

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2012.01553



## 棉花抗黄萎病机制研究进展

徐 理 朱龙付 张献龙\*

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 湖北武汉 430070

**摘 要:** 棉花黄萎病是一种土传真菌维管束病害, 严重影响棉花产量和纤维品质。常规的防治手段可以局部控制但不能有效防治, 采用传统的抗病育种策略培育抗病品种成效缓慢, 因此对其防治一直是棉花生产上的难题。目前越来越多的研究集中在棉花对黄萎病的抗病机制方面。本文结合其他植物抗病研究进展从抗病基因介导的信号路径、乙烯在棉花与黄萎病菌互作中的作用、棉花对黄萎病菌的生理生化抗性以及棉花组织结构与黄萎病菌的抗性 4 个方面总结棉花抗黄萎病的机制, 以期对棉花抗病分子育种提供借鉴。

**关键词:** 棉花; 黄萎病; 抗病基因; 机制

## Research on Resistance Mechanism of Cotton to *Verticillium* Wilt

XU Li, ZHU Long-Fu, and ZHANG Xian-Long\*

National Key Laboratory for Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract:** *Verticillium* wilt in cotton caused by *Verticillium dahliae* is a soil-borne vascular disease, which results in serious loss in yield and fiber quality yearly. However, traditional strategy doesn't work very well to control the disease but the local control, and it isn't an efficient way to develop a new cotton variety with resistances to *Verticillium* wilt via the conventional method, and there are few successful reports with conventional breeding method for disease resistance improvement due to shortage of high resistance germplasm, so the control of this disease has been an obstacle in cotton production. Recently, more researches focus on the resistance mechanism of cotton to this disease. Coupled with results in other crops lately, here, we summarized the processes in cotton for controlling *Verticillium* wilt based on signal transduction of *R* gene, the putative role of ethylene in the interaction between cotton and *V. dahliae*, physiological and biochemical resistance as well as host structural resistance, and from which some suggestions may be inferred for molecular breeding in disease resistance.

**Keywords:** Cotton; *Verticillium* wilt; Resistance gene; Mechanism

棉花纤维作为纺织工业的重要原料使棉花成为全球重要的经济作物。棉花生长周期长, 不仅易受高温、低温、干旱等非生物环境影响, 还会遭到各种病虫害的危害而降低产量或纤维品质。棉花黄萎病于 1914 年在美国被首次发现后, 很快蔓延到世界上其他产棉国。1935 年随着从美国引种棉花黄萎病传入中国, 20 世纪 50~60 年代在部分省份造成危害, 20 世纪 90 年代后, 该病已经蔓延到全国各棉区<sup>[1]</sup>, 成为影响当前棉花生产的主要病害之一。

黄萎病是通过根部侵染的土传真菌维管束病害, 侵染后会引发棉花叶片失绿变黄, 萎蔫脱落, 严重时造成植株死亡, 严重威胁棉花产量及纤维品质。

黄萎病的致病菌在分类学上属于半知菌亚门, 淡色孢科, 轮枝菌属, 其中能引起棉花黄萎病的主要有两个种, 即大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* Kleb.)和黑白轮枝菌(*Verticillium albo-atrum* Reinke & Berth)。这 2 个种在形态、生理特性及寄主范围上均有较大差异<sup>[2]</sup>。20 世纪中国学者在全国范围内的调查发现, 主要棉区的棉花黄萎病菌以大丽轮枝菌为主, 大丽轮枝菌的寄主范围很广, 目前报道的已有 600 多种, 主要是锦葵科、豆科、十字花科和茄科等双子叶植物<sup>[3]</sup>。最新的基因组测序比较分析表明, 相对于黑白轮枝菌, 大丽轮枝菌具有更多的转座子、重复基因、参与信号转导和代谢调控的基因, 这可

本研究由国家公益性行业(农业)专项(3-19)和国家自然科学基金项目(30971822)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 张献龙, E-mail: xlzhang@mail.hzau.edu.cn, Tel: 027-87280510

第一作者联系方式: E-mail: appletears@163.com

Received(收稿日期): 2012-02-08; Accepted(接受日期): 2012-06-06; Published online(网络出版日期): 2012-07-03.

URL: [http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120703.0858.201209.0\\_007.html](http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20120703.0858.201209.0_007.html)

能与大丽轮枝菌的致病力和遗传变异更多样化有关<sup>[4]</sup>。由于大丽轮枝菌的寄主范围很广,容易受到环境和寄主变化的影响而产生新的生理型。而国内棉花生产以农户小田块种植模式为主,品种更换频繁,同一田地中黄萎病菌的类型可能有多种,这也是防控棉花黄萎病较为困难的原因之一。

长期的植物生产实践表明选育和种植抗病棉花品种是防治黄萎病的高效措施。但由于陆地棉抗黄萎病资源缺乏及田间抗病性鉴定结果受多种环境因素影响,传统育种方法选育抗黄萎病品种进展缓慢。随着植物抗病分子生物学和遗传学的发展,运用现代基因工程技术,进行抗病分子育种的条件已趋于成熟,但仍需更加深入理解植物抗黄萎病的机制,找到调控机制中的关键因子,为棉花抗病分子育种提供候选基因。本文将参考其他作物抗黄萎病研究结果总结目前棉花抗黄萎病机制研究进展,并结合本实验室的研究进展进一步提出可行性建议。

## 1 抗病基因介导的抗病反应

植物的抗病防御反应被一系列复杂的信号分子和转录调控因子调控,抗病基因(*R*基因)在识别病原菌和起始抗病信号路径中起着重要作用。目前关于*R*基因的研究主要集中在拟南芥、水稻、番茄和小麦等植物上,还未见从棉花中克隆主效抗病基因的报道。

国内外关于植物抗黄萎病机制的研究在茄科作物上开展得比较深入。Kawchuk等<sup>[5]</sup>从番茄中采用图位克隆法得到*Ve1*和*Ve2*两个抗黄萎病基因,它们是为位于同一基因座位的2个紧连的反向基因,均编码细胞表面的类受体激酶蛋白,由信号肽、N-端成熟区、LRRs重复区、跨膜结构域和C-端胞内短肽组成。*Ve*蛋白在植物细胞内介导的信号传导可能类似于哺乳动物的细胞生成素受体,配体首先与二聚体化的RLPs蛋白结合并导致胞外和胞内的结构域变化,胞内结构域能够和激酶相互作用,结合不同的信号因子而发生酪氨酸磷酸化作用,激活下游一系列信号传导反应<sup>[6]</sup>。随后的研究发现,只有*Ve1*能介导番茄对大丽轮枝菌1号生理小种的抗性。通过VIGS (virus-induced gene silencing)在番茄中的研究结果显示,*Ve1*介导的信号级联反应依赖于EDS1 (enhanced disease susceptibility 1)和NDR1 (nonrace-specific disease resistance 1),并发现MEK2 (MKK2,

MAP kinase kinase 2)和SERK3/BAK1 (BRI1-associated kinase 1)是*Ve1*信号路径的正调控因子<sup>[7]</sup>。2011年Fradin等<sup>[8]</sup>研究证实*Ve1*转化拟南芥后也能使拟南芥产生对黄萎病菌的抗性,并且所介导的信号路径与番茄中类似,茉莉酸信号路径在*Ve1*介导的抗性反应中具有重要作用。最近,VIGS技术在棉花上也得到了应用,通过农杆菌介导的VIGS在棉花上瞬时沉默一些基因,结果发现会对棉花黄萎病的抗性产生影响<sup>[9]</sup>。当沉默棉花中与*Ve1*、*NDR1*和*MKK2*同源的棉花基因*GhVe1*、*GhNDR1*和*GhMKK2*时,会导致棉花对黄萎病菌抗性的丢失,而沉默*GhNPR1* (non-expressor of pathogenesis-related genes 1)则对抗性的影响不大,表明*GhVe1*、*GhNDR1*和*GhMKK2*可能也是棉花抗黄萎病反应中的重要成分。推测棉花对黄萎病菌的抗性反应中可能也存在与番茄以及拟南芥相似的抗病机制。陈捷胤等<sup>[10]</sup>和Zhang等<sup>[11]</sup>分别从抗黄萎病的海岛棉海7124和Pima 90-53中克隆了与*Ve1*和*Ve2*同源的类受体蛋白基因,并在拟南芥中超量表达后能够增强拟南芥对黄萎病菌抗性。陈捷胤等<sup>[10]</sup>进一步通过芯片分析表明,超量表达*GbaVd1*和*GbaVd2*的拟南芥在病菌处理后,能够识别病菌信号,随后激活乙烯和茉莉酸信号转导途径,增强植物抗毒素的合成和细胞壁相关蛋白的表达,形成具有抗真菌活性的植物抗毒素和增强细胞壁的组织障碍,从而增强植物的抗病性。这与Gayoso等<sup>[12]</sup>通过分析2个番茄近等基因系LA3038 (*Ve/Ve*)和LA3030 (*ve/ve*)在受到黄萎病菌侵染时LA3038能迅速积累H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>并伴随PAL、POD的酶活升高以及木质素含量的增加等结论相似。以上结果显示已知的植物抗病信号网络中部分关键因子参与了植物抗黄萎病反应,不同物种在抗黄萎病机制上可能具有一定的保守性,这为我们后续研究棉花抗黄萎病机制提供了借鉴并为未来的棉花广谱抗病分子育种提供了思路或候选基因。

## 2 乙烯在棉花与黄萎病菌互作中的作用

植物抗病反应是受多种信号调控的信号传导网络,通过抗病信号的产生、放大以及相互作用,最终诱导一系列基因的表达而产生抗病反应。激素在这个过程中起着非常重要的作用。关于激素在棉花黄萎病抗病反应中作用的研究相对较少,这里重点介绍乙烯在棉花与黄萎病菌互作中的作用。

乙烯作为一种气态激素不仅在植物的生长发育

过程中起着重要作用, 而且在植物抗病反应中的报道也越来越多<sup>[13]</sup>。在拟南芥中通过对大量乙烯相关突变体的遗传和分子鉴定, 已基本确定了植物从乙烯生物合成、信号识别到转录调控的信号转导机制<sup>[14]</sup>。但是关于乙烯在植物抗病反应中的作用到底是作为信号分子激活抗病反应而增强植物的抗病性还是增强植物对病原的敏感性而使植物更加感病, 目前还没有定论。通常人们认为乙烯在植物抗病反应中的作用与植物和病原互作类型密切相关<sup>[15-16]</sup>。Zuo 等<sup>[17]</sup>用黄萎病菌 V991 接种海岛棉海 7124, 构建了受黄萎病菌诱导的抑制差减文库, 随后 Zuo 等<sup>[18]</sup>从上述文库中分离克隆得到 2 个在海岛棉中受病菌诱导表达的乙烯信号传导途径相关基因 *GbERF1* 和 *GbERF2*。外源乙烯处理和黄萎病菌接种都能诱导 *GbERF1* 和 *GbERF2* 基因快速表达, 暗示它们可能在海岛棉抵御黄萎病的防卫反应中具有一定作用。通过在烟草中超表达 *GbERF2* 发现, 转基因烟草能够调控乙烯诱导相关基因的表达, 并激活一些 PR 蛋白的表达, 增强了烟草对褐斑病的抗性<sup>[17-18]</sup>。2011 年 Xu 等<sup>[19]</sup>和 Wang 等<sup>[20]</sup>分别利用基因表达谱和蛋白组学双向电泳技术分析海岛棉海 7124 受黄萎病菌诱导的基因表达, 发现了一系列与乙烯合成以及乙烯信号传导相关的基因, 如 *ACO1*、*ACO3*、*EIN2* 和 *ERF1*。Xu 等<sup>[19]</sup>进一步的表达分析表明, 这些基因均受黄萎病菌诱导表达并在抗病和感病棉花材料中具有不同的表达模式, 如 *ACO1* 基因在接菌后的抗病材料海 7124 中的诱导速度和表达量都明显高于感病的陆地棉材料 YZ-1。而 *EIN2* 在海 7124 和 YZ-1 中则具有类似的表达模式, 但其下游信号因子 *ERF1* 基因在 2 个材料间具有与 *ACO1* 基因相似的表达模式, 由此推测棉花有可能通过提高乙烯合成以及信号传导路径等蛋白的表达从而激活乙烯防卫反应而增强棉花对黄萎病菌的抗性, 抗感棉花材料可能在 *EIN2* 介导的抗病信号网络中产生分支, 而 *ERF1* 介导的乙烯下游信号路径可能参与抗病反应过程。

但人们早期的研究认为乙烯是导致感病的陆地棉在黄萎病发生时叶片黄化萎蔫脱落的直接原因之一<sup>[21]</sup>。Veronese 等<sup>[22]</sup>利用各种激素响应的突变体研究表明, 野生型拟南芥相对于乙烯不敏感的突变体 *etr1-1* 接种黄萎病菌后具有明显的叶片失绿症状, 推测黄萎病菌有可能通过诱导寄主产生更多的乙烯来加速寄主衰老而促进黄萎病的发生。Pantelides 等<sup>[23]</sup>

进一步研究乙烯信号路径在植物抗黄萎病中作用时发现只有乙烯受体突变体 *etr1-1* 对黄萎病菌的抗性增强了, 黄萎病菌在该突变体维管束中的生长才受到显著抑制, 并且在 *etr1-1* 接种黄萎病菌后 *PR-1*、*PR-2*、*PR-5*、*CHI-1*、*CHI-2* 和 *Myb75* 等抗病响应基因的表达都显著上调。此外乙烯的另一正调控因子突变体 *ein3-1* 也能增强对黄萎病的抗性<sup>[8]</sup>, 但同时乙烯的其他正调控因子如 *ein2-1*、*ein4-1* 和 *ein6-1* 却相对于野生型更加感病<sup>[24]</sup>, 并且 *Ve1* 所介导的抗性反应并不依赖于乙烯信号路径<sup>[8]</sup>。

以上结果表明乙烯在植物与黄萎病菌互作中的作用非常复杂, 乙烯在植物与病原互作过程中的时空变化及生物量的多少可能对于植物抗性的产生或感病性增强的分化具有重要作用。通常人们认为乙烯与茉莉酸两者共同作用于寄主对腐生营养型病原菌的抗性反应, 两者介导的抗病下游信号网络存在某些交叉<sup>[25]</sup>, 在适当的时候乙烯下游信号分子可能通过与茉莉酸信号网络互作共同参与植物抗黄萎病反应, 但其具体机制仍不清楚。同时研究中所采用的接种方法及环境因素对黄萎病发生的影响导致接种结果的不稳定也加大了研究非主效抗病基因位点在植物与黄萎病菌互作中作用的难度。

### 3 棉花对黄萎病菌的生理生化抗性

当植物受到病原菌侵染时相关组织能够积累植物抗毒素, 如棉酚、植保素、单宁等, 这是植物抗病防卫反应的一个重要方面<sup>[26]</sup>。棉酚作为一种重要的植物抗毒素在棉花抗病和抗虫过程中起着重要作用, 有关棉酚及半棉酚的生物合成、调控及功能也是棉花抗黄萎病研究中的重要方面。

Mace 等<sup>[27]</sup>对类萜物的研究中发现脱氧半棉酚(dHG)对黄萎病菌的毒性大于脱氧半棉酚甲醚、半棉酚和半棉酚甲醚; 黄萎病菌侵染棉花时能引起棉花中柱组织及幼叶内浓缩单宁含量显著增加。随后 Mace 等<sup>[28]</sup>通过组织化学染色的方法对受黄萎病菌侵染后的抗病材料海岛棉茎秆木质部中的 dHG 染色, 结果发现只有在薄壁组织以及黄萎病菌菌丝体中能检测到 dHG 以及其他一些萜烯类物质。基因表达分析表明, 萜烯生物合成途径中的相关基因均受黄萎病菌诱导表达, 并且部分基因, 如 3-羟基-3-甲基谷氨酰 *CoA* 还原酶的表达速度在抗病的海岛棉中明显快于在感病的陆地棉中<sup>[29-30]</sup>。δ-杜松烯代谢途径是棉花倍半萜烯类次生代谢物的共有合成途径,

(+)- $\delta$ -杜松烯合成酶基因(CAD)是一种倍半萜烯环化酶,是这个代谢途径中的关键酶,催化棉花中棉子酚和相关的倍半萜烯植物抗毒素生物合成的途径中的第一个分支途径<sup>[31-32]</sup>。细菌性白叶枯病菌和黄萎病菌均能诱导(+)- $\delta$ -杜松烯合成酶基因的表达。用黄萎病菌处理(+)- $\delta$ -杜松烯合成酶基因 *CDNS* (*cad1-c4*) 受到抑制的棉花时,未发现棉花中棉子酚含量和(+)- $\delta$ -杜松烯合成酶基因表达量的变化;但细菌性白叶枯病菌处理的植株中 *CDNS* 基因的表达急剧下降。因此 *CAD* 基因可能是由多基因家族编码,包含一系列具有不同时空表达模式的基因,基因成员间参与植物抗病反应可能具有特异性<sup>[33]</sup>。此外该代谢途径还有一些修饰或调控类基因,如  $\delta$ -杜松烯-8-羟化酶基因和 *GaWRKY1*<sup>[34-35]</sup>。棉花类萜物类物质可能通过抑制黄萎病菌的生长来限制黄萎病菌进入木质部,减轻病害的发生。虽然从基因诱导表达及生理活性分析等方面证实棉酚等次生代谢物参与了棉花对黄萎病的抗性反应,但该代谢途径在棉花抗黄萎病基因网络中的位置、功能以及如何将其应用于棉花抗病育种仍有大量工作需要开展。

#### 4 棉花对黄萎病菌的组织结构抗性

植物的组织结构抗性包括固有的结构抗性和诱导的结构抗性。组织结构的诱导抗性是指植物受到病原菌浸染后经过一系列的分子调控机制,诱发植株体内的一系列代谢变化,在细胞水平上出现形态结构的改变,如细胞壁的木质化和其他一些物质的沉积导致薄壁组织增生,胼胝体、侵填体、周皮以及乳突等结构的形成等以抵抗外来病原菌的入侵和扩展,最终使植物获得抗性<sup>[36]</sup>。

研究发现,具有不同抗病性的棉花品种在组织结构方面存在较大差异,特别是维管束结构的差异。早在20世纪30年代,就有研究发现近乎免疫的埃及棉和抗病的海岛棉品种的维管结构木质化程度加强,并且含有大量淀粉贮存物的髓线,木质部细胞的间隙较小而细胞壁较厚,提高了棉花机械抗病性能,同时也大大阻止了黄萎病菌的侵入以及在植物体内的扩展,而感病品种则与之相反;研究发现在接种黄萎病菌后3~6 d,抗病棉花品种的次生木质部薄壁细胞只有23%左右会受到侵染,而感病品种的细胞入侵率为81%,并且抗病品种胼胝质的沉积也明显高于感病品种<sup>[37]</sup>。同时研究也证实,用大丽轮枝菌的激发子处理不同陆地棉品种下胚轴,

发现抗病品种 OR19 的下胚轴木质化速度和程度都大于感病品种 Acala1517-70<sup>[38]</sup>。此外,大量研究表明一些氧化还原酶类和水解酶类在棉花抗黄萎病抗性反应中起着重要作用,主要包括谷胱甘肽 S 转移酶、过氧化物酶、细胞壁蛋白和水解酶等。目前报道的一些棉花抗黄萎病相关的 cDNA 文库中都分离得到了编码这些蛋白酶的基因<sup>[18-19,39]</sup>。过氧化物酶的活性与棉花植株的抗性相关,接种病菌后,抗病品种中过氧化物酶的活性高于感病品种,这可能是因为过氧化物酶能促进细胞壁中木质素等次生物质的合成,从而影响植物的抗性<sup>[12,38,40]</sup>。而一些水解酶如几丁质酶和葡聚糖酶则能通过降解真菌的细胞壁而在棉花的抗病反应中起重要作用<sup>[41]</sup>。最近,本研究小组通过 RNA-Seq 大规模测序技术分析海 7124 接种黄萎病菌后抗病表达谱,发现苯丙环类物质代谢路径的相关基因在表达谱中得到富集。采用组织化学检测的方法对比分析接菌前后不同抗感材料海 7124 和 YZ-1 的木质素沉积和维管结构变化,并测定木质素含量,结果显示抗病材料的木质素合成增强并在次生壁中积累和沉积使维管结构增强了对病原菌的抗性,在海 7124 对黄萎病菌的抗性中起着重要作用<sup>[40]</sup>。

这些结果说明,棉花黄萎病作为一种从根部感染的维管束病害,固有的组织结构抗性以及受病原菌诱导的组织结构抗性在其中可能起着重要作用。如何找到病原诱导下或正常生长条件下强化根和维管组织细胞壁合成的关键调控基因对于创制广谱抗病棉花材料具有重要意义。

#### 5 棉花抗黄萎病机制与抗病育种展望

##### 5.1 棉花抗黄萎病信号路径研究的前景与疑问

自 Kawchuk 等<sup>[5]</sup>从番茄中采用图位克隆法获得抗黄萎病基因 *Ve1* 以来,人们对植物抗黄萎病的机制研究逐渐深入。研究发现拟南芥中也具有番茄 *Ve1* 产生抗性所需的信号路径,但并无与 *Ve1* 高度同源的基因<sup>[8]</sup>,而 Gao 等<sup>[9]</sup>通过 VIGS 技术也证实了上述信号路径关键因子在陆地棉对黄萎病的抗性中的重要作用。国内的陈捷胤等<sup>[10]</sup>和 Zhang 等<sup>[11]</sup>从海岛棉中克隆了与 *Ve1* 具有较高同源性的类受体蛋白基因,并证实拟南芥中能激活抗黄萎病路径,暗示已知的植物抗病信号网络中部分关键因子参与了棉花抗黄萎病反应,不同物种在抗黄萎病机制上可能具有一定的保守性,我们推测棉花对黄萎病菌的抗性反

应中有可能也存在与番茄以及拟南芥相似的抗病机制,这为进一步挖掘表达谱中的信息研究棉花抗黄萎病信号路径提供了参考。植物在各类抗病基因感应病原菌存在后,由水杨酸、茉莉酸和乙烯这3种主要与抗病相关的激素信号网络产生免疫反应。人们通常认为植物对腐生营养型病原菌抗性反应是通过茉莉酸和乙烯协同产生。众多表达谱分析表明乙烯参与了棉花对黄萎病菌的抗性反应<sup>[17,19-20]</sup>,并且在抗病材料海7124和感病的陆地棉材料YZ-1中具有不同的表达模式<sup>[19]</sup>。但通过对拟南芥各种乙烯受体及响应因子突变体的接种分析获得的相左结果却使人们对于乙烯在植物抗黄萎病中的作用更为疑惑<sup>[8,23]</sup>。我们对棉花接种黄萎病菌后进行体外乙烯利喷施,结果发现适当的低浓度乙烯能增强陆地棉的抗性,而更低浓度或高浓度乙烯下都明显有利于黄萎病发生,但单独将乙烯下游响应因子在棉花中超量表达能提高其对黄萎病菌的抗性(未发表数据)。因此我们推测乙烯的时空表达对植物的抗病性具有重要影响,其信号网络可能存在多方向分支,不同植物对乙烯的时空精确调控力度影响了植物对黄萎病菌的抗病反应。

现有的研究表明 *Ve1* 介导的植物抗黄萎病反应依赖于茉莉酸路径而与乙烯信号路径无关<sup>[8]</sup>。我们实验室最近发现一些棉花功能基因,如WRKY类转录因子、细胞色素P450酶在棉花中超量表达或抑制表达后能显著影响棉花对黄萎病的抗性(未发表数据)。表达谱分析及各种生理测定分析表明,这些基因表达模式的改变能显著影响茉莉酸的合成或信号路径,这可能是改变转基因棉花对黄萎病菌抗性的根本原因。而这些基因在棉花抗黄萎病信号网络中的位置还不确定,也是目前我们正在探索的主要目标。细胞壁结构的强化以及抗菌类物质的产生是病原菌分子模体诱发的植物抗性产生的基础,也是不同类型的抗病基因介导植物抗病反应的普遍策略,通常会使植物产生广谱抗病性。Xu等<sup>[40]</sup>研究发现抗病的海岛棉在接种黄萎病菌后木质素合成代谢路径基因表达水平或酶活强于陆地棉,这与Gayoso等<sup>[12]</sup>研究 *Ve1* 介导的抗病反应研究结果相类似,表明抗黄萎病基因介导的信号路径通过强化细胞壁结构并产生更多的抗菌类物质来对黄萎病菌产生抗性。因此如何在棉花抗黄萎病信号网络中鉴定出调控细胞壁结构或抗菌类物质产生的关键因子对于提高棉花抗病的广谱性和持久性具有重要意义。

国内对于棉花抗黄萎病的遗传进行了大量研究,但结论并不一致。多数专家倾向于抗病海岛棉相对于感病陆地棉,其抗病性主要由一对或少数主效基因控制,并且这种抗性针对不同类型的黄萎病菌具有相对的稳定性;但陆地棉材料间对黄萎病的抗性或耐性遗传要复杂得多,特别是利用多种黄萎病菌鉴定时抗性普遍表现为数量性状<sup>[42-43]</sup>。由于 *Ve1* 编码一个细胞表面的类受体激酶蛋白,因此人们推测植物对黄萎病的抗性可能是由黄萎病菌分子模体诱导的植物抗性,应该具有广谱性。但研究发现, *Ve1* 只能介导番茄和拟南芥对大丽轮枝菌1号生理小种的抗性<sup>[7]</sup>。国内棉花抗病育种家长期通过海岛棉和陆地棉杂交后回交进行定向抗病筛选,但进展甚微,表明海岛棉相对于陆地棉对黄萎病的抗性机制仍具有特殊性,其抗性可能并非一个 *Ve1* 基因或位点所决定。国内如河北农业大学、南京农业大学和中国农业科学院棉花研究所等多家单位长期开展了对棉花抗黄萎病位点的遗传和精细定位研究,但棉花基因组结构复杂,重复性高使得通过图位克隆棉花抗黄萎病基因或位点困难重重。随着未来棉花基因组测序的完成和解析,结合基因组重测序和高通量基因表达谱分析,对于解析和阐明棉花抗黄萎病机制将具有推动作用。

## 5.2 通过生物技术精确调控抗病基因时空表达可望提高棉花抗黄萎病能力

通过基因工程利用各种抗病相关基因或诱发抗病反应基因增强植物抗病性并应用于农业生产已在各种作物分子改良中得到广泛应用,国内外也有多家研究团队在棉花抗病基因工程上开展了类似工作。吴家和等<sup>[44]</sup>通过根癌农杆菌介导法将几丁质酶和 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶嵌合双价基因导入陆地棉品种冀合321和中棉所35。对转基因株系进行无底塑钵菌液浇根法鉴定和大田病圃鉴定,多个转化株系均表现不同程度的抗或耐黄萎病性,部分转基因纯合系的大田病情指数达到高抗水平。最近也有利用人工合成的抗菌肽、棉花病程相关蛋白及病毒促凋亡因子等转化植物能获得对棉花黄萎病的抗性<sup>[45-47]</sup>,但目前生产上还未有通过基因工程改良棉花抗性成功应用于棉花育种的实例。植物的生长发育和对环境胁迫的响应由一套复杂而精密的激素互作网络来调控,研究表明众多参与植物生长发育的激素,如生长素、赤霉素等也参与了植物免疫系统<sup>[25]</sup>。这可能是植物育种中抗性与产量或品质性状通常呈现负相

关的原因,而传统的育种方法和策略很难将这种连锁关系打断。CaMV35S 是基因功能研究和基因工程中最常用的启动子,具有组织表达范围广和表达量高的特点。而通常一些抗病信号分子或基因的组成型表达会对植物的生长发育和产量产生负效应,因而在育种实践中限制了这些抗病转基因棉花材料的应用。如何精确提高抗病基因的利用,减少对产量和品质的负效应需要精确的时空调控启动子,西南大学裴炎课题组通过特异调控棉花胚珠表面生长素的时空表达来提高棉花纤维衣分和改良纤维品质为通过基因工程精确提高棉花抗病性提供了新思路<sup>[48]</sup>,该研究团队从真菌中克隆的抗病基因在棉花中表达已显示出很强的抗病性,预示着基因工程在解决棉花抗病问题方面有很大的潜力。

### 5.3 加强病原与植物互作研究和两方面研究队伍的协同创新

在自然界中植物和病原菌具共进化关系,因此对植物抗病机制的阐明通常不仅依赖于植物抗病基因的获得和信号路径的解析,也依赖于对病原菌的致病机理和变异机制的理解。一些从病原,如病毒、细菌等侵染植物机制研究中获得的成功应用于棉花抗病材料创制的报道也说明了研究植物病原菌致病机制对棉花抗病育种的重要性<sup>[47,49]</sup>。因而分别从大丽轮枝菌和棉花两方面研究两者的互作以及两方面工作的及时交流对于阐明棉花抗黄萎病机制和对生产上持久有效防控棉花黄萎病的发生都很关键。随着大丽轮枝菌基因组测序的完成和其他农作物病原菌基因组测序工作的开展,新方法、新策略以及更多科研团队的参与都将促进棉花与黄萎病菌分子互作机制研究水平的提高。

棉花黄萎病由于在生产上的危害和影响已受到越来越多的关注,但作为一种慢性和从根部入侵的系统维管束病害决定了对其研究的复杂性。此外病原菌变异快、抗性鉴定易受环境因素影响、棉花抗性遗传复杂以及棉花遗传转化效率低等特点更加大了对其研究的难度,这也是棉花抗性机制和育种研究进展缓慢的重要原因。通过 20 世纪 70 年代全国协作陆地棉抗枯萎病种质资源的筛选、鉴定及应用,为我国棉花抗枯萎病育种做出了重大贡献。人们也曾以枯萎病抗病育种经验为参照对陆地棉进行多年抗黄萎病筛选,但结果并不理想。虽然黄萎病在 20 世纪 90 年代以后已成为影响中国棉花生产安全的主要病害,但对黄萎病菌变异和侵染机制以及棉花

抗黄萎病机制等基础研究的投入并未有显著提高。由于短期内不能产生明显的进展和成果,棉花黄萎病相关研究所能获得的资助也是断断续续或零散,这直接导致众多从事黄萎病菌和棉花抗性机制研究的基础科研队伍人员构成不稳定,并最终影响到近 30 年来我国棉花生产受黄萎病影响现状未有实质性改善,棉花黄萎病相关基础研究进展缓慢。因此稳定、高效的棉花与黄萎病菌研究队伍的建设和持续性的资助对于棉花行业健康发展和国家棉花生产安全都至关重要。

### References

- [1] Jian G-L(简桂良), Zou Y-F(邹亚飞), Ma C(马存). Current status and countermeasure of *Verticillium* wilt of cotton in China. *China Cotton* (中国棉花), 2003, (3): 13–14 (in Chinese)
- [2] Fradin E F, Thomma B P. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Mol Plant Pathol*, 2006, 7: 71–86
- [3] Bhat R G, Subbarao K V. Host range specificity in *Verticillium dahliae*. *Phytopathol*, 1999, 89: 1218–1225
- [4] Klosterman S J, Subbarao K V, Kang S, Veronese P, Gold S E, Thomma B P, Chen Z, Henrissat B, Lee Y H, Park J, Garcia-Pedrajas M D, Barbara D J, Anchieta A, de Jonge R, Santhanam P, Maruthachalam K, Atallah Z, Amyotte S G, Paz Z, Inderbitzin P, Hayes R J, Heiman D I, Young S, Zeng Q, Engels R, Galagan J, Cuomo C A, Dobinson K F, Ma L J. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS Pathog*, 2011, 7: e1002137
- [5] Kawchuk L M, Hachey J, Lynch D R, Kulcsar F, van Rooijen G, Waterer D R, Robertson A, Kokko E, Byers R, Howard R J, Fischer R, Prufer D. Tomato *Ve* disease resistance genes encode cell surface-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98: 6511–6515
- [6] Remy I, Wilson I A, Michnick S W. Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*, 1999, 283: 990–993
- [7] Fradin E F, Zhang Z, Juarez Ayala J C, Castroverde C D, Nazar R N, Robb J, Liu C M, Thomma B P. Genetic dissection of *Verticillium* wilt resistance mediated by tomato *Ve1*. *Plant Physiol*, 2009, 150: 320–332
- [8] Fradin E F, Abd-El-Halim A, Masini L, van den Berg G C, Joosten M H, Thomma B P. Interfamily transfer of tomato *Ve1* mediates *Verticillium* resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2011, 156: 2255–2265

- [9] Gao X, Wheeler T, Li Z, Kenerley C M, He P, Shan L. Silencing *GhNDR1* and *GhMKK2* compromises cotton resistance to *Verticillium* wilt. *Plant J*, 2011, 66: 293–305
- [10] Chen J-Y(陈捷胤). Cloning and Functional Analysis of *GbaVd1* and *Gbavd2*, LRR-TM Like, Disease Resistance Genes in *Gossypium barbadense*. PhD Dissertation of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2010 (in Chinese with English abstract)
- [11] Zhang Y, Wang X, Yang S, Chi J, Zhang G, Ma Z. Cloning and characterization of a *Verticillium* wilt resistance gene from *Gossypium barbadense* and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep*, 2011, 30: 2085–2096
- [12] Gayoso C, Pomar F, Novo-Uzal E, Merino F, de Ilarduya O M. The Ve-mediated resistance response of the tomato to *Verticillium dahliae* involves H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peroxidase and lignins and drives PAL gene expression. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 232
- [13] van Loon L C, Geraats B P, Linthorst H J. Ethylene as a modulator of disease resistance in plants. *Trends Plant Sci*, 2006, 11: 184–191
- [14] Broekaert W F, Delaure S L, De Bolle M F, Cammue B P. The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annu Rev Phytopathol*, 2006, 44: 393–416
- [15] Bari R, Jones J D. Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol Biol*, 2009, 69: 473–488
- [16] Stearns J C, Glick B R. Transgenic plants with altered ethylene biosynthesis or perception. *Biotechnol Adv*, 2003, 21: 193–210
- [17] Zuo K J, Qin J, Zhao J Y, Ling H, Zhang L D, Cao Y F, Tang K X. Over-expression *GbERF2* transcription factor in tobacco enhances brown spots disease resistance by activating expression of downstream genes. *Gene*, 2007, 391: 80–90
- [18] Zuo K J, Wang J, Wu W, Chai Y, Sun X, Tang K. Identification and characterization of differentially expressed ESTs of *Gossypium barbadense* infected by *Verticillium dahliae* with suppression subtractive hybridization. *Mol Biol (Mosk)*, 2005, 39: 214–223
- [19] Xu L, Zhu L, Tu L, Guo X, Long L, Sun L, Gao W, Zhang X. Differential gene expression in cotton defence response to *Verticillium dahliae* by SSH. *J Phytopathol*, 2011, 159: 606–615
- [20] Wang F X, Ma Y P, Yang C L, Zhao P M, Yao Y, Jian G L, Luo Y M, Xia G X. Proteomic analysis of the sea-island cotton roots infected by wilt pathogen *Verticillium dahliae*. *Proteomics*, 2011, 11: 4296–4309
- [21] Beyer E M. Ethylene metabolism during leaf abscission in cotton. *Plant Physiol*, 1979, 64: 971–974
- [22] Veronese P, Narasimhan M L, Stevenson R A, Zhu J K, Weller S C, Subbarao K V, Bressan R A. Identification of a locus controlling *Verticillium* disease symptom response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2003, 35: 574–587
- [23] Pantelides I S, Tjamos S E, Paplomatas E J. Ethylene perception via ETR1 is required in *Arabidopsis* infection by *Verticillium dahliae*. *Mol Plant Pathol*, 2010, 11: 191–202
- [24] Johansson A, Staal J, Dixelius C. Early responses in the *Arabidopsis-Verticillium longisporum* pathosystem are dependent on *NDR1*, JA- and ET-associated signals via cytosolic NPR1 and RFO1. *Mol Plant Microbe Interact*, 2006, 19: 958–969
- [25] Pieterse C M, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees S C. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol*, 2009, 5: 308–316
- [26] Nicholson R L, Hammerschmidt R. Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annu Rev Phytopathol*, 1992, 30: 369–389
- [27] Mace M E, Stipanovic R D, Bell A A. Toxicity and role of terpenoid phytoalexins in *Verticillium* wilt resistance in cotton. *Physiol Plant Pathol*, 1985, 26: 209–218
- [28] Mace M E, Stipanovic R D, Bell A A. Histochemical localization of desoxyhemigossypol, a phytoalexin in *Verticillium dahliae*-infected cotton stems. *New Phytol*, 1989, 111: 229–232
- [29] Liu C J, Heinsteins P, Chen X Y. Expression pattern of genes encoding farnesyl diphosphate synthase and sesquiterpene cyclase in cotton suspension-cultured cells treated with fungal elicitors. *Mol Plant Microbe Interact*, 1999, 12: 1095–1104
- [30] Joost O, Bianchini G, Bell A A, Benedict C R, Magill C W. Differential induction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in two cotton species following inoculation with *Verticillium*. *Mol Plant Microbe Interact*, 1995, 8: 880–885
- [31] Chen X Y, Wang M, Chen Y, Davisson V J, Heinsteins P. Cloning and heterologous expression of a second (+)-delta-cadinene synthase from *Gossypium arboreum*. *J Nat Prod*, 1996, 59: 944–951
- [32] Chen X Y, Chen Y, Heinsteins P, Davisson V J. Cloning, expression, and characterization of (+)-delta-cadinene synthase: a catalyst for cotton phytoalexin biosynthesis. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 324: 255–266
- [33] Townsend B J, Poole A, Blake C J, Llewellyn D J. Antisense suppression of a (+)-delta-cadinene synthase gene in cotton prevents the induction of this defense response gene during bacterial blight infection but not its constitutive expression. *Plant Physiol*, 2005, 138: 516–528
- [34] Luo P, Wang Y H, Wang G D, Essenberg M, Chen X Y. Molecular cloning and functional identification of (+)-delta-cadinene-8-hydroxylase, a cytochrome P450 mono-oxygenase

- (CYP706B1) of cotton sesquiterpene biosynthesis. *Plant J*, 2001, 28: 95–104
- [35] Xu Y H, Wang J W, Wang S, Wang J Y, Chen X Y. Characterization of *GaWRKY1*, a cotton transcription factor that regulates the sesquiterpene synthase gene (+)-delta-cadinene synthase-A. *Plant Physiol*, 2004, 135: 507–515
- [36] Huckelhoven R. Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annu Rev Phytopathol*, 2007, 45: 101–127
- [37] Ma C (马存). Researchs on Cotton *Verticillium* Wilt and *Fusarium* Wilt (棉花枯萎病和黄萎病的研究). Beijing: China Agriculture Press, 2007. pp 127–128 (in Chinese)
- [38] Smit F, Dubery I A. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *Verticillium dahliae* elicitor. *Phytochem*, 1997, 44: 811–815
- [39] McFadden H G, Chapple R, Defeyter R, Dennis E. Expression of pathogenesis-related genes in cotton stems in response to infection by *Verticillium dahliae*. *Physiol Plant Pathol*, 2001, 58: 119–131
- [40] Xu L, Zhu L, Tu L, Liu L, Yuan D, Jin L, Long L, Zhang X. Lignin metabolism has a central role in the resistance of cotton to the wilt fungus *Verticillium dahliae* as revealed by RNA-Seq-dependent transcriptional analysis and histochemistry. *J Exp Bot*, 2011, 62: 5607–5621
- [41] Dubery I A, Slater V. Induced defence responses in cotton leaf disks by elicitors from *Verticillium dahliae*. *Phytochem*, 1997, 44: 1429–1434
- [42] Wang H M, Lin Z X, Zhang X L, Chen W, Guo X P, Nie Y C, Li Y H. Mapping and quantitative trait loci analysis of *Verticillium* wilt resistance genes in cotton. *J Integr Plant Biol*, 2008, 50: 174–182
- [43] Jiang F, Zhao J, Zhou L, Guo W, Zhang T. Molecular mapping of *Verticillium* wilt resistance QTL clustered on chromosomes D7 and D9 in upland cotton. *Sci China (Ser C)*, 2009, 52(9): 872–884
- [44] Wu J-H(吴家和), Zhang X-L(张献龙), Luo X-L(罗晓丽), Nie Y-C(聂以春), Tian Y-C(田颖川), Chen Z-H(陈正华). Transgenic cotton plants of chitinase and glucanase genes and their performance of resistance to *Verticillium dahliae*. *Acta Genet Sin (遗传学报)*, 2004, 31(2): 183–188 (in Chinese with English abstract)
- [45] Munis M F, Tu L, Deng F, Tan J, Xu L, Xu S, Long L, Zhang X. A thaumatin-like protein gene involved in cotton fiber secondary cell wall development enhances resistance against *Verticillium dahliae* and other stresses in transgenic tobacco. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 393: 38–44
- [46] Rajasekaran K, Cary J W, Jaynes J M, Cleveland T E. Disease resistance conferred by the expression of a gene encoding a synthetic peptide in transgenic cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Plant Biotech J*, 2005, 3: 545–554
- [47] Tian J, Zhang X, Liang B, Li S, Wu Z, Wang Q, Leng C, Dong J, Wang T. Expression of baculovirus anti-apoptotic genes *p35* and *op-iap* in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) enhances tolerance to *Verticillium* wilt. *PLoS One*, 2010, 5(12): e14218
- [48] Zhang M, Zheng X, Song S, Zeng Q, Hou L, Li D, Zhao J, Wei Y, Li X, Luo M, Xiao Y, Luo X, Zhang J, Xiang C, Pei Y. Spatio-temporal manipulation of auxin biosynthesis in cotton ovule epidermal cells enhances fiber yield and quality. *Nat Biotechnol*, 2011, 29: 453–458
- [49] Miao W, Wang X, Li M, Song C, Wang Y, Hu D, Wang J. Genetic transformation of cotton with a harpin-encoding gene *hpaXoo* confers an enhanced defense response against different pathogens through a priming mechanism. *BMC Plant Biol*, 2010, 10: 67