

# 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

周 晶, 张子莹, 路 远, 田振东\*, 谢从华

(园艺植物生物学教育部重点实验室, 国家蔬菜改良中心华中分中心, 华中农业大学, 湖北 武汉 430070)

**摘要:** 由 *Phytophthora infestans* 引起的晚疫病是马铃薯的毁灭性病害。明确现有马铃薯品种或育种材料含有的晚疫病抗病基因, 对于抗病育种和合理利用不同抗病基因防治马铃薯晚疫病具有重要意义。根据“基因对基因”学说, 马铃薯无毒基因与抗病基因产物互作会产生典型过敏反应(HR)。理论上利用病原菌无毒基因可以鉴定马铃薯是否含有相应抗病基因。本研究尝试利用农杆菌注射技术, 在马铃薯叶片中瞬时表达晚疫病菌无毒基因(*Avr*), 根据过敏反应发生情况, 进而推断马铃薯品种/育种材料所含相应抗病基因(*R*)。研究结果显示: 适合马铃薯瞬时表达的农杆菌浓度为0.5(OD<sub>600</sub>), 马铃薯材料农杆菌瞬时表达存在明显的基因型和叶龄依赖性, 充分展开的幼嫩叶片适合农杆菌瞬时表达。*Avr1*, *Avr2*, *Avr3a* 和 *Avr4* 在含有相应抗病基因的马铃薯鉴别寄主上瞬时表达能够产生HR, 表明无毒基因注射鉴定结果是可靠的。无毒基因注射鉴定结果与抗病基因特异引物PCR扩增结果在不同基因型材料上有时并不一致, 反映了这两种方法各有局限性, 若能将这两种方法结合使用, 则会提高鉴定结果的准确性。

**关键词:** 马铃薯; 晚疫病; 无毒基因; 抗病基因; 瞬时表达; 农杆菌注射

## Identification of Late Blight Resistance *R* Genes of Potato by Transient Expressing of *Phytophthora infestans* Avirulence Genes Using Agro-infiltration

ZHOU Jing, ZHANG Ziyang, LU Yuan, TIAN Zhendong\*, XIE Conghua

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology (HAU), Ministry of Education; National Center for Vegetable Improvement (Central China); Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

**Abstract:** Late blight, caused by *Phytophthora infestans*, is a devastating disease of potato. It is important to distinguish what kind of *R* contained in potato cultivar or potato breeding materials for potato late blight resistant breeding and control late blight through management of different *R* genes. According to the ‘gene-for-gene’ hypothesis, the interaction between pathogen avirulence genes (*Avr*) and resistant genes (*R*) will lead to hypersensitive response (HR) in potato. So, it is possible to distinguish host *R* gene by *Avr* gene expression in potato leaves. In this study, efforts were made to distinguish potato *R* genes by transient expressing *P. infestans* *Avr* gene in potato leaves using agro-infiltration methods. The result revealed that 0.5 optical density at 600 (OD<sub>600</sub>) was suitable for potato agro-infiltration. Agro-infiltration mediated *Avr* expression efficiency depended on potato genotype and leaf age. Full expanded younger leaves were fit for Agro-infiltration mediated transient *Avr* gene expression. Transient expressing *Avr1*, *Avr2*, *Avr3a* and *Avr4* in leaves of diagnose potato material which contains

收稿日期: 2014-07-02

基金项目: 国家“863”项目(2013AA102603); 国家自然科学基金项目(31171603); 华中农业大学2013年大学生科技创新基金(SRF 2013222)。

作者简介: 周晶(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为马铃薯抗病分子生物学。

\*通信作者(Corresponding author): 田振东, 教授, 从事马铃薯分子生物学研究, E-mail: tianzhd@mail.hzau.edu.cn。

corresponding *R* genes led to HR. Identification results of both agro-infiltration method and *R* gene specific primers PCR amplification were not consistent in some potato genotypes, reflecting that both methods have some defects. The desirable results could be obtained by combining the two methods.

**Key Words:** potato; late blight; avirulence gene; resistant gene; transient expression; agro-infiltration

马铃薯是世界第四大粮食作物, 仅次于水稻、玉米和小麦<sup>[1]</sup>。马铃薯在生产过程中受到多种病原菌的危害, 其中由致病疫霉(*Phytophthora infestans*)引起的晚疫病是最严重的病害之一。选育抗晚疫病品种是防治晚疫病最经济、最环保的方法。当前马铃薯抗晚疫病育种利用的抗病基因主要是来自野生种 *Solanum demissum* 的 *R1-R11* 11个主效 *R* 基因<sup>[2]</sup>。这11个主效 *R* 基因已被定位, 其中 *R1*、*R3a* 和 *R3b* 基因已被克隆<sup>[3-5]</sup>; *R1*、*R2*、*R3*、*R4* 和 *R10* 基因已经被广泛的用于马铃薯育种<sup>[6]</sup>。另外来自于不同马铃薯野生种的10多个不同 *R* 基因也已被克隆<sup>[6,7]</sup>, 这些抗病基因的克隆为马铃薯抗晚疫病育种提供了重要基因资源。由于晚疫病病菌变异迅速, 导致马铃薯抗病基因很快失去抗性<sup>[8]</sup>。因此, 在不同产区根据晚疫病生理小种组成来选择合适的抗病品种就显得尤为重要。目前国内研究者已开展了马铃薯产区晚疫病病菌生理小种变化的动态监测, 基本明确了病原菌群体结构, 为晚疫病防治奠定了基础<sup>[9-11]</sup>。中国已育成马铃薯品种近300个, 但是这些品种含有那些抗病基因并不清楚, 这对合理布局含有不同抗性基因的品种防治晚疫病造成很大困难。

根据“基因对基因”假说<sup>[12]</sup>, 抗病基因产物和病原菌无毒基因(*Avr*)产物识别可以产生过敏反应(Hypersensitive response, HR), 因此, 理论上可以利用病原菌无毒基因鉴别寄主所含相应抗病基因。目前已在晚疫病病菌中鉴定了数个无毒基因(*Avr1-R1*、*Avr2-R2*、*Avr3a-R3a*、*Avr3b-R3b* 和 *Avr4-R4* 等), 这些无毒基因产物与其对应抗病基因产物识别可以产生典型HR反应<sup>[13]</sup>。本氏烟草农杆菌注射瞬时表达技术(Agro-infiltration)已成功用于马铃薯抗性(*R*)基因与病原物无毒(*Avr*)基因间的相互作用研究<sup>[14]</sup>。但在马铃薯上进行农杆菌注射瞬时表达还存在一定困难, 主要表现在基因型依赖性, 有些材料不适合注射, 有些材料注射后没有反应。作为一种探索性工作, 本研究利用 Agro-infiltration 技术将几个

已知晚疫病病菌无毒基因在不同马铃薯材料叶片中进行瞬时表达, 根据HR反应发生情况, 期望快速、准确鉴定马铃薯栽培品种及育种材料所含抗病基因, 为利用抗病品种合理布局防治晚疫病和抗病育种奠定技术基础。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 马铃薯材料

马铃薯鉴别寄主材料LBR-R1, 2, 3, 4和10种薯由华中农业大学实验室保存, 经过催芽在塑料大棚内种植。栽培品种‘华恩1号’、‘青薯168’、‘会-2’、‘郑薯5号’和‘鄂马铃薯3号’及育种材料‘93008’、‘93011’和‘93014’叶片采自马铃薯实验室温室种植材料。

### 1.2 无毒基因瞬时表达载体

含有 *Avr1*, *Avr2*, *Avr3a*, *Avr4* 和 *Avr10* 晚疫病病菌无毒基因的双元表达载体由华中农业大学马铃薯实验室提供, 无毒基因插入双元表达载体 pCB-302-3 中。含有 p19 质粒的表达载体用于防止外源基因沉默。pCB-302-3 空载体为阴性对照, 含有 *Avr3a/R3a* 或 *Vnt1/AvrVnt1* 基因对的载体为阳性对照。所有质粒都转化到农杆菌菌株GV3101中。

### 1.3 农杆菌活化、扩大培养和注射用农杆菌菌液准备

(1)活化: 将含有相应无毒基因载体的保存菌液在含有 Rif 和 Kan(50 mg/L) LB 固体培养基(胰蛋白胨 10 g/L, 酵母提取物 5 g/L, NaCl 10 g/L, 琼脂 15 g/L) 平板上划线活化, 36~48 h 后挑选单菌落, 在含有相应抗生素的 1 mL LB 液体培养基中于 28℃, 250 r/min 培养 24 h。

(2)扩大培养: 取 10 μL 上述培养菌液, 加入含有相应抗生素的 5 mL YEB 液体培养基(胰蛋白胨 5 g/L, 酵母提取物 1 g/L, 牛肉浸膏 5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g/L) 的离心管中, 于 28℃, 250 r/min 条件下培养 24 h。

(3)注射菌液准备: 将扩大培养的菌液 4 000 r/

min 离心 10 min 收集菌体, 后加入等体积 MMA (10 mmol/L MES (2-N-吗啡啉乙磺酸), 10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200 mmol/L AS (乙酰丁香酮), pH 5.7) 悬浮液, 悬浮后离心, 4 000 r/min 离心 10 min; 倒掉多余 MMA, 加入 1/2 体积的 MMA, 再次悬浮; 检测 600 nm 下的 OD 值, 用 MMA 稀释到试验所需 OD<sub>600</sub> 值; 加入含 p19 载体的农杆菌, 室温静置 2 h 左右用于注射。

#### 1.4 马铃薯叶片注射

选择较幼嫩 (出苗后 40 d) 健康的马铃薯复叶, 事先在叶片上标注注射位点, 用 2 mL 的一次性注射器吸取菌液, 在划定位置上按压注射, 注意不要损伤叶片, 以免影响 HR 反应的辨别; 每个处理至少做 3 次重复, 复叶叶柄插入装有灭菌水的三角

瓶中, 然后将三角瓶放入大塑料框中, 用塑料膜覆盖置于 (22 ± 2) °C 的房间, 12 h 光照。每天叶面喷水雾一次, 3 d 后观察叶片 HR 发生情况, 记录并拍照。

#### 1.5 马铃薯基因组 DNA 提取与 PCR 扩增

马铃薯材料基因组 DNA 小量抽提采用 CTAB 法。

用于 R 基因 PCR 特异扩增的引物根据已有报道设计, 具体见表 1。PCR 体系 (20 μL): ddH<sub>2</sub>O 15.9 μL, dNTP (10 μmol/L) 0.3 μL, 10×Buffer 2 μL, Primer F (10 μmol/L) 0.3 μL, Primer R (10 μmol/L) 0.3 μL, Taq 酶 0.2 μL, DNA 模板 1 μL。扩增程序: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 50~60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1~2 min, 35 个循环后 72 °C 延伸 10 min。退火温度和延伸时间根据具体引物确定。

表 1 R 基因特异引物序列  
Table 1 R gene specific PCR primers

基因 Gene	引物 Primer	引物序列 (5' → 3' sequence)	大小 (bp) Size	溶解温度 (°C) T <sub>m</sub>	参考文献 Reference
<i>R1</i>	<i>R1</i> -DiaF	CACTCGTGACATATCCTCACTA	1400	50	[3]
	<i>R1</i> -DiaR	CAACCCTGGCATGCCACG			
<i>R2</i>	<i>R2</i> -DiaF	TACTAACCTTTTCCTAGATG	800	58	[15]
	<i>R2</i> -DiaR	AGAACTTTCTCACAGCTTTT			
<i>R3a</i>	<i>R3a</i> -DiaF	ATCGTTGTCATGCTATGAGATTGTT	980	56	[4]
	<i>R3a</i> -DiaR	CTTCAAGGTAGTGGGCAGTATGCTT			
<i>R2</i> family	<i>R2</i> -F1	GCTCCTGATACGATCCATG	682	50	[16]
	<i>R2</i> -R3	ACGGCTTCTTGAATGAA			
<i>Rpi-abpt</i>	<i>R2</i> -F1	GCTCCTGATACGATCCATG	686	50	[16]
	<i>R2</i> -R3	ACGGCTTCTTGAATGAA			

## 2 结果与分析

### 2.1 瞬时表达体系的优化

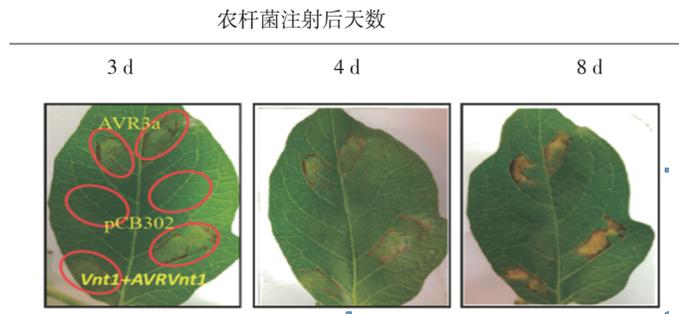
农杆菌浓度是影响瞬时表达效果的关键因素。本试验首先在马铃薯鉴别寄主 ‘LBR-R3’ 叶片上分别注射不同 OD<sub>600</sub> 值 (0.5, 1.0 和 1.5) 的含有 *Avr3a* 载体、阴性和阳性对照载体的农杆菌 (添加含有 p19 载体农杆菌), 观察注射后马铃薯叶片的 HR 反应。结果显示在注射 8 d 后, 3 个浓度阳性对照和 *Avr3a* 注射点都出现明显 HR 反应, 但是当 OD<sub>600</sub> 值为 1.5 时, 个别阴性对照也会出现比较弱的 HR 反应, 而 OD<sub>600</sub> 值为 0.5, 1.0 时阴性对照病均未出现 HR 反应。表明 OD<sub>600</sub> 值为 0.5 菌液浓度适合在马铃薯上瞬时表达, 浓度高时可能引起假象。图 1 显示

鉴别寄主 ‘LBR-R3’ 叶片用 OD<sub>600</sub> 0.5 农杆菌液注射不同天数后 HR 反应发生情况。

### 2.2 5 个病原菌 *Avr* 基因在含有相应 R 基因鉴别寄主上的表型

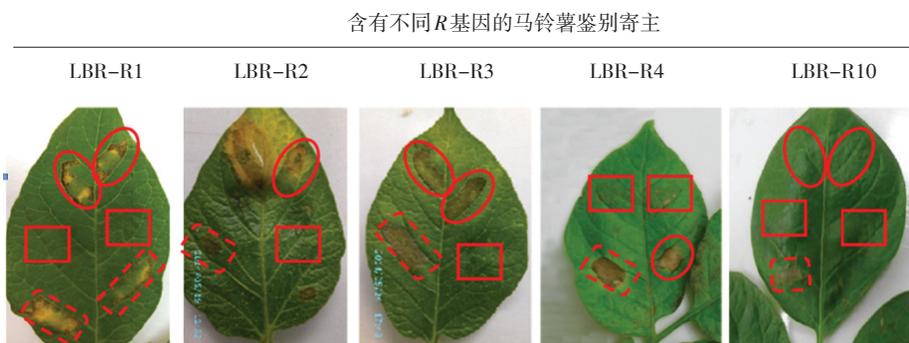
为了鉴别 *Avr1*, *Avr2*, *Avr3a*, *Avr4* 和 *Avr10* 5 个病原无毒基因在含有相应抗病基因的鉴别寄主上能否诱发 HR 反应, 本研究分别在 5 个鉴别寄主上用 OD<sub>600</sub> 0.5 的农杆菌液进行叶片注射。结果显示注射后 3~7 d, *Avr1*, *Avr2*, *Avr3a* 和 *Avr4* 在相应鉴别寄主上能够诱发 HR 反应, 但 *Avr10* 没有诱发 HR 反应 (图 2)。

进一步统计了无毒基因在相应鉴别寄主上 HR 的发生频率 (表 2), 结果显示阳性对照在所有马铃薯材料上均出现 HR, 阴性对照均未出现 HR。从



○ 椭圆表示农杆菌注射部位。Avr3a 为 R3a 对应无毒基因, 阴性对照为空载体 pCB-302-3, 阳性对照同时注射 Vnt1 和 AvrVnt1 基因。  
 ○ represents agro-infiltration sites. Avr3a is the avirulence gene corresponding to R3a. Plasmid pCB-302-3 is used as negative control. Co-infiltration of Vnt1 and AvrVnt1 are used as positive control.

图1 OD<sub>600</sub> 0.5 农杆菌菌液(含有 Avr3a)注射鉴别寄主 ‘LBR-R3’ 叶片不同天数后 HR 表型  
 Figure 1 HR development on potato ‘LBR-R3’ leaves after agro-infiltrating with 0.5 OD<sub>600</sub> Agrobacterium suspensions (containing Avr3a)



○ 代表相应无毒基因注射点; □ 代表空白载体 pCB-302-3 注射点; [ ] 代表阳性对注射点(同时注射 Vnt1 和 AvrVnt1 基因)。  
 ○ represents agro-infiltration sites of avirulence gene; □ represents agro-infiltration sites of empty vector pCB-302-3 (negative control); [ ] represents agro-infiltration sites co-expressing Vnt1 and AvrVnt1(positive control).

图 2 无毒基因 Avr1、Avr2、Avr3a、Avr4 和 Avr10 在相应鉴别寄主上诱发的 HR 反应  
 Figure 2 HR triggered by transient expressing Avr1, Avr2, Avr3a, Avr4 and Avr10 on R gene diagnose potato materials

表 2 马铃薯鉴别寄主上的 HR 发生频率  
 Table 2 HR frequency appeared on corresponding ‘LBR-R’ plant leaves

无毒基因 Avirulence gene	不同马铃薯鉴别寄主				
	LBR-R1	LBR-R2	LBR-R3	LBR-R4	LBR-R10
Avr1	HR(31/42)	N	N	N	N
Avr2	N	HR(12/12)	N	N	N
Avr3a	HR	N	HR(24/24)	N	N
Avr4	N	N	N	HR(8/24)	N
Avr10	N	N	N	N	N
Vnt1+AvrVnt1(阳性对照)	HR(15/24)	HR(12/12)	HR(15/15)	(HR15/24)	HR(16/24)
pCB302-3(阴性对照)	N	N	N	N	N

注: HR 为过敏反应; N 为无 HR; 括号内数据表示 HR 发生频率 (HR 发生点/总注射点数)。

Note: HR-hypersensitive response; N-no hypersensitive response; numbers in bracket means frequency of HR occurrence (HR occurring sites/total infiltration sites).

表2可以看出, *Avr1*, *Avr2*, *Avr3a* 和 *Avr4* 均在对应的‘LBR-R’上产生HR; *Avr10* 未出现HR。 *Avr2*, *Avr3a* 重复性最好, 为100%, *Avr1* 次之, *Avr4* 重复性最差。结果表明在有足量重复的前提下, 利用这些病原无毒基因、采用农杆菌注射法检测寄主含有相应抗性基因是可靠的。

### 2.3 马铃薯栽培品种及育种材料叶片无毒基因农杆菌注射结果

为了检测这5个晚疫病菌无毒基因能否在栽培品种和育种材料上激发HR反应, 从而判断这些品种可能含有的抗病基因, 选取栽培品种‘华恩1号’、‘早大白’、‘会-2’、‘中薯3号’和‘鄂马铃薯3号’、‘郑薯5号’及育种材料‘93008’、‘93011’和‘93014’叶片进行了3次重复农杆菌注射试验。结果表现出三种类型(图3): A. 阳性对照出现HR, 空

白未出现HR, 表明这些马铃薯材料(‘鄂马铃薯3号’, ‘93008’、‘93011’和‘93014’)适合农杆菌注射(图3A)。B. 所有叶片注射点均产生明显的坏死斑, 表明这些材料(‘华恩1号’、‘早大白’和‘会-2’)对农杆菌侵染表现很敏感(图3B), 不适合采用农杆菌瞬时表达技术来鉴定其所含晚疫病抗性基因。C. 注射点均未产生明显的HR(图3C), 表明此类马铃薯材料(‘中薯3号’、‘郑薯5号’)对农杆菌侵染表现很不敏感, 这类材料也不适合采用农杆菌瞬时表达技术来鉴定其所含晚疫病抗性基因。

‘鄂马铃薯3号’经相应无毒基因鉴定可能含有抗病基因 *R1*、*R2*、*R3*、*R4* 和 *R10*, 育种材料‘93008’可能含有抗病基因 *R2*、*R3* 和 *R4*, 育种材料‘93011’和‘93014’可能含有抗病基因 *R2* 和 *R3* (图3A)。

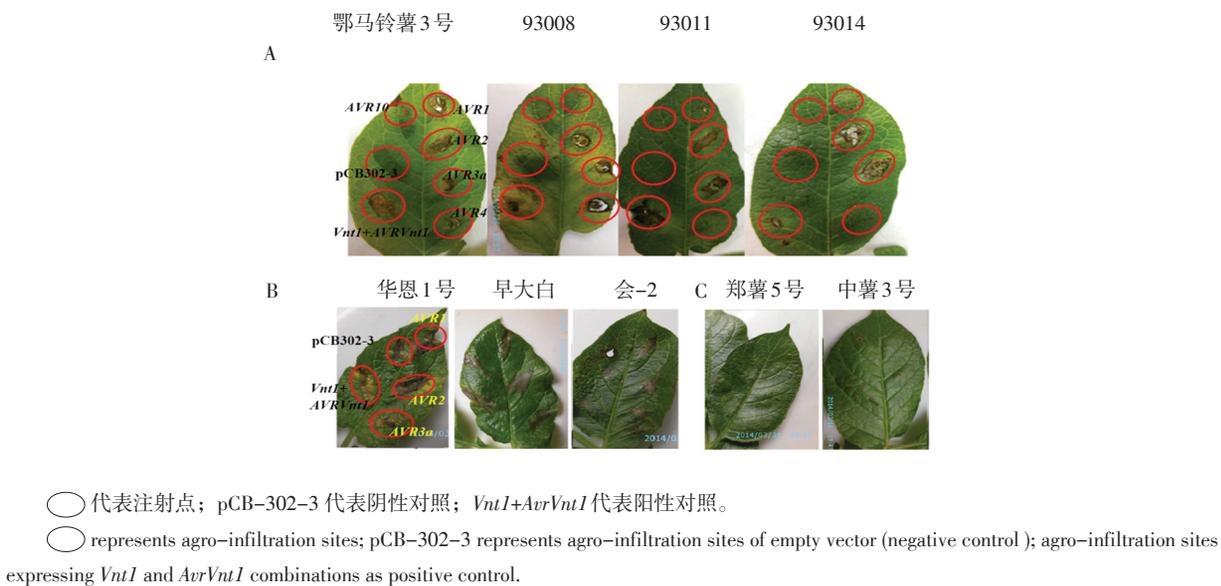


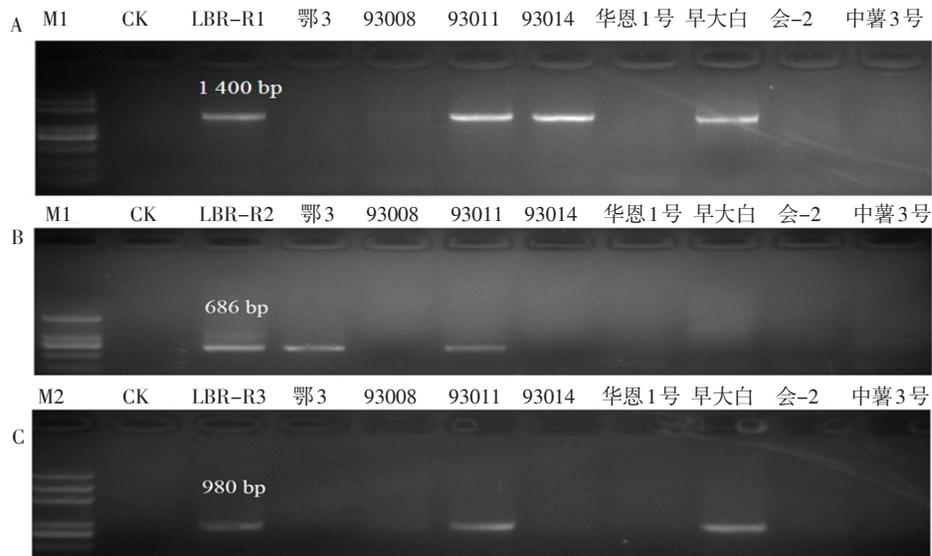
图3 不同马铃薯品种(材料)叶片注射无毒基因后的表型

Figure 3 Phenotype on different potato leaves after infiltration with different *Avr* genes

### 2.4 R基因特异性引物PCR检测

为了检验无毒基因农杆菌瞬时表达鉴定结果是否与分子检测一致, 本研究根据文献报道的5对晚疫病抗病基因特异引物序列合成PCR扩增引物(表1)。以抽提的马铃薯基因组DNA为模板进行PCR扩增。结果显示 *R2*、*R2* family 和 *R4* 3对基因特异引物无PCR扩增产物。 *R1*、*Rpi-abpt* 和 *R3a* 基因特异引物可以扩增出预期大小的带型。马铃薯材料‘93011’、‘93014’和品种‘早大白’能够扩

增出 *R1* 片段(1 400 bp)的条带(图4A), ‘鄂马铃薯3号’和‘93011’能够扩增出 *Rpi-abpt*(686 bp)片段(图4B); 马铃薯材料‘93011’和品种‘早大白’能够扩增出 *R3a* 片段(980 bp)(图4C)。尽管本研究使用文献报道的R基因特异引物进行扩增, 并且扩增出与目标片段大小一致的产物, 但由于没有对产物进行测序, 因此, 不能准确判断扩增出的片段就是对应R基因的片段, 也有可能是其等位基因产物。



A: *R1* 基因特异引物扩增; B: *Rpi-abpt* 基因特异引物扩增; C: *R3a* 基因特异引物扩增; CK: 空白对照 (模板为 ddH<sub>2</sub>O); M1: 分子量标准 Trans 2K Plus; M2: 分子量标准 DL2000。

A: *R1* gene specific primers PCR amplification; B: *Rpi-abpt* gene specific primers PCR amplification; C: *R3a* gene specific primers PCR amplification; CK: negative control (ddH<sub>2</sub>O is used as PCR template); M1: molecular marker Trans 2K Plus; and M2: molecular marker DL2000.

图 4 *R1*、*R2*、*R3a* 和 *R4* 基因在马铃薯材料中的 PCR 鉴定

Figure 4 PCR amplification in different potato materials using *R* gene specific primers

表 3 农杆菌注射结果与基因特异引物 PCR 结果比较

Table 3 Comparison of agro-infiltration and *R* gene specific primers PCR amplification results

马铃薯材料 Potato materials	<i>Avr1</i>		<i>R2</i>		<i>Avr3a</i>		<i>Avr4</i>	<i>Avr10</i>	<i>Rpi-abpt</i>
	分子标记	注射结果	分子标记	注射结果	分子标记	注射结果	注射结果	注射结果	分子标记
	Molecular marker	Infiltration result	Molecular marker	Infiltration result	Molecular marker	Infiltration result	Infiltration result	Infiltration result	Molecular marker
LBR-R1	+	+							
LBR-R2			-	+					+
LBR-R3					+	+			
LBR-R4							+		
LBR-R10								-	
鄂马铃薯 3 号	-	+	-	+	-	+	+	-	+
93008	-	-	-	+	-	+	+	-	-
93011	+	-	-	+	+	+	-	-	+
93014	+	-	-	+	-	+	-	-	-
华恩 1 号	-	-	-	-	-	-	-	-	-
早大白	+	-	-	-	+	-	-	-	-
会-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
中薯 3 号	-	-	-	-	-	-	-	-	-

注: “+”代表出现 HR 或扩增出相应 *R* 基因特异性条带; “-”代表无。

Note: “+” represents HR occurrence or presence of *R* gene specific amplification bands; “-” represents no HR or *R* gene specific amplification bands.

### 2.5 两种方法的一致性比较

为了比较农杆菌注射与 *R* 基因特异引物 PCR 结果之间的异同, 将两种方法的结果进行了归类

(表 3)。由表 3 可看出, 对于鉴别寄主 ‘LBR-R1’ 和 ‘LBR-R3’, 病原无毒基因 *Avr1* 和 *Avr3a* 农杆菌注射结果与 PCR 结果一致。*Avr2* 和 *Avr4* 尽管农杆

菌注射结果为阳性, 但 PCR 没有扩增出目标带。对于马铃薯品种和育种材料, *Avr2* 和 *Avr3a* 农杆菌注射在 4 个材料(‘鄂马铃薯 3 号’、‘93008’、‘93011’和‘93014’)中出现阳性的频率较高, 但是无相应 PCR 扩增产物。材料‘93011’、‘93014’和‘早大白’PCR 扩增出 *RI* 目标带, 但是 *Avr1* 注射为阴性。由此可见, 两种方法鉴定结果存在不一致性。

### 3 讨 论

明确现有马铃薯品种含有的晚疫病抗病基因, 对于合理利用品种抗性防治马铃薯晚疫病具有重要意义。马铃薯晚疫病抗性基因的鉴定一般采用接种含有已知无毒基因的晚疫病小种, 通过抗性反应来推断其是否含有相应抗性基因, 这种方法费时费力。目前, 中国绝大多数栽培品种所含晚疫病抗病基因种类不清楚, 本研究利用晚疫病无毒基因农杆菌瞬时表达技术探索鉴别马铃薯品种含有的抗病基因的方法, 以期利用该方法鉴定马铃薯栽培品种及育种资源晚疫病抗性基因奠定基础。

从研究结果(表 2)来看, *Avr1*、*Avr2*、*Avr3a* 和 *Avr4* 均能够在对应的鉴别寄主上产生 HR, 表明这 4 个无毒基因注射结果是可靠的。但是, 不同无毒基因注射点出现 HR 的频率有一定差异。如果注射点有足够数量, 利用该方法鉴定马铃薯材料所含抗病基因还是可靠的。农杆菌瞬时表达时菌液浓度是一个重要参数, 从本研究结果来看, 0.5 OD<sub>600</sub> 是比较理想的浓度。农杆菌本身作为一种植物病原菌, 很容易引起马铃薯系统抗性, 因此, 浓度太高时可能导致注射点出现坏死斑, 造成假象。由于不同马铃薯材料的叶片厚薄和致密程度差别很大, 有些马铃薯材料很难注射; 本研究结果显示叶片生理状态也是一个显著影响农杆菌注射效果的关键因素, 不同叶龄的叶片敏感性不同, 充分展开的幼嫩叶片容易注射, HR 出现的时间也比较快, 老叶很不敏感, 不适宜农杆菌瞬时表达。另外发现有些马铃薯材料即使幼叶也不能产生 HR 反应。可见农杆菌瞬时表达在马铃薯材料上存在明显的基因型和叶龄依赖性。

理论上马铃薯现有品种抗性基因的鉴定也可利用已知抗病基因特异引物和分子标记进行 PCR 鉴定, 但是到目前为止, 能够用于进行抗病基因分子诊断的实用基因特异引物和分子标记并不多<sup>[17]</sup>。本

研究利用文献报道的基因特异引物进行了 PCR 扩增, 结果显示在鉴别寄主上只有 *Avr1* 和 *Avr3a* 农杆菌注射结果与 PCR 结果一致。其余无毒基因农杆菌注射结果与 PCR 结果并不一致, 有的无毒基因农杆菌注射结果为阳性, PCR 结果为阴性, 有的无毒基因农杆菌注射结果为阴性, PCR 结果为阳性。反映了这两种方法的局限性和复杂性。PCR 结果也有不确定的因素, 一则抗病基因往往与无功能的假基因或同源体成簇出现, 即便是基因特异引物也有可能出现假阳性扩增, 例如有可能扩增出 R 基因的等位基因; 二则即便是同一抗病基因, 在不同马铃薯材料中可能存在碱基序列变化, 如果碱基序列变异位置位于引物结合区域, 也可能导致不能扩增。另外, 马铃薯材料中也有可能存在多个识别同一无毒基因产物的蛋白。综上所述, 无毒基因农杆菌注射和基因特异引物 PCR 扩增鉴定马铃薯材料所含抗病基因都存在不足之处。若将 *Avr* 基因农杆菌瞬时表达和抗病基因特异引物 PCR 扩增结合起来, 则会提高鉴定的准确性。如果两种方法一致, 鉴定的准确性会更可靠; 即使不一致, 至少两种方法能够提供互补的有价值信息, 可以帮助我们判断马铃薯材料可能含有那些抗病基因。

### [ 参 考 文 献 ]

- [1] 谢从华. 马铃薯产业的现状与发展 [J]. 华中农业大学学报: 社会科学版. 2012, 97(1): 1-4.
- [2] Black W, Marstenbroek C, Mills W. A proposal for an international nomenclature of races of *Phytophthora infestans* and of genes controlling immunity in *Solanum demissum* derivatives [J]. Euphytica, 1953, 2: 173-178.
- [3] Ballvora A, Ercolano M R, Weiss J. The *RI* gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes [J]. Plant J, 2002, 30(3): 361-371.
- [4] Huang S, vander Vossen A G, Kuang H, et al. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato [J]. Plant J, 2005, 42 (2): 261-271.
- [5] Li G, Huang S, Guo X, et al. Cloning and characterization of *R3b*; members of the *R3* superfamily of late blight resistance genes show sequence and functional divergence [J]. Mol Plant Microbe Interact, 2011, 24(10): 1132-1142.

[ 6 ] Vleeshouwers, V G A A, Raffaele S, Vossen J, *et al.* Understanding and exploiting late blight resistance in the age of effectors [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 2011, 49: 507–531.

[ 7 ] Hein I, Birch P R J, Danan S, *et al.* Progress in mapping and cloning qualitative and quantitative resistance against *Phytophthora infestans* in potato and its wild relatives [J]. *Potato Res*, 2009, 52 (3): 215–227.

[ 8 ] Fisher M C, Henk D A, Briggs C J, *et al.* Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health [J]. *Nature*, 2012, 484 (7393): 186–194.

[ 9 ] 朱杰华, 杨志辉, 张凤国, 等. 马铃薯晚疫病菌群体遗传结构研究进展 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(9): 1936–1942.

[ 10 ] 吕新, 兰成忠, 李本金, 等. 福建致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 群体遗传多样性分析 [J]. *福建农业学报*, 2008, 23(2): 149–153.

[ 11 ] 李洪浩. 四川马铃薯晚疫病菌群体遗传多样性分析 [D]. 成都: 四川农业大学, 2011.

[ 12 ] Flor H H. Current status of the gene-for-gene concept [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1971, 78: 275–298.

[ 13 ] Hraverkort A, Struik P, Visser R, *et al.* Applied biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans* [J]. *Potato Res*, 2009, 52: 249–264.

[ 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]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2012, 25(7): 910–919.

[ 15 ] Mori K, Sakamoto Y, Mukojima N, *et al.* Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato [J]. *Euphytica*, 2011, 180(3): 1–9.

[ 16 ] 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]. *Theor Appl Genet*, 2012, 124(5): 923–935.

[ 17 ] Tiwari J K, Siddappa S, Singh B P, *et al.* Molecular markers for late blight resistance breeding of potato: an update [J]. *Plant Breeding*, 2013, 132(3): 237–245.

## 《中国马铃薯》杂志约稿函

《中国马铃薯》杂志是目前全国唯一的马铃薯专业科技期刊, 国际刊号: ISSN 1672-3635, 国内刊号: CN 23-1477/S, 邮发代号: 14-167, 国内外公开发行人。它以繁荣我国马铃薯产业为办刊宗旨, 积极报道国内外有关马铃薯的学术研究、科研动态和各种实用技术的最新消息。该刊由东北农业大学和中国作物学会主管, 由东北农业大学和中国作物学会马铃薯专业委员会主办。《中国马铃薯》(原名《马铃薯杂志》)创刊于1987年。2000年经申请报国家新闻出版总署审批, 更名为《中国马铃薯》, 同年改为大16开本, 并增加彩色广告。2001年《中国马铃薯》经报黑龙江省科委及省新闻出版局批准, 将原来的季刊改为双月刊。

《中国马铃薯》立足国内, 并刊登一些其他国家作者的英文稿件。它集学术性和技术性于一体, 是马铃薯科研、生产、经销单位和用户之间信息交流的一个平台。《中国马铃薯》不同于其他园艺类期刊, 刊登的文章全部是有关马铃薯的, 主要栏目包括: 遗传育种、栽培生理、病虫害防治、土壤肥料、产业开发、品种介绍、综述及其他。

该刊于2008年1月1日起开始执行作者在线投稿, 进一步提高了工作效率和办公自动化水平, 方便作者查询。欢迎专业委员会各位委员及广大读者踊跃投稿, 投稿时请登录《中国马铃薯》稿件远程处理系统。

网址: <http://mlsz.cbpt.cnki.net/WKA2/WebPublication/index.aspx?mid=mlsz>。

《中国马铃薯》杂志编辑部  
2014年8月25日