doi:10. 3969/j. issn. 1671-3168. 2012. 04. 014

分子标记技术在黄萎病抗病基因筛选中的应用

王 妍
(北京林业大学省部共建森林培育与保护教育部重点实验室,北京 100083)

摘要:黄萎病是由大丽轮枝菌引起的一类寄主多、分布广的重大生物病害。对该病害目前仍旧缺乏有效防治措施,选育抗病品种被认为是预防该病害爆发成灾最为经济的措施。近年来,分子标记技术的飞速发展为植物抗病品种的选育提供了新的思路。藉此论述分子标记技术的种类及其优缺点,以及分子标记技术在黄萎病抗病基因筛选中的应用情况。
关键词:黄萎病; 分子标记; 抗病基因; *Ve* 基因

中图分类号:S763. 1 文献标识码:A 文章编号:1671-3168(2012)04-0062-04

Application of Molecular Marker Technology in Resistant Gene Screening of *Verticillium wilt*

WANG Yan
(Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Education Ministry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: *Verticillium wilt*, caused by *Verticillium dahliae* is widespread biological disaster, and there is still lack of fundamental measures to control the disease. Breeding of disease resistant varieties is considered as the most cost-effective way of the disease control. Over the last few years, molecular marker technology has developed considerably, which provides a new idea to guide the disaster resistant breeding. The advantages and disadvantages of the variety of molecular markers, as well as application status of molecular marker technology in the use of *Verticillium wilt* resistant gene screening have been elaborated.
Key words: *Verticillium wilt*; molecular markers; resistance gene; *Ve*-gene

黄萎病是一种危害性大、顽固性强的世界性维管束病害,引起植物木质部变色、萎蔫、落叶等,最终导致植物枯死。

其病原菌为大丽轮枝菌(*Verticilium dahliae*),隶属半知菌亚门(Deuteromycotina)丝孢目(Hyphomycetales)轮枝孢属(*Verticillium*)[19,29],分布广,寄主多(目前已达660多种),且寄主范围仍在不断扩大,在世界各地引起许多重要经济作物,如棉花(*Gossypium spp.*)、甘蓝(*Brassica oleracea var. capitata*)、油菜(*Brassica campestris*)、白菜(*Brassica rapa pekinensis*)、番茄(*Lycopersicon esculintum*)、辣椒(*Capsicum frutescens*)、茄子(*Solanum melongena*)等的萎蔫病或黄萎病,造成巨大的经济损失,严重影响了这些经济作物的产量与品质[7,14,16,20,31]。

针对该病害,目前仍缺乏行之有效的防治措施,选育抗病品种是减轻病害最为经济有效的对策。但大多数抗病品种由于抗性基因单一,致使推广数年后其抗性会逐步丧失。传统的抗病育种依赖于抗性鉴定和植株表型选择,这不仅要求具有丰富的育种经验和较长的育种时间,并且还要受病害发病条件

收稿日期:2012-07-22
作者简介:王 妍(1986-),山西长治人,硕士研究生。研究方向:森林保护植物病理。

的限制等因素影响,很难选育出具有多个抗病基因并具持久抗性的品种;提高选择育种效率,减小育种进程中的盲目性,聚合多个抗性基因是未来抗病育种的关键。随着 DNA 分子标记技术的出现与迅猛发展,黄萎病抗性基因的定位和克隆在番茄上取得了突破性进展,这为缩短育种进程、实现多个抗病基因的聚合并获得持久抗性品种奠定了基础。

1 分子标记的种类及其特点

理想的 DNA 分子标记应具备以下特点:①具有丰富的遗传多态性;②共显性遗传;③稳定性和重现性好;④信息量大,分析效率高;⑤检测手段简单快捷,并易于实现自动化,开发成本和使用成本低[18,24]。目前常用的分子标记主要可分为 4 类:①基于杂交的分子标记;②基于 PCR 的分子标记;③基于限制性酶切和 PCR 结合的分子标记;④其他分子标记。在这些标记技术中,目前以 RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR 应用最为广泛[15,21,34]。

1.1 基于 DNA 分子杂交的分子标记技术

限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,RFLP)标记是发展最早的也是最简单的 DNA 标记技术,Bostein 等[1]提出将其作为一种遗传标记。RFLP 的原理是利用限制性内切酶对 DNA 作用位点特定回文顺序识别的专一性,将大片段的 DNA 分子降解为较小的片段。等位基因的差异在酶切位点间 DNA 的片段的长度、碱基序列等差异通过电泳分离酶解产物表现出来。对于大分子片段还需要通过 Southern Blot、放射性标记探针杂交、放射性自显影等步骤才能观察到。该技术的优点是检测到的等位基因具有共显性,能区分纯合子和杂合子,不受环境的影响,能稳定遗传;缺点是对 DNA 的要求较高、操作复杂,耗时费资;同时,RFLP 的多态性过多地依赖内切酶的使用,这都影响了该标记的应用。

1.2 基于 PCR 的分子标记

基于 PCR 的分子标记以 RAPD、SSR 等分子标记为代表。

随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA,RAPD)是一种可对整个未知序列的基因组进行多态性分析的分子标记技术,该技术最早由 Williams 等[10]提出,以基因组 DNA 为模板,以单个人工合成的随机多态核苷酸序列为引物,在热稳定的 DNA 聚合酶作用下,进行 PCR 扩增。扩增产物经琼脂糖或聚丙烯酰胺电泳分离、溴化乙锭染色后,在紫外透视仪上检测多态性。扩增产物的多态性反映了基因组的多态性。RAPD 技术现已广泛地应用于生物的品种鉴定、系谱分析及进化关系的研究上。RAPD 技术所需要的 DNA 模板量少,在操作上能实现自动化,具有方便快捷的优点;同时,RAPD 没有种属的界限,因而一套引物能多个物种共用;RAPD 在实验操作过程中不需要事先知道模板的序列信息,不存在放射性污染,实验得到的带谱信息明确[32]。RAPD 的不足之处在于:不能区分纯合体和杂合体的差异,结果的重复性较差[33],反应受各种条件影响较大,溴化乙锭有一定的致癌作用。

简单序列重复(Simple Sequence Repeat SSR)根据微卫星序列两侧的保守序列涉及引物,对串联重复的微卫星序列进行 PCR 扩增,结果可以显示出微卫星序列拷贝数的差异[30]。它具有 RFLP 遗传学优点,比 RAPD 重复性和可信度高[15,18],共显性、高度可重复性,能体现高度丰富的多态性[22]。但测定并找到两端单核苷酸设计引的过程需要投入大量的人力、物力,前期探索引物需要较长时间。

1.3 基于限制性酶切和 PCR 结合的分子标记

扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism,AFLP)是一种通过对限制性酶切片段选择性扩增来显示限制性片段的多态性的分子标记技术,该项技术既利用了限制性内切酶的方法又利用了 PCR 技术[11]。该技术集 RFLP 和 RAPD 的优点于一身。先将基因组 DNA 用限制性内切酶消化,然后将双链接头连接到 DNA 片段的末端,接头序列和相邻的限制性位点序列作为引物结合位点,通过 PCR 扩增,产物用电泳检测多态性。AFLP 技术具有 RFLP 的稳定可靠性和重复性好的特点,又具有 RAPD 的快速高效的特点,而且条带丰富,能提供的信息更多。但由于该项试验技术受到专利保护,故使用成本比较高。

2 分子标记在黄萎病抗病基因筛选上的应用

目前在林木上关于黄萎病抗病基因的研究相对落后,但在番茄寄主中,*Ve* 基因的成功克隆及功能验证,使黄萎病抗病工程取得了突破性进展。

研究证实,番茄对黄萎病生理小种的抗病性强弱取决于一个单位点调控基因 *Ve*[21],该基因是从野生番茄 peruvian 定位得到。1959 年,Rick 教授对该基因进行定位研究,认为其位于第 4 条染色体上,连锁位点为 e 位点[8];1977 年,Kerr 和 Busch 再次定位该基因,认为 *Ve* 基因位于第 12 条染色体上,距离

一个叶绿素缺失位点 alb 39 个遗传单位。1994 年，Kawchuk 等人应用随机扩增多态性 DNA 标记(RAPD)技术，筛选了 400 个随机引物，得到了一个与 *Ve* 基因的遗传距离仅在 3.5 ±2.7 cm 以内的紧密连锁的分子标记。1999 年，Diwan 等利用限制性内切酶片段长度多态性(RFLP)方法，对 *Ve* 进行制图分析，认为该基因由单一位点控制，与 GP39 位点紧密相连，位于番茄的第 9 条染色体的短臂上[3]。至此，研究认为可以排除黄萎病抗性由多个位点系统控制的可能性，但抗病基因修饰因子在番茄染色体组的具体位置仍有待进一步研究[3]。2001 年，Kawchuk 等利用图位克隆技术，成功地从番茄基因组文库中分离到 2 个抗性基因 *Ve*1 和 *Ve*2。经验证，由 *Ve* 编码的抗性蛋白能够抵抗多种黄萎病菌，*Ve*1 除了对大丽轮枝菌有抗性，对黑白轮枝菌也有抗性[5,6]，这说明 *Ve* 基因的抗性功能已超越了其小种特异性限制[28]。

在结构特点上，*Ve* 基因富含亮氨酸重复序列，N 末端具有疏水的信号肽，是一类编码 LRR 型抗病基因胞壁受体蛋白[27]。

由于 *Ve* 基因具有多效性，并不严格受小种特异性的限制，这为黄萎病抗病基因工程的开展带来了诱人的前景[5,6]。近年来，SCAR 基因标记和 RFLP 基因标记等其他技术也被应用到对 *Ve* 基因的克隆中。

2004 年，Fei 等利用 RACE 技术从水茄(*Solanum torvum* Swartz)中克隆了全长3 640 bp 的 St*Ve* 基因；生物信息学分析显示，St*Ve* 与 *Ve*1 和 *Ve*2 在核酸水平具有较高同源性，编码一个富含亮氨酸 LRRs 型跨膜细胞表面受体类蛋白，暗示了 St*Ve* 可能具有抗黄萎病功能[3,5,6]。经农杆菌介导转化证实，表达了 St*Ve* 基因的番茄对大丽轮枝菌(1 号小种)生长具有显著抑制作用，初步推断 St*Ve* 具有抗番茄黄萎病的功能[13]。

2009 年，Kelly Vining 和 Thomas Davis 等人首次在非茄属植物 Mentha longifolia(唇形科薄荷种)中研究了 *Ve* 基因的同源基因[2]。研究者利用番茄 *Ve*1 基因简并引物从 M. Longifolia 中分离出一个 445bp 大小的 *Ve* 相似序列，并用反向 PCR 扩增序列，得到一段1 413 bp 大小的序列，经比对分析发现，其中 56% ~57% 的对应氨基酸序列与番茄 *Ve*1 和 *Ve*2 基因的相应区域一致[4]。

2011 年，运用染色体步移技术，在海岛棉中也克隆到了 *Ve* 基因的同源片段 Gb*Ve*，该基因全长 3 819 bp，经分析，具有3 387 bp 的开放阅读框，能够编码1 128个氨基酸，同样是富含亮氨酸重复片段的跨膜信号肽。经转化至拟南芥中证实，该基因与寄主对大丽轮枝菌的抗病性密切相关[12]。

3 展望

黄萎病作为一种重要的植物病害，严重影响了我国农林经济发展与生态景观建设。虽然分子标记在农作物的抗病基因研究中得到了广泛应用，为抗病基因的克隆及分子辅助育种提供了基础，但林木上的相关研究几乎为空白，仍旧尚未林木上对黄萎病抗病基因的报道。

当今生物技术的发展日新月异，随着分子生物学的进一步发展和不断成熟，DNA 分子标记技术也会更加完善，并会有越来越多的更有效、更简便、更廉价的分子标记在黄萎病的研究和生产实践中得到广泛使用而成为黄萎病研究中的重要方法。从而促使对黄萎病的深入了解，促进目标基因在品种间的转移，必将使黄萎病在分子水平上的研究推向一个更新的层次和高度，在黄萎病病害研究中发挥更大的作用。

参考文献：

[1] Botstein et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. [J]. Am J Hum Genet. 1980,32(3):314-331.

[2] Davis K V T. Isolation of a *Ve* homolog,*mVe*1,and its relationship to verticillium wilt resistance in Mentha longifolia (L.) Huds [J]. Mol Genet Genomics,2009,282: 173-184.

[3] Diwan et al. Mapping of Ve in tomato: a gene conferring resistance to the broad - spectrum pathogen, *Verticillium dahliae* race 1,Theor Appl Genet,1999,98:315-319.

[4] Fradin E F et al. Genetic dissection of *Verticillium wilt* resistance mediated by tomato Ve1 [J]. Plant Physiol,2009,150(1):320-332.

[5] Kawchuk L M,Hachey J,Lynch D R,et al. Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface - like receptors [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences,2001,98(11):6511.

[6] Kawchuk,L. M. ,J. Hachey,et al. Development of sequence characterized DNA markers linked to a dominant verticillium wilt resistance gene in tomato [J]. Genome,2001,41(1):91-95.

[7] Klosterman S J,A. Z. K. ,Vallad G E Diversity,pathogenicity,and management of Verticillium species [J]. Annu Rev

Phytopathol,2009,47(10):39-62.

[8] Rick CM,Martin FM,Gentile A,Linkage of *Verticillim* resistance (ve) [J]. Tomato Genet Coop,1959(9):44.

[9] Simko et al. Linkage disequilibrium mapping of a *Verticillium dahliae* resistance quantitative trait locus in tetraploid potato (Solanum tuberosum) through a candidate gene approach,Theor Appl Genet,2004,108:217-224.

[10] Williams et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Oxford Journals Life Sciences Nucleic Acids Research,2005,18 (22):6531-6535.

[11] Zabeau et al. Amplified fragment lenght polymorphism (AFLP). [J]. European Patent Application,1993(23):4407-4414.

[12] Zhang et al. Cloning and characterization of a Verticillium wilt resistance gene from *Gossypium barbadense* and functional analysis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Cell Rep,2011(30):2085-2096.

[13] 陈玉辉,赵凌侠,柴友荣,等. 抗黄萎病基因 St*Ve* 转化番茄的研究 [J]. 园艺学报,2008,35(5):693-700.

[14] 陈旭升. 棉花黄萎病鉴定技术进展 [J]. 棉花学报,1997,9(2):64-67.

[15] 陈兆波. 分子标记的种类及其在作物遗传育种中的应用 [J]. 现代生物医学进展,2009,9(11):2179-2183.

[16] 韩瑞娟. 北京地区大白菜黄萎病的病原鉴定 [J]. 园艺学报,2012,39(3):477-484.

[17] 杜威世,杜雄明,马峙英. 棉花黄萎病抗性基因标记研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(3):20-24.

[18] 关强,张月学,徐香玲. DNA 分子标记的研究进展及几种新型分子标记技术 [J]. 黑龙江农业科学,2008(1):102-104.

[19] 雷增普. 北京地区黄栌黄萎病病原菌的研究 [J]. 北京林业大学学报,1993,15(3):88-93.

[20] 李海涛. 茄子黄萎病抗病性鉴定 [J]. 辽宁农业科学,2006(1):4-6.

[21] 雷娜. 番茄抗黄萎病基因分子标记 [D]. 哈尔滨:东北农业大学,2007.

[22] 李明芳,郑学勤. 开发 SSR 引物方法之研究动态 [J]. 遗传,2004(5):26-29.

[23] 刘学堂. 棉花黄萎病菌的研究及最新进展 [J]. 棉花学报,1998,10(1):6-13.

[24] 李怀仓,李琪. 林木抗病育种研究进展 [J]. 陕西林业科技,2007,2(7):35-38.

[25] 刘仲齐,薛俊,张要武. 番茄分子连锁图谱的发展和分子标记辅助育种 [J]. 天津农业科学,2004,10(1):37-40.

[26] 潘家驹,张天真. 棉花黄萎病抗性遗传研究 [J]. 南京农业大学学报,1994,17(3):8-18.

[27] 柒友荣. 植物杭大丽轮枝菌受体类蛋白基因及甘寡馆结合型凝集素墓因的克隆与表达 [D]. 西南农业大学博士学位论文,2003.

[28] 史仁玖. 野生茄子(*Solanum torvum*)抗黄萎病相关基因 Sto Vel 的克隆与分析 [J]. 植物生理学通讯,2006,42(4):638-642.

[29] 田黎,王克荣,陆家云. 轮枝菌的形态、致病力变异及变异机制 [J]. 西北农业学报 1999,8(4):106~109.

[30] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用 [J]. 遗传,2002,24(5):613-616.

[31] 殷锡圣. 棉花黄萎病研究进展 [J]. 中国棉花,1996,23(5):2-6.

[32] 张建博. 分子生物学在大型真菌遗传多样性研究中的应用 [J]. 中国食用菌,2008,27(6):3-7.

[33] 张征锋. 基于生物信息学与生物技术开发植物分子标记的研究进展 [J]. 分子植物育种,2009,7(1):130-136.

[34] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京:化学工业出版社,2005:162.

[35] 朱明涛. 分子标记辅助聚合番茄抗病基因育种 [J]. 园艺学报,2010,37(9):1416-1422.