

过量表达辣椒 *CaNPR1* 提高烟草对青枯菌的抗性

党峰峰^{a,b}, 林金辉^a, 陈成聪^a, 陈永萍^c, 黄国栋^d, 官德义^d, 何水林^{a,b*}

(福建农林大学 a. 生命科学学院; b. 作物遗传改良和综合利用教育部重点实验室;

c. 园艺学院; d. 作物科学学院, 福州 350002)

摘要: 对水稻和拟南芥等模式植物的研究表明, *NPR1* (nonexpressor of pathogenesis-related genes 1) 是依赖于 SA 通路的防御反应调节基因, 但在辣椒和烟草等茄科作物中该蛋白的功能还鲜有报道。研究从辣椒 cDNA 文库中分离获得一个 *NPR1* 的类似物全长 cDNA (*CaNPR1*), 并获得了其超表达的转基因烟草 T₁ 代株系。研究表明, 这些株系与其野生型植株没有明显表型差异, 但却表现出较野生型植株更高的抗青枯菌侵染活性。同时, 研究还发现 *CaNPR1* 的超表达还显著提高了防御相关基因的表达, 表明 *NPR1* 在不同植物间具有较强的功能保守性。

关键词: 辣椒; *NPR1*; 青枯菌

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2012)05-0494-07

Overexpression of *CaNPR1* Enhances Resistance to *Ralstonia solanacearum* Infection in Tobacco

DANG Feng-Feng^{a,b}, LIN Jin-Hui^a, CHEN Cheng-Cong^a, CHEN Yong-Ping^c,
HUANG Guo-Dong^d, GUAN De-Yi^d, HE Shui-Lin^{a,b*}

(a. College of Life Science; b. National Education Minister Key Laboratory of

Plant Genetic Improvement and Comprehensive Utilization; c. College of Horticulture;

d. College of Crop Science; Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The *NPR1* (nonexpressor of pathogenesis-related genes 1) gene plays an important role in SA-dependent defense response processes in model plants such as *Arabidopsis* and rice. However, the function and underlying mechanism of this gene in non-model plants, including pepper (*Capsicum annuum*) and other Solanaceae, remain poorly understood. Here, we report on the functional characterization of *CaNPR1* from pepper. Our data showed that the full-length cDNA of *CaNPR1* was isolated and overexpression of *CaNPR1* was construed in tobacco K326. Compared to wild type K326, *CaNPR1*-OE lines did not exhibit any phenotypic differences, but exhibited higher resistance to *Ralstonia solanacearum* inoculation. In addition, this was coupled with enhanced transcript levels of defense-related marker genes, suggesting that *CaNPR1* possessed higher conservative function in cross species.

Key words: *Capsicum annuum*; *NPR1*; *Ralstonia solanacearum*

收稿日期: 2012-04-07, 修回日期: 2012-06-01。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30971718); 国家高等教育博士研究基因项目 (20093535110004); 转基因重大专项 (2009ZX08001-015B); 福建省自然科学基金 (2008J049) [National Natural Science Foundation of China (30971718); Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20093535110004); The Transgenic Major Program (2009ZX08001-015B); Natural Science Foundation of Fujian Province, China (2008J049)]。

作者简介: 党峰峰 (1986 -), 男, 陕西富平人, 福建农林大学硕士研究生, 研究方向为植物基因表达与调控。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: shlhe2007@yahoo.com.cn)。

植物在其自然生态环境中总是不可避免地遭到各种病害的危害,在长期的进化过程中植物也形成了复杂的防御反应机制,包括对病原菌侵染的感知、信号传导和大量基因表达转录水平上的调节以产生防御反应,导致局部或者广谱性的系统获得性抗性(SAR)^[1]。有研究表明,Ca²⁺^[2]、内源激素(水杨酸(SA))^[3]、乙烯(ET)^[4]、茉莉酸(JA)^[3]、脱落酸(ABA)^[5,6]和油菜素内酯(BR)^[7]、MAPKs^[8]、转录因子(WRKY^[9]、NAC^[10,11]、DREB^[12]、ERF^[13]等广泛地参与了植物应答病原菌的信号传导并在其中起重要的调节作用。此外,还发现非病程相关因子(*NPR1*)在植物整体抵御各种病原菌入侵过程中,不仅对植物的系统获得性和诱导性抗性起核心调控作用^[14],同时也对植物的基础性抗性和*R*基因决定的抗性起关键性作用^[15]。然而,迄今有关*NPR1*的报道大多仅限于拟南芥和水稻等模式植物,在辣椒和烟草等茄科植物中还鲜有报道。

辣椒是一种重要的蔬菜和典型的忌连作茄科植物,辣椒生产常因频繁发生的疫病或青枯病等土传病害而经常导致减产甚至绝收^[16,17],在高温高湿条件下病害发生尤其严重。当前解决辣椒等作物病害的主要手段是采用抗病品种和施用化学农药,辣椒抗病育种具有周期长、抗性丧失快等缺点,而施用化学农药污染严重。研究辣椒抗病分子机制,在此基础上探索新的抗病策略将在解决辣椒等茄科作物抗病问题中发挥重要的作用。鉴于此,本研究分离了辣椒*NPR1*的全长cDNA,并研究了其超表达对烟草青枯病侵染的抗性。

1 材料与方法

1.1 植物生长与环境

烟草 K326 (*Nicotiana tabacum*, 对青枯菌菌株 FJC100301 较敏感), 试验中栽培于温室内。K326 和过量表达辣椒 *CaNPR1* (*CaNPR1*-OE) 的 T₁ 代种子经过 75% 乙醇消毒 30 s, 10% 的过氧化氢消毒 10 min, 无菌水清洗 5 次, 播种于含有 75 mg/L 卡那霉素(Kan)的 MS 培养基上, 培养 14~21 d 后选取大小一致的 K326 和 *CaNPR1*-OE 株系幼苗移栽于无菌的营养基质中(泥炭土: 土: 珍珠岩 = 2: 1: 1, V: V: V), 培养 14~21 d 后, 选取大小一致的 K326

和 *CaNPR1*-OE 株系小苗移栽于无菌的营养基质中培养 21~28 d。温室条件为 25℃±2℃, 光照强度为 60~70 μmol·m⁻²·s⁻¹, 相对湿度 70%, 光暗周期为 16 h/8 h。

1.2 青枯菌培养与接种

青枯菌 (*Ralstonia solanacearum*) 菌株 FJC100301 分离于福建省福清市发病的辣椒植株, 参照 Kelman A. 描述的方法^[18]进行。青枯菌的培养及抗病性接种鉴定参照 Jung J. 描述的方法^[19]进行。

1.3 *CaNPR1* 过量表达植株的构建

运用 gateway 克隆技术 (Invitrogen, USA) 将 *CaNPR1* 全长的 cDNA 克隆于含有 CaMV35S 启动子的 pMDC32 植物表达载体中, 形成 pMDC32-*CaNPR1* 载体并导入农杆菌菌株 LBA105 中^[20], 进一步通过农杆菌介导的遗传转化法进行烟草 K326 的遗传转化。T₀ 代植株通过卡那霉素抗性进行筛选, 最后 8 个株系通过卡那霉素基因特异性引物进行 PCR 验证。

1.4 实时荧光定量 PCR

根据 Applied Biosystems 7500 Real-time PCR 和 SYBR® Premix Ex Taq™ II (perfect real time) 指导说明书进行靶标基因(引物见表 1)相对表达量分析。通过 TRIZOL (Invitrogen™, Carlsbad, CA) 提取 K326 和 *CaNPR1*-OE 株系的 RNA, PrimeScript™ RT-PCR 反转录试剂盒 10 μL 反应体系反转录成 cDNA, 稀释 10 倍, 用于扩增靶标基因和内参基因, 反应条件均为: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 34 s, 收集荧光信号, 40 个循环; 添加溶解曲线 95℃ 15 s, 60℃ 1 min, 95℃ 15 s, 60℃ 15 s。数据分析采用 Livak 等的方法^[21], 即 K326 和 *CaNPR1*-OE 株系靶标基因的相对表达水平通过 2^{-ΔΔCT} 进行分析。

1.5 K326 和 *CaNPR1*-OE 株系植株的抗病性鉴定

K326 和 *CaNPR1*-OE 株系植株的抗病性鉴定采用针注方法, 从盆栽烟草植株顶芽下第 3 伸长叶叶背的叶脉处, 用注射针(4 号针头)将菌液注射到叶片细胞间隙, 病情病级和抗性标准均参照 Jung J. 的方法^[19]进行。

2 结果与分析

2.1 辣椒 *CaNPR1* 过量表达载体的构建与遗传转化

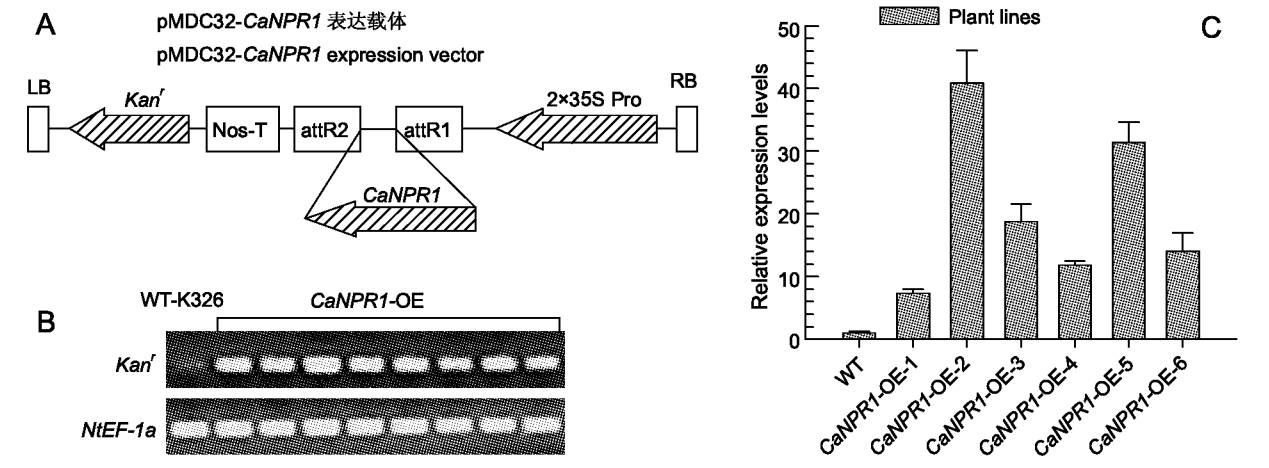
将克隆得到的 *CaNPR1* 基因全长 cDNA 测序, 并经 blast (www.uniprot.org) 同源比对发现, 与已报道的辣椒 *CaNPR1* (Q0ZAK2_CAPAN) 基因 100% 同源^[22], 全长 2191 bp, 其中含有 270 bp 的 5' 非编码区, 1749 bp 的 ORF (开放阅读框), 172 bp

的 3' 非编码区。经过 gateway 技术构建 pMDC32-*CaNPR1* 植物表达载体 (图 1: A)。通过农杆菌介导的烟草叶盘法转化方法, 获得了转基因烟草 T₀ 代植株, 收获种子并对种子进行卡那霉素浸种处理, 所获得的植株构成 T₁ 代株系 8 个 (图 1: B), 并未发现 *CaNPR1*-OE 株系与 K326 存在任何表型差异。应用 RT-qPCR 检测了辣椒 *CaNPR1* 基因在过表达株系 *CaNPR1*-OE-1、*CaNPR1*-OE-2、*CaNPR1*-OE-3、

表 1 研究所用引物
Table 1 Main Primers for PCR

基因 Gene	登录号 Accession No.	上游引物(5'到3') Left primer (5' to 3')	下游引物(5'到3') Right primer (5' to 3')	碱基(bp) Base
<i>CaNPR1</i> ^{a)}	X61679.1	AAAAAGCAGGCTTCATGGATAGTAGGA	AGAAAGCTGGGTCCTATTTCTCTAAAG	187
<i>Kan^r</i> (<i>NPTII</i>)	AB697058.1	TGCCCTGAATGAACTCCA	TATGTCCTGATAGCGGTCC	499
<i>CaNPR1</i> ^{b)}	X61679.1	ACTTCTTCGCCGACGCCAAG	GCCAACACATTACCAGAGCATC	190
<i>NtPR2</i>	M60460	TGATGCCCTTTTGGATTCTATG	AGTTCCTGCCCCGCTTT	175
<i>NtACS1</i>	X65982	CATTAGCGAGGATTCGGAGTT	GTGGTGAATG AGGGATAGGA GA	180
<i>Ntacc deaminase</i>	Z46349.1	TCTGAGGTTACTGATTGGATTGG	TGGACATGGTGGATAGTTGCT	264
<i>NtCAT1</i>	AY128694.1	CAACTTCCTGCTAATGCTCCAA	TGCCTGTCTGGTGTGAATGA	245
<i>NtGST1</i>	D10524	AGCACCCTTACCTTTCCCTC	GCTTTCCTTC ACAGCAGCAT CA	284
<i>NtEF-1α</i>	D63396	TGCTGCTGTAAACAAGATGGATGC	GAGATGGGGA CAAAGGGGAT T	134

注: a) 作为辣椒 *CaNPR1* 基因克隆特异性引物; b) 辣椒 *CaNPR1* 相对表达量监测特异性引物。
Notes: a) Primer for cloned of *CaNPR1*; b) Primer for relative transcript levels of *CaNPR1* detecting.



A. LB 和 RB; T-DNA 左端和右端; attR1 和 attR2; Gateway 克隆技术重组位点; 2 × 35S Pro; 2 个拷贝花椰菜花叶病毒 35S 启动子; Nos-T; 终止密码子; *Kan^r*; 卡那霉素抗性基因。B. 在 8 个过量表达 *CaNPR1* T₁ 转基因株系和野生型 K326 植株中, 用 RT-PCR 分析了卡那霉素基因表达水平, *NtEF-1α* 作为内对照。C. 在 K326 和 *CaNPR1* 过量表达株系中, 应用 RT-qPCR 检测了辣椒 *CaNPR1* 相对表达水平。误差线代表标准误, 数值来源于 3 组独立的生物学重复。
A. LB and RB; Left and right borders of the T-DNA; attR1 and attR2; Recombination sites for gateway cloning; 2 × 35S Pro; Two copies of the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter; Nos-T; Nos-terminator; *Kan^r*; Kanamycin resistance gene. B. RT-PCR analysis *Kan^r* gene transcript levels in eight *CaNPR1*-OE lines and wild-type tobacco plants, *NtEF-1α* served as endogenous control. C. Relative transcripts of *CaNPR1* in K326 and *CaNPR1*-OE lines tobacco plants were tested by RT-qPCR, error bars indicate the standard error; values based on at least three independent repetitions of the biological experiments.

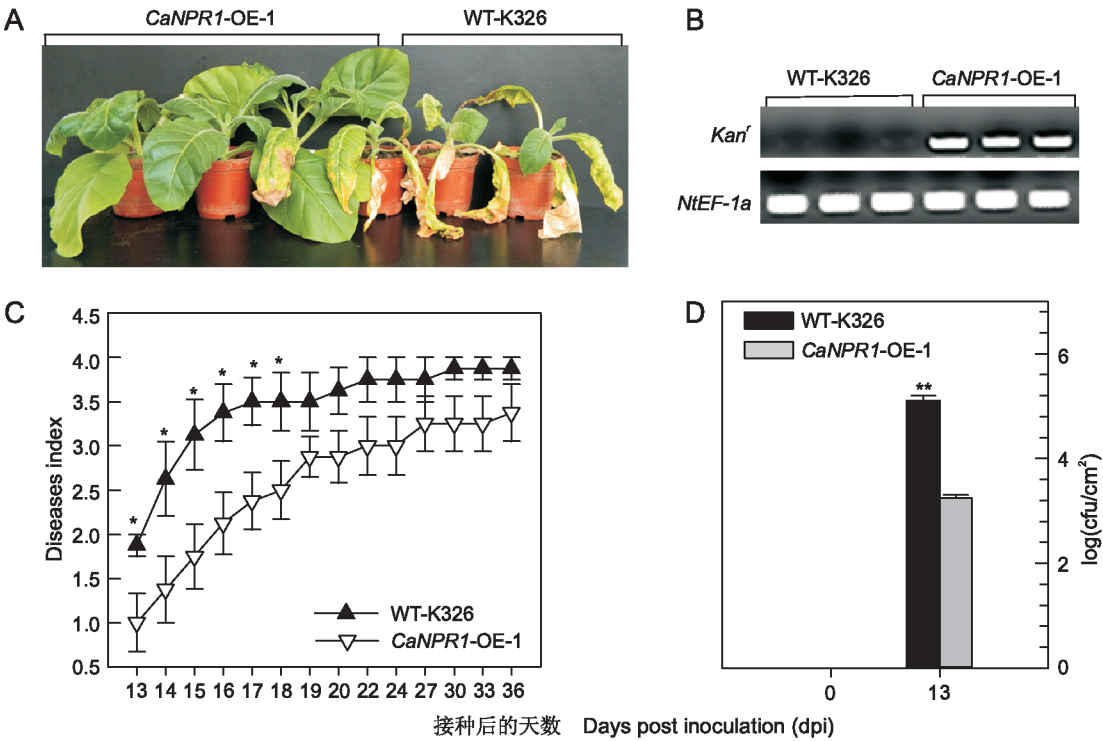
图 1 过量表达辣椒 *CaNPR1* 植物表达载体构建模式图
Fig. 1 Schematic representation of the pMDC32-*CaNPR1* constructs

CaNPR1-OE-4、*CaNPR1*-OE-5、*CaNPR1*-OE-6 和野生型 K326 中相对表达水平(图 1: C),结果表明,各种株系中辣椒 *CaNPR1* 基因均过量表达。

2.2 过量表达辣椒 *CaNPR1* 增强了烟草对青枯菌的抗性

采用高致病性青枯菌菌株 FJC100301,随机挑选 3 个株系的植株进行抗病性分析,接种 13 d 后观察统计发病程度。结果表明,与野生型 K326 相比,3 个 *CaNPR1*-OE 株系均展现了较高的抗性。一个典型的株系 *CaNPR1*-OE-1 用于记录和详细抗性分析。

在接种后 13 d (13dpi, days post inoculation),野生型 K326 发生了严重的烟草青枯病,而 *CaNPR1*-OE-1 株系仅仅发生轻度的烟草青枯病(图 2: A)。在 13dpi、14dpi、15dpi、16dpi、17dpi 和 18dpi 病情指数分析发现,*CaNPR1*-OE-1 株系烟草青枯病病情程度仅为野生型的 53%、52%、56%、62%、67%、71%和 82%(图 2: C)。在接种 13 d 后,青枯菌的生长在 *CaNPR1*-OE-1 植株中也受到了抑制,数量显著低于野生型植株(图 2: D)。可见,过量表达辣椒 *CaNPR1* 增强了烟草对青枯菌的抗性。



A. 7 周大的 *CaNPR1*-OE-1 株系和野生型 K326 植株进行青枯菌抗性分析,采用叶脉注射,每株注射 10 μ L 10^8 cfu/mL (OD =0.8;cfu, 菌落形成单位),接种 13 d 后拍照。B. 在 *CaNPR1*-OE-1 和野生型 K326 植株中,用 RT-PCR 分析了卡那霉素抗性基因表达水平,*NtEF-1α* 作为内对照。C. 病情指数统计分析,范围 0~4: 0(植株健康),1(1%~25% 枯萎),2(26%~50% 枯萎),3(51%~75% 枯萎),4(76%~100% 枯萎或者死亡),数值来源于 3 组生物学重复,每组 5 个植株。D. 接种后 13 d,在 *CaNPR1*-OE-1 和野生型 K326 植株第 3 叶片中,统计分析青枯菌生长情况。数值来源于 3 个生物学重复平均。误差线代表标准误,Student-Newman-Keuls 检验,*表示显著性差异(* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$)。

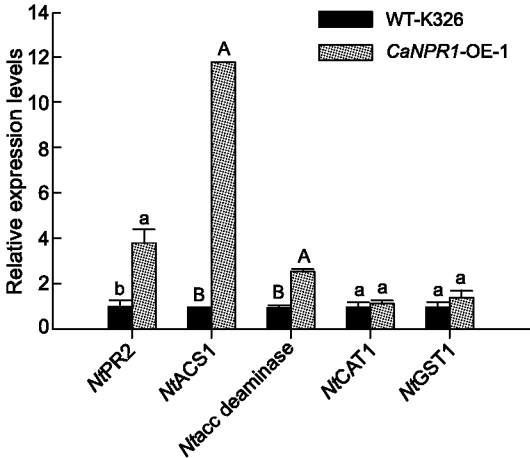
A. Seven-week-old plants of the representative *CaNPR1*-OE-1 line and its parental wild type line (WT-K326) 13 days after inoculation of their third leaves with 10 μ L suspension of 10^8 colony forming units (cfu) mL⁻¹ of the highly virulent *R. solanacearum* strain FJC100301. B. RT-PCR analysis *Kan^r* gene transcript levels in *CaNPR1*-OE-1 and wild-type tobacco plants,*NtEF-1α* served as endogenous control. C. *R. solanacearum*-inoculated plants scored using a disease index ranging from 0 to 4: 0 (no wilting), 1 (1% to 25% wilted), 2 (26% to 50% wilted), 3 (51% to 75% wilted), and 4 (76% to 100% wilted or dead). Averages presented are based on three biological replicates each comprising five plants. D. *R. solanacearum* growth in third leaves of wild type (WT-K326) and *CaNPR1*-OE-1 tobacco plants 0 and 13 days post-inoculation (dpi). Values presented are average cfu based on three biological replicates, each comprising three plants. Error bars indicate the standard error. * indicate a significant difference (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

图 2 过量表达辣椒 *CaNPR1* 增强了烟草植株对青枯菌的抗性

Fig. 2 Transgenic T₁ tobacco plants overexpressing *CaNPR1* exhibit enhanced resistance to *R. solanacearum*

2.3 过量表达辣椒 *CaNPR1* 对防御相关基因表达的影响

为了进一步验证上述抗病表型分析结果,分析了 *CaNPR1* 超表达对防御反应相关基因表达的影响。结果表明, *CaNPR1* 过量表达显著上调了水杨酸(SA)依赖的 *NPR2*, 乙烯(ET)合成相关基因 *NtACS1* 和 *Ntacc deaminase*^[23] 转录水平。其次,防御相关基因植物保护酶 *NtCAT1* 和 *NtGST1*(图3)^[24-26] 的表达水平在 *CaNPR1*-OE-1 株系和野生型 WT-K326 中没有显著性差异。



在 *CaNPR1*-OE-1 和 WT-K326 植株中,用 RT-qPCR 分析了防御相关基因相对表达水平。用 WT-K326 中防御相关基因的表达水平作为对照,表达水平设为“1”。误差线代表标准误,数值来源于 3 组独立的生物学重复。Student-Newman-Keuls 检验,不同字母表示显著性差异(不同小写字母表示 $p < 0.05$;不同大写字母表示 $p < 0.01$)。

RT-qPCR analysis of relative transcript levels of tobacco defense marker genes in *CaNPR1*-OE-1 tobacco or wild type (WT-K326) plants. Defense-related genes transcript contents of WT-K326 were used as control, which was set to “1”. Error bars indicate the standard error; values based on at least three independent repetitions of the biological experiments. Different letters indicate significant difference as determined by Student-Newman-Keuls Test (lowercase difference $p < 0.05$; uppercase difference $p < 0.01$).

图 3 *CaNPR1*-OE-1 和 WT-K326 植株中防御相关基因组成型表达

Fig. 3 Constitutive expression of defense markers in *CaNPR1*-OE-1 and WT-K326 tobacco

3 讨论

NPR1 基因最早从拟南芥中克隆得到^[27,28]。到目前为止,已有大量的数据表明 *NPR1* 是植物天然免疫反应过程中的重要元件,参与植物对病原菌侵染的应答并在其中起重要的调节作用。但是这些

研究大多数集中在拟南芥和水稻等模式植物中^[29-32],在辣椒等非模式植物中的报道还不多见。因此展开辣椒 *CaNPR1* 基因的功能学及作用模式研究,可进一步弥补目前 *NPR1* 基因研究的不足,为进一步丰富 *NPR1* 的研究提供一定的数据。本研究表明,辣椒 *CaNPR1* 与拟南芥中的 *NPR1* 同源基因的序列相似性分别达到 51%,与烟草和番茄中 *NPR1* 的同源性分别高达 91% 和 90% (www.uniprot.org),基本上反应出这些不同物种之间遗传上的差异。该基因在烟草中超表达,显著提高了转基因烟草对青枯菌侵染的抗性,这一结果与 *NPR1* 在水稻和拟南芥等植物中的结果较为一致。而且, *CaNPR1* 的超表达在提高转基因烟草植株抗青枯病与其对 SA-和 ET-依赖型防御反应基因表达的上调相关联。这些结果与前人关于 *NPR1* 参与 SA-和 ET 信号通路的报道一致。可见, *NPR1* 在不同的植物间尽管存在着结构上不同程度的差异性,但其功能却具有较高的保守性。

青枯病是一种重要的茄科植物病害,在高温高湿下发病危害严重。本研究发现 *CaNPR1* 的超表达可显著提高转基因烟草对青枯病的抗性,表明强化该基因的表达可能是辣椒和烟草等茄科植物提高对青枯病抗性的一种重要技术策略。

致谢: 非常感谢福建农林大学方树民教授在青枯病病株样本收集过程中的友情帮助。

参考文献:

[1] Ryals J A, Neuenschwander U H, Willits M G, Molina A, Steiner H Y, Hunt M D. Systemic acquired resistance [J]. *Plant Cell*, 1996, 8 (10): 1809 – 1819.

[2] Ma W, Smigel A, Tsai Y C, Braam J, Berkowitz G A. Innate immunity signaling: cytosolic Ca^{2+} elevation is linked to downstream nitric oxide generation through the action of calmodulin or a calmodulin-like protein [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148 (2): 818–828.

[3] Makandar R, Nalam V, Chaturvedi R, Jeannotte R, Sparks A A, Shah J. Involvement of salicylate and jasmonate signaling pathways in *Arabidopsis* interaction with *Fusarium graminearum* [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2010, 23(7): 861–870.

- [4] Han L, Li G J, Yang K Y, Mao G, Wang R, Liu Y, Zhang S. Mitogen-activated protein kinase 3 and 6 regulate *Botrytis cinerea*-induced ethylene production in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2010, 64 (1): 114–127.
- [5] Larkindale J, Knight M R. Protection against heat stress-induced oxidative damage in *Arabidopsis* involves calcium, abscisic acid, ethylene, and salicylic acid [J]. *Plant Physiol*, 2002, 128 (2): 682–695.
- [6] Liu H T, Liu Y Y, Pan Q H, Yang H R, Zhan J C, Huang W D. Novel interrelationship between salicylic acid, abscisic acid, and PIP₂-specific phospholipase C in heat acclimation-induced thermotolerance in pea leaves [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57 (12): 3337–3347.
- [7] Nakashita H, Yasuda M, Nitta T, Asami T, Fujioka S, Arai Y, Sekimata K, Takatsuto S, Yamaguchi I, Yoshida S. Brassinosteroid functions in a broad range of disease resistance in tobacco and rice [J]. *Plant J*, 2003, 33 (5): 887–898.
- [8] Jonak C, Okresz L, Bogre L, Hirt H. Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2002, 5 (5): 415–424.
- [9] Rushton P J, Somssich I E, Ringler P, Shen Q J. WRKY transcription factors [J]. *Trends Plant Sci*, 2010, 15 (5): 247–258.
- [10] Wu Y, Deng Z, Lai J, Zhang Y, Yang C, Yin B, Zhao Q, Zhang L, Li Y. Dual function of *Arabidopsis* AT-ATF1 in abiotic and biotic stress responses [J]. *Cell Res*, 2009, 19 (11): 1279–1290.
- [11] Xia N, Zhang G, Liu X Y, Deng L, Cai G L, Zhang Y, Wang X J, Zhao J, Huang L L, Kang Z S. Characterization of a novel wheat NAC transcription factor gene involved in defense response against stripe rust pathogen infection and abiotic stresses [J]. *Mol Biol Rep*, 2010, 37 (8): 3703–3712.
- [12] Tsutsui T, Kato W, Asada Y, Sako K, Sato T, Sonoda Y, Kidokoro S, Yamaguchi-Shinozaki K, Tamaoki M, Arakawa K. DEAR1, a transcriptional repressor of DREB protein that mediates plant defense and freezing stress responses in *Arabidopsis* [J]. *J Plant Res*, 2009, 122 (6): 633–643.
- [13] Oñate-Sánchez L, Anderson J P, Young J, Singh K B. *AtERF14*, a member of the ERF family of transcription factors, plays a nonredundant role in plant defense [J]. *Plant Physiol*, 2007, 143 (1): 400–409.
- [14] Mou Z, Fan W, Dong X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes [J]. *Cell*, 2003, 113 (7): 935–944.
- [15] Kinkema M, Fan W, Dong X. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of *PR* gene expression [J]. *Plant Cell*, 2000, 12 (12): 2339–2350.
- [16] Ristaino J B, Johnston S A. Ecologically based approaches to management of *Phytophthora blight* on bell pepper [J]. *Plant Dis*, 1999, 83 (12): 1080–1089.
- [17] Hwang B K, Kim C H. *Phytophthora blight* of pepper and its control in Korea [J]. *Plant Dis*, 1995, 79 (3): 221–227.
- [18] Kelman A. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium [J]. *Phytopathology*, 1954, 44 (12): 693–695.
- [19] Jung J, Won S Y, Suh S C, Kim H R, Wing R, Jeong Y, Hwang I, Kim M. The barley ERF-type transcription factor *HvRAF* confers enhanced pathogen resistance and salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Planta*, 2007, 225 (3): 575–588.
- [20] Oh S K, Park J M, Joung Y H, Lee S, Chung E, Kim S Y, Yu S H, Choi D. A plant EPF-type zinc-finger protein, *CaPIF1*, involved in defence against pathogens [J]. *Mol Plant Pathol*, 2005, 6 (3): 269–285.
- [21] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{(-\Delta\Delta C_T)}$ method [J]. *Methods*, 2001, 25 (4): 402–408.
- [22] Bae H, Roberts D P, Lim H S, Strem M D, Park S C, Ryu C M, Melnick R L, Bailey B A. Endophytic *Trichoderma* isolates from tropical environments delay disease onset and induce resistance against *Phytophthora capsici* in hot pepper using multiple mechanisms [J]. *Mol Plant Microbe Interact*,

- 2011, 24(3): 336–351.
- [23] Chen N, Goodwin P, Hsiang T. The role of ethylene during the infection of *Nicotiana tabacum* by *Colletotrichum destructivum* [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54(392): 2449.
- [24] Sohn S I, Kim Y H, Kim B R, Lee S Y, Lim C K, Hur J H, Lee J Y. Transgenic tobacco expressing the *hrpN_{EP}* gene from *Erwinia pyrifoliae* triggers defense responses against *Botrytis cinerea* [J]. *Mol Cells*, 2007, 24(2): 232–239.
- [25] Takahashi H, Chen Z, Du H, Liu Y, Klessig D F. Development of necrosis and activation of disease resistance in transgenic tobacco plants with severely reduced catalase levels [J]. *Plant J*, 1997, 11(5): 993–1005.
- [26] Takahashi Y, Nagata T. *parB*: an auxin-regulated gene encoding glutathione *S*-transferase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89(1): 56–59.
- [27] Cao H, Bowling S A, Gordon a S, Dong X. Characterization of an *Arabidopsis* mutant that is nonresponsive to inducers of systemic acquired resistance [J]. *Plant Cell*, 1994, 6(11): 1583–1592.
- [28] Cao H, Glazebrook J, Clarke J D, Volko S, Dong X. The *Arabidopsis* *NPR1* gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats [J]. *Cell*, 1997, 88(1): 57–63.
- [29] Spoel S H, Koornneef A, Claessens S M C, Korzelius J P, Van Pelt J A, Mueller M J, Buchala A J, Métraux J P, Brown R, Kazan K, *et al.* NPR1 modulates cross-talk between salicylate- and jasmonate-dependent defense pathways through a novel function in the cytosol [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(3): 760–770.
- [30] Després C, Delong C, Glaze S, Liu E, Fobert P R. The *Arabidopsis* NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors [J]. *Plant Cell*, 2000, 12(2): 279–290.
- [31] Nandi A, Kachroo P, Fukushige H, Hildebrand D F, Klessig D F, Shah J. Ethylene and jasmonic acid signaling affect the NPR1-independent expression of defense genes without impacting resistance to *Pseudomonas syringae* and *Peronospora parasitica* in the *Arabidopsis* *ssi1* mutant [J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2003, 16(7): 588–599.
- [32] Chern M, Canlas P E, Fitzgerald H A, Ronald P C. Rice NRR, a negative regulator of disease resistance, interacts with *Arabidopsis* NPR1 and rice NH1 [J]. *Plant J*, 2005, 43(5): 623–635.

(责任编辑: 张 平)