

番茄对晚疫病的株龄相关抗性及其 *Ph-3* 的抗性机制

李涛*, Sayed Rashad Ali Shah*, 刘磊, 郑峥, 杜永臣, 李君明**

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 目前已明确番茄抗晚疫病 R 基因表现明显的株龄相关抗性 (Age-related Resistance, ARR), 但抗晚疫病 QTL 的抗性规律尚不明确。以携带抗晚疫病基因 *Ph-3* 的栽培种番茄 (*Solanum lycopersicum*) ‘CLN2037B’ 和野生种醋栗番茄 (*S. pimpinellifolium*) ‘L3708’ 以及易感病材料栽培种番茄 (*S. lycopersicum*) ‘LA2818’ 为对照, 对含有抗晚疫病 QTL 的多毛番茄 (*S. habrochaites*) ‘LA2099’、‘LA1033’ 和 ‘LA1777’ 是否也存在株龄相关抗性进行了分析。结果表明, 携带抗晚疫病 QTL 的 3 个材料的 6 叶期和 9 叶期植株病情级数均比 3 叶期明显降低, 表明 QTL 抗性与株龄相关。利用乙烯、水杨酸和茉莉酸素合成或缺失的突变体和病毒诱导基因沉默 (Virus Induced Gene Silencing, VIGS) 技术, 初步明确了乙烯和水杨酸参与 6 叶期 *Ph-3* 基因介导的对晚疫病的抗性, 而茉莉酸不参与。

关键词: 番茄; 晚疫病; 株龄相关抗性; QTL; 突变体; 病毒诱导基因沉默

中图分类号: S 641.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 06-1077-08

Age-related Resistance and the Mechanism of *Ph-3* Gene to *Phytophthora infestans* in Tomato

LI Tao*, Sayed Rashad Ali Shah*, LIU Lei, ZHENG Zheng, DU Yong-chen, and LI Jun-ming**

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Although R genes have been showed significantly age-related resistance (ARR), the mechanism of QTLs involved in this resistance is still unknown. With susceptible material *Solanum lycopersicum* ‘LA2818’, resistant material *S. lycopersicum* ‘CLN2037B’ and *S. pimpinellifolium* ‘L3708’ as control, the age-related resistance of QTL were studied. Except susceptible control LA2818, 6-leaf stage and 9-leaf stage plants of *S. habrochaites* accessions LA2099, LA1033 and LA1777, which contain QTL also showed age-related resistance, were more resistant significantly to late blight disease than 3-leaf stage plants. Thus there is a common defense mechanism in tomato against *Phytophthora infestans* through ARR. Meanwhile, ethylene, salicylic acid and jasmonic acid synthesis or missing mutants and Virus Induced Gene Silencing (VIGS) technology were combined to study the resistant mechanisms of 6-leaf stage plants harboring *Ph-3* gene. The results showed that ethylene and salicylic acid but not jasmonic acid were

收稿日期: 2015-01-07; **修回日期:** 2015-04-22

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31171975); 中国农业科学院科技创新工程项目 (CAAS-ASTIP-IVFCAAS); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 同等贡献者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lijunming@caas.cn)

involved in the resistance to late blight mediated by *Ph-3* gene.

Key words: tomato; *Phytophthora infestans*; age-related resistance; QTL; pathway mutant; VIGS

晚疫病由卵菌纲致病疫霉 [*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary] 引起, 严重危害番茄和马铃薯的生产 (冯兰香 等, 2004)。目前已报道的番茄抗晚疫病 R 基因包括 *Ph-1*、*Ph-2*、*Ph-3*、*Ph-4* 和 *Ph-5*, 它们均来自醋栗番茄 *Solanum pimpinellifolium* (Gallegly & Marvel, 1955; Peirce, 1971; Moreau et al., 1998; Chunwongse et al., 2002; Merk et al., 2012)。同时, 在多毛番茄 (*S. habrochaites*) ‘LA2099’、‘LA1777’、‘LA1033’、潘那利番茄 (*S. pennellii*) ‘LA716’ 和类番茄茄 (*S. lycopersicoides*) ‘LA2051’ 等野生种或野生近缘种中还鉴定出一些抗晚疫病的数量性状位点 QTL (Lough, 2003; Robbins et al., 2010; Li et al., 2011), 但这些 QTL 效应较小、受环境影响大, 且存在连锁累赘 (Li, 2010; Zhang et al., 2013), 使得其在实际生产中的应用受到较大限制。目前, *Ph-2* 和 *Ph-3* 基因已被转育到多个优良的鲜食番茄和加工番茄品种中, 并在生产实践中表现出较好的抗性 (Li, 2010; Robbins et al., 2010)。

株龄相关抗性 (Age Related Resistance, ARR), 即植物抗病性随着植株的生长发育表现增强或减弱的现象, 已被证明广泛存在于不同类型的植物家族中 (Panter & Jones, 2002; Develey-Rivière & Galiana, 2007)。如幼龄感病的烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 成株对晚疫病表现完全抗性。葫芦对疫病的抗性也与株龄相关 (Meyer & Hausbeck, 2013)。业已发现番茄抗晚疫病基因 *Ph-2* 和 *Ph-3* 的抗性表达与株龄相关 (Chunwongse et al., 2002; 李君明 等, 2007; Li, 2010)。然而对于 QTL 抗性是否也呈现与株龄相关尚未见报道。现已明确水杨酸 (SA)、乙烯 (ET)、茉莉酸素 (JA) 等内源小分子激素调控植物对病原菌入侵的防御反应 (Jones & Dangl, 2006; Dodds & Rathjen, 2010), 但不同植物与病原菌的互作机制存在差异。就马铃薯与晚疫病互作而言仍存在相驳的结论。一些研究发现, 马铃薯对晚疫病的抗性需 SA 和 JA 参与, 且 SA 介导基础防御 (Halim et al., 2009; Manosalva et al., 2010); 而另外一些研究发现, 马铃薯 R 基因介导的抗性, 不需 JA 参与 (Eschen-Lippold et al., 2010b)。Shibata 等 (2010) 发现烟草对晚疫病的株龄相关抗性是由于幼龄植株体内 SA 含量少, 成株抗性的完全表达是 SA 诱导细胞发生程序性死亡和乙烯诱导产生了植保素。目前关于番茄与晚疫病互作机制报道甚少, 而番茄对晚疫病株龄相关抗性机制的报道更为鲜见。

本试验中利用番茄晚疫病生理小种 T_{1,2,4} 对不同株龄 (3、6、9 叶期) 番茄植株进行人工接种鉴定, 证明 QTL 控制的对晚疫病抗性与 R 基因介导抗性完全相同, 呈现明显的株龄相关性, 6 叶期与 9 叶期植株抗性明显高于 3 叶期植株。结合抗性相关调控激素的 *Never ripe* (*Nr*)、*defenseless* (*Def-1*) 和 *NahG* 突变体及病毒诱导基因沉默 (Virus Induced Gene Silencing, VIGS) 技术, 初步证明 6 叶期植株 *Ph-3* 基因对晚疫病的抗性需要乙烯和水杨酸介导, 而茉莉酸素不参与。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

试验分别于 2011 年秋季和 2012 年春季在中国农业科学院蔬菜花卉研究所北圃厂试验温室进行。抗病对照材料为含有 *Ph-3* 基因的栽培种番茄 (*Solanum lycopersicum*) ‘CLN2037B’ 和野生种醋栗番茄 (*S. pimpinellifolium*) ‘L3708’ (由亚洲蔬菜研究中心提供), 感病对照为栽培种番茄 (*S. lycopersicum*) ‘LA2818’ (由 TGRC 提供)。用于研究 QTL 抗性的材料为含抗晚疫病 QTL 的多毛番

茄 (*S. habrochaites*) ‘LA1033’、‘LA1777’ 和 ‘LA2099’ (由 TGRC 提供)。株龄相关抗性试验每 15 d 播种 1 次, 以获得 3 叶期 (播种后 20 d)、6 叶期 (播种后 35 d) 和 9 叶期 (播种后 50 d) 植株。每处理设 3 次重复, 每重复 15 株。

为明确 *Ph-3* 基因介导的下游抗性信号传导途径, 利用番茄 3 种激素突变体 (由荷兰瓦格宁根大学白玉玲教授提供) 分别与含有 *Ph-3* 基因的 ‘CLN2037B’ 杂交, 对杂交后的 F₁ 或其自交 F₂ 后代进行晚疫病病菌接种试验。突变体材料包括茉莉酸素 (Jasmonic Acid, JA) 信号传导途径突变体 *def-1* (JA-deficient-1) 转化植株 (转 *def-1* 基因的植株不能积累 JA)、水杨酸 (Salicylic Acid, SA) 信号传导途径突变体 *NahG* 转化植株 (转 *NahG* 基因的植株不能积累 SA)、乙烯 (Ethylene, ET) 信号传导途径突变体 *Nr* (乙烯不敏感)。3 种突变体的遗传背景分别为 ‘Moneymaker’、‘Pearson’ 和 ‘VFN8’, 其中 *Nr* 和 *NahG* 为显性遗传, *def-1* 突变为隐性遗传 (Barry et al., 2001)。对于 *def-1* 突变体, 播种其与 ‘CLN2037B’ 杂交的 F₂ 群体 200 株, 苗期利用 *Ph-3* 基因连锁标记 RGA2M1 (Zhang et al., 2013) 筛选 *Ph-3* 基因纯合后代植株。

1.2 病毒质粒载体和菌株

VIGS 载体分别为信号传导途径关键基因构建的 pTRV2-*ACO1* (乙烯) 和 pTRV2-*NPR1*、pTRV2-*TGA1a*、pTRV2-*TGA2.2* (水杨酸) 载体 (Chen et al., 2009b), 由台湾大学郑秋萍教授提供。利用 pTRV200 空白载体作对照, *PDS* 基因作为病毒诱导基因沉默体系的报告基因。

1.3 VIGS 技术操作步骤

VIGS 技术具体参照 Liu 等 (2002) 的方法。播种 10 d 后将幼苗移栽到营养钵, 第 2 天进行农杆菌转染。将含有 pTRV1 的农杆菌与含有 *PDS*、*ACO1*、*NPR1*、*TGA1a* 和 *TGA2.2* 基因片段的 pTRV2 农杆菌按照 1:1 比例混匀, 空白载体作对照。设 3 次重复, 每重复 10 株。用 1 mL 注射器将菌液从叶片背面注入到两片子叶中, 然后将植株放在控温的玻璃温室内, 温度为 21 °C, 每天 12 h 光照。

1.4 接种与鉴定方法

试验所用番茄晚疫病病菌的生理小种为 T_{1,2,4}。晚疫病病菌培养在黑麦培养基上, 放置在恒温箱内, 黑暗条件, 温度 18 ~ 20 °C, 培养 2 周左右, 待菌丝布满整个培养皿时用于接种。首先制作孢子囊悬浮液, 孢子囊浓度为 1 000 个 · mL⁻¹。将悬浮液放置在 4 °C 条件下 1 ~ 2 h, 促进游动孢子释放。采用活体接种法 (Chen et al., 2009a) 接种。

病情等级分为 0 ~ 6 级。0 级: 无病斑; 1 级: 叶片出现较小病斑, 病斑面积小于 5%; 2 级: 叶片形成限制性病斑, 病斑面积 6% ~ 15%; 3 级: 叶片病斑面积 16% ~ 30%, 或茎部出现水浸状斑点; 4 级: 叶片病斑面积 31% ~ 60%, 或茎部出现少量病斑; 5 级: 叶片病斑面积 61% ~ 90%, 茎部出现较大扩展性病斑; 6 级: 植株发病较重, 叶片病斑面积 > 91%, 或植株死亡。其中 0 ~ 4 级为抗病, 5 ~ 6 级为感病 (Chen et al., 2009a)。

利用 SPSS 16.0 软件进行单变量方差分析, 采用邓肯氏新复极差法检验差异显著性。

2 结果与分析

2.1 QTL 对晚疫病表现出株龄相关抗性

利用含有 *Ph-3* 基因的 ‘CLN2037B’ 和 ‘L3708’ 番茄植株作为抗病对照, ‘LA2818’ 作为感

病对照, 2011年秋季试验结果(表1)表明, 抗病对照‘CLN2037B’和‘L3708’的3、6、9叶期植株病情级数依次降低, 6叶期与3叶期相比分别降低了52.2%和42.4%, 9叶期与3叶期相比分别降低了63.7%和73.7%; 感病对照‘LA2818’3、6和9叶期植株病情级数差异不显著。2012年春季重复上述试验, 所得结果与2011年完全一致(表1)。含有 $Ph-3$ 基因的抗病对照‘CLN2037B’和‘L3708’随着植株的生长发育抗性依次增强, 而感病对照抗性差异不显著, 这说明R基因的抗性与株龄相关, 与李君明等(2007)的报道一致。

对含有抗病QTL的材料同时人工接种鉴定。2011年试验结果(表1)表明, 3个材料的3、6、9叶期植株病情级数均依次降低。6叶期和9叶期的病情级数与3叶期相比, ‘LA1777’分别降低了38.4%和72.0%, ‘LA1033’分别降低了41.9%和64.1%, ‘LA2099’分别降低了35.4%和69.8%。2012年重复上述试验, 所得结果与2011年完全一致(表1), 即6叶期和9叶期的植株较3叶期病情级数显著降低($P < 0.01$)。上述结论说明, 具有广谱抗性的QTL与R基因一样, 呈现明显的株龄相关抗性, 6叶期和9叶期植株的抗性明显高于3叶期植株。

2.2 $Ph-3$ 基因对晚疫病的抗性信号传导途径

前人研究发现, $Ph-3$ 基因的抗性在6叶期可完全表达(李君明等, 2007)。本试验中对含有 $Ph-3$ 基因的‘CLN2037B’6叶期植株进行了活体接种晚疫病病菌。接种8d后, ‘CLN2037B’平均病情级数为0.50, 表现为抗病; 感病对照‘MoneyMaker’为6.00, 表现为感病。由于 $Ph-3$ 为不完全显性基因(Zhang et al., 2013), F_1 (‘CLN2037B’ × ‘MoneyMaker’) 的平均病情级数为1.14, 在下列试验以此 F_1 作为抗病对照。

为明确乙烯信号传导途径是否参与6叶期完全表达的 $Ph-3$ 基因抗性。利用乙烯受体蛋白基因功能缺失突变体 Nr (乙烯不敏感)与‘CLN2037B’杂交获得 F_1 , 通过对12株 F_1 植株进行晚疫病病菌接种, 鉴定病情级数。由于控制 Nr 突变体的基因呈显性, 若乙烯参与了 $Ph-3$ 基因介导的抗性信号传导途径, 植株的病情级数会明显增加。鉴定结果表明 F_1 中5株表现感病, 平均病情级数为5.00, 7株表现为抗病, 平均病情级数2.75, 与抗病对照 F_1 (‘CLN2037B’ × ‘MoneyMaker’) 相比病情级数显著增加($P < 0.05$), 说明 $Ph-3$ 基因介导的晚疫病抗性需要乙烯信号传导途径的参与。5株 F_1 表现感病, 原因可能是 Nr 突变体并非完全的乙烯不敏感(Clark et al., 1999)。

$NahG$ 基因的表达产物为水杨酸氢基酶(Salicylate hydroxylase), 可抑制水杨酸的累积, 导致植株体内水杨酸含量降低。鉴于 $NahG$ 植株是转基因植株, F_1 (‘NahG’ × ‘CLN2037B’) 代应出现1:1分离。试验结果表明, 12株 F_1 植株中有6株表现为感病, 平均病情级数为5, 与抗病对照 F_1

表1 接种晚疫病病菌后, 6种基因型番茄在不同株龄(叶片数)的病情等级

Table 1 Mean disease index (DS) of six genotypes of tomato at different ages infected by late blight disease

材料 Material	基因型 Genotype	叶片数 Number of leaf	2011年秋季 Autumn 2011	2012年春季 Spring 2012
CLN2037B	$Ph-3$	3	3.66 ± 0.63 Ac	2.50 ± 0.50 Ac
		6	1.75 ± 0.57 Bc	0.86 ± 0.68 Bc
		9	1.33 ± 0.60 Cc	0.56 ± 0.50 Cc
L3708	$Ph-3$	3	3.04 ± 0.63 Ac	3.20 ± 0.71 Ac
		6	1.75 ± 1.00 Bc	1.70 ± 0.53 Bc
		9	0.80 ± 0.50 Cc	1.13 ± 0.50 Cc
LA2818	-	3	5.93 ± 0.25 Aa	6.00 ± 0.00 Aa
		6	5.88 ± 0.31 Aa	5.93 ± 0.25 Aa
		9	5.84 ± 0.36 Aa	5.90 ± 0.30 Aa
LA1777	QTL	3	4.35 ± 1.74 Ab	4.46 ± 1.47 Ab
		6	2.68 ± 1.37 Bb	2.06 ± 1.14 Bb
		9	1.22 ± 0.90 Cb	1.30 ± 1.02 Cb
LA1033	QTL	3	3.20 ± 1.58 Ac	1.96 ± 1.29 Ac
		6	1.86 ± 1.01 Bc	1.36 ± 0.66 Bc
		9	1.15 ± 0.79 Cc	0.66 ± 0.47 Cc
LA2099	QTL	3	2.91 ± 0.86 Ac	1.80 ± 0.66 Ac
		6	1.88 ± 0.83 Bc	1.40 ± 0.62 Bc
		9	0.88 ± 0.57 Cc	0.56 ± 0.50 Bc

注: 大写字母表示病情等级差异是否显著 ($P < 0.01$), 小写字母表示不同基因型之间的病情等级差异是否显著 ($P < 0.01$)。

Note: Capital letters show significant difference between ages at a significant level of $P < 0.01$ and small letters show significant difference between genotypes at a significant level of $P < 0.01$.

(‘CLN2037B’ × ‘MoneyMaker’) 差异显著 ($P < 0.05$); 其余 6 株表现为抗病, 平均病情级数为 1.43, 与抗病对照 F_1 差异不显著, 试验结果与预期一致。由于 *NahG* 的参与 (即没有水杨酸的积累), 导致含有 *Ph-3* 基因的植株病情级数增高, 说明水杨酸与乙烯相同, 也参与了 *Ph-3* 基因介导的对晚疫病的抗性。

def-1 是茉莉酸信号传导途径的突变体材料, 由隐性基因控制, 无法正常积累茉莉酸素从而导致植物体内茉莉酸素含量降低。利用标记筛选 *Ph-3* 基因纯合的 F_2 群体单株, 对筛选出的 12 株 ‘def-1’ × ‘CLN2037B’ 的 F_2 代材料接种晚疫病病菌, 均表现为较好的抗病性, 12 株平均病情级数为 0.64, 与抗病对照 ‘CLN2037B’ 平均病情级数 (0.86) 差异不显著, 所以认为茉莉酸素可能没有参与 *Ph-3* 基因介导的对晚疫病的抗性。

2.3 *ACO1*、*NPR1*、*TGA1a* 和 *TGA2.2* 基因参与 *Ph-3* 基因介导的抗性信号传导途径

为了进一步证实乙烯和水杨酸是否参与了 *Ph-3* 基因介导的晚疫病抗性信号传导途径, 利用病毒诱导基因沉默技术沉默了 ‘CLN2037B’ 中乙烯合成关键基因 *ACO1* 和水杨酸合成关键基因 *NPR1*、*TGA1a* 和 *TGA2.2*。农杆菌侵染 2 周后, *PDS* 基因报告基因沉默的植株表现出明显的光漂白现象 (图 1, A), 说明目标基因已被成功沉默。接种晚疫病病菌后, 感病对照植株 ‘MoneyMaker’ 表现感病, 平均病情级数为 6.00, 抗病空载体对照植株 (图 1, B) 表现抗病。



图 1 ‘CLN2037B’ 番茄报告基因 *PDS* 沉默植株 (A) 与空载体对照 *TRV2-EV* 植株 (B) 的表型
Fig. 1 The phenotype of *PDS* gene silenced plant (A) and empty vector control of *TRV2* plant (B)

ACO1 是乙烯合成的关键基因, 控制 ACC 氧化酶 (ACO) 合成, 沉默 *ACO1* 基因会导致乙烯合成无法正常进行。对沉默 *ACO1* 基因的植株进行晚疫病病菌接种, 8 d 后的调查结果表明, *ACO1* 基因沉默的 ‘CLN2037B’ 植株, 30 株材料中有 5 株表现出典型的晚疫病症状, 病斑出现在老叶和茎上, 且病斑不断扩展, 表现为感病, 表明 *ACO1* 基因是 *Ph-3* 基因介导的抗性信号传导途径的关键基因, 进一步证实了乙烯参与 *Ph-3* 基因介导的晚疫病抗性。

NPR1、*TGA1a* 和 *TGA2.2* 是水杨酸合成的关键基因, 沉默后导致水杨酸无法正常合成。*NPR1*、*TGA1a* 和 *TGA2.2* 基因沉默的 ‘CLN2037B’ 植株较其空载体对照植株生长缓慢。植株 6 叶期接种晚疫病病菌, 8 d 后, *NPR1*、*TGA1a* 和 *TGA2.2* 基因沉默的植株老叶上出现大量病斑, 且病斑明显多于空载体对照,

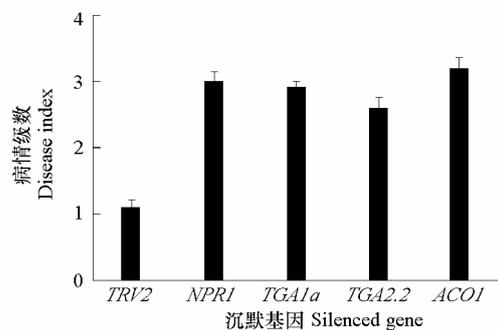


图 2 沉默 *TRV2*、*NPR1*、*TGA1a*、*TGA2.2* 与 *ACO1* 的番茄 ‘CLN2037B’ 植株接种晚疫病病菌后病情级数
Fig. 2 Disease index of *TRV2*、*NPR1*、*TGA1a*、*TGA2.2* and *ACO1* gene silenced ‘CLN2037B’ plants after inoculation with *P. infestans*

部分新叶出现扩展性病斑; *NPR1*、*TGA1a* 和 *TGA2.2* 基因沉默植株的病情级数 (图 2) 显著升高 ($P < 0.05$), 说明 SA 信号传导途径关键基因 *NPR1*、*TGA1a* 和 *TGA2.2* 沉默可导致 *Ph-3* 基因抗性降低。

3 讨论

3.1 番茄对晚疫病的抗性普遍存在株龄相关性

番茄抗晚疫病的 R 基因与株龄相关, 随着株龄的增加抗性表现出不同程度的增加 (Moreau et al., 1998; Chunwongse et al., 2002; 李君明 等, 2007)。本试验中利用含有 QTL 的抗晚疫病番茄材料, 首次证明了番茄抗晚疫病的 QTL 抗性也与株龄相关, 与 R 基因呈现相同的趋势。番茄对晚疫病病菌的株龄相关性具有普遍性, 在筛选晚疫病抗源材料时, 应注意株龄的选择, 以防抗源材料的丢失。株龄相关性, 在研究烟草、马铃薯与晚疫病、甜椒与炭疽病、番茄与叶霉病等互动时均有报道 (Muty & Hossenkhan, 2008; Shibata et al., 2010), 不同作物株龄相关性的调控也不相同, 如大豆对疫病、草莓对灰霉病、拟南芥对芜菁花叶病毒等抗性受营养生长调控, 而小麦对小麦秆锈病菌、烟草对疫病、番茄对灰霉病等的抗性则受开花调控 (Develey-Rivière & Galiana, 2007), 这与马铃薯对晚疫病的熟期和长势相关抗晚疫病的 QTL 位于不同的染色体区域 (Collins et al., 1999) 的结论相吻合。目前植物株龄相关性机制尚未有定论, 研究发现青椒对炭疽病的株龄相关性是由于老叶组织限制了病菌的穿透 (Hong et al., 2001), 而拟南芥对细菌性斑点病的株龄相关性并非系统诱导抗性和系统获得的抗性 (Kus et al., 2002), 番茄 *Cf-9B* 基因对灰霉病抗性的启动不受转录组水平调控 (Panter & Jones, 2002)。株龄相关性有可能是植物需要通过生长或发育获得一些能力, 从而抵御病原菌的侵染 (Develey-Rivière & Galiana, 2007)。通过对不同病原菌产生相同或类似株龄相关性途径, 如营养生长或开花调控的阐明, 可能会为揭示植物株龄相关性提供一定的依据。

3.2 乙烯和水杨酸参与了 *Ph-3* 介导的晚疫病抗性信号传导途径

由于晚疫病具有半活体营养型病原菌的特性, 根据植病互作模式, SA 和 JA 均应参与, 其中 SA 主要介导对活体营养型病原的抗性, JA 介导坏死型病原, ET 也可对 SA-JA 信号互作的最终结果起决定作用 (Jones & Dang, 2006; Pieterse et al., 2009)。本试验已证明番茄生长到 6 叶期时对晚疫病的抗性才完全表达, 结合乙烯、水杨酸和茉莉酸素合成或缺失突变体与病毒诱导基因沉默技术, 研究了 6 叶期番茄植株中 *Ph-3* 基因介导的抗性信号传导途径。结果表明, ET 和 SA 均参与了 *Ph-3* 基因介导的晚疫病抗性信号传导途径, 而茉莉酸素没有参与。SA 可能主要介导晚疫病病菌侵染植株前期的抗性信号传导, 诱导植物细胞发生超敏反应 (Hypersensitive response, HR), 继而导致细胞发生程序性死亡, 而 ET 作用在活体营养阶段和腐生性营养两个阶段, 主要诱导植物产生植保素, 从而抵御病原菌的入侵。结果与烟草成株期对晚疫病的抗性机制结论基本一致, 但烟草株龄相关性与 *NPR1* 基因无关 (Shibata et al., 2010)。本试验中 *NPR1* 基因的沉默却导致了番茄晚疫病抗性的降低, 说明番茄和烟草这两个亲缘关系较近的物种, 抗性机制可能存在一定差异。

本研究中仅对 6 叶期番茄抗晚疫病的 *Ph-3* 基因进行了研究, 初步明确了 6 叶期介导番茄 *Ph-3* 基因的抗性均需 ET 和 SA 参与, 但对 3 叶期等幼苗的抗性基因不完全表达是否由于 SA 和 ET 缺乏积累所致, 仍需要进一步明确。研究发现, 拟南芥对细菌性斑点病 (病原菌为 *P. syringae*) 的株龄相关性必需有 SA 的积累 (Kus et al., 2002), 烟草对晚疫病病菌的株龄相关性也需要 ET 和 SA

参与 (Shibata et al., 2010)。通过 BABA (DL- β -aminobutyric acid) 诱导马铃薯和番茄抗晚疫病发现, 二者均有 SA 积累, 不同基因型番茄诱导的抗性存在明显差异, 而且随着株龄的增加, 这种诱导程度降低 (Eschen-Lippold et al., 2010a), 暗示内源激素参与了相关抗性。马铃薯叶片对晚疫病的株龄相关抗性反应与 R 基因的转录丰度不相关 (Millett et al., 2009), 这也为生长发育相关调控因子参与株龄相关抗性提供了直接依据。因此, 基于已明确的 6 叶期番茄 *Ph-3* 调控机制, 分析比较 3 叶和 6 叶期 SA、ET 等的积累, 可进一步阐明番茄株龄相关调控机制。

References

- Barry C S, Fox E A, Yen H C, Lee S, Ying T J, Grierson D, Giovannoni J J. 2001. Analysis of the ethylene response in the *Epinastic* mutant of tomato. *Plant Physiology*, 127: 58 - 66.
- Chen H C, Wang T C, Black L, Sheu Z M, Perez F, Deal K. 2009a. Phenotypic and genotypic changes in *Phytophthora infestans* population in Taiwan - 1999—2006. *Journal of Phytopathology*, 157: 248 - 255.
- Chen Y Y, Lin Y M, Chao T C, Wang J F, Liu A C, Ho F I, Cheng C P. 2009b. Virus-induced gene silencing reveals the involvement of ethylene-, salicylic acid- and mitogen-activated protein kinase-related defense pathways in the resistance of tomato to bacterial wilt. *Physiologia Plantarum*, 136: 324 - 335.
- Chunwongse J, Chunwongse C, Black L, Hanson P. 2002. Molecular mapping of the *Ph-3* gene for late blight resistance in tomato. *Journal of Horticulture Science and Biotechnology*, 77: 281 - 286.
- Clark D, Gubrium E, Barrett J, Nell T, Klee H. 1999. Root formation in ethylene-insensitive plants. *Plant Physiology*, 121: 53.
- Collins A, Milbourne D, Ramsay L, Meyer R, Chatot-Balandras C, Oberhagemann P, de Jong W, Gebhardt C, Bonnel E, Waugh R. 1999. QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigor. *Molecular Breeding*, 5: 387 - 398.
- Develey-Rivière M P, Galiana E. 2007. Resistance to pathogens and host development stage: A multifaceted relationship within the plant kingdom. *New Phytologist*, 175: 405 - 416.
- Dodds P N, Rathjen J P. 2010. Plant immunity: Towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 211 (8): 539 - 548.
- Eschen-Lippold L, Altmann S, Rosahl S. 2010a. DL- β -aminobutyric acid-induced resistance of potato against *Phytophthora infestans* requires salicylic acid but not oxylipins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23 (5): 585 - 592.
- Eschen-Lippold L, Altmann S, Gebhardt C, Göbel C, Feussner I, Rosahl S. 2010b. Oxylipins are not required for R gene-mediated resistance in potato. *European Journal of Plant Pathology*, 127: 437 - 442.
- Feng Lan-xiang, Yang Yu-hong, Xie Bing-yan, Feng Dong-xin, Yang Cui-rong. 2004. Identification of physiological races of *Phytophthora infestans* on tomato in eighteen provinces of China. *Acta Horticulture Sinica*, 31 (6): 758 - 761. (in Chinese)
- 冯兰香, 杨宇红, 谢丙炎, 冯东昕, 杨翠荣. 2004. 中国 18 省市番茄晚疫病菌生理小种的鉴定. *园艺学报*, 31 (6): 758 - 761.
- Gallegly M E, Marvel M E. 1955. Inheritance of resistance to tomato race-0 of *Phytophthora infestans*. *Phytopathology*, 45: 103 - 109.
- Halim V A, Altmann S, Ellinger D, Eschen-Lippold L, Miersch O, Scheel D, Rosahl S. 2009. PAMP-induced defense response in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *Plant Journal*, 57: 230 - 242.
- Hong J K, Lee Y K, Jeun Y C, Hwang B K. 2001. Histological and ultrastructural study of susceptible and age-related resistance response of pepper leaves to *Colletotrichum coccodes* infection. *Plant Pathology*, 17 (3): 128 - 140.
- Jones J D, Dangl J L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444 (16): 323 - 329.
- Kus J V, Zaton K, Sarkar R, Cameron R K. 2002. Age-related resistance in *Arabidopsis* is a developmentally regulated defense response to *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell*, 14: 479 - 490.
- Li Junming. 2010. Exploration of wild relatives of tomato for enhanced stress tolerance [Ph. D. Dissertation]. Wageningen: Wageningen University. ISBN: 978-90-8585-612-2.
- Li Jun-ming, Song Yan, Yang Yu-hong, Du Yong-chen, Feng Lan-xiang, Xie Bing-yan, Xu He-jin. 2007. Age-related resistance to main strains

- T₁ of late blight (*Phytophthora infestans*) in China during tomato seedlings. *Journal of Plant Genetic Resources*, 8 (2): 231 - 233. (in Chinese)
李君明, 宋 燕, 杨宇宏, 杜永臣, 冯兰香, 谢丙炎, 徐和金. 2007. 番茄苗龄对晚疫病生理小种 T₁ 的抗性表现差异研究. *植物遗传资源学报*, 8 (2): 231 - 233.
- Li J, Liu L, Bai Y, Finkers R, Wang F, Du Y, Yang Y, Xie B, Visser R G F, van Heusden A W. 2011. Identification and mapping of quantitative resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in *Solanum habrochaites* LA1777. *Euphytica*, 179: 427 - 437.
- Liu Y, Schiff M, Dinesh-kumar S P. 2002. Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal*, 31 (6): 777 - 786.
- Lough R C. 2003. Inheritance of tomato late blight resistance in *Lycopersicon hirsutum* LA1033 [Ph. D. Dissertation]. Raleigh: North Carolina State University.
- Manosalva P M, Park S W, Forouhar F, Tong L, Fry W E, Klessig D F. 2010. *Methyl esterase 1* (*StMES1*) is required for systemic acquired resistance in potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23 (9): 1151 - 1163.
- Merk H L, Ashrafi H, Foolad M R. 2012. Selective genotyping to identify late blight resistance genes in an accession of the tomato wild species *Solanum pimpinellifolium*. *Euphytica*, 187: 63 - 75.
- Meyer M D, Hausbeck M K. 2013. Age-related resistance to *Phytophthora* fruit rot in 'dickenson field' processing pumpkin and 'Golden Delicious' winter squash fruit. *Plant Disease*, 97 (4): 446 - 552.
- Millett B P, Molloy D S, Iorizzo M, Carputo D, Bradeen J M. 2009. Changes in disease resistance phenotypes associated with plant physiological age are not caused by variation in R gene transcript abundance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 22: 362 - 368.
- Moreau P, Thoquet P, Olivier J, Laterrot H, Grimsley N. 1998. Genetic mapping of *Ph-2*, a single locus controlling partial resistance to *Phytophthora infestans* in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 11: 259 - 269.
- Mutty S D, Hossenkhan N T. 2008. Age-related resistance in commercial varieties of *Solanum tuberosum* to the late blight pathogen, *Phytophthora infestans*. *Plant Pathology Journal*, 7: 168 - 173.
- Panter S N, Jones D A. 2002. Age-related resistance of plant pathogens. *Advances in Botanical Research*, 38: 251 - 280.
- Peirce L C. 1971. Linkage tests with *Ph* conditioning resistance to race 0, *Phytophthora infestans*. *Tomato Genetic Cooperative Report*, 21: 30.
- Pieterse C M J, Leon-Reyes A, van der Ent S, van Wees S C M. 2009. Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5 (5): 308 - 316.
- Robbins M D, Masud M A, Panthee D R, Gardner R G, Francis D M, Stevens M R. 2010. Marker-assisted selection for coupling phase resistance to Tomato spotted wilt virus and *Phytophthora infestans* (late blight) in tomato. *HortScience*, 45: 1424 - 1428.
- Shibata Y, Kawakita K, Takemoto D. 2010. Age-related resistance of *Nicotiana bethamiana* against hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* requires both ethylene and salicylic acid mediated signaling pathways. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23: 1130 - 1142.
- Zhang C, Liu L, Zheng Z, Sun Y Y, Zhou L X, Yang Y H, Cheng F, Zhang Z H, Wang X W, Huang S W, Xie B Y, Du Y, Bai Y L, Li J M. 2013. Fine mapping of the *Ph-3* gene conferring resistance to late blight (*Phytophthora infestans*) in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 126: 2643 - 2653.