



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

陈孝仁*, 张焯, 黄沈鑫, 邢玉平, 纪兆林

扬州大学园艺与植物保护学院, 江苏 扬州 225009

摘要:【目的】分析辣椒疫霉中 RXLR 型效应子 PcAvh2 的序列多态性, 研究该效应子在辣椒疫霉生长发育和侵染阶段的转录特征及其生物学功能。【方法】本研究通过高保真扩增, 分析 2 个烟草疫霉、1 个恶疫霉和 31 个辣椒疫霉菌株的 PcAvh2 序列; 提取辣椒疫霉菌丝、游动孢子囊、游动孢子、萌发休止孢和 7 个侵染时间点(1.5、3、6、12、24、36、72 h)的本氏烟根部总 RNA, 利用 RT-qPCR 分析 PcAvh2 的转录表达水平; 利用 PVX 瞬时表达系统, 分析 PcAvh2 是否抑制 6 种效应子(BAX、INF1、PsojNIP、PsCRN63、PsAvh241、R3a/Avr3a)激发的植物免疫反应; 利用 CaCl₂-PEG 介导的原生质体稳定转化技术, 沉默 PcAvh2 基因, 分析辣椒疫霉致病力的变化。【结果】PcAvh2 为典型的 RXLR 效应子, 在辣椒疫霉群体中该效应子具有 10 个等位基因, 而且烟草疫霉和恶疫霉中也存在该效应子。该基因在辣椒疫霉的侵染阶段上调表达, 它能够抑制 6 种效应子激发的植物免疫反应, 进一步研究发现基因沉默导致辣椒疫霉的致病力显著下降。【结论】RXLR 型效应子 PcAvh2 是辣椒疫霉中一个重要的侵染致病因子。

关键词: 辣椒疫霉, RXLR 效应子, 序列多态性, RT-PCR, 免疫反应, 基因沉默

疫霉菌 (*Phytophthora* spp.) 隶属于色菌界 (Chromista) 卵菌门 (Oomycota), 是一群重要的植物病原菌, 引起的植物疫病是危害农林业生产最重的植物病害之一^[1]。著名的种包括引起马铃薯晚疫病的致病疫霉 (*P. infestans*) 和引起大豆根腐病的大豆疫霉 (*P. sojae*)^[2]。辣椒疫霉 (*P. capsici*) 侵染危害茄科、葫芦科和豆类等上百种农作物, 每年给

全世界蔬菜生产造成的损失高达 10 亿美元^[3]。由于疫霉菌在亲缘关系上与真菌相差甚远, 多数针对真菌的杀菌剂对防治植物疫病无效, 培育和利用抗病品种是目前防治植物疫病的主要手段^[1]。因此, 从植物与疫霉菌互作的角度入手深入解析疫霉菌操控寄主免疫抗性的致病机理, 无疑对防控植物疫病具有重要的指导意义。

基金项目: 国家自然科学基金(31671971, 31871907); 扬州市自然科学基金(YZ2016121); 公益性行业(农业)科研专项(201303018); 2016 年度扬州大学优秀青年骨干教师培养对象项目

*通信作者。Tel: +86-514-87971383; E-mail: xrchen@yzu.edu.cn

收稿日期: 2018-03-26; 修回日期: 2018-04-22; 网络出版日期: 2018-04-27

为阻止病原物的侵染, 植物已经进化出两层免疫体系, 即植物识别病原物相关的分子模式 PAMP (pathogen-associated molecular pattern) 产生的先天免疫 PTI (PAMP triggered immunity) 反应和识别效应子 (effector) 产生的后天诱导 ETI (effector triggered immunity) 反应^[4]。为建立成功的侵染和定殖, 病原物则抑制植物的免疫反应。植物通过细胞膜上的 PRR (pattern recognition receptor) 受体识别 PAMP 产生的 PTI 反应是一种普遍存在的基本防御机制, 可以抵抗多数病原物的入侵; 病原物为引起病害, 必须通过分泌出效应子到植物细胞内抑制 PTI 反应, 克服植物的基础抗病性; 植物又通过 NB-LRR 类抗性蛋白 (resistance protein, R) 识别效应子产生 ETI 反应, 通常引起过敏性坏死反应 (hypersensitive reaction, HR), 此时的效应子称为无毒蛋白 (avirulence protein, Avr); 病原物则又通过效应子逃避识别或者抑制 ETI 反应^[4]。

疫霉菌分泌出两类效应子以干扰植物的免疫反应: 进入植物体外空间的胞外效应子 (apoplasmic effectors) 以及进入植物细胞内的效应子 (cytoplasmic effectors)^[5-6]。其中, RXLR 效应子是胞内效应子中一个庞大的家族, 包括目前已经得到鉴定的无毒蛋白^[6]。它们序列 N 端的信号肽负责将其分泌到疫霉菌体外, 紧随其后的保守 RXLR 基序 (R, 精氨酸; X, 任意氨基酸; L, 亮氨酸; R, 精氨酸) 负责将其进一步转运到寄主植物细胞内, 而 C 端则执行效应子的功能^[5,7-8]。由于与寄主植物靶标蛋白共进化, 选择压力多导致 RXLR 效应子的 C 端呈现序列多态性^[9]。结构上, 大约 44% 的疫霉菌 RXLR 效应子具有一个保守的核心 α 螺旋折叠^[10]。大多数 RXLR 效应子能够抑制寄主的 PTI 或者 ETI 反应^[9,11]。近年来的研究发现, RXLR 效应子作用于寄主植物的不同生物学途径

上, 或是调控 PTI 或者 ETI 引起的植物细胞死亡, 或是招募植物蛋白激活自身, 或是作用于植物的免疫分泌系统, 或是影响植物激素途径, 或是干扰寄主抗性物质运输, 或是操控植物感病因子, 或是干扰植物基因的转录表达等, 以多种方式抑制植物免疫反应以利于自身的定殖^[9,12-16]。

辣椒疫霉 (*P. capsici*) 能够侵染模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 和本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*), 逐渐成为卵菌研究的重要模式材料^[3,17]。基因组测序发现辣椒疫霉含有 357 个 RXLR 效应子^[18]。利用寄主诱导基因沉默技术 (host-induced gene silencing), 发现类似致病疫霉 Avr3a 的 PcAvr3a1 被烟草属多个种的 R 蛋白识别, 导致这些种对辣椒疫霉产生非寄主抗性^[19]。最近, 几个 RXLR 效应子的毒性功能和晶体生成等得到了初步分析, Pc22053 等可以抑制 BAX、INF1 等触发的植物免疫反应^[20-23]。尽管取得了一定的进展, 但目前仅是少数几个辣椒疫霉 RXLR 效应子得到了初步分析, 而且尚无这些效应子在侵染过程中作用的研究报道。我们基于前期的转录组分析^[20], 进一步鉴定了一个辣椒疫霉 RXLR 效应子 PcAvh2。本研究发现, 辣椒疫霉、烟草疫霉和恶疫霉中均存在该效应子, 在辣椒疫霉群体中该效应子具有 10 个等位基因, 在 11 个氨基酸位点存在序列多态性; PcAvh2 基因在辣椒疫霉的侵染阶段上调表达; 它能够抑制 6 种效应子激发的植物免疫反应; PcAvh2 的沉默导致辣椒疫霉的致病力显著下降。结果表明, PcAvh2 是辣椒疫霉中一个重要的侵染致病因子。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 31 个辣椒疫霉菌株、2 个烟草

疫霉(*P. parasitica*)菌株、1个恶疫霉(*P. cactorum*)菌株(表1)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101均由本实验室保存。所有辣椒疫霉菌株均用于核苷酸多态性分析,只有菌株 Pc537还用于其他试验。利

表1. 疫霉菌株和 *PcAvh2* 的等位基因序列分布

Table 1. *Phytophthora* isolates used in the study and distribution of *PcAvh2* allelic sequences

Species	Isolate	Origin	Allelic sequence [#]
<i>P. capsici</i>	Pc704002	Yunnan Province, China	3
	Pc703903	Yunnan Province, China	2
	Pc702703	Yunnan Province, China	2
	Pc700902	Yunnan Province, China	6
	Pc703203	Yunnan Province, China	3
	Pc703805	Yunnan Province, China	2
	Pc700502	Yunnan Province, China	3
	Pc702701	Yunnan Province, China	2
	Pc800906	Yunnan Province, China	2
	PC2	Anhui Province, China	3
	PC5	Anhui Province, China	3
	Pc537	Fujian Province, China	3
	JO36	Fujian Province, China	3
	WYS-1	Fujian Province, China	4
	Pc2W-3	Fujian Province, China	3
	MH-1	Fujian Province, China	2
	mA1	NA	10
	mA2	NA	9
	NJPC1	Jiangsu Province, China	5
	NJPC2	Jiangsu Province, China	5
	NJPC3	Jiangsu Province, China	3
	NJPC4	Jiangsu Province, China	8
	Hd3	Hebei Province, China	5
	Hd3-2	Hebei Province, China	5
	Hd7	Hebei Province, China	5
	DZ8	Hebei Province, China	7
	Pg1	Hebei Province, China	3
	Pg10	Hebei Province, China	5
	Pg12	Hebei Province, China	5
	Pg14	Hebei Province, China	5
	LT1534	State of Tennessee, USA	1
	<i>P. cactorum</i>	PH-1-17-05	Fars Province, Iran
<i>P. parasitica</i>	PP1	Jiangsu Province, China	2
	PP2	Jiangsu Province, China	2

NA, not applicable. [#]The numbers in this column correspond to those following 'PcAvh2_' in Figure 1.

用 Chen 等(2013)^[20]中的方法获得辣椒疫霉菌株的菌丝、游动孢子囊、游动孢子和萌发的休止孢。

1.1.2 质粒: PVX 表达载体 pGR106 由英国剑桥大学 David Baulcombe 博士提供。致病疫霉 RXLR 效应子编码基因 *Avr3a* 及相应的马铃薯抗性基因 *R3a* 均构建在质粒 pCB302-3 上,由英国 Sainsbury 实验室的 Sophien Kamoun 博士馈赠。*Gfp*、*Bax*、*Inf1*、*PsAvh241*、*PsCRN63* 和 *PsojNIP1* 均构建在载体 pGR106 上,来自南京农业大学王源超教授和窦道龙教授。质粒 pTORMRFP4 来自美国俄勒冈州立大学 Brett M. Tyler 教授。

1.1.3 主要试剂和仪器: 限制性内切酶 *Not I*、*Cla I* 和 *BsiW I* 等(NEB 公司); 高保真 DNA 聚合酶(Platinum *Taq* DNA polymerase High fidelity, Invitrogen 公司), DNA 凝胶回收试剂盒(AXYGEN AxyPrep DNA Gel Extraction Kit, 杭州爱思进公司), T4 DNA 连接酶(TaKaRa 公司), TA 载体 pMD19-T (TaKaRa), RNAiso Plus (TaKaRa), DNase I (TaKaRa), RNA 纯化试剂盒(RNAClean Kit, 北京天根生物), 反转录酶 M-MLV (RNase H-) (TaKaRa), 引物 Oligo d(T)₁₈ (TaKaRa), Recombinant RNase Inhibitor (TaKaRa), iQ SYBR Green Supermix(南京诺唯赞公司);LS-P96G 型 PCR 仪(Thermo Scientific 公司), CFX Connect 荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司)。

1.2 植物培养和接种

本氏烟和辣椒(*Capsicum annuum*)均栽培于含有无菌土的塑料杯中,置于 22–25 °C、16 h/8 h 光暗交替温室,生长 4–6 周后使用。

灌根接种本氏烟前 2 h 进行浇灌,以保证接种时土壤湿润。接种时,每株本氏烟的根部滴加 5 mL 辣椒疫霉游动孢子悬浮液(1×10^6 孢子/mL),以接

种无菌水的本氏烟作为对照。

吸取 1 mL 的游动孢子悬浮液(500 个/ μL)置于 1.5 mL 离心管中。取健康的辣椒植株, 去除根部后置于游动孢子悬浮液中, 于 25 °C 避光孵育 12 h。

1.3 核酸提取

利用 Zelaya-Molina 等(2011)^[24]的方法提取辣椒疫霉菌丝的基因组 DNA。利用 RNAiso Plus 提取疫霉或植物样品的总 RNA, 然后用 DNase I 处理去除 RNA 中残余基因组 DNA 的污染, 再使用 RNA 纯化试剂盒对 RNA 样品进行纯化。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 和总 RNA 的完整性, 并用紫外分光光度法进行浓度和纯度分析。

1.4 PcAvh2 的序列多态性分析

1.4.1 PCR 扩增: 基于辣椒疫霉菌基因组数据库 (<https://genome.jgi.doe.gov/Phyca11/Phyca11.home.html>)中的基因序列(序列 ID 107349), 利用软件 Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>)设计引物对 PcAvh2-snpF/R (表 2)。RXLR 效应子基因均无内

含子, 利用高保真 DNA 聚合酶和基因特异引物对辣椒疫霉菌基因组 DNA 进行扩增。PCR 扩增体系含有: 10×High Fidelity buffer 2 μL , DNA 100–300 ng, 上下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL , Mg^{2+} (25 mmol/L) 1.2 μL , dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL , Platinum *Taq* DNA 聚合酶(5 U/ μL) 0.2 μL , 无菌水补齐到 20 μL 。PCR 反应程序为: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 31 个循环; 72 °C 5 min。

1.4.2 克隆、测序与分析: 利用胶回收试剂盒纯化回收 PCR 产物后, 将其克隆进 TA 载体 pMD19-T。重组质粒转化进 DH5 α 后, 利用 M13 通用引物对 M13-47/RV-M (表 2)和上面的体系进行菌落 PCR, 将筛选出的阳性克隆送至南京金斯瑞公司进行序列测定。利用 BioEdit 软件对序列进行剪接、拼接、蛋白翻译和序列比对。

1.5 农杆菌浸润

利用引物对 PcAvh2SP-ClaI F/NotI R (表 2)和 *Cla* I、*Not* I 位点将 PcAvh2 克隆到 pGR106, 通过电转化技术导入农杆菌 GV3101 菌株中。转化子

表 2. PCR 所用引物

Table 2. PCR primers used in the study

Primer	Sequence (5'→3')*	Purpose
PcAvh2-RTF	TCATGGCTTTTCTTCGAGGT	Sense primer for RT-qPCR analysis
PcAvh2-RTR	TCAGCCACGTCTCGTACAAC	Antisense primer for RT-qPCR analysis
Ubc-RTF	GCGCATCTACCACTGCAAC	Sense primer for RT-qPCR analysis
Ubc-RTR	GACAGCAGCACCTTGGAGA	Antisense primer for RT-qPCR analysis
PcAvh2-snpF	TGTCACCGCTACAAATTCCA	Sense primer for SNP analysis
PcAvh2-snpR	TTGAAACGAGGCGAAAGACT	Antisense primer for SNP analysis
M13-47	CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC	Sense primer for TA insert sequencing
RV-M	GAGCGATAACAATTTACACAGG	Antisense primer for TA insert sequencing
PcAvh2SP-ClaIF	GCCG <u>ATCGAT</u> ATGGCTTCGGTCGACGAAAATAAG	Sense primer for pGR106 cloning
PcAvh2SP-NotIR	ATAG <u>CGGCCGCT</u> TAGACTGCGAGATGCGAG	Antisense primer for pGR106 cloning
PcAvh2-ClaIF	GCCG <u>ATCGAT</u> ATGAGGCTGTTGTTCTGGAC	Sense primer for gene silencing
PcAvh2-BsiWIR	CG <u>CGTACGG</u> ACTGCGAGATGCGAGTACT	Antisense primer for gene silencing

*Restriction sites in primer sequences are underlined. Primers were designed using Primer 3 (<http://primer3.ut.ee/>) based on the gene models (*PcAvh2* ID 107349 and *Ubc* ID 510705) from the *P. capsici* genome database (<https://genome.jgi.doe.gov/Phyca11/Phyca11.home.html>).

接种于 3 mL、含有 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的液体 LB 培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温摇床振荡(220 r/min) 培养 48 h。然后 4000 r/min 离心 4 min 收集菌体, 用 10 mmol/L MgCl_2 溶液重新悬浮菌体, 再次离心。重复 3 次后, 用 10 mmol/L MgCl_2 定容至菌体悬浮液吸光值 $OD_{600}=0.4-0.6$ 。取由上至下第 3 至第 6 片完全展开的本氏烟真叶渗透接种农杆菌。用无菌针头在叶片下表皮造成一个微小伤口, 用无针头的注射器将 20–30 μL 农杆菌悬浮液注射到本氏烟叶片中, 同一叶片上同时注射对照 pGR106::Gfp 和 10 mmol/L MgCl_2 溶液。间隔 24 h 后, 每个注射点分别再次注射相同量的含 *Inf1*、*Bax*、*PsCRN63*、*PsAvh241*、*PsojNIP* 及 *Avr3a/R3a* 的农杆菌。本氏烟置于 22 $^{\circ}\text{C}$ 的温室培养, 48 h 后连续观察并记录叶片注射部位症状。

1.6 *PcAvh2* 的转录水平分析

1.6.1 cDNA 合成: 分别取 Pc537 接种后 1.5、3、6、12、24、36 和 72 h 的本氏烟根部, 以及辣椒疫霉菌丝、游动孢子囊、游动孢子和萌发休止孢的 RNA 样品, 依据 Chen 等(2013)^[20]的方法, 利用反转录酶 M-MLV (RNase H-)和引物 Oligo d(T)₁₈ 将纯化过的 RNA 反转录成第 1 链 cDNA。依次取 Oligo d(T)₁₈ (50 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 1 μL 、总 RNA (700 ng/ μL) 1 μL 和无核酸酶水 4 μL , 置入冰浴的不含核酸酶的 PCR 管中。混匀离心 PCR 管 5 s 后, 于 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min, 然后迅速置于冰上冷却 5 min。离心 PCR 管 5 s, 往管中继续加入下列试剂: 5 \times M-MLV Buffer 2 μL , dNTPs (各 10 mmol/L) 0.5 μL , Recombinant RNase Inhibitor (40 U/ μL) 0.3 μL , 反转录酶 M-MLV (200 U/ μL) 0.3 μL , 无核酸酶水 0.9 μL 。快速混匀后离心 5 s, 于 42 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1 h, 然后 70 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 15 min, 再置于冰上 5 min。

1.6.2 qPCR: 将第 1 链 cDNA 溶液稀释 10 倍用于 PCR 扩增。20 μL 的 PCR 扩增体系含有: iQ SYBR Green Supermix 10 μL , 引物对 *PcAvh2*-RTF/RTR (表 2) (10 $\mu\text{mol}/\text{L}$) 各 0.4 μL , 第 1 链 cDNA 100–300 ng, 无菌水补足到 20 μL 。PCR 反应在荧光定量 PCR 仪上进行, 程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 在退火及延伸阶段检测荧光强度, 收集信号, 共 40 个循环。扩增结束后, 做熔解曲线分析以检测扩增产物的特异性: 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。以温度为横坐标, 荧光强度的变化值为纵坐标制作熔解曲线, 如熔解曲线为单峰时用于后续分析。将基因组 DNA 以 10 倍梯度稀释 5–7 次, 并以稀释的 DNA 为模板进行 qPCR 扩增; 以模板量的对数为横坐标, Ct 值(PCR 反应过程中荧光信号到达设定的域值时所经历的循环数)为纵坐标制作标准曲线, 计算扩增效率 E ($E=10^{-1/\text{直线斜率}}$)。基因表达的数据分析采用 Pfaffl (2001)^[25]的方法进行, 泛素连接酶基因 *Ubc* (序列 ID 510705) (表 2) 为内参基因^[20]。每个样品设置 3 个技术重复。实验重复 3 次, 均得到一致的结果。

1.7 *PcAvh2* 基因的沉默和表型分析

利用引物对 *PcAvh2*-ClaIF/BsiWIR (表 2) 和酶切位点 *Cla* I、*Bsi*W I 将 *PcAvh2* 克隆到 pTORmRFP4。利用 CaCl_2 -PEG 介导的原生质体转化法^[8], 将重组载体 pTORmRFP4::PcAvh2 转入辣椒疫霉 Pc537 原生质体中, 再生后获得 20 个抗 G418 (37.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的转化子。转入 pTORmRFP4 的菌株为转化对照。利用半定量 RT-PCR 分析接种本氏烟 12 h 后转化子中 *PcAvh2* 基因的转录水平, 筛选基因沉默转化子。

取健康本氏烟植株从上至下第 3 至第 6 片完全展开的真叶, 反面朝上置于垫有湿润滤纸的无

菌培养皿中,在主叶脉两侧接种 10 μL (500 个/ μL) 游动孢子悬浮液。叶片左侧接种转化对照菌株的游动孢子,左侧接种基因沉默转化子。叶片置于 25 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育,连续观察叶片的发病情况。48 h 后将本氏烟叶片在 Farmer's 溶液(乙酸、乙醇和氯仿体积比为 1:6:3)中浸泡 30 s 后,再浸没于 0.05% 的 Trypan Blue 溶液中,在 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗孵育 12 h。用超纯水漂洗干净叶片表面的染料后,利用 95% 乙醇对叶片进行水浴脱色。对叶片进行拍照并测量叶片病斑直径。被染成蓝色的为死亡的植物细胞。

2 结果和分析

2.1 *PcAvh2* 的序列多态性

经 PCR 扩增,获得了辣椒疫霉 *PcAvh2* 的基因组和 cDNA 序列(NCBI 登录号 MH106712),编码的蛋白长度为 160 个氨基酸,N 端头 21 个氨基酸为信号肽序列,含有典型的 RXLR 和 dEER 基序(图 1)。经过与辣椒疫霉菌基因组数据库中序列的比对,发现该基因为单拷贝基因,不存在旁系同源基因。本研究利用 PCR 高保真扩增技术分析

PcAvh2 在 31 个辣椒疫霉菌株(表 1)中的序列多态性。经比对发现,在辣椒疫霉菌群体中 *PcAvh2* 存在 10 个等位基因序列(表 1, 图 1),它们的信号肽序列一样,对应的成熟肽序列中在 11 个位点存在序列多态性(图 1),但未检测到自然选择压力作用位点。通过 PCR 扩增,发现烟草疫霉和恶疫霉也含有该效应子,序列分别属于第 2 组和第 5 组(表 1, 图 1),但未在其他卵菌如荔枝疫霉(*P. litchii*)、瓜类疫霉(*P. melonis*)和植物腐霉(*Phytophthora helicoides*)中检测到该效应子。结果表明,*PcAvh2* 可能是普遍存在于辣椒疫霉、烟草疫霉和恶疫霉中的一个保守的 RXLR 效应子,且在辣椒疫霉菌群体中具有 10 个等位基因。

2.2 *PcAvh2* 基因在辣椒疫霉的侵染阶段上调表达

为了解 *PcAvh2* 在侵染过程中的作用,分别提取游动孢子接种 1.5、3、6、12、24、36、72 h 后的本氏烟根部总 RNA,同时提取辣椒疫霉 4 个生长发育阶段(菌丝、孢子囊、游动孢子和萌发休止孢)的总 RNA,分析 *PcAvh2* 基因在侵染和生长发育阶段的转录水平。结果(图 2)发现,在侵染初期

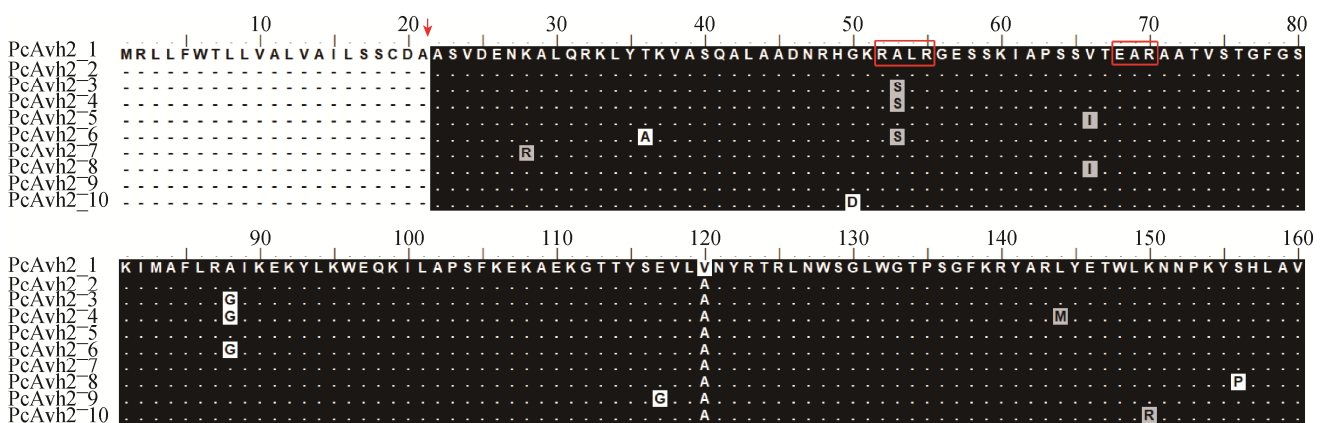


图 1. 辣椒疫霉菌群体中 *PcAvh2* 的 10 个等位基因对应的蛋白序列

Figure 1. Protein sequences of 10 *PcAvh2* alleles in the *P. capsici* population. The red arrow indicates the cleavage site of signal peptide. RXLR-dEER motif is denoted by red boxes.

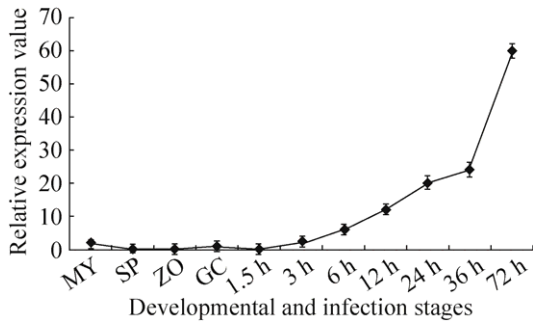


图 2. *PcAvh2* 基因在侵染和生长发育阶段的转录特征
Figure 2. The transcriptional pattern of *PcAvh2* during the infection and developmental stages of *P. capsici*. MY, vegetative mycelia; SP, sporangia; ZO, zoospores; GC, germinating cysts; 1.5–72 h, *N. benthamiana* roots at 1.5, 3, 6, 12, 24, 36, 72 hours post-inoculation. Sterile water and cDNA from sterile water-inoculated plants were used as negative control templates in RT-qPCR.

PcAvh2 的表达量很低, 随着侵染时间的延长表达量逐渐上升, 在接种 72 h 后表达量达到最高值; 在生长发育阶段, 仅在菌丝和萌发休止孢阶段检测到该基因的微弱表达。结果说明, 该效应子在侵染阶段特异上调表达, 参与了辣椒疫霉的侵染

过程。

2.3 *PcAvh2* 抑制植物免疫反应

为分析 *PcAvh2* 是否具有毒性功能, 本研究在本氏烟叶片中先表达该效应子, 24 h 后在同一注射点再表达触发本氏烟免疫反应的效应子(激发 PTI 的 INF1、PsojNIP, 激发 ETI 的 PsCRN63、PsAvh241、R3a/Avr3a, 以及激发植物细胞死亡的细胞凋亡因子 BAX), 观察 *PcAvh2* 是否具有抑制本氏烟免疫反应的毒性功能。这 6 个效应子激发本氏烟产生的 PTI 或 ETI 免疫反应为类似 HR 的细胞死亡^[20]。结果发现, *PcAvh2* 能够抑制所有效应子触发的免疫反应(图 3), 表明它可能在辣椒疫霉侵染寄主植物的过程中发挥重要作用。

2.4 *PcAvh2* 是辣椒疫霉侵染致病的毒性因子

为进一步分析 *PcAvh2* 是否对辣椒疫霉的致病性具有重要作用, 本研究利用 CaCl₂-PEG 介导的原生质体稳定转化系统对 *PcAvh2* 基因进行了沉默分析。利用重组载体 pTORmRFP4::*PcAvh2*

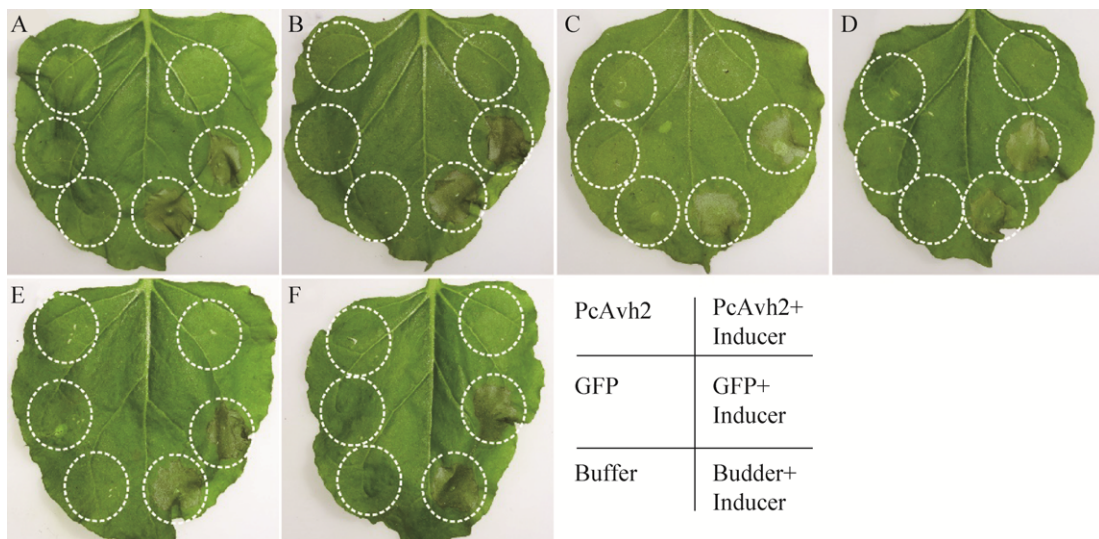


图 3. *PcAvh2* 抑制效应子触发的本氏烟免疫反应

Figure 3. *PcAvh2* suppresses plant immunity triggered by 6 different effectors (i.e. plant cell death inducers) in *N. benthamiana*. Inducers: A: *P. infestans* INF1; B: mouse BAX; C: *P. sojae* PsCRN63; D: *P. sojae* PsojNIP; E: *P. sojae* PsAvh241; F: the combination of *P. infestans* Avr3a and potato R3a.

转化辣椒疫霉原生质体, 共获得 20 个 G418 抗性转化子。利用 RT-PCR 分析抗性转化子中 *PcAvh2* 基因的转录水平(在接种本氏烟 12 h 后), 共获得 3 个基因沉默转化子, 分别命名为 S2、S6 和 S9 (图 4)。

利用游动孢子悬浮液接种本氏烟, 观察基因沉默是否导致辣椒疫霉致病力下降。与转化对照

菌株 Ctrl-1 (转入空载体 pTORmRFP4)相比, *PcAvh2* 基因的沉默导致辣椒疫霉对本氏烟的致病力显著下降(图 5)。利用游动孢子悬浮液接种辣椒幼苗茎秆, 12 h 后 Ctrl-1 菌株接种的辣椒幼苗茎秆出现水渍状病斑并且伴随着明显的缢缩, 而沉默转化子(以 S9 为例)的接种结果与无菌水接种对照相似, 并未出现肉眼可见的明显症状(图 5)。未

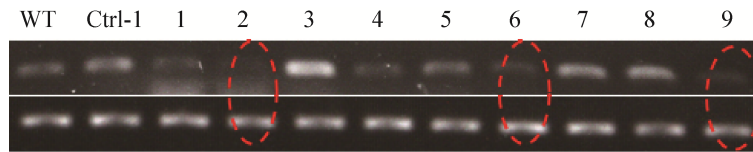


图 4. 接种本氏烟 12 h 后不同菌株中 *PcAvh2* 基因的表达水平

Figure 4. The transcriptional level of *PcAvh2* in different isolates at 12 h post-inoculation of *N. benthamiana*. The upper part is the transcripts of *PcAvh2* while the lower part is the transcripts of the house-keeping *NbEF1α* gene in different isolates. WT, wild type isolate Pc537; Ctrl-1, *mRFP*-transgenic transformant; No. 1–9, representative transformants, of which 2, 6, 9 are *PcAvh2*-silenced transformants (namely S2, S6 and S9) indicated by red dotted circles.

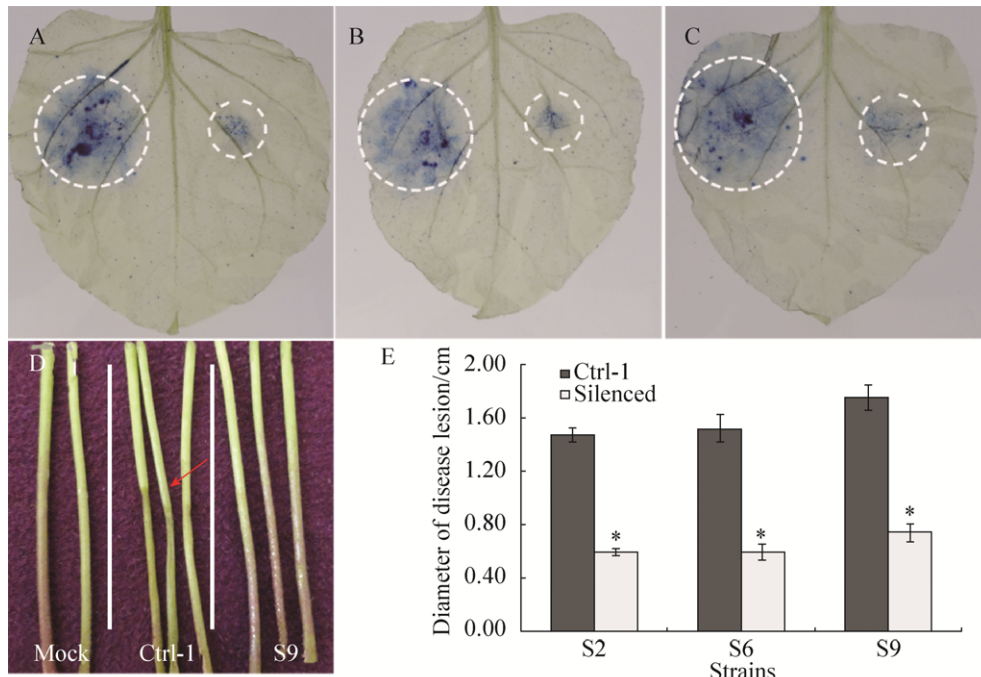


图 5. *PcAvh2* 的沉默削弱了辣椒疫霉对寄主的致病力

Figure 5. Silencing of *PcAvh2* compromises the virulence of *P. capsici* on host plants. A, B, C: Virulence activities of the *P. capsici* strains in *N. benthamiana*. The inoculated leaves were stained with trypan blue and discolored with ethanol. On the left of each leaf is the *mRFP*-transgenic control (Ctrl-1) while on the right of each leaf in order is S2 (A), S6 (B) and S9 (C). D: the virulence of the *P. capsici* strains on bell pepper stems. Mock means sterile water inoculation and arrows indicate the inoculation sites in parallel. E: Statistical analysis of lesion size in panels (A–C). Error bars are s.e. and the asterisks (*) denote statistically significant difference (Student *t*-test, $P < 0.01$).

发生 *PcAvh2* 基因沉默的转化子与 Ctrl-1 对照相比, 毒性未出现改变。这些实验结果表明, 效应子 *PcAvh2* 对于辣椒疫霉的致病性具有重要作用。

3 讨论

RXLR 效应子在疫霉菌的进化和侵染致病中起着很重要的作用^[9]。前期研究表明, 疫霉菌物种之间存在一些保守的效应子, 它们在疫霉菌致病过程中发挥重要作用^[9]。例如, 致病疫霉 *Avr3a* 在辣椒疫霉中存在同源蛋白 *PcAvr3a1*, 它可被烟草属多个种的 R 蛋白识别, 导致这些种对辣椒疫霉产生非寄主抗性^[19]。许静等进一步研究发现, 辣椒疫霉中存在 9 个类似致病疫霉 *Avr3a* 的效应子, 其中 3 个基因 *PcAvh128*、*PcAvh132*、*PcAvh134* 在疫霉菌侵染早期诱导表达, 而且 *PcAvh128* 可以显著促进辣椒疫霉的侵染^[22]。本研究克隆分析了辣椒疫霉中的 *PcAvh2*, 发现在烟草疫霉和恶疫霉中也存在该效应子; 进一步分析发现, 31 个辣椒疫霉菌株中具有 10 个 *PcAvh2* 等位基因序列, 其蛋白序列中 11 个位点具有多态性(图 1), 但不存在自然选择压力作用的痕迹。这些结果说明效应子 *PcAvh2* 是疫霉菌中一个保守的效应子, 可能具有重要的生物学功能。

转录研究结果显示, 辣椒疫霉 *PcAvh2* 基因在生长发育阶段的表达量很低; 在病原菌侵染的过程中随着时间的延长, 其表达量逐渐升高, 到接种后 72 h 达到最高值(图 2), 这表明该效应子在辣椒疫霉的侵染过程中发挥重要的作用。该基因的转录模式与 Wang 等^[11]提出的大豆疫霉 RXLR 效应子基因三类表达模式(immediate-early effectors, early effectors, late effectors)不完全一致, 可能与效应子的特异性或者互作系统有关。

前期研究表明, 侵染本氏烟 18–42 h 后, 辣椒疫霉从活体营养阶段过渡到死体营养阶段^[3]。因此, 基于其转录表达特征, 我们推测 *PcAvh2* 很有可能在活体和死体营养阶段都发挥了重要作用。

疫霉菌效应子具有触发或抑制植物免疫反应的功能^[5]。利用农杆菌介导的 PVX 瞬时表达系统, 我们分析发现 *PcAvh2* 不但可以抑制胞外效应子 INF1、PsojNIP 激发的 PTI, 而且可抑制胞内效应子 PsCRN63、PsAvh241、R3a/Avr3a 激发的 ETI, 以及细胞凋亡因子 BAX 引起的植物细胞死亡(图 3)。相关研究也发现, 疫霉菌其他效应子如 PsAvh328、Pc22053 等也能抑制植物的免疫反应^[9,11,20]。目前, 多个疫霉菌 RXLR 效应子的植物靶标和作用机制得到了解析^[9,12–16]。例如, 致病疫霉的 *Avr3a* 与马铃薯的 E3 泛素连接酶 CMPG1 互作, 通过稳定 CMPG1 蛋白的活性以抑制 INF1 触发的植物免疫反应, 从而促进病原菌的侵染^[9]; 大豆疫霉的 Nudix-RXLR 效应子 *Avr3b* 以模拟植物防卫反应抑制因子的方式来抑制植物活性氧积累等免疫反应, 从而干扰寄主植物抗病性^[9]。这些相关研究结果对进一步分析 *PcAvh2* 通过何种信号途径, 以何种方式抑制植物免疫反应的机制提供了重要的参考依据。

为进一步明确 *PcAvh2* 在辣椒疫霉侵染过程中的作用, 我们对其进行基因沉默分析。结果发现, 该基因的沉默导致辣椒疫霉对寄主植物的致病力显著下降(图 5), 这说明 *PcAvh2* 是辣椒疫霉侵染致病中的重要毒性因子。由于疫霉菌的遗传特性和分子操作的困难, 目前利用遗传工具仅分析了少数几个效应子的功能。最近, CRISPR/Cas9 基因敲除系统在大豆疫霉中得到了成功应用^[26], 我们随即也在辣椒疫霉中成功建立了该系统。但是, 在本研究中我们未能获得 *PcAvh2* 的基因敲除

突变体。是否该效应子是一个非常保守且具有重要生物学功能的蛋白? 敲除该基因是否导致辣椒疫霉丧失活力? 目前并不清楚。然而, *PcAvh2* 的沉默未导致辣椒疫霉的生物学性状(如生长速率、游动孢子形成等)出现异常。是否由于基因沉默引起的是基因的表达水平下调(knock-down)而不是基因从基因组的完全剔除(knock-out)才未导致辣椒疫霉出现异常? 该效应子控制的是哪个生物学过程? 要回答这些问题, 还需要开展深入研究, 比如明确 *PcAvh2* 作用的植物靶标蛋白以及参与的信号途径或生物学过程。这些结果也将为寻找新的植物抗病资源提供重要依据。

本研究通过基因克隆、转录分析、农杆菌浸润和基因沉默, 对辣椒疫霉中一个 RXLR 型效应子 *PcAvh2* 进行了分析, 鉴定它为辣椒疫霉中一个重要的毒性因子, 也是烟草疫霉和恶疫霉中保守的效应子。这些结果为进一步阐明该效应子的生物学功能奠定了坚实基础。

参 考 文 献

- [1] Erwin DC, Ribeiro OK. *Phytophthora* diseases worldwide. St Paul: American Phytopathological Society, 1996.
- [2] Kamoun S, Furzer O, Jones JDG, Judelson HS, Ali GS, Dalio RJD, Roy SG, Schena L, Zambounis A, Panabières F, Cahill D, Ruocco M, Figueiredo A, Chen XR, Hulvey J, Stam R, Lamour K, Gijzen M, Tyler BM, Grünwald NJ, Mukhtar MS, Tomé DFA, Tör M, Van Den Ackerveken G, McDowell J, Daayf F, Fry WE, Lindqvist-Kreuzer H, Meijer HJG, Petre B, Ristaino J, Yoshida K, Birch PRJ, Govers F. The top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(4): 413–434.
- [3] Lamour KH, Stam R, Jupe J, Huitema E. The oomycete broad-host-range pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(4): 329–337.
- [4] Jones JDG, Dangl JL. The plant immune system. *Nature*, 2006, 444(7117): 323–329.
- [5] Kamoun S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Annual Review of Phytopathology*, 2006, 44: 41–60.
- [6] McGowan J, Fitzpatrick DA. Genomic, network, and phylogenetic analysis of the oomycete effector arsenal. *mSphere*, 2017, 2(6): e00408–17.
- [7] Whisson SC, Boevink PC, Moleleki L, Avrova AO, Morales JG, Gilroy EM, Armstrong MR, Grouffaud S, van West P, Chapman S, Hein I, Toth IK, Pritchard L, Birch PRJ. A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*, 2007, 450(7166): 115–118.
- [8] Dou DL, Kale SD, Wang X, Jiang RHY, Bruce NA, Arredondo FD, Zhang XM, Tyler BM. RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector *Avr1b* into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery. *Plant Cell*, 2008, 20(7): 1930–1947.
- [9] Anderson RG, Deb D, Fedkenheuer K, McDowell JM. Recent progress in RXLR effector research. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2015, 28(10): 1063–1072.
- [10] Boutemy LS, King SRF, Win J, Hughes RK, Clarke TA, Blumenschein TMA, Kamoun S, Banfield MJ. Structures of *Phytophthora* RXLR effector proteins: a conserved but adaptable fold underpins functional diversity. *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(41): 35834–35842.
- [11] Wang QQ, Han CZ, Ferreira AO, Yu XL, Ye WW, Tripathy S, Kale SD, Gu B, Sheng YT, Sui YY, Wang XL, Zhang ZG, Cheng BP, Dong SM, Shan WX, Zheng XB, Dou DL, Tyler BM, Wang YC. Transcriptional programming and functional interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR effector repertoire. *Plant Cell*, 2011, 23(6): 2064–2086.
- [12] Boevink PC, Wang XD, McLellan H, He Q, Naqvi S, Armstrong MR, Zhang W, Hein I, Gilroy EM, Tian ZD, Birch PRJ. A *Phytophthora infestans* RXLR effector targets plant PP1c isoforms that promote late blight disease. *Nature Communications*, 2016, 7: 10311.
- [13] Huang J, Gu LF, Zhang Y, Yan TX, Kong GH, Kong L, Guo BD, Qiu M, Wang Y, Jing MF, Xing WM, Ye WW, Wu Z, Zhang ZG, Zheng XB, Gijzen M, Wang YC, Dong SM. An oomycete plant pathogen reprograms host pre-mRNA splicing to subvert immunity. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 2051.
- [14] Kong L, Qiu XF, Kang JG, Wang Y, Chen H, Huang J, Qiu M, Zhao Y, Kong GH, Ma ZC, Wang Y, Ye WW, Dong SM, Ma WB, Wang YC. A *Phytophthora* effector manipulates host histone acetylation and reprograms defense gene expression to promote infection. *Current Biology*, 2017, 27(7): 981–991.
- [15] Qiao YL, Shi JX, Zhai Y, Hou YN, Ma WB. *Phytophthora*

- effector targets a novel component of small RNA pathway in plants to promote infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2015, 112(18): 5850–5855.
- [16] Yang LN, McLellan H, Naqvi S, He Q, Boevink PC, Armstrong M, Giuliani LM, Zhang W, Tian ZD, Zhan J, Gilroy EM, Birch PRJ. Potato NPH₃/RPT₂-like protein StNRL1, targeted by a *Phytophthora infestans* RXLR effector, is a susceptibility factor. *Plant Physiology*, 2016, 171(1): 645–657.
- [17] Wang Y, Bouwmeester K, van de Mortel JE, Shan WX, Govers F. A novel Arabidopsis-oomycete pathosystem: differential interactions with *Phytophthora capsici* reveal a role for camalexin, indole glucosinolates and salicylic acid in defence. *Plant, Cell & Environment*, 2013, 36(6): 1192–1203.
- [18] Lamour KH, Mudge J, Gobena D, Hurtado-Gonzales OP, Schmutz J, Kuo A, Miller NA, Rice BJ, Raffaele S, Cano LM, Bharti AK, Donahoo RS, Finley S, Huitema E, Hulvey J, Platt D, Salamov A, Savidor A, Sharma R, Stam R, Storey D, Thines M, Win J, Haas BJ, Dinwiddie DL, Jenkins J, Knight JR, Affourtit JP, Han CS, Chertkov O, Lindquist EA, Detter C, Grigoriev IV, Kamoun S, Kingsmore SF. Genome sequencing and mapping reveal loss of heterozygosity as a mechanism for rapid adaptation in the vegetable pathogen *Phytophthora capsici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25(10): 1350–1360.
- [19] Vega-Arreguín JC, Jalloh A, Bos JI, Moffett P. Recognition of an Avr3a homologue plays a major role in mediating nonhost resistance to *Phytophthora capsici* in *Nicotiana* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2014, 27(8): 770–780.
- [20] Chen XR, Xing YP, Li YP, Tong YH, Xu JY. RNA-Seq reveals infection-related gene expression changes in *Phytophthora capsici*. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74588.
- [21] Ma LL, Wang YJ, Sun BH, Chen SS, Zhang XG. Preliminary exploration for expression, purification and crystallization of RxLR101012 from *Phytophthora capsici*. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2017, 48(2): 210–214. (in Chinese)
马璐璐, 王玉姣, 孙柏华, 陈姗姗, 张修国. 辣椒疫霉效应因子 RxLR101012 的表达纯化与结晶初探. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2017, 48(2): 210–214.
- [22] Xu J, Zhang MX, Ye TY, Shen DY, Dou DL. Identification and functional analysis of *PiAvr3a*-like genes in *Phytophthora capsici*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2016, 46(2): 160–168. (in Chinese)
许静, 张美祥, 叶廷跃, 沈丹宇, 窦道龙. 辣椒疫霉菌 *PiAvr3a*-like 基因的鉴定及功能分析. *植物病理学报*, 2016, 46(2): 160–168.
- [23] Yang N, Zhang L, Ding P, Wang LY, Liu SY, Zhang XG. Functional analysis of an effector RxLR121504 in *Phytophthora capsici*. *Mycosystema*, 2017, 36(9): 1233–1242. (in Chinese)
杨楠, 张丽, 丁鹏, 王俐颖, 刘淑艳, 张修国. 辣椒疫霉效应分子 RxLR121504 功能特性的研究. *菌物学报*, 2017, 36(9): 1233–1242.
- [24] Zelaya-Molina LX, Ortega MA, Dorrance AE. Easy and efficient protocol for oomycete DNA extraction suitable for population genetic analysis. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(4): 715–720.
- [25] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(9): e45.
- [26] Fang YF, Cui LK, Gu B, Arredondo F, Tyler BM. Efficient genome editing in the oomycete *Phytophthora sojae* using CRISPR/Cas9. *Current Protocols in Microbiology*, 2017, 44(1): 21A.1.1–21A.1.26.

Sequence polymorphism, gene transcriptional pattern and function analysis of the RXLR effector PcAvh2 from *Phytophthora capsici*

Xiaoren Chen^{*}, Ye Zhang, Shenxin Huang, Yuping Xing, Zhaolin Ji

College of Horticulture and Plant Protection, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu Province, China

Abstract: [Objective] The aim was to analyze the sequence polymorphism, gene transcriptional pattern and functions of the RXLR effector PcAvh2 from *Phytophthora capsici*. [Methods] We cloned *PcAvh2* gene by high-fidelity PCR from 31 *P. capsici* isolates, 2 *P. parasitica* isolates and 1 *P. cactorum* isolate. Gene expression changes during the developmental stages (mycelia, zoosporangia, zoospores and germinated cysts) and infection period (1.5, 3, 6, 12, 24, 36, 72 h post-inoculation) of *P. capsici* were monitored by quantitative RT-PCR. PVX-based agroinfiltration assay was performed to examine if PcAvh2 could suppress plant immunity triggered by 6 effectors (BAX, INF1, PsojNIP, PsCRN63, PsAvh241 and R3a/Avr3a). The CaCl₂/PEG-mediated protoplast transformation of *P. capsici* was conducted to silence *PcAvh2* and determine if its silencing affected the pathogen's virulence. [Results] PcAvh2 is a typical RXLR effector and possesses 10 alleles in the population. Furthermore, it also exists in *P. parasitica* and *P. cactorum*. The expression of *PcAvh2* was up-regulated during the host infection by *P. capsici*. It can suppress the plant immunity induced by all 6 effectors. Intriguingly, silencing of *PcAvh2* in *P. capsici* significantly compromised the pathogen's virulence on host plants. [Conclusion] RXLR effector PcAvh2 is one of important pathogenicity factors in *P. capsici*.

Keywords: *Phytophthora capsici*, RXLR effector, sequence polymorphism, RT-PCR, plant immunity, gene silencing

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31671971, 31871907), the Natural Science Foundation of Yangzhou City (China) (YZ2016121), the Special Fund for Agro-Scientific Research in the Public Interest of China (201303018) and the Yangzhou University 2016 Project for Excellent Young Key Teachers

^{*}Corresponding author. Tel: +86-514-87971383; E-mail: xrchen@yzu.edu.cn

Received: 26 March 2018; Revised: 22 April 2018; Published online: 27 April 2018