

芸薹属作物抗芜菁花叶病毒育种研究进展

王雪^{1,2} 刘玉梅^{1*} 李汉霞² 张扬勇¹ 方智远¹

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 华中农业大学园艺林学学院, 武汉 430070)

摘要: 本文从芸薹属作物芜菁花叶病毒的分子特性、TuMV株系分化及检测方法、芸薹属作物抗TuMV的遗传和分子标记、转基因创造新种质、抗源材料的筛选与抗病新品种选育等方面的研究进展进行了较系统地综述, 并讨论了存在的问题和前景。

关键词: 芸薹属作物; 芜菁花叶病毒; 抗性; 育种

中图分类号: S 63 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 05-0939-08

Advance in Research on TuMV-resistance Breeding of Brassica Crops

Wang Xue^{1,2}, Liu Yumei^{1*}, Li Hanxia², Zhang Yangyong¹, and Fang Zhiyuan¹

(¹ Institute of Vegetable and Flowers, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China; ² College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: Advance in the molecular characteristics and strain differentiation of *tumip mosaic virus* (TuMV), the inheritance and molecular marker of TuMV-resistance in *Brassica* crops, creation of new gem-plasm by transformation, the screening of TuMV-resistance and the breeding of new cultivars with TuMV-resistance were reviewed in this paper. The problems to be solved and prospects of TuMV-resistance breeding were discussed.

Key words: *Brassica* crop; *Tumip mosaic virus*; Resistance; Breeding

芜菁花叶病毒 (*Tumip mosaic virus*, TuMV) 属于马铃薯 Y 病毒科 (Potyviridae) 马铃薯 Y 病毒组 (*Potyvinus*), 几乎遍及世界各地, 寄主范围广, 但以芸薹属作物为主, 可导致作物严重减产, 甚至死亡。芸薹属作物主要包括 3 个基本种 [甘蓝 *B. oleracea* ($2n=2x=18$, CC)、芸薹 *B. campestris* ($2n=2x=20$, AA)、黑芥 *B. nigra* ($2n=2x=16$, BB)] 和 3 个复合种 [欧洲油菜 *B. napus* ($2n=4x=38$, AACC)、埃塞俄比亚芥 *B. carinata* ($2n=4x=34$, BBCC)、芥菜 *B. juncea* ($2x=4x=36$, AABB)]。

TuMV 主要是靠蚜虫以非持久性的方式传播, 据报道目前至少有 89 种蚜虫可传播^[1], 而采用杀虫剂不可能很快杀死全部的蚜虫以阻止病毒的传播, 仅靠杀虫剂杀蚜防治病毒病的效果不明显。利用植物的天然抗性可有效地控制病毒病的发生, 而且对生态环境没有破坏。为了解芸薹属作物对 TuMV 抗性机理并在生产中更好地加以利用, 国内外学者围绕芸薹属作物抗 TuMV 方面开展了大量的研究工作, 取得了可喜进展。

1 TuMV 的分子特性

Nicolas 等^[2] 采用反转录得到了第 1 个 TuMV 的外壳蛋白 (coat protein, CP) RNA 全长序列 (GenBank: D10927), 全长 9 830 个核苷酸, 内含 1 个由 9 486 个碱基组成的开放读码框架 (open reading frame, ORF), 该 ORF 编码的多聚蛋白由 3 863 个氨基酸组成。而在 ORF 上游的 129 个核苷酸为富含

收稿日期: 2004-12-27; 修回日期: 2005-06-06

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (5002010); 国家 '863' 项目 (2002AA207012)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: liuym@mail.caas.net.cn)

AU区域 (A: 腺嘌呤; U: 尿嘧啶), AU含量达 70%, 其二级结构为发夹结构。随后, 4个全长序列也相继发表 (GenBank: D83184^[3], AF169561^[4], AF394601, AF394602)。1996年 Ohshima等^[3]对 TuMV 的日本株系进行了测序, 表明它是由 9 833个核苷酸组成 (不包括 pbyA 尾巴)。Xu等^[5]对 TuMV 的 CP基因进行了测序, 表明 CP基因由 867个核苷酸编码的 288个氨基酸组成。Jenner等^[4]指出 TuMV 显性抗性基因 *TURB-01* 的抗性是由 TuMV 病毒的 *CI* (cylindrical inclusion) 基因决定的。Kundu等^[6]进一步研究表明抗源决定簇位于 *CI*蛋白 N-端第 103~119和第 224~237的氨基酸残基上。这些结果将为深入研究分析 TuMV 提供良好的信息资源。

2 芸薹属作物 TuMV 株系分化及其检测方法

国内外在其株系分化方面进行了大量的研究, 最初仅是根据寄主受害症状^[7]或寄主范围^[8]进行的粗略划分。1975年 McDonald等^[8]根据寄主范围把 TuMV 划分为两个株系: 型可以侵染全部的芸薹属作物, 而 型只能侵染其中的一部分。以后逐渐采用寄主鉴定谱进行 TuMV 株系的划分。1980年 Provvidenti^[9]筛选出 9个大白菜品种组成一套株系鉴定谱, 将纽约州的 TuMV 划分为 C₁、C₂、C₃、C₄ 株系, 1985年 Green等^[10]从上述鉴定谱中筛选出 4个大白菜品种作为新的鉴定谱, 把当地 TuMV 划分为 C₁、C₂、C₃、C₄、C₅ 株系。1990年, 冯兰香等^[11]采用 Green的方法对北京地区大白菜上的 31个 TuMV 分离物进行了株系分化研究, 表明 C₁~C₅ 株系都存在, 而且 C₄ 为主要株系, 占分离物的 45.2%, C₅ 致病力最强。国家“六五~八五”蔬菜抗病育种攻关课题十字花科蔬菜抗 TuMV 病害研究协作组, 鉴于 Green 鉴定寄主谱不能区分来自我国 6个大区 10个省市的 TuMV 分离物的株系分化, 选定 6个十字花科蔬菜品种组成一套株系鉴定谱, 将我国 TuMV 归纳为 7个株系, 即 Tu₁~Tu₇^[12]。为进一步提高识别株系水平, 制备单克隆抗体对 7个株系的抗原决定簇进行了测定, 从而将寄主鉴定谱与分子生物学鉴别方法结合起来^[12]。

Jenner等^[13]根据 TuMV 侵染一系列甘蓝型油菜表现出的症状, 将 124个 TuMV 分离物划分成不同的株系, 欧洲以 1、3、4株系为主, 这种划分在欧洲被普遍接受。Jenner等^[14]采用单克隆抗体从血清学上把 41个 TuMV 分离物划分成 3个株系群。Ohshima等^[15]将世界各地搜集的 76个分离物划分为两个致病型: 芸薹属 (B) 及芸薹和萝卜属 (BR) 类型。B 致病型分离物仅侵染参试的芸薹属大白菜、油菜和白菜品种, 而 BR 致病型分离物能够侵染参试的芸薹属 3个作物品种以及萝卜属的萝卜品种。2003年 Sanchez^[16]通过已有的 TuMV CP基因序列分析和限制性内切酶多态性分析, 将 60个不同分离物进行聚类, 分成 2个主要类群 [MB (大多数是芸薹属分离物) 和 MR (大多数是萝卜属分离物)] 以及 2个次要类群 [(在芸薹属和萝卜属之间的类群 (BR) 和以外的类群 (OBR)]。

芜菁花叶病毒的最大特点之一就是侵染寄主范围广泛, 不同的株系可以侵染不同的寄主, 而其株系的分化来源于其自身的变异。这种变异很可能是由于点突变和重组造成的^[13, 16, 17]。其 RNA 聚合酶缺乏 3' 5'校正的功能, 而且 TuMV 为单链 RNA, 不可能进行错配修复。因此, 在复制过程中大约每 10 kb 有 0.1~10个碱基的突变^[18]。此外, Hancock等^[19]发现在 TuMV 基因组 5'端区域存在复制子滑动现象。TuMV 的高频率突变正是其寄主广泛的主要原因, 因而给 TuMV 的防治带来更大困难。

目前对芸薹属作物中 TuMV 的常规检测多采用 ELISA 技术, 既可以定性分析^[20, 21], 又可以定量分析。施曼玲等^[22]建立了三抗体夹心 ELISA 检测 TuMV 方法, 检测病叶的灵敏度为 1 5 120倍, 检测提纯 TuMV 病毒绝对量为 219 ng。由于 ELISA 比生物测定及常规血清学方法灵敏、简便, 因此其应用越来越多^[23~26]。ELISA 检测方法也有不足之处, 其灵敏度有待提高, 而且存在非特异性反应^[27]。

近年来国内外在 TuMV 检测方法方面也取得了一些新进展。Suh等^[28]以获得的单克隆抗体, 利用免疫电镜技术 (immunosorbent electron microscopy, ISEM) 进行 TuMV 检测。邓晓东等^[29]以克隆的 TuMV 外壳蛋白基因的重组质粒 PGT3 为模板, 用 PCR 的方法合成了长度为 0.87 kb 的地高辛标记的双链 DNA 探针, 并用其进行了白菜、芥菜等蔬菜病毒的检测研究。庄木等^[30]利用 RT-PCR 技术, 建

立了一种简便、快速、准确地检测十字花科蔬菜芜菁花叶病毒的方法,可直接对田间病样简单处理后进行检测。

3 芸薹属作物 TuMV 抗性遗传规律

1984年钮心恪^[31]选用不同大白菜抗性材料对 F_1 、 F_2 、 BC_1 群体进行抗性分析,表明大白菜对病毒病的抗性受 2对相互独立的显性基因控制,植株只要具有其中 1对基因就表现抗性。1983年 Leung 等^[32]报道大白菜对 TuMV-C₁ 的抗性遗传受显性基因控制。1993年 Yoon等^[33]选用对 TuMV C₁ ~C₃ 株系均产生抗性的大白菜自交系 O-2为抗病材料,研究发现 TuMV 的抗性遗传受 2个隐性基因控制。Suh等^[34]用两个 TuMV 抗性材料 BP058和 O-2与两个感病材料 ssd31和 B18来研究不同株系间的相互作用,指出单株系的抗性受 1个或 2个显性基因控制,当用混合株系接种时,其抗性受 2个以上主效基因和几个微效基因控制。1995年曹光亮等^[35]采用双列杂交设计结合配合力分析,发现白菜对 TuMV 抗性为不完全显性。Il-Yong Kim^[36]采用 TuMV 的 K1、K2株系对大白菜抗病亲本 (O-2)、感病亲本 (SE、SS) 及其 F_1 、 F_2 、BC 群体进行抗病性鉴定,结果在组合 SS \times O-2中,抗性由 2个显性基因控制;在组合 SE \times O-2中,抗性由显性单基因控制,这表明同一抗病材料在不同的遗传背景下对相同 TuMV 株系的抗性受感病亲本的控制。

国内外开展甘蓝 TuMV 抗性遗传研究不少,但是得出的结论也不一致。Pound 等和 Walkey 最早报道甘蓝对 TuMV 的抗性遗传是不完全显性,推断可能是多基因控制的遗传^[12]。1968年 Williams 也曾经报道甘蓝对 TuMV 和 CaMV 的抗性为显性遗传^[12]。1986年 Pink 等^[37]报道孢子甘蓝对 TuMV 的抗性至少受 4个基因控制。1995年方智远等^[12]指出甘蓝对 TuMV 的抗性表现为显性遗传。王超等^[12]采用 F_2 以及回交世代群体进行抗病鉴定,表明甘蓝对 TuMV 的抗性为显性,细胞质效应不明显,推测甘蓝对 TuMV 的抗性是受两对独立分配的显性基因 R_1 和 R_2 控制。

Hughes 等^[25]鉴定了甘蓝型油菜和白菜型油菜的 42个材料对代表欧洲 3种主要株系的 TuMV 分离物的抗性,其抗性遗传表现也不一致, Jong Bai 2号对株系 1的抗性为单基因显性, P418957C 以及 Jin G 55对株系 4的抗性为单基因隐性; P418957C 对株系 3的抗性为隐性,推测有 2个独立位点中的 1个控制, 2个位点间不连锁 Jong Bai 1号对株系 3的抗性也为隐性,受 3个位点上的等位基因控制, 3个中的任何 2个具有上位性而且为抗性所必需。由此可以看出,对 TuMV 的不同分离物,在芸薹属不同作物中呈现出多种抗 TuMV 遗传规律。

4 芸薹属作物抗 TuMV 基因及其分子标记

迄今发表的芸薹属抗 TuMV 基因主要集中在 A 基因组,少部分在 C 基因组 (表 1),而且位于 C 基因组的 *TuRB02* 基因也呈现出数量性状位点抗性。*TuRB01* 是在油菜品种 'Westar' 中发现的,为显性基因,抗所有生理小种 1的分离物,抗病性几乎达到免疫级别,ELISA 检测没有发现病毒,位于 A 基因组 N6 染色体上。*TuRB01b* 与 *TuRB01* 一样,位于 *Brassica napus* 的 A 基因组 R6 染色体上,但由于接种生理小种不一致,所以命名为 *TuRB01b*。*TuRB02* 为数量性状位点,控制着感病的程度。*TuRB03* 为单显性基因,对分离物 CDN1 的抗性为高抗。*Ret01* (隐性基因) 与 *ConTR01* (显性基因) 协同控制着作物对 TuMV 的抗性,主要是控制病斑的扩散。曹必好等^[41]以甘蓝抗 TuMV 自交不亲和系 84075 和感 TuMV 自交不亲和系 9797 及其杂交的 F_2 代分离群体为材料,鉴定其抗病性表明,甘蓝抗 TuMV 性状符合孟德尔遗传规律,抗

表 1 芸薹属作物抗芜菁花叶病毒病基因

Table 1 Resistance gene to turnip mosaic virus (TuMV) in *Brassica*

基因名称 Name	所在基因组 Located genome	分离物 Isolates	参考文献 Reference
<i>TuRB01</i>	A	1	38
<i>TuRB01b</i>	A	1	39
<i>TuRB02</i>	C	CHN1, JPN1	38
<i>TuRB03</i>	A	CDN1	40
<i>Ret01</i>	A	1, 3, 4, 7, 8, 9, 12	39
<i>ConTR01</i>	A	1, 3, 4, 7, 8, 9, 12	39
<i>TuR2</i>	C	未知 Unknown	41

性基因为单显性基因, 并且克隆了抗 TuMV 相关基因 (*TuR2*), 但未对其功能作进一步分析。

在芸薹属作物中, 油菜上的相关分子标记研究较深入, 芸薹属其它作物上也有一些报道, 而关于芸薹属作物抗 TuMV 的分子标记研究则很少。Hughes等^[40]采用 CDN1 株系接种油菜 (*B. russica napus*) 后, 用分离群体分组分析法 (BSA) 选择回交后代中的抗、感单株建池, 寻找 AFLP 或 SSR 标记, 最终找到了 1 个与抗 TuMV 基因连锁的 AFLP 标记和 6 个 SSR 标记。闫瑾琦^[42]找到 2 个与大白菜抗 TuMV 基因紧密连锁的 RAPD 标记 (OPV181400 和 OPV18820), 其遗传距离分别为 9.5 cM 和 15.36 cM。韩和平^[43]以大白菜抗病自交系 Bp0058 和感病自交系 Bp0181 杂交后代的 F₂ 分离群体为试材, 采用 BSA 法筛选到 2 个与 TuMV 感病基因紧密连锁的 AFLP 分子标记, 利用 Mapmaker 作图软件统计分析, 其遗传距离分别为 7.5 和 8.4 cM。

作者以甘蓝感病自交系 01-16-5-7 和抗病自交系 20-2-5 杂交后代的 F₂ 分离群体为试材, 用侵染我国甘蓝的 TuMV 主导致病株系——TuMV-C₄ 对亲本和 F₂ 群体的各个单株进行室内人工接种, 利用酶联免疫吸附测定法对各单株 TuMV 的抗性进行鉴定。根据鉴定结果采用 BSA 法选取不同 F₂ 单株构建两对抗感池, 用 AFLP 不同引物组合筛选抗、感池以及对 F₂ 群体检测, 获得了与甘蓝抗 TuMV 基因连锁的 AFLP 分子标记。

5 转基因创造新的抗 TuMV 种质资源

卢爱兰等^[44]将 TuMV-CP 基因以整合方式导入甘蓝型油菜, 经分子检测和攻毒试验表明, 再生植株基因组 DNA 中整合了 TuMV-CP 基因, 且得到了表达。张海燕等^[45]采用农杆菌介导法与激光微束穿刺法将损伤诱导型启动子控制之下的商陆抗病毒蛋白 (PAP) cDNA 导入甘蓝型油菜“双低”品种 H165, 获得抗性再生植株, 经 PCR 扩增检测及 Southern 杂交分析表明, PAP cDNA 连同损伤诱导型启动子已稳定整合至油菜基因组。攻毒试验表明, PAP 的表达受损伤诱导型启动子控制, 转基因油菜植株对供试病毒 TuMV 具有不同程度的抗性。朱常香等^[46]将 TuMV-CP 基因导入大白菜中, 获得转化植株。经分子检测证明 TuMV-CP 基因已整合到大白菜的基因组中, 并在转录和翻译水平上进行了有效表达。转基因植株 T₁ 代的遗传分析表明, 外源基因在转基因植株后代中遵循 3:1 的孟德尔分离规律。抗病性测定结果表明转基因植株具有明显的抗病毒侵染能力。曹鸣庆等^[47]克隆了 TuMV 的核内蛋白酶基因 *NIa*, 通过真空渗透法转化白菜, 获得了抗 TuMV 转基因白菜种质材料。Lam 等^[48]将重组天花粉蛋白 (Trichosanthin, TCS) 外源施用 in 菜薹上, 延迟了 TuMV 的发生, 为抗 TuMV 育种提供了一条新途径。此外, 还有很多通过转 TuMV 相关基因来研究转基因沉默和基因互作方面的报道, 如 CP 基因^[49-51]、VPg 基因^[52]等。

6 抗 TuMV 材料的筛选和新品种选育

上世纪 80 年代以前, 白菜、甘蓝等作物的抗病性鉴定主要采用田间自然发病的方法。1983 年, 蔬菜抗病育种列入国家重点科技攻关计划, 开始系统地开展了人工苗期接种抗病鉴定。“六五”期间的育种目标为单一抗性, 如白菜、甘蓝抗 TuMV。“七五”期间则要求抗 TuMV 和抗黑腐病。“八五”期间要求抗 TuMV、抗黑腐病或霜霉病、兼抗 CMV 或根肿病等 3 种病害; 抗病育种攻关协作组对“六五~八五”期间 3 个五年计划开展的抗病性鉴定技术进行了全面总结, 系统地提出了大白菜、结球甘蓝、白菜等对上述病害单抗和多抗性鉴定方法与标准, 包括接种病原、接种方法、调查和分级等。

徐玲等^[53]对 28 份较重要的中国大白菜品种及亲本材料进行了苗期抗性鉴定, 分别筛选出 13、9、5 份高抗相应株系 C₁、C₄、C₅ 的材料。鹿英杰等^[54]采用⁶⁰Co 射线处理, 单株选择得到优良自交系后培育出大白菜新品种——龙辐二牛心, 经人工接种 TuMV 鉴定表明为抗病品种。刘克钧等^[55]选取 84 份经 TuMV、霜霉病菌 (*Peronospora parasitica*)、黑斑病菌 (*Alternaria oleracea*) 单抗鉴定后筛选出的大白菜高代自交系抗源材料, 于 1992~1993 年对其进行上述 3 种病害苗期人工诱发接种多抗性联

合鉴定, 获得 21 份三抗材料。李经略等^[56]对同一甘蓝植株用复合接种平行鉴定的方法, 从 249 份材料中筛选出对 TuMV 和黑腐病兼抗的材料 30 份, 筛选率为 12.05%, 表明目前用于育种的甘蓝材料中不乏兼抗种质存在。在“六五~九五”期间, 甘蓝抗源材料的筛选和创新一直被列为国家重点科技攻关研究内容, 由中国农科院蔬菜花卉研究所主持, 经与其它 5 个合作单位(西南农业大学、原陕西农科院蔬菜所、东北农业大学、江苏农科院蔬菜所、上海农科院园艺所)联合攻关, 共筛选出抗 TuMV、抗黑腐病兼抗 CMV 或根肿病的抗源 21 个, 为多抗性育种提供了新抗源。刘玉梅等^[57]研究了青花菜抗源材料的筛选和利用, 对 80 余份青花菜资源采用苗期多抗性人工接种和田间鉴定相结合的方法进行鉴定, 筛选出 1 份抗 TuMV 兼抗黑腐病的抗源材料, 1 份抗 TuMV 耐黑腐病的抗源材料, 并用该两个抗源材料与其它自交系杂交, 选出两个优良的杂交组合, 田间表现抗病毒病兼抗黑腐病, 且具有优良的经济性状。王述彬等^[58]对我国 982 份白菜种质资源材料进行苗期的 TuMV 抗病性鉴定, 结果表明, 表现高抗的材料有 9 份, 占鉴定总数的 0.92%; 抗病材料 49 份, 占鉴定总数的 4.99%。亚洲蔬菜研究发展中心(AVRDC)选育出抗 TuMV 大白菜材料 Wonye 20020-Wonye 20027 和 Wonye 20028-Wonye 20032^[59]。AVRDC 采用人工机械接种在温室和露地对 8 份埃塞俄比亚芥菜(*B. rassica carinata*)材料进行 TuMV 抗性鉴定, 结果 NRS-、RRS- 和 Mbeya Green 抗病性好^[60]。Hughes 等^[25]对甘蓝型油菜和白菜型油菜的 42 个系进行 TuMV 的抗性筛选, 分别获得了对不同 TuMV 株系的抗病材料(Jong Bai 1、2 号, P418957C 和 Jin G 55)。以上鉴定方法对于抗病育种具有指导作用, 这些抗源在后来的抗 TuMV 育种中已得到很好地利用。

经过 TuMV 抗病鉴定获得的抗源材料已广泛地应用于优良杂交组合的配制中, 育成一大批优良杂交新品种, 并在生产中得到大面积的推广应用。如: 福油 4 号、湘油 10 号、中油 821 等油菜品种; 北京新三号、秦白 3 号、豫新 1 号^[61]、天正秋白一号^[62]、矮抗 6 号^[63]、暑绿^[64]、中白 66、中白 78、中白 80^[65]、东农 903 等大白菜品种; 中甘 8 号、中甘 9 号、中甘 18 号、中甘 19 号、中甘 20 号、西园 4 号、秦甘 12 号、东农 608、黑丰^[66]、中甘 22^[67]等甘蓝品种; 中青 2 号^[68]、上海 1 号等青花菜品种; 云山 1 号、丰花 60、津雪 88^[69]等花椰菜新品种。

7 问题与展望

TuMV 的不同分离物在芸薹属不同作物中呈现出多种抗 TuMV 遗传规律, 推测原因一方面是由于不同作物抗 TuMV 的方式不一致, 导致其抗 TuMV 遗传规律的不同, 另一方面由于 TuMV 株系的分化而导致其致病机理发生了变化, 因而作物相应表现出不同的抗病机制, 这在一定程度上使抗 TuMV 育种具有更大的难度。这就要求深入开展 TuMV 的病理学研究, 包括病原菌的生理生化反应、寄主范围、症状反应、人工接种鉴定方法以及寄主与病原物相互关系的研究。

选用抗病品种是具有广阔前景的病害防治方式。尽管国内有关芸薹属作物抗 TuMV 育种研究早在“六五”期间就已经开始, 并选育出不少抗性材料和抗性强的品种在生产中推广应用, 但从当前生产和市场需求看, 我国的抗病育种工作与发达国家还存在一定的差距。我国开展抗 TuMV 研究时间尚短, 可应用的抗源有限, 特别是一些病害如根肿病、霜霉病、黑斑病、软腐病、CMV 等在原来不是重要病害的地区有上升趋势, 因此需要培育抗多种病害、包括 TuMV 在内的优良品种。

今后一方面要继续开展种质资源的搜集、鉴定和优异抗源材料的创新, 另一方面要开展育种新技术和新方法的研究。在今后的抗病育种中, 常规育种仍占有重要地位, 但为了提高育种水平, 常规育种应与生物技术相结合。现有抗性基因的精确定位还不够, 随着分子生物学的快速发展, 分子标记定位和转基因技术将在抗 TuMV 育种中发挥越来越大的作用, 而且分子标记的使用将使抗性基因的早期选择和多抗性基因的累加成为可能。转基因技术可以创造新的抗病虫害材料, 而且在棉花、大豆、油菜等作物上已经取得了成功。在芸薹属蔬菜上, 由于目前其抗病性还不够理想, 而且生物安全性问题也受到了一定的限制, 因而为该项技术的应用带来了一些难题。随着高效表达载体的构建和转基因技

术的发展, 通过标记基因的去除了以及可靠的安全性评价等措施, 将更大地丰富有限的抗性种质资源, 为抗病育种发挥更大的作用。

参考文献:

- 1 Tomlinson J A. Epidemiology and control of virus disease of vegetables. *Annals of Applied Biology*, 1987, 110: 661 ~ 681
- 2 Nicolas O, Laliberté F. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA. *Journal of General Virology*, 1992, 73: 2785 ~ 2793
- 3 Ohshima K, Tanaka M. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic virus RNA Japanese strain. *Archives of Virology*, 1996, 141 (10): 1991 ~ 1997
- 4 Jenner C E, Sanchez F. The cylindrical inclusion gene of turnip mosaic virus encodes a pathogenic determinant to the *B. brassica* resistance gene *TuRB01*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13: 1102 ~ 1108
- 5 Xu P, Xu J P. Sequence analysis and expression in *E. coli* of turnip mosaic virus coat protein gene. *Chinese Journal of Virology*, 1994, 10 (2): 172 ~ 177
- 6 Kundu A K, Ohshima K, Sako N, Yaegashi H. Cross-reactive and major virus-specific epitopes are located at the N-terminal halves of the cylindrical inclusion proteins of turnip mosaic and zucchini yellow mosaic potyviruses. *Archives of Virology*, 2000 (7): 1437 ~ 1447
- 7 Pound G S, Walker J C. Differentiation of certain crucifer viruses by the use of temperature and host immunity reaction. *Journal of Agricultural Research*, 1945, 71: 255 ~ 278
- 8 McDonald J G, Hiebert E. Characterization of the capsid and cylindrical inclusion protein of three strains of turnip mosaic virus. *Virology*, 1975, 63: 295 ~ 303
- 9 Provvidenti R. Evaluation of Chinese cabbage cultivars from Japan and the People's Republic of China for resistance to turnip mosaic virus and Cauliflower mosaic virus. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1980, 105: 571 ~ 573
- 10 Green D K, Deng T C. Turnip mosaic virus strains in cruciferous hosts in Taiwan. *Plant Disease*, 1985, 69: 28 ~ 31
- 11 冯兰香, 徐玲, 刘佳, 钮心恪, 李秀生. 北京地区大白菜芜菁花叶病毒株系的鉴定. *中国蔬菜*, 1988, 4: 23 ~ 25
Feng L X, Xu L, Liu J, Niu X K, Li X S. The strain identification of turnip mosaic virus infected cabbage in Beijing region. *China Vegetables*, 1988, 4: 23 ~ 25 (in Chinese)
- 12 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展. 北京: 科学出版社, 1995. 5, 6, 22 ~ 25, 583 ~ 584, 624 ~ 626
Li S D. Advances in main vegetable crops breeding for diseases resistance in China. Beijing: Science Press, 1995. 5, 6, 22 ~ 25, 583 ~ 584, 624 ~ 626 (in Chinese)
- 13 Jenner C E, Walsh J A. Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special reference to European isolates. *Plant Pathology*, 1996, 45: 848 ~ 856
- 14 Jenner C E, Keane G J, Jones J E, Walsh J A. Serotypic variation in turnip mosaic virus. *Plant Pathology*, 1999, 48: 101 ~ 108
- 15 Ohshima K, Yamaguchi Y, Hirota R, Hamamoto T, Tomimura K, Zhongyang T, Sano T, Azuhata F, Walsh J A, Fletcher J, Chen J, Gera A, Gibbs A. The molecular evolution of turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology*, 2002, 83: 1511 ~ 1521
- 16 Sanchez F, Wang X, Jenner C E. Strains of turnip mosaic potyvirus as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. *Virus Research*, 2003, 94: 33 ~ 43
- 17 Chen J, Chen J P, Adams M J. Variation between turnip mosaic virus isolates in Zhejiang province, China and evidence for recombination. *Journal of Phytopathology*, 2002, 150: 142 ~ 145
- 18 Domingo E, Holland J J. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annual Review Microbiology*, 1997, 51: 151 ~ 178
- 19 Hancock J M, Chaleproum W, Dale J, Gibbs A. Replication slippage in the evolution of potyviruses. *Journal of General Virology*, 1995, 76: 3229 ~ 3232
- 20 许建平, 李德葆. 侵染花椰菜的芜菁花叶病毒及 RT-PCR扩增外壳蛋白基因研究. *植物病理学报*, 1998, 28 (2): 151 ~ 157
Xu J P, Li D B. Identification and amplification of coat protein gene of an isolate of turnip mosaic virus infected cauliflower. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1998, 28 (2): 151 ~ 157 (in Chinese)
- 21 Suh S K, Park H G, Green S K. Production of monoclonal antibodies against strains of turnip mosaic virus. *Journal of Korea Society for Horticultural Science*, 1996, 37: 52 ~ 57
- 22 施曼玲, 吴建祥, 郭维, 周雪平. 芜菁花叶病毒单克隆抗体的制备及检测应用. *微生物学报*, 2004, 44 (2): 185 ~ 188
Shi M L, Wu J X, Guo W, Zhou X P. Preparation of monoclonal antibodies to turnip mosaic virus and its application for the virus detection. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44 (2): 185 ~ 188 (in Chinese)
- 23 Ostrowska K, Lehmann P, Walsh J A, Kozubek E. Susceptibility of Polish winter oilseed rapes to turnip mosaic virus I. Virus detection in leaves of infected plants by ELISA test. *Genetica Polonica*, 1993, 34: 153 ~ 157
- 24 Walsh J A, Rusholme R L, Hughes S L, Jenner C E, Bambridge J M, Lydiat D J, Green S K. Different classes of resistance to turnip mosaic virus in *B. brassica rapa*. *European Journal of Plant Pathology*, 2002, 108: 15 ~ 20
- 25 Hughes S L, Green S K, Lydiat D J, Walsh J A. Resistance to turnip mosaic virus in *B. brassica rapa* and *B. napus* and the analysis of genetic inheritance in selected lines. *Plant Pathology*, 2002, 51: 567 ~ 573
- 26 Jenner C E, Wang X W, Ponz F, Walsh J A. A fitness cost for turnip mosaic virus to overcome host resistance. *Virus Research*, 2002, 86: 1 ~ 6

- 27 周雪平, 濮祖芹. 大豆花叶病毒外壳蛋白基因克隆及在病毒检测中的应用. 病毒学报, 1994, 10 (1): 81~85
Zhou X P, Pu Z Q. Construction and use of a cloned soybean mosaic virus (SMV) coat protein gene as probe for the detection of SMV. Chinese Journal of Virology, 1994, 10 (1): 81~85 (in Chinese)
- 28 Suh S K, Cha J C, Green S K, Park H G. Detection of TuMV strains with monoclonal antibodies in immunosorbent electron microscopy. Journal of Korea Society for Horticultural Science, 1996, 37: 248~251
- 29 邓晓东, 刘志昕, 潘俊松, 郑学勤. 地高辛标记的 DNA 探针和 D-ELISA 检测芜菁花叶病毒的比较. 热带作物学报, 1997, 18 (2): 48~52
Deng X D, Liu Z X, Pan J S, Zheng X Q. Comparison of digoxigenin labeled DNA probe and D-ELISA in detection of turnip mosaic virus. Chinese Journal of Tropical Crops, 1997, 18 (2): 48~52 (in Chinese)
- 30 庄 木, 王晓武, 郑文光, 娄 平, 方智远. 十字花科蔬菜芜菁花叶病毒的 RT-PCR 快速检测. 中国蔬菜, 2002, 5: 10~11
Zhuang M, Wang X W, Zheng W G, Lou P, Fang Z Y. Quick detection of TuMV in crucifer vegetable crops using RT-PCR. China Vegetables, 2002, 5: 10~11 (in Chinese)
- 31 钮心恪. 大白菜抗霜霉病、病毒病原始材料的筛选及抗性遗传的研究. 中国蔬菜, 1984, 4: 28~32
Niu X K. Screening of original material resistant to downy mildew and TuMV and its resistant inheritance research. China Vegetables, 1984, 4: 28~32 (in Chinese)
- 32 Leung H, Williams P H. Cytoplasmic male sterile *B rassic a campestris* breeding lines with resistance to clubroot turnip mosaic and downy mildew. Horticultural Science, 1983, 18 (5): 774~775
- 33 Yoon J Y, Green S K, Opena R T. Inheritance of resistance to turnip mosaic virus in Chinese cabbage. Euphytica, 1993, 69: 103~108
- 34 Suh S K, Green S K, Park H G. Genetics of resistance to five strains of turnip mosaic virus in Chinese cabbage. Euphytica, 1995, 81 (1): 71~77
- 35 曹光亮, 曹寿椿. 不结球白菜抗病育种研究. 南京农业大学学报, 1995, 18 (1): 106~108
Cao G L, Cao S C. Studies on breeding for disease resistance in non-heading Chinese cabbage. Journal of Nanjing Agricultural University, 1995, 18 (1): 106~108 (in Chinese)
- 36 Il-Yong Kim. Genetics and screening of resistance to turnip mosaic virus in Chinese cabbage (*B rassic a campestris* spp. *pekinensis*): [Master thesis] Korea: Seoul National University, 1995. 31~34
- 37 Pink, Sutherland D A R, Walkey G A. Genetic analysis of resistance in Brussels sprout to cauliflower mosaic and turnip mosaic viruses. Annals of Applied Biology, 1986, 109: 199~208
- 38 Walsh J A, Shapae A G, Jenner C E, Lydiate D J. Characterisation of resistance to turnip mosaic virus in oilseed rapa (*B rassic a napus*) and genetic mapping of TuRB01. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 99: 1149~1154
- 39 Rusholme R L. The genetic control of resistance to turnip mosaic virus (TuMV) in *B rassic a*: [Ph. D thesis] Norwich: University of East Anglia, 2000
- 40 Hughes S L, Hunter P J, Shapae A G, Kearsey M J, Lydiate D J, Walsh J A. Genetic mapping of the novel turnip mosaic virus resistance gene TuRB03 in *B rassic a napus*. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107 (7): 1169~1173
- 41 曹必好, 宋洪元, 雷建军. 结球甘蓝抗 TuMV 相关基因的克隆. 遗传学报, 2002, 29 (4): 646~652
Cao B H, Song H Y, Lei J J. Cloning a gene related to resistance to TuMV in cabbage. Acta Genetica Sinica, 2002, 29 (7): 646~652 (in Chinese)
- 42 闫瑾琦. 大白菜抗芜菁花叶病毒病基因的 RAPD 分子标记: [硕士论文] 北京: 中国农业科学院, 2000. 30~34
Yan J Q. RAPD markers linked to turnip mosaic virus-resistance gene in Chinese cabbage (*B rassic a rapa* L. ssp. *pekinensis*): [Master Degree Dissertation] Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2000. 30~34 (in Chinese)
- 43 韩和平. 大白菜抗芜菁花叶病毒病基因的 AFLP 分子标记的研究: [硕士论文] 北京: 中国农业科学院, 2003. 26~33
Han H P. AFLP markers linked to turnip mosaic virus-resistance gene in Chinese cabbage (*B rassic a rapa* L. ssp. *pekinensis*): [Master Degree Dissertation] Beijing: Chinese Academy of Agricultural Science, 2003. 26~33 (in Chinese)
- 44 卢爱兰, 陈正华, 孔令洁, 方荣祥, 寸守锐, 莽克强. 抗芜菁花叶病毒转基因甘蓝型油菜的研究. 遗传学报, 1996, 23 (1): 77~83
Lu A L, Chen Z H, Kong L J, Fang R X, Cun S X, Mang K Q. Transgenic *B rassic a napus* resistant to turnip mosaic virus. Acta Genetica Sinica, 1996, 23 (1): 77~83 (in Chinese)
- 45 张海燕, 周奕华, 党本元, 蓝海燕, 宋桂英, 王兰岚, 刘桂珍, 张丽华, 陈正华, 田颖川. 将商陆抗病毒蛋白 (PAP) cDNA 导入油菜获得抗病毒转基因植株. 科学通报, 1998, 23: 2534~2537
Zhang H Y, Zhou Y H, Dang B Y, Lan H Y, Song G Y, Wang L L, Liu G Z, Zhang L H, Chen Z H, Tian Y C. Transgenic *B rassic a napus* resistant to turnip mosaic virus with pokeweed antiviral protein cDNA. Chinese Science Bulletin, 1998, 23: 2534~2537 (in Chinese)
- 46 朱常香, 宋云枝, 张 松, 郭兴启, 温乎江. 抗芜菁花叶病毒转基因大白菜的培育. 植物病理学报, 2001, 31 (3): 257~264
Zhu C X, Song Y Z, Zhang S, Guo X Q, Wen F J. Production of transgenic Chinese cabbage by transformation with the CP gene of turnip mosaic virus. Acta Phytopathologica Sinica, 2001, 31 (3): 257~264 (in Chinese)
- 47 Cao M Q, Liu F, Yao L, David Bouchez, Colette Toumeur, Li Y, Christophe Robaglia. Transformation of Pakchoi (*B rassic a rapa* L. ssp. *chinensis*) by *Agrobacterium* infiltration. Molecular Breeding, 2000, 6: 67~72
- 48 Lam Y H, Wong Y S, Wang B, Wong R N S, Yeung H W, Shaw P C. Use of trichosanthin to reduce infection by turnip mosaic virus. Plant Science, 1996, 114: 111~117
- 49 Jan F J, Pang S Z, Fagoaga C, Gonsalves D. Turnip mosaic potyvirus resistance in *Nicotiana benthamiana* derived by post-transcriptional gene

- silencing Transgenic Research, 1999, 8, 203 ~ 213
- 50 Lehmann P, Jenner C E, Kozubek E, Greenland A J, Walsh J A. Coat protein-mediated resistance to turnip mosaic virus in oilseed rape (*B. rassaica napus*). Molecular Breeding, 2003, 11 (2): 83 ~ 94
- 51 Jan F J, Fagoaga C, Pang S Z, Gonsalves D. A single chimeric transgene derived from two distinct viruses confers multi-virus resistance in transgenic plants through homology-dependent gene silencing Journal of General Virology, 2000, 81: 2103 ~ 2109
- 52 Dunoyer P, Thomas C, Harrison S, Revers F, Maulel A. A cysteine-rich plant protein potentiates potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg Journal of Virology, 2004, 78 (5): 2301 ~ 2309
- 53 徐 玲, 冯兰香, 钮心恪. 中国大白菜对芜菁花叶病毒基因型株系的抗性鉴定. 中国蔬菜, 1990, 4: 15 ~ 16
Xu L, Feng L X, Niu X K. The identification of Chinese cabbage resistant to the TuMV strains China Vegetables, 1990, 4: 15 ~ 16 (in Chinese)
- 54 鹿英杰, 李光池. 应用⁶⁰Co 射线辐射育成龙辐二牛心大白菜新品种. 中国蔬菜, 1994, (1): 18 ~ 19
Lu Y J, Li G C. The development of new cabbage variety 'Longfu Emixun' with ⁶⁰Co rays China Vegetables, 1994, (1): 18 ~ 19 (in Chinese)
- 55 刘克钧, 朱月林, 侯喜林, 张蜀宁, 曹寿椿. 不结球白菜抗病育种的研究. 南京农业大学学报, 1997, 20 (3): 31 ~ 35
Liu K J, Zhu Y L, Hou X L, Zhang S N, Cao S C. Studies on breeding for disease resistance in non-heading Chinese cabbage Journal of Nanjing Agricultural University, 1997, 20 (3): 31 ~ 35 (in Chinese)
- 56 李经略, 李惠兰, 干正荣, 张恩慧, 鲁玉妙. 甘蓝对 TuMV 和黑腐病苗期兼抗性平行鉴定研究. 陕西农业科学, 1994, 1: 19 ~ 21
Li J L, Li H L, Gan Z R, Zhang E H, Lu Y M. The study on the identification of seedling resistance to the TuMV and black rot for cabbage Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 1994, 1: 19 ~ 21 (in Chinese)
- 57 刘玉梅, 孙培田, 方智远, 杨丽梅, 侯安福, 王晓武, 刘 佳, 冯兰香. 青花菜抗源材料的筛选和利用. 中国蔬菜, 1996, 6: 23 ~ 26
Liu Y M, Sun P T, Fang Z Y, Yang L M, Hou A F, Wang X W, Liu J, Feng L X. The evaluation and utilization of resistant materials in broccoli China Vegetables, 1996, 6: 23 ~ 26 (in Chinese)
- 58 王述彬, 袁希汉, 苏小俊, 庄 勇, 李 彬. 中国不结球白菜种质资源对芜菁花叶病毒的抗病性鉴定. 中国蔬菜, 2002 (1): 11 ~ 13
Wang S B, Yuan X H, Su X J, Zhuang Y, Li B. Identification on the resistance to turnip mosaic virus for the non-heading Chinese cabbage accessions in China China Vegetables, 2002 (1): 11 ~ 13 (in Chinese)
- 59 AVRDC Korea outreach program. In: Progress Report 1998, AVRDC, Shanhu, Taiwan, China, 1998. 108
- 60 AVRDC Evaluation of Ethiopian kale accessions for resistance to turnip mosaic virus. In: Progress Report 2000, AVRDC, Shanhu, Taiwan, China, 2000. 129 ~ 131
- 61 张晓伟, 原玉香, 耿建峰, 蒋武生, 韩永平, 高睦枪. 大白菜新品种 '豫新 1 号'. 园艺学报, 2004, 31 (2): 280
Zhang X W, Yuan Y X, Geng J F, Jiang W S, Han Y P, Gao M Q. A new Chinese cabbage hybrid - 'Yuxin 1'. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31 (2): 280 (in Chinese)
- 62 王翠花, 何启伟, 牟晋华. 抗病大白菜新品种 '天正秋白一号'. 园艺学报, 2001, 28 (4): 378
Wang C H, He Q W, Mou J H. A disease-resistant F₁ hybrid of Chinese cabbage (*B. rassaica campestris* sp. *pekinensis*) — 'Tianzheng Qibai 1'. Acta Horticulturae Sinica, 2001, 28 (4): 378 (in Chinese)
- 63 侯喜林, 曹寿椿, 管晓春, 金国良. 抗热白菜新品种 '矮抗 6 号'. 园艺学报, 2003, 30 (6): 762
Hou X L, Cao S C, Guan X C, Jin G L. A new heat-resistant non-heading Chinese cabbage variety 'Dwarf Resistant 6'. Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30 (6): 762 (in Chinese)
- 64 侯喜林, 曹寿椿, 张蜀宁, 张增翠, 王建军, 孙红霞. 优质白菜新品种 '暑绿'. 园艺学报, 2004, 31 (3): 421
Hou X L, Cao S C, Zhang S N, Zhang Z C, Wang J J, Sun H X. A new high-quality non-heading Chinese cabbage variety 'Shu L ü'. Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31 (3): 421 (in Chinese)
- 65 孙日飞, 张淑江, 李 菲, 章时蕃, 钮心恪. 中白系列大白菜新品种. 园艺学报, 2004, 31 (3): 420
Sun R F, Zhang S J, Li F, Zhang S F, Niu X K. Development of new Chinese cabbage varieties Acta Horticulturae Sinica, 2004, 31 (3): 420 (in Chinese)
- 66 方智远, 刘玉梅, 杨丽梅, 王晓武, 庄 木, 张扬勇, 孙培田. 我国甘蓝遗传育种研究概况. 园艺学报, 2002, 29 (增刊): 657 ~ 663
Fang Z Y, Liu Y M, Yang L M, Wang X W, Zhuang M, Zhang Y Y, Sun P T. A survey of research in genetic breedings of cabbage in China Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29 (suppl): 657 ~ 663 (in Chinese)
- 67 方智远, 刘玉梅, 杨丽梅, 王晓武, 庄 木, 张扬勇, 孙培田. 以胞质雄性不育系配制的早熟秋甘蓝新品种 '中甘 22'. 园艺学报, 2003, 30 (6): 761
Fang Z Y, Liu Y M, Yang L M, Wang X W, Zhuang M, Zhang Y Y, Sun P T. 'Zhonggan 22' — a new early autumn cabbage variety produced by CMS line Acta Horticulturae Sinica, 2003, 30 (6): 761 (in Chinese)
- 68 方智远, 孙培田, 刘玉梅, 杨丽梅, 侯安福. 青花菜杂种优势利用研究初报. 中国蔬菜, 1990, (6): 2 ~ 5
Fang Z Y, Sun P T, Liu Y M, Yang L M, Hou A F. Preliminary study on the utilization of heterosis in broccoli China Vegetables, 1990, (6): 2 ~ 5 (in Chinese)
- 69 孙德岭, 李素文, 张宝珍, 葛长鹏, 方文慧. 花椰菜新品种 '津雪 88'. 园艺学报, 1999, 26 (2): 138
Sun D L, Li S W, Zhang B Z, Ge W P, Fang W H. Breeding of cauliflower F₁ hybrid 'Jinxue 88'. Acta Horticulturae Sinica, 1999, 26 (2): 138 (in Chinese)