

·学术园地·

cDNA-AFLP 结合 BSA 研究马铃薯晚疫病菌小种特异无毒基因差异表达片段

郭军^{1,2}, 屈冬玉^{1*}, 王晓武¹, 金黎平¹, 谢开云¹, Rays Jiang², Francine Govers²

(1. 中国农科院蔬菜花卉研究所, 北京 100081;

2. Laboratory of Phytopathology, Wageningen University and Graduate School of Experimental Plant Sciences, Binnenhaven 9, 6709 PD Wageningen, The Netherlands)

摘要: 通过对具有 6 个无毒基因不同表型的马铃薯晚疫病菌构建的 4 个混合池进行 cDNA-AFLP 分析, 得到与 6 个与无毒基因相关的差异表达片段 (TDFs) 85 条, 其中与无毒基因 Avr1 相关的为 20 条, Avr2 28 条, Avr3-Avr10-Avr11 16 条, Avr4 21 条。差异表达片段大小主要分布在 100 bp 和 300 bp 之间, 最小片段为 60 bp, 最大片段 440 bp。差异表达片段的获得将有利我们下一步克隆全长无毒基因和对晚疫病垂直抗性机制的研究。

关键词: 马铃薯晚疫病菌; 小种特异无毒基因; cDNA-AFLP; BSA; 差异表达序列

中图分类号: S532

文献标识码: A

文章编号: 1672-3635 (2004) 01-001-03

由致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 引起的马铃薯晚疫病是马铃薯生产中最严重的病害, 也是所有农作物中造成损失最严重的病害, 是世界粮食生产中的主要威胁^[1]。过去十多年来, 全世界许多植物病理学家开始着手于病原菌的研究, 特别是病菌的致病因子和非致病因子, 希望通过从病菌的角度出发揭示其致病机制和寄主抗性机制, 以防治全世界日趋严重的马铃薯晚疫病。病菌的无毒基因 (Avirulence Gene, 简称 Avr 基因) 是非致病因子中研究的热点, 是病原物中决定对带有相应抗病基因的寄主植物特异的不亲和和无毒性基因。无毒基因已在多种植物病原物, 包括真菌^[2]、细菌^[3]、病毒^[4]和卵菌^[5]等中得到克隆。目前荷兰瓦赫宁根大学植物病理实验室 Govers 研究小组正在利用图位克隆法鉴定马铃薯晚疫病菌无毒基因并且取得较大的进展^[6~8]。然而, 目前他们面临的最大的困难在于构建图谱的 F₁ 代群体太小, 同时无毒基因的标记密度太低。因此短期内利用此方法克隆马铃薯晚疫病菌无毒基因是不可能的。

收稿日期: 2003-12-20

中-荷联合国园艺作物基因组技术实验室资助项目。

作者简介: 郭军 (1974-), 男, 中国农科院蔬菜花卉所在读博士生, 主要从事马铃薯晚疫病菌分子遗传学研究。

cDNA-AFLP 是近年来发展起来的一种重要的转录基因组学工具, 被广泛用于基因差异表达的研究^[9,10]。本研究拟通过利用该技术并结合 BSA (Bulk Segregant Analysis) 方法研究马铃薯晚疫病菌正在萌发的孢囊时期 (germinating cyst) 的 6 个无毒基因在转录水平上的表达, 期望初步获得与 6 个无毒基因相关的差异表达片段。

1 材料与方法

1.1 BSA 分析

供试菌株由荷兰瓦赫宁根大学植物病理实验室 Govers 研究小组提供^[6], 包括亲本 80029 (生理小

表 1 用来筛选与无毒基因有关的差异表达片段构建的 4 个池

	Strain	Avr1	Avr10	Avr11	Avr3	Avr4	Avr2
Pool1	rell-16	Avr*	aa**	aa	aa	Avr	Avr
	T15-1	Avr	aa	aa	aa	Avr	Avr
	T30-2	Avr	aa	aa	aa	Avr	Avr
Pool2	D12-2	aa	aa	aa	aa	aa	Avr
	D12-23	aa	aa	aa	aa	aa	Avr
	T35-3	aa	aa	aa	aa	aa	aa
Pool3	D12-17	Avr	Avr	Avr	Avr	aa	aa
	T15-9	Avr	Avr	Avr	Avr	aa	aa
Pool4	T20-2	aa	Avr	Avr	Avr	Avr	Avr
	E12-3	aa	Avr	Avr	Avr	Avr	aa

* 通讯作者

* 菌株具有此无毒基因的表现型; ** 菌株没有此无毒基因的表现型

种 2.4.7; A1 交配型) 和 88133 (生理小种 1.3.7.10.11; A2 交配型) 以及它们的 10 个 F₁ 代, 根据 10 个菌株 6 个无毒基因表型构建 4 个混合池 (表 1), 用来初步确定代表无毒基因的候选转录表达片段 (TDFs)。

1.2 RNA 提取和双链 cDNA 的合成

晚疫病菌株培养至正在萌发的孢囊时期, 培养方法参见文献^[11]。利用 Trizol 试剂盒提取总 RNA, cDNA 的合成按照 SuperScript™ Double-Stranded cDNA Synthesis Kit 合成, 这两种试剂盒由 Invitrogen 生物技术公司提供。

1.3 cDNA-AFLP 差异显示

cDNA-AFLP 体系及程序参照 Christian 等^[12]的方法, 使用 Licor 公司生产的 IR² DNA Analyzer 5200 型测序仪电泳分析。利用 16 个荧光标记的 ApoI+2 引物和 16 个非荧光标记的 TaqI+2 引物, 共 256 个引物组合进行差异片段的筛选。

2 结果与分析

2.1 6 个无毒基因相关片段在 4 个池上的表达形式

根据构建的 4 个池进行 cDNA-AFLP 分析, 预期的无毒基因表达形式应如图 1A 所示。无毒基因 *Avr1* 在池 1 和池 3 中能够表达, 而在池 2 和池 4 中不表达; 无毒基因 *Avr2* 在池 1, 2, 4 中都能表达, 却不能在池 3 中表达; 无毒基因连锁群 *Avr3-Avr10-Avr11* 在池 1 和池 2 中不表达, 而在池 3 和池 4 中表达; 无毒基因 *Avr4* 在池 1 和 4 中表达,

在池 2 和池 3 中不表达。经过电泳分析, 得到了大量的与图 1 完全相符的由不同引物组合扩增出的差异表达片段 (图 1B)。

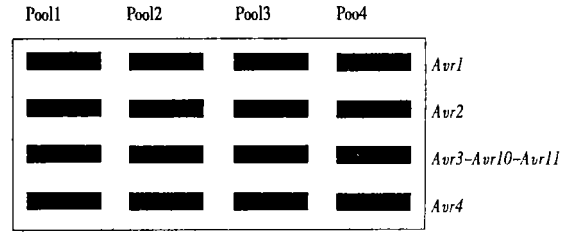


图 1A 预期的 6 个无毒基因表达形式

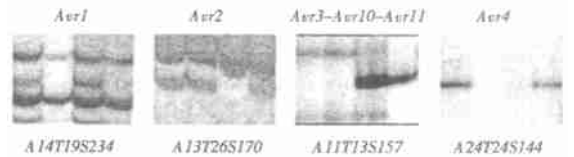


图 1B 不同引物组合在 4 个池中扩增出的 6 个无毒基因的差异表达片段

2.2 马铃薯晚疫病病菌无毒基因差异表达片段分析

通过 256 个 ApoI+2 和 TaqI+2 引物组合对 4 个池的筛选, 从 4 个池中扩增出大约 30000 条清晰可见的条带, 得到与 6 个无毒基因有关的差异表达片段 (TDFs) 85 条, 其中与无毒基因 *Avr1* 相关的为 20 条, *Avr2* 28 条, *Avr3-Avr10-Avr11* 16 条, *Avr4* 21 条。由图 2 可以看出, 差异表达片段大小分布在 60 bp 到 440 bp 之间, 主要分布在 100 bp 和 300 bp 之间, 最小片段为 60 bp, 最大片段 440 bp。

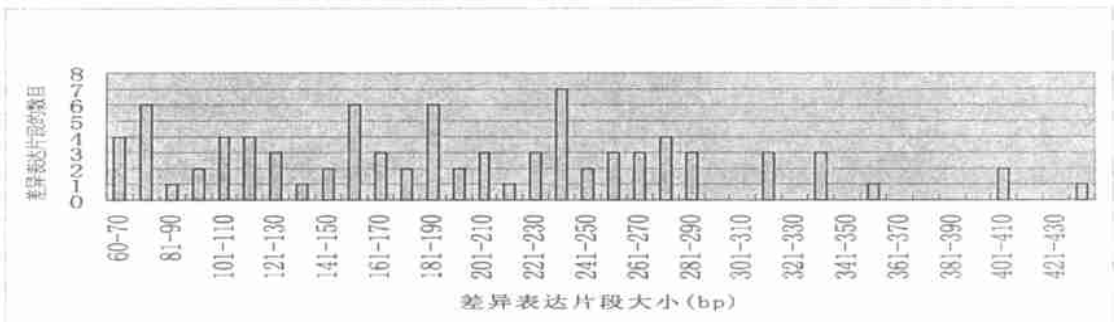


图 2 与 6 个无毒基因相关的差异表达片段大小分布

3 讨论

cDNA-AFLP 技术是研究基因表达的一种新方法, 由于使用严格的 PCR 条件和加接头的方法, 具有较高的重复性。它不仅可以快速简单地观察某

一特定时期的基因表达, 而且可以同时观察不同时期的基因表达, 有利于系统研究基因表达和基因间的相互作用。在本实验中, 通过利用 cDNA-AFLP 技术对构建的 4 个池的 BSA 分析, 初步得到了 85 条与 6 个无毒基因相关的 TDFs (Transcript Derived

Fragments)。这些结果表明利用 cDNA-AFLP 技术可以研究马铃薯晚疫病菌不同特异生理小种和病菌特定生长时期的基因表达, 同时结合 BSA 策略, 可以使我们发现与无毒基因相关的 TDFs, 为晚疫病垂直抗性机制研究和晚疫病菌无毒基因的克隆提供了一条快速有效的途径。下一步我们将对这些 TDFs 在 20 个具有 6 个无毒基因不同表型的马铃薯晚疫病菌个体上进行验证, 对一些有希望的 TDFs 进行 Blast 分析, 进一步获得无毒基因的候选片段, 为最终获得全长无毒基因打下基础。

参 考 文 献

- [1] Erwin D C, O K Ribeiro. *Phytophthora* disease worldwide [M]. APS Press, 1996, Saint Paul, MN, USA.
- [2] Joosten M H A J, De Wit P J G M. The tomato-*Cladosporium fulvum* interaction: a versatile experimental system to study plant-pathogen interactions [M]. Annual Review of Phytopathology, 1999, 37, 335-367.
- [3] Staskawica B J, Douglas D, Keen N T. Cloned avirulence gene of *Pseudomonas syringae* pv. *Glycinea* determines race-specific incompatibility on *Glycine max* (L), Merr. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81, 6024-6028.
- [4] Erickson F L, Holzberg S, Calderon Urrén A, et al. The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N² mediated defense response in tobacco [J]. Plant Journal, 1999, 18, 67-75.
- [5] Lauge R, De Wit P J G M. Fungal avirulence genes: structure and possible functions [J]. Fungal Genetics and Biology, 1998, 24, 285-299.
- [6] van der Lee T, De Witte I, Drenth A, et al. AFLP linkage map of the oomycete *Phytophthora infestans* [J]. Fungal Genetics and Biology, 1997, 21, 278-291.
- [7] van der Lee T, Robold A, Testa A, et al. Mapping of avirulence genes in *Phytophthora infestans* with Amplified Fragment Length Polymorphism Markers selected by bulked segregant analysis [J]. Genetics, 2001, 157, 949-956.
- [8] Whisson S C, van der Lee T, Bryan G J, et al. Physical mapping across an avirulence locus of *Phytophthora infestans* using a high representation, large insert bacterial artificial chromosome library [J]. Molecular and General Genomics, 2001, 266, 289-295.
- [9] Bachem C W B, van der Hoeven R S, de Bruijn S M, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development [J]. Plant Journal, 1996, 9, 745-753.
- [10] Cooper B. Collateral gene expression changes induced by distinct plant viruses during the hypersensitive resistance reaction in *Chenopodium amaranticolor* [J]. Plant Journal, 2001, 26 (3): 339-496.
- [11] van West P, de Jong A J, Judelson H S, et al. The ipiO gene of *Phytophthora infestans* is highly expressed in invading hyphae during infection [J]. Fungal Genetics and Biology, 1998, 23, 126-138.
- [12] Bachem C W, Oomen R J F, Visser R G F, et al. Transcript imaging with cDNA-AFLP: A step-by-step protocol [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1998, 16, 157-173.

GENE EXPRESSION ASSOCIATED WITH AVIRULENCE GENES IN *PHYTOPHTHORA INFESTANS* IS REVEALED BY cDNA-AFLP COMBINED WITH BULK SEGREGANT ANALYSIS (BSA)

GUO Jun^{1,2}, QU Dong-yu¹, WANG Xiao-wu¹, JIN Li-ping¹,
XIE Kai-yun¹, JIANG Rays², GOVERS Francine²

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

2. Laboratory of Phytopathology, Wageningen University and Graduate School of Experimental Plant Sciences, Binnenhaven⁹, 6709 PD Wageningen, The Netherlands)

ABSTRACT: cDNA-AFLP analysis on 4 pools consisted of *Phytophthora infestans* isolates bearing the different genotypes of six avirulence genes with 256 Apo+2 and Taq+2 PCs, resulting in 20 candidate TDFs for *Avr1*, 28 for *Avr2*, 16 for *Avr3-Avr10-Avr11* and 21 for *Avr4*, so in total 85 interesting TDFs. These TDFs mainly distributed from 100 bp to 300 bp, the minimum size being 60 bp and the maximum size being 440 bp. Obtainment of these TDFs will be beneficial for us to clone full-length avirulence genes and study the mechanism of vertical resistance.

KEY WORDS: *Phytophthora infestans*; race-specific avirulence genes; cDNA-AFLP; BSA; Differentially expressed sequences