

潜在马铃薯晚疫病抗性基因的表达和 SNP 标记分析

李晓川, 王朝海, 周平, 马维, 陈军, 陆焱, 吴显, 王宗明, 吴瑞, 宋治豪, 马杰, 付毅

(毕节市农业科学研究所, 贵州毕节 551700)

摘要 从马铃薯参考基因组中筛选出了 433 个 *NBS-LRR* 类基因, 并绘制这些基因在基因组中的分布图, 这些基因的其中一部分成簇分布。马铃薯基因组测序协会 (PGSC) 的转录组数据分析显示, 只有 12 个 *NBS-LRR* 类基因在 PGSC 的转录组数据中完全没有检测到表达, 不同 *NBS-LRR* 类基因转录水平不同, 一部分 *NBS-LRR* 类基因有较高的生物胁迫和激素刺激应激性。分析了这 433 个基因的编码区域的单核苷酸多态性 (SNP) 位点, SNP 标记作为在高通量测序和生物大数据分析中最常使用的遗传标记, 有助于鉴定 *NBS-LRR* 基因在不同马铃薯品种中的实际抗病性。

关键词 马铃薯; 晚疫病; 抗性基因

中图分类号 Q37 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2023)10-0079-06

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2023.10.017



开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):

Expression and SNP Analysis of Candidate *Solanum tuberosum* *Phytophthora infestans* Resistance Genes

LI Xiao-chuan, WANG Chao-hai, ZHOU Ping et al (Bijie Institute of Agriculture Science, Bijie, Guizhou 551700)

Abstract In this paper, 433 *NBS-LRR* genes were screened from the *Solanum tuberosum* reference genome, and the distribution of these genes in the genome were mapped, showing that some of these genes were distributed in clusters. Only 12 *NBS-LRR* genes were not detected in all of the transcriptome analysis data of PGSC. The expression levels of different *NBS-LRR* genes were different, and some *NBS-LRR* genes had higher biological and hormonal stimulation irritability. The single nucleotide polymorphism (SNP) sites in the coding regions of these 433 genes were also analyzed. As the most commonly used genetic markers in high-throughput sequencing and biological big data analysis, SNP markers are helpful for the identification of actual disease resistance of *NBS-LRR* genes in *Solanum tuberosum* varieties.

Key words *Solanum tuberosum*; *Phytophthora infestans* (Mont.) DE Bary; Resistance (R) gene

马铃薯 (*Solanum tuberosum*) 适应性广, 丰产性好, 营养丰富, 经济效益高, 已成为世界上继水稻、小麦的第三大粮食作物^[1]。但在生产中经常受到其第一大病害——晚疫病的危害造成产量严重降低。晚疫病是由致病疫霉菌 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary.] 引起, 特别是由于病原菌 A2 交配型的出现, 与原 A1 交配型有性杂交, 发生变异, 导致最初的抗病马铃薯品种失去抗性^[2-3]。

目前已经发现多个马铃薯晚疫病抗病基因 (*R* 基因), 包括克隆自 *Solanum demissum* 中, 位于第 5 号染色体上的 *R1*^[4], 第 4 号染色体上的 *R2*^[5], 第 11 号染色体上的 *R3a*^[6] 和 *R3b*^[7], 第 9 号染色体上的 *R8*^[8]; 克隆自 *Solanum bulbocastanum*, 位于第 8 号染色体上的 *Rpi-blb1* (*RB*)^[9-10], 第 6 号染色体上的 *Rpi-blb2*^[11], 第 9 号染色体上的 *Rpi-blb3* 和第 4 号染色体上的 *Rpi-abpt*^[5]; 来源于 *Solanum venturii* 位于第 9 号染色体上 *Rpi-vnt1.1*、*Rpi-vnt1.2* 和 *Rpi-vnt1.3*^[12]; 来源于 *Solanum stoloniferum* 位于第 8 号染色体上 *Rpi-sto1* 和 *Rpi-pta1*^[13-14]; 来源于 *Solanum americanum* 位于第 4 号染色体上 *Rpi-amr3i*^[15]。已鉴定出的 *R* 基因都拥有 *NBS-LRR* (Nucleotide-binding site and leucine-rich repeat) 结构, 因此可以利用基因结构上的保守型从参考基因组中筛选潜在的抗性基因^[16-17]。目前已在多个植物的参考基因组中筛选出 *NBS-LRR* 类基因, 包括重要的作物水稻^[18]、小麦^[19]、玉米^[20]、大豆^[21]、棉花^[22]、十字花科^[23]、黄瓜^[24]、模式生物—拟南芥^[25]

以及茄科植物辣椒、番茄^[26] 和茄子^[27] 等。虽然马铃薯晚疫病抗病基因能提供抗病性, 但单个 *R* 基因导入带来的抗性易被变异的致病疫霉菌克服, 如将 *RD* 基因导入而育成的栽培种 Biogold, 在田间种植不到 1 年即被晚疫病菌克服^[28], 但通常认为引入多个 *R* 基因能够增强晚疫病抗病表现^[29]。因此, 尽可能多地筛选出晚疫病抗病基因, 有助于马铃薯晚疫病抗性育种。

高通量测序技术提高了人们对作物遗传学的理解。由于普通栽培马铃薯基因组是高度杂合的同源 4 倍体的特性。马铃薯基因组测序协会 (potato genome sequencing consortium, PGSC) 首先通过对一个纯合的双单倍体 (DM1-3 516 R44, DM) 马铃薯品种测序得到了马铃薯参考基因组, 参考基因组提供了详细的马铃薯基因座信息, 因此可以通过序列比对在参考基因组中查找具有保守序列和结构域的基因^[30]。并且利用参考基因组对一个 (杂合二倍体 RH89-039-16, RH) 马铃薯品种重测序, 基因分型得到了两者之间的单核苷酸多态性位点 (SNP)。PGSC 还利用参考基因组对 DM 的 16 种组织包括: 心皮、花瓣、萼片、雄蕊、花、果肉、未成熟果实、成熟果实、叶柄、叶、匍匐茎、未成熟块茎、成熟块茎、愈伤组织、根和芽的转录组, 以及 11 种经处理包括: 盐、甘露醇和热胁迫, 4 种激素 [IAA (吲哚乙酸)、BAP (6-苄基腺嘌呤)、GA₃ (赤霉素) 和 ABA (脱落酸)] 处理, 4 种生物胁迫 [接种晚疫病菌、2 种诱导植物抗病的因子苯并噻二唑 (BTH) 和 DL-氨基丁酸 (BABA) 处理以及受伤叶片] 后转录组表达水平的变化情况处理进行了转录组测序。并且作为对 DM 转录组数据的补充和对照, PGSC 还对杂合二倍体品种 RH 的花、雄蕊、根、叶、水分胁迫叶、叶柄、茎尖、茎、匍匐茎、未成熟块茎、成熟块茎、块茎

基金项目 贵州省科技计划项目 (黔科合支撑 [2020] 1Y092 号); 贵州省科技计划项目 (黔科合基础 [2019] 1002 号)。

作者简介 李晓川 (1982—), 男, 天津人, 研究实习员, 博士, 从事马铃薯遗传育种方面的研究。

收稿日期 2022-06-07

髓、块茎皮、块茎芽、块茎皮质和整株 16 种组织的转录组进行了测序。转录组测序数据经随后的 RNA 定量验证显示出很高的准确性^[30-31]。因此,可以利用 *R* 基因的 *NBS-LRR* 结构特性,分析马铃薯参考基因组中的 *NBS-LRR* 类基因,并通过转录组数据分析这些基因在不同组织和处理条件下的表达特性,以及利用基因组序列信息,分析分子标记信息,为鉴定各基因的实际抗病性鉴定打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 马铃薯 *NBS-LRR* 类基因的鉴定 使用 BLASTp 工具 (<http://spudadb.uga.edu/blast.shtml>),以期望值 (E -value = 1) 为阈值,用已知的 *R* 基因的蛋白序列作为查询序列,以及隐马模型 (Hidden Markov Model, HMM)^[32],以 Pfam:PF00931 作为查询序号,以默认参数从马铃薯参考基因组 (V 4.03) 中鉴定 (http://spudadb.uga.edu/integrated_searches.shtml)。利用 SMART 检索基因的蛋白结构域 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)^[33];以 0.9 为阈值,利用 COILS 程序检索基因的 CC 结构域 (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html)^[34]。基因的氨基酸序列利用 Clustal Omega 在线服务器进行多序列比对,利用 Neighbor-Joining 参数进行计算 1 000 次生成树图 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)。

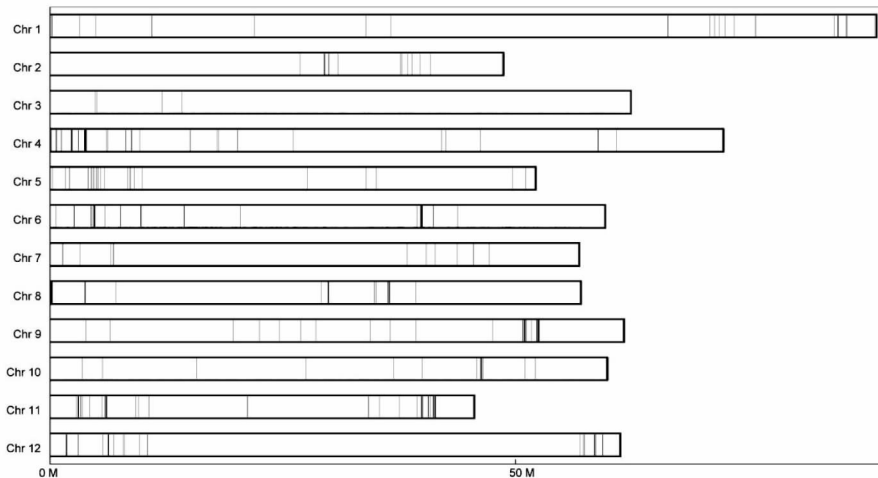
1.2 马铃薯 *NBS-LRR* 类基因的表达分析 利用马铃薯基因组测序协会 (potato genome sequencing consortium, PGSC) 的 Illumina RNA 测序数据分析 *NBS-LRR* 类基因在不同组织和处理方式下的表达模式^[30-31]。转录组数据的表达丰度用每百万个映射上的片段数中映射到外显子中的每 1 000 个碱基上的片段个数 (fragments per kilobase of exon model per million mapped reads, FPKM) 值表示。对不同组织内 *NBS-LRR* 类基因表达水平的热图 (Heat map) 进行构建时,FPKM 值首先经过以 2 为底数的对数进行转化。构建生物胁迫以及激素处理时 *NBS-LRR* 类基因表达水平变化的热图时,首先计算与对照的对比值,以 \log_2 比值的相对值 ≥ 1 确定为差异表达基

因^[31]。热图使用 MeV 4.9.0 软件进行构建^[35]。相关性分析用 IBM SPSS Statistics 22 软件进行 (SPSS GmbH Software, Munich, Germany)。

1.3 马铃薯 *NBS-LRR* 类基因编码序列的 SNP 标记分析 *NBS-LRR* 类基因编内的 SNP 标记信息来源于以 DM 为参考基因组, RH 重测序信息, Sol-CAP 对于 6 个常见栽培种的转录组测序信息,以及对大西洋 (Atlantic) 和 Superior 的重测序信息^[6,36]。

2 结果与分析

2.1 马铃薯 *NBS-LRR* 类基因的鉴定 从马铃薯参考基因组中鉴定得到 433 个 *NBS-LRR* 类基因,其中 366 个基因能够定位到 12 个染色体中。在这些基因中的 142 个基因间的距离小于 1.0 mb,其中 44 个基因间的距离小于 10 kb。21 个基因定位于第 4 染色体上 2.0 mb 的染色体区域,12 个基因定位于第 5 染色体上 1.5 mb 的染色体区域,22 个基因定位于第 11 染色体上 2.0 mb 的染色体区域,说明这些基因的其中一部分成簇分布 (图 1)。433 个 *NBS-LRR* 类基因中的 103 个基因蛋白编码序列的 N 端含有一个 CC (coiled-coil) 结构域,这与已发现的晚疫病抗性基因的 CC-NBS-LRR 蛋白结构域相同 (图 2)。进一步利用已知的 *R* 基因和 CC-NBS-LRR 基因的氨基酸序列进行比对并绘制系统进化树。进化树分成 2 个部分 (黑色和红色),其中黑色部分没有已克隆的 *R* 基因。红色部分的进化树又可分成 2 个部分 (基因编号突出显示和未突出显示的部分),这 2 部分内部又可分成 2~3 个小组 (基因编号不同颜色字体显示)。 *Rpi-blb1* (*RB*) 与 15 个 CC-NBS-LRR 基因聚集成一个小组, *R3a* 和 *R3b* 与 19 个 CC-NBS-LRR 基因亲缘关系较近, *Rpi-amr3i* 与 14 个 CC-NBS-LRR 基因聚集成一个小组, *Rpi-vnt1.1*、*Rpi-vnt1.2* 和 *Rpi-vnt1.3* 与 17 个 CC-NBS-LRR 基因聚集成一个小组,其他 7 个已克隆的 *R* 基因与 23 个 CC-NBS-LRR 基因亲缘关系较近 (图 3)。



注:各基因所在的位置由位于代表染色体的方框内的细线表示。

Note: The locations of genes are represented by thin lines within a box representing chromosomes.

图 1 *NBS-LRR* 基因在马铃薯参考基因组 12 条染色体中分布的物理图谱

Fig.1 Physical map of the 12 potato chromosomes with individual *NBS-LRRs*

2.2 马铃薯 *NBS-LRR* 类基因的表达分析 利用 PGSC 在马铃薯不同器官和发育阶段以及在胁迫处理和激素刺激时的不同转录组测序所产生的数据,包括:DM 的 16 种组织内基因的表达水平,DM 的 11 种包括盐胁迫、激素刺激、生物胁迫处理后转录组表达水平的变化情况,以及以 DM 为参考基因组,RH 的 16 种组织内基因的表达模式。分析 *NBS-LRR* 类基因的表达。转录组数据分析显示,只有 12 个 *NBS-LRR* 类基因在所有的组织或处理中完全没有检测到表达(图 2)。

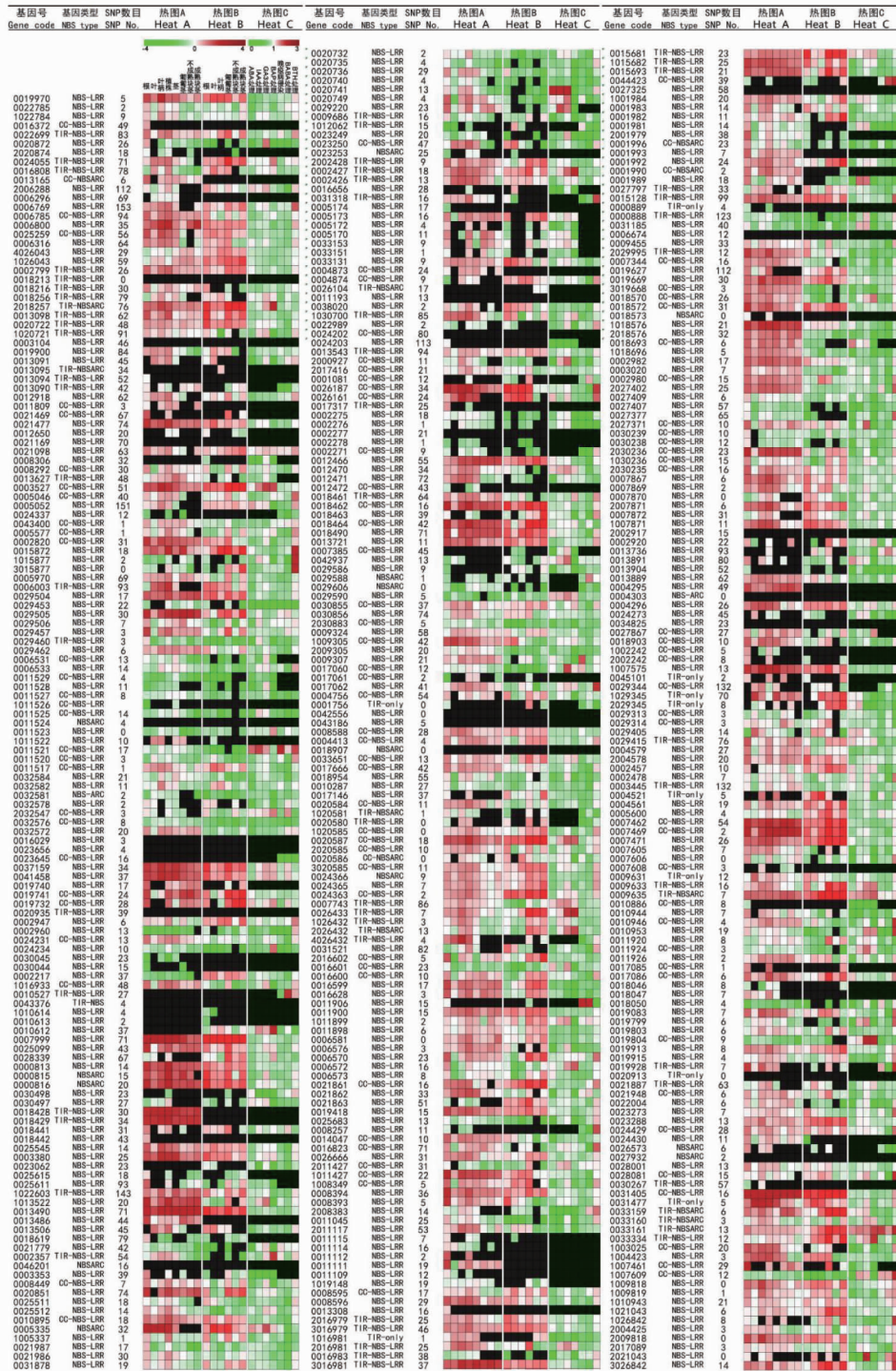
PGSC 分别在 DM 和 RH 的 16 种不同组织中进行了转录组分析,提取了其中易受晚疫病侵染影响的组织的转录组表达数据,进一步分析了 433 个 *NBS-LRR* 类基因在不同组织和样品间的表达模式。在 DM 的 6 种组织中(根、叶、叶柄、匍匐茎、不成熟块茎和成熟块茎),433 个 *NBS-LRR* 类基因,表达量 FPKM 均值最大的 10 个基因分别是 *PGSC0003DMG400007999*、*PGSC0003DMG400009635*、*PGSC0003DMG400007469*、*PGSC0003DMG400003527*、*PGSC0003DMG402018257*、*PGSC0003DMG400018464*、*PGSC0003DMG400031405*、*PGSC0003DMG400020587*、*PGSC0003DMG400033159* 和 *PGSC0003DMG400007471*,其表达量的 FPKM 值在 52.67~11.60。有 57 个基因在 DM 的 6 种组织中没有检测到表达,208 个基因在这 6 种组织中至少有 1 种组织中没有检测到表达。376 个基因在至少 DM 的 6 种组织之一中检测到表达,反映表达量在 6 种组织间离散程度的标准差(σ),最大为 34.13,平均为 1.76。在 RH 的 8 种组织中(根、叶、叶柄、植株、茎、匍匐茎、不成熟块茎和成熟块茎),433 个之间 *NBS-LRR* 类基因,表达量均值最大的 10 个基因分别是 *PGSC0003DMG400007999*、*PGSC0003DMG400007469*、*PGSC0003DMG400031405*、*PGSC0003DMG400013490*、*PGSC0003DMG400029505*、*PGSC0003DMG400005335*、*PGSC0003DMG400007462*、*PGSC0003DMG400018428*、*PGSC0003DMG400018429* 和 *PGSC0003DMG400026187*,其表达量的 FPKM 值在 60.27~12.58。有 32 个基因在 RH 的 8 种组织中没有检测到表达,179 个基因在这 8 种组织中至少有 1 种组织中没有检测到表达。401 个基因在至少 RH 的 8 种组织之一检测到表达,反映表达量 FPKM 值在 8 种组织间离散程度的标准差(σ),最大为 62.45,平均为 1.57。结果显示,相同的 *NBS-LRR* 类基因在 DM 或 RH 的不同组织间的表达水平有一定的差异,但整体上差异并不明显,即组织特异性不明显。在 DM 和 RH 组织之间,相同基因表达量的 FPKM 值均值,其中在 DM 中大于 RH 中的基因有 126 个,在 RH 中大于 DM 中的基因有 283 个,说明相同的 *NBS-LRR* 类基因在 DM 和 RH 之间,整体上基因在 RH 中表达水平略高于在 DM 中。433 个 *NBS-LRR* 基因在 DM 和 RH 组织间表达水平的 Pearson 相关系数 $r=0.600$ ($P<0.01$),有显著的正相关关系,说明 *NBS-LRR* 基因在 DM 和 RH 的组织中有类似的表达模式。

生物胁迫处理包括接种马铃薯晚疫病病菌和 2 种诱导植物抗病的因子[苯并噁二唑(BTH,100 mg/mL)以及 DL-氨基在 433 个 *NBS-LRR* 类基因编码序列内的 SNP 标记。结果显示,在以上 9 个品种的序列信息内,只有 19 个 *NBS-LRR* 类

丁酸(BABA,2 mg/mL)]处理 24 h/48 h/72 h 后混合样本的表达丰度。参加分析的数据为计算每个处理相对于对照的相对表达丰度。从结果中可知,在接种晚疫病病菌处理后,有 32 个基因表达量显著上升(基因表达量 \log_2 比值 ≥ 1 ,即处理后的基因表达量是对照的基因表达量的 2 倍及以上);4 个基因(*PGSC0003DMG400011521*、*PGSC0003DMG400011906*、*PGSC0003DMG400033161* 和 *PGSC0003DMG400009307*)的基因表达量 \log_2 比值 >2 。在接受诱导植物抗病的 BTH 因子处理后,有 36 个基因表达量显著上升,3 个基因(*PGSC0003DMG400011906*、*PGSC0003DMG400010527* 和 *PGSC0003DMG400044423*)的表达量 \log_2 比值 >2 。在 BABA 因子处理后,有 179 个基因表达量显著上升,32 个基因的表达量 \log_2 比值 >2 ,3 个基因(*PGSC0003DMG401007609*、*PGSC0003DMG403015877* 和 *PGSC0003DMG400028081*)的表达量 \log_2 比值 >4 (图 2)。在 3 种生物胁迫方式处理后,有 4 个基因(*PGSC0003DMG400011521*、*PGSC0003DMG400011906*、*PGSC0003DMG400033161* 和 *PGSC0003DMG400044423*)至少在接受 2 种处理后基因表达量 \log_2 比值 >2 。

有研究显示,晚疫病抗性基因的表达受到激素的影响^[37]。为研究激素对 *NBS-LRR* 类基因的表达的影响,分析整株植物经 IAA(吲哚乙酸)10 mmol/L、BAP(6-苄基腺嘌呤)10 mmol/L、GA₃(赤霉素)50 mmol/L、ABA(脱落酸)50 mmol/L 处理 24 h 后的相对表达丰度。在 IAA 刺激后,有 80 个基因表达量显著上升(基因表达量 \log_2 比值 ≥ 1 ,即处理后的基因表达量是对照的基因表达量的 2 倍及以上),4 个基因(*PGSC0003DMG400020741*、*PGSC0003DMG400011521*、*PGSC0003DMG400029220* 和 *PGSC0003DMG400001989*)的基因表达量 \log_2 比值 >2 。在 BAP 处理后,有 66 个基因表达量显著上升,15 个基因表达量 \log_2 比值 >2 ,2 个基因(*PGSC0003DMG400010612* 和 *PGSC0003DMG400026433*)的表达量 \log_2 比值 >4 。在 GA₃ 刺激后,有 159 个基因表达量显著上升,17 个基因表达量 \log_2 比值 >2 ,2 个基因(*PGSC0003DMG400020741* 和 *PGSC0003DMG400019804*)的表达量 \log_2 比值 >4 。在 ABA 处理后,有 51 个基因表达量显著上升,2 个基因(*PGSC0003DMG400020741* 和 *PGSC0003DMG400011521*)的表达量 \log_2 比值 >2 。在 4 种激素刺激后,有 8 个基因(*PGSC0003DMG400001989*、*PGSC0003DMG400002427*、*PGSC0003DMG400003527*、*PGSC0003DMG400011521*、*PGSC0003DMG400019804*、*PGSC0003DMG400020587*、*PGSC0003DMG400020741* 和 *PGSC0003DMG400026433*)至少在接受 2 种处理后基因表达量 \log_2 比值 >2 (图 2)。

2.3 马铃薯 *NBS-LRR* 类基因编码序列的 SNP 标记分析 SNP 标记是 DNA 中的单碱基变异造成的,在该研究中,以双单倍体 DM 为参考基因组,利用杂合二倍体 RH 重测序信息,Sol-CAP 对于 6 个常见栽培种的转录组测序信息,以及对栽培种大西洋(Atlantic)和 Superior 的重测序信息,分析基因的编码区域内没有 SNP,134 个 *NBS-LRR* 类基因的编码区域内有 1~10 个 SNP,67 个 *NBS-LRR* 类基因的编码区域



注:基因号为PGSC注释的编号,图中各基因编号中相同的PGSC0003DMG40部分未显示,即在图中编号为0019970,实际的PGSC编号应为PG-SC0003DMG400019970;基因类型为同属于NBS-LRR基因的不同小类;SNP数量为在各基因编码区内发现的SNP标记的数量;热图A表示各基因在RH各组织的基因表达量,热图B表示各基因在DM各组织的基因表达量,热图C表示各基因在胁迫处理及激素刺激条件下的相对表达量,热图中的黑色部分表示没有检测到表达。

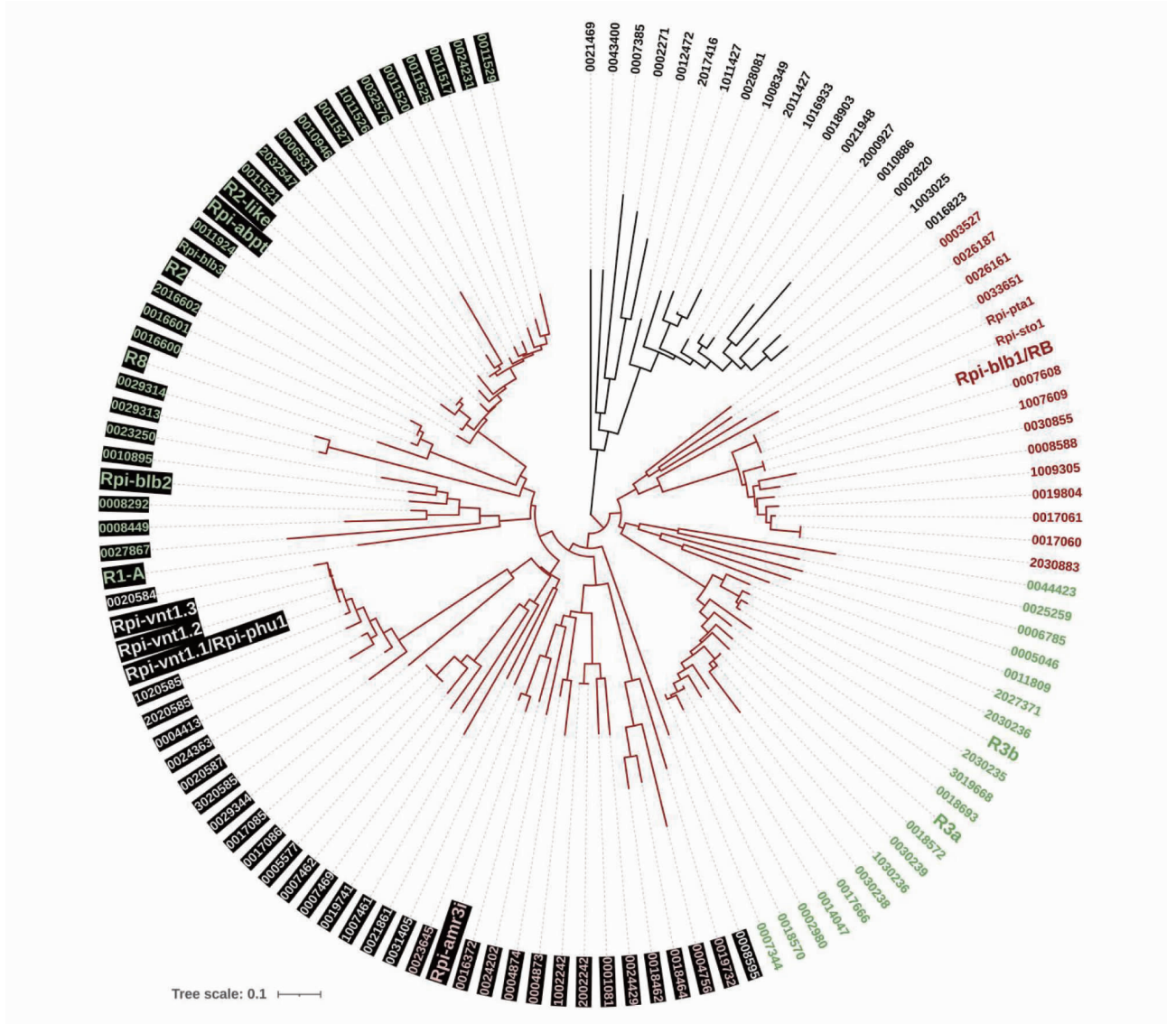
Note:The gene codes are PGSC annotation numbers.The same part of PGSC0003DMG40 of each gene number in the figure is not shown,that is,the number of 0019970 in the figure,but the actual PGSC number should be PGSC0003DMG400019970.The gene types were different subclasses belonging to NBS-LRRs.The SNP No. are the numbers of SNP markers found in NBS-LRRs coding regions.Heat A represent the expression of NBS-LRRs in tissues of RH,and Heat B represent the expression of NBS-LRRs in tissues of DM.Heat C shows the relative expression of NBS-LRRs under stress and hormone stimulation.The black part of the heat maps indicate that no expression is detected.

图2 433个NBS-LRR基因的基因号、基因类型、内部SNP标记数量和表达分析

Fig.2 Gene codes,types,No.SNP markers and expression patterns of 433 NBS-LRRs

内有超过 50 个 SNP(图 2)。同时,还分析了 *NBS-LRR* 类基因编码序列内 SNP 的数量是否影响其表达,结果显示没有相

关性。



注:基因号为 PGSC 注释的编号,图中各基因编号中相同的 PGSC0003DMG40 部分未显示,即在图中编号为 0021469,实际的 PGSC 编号应为 PG-SC0003DMG400021469。

Note:The gene codes are PGSC annotation numbers.The same part of PGSC0003DMG40 of each gene number in the figure is not shown,that is, the number of 0021469 in the figure,but the actual PGSC number should be PGSC0003DMG400021469.

图 3 *CC-NBS-LRR* 基因和已克隆的 *R* 基因的系统进化分析

Fig.3 Phylogenetic tree of *CC-NBS-LRR* genes and cloned *R* genes

3 讨论与结论

目前已发现的晚疫病抗病(*R*)基因都是 *NBS-LRR* 家族基因,利用已测序完成的参考基因组序列信息,可以初步筛选潜在的抗性基因。目前已在多个植物基因组中鉴定出 *NBS-LRR* 家族候选基因,包括重要的作物水稻^[12]、小麦^[13]、玉米^[14]、大豆^[15]、棉花^[16]、十字花科^[17]、黄瓜^[18]以及模式生物-拟南芥^[19]。在茄科植物中,从辣椒的参考基因组中鉴定到了 305 个 *NBS-LRR* 类基因,从番茄的参考基因组中鉴定到了 255 个 *NBS-LRR* 类基因^[20],从茄子的参考基因组中鉴定到了 245 个 *NBS-LRR* 类基因^[21]。该研究从马铃薯参考基因组中鉴定出 433 个 *NBS-LRR* 类基因(图 1)。相较于其他

茄科植物,从马铃薯参考基因组中鉴定出更多的 *NBS-LRR* 类基因,可能是由于更多的基因组倍性变化,如普通栽培种马铃薯的基因组是四倍体,而野生马铃薯的基因组是二倍体至六倍体,导致的基因组更多变异的累加,并分化出不同的 *NBS-LRR* 类基因。这些 *NBS-LRR* 类基因的其中一部分成簇分布(图 1),成簇分布的基因,由于连锁效应,将更易于在杂交育种的过程中,一次性转移更多的 *NBS-LRR* 类基因进行品种改良,而选育晚疫病抗性马铃薯品种需要更多的 *R* 基因累加。

基因发挥功能首先必须转录成 mRNA,在该研究中利用 PGSC 的转录组数据,包括 DM 的 16 种组织内基因的表达水

平,DM对11种包括盐胁迫、激素刺激、生物胁迫处理后转录组表达水平的变化情况,以及以DM为参考基因组,RH的16种组织内基因的表达模式^[30-31]。转录组数据分析显示,只有12个NBS-LRR类基因在所有的组织或处理中完全没有检测到表达。进一步分析转录组数据,在易受晚疫病侵袭影响的DM的6种组织和RH的8种组织中NBS-LRR基因的表达情况中,不同的NBS-LRR基因表达水平不同,但相同的NBS-LRR基因在DM或RH的不同组织间的表达水平有一定差异,但整体上差异并不明显,即组织特异性不明显。相同的NBS-LRR基因整体上在RH中表达水平略高于在DM中的表达水平。433个NBS-LRR基因在DM和RH组织间表达水平有显著的正相关关系,说明NBS-LRR基因在DM和RH中表达模式类似。同时,部分NBS-LRR基因在生物胁迫处理和激素刺激后,表达水平显著上升,有明显的应激性。

SNP标记作为在高通量测序和生物大数据分析中最常用的遗传标记,在该研究中分析了433个NBS-LRR基因的编码区域内的SNP位点(图2),已知的SNP标记,可以利用多态性位点及侧翼序列,通过如KASP(Kompetitive Allele Specific PCR)高通量基因分型技术,实现在不同品种中对该位点较快速的基因分型^[38],有助于鉴定NBS-LRR基因在不同马铃薯品种中的实际抗病性。根据选择性清除理论,在受选择的基因组区域,其多态性会降低,表现为SNP标记数目减少^[39],尽管研究结果显示NBS-LRR基因编码区域内的SNP数量的多少与其表达不相关,但67个NBS-LRR基因的编码区域内存在50个以上的SNP,可能代表基因组的这部分区域重组频繁,对基因的功能也可能产生一定的影响。

参考文献

- [1] BHASKAR P B, VENKATESHWARAN M, WU L, et al. Agrobacterium-mediated transient gene expression and silencing: A rapid tool for functional gene assay in potato [J]. *PLoS One*, 2009, 4(6): 1-8.
- [2] FRY W E, GOODWIN S B. Resurgence of the Irish potato famine fungus [J]. *Bioscience*, 1997, 47: 363-371.
- [3] FRY W. *Phytophthora infestans*: The plant (and R gene) destroyer [J]. *Molecular plant pathology*, 2008, 9(3): 385-402.
- [4] BALLVORA A, ERCOLANO M R, WEISS J, et al. The R1 gene for potato resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) belongs to the leucine zipper /NBS /LRR class of plant resistance genes [J]. *Plant journal*, 2002, 30(3): 361-371.
- [5] LOKOSSOU A A, PARK T H, VAN ARKEL G, et al. Exploiting knowledge of R/Aur genes to rapidly clone a new LZ-NBS-LRR family of late blight resistance genes from potato linkage group IV [J]. *Molecular plant-microbe interactions*, 2009, 22(6): 630-641.
- [6] HUANG S W, VAN DER VOSSEN E A, KUANG H H, et al. Comparative genomics enabled the isolation of the R3a late blight resistance gene in potato [J]. *Plant journal*, 2005, 42(2): 251-261.
- [7] LI G C, HUANG S W, 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]. *Molecular plant-microbe interactions*, 2011, 24(10): 1132-1142.
- [8] 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.
- [9] VAN DER VOSSEN E, SIKKEMA A, HEKKERT B T, et al. An ancient R gene from the wild potato species *Solanum bulbocastanum* confers broad-spectrum resistance to *Phytophthora infestans* in cultivated potato and tomato [J]. *Plant journal*, 2003, 36(6): 867-882.
- [10] SONG J Q, BRADEEN J M, NAESS S K, et al. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum resistance to potato late blight [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(16): 9128-9133.
- [11] VAN DER VOSSEN E A, GROS J, SIKKEMA A, et al. The Rpi-blb2 gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato [J]. *Plant journal*, 2005, 44(2): 208-222.
- [12] FOSTER S J, PARK T H, PEL M, et al. Rpi-vnt1.1, a Tm-2² homolog from *Solanum venturii*, confers resistance to potato late blight [J]. *Molecular plant-microbe interactions*, 2009, 22(5): 589-600.
- [13] VLEESHOUWERS V G A A, 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(8): 1-10.
- [14] WANG M Q, ALLEFS S, VAN DEN BERG R G, et al. Allele mining in *Solanum*: Conserved homologues of Rpi-blb1 are identified in *Solanum stoloniferum* [J]. *Theoretical and applied genetics*, 2008, 116(7): 933-943.
- [15] WITEK K, JUPE F, WITEK A I, et al. Accelerated cloning of a potato late blight-resistance gene using RenSeq and SMRT sequencing [J]. *Nature biotechnol*, 2016, 34(6): 656-660.
- [16] MARTIN G B, BOGDANOVA A J, SESSA G. Understanding the functions of plant disease resistance proteins [J]. *Annual review of plant biology*, 2003, 54: 23-61.
- [17] VAN DER BIEZEN E A, JONES J D. The NB-ARC domain: A novel signalling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals [J]. *Current biology*, 1998, 8(7): R226-R227.
- [18] LIU W, GHOURI F, YU H, et al. Genome wide re-sequencing of newly developed Rice Lines from common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) for the identification of NBS-LRR genes [J]. *PLoS One*, 2017, 12(7): 1-19.
- [19] GU L J, SI W N, ZHAO L N, et al. Dynamic evolution of NBS-LRR genes in bread wheat and its progenitors [J]. *Molecular genetics genomics*, 2015, 290(2): 727-738.
- [20] CHENG Y, LI X Y, JIANG H Y, et al. Systematic analysis and comparison of nucleotide-binding site disease resistance genes in maize [J]. *FEBS journal*, 2012, 279(13): 2431-2443.
- [21] KANG Y J, KIM K H, SHIM S, et al. Genome-wide mapping of NBS-LRR genes and their association with disease resistance in soybean [J]. *BMC plant biology*, 2012, 12: 1-13.
- [22] KHAN A M, KHAN A A, AZHAR M T, et al. Comparative analysis of resistance gene analogues encoding NBS-LRR domains in cotton [J]. *Journal of the science of food and agriculture*, 2016, 96(2): 530-538.
- [23] ZHANG Y M, SHAO Z Q, WANG Q, et al. Uncovering the dynamic evolution of nucleotide-binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) genes in Brassicaceae [J]. *Journal of integrative plant biology*, 2016, 58(2): 165-177.
- [24] WAN H J, YUAN W, BO K J, et al. Genome-wide analysis of NBS-encoding disease resistance genes in *Cucumis sativus* and phylogenetic study of NBS-encoding genes in Cucurbitaceae crops [J]. *BMC genomics*, 2013, 14: 1-15.
- [25] MONDRAGÓN-PALOMINO M, MEYERS B C, MICHELMORE R W, et al. Patterns of positive selection in the complete NBS-LRR gene family of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genome research*, 2002, 12(9): 1305-1315.
- [26] SHAO Z Q, XUE J Y, WU P, et al. Large-scale analyses of angiosperm nucleotide-binding site-leucine-rich repeat genes reveal three anciently diverged classes with distinct evolutionary patterns [J]. *Plant physiology*, 2016, 170(4): 2095-2109.
- [27] WEI H W, LIU J, GUO Q W, et al. Genomic organization and comparative phylogenetic analysis of NBS-LRR resistance gene family in *Solanum pimpinellifolium* and *Arabidopsis thaliana* [J/OL]. *Evolutionary bioinformatics*, 2020, 16[2022-03-17]. <https://doi.org/10.1176934320911055>.
- [28] HERMSEN J G TH, RAMANNA M S. Double-bridge hybrids of *Solanum bulbocastanum* and cultivars of *Solanum tuberosum* [J]. *Euphytica*, 1973, 22(3): 457-466.
- [29] HAVERKORT A J, BOONEKAMP P M, HUTTEN R, et al. Durable late blight resistance in potato through dynamic varieties obtained by cisgenesis: Scientific and societal advances in the DuRPh project [J]. *Potato research*, 2016, 59(1): 35-66.

用,破坏插穗内的生理过程,从而抑制插穗生根。该试验的激素浓度是参考有关学者^[12-15]提到低浓度生长素对黎蒴扦插没有显著影响,为了分析高浓度激素对黎蒴扦插的影响而采用的。另外,还有学者^[16-18]提出生根促进剂对黎蒴生根率的提高并没有显著影响。因此,可在后续试验中探究黎蒴扦插的最适浓度。

激素和扦插基质是影响扦插生根的重要因素,直接影响着扦插效果^[17]。插穗成活率方面,3种基质中砂壤土和黄心土的成活率较高,而激素处理中CK成活率最高,且各处理间差异不大。其中,砂壤土和CK的标准差略大于其他水平效应值,分别为5.96、7.76,两者的水平处理的成活率为92.22%,明显高于其他处理,变异程度大,为提高插穗成活率的最佳组合。插穗愈伤组织生长率方面,3种基质中砂壤土和黄心土的愈伤组织生长率较高;CK的愈伤组织生长率最高,且各处理间差异不大。其中,黄心土和CK的标准差明显大于其他水平效应值,分别为7.07、7.81,两者的水平处理的愈伤组织生长率为68.69%,明显高于其他处理,变异程度大,为提高插穗愈伤组织生长率的最佳组合。虽然长出愈伤组织与长根没有必然的联系,但是可以对生根率提供参考,也可以为该试验的进一步探讨打下基础。插穗芽生长率方面,3种基质中砂壤土和黄心土的芽生长率较高,而3种激素中CK处理和NAA处理的芽生长率较高,且各处理间差异不大。其中,砂壤土和CK的标准差稍大于其他水平效应值,分别为4.63、1.85,两者水平处理的芽生长率为28.89%,变异程度较其他组合稍大,为提高插穗芽生长率的较佳组合。

穗条类型是影响植物扦插成活的关键因素,不同穗条类型具备的营养成分、水分和萌发生根的潜力等特质均不同,开展不同穗条类型对植物扦插影响的研究可以为植物扦插繁殖材料的筛选提供更多的理论基础^[19-21]。该试验的插穗主要采自母株茎部的伸长区和成熟区,插穗为半木质化。插穗离开母体后,插穗的顶端部分成为新植株的分生区,长出新芽。插穗所长出的新芽皆为侧芽,而且均临近分生区。

该试验结果表明,砂壤土与CK为最佳组合。该试验仅考虑了激素种类及扦插基质对黎蒴扦插成活的影响,激素对

黎蒴扦插成活率的影响还需要不同浓度梯度激素试验的结果作为佐证。因此,下一步将继续研究激素不同浓度梯度以及基质比对黎蒴扦插、生根成活率的影响,为黎蒴扦插繁殖提供更多理论依据,使技术体系得到进一步完善。

参考文献

- [1] 孙丽静,陈红跃.施肥对黎蒴秧幼苗叶绿素含量的影响[J].湖南林业科技,2017,44(4):1-6,23.
- [2] 李志明.黎蒴栲形态特征与育苗技术[J].现代农业科技,2013(9):191,193.
- [3] 孙丽静,蒋成益.氮添加对黎蒴栲根区土壤养分及叶片生理特性的影响[J].西南农业学报,2016,29(12):2908-2915.
- [4] 刘有成,曾令海,连辉明,等.黎蒴栲培育技术[J].广东林业科技,2012,28(3):99-102.
- [5] 国家林业局.黎蒴栲培育技术规程:LY/T 2039—2012[S].北京:中国标准出版社,2012.
- [6] 蔡静如,张谦,连辉明,等.黎蒴栲良种选育和繁育的研究进展[J].广东林业科技,2010,26(1):97-101.
- [7] 姜顺邦,陈通旋,彭坤华,等.贵州珍稀濒危植物岩生红豆栲扦插繁殖技术[J].广西林业科学,2021,50(6):696-700.
- [8] 赵逢晖,张江涛,张龙,等.榔树扦插繁殖的研究进展及建议[J].河南林业科技,2021,41(4):16-19.
- [9] 曹艳云,蒋蕊,郝海坤,等.大叶栲扦插育苗技术[J].广西林业科学,2009,38(4):252-253.
- [10] 何波祥,连辉明,曾令海.黎蒴栲扦插繁殖试验研究[J].广东林业科技,2004,20(3):34-36.
- [11] 赵春莉,杨朝草,刘子平,等.正交设计优化红双喜月季扦插繁殖技术研究[J].安徽农业科学,2021,49(22):70-73.
- [12] 郑萍,王先亮,韩冰冰,等.不同基质配比对月季扦插繁殖效果的影响[J].乡村科技,2021,12(20):59-61.
- [13] 徐珊珊,刘小金,徐大平,等. IAA 和 NAA 对降香黄檀扦插繁殖的影响[J].林业科学研究,2021,34(5):168-176.
- [14] 肖雅迪,王虎,李京怡,等.彩叶树种枫香扦插繁殖技术[J].林业科技通讯,2022(2):60-64.
- [15] 彭竹晶,向勤,张金霞,等.三叶青扦插繁殖操作技术[J].农技服务,2021,38(8):74-75,77.
- [16] 陈丽英,祁树安,王开芳,等.激素种类、浓度及浸泡时间对红栲扦插育苗的影响[J].山东农业科学,2018,50(8):72-76.
- [17] 陈来贺,王妍,杨志坚,等.不同植物生长调节剂对闽楠扦插的影响[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2020,48(11):54-62.
- [18] 王书胜,李晓花,张乐华,等.激素种类与浓度对鹿角杜鹃扦插繁殖的影响及其评价[J].广西植物,2014,34(2):227-234.
- [19] 路斌,缴丽莉,李京涛,等.生长调节剂对金叶白蜡扦插生根及酶活性的影响[J].林业与生态科学,2018,33(1):93-97.
- [20] 张琳,程亚男,张欣,等.两种植物生长调节剂对木槿插穗生根的影响[J].南京林业大学学报(自然科学版),2021,45(3):123-129.
- [21] 孔雨光,燕丽萍,吴德军,等.基质和生长调节剂对紫椴嫩枝扦插的影响[J].中南林业科技大学学报,2020,40(6):25-33.
- [22] SAEED A I, SHAROV V, WHITE J, et al. TM4: A free, open-source system for microarray data management and analysis[J]. Biotechniques, 2003, 34(2):374-378.
- [23] HAMILTON J P, HANSEY C N, WHITTY B R, et al. Single nucleotide polymorphism discovery in elite North American potato germplasm[J]. BMC genomics, 2011, 12:1-12.
- [24] TURNBULL D, YANG L N, NAQVI S, et al. RXLR effector AVR2 up-regulates a brassinosteroid-responsive bHLH transcription factor to suppress immunity[J]. Plant physiology, 2017, 174(1):356-369.
- [25] ALVAREZ-FERNANDEZ A, BERNAL M J, FRADEJAS I, et al. KASP: A genotyping method to rapid identification of resistance in *Plasmodium falciparum*[J]. Malar journal, 2021, 20(1):1-8.
- [26] NIELSEN R, WILLIAMSON S, KIM Y, et al. Genomic scans for selective sweeps using SNP data[J]. Genome research, 2005, 15(11):1566-1575.

(上接第84页)

- [30] The Potato Genome Sequencing Consortium. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato[J]. Nature, 2011, 475(7355):189-195.
- [31] MASSA A N, CHILDS K L, LIN H N, et al. The transcriptome of the reference potato genome *Solanum tuberosum* Group Phureja clone DM1-3516R44[J]. PLoS One, 2011, 6(10):1-8.
- [32] EL-GEBALI S, MISTRY J, BATEMAN A, et al. The Pfam protein families database in 2019[J]. Nucleic acids research, 2019, 47:D427-D432.
- [33] LETUNIC I, KHEDKAR S, BORK P. SMART: Recent updates, new developments and status in 2020[J]. Nucleic acids research, 2021, 49(D1):D458-D460.
- [34] LUPAS A, VAN DYKE M, STOCK J. Predicting coiled coils from protein sequences[J]. Science, 1991, 252(5009):1162-1164.