

Fol-miR1 调控 SlyFRG5 甲基化水平介导番茄抗枯萎病免疫应答的功能解析

王月[†], 李彦婷[†], 肖颖, 叶红霞, 陈舒曼, 欧阳寿强^{*}

浙江师范大学生命科学学院, 金华 321004

摘要 番茄(*Solanum lycopersicum*)作为一种营养丰富的蔬菜作物, 在全球范围内被广泛种植。由尖孢镰刀菌番茄专化型(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fo*)引起的番茄枯萎病是一种土传真菌病害, 给全球番茄农业生产造成了极大的经济损失。Small RNA (sRNA)介导的 DNA 甲基化(RdDM)植物抗病分子机制研究备受关注, 但关于病原菌 sRNA 跨界调控宿主 DNA 甲基化介导番茄抗枯萎病的分子机制尚未见报道。本课题组前期研究结果表明, 尖孢镰刀菌的效应分子 *Fol-miR1* 在病原菌侵染过程中跨界转运至番茄体内, 并通过与 *SlyAGO4a* 结合挟持番茄免疫体系。在此基础上, 本研究结果进一步表明 *SlyAGO4a* 以负调控的方式参与番茄枯萎病的抗性; 利用全基因组甲基化测序及分子生物学手段鉴定到 *Solyc02g081370* (*SlyFRG5*)的甲基化水平与 *Fol-miR1* 与直接关联, 其甲基化类型以 CG 为主, 且发生在基因编码区内; *SlyFRG5* 通过调控宿主 ROS 的积累参与番茄对枯萎病的免疫。综上所述, 本研究解析了 *Fol-miR1-SlyAGO4a-SlyFRG5* 功能模块介导番茄抗枯萎病的分子机制, 为探索番茄抗枯萎病品种的培育和品质改良提供新的思路。

关键词 番茄枯萎病, DNA 甲基化, 抗病基因, 抗病分子机制

番茄是重要的果蔬类作物, 在世界范围内广泛种植, 但在种植过程中受到如番茄枯萎病等多种病害的危害。番茄枯萎病是一种典型的维管束病害, 由土传真菌尖孢镰刀菌番茄专化型(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fo*)侵染引发。病原菌侵染番茄植株根系, 通过维管系统向上蔓延并在宿主木质部维管束中富集, 导致植株长势变差、维管束褐变、基部叶片明显黄化萎蔫并向顶端叶片扩散蔓延直至整株死亡, 严重时可造成 70%的番茄果实产量损失(刘缙等, 2010; Di et al., 2016; Srinivas et al., 2019)。

最新研究表明病原菌来源的 sRNA 可作为新型效应分子(Effector)跨界参与宿主-病原菌相互作用(Wang et al., 2015)。灰霉菌(*Botrytis cinerea*)在侵染宿主拟南芥和番茄过程中,

收稿日期: 2025-07-21; 接受日期: 2025-09-02

基金项目: 浙江省自然科学基金(No.KYZ34423025)和国家自然科学基金面上项目(No.31972351)

[†] 共同第一作者

^{*} 通讯作者。E-mail: sqouyang@zjnu.edu.cn。

将自身 Bc-siR3.1、Bc-siR3.2 和 Bc-siR5 转移到宿主细胞, 并通过与宿主 RNAi 体系中重要组分 AGO1 结合, 劫持宿主的免疫体系(Weiberg et al., 2013)。Pst-milR1 是小麦条锈病原菌(*Puccinia striiformis* f. sp. *Tritic*)的一个重要致病因子, 在病原菌基因组中没有其靶基因, 但在小麦基因组中发现存在有一个靶基因 SM638, 其对小麦抗条锈病具有重要功能(Wang et al., 2017)。我们前期研究发现 *Fol* 侵染宿主番茄过程中, 其致病力所必须的 *Fol*-milR1 作为效应分子跨界水平转移至宿主细胞内, 且能在转录水平调控其在番茄基因组中重要抗病基因 *SlyFRG4* 的表达; 同时, *Fol*-milR1 可与 *SlyAGO4a* 结合, 通过干扰宿主的免疫体系以达到成功侵染的目的(Ji et al., 2021)。

研究表明 DNA 甲基化调控在植物免疫中至关重要, 通过影响植物基因组 DNA 甲基化干扰抗病功能基因表达水平(Henderson and Jacobsen, 2007; Law and Jacobsen, 2010a; Yu et al., 2013)。在植物中, 从头甲基化由小 RNA 介导的 DNA 甲基化(RdDM)途径实现(Matzke and Moshier, 2014)。植物基因组编码许多重要的 RdDM 组分, 主要包括 AGO4 蛋白、DCL3 (DICER-LIKE 3) 蛋白和植物特有的 RNA 聚合酶 Pol IV 和 Pol V (Chan et al., 2004; Havecker et al., 2010)。在拟南芥中, AtAGO4 通过其 RdDM 途径调节拟南芥重要抗性基因甲基化水平应答细菌病原丁香假单胞菌的侵染(Agorio and Vera, 2007)。烟草 NaAGO4 通过介导茉莉酸信号通路, 从而调节植株对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抗性(Pradhan et al., 2020)。依赖于 OsDCL3 的水稻 lmiRNAs (long miRNAs)通过与 OsAGO4 结合, 可以在顺式中的自身位点和反式中的靶基因上引导胞嘧啶 DNA 甲基化, 最终导致水稻抗白叶枯病关键基因在转录水平上的沉默(Wu et al., 2010)。这些研究表明 DNA 甲基化和去甲基化是植物对病原物防御体系的重要组成部分。

本研究以本课题组前期构建的 *Fol*-milR1_KO 突变体菌株和野生型(*Fol*-WT)两种病原菌分别侵染三周龄番茄植株, 利用基因组甲基化测序分析番茄基因组 DNA 甲基化水平变化, 挖掘响应 *Fol*-milR1 的差异甲基化基因, 解析 DNA 甲基化介导的番茄抗枯萎病的分子机制, 为番茄抗病品种培育和品质改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试菌株、番茄及质粒: 野生型尖孢镰刀菌番茄专化型(*Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *Fol4287*)由本课题组保存。*Fol*-milR1-KO#108 基因敲除突变菌株由本课题组前期获得, 保存于-80°C冰箱(Ji et al., 2021)。本研究使用的番茄材料是对 *Fol* 侵染表现出

典型抗感表型的两个近等位基因品系：感病品系 Moneymaker (MM, *i-2/i-2*)和抗病品系 Motelle (Mot, *I2/I2*)。本研究所用的质粒载体：pHSE401_tomatoU6 (pTX041); pBI121; pCE2-TA/Blunt-Zero; pHB-GFP (pHG), 菌株由本实验室保存。

1.2 病原菌侵染

Fol 在 PDA 平板 28°C、持续光照培养 4 至 5 天后, 切取菌落边缘 1 cm² 活跃生长区菌丝组织, 转移至 100 mL Vogel's 液体培养基的锥形瓶中, 于 28°C、200 rpm 摇床进行光照振荡培养 4 天。收集孢子, 并将孢子液浓度调为 10⁸ 个/mL。选取在蛭石中生长 3 周左右的健康番茄幼苗, 流水冲洗根系, 在距根尖 2 cm 处制造切口, 将处理的番根系浸入孢子悬液中 30 min, 期间每 10 min 混匀悬液维持孢子均匀分布, 设置无菌水浸泡为阴性对照组。接种完成后将吸净根系菌液, 移植至灭菌蛭石中, 于人工气候培养室培养(25°C, 16 小时光照/8 小时黑暗交替)。持续观察并记录发病进程, 拍照记录发病表型。

1.3 全基因组甲基化测序与生物学分析

不同病原菌 *Fol*-WT/*Fol*-milR1_KO 分别侵染番茄感病品系 MM, CTAB 法提取植物 gDNA。检测合格后的 DNA 样本通过超声波机械打断法将 DNA 片段化处理, 然后进行片段纯化、末端修复、3' 端加 A 尾, 甲基化接头连接等处理。对连接产物实施重亚硫酸盐处理, 通过琼脂糖凝胶电泳进行片段选择并进行 PCR 扩增构建测序文库, 包括 MM_H₂O, MM_*Fol* 和 MM_milR1_KO。甲基化测序后分析不同处理样本间甲基化水平和差异甲基化区域(Differentially Methylated Region, DMR), 并实现 DNA 甲基化水平差异基因挖掘和差异基因功能注释。

1.4 基因亚硫酸氢盐测序(Bisulfite sequencing PCR, BSP)

本研究使用 TIANGE 公司的 DNA 重亚硫酸盐转化试剂盒(离心柱型) (DP215-02)对 DNA 进行重亚硫酸盐处理(详细步骤参考产品说明书)。使用甲基化特异性 PCR 试剂盒(TIANGEN: EM101)进行甲基化特异性 PCR 扩增。用诺唯赞产物纯化试剂盒(DC301)回收纯化目的片段。通过诺唯赞 5 min TA/Blunt-Zero Cloning Kit (C601-01)将目的片段连接到 T 载体上并挑取阳性单克隆测序。将测序正确的序列与参考基因序列比对, 分析甲基化水平并制作甲基化图谱。

1.5 茎秆切片棉兰染色

取发病植株, 切取 5 cm 茎基部组织段, 制作横切薄片, 将切取的组织片立即浸泡于棉兰染液中染色 30 秒, 随后用 dd H₂O 快速漂洗 2 次, 置于光学显微镜下观察维管束褐变程度。

1.6 茎秆再培养观察茎秆内菌量

取发病植株, 切取 5 cm 茎基部组织段, 消毒并充分漂洗后切成 1 mm 小段后铺于 YPDA 固体培养基上, 28°C、持续光照培养 24–36 hr 后记录菌丝生长情况。

1.7 植物内病原菌生物量水平检测

分别取不同处理下的番茄植株同一叶位叶片, 用 CTAB 法提取基因组 DNA, 采用基于尖孢镰刀菌核糖体 DNA 内基因间隔区(IGS)序列设计的特异性引物, 通过定量 PCR 对发病植株和健康植株体内的病原菌生物量进行分析。

1.8 番茄基因过表达载体/CRISPR-Cas9 编辑载体构建及番茄遗传转化

番茄基因过表达载体构建: 使用基因特异性引物, 获得目的基因 ORF 高保真 PCR 产物, 并用同源重组试剂盒(Vazyme C112)连接至表达载体, 将测序验证正确的阳性质粒转化农杆菌 GV3101。

番茄基因 CRISPR-Cas9 编辑载体构建: 基于 <http://crispr.dbcls.jp> 设计 CRISPR 靶点, 以 pCBC-DT1T2_tomatoU6 (CP043)质粒为模板, 扩增特定基因序列并纯化, 导入载体 pTX041, 将经测序验证的重组质粒转化农杆菌 GV3101。

番茄遗传转化主要参照 Li et al., 2005, 简述为: 分别将上述构建成功的基因过表达农杆菌转化感病品系番茄 MM, CRISPR-Cas9 基因编辑载体农杆菌转化抗病品系番茄 Mot, 利用 PCR 技术及测序确定阳性纯和转化植株用于后续研究。

1.9 DAB 染色和 NBT 染色

DAB 染色: 本研究使用碧云天生物技术公司 DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒(P0202), 参照使用手册。简述为: 将病原菌侵染后不同样本同一叶位的番茄叶片浸入染液中, 室温避光孵育过夜固定; 用适量洗涤液洗涤 3–5 次, 每次 3–5 分钟; 加入适量 DAB 染色工作液, 室温避光孵育 3–30 分钟, 直至显色至预期深浅; 去除 DAB 染色工作液, 用蒸馏水洗涤 1–2 次终止显色反应; 用 95%乙醇在 80°C 水浴中脱色至叶片背景为无色并拍照记录。

NBT 染色: 本研究使用碧云天生物技术公司 NBT 碱性磷酸酯酶显色试剂盒(C3206), 参照使用手册。简述为: 将病原菌侵染后不同样本同一叶位的番茄叶片浸入 NBT 染色工作液中, 常温避光浸染 2–6 h, 至阳性部位出现深蓝色, 其余部位为淡蓝色或近无色或呈植物本身的颜色即可; 取出样品, 蒸馏水漂洗 3–5 次, 置于滤纸上吸干多余水分后, 浸入 95%乙醇中 40°C 处理 3–16 h, 至叶片背景为无色并拍照记录。

1.10 H₂O₂ 含量测定

本研究使用南京建成生物工程研究所的过氧化氢测定试剂盒(A064-1-1), 参照使用手

册。简述为: 收集病原菌侵染后不同样本同一叶位的番茄叶片, 于研钵中液氮研磨成粉, 称取植物粉末, 按重量(g):体积(mL)= 1:9 的比例, 加入 9 倍体积的 PBS, 涡旋震荡 1 分钟, 12000 转/分, 离心 10 分钟, 取上清液; 按照指导条件配置反应体系, 待反应结束后测试 $\lambda=405$ nm 吸光度值, 并计算 H_2O_2 含量。

本研究所使用的引物信息请参阅附表 1。

2 结果与分析

2.1 *SlyAGO4a* 负调控番茄对枯萎病抗性

我们前期研究发现 *Fol* 致病力所必须的 *Fol-miR1* 作为效应分子在病原菌侵染过程中跨界转移至宿主细胞, 且 *Fol-miR1* 可与 *SlyAGO4a* 结合, 挟持宿主的免疫体系(Ji et al., 2021)。为了进一步证实验证 *SlyAGO4a* 在植物免疫反应中的作用, 我们分别在抗病品种 Mot 背景构建 *SlyAGO4a* 过表达番茄遗传材料; 在感病品种 MM 背景构建 CRISPR/Cas9 基因编辑(基因敲除)番茄遗传材料。通过 Kan 抗性筛选及 qRT-PCR 技术鉴定, 获得过表达转基因材料 *SlyAGO4a*-OE-Line 1、Line 4、Line 5 (附图 1 A–C)。通过 Kan 抗性 & CRISPR/Cas9 编辑 DNA 片段测序鉴定出两株 *SlyAGO4a* 基因编辑植株 *SlyAGO4a*-KO-Line 29、Line 34。其中 Line 29 在靶点 1 处发生了 10 个碱基的缺失从而导致基因移码框错位, Line 34 在靶点 1 处发生 1 个碱基的插入导致了终止密码子的提前产生(附图 1D–E)。qRT-PCR 结果表明, Line 29、Line 34 纯合体中 *SlyAGO4a* 表达水平显著降低(附图 1 F)。随后, 用野生型 *Fol* 分别侵染生长 3 周左右的 MM、Mot、*SlyAGO4a*-OE-Line 1、*SlyAGO4a*-OE-Line5、*SlyAGO4a*-KO-Line 29、*SlyAGO4a*-KO-Line 34 植株, 结果表明 *SlyAGO4a* 敲除后提高感病品系 MM 的抗性, 而过表达 *SlyAGO4a* 降低 Mot 的抗性(图 1 A)。植株茎基部切片进行棉兰染色结果(图 1 B), 植株中病原菌生物量(图 1 C), 以及病情指数统计结果表明均与上述结果一致(图 1 D)。以上研究结果表明, *SlyAGO4a* 以负调控的方式参与番茄对枯萎病的抗性。

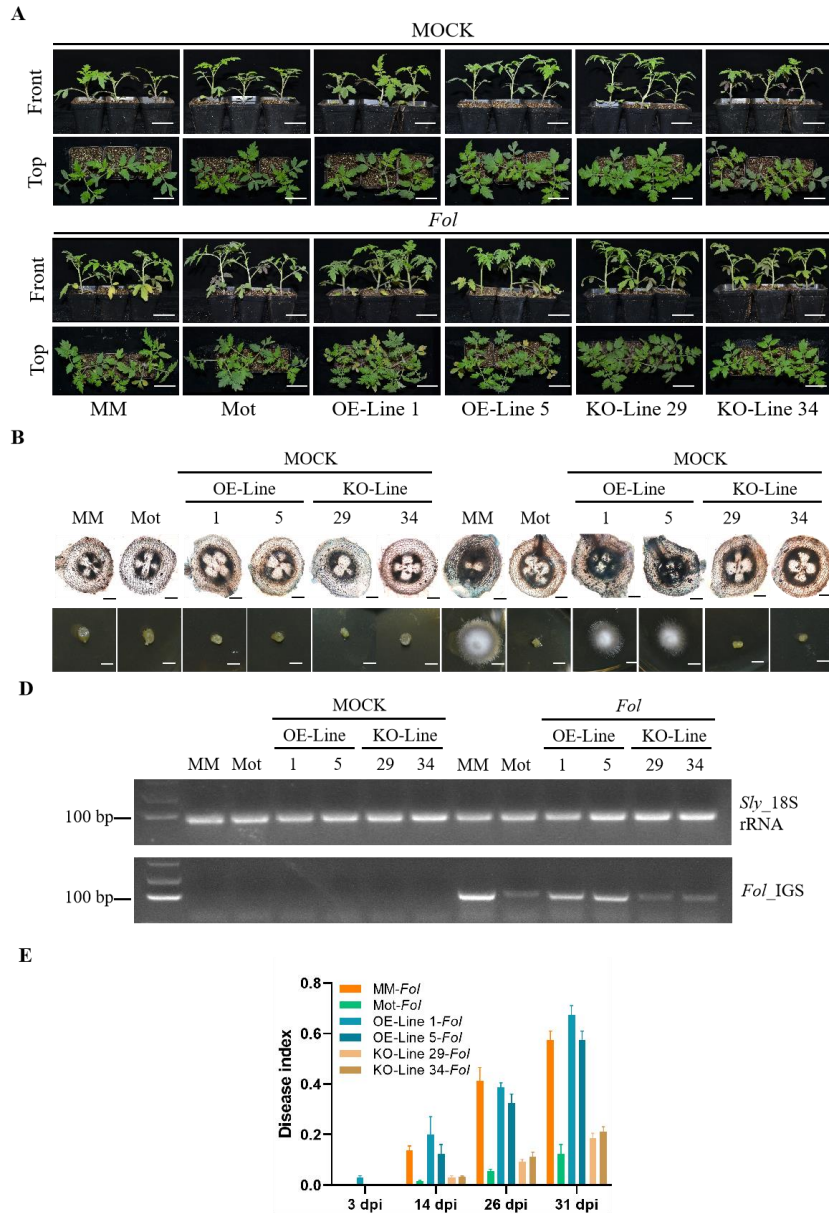


图 1 *SlyAGO4a* 负调控番茄对 *Fol* 的抗性

(A) *Fol* 侵染后 *SlyAGO4a* 不同遗传背景植株的发病表型(bar=4 cm); (B) 茎秆切片棉兰染色情况(bar=1 mm)及茎秆分离再培养病原菌情况(bar=2 mm); (C) *Fol* 侵染后番茄植株内病原菌生物量检测; (D) 病情指数统计。

Figure 1 *SlyAGO4a* negatively regulates tomato resistance to *Fol*

(A) The disease phenotype of plants infected with *Fol*. (bar=4 cm); (B) Stains of stem slices in Medan (bar=1 mm), and isolation and cultivation of *Fol* from stems (bar=2 mm); (C) Detection of pathogen biomass in tomato plants after *Fol* infection; (D) Disease index statistics.

2.2 *Fol*-miR1-*SlyAGO4a* 调控 *SlyFRG5* 甲基化水平

我们进一步利用全基因组甲基化测序,发现在水/*Fol*-WT/*Fol*-milR1_KO 不同方式处理条件下,甲基化水平发生明显变化的共有 22 个候选基因。利用 Chop-PCR 技术(利用特异识别甲基化类型的限制性内切酶消化基因组 DNA,结合 PCR 技术扩增甲基化区域片段,产物与甲基化程度正相关)对这些重点差异基因进行进一步的鉴定结果显示,在野生型病原菌侵染后,经 Hpa II (识别 CG 甲基化类型)和 ScrF I (识别 CHG 甲基化类型)消化处理的样品中,PCR 检测结果表明 *Solyc02g081370* 甲基化水平上升,而在 *Fol*-milR1_KO 菌株侵染条件下,该基因甲基化水平与对照组水平相近,表明 *Fol*-milR1 与 *Solyc02g081370* 的甲基化变化直接关联(图 2 A)。为了进一步确定 *Solyc02g081370* 编码区胞嘧啶(Cytosine, C)发生甲基化的比例,利用重亚硫酸盐处理不同样品 gDNA,通过 PCR 扩增后并对其测序。结果表明 *Fol* 侵染下 *SlyFRG5* 甲基化率显著高于对照组,而在 *Fol*-milR1-KO 侵染的样本中甲基化水平与对照组甲基化水平相近(图 2B, C),且其转录水平与甲基化程度相符(图 2D)。以上结果进一步表明了 *Solyc02g081370* 的甲基化水平与 *Fol*-milR1 表达水平直接相关。因此,我们将其命名为 *SlyFRG5* (*Fusarium* Resistant Gene 5, 编码 Acyl-CoA 合成酶),并作为本研究的研究对象。

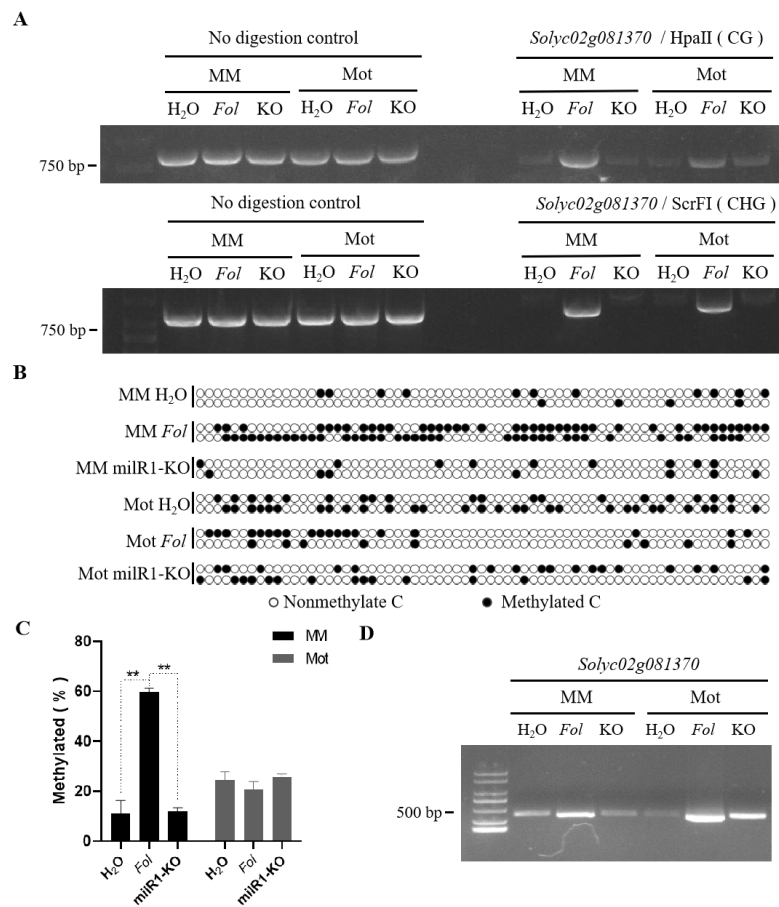


图 2 *Fol*-milR1-SlyAGO4a 调控 *SlyFRG5* 的甲基化水平变化

(A) H₂O/*Fol*-WT/*Fol*-miR1-KO 处理下 *SlyFRG5* Chop-PCR 检测; (B) 不同样品中 *SlyFRG5* 胞嘧啶位点甲基化测序结果; (C) *SlyFRG5* 胞嘧啶位点甲基化统计; (D) 不同样品中 *SlyFRG5* 转录水平。

Figure 2 *Fol*-miR1 regulates the methylation changes of *SlyFRG5*

(A) Detection methylation of *SlyFRG5* under H₂O/*Fol*-WT/*Fol*-miR1-KO treatment by Chop PCR; (B) Methylated cytosine site of *SlyFRG5* in different samples; (C) Statistics of methylated cytosine site in *SlyFRG5*; (D) Transcriptional levels of *SlyFRG5* in different samples.

2.3 *SlyFRG5* 的甲基化主要为 CDS 区域的 CG 类型甲基化

我们进一步利用 BSP 和 Chop-PCR 探究 *Fol*-miR1 调控 *SlyFRG5* 的甲基化类型。结果表明, 在感病品系 MM 中, *Fol*-WT 侵染后 *SlyFRG5* 的 CG 位点甲基化率约 70%, 明显高于对照组和 *Fol*-miR1-KO 病原菌处理组, 但 CHG 和 CHH 位点甲基化率则没有显著差异。而在抗病品系 Mot 中, *SlyFRG5* 的胞嘧啶甲基化整体水平及显著低于 MM, 但也主要是 CG 甲基化类型(图 3A, B)。同时, *SlyFRG5* 在启动子区域的甲基化变化结果表明, 该基因在病原菌侵染后启动子区甲基化水平变化没有明显(附图 2A)。为了探索 DNA 甲基化发生的机制, 我们还检测了番茄基因组甲基化功能相关基因的转录水平。结果表明, 在病原菌侵染条件下, 番茄基因组中与甲基化相关的基因中只有 *SlyCMT3* 和 *SlyDRM6* 的转录水平显著上调, 而其它基因如 *SlyMET 1*、*SlyCMT 2*、*SlyDRM 5* 等的转录水平均无明显变化(附图 2B, 图 3C)。以上结果表明 *SlyFRG5* 的甲基化主要为 CDS 区域的 CG 序列类型甲基化, 且 *SlyCMT3* 和 *SlyDRM6* 是调控 *SlyFRG5* 发生甲基化的主要甲基化酶基因。

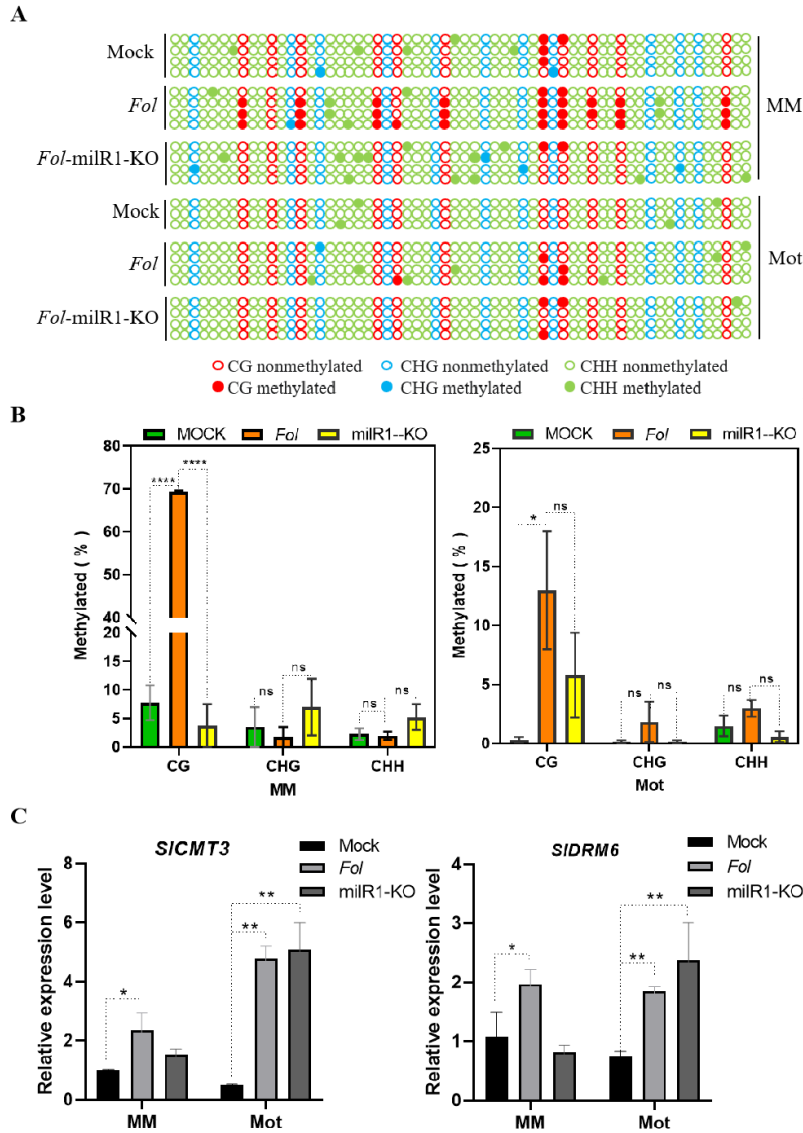


图 3 *SlyFRG5* 在 CDS 区域的甲基化类型

(A) *SlyFRG5* 基因 CDS 区域甲基化类型分布(编码区部分区域); (B) *SlyFRG5* 基因 CDS 区域甲基化类型分布统计; (C) *Sly CMT3* 与 *SlyDRM6* 在不同处理样本中的相对表达水平。

Figure 3 Methylation type of *SlyFRG5* in the CDS region

(A) Distribution of methylation type in the CDS (Partial region) region of *SlyFRG5*; (B) Statistical distribution of methylation types in the CDS region of *SlyFRG5*; (C) The relative expression levels of *Sly CMT3* and *SlyDRM6* in differently samples.

2.4 *Fol-miR1-SlyAGO4a* 通过 DNA 甲基化调控 *SlyFRG5* 基因表达

我们分别用不同菌株侵染番茄植株以检测 *SlyFRG5* 在病原菌侵染后的应答情况, 结果再次证实 *Fol-miR1-KO* 病原菌致病力要低于野生型 *Fol* (图 4A)。在感病品系 MM 中,

SlyFRG5 转录水平整体呈现下降的趋势, 而 *Fol-miR1-KO* 病原菌处理下转录水平始终高于野生型菌处理下的转录水平(图 4B); 在抗病品系 *Mot* 中, *SlyFRG5* 转录水平规律性不明显, 但 *Fol-miR1-KO* 病原菌处理下转录水平一直高于野生型菌处理下的转录水平(图 4C)。Chop-PCR 结果进一步显示, *SlyFRG5* 的甲基化水平在根、茎、叶组织中表现一致(图 4D)。同时半定量结果显示, *Fol-WT* 侵染下, 在 MM 中 *SlyFRG5* 的转录水平极显著低于对照组, 而 *Fol-miR1-KO* 侵染下其转录水平与对照相比无明显变化(图 4E)。以上结果表明, 在尖孢镰刀菌侵染番茄的过程中, *Fol-miR1* 调控 *SlyFRG5* 基因甲基化水平上升进而在转录水平抑制其表达。

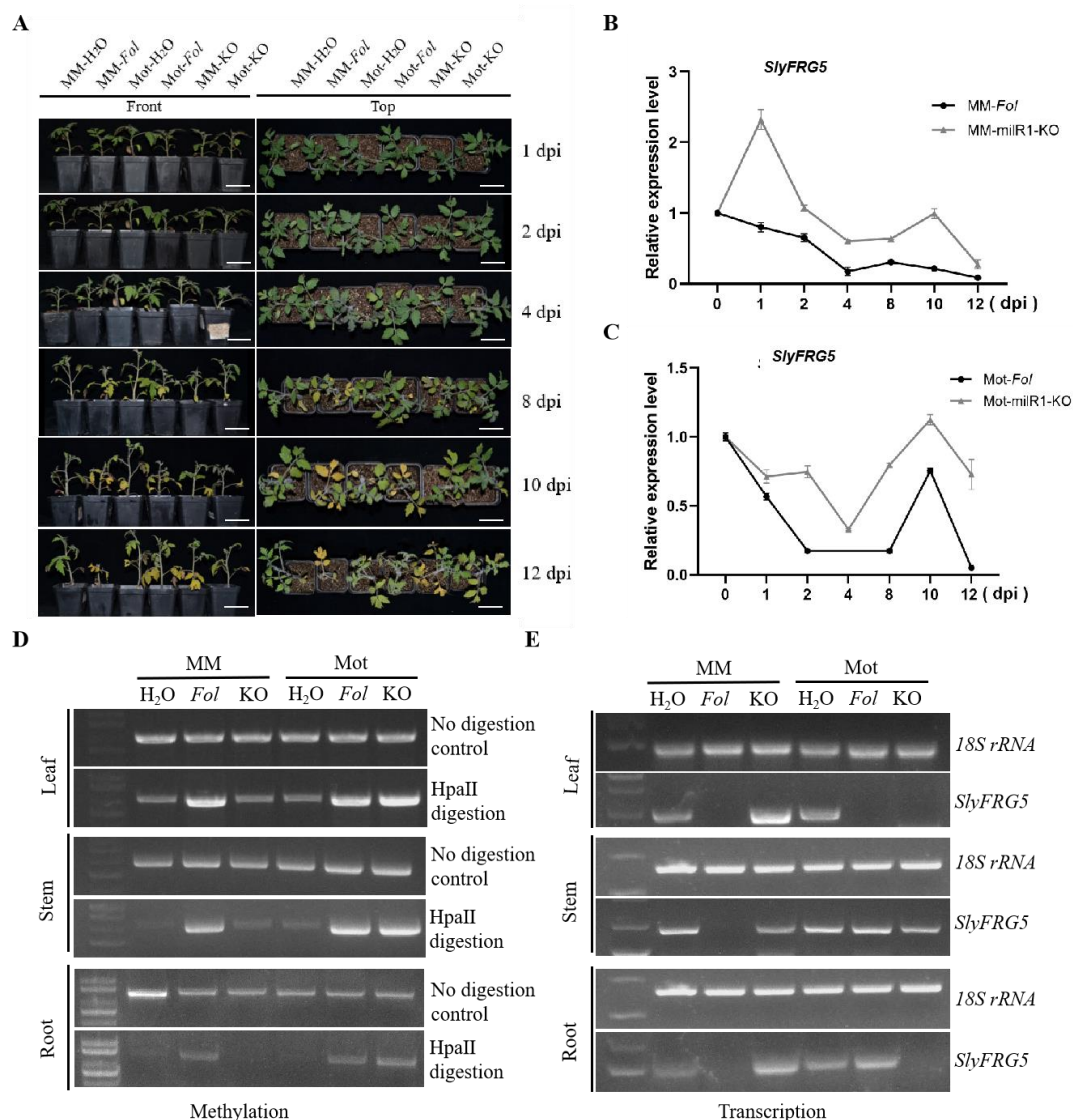


图 4 *Fol-miR1-SlyAGO4a* 通过 DNA 甲基化调控 *SlyFRG5* 表达

(A) 病原菌侵染后不同时间点番茄枯萎病表型(bar=3 cm); (B) 病原菌侵染 MM 后不同时间点 *SlyFRG5* 的表达水平; (C) 病原菌侵染 *Mot* 后不同时间点 *SlyFRG5* 的表达水平; (D) *Fol-WT* 和 *Fol-miR1-KO* 处理 7

天后 *SlyFRG5* 在不同组织中的甲基化水平; (E) *Fol*-WT 和 *Fol*-miR1-KO 处理 7 天后 *SlyFRG5* 在不同组织中的转录水平。

Figure 4 *Fol*-miR1 regulates *SlyFRG5* expression by DNA methylation

(A) Phenotype of tomato wilt disease at different time points after pathogen infection (bar=3 cm); (B) The transcription level of *SlyFRG5* at different time points after pathogen infection in MM; (C) The transcription level of *SlyFRG5* at different time points after pathogen infection in Mot; (D) Methylation level of *SlyFRG5* in different tissues at 7 dpi infection; (E) Transcriptional levels of *SlyFRG5* in different tissues at 7 dpi infection.

2.5 *SlyFRG5* 通过调控活性氧积累参与番茄抗枯萎病过程

为了进一步研究 *SlyFRG5* 在番茄抗枯萎病过程中的生物学功能, 我们分别在番茄感病品种 MM 和抗病品种 Mot 构建过表达和 CRISPR-Cas9 基因编辑遗传材料。通过 *NPTII* 基因表达、qRT-PCR 及测序分别获得 2 株 *SlyFRG5* 过表达阳性苗 OE-Line 6 和 Line 13 (附图 3A, B), 且 *SlyFRG5* 转录水平与野生型相比极显著上升(附图 3C)。获得 2 株 *SlyFRG5* 基因编辑阳性苗 KO-Line 6 和 Line 56(附图 3D, E)。其中 Line 6 在靶点 1 处发生 1 个碱基的插入, 导致终止密码子的提前产生; Line 56 在靶点 1 处发生 23 个碱基的缺失, *SlyFRG5* 转录水平与野生型相比极显著下降(附图 3F)。

用野生型 *Fol* 侵染生长三周左右的 MM、Mot 和 *SlyFRG5* 过表达及敲除番茄植株, 以水处理为阴性对照。结果表明, *Fol* 侵染后, 在感病品系 MM 中过表达 *SlyFRG5* 植株的发病表型明显轻于对照植株; 与之相反, 在抗病品系敲除 *SlyFRG5* 发病则比对照严重(图 4A)。茎秆维管束病原菌的富集量、茎秆分离再培养病原菌检测, 及病情指数统计与植株发病表型相一致(图 4A, B, C)。以上结果表明, *SlyFRG5* 作为正调控因子参与番茄抗枯萎病过程。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)积累量作为防卫信号在植物免疫中发挥重要作用。植物应答生物胁迫的免疫体系 PTI (pattern - triggered immunity)和 ETI (effector - triggered immunity)之间的相互作用是一个复杂且高度调节的过程, 涉及一系列信号事件, 包括 ROS 和 Ca^{2+} 的产生, 二者均为植物免疫反应中的关键第二信使(Yu et al., 2024)。为此, 我们检测了上述处理番茄植株内 ROS 的积累水平, 结果显示 *Fol* 侵染后, 在感病品系 MM 中过表达 *SlyFRG5* 及在抗病品系 Mot 中敲除 *SlyFRG5* 均相应提高植株内 H_2O_2 和 $\cdot O_2^-$ 的积累水平, 表明 *SlyFRG5* 水平的改变与 ROS 的积累水平存在正向关联, 并影响番茄对 *Fol* 侵染的应答(图 4D, E)。

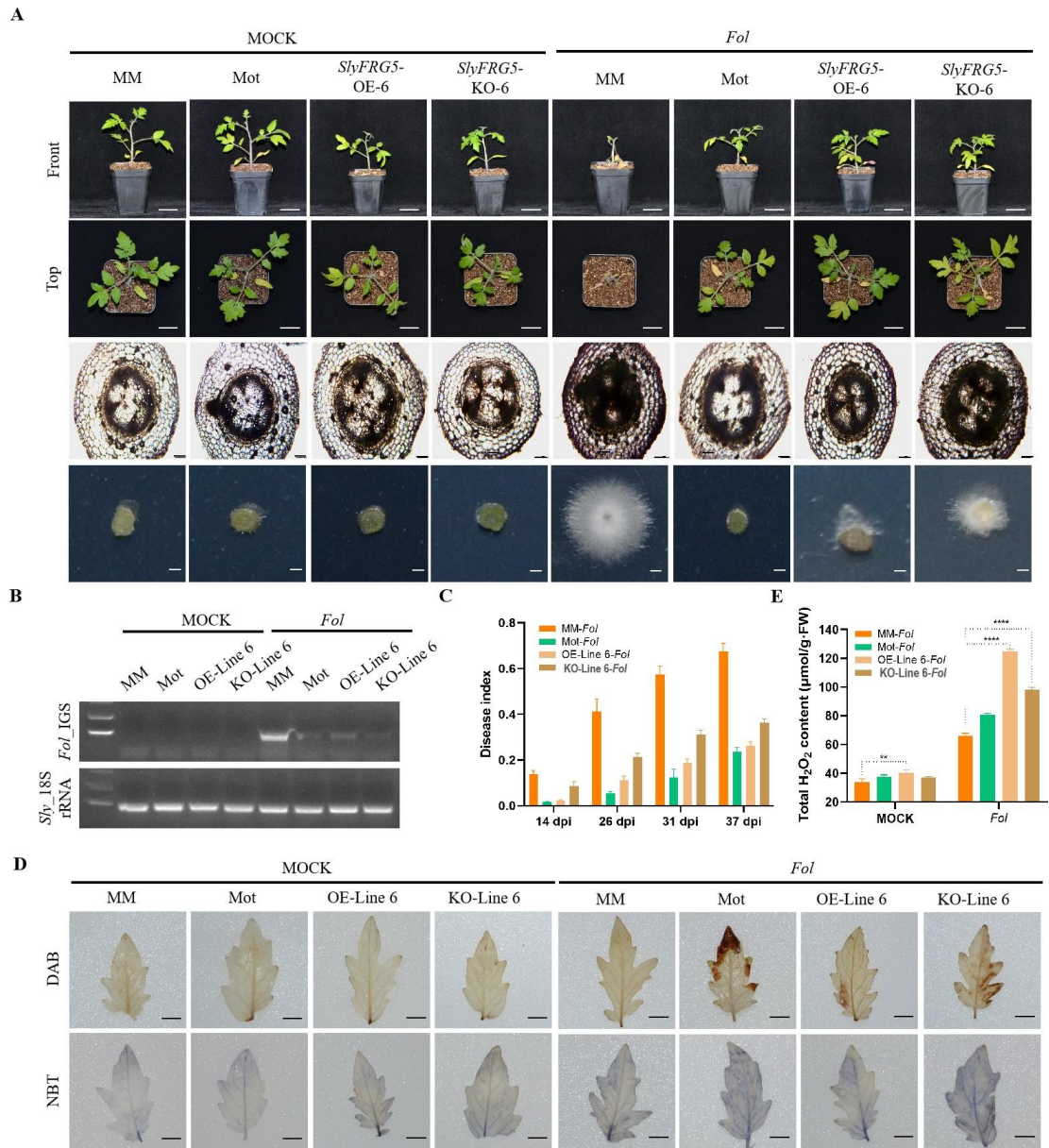


图 5 *SlyFRG5* 作为正调控因子参与番茄抗枯萎病过程

(A) 病原菌侵染后不同番茄遗传材料枯萎病表型(植株: bar=5 cm; 茎秆切片棉兰染色: bar=1 mm; 茎秆分离再培养病原菌: bar=2 mm); (B) *Fol* 侵染后番茄植株内病原菌生物量检测; (C) 病情指数统计; (D) 叶片 DAB (H_2O_2 积累)及 NBT ($\cdot O_2^-$ 积累)染色(bar=1 cm); (E) 番茄植株内 H_2O_2 的积累水平。

Figure 1 *SlyFRG5* as a positive regulatory factor participates in the process of tomato resistance to wilt disease

(A) Phenotypes of wilt disease in different tomato genetic materials after pathogen infection (Seedlings: bar=5 cm; Stains of stem slices in Medan: bar=1 mm; and isolation and cultivation of *Fol* from stems: bar=2 mm); (B) The pathogen biomass in tomato plants after *Fol* infection; (C) Disease index statistical;

(D) Leaf DAB (H_2O_2) and NBT ($\cdot\text{O}_2^-$) staining (bar=1 cm); (E) Accumulation level of H_2O_2 in tomato plants.

3 讨论

病原微生物内源 sRNA 分子可以作为效应子跨界转移到宿主细胞中, 利用宿主 AGO 蛋白沉默宿主防御基因, 实现跨界 RNAi (Wang and Jin, 2015)。植物-真菌相互作用中的跨界 RNAi 在过去十年才被报道, 并立即受到研究人员的广泛关注。本课题组前期报道 *Fol* 在侵染过程中将 sRNA 效应子 *Fol-milR1* 跨界递送至番茄宿主细胞中, 并通过挟持宿主的 *SlyAGO4a* 发挥其生物学功能(Ji et al., 2021)。基于此, 本研究进一步深入探讨 *Fol-milR1-SlyAGO4a* 介导的甲基化调控番茄抗病基因表达参与抗枯萎病的分子机制。

miRNA 与 AGO 蛋白形成沉默复合体介导靶标基因的表达, 进而参与植物免疫反应。AGO 蛋白作为沉默复合体的关键组分, 广泛参与对植物生物胁迫的应答, 调控植物免疫反应。AGO4a 蛋白作为 AGO 蛋白家族成员, 在调节植物免疫反应过程中扮演着重要角色。例如, 拟南芥 *AtAGO4* 通过 RdDM 途径调节拟南芥对丁香假单胞菌的抗性(Agorio and Vera, 2007)。在本氏烟草中, *AGO4* 通过转录后水平调控 NLR (nucleotide binding leucine-rich repeat) 蛋白介导的病毒抗性(Bhattacharjee et al., 2009)。野生烟草 *Nicotiana attenuate AGO4 (NaAGO4)* 通过调控茉莉酸生物发生和信号传导途径, 参与介导植物对尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)的抗性(Pradhan et al., 2020)。本研究分别在番茄感病品种 MM 和抗病品种 Mot 中构建了 *SlyAGO4a* 的敲除和过表达转基因材料, 发现 *Fol* 侵染 *Slyago4a* 突变体后番茄黄化枯萎程度明显轻于野生型 MM, 而 *SlyAGO4a* 过表达番茄中发病程度明显高于野生型 Mot, 表明 *SlyAGO4a* 以负调控的方式参与了番茄对 *Fol* 侵染的应答。

AGO4 是 RNAi 途径中的主要组分之一, 已被证明可以通过 DNA 甲基化参与植物抗病反应。拟南芥 *ago4-1* 突变体中许多内源性基因座(包括转座子和重复元件)的 DNA 甲基化降低, 其中 CHG 序列类型降低 2.8 倍, 不对称甲基化降低 4.5 倍(Zilberman et al., 2003)。水稻 *Osa-miR1876* 与 AGO4a 结合, 通过 DNA 甲基化调节 *NBS8R* 基因的抗病性, 且沉默 *OsaAGO4* 基因后, *miR1876* 靶标基因 *OsaNBS8R* 基因表达量上调, 从而增加对白叶枯病的抗性(Jiang et al., 2020)。此外, AGO4 与 24 nt 的 sRNA 结合后通过甲基转移酶 DRM2 指导 DNA 从头甲基化(Baulcombe, 2004; Chan et al., 2005)。为了进一步证实 *Fol-milR1* 跨界与 *SlyAGO4a* 结合调控重要抗病基因的甲基化水平, 本研究通过全基因组重亚硫酸盐测序检测 *Fol-milR1* 跨界与 *SlyAGO4a* 结合导致番茄基因组的甲基化变化情况, 鉴定出

SlyFRG5 的甲基化水平受跨界 *Fol-miR1* 的调控, 且 *SlyFRG5* 的甲基化模式主要是 CDS 区域的 CG 序列类型的甲基化。目前, 番茄中已报道了 4 个 DRM 亚家族成员, 分别是 *SlyDRM5*、*SlyDRM6*、*SlyDRM7* 和 *SlyDRM8*, 其中 *SlyDRM5* 和 *SlyDRM6* 被证实定位于细胞核(Cao et al., 2014; Guo et al., 2020)。本研究结果表明番茄甲基转移酶 *SlyCMT3* 和 *SlyDRM6* 在此过程中发挥主要作用, 暗示其可能是 *Fol-miR1-AGO4a* 介导 *SlyFRG5* 发生从头甲基化的甲基转移酶。

在番茄抗枯萎病过程中, 有许多重要基因参与了该过程(Ouyang et al., 2014; Ji et al., 2018; Gao et al., 2021; Ji et al., 2021)。本研究通过分别在番茄感病品种 MM 和抗病品种 Mot 构建 *SlyFRG5* 过表达和 CRISPR-Cas9 基因编辑遗传材料, 病原菌侵染表型结果表明 *SlyFRG5* 能够正调控对枯萎病的抗性。植物在受病原菌侵染后会引发 ROS 瞬时爆发, 其积累不仅能够抑制病原菌的定殖扩散, 还可以作为信号分子通过级联反应传递信号激活植物防御基因表达和抗病反应, 表明 ROS 对植物免疫具有正向调控作用(Baxter et al., 2014)。结合 NBT 染色、DAB 染色及过氧化氢含量测定, 证实 *SlyFRG5* 的转录水平与番茄植株中 ROS 积累水平呈正相关。

4 结论

病原菌 *Fol* 在侵染过程中将 *Fol-miR1* 跨界转运至宿主细胞, 并通过与宿主 *SlyAGO4a* 结合, 启动重要抗枯萎病基因 *SlyFRG5* 的从头甲基化, 从而破坏宿主的防御机制达到成功侵染的目的。据此我们推测 *Fol-miR1-SlyAGO4a-SlyFRG5* 三者之间形成了 RISC 模块, 通过 RdDM 路径参与病原菌 *Fol*-番茄宿主的互作过程。

作者贡献声明

王月: 完成实验、分析数据、撰写论文初稿; 李彦婷: 完成实验、分析数据; 肖颖、叶红霞、陈舒曼: 材料管理, 协助完成实验及分析数据; 欧阳寿强: 构思设计实验, 修改论文, 提供实验设备和技术支持。

参考文献

- Agorio A, Vera P (2007). ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 3778-3790.
- Baulcombe D (2004). RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.

- Baxter A, Mittler R, Suzuki N** (2014). ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* **65**, 1229-1240.
- Bhattacharjee S, Zamora A, Azhar MT, Sacco MA, Lambert LH, Moffett P** (2009). Virus resistance induced by NB-LRR proteins involves Argonaute4-dependent translational control. *Plant J* **58**, 940-951.
- Cao D, Ju Z, Gao C, Mei X, Fu D, Zhu H, Luo Y, Zhu B** (2014). Genome-wide identification of cytosine-5 DNA methyltransferases and demethylases in *Solanum lycopersicum*. *Gene* **550**, 230-237.
- Chan SW, Henderson IR, Jacobsen SE** (2005). Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet.* **6**, 351-360.
- Chan SW, Zilberman D, Xie Z, Johansen LK, Carrington JC, Jacobsen SE** (2004). RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* **303**, 1336.
- Di X, Takken FL, Tintor N** (2016). How phytohormones shape interactions between plants and the soil-borne fungus *Fusarium oxysporum*. *Front Plant Sci.* **7**, 170.
- Guo X, Xie Q, Li B, Su H** (2020). Molecular characterization and transcription analysis of DNA methyltransferase genes in tomato (*Solanum lycopersicum*). *Genet Mol Biol.* **43**, e20180295.
- Gao Y, Li SJ, Zhang SW, Feng T, Zhang ZY, Luo SJ, Mao HY, Borkovich KA, Ouyang SQ** (2021). *SlymiR482e-3p* mediates tomato wilt disease by modulating ethylene response pathway. *Plant Biotechnol J.* **19**, 17-19.
- Havecker ER, Wallbridge LM, Hardcastle TJ, Bush MS, Kelly KA, Dunn RM, Schwach F, Doonan JH, Baulcombe DC** (2010). The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *The Plant cell* **22**, 321-334.
- Henderson IR, Jacobsen SE** (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature* **447**, 418-424.
- Huang W, Xian Z, Hu G, Li Z** (2016) SIAGO4A, a core factor of RNA-directed DNA methylation (RdDM) pathway, plays an important role under salt and drought stress in tomato. *Mol Breed* **36**, 28.
- Ji HM, Mao HY, Li SJ, Feng T, Zhang ZY, Cheng L, Luo SJ, Borkovich KA, Ouyang**

SQ (2021). *Fol*-miR1, a pathogenicity factor of *Fusarium oxysporum*, confers tomato wilt disease resistance by impairing host immune responses. *New Phytol* **232**, 705-718.

Ji HM, Zhao M, Gao Y, Cao XX, Mao HY, Zhou Y, Fan WY, Borkovich KA, Ouyang SQ, Liu P (2018). *FRG3*, a target of slmiR482e-3p, provides resistance against the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* in tomato. *Front Plant Sci* **25**, 9:26.

Jiang G, Liu D, Yin D, Zhou Z, Shi Y, Li C, Zhu L, Zhai W (2020). A rice NBS-arc gene conferring quantitative resistance to bacterial blight is regulated by a pathogen effector-inducible miRNA. *Mol Plant* **13**, 1752-1767.

Law JA, Jacobsen SE (2010a). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* **11**, 204-220.

Law JA, Jacobsen SE (2010b). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* **11**, 204-220.

Li C, Schillmiller AL, Liu G, Lee GI, Jayanty S, Sageman C, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Yagi K, Kobayashi Y, Howe GA (2005). Role of beta-oxidation in jasmonate biosynthesis and systemic wound signaling in tomato. *Plant Cell* **17**, 971-986.

刘缙, 田花丽, 王亚红, 郭蔼光 (2010). 黄瓜转新型抗菌蛋白基因 *GNK2-1* 及其抗枯萎病的研究. *植物学报* **45**, 411-418.

Matzke MA, Mosher RA (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat Rev Genet* **15**, 394-408.

Ouyang S, Park G, Atamian HS, Han CS, Stajich JE, Kaloshian I, Borkovich KA (2014). MicroRNAs suppress NB domain genes in tomato that confer resistance to *Fusarium oxysporum*. *PLoS Pathog* **10**, e1004464.

Pradhan M, Pandey P, Baldwin IT, Pandey SP (2020). Argonaute4 modulates resistance to *Fusarium brachygibbosum* infection by regulating Jasmonic Acid signaling. *Plant Physiol* **184**, 1128-1152.

Srinivas C, Nirmala Devi D, Narasimha Murthy K, Mohan CD, Lakshmeesha TR, Singh B, Kalagatur NK, Niranjana SR, Hashem A, Alqarawi AA, Tabassum B, Abd Allah EF, Chandra Nayaka S (2019). *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: Biology to diversity– A review. *Saudi J Biol Sci* **26**, 1315-1324.

Wang B, Sun Y, Song N, Zhao M, Liu R, Feng H, Wang X, Kang Z (2017). *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* microRNA-like RNA 1 (*Pst*-miR1), an important pathogenicity factor of *Pst*, impairs wheat resistance to *Pst* by suppressing the wheat pathogenesis-related 2 gene. *New Phytol* **215**, 338-350.

Wang M, Weiberg A, Jin H (2015). Pathogen small RNAs: a new class of effectors for pathogen attacks. *Mol Plant Pathol* **16**, 219-223.

Weiberg A, Wang M, Lin FM, Zhao H, Zhang Z, Kaloshian I, Huang HD, Jin H (2013). Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science* **342**, 118-123.

Wu L, Zhou H, Zhang Q, Zhang J, Ni F, Liu C, Qi Y (2010). DNA methylation mediated by a microRNA pathway. *Mol Cell* **38**, 465-475.

Yu A, Lepère G, Jay F, Wang J, Bapaume L, Wang Y, Abraham AL, Penterman J, Fischer RL, Voinnet O, Navarro L (2013). Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in *Arabidopsis* antibacterial defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 2389-2394.

Yu XQ, Niu HQ, Liu C, Wang HL, Yin W, Xia X (2024). PTI-ETI synergistic signal mechanisms in plant immunity. *Plant Biotechnol J* **22**, 2113-2128.

Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE (2003). ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**, 716-719.

Zilberman D, Cao X, Johansen LK, Xie Z, Carrington JC, Jacobsen SE (2004). Role of *Arabidopsis* ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation triggered by inverted repeats. *Curr Biol* **14**, 1214-1220.

SlyFRG5 methylation level activated by *Fol*-miR1 mediates immune response against tomato wilt disease

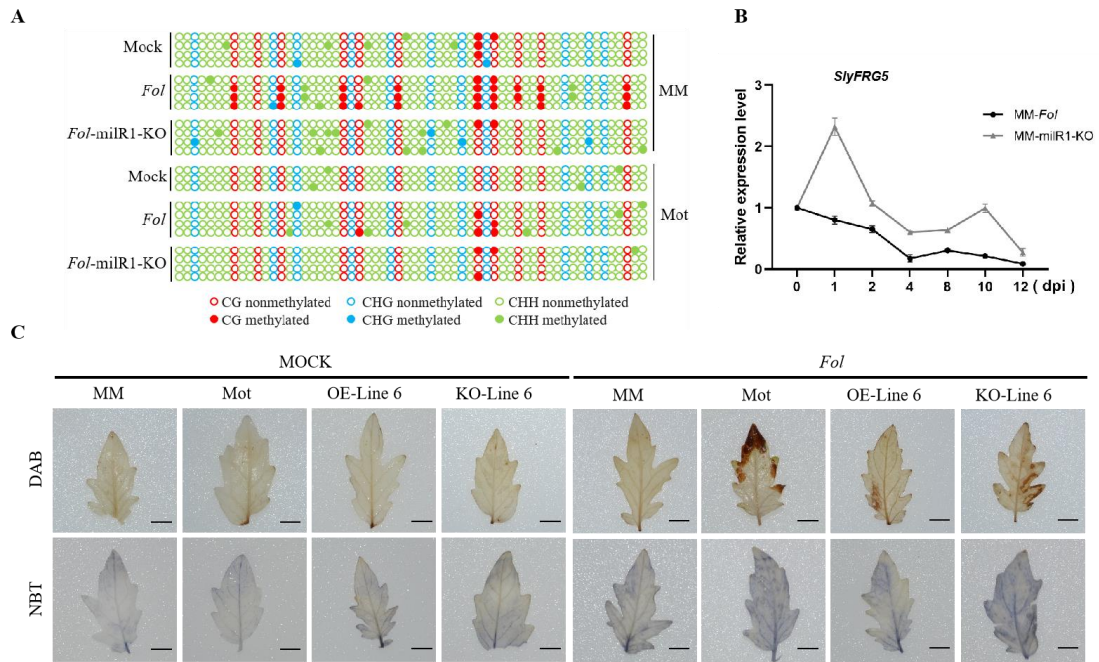
Yue Wang[†], Yanting Li[†], Yin Xiao, Hongxia Ye, Shuman Chen, Shouqiang Ouyang*
School of Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004

INTRODUCTION: Tomato wilt disease, caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (*Fol*), is a soil borne fungal disease that causes significant economic losses to global tomato agricultural production. The molecular mechanism of pathogen sRNA cross-border regulation of host DNA methylation mediated tomato resistance to wilt disease is still unclear. Here, we illustrate that *SlyFRG5* methylation level activated by *Fol*-miR1 mediates immune response against tomato wilt disease.

RATIONALE: The latest research shows that sRNA derived from pathogens can serve as novel effectors for cross-border participation in host-pathogen interactions. Our previous research documented that *Fol*-miR1 was transferred horizontally into host cells as an effector. *Fol*-miR1 repressed the expression of a resistant gene *SlyFRG4* in tomato, as well as binded to SlyAGO4a leading to interfere with the host immune system to achieve successful infection. Therefore, this research further determines whether transmission of *Fol*-miR1 into tomato causes DNA methylation in the tomato genome and elucidate other aspects of the molecular mechanism involving the action of *Fol*-miR1.

RESULTS: The results indicate that SlyAGO4a negatively participates in the resistance to tomato wilt disease. The methylation level of *Solyc02g081370* (*SlyFRG5*) was identified to be directly associated with *Fol*-miR1 using whole genome methylation sequencing and molecular biology methods. *SlyFRG5* loss-of-function alleles created using CRISPR/Cas9 in resistant cultivar tomato Motelle exhibited enhanced disease susceptibility to *Fol*, further supporting the idea that *SlyFRG4* is essential for tomato wilt disease resistance. *SlyFRG5* contributed wilt disease resistance by regulating the accumulation of host ROS in tomato.

CONCLUSION: Combining previous research, we concluded that, during the infection *Fol*, *Fol*-miR1 was transferred into host cells to hijack SlyAGO4a which leads to methylation a *Fusarium* disease resistant gene *SlyFRG5*. This study analyzed how the *Fol*-miR1-SlyAGO4a-*SlyFRG5* functional module mediated tomato resistance to wilt disease, which will provide a new ideas for exploring the cultivation and quality improvement of tomato resistance to *Fusarium* disease.



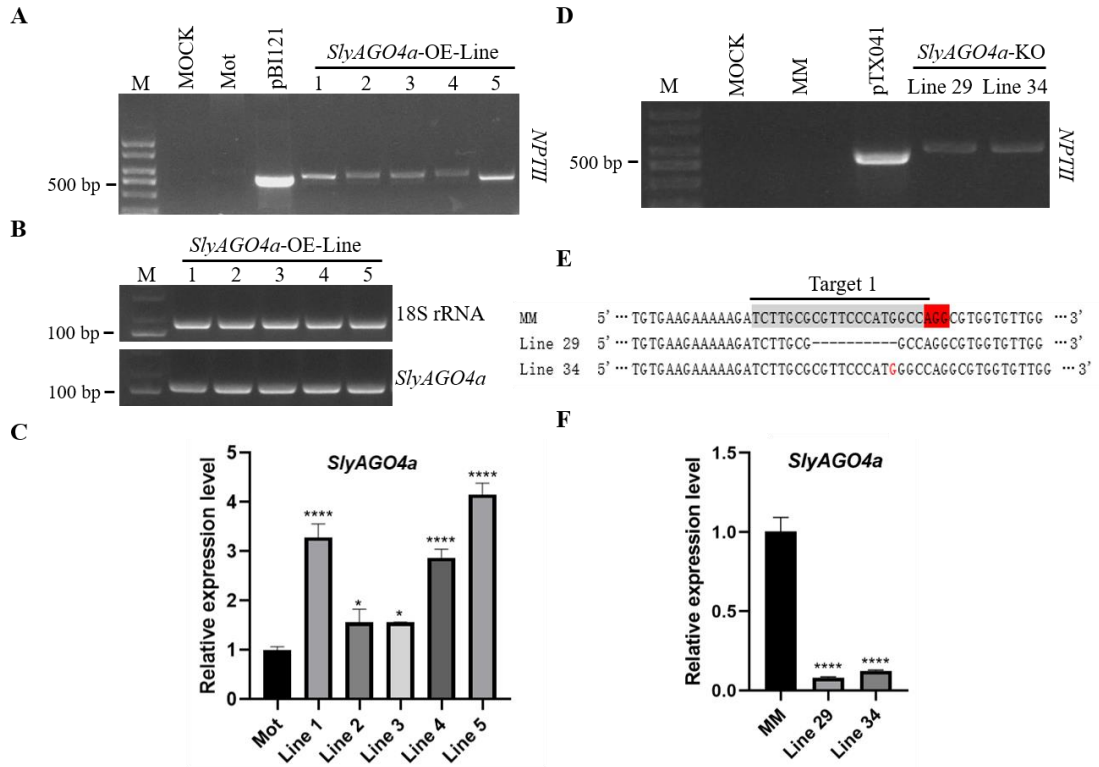
The *Fol-miR1-SlyAGO4a-SlyFRG5* functional module mediated tomato resistance to wilt disease.

(A) Distribution of methylation type in the CDS (Partial region) region of *SlyFRG5*; (B) The transcription level of *SlyFRG5* at different time points after pathogen infection in MM; (C) Leaf DAB (H_2O_2) and NBT ($\bullet O_2^-$) staining (bar=1 cm).

Keywords tomato wilt disease, DNA methylation, disease resistant genes, molecular mechanism of disease resistance

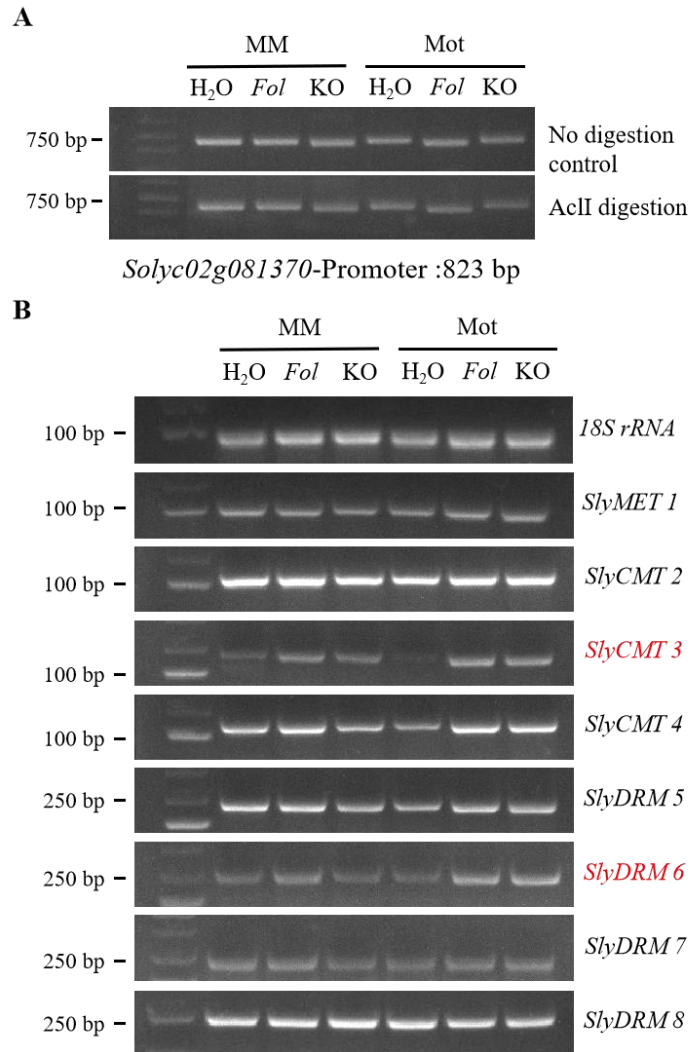
通讯作者简介

欧阳寿强, 博士, 浙江师范大学生命科学学院教授, 博士生导师。主要从事植物-病原物互作分子调控机制研究。主持国家自然科学基金项目、江苏省自然科学基金项目、浙江省自然科学基金项目等多项。以第一作者或通讯作者在 *New Phytol*、*Plant Biotechnol J*、*PLoS Pathog* 等国际学术期刊发表 SCI 论文 10 余篇。



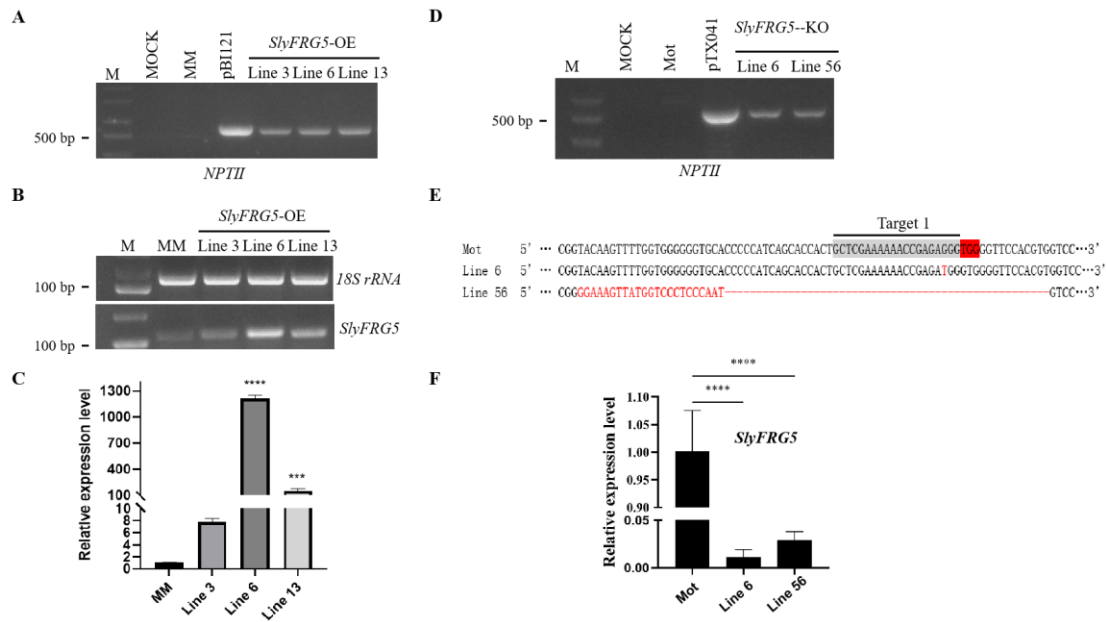
附图 1 *SlyAGO4a*-OE/CRISPR-Cas9 番茄遗传材料的构建 A: *SlyAGO4a*-OE 遗传材料 Kan(*NPT II*)抗性鉴定; B: 半定量 PCR 鉴定 *SlyAGO4a*-OE 遗传材料; C: qRT-PCR 鉴定 *SlyAGO4a*-OE 遗传材料; D: *SlyAGO4a*-CRISPR-Cas9 遗传材料 Kan(*NPT II*)抗性鉴定; E: 测序鉴定 *SlyAGO4a*-CRISPR-Cas9 遗传材料; F: qRT-PCR 鉴定 *SlyAGO4a*-CRISPR-Cas9 遗传材料。

Figure S1 Constructions of *SlyAGO4a*-OE/CRISPR-Cas9 genetic lines A: Identifying Kan(*NPT II*)in *SlyAGO4a*-OE lines; B: Semi-quantitation RT-PCR_to identify *SlyAGO4a*-OE lines; C: Quantitation RT-PCR_to identify *SlyAGO4a*-OE lines; D: Identifying Kan(*NPT II*)in *SlyAGO4a*-CRISPR-Cas9 lines; E: Semi-quantitation RT-PCR_to identify *SlyAGO4a*-CRISPR-Cas9 lines; F: Quantitation RT-PCR_to identify *SlyAGO4a*-CRISPR-Cas9 lines.



附图 2 参与 *SlyFRG5* 在 CDS 区域的甲基化的关键基因 A: *SlyFRG5* 在启动子区域的甲基化; B: 番茄基因组甲基化相关基因转录水平检测。红色字体标记为变化显著的基因。

Figure S2 Key genes involved in the methylation of *SlyFRG5* in the CDS region A: Methylation of *SlyFRG5* in the promoter region; B: Transcription levels of genes related to methylation in tomato genome. The transcription level of genes highlighted by red font are changed significantly.



附图 3 *SlyFRG5* 过表达/CRISPR-Cas9 遗传材料构建 A: *SlyFRG5*-OE 遗传材料 Kan(*NPT II*)抗性鉴定; B: 半定量 PCR 鉴定 *SlyFRG5*-OE 遗传材料; C: qRT-PCR 鉴定 *SlyFRG5*-OE 遗传材料; D: *SlyFRG5*-CRISPR-Cas9 遗传材料 Kan(*NPT II*)抗性鉴定; E: 测序鉴定 *SlyFRG5*-CRISPR-Cas9 遗传材料; F: qRT-PCR 鉴定 *SlyFRG5*-CRISPR-Cas9 遗传材料。

Figure S3 Constructions of *SlyFRG5*-OE/CRISPR-Cas9 genetic lines A: Identifying Kan(*NPT II*)in *SlyFRG5*-OE lines; B: Semi-quantitation RT-PCR_to identify *SlyFRG5*-OE lines; C: Quantitation RT-PCR_to identify *SlyFRG5*-OE lines; D: Identifying Kan(*NPT II*)in *SlyFRG5*-CRISPR-Cas9 lines; E: Semi-quantitation RT-PCR_to identify *SlyFRG5*-CRISPR-Cas9 lines; F: Quantitation RT-PCR to identify *SlyFRG5*-CRISPR-Cas9 lines.

附表 1 本研究使用的引物。

引物名称	引物序列(5'→3')
AGO4a-oe-pbi121-F	GAGAACACGGGGACTCTAGAATGGCTGAAGAAGAAAC AAATG
AGO4a-oe-pbi121-R	ACCACCCGGGGATCCTCTAGATTAGCAAAAGAACATAGA ACTGG
Sol081370- pbi121-F	ACGGGGGACTCTAGAGGATCCATGGATAATTTACCTAA ATGTGG
Sol081370- pbi121-R	GGACTGACCACCCGGGGATCCGAGACGAGACAGAACA AGAA
Sol081370-Crispr-F	GAATCTAACAGTGTAGTTTTGGCTCGAAAAACCGAGAG GGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
Sol081370-Crispr-R	GCTATTTCTAGCTCTAAAACCGCCACTCACACACAAGAG CCCAAACCTACACTGTTAGATTC

Soly081370-q-F	TGAGAGCAGTGGCAAAGACA
Soly081370-q-R	ACAAGCCAAACGTCTTTCTCT
Sol081370-chop-F	TGGTTGGACTTTACGTGGG
Sol081370-chop-R	GCCAAACGTCTTTCTCTTCAATC
Sol370promoter-chop-F	ACTTGGGTCTTGTCTTTCTTCC
Sol370promoter-chop-R	ATGGAGCTGATGGGTTCTGC
Sol080960-chop-F	AAGAAGAGAGGTAGGCCTAG
Sol080960-chop-R	CGAACTACTCATCCATTACC
Sol021280-chop-F	CTTTGGATGGGCTTCACTCC
Sol021280-chop-R	AATGTGTCTCCCCATTGTCC
Sol058450-chop-F	CCAATTTGTCTCGAATTCCTCA
Sol058450-chop-R	CGTCAACTTGTCTGAATGAATATG
Sol100060-chop-F	TGACGGGTCAATGTGCTCAA
Sol100060-chop-R	TAACGGCAGGTCCAGAGTTTT
Sol101110-chop-F	GAGGGTGTGCCAAGGCCATTA
Sol101110-chop-R	AGTTCGGGGTCTGATGACAGG
Sol081520-chop-F	TTGTGATGTGGGGATTGGTG
Sol081520-chop-R	ACTTCACCTCTGCTCCTCAC
Sol103570-chop-F	GGTACAAGTGAGGGAGCATC
Sol103570-chop-R	CTCCAAAGCAGTGTCTAGTTC
Sol100960-chop-F	TGGAGGGTATGACAACCGAG
Sol100960-chop-R	TCTCCTAAAATCCCATAGCC
Sol035130-chop-F	GGTGGTGGTGAACCTTGAC
Sol035130-chop-R	TATCACTCCATCCTGAACCC
Sol008040-chop-F	ACATGCCCCATACTTGTCCC
Sol008040-chop-R	CTCTGTTGATGACAAATGGGCT
Sol099590-chop-F	AGTCAAATATTGTATTAGCGCACA
Sol099590-chop-R	CCCTGAACTGGAGACGGAAC
Sol071690-chop-F	GTTGTAAGGGTTGTATAGGG
Sol071690-chop-R	ACTTTCCTTGCTCCATCTTC
Sol087710-chop-F	GCCTCTGTCCCTCACTCCA
Sol087710-chop-R	CAGCAGCCGACTCAGACAAT
Sol005780-chop-F	CTTTCCTCCTCTACTTTCCG
Sol005780-chop-R	GCTAGGTTTACATGATTGTCATC
Sol081530-chop-F	CTGATTCCCCTGCGAAGGAT
Sol081530-chop-R	GTTGCAATGGCGCTAATCCC
Sol091130-chop-F	GGCCTCAAATCCACTTCTTCC
Sol091130-chop-R	ACCTTGTTGAAGTAACAACCTCAT
Sol046770-chop-F	ACGTTAGCCAGCTTTCAGGT
Sol046770-chop-R	ACAACCGATAAATGAGCCCC
Sol099760-chop-F	GCTTCCTAACTAATGAGGATG
Sol099760-chop-R	TTAGCCACATTTCCCTCTCC
Sol099770-chop-F	GGATATTTTGGTACTACCTAC
Sol099770-chop-R	CTACCTTCCAACGATACATG
Ago4a-qpcr-F	TGCCCATCTTGCTGCTACTC
Ago4a-qpcr-R	AAGCATGAAGGCGTTACGCG
Ago4a-oe-qpcr-F	GGACTACCCAGAGTGGCTTG
Ago4a-oe-qpcr-R	AGCACACGTTTTGCCTTTGC
81370-oe-qpcr-F	GCACACTGTAAGAAGAAGTTAGC
81370-oe-qpcr-R	AATGTCCTTTGCCACTGCTCTC
Sol081370-BSP-Fm	TTTTATTGTAATGGTTGGATTTTA
Sol081370-BSP-Rm	TTAATCTAACTTATTCTTCCCTTAA
SIMET1-qpcr-F	TGCACGTTCTCAAGGTTTCC

SIMET1-qpcr-R	ATGCCAAAGGAGGTGGAACA
SICMT3-qpcr-F	ATCGGCGAATCGTCTGGTC
SICMT3-qpcr-R	GTCCGAATCATGTTGGCAATTT
SICMT2-qpcr-F	TGGTGGAGAACAATGAGCCAA
SICMT2-qpcr-R	ACGCTTCCCAACAACCCATC
SICMT4-qpcr-F	AGTCCCACGTAGAAAGGGAG
SICMT4-qpcr-R	AAAGGCACAGTCAGGAACCA
SIDRM7-qpcr-F	GCTCTTCCCAGTACAACGAAA
SIDRM7-qpcr-R	GTGCTTCTGGACCACATCTC
SIDRM6-qpcr-F	GTTGCGATGTGGAGGCAAG
SIDRM6-qpcr-R	ACTAATGGAGGGTTCCAGCG
SIDRM5-qpcr-F	GTGATGGGGAGGCAAGCTC
SIDRM5-qpcr-R	TAATGCAGGGCTCCAGGTGA
SIDRM8-qpcr-F	CAGTGAGTGATGCCCAGGGGT
SIDRM8-qpcr-R	TGTTCTGGCCCTACAGCTGCC
SIACx1b-qPCR-F	ATGCTGATGAGGGTTGCACA
SIACx1b-qPCR-R	CAAACAGCCCGAGACAAAGC
SIAOC-qPCR-F	TACTTCGGCGATTACGGTCA
SIAOC-qPCR-R	TGCAAATATGCCGGATCCAC
Fol-IGS1049	TGCGATTTGGACGAGATATGTG
Fol-IGS1050	ATTTGCCTACCCTGTACCTACC
