

分类号：Q945.8

授予学位单位代码：*****

学

号：2019110212

****大學

硕士学位论文

通过编辑 SIEDR4 基因提高番茄对灰霉病的抗性和产量

Increase in Resistance to *Botrytis cinerea* and Yield by
Gene Editing of SIEDR4 in Tomato

研 究 生：***

学 科 专 业：作物学

研 究 方 向：作物遗传育种

学 院：***

指 导 教 师：***教授

2022 年 3 月 28 日

论文提交日期:

论文答辩日期:

学位授予日期:

学 科 门 类:

答辩委员会主席:

关于学位论文原创性和使用授权的声明

本人所呈交的学位论文，是在导师指导下，独立进行科学研究所取得的成果。对在论文研究期间给予指导、帮助和做出重要贡献的个人或集体，均在文中明确说明。本声明的法律责任由本人承担。

本人完全了解****大学有关保留和使用学位论文的规定，同意学校保留和按要求向国家有关部门或机构送交论文纸质本和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权****大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文，同时授权中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国学位论文全文数据库》，并向社会公众提供信息服务。

保密论文在解密后应遵守此规定。

论文作者签名：

导 师 签 名：_____

日 期：_____

符号说明

ROS: Reactive oxygen species, 活性氧

cAMP: Cyclic adenosine monophosphate, 环状磷酸腺苷

MAPK: Mitogen-activated protein kinase, 丝裂原活化蛋白激酶

CWDE: cell-wall degrading enzymes, 细胞壁降解酶

MAT: mating-type locus, 交配型位点

PR: pathogenesis related protein, 病程相关蛋白

PRR: pattern recognition receptor, 病原菌分子模式识别受体

MAMP: microbeassociated molecular pattern, 微生物相关分子模式

PAMP: pathogen-associated molecular pattern, 病原相关分子模式

DAMP: damage-associated molecular pattern, 宿主衍生和损伤相关的分子模式

PTI: PAMP triggered immunity, PAMP 相关的免疫反应

ETI: effector-triggered immunity, 效应因子诱导的免疫反应

HR: hypersensitive response, 超敏反应

PRRs: Plant innate pattern recognition receptors, 植物细胞表面模式识别受体

CERK1/LysM-RLK1: chitin elicitor receptor kinase 1, 几丁质受体激酶 1

WAK1: Wall-associated kinases 1, 细胞壁相关激酶 1

PGIPs: polygalacturonase-inhibiting proteins, 多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白

PG: endopolygalacturonases, 多聚半乳糖醛酸酶

RBPG1: *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases 1, 灰霉多聚半乳糖醛酸酶 1

rlp30: receptor-like protein 30, 类受体蛋白 30

BSK1: BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1, 油菜素类固醇信号激酶 1

EDR4: ENHANCED DISEASE RESISTANCE1, 增强型疾病抗性 4 基因

RLK902: RECEPTOR-LIKE KINASE 902, 受体样激酶 902

中文摘要.....	I
Abstract.....	III
1 前言	1
1.1 番茄是重要的经济作物和研究模式作物	1
1.1.1 番茄是重要的经济作物	1
1.1.2 番茄是一种多病害作物	1
1.1.3 番茄是研究果实发育和植物免疫的经典模式	2
1.2 灰霉病及其主要危害	2
1.2.1 灰霉病的发病机制	3
1.2.2 灰霉不同的生殖方式有利于其更好的侵染宿主	4
1.3 植物对灰霉的防御机制	5
1.4 植物防御与激素之间的关系	8
1.4.1 水杨酸 (SA) 信号通路参与植物防御反应	8
1.4.2 茉莉酸 (JA) 信号通路参与植物防御反应	9
1.4.3 乙烯 (ET) 信号通路参与植物防御反应	9
1.5 EDR 家族的功能	10
1.5.1 <i>EDR1</i> 介导了白粉抗病反应	10
1.5.2 <i>EDR2</i> 基因的功能	10
1.5.3 <i>EDR4</i> 调控植物病原菌的抗性	11
1.6 番茄的产量调控	11
1.6.1 番茄的果实产量受细胞周期和内周期调控基因影响	12
1.6.2 通过控制果实大小和形状的基因调节果实生长	12
1.6.3 果实生长的激素调节	13
1.6.4 果实发育的代谢控制	14
1.7 研究目的及意义	15
2 材料与方法	16
2.1 材料	16
2.1.1 植物材料与生长培养条件	16

2.1.2 所用菌株	16
2.1.3 生化试剂	16
2.1.4 仪器设备	17
2.1.5 基因信息网站及数据处理软件	17
2.1.6 培养基配制	17
2.1.7 溶液配制	19
2.1.8 引物	22
2.2 实验方法	22
2.2.1 番茄材料培养	22
2.2.2 灰霉菌株的保存与活化	23
2.2.3 灰霉孢子悬液制备	23
2.2.4 番茄植株的活体侵染	24
2.2.5 番茄叶片的离体侵染	25
2.2.6 染色法检测番茄活性氧含量	25
2.2.7 染色法检测番茄细胞活性：台盼蓝染色	26
2.2.8 CTAB 法提取番茄 DNA	26
2.2.9 植物组织总 RNA 的提取	26
2.2.10 cDNA 第一链的合成	27
2.2.11 荧光定量 PCR	28
3 结果与分析	29
3.1 <i>SIEDR4</i> 氨基酸序列比对和同源蛋白进化树分析	29
3.2 <i>SIEDR4</i> 基因诱导表达模式分析	30
3.3 <i>SIEDR4</i> 在番茄中的遗传转化	30
3.3.1 <i>SIEDR4-OE</i> 转基因苗鉴定	30
3.3.2 <i>SIEDR4-CR</i> 转基因苗鉴定	31
3.4 <i>SIEDR4</i> 负调控番茄对灰霉菌的抗性	32
3.5 <i>SIEDR4</i> 参与番茄对死体营养型病原的防御	32
3.6 <i>SIEDR4</i> 抑制 JA、SA 介导的抗性反应	34

3.6 <i>edr4</i> 突变体促进灰霉侵染早期 ROS 量的积累	35
3.6.1 <i>edr4</i> 突变体促进灰霉侵染后 H ₂ O ₂ 的积累.....	35
3.6.2 <i>edr4</i> 突变体促进灰霉侵染后超氧化物的积累.....	36
3.7 <i>SIEDR4</i> 调控 ROS 合成与清除关键酶基因的表达	37
3.7.1 <i>edr4</i> 突变体促进 NADPH 氧化酶基因的表达	37
3.7.2 <i>edr4</i> 突变体抑制抗氧化酶基因的表达.....	37
3.8 <i>edr4</i> 突变体抑制灰霉侵染下番茄细胞的死亡.....	38
3.9 <i>edr4</i> 突变体具有广谱抗性.....	39
3.10 <i>edr4</i> 突变体农艺性状分析	40
3.10.1 <i>edr4</i> 突变体幼苗期生长缓慢.....	40
3.10.2 <i>edr4</i> 突变体表现为早花、多花.....	40
3.10.3 <i>edr4</i> 突变体表现为高产	40
4 讨论.....	42
4.1 <i>SIEDR4</i> 负调控番茄对灰霉的抗性	42
4.2 <i>SIEDR4</i> 参与 SA、JA 信号通路以及 ROS 积累的调控	43
4.3 <i>SIEDR4</i> 调控番茄的产量	43
5 结论.....	45
参考文献.....	46
附录.....	55
致谢.....	56

中文摘要

灰霉病是一种宿主广泛的世界性真菌病害，是很多蔬菜作物的重要威胁，对我国番茄等蔬菜生产造成了严重破坏。目前对灰霉病缺乏有效抗源，主要防治措施为喷施杀菌剂。农药的持续使用不仅增加了资金投入，并造成了环境生态安全和食品安全问题。利用遗传育种，培育抗病种质是可持续、经济、环保的病害控制策略。栽培番茄 (*Solanum lycopersicum*) 是世界范围内广泛种植的重要蔬菜作物，也是研究植物免疫反应的经典模式。本研究以番茄为模式，通过基因编辑技术对目的基因 *SIEDR4* 进行编辑，研究了 *SIEDR4* 调控番茄防御灰霉病的机制，并揭示该基因对番茄产量性状的影响。

拟南芥基因 *EDR4* 是调控植物免疫反应的重要基因。我们从番茄基因组中鉴定了 *EDR4* 的同源基因 *SIEDR4*。氨基酸序列比对显示 *SIEDR4* 含有保守结构域 zinc_ribbon_12。*SIEDR4* 与拟南芥 *EDR4* zinc_ribbon 结构域相似度仅为 40%。为了揭示 *SIEDR4* 在番茄中的生物学功能，我们利用 CRISPR/Cas9 基因编辑创制了 *SIEDR* 功能丧失突变体，以及过表达植株。qRT-PCR 结果表明，*SIEDR4* 在基因编辑突变体植株中表达水平显著降低，在过表达突变体植株中表达水平显著上调。

基因编辑突变体 *edr4-1* 中 *EDR4* 基因的阅读框提前终止，功能丧失。番茄离体叶片灰霉侵染实验结果表明，与背景型相比 *edr4-1* 病斑面积显著变小，而过表达株系 35s:*EDR4-GFP* 的病斑面积显著增大。这表明 *SIEDR4* 能够负调控番茄的灰霉抗性。我们检测了 *edr4-1* 突变体和背景型植株中 JA、SA 信号通路相关抗性基因的表达。结果显示。灰霉侵染后 JA、SA 相关抗性基因受到诱导，整体表现为 *edr4-1* 表达水平高于背景型 M82。表明 *SIEDR4* 调控番茄中 SA、JA 介导的抗性反应。植物在被病原菌侵染过程中会释放出大量的 ROS，是抗性反应的重要信号分子。我们通过 DAB 和 NBT 染色，检测灰霉侵染 *edr4-1* 突变体和 M82 中 H_2O_2 和 O_2^- 的含量。灰霉侵染后，*edr4-1* 突变体中 ROS 含量显著高于 M82，正常状态下 *edr4-1* 突变体中 O_2^- 含量高于 M82，灰霉侵染后 *edr4-1* 突变体中 ROS 含量显著高于 M82。我们检测了 *edr4-1* 突变体和 M82 中 ROS 合成与清除关键酶基因的表达，发现 *edr4-1* 突变体中 NADPH 氧化酶相关基因表达量显著高于 M82，抗氧化酶基因表达量显著低于 M82，*SIEDR4* 调控 ROS 合成与清除关

键酶基因的表达，促进 *edr4-1* 突变体 ROS 的积累。通过台盼蓝染色发现，M82 染色范围远大于 *edr4-1* 突变体，*edr4-1* 突变体死亡细胞少于 M82，表明 *edr4-1* 突变体减少灰霉侵染下番茄细胞的死亡。

我们对 *edr4* 突变体以及背景型 M82 进行了农艺性状统计，发现在番茄幼苗期（2-7 周）*edr4* 突变体株高显著低于 M82，生长发育缓慢。通过对 50 天龄植株花量及第一穗花下叶片数进行统计，结果发现 *edr4* 突变体相较于 M82 表现为早花、多花。果实全部成熟后，我们对其重量进行了统计，结果显示 *edr4* 突变体相较于 M82 表现为高产。

综上所述，*edr4* 突变体能够通过激活更强烈的 JA、SA 防御反应，增加 ROS 积累以及保护番茄细胞增强灰霉抗性，同时通过增加开花数目，提前花期来提高番茄果实产量。表明，*SIEDR4* 基因能够负调控番茄对灰霉病的抗性和产量。本研究为培育番茄抗病高产品种提供了新的策略和技术路线，也为番茄抗病机制的后续研究提供了理论基础。

关键词：番茄；灰霉菌；*SIEDR4*；产量

Increase in Resistance to *Botrytis cinerea* and Yield by Gene Editing of *SIEDR4* in Tomato

Abstract

Botrytis cinerea is a worldwide fungal disease with a wide range of hosts. It is an important threat to many vegetable crops, and has caused serious damage to the production of vegetables such as tomatoes in my country. At present, there is no effective source of resistance to *Botrytis cinerea*, and the main control measures are spraying fungicides. The continuous use of pesticides not only increases capital investment, but also causes environmental ecological safety and food safety problems. Using genetic breeding to develop disease-resistant germplasm is a sustainable, economical and environmentally friendly disease control strategy. Cultivated tomato (*Solanum lycopersicum*) is an important vegetable crop widely grown worldwide, and it is also a classic model for studying plant immune responses. In this study, using tomato as a model, the target gene *SIEDR4* was edited by gene editing technology to study the mechanism of *SIEDR4* regulating tomato defense against gray mold, and to reveal the effect of this gene on tomato yield traits.

The *Arabidopsis* gene *EDR4* is an important gene regulating plant immune responses. We identified the *EDR4* homolog, *SIEDR4*, from the tomato genome. Amino acid sequence alignment showed that *SIEDR4* contained the conserved domain zinc_ribbon_12. The similarity between *SIEDR4* and *Arabidopsis* *EDR4* zinc_ribbon domain is only 40%. To reveal the biological function of *SIEDR4* in tomato, we used CRISPR/Cas9 gene editing to create *SIEDR* loss-of-function mutants, as well as overexpressing plants. The results of qRT-PCR showed that the expression level of *SIEDR4* was significantly decreased in gene editing mutant plants, and the expression level was significantly increased in overexpression mutant plants.

The reading frame of the *EDR4* gene in the gene editing mutant *edr4-1* is terminated prematurely and is loss-of-function. The results of *Botrytis cinerea* infection experiments on in vitro tomato leaves showed that compared with the background type, the lesion area of *edr4-1* was significantly smaller, while the lesion area of the overexpression line *35s:EDR4-GFG* was

significantly increased. This indicated that *SIEDR4* could negatively regulate *Botrytis cinerea* resistance in tomato. We detected the expression of JA and SA signaling pathway-related resistance genes in *edr4-1* mutant and background plants. The results show that, JA and SA related resistance genes were induced after *Botrytis cinerea* infection, and the overall expression level of *edr4-1* was higher than that of background type M82. It indicated that *SIEDR4* regulated SA and JA-mediated resistance responses in tomato. Plants release a large amount of ROS during infection by pathogens, which are important signaling molecules for resistance responses. We detected the content of H_2O_2 and O_2^- in *Botrytis cinerea* infected *edr4-1* mutant and M82 by DAB and NBT staining. After *Botrytis cinerea* infection, the ROS content in the *edr4-1* mutant was significantly higher than that in M82. Under normal conditions, the O_2^- content in the *edr4-1* mutant was higher than that in M82. After the *Botrytis cinerea* infection, the ROS content in the *edr4-1* mutant was significantly higher on M82. We detected the expression of key enzyme genes for ROS synthesis and scavenging in *edr4-1* mutant and M82, and found that the expression of NADPH oxidase-related genes in *edr4-1* mutant was significantly higher than that of M82, and the expression of antioxidant enzyme genes was significantly lower than that of M82, *SIEDR4* regulates the expression of key enzyme genes for ROS synthesis and scavenging, and promotes the accumulation of ROS in *edr4-1* mutants. It was found by trypan blue staining that the staining range of M82 was much larger than that of the *edr4-1* mutant, and the number of dead cells in the *edr4-1* mutant was less than that of M82, indicating that the *edr4-1* mutant reduced the death of tomato cells under *Botrytis cinerea* infection.

We conducted statistics on agronomic traits of *edr4* mutant and background type M82, and found that the plant height of *edr4* mutant was significantly lower than that of M82 at the tomato seedling stage (2-7 weeks), and the growth and development were slow. By counting the number of flowers in 50-day-old plants and the number of leaves under the first panicle, it was found that the *edr4* mutant showed earlier and more flowers than M82. After the fruits were all ripe, we counted their weights, and the results showed that the *edr4* mutant showed higher yield than M82.

In conclusion, the *edr4* mutant can enhance the resistance to *Botrytis cinerea* by activating stronger JA and SA defense responses, increasing ROS accumulation, and protecting tomato cells, and at the same time, it can improve tomato fruit yield by increasing the number of flowers and advancing the flowering period. The results indicated that *SIEDR4* gene could negatively regulate tomato resistance and yield to *Botrytis cinerea*. This study provides a new strategy and technical route for cultivating tomato disease-resistant high-yield varieties, and also provides a theoretical basis for the follow-up research on tomato disease resistance mechanism.

Keywords: Tomato; *Botrytis cinerea*; *SIEDR4*; Yield

1 前言

1.1 番茄是重要的经济作物和研究模式作物

1.1.1 番茄是重要的经济作物

番茄原产地位于南美洲安第斯山脉的厄瓜多尔境内以及秘鲁的大部分丛林地区。目前番茄在世界蔬菜作物产量中位居前列，是全世界范围内的重要果实作物。近年来在中国、日本和东南亚番茄的产量快速增长(Abreu and Fernández, 2020)。番茄一种重要的的设施栽培作物，目前为我国第四大蔬菜作物。

番茄是一种生熟皆可食用的蔬菜水果，酸甜可口，具有优良的风味，并且本身的营养价值也极为的丰富，因此深受人们的喜爱。番茄本身不含有有毒物质，含有大量人体需要的维生素以及类胡萝卜素，尤其是富含抗癌天然成分番茄红素。番茄红素本质为食物中含有的一种天然色素，属于类胡萝卜素，在人体中存在，具有特殊的抗氧化功能，可以在一定程度上清除新陈代谢及相关疾病产生的自由基（Sánchez-Moreno *et al.*, 2006），此外还具有促进前列腺健康、保护心血管（Costa-Rodrigues *et al.*, 2018）、预防癌症发生（Jain *et al.*, 2018）等多项功能。

1.1.2 番茄是一种多病害作物

栽培番茄面临多种病害的威胁。全世界范围内番茄病害有 200 多种，我国的主要番茄病害超过 30 种。尤其是在驯化改良过程中，出于对经济价值及商品属性的考虑，番茄朝着耐运输、形状规整及产量高的方向发展，这种定向人为筛选导致番茄的遗传多样性减小（赵凌侠等，2012），大量优异基因被遗弃（Williams and Clair, 1993），从而导致番茄遗传多样性的缺失。在这其中，番茄的抗病基因的多样性显著降低，从而导致现代栽培番茄相较于野生番茄抗病能力降低。

番茄的病害按照物种分类可以分成细菌类、真菌类及病毒类病害。细菌类主要包括由野油菜黄单胞菌疮痂致病变种引起的番茄疮痂病，由丁香假单球菌番茄叶斑病致病型引起的番茄细菌性斑疹病；真菌类主要包括由瓜果腐霉菌侵

染所引起的番茄猝倒病，由番茄钉头斑交链孢引起的番茄黑斑病，由粉红单端孢引起的番茄红粉病，由番茄壳二球菌侵染所引起的番茄灰斑病，由灰葡萄孢引起的番茄灰霉病，由多主枝孢和大孢枝孢引起的番茄煤污病；病毒类主要包括由番茄黄化曲叶病毒引起的番茄黄化曲叶病毒病，由番茄斑萎病毒引起的番茄斑萎病毒病（李金堂等，2010）。番茄感染病害会导致植株萎蔫、叶片脱落等多种症状，严重会导致果实腐烂变质、落果等，严重影响了番茄的产量。

1.1.3 番茄是研究果实发育和植物免疫的经典模式

番茄不仅具有极高的经济食用价值，在科学研究方面也发挥着重要作用，目前与番茄有关的论文数量逐年增长，在蔬菜作物中处于领先地位。

栽培番茄（Heinz 1706）的全基因组测序早在 2012 就已完成，这为后续以番茄作为模式作物进行抗虫、抗病、抗逆 等方面的研究以及番茄分子育种提供了基因数据支持。作为茄科植物和呼吸跃变型果实的代表，番茄具有较小的基因组、较短的生长周期及自花授粉等优点，且具有成熟的遗传转化系统，遗传背景清晰，与其他模式植物，如拟南芥、水稻等具有较远的亲缘关系，可利用的突变体资源和分子生物学工具多，因而成为研究果实发育与成熟过程的经典模式植物之一，具有重要的经济和科研价值。

1.2 灰霉病及其主要危害

灰霉病菌是一种死体营养型病原菌，它也是一种出现在衰老和死亡植物上的腐生菌。灰霉菌（*Botrytis cinerea*）在所有 *Botrytis* 属中具有最广泛的寄主范围（超过 200 种）（Amselem *et al.*, 2011），对葡萄和草莓造成的损害相对最大。灰霉菌能够感染植物的茎、叶和种子，但更喜欢果实和植物的花器官，感染的灵活性，加上其非常广泛的寄主范围，使灰霉菌成为农业的重要威胁，导致全球每年的巨大开支（Williamson *et al.*, 2007），造成的损害估计每年超过 10 亿欧元（Dean *et al.*, 2012）。由于灰霉菌感染农作物并造成巨大经济损失，人们一直尝试使用不同的合成化学物质（Rosslenbroich and Stuebner, 2000）和生物抑制等方法来对抗这种病原真菌（Elmer *et al.*, 2006）。当今社会，人们认为使用合成孢霉杀菌剂（即特定针对于孢霉的杀菌剂）控制灰霉菌感染的方法已不再适用，因为自然条件下已经出现了新的抗杀菌剂灰霉菌（Latorre *et al.*, 2002）。除此之

外，针对于特定杀菌剂的使用及其对人类健康影响也引发了激烈讨论，减少使用杀虫剂的呼声越来越高。目前的法律法规对使用化合物来防止真菌感染有严格规定。随着科学技术的发展，对于防治灰霉的方法有了更多的选择，例如植物防御刺激剂、能够和病原体产生拮抗作用的生防微生物（Moser *et al.*, 2008）。

1.2.1 灰霉病的发病机制

灰霉菌在作物上的感染始于分生孢子与植物表面的接触。孢子随气流运动，可以传播很远的距离（Jarvis *et al.*, 1977）。病原菌对于环境湿度的适应性比较强，在合适的条件下，分生孢子萌发随后形成芽管，分生孢子随后发育成附着胞。上述阶段，被称为分生孢子的渗透前阶段。在附着胞中，一系列细胞壁降解酶类的合成基因的表达量上调（Leroch *et al.*, 2013），这些酶通过降低宿主表面机械强度，促进病原菌对于宿主的定殖和侵染（van Kan, 2005）。细胞壁被破坏后，产生的损伤相关的分子模式（damage associated molecular patterns, DAMP）与 H_2O_2 的合成息息相关，二者相互协调并启动下游相应的免疫信号（van Kan, 2006）。随着植物和病原微生物上万年的协同进化，灰霉菌进化出了一个新的机制：从萌发到发展为原发病变阶段，这一过程中植物的防御机制被触发，灰霉则会减缓自身的活动，并且导致一个不确定时间的静止阶段以减少宿主的免疫反应过程（Elmer and Reglinski, 2006b）。此后，待宿主的免疫反应降低时，真菌则开始在植物组织内迅速生长。最终，灰霉菌的侵染会产生新的分生孢子，并随着气流、水流、农事操作等进行传播，随后再次开启侵染循环。整个侵染周期可在短至3-4天内发生，但每次侵染并不完全相同，有时它们可以通过跳过循环中某些特定步骤快速完成侵染过程。

最近的研究表明，灰霉菌可以通过 RNA 沉默的方法分泌小 RNA 来抑制植物的免疫反应（Weiberg *et al.*, 2013）。人们发现，在植物中至少有两条信号途径可以调控灰霉菌的侵染，分别为 cAMP（Cyclic adenosine mnophosphate，环状磷酸腺苷）途径和 MAPK（Mitogen-activated protein kinase，丝裂原活化蛋白激酶）信号通路（Tudzynski and Kokkelink, 2009; Williamson *et al.*, 2007）。灰霉菌在侵染时会分泌草酸，这种酸有许多重要功能：降低宿主表面的机械强度，增强细胞壁降解酶的效力；抑制植物的防御机制，并最终诱导程序性细胞死亡（programmed cell death, PCD），即细胞凋亡（Amselem *et al.*, 2011）。

在侵染过程中，灰霉菌在寄主植物中分泌与细胞壁裂解相关的酶和植物毒素，通过渗透作用抵达寄主植物的叶片角质层（Costa-Rodrigues *et al.*, 2018）。此后，存在于植物细胞表面的模式识别受体（pattern recognized receptors, PRR）能够识别病原物的 PAMP /MAMP，从而诱导宿主植物细胞质膜中积累活性氧（ROS），引发氧化破裂，导致植物细胞死亡。灰霉菌通过分泌细胞壁降解酶（cell-wall degrading enzymes, CWDE），来破坏表皮细胞（Jarvis *et al.*, 1977）。果胶裂解酶、鼠李糖半乳糖水解酶等蛋白是宿主组织中重要的毒力因子（Leroch *et al.*, 2013）。纤维素酶和半纤维素酶是不溶于果胶的细胞壁降解酶，可降解植物细胞壁。其他酶，如蛋白酶和漆酶，也可能参与了发病机制（Costa-Rodrigues *et al.*, 2018）。灰霉菌不仅可以分泌蛋白影响宿主的免疫反应，同时也能够分泌毒素促进灰霉菌的定殖。例如，灰霉菌通过分泌葡双醛毒素（botrydial）杀死其宿主细胞（van Kan, 2005），促进其自身定殖。其他菌株也可产生毒性毒素，如肉毒杆菌内酯（van Kan, 2006）。尽管到目前为止还没有证据表明灰芽孢杆菌产生宿主特异性毒素，但其分泌的草酸是致病性所必需的（Elmer and Reglinski, 2006b）。

总的来说，灰霉通过其分生孢子的传播特性随风扩散，待接触植物后，通过分泌小 RNA、细胞壁裂解相关的酶和植物毒素，抑制植物免疫反应，促进病菌的定殖和侵染。

1.2.2 灰霉不同的生殖方式有利于其更好的侵染宿主

灰霉菌的繁殖方式分为有性繁殖和无性繁殖（Amselem *et al.*, 2011）。无性生殖是通过菌丝形成分生孢子，利用菌丝的分生孢子梗形成分生孢子进行营养萌发，分生孢子随气流飘散，以便于局部定殖。而菌核是一种黑色的，坚硬紧密的真菌菌丝体，可以储藏营养物质，可以帮助灰霉菌度过不良的环境阶段。这种结构被称为生存结构，可以作为有性子实体受精后的发育平台（Elsevier, n.d.）。灰霉菌有性繁殖需要不同的交配伴侣，为异性繁殖。某些灰霉病菌个体能够自我受精，因此他们是同质的（Faretra *et al.*, 1988）。而当两个灰霉病菌个体“交配”时，就开始了有性生殖。有性生殖需要一个灰霉病菌个体的微分生孢子落在另一个个体的菌核上，同时这两个个体的交配型位点（mating-type locus, MAT）具有相反的性等位基因（Amselem *et al.*, 2011）。当开始有性生殖的

时候，菌核开始生长被称为“子囊盘”的子实体（Nelson, 1996）。子鞘是真菌的子实体，含有子囊孢子。这些孢子是单倍体细胞，预先包裹在被称为子囊的外部菌丝中。在一个子囊中有 $8n$ 个单倍体细胞，来源于 $4 \times 2n$ 个二倍体真菌细胞的减数分裂。这子囊孢子与分生孢子相似，也通过风传播，之后它们可能会落在寄主植物上，在那里发芽并感染寄主。综上所述，灰霉菌的不同的生殖方式能够帮助其提高对不良的环境条件的适应性，并通过有性生殖提高了基因的交换频率，有利于环境适应基因更好的交换和保存。

1.3 植物对灰霉的防御机制

植物在自然界中的生存随时受到多种病原微生物的挑战，而植物在进化过程中也形成了多种防御机制（Boller and He, 2009; Chisholm *et al.*, 2006; Dodds and Rathjen, 2010; Nürnberger *et al.*, 2004）。包括先天固有的组成型防御机制以及后天形成的诱导性防御机制。组成型防御机制指植物中原本就存在的、阻碍昆虫取食或病原菌侵染的物理和化学因子；植物细胞表面所产生的蜡质、木质素和次级代谢产物等以及当病原入侵时，植物质外体中胼胝质沉积，同时将病程相关蛋白（PR）、裂解酶、抗性次级代谢产物等分泌到质外体空间，限制叶片和根际微生物定殖（促发根际免疫），这些共同组成了植物的第一道生理防线（Liu *et al.*, 2014; Liu and Wang, 2016）。诱导型防御机制是由昆虫和病原菌诱导导致的植物抗病基因表达的改变，从而激活植物免疫系统以应对外界胁迫，也被称为先天性免疫反应（innate immunity）。植物的先天免疫系统主要包括两个层面：一类通过位于细胞膜上的病原菌分子模式识别受体（PRR）识别微生物相关分子模式（microbe associated molecular pattern, MAMP）和病原相关分子模式（pathogen-associated molecular pattern, PAMP）等病原菌表层抗原标志物，还可检测宿主衍生和损伤相关的分子模式（DAMP），如植物细胞壁、细胞外 ATP 和 NAD 释放结构。另外，植物还产生植物细胞因子免疫调节肽，其受体直接刺激免疫反应或与其他 PRR 互作以调节免疫反应。PRR 对免疫原信号的感知会激发模式诱导的免疫反应（Pattern triggered immunity, PTI）；另外一类则是通过胞内具有特异性识别能力的 NLR（nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors, NLR）识别递送到宿主细胞中的病原菌效应物（由病原菌的毒力因子进化而来），通过 NLR 与效应子间物理互作直接识别或以 NLR 与宿

主细胞效应子-靶蛋白间互作间接发生，从而激活更强烈的植物免疫防卫反应，即效应因子诱导的免疫反应（effector-triggered immunity, ETI）（Ausubel, 2005; Jones and Dangl, 2006; Zipfel, 2008）。PTI 通常防止普通的微生物感染，具有光谱性、稳定性、持久性的优点，因此是抵御疾病的重要屏障，但病原菌分泌的效应物可抑制其防御能力（Couto and Zipfel, 2016; Ronald and Beutler, 2010; Zipfel, 2008）。ETI 可以恢复和放大 PTI 的基本转录程序和抗菌素防御，通常与局部植物细胞死亡（cell death）有关，被称为超敏反应（Hypersensitive response, HR）。局部超敏反应可诱导更持久的全身免疫（全身获得性抗性），使未感染的组织能够抵御随后的病原体攻击，因此 ETI 的应用更加广泛（Coll *et al.*, 2011; DeYoung and Innes, 2006; Nelson *et al.*, 2018; Wang and Valent, 2017）。

在长期进化过程中，植物对灰霉菌的侵染进化出了多种防御策略。病原体的病原相关分子模式（MAMPs）和宿主损伤相关分子模式（DAMPs）可以激活植物的保护性免疫信号（Newman *et al.*, 2013）。植物细胞表面模式识别受体（Plant innate pattern recognition receptors, PRRs）结合致病因子 MAMPs/DAMPs，可以作为免疫系统的早期预警信号。研究发现，宿主质膜受体、几丁质受体激酶 1（chitin elicitor receptor kinase 1, CERK1/LysM-RLK1）和含有 LysM 结构域的糖基磷脂酰肌醇定位蛋白 2（LYM2）可以识别病原菌几丁质，向下游与免疫相关的组分传递信号（Faulkner *et al.*, 2013; Miya *et al.*, 2007）。DAMPs 是植物组织在病原菌侵染或非生物胁迫下释放的内源诱导子（Lorenzo *et al.*, 2011）。当植物被灰霉菌侵染后，会释放出具有 DAMPs 功能的寡糖酸酯（OGs），被 PRR 识别，激活相应免疫系统，这有助于植物抵御该病原菌（Ferrari and Simone, 2013）。拟南芥中的 WAK1（Wall-associated kinases 1，细胞壁相关激酶 1）可以识别 DAMPs，研究者发现，过表达该蛋白可增强拟南芥对灰霉菌的抗性。植物多聚半乳糖醛酸酶抑制蛋白（polygalacturonase-inhibiting proteins, PGIPs）能够限制来自真菌的多聚半乳糖醛酸酶（polygalacturonases, PG）的活性（L. Zhang *et al.*, 2021），过表达 PGIPs 基因的转基因拟南芥表现为增强的果胶降解能力，通过抑制 PG 活性降低灰霉菌的致病能力，虽然拟南芥对灰霉菌多聚半乳糖醛酸酶 1（RBPG1）（一种类受体蛋白，RLP）有反应，可以作为识别灰霉菌的 MAMPs 的受体，但过表达 *RBPG1* 的转基因植株对番茄灰霉菌病菌（L. Zhang *et al.*, 2014）

的敏感性并没有改变。

当植物识别 MAMPs/DAMPs 后，相关的类受体激酶（RLKs）将信号传递到下游靶基因，并与多个 PRR 相互作用组成信号通路（Liebrand *et al.*, 2014, p. 1）。拟南芥类受体蛋白 30（receptor-like protein 30, *rlp30*）突变体信号途径传递受到抑制，不仅表现出对核盘菌的敏感性，而且表现出对灰霉菌的敏感性。BAK1（BR 不敏感相关受体激酶 1）和 SOBIR1/EVR（BIR1/evershed 的抑制因子）是参与 RLP30 介导的信号转导中的两种 RLP，研究发现，*bak1* 突变体和 *sobir1* 突变体对灰霉表现为敏感性增加（W. Zhang *et al.*, 2013, pp. 1–1）。

BIK1（*Botrytis*-induced kinase 1，灰霉病诱导的激酶 1）基因编码一种类受体细胞质激酶（RLCK），参与介导在灰霉病菌侵染早期诱导的病原体衍生的 PTI 免疫反应（Eckardt and NA, 2011）。拟南芥 *BIK1* 基因突变体 *bik1* 表现为对坏死性真菌的敏感性增加（Veronese and P., 2006），几丁质诱导 BIK1 编码需要 BIK1 和 MAPK 的参与（J. Zhang *et al.*, 2010）。

研究表明，被激活的丝裂原活化蛋白激酶（MAPK）通过信号转导将信号从受体传递到特定的级联调节基因表达和细胞活动的效应器组合成初始感知复合物（J. Zhang *et al.*, 2010）。在拟南芥中，MAPK 激酶的激酶（MAPKKK）接收来自 PRR 的信号，然后激活 MAPK 激酶（MAPKK）。随后，激活的 MAPKK 激活 MAP 激酶（MAPK），进而激活靶蛋白（Moustafa *et al.*, 2014）。大量文献证实，MPK3、MPK4 和 MPK6 在植物免疫中发挥重要作用。例如，报道称拟南芥 *mpk3* 突变体表现为对灰霉病菌的敏感性增强（D Ren *et al.*, 2008）。拟南芥 *mpk6* 突变体丧失对灰霉的抗性，这表明诱导因子触发的对灰霉病菌的诱导抗性中，AtMPK6 是必需的（Galletti *et al.*, 100 C.E.）。在灰霉侵染期间，拟南芥植保素和乙烯生物合成需要 MPK3 和 MPK6 的参与（Galletti *et al.*, 100 C.E.; Guan *et al.*, 2015）。在拟南芥中，吲哚族芥子油苷（Indolic glucosinolates, IGs）参与植物对病虫害的抗性反应，与植物的先天免疫和广谱抗真菌活性有关。灰霉侵染后，植物激活 MPK3 和 MPK6 信号通路，通过调节 MYB51 和 MYB12 转录因子的表达从而促进了吲哚族芥子油苷（IGs）的生物合成，增强植物灰霉抗性（Xu *et al.*, 2016）。

研究发现，MKS1（Meckel syndrome type 1）的过表达植物对灰霉的敏感性

增加，这说明在灰霉侵染后，作为 MPK4 底物的 MKS1 负调节拟南芥的防御能力 (Klaus *et al.*, 2010)，因为 (Fiil and Petersen, 2011)。拟南芥 MKP2 (MAPK 磷酸酶 2) 突变体 (*mkp2*) 表现为对灰霉病菌的敏感性增加 (Lumbreras *et al.*, 2010, p. 6)。研究发现，MKP2 正调控氧化胁迫的耐受性，负调节 MPK3 和 MPK6 的表达 (Lee and Ellis, 2007)，MKP2 通过抑制 MPK6 活性调控灰霉抗性，从而调节细胞死亡 (Lumbreras *et al.*, 2010)。尽管真菌诱导子降低了 MKP2 和 MPK3 之间的相互作用，但它增强了 MKP2 和 MPK6 之间的结合能力，使得 *mkp2* 对灰霉病菌的敏感性增加。灰霉侵染后 MKP2 与 MPK3 和 MPK6 之间相互作用的变化，表明植物对灰霉病菌防御反应期间 MPK3 和 MPK6 活性具有差异，这表明 MAPK 磷酸化在植物防御反应中发挥着平衡作用。

灰霉侵染后，MAPK 经历一系列磷酸化，进而诱导抗病反应相关的转录变化，例如，编码 WRKY33 转录因子 (TFs) (Windram *et al.*, 2012)，调节植保素生物合成基因 *PAD3* 的表达 (Birkenbihl *et al.*, 2017)，从而提高拟南芥灰霉抗性 (Ferrari and Simone, 2013)。据报道，病原体激活 MPK4，然后磷酸化 MKS1，随后磷酸化的 MKS1 使得 WRKY33 从 MPK4 释放出来，使得 *PAD3* 表达水平上调 (Qiu *et al.*, 2008)。除了复杂的 MAPK 级联反应外，拟南芥组氨酸激酶 5 (AHK5) 也可以调节灰霉病菌的抗性 (Pham *et al.*, 2012)，表明这两个组分系统可能通过转录调节植物对病原体的防御。

1.4 植物防御与激素之间的关系

植物对坏死营养体的防御在很大程度上依赖于植物激素之间的相互作用 (N Denancé *et al.*, 2013)。众所周知，SA (水杨酸)、JA (茉莉酸)、ET (乙烯)、ABA (脱落酸) 和 BRs (油菜素内酯) 在防御 *B. cinerea* 中起着核心作用 (Audenaert *et al.*, 2002; Belkhadir *et al.*, 2012; Thomma *et al.*, 1999)。所有这些植物激素在一个巨大而复杂的网络中相互关联。在本节中，我们重点讨论植物激素，即 SA、JA、ET 在植物抵御灰霉病菌中的作用。

1.4.1 水杨酸 (SA) 信号通路参与植物防御反应

根据植物种类的不同，SA 在免疫反应中的功能可能会有所不同。例如，外施 SA 于番茄叶片可显著增加 SA 标记基因 *PR1* (Pathogenesis-related protein 1,

致病相关蛋白 1) 的表达水平, 以及对灰霉的抗性 (Angulo *et al.*, 2015)。另一方面, SA 水平的增加没有或仅影响拟南芥主要感染部位的抗性 (Ferrari *et al.*, 2010), 但 SA 对于 flg22 介导的 PTI 免疫反应是必不可少的 (Laluk *et al.*, 2011)。此外, 拟南芥 *npr1* (PR 基因的非表达型 1) 和 *sid2* (水杨酸诱导缺陷型 2) 突变体 (分别在 SA 感知和生物合成方面存在缺陷) 对活体营养型病原体的敏感性增加, 但对灰霉的敏感性没有变化 (Ferrari *et al.*, 2010)。目前, SA 信号在植物抗灰霉病中的作用尚不清楚。在过表达 SA 羟化酶的番茄转基因植物 (*NahG* 植株) 中, 降低内源 SA 水平导致对灰霉的高度敏感性, 而烟草和拟南芥 *NahG* 植株对同一病原体表现出与其相应野生型相似的反应 (Ferrari *et al.*, 2010; Mohamed El Oirdi, 2011)。另一方面, 拟南芥 *bik1* 突变体中 SA 水平的增加与灰霉敏感性的增加相关 (Veronese and P., 2006)。SA 可能表现对灰霉病菌的防御反应的负调节作用 (Ferrari *et al.*, 2010), 但其作用比较复杂, 需要进一步的研究和解析。

1.4.2 茉莉酸 (JA) 信号通路参与植物防御反应

拟南芥 JA 基因敲除突变体表现出对灰霉更强的敏感性。例如, 对 JA 信号感知受损的 *jar1* 和 JA 不敏感突变体 *coil* 表现出对灰霉的敏感性增强 (Thomma *et al.*, 1999)。在 TGA 转录因子三突突变体 *tga256* 中, JA 诱导的植物防御素 (*PDF1.2*) 和碱性几丁质酶 (*B-CHI*) 基因表达受到抑制, 表现为对灰霉的敏感性增加 (Zander *et al.*, 2009)。内源性 JA 水平升高的 *fou2* (脂肪酸氧化上调 2)、*opr3* (12-氧基二烯酸还原酶 3) 和 *ocp3* (阳离子过氧化物酶 3 的过度表达) 突变体对灰霉的抗性增强。此外, 转录辅激活因子介体亚基 25 (Med25) 诱导 JA 依赖性防御基因的表达, 并触发拟南芥对灰霉的抗性 (An and Mou, 2013), 而 JA 生物合成受损的番茄突变体对灰霉的敏感性增加 (AbuQamar *et al.*, 2008)。这些发现共同表明, JA 信号通路在诱导抗灰霉病菌方面至关重要。

1.4.3 乙烯 (ET) 信号通路参与植物防御反应

ET 信号是植物固有免疫系统和防御坏死的重要组成部分 (Shakeel *et al.*, 2013)。当病原体入侵时, 植物识别病原体的 PAMP 使 ET 生物合成基因的表达上调, 导致 ET 生物合成作用增强 (Zhu *et al.*, 2011)。与 ET 信号相关的拟南芥

乙烯不敏感突变体 (*ein2*、*ein3*) 和乙烯受体 1 突变体 (*etr1*) 表现为对灰霉的敏感性增加 (Ferrari *et al.*, 2010)。此外, 乙烯反应因子 1 (*ERF1*) 的组成型过表达增强了拟南芥对灰霉的耐受性。*TPK1b* (番茄蛋白激酶 1) 基因编码 RLK 调节 ET 依赖性防御, 是植物体对灰霉病菌抗性所必需的 (AbuQamar *et al.*, 2008)。这些发现表明, ET 信号通路在植物对灰霉病菌的防御中起着至关重要的作用。

1.5 EDR 家族的功能

1.5.1 *EDR1* 介导了白粉抗病反应

在拟南芥中的研究发现, 除了 *PEN1*、*PEN2*、和 *PEN3* 之外, 还有许多基因在抗白粉病过程中起重要作用。例如, 增强型疾病抗性 1 基因 (Enhanced disease resistance 1, *EDR1*) 编码一种类 Raf 的 MAPK 激酶, 该激酶负调节 SA 诱导的防御反应 (Frye *et al.*, 2001)。*EDR1* 的 N 端调节域与 *MKK4* 和 *MKK5* 发生物理相互作用, 并对 *MKK4/MKK5* 和 *MPK3/6* 蛋白水平产生负面影响。此外, *MPK3*、*MKK4* 或 *MKK5* 的突变可以抑制 *EDR1* 介导的抗性, 这表明 *EDR1* 通过负性调节 MAPK 级联来微调植物先天免疫 (Zhao *et al.*, 2014)。*KEG* (Keep on going) 编码一种包含环 E3 连接酶结构域和激酶结构域的蛋白质, *KEG* 中的特异性错义突变抑制 *edr1* 相关表型。*KEG* 与 *EDR1* 相互作用, 并将其引入跨高尔基网络 (TGN) 的囊泡 (Wawrzynska *et al.*, 2008; Gu and Innes, 2011)。*KEG* 调节内膜蛋白运输, 并在受白粉病感染的细胞中特异性降解 (Gu and Innes, 2012)。最近的研究表明, *EDR1* 还与 *ATL1* (ARABIDOPSIS TOXICOS EN LEVADURA1, 拟南芥毒素 1) 相互作用, *ATL1* 是一种 E3 泛素化连接酶, 可积极调节抗性和细胞死亡。*ATL1* 的过度表达导致拟南芥和烟草的细胞死亡, *EDR1* 可以抑制 *ATL1* 诱导的细胞死亡 (Serrano *et al.*, 2014)。

1.5.2 *EDR2* 基因的功能

EDR2 编码一种包含 PH (pleckstrin homology) 结构域和类固醇生成的急性调节蛋白相关脂质转移结构域的蛋白质 (Tang *et al.*, 2005; Vorwerk *et al.*, 2007)。*EDR2* 主要定位于内质网 (ER), 也定位于质膜和内体 (endosomes) (Vorwerk

et al., 2007)。遗传分析表明, 转录因子 SR1、26S 蛋白酶体亚单位 RPN1a 或类受体细胞质激酶 BSK1 的突变可抑制 *edr1* 和 *edr2* 介导的白粉抗性 (Nie *et al.*, 2012; Yao *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2013)。

1.5.3 EDR4 调控植物病原菌的抗性

越来越多的证据表明, 细胞运输在植物免疫中起着重要作用。前人研究发现, *EDR4* 在白粉病抗性中起到负面作用, 且 *edr4* 突变体中增强的抗病性需要水杨酸信号通路的参与。*EDR4* 主要定位于质膜和内体。遗传分析表明, *EDR4* 和 *EDR1* 在同一遗传途径中发挥作用。*EDR1* 和 *EDR4* 聚集在白粉病感染的穿透部位, *EDR4* 与 *EDR1* 发生物理作用, 将 *EDR1* 招募到真菌穿透部位。此外, *EDR4* 与网格蛋白重链 2 (CHC2) 相互作用, *EDR4* 突变体的内吞率降低。研究表明, *EDR4* 与 CHC2 互作, 并通过调节 *EDR1* 在拟南芥中的重新定位来调节植物免疫 (G. Wu *et al.*, 2015)。拟南芥类受体激酶 902 (RECEPTOR-LIKE KINASE 902, RLK902) 在细菌病原体丁香假单胞菌的抗性中起重要作用, 但对真菌白粉病病原体的抗性不起作用。RLK902 定位于质膜, 并与 *EDR4* 相关。*EDR4* 和 CHC2 调节 RLK902 蛋白的亚细胞运输和积累。此外, RLK902 与植物免疫的关键成分油菜素类固醇信号激酶 1 (BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1, BSK1) 直接相关, 但与 Flg2 免疫复合物的其他成员不相关。RLK902 磷酸化 BSK1, 其 Ser-230 是 RLK902 介导的防御信号的关键磷酸化位点。研究表明, *EDR4* 通过调节 RLK902 的亚细胞运输和蛋白质积累来调节植物免疫, RLK902 通过磷酸化 BSK1 来传递免疫信号 (Zhao *et al.*, 2019)。总的来说, *EDR4* 通过调节相应蛋白质的运输过程, 调控下游免疫反应, 进而调节植物的防御。

1.6 番茄的产量调控

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 是世界上最重要的蔬菜之一, 果实产量 (包括果实数和果实重量) 是番茄育种的主要农艺性状。大量研究表明, 整个番茄果实的生长基本上是基于细胞分裂和扩张, 这依赖于多种激素信号和相关的反应基因 (Abreu and Fernández, 2020; Sánchez-Moreno *et al.*, 2006)。

1.6.1 番茄的果实产量受细胞周期和内周期调控基因影响

与核内复制相关的细胞分裂和细胞扩张分别为果实器官形成和生长提供了基石，有助于确定最终的果实重量/大小。因此，可以利用靶向参与有丝分裂和核内复制的基因来调节番茄的果实生长。CDK - CYC 复合物是由一个被称为细胞周期蛋白依赖激酶（CDK）的催化亚单位和一个调控细胞周期蛋白（CYC）亚单位组成，特定的 CDK - CYC 复合物通过磷酸化靶蛋白在细胞周期的不同阶段之间的边界处起作用（Inzé and De Veylder, 2006）。有研究报道，通过构建 *WEE1* 转基因番茄植株，发现转基因植株果实较小，果皮较薄，由较小的细胞组成。这可能是因为 *WEE1* 激酶活性受损，导致 CDK - CYC 活性增强，核内复制显著减少（Gonzalez *et al.*, 2007）。其 CDK 靶点上的 *WEE1* 磷酸化活性是促进果实发育期间内复制的重要调节模式，有助于决定细胞的大小，并影响最终果实的大小（Bourdon *et al.*, 2011; Chevalier *et al.*, 2014）。与野生型相比，转基因番茄植株中 *CCS52A* 的异位功能丧失导致产生较小的果实（Mathieu-Rivet *et al.*, 2010）。相反，*SICCS52A* 在番茄植株中的异位过度表达导致果实比野生型略小。对这些果实的细胞学分析表明，*SICCS52A* 的过度表达首先减缓了早期果实的生长，然后随着高度内复制的细胞核的形成而恢复，从而产生了更大的细胞（Mathieu-Rivet *et al.*, 2010）。这是因为番茄基因 *CCS52A* 能够介导 APC/C 的激活。APC/C 是一种特定的 E3 型泛素连接酶，它可以导致 CDK - CYC 复合物活性的丧失，促进有丝分裂的完成和有丝分裂回到间期（Heyman and De Veylder, 2012），从而有助于番茄果实膨大。

1.6.2 通过控制果实大小和形状基因调节果实生长

多年以来，番茄的驯化和育种培育出了比野生祖先果实更大的栽培品种（Paran and van der Knaap, 2007）。番茄果实大小的多样性可归因于近 30 个数量性状位点（QTL; Grandillo *et al.*, 1999）。

fw2.2（2 号染色体 2 号果重 QTL）是第一个被鉴定和克隆的 QTL 相关基因（Alpert *et al.*, 1995, p. 2; Alpert and Tanksley, 1996; Frary *et al.*, 2000）。作为一个主要的 QTL，*fw2.2* 导致驯化番茄与其野生近缘品种之间的果实鲜重差异高达 30%。研究表明 *FW2.2* 是细胞增殖的负调节因子，因此解释了其对番茄果实大小的主要影响。*fw3.2* 是番茄中第二个需要精细定位和克隆的果实大小/重量的主

要 QTL (Chakrabarti *et al.*, 2013)。该 QTL 下的基因编码 CYP78A 亚家族的一种 P450 酶, 被鉴定为 KLUH (Anastasiou *et al.*, 2007)。*SIKLUH* 的作用是通过增加果皮和隔膜组织内的细胞数量来扩大果实体积, 使用 RNA 干扰 (RNAi) 策略抑制 *SIKLUH* 导致果实和种子尺寸减小, 因此 FW3.2 是番茄产量的正调控因子。除了增加果实大小, 番茄的驯化还导致了果实形状的高度多样性。番茄果实形状的这种多样性只起源于四个突变基因, 即 *OVATE*、*SUN*、*FASCIATED* (*FAS*) 和 *LOCULE NUMBER* (*LC*) (Rodríguez *et al.*, 2011)。*OVATE* 和 *SUN* 都控制果实的伸长, *OVATE* 是生长的负调节因子, 通过调节番茄 GA 生物合成导致果实形状变短 (Hackbusch *et al.*, 2005; S. Wang *et al.*, 2007, 2011); 而 *SUN* 是生长的正调节因子, *SUN* 过度表达导致果实纵向细胞数量增加, 横向细胞数量减少, 从而导致果实伸长 (S. Wu *et al.*, 2011)。*FAS* 和 *LC* 可以相互作用产生具有极多子房数的果实 (Barrero and Tanksley, 2004), *FAS* 和 *LC* 都控制花分生组织的大小, 并最终控制额外心皮 (室) 的发育, 从而产生更大的果实 (Cong *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2011)。

1.6.3 果实生长的激素调节

研究表明, 生长素和 GA 在果实发育起始阶段扮演着重要角色, 外源应用这两种激素会导致果实提早发育以及单性结实 (de Jong *et al.*, 2009)。细胞分裂素、乙烯和 ABA 已被证明在果实形成过程中发挥重要作用 (Kumar *et al.*, 2014)。

早期果实发育受生长素分配到组织和细胞以启动信号转导途径的控制。有研究发现, PIN-FORMED (PIN) 生长素外排转运蛋白参与了番茄的坐果和早期果实发育过程 (Pattison and Catalá, 2012)。番茄 *SIPIN4* 基因主要在花蕾和幼果中表达, 沉默后产生的无核 (单性结实) 果实体积缩小, 表现出早熟发育 (Mounet *et al.*, 2012)。在番茄中, 果座部分由 GA 介导, 并与生长素之间有复杂的关系 (Serrani *et al.*, 2008)。*CgGA20ox1* 的过度表达导致 GA₄ 含量升高, 促进了营养体发育, 表现为下胚轴和根系更长, 植株高度增加 (García-Hurtado *et al.*, 2012)。前人报道了 *not/flc* 双突变体的表型特征, 这些双突变体果实的 ABA 水平显著降低, 并表现为较小的果实和细胞, 尤其是在果皮内 (Nitsch *et al.*, 2012)。乙烯水平升高而 ABA 降低的结果表明, ABA 通过限制正常果实中

的乙烯水平来刺激果实生长。

1.6.4 果实发育的代谢控制

水果发育的早期阶段是一个关键时期，在此期间，诸如感官成分的特征得以确立，并最终决定水果的最终质量。水、有机酸（主要是柠檬酸和苹果酸）和矿物质在扩张细胞的液泡内积累（Coombe, 2003），而淀粉短暂积累，随后转化为还原糖（F. Wang *et al.*, 1993）。果实软化、着色和甜味在成熟阶段发生（Gapper *et al.*, 2013; Giovannoni, 2004）。果实发育和果实重量与其初级和次级代谢产物的组成密切相关（Carrari and Fernie, 2006; Tohge *et al.*, 2014）。因此，人们通过调节代谢相关基因的表达作为诱导果实组成和大小变化的一种手段。

通过调控关键酶活性（如参与初级碳代谢和光合作用的酶活性）来改变碳代谢和光同化物分配，有望对果实生长产生影响。研究发现，拟南芥己糖激酶 1（*AtHXK1*）基因的番茄过表达植株在果实发育过程中表现出明显的表型和生化变化，如果实变小和细胞膨胀减少（Menu *et al.*, 2004）。同时研究发现，在整个发育过程中，支持这些过程所需的碳供应较低，很可能是由于光合作用减少（Menu *et al.*, 2004）。蔗糖合酶（SuSy）在番茄果实发育中的作用已通过沉默一种果实特异性亚型进行了研究（D'Aoust *et al.*, 1999）。SuSy 活性的抑制影响了坐果和极早期的果实发育，这与蔗糖的卸载能力降低有关。因此，作者提出 SuSy 参与了番茄幼果蔗糖输入能力的控制，从而影响了果实的坐果和发育。QTL *Lin5* 已被确定为控制果实重量和糖含量的主要 QTL（Fridman *et al.*, 2000），相关基因被发现可以编码细胞壁结合转化酶（Fridman *et al.*, 2004）。当 *Lin5* 被 RNA 沉默时，果实产量以及果实大小、种子大小和种子数都大大降低（Zanor *et al.*, 2009）。这表明，糖代谢的异常影响了植物产量。有研究者发现了一种伴侣蛋白 SPA（Sugar Partitioning Affecting），主要作用与参与糖的分配。该基因转基因植物的成熟果实重量、单株果实数和收获指数显著高于野生型植物（Bermúdez *et al.*, 2014）。SPA 作为一种推测的伴侣蛋白，在番茄果实生长过程中通过调节磷酸葡萄糖变位酶、糖激酶和转化酶活性发挥作用，从而通过影响源库碳分布来调节番茄产量。

1.7 研究目的及意义

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 作为世界范围内种植最广泛的蔬菜作物之一, 产量一直是衡量番茄品质的重要标准, 也是番茄育种的主要农艺性状。灰霉作为一种在全球范围内广泛存在的真菌性病原体, 对世界作物安全提出了巨大的挑战。目前, 对这种病原体的主要控制方法是进行杀菌剂处理。然而, 真菌对杀真菌剂产生抗药性的风险限制了用于作物保护的化学品的使用。此外, 新鲜水果和作物上的杀菌剂残留导致的相关公共安全问题也阻碍了化学药剂的使用。因此, 迫切需要以一种可持续、经济、环保的方式利用遗传抗性来控制与灰霉病菌相关的疾病。

本研究从克隆番茄 *EDR4* 基因入手, 通过构建基因敲除以及过表达转基因材料, 鉴定其生物学功能, 以期解析番茄抗灰霉的分子机理。通过对转基因材料农艺性状观察, 分析其高产的特性, 为培育番茄抗病高产品种提供重要基因源。

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 植物材料与生长培养条件

本实验所用番茄栽培品种为 M82。突变体番茄材料为 *edr4*、*EDR4-OE* 遗传背景材料为 M82。所有种质材料均由本实验室繁种与保存，种植于作物生物学国家重点实验室人工气候室、温室大棚，人工气候室培养条件为 26°C 16 h 光照，20°C 8 h 黑暗，光照强度约为 600 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 。

2.1.2 所用菌株

本实验用到的灰霉菌株 B05.10 为本实验室保存。实验所用的大肠杆菌的菌株为订购于全式金公司的 Trans1；用于番茄转化的农杆菌菌株为本实验室保存的 LBA4404。

2.1.3 生化试剂

高保真 DNA 聚合酶（TransStart® FastPfu Fly DNA Polymerase，货号：AP231-13）购自全式金公司。

胶回收/DNA 纯化试剂盒（FastPure® Gel DNA Extraction Mini Kit，货号：DC301 -01）购自诺唯赞公司。

RNA 提取试剂盒（FastPure Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit 细胞/组织总 RNA 提取试剂盒，货号：RC101-01）购自诺唯赞公司。

反转录试剂盒（TransScript® II All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR，货号：AH341-01）购自全式金公司。

定量 PCR 试剂盒（TransStart® Tip Green qPCR SuperMix，货号：AQ131-01）购自全式金公司。

DAB 染色剂（3,3'-Diaminobenzidine，货号：D-8001）购自 Sigma 公司。
NBT 染色剂（氯化硝基四氮唑兰，Nitroblue tetrazolium, NBT，货号:N8140）购自索莱宝公司。

其它常用生物化学试剂均为进口或者国产分析纯试剂。

2.1.4 仪器设备

仪器名称	仪器厂家或型号
移液器	Gilson
植物生长培养箱	PERCIVAL
光学显微镜	德国蔡司公司
高压高温灭菌锅	Panasonic Healthcare
-80℃超低温冰箱	Thermo
凝胶成像系统	BIO-RAD
PCR 扩增仪	BIO-RAD
荧光定量 PCR 仪	BIO-RAD
离心机	Eppendorf
漩涡振荡器	Retsch
血球计数板	QIUJING®KB-K-25, 0.1 mm, 1/400 mm ²
12 穴细胞培养皿	Corning
研磨仪	Retsch
核酸浓度检测仪	NANODROP2000C

2.1.5 基因信息网站及数据处理软件

- (1) Sol genomic Network (<https://solgenomics.net/>)
- (2) NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- (3) Gene Ontology Resource (<http://geneontology.org/>)
- (4) Tomato Genetics Resource Center (<https://tgrc.ucdavis.edu/>)
- (5) ImageJ 用于植物病斑面积统计
- (6) Microsoft office 用于数据处理、绘制图表
- (7) DPS 用于统计学分析
- (8) Adobe Photoshop 用于图片处理
- (9) Primer Premier 5.0 用于引物设计
- (10) DNAMAN 用于序列比对

2.1.6 培养基配制

- (1) PDB 液体培养基 (1 L)

Potato Dextrose Broth	35 g
-----------------------	------

去离子水溶解并定容至 1 L, 高压蒸汽灭菌 15 min。

- (2) PDA 固体培养基 (1 L)

Potato Dextrose Agar	39 g
----------------------	------

去离子水溶解并定容至 1 L，高压蒸汽灭菌 15 min。在灭菌超净台中倒入一次性培养皿，平铺至凝固。

(4) V8 培养基 (1 L)

Potato Dextrose Agar	39 g
金宝 V8 原味蔬菜汁	340 mL

去离子水溶解并定容至 1 L，高压蒸汽灭菌 15 min，在灭菌超净台中倒入一次性培养皿，平铺至凝固。

(5) 0.8% 琼脂固体培养基 (1L)

Agar	8 g
------	-----

去离子水溶解并定容至 1 L，高压蒸汽灭菌 15 min，在灭菌超净台中倒入一次性方形培养皿，平铺至凝固。

(6) 1/2 MS 培养基 (500 mL)

MS 盐	4.308 g
Sucrose	20 g
Myo-inositol	0.2 g
MES hydrate	1 g
Agar	8 g

去离子水溶解并定容至 1 L，使用 1 mM NaOH 调节至 pH = 5.8，高压蒸汽灭菌 15 min，在灭菌超净台中倒入一次性透明塑料罐，至凝固。

(7) LB 液体培养基 (1L)

胰蛋白胨	10 g
酵母提取物	5 g
NaCl	10 g

去离子水溶解并定容至 1 L，使用 1 mM NaOH 调节至 pH = 7.0，高压蒸汽灭菌 15 min。

(8) LB 固体培养基 (1L)

LB 营养琼脂	40 g
---------	------

去离子水溶解并定容至 1 L，高压蒸汽灭菌 15 min。在灭菌超净台中倒入一次性培养皿，平铺至凝固。

(8) YEP 固体培养基 (1L)

YEP 培养基	16.5 g
Agar	15 g

去离子水溶解并定容至 1 L, 高压蒸汽灭菌 15 min。在灭菌超净台中倒入一次性培养皿, 平铺至凝固。

2.1.7 溶液配制

(1) 10 mM $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ (100 mL)

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	0.228 g
无菌去离子水	90 mL

粉末充分溶解后, 定容至 100 mL。

(2) 10 mM KH_2PO_4 (100 mL)

KH_2PO_4	0.136 g
无菌去离子水	90 mL

粉末充分溶解后, 定容至 100 mL。

(3) 10mM PBK 溶液 (100 mL)

10 mM $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	91.5 mL
10 mM KH_2PO_4	8.5 mL

(4) NBT 反应液 (50mL)

10 mM $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	25 mg
10mM PBK	50 mL
Silwet L-77	2 μ L

现用现配, 4℃避光保存。

(5) 50 mM Tris-HCl (100 mL)

Tris Base	0.6057 g
无菌去离子水	80 mL

使用浓盐酸调节 PH 至 3.8。粉末充分溶解后, 定容至 100 mL。

(6) DAB 反应液 (50 mL)

3,3'-Diaminobenzidine	50 mg
50mM Tris-HCl	50 mL
Silwet L-77	2 μ L

摇匀溶解。现用现配，4℃避光保存。

(7) 台盼蓝储液

苯酚	10 g
甘油	10 mL
乳酸	10 mL
Trypan Blue	0.02 g
ddH ₂ O	10 mL

摇匀溶解。室温储藏备用。

(8) 台盼蓝工作液 (60 mL)

台盼蓝储液	20 mL
无水乙醇	40 mL

摇匀溶解，可重复利用，室温保存。

(9) 10% 磷酸三钠溶液

Na ₃ PO ₄	10 g
无菌去离子水	90 mL

(10) 2×CTAB 核酸提取液

CTAB	20 g
0.5 M EDTA	40 mL
1 M Tris-HCl	100 mL
5 M NaCl	280 mL

去离子水定容至 1 L，高压蒸汽灭菌锅 121℃灭菌 15 min，加 1/500 体积的巯基乙醇。

(11) 苯酚/氯仿/异戊醇 (体积比)

苯酚：氯仿：异戊醇	25:24:1
-----------	---------

(12) 氯仿/异戊醇 (体积比)

氯仿：异戊醇	24:1
--------	------

(13) 3 M NaAc (100 mL)

三水乙酸钠	40.8 g
去离子水	80 mL

冰醋酸调 pH 至 5.2，去离子水定容至 100 mL

(14) 50×TAE 电泳贮存液 (1 L)

Tris	242 g
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37.2 g
醋酸	57.1 mL

加入去离子水将溶液定容至 1 L，搅拌均匀，常温保存。

(15) 磷酸缓冲液母液 A (1 L)

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	72 g
--	------

加入去离子水将溶液定容至 1 L，搅拌均匀，常温保存。

(16) 磷酸缓冲液母液 B (1 L)

Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	31.84 g
--	---------

加入去离子水将溶液定容至 1 L，搅拌均匀，常温保存。

(17) 磷酸缓冲液 PH = 7.8 Pbs (1 L)

磷酸缓冲液母液 A	228.7 mL
磷酸缓冲液母液 B	21.25 mL

加入去离子水将溶液定容至 1 L，搅拌均匀，常温保存。

(18) 磷酸缓冲液 PH = 7.0 Pbs (1 L)

磷酸缓冲液母液 A	152.5 mL
磷酸缓冲液母液 B	97.5 mL

加入去离子水将溶液定容至 1 L，搅拌均匀，常温保存。

(19) 提取液 (100 mL)

EDTA	0.0372 g
PVP	10 g

加入磷酸缓冲液将溶液定容至 1 L，搅拌至粉末溶解，常温保存。

(20) 65 mM Met (100 mL)

Met	0.97 g
-----	--------

加入磷酸缓冲液 (PH = 7.8) 将溶液定容至 100 mL，搅拌至粉末溶解，常温保存。

(21) 500 μM NBT (100 mL)

NBT	0.0409 g
-----	----------

加入磷酸缓冲液 (PH = 7.8) 将溶液定容至 100 mL，搅拌至粉末溶解，常温

避光保存。

(22) 100 μ M EDTA- Na_2 (500 mL)

EDTA- Na_2	0.0186 g
---------------------	----------

加入磷酸缓冲液 (PH = 7.8) 将溶液定容至 500 mL, 搅拌至粉末溶解, 常温保存。

(23) 20 μ M 核黄素 (1 L)

核黄素	0.00753 g
-----	-----------

加入磷酸缓冲液 (PH = 7.8) 将溶液定容至 1 L, 搅拌至粉末溶解, 常温保存。

2.1.8 引物

见附录表。

2.2 实验方法

2.2.1 番茄材料培养

2.2.1.1 种子萌发

(1) 吸水浸泡: 种子放入灭菌的 50 mL 带孔离心管中, 加适量无菌水浸泡, 使种子适当吸水。

(2) 温汤浸种: 将上述盛有种子离心管, 放入 50°C 水浴 30 min, 每隔 10min 震荡摇晃, 唤醒种子活力。

(3) 次氯酸钠灭菌: 将上步浸种完成种子完全浸没于次氯酸钠溶液中浸泡 10 min, 之后无菌水冲洗多次至无味。利用次氯酸钠杀灭种子表面的细菌和真菌, 防止萌发过程中长菌。

(4) 磷酸三钠处理: 将上步中的种子在 10% 的磷酸三钠中浸泡 15 min, 无菌水冲洗 3 次以上。目的是使种子表面残留的病毒钝化, 防止种子萌发长成植株带有病毒。

(5) 将消毒后的种子置于铺有湿滤纸的培养皿中, 25°C 黑暗孵育 72 h 至种

子露白。整个过程注意保湿，让种子处于湿润状态。

2.2.1.2 育苗材料栽培

(1) 培养基质：实验室采用 Miracle-Gro® 花园土壤与蛭石 1:1 比例混匀，加适量水浸湿，装于培养钵中。

(2) 材料种植：将露白种子使用镊子轻轻放于有土的培养钵中，表面覆盖一层湿润的薄培养基质。

(3) 培养环境：将培养钵至于可存水的塑料盘，并覆盖透明塑料罩，便于保持湿润。置于灯光下，每隔 2 天补充水分，5 天后可撤除塑料罩。

2.2.2 灰霉菌株的保存与活化

菌株的通用保存方法：

(1) 将手术刀进行高温灭菌，随后从生长健硕的灰霉菌原板上切下小块培养基，将其置于 V8 培养基中央，使其菌丝向下。25℃黑暗条件下培养 10 天左右，培养基表面被灰色孢子覆盖后置于 4℃保存。

(2) 切下小块带有孢子的培养基，放入装有适量无菌去离子水的 50 ml 离心管中，将管口密封好，放入 4℃冰箱保存。

(3) 收集分生孢子，加入 300 μ l 甘油、700 μ l 悬浮孢子液至 1.5 ml 离心管中，液氮速冻后于-80℃中长期保存。

活化菌株方法：使用高温灭菌后的接种针从带有孢子培养基上挑取一小块置于 V8 培养基中央，或是吸取 150 μ L 孢子悬液，使用灭过菌的涂布器均匀涂抹在 V8 培养基上。将培养基倒置，防止凝聚的水滴影响孢子生长。于 25℃培养箱中黑暗培养，此为第一代菌株。培养 7 天后，从中选取长势壮硕的灰霉菌板以同样的方法接种第二代灰霉，可继续活化第三代。与第一代相比，二、三代菌株活力较好，可以用于制作孢子悬浮液用于接种，同时将接种菌株进行保存。

2.2.3 灰霉孢子悬液制备

(1) 将取一块生长健硕的二代灰霉板放于超净台中，利用灭菌的刮菌器从灰霉板上刮取适量的菌丝，放入加有 15-20 mL PDB 液体培养基的无菌 50 ml 离

心管中。

(2) 将上述盛有菌丝的离心管置于漩涡振荡器上振荡 2-3 min，使附着孢子从菌丝上振荡下来，悬浮于培养液中。

(3) 利用灭过菌的显微镜擦镜纸对上述培养液进行过滤，过滤掉菌丝和杂质，只保留孢子，并保存于新的无菌离心管。

(4) 利用血球计数板对孢子浓度进行调节，浓度调解时提前将孢子悬浮液晃匀。

(5) 制备好的孢子悬浮液可放于 4℃冰箱保存，使用时置于冰上，可保存 48 h。(时间过长会导致孢子提前萌发并降低其活性，对侵染结果产生影响)

2.2.4 番茄植株的活体侵染

2.2.4.1 侵染后观察统计病斑

(1) 取 3-4 周的长势一致的番茄植株 (9-12 棵)，放入透明的活体侵染培养箱中，植株之间保持适当距离，避免相互接触，箱底浇适量的水以保持湿度，创造一个有助于灰霉发病的环境。

(2) 选取长势一致稳定的第三、四片真叶上的子叶片作为侵染对象，每个叶片主叶脉左右两侧斜对称偏下点施 10 μ L 灰霉孢子悬浮液。

(3) 点施后使用透明罩封箱，置于气候室等待发病。气候室培养条件为 26℃ 16 h 光照，20℃ 8 h 黑暗。

(4) 培养 3-5 天后，叶片呈现明显的发病表型，剪取侵染过的叶片用相机拍照，使用 ImageJ 软件测量每个病斑的面积，使用 DPS 软件统计分析，并用 EXCEL 制作图表。

2.2.4.2 侵染后取样进行定量 PCR

(1) 选取多株长势一致的两周左右番茄幼苗 (受外界环境影响较小，实验结果更准确)，放入透明的活体侵染培养箱，植株之间保持适当距离，避免相互接触，箱底浇适量的水以保持湿度。

(2) 选取位置大小一致的真叶，处理组每片真叶在偏下位置点施 10 μ L 孢

子悬浮液（孢子用 PDB 悬浮）。对照组在相同位置点施 10 μ L PDB 液体培养基。

（3）点施后使用透明罩封箱，置于气候室等待发病。气候室培养条件为 26°C 16 h 光照，20°C 8 h 黑暗。

（4）到规定时间点后进行取样（处理组和对照组要保证同时取样）。每个处理至少包含三个基础重复，即至少取自三株番茄幼苗，以减小误差。剪取 3 株植株的发病叶片，并立即用锡箔纸包好，做好标记进行液氮速冻。整个过程必须动作迅速，防止 RNA 降解，后续进行磨样提取 RNA，也可暂存于 -80°C 冰箱。

2.2.5 番茄叶片的离体侵染

（1）选取长势一致的 4 周龄番茄植株，使用剪刀剪取位置一致且大小相似的叶片。

（2）将叶片叶柄处插入 0.8% 琼脂固体培养基中，叶片与培养基使用介质分隔，防止叶片接触培养基造成实验结果误差。

（3）选取叶脉的侧下方点施 10 μ L 孢子悬浮液，使用医用胶带对培养皿进行封板。

（4）在特定时间点取样进行拍照，统计病斑，或进行染色处理。

2.2.6 染色法检测番茄活性氧含量

2.2.6.1 超氧化物的检测：NBT 染色

离体叶片的制备和侵染：参考上述“番茄叶片的离体侵染”的方法。

染色及脱色：将叶片浸没在加入 NBT 反应液的细胞培养皿中，抽真空 15 min，室温黑暗放置 4h。将上述叶片放入新的空皿中，加入适量脱色液（无水乙醇：冰乙酸：甘油=3:1:1，v:v:v），95°C 沸水浴 15min。脱色液多次清洗后，可拍照观察，或浸没于新鲜脱色液，可于 4°C 保存 4 天不影响观察。

2.2.6.2 过氧化氢的检测：DAB 染色

离体叶片的制备和侵染：参考上述“番茄叶片的离体侵染”的方法。

染色及脱色：将叶片浸没在加入 DAB 反应液的细胞培养皿中，抽真空 15 min，室温黑暗放置 4h。将上述叶片放入新的空皿中，加入适量脱色液（无水乙醇：冰乙酸：甘油=3:1:1，v:v:v），95℃沸水浴 15min。脱色液多次清洗后，可拍照观察，或浸没于新鲜脱色液，可于 4℃ 保存 4 天不影响观察。

2.2.7 染色法检测番茄细胞活性：台盼蓝染色

离体叶片的制备和侵染：参考上述“番茄叶片的离体侵染”的方法。

染色及脱色：将叶片浸没在加入台盼蓝工作液的细胞培养皿中，加热煮沸 10min。加入适量脱色液（无水乙醇：冰乙酸：甘油=3:1:1，v:v:v）浸泡 15min，新鲜脱色液多次冲洗，可拍照观察，或浸没于新鲜脱色液，可于 4℃ 保存 4 天不影响观察。

2.2.8 CTAB 法提取番茄 DNA

（1）取少量植物新鲜叶片到装有两粒钢珠的 1.5 mL 离心管中，用液氮冷冻后迅速研磨至粉末状，提前准备好 65℃ 水浴锅中预热的 CTAB 溶液。

（2）向离心管中加入 500 μ L 的 CTAB 溶液，在 65℃ 的水浴锅中水浴 30 min，期间振荡 2-3 次。

（3）在通风橱中，向离心管中加入 500 μ L 的氯仿/异戊醇，振荡混匀。13000 rpm，离心 10 min。

（4）吸 400 μ L 上清至新的 1.5 mL 离心管中，并加入 800 μ L 无水乙醇溶液，混匀后于 -20℃ 冰箱中静置 30 min。

（5）13,000 rpm 离心 5 min，弃上清，加 1 mL 75%乙醇进行洗涤，除去提取液中的高盐成分，7500 rpm 离心 1 min，弃上清。用 75%乙醇重复洗涤一次。

（6）将有白色 DNA 沉淀的离心管倒置控水，干燥后加入 50 μ L ddH₂O（或者 TE buffer）溶解 DNA，可 4℃ 短期保存或 -20℃ 长期保存。

2.2.9 植物组织总 RNA 的提取

试剂盒法（BioFlux）：

（1）取适量番茄材料的根或叶片 RNase-free 离心管中，在液氮中磨成粉末，

向离心管中加入已提前加 β -巯基乙醇的裂解液 500 μL ，迅速震荡混匀至无明显颗粒物。在 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机中 13000 rpm，离心 2 min。

(2) 吸取 700 μL 上清至已装入收集管的 FS 中，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 12000 rpm 离心 1min。

(3) 吸取 400 μL 上清至已加入 200 μL 无水乙醇的 RNase-free 离心管中，混匀后转入已装入收集管的 RM 中。4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 13000 rpm，1 min，弃废液后将 RM 再次放入收集管中。

(5) 加入 350 μL Buffer RW1 到 RM 中，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 13000 rpm, 1 min，弃废液，将吸附柱再次放到收集管中。

(7) 向 RM 中央加入 50 μL 的 DNase 1 工作液，室温静置 15 min。

DNase 1 工作液配制 (50 μL):

Dnase	40 μL
Buffer:	
MnCl ₂ :	9 μL
DNase1:	1 μL

(8) 将 350 μL Buffer RW1 加入 RM 中，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 13000 rpm，1 min，弃废液。

(9) 再将 500 μL Buffer RW2 加入 RM 中，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 13000 rpm，1 min，弃废液。

(10) 重复 (7) 步骤。

(11) 将 RM 装入新的 RNase-Free 离心管中，向吸附膜中央悬空滴加 RNase-Free Water，室温放置 2 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 离心机 13000 rpm，1 min。

(12) 回溶一次，将得到的 RNA 于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存备用。

2.2.10 cDNA 第一链的合成

试剂盒法 (*TransScript*[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix):

反转录体系:

Total RNA	2 μg
Anchored Oligo (dT) ₁₈ Primer	1 μL

2×TS Reaction Mix	10 μL
<i>TransScript</i> RT/RI Enzyme Mix	1 μL
gDNA Remover	1 μL
RNase-free Water	Variable
Total volume	20 μL


PCR 反应程序为 42℃, 15 min; 85℃, 5 s, 所得 cDNA 放在 4℃ 保存。

2.2.11 荧光定量 PCR

反应各组分体系如下:

模板 cDNA	25 ng
Forward Prime (10 μM)	0.5 μL
Reverse Primer (10 μM)	0.5 μL
2×TransStart Top/Tip Green qPCR SuperMix	10 μL
Nuclease-free water	Variable
Total volume	20 μL

qPCR 程序为两步法 (高特异性):

94℃	10 sec	
94℃	5 sec	
60℃	3 sec	

40 个循环

3 结果与分析

3.1 SIEDR4 氨基酸序列比对和同源蛋白进化树分析

鉴于 *EDR4* 在拟南芥中的功能研究，我们利用生物信息学手段，在番茄基因库中找到了番茄基因 *SIEDR4*，位于番茄 8 号染色体，在 Sol 网站中被命名为 Solyc08g082040.4.1。

我们对二者氨基酸序列进行氨基酸序列比对，发现其保守结构域 zinc_ribbon_12 相似度仅为 40%，这可能会导致 EDR4 在番茄中发挥不同的功能（图 3-1）。

我们利用 MEGA6 对茄科植物类 SIEDR4 蛋白进行了进化分析。分析结果显示，栽培番茄与野生番茄（*Solanum pennellii*）处于同一分支，与马铃薯（*Solanum tuberosum*）、辣椒（*Capsicum annuum*）等茄科植物亲缘关系较远（图 3-2），这表明茄科植物中含有 zinc_ribbo_12 结构域的蛋白。

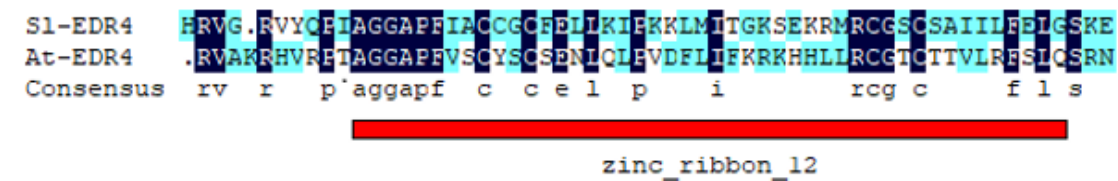


图 3-1 SIEDR4 和 AtEDR4 保守结构域序列比对

Fig. 3-1 Sequence alignment of conserved domains of SIEDR4 and AtEDR4

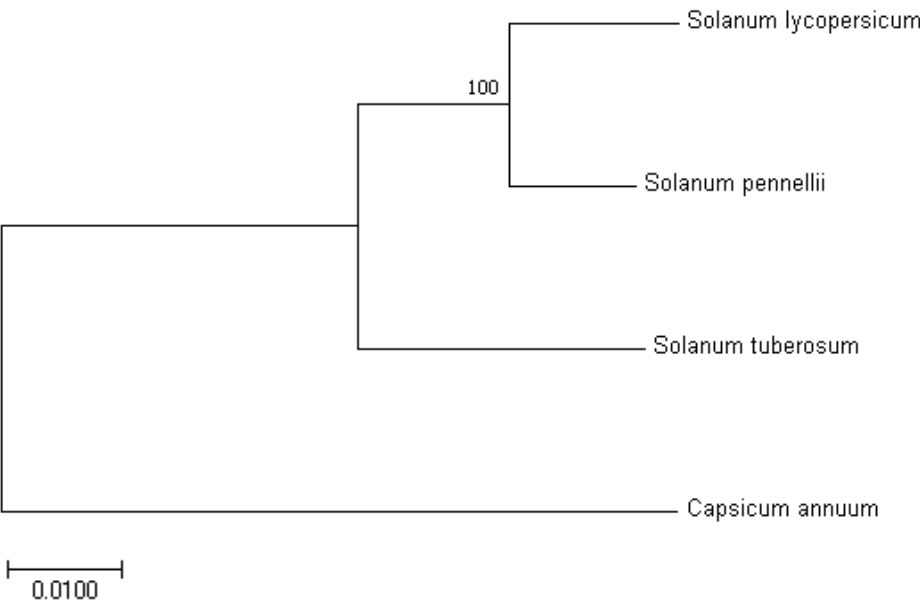


图 3-2 SIEDR4 系统进化分析

Fig. 3-2 Phylogenetic analysis of SIEDR4

3.2 *SIEDR4* 基因诱导表达模式分析

为了研究 *SIEDR4* 在胁迫处理下的表达模式，对野生型番茄进行灰霉侵染处理，提取 RNA，进行反转录，通过荧光定量 PCR 分析检测了 *SIEDR4* 基因在灰霉胁迫下不同时间点的转录水平的差异。

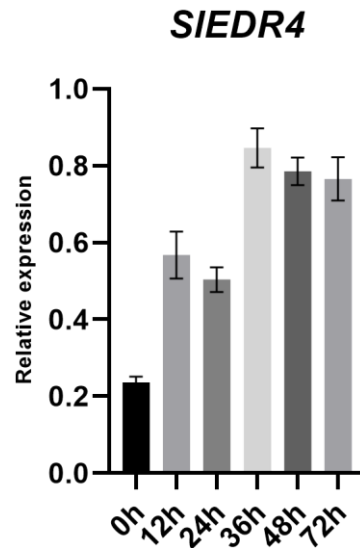


图 3-3 *SIEDR4* 诱导表达模式分析

Fig. 3-3 Expression pattern analysis of *SIEDR4* in tomato

结果如图所示（图 3-3），灰霉侵染后，*SIEDR4* 基因表达被诱导，在 12h、36h 出现大幅度上调，侵染后期表达量达到顶峰，这说明 *SIEDR4* 受灰霉诱导，也暗示了 *SIEDR4* 可能在番茄抗灰霉方面发挥作用。

3.3 *SIEDR4* 在番茄中的遗传转化

为了研究 *SIEDR4* 的生物学功能，我们在番茄中分别构建了 *SIEDR4* 过表达材料（*SIEDR4-OE*）和含有 Crisp-Cas 的基因编辑材料（*edr4*），通过农杆菌转化，得到 *SIEDR4-OE* 和 *edr4* 阳性植株。

3.3.1 *SIEDR4-OE* 转基因苗鉴定

由于过表达载体中含有 GFP 标签，在光学显微镜下过表达植物可以观察到绿色荧光。所以我们以此为判断依据，鉴定过表达植株是否为阳性。如图所示（图 3-4A），在细胞膜中可以观察到绿色荧光，表明该植株为阳性苗，*SIEDR4* 可能定位于细胞膜。随后检测过表达植株 *SIEDR4* 的表达量，发现显著高于背景

材料 M82（图 3-4C）。

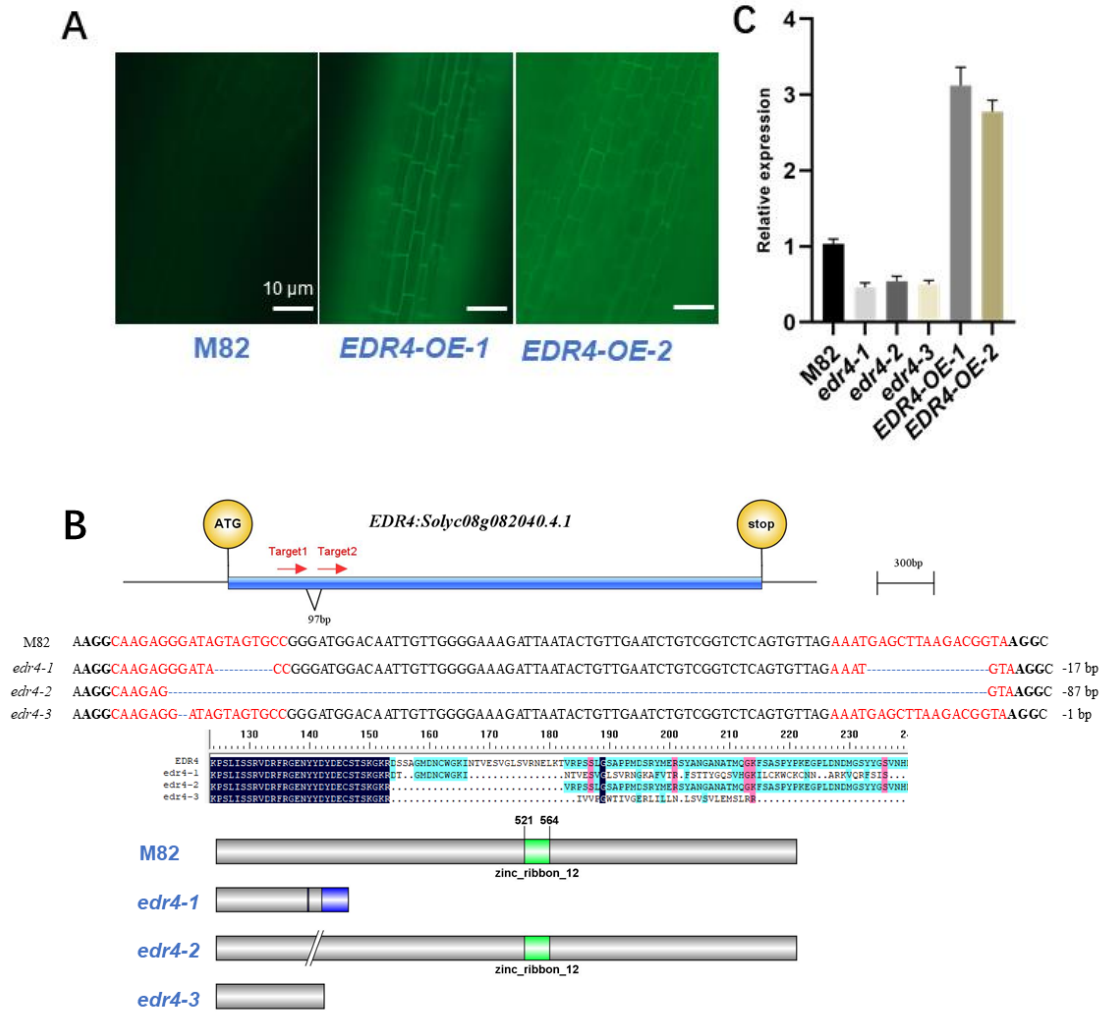


图 3-4 *EDR4*-OE 和 *edr4* 番茄转基因植株的鉴定

(A) 光学显微镜下检测过表达植株的 GFP 信号 (B) 转基因植株的基因型鉴定 (C) *EDR4*-OE、*edr4* 和 M82 番茄植株 *SIEDR4* 基因的表达量

Fig. 3-4 Identification of *EDR4*-OE and *edr4* tomato transgenic plants

(A) Detection of GFP signal in overexpression plants under light microscope. (B) Genotyping of transgenic plants. (C) Expression of *SIEDR4* gene in *EDR4*-OE, *edr4* and M82 tomato plants.

3.3.2 *SIEDR4*-CR 转基因苗鉴定

我们通过对靶点前后 100 bp 序列进行引物设计，提取转基因苗 DNA 进行片段扩增，送测序进行序列鉴定。结果表明，*edr4-1*、*edr4-3* 终止密码子提前，造成保守结构域缺失；*edr4-2* 造成 27 个氨基酸缺失，保守结构域没有发生变化。通过检测基因编辑材料 *SIEDR4* 的表达量，发现均显著低于背景材料 M82（图 3-4B C）。

3.4 *SIEDR4* 负调控番茄对灰霉菌的抗性

为了进一步验证 *SIEDR4* 基因与灰霉病抗性之间的关系，我们分别对背景型材料 M82、过表达材料 *EDR4-OE*、基因编辑材料 *edr4* 进行灰霉菌离体接种实验，并计算病斑面积，统计三者之间的发病情况。结果可以看到，基因编辑材料 *edr4-1*、*edr4-3* 病斑面积显著低于背景材料 M82，相反，过表达材料 *EDR4-OE-1*、*EDR4-OE-2* 的病斑面积显著高于 M82（图 3-5）。这些结果表明，*SIEDR4* 负调控番茄对灰霉菌的抗性。



图 3-5 灰霉感染转基因材料 *edr4*、*EDR4-OE* 和背景型 M82

(A) 和 (B) 为灰霉感染突变体 *edr4*、过表达材料 *EDR4-OE* 和背景型 M82 植株的代表性叶片。误差条代表三个独立实验的 SD (n=16)，根据 Student t 检验，星号表示与背景型存在显著差异 *P<0.05 **P<0.01。

Fig. 3-5 *B. cinerea* infected transgenic materials *edr4*, *EDR4-OE* and background-type M82

(A) and (B) Representative leaves of background-type, *edr4* plants and *EDR4-OE* plants to *B. cinerea* infection. Error bars represent the SD from three independent experiments (n = 16). Asterisks indicate significant difference from the wild type according to Student's t test at *P < 0.05 **P<0.01.

3.5 *edr4* 突变体增强番茄对死体营养型病原的抗性

为了进一步探究 *EDR4* 基因在番茄中的功能，我们分别对 *edr4-1* 突变体以及背景型材料 M82 进行白粉、灰霉和灰叶斑侵染。首先我们利用活体营养型病原白粉的孢子侵染 4 周龄的番茄植株，接种 8 天后对其进行观察，结果发现，与背景型 M82 相比，*edr4-1* 突变体的分生孢子团与感染叶片数量并未表现出明显异常（图 3-6C 和 3-6F）。其次，我们制作死体营养型病原灰霉的孢子悬浮液，对 4 周龄番茄植株的离体叶片进行侵染，观察其病斑面积，结果发现，与 M82 相比，*edr4-1* 突变体灰霉侵染 3 天后的离体叶片病斑面积显著减小（图 3-6A 和

3-6D), 表明灰霉菌在 *edr4-1* 突变体叶片上的扩展受到了抑制。最后, 我们制作死体营养型病原灰叶斑的孢子悬浮液, 侵染 4 周龄番茄植株的离体叶片, 3 天后进行观察, 结果发现, 与 M82 相比, 灰叶斑菌侵染的 *edr4-1* 突变体离体叶片病斑面积显著减小 (图 3-6B 和 3-6E)。综上所述, 相较于背景型 M82, *edr4-1* 突变体的白粉抗性没有发生明显变化, 但增强了对灰霉以及灰叶斑的抗性, 说明 *edr4* 突变体增强番茄对死体营养型病原的抗性。

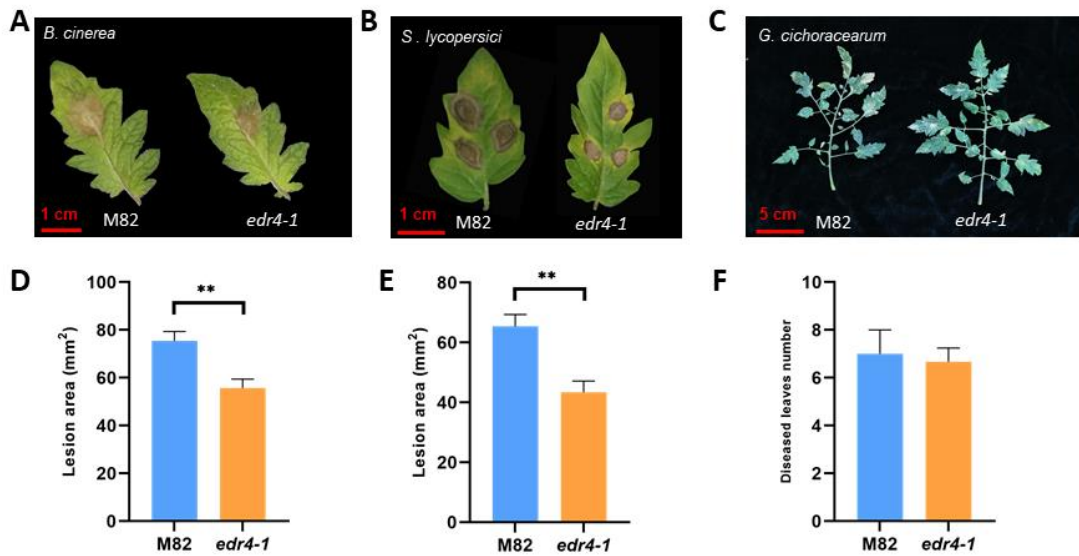


图 3-6 多种真菌侵染突变体 *edr4-1* 和背景型 M82

(A) 和 (D) 灰霉侵染突变体 *edr4-1* 和背景型 M82 植株的代表性叶片。误差条代表三个独立实验的 SD ($n=16$), 根据 Student t 检验, 星号表示与背景型存在显著差异 $*P<0.05$ 。

(B) 和 (E) 灰叶斑侵染突变体 *edr4-1* 和背景型 M82 植株的代表性叶片。误差条代表三个独立实验的 SD ($n=16$), 根据 Student t 检验, 星号表示与背景型存在显著差异 $*P<0.05$ 。

(C) 和 (F) 白粉侵染突变体 *edr4-1* 和背景型 M82 植株的代表性叶片。误差条代表三个独立实验的 SD ($n=6$)。

Fig. 3-6 Multiple fungi infect mutant *edr4-1* and background-type M82

and (D) Representative leaves of background-type and *edr4-1* plants to *B. cinerea* infection. Error bars represent the SD from three independent experiments ($n = 16$). Asterisks indicate significant difference from the wild type according to Student's t test at $*P < 0.05$.

(B) and (E) Representative leaves of background-type and *edr4-1* plants to *S. lycopersici* infection. Error bars represent the SD from three independent experiments ($n = 16$). Asterisks indicate significant difference from the wild type according to Student's t test at $*P < 0.05$.

(C) and (F) Representative leaves of background-type and *edr4-1* plants to *G. cichoracearum* infection. Error bars represent the SD from three independent experiments ($n = 6$).

3.6 *SIEDR4* 抑制 JA、SA 介导的抗性反应

SA、JA 信号通路在植物防御反应中起重要作用。为了检测这些途径是否影响 *edr4* 介导的抗性，我们检测了 SA、JA 信号通路的相关抗性基因的表达情况。包括 SA 信号通路的关键调控因子 *NPR1*，病程相关基因 *PR1*、*PR2*、*PR8*，以及 JA 信号通路的创伤/昆虫反应的常用标记基因 *TD* 和病原体反应的标记基因 *PR-STH2*。我们选取背景型材料 M82 和基因编辑材料 *edr4-1* 进行灰霉菌离体接种实验，以 0h、24h、48h、72h 为时间点进行取样检测。

由图我们可以看到（图 3-7），*PR1*、*PR2*、*PR8* 在正常状态下表达量很低，灰霉侵染后，表达水平在 24h 显著增加，在后期达到顶峰。而 *NPR1* 在正常状态下就有稳定表达，灰霉侵染后，表达水平先上升后下降。在大多数时间点，*edr4-1* 基因表达水平高于 M82。这些结果表明，在灰霉侵染后诱导 SA 信号通路相关防御基因，使其维持在相对较高水平，*edr4-1* 被诱导水平高于 M8

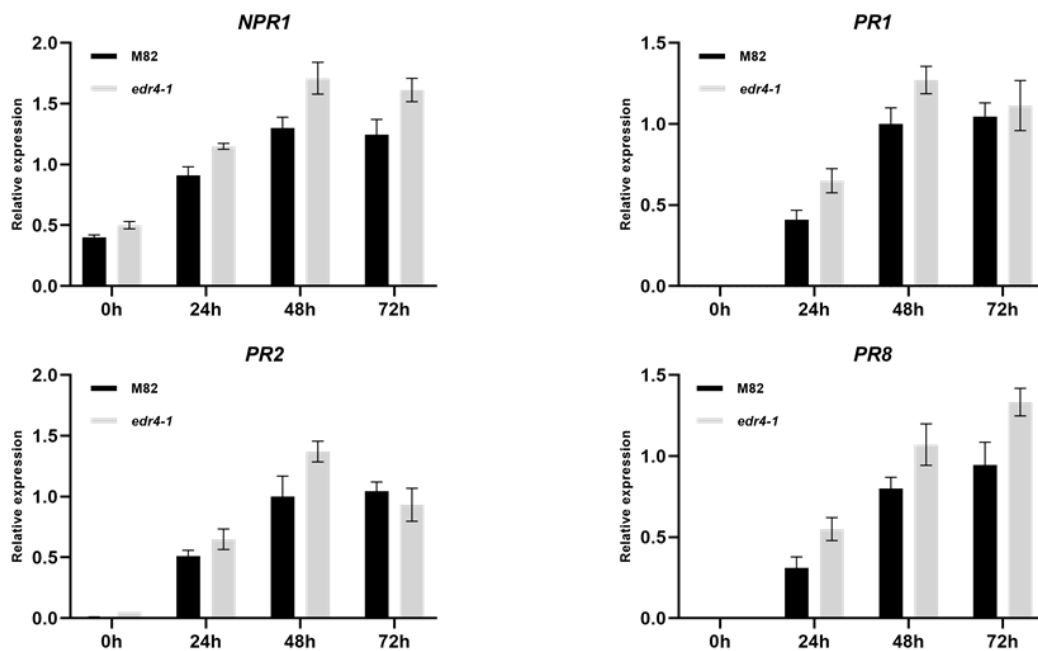


图 3-7 灰霉侵染后 SA 相关基因的表达

PR1、*PR2*、*PR8*：病程相关基因；*NPR1*：SA 调控因子。

Fig. 3-7 Expression of SA-related genes after *B. cinerea* infection

PR1、*PR2*、*PR8*: pathogenesis-related gene; *NPR1*: SA-regulator factor

由图我们可以看到（图 3-8），*TD*、*PR-STH2* 正常状态下表达量很低，基本不表达。灰霉侵染 24h 后表达量迅速上升，在灰霉侵染后期表达量达到顶峰，这与病害开始扩大的时间一致，*edr4-1* 突变体中基因总体表达量高于 M82。这

些结果表明，在灰霉侵染后诱导 JA 信号通路相关防御基因，使其维持在相对较高水平，且 *edr4-1* 被诱导水平高于 M82。综上所述，*SIEDR4* 抑制 JA、SA 介导的抗性反应。

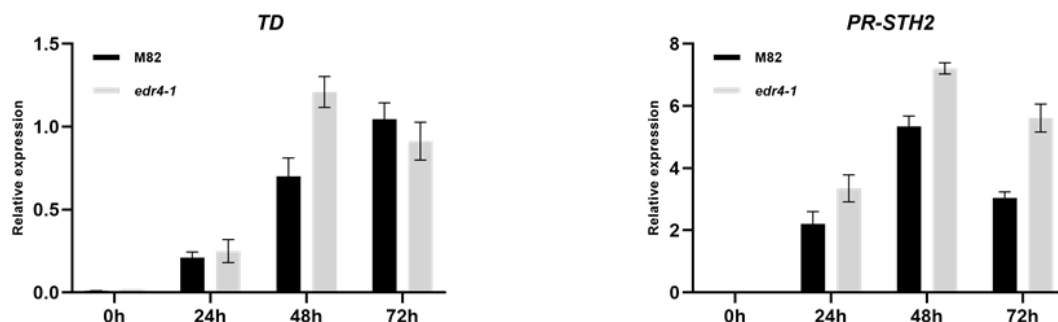


图 3-8 灰霉侵染后 JA 相关基因的表达

TD: 创伤、昆虫反应标记基因; PR-STH2: 病原体反应标记基因

Fig. 3-8 Expression of JA-related genes after *B. cinerea* infection

TD: wounding/insect response marker gene; PR-STH2 : pathogen response marker gene

3.6 *edr4* 突变体促进灰霉侵染早期 ROS 量的积累

植物在被病菌侵染过程中会释放出大量的活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 以增强植物的抗性。在这其中, 过氧化氢 (H_2O_2) 和超氧阴离子 (O_2^-) 是两种主要的 ROS, 我们分别选取了 0H、24H 和 48H 的灰霉菌侵染叶片进行 DAB 和 NBT 染色, 检测背景型以及转基因材料中 ROS 的积累。

3.6.1 *edr4* 突变体促进灰霉侵染后 H_2O_2 的积累

植物叶片中的过氧化酶可以催化 H_2O_2 与 DAB 快速反应为棕色化合物, 从而定位植物叶片中的 H_2O_2 。

由 DAB 染色结果我们可以看到 (图 3-9A), 0h 时 *edr4-1* 突变体和 M82 均未表现出明显的 H_2O_2 积累; 侵染 24H 后, M82 和 *edr4-1* 突变体在孢子侵染部位出现了明显的 H_2O_2 累积, *edr4-1* 突变体积累量高于 M82; 侵染 48H 后, H_2O_2 在 *edr4-1* 突变体中全面爆发, 侵染部位尤其严重, M82 累积量明显增加, 但仍集中于侵染部位, 低于 *edr4-1* 突变体。在整个侵染过程中, *edr4-1* 突变体和 M82 中 H_2O_2 累积量随着时间增加而增加, 但在侵染后同一时间点突变体中 H_2O_2 含量高于 M82。

上述结果表明, 在正常状态下二者之间 H_2O_2 含量没有差异, 灰霉侵染后,

H_2O_2 被诱导产生, *edr4-1* 突变体被诱导水平高于 M82。 H_2O_2 含量的增加有助于激活植物的防御反应, 48H 时 *edr4-1* 突变体中 H_2O_2 累积量显著高于 M82, 这可能会导致 *edr4-1* 突变体激活更强的防御反应, 有助于抑制病原菌发病范围的扩展。

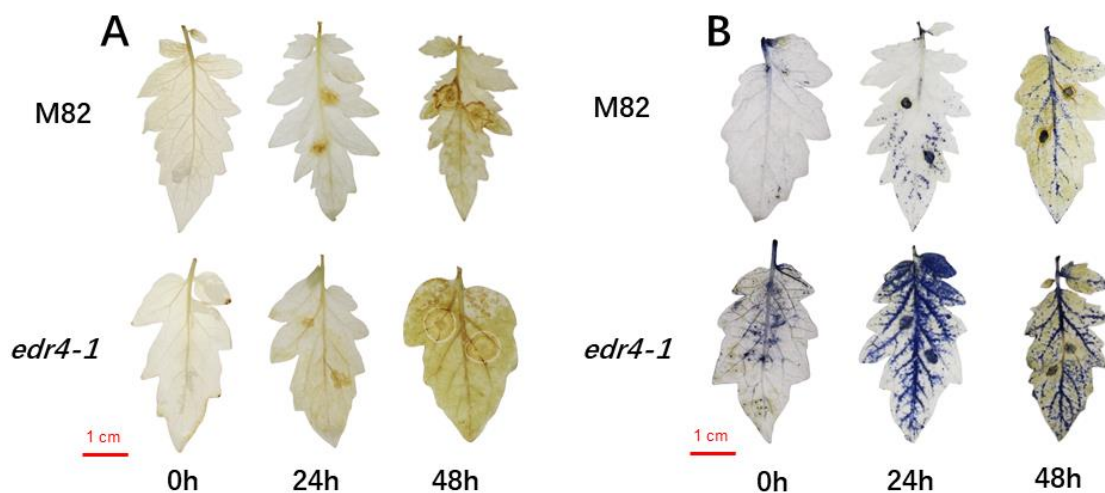


图 3-9 番茄叶片灰霉侵染后 DAB 和 NBT 染色

(A) 棕色化合物指示 H_2O_2 含量; (B) 蓝色物质指示 O_2^- 含量。

Fig. 3-9 Results of DAB and NBT staining of tomato leaves inoculated with *B. cinerea*

(A) Brown compound indicates H_2O_2 content; (B) The blue substance indicates the O_2^- content.

3.6.2 *edr4* 突变体促进灰霉侵染后超氧化物的积累

植物体内的超氧阴离子自由基 (O_2^-) 是一种含氧自由基, 可将 NBT 还原成不溶于水的蓝色甲腈, 从而定位 O_2^- 的产生部位。

由 NBT 染色结果我们可以看到 (图 3-9B), 0H 时 *edr4-1* 突变体中 O_2^- 含量高于 M82; 侵染 24H 后, O_2^- 在 *edr4-1* 突变体中全面爆发, 沿着叶脉产生了大量 O_2^- 的积累, 而 M82 中 O_2^- 的含量略有增加, 变化不显著; 侵染 48H 后, *edr4-1* 突变体中 O_2^- 含量减少, 而 M82 中含量变化不显著, 但仍显著低于 *edr4-1* 突变体。在整个侵染过程中, *edr4-1* 突变体中 O_2^- 含量前期迅速增加, 随后减少, 但 M82 中 O_2^- 含量随着时间增加略有增加。任一时间点突变体中 O_2^- 含量高于 M82。

上述结果表明, 正常状态下 *edr4-1* 突变体中 O_2^- 含量高于 M82。灰霉侵染早期, O_2^- 在 *edr4-1* 突变体中被大量诱导产生, 随后诱导被抑制, 而 M82 中 O_2^- 并未受到明显诱导。*edr4-1* 突变体在正常状态以及侵染早期含有大量的 O_2^- , 这可能会导致激活强烈的防御反应, 有助于抑制病原菌的定殖和扩展。

3.7 *SIEDR4* 调控 ROS 合成与清除关键酶基因的表达

3.7.1 *edr4* 突变体促进 NADPH 氧化酶基因的表达

NADPH 氧化酶 (Niacinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase), 又被称为呼吸氧爆发酶 (Rbohs), 是植物体内氧化还原信号的关键酶,也是体内活性氧簇 (ROS) 的主要来源。

由于灰霉侵染后 *edr4-1* 突变体中 ROS 含量相较于 M82 发生了显著变化, 我们推测是否是因为 *SIEDR4* 影响了 NADPH 氧化酶基因的表达, 为此我们检测了 4 个番茄 *Rbohs* 基因在灰霉侵染后的表达量。由图我们可以看到 (图 3-10A), *RbohB*、*RbohC* 正常状态下基本不表达, 灰霉侵染后, 表达受到强烈诱导, 在后期达到顶峰, 且 *edr4-1* 突变体被诱导程度高于 M82。*RbohD*、*RbohF* 正常状态下也具有一定表量, 灰霉侵染后, 表达受到诱导。在 *edr4-1* 突变体中, *RbohD*、*RbohF* 表达量在 24H 达到顶峰, 随后略有减弱; 而在 M82 中, 24h 后表达量变化不大, 诱导能力受到抑制。结果表明, *edr4-1* 突变体促进 NADPH 氧化酶基因的表达。

3.7.2 *edr4* 突变体抑制抗氧化酶基因的表达

植物产生大量活性氧 (ROS), 如果不能及时清除, 会影响植物正常生长和发育, 植物体内抗氧化酶在清除活性氧的过程中发挥重要作用。植物抗氧化酶主要有超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、抗坏血酸过氧化物酶 (APX)、单脱氢抗坏血酸还原酶 (MDHAR)、脱氢抗坏血酸还原酶 (DHAR) 和谷胱甘肽还原酶 (GR) 等。

植物体内活性氧的累积不仅依赖于活性氧的产生, 也与活性氧的清除能力密切相关, 为此我们检测了 *edr4-1* 突变体和背景型 M82 中 *SODCC1*、*APX1* 的表达量。正常条件下 (图 3-10B), M82 中 *SODCC1* 表达量高于 *edr4-1*, 侵染 24h 后两种材料表达量均升高, *edr4-1* 48h 时达到顶峰, M82 在 72h 达到顶峰, M82 表达量始终高于 *edr4-1*。灰霉侵染前, M82 *APX1* 表达量高于 *edr4-1* 突变体, 灰霉侵染后, 二者 *APX1* 表达量均提高, 但 M82 相比于 *edr4-1* 上升水平更

明显。结果表明，灰霉侵染后，*edr4-1* 突变体抑制抗氧化酶基因的表达。

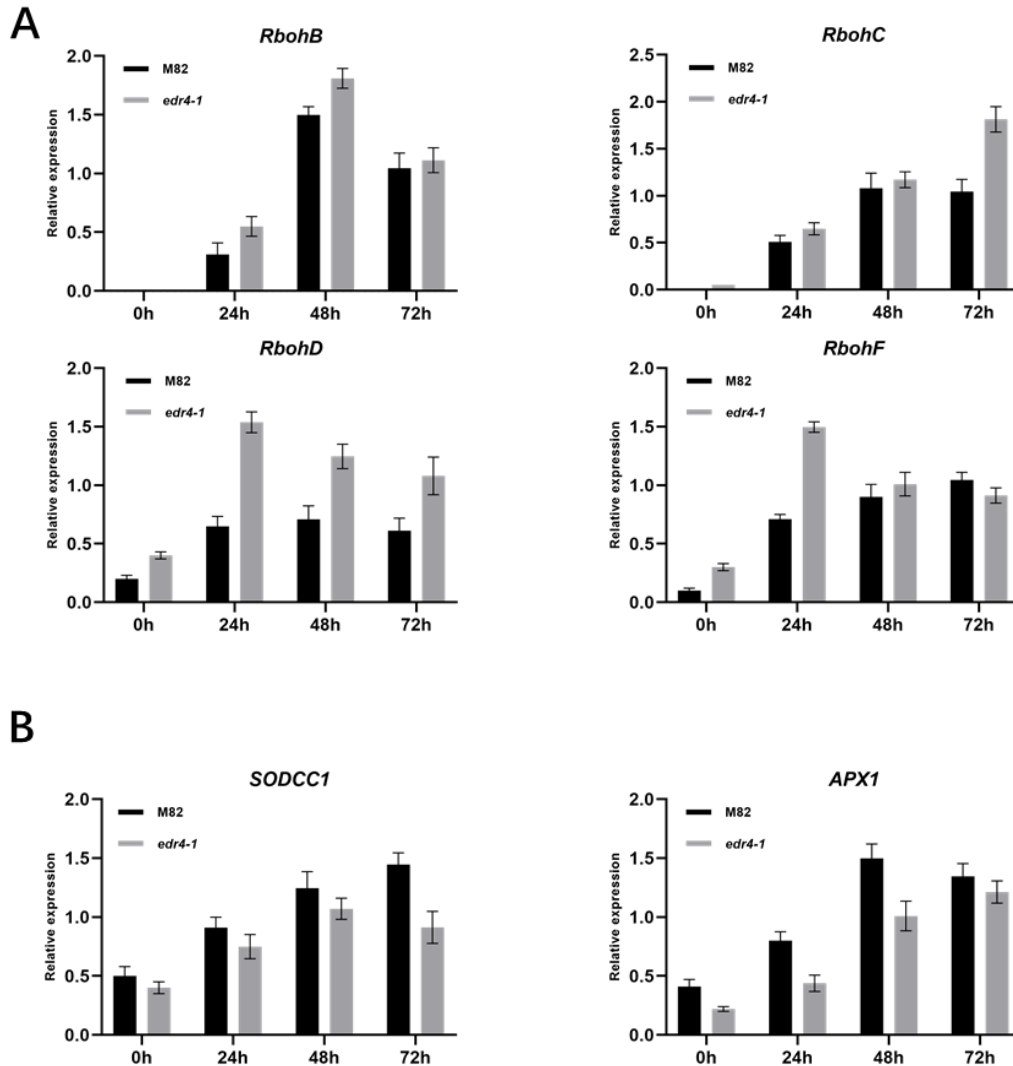


图 3-10 灰霉侵染后 ROS 合成清除相关酶基因的表达

(A) 检测 NADPH 氧化酶相关基因表达量；(B) 检测抗氧化酶相关基因表达量

Fig. 3-10 Expression of ROS synthesis and scavenging related enzyme genes after *B. cinerea* infection

(A) Expression of NADPH oxidase-related genes; (B) Expression of antioxidase-related genes.

3.8 *edr4* 突变体抑制灰霉侵染下番茄细胞的死亡

植物细胞的膜系统在受到病原菌侵染时，会造成细胞死亡，膜透性增加，细胞膜脂过氧化，而台盼蓝染色液可以指示细胞膜的受损程度。

我们对侵染 48h 后 *edr4-1* 突变体和背景型 M82 番茄叶片进行台盼蓝染色，随后进行观察。由图可以看到（图 3-11），二者染色范围均集中于病斑附近，M82 染色范围大于 *edr4-1*。结果表明，灰霉侵染会导致番茄叶片细胞膜受损，*edr4-1* 突变体降低灰霉侵染下番茄细胞膜的伤害程度和范围，抑制细胞的死亡，

具有保护细胞的作用。

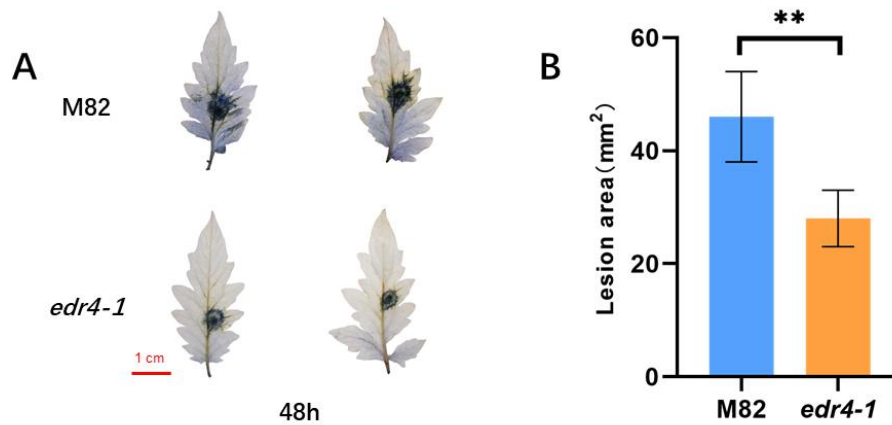


图 3-11 *edr4-1* 突变体和背景型 M82 在灰霉侵染 48h 后台盼蓝染色

(A) 灰霉侵染材料代表性叶片 (B) 病斑面积统计, 误差条代表三个独立实验的 SD ($n=10$), 根据 Student t 检验, 星号表示与背景型存在显著差异 $**P<0.01$ 。

Fig. 3-11 Pan blue staining of *edr4-1* mutant and background-type M82 at 48 h after *B. cinerea* infection

(A) Representative leaves of *B. cinerea* infection. (B) Lesion area statistics, Error bars represent the SD from three independent experiments ($n = 10$). $**P < 0.01$

3.9 *edr4* 突变体具有广谱抗性

2021 年下半年, 由于天气异常和大棚温室管理不善, 温室内病害泛滥, 大部分品种减产甚至绝收。其中病菌包括但不限于灰霉病、白粉病、茎腐病、根腐病、番茄褐色皱纹果病毒病等。我们对 *edr4-1* 突变体、*edr4-2* 突变体以及 M82 死亡番茄植株进行了统计, 发现 *edr4-1* 突变体致死率远低于 M82, *edr4-2* 突变体致死率高于 *edr4-1* 但低于 M82 (图 3-12)。这些结果表明, *edr4* 突变体可能对番茄常见病害具有广谱抗性。

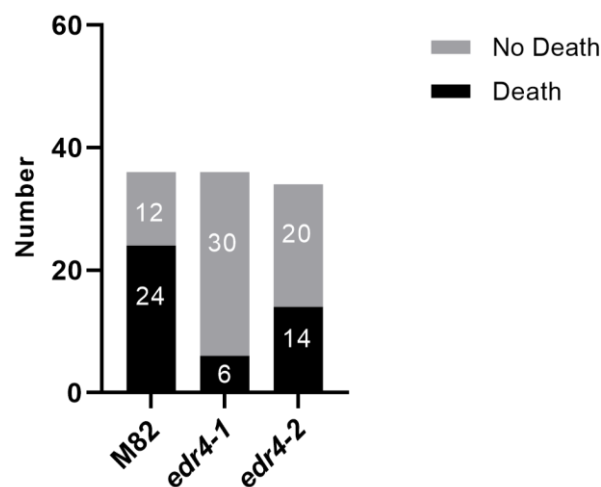


图 3-12 *edr4-1*、*edr4-2* 突变体和背景型 M82 死亡率统计

Fig. 3-12 Mortality statistics of *edr4-1*, *edr4-2* mutant and background-type M82

3.10 *edr4* 突变体农艺性状分析

3.10.1 *edr4* 突变体幼苗期生长缓慢

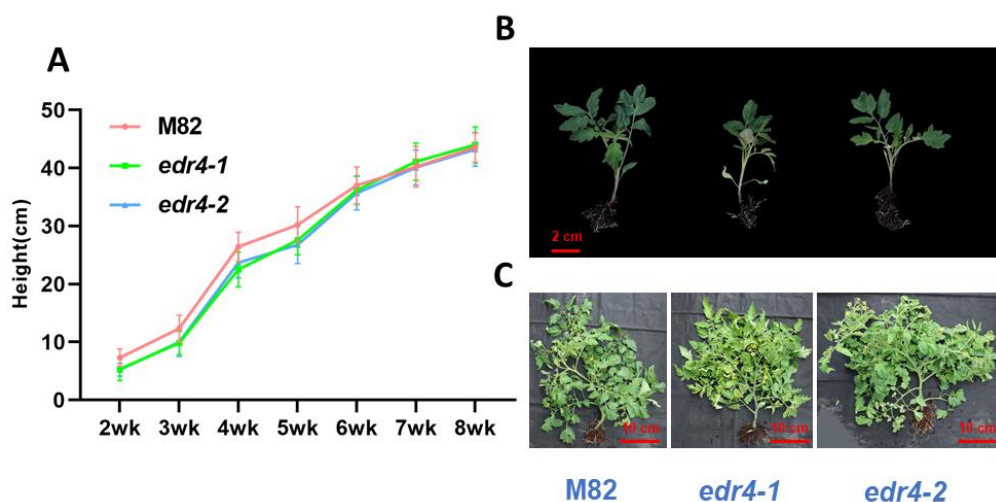
我们将 *edr4-1*、*edr4-2* 和 M82 萌发育苗，3 周后种植于温室大棚，每隔一周对株高进行统计。由图可知（图 3-13A-C），从第二周开始，*edr4-1*、*edr4-1* 株高明显低于 M82，直到第七周。二者之间株高一致，后期株高变化不大。幼苗期通常只需 45~50 天就可完成，结果表明，*edr4* 突变体相较于 M82 初期生长缓慢。

3.10.2 *edr4* 突变体表现为早花、多花

目前，番茄中常用第一穗花下叶片数衡量番茄开花时间早晚，类似于拟南芥莲座叶数目，叶片数越多开花越晚。我们统计了 50 天龄 *edr4-1*、*edr4-1*、M82 的第一穗花下叶片数和花量，并进行统计。由图可知（图 3-13D-E），*edr4-1*、*edr4-2* 第一穗花下叶片数显著低于 M82，但 *edr4-1*、*edr4-2* 的花量显著多于 M82。以上结果表明，*edr4* 突变体表现为早花、多花。

3.10.3 *edr4* 突变体表现为高产

当番茄植株果实全部成熟后，我们以单棵番茄为单位将所有果实进行称重，拍照记录统计结果。从图中我们可以看到（图 3-13F-G），两季番茄中 *edr4-1*、*edr4-2* 的果实重量显著高于 M82，三者果实均匀度较差。以上结果表明，*edr4* 突变体表现为高产。



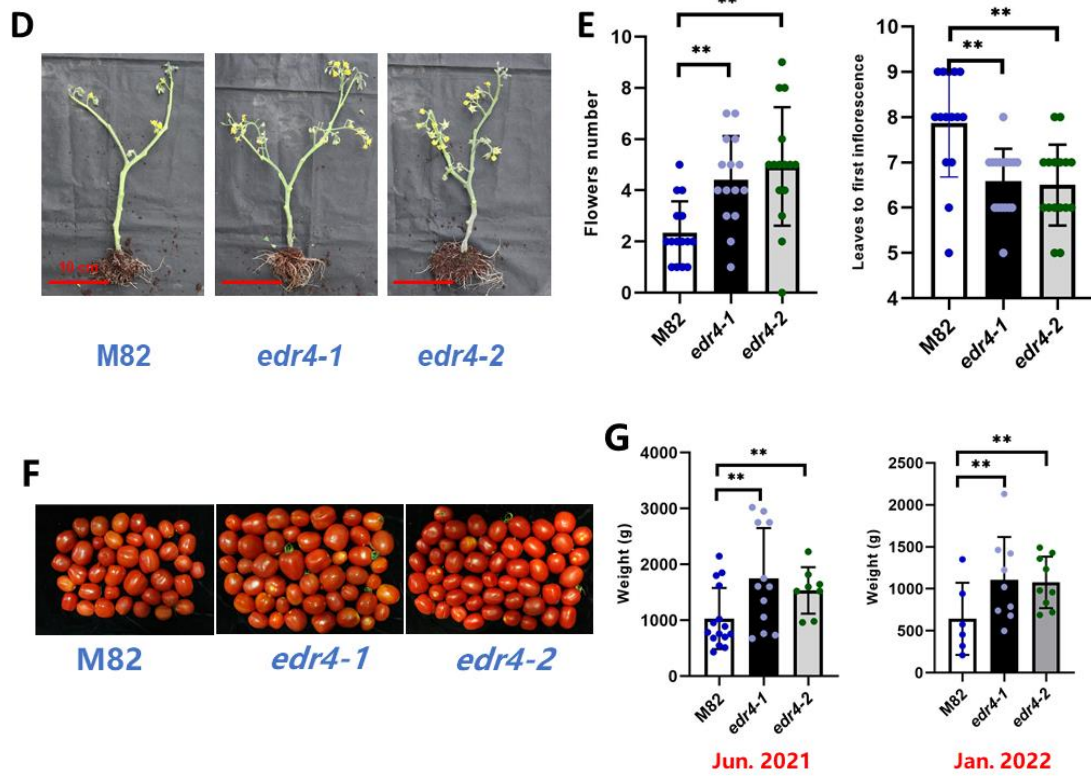


图 3-13 *edr4-1*、*edr4-2* 突变体和背景型 M82 农艺性状统计

- (A)、(B) 和 (C) *edr4-1*、*edr4-2* 突变体和背景型 M82 2-8 周株高，(B) (C) 第 3 周、第 7 周代表性植株。误差条代表实验的 SD (n=16)。
- (D) 和 (E) *edr4-1*、*edr4-2* 突变体和背景型 M82 第 7 周开花数目及第一穗花下叶片数。误差条代表实验的 SD (n=16)，根据 Student t 检验，星号表示与背景型存在显著差异 **P<0.01。
- (F) 和 (G) *edr4-1*、*edr4-2* 突变体和背景型 M82 果实重量。误差条代表实验的 SD (n=16)，根据 Student t 检验，星号表示与背景型存在显著差异 **P<0.01。

Fig. 3-13 Statistics of agronomic traits of *edr4-1*, *edr4-2* mutants and background-type M82

- (A) (B) and (C) Plant heights of *edr4-1*, *edr4-2* mutants and background-type M82 at 2-8 weeks, (B) (C) representative plants at 3 and 7 weeks. Error bars represent the SD from experiments (n = 16) .
- (D) and (E) The number of flowers in the seventh week and the number of leaves under the first panicle of *edr4-1*, *edr4-2* mutant and background-type M82. Error bars represent the SD from experiments (n = 16) . Asterisks indicate significant difference from the wild type according to Student's t test at **P<0.01.
- (F) and (G) *edr4-1*, *edr4-2* mutant and background-type M82 fruit weights. Error bars represent the SD from experiments (n = 16) . Asterisks indicate significant difference from the wild type according to Student's t test at **P<0.01.

4 讨论

番茄是重要的经济作物和研究植物免疫的经典模式。截止 2021 年我国番茄产量位居世界第一，约占世界 1/3。同时番茄也是多病害的作物，世界范围内番茄病害多达 200 种，仅在我国境内就有 30 多种病害。灰霉病是番茄的一种主要真菌性病害，由灰葡萄孢菌引起。灰葡萄孢菌是一种死体营养型病原真菌，其宿主范围广，能侵染 200 多种重要经济作物。灰葡萄孢菌存在于植物全生育期，导致植物全株发病。灰霉病爆发后造成植物组织坏死，严重时造成绝产绝收。即使在果实运输和存储过程，病原也会造成果实腐烂。由于目前番茄中缺乏对灰霉病的抗源，因此灰霉病是番茄生产的一个重要威胁。由于具有重要经济研究价值，因此灰葡萄孢菌也是一种重要的模式真菌，是研究植物-病原互作的经典病原模式。作物驯化过程中叶片抗性降低，昆虫偏向取食，提高了栽培番茄的育性。这就给我们提出了问题，如何在提高抗性的同时维持产量。本研究通过番茄与拟南芥基因的同源比对，发现了一个番茄的抗性基因 *SIEDR4*，可以调控番茄的抗性和产量，为培育抗病高产品种提供了借鉴。

4.1 *SIEDR4* 负调控番茄对灰霉的抗性

拟南芥 EDR4 主要定位于质膜和内体区室，EDR4 与 CHC2 相互作用，使 *edr4* 突变体内吞率降低，在亚细胞运输中发挥着重要作用。EDR4 与 EDR1 相互作用，并将 EDR1 招募到真菌渗透部位，负调节拟南芥对白粉病的抗性 (G. Wu *et al.*, 2015)。此外，研究发现，EDR4 通过调节 RLK902 的囊泡运输来正向调节植物对细菌病原体的免疫，并且 RLK902 通过磷酸化 BSK1 在植物免疫中发挥作用 (Zhao *et al.*, 2019)。EDR4 能够影响植物对真菌和细菌病原物的免疫反应，这表明 EDR4 对植物免疫反应具有重要调控作用，因此我们推测 EDR4 或其同源蛋白可能调控植物对病原物的免疫反应。我们通过蛋白同源比对在番茄中找到了拟南芥 EDR4 的同源基因 *SIEDR4*，通过序列比对，发现二者均具有保守结构域 zinc_ribbon_12。在这里，我们构建了番茄 *SIEDR4* 基因的缺失突变体以及过表达材料，通过外接灰霉，发现过表达材料对灰霉菌表现出显著的敏感性，而缺失突变体则具有更强的抗性。这表明，*SIEDR4* 参与番茄调控灰霉病的防御

反应，并负调控番茄对灰霉的抗性。

4.2 *SIEDR4* 参与 SA、JA 信号通路以及 ROS 积累的调控

植物激活特定的防御信号通路以应对病原体感染或昆虫攻击，而植物激素在这些通路中起着关键的调节作用。通常，水杨酸（SA）信号触发植物对生物营养或半生物营养型病原体和吸食昆虫的免疫，但 *NahG* 转基因番茄植株因内源 SA 水平降低，导致其对灰霉表现为高度敏感（Ferrari *et al.*, 2010）。茉莉酸（JA）信号激活植物对死体营养型病原体和咀嚼昆虫的抗性，对 JA 信号感知受损的 *jar1* 和 JA 不敏感突变体 *coil* 表现为对灰霉的敏感性增强。越来越多证据表明，水杨酸和茉莉酸对植物免疫作用既相互协同又相互抑制（N Denancé *et al.*, 2013）。当植物受到灰霉侵染后，会诱发植物在病菌侵染位置发生细胞程序性死亡（programmed cell death, PCD），通过限制营养传输，抑制病原菌生长，被称为植物超敏反应。从细胞角度来说，病原菌侵染后发生离子交换产生 ROS，诱导 PCD 的发生。所以，ROS 是一种经典的抗病指标。

为了进一步探究 *SIEDR4* 调控灰霉抗性的机制，对 *edr4* 突变体和背景型 M82 进行灰霉接种，检测 SA、JA 信号途径的常用标记基因表达量。结果发现，SA、JA 信号途径相关标记基因表达量在 *edr4* 突变体中显著高于背景型 M82。随后，我们检测了植物叶片中 ROS 含量以及 ROS 合成清除相关酶的表达量。结果发现，相比于 M82，突变体叶片中 ROS 含量显著上升。ROS 合成相关酶基因表达量在 *edr4* 突变体中显著高于背景型 M82，而 ROS 清除相关酶基因表达量在 *edr4* 突变体中显著低于 M82。综上所述，*SIEDR4* 抑制 SA、JA 介导的抗性反应，并通过抑制 ROS 合成，促进 ROS 降解来降低植物中 ROS 含量，负调控番茄的灰霉抗性。

4.3 *SIEDR4* 调控番茄的产量

由于基因的多效性，抗病类基因不仅会影响植物的抗病能力，通常也会影响植物的其他生理特性。多数情况下，抗病突变体在表现出抗性特性的同时，也出现早衰、产量下降等负面表型，从而可能限制其在生产上的广泛应用。因此，我们检测了 *edr4-1*、*edr4-2* 突变体和背景型 M82 的生理表型，发现在 2-6 周范围内，M82 株高高高于 *edr4* 突变体，直到番茄开花后，二者之间株高差异消

除。这可能是 *edr4* 突变体为了维持更多的 ROS 积累以及更强的抗性反应，与番茄生长竞争能量的结果。开花坐果期，*edr4* 突变体花期显著早于 M82，开花数量显著多于 M82。番茄完全成熟后，*edr4* 突变体的果实总重量显著高于 M82。综上所述，相比于 M82 植株，幼苗期 *edr4* 突变体生长发育缓慢，*edr4* 突变体具有早花、多花、高产的农艺性状。*SIEDR4* 既影响番茄生长发育、产量性状，也能够调节植物免疫，是基因编辑改良番茄性状的重要靶点，对于培育高产高抗的番茄品种具有重要意义。

5 结论

本研究对 *SIEDR4* 的生物学功能进行研究，并对该基因发挥灰霉抗性的机制进行了初步探索。

- (1) *SIEDR4* 是番茄灰霉抗性的负调控因子。
- (2) *SIEDR4* 抑制 JA、SA 介导的抗性反应。
- (3) *SIEDR4* 抑制 ROS 合成，促进 ROS 降解
- (4) *edr4* 具有早花、高产的农艺性状。

SIEDR4 既影响番茄生长发育、产量性状，也能够调节植物免疫，这为培育番茄抗病高产品种提供了新的策略和技术路线。抗病机理仍需深入解析，对其他病害的抗性能力，以及它的广谱抗病性仍需进一步研究。调节作物产量的分子机理仍需要进一步研究，该基因在平衡作物产量和抗性过程中的分子作用机理具有重要研究价值，是基因编辑改良番茄性状的重要靶点基因。

参考文献

- 赵凌侠. 番茄野生资源[M]. 上海: 上海交通大学出版社, 2012. 4-17.
- 李金堂. 番茄病虫害防治图谱[M]. 山东: 山东科学技术出版社, 2010. 18-23.
- Abreu A. C., & Fernández, I.. NMR Metabolomics Applied on the Discrimination of Variables Influencing Tomato (*Solanum lycopersicum*). *Molecules*, 2020, 25(16): 3738.
- Abu Qamar., Chai MF., Luo HL., Song Mengiste.. Tomato protein kinase 1b mediates signaling of plant responses to necrotrophic fungi and insect herbivory. *PLANT CELL*, 2008, 20(7): 1964–1983.
- Alpert K. B., Tanksley S. D.. High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing fw2.2: a major fruit weight quantitative trait locus in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(26): 15503–15507.
- Alpert K. B., Grandillo S., Tanksley S. D.. fw 2.2: a major QTL controlling fruit weight is common to both red- and green-fruited tomato species. *Theoretical and applied genetics*. 1995, 91(6–7): 994–1000.
- Amselem J., Cuomo C. A., van Kan J. A. L., Viaud M., Benito E. P., Couloux A., Dickman M.. Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics*, 2011, 7(8): 1002-1030.
- An C., Mou Z.. The function of the Mediator complex in plant immunity. *Plant Signaling and Behavior*, 2013, 8(3).
- Anastasiou E., Kenz S., Gerstung M., MacLean D., Timmer J., Fleck C., Lenhard M.. Control of plant organ size by KLUH/CYP78A5-dependent intercellular signaling. *Developmental Cell*, 2007, 13(6): 843–856.
- Angulo C., Leyva M. de la O., Finiti I., López-Cruz J., Fernández-Crespo E., García-Agustín P., & González-Bosch C.. Role of dioxygenase α -DOX2 and SA in basal response and in hexanoic acid-induced resistance of tomato (*Solanum lycopersicum*) plants against *Botrytis cinerea*. *Journal of Plant Physiology*, 2015, 175: 163–173.
- Audenaert K., Meyer G. B. D., & Höfte M. M.. Absciscic Acid Determines Basal Susceptibility of Tomato to *Botrytis cinerea* and Suppresses Salicylic Acid-Dependent Signaling Mechanisms. *Plant Physiology*, 2002, 128(2): 491.
- Barrero, L. S., Tanksley, S. D.. Evaluating the genetic basis of multiple-locule fruit in a broad cross section of tomato cultivars. *Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 2004, 109(3): 669–679.
- Belkhadir Y., Jaillais Y., Eppe P., Balsemao-Pires E., Dangel J. L., Chory J..

- Brassinosteroids modulate the efficiency of plant immune responses to microbe-associated molecular patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(1): 297–302.
- Bermúdez L., de Godoy F., Balder P. Demarco, D. Osorio, S. Quadrana, L., Carrari F.. Silencing of the tomato Sugar Partitioning Affecting protein (SPA), modifies sink strength through a shift in leaf sugar metabolism. *The Plant Journal*, 2014, 77(5): 676–687.
- Birkenbihl R. P., Kracher B., Somssich I. E., Ziegler J., Liu S.. Negative regulation of ABA signaling by WRKY33 is critical for Arabidopsis immunity towards *Botrytis cinerea* 2100. *Elife*, 2015, 4(e07295).
- Bourdon M., Coriton O., Pirrello J., Cheniclet C., Brown S. C., Poujol C., Frangne N.. In planta quantification of endoreduplication using fluorescent in situ hybridization (FISH). *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2011, 66(6): 1089–1099.
- Carrari F., Fernie A. R.. Metabolic regulation underlying tomato fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(9): 1883–1897.
- Chakrabarti M., Zhang N., Sauvage C., Muños S., Blanca J., Cañizares J., van der Knaap E.. A cytochrome P450 regulates a domestication trait in cultivated tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(42): 17125–17130.
- Chevalier C., Bourdon M., Pirrello J., Cheniclet C., Gévaudant F., Frangne N.. Endoreduplication and fruit growth in tomato: evidence in favour of the karyoplasmic ratio theory. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(10): 2731–2746.
- Cong B., Barrero L. S., Tanksley S. D.. Regulatory change in YABBY-like transcription factor led to evolution of extreme fruit size during tomato domestication. *Nature Genetics*, 2008, 40(6): 800–804.
- Coombe, B.. The Development of Fleshy Fruits. *Annual Review of Plant Physiology*, 2003, 27: 207–228.
- Costa-Rodrigues J., Pinho O., Monteiro P. R. R.. Can lycopene be considered an effective protection against cardiovascular disease? *Food Chemistry*, 2018, 245: 1148–1153.
- D Ren Liu Y., Yang K. Y., Han L., Mao G., Glazebrook J., Zhang S.. A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(14): 5638–5643.
- D'Aoust M. A., Yelle S., Nguyen-Quoc B.. Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *The Plant Cell*, 1999, 11(12): 2407–2418.

- de Jong M., Wolters-Arts M., Feron R., Mariani C., Vriezen W. H.. The *Solanum lycopersicum* auxin response factor 7 (SlARF7) regulates auxin signaling during tomato fruit set and development. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2009, 57(1): 160–170.
- Dean R., Van Kan J. A. L., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Pietro A., Spanu P. D., Foster G. D.. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology: Top 10 fungal pathogens. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(4): 414–430.
- Eckardt N.A.. BIK1 Function in Plant Growth and Defense Signaling. *Plant Cell*, 2011, 23(8): 2806.
- Elmer P. A. G., Reglinski T.. Biosuppression of *Botrytis cinerea* in grapes. *Plant Pathology*, 2006, 55(2): 155–177.
- Faretra F., Antonacci E., Pollastro S.. Sexual Behaviour and Mating System of *Botryotinia fuckeliana* Teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Microbiology-*sgm**, 1988, 134: 2543–2550.
- Faulkner C., Petutschnig E., Benitez-Alfonso Y., Beck M., Robatzek S., Lipka V., Maule A. J.. LYM2-dependent chitin perception limits molecular flux via plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(22): 9166–9170.
- Ferrari Simone.. Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4(49): 49.
- Ferrari S., Plotnikova J. M., Lorenzo G. D., Ausubel F. M.. *Arabidopsis* local resistance to *Botrytis cinerea* involves salicylic acid and camalexin and requires *EDS4* and *PAD2*, but not *SID2*, *EDS5* or *PAD4*. *Plant Journal*, 2003, 35(2).
- Fiil B. K., Petersen M.. Constitutive expression of *MKSI* confers susceptibility to *Botrytis cinerea* infection independent of *PAD3* expression. *Plant Signaling and Behavior*, 2011, 6(10): 1425–1427.
- Frary A., Nesbitt T. C., Grandillo S., Knaap E., Cong B., Liu J., Tanksley S. D.. *fw2.2*: a quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, 2000, 289(5476): 85–88.
- Fridman E., Carrari F., Liu Y.-S., Fernie A. R., Zamir D.. Zooming in on a quantitative trait for tomato yield using interspecific introgressions. *Science*, 2004, 305(5691): 1786–1789.
- Fridman E., Pleban T., Zamir D.. A recombination hotspot delimits a wild-species quantitative trait locus for tomato sugar content to 484 bp within an invertase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, 97(9): 4718–4723.
- Frye C. A., Tang D., Innes R. W.. Negative regulation of defense responses in plants by

- a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2001, 98(1): 373–378.
- Galletti R., Ferrari S., & Lorenzo G. D.. *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 play different roles in basal and oligogalacturonide- or flagellin-induced resistance against *Botrytis cinerea*1. *Plant Physiol*, 2011, 157(2): 804-14.
- Gapper N. E., McQuinn R. P., Giovannoni J. J.. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, 2013, 82(6): 575–591.
- García-Hurtado N., Carrera E., Ruiz-Rivero O., López-Gresa M. P., Hedden P., Gong F., García-Martínez J. L.. The characterization of transgenic tomato overexpressing gibberellin 20-oxidase reveals induction of parthenocarpic fruit growth, higher yield, and alteration of the gibberellin biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(16): 5803–5813.
- Giovannoni J. J.. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, 2004, 16: 170-180.
- Gonzalez N., Gévaudant F., Hernould M., Chevalier C., Mouras A.. The cell cycle-associated protein kinase WEE1 regulates cell size in relation to endoreduplication in developing tomato fruit. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2007, 51(4): 642–655.
- Grandillo S., Ku H. M., Tanksley S. D.. Identifying the loci responsible for natural variation in fruit size and shape in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99(6): 978–987.
- Guan R., Su J., Meng X., Li S., Liu Y., Xu J., Zhang S.. Multilayered Regulation of Ethylene Induction Plays a Positive Role in *Arabidopsis* Resistance against *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiology*, 2015, 169(1): 299–312.
- Hackbusch J., Richter K., Müller J., Salamini F., Uhrig J. F.. A central role of *Arabidopsis thaliana* ovate family proteins in networking and subcellular localization of 3-aa loop extension homeodomain proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(13): 4908–4912.
- Heyman J., De Veylder L.. The anaphase-promoting complex/cyclosome in control of plant development. *Molecular Plant*, 2012, 5(6): 1182–1194.
- Inzé D., De Veylder L.. Cell cycle regulation in plant development. *Annual Review of Genetics*, 2006, 40: 77–105.
- Jain A., Sharma G., Ghoshal G., Kesharwani P., Singh B., Shivhare U. S., Katare O. P.. Lycopene loaded whey protein isolate nanoparticles: An innovative endeavor for enhanced bioavailability of lycopene and anti-cancer activity. *International Journal of Pharmaceutics*, 2018, 546(1–2): 97–105.

- Jarvis W. R., Canada A., Ottawa., Branch Ontario.. Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology, and pathogenicity; a guide to the literature. *Monogr Can Dep Agric*, 1977, 15: 195.
- Klaus P., Qiu J. L., Juri L., Katrine F. B., Sidsel H., John M., ... Markus G.. *Arabidopsis* MKS1 Is Involved in Basal Immunity and Requires an Intact N-terminal Domain for Proper Function. *PLOS ONE*, 2010, 5(12): e14364.
- Kumar R., Khurana A., Sharma A. K.. Role of plant hormones and their interplay in development and ripening of fleshy fruits. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(16): 4561–4575.
- Laluk K., Abuqamar S., Mengiste T.. The Arabidopsis Mitochondria-Localized Pentatricopeptide Repeat Protein PGN Functions in Defense against Necrotrophic Fungi and Abiotic Stress Tolerance. *Plant Physiology*, 2011, 156(4): 2053–2068.
- Latorre B. A., Spadaro I., Rioja M. E.. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*, 2002, 21(10): 957–961.
- Lee J. S., & Ellis B. E.. *Arabidopsis* MAPK Phosphatase 2 (MKP2) Positively Regulates Oxidative Stress Tolerance and Inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(34): 25020.
- Leroch M., Kleber A., Silva E., Coenen T., Koppenhöfer D., Shmaryahu A., Hahn M.. Transcriptome Profiling of *Botrytis cinerea* Conidial Germination Reveals Upregulation of Infection-Related Genes during the Prepenetration Stage. *Eukaryotic Cell*, 2013, 12(4): 614–626.
- Liebrand T. W. H., Burg H. A. V. D., Joosten M. H. A. J.. Two for all: receptor-associated kinases SOBIR1 and BAK1. *Trends in Plant Science*, 2014, 19(2): 123–132.
- Lorenzo G. D., Brutus A., Savatin D. V., Sicilia F., Cervone F.. Engineering plant resistance by constructing chimeric receptors that recognize damage-associated molecular patterns (DAMPs). *FEBS letters*, 2011, 585(11): 1521–1528.
- Lumbreras V., Vilela B., Irar S., Solé M., Capellades M., Valls M., Pagès M.. MAPK phosphatase MKP2 mediates disease responses in Arabidopsis and functionally interacts with MPK3 and MPK6: MKP2 mediates disease responses and interacts with MPK6 and MPK3. *The Plant Journal*, 2010, 63(6): 1017–1030.
- Mathieu-Rivet E., Gévaudant F., Sicard A., Salar S., Do P. T., Mouras A., Hernould M.. Functional analysis of the anaphase promoting complex activator CCS52A highlights the crucial role of endo-reduplication for fruit growth in tomato. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2010, 62(5): 727–741.
- Menu T., Saglio P., Granot D., Dai N., Raymond P., Ricard B.. High hexokinase activity in tomato fruit perturbs carbon and energy metabolism and reduces fruit and seed

- size. *Plant Cell*, 2004, 27, 89–98.
- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Shibuya N.. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(49): 19613–19618.
- Mohamed El Oirdi T. A. E. R., Luciano Rigano., Abdelbasset El Hadrami., María Cecilia Rodriguez., Fouad Daayf., Adrian Vojnov., Kamal Bouarab.. *Botrytis cinerea* Manipulates the Antagonistic Effects between Immune Pathways to Promote Disease Development in Tomato. *Plant Cell*, 2011, 23(6): 2405–21.
- Moser R., Pertot I., Elad Y., Raffaelli R.. Farmers’ attitudes toward the use of biocontrol agents in IPM strawberry production in three countries. *Biological Control*, 2008, 47(2): 125–132.
- Mounet F., Moing A., Kowalczyk M., Rohrmann J., Petit J., Garcia V., Lemaire-Chamley M.. Down-regulation of a single auxin efflux transport protein in tomato induces precocious fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63(13): 4901–4917.
- Moustafa K., AbuQamar S., Jarrar M., Al-Rajab A. J., Trémouillaux-Guiller J.. MAPK cascades and major abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, 2014, 33(8): 1217–1225.
- Muños S., Ranc N., Botton E., Bérard A., Rolland S., Duffé P., Causse M.. Increase in tomato locule number is controlled by two single-nucleotide polymorphisms located near WUSCHEL. *Plant Physiology*, 2011, 156(4): 2244–2254.
- N Denancé., A Sánchez-Vallet., Goffner D., Molina A.. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 155.
- Nelson M. A.. Mating systems in ascomycetes: a romp in the sac, 1996, 12(2): 69–74.
- Newman MA., Sundelin T., Nielsen JT., Erbs G.. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants. *FRONT PLANT SCI*, 2013,4: 139
- Nitsch L., Kohlen W., Oplaat C., Charnikhova T., Cristescu S., Michieli P., Rieu I.. ABA-deficiency results in reduced plant and fruit size in tomato. *Journal of Plant Physiology*, 2012, 169(9): 878–883.
- Paran I., van der Knaap E.. Genetic and molecular regulation of fruit and plant domestication traits in tomato and pepper. *Journal of Experimental Botany*, 2007, 58(14): 3841–3852.
- Pattison R. J., Catalá C.. Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the PIN and AUX/LAX gene families: Auxin transport genes in tomato fruit development. *The Plant Journal*, 2012, 70(4): 585–598.
- Pham J., Liu J., Bennett M. H., Mansfield J. W., Desikan R.. *Arabidopsis* histidine

- kinase 5 regulates salt sensitivity and resistance against bacterial and fungal infection. *New Phytologist*, 2012, 194(1): 168–180.
- Qiu J. L., Fiil B. K., Petersen K., Nielsen H. B., Botanga C. J., Thorgrimsen S., Lichota J.. *Arabidopsis* MAP Kinase 4 regulates gene expression via transcription factor release in the nucleus. *EMBO Journal*. 2008, 27(16): 2214–21.
- Rodríguez G. R., Muños S., Anderson C., Sim S.-C., Michel A., Causse M., van der Knaap E.. Distribution of *SUN*, *OVATE*, *LC*, and *FAS* in the tomato germplasm and the relationship to fruit shape diversity. *Plant Physiology*, 2011, 156(1): 275–285.
- Rosslenbroich H.-J., Stuebler D.. *Botrytis cinerea* — history of chemical control and novel fungicides for its management. *Crop Protection*, 2000, 19(8–10): 557–561.
- Sánchez-Moreno C., Plaza L., de Ancos B., Cano M. P.. Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity. *Food Chemistry*, 2006, 98(4): 749–756.
- Serrani J. C., Ruiz-Rivero O., Fos M., García-Martínez J. L.. Auxin-induced fruit-set in tomato is mediated in part by gibberellins. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2008, 56(6): 922–934.
- Shakeel S. N., Wang X., Binder B. M., Eric S. G.. Mechanisms of signal transduction by ethylene: overlapping and non-overlapping signalling roles in a receptor family. *Aob Plants*, 2013, 5: plt010.
- Thomma B. P. H. J., Eggermont K., Penninckx I. A. M. A., Mauch-Mani B., Vogelsang R., Cammue B. P. A., Broekaert W. F.. Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1999, 95(25): 15107–15111.
- Tohge T., Alseekh S., Fernie A. R.. On the regulation and function of secondary metabolism during fruit development and ripening. *Journal of Experimental Botany*, 2014, 65(16): 4599–4611.
- Tudzynski P., Kokkelink L.. *Botrytis cinerea*: Molecular Aspects of a Necrotrophic Life Style. In *Plant Relationships*, 2009, pp. 29–50.
- van Kan J. A. L.. INFECTION STRATEGIES OF *BOTRYTIS CINEREA*. *Acta Horticulturae*, 2005, 669: 77–90.
- van Kan J. A. L.. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, 2006, 11(5): 247–253.
- Veronese P.. The membrane-anchored BOTRYTIS-INDUCED KINASE1 plays distinct roles in *Arabidopsis* resistance to necrotrophic and biotrophic pathogens. *Plant Cell*, 2006, 18(1): 257–273.
- Wang F., Sanz A., Brenner M. L., Smith A.. Sucrose Synthase, Starch Accumulation,

- p>and Tomato Fruit Sink Strength.
- Plant Physiology*
- , 1993, 101(1): 321–327.
- Wang S., Chang Y., Guo J., Chen J.-G.. *Arabidopsis* Ovate Family Protein 1 is a transcriptional repressor that suppresses cell elongation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 2007, 50(5): 858–872.
- Wang S., Chang Y., Guo J., Zeng Q., Ellis B. E., Chen J.-G.. *Arabidopsis* ovate family proteins, a novel transcriptional repressor family, control multiple aspects of plant growth and development. *PloS One*, 2011, 6(8): e23896.
- Weiberg A., Wang M., Lin F.-M., Zhao H., Zhang Z., Kaloshian I., Jin H.. Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. *Science*, 2013, 342(6154): 118–123.
- Williams C. E., Clair D. A. St.. Phenetic relationships and levels of variability detected by restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA analysis of cultivated and wild accessions of *Lycopersicon esculentum*. *Genome*, 1993, 36(3): 619–630.
- Williamson B., Tudzynski B., Tudzynski P., Van Kan J. A. L.. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(5): 561–580.
- Windram O., Madhou P., Mchattie S., Hill C., Hickman R., Cooke E., Breeze E.. *Arabidopsis* defense against *Botrytis cinerea*: chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 2012, 24(9): 3530–3557.
- Wu G., Liu S., Zhao Y., Wang W., Kong Z., Tang D.. ENHANCED DISEASE RESISTANCE4 associates with CLATHRIN HEAVY CHAIN2 and modulates plant immunity by regulating relocation of EDR1 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2015, 27(3): 857–873.
- Wu S., Xiao H., Cabrera A., Meulia T., van der Knaap E.. SUN regulates vegetative and reproductive organ shape by changing cell division patterns. *Plant Physiology*, 2011, 157(3): 1175–1186.
- Xu J., Meng J., Meng X., Zhao Y., Liu J., Sun T., Zhang S.. Pathogen-Responsive MPK3 and MPK6 Reprogram the Biosynthesis of Indole Glucosinolates and Their Derivatives in *Arabidopsis* Immunity. *Plant Cell*, 2016, 28(5): 1144.
- Zander M., La Camera S., Lamotte O., Métraux J., Gatz C.. *Arabidopsis thaliana* class-II TGA transcription factors are essential activators of jasmonic acid/ethylene-induced defense responses. *The Plant Journal*, 2009, 61(2): 200–10.
- Zanor M. I., Osorio S., Nunes-Nesi A., Carrari F., Lohse M., Usadel B., Fernie A. R.. RNA interference of *LIN5* in tomato confirms its role in controlling Brix content, uncovers the influence of sugars on the levels of fruit hormones, and demonstrates the importance of sucrose cleavage for normal fruit development and fertility. *Plant Physiology*, 2009, 150(3): 1204–1218.

- Zhang J., Li W., Xiang T., Liu Z., Laluk K., Ding X., Chen S.. Receptor-like cytoplasmic kinases integrate signaling from multiple plant immune receptors and are targeted by a *Pseudomonas syringae* effector. *Cell host and microbe*, 2010, 7(4): 290–301.
- Zhang L., Hua C., Pruitt R. N., Qin S., Wang L., Albert I., Nürnberger T.. Distinct immune sensor systems for fungal endopolygalacturonases in closely related Brassicaceae. *Nature Plants*, 2021, 7(9): 1254–1263.
- Zhang L., Kars I., Essenstam B., Liebrand T. W. H., Wagemakers L., Elberse J., Van Kan J. A. L.. Fungal Endopolygalacturonases Are Recognized as Microbe-Associated Molecular Patterns by the *Arabidopsis* Receptor-Like Protein RESPONSIVENESS TO BOTRYTIS POLYGALACTURONASES1. *Plant Physiology*, 2014, 164(1): 352–364.
- Zhang W., Fraiture M., Kolb D., Löffelhardt B., Desaki Y., Boutrot F., Brunner F.. *Arabidopsis* RECEPTOR-LIKE PROTEIN30 and Receptor-Like Kinase SUPPRESSOR OF BIR1-1/EVERSHED Mediate Innate Immunity to Necrotrophic Fungi. *The Plant Cell*, 2013, 25(10): 4227–4241.
- Zhao Y., Wu G., Shi H., Tang D.. RECEPTOR-LIKE KINASE 902 Associates with and Phosphorylates BRASSINOSTEROID-SIGNALING KINASE1 to Regulate Plant Immunity. *Molecular Plant*, 2019, 12(1): 59–70.
- Zhu Z., An F., Feng Y., Li P., Xue L., A M., Guo H.. Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(30): 12539–12544.

附录

引物	序列 (5'-3')
SI-EDR4-qRT-F	GGATATGGAATGCAATATCGCC
SI-EDR4-qRT-R	AAAAGGGTTTCATGTGGATGTG
SI-Actin2-qRT-F	TTGCTGACCGTATGAGCAAG
SI-Actin2-qRT-R	GGACAATGGATGGACCAGAC
NPR1-qRT-F	CCAAAGGAGCTAGACCTTCTGATCT
NPR1-qRT-R	TTCAAGGTATAACAGCTTCATA
PR1-qRT-F	TCTTGTGAGGCCCAAAATTC
PR1-qRT-R	ATAGTCTGGCCTCTCGGACA
PR2-qRT-F	GCGGTGTTTCAGCCTGGATG
PR2-qRT-R	AGCATGAGCAAGTATGTTGTG
PR8-qRT-F	TGCAGGAACATTCACTGGAG
PR8-qRT-R	TAACGTTGTGGCATGATGGT
TD-qRT-F	AGCTCAAACACACGCGCTGGA
TD-qRT-R	AACCCCCACCACCAACAGGT
PR-STH2-qRT-F	GAAGGGGATCCATTGGGACAA
PR-STH2-qRT-R	TTCCCATAGCACTATCTTTTCCA
RbohB-qRT-F	ACAATGCTTCAATCAATCCACC
RbohB-qRT-R	CTTTGTGTCTGTCTTGTGTGAG
RbohC-qRT-F	CACAGTGTCAAAAATGCCACTA
RbohC-qRT-R	ACGCTTGGAAGATTTCTTACG
RbohD-qRT-F	GAAATCACTCTCGATGTTTCGTG
RbohD-qRT-R	GCTGATTTATTCCTGTCTGAACC
RbohF-qRT-F	ACGATTATTTTACGGAGCGTTG
RbohF-qRT-R	CCTGTGAAAACCTGACGAAACTT
SODCC1-qRT-F	CTATTACCGACAAGCAGATTCC
SODCC1-qRT-R	AATACCACAAGCAATCCTTCC
APX1-F	TGCTGGTACCTACGATGTGTG
APX1-R	CTGGTGGCTCTGGCTTGTG

致 谢