

马铃薯晚疫病菌抗甲霜灵的 SCAR 标记

杜洪忠 侯淑英 朱杰华* 杨志辉 赵秀娟

(河北农业大学植物保护学院,河北省农作物病虫害生物防治工程技术研究中心,保定 071001)

摘要: 建立马铃薯晚疫病菌抗甲霜灵 SCAR (sequenced characterized amplified region, 序列特征扩增区域) 标记, 以马铃薯晚疫病菌对甲霜灵高抗菌株 HD01-3 和对甲霜灵高感菌株 DK98-1 为亲本, 通过无性单游动孢子分离和有性杂交获得菌株 HD01-3 无性后代群体、菌株 DK98-1 无性后代群体以及 F_1 代分离群体, 以此为试验材料, 利用 BSA 法 (bulked segregant analysis, 分离群体分组分析法) 构建抗感基因池对后代菌系的甲霜灵抗性进行 RAPD (random amplified polymorphic DNA, 随机扩增多态性 DNA) 分析。从 178 条 RAPD 随机引物中找到一条特异性引物 S2054, 其可以扩增出一个与晚疫病菌对甲霜灵抗性相关的遗传标记, 将该特异条带回收、克隆、测序, 发现此标记大小为 457 bp, 根据测序结果设计特异 PCR 引物, 用于扩增抗感基因池, 成功地将特异 RAPD 标记转化为 SCAR 标记。初步建立了马铃薯晚疫病菌抗甲霜灵 SCAR 标记, 辅助监测晚疫病菌对甲霜灵的抗性。

关键词: 致病疫霉; 随机扩增多态性 DNA; 序列特征扩增区域; 甲霜灵抗性

SCAR marker of resistance of *Phytophthora infestans* on potato to metalaxyl

DU Hong-zhong HOU Shu-ying ZHU Jie-hua* YANG Zhi-hui ZHAO Xiu-juan

(College of Plant Protection, Agricultural University of Hebei, Biological Control Center of Plant Disease and Insect Pests of Hebei Province, Baoding 071001, Hebei Province, China)

Abstract: A SCAR (sequenced characterized amplified region) marker for metalaxyl-resistance of *Phytophthora infestans* was developed. With highly metalaxyl-resistant isolate HD01-3 and highly metalaxyl-sensitive isolate DK98-1 of *Phytophthora infestans* as parents, strains of asexual single-zoospores of HD01-3 and DK98-1 were reproduced by single-zoospore isolation and F_1 progeny were reproduced from the sexual crosses HD01-3 $\times$ DK98-1. DNA pools of metalaxyl-resistant and metalaxyl-sensitive strains were developed by BSA (bulked segregant analysis). By using RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis, the specific primer S2054 was screened out from 178 random 10 bp primers. One genetic marker that linked with metalaxyl-resistance of *Phytophthora infestans* could be amplified using primer S2054. This band was collected, cloned and sequenced, the length was 457 bp. Primers were designed based on the sequence for amplifying DNA pools of metalaxyl-resistant and metalaxyl-sensitive strains. RAPD marker was successfully converted into SCAR marker. A SCAR marker for metalaxyl-resistance of *Phytophthora infestans* was preliminarily found and could monitor the metalaxyl-resistance of *Phytophthora infestans*.

Key words: *Phytophthora infestans*; RAPD; SCAR; metalaxyl-resistance

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2004000379), 河北农业大学重点科技项目 (9816)

作者简介: 杜洪忠, 男, 1981 年生, 在读硕士, 主要从事马铃薯晚疫病方面的研究, email: dhongzhong@163.com

* 通讯作者 (Author for correspondence), email: zhujiehua356@yahoo.com.cn

收稿日期: 2006-09-14

由致病疫霉 *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary 引起的马铃薯晚疫病一直严重威胁着马铃薯的生产。甲霜灵(metalaxyl)属苯基酰胺类内吸性杀菌剂,是生产上防治马铃薯晚疫病应用最多的化学药剂。甲霜灵最早在欧洲用于防治马铃薯晚疫病,但施用后不久便出现了抗性菌株。Davidse 等^[1] 1981 年首次报道在荷兰出现抗甲霜灵的菌株;Reis 等^[2] 报道 1998 ~ 2000 年巴西的晚疫病菌对甲霜灵抗性菌株出现频率为 38%;Day 等^[3] 报道英国调查 354 个地块中 326 个地块存在抗甲霜灵菌株。在我国,各马铃薯主产区近几年也均发现了马铃薯晚疫病菌对甲霜灵高抗的菌株,抗性菌株出现频率均接近 50%^[4~7]。总之,甲霜灵抗性菌株的存在以及抗药性发展已成为马铃薯晚疫病防治中较为突出的问题,严重影响了甲霜灵及其相关药剂的防治效果。

SCAR 标记是由 Paran 等^[8] 提出的一种分子标记技术,具有重复性高、稳定性好和共显性等特点。马铃薯晚疫病菌抗甲霜灵 SCAR 标记的发现及稳定扩增体系的建立,可以对晚疫病发病初期病原菌的甲霜灵抗性进行快速检测,为病害的预测预报和防治措施的制定提供科学依据。作者以马铃薯晚疫病菌对甲霜灵高抗菌株 HD01-3 和对甲霜灵高感菌株 DK98-1 为亲本,通过无性单游动孢子分离和有性杂交获得菌株 HD01-3 无性后代群体、菌株 DK98-1 无性后代群体以及 F_1 代分离群体。利用 BSA 法就后代菌系对甲霜灵的抗感分离群体进行 RAPD 分析,寻找与马铃薯晚疫病菌对甲霜灵抗性连锁或相关的 RAPD 标记,通过回收、克隆、测序,将其转化为稳定的 SCAR 标记,辅助监测晚疫病菌对甲霜灵抗性发生,为晚疫病的有效防治和晚疫病菌的抗药性治理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 菌株

马铃薯晚疫病菌菌株:①野生型甲霜灵高抗菌株 HD01-3、A1 交配型和高感菌株 DK98-1、A2 交配型;②菌株 HD01-3 和 DK98-1 的有性 F_1 代菌系菌株;③菌株 HD01-3 的无性后代 H_{Z01} 菌系菌株;④菌株 DK98-1 的无性后代 D_{Z01} 菌系菌株;⑤野生型对甲霜灵高抗菌株 18 株;⑥野生型对甲霜灵高感菌株 12 株。均由河北农大晚疫病实验室提供。

1.2 马铃薯晚疫病菌基因组 DNA 的提取

将供试菌株接种于黑麦培养基平板上,18℃黑

暗培养 15 天,收集菌丝,用灭菌的滤纸将菌丝中的水分吸干, -20℃ 保存备用。马铃薯晚疫病菌基因组 DNA 的提取参照 Goodwin 等^[9] 的方法。

1.3 DNA 池的构建及 RAPD 分析

1.3.1 DNA 池的构建

在马铃薯晚疫病菌 HD01-3 和 DK98-1 无性后代和有性 F_1 代菌系中分别选择对甲霜灵高抗和高感菌株各 10 株,将其基因组 DNA 等量混合形成 4 个 DNA 池。 S_{Z01} 池:对甲霜灵高感无性后代菌系 DNA 池; S_{F1} 池:对甲霜灵高感有性后代 F_1 菌系 DNA 池; R_{Z01} 池:对甲霜灵高抗无性后代菌系 DNA 池; R_{F1} 池:对甲霜灵高抗有性后代 F_1 菌系 DNA 池。

1.3.2 RAPD 分析

以两个亲本菌株基因组 DNA 及 4 个 DNA 池作为模板,采用 Biometra Tgradient-PCR 仪进行扩增。扩增条件:25 μ L 反应体系,包括 10 $\times$ buffer, 2 mmol/L Mg^{2+} , 100 μ mol/L dNTP, 0.1 μ mol/L 引物, 2.5 U TaqDNA 聚合酶, 25 ng 模板 DNA;扩增程序:94℃ 预变性 4 min, 然后 45 个循环。每个循环为 94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 2 min, 72℃ 延伸 2 min, 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5 μ g/mL)上电泳分离,在 365 nm 紫外灯下检查结果,UVIdoc 凝胶成像系统照相。

1.4 特异片段的回收、克隆、测序

将 RAPD 扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳后,切下含有特异片段的琼脂糖凝胶块,并用 DNA 快速纯化/回收试剂盒回收特异扩增的片段。克隆、测序由宝生物工程(大连)有限公司完成。

1.5 SCAR 标记的转化

1.5.1 SCAR 引物的设计和合成

参考 Paran 等^[8] 的方法,根据 RAPD 特异片段测序结果的两端序列,利用软件 Premier 5.0 设计一对 20 ~ 24 bp 的特异 PCR 引物,交宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.5.2 SCAR 标记的验证

PCR 扩增反应体系为 25 μ L 体系,包括 10 $\times$ buffer, 2 mmol/L Mg^{2+} , 100 μ mol/L dNTP, 2.5 U TaqDNA 聚合酶,每个 SCAR 引物 0.1 μ mol/L, 25 ng 模板 DNA,扩增程序同 RAPD 分析中 PCR 扩增程序。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5 μ g/mL)上电泳分离,在 365 nm 紫外灯下检查结果,UVIdoc 凝胶成像系统照相。

2 结果与分析

2.1 马铃薯晚疫病病菌抗甲霜灵 RAPD 标记

以两亲本菌株基因组 DNA 及 4 个 DNA 池为模板,采用 BSA 法对 178 条 10 bp 的 RAPD 引物进行筛选,结果发现有 10 条引物在抗性亲本及抗性 DNA 池中能扩增出多态性特异片段,对筛选到的特异性片段在 HD01-3 和 DK98-1 无性后代和有性 F_1 代菌系中分别选取对甲霜灵表现高抗和高感的个体进行稳定性验证,结果发现在筛选到的 10 条引物中,除引物 S2054 和 S2016 的特异性片段仍能稳定存在外,其余均不能稳定地存在。引物 S2016 虽然

能在对甲霜灵高抗和高感的亲本及 DNA 池之间扩增出 1 条特异片段,但对无性后代和有性 F_1 代菌系中的单个对甲霜灵高抗和高感菌株的 DNA 进行扩增时,却出现了较多的多态性片段,说明引物 S2016 扩增出的特异片段可能与晚疫病病菌对甲霜灵抗性不相关;用引物 S2054 对后代菌系中单个对甲霜灵高抗和高感菌株的 DNA 进行扩增时,发现无性后代和有性 F_1 代菌系中对甲霜灵高抗菌株均出现了与亲本 HD01-3、 R_{F_1} 池和 R_{Z01} 池相同的特异片段,长约 500 bp,而无性后代和有性 F_1 代菌系中对甲霜灵高感菌株则没有出现此特异片段,说明此特异片段与晚疫病病菌对甲霜灵抗性相关(图 1)。

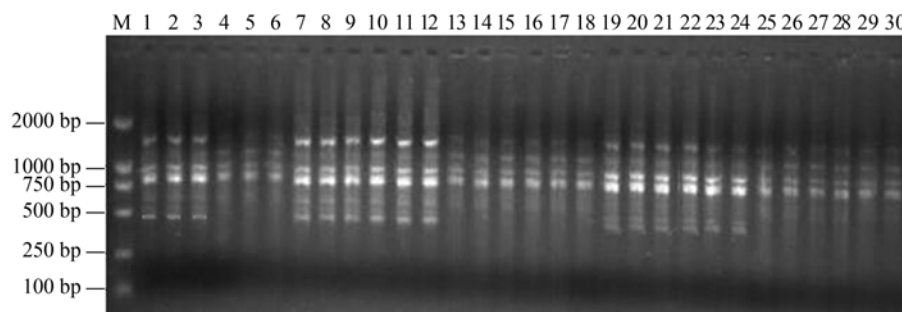


图 1 引物 S2054 扩增的电泳结果

Fig. 1 Electrophoretic products of S2054

注:M;DL2000 marker;1:对甲霜灵高度抗性亲本;2: R_{F_1} 池;3: R_{Z01} 池;4:对甲霜灵高感亲本;5: S_{F_1} 池;6: S_{Z01} 池;7~12: F_1 菌系对甲霜灵高抗个体;13~18: F_1 菌系对甲霜灵高感个体;19~24: H_{Z01} 菌系对甲霜灵高抗个体;25~30: D_{Z01} 菌系对甲霜灵高感个体。图 2 同。Note: M;DL2000 marker; 1;highly metalaxyl-resistant parent; 2; R_{F_1} pool; 3; R_{Z01} pool; 4;highly metalaxyl-sensitive parent; 5; S_{F_1} pool; 6; S_{Z01} pool; 7~12;highly metalaxyl-resistant strains of F_1 ; 13~18;highly metalaxyl-sensitive strains of F_1 ; 19~24;highly metalaxyl-resistant strains of H_{Z01} ; 25~30;highly metalaxyl-sensitive strains of D_{Z01} . The same in Fig. 2.

2.2 特异片段序列及 SCAR 引物的设计

特异片段(457 bp)的测序结果如下:

```

1      GGTCCGACGC CAGGCAAAGC AAAATTAATC CGCTTAAAAA TGAACACCAC TGAGGTACGC
61     CTCTAAAGTA GGAGGCGAGC ACGAAAAGTA GTCCGAAATC TGGTTACGTC CCCAATGACA
121    GGTCAAGCAA TTCGTAAAAC ATACAGCCAT CAGCCAAAAT GCTTCGACAG GCATCGCTTC
181    AATTCTCAGT TGACGTTCCC AGTCCAGAAA AGCAAAGTTT TGAGTTACTT GAGCGTAACC
241    CCATTGACA GATACTCGCA CTTTAGCCAT GCGCTTGTTG AATGCAGTCG CCCACGGTGT
301    CAAATTCCTT CCTCGAAACA TGATCATCAT GATGTTGTTG TTGGGATATG CCGAGTCCGC
361    AAAGACAAGA TACTCGTTCC GTCGAATGAC GTCATGGCCA TCTAAAAATG GCAAGAGATT
421    TGAAGCTCGA AGTATGTATC CATCTCCGCG TCGGACC
  
```

根据测序结果的两端序列,利用软件 Premier 5.0 设计一对 SCAR 引物。其碱基序列为:Primer1:5'-GTCCGACGCCAGGCAAAGCAAAA-3'(24 bp);Primer2:5'-GGTCCGACGCGAGATGGAT-3'(20 bp)。

2.3 SCAR 标记的转化及验证

对 SCAR 引物组合的 PCR 反应条件进行了优化,PCR 扩增反应体系为 25 μ L 体系,包括 10 $\times$ buffer, 2 mmol/L Mg^{2+} , 100 μ mol/L dNTP, 2.5 U TaqDNA

聚合酶,每个 SCAR 引物 0.2 $\mu\text{mol/L}$,25 ng 模板 DNA。扩增程序:94℃ 预变性 4 min,然后 30 个循环。每个循环为 94℃ 变性 10 s,50℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 20 s,最后 72℃ 延伸 10 min。

利用上述 PCR 扩增程序和反应体系对两亲本菌株的 DNA、4 个 DNA 池以及无性后代群体和有性后代群体中对甲霜灵高抗和高感的单个菌株的 DNA 进行 PCR 扩增检测(图 2)。结果显示,亲本 HD01-3、 R_{F1} 池、 R_{Z01} 池以及无性后代群体和有性后代群体中对甲霜灵高抗的单个菌株中均能检测到 1 条与原 RAPD 扩增大小相同(500 bp 左右)的 DNA

片段,而亲本 DK98-1、 S_{F1} 池、 S_{Z01} 池以及无性后代群体和有性后代群体中对甲霜灵高感的单个菌株中没有该扩增条带,说明已将筛选到的 RAPD 标记转化成马铃薯晚疫病病菌抗甲霜灵的 SCAR 标记。为了进一步验证该 SCAR 标记的稳定性,又选取 18 株野生型甲霜灵高抗菌株和 12 株野生型甲霜灵高感菌株进行 PCR 扩增检测(图 3)。结果显示,所有对甲霜灵高抗菌株中均能检测到 1 条与原 RAPD 扩增大小相同的 DNA 片段,而对甲霜灵高度敏感菌株中则没有该扩增条带。

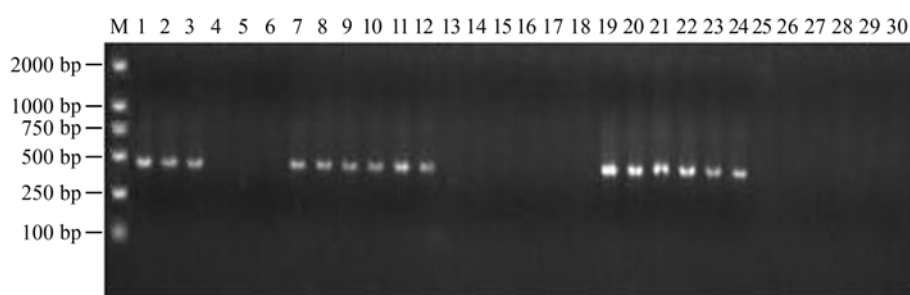


图 2 SCAR 引物扩增的电泳结果

Fig. 2 Electrophoretic products of the primers SCAR

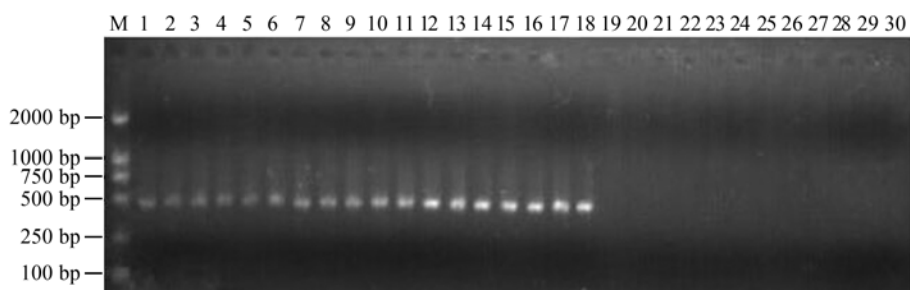


图 3 SCAR 引物扩增野生型菌株的电泳结果

Fig. 3 Electrophoretic products of the primers SCAR for wild isolates of *Phytophthora infestans*

注: M; DL2000 marker; 1~18; 野生型对甲霜灵高抗菌株; 19~30; 野生型对甲霜灵高感菌株。Note: M; DL2000 marker; 1~18; wildly highly metalaxyl-resistant isolates; 19~30; wildly highly metalaxyl-sensitive isolates.

3 讨论

本研究利用 SCAR 标记对已知甲霜灵敏感性表型的 30 个野生型晚疫病病菌菌株进行测定,结果显示:所有对甲霜灵高抗菌株中均能检测到一条特异条带,而对甲霜灵高度敏感菌株中则没有该扩增条带。说明马铃薯晚疫病病菌抗甲霜灵 SCAR 标记已初步建立,并能够稳定地对晚疫病病菌自然群体进行快速、准确的检测。为了进一步验证该 SCAR 标记的稳定性,本研究室下一步将对大量的已知甲霜灵敏

感性表型的晚疫病病菌菌株进行测定。自 Paran 等^[8]通过 SCAR 技术在莴苣中找到了与抗霜霉病基因稳定连锁的标记以来,SCAR 标记技术在基因定位和分子辅助选择方面得到广泛应用。如:刘俊峰等^[10]通过 BSA 法获得了一个与稻瘟病菌无毒基因 *AVR-Pik^m* 连锁的 SCAR 标记;Milla 等^[11]通过 BSA 法在烟草中找到了与烟草抗霜霉病菌连锁的 SCAR 标记,并将其应用于烟草抗病育种。但目前尚无关于马铃薯晚疫病病菌对甲霜灵抗性分子标记方面的报道。

由 RAPD 标记向 SCAR 标记的转化一直是 SCAR 标记技术的关键。本研究利用设计的 SCAR 引物对抗感菌株基因池进行扩增时发现,该 SCAR 标记对反应条件、反应体系较为严谨,尤其对退火温度和时间要求较高,退火时间过长容易出现非特异性扩增带。作者认为是由于抗感菌株在引物结合区同源性较高、在退火温度和时间不适宜、反应体系不够严谨时,错配率增高所致。因此,在该技术的实际应用中应严格控制退火温度及退火时间。马铃薯晚疫病病菌抗甲霜灵 SCAR 标记的建立,可以用于测定晚疫病病菌群体中甲霜灵抗性菌株的出现频率,为晚疫病病菌抗药性治理和甲霜灵抗性基因的定位、克隆提供了理论依据,同时该技术也可用于进口马铃薯的检疫,避免抗甲霜灵菌株随进口种薯进入我国。

参考文献(References)

- Davidse L C, Looijen D, Turkensteen L J, *et al.* Occurrence of metalaxyl-resistant strains of *Phytophthora infestans* in Dutch potato-fields. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 1981, 87(2):65-68
- Reis A, Smart C D, Fry W E, *et al.* Characterization of isolates of *Phytophthora infestans* from southern and southeastern Brazil from 1998 to 2000. *Plant Disease*, 2003, 87(8):896-900
- Day J P, Wattier R A M, Shaw D S, *et al.* Phenotypic and genotypic diversity in *Phytophthora infestans* on potato in Great Britain, 1995-98. *Plant Pathology*, 2004, 53(3):303-315
- 李炜,张志铭,樊慕贞. 马铃薯晚疫病病菌对瑞毒霉抗性的测定. *河北农业大学学报*, 1998, 21(2):63-65
- 毕朝位,杜喜翠,车兴壁,等. 重庆地区马铃薯晚疫病病菌(*Phytophthora infestans*)对甲霜灵抗性及其抗性水平测定. *中国马铃薯*, 2002, 16(2):70-72
- 王英华,国立耘,梁德霖,等. 马铃薯晚疫病病菌在内蒙古和甘肃的交配型分布及对几种杀菌剂的敏感性. *中国农业大学学报*, 2003, 8(1):78-82
- 朱小琼,车兴壁,国立耘,等. 六省市致病疫霉交配型及其对几种杀菌剂的敏感性. *植物保护*, 2004, 30(4):20-23
- Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, 85(8):985-993
- Goodwin S B, Spielman L J, Matuszak J M, *et al.* Clonal diversity and genetic differentiation of *Phytophthora infestans* populations in northern and central Mexico. *Phytopathology*, 1992, 82(9):955-961
- 刘俊峰,张国珍,马秋娟,等. 一个与稻瘟病菌无毒基因 AVR-Pik^m 连锁的 SCAR 标记的分离. *植物病理学报*, 2003, 33(2):151-155
- Milla S R, Levin J S, Lewis R S, *et al.* RAPD and SCAR markers linked to an introgressed gene conditioning resistance to *Peronospora tabacina* D. B. Adam. in tobacco. *Crop Science*, 2005, 45(6):2346-2354

Insect Science 入选 SCI

我国昆虫学英文国际期刊 *Insect Science* (昆虫科学) (ISSN:1672-9609) 被 Science Citation Index (SCI) 收录,成为我国目前唯一进入 SCI 的昆虫学期刊。

Insect Science 能被 SCI 收录是我国期刊改革、走向国际化和与国际著名出版集团 Blackwell 合作的产物。2004 年 5 月, *Insect Science* 与 Blackwell 签署合作出版协议, 2005 年, 双方正式合作出版。 *Insect Science* 于 2006 年 8 月向 ISI 递交申请, 今年 3 月正式被 SCI 收录。

Insect Science 的前身是中国昆虫学会 1994 年创办的昆虫学英文期刊《中国昆虫科学》(Entomologia Sinica), 在与 Blackwell 合作出版时, 将其更名为 *Insect Science*。 *Insect Science* 主要登载有关昆虫分子生物学、生理学、生化与毒理学、生态学与害虫综合治理、行为与社会生物学和进化生物学等学科的英文原始研究论文、简报和综述等, 是向世界反映我国昆虫学研究的一个重要窗口和国际交流的平台。

Blackwell 出版公司是全球排名前 4 位的国际期刊大出版商之一, 拥有 850 份学术期刊, 尤其擅长经营医学和生命科学领域的期刊。全世界约有 1500 多个学术机构和团体订阅 Blackwell 的数据库 Blackwell Synergy。 *Insect Science* 进入 Blackwell 系统后, 刊物的点击量、全文下载量和订户等都呈现出快速发展态势。相信在不久的将来 *Insect Science* 将成为具有重要国际影响的昆虫学期刊。

<http://www.blackwellpublishing.com/ins>

email: zhaoyx@ioz.ac.cn