

辣椒疫霉菌 RXLR 效应分子 Pc13306 调控植物免疫的机理研究

孟 洁^{1,2}, 季贞希^{1,2}, 郭恒远^{1,2}, 钟彩奕^{1,2}, 梁启福^{1,2}, 陈庆河^{1,2*}

1. 海南大学南繁学院(三亚南繁研究院)/热带农林学院, 海南三亚 572025; 2. 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

摘 要: 辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*) 寄主广泛, 可引起茄科、葫芦科、豆科等多科植物的根腐、茎基腐和果实、叶片腐烂, 严重制约相关产业的可持续性发展。辣椒疫霉菌分泌的 RXLR 效应分子可侵入植物细胞, 靶向宿主免疫信号通路以干扰其防御反应, 增强侵染能力。本研究通过筛选辣椒疫霉菌 RXLR 效应分子, 鉴定到 1 个关键效应分子基因 *Pc13306*, 其编码区全长 888 nt, 编码 295 aa, N 端含典型 RXLR 基序(第 34~37 位)。酵母分泌系统验证 *Pc13306* 信号肽具有分泌活性, qRT-PCR 结果表明, *Pc13306* 在辣椒疫霉菌侵染后期表达量显著升高。在农杆菌介导下, 将 *Pc13306* 转化本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*), 瞬时表达结果表明其能够增强病原菌的致病力, 病斑面积扩展和病原菌生物量积累均显著升高。此外, *Pc13306* 的表达可诱导活性氧(ROS)爆发及过敏性坏死反应(HR)。进一步研究发现, *Pc13306* 能够激活 SA 信号通路、自噬及模式触发免疫(PTI)核心基因的显著上调表达, 其能够诱导植物免疫反应的发生。研究结果可为解析辣椒疫霉菌-寄主互作机制及开发靶向效应分子的病害防控策略提供新的依据。

关键词: 辣椒疫霉菌; RXLR 效应分子; 植物免疫; 过敏性坏死反应; 调控机理

中图分类号: S432.2 文献标志码: A

Mechanism of the RXLR Effector Pc13306 of *Phytophthora capsici* Regulating Plant Immunity

MENG Jie^{1,2}, JI Zhenxi^{1,2}, GUO Hengyuan^{1,2}, ZHONG Caiyi^{1,2}, LIANG Qifu^{1,2}, CHEN Qinghe^{1,2*}

1. School of Breeding and Multiplication (Sanya Institute of Breeding and Multiplication) / School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China; 2. Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: *Phytophthora capsici* is a damaging pathogen with a wide host range, causing devastating diseases such as root rot, stem rot, leaf and fruit rot in plants from diverse families like Solanaceae, Cucurbitaceae, and Legumes. The diseases pose a significant threat to the sustainability of related agricultural industries. In this study, we identified a key RXLR effector, Pc13306, from the RXLR effector repertoire of *P. capsici*. The coding region of *Pc13306* comprised 888 nucleotides, encoding 295 amino acids, with a conserved RXLR motif residing at positions 34-37 in the N-terminal region. Utilizing a yeast secretion system, we confirmed that the signal peptide of Pc13306 exhibited robust secretory activity. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis revealed that Pc13306 was specifically upregulated during the late stages of *P. capsici* infection. Through agrobacterium-mediated transient transformation of *Nicotiana benthamiana* Pc13306 was demonstrated to significantly enhance lesion expansion and pathogen biomass accumulation, thereby improving infection efficiency. Moreover, Pc13306 induced reactive oxygen species (ROS) bursts and hypersensitive response (HR). Further exploration into the regulatory mechanism of Pc13306 in plant immunity revealed that it activated the salicylic acid (SA) signaling pathway and autophagy processes. Notably, Pc13306 markedly upregulated the expression of core genes involved in pattern-triggered immunity (PTI), indicating its role in modulating plant immune responses. The findings would provide insights into the interaction

收稿日期 2025-04-13; 接受日期 2025-08-06

基金项目 海南省重点研发项目 (No. ZDYF2022XDNY241); 海南省优希果树产业技术体系项目 (No. HNARS-11); 海南大学科研启动基金项目[No. KYQD(ZR)-20080]。

作者简介 孟 洁 (2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 热带作物病害。*通信作者 (Corresponding author): 陈庆河 (CHEN Qinghe), E-mail: qhchen@hainanu.edu.cn。

mechanisms between *P. capsici* and its host, and facilitate the development of targeted disease control strategies focusing on effectors.

Keywords: *Phytophthora capsici*; RXLR effector; plant immunity; hypersensitive response; regulatory mechanism

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2025.11.002

辣椒疫霉菌 (*Phytophthora capsici*) 的寄主广泛, 除危害辣椒外, 对茄科、豆科、葫芦科等作物造成极大威胁^[1]。该病原菌侵染周期短、发病迅猛, 已成为辣椒等作物种植过程中的毁灭性土传病害^[2]。因此, 深入研究辣椒疫霉菌致病基因的功能与相关机制, 为防控辣椒疫病提供关键的分子靶点。

寄主植物与病原菌在长期协同进化过程中, 演化出一套高度复杂且动态调控的多层次免疫防御体系, 即植物先天免疫系统。该系统的核心机制包含模式触发免疫 (PAMP-triggered immunity, PTI) 和效应分子触发免疫 (Effector-triggered immunity, ETI), 通过精准识别病原菌相关分子模式 (Pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) 或其分泌的效应分子 (Effectors), 激活级联防御反应以产生抗病反应^[3]。卵菌效应分子能够进入寄主植物细胞或细胞间隙, 与寄主植物细胞内的靶标分子相互作用, 从而干扰或操纵寄主植物的免疫反应和生理过程, 以促进病原菌侵染和致病的一类小分子物质或蛋白质^[4]。其中, RXLR 类效应分子因其 N 端保守的 RXLR (Arg-X-Leu-Arg)-dEER (Asp-Glu-Glu-Arg) 转运基序 (通常位于信号肽下游) 可介导胞内转运, 靶向作用宿主免疫组分并操纵生理反应而备受关注, 其 C 端效应域则具有显著的多态性与正向选择特征, 是与宿主靶标互作、决定促侵染或激发 ETI 功能的关键区域^[5]。

目前, 有关辣椒疫霉菌 RXLR 效应分子在侵染过程中的具体功能及其互作宿主靶标的报道较少。因此, 深入解析辣椒疫霉菌效应分子的功能机制及其宿主互作靶标, 对于阐明辣椒疫霉菌的致病机理至关重要。本研究在前期工作中筛选出一个 N 端含有典型 RXLR 保守基序的候选效应分子 Pc13306。在此基础上, 本研究开展了该效应分子的基因克隆和调控免疫机理等方面研究, 结果为深入解析辣椒疫霉菌与宿主互作机理及开发新型靶向效应分子的病害防控策略提供新的依据, 具有重要的理论意义和应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 辣椒 (*Capsicum annuum*) 中感品种 CB226 和本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 均由海南大学南繁学院提供。

1.1.2 菌株及载体 辣椒疫霉菌 (*P. capsici*) 标准菌株 LT1534 和瞬时过表达载体 pCambia1300-GFP 由海南大学南繁学院提供。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101 感受态购自上海唯地生物技术有限公司。酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株 YTK12 感受态、pSUC2 载体和阳性对照质粒 pSUC2-Avr1b^{SP} 均购自北京酷来搏科技有限公司。

1.1.3 主要试剂 TIANprep Mini Plasmid Kit 质粒小提试剂盒、Universal DNA Purification Kit 通用型 DNA 纯化回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。All-in-one RT SuperMix Perfect for qPCR 反转录试剂盒、CloneExpress II One Step Cloning Kit 无缝克隆试剂盒、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 高保真 DNA 聚合酶试剂盒购自诺唯赞生物科技股份有限公司。TB Green Premix Ex Taq II 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qPCR) 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司, 考马斯亮蓝快速免脱色染液、Omni-Easy 一步法 PAGE 凝胶快速制备试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司。HiPure Universal RNA Mini Kit 通用型 RNA 抽提试剂盒购自广州美基生物科技有限公司。本研究所用限制性内切酶购自美国 BioLabs 公司, 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐 (3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB)、2,3,5-氯化三苯基四氮唑 (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, TTC) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司, CMD-W 培养基购自北京酷来搏科技有限公司, 其他试剂均为国产分析纯。LB 培养基按常规配方制备。

1.2 方法

1.2.1 *Pc13306* 的克隆及载体构建 参考 LAMOUR 等^[6]的方法, 提取辣椒疫霉菌的总 RNA 并反转录为 cDNA。根据 FungiDB (<https://fungidb>).

org/fungidb/app/record/dataset/NCBITAXON_763924) 数据库中已公布的辣椒疫霉菌 LT1534 的全基因组序列, 利用 DNAMAN 软件设计 DVH05_013306 基因 CDS 区的序列引物 Pc13306-F 和 Pc13306-R (表 1), 扩增 CDS 序列。pCAMBIA1300-

GFP 瞬时表达载体线性化后使用无缝克隆试剂盒将线性化载体和目的片段进行连接, 连接产物转化 DH5 α 大肠感受态后用引物对 p1300GFP-13306-F 和 p1300GFP-13306-R (表 1) 进行菌落 PCR 验证, 筛选出阳性克隆后进行测序验证。

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')	用途 Usage
Pc13306-F	ATGCGTCTCTCCTTCTTCCTCA	基因扩增
Pc13306-R	CTAGGCCGAGCAGTGGAT	
p1300GFP-13306-F	GAGAACACGGGGGACTCTAGAATGCGTCTCTCCTTCTTCCTCA	
p1300GFP-13306-R	GCCCTTGCTCACCATGGATCCGGCCGAGCAGTGGAT	表达载体的扩增
p1300GFP-F	TGGAGAGAACACGGGGGAC	
p1300GFP-R	GCTGAACTTGTGGCCGTTTAC	
13306-SP-F	AGCTCGGAATTTTAATTAAGATGCGTCTCTCCTTCTTC	Pc13306 信号肽扩增
13306-SP-R	GACTCACTATAGGGAGAACCTGCGTTTGAGAGGCTGATG	
pSUC2-F	GGTGTGAAGTGGACCAAAAGGTCTA	
pSUC2-R	CCTCGTCATTGTTCTCGTTCCCTT	pSUC2 测序
qPCR13306-F	CTTACGACGAGTTTCGGGCAA	
qPCR13306-R	GGGCGATTTCGTCATCACTG	
qPCE1 α -F	GGTCAGATCGGCAACGGTTACTC	qPCR
qPCE1 α -R	GCAGGCATCACCCGACTTCAC	
qNbPR1a-F	CCGCCTTCCCTCAACTCAAC	
qNbPR1a-R	GCACAACCAAGACGTACTGAG	
qNbPR2-F	AGGTGTTTGCTATGGAATGC	
qNbPR2-R	TCTGTACCCACCATCTTGC	
qNbATG8a-F	CACCCACTTGAAAGGCGACAGGC	
qNbATG8a-R	GCCTTCTCAGCACTAAGCTTATTCTC	
qNbHMGR2-F	GTGGCGTGAGAAAATCAGGAA	
qNbHMGR2-R	CTGGAAACGAACGACTGGACA	
qNbSERK3/BAK1-F	CTGGGTCTTTCTATGCTTAATTCGG	
qNbSERK3/BAK1-R	AGCATCACCTTCAGCGTTACC	
qNbWRKY8-F	TCTTTAGCCGTCCAGCCTTACA	
qNbWRKY8-R	CACTTTCGCTTTCTCTTTTCCA	
qNbRXEG1-F	ACTTGACGTTGATGATGATTTTCCA	
qNbRXEG1-R	TTCCCCAGAAATGCAACAAAGA	
qNbGAPDH-F	AGGACAAGGCTGCTGCTCAC	
qNbGAPDH-R	TGGCTGTATTCTTCTCGTTGAC	

1.2.2 Pc13306 的表达模式分析 参照张荣等^[7]的方法收集辣椒疫霉菌的孢子囊和游动孢子, 提取 RNA 并反转录为 cDNA。将辣椒疫霉菌 LT1534 接种于辣椒叶片中脉处, 于不同时间点分别收集菌饼与辣椒叶片, 提取 RNA 并反转录为 cDNA。以辣椒疫霉菌 *PcEF1- α* 为内参基因, 以 LT1534 的 cDNA 为对照, 依据 TB Green 荧光染料试剂盒

说明书配制 qPCR 反应体系并设置相应程序, 定量引物序列见表 1, 每个反应设置 3 个重复, 根据 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法^[8]分析 Pc13306 侵染过程中病原菌体内和植物组织内的相对表达量。基于辛淑香等^[9]的方法, 采用 qRT-PCR 绝对定量技术检测侵染过程中辣椒叶片细胞内 Pc13306 的拷贝数。以含 Pc13306 片段的重组质粒梯度稀释 (10⁸~10¹ 拷贝/ μ L) 构建

标准曲线, 每个梯度设 3 次重复。

1.2.3 Pc13306 的信号肽分泌活性验证 参照 YIN 等^[10]的方法, 采用蔗糖酶外泌缺陷型酿酒酵母菌株 YTK12 验证 Pc13306 信号肽的分泌活性。经 SignalP 5.0 预测 Pc13306 信号肽序列, 构建重组载体 pSUC2-Pc13306^{SP}, 利用醋酸锂法转化至 YTK12 酵母细胞, 参照 YIN 等^[10]的方法进行平板测试和 TTC 显色反应验证信号肽的分泌功能。

1.2.4 Pc13306 在本氏烟草中调控辣椒疫霉菌感染的功能验证 利用农杆菌介导的瞬时表达技术对效应分子 Pc13306 在辣椒疫霉菌感染过程中的功能进行研究。参照霍琳等^[11]的方法, 将 pCambia1300-GFP 空载体和 Pc13306-GFP 重组质粒分别转化至农杆菌 GV3101。筛选出阳性转化子后, 用 100 $\mu\text{mol/L}$ 乙酰丁香酮制备 OD₆₀₀ 为 1.0 的菌液, 与 RNA 沉默抑制因子 P19 表达菌液等体积混合注射, 48 h 后接种辣椒疫霉菌, 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光培养 72 h, 利用 Image J 软件统计病斑面积。同时以本氏烟草 *NbGAPDH* 为内参基因, 以辣椒疫霉菌 *PcEF1- α* 为靶基因, 采用 qRT-PCR 技术检测病菌的相对生物量。

1.2.5 Pc13306 蛋白表达水平验证 为验证 Pc13306 在本氏烟草中的瞬时表达情况, 将叶片组织进行总蛋白提取。样品经含 3 倍体积 (w/V) 蛋白提取缓冲液冰上匀浆后, 于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、14 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液, 取适量上清液加入 4 $\times$ Loading buffer, 沸水浴变性 10 min 后冰浴。经 SDS-PAGE 分离蛋白及电转法转膜, 利用 GFP 一抗、二抗进行 Western blot 检测, 根据条带大小判断 Pc13306 融合蛋白的表达情况, 同时进行考马斯亮蓝染色以验证各泳道总蛋白上样量的一致性。

1.2.6 DAB 染色检测活性氧积累 为检测病原相关分子模式 (PAMP) flg22 诱导的活性氧 (ROS) 爆发, 采用 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB) 组织化学染色法^[12]检测 ROS。于本氏烟草叶片注射 OD₆₀₀ 为 1.0 的相应农杆菌菌液 48 h 后, 均匀喷洒 1 $\mu\text{mol/L}$ flg22 多肽溶液诱导免疫反应, 避光孵育 5~10 min 后加入新鲜配制的 DAB 染色液, 避光振荡染色 4~8 h。随后, 用漂白液 (无水乙醇: 冰醋酸: 甘油=3: 1: 1, V/V/V) 煮沸脱色 (15 $\pm$ 5) min 至叶绿素完全去除, 更换新鲜漂白液浸泡 30 min。最后展平叶片, 于均匀白光下观察并记录活性氧积累情况。

1.2.7 过敏性坏死反应的测定 为研究 Pc13306

诱导的细胞死亡反应, 将含有 Pc13306 的重组农杆菌的菌液注射本氏烟草叶片。阴性对照 (CK) 为无农杆菌的悬液, 阳性对照 (INF1) 为致病疫霉菌分泌的激发素^[13], 可诱导植物细胞的坏死, 另设 GFP 空载体为不能诱导坏死的绿色荧光蛋白作为对照, 注射后 3~5 d 观察细胞坏死表型。

1.2.8 本氏烟草免疫相关基因转录水平分析 以本氏烟草基因 *NbGAPDH* 为内参, pCambia1300-GFP 为对照, 采用 qRT-PCR 检测本氏烟草免疫相关基因的表达水平, 并根据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算相对表达量。

2 结果与分析

2.1 Pc13306 的序列分析和系统发育树的构建

基于 NCBI 数据库中辣椒疫霉菌 LT1534 菌株的基因组序列分析表明, *Pc13306* 基因不含内含子, 其编码区 (CDS) 由单一外显子构成, 长度为 888 nt。氨基酸序列分析表明, *Pc13306* 编码 295 个氨基酸 (aa), 预测分子量为 30.8 kDa, 其序列包含信号肽 (SP; 第 1~24 位 aa)、RXLR 结构域 (第 34~37 位 aa) 和 DEER 基序 (第 106~111 位 aa), 符合典型 RXLR 效应分子的结构特征 (图 1A)。系统发育分析结果显示, *Pc13306* 氨基酸序列 (登录号 KAG1710580.1) 与同样来自辣椒疫霉菌标准菌株 LT1534 的 DVH05_013315 (登录号 KAG1710591.1) 具有最高的序列相似性 (85.19%) (图 1B)。

2.2 Pc13306 表达模式分析

辣椒疫霉菌接种辣椒叶片后, 早期症状 (<24 h) 为针尖状水浸斑伴褪绿, 中期 (24~48 h) 表现为不规则水浸软腐及维管束褐变, 晚期 (>48 h) 出现大面积褐变坏死斑、同时接种部位出现白色霉状物 (病菌组织), 最终叶片萎蔫腐烂。典型晚期症状 (72 h) 出现大面积水浸状软腐伴白色霉层 (图 2A)。采用 qRT-PCR 检测 *Pc13306* 在辣椒疫霉菌不同发育阶段的表达量, 发现 *Pc13306* 在游动孢子阶段几乎不表达, 而在孢子囊阶段呈现显著差异表达 (图 2B)。侵染过程中 *Pc13306* 在病原菌体内的表达水平均显著低于对照组 (CK), 并在侵染 36 h 时达到峰值 (图 2C), 而 *Pc13306* 在辣椒叶片中的表达水平显著高于对照组, 且侵染后 24 h 即开始高表达 (图 2D)。采用绝对定量 qPCR 对 *Pc13306* 在植物细胞内的拷贝数进行分析, 发现侵染初期 *Pc13306* 拷贝数极低, 侵染 12 h

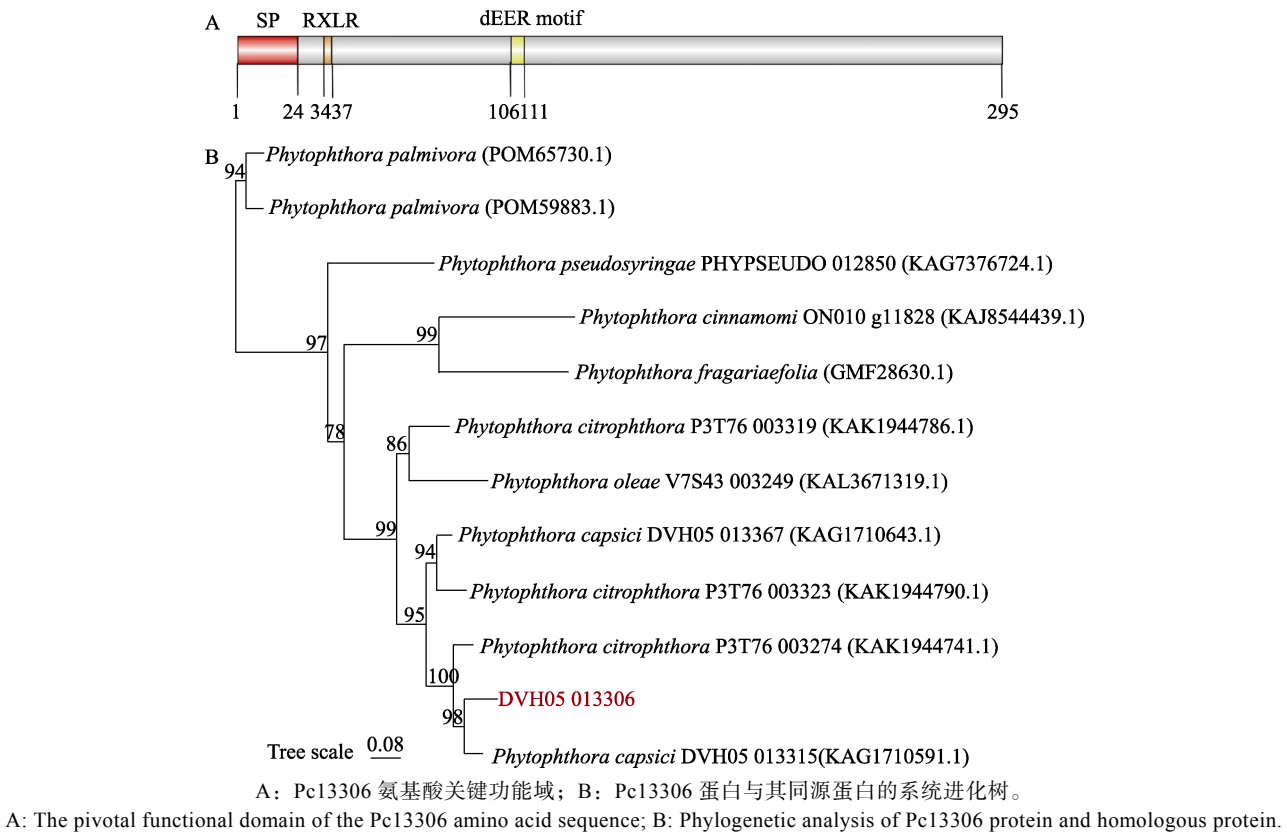
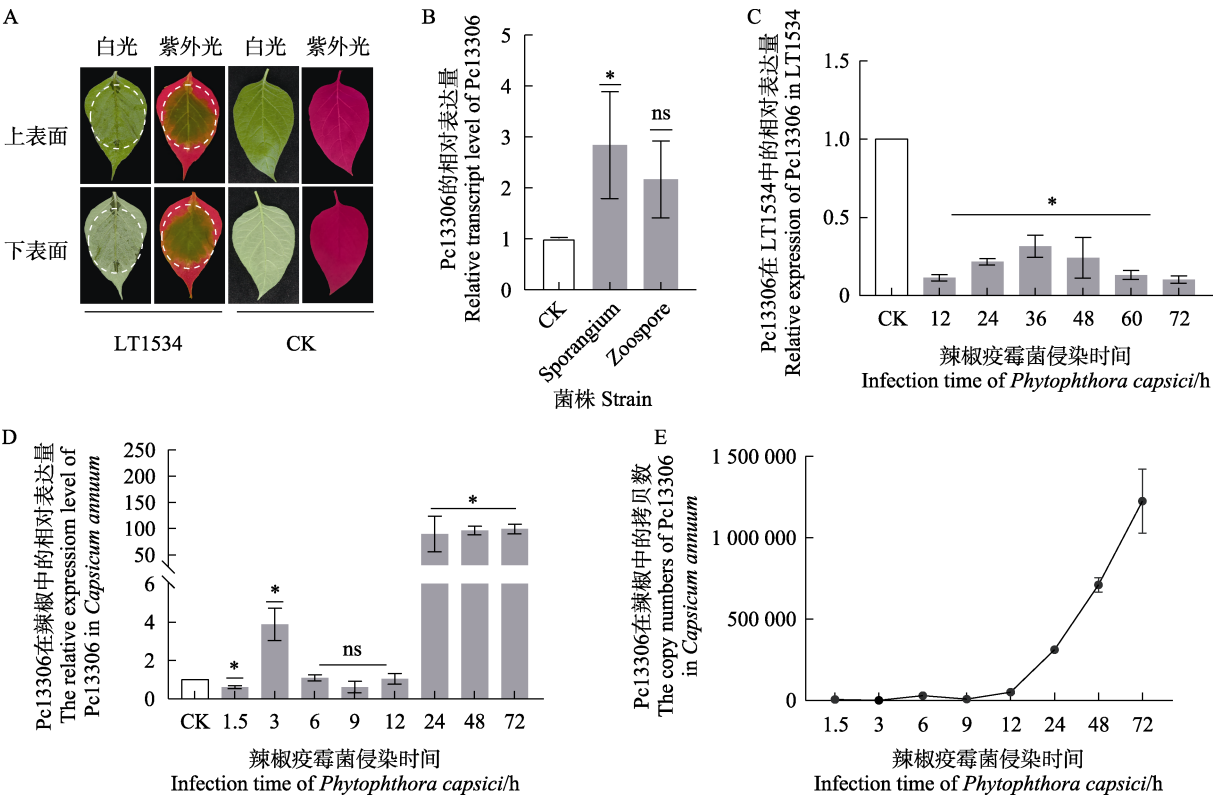


图 1 Pc13306 序列分析和系统发育树的构建

Fig. 1 Sequence analysis of Pc13306 and construction of phylogenetic tree



ns 表示无显著差异 ($P>0.05$), *表示差异显著 ($P<0.05$)。
ns indicates no significant ($P>0.05$), * indicates significant difference ($P<0.05$).

图 2 Pc13306 在辣椒疫霉菌感染阶段的表达量检测

Fig. 2 Detection of Pc13306 expression at infection stage of *P. capsici*

后,拷贝数开始逐渐升高(图 2E)。以上结果表明, Pc13306 主要在辣椒疫霉菌侵染后期发挥作用。

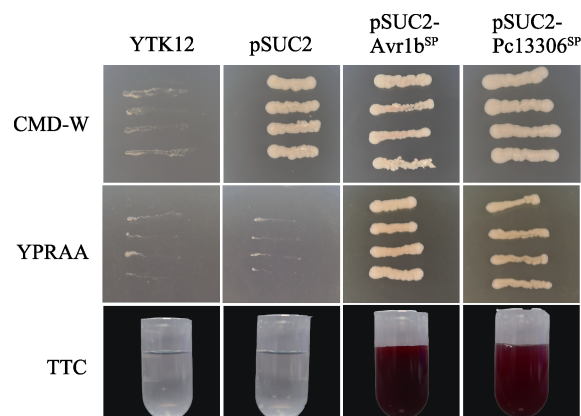
2.3 Pc13306 的信号肽具有分泌功能

SignalP 5.0 软件预测显示, Pc13306 的 N 端第 1~24 位氨基酸为信号肽序列。将 pSUC2-Pc13306^{SP} 融合载体转化至蔗糖酶缺陷型酵母菌株 YTK12 中,发现含 pSUC2 载体的转化子在 CMD-W 培养基上正常生长,表明质粒成功转入。因 YTK12 菌株内源编码蔗糖酶的基因(SUC2)缺失而不能利用棉子糖,故在以棉子糖为唯一碳源的 YPRAA 培养基中, pSUC2-Avr1b^{SP} (阳性对照)与 pSUC2-Pc13306^{SP} 转化子通过信号肽引导 SUC2 分泌至胞外并水解棉子糖,因此能够在培养基上正常生长,而 pSUC2 空载体仅依赖背景渗漏酶活性呈现微弱生长(图 3)。进一步经 TTC 显色反应检测发现, pSUC2-Pc13306^{SP} 转化子中胞外分泌的 SUC2 水解底物生成还原糖,还原 TTC 形成红色甲臍(TPF),其显色强度与阳性对照一致,证实 Pc13306 的信号肽具有分泌活性(图 3)。

2.4 效应分子 Pc13306 调控植物免疫的验证

2.4.1 Pc13306 能够增强辣椒疫霉菌对本氏烟草的致病能力 为探究 Pc13306 在辣椒疫霉菌侵染过程中的功能,利用农杆菌介导的瞬时表达系统,将含有 Pc13306-GFP 融合蛋白的农杆菌悬浮液与 RNA 沉默抑制因子 P19 的农杆菌悬浮液以等体积比例混合后,共浸润烟草叶片。在浸润 24 h 后于注射位点接种辣椒疫霉菌菌饼,并在接种 48 h 后观察病原菌侵染情况。结果显示,在瞬时表达

Pc13306-GFP 叶片中的病斑面积显著大于空载体对照组(GFP)(图 4A),表明 Pc13306 的表达能够促进辣椒疫霉菌在本氏烟草上的侵染扩展。进一步通过 qRT-PCR 分析叶片中病原菌的相对生物量,结果显示, Pc13306-GFP 表达叶片中的病原菌生物量显著高于空载体对照组(图 4B),该结果与病斑表型观察一致。同时, Western blot 检测证实 Pc13306-GFP 融合蛋白在实验叶片中成功表达(图 4C)。以上结果表明,瞬时表达 Pc13306 显著增强了辣椒疫霉菌对本氏烟草的侵染能力。

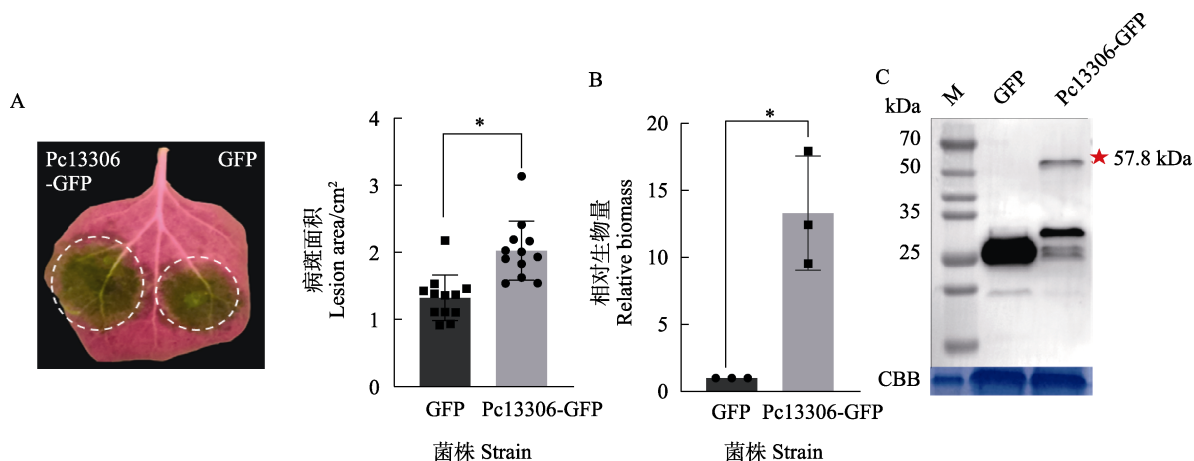


CMD-W: 缺色氨酸培养基; YPRAA: 酵母蛋白胨棉子糖培养基; TTC: 显色溶液; YTK12 和 pSUC2: 阴性对照; pSUC2-Avr1b^{SP}: 阳性对照。

CMD-W: Tryptophan-deficient medium; YPRAA: Yeast peptone raffinose medium; TTC: Chromogenic solution; YTK12 and pSUC2: Negative control; pSUC2-Avr1b^{SP}: Positive control.

图 3 Pc13306 信号肽分泌功能验证

Fig. 3 Verification of secretory function of Pc13306 signal peptide



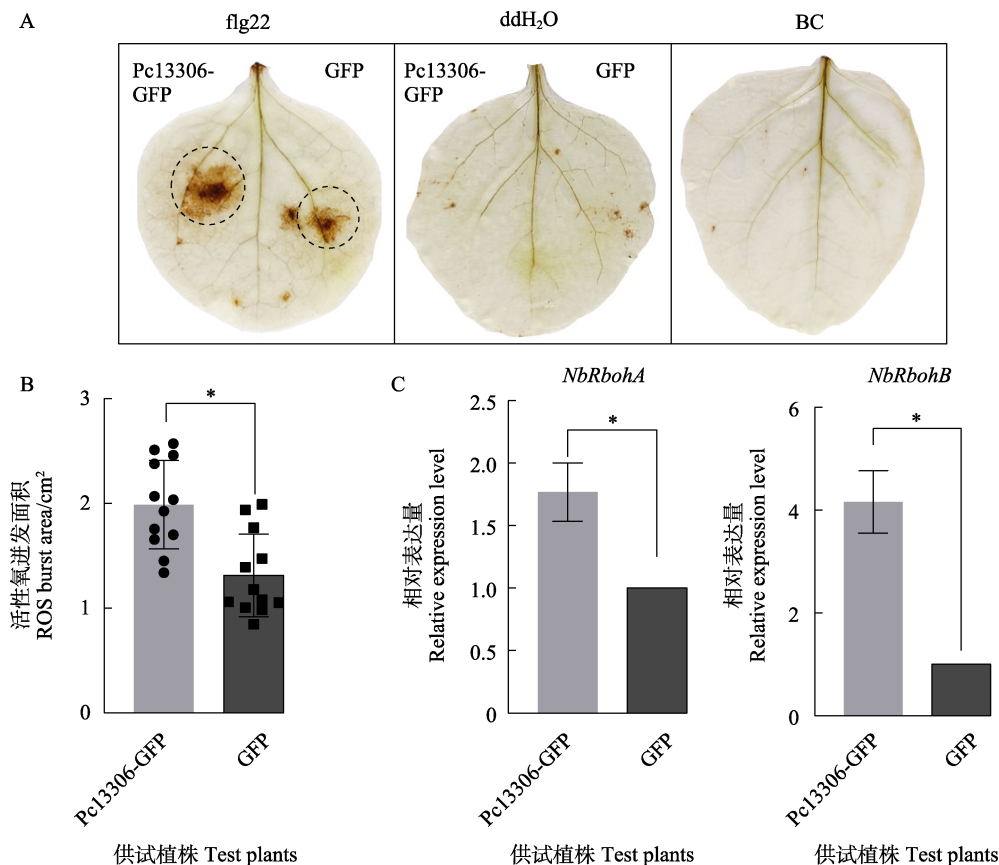
M: 多色预染蛋白分子量标准 WJ103; CBB: 考马斯亮蓝染色进行蛋白定量; *表示差异显著 ($P<0.05$)。 M: Multicolor prestained protein marker WJ103; CBB: Coomassie brilliant blue staining for protein quantification; *indicates significant difference ($P<0.05$).

图 4 Pc13306 能够促进辣椒疫霉菌对本氏烟草的侵染

Fig. 4 Infection promotion of *N. benthamiana* leaves by *P. capsici* Pc13306

2.4.2 Pc13306 能够促进活性氧爆发 采用农杆菌介导法在本氏烟草叶片中瞬时表达 Pc13306-GFP 融合蛋白，并在表达 48 h 后以病原菌经典 PAMPs 中的鞭毛蛋白衍生肽 flg22 进行诱导处理，采用 3,3'-二氨基联苯胺（DAB）染色法检测植物中活性氧（ROS）爆发水平。结果显示，瞬时过

表达 Pc13306-GFP 的叶片中 ROS 爆发面积显著增加（图 5A，图 5B）。为评估 Pc13306 过表达对 ROS 爆发相关基因表达的影响，对 ROS 标志基因 *NbRbohA* 和 *NbRbohB* 的相对表达量进行检测，发现二者均显著上调表达（图 5C）。上述结果表明 Pc13306 可促进活性氧爆发。



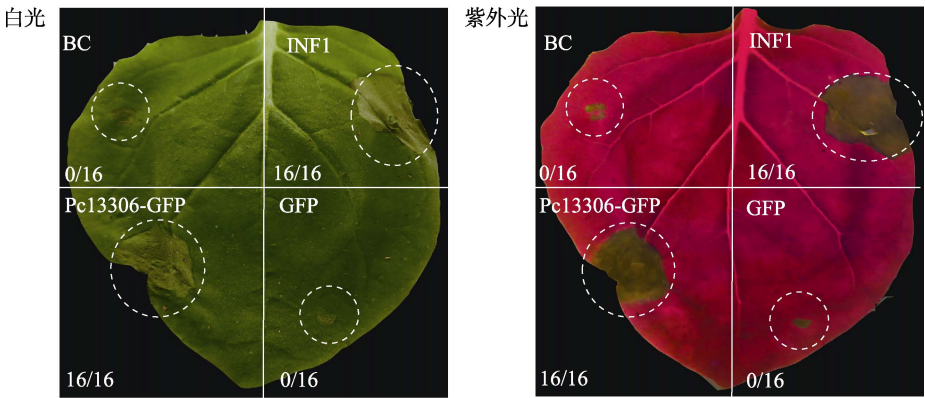
A: flg22 为诱导处理，ddH₂O 为溶剂对照，BC 为空白对照；B：活性氧爆发面积分析；C：活性氧标志性基因的相对表达量检测；
*表示差异显著（*P*<0.05）。
A: Flg22 is induction treatment, ddH₂O is solvent control, BC is blank control; B: ROS burst area statistics;
* indicates significant difference (*P*<0.05).

图 5 活性氧检测

Fig. 5 Reactive oxygen species detection

2.4.3 Pc13306 引起本氏烟草的叶片坏死 为评估 Pc13306 诱导植物细胞死亡的能力，在本氏烟草叶片背面划分 4 个区域进行相应的注射处理，3~5 d 后对细胞坏死情况进行观察。结果（图 6）发现，在白光与紫外光下，瞬时过表达 Pc13306-GFP 的区域和能够激发典型过敏性坏死反应（HR）INF1 区域的烟草叶片均出现明显的坏死斑，表明 Pc13306 与 INF1 一样能够激发寄主 HR 的产生，但与 INF1 诱导的大面积坏死相比，Pc13306 引发的坏死病斑明显较小，说明其触发 HR 的能力相对较弱。

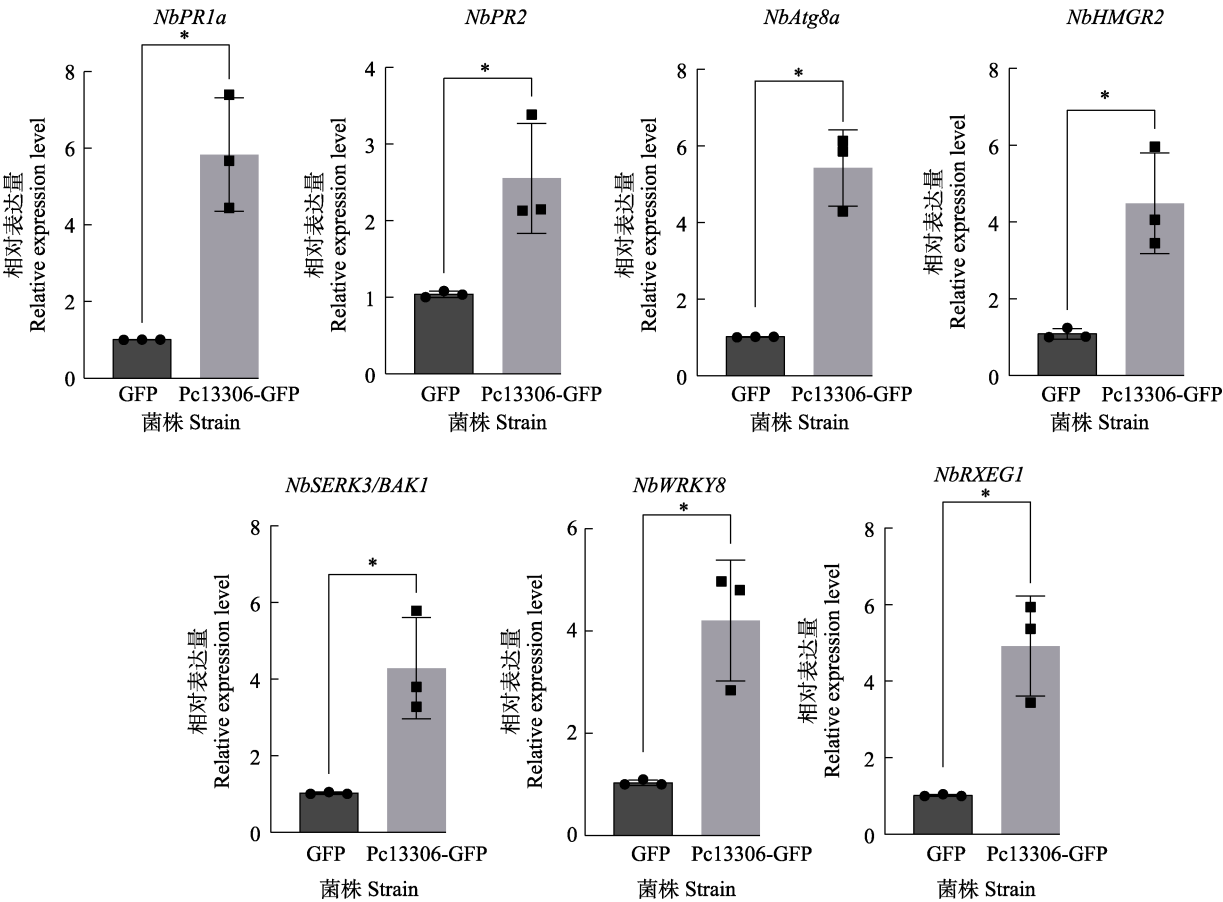
2.4.4 Pc13306 激发烟草免疫反应 为明确 Pc13306 是否激发烟草防御相关基因表达，在 Pc13306-GFP 瞬时表达 48 h 后，检测相关防御基因的表达水平。结果显示，Pc13306 瞬时表达显著上调了 SA 信号通路标志基因 *NbPR1a* 和 *NbPR2*、自噬相关基因 *NbAtg8a* 以及 PTI 免疫反应相关基因 *NbHMGR2*、*NbSERK3/BAK1*、*NbWRKY8* 和 *NbRXEG1* 的表达（图 7），因此推测 Pc13306 能够激发 SA、PTI、自噬等信号通路相关基因的表达而调控烟草防御相关反应。



BC: 无农杆菌的悬液; INF1: 诱导植物细胞坏死的阳性对照组; Pc13306-GFP: 瞬时过表达 Pc13306 的处理组; GFP: 不能诱导坏死的绿色荧光蛋白。

BC: Suspension without Agrobacterium; INF1: Positive control group inducing plant cell necrosis; PC13306-GFP: Treatment group with transient overexpression of Pc13306; GFP: Green fluorescent protein that cannot induce necrosis.

图 6 Pc13306 造成本氏烟草细胞死亡
Fig. 6 Death of *N. benthamiana* cells caused by Pc13306



*表示差异显著 ($P<0.05$)。
* indicates significant difference ($P<0.05$).

图 7 烟草防御相关基因表达水平检测

Fig. 7 Expression levels of defence-related genes in *N. benthamiana*

3 讨论

辣椒疫霉菌是一种破坏性极强的植物病原卵菌，其寄主范围广泛，能造成毁灭性损失^[14]。该

病原菌通过分泌效应分子干扰寄主代谢，促进定殖并逃避 PTI 免疫，寄主识别效应分子后会触发 ETI 免疫反应的发生^[15]。本研究聚焦于辣椒疫霉

菌 RXLR 效应分子 Pc13306 的功能解析, 序列分析表明 Pc13306 具有典型的 RXLR 效应分子保守结构域(N 端信号肽、RXLR 基序及 dEER 基序)。其表达水平在侵染后期显著上调, 该表达模式与前人报道的辣椒疫霉菌 RXLR 效应分子 PcAvh2 在侵染后期(接种后 72 h)达到峰值基本一致^[5]。前人的研究表明, 辣椒疫霉菌侵染辣椒过程中营养方式由活体向死体转变的典型时间为侵染后 48~72 h^[16]。因此, 基于 Pc13306 的表达模式特征, 推测其可能在侵染后期发挥重要作用。

效应分子的关键特征之一是其胞外分泌依赖于经典的内质网-高尔基体分泌途径, 该过程由信号肽介导^[17]。本研究利用酵母分泌系统结合平板测试和 TTC 显色反应, 证实 Pc13306 N 端的 1~24 aa 信号肽序列具有分泌功能, 确定 Pc13306 为经典分泌型 RXLR 效应分子。刘月冉等^[18]对稻曲病菌 (*Ustilaginoidea virens*) SIX 效应蛋白信号肽的研究, 以及王璐璐等^[19]对甘蔗镰孢菌 (*Fusarium sacchari*) 效应分子 Fs03538 信号肽的验证, 均支持信号肽在效应分子分泌中的重要性。李琦^[20]研究发现大豆疫霉 (*P. sojae*) 效应分子 PsCRN63 的信号肽缺失会显著降低病原菌侵染效率; 而李驰^[21]则发现大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 效应分子 VdCE11 激发免疫反应不依赖信号肽。这些研究提示信号肽功能存在多样性, 后续将通过去除 Pc13306 的信号肽, 确定其是否影响 Pc13306 对植物免疫反应的调控。

疫霉菌效应分子具有触发或抑制植物免疫反应的功能^[22]。近年来鉴定到的疫霉菌效应分子, 多数能够抑制植物免疫以促进侵染, 少数则能激活免疫以增强植物抗性^[23]。本研究将 Pc13306 瞬时表达至本氏烟草后发现其能够增强辣椒疫霉菌对本氏烟草的侵染能力, 表明 Pc13306 可能作为毒力因子发挥作用, 这与致病疫霉菌 (*P. infestans*) RXLR 效应分子 Pi04314 过表达时显著扩大病斑面积及相对生物量的报道相似^[24]。

然而, 本研究同时观察到 Pc13306 在本氏烟草中触发了强烈的植物免疫反应。首先, 经 flg22 诱导后, Pc13306 可引起植物活性氧 (ROS) 的迸发。活性氧迸发是植物应对病原菌侵染的基础防卫反应^[25], 利用瞬时表达观察效应分子诱导 ROS 积累是验证其功能的重要手段, 如橡胶树白粉菌 (*Erysiphe quercicola*) 候选效应蛋白 EqCSEP04187 及其同源蛋白^[26], 以及辣椒疫霉菌

效应分子 RXLR23^[27]均被报道能诱导 ROS 积累。其次, Pc13306 可诱导本氏烟草叶片细胞产生过敏性坏死反应 (HR), 瞬时表达效应分子诱导烟草叶片细胞坏死通常说明其触发了植物的免疫反应^[21]。这一发现与辣椒疫霉菌效应分子 RXLR23 诱导的细胞死亡^[27], 以及除仅寄生疫霉菌 (*P. parasitica*) 胞间效应分子 SCR50 外其他疫霉菌中的 SCR50 能引发本氏烟草细胞死亡的报道相似^[28]。最后, 转录水平分析揭示 Pc13306 显著诱导了水杨酸 (SA) 信号通路标志基因 (*NbPR1a*、*NbPR2*)、自噬相关基因 (*NbAtg8a*) 以及 PTI 免疫反应相关基因 (*NbHMGR2*、*NbSERK3/BAK1*、*NbWRKY8*、*NbRXEG1*) 上调表达。李驰^[21]的研究也发现大丽轮枝菌效应分子 VdCE11 能激发 HR 和 SA 信号通路相关基因的上调表达。

Pc13306 在本氏烟草中瞬时表达既能促进辣椒疫霉菌的侵染, 又能引起 ROS 迸发、HR 以及多种防御相关基因的上调, 这种表现矛盾性提示 Pc13306 在辣椒疫霉菌侵染过程中可能扮演双重角色: 一方面作为毒力因子协助病原菌定殖和扩展, 另一方面其存在被植物识别, 进而激活包括 SA 信号、PTI 及自噬在内的多层次防御反应通路。致病疫霉菌效应分子 SCR50 触发的细胞死亡需要本氏烟草中 BIK1、BAK1、MAPKKK 等免疫基因信号的参与^[28], 这为理解效应分子激发免疫的复杂性提供了线索。为明确 Pc13306 在辣椒疫霉菌侵染中的确切作用, 本研究利用 CRISPR/Cas9 基因敲除系统对 Pc13306 进行敲除, 但目前并未获得 Pc13306 的基因敲除突变体。因此, Pc13306 是否为一个非常保守且具有重要生物学功能的蛋白, 以及敲除该基因是否导致辣椒疫霉丧失活力, 目前尚不清楚。

综上, 本研究鉴定出辣椒疫霉菌 RXLR 效应分子 Pc13306, 证实其具有分泌活性, 表达于侵染后期, 并在本氏烟草中展现出促进病原菌侵染与激发多通路免疫反应的双重功能。这些结果为深入解析 Pc13306 在辣椒疫霉菌致病过程中的具体作用机制及其与寄主靶标的互作提供依据。后续研究将重点筛选 Pc13306 在辣椒中的互作蛋白, 并系统解析该互作蛋白在病原菌侵染过程中的功能及作用机制, 以阐明 Pc13306 调控植物免疫和促进毒力的分子机理, 为寻找新的植物抗病资源和开发病害防控策略提供依据。

参考文献

- [1] 廖红娟, 张志斌, 江玉梅, 朱笃. 微生物次级代谢产物抗辣椒疫霉的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2023, 35(4): 705-721.
LIAO H J, ZHANG Z B, JIANG Y M, ZHU D. Research progress of microbial secondary metabolites against *Phytophthora capsici*[J]. Natural Product Research and Development, 2023, 35(4): 705-721. (in Chinese)
- [2] 乔宁, 马蓉丽, 王瑞丽, 成妍, 焦彦生. 辣椒疫病的发生及抗性研究进展[J]. 山西农业科学, 2016, 44(6): 885-888.
QIAO N, MA R L, WANG R L, CHENG Y, JIAO Y S. Research progress on the happening and resistance of blight in pepper[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2016, 44(6): 885-888. (in Chinese)
- [3] YUAN M H, JIANG Z Y, BI G Z, NOMURA K, LIU M H, WANG Y P, CAI B Y, ZHOU J M, HE S Y, XIN X F. Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity[J]. Nature, 2021, 592: 105-109.
- [4] WANG Y, PRUITT R N, NÜRNBERGER T, WANG Y C. Evasion of plant immunity by microbial pathogens[J]. Nature Reviews Microbiology, 2022, 20: 449-464.
- [5] 陈孝仁, 张烨, 黄沈鑫, 邢玉平, 纪兆林. 辣椒疫霉 RXLR 型效应子 PcAvh2 的序列多态性、基因转录特征及功能[J]. 微生物学报, 2018, 58(12): 2204-2215.
CHEN X R, ZHANG Y, HUANG S X, XING Y P, JI Z L. Sequence polymorphism, gene transcriptional pattern and function analysis of the RXLR effector PcAvh2 from *Phytophthora capsici*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(12): 2204-2215. (in Chinese)
- [6] LAMOUR K H, STAM R, JUPE J, HUITEMA E. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(4): 329-337.
- [7] 张荣, 辛光云, 刘爱媛. 辣椒疫霉菌保存及游动孢子诱导技术研究[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(20): 8679-8680.
ZHANG R, XIN G Y, LIU A Y. Methods of zoospore inducing and preservation for *Phytophthora capsica*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2008, 36(20): 8679-8680. (in Chinese)
- [8] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [9] 辛淑香, 蒋刚强, 龙志新, 张小菊, 田沁怡, 罗明, 王翀, 虎子辉, 史博, 翟俊丽. 向日葵茎溃疡病菌数字 PCR 检测方法的建立[J]. 植物检疫, 2024, 38(5): 36-41.
XIN S X, JIANG G Q, LONG Z X, ZHANG X J, TIAN Q Y, LUO M, WANG C, HU Z H, SHI B, ZHAI J L. Development of digital PCR detection method for *Diaporthe helianthi* on sunflower[J]. Plant Quarantine, 2024, 38(5): 36-41. (in Chinese)
- [10] YIN W X, WANG Y F, CHEN T, LIN Y, LUO C X. Functional evaluation of the signal peptides of secreted proteins[J]. Bio-protocol, 2018, 8(9): e2839.
- [11] 霍琳, 及晓宇, 王玉成. 农杆菌介导的烟草瞬时表达试验条件优化[J]. 分子植物育种, 2016, 14(1): 80-85.
HUO L, JI X Y, WANG Y C. Transient expression conditions of tobacco transformation mediated by *Agrobacterium*[J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(1): 80-85. (in Chinese)
- [12] WANG D C, WEI L R, LIU T, MA J B, HUANG K Y, GUO H M, HUANG Y F, ZHANG L, ZHAO J, TSUDA K C, WANG Y M. Suppression of ETI by PTI priming to balance plant growth and defense through an MPK3/MPK6-WRKYs-PP2Cs module[J]. Molecular Plant, 2023, 16(5): 903-918.
- [13] 王儒珣. 马铃薯晚疫病 PAMP 诱导免疫反应相关基因的筛选与验证[D]. 武汉: 华中农业大学, 2021.
WANG R X. Screening and verification of genes related to PAMP triggered immune response against potato late blight[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2021. (in Chinese)
- [14] 蔡泽彦, 张明星, 周池, 陶禹, 杨莎, 李鑫, 李雪峰. 辣椒疫病不同抗性品种内生微生物群落多样性、结构及功能分析[J]. 园艺学报, 2025, 52(2): 322-336.
CAI Z Y, ZHANG M X, ZHOU C, TAO Y, YANG S, LI X, LI X F. Analysis of endogenous microbial community diversity, structure and function of pepper different resistant *Phytophthora* blight cultivars[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2025, 52(2): 322-336. (in Chinese)
- [15] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444(7117): 323-329.
- [16] 冯宝珍. 辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)诱导坏死蛋白基因克隆及功能研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2011.
FENG B Z. Cloning and functional analysis of NPP (necrosis *Phytophthora* protein) genes from *Phytophthora capsici*[D]. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [17] 李慧雪, 黄振, 周宇明, 暴怡雪, 姚姿婷, 张木清, 姚伟. 甘蔗镰孢菌碳水化合物结合模块效应基因 *Fs11724* 的分离鉴定及功能分析[J]. 热带作物学报, 2022, 43(1): 34-42.
LI H X, HUANG Z, ZHOU Y M, BAO Y X, YAO Z T, ZHANG M Q, YAO W. Identification and functional analysis of carbohydrate binding module effector gene *Fs11724* of *Fusarium sacchari*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2022, 43(1): 34-42. (in Chinese)
- [18] 刘月冉, 孙庚, 屈劲松, 王毓富, 阴伟晓, 罗朝喜. 稻曲病菌 SIX 效应蛋白参与调控植物免疫[J]. 植物保护学报, 2022, 49(4): 1004-1012.
LIU Y R, SUN G, QU J S, WANG Y F, YIN W X, LUO Z X. SIX effectors of rice false smut pathogen *Ustilaginoidea*

- virens* are involved in regulation of plant immunity[J]. Journal of Plant Protection, 2022, 49(4): 1004-1012. (in Chinese)
- [19] 王璐璐, 吴登, 洪天澍, 姚伟, 张木清, 胡琴. 甘蔗镰孢菌 (*Fusarium sacchari*) 金属蛋白酶类效应蛋白 Fs03538 参与调控植物免疫响应[J]. 植物病理学报, 2025, 55(1): 19-31. WANG L L, WU D, HONG T S, YAO W, ZHANG M Q, HU Q. Metalloproteinase effector Fs03538 of *Fusarium sacchari* is involved in regulation of plant immunity[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2025, 55(1): 19-31. (in Chinese)
- [20] 李琦. 大豆疫霉效应子 PsCRN63 调控植物先天免疫及细胞死亡的功能与作用机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2016. LI Q. Functional characterization and mechanism exploration of exploration of a *Phytophthora sojae* effector PSCRN63 to regulate plant innate immunity and cell death[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2016. (in Chinese)
- [21] 李驰. 大丽轮枝菌效应蛋白 VdCE11 和 VdCE51 调控寄主免疫的分子机制[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2023. LI C. Molecular mechanism of *Verticillium dahliae* regulating host immunity through effector VdCE11 and VdCE51[D]. Yangling: Northwest A&F University, 2023. (in Chinese)
- [22] KAMOUN S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes[J]. Annual Review of Phytopathology, 2006, 44: 41-60.
- [23] 雷刚, 周坤华, 陈学军, 黄月琴, 袁欣捷, 李歌歌, 谢媛媛, 方荣. 辣椒疫病研究进展[J]. 江西农业学报, 2023, 35(6): 39-48. LEI G, ZHOU K H, CHEN X J, HUANG Y Q, YUAN X J, LI G G, XIE Y Y, FANG R. Research progress in pepper *Phytophthora* blight[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2023, 35(6): 39-48. (in Chinese)
- [24] BOEVINK P C, WANG X D, MCLELLAN H, HE Q, NAQVI S, ARMSTRONG M R, ZHANG W, HEIN I, GILROY E M, TIAN Z D, BIRCH P R J. A *Phytophthora infestans* RXLR effector targets plant PP1c isoforms that promote late blight disease[J]. Nature Communications, 2016, 7: 10311.
- [25] MILLTER R. ROS are good[J]. Trends in Plant Science, 2017, 22(1): 11-19.
- [26] 刘梦瑶. 橡胶树白粉菌候选效应蛋白 EqCSEP04187 免疫诱导活性研究[D]. 海口: 海南大学, 2022. LIU M Y. Immunoinduced activity analysis of candidate effector protein EqCSEP04187 from *Erysiphe quercicola*[D]. Haikou: Hainan University, 2022.
- [27] SHENG H, AI C C, YANG C C, ZHU C Y, MENG Z, WU F Z, WANG X D, DOU D L, MORRIS P F, ZHANG X G. A conserved oomycete effector RxLR23 triggers plant defense responses by targeting ERD15La to release NbNAC68[J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 6336.
- [28] 富盛桂. 致病疫霉胞间效应分子 SCR50 的诱抗功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2021. FU S G. The functional study of *Phytophthora infestans* apoplastic effector SCR50 in induced resistance[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2021. (in Chinese)