

基于晚疫病菌效应子识别策略挖掘马铃薯潜在抗病基因资源

王洪洋^{1,2}, 田振东^{1,3,*}

(¹华中农业大学, 农业部马铃薯生物学与生物技术重点实验室, 武汉 430070; ²云南师范大学马铃薯科学研究院, 昆明 650500; ³华中农业大学, 园艺植物生物学教育部重点实验室, 武汉 430070)

摘要: 为探索利用晚疫病菌效应子识别策略快速挖掘具有潜在抗晚疫病基因的马铃薯资源, 挑选了晚疫病菌感染马铃薯时早期上调表达的 68 个 RXLR 类效应子基因, 将它们分别克隆到 PVX 病毒植物表达载体 pGR106 上, 采用农杆菌牙签穿刺方法, 在 55 份不同基因型的马铃薯叶片上进行瞬时表达, 根据过敏反应 (Hypersensitive response, HR) 发生与否来推断马铃薯中是否存在潜在抗病基因。结果表明, 10 个效应子基因, 包括无毒基因 AVR2 家族成员 PITG_23008, 细胞死亡激发子 PexRD2、无毒基因 PexRD39 (AVRblb2), 以及其它未知功能效应子基因 Pex147-2、PexRD8、PexRD49、PITG_10232、PITG_11484、PITG_07555 和 PITG_22724, 能够在 10 份马铃薯材料上诱导 HR, 预示这些马铃薯材料中具有潜在抗病基因。另外, 离体叶片晚疫病菌接种鉴定表明, 识别 6 个晚疫病菌效应子的马铃薯材料 IVP196-2 比识别 3 个效应子的马铃薯材料 HJT349-3 抗病性更强。

关键词: 马铃薯; 晚疫病菌; 效应子; 过敏反应; 无毒基因

中图分类号: S 532

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2018) 07-1305-09

Exploration of Potential Potato Late-blight Resistance Germplasms Using *Phytophthora infestans* Effectoromics Strategy

WANG Hongyang^{1,2} and TIAN Zhendong^{1,3,*}

(¹Key Laboratory of Potato Biology and Biotechnology, Ministry of Agriculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; ²Joint Academy of Potato Science, Yunnan Normal University, Kunming 650500, China; ³Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: To accelerate the mining of potato germplasm with late blight resistance, the effectoromics strategy was used in this study. Sixty eight *Phytophthora infestans* RXLR effector genes that up-regulated early during infection stage were selected for recognition assay. These effector genes were cloned into the plant expression vector pGR106 and transiently expressed in leaves of 55 potato genotypes using toothpick inoculation with *Agrobacterium* cultures. Ten RXLR effector genes, including Pi23008 (an AVR2 family number), RD39 (AVRblb2), RD2 (a cell death inducer), and other unknown function effector genes (Pex147-2, PexRD8, PexRD49, PITG_10232, PITG_11484, PITG_07555 and PITG_22724), could induce the hypersensitive response (HR) on leaves of a total of 10 potato genotypes, suggesting that these

收稿日期: 2018-01-19; **修回日期:** 2018-07-16

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31761143007); 国家“863”计划项目 (2013AA102603); 云南省应用基础研究计划青年项目 (2015FD015)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: tianzhd@mail.hzau.edu.cn)

potato materials potentially carry *R* genes corresponding to particular effectors. In addition, the potato material IVP196-2 that could recognize 6 RXLR effectors, showed a higher level of late-blight resistance when compared to HJT349-3, which could only recognize 3 effectors.

Keywords: potato; *Phytophthora infestans*; effector; hypersensitive response; avirulence gene

晚疫病是马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 生产上最具危害性的病害, 严重威胁着全球马铃薯的安全生产 (谢从华, 2012)。晚疫病菌 (*Phytophthora infestans*) 侵染马铃薯的过程中, 会通过自身吸器结构向寄主细胞内分泌一些具有特殊结构域的蛋白来抑制或干扰寄主免疫系统, 实现侵染 (King et al., 2014; Zheng et al., 2014; Boevink et al., 2016; Yang et al., 2016)。这些特殊结构域蛋白统称为胞质效应蛋白, 例如 RXLR 类家族蛋白 (Kamoun, 2006)。目前已报道的晚疫病菌无毒基因 (Avirulence gene, AVR) 均属于 RXLR 类效应子基因, 如 *AVR1* (van der Lee et al., 2001), *AVR2* (Saunders et al., 2012), *AVR3a* (Armstrong et al., 2005), *AVR3b* (Li et al., 2011), *AVR4* (van Poppel et al., 2008), *AVRblb1* (Vleeshouwers et al., 2008), *AVRblb2* (Oh et al., 2009) 及 *AVRvnt1.1* (Pel, 2010) 等。当 AVR 蛋白进入寄主细胞后, 会抑制病原相关分子模式 (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) 激发的免疫反应 (PAMP-triggered immunity, PTI)。然而当寄主细胞内含有相应 NB-LRR 类抗病基因时, 编码的抗病蛋白会特异识别这些 AVR 蛋白, 产生效应子激发免疫反应 (Effector-triggered immunity, ETI)。目前所有克隆到的马铃薯抗晚疫病基因 (Resistance gene to *P. infestans*, *Rpi*) 均属于 NB-LRR 类抗病基因。*Rpi* 编码蛋白通过识别晚疫病菌中 RXLR 类 AVR 蛋白产生过敏反应 (hypersensitive response, HR), 同时激发免疫应答反应, 从而使马铃薯产生抗病性 (Hein et al., 2009; Franceschetti et al., 2017)。因此, 理论上可以利用效应子与抗病基因的识别来鉴别马铃薯资源材料中是否含有潜在抗病基因 (Vleeshouwers & Oliver, 2014)。

马铃薯野生种和栽培种中可能含有多个抗病基因, 快速鉴定材料中是否存在潜在抗病基因, 可为有效利用抗病资源、克隆潜在抗病基因提供关键信息。Vleeshouwers 等 (2008) 利用效应子组学策略, 将 54 个晚疫病菌 RXLR 效应子在 10 个不同基因型马铃薯材料上进行识别分析, 克隆了 2 个马铃薯抗病基因 (*Rpi-sto1* 和 *Rpi-pt1*), 并鉴定出 *Rpi-blb1* 对应的晚疫病菌无毒基因为 *PexRD6*。Lee 等 (2014) 研究发现, 辣椒对晚疫病菌的非寄主抗性可能是由于辣椒识别多个晚疫病菌 RXLR 效应子激发的免疫反应所致。目前, 效应子组学策略已逐渐成为植物抗病育种、快速鉴定抗病基因及晚疫病菌无毒基因的强有力工具 (Vleeshouwers & Oliver, 2014)。

本研究中利用效应子组学策略, 将 68 个晚疫病菌 RXLR 效应子基因在 55 份不同基因型的马铃薯中进行了瞬时表达分析, 以期快速筛选出可能含有潜在抗病基因的马铃薯资源材料及其对应的候选 AVR 基因, 为后续深入开展这些马铃薯资源材料的相关研究奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料

马铃薯野生种、育种资源材料和栽培种共 55 份 (表 1)。其中, 材料 R1 ~ R11 为含有来自马铃薯野生种 *Solanum demissum* 相应抗病基因的马铃薯鉴别寄主材料, 材料 93002 ~ 93025 为国际马铃薯中心水平抗性材料, 其他材料为地方品种和国外引进材料。所有材料用无菌试管苗保存, 试管苗在含有 4% 蔗糖的 MS 培养基中繁殖, 待试管苗生长 30 d 时将其移栽于温室塑料钵 (20 cm × 20 cm)

中生长, 浇水、施肥等按日常管理。将生长两个月健康无机械损伤的叶片用于晚疫病病菌 RXLR 效应子的 PVX-agroinfection 分析。

本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 种子由华中农业大学马铃薯实验室保存, 种植于恒温生长室内。幼苗移栽后于 25 °C, 16 h 光照/8 h 黑暗条件下生长 28 ~ 35 d, 然后进行农杆菌注射瞬时表达基因。

表 1 用于农杆菌穿刺的马铃薯材料
Table 1 Potato materials used for PVX-agroinfection

| 种名 Species | 材料 Material | 种名 Species | 材料 Material | 种名 Species | 材料 Material | 种名 Species | 材料 Material |
|---------------------|----------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------------|---------------------------------------|----------------|
| <i>S. tuberosum</i> | 93002 | <i>S. tuberosum</i> | R1 | <i>S. tuberosum</i> | 转心乌 Zhuixinwu | <i>S. berthautii</i> | CW2-1 |
| | 93003 | | R2 | | 大西洋 Daxiyang | | CT5-7 |
| | 93004 | | R3 | | Congo | | CT5-8 |
| | 93005 | | R4 | | Shepody | <i>S. bukasovii</i> | Buk512-3 |
| | 93006 | | R5 | | Pink Fir Apple | <i>S. hjertingii</i> | CT11-1 |
| | 93007 | | R6 | | ACRed Island | | HJT349-3 |
| | 93009 | | R7 | | J101K27 | <i>S. raphanifolium</i> | CT19-4 |
| | 93012 | | R8 | | AC029 | <i>S. sanctae-rosae</i> | CT22-8 |
| | 93015 | | R9 | <i>S. demissum</i> | DMS264-1 | <i>S. piurana</i> | PUR206-1 |
| | 93018 | | R10 | | DMS364-2 | <i>S. acaule</i> ssp. <i>aemulans</i> | AEM669-4 |
| | 93019 | | R11 | | SD-27 | <i>S. acaule</i> | SA-27 |
| | 93020 | | 南中 552 Nanzhong 552 | | SD-14 | <i>S. chomatophilum</i> | CHM559-1 |
| | 93022 | | 东农 303 Dongnong 303 | | CT9-4 | <i>S. phureja</i> | IVP196-2 |
| | 93025 | | 克新 4 号 Kexin 4 | | | <i>S. chacoense</i> | Cha |

1.2 晚疫病菌

晚疫病菌生理小种 88069 (1.3.4.7) 和 HB09-14-2 (1.2.3.4.5.6.7. 9.10.11) 由华中农业大学马铃薯实验室保存。菌株繁殖和保存采用黑麦培养基 (Vleeshouwers et al., 1999)。

1.3 晚疫病菌 RXLR 效应子基因、马铃薯抗病基因 *Rpi-hjt1.1* 的克隆及重组质粒构建

根据 Oh 等 (2009) 和 Raffaele 等 (2010) 报道, 选择晚疫病菌 68 个具有 RXLR 结构域, 且在侵染 48 h 内上调表达的效应子基因 (表 2)。利用 SignalP 4.0 软件进行信号肽预测分析 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), 在信号肽剪切位点之后设计基因上下游引物, 并在上下游引物

表 2 用于农杆菌穿刺的晚疫病病菌 RXLR 效应子基因
Table 2 *Phytophthora infestans* RXLR effector genes used for PVX-agroinfection

| 编号 No. | 基因 Gene | 编号 No. | 基因 Gene | 编号 No. | 基因 Gene | 编号 No. | 基因 Gene | 编号 No. | 基因 Gene |
|-----------|-----------------|-----------|----------------|-----------|-------------------|-----------|-------------------|-----------|-------------------|
| 1 | <i>PexRD2</i> | 15 | <i>PexRD22</i> | 29 | <i>PITG_17063</i> | 43 | <i>PITG_07555</i> | 57 | <i>PITG_22798</i> |
| 2 | <i>PexRD3</i> | 16 | <i>PexRD24</i> | 30 | <i>PITG_06092</i> | 44 | <i>PITG_07558</i> | 58 | <i>PITG_22804</i> |
| 3 | <i>PexRD4</i> | 17 | <i>PexRD26</i> | 31 | <i>PITG_13093</i> | 45 | <i>PITG_07594</i> | 59 | <i>PITG_02860</i> |
| 4 | <i>PexRD6</i> | 18 | <i>PexRD27</i> | 32 | <i>PITG_06099</i> | 46 | <i>PITG_07597</i> | 60 | <i>PITG_05918</i> |
| 5 | <i>Pex147-2</i> | 19 | <i>PexRD28</i> | 33 | <i>PITG_04196</i> | 47 | <i>PITG_19617</i> | 61 | <i>PITG_22925</i> |
| 6 | <i>Pex147-3</i> | 20 | <i>PexRD31</i> | 34 | <i>PITG_09216</i> | 48 | <i>PITG_10654</i> | 62 | <i>PITG_01934</i> |
| 7 | <i>PexRD8</i> | 21 | <i>PexRD36</i> | 35 | <i>PITG_10232</i> | 49 | <i>PITG_16663</i> | 63 | <i>PITG_14962</i> |
| 8 | <i>PexRD10</i> | 22 | <i>PexRD39</i> | 36 | <i>PITG_16275</i> | 50 | <i>PITG_18683</i> | 64 | <i>PITG_14983</i> |
| 9 | <i>PexRD11</i> | 23 | <i>PexRD40</i> | 37 | <i>PITG_04314</i> | 51 | <i>PITG_22724</i> | 65 | <i>PITG_23008</i> |
| 10 | <i>PexRD12</i> | 24 | <i>PexRD41</i> | 38 | <i>PITG_10396</i> | 52 | <i>PITG_12737</i> | 66 | <i>PITG_22758</i> |
| 11 | <i>PexRD13</i> | 25 | <i>PexRD44</i> | 39 | <i>PITG_11484</i> | 53 | <i>PITG_05751</i> | 67 | <i>PITG_22870</i> |
| 12 | <i>PexRD14</i> | 26 | <i>PexRD45</i> | 40 | <i>PITG_09496</i> | 54 | <i>PITG_15753</i> | 68 | <i>PITG_13936</i> |
| 13 | <i>PexRD16</i> | 27 | <i>PexRD49</i> | 41 | <i>PITG_11507</i> | 55 | <i>PITG_00774</i> | | |
| 14 | <i>PexRD21</i> | 28 | <i>PexRD50</i> | 42 | <i>PITG_07550</i> | 56 | <i>PITG_21778</i> | | |

5' 端插入相应酶切位点。晚疫病菌 HB09-14-2 基因组 DNA 提取参照真菌 DNA 提取试剂盒（上海生物工）操作说明。以晚疫病菌基因组 DNA 为模板，用高保真 pfu 聚合酶 PCR 扩增 68 个 RXLR 效应子基因。PCR 产物经酶切、回收、连接、转化，测序确认序列正确后，最终构建到基于马铃薯 PVX 病毒的植物表达载体 pGR106 中，将构建的载体转入农杆菌 GV3101 中用于 agroinfection 分析。

以 NCBI 公布马铃薯抗病基因 *Rpi-hjt1.1* (GenBank: GU563971) 序列设计引物 (F: ATGGCTGATGCCTTCTATCAT; R: TCACAACATATAATTCCGCTTC)，以马铃薯材料 HJT349-3 的 cDNA 为模板，采用高保真 pfu 聚合酶进行 PCR 扩增，得到 *Rpi-hjt1.1* 基因，测序表明与已公布 *Rpi-hjt1.1* 基因序列完全相同。pRI101-*Rpi-hjt1.1* 重组质粒构建方法同上。

1.4 基于农杆菌牙签穿刺的基因瞬时表达分析

采用 Du 等 (2014) 的研究方法。选取健康无机械伤害的马铃薯叶片进行 PVX-agroinfection 分析。将含有 RXLR 效应子基因的农杆菌在 LB 平板培养基上活化，28 °C 培养 2 d。挑取单克隆接入 1 mL LB 液体培养基（含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 和 25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Rif）中，28 °C，200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养过夜，培养至 OD₆₀₀ 值约为 1.0。取 500 μL 菌液涂布在 LB 固体培养基（含 Kan 和 Rif）上，28 °C 过夜培养。将 LB 固体培养基上的菌体收集于 1.5 mL 离心管中，用无菌牙签粘取少量农杆菌穿刺马铃薯叶片。pGR106-GFP 为阴性对照，pGR106-CRN2 为阳性对照（CRN2 表达能够引起穿刺点发生细胞死亡）。

每个效应子每次重复穿刺接种 2 株同一基因型马铃薯，每株 3 片叶片，每片叶片 3 个穿刺点，生物学重复 3 次，共计 54 个穿刺点。68 个效应子在 55 份马铃薯材料上共计穿刺数为 201 960 个（68 × 55 × 54）。穿刺 14 d 后观察，叶片分别在自然光和紫外光下拍照，如果穿刺点发生和阳性对照相同的表型，表明该穿刺点发生过敏性细胞死亡，最后统计每个效应子穿刺点表现过敏性细胞死亡的百分率。以此判断该效应子在马铃薯材料上激发 HR 的稳定性，利用 *t* 测验分析显著性差异。

1.5 基于农杆菌注射的基因瞬时表达分析

采用 Wang 等 (2014) 的研究方法。将含有晚疫病菌效应子基因 *PITG_23008* 和马铃薯抗病基因 *Rpi-hjt1.1* 的农杆菌在 LB 平板培养基上活化，28 °C 培养 2 d。挑取单克隆接入 1 mL LB 液体培养基（含 50 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Kan 和 25 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ Rif），28 °C，200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，培养过夜。取 500 μL 菌液加入 5 mL 含相应抗生素 YEB 培养液中，另加 0.5 μL 的 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮 (Acetosyringone, AS)，28 °C，200 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，培养过夜。4 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min，收集农杆菌沉淀，并加入 MMA buffer (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MES，10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl₂，200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS，pH 5.6)，调整农杆菌悬浮液的 OD₆₀₀ 值约为 0.4。最后将两种农杆菌悬菌液等体积混合，室温静置 2 h 后，用 1 mL 无针头注射器以点状注射方式（直径 1 cm 左右）在本氏烟草叶片上注射。GFP 为阴性对照。5 d 后观察 HR 表型。

1.6 晚疫病菌接种及病斑面积统计

参照 Vleeshouwers 等 (1999) 的研究方法。将晚疫病菌生理小种 88069 和 HB09-14-2 的孢子囊浓度调至约 5 × 10⁴ 个 · mL⁻¹，4 °C 下放置 2 ~ 3 h 后，用于接种。采用离体叶片接种方式接种马铃薯材料 ‘Désirée’（不含抗病基因，为感病对照）、HJT349-3 和 IVP196-2。选取自顶叶以下第 3 ~ 5 复叶上的单叶用于接种鉴定，每个单叶两边各接种 10 μL 孢子悬液，塑料薄膜封口接种盘，保持空气湿度 95% 左右，温度 20 °C 左右。接种后 5 d，将叶片分别在自然光和紫外光下拍照，用游标卡尺测量病斑的长和宽，病斑面积 = 1/4 × π × 长 × 宽，利用 *t* 测验分析差异显著性。

2 结果与分析

2.1 马铃薯潜在抗病基因资源和候选无毒基因筛选

已报道的马铃薯 *Rpi* 基因均是通过其编码的抗病蛋白识别晚疫病菌中含有 RXLR 结构域的无毒蛋白激发抗病功能。为了挖掘含有潜在抗病基因的马铃薯资源, 挑选并构建了 68 个晚疫病菌 RXLR 效应子基因表达载体, 分别在 55 份不同基因型马铃薯材料中进行 PVX-agroinfection 分析, 结果表明有 10 个 RXLR 效应子能够在 10 份马铃薯材料叶片上激发 HR 表型, 预示这些马铃薯材料中存在潜在 *Rpi* 基因 (表 3)。有 4 份马铃薯材料 (DMS264-1、DMS364-2、PUR206-1 和 SD-27) 上的所有穿刺点处均未出现 HR 表型。效应子 PexRD2 则在除上述 4 份材料以外其他供试马铃薯材料上均激发 HR 表型。

表 3 诱发 HR 的效应子及其相应马铃薯材料
 Table 3 HR-inducible RXLR effectors and their responding potato materials

| 效应子 Effector | 马铃薯材料 Potato material | | | | | | | | | |
|------------------------------|-----------------------|----|----|----|-----|-------|----------|----------|------|---------|
| | R1 | R2 | R5 | R7 | Cha | AC029 | HJT349-3 | IVP196-2 | SD14 | J101K27 |
| GFP (阴性对照 Negative control) | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| CRN2 (阳性对照 Positive control) | - | + | + | - | - | - | + | + | + | + |
| PexRD2 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Pex147-2 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | + |
| PexRD8 | - | + | + | - | - | - | - | - | - | - |
| PexRD39 | + | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| PexRD49 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| PITG_23008 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| PITG_10232 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| PITG_11484 | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - |
| PITG_07555 | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| PITG_22724 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |

注: + 表示有 HR 发生; - 表示无 HR 发生。

Note: + represents HR, - represents no HR.

2.2 晚疫病菌 RXLR 效应子识别与马铃薯抗病性分析

为了探索马铃薯识别晚疫病菌 RXLR 效应子和抗病性之间的关系, 选择 HJT349-3 和 IVP196-2 两个马铃薯材料进行 PVX-agroinfection 和抗病性评价。结果表明, 晚疫病菌效应子 PexRD2、PITG_23008 和 PITG_22724 能够在马铃薯 HJT349-3 材料穿刺点上激发与阳性对照 CRN2 相同的细胞死亡 (图 1, A), 发生细胞死亡的穿刺点达 90% 以上 (图 1, C)。晚疫病菌效应子 PexRD2、PexRD39、PexRD49、Pex147-2、PITG_10232 和 PITG_11484 能够在马铃薯 IVP196-2 材料穿刺点上激发细胞死亡, 发生细胞死亡的穿刺点达到 80% 以上 (图 1, B、D)。

用 2 个致病力不同的晚疫病菌生理小种 88069 (1.3.4.7) 和 HB09-14-2 (1.2.3.4.5.6.7.9.10.11) 对马铃薯材料 HJT349-3、IVP196-2 和感病对照 ‘*Désirée*’ 进行接种鉴定, 结果显示 HJT349-3 和 IVP196-2 对晚疫病菌 88069 表现抗病, 有明显 HR 表型产生 (图 2, A), 晚疫病菌接种 5 d 后, 接种点只有很小的病斑, 病斑面积小于对照 ($P < 0.01$) (图 2, C)。接种晚疫病菌 HB09-14-2 时, HJT349-3 和对照 ‘*Désirée*’ 都表现感病症状, 有明显的水浸状病斑产生 (图 2, B), 5 d 后病斑与对照无差异 (图 2, D)。而识别多个 RXLR 效应子的马铃薯 IVP196-2 对晚疫病菌 HB09-14-2 表现抗病, 有明显 HR 表型产生 (图 2, B), 接种点只有很小的病斑, 病斑面积小于对照 ($P < 0.01$) (图 2, D)。以上结果表明, 能够识别更多晚疫病菌效应子的马铃薯材料 IVP196-2 其晚疫病抗性强于 HJT349-3。

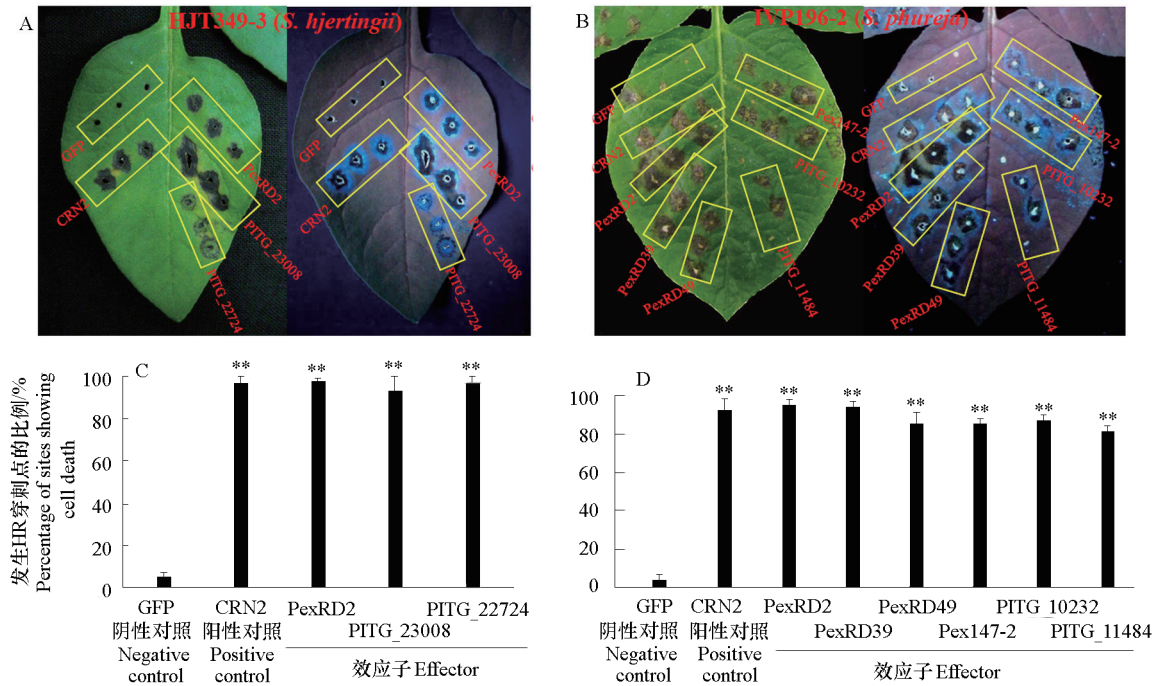


图 1 含晚疫病菌效应子的农杆菌牙签穿刺接种马铃薯材料 HJT349-3 和 IVP196-2 叶片上诱发 HR 表型和比例

Fig. 1 HR phenotype and percentage in inoculation sites on the leaves of potato material HJT349-3 and IVP196-2 triggered by *Agrobacteria* containing *Phytophthora infestans* effector genes

** $P < 0.01$.

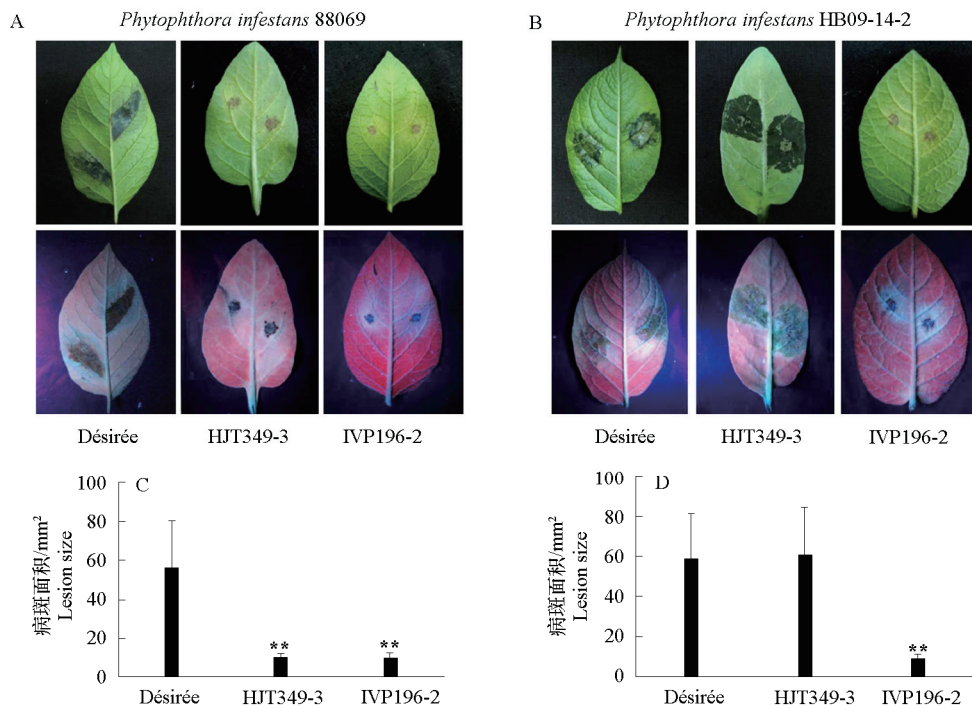


图 2 马铃薯材料 HJT349-3 和 IVP196-2 接种晚疫病病菌 88069 和 HB09-14-2 后的发病表型和病斑面积

Fig. 2 Symptoms and disease lesion area on the leaves of the potato materials HJT349-3 and IVP196-2 after *Phytophthora infestans* 88069 and HB09-14-2 inoculation

** $P < 0.01$.

2.3 晚疫病菌效应子 PITG_23008 可被马铃薯抗病蛋白 Rpi-hjt1.1 识别

基于效应子筛选结果, 发现马铃薯无毒基因 *AVR2* 家族成员 *PITG_23008* 可以在马铃薯材料 HJT349-3 上诱发过敏反应, 因此推测马铃薯 HJT349-3 材料中含有 *Rpi-R2* 同源基因。通过 NCBI 公布的 *Rpi-R2* 同源基因 *Rpi-hjt1.1* 序列设计引物, 在马铃薯材料 HJT349-3 中克隆得到 1 个与 *Rpi-hjt1.1* 基因序列完全相同的基因。将含有 *Rpi-hjt1.1* 和 *PITG_23008* 基因植物表达载体的农杆菌在本氏烟上共注射瞬时表达, 结果显示 *Rpi-hjt1.1* 可以识别 *PITG_23008*, 激发 HR 表型(图 3)。表明 *PITG_23008* 在马铃薯材料 HJT349-3 上诱发的过敏反应是由于 *Rpi-hjt1.1* 与其识别引起。

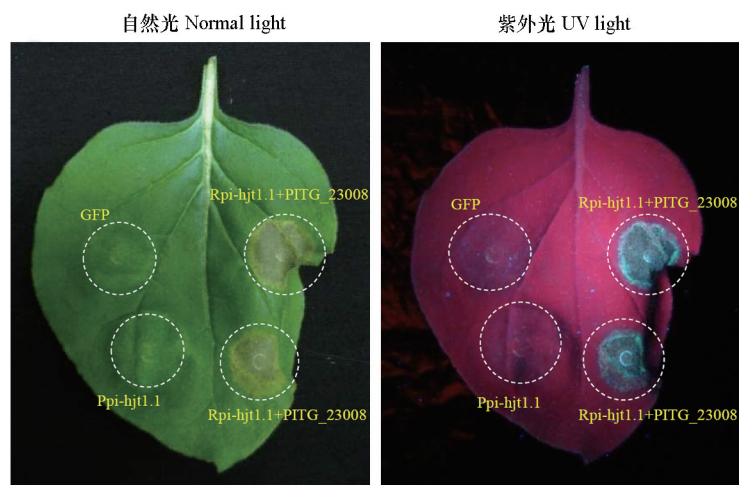


图 3 本氏烟叶片注射含有马铃薯抗病基因 *Rpi-hjt1.1* 和晚疫病菌效应子基因 *Pi23008* 的农杆菌诱导 HR 表型

Fig. 3 HR phenotype triggered by co-expression of potato resistance gene *Rpi-hjt1.1* and *Phytophthora infestans* effector gene *PITG_23008* using agro-infiltration in *Nicotiana benthamiana* leaves

3 讨论

随着马铃薯晚疫病菌参考基因组信息的公布 (Haas et al., 2009), 效应子已被广泛用于马铃薯与晚疫病菌互作的研究中。RXLR 效应子可以在含有对应 *Rpi* 基因的马铃薯材料上诱导 HR 反应 (Vleeshouwers et al., 2008; Oh et al., 2009), 根据这种 HR 细胞死亡表型特征, 可以判断马铃薯材料中是否含有相应抗病基因。本研究挑选了 68 个晚疫病菌侵染前期上调表达的 RXLR 型效应子基因, 分别在 55 份不同基因型的马铃薯材料上进行了 PVX-agroinfection 分析。结果表明, 除 DMS264-1、DMS364-2、PUR206-1 和 SD-27 等 4 个材料外, 效应子 PexRD2 在其余供试马铃薯材料上都能诱发 HR 细胞死亡, 这一结果与前人报道 (Vleeshouwers et al., 2008; Oh et al., 2009) 一致。推测 PexRD2 是一个可以在马铃薯野生种和栽培种中非特异激发细胞死亡的效应子。PexRD39 是识别抗病蛋白 *Rpi-blb2* 的无毒蛋白 (*AVRblb2*) (Oh et al., 2009)。其余 8 个能够在马铃薯材料上诱导 HR 的效应子 Pex147-2、PexRD8、PexRD49、PITG_10232、PITG_11484、PITG_07555、PITG_22724 和 PITG_23008 均未报道与之识别的抗病蛋白。尽管本试验没有进一步明确这些材料中是否含有与 8 个效应子对应的抗病基因, 但是通过马铃薯材料 HJT349-3 (*S. hjertingii*) 响应效应子 PITG_23008 的表型, 以及抗病蛋白 *Rpi-hjt1.1* 与效应子 PITG_23008 的识别反应, 验证了通过效应子识别策略发掘抗病基因方法的有效性。本研究表明, 能够识别 6 个晚疫病菌效应子的马铃薯材料 IVP196-2 其

晚疫病抗性强于能识别 3 个效应子的马铃薯材料 HJT349-3。这一现象部分证实了能够识别多个效应子的马铃薯材料（含有多个潜在 *Rpi* 基因）晚疫病抗性更强、更为持久的观点（Kim et al., 2012）。

PVX-agroinfection 分析方法是建立在 PVX 病毒植物表达载体和农杆菌侵染的基础上，所以植物材料对 PVX 病毒和对农杆菌的敏感性是制约 PVX-agroinfection 分析准确性、规模化的两大因素。马铃薯对 PVX 病毒抗性通常表现为两种：一种是过敏反应，接种或感染 PVX 病毒后植物表现细胞坏死或系统坏死；另一种是极端抗性，接种或感染 PVX 病毒后植物没有任何表型变化（Du et al., 2014）。本研究中，有些马铃薯材料，例如 DMS264-1、DMS364-2、PUR206-1 和 SD-27 穿刺点无任何 HR 表型，推测这些材料对 PVX 病毒表现抗性。因此，基于 PVX 病毒载体瞬时表达的 PVX-agroinfection 分析系统具有基因型依赖性。另外，也有一些马铃薯材料对农杆菌很敏感，叶片注射农杆菌后会诱发强烈的细胞死亡表型，这种类型也不适合农杆菌表达技术。开展相关研究时，可以通过初步的材料筛选，先筛选出适合 PVX-agroinfection 的材料，然后再进行细致的互作研究。

本研究利用效应子识别策略筛选出 10 个 RXLR 效应子能够在 10 份不同基因型马铃薯资源材料上诱发 HR，预示这些材料中含有潜在抗病基因。本研究是利用效应子识别发掘抗性资源的一次有益尝试，将为以后克隆抗病基因和开展马铃薯与晚疫病菌分子互作奠定基础。

References

- Armstrong M R, Whisson S C, Pritchard L, Bos J I, Venter E, Avrova A O, Rehmany A P, Böhme U, Brooks K, Cherevach I, Hamlin N, White B, Fraser A, Lord A, Quail M A, Churcher C, Hall N, Berriman M, Huang S, Kamoun S, Beynon J L, Birch P R. 2005. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene *Avr3a*, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102 (21): 7766 - 7771.
- Boevink P C, Wang X, McLellan H, He Q, Naqvi S, Armstrong M R, Zhang W, Hein I, Gilroy E M, Tian Z, Birch P R. 2016. A *Phytophthora infestans* RXLR effector targets plant PP1c isoforms that promote late blight disease. *Nature Communications*, 7: 10311.
- Du J, Rietman H, Vleeshouwers V G. 2014. Agroinfiltration and PVX agroinfection in potato and *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Visualized Experiments*, 83: e50971.
- Franceschetti M, Maqbool A, Jiménez-Dalmaroni M J, Pennington H G, Kamoun S, Banfield M J. 2017. Effectors of filamentous plant pathogens: commonalities amid diversity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81 (2): e00066-16.
- Haas B J, Kamoun S, Zody M C, Jiang R H, Handsaker R E, Cano L M, Grabherr M, Kodira C D, Raffaele S, Torto-Alalibo T, Bozkurt T O, Ah-Fong A M, Alvarado L, Anderson V L, Armstrong M R, Avrova A, Baxter L, Beynon J, Boevink P C, Bollmann S R, Bos J I, Bulone V, Cai G, Cakir C, Carrington J C, Chawner M, Conti L, Costanzo S, Ewan R, Fahlgren N, Fischbach M A, Fugelstad J, Gilroy E M, Gnerre S, Green P J, Grenville-Briggs L J, Griffith J, Grünwald N J, Horn K, Horner N R, Hu C H, Huitema E, Jeong D H, Jones A M, Jones J D, Jones R W, Karlsson E K, Kunjeti S G, Lamour K, Liu Z, Ma L, Maclean D, Chibucos M C, McDonald H, McWalters J, Meijer H J, Morgan W, Morris P F, Munro C A, O'Neill K, Ospina-Giraldo M, Pinzón A, Pritchard L, Ramshoye B, Ren Q, Restrepo S, Roy S, Sadanandom A, Savidor A, Schornack S, Schwartz D C, Schumann U D, Schwessinger B, Seyer L, Sharpe T, Silvar C, Song J, Studholme D J, Sykes S, Thines M, van de Vondervoort P J, Phuntumart V, Wawra S, Weide R, Win J, Young C, Zhou S, Fry W, Meyers B C, van West P, Ristaino J, Govers F, Birch P R, Whisson S C, Judelson H S, Nusbaum C. 2009. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 461 (7262): 393 - 398.
- Hein I, Gilroy E M, Armstrong M R, Birch P R. 2009. The zig-zag-zig in oomycete-plant interactions. *Molecular Plant Pathology*, 10 (4): 547 - 562.
- Kamoun S. 2006. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 44: 41 - 60.
- Kim H J, Lee H R, Jo K R, Mortazavian S M, Huigen D J, Evenhuis B, Kessel G, Visser R G, Jacobsen E, Vossen J H. 2012. Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked *R* genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 124 (5): 923 - 935.

- King S R, McLellan H, Boevink P C, Armstrong M R, Bukharova T, Sukarta O, Win J, Kamoun S, Birch P R, Banfield M J. 2014. *Phytophthora infestans* RXLR effector PexRD2 interacts with host MAPKKK epsilon to suppress plant immune signaling. *The Plant Cell*, 26 (3): 1345 - 1359.
- Lee H A, Kim S Y, Oh S K, Yeom S I, Kim S B, Kim M S, Kamoun S, Choi D. 2014. Multiple recognition of RXLR effectors is associated with nonhost resistance of pepper against *Phytophthora infestans*. *New Phytologist*, 203 (3): 926 - 938.
- Li G, Huang S, Guo X, Li Y, Yang Y, Guo Z, Kuang H, Rietman H, Bergervoet M, Vleeshouwers V G, van der Vossen E A, Qu D, Visser R G, Jacobsen E, Vossen J H. 2011. Cloning and characterization of *R3b*; members of the *R3* superfamily of late blight resistance genes show sequence and functional divergence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24 (10): 1132 - 1142.
- Oh S K, Young C, Lee M, Oliva R, Bozkurt T O, Cano L M, Win J, Bos J I, Liu H Y, van Damme M, Morgan W, Choi D, Van der Vossen E A, Vleeshouwers V G, Kamoun S. 2009. In planta expression screens of *Phytophthora infestans* RXLR effectors reveal diverse phenotypes, including activation of the *Solanum bulbocastanum* disease resistance protein Rpi-blb2. *The Plant Cell*, 21 (9): 2928 - 2947.
- Pel M A. 2010. Mapping, isolation and characterization of genes responsible for late blight resistance in potato [Ph. D. Dissertation]. Netherlands: Wageningen University.
- Raffaele S, Win J, Cano L M, Kamoun S. 2010. Analyses of genome architecture and gene expression reveal novel candidate virulence factors in the secretome of *Phytophthora infestans*. *BMC Genomics*, 11: 637.
- Saunders D G, Breen S, Win J, Schornack S, Hein I, Bozkurt T O, Champouret N, Vleeshouwers V G, Birch P R, Gilroy E M, Kamoun S. 2012. Host protein BSL1 associates with *Phytophthora infestans* RXLR effector AVR2 and the *Solanum demissum* immune receptor R2 to mediate disease resistance. *The Plant Cell*, 24 (8): 3420 - 3434.
- van der Lee T, Robold A, Testa A, van't Klooster J W, Govers F. 2001. Mapping of avirulence genes in *Phytophthora infestans* with amplified fragment. *Genetics*, 157 (3): 949 - 956.
- van Poppel P M, Guo J, van de Vondervoort P J, Jung M W, Birch P R, Whisson S C, Govers F. 2008. The *Phytophthora infestans* avirulence gene *Avr4* encodes an RXLR-dEER effector. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21 (11): 1460 - 1470.
- Vleeshouwers V G, Dooijeweert W V, Keizer L C P, Sijpkens L, Govers F, Colon L T. 1999. A laboratory assay for *Phytophthora infestans* resistance in various *Solanum* species reflects the field situation. *European Journal of Plant Pathology*, 105: 241 - 250.
- Vleeshouwers V G, Rietman H, Krenek P, Champouret N, Young C, Oh S K, Wang M, Bouwmeester K, Vosman B, Visser R G, Jacobsen E, Govers F, Kamoun S, Van der Vossen E A. 2008. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS ONE*, 3: e2875.
- Vleeshouwers V G, Oliver R P. 2014. Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27 (3): 196 - 206.
- Wang H, Sun C, Jiang R, He Q, Yang Y, Tian Z, Tian Z, Xie C. 2014. The dihydrolipoyl acyltransferase gene *BCE2* participates in basal resistance against *Phytophthora infestans* in potato and *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Plant Physiology*, 171 (11): 907 - 914.
- Xie Cong-hua. 2012. The present situation and development of potato industry. *Journal of Huazhong Agricultural University (Social Sciences Edition)*, 97: 1 - 4. (in Chinese)
- 谢从华. 2012. 马铃薯产业的现状与发展. *华中农业大学学报 (社会科学版)*, 97: 1 - 4.
- Yang L, McLellan H, Naqvi S, He Q, Boevink P C, Armstrong M, Giuliani L M, Zhang W, Tian Z, Zhan J, Gilroy E M, Birch P R. 2016. Potato NPH3/RPT2-Like protein StNRL1, targeted by a *Phytophthora infestans* RXLR effector, is a susceptibility factor. *Plant Physiology*, 171 (1): 645 - 657.
- Zheng X, McLellan H, Fraiture M, Liu X, Boevink P C, Gilroy E M, Chen Y, Kandel K, Sessa G, Birch P R, Brunner F. 2014. Functionally redundant RXLR effectors from *Phytophthora infestans* act at different steps to suppress early flg22-triggered immunity. *PLoS Pathogens*, 10 (4): e1004057.