研 究 报 告
Research Reports

蛋白激发子 PevD1 诱导本生烟植保素辣椒醇的产生和积累

李 泽[1]， 梁颖博[1]， 段佳琪[1]， 曾洪梅[1]， 李广悦[1]， 赵国存[2]， 杨秀芬[1*]

（1. 中国农业科学院植物保护研究所，植物病虫害生物学国家重点实验室，北京 100193；
2. 河北省农药检定监测总站，石家庄 050031）

摘要 诱导抗病性是实现植物病害绿色防控的重要途径，大丽轮枝菌蛋白激发子 PevD1 能激活植物免疫系统，提高本生烟对烟草花叶病毒(TMV)和烟草野火病病原菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*、棉花对大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 的抗病性，但分子机制不清晰。前期转录组测序(RNA-Seq)分析结果显示，本生烟响应 PevD1 诱导的差异表达基因显著富集在倍半萜烯和三萜烯的合成途径中。本文进一步分析了这些差异表达基因的功能，并通过测定倍半萜植保素辣椒醇合成关键基因 *EAS* 和 *EAH* 的转录表达水平和辣椒醇积累量，证明 PevD1 能诱导本生烟产生植保素辣椒醇，明确了 PevD1 诱导植保素辣椒醇的产生是提高植物抗病性的重要机制之一。

关键词 蛋白激发子 PevD1； 转录组测序； 植保素； 辣椒醇

中图分类号： S 432.2 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2019605

Elicitor PevD1 induces phytoalexin capsidiol production and accumulation in *Nicotiana benthamiana*

LI Ze[1]， LIANG Yingbo[1]， DUAN Jiaqi[1]， ZENG Hongmei[1]， LI Guangyue[1]， ZHAO Guocun[2]， YANG Xiufen[1*]

（1. *State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests*，*Institute of Plant Protection*，*Chinese Academy of Agricultural Sciences*，*Beijing* 100193，*China*；2. *Hebei Provincial Pesticide Testing and Monitoring Station*，*Shijiazhuang* 050031，*China*）

Abstract Induced disease resistance is an important approach for plant disease management. The *Verticillium dahliae* protein elicitor PevD1 could trigger plant immune response and improved the disease resistance of tobacco to *Tobacco mosaic virus* (TMV) and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*, and the resistance of cotton to *V. dahliae*. However, the molecular mechanism is still unclear. In previous research, the differential expression genes (DEGs) in response to PevD1 in *Nicotiana benthamiana* were obtained by RNA-seq and a lot of DEGs were significantly enriched in the sesquiterpene and triterpene synthesis pathway. In this study, we analyzed the functions of these DEGs in sesquiterpene and triterpene synthesis, and confirmed the transcriptional expression level of the key genes in the sesquiterpene synthesis pathway after PevD1 inducement. The results showed that the expression level of the key genes, *EAS* and *EAH* in capsidiol synthesis were significantly elevated. The capsidiol content also increased after PevD1 inducement. Our results indicated that PevD1-induced capsidiol production is one of the important mechanism of plant disease resistance improvement.

Key words protein elicitor PevD1； RNA-Seq； phytoalexin； capsidiol

在长期进化过程中，植物为了抵御有害生物侵袭已经形成了精细而复杂的免疫防御系统，包括病原物/微生物相关分子模式(pathogen/microbe-associated molecular pattern，P/MAMP)诱导的 PTI (PAMP-triggered immunity)和效应子诱导的 ETI(effector-triggered immunity)[1-2]。当植物受到病原菌侵

收稿日期： 2019－11－05 **修订日期：** 2020－01－07
基金项目： 国家重点研发计划(2017YFD0201100)；国家自然科学基金(31772151)
* 通信作者 E-mail：yangxiufen@caas.cn

染或病原菌产生的激发子诱导后可以启动多重免疫防御反应，主要包括活性氧（ROS）暴发、NO 积累、细胞膜通透性改变、病程相关蛋白表达、植物激素积累以及植保素的产生等，使植物产生局部抗性和系统抗性。利用植物诱导抗性提高植物自身免疫力、减轻病害发生已经成为现代植物保护的新技术。植保素是植物受到外界因素诱导产生的小分子植物次生代谢产物，能抑制或杀死多种植物病原微生物，常常被用作植物抗病性的分子标志[3]，在植物免疫防御系统中发挥着重要作用，其化学合成速度及积累量与植物抗病性密切正相关，被誉为植物的“化学武器”。不同植物产生的植保素种类和产物组成不同，其中萜类化合物是植物在代谢过程中产量最高的植保素。倍半萜和三萜次生代谢产物是马铃薯、烟草和辣椒等茄科植物重要的植保素，如日齐素（rishitin）、辣椒醇（capsidiol）和二烯酮/香根酮（solavetivone）[4-5]。香根酮和日齐素是马铃薯响应花生四烯酸和欧文氏杆菌 *Erwinia carotovora* 侵染产生的植保素[6-7]，这些植保素能抑制马铃薯致病疫霉 *Phytophthora infestans* 和欧文氏杆菌的生长。烟草中倍半萜烯植保素主要有东莨菪内酯/东莨菪素（scopoletin）[8-9]和辣椒醇[10-11]。辣椒醇能抑制多种真菌菌丝生长和孢子形成，包括辣椒疫霉 *Phytophthora capsici* 和灰葡萄孢 *Botrytis cinerea*[12-13]。

大量研究已经证明，烟草受到病原菌侵染或激发子诱导后，植株体内产生并积累植保素辣椒醇，从而减轻自身受到的侵染和危害。例如烟草 *Nicotiana attenuata* 被链格孢 *Alternaria alternata* 侵染后积累大量辣椒醇[14]；被辣椒疫霉菌侵染的辣椒产生的细胞坏死区域有高浓度辣椒醇积累[15-16]；隐地蛋白（cryptogein）、麦角甾醇（ergosterols）、致病疫霉 *P. infestans* 激发素 INF1 或花生四烯酸等 PAMP 因子均能诱导烟草辣椒醇的产生和积累[17-19]。PevD1 是作者实验室从大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 胞外分离的蛋白激发子，能诱导烟草产生细胞坏死反应，产生 NO 和 H_2O_2，胼胝质、酚类化合物及木质素的积累，提高烟草对 TMV、烟草野火病以及棉花对大丽轮枝菌的抗性[20-22]，但是 PevD1 诱导植物抗病性的分子机制尚不清楚。前期通过 RNA-Seq 技术已经获得了 PevD1 诱导本生烟前后大量差异表达的基因[23]，本文将进一步分析倍半萜和三萜合成通路上的差异表达基因的功能，测定倍半萜植保素辣椒醇的积累及其合成关键基因的转录水平，以期明确植保素辣椒醇是 PevD1 诱导本生烟提高植物抗病性的重要作用机制。

1 材料与方法

1.1 蛋白激发子 PevD1 的表达与纯化

构建 PevD1 真核表达载体 pPICZαA-PevD1，转化毕赤酵母细胞后通过甲醇诱导表达，采用 Ni-NTA 纯化介质（ProteinIso® Ni-NTA Resin，北京全式金）亲和纯化 PevD1-His 重组蛋白，利用 SDS-PAGE 与 Western blot 技术验证 PevD1-His 重组蛋白的正确性，具体方法参照文献[24]。

1.2 PevD1 处理本生烟

本生烟种子由本实验室保存，将种子播种在装有营养土的培养钵中，在 25℃下培养。选取 4 周龄的本生烟，用去掉针头的 1 mL 注射器在本生烟叶片背部注射 20 μL PevD1 蛋白液（蛋白浓度 10 μmol/L），以注射 20 μL Tris-HCl（浓度 20 mmol/L，pH 8.0）为对照，每个处理 10 片叶。处理后分别在 6、12、24 h 对全叶片进行取样，液氮速冻后于－80℃保存用于转录组测序。

1.3 转录组测序

用 EasyPure Plant RNA Kit 试剂盒提取植株叶片总 RNA，质检合格后通过华大 BGISEQ-500 平台建库测序。

1.4 差异表达基因的筛选

通过 DEG-seq 进行差异表达基因的检测，DEG-seq 方法基于泊松分布[25]。将差异倍数为 2 倍以上（Fold Change≥2）并且 Q-value≤0.001 的基因确定为差异显著的差异表达基因。

1.5 差异表达基因 KEGG 富集分析

根据 KEGG pathway 注释来分类，通过 R 软件中的 phyper 函数进行富集分析，通常情况下 FDR≤0.01 的功能被认为是显著富集。

1.6 差异表达基因的 qRT-PCR 检测

参考茄科数据库（https://solgenomics.net/）的目的基因序列，通过 Beacon Designer 8.0 软件设计荧光定量 PCR 的特异性引物（表 1）。以上述样品提取的总 RNA 反转录后的 cDNA 为荧光定量 PCR 的模板，以 *Actin* 基因为内参基因，通过荧光定量 PCR 试剂盒（北京全式金）来特异性扩增每个目的基因。最后参照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算方法，对每个 mRNA 进行相对定量分析[26]。

表 1　差异基因的定量验证引物

Table 1　Primers for quantitative validation of differentially expressed genes

基因 Gene	正向引物(5′-3′) Forward primer	反向引物(5′-3′) Reverse primer
Actin	GCAAGGAAATCACCGCTTTGG	TGCCTGCTGGAATGTGCTAAG
CYP17A	AGCTCAATTGTTGTATCAC	ACAGGTTGCTCTTTCTTG
AFS	AGCAGTGGTTATTATTCG	AGTCCTTTAACATATCTTGG
MVAD	GCCAAATGCTGTTCTAATTG	CCACATCCTTTATATCCTGAA
HMGCR	CGAAGAACCTTTCAAACC	TGGAGAGGAGTAGAGTTC
*TPS*31	GTGTGATAATATGCCGAG	CCTCTTCTGTTGATATGC
EAS	CGATGATTTCACCACTTC	TCAGCATGAGTTCTTACA
EAH	TCGTCTCATTGACTCTATC	AAGGGAAGATGTCTACTAC

1.7　植保素辣椒醇的检测

取 PevD1 渗入本生烟叶片处理后 9、12 h 和 16 h的叶片 200 mg,液氮研磨后用 1 mL 二氯甲烷提取,振荡 10 min 后离心(3 000 g, 5 min)收集上清液,沉淀物进行第二次提取,合并提取液旋转蒸发去除有机溶剂,用 1 mL 甲醇溶解后用 HPLC(Agilent 1260, USA)检测,具体检测条件参照文献[14]。辣椒醇标准品由中国科学院昆明植物所吴劲松研究员馈赠,将标准品稀释 6 个浓度(6.25、12.5、25、50、100、200 μg/mL),以标准品浓度为横坐标,HPLC 产生的峰面积为纵坐标,制作辣椒醇标准曲线,根据标准曲线方程计算样品中辣椒醇浓度。

2　结果与分析

2.1　PevD1 蛋白的表达纯化及验证

将获得的酵母表达菌株用无菌甲醇诱导培养 3～4 d 后收集发酵上清液。用亲和柱层析过滤发酵液,收集表达的 PevD1 重组蛋白。蛋白稀释后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳并染色,在分子量 17 kDa 左右处可见一条蛋白条带,并且与 PevD1-His 重组蛋白的理论分子量一致(图 1)。为了进一步确定表达的蛋白是 PevD1-His 重组蛋白,进行了 Western blot 检测,以抗 His 标签的鼠单克隆抗体为一抗,以辣根过氧化物酶 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 为二抗。根据结果显示只有单一条带能够与抗 His 标签的抗体结合并发生显色反应,并且条带大小与 SDS-PAGE 显示的大小一致,说明成功表达了 PevD1-His 重组蛋白(图 1)。

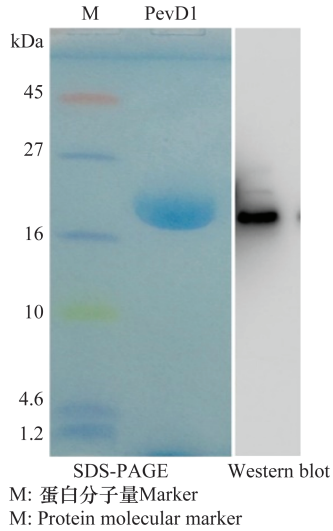


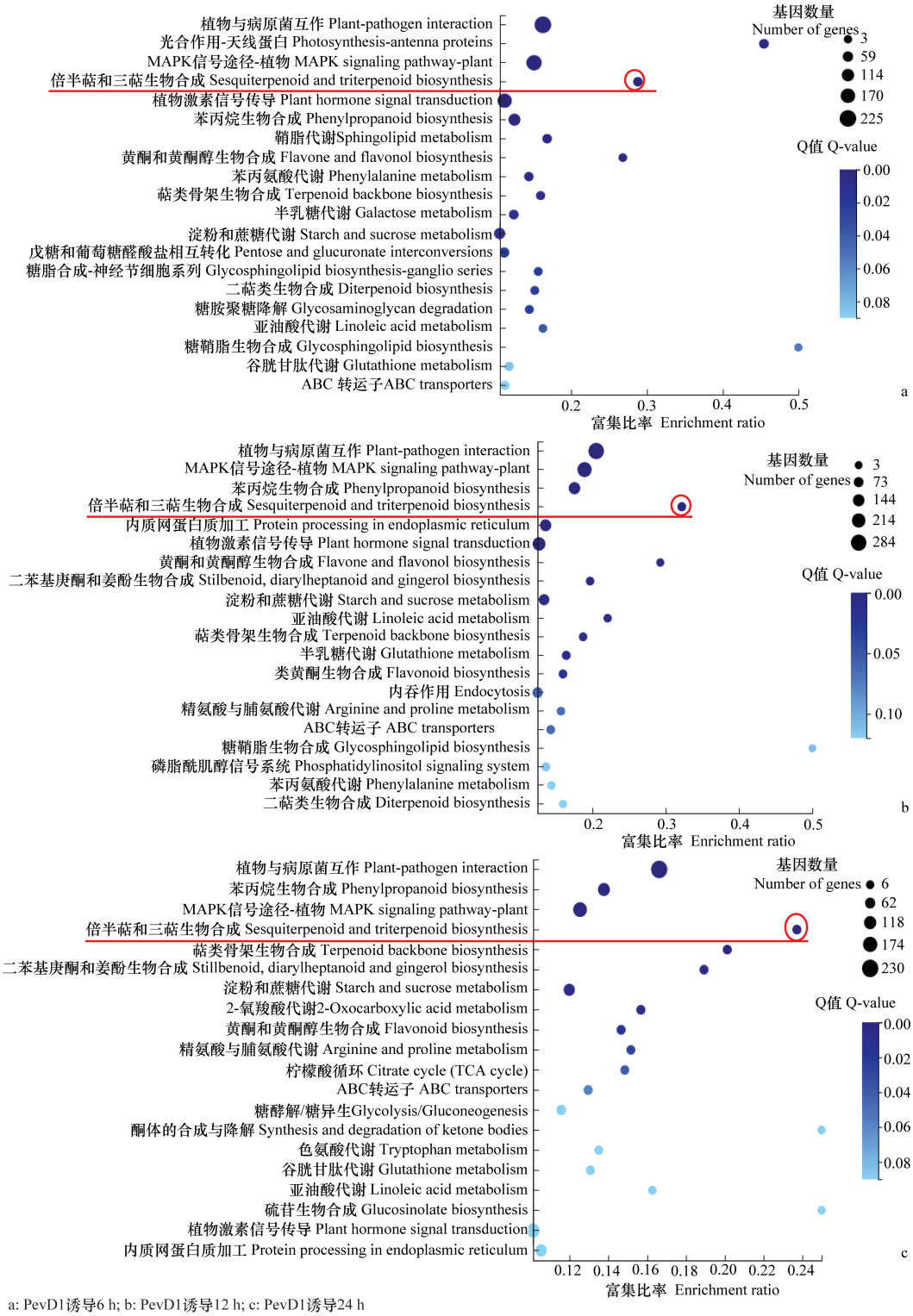
图 1　重组蛋白 PevD1 的表达纯化与分子验证

Fig. 1　SDS-PAGE and Western blot analysis of recombinant PevD1

2.2　PevD1 诱导的大量差异表达基因富集于倍半萜和三萜次生代谢产物合成通路

PevD1 诱导本生烟 6、12 h 和 24 h 差异表达基因 KEGG pathway 富集分析显示,排在前 4 位的有植物与病原菌互作、MAPK 信号通路、苯丙烷合成途径和倍半萜和三萜次生代谢产物合成通路(图 2a, b,c)。为了进一步明确 PevD1 诱导后不同时间富集在倍半萜和三萜次生代谢产物合成通路上的差异表达基因情况,根据差异基因 KEGG 富集气泡图,统计了诱导不同时间后的差异基因数量。结果显示,PevD1 处理 6 h 共有 34 个差异表达基因,其中 32 个上调;PevD1 处理 12 h 时,共有 38 个差异表达基因,其中 33 个基因上调;PevD1 处理 24 h 时,共筛选到 28 个差异表达基因,全部为上调表达基因(图 3),说明 PevD1 蛋白激发子诱导了本生烟倍半萜和三萜次生代谢产物合成通路上的大量差异表达基因上调表达。提取部分差异表达上调基因的序列,并在 NCBI 的 Nr 数据库进行 BLAST 序列比对及注释(表 2),发现多数基因与辣椒醇植保素合成代谢相关。如 5-马兜铃烯合成酶(5-epiaris-

tolochene synthase，EAS）催化反式法尼基焦磷酸（Farnesyl pyrophosphate，FPP）的环化，形成双环的中间体 5-马兜铃烯，是转化成倍半萜类植保素辣椒醇的初始步骤[27]。螺二烯加氧酶（premnaspirodiene oxygenase，CYP71）是一种细胞色素 P450 单加氧酶，不仅能够使三萜类底物羟基化从而增强三萜类化合物的活性，而且在 5-马兜铃烯羟基化形成辣椒素的过程中也起到一定的作用。



a: PevD1诱导6 h; b: PevD1诱导12 h; c: PevD1诱导24 h
a: 6 h post PevD1 induction; b: 12 h post PevD1 induction; c: 24 h post PevD1 induction

图 2　蛋白激发子 PevD1 诱导的差异基因 KEGG 富集气泡图

Fig. 2　KEGG enrichment analysis of DEGs at each time point after PevD1 inducement

表 2　倍半萜和三萜代谢产物合成通路部分差异表达基因[1)]

Table 2　DEGs in the sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis pathway

基因 ID Gene ID	log2 差异倍数 log2 fold change			蛋白属性 Protein property
	6 hpi	12 hpi	24 hpi	
Niben101Scf00700g00005	9.74	9.90	5.95	EGRD, (-)-germacrene D synthase, PREDICTED: 5-epi-aristolochene synthase-like
Niben101Scf00712g02011	8.87	9.18	4.75	GERD, (-)-germacrene D synthase, PREDICTED: 5-epi-aristolochene synthase-like
Niben101Scf00994g00001	7.18	6.55	3.53	CYP71D55, premnaspirodiene oxygenase. epi-aristolochene dihydroxylase
Niben101Scf04362g07009	8.14	5.85	6.81	EGRD, (-)-germacrene D synthase, PREDICTED: 5-epi-aristolochene synthase-like isoform X1
Niben101Scf04362g07011	8.74	7.5	3.09	CYP71D55, premnaspirodiene oxygenase
Niben101Scf00700g00005	9.74	9.90	5.95	GERD, (-)-germacrene D synthase,5-epi-aristolochene synthase-like
Niben101Scf00712g02011	8.87	9.18	4.75	GERD, (-)-germacrene D synthase,5-epi-aristolochene synthase-like
Niben101Scf06245g01017	8.93	10.12	4.37	PREDICTED: 5-epi-aristolochene synthase-like
Niben101Scf07725g00004	8.45	6.81	2.98	EAS, 5-epi-aristolochene synthase
Niben101Scf07725g01004	7.63	4.72	2.22	EAS, 5-epi-aristolochene synthase
Niben101Scf03993g06006	7.94	6.65	2.93	GERD, (-)-germacrene D synthase, 5-epi-aristolochene synthase-like
Niben101Scf01683g03005	10.19	6.80	—	EAS, 5-epi-aristolochene synthase
Niben101Scf00072g05003	8.47	6.39	—	CYP71D55,premnaspirodiene oxygenase
Niben101Scf00072g05004	8.25	6.29	—	CYP71D55,premnaspirodiene oxygenase
Niben101Scf03993g05005	6.64	—	3.16	GERD, (-)-germacrene D synthase, PREDICTED: 5-epi-aristolochene synthase-like, EAS
Niben101Scf04869g01008	—	—	8.14	CYP17A, steroid 17 α-monooxygenase/17 α-hydroxyprogesterone deacetylase
Niben101Scf16511g00010	—	—	9.29	TPS31, viridiflorene synthase, PREDICTED: vetispiradiene synthase 3-like
Niben101Scf03171g03017	—	6.41	4.25	TPS31, viridiflorene synthase, PREDICTED: vetispiradiene synthase 3-like
Niben101Scf01683g03006	—	6.86	—	GERD, (-)-germacrene D synthase, RecName:Full=5-epi-aristolochene synthase; Short=EAS
Niben101Scf04362g07009	8.13	5.85	—	GERD,(-)-germacrene D synthase,5-epi-aristolochene synthase-like
Niben101Ctg02231g00001	8.61	5.35	—	EAS,5-epi-aristolochene synthase
Niben101Scf00176g03001	6.10	6.02	—	AFS, α-farnesene synthase, PREDICTED: α-farnesene synthase-like
Niben101Scf03193g00006	—	3.5	—	cytochrome P450 71A2 premnaspirodiene oxygenase-like
Niben101Scf01316g01005	1.84	1.19	1.03	PREDICTED: squalene epoxidase 3-like

1) "—"代表未达到筛选显著差异表达基因的标准。
"—"indicates no different expression gene (DEG).

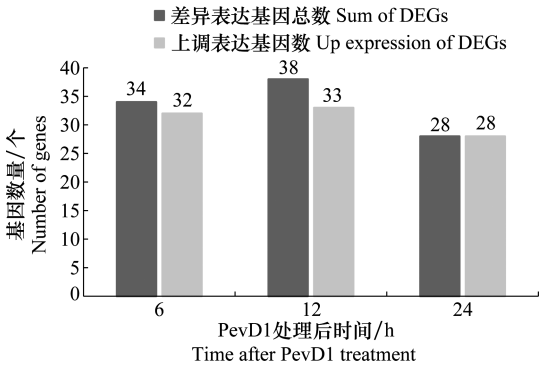


图 3　蛋白激发子 PevD1 诱导不同时间富集在倍半萜合成途径中差异基因数量

Fig. 3　The number of DEGs in the sesquiterpene and triterpene synthesis pathway at each time point after PevD1 inducement

2.3　PevD1 诱导倍半萜和三萜次生代谢合成关键基因转录上调表达

本研究选取倍半萜和三萜次生代谢产物合成途径中的 6 个关键基因进行 qPCR 检测(表 3,图 4)。结果表明,PevD1 诱导后这些基因的表达模式与转录组数据基本吻合,PevD1 诱导后的基因表达水平明显高于未诱导的对照,说明倍半萜和三萜次生代谢产物合成途径参与了 PevD1 诱导的本生烟抗病性。转录组分析 PevD1 诱导了大量的 *EAS* 基因上调表达,诱导 6 h 时 32 个上调表达基因中有 14 个与 *EAS* 有关,诱导 12 h 时 33 个上调表达基因中有 16 个与 *EAS* 基因有关,诱导 24 h 时上调的 28 个上

表 3　倍半萜和三萜类代谢产物合成关键基因

Table 3　Key genes for biosynthesis of sesquiterpenoids and triterpenoids

基因 ID　Gene ID	基因名称　Gene name
Niben101Scf00176g03001	α-法尼烯合成酶(*AFS*)
Niben101Scf07725g00005	5-马兜铃烯合成酶(*EAS*)
Niben101Scf02203g05002	3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(*HMGCR*)
Niben101Scf03193g00006	螺二烯加氧酶(*CYP17A*)
Niben101Scf16511g00010	倍半萜合成酶(*TPS31*)
Niben101Scf03413g01011	甲羟戊酸-5-二磷酸脱羧酶(*MVAD*)

调表达基因中有 11 个与 *EAS* 有关，说明富集在倍半萜和三萜次生代谢合成途径上的差异表达基因中有近 40%～50% 的基因与辣椒醇合成关键基因 *EAS* 有关，qPCR 检测 *EAS* 基因上调表达近 70 倍，暗示了 PevD1 可能诱导了植保素辣椒醇的产生和积累。

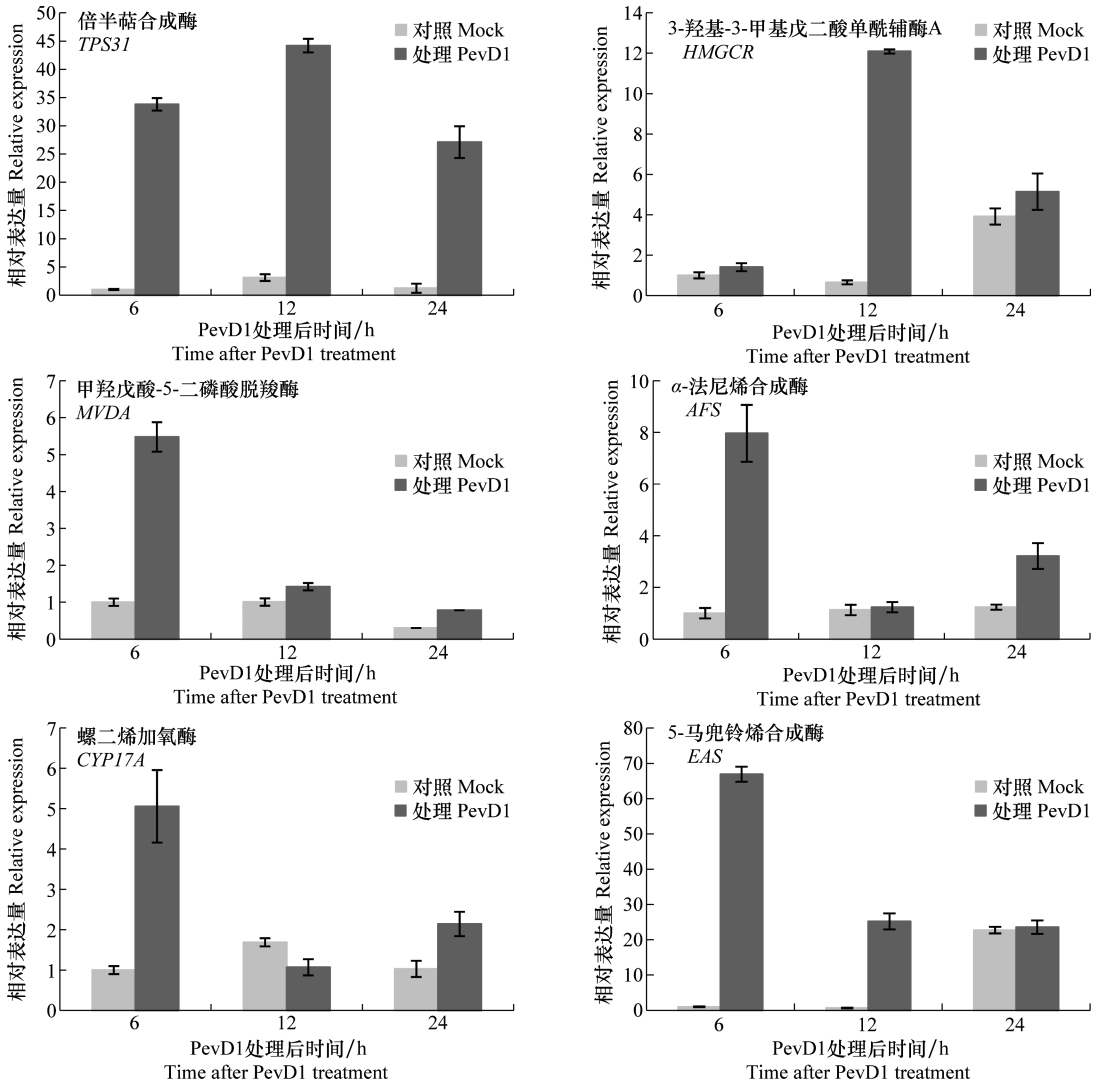


图 4　倍半萜和三萜合成相关差异基因的验证

Fig. 4　Validation of DEGs related to sesquiterpenoid and triterpenoid biosynthesis

2.4　PevD1 诱导植保素辣椒醇合成关键基因上调表达和产物积累

EAS 和 EAH 是植保素辣椒醇合成通路上的两个关键酶，沉默 *NbEAS* 或 *NbEAH* 的本生烟植株接种致病疫霉后 3 d 均比未沉默植株的辣椒醇含量降低，而且对致病疫霉的抗性也降低[14]。在辣椒醇合成过程中，EAS 先将法尼烯焦磷酸（FPP）环化成马兜铃烯，经马兜铃烯二羟基化酶（5-epi-aristolochene dihydroxylase，EAH）催化 2 个羟基化反应，形成终产物辣椒醇[28-29]。本研究分析发现，PevD1诱导 6～12 h 富集在倍半萜和三萜次生代谢产物合成通路上的基因中有 50%以上的差异表达基因与 EAS 相关，意味着 PevD1 可能诱导辣椒醇的产生。为了验证该推测，用 PevD1 分别诱导本生烟叶片 9 h 和 12 h 后取样，用 HPLC 检测辣椒醇的含量。结果表明，PevD1 诱导的叶片均能检测到辣椒醇的积累，而未诱导的对照检测不到辣椒醇，同时 PevD1 诱导的叶片 *EAS* 和 *EAH* 基因转录水平也大幅度提高（图 5），说明 PevD1 确实诱导了植保素辣椒醇的积累。

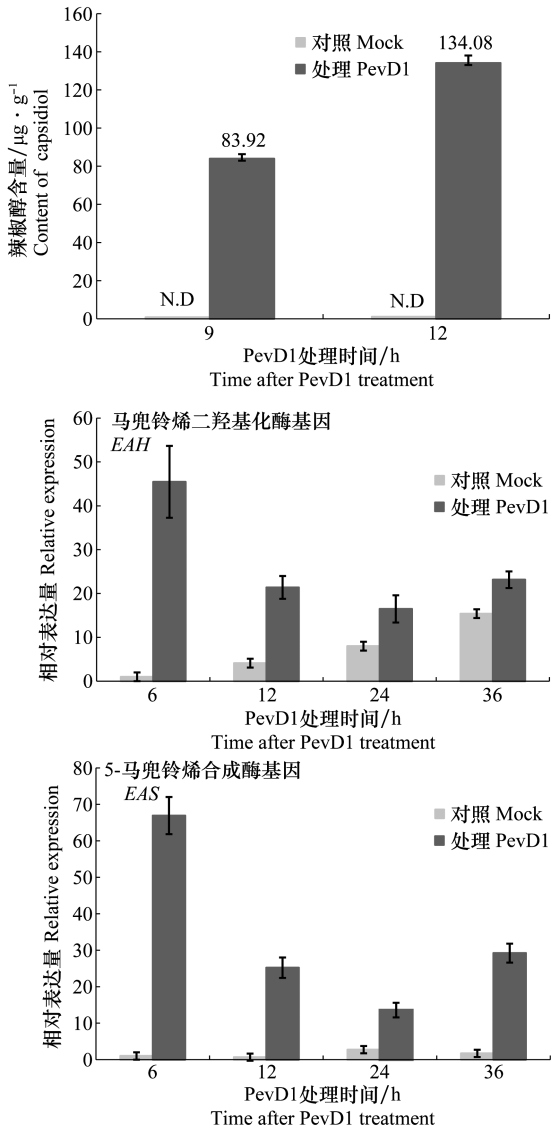


图 5　PevD1 诱导后烟草叶片中辣椒醇含量及合成关键基因 *EAS* 和 *EAH* 的转录表达

Fig. 5　Accumulation of capsidiol in leaves after PevD1 treatment and expression levels of *EAS* and *EAH* genes in capsidiol biosynthesis

3　讨论

植保素是植物防御病原物的主要生化壁垒,在病原菌侵染点周围产生并积累,杀死病原物或抑制其侵染,是植物抗性的重要机制。萜类化合物是植物代谢过程中产生最多的一类化合物[30],根据其结构可分为半萜、单萜、倍半萜、二萜、三萜以及多聚萜等。异戊二烯(IPP)是萜类化合物的基本结构单位,萜类化合物的合成途径非常复杂,目前已经克隆了萜类化合物合成路径中的一些关键基因并进行了功能分析。5-马兜铃烯合成酶(EAS)是最早被研究的倍半萜合成酶,能够催化法尼基焦磷酸(FPP)合成倍半萜类植保素辣椒醇的前体物质 5-马兜铃烯[31],是辣椒醇合成的关键酶之一,萜烯合成酶(terpenoid synthase,TPS)是异戊二烯、单萜、倍半萜烯和二萜等低分子量萜类形成的关键酶,TPS 转录水平的提高伴随着萜类物质的大量积累[32]。α-法尼烯是挥发性倍半萜类次生代谢物,苹果中的 α-法尼烯的代谢水平直接影响到苹果虎皮病害的发展[33-34]。α-法尼烯合成酶(AFS)是合成 α-法尼烯的限速酶,主要功能是催化法尼烯基焦磷酸(FPP)合成 α-法尼烯。3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶(HMGCR/HMGR)、法尼基焦磷酸合成酶(FPS)以及马兜铃烯合成酶(EAS)是倍半萜生物合成途径中的关键酶[35]。当烟草中的 HMGCR 表达受到抑制后,植株体内的倍半萜化合物的含量会明显下降。FPS 催化 IPP 与其他化合物生成 FPP,FPP 不仅是多萜醇、甾体和泛醌等重要初生代谢物的合成前体,它还能在倍半萜环化酶的作用下生成倍半萜类植保素等物质[28]。马兜铃烯二羟基化酶 EAH 是 5-马兜铃烯羟基化形成辣椒醇的另一个重要酶,法尼烯二磷酸盐经过 EAH 和 EAS 两步催化形成辣椒醇[34]。

辣椒醇属于倍半萜植保素,其产生受多个途径的调控。渐狭叶烟草 *N. attenuata* 被链格孢侵染后可以诱导产生辣椒醇植保素,用 VIGS 技术沉默 *EAS* 或 *EAH* 基因的表达则辣椒醇积累显著减少,同时降低了对链格孢病原菌侵染的抗性,而且辣椒醇的产生不依赖于茉莉酸(JA)和乙烯(ET)信号途径,其合成受到转录因子 ERF2 的正调控[14]。用纤维素酶/花生四烯酸处理或灰葡萄孢侵染野生烟草 *N. plumbaginifolia* ABA 合成缺陷型烟草突变体,其辣椒醇含量比野生型高 2 倍以上[9],说明 ABA 负调控辣椒醇植保素的合成。此外,大量研究表明,植保素产生依赖于活性氧和 HR[36-37]。前期研究表明,PevD1 能诱导 MAPK 激活和大量 ERF 转录因子转录上调,MAPK 和 ERF 转录因子是否参与 PevD1 诱导辣椒素的合成,从而提高烟草抗病性有待于进一步研究。另外,PevD1 转化拟南芥能显著提高对灰葡萄孢菌和丁香假单胞菌的抗性,而且 JA 含量明显提高,ABA 响应通路中的 3 个重要负调控因子基因 *WRKY40*, *PP2CA* 和 *HAI2* 显著上调表达,意味着 PevD1 抑制了 ABA 响应通路[38]。JA 和 ABA 通路是否参与 PevD1 诱导辣椒醇的积累有待于深入探讨。

参考文献

[1] DODDS P N, RATHJEN J P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions [J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(8): 539 - 548.

[2] ZIPFEL C. Early molecular events in PAMP-triggered immunity [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2009, 12(4): 414 - 420.

[3] AHUJA I, KISSEN R, BONES A M. Phytoalexins in defense against pathogens [J]. Trends in Plant Science, 2012, 17: 73 - 90.

[4] DESJARDINS A E, MCCORMICK S P, CORSINI D L. Diversity of sesquiterpenes in 46 potato cultivars and breeding selections [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(8):2267 - 2272.

[5] ENGSTRM K, WIDMARK A K, BRISHAMMAR S, et al. Antifungal activity to *Phytophthora infestans* of sesquiterpenoids from infected potato tubers [J]. Potato Research, 1999, 42:43 - 50.

[6] LYON G D, BAYLISS C E. The effect of rishitin on *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* and other bacteria [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1975, 6(2):177 - 186.

[7] EL OIRDI M, TRAPANI A, BOUARAB K. The nature of tobacco resistance against *Botrytis cinerea* depends on the infection structures of the pathogen [J]. Environmental Microbiology, 2010, 12(1): 239 - 253.

[8] SUN Huanhuan, SONG Na, MA Lan, et al. Ethylene signalling is essential for the resistance of *Nicotiana attenuata* against *Alternaria alternata* and phytoalexin scopoletin biosynthesis [J]. Plant Pathology, 2017, 66(2): 277 - 284.

[9] MIALOUNDAMA A S, HEINTZ D, DEBAYLE D, et al. Abscisic acid negatively regulates elicitor-induced synthesis of capsidiol in wild tobacco [J]. Plant Physiology, 2009, 150: 1556 - 1566.

[10] SHIBATA Y, KAWAKITA K, TAKEMOTO D. Age-related resistance of *Nicotiana benthamiana* against hemibiotrophic pathogen *Phytophthora infestans* requires both ethylene-and salicylic acid-mediated signaling pathways [J]. Molecular Plant Microbe Interactions, 2010, 23(9): 1130 - 1142.

[11] GROSSKINSKY D K, NASEEM M, ABDELMOHSEN U R, et al. Cytokinins mediate resistance against *Pseudomonas syringae* in tobacco through increased antimicrobial phytoalexin synthesis independent of salicylic acid signaling [J]. Plant Physiology, 2011, 157(2): 815 - 830.

[12] STOESSL A, UNWIN C H, WARD E W B. Postinfectional inhibitors from plants I. capsidiol, an antifungal compound from capsicum frutescens [J]. Phytopathology, 1972, 74(2): 141 - 152.

[13] WARD E W B, UNWIN C H, STOESSL A. Postinfectional inhibitors from plants. XIII. Fungitoxicity of the phytoalexin, capsidiol, and related sesquiterpenes [J]. Canadian Journal of Botany, 1974, 52(12): 2481 - 2488.

[14] SONG Na, MA Lan, WANG Weiguang, et al. An ERF2-like transcription factor regulates production of the defense sesquiterpene capsidiol upon *Alternaria alternata* infection [J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(20): 5895 - 5908.

[15] MOLOT P M, MAS P, CONUS M, et al. Relations between capsidiol concentration, speed of fungal invasion and level of induced resistance in cultivars of pepper (*Capsicum annuum*) susceptible or resistant to *Phytophthora capsici* [J]. Physiological Plant Pathology, 1981, 18(3): 379 - 389.

[16] EGEA C, ALCAZAR M D, CANDELA M E. Capsidiol: its role in the resistance of *Capsicum annuum* to *Phytophthora capsici* [J]. Physiologia Plantarum, 1996, 98(4): 737 - 742.

[17] HOSHINO T, CHIDA M, YAMAURA T, et al. Phytoalexin induction in green pepper cell cultures treated with arachidonic acid [J]. Phytochemistry, 1994, 36(6): 1417 - 1419.

[18] KELLER H, CZERNIC P, PONCHET M, et al. Sesquiterpene cyclase is not a determining factor for elicitor-and pathogen-induced capsidiol accumulation in tobacco [J]. Planta, 1998, 205: 467 - 476.

[19] TUGIZIMANA F, STEENKAMP P A, PIATER L A, et al. Ergosterol-induced sesquiterpenoid synthesis in tobacco cells [J]. Molecules, 2012, 17(2): 1698 - 1715.

[20] WANG Bingnan, YANG Xiufen, ZENG Hongmei, et al. The purification and characterization of a novel hypersensitive-like response-inducing elicitor from *Verticillium dahliae* that induces resistance responses in tobacco [J]. Applied Microbiology & Biotechnology 2012, 93(1):191 - 201.

[21] BU Bingwu, QIU Dewen, ZENG Hongmei, et al. A fungal protein elicitor PevD1 induces Verticillium wilt resistance in cotton [J]. Plant Cell Reports, 2014, 33(3): 461 - 470.

[22] 王炳楠，杨秀芬，曾洪梅，等. 大丽轮枝菌分泌蛋白激发子的分离纯化及生物功能研究[J]. 生物技术通报，2011(11): 166 - 171.

[23] 梁颖博，李泽，邱德文，等. 本生烟响应蛋白激发子 PEVD1 的差异表达基因鉴定与分析[J]. 中国农业科学，2019，52(21): 3794 - 3805.

[24] ZHANG Yi, GAO Yuhan, LIANG Yingbo, et al. *Verticillium dahliae* PevD1, an Alt a 1-like protein, targets cotton PR5-like protein and promotes fungal infection [J]. Journal of Experimental Botany. 2019,70(2):613 - 626.

[25] WANG Likun, FENG Zhixing, WANG Xi, et al. DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data [J]. Bioinformatics, 2010,26(1):136 - 138.

[26] SCHMITTGEN T D, LEE E J, JIANG Jinmai. High-throughput real-time PCR [J]. Methods in Molecular Biology, 2008, 429: 89 - 98.

[27] STARKS C M, BACK K, CHAPPELL J, et al. Structural basis for cyclic terpene biosynthesis by tobacco 5-epi-aristolochene synthase [J]. Science, 1997, 277(5333): 1815 - 1820.

[28] FACCHINI P J, CHAPPELL J. Gene family for an elicitor-induced sesquiterpene cyclase in tobacco [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89(22): 11088 - 11092.

[29] RALSTON L, KWON S T, SCHOENBECK M, et al. Cloning, heterologous expression, and functional characterization of 5-epi-aristolochene-1,3-dihydroxylase from tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2001, 393(2): 222 - 235.

[30] DIXON R A. Natural products and plant disease resistance [J]. Nature, 2001, 411(6839): 843 - 847.

[31] WHITEHEAD L M, THRELFAL D R, EWING D F. 5-*epi*-aristolochene is a common precursor of the sesquiterpenoid phytoalexins capsidiol and debneyol [J]. Phytochemistry, 1989, 28(3): 775 - 779.

[32] GAO Yang, HONZATKO R, PETERS R. Terpenoid synthase structures: a so far incomplete view of complex catalysis [J]. Natural product reports, 2012, 29:1153 - 1175.

[33] PECHOUS S W, WHITAKER B D. Cloning and functional expression of an (E, E)-alpha-farnesene synthase cDNA from peel tissue of apple fruit [J]. Planta, 2004, 219(1): 84 - 94.

[34] ROWAN D D, HUNT M B, FIELDER S, et al. Conjugated triene oxidation products of alpha-farnesene induce symptoms of superficial scald on stored apples [J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2001, 49(6): 2780 - 2787.

[35] CHOI D, WARD B L, BOSTOCK R M. Differential induction and suppression of potato 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase genes in response to *Phytophthora infestans* and to its elicitor arachidonic acid [J]. Plant Cell, 1992, 4(10): 1333 - 1344.

[36] PERRONE S T, MCDONALD K L, SUTHERLAND M W, et al. Superoxide release is necessary for phytoalexin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells during the expression of cultivar-race and non-host resistance towards *Phytophthora* spp. [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2003, 62(3): 127 - 135.

[37] ARACELI A C, ELDA C M, EDMUNDO L G, et al. Capsidiol production in pepper fruits (*Capsicum annuum* L.) induced by arachidonic acid is dependent of an oxidative burst [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2007, 70(1 - 3): 69 - 76.

[38] LIU Mengjie, KHAN N U, WANG Ningbo, et al. The Protein elicitor PevD1 enhances resistance to pathogens and promotes growth in *Arabidopsis* [J]. International journal of biological sciences, 2016, 12(8): 931 - 943.

(责任编辑:田　喆)

(上接 30 页)

[13] FU Fanghong, LI Shifang, JIANG Dongmei, et al. First report of *Coleus blumei viroid* 2 from commercial coleus in China [J]. Plant Disease, 2011, 95(4): 494.

[14] SPIEKER R L, MARINKOVIC S, SANGER H L. A new sequence variant of *Coleus blumei viroid* 3 from the *Coleus blumei* cultivar 'Fairway Ruby' [J]. Archives of Virology, 1996, 141(8): 1377 - 1386.

[15] JIANG Dongmei, LI Shifang, FU Fanghong, et al. First reported occurrence of *Coleus blumei viroid* 3 in China [J]. Journal of Plant Pathology, 2011, 93(4): 82.

[16] HOU Wanying, SANO T, LI Shifang, et al. Identification and characterization of a new *Coleviroid* (CbVd-5) [J]. Archives of Virology, 2009, 154: 315 - 320.

[17] JIANG Dongmei, LI Shifang, FU Fanghong, et al. First report of *Coleus blumei viroid* 5 from *Coleus blumei* in India and Indonesia [J]. Plant Disease, 2013, 97(4): 561.

[18] TSUSHIMA T, SANO T. First report of *Coleus blumei viroid* 5 infection in vegetatively propagated clonal coleus cv. 'Aurora black cherry' in Japan [J]. New Disease Reports, 2015, 32: 7.

[19] SMITH R L, LAWRENCE J, SHUKLA M, et al. First report of *Coleus blumei viroid* 5 and molecular confirmation of *Coleus blumei viroid* 1 in commercial *Coleus blumei* in Canada [J]. Plant Disease, 2018, 102(9): 1862.

[20] SMITH R L, LAWRENCE J, SHUKLA M, et al. Occurrence of *Coleus blumei viroid* 6 in commercial *Coleus blumei* in Canada-The first report outside of China [J]. Plant Disease, 2019, 103: 782.

[21] 苏前富,郭瑞,成卓敏,等. 中国锦紫苏类病毒的检测及其分子生物学特征研究[J]. 植物病理学报, 2006, 36(3): 226 - 231.

[22] ZHANG Yongjiang, YIN Jun, JIANG Dongmei, et al. Universal oligonucleotide microarray with a minimal number of probes for the detection and identification of viroids at the genus level [J/OL]. PLoS ONE, 2013, 8(5): e64474. DOI: 10.1371/journal.pone.0064474.

[23] JIANG Dongmei, WANG Meng, ZHANG Zhixiang, et al. High-throughput sequencing analysis of small RNAs derived from *Coleus blumei* viroids [J/OL]. Viruses, 2019, 11(7): 619. DOI:10.3390/v11070619.

[24] JIANG Dongmei, WU Zujian, XIE Lianhui, et al. Sap-direct RT-PCR for the rapid detection of *Coleus blumei* viroids of the genus *Coleviroid* from natural host plants [J]. Journal of Virological Methods, 2011, 174(1 - 2): 123 - 127.

[25] JIANG Dongmei, HOU Wanying, SANO T, et al. Rapid detection and identification of viroids in the genus *Coleviroid* using a universal probe [J]. Journal of Virological Methods, 2013, 187(2): 321 - 326.

[26] SPIEKER R L. A new sequence variant of *Coleus blumei viroid* 1 from the *Coleus blumei* cultivar "Rainbow Gold" [J]. Archives of Virology, 1996, 141(11): 2153 - 2161.

[27] JIANG Dongmei, GAO Rui, QIN Lü, et al. Infectious cDNA clones of four viroids in *Coleus blumei* and molecular characterization of their progeny [J]. Virus Research, 2014, 180: 97 - 101.

[28] TSUSHIMA T, SANO T. A point-mutation of *Coleus blumei viroid* 1 switches the potential to transmit through seed [J]. Journal of General Virology, 2018, 99(3): 393 - 401.

(责任编辑:田　喆)