

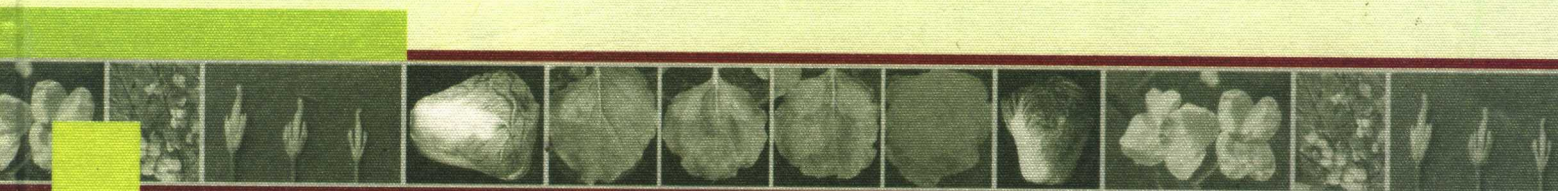
园艺作物基因组学研究

——CAAS-WU合作研究论文集

Genomics Research on Horticultural Crops

——Paper Collection of CAAS - WU Joint Program

屈冬玉 主编



中国农业科学技术出版社

园艺作物基因组学研究
——CAAS-WU 合作研究论文集
Genomics Research on Horticultural Crops
——Paper Collection of CAAS-WU Joint Program

屈冬玉 主编

中国农业科学技术出版社

图书在版编目(CIP)数据

园艺作物基因组学研究/屈冬玉主编. —北京:中国
农业科学技术出版社, 2006. 3

ISBN 7-80167-923-7

I. 园... II. 屈... III. 园艺作物—基因组—研究
IV. S601

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2006)第 011820 号

责任编辑
责任校对
出版发行

经 销
印 刷
开 本
印 数
版 次
定 价

鲁卫泉

马丽萍 张素红 贾晓红

中国农业科学技术出版社

(北京市海淀区中关村南大街 12 号 邮编:100081 电话:010-62189012)

新华书店北京发行所

北京市佳信达艺术印刷有限公司

889mm × 1194mm 1/16 印张:24.5

1~1500 册 字数:620 千字

2006 年 3 月第 1 版 2006 年 3 月第 1 次印刷

128.00 元

谨以此书献给为中荷农业
科技教育合作作出杰出贡
献的人们！

To Whom with Great Contribution to
Sino-Dutch Collaboration on Agricultural
Research and Education!

《园艺作物基因组学研究》编委会

主 编 屈冬玉

副主编 王晓武 杜永臣

编 委 屈冬玉 王晓武 杜永臣 孙日飞

刘广树 谢开云 胡 鸿 黄三文

武 剑 张延国

CAAS-WU 博士生联合培养项目

简介

中国农业科学院和荷兰的瓦赫宁根大学已具有 20 多年的科研合作历史。受益于友好合作,双方许多联合培养的博士生已经完成或正在完成他们的博士论文。身为瓦赫宁根大学植物科学学院院长的 Jacobsen 教授是项目合作的发起人和负责人之一,他于 1996 年受聘为中国农业科学院名誉研究员并对该院的学术交流发挥咨询作用。合作双方均致力于高质量科学研究与培训,并希望通过建立正式与稳固的学术联系(例如,建立联合博士培养项目),进一步建设性地发展双方的合作。我们期望这一合作能够在为中国各地的其他科学研究和培训中心提供科研支持中发挥关键作用。2001 年 4 月项目的子项目:“蔬菜基因组学——从作物生产到健康食品”率先运作。

目标

博士生联合培养项目目标:

- 建立和增强中国农业科学院在食品生产各个领域的科研、教育和推广方面的能力(机构建设)。
- 培养中国农业科学院的相关人力资源,以适应中国日益增长的人口对健康食品数量增加及质量提高的需求(能力建设)。
- 在中国建立科学知识基地,满足与当地条件相关且实用的跨学科知识的需要(知识开发)。
- 建立瓦赫宁根大学和中国农业科学院间高效、长期的合作,启动更多的科研合作项目(国际化)。

CAAS-WU Joint PhD Training Programme

Introduction

Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS) in Beijing and Wageningen University and Research Center (Wageningen UR) in the Netherlands have scientific cooperation for two decades. As a result of the cooperation many Chinese PhD students have finalized or are in the process of finalizing their Wageningen University dissertation. Prof. Dr. E. Jacobsen (project leader of the CAAS-WU cooperation and director of Wageningen Plant Sciences) is awarded the Honorary Professorship of CAAS in 1996, implying a position in the Advisory Board of CAAS.

Both partners aim for high quality scientific research and training, and like to further develop and structure their cooperation by establishing formal institutional linkages, i. e. a Joint PhD Training Program. It is expected that this cooperation can play a key-role in giving scientific support to other research and training centers throughout the country. The program started in April 2001 with a sub-PhD program; Vegetable Genomics: from Plant Production to Healthy Food.

Aims

The aims of the Joint PhD training program include:

- To develop and strengthen the institutional capacity in CAAS for research, training and extension in the respective areas of food production (institutional development).
- To build up human capacity in CAAS in view of the need to increase and improve the production of healthy food for a growing population (capacity building).
- To develop the scientific knowledge base in China in view of the need for interdisciplinary knowledge that is relevant and useful for the local conditions (knowledge development).
- To enable efficient, long-term collaboration between CAAS and WUR institutes and initiate joint research programs (Internalization).

序

改革开放以来,中国与荷兰在农业领域开展了广泛的合作,早在 20 世纪 80 年代初期,我国就与荷兰在畜牧、园艺和农业经济等领域开展了合作研究。1993 年荷兰瓦赫宁根大学植物科学学院院长 E. Jacobsen 教授应邀参加中国园艺学会“园艺作物品种改良国际学术研讨会”,作了题为“蔬菜生物技术研究”的报告,此后又多次以瓦赫宁根大学研究生院院长身份来访,商谈与中国农业科学院开展蔬菜分子生物学领域的合作研究及联合培养研究生事宜。在双方的共同努力下,1992 年首次开展了博士研究生联合培养,1996 年首位联合培养的博士研究生屈冬玉获得瓦赫宁根大学博士学位。在过去的十多年中,瓦赫宁根大学还通过 IAC 等项目的支持,以多种方式为中国培养了大量的科技人员。

在 E. Jacobsen 教授与中国农业科学院领导的共同推动下,1998 年中国农业科学院与荷兰瓦赫宁根大学签署了在北京联合组建园艺作物分子生物技术实验室及合作培养博士研究生的协议,并于 2001 年初正式签订了为期 5 年(2001 ~ 2005)的协议,即“蔬菜基因组学——从作物生产到健康食品”计划。同年这一项目列为科技部、农业部的重点国际合作项目,并在中国农业科学院蔬菜花卉研究所建立了中荷联合园艺作物基因组分析实验室。通过几年的建设,该实验室目前已拥有国际一流的研究条件,成为中荷农业科技交流的一个重要平台。依托该平台先后启动了 12 个博士研究生联合培养项目,开展了旨在提高蔬菜作物营养品质、抗病性和产量的基因组学、功能基因组学和生物信息学等方面的研究。通过这一项目的执行,在甘蓝显性雄性不育基因定位与基因表达、马铃薯晚疫病细菌毒力基因克隆、番茄抗白粉病基因表达、白菜类作物遗传作图与微量营养成分含量遗传分析等方面取得了重要进展,显著提高了我国蔬菜作物的基因组学与功能基因组学研究水平。

中国农业科学院和瓦赫宁根大学的长期合作在双方的共同努力下取得了很大的进展,合作的领域和深度不断扩展。2004 年,“国家重点基础研究发展(973)

计划”和荷兰皇家科学院联合建立“中荷科技战略合作研究”项目,开展“白菜有益人体健康微量营养品质性状的基因组学研究和马铃薯抗晚疫病基因克隆”的研究,这不仅标志着双方合作的重大成功,同时也显示了合作的美好前景和巨大潜力。

本书收集了自 2001 年以来中国农业科学院与荷兰瓦赫宁根大学合作研究的部分论文,总结了双方合作研究的最新成果,对进一步扩大双方的科技交流和推动双方的合作具有重要意义。作为一部学术性著作,该书反映了该领域的最新动态,对从事蔬菜作物遗传学、病理学、基因组学和功能基因组学等研究的人员具有很好的参考价值。

中国农业科学院院长兼党组书记
中国农业科学院研究生院院长
中国农业科技国际交流协会理事长

翟虎渠

2006 年 1 月 20 日

目 录

马铃薯晚疫病菌分子遗传及与寄主互作研究进展	(1)
利用 cDNA-AFLP 技术鉴定马铃薯晚疫病菌小种特异无毒基因候选表达序列	(9)
与马铃薯晚疫病菌无毒基因 <i>Avr1</i> 连锁的 AFLP 标记	(16)
cDNA-AFLP 结合 BSA 初步研究马铃薯晚疫病菌小种特异无毒基因差异表达片段	(21)
甘蓝型油菜种子无机磷含量变异的初步分析	(26)
作物低植酸育种研究进展	(30)
番茄 <i>Cf-4-Avr4</i> 互作系统中信号转导基因的克隆与功能分析	(37)
利用 PCR 标记同时鉴定番茄抗根结线虫和番茄斑点萎凋病毒病基因	(46)
利用多重 PCR 反应同时筛选番茄 <i>Tm2²</i> 和 <i>Mi</i> 基因	(53)
与番茄 <i>Ps-2</i> 位点紧密连锁的 AFLP 分子标记的获得	(60)
番茄对黄瓜花叶病毒病的抗性材料鉴定及其转育	(66)
番茄抗晚疫病材料的鉴定及初步转育	(70)
利用 cDNA-AFLP 检测不同甘蓝雄性不育育性相关基因时序性表达	(74)
四种甘蓝雄性不育类型差异基因表达分析	(82)
青花菜快速碱化因子 <i>RALF</i> (Rapid Alkalinization Factors) 基因的克隆	(89)
与序列分析	(89)
青花菜花药发育相关基因 <i>BoDHAR</i> 及其启动子区的克隆与分析	(96)
辣椒 <i>C</i> 基因全长序列的获得及同源序列比较	(104)
大白菜部分叶球性状的 QTL 定位	(112)
大豆中 Glycinol 的分离与鉴定	(121)
外源茉莉酸对大豆异黄酮的影响	(129)
外源茉莉酸对大豆中异戊烯黄酮 Glyceollins 及其前体 Glycinol 累积的影响	(135)
异源表达细菌二氢喋呤合成酶基因提高拟南芥叶酸含量的研究	(142)
侵染花生的黄瓜花叶病毒 (CMV) CA 株系核酸全序列分析	(151)
Linkage mapping of a dominant male sterility gene <i>Ms-cd1</i> in <i>Brassica oleracea</i> ...	(158)

Transcript profiling of a dominant male sterile mutant (<i>Ms-cd1</i>) in cabbage during anther development	(168)
Characterization of natural variation for zinc accumulation and zinc response in <i>Brassica rapa</i> L.	(178)
Establishment of ecotilling for discovery of DNA polymorphisms in <i>Brassica rapa</i> natural population	(194)
Identification of QTLs related to bolting in <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i> (syn. <i>Brassica campestris</i> ssp. <i>pekinensis</i>)	(202)
Mapping QTLs for mineral content in heading Chinese cabbage (<i>Brassica rapa</i> L. ssp. <i>pekinensis</i>)	(211)
Genetic relationships within <i>Brassica rapa</i> as inferred from AFLP fingerprints	(223)
A cDNA-AFLP based strategy to identify transcripts associated with avirulence in <i>Phytophthora infestans</i>	(244)
The utility of NBS profiling for plant: a first study in tuber-bearing <i>Solanum</i> species	(262)
Tomato defense to the powdery mildew fungus: differences in expression of genes in susceptible, monogenic and polygenic resistance responses are mainly in timing	(272)
Transcript profiling of genes involved in powdery mildew induced defense responses in tomato mediated by papilla formation, fast or slow hypersensitive responses	(291)
Tomato defense against powdery mildew: quantitative resistance is mainly mediated by the hypersensitive response	(311)
Transcriptome investigations of powdery mildew challenged tomato lines carrying different combinations of resistance QTLs	(326)
Linkage disequilibrium mapping for complex Traits: individual markers versus Haplo-blocks	(348)
Developing institutional collaboration between Wageningen University (WU) and the Chinese Academy of Agricultural Sciences (CAAS): the joint CAAS-WU sandwich PhD program	(358)
后 记	(375)

马铃薯晚疫病菌分子遗传及与寄主互作研究进展

郭军 屈冬玉* 王晓武 金黎平 谢开云

中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081

摘 要 马铃薯晚疫病菌 *Phytophthora infestans* 是致病卵菌, 对全世界马铃薯作物具有毁灭性的危害。近年来, 马铃薯晚疫病的重新暴发再次引起了全世界的极大关注, 特别是对 *P. infestans* 的分子遗传学的研究, 包括病菌基因组遗传、转录和物理图谱的构建, 病菌致病的分子机制以及马铃薯-*P. infestans* 互作分子机制等。本文就近几十年来马铃薯晚疫病菌在生物学、遗传学和病理学, 特别是分子遗传学的研究作一简要综述, 并对其研究趋势进行展望。

关键词 *Phytophthora infestans*; 分类学地位; 基因组分析; 致病机理; 马铃薯-*P. infestans* 互作

由致病卵菌 *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary 引起的马铃薯晚疫病是重要的作物病害。Waterhouse^[1] 曾对 *P. infestans* 分类史进行了详细的记载。最初 Montagne 将 *P. infestans* 划分在 *Botrytis* 属内, 后来 de Bary 将其划为 *Phytophthora* 属内的一个种^[2]。尽管很早就把 *P. infestans* 作为具有重大影响的病菌, 但是在真菌遗传学和生物学研究方面, 并没有把它像子囊菌和担子菌那样作为主要的病菌来进行研究; 同时又由于许多学者错误地认为卵菌与真菌在分类上没有差异^[3,4]。所以, 与其他真菌相比, 卵菌在经典遗传学和分子遗传学方面的研究是非常缓慢和缺乏的。然而马铃薯作为全世界最大的非谷类作物, 特别是过去几十年来由于晚疫病造成的损失愈来愈严重, 因此, 马铃薯晚疫病菌的研究再度引起全世界科学家的极大关注^[5]。与此同时, 研究马铃薯晚疫病的实验技术水平也得到了较大的改善和提高。所有这些为全世界的科学家提供了难得的机遇去深入研究晚疫病菌的生物学、遗传学和致病机制, 特别是对其分子遗传学的研究。

1 晚疫病菌的分类学地位

P. infestans 属于活体营养型 (Biotrophy) 致病卵菌, 寄主范围狭窄, 侵染马铃薯、番茄和其他 50 个 *Solanum* 植物。*P. infestans* 现被划分在 Chromista 界, Oomycota 门, Peronosporales 目, Pythiaceae 科, *Phytophthora* 属。虽然卵菌有很多类似真菌的特性, 但是它不再被划分为真菌^[6,7]。过去一直错误地把属于卵菌的 *P. infestans* 认为是真菌, 虽然卵菌和真菌具有一些共同的特点, 例如, 菌丝的生长等, 但是现代研究并不支持这一观点。通过对卵菌的新陈

* 通讯作者 (Author for correspondence)

基金项目: 中-荷联合园艺作物基因组技术实验室资助项目

代谢^[8,9]、细胞壁组成成分^[10]、rRNA 序列^[3,4]的研究表明,卵菌与硅藻、褐藻和金藻有较近的亲缘关系,而与真菌的亲缘关系较远。这表明卵菌具有与真菌截然不同的遗传和生化互作机制。

2 *P. infestans* 基因组结构和变异的研究

1987 年 Tooley 和 Thierrien^[11]通过福尔根反应得到 *P. infestans* 的基因组大小约为 2.5×10^8 bp,比一般真菌基因组大。由于基因组大,所以可以通过光学显微镜观察到染色体的减数分裂。这样有助于细胞学的早期研究,以了解物种是否为二倍体或单倍体,将来可以借助其他方法如荧光原位杂交进行物理图谱构建。另一方面,由于基因组太大,难以通过脉冲电泳进行精确分离,这样就导致了很难检测到 B-DNA 或小片段染色体,然而其他卵菌如 *Bremia Lactucae*(莴苣盘梗霉菌)却可以检测到^[12]。

研究表明,*P. infestans* 可能具有一个可变和可塑的基因组。这可以用来解释已报道的研究,如在一定的单一培养条件下,*P. infestans* 的生长率,菌落生态学,无毒性以及致病侵染。虽然这种内部培养的变异可能是外来的,但能够说明变异机制的转座子序列已经被鉴定^[13]。重要染色体的异质或者许多隐性缺陷性位点可能在 *P. infestans* 存在,这可以用来解释不同杂交的卵孢子萌发率为 0~100% 的原因,以及致病 *P. infestans* 的亲本杂交会产生非致病后代^[14]。1980 年以前,*P. infestans* 除在墨西哥存在有性生殖外,绝大部分的其他国家和地区的 *P. infestans* 以无性生殖生存,因此 *P. infestans* 缺陷型位点的积累或染色体异常的存在并不奇怪。同其他很少具有有性循环的二倍体生物一样,这是由于存在很少的外界选择力以便保护基因组结构或者去除隐性缺陷位点。需要说明的一点是,这种现象并不只是存在于 *P. infestans*,同时也普遍存在于二倍体生物^[15]和单倍体真菌中^[16]。

目前利用 DNA 标记构建了 *P. infestans* 的遗传图谱,这张图谱可以帮助解释其基因组变异和进行图位克隆^[17]。除了一含有 13 个 AFLP 标记(都来自于 A1 型亲本)和交配型位点的区域外,*P. infestans* 基因组所有的区域都遵循正常的孟德尔分离规律。这个例外可能就是结构变异的证据,同时以前的研究也表明这个区域存在异常分离^[18~20]。

大量的倍性变异在 *P. infestans* 及其相关其他物种中报道过。早期的细胞学研究表明,*P. infestans* 的某些生理小种的染色体数目为 9~12 条,其他生理小种的则为这些生理小种的两倍。染色体计数和细胞分光光度分析以及遗传研究确定了 *P. infestans* 正常情况下为二倍体,C 值为 9~10,当然也存在三倍体、四倍体以及非整倍体^[11]。不同倍性的亲本杂交不是产生有性后代丰产度的主要影响因素,即使这种杂交也会产生染色体内含物变化的杂交后代。有研究表明,高倍性 *P. infestans* 生理小种更易于适应环境,倍性变异利于高适应性生理小种的进化^[21]。在倍性水平上的变异易导致后代分离比例的无规律性和遗传研究的复杂性,因此,目前的实验尽量应用已知或明确的二倍体。

3 *P. infestans* 致病性研究

病菌致病性研究的长期目的是为了了解和最终控制病菌致病途径。随着遗传技术的发展,对病菌侵染过程的细胞学和致病因素的生理生化的研究已转向导致致病和具有寄主特异

性的基因的研究。

晚疫病菌生理小种对不同马铃薯品种侵染能力的差异,在块茎和叶片组织上生长的能力以及在马铃薯和番茄寄主上的差异,都有详细的研究^[39,40],进一步的研究将有助于对致病机制的理解以及病菌怎样避免不同寄主的抗性反应。

马铃薯晚疫病菌对苯氨基类抗真菌剂的抗性特点将利于创新抗真菌剂,分离此抗性基因以作为卵菌转化的选择性标记。苯氨基类化合物是首次应用于抗卵菌的广谱性药剂,由于经常使用会导致病菌抗性的增强^[41]。其他的抗真菌化合物,例如苯丙咪唑和脱甲基固醇抑制剂,对卵菌的杀菌效果并不理想。生化研究表明,苯氨基类抗真菌剂杀菌的原因在于可能抑制了病菌的 rRNA 合成。遗传研究表明,可能一个或多个半显性位点决定寄主的抗性,同时连锁标记的获得将有利于通过染色体步移克隆寄主抗性基因^[42]。

目前有几个介于病菌致病过程的基因已被分离得到,但对它们的功能知之甚少。Pieterse 等^[35]利用差异表达克隆方法鉴定了在病菌侵染过程中优先表达的基因,其中几个基因编码已知蛋白如多态泛素和钙调蛋白,但对其它基因编码的蛋白尚需确定,编码钙调蛋白的这些基因包括合成富含氨基乙酸的 *ipiB* 基因家族以及可能编码小的分泌蛋白的 *ipiO* 基因。同时利用差异表达鉴定得到了病菌侵染前表达的基因,其中某个基因在游动孢子萌发时表达,这个基因可能编码含有多个八肽基序的分泌蛋白。Kamoun 等^[43]对编码小分子量(10ku)胞外蛋白的 *elicitin* 基因进行了分析,研究表明,这种蛋白首先在菌丝中表达,但同时又又在寄主上寄生的初始和活体营养阶段具有下调作用。目前这种形式表达的机制不很清楚,可能与诱导寄主结构或组织坏死有关。大多数 *Phytophthora* 种合成的蛋白 Elicitin 诱导许多寄主植物的组织坏死但却不能诱导马铃薯,所以这种蛋白在寄主-病菌互作的作用是有争议的。随着分子生物学和分子遗传学技术的发展,这些疑问将会被解答。

4 *P. infestans*-马铃薯互作的分子基础研究

4.1 *P. infestans*-马铃薯基因与基因互作研究

不论是马铃薯的野生种或栽培种,其对 *P. infestans* 的抗性有两种方式:垂直抗性和水平抗性。垂直抗性可以通过寄主的显性抗性基因产物与病菌中互补的无毒基因的产物互作这种形式表现出来,这种形式称之为“基因对基因”互作^[22]。互作的结果是植物表现高度敏感反应(HR, Hypersensitive Response, 植物细胞局部程序化死亡的一种),从而阻止病菌的进一步侵染。目前对寄主水平抗性的机制了解甚少,研究表明,HR 是寄主对卵菌所有抗性形式中的主要形式。

研究表明,至少 11 个抗性基因(命名为 *R1-R11*)已经从 *Solanum demissum* 整合到马铃薯栽培种^[23],并且许多抗性基因已经定位在染色体上,其中包括 *R1* 和 *R3*^[24,25], *R2*^[26], *R6* 和 *R7*^[27]。目前只有 *R1* 被克隆得到^[28]。对 *P. infestans* 无毒性的遗传基础有过很多报道。这些研究表明,大多数的互作是由显性无毒基因与互补的抗性基因相互作用。然而,不同 *P. infestans* 生理小种无毒基因表现不同,如 *Avr2* 和 *Avr4* 在某些病菌小种表现显性,而在另一些小种表现隐性。出现这种情况的原因可能是由于一个自由位点决定一个无毒基因,或者是由于上位显性作用。Al-Kherb^[14]等对 *Avr10* 的研究表明了上位显性作用的存在。

为了便于从 *P. infestans* 中图位克隆无毒基因, van der Lee 等^[17] 构建了第一张 *P. infestans* 连锁图谱, 含有 183 个 AFLP 标记和 7 个 RFLP 标记。Avr4 定位在连锁群 A2-a, Avr2 定位在连锁群 VI, Avr1 在连锁群 IV, Avr3、Avr10、Avr11 在连锁群 VIII, 并且紧密连锁。无毒基因位点的紧密连锁, 不仅在真菌中存在, 同时在另一个卵菌 *Phytophthora sojae* 也有发现^[29]。

一个含有大的插入片段和几倍基因组大小的 DNA 文库对图位克隆基因是非常必要的。近来, Whisson 等^[30] 利用 *P. infestans* 的含有 6 个无毒基因的 F₁ 后代个体构建了一个 BAC 库, 这个 BAC 库含有相当于 10 个 *P. infestans* 基因组大小的克隆, 平均插入片段大小为 98kb。通过三维构池策略利用 AFLP 标记筛选 BAC 库, 构建了一个含有 11 个克隆的跨越 Avr11 的 BAC 重叠群。目前他们正在构建跨越所有 Avr 位点的 BAC 重叠群, 寻找与无毒基因表型相符的无毒基因。

4.2 *P. infestans*-马铃薯互作的转录组学研究

在 *P. infestans*-马铃薯互作过程中, 如果病菌侵染成功, 同时植株表现感病症状, 则称之为亲和性互作; 否则寄主与病原物的关系为非亲和性互作。*P. infestans* 被寄主植物的感知和 *P. infestans* 避免或克服寄主植物的抵抗, 说明两者之间存在复杂的、动态的交流网络。生化反应路径的感应或者是互作中出现的特异细胞类型, 都是由于成千上万的基因上调或下调的结果。术语“互作转录组学”的意思是病菌和寄主互作过程中产生的寄主和病菌的转录物的总称^[31]。对 *P. infestans* 与寄主植物马铃薯互作的分子机制和过程的研究程度将决定转录组学的研究深度。

由于低消耗、高产出的 DNA 测序技术的快速发展, 植物病理学的研究进入了“基因组时代”。特别对许多作物而言, 大规模测序 cDNA 的项目正在启动实施。目前, *P. infestans* 和 *P. sojae* 的 ESTs (表达序列标签, Expressed Sequence Tags) 工作也已经开展。每个病菌有 2000 ~ 3000 个 ESTs 保存在 PGI (Phytophthora Genome Initiative) 数据库 (<http://www.ncgr.org/pgi/index.html>)^[32]。PGI 是全世界的科学家为了研究 *P. infestans* 和 *P. sojae* 基因组而创建的。美国农业部也投资进一步测序 41000 个 *P. sojae* ESTs 和 14000 个 *P. infestans* ESTs (<http://www.ncgr.org/pgc>)。

通过从利用 *Phytophthora* 侵染植物组织构建的 cDNA 文库中获得的 ESTs 可能来源于病菌或寄主植物。不过寄主植物和病菌的 ESTs 可以非常容易地通过应用生物信息分析的方法区分开来。Qutob 等^[33] 研究表明, 寄主植物和 *Phytophthora* 的 ESTs 的 GC 含量存在明显的不同, 根据此结论可以区别大多数的 ESTs。他们通过对仅利用大豆或 *P. sojae* 构建的 cDNA 文库获得 ESTs 来测算两者的 GC 含量, *P. sojae* 的 GC 含量为 58%, 而大豆的 GC 含量为 46%。同样利用 *P. sojae* 被侵染后的大豆构建的 cDNA 文库进行的序列分析研究表明, ESTs 的 GC 含量出现 46% 和 58% 两个峰值。从文库中获得的 2/3 的 ESTs 的 GC 含量为 58%, 表明这些 ESTs 来自于病菌。关于 *P. infestans* 和马铃薯, 同样病菌和寄主植物存在 GC 含量的不同。

病菌的许多蛋白在病菌致病过程中有很重要的作用, 这些蛋白可能是病菌表面组成成分。Torto 等^[34] 利用已存在的 EST 信息搜索编码潜在胞外蛋白的 *P. infestans* 基因。为此他们建立了 P_{EX} Finder V1.0 (P_{EX} 表示 *Phytophthora* 胞外蛋白) 运算法则以便快速鉴定得到的 ESTs 编码的分泌或细胞膜相关的蛋白, 从而得到具有与病菌生存或毒性相关的候选基因以进行下游功能分析。

在 *P. infestans* 与寄主马铃薯互作过程中,许多在寄主抗性 or 致病性方面起主要作用的基因具有上调作用。Pieterse 等^[35,36]通过差异筛选 *P. infestans* 基因组 cDNA 文库分离得到植物诱导的 *ipi* 基因,在具有上调作用的 *P. infestans* 序列中,*ipiO* 和 *ipiB* 基因是其中两个具有此功能的基因。van West 等^[37]研究表明,*ipiO* 基因在病菌侵染初期的正在侵入的菌丝中表达。通过差减杂交(subtractive hybridization)技术,Gönhaldt 等^[38]分离得到似黏液素基因家族,称之为 *car* 基因,*car* 基因在侵染初期的萌发静孢子表达,具有上调作用。

近年来,一种以 PCR 为基础用来分离差异表达基因的方法——抑制差减杂交法(Suppression subtractive hybridization),被用来研究马铃薯-*P. infestans* 的互作。这种方法可用于大批量测序工作以及检测微量差异表达转录物。SSH 方法已经被用来分离马铃薯与 *P. infestans* 亲和性互作和非亲和性互作过程中表现上调的马铃薯基因。更多的是,利用 SSH 得到病菌侵染后 15h 和 72h 不同差异表达的 cDNAs,这些 cDNAs 被用作探针筛选 Whisson 等构建的 BAC 库^[30]。每个探针与许多 BACs 杂交,但没有出现与同一个克隆杂交的情况。定量 RT-PCR 研究表明,这些 BACs 含有在侵染初期或晚期特异表达的序列,从而可以推测这些 BACs 是否含有病菌致病的候选基因。

5 展望

自从 1840 年的爱尔兰马铃薯大饥荒以来,马铃薯晚疫病病菌的生物学、遗传学和病理学的研究取得了可喜的成就和较大的进展,但怎样更好地利用杀真菌剂、植物遗传工程或其他策略去预防和控制马铃薯晚疫病,仍然需要进一步深入和加强研究。在对 *P. infestans* 遗传学研究方面,对病菌进行实验室操作的基本技术研究已成为重点,但并不仅局限于对病菌的重要基因和遗传网络的鉴定,同时对病菌的交配型、致病性、变异以及其他领域的研究也取得了较大的进展。此外,寄主植物马铃薯对晚疫病病菌的反应机制研究取得的成果将会促进对病菌遗传学的进一步了解和研究。

P. infestans 与寄主马铃薯互作机制的研究始终是一个重要的长期的研究课题。*P. infestans* 许多生物学方面的研究完全是在培养基上进行的,然而,*P. infestans* 自然生长和发育是受代谢物和一些来自植物信号的影响;这些信号究竟是什么以及它们怎样影响病菌的侵染过程,生长,吸器的形成,孢子形成和杂交;这些信号传导途径能不能被用来改造以形成寄主的持久抗性。这些问题将是需要解决又亟待研究的领域。

由于卵菌在分类学、遗传学以及生物学方面明显不同于真菌,所以通过对子囊菌和担子菌研究得到的结论对研究卵菌没有太大的意义。例如,就鉴定 *P. infestans* 基因而言,依靠传统的突变体途径已经不行了,只有利用以基因组为基础的或差异克隆策略才是可行的。通过对 *P. infestans* 的研究,可以获得生物学和遗传学新发现,这种发现不仅有其他真菌缺乏的途径如游动孢子形成,而且也有独创的人为类似途径如人工杂交。把 *P. infestans* 当作一种模式病菌来研究,这将更加有利于对许多其他的植物病菌、动物寄生虫、腐生物的了解。揭开 *P. infestans* 的分子遗传学的奥秘将是科学家为之奋斗的一项巨大和有重要意义的挑战,同时也将为防治马铃薯晚疫病提供新的思路和途径。

主要参考文献

- 1 Waterhouse G M. Key to the species of *Phytophthora* de Bary. Mycological papers No. 92 [C]. Commonwealth Mycological Institute, Kew, 1963
- 2 de Bary A. Researches into the nature of the potato fungus *Phytophthora infestans* [C]. JR Agric Soc England 2nd Series, 1876, 12:239 ~ 269
- 3 Förster, H., Coffey, M. D., Elwood, H., et al. Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoosporic fungi and implications for fungal evolution [J]. Mycologia, 1990, 82:306 ~ 312
- 4 Illingworth, C. A., Andrews, J. H., Bibeau, C., et al. Phylogenetic placement of *Athelia bombacina*, *Aureobasidium pullulans*, and *Colletotrichum gloeosporioides* inferred from sequence comparisons of small-subunit ribosomal RNAs [J]. Exp. Mycol., 1991, 15: 65 ~ 75
- 5 Daly, D. C. The blight is back [J]. Nat. Hist., 1996, 105:31
- 6 Barr, D. J. S.. The zoosporic grouping of plant pathogens, Entity or non-entity [R]. In: Zoosporic plant pathogens, A modern Perspectives (S.T. Buczaki. Ed.), pp. 43 ~ 83. Academic Press, 1983
- 7 Dick, M. W. The Straminipillous fungi. A new classification for the biflagellate fungi and their uniflagellate relatives with particular reference to Lagenidiaceous fungi [C]. C. A. B. Internat. Mycol. Pap. No. 168. 1995
- 8 Pfyster, G., Boraschi-Gaia, E., Weber, B., et al. A further report on the occurrence of acyclic sugar alcohols in fungi [J]. Mycol. Res., 1990, 92: 219 ~ 222
- 9 Vogel, H. J. Distribution of lysine pathways among fungi: evolutionary implications. Am. Nat., 1964, 98: 435 ~ 446
- 10 Bartnicki-Garcia, S., and Wang, M. C. Biochemical aspects of morphogenesis in *Phytophthora*: Its Biology, Taxonomy, Ecology, and Pathology (D.C. Erwin, S. Bartnicki-Garcia, and P. H. Tsao. Eds.), pp. 121 ~ 138 [C]. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN. 1983
- 11 Tooley, P. W. and Therrien, C. D. Cytophotometric determination of the nuclear DNA content of 23 Mexican and 18 non-Mexican isolates of *Phytophthora infestans* [J]. Exp. Mycol., 1987, 11: 19 ~ 26
- 12 Francis, D. M., and Michelmores, R. W. Two classes of chromosome-sized molecules are present in *Bremia lactucae* [J]. Exp. Mycol., 1993, 17: 284 ~ 300
- 13 Tooley, P. W. and Garfinkel, D. J. Presence of Tyl-copia group retrotransposon sequences in the potato late blight pathogen *Phytophthora infestans* [J]. Mol. Plant-Microbe Interact., 1996, 9:305 ~ 309
- 14 Al-Kherb, S. M., Fininsa, C., Shattock, R. C. et al. The inheritance of virulence of *Phytophthora infestans* to potato [J]. Plant Pathol., 1995, 44: 552 ~ 562
- 15 Valentine, G. H. The chromosome disorders [M]. William Heinmann, London, Canada. 1975
- 16 Perkins, D. D. The manifestation of chromosome rearrangements in unordered asci of *Neurospora* [J]. Genetics, 1974, 77: 459 ~ 489
- 17 Van der Lee, T., de Witte, I., Drenth, A., et al. AFLP linkage map of the oomycete *Phytophthora infestans* [J]. Fungal Gen. Biol., 1997, 21: 278 ~ 291
- 18 Judelson, H. S., Spielman, L. J., and Shattock, R. C. Genetic mapping and non-Mendelian segregation of mating type loci in the oomycete, *Phytophthora infestans* [J]. Genetics, 1995, 141: 503 ~ 512
- 19 Judelson, H. S. Chromosomal heteromorphism linked to the mating type locus of oomycete, *Phytophthora infestans* [J]. Mol. Gen. Genet., 1996, 252: 155 ~ 161
- 20 Judelson, H. S. Physical and genetic variability at the mating type locus of oomycete, *Phytophthora infestans* [J]. Genetics, 1996, 144: 1005 ~ 1013
- 21 Sansome, E. Polyploidy and induced gametangial formation in *Phytophthora infestans* [J]. J. Gen. Microbiol., 1977, 99: 311 ~ 316
- 22 Flor, H. H. Current status of the gene-for-gene concept [J]. Annu. Rev. Phytopathol., 1971, 9, 275 ~ 296
- 23 Wastie, R. L. Breeding for resistance. In: Advances in Plant Pathology, Vol. 7: *Phytophthora infestans*, the Cause of Late Blight of Potato (D. S. Ingram and P. H. Williams, eds), pp. 193 ~ 223 [M]. Academic