

大豆病毒病的遗传标记^{*}

刘丽君

(黑龙江省农科院大豆所)

植物的遗传标记主要分为四大类:即形态学遗传标记、细胞学遗传标记、生化遗传标记及分子遗传标记。形态学遗传标记:主要是指可以观察到的一些性状,如抗病性、株高、产量性状等。细胞学遗传标记:主要包括染色体核型分析、染色体分带技术及染色体原位杂交技术;生化遗传标记:主要包括用同工酶和种子贮藏蛋白标记遗传性状;分子遗传标记:指在 DNA 分子水平上的标记。它是目前发展最为迅速的一类遗传标记,主要包括限制性内切酶酶切片段长度多态性(RFLP)及九十年代发展起来的建立在 DNA 聚合酶链式反应基础上的随机扩增的多态 DNA 即 RAPD 技术;扩增片段长度多态性(也称 AFLP)、微卫星(或称简单序列重复的多态性序列靶位(STS)技术)。由于遗传标记学的发展,开拓了遗传学的新领域,我国学术界在追踪世界同行的科学研究上开展了大量的工作。现将我们的工作和国内外关于病毒病的研究动向做一简要介绍:

1 大豆花叶病毒的形态抗性遗传标记

大豆花叶病毒的抗性遗传研究始于 70 年代,研究表明:大豆花叶病的抗性由核基因控制,由显性单基因控制。但也有人指出,抗性为复等位基因或隐性单基因控制。1982 年利姆(S. M. Lim)研究了苏文 97 对古德曼(R. M. Goodman)等人的 G_2 和 G_7 株系的抗性遗传,从 F_1 、 F_2 和 F_3 的表型分离结果发现该抗性由一对显性基因控制,抗病基因命名为 R_v 。多数研究结果支持这一结论,但也有不同结果。1980 年夸思(S. H. Kwon)证明大豆对大豆花叶病坏死株系的抗性由一对隐性基因支配。奥登发现对 R_v 为隐性的等位基因定名为 rsv^+ ,两个等位基因对感病等位基因是显性。鲁思(C. W. Koane, 1983)研究提出抗大豆花叶病基因和抗花生花叶病基因间存在连锁,其重组率为 3.7±8%。

胡蕴珠(1985 年)等应用杂交的三代遗传型和回交一代的遗传表型特征证实:对大豆花叶病毒 SMV 的两个本地株系 S_A 、 S_C 的抗性呈现一对显性基因控制的遗传。

利用 4 个抗病种质配制抗×感 4 个组合,其 F_1 、 F_2 群体对 SMV 1 号株系的抗性进行了鉴定和分析。实验结果证实:4 个抗病种质的 F_1 代,其成株抗性和种粒斑驳均表现为显性;成株抗性受两对互补显性基因控制,抗、感分离比例为 9:7;对种粒斑驳的抗性均受一对显性基因控制,其抗、感分离比例为 3:1(陈怡, 1994)。

2 大豆病毒病的分子生物学特点

关于大豆抗病和感病、病原物毒性和无毒性的生化机制从六十年代起就进行了大量的研究。但自八十年代起,由于分子生物学理论和方法与大豆病理学交叉、渗透后取得了明显进展,从而形成了分子病理学的新分支,这一学科的发展对大豆抗(或感)病性基因和病原物的无毒或毒性基因的特征、表达、调控和相互作用的研究起到了重要的推动作用。从我们的研究结果

* 收稿日期 1996-11-03

可以看到,大豆抗病毒物的分子表型特征为:

2.1 病毒病(SMV1号) 侵染大豆品种后,高抗病毒病大豆的叶肉细胞内蛋白亚基的表达与CK相比增加1~2条蛋白亚基,用于增强对病毒病的抗性,同时又保持原有基因表达的不改变,使植株在SMV病毒侵染下能够正常生长。如哈88-7704,增加了一条分子量为76KD的蛋白亚基;哈88-2501增加了二条分子量为54.4KD 44.5KD的谱带蛋白亚基,正常工作的蛋白亚基没有缺失。而感病品种,SMV1号侵染后,叶肉细胞内蛋白亚基增加了,但也伴随着一些正常表达和工作的蛋白亚基消失,虽然产生许多新蛋白用于克服病原菌的侵染,但由于SMV病毒的作用,使其正常工作的蛋白亚基的转录、表达等过程受到影响,使其合成减少或者不能完全表达,因而表现出病症。如合丰25,幼苗接种SMV1号后,叶肉细胞内蛋白亚基增加了三个分子量为93KD 58KD 47KD,但正常表达和工作的蛋白亚基一分子量为72KD,在接种条件下,没有表达

2.2 就防卫系统细胞保护酶分子表达的特征来看,研究结果也证实抗病与感病品种过氧化物酶、苹果酸脱氢酶同工酶的酶蛋白表达存在着明显的差异。感病品种,病毒侵染条件下,酶活性增强,产生了一些大的酶分子蛋白,这表明SMV1号的侵入确实能引起酶分子表达的变化,导致寄主本身某些代谢过程及组织结构的异常。感病品种叶绿素含量均低于CK,叶绿素a/b值略低于CK,蛋白质含量和过氧化物酶活性均高于CK。而抗SMV1号的大豆品种,叶肉细胞内的过氧化物酶同工酶的表达没有改变,只是酶活性有所增强。苹果酸脱氢酶是植物抗病性鉴定中的一种重要酶,不同抗病类型的大豆品种,在病毒的侵染条件下,苹果酸脱氢酶同工酶的表达类型差别不大,但酶活性变化较大,感病品种如黑农34 合丰25的苹果酶脱氢酶活性明显增强。而抗病品种如合丰33 黑农39的酶活性变化不大。

2.3 就细胞膜保护酶体系的变化来看,参试品种在SMV1号株系诱导后,感病品种超氧化物歧化酶活性变化较大。这说明病毒侵染下,首先使细胞膜受到破坏,防御体系受到严重的影响,因而使感病品种细胞膜免受过氧化物的两个保护酶受到影响,酶活性增强,用于增加对病毒的防御。这种由“活性过高”而产生对自身有害的变态反应,在免疫缺陷的个体上是非常突出的。病原侵染胁迫细胞积累了一种抑制过氧化氢酶的低分子物质,当过氧化物体膜受到损伤,过氧化氢酶外漏之后就受到这种物质的抑制。过氧化氢酶活性的增强,标志着病毒的胁迫强度。抗病品种体内产生抑制过氧化氢酶的物质很少,而感病品种则相反,病毒易使感病品种的细胞膜受到伤害。

2.4 SMV对大豆膜质过氧化水平的调节 叶肉细胞丙二醛含量的变化标志着细胞膜质过氧化的有毒代谢产物的积累程度。从我们的研究结果看到:大豆品种经SMV1号株系诱导后,感病品种黑农34 合丰25的丙二醛含量增加较多,达11.0%左右,而抗病品种,体内丙二醛含量积累较少,有的高抗材料,如黑农39 合丰33,病毒病作用下,体内产生的丙二醛含量比无病条件下还要低,说明高抗材料对膜脂的过氧化调节能力是很强的。

2.5 SMV蛋白酶的分析 1990年Ghabrial等用Amersham系统合成DNA的方法来合成SMV的cDNA,然后制作成含有cDNA的质粒,并用 P^{32} -SMV cDNA的探针进行杂交分析,表明SMV-NL₃蛋白酶的开放阅读框的核苷酸序列是一个17.54bp的SMV-DNA片断,发现SMV-NL₃蛋白酶的长度为433个氨基酸,并明确3NL₃蛋白酶的作用位点。

3 大豆病毒病的生化遗传

我们应用过氧化物酶和酯酶同工酶标记不同抗性品种及杂种后代的抗性遗传特点表明:抗病与感病亲本及其F₁代接种后的同工酶谱带存在着明显的差异。感病亲本及F₁代酶的活

性增强,酶带数较多,而且部分酶带变宽,颜色变深,抗病亲本则不发生变化。不同抗性品种杂交组合后代的 F_1 代酶谱表型与双亲有关。抗病 \times 抗病的 F_1 代酶谱与双亲完全相同,抗病 \times 感病的 F_1 代酶谱偏向抗性亲本,感病 \times 感病的 F_1 代产生了一个双亲所不具备的小分子新杂种酶带。未接种的感病亲本酶谱与抗病亲本相同,植株内部同工酶的变化与成株抗性相一致。

从不同抗性亲本及 F_1 代过氧化物酶同工酶的表达特性证实:SMV1号侵染后,抗性亲本Marshall和D82-198过氧化物酶同工酶呈现了三条酶带。感病亲本黑农16和合丰25均表现10条酶带。感病亲本接种后比不接种的ck多7条谱带。感病品种接种的也较抗病品种多7条谱带,其迁移率与上述7条相同,而且感病品种的0.32 0.46和0.66这三条酶带较宽,颜色较深,酶的活性明显增强。抗病 \times 抗病D82-198 \times Marshall的 F_1 代,成株表现为抗病,它的酶带与双亲完全相同,显示出了三条酶带。抗病 \times 感病的合丰25 \times 黑农16的 F_1 代产生双亲所不具备的新杂种酶带,其迁移率为0.72。抗病 \times 感病的6个 F_1 代酶谱倾向抗性亲本。在成株抗性上均表现为抗病,但由于不同抗感亲本间基因互作,在内部生化症状上略有差异, F_1 代酶谱的表现类型与亲本的抗性遗传多样性表达有关。

同工酶是生物体中分子表达的天然标记。对不同抗性的大豆品种接种SMV1号株系后,过氧化物酶、酯酶同工酶表现出明显的变化,同工酶谱型具有高度的特异性。我们的研究认为:抗病 \times 抗病的 F_1 代酶谱完全同于双亲,感病 \times 感病的 F_1 代则产生新的杂种酶带;抗病 \times 感病的 F_1 代酶谱基本倾向抗性亲本;正反交 F_1 代酶谱表现一致,表明无母体效应。因此,可利用同工酶表达的遗传特性,作为筛选抗病毒杂交后代的一种技术。

4 大豆病毒病分子标记

几年来,尽管人们从形态、生理生化细胞遗传等方面对其进行了大量的研究,但其遗传研究进展十分缓慢。八十年代初,产生了RFLP技术(限制性内切酶酶切片段长度多态性,简称:RFLP),它给各种生物,特别是大豆这样难以用传统方法深入进行遗传研究的作物带来了极大的方便,并使大豆的遗传研究有了一个质的飞跃。

RFLP反映了DNA水平上的变异,任何DNA序列的改变如插入、重排、缺失等都会改变原有酶切位点所在位置,从而使两酶切点间的DNA片段长度发生变化,这种变化经酶切、杂交及放射性自显影后,就会使RFLP带的特征有所改变,由此即可对生物的变异进行分析。

大豆RFLP图谱的构建为一些重要的农艺性状,特别是数量性状的遗传研究开辟了一条全新的途径。目前已经定位的性状遍及形态、发育、生殖以及品质等方面。如茎粗、叶宽已分别定位于R组与E组上,含油量被定位于第3连锁群上(1992),对质量性状的基因定位研究亦有多篇报导。Yu等(1994)对大豆抗花叶病基因的研究表明:抗SMV基因 R_{sv} 与两个RFLP位点(pA186, pK644a)相连锁。由于限制性核酸内切酶种类有限,一些生物的DNA序列抗限制性酶的内切作用以及RFLP方法在操作技术和分析上的复杂性,限制了RFLP在植物上大规模改良研究上的应用。故九十年代后,又出现了新的分子标记技术,这就是我们目前所谈到的RAPD技术(即:随机扩增多态性DNA random amplified polymorphic DNA)。由于RAPD方法在检测生物种内遗传分化中的独特优越性而受到植物育种学家的青睐。应用RAPD方法,以近等基因为试材,即可进行特定基因的定位研究。RAPD分析过程简单、快速,仅通过PCR反应就可完成,不使用Southern杂交。因此,这个方法近年来得到了广泛的应用。而在大豆抗花叶病毒病基因的定位及遗传距离的确定研究还没有开展,它将是今后一个时期的主要任务。

(参考文献略)