

陈曦, 冯辉, 张金凤, 等. 拟南芥抗根结线虫和蚜虫的功能基因鉴定[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(6): 1250-1256.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2015.06.009

## 拟南芥抗根结线虫和蚜虫的功能基因鉴定

陈曦, 冯辉, 张金凤, 卢小雪, 陈怀谷, 魏利辉  
(江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

**摘要:** 为了鉴定出增强植物对根结线虫和蚜虫抗性的功能基因, 从9个抗蚜虫的拟南芥激活标签突变体中筛选增强根结线虫抗性的突变体。利用反向PCR技术定位激活标签在基因组上的插入位点, 并通过荧光定量PCR技术分析插入位点上、下游基因表达水平, 结合根结线虫和蚜虫在过量表达转基因植株上的表现验证基因功能。结果显示接种根结线虫后7 d, 侵入3个拟南芥突变体根系的根结线虫数量明显少于野生型。其中2个突变体中的激活标签插入位点只相差2个碱基, *SKS13* 基因表达水平提高; 另一个株系中激活标签导致 *PERK2* 基因的表达水平提高。与野生型植株相比, 分别过量表达 *SKS13* 和 *PERK2* 的转基因植株能明显减少侵入根系的根结线虫数量, 同时蚜虫的繁殖数量也较低。

**关键词:** 根结线虫; 蚜虫; 拟南芥激活标签突变体; 抗性鉴定

**中图分类号:** S433.3, S433.89 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2015)06-1250-07

## Identification of genes resistant to root knot nematodes and aphids in *Arabidopsis thaliana*

CHEN Xi, FENG Hui, ZHANG Jin-feng, LU Xiao-xue, CHEN Huai-gu, WEI Li-hui  
(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** To identify plant genes that can increase resistance towards root knot nematode (RKN) and aphid, nine *Arabidopsis* activation tag mutants carrying aphid resistance were used to explore RKN resistance. Inverse PCR was performed to locate the activation tag on *Arabidopsis* genome and quantitative RT-PCR was used to quantify the expression levels of upstream and downstream genes. Three out of the nine aphid resistant mutants were identified with resistance towards RKN, indicated by lower infection level compared to wild type at 7 days after inoculation. Among these three mutants, two had almost the same location of the activation tag and activated *SKS13* gene. In the other mutant, activation tag enhanced the expression level of *PERK2* gene. Transgenic lines overexpressing either *SKS13* or *PERK2* resulted in reduced infection level of RKN and poorer aphid performance.

**Key words:** root knot nematode; aphid; *Arabidopsis* activation tag mutant; resistance identification

根结线虫和蚜虫的寄主范围广泛, 经常同时出现, 给农业生产造成巨大危害。根结线虫寄生根系

导致根系出现根结甚至根瘤, 根组织的运输系统被破坏, 水分和养分的输送严重受阻, 植株枝叶生长缓慢萎缩黄化<sup>[1-2]</sup>; 蚜虫取食茎叶损耗光合作用产生的营养物质, 蚜虫分泌的蜜露附着叶片表面滋生真菌病害<sup>[3-4]</sup>。最经济有效的病虫害防治方法是培育使用抗性品种, 而鉴定出参与植株抗病虫害的功能基因是先决条件。

目前, 从番茄中鉴定到的 *Mi* 基因是唯一同时对

收稿日期: 2015-06-24

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项基金项目(201403032); 2014江苏省博士计划项目(2014)

作者简介: 陈曦(1983-), 女, 江苏滨海人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物抗病性研究。(Tel) 025-4392995; (E-mail) chenxi\_201402@163.com

根结线虫和蚜虫产生抗性的基因<sup>[5]</sup>。通过将根结线虫抗性番茄品系与感病栽培品系杂交构建出多个作图群体,利用分子标记技术结合图位克隆技术逐步分离鉴定出根结线虫抗性基因 *Mi*<sup>[6-8]</sup>。在随后筛选番茄对蚜虫抗性的试验中发现凡是携带 *Mi* 基因的番茄品系都表现出对蚜虫的抗性,由此将 *Mi* 基因介导的抗性作用范围拓展到刺吸式口器昆虫<sup>[9]</sup>。*Mi* 基因产生的对根结线虫的抗性反应是在线虫入侵位点出现局部细胞死亡,即超敏反应,从而限制线虫进一步入侵或迁徙。超敏反应很可能由持续过量积累的过氧化物 (Reactive oxygen species, ROS) 导致<sup>[9]</sup>。*Mi* 基因对蚜虫的抗性作用不出现超敏反应,而是限制蚜虫在韧皮部的取食<sup>[10]</sup>。

在随后的研究中,若干参与 *Mi* 基因抗性反应通路中的其他因子陆续被发掘出来。例如,研究人员通过筛选携带 *Mi* 基因却又丧失抗性的番茄突变体鉴定出 *Rmel* 基因<sup>[11]</sup>;Bhattarai 等通过分析抗性反应通路通用原件获得 *Hsp90* 和 *Sgt1* 基因<sup>[12]</sup>;此外,研究者通过比较携带和不携带 *Mi* 基因的番茄在根结线虫侵染后表达谱的差异鉴定出转录因子 *WRKY* 家族成员<sup>[13-14]</sup>,以及通过筛选超敏反应抑制子分离出番茄 *SERK* 基因家族<sup>[15]</sup>。然而,*Mi* 基因介导的抗性对温度敏感,在高于 28 ℃ 条件下抗性水平显著降低<sup>[16]</sup>,严重制约了 *Mi* 基因及其通路中抗性因子的作用。因此,迫切需要通过其他策略来鉴定抗根结线虫和蚜虫的功能基因。

拟南芥具有丰富的突变体资源,测序完成的基因组和完备的基因注释数据库,是筛选根结线虫和蚜虫抗性以及鉴定功能基因的理想材料。拟南芥激活标签突变体包含可以随机插入基因组的标签,标签上携带的增强子可以激发插入位点上下游基因过量表达,从而使植株出现在基因正常表达水平下体现不出来的表型<sup>[17]</sup>。我们在前期的研究中从这类突变体库中成功筛选到 9 个抗蚜虫的突变体<sup>[18]</sup>,本研究拟进一步鉴定这些突变体对根结线虫的抗性,采用分子生物学和遗传学手段鉴定拟南芥抗根结线虫和蚜虫的关键基因。

## 1 材料与方法

### 1.1 拟南芥的种植

拟南芥种植在装有蛭石的穴盘中,穴孔大小为 40 mm×40 mm×55 mm,每穴种植 1 棵植株。生长条

件:24 ℃,光照度 180 μmol/(m<sup>2</sup>·s),16 h 光照/8 h 黑暗。拟南芥发芽后 28 d 用于试验,试验前用剪刀将穴盘分离成独立的穴孔。

### 1.2 抗根结线虫试验和抗蚜虫试验

试验用根结线虫为南方根结线虫,用感病番茄培养保存。取接种后 56 d 的番茄根组织,用水轻轻冲洗,从根系表面挑取新鲜卵块,用 0.5% 次氯酸钠消毒 3 min,用无菌水冲洗 3 次,室温(24 ℃ 左右)下置于贝曼漏斗中,每天收集孵化的二龄幼虫,4 ℃ 保存待用。试验前,将二龄幼虫悬液以 2 500 r/min 离心 3 min 弃大部分上清混匀,取 3 滴虫悬液于计数板上,在显微镜下计数,取平均值计算虫口密度,加入适量灭菌水调节至 1 ml 虫悬液含 250 头二龄幼虫。用移液器将 1 ml 二龄幼虫悬液接种在穴孔一半深度的拟南芥根系周围。接种后 7 d 用细水流将根系从蛭石中洗脱,用酸性品红染色法检测入侵拟南芥根系的线虫数量<sup>[19]</sup>。

试验用蚜虫为桃蚜,在白菜上饲养保存。试验前将一片离体白菜叶铺在放有湿润滤纸的培养皿中,用细毛笔将蚜虫成虫转移到培养皿中的白菜叶上,次日,将新生的蚜虫用细毛笔转移到拟南芥叶片上,14 d 后记录植株上蚜虫数量。试验期间将每棵植株置于小培养皿上,放在盛有水的托盘中,以避免蚜虫在株系之间移动。

新生蚜虫在离体白菜上饲养 6 d 后用于刺探电位图谱试验,饲养过程中每 2 d 更新 1 次菜叶。用水溶性导电银胶将直径约 10 μm 的金丝粘在蚜虫前胸背板上形成蚜虫电极,将植物电极插入植株生长的蛭石中(保持蛭石湿润)。将蚜虫电极和植物电极接入生物电流放大器。每棵植株上放置 1 只蚜虫,连续监测 8 h。产生的刺吸电位图谱(EPG)数据用 PROBE3.0 软件分析以区分各种波形。Np 波表示非刺探,C 波表示穿刺,E1 波表示韧皮部水溶性唾液分泌,E2 波表示韧皮部被动吸食,F 波表示遭受物理阻力,G 波表示在木质部主动吸食汁液。

以上试验中,每个拟南芥株系检测 15 棵植株,采用 SPSS19 软件独立样本 *t* 检验或 Mann-Whitney U 测试进行差异显著性分析。

### 1.3 反向 PCR

采用 CTAB 法提取拟南芥 DNA,用限制性内切酶 *RcoR* I (TaKaRa 公司产品)处理提取的 DNA,以 T4 连接酶(TaKaRa 公司产品)处理酶切产物。以 5

$\mu\text{l}$  连接产物为模板用于反向 PCR。PCR 反应体系为 50.0  $\mu\text{l}$ : ddH<sub>2</sub>O 24.6  $\mu\text{l}$ , 5 $\times$  Buffer 10.0  $\mu\text{l}$ , 2 mmol/L dNTP 5.0  $\mu\text{l}$ , 10  $\mu\text{mol/L}$  引物各 2.5  $\mu\text{l}$ , Phusion 聚合酶 (Finnzymes) 0.4  $\mu\text{l}$ 。扩增反应条件是: 98  $^{\circ}\text{C}$  30 s; 98  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 64  $^{\circ}\text{C}$  10 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  3 min, 35 个

循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  10 min, 保持 12  $^{\circ}\text{C}$ 。PCR 产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离后连接到 pMD18-T 载体, 涂板转化后挑选阳性克隆进行测序。将测序结果中激活标签旁侧序列与拟南芥基因组数据库进行比对。本研究所用引物见表 1。

表 1 试验中使用的引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	试验目的	引物序列 (5'→3')
T-DNALBF	反向 PCR	CCCGTCTCACTGGTGAAGAA
T-DNALBR	反向 PCR	ATTCCGGCTATGACTGGGCACA
At3g24400F	荧光定量 PCR	CAAGCAGAGGTTGGGATCAT
At3g24400R	荧光定量 PCR	AACCATGGAGGTGAAACTCG
At3g24420F	荧光定量 PCR	GAAGATGAAGCCCGAGACAG
At3g24420R	荧光定量 PCR	GCACTGACACTTGTCCCAAA
At3g24430F	荧光定量 PCR	TGCAACCGTCAGAAGAAATG
At3g24430R	荧光定量 PCR	CAGCGTAGTTTCCCATTTGGT
At3g24440F	荧光定量 PCR	GGAGCAATCTGTTGTGAGCA
At3g24440R	荧光定量 PCR	TAAATGCGTCGACAAGTTGG
ACTIN8F	荧光定量 PCR	TGCAGACCGTATGAGCAAAG
ACTIN8R	荧光定量 PCR	CTGGAAAGTGCTGAGGGAAG
AttB1_At3g24400F	构建基因过表达载体	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTAGACCTCTTTTCCCGCTTTT
AttB2_At3g24400R	构建基因过表达载体	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGCACAACCAAACTCAAT
AttB1F	构建基因过表达载体	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT
AttB2R	构建基因过表达载体	ACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

#### 1.4 荧光定量 PCR

用于荧光定量 PCR 检测的每个株系有 3 个生物学重复的样品, 每个样品由 15 棵植株混合而成。采用 TRIzol 法提取植株的总 RNA, 经 DNA 酶 (DNase I, Promega) 消化处理后, 利用 MMLV Reverse Transcriptase 试剂盒 (Promega) 将总 RNA 反转录成 cDNA, 并经 RNase H (TaKaRa 公司) 处理, -20  $^{\circ}\text{C}$  保存待用。以稀释 20 倍的 cDNA 作为实时定量 PCR 的模板。按照 SYBR Premix Ex Taq TM II (TaKaRa 公司) 说明书, 利用 iCyclerIQ (Bio-Rad) 进行实时荧光定量 PCR 反应。每个样品做 2 个重复。反应条件是: 95  $^{\circ}\text{C}$  3 min, 95  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 60  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 40 个循环。以拟南芥持家基因 ACTIN8 (*Atlg49240*) 作为内参, 参照  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法计算基因相对表达量。用 SPSS19 软件独立样本的 *t* 检验进行差异显著性

分析。

#### 1.5 转基因拟南芥植株的获得

根据基因编码框上下游序列设计特异引物并连接 attB 位点序列, 以 cDNA 为模板扩增基因全序列, 扩增条件与反向 PCR 相同。PCR 产物经测序确定后, 在 B/P 重组酶 (Invitrogen) 的作用下, 与带有 attP 位点的载体 pDONR207 通过 B/P 反应产生入门载体。将入门载体与目标载体 FAST-R02 通过 B/P 反应产生表达载体, 此时基因由 CaMV 35S 启动子驱动表达。将表达载体转化至大肠杆菌, 用 AttB 通用引物进行 PCR 验证基因序列的正确性, 随后将表达载体转化到根癌农杆菌株 GV3101。通过农杆菌介导的转化方法将表达载体转化到野生型拟南芥植株中。利用红色荧光显微镜检测带有表达载体的拟南芥种子<sup>[20]</sup>, T<sub>2</sub> 代植株用于抗根结线虫和蚜虫

试验。

## 2 结果与分析

### 2.1 拟南芥根结线虫抗性株系的鉴定

以 9 个抗蚜虫的拟南芥突变体接种根结线虫后 7 d 检测侵入根系中的线虫数量,结果显示所有突变株系的侵入线虫数量低于野生型,其中株系 2018、3790 和 4619 与野生型差异显著(图 1)。形态学观察结果表明,突变株系的茎叶与野生型植株相比明显较小,根系也较野生型短,但这些差异在 3 个双抗株系与 6 个单抗蚜虫的株系之间并不明显。

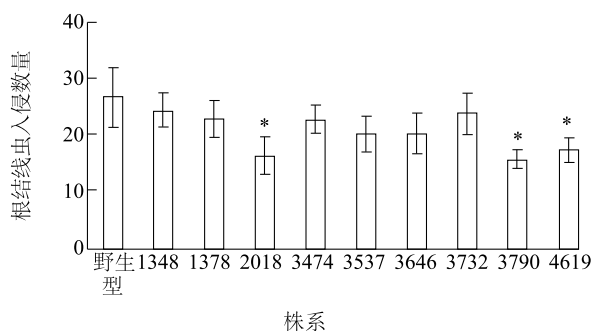


图 1 根结线虫在野生型拟南芥和突变株系根中的入侵数量

Fig.1 Number of infected root knot nematodes (RKNs) on wild type *Arabidopsis* and its mutants

### 2.2 拟南芥抗性株系中功能基因的鉴定

Chen 等<sup>[21]</sup>已经报道了对株系 3790 的鉴定,本研究通过反向 PCR 扩增激活标签旁侧序列,结合拟南芥基因组序列比对,对抗性株系中激活标签进行定位。结果显示突变体 2018 中激活标签插入在第 3 条染色体 4 350 851 位点,与突变体 3790 中激活标签插入位点只相差 2 个碱基;突变体 4619 中激活标签定位于第 3 条染色体 8 862 904 位点 *At3g24420* 基因的 3'非编码区。

突变体 2018 中激活标签插入位点与突变体 3790 几乎相同,以此判断这 2 个突变体中影响表达水平的基因也一致。基于增强子对其上下游基因表达水平能够产生影响的范围不超过 8 kb 的原则,对突变体 4619 中基因表达水平的检测锁定在 *At3g24400*、*At3g24420*、*At3g24430* 和 *At3g24440*。荧光定量 PCR 结果显示只有 *At3g24400*(*PERK2*) 表达水平显著高于野生植株,其他基因的表达水平均与野生型植株相当(图 2)。

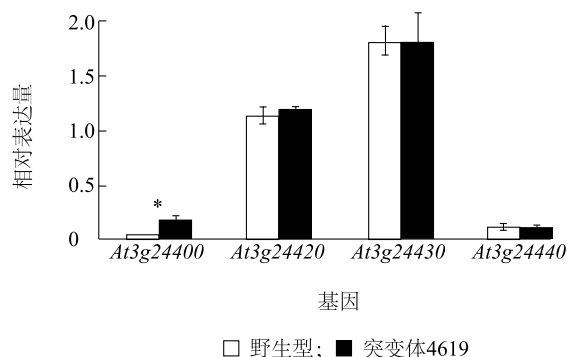
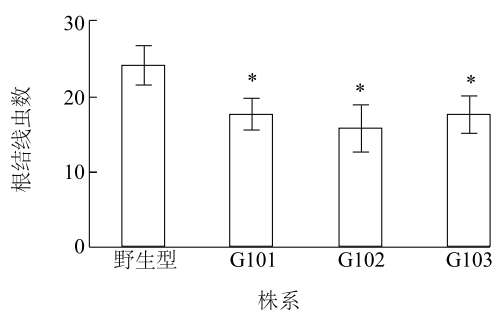


图 2 突变体 4619 中激活标签上下游基因表达水平分析

Fig.2 Expression analysis of genes adjacent to activation tag in mutant 4619

前期研究结果证实突变体 3790 对蚜虫的抗性是由 *SKS13* 过量表达产生,本研究以 *SKS13* 过表达转基因株系 G101、G102 和 G103 为材料检测根结线虫的侵染水平,结果(图 3)显示入侵转基因植株的线虫数量明显低于野生型植株,表明基因 *SKS13* 过量表达是突变体 3790 抗根结线虫的原因。突变体 4619 中 *PERK2* 是检测到的唯一表达量上调基因。以 CaMV 35S 启动子驱动 *PERK2* 基因表达,构建过量表达转基因植株 G201、G202 和 G203。荧光定量 PCR 结果显示转基因株系中该基因表达水平显著高于野生型(图 4)。抗根结线虫和蚜虫试验结果显示,与野生型相比入侵转基因植株根系的线虫数量显著减少(图 3),转基因植株叶片上的蚜虫数量也显著降低(图 4)。这些结果证实 *PERK2* 是抗根结线虫和蚜虫的功能基因。

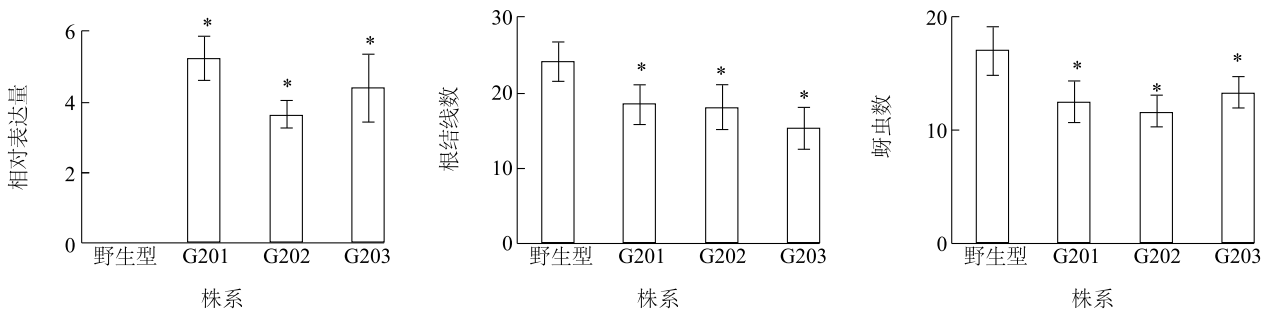


\* 表示与野生型相比差异达 0.05 显著水平。

图 3 根结线虫在 *SKS13* 转基因过量表达拟南芥植株上的侵染水平

Fig.3 RKN infection levels on wild type and transgenic *Arabidopsis* lines overexpressing *SKS13*





\* 表示与野生型相比差异达 0.05 显著水平。

图 4 根结线虫和蚜虫在 *PERK2* 转基因过量表达拟南芥植株上的表现  
Fig.4 RKN and aphid performance on wild type and transgenic lines overexpressing *PERK2*

2.3 突变体 4619 上蚜虫刺吸取食行为分析

通过刺探电位图谱技术了解蚜虫在植株上穿刺取食行为,可以为锁定植株抗性因子作用位点提供线索。与野生型植株相比,在突变体 4619 上的蚜虫取食过程出现更长的总穿刺时间(C 波),口针进行更多次的尝试性穿刺,而且几乎每只蚜虫都出现物理

阻力的 F 波(而在野生型上的蚜虫没有一只出现 F 波)(表 2),表明在突变体 4619 上蚜虫口针穿刺植物组织时遇到明显阻力。此外,在突变体 4619 上蚜虫在韧皮部取食过程也受到限制,表现为需要更长时间开始在韧皮部取食,且取食次数和总历时(E1 和 E2 波)也不如在野生型植株上蚜虫的一半(表 2)。

表 2 蚜虫刺探电位图谱

Table 2 Electrical penetration graph (EPG) of aphid

参数	抗性因子定位	野生型	株系 4619
C 波总历时 (min)	路径	244.3±15.6	364.4±28.6 *
探测穿刺数量	路径	7.2±1.9	19.6±2.9 *
F 波历时 (min)	路径	0	13.2±2.6 *
F 波数量	路径	0	1.2±0.3 *
E1 波数量	韧皮部	18.6±2.3	7.6±1.2 *
E2 波数量	韧皮部	16.4±2.1	7.9±1.9 *
首次出现 E1 波的时间 (min)	韧皮部	69.1±18.4	163.4±24.6 *
首次出现 E2 波的时间 (min)	韧皮部	71.1±15.4	165.6±21.4 *
E1 总历时 (min)	韧皮部	12.6±2.3	6.6±1.1 *
E2 总历时 (min)	韧皮部	100.6±15.9	54.0±14.1 *
Np 波总历时 (min)	总体抗性	121.4±18.9	189.5±20.1 *

\* 表示与野生型相比差异到达 0.05 显著水平。

3 讨论

根结线虫和蚜虫经常同时危害作物,对农业生产造成巨大损失,鉴定并使用对二者都能产生抗性的基因具有重要意义。本研究以抗蚜虫拟南芥突变体为材料进一步挖掘其对根结线虫的抗性,筛选到具有双重抗性的突变体,并鉴定了其产生抗性的功能基因。

根结线虫和蚜虫对植物寄生或取食的过程存在诸多相似。比如根结线虫和蚜虫口针在植物组织细胞间隙活动,产生包含多种蛋白酶的分泌物。当寻找到合适的寄生位点根结线虫停止迁徙开始发育直至完成生活史,而蚜虫也可以从固定的细胞长时间连续取食<sup>[22-23]</sup>。基于这些相似性,推测植物某些抗性因子可能会同时作用于这 2 种病虫害。本研究 9 个抗蚜虫的突变体中有 1/3 表现出对根结线虫的

抗性就印证了这一推测。

在3个双抗突变体中2018和3790的抗性是由*SKS13*基因过量表达导致。前期研究结果证明*SKS13*过量表达植株中存在ROS的过量积累,抑制蚜虫从韧皮部取食<sup>[21]</sup>。ROS持续过量积累会导致超敏反应,但这一现象没有出现在被根结线虫感染的*SKS13*过量表达植株根系中,表明ROS很可能作用于根结线虫其他寄生阶段。ROS还可以作为信号分子与植株激素信号通路(如茉莉酸信号通路)协同调控防御反应<sup>[24]</sup>。茉莉酸信号通路的表达对植物抗根结线虫和蚜虫的作用不同,阻断茉莉酸信号通路的植株对蚜虫敏感性增强<sup>[25]</sup>,对根结线虫的敏感性却降低<sup>[26]</sup>。前期研究结果表明,茉莉酸信号通路过量表达只出现在*SKS13*过量表达的转基因植株中,没有出现在突变体3790中,而本研究结果显示这些植株的抗性水平并没有差异,说明*SKS13*过量表达产生的抗性独立于茉莉酸信号通路。

突变体4619对根结线虫和蚜虫的抗性是由受体蛋白激酶基因*PERK2*过量表达产生。受体蛋白激酶在植物识别入侵病原的过程中发挥重要作用,番茄受体蛋白激酶*SERK*家族中*SERK1*是番茄对蚜虫产生抗性反应的必须因子,*SERK3A*和*SERK3B*是番茄对根结线虫的基础防卫反应重要原件<sup>[15]</sup>。本研究中鉴定到的*PERK2*属于富含脯氨酸的受体蛋白激酶家族。这个基因家族包含15个成员,其中*perk4*突变体细胞长度增加,根系较野生型更长<sup>[27]</sup>。*PERK1*基因表达水平在植株受到损伤或被病原感染时显著上升,推测该基因家族在植物抗病反应中发挥作用<sup>[28]</sup>。*PERK*基因家族编码细胞壁结构蛋白质,对保持细胞壁的稳定性的作用<sup>[29]</sup>。在突变体4619上蚜虫穿刺植物组织时遭遇明显的物理阻力,说明*PERK2*过量表达可能导致细胞壁结构被强化,这可能也是导致根结线虫入侵数量降低的原因。

## 参考文献:

- [1] 万景旺,邵颖,朱华,等. 生防菌Jdm2与生物源农药混用防治黄瓜根结线虫病的效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(4): 108-110.
- [2] 高玉红,闫生辉,赵卫星. 印楝素与不同杀虫剂混配对根结线虫的防治效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(7): 133-135.
- [3] NICOL J M, TURNER S J, COYNE D L, et al. Current nematode threats to world agriculture, in genomics and molecular genetics of plant-nematode interactions [M]. Netherlands: Springer, 2011:21-43.
- [4] KALOSHIAN I, DE ILARDUYA O M. Mi-1, a dual function disease resistance gene in tomato[C]// Keen N T, Mayama S. Delivery and Perception of Pathogen Signals in Plants. St Paul, MN: APS Press, 2001: 145-153.
- [5] 尤江,郭宏霞,张玉粉,等. 野生与人工种植伏毛铁棒锤对枸杞蚜虫的杀虫活性比较[J]. 江苏农业科学,2013,41(8): 148-149.
- [6] YAGHOUBI J, KALOSHIAN I, WEN Y, et al. Mapping a new nematode resistance locus in *Lycopersicon peruvianum* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91(3): 457-464.
- [7] KALOSHIAN I, YAGHOUBI J, LIHARSKA T, et al. Genetic and physical localization of the root-knot nematode resistance locus Mi in tomato [J]. Molecular and General Genetics MGG, 1998, 257(3): 376-385.
- [8] MILLIGAN S B, BODEAU J, YAGHOUBI J, et al. The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes [J]. The Plant Cell, 1998, 10(8): 1307-1319.
- [9] ROSSI M, GOGGIN F L, MILLIGAN S B, et al. The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1998, 95(17): 9750-9754.
- [10] DE ILARDUYA O M, XIE Q G, KALOSHIAN I. Aphid-induced defense responses in Mi-1-mediated compatible and incompatible tomato interactions [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003, 16(8): 699-708.
- [11] DE ILARDUYA O M, MOORE A E, KALOSHIAN I. The tomato Rme1 locus is required for Mi-1-mediated resistance to root-knot nematodes and the potato aphid [J]. The Plant Journal, 2001, 27(5): 417-425.
- [12] BHATTARAI K K, LI Q, LIU Y L, et al. The Mi-1-mediated pest resistance requires Hsp90 and Sgt1 [J]. Plant Physiology, 2007, 144(1): 312-323.
- [13] BHATTARAI K K, ATAMIAN H S, KALOSHIAN I, et al. WRKY72-type transcription factors contribute to basal immunity in tomato and *Arabidopsis* as well as gene-for-gene resistance mediated by the tomato R gene Mi-1 [J]. The Plant Journal, 2010, 63(2): 229-240.
- [14] ATAMIAN H, EULGEM T, KALOSHIAN I. SIWRKY70 is required for Mi-1-mediated resistance to aphids and nematodes in tomato [J]. Planta, 2012, 235(2): 299-309.
- [15] MANTELIN S, PENG H C, LI B B, et al. The receptor-like kinase SISRK1 is required for Mi-1-mediated resistance to potato aphids in tomato [J]. The Plant Journal, 2011, 67(3): 459-471.
- [16] JABLONSKA B, AMMIRAJU J S S, BHATTARAI K K, et al. The Mi-9 gene from *Solanum arcanum* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes is a homolog of Mi-1 [J]. Plant Physiology, 2007, 143(2): 1044-1054.
- [17] MARSCH-MARTINEZ N, GRECO R, VAN ARKEL G, et al. Ac-

- tivation tagging using the En-I maize transposon system in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(4): 1544-1556.
- [18] CHEN X, VOSMAN B, VISSER R G, et al. High throughput phenotyping for aphid resistance in large plant collections [J]. *Plant Methods*, 2012, 8(1): 33-33.
- [19] THIES J A, MERRILL S B, CORLEY E L. Red food coloring stain: new, safer procedures for staining nematodes in roots and egg masses on root surfaces [J]. *Journal of Nematology*, 2002, 34(2): 179-181.
- [20] SHIMADA T L, SHIMADA T, HARA-NISHIMURA I. A rapid and non-destructive screenable marker, FAST, for identifying transformed seeds of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2010, 61(3): 519-528.
- [21] CHEN X, ZHANG Z, VISSER R, et al. Constitutive overexpression of the pollen specific gene SKS13 in leaves reduces aphid performance on *Arabidopsis thaliana* [J]. *BMC Plant Biology*, 2014, 14(1): 1-10.
- [22] CHITWOOD D J. Research on plant-parasitic nematode biology conducted by the United States Department of Agriculture-Agricultural Research Service [J]. *Pest Management Science*, 2003, 59(6-7): 748-753.
- [23] TJALLINGII W F. Continuous recording of stylet penetration activities by aphids, in *Aphid-plant genotype interactions* [M]. Amsterdam; Elsevier Science, 1990: 89-99.
- [24] LALOI C, APEL K, DANON A. Reactive oxygen signalling: the latest news [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7(3): 323-328.
- [25] ELLIS C, TURNER J G. The *Arabidopsis* mutant cev1 has constitutively active jasmonate and ethylene signal pathways and enhanced resistance to pathogens [J]. *The Plant Cell*, 2001, 13(5): 1025-1033.
- [26] BHATTARAI K K, XIE Q G, MANTELIN S, et al. Tomato susceptibility to root-knot nematodes requires an intact jasmonic acid signaling pathway [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2008, 21(9): 1205-1214.
- [27] BAI L, ZHANG G Z, ZHOU Y, et al. Plasma membrane-associated proline-rich extensin-like receptor kinase 4, a novel regulator of  $Ca^{2+}$  signalling, is required for abscisic acid responses in *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 2009, 60(2): 314-327.
- [28] SILVA N, GORING D. The proline-rich, extensin-like receptor kinase-1 (PERK1) gene is rapidly induced by wounding [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50(4-5): 667-685.
- [29] LAMESCH P, BERARDINI T Z, LI D H, et al. The *Arabidopsis* information resource (TAIR): improved gene annotation and new tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40(1): 1202-1210.

(责任编辑:张震林)