

专题介绍 REVIEW

棉花对黄萎病的抗病机制研究进展

陈捷胤 戴小枫*

中国农业科学院作物科学研究所, 北京, 100081

* 通讯作者, dxf@caas.net.cn

摘 要 本文概述了棉花黄萎病抗性的遗传规律和特点, 从寄主与病原菌识别的相互作用、组织抗性、生理生化抗性、生态抗性 4 个方面综述了棉花对黄萎病抗病机制的研究进展。指出真菌诱导子是寄主与病原菌识别和互作的关键因素, 不同棉株的固有组织结构抗性和诱导组织结构抗性对黄萎病的抗病表现也不相同; 在生理生化抗性上重点介绍了植物抗毒素、酶、糖类物质、激素与棉花抗病性的关系; 阐述了棉花对黄萎病的生态抗性, 即棉花根系分泌物和根系微生物与黄萎病抗性的相互作用。在这 4 种抗性中, 生理生化抗性起主导作用, 但离不开多种抗性机制的相互作用和协调。此外, 作者对棉花抗黄萎病分子育种的进展作了概述, 简要介绍了 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 等分子标记技术和转基因技术在分子育种中的应用与所取得的进展。最后对棉花黄萎病抗性机制及棉花抗黄萎病分子育种研究的未来发展方向和重点作了展望。

关键词 棉花, 黄萎病, 抗病机制, 分子育种

Research Advance on the Resistant Mechanism of Cotton against *Verticillium Wilt*

Chen Jieyin Dai Xiaofeng*

Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081

*Corresponding author, dxf@caas.net.cn

ABSTRACT In this paper, the hereditary characteristic and the resistant mechanism of cotton against *Verticillium wilt*, such as the identification of the pathogen to host, tissue resistance, physiological and biochemical resistance, ecological resistance were reviewed. The results showed that the fungal elicitor was the key factor of host and pathogen making each other. The inherent and inducible tissue structure resistance of different cotton plants resist to *Verticillium wilt* was diverse. The relation of antitoxin, enzyme, saccharide, hormone and cotton disease resistant in physiological biochemistry resistance was reviewed, the ecology resistance of the cotton to *Verticillium wilt* that was the effect of cotton root system secretion and root system microorganism with the *Verticillium wilt* was explained. Among of them, although the physiological biochemistry resistance is the dominant effect, it is related to the effect of other mechanism. In addition, the progress of molecular breeding of cotton resist to the *Verticillium wilt*, the application of molecule marker technology such as RFLP, RAPD, AFLP, SSR etc. and transgenic technology in the molecule breeding were given. Finally, the priority in resistant mechanism and the molecular breeding of cotton resisted to the *Verticillium wilt* in the future were prospected.

KEYWORDS Cotton (*Gossypium* L.), *Verticillium wilt*, Resistant mechanism, Molecular breeding

棉花黄萎病 (Cotton *Verticillium Wilt*) 属于土传病害, 特点是分布广、危害重、寄主范围宽、传播途径多、存活时间久, 是我国棉花生产过程中最具毁

灭性的病害之一, 也是世界性危害棉花的第一病害, 由于生产上一直没有找到理想的防治技术与控制方法, 被称为棉花的“癌症”。其致病菌大丽轮枝

菌(*Verticillium Dahliae* Kleb)分类学上属半知菌亚门(*Deuteromycotina*)、淡色孢科轮枝菌属(*Verticillium*)。棉花黄萎病通常在棉株生长的现蕾期发病,发病时叶片最先表现出症状,叶片边缘或主脉呈现淡黄色不规则斑块,随后病斑逐渐扩大,变成褐色干枯并逐渐向上发展,到花铃期时黄萎病最严重。受病棉株叶片变黄,干枯脱落,棉铃变小,脱铃率高,导致产量降低,品质变劣。1914年棉花黄萎病首先在美国弗吉尼亚棉区发现,随后在美国其它州陆续报道了黄萎病的发生和危害情况。1935年,棉花黄萎病因引进美国棉花而传入我国,先后在陕西泾阳、山西运城、山东高密和河南安阳等地发生危害,70年代以后已经有12个省市自治区发生黄萎病,主要分布在黄河流域棉区,进入20世纪90年代棉花黄萎病已蔓延遍及国内21个产棉省(区、市),发病县达477个,其中单一黄萎病面积达13万hm²,1997年全国因黄萎病减产10.7%,损失皮棉4.3亿kg,直接经济损失达60.5亿元,尤其是北方棉区更为严重,成为棉花减产的主要原因。

1 棉花对黄萎病抗性的遗传特点

棉花黄萎病抗性遗传的规律比较复杂,由于棉花黄萎病菌菌系的种类比较多,致病能力存在差别,抗病亲本材料的抗病能力不同,抗性鉴定方法多种多样,加上田间病圃菌系的相互作用、发病条件与发病时期的差别、病级分级标准和统计方法的差异,造成对棉花黄萎病抗性遗传特点的认识存在很大的分歧。争论的焦点主要集中在抗性是由单基因或主效基因控制,还是受微效多基因控制,抗病对感病是显性还是隐性。研究表明将抗病海岛棉与感病陆地棉杂交,采用温室鉴定的方法证明海岛棉对黄萎病的抗性遗传为显性,提出棉花对黄萎病的抗性是由单基因或少数主效基因控制;采用生长箱培养鉴定和田间病菌鉴定的方法进一步提出棉花对黄萎病的抗性呈单显性基因遗传。而马峙英等通过7个陆地棉配制6个组合,采用单菌系接种、人工生长鉴定的方法证明品种黄萎病的抗性受2个显性互补基因控制;通过田间病圃实验表明,陆地棉的黄萎病抗性呈数量遗传性状,受微效多基因控制。此外,采用2种陆地棉杂交并通过田间鉴定提出棉花对黄萎病的抗性受2对隐性基因支配。综合上述的研究结果,海岛棉的抗病性对陆地棉的感病性受显性或者不完全显性单基因控制,但陆地棉种

内杂交却呈现复杂的情况,主要有三种结论,一种认为杂交陆地棉在温室或生长室用单一菌系接种鉴定的抗性为单基因控制,呈质量遗传性状;第二种结论认为陆地棉的黄萎病抗病性属于数量遗传性状,受多基因控制,采用的鉴定方法主要是田间病圃鉴定;第三种观点认为在田间病圃鉴定中,黄萎病的抗性遗传受多个隐性基因控制,每个抗病基因可能对应不同致病的大丽轮枝菌菌株。需要指出,田间病圃鉴定由于不同菌系的相互作用,使得棉花黄萎病的抗性呈数量遗传性状,受多基因控制,加性、显性和上位性基因效应都存在,以加性效应为主。通过10种抗病和感病品种的所有可能杂交组合,针刺法接种并在田间鉴定得出黄萎病的抗性呈加性效应;校百才等(1998)设计陆地棉之间的3种不同组合,在田间人工病圃鉴定证明棉花对黄萎病的抗性属数量遗传性状,加性效应大于显性效应。总之,不同的棉花种或品种,不同的黄萎病生理型或致病型,不同的发病环境条件,不同的抗感病分级方法等都会对其分析有一定的影响,从而导致不同的结论。目前比较趋于一致的结论是,棉花不同的品种对黄萎病的抗性可能存在不同的控制基因,随着生物技术的不断发展,关于黄萎病抗性的遗传规律和机制将逐渐被揭示出来。

2 棉花对黄萎病抗病机制的研究进展

2.1 棉花与黄萎病菌的识别与互作机制

Flor于1971年根据亚麻对锈菌小种特异性的研究提出基因对基因假说(gene for gene hypothesis),即寄主分别含有感病基因和抗病基因,病原体分别含有毒性基因和无毒基因,只有当具有相应抗病基因的植物与具有无毒基因的病原体相遇时,才会激发植物的抗病反应,否则寄主感病。病原物的诱导子是引发植物防卫反应的生物大分子,在寄主植物和病原物的信号传导过程中起着重要的作用(Hahn, 1996)。诱导子能够在低水平条件下同植物原生质膜上的受体相结合,调控下游的信号传导,通过引发一系列的生理生化反应以获得植物抗病性(Ebel and Gosio, 1994)。棉花与黄萎病菌的识别机制似乎也符合这一规律,当黄萎病菌侵染棉花抗病品种时,寄主细胞膜中的酶作用于病菌的细胞壁,激发病菌细胞壁中的启动子,产生一系列的生理生化反应,形成的产物又导致寄主细胞产生胍脂质和抗毒素等次生代谢物质,这些物质渗透到寄主细胞

中,阻止病原菌的侵入。而感病的棉花品种由于没有这种识别机制,病原菌很容易入侵寄主并成功定殖,这表明抗病棉花细胞膜上的受体与黄萎病菌的识别过程起着关键的作用。

当受到病原物攻击时,所有的植物都会诱导复杂的防卫反应,这包括以下几种途径:信号识别;信号转导反应如产生活性氧化物;富含羟脯氨酸糖蛋白的积累;合成木质素形成新的细胞壁;局部细胞消失和感染位点的细胞死亡;植物抗毒素的合成和积累,如PR蛋白(Kombrink and Somssich, 1995)。用接种病原菌的方法观察到当病原菌与寄主导管薄壁细胞接触后,在抗毒素如萜烯类化合物、单宁等尚未出现之前,接近病原菌的抗病品种原生细胞质即发生膨胀,并高于远离接触病菌的其它部位,表明黄萎病的抗性同受体的识别有密切关系。利用棉花黄萎病感染后的陆地棉 Sicala V-1 根部组织 cDNA 文库差异搜索得到一些棉花抗病反应中的新基因如 14-3-3 类似蛋白及 PR 蛋白(Hill et al., 1999)。14-3-3 类似蛋白同植物的胁迫反应相关,水稻中盐胁迫和高温胁迫对 14-3-3 类似蛋白的表达影响不大(Kidou et al., 1993),在玉米中组织缺氧胁迫则能够诱导 14-3-3 类似蛋白的表达,大麦在受到 *Erysiphe graminis* 霉菌侵染的条件下 14-3-3 类似蛋白则诱导表达(Brandt et al., 1992)。许多证据表明 14-3-3 类似蛋白和信号转导途径有关,与宿主植物抗病性相关的 14-3-3 类似蛋白作为受体分子与真菌产生的诱导子 FC 相互作用,激活 H^+ -ATPase,启动信号转导系统并引发一系列相关的抗病反应(Korhouth and de Boer, 1994; Marra et al., 1994)。PR 蛋白具有核糖核酸酶活性,这是 PR 蛋白家族普遍的生物学功能(Deutscher, 1993)。核糖核酸酶能够改变或者减少 RNA 的表达量,并且作为细胞抗毒素对细胞的代谢和增殖起作用,进而影响病原物对细胞的侵染(Moiseyev et al., 1997)。综上所述表明,棉花对黄萎病的抗性与黄萎病菌对棉花细胞膜上受体的识别有关,信号传导在棉花对黄萎病的抗性中扮演着重要角色。

2.2 棉花对黄萎病的形态抗性

棉株自身组织结构的不同导致对黄萎病的抗病表现也不相同,这包括固有的组织结构抗性和诱导的组织结构抗性。研究表明,棉株抗病和感病品种在组织结构上存在很大的差异,棉花品种的抗病性与微管束有直接的关系,如对黄萎病近于免疫的

埃及棉和美国抗病棉花品种均具有坚实的木质部和含有大量淀粉储存物的多列髓线,并且木质部的间隙较小,细胞壁比较厚,而感病品种的组织结构则相反;另外抗病品种的导管腔和木质纤维腔的直径都小于感病品种,推断棉花品种对黄萎病的抗性与木质部的坚实程度有关。进一步研究发现,棉花根、茎切片中抗病品种单位面积的细胞数量比感病品种多一倍以上,细胞数量的增加导致细胞间隙的减小,能够提高棉花机械抗病性能,进而在一定程度上阻止黄萎病菌的侵入和扩散。顾本康和马存(1996)发现感病品种(泗棉 2 号)的导管细胞排列比抗病品种(冀 328-1)松弛,且感病品种的菌丝占有细胞数多于抗病品种。

另一方面,棉株在遭到病原菌侵袭后会引发一系列的防卫反应,进而导致亚细胞或组织水平上形态结构的变化,如表皮木质化和内部组织木栓化,导管薄壁细胞的增生以及形成胶状物和侵填体堵塞导管,称之为诱导性组织结构抗性。当棉株受到病原物侵染时,会激发一系列复杂的防卫反应,这涉及到植物本身生理和生化代谢的变化,进而改变棉株组织的成分和结构,包括类似木质素在细胞壁上的积累以阻止入侵的菌丝或在菌丝周围形成木质素块将菌丝包围起来,果胶质迅速封闭导管,纹孔膜扩大形成侵填体以阻止分生孢子在木质部的扩散。研究发现棉株木质部导管的发病引起导管堵塞,可将入侵的病原菌限制在微管束系统的一定部位里,而在感病品种中由于没有这种组织结构抗性,病原菌能在整个维管束系统里迅速生长和繁殖。研究还表明,诱导性组织结构抗性是影响棉株萎蔫的普遍率和萎蔫程度的主要因素,它形成的速度与棉花品种的耐病程度成正比。

2.3 棉花对黄萎病的生理生化抗性

2.3.1 抗毒素与抗病性的关系

植物抗毒素的形成是植物抗病防卫反应很重要的一方面,包括萜烯类化合物的生成,类黄酮抗生物素的产生和单宁等化合物的合成(Ebel, 1986)。研究表明,萜烯类化合物和类黄酮抗生物素的产生与植物的防卫机理有很大的关系。当棉花发育过程中受到 *V.dahliae* 侵染 2d 后导管就完全堵塞,萜烯类化合物在 18h 内就可以检测到(Memphis et al., 1990)。黄萎病菌侵染感病棉花或者抗病棉花均会引发一系列抗病反应,这包括了植物抗毒素萜烯类化合物的生成,萜烯类化合物大致可以分成 4 类:脱氧半棉

酚(desoxyhemigossypol, dHG)、半棉酚(hemigossypol, HG)、脱氧甲氧基半棉酚(desoxyhemigossypol-6-methyl ether, dMHG)和甲氧基半棉酚(hemigossypol-6-methyl ether, MHG), 其中 dHG 和 HG 是从感病品种 *Gossypium hirsutum* 得到的, 而 dMHG 和 MHG 是从抗病品种 *Gossypium barbadense* SBSI(Seabrook Sea Island 12B2, SBSI)分离到的(Bell et al., 1975)。研究表明, SBSI 的抗病性并不是由于这 2 种物质甲基化的原因, 因为它比未甲基化的祖先的抗病性更差(Mace et al., 1985)。实验表明, 随着这 2 种物质甲基化水平的提高, 甲基化程度高的品种对 *V.dahliae* 的抗性比它们甲基化程度不高的祖先更为敏感。dHG 是 4 种植物抗毒素最有效的一种, 杀死菌丝体的有效浓度为 15 μ g/ml, 而 HG、dMHG 和 MHG 则分别要 35 μ g/ml、25 μ g/ml 和 45 μ g/ml。进一步研究发现, dHG 在 pH6.3 的水中溶解度为 50.2 μ g/ml, 而这正是受感染棉花茎部木质素的 pH 值, HG、dMHG 和 MHG 的溶解度则分别为 4.2 μ g/ml、2.9 μ g/ml 和 2.0 μ g/ml(Mace et al., 1985)。这表明 dHG 较高的溶解度使它能够较快地迁移到受真菌感染并形成生殖芽的木质部导管中, 然后分散到这些薄壁组织的生殖芽, 形成较强的抗病性(Mace et al., 1978)。

生长在地面的表皮下组织和根部的表皮组织能够积累倍半萜烯, 当受到真菌或者细菌侵染及其它因素胁迫时, 这些物质就起到植物抗毒素的作用(Essenberget al., 1990)。棉花中大部分倍半萜烯包括棉酚都是从 δ -杜松烯代谢途径而来的, δ -杜松烯合成酶是该代谢途径的关键酶(Alchannati et al., 1998), 但该途径的其它反应还不清楚, 脱氧半棉酚-6-氧甲基转移酶(desoxyhemigossypol-O-methyl transferase)可能是催化后续反应的一种关键酶(Liu et al., 2002)。

2.3.2 酶与抗病性的关系

棉株体内的一些酶与其抗病性有关, 如过氧化物酶、超氧化物歧化酶、杜松烯合成酶、苯丙氨酸解氨酶等。过氧化物酶与棉花品种黄萎病的抗性相关, 棉株发病后, 抗病品种过氧化物酶的活性较感病品种高, 推测它能促进细胞壁的合成, 从而产生抗病作用。超氧化物歧化酶是植物体内防御氧化损伤的主要酶类, 病原菌侵入棉株后抗病品种的超氧化物歧化酶的活性迅速上升, 使得病原菌对膜系统造成的损伤比较小, 而感病品种由于来不及清除病害胁迫下产生的自由基, 对膜系统造成较大的损

伤。 δ -杜松烯合成酶是棉花抗毒素如倍半萜烯和棉酚代谢途径的关键酶, δ -杜松烯合成酶是由一个基因家族编码的, 根据序列的同源性可以将这个基因家族分为 2 个亚家族: CAD1-A 和 CAD1-C。*Gossypium arboreum* 基因组的 CAD1-C 含有 6 个基因, 而 CAD1-A 则只有 1 个拷贝(Tan et al., 2000)。 δ -杜松烯-8-羟化酶是一种细胞色素 P450 单加氧酶(mono-oxygenase), 它能够催化 δ -杜松烯 8 位羟基化, 这是合成 dHG、HG 以及倍半萜醛的关键底物(Benedict et al., 1995; Davis and Essenberg, 1995)。在棉花的整个生长过程当中, CAD1-C 的转录产物在茎、叶子、果皮、萼片及花瓣等组织均能检测到, 但 CAD1-A 的转录产物却无法在生长在地面上的组织检测到, 受到侵染后倍半萜类化合物在花瓣中积累而在萼片中则有所下降。法尼基焦磷酸合酶(FPS)和杜松烯合成酶(CAD)参与了植物在细胞腺中积累萜烯醛类化合物的合成。从 *G.arboreum* 中分离到编码 FPS 的全长 cDNA 序列并在 *E.coli* 中做原核表达验证, 当用 *V.dahliae* 的诱导子侵染 *G.arboreum* 时, FPS 和 CAD 均被诱导表达, 并导致萜烯醛在细胞腺中积累(Liu et al., 1999)。对于澳大利亚的品种 *Gossypium australe*, *V.dahliae* 的侵染只能诱导 FPS 表达, 但对于 CAD 只是低水平诱导。在 *Gossypium australe* 中积累杜松烯而不是萜烯醛, 这表明在法呢基焦磷酸合成以后萜烯醛的生物合成途径已经消失或者关闭了。

研究发现在黄萎病潜伏期 RNA 聚合酶表达量高, 感染之后只有部分 mRNA 存在(Plekhanova et al., 1978)。抗氧化苯丙酸代谢途径的多种酶也被认为同木质素的合成相关, 导致细胞壁加厚(Dubery and Smit, 1997)。用西红柿 2 个近等基因系得出对 *Verticillium albo-atrum* 敏感的植株的苯丙氨酸裂解酶转录本水平显著低于抗性植株(Lee et al., 1992)。在高抗棉花和感病棉花生长过程中, 用 *V.dahliae* 侵染后与抗病相关的苯丙氨酸解氨酶(PAL)、杜松烯合成酶(CAD)和过氧化物酶的活性均增加(Dubery and Smit, 1997)。据报道棉花的苯丙氨酸裂解酶受大丽轮枝菌毒素诱导表达(Dubery and Smit, 1994)。*V.dahliae* 侵染 *G.hirsutum* 时 PAL 基因短时间内大量诱导表达并参与棉花的防卫反应。类苯丙醇的代谢机理以及苯丙氨酸解氨酶(PAL)在植物抗病的作用是多方面的, 这个途径的产物植物抗毒素能形成木质素并使细胞壁增厚。研究表明, 棉花在受到大丽轮枝菌侵染时与抗性相关的 3-羟基-3-甲基谷氨

酰 CoA 还原酶(HMGR)的 mRNA 的表达量增加,它是萜烯合成途径的第 1 个酶 (Joost et al., 1995),也是植物抗毒素 3,5- 羟基-3- 甲基戊酸酯合成途径的关键酶,在 *G.hirsutum* 和 *G.barbadense* 都受 *V.dahliae* 诱导(Joost et al., 1995),而且大丽轮枝菌诱导表达的速度在抗性的海岛棉中明显快于感病的陆地棉。另外同发病机理相关的酶如几丁质酶和 β -1,3- 葡聚糖酶也在抗病反应中起重要的作用 (Dubery and Slater, 1997)。

2.3.3 糖类物质与抗病性的关系

实验表明可溶性多糖的形成能够促进与抗性有关化合物的合成。从 *V.dahliae* 液体培养液中纯化出 65kD 的糖蛋白,它是植物抗毒素形成的诱导子 (Davis et al., 1998)。从马铃薯分离的 *V.dahliae* 能够产生一种同发病机理相关的脂多糖蛋白质 (protein-lipoid-polysaccharide complex, PLPC), PLPC 主要从 *V.dahliae* 的液体培养液中纯化出来,包括 5 种蛋白质 (Meyer et al., 1994)。从 PLPC 中纯化出一种分子量小于 3kD 的植物毒素多肽片段,它是引起黄萎病的功能性小肽片段 (Nachmias et al., 1987)。从棉花 *V.dahliae* 分离出的 197kD 的 PLPC 能够导致棉花坏死和枯萎,刺激苯丙氨酸解氨酶的活性和细胞壁中棉花抗毒素的合成。另据报道,一种功能未知的 26kD 的糖蛋白能够诱导棉花抗毒素的形成和叶子枯萎 (Chu et al., 1999)。研究表明在纯化的 *V.dahliae* 诱导子或病原物侵染后,编码同糖基化反应有关的酶的转录本迅速增加,导致糖类和倍半萜类化合物的积累 (Luo et al., 2001)。

2.3.4 激素与抗病性的关系

内源激素对棉株的生化抗性也有一定的作用,病原菌侵染棉花感病品种后的乙烯、脱落酸、生长素的含量增加,而细胞分裂素减少。研究表明,乙烯诱导相关转录因子 ERF1 (ethylene-responsive factor) 和 EREBPS (Ethylene-responsive element binding proteins) 对抗病基因具有调控作用,它们能够与抗病基因的顺式作用元件结合调控抗病基因的表达。由真菌感染引起的乙烯诱导防卫反应基因同催化水果成熟和衰老的乙烯反应顺式作用元件明显不同,在这些防卫反应基因的启动子区 GCC box (AGCCGCC) 是细胞信号转录因子结合区 (Ohme-Takagi et al., 2000)。研究还发现棉花表达一种蛋白 PGIP,可以抑制大丽轮枝菌多聚半乳糖醛酸的活性并已分离纯化得到了该蛋白,此蛋白受水

杨酸的诱导在信号转导中起作用 (James and Dubery, 2001)。研究者从 *V.dahliae* 中得到了 1 000 个 5' 末端 ESTs, 部分 EST 编码的蛋白质很可能是一种信号肽和具有诱导子活性的蛋白质 VdNEP, 由 233 个氨基酸组成, 它们的 cDNA 和其它真菌的 VdNEP 具有很高的同源性。细菌侵染烟草 *Nicotiana benthamiana* 的叶子也能表达 His-VdNEP 并导致植株坏死 (Yu, 1995), 在拟南芥中这些蛋白能够诱导活性氧化物的合成和 PR 基因的表达。当 VdNEP 侵染棉花时, 这些蛋白质诱导棉子酚的生物合成和抑制植物抗毒素倍半萜类的水平, 导致细胞大量死亡, 最终导致棉花的子叶和叶子脱水并枯萎。另外已发现经过处理的拟南芥叶子表达的基因编码同病原物相关的蛋白质, 如 ACS6 编码氨基环丙烷羧酸合成酶用于乙烯的合成 (Sato and Theologis, 1989)。PR1 和 PDF1.2 是水杨酸和茉莉酸酮酯的标记基因, 它们参与依赖酸的防卫反应的信号转导途径 (Glazebrook, 1999), 第二信使水杨酸对植物的抗性也具有显著的作用 (Dixon and Paiva, 1995), 而 His-VdNEP 能够迅速诱导这 3 个基因的生物合成。因此在拟南芥叶子中, 依赖水杨酸和茉莉酸酮酯的防卫反应途径能够被 VdNEP 激活 (Hammon-Kosack and Jones, 1996)。

2.4 棉花对黄萎病的生态抗性

越来越多的试验表明, 根际微生物和根际分泌物等生态因素与植物的抗病性有密切的关系。根际微生物除受土壤环境条件的影响外, 最重要的还是取决于根际分泌物, 根际分泌物的细小变化都会导致根际微生物区系的极大变化, 其中以丙氨酸的作用最为明显 (Dixon and Harrison, 1990)。不同棉花品种根际分泌物中氨基酸和维生素的变化影响着根际细菌种群的变化。研究认为在棉花根部和木质部汁液中氨基酸水平特别是丙氨酸水平的增加是由于缺氧造成的, 进而影响了棉花黄萎病的抗性表现。比较了棉花抗感黄萎病品种根际分泌物中的氨基酸含量, 在所分析的 7 种氨基酸包括丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸, 只有丙氨酸在抗病品种 (Acala-8829) 中比感病品种 (Acala-1517C) 中分泌的少, 其余 6 种差异不明显。抗病品种的丙氨酸含量较低, 可能直接抑制了病菌的发育并影响根系周围微生物的活动。进一步研究表明丙氨酸能刺激黄萎病菌的生长, 把丙氨酸加入棉花营养液中可以使抗病的品种 Acala8229

失去抗病性。把丙氨酸注射到陆地棉抗病品种 Okahona 中,可使其失去抗病性,但不能使高抗的海岛棉失去抗病性。目前,对根系分泌物的研究比较少,使用的材料也多为陆地棉。因此加强对根系分泌物的研究特别是采用多种棉花材料进行研究,对逐步明确棉花抗黄萎病的多种共存机制有积极作用。

3 棉花抗黄萎病的分子育种

分子育种目前主要包括分子标记辅助聚合育种和转基因育种 2 种途径。分子标记辅助选择 (molecular marker-assisted selection, MAS) 主要是指基于分子标记和作图技术,利用与目标性状紧密连锁的 DNA 分子标记对目标性状进行间接选择,以更短代数就能够对目标基因的转移进行准确而稳定的选择,聚合多种目标性状特别是对选择隐性基因控制的优良农艺性状十分有利,结合加代技术就可以大大缩短育种年限,缩小育种群体,提高育种效率,聚合选育出抗病、优质、高产的品种。目前通常采用的分子标记技术主要有 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 等。RFLP 是基于 DNA-DNA 杂交的分子标记技术,该技术利用限制性内切酶酶切及凝胶电泳技术分离不同生物体的 DNA 分子,然后用经过标记过的特异探针与之进行 Southern 杂交,通过放射自显影或非同位素显色技术(如地高辛、生物素等)来揭示 DNA 的多态性。利用这一技术,人们以近等基因系 (near-isogenic line, NIL) 为材料找到了 1 个与小麦抗白粉病基因 *Pm3b* 紧密连锁的 RFLP 标记 (Hartl et al., 1993),之后又陆续找到了与 *Pm1*、*Pm2*、*Pm4a*、*Pm5*、*Pm6*、*Pm12* 等连锁的 RFLP 标记;在番茄的果重和可溶性固相物含量的改良方面,应用 RFLP 图谱技术定向转移微效数量性状基因已经获得成功,在已构建的 RFLP 图谱中定位了 6 个控制果重的 QTL,每一位点的作用幅度为 3.5~6.0g,还定位了 4 个控制可溶性固相物含量的 QTL,每个位点的作用幅度为 0.83%~1.89% (Paterson, et al., 1990)。RAPD 是基于 PCR 的分子标记技术,即采用一套随机引物—基因组 DNA 为模板,扩增随机长度的 DNA 片段,进而获得 DNA 多态性。利用小麦 F_2 分离群体构建的 DNA 文库进行 RAPD 分析鉴定到 1 个与 Trigo BR34 中的未知白粉病基因连锁距离为 13cM 的 RAPD 标记 (Hartl L et al., 1995),随后 *Pm1*、*Pm4a* 和 *Pm25* 的 RAPD 标记相继

被鉴定出。郭旺珍等(1999)用中国农业科学院棉花研究所 12A-1 和 0-613-2R 杂交的 F_2 为标记群体,找到了与恢复基因连锁的 RAPD 标记 OPV-15300,二者之间的交换值是 13.0%,他们进而利用 RAPD 技术对抗(感)黄萎病陆地棉品种(系)进行聚类分析,从被测试的 40 个引物中选取对 25 个棉花品种(系)DNA 扩增表现多态性的 26 个随机引物,构建 25 个棉花品种(系)DNA 指纹图谱并进一步分析了遗传多样性,结果表明可将抗病品种(系)分成 3 组而感病品种(系)聚在另一组,该研究从 DNA 水平上揭示了中国现有的抗(耐)黄萎病品种(系)的遗传真实性。AFLP 是基于 PCR 与限制性内切酶酶切结合的分子标记技术,通过对限制性酶切的选择性扩增来显示限制性片段的多态性。利用 2 个栽培大豆 (BSR101×P14371654) 杂交构建的 RIL (recombinant inbred lines) 群体,在 RFLP 和 RAPD 标记的基础上,进一步通过 AFLP 标记构建了一个高密度的连锁图谱,包括由 165 个 RFLP 标记、25 个 RAPD 标记和 650 个 AFLP 标记,28 个连锁群,覆盖基因组达 3 441cM 的分子连锁图 (Keim et al., 1997);利用 AFLP 技术分析 Sicala V-1 (抗)、Siokra 1-4 (感)的 F_2 组合得到 Sicala V-1 的主效抗性单基因 *VWR1* 紧密连锁的 2 个分子标记 SV-M1、SV-M3 (Lyon, 1999)。此外目前还有正在快速发展的 CAPS 标记、SSR 标记、SNP 标记等方法,这些分子标记技术的发展必将为农作物的分子育种带来巨大的变革,加快抗病虫、高产、优质品种的育种进程,实现优良农艺性状基因的聚合育种。目前,分子标记选择辅助育种在水稻、小麦、玉米、大豆、油菜等作物的应用已经相对成熟,主要是这些作物建立高密度饱和的遗传图谱和物理图谱。而棉花的分子标记相对比较少,因此寻找棉花优良农艺性状的分子标记,建立高密度饱和的棉花遗传图谱已经成为棉花分子育种的重要前提和迫切需求。

在棉花转基因工程抗病育种领域,主要采用农杆菌介导法和花粉管通道法来获得转基因抗病虫的优良植株即育种材料,然后经过常规的杂交育种或者系统选育,最终培育出优良的棉花新品种。我国自 20 世纪 80 年代末开始进行转基因育种的研究,谢道昕等(1991)通过花粉管途径将 *B.t.aizawai* 7-29 和 *B.t.kurstaki* HD-1 的杀虫基因分别导入我国棉花品种(无毒棉、中棉 12、中棉 3118 和中棉 3414)中,获得 3 株带有 *B.t.aizawai* 7-29 杀虫基因的棉花 (A1、A2 和 A5) 和 18 株带有杀虫基

因 *B.t.kurstaki* HD-1 的棉花;倪万潮等(1998)通过双链合成 DNA 的方法人工合成了 *CryIA(b)*和 *CryIA(c)*杀虫基因并培育转基因抗虫棉花品种,使我国成为继美国之后第 2 个具有自主研发转基因棉花的国家。随后,棉花转基因育种在抗棉铃虫研究方面获得成功并大规模的商品化,为世界及我国带来了巨大的经济效益。但棉花转基因育种在棉花抗黄萎病方面迄今尚没有取得理想的效果,成为制约我国棉花生产发展的瓶颈。

借鉴转基因抗虫棉的成功培育的思路,我国于“九五”计划期间国家 863 计划开始资助培育转基因抗黄萎病棉花的研究课题。1996 年中国科学院上海植物生理生态所、中国农业科学院生物技术研究所、中国农业科学院植物保护研究所等单位合作分离合成了几种抗真菌基因如几丁质酶基因(*Chi*)、 β -1,3-葡聚糖酶基因(*Glu*)、 β -3,3-葡聚糖酶基因、萝卜抗真菌蛋白基因(*R-afp11*)以及葡萄糖氧化酶基因等,并导入我国棉花的主栽品种中,培育出一批抗枯、耐黄萎病性能较好的棉花株系,其中导入几丁质酶基因的 B04-9 和导入萝卜抗真菌蛋白基因的 B08-2 的棉花品种明显比其它品种有良好的抗病性;贾士荣(2000)将抗真菌的基因导入抗虫棉 GK19,使其抗黄萎病的性能进一步提高,同时不改变棉花的抗虫性,使其具有了抗病和抗虫的双重特性,培育出转基因 B9829、B9866-3、B99001、B99059、B99088、B99137 等新株系,开始进入小区抗性观察实验阶段。

4 展望

棉花对黄萎病的抗性存在一个复杂的作用机制,以目前的知识、技术和方法,从棉株与病原菌的识别到组织抗性、生理生化抗性及生态抗性都还无法完全解释棉花的抗性机制。多数学者较为接受的观点是,生理生化抗性起主导作用,但离不开多种抗性机制的相互作用和协调。虽然目前已经对棉花抗黄萎病进行了一系列的生理生化研究并克隆到一些抗黄萎病的基因,但均存在抗性范围窄、抗性表达水平不理想、抗性遗传不稳定等问题,远远不能满足棉花生产发展对控制棉花黄萎病危害的要求。因此,继续深入对棉花的生理生化抗性进行研究,进一步了解其生理生化抗性过程的分子基础,分析棉株和病原菌识别过程中的关键环节和调控因子,利用现代分子生物学手段进行抗黄萎病相关

基因的定位和基因标记,筛选优良的抗病基因,为棉花抗黄萎病的分子育种提供关键基因、分子标记和相关元件是急待解决的关键问题。王力华和戴小枫(2003)通过抑制消减杂交技术克隆到 15 个与棉花抗黄萎病相关基因的 cDNA 序列并对其进行基因定位,为棉花抗黄萎病关键基因的筛选、克隆、分离和应用提供了依据和工作基础。

同时,与常规育种技术相结合,将具有抗病基因的棉株系与综合形状优良的常规品种杂交和回交,选育出集抗病性好、产量高、适应性强、纤维品质于一体的转基因新品种,从根本上解决黄萎病的危害,无疑也是本领域研究的主要方向之一。

致谢

本研究为国家 863 现代农业主题分子育种专项资助课题。

参考文献

- Alchanati I., Patel J., Liu J., Benedict., Stipanovic R., Bell A.A., Cui Y., and Magill C.W., 1998, The enzymatic cyclization of nerolidyl diphosphate by δ -cadinene synthase from cotton stele tissue infected with *Verticillium dahliae*, *Phytochemistry*, 47(6): 961-967
- Bell A.A., Stipanovic R.D., Howell C.R., and Fryxell P.A., 1975, Antimicrobial terpenoids of *Gossypium hemigossypol*, 6-methoxyhemigossypol, and 6-deoxyhemigossypol, *Phytochemistry*, 14: 225-231
- Benedict C.R., Alchanati I., Harvey P.J., Liu J., Stipanovic R.D., and Bell A.A., 1995, The enzymatic formation of δ -cadinene from farnesyl diphosphate in extracts of cotton, *Phytochemistry*, 39(2): 327-331
- Brandt J., Thordal-Christensen H., Vad K., Gregersen P.L., and Collinge D.B., 1992, A pathogen-induced gene of barley encodes a protein showing high similarity to a protein kinase regulator, *Plant J.*, 2: 815-820
- Chu Z.Q., Jia J.W., Zhou X.J., and Chen X.Y., 1999, Isolation of glycoproteins from *Verticillium dahliae* and their phytotoxicity, *Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Sinica)*, 41 (9): 972-976
- Davis D.A., Low P.S., and Heinsteint P., 1998, Purification of a glycoprotein elicitor phytoalexin formation from *Verticillium dahliae*, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 52: 259-273
- Davis G.D., and Essenberg M., 1995, (+)- δ -cadinene is a product of sesquiterpene cyclase activity in cotton, *Phytochemistry*, 39: 553-567

- Deutscher M.P., 1993, Ribonuclease multiplicity, diversity, and complexity, *J. Biol. Chem.*, 268(18): 13011-13014
- Dixon R.A., and Pavia N.L., 1995, Stress-induced phenylpropanoid metabolism, *Plant Cell*, 7(7): 1085-1097
- Dixon R.A., and Harrison M.J., 1990, Activation, structure and organization of genes involved in microbial defence in plants, *Advan. Genet.*, 28: 165-234
- Dubery I.A., and Smit F., 1994, Phenylalanine ammonia-lyase from cotton (*Gossypium hirsutum*) hypocotyls: properties of the enzyme induced by a *Verticillium dahliae* phytotoxin, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1207(1): 24-30
- Dubery I.A., and Smit F., 1997, Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor, *Phytochemistry*, 44(5): 811-815
- Dubery I.A., and Slater V., 1997, Induced defence responses in cotton leaf disks by elicitors from *Verticillium dahliae*, *Phytochemistry*, 44(8): 1429-1434
- Ebel J., 1986, Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 24: 235-264
- Ebel J., and Gosio E.G., 1994, Elicitor of plant defense response, *Int. Rev. Cytol.*, 148: 1-36
- Essenberg M., Grover P.B., and Cover E.C., 1990, Accumulation of antibacterial sesquiterpenoids in bacterially inoculated *Gossypium* leaves and cotyledons, *Phytochemistry*, 29: 3107-3113
- Flor H.H., 1971, Current status of the gene-for-gene concept, *Annual Review of Phytopathology*, 9: 275-296
- Glazebrook J., 1999, Genes controlling expression of defense responses in *Arabidopsis*, *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2 (4): 280-286
- Gu B.K., and Ma C., 1996, Cotton Breeding for Disease Resistance in China, Jiangsu Scientific and Technical Press, Nanjing, China, pp.73-90 (顾本康, 马存, 1996, 中国棉花抗病育种, 江苏科学技术出版社, 中国, 南京, pp.73-90)
- Guo W.Z., Zhou Z.H., Zhang T.Z., and Pan J.J., 1999, Detection of genetic variation of upland cotton cultivars (Lines) resistance (Tolerant) to *Verticillium dahliae* with RAPD technique, *Jiangsu Nongye Xuebao* (Jiangsu Journal of Agricultural Science), 15(1): 1-6 (郭旺珍, 周兆华, 张天真, 潘家驹, 1999, RAPD 鉴定棉花抗(耐)黄萎病品种(系)的遗传变异研究, 江苏农业学报, 15(1): 1-6)
- Hahn M.G., 1996, Microbial elicitors and their receptors in plants, *Annu. Rev. Phytopathol.*, 34: 387-412
- Hammon-Kosack K.E., and Jones D.G., 1996, Resistance gene-dependent plant defense responses, *Plant Cell*, 8(10): 1773-1791
- Hartl L., Weiss H., Stephan U., Zeller F.J., and Jahoor A., 1995, Molecular identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 90:600-606
- Hartl L., Weiss H., Zeller F.J., and Jahoor A., 1993, Use of RFLP markers for the identification of alleles of the Pm3 locus conferring powdery mildew resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 86(8): 959-963
- Hill M.K., Lyon K.J., and Lyon B.R., 1999, Identification of disease response genes expressed in *Gossypium hirsutum* upon infection with the wilt pathogen *Verticillium dahliae*, *Plant Mol. Biol.*, 40(2): 289-296
- James J.T., and Dubery I.A., 2001, Inhibition of polygalacturonase from *Verticillium dahliae* by a polygalacturonase inhibiting protein from cotton, *Phytochemistry*, 57 (2): 149-156
- Jia S.R., 2000, Progress in cotton genetic engineering in China, *Zhongguo Nongye Keji Daobao* (Review of China Agricultural Science and Technology), (2): 18-20 (贾士荣, 2000, 我国棉花基因工程的研究进展, 中国农业科技导报, (2): 18-20)
- Joost O., Bianchini G., Bell A.A., Benedict C.R., and Magill C.W., 1995, Differential induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in two cotton species following inoculation with *Verticillium*, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 8(6): 880-885
- Keim P., Schupp J.M., Travis S.E., Clayton K., Zhu T., Shi L., Ferreira A., and Webb D.M., 1997, A high-density soybean genetic map based on AFLP markers, *Crop Sci.*, 37: 537-543
- Kidou S.I., Umeda M., Kato A., and Uchimiya H., 1993, Isolation and characterization of a rice cDNA similar to the bovine brains-specific 14-3-3 protein gene, *Plant Mol. Biol.*, 21: 191-194
- Kombrink E., and Somssich I.E., 1995, Defense responses of plants to pathogens, *Adv. Bot. Res.*, 21: 1-34
- Korthout H.A.A., and de Boer A.H., 1994, A fusaricocin binding protein belongs to the family of 14-3-3 brain protein homologs, *Plant Cell*, 6: 1681-1692
- Lee S.W., Nazar R.N., Powell D.A., and Robb J., 1992, Reduced PAL gene suppression in *Verticillium*-infected resistant tomatoes, *Plant Mol. Biol.*, 18(2): 345-352
- Liu C.J., Heinsteins P., and Chen X.Y., 1999, Expression pattern of genes encoding farnesyl diphosphate synthase and sesquiterpene cyclase in cotton suspension-cultured cells treated with fungal elicitors, *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12(12): 1095-1104
- Liu J., Benedict C.R., Stipanovic R.D., Magill C.W., and Bell A.A., 2002, Cloning and expression of desoxyhemigossypol-6-O-methyltransferase from cotton (*Gossypium barbadense*), *J. Agric. Food Chem.*, 50(11): 3165-3172

- Luo P., Wang Y.H., Wang G.D., Essenberg M., and Chen X.Y., 2001, Molecular cloning and functional identification of (+)-delta-cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 mono-oxygenase (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis, *Plant J.*, 28(1): 95-104
- Lyon B.R., 1999, DNA markers and the molecular breeding of cotton, *The Australian Cottongrower*, 20(5): 80-83
- Mace M.E., 1978, Contributions of tyloses and terpenoid aldehyde phytoalexins to *Verticillium wilt* resistance in cotton, *Physiol. Plant Pathol.*, 12: 1-11
- Mace M.E., Stipanovic R.D., and Bell A.A., 1985, Toxicity and role of terpenoid phytoalexins in *Verticillium wilt* resistance in cotton, *Physiol. Plant Pathol.*, 26: 209-218
- Marra M., Fullone M.R., Fogliano V., Pen J., Mattei M., Masi S., and Aducci P., 1994, The 30-Kilodalton protein present in purified fusococcin receptor preparations is a 14-3-3-like protein, *Plant Physiol.*, 106(4): 1497-1501
- Memphis T.N., Mace M.E., Stipanovic R.D., and Bell A.A., 1990, Relation between sensitivity to terpenoid phytoalexins and virulence to cotton of *Verticillium dahliae* strains, *Pest. Biochem. Physiol.*, 36: 79-82
- Meyer R., Slater V., and Dubery I.A., 1994, Purification and characterization of a phytotoxic proteinlipopolysaccharide complex produced by a cotton isolate of *Verticillium Dahliae*, *Phytochemistry*, 35(6): 1449-1453
- Moiseyev G.P., Fedoreyeva L.I., Zhuravlev Y.N., Yasnetskaya E., Jekel P.A., and Beintema J.J., 1997, Primary structures of two ribonucleases from ginseng calluses. New members of the PR-10 family of intracellular pathogenesis-related plant proteins, *FEBS Lett.*, 407: 207-210
- Nachmias A., Buchner V., Tsrer L., Burstein Y., and Keen N., 1987, Differential phytotoxicity of peptides from culture fluids of *Verticillium dahliae* race 1 and 2 and their relationship to pathogenicity of the fungi on tomato, *Physiol. Biochem.*, 77: 123-130
- Ni W.C., Zhang Z.L., and Guo S.D., 1998, Development of transgenic insect-resistant cotton plants, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 31(2): 8-13 (倪万潮, 张震林, 郭三堆, 1998, 转基因抗虫棉的培育, *中国农业科学*, 31(2): 8-13)
- Ohme-Takagi M., Suzuki K., and Shinshi H., 2000, Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes, *Plant Cell Physiol.*, 41(11): 1187-1192
- Paterson A.H., DeVerna J.W., Lanini B., and Tanksley S.D., 1990, Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes in an interspecies cross of tomato, *Genetics*, 124(3): 735-742
- Plekhanova L.S., Gevork'ian AhG., Ashirova Z.K., and Ibragimov A.I., 1978, Biosynthesis of RNA in the nuclear structure of wilted cotton plant leaves, *Biokhimiia*, 43 (3): 407-412
- Sato T., and Theologis A., 1989, Cloning the mRNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, the key enzyme for ethylene biosynthesis in plants, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86(17): 6621-6625
- Tan X.P., Liang W.Q., Liu C.J., Luo P., Heinsteins P., and Chen X.Y., 2000, Expression pattern of (+)-delta-cadinene synthase genes and biosynthesis of sesquiterpene aldehydes in plants of *Gossypium arboreum* L., *Planta*, 210: 644-651
- Wang L.H., and Dai X.F., 2003, Progress on molecular research of cotton *Verticillium wilt* resistances, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 1(1): 97-102 (王力华, 戴小枫, 棉花黄萎病抗性的分子研究进展, *分子植物育种*, 2003, 1(1): 97-102)
- Xiao B.C., Jing Y.L., Liu Y.B., and Fan W.F., 1998, A preliminary study on the inheritance of resistance to *Verticillium wilt* in upland cotton, *Xibei Nongye Xuebao (Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica)*, 7(2): 55-58 (校百才, 景忆莲, 刘耀斌, 范万发, 1998, 陆地棉抗黄萎病性状遗传的初步研究, *西北农业学报*, 7(2): 55-58)
- Yu L.M., 1995, Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92(10): 4088-4094