

胞泌复合体亚基 E_qExo70 调节橡胶树白粉菌生长和致病

陈亚龙¹, 殷金瑶^{1,2}, 朱雪鸮^{1,2}, 吕焱洋^{1,2}, 刘文波^{1,2}, 缪卫国^{1,2*}, 李 潇^{1,2*}

1. 海南大学热带农林学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海南海口 570228; 2. 海南省入侵生物监测-儋州野外观测站, 海南儋州 571737

摘 要: 丝状真菌中, 菌丝需要将生长相关的物质不断向菌丝的顶端分泌以完成极性生长, 已有研究表明胞泌复合体 (exocyst complex) 在真菌分泌、极性生长过程中发挥重要作用, 但目前对于专性寄生真菌的菌丝生长及致病机制的研究较少。巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 是天然橡胶的主要来源, 白粉病是为害巴西橡胶树最严重的病害之一, 其病原菌橡胶树白粉菌 (*Erysiphe quercicola*) 属于专性寄生真菌。本研究在橡胶树白粉菌中鉴定到了胞泌复合体亚基 E_qExo70, 通过电击转化的方法在橡胶树白粉菌中表达 GFP 标记的 E_qExo70, 表现出荧光在菌丝顶端聚集的现象, 表明 E_qExo70 可能与菌丝顶端极性生长有关。通过将 E_qExo70 的反向互补序列电击转化到橡胶树白粉菌中进行基因沉默, 发现白粉菌的致病能力下降且菌丝生长减慢, 说明 E_qExo70 影响橡胶树白粉菌的致病力。接种沉默 E_qExo70 基因的橡胶树白粉菌的橡胶树叶片, 表现出胼胝质沉积和活性氧爆发增强的现象, 这表明 E_qExo70 能够抑制寄主的防卫反应。上述结果表明 E_qExo70 是影响橡胶树白粉菌致病的关键因子, 并可能参与了橡胶树白粉菌与橡胶树的互作及菌丝的极性生长。

关键词: 橡胶树; 白粉菌; 胞泌复合体; Exo70 蛋白亚基

中图分类号: S763.7 **文献标志码:** A

E_qExo70 Subunit of Exocyst Complex Regulating the Growth and Pathogenicity of *Erysiphe quercicola*

CHEN Yalong¹, YIN Jinyao^{1,2}, ZHU Xuehuan^{1,2}, LYU Yanyang^{1,2}, LIU Wenbo^{1,2}, MIAO Weiguo^{1,2*}, LI Xiao^{1,2*}

1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Danzhou Invasive Species Observation and Research Station of Hainan Province, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract: Hyphal polarized growth in filamentous fungi requires tip-directed secretion of growth-related substances, and previous studies have shown that exocyst complex plays an important role in the processes of fungal secretion and polar growth. However, there are few researches on the hyphal polarized growth and pathogenic mechanism of obligate biotrophic fungi at present. Rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is the most important source of natural rubber. Powdery mildew is one of the most serious diseases of *H. brasiliensis*, and its pathogen *Erysiphe quercicola* belongs to obligate parasitic fungi. In this study, E_qExo70, a subunit of the exocyst complex, was identified in *E. quercicola*. The GFP labeled E_qExo70 was expressed in the *E. quercicola* by electrotransformation method, and it was found that the protein showed fluorescence aggregation at the hyphal tip, suggesting that E_qExo70 may be related to hyphal polarized growth. In addition, we silenced the E_qExo70 by electroporating the reverse complementary sequence of E_qExo70 into the *E. quercicola*, it was found that the pathogenic ability of *E. quercicola* decreased and the growth of hypha slowed down, suggesting that E_qExo70 affects the pathogenicity of *E. quercicola*. The level of callose deposition and reactive oxygen species burst in *H. brasiliensis* significantly increased upon infection with the E_qExo70-silenced strain, indicating that

收稿日期 2024-11-29; 接受日期 2025-01-16

基金项目 海南省科技人才创新项目 (No. KJRC2023B14); 海南大学南繁与热带高效农业协同创新中心项目 (No. XTCX2022 NYA01); 国家自然科学基金项目 (No. 32360640)。

作者简介 陈亚龙 (1998—), 男, 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。

EqExo70 contributes to suppressing host immune response. The results indicated that EqExo70 is a key factor affecting pathogenicity of *E. quercicola*, and may be involved in the interaction with *H. brasiliensis*, as well as the hyphal polarized growth.

Keywords: rubber tree; powdery mildew fungus (*Erysiphe quercicola*); exocyst complex; Exo70 subunit of the exocyst complex

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.05.019

真核生物的胞泌复合体 (exocyst complex) 控制蛋白的外泌 (exocytosis) 和细胞极性生长 (polarized growth)。胞泌复合体主要由 Exo70、Sec5 和 Sec6 等 8 个蛋白亚基组成。在酵母中,胞泌复合体定位于出芽部位、子细胞的极性顶端及子细胞与母细胞连接处^[1]。在丝状真菌,如粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*)、棉病囊菌 (*Ashbya gossypii*)、白色念珠菌 (*Candida albicans*) 和米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 中,胞泌复合体定位于菌丝尖端^[2-6],调节菌丝的顶端生长。此外,胞泌复合体也与丝状真菌的致病性有关。稻瘟病菌 (*Magnaporthe Oryzae*) 中 Sec5 和 Exo70 基因的突变抑制了侵染结构附着胞的形成并导致毒性蛋白/效应蛋白 (effectors) 分泌缺陷,导致致病性下降^[7]。灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 中 Exo70 的缺失显著影响了真菌的生长、分生孢子和菌核的产生以及致病性,并且 Sec5、Sec4 基因突变菌株的生长速率减慢,对番茄、苹果和葡萄的侵染下降^[8-9]。烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 中的 Sec4 同源基因敲除后其致病能力降低^[10]。但目前对于该复合体在专性寄生真菌的侵染以及克服寄主防卫反应的过程中发挥的作用知之甚少。

白粉菌是一类专性寄生真菌,侵染多种作物,如大麦、葡萄、橡胶树等。橡胶树白粉菌 (*Erysiphe quercicola*) 侵染巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 后会导致天然橡胶产量严重下降^[11-12]。该白粉菌常侵染植物幼嫩组织,包括叶片和芽,并在受侵染的组织表面产生由菌丝和分生孢子组成的白粉菌菌落^[13]。专性寄生真菌目前无法离体培养,因此,传统的模式真菌基因操作方法无法适用^[14-15]。目前已有研究报道,在瓜类白粉菌 (*Podosphaera xanthii*) 和橡胶树白粉菌 (*E. quercicola*) 中使用电击转化的方法^[16-17]分别表达了绿色荧光蛋白 GFP 和效应蛋白 EqIsc1,并且这种电击转化方法可以实现靶基因的沉默。

本课题组前期已完成对橡胶树白粉菌基因组的测序^[18-19],多基因组比对分析结果表明该菌碳

水化合物代谢相关基因、植物细胞壁降解酶和效应蛋白基因较少,推测该菌可能可以较好地克服寄主抗性^[17]。因此,本研究拟利用电击转化的方法初步分析和探讨橡胶树白粉菌中 EqExo70 蛋白亚基在菌丝极性生长和致病力等方面的生物功能,以期增加对白粉菌致病机制的了解,为控制白粉病找到更多的潜力靶点。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料及实验菌株 橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 品种:热研 7-33-97 (嫁接苗) 购自中国热带农业科学院;橡胶树白粉菌 (*Erysiphe quercicola*) (菌株 HO-73) 保存于海南大学植物保护学院分子植物病理学实验室,采自海南省儋州市橡胶林,接种在橡胶树热研 7-33-97 (嫁接苗) 上,培养温度为 22 ℃,16 h 光照/8 h 黑暗周期,相对湿度为 70%。大肠杆菌 (DH5α) 购自天根生化科技有限公司。

1.1.2 载体以及培养基 pJNARG 载体由热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室保存。LB 培养基按常规方法配制^[20-21]。

1.1.3 实验试剂 Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix、RNA isolater Total RNA Extraction Reagent、DNA 纯化试剂盒、2×ClonExpress Mix、2×Phanta Max Master Mix 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;质粒提取试剂盒购自 Omage 公司;苯胺蓝、3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;其他试剂购自 TaKaRa 公司及北京索莱宝科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 EqExo70 的生物信息学分析 使用 Bioedit 软件对橡胶树基因组数据进行对比,获得酵母菌 Exo70 的同源基因 EqExo70;使用 MEGA 软件对 11 个同源蛋白进行 Clustal W 多序列比对并绘制进化树;使用 MEME (<https://memesuite.org/meme/tools/meme>) 在线软件对 11 个蛋白进行结构域分

析;使用 NCBI 的 Conserved Domain Search Service (CD Search) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 分析 EqExo70 的保守结构域。使用 TB-tools 软件制图^[22]。

1.2.2 目的基因的克隆与载体构建 通过 Premier 5.0 软件设计基因扩增引物 EqExo70-F/R (表 1),

扩增 EqExo70 基因的完整序列。收集新鲜的橡胶树白粉菌孢子,使用 RNA 提取试剂盒提取橡胶树白粉菌的 RNA,反转录合成 cDNA。以橡胶树白粉菌 cDNA 为模板,进行目的片段的扩增。在获得目的片段之后,通过 T4 连接酶将片段构建到 pMD-18T 载体中以便后续进行基因扩增。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
EqExo70-F	ATGGTGAGGCCAAGGCAGGC
EqExo70-R	TTATACGAGCCCCCAAAGA
GFP-F	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
GFP-R	GGGCATGGCGGACTTGAAGA
EqExo70-EcoR I -F	GTAGGAACCCAATCTTCAAAGAATTCATGGTGAGGCCAAGGCAGGC
EqExo70-EcoR I -R	GAACCACGATTAAATCGAGCCATGAATTCTACGAGCCCCCAAAGAC
EqEF1a-F	GAACCTTCATCTAACTGC
EqEF1a-R	GTCGTAGTGGTTTGTCTAG
RP60Tub2-Xcm I -1F	CGTGAAAATGAGGATTACC
RP60Tub2-Xcm I -1R	AGATGAACAATTTACGCACTTTTGACTTTTTGGATGCAG
RP60Tub2-Xcm I -2F	CTGCATCCAAAAAGTCAAAGATGCGTGAAATTGTTTCATCT
RP60Tub2-Xcm I -2R	TTATTCTCCGGTTGCATGGGTGGTTC

1.2.3 EqExo70 蛋白亚基在白粉菌丝中的定位 使用 EcoR I 限制性内切酶将 pJNARG 载体进行单酶切,使用 Cycle Pure Kit 纯化试剂盒(诺唯赞, DC301-1) 进行酶切载体的纯化回收。扩增 EqExo70 片段,通过同源重组构建 pJNARG-EqExo70-GFP 载体。提取含有 pJNARG-EqExo70-GFP 载体的质粒,使用 Xcm I 限制性内切酶进行酶切、回收。从白粉菌基因组中扩增 RP60 启动子及 Tub2 抗性基因 (携带多菌灵抗性), 进行融合 PCR 后回收,通过 T4 连接酶与回收的 pJNARG-EqExo70-GFP 载体 16 ℃ 过夜连接,获得 pJNARG-EqExo70-GFP-Tub2 重组表达载体。收集白粉菌孢子悬浮液 (浓度为 1×10^6 个/mL), 将含有 pJNARG-EqExo70-GFP-Tub2 的质粒通过电击转化的方法 (1.70 kV, 间隔 5 s, 电击 3 次) 转入白粉菌孢子^[17],在橡胶树古铜期叶片上接种白粉菌孢子悬浮液,24 ℃ 环境下培养 7 d,在接种的第 2~7 天内,每天施用多菌灵 (100 μg/mL) 筛选转化菌株,7 d 后用显微镜观察转化子荧光分布情况。

1.2.4 EqExo70 基因沉默对白粉菌致病力的影响测定 构建 pJNARG-EqExo70RNAi-GFP-Tub2 重

组表达载体,通过电击转化的方法转入白粉菌孢子^[17] (方法同 1.2.3), 接种在橡胶树的古铜期叶片,进行多菌灵药剂筛选,接种 7 d 后观察发病情况并使用 ImageJ 软件对叶片上的病斑面积进行计算,本实验进行 3 次生物学重复。用 RNA isolater Total RNA Extraction Reagent 试剂盒提取白粉菌的总 RNA。以 EqEF1a 为内参基因,采用 SYBR Green I 荧光染料法进行荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRT-PCR) 检测。每个样本进行 3 次独立重复。反应完成后,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析 EqExo70 基因的相对表达水平。

1.2.5 苯胺蓝染色 在橡胶树古铜期叶片表面接种 EqExo70 沉默菌株 (方法同 1.2.4), 同时施用多菌灵药剂筛选,接种 7 d 后用乙醇乙酸脱色液 (乙醇:乙酸=3:1) 脱色,用 0.1% 的苯胺蓝染色,30 min 后使用显微镜观察菌丝发育状况以及吸器数量 (统计每 0.3 mm² 的吸器数量)。

1.2.6 活性氧爆发和胼胝质沉积测定 为探究 EqExo70 沉默后是否影响橡胶树的防卫反应,将沉默 EqExo70 的白粉菌转化子接种至橡胶树古铜期叶片上,使用多菌灵 (100 μg/mL) 溶液进行喷洒处理,7 d 后使用 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB)

染色以及 0.01% 苯胺蓝染色后检测橡胶树叶片活性氧爆发和胼胝质沉积情况。

(1) 活性氧爆发测定。将带有白粉菌病斑的橡胶叶片剪下，置于培养皿中，加入 20 mL 0.1% 3,3'-二氨基联苯胺（DAB）溶液中，用锡箔纸包裹并在摇床上过夜染色（振荡混匀）。配制脱色液并将叶片放在烧杯中水浴脱色，显微镜观察叶片活性氧爆发情况。

(2) 胼胝质沉积测定。接种橡胶树白粉菌的橡胶叶片放入脱色液中室温脱色 3~4 h，随后加入缓冲液（5% K₂HPO₄），在室温静置 0.5 h。使用 0.01% 苯胺蓝溶液（0.01 g 苯胺蓝溶于 100 mL 0.067 mol/L K₂HPO₄）进行避光染色 4 h，使用荧光显微镜检测胼胝质沉积情况（统计每 0.3 mm² 的胼胝质数量）。

2 结果与分析

2.1 Exo70 生物信息学分析

使用 Mega 软件进行 Clustal W 比对并绘制进化树发现，E_qExo70 与布氏白粉菌、葡萄白粉菌及甜瓜白粉菌的亲缘关系较近，可能在遗传上具

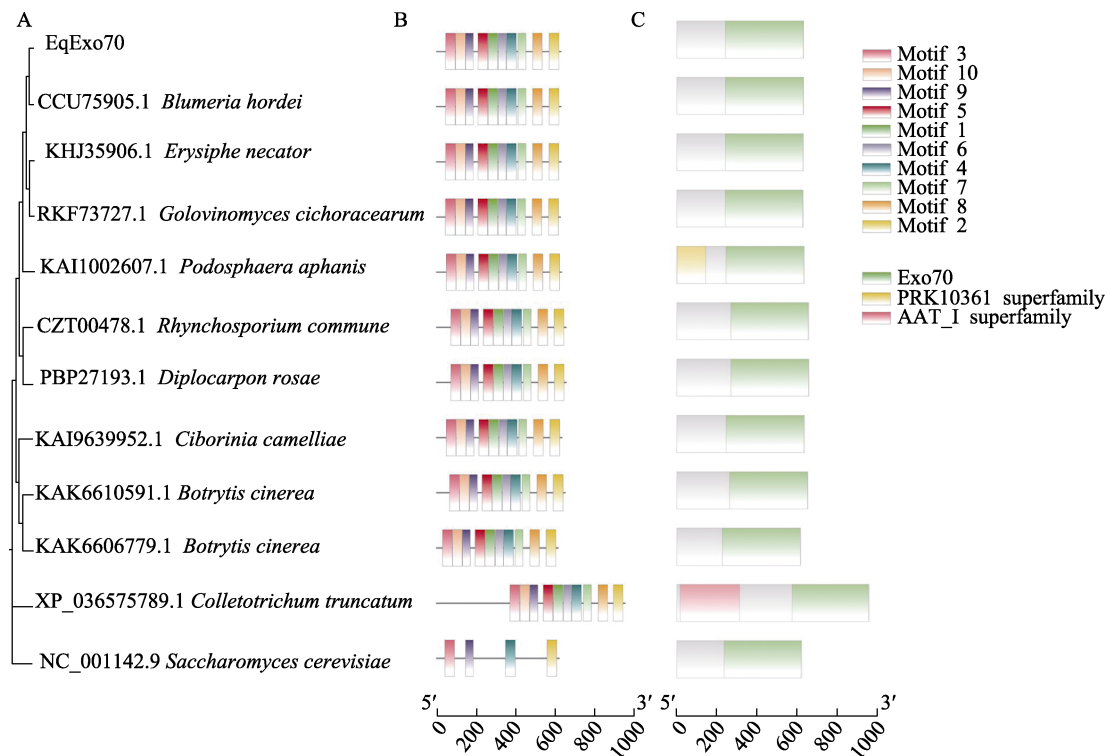
有稳定性和保守性。同时利用 MEME 在线软件分析发现，E_qExo70 与除酵母菌 Exo70 外的 10 个 Exo70 蛋白均具有位置、大小相近的 10 个 motif，可能在功能上具有相似性。同时使用 NCBI 的 CD-Search 工具分析发现，所有 Exo70 蛋白均具有典型的 Exo70 结构域（图 1）。

2.2 E_qExo70 蛋白亚基定位在白粉菌菌丝尖端

为了观察 E_qExo70 蛋白亚基在白粉菌菌丝中的定位，构建了 pJNARG-E_qExo70-GFP-Tub2 荧光表达载体，通过电击转化的方法转入白粉菌孢子，7 d 后用荧光显微镜观察其定位情况。结果显示，E_qExo70-GFP 融合蛋白菌株荧光聚集在菌丝尖端，呈现顶端定位，而 GFP 菌株（对照）则均匀分布在白粉菌菌丝中，未表现顶端定位（图 2）。在丝状真菌中，顶端极性的维持对菌丝的极性生长至关重要，这表明 E_qExo70 蛋白亚基可能在白粉菌菌丝的极性生长中发挥作用。

2.3 电击转化沉默 E_qExo70 导致橡胶树白粉菌致病力下降

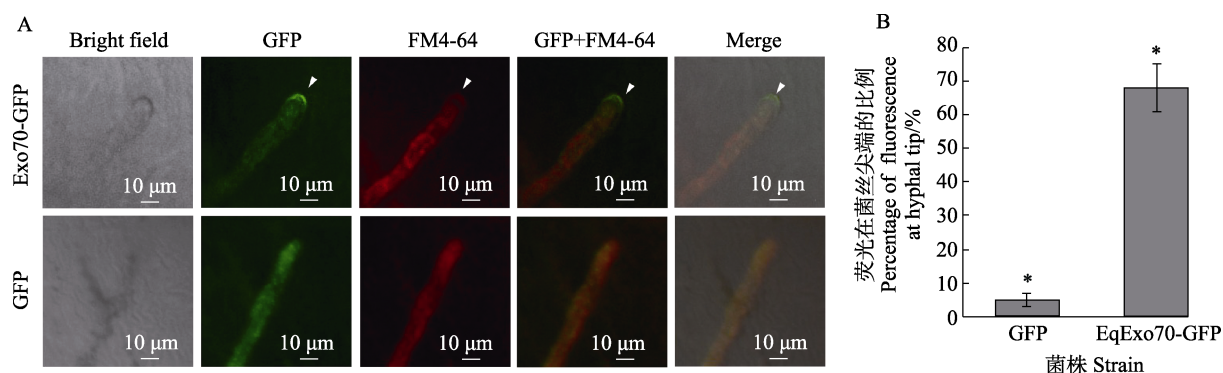
为了探究 E_qExo70 是否影响橡胶树白粉菌的致病能力，通过电击转化将 E_qExo70 反向互补序



A: Exo70 进化树；B: Exo70 结构域分析；C: Exo70 保守结构域。
A: Phylogenetic tree of Exo70; B: Domain identification of Exo70; C: Conserved motifs of Exo70.

图 1 Exo70 进化树及保守结构域分析

Fig. 1 Phylogenetic tree and conserved domain analysis of Exo70



A: EeqExo70-GFP 在菌丝尖端的定位, FM4-64 指经过细胞膜染料标记的菌丝; B: GFP、EeqExo70-GFP 菌株的 GFP 荧光在菌丝尖端聚集的数量统计, *表示处理间差异极显著 ($P<0.01$)。

A: The localization of EeqExo70-GFP at the hyphal tip, FM4-64 was used as a membrane dye; B: Statistical analysis of fungal cells with hyphal tip-localized GFP and EeqExo70-GFP strains, * indicates extremely significant difference among treatments ($P<0.01$).

图 2 橡胶树白粉菌中 GFP 和 EeqExo70 蛋白亚基的定位

Fig. 2 Localization of GFP and EeqExo70-GFP in *E. quercicola*

列转入橡胶树白粉菌中, 诱导靶基因沉默并测定菌株致病性。与对照 (WT、GFP: 表达 GFP 基因的转化子) 相比, -EeqExo70 (沉默 EeqExo70 基因的转化子) 菌株的病斑面积降低了 64% (图 3A, 图 3B), 提取白粉菌中的 RNA, 通过 qRT-PCR 检测发现, EeqExo70 沉默后的白粉菌中 EeqExo70 基因表达量下调 47% (图 3C)。结果表明 EeqExo70 基因沉默会导致白粉菌致病力显著下降, 因此该蛋白亚基在白粉菌侵染过程中发挥重要作用。

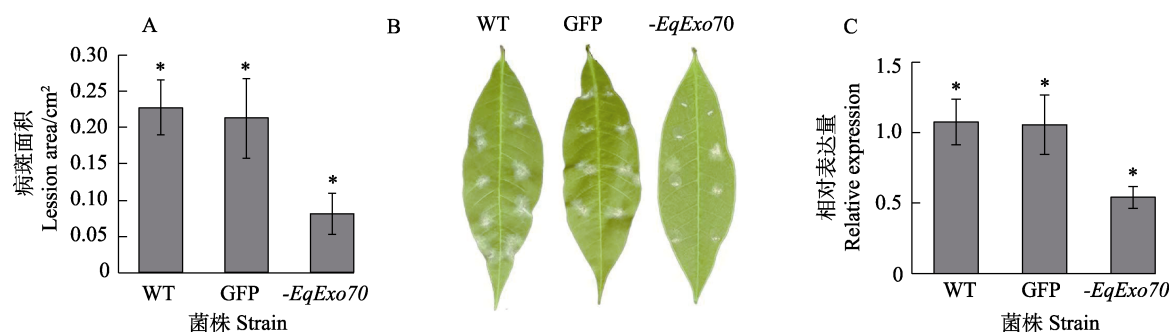
2.4 EeqExo70 基因沉默影响白粉菌菌丝发育

为了探究 EeqExo70 对白粉菌菌丝发育的影响, 将 EeqExo70 进行沉默, 观察菌丝生长发育状况。结果显示与对照 (WT、GFP 菌株) 相比, EeqExo70 沉默菌株的菌丝发育受到明显抑制 (图 4A), 经过统计分析, 吸器数量与对照相比减少

94% (图 4B)。这表明 EeqExo70 蛋白在白粉菌的生长发育过程中发挥着至关重要的作用, EeqExo70 的基因沉默严重抑制白粉菌菌丝的生长以及吸器的形成。

2.5 EeqExo70 影响橡胶树的防卫免疫反应

植物可以通过表面受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 特异性识别胞外信号, 并引起相应免疫应答反应, 如气孔关闭、活性氧和胍脂质积累等来抑制病原菌侵染实现广谱抗性^[23-24]。本研究中 EeqExo70 沉默转化子接种的橡胶树叶片与对照相比, 活性氧爆发及胍脂质沉积显著增加 (图 5A)。沉默 EeqExo70 后每克叶片的活性氧强度显著提高, 胍脂质沉积面积增加 (图 5B, 图 5C)。因此, EeqExo70 基因沉默可增加橡胶树叶片活性氧的爆发和胍脂质的沉积, EeqExo70 可能参与白粉菌与橡胶树的互作过程。

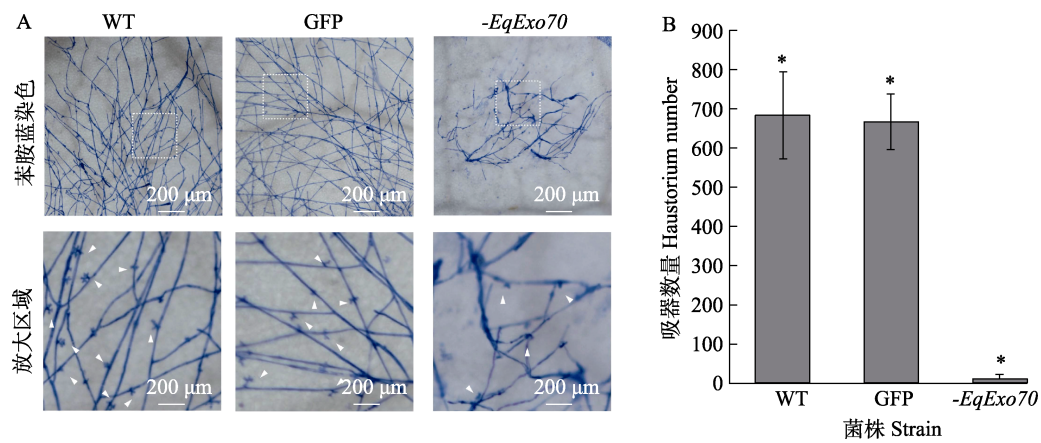


A: EeqExo70 的相对转录水平, *表示差异极显著 ($P<0.01$); B: *E. quercicola* 菌株在橡胶树叶片上的致病力表型; C: EeqExo70 基因沉默菌株接种的橡胶树叶片病斑大小明显降低, *表示差异极显著 ($P<0.01$)。

A: The relative transcription level of EeqExo70, * indicates extremely significant difference ($P<0.01$); B: Pathogenicity phenotype of *E. quercicola* strains on rubber tree leaves; C: The lesion area on rubber tree leaves inoculated with EeqExo70 gene-silenced strains is significantly reduced, * indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

图 3 EeqExo70 的沉默抑制了 *E. quercicola* 的致病力

Fig. 3 EeqExo70 silencing reducing *E. quercicola* pathogenicity

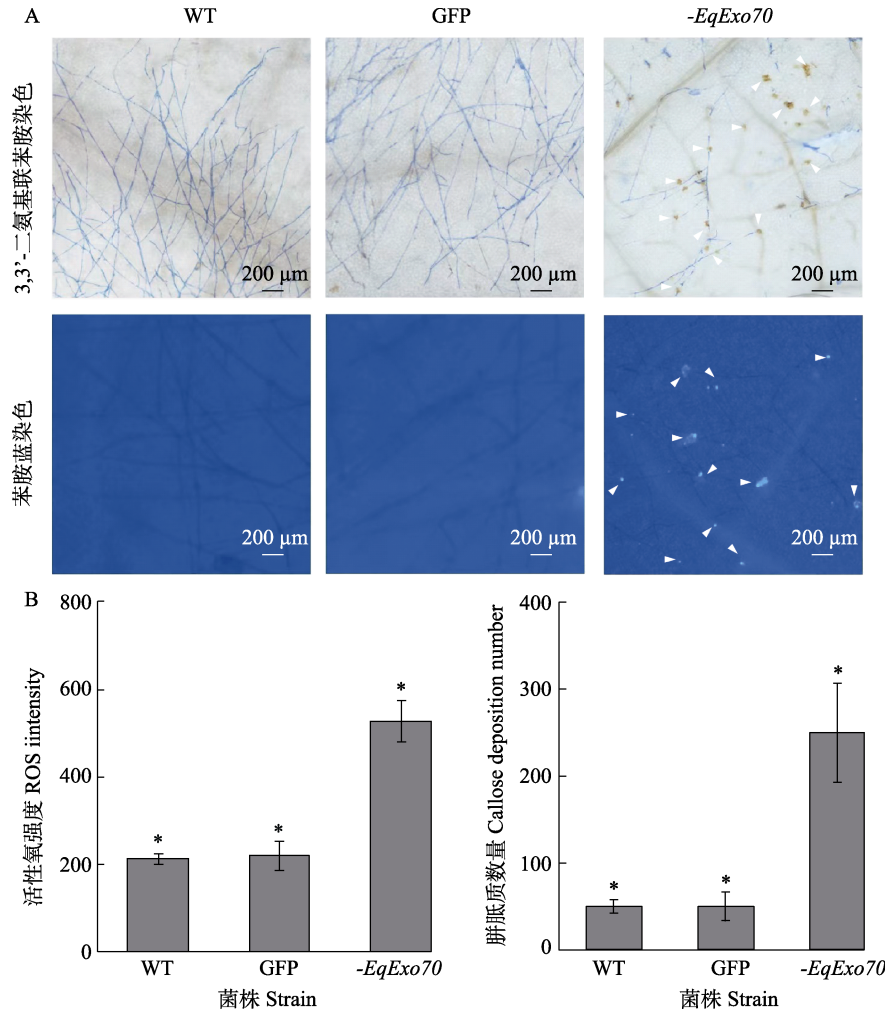


A: *EqExo70* 沉默菌株的菌丝发育，放大区域表示白色框位置的放大，箭头表示吸器；B: *EqExo70* 沉默后菌丝吸器数量，*表示差异极显著 ($P<0.01$)。

A: Hyphal development of *EqExo70*-silenced strains, the magnified area showing an enlargement of the region indicated by the white box, and arrows indicating haustoria; B: The number of hyphal haustoria after *EqExo70* silencing, * indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

图 4 沉默 *EqExo70* 影响 *E. quercicola* 菌丝的生长

Fig. 4 Silencing of *EqExo70* affecting hyphalgrowth in *E. quercicola*



A: 活性氧的爆发和胼胝质的沉积情况，箭头表示活性氧爆发和胼胝质沉积的区域；B: *EqExo70* 沉默的白粉菌菌株中活性氧强度和胼胝质数量，*表示差异极显著 ($P<0.01$)。

A: The burst of ROS and the deposition of callose, with arrows indicating the areas of ROS burst and callose deposition; B: The intensity of ROS and the quantity of callose in *EqExo70*-silenced powdery mildew strains, * indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

图 5 *EqExo70* 沉默影响橡胶树的防卫反应

Fig. 5 Silencing of *EqExo70* affecting defense level of *H. brasiliensis*

3 讨论

本研究对橡胶树白粉菌 *EqExo70* 蛋白亚基功能进行了分析,通过电击转化的方法将 pJNARG-Tub2-*EqExo70*-GFP 载体转入白粉菌中,观察到 *EqExo70*-GFP 融合蛋白荧光聚集在白粉菌丝尖端,呈现极性定位。菌丝的极性生长依赖菌丝尖端的定向延伸,此前已有研究报道,灰葡萄孢菌 (*B. cinerea*) 中的 *Exo70* 聚集在菌丝尖端,影响菌丝的极性生长^[8]。在非丝状真菌中, *Exo70* 蛋白亚基也具有相似的功能,如在裂变酵母 (*S. romyces*) 中 *Exo70* 可沿着肌动蛋白进行运输,并定位到细胞极点^[25];在出芽酵母 (*S. cerevisiae*) 中,芽体的极性生长也离不开 *Exo70* 蛋白与 GTPase 的相互作用^[26]。这也表明 *EqExo70* 蛋白可能在菌丝极性生长以及物质的极性运输中发挥着重要作用,具体作用模式将在后续研究中进行进一步探索。

电击转化介导的基因沉默是通过电穿孔的方法将相关靶基因的反向互补序列转入,进行抗性筛选获得沉默转化子的一项技术^[16]。橡胶树白粉菌相关研究已经报道通过该技术对保守的 MAPK 激酶 *EqFus3*、*EqSlt2* 以及 actin 相关基因 *EqSac6* 进行沉默,并发现与 *EqSlt2* 和 *EqSac6* 沉默相比, *EqFus3* 沉默导致的致病性下降更为明显^[17]。本研究中,通过电击转化技术对 *EqExo70* 进行沉默,发现白粉菌的致病力降低并且沉默菌株吸器数量减少,表明 *EqExo70* 对橡胶树白粉菌菌丝发育以及致病力至关重要。据报道香蕉枯萎病菌 (*Fusarium odoratissimum*) 中 *Exo70* 基因的缺失导致了病原菌的生长、分化和致病性的缺陷, *Exo70* 的缺失还导致内源性葡萄糖苷酶和淀粉酶活性的下降^[27]。内毒素类似物 ES2-14 处理稻瘟病菌 (*M. oryzae*) 可抑制附着胞的形成,减小稻瘟病菌引起的病变^[28]。这为 *EqExo70* 在未来能够应用于橡胶树白粉菌的防治提供了更多的参考和可能性,同时,本研究也对病原菌的靶标防治提供了新的研究方向。

Exo70 蛋白亚基在真菌——植物相互作用方面,也发挥着重要作用。如植物中的 *Exo70* 亚基在 PTI 中扮演着重要角色,能协助对真菌病原体的分离和包裹^[29-31]。活性氧爆发和胼胝质沉积被认为是植物应对病原物侵染的基础防卫反应^[32]。此前的研究表明,拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中 *Exo70* 和 MLO 蛋白可以相互作用调节胼胝质的

合成,增强其对白粉菌的抗病能力^[33]。本研究中发现, *EqExo70* 沉默后,活性氧爆发及胼胝质沉积显著增加,表明植物防卫反应增强,这预示着 *EqExo70* 可能参与了白粉菌与橡胶树的互作过程,帮助白粉菌的侵染。

橡胶树白粉菌的胞泌复合体亚基 *EqExo70* 能够表现出在菌丝尖端的极性定位,沉默 *EqExo70* 时能够影响白粉菌的生长和致病力,并且能够引起寄主防卫反应的增强,这表明 *EqExo70* 蛋白亚基在真菌——植物相互作用以及病原菌的靶标防治方面具有很大的研究价值和研究潜力。本课题组将进一步研究橡胶树白粉菌 *EqExo70* 蛋白亚基在极性生长和极性运输的作用,以期明确 *EqExo70* 在白粉菌侵染过程中发挥的作用。

参考文献

- [1] FINGER F P, HUGHES T E, NOVICK P. Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast[J]. Cell, 1998, 92: 559-571.
- [2] RIQUELME M, BREDEWEG E L, CALLEJAS-NEGRETE O, ROBERSON R W, LUDWIG S, BELTRÁN-AGUILAR A, SEILER S, NOVICK P, FREITAG M. The *Neurospora crassa* exocyst complex tethers Spitzenkörper vesicles to the apical plasma membrane during polarized growth[J]. Molecular Biology of The Cell, 2014, 25(8): 1312-1326.
- [3] KÖHLI M, GALATI V, BOUDIER K, ROBERSON R W, PHILIPPSEN P. Growth-speed-correlated localization of exocyst and polarisome components in growth zones of *Ashbya gossypii* hyphal tips[J]. Cell Science, 2008, 121(23): 3878-3889.
- [4] GUPTA Y K, DAGDAS Y F, MARTINEZ-ROCHA A L, KERSHAW M J, LITTLEJOHN G R, RYDER L S, SKLENAR J, MENKE F, TALBOT N J. Septin-dependent assembly of the exocyst is essential for plant infection by *Magnaporthe oryzae*[J]. Plant Cell, 2015, 27: 3277-3289.
- [5] JONES L A, SUDBERY P E. Spitzenkörper, exocyst, and polarisome components in *Candida albicans* hyphae show different patterns of localization and have distinct dynamic properties[J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(10): 1455-1465.
- [6] HAYAKAWA Y, ISHIKAWA E, SHOJI J Y, NAKANO H, KITAMOTO K. Septum-directed secretion in the filamentous fungus *Aspergillus oryzae*[J]. Molecular Microbiology, 2011, 81: 40-55.
- [7] GIRALDO M C, DAGDAS Y F, GUPTA Y K, MENTLAK T A, YI M, MARTINEZ-ROCHA A L, SAITOH H, TERAUCHI R, TALBOT N J, VALENT B. Two distinct se-

- cretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *Nature Communications*, 2013, 4: 1996.
- [8] ZHANG Z Q, QIN G Z, LI B Q. Knocking out *Bcsas1* in *Botrytis cinerea* impacts growth, development, and secretion of extracellular proteins, which decreases virulence[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(6): 590-600.
- [9] GUAN W Q, FENG J, WANG R X, MA Z W, WANG W X, WANG K, ZHU T H. Functional analysis of the exocyst subunit BcExo70 in *Botrytis cinerea*[J]. *Current Genetics*, 2020, 66: 85-95.
- [10] POWERS-FLETCHER M V, FENG X Z, KRISHNAN K, ASKEW D S. Deletion of the *sec4* homolog *srgA* from *Aspergillus fumigatus* is associated with an impaired stress response, attenuated virulence and phenotypic heterogeneity[J]. *PLoS One*, 2018, 58(3): 379.
- [11] BERTHELOT K, PERUCH F, LECOMTE S. Highlights on *Hevea brasiliensis* hevein proteins[J]. *Biochimie*, 2016, 127: 258-270.
- [12] LIYANAGE K K, KHAN S, BROOKS S, MORTIMER P E, KARUNARATHNA S C, XU J. Taxonomic revision and phylogenetic analyses of rubber powderymildew fungi[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 105: 185-195.
- [13] WU H, PAN Y, DI R, HE Q G, RAJAOFERA M J N, LIU W B. Molecular identification of the powdery mildew fungus infecting rubber trees in China[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 49: e12519.
- [14] MARGARITOPOULOU T, KIZIS D, KOTOPOULIS D, PAPADAKIS I E, ANAGNOSTOPOULOS C, BAIRA E, TERMENTZI A, VICHOU A E, LEIFER T C, MARKELLOU E. Enriched H3K4me3 marks at Pm-0 resistance-related genes prime courgette against *Podosphaera xanthii*[J]. *Plant Physiology*, 2022, 188(1): 576-592.
- [15] MARTÍNEZ-CRUZ J M, POLONIO Á, RUIZ-JIMÉNEZ L, VIELBA-FERNÁNDEZ A, HIERREZUELO J, ROMERO D. Suppression of chitin-triggered immunity by a new fungal chitin-binding effector resulting from alternative splicing of a chitin deacetylase gene[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(10): 1022.
- [16] MARTÍNEZ-CRUZ J, ROMERO D, VICENTE A D, PÉREZ-GARCÍA A. Transformation of the cucurbit powdery mildew pathogen *Podosphaera xanthii* by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. *New Phytologist*, 2017, 213(4): 1961-1973.
- [17] YIN J Y, LI X, DONG L P, ZHU X H, CHEN Y, L ZHAO W Y, LIU Y H, SHAN J X, LIU W B, LIN C H, MIAO W G. Transformation-based gene silencing and functional characterization of an ISC effector reveal how a powdery mildew fungus disturbs salicylic acid biosynthesis and immune response in the plant[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2024, 25(11): e70030.
- [18] LIANG P, LIU S Y, XU F, JIANG S Q, YAN J, HE Q G, LIU W B, LIN C H, ZHENG F C, WANG X F, MIAO W G. Powdery mildews are characterized by contracted carbohydrate metabolism and diverse effectors to adapt to obligate biotrophic lifestyle[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3160.
- [19] JI X B, TIAN Y, LIU W B, LIN C H, HE F, YANG J, MIAO W G, LI Z G. Mitochondrial characteristics of the powdery mildew genus *Erysiphe* revealed an extraordinary evolution in protein-coding genes[J]. *Journal of Biological Macromolecule*, 2023, 230: 123153.
- [20] 董林朋, 殷金瑶, 赵文渊, 林春花, 刘文波, 缪卫国, 李潇. 启动子 WY172 和 WY195 在暹罗炭疽菌中的活性研究[J]. *热带生物学报*, 2023, 14(5): 506-513.
- DONG L P, YIN J Y, ZHAO W Y, LIN C H, LIU W B, MIAO W G, LI X. Study on the activity of promoter WY172 and WY195 in *Anthraxis Siamensis*[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2023, 14(5): 506-513. (in Chinese)
- [21] 聂雪纯, 李思鹏, 刘玉涵, 缪卫国, 李潇. 橡胶树 HbLFG2 蛋白对植物免疫防卫的调控机理[J]. *热带生物学报*, 2023, 14(4): 380-388.
- NIE X C, LI S P, LIU Y H, MIAO W G, LI X. Regulation mechanism of HbLFG2 protein on plant immune defense[J]. *Journal of Tropical Biology*, 2023, 14(4): 380-388. (in Chinese)
- [22] CHEN C J, WU Y, LI J W, WANG X, ZENG Z H, XU J, LIU Y L, FENG J T, CHEN H, HE Y H, XIA R. TBtools-II: A "one for all, all for one" bioinformatics platform for biological big-data mining[J]. *Molecular Plant*, 2023, 16: 1733-1742.
- [23] BIGEARD J, COLCOMBET J, HIRT H. Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI)[J]. *Molecular Plant*, 2015, 8: 521-539.
- [24] COUTO D, ZIPFEL C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16: 537-552.
- [25] BENDEZÚ F O, VINCENZETTI V, MARTIN S G. Fission yeast Sec3 and Exo70 are transported on actin cables and localize the exocyst complex to cell poles[J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e40248.
- [26] HE B, XI F G, ZHANG X Y, ZHANG J, GUO W. Exo70 interacts with phospholipids and mediates the targeting of the exocyst to the plasma membrane[J]. *European Molecular Biology Organization Journal*, 2007, 26(18): 4053-4065.
- [27] YANG S, ZHOU X, GUO P T, LIN Y Q, FAN Q W,

- ZURIEGAT Q, LU S M, YANG J J, YU W Y, LIU H, LU G D, SHIM W B, WANG Z H, YUN Y Z. The exocyst regulates hydrolytic enzyme secretion at hyphal tips and septa in the banana fusarium wilt fungus *Fusarium odoratissimum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(17): e0308820.
- [28] HUANG L, LI X H, LI Y, YIN X L, LI Y, WU B, MO H P, LIAO C J, MENGISTE T, GUO W, DAI M J, ZHANG C H. Endosidin2-14 Targets the exocyst complex in plants and fungal pathogens to inhibit exocytosis[J]. *Plant Physiology*, 2019, 180(3): 1756-1770.
- [29] STEGMANN M, ANDERSON R G, WESTPHAL L, ROSAHL S, MCDOWELL J M, TRUJILLO M. The exocyst subunit Exo70B1 is involved in the immune response of *Arabidopsis thaliana* to different pathogens and cell death[J]. *Plant Signal and Behavior*, 2013, 8: e27421.
- [30] STEGMANN M, ANDERSON R G, ICHIMURA K, PECENKOVA T, REUTER P, ŽÁRSKY V, MCDOWELL J M, SHIRASU K, TRUJILLO M. The ubiquitin Ligase PUB22 targets a subunit of the exocyst complex required for PAMP-triggered responses in *Arabidopsis*[J]. *Plant Cell*, 2012, 24: 4703-4716.
- [31] PECENKOVÁ T, HÁLA M, KULICH I, KOCOURKOVÁ D, DRDOVÁ E, FENDRYCH M, TOUPALOVÁ H, ŽÁRSKY V. The role for the exocyst complex subunits Exo70B2 and Exo70H1 in the plant-pathogen interaction[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62: 2107-2116.
- [32] MITTLER R. ROS are good[J]. *Trends in Plant Science*, 2017, 22(1): 11-19.
- [33] HUEBBERS J W, CALDARESCU G A, KUBÁTOVÁ Z, SABOL P, LEVECQUE S C J, KUHN H, KULICH I, REINSTÄDLER A, BÜTTGEN K, MANGA-ROBLES A, MÉLIDA H, PAULY M, PANSTRUGA R, ŽÁRSKÝ V. Interplay of EXO70 and MLO proteins modulates trichome cell wall composition and susceptibility to powdery mildew[J]. *Plant Cell*, 2024, 36(4): 1007-1035.