

蔬菜抗病分子标记研究进展

郭仰东¹ 连蔚然¹ 徐凤凤¹ 郑禾² 赵冰¹

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院,100193;

2. 北京市海淀区农业科学研究所,北京 100080)

摘要 蔬菜是我国重要的经济作物,而病害是制约蔬菜生产可持续发展的重要的因子。综述各种分子标记技术在茄科、十字花科和葫芦科等重要蔬菜作物抗病育种中的应用及其发展,并提出在未来的抗病育种中分子标记技术的重要性。

关键词 蔬菜病害;分子标记;抗病育种

中图分类号 S 436.3

文章编号 1007-4333(2015)02-0077-09

文献标志码 A

Research progress of molecular markers for disease resistance in vegetable crops

Guo Yang-dong¹, LIAN Wei-ran¹, XU Feng-feng¹, ZHENG He², ZHAO Bing¹

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Agricultural Institute of Haidian, Beijing 100080, China)

Abstract Vegetable is one of the most important economic crops in China, and the disease is a critical factor affecting their sustainable production. This paper introduced the various applications of molecular marker technology that were used in significant vegetables such as solanaceae, cruciferae and cucurbitaceae in disease resistance breeding and its development, and put forward to the importance of molecular marker technology in disease-resistant breeding.

Key words vegetable diseases; molecular marker; disease-resistant breeding

在我国农业经济中,蔬菜是第一大经济作物,同时,也是入世后我国少数几类比较具有优势的农业产品^[1]。而病害是制约蔬菜生产可持续发展的十分重要的因子。近些年来,蔬菜的种植面积,尤其是保护地蔬菜种植面积正在迅速扩大,在此条件下,多种蔬菜周年生产容易造成蔬菜病害种类增多,危害逐年加重,加之不合理的使用化学农药,不仅容易引起各种病害抗药性增强,而且会使蔬菜产品中农药残留增加,极大影响蔬菜的产量和品质,限制蔬菜产业的可持续发展^[2]。因此,蔬菜病害的研究越来越受到人们的重视。对于一些病害的防治,现阶段的主流还是农药、抗菌剂或者抗病毒制剂的使用,但是这些制剂的使用,在不同环境下的效果相差很大,且如果长期使用,对于环境与植物来说,都是不小的负

荷,所以只能作为一种补充防治措施。笔者认为目前解决上述问题的最好办法就是抗病品种的选育。

在传统育种过程中,基本上是对植株的表现型进行直接选择,环境条件、基因互作及环境与基因的互作都会对表现型有一定的影响,而且效率低、周期长。特别是对受多基因控制的数量性状的选择,更难做到准确。现在育种学虽然已建立一套完整的育种程序,并培育出许多抗逆、优质的新品种,然而周期长、工作量大等仍是很大的问题。生物技术的发展使得对基因型的直接选择成为可能,分子育种因此应运而生,特别是分子遗传学的发展及分子标记技术的建立,使作物育种进入一个新阶段。目前,分子标记已开始进入到作物遗传育种研究的各个方面,其巨大的应用前景正在被显示出来。

收稿日期:2014-06-09

基金项目:国家“863”计划项目(2012AA100A03);北京市现代农业产业技术体系(BL.VT-03)

第一作者:郭仰东,教授,主要从事植物生物技术研究,E-mail:yaguo@cau.edu.cn

1 分子标记主要技术研究与应用

DNA 分子标记技术已有数十种,广泛应用于遗传育种、基因定位、基因组作图、基因库构建、物种亲缘关系鉴别和基因克隆等方面。大概分为:

1.1 限制性片段长度多态性 (Restriction fragment length polymorphism, RFLP)

1974 年 Grodzicker 等创立了 RFLP 技术,它是一种以 DNA-DNA 杂交为基础的第一代遗传标记。其基本原理是将不同生物个体的基因组 DNA 利用特定的限制性内切酶识别并切割,通过分子杂交检测酶切同源片段大小上的差异。通过凝胶电泳分析这些片段,并与克隆 DNA 探针进行 Southern 杂交和放射显影,即获得反映个体特异性的 RFLP 图谱。RFLP 标记一般为共显性,可利用的探针很多,可以检测到很多遗传位点。但是,检验步骤多、周期长、成本高以及过程繁琐等都是 RFLP 分析的缺点。

1.2 随机扩增多态性 DNA 标记 (Random amplified polymorphism DNA, RAPD)

RAPD 技术是 1990 年由 Wiliam 和 Welsh 等人利用 PCR 技术发展的检测 DNA 多态性的方法。它利用随机引物进行扩增并检测扩增产物的多态性。就单一引物而言,只能检测基因组特定区域 DNA 多态性,但利用一系列引物则可使检测区域扩大到整个基因组,因此,RAPD 可用于对整个基因组 DNA 进行多态性检测,也可用于构建基因组指纹图谱。尽管 RAPD 标记具有快速、简便和高效等优点,但 RAPD 标记不能区分杂合型和纯合型,且信息度低、重复性差。为克服这一缺陷,可将 RAPD 扩增的特异片段进行克隆和测序,再根据两端的序列,合成较长的引物对,再进行特异 PCR 扩增,转化为序列特异性扩增区 (Sequence-characterized amplified region, SCAR) 标记。

1.3 简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR)

SSR 也称微卫星 DNA,其串联重复的核心序列为 2~5 bp,也有以 1~6 个核苷酸为串联单位重复。其中最常见的是双核苷酸重复,即 $(CA)_n$ 和 $(TG)_n$,每个微卫星 DNA 的核心序列结构相同,重复单位数目为 10~60 个,其串联数目的不同带来高度多态性。相比其他分子标记,SSR 标记具有以下优点:一般检测到的都是 1 个单一的多等位基因位点;微卫星呈共显性遗传,所以可鉴别杂合子和纯合子;对

DNA 质量要求不高,量少;覆盖整个基因组,多态性高。

简单重复序列区间 (Inter-simple sequence repeat, ISSR) 是简单序列重复间区的 DNA 序列,检测的是基因组中 2 个 SSR 之间一段短的 DNA 序列上的多态性。

1.4 扩增片段长度多态性 (Amplified fragment length polymorphism, AFLP)

AFLP 是 Vos 等^[3]在 1995 年发展起来的一种检测 DNA 多态性的新方法。AFLP 是 RFLP 与 PCR 相结合的新产物,其基本原理是先利用 2 种限制性内切酶酶切基因组 DNA,再将双链人工接头与酶切片段相连,作为扩增反应的模板 DNA,最后进行选择性地扩增,根据扩增片段的长度不同检测出多态性。AFLP 结合了 RFLP 和 RAPD 这 2 种技术的优点,分辨率高、稳定性好,但是同时对 DNA 的纯度和内切酶的质量要求很高,费用昂贵。尽管 AFLP 诞生时间较短,但是备受分子生物学家的喜爱,可称其为分子标记技术的一次重大突破,是一种非常理想、有效的分子标记。

酶切扩增多态性序列 (Cleaved amplified polymorphism sequences, CAPS) 与 AFLP 相反,是先利用特异性引物扩增后再进行酶切检测多态性。

1.5 核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP)

SNP 标记是 Lander 在 1996 年提出的 DNA 遗传标记。SNP 是指在基因组的核苷酸序列中因个别核苷酸的差异而引起的基因序列多态性。SNP 因为数量多、位点丰富、覆盖密度大、遗传稳定性强、多态性丰富且可实现大规模高自动化,被称为第 3 代 DNA 分子标记技术,成为现今最有发展潜力的分子标记技术。在检测每个基因的等位基因与表现型相关性,特别是多基因遗传疾病的研究时,SNP 分析具有巨大的应用潜力^[4-5]。现今 SNP 标记已受到各国学者的广泛关注,已成为分子领域研究的焦点,并且随着高通量测序技术的逐渐成熟,作为新一代遗传标记技术,SNP 一定会对各个领域产生推动作用。

2 茄科蔬菜抗病分子标记

茄科植物具有很重要的经济价值。番茄、辣椒、马铃薯和茄子等是重要的粮食和蔬菜作物。我国番茄病害中最常见的有晚疫病、番茄花叶病

毒病、白粉病、根结线虫病、枯萎病和青枯病等 10 余种。

2.1 番茄

2.1.1 晚疫病

晚疫病是我国番茄中的重要病害, 现已从番茄的不同野生种中鉴定出抗晚疫病的 R 基因 (*Ph-1*、*Ph-2*、*Ph-3*、*Ph-4* 和 *Ph-5*) 和数量抗性位点 (QTL)。李涛^[6]在前人对 *Ph-2* 基因定位的基础上, 充分利用番茄测序及重测序结果, 筛选出 26 对 SNP、1 对 CAPS 标记和 6 对插入缺失 (Insertion-deletion, InDel) 标记; 并将番茄抗晚疫病的 *Ph-2* 基因精细定位于 Indel-4 和 CAPS-1 标记间。高永利^[7]以抗番茄晚疫病的品种 L3708 与感病品种 04968 组合的 F₂ 为群体, 利用混合分组分析法 (Bulked segregant analysis, BSA) 及 RAPD 标记构建了 1 个全长为 25.5 cM 的连锁群, 并在此连锁群上检测到 2 个 QTLs。黄晓梅等^[8]利用含番茄晚疫病抗性基因 *Ph-1*、2 和 3 的 L3708 为父本, 感病的优良品系 04968 为母本, 以 260 个 F₂ 单株为图谱构建群体, 通过 AFLP 和 SSR 这 2 种分子标记构建包含 12 个连锁群的分子遗传图谱, 检测到 5 个与 *Ph-3* 相关的 QTL 位点, 都可作为选育抗晚疫病番茄品种的辅助选择工具。Truong 等^[9]利用 RAPD 及 BAS 从 800 个随机引物中筛选到 1 个与 *Ph-3* 基因紧密相连的可作为选育抗晚疫病番茄品种的 RAPD 标记 UBC # 602, 并成功转化为 SCAR 标记。

2.1.2 花叶病毒病

在番茄花叶病毒病中目前已鉴定出 3 个显性抗病基因 *Tm-1*、*Tm-2* 和 *Tm-2²* (或 *Tm-2a*), 找到与这些基因紧密连锁的标记, 对于抗病植株筛选和基因克隆都是必要和有益的^[10]。Ohmori 等^[11-12]分别在 1995 和 1996 年找到与 *Tm-2* 和 *Tm-1* 基因紧密连锁的 RAPD 标记, 并将它们转化成为 SCAR 标记。田苗英等^[13]在番茄花叶病毒抗性基因 *Tm2^m* 的 F₂ 代群体中运用 RAPD 及 BSA 法找到 1 个与 *Tm2^m* 基因连锁的分子标记 OPD20₁₇₀₀。Shi 等^[14]找到 4 个可用来识别 *Tm-2*、*Tm-2²* 和 2 个敏感的等位基因 *Tm-2* 的等位基因特异性标记, 识别和区分 *Tm-2*、*Tm-2²* 的 3 个 CAPS 位点以及 3 个可特定识别 *Tm-2* 的 SNP 标记。

2.1.3 白粉病

根据病原物的不同, 目前标记的抗番茄白粉病

的基因主要有 3 个 (*Lv*、*Ol-1* 和 *Ol-2*)^[10]。De 等^[15]利用 *Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*@ *Super marmande* 的杂交 F₂ 代群体, 找到与番茄白粉病抗性基因 *Ol-2* 连锁的 RAPD 标记 OPU3₁₅₀₀, 并转化成为 CAPS 标记, 同时获得 2 个 AFLP 标记。Ricciardi 等^[16]利用 BSA 法对抗病品种 *Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme* 和易感品种 *Super marmande* 的 F₂ 代材料进行 AFLP 分析, 找到与抗番茄白粉病基因 *Ol-2* 紧密连锁的 8 个 AFLP 标记。Faino 等^[17]将茄属上的 2 个 QTLs, *Ol-qt11* 和 *Ol-qt12*, 分别定位在番茄 6 号染色体的长臂以及 12 号染色体的短臂上。Chunlin 等^[18]通过番茄的杂交种 DRW4409 从 158 个 SSR 位点中发现 1 个与抗白粉病基因距离为 8.0 cM 的 SSR 标记 LEat014。

2.2 辣椒

辣椒在我国是一种很重要的经济作物, 不仅营养丰富, 维生素 C 含量居各类蔬菜之首。但随着疫病在我国的发现, 辣椒疫病已经成为当前限制辣椒生产的主要因子。并且通过研究发现, 不同辣椒品种对疫病的抗性存在相当大的差异, 所以开发较好的辣椒抗病品种是防治该病害最有效的途径之一。

2.2.1 疫病

易图永等^[19]利用辣椒品种 93-100-17-1-0 和茄门杂交得到的 F₂ 群体, 构建了一张辣椒抗疫病分子遗传图谱, 包含 11 个连锁群和 46 个 AFLP 标记, 并进行了 QTL 定位。安静等^[20]以抗疫病材料 perennial 和感疫病材料 83-60 杂交得到的 F₂ 群体, 利用 AFLP、RAPD 和 SSR 等分子标记, 得到包括 12 个连锁群、70 个标记位点、覆盖长度为 429.02 cM、平均图距为 6.13 cM 的连锁图谱, 连锁群长度在 4.30~85.85 cM 之间; 对 F₂ 群体进行辣椒疫病的室内人工接种, 进行 QTL 分析, 在第 4 连锁群上检测到 2 个 QTL。马俊平^[21]选取感病品种 Jm 及抗病品种 NSC0501 的 F₂ 群体, 构建抗病基因池和感病基因池, 后设计 SSR 引物进行 PCR 扩增, 最终得到 2 个可能与辣椒抗疫病性状紧密连锁的 SSR 分子标记, 奠定辣椒抗疫病育种的理论与实践基础。

2.2.2 炭疽病

辣椒生产的另一障碍是辣椒炭疽病, 已经受到各国的重视。孙春英^[22]利用高感尖孢炭疽菌自交系 77013 为回交亲本, 高抗尖孢炭疽菌品种 PBC932 为父本组合交配, 获得种间群体, 构建了 1

张由 14 个连锁群组成的种间遗传连锁图,包含 350 个 SSR 标记、35 个 CAPS 标记和 1 个 InDel 标记。Lee 等^[23]在 2010 年定位了 1 个抗尖孢炭疽菌的主效 QTL CaR12.2、1 个抗黑点炭疽菌的主效 QTL CcR9,后又运用 AFLP 和 BAS 的方法将主效 QTL 区域的分子标记进一步加密,将与主效 QTLs CaR12.2 和 CcR9 连锁的 AFLP 标记 EtagMcgt04 和 EtacMccg13 分别转换为基于 PCR 的简单分子标记 CaR12.2M1-CAPS 和 CcR9M1-SCAR,但未公布这 2 个标记的序列。目前,关于抗炭疽病遗传规律的研究在国内少有报道。国内外学者已对病原菌的生物学特性、寄主范围、寄主的抗性机制、苗期和果期的抗病性鉴定方法、抗病遗传规律等进行研究,并取得重要进展,但仍有许多方面亟待进一步深入研究^[24]。

2.3 马铃薯

马铃薯是中国五大主食之一,也是重要蔬菜。近年来,其种植面积与产量都呈增加趋势。

2.3.1 晚疫病

马铃薯晚疫病是马铃薯的第一大病害。马铃薯晚疫病是由疫霉引起的一种毁灭性真菌病害,疫霉是马铃薯疫灾中危害最大的病原菌,且马铃薯是基因高度杂合的同源四倍体作物,常规育种过程复杂耗时,所以将抗晚疫病的野生种的抗病基因导入栽培品种中,是防治马铃薯晚疫病的有效方法。但晚疫病菌小种变异极快,所以只能利用广谱抗性基因或多个抗性基因的叠加来实现其抗晚疫病的持久性。Meyer 等^[25]利用 AFLP 标记技术构建总长为 990.9 cM,含有 231 个分子标记的四倍体马铃薯部分连锁图谱,并利用该图谱进行晚疫病抗性的 QTL 分析,发现在 8 号染色体上有与晚疫病抗性相关的 QTL。Ghislain 等^[26]利用 RFLP、AFLP 和 SSR 标记,据二倍体 *S. phureja* 晚疫病的田间自然抗性,构建 2 个遗传图谱,并得到 1 个新的抗晚疫病的 QTL 遗传位点。Leonards-Schippers 等^[27]在马铃薯中利用 RFLP 和 AFLP 将抗晚疫病 R1 基因定位 5 号染色体上;将 3 个高度连锁的 R3、R6 和 R7 基因定位在 11 号染色体上^[28-29];R2 基因定位在 4 号染色体上^[30]。

2.3.2 青枯病

青枯病是由茄科雷尔氏菌引起的一种世界性的细菌性土传病害,可造成严重的减产及巨大的经济损失,其中马铃薯、番茄等茄科作物受害最为严重。

马铃薯抗青枯病研究起步较晚,进展较慢。李林章^[31]利用 RAPD 技术与 BAS 法,从 160 个随机引物中筛选得到 2 个与青枯病抗性连锁的标记 OPA07₄₄₆ 和 OPA12₉₈₀,并将其转化为 SCAR 标记 SCA07₄₄₆ 和 SCA12₉₈₀。郜刚等^[32]综合 RAPD、SSR 和 AFLP 这 3 种标记技术以及 BSA 分析方法,筛选到与抗病感病性状相连锁的 3 个 RAPD 标记 OPG05₉₄₀、OPR11₈₀₀ 和 OPO13₇₇₀,1 个 SSR 标记 STM0032,检测到 7 个 AFLP 多态性带,都可用于马铃薯分子育种。

2.4 茄子

茄子属于茄科家族中的一员,是为数不多的紫色蔬菜之一,营养丰富。但是其易受病害的侵袭,特别是青枯病、黄萎病和枯萎病,发病较严重时可造成茄子产量和品质的大幅下降。

曹必好等^[33]利用 RAPD 及 BAS 法,得到 1 个与抗青枯病基因紧密连锁的 RAPD 标记,并且成功转换成 SCAR 标记。李猛等^[34]以茄子高感青枯病品种-三月茄.与高抗品种-S69.的 F₁ 和 F₂ 为材料,发现青枯抗性由 1~2 对基因控制,并鉴定出 1 个与-S69.抗性基因连锁的 AFLP 标记 39A₉₈₀。朱华武等^[35]利用高感青枯病品种北京六叶茄 064、高抗青枯病半栽培种马来西亚 S3 及其 F₂ 代,用 RAPD 技术从 300 个随机引物中找到 1 个与亲本 S3 中的抗病基因紧密连锁的分子标记 S264780。

3 十字花科蔬菜抗病分子标记

十字花科是植物中最繁盛的科之一,该科主产蔬菜和油料作物,如芸薹属和萝卜属等,其中甘蓝和白菜是世界性的重要蔬菜。

3.1 甘蓝

3.1.1 枯萎病

甘蓝枯萎病菌几乎能侵染所有的甘蓝类蔬菜,该病害在我国北方地区逐年加重,已对甘蓝生产产生巨大威胁。姜明^[36]用甘蓝高抗枯萎病自交系 8024 与感病自交系 6A 进行杂交,获得了 F₃ 代家系,通过 AFLP 分子标记技术及 BSA 法,筛选出 1 个与甘蓝枯萎病基因紧密连锁的 AFLP 标记,并转化成稳定的 SCAR 标记 S4M48199。朱洪运等^[37]用不同生态型甘蓝抗枯萎病高代自交系 R4-P1 和感枯萎病自交系 R2-P2 为亲本组配得到 F₂ 单株,利用 AFLP、SSR 及相关序列扩增多态性 (Sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 分子标记

技术对该群体进行遗传连锁分析,构建1张含有包含162个 AFLP 标记、52个 SSR 标记和26个 SRAP 标记的高密度甘蓝分子遗传连锁图谱,是目前发表的覆盖基因组较全面的结球甘蓝亚种内遗传连锁图谱。

3.1.2 结球甘蓝病毒病

结球甘蓝是中国的一种重要蔬菜,其病毒病的大面积发生,影响其产量和品质,并常给菜农造成巨大的经济损失。结球甘蓝病毒病的来源为芜菁花叶病毒(TuMV),是世界性的病原。王雪^[38]利用甘蓝感病自交系和抗病自交系杂交后代的 F_2 群体,侵染主导致病株系 TuMV-C4,采用 BSA 法及 AFLP,筛选出与甘蓝抗 TuMV 基因连锁的 AFLP 分子标记 E24M61-530。高金萍等^[39]应用 RAPD 及 BSA 法,获得2个与甘蓝抗 TuMV 基因连锁的 RAPD 标记 U16/660 和 AG13/2000,并分别将其转化成 SCAR 标记。

3.1.3 霜霉病

结球甘蓝的霜霉病是由十字花科寄生霜霉菌引发的严重病害。王神云^[40]利用 AFLP 分子标记及 BSA 法,在感病亲本与抗病及其杂交 F_2 分离群体,与分别以感病亲本和抗病亲本为回交亲本的 BC 群体进行抗性分析,得到 AFLP 标记 BoR_{AAG/CTC},并将其成功转化成 SCAR 标记 BoR_{AAG/CTC113}。

3.2 大白菜

3.2.1 病毒病

大白菜病毒病在随着蔬菜生产的产业化、规模化及环境的日益恶化条件下日趋严重。病毒病防治困难,目前还没有找到可以普遍适用的抗病毒病药剂或其他有效的控制技术。在大白菜病毒病中,芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)是主要病原,因此抗 TuMV 白菜一直是育种的主要目标。阎瑾琦^[41]以大白菜抗病与感病亲本杂交后自交所得的 F_2 群体为材料,采用 BSA 及 RAPD 分子标记,找到2个与大白菜抗 TuMV 基因紧密连锁的遗传标记,遗传距离分别为 9.5 cM 和 15.36 cM。韩和平等^[42]利用抗病材料 Brp058 和感病材料 Brp181 杂交后代构建 F_2 分离群体,用 TuMV-C5 株系对 F_2 的116个单株进行人工接种后,采用 AFLP 及 BSA 方法筛选到2个与大白菜 TuMV 感病基因紧密连锁的 AFLP 标记,其遗传距离分别为 7.5 cM 和 8.4 cM。张俊华等^[43]以高抗芜菁花叶病毒株系的高代自交系和感病自交系杂交后的 F_2 代为群体,

根据大白菜的抗性相关的表达序列标签(Expressed sequence tag, EST)设计引物,利用 BSA 法,筛选得到2个与芜菁花叶病毒株系抗病基因紧密连锁的 EST-PCR-RFLP 分子标记 BS300 及 BS160。Li 等^[44]以高抗 TuMV 的自交系材料和高感 TuMV 的自交系材料的 F_2 代166个单株为群体,采用 EST-SSR 方法筛选到1个与大白菜 TuMV 抗性基因紧密连锁的共显性分子标记,连锁距离为 3.8 cM。

3.2.2 霜霉病

霜霉病是危害大白菜的几大病害之一,是一种气传病害,该病害的发生会严重影响大白菜的产量及品质。李慧等^[45]选用高感霜霉病株系与高抗霜霉病株系以及由二者为双亲构建的 DH 群体为试验材料,将与抗病基因连锁的 RAPD 标记 K14-1030 定位于大白菜 KBrB058M10 上,并筛选得到5个 RAPD 标记;同时,得到1个 SSR 标记 bru1209,为霜霉病抗性分子育种奠定了良好基础。虞慧芳等^[46]利用高抗自交系和高感自交系及其杂交 F_2 群体为材料,用 BSA 及 SSR 分子标记,获得了1个与大白菜抗霜霉病基因紧密连锁的,遗传距离为 5.6 cM 的分子标记 RPP13MK。

3.2.3 根肿病

芸薹根肿菌(*Plasmodiophora brassicae* Woron.)是一种土传真菌性病害,侵染大白菜可以引起大白菜根肿病,是一种世界性的病害,可导致大白菜产量下降,甚至绝收。Matsumoto 等^[47]采用 DH 群体和 RFLP 技术,构建1张覆盖 735 cM 的基因组长度的大白菜连锁图谱,其中根肿抗性由1对显性基因(CRa)控制,并被定位在3号连锁群上,RFLP 标记 HC352b 和 HC181 与该基因的连锁距离分别为 3 和 12 cM。Kwang 等^[48]进行大白菜抗生理小种4的基因遗传分析,利用 BSA 及 RAPD 技术,获得1个遗传距离为 3.1 cM 的 RAPD 标记 OPJ₁₁₀₀。Hayashida 等^[49]筛选到1个与根肿抗性紧密连锁的共显性 SCAR 标记 HC352b-SCAR,该标记与基因 CRa 和标记 E49₃₈₀的连锁距离分别为 2.9 和 7.5 cM。王森等^[50]利用感根肿病的大白菜自交系 94SK 和抗根肿病的‘CR Shinki DH’系为亲本构建的 F_2 群体作为材料,采用 BSA 法和 AFLP 标记技术,构建1张包含179个标记位点、10个连锁群、覆盖长度为 576 cM、平均图距为 3.3 cM 的遗传图谱,并将抗根肿病基因 CRb 定位在第一条连锁群 9 cM

的范围内。刘亚培^[51]以抗根肿病的芜菁自交系和感病的大白菜自交系及其 F₁、F₂ 和 BC₁ 为材料,筛选获得 1 个与感病相关基因的遗传距离为 11.6 cM 的连锁的 SSR 标记 BrSSR009。

3.3 萝卜

3.3.1 软腐病

软腐病病原菌主要为胡萝卜软腐欧文氏菌胡萝卜亚种(简称 Ecc),是危害大白菜的三大重要病害之一,并且可严重制约大白菜的生产。牟晋华等^[52]对大白菜软腐病抗病材料 683 和感病材料 1042 及其 F₂ 代群体进行 Ecc 接种,利用 BSA 法和 AFLP 技术筛选出 1 个与感病基因连锁的标记 GG150。韩香婷^[53]使用 1 组高抗、高感软腐病的大白菜自交系群体,对其接种 Ecc,使用 SSR 标记分析,发现与大白菜的抗软腐病数量性状之间呈显著相关的 4 个 EST-SSR 分子标记,编号分别为 S4、S7、S9 和 S10。相对于其他几种大白菜抗病性状来说,抗软腐病的分子标记研究较少,因此需加强此方面的研究。

3.3.2 病毒病及黑腐病

萝卜为十字花科萝卜属,在世界范围内广泛栽培,我国是萝卜的主要起源地之一。病毒病和黑腐病是危害萝卜的两大重要病害,在全国范围内普遍发生,造成减产并且严重影响萝卜的品质。其中 TuMV 是萝卜病毒病的主要病原。李红双^[54]利用对萝卜 TuMV 和黑腐病都存在明显抗性差异的自交系构建 F₂ 分离群体,发现控制萝卜对 TuMV 抗性和黑腐病抗性的 4 个 QTL;同时采用 BSA 法对萝卜 TuMV 不同抗源的抗性基因进行分子标记研究,找到 1 个与抗病基因连锁的分子标记 CoMe7F/BEml2R-120。

4 葫芦科蔬菜抗病分子标记

葫芦科是世界上最重要的食用植物科之一,其重要性仅次于禾本科、茄科和豆科。其中包括黄瓜、西瓜、葫芦和冬瓜等常见的瓜果与蔬菜。

4.1 黄瓜

黄瓜在中国各地广泛分布,是主要的温室产品之一。

4.1.1 枯萎病

黄瓜枯萎病(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*)是影响黄瓜的三大病害之一,是由黄瓜专化型尖孢镰刀菌侵染引起的土传病害,是黄瓜生产上较难防治的病害之一,经常造成较大的损失。

张海霞等^[55]以黄瓜抗枯萎病亲本 WIS2757 和感枯萎病亲本津研 2 号及其 F₂ 分离群体为试材,采用 BSA 及 RAPD 技术,得到与抗黄瓜枯萎病基因连锁的特异 DNA 片段 S49-300。后张海英等^[56]又以以上亲本及其 F₂ 代分离群体为试材,采用 BSA 及 AFLP 分子标记技术,得到 1 个与 WIS2757 黄瓜枯萎病抗性基因连锁的特异 DNA 片段。王亚娟^[57]以黄瓜抗枯萎病和感枯萎病亲本组合的 F₂ 分离群体为试材,找到 1 个与黄瓜枯萎病抗性相关基因连锁的 SSR 标记 CSWCT06A。

4.1.2 白粉病

黄瓜白粉病(Powdery mildew, PM)是一种广泛性的世界病害,主要由瓜单囊壳菌和二抱白粉菌等专性活体寄生的白粉菌引起,主要通过雨水和气流进行传播。张桂华等^[58]以黄瓜抗白粉病母本 Q9 和感白粉病父本 Q10 及组合(津春 3 号)的 F₂ 分离群体为试材,采用 BSA 法及 AFLP 技术,同时得到 2 个与白粉病抗病相关基因紧密连锁的特异片段。崔洪宇等^[59]将张桂华的 2 个 AFLP 标记分别转化成为更简单、实用的 SCAR 标记 SCPM166 及 SCPM66, SCPM166 可鉴定纯合感病个体, SCPM66 可区分纯合抗病个体,如果这 2 个标记同时使用相当 1 个共显性的 SCAR 标记。聂京涛等^[60]以黄瓜高感和高抗白粉病自交系 M12 和 M3 为亲本组合得到的 F₂ 群体和 BC₁ 群体为试材,结合 BSA 法和 SSR 技术,获得与黄瓜白粉病抗性主效基因连锁的 SSR 标记 SSR15592。

4.1.3 霜霉病

黄瓜霜霉病是国内外黄瓜产区的主要叶部病害之一。Kennard 等^[61]得到 2 个与黄瓜抗霜霉病基因连锁的 RFLP 标记 CsC230/EcoR1 和 CsC593/DIaI,与抗性基因的遗传距离分别为 9.5 和 17.7 cM。Horejsi 等^[62]运用 RAPD 技术,得到 1 个 RAPD 标记 BC519₁₁₀₀,与控制霜霉病基因 *dm* 的遗传距离为 9.9 cM。丁国华等^[63]以感霜霉病黄瓜 L18-10-2 和抗霜霉病黄瓜 129 为亲本构建 F₂ 代分离群体,采用 RAPD 技术获得 1 个与霜霉病抗病基因之间紧密连锁的 RAPD 标记 SBSP18₅₆₁,并将将其转化成 SCAR 标记 SSBSP18₄₉₄。

4.2 西瓜

4.2.1 枯萎病

西瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌西瓜专化型侵染所致,是西瓜栽培中常见的土传病害,已成为限制西瓜

生产的主要因素之一。范敏等^[64]利用99个随机引物在西瓜栽培种97103与抗枯萎病西瓜野生种质PI296341杂交形成的F₂群体中,扩增得到130个RAPD标记、3个SSR标记、3个同工酶标记、4个形态标记及1个抗枯萎病生理小种1基因,并用这些标记构建全长为1 203.2 cM的分子连锁图谱。许勇等^[65]运用RAPD技术及BSA法进行西瓜野生种质PI296341抗枯萎病基因连锁的分子标记研究,得到与抗病基因连锁的RAPD标记OPPOL/700。在随后的一年内,许勇等^[66]将RAPD标记OPPOL/700转化为SCAR标记。

4.2.2 炭疽病

西瓜炭疽病是西瓜生产上的重要病害之一,在西瓜的各个生育期均可发。牛晓伟等^[67]选取抗西瓜炭疽病的PI189225和感西瓜炭疽病的Black Diamond及其有性杂交的F₂世代为试验材料,利用AFLP和SSR技术寻找与西瓜抗炭疽病基因相关的分子标记,获得3个与西瓜炭疽病抗性基因连锁的AFLP标记E4/M19、E1/M8和E29/M5,连锁距离分别为34.8、23.4和6.9 cM。

5 展望与结语

近些年来,随着分子标记技术不断的发展与完善,大大加速了作物遗传改良进程,这门技术相比于传统技术来说具有无可比拟的优越性,但相比于传统育种中对育种群体的形态生理选择的直观性来说,分子标记技术对操作人员有一定的技术要求,大规模的筛选蔬菜作物优良品系或品种的愿望仍未实现。除了一些较重要的蔬菜作物外,大部分蔬菜作物的遗传图谱饱和度较低,多数研究仍处在起步阶段,且大部分抗病基因还未克隆,所以无法得到基因标记;而已知的大多数标记都是在特定的品种中获得的,大部分标记的通用性尚未检验,这些都无法满足育种的需求。这是目前蔬菜作物分子标记辅助育种中存在的主要问题。

因此,就需要分子生物学家、植物病理学家和育种家密切配合,相互协作,加快整合与完善高密度遗传标记连锁图谱的构建,同时应探索新型实用分子标记技术,并与传统育种技术有效结合,使分子标记辅助抗病育种走向更加实用的阶段,以更快的速度培育出具有优良抗病性的高产优质作物新品种,为蔬菜抗性育种提供更好的基础。分子标记必将各个领域的发展产生深远的影响。

参 考 文 献

- [1] 刘伟. 我国蔬菜种业概况及发展策略[J]. 中国种业, 2010(11): 17-19
- [2] 张慎璞, 李宝聚. 蔬菜病害防治靶标与有效防治[J]. 北方园艺, 2009(4): 118-120
- [3] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23 (21): 4407-4414
- [4] 刘万清, 贺林. SNP 为人类基因组描绘新的蓝图[J]. 遗传, 1998, 20(6): 38-40
- [5] Jorde L B. Linkage disequilibrium and the search for complex disease genes[J]. Genome Res, 2000(10): 1435-1444
- [6] 李涛. 番茄抗晚疫病(*Phytophthora infestans*) Ph-2 和 Ph-3 基因的抗性机制研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014
- [7] 高永利. 番茄晚疫病抗性 QTL 分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006
- [8] 黄晓梅, 许向阳, 李景富, 等. 番茄分子遗传图谱构建和晚疫病抗性基因簇 Ph-3 的 QTL 分析[J]. 中国农业科学, 2009, 42 (10): 3571-3580
- [9] Truong H T H, Tran H N, Choi H S, et al. Development of a co-dominant SCAR marker linked to the Ph-3 gene for *Phytophthora infestans* resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) [J]. Eur J Plant Pathol, 2013, 136(2): 237-245
- [10] 吴媛媛, 李海涛, 张子君, 等. 番茄抗病基因分子标记研究进展[J]. 贵州农业科学, 2010, 38(2): 27-31
- [11] Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F. Identification of RAPD markers linked to the Tm-2 locus in tomato [J]. Theor Appl Genet, 1995, 90(3/4): 307-311
- [12] Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F. Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the Tm-1 locus in tomato [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92(2): 151-156
- [13] 田苗英, 冯兰香, 杨翠荣. 应用 RAPD 方法获得与番茄 ToMV 抗性基因 Tm^{2m} 连锁的分子标记[J]. 植物病理学报, 2000, 30 (2): 158-161
- [14] Shi A N, Vierling R, Grazzini R, et al. Molecular markers for Tm-2 alleles of tomato mosaic virus resistance in tomato [J]. Am J Plant Sci, 2011, 2(2): 180-189
- [15] De Giovanni C, Dell'Orco P, Bruno A, et al. Identification of PCR-based markers (RAPD, AFLP) linked to a novel powdery mildew resistance gene (*Ot-2*) in tomato [J]. Plant Sci, 2004, 166 (1): 41-48
- [16] Ricciardi L, Lotti C, Pavan S, et al. Further isolation of AFLP and LMS markers for the mapping of the Ot-2 locus related to powdery mildew (*Oidium neolyopersici*) resistance in tomato (*Solanum lycopersicum* L) [J]. Plant Sci, 2007, 172(4): 746-755
- [17] Faino L, Azizinia S, Hassanzadeh B H, et al. Fine mapping of two major QTLs conferring resistance to powdery mildew in tomato [J]. Euphytica, 2012, 184(2): 223-234

- [18] Chunlin He, Poysa V, Kangfu Yu, et al. Inheritance of resistance to powdery mildew (*Oidium lycopersicum*) and its linkage to an SSR marker in tomato hybrid DRW4409[J]. *Can J Plant Sci*, 2010, 90(6): 803-807
- [19] 易图永. 辣椒抗疫病相关基因的分析及 QTL 定位[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2003
- [20] 安静, 胡勇胜, 张宝玺, 等. 辣椒分子连锁遗传图谱的构建及抗疫病 QTL 定位[J]. *中国蔬菜*, 2007(10): 9-12
- [21] 马俊平. 辣椒疫病抗性的 SSR 分子标记及雄性不育系花粉败育的细胞学观察[D]. 杭州: 浙江大学, 2013
- [22] 孙春英. 辣椒抗炭疽病 QTL 定位及分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013
- [23] Lee J, Do J W, Yoon J B. Development of STS markers linked to the major QTLs for resistance to the pepper anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* and *C capsici* [J]. *Hortic Environ Biote*, 2011, 52(6): 596-601
- [24] 孙春英, 毛胜利, 张正海, 等. 辣椒抗炭疽病遗传与育种研究进展[J]. *园艺学报*, 2013, 40(3): 579-590
- [25] Meyer R C, Milbourne D, Hackett C A, et al. Linkage analysis in tetraploid potato and association of markers with quantitative resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) [J]. *Mol Gen Genet*, 1998, 259(2): 150-160
- [26] Ghislain M, Trognitz B, Ma del R. Genetic loci associated with field resistance to late blight in offspring of *Solanum phureja* and *S Tuberosum* grown under short-day conditions[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103(2/3): 433-442
- [27] Leonards-Schippers C, Gieffers W, Salamini F, et al. The R1 gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V[J]. *Mol Gen Genet*, 1992, 233(1/2): 278-283
- [28] El-Knarbotly A, Leonards-Schippers C, Huigen D J, et al. Segregation analysis and RFLP mapping of the R1 and R3 alleles conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in progeny of diploid potato parents [J]. *Mol Gen Genet*, 1994, 242(6): 749-754
- [29] El-Knarbotly A, Palomino Sanchez C, Salamini F, et al. R6 and R7 alleles of potato conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary identified genetic loci clustering with the R3 locus on chromosome XI[J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92(7): 880-884
- [30] Li X, Eck H J, Rouppe van der Voort, et al. Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: The R2 allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96(8): 1121-1128
- [31] 李林章. 二倍体马铃薯青枯病抗性的分离及分子标记鉴定[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004
- [32] 郜刚, 屈冬玉. 马铃薯青枯病抗性的分子标记[J]. *园艺学报*, 2000, 27(1): 37-41
- [33] 曹必好, 王勇, 雷建军, 等. 茄子抗青枯病遗传规律及分子标记筛选研究[C]//中国园艺学会第八届青年学术讨论会暨现代园艺论坛论文集. 上海: 上海交通大学出版社, 2008: 507-511
- [34] 李猛, 王永清, 田时炳, 等. 茄子青枯病抗性基因的遗传分析及其 AFLP 标记[J]. *园艺学报*, 2006, 33(4): 869-872
- [35] 朱华武, 姚元干, 刘志敏, 等. 茄子抗青枯病基因的 RAPD 标记研究[J]. *园艺学报*, 2006, 33(4): 869-872
- [36] 姜明. 甘蓝枯萎病抗性基因的分子标记研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2011
- [37] 朱洪运, 颀建明, 郁继华, 等. 结球甘蓝 AFLP, SSR, SRAP 标记高密度遗传图谱构建[J]. *华北农学报*, 2013, 28(3): 82-87
- [38] 王雪. 结球甘蓝抗 TuMV 基因的 AFLP 标记研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2004
- [39] 高金萍, 王超, 刘英. 结球甘蓝抗 TuMV 基因的 RAPD 和 SCAR 标记研究[J]. *植物病理学报*, 2008, 38(5): 549-552
- [40] 王神云. 结球甘蓝霜霉病抗性的 AFLP 分子标记的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2006
- [41] 阎瑾琦. 大白菜抗芜菁花叶病毒病基因的 RAPD 分子标记研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2000
- [42] 韩和平, 孙日飞, 张淑江, 等. 大白菜中与芜菁花叶病毒 (TuMV) 感病基因连锁的 AFLP 标记[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(4): 539-544
- [43] 张俊华, 潘春清, 张耀伟, 等. 大白菜抗芜菁花叶病毒基因 EST-PCR-RFLP 分子标记的研究[J]. *植物病理学报*, 2007, 36(6): 523-527
- [44] Li Q, Tong H, Zhang Z, et al. Inheritance and development of EST-SSR marker associated with turnip mosaic virus resistance in Chinese cabbage [J]. *Can J Plant Sci*, 2011, 91(4): 707-715
- [45] 李慧, 于拴仓, 张凤兰, 等. 与大白菜霜霉病抗性主效 QTL 连锁的分子标记开发[J]. *遗传*, 2011, 33(11): 1271-1278
- [46] 虞慧芳, 钟新民, 李必元, 等. 与大白菜抗霜霉病基因连锁的分子标记研究[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(15): 66-70
- [47] Matsumoto E, Yasui C, Ohi M, et al. Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp *pekinensis*) [J]. *Euphytica*, 1998, 104(2): 79-86
- [48] Kwang Soo Cho, Su Young Hong, Young Han Han, et al. Genetic analysis of clubroot resistance in chinese cabbage using single-spore isolates of *Plasmodiophora brassicae* and development of RAPD markers linked to its resistance gene [J]. *J Crop Sci Biotech*, 2008, 11(2): 101-106
- [49] Hayashida N, Takabatake Y, Nakazawa N, et al. Construction of a practical SCAR marker linked to clubroot resistance in Chinese cabbage with intensive analysis of HC3526 genes[J]. *J Japan Soc Hort Sci*, 2008, 77(2): 150-154
- [50] 王森, 王剑, 李宏博, 等. 利用抗、染根肿病 F₂ 群体构建大白菜 AFLP 遗传连锁图谱[J]. *华北农学报*, 2009, 24(2): 64-70
- [51] 刘亚培. 芸薹种蔬菜根肿病发病机理及其抗病分子标记的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013
- [52] 牟晋华, 徐文玲, 张一卉, 等. 大白菜软腐病抗性的分子标记筛选[J]. *山东农业科学*, 2008(4): 1-4
- [53] 韩香婷. 大白菜抗软腐病性状的 SSR 分子标记分析[D]. 北京: 首都师范大学, 2006

- [54] 李红双. 萝卜对芜菁花叶病毒病和黑腐病抗性的遗传分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009
- [55] 张海霞, 张海英, 于广建, 等. 与黄瓜抗枯萎病基因连锁的 RAPD 标记[J]. 华北农学报, 2006, 21(2): 121-123
- [56] 张海英, 张海霞, 张峰, 等. 黄瓜枯萎病抗性基因的连锁分子标记[J]. 生物技术通报, 2006(S1): 320-322
- [57] 王亚娟. 黄瓜(*Cucumis sativus* L) 枯萎病抗性相关基因分子标记研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005
- [58] 张桂华, 杜胜利, 王鸣, 等. 与黄瓜抗白粉病相关基因连锁的 ALFP 标记的获得[J]. 园艺学报, 2014, 31(2): 189-192
- [59] 崔洪宇, 张桂华, 杜胜利. 用于黄瓜白粉病抗病性鉴定的 SCAR 标记[J]. 中国蔬菜, 2009(20): 35-39
- [60] 聂京涛, 潘俊松, 何欢乐, 等. 黄瓜白粉病抗性遗传分析与连锁标记筛选[J]. 中国蔬菜, 2011(10): 45-49
- [61] Kennard W C, Poetter K, Dijkhuizen A. Linkages among RFLP, RAPD, isozyme, disease-resistance, and morphological markers in narrow and wide crosses of cucumber [J]. Theor Appl Genet, 1994, 89(1): 42-48
- [62] Horejsi T, Staub J, Thomas C. Linkage of random amplified polymorphic DNA marker to downy mildew resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L) [J]. Euphytica, 2000, 115(2): 105-113
- [63] 丁国华, 秦智伟, 周秀艳, 等. 黄瓜霜霉病抗病基因的 RAPD 及 SCAR 标记[J]. 西北植物学报, 2007, 37(9): 1747-1751
- [64] 范敏, 许勇, 张海英, 等. 西瓜果实性状 QTL 定位及其遗传效应分析[J]. 遗传学报, 2000, 27(10): 902-910
- [65] 许勇, 欧阳新星. 与西瓜野生种质抗枯萎病基因连锁的 RAPD 标记[J]. 植物学报: 英文版, 1999, 41(9): 952-955
- [66] 许勇, 张海英, 康国斌, 等. 西瓜抗枯萎病育种分子标记辅助选择的研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(2): 151-157
- [67] 牛晓伟, 唐宁安, 范敏, 等. 西瓜抗炭疽病的遗传分析和抗性基因定位研究[J]. 核农学报, 2014, 28(8): 1365-1369

责任编辑: 袁文业