

分子标记及其在葫芦科作物抗病育种中的应用

周 辉^{1,2}, 赵福宽¹, 林 成², 高遐虹³, 程继鸿³

(1. 北京农学院生物技术系, 北京 102206; 2. 新疆农业大学园艺学院, 乌鲁木齐, 830052; 3. 北京农学院植物科技系, 北京 102206)

摘 要: 分子标记技术是较形态标记、细胞标记和生化标记更为理想的遗传标记, 已被广泛地应用于生命科学研究的各个领域。本文综述了分子标记技术的基本原理和应用范围, 近年来在植物抗病性遗传基因的 DNA 分子标记和定位, 分子标记辅助选择在抗病育种方面的应用, 对葫芦科作物病害以及应用分子标记进行抗病育种研究的现状进行了介绍, 并对目前的研究中所存在的问题及应用前景进行了探讨。

关键词: 分子标记; 葫芦科; 抗病

中图分类号: S642.603.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2005)01-0004-03

由病毒、细菌、真菌等引起的病害侵染葫芦科作物后会表现出多种症状, 常导致产量和品质的降低, 严重时甚至绝产。其中病毒病的发生和流行已成为困扰葫芦科生产的主要因素, 这些病毒已遍及世界各地种植葫芦科作物的地区。虽然人们已较深入地研究了葫芦科作物病害发生与流行的趋势, 完善了多种病原检测技术, 也为寻找相关抗病种质资源做了大量工作, 但其危害还是有不断发展的趋势, 主要原因在于缺乏单抗或多抗病害的栽培品种。而利用传统的育种方法使筛选抗源和培育新抗病品种的过程漫长, 又耗费人力物力。作为一种强有力的辅助性工具, 分子标记已全方位渗透到现代植物育种的各个方面, 从原材料的收集到标记辅助育种都显示了它无可比拟的优越性。它的应用不仅没有造成传统育种体系的紊乱, 反之却使后者更趋成熟、合理与完善, 从而成为一种高效、快速、准确的改良和创造作物新品种的新技术体系。在葫芦科抗病育种中, 利用分子标记可以加快抗源筛选和抗病基因鉴定的速度, 从而加快抗病育种的进程, 促进抗病基因的有效利用。

1 用于植物抗病育种的分子标记

分子标记是继形态标记、细胞标记和生化标记之后发展起来的一种新的遗传标记形式。同那些标记相比, 分子标记直接以 DNA 的形式表现, 数量多且多态性高, 许多分子标记表现为显性、共显性, 能够鉴别出纯合基因型和杂合基因型, 提供完整的遗传信息供育种实践利用^[1]。

1980年 Bostein 和 White 等首次提出用 RFLP 作为遗传标记构建遗传连锁图谱, 之后, 相继出现了 20 多种 DNA 分子标记方法, 它们的应用已覆盖了生命科学的许多领域。按其

技术原理, 分子标记可分为 3 大类: 第 1 类是以分子杂交为基础的标记技术, 主要是 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)。第 2 类是以 PCR 反应为基础的一系列分子标记技术, 如 RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA); SSR(Simple Sequence Repeat); SCAR(Sequence Characterized Amplified Regions); STS(Sequence Tagged Site)等。第 3 类是以酶切和 PCR 为基础的分子标记技术, 如 AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism); CAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)。目前应用较多的是 RFLP, RAPD, AFLP 及 SSR。

RFLP 是指不同生物的 DNA 经限制性内切酶消化后, 通过分子杂交检测酶切同源片段大小上的差异。这种差异是 DNA 分子碱基突变引起的限制性内切酶酶切位点的缺失或增加, 以及 DNA 分子片段插入、重复、缺失等行为造成的酶切片段长度上的差异。RFLP 标记一般为共显性, 但 RFLP 操作较复杂、费用较高。

RAPD 是 Williams 和 Welsh(1991)两个研究小组同时创建的一种运用随机引物扩增基因组, 寻找多态性 DNA 片段作为分子标记的新技术。RAPD 技术建立在 PCR(Polymerase Chain Reaction)技术基础之上, 利用一系列不同的寡聚核苷酸为引物, 对所研究的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。RAPD 技术程序简单、快捷、成本低。

AFLP 标记是由 Zabeau 和 Vos(1993)发明的一项 DNA 分子标记。其要点是选择性地扩增基因组 DNA 的限制性酶切片段; 首先用两个(也可一个或多个)限制性内切酶消化基因组 DNA, 再用与这两个酶酶切末端配对的两个双链人工接头连接限制性酶切片段, 作为扩增反应模板。其实质是 RFLP 与 PCR 结合的一种技术。AFLP 多态性强、稳定性高、重复性好。该技术的缺点是通常需用同位素, 危害人的健康, 成本较高。

SSR 也叫微卫星 DNA, 是指 DNA 分子中 2—4 个碱基组成的简单重复序列, 其分布遍及人类和动植物的所有染色体及染色体各个片段^[3]。不同品种间, 其重复单位数有极高的变异, 根据其两端特异序列来设计引物, 通过 PCR 扩增基因



第一作者简介: 周辉, 女, 1979 年生, 2002 年毕业于新疆农业大学园艺学院, 现在职硕士研究生, 在北京农学院生物技术系从事蔬菜生物技术育种方面的研究。参与了北京市教委与农业应用新技术北京市重点实验室资助项目南瓜育种课题的研究工作。

*北京市教委和农业应用新技术北京市重点实验室资助项目

收稿日期: 2004—09—08

组中的重复序列位点,分析基因组的多态性。该标记具有 RAPD 标记的所有优点,且多态性更丰富,同时又克服了 RAPD 缺点,具有较高的稳定性。但要获得 SSR 引物需要进行大量克隆、测序和杂交验证工作。

在植物抗病育种中,分子标记除了被用于种质资源鉴定、分子遗传连锁图的构建、基因克隆、杂种优势预测外,还主要用于目标性状基因的分子标记和标记辅助选择。

利用 DNA 分子标记对与抗性基因连锁的基因组区域进行分析,鉴定染色体上特异的 DNA 片段,找出与抗病基因连锁的分子标记,进而确认其在染色体上的位置,为以标记为基础的选择和分离抗病基因打下基础^[3]。携带目的基因的近等基因系是抗病基因分子标记定位的首选模式材料,但需要经过多代回交才能获得,周期很长。在没有近等基因系的条件下可以采用 Michmore(1991)提出的 BSA 法,它只需在分离群体中(如 F₂、BC、DH 等)依据目标性状表型的差异(如抗病与感病)构建两个基因池,即可对目的基因进行标记。目前,利用分子标记已对多种作物的抗病基因进行了定位。徐炎、王跃进^[4]等采用 SSR 和 PAPD 技术通过 155 个随机引物的筛选,获得了一个与葡萄抗白腐病基因连锁的 RAPD 标记 OPP09-760,并在中国野生葡萄 8 个种的 32 个株系及欧洲葡萄 16 个品种中得到验证;Paran 和 Michmore 将生菜抗霜霉病的 RAPD 标记 Chang 将番茄抗斑萎病基因 Sw-5 标记转化为 SCAR 标记;田苗英^[6]等应用 RAPD 方法获得了一个与番茄 ToMV 抗性基因 Tm²连锁的标记。已定位的还有茄子抗青枯病基因 RAPD 标记,马铃薯的青枯病基因,番茄抗斑萎病基因等。

我们能够借助分子标记对目标性状的基因型进行选择,这称为标记辅助选择(MAS, marker-assisted selection)。它可以使我们易于发现抗病材料,既省去抗病接种鉴定的繁琐程序,又无需受各种环境因素的影响,这将加速对抗源的筛选与抗病基因的鉴定,对制订有效的育种计划,提高育种效率,缩短育种周期提供帮助。Hittalmani 等以抗稻瘟病基因 Pi2(t)为目标,先用一个与遗传距离为 2.8 cM 的标记进行选择,准确率为 96.8%;而用 Pi2(t)另一侧与之相距 5.0 cM 的标记共同选择时,准确率为 100%,说明分子标记辅助选择在抗病育种中应用是完全可行的。Barone 等用 RLFP, RAPD 和 AFLP 分子标记分析了马铃薯栽培品种与野生种(*S. commersonii*)的 BC₁, BC₂ 和 BC₃ 回交各代中携带的野生型基因的程度及抗软腐病基因渐渗的效率,以指导回交后代的选择。

2 葫芦科作物病害及防治

2.1 葫芦科作物病害

葫芦科作物的生产受到多种病害的侵袭,发病植株明显矮化,叶片褪绿、斑驳甚至卷曲变形,果实皱缩畸形,致使产量降低,品质下降,商品性差,给生产造成较大的损失,已引起人们的普遍关注。在我国,随着近几年葫芦科作物的栽培面积逐年增加,病害也愈来愈严重。特别是病毒病已成为导致葫芦科作物损失最严重并最难防治的病害,凡是种植瓜类作物的地区都会有病毒病的发生,常年发病率为 1%~100%,各

种瓜类作物都有过病毒病害减产甚至毁灭性灾害的报道。王中原^[7]等 2000 年对湖北江汉平原的甜瓜病毒病进行了调查,当年病毒病的暴发造成甜瓜约 50% 的面积减产,有 260 hm²(公顷)以上的面积绝收。到目前为止,经国际病毒分类委员会(ICTV)承认的能侵染葫芦科作物的病毒就包括 38 个确定种和 9 个暂定种。其中黄瓜花叶病毒(CMV),西瓜花叶病毒(WMV),小西葫芦黄化花叶病毒(ZYMV),南瓜花叶病毒(SqMV),番木瓜花叶病毒(PRSV-W)等为世界性分布和危害最严重的病毒。

2.2 葫芦科病害的防治

研究葫芦科病害的目的在于寻找有效防治措施,控制和减轻病害所造成的损失。由于病害的发生受病原、传播媒介、寄主和环境等多种因素的制约,其防治的手段也是多方面的,如农业防治、化学防治、脱毒和繁育无病毒苗木、交叉保护等。而采用抗病品种是防治葫芦科作物病害的最根本有效的措施,目前进行抗病育种可以采用基因工程育种,传统的杂交育种及分子标记辅助选择育种。

基因工程育种中的有效基因主要来源于病毒,葫芦科作物上应用较多的是外壳蛋白基因策略。在国外,葫芦科作物的几种主要病毒 WMV-2、CMV、SqMV、ZYMV 的外壳蛋白基因均有转入葫芦科作物的报道。目前,通过 CP 基因策略在葫芦科作物上已获得了一些工程植株,但由于多是采用单一基因策略,获得的工程植株常表现的是阶段抗病性及延迟发病,因此,研究者们将两种或多种 CP 基因转化到葫芦科作物上,以扩大其抗病范围。M. Fuchs(1995)等在日内瓦调查了表达 ZYMV 和 WMV-2 的蛋白外壳基因的转基因南瓜 ZW-20 对这两种病毒混合接种表现高水平抗性。在我国也已经把 WMV 的 CP 基因转入甜瓜、西瓜、黄瓜;CWV 的 CP 基因转入南瓜、甜瓜、番茄、辣椒;SqMV 的 CP 基因转入烟草^[8~10]。但目前我国报道的都是转入单一病毒的 CP 基因。

传统杂交育种方法获得抗病性的最重要前提是筛选和收集抗病材料。目前在葫芦科作物上已收集到的抗病种质资源在抗病育种中发挥着重要的作用。甜瓜对病毒病的抗性研究在葫芦科中起步较早。1967 年 R. E. Webb 就选育出了抗病病毒病的厚皮甜瓜品系 B66-5。Provvidenti 和 Robison(1978)对南瓜属 14 个抗病野生种和 3 个栽培种进行了抗多种病毒的筛选,发现南瓜品种中 *C. moschata* Nigerian local, *C. maxima* 'Pai Yu' (China), *C. ecuadorensis*, *C. ficifolia*, *C. foetidissima* 和 *C. pedatifolia* 等对 WMV-2 均有一定抗性。两个野生种 *C. ecuadorensis* 和 *C. foetidissima* 高抗 WMV 和 PRSV-W,对 CMV 也有一定的抗性,是南瓜属中最有希望的 2 个多抗瓜类作物优势病毒的野生种。康东木等对西瓜野生材料 Egun 鉴定,初步表现出对 WMV、ZYMV、CMV 等病毒高抗。古勤生等对中国 18 个西瓜品种(品系)进行了抗 ZYMV 的筛选,结果表明全部品种(品系)均感病。

3 分子标记在葫芦科作物抗病育种中的应用

通过传统的杂交育种法获得抗病性就是要从现有品种、原始品种或农家品种及其相关的种间、属间选择抗性材料;或

者需要鉴定抗病基因,通过增系法或回交法,将抗病基因导入现有品种。但是传统的抗病育种是以表型选择为基础的,杂种后代的抗病筛选比较复杂,费时费力,抗性鉴定结果易受环境和生育期的影响,且难以同时对多个抗性基因进行筛选。特别是对植物数量性状抗性基因的鉴定和筛选中,投入人力物力最多,工作量最大,效果不明显,严重地阻碍了数量抗病基因在抗病育种中的应用。而现在采用传统的杂交育种和分子生物学结合的方法可以弥补传统育种方法的许多弊病。在葫芦科作物抗病育种中利用分子标记可加快抗源筛选和抗病基因的鉴定速度,提高品种选育效率,缩短育种周期,从而加快抗病育种的进程和促进抗病基因的有效利用。

目前,已经有许多葫芦科作物的抗病基因得到了可靠的标记:许勇等获得了与西瓜抗病材料 PI296341 抗枯萎病生理小种 1 的抗性基因连锁的分子标记 OPP01/700,该标记与抗病基因的遗传距离为 3.0 cM。通过 Southern 杂交检测证明抗病连锁 RAPD 标记 OPP01/700 为单拷贝,对其进行克隆与测序并转化为 SCAR 标记。该技术在抗病转育 F3 代群体中得到了很好的应用。这是国内外到目前为止首次在西瓜上获得的抗病基因 RAPD 标记及 SCAR 标记,并成功建立了一整套西瓜抗枯萎病育种分子标记辅助选择技术系统。Wechter 等在甜瓜抗病材料 MR-1 上获得了与抗枯萎病生理小种 1 连锁的 RAPD 标记,并成功地将其转化为 SCAR 标记。Hallen 等找到了与黄瓜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。

4 问题与展望

DNA 分子标记技术是建立在分子生物学基础上的,它使对抗病基因和遗传变异的研究从传统的形态学性状分析跨入到以核苷酸多态性为基础的分子水平分析,从而在选择的手段上实现了从表现型选择到基因型选择的质的飞跃。尽管十多年来分子育种的理论研究已取得了很大的进展,在植物抗病育种中的应用还处于逐步探索阶段。在葫芦科作物抗病育种实际应用中,凭借分子选择手段育成品系或品种的报道的例子还很少。究其原因主要是以下几点:

首先是基因定位研究与育种程序相脱节,绝大多数的研究者只把工作目标确定在鉴定和定位重要的基因上。在设计研究方案时,选材往往只考虑基因定位的便利而不考虑育种的需要。因此,在完成目标基因的定位后,并不能直接应用于育种。如果选用的试验材料是目前推广的优良品系或品种,那么目标基因定位的结果就可以直接指导育种实践。其次,基因定位和分子标记技术在实用性和成本方面还有待于进一步改进。对于质量性状的基因定位在技术上是成熟的,但对于数量性状的基因定位仍然是个耗资费力的过程^[2]。而且,缺乏良好的抗病种质资源,特别是缺乏单抗或多抗病害的栽培品种成为分子育种的主要制约因素。尽管人们在现有的葫芦科作物栽培种中努力寻找良好的抗源,但收效甚微。而要把在近缘野生种中已找到一些抗源基因引入栽培种还有一定的难度。对葫芦科野生种质抗病的生理生化机制和遗传规律等基础理论的研究也很缺乏。现已从番茄、小麦、水稻、大豆

等多种作物的种质资源中筛选出高抗品系,葫芦科作物病害研究的系统性缺乏,使得该类作物在抗病育种方面远远落后于其它作物。

随着新的分子生物学技术的发展,我们相信会有更完善、效率更高的新的分子选择育种技术体系建立起来,从而产生更多精确定位的分子标记,在标记辅助选择研究领域发挥重要的作用,成为加快植物抗病育种进程的更可行和实用的新途径,也为葫芦科作物抗病育种工作开辟新的前景。

主要参考文献:

- [1] 王宏,蔡平钟,何俊蓉,等.分子标记在作物遗传育种中的应用[J].西南农业学报,1999,12:52~56.
- [2] 方宣钧,吴为人,唐纪良.作物DNA标记辅助育种[M].北京:科学出版社,2002.
- [3] 沈法富,刘凤珍,于元杰.分子标记在植物遗传育种中的应用[J].山东农业大学学报,1997,28(1):83~88.
- [4] 徐炎,王跃进,周鹏,等.中国野生葡萄果实抗白腐病基因的分子标记[J].园艺学报,2003,30(1):6~30.
- [5] CHEUNG W Y, CHAMPAGHEG, HUBERT N. et al. Comparison of genetic maps of Brassica napus and Brassica oleracea[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1997, 94: 569~582.
- [6] 田苗英,冯兰香,杨翠荣,等.应用RAPD方法获得与番茄ToMV基因Tm2^a连锁的分子标记[J].植物病理学报,2002,20(2):158~161.
- [7] 王中原,肖贤芳.2000年江汉平原甜瓜病毒病暴发的原因及对策[J].中国西瓜甜瓜,2000(3):31.
- [8] 王慧中.转基因甜瓜植株的获得及其抗病性[J].植物保护学报,2000,27(6):126~130.
- [9] 王慧中,赵培洁,周晓云.转WMV-2 CP基因黄瓜植株的再生[J].植物生理学报,2000,26(3):267~272.
- [10] 王慧中,赵培洁,周晓云.农杆菌法转化获得转基因西瓜植株[J].浙江农业大学学报(农业与生命科学版),2000,26(1):111~113.

保护地栽培芹菜的病害防治

侯和菊

芹菜保护地栽培主要病害有芹菜斑枯病和叶斑病,以叶、茎危害为主。防治措施:

- 1 种子处理 采用温水浸种法,将种子置 48℃~50℃温水中,并加以搅拌,30 min(分钟)后转用冷水浸 20 min(分钟),滤出晾干播种,可杀死种子上的病菌。
- 2 实行轮作 这两种病菌均可在土壤中存活,实行 2~3 年轮作可减轻发病危害。
- 3 控制温度 白天一般控制在 15℃~20℃,高于 20℃应通风,夜间控制在 10℃~15℃,缩小昼夜温差,减少结露。
- 4 摘病叶 发病初期,将发病株的病叶和底部老叶摘除,带出棚外深埋,防止传染。
- 5 合理密植 科学灌水,栽培密度要适宜,不能过密,灌水要避免大水漫灌,防止棚内温度过大,引起病害的发生和流行。
- 6 药剂防治 为了不增加棚内温度,常采用烟雾剂或粉尘剂防治,667 m²(平方米)用 45%百菌清烟剂 0.23 kg(公斤),或 5%百菌清粉尘剂 1 kg(公斤)。(山东省沂水县职教中心,276400)