

番茄及灰霉菌转化酶和糖转运蛋白基因在发病期的表达研究

张越亭, 赵虎, 刘永华* (海南大学园艺学院, 海南海口 570228)

摘要 研究番茄叶片接种灰霉菌后番茄和病菌各自的转化酶和糖转运蛋白基因表达水平的变化规律, 以阐明番茄和病菌各自的转化酶和糖转运蛋白在发病中的可能作用。通过系统测定接种后 0、12、36 和 60 h 番茄和灰霉菌的转化酶和糖转运蛋白基因的表达, 结果发现, 在接种后叶片逐渐发病, 60 h 时出现明显病斑。番茄叶片的 CWIN 基因 *LIN6* 表达水平在接种后 12 和 60 h 显著高于对照叶片, CWIN 抑制蛋白基因 *INVINH1* 表达水平在接种后 12 h 也显著高于对照; 番茄的 2 个 STP 基因 *SISTP2* 和 *SISTP1* 的表达水平分别在接种后 12 和 60 h 显著高于对照叶片; 此外, 番茄的 3 个 Clade III SWEET 基因 *SISWEET10c*、*SISWEET11a* 和 *SISWEET11c* 在接种后 12 h 即显著高于对照叶片。灰霉菌胞外转化酶基因 *Bc1g10247* 的表达水平在接种叶片后大幅上升, 此外 *BcHXT1*、*BcHXT6*、*BcHXT13* 这 3 个己糖转运蛋白的表达水平在接种后也呈大幅上升趋势。总之, 番茄 CWIN 和 STP 基因表达水平的上升并不能有效诱导抗病反应并阻止灰霉菌吸收叶片中的糖分。相反, 番茄 Clade III SWEET 表达的上升可能会导致蔗糖被大量转运至细胞外空间, 而灰霉菌胞外转化酶和己糖转运蛋白表达量的上升则可将细胞外蔗糖分解为己糖并吸收利用, 最终导致灰霉病的发生。

关键词 灰霉病; 番茄; 蔗糖转化酶; 糖分转运蛋白; 基因表达

中图分类号 S436.412.1³ 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)10-0101-07

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.10.027



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Expression of Invertase and Sugar Transporter Genes in Both Tomato and *Botrytis cinerea* during the Development of Grey Mold

ZHANG Yue-ting, ZHAO Hu, LIU Yong-hua (College of Horticulture, Hainan University, Haikou, Hainan 570228)

Abstract The dynamic changes in the expression levels of invertase and sugar transporter genes in both tomato and pathogens during the development of grey mold on tomato leaves caused by *Botrytis cinerea* were studied to clarify the possible roles of invertase and sugar transporter of tomato and pathogens in the pathogenesis. The expression of invertase and sugar transporter genes of tomato and *Botrytis cinerea* at 0, 12, 36, and 60 h after inoculation were systematically measured. It was found that the leaves were gradually infected and showed obvious disease lesions at 60 h after inoculation. The expression level of CWIN gene *LIN6* in tomato leaves was significantly higher than that of control leaves at 12 and 60 h after inoculation, and the expression level of CWIN inhibitory protein gene *INVINH1* was also significantly higher than that of control at 12 h after inoculation; the expression levels of two STP genes *SISTP2* and *SISTP1* in tomato were significantly higher than those of control leaves at 12 and 60 h after inoculation, respectively. In addition, the three Clade III SWEET genes *SISWEET10c*, *SISWEET11a* and *SISWEET11c* of tomato were also significantly higher than those of control leaves at 12 h after inoculation. The expression level of the extracellular invertase gene *Bc1g10247* of *Botrytis cinerea* rose sharply after inoculating to tomato leaves. Additionally, the expression levels of three hexose transporters including *BcHXT1*, *BcHXT6* and *BcHXT13* also showed a significant increase after inoculation. In short, the induced expression of tomato CWIN and STP genes cannot effectively enhance defense responses and prevent grey mold from absorbing sugar in tomato leaves. On the contrary, the increased expression of Clade III SWEET in tomato leaves may cause a large amount of sucrose to be exported to the extracellular space of tomato leaves, which is subsequently hydrolyzed into hexose (glucose and fructose) and absorbed into the fungal cells by the induced extracellular invertase and hexose transporter in *Botrytis cinerea*, eventually leading to the incidence of grey mold.

Key words *Botrytis cinerea*; Tomato; Sucrose invertase; Sugar transporter; Gene expression

番茄(*Solanum lycopersicum*)原产于南美洲,属于喜温、喜光性一年生或多年生茄科草本植物^[1]。番茄是重要的果菜类蔬菜,2018 年全世界番茄产量高达 1.82 亿 t,其中我国番茄产量为 0.62 亿 t(FAO)。番茄灰霉病是由灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)引起的一种世界性重要病害^[2]。它主要危害番茄的果实,也会对花、茎、叶等部位产生危害,造成番茄减产,严重时甚至绝收^[3]。

在植物对病菌的防卫方应中,蔗糖分解代谢发挥着重要作用^[4-5],一方面,蔗糖分解代谢可以为植物防卫反应提供碳骨架和能量。如细胞壁加厚、植物抗毒素(Phytoalexin)的合成以及抗病相关蛋白的积累等防卫反应都需要大量的糖分供应^[6]。另一方面,蔗糖分解产生的己糖(葡萄糖和果糖)也可以为病菌的生长提供能量和碳骨架^[7]。在植物体内有 2 种分解蔗糖的酶,分别是蔗糖合成酶(sucrose synthase, Sus)和蔗糖转化酶(sucrose invertase, INV)。Sus 可以将蔗糖分解

为 UDP-葡萄糖和果糖(该反应可逆),是叶片光合作用产物蔗糖进入各种代谢途径所必需的关键酶之一^[8]。INV 可以将蔗糖水解为葡萄糖和果糖(该反应不可逆),在植物生长发育中发挥着许多不同的功能,其中包括调节植物对病原菌的响应^[5]。在植物中,根据亚细胞定位的不同可以将 INV 分为三类:细胞壁转化酶(cell wall invertase, CWIN)、液泡转化酶(vacuolar invertase, VIN)和细胞质转化酶(cytoplasmic invertase, CIN)^[9]。

目前有关蔗糖分解酶在植物抗病中的研究主要集中于 CWIN。植物在受到病菌侵染的过程中其 CWIN 活性呈上升趋势^[10-11]。研究表明 CWIN 在植物抗病方面发挥着积极作用。如表达细胞壁转化酶的转基因烟草对马铃薯 Y 病毒(potato virus Y)的抗性增加^[12]。超表达 CWIN 基因的水稻可以增强对细菌性病菌 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 和真菌性病菌 *Magnaporthe oryzae* 的抗性^[13]。相反,抑制 CWIN 表达会降低植物的抗病性。如通过 RNA 干扰技术抑制烟草中 CWIN 的表达导致植株对卵菌病原菌 *Phytophthora nicotianae* 的抗性降低^[10]。利用化学试剂 Acarbose 专一性抑制 CWIN 的活性导致拟南芥对细菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *To-*

基金项目 国家自然科学基金项目(31760579)。

作者简介 张越亭(1995—),男,山东菏泽人,硕士研究生,研究方向:蔗糖代谢和番茄抗病性。*通信作者,副教授,博士,从事蔗糖代谢与蔬菜作物产量、品质和抗逆性研究。

收稿日期 2021-01-09

mato DC3000 (Pst DC3000) 的抗性下降^[11]。然而,研究表明 CWIN 在一些植物的抗病中发挥着负面作用。如沉默番茄 CWIN 基因 LIN8 的表达增强了番茄对细菌性病菌 *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) 的抗性^[14]。同样,通过超表达 CWIN 抑制因子的方法降低 CWIN 的活性导致拟南芥对真菌病菌 *Plasmodiophora brassicae* 的抗性增加^[15]。表明 CWIN 在植物抗病性中的作用可能受到植物和病菌种类的影响。

CWIN 在质外体空间将蔗糖分解为葡萄糖和果糖后,植物为了阻止病原菌对糖分的吸收上述己糖往往会上调糖转运蛋白 STP (Sugar TransPorter) 的表达。STP 主要位于植物细胞膜上,负责将细胞外空间的己糖吸收进入植物细胞,从而抑制病原菌的生长和繁殖^[16-17]。如在拟南芥受到病菌感染时,超表达 AtSTP13 可以增强其单糖摄取活性,与细菌竞争胞外糖,导致细菌无法得到能量来源,增强植物的抗病性^[18]。相应地,病原菌为了从植物获得足够的糖分用于自身的生长发育也进化出了不同的对抗策略:一方面,病原菌诱导植物中糖转运蛋白 SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporter) 的表达,SWEET 可将植物细胞内的糖分(蔗糖、葡萄糖和果糖)转运至细胞外部供病原菌吸收利用^[19]。如白叶枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) 感染水稻植株后分泌特定的转录激活 (transcription Activator-Like, TAL) 效应因子,该效应因子与 *OsSWEET11* 基因的启动子特异原件结合,诱导 *OsSWEET11* 基因表达上调,导致更多糖分转运至水稻细胞外部,病菌获得糖分,从而植株感病^[20-22]。另一方面,大部分病原菌包括灰霉菌主要利用己糖(主要是葡萄糖)作为碳源,因此病原菌自身还表达蔗糖转化酶和己糖转运蛋白,可分解并吸收利用来自于植物的蔗糖^[23]。如灰霉菌糖转运蛋白 FRT1 对果糖具有很高的特异性^[24],而转运蛋白家族 BcHXTs 对己糖有很高的特异性^[25]。此外,灰霉菌也向细胞外分泌转化酶(如 *Bc1g10247* 和 *Bc1g16010*)^[26]。在灰霉菌感染拟南芥时,该病菌的 *Bc1g10247* 基因表达增强^[27]。目前大多数研究仅关注植物细胞壁转化酶和糖转运蛋白对植物抗病性的影响,很少研究病菌蔗糖转化酶和糖转运蛋白对植物抗病性的影响,特别是尚未见有关番茄 CWIN、STP 和 SWEET 以及灰霉菌转化酶和己糖转运蛋白在番茄-灰霉菌互作过程中具体作用的研究。

笔者研究灰霉菌感染番茄叶片过程中番茄叶片中 CWIN、STP 和 SWEET 相关基因表达水平的动态变化,同时也对灰霉菌主要转化酶基因和己糖转运蛋白基因的表达变化进行研究,以期从番茄和灰霉菌两方面初步阐明糖代谢和转运调控灰霉菌发病的可能机制,为后续高抗灰霉菌番茄品种的选育提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 材料

试验所用的番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 品种为新疆农业科学院园艺研究所育成的“新番 2 号”。挑选番茄种子并消毒,23℃ 恒温催芽 6 d。待种子发芽后,将已发芽的种子播种到穴盘内。待子叶长出后,开始浇施稀释后的日本

园式营养液。栽培约 20 d 后,将 4 叶 1 心的番茄苗定植到海南大学实验基地大田中进行露地栽培,并施用一定量的复合肥(N:P:K=15:15:15)作为基肥。待番茄生长约 30 d 后,选取从植株顶端往下数第 3~4 叶位置的大小、形状均匀一致且较为平整的叶片进行灰霉菌离体接种。

1.2 方法

1.2.1 灰霉菌的培养和接种。

灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 在 V8 培养基上,温度为 23℃ 的黑暗条件下进行倒置培养,约 14 d 后灰霉菌产生大量分生孢子,可用于接种试验。番茄叶片离体接种灰霉菌的方法参照 Lian 等^[28]并作一些调整。用 SMB 液体培养基先制备灰霉菌的孢子悬浮液,并调整孢子浓度为 2×10^4 /mL。用蒸馏水将番茄叶片的表面清洗干净,并用吸水纸吸干叶面的水,在直径 12 cm 的塑料培养皿中倒入 70 mL 0.8% 的琼脂,琼脂冷却凝固后将叶片的叶柄轻轻地嵌入琼脂中并保持叶片上面平整。在每片叶子的主脉两侧各接种 1 滴孢子悬浮液,每滴 5 μ L,封口膜密封后,在 23℃ 黑暗下培养。对照叶片则接种不含孢子的 SMB 液体培养基。分别于接种后 0、12、36 和 60 h 进行观察并取样,取样时以接种部位为中心取样,称取 0.15 g 样品,液氮速冻后在 -80℃ 保存,用于后续相关指标的测定。每个处理均包含 4 个生物学重复。

1.2.2 灰霉菌生物量定量。

灰霉菌生物量测定方法参考 Gachon 等^[29],使用 Tiangen 植物 DNA 提取试剂盒 DP305 分别提取番茄叶片和灰霉菌的 DNA,并用 NanoDrop 测定浓度和纯度。使用诺唯赞 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒,在德国耶拿 qTOWER³G 上进行 qRT-PCR。具体反应条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,40 个循环。实时定量 PCR 的反应体系为 10 μ L,包括 1.0 μ L DNA,5.0 μ L SYBR Green I Master mix,10 μ mol/L 的正反向引物各 0.2 μ L,3.6 μ L ddH₂O。使用番茄叶片 DNA 和灰霉菌 DNA 梯度稀释液绘制标准曲线,用于对每个样品中番茄和灰霉菌的 DNA 含量进行定量测定。

使用 Tiangen 试剂盒 DP305 提取接种灰霉菌后的番茄叶片总 DNA。使用诺唯赞 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒,在德国耶拿 qTOWER³G 上进行 qRT-PCR。具体反应条件:95℃ 预变性 5 min;95℃ 变性 5 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,40 个循环。实时定量 PCR 反应体系为 10 μ L,包括 1.0 μ L DNA,5.0 μ L SYBR Green I Master mix,10 μ mol/L 的正反向引物各 0.2 μ L,3.6 μ L ddH₂O。根据标准曲线,计算出每个样品中 IGS 和 ACTIN 的 DNA 量,用 IGS/ACTIN 表示灰霉菌的生物量,灰霉菌 IGS 引物参考 Suarez 等^[30],用 SPSS 19.0 软件分析数据。

1.2.3 引物设计。

番茄的基因序列均从 <http://www.sgn.cornell.edu> 网站获取,灰霉菌的基因均从 <https://www.broadinstitute.org> 网站获取。使用 Primer 5 设计 qRT-PCR 引物,使用 NCBI 网站的 Primer Blast 进行引物特异性筛选,具体引物信息见表 1。

1.2.4 植物和灰霉菌总 RNA 的提取。

根据生工 UNIQ-10

柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒的步骤提取植物和灰霉菌的总 RNA,使用诺唯赞 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit

逆转录试剂盒按说明书将总 RNA 逆转录为 cDNA,用于番茄和灰霉菌的转化酶和糖转运蛋白基因表达的分析。

表 1 qRT-PCR 测定所用引物信息

Table 1 Informaiton of primers in qRT-PCR analysis

序号 No.	项目 Item	基因名称 Gene name	登录号 Accession No.	正向引物(5'—3') Forward primer (5'—3')	反向引物(5'—3') Reverse primer (5'—3')	产物长度 Amplicon length//bp
1	番茄基因表达测定所用 qRT-PCR 引物	SISTP1	Solyc02g079220	TGCCAATCAGTCTGTTCCACTA	CACCTCCTAAACTCAATCTCCA	170
		SISTP2	Solyc09g075820	GGAGATGACGGAGAGGCTGT	GAGAAACACTTATCGATATCAC	261
		SISTP12	Solyc05g018230	GGCTTGATATTCATCATGA	CATTCTGAAGGAATCCATTGTG	246
		SISWEET10a	Solyc03g097580	TTGACATTGTGAGGCTTGCTG	TAGCTGGCTTCCACAGTTTGC	145
		SISWEET10b	Solyc03g097600	TGACATTGTGAGGCTTGTTTA	CGCTTTGCCAGTTTAGAGTAGA	164
		SISWEET10c	Solyc03g097610	AGCCAGGGTTAATACTGTGAAA	AAATAAGGCAAATCCATCCAAC	142
		SISWEET11a	Solyc03g097870	CGTGGTTGCGCTCTTTAGTTC	TATGGACCCTGGCTTTCTTTG	162
		SISWEET11c	Solyc06g072620	GATTTTCTGACCACTGGACCTT	TATAGTTTGGACCTGGCTTTC	299
		SISWEET12a	Solyc03g097590	CTTTTGCCTTTTGGTGTCTTGG	CGATTGATAACCTTCTGTAGATTTT	110
		SISWEET12c	Solyc05g024260	CCAGTACTGTTGGCAAATAACA	AAGGCAATGAAACATAGAAGCA	152
		LIN6	Solyc10g083290	GTAGATGTAGATTTAGCAGA	CTATGGTTTCTTTGTGACCT	125
		LIN8	Solyc10g083300	AGTCATTGAATGCATGGAGCAT	GAGCAATCAAATACGTCACCACAA	121
		INVINH1	AJ010943	TGTTGGTAGAGCCATTGTAAGA	GGGGATACACACATAACATTTGAGG	234
		ACTIN	BT012695	CGGTGACCACTTTCCGATCT	TCCTCACCCGTCAGCCATTTT	62
		2	灰霉菌基因表达测定所用 qRT-PCR 引物	BcHXT1	Belg09068	CCACCATGGCTGGCTTCTA
BcHXT6	Belg03115			AGGGTCTTTCCCTTGAGCAAGT	GAACCCATTTGGCGGAGTT	72
BcHXT11	Belg09891			GGGTGCTCTGCGGAGAGATATT	GTGGCGACCCGACATGGA	67
BcHXT13	Belg11623			GCGGTGCTGCTCAGTAT	ACTCAATCCCACAATCAATCTCTA	87
BcFRT1	AY738713			CCAGAATCCCCCGTTTC	TTTCCAGACACCCCAAGCA	63
灰霉转化酶	Belg10247			TCTCGCAAACGTCACACGTA	GGGGTTCGGATTGCTGTAG	83
BcTubA	Belg05600			GCGTTCGTGCATTTGGTATGT	CAGGGGCTCAGAGAATTCA	61
3	灰霉菌生物量测定所用 qRT-PCR 引物	SIACTIN	107017728	GTGGTACTACCATGTTCCAGGT	AAGATAGAGCCTCCAATCCAGAC	136
		BeIGS	N/A *	FGCTGTAATTTCAATGTGCAGAATCC	GGAGCAACAATTAATCGCATTTC	95

注: * IGS 引物序列来自 Suarez^[30]

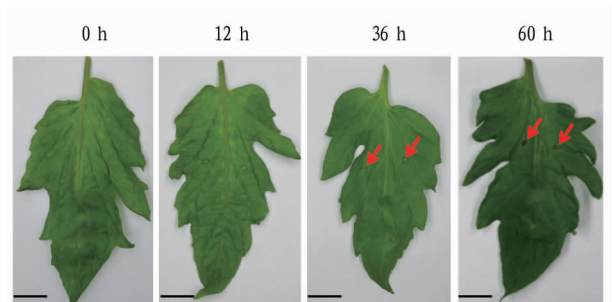
Note: IGS primer sequence came from Suarez^[30]

1.2.5 植物和灰霉菌的基因表达。使用诺唯赞 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂盒,在德国耶拿 qTOWER3G 上进行。具体反应条件:95 °C 预变性 5 min;95 °C 变性 5 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,40 个循环。实时定量 PCR 的反应体系为 10 μL,包括 1.0 μL cDNA,5.0 μL SYBR Green I Master mix,10 μmol/L 的正反向引物各 0.2 μL,3.6 μL ddH₂O。选择用番茄 ACTIN 和灰霉菌 BcTubA 作为内参基因,以上述 cDNA 为模板,对番茄和灰霉菌的蔗糖转化酶和糖转运蛋白相关基因的表达进行检测。以 0 h 的 W 样品对照,采用 2^{-ΔΔCT}法对 qRT-PCR 结果进行计算。

1.3 数据处理 利用 Excel 2010 软件对试验数据进行作图,使用 SPSS 19.0 软件对数据 t-test 分析。

2 结果与分析

2.1 接种后番茄叶片发病情况和灰霉菌生长情况 对接种后 0、12、36、60 h 的番茄叶片进行观察,发现在接种后 0~12 h 观察不到病斑,接种后 36 h 在番茄叶片表面开始出现较小的病斑,而在接种后 60 h 则可观察到明显的病斑(图 1)。根据 Gachon 等^[29]的方法,通过提取接种后番茄叶片的总 DNA,利用 qRT-PCR 技术分别对灰霉菌 IGS 基因和番茄 ACTIN 基因进行 qRT-PCR 测定,利用 IGS/ACTIN 来反映接种后叶片中灰霉菌的生长量,该比值越大表明番茄叶片中灰霉菌的生长



注:图中标尺代表 1 cm

Note: Scale bar represents 1 cm

图 1 接种灰霉菌后番茄叶片表面病斑的发育情况

Fig.1 The development of disease lesions on surface of tomato leaves inoculated with *Botrytis cinerea*

量越高。测定结果发现,接种 12 h 后番茄叶片中的灰霉菌生长量出现小幅上升,而 36 和 60 h 灰霉菌的生长量呈大幅增加的趋势(图 2)。表明随着番茄叶片病斑面积的增大,叶片中灰霉菌的生长量也逐渐增加。

2.2 接种灰霉菌后番茄叶片中 CWIN 及其抑制蛋白基因的表达分析 番茄基因组中共有 4 个编码 CWIN 的基因,分别为 LIN5、LIN6、LIN7、LIN8,其中在番茄叶片表达 CWIN 只有 LIN6 和 LIN8,且 LIN8 的表达量显著高于 LIN6^[31]。接种灰霉

菌后,番茄叶片中主要的 CWIN 基因 *LIN8* 的表达量呈先上升后下降的趋势,且在接种后 36 h 达到峰值(图 3)。未接种灰霉菌的对照叶片中 *LIN8* 的表达量也呈相似的变化趋势,且在 4 个时期内未接种灰霉菌的对照叶片和接种灰霉菌的叶片之间均无显著差异。接种叶片和对照叶片中的 *LIN6* 表达水平均呈先上升后下降再上升的趋势;特别值得注意的是,与对照叶片相比,接种番茄叶片的 *LIN6* 表达水平在接种后 12 和 60 h 显著升高,其表达水平分别为对照叶片的 3 和 13 倍。

植物中 CWIN 的活性不仅受到自身基因表达水平的影响,还受到 CWIN 抑制蛋白表达水平的调控,该抑制蛋白通过与 CWIN 蛋白结合的方式来抑制 CWIN 的活性^[32]。对番茄叶片中 CWIN 抑制蛋白基因 *INVINH1* 表达水平的测定表明,接种叶片的 *INVINH1* 表达水平在接种后快速上升,而对照叶片中该基因的表达水平上升速度相对较慢,这导致在接

种早期(12 h)接种叶片中的 *INVINH1* 表达水平显著高于对照叶片(图 3);然而在接种后 36 和 60 h 接种叶片和对照叶片在 *INVINH1* 表达水平上均无显著差异。

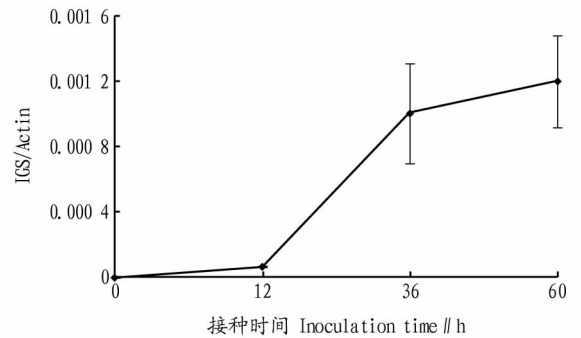
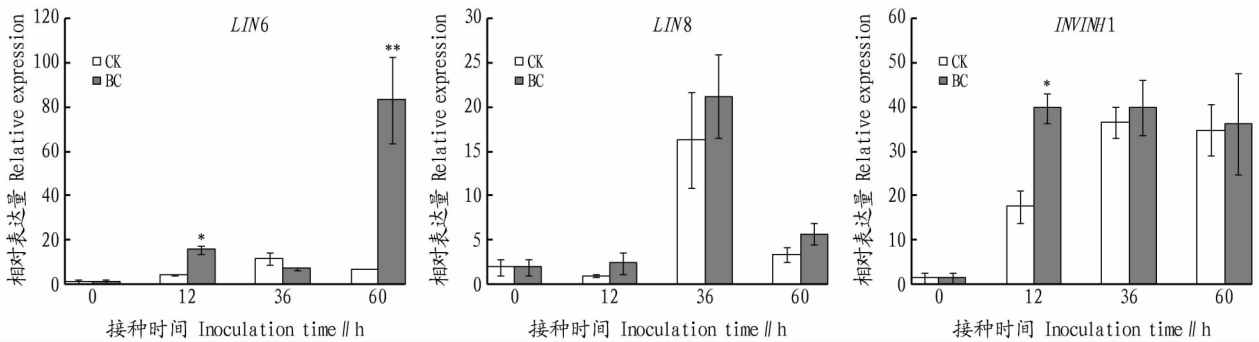


图 2 接种灰霉菌后番茄叶片中灰霉菌生长量

Fig.2 The quantification of *Botrytis cinerea* biomass in tomato leaves after inoculated with *Botrytis cinerea*



注: * 和 ** 分别表示病菌接种处理与对照之间在 0.05 和 0.01 水平存在显著差异

Note: * and ** indicate significant difference between inoculated and non-inoculated tomato leaves at 0.05 and 0.01 level, respectively

图 3 接种灰霉菌后番茄叶片 CWIN 及其抑制因子相关基因的定量表达分析

Fig.3 Expression analysis of CWIN and its inhibitor genes in tomato leaves inoculated with *Botrytis cinerea*

2.3 接种灰霉菌后番茄叶片中糖转运蛋白 STP 和 SWEET 基因的表达分析 番茄基因组中共有 18 个 STP 基因家族成员,分别为 *SISTP1-18*,其中仅有 *SISTP1*、*SISTP2* 和 *SISTP12* 这三个家族成员在叶片中表达,且表达量依次为 *SISTP12*>*SISTP1*>*SISTP2*^[33]。qRT-PCR 测定结果表明,接种叶片中的 *SISTP1* 表达量在接种后 12 和 36 h 与对照叶片无显著差异,但在接种后 60 h 则显著高于对照叶片,比对照高 2 倍左右(图 4);接种叶片中的 *SISTP2* 表达量在接种后 12 h 显著高于对照叶片,较对照高 4 倍以上,但在接种后 36 和 60 h 与对照无显著差异;和上述 2 个基因不同,接种叶片中的 *SISTP12* 表达量在接种后 12 和 60 h 不但没有高于对照叶片,反而显著低于对照叶片,而在接种后 36 h 与对照叶片无显著差异。上述结果表明灰霉菌接种会对 STP 相关基因的表达水平产生显著影响,且不同 STP 成员对灰霉菌接种的响应存在显著差异。

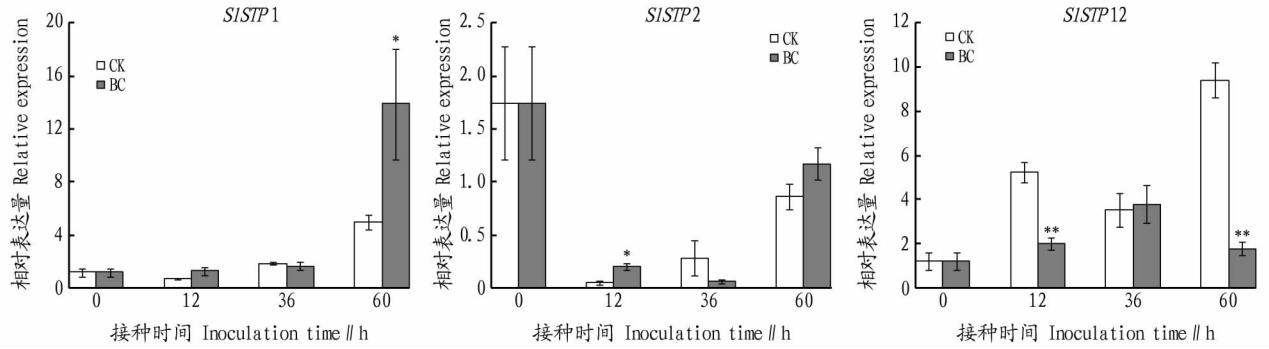
植物的 SWEET 基因分为 4 类,其中专一性运输蔗糖的 Clade III SWEET 和植物之间的抗病性关系最为密切^[19]。番茄中有 29 个 SWEET 家族成员,其中属于 Clade III 的有 13 个,而在叶片中表达量较高的 Clade III 基因有 7 个,分别为 *SISWEET10a*、*SISWEET10b*、*SISWEET10c*、*SISWEET11a*、*SISWEET11c*、*SISWEET12a*、*SISWEET12c*^[33]。qRT-PCR 测定结果表明,上述 7 个 SWEET 基因的表达对灰霉菌接种的反应大致可以分为两类,一类是接种灰霉菌后其表达量和对照叶片相比无显著差异,包括 *SISWEET10a*、*SISWEET10b*、*SISWEET12a*、*SISWEET12c*(图 5);另一类是接种灰霉菌后其表达量和对照相比显著升高,其中 *SISWEET10c* 在接种后 12 h 相比对照分别上调了 78%,*SISWEET11a* 在 12 和 60 h 相比对照分别上调了 225%和 267%;*SISWEET11c* 在 12 和 36 h 相比对照分别上调了 97%和 126%;上述结果表明灰霉菌接种可能只是对部分 SWEET 基因的表达产生上调的影响,而这些 SWEET 可能在番茄抵御灰霉菌病侵袭中发挥着重要作用。

2.4 接种番茄叶片后灰霉菌转化酶和己糖转运蛋白基因的表达分析 除测定番茄叶片中细胞壁转化酶和糖转运蛋白基因的表达外,还测定了接种后灰霉菌自身转化酶和己糖转运蛋白基因的表达变化。结果表明,灰霉菌可向细胞外分泌转化酶,灰霉菌基因组中一个编码胞外转化酶的基因为 *Bc1g10247*,其在灰霉菌致病性中发挥着重要作用^[27]。对 *Bc1g10247* 表达量的测定表明,接种番茄叶片后灰霉菌 *Bc1g10247* 表达量呈快速上升趋势(图 6)。此外,灰霉菌基因组中有 17 个编码己糖转运蛋白的基因,其中 *BcHXT1*、

BcHXT2、*BcHXT3*、*BcHXT4*、*BcHXT5*、*BcHXT6*、*BcHXT7*、*BcHXT8*、*BcHXT9*、*BcHXT10*、*BcHXT11*、*BcHXT12*、*BcHXT13*、*BcHXT14*、*BcHXT15*、*BcHXT16*、*BcHXT17*。上述结果表明,灰霉菌可向细胞外分泌转化酶,灰霉菌基因组中一个编码胞外转化酶的基因为 *Bc1g10247*,其在灰霉菌致病性中发挥着重要作用^[27]。对 *Bc1g10247* 表达量的测定表明,接种番茄叶片后灰霉菌 *Bc1g10247* 表达量呈快速上升趋势(图 6)。此外,灰霉菌基因组中有 17 个编码己糖转运蛋白的基因,其中 *BcHXT1*、

BcHXT6、*BcHXT11*、*BcHXT13* 这 4 个己糖转运蛋白白藤基因的表达丰度较高^[27]。测定结果表明 *BcHXT1*、*BcHXT6*、*BcHXT13* 的表达水平在接种番茄叶片后均呈上升趋势,特别是 *BcHXT1* 在接种后 36 h 即出现明显的上升,表明这 3 个己糖

转运蛋白基因可能在灰霉菌获取糖分的过程中发挥着重要作用。*BcHXT11* 的表达水平在接种番茄后呈下降趋势。此外,灰霉菌中编码果糖转运蛋白的基因 *BcFRT1* 的表达水平在接种番茄叶片后也呈下降趋势(图 6)。

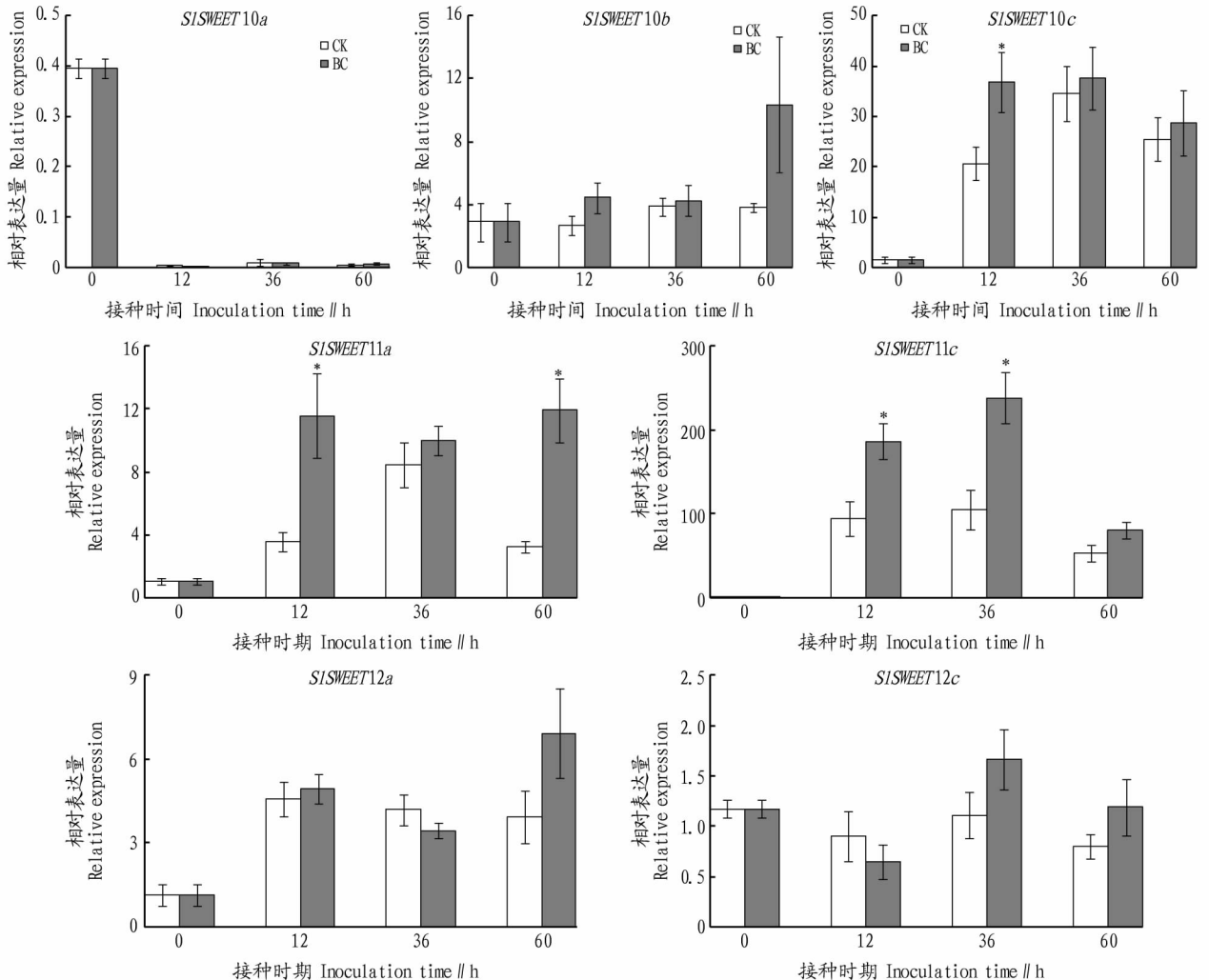


注: * 和 ** 分别表示病菌接种处理与对照之间在 0.05 和 0.01 水平存在显著差异

Note: * and ** indicate significant difference between inoculated and non-inoculated tomato leaves at 0.05 and 0.01 level, respectively

图 4 接种灰霉菌后番茄叶片 STP 基因的表达分析

Fig.4 Expression analysis of STP genes in tomato leaves inoculated with *Botrytis cinerea*



注: * 和 ** 分别表示病菌接种处理与对照之间在 0.05 和 0.01 水平存在显著差异

Note: * and ** indicate significant difference between inoculated and non-inoculated tomato leaves at 0.05 and 0.01 level, respectively

图 5 接种灰霉菌后番茄叶片 SWEET 基因的表达分析

Fig.5 Expression analysis of SWEET genes in tomato leaves inoculated with *Botrytis cinerea*

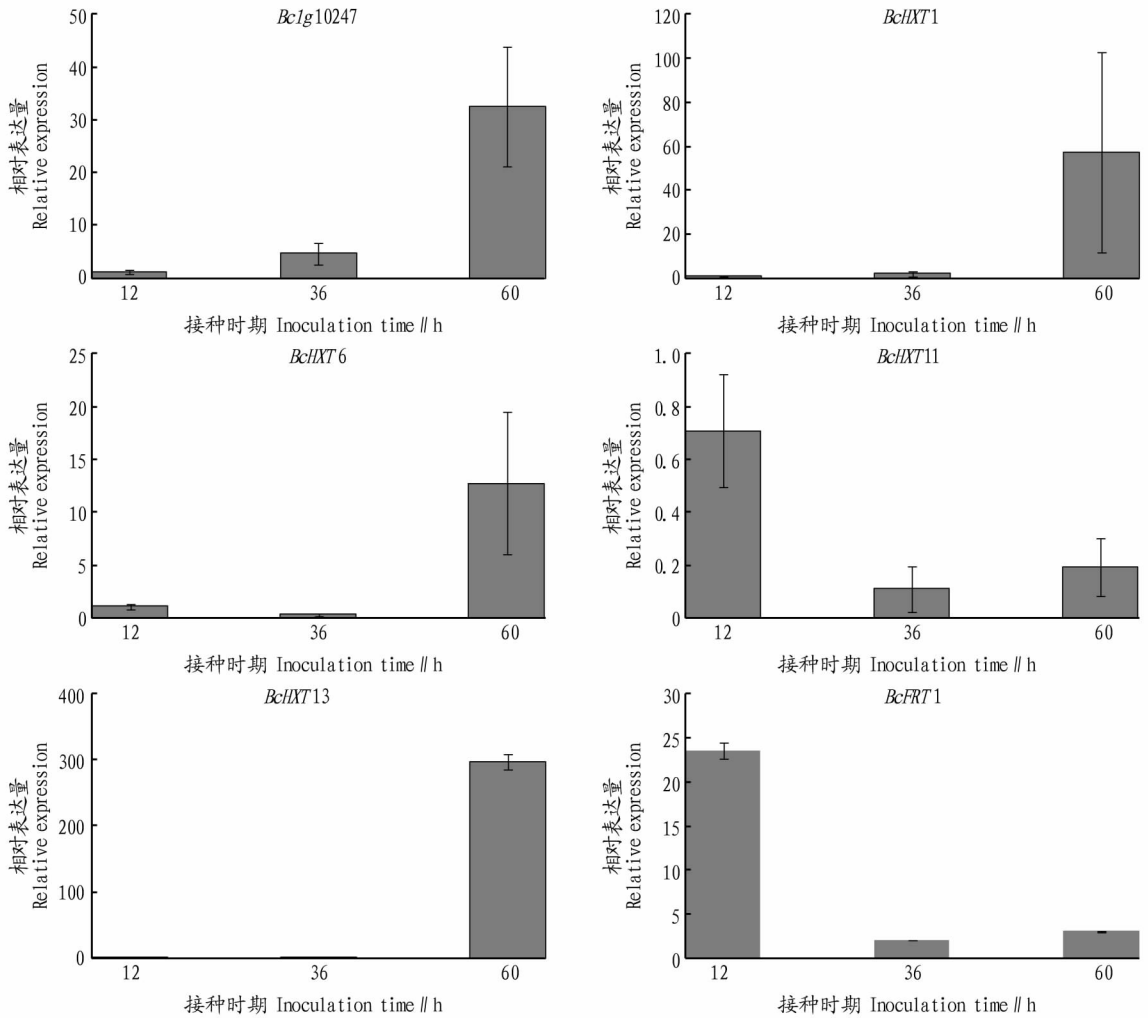


图6 接种番茄叶片后灰霉菌自身转化酶和己糖转运蛋白相关基因的表达分析

Fig.6 The expression analysis of *Botrytis cinerea*-originated invertase and hexose transporter genes after inoculating to tomato leaves

3 讨论

病原菌成功侵入植物细胞之前及其随后在植物组织中的整个发育过程都需要从植物体外空间吸收糖分(主要是葡萄糖)来维持其生长发育^[34-35]。因此,无论是植物还是病菌的蔗糖分解酶和糖转运蛋白均会对植物-病菌的互作产生重要影响,从而影响病害的发生。然而,目前绝大部分有关糖代谢在植物抗病中的作用研究仅集中于研究植物蔗糖分解酶和糖分转运蛋白,很少同时对病原菌的蔗糖分解酶和糖转运蛋白进行研究,该研究则同时研究番茄和灰霉菌的蔗糖转化酶和糖转运蛋白相关基因的表达。

研究表明,番茄叶片的CWIN活性在接种灰霉菌后12、24和48h均显著高于对照叶片^[36],但尚不清楚是哪个CWIN基因的表达在其中发挥主要作用,也不清楚CWIN抑制蛋白的表达水平发生了何种变化。该研究对番茄CWIN基因LIN6和LIN8表达水平的测定表明,在番茄叶片中表达丰度最高的LIN8的表达水平在接种叶片和对照叶片之间无显著差异,而LIN6的表达水平在接种后12和60h叶片中的表达水平显著高于对照叶片(图3)。同时,接种叶片中的CWIN抑制蛋白基因INVINH1表达水平在接种后12h显著高于对照叶片(图3)。上述结果表明,接种灰霉菌后番茄叶

片中CWIN活性的升高主要是LIN6表达水平上升所导致的,而CWIN抑制蛋白基因INVINH1表达水平的升高并不能显著抑制接种后番茄叶片CWIN活性的上升。

接种后番茄叶片CWIN活性的增加可通过将更多蔗糖分解为己糖(葡萄糖和果糖)从而导致质外体空间中己糖/蔗糖比值的升高^[36]。一方面,升高的己糖/蔗糖比值可诱导番茄的抗病反应^[16-17];但另一方面,增加的质外体空间己糖也可为病菌生长发育提供更多的能量和碳骨架,从而促进病害的发生^[7]。植物的糖分转运蛋白STP可将质外体空间的糖分吸收进入植物细胞从而可阻止病菌从叶片获取糖分。对番茄叶片中表达的3个STP基因SISTP1、SISTP2和SISTP12表达水平的测定表明,SISTP1的表达量在接种后60h显著高于对照叶片,而SISTP2表达量在接种后12h显著高于对照叶片。鉴于上述2个STP蛋白均位于植物细胞质膜上^[37],推测其表达量的上升可通过将糖分吸收进入叶片细胞从而抑制番茄灰霉菌的发生。然而,伴随着STP表达水平的变化,糖分转运蛋白SWEET的表达水平也发生了较大的变化。由于SWEET可将植物细胞内的糖分(蔗糖、葡萄糖和果糖)转运至细胞外部供病原菌吸收利用,因此会促进病菌对糖分的吸收利用^[19]。对在番茄叶片中表达量较高的7个Cl-

deIII SWEET 基因表达水平进行测定,结果表明有 3 个 SWEET 基因的表达水平受到灰霉菌的强烈诱导,分别是 *SlSWEET10c*、*SlSWEET11a* 和 *SlSWEET11c*。上述结果表明,灰霉菌可能通过诱导番茄 SWEET 基因的表达来抵消 STP 表达增加的作用,从而能获取足够的糖分来成功侵袭番茄。

除测定番茄叶片中细胞壁转化酶和糖转运蛋白基因的表达外,还测定了接种后灰霉菌自身转化酶和己糖转运蛋白基因的表达变化。研究发现,接种番茄叶片后,灰霉菌胞外转化酶基因 *Bc1g10247* 的表达水平呈持续增加的趋势;此外,3 个己糖转运蛋白 *BcHXT1*、*BcHXT6*、*BcHXT13* 的表达水平在接种番茄叶片也大幅上升。上述结果表明,接种番茄叶片后胞外转化酶和己糖转运蛋白基因表达水平的上升,将有利于灰霉菌将番茄叶片质外体空间的蔗糖分解为己糖并吸收利用,从而有助于灰霉菌的成功侵袭。

接种灰霉菌后,番茄叶片 SWEET 相关基因的表达水平受到灰霉菌的诱导而增加,糖分(主要是蔗糖)被 SWEET 转运至质外体空间。同时,灰霉菌的胞外转化酶和己糖转运蛋白相关基因的表达量上升,从而可将番茄质外体空间的蔗糖分解为己糖并吸收利用。虽然番茄叶片 STP 相关基因的表达量在接种灰霉菌后也大幅增加,但这并不能有效阻止灰霉菌对己糖的吸收利用,最终灰霉菌成功侵袭番茄叶片。

参考文献

[1] 程智慧.蔬菜栽培学各论[M].北京:科学出版社,2010:6.
 [2] 陈利军,郭世保,田雪亮,等.产香真菌 GS-1 菌株鉴定及其挥发性物质对番茄灰霉病的生防效果[J].植物保护学报,2016,43(4):608-613.
 [3] 李保聚,朱国仁,赵奎华,等.番茄灰霉病在果实上的侵染部位及防治新技术[J].植物病理学报,1999,29(1):63-67.
 [4] KOCH K.Sucrose metabolism:Regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development[J].Current opinion in plant biology,2004,7(3):235-246.
 [5] RUAN Y L.Sucrose metabolism:Gateway to diverse carbon use and sugar signaling[J].Annual review of plant biology,2014,65(1):33-67.
 [6] BERGER S,SINHA A K,ROITSCH T.Plant physiology meets phytopathology:Plant primary metabolism and plant-pathogen interactions[J].Journal of experimental botany,2007,58(15/16):4019-4026.
 [7] RICO A,PRESTON G M.*Pseudomonas syringae* pv.*tomato* DC3000 uses constitutive-and apoplast-induced nutrient assimilation pathways to catabolize nutrients that are abundant in the tomato apoplast[J].Molecular plant-microbe interactions,2008,21(2):269-282.
 [8] 李丽娜,孔建强.植物蔗糖合酶的结构、功能及应用[J].中国生物化学与分子生物学报,2015,31(9):904-913.
 [9] STURM A.Invertases:Primary structures,functions,and roles in plant development and sucrose partitioning[J].Plant physiology,1999,121(1):1-8.
 [10] ESSMANN J,BONES P,WEIS E,et al.Leaf carbohydrate metabolism during defense[J].Plant signaling and behavior,2008,3(10):885-887.
 [11] BONFIG K B,GABLER A,SIMON U K,et al.Post-translational derepression of invertase activity in source leaves via down-regulation of invertase inhibitor expression is part of the plant defense response[J].Molecular plant,2010,3(6):1037-1048.
 [12] HERBERS K,MEUWLY P,FROMMER W B,et al.Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase:Possible hexose sensing in the secretory pathway[J].Plant cell,1996,8(5):793-803.
 [13] SUN L,YANG D L,KONG Y,et al.Sugar homeostasis mediated by cell wall invertase GRAIN INCOMPLETE FILLING 1 (GIF1) plays a role in pre-existing and induced defence in rice[J].Molecular plant pathology,2014,15(2):161-173.
 [14] KOCAL N,SONNEWALD U,SONNEWALD S.Cell wall-bound invertase limits sucrose export and is involved in symptom development and inhibition of photosynthesis during compatible interaction between tomato and *Xanthomonas campestris* pv *vesicatoria* [J].Plant physiology,2008,148(3):1523-1536.

[15] SIEMENS J,GONZÁLEZ M C,WOLF S,et al.Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*[J].Molecular plant pathology,2011,12(3):247-262.
 [16] DOIDY J,GRACE E,KÜHN C,et al.Sugar transporters in plants and in their interactions with fungi[J].Trends in plant science,2012,17(7):413-422.
 [17] POMMERENIG B,MÜDSAM C,KISCHKA D,et al.Treat and trick:Common regulation and manipulation of sugar transporters during sink establishment by the plant and the pathogen[J].Journal of experimental botany,2020,71(14):3930-3940.
 [18] LEMONNIER P,GAILLARD C,VEILLET F,et al.Expression of *Arabidopsis* sugar transport protein STP13 differentially affects glucose transport activity and basal resistance to *Botrytis cinerea*[J].Plant molecular biology,2014,85(4/5):473-484.
 [19] CHEN L Q,HOU B H,LALONDE S,et al.Sugar transporters for intercellular exchange and nutrition of pathogens[J].Nature,2010,468(7323):527-532.
 [20] CHU Z H,FU B Y,YANG H,et al.Targeting, *xa13*, a recessive gene for bacterial blight resistance in rice[J].Theoretical and applied genetics,2006,112(3):455-461.
 [21] YUAN M,CHU Z H,LI X H,et al.Pathogen-induced expressional loss of function is the key factor in race-specific bacterial resistance conferred by a recessive R gene *xa13* in rice[J].Plant and cell physiology,2009,50(5):947-955.
 [22] YANG B,SUGIO A,WHITE F F.Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice[J].Proceedings of the national academy of sciences,2006,103(27):10503-10508.
 [23] WILSON A M,WILKEN P M,VAN DER NEST M A,et al.Homothallism:An umbrella term for describing diverse sexual behaviours[J].IMA Fungus,2015,6(1):207-214.
 [24] DOEHLEMANN G,MOLITOR F,HAHN M.Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*[J].Fungal genetics and biology,2005,42(7):601-610.
 [25] DULERMO T,RASCLE C,CHINNICI G,et al.Dynamic carbon transfer during pathogenesis of sunflower by the necrotrophic fungus *Botrytis cinerea*:From plant hexoses to mannitol[J].New phytologist,2009,183(4):1149-1162.
 [26] PARRENT J L,JAMES T Y,VASAITIS R,et al.Friend or foe? Evolutionary history of glycoside hydrolase family 32 genes encoding for sacrolytic activity in fungi and its implications for plant-fungal symbioses[J].BMC Evolutionary Biology,2009,9:1-16.
 [27] VEILLET F,GAILLARD C,COUTOS-THÉVENOT P,et al.Targeting the *AtCW11* gene to explore the role of invertases in sucrose transport in roots and during *Botrytis cinerea* infection[J].Frontiers in plant science,2016,7:1-20.
 [28] LIAN J J,HAN H Y,ZHAO J H,et al.*In-vitro* and in-planta *Botrytis cinerea* inoculation assays for tomato[J].The plant cell,2018,8(8):e2810.
 [29] GACHON C,SAINDRENAN P.Real-time PCR monitoring of fungal development in *Arabidopsis thaliana* infected by *Alternaria brassicicola* and *Botrytis cinerea*[J].Plant physiology and biochemistry,2004,42(5):367-371.
 [30] SUAREZ M B,WALSH K,BOONHAM N,et al.Development of real-time PCR (TaqMan) assays for the detection and quantification of *Botrytis cinerea* in planta[J].Plant physiology and biochemistry,2005,43(9):890-899.
 [31] FRIDMAN E,ZAMIR D.Functional divergence of a syntenic invertase gene family in tomato,potato,and *Arabidopsis*[J].Plant physiology,2003,131(2):603-609.
 [32] JIN Y,NI D A,RUAN Y L.Posttranslational elevation of cell wall invertase activity by silencing its inhibitor in tomato delays leaf senescence and increases seed weight and fruit hexose level[J].Plant cell,2009,21(7):2072-2089.
 [33] FENG C Y,HAN J X,HAN X X,et al.Genome-wide identification,phylogeny, and expression analysis of the SWEET gene family in tomato[J].Gene,2015,573(2):261-272.
 [34] NEHLS U,GÖHRINGER F,WITTULSKY S,et al.Fungal carbohydrate support in the ectomycorrhizal symbiosis: A review[J].Plant biology,2010,12(2):292-301.
 [35] FERNANDEZ J,MARROQUIN-GUZMAN M,WILSON R A.Mechanisms of nutrient acquisition and utilization during fungal infections of leaves[J].Annual review of phytopathology,2014,52:155-174.

3 结论与讨论

(1) 该研究主要对3类金佛山方竹林发笋规律进行调查,研究发现3类竹林的发笋规律存在差异。金佛山方竹为混生竹,发笋期在中秋节前后,与散生竹毛竹等竹种发笋季节有明显差异^[17],与丛生状竹种甜龙竹(*Dendrocalamus hamiltonii*)的发笋期相差不大^[18]。对于笋用竹种,发笋质量是整个竹林生产量的保证,笋期的管理对于整个竹林的壮大至关重要,因此研究金佛山方竹发笋规律可为该竹林的经营管理和采笋策略提供理论基础。研究结果表明,金佛山方竹天然林发笋期为9月2日起始,笋坝种源实生苗新造10年生竹林发笋日期相比天然林推迟5 d,黄连种源所造林相比天然林推迟9 d。2个种源实生苗所造林发笋日期推迟的原因推测与海拔高度有密切联系,海拔越高,发笋日期越早,且海拔较高的天然林笋期持续较长,发笋量相对较多。笋坝种源实生苗为原产地育苗,黄连种源实生苗为异地育苗,前者对笋坝气候有更强的适应性,故前者所造林发笋期相对较早。综上,金佛山方竹为典型的高山竹种,对海拔、温湿度具有较高的要求,在相对低海拔地区有移栽成活的可能性。

(2) 该研究结果与慕山丁等^[19]对贵州省桐梓县金佛山方竹的调查结果有差异,其最大发笋量高于该研究的发笋量,这可能与竹林的大小年、经营情况及生长海拔有关。金佛山方竹作为优良的笋用竹种,海拔下调的适应性对于该竹种的引种栽培具有重要意义。唐红等^[20]对圣音竹(*Ph. edulis f. tubaeformis*)发笋规律调查发现,整个笋期可分为3个时期,发笋规律呈现类似于正态分布的规律,以盛期发笋量最大,且质量较好,该时期的竹笋宜被选为母竹留养,这与该研究天然林发笋规律大致相同,其他竹种如毛竹和甜龙竹也表现出相同的发笋规律。对于金佛山方竹,其发笋期在中秋节前后,发笋前期气温较高,因此在可行情况下,提前降温、补充水分,有可能使发笋期提前。该研究结果表明,盛期发笋量大且质量较优,竹林在留笋养竹时应尽量选择盛期竹笋作为母竹,以不断壮大竹林;实生苗新造林与天然林的发笋规

律具有较大差异,萌发笋数量多,但大多难以生长为成竹,对于竹林的壮大无积极作用,故对于实生苗新造林应及时进行间伐和合理管理,去除竹林中多余的竹笋,留给母竹足够的营养和空间成长,这对于竹林的壮大具有重要意义。

参考文献

- [1] 傅文举.桐梓县金佛山方竹资源概况及发展措施[J].贵州林业科技,1999,27(3):62-64.
- [2] 彭海君.遵义市金佛山方竹资源现状及开发对策[J].现代农业科技,2019(19):150,152.
- [3] 贵州省桐梓县林业局,林业部竹子研究开发中心.桐梓县金佛山方竹资源及今后经营利用[J].竹子研究汇刊,1997,16(3):75-77.
- [4] 邓锦森,董敦义,丁雨龙.毛竹实生苗专题文献分析[J].竹子研究汇刊,2004,23(2):8-12.
- [5] 赵昌恒,方乐金.安徽省毛竹实生苗造林苗木标准的探讨[J].竹子研究汇刊,2006,25(2):1-2,6.
- [6] 李国栋,胡晓伟,牟梦晓,等.不同氮素形态及配比对毛竹实生苗生长及养分吸收的影响[J].福建农林大学学报(自然科学版),2014,43(2):151-155.
- [7] 陈红,冯云,周建梅,等.采用纸培法研究毛竹实生苗根系构型[J].经济林研究,2013,31(3):158-160,168.
- [8] 颜培栋,覃荣科,蒙春江,等.桂西北地区毛竹造林与成效分析[J].广西林业科学,2011,40(3):210-212.
- [9] 王恒义.毛竹实生苗繁育技术[J].安徽林业,2008,34(6):38.
- [10] 黄伟彬.毛竹实生苗培育及造林技术[J].吉林农业,2013(2):211.
- [11] 陆奇勇,杨庆安,张弼,等.毛竹笋期切秆育苗与造林技术研究[J].中南林业科技大学学报,2009,29(4):31-36.
- [12] 汪政忠.皖南山区毛竹实生苗繁育及实生林生长发育规律研究[J].安徽林业科技,2013,39(1):30-32.
- [13] 胡建勋.皖西南地区毛竹实生苗培育及丰产栽培技术[J].农技服务,2014,31(3):97,109.
- [14] 郭起荣,陈红,冯云,等.用根箱法研究毛竹实生苗根系构型[J].中南林业科技大学学报,2014,34(4):6-9,24.
- [15] 郑先蓉,仇德昌,文级强.金佛山方竹种子育苗技术初探[J].种子,2007,26(7):108-109.
- [16] 凡美玲,方水元,张勤,等.金佛山方竹两个种源一年生实生苗的选优[J].内蒙古科技,2020,39(9):255-259.
- [17] 曹福亮,楼崇.毛竹林出笋与幼竹生长发育规律的研究[J].竹子研究汇刊,1991,10(1):64-71.
- [18] 李荣,何明霞,刀定伟,等.版纳甜龙竹发笋及幼竹高生长规律[J].基因组学与应用生物学,2010,29(4):735-739.
- [19] 慕山丁,张喜,张佐玉.金佛山方竹出笋规律的初步研究[J].贵州林业科技,1997,25(3):18-24.
- [20] 唐红,刘玮,黄滔,等.圣音竹发笋及幼竹高生长规律研究[J].中南林业科技大学学报,2015,35(8):27-31.

(上接第107页)

- [36] 彭家丽,赵虎,李智佳,等.灰霉病对番茄叶片蔗糖转化酶活性和可溶性糖含量的影响[J].安徽农业科学,2020,48(11):156-160,163.

- [37] REUSCHER S, AKIYAMA M, YASUDA T, et al. The sugar transporter inventory of tomato: Genome-wide identification and expression analysis[J]. Plant and cell physiology, 2014, 55(6): 1123-1141.