



致病疫霉效应蛋白 Pi16275 的功能研究

刘晶^{1,2}, 杨祝强^{1,2}, 陈泓妃^{1,2}, 许机分^{1,2}, 王洪洋^{1,2*}, 李灿辉^{1,2*}

1 云南师范大学云南省马铃薯生物学重点实验室, 云南 昆明 650500

2 云南师范大学云南省高校马铃薯生物学重点实验室, 云南 昆明 650500

刘晶, 杨祝强, 陈泓妃, 许机分, 王洪洋, 李灿辉. 致病疫霉效应蛋白 Pi16275 的功能研究. 微生物学报, 2022, 62(3): 1073–1082.

Liu Jing, Yang Zhuqiang, Chen Hongfei, Xu Jifen, Wang Hongyang, Li Canhui. Toxicity of effector Pi16275 of *Phytophthora infestans*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(3): 1073–1082.

摘要:【目的】分析致病疫霉效应蛋白 Pi16275 的超量表达对病原菌致病性的影响, 明确 Pi16275 的亚细胞定位, 筛选 Pi16275 在植物中的互作靶标蛋白及靶标蛋白在抵御病原菌侵染过程中的作用, 初步揭示 Pi16275 在病原菌侵染植物过程中的作用机制。【方法】利用农杆菌介导的烟草瞬时表达系统在烟草叶片表皮细胞中瞬时表达 Pi16275 并观察其亚细胞定位, 同时在瞬时表达部位接种致病疫霉游动孢子并统计病斑面积; 通过酵母核系统 cDNA 文库及酵母双杂交技术筛选、验证, 确定 Pi16275 在马铃薯中的靶标蛋白; 运用病毒介导的基因沉默技术在植物中沉默靶标蛋白基因, 探究基因沉默是否影响植物对病原菌的抗性。【结果】在烟草叶片中瞬时表达 Pi16275 显著促进致病疫霉的侵染; Pi16275 定位在植物细胞核、细胞质及细胞膜中; 初步筛选到 3 个与 Pi16275 互作的马铃薯蛋白: 40S 核糖体亚基蛋白 S5 (StRPS5)、粘蛋白 2 (StMUC2)、V 型 ATP 酶 E 亚基类似蛋白 (StVAEL); 沉默 StRPS5 的同源基因后显著降低了烟草对致病疫霉的抗性。【结论】Pi16275 在致病疫霉侵染植物过程中发挥重要作用。

关键词: 致病疫霉; 马铃薯; RxLR 效应蛋白; 靶标蛋白

基金项目: 云南省基础研究计划(202001AU070091, 202005AE160015, 2019FB023); 云南省教育厅科学研究基金(2019J0067); 国家自然科学基金(31800134, 32060499)

Supported by the Yunnan Fundamental Research Projects (202001AU070091, 202005AE160015, 2019FB023), by the Foundation of Yunnan Educational Committee (2019J0067) and by the National Natural Science Foundation of China (31800134, 32060499)

*Corresponding authors. E-mail: WANG Hongyang, hongyang8318@ynnu.edu.cn; LI Canhui, ch2010201@163.com

Received: 6 July 2021; Revised: 15 August 2021; Published online: 16 November 2021

Toxicity of effector Pi16275 of *Phytophthora infestans*

LIU Jing^{1,2}, YANG Zhuqiang^{1,2}, CHEN Hongfei^{1,2}, XU Jifen^{1,2}, WANG Hongyang^{1,2*}, LI Canhui^{1,2*}

1 Yunnan Key Laboratory of Potato Biology, Yunnan Normal University, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Key Laboratory of Potato Biology in Universities of Yunnan Province, Yunnan Normal University, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: [Objective] Our aim was to analyze the effect of overexpressing the effector Pi16275 on the pathogenicity of *Phytophthora infestans*, and to clarify the subcellular localization of Pi16275. We screened the plant proteins that interacted with Pi16275 and explored their role in plant disease resistance, and finally revealed the role of Pi16275 in the process of pathogen infecting plants. [Methods] We used the *Agrobacterium*-mediated method to transiently overexpress Pi16275 in the epidermal cells of tobacco leaves, and then observed the subcellular location of Pi16275 under a fluorescence microscope. After inoculating the zoospores of *P. infestans* at the transient expression site, we measured the area of the diseased spot. The yeast nuclear cDNA library and yeast two-hybrid assay were used to mine and verify the target protein of Pi16275 in potato. In order to explore whether gene silencing affects the plant resistance to pathogens, we used virus-mediated gene silencing technology to silence the homologous gene of the target protein gene in tobacco and inoculated the tobacco leaves with zoospores of *P. infestans*. [Results] The transient expression of Pi16275 in tobacco leaves significantly promoted the infection of *P. infestans*, and Pi16275 was located in plant cell nucleus, cytoplasm, and cell membrane. Three target proteins of potato interacted with Pi16275, including 40S ribosomal protein S5 (StRPS5), mucin 2 (StMUC2), and V-type proton ATPase subunit E-like protein (StVAEL). Silencing the homologous gene of *StRPS5* significantly weakened the resistance of tobacco to *P. infestans*. [Conclusion] Pi16275 plays a role in the infection of *P. infestans* in plants.

Keywords: *Phytophthora infestans*; potato; RxLR effectors; target protein

马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 属于茄科 (*Solanaceae*) 茄属 (*Solanum*) 一年生草本植物, 别名土豆、洋芋、地蛋等, 是世界四大主要粮食作物之一。然而由致病疫霉 (*Phytophthora infestans*) 引起的马铃薯晚疫病能够使马铃薯产量急剧下降甚至绝收, 是马铃薯生产上的毁灭性病害^[1]。目前, 多数杀菌剂对马铃薯晚疫病无效, 培育抗病品种是防治马铃薯晚疫病的主要手段。因此, 从植物与病原菌互作的角度深入解析病原菌调控植物免疫的致病机理对病害的防治具有重要意义。

为抵御病原菌的侵染, 植物进化出了一套

复杂的免疫体系来激活自身的防卫反应。该套免疫体系主要包括两个层次, 由病原相关分子模式 (pathogen-associated molecular pattern, PAMP) 诱导的植物先天免疫反应 (PAMP-triggered immunity, PTI) 和病原菌效应蛋白 (effectors) 诱导的特异性免疫反应 (effectors-triggered immunity, ETI)^[2-3]。植物细胞表面的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRR) 能够识别病原菌的 PAMP, 诱导植物产生非特异免疫反应, 即 PTI 反应。而 ETI 反应主要由植物自身的抗病蛋白 (resistance protein, R) 识别病原菌产生的效应蛋白引发^[4-6]。根据效应蛋白能否被植物抗病蛋白

识别将其分成两类, 能够被抗病蛋白识别的效应蛋白也被称为无毒蛋白(avirulence protein, Avr); 反之, 则称该效应蛋白为毒性蛋白。根据效应蛋白在寄主细胞中的定位, 可将其分为胞外效应蛋白和胞质效应蛋白两类。其中, RxLR 效应蛋白是胞质效应蛋白的典型代表, 该类效应蛋白的N端含有一个保守的 Arg-x-Leu-Arg (RxLR, x 代表任意氨基酸)结构域。这些效应蛋白通过靶标寄主植物蛋白来干扰植物的免疫反应, 帮助病原菌快速侵染和成功定殖^[7-9]。

目前, 在致病疫霉基因组中发现有 563 个 RxLR 胞质效应蛋白基因, 但它们并不是都表达, 研究发现只有 100 多个可以在植物体内表达和调控^[10]。He 等研究发现, 致病疫霉效应蛋白 Pi06087 能够通过马铃薯 U-box 蛋白激酶 (StUBK) 互作进而抑制植物免疫, 促进病原菌的侵染^[11]。致病疫霉效应蛋白 Pi17316 在本氏烟中的瞬时表达增强了病原菌在植物中的定殖, 并且能够减弱由 PAMP 触发的植物细胞死亡, 表明 Pi17316 通过抑制植物的 PTI 免疫反应促进植物感病^[12]。此外, 还有研究显示大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*) 效应蛋白 Avh241 通过与植物质膜中的 NDR1 相互作用来抑制植物 ETI 反应, 干扰植物免疫^[13]。辣椒疫霉 (*Phytophthora capsici*) 效应蛋白 PcAvh103 能够与植物 EDS1 的脂肪酶结构域特异性互作, 通过破坏 EDS1-PAD4 免疫信号通路来抑制植物免疫^[14]。然而, 目前仍有大量的效应蛋白未被报道, 这些效应蛋白如何与植物互作从而调控植物自身免疫应答有待进一步研究。

课题组前期研究发现一个致病疫霉 RxLR 效应蛋白 PITG_16275 (命名为 Pi16275)。农杆菌穿刺实验表明, 该效应蛋白能够被四倍体马铃薯野生种 HJT349-3 (*Solanum hjertingii*) 识别并产生过敏性坏死反应, 但不能被四倍体马铃

薯栽培种 C88 识别, 说明 Pi16275 兼具无毒和毒性双重功能。本研究从蛋白亚细胞定位、农杆菌介导的烟草瞬时表达、寄主靶标蛋白鉴定及其功能初步研究等方面挖掘 Pi16275 在致病疫霉侵染植物过程中发挥的作用。研究结果将为马铃薯抗病新品种的培育及马铃薯晚疫病防治奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

致病疫霉 (*P. infestans*) 菌株 88069、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101、酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) Y2HGold 及 Y187 均由本实验室保存提供。

1.1.2 植物

本氏烟 (*Nicotiana benthamiana*) 和马铃薯 (*S. tuberosum* L.) 均种植于恒温气候室中 (22 °C, 16 h/8 h 光照/黑暗) 生长 3–6 周后使用。

1.1.3 质粒

瞬时表达载体 pRI101-GFP, 酵母双杂交载体 pGBKT7、pGADT7, 病毒介导的基因瞬时沉默载体 pTRV1、pTRV2-GFP、pTRV2-PDS、pTRV2 均由本实验室保存提供。

1.2 基因克隆及载体构建

构建 pRI101-GFP-Pi16275 载体用于瞬时超表达及蛋白亚细胞定位。利用引物对 (表 1) 扩增 Pi16275 除信号肽以外的编码序列并连接到经 *Sma* I 及 *Kpn* I 双酶切的 pRI101-GFP 载体上, 形成重组载体 pRI101-GFP-Pi16275。

构建载体 pGBKT7-Pi16275 及 pGADT7-X (X 代表可能与 Pi16275 产生互作的蛋白), 分别用于酵母核系统 cDNA 文库 (文库材料来源于致病疫霉菌株 88069 侵染马铃薯栽培种 C88 叶片

不同时间的植物病样)筛选及酵母点对点杂交。利用引物对(表 1)扩增 Pi16275 除信号肽以外的编码序列及 X 的编码序列,分别连接到经 *Nde* I 和 *Eco*R I 双酶切的 pGBKT7 及 pGADT7 载体上。

构建 pTRV2-X 载体用于病毒介导的基因沉默(VIGS)实验。利用引物对(表 1)扩增 X 的编码序列并连接到经 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切的 pTRV2 载体上。将上述重组载体依次转入大肠杆菌感受态 DH5 α 及农杆菌感受态 GV3101 中,测序正确的菌株用于后续实验。

1.3 Pi16275 在本氏烟中的瞬时表达及蛋白亚细胞定位

参考王洪洋^[15]的方法,利用农杆菌介导的烟草瞬时表达系统在烟草叶片表皮细胞中瞬时表达 Pi16275。农杆菌注射烟草叶片 24 h 后,在注射部位接种浓度为 2×10^5 个/mL 的致病疫霉孢子囊悬浮液 10 μ L。接种后的叶片置于 22 $^{\circ}$ C,相对湿度 80%,16 h/8 h 光照/黑暗的条件下培养,5 d 后统计病斑面积。农杆菌注射烟

草叶片 36–48 h 后,撕取烟草叶片下表皮,用激光共聚焦显微镜观察融合蛋白的亚细胞定位并拍照。同时,提取该烟草叶片的总蛋白,以 GFP 抗体(成都正能)为一抗、HRP 抗体为二抗(成都正能),参照 Liu^[16]等方法进行 Western blotting 分析。

1.4 酵母核系统 cDNA 文库筛选及酵母点对点杂交

以 pGBKT7-Pi16275 为诱饵载体筛选酵母核系统 cDNA 文库,以 pGADT7-X 为猎物载体,分别与 pGBKT7-Pi16275 载体进行酵母点对点杂交验证,具体操作步骤参照李晓静^[17]的方法。

1.5 病毒介导的基因沉默

病毒介导的基因沉默具体操作步骤参照王洪洋^[16]的方法。利用荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术确定目的基因的沉默效率大于 70%后,采用离体本氏烟叶片接种法接种致病疫霉孢子囊悬浮液,孢子囊悬浮液浓度、接种量及接种后的培养条件同 1.3,6 d 后统计病斑面积。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 PCR primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Purposes
Pi16275-F/Pi16275-R	<u>gacgagctgtacaagcccggg</u> TCTACCGGGACCGACGTTT/ ggtgattcagaattc <u>ggatcc</u> GTCCAATTTGCCATTGTCTTT	pRI101-GFP-Pi16275 cloning
BD-Pi16275-F/BD-Pi16275-R	tcagaggaggacgtc <u>catatg</u> TCTACCGGGACCGACGTTT/ ggatccccgagtttg <u>gaattc</u> GTCCAATTTGCCATTGTCTTT	pGBKT7-Pi16275 cloning
AD-F2-F/AD-F2-R	gtaccagattacgtc <u>catatg</u> ATGGACGCAGGTGTAGTTGCTG/ atgccaccgggtg <u>gaattc</u> TTAACGATTGGCCTTGCCAA	pGADT7-F2 cloning
AD-F21-F/AD-F21-R	gtaccagattacgtc <u>catatg</u> ATGGCACTTCTACCCACCA/ atgccaccgggtg <u>gaattc</u> TTAGTTTCCAGAAGCTGGATCGT	pGADT7-F21 cloning
AD-F33-F/AD-F33-R	gtaccagattacgtc <u>catatg</u> ATGAATGACCCGATGTCTCC/ atgccaccgggtg <u>gaattc</u> TCAAGCAGCAACCTGACCG	pGADT7-F33 cloning
AD-242-F/AD-242-R	gtaccagattacgtc <u>catatg</u> ATGGGCAAGAAAGGAA/ atgccaccgggtg <u>gaattc</u> TCAACTAAAATTATAT	pGADT7-242 cloning
VIGS-F2-F/VIGS-F2-R	gtgagtaaggtacc <u>gaattc</u> TTTCTCCACTTCGCCGTGTT/ cgtgagctcgggtacc <u>ggatcc</u> CAACGATTGGCCTTGCCAAAC	pTRV2-F2 cloning
VIGS-F21-F/VIGS-F21-R	gtgagtaaggtacc <u>gaattc</u> GGATGGTGTGAGGTCTCTTC/ cgtgagctcgggtacc <u>ggatcc</u> GCACGCTTGACATGTCTTTG	pTRV2-F21 cloning
VIGS-F33-F/VIGS-F33-R	gtgagtaaggtacc <u>gaattc</u> CTTCTCACCACCAAGACAGT/ cgtgagctcgggtacc <u>ggatcc</u> CTCAGGTGCATGGACATTTGC	pTRV2-F33 cloning

Restriction sites in primer sequences are underlined. Lowercase letters represent homologous sequences at the end of the vector.

2 结果与分析

2.1 瞬时超表达 Pi16275 促进致病疫霉侵染

利用农杆菌介导的烟草瞬时表达体系在本氏烟叶片中超量表达 Pi16275。随后, 利用离体烟草叶片接种法在超量表达 Pi16275 的本氏烟叶片上接种致病疫霉。结果显示, 瞬时超表达 Pi16275 的病斑面积显著大于阴性对照(超表达 GFP)的病斑面积, 是阴性对照病斑面积的 3.28 倍(图 1)。由此说明, 在烟草叶片中瞬时超量表达 Pi16275 显著地促进了致病疫霉的侵染。

2.2 Pi16275 的亚细胞定位

为明确 Pi16275 在植物中的亚细胞定位, 利用农杆菌介导的烟草瞬时表达体系在本氏烟叶片中表达 GFP-Pi16275 融合蛋白。撕取烟草叶片下表皮并在荧光显微镜下观察拍照, 结果表明 GFP-Pi16275 融合蛋白定位在细胞核、细胞质及细胞膜(图 2A)。提取本氏烟叶片总蛋白

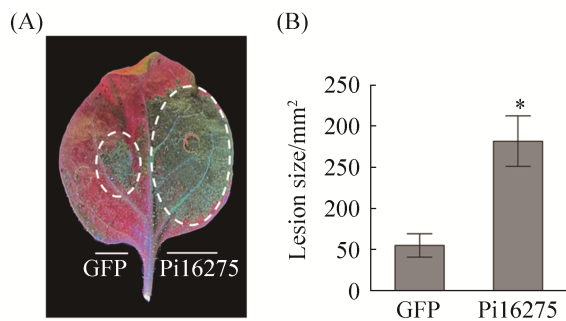


图 1 本氏烟叶片中瞬时超表达 Pi16275 能够促进致病疫霉侵染

Figure 1 Transient expression of Pi16275 in *N. benthamiana* promote the infection of *P. infestans*. A: GFP and Pi16275 are transiently expressed in *N. benthamiana*, followed by inoculation with *P. infestans* 88069 sporangia. Compared with GFP, Pi16275 is able to promote *P. infestans* infection after 6 days of inoculation. B: the lesion area expressing Pi16275 is significantly increased compared to GFP. Asterisked bars in each bar group differ significantly from those unmarked ($P < 0.05$). Error bars: SD from three replicates.

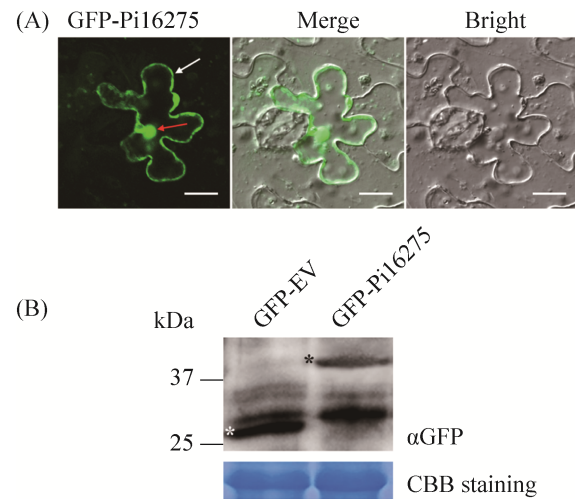


图 2 RxLR 效应蛋白 Pi16275 亚细胞定位

Figure 2 Subcellular localization of Pi16275. A: Pi16275 is located in the nucleus, cytoplasm and cell membrane of *N. benthamiana*. The white arrow represents the cell membrane, and the red arrow represents the nucleus. Scale bars: 20 μ m. B: Western blotting showed that both GFP and GFP-Pi16275 are stably expressed in *N. benthamiana*. The consistency of protein loading is indicated by Coomassie brilliant blue staining. The asterisk represents the target protein.

进行 Western blotting 分析, 结果显示, GFP 及 GFP-Pi16275 的蛋白分子量均与预期大小一致, 分别为 27 kDa 和 43 kDa。以上结果表明, GFP、GFP-Pi16275 均能够在烟草叶片细胞中稳定表达(图 2B), 蛋白亚细胞定位结果准确、可信。

2.3 Pi16275 诱饵蛋白毒性和自激活检测

本课题组前期以致病疫霉菌株 88069 侵染马铃薯栽培种 C88 叶片不同时间的病样为材料构建了酵母核系统 cDNA 文库。为明确马铃薯中哪些蛋白能够与 Pi16275 互作, 本研究以效应蛋白 Pi16275 作为诱饵蛋白筛选酵母核系统 cDNA 文库, 文库筛选前首先对 Pi16275 诱饵蛋白的毒性和自激活特性进行了检测。将 pGBKT7-53 和 pGADT7-T (阳性对照组合)、pGBKT7-Lam 和 pGADT7-T (阴性对照组合)、

pGBKT7-Pi16275 和 pGADT7 (实验组组合)、pGBKT7 和 pGADT7 (空载体组合)分别转化到酵母菌株 Y2HGold 中,涂布到相应的筛选平板上培养 3–5 d。结果显示,所有载体组合转化酵母菌株都能在 SD-Trp 培养基上生长,而且酵母菌落大小和数量都没有明显差异,说明 pGBKT7-Pi16275 表达的诱饵蛋白对酵母细胞的生长无毒性(图片未展示)。将上述各转化酵母菌株点样在 SD-Trp-Leu/X- α -gal (二缺)和 SD-Trp-Leu-His/X- α -gal (三缺)固体培养基上继续培养 3–5 d。结果显示,各酵母转化菌株均能在二缺培养基上生长;除阳性对照组合的酵母转化菌株外,其余所有酵母转化菌株在二缺培养基上都不显蓝色;除阳性对照组合酵母转化菌株外,其余所有酵母转化菌株均不能在三缺培养基上生长。以上结果说明,诱饵质粒 pGBKT7-Pi16275 已经成功转入酵母 Y2HGold 中,且诱饵蛋白 Pi16275 不能启动下游报告基因,不存在自激活(图 3)。

2.4 酵母核系统 cDNA 文库筛选 Pi16275 的互作蛋白

以 Pi16275 为诱饵蛋白,通过筛选酵母核系统 cDNA 文库得到酵母菌株阳性克隆,提取阳性克隆菌株的质粒并送生物公司测序,将测

序结果在 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)上进行 BLAST 比对分析,共得到 10 个可能与 Pi16275 产生互作的候选靶标蛋白(表 2)。

2.5 Pi16275 与候选靶标蛋白酵母点对点杂交验证

将 10 个候选基因构建到酵母双杂交猎物载体中,其中 7 个候选靶标蛋白的载体构建与表达获得成功(F22、F32、F106 并未构建成功),随后将猎物载体分别转化酵母 Y2HGold 后涂布到酵母缺陷型培养基上。除了阳性对照菌落显蓝色外,其余菌落均为白色且菌落大小与阳性、阴

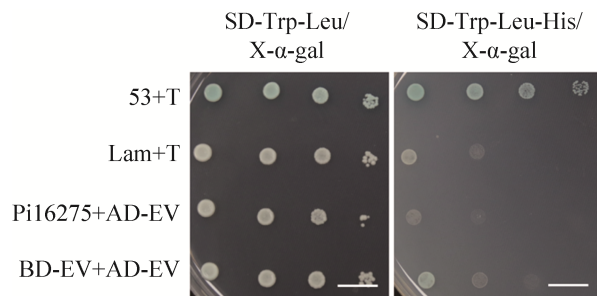


图 3 Pi16275 无酵母自激活效应

Figure 3 Pi16275 has no auto-activation effect in yeast. All yeast transformed strains can grow on SD-Trp-Leu/X- α -gal medium. Yeast co-expressing pGBKT7-Pi16275 with pGADT7 does not grow on SD-Trp-Leu-His/X- α -gal medium and does not have X- α -gal activity. Scale bars: 10 mm.

表 2 候选靶标蛋白编码基因测序比对结果

Table 2 Sequencing results of candidate target protein coding genes

Number	Gene ID	Gene annotation
242	102600586	Solanum tuberosum protein IQ-DOMAIN 1, transcript variant X1, mRNA
F2	102597496	40S ribosomal protein S5
F21	102599206	Mucin-2 isoform X2
F22	102596179	Uncharacterized protein
F32	102601057	40S ribosomal protein SA-like
F33	102589135	V-type proton ATPase subunit E-like
F40	102603033	Isocitrate dehydrogenase [NAD] regulatory subunit 1, mitochondrial-like
F44	102598404	Annexin D1-like
F59	102605698	Pre-mRNA-splicing factor SPF27 homolog
F106	102600457	SEC1 family transport protein SLY1-like

性对照无明显差异。由此可知, 候选靶标蛋白对酵母 Y2HGold 细胞无毒性, 也无自激活现象(部分结果见图 4)。将上述猎物载体分别与诱饵载体 pGBKT7-Pi16275 进行组合, 共转化 Y2HGold 后于酵母缺陷型培养基上分别培养 3–5 d。结果显示, 其中 3 个实验组合在缺陷型培养基上有菌落生长, 并且菌落呈蓝色(图 5)。上述结果表明,

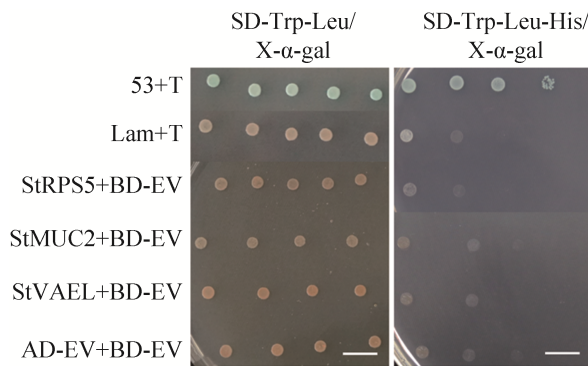


图 4 猎物蛋白无酵母自激活效应(图中仅展示部分结果)

Figure 4 Prey proteins have no auto-activation effect in yeast (only partial results are shown in the figure). All yeast transformed strains can grow on SD-Trp-Leu/X- α -gal medium. Yeast co-expressing pGADT7-X with pGBKT7 does not grow on SD-Trp-Leu-His/X- α -gal medium and does not have X- α -gal activity. Scale bars: 10 mm.

Pi16275 能够与 3 个靶标蛋白产生互作, 它们分别是 40S 核糖体亚基蛋白 S5 (StRPS5)、粘蛋白 2 (StMUC2)、V 型 ATP 酶 E 亚基类似蛋白(StVAEL) (分别对应表 2 中的编号 F2、F21、F33)。

2.6 VIGS 技术分析靶标蛋白的功能

利用 VIGS 技术沉默 3 个靶标蛋白基因在本氏烟中的同源基因, 荧光定量 PCR 方法检测 3 个靶标蛋白基因的沉默效率在 80.59%–89.39%, 表明沉默效果较好(图 6C)。随后采集各实验组的

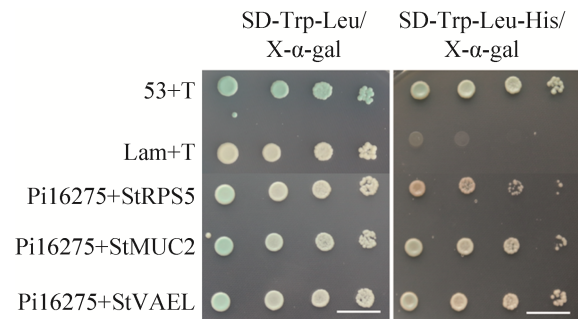


图 5 Pi16275 与 3 个候选蛋白的酵母点对点互作验证

Figure 5 Verification of yeast point-to-point interaction of Pi16275 and 3 candidate proteins. All three point-to-point combinations can grow on SD-Trp-Leu-His-Ade/X- α -gal medium and have X- α -gal activity. Scale bars: 10 mm.

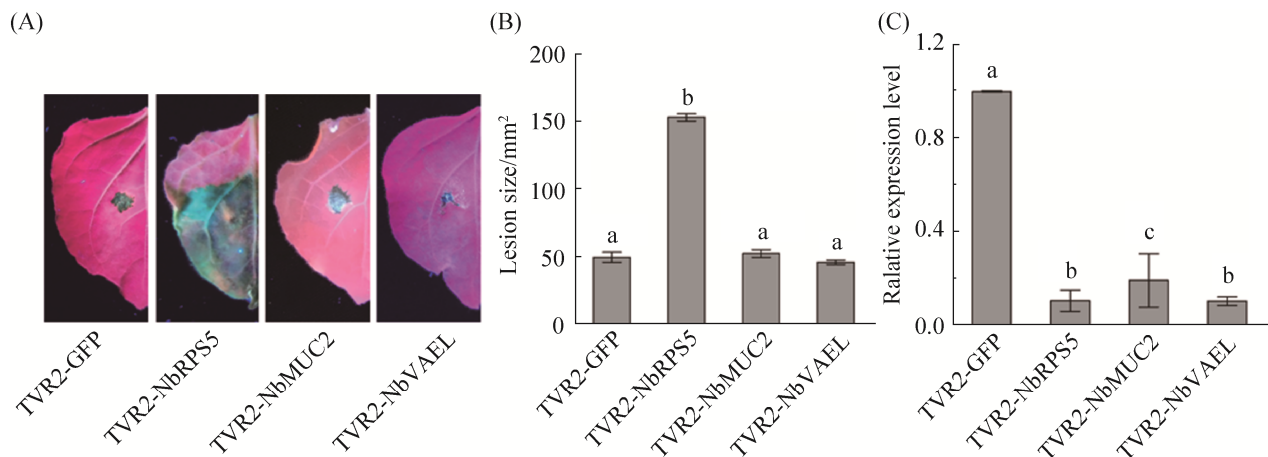


图 6 VIGS 沉默靶标基因后致病疫霉感染情况

Figure 6 Infection of *P. infestans* after VIGS silencing target genes. A: the typical photos were taken on the 6th day after inoculation; B: lesion area of each silenced *N. benthamiana* leaves; C: gene silencing efficiency.

烟草叶片, 接种致病疫霉。病斑面积统计结果表明, 沉默 *NbRPS5* 的叶片病斑面积为 $153.67 \text{ cm} \pm 4.71 \text{ cm}$ 显著大于阴性对照 *GFP* ($49.93 \text{ cm} \pm 6.51 \text{ cm}$); 沉默 *NbMUC2* 和 *NbVAEL* 的叶片病斑面积(分别为 $52.67 \text{ cm} \pm 4.91 \text{ cm}$ 、 $46.20 \text{ cm} \pm 2.91 \text{ cm}$)与阴性对照相比并无显著差异(图 6A, 6B)。以上结果表明, 沉默 *NbRPS5* 基因能够促进致病疫霉的侵染, 说明 *NbRPS5* 在植物抵御病原菌侵染过程中发挥正调控作用。

3 讨论与结论

致病疫霉基因组中约有 563 个 RxLR 效应蛋白, 一些 RxLR 效应蛋白在植物中超量表达能够促进致病疫霉的侵染^[11]。例如, 在植物中瞬时表达 RxLR 效应蛋白 Pi04314、Pi04089、IPI-O1 和 IPI-O4 等均能够增强病原菌定殖并促进植物感病^[18-20]。本研究利用农杆菌介导的瞬时超量表达技术在本氏烟叶片中瞬时超量表达致病疫霉 RxLR 效应蛋白 Pi16275 并接种致病疫霉游动孢子。研究表明, Pi16275 的超量表达显著促进了致病疫霉的侵染, 暗示 Pi16275 在致病疫霉的侵染过程中发挥重要作用。

致病疫霉效应蛋白能够被分泌并进入植物细胞内, 在不同的亚细胞区域发挥其功能。例如, 致病疫霉效应蛋白 PITG_22926 定位在细胞核, 且在细胞核中发挥其致病功能^[21]。效应蛋白 PITG_22798 定位在细胞核并能够被寄主植物识别并触发细胞死亡^[22]。效应蛋白 PITG_04089 主要定位在细胞核同时伴有细胞质背景, 在该蛋白的 N 端分别加上核输出信号(NES)及核定位信号(NLS)形成融合蛋白, 结果表明核输出融合蛋白显著降低了致病疫霉的侵染水平, 说明 PITG_04089 的细胞核定位对病原菌的侵染至关重要^[19]。本研究中, 亚细胞定

位研究结果显示 Pi16275 定位于烟草叶片表皮细胞的细胞核、细胞质及细胞膜中, 且 Western blotting 分析结果表明 Pi16275 能够在植物细胞中稳定表达。此外, Pi16275 的亚细胞定位与致病性之间的关系如何还有待进一步研究。后续可分别构建 Pi16275 的核输出及核定位融合蛋白, 在烟草叶片中分别表达后接种致病疫霉游动孢子并统计叶片的病斑面积, 根据病斑面积情况判断 Pi16275 的亚细胞定位与其致病性之间的关系。

为进一步明确 Pi16275 在致病疫霉侵染过程中的作用, 本研究利用酵母核系统 cDNA 文库筛选技术及酵母双杂交技术对 Pi16275 在马铃薯中可能的互作蛋白进行了筛选。本研究最终筛选出 3 个能够与 Pi16275 产生互作的候选靶标蛋白。进一步利用 VIGS 技术在本氏烟中沉默 3 个候选靶标蛋白基因的同源基因, 结果发现沉默 *StRPS5* 的同源基因 *NbRPS5* 后, 本氏烟对致病疫霉的抗性大大降低。以上结果说明 *StRPS5* 在马铃薯抵御致病疫霉侵染过程中发挥重要作用。前人研究表明, 核糖体蛋白参与了 rRNA 的加工、折叠、核糖体亚基的组装和转运等^[23]。除此之外, 还有研究显示植物核糖体蛋白与抗病免疫应答、紫外胁迫应答、高温及低温胁迫应答等相关^[24-27]。目前, 关于 RPS5 参与植物免疫应答的报道很少。Saha 等的研究表明, 水稻(*Oryza sativa*)核糖体蛋白 RPS5 及 RPS5a 能够通过提高自身基因的表达水平分别抵御丝核菌(*Rhizoctonia solani*)及黄单胞菌 [*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*)]的侵染^[28]。但是, 以上有关植物 RPS5 的功能研究均停留在表型层面, 缺乏相应的机制研究。因此, 后续可以 *StRPS5* 为切入点, 解析 *StRPS5* 与 Pi16275 的互作机制, 进一步阐明 Pi16275 促进植物感病的可能途径。

参考文献

- [1] Fry W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9(3): 385–402.
- [2] Dodds PN, Rathjen JP. Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics*, 2010, 11(8): 539–548.
- [3] Thomma BPHJ, Nürnberger T, Joosten MHJ. Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The Plant Cell*, 2011, 23(1): 4–15.
- [4] Vleeshouwers VGAA, Rietman H, Krenek P, Champouret N, Young C, Oh SK, Wang MQ, Bouwmeester K, Vosman B, Visser RGF, Jacobsen E, Govers F, Kamoun S, Van Der Vossen EAG. Effector genomics accelerates discovery and functional profiling of potato disease resistance and *Phytophthora infestans* avirulence genes. *PLoS One*, 2008, 3(8): e2875.
- [5] Pel M. Mapping, isolation and characterization of genes responsible for late blight resistance in potato. Wageningen, The Netherlands: Wageningen University, 2010.
- [6] Li GC, Huang SW, Guo X, Li Y, Yang Y, Guo Z, Kuang HH, Rietman H, Bergervoet M, Vleeshouwers VGGA, Van Der Vossen EAG, Qu DY, Visser RGF, Jacobsen E, Vossen JH. Cloning and characterization of r3b; members of the r3 superfamily of late blight resistance genes show sequence and functional divergence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(10): 1132–1142.
- [7] Birch PRJ, Rehmany AP, Pritchard L, Kamoun S, Beynon JL. Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells. *Trends in Microbiology*, 2006, 14(1): 8–11.
- [8] Rehmany AP, Gordon A, Rose LE, Allen RL, Armstrong MR, Whisson SC, Kamoun S, Tyler BM, Birch PRJ, Beynon JL. Differential recognition of highly divergent downy mildew avirulence gene alleles by RPP₁ resistance genes from two *Arabidopsis* lines. *The Plant Cell*, 2005, 17(6): 1839–1850.
- [9] Armstrong MR, Whisson SC, Pritchard L, Bos JI, Venter E, Avrova AO, Rehmany AP, Böhme U, Brooks K, Cherevach I, Hamlin N, White B, Fraser A, Lord A, Quail MA, Churcher C, Hall N, Berriman M, Huang SW, Kamoun S, Beynon JL, Birch PR. An ancestral oomycete locus contains late blight avirulence gene Avr3a, encoding a protein that is recognized in the host cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(21): 7766–7771.
- [10] Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RHY, Handsaker RE, Cano LM, Grabherr M, Kodira CD, Raffaele S, Torto-Alalibo T, Bozkurt TO, Ah-Fong AMV, Alvarado L, Anderson VL, Armstrong MR, Avrova A, Baxter L, Beynon J, Boevink PC, Bollmann SR, Bos JIB, Bulone V, Cai GH, Cakir C, Carrington JC, Chawner M, Conti L, Costanzo S, Ewan R, Fahlgren N, Fischbach MA, Fugelstad J, Gilroy EM, Gnerre S, Green PJ, Grenville-Briggs LJ, Griffith J, Grünwald NJ, Horn K, Horner NR, Hu CH, Huitema E, Jeong DH, Jones AME, Jones JDG, Jones RW, Karlsson EK, Kunjeti SG, Lamour K, Liu ZY, Ma LJ, MacLean D, Chibucos MC, McDonald H, McWalters J, Meijer HJG, Morgan W, Morris PF, Munro CA, O'Neill K, Ospina-Giraldo M, Pinzón A, Pritchard L, Ramsahoye B, Ren QH, Restrepo S, Roy S, Sadanandom A, Savidor A, Schornack S, Schwartz DC, Schumann UD, Schwessinger B, Seyer L, Sharpe T, Silvar C, Song J, Studholme DJ, Sykes S, Thines M, Van De Vondervoort PJI, Phuntumart V, Wawra S, Weide R, Win J, Young C, Zhou SG, Fry W, Meyers BC, van West P, Ristaino J, Govers F, Birch PRJ, Whisson SC, Judelson HS, Nusbaum C. Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 2009, 461(7262): 393–398.
- [11] He Q, McLellan H, Hughes RK, Boevink PC, Armstrong M, Lu Y, Banfield MJ, Tian ZD, Birch PRJ. *Phytophthora infestans* effector SFI₃ targets potato UBK to suppress early immune transcriptional responses. *New Phytologist*, 2019, 222(1): 438–454.
- [12] Murphy F, He Q, Armstrong M, Giuliani LM, Boevink PC, Zhang W, Tian ZD, Birch PRJ, Gilroy EM. The potato MAP3K StVIK is required for the *Phytophthora infestans* RXLR effector Pi17316 to promote disease. *Plant Physiology*, 2018, 177(1): 398–410.
- [13] Yang B, Yang S, Guo BD, Wang YY, Zheng WY, Tian MJ, Dai KX, Liu ZH, Wang HN, Ma ZC, Wang Y, Ye WW, Dong SM, Wang YC. The *Phytophthora* effector Avh241 interacts with host NDR1-like proteins to manipulate plant immunity. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2021, 63(7): 1382–1396.
- [14] Li Q, Wang J, Bai T, Zhang M, Jia YL, Shen DY, Zhang MX, Dou DL. A *Phytophthora capsici* effector suppresses plant immunity via interaction with EDS1. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(4): 502–511.
- [15] 王洪洋. 基于效应子介导免疫体系的马铃薯晚疫病

- 菌无毒基因挖掘及功能分析. 华中农业大学博士学位论文, 2014.
- [16] Liu J, Wang ZK, Sun HH, Ying SH, Feng MG. Characterization of the Hog1 MAPK pathway in the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Environmental Microbiology*, 2017, 19(5): 1808-1821.
- [17] 李晓静. 马铃薯3个青枯菌效应蛋白功能研究. 华中农业大学硕士学位论文, 2018.
- [18] 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.
- [19] Wang XD, Boevink P, McLellan H, Armstrong M, Bukharova T, Qin ZW, Birch PRJ. A host KH RNA-binding protein is a susceptibility factor targeted by an RXLR effector to promote late blight disease. *Molecular Plant*, 2015, 8(9): 1385-1395.
- [20] Chen Y, Halterman DA. *Phytophthora infestans* effectors IPI-O1 and IPI-O4 each contribute to pathogen virulence. *Phytopathology*, 2017, 107(5): 600-606.
- [21] Ren YJ, Armstrong M, Qi YT, McLellan H, Zhong C, Du BW, Birch PRJ, Tian ZD. *Phytophthora infestans* RXLR effectors target parallel steps in an immune signal transduction pathway. *Plant Physiology*, 2019, 180(4): 2227-2239.
- [22] Wang HY, Ren YJ, Zhou J, Du J, Hou J, Jiang R, Wang HX, Tian ZD, Xie CH. The cell death triggered by the nuclear localized RxLR effector PITG_22798 from *Phytophthora infestans* is suppressed by the effector AVR3b. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(2): 409.
- [23] 靳聪聪, 侯名语, 潘延云. 拟南芥核糖体蛋白生物学功能研究进展. *植物生理学报*, 2018, 54(2): 203-212.
- Jin CC, Hou MY, Pan YY. Research progress of ribosomal protein function in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology Journal*, 2018, 54(2): 203-212. (in Chinese)
- [24] Carvalho CM, Santos AA, Pires SR, Rocha CS, Saraiva DI, Machado JPB, Mattos EC, Fietto LG, Fontes EPB. Regulated nuclear trafficking of rpL10A mediated by NIK₁ represents a defense strategy of plant cells against virus. *PLoS Pathogens*, 2008, 4(12): e1000247.
- [25] Rocha CS, Santos AA, Machado JPB, Fontes EPB. The ribosomal protein L10/QM-like protein is a component of the NIK-mediated antiviral signaling. *Virology*, 2008, 380(2): 165-169.
- [26] Gong Q, Yang ZE, Wang XQ, Butt HI, Chen EY, He SP, Zhang CJ, Zhang XY, Li FG. Salicylic acid-related cotton (*Gossypium arboreum*) ribosomal protein GaRPL18 contributes to resistance to *Verticillium dahliae*. *BMC Plant Biology*, 2017, 17(1): 59.
- [27] Kang CH, Lee YM, Park JH, Nawkar GM, Oh HT, Kim MG, Lee SI, Kim WY, Yun DJ, Lee SY. Ribosomal P3 protein AtP3B of *Arabidopsis* acts as both protein and RNA chaperone to increase tolerance of heat and cold stresses. *Plant, Cell & Environment*, 2016, 39(7): 1631-1642.
- [28] Saha A, Das S, Moin M, Dutta M, Bakshi A, Madhav MS, Kirti PB. Genome-wide identification and comprehensive expression profiling of ribosomal protein small subunit (RPS) genes and their comparative analysis with the large subunit (RPL) genes in rice. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8: 1553.

(本文责编 李磊)