

调查 研究

Investigations

29 个马铃薯品种(品系)抗晚疫病基因组成与抗病相关性分析

马 英¹, 赵冬梅^{1*}, 杨志辉¹, 胡朝月¹,
潘 阳¹, 张 岱¹, 薛 雪², 朱杰华^{1*}

(1. 河北农业大学植物保护学院, 保定 071000; 2. 新加坡利农私人有限公司北京代表处, 北京 100026)

摘要 由致病疫霉引起的马铃薯晚疫病是马铃薯生产中最具危害性的病害,明确现有马铃薯品种(品系)中抗病基因组成情况对于指导抗病品种合理布局及抗病育种具有重要意义。本研究利用农杆菌介导的无毒基因瞬时表达技术分析致病菌 8 个无毒基因在 29 个马铃薯品种(品系)中的分布情况。结果表明,品种间抗病基因组成各异,平均每个品种含有 4 个抗病基因。同时,不同抗病基因在品种中的分布频率也不同,抗病基因 *R1*(76%)、*Rpi-blb1*(66%)和 *Rpi-blb2*(66%)在品种中分布较普遍;而含抗病基因 *R3b*(45%)、*R4*(38%)和 *Rpi-vnt1*(34%)的品种较少。此外,品种中所含抗性基因的数量和品种室内抗性程度呈显著正相关($r=0.9156$, $P=0.0291$)。

关键词 马铃薯品种; 马铃薯晚疫病; 瞬时表达技术; 抗性基因

中图分类号: S 432.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2018522

Correlation analysis of genetic composition and disease resistance of 29 potato varieties (strains) against late blight

MA Ying¹, ZHAO Dongmei^{1*}, YANG Zhihui¹, HU Zhaoyue¹,
PAN Yang¹, ZHANG Dai¹, XUE Xue², ZHU Jiehua^{1*}

(1. College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000, China;

2. Singapore Agrolex Private Limited Beijing Representative Office, Beijing 100026, China)

Abstract Late blight, caused by *Phytophthora infestans*, is a devastating disease of potato. It is important to distinguish what kind of *R* gene contained in potato cultivar or potato breeding materials for resistant breeding to potato late blight and its control through management of different resistant cultivars. By using 8 avirulence genes as tool, the composition of resistance genes in 29 potato varieties (lines) was analyzed by *Agrobacterium*-mediated transient expression technique. The results showed that the composition of resistance genes in each variety was different, with an average of four genes in each. Resistant genes *R1* (76%), *Rpi-blb1* (66%) and *Rpi-blb2* (66%) were widely distributed in tested potato cultivars, while *R3b* (45%), *R4* (38%) and *Rpi-vnt1* (34%) were less. In addition, the number of resistance genes and indoor resistance level of tested varieties showed significant positive correlation ($r=0.9156$, $P=0.0291$).

Key words potato variety; potato late blight; transient expression; resistant gene

马铃薯是世界上第三大重要粮食作物^[1]。2015 年农业部把马铃薯主粮化工作列入重要议程^[2],我国马铃薯生产处于一个快速增长的时期。由致病疫霉 *Phytophthora infestans* 引起的马铃薯晚疫病是马铃薯生产中最具危害性的病害。目前对晚疫病的防治主要是化学

防治,不仅增加生产成本,而且造成环境污染以及土壤板结等问题。因此,在我国大力倡导化学药剂减量增效的背景下,如何快速开发抗病品种和高效、持久地使用它们成为晚疫病防控工作亟待解决的关键问题。

目前,国内部分马铃薯主栽品种和新育品种虽

收稿日期: 2018-12-20

修订日期: 2019-02-13

基金项目: 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-09-P18)

* 通信作者 E-mail:赵冬梅 zhaodongm03@126.com;朱杰华 zhujiehua356@126.com

对晚疫病表现不同程度抗性,但由于对这些品种的抗病遗传背景缺乏系统的了解,品种所含抗病基因还未知,使得我们无法从基因水平来判断品种抗病性是否丧失,品种抗性是否持久等问题。此外,利用这些品种进行抗病育种工作时多靠经验和田间抗病性鉴定,不利于育种过程中抗病基因的追踪和聚合^[3],严重阻碍了马铃薯品种的合理布局和推广,增加了晚疫病暴发流行的风险。

借助农杆菌介导的瞬时表达技术^[4]在马铃薯叶片上表达无毒基因,这些无毒基因会引发含有相应抗病基因马铃薯品种的过敏性坏死反应(HR, hypersensitive response),通过叶片的过敏性坏死反应可快速、有效地检测马铃薯品种中的抗病基因组成,在抗病育种中追踪抗病基因和为抗病基因聚合提供遗传资源^[5]。前人曾利用无毒基因的瞬时表达系统对多个马铃薯品种的抗病基因组成进行了分析,结果均表明,无毒基因可诱导含有相应抗病基因的马铃薯品种产生 HR 反应,但不含有相应抗病基因的马铃薯品种无反应(NR, no response)^[6-7]。目前,已被克隆的致病疫霉的无毒基因(*Avr*, avirulence gene)有 10 个,即 *Avr1*、*Avr2*、*Avr3a*、*Avr3b*、*Avr4*、*Avrblb1*、*Avrblb2*、*Avront1*、*AvrSmira1* 和 *AvrSmira2/Avr8*^[8]。2014 年,周晶等^[9]通过无毒基因瞬时表达技术检测出‘鄂马铃薯 3 号’有 *R1*、*R2*、*R3*、*R4* 和 *R10* 5 个抗病基因,‘93008’含有 *R2*、*R3* 和 *R4* 3 个抗病基因;2015 年,马红梅^[10]运用无毒基因瞬时表达技术对 17 个马铃薯材料进行了抗病基因的组成鉴定,结果表明,每个品

种平均含有 5 个抗病基因,并且这些品种所含的抗病基因的数量与其在田间的抗性表现相关,即高抗品种所含的抗病基因相对较多,感病品种所含抗病基因相对较少;2017 年,尹军良^[11]以 10 个致病疫霉菌无毒基因为工具,分析了 20 个马铃薯品种的抗病基因组成,发现各品种抗病基因数量和组成不同,并且供试品种抗病基因数量和病情指数(AUDPC)间呈显著负相关($r=0.70^{**}$, $P<0.05$),表明品种中抗病基因的增加可以提高品种的抗性水平。

本研究基于“基因对基因”学说,利用农杆菌介导的瞬时表达系统,在不同品种的马铃薯叶片上表达致病疫霉的 8 个无毒基因,通过是否产生过敏性坏死反应来判断 29 个马铃薯品种(品系)中抗病基因数量和组成情况,并分析马铃薯品种(品系)中抗病基因的数量和室内抗性水平之间的关系。研究结果可解析马铃薯品种抗病性遗传背景,更好地指导抗病品种合理布局,提高抗病育种效率,同时也可以进行基因聚合中辅助抗病育种工作。

1 材料与方法

1.1 供试马铃薯品种(品系)

供试的 29 个马铃薯品种(品系)由全国各地的育种单位和种薯生产公司提供,有些品种由于未被推广使用而用编号代替,各品种的抗性水平为保定市国家级马铃薯抗性鉴定站依据河北省地方标准《马铃薯抗晚疫病室内鉴定技术规范》进行室内抗性鉴定得到的结果,具体信息见表 1。

表 1 马铃薯品种(品系)来源及抗性水平

Table 1 Source and resistance level of potato cultivar

品种名称 Cultivar	品种提供单位 Source	抗性水平 Resistance level	品种名称 Cultivar	品种提供单位 Source	抗性水平 Resistance level
克新 13 号 Kexin 13	黑龙江省农业科学院克山分院	高感	HLJ-1	黑龙江省农业科学院克山分院	中感
荷兰 15 Helan 15	内蒙古农牧业科学院	高感	克新 1 号 Kexin 1	内蒙古农业大学	中感
慧薯 2 号 Huishu 2	河北省慧谷农业科技有限公司	高感	HB-4	河北省张家口市农业科学院	中感
HB-3	河北北方学院	高感	NMG-4	内蒙古中加生物科技有限公司	中感
HB-1	河北北方学院	高感	紫花白 Zihuabai	河北省张家口市农业科学院	中感
NKY-1	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	高感	冀张薯 8 号 Jizhangshu 8	内蒙古中加生物科技有限公司	中感
NMG-1	内蒙古农业科学院	高感	HB-6	河北省张家口市农业科学院	中感
NMG-2	内蒙古农业科学院	高感	中薯 3 号 Zhongshu 3	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	中感
NMG-5	内蒙古中加生物科技有限公司	高感	NKY-3	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	中抗

续表 1 Table 1(Continued)

品种名称 Cultivar	品种提供单位 Source	抗性水平 Resistance level	品种名称 Cultivar	品种提供单位 Source	抗性水平 Resistance level
HB-5	河北省张家口市农业科学院	高感	GS-1	甘肃省定西市农业科学研究所	中抗
JL-1	吉林省蔬菜花卉科学研究所	高感	GS-2	甘肃省天水市农业科学研究所	中抗
NKY-2	中国农业科学院蔬菜花卉研究所	中感	陇薯 6 号 Longshu 6	青海省农林科学院生物技术研究所	中抗
夏波蒂 Xiabodi	内蒙古中加生物科技有限公司	中感	克新 19 号 Kexin 19	黑龙江省农业科学院克山分院	高抗
GS-3	甘肃省定西市农业科学研究所	中感	HB-2	河北北方学院	免疫
NMG-3	内蒙古中加生物科技有限公司	中感			

1.2 无毒基因瞬时表达载体的构建

1.2.1 引物设计

根据 NCBI 数据库中 T30-4 菌株 *Avr1*、*Avr3a*、

Avr3b、*Avrblb1*、*Avr4*、*Avront1*、*AvrSmira1* 和 *Avrblb2* 的基因序列设计引物,引物由上海生工生物工程有 限公司合成。引物具体信息见表 2。

表 2 无毒基因引物序列¹⁾

Table 2 Primer sequence of avirulence genes

基因名称 Gene name	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	目的片段长度/bp Length
<i>Avrblb1</i>	<i>Avrblb1</i> -F	<u>CGGATCCGATGCGTTCGCTCCTG</u>	459
	<i>Avrblb1</i> -R	<u>CGAGCTCGTAGCTAGGGCCAACGTT</u>	
<i>Avrblb2</i>	<i>Avrblb2</i> -F	<u>CGGATCCGATGCGCAGTTTTTCTC</u>	303
	<i>Avrblb2</i> -R	<u>CGAGCTCGTCAGGACTTCGTCAAT</u>	
<i>Avr3a</i>	<i>Avr3a</i> -F	<u>CGGATCCGATGCGTCTGGCAATT</u>	444
	<i>Avr3a</i> -R	<u>CGAGCTCGTAATATCCAGT</u>	
<i>Avr3b</i>	<i>Avr3b</i> -F	<u>CGGATCCGATGCGCTTCCTGTTC</u>	684
	<i>Avr3b</i> -R	<u>CGAGCTCGTTAGAAATGTTTCTT</u>	
<i>Avront1</i>	<i>Avront1</i> -F	<u>CGGATCCGATGCGAGTGTACGCC</u>	462
	<i>Avront1</i> -R	<u>CGAGCTCGTCAAGCTCTAAT</u>	
<i>AvrSmira1</i>	<i>AvrSmira1</i> -F	<u>CGGATCCGATGCGTCTAAGCTCCACA</u>	661
	<i>AvrSmira1</i> -R	<u>CGAGCTCGTTATCCGAGGGGTT</u>	
<i>Avr4</i>	<i>Avr4</i> -F	<u>CGGATCCGATGCGCCTGA</u>	841
	<i>Avr4</i> -R	<u>CGAGCTCGTAAGATATGGGCCGTCT</u>	
<i>Avr1</i>	<i>Avr1</i> -F	<u>CGGATCCGATGTTTCGACCACGAC</u>	627
	<i>Avr1</i> -R	<u>CGAGCTCGTTAAAATGGTAC</u>	

1) 下划线为引入的酶切位点。

Underlined is the introduced restriction site.

1.2.2 基因组 DNA 的提取

将供试晚疫病菌株 JWD15-9(2015 年分离自河北省保定市)接种在黑麦培养基上,倒置在 18℃ 黑暗培养箱中培养 2 周。待菌丝长满培养皿后收集菌丝并采用改良的 CTAB 法^[12]提取基因组 DNA。

1.2.3 无毒基因的 PCR 扩增

以 JWD15-9 菌株的基因组 DNA 为模板对无毒基因进行扩增。PCR 扩增体系为 25 μL,包含 DNA 1 μL、10 μmol/L 上、下游引物各 1 μL、2×Cobuddy Master Mix(CWBIO,北京)12.5 μL、ddH₂O 9.5 μL。不同的无毒基因在扩增中采用不同的退火温度,具

体扩增程序见表 3。

1.2.4 无毒基因瞬时表达载体的构建

采用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(OMEGA, USA)回收 PCR 扩增的目的基因片段。利用 *Sca* I 和 *Bam*H I(NEB,USA)对回收产物和 pBI121 质粒进行双酶切。将双酶切后的 8 个目的基因片段分别和 pBI121-*Sca* I-*Bam*H I-cut 载体利用 T4 DNA Ligase(NEB, USA)进行连接,连接产物转化 DH5α 感受态细胞(北京全式金生物)。将转化得到的阳性质粒送上海生工生物工程有 限公司测序,测序正确的质粒转化农杆菌 GV3101 感受态细胞(河北农业大学杨文香老师惠赠)。

表 3 无毒基因频率检测的 PCR 扩增程序

Table 3 PCR amplification program for frequency detection of avirulence genes

基因名称 Gene name	预变性 Pre-denaturation	变性 Denaturation	退火 Annealing	延伸 Extend	循环数 Number of cycles	再延伸 Further extension	保存 Save
<i>Avr1</i>	94°C 2 min	94°C 30 s	59°C 30 s	72°C 30 s	30	72°C 2 min	10°C
<i>Avr3a</i>	94°C 2 min	94°C 30 s	57°C 30 s	72°C 30 s	30	72°C 2 min	10°C
<i>Avr4</i>	94°C 2 min	94°C 30 s	60°C 30 s	72°C 30 s	30	72°C 2 min	10°C
<i>Avrblb1</i>	94°C 2 min	94°C 30 s	63°C 30 s	72°C 30 s	30	72°C 2 min	10°C
<i>Avrblb2</i>	94°C 2 min	94°C 30 s	58°C 30 s	72°C 30 s	30	72°C 2 min	10°C
<i>Avr3b</i>	94°C 2 min	94°C 30 s	59°C 30 s	72°C 30 s	30	72°C 2 min	10°C
<i>AvrSmira1</i>	94°C 2 min	94°C 30 s	62°C 30 s	72°C 30 s	26	72°C 2 min	10°C
<i>AvrOnt1</i>	94°C 2 min	94°C 30 s	59°C 30 s	72°C 30 s	30	72°C 2 min	10°C

1.3 马铃薯叶片无毒基因瞬时表达

1) 农杆菌悬浮液制备:携带目的基因的农杆菌菌株划线分离获得单克隆,挑取单克隆在含有 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利福平的 LB 液体培养基中 28°C 振荡过夜培养,3 000 r/min 离心 15 min,弃上清,用 Infiltration Buffer(10 mmol/L MgCl₂、pH 5.6 的 10 mmol/L MES、150 μmol/L 乙酰丁香酮)重悬菌体,将 OD₆₀₀ 调至 0.5。室温静置 2 h 备用。

2) 选择叶片:当幼苗长到具 5~7 对复叶或出苗 40 d 左右时自植株顶部向下选取第 5~第 6 个健康、大小适中及无损伤叶片进行注射。

3) 注射:用 5 mL 不带针头的注射器装好菌液后自叶片背部二级叶脉基部进行注射,使菌液渗入叶片之中并充满二级叶脉之间但不能使叶片受损(图 1 左),每个无毒基因至少重复 8 次。

4) 标记与培养:注射完的叶片做好相应标记,复叶叶柄用吸水后的棉花包裹,置于铺有浸湿滤纸的托盘中培养,并用保鲜膜覆盖托盘保持湿度(图 1 右),托盘置于 24°C 恒温温室中,每天叶面喷雾 1 次,初 24 h 进行暗培养,后按光周期 L//D=12 h//12 d 进行培养。

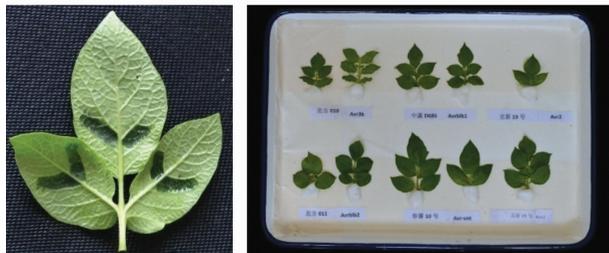


图 1 菌液注射(左)及标记与培养(右)

Fig. 1 Injection of *Agrobacterium* broth (left), marking and cultivating (right)

5) 鉴定标准:如图 2 所示 HR 为过敏性坏死反应,N 为非过敏性坏死反应。当无毒基因注射结果为 HR,阴性对照为 N 时,最终结果记录为 HR;当

无毒基因注射结果为 N,阴性对照为 N 时,最终结果记录为 N。

6) 结果观察与记录:离体表达两天后,每天固定时间观察记录反应情况并拍照。阳性对照和阴性对照反应正常时,对试验组结果进行统计分析,根据坏死和无坏死情况判断是否存在与注射无毒基因相对应的抗病基因。

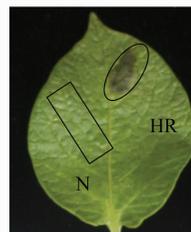


图 2 马铃薯叶片注射结果

Fig. 2 Injection result on potato leaves

1.4 无毒基因表达的验证

对注射无毒基因后未出现 HR 反应的叶片进行无毒基因的表达验证,以检验鉴定结果的准确性。将注射无毒基因后未出现 HR 反应的叶片,重新注射同一无毒基因,注射后第 3 天用灭菌剪刀将注射无毒基因部位剪下,置于离心管中,迅速用液氮冷冻,保存于-80°C 冰箱中,之后利用 RNA 提取试剂盒(CW-BIO,北京)和逆转录试剂盒(US Everbright Inc.,苏州)提取 RNA、逆转录,并以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,检测无毒基因是否表达。

2 结果与分析

2.1 马铃薯品种(品系)中抗病基因的组成

29 个供试的马铃薯品种(品系)中含有抗病基因的数量不同(表 3)。其中,‘陇薯 6 号’含抗病基因数量最多,含有 7 个抗病基因,分别为 *R1*、*R3a*、*R4*、*Rblb1*、*Rblb2*、*Rpi-vnt1* 和 *Rpi-Smira1*。‘GS-3’仅含有一个抗病基因 *R1*。‘HB-5’未检测到已知的 8 个抗病基因,其他品种(品系)含有 3~6 个抗病基因(表 4)。

表 4 农杆菌介导的无毒基因在不同马铃薯品种叶片上的瞬时表达结果¹⁾

Table 4 Expression of avirulence genes on potato cultivar leaves

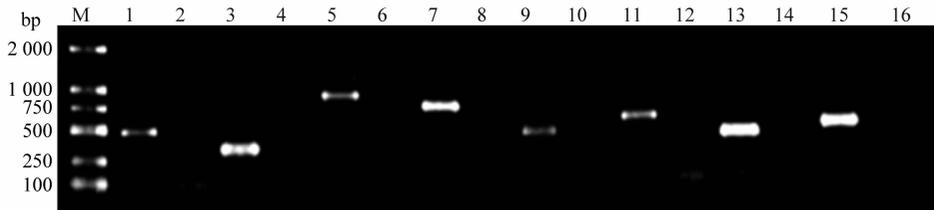
品种 Cultivar	无毒基因 Avirulence gene								
	<i>Avr1</i>	<i>Avr3a</i>	<i>Avr3b</i>	<i>Avr4</i>	<i>Avrblb1</i>	<i>Avrblb2</i>	<i>Avrvnt1</i>	<i>AvrSmira1</i>	
克新 13 号 Kexin 13	HR	N	HR	HR	N	HR	N	HR	
荷兰 15 Helan 15	HR	HR	N	HR	N	HR	HR	N	
慧薯 2 号 Huishu 2	HR	N	N	N	HR	N	HR	N	
HB-3	HR	HR	HR	N	HR	N	N	N	
HB-1	HR	N	HR	N	HR	N	N	N	
NKY-1	HR	N	N	N	N	N	HR	HR	
NMG-1	HR	HR	N	N	HR	HR	H	HR	
NMG-2	N	HR	N	N	N	HR	N	HR	
NMG-5	HR	HR	HR	HR	HR	N	HR	N	
HB-5	N	N	N	N	N	N	N	N	
JL-1	N	HR	HR	N	HR	HR	N	N	
NKY-2	HR	HR	N	N	HR	HR	HR	N	
夏波蒂 Xiabodi	HR	N	HR	N	HR	HR	N	HR	
GS-3	HR	N	N	N	N	N	N	N	
NMG-3	HR	N	N	N	HR	HR	HR	HR	
HLJ-1	N	N	HR	HR	HR	HR	HR	HR	
克新 1 号 Kexin 1	HR	HR	N	HR	HR	HR	N	N	
HB-4	HR	HR	HR	N	HR	N	N	N	
NMG-4	HR	N	N	HR	HR	N	N	HR	
紫花白 Zihuabai	HR	HR	HR	HR	HR	HR	N	N	
冀张薯 8 号 Jizhangshu 8	HR	HR	HR	N	N	N	HR	N	
HB-6	N	HR	N	N	N	HR	N	HR	
中薯 3 号 Zhongshu 3	HR	N	N	HR	HR	HR	N	HR	
NKY-3	N	N	N	N	HR	HR	HR	HR	
GS-1	HR	HR	HR	N	HR	HR	N	HR	
GS-2	N	N	HR	N	N	HR	N	HR	
陇薯 6 号 Longshu 6	HR	HR	N	HR	HR	HR	HR	HR	
克新 19 号 Kexin 19	HR	HR	N	HR	HR	HR	N	N	
HB-2	HR	HR	HR	HR	N	HR	N	HR	

1) HR: 过敏反应; N: 无过敏反应。
HR: Hypersensitive response; N: No hypersensitive response.

2.2 致病疫霉无毒基因表达验证

对未出现过敏性坏死反应的叶片进行无毒基因表达的验证,通过提取注射部位马铃薯叶片的 RNA 并反转录为 cDNA,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩

增,结果表明,未产生过敏性坏死反应的叶片均扩增得到了相应预期大小的条带(图 3),表明无毒基因均已经表达,只是检测的马铃薯品种(品系)中没有对应的抗病基因,因而并未产生过敏性坏死反应。



M: Marker 2000; 1: 提取自马铃薯材料‘NKY-1’的无毒基因*Avrblb1*; 2: *Avrblb1*的阴性对照; 3: 提取自‘HB-5’的*Avrblb2*; 4: *Avrblb2*的阴性对照; 5: 提取自‘NMG-2’的*Avr4*; 6: *Avr4*的阴性对照; 7: 提取自‘HB-4’的*AvrSmira1*; 8: *AvrSmira1*的阴性对照; 9: 提取自‘NKY-3’的*Avr3a*; 10: *Avr3a*的阴性对照; 11: 提取自‘HB-6’的*Avr1*; 12: *Avr1*的阴性对照; 13: 提取自‘GS-1’的*Avrvnt1*; 14: *Avrvnt1*的阴性对照; 15: 提取自‘HB-6’的*Avr3b*; 16: *Avr3b*的阴性对照
M: Marker 2000; 1: *Avrblb1* extracted from potato material ‘NKY-1’; 2: Negative control of *Avrblb1*; 3: *Avrblb2* extracted from ‘HB-5’; 4: Negative control of *Avrblb2*; 5: *Avr4* extracted from ‘NMG-2’; 6: Negative control of *Avr4*; 7: *AvrSmira1* extracted from ‘HB-4’; 8: Negative control of *AvrSmira1*; 9: *Avr3a* extracted from ‘NKY-3’; 10: Negative control of *Avr3a*; 11: *Avr1* extracted from ‘HB-6’; 12: Negative control of *Avr1*; 13: *Avrvnt1* extracted from ‘GS-1’; 14: Negative control of *Avrvnt1*; 15: *Avr3b* extracted from ‘HB-6’; 16: Negative control of *Avr3b*

图 3 无毒基因在马铃薯叶片中表达

Fig. 3 Expression of avirulence genes in potato leaves

2.3 马铃薯品种(品系)中抗性基因的出现频率

8 个抗病基因在所测试的 29 个品种(品系)中分布频率不同(图 4)。抗病基因 R1、*Rpi-blb1* 和 *Rpi-blb2* 分布频率较高,其中,R1 出现频率最高(76%),存在于 22 个品种中;*Rpi-blb1* 和 *Rpi-blb2* 存在于 19 个品种中(出现频率为 66%);抗病基因 R3a 和 *Rpi-Smira1* 分布比较均匀,R3a 存在于 16 个品种中(出现频率为 55%),*Rpi-Smira1* 存在于 15 个品种中(出现频率为 52%);抗病基因 R3b、R4 和 *Rpi-vnt1* 分布频率较低,R3b 存在于 13 个品种中(出现频率为 45%),R4 存在于 11 个品种中(出现频率为 38%),*Rpi-vnt1* 存在于 10 个品种中(出现频率为 34%)(图 4)。

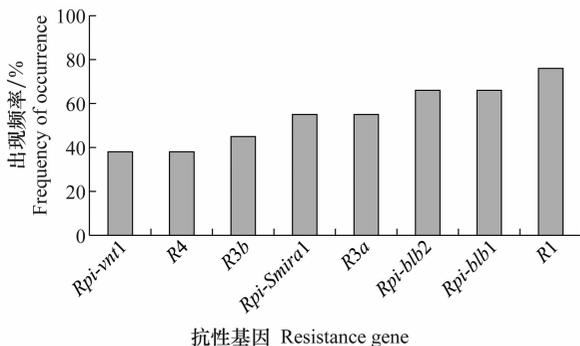


图 4 抗病基因在马铃薯品种(品系)中的分布情况

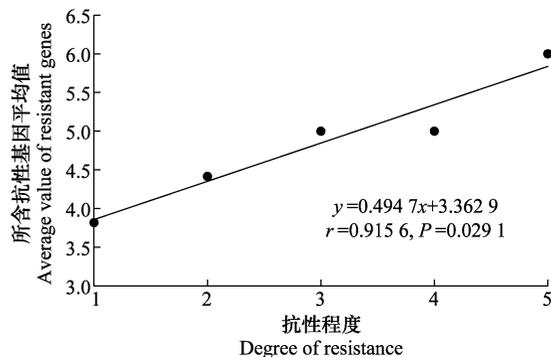
Fig. 4 Distribution of resistance genes in potato cultivars

2.4 抗病基因组成与抗病性相关性

根据河北省保定市国家级马铃薯抗性鉴定站的室内抗性鉴定结果可将供试的 29 个马铃薯品种(品系)分为 5 种抗病类型,其中高感 11 个、中感 12 个、中抗 4 个、高抗 1 个、免疫 1 个。对马铃薯品种(品系)中所含抗性基因的个数与马铃薯品种(品系)的抗性水平进行相关性分析。结果表明(图 5),所含抗性基因的个数和品种抗性水平呈显著正相关($r=0.9156, P=0.0291$),表明品种的抗病性水平会随抗病基因数量的增加而提高。

3 讨论

根据基因对基因假说^[13],以无毒基因为工具,通过农杆菌介导的瞬时表达系统可分析马铃薯品种中抗病基因组成以及在抗病育种中追踪抗病基因和帮助抗病基因聚合^[5]。在本研究中,我们以致病疫霉的 8 个无毒基因(*Avr1*、*Avr3a*、*Avr3b*、*Avr4*、*Avrblb1*、*Avrblb2*、*Avrvnt1* 和 *AvrSmira1*)为工具,检测了 29 个马铃薯品种(品系)中抗病基因的数量和组成情况。



1: 高感; 2: 中感; 3: 中抗; 4: 高抗; 5: 免疫

1: Highly susceptible; 2: Moderately susceptible; 3: Moderately resistant; 4: Highly resistant; 5: Immune

图 5 马铃薯品种中所含抗性基因与马铃薯抗性程度相关性

Fig. 5 Correlation between resistance genes contained in potato cultivars and potato resistance level

8 个抗病基因在 29 个品种中分布频率不同。抗病基因 *Rpi-blb2* 和 *Rpi-blb1* 存在于 19 个马铃薯品种中,R1 存在于 22 个马铃薯品种中,出现频率较高;抗病基因 R3a 和 *Rpi-Smira1* 分别存在于 16 个和 15 个马铃薯品种中;抗病基因 R4 和 *Rpi-vnt1* 分别存在于 11 个和 10 个马铃薯品种中;R3b 存在于 13 个马铃薯品种中,出现频率较低(图 4)。在一些早期推广的品种,如:‘紫花白’、‘克新 19’、‘克新 1 号’、‘冀张薯 8 号’中含有早期报道或克隆的抗病基因 R1、R3a、R3b 和 R4; 而最近新育成的品种,例如‘NKY-2’、‘NKY-3’、‘NMG-3’、‘HLJ-1’则含有近期报道或克隆的抗病基因 *Rpi-blb1*、*Rpi-blb2*、*Rpi-Smira1* 和 *Rpi-vnt1*; 同时近期培育的品种既含有“老抗病基因”,又含有“新抗病基因”,如‘GS-1’和‘HB-2’。说明为了应对致病疫霉的变异,通过抗病育种获得的新品种的抗性基因也在不断变化。

单基因控制的抗病性难以持久,品种的抗病性容易被毒性菌株克服^[14],而抗病基因聚合是提高品种持久抗病性的重要策略之一^[15-16]。2012, Kim 等^[7]提出正是由于聚合了多个抗性基因,才使得 *Solanum demissum* 的‘MaR8’和‘MaR9’两个材料对晚疫病菌在田间和室内表现广谱抗病性的观点。同年 Rietman 等^[6]分析了一个典型持久抗病品种‘Sarpomira’的抗病基因组成,结果发现该品种抗性持久的原因是多个抗病基因(至少 5 个)聚合到了一起,随后,作者利用农杆菌瞬时表达的方法鉴定出表达这些抗性基因对应的无毒基因。2014 年, Jones 等^[16]通过转基因的方式将抗病基因 *Rpi-vnt1.1* 转入栽培种‘Desiree’中,发现转抗病基因后‘Desiree’对晚疫病菌的抗性提高了。

本研究发现,供试的 29 个马铃薯品种中,抗病基因组成类型多样,不同品种所含的抗病基因组成不同,每个品种平均含有 4 个抗病基因。‘陇薯 6 号’含抗病基因数量最多,含有测试的 8 个抗病基因中的 7 个,在马铃薯室内抗性水平测定中表现中抗;‘GS-3’仅含一个抗病基因 R1,在马铃薯室内抗性水平测定中表现中感;‘HB-5’未检测到供试的 8 个抗病基因,在马铃薯室内抗性水平测定中表现高感;在马铃薯室内抗性水平测定中表现免疫的品种‘HB-2’本次检测只发现 6 个抗性基因,说明‘HB-2’可能还含有我们没有检测到的抗性基因;其他品种(品系)含有 3~6 个抗病基因。我们通过分析马铃薯品种(品系)室内的抗性水平和抗病基因数量间的关系(图 5)发现,供试的马铃薯品种(品系)中所含抗性基因的数量和品种抗性水平呈显著正相关($r=0.9156$, $P=0.0291$),表明品种中抗病基因的增加可以提高品种的抗病性。马红梅^[10]和尹军良^[11]同样也发现马铃薯品种抗病基因数量和病情指数呈显著负相关,表明聚合抗病基因越多的品种田间抗病表现越好。因此,在抗病育种工作中可通过向马铃薯品种中聚合更多的抗病基因来提高品种的抗性水平。该结果从抗病基因水平证明了基因聚合在马铃薯抗病育种中的必要性及对晚疫病防治工作的重要意义。

参考文献

- [1] BIRCH P R J, BRYAN G, FENTON B, et al. Crops that feed the world 8: Potato; are the trends of increased global production sustainable [J]. *Food Security*, 2012, 4(4): 477–508.
- [2] 卢肖平. 马铃薯主粮化战略的意义、瓶颈与政策建议[J]. *华中农业大学学报(社会科学版)*, 2015(3): 1–7.
- [3] ZHU Suxian, VOSSSEN J H, BERGERVOET M, et al. An updated conventional- and a novel GM potato late blight R gene differential set for virulence monitoring of *Phytophthora infestans* [J]. *Euphytica*, 2015, 202(2): 219–234.
- [4] 邱苜, 陶刚, 李奇科, 等. 农杆菌渗入法介导的基因瞬时表达技术及应用[J]. *分子植物育种*, 2009, 7(5): 1032–1039.

- [5] DU Juan, RIETMAN H, VLEESHOUWERS V G AA. Agroinfiltration and PVX agroinfection in potato and *Nicotiana benthamiana* [J/OL]. *Journal of Visualized Experiments*, 2014, 83: e50971.
- [6] RIETMAN H, BIJSTERBOSCH G, CANO L M, et al. Qualitative and quantitative late blight resistance in the potato cultivar Sarpo Mira is determined by the perception of five distinct RXLR effectors [J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2012, 25(7): 910–919.
- [7] KIM H J, LEE H R, JO K R, et al. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked R genes [J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 2012, 124(5): 923–935.
- [8] 王洪洋, 秦丽娟, 唐唯, 等. 致病疫霉 RXLR 效应蛋白相关研究进展[J]. *生物技术通报*, 2018, 34(2): 102–111.
- [9] 周晶, 张子莹, 路远, 等. 利用晚疫病菌无毒基因瞬时表达技术鉴定马铃薯抗病基因[J]. *中国马铃薯*, 2014(4): 217–224.
- [10] 马红梅. 西北地区部分马铃薯主栽品种晚疫病抗性鉴定和抗病基因组成分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2015.
- [11] 尹军良. 西北地区马铃薯主栽品种的抗晚疫病性评价及致病疫霉菌候选核心 RXLR 效应基因的鉴定[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2018.
- [12] 齐明星. 致病疫霉线粒体单倍型 PCR 检测方法的建立及应用[D]. 保定: 河北农业大学, 2014.
- [13] FLOR H H. Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini* [J]. *Phytopathology*, 1942, 32: 653–669.
- [14] VLEESHOUWERS V G A A, OLIVER R P. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(3): 196–206.
- [15] SONG Junqi, BRADEEN J M, NAESS S K, et al. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight [J]. *Proceedings of National Academy Sciences of United States America*, 2003, 100(16): 9128–9133.
- [16] VLEESHOUWERS V G AA, RAFFAELE S, VOSSSEN J H, et al. Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors [J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2011, 49(1): 507–531.
- [17] JONES J D G, WITEK K, VERWEIJ W, et al. Elevating crop disease resistance with cloned genes [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Science*, 2014, 369(1639): 20130087.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 211 页)

- [13] FOULY A H. Effects of prey mites and pollen on the biology and life tables of *Proprioseiopsis aetus* (Chant) (Acari, Phytoseiidae) [J]. *Journal of Applied Entomology*, 1997, 121(1–5): 435–439.
- [14] HUANG J H, FREED S, WANG L S, et al. Effect of temperature on development and reproduction of *Proprioseiopsis aetus* (Acari, Phytoseiidae) fed on asparagus thrips, *Thrips tabaci* [J]. *Experimental and Applied Acarology*, 2014, 64(2): 235–244.
- [15] 何琦琛, 陈文华. 马氏捕植螨及少毛捕植螨捕食南黄蒿马之生活史和捕食量[J]. *台湾昆虫*, 2001, 21(4): 321–328.

- [16] 王丽思, 陈洪凡, 黄建华, 等. 丝瓜花粉对少毛钝绥螨发育和繁殖的影响[J]. *植物保护*, 2016, 42(5): 110–112.
- [17] 黄建华, 王丽思, 秦文婧, 等. 一种捕食螨饲养观察装置[J]. *应用昆虫学报*, 2015, 52(3): 776–779.
- [18] SONODA S, KOHARA Y, SIQINGERILE, et al. Phytoseiid mite species composition in Japanese peach orchards estimated using quantitative sequencing [J]. *Experimental and Applied Acarology*, 2012, 56(1): 9–22.

(责任编辑: 田 喆)