

· 研究报告 ·

## 拟南芥与大豆疫霉菌的非寄主互作及一个感病突变体的遗传分析

刘秋萍<sup>1,4</sup>, 曹华<sup>2,4</sup>, 姚茂金<sup>3,4</sup>, 马英<sup>3,4</sup>, 邓斌生<sup>3,4</sup>, 权军利<sup>4</sup>, 单卫星<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>西北农林科技大学植物保护学院, 杨凌 712100; <sup>2</sup>西北农林科技大学生命科学学院, 杨凌 712100

<sup>3</sup>西北农林科技大学农学院, 杨凌 712100; <sup>4</sup>西北农林科技大学陕西省农业分子生物学重点实验室, 杨凌 712100

**摘要** 非寄主抗病性是一种普遍的自然现象, 该文通过建立拟南芥-大豆疫霉菌(*Arabidopsis thaliana-Phytophthora sojae*)非寄主互作系统, 筛选对大豆疫霉菌感病的拟南芥突变体, 为研究植物对卵菌的非寄主抗病性遗传机制奠定基础。以大豆疫霉菌游动孢子接种拟南芥T-DNA插入突变体离体叶片, 从代表12 000个独立转化株系的40 000株T<sub>3</sub>代T-DNA插入拟南芥突变体中获得一系列对大豆疫霉菌感病的突变体。其中突变体581-51感病性状表现稳定, 离体叶片接菌后3天内出现明显的水渍状病斑, 4–5天后产生大量卵孢子和/或孢子囊。细胞学观察发现有典型的吸器形成。Southern杂交和遗传分析结果表明, 581-51突变体含有4个T-DNA插入事件, 其感病性状可能由隐性单基因控制。

**关键词** 拟南芥, 非寄主抗病性, 卵菌, 大豆疫霉菌, T-DNA插入突变体

刘秋萍, 曹华, 姚茂金, 马英, 邓斌生, 权军利, 单卫星 (2010). 拟南芥与大豆疫霉菌的非寄主互作及一个感病突变体的遗传分析. 植物学报 45, 548–555.

植物的非寄主抗病性是一种普遍的自然现象, 是指一种植物的所有个体对某种病原菌所有个体都具有的抗病性, 是一种广泛也极有可能比较持久的抗病性(Heath, 2000)。寄主植物的基因对基因抗病性一般是指植物种内水平的主动抗病性, 是通过单个抗性(R)基因直接或者间接识别由病原物无毒基因编码的效应蛋白来实现的(Flor, 1971; Jones and Dangl, 2006)。植物对病原物的这种主动抗病性也存在于种或属的水平上(Heath, 2000), 这种寄主种或属水平的抗病性也被归为非寄主抗病性。植物的许多非寄主抗病性都涉及植物的主动防卫反应(Hammond-Kosack and Jones, 1996), 因此存在植物对病原物的识别环节。

相对于在寄主R基因抗性方面取得的进展, 目前对植物非寄主抗性的机制知之甚少(Heath, 2000; Mysore and Ryu, 2004)。植物非寄主抗病性的遗传

基础还不十分清楚, 已有的研究表明其遗传基础比较多样。例如, 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)对假单胞菌的丁香假单胞杆菌菜豆致病变种(*Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*)、烟草野火病菌(*P. syringae* pv. *tabaci*)和荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)的非寄主抗病基因NHO1(Lu et al., 2001)编码一个甘油激酶(Kang et al., 2003); 拟南芥PEN1、PEN2和PEN3等与非寄主抗病性相关的基因通过参与调控拟南芥表皮细胞结构, 影响非寄主病原菌大麦白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*)对非寄主植物拟南芥表皮细胞的穿透能力(Thordal-Christensen, 2003; Collins et al., 2003; Stein et al., 2006)。此外, 非寄主抗病性还被认为是由多个R基因同时识别多个来自病原物的效应蛋白等激发子而产生的(Jones and Dangl, 2006)。

卵菌包括疫霉菌、霜霉菌和腐霉菌等, 是在进化

收稿日期: 2009-09-23; 接受日期: 2009-12-23

基金项目: 国家大学生创新性实验计划(No. 071071202)、教育部新世纪优秀人才支持计划(No. NCET-05-0856)和现代农业产业技术体系(No.nycyt-x-15)

\* 通讯作者。E-mail: wxshan@nwsuaf.edu.cn

上与真菌分属不同生物界的真核病原微生物(Kumar and Rzhetsky, 1996; Baldauf et al., 2000), 给农业生产造成了广泛的经济损失(Tyler et al., 2006)。其中大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)和致病疫霉菌(*P. infestans*)由于其经济重要性, 已从遗传学、分子操作、基因组学以及全基因组测序等方面开展了大量的工作, 成为卵菌遗传学和生物学的模式种(Tyler, 2002; Tyler et al., 2006; Jiang et al., 2008; Haas et al., 2009)。拟南芥作为模式植物, 除了早在2000年就已完成全基因组测序外, 还积累了成熟、方便的研究方法以及大量的遗传材料和基因组资源(Meinke et al., 2008)。致病疫霉菌不能侵染拟南芥, 但是能诱发主动防卫反应, 如过敏反应和防卫基因的表达(Vleeshouwers et al., 2000)。在疫霉菌中也分离到多种诱发非寄主植物抗性反应的激发子(Ricci et al., 1989; Nürnberger et al., 1994; Yu, 1995; Kamoun et al., 1993, 1998)。因此, 拟南芥中可能存在调控对疫霉菌非寄主抗病性的抗病基因, 以模式植物拟南芥和卵菌模式种大豆疫霉菌为材料, 可望推动对植物与卵菌类病原菌非寄主互作的遗传基础的认识。

本研究以大豆疫霉菌游动孢子接种离体叶片, 建立拟南芥-大豆疫霉菌非寄主互作体系, 通过筛选一个包含12 000个独立转化株系的化学诱导激活(LexA-VP16-ER)的拟南芥T-DNA插入突变体库(Zuo et al., 2000; 张建等, 2005), 以期获得感病突变体, 并阐明植物对卵菌的非寄主抗病性的遗传基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 拟南芥和疫霉菌

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.) Columbia-0生态型由本实验室保存, IGDB-XVE突变体由中国科学院遗传与发育生物学研究所左建儒研究员惠赠。突变体库由T<sub>3</sub>代种子组成, 包括12 000个独立的转化株系, 在此研究中共筛选了近40 000个植株。大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)P6497菌系是其全基因组测序用的模式菌系(Tyler et al., 2006); 寄生疫霉菌(*P. parasitica*)H1111菌系(ATCC MYA-141)分离自烟草, 由澳大利亚国立大学Adrienne Hardham教授

惠赠。

### 1.2 拟南芥的种植及筛选

#### 1.2.1 拟南芥的种植

拟南芥种子经4°C存放后, 直接播种于培养基质(含泥炭、蛭石和珍珠岩等)中, 用保鲜膜覆盖并打孔, 置于下述条件下培养: 23°C, 相对湿度25%, 16小时光照/8小时黑暗和光照强度6 000 lx。3天后全部出苗, 揭去保鲜膜。1周浇1次营养液(0.005 mol·L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>, 0.002 5 mol·L<sup>-1</sup> KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.004 mol·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.002 mol·L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O)。大豆疫霉菌培养基为CA培养基(胡萝卜培养基), 成分为5%(v/v)的胡萝卜汁、0.1 g·L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>和20 mg·L<sup>-1</sup> β-谷甾醇。

#### 1.2.2 大豆疫霉菌游动孢子的制备

盐溶液配方: 1 L水中加入2 mL整合液(10 mmol·L<sup>-1</sup> Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mmol·L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)、5 mL盐溶液A(2 mol·L<sup>-1</sup> Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 1 mol·L<sup>-1</sup> KNO<sub>3</sub>)和5 mL盐溶液B(0.8 mol·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>)。

大豆疫霉菌P6497菌系用固体CA培养约1周, 用刀片划成约5 mm × 5 mm的小块, 每10块左右放入1个培养皿内, 液体培养3天, 用灭菌蒸馏水漂洗处理3次, 然后加入盐溶液, 25°C培养。每隔3小时更换1次盐溶液, 一天共更换4次, 然后放置过夜, 第2天换成蒸馏水, 4°C处理30分钟, 25°C放置4–6小时, 释放游动孢子备用。

#### 1.2.3 大豆疫霉菌的接种

离体叶片接菌: 拟南芥播种后30–35天, 在其抽薹之前进行大豆疫霉菌游动孢子接种鉴定。叶片背面朝上, 放于透明塑料托盘中, 用脱脂棉保湿叶柄, 托盘底部铺上蒸馏水浸湿的滤纸。叶片背面用灭菌牙签划伤, 两道划痕对称, 分别位于主脉两侧, 长约3 mm。每个伤口接菌10 μL、大约500个游动孢子的悬液。分别用灭菌蒸馏水和寄生疫霉菌作为阴性和阳性对照。接菌后将托盘用保鲜膜覆盖保湿, 于25°C、相对湿度为60%的培养箱内黑暗培养过夜, 然后转入16小时光照/8小时黑暗培养, 每天观察症状, 持续4–5天。

活体接菌: 对于用离体接菌方法筛选出来的突变体, 种植其T<sub>6</sub>代植株。生长约25天时, 在整株上划伤

约3–4片叶子(较小的叶子可以不划伤),将游动孢子悬液滴在叶片上。然后采取与上述相同的条件培养,连续5天观察症状。

#### 1.2.4 突变体的筛选

给每一株突变体编号,用离体叶片接菌法筛选拟南芥突变体。在第1次收集叶片后,用 $5\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的17- $\beta$ -雌二醇喷施拟南芥,6小时后第2次剪取叶子,以同样的方法接菌观察。共筛选了包含12 000个独立转化体系的近40 000株拟南芥突变体。将筛选出来的可能感病的突变体移植到较大的培养钵中,继续培养并收取种子。后代用同样的办法验证,直至 $T_6$ 代。每一代突变体植株选取感病较重的分单株收种。

#### 1.3 发病叶片的细胞学观察

用大豆疫霉菌游动孢子接种候选感病突变体离体叶片,分别在接种后第1天和第2天将叶片进行台盼兰染色,显微镜下观察病菌的侵染和定殖情况。接菌4–5天后,病叶可直接用3%NaOH煮沸5分钟,显微观察卵孢子和/或孢子囊的产生情况。具体操作方法参考拟南芥实验手册(Weigel and Glazebrook, 2002)。

#### 1.4 探针设计及Southern杂交

T-DNA的长度约为4 500 bp,根据T-DNA序列及常用内切酶的酶切图谱选择内切酶及探针位置,并设计引物(Forward, 5'-CCATGGAGCACCCGTTGTCAC-3'; Reverse, 5'-ATCTCGTGATGGCAGGTTGGGC-3')。用CTAB法提取拟南芥突变体的基因组DNA,并作为模板扩增部分T-DNA区段。20  $\mu\text{L}$  PCR反应体系中包括13.3  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O、2  $\mu\text{L}$  10 $\times$ 反应缓冲液、1.6  $\mu\text{L}$  dNTPs (2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ )、2  $\mu\text{L}$  引物(Forward和Reverse引物各1  $\mu\text{L}$ ) (10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )、0.1  $\mu\text{L}$  ExTaq-DNA聚合酶(TaKaRa公司)(5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )和1  $\mu\text{L}$  模板(50 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )。按照以下反应程序扩增:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性2分钟;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性30秒,64 $^{\circ}\text{C}$ 退火45秒,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸1分钟,35个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10分钟。采用1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物,凝胶回收扩增产物(天根公司凝胶回收试剂盒)并制备探针。分别用BamHI和EcoRV过夜酶切基因组DNA,然后转膜。转膜、探针制备以及杂交条件采用常规方法(Sambrook and Russell, 2001)。

#### 1.5 遗传杂交

按照拟南芥手册(Weigel and Glazebrook, 2002)中的方法,分别以筛选得到的感病突变体(581-51)为父本和母本与野生型拟南芥进行遗传杂交,收获、种植杂交种子,并进行大豆疫霉菌接菌实验,观察 $F_1$ 代的抗感病情况,确定突变体变异性的显隐性。收取 $F_2$ 代的种子,确定分离群体的抗感分离情况,并根据抗感分离比,确定突变体变异性状是否由单基因控制。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大豆疫霉菌与野生型拟南芥的互作

将大豆疫霉菌游动孢子(500–1 000个)划伤接种野生型拟南芥(Columbia-0和Lansberg-0生态型)离体叶片,结果与阴性对照一样,均无任何症状;而寄生疫霉菌却可使拟南芥叶片发病,呈现出明显的水渍状病斑(图1)。表明在本研究实验条件下大豆疫霉菌不能在野生型拟南芥上侵染和定殖,其互作关系属于非亲和类型。

### 2.2 拟南芥感病突变体的筛选和鉴定

自然情况下大豆疫霉菌不能侵染野生型拟南芥,拟南芥是大豆疫霉菌的非寄主植物。由于疫霉菌侵染植物



图1 野生型拟南芥对大豆疫霉菌和寄生疫霉菌侵染的反应

图片显示野生型拟南芥(Columbia生态型)离体叶片接种约500个游动孢子并保湿培养3天后的反应。1, 2: 寄生疫霉菌; 3: 大豆疫霉菌; 4: 接水对照

Figure 1 Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Phytophthora parasitica* and *P. sojae*

The detached leaves of wild-type *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) were inoculated with 500 zoospores and incubated for 3 days. 1, 2: *Phytophthora parasitica*; 3: *P. sojae*; 4: Inoculation of detached leaves by water control

发病很快,一般在接菌后的48小时左右即可产生明显的病斑,而包括拟南芥在内的许多植物的离体叶片在适当的保湿和光照条件下,1周内仍可保持较高的生理活性。

用大豆疫霉菌游动孢子划伤接种拟南芥离体叶片,从包含约12 000个T-DNA插入突变体的近40 000个单株中,获得一系列对大豆疫霉菌感病的拟南芥突变体,其中既有功能缺失型又有获得型的。一株编号为581-51的功能缺失型突变体,感病性状明显, $T_3$ - $T_6$ 代植株均稳定表现感病。581-51突变体离体叶片在大豆疫霉菌游动孢子接种24小时内没有明显的症状;48小时后,叶片出现轻微的发黄和水渍状病斑,并且集中在接菌处;接菌72小时后,叶片变黄,水渍状病斑扩展到大部分或整个叶片。接菌24-48小时内可观察到吸器的形成。接菌4-5天后,在发病叶片上检测到大量的卵孢子和孢子囊。在较潮湿的条件下孢子囊产生较多。野生型拟南芥对照在培养期间始终表现为绿色,没有任何发病症状。对感病突变体581-51从 $T_3$ - $T_6$ 连续4代接菌,结果一致,感病性状十分稳定(图2)。

水渍状病斑的产生和病菌吸器的形成说明大豆疫霉菌与拟南芥581-51突变体的互作是高度亲和的,进一步确认了581-51突变体的感病特性。植物对病原

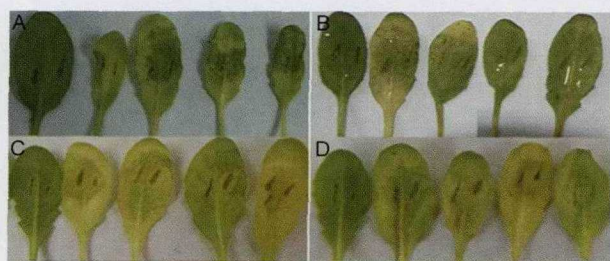


图2 拟南芥突变体581-51对大豆疫霉菌的感病性状表现稳定 (A)-(D)分别代表拟南芥突变体581-51的 $T_3$ - $T_6$ 代植株,每组的第1片叶为野生型拟南芥(Columbia生态型)对照,其余4片为突变体离体叶片。

Figure 2 *Arabidopsis thaliana* mutant 581-51 showed the stable disease susceptibility to the infection of *Phytophthora sojae*

(A)-(D) represent  $T_3$ - $T_6$  progeny of *Arabidopsis thaliana* mutant 581-51, respectively. The first leaf in each group was the wild-type *A. thaliana* (ecotype Columbia) control and the remaining four were detached leaves of mutant.

菌的非寄主抗病性往往被认为是由多基因控制的性状,因此长期以来是研究的难点。对大豆疫霉菌丧失抗性的拟南芥突变体的成功获得,说明通过突变体筛选寻找非寄主植物抗病性相关基因,系统研究植物对卵菌的非寄主抗性机制是可行的。

### 2.3 感病突变体581-51的活体接菌测试

为进一步验证突变体581-51的感病性状,用大豆疫霉菌游动孢子对其整株活体植物进行了接菌测试。结果表明(图3),接菌48小时后野生型拟南芥没有表现任何感病症状,而突变体581-51叶片发黄,并出现明显的水渍状病斑;接菌72小时后,突变体581-51整株变黄,变软萎蔫并最终枯死,而野生型拟南芥只有部分叶片发黄,生命力仍然旺盛。

### 2.4 大豆疫霉菌侵染突变体581-51过程的细胞学观察

用大豆疫霉菌游动孢子接种突变体581-51离体叶片,1-2天后,观察到吸器的形成(图4A),且其有时分布较为密集。接种3-5天后在染病组织内可见卵孢子产生(图4B),在染病组织表面产生孢子囊(图4C)。

### 2.5 突变体581-51的Southern杂交分析

根据T-DNA区段的限制性内切酶图谱和设计的探针

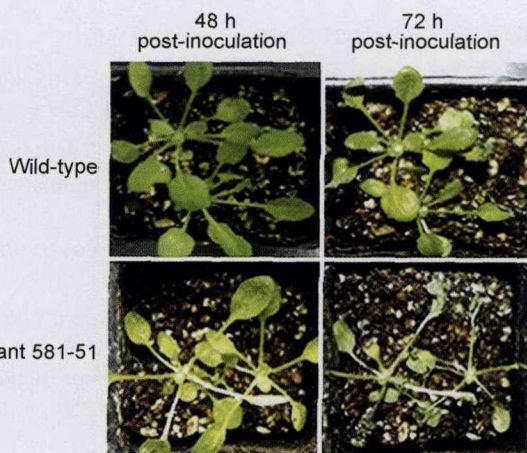
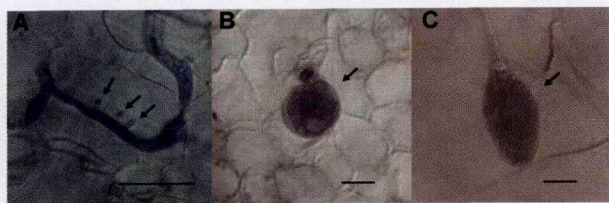


图3 拟南芥突变体581-51的整株大豆疫霉菌接菌测试

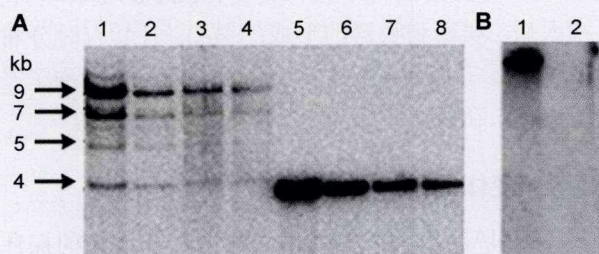
Figure 3 Whole plant inoculation of the *Arabidopsis thaliana* mutant 581-51 by *Phytophthora sojae* zoospores



**图4** 大豆疫霉菌侵染拟南芥突变体581-51过程的细胞学观察 (A) 接种大豆疫霉菌游动孢子1-2天后, 染病组织中病菌产生吸器类结构(如箭头所示); (B) 接种大豆疫霉菌游动孢子4天后染病组织中形成的卵孢子(箭头所示); (C) 接种大豆疫霉菌游动孢子4天后染病组织中形成的孢子囊(箭头所示)。Bar=50 μm

**Figure 4** Microscopic characterization of *Arabidopsis thaliana* mutant 581-51 inoculated with *Phytophthora sojae*

(A) Haustoria-like structures (arrows) formed in the infested plant tissues 1-2 d post inoculation with *P. sojae* zoospores; (B) Oospore (arrow) formed in the diseased tissues 4 d post inoculation with *P. sojae* zoospores; (C) Sporangium (arrow) formed in the diseased tissues 4 d after inoculation with *P. sojae* zoospores. Bar=50 μm



**图5** 拟南芥突变体581-51的Southern杂交分析

(A) 突变体581-51基因组DNA的杂交结果 1-4和5-8分别为 *Bam*HI和 *Eco*RV酶切, 基因组DNA用量分别为4、3.5、3.5和3 μg; 箭头示杂交形成的4条带; (B) 未经酶切的拟南芥基因组DNA 1: 突变体581-51; 2: 野生型拟南芥(Columbia生态型)

**Figure 5** Southern blot analysis of *Arabidopsis thaliana* mutant 581-51

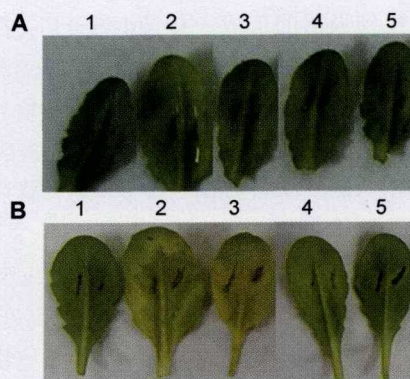
(A) Genomic DNA of mutant 581-51 (4, 3.5, 3.5 and 3 μg) was digested with *Bam*HI (lanes 1-4) and *Eco*RV (lanes 5-8), respectively. Arrows indicated the four hybridizing bands; (B) Undigested *Arabidopsis* genomic DNA, 1: Mutant 581-51; 2: Wild type (ecotype Columbia)

序列(621 bp), 用 *Bam*HI酶切拟南芥突变体581-51的基因组DNA, 通过Southern杂交可确定T-DNA插入的拷贝数, 而 *Eco*RV酶切和探针杂交组合应该是1条

带。为防止酶切不完全导致假阳性杂交条带的出现, 对不同量的突变体基因组DNA进行酶切处理。杂交结果表明(图5), *Bam*HI酶切与杂交探针组合呈现4条杂交带, 而 *Eco*RV酶切后的杂交结果都呈现1条带, 因此判断基因组酶切彻底, 并且此突变体含有至少4个拷贝的T-DNA插入。

## 2.6 突变体581-51的遗传分析

将突变体581-51与野生型拟南芥杂交, 共获得80粒  $F_1$ 代种子。用大豆疫霉菌游动孢子接菌测试, 全部表现抗病(图6A), 表明581-51属于隐性细胞核基因突变。一共种植了4个  $F_2$ 代群体, 分别来自不同的  $F_1$ 代单株, 抗感性状表现分离(图6B)。如果此突变确是一个



**图6** 拟南芥感大豆疫霉菌突变体581-51的遗传分析

(A) 野生型拟南芥与突变体581-51杂交  $F_1$ 代的接菌测试结果 1: 野生型拟南芥(Columbia生态型); 2, 3: 以突变体581-51为母本的  $F_1$ 代; 4, 5: 以野生型拟南芥为母本的  $F_1$ 代; (B) 野生型拟南芥与突变体581-51杂交  $F_2$ 代的接菌测试结果 1: 野生型拟南芥(Columbia生态型); 2, 3:  $F_2$ 代中表现感病的植株; 4, 5:  $F_2$ 代中表现抗病的植株

**Figure 6** Genetic analysis of *Arabidopsis thaliana* mutant 581-51 susceptible to *Phytophthora sojae* infection

(A) The infection assay of  $F_1$  progeny derived from cross between the wild-type *A. thaliana* and mutant 581-51 by inoculation with *P. sojae* zoospores. 1: Wild-type *A. thaliana* (ecotype Columbia); 2, 3:  $F_1$  progeny derived from the cross between wild-type pollen and 581-51 carpel; 4, 5:  $F_1$  progeny derived from the cross between 581-51 pollen and wild-type carpel; (B) The infection assay of  $F_2$  progeny derived from cross between the wild-type *A. thaliana* and mutant 581-51 by inoculation with *P. sojae* zoospores. 1: Wild-type *A. thaliana* (ecotype Columbia); 2, 3:  $F_2$  progeny susceptible to *P. sojae*; 4, 5:  $F_2$  progeny resistant to *P. sojae*

**表1** 拟南芥突变体581-51与野生型杂交F<sub>2</sub>代对大豆疫霉菌的抗感分离结果

**Table 1** Segregation of resistance and susceptibility of F<sub>2</sub> populations derived from the cross between wild-type *Arabidopsis thaliana* and mutant 581-51 to *Phytophthora sojae* infection

F <sub>2</sub> population	Total	R	S	$\chi^2$ value
1	78	54	24	1.384 6
2	87	64	23	0.095 8
3	84	62	22	0.063 5
4	79	57	22	0.341 8

R: 抗病株数; S: 感病株数;  $\chi^2$ 检验显示, 在置信水平为0.05时,  $\chi^2$ 值都小于 $\chi^2_{0.05}(3.84)$ , 4个F<sub>2</sub>代群体的抗感分离比都没有偏离预期值(3:1)。

R: The number of resistant plants; S: The number of susceptible plants; Chi-square value showed that the observed resistance-to-susceptibility ratios of the four F<sub>2</sub> populations did not deviate significantly from the expected ratio (3:1) because all the values were smaller than the  $\chi^2_{0.05}$  value (3.84).

隐性突变, 那么F<sub>2</sub>代的抗病与感病植株比例应为3:1, 结果显示抗感分离4个群体的 $\chi^2$ 值都小于 $\chi^2_{0.05}$ , 均符合3:1的分离比例(表1), 因此判断单个隐性突变的假设成立, 即突变体581-51的感病性状是由单个隐性突变基因造成的。初步的遗传分析和分子生物学鉴定也表明此基因不同于已知的非寄主抗性相关基因。已有研究表明植物对病原菌的非寄主抗病性的遗传基础比较多样, 通过分离鉴定不同类型的非寄主抗性相关基因, 有助于全面认识植物的非寄主抗病性。

由基因对基因这类主动抗性介导的植物抗病性被广泛应用于主要农作物的病害防控和可持续生产中, 然而这类抗性基因只对含有特定无毒基因的病原菌起作用, 病原菌可以通过一系列变异途径避免被植物识别, 因此其抗病性丧失的问题十分突出。尤其在农业生产中, 作物对卵菌类病原菌的抗病性丧失问题更加严重。例如马铃薯(*Solanum tuberosum*)中目前已知的介导致病疫霉菌抗性的11个R基因已全部丧失抗性(赵志坚等, 2008)。晚疫病始终是马铃薯生产中最主要的病害, 因此寻找新的抗病基因在诸如马铃薯等重要作物的可持续生产中显得十分迫切。非寄主抗病性被认为是比较持久的抗病性, 在农业上有广泛的应用前景(Heath, 2000; Mysore and Ryu, 2004)。然而, 有关植物对卵菌类病原菌的非寄主抗病性遗传基础的研究十分有限, 本研究建立的拟南芥

-大豆疫霉菌互作系统可望推动植物与卵菌类病原菌非寄主互作的研究。

**致谢** 拟南芥XVE诱导型标记激活突变体库由中国科学院遗传与发育生物学研究所提供, 特此致谢。

## 参考文献

- 张建, 徐金相, 孔英珍, 纪振动, 王兴春, 安丰英, 李超, 孙加强, 张素芝, 杨晓辉, 牟金叶, 刘新仿, 李家洋, 薛勇彪, 左建儒 (2005). 化学诱导激活型拟南芥突变体库的构建和分析. 遗传学报 **32**, 1082–1088.
- 赵志坚, 曹继芬, 杨明英, 孙道旺, 李先平, 杨万林 (2008). 用两个微卫星标记分析云南马铃薯晚疫病病菌的遗传多样性. 中国农业科学 **41**, 3610–3617.
- Baldauf SL, Roger AJ, Wenk-Siefert I, Doolittle WF (2000). A kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data. *Science* **290**, 972–977.
- Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrink E, Qiu J, Hükelhoven R, Stein M, Freialdenhoven A, Somerville SC, Schulze-Lefert P (2003). SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature* **425**, 973–977.
- Flor HH (1971). Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* **9**, 275–296.
- Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RH, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, Bozkurt TO, Ah-Fong AM, Alvarado L, Anderson VL, Armstrong MR, Avrova A, Baxter L, Beynon J, Boevink PC, Bollmann SR, Bos JI, Bulone V, Cai G, Cakir C, Carrington JC, Chawner M, Conti L, Costanzo S, Ewan R, Fahlgren N, Fischbach MA, Fugelstad J, Gilroy EM, Gnerre S, Green PJ, Grenville-Briggs LJ, Griffith J, Grunwald NJ, Horn K, Horner NR, Hu CH, Huitema E, Jeong DH, Jones AM, Jones JD, Jones RW, Karlsson EK, Kunjeti SG, Lamour K, Liu Z, Ma L, Maclean D, Chibucos MC, McDonald H, McWalters J, Meijer HJ, Morgan W, Morris PF, Munro CA, O'Neill K, Ospina-Giraldo M, Pinzon A, Pritchard L, Ramsahoye B, Ren Q, Restrepo S, Roy S, Sadanandom A, Savidor A, Schornack S, Schwartz DC, Schumann UD, Schwessinger B, Seyer L, Sharpe T, Silvar C, Song J, Studholme DJ, Sykes S, Thines M, van de Vondervoort PJ, Phuntumart V, Wawra S, Weide R, Win J, Young C, Zhou S, Fry W, Meyers BC, van West P, Ristaino J, Govers F, Birch PR, Whisson SC, Judelson HS, Nusbaum C (2009). Genome sequence and analysis

- of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature* **461**, 393–398.
- Hammond-Kosack KE, Jones JDG** (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773–1791.
- Heath MC** (2000). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Curr Opin Plant Biol* **3**, 315–319.
- Jiang RHY, Tripathy S, Govers F, Tyler BM** (2008). RXLR effector reservoir in two *Phytophthora* species is dominated by a single rapidly evolving superfamily with more than 700 members. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 4874–4879.
- Jones JDG, Dangl JL** (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323–329.
- Kamoun S, van West P, Vleeshouwers VG, de Groot KE, Govers F** (1998). Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1. *Plant Cell* **10**, 1413–1425.
- Kamoun S, Young M, Glascock C, Tyler BM** (1993). Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to fungal and bacterial phytopathogens. *Mol Plant Microbe Interact* **6**, 15–25.
- Kang L, Li JX, Zhao TH, Xiao FM, Tang XY, Thilmony R, He SY, Zhou JM** (2003). Interplay of the Arabidopsis nonhost resistance gene *NHO1* with bacterial virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 3519–3524.
- Kumar S, Rzhetsky A** (1996). Evolutionary relationships among the eukaryotic kingdoms. *J Mol Evol* **42**, 183–193.
- Lu M, Tang XY, Zhou JM** (2001). Arabidopsis *NHO1* is required for general resistance against *Pseudomonas* bacteria. *Plant Cell* **13**, 437–447.
- Meinke D, Muralla R, Sweeney C, Dickerman A** (2008). Identifying essential genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends Plant Sci* **13**, 483–491.
- Mysore KS, Ryu CM** (2004). Nonhost resistance: how much do we know? *Trends Plant Sci* **19**, 98–104.
- Nürnberg T, Nennstiel D, Jabs T, Sacks WR, Hahlbrock K, Scheel D** (1994). High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* **78**, 449–460.
- Ricci P, Bonnet P, Huet JC, Sallantin M, Beauvais-Cante F, Bruneteau M, Billard V, Michel G, Pernollet JC** (1989). Structure and activity of proteins from pathogenic fungi *Phytophthora* eliciting necrosis and acquired resistance in tobacco. *Eur J Biochem* **183**, 555–563.
- Sambrook J, Russell D** (2001). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stein M, Dittgen J, Rodríguez SC, Hou BH, Molina A, Schulze-Lefert P, Lipka V, Somerville SC** (2006). Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell* **18**, 731–746.
- Thordal-Christensen H** (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Curr Opin Plant Biol* **6**, 351–357.
- Tyler BM** (2002). Molecular basis of recognition between *Phytophthora* pathogens and their hosts. *Annu Rev Phytopathol* **40**, 137–167.
- Tyler BM, Tripathy S, Zhang XM, Dehal P, Jiang RHY, Aerts A, Arredondo FD, Baxter L, Bensasson D, Beynon JL, Chapman J, Damasceno CM, Dorrance AE, Dou D, Dickerman AW, Dubchak IL, Garbelotto M, Gijzen M, Gordon SG, Govers F, Grunwald NJ, Huang W, Ivors KL, Jones RW, Kamoun S, Krampis K, Lamour KH, Lee MK, McDonald WH, Medina M, Meijer HJ, Nordberg EK, Maclean DJ, Ospina-Giraldo MD, Morris PF, Phuntumart V, Putnam NH, Rash S, Rose JK, Sakihama Y, Salamov AA, Savidor A, Scheuring CF, Smith BM, Sobral BW, Terry A, Torto-Alalibo TA, Win J, Xu Z, Zhang H, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Boore JL** (2006). *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* **313**, 1261–1266.
- Vleeshouwers VG, van Dooijeweert W, Govers F, Kamoun S, Colon LT** (2000). The hypersensitive response is associated with host and nonhost resistance to *Phytophthora infestans*. *Planta* **210**, 853–864.
- Weigel D, Glazebrook J** (2002). Arabidopsis: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Yu LM** (1995). Elicitins from *Phytophthora* and basic resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**, 4088–4094.
- Zuo J, Niu QW, Chua NH** (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* **24**, 265–273.

## Nonhost Interaction of *Phytophthora sojae* and *Arabidopsis thaliana* and Genetic Analysis of a Susceptible Mutant

Qiuping Liu<sup>1,4</sup>, Hua Cao<sup>2,4</sup>, Maojin Yao<sup>3,4</sup>, Ying Ma<sup>3,4</sup>, Binsheng Deng<sup>3,4</sup>, Junli Quan<sup>4</sup>, Weixing Shan<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>College of Plant Protection, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; <sup>3</sup>College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling 712100, China; <sup>4</sup>Shaanxi Key Laboratory of Molecular Biology for Agriculture, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

**Abstract** *Phytophthora sojae* and *Arabidopsis thaliana* were used in this study as a nonhost plant-oomycete interaction system to investigate the genetic basis of nonhost resistance against oomycete pathogens in plants. A collection of more than 40 000 T<sub>3</sub> *A. thaliana* T-DNA mutant plants representing 12 000 independent insertion lines were screened by inoculating detached leaves with *P. sojae* zoospores, and the susceptible mutant was re-confirmed by pathogen inoculation and cytological characterization. A number of *P. sojae*-susceptible *A. thaliana* mutants were successfully obtained, and one of them, mutant 581-51, was shown to be stably susceptible to *P. sojae* infection. Water-soaked lesions formed on the detached leaves within 3 days, as did oospores and sporangia 4–5 days after inoculation with *P. sojae* zoospores. Cytological characterization revealed the formation of haustoria-like structures. Southern analysis showed the presence of four T-DNA insertion events in the mutant. Genetic analysis indicated that the susceptibility to infection by the nonhost pathogen *P. sojae* in the mutant 581-51 was likely controlled by a single recessive gene.

**Key words** *Arabidopsis thaliana*, nonhost disease resistance, oomycetes, *Phytophthora sojae*, T-DNA insertional mutants

Liu QP, Cao H, Yao MJ, Ma Y, Deng BS, Quan JL, Shan WX (2010). Nonhost interaction of *Phytophthora sojae* and *Arabidopsis thaliana* and genetic analysis of a susceptible mutant. *Chin Bull Bot* **45**, 548–555.

---

\* Author for correspondence. E-mail: wxshan@nwsuaf.edu.cn