

细胞壁转化酶调控番茄响应灰霉菌侵染的转录组分析

付兰平^{1,3}, 辛曙丽², 刘永华^{1,3*}, 朱国鹏^{1,3*}

1. 海南大学园艺学院/海南省热带园艺作物品质调控重点实验室, 海南海口 570228; 2. 保亭黎族苗族自治县农业服务中心, 海南保亭 572316; 3. 海南大学三亚南繁研究院, 海南三亚 572022

摘要: 由死体营养型病菌 (necrotrophic pathogen) 灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 侵染引起的灰霉病是番茄生产上的常见病害, 可导致番茄大面积减产甚至绝收。蔗糖分解代谢在植物抗病中发挥着重要作用, 不仅可为植物防御反应提供碳骨架和能量, 还可通过信号途径调控抗病基因的表达。研究表明, 分解蔗糖的细胞壁转化酶 (cell wall invertase, CWIN) 可增强植物对死体营养型病害的抗性。然而, 目前尚无 CWIN 对番茄灰霉病抗性影响的相关研究。本研究以 CWIN 活性上调的转基因番茄 (RNAi/R) 及野生型番茄 (WT/W) 为材料, 对其叶片进行灰霉菌 (Bc) 离体接种, 研究 CWIN 对番茄灰霉病抗性的影响, 同时对接种后 12、60 h 的叶片进行取样, 通过转录组测序初步阐明 CWIN 调控番茄灰霉病抗性的分子机制。结果表明: (1) 提高番茄 CWIN 活性可增强番茄叶片对灰霉菌的抗性。(2) KEGG 注释表明, 接种 12 h 的 DEGs (W-Bc-12 h-vs-R-Bc-12 h) 共获得 5 个显著性富集通路, 包括次生代谢物生物合成 (biosynthesis of secondary metabolites)、代谢途径 (metabolic pathways)、DNA 复制 (DNA replication)、淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism) 以及甾族化合物生物合成 (steroid biosynthesis); 接种 60 h 的 DEGs (W-Bc-60 h-vs-R-Bc-60 h) 则未发现显著性富集通路, 表明接种早期是 CWIN 调控番茄抗病性的关键时期。(3) 植物-病原菌互作图分析表明, 参与超敏反应和防御相关基因诱导的富含亮氨酸重复 (LRR) 受体类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶基因 *FLS2* 和热激蛋白基因 *HSP90* 在接种后的 RNAi 叶片中上调, 其可能是 CWIN 增强番茄抗病性机制中的重要基因。(4) 植物激素信号通路和 MapMan 作图分析表明, 接种后 RNAi 番茄的抗病激素茉莉酸 (JA) 和乙烯 (ET) 信号途径上调, 同时水杨酸 (SA) 信号途径减弱, 表明其可能共同作用提高 RNAi 番茄的抗病性。此外, 接种后 RNAi 番茄叶片的生长促进激素生长素 (IAA) 和细胞分裂素 (CTK) 信号途径增强, 而衰老促进激素脱落酸 (ABA) 信号途径减弱, 这样可以抑制病菌侵染期间细胞的死亡, 从而阻止死体营养型病菌灰霉菌从死亡寄主细胞上获得必要的养分用于侵染。此外, MapMan 作图还揭示接种后 RNAi 番茄叶片在细胞壁增厚、蛋白水解、活性氧 (氧化还原状态和过氧化物酶)、次生代谢物方面也得到极大的加强, 这些途径均有助于提高番茄的抗病性。综上, 提高 CWIN 活性可增强番茄灰霉病抗性, 转录组分析不仅验证已有的 CWIN 抗病分子机制, 如细胞壁加厚、活性氧积累和超敏反应 (HR)、抗病激素积累 (SA 和 JA/ET)、病程相关蛋白 (如 HSP 和 PR) 和次生代谢物的合成 (如植物毒素和多酚等) 等, 而且还挖掘出一些新的 CWIN 抗病机制, 包括生长促进激素 (IAA 和 CTK) 和衰老促进激素 (ABA) 信号途径和蛋白水解途径。研究结果可为下一步利用基因工程、分子育种等现代生物技术手段提高番茄灰霉病抗性提供理论指导。

关键词: 细胞壁转化酶; 灰霉菌 (*Botrytis cinerea*); 番茄; 转录组测序; 抗病基因

中图分类号: S436.412.13

文献标志码: A

Transcriptome Analysis of CWIN-mediated Tomato Response to the Infection of *Botrytis cinerea*

FU Lanping^{1,3}, XIN Shuli², LIU Yonghua^{1,3*}, ZHU Guopeng^{1,3*}

1. School of Horticulture, Hainan University / Key Laboratory for Quality Regulation of Tropical Horticultural Crops of Hainan Province, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Agricultural Service Center of Baoting, Baoting, Hainan 572316, China; 3. Sanya Nan-

收稿日期 2023-03-30; 修回日期 2023-04-06

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31760579); 海南省研究生创新课题 (No. Qhys2021-250)。

作者简介 付兰平 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 糖代谢和蔬菜抗病性。*通信作者 (Corresponding author): 刘永华 (LIU Yonghua), E-mail: 372333307@qq.com; 朱国鹏 (ZHU Guopeng), E-mail: zhuguopeng@hainanu.edu.cn。

fan Research Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572022, China

Abstract: Grey mold is a common disease in tomato production caused by *Botrytis cinerea*, a necrotrophic pathogen, which often leads to dramatic reduction of tomato yield. Sucrose catabolism plays an important role in plant defense against pathogen infection by providing carbon skeleton and energy for plant defense responses and/or regulating the expression of defense-related genes through signaling pathway. Previous studies have shown that cell wall invertase (CWIN), a kind of sucrose-degrading enzyme, can enhance plant resistance to several necrotrophic pathogens. However, no research has been conducted to study the role of CWIN in tomato resistance to *B. cinerea*. In this study, wild type tomato (W) and its transgenic line (R) with elevated CWIN activity were used as materials to study the effect of CWIN on tomato resistance to *B. cinerea* (Bc) via *in vitro* inoculation. In addition, inoculated leaves were sampled 12 h and 60 h post inoculation (hpi) for RNA-Seq to elucidate possible molecular mechanisms underlying the regulation of CWIN to tomato resistance against *B. cinerea*. The results are as follows: (1) Elevated CWIN activity enhanced tomato resistance to *B. cinerea*; (2) KEGG annotation showed that DEGs (W-Bc-12 h-vs-R-Bc-12 h) from 12 hpi were significantly enriched in five pathways, including biosynthesis of secondary metabolites, metabolic pathways, DNA replication, starch and sucrose metabolism, and steroid biosynthesis; No significant enrichment pathway was found for DEGs (W-Bc-60 h-vs-R-Bc-60 h) from 60 hpi. (3) By mapping DEGs to plant-pathogen interaction pathway, it was revealed that the LRR-receptor serine/threonine-like kinase gene *FLS2* and heat shock protein gene *HSP90* involved in hypersensitive response and defense-related gene induction were up-regulated in RNAi leaves after inoculation, indicating the two genes may participate in the regulation of CWIN to tomato resistance to *B. cinerea*. (4) The analysis of plant hormone signal transduction pathways and MapMan mapping showed that the signal pathway of jasmonic acid (JA) and ethylene (ET) was enhanced in RNAi leaves after inoculation, while the signal pathway of salicylic acid (SA) was weakened, indicating that the hormones might work together to improve the resistance of RNAi tomato to *B. cinerea*. In addition, the signal transduction of growth-promoting hormone auxin (IAA) and cytokinin (CTK) was also enhanced in RNAi leaves after inoculation, but that of senescence-promoting hormone abscisic acid (ABA) was weakened. The changes in signal pathways of IAA, CTK and ABA could inhibit the cell death in host during bacterial infection, thus preventing the necrotrophic pathogen *B. cinerea* from obtaining necessary nutrients from the dead host cells for its infection. In addition, MapMan mapping also revealed that cell wall thickening, proteolysis, reactive oxygen species (redox state and peroxidases) and secondary metabolites were also greatly enhanced in RNAi leaves after inoculation, which all contribute to improving the disease resistance of tomato. In conclusion, this study showed that elevated CWIN activity enhanced tomato resistance to *B. cinerea*. Transcriptome analysis not only verified the existing molecular mechanisms underlying the regulation of CWIN to plant resistance to microbial pathogens, such as cell wall thickening, accumulation of reactive oxygen species (ROS) and hypersensitive response (HR), accumulation of resistance hormones (SA and JA/ET), biosynthesis of pathogenesis-related protein (e.g. PR and HSP proteins) and secondary metabolites (such as phytotoxins and phenolics), but also revealed several possible new mechanisms including the signal transduction of growth-promoting hormone (IAA and CTK) and senescence-promoting hormone (ABA) and proteolysis. This study can provide theoretical guidance for the improvement of tomato resistance to *B. cinerea* by using modern biotechnologies such as genetic engineering and molecular breeding.

Keywords: cell wall invertase; *Botrytis cinerea*; tomato; RNA-seq; disease resistance gene

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.06.006

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 是一种重要的蔬菜作物, 在世界各地广泛种植。近 10 年来我国番茄种植面积和产量均呈不断上升的趋势, 2021 年我国番茄产量达到 0.68 亿 t, 约占世界总产量的 35.8%, 稳居世界第一^[1]。番茄栽培过程中常有多种病害发生, 严重制约着番茄产量和品质的进一步提升^[2]。其中, 番茄灰霉病是一种世界性的真菌病害, 尤其是随着保护地番茄栽培面积的逐年增加, 我国番茄灰霉病的发生越来越严重和

频繁, 经常造成大面积减产, 严重时甚至绝收^[3-4]。番茄灰霉病是由灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 感染引起^[5-6], 该病菌是一种广泛分布的植物真菌病原体, 在侵染植物的过程中, 因发病部位会产生大量灰色孢子, 形成灰色霉层, 因此该病被称作灰霉病^[7]。

灰霉病主要为害番茄叶片、果实、花、茎、叶等部位^[3-4]。尽管生物防治措施已逐渐用于番茄灰霉病的防治, 但目前施用化学杀菌剂仍是防治

灰霉病的主要措施^[8]。一方面, 化学药剂防治灰霉病的成本非常高。如欧洲为防治作物灰霉病每年在采购化学药剂上的花费高达 5.4 亿欧元, 约占世界杀菌剂市场总额的 10%^[9]。另一方面, 杀菌剂不仅对环境和人类健康产生危害, 长期施用所导致的病菌抗药性也在一定程度上限制了杀菌剂的防治效果^[10]。因此, 选育抗病品种是解决番茄生产上灰霉病为害的有效措施之一。由于缺少抗性种质资源, 导致利用传统育种手段进行番茄灰霉病抗性育种受到限制。因此, 有必要通过生理生化和基因工程等研究和技术手段来克服这一困难。

已有研究表明, 蔗糖分解代谢在植物抗病中发挥着重要作用, 不仅可以为植物防御反应(如细胞壁加厚、植物毒素合成等)提供所需的碳骨架和能量, 而且蔗糖及其分解产生的己糖(葡萄糖和果糖)还可以作为信号分子调控抗病基因的表达^[11]。植物体内有两大类分解蔗糖的酶, 即转化酶(invertase, INV)和蔗糖合成酶(sucrose synthase, Sus)。根据亚细胞定位的不同, 转化酶可进一步细分为细胞壁转化酶(cell wall invertase, CWIN)、液泡转化酶(vacuolar invertase, VIN)和细胞质转化酶(cytosolic invertase, CIN)^[12]。

目前有关蔗糖分解代谢和植物抗病性的相关研究主要集中于CWIN。与其他3种蔗糖分解酶(VIN、CIN和Sus)不同, CWIN在质外体空间水解蔗糖, 这使CWIN在植物抗病中发挥着独特的作用。首先, CWIN通过降低感染部位的蔗糖浓度从而促进蔗糖沿浓度梯度从韧皮部向病菌感染部位运输和卸载, 为植物防卫反应提供足够的糖分供应^[12-14]; 其次, CWIN在质外体空间分解产生的己糖可以作为信号分子激活植物的防卫反应。研究表明, 植物防御反应的启动主要受质外体空间己糖信号的调控, 而不是细胞内的己糖信号^[15-16]。最后, 病原菌成功侵入植物细胞之前, 需要从植物的质外体空间吸收糖分(主要是葡萄糖和果糖)来维持其生长发育^[17-18]。因此, CWIN还可以通过调控质外体空间蔗糖的分解速度和己糖含量来影响病菌的生长发育。已有研究表明, CWIN在植物抗病中的作用可能受病菌从植物寄主中获取营养方式的影响, 即CWIN可提高植物对死体营养型病菌(necrotrophic pathogens)的抗性, 但会降低其对活体营养型病菌(biotrophic pathogens)的抗性^[11]。

然而, 目前尚无CWIN对番茄灰霉病抗性影响的相关研究。由于灰霉菌属于死体营养性病菌^[19], 因此推测CWIN可提高番茄对灰霉病的抗性。前人通过RNA干扰(RNAi)技术下调番茄CWIN抑制因子基因(*INVINH1*)的表达可显著提高番茄中的CWIN活性^[20]。本研究以该转基因番茄(RNAi)及其相应的野生型番茄(WT)为材料, 阐明CWIN对番茄灰霉病抗性的影响。同时, 通过转录组测序技术初步揭示CWIN调控番茄灰霉病抗性的分子机制, 为下一步利用基因工程、分子育种等现代生物技术手段提高番茄灰霉病抗性提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的野生型番茄(WT)为新疆农业科学院园艺研究所培育的新番2号品种。利用RNAi技术下调WT番茄中CWIN抑制因子基因*INVINH1*的表达, 从而获得CWIN活性上调的转基因番茄(RNAi)^[20]。灰霉菌(*Botrytis cinerea*)由海南大学植物保护学院刘铜教授提供。

1.2 方法

1.2.1 番茄种植 各取30粒RNAi和WT种子, 首先用70%无水乙醇浸泡并振荡1 min。用蒸馏水清洗2遍后在0.2% NaClO溶液中浸泡5 min, 再使用蒸馏水清洗5遍。将消毒灭菌后的种子置于底部垫有湿润滤纸的培养皿内, 于培养箱中避光恒温(27℃)催芽5 d。种子露白后, 将种子播种于24孔穴盘内进行育苗, 所用基质为直径2~6 mm的蛭石。待子叶出土后, 开始浇施1/2浓度的园试配方营养液。将20 d苗龄的番茄幼苗移栽至由土和生物有机肥组成的混合栽培基质中(土肥比为3:1), 按照30 kg/667 m²的规格施入史丹利复合肥(N:P:K=15:15:15)作为基肥^[21], 然后盆栽于海南大学园艺学院实验基地温室内。

1.2.2 病菌接种 从移栽5周后的RNAi和WT植株从上往下选取第3、4片大小和形状一致的复叶, 用蒸馏水清洗干净后用于灰霉菌接种试验^[21]。灰霉菌接种方法参照LIAN等^[22]的方法。首先用SMB液体培养基制备灰霉菌孢子悬浮液, 并调整孢子终浓度至 2×10^4 个/mL, 然后将叶柄嵌入含有0.8%琼脂的培养皿中, 并保持叶面平整; 在每片叶子主脉两侧各接种3滴孢子悬浮液, 每滴约5 μ L;

密封培养皿避光恒温 (23 °C) 培养, 分别于接种后 12、60 h 对番茄叶片进行病情观察并取样。取样时以接种部位为中心进行打孔取样, 圆孔直径为 1 cm, 共称取 0.15 g 样品, 液氮速冻, 置于 -80 °C 保存, 用于后续总 RNA 的提取和酶活性测定。每个处理设置 3 个生物学重复。

1.2.3 酶活性测定 参照 TOMLINSON 等^[23]的方法, 采用分光光度计法测定番茄叶片中 CWIN 活性。

1.2.4 转录组测序与分析 对未接种 (Mock) 和接种 (Bc) 灰霉菌的 WT (W) 和 RNAi (R) 番茄叶片在 12 h 和 60 h 进行取样, 每个处理 3 个生物学重复, 共 24 个样品, 然后进行转录组测序。总 RNA 的提取纯化与质量评估、cDNA 文库的构建、转录组测序委托广州基迪奥生物科技有限公司完成。对下机的 raw reads 利用 fastp 进行质控, 过滤去除含 adapter 的 reads、去除含 N 比例大于 10% 的 reads、去除全部均为 A 碱基的 reads、去除低质量 reads (质量值 $Q \leq 20$ 的碱基数占整条 read 的 50% 以上), 得到 clean reads。利用 HISAT2 软件对 clean reads 与番茄参考基因组 (ITAG4.0, <http://www.sgn.cornell.edu>) 开展基于参考基因组的比对分析。按照 $FDR < 0.05$ 且 $|\log_2 FC| > 1$ 的基因为显著差异基因的筛选标准, 进行差异表达基因的筛选。通过广州基迪奥生物科技有限公司提供的在线网站 (<https://www.omicsmart.com>) 进行差异表达基因的 GO 和 KEGG 富集分析, 其中 KEGG 通路图是利用 pathview 在线网站 (<https://pathview.uncc.edu/analysis>) 制成, 利用 MapMan 软件检测生物胁迫过程中的差异表达基因。

1.2.5 RNA-seq 结果的 qRT-PCR 验证 以转录组测序使用的总 RNA 为模板, 使用诺唯赞 HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR (R333) 逆转录试剂盒对 RNA 样品进行逆转录, 使用诺唯赞 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (Q711) 试剂盒, 通过德国耶拿 qTOWER3G 定量 PCR 仪定量分析基因的相对表达水平。使用 NCBI Primer-Blast 工具 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计基因特异性引物对, 以番茄 *actin* 基因作为参照基因、根据 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法计算转录物的相对表达水平。qRT-PCR 验证所用到的基因和引物信息见表 1。

1.3 数据处理

利用 Excel 2020 软件对酶活性数据进行作图并进行 *t*-test 分析。

表 1 qRT-PCR 引物信息

Tab. 1 Information of primer pairs for qRT-PCR

基因编号 Gene ID	正向引物 (5'-3') Forward primers (5'-3')	反向引物 (5'-3') Reverse primers (5'-3')
Solyc01g106620.2	GGCGTAACTCGGTA CGTCTT	TGGACGTTGTCTC TCCAGT
Solyc01g110110.3	GCAGCAACTTGTG GACTGTG	TTGACGTTGCCTT ATCGGT
Solyc03g118810.1	CTCCGTTTCCAAGC CTTCTCT	TTCACGAAGCTCCC TAACGC
Solyc01g106605.1	GCTGTGAAGATGTG GGACGA	ACCGACTTACGCCA TACCAC
Solyc08g066350.2	CAAGGGTAGCAGC TCAAGCA	CTTGGAATGCCCTC TTGCAC
Solyc08g067410.2	GCTTGTTTAACCCG ACCCCT	GGCGTAAAGTGTGG GATGGA
Solyc09g007010.1	TGTCCGAGAGGCC AGACTAT	GAACCACACCCAT TGTTGC
Solyc10g008520.3	TGTCCCTAATCCAG AGTTGGC	ACCAAAGGCAAAT CCCCACA
Solyc10g079755.1	CGGCTTCAGAAAA CCAACCG	GTTCAGTCCCAGCT CTGCTT
Solyc11g011030.2	AGCACTTGCTATGG CTCGTA	ACGACGCCGTTTCT TCTTCT

注: 基因编号来自番茄基因组网站 <http://www.sgn.cornell.edu>。

Note: Gene ID comes from the website of tomato genome, <http://www.sgn.cornell.edu>.

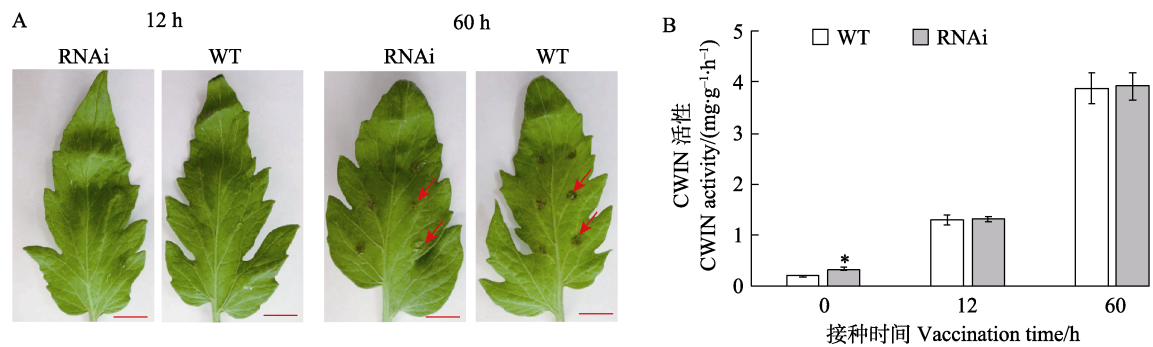
2 结果与分析

2.1 WT 和 RNAi 番茄在灰霉病抗性上的差异

将 WT 和 RNAi 番茄叶片接种灰霉菌后, 分别于接种后 12、60 h 观察发病程度的差异。结果表明, 接种后 12 h, WT 和 RNAi 番茄叶片均无明显病斑 (图 1A); 在接种后 60 h, WT 和 RNAi 番茄叶片均出现明显病斑, 但 WT 叶片的病斑面积明显大于 RNAi 叶片 (图 1A 中箭头所示)。CWIN 活性测定表明, 在 0 h 时 RNAi 番茄叶片的 CWIN 活性比 WT 高 73%; 而在接种后 12、60 h, WT 和 RNAi 的 CWIN 活性无显著差异。并且随着接种时间的延长, WT 和 RNAi 叶片的 CWIN 活性均呈快速上升的趋势 (图 1B), 表明接种灰霉菌可诱导番茄叶片 CWIN 活性的上升。综上所述, RNAi 番茄叶片中的高 CWIN 活性可提升番茄对灰霉病的抗性。

2.2 转录组测序数据质量分析

对未接种 (Mock) 和接种 (Bc) 灰霉菌的 WT (W) 和 RNAi (R) 番茄叶片在 12 h 和 60 h 进行取样, 然后进行转录组测序。将经过质控后的数据与番茄基因组进行比对, 其中单一比对结果的比例是 65.43%~95.28%, clean reads 总数为



A: 接种叶片病斑; B: 细胞壁转化酶 (CWIN) 活性。*表示差异显著 (P<0.05)。
A: Inoculate leaf lesions; B: CWIN activity. * indicate significant difference (P<0.05).

图 1 接种灰霉病菌后 WT 和 RNAi 番茄叶片病斑和 CWIN 活性

Fig. 1 Pathogenic spots and CWIN activity of WT and RNAi tomato leaves after inoculation with *B. cinerea*

1 047 124 488; 通过对过滤后数据进行质量评估, 各样品 Q₃₀ 碱基百分比≥93.02%, GC 含量为 41.88%~42.47% (表 2), 说明测序质量较高, 数据可信度较高。在剔除 2 个离群样本后 (W-Mock-12 h-2 和 W-Bc-60 h-2), 样本间相关性热图分析表明 *r* 值均大于 0.80 (图 2), 表明同一处理不同重复样品间具有较好的重复性, 可用于后续分析研究。

2.3 差异表达基因 (DEGs) 分析

按照 FDR<0.05 和|log₂FC|>1 的双重标准来筛选显著差异表达基因 (DEG)。对番茄接种灰霉病菌前后的 DEGs (R-Mock-vs-R-Bc 和 W-Mock-vs-W-Bc) 进行分析 (图 3A)。结果发现, 与未接种灰霉病菌番茄相比, 接种 12 h 后 WT 和 RNAi 番茄的 DEGs 总数 (上调和下调) 分别为 4 个和 6 个, 接种 60 h 的 DEGs 总数则分别为 76 个和 163 个。与接种早期相比, 接种后期番茄叶片的 DEGs 数量更多, 并且接种后 (特别是 60 h) RNAi 番茄的 DEGs 数量明显高于 WT。进一步分析表明, 与未接种灰霉病菌相比, 接种 12 h 后 WT 和 RNAi 番茄叶片上调的基因数量分别为 1 个和 3 个, 接种 60 h 的上调基因数量分别为 52 个和 137 个。同样, 与未接种灰霉病菌相比, 接种 12 h 后 WT 和 RNAi 番茄叶片下调的基因数量均为 3 个, 接种 60 h 后的下调基因数量分别为 24 个和 26 个。表明接种病菌后, RNAi 番茄上调的基因数量多于 WT, 而二者的下调基因数差异不大。因此, 接种后 WT 和 RNAi 在上调基因数量上的差异可能是导致抗病性差异的主要原因。值得注意的是, WT 和 RNAi 叶片上调 DEGs 和下调 DEGs 在接种 12 h 和 60 h 之间均无重叠, 均为各自所特有的 DEGs, 表明番茄叶片在接种灰霉病菌早期和后期的防御

机制存在较大差异。

总体来看, 在 2 个取样时期中, 共有 169 个基因在 R-Mock-vs-R-Bc 中差异表达, 80 个基因在 W-Mock-vs-W-Bc 中差异表达 (图 3B), 表明

表 2 RNA-seq 数据质量分析
Tab. 2 Summary statistics of RNA-seq data

样品编号 Sample No.	过滤后 reads 数目 Number of clean reads	单一比对 结果比例 Unique mapped/%	Q ₂₀ /%	Q ₃₀ /%	GC/%
W-Mock-12 h-1	48 153 370	95.28	97.93	93.68	42.18
W-Mock-12 h-3	40 876 574	73.18	97.62	93.02	42.12
W-Mock-60 h-1	40 943 546	95.12	97.84	93.53	42.24
W-Mock-60 h-2	54 919 720	70.13	97.91	93.70	42.31
W-Mock-60 h-3	42 966 862	93.82	97.91	93.65	42.24
W-Bc-12 h-1	40 506 610	82.69	98.01	93.94	42.23
W-Bc-12 h-2	64 984 710	95.28	98.00	93.89	41.95
W-Bc-12 h-3	67 622 744	70.78	98.10	94.11	42.08
W-Bc-60 h-1	53 498 630	65.43	97.73	93.29	42.27
W-Bc-60 h-3	42 806 726	79.94	97.87	93.56	42.31
R-Mock-12 h-1	46 541 394	95.16	97.91	93.64	42.18
R-Mock-12 h-2	45 396 356	94.93	98.13	94.21	42.27
R-Mock-12 h-3	47 965 106	94.64	97.71	93.07	42.23
R-Mock-60 h-1	46 707 842	93.18	97.92	93.67	42.47
R-Mock-60 h-2	45 446 302	92.89	97.87	93.58	42.36
R-Mock-60 h-3	52 805 972	93.29	97.83	93.49	42.11
R-Bc-12 h-1	47 468 632	94.68	97.89	93.54	41.95
R-Bc-12 h-2	41 866 798	95.03	97.85	93.57	41.96
R-Bc-12 h-3	42 292 870	94.42	97.86	93.52	41.88
R-Bc-60 h-1	46 047 566	91.12	98.03	93.96	42.39
R-Bc-60 h-2	43 563 294	93.52	97.81	93.45	42.13
R-Bc-60 h-3	43 742 864	92.27	97.88	93.64	42.32

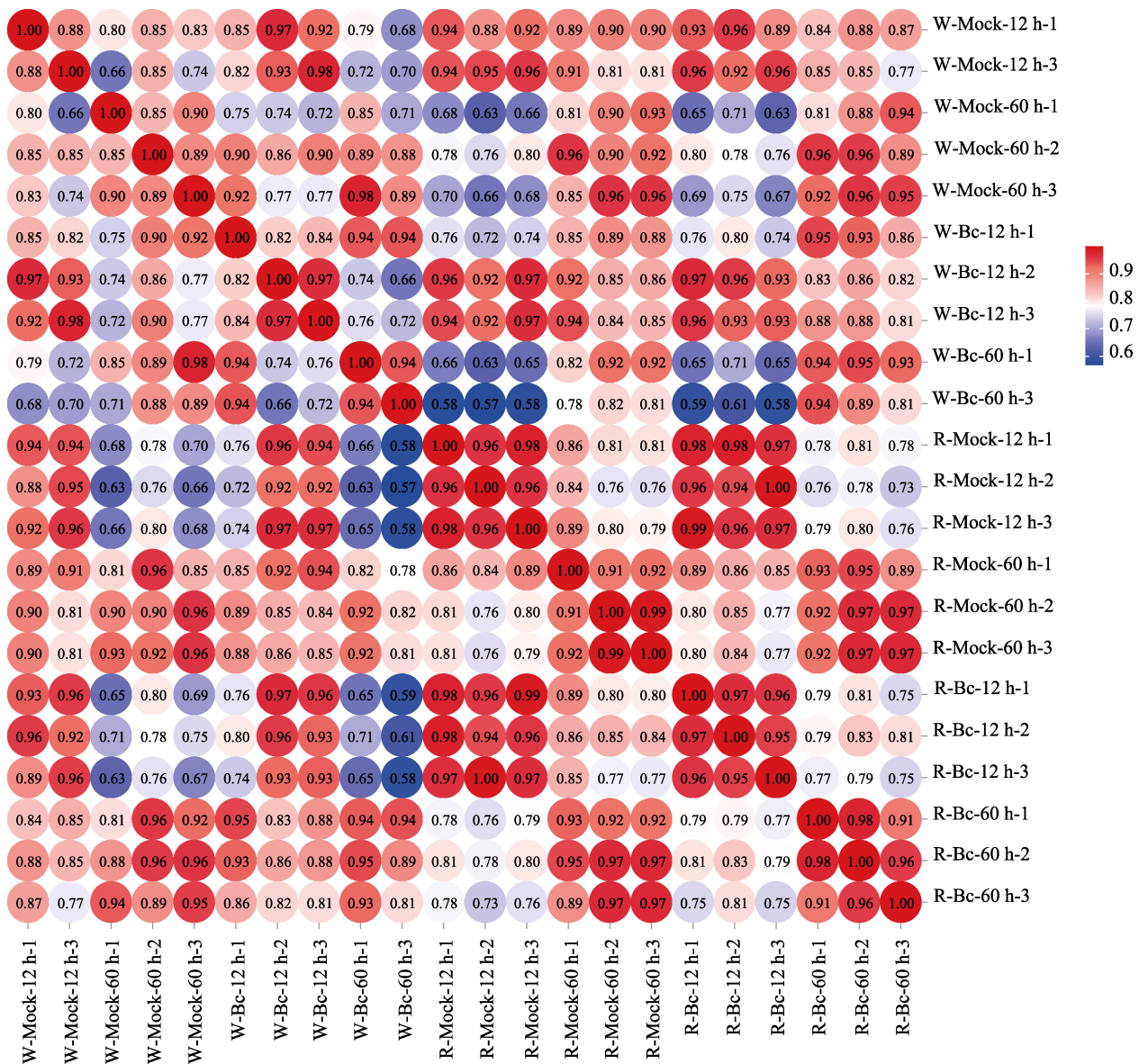


图 2 样本间相关性热图
Fig. 2 Sample-to-sample correlation heat map

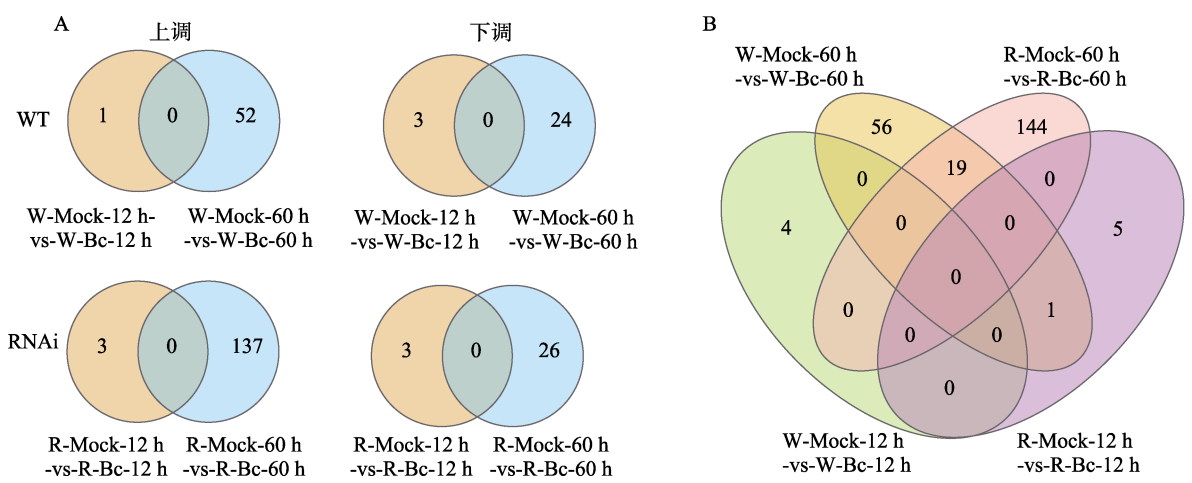


图 3 接种前后 WT 和 RNAi 番茄差异表达基因 (DEGs) 维恩图
Fig. 3 Venn diagram of DEGs between uninoculated and inoculated WT or RNAi tomato

灰霉菌对 RNAi 番茄基因表达的影响大于 WT 番茄。并且 R-Mock-vs-R-Bc 的 DEGs 和 W-Mock-vs-W-Bc 的 DEGs 之间重叠的数量非常少, 其中 W-Mock-60 h-vs-W-Bc-60 h 和 R-Mock-60 h-vs-R-Bc-60 h 的 DEGs 之间仅有 19 个共同的 DEGs, 而 W-Mock-60 h-vs-W-Bc-60 h 和 R-Mock-12 h-vs-R-Bc-12 h 的 DEGs 之间则仅有 1 个共同的 DEG, 表明 RNAi 番茄接种灰霉菌后出现大量未重叠的 DEGs (R-Mock-vs-R-Bc) 可能是增强番茄对灰霉病抗性的重要基因。

为进一步发掘导致 RNAi 抗病性增强的 DEGs, 对接种灰霉菌后 WT 和 RNAi 番茄之间的 DEGs 进行分析 (W-Bc-vs-R-Bc) (图 4)。结果发现, 与接种后 12 h 和 60 h 的 WT 相比, RNAi 番茄上调的基因分别有 406 个和 362 个, 下调的

基因分别有 183 个和 112 个 (图 4A)。与接种后期 (60 h) 相比, 接种早期 (12 h) 的 DEGs 总数更多, 接种 12 h 和 60 h, DEGs 数量分别为 589 个和 474 个; 并且接种后 12 h 和 60 h, 上调的 DEGs 数量均明显高于下调 DEGs 数量, 其中大部分为每个时期所特有的 DEGs, 只有 85 个为共同的 DEGs (图 4B), 表明 RNAi 番茄叶片在接种灰霉菌早期和后期的防御机制存在较大差异。综上, 接种灰霉菌后 WT 和 RNAi 对比 (W-Bc-vs-R-Bc) 得到的 DEGs 数量 (图 4) 高于 WT 接种前后对比 (W-Mock-vs-W-Bc) 和 RNAi 接种前后对比 (R-Mock-vs-R-Bc) 得到的 DEGs 总数 (图 3)。因此, 后续的转录组分析仅聚焦于接种灰霉菌后 WT 和 RNAi 对比 (W-Bc-vs-R-Bc) 得到的 DEGs。

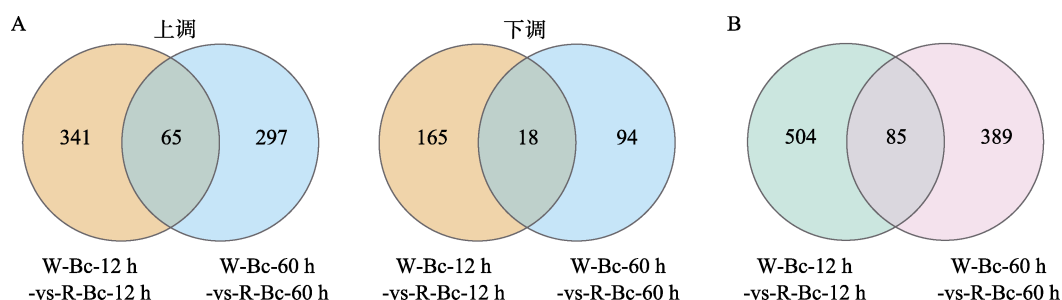


图 4 接种后 WT 和 RNAi 番茄差异表达基因的维恩图

Fig. 4 Venn diagram analysis of DEGs between inoculated WT and RNAi tomato

2.4 差异表达基因的 GO 富集分析

利用 GO 数据库, 对上述 589 个 W-Bc-12 h-vs-R-Bc-12 h 的 DEGs 和 474 个 W-Bc-60 h-vs-R-Bc-60 h 的 DEGs 进行 GO 富集分析, 发现 12 h 和 60 h 的 DEGs 分别分布在三大类功能注释中的 39 个和 46 个类别。其中, 12 h 的 DEGs 在生物学过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 和细胞组分 (cellular component, CC) 中分别有 20 个、8 个和 11 个类别 (图 5A), 而 60 h 的 DEGs 在上述三大类功能注释中分别有 21 个、11 个和 14 个类别 (图 5B)。因此, 接种 12 h 和 60 h 的 DEGs 均主要集中于 BP, 其次是 CC, 第三为 MF。进一步分析表明, 接种 12 h 的 BP 包括代谢过程、细胞过程、单生物过程、应激反应等词条, MF 包括催化活性、粘合、转运活性和核酸结合转录因子活性等词条, CC 包括细胞、细胞组分、细胞器和膜等词条。值得注意的是, 尽管接种 60 h 和 12 h 的 DEGs 在三大类功能

注释中的词条种类和数目存在一定的差异, 但接种 60 h 的 DEGs 在三大类功能注释中的前 5 个词条和接种 12 h 的完全一致, 表明 CWIN 在接种灰霉菌早期和后期调控番茄抗病性的机理存在一定的相似性。

2.5 差异表达基因的 KEGG 注释和 MapMan 图

在生物体内, 不同蛋白相互协调行使其生物学功能, 基于 Pathway 的分析有助于更进一步了解 DEG 的生物学功能, KEGG 是有关 Pathway 的主要公共数据库^[24]。将 2.3 中的 DEGs 在 KEGG 数据库中进行 Pathway 注释发现, W-Bc-12 h-vs-R-Bc-12 h 的 DEGs 共富集到 85 个通路, 其中只有 5 个显著性富集的通路 (图 6A), 包括次生代谢物生物合成 (biosynthesis of secondary metabolites)、代谢途径 (metabolic pathways)、DNA 复制 (DNA replication)、淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism) 以及甾族化合物生物合成 (steroid biosynthesis); W-Bc-60 h-vs-R-

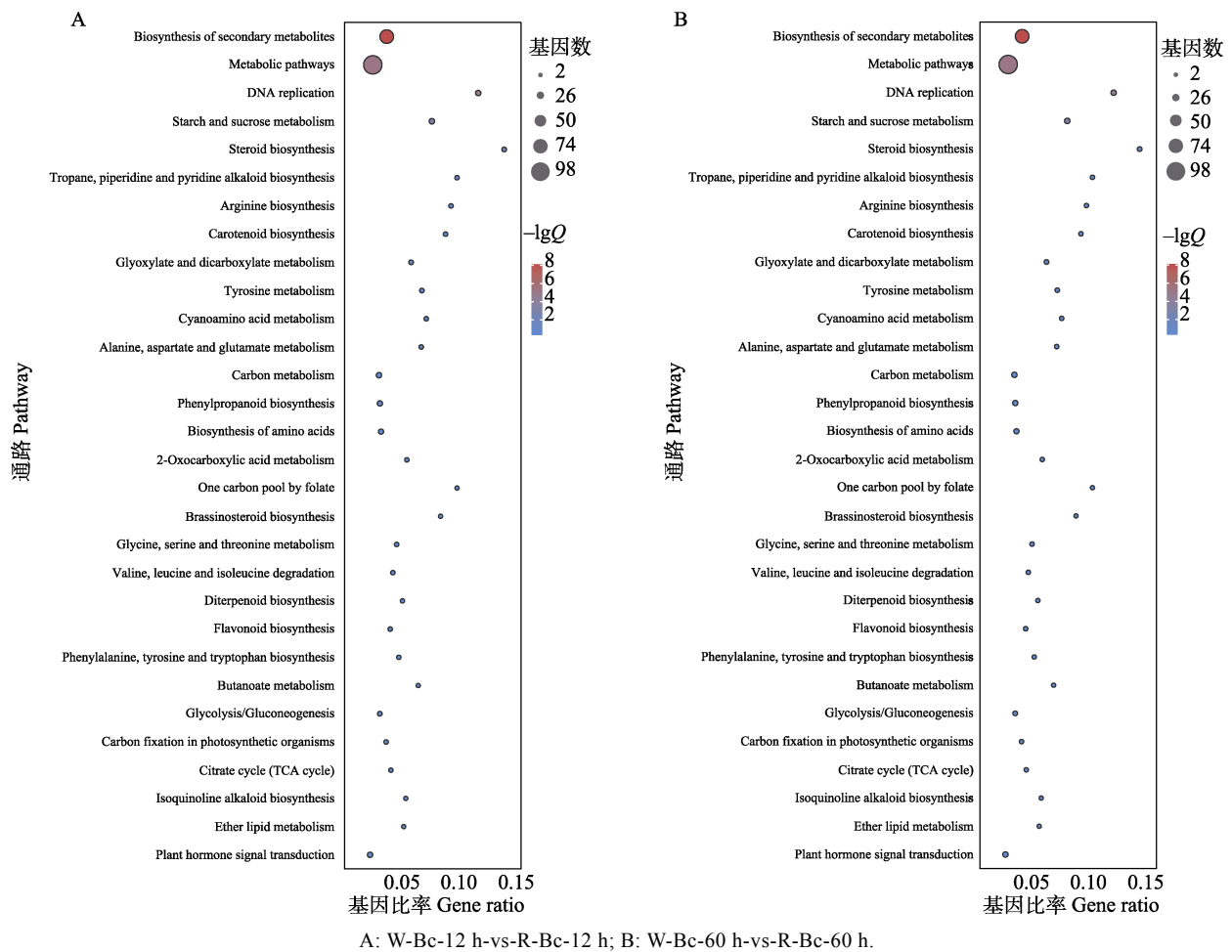
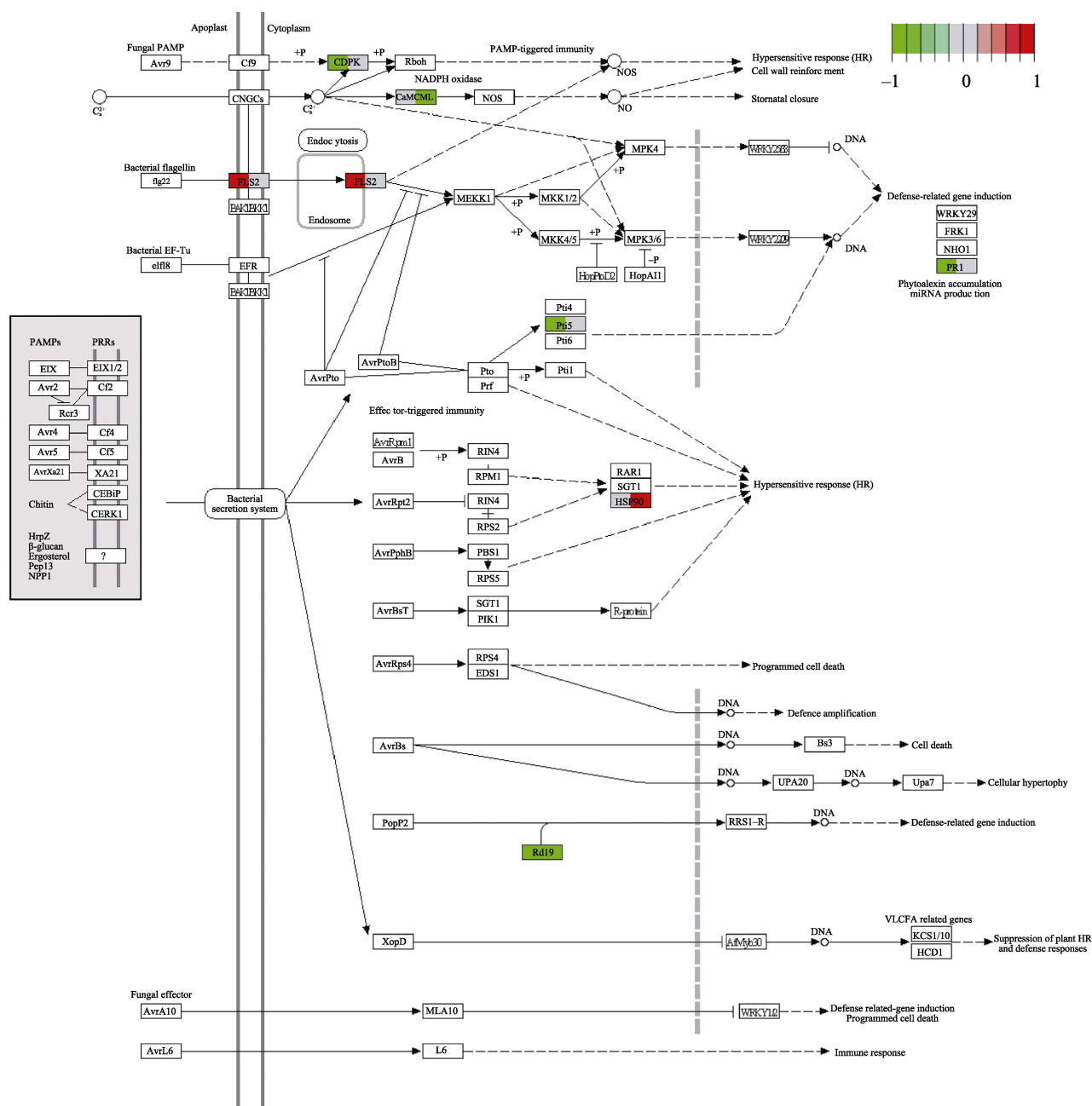


图 6 差异基因 Pathway 富集结果
Fig. 6 Pathway enrichment results of DEGs

为进一步鉴定出与灰霉病抗病性密切相关的 DEGs，尝试将所有 DEGs 整合到植物-病原菌互作中（图 7）。结果发现，接种后 12 h 和 60 h 的 DEGs 主要富集到 4 个通路中，包括超敏反应（hypersensitive response）、细胞壁增强（cell wall reinforcement）、气孔关闭（stomatal closure）和防御相关基因诱导（defense-related gene induction）。与 WT 相比，接种 12 h 的 RNAi 番茄的超敏反应和胞壁增强通路中的的钙依赖蛋白激酶基因 *CDPK*（Solyc02g083850.3）以及防御相关基因诱导通路中的基因 *Pti5*（Solyc02g077370.1）、*Rd19*（Solyc01g110110.3）和 *PR1*（Solyc01g106605.1、Solyc01g106620.2 和 Solyc09g007010.1），其表达下调，而同时参与超敏反应和防御相关基因诱导通路的基因 *FLS2*（Solyc02g072440.4）表达上调。接种 60 h 时，RNAi 番茄中与超敏反应有关的热激蛋白基因 *HSP90*（Solyc07g047790.3）表达上调，而气孔关闭和细胞壁增强基因 *CaLM/CML*

（Solyc03g118810.1）、防御相关基因诱导基因 *Rd19*（Solyc01g110110.3）则表达下调。综上，所有 1063 个 DEGs 中仅有 9 个基因富集到植物-病原菌互作通路中，表明这些基因可能在 CWIN 增强番茄对灰霉病抗性过程中发挥着重要的作用。

植物激素（如水杨酸和茉莉酸等）在植物抗病中发挥着重要的调控作用^[25]。通过将相关 DEGs 整合到植物激素信号通路中（图 8），发现与 WT 相比，接种灰霉菌后 RNAi 番茄的 1 个生长素内向转运载体基因 *Aux1*（Solyc10g055260.2, auxin influx carrier）和 5 个生长素响应蛋白基因 *Aux/IAA*（Solyc01g097290.4、Solyc06g053830.3、Solyc08g021820.3、Solyc09g083280.3、Solyc09g083290.3, auxin-responsive protein）、2 个生长素响应基因 *GH3*（Solyc07g054580.3、Solyc10g008520.3, auxin responsive GH3 gene family）的表达均上调，只有 1 个生长素响应因子基因 *ARF*（Solyc04g081240.2, auxin response factor）的表达下调，但



方框被分成 2 部分，左侧表示 W-Bc-12 h-vs-R-Bc-12 h，右侧表示 W-Bc-60 h-vs-R-Bc-60 h。灰色框或无颜色填充框表示没有为该 KO (KEGG Ontology) 项分配 DEG。颜色渐变代表 log2 倍率，红色代表上调，绿色代表下调。

The box is divided into two halves. The left represents W-Bc-12 h-vs-R-Bc-12 h and the right represents W-Bc-60 h-vs-R-Bc-60 h. Gray box or no color fill means no DEG was assigned to that KO term. Color gradient represents log2 fold ratios with red representing up-regulation and green representing down-regulation.

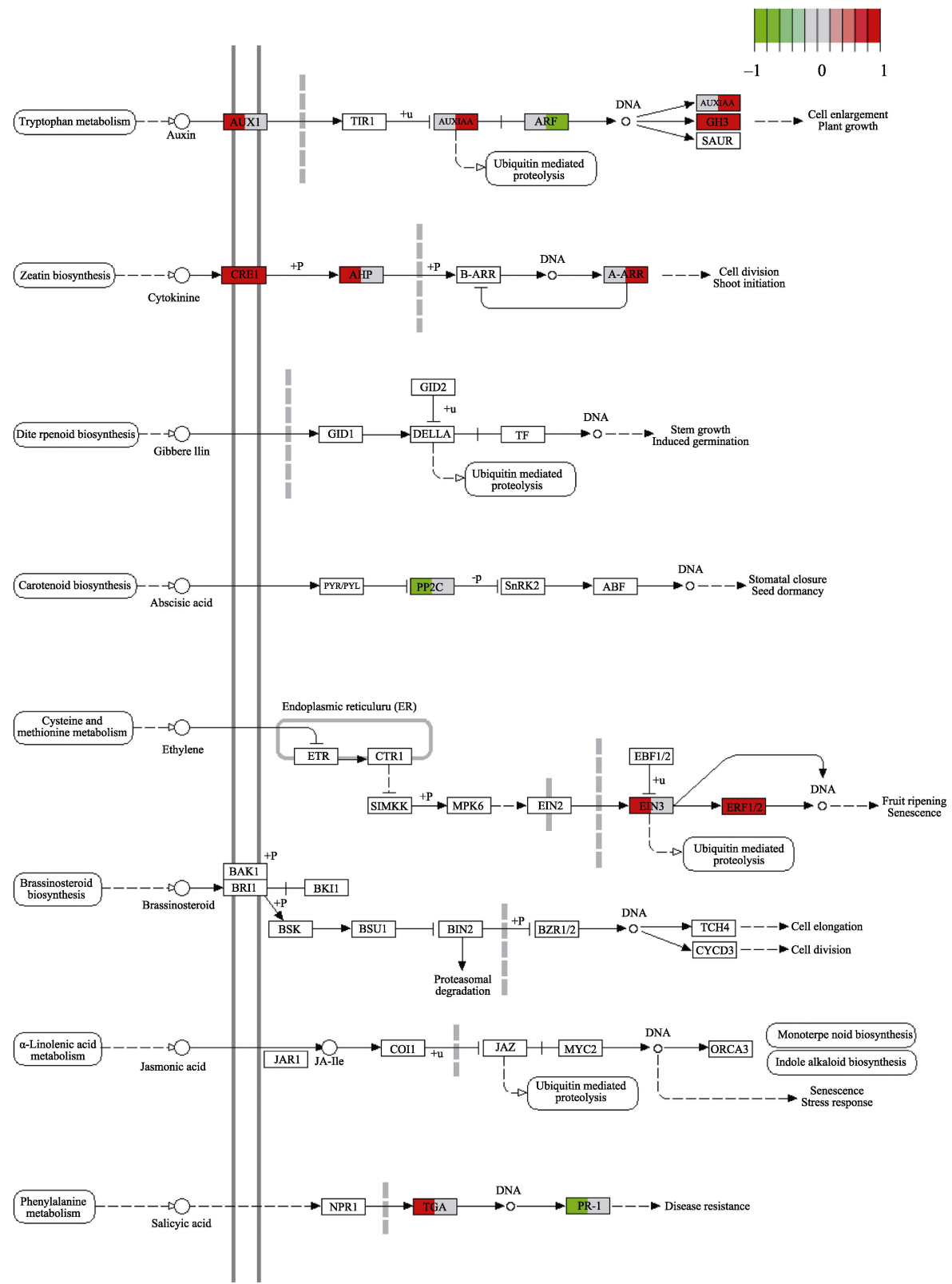
图 7 植物-病原互作通路图

Fig. 7 Plant-pathogen interaction pathway

ARF 是生长素信号途径中的负调控因子^[26-27]。

和生长素信号途径类似，接种灰霉菌后 RNAi 番茄的细胞分裂素信号途径也呈现上调趋势，包括 2 个细胞分裂素受体基因 *CRE1* (Solyc04g008110.3, Solyc04g008110.3, cytokinin receptor)、2 个 *AHP* 基因 (Solyc01g098400.3, Solyc08g066350.2, histidine-containing phos-

photransfer protein) 和 1 个 *A-ARR* 基因 (Solyc05g006420.3, two-component response regulator ARR-A family) 的表达均上调。此外，乙烯信号转导途径的 1 个 *EIN3* 基因 (Solyc01g006650.2, ethylene-insensitive protein 3) 和 1 个乙烯响应转录因子基因 *ERF1/2* (Solyc05g051180.3, ethylene-responsive transcription factor 1) 的表达同样上调。



方框被分成 2 个部分，左侧表示 W-Bc-12 h-vs-R-Bc-12 h，右侧表示 W-Bc-60 h-vs-R-Bc-60 h。灰色框或无颜色填充框表示没有为该 KO（KEGG Ontology）项分配 DEG。颜色渐变代表 log2 倍率，红色代表上调，绿色代表下调。

The box is divided into two halves. The left represents W-Bc-12 h-vs-R-Bc-12 h and the right represents W-Bc-60 h-vs-R-Bc-60 h. Gray box or no color fill means no DEG was assigned to that KO term. Color gradient represents log2 fold ratios with red representing up-regulation and green representing down-regulation.

图 8 植物激素信号转导通路图

Fig. 8 DEGs mapped on plant hormone signal transduction pathway

值得注意的是, RNAi 番茄的脱落酸信号途径的 1 个 *PP2C* 基因 (Solyc07g040990.4, protein phosphatase 2C) 的表达出现下调, 这可能会导致病菌侵染期间气孔关闭受阻, 这与植物病原菌互作通路分析 (图 7) 得到的结果相同。最后, 水杨酸信号途径上游的 1 个 *TGA* 基因 (Solyc05g009660.4, transcription factor) 的表达上升, 但下游 3 个 *PR-1* 基因 (Solyc01g106605.1、Solyc01g106620.2、Solyc09g007010.1, pathogenesis-related protein 1) 的表达下降, 表明 RNAi 番茄叶片中的水杨酸信号途径总体呈减弱的趋势。总体而言, 与 WT 相比, 接种后 RNAi 番茄叶片中的生长素、细胞分裂素、乙烯信号途径增强, 而脱落酸和水杨酸信号途径则减弱。

为进一步鉴定番茄对灰霉病抗性相关的 DEGs, 利用 MapMan 软件对上述 DEGs 进行生物胁迫相关基因分析 (图 9)。在激素信号方面, RNAi 番茄在生长素和乙烯信号途径方面得到增强, 在脱落酸信号途径上减弱, 这和植物激素信号转导通路图的分析结果一致。此外, MapMan 图还揭示出 RNAi 番茄在油菜素内酯和茉莉酸途径上也得到增强, 而这 2 种激素信号途径的增强也有助于提高植物的抗病性^[25]。

此外, RNAi 番茄在细胞壁合成、蛋白水解、氧化还原状态、过氧化物酶、抗病信号转导、次生代谢物方面也得到极大的加强, 特别是次生代谢物相关基因的上调与 KEGG 分析结果一致 (图 6)。值得注意的是, 和植物抗病密切相关的转录因子 MAPK 和 WRKY 出现下调或者未富集到的情况, 这和前人的研究结果^[28]并不相同, 表明 MAPK 和 WRKY 并未参与防御反应, CWIN 对番茄灰霉病抗性的调控具有其特有的机制。

2.6 RNA-seq 数据的 qRT-PCR 验证

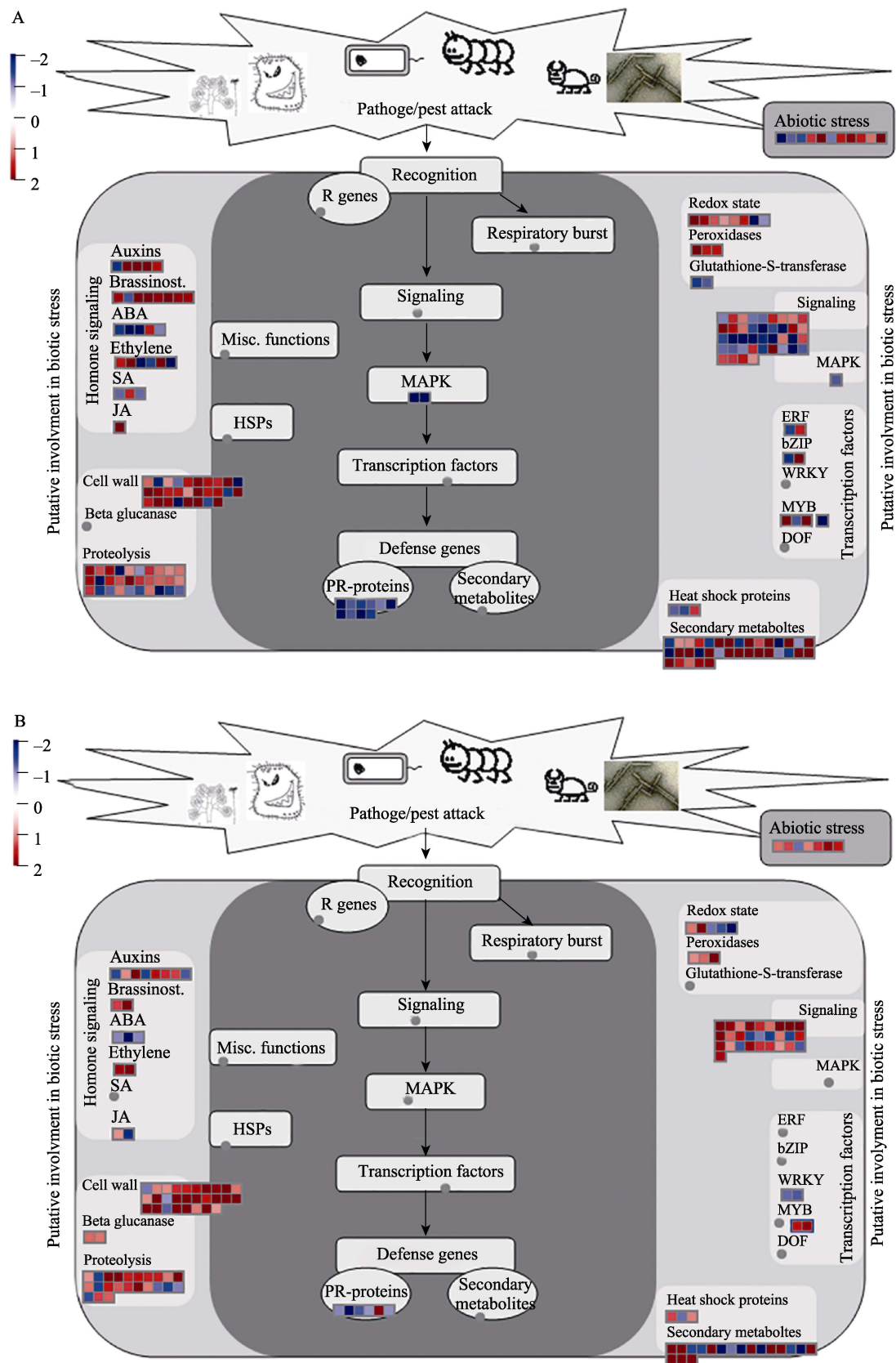
为验证 RNA-seq 数据的准确性, 选取 10 个 DEGs (表 1), 并使用与 RNA-seq 相同的总 RNA 进行 qRT-PCR 试验。结果表明, qRT-PCR 相对表达量的对数值与 RNA-seq 分析的 $\log_2FC$ 趋势一致 (图 10), 表明本研究的 RNA-seq 数据准确可靠。

3 讨论

已有研究表明, CWIN 可提高植物对死体营养型病菌的抗性, 但会降低植物对活体营养型病菌的抗性^[11]。如超表达 CWIN 基因的水

稻对死体营养型细菌病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 和真菌病菌 *Magnaporthe oryzae* 的抗性均明显增强^[29]。通过 RNA 干扰技术抑制烟草中 CWIN 的表达则导致植株对死体营养型卵菌病原菌 *Phytophthora nicotianae* 的抗性降低^[30]。与此相反, CWIN 可降低植物对活体营养型病菌的抗性。如番茄 CWIN 基因 *LIN8* 的沉默不仅未降低番茄植株的抗性, 反而增加了其对活体营养型细菌病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* 的抗性^[31]。同样, 通过超表达 CWIN 抑制因子的方法降低 CWIN 的活性导致拟南芥对活体营养型真菌病菌 *Plasmodiophora brassicae* 抗性增加^[32]。灰霉病是番茄生产中常见的病害, 灰霉病菌属于死体营养性病菌^[19], 推测 CWIN 活性的升高会增强番茄对灰霉病的抗性。通过灰霉病菌离体接种试验研究表明, 提高 CWIN 活性确实可显著增强番茄对灰霉病的抗性。对番茄叶片 CWIN 活性的测定表明, 接种 0 h, RNAi 番茄叶片的 CWIN 活性显著高于 WT。接种 12、60 h 后, 2 种基因型番茄叶片的 CWIN 活性受灰霉菌的诱导均呈快速上升趋势, 导致 CWIN 活性在 RNAi 和 WT 上的差异消失。因此, RNAi 和 WT 的抗病性差异主要是由于接种早期的 CWIN 活性差异导致的。此结果和前人研究结果^[33-34]一致, 即接种病菌后 CWIN 活性上升早有利于提高植物的抗病性, 而 CWIN 活性上升晚则不利于增强其抗病性。

对 2 种基因型番茄接种和未接种灰霉菌 12、60 h 的叶片进行取样和转录组测序后, 分别对接种前后番茄的 DEGs (W-Mock-vs-W-Bc 和 R-Mock-vs-R-Bc) 及其接种后 2 种基因型番茄的 DEGs (W-Bc-vs-R-Bc) 进行分析, 分析结果均显示: 接种 12、60 h 的 DEGs 之间的重叠数量非常少, 这表明番茄叶片在接种早期和接种后期的防御反应存在较大差异。不同的是前者分析表明, 接种后期 (60 h) 番茄叶片的 DEGs 数量大幅高于接种早期 (12 h), 而后者分析表明, 接种早期 (12 h) DEGs 总数明显高于接种后期 (60 h)。考虑到接种早期是病菌侵染的关键时期且 2 种基因型番茄的 CWIN 活性差异仅存在于接种早期, 因此对接种早期更多数量的 DEGs 分析有助于阐明 CWIN 调控灰霉病抗性的分子机制并挖掘关键抗病基因。据此后续的转录组分析仅聚焦于 W-Bc-vs-R-Bc 分析得到的 DEGs。



A: W-Bc-12 h-vs-R-Bc-12 h; B: W-Bc-60 h-vs-R-Bc-60 h. 红色表示上调基因，蓝色表示下调基因。
A: W-Bc-12 h-vs-R-Bc-12 h; B: W-Bc-60 h-vs-R-Bc-60 h. Red and blue indicates up-regulated and down-regulated genes, respectively.

图 9 生物胁迫相关基因的 MapMan 图
Fig. 9 MapMan overview of the genes involved in biotic stress

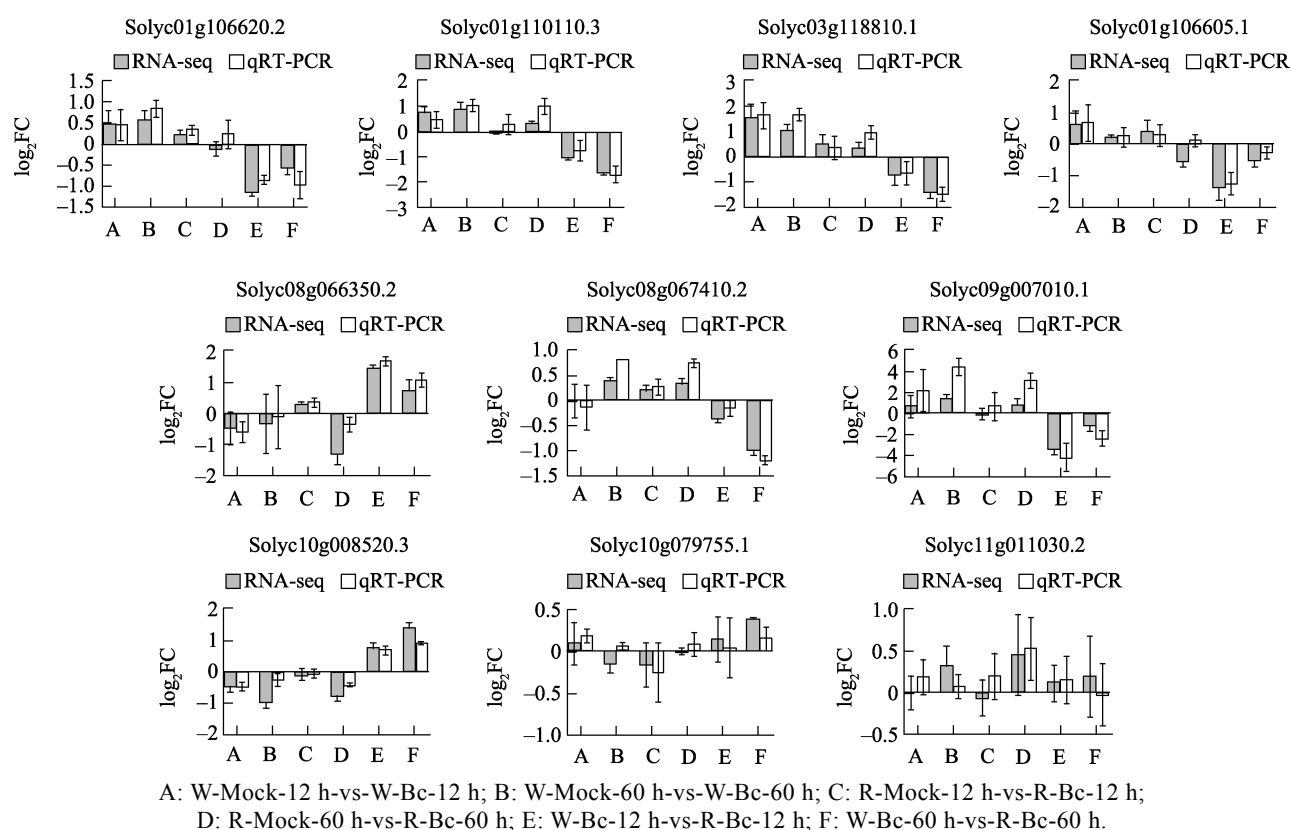


图 10 RNA-Seq 数据的 qRT-PCR 验证

Fig. 10 qRT-PCR validation of RNA-Seq data

对 DEGs (W-Bc-vs-R-Bc) 的 KEGG 注释表明, 接种灰霉病菌 12 h 的 DEGs 共富集到 85 个通路上, 其中只有 5 个显著性富集的通路, 包括次生代谢物生物合成 (biosynthesis of secondary metabolites)、代谢途径 (metabolic pathways)、DNA 复制 (DNA replication)、淀粉和蔗糖代谢 (starch and sucrose metabolism) 以及甾族化合物生物合成 (steroid biosynthesis); 虽然接种 60 h 的 DEGs 共富集到 74 个通路, 但并未发现显著性富集的通路。KEGG 注释表明, 与 CWIN 增强番茄对灰霉病抗性密切相关的 DEGs 可能主要存在于接种早期, 这与接种后 12 h 比 60 h 具有更多数量的 DEGs 分析结果一致。

上述 KEGG 注释虽然发现 5 个 DEGs 显著富集的通路, 但这些通路中的基因并不是均与植物的抗病性相关, 因此继续进行植物-病原菌互作图分析, 以鉴定出和番茄抗病性密切相关的基因。结果发现, 有 9 个 DEGs 富集到 4 类通路中, 其中值得关注的是同时参与超敏反应和防御相关基因诱导的基因 *FLS2* (Solyc02g072440.4) 以及参与与超敏反应有关的热激蛋白基因 *HSP90* (Solyc07g047790.3), 与接种后的 WT 相比, 这

2 个基因在接种后的 RNAi 番茄中均显著上调。研究表明, *FLS2* 是富含亮氨酸重复 (LRR) 受体类丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 (LRR-receptor serine/threonine-like kinase), 是植物的先天性免疫系统的重要组成部分, 构成植物防御病原微生物感染的第一道防线, 同时对系统获得性抗性 (SAR) 的激活也有重要的影响^[35-36]。此外, 超敏反应是植物抵抗病菌侵染最有效和最直接的抗性反应之一^[37], 而 *HSP90* 基因作为超敏反应的下游成分, 可通过激活植物的超敏反应来提高植物的抗病性^[38]。因此, *FLS2* 和 *HSP90* 这 2 个基因可能是 CWIN 增强番茄对灰霉病抗性途径中的重要基因。

植物激素如水杨酸 (SA) 和茉莉酸 (JA) 在植物抗病中发挥着重要的调控作用^[25]。通过继续将相关 DEGs 整合到植物激素信号通路中, 发现与 WT 相比, 接种灰霉病菌后 RNAi 番茄的生长素 (IAA)、细胞分裂素 (CTK) 和乙烯 (ET) 信号途径增强, 而脱落酸 (ABA) 和 SA 信号途径则减弱。生物胁迫相关基因的 MapMan 作图分析也部分验证了上述结果, 即接种灰霉病菌后 RNAi 番茄在 IAA 和 ET 信号途径得到增强, 而 ABA 信号途径减弱。此外, MapMan 作图还发现 RNAi

番茄在油菜素内酯 (BR) 和茉莉酸 (JA) 途径上也得到增强。

植物激素在广义上也属于次生代谢物, 因此该结果和 KEGG 注释得到结果一致, 即次生代谢物生物合成是富集到的显著性最高的通路。在植物激素中, SA 和 JA/ET 因其在植物抗病中的重要作用而被称作抗病相关激素, 其中 SA 可增强植物对活体营养型病菌 (如 *Pst* DC3000) 的抗性, 而 JA/ET 可增强植物对死体营养型病菌 (如灰霉病菌) 的抗性, 且 SA 和 JA/ET 之间存在拮抗作用^[25, 39]。因此, 接种灰霉病菌后 RNAi 番茄中 JA 和 ET 信号途径的上调可增加番茄对灰霉病的抗性, 同时 SA 信号途径的减弱也可进一步增强 JA/ET 信号途径的作用。IAA 和 CTK 被称作生长促进激素, 而 ABA 属于衰老促进激素^[40]。接种后, RNAi 番茄叶片中的 IAA 和 CTK 信号途径增强, 而 ABA 信号途径减弱, 这样可以抑制病菌侵染期间细胞的死亡, 从而阻止灰霉病菌从死亡细胞上获得必要的养分供应用于侵染番茄。虽然在正常生长发育条件下, 乙烯也属于衰老相关激素, 但在病菌胁迫下, 乙烯信号途径的主要作用是增强植物的抗病性^[25, 40]。总之, CWIN 转化酶可通过调控植物激素信号途径来增强番茄对灰霉病的抗性。此外, MapMan 图还揭示接种灰霉病菌后 RNAi 番茄在细胞壁代谢、蛋白水解、活性氧 (氧化还原状态和过氧化物酶)、次生代谢物方面也得到极大的加强, 其中次生代谢物相关基因的上调和 KEGG 分析结果一致, 而这些途径也均有助于增强植物的抗病能力^[41-42]。

以往有关 CWIN 调控植物抗病性的研究主要通过组织学、生理生化、qRT-PCR 等方法^[29-32], 尚无采用转录组测序方法进行研究的报道。已有研究表明, CWIN 主要通过激活植物防御反应来提高植物对死体营养型病害的抗性, 包括细胞壁加厚 (如胼胝质合成)、活性氧积累和超敏反应 (HR)、抗病激素的积累 (主要是水杨酸、茉莉酸和乙烯)、病程相关蛋白 (如 PR 蛋白) 和次生代谢物的合成 (如植物毒素和多酚等)、气孔关闭等^[41-42]。本研究转录组测序结果不仅部分验证了已有研究结果, 而且还发现 CWIN 调控番茄对灰霉病的抗性新机制和新途径。如在植物激素信号途径方面, 除了发现抗病激素水杨酸、茉莉酸和乙烯外, 还发现生长素、细胞分裂素和脱落酸信号途径也参与了 CWIN 对植物抗病性的调控。此

外, 大量蛋白水解相关基因在 RNAi 番茄中显著上调, 鉴于灰霉病菌的致病因子包含了多种酶, 如天冬氨酸蛋白酶、多聚半乳糖醛酸酶和漆酶^[43-44], 同时灰霉病还可分泌大量寄主降解酶^[45]。因此, RNAi 番茄很可能通过上调蛋白水解相关基因的表达来防御灰霉病菌的侵染。

此外, 本研究还发现有些抗病机制与已有研究结果不同。首先, 前人研究表明, CWIN 可通过减小气孔的开度来防治病菌通过气孔侵染植物, 从而提高植物的抗病能力^[41-42]。然而, 本研究表明, 促进气孔关闭的基因 *CaLM/CML* 和 *PP2C* 的表达在 RNAi 番茄中下调, 这可能会抑制气孔在病原菌侵染时的关闭, 从而导致发病加重, 但实际情况却是 RNAi 番茄的抗性增强。其原因可能是本研究在离体条件下进行, 如果植物气孔关闭幅度过大则叶片可能会因为不能进行正常光合作用从而导致叶片的糖分供应减少, 而 RNAi 番茄适当增加气孔的开度可为防御反应提供更多的糖分供应, 从而有助于提高番茄的抗病能力。其次, 与植物抗病密切相关的转录因子 MAPK 和 WRKY 出现下调或者未富集到的情况, 这与前人研究结果^[28]并不相同。这些证据表明, CWIN 调控番茄-灰霉病菌互作的机制有其独特之处, 可能与其他植物-病菌互作体系 (pathosystem) 不同。

总之, 本研究不仅表明提高番茄的 CWIN 活性可显著增强番茄对灰霉病的抗性, 而且通过转录组测序技术系统研究了 CWIN 增强番茄抗病性的分子机制, 不仅验证了已有的 CWIN 抗病机制, 而且还挖掘出一些新的 CWIN 抗病机制, 这将为下一步利用基因工程、分子育种等现代生物技术手段提高番茄对灰霉病的抗性提供理论指导。

参考文献

- [1] FAOSTAT (2020)[DB/OL]. [2023-02-20]. <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.
- [2] 张冬野. 番茄抗叶霉病 *Cf-16* 基因定位及抗病应答机制研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2020.
ZHANG D Y. Mapping of tomato leaf mold resistance gene *Cf-16* and analysis of resistance response mechanism[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2020. (in Chinese)
- [3] 陈利军, 郭世保, 田雪亮, 王国君, 史洪中, 曲良建. 产香真菌 GS-1 菌株鉴定及其挥发性物质对番茄灰霉病的生防效果[J]. 植物保护学报, 2016, 43(4): 608-613.

- CHEN L J, GUO S B, TIAN X L, WANG G J, SHI H Z, QU L J. Identification of aroma-producing fungus GS-1 strain and its biocontrol efficacy against tomato gray mold[J]. Journal of Plant Protection, 2016, 43(4): 608-613. (in Chinese)
- [4] 李保聚, 朱国仁, 赵奎华, 乔勇. 番茄灰霉病在果实上的侵染部位及防治新技术[J]. 植物病理学报, 1999(1): 64-68.
- LI B J, ZHU G R, ZHAO K H, QIAO Y. Infection gates of grey mould of tomato fruits and a new technique for its controlling[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 1999(1): 64-68. (in Chinese)
- [5] 李景富, 张贺, 许向阳. 中国番茄主要病害抗病育种研究进展[C]//中国园艺学会第十届会员代表大会暨学术讨论会论文集, 2005: 487-495.
- LI J F, ZHANG H, XU X Y. Research progress on resistance breeding of tomato main diseases in China[C]//Proceedings of the Tenth Congress and Symposium of China Horticultural Society, 2005: 487-495. (in Chinese)
- [6] 陶岚. 灰葡萄孢致病缺陷突变体库的建立及 *BcATM1* 基因的致病功能研究[D]. 长春: 吉林大学, 2016.
- TAO L. Construction of pathogenicity-deficient mutant library and functional analysis of *BcATM1* in *Botrytis cinerea*[D]. Changchun: Jilin University, 2016. (in Chinese)
- [7] WILLIAMSON B, TUDZYNSKI B, TUDZYNSKI P, VAN KAN J A L. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease[J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8(5): 561-580.
- [8] MOSER R, PERTOT I, ELAD Y, RAFFAELLI R. Farmers' attitudes toward the use of biocontrol agents in IPM strawberry production in three countries[J]. Biological Control, 2008, 47(2): 125-132.
- [9] DEAN R, VAN KAN J A L, PRETORIUS Z A, HAMMOND-KOSACK K E, DI PIETRO A, SPANU P D, RUDD J J, DICKMAN M, KAHMANN R, ELLIS J, FOSTER G D. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology: top 10 fungal pathogens[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(4): 414-430.
- [10] LEROCH M, KRETSCHMER M, HAHN M. Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany: fungicide resistance of *Bcinerea* isolates from vineyards[J]. Journal of Phytopathology, 2011, 159(1): 63-65.
- [11] LIU Y H, SONG Y H, RUAN Y L. Sugar conundrum in plant-pathogen interactions: roles of invertase and sugar transporters depend on pathosystems[J]. Journal of Experimental Botany, 2022, 73(7): 1910-1925.
- [12] RUAN Y L. Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling[J]. Annual Review of Plant Biology, 2014, 65(1): 33-67.
- [13] SONNEWALD S, PRILLER J P R, SCHUSTER J, GLICKMANN E, HAJIREZAEI M R, SIEBIG S, MUDGETT M B, SONNEWALD U. Regulation of cell wall-bound invertase in pepper leaves by *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* type three effectors[J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51763.
- [14] PARK J, KIM S, CHOI E, AUH C K, PARK J B, KIM D G, CHUNG Y J, LEE T K, LEE S. Altered invertase activities of symptomatic tissues on Beet severe curly top virus (BSCTV) infected *Arabidopsis thaliana*[J]. Journal of Plant Research, 2013, 126: 743-752.
- [15] HERBERS K, MEUWLY P, FROMMER W B, METRAUX J P, SONNEWALD U. Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexose sensing in the secretory pathway[J]. The Plant Cell, 1996, 8(5): 793-803.
- [16] ROITSCH T, BALIBREA M, HOFMANN M, PROELS R, SINHA A. Extracellular invertase: key metabolic enzyme and PR protein[J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54(382): 513-524.
- [17] NEHLS U, GÖHRINGER F, WITTULSKY S, DIETZ S. Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: a review[J]. Plant Biology, 2010, 12(2): 292-301.
- [18] FERNANDEZ J, MARROQUIN GUZMAN M, WILSON R A. Mechanisms of nutrient acquisition and utilization during fungal infections of leaves[J]. Annual Review of Phytopathology, 2014, 52(1): 155-174.
- [19] ASSELBERGH B, CURVERS K, FRANÇA S C, AUDENAERT K, VUYLSTEKE M, VAN BREUSEGEM F, HÖFTE M. Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis[J]. Plant Physiology, 2007, 144(4): 1863-1877.
- [20] JIN Y, NI D A, RUAN Y L. Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level[J]. The Plant Cell, 2009, 21(7): 2072-2089.
- [21] 赵虎, 张越亭, 刘永华. 糖分含量对番茄叶片 *Pst* DC3000 抗性的影响及其机理[J]. 浙江农业学报, 2021, 33(6): 1001-1011.
- ZHAO H, ZHANG Y T, LIU Y H. Effects of sugar content on resistance of tomato leaf to bacterial leaf spot and possible underlying mechanism[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2021, 33(6): 1001-1011. (in Chinese)
- [22] LIAN J, HAN H, ZHAO J, LI C. *In-vitro* and *in-planta* *Botrytis cinerea* inoculation assays for tomato[J]. Bio-protocol,

- 2018, 8(8): e2810.
- [23] TOMLINSON K L. Evidence that the hexose-to-sucrose ratio does not control the switch to storage product accumulation in oilseeds: analysis of tobacco seed development and effects of overexpressing apoplastic invertase[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(406): 2291-2303.
- [24] KANEHISA M, ARAKI M, GOTO S, HATTORI M, HIRAKAWA M, ITOH M, KATAYAMA T, KAWASHIMA S, OKUDA S, TOKIMATSU T, YAMANISHI Y. KEGG for linking genomes to life and the environment[J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(Suppl. 1): D480-D484.
- [25] GLAZEBROOK J. Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2005, 43: 205-227.
- [26] WANG H, JONES B, LI Z, FRASSE P, DELALANDE C, REGAD F, CHAABOUNI S, LATCHE A, PECH J C, BOUZAYEN M. The tomato Aux/IAA transcription factor IAA9 is involved in fruit development and leaf morphogenesis[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(10): 2676-2692.
- [27] DE JONG M, WOLTERS ARTS M, FERON R, MARIANI C, VRIEZEN W H. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (SIARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development[J]. *The Plant Journal*, 2009, 57(1): 160-170.
- [28] MATIĆ S, BAGNARESI P, BISELLI C, ORRU' L, AMARAL CARNEIRO G, SICILIANO I, VALÉ G, GULLINO M L, SPADARO D. Comparative transcriptome profiling of resistant and susceptible rice genotypes in response to the seedborne pathogen *Fusarium fujikuroi*[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 1-17.
- [29] SUN L, YANG D, KONG Y, CHEN Y, LI X Z, ZENG L J, LI Q, WANG E T, HE Z H. Sugar homeostasis mediated by cell wall invertase GRAIN INCOMPLETE FILLING 1 (GIF1) plays a role in pre-existing and induced defence in rice: cell wall invertase modulates disease resistance[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2014, 15(2): 161-173.
- [30] ESSMANN J, BONES P, WEIS E, SCHARTE J. Leaf carbohydrate metabolism during defense: intracellular sucrose-cleaving enzymes do not compensate repression of cell wall invertase[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2008, 3(10): 885-887.
- [31] KOCAL N, SONNEWALD U, SONNEWALD S. Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria*[J]. *Plant Physiology*, 2008, 148(3): 1523-1536.
- [32] SIEMENS J, GONZÁLEZ M C, WOLF S, HOFMANN C, GREINER S, DU Y, RAUSCH T, ROITSCH T, LUDWIG MÜLLER J. Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*: invertase and clubroot disease[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(3): 247-262.
- [33] SCHARTE J, SCHON H, WEIS E. Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*[J]. *Plant, Cell and Environment*, 2005, 28(11): 1421-1435.
- [34] EL KASMI F, HORVATH D, LAHAYE T. Microbial effectors and the role of water and sugar in the infection battle ground[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2018, 44: 98-107.
- [35] GÓMEZ-GÓMEZ L, BOLLER T. Flagellin perception: a paradigm for innate immunity[J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(6): 251-256.
- [36] MORRIS E R, WALKER J C. Receptor-like protein kinases: the keys to response[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, 6(4): 339-342.
- [37] MOORE J W, HERRERA FOESSEL S, LAN C, SCHNIPPENKOETTER W, LAGUDAH E. A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat[J]. *Nature Genetics*, 2015, 47(12): 1494-1498.
- [38] TAKAHASHI A, CASAIS C, ICHIMURA K, SHIRASU K. HSP90 interacts with RAR1 and SGT1 and is essential for RPS2-mediated disease resistance in *Arabidopsis*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2003, 100(20): 11777-11782.
- [39] VAN DER DOES D, LEON REYES A, KOORNNEEF A, VAN VERK M C, RODENBURG N, PAUWELS L, GOOSSENS A, KÖRBES A P, MEMELINK J, RITSEMA T, VAN WEES S C M, PIETERSE C M J. Salicylic acid suppresses jasmonic acid signaling downstream of SCFCO11-JAZ by targeting GCC promoter motifs via transcription factor ORA59[J]. *The Plant Cell*, 2013, 25(2): 744-761.
- [40] LIU Y H, OFFLER C E, RUAN Y L. Regulation of fruit and seed response to heat and drought by sugars as nutrients and signals[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 282.
- [41] PROELS R K, HÜCKELHOVEN R. Cell-wall invertases, key enzymes in the modulation of plant metabolism during defence responses: cell-wall invertase in the defence response[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2014, 15(8): 858-864.
- [42] TAUZIN A S, GIARDINA T. Sucrose and invertases, a part of the plant defense response to the biotic stresses[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2014, 5: 293.

- [43] MANTEAU S, ABOUNA S, LAMBERT B, LEGENDRE L. Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2003, 43(3): 359-366.
- [44] TEN HAVE A, TENBERGE K B, BENEN J A E, TUDZYNSKI P, VISSER J, VAN KAN J A L. The contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of fungal plant pathogens[M]//Agricultural Applications. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2002: 341-358.
- [45] WALTON J D. Host-selective toxins: agents of compatibility[J]. The Plant Cell, 1996, 8(10): 1723-1733.