

# 马铃薯抗晚疫病主效基因 R10 的 RGA-CAPS 标记的开发

王加加<sup>1,2</sup>, 徐建飞<sup>2</sup>, 李颖<sup>2</sup>, 王凤义<sup>1</sup>, 黄三文<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; <sup>2</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 马铃薯晚疫病抗性基因 R10, 属于马铃薯抗晚疫病主效位点 MLB 单倍型之一, 该位点已知的各单倍型基因均具有保守结构域, 属于同一个 R3a 基因家族。将 R3a 基因和源于 MLB 位点的 R3a 基因的同源序列进行比对, 根据它们高度保守的区域设计引物, 以马铃薯晚疫病鉴别寄主 MaR10 (含抗晚疫病基因 R10)、四倍体马铃薯栽培种 Katahdin (不含已知抗病基因) 及其杂交一代为试材, 得到 R3a 的抗病基因同源序列, 再结合限制性内切酶筛选, 开发出与马铃薯抗晚疫病主效基因 R10 连锁的两个 RGA-CAPS 标记: RGA-600 和 RGA-1000, 这两个标记距离 R10 基因 0.25 cM。

**关键词:** 马铃薯; 晚疫病; R10 基因; RGA-CAPS 标记

中图分类号: S 532 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 06-0885-06

## Developing of RGA-CAPS Markers for Resistant Gene R10 to Potato Late Blight

WANG Jia-jia<sup>1,2</sup>, XU Jian-fei<sup>2</sup>, LI Ying<sup>2</sup>, WANG Feng-yi<sup>1</sup>, and HUANG San-wen<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup> College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; <sup>2</sup> Institute of Vegetable and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** R10 gene conferring resistance to potato (*Solanum tuberosum* L.) late blight is one of haplotypes in major late blight (MLB) resistance complex. Based on sequence analysis for resistant genes known in this complex, it's indicated that these haplotypes have conserved domains and belong to R3a gene family. So twelve primer combinations were designed based on the conserved sequences of R3a gene and its homologs derived from MLB and were used to identify resistance gene analogs (RGA) closely linked to the R10 gene. The conserved primers combinations were screened by a population of the R10 differential (MaR10) and the susceptible potato (*Solanum tuberosum* L.) cultivar Katahdin. The PCR products then were digested with twelve restriction enzymes and were assessed for polymorphism by bulk segregant analysis. The RGA-CAPS marker RGA-600 and RGA-1000 linked 0.25 cM to the R10 gene, were developed and made base for the cloning of R10 gene.

**Key words:** potato; late blight; R10 gene; RGA-CAPS marker

克隆马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 抗晚疫病基因, 构建田间抗晚疫病基因多态性是实现高效、持久的防治马铃薯晚疫病工作的一项重要策略 (徐建飞等, 2006)。目前已有 4 个马铃薯抗晚疫病基因被成功克隆 (Ballvora et al, 2002; Song et al, 2003; Huang et al, 2005; van der Vossen et al, 2003, 2005)。这些抗病基因具有较高的序列一致性, 蛋白产物往往也具有相似的结构域, 如核苷酸结合位点 (nucleotide binding site, NBS), 富含亮氨酸重复 (leucine-rich repeats, LRR), 卷曲螺旋

收稿日期: 2008 - 02 - 27; 修回日期: 2008 - 04 - 24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671319)

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: huangsanwen@caas.net.cn)

(coiled-coil domain, CC) 等。这些结构域在植物对病原物的识别、诱导抗病反应及信号传导等过程中起到非常重要的作用 (Dangl & Jones, 2001)。

从马铃薯野生种 *S. demissum* 导入到栽培种中的 11 个主效基因 ( $R1 \sim R11$ ) 中有 8 个基因 ( $R3, R5 \sim R11$ ) 来自于同一个等位多态性非常高的染色体区域, 即马铃薯抗晚疫病主效位点 MLB (major late blight resistance complex) (Huang, 2005)。该位点和番茄的抗枯萎病位点  $I_5$  同源, 两者都位于第 11 号染色体上, 且都是复合抗病基因位点, 因此  $R3, R5 \sim R11$  被称为 MLB 的单倍型 (haplotypes), 而非经典意义上的等位基因 (alleles)。通过进一步的分子标记分析和对 MLB 的 10 余个细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 的测序了解到 MLB 的单倍型之间具有很大相似性, 都是  $R3a$  的同源基因。

基于以上两点, 作者通过设计保守引物来获得与  $R10$  基因连锁的  $R3a$  基因家族的抗病基因同源序列 (resistance gene analogs, RGAs), 通过限制性内切酶酶切筛选, 构建出两个 RGA-CAPS 标记: RGA-600 和 RGA-1000。这将有助于  $R10$  基因的遗传定位, 为进一步克隆  $R10$  基因奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为四倍体马铃薯 MaR10、Katahdin 及其杂交一代分离群体。亲本由中国农业科学院蔬菜花卉研究所马铃薯研究室提供, 其中 MaR10 含有马铃薯抗晚疫病基因  $R10$ , 基因型为  $R_{10} r_{10} r_{10} r_{10}$  (Muller & Black, 1952; Malcolmson & Black, 1966; Malcolmson, 1969), Katahdin 不含已知抗晚疫病基因, 基因型为  $r_{10} r_{10} r_{10} r_{10}$ , 简称 Kat (徐建飞等, 2007)。

将 MaR10 和 Kat 杂交获得的 410 粒种子播种于 MS 培养基中, 25 °C, 16 h (光) / 8 h (暗) 条件培养, 扩繁后定植于营养钵中, 并置于温室中培养。最终获得包含 400 个单株的杂交一代分离群体, 用于遗传分析和接种鉴定。

晚疫病菌株 89148-9 (0 号小种) 由荷兰 Wageningen 大学的 Francine Govers 博士提供。晚疫病菌株于液氮中保存。

### 1.2 DNA 提取

采取试管苗叶片, 利用 CTAB 法 (Jones & Walker, 1963) 结合高通量的 Retsch 细胞破碎仪 (RETSCH NC, Haan, Germany) 和 96 孔 COSTAR 深孔板 (CORNING NC, New York) 进行 DNA 快速提取。提取的 DNA 溶于 TE 中于 -20 °C 保存。

### 1.3 引物设计

依据马铃薯抗晚疫病基因  $R3a$  及其同源家族基因的序列信息比对结果, 利用 Primer5.0 软件在它们高度保守的区域分别设计 4 个上游引物和 3 个下游引物 (表 1)。引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。将设计的保守引物自由组合成 12 对引物组合。

### 1.4 分离群体分组分析法

根据杂交一代分离群体的接种结果构建抗病池和感病池。抗病池由表现明显过敏反应的 20 个单株组成, 感病池由表现最明显孢子化病斑的 20 个单株组成。两池的 DNA 均由各单株 DNA 等量混合

表 1 保守引物序列

Table 1 Sequence of conserved primers

引物名称 Name	引物序列 Primer sequence (5' - 3')	引物 长度 /bp Length	保守区域 Conserved regions
$R3a$ -1F	ATGGAGATTGGCTTAGCAGTTGG	23	CC
$R3a$ -2F	TTAGCAGTTGGTGGTGCAATTCT	23	CC
$R3a$ -3F	GTTGGTGGTGCAATTCTCTCTTCAG	25	CC
$R3a$ -4F	ATGTCTCTTTGATAGGCTTGCTCC	25	CC
$R3a$ -1R	GCTTCCCTTCTATCAACCACATTTT	25	NBS
$R3a$ -2R	CAGCTTCCCTTCTATCAACCACATTT	25	NBS
$R3a$ -3R	AAGGRAGTTGTCTTAGTGCTGGC	23	NBS

注: F: 上游引物; R: 下游引物。

Note: F: Forward primer; R: Reverse primer

组成 (徐建飞等, 2007)。如果某个标记在抗病亲本和抗病池中具有条带, 而在感病亲本和感病池中缺失条带, 便推断该标记与目的基因连锁, 进而进行分离群体验证。

### 1.5 PCR扩增

PCR扩增体系为: 20  $\mu\text{L}$  反应体系中含 10  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  DNA模板 1.5  $\mu\text{L}$ , 5  $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  上游 primer 1.0  $\mu\text{L}$ , 5  $\text{pmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  下游 primer 1.0  $\mu\text{L}$ , 2  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs 2.0  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$ PCR buffer 2.0  $\mu\text{L}$ , *Taq* DNA聚合酶 (2.5  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 12.1  $\mu\text{L}$ 。*Taq* DNA聚合酶为 Tiangen公司产品。

反应程序: 95  $^{\circ}\text{C}$ , 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$ , 30 s; 退火, 1 min; 72  $^{\circ}\text{C}$ , 2 min, 35个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。

### 1.6 酶切反应

选取的限制性内切酶有: *EcoR*、*HpyCH<sub>4</sub>*、*Hif*、*Hha*、*Hind*、*Dra*、*Sau96*、*HpyCH<sub>4</sub>*、*Xho*、*Ava*、*Hpy188* 和 *Hinc*, 均为 NEB公司产品。

15  $\mu\text{L}$  反应体系中包含 PCR扩增产物 6.0  $\mu\text{L}$ , 10  $\times$ buffer 1.5  $\mu\text{L}$ , 限制性内切酶 1 U, 用 ddH<sub>2</sub>O 补足体积。在酶最适温度下保温 2~3 h后加入 loading buffer终止反应, 用 2% 琼脂糖凝胶在 5 V  $\cdot \text{cm}^{-1}$  电压条件下电泳 1 h, 溴化乙锭染色, Bio-RAD 凝胶成像系统显示。

### 1.7 晚疫病菌活化及抗性鉴定

于黑麦培养基上活化晚疫病菌, 活化的菌株在霉菌培养箱中 16  $^{\circ}\text{C}$  黑暗培养 7~14 d, 待菌丝长满培养皿时加适量无菌水, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  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。

抗性鉴定采取离体叶片接种法 (Vleeshouwers et al, 1999)。接种的游动孢子浓度为  $5 \times 10^4$  spores  $\cdot \text{mL}^{-1}$ , 在叶片背面主叶脉两侧各接种 1滴, 每滴 10  $\mu\text{L}$ 。接种叶片插于岩棉上, 置于接种盒, 密闭保湿。将接种盒放入人工气候箱, 16  $^{\circ}\text{C}$ 、16 h (光)/8 h (暗) 条件诱导发病。接种 6 d后统计发病情况。

抗性分级采用 van der Lee等 (2001) 方法, 从最明显感病的孢子化病斑到最明显抗病的原位坏死, 过敏反应分别记为 1~5级。

### 1.8 连锁性分析

利用 JoinMap3.0软件对杂交一代分离群体重组单株分子标记和晚疫病接种结果进行连锁分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选

用 12对引物组合分别对两亲本 MaR10和 Kat进行扩增, 均扩增出 2 400 bp的主带。选择其中具有代表性的 3对引物组合 (*R3a*-2F + *R3a*-1R, *R3a*-3F + *R3a*-3R, *R3a*-4F + *R3a*-3R) 分别以 MaR10、Kat 抗病池和感病池的 DNA为模板进行扩增。结果表明, 引物组合 *R3a*-3F + *R3a*-3R (退火: 63  $^{\circ}\text{C}$ ) 除扩增出 2 400 bp的主带外, 还扩增出 1 400 bp和 600 bp的条带, 而其他引物没有扩增出这两条带。鉴于该引物组合扩增出的条带数多、一致性好、重复性高和酶切时产生多态性的几率较高等原因, 选择该引物组合来扩增 *R3a*基因的抗病基因同源序列 (RGA) (图 1), 以进一步构建 RGA-CAPS标记。

### 2.2 RGA-CAPS标记的开发

用引物组合 *R3a*-3F + *R3a*-3R, 以 MaR10、Kat 抗病池和感病池的 DNA为模板进行 PCR扩增, 对其扩增产物进行限制性内切酶酶切, 构建 Caps标记。结果表明: *HpyCH<sub>4</sub>* 酶切时, 在抗病亲本 (MaR10) 和抗病池中能够切出约 600 bp的条带, 而感病亲本 (Kat) 和感病池的酶切产物中没有此条带; 用 *Ava* 酶切时, 在抗病亲本 (MaR10) 和抗病池中能够切出约 1 000 bp的条带, 而感病亲本 (Kat) 和感病池的酶切产物中没有此条带, 符合分离群体分组分析。所以将这两个限制性内切酶酶

切的特异片段构建成 CAPS 标记, 分别记为 RGA-600 和 RGA-1000 (图 2)。

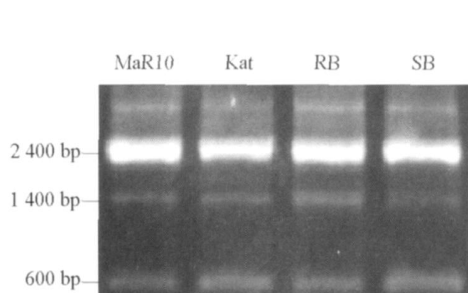


图 1 引物组合 (R3a-3F + R3a-3R) 的 PCR 扩增

MaR10: 抗性亲本; Kat: 感性亲本; RB: 抗病池; SB: 感病池。

Fig 1 The PCR of primer (R3a-3F + R3a-3R)

MaR10: Resistant plant; Kat: Susceptible plant;

RB: Resistant bulk; SB: Susceptible bulk

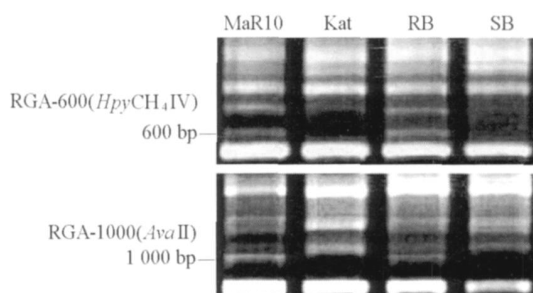


图 2 RGA-600 (HpyCH<sub>4</sub>) 和 RGA-1000 (Ava) 标记

MaR10: 抗性亲本; Kat: 感性亲本; RB: 抗病池; SB: 感病池。

Fig 2 RGA-600 (HpyCH<sub>4</sub>) and RGA-1000 (Ava)

MaR10: Resistant plant; Kat: Susceptible plant;

RB: Resistant bulk; SB: Susceptible bulk

## 2.3 RGA-CAPS 标记的定位

根据本实验室前期对 *R10* 基因低分辨率遗传图谱构建的研究可知: *R10* 基因的两侧标记分别为 *dLET5E4* 和 *C2\_A5g59960* (徐建飞等, 2007), 遗传距离分别为 6.2 cM 和 1.6 cM。用这两个标记分析 MaR10 × Kat 杂交后代 400 个单株的杂交一代分离群体, 从中筛选出在 *dLET5E4* 和 *C2\_A5g59960* 之间发生重组的 20 个单株, 然后用新构建的 CAPS 标记 RGA-600 和 RGA-1000 进行分析 (图 3), 发现 20 个单株中有 8 个与抗性亲本一致, 扩增出特异性条带, 12 个单株与感性亲本一致, 未扩增特异性条带, 两个标记之间没有发生重组的单株。

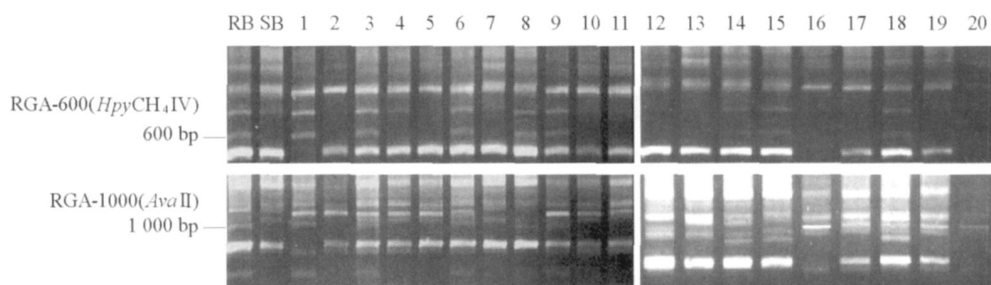


图 3 RGA-600 (HpyCH<sub>4</sub>) 和 RGA-1000 (Ava) 标记在 MaR10 和 Kat 杂交后代 F<sub>1</sub> 的重组单株中的验证

RB: 抗病池; SB: 感病池; 1~20: MaR10 × Kat 后代中在 *dLET5E4* 与 *C2\_A5g59960* 之间的 20 个重组单株。

Fig 3 Screening of RGA-600 (HpyCH<sub>4</sub>) and RGA-1000 (Ava) in the recombinants of F<sub>1</sub> plants

RB: Resistant bulk; SB: Susceptible bulk; 1 - 20: The recombinants of MaR10 × Kat between *dLET5E4* and *C2\_A5g59960*.

## 2.4 接种鉴定

根据徐建飞等 (2007) 对 *R10* 基因遗传定位的研究结果, 晚疫病菌株 89148-9 与抗性亲本 MaR10 产生 HR 反应, 与感病亲本 Kat 产生感病反应。因此, 可以认为与 89148-9 产生 HR 反应的单株具有 *R10* 基因。用晚疫病菌株 89148-9 接种在 *dLET5E4* 和 *C2\_A5g59960* 这两个标记间发生重组的 20 个单株。其中, 产生明显 HR 反应的有 9 株, 有明显孢子化病斑的 11 株, 20 个单株中只有 1 株 (JF2006-17) 在这两个 RGA-CAPS 标记与 *R10* 基因之间发生了重组 (图 4)。

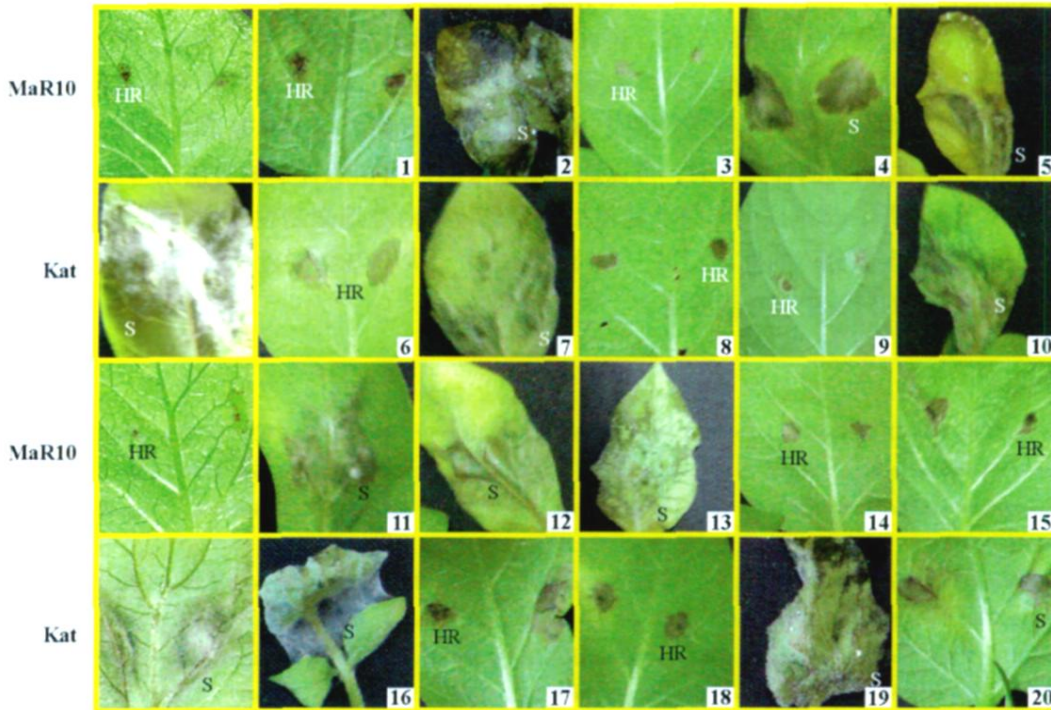


图 4 杂交亲本及其后代的 20 个重组单株对晚疫病菌株 89148-9 的接种反应

1~20: 重组单株; MaR10 表现过敏反应 (HR), Kat 表现感病反应 (S);

17: RGA-CAPS 标记与 *R10* 基因之间发生重组的单株, 其后代中的重组单株表现明显的抗感分离。

Fig. 4 Phenotype of differential resistance reaction to *P. infestans* isolates 89148-9 on parents and recombinants of their progeny

1 - 20. The recombinants; MaR10 showed hypersensitive response (HR), and Kat is susceptible as shown by sporulating lesion (S); 17: Obvious resistance segregation to the isolate was showed in the recombinants of RGA-CAPS markers and *R10* gene

## 2.5 连锁图的构建

如图 5 所示, RGA-600 和 RGA-1000 与 *R10* 基因的遗传距离为 0.25 cM, 较之以前标记, 离 *R10* 基因更近一步。由于在此位点上这两个标记未发生重组, 导致 RGA-600 和 RGA-1000 位于同一遗传位置。

## 3 讨论

马铃薯遗传背景复杂, 基因组测序尚未完成, 其标记开发较为困难。现有的马铃薯标记多数为 RFLP、AFLP 标记, 而 SSR、CAPS 标记

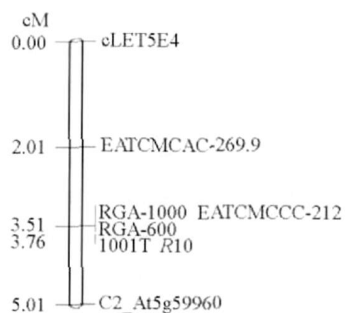


图 5 RGA-600、RGA-1000 与 *R10* 基因的连锁图

Fig. 5 Genetic map of *R10*, RGA-600 and RGA-1000

相对较少, 且大多数标记都是以二倍体马铃薯为研究对象 (宋吉轩 等, 2006)。四倍体马铃薯相对于二倍体马铃薯而言, 遗传背景更为复杂, 这就使得有些标记在四倍体马铃薯中的应用受到限制。本研究是根据 *R3a* 和源于 MLB 位点的 *R3a* 同源序列的保守区域设计引物, 从四倍体马铃薯中克隆出 *R3a* 基因的 RGA, 进而构建出与 *R10* 基因连锁的标记, 丰富了四倍体马铃薯的分子标记, 为今后直接从四倍体马铃薯中克隆抗晚疫病基因奠定基础。

需要指出的是, 这两个 RGA-CAPS 标记尚未分开, 产生这种现象的原因可能是由于分离群体不够大, 没有在这两个标记间发生重组的单株, 还可能是这两个标记本身属于一个标记, 而在染色体区段上发生了重叠, 所以可以通过扩大分离群体数量的方法来验证。如果 RGA 包含 R10 基因, 那么开发的标记应与 R10 基因共分离。但本研究的两个 RGA-CAPS 标记都未与 R10 基因共分离, 一方面可能与试验中选用的限制性内切酶种类有关, 可以通过增加限制性内切酶种类的方法来寻找新的标记, 或者可以将 PCR 产物测序, 根据序列的多态性位点信息进行针对性地限制性酶切, 更准确的开发出与 R10 遗传距离更近甚至共分离的标记; 另一方面可能是由于 R10 基因附近存在其同源基因或类似物, 以上推测将在以后的试验中进一步验证。

## References

- Ballvora A, Ercolano M R, Weiss J, Meksem K, Bormann C A, Oberhagemann P, Salamini F, Gebhardt C. 2002. The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper/NBS/LRR class of plant resistance genes. *Plant J*, 30 (3): 361 - 371.
- Huang S. 2005. Discovery and characterization of the major late blight resistance complex in potato [Ph.D. Dissertation]. Wageningen: Wageningen University.
- Huang S, van der Vossen E, Kuang H, Vleeshouwers V G, Zhang N, Bom T J, van Eck H J, Baker B, Jacobsen E, Visser R. 2005. Comparative genomics enabled the isolation of the R3a late blight resistance gene in potato. *Plant J*, 42 (2): 251 - 261.
- Jones J R, Walker R T. 1963. Isolation and analysis of the deoxyribonucleic acid of *Mycoplasma mycoides* var. *capri*. *Nature*, (198): 588 - 589.
- Malcolmson J F. 1969. Races of *Phytophthora infestans* occurring in Great Britain. *Trans Br Mycol Soc*, 53: 417 - 423.
- Malcolmson J F, Black W. 1966. New R-genes in *Solanum demissum* L. and their complementary races of *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary. *Euphytica*, 15 (2): 199 - 203.
- Muller K O, Black W. 1952. Potato breeding for resistance to blight and virus diseases during the last hundred years. *Z Pflanzenzuchtg*, 31: 305 - 318.
- Song J, Bradeen J M, Naess S K, Raasch J A, Wielgus S M, Haberlach G T, Liu J, Kuang H, Austin-Phillips S, Buell C R, Helgeson J P, Jiang J. 2003. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight. *Proc Natl Acad Sci, USA* 100 (16): 9128 - 9133.
- Song Ji-xuan, Fan Shi-jie, Deng Kuan-ping, Yan Qian, Zhang Min, Zhang De-yu. 2006. Application of molecular mark technology in potato breeding. *Guizhou Agricultural Sciences*, 34 (5): 72 - 75. (in Chinese)
- 宋吉轩, 范士杰, 邓宽平, 颜 谦, 张 敏, 张德宇. 2006. 分子标记技术在马铃薯育种中的应用. *贵州农业科学*, 34 (5): 72 - 75.
- van der Vossen E, Gros J, Sikkema A, Muskens M, Wouters D, Wolters P, Pereira A, Allefs S. 2005. The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is a M1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant J*, 44 (2): 208 - 222.
- van der Vossen E, Sikkema A, te Lintel Hekkert B, Gros J, Stevens P, Muskens M, Wouters D, Pereira A, Stiekema W, Allefs S. 2003. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato. *Plant J*, 36 (6): 867 - 882.
- van der Lee T, Robold A, Van't Klooster J W, Goves F. 2001. Mapping of avirulence genes in *Phytophthora infestans* with amplified fragment length polymorphism markers selected by bulked segregant analysis. *Genetics*, 157: 949 - 956.
- Vleeshouwers V G, van Dooijeweert W, Keizer P L C, Sijkes L, Govers F, Colen L T. 1999. A laboratory assay for *Phytophthora infestans* resistance in various *Solanum* species reflects the field situation. *European J Plant Pathol*, 105 (3): 241 - 250.
- Xu Jian-fei, Wang Jia-jia, Li Ying, Jin Li-ping, Evert Jacobsen, Huang San-wen, Qu Dong-yu. 2007. Genetic mapping of the R10 gene for resisting late blight in potato by comparative genomics. *Science & Technology Review*, 25 (17): 30 - 35. (in Chinese)
- 徐建飞, 王加加, 李 颖, 金黎平, Evert Jacobsen, 黄三文, 屈冬玉. 2007. 利用比较基因组学定位马铃薯抗晚疫病主效基因 R10. *科技导报*, 25 (17): 30 - 35.
- Xu Jian-fei, Xin Cui-hua, Huang San-wen. 2006. Potato late blight control using R-gene polyculture. *Review of China Agricultural Science and Technology*, 8 (4): 8 - 13. (in Chinese)
- 徐建飞, 辛翠花, 黄三文. 2006. 利用田间抗病基因近等混合系防治马铃薯晚疫病. *中国农业科技导报*, 8 (4): 8 - 13.