

橡胶树白粉菌保守效应蛋白致病机制研究

刘鑫雨, 何礼娟, 殷金瑶, 林春花, 李 潇*, 缪卫国*

1. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 2. 热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海南三亚 572024

摘 要: 白粉菌可侵染多种重要作物, 而橡胶树白粉菌 (*Erysiphe quercicola*) 引起的橡胶树白粉病严重威胁天然橡胶产业。为探究橡胶树白粉菌致病分子机制, 前期对橡胶树白粉菌 HO-73 菌株进行基因组测序分析, 预测出 133 个潜在的效应蛋白 (candidate secreted effector proteins, CSEPs), 这类 CSEPs 仅在白粉菌群中具有同源蛋白。本研究鉴定了其中一个在橡胶树白粉菌中较为保守的效应蛋白—CSEP02974。利用酵母系统测定信号肽功能的试验表明, CSEP02974 为分泌蛋白。利用农杆菌介导的本氏烟草转化, 瞬时表达 CSEP02974-GFP, 并进行烟草中的定位分析, 结果显示 CSEP02974 是一个细胞质效应蛋白。进一步在拟南芥表达 CSEP02974 可抑制几丁质和 flg22 诱导的活性氧 (ROS) 爆发和胼胝质积累, 表明 CSEP02974 是白粉菌抑制植物免疫的毒性因子。通过喷施外源双链 RNA, 使橡胶树白粉菌中 CSEP02974 基因沉默。致病性分析表明, 沉默该基因会导致病菌扩展侵染受抑制。综上, 本研究鉴定到保守的橡胶树白粉菌致病因子, 为进一步了解橡胶树-白粉菌的相互作用机制提供新的线索。

关键词: 橡胶树; 白粉菌; 效应蛋白

中图分类号: S432.1 文献标志码: A

Study on the Pathogenic Mechanism of a Conservative Effector Protein in Rubber Tree Powdery Mildew

LIU Xinyu, HE Lijuan, YIN Jinyao, LIN Chunhua, LI Xiao*, MIAO Weiguo*

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education, Sanya, Hainan 572024, China

Abstract: Powdery mildew (*Erysiphe quercicola*) can infect a variety of economically important crops, and seriously threatens the rubber industry. In order to explore the molecular mechanism of the pathogenesis, the genome of *E. quercicola* (HO-73 strain) was sequenced and 133 candidate secreted effector proteins (candidate secreted effector proteins, CSEPs), which have homologous proteins only in other powdery mildew, were identified. An effector protein, CSEP02974, which is conserved in powdery mildew, was identified. The function of the signal peptide in secreted protein was assayed using the yeast secretion system. CSEP02974 was a cytoplasmic effector protein verified by using the *Agrobacterium*-mediated transient expression system and localization analysis. Further, CSEP02974 expression in *Arabidopsis thaliana* inhibited chitin- or flg22-induced callose deposition and ROS accumulation. The result suggests that CSEP02974 is a virulence factor in suppressing plant immunity. CSEP02974 was silenced by spraying exogenous double-stranded RNA on *E. quercicola*. Pathogenicity analysis showed that this gene silencing led to inhibitions of extended growth and infection. In conclusion, this study identified a key *E. quercicola* virulence factor, which would provide an important clue on the mechanism of interaction between rubber tree and *E. quercicola*.

Keywords: rubber tree; powdery mildew fungus (*Erysiphe quercicola*); effector protein

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.09.013

收稿日期 2023-12-22; 修回日期 2024-01-28

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31960518)。

作者简介 刘鑫雨 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。*通信作者 (Corresponding author): 李 潇 (LI Xiao), E-mail: 993773@hainau.edu.cn; 缪卫国 (MIAO Weiguo), E-mail: miao@hainanu.edu.cn。

病原菌与植物的互作过程中, 要突破植物的免疫系统, 才能够实现成功侵染。在这个过程中, 病原相关分子模式(pathogen-associated molecular pattern) 往往被植物细胞表面的模式识别受体(pattern recognition receptor) 识别, 激发保守分子模式触发的免疫(PAMP-triggered immunity)^[1]。然而, 很多病原菌可分泌效应蛋白(effector proteins) 抑制植物的免疫, 效应蛋白是病原菌致病的关键毒性因子, 大部分植物真菌或卵菌的效应蛋白在分泌后可作用于侵入点的植物细胞, 影响植物细胞对病原的识别, 抑制胞内免疫信号途径, 效应蛋白的核心功能是抑制植物免疫, 促进自身侵染^[2]。

白粉菌是一种活体营养型专性寄生真菌, 在与宿主互作的过程中, 会穿透宿主细胞壁形成吸器在宿主细胞内获得水分和营养, 同时产生大量的效应蛋白分泌至宿主细胞内, 从而促进真菌的增殖和侵染^[3]。目前已针对大小麦白粉菌和侵染豆科作物、葫芦科作物、葡萄、拟南芥等的白粉菌开展了寄主-病原互作机理研究。目前已预测到白粉菌特有的一类候选效应蛋白可能是侵染寄主过程中的重要武器。预测到的效应蛋白(candidate secreted effector proteins, CSEPs) 需符合以下3个特征: (1) 编码蛋白N端存在预测信号肽(signal peptide) 序列; (2) 信号肽剪切位点后无跨膜域结构; (3) 白粉菌外的物种中无同源序列^[4]。解析CSEPs的功能将深入了解病原菌致病机理, 并促进病害防控。但很多CSEPs的功能仍是未知的。

对于一些专性寄生真菌, 常利用寄主诱导的基因沉默(host-induced gene silencing, HIGS) 来研究效应蛋白功能。HIGS 需要构建表达沉默RNA的转基因植物, 而有些寄主植物难以实现转基因, 因此限制了HIGS的应用范围。喷施诱导基因沉默(spraying-induced gene silencing, SIGS) 技术通过喷施外源RNA传递到植物、病原菌等生物体表面, 进而沉默生物体关键基因^[5], SIGS具有与HIGS类似的功能, 但不依赖于作物基因转化, 应用范围更广。对于专性寄生真菌, 包括橡胶树白粉菌(*Erysiphe quercicola*)^[6]、葡萄白粉菌(*E. necator*)^[7]、葫芦科白粉菌(*E. cucurbitacearum*)^[8]、大豆锈病病原菌(*Phakopsora pachyrhizi*)^[9], 已应用SIGS进行真菌基因沉默, 并展示出良好的沉默效果。

橡胶树(*Hevea brasiliensis*) 为多年生木本植

物, 是天然橡胶的主要来源^[10], 但橡胶树白粉菌侵染引起白粉病连年爆发, 导致橡胶产量下降^[11]。在前期工作中, 对橡胶树白粉菌全基因组完成了测序, 从中预测到133个CSEPs^[12], 但对这些CSEPs在侵染中发挥的功能几乎是未知的。本研究对其中一个保守的效应蛋白CSEP02974开展致病功能研究, 该效应蛋白在其他7个白粉菌中均有同源基因, 因此这类蛋白可能是多个白粉菌的致病因子。酵母蔗糖转化酶分泌试验证明了CSEP02974信号肽具有引导蛋白分泌的活性。烟草定位试验表明CSEP02974可能在植物中被转运至植物细胞内。在拟南芥中表达该效应蛋白可以抑制植物免疫。由于橡胶树难以实现转基因, 无法通过HIGS进行基因沉默, 因此采用适用范围更广的SIGS进行研究。基因沉默和致病性测试显示, 该效应蛋白为白粉菌致病所需。本研究鉴定到一个橡胶树白粉菌致病的关键效应蛋白, 为进一步研究橡胶树-白粉菌互作分子机理提供良好基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试的本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)、橡胶树热研7-33-97、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 由本实验室提供。在橡胶树叶片古铜期进行致病性试验, 在烟草、拟南芥第4~6周时开展农杆菌介导的瞬时表达试验。

1.1.2 质粒及菌株 橡胶树白粉菌HO-73菌株接种于橡胶树叶培养, 由本实验室保存、提供; 酵母YTK12菌株感受态由本实验室保存提供; pBin-GFP载体为本实验室构建保存; 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.1.3 试剂 植物总RNA提取试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司, 逆转录试剂盒 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis kit 和限制性内切酶购自Thermo Fisher Scientific, 高保真DNA聚合酶试剂盒 Prime STAR HS DNA Polymerase (Cat.R040A) 购自TaKaRa公司, 通用型DNA纯化回收试剂盒 (Cat.DP204) 购自天根生化科技(北京)有限公司, 质粒提取试剂盒 (Cat.C201-01)、同源重组试剂盒 ClonExpress II One Step Cloning Kit (Cat.C112-01) 购自诺维赞(南京)

生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆及载体构建 利用本实验室发表的橡胶树基因组数据及注释文件查找 CSEP02974 基因的完整序列，通过 Premier 5.0 软件设计基因扩增引物 CSEP02974-F/R（表 1）。PCR 反应程序：95 ℃预变性 5 min；95 ℃变性 30 s，60 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 50 s，32 个循环，72 ℃再延伸 10 min，4 ℃待机。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后，将含有目的基因的条带用琼脂糖凝胶回收试剂盒纯化。将回收产物与 pBin-GFP 载体连

接，转化 DH5α 感受态细胞后进行 Sanger 测序。使用限制性内切酶 *Bam*H I 对 pBin-GFP 载体进行酶切，设计引物 pBin-CSEP02974-F/R、pBin-CSEP-02974^{ΔSP}-F/R、SP_{PR1}-CSEP02974-GFP-F（表 1），扩增 CSEP02974 基因，通过同源重组构建 pBin-CSEP02974-GFP、pBin-CSEP02974^{ΔSP}-GFP、SP_{PR1}-CSEP02974-GFP 载体。利用 Lti6b-F/R 引物从拟南芥 cDNA 中扩增 Lti6b（At3g05890），并克隆至 35S-RFP 表达载体上，完成 Lti6b-mRFP 表达载体的构建。所有载体均通过 PCR 检测和生工生物工程（上海）股份有限公司测序验证其准确性。

表 1 本研究所用引物序列
Tab. 1 Primer sequences in this study

引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′）Primer sequence (5′-3′)
CSEP02974-F	ATGTGTTATGTCCCAAC
CSEP02974-R	GAAATTATAAGCATATCCTTC
pBin-CSEP02974-F	CCCCCGGGGTCGACGGATCCATGTGTTATGT
pBin-CSEP02974-R	CGCCCTTGCTCACCATGGATCCGAAATTATAAG
pBin-CSEP02974 ^{ΔSP} -F	ACCCCGGGGTCGACGGATCCATGTCTCCTTTA
SP _{PR1} -CSEP02974-GFP-F	GGGGTCGACGGATCCATGAATTTTACTGGCTATTCTCGATTTTAAATCGTCTTTGTAGCTCTTGTAGG TGCTTCTCCTTAA
CSEP02974-dsRNA-F	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGATGGTAACCAACGGT
CSEP02974-dsRNA-R	TAATACGACTCACTATAGGGGATCACACCAGAACCACGCATAAC
qRT-CSEP02974-F	CGCTCGTATTTACAACAT
qRT-Eq-EF1a-R	GTCGTAGTGGTTTGTCTAG
Lti6b-F	ATGAGTACAGCCACTTTTCGTA
Lti6b-R	CTTGGTGATGATATAAAGAGC

1.2.2 农杆菌介导的本氏烟草和拟南芥转化 将构建的植物表达载体转入农杆菌 GV3101 的感受态中。在含有 50 μg/mL 卡那霉素（kanamycin）和 25 μg/mL 利福平（rifampicin）的 LB 培养基中 28 ℃振荡培养 2~3 d 后离心（5000 r/min, 5 min）菌液 3 次，用氯化镁缓冲液（10 mmol/L MES, 10 mmol/L MgCl₂, 100 μmol/L AS）^[13]悬浮，并将 OD₆₀₀ 调至 0.6，室温静置 2 h 后用注射器将菌液接种至生长 4~6 周的本氏烟叶背面。参考蘸花法^[14]在 LB 培养基中培养含有 CSEP02974-GFP 质粒的土壤杆菌，于 28 ℃恒温摇床 5000 r/min 培养 48 h。然后以相同转速离心 10 min，收集菌体。参考蘸花法^[14]配置转化悬浮液，确保土壤杆菌悬浮液的 OD₆₀₀ 大于 0.6。从培养 4 周龄的野生型 Col-0 拟南芥中选择正常生长和发育的植株，将修剪的拟南芥植株花苞浸泡在土壤杆菌悬浮液中，

5 min 后密封，暗箱处理 24 h。培养转化后的拟南芥植株至 8 周龄，于 37 ℃烘箱烘 48 h。加热溶解 1/2MS 固体培养基，每 100 mL 中加入 50 μL 潮霉素溶液，倒入平板中。拟南芥种子处理：75%乙醇浸泡 15 s，去离子水漂洗，2%次氯酸钠溶液中浸泡 2 min，再次漂洗，置于 1/2MS 培养基中无菌萌发。筛选经萌发的拟南芥幼苗，按营养土与蛭石比例 3：1 移栽，植株成熟后提取 DNA 验证转化子，选择 T₂ 代转基因植株进行后续试验。

1.2.3 鲁米诺法（Luminol）测定拟南芥叶片活性氧（ROS）的变化 在 96 孔板中加入 90 μL ddH₂O 和 10 μL 鲁米诺过氧化物酶缓冲液（200 μmol/L luminol, 10 μg/mL 过氧化物酶）。向 96 孔板中加入拟南芥叶盘（约 10 000 个），并加入 10 μmol/L (GlcNAc)₇。用酶标仪检测荧光强度的变化情况（发射波长为 530 nm，激发波长为 400 nm），以

荧光强度表示 ROS 迸发水平

1.2.4 拟南芥叶片胼胝质积累测定 本氏烟草叶片成功注射农杆菌 2 d 后, 摘取叶片放于脱色液 (乙醇: 乙酸=3: 1) 中脱色至透明, 透明叶片用 0.01% 苯胺蓝溶液 (苯胺蓝溶于 0.067 mol/L K_2HPO_4 溶液) 进行避光染色 4 h, 荧光显微镜 (发射波长为 665 nm, 激发波长为 600 nm) 下观察胼胝质积累情况, 使用 ImageJ 软件计算每 100 mm^2 胼胝质的积累数量。

1.2.5 酵母表达载体构建 酵母表达载体 pSUC2、pSUC2-Avr1b 由本实验室保存。将 pSUC2 载体用 *EcoR* I 和 *Xho* I 限制性内切酶酶切, 用 Cycle Pure Kit 纯化试剂盒纯化回收。用 CSEP02974SP-F/R 引物 KeyPo Master Mix 聚合酶扩增 CSEP02974 的信号肽全长, 用 Gel Extraction Kit 纯化试剂盒纯化回收。用 ClonExpress One Step Cloning Kit 将纯化后的 SP 片段克隆到 pSUC2 载体中得到 pSUC2-CSEP02974-SP 酵母分泌载体。操作方法和反应体系均参考产品使用说明书, 所有载体均通过 PCR 检测和生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序验证其准确性。

1.2.6 酵母分泌试验 用酵母分泌系统对 CSEP02974 的信号肽功能进行验证。将 pSUC2、pSUC2-Avr1b、pSUC2-CSEP02974SP 载体用经典酵母转化试剂盒进行转化得到含有相应载体的酵母菌株, 操作步骤参考产品使用说明书。将含有不同载体的酵母菌株分别接种于 CMD-W 和 YPRAA 培养基平板上, 验证 YTK12 是否含有转化酶的活性。转化酶可将氯化三苯四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 还原为 1,3,5-三苯甲腈 (1,3,5-triphenylformazan, TPF) 形成不溶红色沉淀, 以进一步验证信号肽的功能。

1.2.7 蛋白提取和免疫印迹分析 剪下本氏烟草叶片蛋白表达区域, 加入液氮研磨叶片成粉状。在 1.5 mL 离心管中加入 1 mL 植物蛋白裂解液和 5 μ L 蛋白酶抑制剂以及研磨的植物叶片, 放于冰上冰浴 30 min, 每 5 min 震荡 1 次, 4 $^{\circ}$ C 下, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液至新的离心管中。用移液枪吹打悬浮 Anti-GFP 免疫磁珠, 转移 30 μ L 混合液到新的离心管中。加入 500 μ L 1 $\times$ PBST, 移液枪吹打悬浮 Anti-GFP 磁珠, 800 r/min 离心 1 min, 弃上清液, 向沉淀中加入提取的植物蛋白 500 μ L, 4 $^{\circ}$ C 下, 50 r/min 孵育 6 h。4 $^{\circ}$ C 800 r/min 离心 3 min, 将上清液转移至新的离心

管中备用。加入 500 μ L 1 $\times$ PBST 上下翻转样品 1 min, 4 $^{\circ}$ C, 800 r/min 离心 3 min, 磁性分离后弃上清液。重复洗涤 3 次, 直至洗涤后的上清液 OD₂₈₀ 小于 0.05, 弃上清液。向所得沉淀中加入 100 μ L 1 $\times$ PBST 吸打, 加入 30 μ L 蛋白上样缓冲液, 加热煮沸 15 min, 冷却至室温后用 GFP 一抗缓冲液、荧光二抗进行 Western Blot 检测。根据 Western Blot 图像中条带大小判断蛋白是否表达。

1.2.8 CSEP02974-dsRNA 的体外合成及处理选择 CSEP02974 序列中特异性最高的区域为 dsRNA 体外转录模板序列, 根据 Invitro Transcription T7 Kit (TaKaRa) 使用说明合成并纯化 dsRNA。利用浓度为 2×10^5 个/mL 的白粉菌孢子悬浮液接种古铜期橡胶树叶片, 24 h 后喷施 0.1 μ g/mL dsRNA 至叶片接菌处。在接种后第 7 天对橡胶树叶片病斑进行致病性分析。

1.2.9 CSEP02974 表达的 qRT-PCR 分析 分别收集橡胶树叶片上经过沉默处理后第 7 天的叶片于液氮中研磨至粉末, 用 Eastep R Super total RNA Extraction Kit 总 RNA 提取试剂盒 (Promega Biotech) 提取所有样品的总 RNA。用 RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒 (Thermo Fisher Scientific) 将总 RNA 反转录为 cDNA。橡胶树的 *Actin* 基因作为内参, 使用 QuantStudioTM5 RealTime PCR 仪器 (Thermo Fisher Scientific) 和 SuperReal PreMix Plus 荧光定量试剂盒 (TianGen Biotech) 进行 qRT-PCR 检测, 利用 QuantStudioTM Design & Analysis Software v1.5.2 软件对基因表达量进行分析。操作方法参考使用说明书。

2 结果与分析

2.1 CSEP02974 抑制植物免疫防卫反应功能分析

本研究选取橡胶树白粉菌效应蛋白 CSEP-02974 进行试验, 经过 NCBI (national center for biotechnology information, <http://ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对, 发现该蛋白与其他白粉菌种的蛋白均具有较高的氨基酸相似性 (表 2), 表明 CSEP02974 可能是保守的致病因子。

为了研究 CSEP02974 是否具有保守的抑制植物免疫的功能, 构建了携带 CSEP02974 的表达载体 pBin-CSEP02974-GFP。通过农杆菌转化法, 对

表 2 NCBI Blastp 分析结果
Tab. 2 NCBI Blastp analysis results

白粉菌种 Powdery mildew fungi	蛋白 (NCBI 登录号) Protein (NCBI Accession No.)	相似度 Similarity/%
山茱萸白粉菌	POS84953.1	74.13
<i>E. pulchra</i>	POS85717.1	41.99
番茄白粉菌	RKF57282.1	75.49
<i>E. neolycopersici</i>	RKF65846.1	41.99
大麦白粉菌	CCU82018.1	48.41
<i>Blumeria hordei</i>	SZF04992.1	40.22
	CCU81172.1	40.22
小麦白粉菌	EPO66483.1	52.32
<i>B. graminis</i> f sp. <i>tritici</i>	EPO64468.1	39.66
草莓白粉菌	KAI1000103.1	48.56
<i>Podosphaera aphanis</i>	KAI0999833.1	39.23
	KAI6249304.1	42.54
葡萄白粉菌	KHJ34660.1	42.54
<i>E. necator</i>		
二孢白粉菌	RKF77615.1	39.56
<i>Golovinomyces</i>	RKF76916.1	40.33
<i>cichoracearum</i>	RKF55891.1	39.56
	TOS36349.1	39.23

拟南芥 Col-0 进行转化, 获得表达 CSEP02974-GFP 的转基因株系, 并且通过逆转录 PCR 分析验证拟南芥中 CSEP02974-GFP 的表达 (图 1A)。真菌来源的几丁质 (chitin) 和细菌来源的 flg22 是已报道的 PAMP^[15], 分别用 10 μmol/L 几丁质单体 (GlcNAc)₇ 和 10 μmol/L flg22 处理拟南芥叶片 36 h, 利用苯胺蓝 (aniline blue) 染料对胼胝质染色, 并统计胼胝质形成量。统计结果显示, flg22 和 (GlcNAc)₇ 均可以激发野生型 (WT) 拟南芥叶片形成大量的胼胝质, 而表达 CSEP02974 的拟南芥叶片中, 胼胝质数量明显减少 (图 1B, 图 1C)。

通过鲁米诺化学发光的方法检测 CSEP02974-GFP (浓度为 5 μmol/L) 处理后拟南芥叶片活性氧 (ROS) 的含量变化。结果显示, (GlcNAc)₇ 和 flg22 诱导叶肉原生质体 ROS 的积累, 在 50 min 时 ROS 积累量较高, 而表达 CSEP02974 的叶盘中 ROS 含量较少 (图 1D)。

2.2 CSEP02974 的分泌功能验证

为了测试 CSEP02974 是否为分泌蛋白, 通过 SignalP-5.0 在线系统 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>) 对 CSEP02974 的蛋白序列进行分析, 预测到 CSEP02974 的第 1~22

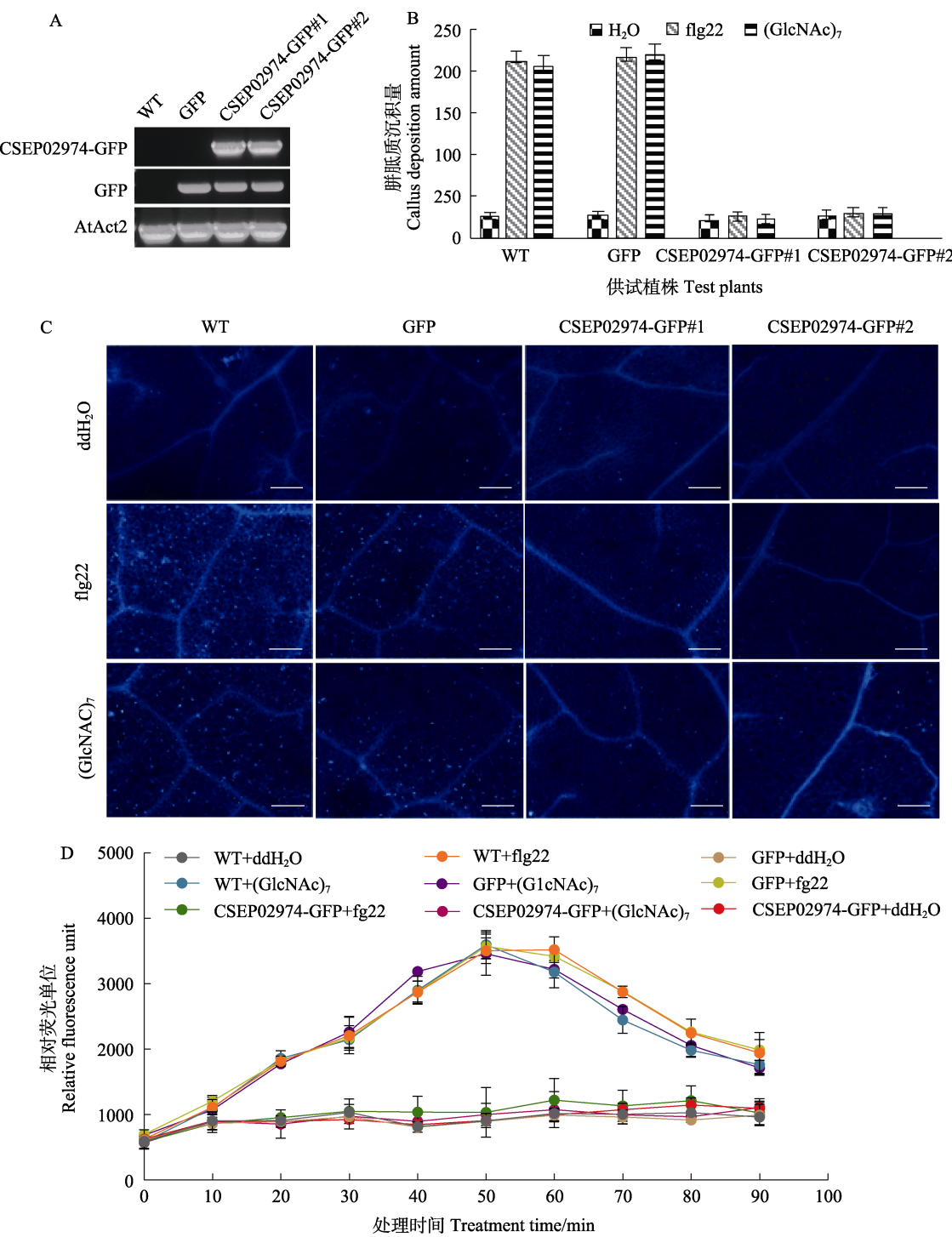
位氨基酸为信号肽序列。为了确认 CSEP02974 的假定 N 端信号肽的分泌功能, 通过蔗糖酶缺陷型酿酒酵母 YTK12 菌株测试信号肽活性^[16]。将 CSEP-02974 信号肽序列连接至含有蔗糖酶 (invertase) 基因的 pSUC2 载体上, 之后把构建的载体转入 YTK12 酵母菌株中, 28 ℃ 培养 3 d 后, 转化含 CSEP02974 信号肽的 YTK12 菌株在含棉子糖的 YPRAA 培养基上生长较快。另外, 在化学催化方法中, 转化含 CSEP02974 信号肽的 YTK12 菌株能使透明状态的 TTC 溶液转化为不可溶的红色物质 TPF (图 2)。以上结果表明 CSEP02974 信号肽具有活性, 因此 CSEP02974 可能为分泌蛋白。

2.3 CSEP02974 的定位分析

为了研究 CSEP02974 在分泌后是否转运至植物细胞内, 本研究利用本氏烟草瞬时表达所测试的蛋白并研究其定位 (图 3A)。使用 30% 蔗糖溶液诱导烟草细胞质壁分离, 并以共表达的 Lti6b-mRFP 作为细胞膜标签^[17]。以单独的 GFP 作为对照, 当将烟草 PR1 蛋白信号肽 (SP_{PR1}) 连接至 GFP, 观察到 SP_{PR1}-GFP 蛋白在植物胞质中信号减弱 (图 3B), 说明 PR1 蛋白信号肽可以引导 GFP 蛋白分泌出植物细胞。将 SP_{PR1} 替换 CSEP02974 自身信号肽和使 CSEP02974 融合 GFP 标签, 观察到 SP_{PR1}-CSEP02974-GFP 在植物胞质中信号较强 (图 3B), 表明 SP_{PR1} 引导 CSEP02974 分泌出细胞后, CSEP02974 又可被转运至胞质。同时, 观察到含自身信号肽的 CSEP02974-GFP 或删除信号肽的 CSEP02974-GFP (CSEP02974^{ΔSP}-GFP) 和单独 GFP 类似, 均主要定位在胞质中 (图 3B)。上述结果表明 CSEP02974 可被植物转运至细胞质。

2.4 CSEP02974 的致病性分析

为研究 CSEP02974 在白粉菌侵染过程中的作用, 接种白粉菌 24 h 后, 将合成的 CSEP02974-dsRNA 稀释至 0.1 μg/mL 后喷施于已接种白粉菌的橡胶树叶片表面, 并于接种 7 d 后观察白粉菌侵染情况 (图 4A)。与野生型 (WT) 和喷洒 GFP 序列的 dsRNA (GFP-dsRNA) 相比, 喷施 CSEP02974-dsRNA 的植株上白粉菌引起的症状明显减轻, 病斑面积仅为 GFP-dsRNA 处理的 11.11% (图 4B)。对经 dsRNA 处理过的橡胶树叶片进行取样, 以白粉菌 EF1a 引物为内参, 采用 qRT-PCR 检测 CSEP02974 在侵染过程中的表达情况 (图 4C)。结果表明, CSEP02974-dsRNA 处



A: 逆转录 PCR; B: 胼胝质沉积量 (每 1 mm² 的胼胝质数量); C: 苯胺蓝染色法观察胼胝质数量; D: ROS 含量。
A: Reverse transcription PCR; B: Callus deposition amount (callus number per 1 mm²); C: Callose depositions were visualized by aniline blue staining; D: ROS content.

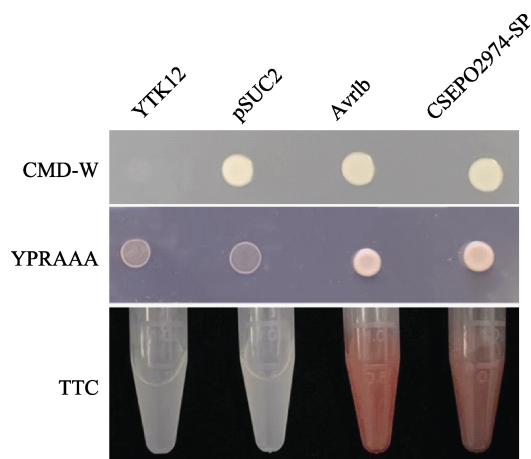
图 1 CSEP02974 在拟南芥中的表达抑制植物免疫反应
Fig. 1 CSEP02974 expression inhibits defense responses in *A. thaliana*

理后，CSEP02974 的表达水平为野生型的 39%，为 GFP-dsRNA 处理的 48%。以上结果表明，叶面喷施 CSEP02974-dsRNA 可导致侵染橡胶树的白粉菌基因沉默，并显著抑制白粉菌的侵染和在

叶片内的扩展。

3 讨论

橡胶树为多年生木本植物，因其自然特性，

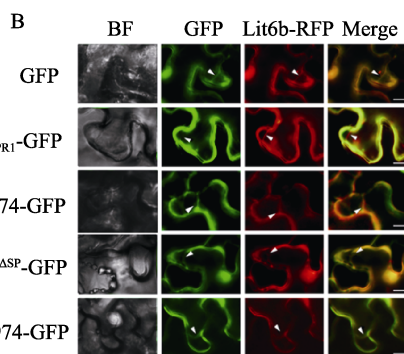
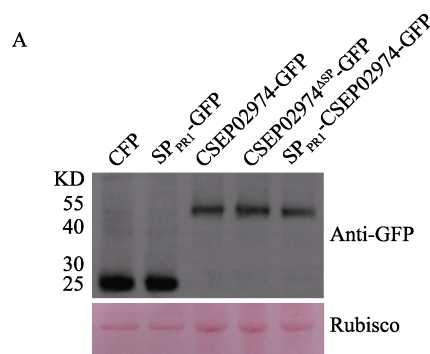


CMD-W: 以蔗糖、葡萄糖为碳源的培养基; YPRAA: 以棉籽糖作为唯一碳源的培养基; TTC: 颜色的转变指示蔗糖转化酶的分泌; Avr1b: 阳性对照; YTK12、pSUC2: 阴性对照。

CMD-W: Medium with sucrose and glucose as carbon source; YPRAA: Medium contained raffinose as sole carbon source; TTC: Color change indicator, used to indicate invertase secretion; Avr1b: Positive control; YTK12, pSUC2: Negative control.

图 2 酵母转化酶分泌试验验证 CSEP02974 信号肽功能

Fig. 2 Functional validation of signal peptide of CSEP02974 by yeast invertase secretion assay

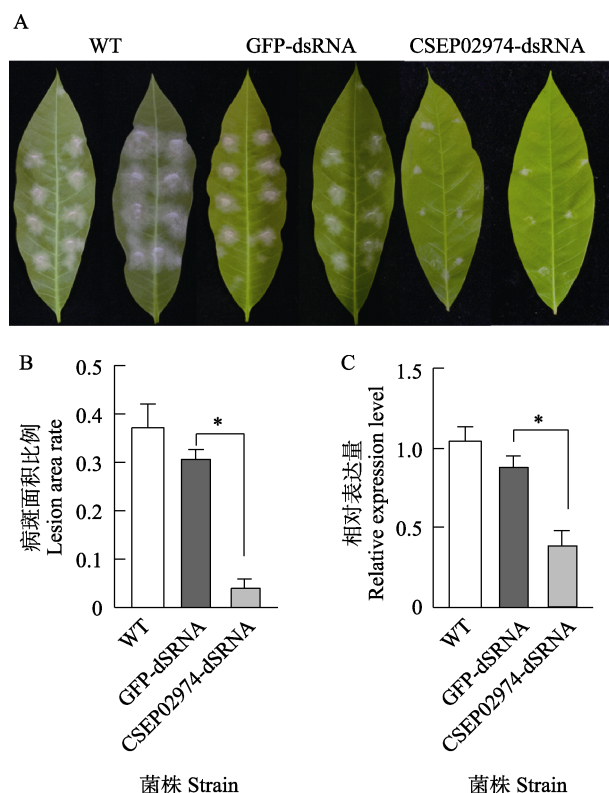


A: Western blot 检测蛋白表达情况, 采用丽春红染色进行蛋白定量; B: GFP、SP_{PR1}-GFP、CSEP02974-GFP、删除信号肽的 CSEP02974-GFP 和 SP_{PR1}-CSEP02974-GFP 在烟草细胞中质壁分离后的荧光分布。箭头指示质壁分离处的细胞质, bar=20 μm。

A: Western blot was used to detect protein expression, and ponceaus was used for protein quantification; B: Fluorescence distribution of GFP, SP_{PR1}-GFP, CSEP02974-GFP, CSEP02974^{ASP}-GFP and SP_{PR1}-CSEP02974-GFP after plasmolysis in *N. benthamiana*. Arrow represents cytoplasm with cytoplasmic wall separation, bar=20 μm.

图 3 CSEP02974 在本氏烟草细胞中的定位

Fig. 3 Localization of CSEP02974 in *N. benthamiana*



A: 喷施 dsRNA 与白粉菌孢子悬浮液后橡胶树叶片发病情况; B: 白粉菌侵染橡胶树叶片病斑面积比例; C: 白粉菌喷施 dsRNA 后的表达量, *表示差异显著 ($P<0.05$)。

A: The incidence of rubber leaf disease after spraying a mixed of dsRNA and *E. quercicola* spores suspension; B: The proportion of *E. quercicola* spores infection area in rubber leaves; C: Expression levels after spraying dsRNA during *E. quercicola* infection, * indicates significant difference ($P<0.05$).

图 4 CSEP02974 基因沉默对橡胶树白粉菌致病性的影响

Fig. 4 Effect of gene silencing on pathogenicity of *E. quercicola* in rubber trees

其抗病基因鉴定和育种较难开展, 抗病资源稀缺; 并且对于专性寄生真菌, 特别是白粉菌, 目前对这类真菌的效应蛋白的基因功能缺乏了解, 因此, 亟需进行寄主-病原互作机制的研究, 以探寻抑菌的新靶点。

活性氧迸发和胼胝质的积累被认为是植物应对病原物侵染的基础防卫反应^[18], 利用农杆菌介导的瞬时表达方法, 观察候选效应蛋白是否能诱导或抑制模式植物细胞活性氧爆发、胼胝质沉积等反应, 是真菌效应蛋白筛选的常用方法^[19-20]。如稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 效应蛋白 Slp1、小麦禾生球腔菌 (*Mycosphaerella graminicola*) 效应蛋白 Mg3LysM 可抑制几丁质触发的免疫^[21-22]; 水稻黄单胞菌 T3SS 效应蛋白可抑制 flg22 诱导的拟南芥的 PTI^[23]; 玉米黑粉菌分泌的 Pep1 通过抑制植物的过氧化物酶活性, 清除活性氧的积累来

保护菌丝^[24]。为了检测克隆的候选效应蛋白是否具有免疫抑制的功能,本研究构建了表达 CSEP02974-GFP 的转基因拟南芥,用 PAMP 进行处理后发现 CSEP02974 可抑制 flg22 和几丁质诱导的胼胝质和活性氧的积累,确定 CSEP02974 为毒性蛋白。

目前对白粉菌效应蛋白的功能验证常用的方法是基因沉默。SIGS 作为一种新型基因沉默技术,其以病原菌生长发育和致病相关基因为靶标,将体外合成的针对靶基因的 dsRNA 喷施于植物表面,抑制靶基因的表达^[25]。SIGS 已被应用于多种植物病害机理研究,并展示出良好的应用前景。已有报道指出, SIGS 技术能够有效沉默核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*)、禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 等农业上重要的病原真菌^[26]。局部应用靶向 DCL1 和 DCL2 的 dsRNA 可抑制水果、蔬菜和花卉的灰霉菌病^[23]。SIGS 在白粉菌中的应用也较为广泛,如葫芦科白粉菌 CNAP8878、CNAP9066 等 6 个保守非注释蛋白通过 dsRNA 诱导的基因沉默后,出现明显的沉默表型,白粉菌生物量和病状大幅减少^[8]。通过 SIGS 技术沉默橡胶树白粉菌 β -微管蛋白 (*Tub*)、甾醇 14 α -去甲基化酶 (*CYP51*) 和几丁质合酶 (*Chs*) 基因,导致致病力下降,病斑大幅减少^[6]。这为白粉菌的基因沉默技术提供了新方向。在白粉菌中对 CSEP02974 进行基因沉默,通过荧光定量 PCR 分析和表型观察发现,沉默该基因会导致白粉菌扩展侵染受抑制。

近年来,对白粉菌效应蛋白的功能鉴定、靶标筛选等研究已经取得了一定进展,但关于白粉菌效应蛋白转运的研究甚少,在效应蛋白功能机制的研究中,对效应蛋白的分泌和转运机制具有重要的研究价值^[27]。本研究通过酵母分泌系统验证了 CSEP02974 信号肽具有分泌活性,通过烟草系统探明了 CSEP02974 被分泌后进入宿主细胞。目前,效应蛋白在稻瘟菌中的转运机制研究已经取得了一定进展,稻瘟菌效应蛋白从病原菌的侵染菌丝中分泌后,细胞质效应蛋白 PWL2 会进入受体植物的细胞质中直接作用于宿主,并能通过转运进入诸多还未侵染菌丝的相邻宿主细胞中,质外体效应蛋白 Bas4 会停留在由 EIHM 膜 (extra invasive hyphal membrane, EIHM) 与侵染菌丝膜形成的质外体隔间里^[28-29]。效应蛋白的这一系列作用机制的差异性取决于效应蛋白分泌后定位特

点的多样性。本研究通过农杆菌介导的烟草瞬时表达技术在烟草叶片中瞬时表达全长效应蛋白,发现 CSEP02974 在细胞质壁分离分泌到细胞外后,在细胞膜上仍可见到荧光,推测 CSEP02974 被分泌到细胞外后又进入细胞质内,推测 CSEP-02974 是细胞质效应蛋白。

综上,本研究利用异源表达系统、农杆菌侵染系统、酵母分泌系统以及相对定量、亚细胞定位、SIGS 技术鉴定了橡胶树白粉菌关键致病因子,为致病机理研究提供有利支撑。

参考文献

- [1] DOU D, ZHOU J M. Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground[J]. *Cell Host & Microbe*, 2012, 12(4): 484-495.
- [2] 金聪, 谢建坤. 白粉菌效应蛋白研究进展[J]. 江西师范大学学报(自然科学版), 2020, 44(5): 478-483.
JIN C, XIE J K. Recent progress in powdery mildew effector proteins[J]. *Journal of Jiangxi Normal University (Natural Science Edition)*, 2020, 44(5): 478-483. (in Chinese)
- [3] WANG Y, NISHIMURA M T, ZHAO T, TANG D. ATG2, an autophagy-related protein, negatively affects powdery mildew resistance and mildew-induced cell death in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Journal*, 2011, 68(1): 74-87.
- [4] PEDERSEN C, VAN THEMAAT E V L, MCGUFFIN L J, ABBOTT J C, BURGIS T A, BARTON G, BINDSCHIEDLER L V, LU X, MAEKAWA T, WESSLING R, CRAMER R. Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1): 694.
- [5] PADILLA-ROJI I, RUIZ-JIMENEZ L, BAKHAT N. RNAi technology: a new path for the research and management of obligate biotrophic phytopathogenic fungi[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(10): 9082.
- [6] CAO X R, HAN Q, WEST J S. Spray-induced gene silencing as a potential tool to control rubber tree powdery mildew disease[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2024, 129: 102182.
- [7] MCRAE A G, TANEJA J, YEE K, SHI X Y, HARIDAS S, LABUTTI K, SINGAN V, GRIGORIEV L V, WILDERMUTH M C. Spray-induced gene silencing to identify powdery mildew gene targets and processes for powdery mildew control[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2023, 24(9): 1168-1183.
- [8] RUIZJIMENEZ L, POLONIO A, VIELBA F A, PEREZ G A, FERNANDEZ O D. Gene mining for conserved, non-annotated proteins of *Podosphaera xanthii* identifies novel target candidates for controlling powdery mildews by

- spray-induced gene silencing[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(9): 735.
- [9] HU D, CHEN Z Y, ZHANG C, GANIGER M. Reduction of *Phakopsora pachyrhizi* infection on soybean through host- and spray-induced gene silencing[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(6): 794-807.
- [10] BERTHELOT K, PERUCH F, LECOMTE S. Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro) hevein proteins[J]. *Biochimie*, 2016, 12(7): 258-270.
- [11] CHERIAN S, RYU S B, CORNISH K. Natural rubber biosynthesis in plants, the rubber transferase complex, and metabolic engineering progress and prospects[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2019, 17(11): 2041-2061.
- [12] LIANG P, LIU S, XU F, JIANG S Q, YAN J, HE Q G, LIU W B. Powdery mildews are characterized by contracted carbohydrate metabolism and diverse effectors to adapt to obligate biotrophic lifestyle[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 10(1): 3160.
- [13] ZHOU X G, ZHAO C J, GUO Z J. Rice MAP kinase kinase MKK10-2 triggers cell death and H₂O₂ production in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2017, 47(6): 767-775.
- [14] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Journal for Cell and Molecular Biology*, 1998, 16(6): 735-778.
- [15] CHISHOLM S T, COAKER G, DAY B. Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response[J]. *Cell*, 2006, 124(4): 803-817.
- [16] YIN W, WANG Y, CHEN T, LIN Y, LUO C X. Functional evaluation of the signal peptides of secreted proteins[J]. *Bio-protocol*, 2018, 8(9): e2839.
- [17] KURUP S, RUNIONS J, KOHLER U, LAPLAZE L, HODGE S, HASELOFF J. Marking cell lineages in living tissues[J]. *The Plant Journal*, 2005, 42(3): 444-453.
- [18] MITTLER R. ROS are good[J]. *Trends in Plant Science*, 2017, 22(1): 11-19.
- [19] SPERSCHNEIDER J, DODDS P N, GARDINER D M, SINGH K B, TAYLOR J M. Improved prediction of fungal effector proteins from secretomes with EffectorP 2.0[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(9): 2094-2110.
- [20] 万三连, 梁鹏, 刘文波, 张宇, 缪卫国, 郑服丛. 橡胶树与白粉病菌亲和互作组织细胞学研究[J]. *植物保护*, 2014, 40(3): 26-36.
- WAN S L, LIANG P, LIU W B, ZHANG Y, MIAO W G, ZHENG F C. Cytological analysis of compatible interactions between rubber tree and *Oidium heveae*[J]. *Plant Protection*, 2014, 40(3): 26-36. (in Chinese)
- [21] MARSHALL R, KOMBRINK A, MOTTERAM J, LOZA R E, LUCAS J, THOMMA B P H, RUDD J. Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat[J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(2): 756-769.
- [22] MENTLAK T A, KOMBRINK A, SHINYA T, RYDER L S, OTOMO L, SAITOH H, TERAUCHI R, NISHIZAWA Y, SHI B Y, THOMMA B P H J, TALBOT N J. Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease[J]. *Plant Cell*, 2012, 24(1): 322-335.
- [23] WANG M, WEIBERG A, LIN F M, THOMMA B P H J, HUANG H D, JIN H L. Bidirectional cross-kingdom RNAi and fungal uptake of external RNAs confer plant protection[J]. *Nature Plants*, 2016, 2(10): 16151.
- [24] HEMETSBERGER C, MUELLER A N, MATEI A, HERRBERGER C, HENSEL G, KUMLEHN J, MISHRA B, SHARMA R, THINES M, DOEHLEMANN G. The fungal core effector Pep1 is conserved across smuts of dicots and monocots[J]. *New Phytologist*, 2015, 206(3): 1116-1126.
- [25] NERVA L, SANDRINI M, GAMBINO G, CHITARRA W. Double-stranded RNAs (dsRNAs) as a sustainable tool against gray mold (*Botrytis cinerea*) in grapevine: effectiveness of different application methods in an open-air environment[J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 200.
- [26] QIAO L, LAN C, CAPRIOTTI L, AHFONG A, NINO S J, HAMBY R, HELLER J, ZHAO H W, GLASS N L, JUDELSON H S, MAZZETTI B, NIU D D, JIN H L. Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(9): 1756-1768.
- [27] 吴旻, 陈锋, 林福呈, 刘小红. 稻瘟病菌效应蛋白的分泌特征及其在水稻细胞中的转运[J]. *中国细胞生物学学报*, 2019, 41(2): 289-296.
- WU M, CHEN F, LIN F C, LIU X H. Secretory characteristics of the *Pyricularia oryzae* effectors and their intercellular translocation in rice cells[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2019, 41(2): 289-296. (in Chinese)
- [28] CAILLAUD M C, PIQUEREZ S J M, FABRO G, STEINBRENNER J, ISHAQUE N, BEYNON J, JONES J D G. Subcellular localization of the Hpa RxLR effector repertoire identifies a tonoplast-associated protein HaRxL17 that confers enhanced plant susceptibility[J]. *Plant Journal*, 2012, 69(2): 252-265.
- [29] GIRALDO M C, DAGDAS Y F, GUPTA Y K, MENTLAK T A, MARTINEZ R A L, SAITOH H, TERAUCHI R, TALBOT N J, VALENT B. Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *Nature Communications*, 2013, 4(7): 1996.