

摘 要

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 是继小麦、玉米、水稻之后的世界第四大作物, 在世界的食品安全体系中具有重要的作用。由青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* 引起的马铃薯青枯病是仅次于马铃薯晚疫病的世界性病害, 目前尚没有行之有效的化学药剂防治办法, 严重影响了马铃薯的生产。培育抗病品种已成为防治马铃薯青枯病的根本手段。长期以来人们对马铃薯青枯病的研究和探讨主要集中在病菌的病理学机制、分类学、流行病学等方面, 而在马铃薯本身的抗病遗传特性、马铃薯青枯病抗性相关基因的种类、数量及其表达调控途径等方面还不清楚。本研究旨在通过马铃薯青枯病抗性相关基因的分离和分析, 初步揭示参与青枯病抗性的基因种类与数量, 为进一步深入开展青枯病的抗病机制研究及利用抗性资源进行抗病品种选育奠定基础。主要研究结果如下:

1. 建立了快速可靠的马铃薯抗青枯病鉴定新方法, 并筛选出了 13 份抗或高抗青枯病和高感青枯病的二倍体材料。采用传统方法和改进方法对马铃薯二倍体 CE 和 ED 群体、番茄抗病和感病品系进行了青枯病抗性鉴定和评价, 建立了更加简便快速、经济和可重复的病菌鉴定新方法——茎枝菌液共培养法, 该方法对于茄科作物的种质资源抗病性评价和筛选, 特别是对于病菌诱导产生抗性的抗(感)病植株的快速鉴定及其幼苗的先期快速筛选具有重要意义。同时利用该方法筛选出了 6 份抗或高抗青枯病材料和 7 份高感青枯病材料(见表 2.4), 其中 6 个材料(如高抗青枯病基因型 ED13、高感青枯病基因型 ED25 等)已被用于亲本构建作图群体, 为今后开展马铃薯的抗病遗传研究奠定了基础。

2. 建立了富集差异表达基因的 SSH 文库并获得了 44 个病菌侵染早期马铃薯抗青枯病相关基因。以抗青枯病二倍体基因型 ED13 为材料, 青枯病菌小种 3 号 PO41 为供试菌株, 利用抑制差减杂交 (SSH) 和微阵列杂交筛选技术相结合, 获得了 123 个差异表达的非重复的早期抗病相关基因 EST 片段, 其中 99 个 (80%) EST 可找到与其具有较高同源性的序列 ($0 < E\text{-值} < 10^{-10}$), 16 个 (13%) 可找到较低同源性的序列 ($E\text{-值} > 10^{-10}$), 8 个 (7%) 无同源序列。这些无同源序列或具有较低同源性的序列可能代表新基因。在 123 个差异表达的 EST 中, 除 22% 的功能未知或已知功能而未分类和 8% 的无同源序列外, 其余 70% 的 EST 分属于初级代谢、能量代谢、细胞结构、调控、蛋白合成/修饰/加工、转运相关、抗病防御、转录相关和信号转导等生命过程。

在获得的 123 个差异表达 EST 中, 至少有 44 个 (约 35.8%) 参与了马铃薯的抗青枯病反应。这些 EST 对应的基因涉及到信号识别、信号转导、转录调控、过敏 (HR) 反应、系统获得性抗性 (SAR)、细胞自救与抗病防御等抗病反应的基本过程。这些抗病相关基因中大部分与已知基因高度同源, 预示着这些基因较为保守, 在不同植物种的抗病反应中可能具有重要的作用。

3. 构建了一个富集青枯病抗性相关基因的 SMART cDNA 文库。以青枯病菌小种 3 号 (PO41) 诱导 24 h 和 48 h 的马铃薯高抗青枯病二倍体基因型 ED13 的叶片为材料, 利用 SMART 和 LD-PCR 技术相结合构建了一个富集青枯病抗性相关基因的全长 cDNA 文库, 为进行重要基因全长 cDNA 的克隆奠定了基础。所建文库的原始文库和扩增文库滴度分别为 4.4×10^6 和 1.8×10^{10} pfu/ml, 重组率为 96%, 插入片段大小分布在 400-1800 bp, 平均大小为 700-1000 bp。

4. 获得了三个基因的全长 cDNA、四个基因的 RACE 产物及它们的诱导表达模式。利用 RACE

与 LD-PCR 方法和 cDNA 文库相结合,快速获得了三个具有完整开放阅读框架基因的全长 cDNA (*StPI*、*StPMEI* 和 *StDnaJ*) 和四个抗病相关基因 (*L51*、*L77*、*L181* 和 *L362*) cDNA 的 5'和 3' RACE 的 PCR 产物,同时研究了这些基因的诱导表达。具体为:

StPI 编码 116 个氨基酸,与马铃薯蛋白酶抑制子 I 前体 cDNA 有较高的同源性(核苷酸和氨基酸序列的同源性分别为 89% 和 74%)。该基因受青枯病菌的诱导和 JA 的调节,均为上调。推测 *StPI* 基因是马铃薯蛋白酶抑制子基因家族的重要成员,在马铃薯的抗青枯病的反应中可能具有重要作用。该基因已在 GenBank 注册,序列号为 DQ822994。

StPMEI 编码 198 个氨基酸,与烟草果胶甲脂酶抑制子基因具有较高的同源性(核苷酸和氨基酸序列的同源性分别为 85% 和 78%)。*StPMEI* 基因的表达受青枯病菌侵染的抑制,可能与病菌侵染早期促使果胶甲脂酶(PME)表现活性,加固细胞壁有关;但该基因又受 JA 的诱导可能与病菌侵染后期细胞壁的扩展和新细胞壁的建立有关。该基因已在 GenBank 注册,序列号为 DQ822993。

*StDnaJ*编码177个氨基酸,与拟南芥*DnaJ-like*基因的部分核苷酸具有84%的一致性,与其编码的氨基酸序列具有59%的一致性。该基因受青枯病菌的诱导,也受JA的调节。但JA诱导后其上调表达明显比青枯病菌诱导提前,且其维持高表达水平的时间也明显缩短。该基因已在GenBank注册,序列号为DQ885360。

L51 (methyl-CpG-binding domain-containing protein) 和 *L77* (putatively encoding receptor-like kinase RHG1) 均受青枯病菌的诱导,但它们的受诱导速度不同。*L51*在6-12小时内表达量即达到最高;*L77* 约需48小时才可达到最高表达量。这两个基因均不受JA的调节。

L181 (phosphatase 2C) 同时存在于抗病基因型和感病基因型中,在抗病基因型ED13中受青枯病菌的诱导下调表达,与此相反却受JA的诱导上调表达;在感病基因型ED25中,该基因不受JA调节。预示着对于*L181*而言,病菌处理和JA刺激可能采用不同的调节途径,并且该基因在抗病材料中因受诱导下调表达而参与抗病反应。

L362 (protein kinase Pti1) 同时受青枯病菌的诱导和 JA 的调节,其表达模式与 *StDnaJ* 相似,均为上调表达。在处理 24 小时之前该基因的 mRNA 积累量即达到最高,并且 *L362* 在 JA 诱导后其上调表达明显比青枯病菌的诱导提前。*Pti1* 基因为 *Pto* 基因的下游基因,参与番茄的抗病反应,推测 *L362* 也可能参与了马铃薯的抗青枯病反应。

总之本研究不仅为我们提供了一些有益的数据 (ESTs),还有助于提高我们对马铃薯与青枯病菌互作本质的认识,并且有些 EST 将可能被转化为分子标记进行马铃薯抗青枯病的标记辅助育种。

关键词: 马铃薯青枯病, cDNA 文库, 抗病相关基因, 基因表达

Abstract

Potato (*Solanum tuberosum* L.) as one of top four important crops in the world after wheat, corn and rice, plays more and more important role in food security. Bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum* (*Rs*) is one of devastating diseases of potato. As a soil-borne disease, there are no any efficient chemical methods to control it. Probably, the most promising way is to develop resistant cultivars. During the past years, research mainly focused on pathology, taxonomy and epidemiology of the pathogen. The genetics of host resistance and the mechanism of potato-*Rs* interaction along with regulation of gene expression are still poorly understood. In this study, gene expression of the incompatible interaction of potato-*Rs* was surveyed. The main results of this investigation are as follows:

1. A new inoculation method, named as “Stem Culture in Bacterial Solution Method” was established. Two conventional methods and the new method were used to evaluate the resistance against *Rs* in two potato populations as well as in seven tomato lines. The results showed that the new method is more economic and reproducible, simpler and easier to operate than the two conventional methods. Six *Rs*-resistant and seven *Rs*-susceptible potato genotypes were obtained. Six genotypes (e.g. the most resistant clone ED13 and susceptible clone ED25) have been used as parents to construct mapping populations, which are useful to study the inheritance of *Rs*-resistance in future.

2. A subtractive cDNA library of *Rs*-resistant potato at early stage was constructed using suppression subtractive hybridization (SSH) and macroarrays. Totally 123 differentially expressed uni-gene fragments were identified. Ninety-nine ESTs (80%) have high similarity with genes (fragments) in the NCBI database ($0 < E\text{-value} < 10^{-10}$), sixteen (13%) have low identity ($E\text{-value} > 10^{-10}$), eight (8%) have no match. The genes with low identity and no match to known genes may represent novel genes. Seventy percent of 123 ESTs were related to the primary metabolism, energy, cell structure, gene regulation, protein synthesis, protein modification and processing, transporters, disease defence, transcription and signal transduction, etc. while the remaining 30% were function unknown or unclassified.

Forty-four ESTs out of the 123 differentially expressed fragments were considered as *Rs*-resistance related ESTs and were classified into six groups, which are involved in basal disease resistance process, including signal recognition, signal transduction, hypersensitive response, systemic acquired resistance, cell rescue and protection, and resistance or defense, etc. Most of these ESTs shared high similarity with known genes, indicating that these genes may be conservative in function and play important roles in disease resistance in different plant species.

3. A full-length cDNA library of *Rs*-resistant potato was constructed based on SMART (switching

mechanism at 5' end of RNA transcript) and LD-PCR (long distance PCR) techniques. The titers of unamplified and amplified cDNA library were 4.4×10^6 pfu/ml and 1.8×10^{10} pfu/ml respectively. The rate of recombination was 96%. The length of inserted fragments was 400-1800 bp and the average size was 700-1000 bp.

4. Three full-length cDNAs (*StPI*, *StPMEI* and *StDnaJ*) with completed open reading frame (ORF) were cloned from *Rs*-resistant potato leaves using RACE method combined with LD-PCR and cDNA library as well as four other genes' RACE PCR products. Expression patterns of these genes were also confirmed using Northern blot and semi-quantitative RT-PCR.

StPI gene encodes a protein of 116 amino acids, and shares 89% identity with potato proteinase inhibitor I precursor in nucleotide and 74% in amino acid. *StPI* gene was induced by *Rs* and also regulated by JA. *StPI* gene is one of the members in potato proteinase inhibitor gene family, and may play an important role in potato's resistance to *Rs*. This gene has been registered in GenBank and the accession number is DQ822994.

StPMEI gene encodes a protein of 198 amino acids, and shares 85% identity with tobacco invertase/pectin methylesterase inhibitor in nucleotide and 78% in amino acid. The expression of *StPMEI* was inhibited by *Rs*, which might result in improving the activity of pectin methylesterase (PME) and stiffening the cell wall in early stage post *Rs*-invasion. Whereas *StPMEI* gene was up-regulated by JA, which may be related to cell wall extension and building up in later stage. This gene has been registered in GenBank and the accession number is DQ822993.

StDnaJ gene encodes a protein of 177 amino acids, and shares 84% identity with *DnaJ-like 20* of *Arabidopsis thaliana* in nucleotide and 59% in amino acid. *StDnaJ* gene was induced by *Rs* and also regulated by JA. This gene was induced earlier and its high expression level persisting time was obviously shorter treated with JA than that infected by *Rs*. *StDnaJ* gene has been registered in GenBank and the accession number is DQ885360.

L51 (methyl-CpG-binding domain-containing protein) and *L77* (encoding receptor-like kinase RHG1) have different *Rs*-induced expression patterns. *L51* reached the highest expression level in 6-12h p.i. while *L77* did so in 48h p.i. These two genes were not regulated by JA.

L181 (phosphatase 2C) exists both in resistant and susceptible genotypes. This gene was down-regulated by *Rs* in resistant genotype, whereas up-regulated by JA, but was not regulated by JA in susceptible genotype, indicating that *Rs* invasion may have different signal transduction pathway with JA-treatment for this gene and this gene show its function due to stress induction.

L362 (Protein kinase Pti1) was up-regulated by *Rs* and JA, and its expression pattern was similar to that of *StDnaJ*. The mRNA accumulation of *L362* reached the highest level before 24h post treated by *Rs* and JA. Also this gene was induced earlier treated with JA than that infected by *Rs*. *Pti1* gene is

located downstream of *Pto* and involved in disease resistance in tomato, suggesting that L362 may also play an important role in *Rs*-resistance reaction in potato.

This investigation, although far from being exhaustive, has provided new molecular insights into the nature of the potato-*Rs* interaction in potato leaves. The ESTs reported here may provide useful data for improving our knowledge of potato resistance to pathogens, and may also be used as candidate genes for developing molecular markers to assist potato genetic breeding in future.

Key words: potato bacterial wilt, cDNA library, resistance-related gene, gene expression

缩 略 语

简写符号	英文全称	中文意义
<i>Avr</i>	Avirulent gene	无毒基因
BLAST	Basic local alignment search tool	局部比对基本检索工具
BW	Bacterial wilt	青枯病
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
cDNA-AFLP	cDNA amplified fragment length polymorphism	cDNA 扩增长度多态性
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	焦磷酸二乙酯
ds-cDNA	Double strand cDNA	双链互补 DNA
DTT	Dithiothreitol	二硫苏糖醇
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
EST	Expressed sequence tag	表达序列标签
GA	Gibberellic acid	赤霉素
HR	Hypersensitive response	过敏反应
IPTG	Isopropylthio- β -D-galactoside	异丙基硫代- β -D-半乳糖苷
JA	Jasmonic acid	茉莉酸
LD-PCR	Long distance PCR	长距离聚合酶链式反应
MeJA	Methyl jasmonic acid	茉莉酸甲酯
mRNA	Message RNA	信使 RNA
ORF	Open reading frame	开放读码框
PRP	Pathogenesis-related protein	病程相关蛋白
QTLs	Quantitative trait loci	数量性状位点
<i>R</i>	Resistance gene	抗病基因
RACE	Rapid amplification of cDNA ends	快速扩增 cDNA 末端
RGA	Resistance gene analogs	抗病基因类似物
RNA	Ribonucleic acid	核糖核酸
rRNA	Ribosomal RNA	核糖体 RNA
RT-PCR	Reverse transcriptional polymerase chain reaction	反转录 PCR
SA	Salicylic acid	水杨酸
SAR	Systemic acquired resistance	系统获得抗性
SMART	Switching mechanism at 5' end of RNA transcript	RNA 5' 端逆转录模板转换
SSH	Suppression subtractive hybridization	抑制差减杂交
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indol- β -D-galactoside	5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：李存

时间：2006年10月10日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：李存

时间：2006年10月10日

导师签名：廖冬水

时间：2006年10月12日

第一章 前言

1.1 课题的提出

马铃薯主要起源于南美洲安第斯山区、散见于中美洲加勒比地区、墨西哥及美国南部地区,目前发现的野生种和栽培种超过 220 个,新“种”的发掘和鉴定工作还在继续进行(Hawkes, 1990)。用于生产的仅 8 个种,除普通栽培种(*S. tuberosum* ssp. *tuberosum*)在世界各地广泛种植外,其他种限于安第斯山区(Huamán, 1986),栽培马铃薯 17 世纪引入中国(佟屏亚等, 1991)。

马铃薯以其适应性强、产量高、营养全面、适于加工等特点,在世界各地迅速推广种植,已成为继小麦、玉米、水稻之后的世界第四大作物,种植面积达到 1865.24 万公顷,年总产量为 32197.42 万吨,平均单产为 17.26 吨/公顷(FAO, 2005)。中国马铃薯栽培面积最大达 440.15 万公顷,占世界的 23.6%;年总产量为 7377.65 万吨,为世界的 22.91%;平均单产为 16.76 吨/公顷(FAO, 2005)。自 1961 年至今,马铃薯在发达国家的栽培面积总体呈下降趋势,从 1961 年的 1879.93 万公顷减少到了 2005 年的 914.92 万公顷;而在发展中国家却呈增长趋势,从 1961 年的 334.87 万公顷增加到了 2005 年的 950.32 万公顷,平均年增长 13.68 万公顷;但由于生产水平的提高,世界马铃薯总产量仍然呈逐渐上升趋势。据国际马铃薯中心(CIP)和国际粮食政策研究所(IFPRI)预测,1993 至 2020 年,全球马铃薯产量的平均年增长率为 2.7%,远高于水稻、玉米、小麦等作物,世界人口达到高峰时,马铃薯和其他块根、块茎类作物将成为世界粮食安全保障体系中的重要作物(Gregory, *et al.* 2000)。

尽管目前我国的马铃薯种植面积和产量均居世界首位,但单产与世界发达国家相比(如单产最高的英国为 45.00 吨/公顷(FAO, 2005))还有相当大的差距,并且我国各地区的生产水平也很不均衡,发展潜力巨大,同时马铃薯品质也有待进一步提高。专家预测,中国将成为亚太地区最重要的生产中心(屈冬玉等, 2001),是 21 世纪全球最大的马铃薯快餐食品消费市场,由此可见马铃薯加工领域的巨大潜力也不容忽视。

由青枯病病原菌(*Ralstonia solanacearum* (E. F. Smith) comb. nov., 原名为 *Pseudomonas solanacearum*, 以下简称为青枯病菌)引起的马铃薯青枯病(Bacterial Wilt)是世界性的细菌性病害(Yabuuchi, *et al.* 1995),其危害程度仅次于马铃薯晚疫病,可通过土壤、灌溉、植株、种薯等进行传播。该病菌寄主范围广,可侵染 50 个科的数百种植物,尤其是茄科植物,如马铃薯、番茄等(Martin, *et al.* 1985),防治非常困难,特别是在温暖潮湿的环境中,发病率更高,严重者可使马铃薯减产 80%,甚至绝产(He, 1987),严重威胁着我国乃至世界的马铃薯生产。

此病目前尚没有行之有效的化学药剂防治办法,尽管与其他作物轮作、间套作及调整播种时期等综合防治措施在一时间可较有效的防治该病的发生和蔓延,但防治马铃薯青枯病的根本手段还是培育抗病品种。长期以来,国内外科技工作者对马铃薯青枯病的研究和探讨主要集中在该病的病理学机制、分类学及流行病学、品种资源评价及杂交筛选等方面,但在抗性遗传机制方面却知之不多,控制马铃薯对青枯病的抗性基因种类和数量以及它们的表达调控机制还不清楚。同时由于可供利用的抗病育种材料有限,普通四倍体栽培品种遗传背景复杂,又缺乏优良的抗病基因源,严重影响了抗病育种工作的进程。因此深入研究马铃薯的抗青枯病机制和进行抗病相关基因

的分离将有助于了解和揭示复杂的抗病防御反应机理，对确定更有效的抗病育种途径，培育高抗青枯病的马铃薯新品系（品种）具有重要的理论与实践意义。

1.2 青枯病研究进展

1.2.1 青枯病菌的研究概况

1.2.1.1 病菌的分类

青枯病菌具有明显的生理分化或菌系多样性。不同地区或寄主植物来源的分离物在寄主范围上、致病力强弱上或细菌学特性上并不完全相同。目前国际上公认的主要有两个亚分类系统。一是美国的 Buddenhagen、Sequeira 和 Kelman 于 1962 年根据不同来源菌株对不同植物种类的致病性差异，将青枯病菌划分为三个生理小种（Race）：可高度侵染茄科植物（包括马铃薯、番茄、茄子、辣椒和烟草等）和其它植物，寄主范围较广的为小种 1 号；只侵染香蕉、大蕉和海里康（*Heliconia*）的为小种 2 号；只侵染马铃薯和偶尔侵染番茄、茄子的为小种 3 号。另一个亚分类系统是澳大利亚 Hayward 根据不同菌株对 3 种双糖和 3 种己醇氧化产酸能力的差异，将青枯病菌划分为四个生化变种（Biovar，原先称生化型 Biotype），即：生化变种 1—不能氧化 3 种双糖和 3 种己醇；生化变种 2—只能氧化 3 种双糖，不能氧化 3 种己醇；生化变种 3—能氧化 3 种双糖和 3 种己醇；生化变种 4—只能氧化 3 种己醇，不能氧化 3 种双糖。后来又发现两个生理小种 4、5 和一个生化变种 5。生理小种和生化变种之间的对应关系如图 1.2。

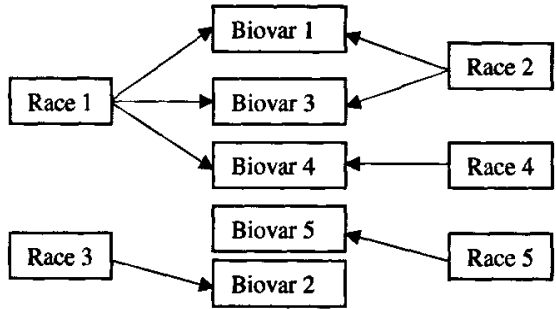


图 1.2 生理小种和生化变种之间的对应关系

Fig. 1.2 Corresponding relationship between two classified system (race and biovar of *Ralstonia solanacearum*)

两种分类之间无一一对应关系，如小种 1 号包括三个生化变种 1、3 和 4，而这三个生化变种又分属于三种生理小种 1、2、4，为进行青枯病抗病研究和国际间的信息交流带来了困难，并且这两种分类方法都不符合通用的细菌命名法（Code of Nomenclature of Bacteria）。因此统一和系统分类青枯病菌及弄清所研究病菌分属于哪个生理小种和生化变种是必要的，未来青枯病菌的分类可能会分为 2 个或更多的亚类（Hayward, 1991）。目前为害我国马铃薯的优势菌（系）是生化变种 2，它是一个低温型菌系，在低温下生化变种 2（小种 3）比生化变种 3 和 4 更具有侵染力（Ciampi, et al. 1980），严重威胁着马铃薯生产。

1.2.1.2 病菌的检测

随着青枯病菌的寄主越来越广泛及其本身的高变异性，诊断技术对于青枯病的鉴定、栽培材

料的带菌检测和控制病害蔓延传播等具有重要作用。近年来国内外的专家学者对其进行了大量的研究和探讨,并建立了多种方法用于土壤、水、杂草等的青枯病菌检测。20世纪90年代,随着在西欧和北欧陆续发现青枯病菌小种3号(生化变种2号),Wullings等(1998)建立了一种基于FISH的检测马铃薯青枯病菌的新方法:用特异探针RSOLA和RSOLB可有效检测污染地区的土壤、水及杂草寄主根组织中的青枯病菌。为提高病菌检测的灵敏度,Poussier等(2002)优化了病菌提取程序,采用简单的PCR方法可有效检测来源不同的低含量的青枯病菌。同年,Caruso等利用特异单克隆抗体8B-IVIA可与168个典型的青枯病菌系发生反应,而与174个其他病原或源自马铃薯的未知病原不发生反应的特性,建立了富集双抗体夹心间接ELISA法。该方法引入了一个病菌富集过程,灵敏度可达1~10 cfu/ml(马铃薯块茎提取物),可有效检测马铃薯块茎中的病菌。2003年,Schonfeld等在Poussier等报道的PCR检测方法基础上,进一步发展了Rsol-fliC PCR系统,该方法不仅可快速检测低含量的青枯病菌,而且对于不同地理起源的青枯病菌的检测同样有效。同年Caruso等也对PCR方法检测青枯病菌的灵敏度和检测方法简单化方面进行了卓有成效的改进:根据16S rRNA序列设计3个PCR引物,利用Co-PCR(在同一个反应体系中进行多对引物的PCR扩增)法可在一个反应中同时对水中青枯病菌生化变种1、2和4号进行特异检测分析,灵敏度可达1cfu/ml。表1对不同检测方法的性能进行了比较。

表1 检测青枯病菌不同方法的性能比较

Table 1 Comparison of different methods in *Ralstonia solanacearum* detection

方法	灵敏度	评述
PCR法	1cfu/ml	简单,方便
杂交	高	采用特异探针增加检测的灵敏度和准确性
免疫学方法	1~10 cfu/ml	应用单克隆抗体,准确性更强,灵敏度更高
电镜	高	准确、可靠

我国在青枯病诊断技术方面也做了大量研究,20世纪80年代初主要是采用显微镜检视组织菌溢,不同部位人工接种以及多抗血清技术等一些传统方法,虽取得一定成效,但未用于生产实践。1985年,中国农科院植保所与生物技术中心合作,研制出了单克隆抗体试剂,采用ELISA方法和免疫荧光抗体(IFA)方法进行青枯病菌的马铃薯潜伏侵染检测,取得很好的效果。单克隆抗体技术较之传统的兔抗血清技术具有更好的特异性,准确性更强,灵敏度更高。应该说,随着分子生物学技术的不断发展,应用于病菌检测的更灵敏、更经济有效的方法也将应运而生,同时,该技术也将有广阔的应用前景。

1.2.1.3 病菌的分子生物学研究进展及致病机制

青枯病菌的基因组一般由两个复制子组成,一个3.7Mb染色体和一个2.1Mb的大质粒,菌株GMI1000就是典型代表(Salanoubat, *et al.* 2002),这种双向的基因组结构是大多数青枯病菌的共有特征。这两个复制子在分布和组成等方面很相似,并且它们在组成和SSR上的微小变化即可能导致基因表达量的不同,并进而影响相关基因的表达调节。因此Coenye等(2003)认为这两个复制子具有相似的进化史,2.1Mb的大质粒是其最初染色体的一部分,而不是通过横向基因转移来自其它生物。青枯病菌的大质粒(2.1 Mb)上存在有金属抗性基因,这与*Ralstonia metallidurans* CH34基因组中也含有金属抗性的大质粒pMOL28和pMOL30很相似(Mergeay, *et al.* 2003)。对

CH34 的研究还揭示:大量的金属抗性基因座不仅存在于质粒 pMOL28 和 pMOL30 上,在染色体上也存在,这种金属抗性基因的存在使得青枯病菌更能适应金属富集环境。

由 *hrp* 基因编码的 III 型分泌系统在青枯病菌致病中起着关键作用,其组成基因 *popB*、*popC* 位于 *popA* 基因的下游,并与 *popA* 基因共同组成一个操纵元,*popABC* 操纵元的表达受 *hrpB* 基因的调控和植物悬浮细胞共培养的诱导,这种特异性诱导依赖于特异信号受体 PrhA (Gueneron, *et al.* 2000)。进一步的研究表明:PrhA 是植物细胞壁的非扩散信号第一个细菌受体,该受体可激发细菌毒性基因的转录活性 (Aldon, *et al.* 2000)。*hrpB* 基因有两个启动子 *hrpY* 和 *popABC*,研究发现其活性是由一个称作 *hrp(II)* box (TTTCGn16TTTCG) 的 25nt 的 DNA 单元赋予的,该 25nt 的 DNA 单元在其它 *hrp* 启动子中也存在 (Cunnac, *et al.* 2004)。在启动子 *hrpY* 的下游还存在两个 *hrpB* 调节基因 *hpaZ* 和 *hpaB*,其中 *hpaB* 基因对于青枯病菌的致病性和诱导植物产生过敏反应是必须的 (Mukaihara, *et al.* 2004)。青枯病菌致病因子蛋白通过 III 型分泌系统进入寄主植物细胞,但它们又受到 *hrpB* 依赖或非依赖的调节 (Cunnac, *et al.* 2004)。

胞外因子在青枯病菌的致病过程中起着十分重要的作用。很多致病因子受一个复杂的网络控制,该网络的核心是一个五基因 *Phc* 系统,调控着胞外多糖、细胞壁降解酶和其它与自体信号分子相应的因子,这些因子监视着病菌的生长及生长环境;在病菌中另一个关键系统是 *Prh* 系统,它通过 6 基因的复合装置激活 III 型分泌系统来传导植物细胞获得的信号 (Schell, 2000)。胞外多糖是青枯病菌致病因子的主要因子,可阻碍植物导管内水分的运输,从而引起萎蔫症状。胞外多糖的合成与 *epsI* 操纵元密切相关,磷酸化的 EpsR 可特异结合 *epsI* 启动子,并对 *epsI* 操纵元具有调控作用,其调节能力与 EpsR 本身的磷酸化程度有关 (Chapman, *et al.* 1998)。青枯病菌可产生 3 种胞外多糖 PehA、PehB 和 PehC, *pehC* 突变体对番茄的致病力与野生型病菌无明显差别,奇怪的是 *pehA/B/C* 缺失突变体的毒力稍高于 *pehA/B* 突变体 (Gonzalez ET. and Allen C., 2003), *pehC* 的作用值得进一步研究。

在胞外蛋白方面,康耀卫等 (1995) 获得了青枯病菌胞外蛋白外输基因缺失突变体,并克隆了相关基因,证明胞外蛋白在致病过程中起着非常关键的作用。Denny 等 (1996) 也曾报道青枯病菌的 28kDa 的胞外蛋白与其它毒蛋白基因的转录有协同关系。刘焕利等 (1999) 在康耀卫等研究的基础上,采用转座子的方法获得了胞外蛋白结构基因同时发生缺失的突变体菌株,并通过基因互补的方法获得了能完全互补突变株 PM2644 所缺失的胞外蛋白和聚半乳糖醛酶活性的克隆 pLCQ2,并恢复了其致病力。进一步的研究表明:聚半乳糖醛酶和 PM2644 所缺失的 62.5 kDa 胞外蛋白共同存在时对于青枯病菌的致病性有着明显的作用 (罗天宽 2002)。Ozawa 等也于 2001 年分离了编码 71 kDa 的杀菌蛋白基因 *P4282*,该基因序列保守,在大肠杆菌中的表达产物具有杀菌活性,且具有对几种青枯病菌系的广谱抗性。研究表明,青枯病菌还可产生两种与海藻糖具有不同亲和力的凝集素:RSL 和 RS-III, RS-III 与海藻糖结合凝集素 PA-III 高度同源,并能识别海藻糖,但对甘露糖和果糖却具有非常高的亲和力 (Sudakevitz, *et al.* 2004)。

在青枯病菌对寄主植物的入侵和定居的早期,其运动性对于它的毒力也是至关重要的。青枯病菌的蠕动需要 IV 型菌毛系统的参与,IV 型菌毛对于青枯病菌的表面吸附及其毒性是非常重要的 (Kang, *et al.* 2002),其装配需要 HrpV 和 HrpX 蛋白的参与 (Van Gijsegem, *et al.* 2002),蠕动所需的很多基因也非常保守 (Liu, *et al.* 2001)。当青枯病菌一旦进入植物的木质部导管后就基本上不再运动,为确定运动基因什么时间和怎么表达,Tans-Kersten J 等 (2004) 克隆并突变了青枯

病菌的运动调节基因 *flhDC*。研究表明：*flhDC* 基因突变体在番茄和拟南芥上不能运动，且致病力明显下降，该基因在体外和在寄主中有着明显不同的表达模式。*flhDC* 基因在体外的表达依赖于病菌的一个早期致病因子的调节子 *PehSR*，而在番茄寄主中 *flhDC* 基因在野生型菌株和 *pehR* 突变体菌株中均能表达，但 *PehSR* 是病菌运动所必须的。*flhDC* 和 *pehSR* 在培养基中和在寄主植物中同样受诱导表达，然而在 *flhC* 表达的细胞中却没有发现有细菌运动。在寄主体内，*flhDC* 和鞭毛蛋白基因的表达对于细菌的运动性是各自独立的，这表明在寄主发病过程中还有其它的信号和调节途径抑制了细菌的运动。应该说青枯病菌的致病机制比较复杂，仍然需要更多的研究和证据来解释它们的致病因子的具体功效和其编码基因的表达调控机制。

1.2.2 植物抗病机制及病原与植物的互作

植物病害的发生是一个植物、病原、环境互作的极其复杂的过程。植物-病原互作的本质是植物与病原基因组及其产物间相互识别和相互作用，最终导致植物表现抗病或感病。植物经过长期的进化，已经发展了自己的防卫反应机制，来保卫自身，免遭病原的侵染。在长期的病原和寄主互作中，经过基因的进化和重排，植物获得了抗性基因，而病菌则获得了相应的无毒基因 (Flor, 1942)。很多抗性基因是小种专化性的 (Ellis, *et al.* 1998; Bent, 1996)，并且大多数抗病基因具有富亮氨酸重复结构域 (LRR)，该结构域可介导蛋白和蛋白之间的相互作用 (Kobe, *et al.* 1995)，并在基因对基因模型中具有重要作用 (Bent, 1996; Jones, *et al.* 1997)。然而基因对基因学说无法解释许多由隐性基因介导的植物抗病性。大麦隐性基因 *mlo* 突变体对真菌的多种株系具有广谱抗性，并且 *mlo* 基因编码一类新的植物特异性膜蛋白 (Büschges, *et al.* 1997; Devoto, *et al.* 1999)；拟南芥隐性基因 *edr1* 突变体也表现出了对一些细菌和真菌病原的高度抗性 (Frye, *et al.* 1998)，*edr1* 基因编码的类 *raf* 是具有分裂素活性的蛋白激酶，该激酶与 *mlo* 基因编码产物一样也是作为抗病的负调控子 (Frye, *et al.* 2001)。隐性基因突变体具有对病原的高抗性揭示了植物抗病机制的复杂性。

目前描述植物与病原关系的遗传互作模式主要有两种：①与不亲和因子相关的互作模式，也称基因对基因学说 (Flor, 1971)。病原与其寄主的关系分为亲和及不亲和两种，亲和与不亲和的病原分别含有毒性基因 (*vir*) 和无毒基因 (*avr*)，而亲和与不亲和的寄主分别含有感病基因 (*r*) 和抗病基因 (*R*)。当携带无毒基因的病原与携带抗病基因的寄主互作时，二者表现不亲和，寄主表现抗病。其它情况下，二者亲和，寄主感病。寄主与病原间的互作关系取决于病原产生的无毒因子的变异性和寄主对该因子的敏感性，无毒因子通过改变寄主的生理特性起作用；②与亲和因子相关的互作模式。病原与互作有关的基因的作用是导致病原与其寄主仅发生亲和性互作，亲和因子通过改变寄主的生理特性而使其易受病原侵染，而抗病寄主含有相应的抗病基因，其基因产物使亲和性因子失活而不起作用 (Briggs, *et al.* 1994)。不同植物-病原互作中诱导产生的防御反应有所不同，但 *R* 基因介导的防御反应有很多共同点：某特定的 *R* 基因的功能依赖于病原的表型，即 *R* 基因产物与病原之间存在专一性识别，病原在侵染寄主时产生很多潜在信号，其中的一些信号被寄主识别而诱发寄主产生抗病反应 (Keen, 1990; Dewit, 1992)。由于目前人们对于马铃薯抗青枯病的遗传特性及马铃薯与青枯病菌的互作模式尚不清楚，马铃薯与青枯病菌的互作是否属于上述互作模式中的一种尚需探讨。

1.2.3 抗青枯病研究进展

1.2.3.1 抗病研究

环境对寄主植物的青枯病抗性具有重要影响,通常情况下,提高温度可引起寄主植物的发病率提高。寄主植物的青枯病抗性对温度敏感且特异(Krausz, *et al.* 1975; Tung, *et al.* 1990),在低温下表现为抗病的植株,多数则在高温下表现为感病,是否是由于病菌的致病因子只在高温下才能完全表达或寄主植物的抗病基因在高温下表达受到抑制尚不明了(Tung, *et al.* 1990)。光照也可影响寄主植物的青枯病抗性,如在 26.6℃ 下光密度降低对于番茄品系 1169 的 LB-6 抗性无影响,但在 29.4℃ 却使其抗性明显降低,并且缩短光周期也可明显降低其抗性(Krausz, *et al.* 1975);在马铃薯中,高光强(2000 ft-c)下比低光强(1300 ft-c)下更易表现出抗性(Sequeira, *et al.* 1969)。植物对青枯病的抗性机制比较复杂,目前人们对它的理解仍然不够深入,对于植物抗青枯病的研究也主要集中在烟草、番茄、拟南芥和马铃薯等几种植物上。

烟草(*Nicotiana tabacum*) 抗青枯病研究:烟草 *hsr203* 基因产物是一个丝氨酸水解酶,具有脂酶活性,与程序性细胞死亡密切相关,该基因的表达对于不同病原及邻近细胞死亡触发引起的程序性细胞死亡都是有用的标记(Pontier, *et al.* 1998)。*hsr203* 反义基因抑制在烟草过敏性细胞死亡和防卫机制上具有多效性,并且能够增加烟草对不同病原的抗性(Tronchet, *et al.* 2001)。Belbahri 等(2001)创造了 *hsr203J* 基因的病原诱导启动子控制青枯病菌 *popA* 基因表达的转基因烟草植株,由于 *PopA* 本身也可诱导 *hsr203J* 启动子,转基因植株的病原浸染位点快速积累病菌激发子。另有研究表明:Papa(一种青枯病菌)的浸染可启动 *popA* 在烟草中的迅速表达,致使细菌增殖和运动受到抑制,最终导致其毒力丧失(Kanda, *et al.* 2003)。在可引起过敏反应的非致病性病原青枯病菌 8107 接种的烟草叶片中,*hsr203J* 基因只在病菌接种区域表达,但在病菌接种区域却检测不到 *PR-1a* 和 *PR-1b* 基因的表达,而在接种区域附近确发现有过敏反应,看来这些 *PR-1* 基因的表达调节依赖于距接种区域的远近,因此可推测这些信号可能由产生过敏反应的细胞产生,并向周围细胞传播,进而引起 *PR* 基因的表达。进一步研究指出烟草对 8107 的抗性是水杨酸依赖性的,具有与对 CMV 的获得性抗性不同的抗性机制(Kiba, *et al.* 2003)。

在分子标记方面也做了相关研究,Nishi 等(2003)利用 AFLP 从 W6(源自日本当家品种的具有青枯病抗性的烟草品种)、Hatano 和 Michinoku 1(商业用野生感病品种)中鉴定筛选出了 117 个 DNA 标记,包含 10 个连锁群,并找到了一个 W6 抗病 QTL 和与之相关的 DNA 标记,该 QTL 可解释 30%以上的青枯病抗性。

番茄(*Lycopersicon esculentum*) 抗青枯病研究:番茄对青枯病菌的抗性是由多基因控制的,Danesh 等(1994)采用不同的接菌方式研究了番茄对青枯病菌的抗性,结果表明番茄中有 3 个与青枯病抗性相关的基因座,且基因座对抗性的相对影响与接种的部位有关,接种根的植株表现抗性的基因座位于第 6 和第 10 号染色体上,而接种芽的植株表现抗性的基因座则位于第 7 号染色体上。6 号染色体的基因座与青枯病抗性紧密相关,起着关键作用(Mangin, *et al.* 1999)。进一步的研究表明在 12 号染色体上也存在青枯病抗性基因座,并且该基因座对小种 1 号,生化变种 3 号 Pss4(台湾的地方株系)具有专化抗性(Wang, *et al.* 2000)。目前已经建立了包括 1000 个标记,

平均遗传图距为 1.2 cM (约 900 kb) 的番茄高密度分子连锁图谱 (Tanksley, *et al.* 1992), 并分离和鉴定出了多个与青枯病抗性相关基因和基因座。这些基因和基因座对青枯病抗性均具有较高的贡献率。

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 抗青枯病研究: 1998 年 Deslandes 等通过对感病的 Col-5 和抗病的 Nd-1 的杂交后代分析鉴定得知, 拟南芥对青枯病菌菌株 GMI1000 的抗性是一个简单的隐性遗传。并利用 Col-5 和 Nd-1 的重组自交系 F9 代筛选出了一个位于 5 号染色体上的起决定性作用的青枯病抗性标记 *RRS1*。进一步的研究表明: 显性基因 *RRS1-S* 和其等位隐性基因 *RRS1-R* 编码长度不同、但结构高度相似的蛋白质, 这些蛋白质具有 NBS-LRR 抗性蛋白的结构域和植物转录因子的 WRKY 区域。尽管遗传上认定 *RRS1-R* 为隐性基因, 但在转基因植物中它却具有显性抗性功能。对 *RRS1-R* 的序列分析表明 *RRS1-R* 基因上有几个区域对于其抗性是必需的, 并且 *RRS1-R* 介导的抗性是水杨酸依赖性的, 这无疑说明具有专化抗性的抗性基因所控制的抗性具有相似的信号传导途径 (Deslandes, *et al.* 2002)。PopP2 是青枯病菌的一个 III 型受体, 属于 YopJ/AvrRxv 蛋白家族, 编码与拟南芥 *RRS1-R* 基因相匹配的无毒基因决定簇, popP2 是 YopJ/AvrRxv 蛋白家族另一成员 *popP1* 基因产物趋异进化的结果, 且全长的 *popP2* 基因是 *RRS1-R* 和 *RRS1-S* 蛋白存在于核的必要条件 (Deslandes, *et al.* 2003)。进一步的研究表明: *RRS1-R* 和 *popP2* 间基因互作是分子连接蛋白使 *RRS1-R* 和 PopP2 形成了复合体 (Lahaye, 2004)。与番茄的抗青枯病遗传研究结果相似, 拟南芥的青枯病抗性至少由三个座位控制 (Godiard, *et al.* 2003)。

马铃薯抗青枯病研究: 马铃薯抗青枯病基因与耐热基因之间存在着密切关系, 有些耐热无性系, 虽然没有抗性基因存在, 但在高温条件下对青枯病的抗性反而比虽有抗性基因但不耐热的无性系强。研究认为: 这种适应性基因可能参与调控抗性基因的表达, 且这两种基因都有主效基因和微效基因的存在, 耐热基因与抗性基因之间的高度互作效应表明了有大量有益非加性基因作用的存在; 研究还发现基因的适应性基因赋予寄主植物的青枯病抗性高度相关, 亲本赋予后代的青枯病抗性依赖于亲本本身的抗病能力和适应环境的能力, 耐热亲本赋予后代的青枯病抗性可能性更大 (Krausz, *et al.* 1975; Tung, *et al.* 1990)。因此增加遗传上的抗病和环境适应能力, 特别是提高耐热性对于培育抗青枯病的马铃薯具有重要作用。尽管马铃薯的青枯病抗性比较复杂, 目前对其研究仍然取得了一定进展。

四倍体普通栽培种中只有极少数耐病或中等抗病, 因此, 二十世纪 60 年代以前未见有关马铃薯抗性遗传研究的报道。60 年代末到 70 年代初, Rowe 和 Sequeira 等人曾利用青枯病菌小种 1 号不同菌株对富利亚薯的 4 个抗青枯病无性系进行了研究: 富利亚薯对青枯病菌 (K60 菌株) 的抗性由 3 个独立的显性基因控制, 且存在着修饰性基因; 并且其抗性还受少数加性基因 (包括对青枯病菌不同菌系 (Strains) 的专化抗性基因) 控制。80 年代末到 90 年代初期间, Tung 等人以含有不同抗源 (包括富利亚薯, AVRDC-1287.19 等) 的无性系或品种为试验材料, 研究了寄主 (不同抗源、不同适应特征马铃薯材料) — 病原 (青枯病不同小种或菌系) — 环境 (不同温、光条件) 的相互作用对马铃薯的抗性影响, 指出马铃薯对青枯病的抗性为部分显性抗性; 加性基因和非加性基因的作用对抗性表达都有贡献。在马铃薯抗青枯病的分子标记方面, 国内外则报道较少。郜刚等 (2000, 2002) 从源于 *Solanum phureja* 和 *S.vernei* 等高抗材料的两个分离世代群体 (CE 和

DE) 中筛选出了三个 RAPD 标记和一个 SSR 标记, 最短遗传图距为 9.5cM, 这也是目前遗传图距最短的马铃薯抗青枯病分子标记。同时他认为二倍体马铃薯青枯病抗性至少由三对隐性基因控制。要真正弄清马铃薯抗青枯病的遗传尚需进一步研究, 尤其有必要发掘更多的抗病种质资源和在抗病分子机制上来阐明马铃薯对青枯病抗性的遗传本质。

现已发现马铃薯二倍体野生种、原始栽培种及四倍体野生种中很多材料具有对青枯病不同程度的抗性和耐性 (Qu, 1996)。为丰富我国马铃薯抗青枯病的种质资源, 屈冬玉等 (1996) 利用产生 2n 配子的材料进行 4x-2x 有性多倍化, 筛选出了既能高频率产生 2n 配子又具有青枯病抗性的二倍体种质, 并且利用 2n 配子将 *Solanum phureja* 的抗青枯病基因转移到四倍体栽培种中, 获得了 MS42.3×CD1045, AVRDC1287×ED1022, B927017×CD1045, W2×D-2-1 等一批高抗青枯病的四倍体组合及后代材料。何礼远等利用 Mira 与来自国际马铃薯中心 (CIP) 的材料 377852.2 和 800928 组配杂交组合, 从中筛选出了 895010 和 898006 两个抗病高产的优良品系。湖北恩施南方马铃薯研究中心也从中筛选出了 800935、385233-3、388193-21 等 14 份抗病材料。利用细胞工程技术如组织培养、离体再生, 并加以抗性筛选等 (何礼远, 1990) 也可创造一些抗青枯病的材料。Fock 等 (2000) 通过原生质体融合将马铃薯二倍体栽培种 BF15 与二倍体原始栽培种 *Solanum phureja* 进行体细胞杂交获得了 10 个抗青枯病马铃薯品系。DNA 分析表明: 其中 6 个四倍体, 2 个混倍体, 1 个双倍体和 1 个 8 倍体。在温室中这些杂交种均表现较强的生命力。青枯病菌的接种试验表明: 除两个体细胞杂种外, 其余均对青枯病菌小种 1 号具有耐性。另外基因工程技术如转基因 (贾士荣等, 1998; 梁成罡等, 2002) 也是一条非常有效的方法, 但需要有好的抗性基因, 相信, 随着抗病基因的不断发掘, 这条途径将越发显示出其优势。

在抗青枯病菌蛋白研究方面, 中国农科院植保所 (Yuan, *et al.* 1998; 高音, 1999; 刘焕利等, 1999; 梁成罡等, 2002; Feng, *et al.* 2003) 分离了抗菌相关蛋白并克隆了相关基因。Yuan 等 (1998) 首次从富利亚薯的杂交后代材料中分离纯化了一种抗青枯病菌蛋白 AP1。冯洁等 (1999, 2003) 从马铃薯叶片的 cDNA 表达文库中利用抗 AP1 抗体和 RACE PCR 获得了该蛋白的编码基因, 该 AP1 蛋白对 5 种源自马铃薯和其他作物的青枯病菌系和源自马铃薯的 2 种真菌病原 *Rhizoctonia solani* 和 *Alternaria solani* 均具有较好的抑菌活性, 同时该基因的原核表达产物具有与源自马铃薯的 AP1 蛋白同样的抑菌活性。之后, 梁成罡等 (2002) 构建了 AP1 蛋白编码基因的植物表达载体, 通过农杆菌介导法将其转入马铃薯和烟草, 获得了马铃薯和烟草的转基因植株, 转基因植株对青枯病菌具有不同程度的抗耐性。同时他们还利用芽孢杆菌制剂 GP7-13 和 0702 在田间条件下对马铃薯的防病增产效果进行了初步研究, 防病增产效果明显 (徐进, 2003)。

1.2.3.2 抗青枯病相关基因分离

马铃薯的基因组较大, 高度杂合, 高抗或免疫的材料较少, 且马铃薯抗青枯病基因与耐热基因之间存在着高度互作, 人们对其抗病机制的理解仍然不够透彻。从基因克隆的方法上也主要采用转座子标签法和图位克隆法, 而在马铃薯上又缺乏高密度的抗青枯病分子标记等。这些都为从马铃薯上分离和鉴定抗青枯病基因带来了困难, 因此目前对于青枯病的研究也主要是从青枯病菌本身和拟南芥、番茄等植物入手, 来分离和鉴定抗病相关基因及贡献率较大的基因座位 (表 1.2)。

表 1.2 青枯病抗性相关基因及其结构

Table 1.2 *Ralstonia solanacearum* resistance related genes and their structure

基因 (基因座)	植物种类	无毒 基因	结构域	染色体定位	参考文献
<i>RRS1</i>	<i>Arabidopsis</i>	<i>PopP2</i>	NBS-LRR	5	Deslandes, <i>et al.</i> 1998
<i>ERECTA</i>	<i>Arabidopsis</i>		LRR-RLK	2	Torii, <i>et al.</i> 1996
<i>QRS1(Q)</i>	<i>Arabidopsis</i>			2	Godiard, <i>et al.</i> 2003
<i>QRS2(Q)</i>	<i>Arabidopsis</i>			2	Godiard, <i>et al.</i> 2003
<i>QR31(Q)</i>	<i>Arabidopsis</i>			5	Godiard, <i>et al.</i> 2003
<i>BW-1(Q)</i>	tomato			6	Danesh, <i>et al.</i> 1994
<i>BW-3(Q)</i>	tomato			10	Danesh, <i>et al.</i> 1994
<i>BW-4(Q)</i>	tomato			4	Thoquet, <i>et al.</i> 1996
<i>BW-5(Q)</i>	tomato			6	Thoquet, <i>et al.</i> 1996
<i>AP1</i>	potato				冯洁等, 1999 Feng, <i>et al.</i> 2003

1.2.4 问题与探讨

深入研究马铃薯, 不断提高其品质和产量对世界粮食安全问题无疑会起到巨大的作用。但目前仍然存在的一些问题:

1. 马铃薯抗青枯病基因与耐热基因之间存在着密切关系, 且这两种基因都有主效基因和微效基因的存在, 耐热基因与抗性基因之间的高度互作效应表明了有大量有益非加性基因作用的存在。这两种基因是如何互作的仍然不得而知。
2. 深入了解马铃薯抗青枯病机制是解决马铃薯抗青枯病问题、培育抗青枯病品种的关键, 由于国内外在此领域的研究相对薄弱, 因而人们对此仍然知之甚少。
3. 马铃薯的基因组较大, 高度杂合, 高抗或免疫的抗青枯病材料较少。尽管已经建立了马铃薯基因组的高密度分子图谱, 但在马铃薯抗青枯病分子标记方面仍然需要进一步加密。
4. 长期以来人们对马铃薯青枯病的研究和探讨主要集中在病菌的病理学机制、分类学、流行病学等方面, 而在马铃薯本身的抗病遗传特性、马铃薯青枯病抗性相关基因的种类、数量及其表达调控途径等还不清楚。有关马铃薯与青枯病菌之间的互作研究有待进一步加强。

随着技术的不断进步, 从以下几个方面对马铃薯的抗性研究将成为可能:

1. 现已在番茄、拟南芥等模式植物上得到了一些抗性相关基因和基因座, 并有了马铃薯的高密度连锁图谱, 可将生物信息学和比较基因组学相结合分离抗病相关基因。
2. 引入 Gene Shuffling 概念, 将所有可能的专化性抗病相关基因片段切割打乱后重新整合, 有可能获得具有水平抗性的基因片段, 进而进行基因转化获得抗病转基因植株。
3. 目前已有近 40 种抗病基因从 10 余种作物中被分离和鉴定 (张祥喜等, 2003), 其中包括自马铃薯分离的具有广谱抗性的抗晚疫病基因 (Song, *et al.* 2003)。植物抗病基因的编码蛋白具有类似的结构 (如: NBS-LRR, PK 等), 可以利用其保守序列设计简并引物, PCR 扩增抗性相关基因片段, 进而研究其功能。

4. 现已克隆出只在马铃薯匍匐枝的皮层表达的特异启动子 (Trindade, *et al.* 2003), 因此可将一些源自病菌的抗病基因在马铃薯中进行特异表达, 尽可能避免生物安全问题, 以尽快培育出抗病品种, 进入环境释放。同时寻找、构建新的、强的特异启动子。
5. 加大外源基因在转基因植物中的定点整合和多个基因协同表达的研究, 打破基因沉默, 提高其表达效率。
6. 继续发掘马铃薯抗青枯病基因和抗病相关基因, 加强植物抗性机理研究, 寄主与病原的互作研究, 寻求创造抗病植物新途径, 这也是本文的研究目的所在。

总之, 随着技术手段的不断提高, 新的抗病基因的发掘也将逐渐加速, 人们对于植物的抗病机理和植病互作的理解也会更加深入, 将会制定出更有效的抗病育种策略, 加速获得高抗青枯病新品系 (品种) 的进程。

1.3 植物抗病基因的克隆方法

基因克隆的途径有两种: 正向遗传学和反向遗传学。正向遗传学是以目标基因所表现的功能为基础, 通过鉴定其产物或某种表型突变而进行的基因克隆途径; 反向遗传学则着眼于基因本身, 通过特定的序列或在基因组中的位置进行。

进行基因克隆主要从三个水平上进行: 基因组水平, 转录水平和蛋白质水平。基于基因组水平的基因克隆方法主要有图位克隆法 (map based cloning 或 positional cloning)、转座子标签法 (transposon tagging) 和抗病基因类似序列法 (又称候选基因克隆法, resistance-gene analogs, RGAs)。基于蛋白质水平的基因克隆方法主要有两条途径, 一条是分离纯化已知的蛋白质或多肽, 制备该蛋白的特异抗体, 继而利用该特异抗体为探针筛选由表达型载体建立的基因组文库或者 cDNA 文库, 通过免疫杂交筛选到重组克隆, 并最终克隆目的基因; 第二条途径是将蛋白质纯化后测定其N端一段氨基酸序列, 根据蛋白质密码子编码规律和密码子偏爱原则, 反向推算出 mRNA 序列, 然后据此人工合成一段寡核苷酸作探针, 利用同位素或其它方法标记后筛选基因组文库或 cDNA 文库, 并最终克隆目的基因。该方法对于目的基因序列未知, 但其编码产物的生理生化及代谢途径研究得比较清楚的基因特别有用, 由于很多基因的产物及表达调控特性尚不清楚, 因此在一定程度上限制了该策略的应用。基于转录水平寻找和分离基因的方法主要有: 差别杂交筛选 (Tedder, *et al.* 1988)、差减库构建 (Hedrick, *et al.* 1984)、代表性差别分析 (Lisitsyn, *et al.* 1993; Hubank, *et al.* 1994)、差异显示 (Liang, *et al.* 1992)、传统 cDNA 阵列杂交 (Schummer, *et al.* 1997)、基因表达系列分析 (Velculesu, *et al.* 1995; Zhang, *et al.* 1997)、cDNA 扩增长度多态性 (Vos, *et al.* 1995; Bachem, *et al.* 1996) 及抑制差减杂交 (Diatchenko, *et al.* 1996) 等。

1.3.1 图位克隆

图位克隆 (map-based cloning) 技术主要是根据目的基因在染色体上的位置进行基因克隆, 其基本原理是: 功能基因在基因组中都有相对较稳定的基因座, 通过对目的基因精细定位和构建目的基因所在区域的物理图谱, 进行染色体步移 (chromosome walking) 逐步逼近目的基因或利用染色体登陆 (chromosome landing) 方法找到目的基因, 继而进行基因功能验证。该技术自 Alan Coulson 于 1986 年提出后, 随着各种分子标记技术的发展、遗传图谱和大片段基因组文库的构建

(包括 YAC, BAC, TAC 或 Cosmid 等), 现已成功用于拟南芥、水稻、大麦、小麦、玉米、马铃薯、番茄等 30 多种植物, 并成功克隆出 130 多个基因, 包括马铃薯的抗晚疫病基因 *Rpi-blb1*、*Rpi-blb2* 和 *R3a* (van der Vossen, *et al.* 2003; van der Vossen, *et al.* 2005; Huang, *et al.* 2005), 应该说图位克隆技术已成为一种常规的基因克隆技术。

由于在进行图位克隆时, 需要构建完整的基因组文库, 建立高分辨率分子标记连锁图和完善的遗传转化体系, 因此该技术对于基因组较大、标记数量不多而重复序列较多的生物效率较低, 目前图位克隆技术也主要用于拟南芥、水稻、番茄等模式植物。随着比较基因组学的兴起和高多态性的以 PCR 为基础的分子标记日渐成熟的背景下, 图位克隆技术必将有更广阔的应用前景。

1.3.2 转座子标签法

转座子(transposon)又称转座因子, 最早是在 1951 年由美国遗传学家 Mc Clintock 在研究玉米籽粒色斑不稳定现象而提出来的。转座子是染色体上一段可以移动的 DNA 序列, 可以从一个基因座位转移到另一个基因座位, 当转座子插入到某个功能基因内部或邻近位点时, 就会使插入位置的基因失活并诱导产生突变型, 进而通过杂交筛选野生型植株的基因组文库, 最终获得目的基因。根据转座子分离植物基因的物种范围不同, 转座子标签法可分为两大类: 同源转座子标签技术和异源转座子标签技术, 异源转座子标签技术更具有应用前景。

用于基因克隆的转座子有很多, 如: 细菌的插入序列(insertion sequence)、复合转座子(composite transposon)、TnA 转座子家族(TnA family)、果蝇的 P 成分、FB(foldback)成分和玉米的 Ac/Ds(Activator/dissociation)、En/Spm(Enhancer/suppressor mutator)系统等。但研究得比较清楚且应用较多的是玉米的 Ac/Ds、En/Spm 和金鱼草的 Tam3 转座子。目前利用转座子标签法克隆的异源植物基因至少有 25 个, 且主要集中在拟南芥、番茄、矮牵牛、烟草和亚麻等物种, 所用的转座子也仅限于 Ac/Ds 和 En/Spm 转座子。随着可利用转座子的不断增多, 转座子标签系统的不断改进与完善, 转座子标签技术将会得到更为广泛的应用。

1.3.3 抗病基因类似物法

根据已克隆抗病基因编码蛋白的保守结构及其在细胞中的位置, 可将植物的抗病基因分成 NBS-LRR、eLRR-TM、eLRR-TM-pkinase、STK 和其他五大类, 其中以 NBS-LRR 类抗病基因为主 (Ellis, *et al.* 2000)。NBS-LRR 类抗病基因编码蛋白一般存在于细胞质中, NBS 结构域能结合 ATP 或 GTP, LRR 结构域则可能作为受体, 结合病原产生的某种诱导物, 从而在植物的抗病反应中起重要作用。NBS-LRR 类抗病基因又可分成三个亚类, 即 LZ-NBS-LRR 亚类、TIR-NBS-LRR 亚类和 NBS-LRR 亚类。

抗病基因类似物法(resistance gene analog, RGA)是根据抗病基因的保守核苷酸序列设计简并引物, 对含有目的基因的基因组(文库)进行扩增、获得抗病基因类似序列, 进而找出与抗病基因紧密连锁或带有抗病基因的同源序列, 并以此为探针筛选基因组文库, 获得候选抗病基因。该方法自 1996 年报道以来 (Yu, *et al.* 1996) 已在 10 余种植物上扩增出一大批抗病基因同源序列 (易图永等, 2002)。由于在植物基因组中, 并非只有抗病基因具有这些保守结构域, 因此在基因组水平上利用 RGA 进行抗病相关基因的分离将会出现一些假阳性, 给后续工作带来不便, 在实际克

隆过程中将RGA与图位克隆技术结合使用或应用于反转录合成的cDNA上，可以提高克隆的速度与准确性。

1.3.4 转录水平上几种常用方法的比较

生物的生长、发育、衰老和死亡等生命过程伴随着复杂的生理生化变化，也是生物体内基因在时空上有序表达和调控的结果，即基因的选择性差异表达的结果。因此分离和克隆差异表达基因对于了解和揭示生物的生命活动规律，进而进行生物的改良、抗逆、抗病等研究具有重要的理论和实践意义。目前进行基因差异表达研究的方法很多，主要为两类：基于 PCR 的方法和基于杂交的方法。这些方法均已成功用于植物病理、胚胎发育、形态发生、信号转导、抗逆、抗病等众多领域，并成功地分离了病理、植物抗逆、抗病、组织特异性表达等相关基因。这些方法并非非常完善，而是各有优缺点，因此，对一项具体研究而言，选择合适的方法是十分重要的。为了更好的理解和使用这些方法，表 1.3 对转录水平上主要基因分离方法进行了比较和分析。

表 1.3. 转录水平上主要基因分离方法的比较与分析

Table 1.3 Comparison and analysis of several gene isolation methods on transcription level		
技术	优点	不足
EST sequencing	1 数量可知 2 勿需已知基因序列信息 3 可与已有序列库比较	成本高
SAGE	1 数量可知 2 可与已有序列库比较 3 比 EST sequencing 成本低	1 需要较大的参考数据库 2 短标签随机性大
DDRT-PCR	1 低成本 2 操作简便,灵敏度高	1 假阳性高,重复性差。 2 需进一步分离片段和测序 3 需要进行大量的引物筛选工作、得到的特异 cDNA 片段往往是 3'端的非编码序列。
cDNA-AFLP	1 低成本 2 采用特异的引物组合克服了 DD 的不足	1 需要较大的参考数据库 2 需进一步分离片段和测序
cDNA-RDA	1 靶序列可在三轮杂交后得到百万倍以上富集。 2 避免了引物错配问题,假阳性低。	1 需要高质量的 cDNA。 2 当靶序列浓度较低时,其富集受抑制等。 3 操作繁琐,实验周期长、成本高。
SSH	1 速度快、效率高：一轮 SSH 过程仅需 3~4 天,且一次可分离几十至上百个差异表达基因。 2 阳性率高：可高达 94%(Von tein O D, et al.1997; Bertram J, et al.1998) 3 灵敏度高：可使低丰度 mRNA 得以高于 1000 倍的富集。 4 实验结果易于分析。	1 与 RDA 相比, SSH 只进行一轮杂交循环,差异基因的富集程度仍然不够充分,特别是当 Tester 与 Driver 两群体间的差异较小时,仅一轮杂交将造成假阳性率升高。 2 所需 RNA 量较大(一般为几微克)。 3 SSH 中两次 driver-cDNA 均过量,可能掩盖 tester-cDNA 中某些有表达差别的 cDNA。

cDNA microarrays	1 高度自动化。	1 存在交叉杂交信号干扰。
	2 易分析待分析的转录本。	2 需要克隆和 PCR 所要求的药品。
	3 勿需已知基因序列信息。	3 成本高。
	4 表达差异较小的或是低拷贝的基因也可得到克隆。	4 对基因序列信息的依赖使该方法只能用于研究较深入的少数物种。

1.4 抑制差减杂交

抑制差减杂交 (SSH) 是一个基于抑制 PCR 和差减杂交技术, 由 CLONTECH 实验室建立的简单有效的方法, 通过一次差减杂交可使低丰度表达的序列 (mRNA) 得以高于 1000 倍的富集, 有效的选择性扩增目标序列, 同时抑制非目标序列的扩增, 因此在分离基因特别是分离低丰度差异表达基因方面具有更广阔的应用前景。

1.4.1 抑制差减杂交技术的基本原理

抑制差减杂交技术运用了杂交二级动力学原理, 即高丰度的单链 cDNA 在退火时产生同源杂交的速度要快于低丰度的单链 cDNA, 因而在试验方 (tester) 和驱动方 (driver) 的 cDNA 变性后再复性的过程中, 原来在丰度上有差别的单链 cDNA 达到均一化。同时, 由于试验方的 cDNA 在进行杂交之前等分的两份加有不同的接头, 因此杂交时将产生 5 种不同类型的分子, 在采用与两个不同接头序列互补的引物进行 PCR 扩增时, 只有目标序列得到有效扩增, 而非目标序列因两端存在反向重复序列, 退火时易产生类似“锅柄”的结构, 无法与引物配对, 扩增受到抑制。

抑制差减杂交 (SSH) 技术的关键步骤: ①cDNA 的合成与酶切; ②试验方 cDNA 分成两份, 并与两个不同的接头连接; ③试验方与过量的对照组 (或称驱动方) 杂交; ④与接头相连的试验方 cDNA 分子的选择性 PCR 扩增; ⑤克隆 PCR 产物, 构建差减 cDNA 文库; ⑥筛选文库。

1.4.2 抑制差减杂交技术的发展

差减杂交是一种富集差异表达基因的有效方法, 该方法最早在 20 世纪 60 年代中期已用于纯化 T4 噬菌体 mRNA (Bautz, *et al.* 1966)。但差减杂交的应用受其所需的 mRNA 量大的限制。后来 Duguid 和 Dinanuer (1990) 对该方法加以改进, 在 cDNA 中引入了一个普通接头, 使得在杂交循环中选择性扩增试验方 cDNA (tester cDNA)。1996 年 Diatchenko 等在此基础上对其进一步完善, 建立了抑制差减杂交 PCR (SSH PCR) 技术, 使得差异表达基因在一次杂交中得以均一化和高于 1000 倍的富集。这为分离低丰度的差异表达基因提供了方便。1999 年 Diatchenko 等以睾丸为材料介绍了 SSH 库的构建及筛选的具体细节。同年, Yang 等 (1999) 将 SSH 与 cDNA 微阵列筛选技术相结合实现了快速有效的鉴定大量差别表达基因, 但此方法仍存在明显不足, 如: 微阵列筛选对于 cDNA 插入片段小, 丰度太低的 mRNA 不太有效, 特别是对于 5' 端小短序列不易检测到。SSH 方法自建立以来, 尽管该方法已被广泛使用, 但人们对其实际功效和潜在局限性的理解还不够深入。为研究确定影响 SSH 效率的因素, Ji 等 (2002) 基于假定 cDNA 杂交符合理想的二级动力学原理, 提出了一个理论模型, 并以纤维原细胞 cDNA 为材料, 加入 4x174 DNA 作为差异表达基因进行了实验研究指出: 影响 SSH PCR 效率的关键因素是目标基因在两个 cDNA 样品中的浓度比例, 差异表达基因是否得到有效富集主要取决于这个浓度比例, 浓度比例越大,

富集更有效：一般来讲，为了得到差异表达基因的有效富集，目标基因的浓度应高于 0.01%，并且目的基因在两个样品中的浓度比例也应达到 5 倍以上。

限制酶的酶切效率和接头的连接效率是 SSH 成功的关键。接头连接后用磁珠分离纯化试验组（方）内已经连上的片段可大大提高差减的效率，用这种改进的 SSH 方法分离 EBV 中差异表达基因，在表达差异大的 44 个 cDNA 克隆中有 20 个基因的表达差异达 3 倍，且其中有 7 个是 EBV 基因（Kiss, *et al.* 2003）。尽管 SSH 是分离差异表达基因的最有效的方法之一，然而 SSH 库中仍然有非差异表达的转录本背景克隆。MOS（Mirror orientation selection）方法的建立为解决转录本背景克隆问题提供了可能，它基于目标克隆和背景克隆的差异（每种背景克隆分子都只有一个与 SSH 中两个不同的接头序列相应的方向，而真正差异表达的目标 cDNA 片段都具有两个序列方向），只选择那些镜像分子，从而达到减少背景克隆的目的（Rebrikov, *et al.* 2000）。目前 SSH 与 MOS 相结合已经用于差异表达基因的快速鉴定，得到良好的效果（Boengler, *et al.* 2003）。

为拓展 SSH 的应用范围，Levesque 等（2003）在 SSH 法的基础上建立了一种基于片段大小进行 SSH 差减库的筛选、克隆全长 cDNAs 方法。该方法首先用 SSH-cDNA 作为 ^{32}P 标记探针，采用 Northern 方法检测基因表达的水平 and 模式，并获得相应的 cDNAs；然后，在琼脂糖凝胶上将大小不同的 cDNAs 分开，建立不同大小的 cDNA 质粒库，并用 SSH-cDNA 片段进行杂交筛选。该策略对于特殊目标基因的分离及功能基因组研究具有特殊功效。

SSH 方法不仅可在转录水平上研究基因的差异表达并分离基因片段，在基因组水平上也有其独到的应用，Li 等（2004）将 SSH 和 DNA 微阵列技术相结合，从 *Dendrobium* 的 5 个种 *D. aurantiacum* Kerr, *D. officinale* Kimura et Migo, *D. nobile* Lindl., *D. chrysotoxum* Lindl. 和 *D. fimbriatum* Hook 中找到了区分它们的种特异性探针，并对它们进行有效的区分和鉴定。其主要策略为：首先通过 SSH 在两个种间得到差异基因组 DNA 片段，然后用所得到的不同的基因组 DNA 片段与多个不同种的完整基因组的 DNA 阵列杂交，来筛选某一个种特有的基因组 DNA 片段，筛选出的特异基因组 DNA 片段即可被用来作为种特异性探针来区别、鉴定不同的种。

最近的研究表明：SSH 方法可以作为基因芯片研究基因转录谱的有效补充方法，特别是在新基因的发现和低丰度转录本研究上更能显示其优越性（Cao, *et al.* 2004）。同一年，比利时安特卫普大学针对 SSH 差减库所获得的差异表达片段，设计了 SSHSuite 软件，该软件包括四个部分：SSHHandler, SSHOverview, SSHAnalysis 和 SSHCompare。可对 SSH 库的片段进行操作存储、分析比对，为从事 SSH 差减库构建的研究人员提供了方便（Weckx, *et al.* 2004）。

1.4.3 SSH方法在植物基因分离上的应用

目前 SSH 方法已成功用于细胞分化、发育、再生、衰老等的研究中（罗文波等，2000）和分离不同器官组织之间、个体不同发育阶段以及受外界因子作用而差异表达的基因（Guan, *et al.*, 1998; Kuang, *et al.*, 1998）等方面，相关论文近 400 篇，且主要集中在动物和人的研究上（李广存等，2004）。尽管该方法在植物上的应用起步较晚，自 1999 年首次应用该方法以来，也已有近 100 篇有关该方法在植物上应用的报道，涉及到水稻（Cho, *et al.* 2004; Han, *et al.* 2004）、玉米（Gao, *et al.* 2003; Zheng, *et al.* 2004）、小麦（王转等，2003）、马铃薯（Brich, *et al.* 1999; Tian, *et al.* 2003; Faivre-Rampant, *et al.* 2004）、大豆（Liao, *et al.* 2003）、拟南芥（Hinderhofer, *et al.* 2001; Kang, *et al.* 2003）等 20 余种植物（GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>），并显示出其诱人的应用前景。

总之, SSH 方法已成为研究生物或非生物逆境信号诱导表达的相关基因, 生物的生长、发育、衰老、死亡等生命过程的最有效的方法之一。

1.4.4 小结

抑制差减杂交方法具有其独到的优越性, 但它也存在一些局限性, 因此深入细致地了解该方法的特点及使用要求是有效使用它的前提。SSH 方法一般只用于两个样品的差异比较分析, 样品间的差异不宜太大或太小, 而对于多个样品则无能为力, 这在很大程度上限制了它的应用。在进行基因差异表达的研究中, tester RNA 的提取时期非常关键, 首先要根据不同的研究目的确定取材的最佳时期, 取材时期不当将会给试验带来意想不到的困难, 或许只得到很少几个差减克隆或根本得不到克隆, 或得到一些非目的克隆。从技术本身讲, 提取的 tester RNA 和 driver RNA 及从中分离的 mRNA 的质量、限制酶的酶切效率、接头的连接效率、第二次 PCR 产物的转化效率及差减克隆的筛选方法等关系着试验的成败。SSH 所需的起始 RNA 量较大, 一般为几个微克, 对于一些珍贵稀有的不易获得足够 RNA 的材料要慎重使用。

SSH 方法在研究植物基因的差异表达方面已得到有效应用, 该方法在应用范围和深度上可进一步拓宽和加深: ①利用 SSH 方法研究生物(如细菌和真菌等)和非生物逆境(如干旱和寒冷等)对植物的影响及生物与寄主植物的互作时, 可进一步提早取材时期(如逆境诱导后的 6 小时或更早)和缩短取材间隔, 以获得植物差异表达基因的表达动态和进行有关转录因子等方面的研究, 进而获得植物与逆境互作的关键点, 更好的理解其互作机制, 为从分子水平上定向培育抗旱、抗寒、抗病等作物提供更可靠的理论依据。②将获得的一些差异表达基因片段转化为分子标记, 进行标记辅助选择, 进一步为育种服务。③衰老、凋亡同生长、发育一样也是植物的重要生命活动过程, 利用 SSH 研究了解作物的衰老、凋亡机制, 适当有效的延长或缩短作物的生命周期, 对于提高作物的生物产量和经济产量均具有重要意义。就马铃薯育种研究工作而言, 工作重点主要集中在抗逆(如抗病、抗旱等)、品质及产量等方面, 利用该方法可进一步了解其机制, 将所获得的相关基因转化为分子标记等, 可加速马铃薯抗逆、品质改良和产量等方面的育种研究进程。④基因的协同表达是植物分子生物学研究的一个重要领域, SSH 方法在转录水平上作为研究生物基因表达的重要方法, 可为研究者展示所研究生物某一特定时期的基因表达轮廓, 此领域的研究将成为今后植物分子生物学研究的一个热点。

随着分子生物学技术的不断发展和完善, 将会涌现出越来越多的新技术和新方法, SSH 与其它新技术和新方法的有机结合将不失为一种分离和鉴定差异表达基因的良策, 如 SSH 与 cDNA 微阵列技术及 MOS 方法相结合对阳性差减产物进行快速、有效的筛选等已经显示出其优越性。总之, 随着 SSH 技术的进一步改进和提高, 它将在新基因的分离和克隆及研究基因的表达调控和植物的生长发育等方面发挥更大的作用。

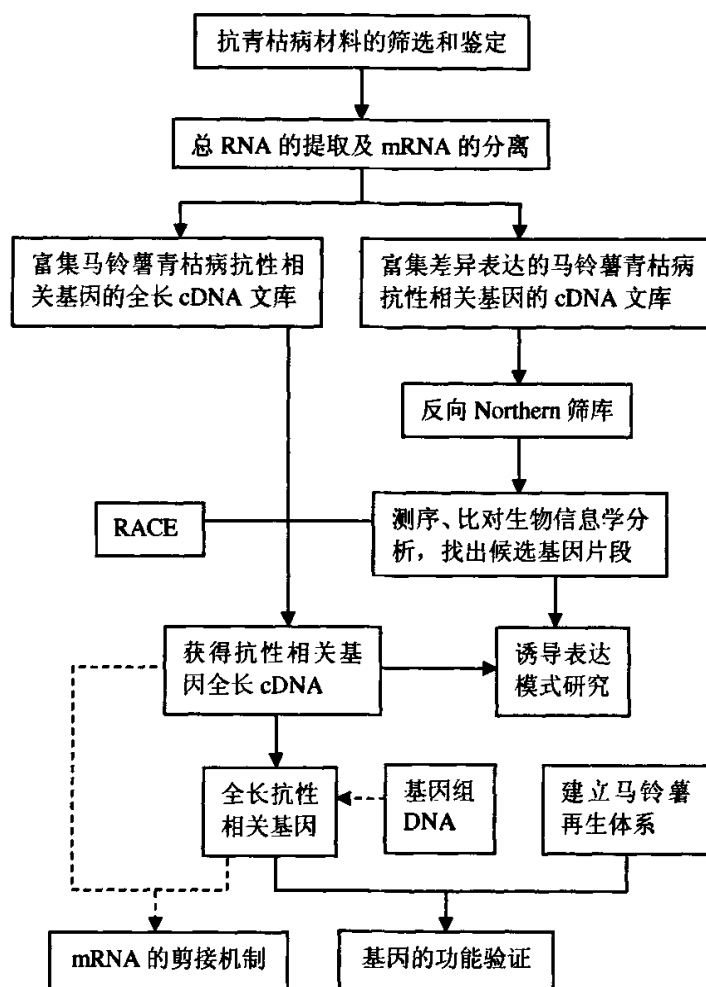
1.5 本研究的目的是和预期目标

研究目的: 分离和克隆马铃薯青枯病抗性相关基因, 为进一步开展马铃薯的抗青枯病机制及抗性基因的表达调控提供理论基础和技术体系, 为确定更有效的抗病育种途径, 改良和培育高抗青枯病的马铃薯新品系(品种)进行基础性探索。

预期目标: 筛选携带有抗青枯病基因二倍体材料; 利用 SSH 方法分离青枯病抗性相关基因片

段 (EST), 了解特定时期参与马铃薯青枯病抗性的相关基因种类与数量, 初步建立特定时期马铃薯青枯病抗性相关基因表达谱; SSH 与 RACE 技术及 cDNA 文库相结合分离和克隆青枯病抗性相关基因全长。研究部分候选基因的诱导表达模式, 为后续基因克隆、功能研究和抗病机理的深入研究建立技术平台。

1.6 总体设计



第二章 几种马铃薯抗青枯病鉴定方法的比较

2.1 引言

马铃薯青枯病是仅次于马铃薯晚疫病的一种细菌性病害。该病菌传播快, 寄主广, 防治困难, 发病率高, 严重者可使马铃薯减产 80%, 甚至绝产 (Yabuuchi, *et al.* 1995; He, 1987)。进行马铃薯抗青枯病种质资源的鉴定主要分为室内鉴定和田间鉴定。室内鉴定可为田间鉴定提供参考, 具有一定的优越性: 可人工控制生长环境, 进行工厂化作业和管理, 保持条件的一致性, 不易受外界因素干扰; 可对育种研究初期获得的杂交后代或无性系的试管苗等进行早期大量鉴定和筛选; 也可在标准化条件下采用多个菌系 (小种或致病型) 和不同接菌量接种进行马铃薯的抗病性鉴定和评价。目前进行马铃薯抗青枯病鉴定所采用的接种方法主要有灌根法 (伤根土壤接种法、不伤根土壤接种法) 和茎部毛细管菌液滴注法, 另外还有水培法等。但这些接种鉴定方法所需时间周期较长、要求条件高。本文将在此基础上报道一种快速的青枯病菌接种鉴定方法 (取名为茎枝菌液共培养法), 并与传统方法进行比较和探讨; 同时为进行后续的抗青枯病相关基因的分离和表达研究筛选出高抗青枯病材料。

2.2 材料与方法

2.2.1 供试青枯病菌株及材料

青枯病菌小种 3 号 PO41 和小种 1 号 TM60 由中国农科院蔬菜花卉所植保室提供。马铃薯 ED 和 CE 分离群体的亲本为 C (USW5337), D (USW7859) 和 E (772102.37), 其中 E 来源于二倍体抗青枯病原始栽培种 *S. phureja* 和野生种 *S. vernei*, 其遗传背景见文献 (Qu, 1996)。抗病对照植株 (MS42.3) 源自国际马铃薯中心 (International Potato Center, CIP)。番茄植株由中国农科院蔬菜花卉所番茄组提供, 其中抗病番茄 392 (CLN2366A)、393 (CLN2366B)、395 (CLN1314G) 和 419 (CLN1466-65-40-15-0-12-0) 来源于亚洲蔬菜中心, 感病番茄 D3 (早粉 2 号)、D5 (中蔬 6 号) 和 D14 (中蔬 5 号) 为中国农科院蔬菜花卉所育成品种。

2.2.2 青枯病菌的培养

取一环保存在灭菌蒸馏水中的菌种悬浊液, 在 TZC 平板 (牛肉汁培养基 (葡萄糖 10g、蛋白胨 5g、牛肉浸膏 3g、琼脂 17~20g、蒸馏水 1000ml) + 0.5/L 2,3,5-氯化三苯基四氮唑) 上划线, 在 30℃ 培养 48 小时。挑选致病力强的单菌落在 TZC 培养基上培养 48 小时后, 用无菌水将细菌制成悬浊液, 分光光度计测定其 OD₆₀₀ 吸光值, 调整菌液浓度分别为 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ cfu/ml 备用。

2.2.3 青枯病菌接种

2.2.3.1 青枯病菌小种 3 号接种马铃薯

茎枝菌液共培养法: 取生长正常、旺盛、整齐、无其它病虫害的块茎繁殖的马铃薯植株, 待植株长至 7-8 片展叶时, 去除主茎顶芽, 促使侧芽生长至 5-6 片展叶时, 用锋利的手术刀片垂直

切取带有 4-5 片展叶的主茎或侧枝, 首先存放于自来水中保湿, 待取完全部所需的主茎或侧枝后, 同时插入盛有不同浓度 (1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、 1×10^8 cfu/ml) 的青枯病菌小种 3 号菌液的容器内进行共培养, 做好详细标记, 并于共培养后第 3、5、7、10、14 天逐个材料、逐枝详细调查发病期和严重程度。

灌根法和毛细管菌液滴注法接菌所用菌液浓度为 1×10^8 cfu/ml。灌根法的菌液接种量为 30ml, 且所使用的器具、土壤等均进行相应的消毒灭菌处理, 毛细管菌液滴注法接种量为 30 μ l。所有接种后的马铃薯植株或茎枝置于 28℃可控温室内, 空气相对湿度为 70%以上, 灌根法和毛细管菌液滴注法的土壤湿度为土壤最大持水量的 60%, 调查方法同上。

三种接种鉴定方法均于不同时间连续鉴定同一批马铃薯基因型植株 3 次, 每次鉴定所用的每个基因型均设置 3 个重复, 每个重复至少 10 株 (或茎枝), 且每个重复内植株或茎枝分别来自同一基因型的不同植株。

2.2.3.2 青枯病菌小种 1 号接种番茄

分别采用茎枝菌液共培养法和伤根灌注法对已知抗、感病番茄植株基因型进行鉴定, 每个基因型 5 棵番茄主茎或植株, 两种接种方法均设三次重复, 操作方法同 2.2.3.1。接菌后的番茄植株培养在 30℃, 其它培养条件及调查方法同上。

2.2.4 抗病性评价方法和标准

供试材料接种后, 从第二天开始持续观察发病情况, 以发病高峰期且最能反应抗、感病差异的调查记载数据。参照文献 (孙惠生, 2003) 将植株发病严重程度分为 5 级: 1 级: 无症状, 健康; 2 级: 1~2 个叶片萎蔫; 3 级: 3~4 个叶片萎蔫; 4 级: 全部叶片萎蔫; 5 级: 茎枝死亡。

2.3 结果与分析

2.3.1 茎枝菌液共培养法与灌根法和毛细管菌液滴注法鉴定马铃薯的比较

2.3.1.1 茎枝菌液共培养法接菌鉴定结果

不同的共培养菌液浓度之间存在茎枝发病早晚的差异, 菌液浓度与发病早晚存在高度相关, 菌液浓度越高, 茎枝发病越早 (表 2.1)。以菌液浓度 1×10^6 cfu/ml 为例, 接菌后第 3 天, 感病植株的茎枝开始出现萎蔫, 第 4 天萎蔫程度明显加重, 个别高感植株的茎枝已大部分萎蔫, 第 5 天高感植株的茎枝已全部萎蔫, 高抗植株的茎枝也出现萎蔫症状, 第 7 天抗病植株的茎枝萎蔫程度明显加重, 高抗植株的茎枝萎蔫程度基本不变; 第 10 天高抗植株茎枝萎蔫症状减轻, 有的已基本恢复健康, 而感病植株的茎枝则腐烂死亡, 第 14 天高抗植株的茎枝已恢复健康, 个别的已开始生根。试验中不同浓度的共培养菌液共培养植株茎枝所得的抗、感结果一致, 且每个基因型内不同植株茎枝的抗病表现也基本一致, 因此该方法对于种质资源的抗病筛选、资源评价和抗病锻炼具有重要的指导意义。同时在试验中还发现抗病植株茎枝与菌液共培养后, 在其受菌液浸泡部位形成了一些瘤状乳突结构 (图 2.1), 抗性级别越高的植株茎枝所形成的瘤状乳突结构越多, 且共培养菌液变得澄清; 而在感病植株的茎枝上未发现有瘤状乳突结构的形成, 且其浸泡菌液的末端发生褐变, 共培养菌液变得混浊, 推测这可能是由于抗病植株所产生的瘤状乳突或茎枝本身能够释放一种抑菌物质所致 (冯洁等, 1999; Feng, et al. 2003)。

表 2.1 不同接菌浓度下 3 次鉴定马铃薯茎枝的综合统计结果（部分）
Table 2.1 Integrated evaluation results of three-repeat of potato stem in different concentration of *Ralstonia solanacearum* (partial results)

接菌浓度	基因型	抗性	发病严重程度														
			接菌后 3 天			接菌后 5 天			接菌后 7 天			接菌后 10 天			接菌后 14 天		
			rep1	rep2	rep3	rep1	rep2	rep3	rep1	rep2	rep3	rep1	rep2	rep3	rep1	rep2	rep3
10 ⁵	MS42.3	R	1	1	1	2	1	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1
	E	MR	1	1	1	3	2	2	4	4	4	4	5	5	5	5	5
	ED11	S	2	2	2	3	4	3	4	4	4	5	5	5	5	5	5
	ED13	R	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
	ED25	S	2	3	2	3	4	3	4	4	4	5	5	5	5	5	5
10 ⁶	MS42.3	R	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1 ^a
	E	MR	1	2	1	2	3	3	4	5	4	5	5	5	5	5	5
	ED11	S	2	3	2	3	4	3	4	5	4	5	5	5	5	5	5
	ED13	R	1	1	1	2	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1	1 ^a
	ED25	S	3	3	3	4	4	4	5	4	4	5	5	5	5	5	5
10 ⁷	MS42.3	R	1	1	1	2	3	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1 ^b
	E	MR	2	2	2	4	3	3	5	4	4	5	5	5	5	5	5
	ED11	S	3	3	3	4	4	4	4	5	4	5	5	5	5	5	5
	ED13	R	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	1 ^b
	ED25	S	3	3	3	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5

注：1—健康；2—1~2 个叶片萎蔫；3—3~4 个叶片萎蔫；4—全部叶片萎蔫；5—茎枝死亡。^a 茎枝恢复健康，但一些老叶死亡；
^b 茎枝恢复健康，但部分老叶死亡。



图 2.1 马铃薯茎枝与青枯病菌液共培养后瘤状乳突形成
A: 感病植株的茎枝 B: 抗病植株的茎枝 C: 高抗病植株的茎枝
Fig. 2.1 Tumor formation of potato stem cuttings after co-cultured with *Ralstonia solanacearum*
A: Rs-susceptible potato stem cuttings B: Rs-resistant potato stem cuttings
C: High Rs- resistant potato stem cuttings

因此，根据植株茎枝与菌液共培养后所形成的瘤状乳突结构的有无、多少及共培养菌液是否变得浑浊也可以对相应植株的抗病性进行初步预测。比较不同浓度菌液接种后马铃薯的抗病表现认为：共培养菌液的浓度以 1×10^6 cfu/ml 为宜，以第 4 或第 5 天调查结果为标准进行评价；若提高共培养菌液的浓度，则适当提前调查时间。

当接菌浓度为 10^7 cfu/ml 时，接菌后 48h 感病植株的茎枝即出现萎蔫症状；72h 萎蔫程度明显

加重并达3级；而抗病植株的茎枝无明显症状。推测由于病菌的侵染刺激，在接菌后24h马铃薯茎枝中已有大量的基因被启动，并发生了复杂的植病互作效应；到48h时由于感病植株中不含有抗病因子或含有少量的抗病因子，但未被激发而产生感病症状。而在抗病植株中因含有抗病因子，且被激发而表达，从而无明显萎蔫症状。

2.3.1.2 茎枝菌液共培养法与灌根法及毛细管菌液滴注法鉴定结果的比较

多年的实践证明，灌根法及毛细管菌液滴注法对于马铃薯抗病性的筛选和评价是有效的，这些方法所需时间较长，特别是灌根法需要3周时间，无疑会加大资源评价的成本，从三种方法的比较中发现：茎枝菌液共培养法同灌根法及毛细管菌液滴注法的评价结果是一致的（图2.2），同时研究中还发现茎枝菌液共培养法接种后，植株茎枝抗病表现的变异范围小于伤根灌注法和毛细管滴注法（表2.2，图2.3, 2.4），这可能是由于茎枝菌液共培养法接种时茎枝所受伤害基本一致，避免了伤根灌注法伤根程度不同和毛细管滴注法对不同粗细的植株茎枝所造成的伤害程度不同等引起的植株抗感表现的差异所致。综合三种方法的鉴定结果，从77份二倍体材料中筛选出了6份抗或高抗青枯病二倍体材料和7份高感青枯病材料（表2.3）。

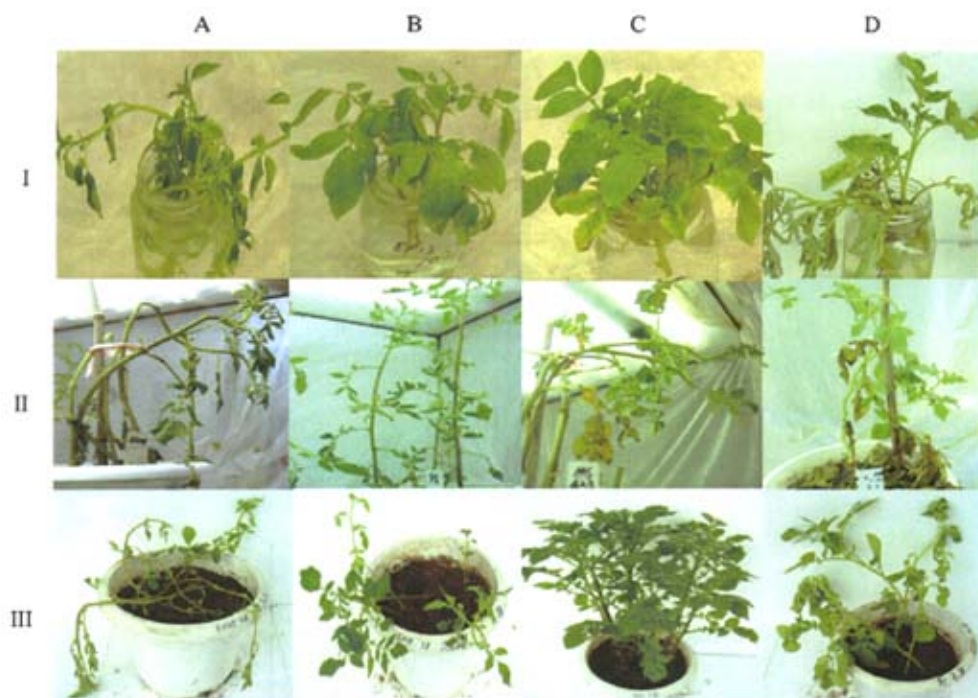


图 2.2 不同接种方法接种相应马铃薯植株（茎枝）的结果对比

I: 茎枝菌液共培养法接菌鉴定 II: 毛细管菌液滴注法接菌鉴定 III: 灌根法接菌鉴定

A: 感病基因型 ED25 B: 抗病基因型 ED13 C: 抗病对照 MS42.3 D: 抗病亲本 E

Fig. 2.2 Results of different inoculation methods in corresponded potato plant(or stem)

I: Inoculation with stem culture in bacterium solution method for 5 d.

II: Inoculation with capillary method for 7 d.

III: Inoculation with wound-root method for 10 d.

A: Rs-susceptible genotype ED25

B: High Rs-resistant genotype ED13

C: Rs-resistant control MS42.3

D: Rs-resistant parent E

表 2.2. 三种接种方法接菌后马铃薯（茎枝）的发病情况（部分结果）

Table 2.2. *Rs*-resistance result of three different inoculation method

基因型	株（茎枝） 抗性 & 总数		灌根法接菌后 10 天 (10^8 cfu/ml)		毛细管法接菌后 7 天 (10^8 cfu/ml)		茎枝菌液共培养法接菌后 5 天 (10^6 cfu/ml)	
			平均值	变异幅度	平均值	变异幅度	平均值	变异幅度
MS42.3	R	60	2.00	1-3	1.92	1-4	1.93	1-2
E	MR	76	3.33	2-4	3.33	2-4	2.83	2-3
ED11	S	55	3.93	3-5	3.65	3-5	3.36	3-4
ED13	R	82	1.83	1-4	2.56	2-4	1.91	1-2
ED25	S	83	4.35	3-5	4.00	3-5	4.11	4-5

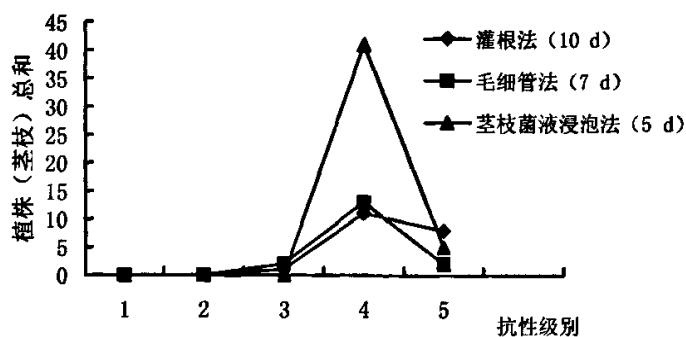


图2.3 三种接种方法的比较（ED25）

Fig.2.3 Result comparison of three inoculation method on ED25

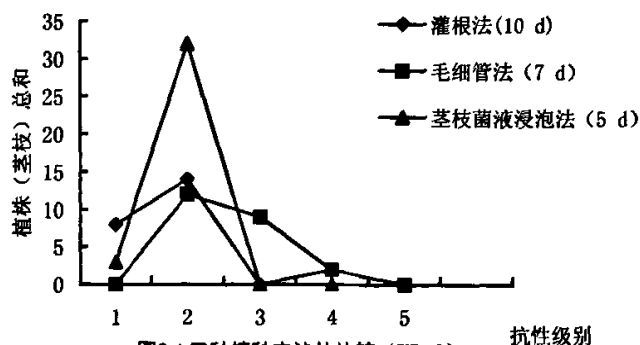


图2.4 三种接种方法的比较（ED13）

Fig 2.4 Result comparison of three inoculation method on ED13

表 2.3 筛选出的抗病和感病基因型

Table 2.3 List of Rs-resistance and Rs-susceptible genotype

基因型	抗性	基因型	抗性
E (parent)	MR	ED11	HS
MS42.3 (control)	HR	ED25	HS
ED13	HR	ED43	HS
ED128	R	ED148	HS
ED178	R	ED159	HS
ED?-2	R	CE100	HS
CE155	R	CE276	HS
CE171	R		

2.3.2 茎枝菌液共培养法与灌根法及毛细管菌液滴注法鉴定番茄的比较

2.3.2.1 茎枝菌液共培养法接菌鉴定结果

与马铃薯鉴定结果相似,不同的共培养菌液浓度之间也存在茎枝发病早晚的差异,菌液浓度与发病早晚同样存在高度相关,菌液浓度越高,茎枝发病越早。以菌液浓度 1×10^4 cfu/ml 为例,接菌后第 3 天,高感植株的茎枝萎蔫程度已达 3 级,抗病植株的茎枝则刚开始有萎蔫症状;第 5 天感病植株的茎枝已经全部萎蔫,抗病植株的茎枝萎蔫程度加重;第 7 天抗病植株茎枝的萎蔫症状减轻,而感病植株的茎枝却已部分死亡,第 10 天高抗植株的茎枝已基本恢复健康,仍然存活的感病植株茎枝的萎蔫症状也有所缓解;到第 14 天,高抗植株的茎枝已恢复健康,仍然存活的感病植株茎枝也基本恢复健康(表 2.3, 图 2.5, 2.6, 2.7)。说明当植株受病菌浸染后,感病植株因不含有抗病因子,无法抵御病菌的浸染而发病,甚至死亡,而抗病植株由于含有抗病因子,病菌的浸染刺激激活了其体内抗病基因的表达,抗病基因的表达产物对病菌在植株体内的存活和扩散具有一定的抑制作用,二者经过一段时间的互作,虽然高抗植株最初也表现出感病,但最终仍能恢复健康,这与前人的分析是一致的(Vasse, *et al.* 1995)。如果接菌浓度太高,抗病基因的表达不足以抑制病菌在植株体内的的存活和扩散,抗病植株也将感病,且无法恢复而最终死亡。利用该方法进行抗病鉴定时,每个基因型内不同植株茎枝的抗病表现基本一致,表 2.4 列出了不同基因型植株茎枝的综合评价结果。

2.3.2.2 茎枝菌液共培养法与灌根法鉴定结果的比较

茎枝菌液共培养法与灌根法对于番茄的评价结果是一致的。综合两种方法的鉴定结果,对于番茄而言,共培养菌液的浓度以 1×10^4 cfu/ml 为宜,以第 5—7 天调查结果为标准进行评价;若要筛选高抗植株,则可适当提高菌液浓度(如 1×10^5 cfu/ml),根据接菌 14 天后植株的茎枝是否可以恢复正常进行筛选。与马铃薯一样,若提高共培养菌液的浓度,则适当提前调查时间。

表 2.4 不同菌液浓度下番茄茎枝三次重复的综合评价结果（部分结果）

Table 2.4 Integrated evaluation results of three-repeat of tomato stem in different concentration of *Ralstonia solanacearum* (partial results)

接菌浓度	基因型	抗性	发病严重度				
			接菌后 3d	接菌后 5d	接菌后 7d	接菌后 10d	接菌后 14d
10 ³	D3	S	2	2	1	1	
	D5	S	2	2	1	1	
	D14	S	2	2	1	1	
	393	R	1	1	1		
	395	R	1	1	1		
	419	R	1	1	1		
10 ⁴	D3	S	3	4	4 ^a	3	1
	D5	S	2	4	4 ^a	3	1
	D14	S	3	4	4 ^a	3	1
	393	R	2	2	1	1	1
	395	R	2	2	1	1	1
	419	R	2	3	2	1	1
10 ⁵	D3	S	3	5	5		
	D5	S	3	4	5		
	D14	S	4	5			
	393	R	3	4	4	1	1
	395	R	2	3	3	1	1
	419	R	2	3	4	3 ^b	2
10 ⁶	D3	S	4	5			
	D5	S	4	5			
	D14	S	4	5			
	393	R	3	4	4	2	1
	395	R	3	4	3	2	1
	419	R	4	4	4 ^b	3	2

注：1—健康；2—1~2 叶片萎蔫；3—3~4 叶片萎蔫；4—全部叶片萎蔫；5：茎枝死亡；^a 部分萎蔫的茎枝死亡 ^b 部分萎蔫的叶片死亡。



图 2.5 抗病番茄（393）在不同接菌浓度下的抗病表现
从左至右：接菌浓度依次为 0、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸cfu/ml.

Fig. 2.5 Result of *R_s*-resistant tomato in different bacterium concentration.
From left to right: bacterium concentration is 0、10⁵、10⁶、10⁷、10⁸cfu/ml.



图 2.6 不同浓度下抗病番茄 393 浸泡 10 天时的生根表现

从左至右：接菌浓度依次为 10^3 、 10^4 、 10^5 cfu/ml.

Fig. 2.6 Root growth of *R_s*-resistant tomato after bacterium inoculation 10 days

From left to right: bacterium concentration is 10^3 、 10^4 、 10^5 cfu/ml.



图 2.7 抗病性不同的番茄接菌后 14 天的抗病表现

从左至右：依次为感病番茄 D3、D14、D5，抗病番茄 393、395、419。接菌浓度为 10^5 cfu/ml.

Fig. 2.7 *R_s*-resistant result of different tomato plant stem after bacterium inoculation 14 days

From left to right: susceptible tomato D3、D14、D5; *R_s*-resistant tomato 393、395、419.

Inoculation bacterium concentration is 10^5 cfu/ml.

2.4 讨论

茎枝菌液共培养法的实质就是将同一个植株或遗传背景不同的不同植株的主茎或侧枝插入盛有不同浓度菌液的容器内进行共培养，以观察其抗（感）病情况，并且可根据需要调整共培养菌液的浓度，提前或推迟抗（感）病的表现。也可将要研究的多种病原菌按比例混合进行混合接种。该方法不仅适用于马铃薯青枯病的抗性鉴定和筛选，对于其它易于水培的茄科作物（如番茄、烟草等）的抗性筛选和鉴定，特别是病菌诱导产生抗性的抗（感）病植株的快速鉴定及其幼苗的先期快速筛选等同样适用。本研究采用三种方法对马铃薯 ED 和 CE 群体进行了筛选和鉴定，筛选出的部分高抗青枯病材料和高感青枯病材料（如 ED13、ED25 等）已被用于亲本构建杂交作图群体，为构建分子标记连锁图谱及抗青枯病基因定位奠定了基础，同时也为进行后续的抗青枯病研究提供了高抗青枯病材料（如 ED13）。

茎枝菌液共培养法属于室内鉴定法，与其它传统的室内接种方法相比具有独到的优越性：①简单易行：该方法只需将生理年龄一致的同一基因型不同植株的茎枝或同一植株的主茎和侧枝剪

下,共培养在含有一定浓度的菌液中即可,不需将整个植株进行伤根浸染,保证了实验试材生理年龄的一致性,也增加了鉴定的准确性。②可操作性更强,更加经济:可通过去掉植株顶芽使其产生大量侧枝的方法获得足够数量的茎枝,无需培养大量植株,降低了工作量;同一个容器内可共培养多个植株的茎枝,节省了空间,并有利于控制发病条件,更加便于管理,有利于大量不同材料和不同基因型的鉴定;可通过改变共培养菌液的浓度人为控制发病的速度,节省时间,降低能耗。③鉴定结果的一致性和重复性更高:由于对每一个茎枝在菌液共培养前均经过同样的锋利刀片的垂直切割,所受到的伤害基本一致,避免了伤根灌注法伤根程度不同和毛细管滴注法对不同粗细的植株茎枝所造成的伤害程度不同的弊端及由此引起的植株抗感表现的差异(Perera, *et al.* 1992);同时共培养所用菌液均匀一致,减少其他条件的干扰,保证了鉴定结果的一致性和可重复性;并且同一植株的多个茎枝可同时进行鉴定,增加了单株鉴定的准确性,这对于无性繁殖的作物具有重要意义。④适用对象广:大田生长的植株,组培幼苗,小气候环境下的植株(开放环境下的盆栽植株和温室内盆栽植株),植株的主枝和次生枝等均可采用该方法进行鉴定;同时对所要鉴定的群体大小没有严格的限制,只要每个基因型的植株茎枝能够满足5个以上即可。⑤可人为控制发病时间的早晚:增加所使用菌液的浓度,可进行植株抗病性的快速鉴定;降低共培养菌液的浓度,则可推迟发病时间,按照传统的调查方法进行调查后,确定植株的抗病级别。⑥鉴定后的植株可直接应用:由于用于鉴定的是植株的茎枝,所剩余的植株没有接触病菌,因此可直接应用,而灌根法和毛细管法则不能,这对于珍贵稀有的植株材料的保存和繁殖具有重要意义。⑦适用范围广:不仅适用于马铃薯的抗病评价,对于其它茄科作物(如番茄)的抗病性筛选同样适用。

茎枝菌液共培养法与传统的灌根法及毛细管菌液滴注法等一样,与大田环境仍然存在一定的差异。因此要最终确定种质资源的抗病性,尚需结合大田鉴定方法共同确定。但该方法与其它室内鉴定方法相比更加简单、便捷和经济,可操作性更强,对于资源材料的先期评价和筛选具有重要的指导价值和实践意义。

第三章 青枯病菌胁迫下的马铃薯早期基因表达

3.1 引言

植物经过长期的进化,为了保卫自身,免遭病原的侵染,已经发展了较为完善的自身防卫反应机制,包括产生抗菌肽、次级代谢物、细胞溶解酶、膜反应蛋白及自身细胞壁的加厚等 (Scheel, 1998; Karin, *et al.* 2000)。寄主植物中抗病基因的有无和侵染病原中无毒基因的存在与否决定着寄主与侵袭病原间的亲和性互作和非亲和性互作。根据基因对基因学说 (Flor, 1971),无毒基因编码产物可直接或间接的作为抗病基因编码产物 (受体) 的配体识别抗病基因产物,从而产生非亲和性互作,引发寄主植物复杂的抗病防御反应 (Gabriel, *et al.* 1990)。

近年来人们开始对抗病基因和数量性状位点 (Quantity Trait Locus, QTL) 进行分离和鉴定,并利用异源抗病基因对马铃薯进行转化,现已从不同植物种中分离或鉴定了多个抗病基因和抗病 QTL,如拟南芥的 *RRS1* 和 *QTLs* (*QRS1*, *QRS2* 和 *QRS3*) (Deslandes, *et al.* 1998; Godiard, *et al.* 2003), 马铃薯的 *API* (Feng, *et al.* 2003), 番茄的 *QTLs* (*BW-1*, *BW-3*, *BW-4* 和 *BW-5*) 等 (Danesh, *et al.* 1994; Thoquet, *et al.* 1996) 以及相应的无毒基因 (Deslandes, *et al.* 1998)。在用于马铃薯转基因的外源基因中,如几丁质酶基因 (Lorito, *et al.* 1998), 防卫基因 *defensins* (Gao, *et al.* 2000), 抗菌肽 (Jia, *et al.* 1996), 只有很少几个基因是来自马铃薯,如 *snakin-1* 基因和 *snakin-2* 基因,这些基因提高了马铃薯对青枯病菌的抗性 (Berrocal-Lobo, *et al.* 2002; Gebhardt, *et al.* 2001)。尽管已经克隆和鉴定了一些功能基因,但是人们对参与马铃薯与青枯病菌之间的亲和性和非亲和性互作的遗传因子的理解仍然不甚明了。

大规模进行基因表达分析是有效探索植物-病原互作的重要手段。抑制差减杂交是一种构建均一化 cDNA 文库,富集差异表达基因的有效方法 (Diatchenko, *et al.* 1996; Brich, *et al.* 1999; Tian, *et al.* 2003; Faivre-Rampant, *et al.* 2004; Sun, *et al.* 2005), 尽管该方法也存在一些诸如产生假阳性的不足,但通过与 MOS (Mirror orientation selection) 方法的有机结合为解决转录本背景克隆问题和减少假阳性提供了可能 (George, *et al.* 1999; Rebrikov, *et al.* 2000; Boengler, *et al.* 2003)。本研究拟利用 SSH 和 cDNA 宏阵列 (cDNA macroarray) 筛选相结合研究马铃薯与青枯病菌非亲和性互作过程中的基因表达,获得大量参与抗病反应的基因表达信息,初步揭示早期反应的马铃薯抗病相关基因的种类和数量,为今后的分子植物育种提供理论依据。

3.2 材料与方法

3.2.1 试验材料 with 处理

植物材料为高抗青枯病二倍体基因型 ED13,病原菌为青枯病菌小种 3 号 PO41,接菌方法采用茎枝菌液共培养法接种,具体见 2.2.3.1。限制性内切酶、DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、DNA 分子量标准、各种生化试剂及试剂盒等分别购自 CLONTECH 公司、Invitrogen 公司、promega 公司、

TAKARA公司及北京天为时代公司等。

3.2.2 总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

总RNA的提取采用TRIZOL[®] Reagent一步法抽提试剂盒 (Invitrogen, USA), 依试剂盒说明书分别提取接菌处理和对照水处理0、6、12、24、36、48、72、96h的叶片总RNA。并按mRNA分离试剂盒 (QIAGEN) 说明书分离所提取的接菌处理和对照水处理6h和12h样品总RNA的mRNA。

3.2.3 SSH 文库的构建

以接菌处理材料的cDNA为试验方 (Tester), 水处理的为驱动方 (Driver), 利用抑制差减杂交技术, 参照Clontech PCR-SelectTM cDNA Subtractive Kit (Clontech公司) 说明书进行SSH文库的构建, 其步骤简要叙述如下:

3.2.3.1 ds-cDNA 的合成

分别取2 μg 接种处理与对照水处理的mRNA, 加入1 μl cDNA合成引物 (10 $\mu\text{mol/L}$), 使用试剂盒提供的AMV逆转录酶合成cDNA第一链; 用第二链合成酶混合物合成第二链。合成的双链cDNA用苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 充分抽提纯化。纯化产物经95%乙醇沉淀后溶于50 μl ddH₂O中, 取出6 μl 保存于-20 $^{\circ}\text{C}$ 以用于Rsa I消化后ds-cDNA的电泳对照来检测Rsa I酶切效果及ds-cDNA的产量、大小和合成效率 (3.2.3.2)。

3.2.3.2 ds-cDNA的Rsa I 酶切及cDNA合成效率检测

分别在剩余的接种与对照ds-cDNA中 (约为43.5 μl) 加入5 μl 10 \times Rsa I Restriction Buffer和1.5 μl Rsa I (10 units/ μl), 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育6 h以完全酶切。取出5 μl 进行琼脂糖凝胶电泳检测酶切效果, 其余的用苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 和氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提纯化, 乙醇沉淀后溶于5.5 μl ddH₂O中, 以进行后续接头连接。

根据已报道的Actin基因 (Drouin, *et al.* 1990) 第3个外显子核酸序列设计5'端引物Actin-F: 5'-GATGGTGTTCAGCCACAC-3'和3'端引物Actin-R: 5'-ATTCCAGCAGCTTCCATTCC-3'。且这两个引物之间的Actin基因第3个外显子区段内无Rsa I 酶切位点, 可用于双链cDNA与接头连接效率的检测 (3.2.3.3): Actin-F与Actin-R配对可以扩增出约420 bp长的片段, Actin-R与接头引物配对可以扩增出约350 bp长的片段。

利用Actin基因的特异引物Actin-F和Actin-R对所合成的接种处理与对照水处理的ds-cDNA进行PCR扩增, PCR扩增体系为50 μl , 在PCR扩增过程中分别于第20、25、30和35个循环取出5 μl , 最后进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测cDNA的合成效率。

3.2.3.3 接头连接

接菌处理和对照水处理的经Rsa I酶切的ds-cDNA分别与接头1和接头2连接, 分别记为: Tester-1、-2和Driver-1、-2。具体为:

- 分别取经Rsa I消化的接菌处理和对照水处理的ds-cDNA各1 μl , 用5 μl 无菌水稀释。
- 在0.5 ml离心管中混合以下成分, 准备Ligation Master Mix。

	per rxn
Sterile H ₂ O	3 μ l
5X Ligation Buffer	2 μ l
T4 DNA Ligase (400 units/ μ l)	1 μ l

- c. 对于每一个试验tester cDNA 和对照Driver cDNA, 在0.5ml离心管中依次加入以下成分, 并用移液器充分混匀。(对于正向库的构建: 接菌处理的ds-cDNA为Tester, 对照为Driver; 对于反向库的构建: 对照ds-cDNA为Tester, 接菌处理为Driver)。接头引物序列见附录D。

Component	Tester1 (μ l)	Tester2 (μ l)
diluted tester cDNA	2	2
Adaptor 1 (10 μ M)	2	-
Adaptor 2R (10 μ M)	-	2
Master Mix	6	6
Final volume	10	10

- d. 取2 μ l Tester-1和2 μ l Tester-2于一个新的无菌离心管中混合起来。(连接反应完成后, 该混合物即作为未差减对照1-c)。
- e. 短暂离心, 16 $^{\circ}$ C温育过夜。
- f. 加1 μ l EDTA/Glycogen Mix终止连接反应。
- g. 72 $^{\circ}$ C温育5 min使连接酶失活。
- h. 短暂离心。
- i. 从Tester-1、-2和Driver-1、-2中各取1 μ l稀释于1ml ddH₂O中用于后续的接头连接效率检测, 同时取出1 μ l 未差减对照(1-c)稀释至1 ml无菌水中, 以用于PCR 扩增(3.2.3.5)和差减效率的检测(3.2.3.6)。
- j. 将样品储存于-20 $^{\circ}$ C。

分别采用两种引物组合Actin-F+Actin-R和Actin-R+接头引物对连有接头的ds-cDNA和未连有接头的ds-cDNA进行PCR扩增。PCR反应体系为: 1 μ l稀释连接产物, 2.5 μ l 10 \times PCR Buffer, 2 μ l MgCl₂ (25 mmol/L), 1 μ l dNTPs (2 mmol/L), 0.25 μ l Taq Polymerase (5 u/ μ l), Actin-F与Actin-R各1 μ l或Actin-R与接头引物各1 μ l (引物浓度均为10 μ mol/L), 补加无菌水至终体积25 μ l。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 3 min; 94 $^{\circ}$ C 30s, 56 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸5 min。根据两个引物组合扩增产物量的多少来估测接头的连接效率。

3.2.3.4 差减杂交

- a. 在0.5ml离心管中将每一个实验和对照的连接产物依次加入下列各组分。

Component	Hybridization sample 1 (μ l)	Hybridization sample 2 (μ l)
<i>Rsa</i> I digested driver cDNA	1.5	1.5
Adaptor 1-Igated Tester-1	1.5	-
Adaptor 2R-Igated Tester-2	-	1.5
4 \times Hybridization Buffer	1.0	1.0
Final volume	4.0	4.0

- b. 加一滴石蜡油，短暂离心。
- c. 将样品在PCR仪上98℃加热1.5 min，68℃温育过夜（8-10 hr）。
- d. 在无菌离心管中加入以下试剂：

Driver cDNA	1 μl
4× Hybridization Buffer	1 μl
Sterile H ₂ O	2 μl

- e. 取1 μl上述混合物于0.5 ml离心管中，上面覆盖一滴石蜡油。
- f. PCR上98℃加热1.5 min。
- g. 从PCR仪上取下新鲜变性的driver cDNA，并将其与样品1、2混合起来。（注意：三者需同时混合）
- h. 短暂离心后，68℃温育过夜。
- i. 加200 μl dilution buffer混匀，68℃继续温育7 min后存于-20℃。

3.2.3.5 选择性PCR扩增

首先采用接头外侧引物对每一个正向、反向差减产物和相应的未差减对照进行第一次选择性PCR扩增，由于双链cDNA分子经过差减杂交后，只有差异表达基因片段两端分别带有两个不同接头，因此在进行PCR扩增时只有差异表达基因片段得到有效扩增，从而达到选择性扩增的目的。PCR扩增条件为：94℃ 25s；94℃ 10s，66℃ 30s，72℃ 1.5min，27个循环。将第一次PCR产物稀释10倍后，利用接头的内侧引物进行第二次选择性PCR扩增，PCR扩增条件为：94℃ 10s，66℃ 30s，72℃ 1.5min，10-12个循环。

3.2.3.6 差减效率的检测

本实验通过检测组成性表达基因在差减产物和未差减对照的第二次PCR产物中丰度变化来推断差减效率。具体为：将差减产物和未差减对照的第二次PCR产物稀释1000倍后，利用*Actin*基因的特异引物进行PCR扩增，PCR扩增条件为：94℃ 3min；94℃ 30s，56℃ 45s，72℃ 1min，35个循环；72℃延伸5 min。在PCR扩增过程中分别于第20、25、30和35个循环取出5μl，最后进行1.5%琼脂糖凝胶电泳检测cDNA的差减效率。

3.2.3.7 差减cDNA 文库的质量评价

将第二次PCR扩增产物利用QIAquick PCR purification kit纯化回收后，通过T-A克隆插入到pMD18-T载体上（TAKARA公司），转化大肠杆菌Top10感受态细胞（天为时代公司），通过蓝白斑筛选阳性重组子。随即挑取20个白斑菌落作为模板，分别进行菌落PCR扩增，PCR扩增条件为：94℃ 3min；94℃ 30s，55℃ 45s，72℃ 1min，35个循环；72℃延伸5 min。

3.2.4 测序及序列分析

随即挑取阳性重组子，由北京擎科公司测序。去除载体和接头序列后，利用BLASTN和BLASTX（Basic Local Alignment Search Tool, BLAST）在NCBI（National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）和TIGR（The Institute for Genomic Research (TIGR), <http://www.tigr.org/>）的数据库中进行比对分析。

3.2.5 差减文库筛选

3.2.5.1 探针制备

为了尽可能降低和消除接头共有序列对杂交信号的影响,减少背景和假阳性的产生,在进行探针标记前,分别利用 *Rsa* I 酶切以去除正向与反向差减产物的接头序列。探针标记参照Roche公司DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit I 的操作说明进行。

3.2.5.2 Reverse-Northern

3.2.5.2.1 PCR 扩增:

以阳性重组子的菌液为模板,利用接头内侧引物进行PCR扩增,电泳检测插入片段的大小和产量,剔除插入片段小于100 bp以及双带产物,并依据电泳条带强度调整PCR产物浓度使其趋于一致。

3.2.5.2.2 macarray 制备:

取5 μ l PCR产物(约100ng)与5 μ l新鲜配制的0.6mol/L NaOH混匀,用排枪将1.2 μ l样品点于尼龙膜(Nylon membranes, positively charged, Boehringer Mannheim)上。点膜完毕,将尼龙膜用0.5mol/L Tris-HCl (pH 7.5)中和5min,然后用双蒸水漂洗。凉干后于80℃烘烤2小时,以固定DNA于尼龙膜上。

3.2.5.2.3 杂交与显色

杂交依照DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit I的说明进行,探针量约为35 ng/ml,40℃杂交过夜。室温下用2×SSC (0.1% SDS)洗膜两次,每次15min。然后于68℃用0.5×SSC (0.1% SDS)继续洗膜两次,每次15min。杂交显色采用该试剂盒的NBT/BCIP体系显色,时间为4-5h,显色完毕用足量TE (pH 8.0)洗膜两次,凝胶成像系统在可见光下扫描显色结果。

3.2.6 Northern 印迹

分别取不同时间点的总RNA 35 μ g进行1.5%甲醛变性凝胶电泳,碱上行法转膜(Hybrid N⁺ 尼龙膜, Amersham),然后120℃烘烤30min。特异探针的制备参照Roche公司DIG High Primer DNA Labeling and Detection Starter Kit I 的操作说明进行。杂交与显色同Reverse-Northern。

3.2.7 半定量 RT-PCR 验证

根据所测基因片段的序列设计合成特异引物,引物序列见表3.1。利用Superscript II (Invitrogen)逆转录酶,以oligo-dT(18)为引物(购自上海生工公司),青枯病菌处理0、6、12、24、36、48、72、96h的总RNA为模板,逆转录合成cDNA第一链。具体PCR扩增条件为:94℃ 3min; 94℃ 30s, 52-58℃ 30s, 72℃ 30s, 20-35个循环; 72℃延伸5 min。PCR产物进行1.5%的琼脂糖凝胶电泳,根据扩增的DNA条带的亮度来判断所分析基因在不同时间点的表达水平。

表3.1 半定量RT-PCR所用引物及序列

Table 3.1 Primers and their sequences used in Semi-quantity RT-PCR

名称	序列(5'---3')
L51-F	AAGGAAGGCTTGGAGAAGGAG
L51-R	CCCTTGTCCTCCATTTCAACT T
L358-F	GCCTTACCCCTTCTCACTCT
L358-R	CACCCATTCCAACATCAGAC
L496-F	GGAGTCGGATTATGGTGATG
L496-R	ATTTGGAACCTTCTGGTGTC
L284-F	CTTGGTGGCTTATGGGATGC
L284-R	CGGTGGAACCTTGATGGTTGG
L77-F	AGGGCTACATTAGAAGATGG
L77-R	CTATTCTCATCCTTGTGGC
L248-F	ACCACCCAGATGTTTCACCC
L248-R	TGCCAACGATTCTTCCATTAC
L362-F	ACACAGTAACCAAGCAACTC
L362-R	CCTGCGTTGTCTTTGGATG

为使所分析基因在不同时间点的表达具有可比性,首先利用看家基因 *Actin-exon 3* 的特异引物对所有不同时间点的 cDNA 第一链进行 PCR 扩增,根据其 PCR 扩增产物量的不同调整起始 cDNA 第一链的浓度,使其趋于一致。其次在进行 PCR 扩增时,扩增循环数停止于指数增长期,使其 PCR 扩增为不饱和扩增,以保持所分析基因的起始差异。

3.3 结果与分析

3.3.1 试验材料的选择及取材时间的确定

选择什么材料及病菌诱导后什么时间取材至关重要,本实验首先利用传统方法和改进方法进行多次鉴定,选出高抗青枯病基因型后,进而采取改进的青枯病菌接种方法对抗病基因型进行接菌(接菌浓度为 10^7 cfu/ml)发现:感病材料在接菌后3-4天叶片萎蔫,部分高感病材料接菌后2天叶片就已经萎蔫,但抗病材料(如ED13)则无明显萎蔫症状。为了获得马铃薯与青枯病菌非亲和互作的早期信息,本研究采取接菌后6h和12h取材,提取总RNA和分离mRNA,并以这两个时期的混合mRNA反转录所得的cDNA池构建SSH文库。

3.3.2 总 RNA 的提取及 mRNA 的分离

高质量的总RNA是构建cDNA文库的首要前提,本试验采用TRIZOL[®] Regent一步法抽提试剂盒提取的总RNA 28s和18s rRNA条带清晰、无拖尾,且28s带的亮度约为18s的2倍(图3.1);紫外分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280} 为1.9-2.0,说明所提取的总RNA纯度较高,质量较好。利用Oligotex[®] (QIAGEN) mRNA分离试剂盒分离纯化的mRNA电泳检测显示为smear状,28s 和18s

rRNA条带变得模糊不清(图3.2), 且mRNA的分子量大小主要分布在500bp以上, 紫外分光光度计测定 OD_{260}/OD_{280} 为1.9-2.1。表明实验分离得到的mRNA质量合格, 满足cDNA合成要求。

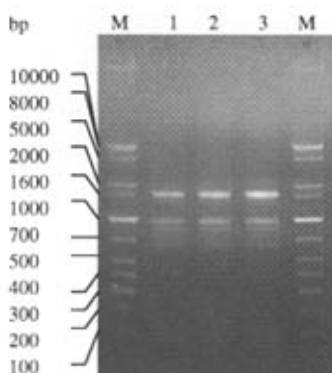


图 3.1 总 RNA 的电泳结果

M: DNA marker MD113

1-3: 总 RNA

Fig. 3.1 Electrophoresis result of total RNA on 1.5% agarose gel.

M: DNA marker MD113

1-3: Total RNA

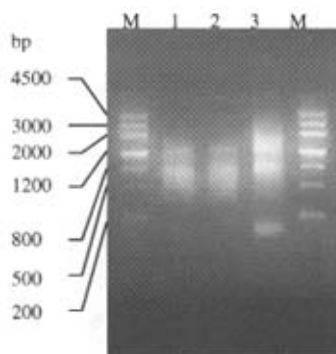


图 3.2 mRNA 的电泳结果

M: DNA marker III

1: 源自病菌处理材料的 mRNA

2: 源自对照处理材料的 mRNA

3: 分离出 mRNA 后的总 RNA

Fig. 3.2 Electrophoresis result of isolated mRNA on 1.5% agarose gel.

M: DNA marker III

1: mRNA from un-treated sample

2: mRNA from *Rs*-treated sample

3: ED13 total RNA after isolated mRNA

3.3.3 cDNA 的合成及合成效率检测

参照Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit说明书合成cDNA, 并根据持家基因(*Actin*)的PCR扩增情况对cDNA的合成效率进行了检测(图3.3)。以病菌处理的和对照样品的cDNA为模板, PCR扩增25个循环均可检测到*Actin*基因的PCR扩增带, 30个循环带型清晰且浓密, 说明cDNA的合成效率较高。

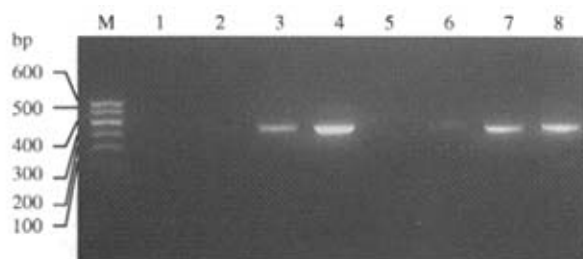


图 3.3 cDNA 合成效率检测

M: DNA marker I

1-4: *Rs* 处理样品 cDNA 的第 20、25、30 和 35 个循环的扩增产物

5-8: 对照水处理样品 cDNA 的第 20、25、30 和 35 个循环的扩增产物

Fig. 3.3 Efficiency detection of cDNA synthesis on 1.5% agarose gel

M: DNA marker I

1-4: PCR product of 20, 25, 30, 35 cycles for ds-cDNA of *Rs*-treated sample

5-8: PCR product of 20, 25, 30, 35 cycles for ds-cDNA of control sample

3.3.4 接头连接效率及差减杂交效率检测

实验中以组成性表达的*Actin*基因为内参，利用*Actin*基因的特异引物和SSH文库构建试剂盒提供的引物相结合，相应的cDNAs为模板，进行PCR扩增以监测双链cDNA与接头的连接效率和消减杂交的效率。对于双链cDNA与接头的连接效率的检测，以连有接头的cDNA样品为模板，分别利用引物组合PCR N1+Actin-R和Actin-F+Actin-R进行PCR扩增，30个循环后，所得扩增片段的强度基本一致（图3.4），说明接头的连接效率较高。

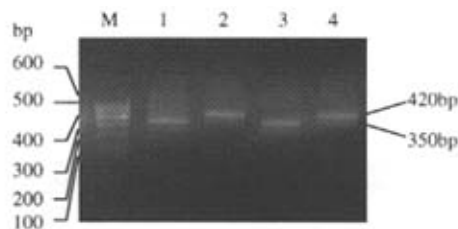


图3.4 接头连接效率检测

M: DNA marker I

1,3: 引物组合 Actin-F+Actin-R 的 PCR 产物

2,4: 引物组合 PCR primer N1+Actin-R 的 PCR 产物

Fig. 3.4 Ligation efficiency detection

M: DNA marker I

1,3: PCR products of Actin-F+Actin-R primer pairs

2,4: PCR products of N1+Act-R primer pairs

经过差减杂交和两次选择性PCR扩增，差异表达基因片段得到高度富集，且最初的丰度不同的转录本已基本得到均一化。对于消减杂交效率的检测，以消减的和未消减的cDNA样品为模板，利用*Actin*的特异引物进行扩增，对于未消减的cDNA样品，只需25个PCR循环即可获得清晰的扩增产物，但对于消减后的cDNA样品，35个循环后扩增产物才可检测到，要比未消减的晚10个

循环（图3.5），表明：经过差减杂交后*Actin*基因和其它组成性表达基因的丰度已大大降低，差异表达基因得到了富集和均一化。

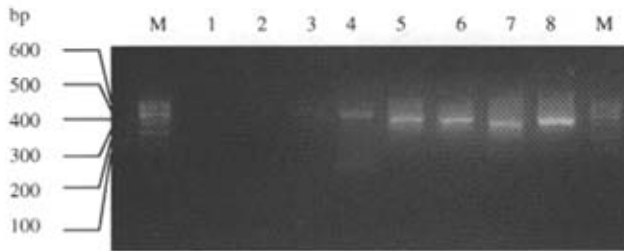


图3.5 差减杂交效率检测

M: DNA marker I

1—4: 消减cDNA文库第20、25、30和35个循环的*Actin* 基因扩增产物

5—8: 未消减 cDNA 文库第 20、25、30 和 35 个循环的 *Actin* 基因扩增产物

Fig. 3.5 Subtractive efficiency evaluation on 1.5% agarose gel

M: DNA marker I

1~4: PCR products of *Actin* in 20, 25, 30, 35cycles for subtracted cDNAs

5~8: PCR products of *Actin* in 20, 25, 30, 35cycles for un-subtracted control

3.3.5 差减产物克隆及文库质量评价

将纯化回收的第二次PCR产物通过T-A连接插入到pMD18-T载体上，转化大肠杆菌Top10感受态细胞，共获得约1000个阳性重组子（图3.6），随即挑取20个白斑菌落进行菌落PCR扩增，结果表明：插入片段的大小约为100bp-600bp，平均为300bp（图3.7）符合识别4碱基的*Rsa* I酶切片段大小。

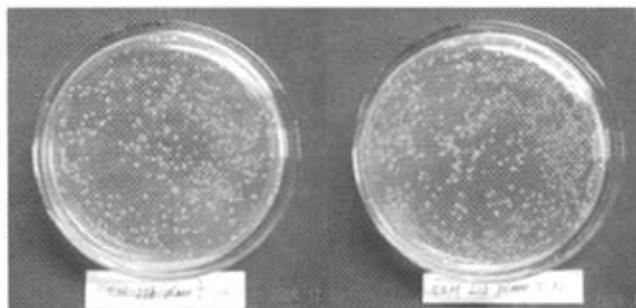


图3.6 差异表达基因片段克隆（白斑菌落占总菌落数的百分比约95%）

Fig. 3.6 Clones of differentially expressed gene fragments

(Rate of recombination is about 95%)

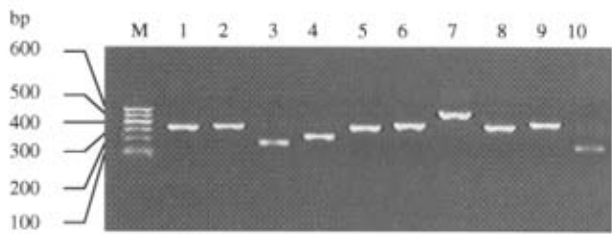


图3.7 阳性克隆插入片段大小的检测
M: DNA marker I 1-10: 不同阳性克隆的PCR产物
Fig. 3.7 Size evaluation of inserted fragments
M: DNA marker I 1-10: PCR products of different positive clones

3.3.6 测序和差异表达片段的筛选

从所获1000个重组克隆中随即挑取600个克隆利用ABI3730测序, 结果表明这些克隆的插入片段大小为100至700bp, 平均大小为300bp。去除载体和接头序列, 利用BLASTX 或 BLASTN 在NCBI和TIGR的数据库中进行比对分析, 共获得216个非重复ESTs。在所测的600个克隆中只检测到1个Actin基因, 进一步说明了经过消减后Actin基因和其它组成性表达基因被有效的去除, 差异表达基因得到了有效富集和均一化。

所有216个非重复ESTs均点在带正电荷的尼龙膜上进行差异筛选, 为了减少背景的干扰和假阳性的产生, 在标记探针前, 首先去除实验方 (tester) cDNA和驱动方 (driver) cDNA的接头序列, 接头去除效率的检测表明: PCR扩增30个循环, 引物组合N1+Actin-R无扩增产物, 而引物组合Actin-F + Actin-R则有较强的扩增带, 说明接头已经基本去除, 保证了后续反向Northern筛选的可靠性。

为了减少人为因素的影响, 根据探针的标记效率调整杂交反应中探针用量, 使用于杂交的探针量基本相同。反向Northern结果表明: 在216个克隆中有123个cDNA克隆与正向差减cDNA (Forward-subtracted cDNA) 探针有较强的杂交信号, 而与反向差减cDNA (Reverse-subtracted cDNA) 探针无杂交信号或杂交信号较弱; 或者与反向差减cDNA探针有较强的杂交信号, 而与正向差减cDNA探针无杂交信号或杂交信号较弱 (图3.8)。

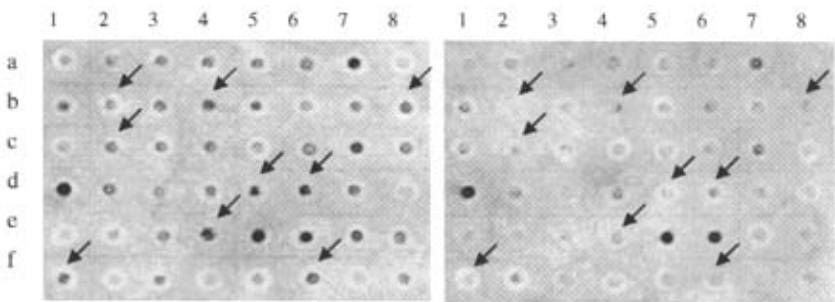


图3.8 部分样品的反向Northern杂交筛选结果
左侧: 与正向差减探针杂交结果 右侧: 与反向差减探针杂交结果 箭头所指: 差异表达的克隆
Fig. 3.8 Partial results of Reverse Northern blot screening
Left: Hybridization result with forward-subtracted probe Right: Hybridization result with reverse-subtracted probe
Arrow: indicate differential expressed clones

进一步分析表明这123个差异表达克隆的插入片段平均大小为295 bp, 除3个克隆(2.4%)的插入片段小于100bp(去除接头序列)外, 其余120个克隆的插入片段大小均大于100bp。BLASN和BLASX在NCBI和TIGR数据库中比对分析发现: 99个克隆(80%)可找到与其具有较高同源性的序列($0 < E\text{-值} < 10^{-10}$), 16个克隆(13%)可找到较低同源性的序列($E\text{-值} > 10^{-10}$), 8个克隆(7%)无同源序列。研究中还发现在123个差异表达的克隆中有21个克隆(17%)杂交信号非常强, 且大部分克隆(插入片段大小为120-650bp)与已知植物基因序列具有较高的同源性($E\text{-值} < e^{-30}$)。冗余序列分析表明: 在所有600个测序的EST中有8个高丰度的EST出现131次(约21.8%), 这些高丰度的EST主要为细胞结构成分(如胞壁蛋白)、细胞自救和防御、细胞代谢、蛋白质的合成与加工以及功能未知蛋白等(表3.2)。这些高丰度的EST在反向Northern中均具有较强的杂交信号, 且出现的频率越高, 杂交信号越强。BLAST比对分析还发现在差异表达和非差异表达的序列中有18个ESTs尚未在马铃薯中报道(时间: 2006年6月), 占所测序EST的3%(表3.3), 这些EST可能代表马铃薯新基因。

表 3.2 出现频率较高的 EST

Table 3.2 The most frequent ESTs in the SSH library.

匹配核酸编码产物	出现频次	所占比率(%)*	预测功能
Cell wall protein	94	15.67	cell structure
Glycine-rich protein	8	1.33	cell rescue and defence
Catalase	7	1.17	cell rescue and defence
Hybrid proline-rich protein	5	0.83	function unknown
Ribulose biphosphate carboxylase	5	0.83	metabolism
Pre-pro-cysteine proteinase	4	0.67	metabolism
Ubiquitin-conjugating enzyme UBC2	4	0.67	protein synthesis and processing
Nucleotide sugar epimerase-like protein	4	0.67	Function unknown
Sum of Top 22 Redundant clones	131	21.83	

* 在所测序的600个克隆中所占百分比

表 3.3 本试验获得的 GenBank 和 TIGR 中尚未在马铃薯中报道的 ESTs^{*}

Table 3.3 The unreported ESTs in GenBank and TIGR database in the present study

EST 编号	EST 长度(bp)	匹配序列号	同源基因 (BLASTX and BLASTN) 及来源	一致性	Score 值	E-值
差异表达的 ESTs						
L77	301	AAM44274.1	receptor-like kinase RHG1 [Glycine max]	74/99 (74%)	153	2e-36
L434	315	NP_198009.3	PWD (PHOSPHOGLUCAN WATER DIKINASE); catalytic [Arabidopsis thaliana]	70/104 (67%)	154	1e-36
L5	421	No match				
L15	157	No match				
L136	112	No match				
L139	120	No match				
L185	155	No match				
L214	278	No match				
L367	208	No match				
L423	329	No match				
非差异表达的 ESTs						
L52	100	NP_193605.1	CIPK12 (CBL-interacting protein kinase 12); ATP binding / kinase/ protein kinase/ protein serine/threonine kinase/ protein-tyrosine kinase [Arabidopsis thaliana]	44/47 (93%),	97.1	2e-19
L17	104	No match				
57	95	No match				
150	249	No match				
217	321	No match				
269	102	No match				
318	123	No match				
340	100	No match				

^{*} 由于在 TIGR 数据库中, TC 号所代表的序列为多个 EST 的拼接而来, 一般具有较长的序列, 因此经比对后大部分在 GenBank 中尚未在马铃薯中报道的差异表达的 ESTs, 而在 TIGR 数据库中却可以找到其对应序列, 因此在这两个数据库中都没有同源序列的较少。这些序列应该代表新基因。

3.3.7 差异表达片段的 Northern 和 RT-PCR 验证

为进一步验证反向 Northern 结果的可靠性,挑选 8 个基因进行 Northern 印迹和半定量 RT-PCR 分析。采用接菌后不同的时间点(对于 Northern 采用接菌后 0h、6h、24h、36h 和 48h;对于半定量 RT-PCR 采用 0h、6h、12h、24h、48h、72h 和 96h)来研究候选基因在抗青枯病的马铃薯叶片中的表达模式。Northern 杂交和 RT-PCR 结果表明:8 个基因中 7 个受青枯病菌诱导表达,但它们的诱导表达强弱存在明显差异,诱导表达模式也各不相同(图 3.11a, 图 3.11b)。

L181 (putative protein phosphatase 2C) 为下调(图 3.11a),预示着植物受青枯病菌浸染后可能产生一种抑制因子,该抑制因子抑制了 *L181* 的表达。对于半定量 RT-PCR 分析方法,首先利用组成性表达基因 *Actin* 为内参,调整了用于 PCR 扩增的所有时间点的样品模板量,使其起始模板量一致,同时通过优化循环参数,使所有扩增均处于对数增长期。半定量 RT-PCR 结果表明:除 *L358* (ADP-ribosylation factor) 外,其它 6 个均受青枯病菌的诱导(图 3.11b)。*L51* (methyl-CpG-binding domain-containing protein) 受青枯病菌的快速诱导,在 6-12 小时内即达到最高表达水平,然后回到其自然低水平。*L362* (protein kinase Pti1) 和 *L248* (DnaJ-like protein) 与 *L51* 具有相似的表达模式,但是 *L362* 需 24h 尚可达到最高表达水平,比 *L51* 稍推迟一些,并且该基因在正常情况下维持低水平表达;*L248* 在约 12h 达到最高表达水平后缓慢降低。与以上不同的是 *L496* (putatively encoding kunitz-type trypsin inhibitor) 和 *L77* (putatively encoding receptor-like kinase RHG1) 对于青枯病菌的诱导反应较慢,约需 48h 才可达到最高表达量,然后逐渐下降。*L284* 与烟草 N 基因的 3'端具有较高的一致性,该基因具有独特的表达模式,受青枯病菌的强烈诱导,在 6-12h 内表达量达到最高,然后维持高水平表达 36h 后,逐渐降低。这些片段不同的表达模式预示着这些基因在病原与寄主互作中起着不同的作用。

Northern 印迹和半定量 RT-PCR 分析结果还表明这些基因均在 12h 之前就已经受诱导而启动表达,与反向 Northern 的筛选结果是吻合的,也进一步证明了差异筛选结果的可靠性。当然,在反向 Northern 筛选时有少数片段也可能被遗漏。未进行验证的片段中,少数片段也有假阳性的可能,对于需要深入研究的片段,尚需进一步验证。

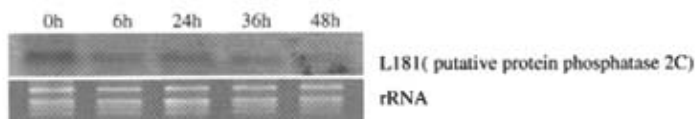


图3.11a 不同时间点*L181*转录水平的 Northern印迹分析

总RNA分别来自接菌处理0, 6, 24, 36 和 48h的样品;根据核糖体RNA的量来调整电泳总RNA上样量。

Fig. 3.11a Northern blot analysis of *L181* transcript levels at different time-point post-inoculated with *Ralstonia solanacearum*. Total RNAs were extracted from potato leaves harvested 0, 6, 24, 36 and 48h p.i. The quantity of total RNA loaded in each agarose gel channel was modulated equal according to their rRNA.

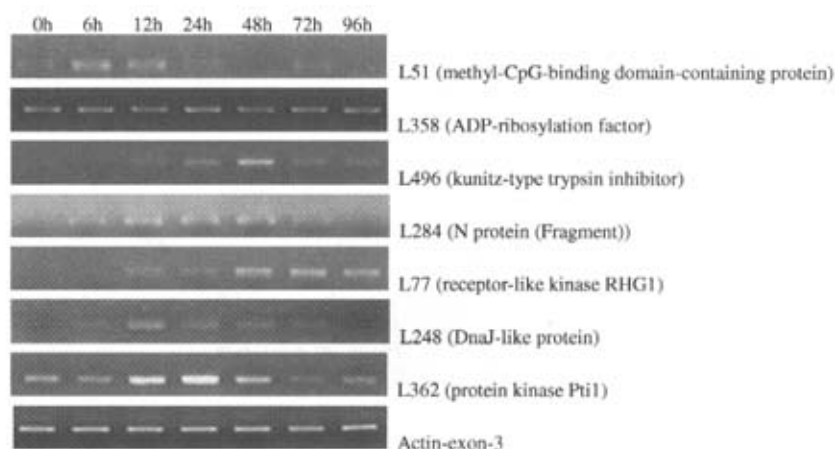


图 3.11b 差异表达基因的 RT-PCR 分析

右侧标出每个克隆可能编码的蛋白质，RT-PCR 模板来源于不同接种时期（0, 6, 12, 24, 48, 72 和 96h）样品经反转录合成的 cDNA 第一链，并根据持家基因 *Actin* 的 PCR 扩增量来调整模板用量。

Fig. 3.11b RT-PCR analysis of transcript levels of potato genes differentially expressed in potato leaves inoculated with *Ralstonia solanacearum*. Clone designation is indicated to the right of each panel. cDNAs were synthesized from RNAs of potato leaves harvested 0, 6, 12, 24, 48, 72 and 96h p.i. using oligo(dT). Primers for *Actin-exon-3* gene were used to verify that quantity of cDNA template for samples were equal.

3.3.8 基因的功能分析

根据所获得123个差异表达EST可能的生物学功能，可将其分为12个功能组（图3.10），具体见表3.4，其中23%的EST与细胞自救和防御有关（如：几丁质酶、细胞色素P450、富亮氨酸重复蛋白家族等），9%的与信号转导相关（如：14-3-3蛋白、类受体激酶RHG1、乙烯受体等），4%的为转录因子（如：nam-like蛋白4、GAMYB结合蛋白等），9%的参与代谢，13%的参与蛋白的合成与加工，22%的未分类或功能未知。BLAST检索结果还表明，得分较高（ $0 < E\text{-value} < 10^{-20}$ ）的绝大部分ESTs（共81个）来源于马铃薯（39个），其次为烟草（8个）、番茄（7个）、拟南芥（7个）和其它（20个）等。

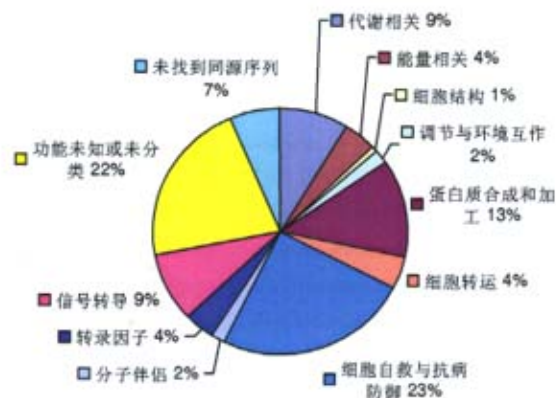


图 3.10 差异表达片段的功能分类

根据 BLASTX 的比对结果, 将所获得的 123 个 EST 按照与它们同源的基因的生物学功能分为 12 类。

Fig.3.10 EST classification according to putative biological function following the Expressed Gene Anatomy database cellular role classification scheme (White and Kerlavage, 1996) based on homologies to sequences of known function detected by BLASTX searches.

3.3.9 抗病相关基因

根据已发表的抗病研究资料推测在差异表达的 123 个 ESTs 中, 至少有 44 个 (约 35.8%) 参与了马铃薯的抗青枯病反应, 分类整理后列于表 3.5。这些片段涉及到抗病反应的基本过程, 包括信号识别 (如 L284)、信号传导和转录因子如类受体激酶 RHG1 (L77)、乙烯受体的同源物 (L349)、锌指蛋白 Lsd1 (L332) 和转录因子 RAU1 (L373) 等, 参与过敏反应如热激蛋白 70-3 (L160) 和细胞色素 P450 (L119) 等, 系统获得性抗性中的病程相关蛋白如几丁质酶 (L58、L251) 和甲基 CpG 结合蛋白 (L51) 等, 参与细胞保护机制如液胞加工蛋白 (L480)、富甘氨酸蛋白 (L13, L241)、类金属硫因子蛋白 (L229)、果胶甲脂酶 (L107) 及果胶甲脂酶抑制子 (L222, L380) 等, 以及其它抗病防御相关基因 (如半胱氨酸蛋白酶 L84 和 L283, 过氧化氢酶 L126 等)。它们中大部分与已知基因高度同源, 如: *nam-like* 蛋白 4 (L221)、果胶甲脂酶抑制子蛋白 (L380) 及过氧化氢酶 (L126) 等。这种高同源性预示着这些基因非常保守, 在不同植物种的抗病反应中可能具有重要的作用。

表 3.4 与已知基因同源性比较结果^a

Table 3.4 The results of EST similarity analysis from comparing with the function identified genes

EST 编号	EST 长度(bp)	匹配序列号	同源基因 (BLASTX 和 BLASTN) 及来源	一致性	Score 值 ^a	E-值 ^a
Metabolism (11)						
L26	159	TC115342	[<i>Solanum tuberosum</i>] weakly similar to UPQ8S9A7 (Q8S9A7) Glucosyltransferase-2, partial (32%) Length = 1643	53/53 (100%)	272	9.2e-23
L87	245	P31542	[<i>Lycopersicon esculentum</i>] ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B, chloroplast precursor	81/81 (100%)	161	7e-39
L93	356	AAC25984.1	Beta-galactosidase [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	26/27 (96%)	61.6	1e-08
L187	268	AAP23933.1	Asparagine synthetase [<i>Lycopersicon esculentum</i>] Length=243	43/44 (97%)	94.7	1e-18
L203	366	CAA49416.1	Ribulose biphosphate carboxylase [<i>Solanum tuberosum</i>]	46/46 (100%)	97.1	2e-19
L231	567	BAC23042.1	NADP-dependent malic enzyme [<i>Solanum tuberosum</i>]	83/84 (98%)	140	3e-32
L286	292	AAL29212.1	Putative acyl-CoA synthetase [<i>Capsicum annuum</i>]	91/95 (95%)	186	2e-46
L321	271	ABE87031.1	Alpha/beta hydrolase fold [<i>Medicago truncatula</i>]	68/89 (76%)	145	7e-34
L335	200	AAZ08349.1	Xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase 16 protein [<i>Lycopersicon esculentum</i>] Length=266	64/66 (96%)	142	3e-33
L425	363	CAC67407.1	Clp protease 2 proteolytic subunit [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	92/104 (88%)	187	2e-46
L434	315	NP_198009.3	PWD (PHOSPHOGLUCAN WATER DIKINASE); catalytic [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	70/104 (67%)	154	1e-36
Energy-related (5)						
L172	239	CAA67696.1	23 kDa oxygen evolving protein of photosystem II [<i>Solanum tuberosum</i>]	59/61 (96%)	92.8	4e-18
L233	567	AAK82651.1	RSH-like protein [<i>Capsicum annuum</i>]	184/188 (97%)	392	4e-108
L268	76	NP_568913.1	34-dihydroxy-2-butanone-4-phosphate synthase/ GTP cyclohydrolase II [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	24/24 (100%)	52.4	6e-06

表 3.4 (续)

EST 编号	EST 长度	匹配序列号	同源基因 (BLASTX 和 BLASTN) 及来源	一致性	Score 值	E-值
L274	344	AAP30039.1	Aconitase [<i>Lycopersicon pennellii</i>]	109/114 (95%)	221	8e-57
L319	159	ABE90636.1	ATPase histidine kinase- DNA gyrase B- and HSP90-like domain protein putative [<i>Medicago truncatula</i>] Length=378	38/47 (80%)	79	6e-14
Cell structure (1)						
L186	426	CAA54561.1	cell wall protein [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	25/28 (89%)	49.3	7e-07
Regulation and interaction with environment (2)						
L36	137	BAC98494.1	AG-motif binding protein-4 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	38/45 (84%)	61.2	1e-08
L452	285	BAD27890.1	Putative vacuolar protein sorting; Vps29p [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	20/21 (95%)	46.6	6e-06
Protein synthesis and processing (16)						
L09	N208	DQ200381.1	<i>Solanum tuberosum</i> clone 062E11 ribosomal protein L25-like protein mRNA complete cds Length=696	167/173 (96%)	295	3e-77
L21	N364	M75731	<i>Nicotiana tabacum</i> ribosomal protein L27 mRNA complete cds Length=853	141/153 (92%)	200	2e-48
L28	417	BAA96367.1	Ribosomal protein L27 [<i>Panax ginseng</i>]	80/86 (93%)	159	3e-38
L60	431	AAD51109.1	Ubiquitin-conjugating enzyme UBC2 [<i>Mesembryanthemum crystallinum</i>]	122/126 (96%)	261	8e-69
L89	N199	X67045.1	<i>Solanum tuberosum</i> mRNA TPT for triose phosphate translocator Length=1567	198/199 (99%)	387	9e-105
L112	278	ABE89154.1	RNA-binding region RNP-1 (RNA recognition motif) [<i>Medicago truncatula</i>]	37/48 (77%)	83.6	2e-15
L117	356	AAV41426.1	Putative L24 ribosomal protein [<i>Ipomoea batatas</i>]	65/73 (89%)	81.3	1e-14
L171	241	CAA28450.1	ST-LS1 protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	75/75 (100%)	145	5e-34
L178	283	ABB29951.1	Ubiquitin-conjugating enzyme family protein-like [<i>Solanum tuberosum</i>]	92/94 (97%)	202	5e-51
L190	261	XP_465742.1	Putative 40S ribosomal protein S8 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	82/86 (95%)	167	1e-40
L240	258	AAB01095.1	Putative ribosomal protein [<i>Daucus carota</i>]	72/81 (88%)	147	1e-34

表 3.4 (续)

EST 编号	EST 长度	匹配序列号	同源基因 (BLASTX 和 BLASTN) 及来源	一致性	Score 值	E-值
L255	258	ABB29931.1	P40-like protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	36/51 (70%)	49.3	5e-05
L256	380	CAA49693.1	NtpII10 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	24/25 (96%)	56.6	3e-07
L289	360	CAA55641.1	Translation initiation factor (eIF-4A) [<i>Nicotiana tabacum</i>]	119/120 (99%)	241	5e-63
L363	244	ABB72816.1	Ribosomal protein L24-like protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	71/75 (94%)	151	9e-36
L464	X570	BAC23049.1	Elongation factor 1-alpha [<i>Solanum tuberosum</i>] Length=448	136/136 (100%)	273	3e-72
Cellular transport and transport mechanisms (5)						
L175	421	TC122089	Weakly similar to UPQ8T6H4 (Q8T6H4) ABC transporter ABCC.5(Fragment) partial (3%) Length = 597 [<i>Solanum tuberosum</i>]	115/140 (82%)	550	1.6e-52
L176	X435	NP_569032.1	ATFOLT1; binding / folic acid transporter [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	100/147 (68%)	190	2e-47
L314	526	CAA70968.2	Amino acid transporter [<i>Solanum tuberosum</i>]	102/115 (88%)	219	3e-56
L382	254	CAA71785.1	Plastidic ATP/ADP-transporter [<i>Solanum tuberosum</i>]	69/75 (92%)	145	4e-34
L494	474	CAA54045.1	H(+)-transporting ATPase [<i>Solanum tuberosum</i>]	56/56 (100%)	112	6e-24
Molecular chaperonin (2)						
L248	525	AAF24498.1	DnaJ-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	64/105 (60%)	129	5e-29
L378	289	CAA63965.1	DnaJ protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	73/85 (85%)	116	3e-25
Transcription factor (5)						
L55	285	ABB87130.1	Putative transcription factor BTF3-like [<i>Solanum tuberosum</i>]	92/94 (97%)	183	2e-45
L115	305	AAZ38969.1	GAMYB-binding protein [<i>Glycine max</i>]	43/56 (76%)	80.9	2e-14
L221	277	AAM34767.1	Nam-like protein 4 [<i>Petunia x hybrida</i>]	84/92 (91%)	188	5e-47
L332	134	CK716927	Zinc-finger protein Lsd1 [<i>Arabidopsis thaliana</i>] partial (15%) Length = 622	43/44 (97%)	247	2.4e-20
L373	193	TC120214	Transcription factor RAU1 partial Length = 1649 [<i>Solanum tuberosum</i>]	(36%) (97%)	278	8.6e-31

表 3.4 (续)

EST 编号	EST 长度	匹配序列号	同源基因 (BLASTX 和 BLASTN) 及来源	一致性	Score 值	E-值
Signal transduction (11)						
L77	301	AAM44274.1	Receptor-like kinase RHG1 [<i>Glycine max</i>]	74/99 (74%)	153	2e-36
L152	N163	Y11688.1	<i>Solanum tuberosum</i> mRNA for 14-3-3 protein isolate 35G Length=958	70/70 (100%)	139	3e-30
L181	110	NP_180926.1	Catalytic/ protein phosphatase type 2C/ protein serine/threonine phosphatase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	26/36 (72%)	59.3	5e-08
L244	92	ABB02651.1	Annexin p34-like [<i>Solanum tuberosum</i>]	30/30 (100%)	60.8	2e-08
L247	342	ABB86244.1	Unknown [<i>Solanum tuberosum</i>] Length=548	111/113 (98%)	226	2e-58
		AAZ32878.1	Putative ABI3-interacting protein [Medicago sativa] Length=183	70/111 (63%)	130	1e-29
L272	219	NP_195118.1	Catalytic/ protein phosphatase type 2C [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	35/54 (64%)	65.9	5e-10
L293	109	TC117177	WD-40 repeat family protein / zfw1 protein (ZFW1) identical to zfw1 protein (GI:12057164) [<i>Arabidopsis thaliana</i>] partial (17%) Length = 758	35/36 (97%)	179	2.8e-13
L330	301	AAR83888.1	Auxin-repressed protein ARP1 [<i>Capsicum annuum</i>]	52/53 (98%)	116	3e-25
L349	137	AAD12777.1	Ethylene receptor homolog [<i>Solanum tuberosum</i>]	19/19 (100%)	41.6	7e-09
L358	N284	DQ228333.1	<i>Solanum tuberosum</i> clone 145A11 ADP-ribosylation factor 1-like protein mRNA complete cds. Length=1025	281/284 (98%)	543	1e-151
L362	336	AAO92595.1	Protein kinase Pti1 [<i>Glycine max</i>]	94/111 (84%)	191	8e-48
Cell rescue and defense(30)						
L13	253	X55691.1	Tomato mRNA for a glycine-rich protein (clone w1-8) Length=619	71/77 (92%)	99.6	4e-18
L20	322	BAD07011.1	Peroxidase [<i>Coffea arabica</i>]	78/106 (73%)	163	2e-39
L51	N362	TC127470	Weakly similar to TIGR_Ath1 At3g15790.1 68416.m01999 methyl-CpG-binding domain-containing protein contains Pfam profile PF01429: Methyl-CpG binding domain partial (31%) Length = 1476 [<i>Solanum tuberosum</i>]	78/106 (73%)	368	1.2e-33

表 3.4 (续)

EST 编号	EST 长度	匹配序列号	同源基因 (BLASTX 和 BLASTN) 及来源	一致性	Score 值	E-值
L58	265	TC111772	Similar to UPQ76KW5 (Q76KW5) Class1 chitinase (Fragment) partial (95%)Length = 1319 [<i>Solanum tuberosum</i>]	50/51 (98%)	260	1.0e-21
L84	422	BAA96501.1	Cysteine protease [<i>Nicotiana tabacum</i>] Length=360	129/140 (92%)	240	1e-62
L90	618	BAA10929.1	Cytochrome P450 like_TBP [<i>Nicotiana tabacum</i>]	119/153 (77%)	207	2e-52
L91	N181	AY500290.1	<i>Solanum tuberosum</i> catalase (CAT2) mRNA complete cds Length=1761	141/146 (96%)	250	1e-63
L107	334	AAF23892.1	Pectin methyl esterase [<i>Solanum tuberosum</i>]	111/111 (100%)	236	3e-61
L118	424	CAA63482.1	Glycolate oxidase [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	133/138 (96%)	260	1e-68
L119	146	TC113130	Cytochrome P450 partial (39%) Length = 758 [<i>Solanum tuberosum</i>]	46/48 (95%)	239	1.4e-19
L126	481	AAR97905.1	Catalase [<i>Solanum tuberosum</i>]	160/160 (100%)	346	2e-94
L129	128	DQ168314.1	<i>Solanum tuberosum</i> clone 028F07 proteinase inhibitor I precursor mRNA complete cds Length=467	109/111 (98%)	204	5e-50
L155	253	CAD29291.1	Alcohol NADP+ oxidoreductase [<i>Solanum tuberosum</i>]	61/63 (96%)	137	1e-31
L158	341	BAD37413.1	Putative senescence-associated protein 5 [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	49/69 (71%)	93.6	2e-18
L160	434	AAR17080.1	Heat shock protein 70-3 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	107/109 (98%)	209	4e-53
L161	203	TC120079	Similar to TIGR_Ath1[At1g15740.1 68414.m01888 leucine-rich repeat family protein partial (14%) Length = 870 [<i>Solanum tuberosum</i>]	64/67 (95%)	334	9.8e-30
L222	405	BAA95794.1	DC1.2 homologue [<i>Nicotiana tabacum</i>]	58/66 (87%)	98.6	7e-20
L224	N118	Z48736.1	<i>L.esculentum</i> cyp-3 gene for pre-pro-cysteine proteinase Length=1388	60/61 (98%)	113	1e-22
L229	352	CAA92243.1	Metallothionein-like protein [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	27/27 (100%)	67.8	1e-10
L241	650	TC115984	Similar to TIGR_Ath1[At4g30450.1 68417.m04324 glycine-rich protein partial (91%) Length = 732 [<i>Solanum tuberosum</i>]	73/99 (73%)	353	1.6e-51

表 3.4 (续)

EST 编号	EST 长度	匹配序列号	同源基因 (BLASTX 和 BLASTN) 及来源	一致性	Score 值	E-值
L251	156	P52403	Endochitinase I precursor	50/52 (96%)	115	8e-25
L263	468	BAD15331.1	Cytochrome P450 [<i>Panax ginseng</i>]	75/127 (59%)	165	6e-40
L283	396	CAB53515.1	Cysteine protease [<i>Solanum tuberosum</i>]	93/93 (100%)	213	2e-54
L284	421	AAR21295.1	Bacterial spot disease resistance protein 4 [<i>Lycopersicon esculentum</i>] Length=1146	32/86 (37%)	51.2	1e-05
		BAD12594.1	N protein [<i>Nicotiana tabacum</i>] Length=1128	20/26 (76%)	48.5	9e-05
		AB120513.1(N)	<i>Nicotiana tabacum</i> N mRNA for N protein partial cds Length=3385	56/61 (91%)	81.8	2e-12
		TC128390	Weakly similar to UP Q75WV4 (Q75WV4) N protein (Fragment)partial (6%) Length = 645	27/30 (90%)	141	8.8e-25
		TC128391	Similar to UP Q75WV4 (Q75WV4) N protein (Fragment) partial(9%) Length = 718	479 135/169 (79%)	2.8e-27	
L292	96	AF243378	<i>Glycine max</i> glutathione S-transferase GST 23 mRNA complete cds Length=1290	70/83 (84%)	56.0	2e-05
L345	306	NP_194457.2	FMN binding / oxidoreductase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	92/101 (91%)	167	1e-40
		AAO12869.1	putative quinone reductase [<i>Vitis vinifera</i>]Length=166	93/101 (92%)	167	2e-40
L380	462	AAX20046.1	DC1.2-like [<i>Capsicum annuum</i>]	122/152 (80%)	240	2e-62
L409	307	NP_194457.2	FMN binding / oxidoreductase [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	87/96 (90%)	156	2e-37
L480	387	BAC54828.1	Vacuolar processing enzyme-1b [<i>Nicotiana tabacum</i>]	71/75 (94%)	154	1e-36
L496	111	AB061247.1	<i>Solanum tuberosum</i> StKTI mRNA for kunitz-type trypsin inhibitor, partial cds Length = 802	101/103 (98%)	188	2e-45
Function unknown and unclassified proteins (27)						
L07	395	TC118913	Similar to TIGR_Ath1 At4g14900.1 68417.m02288 hydroxyproline-rich glycoprotein family protein. Partial Length = 1868 [<i>Solanum tuberosum</i>]	131/131 (100%) (76%)	692	4.7e-68
L10	N282	BT013941.1	<i>Lycopersicon esculentum</i> clone mRNA sequence Length=1334	132964F (92%)	217/235	319 3e-84

表 3.4 (续)

EST 编号	EST 长度	匹配序列号	同源基因 (BLASTX 和 BLASTN) 及来源	一致性	Score 值	E-值
L11	N115	AB061265.1	<i>Solanum tuberosum</i> StLTSR mRNA for low temperature and salt responsive protein complete cds. Length=469	37/38 (97%)	60	1e-06
L14	431	YP_173415.1	Hypothetical protein NitaMp073 [<i>Nicotiana tabacum</i>]	50/52 (96%)	110	7e-32
L16	117	NP_195300.1	Unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	20/37 (54%)	49.3	5e-05
L18	420	AF542504.1	<i>Solanum soganardinum</i> dehydrin-like protein (ci18) mRNA complete cds Length=417	134/139 (96%)	236	5e-59
L42	251	AAT39006.1	AML1 [<i>Solanum tuberosum</i>]	63/63 (100%)	133	3e-30
L46	120	TC121148	Weakly similar to UPQ9XIC8 (Q9XIC8) F23M19.10 partial (13%) Length = 1867 [<i>Solanum tuberosum</i>]	40/40 (100%)	208	1.0e-15
L116	428	ABA40468.1	Drm3-like protein [<i>Solanum tuberosum</i>]	45/45 (100%)	52.8	5e-06
L131	318	AAX20042.1	Proline-rich protein [<i>Capsicum annuum</i>]	78/100 (78%)	130	2e-29
L137	155	TC111753	Similar to UPQ9LKW3 (Q9LKW3) Dehydration-induced protein ERD15 partial (88%) Length = 1103 [<i>Solanum tuberosum</i>]	49/50 (98%)	257	9.9e-22
L145	392	ABA91466.1	Helix-hairpin-helix motif putative [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)]	83/100 (83%)	169	4e-41
L170	451	BAA06153.1	CR9 [<i>Cucumis sativus</i>]	80/142 (56%)	124	2e-27
L236	N295	AJ320154.2	<i>Solanum tuberosum</i> partial ds2 gene and promoter region Length=2522	125/126 (99%)	242	5e-61
L259	309	TC127349	Similar to TIGR_Osa19636.m01010 expressed protein partial(46%) Length = 534 [<i>Solanum tuberosum</i>]	85/88 (96%)	431	7.6e-40
L264	384	CAJ30047.1	Conserved hypothetical protein [<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>]	23/36 (63%)	47.8	3e-09
L271	N329	AB061241.1	<i>Solanum tuberosum</i> mRNA for extensin partial cds Length=797	323/329 (98%)	597	9e-168
L302	276	XP_482181.1	Membrane protein-like [<i>Oryza sativa</i> (japonica cultivar-group)] Length=465	72/91 (79%)	66.6	3e-10
L310	230	AAD28682.1	Hypothetical protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	37/74 (50%)	68.2	1e-10

表 3.4 (续)

EST 编号	EST 长度	匹配序列号	同源基因 (BLASTX 和 BLASTN) 及来源	一致性	Score 值	E-值
L352	236	CAB79969.1	Glycine hydroxymethyl transferase (EC 2.1.2.1)-like protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	31/58 (53%)	60.8	2e-08
L357	211	TC121644	Similar to UPQ42461 (Q42461) High mobility group protein partial (56%) Length = 787 [<i>Solanum tuberosum</i>]	68/69 (98%)	329	2.8e-29
L426	329	AAM96970.1	Putative wound-induced protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	34/92 (36%)	51.2	1e-05
L433	N235	AJ620906.1	<i>Antirrhinum majus</i> mRNA for STY-L protein Length=2865	180/216 (83%)	143	3e-31
L438	561	AAP21362.1	At2g21970 [<i>Arabidopsis thaliana</i>]	103/159 (64%)	180	2e-44
L467	412	TC126992	Weakly similar to TIGR_Osa19630.m03531 expressed protein partial (71%) Length = 778 [<i>Solanum tuberosum</i>]	58/73 (79%)	303	1e-35
L472	344	TC128455	Length = 915 [<i>Solanum tuberosum</i>]	115/115 (100%)	581	6e-56
L489	399	AAS80139.1	Arachidonic acid-induced DEA1 [<i>Lycopersicon esculentum</i>]	54/54 (100%)	81.3	4e-16
No match (8)						
L5	421	No match				
L15	157	no match				
L136	112	No match				
L139	120	No match				
L185	155	No match				
L214	278	No match				
L367	208	No match				
L423	329	no match				

* 首先在 GenBank 中进行 BLASTX 比对, 无同源性序列的 EST 继续进行 BLASTN 比对; 其次对仍无同源性序列的 EST 在 TIGR 中进行 BLASTX 比对和 BLASTN 比对。

表中用黄色标出的 ESTs 为本试验获得的 GenBank 中尚未在马铃薯中报道的差异表达的 ESTs, 如 L489。

* 指命中序列和查询序列之间的联配值, 联配值越高, 命中序列和查询序列之间的相似性就越高。

* 用来衡量命中序列和查询序列匹配的显著程度, E-值越小, 命中序列和查询序列之间的相似性仅仅是出于偶然的机会就越小。

表3.5 马铃薯青枯病抗性相关基因
Table 3.5 Bacterial wilt resistance-related genes in potato

EST 编号	抗病相关同源基因	EST 编号	抗病相关同源基因
Signal recognition		L251	Endochitinase 1 precursor
L284	N protein fragment	L452	Putative vacuolar protein sorting; Vps29p
Signal transduction and transcription factor		System rescue and protection	
L55	Transcription factor BTF3-like	L13	Tomato mRNA for a glycine-rich protein
L77	Receptor-like kinase RHG1	L107	Pectin methyl esterase
L115	GAMYB-binding protein	L158	Senescence-associated protein 5
L152	14-3-3 protein isolate 35G	L222	[<i>Nicotiana tabacum</i>] DC1.2 homologue
L181	Catalytic/ protein phosphatase type 2C/ protein serine/threonine phosphatase	L229	Metallothionein-like protein
L221	Nam-like protein 4	L241	Similar to glycine-rich protein
L244	Annexin p34-like	L380	[<i>Capsicum annuum</i>] DC1.2-like
L293	WD-40 repeat family protein	L480	Vacuolar processing enzyme-1b
L330	Auxin-repressed protein ARP1	Other related pathogen-resistance genes	
L332	Zinc-finger protein Lsd1	L20	Peroxidase
L349	Ethylene receptor homolog	L84	[<i>Nicotiana tabacum</i>] cysteine protease
L358	ADP-ribosylation factor 1-like protein	L91	Catalase (CAT2)
L362	Protein kinase Pti1	L118	Glycolate oxidase
L373	Transcription factor RAU1	L126	Catalase
Hypersensitive response, HR		L129	Proteinase inhibitor I precursor mRNA
L90	[<i>Nicotiana tabacum</i>]cytochrome P450 like TBP	L155	Alcohol NADP+ oxidoreductase
L119	[<i>Solanum tuberosum</i>] Cytochrome P450	L161	Similar to leucine-rich repeat family protein
L160	Heat shock protein 70-3	L224	Pre-pro-cysteine proteinase
L263	[<i>Panax ginseng</i>] cytochrome P450	L283	[<i>Solanum tuberosum</i>] cysteine protease
System acquired resistance		L292	Glutathione S-transferase
L51	Methyl-CpG-binding domain-containing protein	L409	FMN binding / oxidoreductase
L58	Class1 chitinase (Fragment)	L496	Kunitz-type trypsin inhibitor

3.4 讨论

3.4.1 基于 SSH 方法所得结果的可靠性

为了获得马铃薯与青枯病菌非亲和性互作中早期诱导表达的抗性相关基因,本研究采用抑制差减杂交技术构建了富集青枯病抗性相关基因的cDNA文库。SSH方法通过差减杂交,引入均一化步骤和两次选择性PCR扩增,使得低丰度表达基因得以高于1000倍的富集,增加了低丰度表达基因(EST)的检出效率。同时采用改进的青枯病菌接种方法对马铃薯茎段进行接菌处理,感病基因型在接菌后2天即表现出萎蔫症状,而抗病基因型无明显症状,这不仅可使抗感基因型尽快区分出来,而且还增加了取材时期的准确性。本实验采用接菌后6h和12h作为取样时间点来研究马铃薯受青枯病菌侵染后早期基因的表达,与采用改进的接菌方法接菌处理抗感基因型的表现也是吻合的。

在进行的8个基因Northern印迹和半定量RT-PCR验证结果表明:它们中有7个基因受病菌的诱导,且在12h之前就已经启动表达,不仅与反向Northern的筛选结果吻合,也与接菌后6h和12h作为取样时间点相符,同时也进一步证明了差异筛选结果的可靠性。*Actin*基因在所测序的600个克隆中仅出现1次,说明经过消减后*Actin*基因和其它组成性表达基因被有效的去除,预示着所建SSH文库中大部分基因应为差异表达基因。

在文库构建过程中,尽管已经对样品中不同丰度的转录本进行了均一化,但仍然发现在所构建的SSH文库中有些EST的出现频率远远高于其它的EST,这与反向Northern的结果是一致的,出现频率越高的EST,其反向Northern的杂交信号也越强,这是否预示着这些基因在马铃薯的抗病反应中起着重要的作用尚需进一步研究。

3.4.2 SSH 是获得新基因和低丰度表达基因的有效方法

自上世纪90年代中期以来,陆续出现了基于转录水平的相关技术和方法,如:DNA微阵列(Schena, *et al.* 1995)、cDNA扣除杂交及基因表达系列分析(Serial Analysis of Gene Expression, SAGE)(Velculescu, *et al.* 1995)等。DNA微阵列和SAGE具有高通量、大范围等优点,并已经广泛应用于动物、植物、微生物和人等不同的领域,但由于受检测灵敏度的限制,对于低丰度表达转录本的研究并非十分有效(Evans, *et al.* 2002)。对于DNA微阵列,由于受探针和互补RNA(DNA)杂交效率的影响,甚至有些高丰度的转录本也有可能检测不到(Cao, *et al.* 2004)。SSH技术由于引入了均一化步骤,目标群体内的转录本得到相对的均一化,使得检测低丰度的转录本成为可能(Diatchenko, *et al.* 1996)。Cao等(2004)通过研究单核细胞分化成骨髓细胞过程中转录模式的变化,比较了SSH和GeneChip在基因发现上的应用:利用差减后的cDNA制作cRNA探针,采取基因芯片技术对SSH cDNA进行了筛选,结果表明在SSH文库中已鉴定的基因中有多于一半的基因在基因芯片中未能检测出来。这些基因中有些基因为新基因,有些为芯片中不存在这些基因探针的基因。并且有些基因尽管在芯片中存在相应的探针,但仍有相当一部分基因不能被检测到。因此,在转录模式研究中,特别是在新基因发现和低丰度转录本的鉴定方面,SSH是有效的,并可被用来作为基因芯片的备选方法或互补访法。本试验利用

SSH 方法获得的差异表达基因 (EST) 中, 有 13% 的基因 (EST) 只能找到与其具有较低同源性的序列 (E -值 $>10^{-10}$), 并且 7% (8 个克隆) 的无同源序列, 这些基因可能为新基因或低丰度表达基因。

3.4.3 信号识别相关 EST

植物受到病原侵染, 首先发生病原与植物的识别, 继而引发大量的信号传导。N 基因是一个典型的 NBS-LRR 类抗病基因, 它作为一个受体特异的与病原无毒基因的表达产物 (配体) 进行识别, 从而限制病原的复制和运动引发抗病反应, 符合典型的基因对基因假说 (Flor, 1971; Whitham, *et al.* 1994; Erickson, *et al.* 1999)。N 基因受烟草花叶病毒 (TMV) 的强烈诱导, 在 TMV 接种后 30h, 其 mRNA 的积累量相当于未接种对照的 38 倍, 40h 后积累量下降, 并且这种诱导具有特异性, 如它不受马铃薯 Y 病毒的诱导 (Michal Levy, *et al.* 2004)。本研究获得的 EST L284 与 N 基因 3' 端 23 个氨基酸具有 82% 的一致性, 与其 3' 端 51 个核苷酸具有 94% 的一致性, 可能是 N 基因的同源物, L284 受青枯病菌的诱导, 其表达模式与 TMV 诱导的 N 基因的表达模式是一致的, 说明青枯病菌的侵染和烟草花叶病毒的侵染可能具有类似的信号途径。JA 是抗病反应中的重要信号分子, 具有引发植物抗病反应的作用, 但 L284 却不受 JA 的调节 (数据未列出), 有关该 EST 对应基因的详细信息, 尚需进一步探讨。

3.4.4 信号转导和转录因子

3.4.4.1 信号转导

信号转导是植物与病原互作过程中重要的信息传递过程, 在此过程中将会引发一系列的抗病防御反应, 如过敏反应, 系统获得性抗性, 细胞自救和自我保护等。本研究中至少有 14 个基因参与了信号转导过程, 如: L181 (磷酸酯酶 2C)、L77 (类受体蛋白激酶 RHG1)、L349 (乙烯受体蛋白)、L152 (14-3-3 蛋白)、L362 (蛋白激酶 Pti1) 等。

渗透胁迫下, 磷酸酯酶 2C (protein phosphatase 2C, PP2C) 在有丝分裂蛋白激酶途径中起重要作用 (Shiozaki and Russell, 1995; Meskiene, *et al.* 1998), 并且 FsPP2C1 (一种新的磷酸酯酶 2C) 受 ABA 的诱导, 但干旱胁迫却对其不起作用。而当用 GA 进行处理时, 该基因表现为下调 (Oscar, *et al.* 2001), 本实验所获 EST L181 与磷酸酯酶 2C 高度同源, 青枯病菌处理后该基因下调表达, 推测它可能通过与 GA 相似的途径来调节磷酸酯酶 2C 基因的表达。

14-3-3 蛋白 (L152) 家族高度保守, 存在于几乎所有研究的真核生物中, 可结合 200 多种磷酸化蛋白。14-3-3 结合的配体 (binding partner) 几乎涉及到细胞的每一个过程, 并且 14-3-3 蛋白在这些过程中起着关键性的作用。14-3-3 蛋白首先从人的大脑中被分离出来, 是识别转录后修饰的磷酸化蛋白的第一个蛋白 (Muslin, *et al.* 1996)。在人体中 14-3-3 蛋白可与致癌基因产物及人类疾病相关蛋白互作, 这种互作的中断将会导致一系列疾病的发生, 如癌症等 (Benzinger, *et al.* 2005; van Heusden, 2005)。乙烯是一种非常重要的植物激素, 参与植物的整个生长发育过程, 同时它还参与植物对生物逆境和非生物逆境的响应 (Bleecker, *et al.* 2000)。乙烯信号可被膜蛋白受体感知, 如拟南芥中的受体 ETR1/ETR2, ERS1/ERS2 和 EIN4 可感知乙烯信号并作为受体对乙烯具

有负调控作用 (Chang, *et al.* 2001; Guo, *et al.* 2004), 本研究中L349是一个乙烯受体的同源物, 可能参与对乙烯信号的识别。

3.4.4.2 转录因子

转录因子在植物的抗病反应起着重要的作用 (Robatzek, *et al.* 2001; Vaillau, *et al.* 2002; Mengiste, *et al.* 2003; Oh, *et al.* 2005), 并且有些转录因子受病原或水杨酸的快速诱导, 如: *WRKY* 基因 (Eulgem, *et al.* 1999; Robatzek and Somssich, 2001; Ulker, *et al.* 2004; Liu, *et al.* 2005), 推测本研究所获的5个转录因子 (L55, L332, L115, L221和 L373) 可能在马铃薯抗青枯病反应中也具有重要的作用。*AMYB* (*L115*) 是目前研究的最为透彻的转录因子, 该转录因子调节淀粉酶基因的表达 (Gubler, *et al.* 1995), 在大麦的糊粉层细胞中其转录和翻译均受赤霉素(GA)的诱导 (Gubler, *et al.* 1995, 2002), 近来研究认为*GAMYB*可能作为转录复合体的一部分, 在基因转录和翻译两个水平上均受调节 (Fiona, *et al.* 2003)。*LSD1* (*L332*) 编码锌指蛋白, 与GATA类转录因子同源, 在抗病反应过程中首先表现出负调控作用, 即限制抗病反应的启动和HR的扩展, 当信号强度超过一个阈值 (threshold) 时, 该基因被完全激活引起类HR的细胞死亡而参与抗病反应 (Dietrich, *et al.* 1994; Dietrich, *et al.* 1997; Rustérucci, *et al.* 2001)。最近研究发现水稻中*LSD1*的同源物*OsLSD1* 也是一个锌指蛋白, 对程序性细胞死亡和细胞分化也具有调节作用 (Wang, *et al.* 2005)。

3.4.5 过敏反应与系统获得性抗性

过敏反应是植物抗击病原侵染的基本的植物细胞保护机制, 细胞色素P450基因可能参与HR反应中抗病复合物的生物合成 (Zhou, *et al.* 1999; Fernandez, *et al.* 2004)。并且*HSP70*基因家族的成员也是植物抗病信号转导的基本成分 (Kanzaki, *et al.* 2003)。曾有研究报道*PAD3* 基因是拟南芥抗*Alternaria brassicicola*反应中抗病复合物合成所必须的 (Zhou, *et al.* 1999), 本研究中*L119*和*L263*及*L160*分别与细胞色素P450和热休克蛋白70-3高度同源, 因此可以推测*L119*和*L263*及*L160*也可能参与了马铃薯的类过敏反应。

过敏反应后信号的传递将引发植物的系统获得性抗性 (system acquired resistance, SAR) 和相应的细胞自救和自我保护反应 (Ryals, *et al.* 1996), 系统获得性抗性将赋予植物非特异性的广谱抗性。本研究中发现至少4个基因可能参与了此过程 (表2)。*L51*可能编码含有甲基化CpG结构域的蛋白, 研究表明: 在真核基因组中二联体CpG中胞嘧啶的甲基化是一个非常普遍的特征, DNA甲基化与基因的失活密切相关, 甲基化将导致基因的表达受到抑制, 并且甲基化和去甲基化调节着基因的表达 (Razin, 1998), 如在胚胎发生过程中, 看家基因保持非甲基化状态, 而组织特异性基因则被甲基化, 当组织特异性基因被诱导转录时则被去甲基化 (Bergman, *et al.* 1998)。几丁质酶 (*L58*) 是一个众所周知的病程相关蛋白, 在植物体内通常维持低水平表达, 但当植物受到真菌、细菌或其它病原的侵染时, 将强烈的受到诱导而表达 (Neuhaus, 1999; van Loon, 1999), 并且几丁质酶也可通过间接释放寡糖作为激发子 (elicitors) 来引发其它植物的抗病反应 (Shibuya, *et al.* 2001)。

3.4.6 马铃薯与青枯病菌互作中的抗病防御

植物经过长期的进化已经发展了自身复杂的抗病防御体系,当受到病原侵袭时首先表现为抗侵入,即结构系统的阻碍作用如细胞壁的加厚、角质化、胼胝质的形成、加固和木质素沉积;继而引发一些局部抗病反应和产生系统获得性抗性等。和其它的植物与病原互作一样,马铃薯在与青枯病菌的互作中,其本身也启动了一大批防卫基因和多重防卫反应来干扰和阻止病原的入侵,如细胞壁蛋白的快速积累、代谢酶活性的提高、病原物酶抑制剂产生、HR反应和SAR的产生及其它抗病相关基因的表达(表3.4)等。在马铃薯中尽管已发现了许多抗病相关基因,但这些基因在植-病互作中扮演何种角色目前还不十分清楚。

果胶甲基酯酶(Pectin methyl esterase, PME)作为作用于果胶的第一个酶,不仅在植物生理上起着重要的作用,在其它方面也具有重要作用(Giovane, *et al.* 2004),如:PME在植物细胞壁上可以作为烟草花叶病毒运动蛋白的受体,这对于该病毒粒子在胞间连丝间的运动是必须的。果胶甲基酯酶抑制子(Pectin methylesterase inhibitors, PMEIs)作为果胶甲酯酶的调节子,同样参与了植物的抗病防御来阻止病毒粒子的转运和繁殖(Dorokhov, *et al.* 1999)。本研究L380与果胶甲基酯酶抑制子蛋白高度同源,可能是其蛋白家族的一个成员,在马铃薯抗青枯病防御过程中与果胶甲基酯酶抑制子具有相似的功能。

植物的液泡加工酶(Vacuolar processing enzyme (L480), VPE)与动物的半胱氨酸蛋白酶caspase具有相似的功能,VPE的缺乏对植物过敏反应中的细胞死亡和胚胎发生早期的限制层细胞(limited cell layers)的死亡具有阻止作用。植物不像动物那样具有巨噬细胞,因此死亡细胞的清除必须依靠自身降解来完成,并且VPE在植物的抗病防御和生长发育过程中具有调节溶解酶系的重要作用(Hara-Nishimura, *et al.* 2005)。同时研究表明,VPE在病毒诱导的HR反应的细胞死亡中也具有重要作用(Hatsugai, *et al.* 2004)。

在很多植物种中,有关富甘氨酸蛋白(L241)的报道也比较多,该类蛋白不仅受病原的诱导,还受生长素、ABA、水杨酸、损伤等的诱导(Sachetto-Martins, *et al.* 2000),如:在大麦和真菌病原*Erysiphe graminis*和*Rhynchosporium secalis*的亲性和非亲性的互作中,Hvgrp-2和Hvgrp-3基因均分别被诱导,并且它们受JA和乙烯的调节(Molina, *et al.* 1997)。

金属硫因子对重金属具有较强的结合能力,并参与动物和真菌细胞解毒过程,同时它们还与几种大脑疾病有关(Ebadi, *et al.* 1995)。在植物中目前仅有少数几篇有关类金属硫因子的报道:如类金属硫因子基因的表达受损伤和烟草花叶病毒侵染的诱导(Choi, *et al.* 1996)或受重金属和硫脲药物(thioloxidising drug diamide)的影响(Giritch, *et al.* 1998)等,表明这些基因也可能在植物生理上扮演着重要的角色,本研究所分离的类金属硫因子片段(L229)的功能尚不清楚,需进一步研究。

本研究共获得216个非重复EST,反向Northern 筛选得到123个差异表达的EST中,除22%的功能未知或已知功能而未分类和8%的无同源序列外,其余70%的EST分属于初级代谢、能量代谢、细胞结构、调控、蛋白合成/修饰/加工、转运相关、抗病防御、转录相关和信号传导等生命过程。其中至少有44个(37%)参与了马铃薯的抗青枯病反应,如L58、L119 (Neuhaus, 1999; Fernandez,

et al. 2004) 等。除利用反向Northern 筛选得到的123个差异表达EST外, 其它93个非重复EST中也有可能部分为差异表达, 只是由于它们表达差异较小, 而未能利用反向Northern筛选出来, 这些基因中的部分基因也可能在马铃薯的抗病防卫反应中具有重要的作用。总之这些EST的分离初步展示了马铃薯与青枯病菌非亲和性互作过程中早期表达的抗病相关基因的种类和数量。目前为止, 除少数几个基因, 如: *StSN2* 和 *API* 在马铃薯上报道过与青枯病抗性有关 (Berrocal-lobo, *et al.* 2002; Feng, *et al.* 2003) 外, 未见有其它相关的报道。尽管还有很多工作要做, 但本研究已为我们提供了一些有益的数据, 对于我们理解马铃薯与青枯病菌的互作, 提高对马铃薯青枯病抗性的认识等具有重要作用, 同时有些EST也可能被进一步转化为分子标记用于标记辅助育种。

第四章 马铃薯青枯病抗性相关基因 cDNA 的分离及表达分析

在植物中普遍存在依赖于茉莉酸/乙烯 (JA/ethylene) 的信号传导途径, 而 JA 在植物-病原互作中, 又是寄主抗病防卫系统中极为重要的信号分子, 有研究表明: JA 对于马铃薯晚疫病的基本抗性 (basal resistance) 也是非常重要的 (Halim, *et al.* 2006)。前文通过构建 SSH 文库已获得了一批青枯病抗性相关基因的 EST 片段, 并对部分基因的青枯病菌诱导表达模式进行了研究。为了进一步获得这些基因的相关信息, 本文拟在前文研究的基础上, 采用 RACE 方法, 对感兴趣的部分青枯病抗性相关基因, 进行 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增, 以期获得全长 cDNA, 并进一步利用半定量 RT-PCR 方法研究其 JA 诱导表达模式, 为后续的功能研究奠定基础。

第一节 马铃薯青枯病抗性相关基因 (全长) cDNA 的获得

4.1.1 引言

克隆目的基因 cDNA 的方法有多种, 以核酸杂交技术为基础的 cDNA 文库筛选法是较为常用的一种方法, 该方法较为繁琐, 假阳性率往往较高, 所获得的克隆有时不够完整, 但是它可避免 PCR 非特异性扩增或错配, 因此仍然被认为是一种准确可靠的 cDNA 克隆方法而受到研究者的青睐。近年来, RACE (rapid amplification of cDNA ends) 技术的提出为快速克隆全长 cDNA 提供了方便。该方法不需接头连接合成双链 cDNA, 而直接以单链 cDNA 为模板进行扩增, 避免了合成双链 cDNA 时, 转录本丰度差异的放大, 对于获得低丰度转录本的全长 cDNA 较为有效。由于在利用 BD SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 合成 cDNA 时, 在引物末端加入了少数几个 dG, 使得反转录酶到达 RNA 的末端时, 只有带 dC 的 RNA 才能被进一步的延伸, 从而最大限度的保证了完整 5' 端的获得。本文既是采用该方法对来自青枯病菌侵染马铃薯叶片的总 RNA 合成 cDNA 单链, 进行 RACE PCR 扩增以获得全长 cDNA, 为今后该基因的表达模式研究和功能研究奠定基础。

4.1.2 材料与方法

4.1.2.1 试验材料与处理

采用茎枝菌液共培养法接种处理二倍体高抗青枯病基因型 ED13, 所用病原菌为青枯病菌小种 3 号 PO41 (具体接菌处理方法见 2.2.3.1), 分别于病原菌处理 6h 和 12h 时取样, 液氮冷却后, -80℃ 保存。所用试剂和药品同 3.2.1。

4.1.2.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

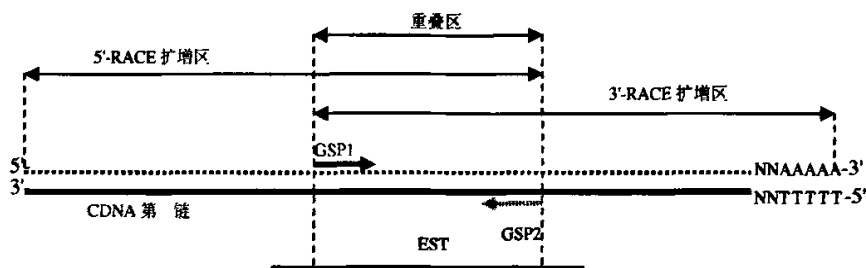
总 RNA 的提取采用 TRIZOL[®] Regent 一步法抽提试剂盒 (Invitrogen, USA), 依试剂盒说明书

进行。提取接菌处理6h和12h的马铃薯叶片的总RNA，等量混合后分光光度计测定其OD值，并电泳检测所提取总RNA的质量。参照BD SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit (Clontech公司)的操作说明书，以1 μ g总RNA为模板，利用试剂盒提供的逆转录引物 (SMART IVTMOligonucleotide: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGG-3'; 5'-CDS Primer: 5'-(T)₂₅VN-3'; 3'-CDS Primer A: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTAC(T)₃₀VN-3')，在BD PowerScriptTM 逆转录酶作用下合成5'-RACE-Ready cDNA和3'-RACE-Ready cDNA第一链。

4.1.2.3 RACE

不同大小的EST，采用不同的全长cDNA克隆策略 (图4.1.1)，较短的EST采用图4.1.1A策略，较长的EST采用图4.1.1B策略。具有3'末端的EST只进行5'-RACE的PCR扩增，具有5'末端的EST只进行3'-RACE的PCR扩增。因此在进行引物设计时，充分考虑EST的长度，依据EST片段的测序与检索结果，分别在L51、L77、L129、L181、L222和L362序列内部设计基因特异引物 (GSP)，引物序列见表4.1.1。分别利用Universal Primer A (SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit) 和GSP2引物扩增cDNA 5'端；Universal Primer A和GSP1引物扩增cDNA 3'端。最后根据扩增片段与已有EST的重叠区将cDNA 5'和3'端拼接起来。PCR反应体系参见SMARTTMRACE cDNA Amplification Kit说明书。

A: 较短 EST 的全长 cDNA 克隆策略



B: 较长EST的全长cDNA克隆策略

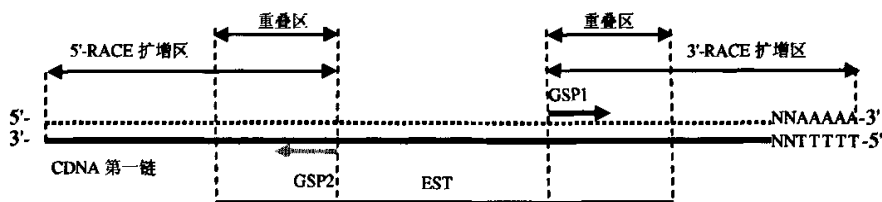


图4.1.1 RACE克隆全长cDNA 策略

Fig. 4.1.1 Strategies for full-length cDNA cloning by RACE

表4.1.1 用于RACE的基因特异引物

Table 4.1.1 Gene specific primers used for RACE

引物名称	引物序列 (5'----3')	对应EST的长度	对应EST是否包括 polyA
L51-GSP1	CAGCCAAGGATGGAGGCAAAC	363	否
L51-GSP2	CTACATTCTCCTCTCTCCAAGCC		
L77-GSP1	GCCAACAAGGATGAGAATAGCA	302	否
L77-GSP2	CTCGCCTTTCGTCCCTAAGTAA		
L129-GSP1	GGAGGGAAAGAGTATGCTCAAGTT	129	否
L181-GSP1	ACATGGAGGATGAACATATC	111	否
L181-GSP2	CCATGGCCATCAAAGAC		
L222-GSP2	ACTTTCCTCCGTTTCATCGCTTT	406	是
L362-GSP1	ACACAGTAACCAAGCAACTC	336	否
L362-GSP2	CCTGCGTTGTCTTTGGATG		

4.1.2.4 PCR 产物的克隆与测序

采用QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) 回收、纯化特异的PCR扩增产物，通过T-A连接插入到pMD-18T载体上（大连宝生物公司），转化大肠杆菌TOP10感受态细胞（北京天为时代公司），蓝白斑法筛选阳性重组子并进行PCR鉴定，确证阳性克隆后，单菌落培养菌液送上海生工公司测序，所得序列利用BLAST软件在NCBI上比对分析。

4.1.3 结果与分析

4.1.3.1 总RNA的提取

所提取的马铃薯叶片总RNA经电泳检测，如图4.1.2。18s和28s rRNA带型清晰可辨，紫外分光光度计检测OD₂₆₀/OD₂₈₀在1.9-2.0之间，证明抽提的RNA质量和纯度符合要求。

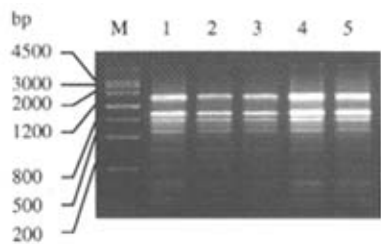


图4.1.2 总RNA 电泳质量检测(部分)

M: DNA marker III 1-3: 青枯病菌处理样品 6h 的总 RNA 4-5: 青枯病菌处理样品 12h 的总 RNA

Fig. 4.1.2 Electrophoresis detection of total RNA on 1.5% agarose gel

M: DNA marker III 1-3: Total RNA of 6h post Rs-inoculated samples 4-5: Total RNA of 12h post Rs-inoculated samples

4.1.3.2 RACE-PCR产物分析

分别取5 μl 5'-RACE和3'-RACE扩增产物进行1.2%琼脂糖胶电泳，图4.1.3示出了对应于不同EST的RACE扩增结果：多数RACE-PCR扩增特异性较好，但也有部分扩增呈smear状或多带，如图4.1.3D中181-5为多带（两条主带）。

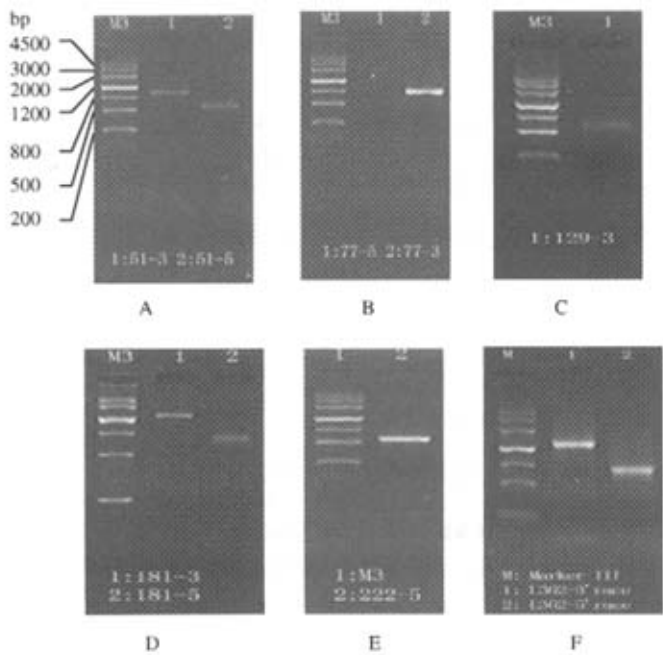


图4.1.3 5'-RACE和3'-RACE 结果

A: L51的5'-和3'-RACE产物 B: L77的5'-和3'-RACE产物 C: L129的3'-RACE产物

D: L181的5'-和3'-RACE产物 E: L222的5'-RACE产物 F: L362的5'-和3'-RACE产物

Fig. 4.1.3 5'-RACE and 3'-RACE results.

A: 5'- and 3'-RACE products of L51 B: 5'- and 3'-RACE products of L77 C: 3'-RACE products of L129

D: 5'- and 3'-RACE products of L181 E: 5'-RACE products of L222 F: 5'- and 3'-RACE products of L362

4.1.3.3 序列分析

将所得的5'-RACE和3'-RACE的PCR产物克隆测序，去除载体序列和引物序列后，在NCBI上进行BLAST比对分析，若比对结果与对应EST序列在NCBI上的BLAST比对结果一致，则认为所获得的RACE扩增产物与该EST为同一个基因的不同片段，并通过它们的重叠进行拼接，若比对结果不一致，则认为是不一样的基因片段。将拼接后的序列再次在NCBI上进行BLAST比对分析，并与对应EST序列的BLAST比对结果进行比较以进一步验证。

L129包含一个完整的351bp的开放读码框架（Open Reading Frame, ORF），5'端有18bp的非翻译区（un-translate region, UTR），3' 端具有完整的PolyA尾，PolyA上游有加尾信号AATAAAA

(Rothine, 1996), 编码区编码116个氨基酸(图4.1.4a), 并且该基因5'端具有跨膜区和信号肽, 符合典型的蛋白酶抑制子结构。该基因已在GenBank注册, 登记序列号为DQ822994, 该基因暂命名为*StPI*。*StPI* cDNA序列与马铃薯蛋白酶抑制子 I 前体cDNA (GenBank序列号: DQ168314.1) 核苷酸序列有89%的同源性, 与其编码的氨基酸序列 (GenBank序列号: AAZ94182.1) 有74%的同源性(图4.1.4b)。同时氨基酸序列的同源性比对还表明, *StPI* 基因与马铃薯蛋白酶抑制子 I 基因的5'端同源性较高, 而与其3'端同源性较低, 可能是该类基因的5'端较为保守, 而其3'端相对是易变的, 尚需探讨。

```

1   ATAAAATAAAAGCAAA ATG GAG GGA AAG AGT ATG CTC AAG TTA TCT CAT GTG CTT GCT TTC TTG CTT
    M E G K S M L K L S H V L A F L L
70  T GCA TCA CTT TTT CAA TCA CTG ATG GCA AGA GAT TTG ATC AGT GAT GGC ATA GAA GTA CTG CAA
    A S L F Q S L M A R D L I S D G I E V L Q
136 T CTG GAA AAT GAA ATC CAA GAT GTA TTG TGC CCA GGT AAG CAA TCA TGG CCT GAA CTT GTT GGG
    L E N E I Q D V L C P G K Q S W P E L V G
201 G CCA GCA GAA TAT GCT AAG AAA ATA ATT GAG AAG GAA AAT CCC ATA GCT CAT GAT ATT AGA GTT
    K P A E Y A K K I I E K E N P I A H D I R V
267 A TTT CCT GGT ATG CTT AGG CCA TCT AAT TAT GTT TGT GGT AGA GTT TTT CTG GTT GTT GAC TGG
    F P G M L R P S N Y V C G R V F L V V D W
333 G GCC ATT GTT AAA ATT ACT CCC ATA ATG GGT TAATTAATTATTTATGGGAACATTATGTTATGAAAAATA
    E A I V K I T P I M G *
406 TAAAGTGGAGATACTAAATATAGTGTCTTCATGTACTTTACTATTTCAGATAAAATAAACTAATGTTCTTAAAAA
489 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

```

图 4.1.4a *StPI* 基因核酸序列及推断氨基酸序列

推导氨基酸序列标示于相应核苷酸之下; 加尾信号用黑体标出; 非编码区用下画线标出; * 标示终止密码子。

Fig. 4.1.4a Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of the potato *StPI* gene

The nucleotide sequence is numbered on the left. The deduced amino acid sequence is shown underneath the corresponding nucleotide sequence. The un-coding region is underlined. A putative polyadenylation signal is bolded. Stop code indicated with *.

```

StPI 19  MEKGSMLKLSHVLAFLLLASLFQSLMARDLISDGIEVLQI-LENEIQDVLCPGKQSWPEL 195
        MEKGSMLKLSHVLAFLLLASLFQ LMARDLISDGIEVLQ+ +EN+ + V CPGKQSWPEL
pI-I 1   MEKGSMLKLSHVLAFLLLASLFQPLMARDLISDGIEVLQLPVENDGEFVFCPGKQSWPEL 60

StPI 196 VGKPAEYAKKIIKENPIAHDIRVLPFPGMLRPSNYVCGRVFLVVDWEAIVKITPIMG 366
        VGK A YAK++IEKEN I H++++LFPGM +P NYVCGRVFLV+++ +V+++TP MG
pI-I 61  VGKSAGYAKQVIEKENSIVHEVKLLFPMPKPLNYVCGRVFLVNFVKLVVQVTPSMG 117

```

图4.1.4b 马铃薯*StPI*基因氨基酸序列与马铃薯蛋白酶抑制子 I 前体氨基酸序列比较

Fig. 4.1.4b Comparison of deduced amino acid sequences of potato *StPI* gene with potato proteinase inhibitor I precursor

L222包含一个完整的594bp的开放读码框架(Open Reading Fram, ORF), 5'端有66bp的非翻译区(un-translate region, UTR), 3'端具有完整的PolyA尾, 编码区编码194个氨基酸(图4.1.5a), 并且该基因与*StPI*相似, 在其5'端也具有跨膜区和信号肽, 符合典型的蛋白酶抑制子结构。该基因已在GenBank注册, 登记序列号为: DQ822993, 该基因暂命名为*StPMEI*。*StPMEI* cDNA序列与烟

草果胶甲脂酶抑制子DC1.2 cDNA (GenBank序列号: AB009888.1)的核苷酸序列有85%的同源性, 与其编码的氨基酸序列 (GenBank序列号: BAA95794.1) 有78%的同源性 (图4.1.5b)。同时氨基酸序列的同源性比对还表明, *StPMEI* 基因与烟草果胶甲脂酶抑制子基因的3'端同源性较高, 而与其5'端同源性较低, 可能是该类基因的3'端较为保守, 而其5'端相对是易变的, 尚需探讨。

```

1   GATCAGCTCACTAGCTTTAGTTATTGAGAAACAAAACAAAAGCTTAGAGAAAAGAGAGAAATG GAA GGT TGT TGT
                                     M   E   G   C   C
82  AAT TAT AAC CAT TAC AAC TTT CTC ACT GTC TTT CTT ATT TTA TTA GCC TTC ACT ACT GCA GCA AGG
    N   Y   N   H   Y   N   F   L   T   V   F   L   I   L   L   A   F   T   T   A   A   R
148 CCA GAT TCG GGA GAA ACA AAT AGA GAG TTT ATA CGA ACA TCA TGT AAG TCA ACA ACT TAT CCT AAC
    P   D   S   G   E   T   N   R   E   F   I   R   T   S   C   K   S   T   T   Y   P   N
214 CTA TGT TTC AGT TCA TTA TCA AGC CGT TCA AGT GCT ATT GGA GTT TCT CCA CAA CTT CTA GCA CAT
    L   C   F   S   S   L   S   S   R   S   S   A   I   G   V   S   P   Q   L   L   A   H
280 GAA TCC CTC TCC GTT AGC ATC GAA ACA GCC CAA TCA ACA TCC ACC ATG ATC AAG GTG GCA CAC
    E   S   L   S   V   S   I   E   T   A   Q   S   T   S   T   M   I   K   V   A   H
346 AGT CAA GGC ATG ACG CCT AGA GAG GTA GGC GCC ATG CAA GAC TGT GTG GAG GAA TTA AGT GAC ACA
    S   Q   G   M   T   P   R   E   V   G   A   M   Q   D   C   V   E   E   L   S   D   T
412 GTA AGT GAA CTC AGA AAA TCT TTA GGA GAA ATG AAG CAA TTA AGG GGA AGA GAT TTT GAC ATG AAA
    V   S   E   L   R   K   S   L   G   E   M   K   Q   L   R   G   R   D   F   D   M   K
478 ATG AGT GAT ATT CAA ACA TGG GTA AGT GCT GCC TTA ACC AAC GAA GAC ACC TGC ACG GAA GGG TTC
    M   S   D   I   Q   T   W   V   S   A   A   L   T   N   E   D   T   C   T   E   G   F
544 GCC GGA AAA GCG ATG AAC GGG AAA GTT AAG ACA GTA GTA AGG GAA AAG ATA CTT GAA GTT GCA CAT
    A   G   K   A   M   N   G   K   V   K   T   V   V   R   E   K   I   L   E   V   A   H
610 ATG ACG AGT AAT GCT TTG GCT ATC AAC AGA CTT GCC GCT CTT CAC GGC TGAAGTAATTGAAACGACA
    M   T   S   N   A   L   A   L   I   N   R   L   A   A   L   H   G   *
681 ATTAATATATATACATATTAATGTTTAAATCGATCTTCCTTTAGAAAAAAAGTATACTTAATTCATGCTAAGTTGATTGTTGTA
769 TAGATAAAGATGATTGTTTGATGAATTGTTAAATCAAAATATTCATATGCATTGTTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
857 AAAAAAAAAA

```

图 4.1.5a *StPMEI* 基因核酸序列及推断氨基酸序列

推导氨基酸序列标示于相应核苷酸之下; 非编码区用下划线标出; * 标示终止密码子。

Fig. 4.1.5a Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of the potato *StPMEI* gene.

The nucleotide sequence is numbered on the left. The deduced amino acid sequence is shown underneath the corresponding nucleotide sequence. The un-coding region is underlined. Stop code indicated with *.

```

StPMEI 68  MEGCCNYNHYNFLTVFLILLAFTT-----AARPDSETNREFIRTSCCKSTTYPNLCF 223
          MEG CN N +F T+FLIL+ FT+      AARP +G+TN EFIRTSCCKSTTYPNLCF
DC1.2 1   MEGTCN-NRSHFQTLFLILVVFTSSSFTEVSAAARPVAGDTNTEFIRTSCCKSTTYPNLCF 59

StPMEI 224 SSLSSRSSAIGVSPQLLAHESLSVSIETAQSTSTMIVKVAHSQGMTPREVGAMQDCVEEL 403
          SSLSSR++AIGVSPQLLAHESL+VS+ETAQSTS M+++AH QGMTPRE+GAM DCVEEL
DC1.2 60  SSLSSRATAIGVSPQLLAHESLTVSLETAQSTSVTMVELAHGQGMTPREIGAMHDCVEEL 119

StPMEI 404 SDTVSELRKSLGEMKQLRGKDFDKMSDIQTWVSAALTNEDTCTEGFAGKAMNGKVKTVV 583
          SD V ELRKSLGEMKQLRG+DFD+KMSDIQTWVSAALT+EDTCTEGFAGK MNGKVKTVV
DC1.2 120 SDAVVVELRKSLGEMKQLRGKDFDKMSDIQTWVSAALTDEDTCTEGFAGKVMNGKVKTVV 179

StPMEI 584 REKILEVAHMTSNALALINRLAALHG 661
          R +IL+VAHMTSNALALIN LAA HG
DC1.2 180 RGRILDVAHMTSNALALINSLAAFHG 205

```

图4.1.5b *StPMEI*基因氨基酸序列与烟草果胶甲脂酶抑制子DC1.2 氨基酸序列比较

Fig. 4.1.5b Comparison of deduced amino acid sequences of *StPMEI* gene with tobacco DC1.2 homologue

*L51*只在氨基酸水平上与MBD11 (DNA结合蛋白) 具有较低的同源性 (图4.1.6), 未找到与之同源的核酸序列; *L77*与水稻类受体激酶RHG1 (GenBank序列号: AF506517.1) 的核苷酸具有80%的一致性, 与其氨基酸具有69%的一致性 (图4.1.7)。推测*L51*和*L77*可能代表新基因。

>gi15232694|ref|NP_188200.1| MBD11; DNA binding [*Arabidopsis thaliana*] Score= 123 bits (308), Expect = 1e-26 Identities = 65/102 (63%), Positives = 72/102 (70%), Gaps = 2/102 (1%) Frame = +2

```

L51      59  VELPAAPLSWKKLLMPKKGVRAKKNEVVFVAPTGEEIRNKRQLEKYLKTHNGNPGMSEFD 238
          VELPA P SWKKL P K   KK EVVFVAPTGEEI N++QLE+YLK+H GNP ++EFD
MBD11    10  VELPA-PSSWKKLFYPNKGVSVKKTEVVFVAPTGEEISNRKQLEQYLKSHPGNPAIAEFD 68

L51      239 WTAGEAPRRSARISQVKAMPLPAVLEPAKKRQRTSYATKKK 364
          WT   PRRSARIS+K KA P P   EP KKR RT   KK
MBD11    69  WTTSGTPRRSARISEKTKATPSPD-KEPPKKRGRTKSPVSKK 109

```

图4.1.6 马铃薯*L51*编码氨基酸序列与MBD11氨基酸序列比较

Fig. 4.1.6 Comparison of deduced amino acid sequences of potato gene *L51* with *MBD11*

>gi21239382|gb|AAM44274.1| receptor-like kinase RHG1 [Glycine max]
 gi21239380|gb|AAM44273.1| receptor-like kinase RHG1 [Glycine max]
 Length=855 Score = 355 bits (911), Expect = 2e-96 Identities = 188/274 (68%), Positives = 221/274 (80%), Gaps = 11/274 (4%) Frame = +1

```

L77      1   TVYRATLEDGSQVAVKRMREKITKVQREFEKEVNVLGKIRHPNLLAIRAYYLGTKGEKLL 180
          TVY+A LEDGSQVAVKR+REKI K REFE EV+VLGKIRHPN+LA+RAYYLG KGEKLL
RHG1     582 TVYKAILEDGSQVAVKRLREKIAKGHREFESEVSVLGKIRHPNVLALRAYYLGPKGEKLL 641

L77      181 IFDYMPKGSLSNFLHARGPDTPIDWPTRMKIAKGTTRDCCTSYYCQHHS——WESTSS 345
          +FDYM KGSL++FLH G +T IDWPTRM+IA   +D   +C H           TSS
RHG1     642 VFDYMSKGSLSAFLHGGGTETFDWPTRMKIA——QDLARGLFCLHSQENIIHGNTSS 697

L77      346 NVLLDENTDAIITDYGVSrvvTAAANSNVIVTAGALGYRAPELNKPKKANVKTdVYSLGV 525
          NVLLDENT+A I D+G+SR+++ ANSNVI TAGALGYRAPEL+K KKAN KTD+YSLGV
RHG1     698 NVLLDENTNAKIADFGLSRLMSTTANSNVIATAGALGYRAPELSKLKANTKTDIYSLGV 757

L77      526 IILELLTGKSPGEAVNGVVDLPRKVASIVKEEGTKEVFDLELMKDASIIGDELLVTLKLA 705
          I+LELLT KSPG ++NG +DLP+ VAS+VKEE T EVFD +LM+DAS +GDELL TLKLA
RHG1     758 IILELLTRKSPGVSMMNG-LDLPQWVASVVKEEWTNEVFDADLMRDASTVGDENLTLKLA 816

L77      706 LHCVDPSPTRPQLQVLRQLEDIRRE-TPTAGP 804
          LHCVDPSPS RPE+ QVL+QLE+IR E + TA P
RHG1     817 LHCVDPSPSARPEVHQVLQQLEEIRPERSVTASP 850

```

图 4.1.7 马铃薯*L77*编码氨基酸序列与水稻类受体激酶基因RHG1的氨基酸序列比较

Fig. 4.1.7 Comparison of deduced amino acid sequences of potato gene *L77* with *RHG1*

电泳和测序结果表明: *StPI*和*StPMEI*为全长cDNA, 其它4个因测序未成功或序列太长并存在复杂结构未测通, 尚未获得对应基因的全长cDNA (表4.1.2)。

表4.1.2 RACE的最终总结
Table 4.1.2 Final results of RACE

EST 编号	5'-RACE	3'-RACE	是否全长	与NCBI的BLASTX 比对结果	一致性	E-值
L129	—	+	是	Proteinase inhibitor I precursor [Solanum tuberosum]	74%,	2e-30
L222	+	—	是	DC1.2 homologue [Nicotiana tabacum]	78%,	4e-74
L51	+	+	不确定	MBD11 (methyl-CpG-binding domain); DNA binding protein [A. thaliana]	63%,	2e-26
L77	+*	+	否	Receptor-like kinase RHG1 [Glycine max]	68%,	2e-96
L181	+	+*	否	Catalytic/ protein phosphatase type 2C/ protein serine/threonine phosphatase [A. thaliana]	42%,	5e-22
L362	+*	+	否	Protein kinase Pti1 [Glycine max]	87%	2e-169

*已获得RACE PCR结果，但测序未成功或序列太长并存在复杂结构未测通。

4.1.4 讨论

RACE技术自（Frohman, *et al.* 1988）首次报道以来，已被成功地应用于植物基因克隆中，如：获取全长cDNA（Reddy, *et al.* 2001; Lingle, *et al.* 2001），制备筛选cDNA文库的探针（Chen, *et al.* 2000），克隆已知片段的旁侧序列（陈渝萍等, 1999），分离调控元件或被选择性剪接的特殊转录物等（Klein, *et al.* 1998）。但是该技术也存在一些局限：①对于较长的基因，一次RACE很难获得全长cDNA；②由于RACE扩增时所用引物只有一端是基因的特异引物，因此在RACE的PCR产物中，可能会有一些非特异性扩增产物，使得扩增结果出现多条带或smear状，致使目的片段的选择变得较为困难，特别是对于多基因家族更是如此，因此如何提高扩增的特异性至关重要。

合理的设计引物是成功RACE的重要因素，较高的GC含量（55~70%）和较高的Tm值（70℃以上）是提高PCR产物特异性的必要条件，设计引物时尽量避开保守区，准备材料时应尽量选择目的基因高表达组织和高表达时间取材；遇到非特异性扩增时应进一步利用巢式引物进行PCR扩增，以获得特异的产物。对于较长片段的获得，可使用LD-PCR（long distance PCR）方法或采用多次循环RACE方法进行。本试验通过不同的基因采用不同的RACE策略，快速获得了两个基因的cDNA全长和四个基因cDNA的5'和3' RACE的PCR产物。

RACE所得的片段与对应的EST拼接后所得序列在NCBI上的比对结果与对应EST的比对结果是一致的，说明通过RACE所获得的EST两侧序列与对应EST为同一个基因不同的片段。BLAST比对和功能预测结果表明：这些EST所对应的基因在非亲和性植-病互作过程中分别参与信号识别、信号传导、抗病防御等，在马铃薯抗青枯病反应中很可能具有重要的作用。其中已获得全长cDNA的两个基因（L129和L222）分别与马铃薯蛋白酶抑制子基因和烟草果胶甲脂酶抑制子同源。蛋白酶抑制子参与植物的抗病防御及植物程序性细胞死亡等，而果胶甲脂酶抑制子与果胶甲脂酶可协同作用调节细胞壁的稳定性和参与细胞壁的重建。

第二节 马铃薯青枯病抗性相关基因的诱导表达

4.2.1 引言

马铃薯对青枯病的抗性研究目前仍处于初级阶段,相关的文献报道较少,因此人们对于马铃薯的青枯病抗性的了解也较少,马铃薯抗青枯病机制及病菌入侵后的信号传导途径尚不清楚。为探讨青枯病抗性相关基因可能的信号转导途径,本实验拟采用半定量 RT-PCR 的方法对感兴趣的几个基因在不同时间点的青枯病菌和 JA 的诱导表达进行分析,为进一步的功能研究获取更多有益的信息。

4.2.2 材料与方法

4.2.2.1 试验材料 with 处理

青枯病菌接菌处理:采用茎枝菌液共培养法接种处理二倍体高抗青枯病基因型ED13,所用病原菌为青枯病菌小种3号PO41(具体接菌处理方法见2.2.3),分别于病原菌处理0h、6h、12h、24h、48h、72h和96h 时取样,液氮冷却后, -80℃保存。

JA诱导处理:取生长正常、旺盛、整齐、无其它病虫害的块茎繁殖的二倍体马铃薯抗病基因型ED13植株和感病基因型ED25,待植株长至7-8片展叶时,用50 μmol/L的JA进行喷洒,同时以喷水作为对照,分别于0h、3h、6h、12h、24h、48h和72h 取样,液氮冷却后, -80℃保存。

所用试剂和药品同3.2.1.

4.2.2.2 总RNA的提取及cDNA第一链的合成

分别提取青枯病菌处理0h、6h、12h、24h、48h、72h、96h, JA和水处理0h、3h、6h、12h、24h、48h、72h的马铃薯叶片总RNA。提取方法及总RNA质量检测同5.1.2.2。采用Superscript II (Invitrogen) 逆转录酶,以oligo-dT(18) 为引物(上海生工)逆转录合成cDNA第一链。

4.2.2.3 青枯病菌和JA诱导表达

依据所获得的两个全长cDNA序列(*StPI*和*StPMEI*)及已有青枯病菌诱导表达模式的基因(EST)序列和它们相应的RACE结果,分别设计*StPI*、*StPMEI*、*L51*、*L77*、*L181*和*L362*的正向和反向基因特异引物(表4.2.1)。以*Actin*基因作为内参(引物序列见3.2.3.2),采用半定量RT-PCR方法研究其青枯病菌和JA诱导表达模式。PCR扩增条件为:94℃ 3min; 94℃ 30s, 52-56℃ 45s, 72℃ 60s, 17-35个循环; 72℃延伸5 min。PCR产物进行1.0%的琼脂糖凝胶电泳,根据扩增的DNA条带的亮度来判断基因在不同时间点的表达水平。为了使所分析基因在不同时间点的表达具有可比性,首先对起始cDNA第一链的用量进行了调整(见3.2.7)。

表4.2.1 用于RT-PCR的基因特异引物

Table 4.2.1 Gene specific primers used for RT-PCR

引物名称	引物序列 (5'----3')
StPI-F	TGCTTTCTTGCTTCTTGCATC
StPI-R	TTTAACAATGGCCTCCCAGTC
StPMEI-F	CAAGCCGTTCAAGTGCTATTG
StPMEI-R	CGTGCAGGTGTCTTCGTTG
L51-F	AAGGAAGGCTTGGAGAAGGAG
L51-R	CCCTTGTCCTCCATTTCAACTT
L77-F	AGGGCTACATTAGAAGATGG
L77-R	CTATTCTCATCCTTGTTGGC
L181-F	ACATGGAGGATGAACATATC
L181-R	CCATGGCCATCAAAGAC
L362-F	ACACAGTAACCAAGCAACTC
L362-R	CCTGCGTTGTCTTTGGATG

4.2.3 结果与分析

4.2.3.1 两个具有全长cDNA基因的青枯病菌及JA诱导表达

*StPI*基因同时受青枯病菌和JA的诱导,在6-12小时内即达到最高表达水平,然后回到其自然低水平,但二者又有明显不同。相对而言,*StPI*基因受青枯病菌的诱导较慢(图4.2.1A),而受JA的诱导较为强烈。在JA处理3h表达量即明显升高,6-12h迅速升至最高(图4.2.1B),相反在水处理对照中该基因的表达量没有明显变化(图4.2.1C)。说明正常情况下该基因在植物体内维持低水平表达,以调节其基本的代谢,当受到病原入侵或非生物胁迫时,该基因受到进一步的激活,从而表现出表达量的升高,推测该基因可能参与马铃薯对青枯病的抗病反应,同时也说明对于该基因而言,病菌处理和JA刺激可能采用相似的或同一个信号传导途径。

*StPMEI*基因受青枯病菌诱导表现为急剧下调,在*Rs*处理24h后,几乎难以检测到*StPMEI*基因的表达(图4.2.2A),这可能由于青枯病菌的侵染对该基因的表达具有抑制作用。相反,该基因受JA的强烈诱导,JA处理6h,已明显上调表达,12h-24h表达量急剧上升而达到最高,48h后又下降至自然低水平(图4.2.2B)。预示着对于*StPMEI*基因而言,青枯病菌的侵染刺激和JA处理具有不同的信号途径,同时也说明该基因在植物细胞中可能具有多种功能。图4.2.2C示出了水处理对照中该基因的表达情况。

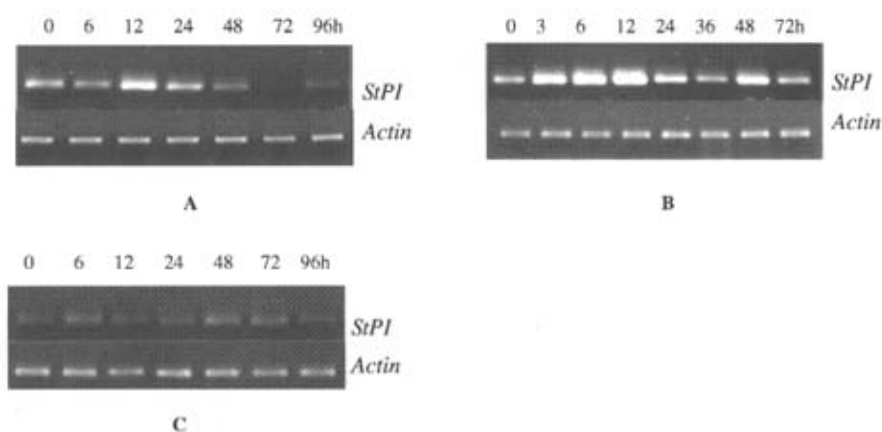


图 4.2.1 青枯病菌处理不同时间下 *StPI* 基因的 RT-PCR 分析。

RT-PCR 模板来源于不同处理、不同接种时期样品反转录合成的 cDNA 第一链，并根据持家基因 *Actin* 的 PCR 扩增量来调整模板用量。A：青枯病菌诱导处理的样品。B：JA 诱导处理的样品。C：对照水处理的样品。

Fig. 4.2.1 RT-PCR analysis of transcript levels of *StPI* gene in potato leaves.

cDNA was synthesized using oligo(dT). Primers for *Actin* gene were used to verify that quantity of cDNA template for each sample was equal. Different time points are indicated on the top of the figure. A: inoculated with *Rs* at different time points. B: treated with JA at different time points. C: treated with water at different time points.

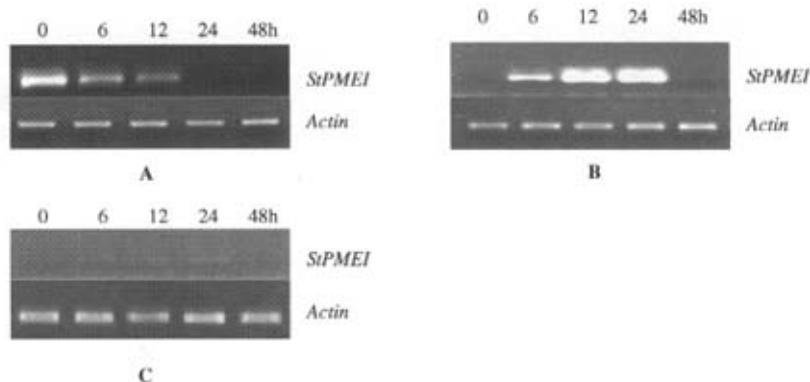


图 4.2.2 青枯病菌处理不同时间下 *StPMEI* 基因的 RT-PCR 分析

RT-PCR 模板来源于不同处理、不同接种时期样品反转录合成的 cDNA 第一链，并根据持家基因 *Actin* 的 PCR 扩增量来调整模板用量。A：青枯病菌诱导处理的样品。B：JA 诱导处理的样品。C：对照水处理的样品。

Fig. 4.2.2 RT-PCR analysis of transcript levels of *StPMEI* gene in potato leaves.

cDNA was synthesized using oligo(dT). Primers for *Actin* gene were used to verify that quantity of cDNA template for each sample was equal. Different time points are indicated on the top of the figure. A: inoculated with *Ralstonia solanacearum* at different time points. B: treated by JA at different time points. C: treated with water at different time points.

4.2.3.2 尚未获得全长cDNA基因的JA诱导表达

本研究利用半定量RT-PCR方法研究了 *L51*、*L77*、*L181*和*L362*的JA诱导表达模式，从电泳图谱

(图4.2.3)可以看出,它们在不同的材料中表达各异:

*L51*在JA处理和对照水处理的抗病基因型ED13中均无PCR扩增产物,在JA处理的感病基因型ED25中,PCR扩增呈Smear状,无明显的特异条带,推测*L51*可能不受JA的诱导。

*L77*只在JA处理的抗病基因型ED13中有特异PCR扩增产物,且不受JA的调节,而在对照水处理的抗病基因型ED13和JA处理的感病基因型ED25中扩增均呈Smear状,并且在感病基因型中Smear状产物的分子量较目标PCR产物稍小一点,可能是在感病基因型中不存在类受体激酶*L77*,由PCR非特异性扩增所致。

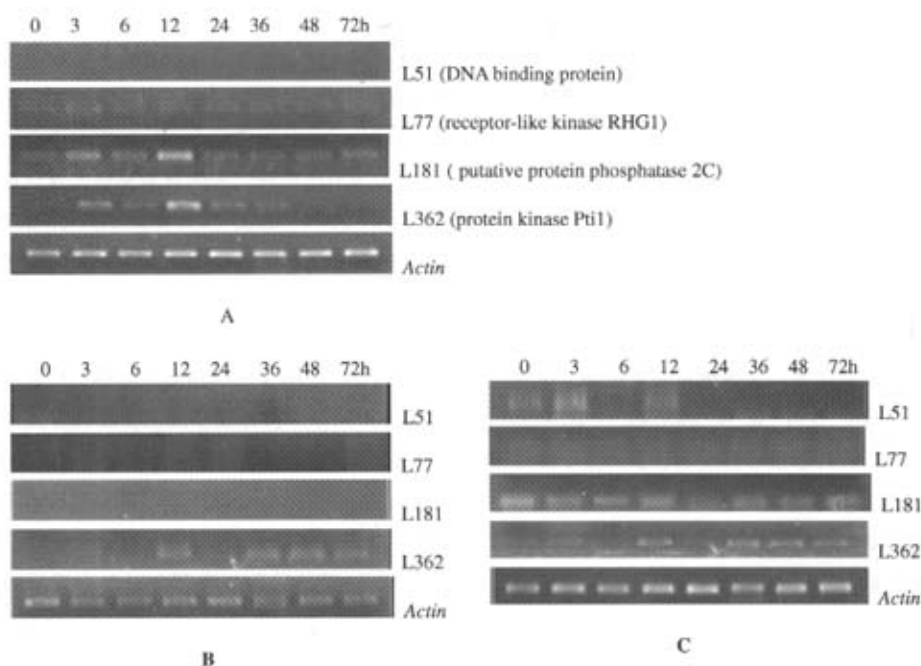


图4.2.3 JA诱导后几个基因的RT-PCR分析

A: JA处理后抗病基因型ED13中的基因表达 B: 水处理后抗病基因型ED13中的基因表达

C: JA处理后感病基因型ED25中的基因表达

Fig. 4.2.3 RT-PCR analysis of several potato genes in different JA-treated potato leaves.

A: Gene expression analysis of potato disease-resistance genotype ED13 treated with JA.

B: Gene expression analysis of potato disease-resistance genotype ED13 treated with water.

C: Gene expression analysis of potato susceptible genotype ED25 treated with JA.

*L181*在抗病基因型中受JA的诱导, JA处理后3小时已明显开始上调表达,但12h后其表达量又逐渐降低(图4.2.3a),这与利用青枯病菌处理后该基因的下调表达(图3.11a)恰好相反,预示着在抗病基因型ED13中,对于*L181*而言,病菌处理和JA刺激可能采用不同的调节途径。在对照水处理的抗病基因型中无PCR扩增产物,可能是由于该基因的丰度太低所致。在JA处理的感病基因型ED25中,该基因不受JA调节。说明该基因在抗病和感病材料中均存在,只是由于在抗病材料中受诱导表达而行使其功能。

L362在抗病基因型中受JA的诱导,为上调表达,并于6至12小时内达到最高,而后又逐渐降低,这与利用青枯病菌处理后其诱导表达模式(图3.11b)相似,但JA诱导后该基因上调表达明显提前,而其维持高表达水平的时间也明显缩短。该基因在对照水处理的抗病基因型和JA处理的感病基因型中的表达呈波浪型,究其原因,尚待进一步研究。

4.2.4 讨论

4.2.4.1 蛋白酶抑制子在植物的抗病反应中具有重要作用

蛋白酶抑制子是一类小蛋白,几乎存在于所有的生命体中(Fritz, 2000),并且它不仅存在于植物种子、块根、块茎等储藏器官中,也存在于非储藏器官中,如叶、花和根(Brzin and Kidric, 1995; De Leo, *et al.* 2002; Sin and Chye, 2004)。植物蛋白酶抑制子参与植物的抗病防御和植物内源蛋白酶的调节(Mosolov, *et al.* 2001; Birk, 2003),其参与植物的抗病防御主要是通过抑制参与致病过程的外来病原的蛋白酶或消化酶活性,从而导致病原缺乏必须氨基酸的供应而达到抗病防御的目的(De Leo, *et al.* 2002),也可通过干扰外来病原的生理生化过程,如干扰病毒的复制、酶的活性等(Gutierrez-Campos, *et al.* 1999)来起作用。自第一个蛋白酶抑制子从大豆中分离出来后,现已有495个蛋白酶抑制子从129个不同的植物中相继被分离和鉴定(De Leo, *et al.* 2002)。

植物抵御病原的最好办法是加强自身的防卫能力。蛋白酶抑制子是植物体内自然存在的病程相关蛋白,特别是在植物种子和一些受胁迫的特异组织中,植物受到病原侵袭时所发生的最为普遍的抗病防御反应就是激活这些基因来赋予植物自然抵抗能力(Koiwa, *et al.* 1997; Fan, *et al.* 2005)。利用蛋白酶抑制子基因,特别是源自植物的抑制子基因进行基因转移创造具有抗病虫性的工程植株具有广阔的前景(Boulter, 1993),如转 *Vigna unguiculata* 的胰蛋白酶抑制子基因(trypsin inhibitor gene)的烟草植株具有对病虫的广谱抗性(Hilder, *et al.* 1987)。蛋白酶抑制子在植物对真菌侵染中的抗病防御及调节植物程序性细胞死亡中也具有重要作用(Solomon, *et al.* 1999; Soares-Costa, *et al.* 2002)。根据蛋白酶抑制子的同源性及其二硫键和起功能作用位点的拓扑关系可将其分为几个基因家族,其中丝氨酸蛋白酶抑制子是植物中普遍存在的,也是研究的较为透彻的一类(Haq, *et al.* 2004),该基因家族中的成员对于植物抗病防御具有重要作用。

在植物的抗病信号转导中研究的较为深入的两个信号转导途径为水杨酸(SA)途径和茉莉酸/乙烯(JA/Et)途径,二者在信号转导通路中既有重合又相对独立(Bostock, 2005)。但目前人们对SA在马铃薯的抗病反应中所起的作用尚不十分清楚,有研究表明:JA处理可增加马铃薯对晚疫病菌的基本抗性(basal resistance)(Halim, *et al.* 2006)。植物蛋白酶抑制子在马铃薯叶片中的表达存在两个独立的调控途径:JA途径和ABA途径(Fan, *et al.* 2005),但JA和ABA又可对于某些基因进行协同调节,这依赖于具体的基因和反应(Chao, *et al.* 1999)。本研究所获得的*StPI*基因与马铃薯蛋白酶抑制子 I 前体的核苷酸具有89%的一致性,与其编码的氨基酸序列具有74%的一致性,说明*StPI*基因也是马铃薯蛋白酶抑制子基因家族的成员,在马铃薯的抗青枯病的反应中也可能具有重要作用。*StPI*基因在马铃薯中同时受青枯病菌的诱导和JA的调节,均为上调。推测在信号转导中青枯病菌侵染刺激与JA处理可能共用某一成分,或采用相似的信号转导途径来调节该基因的表达,但*StPI*基因是否也受SA的调节或受JA-ABA的协同调节及其在植物中的详细功能及确切转导途径尚需进一步探讨。

4.2.4.2 PME1与PME协同作用调节细胞壁的稳定性和参与细胞壁的重建

果胶甲酯酶抑制子 (PMEI) 对于果胶甲酯酶 (Pectin methyl esterase, PME) 具有抑制作用, 而 PME 是作用于果胶的第一个酶, 不仅在植物生理上, 在其它方面也具有重要作用 (Giovane, *et al.* 2004), 如参与植病互作 (Chen, *et al.* 2000; Chen and Citovsky, 2003)。自第一个 PME1 从猕猴桃 (kiwi fruit) 中分离出来后 (Camardella, *et al.* 2000; Giovane, *et al.* 2004), PME1 陆续从其它植物种中被分离和鉴定 (Wolf, *et al.* 2003; Raiola, *et al.* 2004)。PMEI 具有热稳定性, 如自香蕉中分离的 PME1 在开水中温育 3h 仍然有 80% 的抑制酶活性 (Wu, *et al.* 2002), 随着人们对于 PME1 研究的深入, PMEI 也已被应用于许多方面, 如在橙汁中加入 PMEI 将会阻止橙汁中固形物的丧失, 从而可在 5℃ 下保存 9 个月 (Castaldo, *et al.* 1991)。

果胶甲酯酶作用于细胞壁可能存在两种相对的方式: 成熟 PME 自高尔基体分泌出来进入细胞壁后, 一方面通过线性 (linearly) 作用于同型半乳糖醛酸 (植物), 使得催化产生的具有非酯化的羧基基团 (blocks of unesterified carboxyl groups) 与细胞壁中 Ca^{2+} 作用形成不溶性的果胶酸盐 (脂), 致使细胞壁中的内源多聚半乳糖醛酸酶的活性受到了限制, 从而加固细胞壁; 另一方面通过随机 (randomly) 作用于同型半乳糖醛酸 (如在细菌和真菌中), 引起质子的释放, 促使内源多聚半乳糖醛酸酶表现出活性, 从而使得细胞壁变的疏松 (Nari, *et al.* 1986; Moustacas, *et al.* 1991; Micheli, 2001; Vorwerk, *et al.* 2004)。研究表明: 同型半乳糖醛酸的去甲基化程度不仅可直接影响细胞壁的稳定 (Micheli, 2001) 和根发育、茎延长及果实成熟等重要生理过程 (Frenkel, *et al.* 1998; Wen, *et al.* 1999; Pilling, *et al.* 2000; Brummell and Harpster, 2001), 还可作为烟草花叶病毒运动蛋白的受体参与植-病互作 (Chen, *et al.* 2000; Chen and Citovsky, 2003)。

果胶甲酯酶抑制子 (Pectin methylesterase inhibitors, PMEIs) 通过作用于果胶甲酯酶形成 1:1 的非共价可逆复合体而起作用, 这种复合体的稳定性受 pH 的强烈影响, 二者的亲合力随 pH 的降低而升高, 致使 PME 的活性受到抑制。同时 pH 的降低也使得细胞中的糖苷酶和糖基转移酶被激活, 而糖苷酶和糖基转移酶对于细胞壁的扩展和建立具有重要作用 (Ricard, *et al.* 1986), 这预示着 PME 的活性可以通过直接调节 pH 或 PME 与 PMEI 的亲合力来实现 (Giovane, *et al.* 2004)。

本研究所获得的 *SlPMEI* 基因的表达受青枯病菌侵染的抑制, 这可能会导致因 PMEI 的量不足而无法形成足够的非活性状态的 PME:PMEI 复合物, 从而使 PME 表现出活性, 通过催化产生的具有非酯化的羧基基团与细胞中 Ca^{2+} 作用形成不溶性的果胶酸盐 (脂), 加固细胞壁达到早期防御病原侵染的目的。同时该基因又受 JA 的诱导而上调表达, 推测这可能会使得 PME 以非活性的 PME:PMEI 复合物形式存在, 引起细胞内 pH 的降低, 最终使得细胞中的糖苷酶和糖基转移酶被激活, 这对于细胞壁的扩展和新细胞壁的建立具有重要作用。PME 的功能较为复杂, 而 PMEI 究竟如何通过抑制 PME 而起作用尚不十分清楚, 有关本研究所获得的 *SlPMEI* 基因在马铃薯中所扮演的角色正在进一步研究中。

4.2.4.3 植物类受体激酶参与抗病防御

植物类受体激酶 (L77) 属于 RLK/Pelle 基因大家族, 受体激酶在动物中具有重要的生理作用, 如动物的内毒素受体激酶不仅在动物生理上起着重要作用, 而且具有先天性的免疫反应以防御外来病原的入侵 (O'Neill, 2002)。与动物相似, 植物中的类受体激酶在植物的生长、发育和抗病防御反应等方面也起着重要的作用 (Torii, 2000; Becraft, 2002; Dievart and Clark, 2003)。植物中第一

个类受体激酶是从玉米中发现的 (Walker and Zhang, 1990), 后来又陆续在其它很多植物种中被发现, 目前已知仅在拟南芥基因组中就有至少 600 个类受体激酶 (Shiu, *et al.* 2004), 而在变形虫和动物中只有 1-6 个 RLK/Pelle 基因成员 (Shiu and Blecker, 2003), 并且尚未在真菌中发现 RLK/Pelle 的同源物。典型的植物类受体激酶具有信号序列、跨膜区和 C-末端 (van der Geer, *et al.* 1994)。研究发现在拟南芥中, 大约 75% 的类受体激酶具有信号序列和跨膜区, 但也有一些不具有信号序列 (Silva and Goring, 2002)。本研究获得的 RHG1-like 受体激酶 (L77) 受青枯病菌的诱导 (图 3.11b), 但却不受 JA 的调节, 推测 RHG1-like 受体激酶也可能作为受体参与了信号识别和抗青枯病反应。

4.2.4.4 磷酸酯酶 2C 对 JA 的响应

渗透胁迫下, 磷酸酯酶 2C (protein phosphatase 2C, PP2C) 在有丝分裂蛋白激酶途径中起重要作用, 并且 FsPP2C1 (一种新的磷酸酯酶 2C) 受 ABA 的诱导, 但干旱胁迫却对其不起作用 (Shiozaki and Russell, 1995; Meskiene, *et al.* 1998)。而当用 GA 进行处理时, 该基因表现为下调 (Oscar, *et al.* 2001), 本实验所获 EST L181 与磷酸酯酶 2C 高度同源, 受青枯病菌的诱导呈下调表达 (图 3.11a), 推测它可能与 GA 通过相似的途径来调节磷酸酯酶 2C 的表达, 但该基因在 JA 的处理下表现为上调。看来要弄清 L181 的调控机制尚需进一步探讨。

4.2.4.5 蛋白激酶 Pti1 类似物可能功能

植物的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 Pto 和细菌的无毒基因产物 AvrPto 的特异识别引发了番茄对细菌病原 *P. syringae* 的抗病反应, 符合典型的基因对基因学说。Pti1 与 Pto 相似, 也是一个丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因, 位于 Pto 基因的下游, 在体外其编码产物可被 Pto 特异磷酸化, 在体内参与 HR 反应, 并且该基因的过量表达将增加植物抵御病原侵袭的 HR 反应, 从而赋予植物抗性, 因此, Pti1 基因在 Pto 基因介导的抗病反应具有重要作用 (Zhou, *et al.* 1995; Sessa, *et al.* 1998)。近来, Tian 等 (2004) 从大豆中分离了一个 Pti 基因的同源类似物 GmPti1, GmPti1 基因的编码蛋白也具有 Ser/Thr/Tyr 结构域, 该基因受水杨酸和损伤的诱导。本试验获得的蛋白激酶 Pti1 类似物 (L362) 同时受青枯病菌和 JA 的诱导, 均为上调表达, 与上述报道相符, 推测该蛋白激酶 Pti1 类似物在马铃薯的抗青枯病的反应中发挥着重要作用。

第五章 cDNA 文库结合 RACE 方法克隆马铃薯

DnaJ-like 基因全长 cDNA

构建富集抗病相关基因的马铃薯 SMART-cDNA 文库, 对于系统研究马铃薯与青枯病菌互作分子机理和从中获取抗病相关基因的全长 cDNA 非常重要。而 RACE 方法又提供了快速获得全长 cDNA 的策略。因此, 本文拟通过构建 SMART-cDNA 文库结合 RACE 方法克隆分子伴侣 *DNAJ-like* 基因的全长 cDNA, 并对其在茉莉酸诱导下的表达动态进行研究, 为深入探讨该基因的功能奠定基础。

第一节 富集青枯病抗性相关基因 SMART-cDNA 文库的构建

5.1.1 引言

经典 cDNA 文库的构建方法都是采用 Gubler-Hoffman 方法或者 Gubler 的引物-接头改良法 (Gubler-Hoffman, 1983), 但是该方法较为繁琐, 因此本实验采用 SMART (switching mechanism at 5' end of RNA transcript) (Chenchik, *et al.* 1994) 和 LD-PCR (long distance PCR) (Barnes, *et al.* 1994) 技术进行 cDNA 文库的构建。SMART 方法主要有两个优点: 第一, 在起始第一链的合成时, 引入末端转移酶活性, 当反转录到达 5' 端时, 末端转移酶将在 cDNA 新合成链的 3' 末端加上几个核苷酸 (dC) 正好与引入的 SMART IV Oligo 配对, 然后逆转录酶将转换模板 (以所引入的 SMART IV Oligo 为模板) 继续进行复制直至寡聚核苷酸的末端, 从而达到提高全长 cDNA 获得率的目的。第二, 在 cDNA 的 3' 和 5' 端引入了不对称的 Sfi I 位点, Sfi I 酶切后, 大小不同的片段可用 CHROMA SPIN™ Columns 进行分离, 并可直接与 Sfi I 消化后的 λTriplEx2™ 载体相连。

根据茎枝菌液共培养法对马铃薯的接菌评价结果 (第二章) 可推测: 在接菌后 24h 至 48h 寄主马铃薯植株内将有大量的基因被启动, 并与侵染的病菌产生互作, 此时应为抗病相关基因的高表达时期; 同时第三章 (3.3.7) 的半定量 RT-PCR 结果也证实了上述推测的可靠性。因此本研究拟利用青枯病菌接菌后 24h 和 48h 样品的混合 mRNA 合成 cDNA, 构建 cDNA 文库, 为青枯病抗性相关基因全长 cDNA 的克隆及探索马铃薯抗病分子机理研究奠定基础。

5.1.2 材料与方法

5.1.2.1 试验材料与处理

植物材料为高抗青枯病基因型 ED13, 病原菌为青枯病菌小种 3 号 PO41, 接菌方法采用茎枝菌液共培养法接种, 具体见 2.2.3.1。所用试剂和药品同 3.2.1。

5.1.2.2 双链 cDNA 合成

采用 TRIzol[®] Regent 一步法抽提试剂盒 (Invitrogen, USA), 依试剂盒说明书提取接菌处理

24h和48h的叶片总RNA, 等量混合。参照Clontech SMART™ Library构建试剂盒操作说明逆转录第一链: 在0.5ml DEPC 处理离心管中加入1 μ l (1 μ g) 总RNA, 1 μ l SMART IV Oligonucleotide, 1 μ l CDSIII/3' PCR primer, 2 μ l双蒸水, 72℃ 温育2 min 后迅速置于冰上。依次加入以下成分: 2.0 μ l 5 \times First-Strand buffer, 1.0 μ l DTT (20mmol/L), 1.0 μ l dNTPs (10mmol/L), 1.0 μ l PowerScript Reverse Transcriptase, 混匀后置于PCR仪中42℃ 1.5h, 逆转录合成cDNA第一链。

LD-PCR法合成双链cDNA: 在PCR管中加入2 μ l cDNA第一链逆转录产物, 80 μ l ddH₂O, 10 μ l 10 \times Advantage 2 PCR buffer, 2.0 μ l dNTPs (50mmol/L), 2 μ l 5' PCR primer, 2 μ l CDSIII/3' PCR primer, 最后加入2 μ l Advantage 2 polymerase Mix, 轻轻混匀, 加入2滴矿物油。PCR反应在PTC200 (Biometra, Germany) PCR仪上进行, 扩增条件如下: 95℃ 40 s, 95℃ 10s, 68℃ 6 min, 21个循环。PCR扩增完毕, 取5 μ l扩增产物进行1.1%琼脂糖电泳检测cDNA合成情况。

5.1.2.3 双链cDNA的酶切与连接

取LD-PCR法合成的双链cDNA 50 μ l, 加入2 μ l 蛋白酶K (20 μ g/ μ l), 置45℃水浴中酶解20min后, 加入50 μ l ddH₂O, 用等体积苯酚/氯仿/异戊醇 (25: 24: 1) 和氯仿/异戊醇 (24: 1) 溶液分别抽提一次, 加入10 μ l 3mol/L NaAc (pH 4.5), 1.3 μ l糖原 (20 μ g/ μ l) 和260 μ l的95%乙醇沉淀cDNA。空气干燥10分钟后, 溶解于79 μ l ddH₂O, 加入10 μ l 10 \times SfiI buffer, 10 μ l SfiI (20 u/ μ l), 1 μ l 100 \times BSA 50℃ 酶切2h。加入2 μ l 1%的二甲苯兰作为指示剂, 然后用CHROMA SPIN-400 柱进行双链cDNA的分级分离, 收集16滴单滴, 分别取3 μ l在1.1% 琼脂糖胶上电泳检测每个组分的ds-cDNA的片段大小, 根据需要合并部分组分的单滴, 加入糖原和2.5倍的95%的乙醇沉淀cDNA, 室温干燥后将其溶解于7 μ l 双蒸水中。分别以cDNA与 λ TripIEx2载体臂 (SfiI-digested arms) 的比例为0.5:1、1:1、1.5:1建立5 μ l连接体系, 加入T4 DNA连接酶和ATP, 16℃温育24h。

5.1.2.4 噬菌体的体外包装

噬菌体包装采用Packagene® Lambda DNA Packaging System (Promega)。自-70℃冰箱中快速取出2管包装抽提物, 冰上解冻, 分装每管为25 μ l, 加入连接产物, 混匀, 30℃温育90min, 再次加入解冻的提取物, 每管25 μ l 继续于30℃温育90min。每份包装混合物中加入500 μ l 1 \times Lambda phage dilution buffer, 25 μ l氯仿, 混匀。

5.1.2.5 效价测定与文库扩增

用1 \times 噬菌体稀释液做梯度稀释后, 转染*E. coli* XL1-Blue, 铺平板测定原始文库滴度, 同时在X-gal/IPTG的平板上测定重组率 (方法参照文库构建试剂盒说明书)。随机挑取20个单噬斑作为模板进行PCR扩增, PCR 反应条件为: 94℃变性3min; 94℃, 30 s, 60℃, 45s, 72℃, 2.5 min; 35个循环, 最后72℃ 延伸5 min。扩增产物进行1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测插入片段大小。

根据原始文库的滴度, 以每皿6-7 $\times 10^4$ 噬菌斑数, 在150 mm平板上铺板, 待噬菌斑生长融合时, 每皿加入12ml 1 \times 噬菌体稀释液, 置4℃过夜。然后在水平摇床上以 ~ 50 rpm转速轻摇2 h, 收集全部洗脱液, 加入1/5体积氯仿振荡2min, 7000rpm离心10 min后, 收集上清即为扩增文库。加DMSO至终体积的7%, 分装为1 ml小份-70℃保存, 避免多次反复冻融。将扩增文库稀释 $10^2\times$ 、 $10^4\times$ 、 $10^6\times$, 铺板后确定扩增文库滴度。

5.1.3 结果与分析

5.1.3.1 总RNA抽提

本实验采用TRIZOL[®] Reagent 一步法抽提试剂盒抽提马铃薯叶片总RNA，经电泳检测，18s和28s rRNA带型清晰可辨（图5.1.1），紫外分光光度计检测OD₂₆₀/OD₂₈₀在1.9-2.0之间，证明抽提的RNA质量和纯度符合文库构建要求。

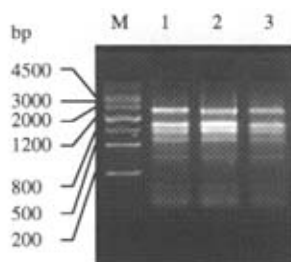


图5.1.1 马铃薯叶片总RNA 电泳质量检测

M: DNA marker MD113

1-3: 总RNA

Fig. 5.1.1 Electrophoresis detection of total RNA on 1.1% agarose gel

M: DNA marker MD113

1-3: Total RNA

5.1.3.2 双链cDNA合成及分级分离

由于SMART技术克服了普通cDNA合成方法中逆转录时完整mRNA还没有转录完，转录即停止的缺陷，从而大大提高了合成全长cDNA的获得率。LD-PCR法合成的双链 cDNA 经电泳检测，大小约分布在200-2700bp，呈smear状，且主要集中在800bp附近，对照为人的cDNA，也符合预期大小，表明cDNA合成质量较好（图5.1.2）。利用CHROMA SPIN-400 柱对双链cDNA进行分级分离，收集16个组分（单滴），每个组分取3 μl进行1.1%琼脂糖胶电泳（图5.1.3），选取组分8-11作为进一步建库的cDNA样品。

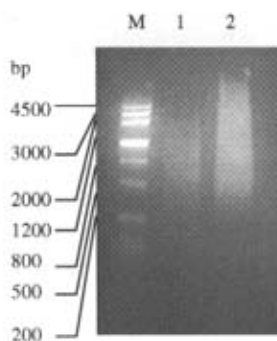


图5.1.2 LD-PCR法合成的双链cDNA

M: DNA marker III

1: 样品的双链cDNA 2: 对照人的双链cDNA (SMART试剂盒提供)

Fig. 5.1.2 Electrophoresis detection of ds-cDNA on 1.1% agarose gel.

M: DNA Marker III

1: ds-cDNA of potato sample

2: control ds-cDNA of human (provided by SMART kit)

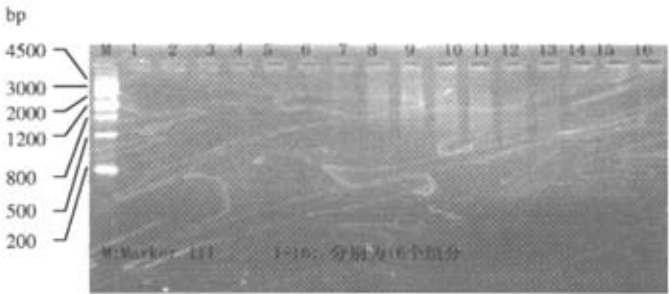


图5.1.3 双链cDNA分级分离

M: DNA marker III 1-16: 马铃薯样品的16个双链cDNA组分

Fig. 5.1.2 Electrophoresis detection of different fraction of ds-cDNA on 1.1% agrose gel.

M: DNA marker III 1-16: 16 ds-cDNA fractions of potato sample

5.1.3.4 文库质量检测

参照文库构建试剂盒说明书测定原始文库滴度，三个连接反应的结果分别为 4.4×10^6 、 2.4×10^6 和 2.0×10^6 pfu/ml。蓝白斑筛选法测定文库重组率为96%。随机挑取20个原始文库单噬斑，PCR鉴定插入片段大小分布在400-1800 bp左右，平均约在700-1000 bp之间(图5.1.4)。用滴度为 4.4×10^6 pfu/ml的原始文库进行扩增，最后所得扩增文库的滴度为 1.8×10^{10} pfu/ml。以上结果表明，本实验构建的cDNA文库滴度、重组率和插入片段大小，均基本符合cDNA文库构建要求。



图5.1.4 cDNA文库插入片段大小检测

泳道1: DNA marker III 泳道2-16: 不同噬菌斑的PCR扩增产物

Fig. 5.1.4 Length detection of inserted fragments in cDNA library

Lane 1: DNA marker III 2-16: PCR products of different phages of the cDNA library.

5.1.4 讨论

病原菌的侵染刺激将会引发植物一系列的反应，包括抗病基因和防御基因的表达及信号分子基因的转录等。在真核植物基因组中只有部分基因得到表达，构建富集青枯病抗性相关基因全长cDNA文库，将大大有助于全长cDNA的寻找和分离。

由于利用传统方法建立cDNA文库, 所获得的cDNA 5'端往往不完整, 缺乏5-30个核苷酸, 对后续基因克隆带来不便。SMART LD-PCR方法, 是最近发展起来的基于PCR 技术的简便、快速建库方法。该技术可产生出更高比例的全长cDNA, 同时低丰度转录本也得到有效提高 (Chenchik, *et al.* 1998), 这将为以后克隆全长抗病相关基因提供一个有利条件。同时, 构建文库所用的克隆载体 λ TripIEx2变换宿主菌后, 可通过Cre-loxP位点专一性重组很容易环化为质粒载体, 更便于操作, 并且载体 λ TripIEx2在多克隆位点上游不同读码框架内有两个翻译起点和一个核糖体滑行位点 (dT13), 插入的cDNA可以进行三种阅读框架的表达。本研究利用该方法所建文库的滴度和插入片段大小均符合cDNA文库构建要求, 为今后利用该cDNA文库进一步分离和克隆青枯病抗性相关基因奠定了基础。

第二节 马铃薯 *DnaJ-like* 基因全长 cDNA 的克隆

5.2.1 引言

在生物体内, 多肽合成后将获得一系列必要的信息来指导其正确的折叠以发挥其必要的功能, 然而在细胞内有限的环境中存在大量的其它分子成分, 将会大大降低这些多肽的折叠效率或减慢其折叠的速度, 因此需要另外一些分子来辅助它进行快速有效的正确折叠, 避免聚集造成危害。分子伴侣是一类与其它蛋白不稳定构像相结合并使之稳定的蛋白, 其本身并不含有有关蛋白质正确折叠的任何特定信息, 而只是通过疏水键阻止非天然状态的蛋白分子间或分子内的不正确相互作用, 从而增加正确折叠的产率。分子伴侣在生物体内广泛存在, 是细胞内蛋白质折叠和组装的重要调节者。自 1991 年第一个分子伴侣 hsp70 (DnaK) 从 *S. pistillata* 分离出来以后, 陆续有 Hsp40 (DnaJ), hsp90, hsp23 (grpE) 等被分离和鉴定 (Walsh, *et al.* 2004)。DnaK 和 DnaJ 分别作为分子伴侣和协同分子伴侣 (cochaperone) 可通过促进部分变性的蛋白复性 (重新折叠) 来保护胁迫损害的细胞并使其恢复正常功能 (Glover and Lindquist. 1998; Guagliardi, *et al.* 1994; Macario and de Macario. 1999; Weber-Ban, *et al.* 1999)。不同的分子伴侣具有不同的亚细胞定位, 也具有不同功能: 参与蛋白折叠、翻译起始 (Translation initiation)、mRNA 剪接 (mRNA splicing)、蛋白质转移 (translocation) 及降解等 (Walsh, *et al.* 2004)。前文 SMART-cDNA 文库的构建已为获得全长 cDNA 奠定了基础, 本文拟采用 RACE 策略, 在 cDNA 文库的基础上克隆分子伴侣 *DNAJ-like* 基因的全长 cDNA, 为深入探讨该基因的功能奠定基础。

5.2.2 材料与方法

5.2.2.1 试验材料与处理

所用材料为二倍体马铃薯高抗青枯病基因型 ED13。JA 诱导处理方法及取样时间同 4.2.2.1。所用试剂和药品同 3.2.1。

5.2.2.2 目的基因 5' 端序列的扩增

依据 SSH 文库所得 EST L248 (含有完整的 3' 末端) 的测序结果, 在其序列内部设计基因特异引物 GSP-R: 5'-CTTGAACCCGAATAAACCTTTGGG-3'。以噬菌体 cDNA 文库 (见本章第一节) 为模板, 利用 SMARTTM cDNA Library Construction Kit 提供的 5' 测序引物和 GSP-R 引物扩增该基因的 cDNA 5' 端。PCR 产物克隆、测序后, 根据扩增片段与已有 EST 的重叠区将 cDNA 5' 和 3' 端拼接起来。PCR 反应体系参见 SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit 说明书。

5.2.2.3 茉莉酸诱导表达

总 RNA 提取及 cDNA 第一链合成同 4.2.2.2。依据所获得的 L248 全长 cDNA 序列设计其正向引物 L248-F: 5' ACCACCCAGATGTTTCACCC 3' 和反向引物 L248-R: 5'

TGCCAACGATTCTTCCATTTCAC 3'。以 *Actin* 基因为内参（引物序列见 3.2.3.2），采用半定量 RT-PCR 方法研究其 JA 诱导表达模式。PCR 扩增条件为：94℃ 3min；94℃ 30s，56℃ 45s，72℃ 60s，17-35 个循环；72℃ 延伸 5 min。PCR 产物进行 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳，根据扩增的 DNA 条带的亮度来判断基因在不同时间点的表达水平。

为了使所分析基因在不同时间点的表达具有可比性，首先对起始 cDNA 第一链的用量进行了调整（见 3.2.7）。

5.2.3 结果与分析

5.2.3.1 马铃薯 *DnaJ-like* 基因的分离

采用 RACE 策略，以噬菌体 cDNA 文库为模板进行 L248（分子伴侣 *DnaJ-like*）的 5'-RACE PCR 扩增，取 5 μ l 5'-RACE 扩增产物进行 1.2% 琼脂糖胶电泳（图 5.2.1）。5'-RACE 扩增片段特异性较好，大小约为 400bp，去除接头序列的 45bp，所扩增 cDNA 的 5' 端大小约为 350bp。

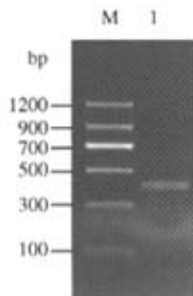


图 5.2.1 马铃薯分子伴侣 *DnaJ-like* 基因的 5'-RACE 结果

M: DNA Marker II 1: 5'-RACE 产物

Fig. 5.2.1 5'-RACE result of *DnaJ-like* gene in potato

M: DNA Marker II 1: 5'-RACE product

5.2.3.2 序列分析

将所得 5'-RACE 的 PCR 产物克隆测序，去除载体序列和引物序列后，在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析，并通过与 EST L248 的重叠区进行拼接。拼接后的序列再次在 NCBI 上进行 BLAST 比对分析，并与对应 EST 序列的 BLAST 比对结果进行比较以进一步验证。

L248 包含一个完整的 531bp 的开放读码框架（Open Reading Frame, ORF），5' 端有 25bp 的非翻译区（Un-translate Region, UTR），3' 端具有完整的 PolyA 尾，编码区编码 177 个氨基酸（图 5.2.2a）。该基因已在 GenBank 注册，登记序列号为 DQ885360，该基因暂命名为 *StDnaJ*。*StDnaJ* cDNA 序列与拟南芥 *DnaJ-like* 20 cDNA（GenBank 序列号：NM_179045.2）的部分核苷酸序列有 84% 的一致性，与其编码的氨基酸序列（GenBank 序列号：NP_193119.1）有 59% 的一致性（图 5.2.2b）。

图5.2.2a *StDnaJ*基因核酸序列及推断氨基酸序列

Fig. 5.2.2a Nucleotide sequence and the deduced amino acid sequence of the potato *StDnaJ* gene

<i>StDnaJ</i>	68	SYPQSRRTQKSGSLRVHSHKL-NNNVIEISESKSFYELLGIQETVSLLEIKQAYKQLARKYH	244
		SYP +RT+ S R+ S+L +++ ++ SE SFY+LLG+ E+V+L EIKQAYKQLARKYH	
<i>DnaJ-like 20</i>	37	SYP—TRTRFSSSTRISQRLTHDDPVKQSEDLSEFYDLLGVTESVTLPEIKQAYKQLARKYH	94
<i>StDnaJ</i>	245	PDVSPPGRVEENTQRFRIRVQEAYETLSDPKSRDMYKDKMSKGLHLAFSPRRKQND-ESM	421
		PDVSP RVEE T RFIRVQEAYETLSDP+ R +YD+D+S G +PS RR+ + D E +	
<i>DnaJ-like 20</i>	95	PDVSPDRVEEYTDRFIRVQEAYETLSDPRRRVLYDRDLSMGFSFSPSGRRQNRDQEVV	154
<i>StDnaJ</i>	422	EDTGEWKNRWHSQSELKRRNRTHKDSGNNMSWGARMRRQRNETS	553
		E+ EWK +W +QLS L+RR+ KD+ N MSW ARMRRQ+ E+S	
<i>DnaJ-like 20</i>	155	EEKSEWKAKWQQLSGLRRRSNQKDN-NTMSWAARMRRQDESS	197

Fig. 5.2.2b Comparison of deduced amino acid sequences of potato *StDnaJ* gene with *DnaJ*-like 20 of *A. thaliana*

5.2.3.3 马铃薯*DnaJ-like*基因的诱导表达

马铃薯*DnaJ-like*基因 (*StDnaJ*) 在抗病基因型中受JA的诱导，为上调表达，并于6至12小时内达到最高，而后又逐渐降低，这与利用青枯病菌处理后该基因的诱导表达模式（图3.11b）相似，但JA诱导后其上调表达明显提前。JA处理3h时，其表达量即明显升高，6-12h迅速升至最高，且维持高表达水平的时间也明显缩短。*StDnaJ*基因在对照水处理的抗病基因型和JA处理的感病基因型ED25中的表达呈波浪型，究其原因，尚待进一步研究。图5.2.3示出了*StDnaJ*基因的JA诱导表达模式。

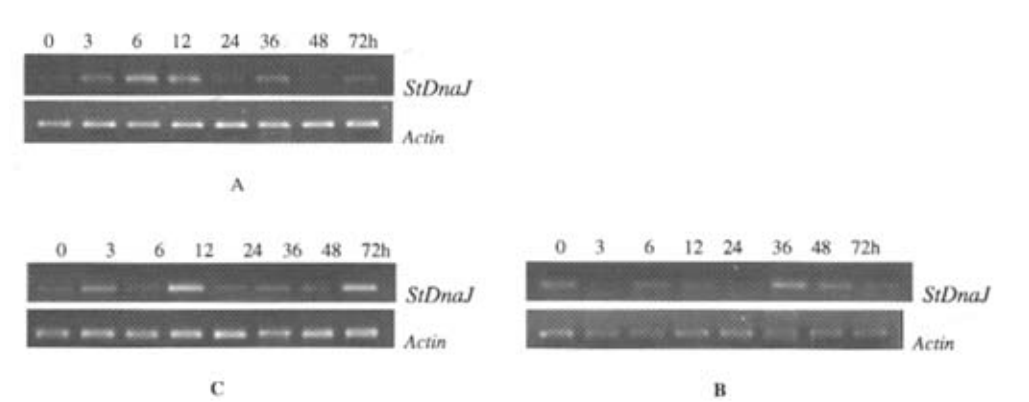


图5.2.3 马铃薯叶片中*StDnaJ*基因的JA诱导表达

- A: JA处理后抗病基因型ED13中的基因表达
- B: 水处理后抗病基因型ED13中的基因表达
- C: JA处理后感病基因型ED25中的基因表达
- Fig. 5.2.3 JA-induced expression of *StDnaJ* gene in potato leaves.**
- A: Gene expression of potato disease-resistance genotype ED13 treated with JA.
- B: Gene expression of potato disease-resistance genotype ED13 treated with water.
- C: Gene expression of potato susceptible genotype ED25 treated with JA.

5.1.4 讨论

DnaK 是热激蛋白 hsp70 家族的成员，所编码的蛋白较为保守，并被认为是在进化中最保守的蛋白之一（Gupta, 1998；Gupta and Singh, 1994；Rensing and Maier, 1994）。但并非所有物种中都存在 hsp70（Bult, *et al.* 1996），是什么替代了 hsp70 来行使其功能尚不清楚。DnaJ 是热激蛋白 hsp40 家族（也称为 J 蛋白家族）的成员，该家族的成员对 hsp70 家族成员的活性具有调节作用。hsp70 首先结合于未折叠（如初生肽链）多肽的疏水区，促进蛋白的装配（Bukau and Horwich, 1998），同时它也具有促使蛋白解装配（disassembly）的功能：例如蛋白穿膜移位过程中的解装配（Jensen and Johnson, 1999）；当一些多肽变性后无法复性时，将可能聚集而成为对细胞的有害成分，此时分子伴侣也将参与蛋白的降解作用（Ciechanover, 1998；Herman and D'Ari, 1998）。hsp40 家族的成员可以作为 hsp70 家族成员的耦合因子（coupling factors）来促使 ATP 水解，以调节 hsp70 的活性。

基于序列的组成结构不同可将DnaJ分为三种类型，通常所说的DnaJ同源物是指I型J蛋白

(Cheetham and Caplan, 1998)。I型J蛋白具有三个结构域 (domain): J结构域、锌指结构域和C末端结构域 (carboxy-terminal domain)。J结构域通过富甘氨酸区域与锌指结构域相连, 锌指结构域和C末端区域能与非自身底物反应。II型J蛋白具有J结构域和C末端结构域, 二者通过富甘氨酸区域相连。III型J蛋白只具有J结构域。J结构域是hsp40家族的基本特征。本文所获得的*StDnaJ*基因也具有典型的J结构域, 可能为马铃薯分子伴侣hsp40家族的重要成员。目前研究认为, 分子伴侣可能通过一个由hsp90, hsp70, Hop, hsp40和p23五个蛋白组成的类固醇受体:hsp90的复合物装配模型来起作用。在这个复合物模型中, hsp40通过激活hsp70的ATP酶活性而扮演着重要的角色 (Fan, *et al.* 2003; Dittmar, *et al.* 1998; Kosano, *et al.* 1998)。研究表明hsp40在受到热激后上调表达 (Clarens, *et al.* 1995; Conway de Macario, *et al.* 1995), 本研究中, *StDnaJ*基因在青枯病菌和JA的胁迫下也均为上调, 这是否预示着该基因与hsp40相似, 在青枯病菌和JA胁迫下具有促使胁迫损害细胞内蛋白恢复活性的功能尚需探讨。

第六章 结论

1. 建立了马铃薯抗青枯病鉴定新方法。采用传统的灌根法、毛细管菌液滴注法和改进方法（取名为茎枝菌液共培养法）对马铃薯二倍体 CE 和 ED 群体、抗病番茄 392 (CLN2366A)、393 (CLN2366B)、395 (CLN1314G) 和 419 (CLN1466-65-40-15-0-12-0) 和感病番茄 D3 (早粉 2 号)、D5 (中蔬 6 号) 和 D14 (中蔬 5 号) 的青枯病抗性评价和鉴定表明：茎枝菌液共培养法更加简便快速和经济，同时重复性更好，对于茄科作物的种质资源抗病性评价和筛选，特别是对于病菌诱导产生抗性的抗（感）病植株的快速鉴定及其幼苗的先期快速筛选具有重要意义。

2. 鉴定出了 13 份抗或高抗青枯病和高感青枯病材料。灌根法、毛细管菌液滴注法和茎枝菌液共培养法三种青枯病鉴定方法相结合，增加了所鉴定材料的可靠性，并筛选出了 6 份抗或高抗青枯病材料和 7 份高感青枯病材料（表 2.4）。其中 6 份材料（如高抗青枯病基因型 ED13 和高感青枯病基因型 ED25 等）已被用于亲本构建杂交作图群体，为进一步抗青枯病基因（座）的定位、分析和最终克隆奠定了基础。

3. 构建了富集差异表达基因的 SSH-cDNA 文库，初步明确了在马铃薯与青枯病菌非亲和性互作中，早期青枯病抗性相关基因的种类和数量，并获得了 44 个马铃薯与青枯病菌互作的早期抗病相关基因，同时发现了一批可能新基因。利用抑制差减杂交技术（SSH）和微阵列相结合，共获得 123 个差异表达的非重复的早期抗病相关基因的 EST 片段，其中有 13%（16 个）的 EST 只能在公用数据库（NCBI 和 TIGR）中找到较低同源性的序列（E-值 $>10^{-10}$ ），7%（8 个克隆）无同源序列。这些无同源序列或具有较低同源性的 EST 序列可能代表新基因。在 123 个差异表达的 EST 中，除功能未知和已知功能而未分类及无同源序列外，其余 70% 的 EST 分属于马铃薯基本生命过程的各个环节：初级代谢、能量代谢、细胞结构、调控、蛋白合成/修饰/加工、转运相关、抗病防御、转录相关和信号传导等。参与马铃薯抗病反应的 44 个 EST 的预测功能表明，这些 EST 的对应基因涉及到抗病反应的基本过程，包括信号识别、信号传导和转录调控、过敏反应、系统获得抗性、细胞自救和抗病防御等。

4. 构建了富集青枯病抗性相关基因 SMART-cDNA 文库。原始文库和扩增文库滴度分别为 4.4×10^6 和 1.8×10^{10} pfu/ml，重组率为 96%，插入片段大小分布约在 400-1800 bp，平均大小为 700-1000 bp。

5. 利用 RACE 技术与重叠延伸和 cDNA 文库构建相结合从马铃薯抗病基因型中获得了三个病程相关蛋白基因的全长 cDNA（分别命名为 *StPI*、*StPMEI* 和 *StDnaJ*）和四个基因 cDNA 的 5' 和 3' RACE 的 PCR 产物，并对其诱导表达模式进行了 RT-PCR 分析。*StPI* 编码 116 氨基酸，与马铃薯蛋白酶抑制子 I 前体核苷酸序列有 89% 的一致性，与其编码的氨基酸序列有 74% 的一致性；*StPMEI* 编

码198个氨基酸,与烟草果胶甲脂酶抑制子基因核苷酸序列有85%的一致性,与其编码的氨基酸序列有78%的一致性;*StDnaJ*编码177个氨基酸,与拟南芥*DnaJ-like 20* 基因的部分核苷酸序列有84%的一致性,与其编码的氨基酸序列有59%的一致性。这三个基因均受青枯病菌和JA的诱导,但具有不同的诱导表达模式,推测它们可能参与了马铃薯的抗病反应或促使胁迫损害细胞蛋白恢复活性的功能。另四个基因的表达模式也各不相同:

L51 (methyl-CpG-binding domain-containing protein) 和 *L77* (putatively encoding receptor-like kinase RHG1) 受青枯病菌的诱导,但均不受JA的调节。*L181* (phosphatase 2C) 在抗病基因型ED13中受*R_s*诱导下调表达,相反却受JA的诱导上调表达;在感病基因型ED25中,该基因不受JA调节。推测对于*L181*而言,在抗病基因型中病菌处理和JA刺激可能采用不同的调节途径,并且该基因在抗病材料中因受诱导下调表达而参与抗病反应。*L362* (protein kinase Pti1) 同时受*R_s*诱导和JA的调节,均为上调表达。该基因在JA诱导后其上调表达明显比*R_s*诱导提前,且其维持高表达水平的时间也明显缩短。*Pti1*基因为*Pto*基因的下游基因,参与抗病反应。

尽管本实验所得数据尚不足以揭示马铃薯青枯病抗性的全貌,但病菌侵染早期马铃薯抗青枯病相关基因的分离,初步揭示了参与马铃薯抗青枯病的早期基因的种类和数量,为进一步克隆重要基因进行基因功能分析、深入开展马铃薯抗青枯病的分子机制研究及利用抗性资源进行抗病品种选育奠定了基础。

后续工作展望

本研究通过SSH技术与微阵列杂交筛选相结合从二倍体高抗青枯病的马铃薯中已获得了一批青枯病抗性相关基因片段,但这些基因的调控和表达模式及分属于何种信号传导途径等尚不清楚,这些基因的真正功能也无从知晓,进一步研究这些基因片段在植-病互作中所扮演的角色及功能,建立整体的基因交叉互作网络,对于全面了解马铃薯的抗病机制具有重要作用。后续研究可从以下几个方面进行:

1. 马铃薯的抗青枯病机理及表达调控研究:横向研究这些基因在不同的青枯病抗性材料和及其相近的感病材料中的生物和非生物(如:SA、JA、Eth等信号分子及渗透和伤害等)胁迫下诱导表达模式;纵向研究这些基因片段在马铃薯受青枯病菌侵染不同时期和非生物胁迫不同阶段的表达动态。建立这些基因的交互诱导表达调控网络,分析这些基因片段可能参与的信号转导途径,寻找关键的调控节点,为调控马铃薯的防卫系统,增强抗病性提供研究思路。

2. 重要基因的深入探讨:对研究中所获得的一些重要的基因片段(如抗病基因类似物、转录因子等)进一步研究,包括全长基因克隆,时空和诱导表达模式、基因定位、功能注释以及基因的上游调控元件和下游响应因子的研究,基因的选择性剪接研究等,为最终获得基因的全貌,进行基因应用提供依据。

3. 基因片段转化为分子标记研究:在所获得的基因片段中,有些基因片段可能与抗病基因

（紧密）连锁，可根据这些基因片段的序列开发分子标记用于标记辅助育种。

4. 植物与环境的互作研究：重点研究温度和光照等对寄主植物（马铃薯）抗青枯病的影响，整合植物-病原互作与植物-环境互作的数据库，探讨马铃薯青枯病抗性与耐热的相关性及基因间的内在联系，为更合理的制定马铃薯抗青枯病分子育种策略提供理论依据。

5. 基因芯片与SSH相结合探讨马铃薯-病原的亲合性互作与非亲合性互作中的抗病基因表达，从整体上反应植物-病原互作中的关键问题。

本实验已为上述研究打下良好的实验技术基础，相信随着后续研究的深入开展，对马铃薯青枯病抗性分子机理的认识将得到不断深入和拓展。

参考文献

- 1 陈渝萍,薛社普. 应用改进的 SSP2 抑制 PCR 技术扩增 cDNA 片段旁侧序列[J]. 基础医学与临床, 1999, 19 (4): 125.
- 2 冯洁, 何礼远, 袁凤华. 马铃薯 32kD 抗菌蛋白的 cDNA 分子克隆研究 [J]. 农业生物技术学报, 1999, 7(1): 37-40.
- 3 高音. 马铃薯抗青枯病菌蛋白的基因克隆及其在大肠杆菌中表达. 中国农科院博士论文 (导师何礼远研究员). 1999.
- 4 邵刚, 屈冬玉, 连勇, 金黎平, 冯兰香. 马铃薯青枯病抗性的分子标记. 园艺学报. 2000, 27(1): 37-41.
- 5 何礼远. 马铃薯抗青枯病体细胞变异体离体筛选研究初报. 马铃薯杂志. 1990, 4 (1): 14-18.
- 6 贾士荣, 屈贤铭, 冯兰香, 唐惕, 唐益雄, 刘坤, 赵艳丽, 白永延, 蔡敏莺. 转抗菌肽基因提高马铃薯对青枯病的抗性. 中国农业科学, 1998, 31(3): 5-12.
- 7 康耀卫, 毛国璋, 何礼远, 黄建中, Schell, M.A. 植物青枯病菌致病机理. 自然科学进展, 1995, 5: 119-122.
- 8 李广存, 金黎平, 谢开云, 屈冬玉. 抑制差减杂交 (SSH) 技术及其在植物基因分离上的应用. 中国生物工程杂志. 2004, 24(9): 26-31.
- 9 梁成罡, 何礼远. 抗菌蛋白 API 编码基因对马铃薯的转化及其介导的青枯病抗性研究. 植物保护学报, 2002, 29(1): 51-56.
- 10 刘焕利, 何礼远, 毛国璋, 康耀卫. 植物青枯病原细菌胞外蛋白相关基因的克隆. 植物病理学报, 1999, 29(2): 110-114.
- 11 罗天宽, 刘焕利, 张小玲, 何礼远. 植物青枯病菌相关基因的克隆及致病力测定分析. 浙江农业学报, 2002, 14(3): 131-134.
- 12 罗文波, 于淑娟, 高大维. 抑制性扣除杂交技术(SSH)及其研究进展. 生物技术, 2000, 10(3): 37-40.
- 13 罗志勇, 陆秋恒, 刘水平, 陈湘晖, 罗建清, 汤立军, 胡维新. 人参植物皂苷生物合成相关新基因的筛选与鉴定. 生物化学与生物物理学报. 2003, 35(6): 554-560.
- 14 屈冬玉, 金黎平, 谢开云, 卞春松. 中国马铃薯产业现状、问题和趋势. 陈伊里主编. 马铃薯产业与西部开发. 哈尔滨: 哈尔滨工程大学出版社, 2001, 1-8.
- 15 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南, 第三版. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社. 2002, 426-429.
- 16 孙惠生. 马铃薯育种学[M]. 中国农业出版社. 2003, 237-238.
- 17 佟屏亚, 赵国磐. 马铃薯史略. 中国农业科技出版社, 北京, 1991. 88.
- 18 王转, 贾晋平, 景蕊莲. 用抑制差减杂交法分离小麦幼苗水分胁迫诱导表达的 cDNA. 生物技术通报, 2003, 5: 36-39.
- 19 徐进. 根围芽孢杆菌对植物细菌性青枯病的防病促生产作用和抗生机理初步研究. 中国农科院硕士论文 (导师何礼远研究员. 2003).
- 20 闫其涛, 遂慧, 毛万霞, 李建粤. 植物基因分离的图位克隆技术. 分子植物育种. 2005, 3(4):

- 585-590.
- 21 易图永, 谢丙炎, 张宝玺, 高必达. 植物抗病基因同源序列及其在抗病基因克隆与定位中的应用. 生物技术通报, 2002, 2: 16-20
 - 22 张祥喜, 罗林广. 植物抗病基因研究进展. 分子植物育种. 2003, 1(4): 531-537.
 - 23 中国农业年鉴. 中国农业年鉴编辑委员会, 中国农业出版社, 北京. 2001. 263.
 - 24 Aldon D, Brito B, Boucher B and Genin S. A bacterial sensor of plant cell contact controls the transcriptional induction of *Ralstonia solanacearum* pathogenicity genes. EMBO J. 2000, 19(10): 2304-2314.
 - 25 Bachem CWB, van der Hoeven RS, de Bruijin SM, Vreugdenhil D, Zabeau M and Visser RGF. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. Plant J. 1996, 9: 745-753.
 - 26 Barnes WM. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from 1 bacteriophage templates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994, 91: 2216-2220.
 - 27 Bautz EK and Reilly E. Gene-specific messenger RNA: isolation by the deletion method. Science. 1966, 151: 328-330.
 - 28 Becraft PW. Receptor kinase signaling in plant development. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2002, 18: 163-192.
 - 29 Belbahri L, Boucher C, Candresse T, Nicole M, Ricci P and Keller H. A local accumulation of the *Ralstonia solanacearum* PopA protein in transgenic tobacco renders a compatible plant-pathogen interaction incompatible. Plant J. 2001, 28(4): 419-430.
 - 30 Bent AF. Plant Disease Resistance Genes: Function Meets Structure. Plant Cell. 1996, 8: 1757-1771.
 - 31 Benzinger A, Muster N, Koch HB, Yates JR and Hermeking H. Targeted proteomic analysis of 14-3-3 sigma, a p53 effector commonly silenced in cancer. Mol. Cell. Proteomics 2005, 4: 785-795.
 - 32 Bergman Y, and Mostoslavsky R. DNA demethylation: turning genes on. Biol. Chem. 1998, 379: 401-407
 - 33 Berrocal-Lobo M, Segura A, Moreno M, Lopez G, Garcia-Olmedo F and Molina A. Snakin-2, an antimicrobial peptide from potato whose gene is locally induced by wounding and responds to pathogen infection. Plant Physiol. 2002, 128: 951-961.
 - 34 Bertram J, Palfner K, Hiddemann W, Kneba M. Elevated expression of S100P, CAPL and MAGE 3 in doxorubicin-resistant cell lines: comparison of mRNA differential display reverse transcription-polymerase chain reaction and subtractive suppressive hybridization for the analysis of differential gene expression. Anticancer Drugs. 1998, 9(4): 311-317.
 - 35 Birk Y. Plant Protease Inhibitors: Significance in Nutrition, Plant Protection, Cancer Prevention and Genetic Engineering, Springer, Berlinpp, 2003. pp. 170.
 - 36 Bleecker AB and Kende H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Annu Rev Cell Dev

- Biol. 2000, 16:1-18.
- 37 Boengler K, Pipp F, Schaper W, Deindl E. Rapid identification of differentially expressed genes by combination of SSH and MOS. *Lab Invest.* 2003, 83(5): 759-761.
- 38 Bostock RM. Signal crosstalk and induced resistance: straddling the line between cost and benefit. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2005, 43:545-580.
- 39 Boulter D. Insect pest control by copying nature using genetically engineered crops. *Biochemistry.* 1993, 34: 1453-1466.
- 40 Brich PRJ, Avrova AO, Duncan JM, Lyon GD and Toth RL. Isolation of potato genes that are induced during an early stage of hypersensitive response to *Phytophthora infestans*. *Mol Plant-Microbe Interact.* 1999, 12(4): 356-361.
- 41 Briggs SP and Johal GS. Genetic patterns of plant host-parasite interaction. *Trends Genet.* 1994, 10(2): 12-16.
- 42 Brummell DA and Harpster MH. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* 2001, 47, 311-340.
- 43 Brzin J and Kidric M. Proteinases and their inhibitors in plants: role in normal growth and in response to various stress conditions. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* 1995, 13: 420-467.
- 44 Bukau B and Horwich AL. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell.* 1998, 92, 351-366.
- 45 Bult CJ, White O, Olsen GJ, Zhou L, Fleischmann RD, Sutton GG, Blake JA, FitzGerald LM, Clayton RA, Gocayne JD, Kerlavage AR, Dougherty BA, Tomb JF, Adams MD, Reich CI, Overbeek R, Kirkness EF, Weinstock KG, Merrick JM, Glodek A, Scott JL, Goeghagen NSM, Weidman JF, Fuhrmann JL, Nguyen D, Utterback TR, Kelley JM, Peterson JD, Sadow PW, Hanna MC, Cotton MD, Roberts KM, Hurst MA, Kaine BP, Borodovsky M, Klenk HP, *et al.* Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 1996, 273, 1058-1073.
- 46 Büschges R, Hollricher K, Panstruga R, Simons G, Wolter M, Frijters A, van Daelen R, van der Lee T, Diergaarde P, Groenendijk J, Töpsch S, Vos P, Salamini F and Schulze-Lefert P. The barley Mlo gene: A novel control element of plant pathogen resistance. *Cell.* 1997, 88: 695-705.
- 47 Cao W, Epstein C, Liu H, DeLoughery C, Ge N, Lin J, Diao R, Cao H, Long F, Zhang X, Chen Y, Wright PS, Busch S, Wenck M, Wong K, Saltzman AG, Tang Z, Liu L and Zilberstein A. Comparing gene discovery from Affymetrix GeneChip microarrays and Clontech PCR-select cDNA subtraction: a case study. *BMC Genomics.* 2004, 5(1): 26.
- 48 Caruso P, Bertolini E, Cambra M and López MM. A new and sensitive Co-operational polymerase chain reaction for rapid detection of *Ralstonia solanacearum* in water. *J Microbiol Methods.* 2003, 55(1): 257-72.
- 49 Caruso P, Gorris MT, Cambra M, Palomo J L, Collar J, Lopez MM. Enrichment double-antibody sandwich indirect enzyme-linked immunosorbent assay that uses a specific monoclonal antibody for sensitive detection of *Ralstonia solanacearum* in asymptomatic potato tubers. *Appl Environ Microbiol.* 2002, 68 (7): 3634-3638.

- 50 Chang C and Stadler R. Ethylene hormone receptor action in *Arabidopsis*. *Bioessays* 2001, 23: 619-627.
- 51 Chao WS, Gu YQ, Pautot V, Bray EA and Walling LL. Leucine aminopeptidase RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid. *Plant Physiol.* 1999, 120: 979-992.
- 52 Chapman MR and Kao CC. EpsR modulates production of extracellular polysaccharides in the bacterial wilt pathogen *Ralstonia (Pseudomonas) solanacearum*. *J Bacteriol.* 1998, 180(1): 27-34.
- 53 Cheetham ME and Caplan AJ. Structure, function and evolution of DnaJ: conservation and adaptation of chaperone function. *Cell Stress Chaperones*, 1998, 3, 28-36.
- 54 Chen H and Vierling R. A Molecular cloning and characterization of soybean peroxidase gene families. *Plant Science.* 2000, 150 (2): 129-137.
- 55 Chen C and Chen Z. Potentiation of developmentally regulated plant defense response by AtWRKY18, a pathogen-induced *Arabidopsis* transcription factor. *Plant Physiol.* 2002, 129, 706-716.
- 56 Chen MH and Citovsky V. Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *Plant J.* 2003, 35, 386-392.
- 57 Chen MH, Sheng J, Hind G, Handa AK and Citovsky V. Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J.* 2000, 19, 913-920.
- 58 Chenchik A, Diatchenko L, Chang C and Kuchibhatla S. Great Lengths cDNA Synthesis Kit for high yields of full-length cDNA. *CLONTECHniques*. 1994, IX (1): 9-12.
- 59 Cho SK, Jeung JU, Kang KH, Shim KS, Jung KW, You MK, Ok SH, Chung YS, Hwang HG, Choi HC, Moon HP, and Shin JS. Identification of genes induced in wound-treated wild rice (*Oryza minuta*). *Mol Cells.* 2004, 17(2): 230-236.
- 60 Choi D, Kim HN, Yun HK, Park JA, Kim TW and Bok SH. Molecular cloning of a metallothionein like gene from *Nicotiana glutinosa* L. and its induction by wounding and tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol.* 1996, 112: 353-359.
- 61 Chong J, Baltz R, Schmitt C, Beffa R, Fritig B and Saindrenan P. Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP—Glc: phenylpropanoid glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell.* 2002, 14: 1093-1107.
- 62 Rustérucci C, Aviv DH, Holt III BF, Dangl JL and Parker JE. The disease resistance signaling components EDS1 and PAD4 are essential regulators of the cell death pathway controlled by LSD1 in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 2001, 13: 2211-2224.
- 63 Ciampi L and Sequeira L. Influence of temperature on virulence of race 3 strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Am. Potato J.* 1980, 57: 307-317.
- 64 Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J.*

- 1998, 17, 7151-7160.
- 65 CIP Potato Facts, 2000. International Potato Center. Lima, Peru.
- 66 Clarens MA, Macario JL and Conway de ME. The archaeal *dnaK-dnaJ* gene cluster: organization and expression in the methanogen *Methanosarcina mazei*. *J. Mol. Biol.* 1995, 250, 191-201.
- 67 Coenye T and Vandamme P. Simple sequence repeats and compositional bias in the bipartite *Ralstonia solanacearum* GMI1000 genome. *BMC Genomics.* 2003, 4(1): 10.
- 68 Conway de ME, Clarens M and Macario AJL. Archaeal *grpE*: transcription in two different morphologic stages of *Methanosarcina mazei* and comparison with *dnaK* and *dnaJ*. *J. Bacteriol.* 1995, 177, 544-550.
- 69 Cunnac S, Boucher C and Genin S. Characterization of the *cis*-acting regulatory element controlling HrpB-mediated activation of the type III secretion system and effector genes in *Ralstonia solanacearum*. *J Bacteriol.* 2004, 186(8): 2309-18.
- 70 Cunnac S, Occhialini A, Barberis P, Boucher C and Genin S. Inventory and functional analysis of the large Hrp regulon in *Ralstonia solanacearum*: identification of novel effector proteins translocated to plant host cells through the type III secretion system. *Mol Microbiol.* 2004, 53(1): 115-28.
- 71 Danesh D, Aarons S, McGill GE, Young ND and Quelle. Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Molecular Plant and Microbe Interactions.* 1994, 7(4): 464-471.
- 72 Danesh D, Aarons S, McGill GE and Young ND. Genetic dissection of oligogenic resistance to bacterial wilt in tomato. *Molecular Plant and Microbe Interactions.* 1994, 7: 464-471.
- 73 De Leo F and Gallerani R. The mustard trypsin inhibitor 2 affects the fertility of *Spodoptera littoralis* larvae fed on transgenic plants. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002, 32: 489-496.
- 74 De Leo F, Volpicella M, Licciulli F, Liuni S, Gallerani R and Ceci LR. PLANT-PIs: a database for plant protease inhibitors and their genes. *Nucl. Acids Res.* 2002, 30: 347-348.
- 75 Denny TP, Ganova-Raeva LM, Huang J, and Schell MAL. cloning and characterization of *tek*, the gene encoding the major extracellular protein of *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant and Microbe Interactions.* 1996, 9: 272-281.
- 76 Deslandes L, Olivier J, Peeters N, Feng DX, Khounlotham M, Boucher C, Somssich I, Genin S and Marco Y. Physical interaction between RRS1-R, a protein conferring resistance to bacterial wilt, and PopP2, a type III effector targeted to the plant nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003, 100(13): 8024-8029.
- 77 Deslandes L, Olivier J, Theulieres F, Hirsch J, Feng DX, Bittner-Eddy P, Beynon J and Marco Y. Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002, 99(4): 2404-2409.
- 78 Deslandes L, Pileur F, Liaubet L, Camut S, Canan K, Kevin W, Holub E, Beynon J, Arlat M and

- Marco Y. Genetic characterization of RRS1, a recessive locus in *Arabidopsis thaliana* that confers resistance to the bacterial soilborne pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Molecular Plant and Microbe Interactions*. 1998, 11(7): 659-667.
- 79 Devoto A, Piffanelli P, Nilsson I, Wallin E, Panstruga R, von Heijne G and Schulze-Lefert P. Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants. *J. Biol. Chem*. 1999, 274: 34993-35004.
- 80 Dewit, PJGM. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in the control of plant pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol*. 1992, 30: 391-418.
- 81 Diatchenko L, Lukyanov S, Lau YF and Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a versatile method for identifying differentially expressed genes. *Methods Enzymol*. 1999, 303: 349-380.
- 82 Diatchenko LYF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED and Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1996, 93: 6025-6030.
- 83 Dietrich RA, Delaney TP, Uknes SJ, Ward ER, Ryals JA and Dangl JL. *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell*. 1994, 77, 565-577.
- 84 Dietrich RA, Richberg MH, Schmidt R, Dean C and Dangl JL. A novel zinc finger protein is encoded by the *Arabidopsis* LSD1 gene and functions as a negative regulator of plant cell death. *Cell*. 1997, 88: 685-694.
- 85 Dievart A, and Clark SE. Using mutant alleles to determine the structure and function of leucine-rich repeat receptor-like kinases. *Curr. Opin. Plant Biol*. 2003, 6: 507-516.
- 86 Dittmar KD, Banach M, Galigniana MD and Pratt WB. The role of DnaJ-like proteins in glucocorticoid receptor-hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90-p60-hsp70 foldosome complex. *J Biol Chem*, 1998, 273, 7358-7366.
- 87 Dong XN. SA, JA, ethylene, and disease resistance in plant. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, 1: 316-326
- 88 Dorokhov YL, Makinen K, Frolova OY, Merits A, Saarinen J, Kalkkinen N, Atabekov JG and Saarma M. A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein, *FEBS Lett*. 1999, 461: 223-228.
- 89 Drouin G and Dover GA. Independent gene evolution in the potato actin gene family demonstrated by phylogenetic procedures for resolving gene conversions and the phylogeny of angiosperm actin genes. *J. Mol. Evol*. 1990, 31(2): 132-150
- 90 Du L and Chen Z. Identification of genes encoding receptor-like protein kinases as possible targets of pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding proteins in *Arabidopsis*. *Plant J*. 2000, 24: 837-847.
- 91 Duguid JR and Dinauer MC. Library subtraction of in vitro cDNA libraries to identify

- differentially expressed genes in scrapie infection. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18: 2789-2792.
- 92 Ebadi M, Iversen PL, Hao R, Cerutis DR, Rojas P, Happe HK, Murrin LC and Pfeiffer RF. Expression and regulation of brain metallothionein. *Neurochemistry International*, 1995, 27: 1-22.
- 93 Ellis J, Dodds P and Pryor T. Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. *Curr Opin Plant Biol.* 2000, 3: 278-284.
- 94 Ellis J and Jones D. Structure and function of proteins controlling strain-specific pathogen resistance in plants. *Curr Opin Plant Biol.* 1998, 1: 288-293.
- 95 Erickson FL, Dinesh-Kumar SP, Holzberg S, Ustach CV, Dutton M, Handley V, Corr C and Baker BJ. Interactions between tobacco mosaic virus and the tobacco N gene. *Phil.Trans. R. Soc. Lond. B.* 1999, 354: 653-658.
- 96 Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K and Somssich IE. Early nuclear events in plant defence signalling, rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J.* 1999, 18: 4689-4699.
- 97 Evans SJ, Datson NA, Kabbaj M, Thompson RC, Vreugdenhil E, De Kloet ER, Watson SJ and Akil H. Evaluation of Affymetrix Gene Chip sensitivity in rat hippocampal tissue using SAGE analysis. *Serial Analysis of Gene Expression. Eur J Neurosci.* 2002, 16: 409-413.
- 98 Faivre-Rampant O, Cardle L, Marshall D, Viola, R. and Taylor MA. Changes in gene expression during meristem activation processes in *Solanum tuberosum* with a focus on the regulation of an auxin response factor gene. *J Exp Bot.* 2004, 55 (397): 613-622.
- 99 Fan CY, Lee S and Cyr DM. Mechanisms for regulation of Hsp70 function by Hsp40. *Cell Stress & Chaperones*, 2003, 8: 309-316.
- 100 Fan SG and Wu GJ. Characteristics of plant proteinase inhibitors and their applications in combating phytophagous insects. FAN and Wu - Plant proteinase inhibitors *Bot. Bull. Acad. Sin.* 2005, 46: 273-292.
- 101 Feng J, Yuan F, Gao Y, Liang C, Xu J, Zhang C and He L. A novel antimicrobial protein isolated from potato (*Solanum tuberosum*) shares homology with an acid phosphatase. *Biochem J.* 2003, 376 (2): 481-487.
- 102 Fernandez D, Santos P, Agostini C, Bon MC, Petitot AS, Silva MC, Guerra-Guimraes L, Ribeiro A, Argout X and Nicole M. Coffee (*Coffea arabica* L.) genes early expressed during infection by the rust fungus (*Hemileia vastatrix*). *Mol. Plant Pathol.* 2004, 5: 527-536
- 103 Fiona J, Woodger, Frank Gubler¹ and Barry J. Pogson² and John V. Jacobsen. A Mak-like kinase is a repressor of GAMYB in barley aleurone. *Plant J.* 2003, 33: 707-717
- 104 Flor H. Current status of gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1971, 9: 275-296.
- 105 Fock I I, Collonnier C, Purwito A, Luisetti J, Souvannavong VV, Vedel F, Servaes A, Ambroise A, Kodja H, Ducreux G and Sihachakr D. Resistance to bacterial wilt in somatic hybrids between *Solanum tuberosum* and *Solanum phureja*. *Plant Sci.* 2000, 160(1): 165-176.
- 106 Frenkel C, Peters JS, Tieman DM, Tiznado ME and Handa AK. Pectin methylesterase regulates

- methanol and ethanol accumulation in ripening tomato (*Lycopersicon esculentum*) fruit. *J. Biol. Chem.* 1998, 273: 4293–4295.
- 107 Fritz H. Foreword. In K. von der Helm, B.D. Korant, and J.C. Cheronis (eds.), *Proteases as Targets for Therapy*. Berlin: Springer-Verlag, 2000. pp. V-VI.
- 108 Frohman MA, Dush MK and Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85(23): 8998–9002
- 109 Frye CA, Innes RW. An Arabidopsis mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell*. 1998, 10: 947–956.
- 110 Frye CA, Tang D, Innes RW. Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2001, 98: 373–378
- 111 Gabriel D and Rolfe B. Working models of specific recognition in plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 1990, 28: 365–391.
- 112 Gao G, Qu DY, Lian Y, Jin LP and Feng L X. A RAPD marker linked to the potato resistance to bacterial wilt. *Acta Phytopathology Sinica*. 2002, 32(3): 267–271.
- 113 GAO P, Wang GY, Zhao HJ, Fan L and Tao YZ. Isolation and identification of submergence-induced genes in maize (*Zea mays*) seedlings by suppression subtractive hybridization. *Acta Botanica Sinica*. 2003, 45(4): 479–483.
- 114 Gao AG, Hakimi SM, Mittanck CA, Wu Y, Woerner BM, Stark DM, Shah DM, Liang J and Rommens CM. Fungal pathogen protection in potato by expression of a plant defensin peptide. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 1307–1310.
- 115 Gebhardt C and Valkonen JP. Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Annu. Rev. Phytopathol.* 2001, 39: 79–102.
- 116 Sachetto-Martins G, Franco LO and de Oliveira DE. Plant glycine-rich proteins: a family or just proteins with a common motif? *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000, 1492, 1–14.
- 117 Giritch A, Ganai M and Udo W. Stephan and Helmut B'baumlein. Structure, expression and chromosomal localisation of the metallothioneinlike gene family of tomato. *Plant Molecular Biology*. 1998, 37: 701–714.
- 118 Giovane A, Servillo L, Balestrieri C, Raiola A, D'Avino R, Tamburrini M, Ciardiello MA and Camardella L. Pectin methylesterase inhibitor. *Biochimica and Biophysica Acta*. 2004, 1696: 245–252.
- 119 Glover JR and Lindquist S. Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*. 1998, 94, 73–82.
- 120 Godiard L, Sauviac L, Torii KU, Grenon O, Mangin B, Grimsley NH and Marco Y. ERECTA, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt. *Plant J*. 2003, 36(3): 353–365.
- 121 Gonzalez ET and Allen C. Characterization of a *Ralstonia solanacearum* operon required for polygalacturonate degradation and uptake of galacturonic acid. *Molecular Plant and Microbe*

- Interactions. 2003, 16(6): 536-544.
- 122 Gregory J, Scott and Mark W. Rosegrant and Claudia Ringler, Global projections for root and tuber crops to the year 20. Food Policy. 2000, 25:561-597.
- 123 Guan LS, Rauchman M and Wang ZY. Induction of Rb-associated protein (RbAp46) by Wilm's tumor suppressor WT1 mediates growth inhibition. J Biol Chem, 1998, 273(42): 27047-27050.
- 124 Guagliardi AL, Cerchia S, Bartolucci and Rossi M. The chaperonin from the archaeon *Sulfolobus solfataricus* promotes correct refolding and prevents thermal denaturation in vitro. Protein Sci. 1994, 3, 1436-1443.
- 125 Gubler F, Chandler PM, White R and Llewellyn D. GA signalling in barley aleurone cells: control of SLN1 and GAMYB expression. Plant Physiol. 2002, 129, 191-200.
- 126 Gubler F, Kalla R, Roberts JK and Jacobsen JV. Gibberellin-regulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI alpha-amylase gene promoter. Plant Cell. 1995, 7, 1879-1891.
- 127 Gubler U and Hoffman BJ. A simple and very efficient method for generating complementary DNA libraries. Gene. 1983, 25: 263-269.
- 128 Gueneron M, Timmers AC, Boucher C and Arlat M. Two novel proteins, PopB, which has functional nuclear localization signals, and PopC, which has a large leucine-rich repeat domain, are secreted through the hrp-secretion apparatus of *Ralstonia solanacearum*. Mol Microbiol. 2000, 36(2): 261-277.
- 129 Sessa G, D'Ascenzo M, Loh YT and Martin GB. Biochemical properties of two protein kinases involved in disease resistance signaling in tomato. Biol. Chem. 1998, 273(25): 15860-15865.
- 130 Gupta RS. Protein phylogenies and signature sequences: a reappraisal of evolutionary relationships among archaeobacteria, eubacteria, and eukaryotes. Microbiol. Mol. Biol. 1998, 62, 1435-1491.
- 131 Gupta RS and Singh B. Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. Curr. Biol. 1994, 4: 1104-1114.
- 132 Gutierrez-Campos R, Torres-Acosta JA, Saucedo-Arias LJ and Gomez-Lim MA. The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. Nature Biotech. 1999, 17: 1223-1226.
- 133 Han CU, Lee CH, Jang KS, Choi GJ, Lim HK, Kim JC, Ahn SN, Choi JE, Cha JS, Kim HT, Cho KY and Lee SW. Identification of rice genes induced in a rice blast-resistant mutant. Mol Cells. 2004, 17(3): 462-468.
- 134 Haq SK, Atif SM and Khan RH. Protein proteinase inhibitor genes in combat against insects, pests, and pathogens: natural and engineered phytoprotection. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2004, 431: 145-159.
- 135 Hara-Nishimura I, Hatsugai N, Nakaune S, Kuroyanagi M and Nishimura M. Vacuolar processing enzyme: an executor of plant cell death. Curr Opin Plant Biol. 2005, 8(4): 404-8.
- 136 Hara-Nishimura I, Inoue K and Nishimura M. A unique vacuolar processing enzyme responsible

- for conversion of several proprotein precursors into the mature forms. FEBS Lett. 1991, 294:89-93.
- 137 Hatsugai N, Kuroyanagi M, Yamada K, Meshi T, Tsuda S, Kondo M, Nishimura M and Hara-Nishimura I. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. Science. 2004, 305: 855-858.
- 138 Hawkes JG. The potato evolution, biodiversity and genetic resources. Belhaven Press, 1990, pp259.
- 139 Hayward AC. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. Annu. Rev. Phytopathol. 1991, 29: 65-87.
- 140 He LY. Characterization of *Pseudomonas solanacearum* from china, Plant Dis. 1987, 67: 1357-1362.
- 141 Hedrick SM, Cohen DI, Nielsen EA and Davis MM. Isolation of cDNA clones encoding T cell-specific membrane-associated proteins. Nature. 1984, 308: 149-153.
- 142 Helena S, Sarka S and Lenka B. High content of endogenous cytokinins stimulates activity of enzymes and proteins involved in stress response in *Nicotiana tabacum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 2004, 79: 169-179.
- 143 Herman C and D'Ari R. Proteolysis and chaperones: the destruction/reconstruction dilemma. Curr. Opin. Microbiol. 1998, 1: 204-209.
- 144 Hilder VA, Gatehouse AMR, Sheerman SE, Barker RF and Boulter D. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. Nature. 1987, 330: 160-163.
- 145 Hinderhofer K and Zentgraf U. Identification of a transcription factor specifically expressed at the onset of leaf senescence. Planta. 2001, 213(3): 469-473.
- 146 Guo HW and Ecker JR. The ethylene signaling pathway: new insights. Current Opinion in Plant Biology, 2004, 7:40-49.
- 147 Halim VA, Vess A, Scheel D and Rosahl S. The role of salicylic acid and jasmonic acid in pathogen defence. Plant Biol. 2006, 8: 307-313.
- 148 Huamán Z. Systematic botany and morphology of the potato. International Potato Center, Lima, Peru. 1986, P6.
- 149 Huang S, van der Vossen EAG, Kuang H, Vleeshouwers VGAA, Zhang N, Borm TJH, van Eck HJ, Baker B, Jacobsen E and Visser RGF. Comparative genomics enabled the isolation of the *R3a* late blight resistance gene in potato. Plant J. 2005, 42, 251-261.
- 150 Hubank M and Schatz DG. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. Nucleic Acids Research, 1994, 22(25): 5640-5648.
- 151 Jensen RE and Johnson AE. Protein translocation: is Hsp70 pulling my chain? Curr Biol, 1999, 9: 779-782.
- 152 Ji W, Wright MB, Cai L, Flament A and Lindpaintner K. Efficacy of SSH PCR in isolating differentially expressed genes. BMC Genomics. 2002, 3(1): 12.
- 153 Jia SR, Qu XM, Feng LX and Tang X. Progress in the genetic engineering of potato cultivars for

- resistance to bacterial wilt in 1987–1995. In Genetic Engineering of Potato by Introducing Antimicrobial Peptides (Jia, S.R. and Qu, X.M., eds.), pp. 1–12, The China Agricultural Science and Technology Press, Beijing. 1996.
- 154 Jones DA and Jones JDG. The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. *Adv Bot Res.* 1997, 24: 89-167.
- 155 Kanda A, Yasukohchi M, Ohnishi K, Kiba A, Okuno T and Hikichi Y. Ectopic expression of *Ralstonia solanacearum* effector protein PopA early in invasion results in loss of virulence. *Molecular Plant and Microbe Interactions.* 2003, 16(5): 447-455.
- 156 Kang Y, Liu H, Genin S, Schell MA and Denny TP. *Ralstonia solanacearum* requires type 4 pili to adhere to multiple surfaces and for natural transformation and virulence. *Mol Microbiol.* 2002, 46(2): 427-437.
- 157 Kanzaki H, Saitoh H, Ito A, Fujisawa S, Kamoun S, Katou S, Yoshioka H and Terauchi R. Cytosolic HSP90 and HSP70 are essential components of INF1-mediated hypersensitive response and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant Pathol.* 2003, 4: 383–391.
- 158 Karin T, Rupert W O, David PA and Willem FB. Specific binding sites for an antifungal plant defensin from Dahlia (*Dahlia merckii*) on fungal cells are required for antifungal activity. *Molecular Plant and Microbe Interactions.* 2000, 13: 54–61
- 159 Keen N. Gene-for-gene complementary in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Genet.* 1990, 24: 447-463.
- 160 Kiba A, Tomiyama H, Takahashi H, Hamada H, Ohnishi K, Okuno T and Hikichi Y. Induction of resistance and expression of defense-related genes in tobacco leaves infiltrated with *Ralstonia solanacearum*. *Plant Cell Physiol.* 2003, 44(3): 287-295.
- 161 Kim JY, Chung YS, Paek KH, Park YI, Kim JK, Yu SN, Oh BJ and Shin JS. Isolation and characterization of a cDNA encoding the cysteine proteinase inhibitor, induced upon flower maturation in carnation using suppression subtractive hybridization. *Mol Cells.* 1999, 9(4): 392-397.
- 162 Klein M, Pieri I, Uhlmann F, Pfizenmaier K and Eisel U. Cloning and characterization of promoter and 5'UTR of the NMDA receptor subunit 2: Evidence for alternative splicing of 5'-non-coding exon. *Gene.* 1998, 208 (2): 259-269.
- 163 Kobe B and Deisenhofer J. Proteins with leucine-rich repeats. *Curr Opin Struct Biol.* 1995, 5: 409-416.
- 164 Koiwa H, Bressan RA and Hasegawa PM. Expression of proteinase inhibitor genes - host plant/insect interaction. *Trends Plant Science.* 1997, 2: 379-384
- 165 Kosano H, Stensgard B, Charlesworth MC, McMahon N and Toft DO. The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins. *J Biol Chem.* 1998, 273, 32973-32979.
- 166 Gruden K, Strukelj B, Ravnikar M, Poljsak-Prijatelj M, Mavric I, Brzin J, Pungercar J and

- Kregar I. Potato cysteine proteinase inhibitor gene family: molecular cloning, characterisation and immunocytochemical localisation studies. *Plant Molecular Biology*. 1997, 34, 317–323.
- 167 Krausz JP and Thurston D. Breakdown of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in tomato. *Phytopathology*. 1975, 65: 1272–1274.
- 168 Kuang WW, Thompson DA, Hoch RV and Weigel RJ. Differential screening and suppression subtractive hybridization identified genes differentially expressed in an estrogen receptor-positive breast carcinoma cell line. *Nucleic Acids Research*. 1998, 26(4): 1116–1123.
- 169 Lahaye T. Illuminating the molecular basis of gene-for-gene resistance: *Arabidopsis thaliana* RRS1-R and its interaction with *Ralstonia solanacearum* popP2. *Trends Plant Sci*. 2004, 9(1): 1–4.
- 170 Levesque V, Fayad T, Ndiaye K, Nahe Diouf M and Lussier JG. Size-selection of cDNA libraries for the cloning of cDNAs after suppression subtractive hybridization. *Biotechniques*. 2003, 35(1): 72–78.
- 171 Li TX, Wang J, Bai Y, Sun X and Lu Z. A novel method for screening species-specific gDNA probes for species identification. *Nucleic Acids Res*. 2004, 32(4): E45.
- 172 Liang P and Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. 1992, 257: 967–971.
- 173 Liao H, Wong FL, Phang TH, Cheung MY, Li WY, Shao G, Yan X and Lam HM. GmPAP3, a novel purple acid phosphatase-like gene in soybean induced by NaCl stress but not phosphorus deficiency. *Gene*. 2003, 318: 103–11.
- 174 Lingle SE and Dyear JM. Cloning and expression of sucrose synthase²¹ cDNA from sugarcane[J]. *Journal of Plant physiology*, 2001, 158 (1): 1292131.
- 175 Lisitsyn N, Lisitsyn N and Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science*. 1993, 259: 5640–5648.
- 176 Liu H, Kang Y, Genin S, Schell MA and Denny TP. Twitching motility of *Ralstonia solanacearum* requires a type IV pilus system. *Microbiology*. 2001, 147(12): 3215–3229.
- 177 Lorenzo O, Rodríguez D, Nicolás G, Rodríguez PL and Nicolás C. A new protein phosphatase 2C (FsPP2C1) induced by abscisic acid is specifically expressed in dormant beechnut seeds. *Plant Physiology*, 2001, 125, 1949–1956.
- 178 Lorito M, Woo SL, Garcia I, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S and Scala F. Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1998, 95, 7860–7865.
- 179 Macario AJL and de Macario EC. The Archaeal Molecular Chaperone Machine: Peculiarities and Paradoxes. *Genetics*, 1999, 152, 1277–1283.
- 180 Mangin B, Thoquet P, Olivier J and Grimsley NH. Temporal and multiple quantitative trait loci analyses of resistance to bacterial wilt in tomato permit the resolution of linked loci. *Genetics*. 1999, 151(3): 1165–1172.
- 181 Martin C and French ER. Bacterial wilt of potato. Peru, Lima: Technical Information Bulletin

- 13 CIP. 1985, 16-18.
- 182 Mergeay M, Monchy S, Vallaey S, Auquier V, Benotmane A, Bertin P, Taghavi S, Dunn J, van der Lelie D and Wattiez R. *Ralstonia metallidurans*, a bacterium specifically adapted to toxic metals: towards a catalogue of metal-responsive genes. FEMS Microbiol Rev. 2003, 27(2-3): 385-410.
- 183 Meskiene I, Bogre L, Glaser W, Balog J, Brandstotter M, Zwerger K, Ammerer G and Hirt H. MP2C, a plant protein phosphatase 2C, function as a negative regulator of mitogen activated protein kinase pathways in yeast and plants. Proc Natl Acad Sci. 1998, 95, 1938-1943.
- 184 Micheli F. Pectin methylesterases: Cell wall enzymes with important roles in plant physiology. Trends Plant Sci. 2001, 6: 414-419.
- 185 Molina A, Mena M, Carbonero P and GarciaOlmedo F. Differential expression of pathogen-responsive genes encoding two types of glycine-rich proteins in barley. Plant Mol. Biol. 1997, 33, 803-810.
- 186 Montesano M, Hyytiainen H, Wettstein R and Palva ET. A novel potato defence-related alcohol: NADP+ oxidoreductase induced in response to *Erwinia carotovora*. Plant Mol. Biol. 2003, 52, 177-189.
- 187 Morris E and Walker J. Receptor-like protein kinases, the keys to response. Curr. Opin. Plant Biol. 2003, 4: 339-342.
- 188 Mosolov VV, Grigor'eva LI and Valueva TA. Plant proteinase inhibitors as multifunctional proteins. Appl. Biochem. Microbiol. 2001, 37: 643-650.
- 189 Mukaihara T, Tamura N, Murata Y and Iwabuchi M. Genetic screening of Hrp type III-related pathogenicity genes controlled by the HrpB transcriptional activator in *Ralstonia solanacearum*. Mol Microbiol. 2004, 54 (4): 863-75.
- 190 Muslin AJ, Tanner JW, Allen PM and Shaw AS. Interaction of 14-3-3 with signaling proteins is mediated by the recognition of phosphoserine. Cell. 1996, 84, 889-897.
- 191 Neuhaus JM. Plant chitinases (PR-3, PR-4, PR-8, PR-11). In SK Datta, S Muthukrishnan, eds, Pathogenesis-Related Proteins in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL. 1999, pp 77-105.
- 192 Niebel A, Heungens K, Barthels N, Inze D, Van Montagu M and Gheysen G. Characterization of a pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection. Mol Plant Microbe Interact. 1995, 8, 371-378.
- 193 Nishi T, Tajima T, Noguchi S, Ajisaka H and Negishi H. Identification of DNA markers of tobacco linked to bacterial wilt resistance. Theor Appl Genet. 2003, 106(4): 765-770.
- 194 O'Neill LA. Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor/toll-like receptor superfamily. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2002, 270, 47-61.
- 195 Ozawa H, Tanaka H, Ichinose Y, Shiraishi T and Yamada T. Bacteriophage P4282, a parasite of *Ralstonia solanacearum*, encodes a bacteriolytic protein important for lytic infection of its host. Mol Genet Genomics. 2001, 265(1): 95-101.
- 196 Park JM, Park CJ, Lee SB, Ham BK, Shin R and Paek KH. Overexpression of the tobacco Tsi1

- gene encoding an EREBP/AP2- type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell*. 2001, 13, 1035–1046.
- 197 Perera KDA, Hartman GL and Poulos JM. Introduction procedures and the evaluation of peppers for resistance to *P. solanacearum*. Bacterial Wilt. The Australian Center for International Agricultural Research, 1992, 193-198.
- 198 Pilling J, Willmitzer L and Fisahn J. Expression of a *Petunia inflata* pectin methyl esterase in *Solanum tuberosum* L. enhances stem elongation and modifies cation distribution. *Planta*. 2000, 210, 391–399.
- 199 Pontier D, Tronchet M, Rogowsky P, Lam E and et Roby D. Activation of *hsr203*, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Molecular Plant and Microbe Interactions*. 1998, 11(6): 544-554.
- 200 Poussier S, Cheron JJ, Couteau A and Luisetti J. Evaluation of procedures for reliable PCR detection of *Ralstonia solanacearum* in common natural substrates. *J Microbiol Methods*. 2002, 51(3): 349-359.
- 201 Qu DY. Use of unreduced gametes of potato for TPS production through 4x - 2x crosses : (dissertation) . Wageningen : Wageningen Agricultural University , 1996, 38-46.
- 202 Raiola A, Camardella L, Giovane A, Mattei B, De Lorenzo G, Cervone F and Bellincampi D. Two *Arabidopsis thaliana* genes encode functional pectin methylesterase inhibitors. *FEBS Lett*. 2004, 557, 199–203.
- 203 Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing—a three-way connection. *EMBO J*. 1998, 17: 4905–4908
- 204 Rebrikov DV, Britanova OV, Gurskaya NG, Lukyanov KA, Tarabykin VS and Lukyanov SA. Mirror orientation selection (MOS): a method for eliminating false positive clones from libraries generated by suppression subtractive hybridization. *Nucleic Acids Res*. 2000, 28(20): E90.
- 205 Reddy MK, Nair S, Singh BN, Mudgil Y, Tewari KK and Sopory SK. Cloning and expression of a nuclear encoded plastid specific 33 kDa ribonucleoprotein gene (33RNP) from pea that is light stimulated. *Gene*. 2001, 263 (1): 179-187.
- 206 Rensing SA and Maier UG. Phylogenetic analysis of the stress-70 protein family. *J. Mol. Evol*. 1994, 39: 80-86.
- 207 Ricard J and Noat G. Electrostatic effects and the dynamics of enzyme reactions at the surface of plant cells. 1. A theory of the ionic control of a complex multi-enzyme system, *Eur. J. Biochem*. 1986, 57: 929–967.
- 208 Robatzek S and Somssich IE. A new member of the *Arabidopsis* WRKY transcription factor family, AtWRKY6, is associated with both senescence- and defence-related processes. *Plant J*. 2001, 28, 123–133.
- 209 Rothnie HM. Plant mRNA 3' end formation. *Plant Mol Biol*, 1996, 32: 43-61.
- 210 Rowe PR, Sequeira L and Gonzalez LC. Additional gene for resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*. *Phytopathology*. 1972, 62: 1093-1094.

- 211 Rowe PR and Sequeira L. Inheritance of resistance to *Pseudomonas solanacearum* in *Solanum phureja*. *Phytopathology*. 1970, 60: 1499-1501.
- 212 Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY and Hunt MD. Systemic acquired resistance. *Plant Cell*. 1996, 8: 1809-1819.
- 213 Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, Gouzy J, Mangenot S, Arlat M, Billault A, Brottier P, Camus JC, *et al.* Genome sequence of the plant pathogen *Ralstonia solanacearum*. *Nature*. 2002, 415: 497-502.
- 214 Scheel D. Resistance response physiology and signal transduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 1998, 1: 305-310.
- 215 Schell MA. Control of virulence and pathogenicity genes of *Ralstonia solanacearum* by an elaborate sensory network. *Annu Rev Phytopathol.* 2000, 38: 263-292.
- 216 Schena M, Shalon D, Davis RW and Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995, 270: 467-470.
- 217 Schonfeld J, Heuer H, Van Elsas JD and Smalla K. Specific and Sensitive Detection of *Ralstonia solanacearum* in Soil on the Basis of PCR Amplification of *fliC* Fragments. *Appl Environ Microbiol.* 2003, 69(12): 7248-7256.
- 218 Schummer M, Ng WL, Nelson PS, Bumgarner RE and Hood LE. A Simple High-Performance DNA Arraying Device for Comparative Expression Analysis of a Large Number of Genes. *Biotechniques*. 1997, 23:1087-1092.
- 219 Sequeira L and Rowe PR. Selection and utilization of *Solanum phureja* clones with high resistance to different strains of *Pseudomonas solanacearum*. *Am Potato J.* 1969, 46:451-462.
- 220 Shibuya N and Minami E. Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol Mol Plant Pathol.* 2001, 59, 223-233.
- 221 Shin R, Park JM, An JM and Paek KH. Ectopic expression of *Tsi1* in transgenic hot pepper plants enhances host resistance to viral, bacterial, and oomycete pathogens. *Molecular Plant and Microbe Interactions.* 2002, 15, 983-989.
- 222 Shiozaki K and Russell P. Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J.* 1995, 14, 492-502.
- 223 Shiu SH and Bleecker AB. Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and receptor-like proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2003, 132, 530-543.
- 224 Shiu SH, Karlowski WM, Pan R, Tzeng YH, Mayer KFX and Lia WH. Comparative Analysis of the Receptor-Like Kinase Family in *Arabidopsis* and Rice. *The Plant Cell.* 2004, 16, 1220-1234.
- 225 Silva NF and Goring DR. The proline-rich, extensin-like receptor kinase-1 (PERK1) gene is rapidly induced by wounding. *Plant Mol. Biol.* 2002, 50, 667-685.
- 226 Sin SF and Chye ML. Expression of proteinase inhibitor II proteins during floral development in *Solanum americanum*. *Planta* 2004, 219: 1010-1022.
- 227 Soares-Costa A, Beltramini L, Thieman O and Henrique-Silva F. A sugarcane cystatin: recombinant expression, purification, and antifungal activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

- 2002, 296: 1194-1199.
- 228 Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, Menachem E and Levine A. The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*. 1999, 11: 431-443.
- 229 Song J, Bradeen JM, Naess SK, Raasch JA, Wielgus SM, Haberalach GT, Liu J, Kuang H, Austin-Phillips S, Buell CR, Helgeson JP and Jiang J. Gene RB cloned from *Solanum bulbocastanum* confers broad spectrum to potato late blight. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003, 100(16): 9128-9133.
- 230 Sudakevitz D, Kostlanova N, Blatman-Jan G, Mitchell EP, Lerrer B, Wimmerova M, Katcoff DJ, Imberty A and Gilboa-Garber N. A new *Ralstonia solanacearum* high-affinity mannose-binding lectin RS-III structurally resembling the *Pseudomonas aeruginosa* fucose-specific lectin PA-III. *Mol Microbiol*. 2004, 52(3): 691-700.
- 231 Sun G, Liu F and Lin TJ. Identification of *Pseudomonas aeruginosa*-induced genes in human mast cells using suppression subtractive hybridization: up-regulation of IL-8 and CCL4 production. *Clin Exp Immunol*. 2005, 142, 199-205.
- 232 Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Paterson AH, Pineda O, Roder MS, Wing RA, Wu W, and Young ND. High Density Molecular Linkage Maps of the Tomato and Potato Genomes. *Genetics*. 1992, 132(4): 1141-1160.
- 233 Tans-Kersten J, Brown D and Allen C. Swimming motility, a virulence trait of *Ralstonia solanacearum*, is regulated by FlhDC and the plant host environment. *Molecular Plant and Microbe Interactions*. 2004, 17(6): 686-695
- 234 Tedder TF, Streuli M, Schlossman SF and Saito H. Isolation and structure of a cDNA encoding the B1 (CD20) cell-surface antigen of human Blymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1988, 85(1): 208-212.
- 235 Thoquet P, Olivier J, Sperisen C, Rogowsky P, Prior P, Anaïs G, Mangin B, Bazin B, Nazer R and Grimsley N. Polygenic resistance of tomato plants to bacterial wilt in the French West Indies. *Molecular Plant and Microbe Interactions*. 1996, 9: 837-842.
- 236 Tian AG, Luo GZ, Wang YJ, Zhang JS, Gai JY and Chen SY. Isolation and characterization of a Pti1 homologue from soybean. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(396): 535—537.
- 237 TIAN ZD, Liu J and Xie CH. Isolation of resistance related-genes to *Phytophthora infestans* with suppression subtractive hybridization in the R-gene-free potato. *Acta Genetica Sinica*. 2003, 30(7): 597-605.
- 238 Tjaden J, Mohlmann T, Kampfenkel K, Henrichs G and Neuhaus HE. Altered plastidic ATP/ADP-transporter activity influences potato (*Solanum tuberosum* L.) tuber morphology, yield and composition of tuber starch. *Plant J*. 1998, 16, 531-540.
- 239 Torii KU, Mitsukawa N, Oosumi T, Matsuura Y, Yokoyama R, Whittier RF and Komeda Y. The Arabidopsis ERECTA gene encodes a putative receptor protein kinase with extracellular

- leucine-rich repeat. *Plant Cell*. 1996, 8, 735-746.
- 240 Torii KU. Receptor kinase activation and signal transduction in plants: An emerging picture. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2000, 3, 361-367.
- 241 Trindade LM, Horvath B, Bachem C, Jacobsen E and Visser RGF. Isolation and functional characterization of a stolon specific promoter from potato (*Solanum tuberosum*). *Gene*. 2003, 303: 77-87.
- 242 Tronchet M, Ranty B, Marco Y and Roby D. HSR203 antisense suppression in tobacco accelerates development of hypersensitive cell death. *Plant J*. 2001, 27(2):115-127.
- 243 Tung PX, Rasco ETJ, Vander ZP and Schmiediche P. Resistance of *Pseudomonas solanacearum* in the potato. I. Effects of sources of resistance and adaptation. *Euphytica*. 1990, 45: 203-210.
- 244 Tung PX, Rasco ET, Vander ZP and Schmiediche P. Resistance to *Pseudomonas solanacearum* in the potato: II. Aspects of host-pathogen-environment interaction. *Euphytica*. 1990, 45: 21-215.
- 245 Vailleau F, Daniel X, Tronchet M, Montillet JL, Triantaphyllides C and Roby D. A R2R3-MYB gene, AtMYB30, acts as a positive regulator of the hypersensitive cell death program in plants in response to pathogen attack. *Proc. Natl Acad. Sci.* 2002, 99, 10179-10184.
- 246 van der Geer P, Hunter T and Lindberg RA. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu Rev Cell Biol.* 1994, 10: 251-337.
- 247 van der Vossen E, Sikkema A, te Linte Hekkert B, Gros J, Stevens P, Muskens M, Wouters D, Pereira A, Stiekema W and Allefs J. 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*. 2003, 36, 867-882.
- 248 van der Vossen EAG, Gros J, Sikkema A, Muskens M, Wouters D, Wolters P, Pereira A and Allefs J. The Rpi-bib2 gene from *solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. *Plant J*. 2005, 44, 208-222.
- 249 Van Gijsegem F, Vasse J, De Rycke R, Castello P and Boucher C. Genetic dissection of *Ralstonia solanacearum* hrp gene cluster reveals that the HrpV and HrpX proteins are required for Hrp pilus assembly. *Mol Microbiol.* 2002, 44 (4): 935-946.
- 250 van Heusden GP. 14-3-3 Proteins: Regulators of Numerous Eukaryotic Proteins. *IUBMB Life*. 2005, 57(9): 623-629.
- 251 Van Loon LC. Occurrence and properties of plant pathogenesis-related proteins. In SK Datta, S Muthukrishnan, eds, *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1999, pp 1-19.
- 252 Vasse J, Frey P and Trigalet A. Microscopic studies of intercellular infection and protoxylem invasion of tomato roots by *Pseudomonas solanacearum*. *Molecular Plant and Microbe Interactions*. 1995, 8: 241-251.
- 253 Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B and Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995, 268: 484-487.

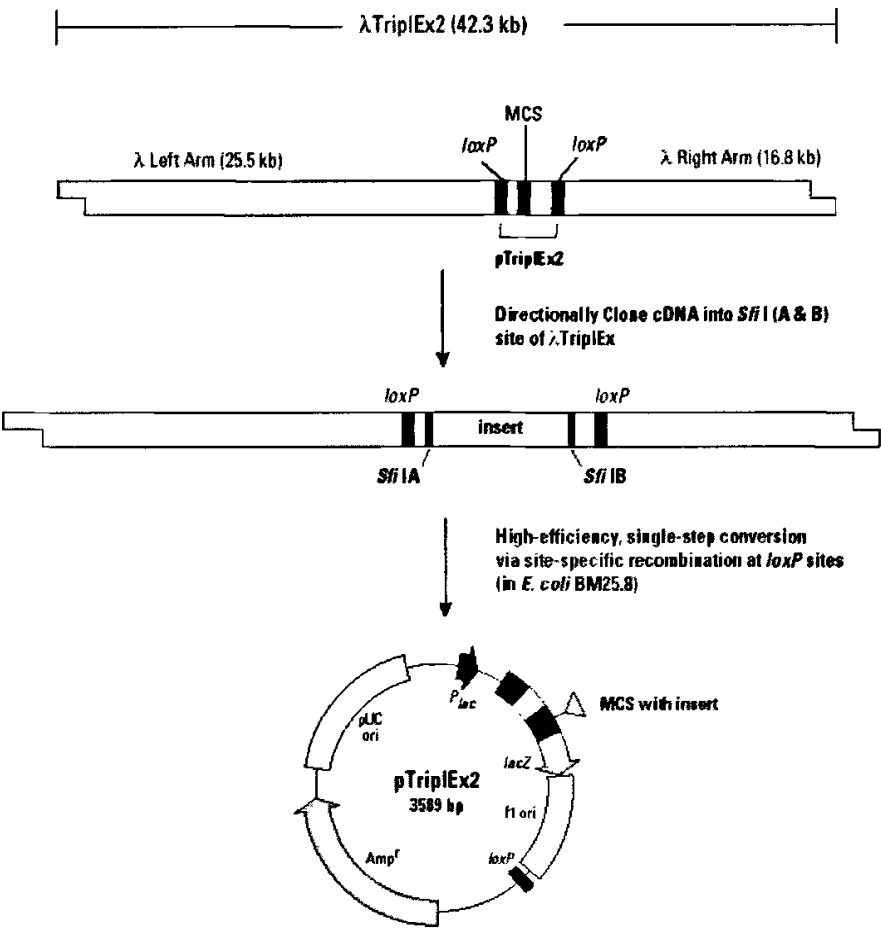
- 254 Von tein OD, Thies WG and Hofmann MA. A high throughput screening for rarely transcribed differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*. 1997, 25(13): 2598-2602.
- 255 Vorwerk S, Somerville S and Somerville C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci*. 2004, 9, 203-209.
- 256 Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Freijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res*. 1995, 23: 4407-4414.
- 257 Walker JC and Zhang R. Relationship of a putative receptor protein kinase from maize to the S-locus glycoproteins of Brassica. *Nature*. 1990, 345, 743-746.
- 258 Wang JF, Olivier J, Thoquet P, Mangin B, Sauviac L and Grimsley NH. Resistance of tomato line Hawaii7996 to *Ralstonia solanacearum* Pss4 in Taiwan is controlled mainly by a major strain-specific locus. *Molecular Plant and Microbe Interactions*. 2000, 13(1): 6-13.
- 259 Wang L, Pei Z, Tian Y and He C. OsLSD1, a rice zinc finger protein, regulates programmed cell death and callus differentiation. *Molecular Plant and Microbe Interactions*. 2005, 18(5): 375-84.
- 260 Walsh P, Bursac' D, Law YC, Cyr D and Lithgow T. The J-protein family: modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO reports*. 2004, 5: 567-571.
- 261 Weber-Ban EU, Reid BG, Miranker AD and Horwich AL. Global unfolding of a substrate protein by the Hsp100 chaperone ClpA. *Nature*. 1999, 401, 90-93.
- 262 Weckx S, De Rijk P, Van Broeckhoven C and Del-Favero J. SSHSuite: an integrated software package for analysis of large-scale suppression subtractive hybridization data. *Biotechniques*. 2004, 36(6): 1043-1045.
- 263 Wen F, Zhu Y and Hawes MC. Effect of pectin methylesterase gene expression on pea root development. *Plant Cell*. 1999, 11, 1129-1140.
- 264 Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C and Baker B. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to Toll and the Interleukin-2 receptor. *Cell*. 1994, 78: 1101-1115
- 265 Wolf S, Grsic-Rausch S, Rausch T and Greiner S. Identification of pollen-expressed pectin methylesterase inhibitors in Arabidopsis. *FEBS Lett*. 2003, 555, 551-555.
- 266 Wullings BA, Van Beuningen AR, Janse JD and Akkermans ADL. Detection of *Ralstonia solanacearum*, which causes brown rot of potato, by fluorescent in situ hybridization with 23S rRNA-targeted probes. *Appl Environ Microbiol*. 1998, 64(11): 4546-4554.
- 267 Yang GP, Ross DT, Kuang WW, Brown PO and Weigel RJ. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. *Nucleic Acids Research*. 1999, 27, 1517-1523.
- 268 Yabuuchi E, Kosako Y, Yano I, Hotta I and Nishiuchi Y. Transfer of two *Bulkholderia* and *Alcaligenes* species to *Ralstonia* gen nov: Proposal of *Ralstonia pickettii*. *Microbiol. Immunol*. 1995, 39: 897-904.
- 269 Yu YG, Buss GR and Saghai-Marooof MA. Isolation of a superfamily of candidate disease-resistance genes in soybean based on a conserved nucleotide-binding site. *Proc Natl Acad*

- Sci USA. 1996, 93: 11751-11756
- 270 Yuan FH and He LY. An anti-*Ralstonia solanacearum* protein from and its immunogold localization in vivo. Bacterial wilt Disease. Germany Springer Press. 1998, 209-217.
- 271 Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, Kern SE, Hruban RH, Hamilton SR, Vogelstein B and Kinzler KW. Gene expression profiles in normal and cancer cells. Science. 1997, 276(5316): 1268-1272.
- 272 Zhang Y, Huck-Hui N, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Bird A and Reinberg D. Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. GENES & DEVELOPMENT. 1999, 13: 1924-1935.
- 273 Zheng J, Zhao J, Tao Y, Wang J, Liu Y, Fu J, Jin Y, Gao P, Zhang J, Bai Y and Wang G. Isolation and analysis of water stress induced genes in maize seedlings by subtractive PCR and cDNA macroarray. Plant Mol Biol. 2004, 55(6): 807-823.
- 274 Zhou J, Loh YT, Bressan RA and Martin GB. The tomato gene *Pti1* encodes a serine/threonine kinase that is phosphorylated by Pto and is involved in the hypersensitive response. Cell. 1995, 83(6): 925-35.
- 275 Zhou N, Tootle TL and Glazebrook J. *Arabidopsis* PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. Plant Cell. 1999, 11: 2419-2428.

附录

附录A: λ TripIEx2载体转化为质粒载体图

Appendix A: Converting λ TripIEx2 to pTripIEx2

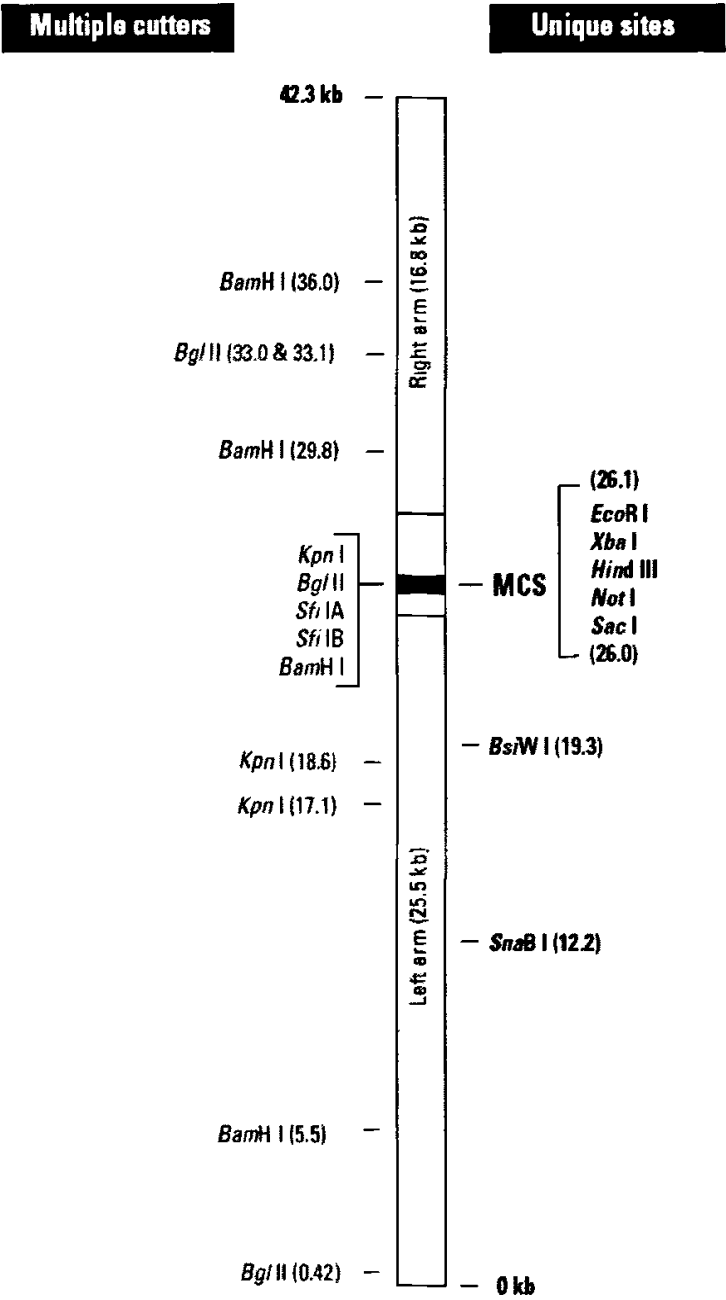


Conversion of a recombinant λ TripIEx2 to the corresponding pTripIEx2.

The λ TripIEx2 MCS is located within an embedded plasmid, which is flanked by $loxP$ sites at the λ junctions. Transduction of a λ TripIEx2 lysate into *E. coli* strain BM25.8 promotes Cre recombinasemediated release and circularization of pTripIEx2 at the $loxP$ sites. pTripIEx2 carries the bla gene for ampicillin resistance and the pUC ori for autonomous replication in *E. coli*. The MCS provides several unique restriction sites flanking the Sfi I A & B sites to facilitate the subcloning and analysis of inserts. See Appendix C for a restriction map of λ TripIEx2.

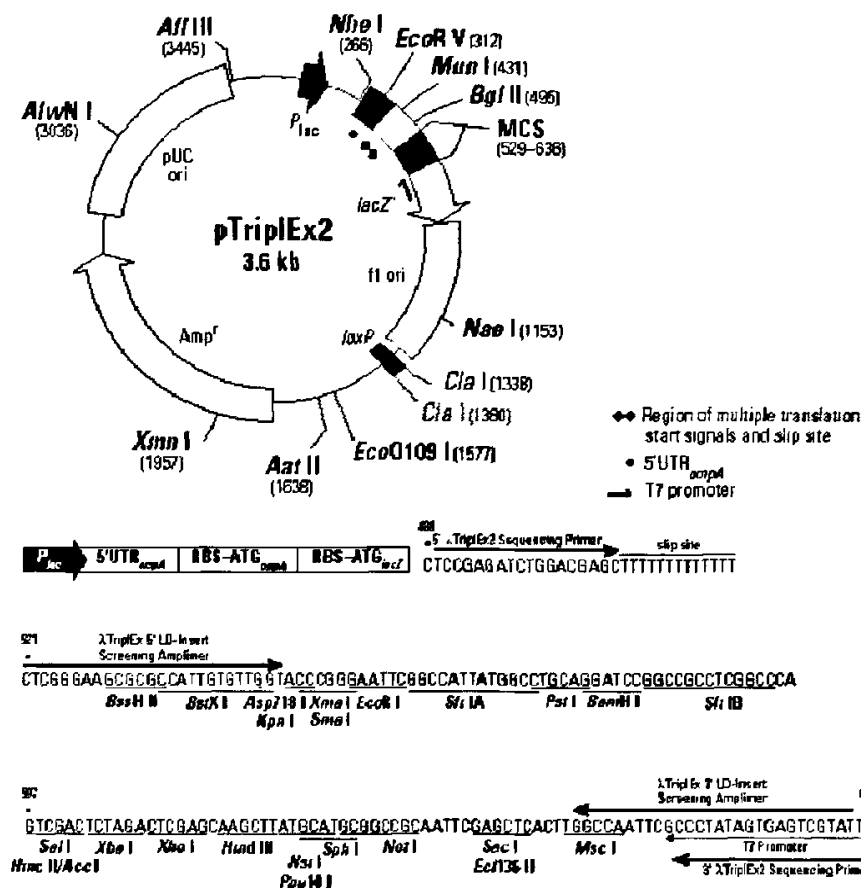
附录B: cDNA文库λTripIEx2载体酶切位点图

Appendix B: Restriction Map of λTripIEx2



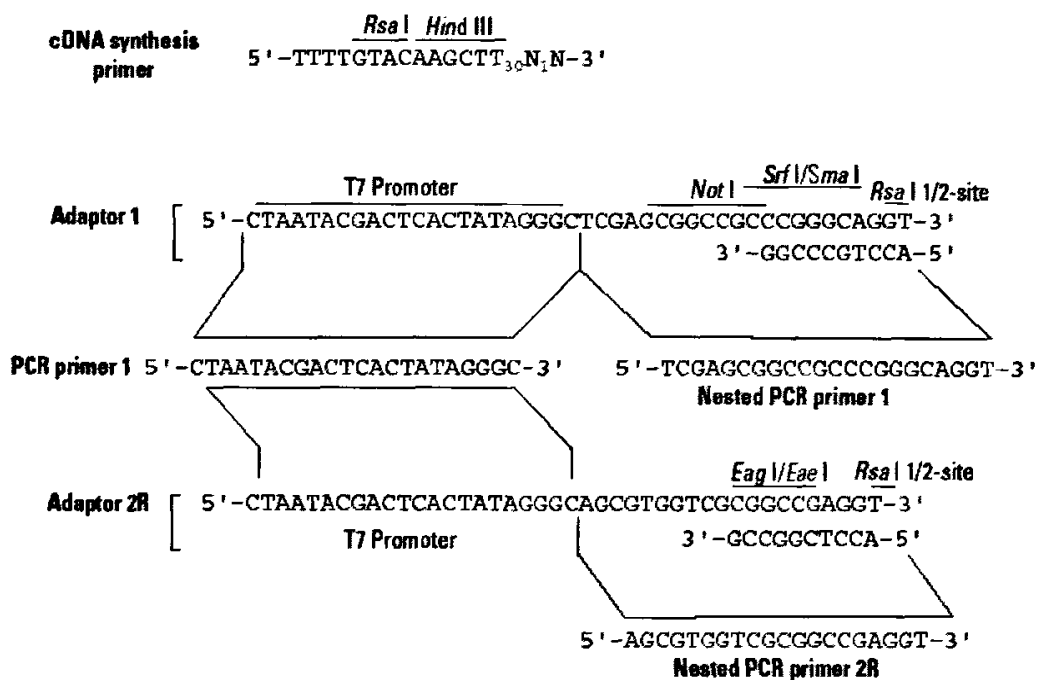
附录C: pTriplEx2 载体信息

Appdx C: pTriplEx2 vector information



附录D: 差减文库所用接头信息

Appendix E: Adaptor information of subtractive library



致谢

衷心感谢我的导师屈冬玉研究员三年来的亲切关怀和悉心指导，能成为您的弟子并聆听您的教诲是我一生的荣幸。从论文的选题、设计、实施至成文，每一步无不凝聚着导师的心血和汗水。导师的授业解惑、言传身教使我终身受益。导师高尚的品德、渊博的知识、严谨求实的治学态度、勤奋忘我的工作精神、干练果断的工作作风，更是我终身追求的目标和榜样。在三年多的博士生活中，导师对我的成长倾注了大量的心血，给我无微不至的关怀和体贴，使我在思想素质、科研能力和为人处世等各方面都有了显著提高。值此论文完成之际，请允许我向您致以最诚挚的谢意！此时此刻我只想对您说一句话‘吾爱吾师’。

特别感谢金黎平研究员、黄三文博士和王晓武博士。在论文的完成过程中，从实验设计、具体实施到最终的论文撰写等每一个环节无不与您们息息相关。三位老师不仅在学业上给我以指导，在精神上给我以鼓励，也在生活上给我以帮助。借此机会，表示我最崇高的敬意和最衷心的感谢。

感谢马铃薯组和生物技术室全体成员三年来对我学习和工作的极大支持，特别感谢谢开云老师、卞春松老师、段绍光老师和李颖老师对我实验材料种植和生活上的关心和支持，谢谢你们对我实验进展的关心和生活上的无私帮助！

感谢中国农业科学院研究生院和蔬菜花卉研究所的各位领导和老师在我攻读博士学位期间给予了无私的指导、关心和帮助，特别感谢冯兰香研究员、冯东昕研究员对我实验材料鉴定提供的方便和指导，徐利群老师在我博士学习期间给予的莫大支持和关心。

在蔬菜所马铃薯组和生物技术室工作和学习的三年里，和实验室的老师和同学结下了深厚友谊。特别感谢邵刚博士，是我们经常的学术争论激励我前进，同时也感谢你在我论文撰写过程中提出的宝贵意见。感谢张建华博士、袁华玲博士、范敏博士、辛翠华博士、徐建飞博士、夏利红博士等对我日常生活的关心和帮助及精神上的鼓励。

感谢 Edwin 博士和师兄赵建军博士、姜平博士后及汤继凤博士等对我在荷兰期间给予我生活和学习上的支持和帮助。感谢车代弟教授、孙中魁博士和印东升研究员等，是你们使我度过了轻松愉快而又难忘的荷兰时光。

感谢山东省农科院的领导和老师对我读博士期间给予生活上的支持和帮助。

感谢所有关心和帮助我的人。

最后要感谢我最亲爱的家人：我的父母、岳父母、妻子和女儿，是您们在我求学过程中给予了莫大的鼓励和无私的奉献；尤其感谢妻子陈晓燕女士三年多来的默默付出，还有我可爱的女儿李文超的理解。谢谢你们的支持！祝愿你们平安、健康！

李广存
2006年7月

作者简历

李广存, 男, 1972 年 7 月出生, 副研究员。1995 年毕业于东北农业大学, 获理学学士学位, 同年分配到山东省农业科学院生物技术研究中心工作植物分子生物学研究工作。2002 年获得山东大学生命科学院理学硕士学位。2003 年 9 月考入中国农业科学院研究生院攻读博士学位。自 1995 年以来一直从事植物分子生物学研究工作。参加和参与主持国家及省部级课题 8 项, 曾获山东省科技进步二等奖 1 项, 山东省农业科学院科技进步一等奖 1 项, 山东省十佳国际科技合作项目 1 项。参与主持的农业部“948”引进项目和山东省科技攻关项目均已通过专家鉴定, 现正在申报山东省科技进步奖。期间曾被评为山东省农科院优秀团员和山东省农科院先进工作者。发表论文 20 余篇, 指导和协助指导硕士 2 人。在读博士期间, 除完成博士论文的研究内容外, 导师厚爱, 还被导师派往荷兰瓦赫宁根大学, 进行马铃薯抗晚疫病基因 *R3b* 和 *R2-like* 的克隆工作, 并已取得阶段性进展。

研究生期间发表和待发表的主要论文

1. 李广存, 金黎平, 谢开云, 屈冬玉. 抑制差减杂交 (SSH) 技术及其在植物基因分离上的应用. 中国生物工程杂志. 2004, 24(9): 26~31.
2. 李广存, 金黎平, 谢开云, 屈冬玉. 马铃薯青枯病研究进展. 中国马铃薯. 2004, 18(6): 350~354.
3. 李广存, 金黎平, 谢开云, 庞万福, 卞春松, 段绍光, 屈冬玉. 马铃薯青枯病抗性鉴定新方法. 中国马铃薯. 2006, 3: 129-134.
4. 李广存, 金黎平, 谢开云, 卞春松, 段绍光, 屈冬玉. 马铃薯 *KTI-like* EST 的分离及表达分析. 园艺学报 (近期刊出)
5. 李广存, 金黎平, 谢开云, 李颖, 屈冬玉. 马铃薯蛋白酶抑制子 *StPI* 基因的克隆及表达. 中国农业科学. (已接受)
6. 李广存, 金黎平, 王晓武, 谢开云, 谢丙炎, 屈冬玉. cDNA 文库与 RACE 方法结合克隆马铃薯 *DnaJ-like* 基因全长 cDNA. 园艺学报. (已接受)
7. Li Guangcun *et al.* Gene expressed early during infection by *Ralstonia solanacearum* in diploid potato. (Submitted)
8. Li Guangcun *et al.* Cloning and expression analysis of *StPMEI* gene full-length cDNA in diploid potato. (in preparation).
9. Li Guangcun *et al.* Expression pattern analysis of methyl-CpG-binding domain-containing-like gene in diploid potato. (in preparation).