 082-398, 145-471, 145-890, 890-398) as the tested materials, we investigated the different resistant performance by gradient spores vaccination identification and the different expression of *PAL* by RT-PCR method. The results showed that when the spores concentration was 5×10^9 mL⁻¹, the single-sources began to appear susceptible, but the pyramided genes materials still showed high resistance or resistance. The pyramided genes materials 145-471(PI420145 $\times$ PI140471) showed the highest resistance($RI < 1.0$). Real-time PCR analysis showed that the *PAL* expression in different tissues were first increased and then reduced to stable, but the change speed and range were different. This study indicated that pyramiding resistance genes could enhance the resistance to GSB, but the resistance performance of different polymeric genes is not the same. The pyramided hybrid 145-471

收稿日期: 2014-08-01; 修改稿收到日期: 2014-11-20

基金项目: 国家自然科学基金新疆联合基金(U1178307)

作者简介: 毕研飞(1989—), 男, 在读硕士研究生, 主要从事园艺作物遗传育种与生物技术研究。E-mail: 2012104072@njau.edu.cn

* 通信作者: 钱春桃, 博士, 副教授, 主要从事园艺作物遗传育种与生物技术研究。E-mail: chuntaoq@njau.edu.cn

can be used for pyramiding breeding of melon. The defense gene *PAL* played an important role in the melon resistance to GSB processes, its higher and earlier expression in the pyramided genes materials can provide higher resistance.

Key words: melon (*Cucumis melo* L.); pyramiding resistance genes; resistance identification; *PAL* gene; expression analysis

蔓枯病(gummy stem blight)又称黑腐病,是影响瓜类蔬菜生产的重要病害之一,它可以危害甜瓜、黄瓜、西瓜、西葫芦等作物,大田发病率可达 20%~30%,在连作地或温室高达 80%,病害严重的年份常常会造成毁灭性减产^[1-5]。目前,生产上防治蔓枯病的常用方法是化学防治,但化学防治效率低、易造成环境污染。另外,在公众食品安全意识日益强化的社会背景下,使用化学农药防治蔓枯病的方法已经越来越不适宜现代农业生产。因此,筛选抗病资源具有重要的生态价值和经济价值。

国内外针对瓜类蔓枯病抗病资源鉴定的研究较多,筛选获得了多份抗病材料。戴富明等^[6]对 20 份来自美国和中国的西瓜品种进行人工接种抗病性鉴定,发现从美国引进的 AG、AS、AJ 对蔓枯病的抗性较强。王晓东等^[7]对新疆 17 个哈密瓜品种进行抗蔓枯病鉴定,筛选到‘新蜜杂 1 号’和‘新蜜 19 号’2 个抗蔓枯病品种。李英等^[8]从 26 份黄瓜材料中筛选出 4 份(酸黄瓜、‘朝优 3 号’以及 2 个酸黄瓜回交后代 HH1-8-57 和 HH1-8-2)对蔓枯病有较高抗性的材料。Wehner 等^[9]对田间 851 个黄瓜品系进行蔓枯病抗性鉴定,获得 PI200815、AR79-75 和 Transamerica 等 9 个高抗品系。Molly Jahn 等^[10]通过田间和温室接种鉴定了 798 份甜瓜资源,并从中筛选出 4 份高抗材料(PI157082、PI511890、PI482398、PI483399)。Gusmini 等^[11]通过接种鉴定筛选出了 PI279461、PI482379 和 PI254744 等 10 个抗病西瓜种质。

蔓枯病病原菌 [*Didymella bryoniae* (Auer-sw)] 存在生理小种的分化,若品种仅携带单个抗病基因,则会导致其抗性降低甚至失去抗性^[12-14]。相关研究表明,不同抗性基因的聚合有助于提高作物的抗性和抗谱^[15-18]。因此选育聚合抗源是提高甜瓜抗蔓枯病的有效途径之一。然而,有关甜瓜不同聚合抗源抗性的鉴定及筛选还鲜见报道。抗蔓枯病基因 *PAL* 的表达与植物的抗病性密切相关,当植物受到病原菌侵染时 *PAL* 被诱导表达,以提高植物的抗性,且其表达时间和表达量与植物抗性呈正相关^[19-22]。但目前关于甜瓜 *PAL* 的研究较少,且主

要集中从生理生化角度研究不同诱导条件下其酶活性变化,而从分子水平进行甜瓜 *PAL* 基因在蔓枯病菌胁迫条件下表达特性的研究还未见报道。

本实验通过对 5 份单基因抗源和 6 份聚合抗源材料进行甜瓜苗期蔓枯病菌的梯度接种鉴定,并利用 RT-PCR 技术对抗蔓枯病基因 *PAL* 在不同抗性材料中的差异表达进行分析。旨在筛选抗性显著提高的聚合抗源,揭示其抗性提高的相关分子机制,为甜瓜抗蔓枯病聚合育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 甜瓜抗源材料和接种菌株

5 份甜瓜单基因抗源材料 PI140471、PI157082、PI511890、PI482398 和 PI420145,分别含有抗病基因 *Gsb-1*、*Gsb-2*、*Gsb-3*、*Gsb-4*^[10] 和 *Gsb-6*^[23],其中 PI140471、PI157082、PI511890 和 PI482398 由美国康乃尔大学 Molly John 教授提供,PI420145 是由本课题组的 Joseph 等筛选得到,并命名为 *Gsb-6*。6 份聚合基因材料分别由 5 份单基因抗源杂交并结合相关分子标记筛选获得:082-890 (PI157082 × PI511890)、082-398 (PI157082 × PI482398)、145-471 (PI420145 × PI140471)、145-082 (PI420145 × PI157082)、145-890 (PI420145 × PI511890) 和 890-398 (PI511890 × PI482398)。感病品种‘白皮脆’,由项目合作单位新疆农业科学院提供。

2013 年春季(3 月 10 号)、秋季(8 月 1 号)在南京农业大学人工气候室内进行育苗。将种子消毒、浸种后,28℃催芽,挑选饱满、整齐一致的播种于 72 孔穴盘中。育苗期间平均昼/夜温度为 24℃~28℃/17℃~19℃,光合有效辐射 500 μmol·m⁻²·s⁻¹,相对湿度维持在 60%~70%。待幼苗第一片真叶展平时,挑选长势较好且一致的植株移栽至 12 cm×10 cm×8 cm(口径/底径/高)营养钵中,每钵 1 株。基质由草炭、蛭石(V:V=1:1)混合而成。

试验用蔓枯病菌为本实验室分离纯化并保存的 A 型菌株,参照李英等^[24]的方法进行产孢培养。用解剖针挑取菌丝接种于 PDA 培养基平板的中央,

表 1 防卫基因表达分析的引物序列及产物大小
Table 1 Primer sequences and product sizes by expression analysis of defense genes

基因 Gene	登录号 GenBank accession	引物序列 Primer Sequence	扩增长度 Product length/bp
PAL	X76130.1	5'-TCCTTAACCACAATGTCACACCTT-3' 5'-CTCCACTATCATGCCAGCGTAT-3'	183
Cm-Actin	FJ763186.1	5'-GTGATGGTGTGAGTCACACTGTTC-3' 5'-ACGACCAGCAAGGTCCAAAC-3'	82

经 25 ℃ 黑暗培养 7 d 后,再在 40 W 紫外灯下 30 cm 间歇照射 4 d(12 h 紫外/12 h 黑暗)产生孢子。在显微镜下利用血球计数板将分生孢子悬浮液配成 5×10^5 个/mL、 5×10^7 个/mL 和 5×10^9 个/mL 备用。

1.2 试验方法

1.2.1 苗期梯度接种鉴定 完全随机设计,试验材料分为 A、B、C 等 3 组,每组每份材料 35 株,均种植于南京农业大学园艺学院牌楼试验基地温室内。参照 Zhang 等^[12]的方法,待幼苗长到 3~4 片真叶时进行人工喷雾接种,用微型喷雾器对 3 组分别喷洒浓度为 5×10^5 、 5×10^7 和 5×10^9 个/mL 的蔓枯病菌孢子悬浮液。接种后覆盖塑料棚膜遮光密闭,相对湿度保持 92%~95%,温度 23 ℃~27 ℃,3 d 后揭开棚膜,于 7 和 10 d 调查统计病情。

叶片侵染分级标准:0 级. 无可见侵染;1 级. 老叶上边缘坏死或斑点<10 mm,新叶无病;2 级. 老叶同上,新叶边缘坏死;3 级. 所有叶均有感染,叶坏死面积<25%;4 级. 叶坏死面积>25%,≤50%;5 级. 叶坏死面积>50%。

根据平均病情级别数(RI)确定蔓枯病抗性级别:高抗(HR). $RI<1.0$;抗(R). $1.0\leq RI<2.0$;中抗(MR). $2.0\leq RI<3.0$;感(S). $3.0\leq RI<4.0$;高感(HS). $RI\geq 4.0$ 。平均病级计算公式:

$$RI=\sum(\text{级值}\times\text{株数})/\text{总株数}$$

根据接种鉴定结果,选取能准确区分聚合基因材料和单基因抗源材料抗性差异的接种浓度进行再次苗期接种,并于接种后 0、12、24、48、72 h,及 5 和 7 d 取样,样品取后立即放入液氮速冻,置于-70 ℃超低温冰箱保存备用。每一时间点的样品进行 3 次独立生物学重复。

1.2.2 引物设计、RNA 提取和 cDNA 合成 从 GenBank 中(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)搜索苯丙氨酸解氨酶基因[*C. melo* (cantaloupe) pal mRNA]的 mRNA 序列,利用 Primer 6.0 软件设计引物并由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成,内参基因参照 Islam El-Sharkawy^[25](表 1)。利用 RNA

提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取总 RNA,并用 DNase I 除去基因组 DNA。利用反转录试剂盒(Takara 公司)进行反转录得到 cDNA 用于基因的特异性表达分析,方法参照试剂盒说明书。

1.2.3 mRNA 的 RT-PCR 扩增 利用 SYBR Green 试剂盒(Takara 公司)进行实时荧光定量 PCR 分析。25 μL 反应体系为 SYBR® Premix($2\times$)12.5 μL,上下游引物($2.5\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 0.8 μL,cDNA 1.0 μL,ddH₂O 9.9 μL,每个样本进行 3 次技术重复。RT-PCR 反应条件为 95 ℃预变性 30 s,95 ℃变性 5 s,60 ℃退火 20 s,65 ℃延伸 30 s,进行 40 个循环,在 65 ℃延伸步骤收集荧光信号。最后,采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行相对定量数据分析。

2 结果与分析

2.1 不同抗性基因聚合后的抗病表现

不同抗性植株春、秋季的病级统计结果见表 2,当接种浓度为 5×10^5 个/mL 时,只有感病品种‘白皮脆’出现病症,单基因抗源和聚合抗源都无发病症状。当接种浓度为 5×10^7 个/mL 时,PI157082 平均病级(RI)为 2.0,表现为中抗,其他单基因抗源 RI 为 1.3~1.6 之间,表现为抗,而聚合抗源 145-471、082-890、890-398 和 082-398 的平均病级 $RI<1.0$,表现为高抗。当接种浓度为 5×10^9 个/mL 时,不同抗源出现不同等级的病症,其中单基因抗源 PI420145 与 PI140471 的平均病级分别为 3.0~3.6,表现为感病,而聚合抗源 145-471(PI420145×PI140471)的平均病级为 0.39~0.51,仍表现为高抗,抗性显著高于单基因抗源亲本。

2.2 防卫基因的表达分析

选取抗病基因聚合后抗性显著提高的聚合抗源 145-471(PI420145×PI140471)、单基因抗源 PI420145、PI140471 和感病品种‘白皮脆’为材料,利用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)技术,以 *Cm-Actin* 为内参基因,分析 PAL 基因在甜瓜幼苗根(图 1,A)、茎(图 1,B)、叶(图 1,C)中的表达情况。结果表明,PAL 在根、茎、叶中均有表达,但表

表 2 接种鉴定结果统计(RI)
Table 2 Estimation of disease rating(RI)

材料 Material	接种不同浓度(个/mL)菌液不同季节测定的 RI The RI of material inoculated with gradient spores in different seasons					
	5×10 ⁵		5×10 ⁷		5×10 ⁹	
	春 Spring	秋 Autumn	春 Spring	秋 Autumn	春 Spring	秋 Autumn
白皮脆 Baipicui	3.20±0.151	3.40±0.183	3.60±0.200	3.90±0.212	4.70±0.251	4.90±0.238
PI420145	0	0	1.40±0.061	1.60±0.073	3.50±0.129	3.60±0.170
PI140471	0	0	1.30±0.070	1.35±0.082	3.00±0.112	3.15±0.126
PI157082	0	0	2.00±0.103	2.00±0.110	3.42±0.131	3.70±0.142
PI511890	0	0	1.54±0.072	1.60±0.080	3.27±0.119	3.56±0.130
PI482398	0	0	1.30±0.060	1.45±0.057	3.30±0.136	3.30±0.150
145-471	0	0	0.24±0.031	0.28±0.017	0.39±0.021	0.51±0.030
145-082	0	0	1.26±0.055	1.50±0.070	2.30±0.121	2.70±0.135
145-890	0	0	1.00±0.049	1.00±0.041	2.13±0.100	2.29±0.107
082-890	0	0	0.68±0.040	0.74±0.036	1.20±0.053	1.67±0.060
082-398	0	0	0.81±0.063	0.85±0.049	1.46±0.060	1.59±0.071
890-398	0	0	0.70±0.045	0.76±0.041	1.60±0.073	1.85±0.082

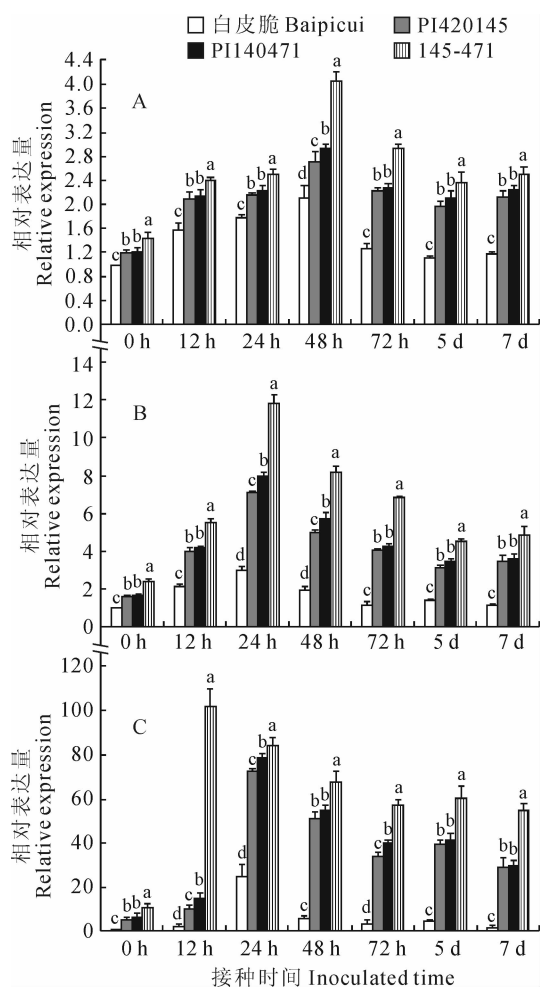


图 1 蔓枯病菌胁迫下 PAL 在不同抗性甜瓜根(A)、茎(B)和叶(C)中的表达
以‘白皮脆’0 h 的表达量为 1;同一时间段不同字母表示不同材料间在 0.05 水平存在显著性差异
Fig.1 Expression of PAL in root(A), stem(B) and leaf(C) under gummy stem blight stress
The expression of ‘Baipicui’ at 0 h was as 1; Different letters mean significant difference at $P<0.05$

达存在一定差异,在叶中表达较高,根和茎中表达较低。

接种后,‘白皮脆’根中 PAL 的表达在 12~48 h 内变化不大,72 h 时快速下降,5 d 时降至最低,但仍高于对照,为对照的 1.1 倍,7 d 时有所上调,但仍低于 72 h 的表达量;单基因抗源 PI420145、PI140471 和聚合抗源 145-471 根中 PAL 表达的变化趋势基本一致,都在 48 h 时达到最高峰,但峰值却不同,145-471 分别为 PI420145 和 PI140471 的 1.5 倍和 1.38 倍。不同抗性材料茎中 PAL 表达变化趋势基本一致,先上调,24 h 时达到最高峰,然后下调,但变化幅度具有明显差异。茎中表达量达到最高峰时(24 h),‘白皮脆’、PI420145、PI140471 和 145-471 分别为对照的 3 倍、4.44 倍、4.59 倍和 4.9 倍。聚合抗源 145-471 叶片中 PAL 表达在 12 h 时达到最高峰,为对照的 9.3 倍,而‘白皮脆’、PI420145 和 PI140471 在 24 h 时达到最高峰,分别为对照的 25 倍、14.2 倍和 12 倍。接种后,不同抗性甜瓜中 PAL 的表达量均高于对照,且与感病品种白皮脆相比,抗源中的表达量始终相对较高。

3 讨论

传统的甜瓜抗蔓枯病苗期接种鉴定孢子液浓度为 5×10^5 个/mL,可以有效区分出抗、感材料的差异,但不能准确区分抗性材料之间的差异^[12,26]。本研究利用 3 个蔓枯病菌浓度(5×10^5 、 5×10^7 和 5×10^9 个/mL)进行梯度接种鉴定实验,以准确鉴定单基因抗源与聚合抗源以及不同聚合抗源之间的抗性能力的差异。结果表明,单基因抗源对不同蔓枯病菌表现出一定程度的选择性抗性,而聚合抗源却

一直表现为抗病,说明聚合基因可以提高甜瓜的抗性与抗谱,这与 Matsumoto 等^[16]在黄瓜方面以及朱明涛等^[17]在番茄方面的研究结果相一致。另外,不同聚合抗源之间的抗性表现也存在一定差异,145-471 对不同浓度病原菌抗性表现基本一致,均为高抗。145-082、145-890、082-890、082-398 和 890-398 对不同浓度表现选择性抗性,当接种浓度为 5×10^5 个/mL 时均表现为高抗, 5×10^7 个/mL 时,082-890、082-398 和 890-398 表现高抗,145-082 和 145-890 表现为抗; 5×10^9 个/mL 时,聚合抗源 082-890、082-398 和 890-398 表现为抗,而 145-082 和 145-890 表现为中抗。本研究筛选到的聚合抗源 145-471 可作为甜瓜优质、抗病和高产育种重要的中间材料,为获得新的高抗甜瓜品种(系)奠定了基础。

基因表达分析表明,防卫基因 PAL 在甜瓜不同组织均有表达,叶片的表达量最高,其次是茎,而根中的表达量比较低。接种蔓枯病菌后,不同抗性甜瓜及不同组织中 PAL 表达量变化存在明显差异。聚合抗源 145-471 叶片中 PAL 基因表达量在 12 h 时达到最高峰,而单基因抗源 PI420145 和 PI140471 叶片中 PAL 基因表达的最高峰在 24 h。

不同抗性甜瓜茎中 PAL 基因的表达在 24 h 时均达到最高峰,而根 PAL 基因在 12~24 h 表达变化幅度较小。由此可知,甜瓜幼苗对蔓枯病菌侵染的时空响应或适应性存在一定差异。防卫基因 PAL 表达量在接种后呈现出先升高后降低的趋势,且后期有所波动。这可以有效避免基因表达产物的过度积累而对植株自身造成损害,同时还可降低病原菌的适应性,与王红英等^[27]在甜瓜和缪卫国等^[28]在棉花上从生理生化方面研究酶活性变化的趋势基本一致。

本研究首次在转录水平上研究 PAL 与甜瓜蔓枯病抗性的关系,聚合抗源 145-471 中 PAL 基因的表达量高于或表达时间早于单基因抗源 PI420145 和 PI140471,在一定程度上揭示了甜瓜聚合抗源抗性提高的原因。RT-PCR 方法分析 PAL 转录水平与研究 PAL 酶活性相比,方法简单、快捷、准确,为进一步研究 PAL 与甜瓜抗病性的关系提供了技术和理论支持。另外,与感病品种‘白皮脆’相比,抗病材料中 PAL 基因的表达量始终相对较高,表明 PAL 与甜瓜蔓枯病抗性有密切关系,其表达量可作为甜瓜前期蔓枯病抗性鉴定的重要参考指标。

参考文献:

- [1] KEINATH A P, FARNHAM M W, ZITTER T A. Morphological, pathological, and genetic differentiation of *Didymella bryoniae* and *Phoma* spp. isolated from cucurbits[J]. *Phytopathology*, 1995, **85**(3): 364—369.
- [2] WU M ZH(吴明珠), YI H P(伊鸿平), FENG J X(冯炯鑫), et al. Ecobreeding of hamimelon and soilless cultivation of organic ecotype[J]. *Engineering Science*(中国工程科学), 2000, **2**(8): 83—88(in Chinese).
- [3] LIU SH L(刘书林), GU X F(顾兴芳), SHI Y X(石延霞), et al. General research situation on gummy stem blight of cucurbitaceae vegetables[J]. *China Vegetables*(中国蔬菜), 2013, (18): 1—10(in Chinese).
- [4] BI Y F(毕研飞), XU B H(徐兵划), QIAN CH T(钱春桃), et al. Research progress in melon resistance breeding to gummy stem blight[J]. *China Vegetables*(中国蔬菜), 2013, (20): 10—16(in Chinese).
- [5] WOLUKAU J N, ZHOU X H, LI Y, et al. Resistance to gummy stem blight in melon(*Cucumis melo* L.) germplasm and inheritance of resistance from plant introductions 157076, 420145, and 323498[J]. *Hort Science*, 2007, **42**(2): 215—221.
- [6] DAI F M(戴富明), LU J P(陆金萍), GU W H(顾卫红), et al. Induction of fruiting-body of *Didymella bryoniae* and identification of watermelon resistance to the pathogen[J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2003, **30**(2): 138—142(in Chinese).
- [7] WANG X D(王晓东), LI G Y(李国英). Producing pycnidia and viridity susceptibility of gummy stem blight fungus of muskmelon[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2004, **41**(5): 341—344(in Chinese).
- [8] 李 英. 瓜类蔓枯病菌的生物学特性和黄瓜抗病资源的筛选[D]. 南京: 南京农业大学. 2007.
- [9] WEHNER T C, SHETTY N V. Screening the cucumber germplasm collection for resistance to gummy stem blight in North Carolina field tests[J]. *Hort Science*, 2000, **35**(6): 1 132—1 140.
- [10] FRANTZ J D, JAHN M M. Five independent loci each control monogenic resistance to gummy stem blight in melon(*Cucumis melo* L.) [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, **108**(6): 1 033—1 038.

- [11] 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.
- [12] ZHANG Y P, MOLLY K, ANAGNOSTOU K. Screening melon for resistance to gummy stem blight in the greenhouse and field[J]. *Hort Science*, 1997, **32**(1): 117—121.
- [13] LIU L ZH(刘龙洲), ZHAI W Q(翟文强), CHEN Y L(陈亚丽), *et al.* QTL molecular marker location of gummy stem blight resistance in melon(*Cucumis melo*) [J]. *Journal of Fruit Science*(果树学报), 2013, **30**(5): 748—752(in Chinese).
- [14] KEINATH A P, HOLMES G J, EVERTS K L, *et al.* Evaluation of combinations of chlorothalonil with azoxystrobin harpin, and disease forecasting for control of downy mildew and gummy stem blight on melon[J]. *Crop Protection*, 2007, **26**: 83—88.
- [15] XU Y(许 勇), ZHANG H Y(张海英), KANG G B(康国斌), *et al.* Studies of molecular marker-assisted-selection for resistance to fusarium wilt in watermelon(*Citrullus lanatus*) breeding[J]. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 2000, **27**(2): 151—157(in Chinese).
- [16] MATSUMOTO Y, WATANABE N, KUBOYAMA T, *et al.* Cross-species transferability of 86 cucumber(*Cucumis sativus* L.) microsatellite markers to gherkin(*C. anguria* L.) [J]. *Scientia Horticulturae*, 2012, **136**(4): 110—114.
- [17] ZHU M T(朱明涛), SUN Y L(孙亚林), ZHENG SH(郑 莎), *et al.* Pyramiding disease resistance genes by molecular marker-assisted selection in tomato[J]. *Acta Horticulturae Sinica*(园艺学报), 2010, **37**(9): 1 416—1 422(in Chinese).
- [18] YU H(余 辉), SONG W(宋 伟), ZHAO J R(赵久然), *et al.* Two major resistance genes pyramiding on maize inbred line Jing 24 with marker assisted selection[J]. *Molecular Plant Breeding*(分子植物育种), 2014, **12**(2): 240—245(in Chinese).
- [19] CHENG ZH H(程智慧), LI Y H(李玉红), MENG H W(孟焕文), *et al.* The relationship between BTH-induced resistance to downy mildew in cucumber seedlings and content of HRGP and lignin in cell wall[J]. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2006, **39**(5): 935—940(in Chinese).
- [20] YU H J(于洪久), ZHU H D(朱洪德), LIU L J(刘丽君), *et al.* PAL and POD activities of soybean hypocotyls infected by pythium[J]. *Soybean Science*(大豆科学), 2012, **31**(3): 495—497(in Chinese).
- [21] WADA K C, MIZUUCHI K, KOSHIO A, *et al.* Stress enhances the gene expression and enzyme activity of phenylalanine ammonia-lyase and the endogenous content of salicylic acid to induce flowering in pharbitis [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2014, **171**(11): 895—902.
- [22] KIM D S, HWANG B K. An important role of the pepper phenylalanine ammonia-lyase gene(PAL1) in salicylic acid-dependent signalling of the defence response to microbial pathogens[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2014, **65**(9): 2 295—2 306.
- [23] JOSEPH N W, ZHOU X H, CHEN J F. Identification of amplified fragment length polymorphism markers linked to gummy stem blight (*Didymella bryoniae*) resistance in melon(*Cucumis melo* L.) PI420145[J]. *Hort Science*, 2009, **44**(1): 32—34.
- [24] LI Y(李 英), ZHANG Y B(张永兵), JOSEPH N W, *et al.* Fruit-body isolation of *Didymella bryoniae* and sporulation conditions of its a stain[J]. *Journal of Fruit Science*(果树学报), 2007, **24**(1): 84—88(in Chinese).
- [25] ISLAM E, DANIEL M, FRANCISCO B F, *et al.* Functional characterization of a melon alcohol acyl-transferase gene family involved in the biosynthesis of ester volatiles. Identification of the crucial role of a threonine residue for enzyme activity[J]. *Plant Mol. Biol.*, 2005, **59**: 345—362.
- [26] XU B H(徐兵划), QIAN CH T(钱春桃), WANG H Y(王红英), *et al.* The expression analysis of defense genes in the genes pyramided melon(*Cucumis melo* L.) resistance to gummy stem blight[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*(南京农业大学学报), 2014, **37**(5): 63—68(in Chinese).
- [27] WANG H Y(王红英), QIAN CH T(钱春桃), ZHANG Y B(张永兵), *et al.* Changes of several physiological characters in melons with different resistances after inoculation with *Didymella bryoniae* [J]. *China Cucurbits and Vegetables*(中国瓜菜), 2012, **25**(1): 7—10(in Chinese).
- [28] MIAO W G(缪卫国), SONG C F(宋从凤), QIAO Z CH(乔子辰), *et al.* The generation of reactive oxygen intermediates and expression of defense genes in transgenic hpa1Xoo cotton[J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*(南京农业大学学报), 2011, **34**(2): 61—66(in Chinese).

(编辑:宋亚珍)