

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2026.05.004

万思屹, 李美华, 于晓涵, 等. 类系统肽 HypSys 增强植物黄萎病抗性及其机制 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2026, 48(5): 39-50.

# 类系统肽 HypSys 增强植物黄萎病抗性及其机制

万思屹, 李美华, 于晓涵, 叶兴怡,  
郑雪丽, 李慧, 刘庭, 李先碧

西南大学 农学与生物科技学院/重庆市作物分子改良重点实验室, 重庆 400715

**摘要:** 大丽轮枝菌引起的棉花黄萎病严重威胁着我国棉花的生产, 筛选鉴定提高植物抗黄萎病的基因, 解析其作用机制, 对培育抗病新种质具有重要意义。为阐明番茄和烟草类系统肽 HypSys 调控植物对黄萎病的抗性及其作用机制, 首先合成番茄 SlHypSys 成熟肽, 通过外源施用评估其在黄萎病防御中的作用; 然后构建过表达 *NtHypSys* 或 *SlHypSys* 前体基因的转基因拟南芥、烟草和棉花, 并利用灌根接种法对转基因植株进行抗病鉴定; 再利用 RT-qPCR 方法检测水杨酸(SA)、茉莉酸(JA)和一氧化氮(NO)防御信号途径标记基因 *PR1*、*PDF1.2* 和 *NOS1* 的表达模式。结果显示: 外源施用 10  $\mu\text{mol/L}$  SlHypSys 可提高拟南芥、烟草和棉花对黄萎病的抗性, 病情指数下降 29.23%~58.00%。过表达 *NtHypSys* 或 *SlHypSys* 前体基因可显著提高拟南芥、烟草和棉花纯合株系对黄萎病的抗性, 病情指数较非转基因植株分别降低 58.59%~78.22%、69.60%~82.05% 和 64.13%~74.84%。接种黄萎病菌后, SA、JA 和 NO 信号途径标记基因 *PR1*、*PDF1.2* 和 *NOS1* 在 SlHypSys 处理和转基因植株中上调水平最高可以达到 6.5、38.3 和 3.5 倍。综合表明: 番茄和烟草的类系统肽 HypSys 可通过激活植物防御反应信号途径, 进而提高植物对黄萎病的抗性。

**关键词:** 类系统肽 HypSys; 黄萎病; 防御信号途径; 转基因植株; 抗性

中图分类号: S432

文献标识码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



文章编号: 1673-9868(2026)05-0039-12

## Function and Mechanism of Systemin-like Peptide HypSys in Enhancing Plant Resistance against Verticillium wilt

WAN Siyi, LI Meihua, YU Xiaohan, YE Xingyi,  
ZHENG Xueli, LI Hui, LIU Ting, LI Xianbi

College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University/Chongqing Key Laboratory of  
Crop Molecular Improvement, Chongqing 400715, China

收稿日期: 2025-08-04

基金项目: 国家自然科学基金项目(32572397, 31071463); 重庆市基础科学与前沿技术研究专项(CSTC2017JCYJB0316)。

作者简介: 万思屹, 硕士研究生, 主要从事基因功能研究。

通信作者: 李先碧, 博士, 副研究员, 硕士研究生导师。

**Abstract:** Cotton Verticillium wilt caused by *Verticillium dahliae* seriously threatens cotton production in China. Screening and identifying genes that enhance plant defense against Verticillium wilt, and elucidating their mechanisms of action, are of great significance for developing disease-resistant germplasm. To elucidate the regulatory role and mechanism of systemin-like peptides HypSys from tomato and tobacco in plant resistance against Verticillium wilt, the mature peptide SlHypSys from tomato was synthesized, and its efficacy against Verticillium wilt was evaluated through exogenous application. Transgenic Arabidopsis, tobacco, and cotton plants overexpressing the precursor genes *NtHypSys* or *SlHypSys* were constructed, and disease resistance of the transgenic plants was assessed using root drenching-inoculation. RT-qPCR was employed to analyze the expression pattern of defense signaling pathway marker genes *PR1* (salicylic acid, SA), *PDF1.2* (jasmonic acid, JA), and *NOS1* (nitric oxide, NO). Results demonstrated that exogenous application of 10  $\mu\text{mol/L}$  SlHypSys enhanced resistance to Verticillium wilt in Arabidopsis, tobacco, and cotton, reducing disease index by 29.23%–58.00%. Overexpression of *NtHypSys* or *SlHypSys* precursor genes significantly improved resistance to Verticillium wilt in homozygous transgenic Arabidopsis, tobacco, and cotton. Compared with non-transgenic plants, the disease index of the corresponding transgenic lines decreased by 58.59%–78.22%, 69.60%–82.05% and 64.13%–74.84%, respectively. Following *V. dahliae* inoculation, the expression levels of *PR1*, *PDF1.2*, and *NOS1* in SlHypSys-treated and transgenic plants were upregulated by up to 6.5-fold, 38.3-fold, and 3.5-fold, respectively. These findings indicate that the systemin-like peptides HypSys of tomato and tobacco play a crucial role in plant defense against Verticillium wilt by activating defense signaling pathways.

**Key words:** systemin-like peptide HypSys; Verticillium wilt; defense signaling pathway; transgenic plant; resistance

黄萎病是一种主要由大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)侵染引起的土传维管束病害。黄萎病菌能够侵染马铃薯、茄子、番茄、向日葵和棉花等 600 多种植物,特别是双子叶植物几乎都能被侵染,给我国乃至世界农业生产造成严重的经济损失<sup>[1]</sup>。在我国,黄萎病对棉花生产的威胁尤为突出,据统计,棉花黄萎病年发病面积占植棉区 50% 以上,一般导致减产 10%~30%,严重田块减产达 80% 甚至绝收,每年直接经济损失高达 15 亿~20 亿元<sup>[2-4]</sup>。由于黄萎病病原菌可在土壤中存活数十年,且宿主范围广、传播途径多、变异频繁,因而防治难度大<sup>[5-7]</sup>。因棉花栽培中缺乏广谱持久抗性的抗原,加之难以防治,黄萎病被称为棉花的“癌症”<sup>[2]</sup>。因此,挖掘可利用的基因资源并阐明其抗病机制,可为棉花抗黄萎病分子育种提供理论支持。

HypSys(Hydroxyproline-rich Systemins, 富含羟脯氨酸的系统素)是植物受机械损伤或病原菌侵染时激活免疫反应的信号分子之一,是植物自身合成的小分子肽,属于系统素(Systemin, Sys)亚家族,富含羟基脯氨酸(Hydroxyproline, Hyp),其成熟肽由 18~20 个氨基酸组成,来源于有 N-末端分泌信号的前体蛋白肽<sup>[8]</sup>。HypSys 的氨基酸在通过分泌系统加工后,多聚脯氨酸会经历羟基化,随后再糖基化<sup>[9-10]</sup>。这类系统肽通过结构修饰、信号转导及代谢调控在植物防御中发挥着重要作用<sup>[8-9,11-13]</sup>。HypSys 最初在研究烟草系统性创伤信号时被发现,之后陆续在番茄、马铃薯、甘薯等茄科和旋花科植物中发现了它的同源基因。HypSys 通过介导细胞间或系统性的信号传递,协调植物的局部和整体性防御反应<sup>[14]</sup>,它们之间没有明显的序列相似性,但都可以被创伤诱导,激活蛋白酶抑制剂、茉莉酸(JA)或乙烯(ET)信号通路以及昆虫防御的相关基因,进而影响昆虫的取食或消化功能,达到抗虫的效果<sup>[10,12,15]</sup>。烟草中组成型表达 HypSys 的前体基因 *TobpreproHypSys-A*,可显著增强烟草对棉铃虫(*Helicoverpa armigera*)幼虫的抗性<sup>[16]</sup>;过表达 *IbpreproHypSys* 的甘薯能显著抑制斜纹夜蛾(*Spodoptera litura*)幼虫的生长<sup>[17]</sup>。植物的 HypSys 也能激活植物防御素基因,或诱导病程相关蛋白基因的表达,或增强抗氧化酶活性,减轻病原菌侵染引起的氧化应激,进而在病原菌的防御中发挥作用<sup>[12,15,18-19]</sup>。烟草和拟南芥中组成型表达番茄系统素前体蛋白(Prosystemin, Pro-SYS)能提高烟草和拟南芥对死体营养型真菌灰霉菌(*Botrytis*

*cinerea*) 的抗性<sup>[20-21]</sup>; 外源施用来自番茄的 HypSys 可增强拟南芥对死体营养型真菌黄瓜棘孢菌(*Plectosphaerella cucumerina*) 的抗性<sup>[22]</sup>。研究表明, HypSys 在植物对死体营养型病原菌和病毒病的防御中具有重要作用<sup>[21-24]</sup>。

引起黄萎病的大丽轮枝菌为兼性营养型病原菌, 植物能通过激活 JA 信号途径提高对黄萎病的防御能力<sup>[25]</sup>。HypSys 也能激活 JA 信号通路, 而 HypSys 是否影响植物对黄萎病菌的防御尚不清楚。为了阐明 HypSys 对黄萎病抗性的影响以及黄萎病菌侵染过程中 HypSys 的可能作用机制, 本研究首先通过外施方法, 阐明 HypSys 对黄萎病抗性的影响; 其次利用组成型表达 HypSys 前体基因的转基因材料, 研究 HypSys 能否稳定提高植物对黄萎病的抗性; 再利用 RT-qPCR(实时荧光定量 PCR)方法检测防御信号途径标记基因表达水平的变化, 分析 HypSys 影响植物黄萎病抗性的可能作用机制, 以阐明其在植物抵抗黄萎病菌侵染中的作用及其作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料与菌株

植物材料: 使用的植物材料分别为哥伦比亚生态型(Columbia ecotype)拟南芥、Sanmon 烟草、本氏烟、陆地棉栽培种冀棉 14 号。黄萎病菌菌株: 落叶型强致病力菌株 V991。工程菌: 农杆菌感受态细胞 LBA4404 和 GV3101, 大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ 。

### 1.2 SIHypSys 的合成和外施处理

SIHypSys 成熟肽(序列为 GRHDSVLPPSPKTDPII)<sup>[12]</sup>, 由南京强耀生物有限公司合成, 用无菌双蒸水溶解, 调整浓度至 10  $\mu$ mol/L。完全生长的拟南芥、本氏烟和棉花叶片用 SIHypSys 溶液浸润的吸水纸包裹离体叶片的叶柄, 并于叶片表面均匀喷洒 SIHypSys 溶液进行处理, 喷施水的处理为对照。外施处理试验重复进行 3 次, 每次试验中, 拟南芥、本氏烟草和棉花用 SIHypSys 和水处理叶片各 30 叶, 所有处理的叶片均接种病原菌进行抗性分析。

### 1.3 RNA 提取和 cDNA 的合成

取少许样品组织, 利用 Eastep<sup>®</sup> Super 总 RNA 提取试剂盒(LS1040, Promoga), 按说明书提供的操作程序提取 RNA; 然后利用 TaKaRa 的 PrimeScript<sup>™</sup> RT reagent Kit with gDNA Eraser(RR047A)反转录试剂盒, 按说明书提供的程序合成一链 cDNA。

### 1.4 NtHypSys 和 SIHypSys 前体基因过表达载体构建

NCBI 搜索 NtHypSys 和 SIHypSys 前体的编码序列(Gene ID: AY033148.1 和 AY292201), 依据序列登录号 NC\_134094.1 和 NC\_09080 分别设计 NtHypSys 和 SIHypSys 前体基因 PCR 扩增引物(表 1), 利用 NtHypSys F 和 NtHypSys R 引物对扩增 NtHypSys 前体基因的 CDS(Coding sequence, 编码序列)序列; SIHypSys F 和 SIHypSys R 引物对扩增 SIHypSys 前体基因的 CDS 序列。

表 1 NtHypSys 和 SIHypSys 前体基因 CDS 序列扩增引物

引物名称	引物序列(5'-3')	产物大小/bp
NtHypSys F	CGCGGATCCGCGATGAGAGTTCTGTTTCTCATC	498
NtHypSys R	CGGGGTACCCCGTAATAGGAGTGAAGAGGACGC	
SIHypSys F	CGCGGATCCGCGATGATCAGCTTCTTCAGAGC	453
SIHypSys R	CGGGGTACCCCGTAAATAGGAAGCTTGAAGAGGC	

4 周龄本氏烟和番茄叶片, 于叶柄基部用镊子轻轻夹伤, 损伤处理 4~6 h, 按 1.3 的方法提取 RNA 和合成 cDNA, 然后以 cDNA 作为模板, 利用设计的引物(表 1)和 Primes STAR MAX DNA Polymerase 进行 PCR 扩增, 扩增程序为 98  $^{\circ}$ C 3 min; 98  $^{\circ}$ C 10 s, 55  $^{\circ}$ C 15 s, 72  $^{\circ}$ C 10 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 并利用胶回收试剂盒回收目的片段, 然后按图 1 的流程图构建 NtHypSys 和 SIHypSys 前体基因的过表达载体。

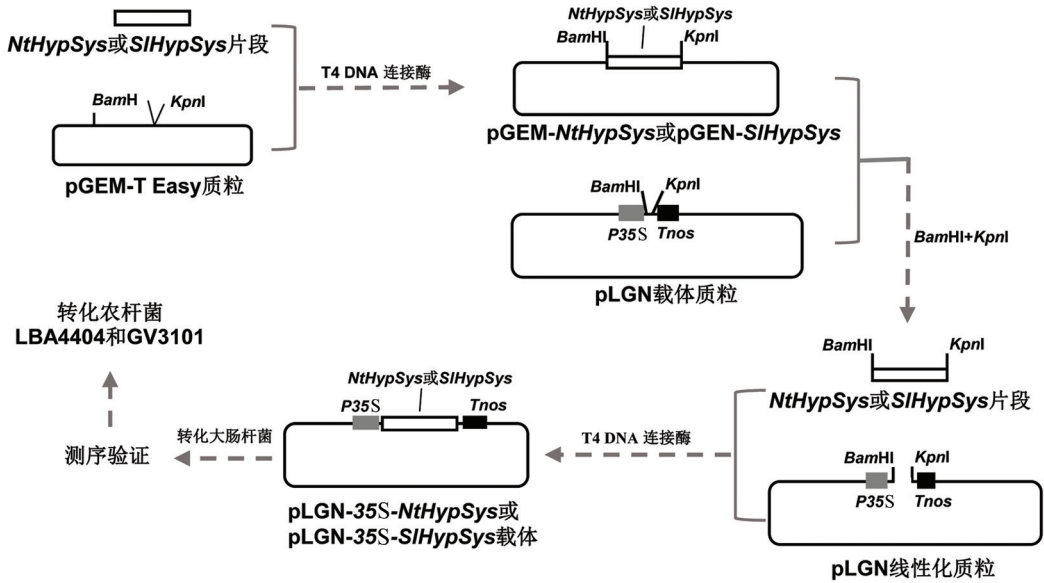


图 1 载体构建流程图

## 1.5 拟南芥、烟草和棉花的遗传转化

参照 Clough 等<sup>[26]</sup>农杆菌介导的浸花转化法转化拟南芥, 并利用 Harrison 等<sup>[27]</sup>的方法筛选具有抗生素抗性的拟南芥幼苗。参照 Zheng 等<sup>[28]</sup>农杆菌介导的叶盘转化法, 以 Sanmon 无菌烟草叶片为材料, 转化烟草; 参照 Luo 等<sup>[29]</sup>以冀棉 14 号无菌下胚轴为受体, 农杆菌介导的棉花遗传转化法转化棉花。

## 1.6 转基因植株的分子鉴定及纯合株系的筛选

### 1.6.1 转基因拟南芥的分子鉴定及纯合株系的筛选

参照 Harrison 等<sup>[27]</sup>的方法进行抗生素抗性筛选, 获得具有卡那霉素抗性的植株。然后参照 Jefferson<sup>[30]</sup>的方法, 所有卡那霉素抗性植株均进行 GUS( $\beta$ -葡萄糖醛酸糖苷酶)组织化学染色检测, 获得转基因植株。进一步对所有 GUS 染色阳性植株进行 RT-qPCR 检测, 筛选表达水平显著提高的植株用于功能分析。RT-qPCR 检测的内标基因为 *AtACT3* (基因登录号 AT3G53750), 设置 3 个技术重复。RT-qPCR 的 20  $\mu$ L 反应体系包括: cDNA 模板 1  $\mu$ L, 基因上下游引物各 1  $\mu$ L, 2 $\times$ Taq SYBR Green qPCR Premix 10  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu$ L。扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 94  $^{\circ}$ C 10 s, 57  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 共扩增 40 个循环。扩增完成后利用 Gene study 软件分析样本中目的基因的表达量, 所有表达检测引物均用 Primer Premier 5 软件设计, 序列见表 2。

转基因拟南芥纯合株系的筛选: 每个转化子分单株收获种子, T<sub>2</sub> 代开始, 单株收获的种子取少许 (100 粒以上) 水培至种子萌发产生胚根, 然后进行 GUS 组织化学染色, 若所有幼苗均能染成蓝色, 则这个单株为纯合株系。如果 T<sub>2</sub> 代没有筛选到纯合的株系, T<sub>3</sub> 代继续按此方法进行筛选。

### 1.6.2 转基因烟草的分子鉴定及纯合株系的筛选

转基因烟草再生过程中利用卡那霉素进行筛选, 再生植株利用 GUS 组织化学染色进行鉴定, 再利用 RT-qPCR 方法检测转基因的表达水平, 筛选表达水平显著提高的转基因株系进行基因功能分析。

转基因烟草纯合转化子的筛选和表达水平检测方法同 1.6.1。RT-qPCR 检测的内标基因为 *NtGAP-DH* (LOC107817246), 引物见表 2, 设置 3 个技术重复。

### 1.6.3 转基因棉花的分子鉴定及纯合株系的筛选

转基因棉花再生过程中利用卡那霉素进行筛选, 再生植株的 GUS 组织化学染色和 RT-qPCR 检测方法同 1.6.1。RT-qPCR 检测的内标基因为 *GhHIS3* (AF024716), 引物序列见表 2, 设置 3 个技术重复。

转基因棉花纯合株系的筛选: T<sub>2</sub> 代转基因棉花开花前 1 d, 利用自交夹封闭花朵进行自交, 挂牌标记开花日期, 每株取开花后 20 d 的棉桃 2 个, 剥取每粒种子的子叶, 逐一进行 GUS 组织化学染色, 若子叶能全部着蓝色, 则这个单株及其后代为纯合株系。

表 2 表达水平检测引物

引物名称	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')	产物大小/bp
<i>NtHypSys</i>	AGGAATTGACGGAAGGGCA	GTGCGGCCAGAACATCTAAG	131
<i>SlHypSys</i>	TTACCACCTCCTTCTCCC	TACATAATCGTGCCTCCC	140
<i>AtACT3</i>	TATCGCTGACCGTATGAG	CTGAGGGAAGCAAGAATG	126
<i>NtGAPDH</i>	TGGGTGTCAACGAGAAGGAA	TCTGGGTGGCAGTAAGGGA	132
<i>GhHIS3</i>	CCGTCCTGGAAGTGTGCTCT	ACCCACAAGGTATGCCTCTGC	184

### 1.7 黄萎病菌侵染后, 防御信号途径标记基因转录表达水平检测

外施 *SlHypSys* 拟南芥植株, 接种黄萎病菌前(0 h)和接种后 6、12、24、36、48、60、72 h 的叶片; 转基因和野生型(WT)拟南芥植株, 接种黄萎病菌前(0 h)和接种后 12、24、36、48 h 的叶片, 利用 1.3 的方法提取 RNA 和合成一链 cDNA, 然后以 cDNA 为模板, 利用 RT-qPCR 方法检测 SA 信号途径的标记基因 *AtPRI* (AT2G14610)或 *AtNPR1* (AT1G64280)、JA 信号途径标记基因 *AtPDF1.2* (AT5G44420)、NO 信号途径标记基因 *AtNOS1* (AT3G47450)的表达水平。按照 1.6 方法进行 RT-qPCR 扩增, 引物序列见表 3, 设置 3 个技术重复。所有基因表达检测引物均参照 TAIR 数据库(<https://www.arabidopsis.org/>)中的基因序列, 以 *AtACT3* 为内参基因, 利用 Primer Premier 5 软件设计。

表 3 防御信号途径标记基因表达水平检测引物

引物名称	正向序列(5'-3')	反向序列(5'-3')	产物大小/bp
<i>AtPRI</i>	GCAGATTGTATGCTCGTA	ACTGTTTCTCATTGACCC	182
<i>AtNPR1</i>	CGCCGGCGGAGATTACTTCACT	GGACTCCTCGCCGACAAAATG	181
<i>AtPDF1.2</i>	CCCTGGAATATGCCTTACC	CCTTCTGAGGATTTTGCTAC	106
<i>AtNOS1</i>	GCTCCGTTACAAACTTCCG	CCATTACCACCAACTGCTG	240

### 1.8 *SlHypSys* 处理的拟南芥、烟草和棉花叶片对黄萎病的抗性鉴定

甘油保存的黄萎病菌 V991 菌株, 挑取少许接种至 PDA(马铃薯葡萄糖琼脂培养基)平板, 26 °C 暗培养 14 d, 再刮取孢子接种至 100 mL 的 PDB(马铃薯葡萄糖肉汤)培养基, 26 °C, 200 r/min 振荡培养 7 d, 4 层纱布过滤去除菌丝, 滤液 5 000 r/min 室温离心 5 min, 收集孢子, 用去离子水调整孢子浓度为  $1.0 \times 10^{10}$  个/mL。

喷施 *SlHypSys* 的叶片表面晾干后, 用吸头在棉花和本氏烟叶片主叶脉上轻轻挤压损伤 2 个点, 拟南芥叶片在主叶脉中部损伤 1 个点, 然后每个点接种 5  $\mu$ L 孢子浓度为  $1.0 \times 10^{10}$  个/mL 的黄萎病菌孢子悬浮液, 保湿培养 7 d 后, 按照 5 级统计叶片的病级和病情指数。*SlHypSys* 处理离体叶片的抗病分析试验重复进行 3 次, 每次处理和接种的拟南芥、棉花和烟草的叶片均为 30 叶。根据叶片的发病面积进行病级统计, 分级标准为: 0 级: 整个叶片均无病症; 1 级: 叶片发病面积为(0~25%]; 2 级: 叶片发病面积为(25%~50%]; 3 级: 叶片发病面积为(50%~75%]; 4 级: 叶片发病面积超过 75%<sup>[31]</sup>。

$$I_{\text{病情}} = \left[ \frac{\sum (N_{\text{病叶}} \times G_{\text{相应}})}{N_{\text{总叶}} \times G_{\text{最高}}} \right] \times 100\% \quad (1)$$

式中:  $I_{\text{病情}}$  为叶片病情指数;  $N_{\text{病叶}}$  为各级病叶数;  $G_{\text{相应}}$  为相应级数;  $N_{\text{总叶}}$  为调查总叶数;  $G_{\text{最高}}$  为最高级别值。

### 1.9 转基因拟南芥、烟草和棉花对黄萎病的抗性鉴定

1.8 中培养的黄萎病菌液, 用去离子水调整孢子浓度分别为  $1.0 \times 10^7$ 、 $1.0 \times 10^8$  个/mL, 用于转基因棉花、拟南芥和烟草植株的接种。

转基因拟南芥的抗病鉴定: 按 1.6.1 的方法获得纯合的转基因拟南芥株系,  $T_3$  代纯合的 *SlHypSys* 和 *NtHypSys* 转基因拟南芥, 每转化子随机选取 30 株生长均匀、6~8 叶的植株, 利用灌根接种法, 接种

孢子浓度为  $1.0 \times 10^8$  个/mL 的黄萎病菌孢子液 10 mL/株, 然后 12 h 光照(26 °C)、12 h 黑暗(20 °C)条件培养。接种 14 d, 按照 5 级统计法统计植株的病级, 计算每个转化子的病情指数。T<sub>1</sub> 代转基因拟南芥 GUS 染色分离的不着蓝色的植株为非转基因植株, 这部分植株进行繁殖, 用作抗病鉴定的对照, 试验重复 3 次。

转基因烟草和棉花的抗病鉴定: 按 1.6.2 和 1.6.3 的方法筛选转基因烟草和棉花的纯合株系, 纯合 T<sub>3</sub> 代 *NtHypSys*、*SlHypSys* 转基因烟草或棉花幼苗, 利用灌根接种法, 棉花每株灌 10 mL 孢子浓度为  $1.0 \times 10^7$  个/mL 的黄萎病菌孢子悬浮液, 烟草每株灌 50 mL 孢子浓度为  $1.0 \times 10^8$  个/mL 的黄萎病菌孢子悬浮液, 接种后幼苗的培养条件为 16 h 光照(28 °C), 8 h 黑暗(20 °C)。接种 14 d 和 20 d, 分别统计棉花和烟草植株的病级和转化子的病情指数, 试验重复 3 次。

植株病级的分级方法: 根据叶片发病比率进行病级统计, 分级标准<sup>[31-32]</sup>: 0 级: 整个植株均无病症; 1 级: 发病叶片占(0~25%]; 2 级: 发病叶片占(25%~50%]; 3 级: 发病叶片占(50%~75%]; 4 级: 发病叶片超过 75%。植物对黄萎病的抗性用植株病情指数进行评价。

$$I'_{\text{病情}} = \left[ \frac{\sum (N_{\text{病株}} \times G_{\text{相应}})}{(N_{\text{总株}} \times G_{\text{最高}})} \right] \times 100\% \quad (2)$$

式中:  $I'_{\text{病情}}$  为植株病情指数;  $N_{\text{病株}}$  为各级病株数;  $N_{\text{总株}}$  为调查总株数。

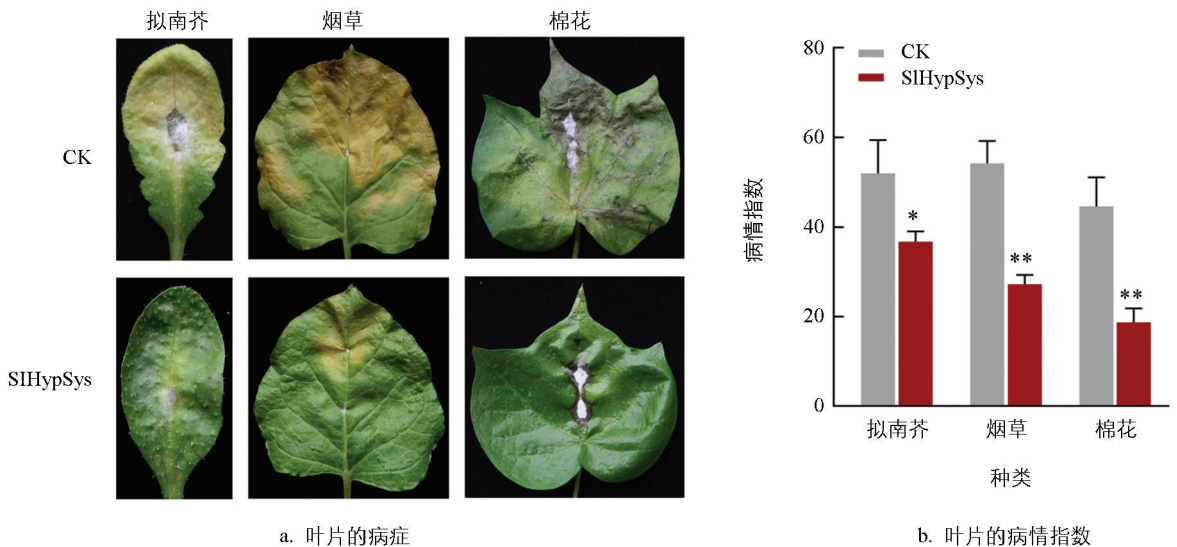
### 1.10 数据分析

所有数据都以  $\bar{x} \pm s$  表示, 用  $t$  检验分析对照和处理、转基因和非转基因植株间的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 外施番茄类系统肽 *SlHypSys* 能提高拟南芥、烟草和棉花对黄萎病的抗性

为了分析 *HypSys* 在植物中防御黄萎病的作用, 人工合成了番茄 *SlHypSys* 成熟肽, 并对植物叶片进行喷施处理。植物叶片喷施 *SlHypSys* 后, 定点接种黄萎病菌 V991 菌株。结果显示: 接种菌株 5 d, *SlHypSys* 处理的拟南芥、烟草和棉花叶片失绿黄化或萎蔫的病症面积明显较水处理对照更小(图 2a)。病情指数统计结果显示: 10  $\mu\text{mol/L}$  *SlHypSys* 处理的拟南芥、烟草和棉花的病情指数分别为 36.78、27.22 和 18.75, 相比水处理对照的 51.97、54.25 和 44.64, 分别下降 29.23%、49.82% 和 58.00%, 达到极显著水平(图 2b)。这些结果表明, 外施 *SlHypSys* 能够提高拟南芥、烟草和棉花对黄萎病的抗性。



\* 表示  $p < 0.05$ , \*\* 表示  $p < 0.01$ , 差异有统计学意义, 下同。

图 2 外施 *SlHypSys* 的拟南芥、烟草和棉花叶片对黄萎病的抗性分析

### 2.2 *SlHypSys* 能提高防御信号途径标记基因的表达

为了明确黄萎病菌侵染过程中 *SlHypSys* 影响植物黄萎病抗性的机制, 利用 RT-qPCR 方法检测

SlHypSys 诱导防御信号途径标记基因的表达模式。结果显示: 与喷施水的对照相比, 黄萎病菌侵染过程中, 喷施 SlHypSys 植株 *PR1* 的表达水平在接种后 60 h 大幅提高, 接种 12 h 时提高了 6.5 倍(图 3a)。 *PDF1.2* 的表达水平从 12 h 开始提高, 与喷施水的对照植株相比, 喷施 SlHypSys 植株在接种 72 h 时 *PDF1.2* 的表达水平提高了 38.3 倍(图 3b)。 *NOS1* 的表达水平也有一定程度的提高, 最高在接种后 60 h 达到 3.5 倍(图 3c)。这些结果表明, 黄萎病菌侵染期间, 外施 SlHypSys 可以提高 SA、JA 和 NO 信号途径标记基因 *PR1*、*PDF1.2* 和 *NOS1* 的表达水平。

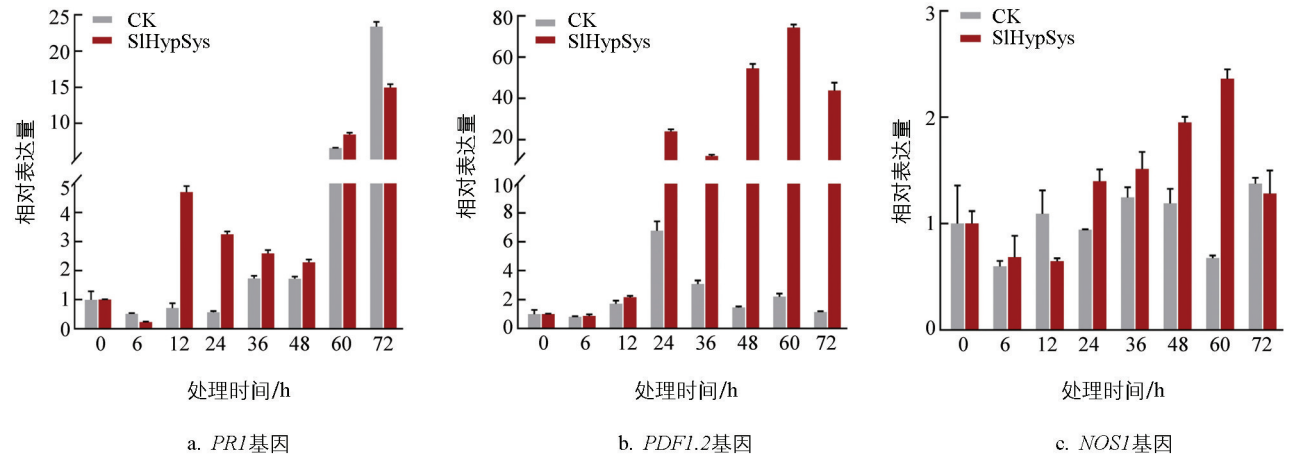


图 3 SlHypSys 处理的拟南芥叶片接种黄萎病菌后, *PR1*、*PDF1.2* 和 *NOS1* 的表达模式

### 2.3 过表达 *SlHypSys* 和 *NtHypSys* 前体基因能提高拟南芥和烟草对黄萎病的抗性

为进一步阐明 HypSys 在黄萎病菌侵染过程中的作用, 利用 PCR 扩增法分别获得 SlHypSys 和 NtHypSys 前体的编码序列, 构建其过表达的植物表达载体 pLGN-35S-SlHypSys 和 pLGN-35S-NtHypSys(图 4a)。利用根癌农杆菌介导的遗传转化法将这两个载体分别转入拟南芥和烟草, 经卡那霉素抗性筛选、GUS 组织化学染色和 RT-qPCR 分析, 最终获得 5 个烟草和 11 个拟南芥的 *NtHypSys* 转化子、6 个烟草和 12 个拟南芥的 *SlHypSys* 转化子。

RT-qPCR 结果显示, 转基因拟南芥和烟草纯合株系中 *NtHypSys* 和 *SlHypSys* 都能稳定表达(图 4c-4d 和图 5b-5c)。拟南芥浸根接种的抗病鉴定结果显示, 接种黄萎病菌 14 d, 转基因株系中分离的非转基因对照植株叶片(CK)出现大面积失绿变黄等典型的黄萎病病症, 但转基因植株仅底部少数叶片出现了病症(图 4b)。 *NtHypSys*-1、*NtHypSys*-8、*SlHypSys*-3 和 *SlHypSys*-15 转化子的病情指数分别为 13.19、11.04、13.52 和 20.99, 与非转基因对照(50.69)相比, 转基因株系的病情指数极显著降低, 降低比率分别为 73.98%、78.22%、73.33%和 58.59%(图 4e)。转基因烟草抗病鉴定结果显示, 转基因株系中分离的非转基因对照植株(CK)多数叶片出现失绿变黄的黄萎病病症, 而转基因植株仅底部叶片变黄(图 5a)。 *NtHypSys*-2、*NtHypSys*-14、*SlHypSys*-1 和 *SlHypSys*-4 转化子的病情指数分别为 9.87、13.07、9.11 和 15.43, 极显著低于非转基因对照的 50.74, 病情指数下降比率分别为 80.55%、74.24%、82.05%和 69.60%(图 5d)。这些结果表明, 过表达来自烟草和番茄的类系统素前体基因 *SlHypSys* 和 *NtHypSys* 能显著提高拟南芥和烟草对黄萎病的抗性。

### 2.4 过表达 *SlHypSys* 前体基因能提高棉花对黄萎病的抗性

利用根癌农杆菌介导法将 *SlHypSys* 转入棉花, 经卡那霉素抗性筛选和严格的分子鉴定后, 获得独立转化子 5 个。灌根接种法接种黄萎病菌 V991 菌株 14 d, 转基因株系分离的非转基因对照植株叶片出现严重失绿的黄萎病病症, 而转基因株系仅下部叶片出现了病症(图 6a)。RT-qPCR 结果表明, *SlHypSys* 在转基因棉花中得到有效表达(图 6b)。 *SlHypSys*-1 和 *SlHypSys*-5 转化子的病情指数分别为 23.61 和 16.56, 与非转基因对照(65.83)相比, 转基因株系的病情指数分别下降 64.13%和 74.84%, 达到极显著水平(图 6c)。综合表明, 棉花中过表达 *SlHypSys* 前体基因能显著提高棉花对黄萎病的抗性。

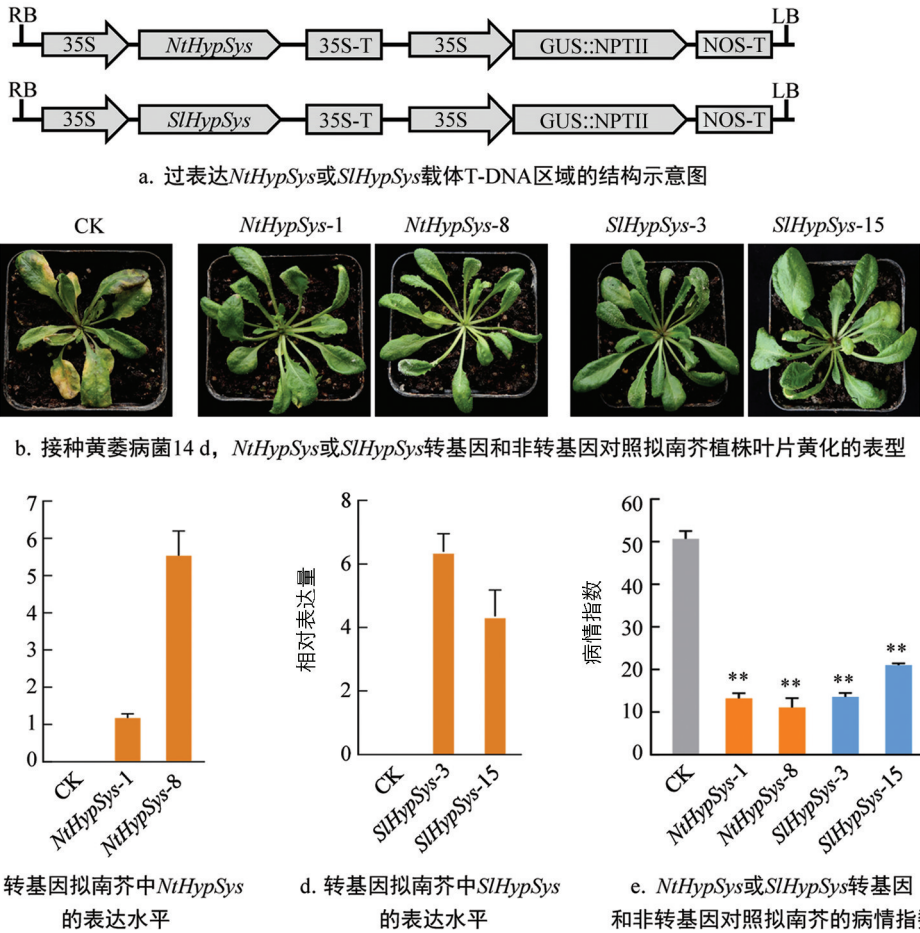


图 4 *NtHypSys* 和 *SlHypSys* 转基因拟南芥对黄萎病的抗性分析

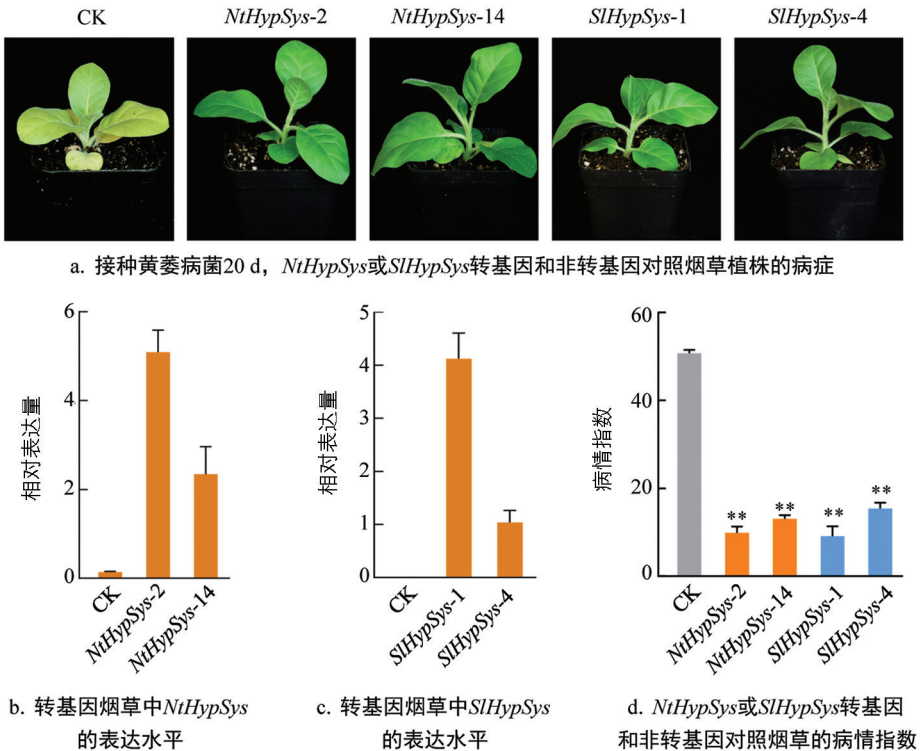
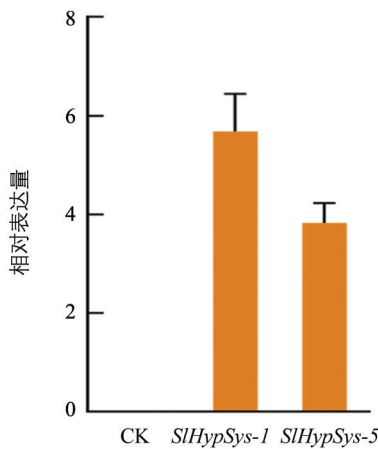
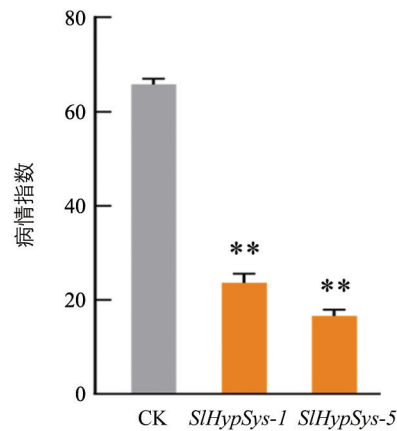


图 5 *NtHypSys* 和 *SlHypSys* 转基因烟草对黄萎病的抗性分析

a. 接种黄萎病菌 14 d, *SIHypSys* 转基因和非转基因棉花的病症b. 转基因棉花中 *SIHypSys* 的表达水平c. *SIHypSys* 转基因和非转基因对照棉花的病情指数图 6 *SIHypSys* 转基因棉花对黄萎病的抗性分析

## 2.5 黄萎病菌侵染过程中, *SIHypSys* 和 *NtHypSys* 能促进防御信号途径标记基因的表达

为进一步阐明 *HypSys* 能提高植物对黄萎病抗性的机制, 利用 RT-qPCR 方法检测接种黄萎病菌后转基因拟南芥中 SA、JA 和 NO 信号途径标记基因的表达模式。结果显示, 接种黄萎病菌后 12 h 和 24 h, *NtHypSys* 转基因拟南芥中 *RP1*、*NPR1*、*PDF1.2* 和 *NOS1* 的转录表达水平均明显高于对照; *SIHypSys* 转基因拟南芥接种黄萎病菌后的 12 h 和 48 h, *RP1*、*NPR1*、*PDF1.2* 和 *NOS1* 的转录表达水平也高于对照(图 7)。 *PR1* 表达水平提高主要集中在接种黄萎病菌后 36 h 以内, 而 *PDF1.2* 和 *NOS1* 表达水平提高持续时间更久。结果显示, 拟南芥中异源表达 *SIHypSys* 和 *NtHypSys* 前体基因能有效提高防御反应信号途径标记基因 *PR1*、*NPR1*、*PDF1.2* 和 *NOS1* 的转录表达水平, 表明 *NtHypSys* 和 *SIHypSys* 能通过激活植物的 SA、JA 和 NO 防御信号途径提高植物对黄萎病的抗性。

## 3 讨论与结论

### 3.1 讨论

#### 3.1.1 类系统肽 *HypSys* 在植物兼性营养型病原菌防御中具有重要作用

Molisso 等<sup>[33]</sup> 研究表明, 外施 Systemin 可以提高茄子和葡萄对灰葡萄孢的抗性。多位学者的研究表明, 在番茄和拟南芥中组成型表达来自番茄的系统素前体基因 *Prosystemin*, 不仅能提高番茄对灰葡萄孢 (*B. cinerea*) 和链格孢菌 (*A. alternata*) 的抗性, 还能提高拟南芥对灰葡萄孢和病毒病的抗性<sup>[21, 23-24]</sup>。 Pastor-Fernández 等<sup>[22]</sup> 研究发现外施来自番茄的 *HypSys* 可以提高拟南芥对褐斑病菌 (*Plectosphaerella cucumerina*) 的抗性。上述研究表明, 外源应用和内源增加 *HypSys* 或 *Sys* 的水平能提高植物对死体营养

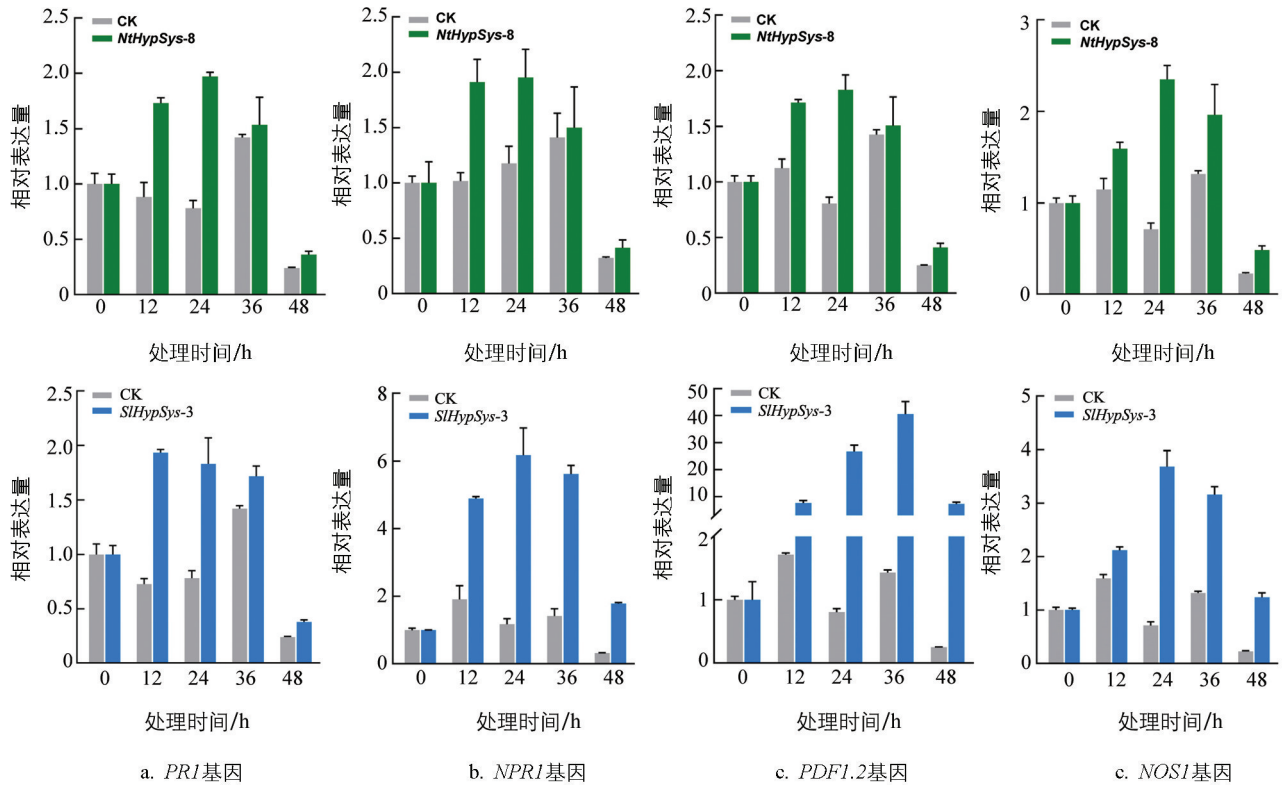


图 7 黄萎病菌侵染期间, *NtHypSys* 和 *SIHypSys* 转基因拟南芥中 *PR1*、*NPR1*、*PDF1.2* 和 *NOS1* 的表达模式

型病原菌的抗性。本研究发现,不管是外施还是通过转基因手段提高拟南芥、烟草和棉花内 HypSys 的水平,都可以有效提高其对黄萎病的抗性。黄萎病的致病菌大丽轮枝菌是一种土传维管束病原菌,具兼性营养特性<sup>[5]</sup>,能通过植物的根或损伤部位侵染植物,然后在植物的维管组织内繁殖并扩展,加剧对植物的危害。HypSys 或 Sys 等植物防御信号肽的前体蛋白或成熟肽在维管组织中积累,并在维管束内放大防御信号<sup>[14]</sup>,因此推测 HypSys 可能通过在维管束内放大防御信号与黄萎病菌的侵染在空间上发生重叠,从而发挥一定的防御作用。

### 3.1.2 HypSys 通过激活 SA、JA 和 NO 等信号途径提高植物对黄萎病菌的防御能力

Pearce 等<sup>[19]</sup>研究表明,来自矮牵牛的 HypSys 前体蛋白能特异性激活病原菌防御相关基因 *defensin1* 的表达;Bhattacharya 等<sup>[12]</sup>利用外源供给的方式研究了马铃薯的 HypSys(*StHypSys*)对病原菌防御相关基因表达的影响,结果表明, *StHypSys* 能激活谷胱甘肽-S-转移酶 *GST3*、水杨酸信号通路基因 *PAD4* 和 *NPR1* 等相关基因的表达;Pastor-Fernández 等<sup>[22]</sup>研究表明, Systemin 和 HypSys 增强植物的抗病性依赖于茉莉酸(JA)信号途径,并能在病原体侵染时增强由病原相关分子模式触发的免疫反应(PTI)。Bhattacharya 等<sup>[12]</sup>则发现, HypSys 能诱导 ROS 的产生,进而提高植物对病虫害的抗性。在褐斑病菌侵染拟南芥时,系统素将激活 MAPK 信号途径,引发 MPK3 和 MPK6 的磷酸化,进而提高拟南芥对褐斑病的抗性<sup>[34]</sup>。本研究以拟南芥为材料,通过外施来自番茄的 HypSys,发现在黄萎病菌侵染过程中, *SIHypSys* 能激活 SA、JA 和 NO 信号途径标记基因 *PR1*、*PDF1.2* 和 *NOS1* 的转录表达水平(图 3),进一步在稳定遗传的转基因拟南芥中进行了类似的检测,结果显示,接种黄萎病菌后, *NtHypSys* 和 *SIHypSys* 转基因拟南芥中 *PR1*、*NPR1*、*PDF1.2* 和 *NOS1* 的转录表达水平也都明显高于非转基因植株对照(图 7),表明番茄和烟草的类系统肽 HypSys 通过激活 SA、JA 和 NO 防御信号途径,进而提高植物对黄萎病的抗性。比较不同的研究结果发现,针对不同的病原菌, HypSys 激活的防御反应存在一定的差异,但都是通过激活植物免疫相关的反应提高植物的抗病性。Pastor-Fernández 等<sup>[34]</sup>的研究结果表明系统素和 HypSys 本身不具有直接的抑菌活性,本研究也发现 *SIHypSys* 没有抑菌活性,但外施应用 *SIHypSys* 和过表达 *NtHypSys*

和 *SlHypSys* 前体基因的转基因植株都能提高植物对黄萎病的抗性, 研究结果证实, HypSys 是通过激活植物免疫系统发挥保护作用。

### 3.2 结论

本研究发现, 不仅外源施加番茄的 *SlHypSys* 可以显著提高拟南芥、烟草和棉花对黄萎病的抗性, 而且过表达 *NtHypSys* 和 *SlHypSys* 前体基因的转基因拟南芥、烟草和棉花纯合株系对黄萎病的抗性也显著提高。研究还表明, HypSys 不仅在兼性营养型病原菌的防御中具有重要作用, 还能跨物种提高植物对黄萎病的抗性。综合表明, 来自茄科植物的外源 HypSys 能够被分类学上远缘的植物(如棉花和拟南芥)感知, 受病原菌诱导时激活其防御信号途径, 进而对兼性营养型病原真菌黄萎病菌(*V. dahliae*)产生抗性。该研究结果为 HypSys 在植物抗病育种中的应用提供了重要依据。

### 参考文献:

- [1] 金利容, 黄薇, 杨妮娜, 等. 大丽轮枝菌致病机理及相关致病基因研究进展 [J]. 安徽农业科学, 2021, 49(10): 15-19, 27.
- [2] 朱荷琴, 李志芳, 冯自力, 等. 我国棉花黄萎病研究十年回顾及展望 [J]. 棉花学报, 2017, 29(S1): 37-50.
- [3] SONG R R, LI J P, XIE C J, et al. An Overview of the Molecular Genetics of Plant Resistance to the *Verticillium* Wilt Pathogen *Verticillium dahliae* [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(3): 1120.
- [4] 李廷刚, 巩东营, 张倩倩. 棉花抗黄萎病遗传学研究进展 [J]. 农学学报, 2022, 12(9): 31-36.
- [5] KLOSTERMAN S J, ATALLAH Z K, VALLAD G E, et al. Diversity, Pathogenicity, and Management of *Verticillium* Species [J]. Annual Review of Phytopathology, 2009, 47: 39-62.
- [6] 徐理, 朱龙付, 张献龙. 棉花抗黄萎病机制研究进展 [J]. 作物学报, 2012, 38(9): 1553-1560.
- [7] 代培红, 胡子曜, 李秀青, 等. 棉花黄萎病相关基因 GhMYB6 的克隆与功能分析 [J]. 南方农业学报, 2022, 53(11): 3020-3027.
- [8] ZHANG H Y, ZHANG H, LIN J X. Systemin-Mediated Long-Distance Systemic Defense Responses [J]. New Phytologist, 2020, 226(6): 1573-1582.
- [9] PEARCE G, MOURA D S, STRATMANN J, et al. Production of Multiple Plant Hormones from a Single Polyprotein-Precursor [J]. Nature, 2001, 411(6839): 817-820.
- [10] NARVÁEZ-VÁSQUEZ J, OROZCO-CÁRDENAS M L, RYAN C A. Systemic Wound Signaling in Tomato Leaves is Cooperatively Regulated by Systemin and Hydroxyproline-Rich Glycopeptide Signals [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 65(6): 711-718.
- [11] PEARCE G, RYAN C A. Systemic Signaling in Tomato Plants for Defense Against Herbivores Isolation and Characterization of Three Novel Defense-Signaling Glycopeptide Hormones Coded in A Single Precursor Gene [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(32): 30044-30050.
- [12] BHATTACHARYA R, KORAMUTLA M K, NEGI M, et al. Hydroxyproline-Rich Glycopeptide Signals in Potato Elicit Signalling Associated with Defense Against Insects and Pathogens [J]. Plant Science, 2013, 207: 88-97.
- [13] ZHOU K, WU F M, DENG L, et al. Antagonistic Systemin Receptors Integrate the Activation and Attenuation of Systemic Wound Signaling in Tomato [J]. Developmental Cell, 2025, 60(4): 535-550.
- [14] YAMAGUCHI Y, PEARCE G, HUFFAKER A. Defense Signal Peptides [M] // KASTIN A J. Handbook of Biologically Active Peptides. Amsterdam: Elsevier, 2013: 5-14.
- [15] YAMAGUCHI Y, HUFFAKER A. Endogenous Peptide Elicitors in Higher Plants [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2011, 14(4): 351-357.
- [16] REN F, LU Y T. Overexpression of Tobacco Hydroxyproline-Rich Glycopeptide Systemin Precursor a Gene in Transgenic Tobacco Enhances Resistance Against *Helicoverpa armigera* Larvae [J]. Plant Science, 2006, 171(2): 286-292.
- [17] LI Y C, WAN W L, LIN J S, et al. Signal Transduction and Regulation of *IbpreproHypSys* in Sweet Potato [J]. Plant, Cell & Environment, 2016, 39(7): 1576-1587.
- [18] RUMEAU D, MAZAU D, ESQUERRÉ-TUGAYÉ M T. Hydroxyproline-Rich Glycoproteins (HRGPS) in Infected

- Plants; Signaling, Accumulation and Gene Expression [M] // Recognition in Microbe-Plant Symbiotic and Pathogenic Interactions. Berlin, Heidelberg: Springer, 1986: 377-384.
- [19] PEARCE G, SIEMS W F, BHATTACHARYA R, et al. Three Hydroxyproline-Rich Glycopeptides Derived from a Single Petunia Polyprotein Precursor *ActivateDefensin I*, a Pathogen Defense Response Gene [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(24): 17777-17784.
- [20] ROCCO M, CORRADO G, ARENA S, et al. The Expression of Tomato Prosystemin Gene in Tobacco Plants Highly Affects Host Proteomic Repertoire [J]. *Journal of Proteomics*, 2008, 71(2): 176-185.
- [21] ZHANG H Y, YU P L, ZHAO J H, et al. Expression of Tomato Prosystemin Gene in *Arabidopsis* Reveals Systemic Translocation of Its mRNA and Confers Necrotrophic Fungal Resistance [J]. *New Phytologist*, 2018, 217(2): 799-812.
- [22] PASTOR-FERNÁNDEZ J, GAMIR J, PASTOR V, et al. *Arabidopsis* Plants Sense Non-Self Peptides to Promote Resistance Against *Plectosphaerella cucumerina* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2020, 11: 529.
- [23] COPPOLA M, CORRADO G, COPPOLA V, et al. Prosystemin Overexpression in Tomato Enhances Resistance to Different Biotic Stresses by Activating Genes of Multiple Signaling Pathways [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2015, 33(5): 1270-1285.
- [24] BUBICI G, CARLUCCIO A V, STAVOLONE L, et al. Prosystemin Overexpression Induces Transcriptional Modifications of Defense-Related and Receptor-Like Kinase Genes and Reduces the Susceptibility to *Cucumber mosaic* Virus and Its Satellite RNAs in Transgenic Tomato Plants [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171902.
- [25] ZHU Y T, HU X Q, WANG P, et al. GhPLP2 Positively Regulates Cotton Resistance to *Verticillium* Wilt by Modulating Fatty Acid Accumulation and Jasmonic Acid Signaling Pathway [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 749630.
- [26] CLOUGH S J, BENT A F. Floral Dip: A Simplified Method for Agrobacterium-Mediated Transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *The Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.
- [27] HARRISON S J, MOTT E K, PARSLEY K, et al. A Rapid and Robust Method of Identifying Transformed *Arabidopsis thaliana* Seedlings Following Floral Dip Transformation [J]. *Plant Methods*, 2006, 2(1): 19.
- [28] ZHENG X L, DENG W, LUO K M, et al. The Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) 35S Promoter Sequence Alters the Level and Patterns of Activity of Adjacent Tissue-and Organ-Specific Gene Promoters [J]. *Plant Cell Reports*, 2007, 26(8): 1195-1203.
- [29] LUO M, XIAO Y H, LI X B, et al. GhDET2, a Steroid5  $\alpha$ -Reductase, Plays an Important Role in Cotton Fiber Cell Initiation and Elongation [J]. *The Plant Journal*, 2007, 51(3): 419-430.
- [30] JEFFERSON R A. Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS Gene Fusion System [J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 5(4): 387-405.
- [31] MIAO Y H, XU L, HE X, et al. Suppression of Tryptophan Synthase Activates Cotton Immunity by Triggering Cell Death via Promoting SA Synthesis [J]. *The Plant Journal*, 2019, 98(2): 329-345.
- [32] 李淑敏, 郑成彧, 张润芝, 等. 生物熏蒸对大棚连作茄子产量和黄萎病发病率影响 [J]. *东北农业大学学报*, 2017, 48(5): 35-41.
- [33] MOLISSO D, COPPOLA M, APRILE A M, et al. Colonization of *Solanum melongena* and *Vitis vinifera* Plants by *Botrytis cinerea* is Strongly Reduced by the Exogenous Application of Tomato Systemin [J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(1): 15.
- [34] PASTOR-FERNÁNDEZ J, SÁNCHEZ-BEL P, GAMIR J, et al. Tomato Systemin Induces Resistance Against *Plectosphaerella cucumerina* in *Arabidopsis* through the Induction of Phenolic Compounds and Priming of Tryptophan Derivatives [J]. *Plant Science*, 2022, 321: 111321.