

海南本地抗病小米辣响应象耳豆根结线虫侵染的 miRNA 鉴定及其靶基因预测

高 畅¹, 张志远², 刘子记³, 陈梅红⁴, 朱 婕^{1*}, 曹振木^{3*}

1. 海南大学热带农林学院(农业农村学院, 乡村振兴学院)/海南省热带园艺作物品质调控重点实验室, 海南海口 570228;
2. 浙江大学海南研究院, 海南三亚 572025; 3. 中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所, 海南海口 571101; 4. 海南缤纷园艺有限公司, 海南海口 571133

摘 要: 象耳豆根结线虫 (*Meloidogyne enterolobii*) 是一种对辣椒生产危害较大的病原物, 使用抗病品种是防治该病害最为经济、环保的手段。深入理解根结线虫抗性调控机理将有利于加速抗病育种进程。本课题组前期研究中对海南本地抗病小米辣种质 CF25 进行了接种前后的转录组数据分析, 挖掘了与根结线虫抗性相关的代谢通路。为进一步探索抗性表达调控机理, 本研究对 CF25 接种前后 sRNA 文库进行了高通量测序, 共检测到 133 个差异表达 miRNAs。以 $P \leq 0.05$ 和 $|\log_2(FC)| \geq 3$ 为筛选标准, 鉴定出 33 个显著差异表达的 miRNAs, 其中包括 19 个已知 miRNAs 和 14 个新发现 miRNAs。对 33 个显著差异表达的 miRNAs 进行靶基因预测, 共得到 373 个靶基因, 其中 miR5658-z 预测靶基因数量最多。GO 功能和 KEGG 代谢通路富集分析显示靶基因主要富集于植物-病原菌互作、信号转导等通路, 推测 miRNA 介导的信号转导及植物防御反应可能是 CF25 抗象耳豆根结线虫的重要原因。为初步验证差异表达 miRNA 和靶基因间的调控关系, 选取 6 个差异表达 miRNAs 及其靶基因进行 qRT-PCR 表达验证, 得出 miRNA 与靶基因的表达差异趋势与高通量测序结果一致, 基本符合 miRNA 负向调控靶基因表达的规律。以上研究结果表明 miRNA 可能在辣椒对根结线虫的防御反应中起到了重要作用, 为后续深入解析 miRNA 介导的根结线虫抗性机理奠定基础。

关键词: 灌木辣椒; 抗象耳豆根结线虫; sRNA 测序; miRNA; 靶基因

中图分类号: S436.418 文献标志码: A

Identification and Target Gene Prediction of miRNA Responding to the Infection of *Meloidogyne enterolobii* in Local Resistant Xiaomila Pepper of Hainan, China

GAO Chang¹, ZHANG Zhiyuan², LIU Ziji³, CHEN Meihong⁴, ZHU Jie^{1*}, CAO Zhenmu^{3*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry (School of Agriculture and Rural Affairs / School of Rural Revitalization), Hainan University / Hainan Key Laboratory for Quality Regulation of Tropical Horticultural Crops, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Hainan Research Institute, Zhejiang University, Sanya, Hainan 572025, China; 3. Institute of Tropical Crops Genetic Resources, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 4. Hainan Binfen Horticulture Co., Ltd., Haikou, Hainan 571133, China

Abstract: *Meloidogyne enterolobii* is a pathogen causing significant damages to pepper production. Utilization of resistant cultivars is the most economical and environmentally friendly method to control this disease. A deeper understanding of the regulatory mechanisms of resistance to root-knot nematodes could facilitate the breeding process of disease-resistant cultivars. In previous studies, analysis of transcriptomic data of Hainan local *M. enterolobii*-resistant pepper germplasm CF25 before and after inoculation were carried out to explore metabolic pathways closely related to

收稿日期 2025-02-04; 接受日期 2025-03-09

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 323RC412)。

作者简介 高 畅 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蔬菜遗传育种。*通信作者 (Corresponding author): 朱 婕 (ZHU Jie), E-mail: jiezh@hainanu.edu.cn; 曹振木 (CAO Zhenmu), E-mail: caozhenmu2007@163.com。

nematode resistance. In order to further explore the regulatory mechanisms of resistance, sRNA libraries of CF25 before and after inoculation with *M. enterolobii* were sequenced to identify a total of 133 differentially expressed miRNAs. Based on the criteria of $P \leq 0.05$ and $|\log_2(FC)| \geq 3$, 33 significantly differentially expressed miRNAs were identified, including 19 known miRNAs and 14 newly discovered miRNAs. Target gene prediction for the 33 miRNAs yielded a total of 373 target genes, with miR5658-z having the highest number of predicted target genes. GO and KEGG analyses showed that the target genes were mainly enriched in pathways related to plant-pathogen interactions and signal transduction. It is speculated that miRNA-mediated signal transduction and plant defense responses might be important reasons for the resistance of CF25 to *M. enterolobii*. To preliminarily verify the regulatory relationships between differentially expressed miRNA and the target genes, six differentially expressed miRNA and the target genes were selected for qRT-PCR validation. The results showed that the differential expression trends of miRNA and target genes were consistent with the high-throughput sequencing results and generally conformed to the negative regulation pattern between miRNA and the target genes. The results of this study suggest that miRNA may play significant roles in the defense response to root-knot nematodes and lay the foundation for further elucidating the mechanisms of miRNA-mediated nematode resistance in pepper.

Keywords: *Capsicum frutescens*; *Meloidogyne enterolobii* resistance; sRNA sequencing; miRNA; target gene

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.07.005

辣椒 (*Capsicum* spp.) 是茄科 (Solanaceae) 辣椒属 (*Capsicum*) 一年生或多年生草本植物, 距今已经有 6000 多年的栽培历史^[1]。辣椒种植方法简单、产值高, 果实富含辣椒素、类胡萝卜素和类黄酮等营养成分, 不仅能满足人们对调味的需求, 还在医药、军事、农业方面都有一定应用价值^[2]。由于全球气候改变和农业文明现代化等多种因素的影响, 辣椒面临多种病虫害的威胁。其中根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 被认为是一类重要的辣椒土传病害, 可导致其产量和品质严重下降^[3]。

根结线虫是一类透明无脊椎植物病原物, 能侵染植物根部使其形成膨大根结, 从而破坏根系对水分和养分的吸收, 影响植物的生长发育, 甚至导致植物提早死亡。根结线虫种类繁多, 其中象耳豆根结线虫 (*Meloidogyne enterolobii*) 广泛分布于热带、亚热带地区, 对辣椒的致病性和侵染能力较强, 且已经克服 *N*、*Me1*、*Me3/Me7* 等辣椒抗根结线虫基因^[4-5], 在辣椒生产上造成的经济损失日益严重^[6], 因此需要深入研究辣椒抗病机理, 发掘新的抗病基因, 为抗病育种工作提供理论依据和基因资源。

microRNA (miRNA) 是一类具有调控功能的内源性非编码小分子 RNA, 其长度为 21~24 nt。miRNA 可以通过碱基互补配对识别相关靶基因 mRNA, 进而降解该 mRNA 或者抑制其翻译, 达到负调控基因表达的效果^[7]。miRNA 广泛参与各植物生物学过程, 在防御应答以及寄主-病原物互作中均起到重要作用。有研究发现马铃薯遭大丽

轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 侵染后, miR482 下调表达, 负向调控 *NBS-LRR* 基因上调表达, 从而提高其抗病性^[8]。水稻感染稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 后, miR398b 下调表达, 从而调控超氧化物歧化酶基因上调表达, 加强了对稻瘟病的抗性^[9]。由 miR397 靶向的漆酶基因 *CA07g11100* 在辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*) 侵染的前期上调, 而后转为下调, 推测该基因可能参与辣椒与疫霉菌的互作^[10]。由此可见, miRNA 可以通过调节靶基因的表达来影响植物对病原物的抗性^[11]。然而, 目前有关辣椒抗根结线虫 miRNA-靶基因的研究工作相对较少, 从 miRNA 层面探究根结线虫与辣椒互作的分子机制将加深人们对作物抗根结线虫机理的认识, 为后续抗病育种工作提供较为新颖的切入点。

小米辣原产于云南、海南等地区的野生、半野生灌木辣椒 (*Capsicum frutescens*)。其植株粗大近似锄柄, 根系发达, 结果期长, 产量较高^[12]。在长期自然选择的压力下, 小米辣逐步演化出了耐高温潮湿、抗病、耐瘠薄和耐弱光的特性^[13], 对许多生物及非生物胁迫都具有良好的抗性, 能生长在极其恶劣的环境条件下^[14-18]。为了改良我国现有辣椒栽培种, 挖掘小米辣在抗病育种中的潜力, 本课题组前期从 21 份海南本地小米辣资源中筛选出 7 份象耳豆根结线虫高抗种质。通过酸性品红染色和石蜡切片等组织病理学方法, 发现高抗种质 CF25 对象耳豆根结线虫的抗性主要体现在抗侵入和限制取食两方面。通过对 CF25 和感病对照 CF29 进行接种前后的防御酶测定, 得

出 CF25 在接种后多数时间点的 PAL 和 POD 活性显著高于感病对照, 推测较高的 PAL 和 POD 活性可能导致包括木质素在内的更多苯丙烷类次生代谢产物的积累。本课题组前期发现接种第 24 小时, 抗、感材料中线虫数量分别为 (0.67 ± 0.94) 条和 (0.33 ± 0.47) 条, 不存在显著差异 ($P=0.68$)。然而, 当接种第 4 天时, CF25 单株根系中仅发现 (0.67 ± 0.94) 条线虫, 而感病对照 CF29 中约存在 (11 ± 3.27) 条线虫, 数量差异达到了显著水平 ($P=0.01$)。不仅如此, 通过观察接种第 1、2、3、4 天的线虫形态, 发现接种第 4 天线虫略有加粗, 推测已开始建立取食点。为兼顾对阻止侵入和抑制取食分子机理的研究, 本课题组对高抗材料 CF25 和感病对照 CF29 进行接种前后 (第 0 天, 第 4 天) 的转录组测序分析, 得出抗、感材料接种前后差异基因主要富集于苯丙烷生物合成、植物-病原体互作等代谢通路^[19-20]。然而, 如何从这些代谢通路中筛选出与抗性紧密关联的基因是一个亟待解决的问题, 且相关基因的表达调控机理尚未得到解析。为此, 本研究以高抗象耳豆根结线虫种质 CF25 为研究对象, 构建接种前后 (接种第 0 天和第 4 天) sRNA 文库, 利用 Illumina 二代测序技术开展 miRNA 测序, 筛选差异表达 miRNA 并进行靶基因的预测和初步验证, 为进一步研究辣椒中 miRNA 介导的根结线虫抗性机制提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选取海南本地收集的象耳豆根结线虫抗性小米辣资源 CF25 为试验对象。将种子在 55 °C 温水中浸泡 15 min, 28 °C 恒温催芽。种子露白后播种到用灭菌土填充的 21 孔穴盘中, 每穴播种 1 粒种子。待辣椒苗长出 6 片真叶, 对每株种苗接种 1000 条象耳豆根结线虫二龄幼虫, 在接种第 0 天 (R0, 对照) 和第 4 天 (R4) 分别选取大小均一的种苗各 3 株, 将根系洗净, 迅速用滤纸吸干水分, 投入液氮速冻, 送至广州基迪奥生物科技有限公司进行 sRNA 文库构建和高通量测序。

1.2 方法

1.2.1 miRNA 的提取和文库构建 用 Trizol 法从样本中提取总 RNA, 聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳切胶选择 18~30 nt 范围的条带, 回收 sRNA。根据 sRNA 的结构特点, 分别连接 3' 和 5' 接头, 对 sRNA 进行反转录和 PCR 扩增, 最后使用 PAGE

胶回收并纯化条带, 完成文库构建。构建好的文库使用 Agilent2100 以及 ABI StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies) 进行质量和产量的检测, 合格后上机测序。

1.2.2 miRNA 鉴定 对测序原始数据 (raw data) 进行清洗, 去除不带有 3' 接头的、测序效果不好的、不含插入片段或插入片段长度小于 18 nt 的、70% 以上碱基为 poly A 的低质量序列, 得到用于后续分析的纯净序列 (clean reads)。将纯净序列与中国辣椒 (*Capsicum chinense*) 参考基因组数据 (<http://peppergenome.snu.ac.kr/download.php>) 进行比对, 得出比对基因组情况。将测序数据与 miRBase 中数据进行比对分析得出已知 miRNA 情况。利用 miREvo 和 mirdeep2 软件预测样品中的 novel miRNA。

1.2.3 miRNA 差异表达分析 对所有 miRNA 用 TPM 进行归一化处理, 以 $P \leq 0.05$ 和 $|\log_2(FC)| \geq 3$ 为标准进行显著差异表达 miRNA 的筛选工作。

1.2.4 靶基因预测及功能分析 使用 Patmatch_v 1.2 软件进行 miRNA 和靶基因的互补配对分析, 再通过程序筛选预测得到最终结果, 同时对 miRNA 靶基因进行 GO 分析和 KEGG 富集分析。将差异表达蛋白向 GO 数据库 (<http://www.geneontology.org/>) 的各 term 映射, 并计算每个 term 的蛋白数, 从而得到具有某个 GO 功能的蛋白列表及蛋白数目。GO 功能分析: 应用超几何检验, 找出与整个背景蛋白相比, 在差异表达蛋白中显著富集的 GO 条目, 将计算得到的 P 值通过校正之后, 以 $\text{corrected-}P \leq 0.05$ 为阈值, 满足此条件的 GO term 定义为在差异表达蛋白中显著富集的 GO term。KEGG 富集分析: 应用超几何检验, 找出与背景蛋白相比, 在差异表达蛋白中显著富集的 Pathway, 然后经过多重检验校正后, 选择 $Q \leq 0.05$ 的 Pathway 定义为在差异表达蛋白中显著富集的 Pathway。

1.2.5 miRNA 及其靶基因的 qRT-PCR 验证 选取 6 个显著差异 miRNA 及其靶基因进行 qRT-PCR 验证, 引物序列如表 1 所示。qRT-PCR 反应体系为 PCR Master Mix 10 μL , 上/下游引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL , ddH₂O 8.6 μL , cDNA 模板 1 μL 。扩增条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 45 个循环。内参为 U6 和 Actin。采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算目的基因的相对表达量。使用 Microsoft Excel 2016 软件对相对表达量数据进行统计和作图。

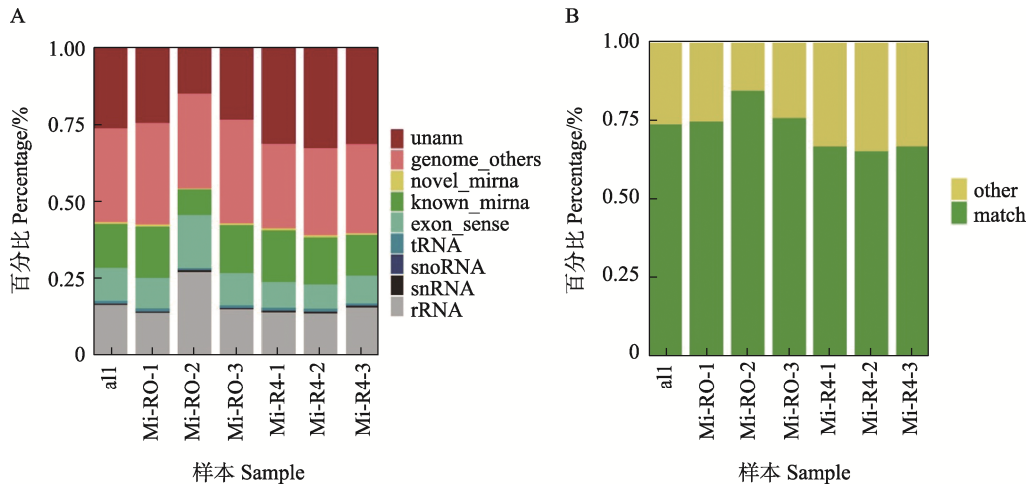
表 1 qRT-PCR 引物序列信息
Tab. 1 Primer sequences for qRT-PCR tests

miRNA	上游引物 (5'-3') Forward primer (5'-3')	下游引物 (5'-3') Reverse primer (5'-3')
U6	GATTGTGCGTGTC ATCCTT	GGGGACATCCGATA AAATTGG
Actin	GCTGGACGTGACCT AACTG	GCAGTTTCAAGCTC CTGCTC
miR1448-z	TCTTTCCAACCTCT CCCATACC	CGCGTCTTTCCAAC TCCTCC
miR8028-x	TGGTACAATTGTGA AGAA	CGCGCGTGGTACAA TTGT
miR5658-z	AGGCGATGATGATG ATGATGAA	GCGAGGCGATGATG ATGAT
miR5185-y	GGAGGTTGGCTTAG AAGC	CGCGGGAGGTTGG CTT
novel-m0253-5p	TGTAATAAGATTTT GGAAAGC	CGCGCGTGTAATAA GATTTTG
novel-m0128-3p	TGAGCCGTGCCAAT ATCATTT	GCGTGAGCCGTGCC AATA
RPS2	CCAGCGGCTATTCC AACAGA	ACGAACCACGTCAT GCATCT
ATAS3	TGCTAACGCGGCTT CTTCTT	AATGGAGGTTGGTG GTAGCG
ADK	CGGCCATGATCCGC CTATT	CCAACACCAGGAC AACCCAA
FLS2	GTTTATTGCGACCT CAAGCC	AATGTCTCGGTGTG TGCCAT
CCD7	GGATGATCACGGGT CCACAG	TTCCACTTCCAGT CAGCGG

2 结果与分析

2.1 sRNA 高通量测序数据分析

分别构建抗病小米辣种质 CF25 接种象耳豆根结线虫第 0 天 (Mi-R0-1、Mi-R0-2、Mi-R0-3)



A: 不同类别 sRNA 丰度; B: sRNA 比对基因组情况。
A: Abundance of different class of sRNAs; B: Alignment of sRNAs to pepper genome.

图 2 辣椒 sRNA 测序数据分析

Fig. 2 Analysis of pepper sRNA sequencing data

和第 4 天 (Mi-R4-1、Mi-R4-2、Mi-R4-3) 的 sRNA 文库, 进行高通量测序。由图 1 可知, 分别从 Mi-R0 和 Mi-R4 中获得 39 810 053 和 34 003 912 条原始序列。去污处理后分别得到 33 851 394 和 29 645 658 条纯净序列, 分别占序列总数的 85% 和 87%。所有样品的 sRNA 总丰度为 63 497 052 条, 其中包括 rRNA 10 351 257 条 (16.3%)、SnRNA 277 536 条 (0.44%)、snoRNA 87 954 条 (0.14%)、tRNA 499 442 条 (0.79%)、exon sense 6 709 635 条 (10.57%)、已知 miRNAs 9 149 130 条 (14.41%)、新发现 miRNAs 384 833 条 (0.61%)、genome others 19 396 665 条 (30.55%)、未注释序列 16 640 600 条 (26.21%) (图 2A)。将用于后续分析的 clean reads 和中国辣椒 (*Capsicum chinense*) 参考基因组数据进行比对, 结果如图 2B 所示。总比对率为 73.6%, Mi-R0 的平均比对率为 78.12%, Mi-R4 的平均比对率为 66.41%, 6 个文库的比对率均达到 65% 以上。综上, 本研究测得的 sRNA 序列质量较好, 适合开展后续 miRNA 研究工作。

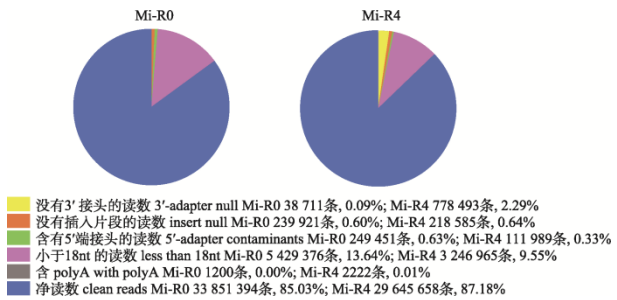


图 1 辣椒 sRNA 测序数据的分类

Fig. 1 Classification of pepper sRNA sequencing data

2.2 miRNA 鉴定

对 sRNA 测序数据进行鉴定，共检测到 1023 个 miRNAs,其中包括已知 miRNAs 362 个和新发现的 miRNAs 661 个。对这些 miRNA 进行长度分析，发现其长度主要集中在 20~24 nt 之间，其中 21 nt 和 24 nt 的 miRNAs 数量最多，分别为 233 个和 502 个（图 3），符合植物 miRNA 的长度特点。对 miRNA 的碱基偏好性进行分析，发现在第 1、3、14、15、18、19、24 位点更偏好于尿嘧啶（U），均达到了 50%以上；在第 2、4、8、9、13、16、20、21、22、23 位点更偏好于胞嘧啶（C），均达到 51%以上；在第 5、6、11、12 位点更偏好于鸟嘌呤（G），均达到 65%以上；在第 7、10、17 位点更偏好于腺嘌呤（A），均达到 66%以上（图 4A）。miRNA 的首位碱基偏好是尿嘧啶（U），在

长度 18~22 nt 的 miRNA 中占有比例均超过 80%。在 24 nt 长度的 miRNA 中 5'端首位碱基腺嘌呤（A）含量较高，占比为 60.60%，其次为尿嘧啶（U），占比为 2.50%，最后是鸟嘌呤（G），占比为 36.86%（图 4B）。

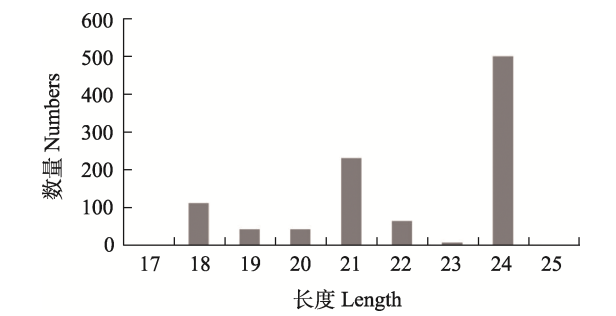
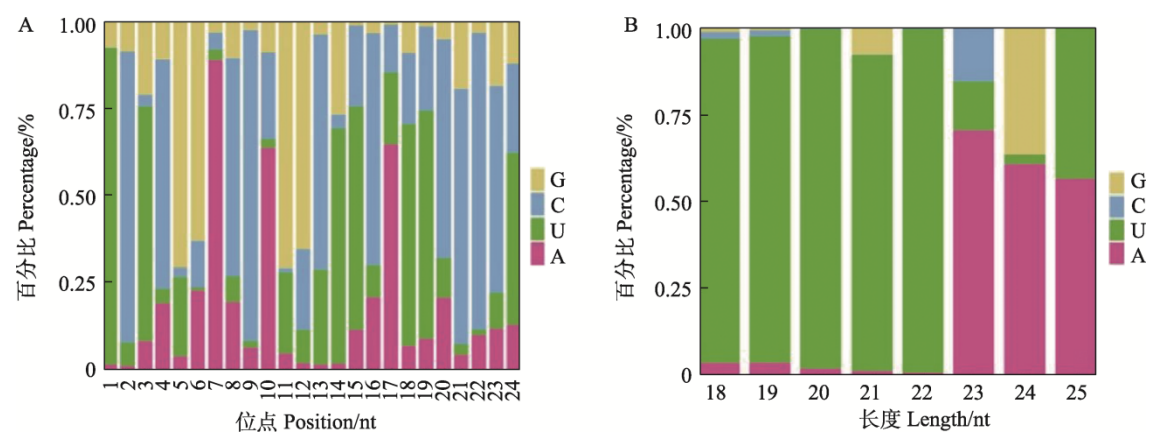


图 3 miRNA 长度分析
Fig. 3 Analysis of miRNA lengths



A: miRNA 各位点碱基偏好性分析; B: miRNA 首位碱基分布情况。
A: Base bias analysis of each position of miRN; B: Distribution of first nucleotide of miRNA.

图 4 miRNA 碱基偏好性分析

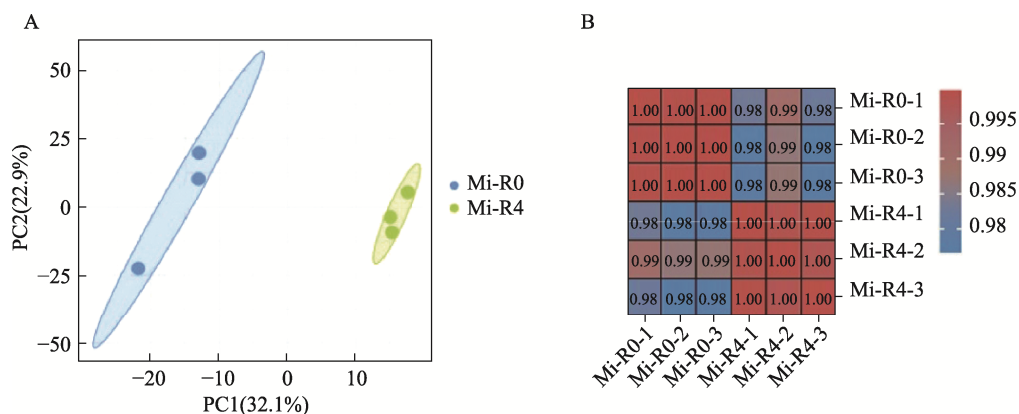
Fig. 4 Analysis of bias of miRNA bases

2.3 接种前后差异表达 miRNA 分析

为检测处理组（Mi-R4）和对照组（Mi-R0）之间以及组内生物学重复间变异度大小，对 miRNA 测序数据进行主成分（PCA）分析，得到 6 个主成分。如图 5A 所示，主成分 PC1 和 PC2 能解释 miRNA 转录组数据 55% 的差异。处理组和对照组样本表现出明显的分离趋势，且距离较远,说明处理组和对照组 miRNA 的差异比较大。而组内各生物学重复间的 miRNA 数据表现出一定的聚集性，说明组内样品间重复性相对较好。采用 Pearson 相关性系数对 6 个样本的相关性进行分析，相关系数越接近 1，代表样本之间相关性越高。结果显示，组内生物学重复间的相关性均为 1，说明组内样本均一度较高。而组间样本

的相关性处于 0.98~0.99 之间,表明存在一定差异（图 5B）。综上所述，处理组和对照组 miRNA 相对差异较大，而组内差异较小，可进行后续差异表达 miRNA 的鉴定工作。

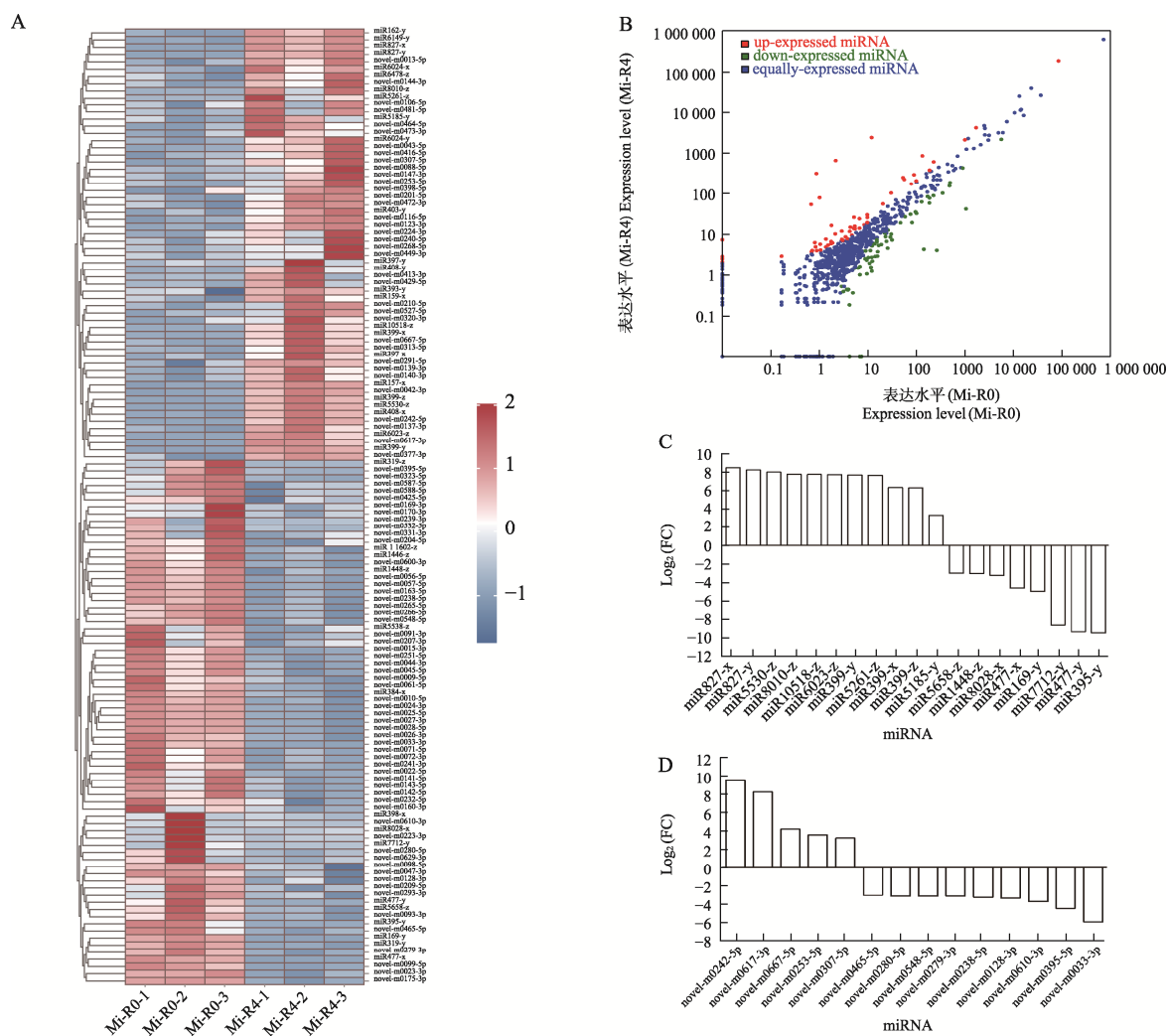
如图 6A 所示，处理组与对照组间鉴定出 133 个差异表达 miRNAs，其中上调表达的为 60 个，下调表达的为 73 个。由此可见，处理组下调表达 miRNA 比上调表达 miRNA 数量更多。以 $P \leq 0.05$ 和 $|\log_2(FC)| \geq 3$ 为筛选标准，鉴定出 33 个显著差异表达的 miRNAs，其中包括 19 个已知 miRNAs 和 14 个新发现 miRNAs（图 6B）。表达差异显著的 19 个已知 miRNAs 中，miR827-x、miR827-y、miR5530-z、miR8010-z、miR10518-z、miR6023-z、miR399-y、miR5261-z、miR399-x、miR399-z、



A: PCA 主成分分析; B: 相关性热图。
A: Principal component analysis; B: Correlation heat map.

图 5 miRNA 相关性分析

Fig. 5 Correlation analysis of miRNA



A: 差异表达 miRNA 分析热图; B: 差异表达 miRNA 散点图; C: 已知 miRNA 差异表达分析;

D: 新发现 miRNA 差异表达分析。A 和 B 中红色表示上调, 蓝色表示下调。

A: Heat map of differentially expressed miRNA; B: Scatter plot of differentially expressed miRNA; C: Differential expression analysis of known miRNA; D: Differential expression analysis of novel miRNA. Red color meant up-regulation and blue color meant down-regulation in picture A and B.

图 6 差异表达 miRNA 分析

Fig. 6 Differential expression analysis of miRNA

miR5185-y 等 11 个 miRNAs 为上调表达, 而 miR5658-z、miR1448-z、miR8028-x、miR477-x、miR169-y、miR7712-y、miR477-y、miR395 等 8 个 miRNAs 则表现出下调表达趋势(图 6C)。而在新发现的 14 个显著差异表达 miRNAs 中, 上调表达的 miRNAs 有 5 个, 分别为 novel-m0242-5p、novel-m0617-3p、novel-m0667-5p、novel-m0307-5p 和 novel-m0253-5p; 显著下调表达的 miRNAs 有 9 个, 分别为 novel-m0465-5p、novel-m0280-5p、novel-m0548-5p、novel-m0279-3p、novel-m0238-5p、novel-m0128-3p、novel-m0610-3p、novel-m0395-5p 和 novel-m0033-3p(图 6D)。

2.4 差异表达 miRNA 靶基因预测

对 133 个差异表达 miRNAs 进行靶基因预测, 得到 1781 个靶基因, 其数量大约是差异表达 miRNA 数量的 13 倍。对 33 个显著差异表达的 miRNAs 进行靶基因预测, 得到 373 个靶基因, 其中在 19 个已知 miRNAs 中预测到 296 个靶基因。miR5658-z 预测靶基因数量最多, 为 83 个。其次是 miR5185-y, 预测到 38 个靶基因。miR8028-x 预测到 37 个靶基因, 排名第三。而 miR5530-z 仅预测到了个靶基因。miR8010-z 和 miR399-x 没有预测到靶基因。新发现的 14 个 miRNAs 中共预测到 77 个靶基因。novel-m0238-5p 预测的靶基因最多, 为 33 个。其次为 novel-m0617-3p, 预测到 17 个靶基因。novel-m0253-5p 预测到 13 个靶基因, 排名第三。而 novel-m0667-5p 和 novel-m0610-3p 分别只预测到 1 个靶基因(表 2)。novel-m0465-3p、novel-m0280-5p、novel-m0548-5p、novel-m0279-3p、novel-m0395-5p、novel-m0033-3p 这 6 个新发现 miRNAs 没有预测到靶基因(表 2)。

2.5 差异表达 miRNA 靶基因 GO 富集和 KEGG 代谢通路分析

进一步对差异显著 miRNA 的靶基因进行 GO 富集和 KEGG 代谢通路分析。将靶基因的 GO 注释按照生物学过程(biological process, BP)、细胞组分(cell component, CC)和分子功能(molecular function, MF)分为 3 类, 并将这 3 类的条目按照注释到的差异基因数目由大到小进行排序和绘图。BP 中富集的条目最多, 主要集中于细胞过程和代谢过程; 其次为 MF, 主要集中于结合和催化活性; 富集条目最少的为 CC, 主要集中于细胞解剖实体和蛋白质复合物等(图 7)。富集条目最多的类目依次为结合、细胞过程、代

谢过程和催化活性。

对差异显著 miRNA 的靶基因进行 KEGG 通路富集分析, 发现多个代谢通路产生了较大差异。其中, 靶基因主要富集于植物-病原体互作途径(plant-pathogen interaction), 其次为 MAPK 植物信号转导途径(MAPK signaling pathway-plant)、嘌呤代谢(purine metabolism)和单环类抗生素生物合成(monobactam biosynthesis)等通路(图 8)。富集于植物-病原体互作的靶基因最多, 达到了 27 个。靶基因数量占第二位是 MAPK 植物信号转导途径, 富集了 11 个靶基因。对靶基因富集的 KEGG 通路进行分类, 可以得到不同分类层级的通路。这 33 个显著差异表达 miRNAs 通过 68 个靶基因在 58 条生命途径中起作用, 其中环境适应(environmental adaptation)和信号转导(signal transduction)这 2 条生命途径中富集的靶基因最多(图 9)。由此可见, 显著差异 miRNA 的靶基因主要富集于植物防御反应和信号转导等 KEGG 通路或层级, 推测 CF25 抗象耳豆根结线虫的分子机理可能主要基于 miRNA 介导的植物防御反应及其信号转导相关基因的表达调控。

2.6 差异表达 miRNA 及其靶基因的表达验证

为验证差异表达 miRNA 及其靶基因间的调控关系, 利用 qRT-PCR 对 6 个差异表达 miRNAs(miR1448-z、miR8028-x、miR5658-z、novel-m0128-3p、miR5185-y、novel-m0253-5p)及其对应靶基因(CC.CCv1.2.scaffold436.45、CC.CCv1.2.scaffold876.5、CC.CCv1.2.scaffold703.8、CC.CCv1.2.scaffold785.9、CC.CCv1.2.scaffold19.56)进行表达验证。如图 10 所示, 与对照组相比, miR1448-z、miR8028-x、miR5658-z、novel-m0128-3p 在接种象耳豆根结线虫后呈现下调表达趋势, 其靶基因 CC.CCv1.2.scaffold436.45(RPS2)、CC.CCv1.2.scaffold876.5(ATA53)、CC.CCv1.2.scaffold703.8(CCD7)呈现上调表达趋势, 符合 miRNA 负调控靶基因的特点。而 miR5185-y、novel-m0253-5p 则是呈现上调表达趋势, 其靶基因 CC.CCv1.2.scaffold785.9(ADK)、CC.CCv1.2.scaffold19.56(FLS2)呈现下调表达趋势。由此可见, 所选择的 6 个 miRNAs 以及 5 个靶基因的 qRT-PCR 表达验证结果与基于 RNA-seq 的基因表达量分析结果基本一致, 说明测序结果准确可靠, 且这 6 个 miRNAs 可能与相关靶基因存在一定的调控关系。

表 2 差异表达 miRNAs 靶基因
Tab. 2 Target gene annotation of significantly differential expressed miRNAs

miRNA	靶基因数量 Number of target genes	靶基因 Target gene
miR827-x	2	<i>At4g38062</i> , <i>RAD50</i>
miR827-y	6	<i>PCMP-H60</i> , <i>RLP1</i> , <i>FBPban1</i> , <i>CBSDUF1</i> , <i>IF2CP</i>
miR5530-z	1	<i>At2g40450</i>
miR10518-z	10	<i>BXL7</i> , <i>ALMT9</i> , <i>GL1-5</i> , <i>GSTT1</i> , <i>FLA1</i> , <i>AMT1-2</i>
miR6023-z	27	<i>HCR9-0</i> , <i>CF-9</i> , <i>9DC3</i> , <i>RPS2</i>
miR399-y	7	<i>PHT1-7</i> , <i>IST1</i> , <i>INVA</i> , <i>NUC</i>
miR5261-z	23	<i>At3g12390</i> , <i>RCA</i> , <i>MIK2</i> , <i>PCMP-E80</i> , <i>PSI2</i> , <i>At3g12390</i> , <i>BOR2</i> , <i>PAP17</i> , <i>ASIL2</i> , <i>METE</i> , <i>RPN6</i> , <i>PEX1</i> , <i>GSO1</i> , <i>ARF4</i> , <i>CUV</i> , <i>RPL24</i> , <i>PATROL1</i> , <i>GCS1</i> , <i>ITPK3</i> , <i>ERF003</i> , <i>CRK26</i> , <i>IGHMBP2</i>
miR399-z	10	<i>PHT1-7</i> , <i>Tm-2(2)</i> , <i>R1A-10</i> , <i>R1B-16</i> , <i>At5g14430</i> , <i>R1B-12</i>
miR5185-y	38	<i>At1g63430</i> , <i>TKT2</i> , <i>CCC1</i> , <i>WNK2</i> , <i>NEK5</i> , <i>FTIP3</i> , <i>At5g46580</i> , <i>PTST2</i> , <i>ABCC3</i> , <i>XTH28</i> , <i>BOU</i> , <i>APRR1</i> , <i>TUBA</i> , <i>CARB</i> , <i>CYP94C1</i> , <i>VPS13C</i> , <i>At5g46580</i> , <i>IQD1</i> , <i>At3g55350</i> , <i>AGL65</i> , <i>DYNLL2</i> , <i>BOU</i> , <i>At1g11620</i> , <i>At3g02320</i> , <i>CS2</i> , <i>NLP5</i> , <i>GGT1</i> , <i>ACA2</i> , <i>At5g56420</i> , <i>BOU</i> , <i>RPS6A</i> , <i>CTF7</i> , <i>FTIP3</i> , <i>NAC056</i>
miR5658-z	83	<i>BAP2</i> , <i>At2g47680</i> , <i>HMA1</i> , <i>GLOX</i> , <i>pds5a-b</i> , <i>DGK7</i> , <i>MYB306</i> , <i>COV1</i> , <i>SAUR32</i> , <i>OVA7</i> , <i>TOR1</i> , <i>CHUP1</i> , <i>PGMP</i> , <i>GDU3</i> , <i>MYC2</i> , <i>At1g33170</i> , <i>VQ4</i> , <i>KIN7D</i> , <i>GLOX1</i> , <i>FTSH4</i> , <i>SINAT3</i> , <i>ankrd13c-b</i> , <i>DAT</i> , <i>LTPG1</i> , <i>SPAPB24D3.06c</i> , <i>HVT1</i> , <i>rnf12-a</i> , <i>MYB60</i> , <i>dsk1</i> , <i>RL3</i> , <i>SBT1.8</i> , <i>ABR1</i> , <i>FLZ15</i> , <i>BRM</i> , <i>CPRF2</i> , <i>FHA1</i> , <i>OXA1</i> , <i>OFUT19</i> , <i>CLPR3</i> , <i>NAC017</i> , <i>MYB20</i> , <i>ZHD4</i> , <i>BRM</i> , <i>DOF3.1</i> , <i>AIL6</i> , <i>LPA1</i> , <i>YAB5</i> , <i>ZAT5</i> , <i>KUA1</i> , <i>AP2-1</i> , <i>ADK</i> , <i>ML2</i> , <i>MTERF1</i> , <i>CLE13</i> , <i>ASAT3</i> , <i>KAN1</i> , <i>PLT2</i> , <i>At2g25737</i> , <i>SRS1</i> , <i>C/VIF2</i> , <i>Ipo5</i> , <i>SYP61</i> , <i>UPL4</i>
miR1448-z	28	<i>murG</i> , <i>PHR1</i> , <i>RPS2</i> , <i>ROQ1</i> , <i>RPP13L4</i> , <i>At4g27190</i> , <i>ARSA1</i> , <i>At4g19060</i> , <i>UNI</i> , <i>ENT3</i>
miR8028-x	37	<i>RPS2</i> , <i>SBT4.14</i> , <i>FLS</i> , <i>PARP1</i> , <i>HCS2</i> , <i>Os02g0677700</i> , <i>PRL1-IFG</i> , <i>At5g22620</i> , <i>R1C-3</i> , <i>TAF12B</i> , <i>At4g27190</i> , <i>CDR1</i> , <i>MIZ1</i> , <i>LYK5</i> , <i>LYK4</i> , <i>ALA1</i> , <i>R1A-10</i> , <i>HAT3</i> , <i>CURL3</i> , <i>ABCB29</i> , <i>PPD5</i> , <i>At4g27520</i> , <i>At3g47110</i> , <i>MSL2</i> , <i>ICP55</i> , <i>ACA2</i> , <i>RLP44</i> , <i>UGNT1</i> , <i>FLOT6</i>
miR477-x	6	<i>NUG2</i> , <i>AAE2</i> , <i>RFC3</i> , <i>RAM1</i> , <i>RPL19A</i>
miR477-y	2	<i>CYC</i> , <i>BAT1</i>
miR169-y	5	<i>At1g77840</i> , <i>SOV</i> , <i>SWEET7B</i> , <i>URH2</i> , <i>DOF3.7</i>
miR7712-y	3	<i>WSD1</i> , <i>ABP19A</i>
miR395-y	8	<i>BCHC2</i> , <i>ST3</i> , <i>SULTR2;2</i> , <i>APS3</i> , <i>APS1</i> , <i>SULTR2;1</i>
novel-m0242-5p	4	<i>ROG1</i> , <i>IAMT1</i> , <i>ELF3</i> , <i>At2g30270</i>
novel-m0617-3p	17	<i>RPM1</i> , <i>ccb1</i> , <i>SNL6</i> , <i>Mo25</i> , <i>APY1</i> , <i>FBL12</i> , <i>At1g12460</i> , <i>R1A-10</i> , <i>BHLH95</i> , <i>At5g05130</i> , <i>PDIL2-1</i> , <i>ADH1</i>
novel-m0667-5p	1	<i>PVS1</i>
novel-m0307-5p	3	<i>eif2b1</i> , <i>RBK2</i>
novel-m0253-5p	13	<i>XA21</i> , <i>FLS2</i> , <i>tmem87a</i>
novel-m0238-5p	33	<i>Os05g0155601</i> , <i>ART3</i> , <i>ART2</i>
novel-m0128-3p	5	<i>SCL15</i> , <i>NSP2</i> , <i>SCL6</i> , <i>SCL6</i> , <i>CCD7</i>
novel-m0610-3p	1	<i>APY1</i>

3 讨论

本研究通过高通量测序对抗病小米辣种质 CF25 接种象耳豆根结线虫前后的 miRNA 表达差异进行了探索，筛选出 33 个表达差异显著的 miRNAs。其中一些 miRNA 可能与抗病性有一定联系。miR5658 在接种象耳豆根结线虫 4 d 后呈现显著下调表达趋势。而 miR5658 在黄瓜绿斑驳花叶病毒（*Cucumber green mottle mosaic virus*,

CGMMV)侵染黄瓜 1dpi 时也出现了下调表达^[21]。在毛果杨中 miR1448 被认为是与抗病相关的 miRNA^[22], 在本研究中 miR1448 呈现下调表达趋势。miR395 可通过调节硫酸盐代谢来提高水稻对病原体的免疫能力^[23], 在本研究中 miR395 呈现下调表达趋势。miR399 在抗性品种四季橘(*Citrus microcarpa*)感染柑橘溃疡病菌(*Xanthomonas citri* subsp.citri) 5 d 时, 表达量显著增加。在柑橘中

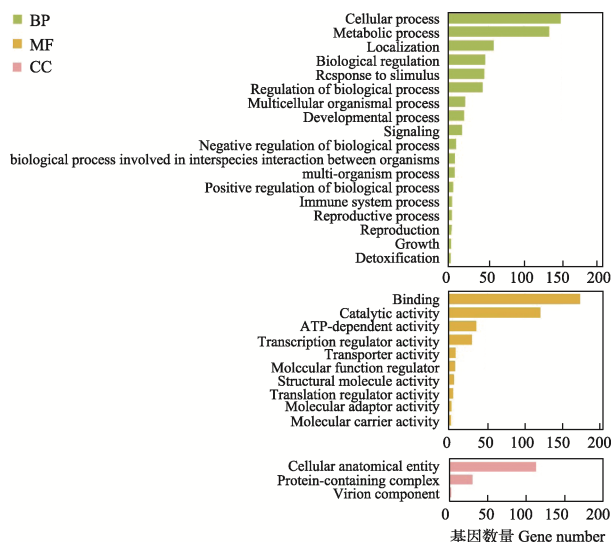


图 7 GO 富集柱状图

Fig. 7 GO enrichment histogram

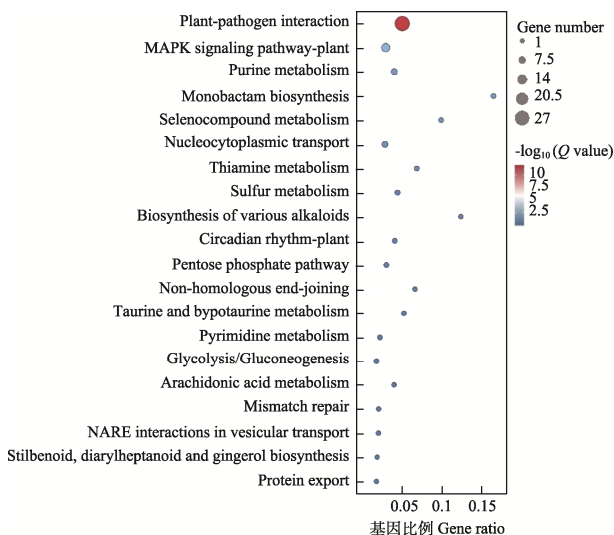


图 8 差异表达基因的 KEGG 富集通路气泡图

Fig. 8 KEGG enrichment pathway bubble plot of differentially expressed genes

过表达 miR399 可使溃疡病病斑面积显著减小, 病情指数显著降低, 这表明 miR399 与柑橘的抗溃疡病密切相关^[24], 在本研究中 miR399 在抗性辣椒种质 CF25 接种根结线虫 4 d 时也呈现上调表达。过表达 miR827 可以提高烟草对辣椒脉斑病毒 (ChiVMV) 感染的抵抗力^[25], 本研究中 miR827 呈现上调表达。还有一些本研究中差异显著的 miRNA 在非生物胁迫研究中有所报道, 如 miR169 能响应干旱、低温、高盐和高温^[26]。miR10518-z、miR5261-z、miR5530-z、miR7712-y、miR8010-z 和新发现的 novel-m0242-5p、novel-m0617-3p 虽未见相关功能的研究报道, 但是在小米

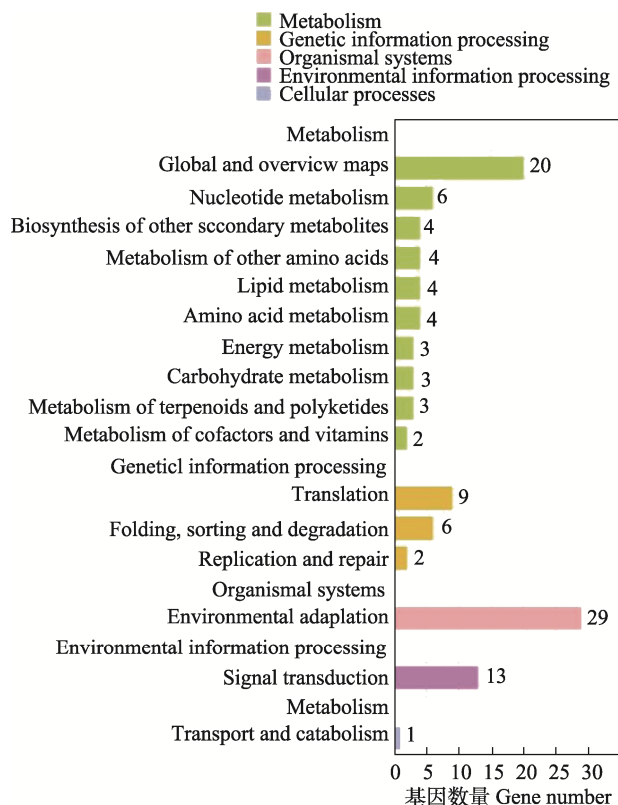


图 9 差异表达 miRNAs 靶基因 KEGG 富集分类

Fig. 9 KEGG enrichment classification of targeted genes of differentially expressed miRNAs

辣被象耳豆根结线虫感染后出现特异性表达, $|\log_2(FC)|$ 值分别高达 7.73、7.64、8.00、8.71、7.75、9.56、8.19, 猜测它们在辣椒抗根结线虫这一过程中可能发挥了重要的作用, 值得进一步开展研究。

为了探究 miRNA 在辣椒抗象耳豆根结线虫过程中的机制和作用, 本研究对其靶基因进行了预测和功能分析。miR5658 是 33 个显著差异表达 miRNA 中注释靶基因最多的 miRNA。其靶向的可能与抗病性有关的基因为 MYB20、MYB60、MYB306 等。MYB 家族是植物中最大的转录因子家族之一, 其成员通过 N 端保守的 MYB 结构域与下游基因启动子区的特异性位点相结合, 进而调控这些基因的转录^[27-29], 在植物的生长发育、激素信号传递以及逆境胁迫响应中发挥关键作用^[30-31]。在溃疡病菌感染时, MYB20 在抗性品种四季橘 (*Citrus microcarpa*) 中表现出显著的差异表达, 感病后其表达量上调了 3 倍, 参与了柑橘对溃疡病的抗性调控^[32]。此外, MYB20 是木质素生物合成途径的调节因子, 在次生细胞壁形成过程中调控木质素的生物合成^[33]。木质素作为植物细胞壁的关键成分之一, 能够在植物抵御病原物入侵的

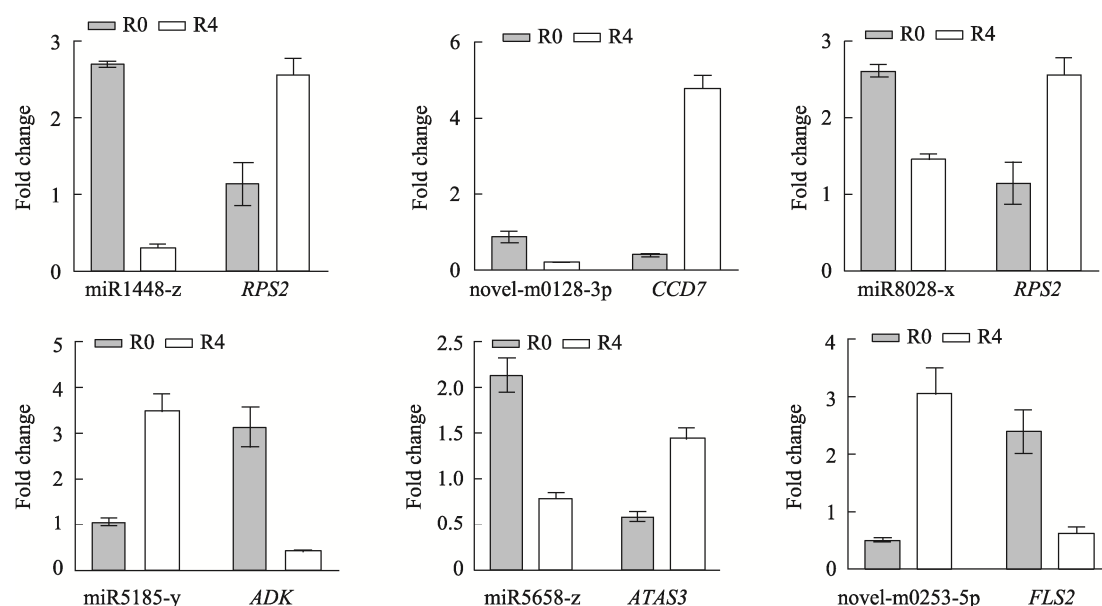


图 10 差异 miRNA 及其靶基因的 qRT-PCR 表达验证

Fig. 10 qRT-PCR verification of differentially expressed miRNAs and their target genes

过程中起到屏障作用^[34]。*MYB60*、*MYB306* 虽然在植物抗病方面未见报道，但在非生物胁迫中报道较多，如 *MYB60* 参与了细胞中活性氧的平衡调节过程，并以此影响气孔开闭，响应木薯^[35]和海岛棉^[36]的干旱胁迫。而 *MYB306* 在燕子花中对低温胁迫产生了较大的响应^[37]。新预测的 14 个显著差异表达的 miRNA 中，*novel-m0238-5p* 是预测靶基因最多的 miRNA，可靶向 *ART2* 基因。*ART2* 是一种 C₂H₂ 型锌指转录因子，能在水稻中通过调控细胞壁相关蛋白 *Os01g0827300* 上调表达来增强细胞壁的木质化，从而提高植物铝耐受性^[38]。miRNA 可通过靶向抗病基因，让植物产生抗病反应。本研究预测的靶基因主要富集于植物-病原菌互作、信号转导等通路。而相关的靶基因主要为 *FLS2*、*RPM1*、*RPS2* 等。

基于前期转录组测序数据，得出 CF25 接种第 0 天和第 4 天的显著差异表达基因主要富集于代谢途径、次生代谢物的生物合成等途径^[20]。结合本研究 miRNA 差异表达数据进行联合分析，初步鉴定出 19 个显著差异表达 miRNA。依据基因功能，可将这些 miRNA 关联的转录组靶基因大体分为五大类。第一类为代谢相关基因，包括与色素次生代谢相关的 *PKS1*、氮代谢相关的 *GGT1*、嘌呤代谢相关的 *ADK*、色氨酸代谢相关的 *ASAT3* 和脂质代谢相关的 *AAE2* 等；第二类为生物合成相关基因，包括淀粉生物合成酶 *APS1*、海藻糖合成酶 *TPS11* 和独角金内酯合成酶 *CCD7*

等。第三类为生长发育相关基因，如花发育相关基因 *AGL27*、生物钟调节基因 *LHY* 和 DNA 复制相关基因 *RFC3* 等；第四类为与应激响应相关的基因，如 *SBT4.14* 和 *SIN2* 等；第五类为植物抗病基因，如 *TGA1*、*RPP13*、*FLS2* 和 *RPS2* 等。由此可见，*FLS2* 和 *RPS2* 可能是 CF25 在 miRNA 调控下防御象耳豆根结线虫的重要基因。*novel-m0128-5p* 在接种后表达量降低了 1.37 倍，其潜在靶基因是 *FLS2*。鞭毛感知蛋白 *FLS2* (flagellin sensing 2) 是属于 XII 家族的富亮氨酸重复受体样激酶，*FLS2* 可通过识别鞭毛蛋白表位 flg22，对病菌入侵做出迅速反应^[39]。*FLS2* 是植物免疫系统的重要组成部分^[40]，植物体内缺失 *FLS2* 蛋白会导致植物对病菌的免疫性下降^[41]。*FLS2* 是蒜芥茄 (*Solanum sisymbriifolium* Lam.) 响应黄萎病 (eggplant verticillium wilt) 胁迫的重要基因^[42]，也是中华猕猴桃抗溃疡病 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae*, Psa) 的候选抗病基因^[43]。在本研究中，基于前期转录组数据可以看出，抗病小米辣 CF25 在接种象耳豆根结线虫第 4 天后，*FLS2* 上调表达，推测 *novel-m0128-5p* 通过负调控靶基因 *FLS2* 增强了 CF25 的免疫系统，从而提高其抗病能力。目前抗病 R 蛋白大多数属于 NBS-LRR 类^[44]，NB-ARC 属于 NBS-LRR 类蛋白中的一个分支，可以通过结合 ADP 或 ATP 来参与植物抗病蛋白的构象变化，进而激活植物免疫响应与病原菌识别^[45]。*RPS2* 是典型的 NB-ARC 类抗病基因，在拟南芥

抗丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) 中发挥重要作用^[46], 此外, *RPS2* 在水稻中过表达后, 对真菌病原体稻瘟病菌和细菌病原体水稻白叶枯病菌产生正响应^[47]。在本研究中, *RPS2* 关联到了 miR6023-z、miR1448 和 miR8028 三个 miRNAs, 是关联 miRNA 数量最多的靶基因。其中, miR1448 与其靶基因 *RPS2*^[48] 都被认为与抗病有关, 在本研究中, miR1448 可能通过下调表达从而引起 *RPS2* 上调表达发挥抗病作用。

综上所述, 本研究通过分析抗象耳豆根结线虫小米辣资源 CF25 在接种前后的 sRNA 测序数据, 得出 miRNA 可能调控了植物抗病及信号转导方面的基因表达变化, 并由此介导了 CF25 抗病反应的发生。本研究获得了较多差异表达 miRNA, 但它们具体如何通过调节靶基因在根结线虫和寄主的互作中发挥抗性作用, 需要进一步通过试验来验证。还可在此基础上深入挖掘在辣椒与根结线虫互作机制中发挥重要调节作用的 miRNA, 为后续辅助抗病育种工作奠定基础。

4 结论

本研究对抗性小米辣材料 CF25 接种象耳豆根结线虫前后的 sRNA 数据进行分析, 鉴定出 33 个表达差异显著的 miRNA。其中包括一些已知与作物抗病性相关的 miRNA, 如 miR5658、miR1448、miR395、miR399 和 miR827 等。对这 33 个表达差异显著的 miRNA 进行靶基因预测, 得到 373 个靶基因。经 GO 功能和 KEGG 代谢通路富集分析, 得出靶基因主要富集于植物-病原体互作以及信号转导等代谢途径。推测 miRNA 可能通过调控靶基因参与这些代谢通路发挥抗病功能。本研究为深入了解辣椒中 miRNA 介导的根结线虫抗性机制提供有益的参考数据。

参考文献

- [1] 邹学校, 朱凡. 辣椒的起源、进化与栽培历史[J]. 园艺学报, 2022, 49(6): 1371-1381.
ZOU X X, ZHU F. Origin, evolution and cultivation history of the pepper[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2022, 49(6): 1371-1381. (in Chinese)
- [2] 梁文荟, 单庆云, 王瑾, 王兵, 张美玲, 万彧, 邹学校, 熊程. 辣椒果实辣椒素类物质生物合成调控及其影响因素研究进展[J]. 中国蔬菜, (2025-01-08)[2025-01-20]. <https://doi.org/10.19928/j.cnki.1000-6346.2025.2005>.
LIANG W H, SHAN Q Y, WANG J, WANG B, ZHANG M L, WAN Y, ZOU X X, XIONG C. Research progress on biosynthesis regulation and influencing factors of capsaicinoids in pepper fruit[J]. China Vegetables, (2025-01-08)[2025-01-20]. <https://doi.org/10.19928/j.cnki.1000-6346.2025.2005>. (in Chinese)
- [3] MAGA J A, TODD P H. Critical reviews in food Science & Nutrition[J]. Capsicum, 1975, 6(2): 177-199.
- [4] KIEWNICK S, DESSIMOZ M, FRANCK L. Effects of the *Mi-1* and the *N* root-knot nematode resistance gene on infection and reproduction of *Meloidogyne enterolobii* on tomato and pepper cultivars[J]. Journal of Nematology, 2009, 41: 134-139.
- [5] PINHEIRO J B, BOITEUX L S, ALMEIDA M R A, PEREIRA R B, GALHARDO L C S, CARNEIRO R M D G. First report of *Meloidogyne enterolobii* in capsicum root stocks carrying the *Me1* and *Me3/Me7* genes in central Brazil[J]. Nematropica, 2015, 45(2): 184-188.
- [6] 王剑, 宋志强, 成飞雪, 程菊娥, 张德咏, 刘勇. 湖南省辣椒上首次发现象耳豆根结线虫[J]. 植物保护, 2015, 41(4): 180-183.
WANG J, SONG Z Q, CHENG F X, CHENG J E, ZHANG D Y, LIU Y. First report of *Meloidogyne enterolobii* on pepper in Hunan province[J]. Plant Protection, 2015, 41(4): 180-183. (in Chinese)
- [7] HWANG D G, PARK J H, LIM J Y, KIM D, CHOI Y, KIM S, REEVES G, YEOM S I, LEE J S, PARK M, KIM S, CHOI I Y, CHOI D, SHIN C. The hot pepper (*Capsicum annuum*) microRNA transcriptome reveals novel and conserved targets: a foundation for understanding MicroRNA functional roles in hot pepper[J]. PLoS One, 2013, 8(5): e64238.
- [8] YANG L, MU X, LIU C, CAI J, SHI K, ZHU W, YANG Q. Overexpression of potato miR482e enhanced plant sensitivity to *Verticillium dahliae* infection[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2015, 57(12): 1078-1088.
- [9] LI Y, CAO X, ZHU Y, YANG X, ZHANG K, XIAO Z, WANG H, ZHAO J, ZHANG L, LI G. Osa-miR398b boosts H₂O₂ production and rice blast disease-resistance via multiple superoxide dismutases[J]. New Phytologist, 2019, 222(3): 1507-1522.
- [10] LI Y, WANG N, GUO J, ZHOU X J, BAI X Y, Azeem M, ZHU L Y, CHEN L, CHU M, WANG H, CHENG W. integrative transcriptome analysis of mRNA and miRNA in pepper's response to *Phytophthora capsici* infection[J]. Biology, 2024, 13(3): 186.
- [11] PARK J H, SHIN C. The role of plant small RNAs in *NB-LRR* regulation[J]. Briefings in Functional Genomics. 2015, 14(4): 268-274.
- [12] 杨德荣. 大有开发前途的灌木辣椒[J]. 北京农业, 1994, 9: 35.

- YANG D R. The shrub chili pepper, which holds great potential for development[J]. Beijing Agriculture, 1994, 9: 35. (in Chinese)
- [13] 邓明华, 文锦芬. 云南灌木辣椒资源[J]. 辣椒杂志, 2009, 7(1): 36-37.
- DENG M H, WEN J F. Yunnan shrub chili resources[J]. Journal of China Capsicum, 2009, 7(1): 36-37.
- [14] LIU S, LI W, WU Y, CHEN C, LEI J, CHRISTIAN S. *De novo* transcriptome assembly in chili pepper (*Capsicum frutescens*) to identify genes involved in the biosynthesis of capsaicinoids[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e48156.
- [15] KIM J S, JEE H J, GWAG J G, KIM C K, SHIM C K. Evaluation on red pepper germplasm lines (*Capsicum* spp.) for resistance to anthracnose caused by *Colletotrichum acutaum*[J]. The Plant Pathology Journal, 2010, 26(3): 273-279.
- [16] 方荣, 周坤华, 马辉刚, 陈学军, 何烈干, 缪南生. 中国灌木辣椒种质农艺性状鉴定与疫病抗性评价[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(1): 186-191.
- FANG R, ZHOU K H, MA H G, CHEN X J, HE L G, MIU N S. Identification of agronomic traits and evaluation of resistance to *phytophthora capsici* in *C. frutescens* in China[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2014, 15(1): 186-191. (in Chinese)
- [17] LIU S, LI W, WU Y, CHEN C, LEI J. *De novo* transcriptome assembly in chili pepper (*Capsicum frutescens*) to identify genes involved in the biosynthesis of capsaicinoids[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e48156.
- [18] 庄灿然, 吕金殿, 梁耀琦. 中国干制辣椒[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995.
- ZHUANG C R, LYU J D, LIANG Y Q. Chinese chili[M]. Beijing: China Agricultural Press, 1995. (in Chinese)
- [19] 陈梅红, 黄银香, 林珑, 高畅, 涂容生, 朱婕, 刘子记. 灌木辣椒 (*Capsicum frutescens*) 抗象耳豆根结线虫的组织学及生理生化特征分析[J]. 热带作物学报, 2024, 45(9): 1902-1911.
- CHEN M H, HUANG Y X, LIN L, GAO C, TU R S, ZHU J, LIU Z J. Analysis of histological and physiological-biochemical characteristics of *Capsicum frutescens* on the resistance to *Meloidogyne enterolobii*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2024, 45(9): 1902-1911. (in Chinese)
- [20] 陈梅红. 抗象耳豆根结线虫海南本地小米辣资源的筛选及其作用机理研究[D]. 海口: 海南大学, 2024.
- CHEN M H. Screening of Hainan endemic Xiaomila resources for resistance to *Meloidogyne enterolobii* and the study of mechanisms of resistance[D]. Haikou: Hainan University, 2024. (in Chinese)
- [21] LIANG C Q, LIU H W, HAO J J, LI J Q, LUO L X. Expression profiling and regulatory network of cucumber microRNAs and their putative target genes in response to cucumber green mottle mosaic virus infection[J]. Archives of Virology, 2019, 164 (4): 1121-1134.
- [22] ZHAO J P, DIAO S, ZHANG B Y, NIU B Q, WANG Q L, WAN X C, LUO Y Q. Phylogenetic analysis and molecular evolution patterns in the MIR482-MIR1448 polycistron of *Populus* L.[J]. PLoS One, 2012, 7(10): e47811.
- [23] YANG Z Y, HUI S G, LV Y, ZHANG M J, CHEN D, TIAN J J, ZHANG H T, LIU H B, CAO J B, XIE W Y, WU C Y, WANG S P, YUAN M. miR395-regulated sulfate metabolism exploits pathogen sensitivity to sulfate to boost immunity in rice[J]. Molecular plant, 2021, 15(4): 671-688.
- [24] 王兆昊, 郭兴茹, 张乐欢, 何永睿, 陈善春, 姚利晓. *csi-miR399* 响应柑橘溃疡病菌侵染的表达模式及其抗病性分析[J]. 中国农业科学, 2023, 56(8): 1484-1493.
- WANG Z H, GUO X R, ZHANG L H, HE Y R, CHEN S C, YAO L X. Expression pattern of *csi-miR399* in response to *Xanthomonas citri* subsp. *citri* Infection and Its disease resistance analysis[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2023, 56(8): 1484-1493. (in Chinese)
- [25] TANG R X, YANG Y F, JI C L, SU Y S, JIAO B L, YUAN B W, YANG X Y, XI D H. MiR827 positively regulates the resistance to chilli veinal mottle virus by affecting the expression of FBPase in *Nicotiana benthamiana*[J]. Physiologia Plantarum, 2024, 176(3): e14375.
- [26] 黄渺, 宋泽洋, 蔡骏一, 南红, 肇瑾. 辣椒 miR169 家族在非生物胁迫下的表达及启动子顺式作用元件分析[J]. 西部林业科学, 2023, 52(1): 165-174.
- HUANG M, SONG Z Y, CAI J Y, NAN H, ZHAO J. Analysis on expression under abiotic stress and the promoter cis-acting elements of miR169 family in pepper (*Capsicum annum* L.)[J]. Journal of West China Forestry Science, 2023, 52(1): 165-174. (in Chinese)
- [27] AMBAWAT S, SHARMA P, YADAV N R, YADAV R C. MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview[J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2013, 19(3): 307-321.
- [28] DUBOS C, STRACKE R, GROTEWOLD E, WEISSHAAR B, MARTIN C, LEPINIEC L. MYB transcription factors in *Arabidopsis*[J]. Trends in Plant Science, 2010, 15(10): 573-581.
- [29] BALDONI E, GENGA A, COMINELLI E. Plant MYB Transcription factors: their role in drought response mechanisms[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(7): 15811-15851.
- [30] PIREY R E M, BUROW M. Regulation of MYB and bHLH transcription factors: a glance at the protein level[J]. Molecular Plant, 2015, 8: 378-388.
- [31] GOLLDACK D, LI C, MOHAN H, PROBST N. Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling

- networks[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 151.
- [32] 范海芳, 彭蕴, 张庆雯, 何永睿, 邹修平, 李强, 彭爱红, 许兰珍, 雷天刚, 陈善春, 姚利晓. 柑橘 R2R3-MYB 类转录因子 *CitMYB20* 的克隆与表达分析[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(10): 3199-3207.
- FAN H F, PENG Y, ZHANG Q W, HE Y R, ZOU X P, LI Q, PENG A H, XU L Z, LEI T G, CHEN S C, YAO L X. Cloning and expression of citrus R2R3-MYB transcription factor *CitMYB20*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(10): 3199-3207. (in Chinese)
- [33] GENG P, ZHANG S, LIU J Y, ZHAO C H, WU J, CAO Y P, FU C X, HAN X, HE H, ZHAO Q. *MYB20*, *MYB42*, *MYB43*, and *MYB85* regulate phenylalanine and lignin biosynthesis during secondary cell wall formation[J]. *Plant Physiology*, 2020, 182(3): 1272-1283.
- [34] 宾金华, 潘瑞焱. 茉莉酸甲酯诱导烟草幼苗抗病与过氧化物酶活性和木质素含量的关系[J]. *应用与环境生物学报*, 1999(2): 49-53.
- BIN J H, PAN R Z. The relationship of the disease resistance of tobacco seedlings induced by methyl jasmonate with peroxidase activity and lignin content[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 1999(2): 49-53. (in Chinese)
- [35] 徐子寅, 于晓玲, 邹良平, 赵平娟, 李文彬, 耿梦婷, 阮孟斌. 木薯 MYB 转录因子基因 *MeMYB60* 表达特征分析及其互作蛋白筛选[J]. *作物学报*, 2023, 49(4): 955-965.
- XU Z Y, YU X L, ZOU L P, ZHAO P J, LI W B, GENG M T, RUAN M B. Expression pattern analysis and interaction protein screening of cassava MYB transcription factor *MeMYB60*[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2023, 49(4): 955-965. (in Chinese)
- [36] 高巍, 刘会利, 田新权, 张慧, 宋洁, 杨勇, 龙璐, 宋纯鹏. 海岛棉转录因子基因 *GbMYB60* 的克隆、表达及其抗逆性分析[J]. *作物学报*, 2016, 42(9): 1342-1351.
- GAO W, LIU H L, TIAN X Q, ZHANG H, SONG J, YANG Y, LONG L, SONG C P. Cloning, expression, and functional analysis of transcription factor gene *GbMYB60* in cotton[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2016, 42(9): 1342-1351. (in Chinese)
- [37] 杨娟. 燕子花 *IlMYB306* 基因克隆及其抗逆功能初探[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2019.
- YANG J. Cloning and primary functional analysis on stress resistance of *IlMYB306* gene in *Iris laevigata*[D]. Harbin: Northeast Forestry University, 2019. (in Chinese)
- [38] CHE J, TSUTSUI T, YOKOSHO K, YAMAJI N, MA J F. Functional characterization of an aluminum (Al)-inducible transcription factor, *ART2*, revealed a different pathway for Al tolerance in rice[J]. *New Phytologist*, 2018, 220(1): 209-218.
- [39] SUN Y D, LI L, MACHO A P, HAN Z F, HU Z H, ZIPFEL C, ZHOU J M, CHAI J J. Structural basis for flg22-induced activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 immune complex[J]. *Science*, 2013, 342(6158): 624-628.
- [40] TRDÁ L, BOUTROT F, CLAVERIE J, BRULÉ D, DOREY S, POINSSOT B. Perception of pathogenic or beneficial bacteria and their evasion of host immunity: pattern recognition receptors in the frontline[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2015, 6: 219.
- [41] 刘沁松. 植物免疫受体 FLS2 的胞内运输机制[J]. *生命科学*, 2021, 33(5): 576-581.
- LIU Q S. Intracellular trafficking of the plant immune receptor FLS2[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2021, 33(5): 576-581. (in Chinese)
- [42] 孙茂, 吴丽艳, 龚亚菊, 鲍锐, 桂敏, 黎志彬, 杜光辉. 蒜芥茄 *SsFLS2* 基因的克隆及其表达分析[J]. *西南农业学报*, 2024, 37(8): 1669-1676.
- SUN M, WU L Y, GONG Y J, BAO R, GUI M, LI Z B, DU G H. Cloning and expression analysis of *SsFLS2* gene in *Solanum sisymbriifolium* Lam[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2024, 37(8): 1669-1676. (in Chinese)
- [43] 匡美美, 李黎, 马建伟, 刘原, 蒋鸿霏, 雷瑞, 满玉萍, 王一帆, 黄波, 王彦昌, 刘世彪. 利用中华猕猴桃杂交后代转录组测序筛选抗溃疡病相关基因[J]. *园艺学报*, 2024, 51(8): 1743-1757.
- KUANG M M, LI L, MA J W, LIU Y, JIANG H F, LEI R, MAN Y P, WANG Y F, HUANG B, WANG Y C, LIU S B. Screening of kiwifruit canker resistance-related genes based on the transcriptome sequencing analysis of hybrids from *actinidia chinensis*[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2024, 51(8): 1743-1757. (in Chinese)
- [44] KIM E H, JANE E P. Deciphering plant-pathogen communication: fresh perspectives for molecular resistance breeding[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(2): 177-193.
- [45] LEAH M, TAN X P, PATRICE K, RICHARD W M. Plant *NBS-LRR* proteins: adaptable guards[J]. *Genome Biology*, 2006, 7(4): 212.
- [46] KUNKEL B N, BENT A F, DAHLBECK D, INNES R W, STASKAWISC B J. *RPS2*, an *Arabidopsis* disease resistance locus specifying recognition of *Pseudomonas syringae* strains expressing the avirulence gene *avrRpt2*[J]. *The Plant Cell*, 1993, 5(8): 865-875.
- [47] FLOR H. Current status of the gene for gene concept[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 1971(9): 275-296.
- [48] GURURANI A M, VENKATESH J, UPADHYAYA P C, NOOKARAJU A, PANDEY S K, PARK S W. Plant disease resistance genes: current status and future directions[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2012, 78: 51-65.