

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2021)02-0097-09

DOI: 10.19918/j.cnki.1672-3635.2021.02.001

遗传育种

基于效应子 E38 识别与 NB-LRR 富集 测序挖掘抗晚疫病马铃薯资源

段艳凤¹, 文国宏², Armstrong M R³, 李广存¹, 金黎平^{1*}

(1. 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; 2. 甘肃省农业科学院马铃薯研究所, 甘肃 兰州 730070;

3. 英国邓迪大学/詹姆斯赫顿研究所植物科学系, 英国 邓迪 DD2 5DA)

摘要: 为挖掘抗晚疫病马铃薯资源, 研究利用 4 个不同毒力的晚疫病菌株, 基于离体叶片接种法对四倍体材料‘陇薯 12 号’和‘L05Nsr-j-1’进行抗性鉴定。结果表明‘陇薯 12 号’高抗除“超级生理小种”CN152 外的其余 3 个菌株, ‘L05Nsr-j-1’则对 4 个菌株均表现为高感; 进一步利用晚疫病效应子 E38 在上述 2 份材料上进行农杆菌介导的瞬时表达, 发现只有‘陇薯 12 号’可以识别 E38 产生特异的 HR 反应; 抗病基因富集测序诊断(dRenSeq)结果表明‘陇薯 12 号’不含已知的晚疫病抗病基因, 预示‘陇薯 12 号’含有未知的抗病基因; 利用 E38 对‘陇薯 12 号’和‘L05Nsr-j-1’的 F₁ 群体 215 个单株进行农杆菌介导的瞬时表达检测, 结果显示 67% 的单株出现假阳性反应, 表明其 F₁ 群体不适合利用农杆菌介导的效应子识别鉴别基因型。研究结果为今后‘陇薯 12 号’的利用及其晚疫病抗性基因的克隆奠定了基础。

关键词: 马铃薯; 晚疫病; 效应子; 抗病基因

Identification of Potato Resistance Resource Through *Phytophthora infestans* Effector E38 Recognition and NB-LRR Enrichment Sequencing

DUAN Yanfeng¹, WEN Guohong², Armstrong M R³, LI Guangcun¹, JIN Liping^{1*}

(1. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. Potato Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China;

3. The University of Dundee, Division of Plant Sciences at the James Hutton Institute, Dundee, DD2 5DA, UK)

Abstract: Four *Phytophthora infestans* isolates with different virulence were used to evaluate late blight resistance on tetraploid potatoes, 'Longshu 12' and 'L05Nsr-j-1', by detached leave assay in order to mine the potato resistance resources. The results showed that 'Longshu 12' was high resistant to other three isolates with exception of 'super-isolate' CN152, while 'L05Nsr-j-1' was high sensitive to all the four isolates. *P. infestans* effector E38 was further used to identify the above two materials by *Agrobacterium*-mediated transient expression, and it was found that only 'Longshu 12' could recognize E38 to induce a specific hypersensitive cell death. Diagnostic resistance gene enrichment (dRenSeq) revealed that 'Longshu 12' did not contain previously identified nucleotide-binding, leucine-rich repeat late blight resistance genes, suggesting that 'Longshu 12' contains potential resistance gene(s), and it might be a distinct

收稿日期: 2021-02-01

基金项目: 现代农业产业技术体系专项资金资助(CARS-9)。

作者简介: 段艳凤(1982-), 女, 博士后, 从事马铃薯遗传育种研究。

*通信作者(Corresponding author): 金黎平, 博士, 研究员, 主要从事马铃薯遗传育种研究, E-mail: jinliping@caas.cn。

new *R* gene(s). The E38 was used to recognize 215 F_1 population genotypes derived from 'Longshu 12' and 'L05Nsr-j-1', and the results showed that 67% of the genotypes had a false positive reaction, indicating that F_1 population derived from 'Longshu 12' and 'L05Nsr-j-1' was not suitable for high-throughput effectoromics screens that were typically based on *Agrobacterium*-based effector recognition studies. The results of this study would lay the foundation for the future use of 'Longshu 12' and the cloning of late blight resistance genes.

Key Words: potato; late blight; effector; resistance gene

马铃薯是世界上继小麦、玉米和水稻之后的第4大粮食作物, 也是中国重要的粮菜饲兼用作物^[1]。由致病疫霉(*Phytophthora infestans*)引起的晚疫病是马铃薯生产上最具毁灭性的病害^[2]。目前, 生产上对晚疫病的防治措施主要应用杀菌剂, 不仅会导致抗药性菌株的产生, 还增加了环境污染及对人类健康带来风险。实践证明, 培育抗病品种是防治晚疫病的根本手段^[3]。然而, 由于栽培马铃薯抗源缺乏, 抗病基因(*R*基因)容易被高度进化的晚疫病菌株克服, 致使抗晚疫病育种进程缓慢。因此, 寻找优异晚疫病抗源材料, 挖掘新的*R*基因, 对于促进马铃薯抗晚疫病育种具有重要意义。

致病疫霉菌基因组容量高达240 Mb, 编码了大量的效应蛋白, 其中最大的效应蛋白家族为RXLR类蛋白, 大约有560多个^[2]。目前, 所有被报道的致病疫霉效应蛋白(AVR)均属于RXLR类蛋白, 并且都排列在基因稀疏、重复序列较高的区域, 例如AVR1^[4]、AVR2^[5]、AVR3a^[6]、AVR4^[7]及AVR-blb2^[8]等。目前已经克隆的马铃薯晚疫病*R*基因有近30个, 均属于NB-LRR类抗病基因^[9]。基于植物与病菌识别的ETI理论, 这些*R*基因编码的蛋白可以通过识别致病疫霉中RXLR类AVR蛋白产生过敏反应(Hypersensitive response, HR), 从而使马铃薯产生抗病性^[10]。效应子组学策略由Vleeshouwers等^[11]在2008年提出, 即通过效应子与抗病基因的识别鉴别马铃薯资源中是否含有潜在抗病基因, 该方法大大提高了抗病资源的评价及抗病基因的鉴定和利用效率。

近年来一种基于NB-LRR序列富集测序(Resistance gene enrichment Sequencing, RenSeq)技术发展成熟。该技术可以精确地对植物基因组中NB-LRR基因序列进行进一步注释, 通过该技术研究者们将马铃薯基因组中的NB-LRR基因数目从

438个增加到了755个^[12]。RenSeq技术可以快速有效地对*R*基因进行定位和分离。Jupé等^[12]利用该技术分别以野生种*Solanum berthaultii*和*S. ruiz-ceballosii*分离群体为材料, 成功鉴定到了上述两个群体中与晚疫病抗性位点共分离的标记。RenSeq还可以作为一种快速诊断工具(dRenSeq), 对通过磁珠富集的片段测序后与已知的*R*基因进行比对, 可以快速确定被检测的材料是否含有已知的*R*基因^[13]。

本研究所用的晚疫病菌效应子E38由西北农林科技大学实验室提供, 该实验室在前期研究中发现, 在马铃薯栽培品种‘陇薯12号’中过表达E38可引发过敏性坏死反应(HR), 揭示了在‘陇薯12号’中可能存在特异识别E38的抗病基因。本研究以‘陇薯12号’和‘L05Nsr-j-1’为材料, 通过晚疫病抗性鉴定、效应子识别及dRenSeq等分析, 并以‘陇薯12号’与‘L05Nsr-j-1’的分离群体为材料, 以期解析其抗性遗传基础, 为‘陇薯12号’的利用及抗晚疫病基因克隆等后续研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

‘陇薯12号’和‘L05Nsr-j-1’均为四倍体, F_1 杂交后代分离群体共计215个单株, 以上材料由甘肃省农业科学院马铃薯研究所提供。试管苗在MS培养基(20 g/L蔗糖, 5 g/L含维生素MS, 8 g/L琼脂, pH 5.8)上, 23℃、16 h/8 h光暗培养两周后, 移植于日光温室营养钵中生长, 期间进行浇水、施肥等日常管理。‘陇薯12号’、‘L05Nsr-j-1’及 F_1 分离群体在移植后4~5周时选取健康、幼嫩完全展开的叶片进行病菌效应子分析。晚疫病菌接种鉴定在移植后8~10周时进行。

1.2 晚疫病菌株及抗性鉴定

用于接种的晚疫病菌株为428-2、T30-4、

90128 和 CN152(表 1), 其中 CN152 可以克服很多已知的抗晚疫病基因, 包括广谱抗病基因 *Rpi-blb1/RB*, 被称为“超级生理小种”。晚疫病菌株于液氮保存, 待接种时于黑麦培养基上活化。活化的菌株在霉菌培养箱 18℃ 黑暗培养 7~14 d, 待菌丝长满培养皿时加适量无菌水于 4℃ 诱导游动孢子 3~6 h, 利用血球计数器统计游动孢子数量并稀释到接种浓度, 准备接种。

接种方法采用离体叶片法^[16], 并略加改动。从

植株顶部计起, 选取第 3~5 片展开叶, 背面朝上置于双层湿润灭菌滤纸上, 在每个叶片背面主叶脉两侧各接种 1 滴浓度为 5×10^4 个游动孢子/mL 的孢子悬浮液, 每滴 10 μ L。接种后将容器封好, 置于 18℃ 培养箱内, 在每日光照 16 h, 黑暗 8 h, 相对湿度 100% 条件下培养。接种后 6~7 d 调查发病情况。对于接种的每个菌株, 每份材料从 3 个植株上各选取一个叶片进行接种, 每个接种试验重复 3 次。本研究以 ‘CPH1-14’ 为抗病对照, ‘Desiree’ 为感病对照。

表 1 晚疫病抗性鉴定所用菌株
Table 1 Isolates used for late blight resistance evaluation

菌株 Isolate	来源 Origin	交配型 Mating type	生理小种 Physiological race
428-2 ^[14]	荷兰	A1	1,3,4,7,8,10,11
T30-4 ^[2]	荷兰	A1	1,3,4,5,6,7
90128 ^[15]	荷兰	A1	1,3a,3b,4,6,7,8,10,11
CN152 ^[16]	中国四川	A2	1,3b,4,5,6,7,8,9,10,11

1.3 重组质粒及转化质粒的鉴定

重组质粒 pMDC83-E38 由西北农林科技大学实验室提供; pBINPLUS-*R3a* 和 pK7WG2-*Avr3a* 重组质粒由荷兰瓦赫宁根大学实验室提供; 空载体 pMDC83 由本实验室保存(表 2)。将以上质粒通过冻融法^[17]转至农杆菌 GV3101 中。将转入质粒的农杆菌分别在含有相应抗生素的 LB 平板培养基上活化, 28℃ 静置培养 2 d。挑取单克隆接入 1 mL 含有相应抗生素的 LB 液体培养基, 28℃, 200 r/min, 培养过夜, 菌液 DNA 进行 PCR 验证, 经过验证的菌液加 20% 灭菌甘油保存在 -80℃ 冰箱。

R3a^[18]和 *Avr3a*^[19]特异引物序列来源于参考文献, E38 和 pMDC83 引物序列通过软件 Primer premier 5.0 设计(表 3)。PCR 反应体系: 菌液 DNA 模板 1 μ L、上游引物(5 μ mol)0.3 μ L、下游引物(5 μ mol)0.3 μ L、 $2 \times$ Taq mix 8 μ L、ddH₂O 6.4 μ L。PCR 反应程序: 94℃ 变性 30 s, T_m 退火 30 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环。第一个循环之前 94℃ 预变性 5 min, 最后 72℃ 延伸 7 min。

1.4 基于农杆菌介导的基因瞬时表达分析 (Agroinfiltration assay)

采用 Vossen 等^[20]的方法, 每个植株选取 3 片幼

表 2 用于农杆菌瞬时表达的质粒
Table 2 Vectors used for agroinfiltration

插入基因 Insert	质粒载体 Vector	载体筛选抗性(50 μ g/mL) Antibiotics for vector selection
<i>R3a</i>	pBINPLUS	卡那霉素
<i>Avr3a</i>	pK7WG2	奇霉素
<i>E38</i>	pMDC83	卡那霉素
/	pMDC83	卡那霉素

嫩、健康和完全展开的叶片进行基因瞬时表达分析, 设置3次生物学重复。将于-80℃贮存的农杆菌菌液在含有相应抗生素的3 mL LB液体培养基中28℃过夜培养。第2 d, 将这些培养物接种到含有相应抗生素的15 mL YEB培养基中(1 L蒸馏水中添加5 g牛肉浸膏、5 g蛋白胨、5 g蔗糖、1 g酵母提取物及2 mL 1 mol MgSO₄), 另加10 μL/L 200 mol 乙酰丁香酮(Acetosyringone, AS)及1 000 μL/L 1 mol 2-氮吗啉乙烷磺酸[2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid, MES], 28℃, 200 r/min, 培养过夜。第3 d, 16℃、

4 000 r/min离心8 min收集细胞, 用MMA缓冲液(1 L蒸馏水中添加20 g蔗糖、5 g MS及1.95 g MES, 用NaOH调节pH至5.6, 另外添加1 mL/L 200 mol溶于DMSO的AS)重悬浮至OD₆₀₀达到0.2。将含有R3a和Avr3a基因悬菌液1:1混合, 室温静置3 h后, 用1 mL无针头注射器以点注射方式(直径1 cm左右)在叶片上注射作为阳性对照。空载体pMDC83、农杆菌GV3101为阴性对照。3~4 d后观察、统计表型。试验设置3次生物学重复和3次试验重复。

1.5 基因组DNA提取及dRenSeq分析

表3 用于PCR验证的引物

Table 3 Primers used for PCR validation

引物编号 Primer code	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	退火温度(℃) T _m	扩增片段长度(bp) Amplified fragment length
R3a	fw ATCGTTGTCATGCTATGAGATTGTT	56	982
	rv CTTCAAGGTAGTGGGCAGTATGCTT		
Avr3a	fw AAGAACGAAGAGAATGAAGAAAC	55	300
	rv ATATCCACTGAGCCCCAGG		
E38	fw TGGTGATGCTTCTAGCAATG	57	423
	rv ACCAACGAGGAAGTTGTCAC		
pMDC83	fw GAGGACCATCTTCTTCAAGG	60	321
	rv GACAGGTAATGGTTGTCTGC		

采用改良的CTAB法^[21]提取‘陇薯12号’及‘L05Nsr-j-1’基因组DNA, 利用Nanodrop ND-100型分光光度计检测DNA的质量及浓度。

dRenSeq分析参考Armstrong等^[22]的方法进行。利用‘陇薯12号’和‘L05Nsr-j-1’的DNA分别构建基因组DNA测序文库, 与标记有NB-LRR基因保守序列的磁珠杂交富集。将杂交上的DNA洗脱, 并基于Illumina MiSeq测序平台测序。将测序的reads与已知的马铃薯晚疫病R基因以1%和2%的错配率进行比对。

2 结果与分析

2.1 ‘陇薯12号’可能含有未知晚疫病抗病基因

利用包括超级生理小种CN152(13_A2型)在内的4个来源不同、毒力不同的晚疫病菌株对‘陇薯12号’和‘L05Nsr-j-1’进行了接种鉴定。结果如图1所

示, ‘陇薯12号’对CN152表现为感病, 对90128、T30-4及428-2 3个菌株表现为抗病; ‘L05Nsr-j-1’则对4个菌株均表现为感病。结合4个菌株的生理小种类型, 推测‘陇薯12号’可能含有晚疫病抗病基因R2、R9或其他抗病基因。

2.2 病原效应子E38可以激发‘陇薯12号’特异的HR反应

目前, 已公布的马铃薯R基因均是通过识别致病疫霉中一类含有RXLR结构域的效应子从而激发抗病功能。本研究采用效应子E38分别在‘陇薯12号’和‘L05Nsr-j-1’中进行农杆菌瞬时表达分析, 结果表明‘陇薯12号’可以识别效应子E38产生特异的HR, 预示‘陇薯12号’存在识别E38的潜在R基因(图2)。而‘L05Nsr-j-1’则不能识别E38, 未产生特异的HR。

2.3 dRenSeq检测揭示‘陇薯12号’中存在未知晚疫

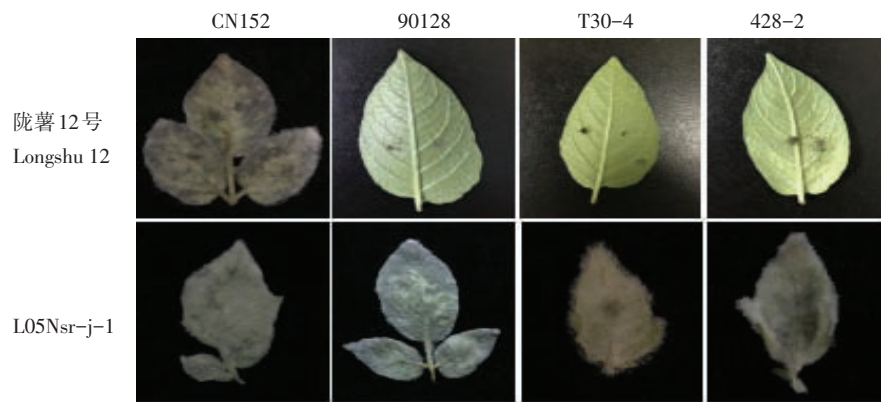
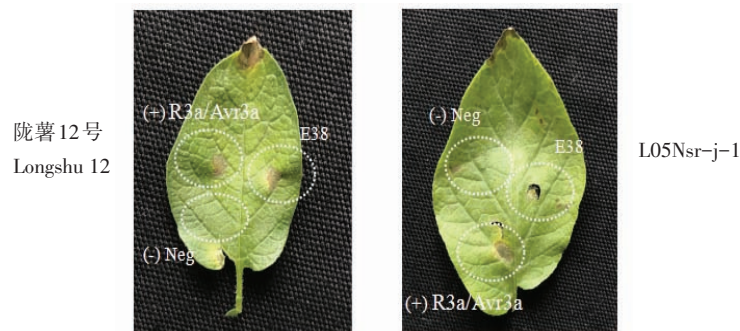


图1 ‘陇薯12号’和‘L05Nsr-j-1’的晚疫病抗性鉴定
Figure 1 Late blight resistance identification of 'Longshu 12' and 'L05Nsr-j-1'



注: 含有 pBINPLUS-R3a 和 pK7WG2-Avr3a 的农杆菌 GV3101 菌液 1:1 混合物为阳性对照, 空载体 pMDC83 为阴性对照。

Note: A 1 : 1 mixture of *Agrobacterium* strain GV3101 containing pBINplus-R3a and pK7WG2-Avr3a is used as positive control and empty pMDC83 is used as negative control.

图2 效应子 E38 在‘陇薯12号’和‘L05Nsr-j-1’叶片上的识别表现
Figure 2 Recognition performance of *Agrobacterium*-mediated transformation of 'Longshu 12' and 'L05Nsr-j-1' with effector E38

病抗病基因

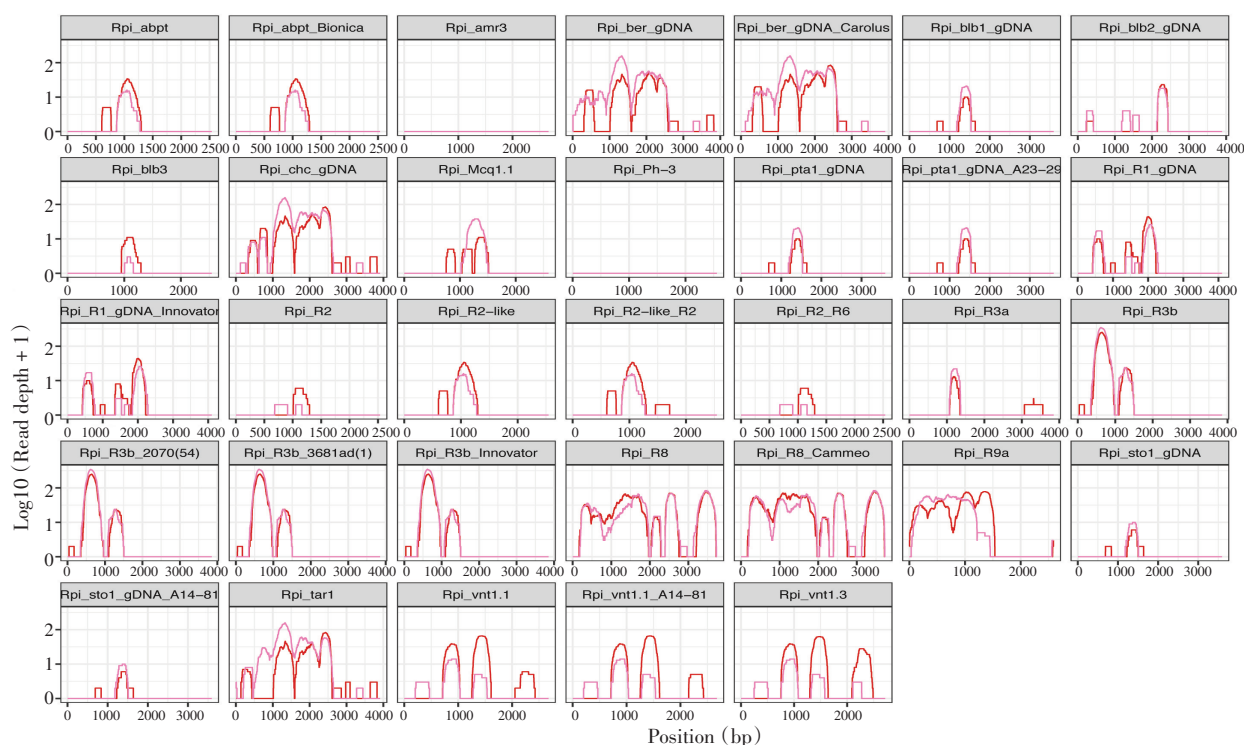
‘陇薯12号’除对“超级生理小种”CN152表现为感病外, 对90128、T30-4及428-2 3个菌株均表现为抗病, ‘L05Nsr-j-1’则对以上4个菌株均表现为感病。为确认‘陇薯12号’的抗性是否来源于已知的NB-LRR基因, 采用了R基因诊断技术dRenSeq对‘陇薯12号’进行了富集分析, 结果显示, 在容许1%和2%错配率时, ‘陇薯12号’的reads没有完全覆盖所检测的任一基因(表4, 图3)。因此推测, ‘陇薯12号’的抗性可能来源于这些基因外的其他基因或同源基因。

2.4 F₁分离群体大部分基因型对农杆菌敏感

为了挖掘‘陇薯12号’中含有的特异识别效应子E38的潜在抗病基因, 本研究将E38在‘陇薯12号’和‘L05Nsr-j-1’杂交的F₁分离群体215个单株上进行农杆菌瞬时表达分析, 理论上携带潜在抗病基因的个体会识别效应子E38进而出现细胞坏死的表型。结果显示F₁群体145个(67%)单株阴性对照出现细胞坏死, 表现出假阳性反应; 70个(33%)单株阳性对照和阴性对照均正常, 其中23个单株能被E38识别产生HR, 47个单株不能被E38识别产生HR(图4)。

表4 ‘陇薯12号’NLR基因的覆盖率
Table 4 NLR coverage in 'Longshu 12'

编号 Code	基因 Gene	1%和2%错配率时比对到相应抗病基因序列上的reads百分比 Percentage of reads mapped to corresponding <i>R</i> gene sequence at 1% and 2% mismatch rate	
		1%	2%
1	<i>Rpi_Mcql1.1</i>	15.49	18.62
2	<i>Rpi_Ph-3</i>	0.00	0.00
3	<i>Rpi_R1_gDNA</i>	6.07	27.21
4	<i>Rpi_R1_gDNA_Innovator</i>	6.07	27.21
5	<i>Rpi_R2</i>	0.00	13.24
6	<i>Rpi_R2-like</i>	0.00	16.19
7	<i>Rpi_R2-like_R2</i>	0.00	16.19
8	<i>Rpi_R2_R6</i>	0.00	13.24
9	<i>Rpi_R3a</i>	4.83	7.74
10	<i>Rpi_R3b</i>	14.10	27.73
11	<i>Rpi_R3b_2070(54)</i>	14.10	27.41
12	<i>Rpi_R3b_3681ad(1)</i>	14.10	27.73
13	<i>Rpi_R3b_Innovator</i>	14.10	27.73
14	<i>Rpi_R8</i>	62.52	86.33
15	<i>Rpi_R8_Cammeo</i>	71.40	85.96
16	<i>Rpi_R9a</i>	44.17	56.06
17	<i>Rpi_abpt</i>	0.00	16.23
18	<i>Rpi_abpt_Bionica</i>	0.00	16.23
19	<i>Rpi_amr3</i>	0.00	0.00
20	<i>Rpi_ber_gDNA</i>	39.40	71.32
21	<i>Rpi_ber_gDNA_Carolus</i>	39.37	68.97
22	<i>Rpi_blb1_gDNA</i>	6.24	9.83
23	<i>Rpi_blb2_gDNA</i>	4.70	23.57
24	<i>Rpi_blb3</i>	0.00	6.09
25	<i>Rpi_chc_gDNA</i>	44.40	65.29
26	<i>Rpi_pta1_gDNA</i>	6.24	9.83
27	<i>Rpi_pta1_gDNA_A23-29</i>	6.24	9.83
28	<i>Rpi_sto1_gDNA</i>	5.23	9.21
29	<i>Rpi_sto1_gDNA_A14-81</i>	5.23	9.21
30	<i>Rpi_tar1</i>	49.74	67.28
31	<i>Rpi_vnt1.1</i>	10.39	31.54
32	<i>Rpi_vnt1.1_A14-81</i>	10.39	31.54
33	<i>Rpi_vnt1.3</i>	10.23	37.16



注: X轴代表33个具有功能的R基因, Y轴代表比对上这33个基因的序列的测序深度, 转化为log10。序列比对采用1%和2%的错配率, 此处显示2%错配率时的比对结果, 曲线代表‘陇薯12号’。

Note: RenSeq-derived reads are mapped against a reference set of 33 known NLR genes in very-sensitive mode. Each box represents an entire NLR coding sequence from the start codon to the stop codon (x-axis). The y-axis reveals the coverage of NLRs on a log scale. Mapping of the reads is carried out at 1% and 2% mismatch rates, and the results for 2% mismatch rate are shown. Curves represent 'Longshu 12'.

图3 dRenSeq分析‘陇薯12号’中的NLR基因
Figure 3 dRenSeq analysis of NLR genes on 'Longshu 12'



注: 含有 pBINPLUS-R3a 和 pK7WG2-Avr3a 的农杆菌 GV3101 菌液 1 : 1 混合物为阳性对照, 空载体 pMDC83 为阴性对照 1, 农杆菌 GV3101 为阴性对照 2。a. 对照正常, E38 在该基因型叶片上诱发 HR; b. 对照正常, E38 在该基因型叶片上不能诱发 HR; c. 所有接种部位均出现细胞坏死。

Note: A 1 : 1 mixture of *Agrobacterium* strain GV3101 containing pBINplus-R3a and pK7WG2-Avr3a (positive control), pMDC83 (negative control 1), and GV3101 (negative control 2). a. Control is normal, and E38 induces HR; b. Control is normal, and E38 can not induce HR; and c. Cell necrosis occurs at all inoculation sites.

图4 效应子 E38 在 F₁ 群体基因型进行农杆菌接种的实例
Figure 4 Examples of agroinfiltration in F₁ population genotypes with effector E38

3 讨 论

晚疫病是马铃薯的第一大病害, 严重制约中国乃至世界马铃薯产业的发展。寻找优异抗源材料, 挖掘和利用新的 *R* 基因, 对于促进马铃薯抗晚疫病育种尤为重要。尽管国内外研究者进行了大量研究, 在马铃薯中克隆了近30个晚疫病 *R* 基因^[9], 但这些基因全部来自野生种, 且很多抗性已经被克服, 包括 *Rpi-blb1/RB*、*Rpi-sto1* 和 *Rpi-pta1*^[23]等一些广谱抗性基因抗性被快速进化的生理小种克服。马铃薯野生种中具有丰富的等位基因多态性, 利用于遗传育种, 可以拓展育种材料的遗传基础^[24]。然而, 野生种与栽培种之间普遍具有杂交不亲和、胚乳败育、雄性不育等生殖障碍^[25], 导致野生资源利用难度增大。马铃薯普通栽培种经过长期的适应性选择, 聚集了高产优质等优良的农艺性状, 其中不乏一些晚疫病抗性强的材料。如果能在普通栽培种中筛选到优良抗源材料、挖掘 *R* 基因, 将显著提高马铃薯抗晚疫病育种效率。

本研究所用材料普通栽培种品种‘陇薯12号’植株在田间高抗晚疫病^[26], 室内接种鉴定对“超级生理小种”CN152外的其余3个菌株表现为高抗或免疫, 通过系谱分析发现‘陇薯12号’含有‘小白花’、‘渭会4号’、‘中德6号’及‘大西洋’的血缘, 其中‘小白花’为中国农家品种, 在1983年出版的《全国马铃薯品种资源编目》中记载具有较强晚疫病抗性。近年来, 逐渐发展起来的效应子组学策略大大提高了抗病资源的评价和筛选及 *R* 基因的鉴定和利用效率^[27]。本研究晚疫病效应子E38可以激发‘陇薯12号’产生特异的HR反应, dRenSeq检测其未包含已知的 *R* 基因。然而通过农杆菌介导的瞬时表达在 *F₁* 群体进行E38的识别, 67%的材料出现假阳性反应, 表明群体不适合采用农杆菌介导的瞬时表达进行效应子识别挖掘抗病基因, 这与Chen等^[13]结果相符, 在其研究中野生种 *S. verrucosum* 群体不适合用农杆菌或PVX介导的瞬时表达进行高通量的效应子组学筛选和鉴定。

本研究通过晚疫病抗性鉴定、效应子E38识别及dRenSeq等方法鉴定获得‘陇薯12号’为含有未知 *R* 基因的优良抗源材料, 对 *F₁* 群体采用效应

子E38识别挖掘抗病基因, 但大部分材料出现背景反应, 证实并非所有材料均适合效应子组学策略识别鉴定。本研究鉴定得到的‘陇薯12号’能够识别效应子E38激发过敏反应, 预示‘陇薯12号’存在潜在抗病基因, 为以后克隆其抗病基因、抗病育种实践和开展马铃薯与晚疫病菌分子互作奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] 屈冬玉, 谢开云, 金黎平, 等. 中国马铃薯产业发展与食物安全[J]. 中国农业科学, 2005, 38(2): 358–362.
- [2] Haas B J, Kamoun S, Zody M C, et al. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans* [J]. Nature, 2009, 461: 393–398.
- [3] 孙慧生. 马铃薯育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.
- [4] van der Lee T R A, Testa A, van't Klooster J W, et al. Mapping of avirulence genes in *Phytophthora infestans* with amplified fragment [J]. Genetics, 2001, 157: 949–956.
- [5] Gilroy E M, Breen S, Whisson S C, et al. Presence / absence, differential expression and sequence polymorphisms between *PiAVR2* and *PiAVR2-like* in *Phytophthora infestans* determine virulence on *R2* plants [J]. New Phytologist, 2011, 191(3): 763–776.
- [6] Armstrong M R, Whisson S C, Pritchard L, et al. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 102(21): 7766–7771.
- [7] van Poppel P M, Guo J, van de Vondervoort P J, et al. The *Phytophthora infestans* avirulence gene *Avr4* encodes an RXLR-dEER effector [J]. Molecular Plant–Microbe Interactions, 2008, 21(11): 1460–1470.
- [8] Oh S K, Young C, Lee M, et al. In planta expression screens of *Phytophthora infestans* RXLR effectors reveal diverse phenotypes, including activation of the *Solanum bulbocastanum* disease resistance protein *Rpi-blb2* [J]. Plant Cell, 2009, 21: 2928–2947.
- [9] Sun K, Wolters A M A, Vossen J H, et al. Silencing of six susceptibility genes results in potato late blight resistance [J]. Transgenic Research, 2016, 25(5): 1–12.
- [10] Hein I, Gilroy E M, Armstrong M R, et al. The zig-zag-zig in

- oomycete-plant interactions [J]. Molecular Plant Pathology, 2009, 10(4): 547-562.
- [11] Vleeshouwers V G, Rietman H, Krenek P, *et al.* Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes [J]. PloS one, 2008, 3: e2875.
- [12] Jupe F, Witek K, Verweij W, *et al.* Resistance gene enrichment sequencing (RenSeq) enables reannotation of the NB-LRR gene family from sequenced plant genomes and rapid mapping of resistance loci in segregating populations [J]. The Plant Journal, 2013, 76(3): 530-544.
- [13] Chen X W, Lewandowska D, Armstrong M R, *et al.* Identification and rapid mapping of a gene conferring broad-spectrum late blight resistance in the diploid potato species *Solanum verrucosum* through DNA capture technologies [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2018, 131(4): 1287-1297.
- [14] 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.
- [15] Huang S W, Vleeshouwers V G A A, Werij J S, *et al.* The *R3* resistance to *Phytophthora infestans* in potato is conferred by two closely linked *R* genes with distinct specificities [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2004, 17(4): 428-435.
- [16] Duan Y F, Duan S G, Armstrong M R, *et al.* Comparative transcriptome profiling reveals compatible and incompatible patterns of potato toward *Phytophthora infestans* [J]. G3: Genes Genomes Genetics, 2020, 10(2): 623-634.
- [17] 王萍, 殷春燕, 盈磊. 不同方法转化大肠杆菌和农杆菌转化效率的研究 [J]. 淮海工学院学报, 2007, 16(2): 55-58.
- [18] Huang S W, Vossen E A G V D, Kuang H H, *et al.* Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato [J]. Plant Journal, 2010, 42(2): 251-261.
- [19] Wawra S, Trusch F, Matena A, *et al.* The RxLR motif of the host targeting effector *AVR3a* of *Phytophthora infestans* is cleaved before secretion [J]. Plant Cell, 2017, 29(5): 1184-1195.
- [20] Vossen J H, Van Arkel G, Bergervoet M, *et al.* The *Solanum demissum* *R8* late blight resistance gene is an *Sw-5* homologue that has been deployed worldwide in late blight resistant varieties [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2016, 129(9): 1785-1796.
- [21] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochemical Bulletin, 1987, 19 (1): 11-15.
- [22] Armstrong M R, Vossen J, Lim T Y, *et al.* Tracking disease resistance deployment in potato breeding by enrichment sequencing [J]. Plant Biotechnology Journal, 2018, 17(3): 540-549.
- [23] 朱素贤, 祝军, 李颖, 等. 马铃薯广谱抗病 *Rpi-blb1* 同源基因抗性被进化晚疫病菌株克服 [J]. 园艺学报, 2010, 37(2): 241-246.
- [24] Jansky S. Overcoming hybridization barriers in potato [J]. Plant Breeding, 2006, 125(1): 1-12.
- [25] 徐建飞, 金黎平. 马铃薯遗传育种研究: 现状与展望 [J]. 中国农业科学, 2017, 50(6): 990-1015.
- [26] 文国宏, 李高峰, 王一航, 等. 优质抗病马铃薯新品种‘陇薯12号’的选育 [J]. 中国马铃薯, 2017, 31(3): 186-189.
- [27] 王洪洋, 田振东. 基于晚疫病菌效应子识别策略挖掘马铃薯潜在抗病基因资源 [J]. 园艺学报, 2018, 45(7): 86-94.