

# 番茄茉莉酸缺失突变体灰霉菌侵染响应 miRNA 及其表达分析

李琳琳<sup>1</sup>, 金 华<sup>1</sup>, 刘斯超<sup>3</sup>, 邹吉祥<sup>1</sup>, 李天来<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup>大连民族大学环境与资源学院, 辽宁大连 116605; <sup>2</sup>沈阳农业大学园艺学院, 设施园艺省部共建教育部重点实验室, 沈阳 110866; <sup>3</sup>承德市蔬菜技术推广站, 河北承德 067000)

**摘 要:** 为揭示 miRNA 对番茄灰霉菌胁迫的响应机制, 以番茄茉莉酸 (JA) 缺失突变体 *def1*、*spr2* 及其野生型 (CM) 为试验材料, 构建了 3 个材料接种灰霉菌前后 (0 h、48 h) 2 个时期的 miRNA 文库, 并采用 Illumina 平台测序, 对测序数据进行生物信息分析, 结合实时荧光定量检测目的 miRNA 及其预测的靶基因表达情况。结果表明灰霉菌侵染番茄后, JA 缺失突变体 *def1* 和 *spr2* 的病情指数显著高于 CM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量低于 CM。高通量测序鉴定了 130 个已知 miRNA 和 811 个新 miRNA。进一步筛选出 8 个保守 miRNA (Sly-miR156e-3p、Sly-miR166c-5p、Sly-miR171f、Sly-miR172b、Sly-miR319a、Sly-miR390b-5p、Sly-miR399b、Sly-miR482d-5p), 其在 6 个样本中表达模式各异。预测差异 miRNA 靶基因 122 个, 结合 qRT-PCR 技术分析了 8 个 miRNA 和 8 个靶基因的表达情况, 与高通量测序结果基本一致。推测 Sly-miR156e-3p、Sly-miR390b-5p、Sly-miR399b、Sly-miR482d-5p 通过依赖 JA 信号途径参与番茄对灰霉病的抗性。

**关键词:** 番茄; miRNA; 突变体; 茉莉酸; *def1*; *spr2*; 灰霉菌

**中图分类号:** S 641.2

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2020) 07-1323-12

## Expressed Analysis of miRNA with Tomato JA Deficient Mutant Response to *Botrytis cinerea* Infection

LI Linlin<sup>1</sup>, JIN Hua<sup>1</sup>, LIU Sichao<sup>3</sup>, ZOU Jixiang<sup>1</sup>, and LI Tianlai<sup>2,\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Environment and Bioresources, Dalian Minzu University, Dalian, Liaoning 116605, China; <sup>2</sup>Key Lab of Protected, Ministry of Education, College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China; <sup>3</sup>Chengde Vegetable Technology Promotion Station, Chengde, Hebei 067000, China)

**Abstract:** In order to investigate the mechanism of miRNA response to *Botrytis cinerea* in tomato, two JA deficient mutants *def1* and *spr2*, and the wild type (Castlemart) plant had been used in this study. miRNA database were conducted following RNA-seq and bioinformatics analysis after *B. cinerea* inoculation on plant materials at 0 h and 48 h. The qRT-PCR was performed to examine the target miRNA and its predicted target gene expression levels. The results showed that JA defective mutants were more sensitive than wild type to *B. cinerea*. And H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content was also lower compared to that of wild type.

**收稿日期:** 2020-03-11; **修回日期:** 2020-06-28

**基金项目:** 辽宁省自然科学基金项目 (20170540189); 大连市高层次人才项目 (2018RQ80); 河北省重点研发计划项目 (19226914D); 河北省现代农业产业技术体系项目 (HBCT2018030402); 辽宁省自然科学基金联合基金项目; 中央高校基本科研业务费项目

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: tianlaili@126.com)

One hundred and thirty known miRNAs and 811 new miRNAs had been identified by RNA-seq, and 8 conserved miRNAs (Sly-miR156e-3p, Sly-miR166c-5p, Sly-miR171f, Sly-miR172b, Sly-miR319a, Sly-miR390b-5p, Sly-miR399b and Sly-miR482d-5p) showed different expression patterns which had been selected in 6 samples. Altogether 122 predicted target genes were obtained, and the expression level of 8 miRNAs and their target genes have been verified by qRT-PCR which showed consistent results with RNA-seq. Therefore, Sly-miR156e-3p, Sly-miR390b-5p, Sly-miR399b and Sly-miR482d-5p may involve in *B. cinerea* resistance through JA pathway.

**Keywords:** tomato; microRNA; JA; mutant; *def1*; *spr2*; *Botrytis cinerea*

植物病原菌侵入宿主细胞后通过分泌有毒化合物、分解酶或产生一系列的致病因子抑制宿主的防御反应从而杀死宿主 (Chisholm et al., 2006; Jones & Dangl, 2006)。而宿主细胞则通过产生信号分子如活性氧 (ROS)、Ca<sup>2+</sup>等启动防御机制抑制病原菌侵染到周围细胞 (Jones & Dangl, 2006; Aldon et al., 2018)。在此过程中, 茉莉酸 (JA)、水杨酸 (SA)、生长素 (IAA)、乙烯 (ETH) 广泛参与 (Navarro et al., 2006; Chen et al., 2017; Dinolfo, 2017; Jiang & Yan, 2018; Feng et al., 2019)。

miRNA 是一类长度为 21 ~ 24 nt 的非编码小 RNA, 在植物中 miRNA 通过降解靶 mRNA 起到转录后调控作用 (Djami-Tchatchou et al., 2017; Momen-Heravi & Bala, 2018)。研究显示 miRNA 参与植物对真菌的抗性调控, 如灰霉菌侵染番茄后检测到 miR160、miR169 和 miR171 表达 (Jin & Wu, 2015); 而 Chen 等 (2017) 发现 miR396a-3p 和-5p 分别调控番茄对疫霉和灰霉病的抗性。miRNA 还可通过依赖 IAA、SA、ABA 等激素信号途径来调节植物对多种病原的抗性 (Navarro et al., 2006; Chen et al., 2017; Xu et al., 2017)。如 *Verticillium dahlia* 侵染拟南芥后 4 个 miRNA 靶向调控 ARF10、NAC10、PHV 和 ARF6 (Jin et al., 2018); miR160、miR167 通过下调 IAA 响应因子 ARF8、ARF10、ARF16、ARF17 提高拟南芥对 *Pst* DC3000 的抗性 (Zhang et al., 2011)。miR396a 通过靶基因 *GRF1* 和 *SAMT* 分别抑制 JA 途径 *PI I* 和 *PI II* 表达, 提高番茄对叶霉菌的敏感性 (Chen et al., 2017)。

茉莉酸 (Jasmonic acid, JA) 可激活植物对腐生型病原菌的抗性已经得到公认 (Chini et al., 2018; Howe, 2018)。番茄 JA 缺失突变体 *def1* (*defenseless 1*) 和 *spr2* (*prosystemin-mediated responses 2*) 已广泛应用于研究植物对生物及非生物胁迫反应的响应机制, 如抗灰霉病 (Mehari et al., 2015)、抗食草昆虫 (Grinberg-Yaari et al., 2015)、响应盐胁迫 (Abouelsaad & Renault, 2018) 等。但有关 miRNA 通过 JA 信号途径参与植物抗病的机制尚不清楚。

本研究中以番茄 JA 缺失突变体及其野生型为材料, 通过比较灰霉病易感型 *def1*、*spr2* 和抗性品种 CM 间的差异表达 miRNA, 预测其靶基因, 并结合实时荧光定量技术进一步验证目的 miRNA 和靶基因的表达情况。初步探究 miRNA 及其靶基因通过介导 JA 信号途径响应灰霉病胁迫的机制, 为后期目的 miRNA 的功能验证奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以番茄 JA 缺失突变体 *def1*、*spr2* (由浙江大学农业与生物技术学院园艺系汪俏梅教授惠赠) 及其野生型番茄 (CM) 为试材。2017 年 5 月将 *def1*、*spr2* 和 CM 播种在大连民族大学温室内。按照 25 °C/15 °C (昼/夜) 调控温度, 自然光照, 相对湿度 60% ~ 70%。常规管理。待植株长至 4 片真

叶时选取整齐一致植株进行接种灰霉菌处理, 每处理 5 次重复。

## 1.2 病原菌培养、接种与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量测定

供试番茄灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*) 由辽宁省农业科学院蔬菜研究所提供, 参照李君明 (2005) 的方法进行菌株培养与接种。接种前 24 h 保持湿度 90% 以上, 接种后 48 h 内保持湿度达 100%。接种后 0 和 48 h 取样, 液氮速冻, 用于提取叶片总 RNA 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量测定 (Miller et al., 2010); 接种 5 d 后调查发病情况、计算病情指数 (黄海 等, 2015)。

## 1.3 文库构建、高通量测序与分析

Trizol 法提取番茄叶片总 RNA, 进行 1.0% 非变性琼脂糖凝胶电泳检测, 确保浓度及纯度。miRNA 文库构建采用 Illumina 公司 TruSeq Small RNA Sample prep Kit 试剂盒 (Illumina, 美国) 进行构建。检测合格后干冰运输送至上海派森诺生物科技股份有限公司利用 Illumina Hiseq 平台测序, 测序读长为 50 nt。

将测序原始序列 (raw reads) 去除接头序列和 < 18 nt 或 > 30 nt 的序列获得过滤后序列 (clean reads) 用于后续分析。运用 GenBank 和 Rfam (11.0) 数据库, 过滤、剔除样本中 rRNA、tRNA、snRNA 和 snoRNA。利用 Bowtie2 (2.2.9) 软件分析 miRNA 序列在基因组上的分布情况。

## 1.4 miRNA 鉴定、差异表达 miRNA 筛选和靶基因预测

将未注释到 rRNA、tRNA、snRNA 和 snoRNA 中四类 ncRNA 序列与 miRBase21 (V21.0) 数据库中的番茄成熟 miRNA 序列进行比对, 从中筛选保守 miRNA。整理各样品保守 miRNA 表达量数据, 采用 TPM 算法归一化处理 miRNA 的表达量, 按照表达量 2 倍以上且  $P < 0.05$  的标准筛选差异表达 miRNA。使用在线分析软件 psRNATarget, 对得到的 miRNA 序列进行靶基因预测。

## 1.5 实时荧光定量测定

依据在形成茎环结构序列的 3' 端加上与之相对应 miRNA 互补的 6~8 个碱基的原则, 设计 qRT-PCR 引物。根据测序后筛选差异较大或特异表达的 8 个 miRNA 及其靶基因设计引物, 并进行引物合成 (表 1, 表 2)。

表 1 miRNA 茎环结构反转录引物和特异引物序列  
Table 1 Stem-loop RT and PCR primer sequences of miRNA

miRNA	引物序列 (5' - 3') Primer	反转录引物序列 (5' - 3') Reverse transcription primer
miR156e-3p	F: CGTGCTGATAGAAGAGAGTG R: TCCCGACCACCACAGCC	GCGTGGTCCCGACCACCACAGCCGCCACGACCACGCGTGCTC
miR166c-5p	F: CGTGCGGGATGTTGTCTGGC R: TCCCGACCACCACAGCC	GCGTGGTCCCGACCACCACAGCCGCCACGACCACGCTGTGCGA
miR171f	F: CGTGCTATTGGCCTGGTTCAC R: TCCCGACCACCACAGCC	GCGTGGTCCCGACCACCACAGCCGCCACGACCACGCTCTAGA
miR172b	F: CGTGCAGAATCTTGATGATG R: TCCCGACCACCACAGCC	GCGTGGTCCCGACCACCACAGCCGCCACGACCACGCATGCAG
miR319a	F: CGTGCCCTGGACTGAAGGGA R: TCCCGACCACCACAGCC	GCGTGGTCCCGACCACCACAGCCGCCACGACCACGCGGAGCT
miR390b-5p	F: CGTGCAAGCTCAGGAGGGAT R: TCCCGACCACCACAGCC	GCGTGGTCCCGACCACCACAGCCGCCACGACCACGCGGGCGCT
miR399b	F: CGTGCGGGCTACTCTCTATT R: TCCCGACCACCACAGCC	GCGTGGTCCCGACCACCACAGCCGCCACGACCACGCCATGCC
miR482d-5p	F: CTGTGTTTCTATTCCACCC R: GGCTGTCGTGGACTGCG	CTCAGCGGCTGTCGTGGACTGCGCGCTGCCGCTGAGTTGGCA

表 2 miRNA 靶基因荧光定量 PCR 引物  
Table 2 miRNA target gene primers for quantitative real-time PCR

靶基因 (miRNA) Target gene (miRNA)	正向引物 (5' - 3') Forward primer	反向引物 (5' - 3') Reverse primer
Solyc10g009080.2.1 (miR156e-3p)	GTGAATGCTAAGACATACCATCG	ATCATCAAACCTCCGCAACT
Solyc01g090460.2.1 (miR166c-5p)	GCCCTCCAACAACCCCTTAC	GCGAACATTGCAGCCCAT
Solyc09g007260.2.1 (miR172b)	AAGCGCATTAAGCATTCAACA	CTGCACGACCGCAAAAAAC
Solyc10g019260.1.1 (miR319a)	CAGTTACCAACTTTGATCGTAGC	TTAGATGAAGAATTTTGACCCCT
Solyc01g011040.2.1 (miR390b-5p)	GCGTTTGGATTCCGGTTG	GTCACGTTTCAGGGTTTATGAG
Solyc03g082810.1.1 (miR171f)	GACGACAACGTGCAGGCTT	GTGGCGGATACAACAGATGAGT
Solyc02g092820.2.1 (miR399b)	TCAAGGCAGAAACGAAGACG	AGTAAGCCAGAGGCAAAAAACA
Solyc06g008450.2.1 (miR482d-5p)	CAACTCATTGGTGTATTCTCTGCG	CAACCTCTGTCTTTTCTCTGCTC

使用 Trizol 法提取不同处理的番茄叶片总 RNA, TaKaRa PrimeScript Reverse Transcriptase 反转录合成 cDNA 第 1 链。采用 ABI 7500 实时荧光定量 PCR 系统进行扩增。扩增条件: 95 °C 预变性 3 min, 然后 95 °C 30 s, 57 °C 30 s, 40 个循环, 68 °C 保存。以 *Actin* 基因作为内参, 每个模板和每种引物 3 组试验重复, 3 组生物学重复。相对表达量用公式  $2^{-\Delta\Delta CT}$  计算。

试验所得数据采用 Excel 软件处理, DPS 软件进行统计分析, 差异显著性比较使用 Duncan's 新复极差法。

## 2 结果与分析

### 2.1 JA 缺失突变体抗病性的差异

番茄 JA 缺失突变体 *def1* 和 *spr2* 及其野生型接种番茄灰霉菌 5 d 后, 其病情指数分别为 59.79、76.11 和 44.22, JA 缺失突变体显著高于 CM (图 1, A)。3 个材料的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含量在接种后 48 h 都升高, 其中 CM 高于 *def1* 和 *spr2* (图 1, B)。

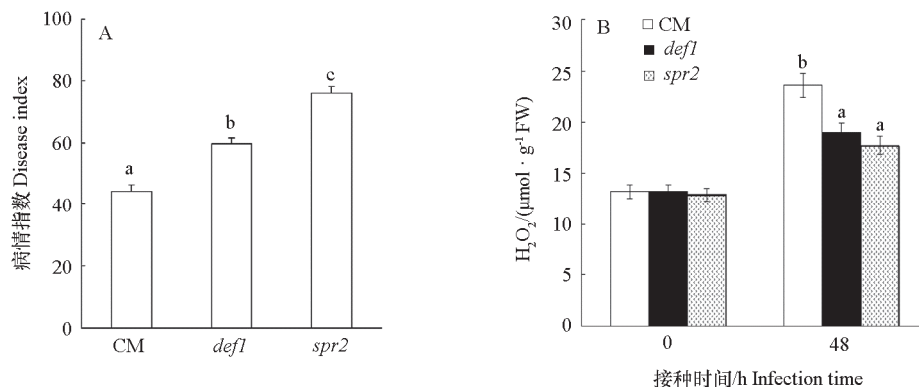


图 1 番茄 JA 缺失突变体 *def1*、*spr2* 及其野生型 CM 接种灰霉菌的病情指数 (A) 及过氧化氢含量 (B)  
Fig. 1 The disease index (A) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> content (B) of JA deficient mutant *def1*, *spr2* and its wild type tomato CM after *Botrytis cinerea* infection  
 $P < 0.05$ .

### 2.2 测序数据处理和 miRNA 的分类注释

如表 3 所示, 番茄 CM、*def1* 和 *spr2* 接种灰霉菌 0 和 48 h 得到的过滤后序列占原始序列的 87.23%; 样品中未注释的序列居多, 达 90%; rRNA、tRNA、snRNA、snoRNA 所占比重较少, 符合建库要

求, 可进行下一步分析。接种 0 和 48 h, CM、*def1*、*spr2* 比对到正链上的过滤后序列数占所有锚定序列 (mapped reads) 的比例分别为 50.62%、50.36%、50.07%、50.18%、62.32%、50.60% (表 4)。过滤后序列进行 miRNA 片段长度统计 (图 2), 各处理 miRNA 长度在 21~24 nt 的丰度较高, 且不同品种不同处理之间 miRNA 的长度峰值略有差异。其中长度 24 nt 的 miRNA 占比最高, 平均为 33.92%。

表 3 JA 缺失突变体 *def1*、*spr2* 及其野生型 CM 的 Illumina 测序数据统计表

Table 3 Summary of the Illumina sequencing results of JA deficient mutant *def1*, *spr2* and its wild type tomato CM

材料 Material	接种时间/h Infection time	原始序列 Raw reads	过滤后序列 Clean reads	rRNA	tRNA	snRNA	snoRNA	已知 miRNA Known miRNA	新 miRNA Novel miRNA	未注释 Unannotated
CM	0	16 667 793	12 435 363	169 872	27 953	11 405	23 024	399 813	3 708	3 574 296
	48	25 085 314	23 377 373	257 803	40 922	9 686	21 320	717 394	7 846	3 455 284
<i>def1</i>	0	15 010 488	12 893 568	164 907	20 713	5 704	13 485	370 972	3 266	2 290 616
	48	15 282 621	13 744 155	225 037	26 768	6 150	16 526	261 682	2 158	2 016 164
<i>spr2</i>	0	23 660 234	20 874 273	255 399	27 701	7 381	17 980	393 592	2 781	2 640 699
	48	16 322 005	14 939 563	224 333	35 423	5 477	14 117	252 705	2 403	1 948 876

表 4 JA 缺失突变体 *def1*、*spr2* 及其野生型 CM 参考基因组对比信息

Table 4 Distribution of sequence reads mapped to genome of JA deficient mutant *def1*, *spr2* and its wild type tomato CM

材料 Material	接种时间/h Infection time	比对上基因组的序列 Mapped reads	比对上正链的序列 Mapped reads (+)	比对上负链的序列 Mapped reads (-)
CM	0	5 361 510	2 713 892	2 647 618
	48	4 971 749	2 503 651	2 468 098
<i>def1</i>	0	3 570 978	1 823 754	1 747 224
	48	3 109 599	1 560 353	1 549 246
<i>spr2</i>	0	4 197 164	2 165 052	2 032 112
	48	2 943 988	1 489 769	1 454 219

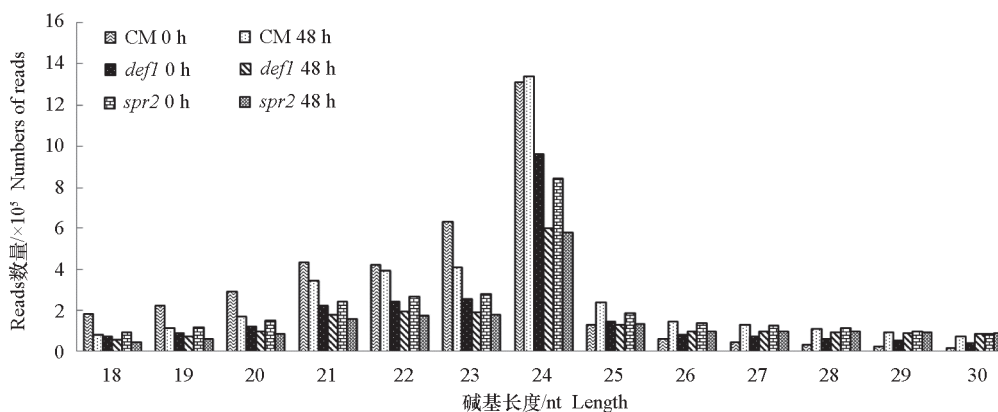


图 2 番茄 JA 缺失突变体 *def1*、*spr2* 及其野生型 CM 样本 miRNA 片段长度分布统计

Fig. 2 Length distribution of miRNAs in JA deficient mutant *def1*, *spr2* and its wild type tomato CM libraries

### 2.3 差异表达 miRNA 分析

与 miRBase (V21.0) 数据库比对鉴定到 130 个已知 miRNA 和 811 个新 miRNA。筛选得到 62 个已知的差异 miRNA。不同品种不同处理之间差异表达的 miRNA 大多数在 *def1* 和 *spr2* 中呈下调表达, 少数呈上调表达 (图 3)。接种前 JA 缺失突变体共同下调的 miRNA 有 6 个, 共同上调的为 4 个; 接种后 48 h 与 CM 相比, 两个 JA 缺失突变体共同下调 miRNA 为 2 个, 上调 miRNA 为 2 个 (表 5)。

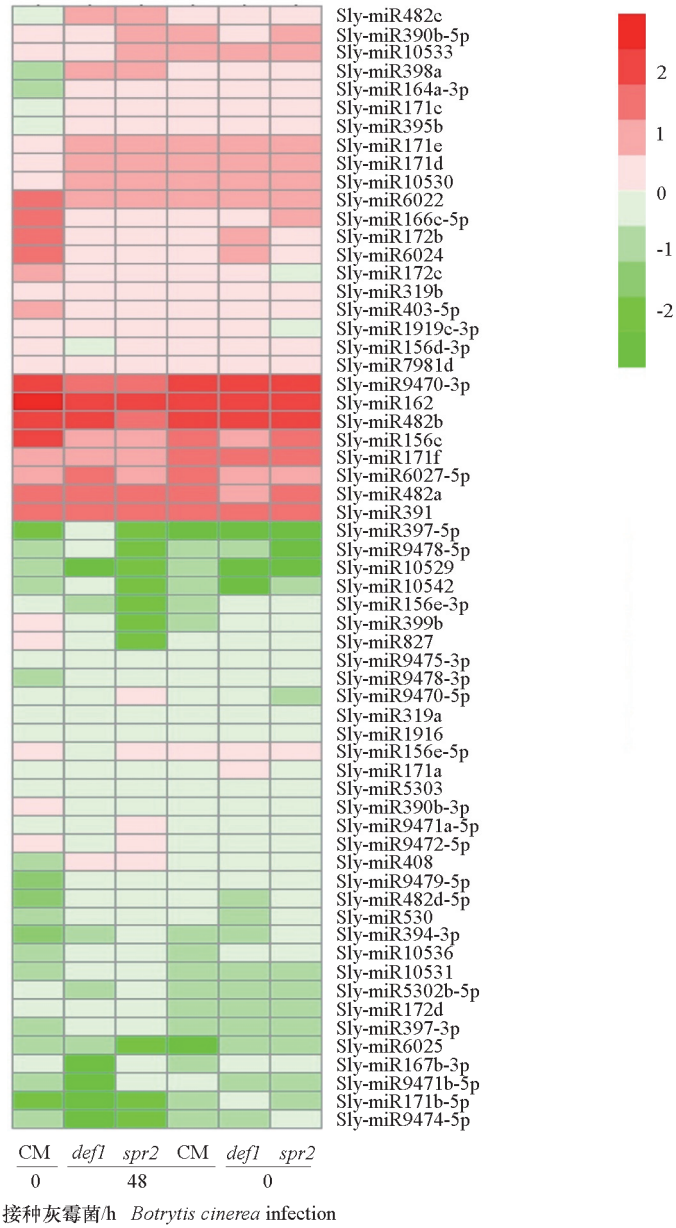


图3 番茄 JA 缺失突变体 *def1*、*spr2* 及其野生型 CM 样本中 62 个已知 miRNA 差异表达热图

Fig. 3 Heatmap of difference expression of 62 known miRNAs in JA deficient mutant *def1*, *spr2* and its wild type tomato CM libraries

表5 番茄 JA 缺失突变体 *def1*、*spr2* 与野生型 CM 相比差异表达 miRNA 数统计

Table 5 Summary of differentially expressed miRNAs between JA deficient mutant *def1*, *spr2* and its wild type tomato CM

接种灰霉菌时间/h <i>Botrytis cinerea</i> infection	突变体 Mutant	总数 Total	上调 No. up-regulated	下调 No. down-regulated
0	<i>spr2</i>	29	8	21
	<i>def1</i>	27	10	17
	<i>spr2</i> , <i>def1</i>	10	4	6
48	<i>spr2</i>	10	6	4
	<i>def1</i>	8	2	6
	<i>spr2</i> , <i>def1</i>	4	2	2

从差异表达的保守 miRNA 中进一步筛选出差异明显或表达量较高的 8 个保守 miRNA, 分别为 miR156e-3p、miR166c-5p、miR171f、miR172b、miR319a、miR390b-5p、miR399b 和 miR482d-5p (图 4)。qRT-PCR 验证 miR156e-3p 接种灰霉菌后 48 h 在野生型 CM 中表达量上调, 在 JA 缺失突变体 *def1* 和 *spr2* 中均明显下调; miR399b 则在 CM 接种后 48 h 下调表达, 在 *def1* 和 *spr2* 中均明显上调; miR166c-5p、miR172b、miR319a 在 CM、JA 缺失突变体中表达模式相似, 均在接种后 48 h 呈下调表达; miR482d-5p 和 miR390b-5p 的表达模式在 3 个材料中表现不一致, miR482d-5p 在 CM 中接种后呈上调表达, 在 *def1* 和 *spr2* 接种后均呈下调表达; miR390b-5p 在 CM 和 *spr2* 中接种后上调表达, 在 *def1* 中稍下调。综合看, qRT-PCR 验证与测序结果多数一致。

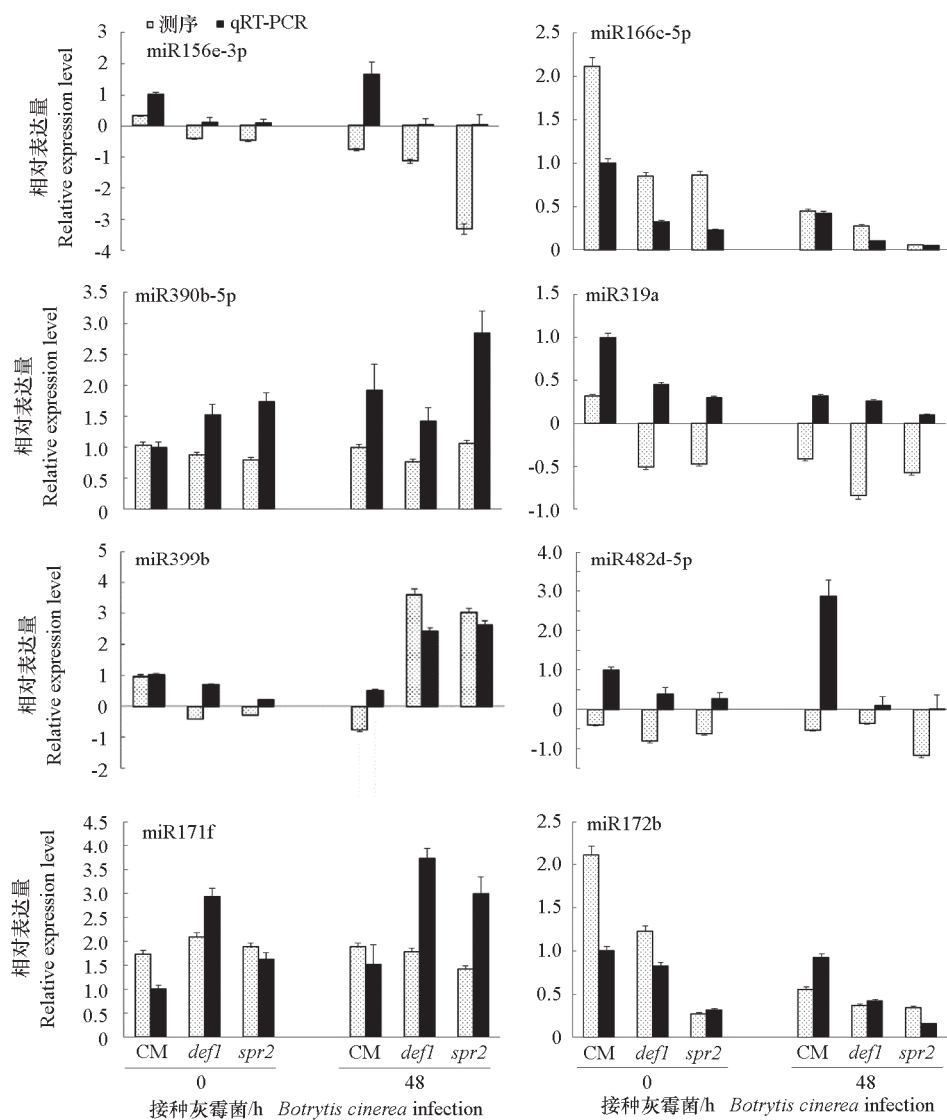


图 4 番茄 JA 缺失突变体 *def1*、*spr2* 与野生型 CM 叶片中 miRNA 的相对表达量和测序结果比较

Fig. 4 Relative expression confirmed by qRT-PCR and comparison with sequencing data in tomato leaves of JA deficient mutant *def1*, *spr2* and its wild type CM

## 2.4 差异表达 miRNA 的靶基因预测及表达分析

预测到差异 miRNA 靶基因共 122 个, 涉及多种植物激素合成/信号转导的基因, ROS 清除系统的酶, 抗逆反应直接相关的基因等。单个 miRNA 可调控多个靶基因, 也存在多个 miRNA 调控同一类靶基因。根据经验和表达差异情况筛选了 8 个靶基因进行实时定量分析 (图 5)。

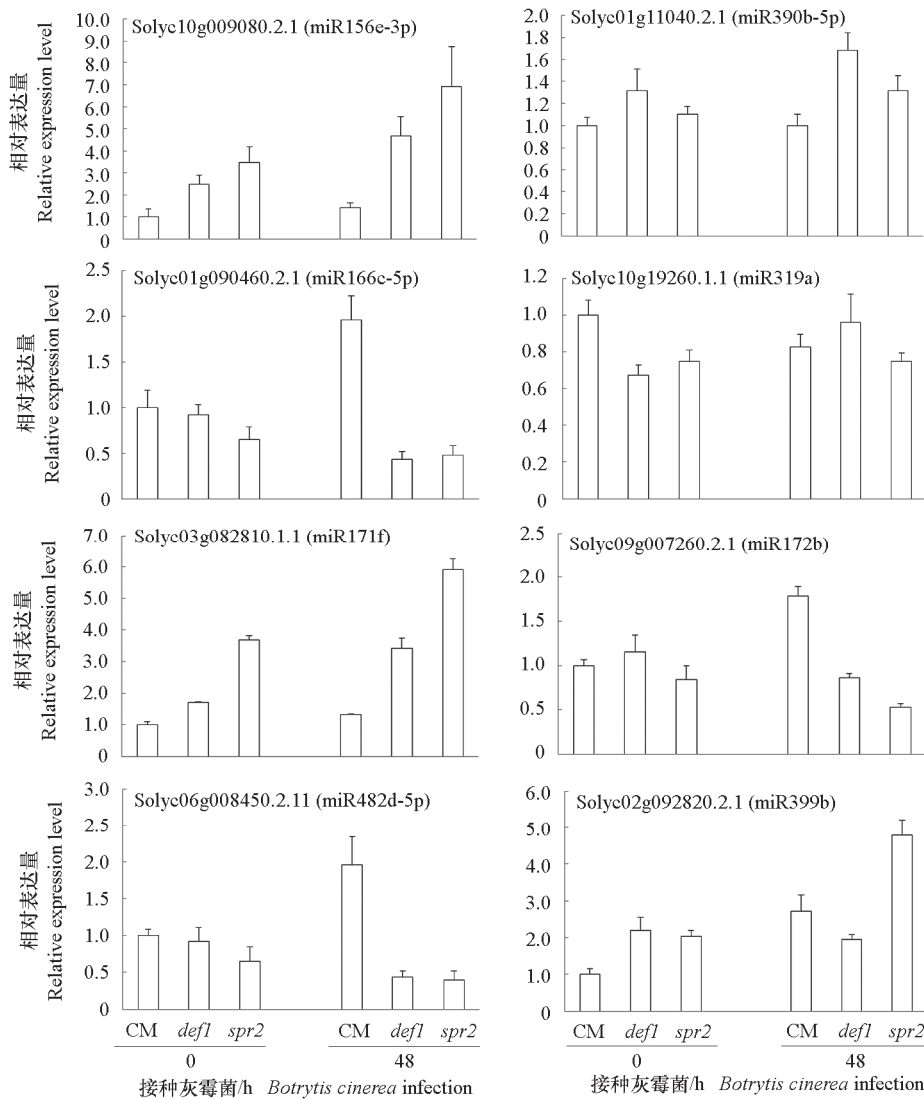


图 5 番茄 JA 缺失突变体 *def1*、*spr2* 与野生型 CM 叶片中 8 个差异 miRNA 的靶基因相对表达量  
Fig. 5 Relative expression of 8 differentially expressed miRNA target genes in tomato leaves of JA deficient mutant *def1*, *spr2* and its wild type CM

Solyc10g009080.2.1 (miR156e-3p)、Solyc01g090460.2.1 (miR166c-5p)、Solyc03g082810.1.1 (miR171f)、Solyc09g007260.2.1 (miR172b)、Solyc01g11040.2.1 (miR390b-5p)、Solyc10g19260.1.1 (miR319a)、Solyc02g092820.2.1 (miR399b) 和 Solyc06g008450.2.1 (miR482d-5p) 这 8 个靶基因分别编码 SPL3 基因、HD-ZIP 蛋白基因、WRKY 转录因子基因、ERF 基因、LRR 家族蛋白基因、MYB 类转录因子基因、GH3.1 基因和 NBS-LRR 基因。Solyc10g009080.2.1、Solyc03g082810.1.1、



Solyc01g011040.2.1 在番茄 CM、*defl* 和 *spr2* 接种灰霉菌后均呈上调表达。Solyc01g090460.2.1、Solyc09g007260.2.1、Solyc06g008450.2. 在 *defl* 和 *spr2* 接种灰霉菌后下调表达, 在 CM 接种后呈上调表达。Solyc10g019260.1.1 在 *spr2* 接种后上调表达, *defl* 无变化, 在其野生型 CM 中呈下调表达。Solyc02g092820.2.1 编码 *GH3.1* 基因, 在 CM 和 *spr2* 接种后上调表达, 在 *defl* 中则下调表达。

### 3 讨论

越来越多的证据显示“组学”技术在生物逆境领域是一个强大的工具, 可快速、有效破译植物抗性机制 (Zhuang et al., 2014)。在本研究中借助 Illumina 的高通量测序技术对番茄 CM 及其 JA 缺失突变体 *defl*、*spr2* 侵染灰霉菌前后的样品进行 miRNA 测序, 追踪 miRNA 及其靶基因参与 JA 介导番茄灰霉病抗性的分子差异。结果显示 3 个材料番茄接种灰霉菌后病情指数差异显著, JA 缺失突变体 *defl*、*spr2* 抗病性显著低于 CM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的含量显著低于 CM。细胞内适当的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度被认为是激活植物防卫反应的重要信使 (董海丽和井金学, 2003)。本研究结果显示 *defl* 和 *spr2* 体内缺失 JA, 抑制植株体内 ROS 爆发, 降低了对灰霉病的抗性。

许多研究表明不同长度的 miRNA 具有不同的功能。例如, 21 nt 的 miRNA 通常调控转录后沉默, 而 24 nt 的 miRNA 通过 RNA 依赖的 DNA 甲基化和异染色质维持介导基因的沉默 (Schreiber et al., 2011; Duan et al., 2016)。本研究中调查了 3 个材料 6 个处理样本文库, miRNA 序列长度分布具有差异, 长度为 24 nt 的小 RNA 所占比例最高, 此结果与前人在马铃薯、雍菜、梨、番茄等植物中观察到的 miRNA 长度分布 (Zhao et al., 2016; Liu et al., 2017; 马鑫瑞 等, 2018; 王杏茹 等, 2019) 一致, 推测本研究中 24 nt miRNA 高丰度表达可能与 JA 介导番茄抗灰霉病反应过程密切相关。本研究中共鉴定到 130 个已知 miRNA 和 811 个新 miRNA。不同物种和胁迫处理保守 miRNA 有着不同的表达水平, 从数个到几百甚至上千个不等 (Wickneswari et al., 2015)。锈菌侵染敏感型大豆后 miR166、miR169 均下调表达 (Kulcheski et al., 2011), 本研究中灰霉病敏感型番茄突变体 *defl* 和 *spr2* 的 miR166 在接种后下调表达, 与前人的结果 (Kulcheski et al., 2011) 一致。另外有研究表明灰霉菌侵染番茄后 miR482b 和 miR156 上调表达 (Jin & Wu, 2015), 本研究中 *defl* 在接种灰霉菌后 miR482b 和 miR156d-3p 下调表达, 结果与前人 (Jin & Wu, 2015) 不同。说明在抵御病原菌侵染过程中 miRNA 的表达模式取决于特定的植物和病原菌, 很难概括 miRNA 在与病原菌互作过程中的调控规律。

miR156 家族成员 miR156e-3p 预测的主要靶基因为转录因子 *SPL3* 基因。在众多植物中鉴定到了 miR156 家族 (沈雷定, 2015; Gao et al., 2018), miR156 通过靶基因 SPLs 主要调控植物发育阶段转变、开花过程、叶片发育, 在抗病中鲜见报道。如 miR156 靶向调控 SPL 在柑橘阶段发育和成花起重要作用 (沈雷定, 2015); 在拟南芥中 miR156/SPL10 调控侧根发育、分支和叶片形态 (Gao et al., 2018), 本试验中 miR156e-3p 在 JA 缺失突变体 *defl* 和 *spr2* 中接种后 48 h 均下调表达, 其靶基因 *SPL3* 呈上调表达, 推测 miR156e-3p 与靶基因 *SPL3* 参与 JA 缺失导致对灰霉菌敏感性发挥作用。

miR171 和 miR172 家族成员 miR171f、miR172b 的靶基因分别是 *WRKY* 和 *ERF*。有研究发现 miR171 的靶基因 *SCL* 分别调控大麦花分生组织形成、梨花芽休眠进程 (Curaba et al., 2013; 马鑫瑞 等, 2018), miR172 通过靶基因 AP2/ERF 调控水稻成花过程 (Wickneswari et al., 2015)。本试验中预测到番茄 *defl* 和 *spr2* 中的 miR171f 靶基因包括 *WRKY*、*NAC*、*MYB* 基因, 但与上述 miR171 两种靶基因均不同, 推测番茄 JA 缺失突变体在灰霉菌侵染后通过其他转录因子启动抗性途径。本

研究中发现 miR172b 预测到 3 个 AP2/ERF 类转录因子基因, qRT-PCR 分析 *ERF* 转录因子基因在 *defl* 和 *spr2* 中呈下调表达, 说明 JA 缺失突变体 miR172b 靶向调控 *ERF*, 影响番茄抗病性。miR166 家族成员 miR166c-5p 预测的靶基因 HD-ZIP, 除此之外还有生长素、乙烯、赤霉素植物激素合成、信号转导相关的基因。说明 miR166c-5p 除了与 HD-ZIP, 可能还与其他激素途径基因互作参与 JA 信号的抗病途径。

miR319 和 miR390 是一类保守的 miRNA。一些研究证实 miR319 参与植物抗病反应, 大豆抗病过程中 miR319 靶向调控 LRR 家族蛋白基因、转录因子基因 *GAMYB*、*TCP2*、*TCP24* 等(薛巨坤等, 2019)。本试验中确定的差异 miR319a 的靶基因为 MYB 类转录因子基因, *miR319a* 在 CM、*defl*、*spr2* 番茄接种灰霉菌后均下调表达, *MYB* 靶基因在 JA 缺失突变体 *spr2* 中上调表达, 而在野生型 CM 中则下调表达。CM 及 JA 缺失突变体中 miR319a 是否启动了不同的调控途径有待通过转基因手段进一步验证。据报道 miR390 靶基因众多, 如在拟南芥中 miR390 靶向调控 *ARF* 基因(Garcia et al., 2006); 在番茄中靶向降解 *TAS3a*、*TAS3b*; 在马铃薯响应低温胁迫过程中 miR390 靶基因有 2 个 LRR 蛋白基因、3 个 *LRR-RLKs* 基因家族(谢洁等, 2018)。本试验中发现 miR390 靶基因虽数量多但较一致为编码受体类 LRR——丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶的基因, 其在 *defl* 和 *spr2* 中表达上调, 表明众多 LRR 蛋白参与 JA 缺失导致的细胞代谢、生长发育和防御反应中来。miR399 主要参与植物多种元素胁迫(Hu et al., 2015), 在植物抗病中未见相关报道。本试验中预测到 miR399b 的靶基因 *GH3.1*, 其编码生长素酰胺合酶, 调控植物体内生长素平衡(Staswick et al., 2002)。*GH3.1* 基因在 CM 中和 *spr2* 中上调, *defl* 中变化不明显, 推测 *spr2* 中 JA 缺失导致 JA 抗性途径部分元件被抑制, 共同抑制或启动了生长素信号途径。

Ji 等(2018)在抗病型和敏感型番茄品种 Mot 和 MM 中接种番茄尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*), miR482d-5p 在 Mot 中上调表达, 在 MM 中呈下调表达。本研究结果与前人结果一致, 即 miR482d-5p 在番茄灰霉病抗性品种 CM 中呈上调表达, 在感病突变体 *defl* 和 *spr2* 中则呈下调表达, 表明 miRNA482d-5p 与其靶基因 *NBS-LRR* 共同提高了 JA 缺失突变体对番茄灰霉病的敏感性。马铃薯 miR482e 与其靶基因 *NBS-LRR* 共同作用负调控大丽轮枝菌侵染引起的马铃薯黄萎病(Yang et al., 2015)。*NBS-LRR* 在效应子触发免疫和植物自身免疫系统中扮演重要角色(Mchale et al., 2006), 在众多物种中确定了降低 *NBS-LRR* 抗病基因表达提高了植物对不同病原物的敏感性, 如大丽轮枝菌(Yang et al., 2015)、疫霉菌(Jiang et al., 2019)、灰霉菌(Jin & Wu, 2015)。

本试验中利用高通量测序技术鉴定了番茄 JA 缺失突变体及野生型 CM 中差异表达的 miRNA 靶基因, 通过 qRT-PCR 分析发现 miR156e-3p、miR390b-5p、miR399b、miR482d-5p 通过调控靶基因 *SPL3* 基因、LRR 家族蛋白基因、*NBS-LRR* 基因共同作用影响 JA 缺失突变体番茄对灰霉病的抗性。试验结果为探明 JA 介导番茄抗灰霉病相关的 miRNA 的调控机制提供参考依据。

## References

- Abouelsaad I, Renault S. 2018. Enhanced oxidative stress in the jasmonic acid-deficient tomato mutant *def-1* exposed to NaCl stress. *Journal of Plant Physiology*, 226: 136 - 144.
- Aldon D, Mbengue M, Mazars C, Galaud J P. 2018. Calcium signalling in plant biotic interactions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (3): 665.
- Chen L, Meng J, Zhai J, Xu P, Luan Y. 2017. MicroRNA396a-5p and -3p induce tomato disease susceptibility by suppressing target genes and upregulating salicylic acid. *Plant Science*, 265: 177 - 187.
- Chini A, Cimmino A, Masi M, Reveglia P, Nocera P, Solano R, Evidente A. 2018. The fungal phytotoxin lasiojasmonate A activates the plant

- jasmonic acid pathway. *Journal of Experimental Botany*, 69 (12): 3095 - 3102.
- Chisholm S T, Coaker G, Day B, Staskawicz B J. 2006. Host-Microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, 124 (4): 803 - 814.
- Curaba J, Talbot M, Li Z, Helliwell C. 2013. Over-expression of microRNA171 affects phase transitions and floral meristem determinancy in barley. *BMC Plant Biology*, 13 (1): 6.
- Dinolfo M I, Castañares E, Stenglein S A. 2017. Resistance of *Fusarium poae* in *Arabidopsis* leaves requires mainly functional JA and ET signaling pathways. *Fungal Biology*, 121 (10): 841 - 848.
- Djami-Tchatchou A T, Sanan-Mishra N, Ntushelo K, Dubery I A. 2017. Functional roles of microRNAs in agronomically important plants-potential as targets for crop improvement and protection. *Frontiers in Plant Science*, 8: 378.
- Dong Hai-li, Jing Jin-xue. 2003. Role of ROS and NO in plant disease resistance responses. *Journal of Northwest A & F University (Nat Sci Ed)*, 31 (1): 161 - 166. (in Chinese)
- 董海丽, 井金学. 2003. 活性氧和一氧化氮在植物抗病反应中的作用. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 31 (1): 161 - 166.
- Duan H, Lu X, Lian C, An Y, Xia X, Yin W. 2016. Genome-wide analysis of microRNA responses to the phytohormone abscisic acid in *Populus euphratica*. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1184.
- Feng L, Xia R, Liu Y L. 2019. Comprehensive characterization of miRNA and PHAS loci in the diploid strawberry (*Fragaria vesca*) genome. *Hortic Plant J*, 5 (6): 255 - 267.
- Gao R, Wang Y, Gruber M Y, Hannoufa A. 2018. MiR156/SPL10 modulates lateral root development, branching and leaf morphology in *Arabidopsis* by silencing AGAMOUS-LIKE 79. *Frontiers in Plant Science*, 8: 2226.
- Garcia D, Collier S A, Byrne M E, Martienssen R A. 2006. Specification of leaf polarity in *Arabidopsis* via the trans-acting siRNA pathway. *Current Biology*, 16 (9): 933 - 938.
- Grinberg-Yaari M, Alagarmalai J, Lewinsohn E, Perl-Treves R, Soroker V. 2015. Role of jasmonic acid signaling in tomato defense against broad mite, *Polyphagotarsonemus latus* (Acari: Tarsonemidae). *Arthropod-Plant Interactions*, 9 (4): 361 - 372.
- Howe G A. 2018. Plant hormones: metabolic end run to jasmonate. *Nature Chemical Biology*, 14 (2): 109 - 110.
- Hu B, Wang W, Deng K, Li H, Zhang Z, Zhang L, Chu C. 2015. MicroRNA399 is involved in multiple nutrient starvation responses in rice. *Frontiers in Plant Science*, 6: 188.
- Huang Hai, Zhang Xin, Zou Hang, Yang Hai-yan, Cao Jing-jing, An De-rong. 2015. Toxicity and control efficiency of fungicides against *Botrytis cinerea*. *Journal of Northwest A & F University (Nat Sci Ed)*, 43 (2): 184 - 190. (in Chinese)
- 黄 海, 张 鑫, 邹 杭, 杨海艳, 曹晶晶, 安德荣. 2015. 番茄灰霉菌室内毒力测定及药效试验. *西北农林科技大学学报 (自然科学版)*, 43 (2): 184 - 190.
- Ji H M, Zhao M, Gao Y, Cao X X, Mao H Y. 2018. FRG3, a target of slmiR482e-3p, provides resistance against the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* in tomato. *Frontiers in Plant Science*, 9: 26.
- Jiang D, Yan S. 2018. MeJA is more effective than JA in inducing defense responses in *Larix olgensis*. *Arthropod-Plant Interactions*, 12 (1): 49 - 56.
- Jiang N, Cui J, Shi Y, Yang G, Zhou X, Hou X, Meng J, Luan Y. 2019. Tomato lncRNA23468 functions as a competing endogenous RNA to modulate NBS-LRR genes by decoying miR482b in the tomato-*Phytophthora infestans* interaction. *Horticulture Research*, 6: 28.
- Jin W, Wu F. 2015. Characterization of miRNAs associated with *Botrytis cinerea* infection of tomato leaves. *BMC Plant Biology*, 15 (1): 1.
- Jin Y, Zhao P, Fang Y Y, Guo H S, Zhao J H. 2018. Genome-wide profiling of sRNAs in the *Verticillium dahliae*-infected *Arabidopsis* roots. *Mycology*, 9 (4): 1 - 11.
- Jones J D G, Dangl J L. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444: 323 - 239.
- Kulcheski F R, de Oliveira L F, Molina L G, Almerão M P, Rodrigues F A, Marcolino J, Barbosa J F, Stolf-Moreira R, Nepomuceno A L, Marcelino-Guimarães F C, Abdlnoor R V, Nascimento L C, Carazzollen M F, Pereira G A, Margis R. 2011. Identification of novel soybean microRNAs involved in abiotic and biotic stress. *BMC Genomics*, 12: 307.
- Li Jun-ming. 2005. Mapping of genes resistant to late blight (*Phytophthora infestans*) and gray mold (*Botrytis cinerea*) and multiple gene selection assisted by molecular markers for breeding in tomato (*Lycopersicon esculentum*) [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences. (in Chinese)

- 李君明. 2005. 番茄抗灰霉病和晚疫病基因定位及分子标记基因辅助选育技术研究[博士论文]. 北京: 中国农业科学院.
- Liu M, Yu H, Zhao G, Huang Q, Lu Y, Ouyang B. 2017. Profiling of drought-responsive microRNA and mRNA in tomato using high-throughput sequencing. *BMC Genomics*, 18: 481.
- Ma Xin-rui, Li Liang, Liu Jin-hang, Yang Meng-jie, Chen Jie, Liang Qin, Wu Shao-hua, Li Yong-yu. 2018. Identification and differentially expressed analysis of microRNA associated with dormancy of pear flower buds. *Acta Horticulturae Sinica*, 45 (11): 22 - 38. (in Chinese)
- 马鑫瑞, 李亮, 刘瑾航, 杨梦洁, 陈洁, 梁沁, 吴少华, 李永裕. 2018. 梨花芽休眠相关 miRNA 的鉴定和差异表达分析. *园艺学报*, 45 (11): 22 - 38.
- Mchale L, Tan X P, Koehl P, Michelmore R W. 2006. Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biology*, 7 (4): 212.
- Mehari Z H, Elad Y, Rav-David D, Graber E R, Meller Harel Y. 2015. Induced systemic resistance in tomato (*Solanum lycopersicum*) against *Botrytis cinerea* by biochar amendment involves jasmonic acid signaling. *Plant and Soil*, 395 (1): 31 - 44.
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-yilmaz S, Mittler R. 2010. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment*, 33 (4): 453 - 467.
- Momen-Heravi F, Bala S. 2018. miRNA regulation of innate immunity. *Journal of Leukocyte Biology*, 103 (6): 1205 - 1217.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiti N, Estelle M, Vlivier V, Jones J D G. 2006. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312 (5772): 436 - 439.
- Schreiber A W, Shi B J, Huang C Y, Langridge P, Baumann U. 2011. Discovery of barley miRNAs through deep sequencing of short reads. *BMC Genomics*, 12 (1): 129.
- Shen Lei-ding. 2015. Function of MiR156 in citrus plant development [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 沈雷定. 2015. MiR156 家族基因在柑橘阶段发育以及成花调控中的作用[硕士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Staswick P E, Tiryaki I, Rowe M L. 2002. Jasmonate response locus *JARI* and several related *Arabidopsis* genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic, and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *The Plant Cell*, 14 (6): 1405 - 1415.
- Wang Xing-ru, Li Wen-jing, Chen Bing-xing, Liu Tao, Shang Wei, Lai Zhong-xiong, Guo Rong-fang. 2019. Analysis of miRNA in water spinach (*Ipomoea aquatica*) under long-time high temperature. *Acta Horticulturae Sinica*, 46 (3): 486 - 498. (in Chinese)
- 王杏茹, 李文静, 陈冰星, 刘涛, 尚维, 赖钟雄, 郭容芳. 2019. 蕹菜耐受长时间高温后的 miRNA 分析. *园艺学报*, 46 (3): 486 - 498.
- Wickneswari B H, Nadarajah K, Divate M D, Wickneswari R. 2015. Identification of four functionally important microRNA families with contrasting differential expression profiles between drought-tolerant and susceptible rice leaf at vegetative stage. *BMC Genomics*, 16 (1): 692.
- Xie Jie, Wang Ming, Li Qing, Pan Fei, Xiong Xing-yao, Qin Yu-zhi. 2018. Research progress on plant miR2390. *Biotechnology Bulletin*, 34 (6): 1 - 10. (in Chinese)
- 谢洁, 王明, 李青, 潘妃, 熊兴耀, 秦玉芝. 2018. 植物 miR390 的研究进展. *生物技术通报*, 34 (6): 1 - 10.
- Xu D, Cao H, Fang W, Pan J, Shen W. 2017. Linking hydrogen-enhanced rice aluminum tolerance with the reestablishment of GA/ABA balance and miRNA-modulated gene expression: a case study on germination. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 145: 303 - 312.
- Xue Ju-kun, Wang Bo, Wang Lian-ping, Yang Chun-yu, Guo Hui-ying, Hao Ai-ping. 2019. Vector construction of a cis-acting element and interaction analysis with a MYB transcription factor. *Molecular Plant Breeding*, 17 (5): 1519 - 1524. (in Chinese)
- 薛巨坤, 王博, 王莲萍, 杨春雨, 国会艳, 郝爱平. 2019. 一个顺式作用元件的载体构建及与一个 MYB 转录因子的互作分析. *分子植物育种*, 17 (5): 1519 - 1524.
- Yang L, Mu X, Liu C, Cai J, Shi K. 2015. Overexpression of potato miR482e enhanced plant sensitivity to *Verticillium dahliae* infection. *Journal of Integrative Plant Biology*, 57 (12): 1078 - 1088.
- Zhang W, Gao S, Zhou X, Chellappan P, Chen Z, Zhou X, Zhang X, Fromuth N, Coutino G, Coffey M. 2011. Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Molecular Biology*, 75 (1 - 2): 93 - 105.
- Zhao J, Liu Q, Hu P, Jia Q, Liu N, Yin K, Cheng Y, Yan F, Chen J, Liu Y. 2016. An efficient potato virus X-based microRNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Scientific Reports*, 6 (1): 20573.
- Zhuang J, Zhang J, Hou X L, Wang F, Xiong A S. 2014. Transcriptomic, proteomic, metabolomic and functional genomic approaches for the study of abiotic stress in vegetable crops. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 33 (2 - 3): 225 - 237.