



主持人: 缪卫国

香蕉枯萎病菌候选效应蛋白 FoSSP20 的 鉴定和功能初探

王田, 符俐盈, 赵阳, 刘爽, 张玉芳, 陈代朋, 郑丽
(海南大学植物保护学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要: 为了鉴定课题组前期在 *Foc4* 基因组中筛选的候选效应蛋白的毒力功能, 以从中选取的 FoSSP20 为研究对象, 通过生物信息学分析其结构, 并通过信号肽分泌实验、亚细胞定位实验、烟草瞬时表达实验和 qRT-PCR 初步分析其功能, 结果显示, 利用酵母分泌实验验证 FoSSP20 的信号肽的分泌功能, 亚细胞定位分析表明分泌蛋白定位于烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 细胞的细胞膜和细胞核中。qRT-PCR 结果分析表明 FoSSP20 在香蕉枯萎病菌感染前期显著上调表达。以上结果表明, FoSSP20 是一个经典分泌蛋白, 可能在病原菌侵染过程中发挥作用。

关键词: 尖孢镰刀菌古巴专化型; 效应蛋白; 亚细胞定位; 细胞死亡

中图分类号: S432.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-7054(2024)01-0085-09

王田, 符俐盈, 赵阳, 等. 香蕉枯萎病菌候选效应蛋白 FoSSP20 的鉴定和功能初探 [J]. 热带生物学报, 2024, 15(1): 85-93. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230045

香蕉 (*Musa spp.*) 在亚非拉等不发达地区不仅是主要食物来源, 而且是重要的经济支柱^[1]。据联合国粮农组织统计, 我国香蕉产量占全球总产量的 10% 左右, 仅次于印度^[2]。由香蕉枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Foc*) 引起的香蕉枯萎病是一种严重危害香蕉生产的土传病害。根据 *Foc* 菌株对宿主的毒力差异, *Foc* 可分为 4 个生理小种, *Foc* race1、*Foc* race2、*Foc* race3 和 *Foc* race4 (*Foc1*, *Foc2*, *Foc3* and *Foc4*), 其中 *Foc4* 可细分为 *Foc* TR4 (tropical race 4) 和 *Foc* STR4 (subtropical race 4)^[3]。*Foc1* 能侵染大多数三倍体香蕉 (*Musa spp.*, AAA 和 *Musa spp.*, AAB), 如栽培品种 “Gros Michel” 等^[4]。20 世纪 50 年代, 由 *Foc1* 引起的香蕉枯萎病大面积爆发, 使 “Gros Michel” 香蕉 (*Musa spp.*, AAA) 大量死亡, 种植园绝收, 对当时的香蕉产业造成了毁灭性的打击^[5]。“Cavendish”

香蕉开始替代 “Cros Michel” 香蕉, 贡献了 50% 全球产量和 99% 的出口市场, 而毒性更强的 *Foc* TR4 能侵染 “Cavendish” 香蕉和大多数重要的栽培品种, 并在世界各地广泛传播, 对现在的香蕉产业造成严重破坏^[6]。

在植物与病原菌长期的协同进化过程中, 植物建立起了能有效抵御病原微生物的先天免疫系统 (innate immune system), 当植物遭受病原菌侵染时, 免疫系统能特异识别信号分子从而激活植物自身免疫应答^[7]。先天免疫系统包括 2 个不同的层面。第 1 层免疫系统是由位于植物细胞表面的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 识别并结合病原微生物的病原或微生物相关分子模式 (pathogen or microbial-associated molecular patterns, PAMPs or MAMPs) 诱导的免疫反应, 称为 PTI (PAMP-triggered immunity)^[8-9]。第二层免

收稿日期: 2023-04-04

修回日期: 2023-04-27

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (32260648); 海南省青年基金项目 (320QN188); 海南省重点研发项目 (ZDYF2022XDNY242)

第一作者: 王田 (1997-), 男, 海南大学植物保护学院 2020 级硕士研究生。E-mail: wt734180363@outlook.com

通信作者: 陈代朋 (1987-), 男, 讲师, 研究方向: 植物病理学。E-mail: chen.daipeng@163.com; 郑丽 (1985-), 女, 教授, 研究方向: 植物病理学。E-mail: zhenglihappy0617@126.com

疫系统中,一些病原微生物分泌的效应蛋白直接或间接被植物中的抗病(resistance, R)蛋白识别,如核苷酸结合富亮氨酸重复序列(nucleotide-binding leucine-rich repeat, NLR)蛋白,随后诱导的免疫反应,称为 ETI(effector-triggered immunity)^[10]。在免疫反应中,ETI 相比 PTI 免疫反应更剧烈,通常会导致植物局部细胞死亡,称为过敏性坏死反应(hypersensitive response, HR)^[11]。病原微生物为了更好地侵染寄主植物会分泌效应蛋白干扰 PTI^[12]。研究表明,香蕉中过表达细胞凋亡基因或 PCD 相关基因可以提高香蕉对 *Foc* 的抗病性,说明香蕉细胞 HR 反应也是香蕉抗枯萎病的重要抗病机制^[13-14]。

效应蛋白被证明在 *Foc* 的侵染过程中发挥作用。*Foc* 的全基因组测序已经完成,利用基因组测序技术和生物信息学分析在 *Foc* TR4 中预测了大量的候选效应蛋白^[15-16]。然而,许多候选效应蛋白的毒力功能并不清楚。因此,*Foc* 中的候选效应蛋白的鉴定和毒力分析对于研究 *Foc* 的致病机制和其与宿主间相互作用至关重要。

烟草瞬时表达系统被广泛应用于鉴定各种病原菌候选效应蛋白的功能^[17]。BAX 蛋白是 Bcl-2 蛋白家族中的一种能诱导细胞坏死的蛋白,将其构建在烟草花叶病毒载体(tobacco mosaic virus vector)中在本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)中瞬时表达时,可以作为阳性对照诱导本氏烟叶片的细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)^[18-19]。苹果炭疽菌(*Colletotrichum fructicola*)中的候选效应蛋白 CfEC92 被验证可以抑制由 BAX 诱导的 PCD^[20]。激发子 INF1 是一种毒力因子,可以诱导本氏烟叶片的过敏性坏死(hypersensitive response, HR)反应^[21]。另外,17 种葡萄霜霉菌(*Plasmopara viticola*)PvRXLR 候选效应蛋白可以完全抑制由 BAX 和 INF1 诱导的 PCD,并且 PvRXLR159 在本氏烟中的瞬时表达可以抑制本氏烟对葡萄霜霉菌的抗性^[22-23]。本研究从课题组前期在 *Foc4* 基因组中筛选出的 80 个候选效应蛋白(FoSSP1-FoSSP80)中选取 FoSSP20 为研究对象,通过生物信息学分析其结构,并通过信号肽分泌实验、亚细胞定位实验、烟草瞬时表达实验和 qRT-PCR 初步分析其功能,以鉴定 FoSSP20 的毒力功能,从而为研究 FoSSP20 在 *Foc4* 与香蕉的相互作用中的分子机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和植物 真菌菌株:尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, *Foc4*);根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 GV3101;大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5a;酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株 YTK12。以上菌株由海南大学植物保护学院真菌病毒与植物免疫实验室保存并提供,感受态购自 Takara 生物公司。

本试验接种香蕉品种为巴西蕉(*Musa AAA Cavendish* var. *Brazilian*),购自海南热作两院种业科技有限公司。本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)由海南大学植物保护学院真菌病毒与植物免疫实验室保存。

1.2 试验试剂 DNA 聚合酶: TaKaRa *Taq*TM (Takara Biotech); 2×*Taq* PCR Mix(TianGen Biotech); Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific); Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase(Vazyme Biotech); 2 × KeyPo Master Mix(Vazyme Biotech); 2 × Phanta Max Master Mix(Vazyme Biotech)。限制性内切酶: Restriction Endonucleases(New England Biolabs, NEB)。试剂盒: Cycle Pure Kit 纯化试剂盒与 Gel Extraction Kit 纯化试剂盒 (Omega Biotech); Hi-DNAsecure Plant Kit 高效植物基因组 DNA 提取试剂盒 (TianGen Biotech); Eastep R Super Total RNA Extraction Kit 总 RNA 提取试剂盒(Promega Biotech); RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒 (Thermo Fisher Scientific); SuperReal PreMix Plus 荧光定量试剂盒 (TianGen Biotech); ClonExpress II One Step Cloning Kit (Vazyme Biotech); 经典酵母转化试剂盒(Coolaber Biotech); 12.5% SDS-PAGE 变性聚丙烯酰胺彩色凝胶快速制备试剂盒 (Sangon Biotech)。PDA/PDB、LB/LBA、YPDA、CMD-W 以及 YPRAA 培养基均参考常规方法配制。

1.3 试验引物 本研究所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

1.4 菌株及植物培养 WT-*Foc4* 在 PDA 或 PDB 培养基中 28 °C 恒温黑暗培养。DH5a 和 GV3101 分别于 37 °C 和 28 °C 的条件下在 LB 培养基中恒

表 1 本研究所用引物

引物名称	序列(5'-3')
FoSSP20SP-F	CGGAATTTTAATTAAGAATTCATGAAGTTCGCCATCACCCCT
FoSSP20SP-R	CACTATAGGGAGAACCTCGAGAGCGTCGAGGGGAGTGG
pBin-FoSSP20-F	TTTACGAACGATAGGGTACCATGAAGTTCGCCATCACCCCT
pBin-FoSSP20-R	CCGTCGACCCCGGGGTACCAGCCTGGGGGAACTTGAATC
pBin-FoSSP20 ^{ASP} -F	TTTACGAACGATAGGGTACCatgTCCACCAGCAGCTGCAAGC
pBin-FoSSP20-R	CCGTCGACCCCGGGGTACCAGCCTGGGGGAACTTGAATC
pGR107-GFP-FoSSP20-F	TCAGCACCAGCTAGCATCGATATGAAGTTCGCCATCACCCCT
pGR107-GFP-FoSSP20-R	GACGTCTTTAAATTTATCGATAGCCTGGGGGAACTTGAAT
pGR107-GFP-FoSSP20 ^{ASP} -F	TCAGCACCAGCTAGCATCGATatgTCCACCAGCAGCTGCAAGC
pGR107-GFP-FoSSP20-R	GACGTCTTTAAATTTATCGATAGCCTGGGGGAACTTGAAT
qRT-FoSSP20-F	GGAACTTACTCCTGCACCCC
qRT-FoSSP20-R	AGGGACACAGTAGGGGCTAG
Actin-F	GAGGGCGAGGTATTCAT
Actin-R	TGGATGTGTGGAGTGCG

温黑暗培养。YTK12 在 YPDA 培养基中 30 °C 恒温暗培养。本氏烟在培养箱中 24 °C 昼夜(16 h/8 h)交替培养。选取 5~6 片叶的巴西蕉苗在(28±2) °C 的温室中昼夜交替培养。

1.5 生物信息学分析 FoSSP20(FOIG_10940; Genomic Sequence: NW_022158703.1)的序列信息从 NCBI 数据库下载。将 FoSSP20 的氨基酸序列通过 BlastP 在线比对 NCBI NR 和 Ensemble Fungi 数据库获得同源蛋白的序列。利用 MEGA11 软件采用最大似然法构建系统发育树^[24]。利用 Clustal W 软件进行氨基酸序列比对, GeneDoc 软件对结果进行分析^[25]。利用在线软件 SignalP 5.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?SignalP-5.0>)和 TMHMM2.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>)对 FoSSP20 的氨基酸序列进行分析^[26-27]。

1.6 酵母表达载体构建 pSUC2、pSUC2-*Avr1b* 和 pSUC2-*Mg87* 载体由笔者所在实验室保存。将 pSUC2 载体用 *EcoRI* 和 *XhoI* 限制性内切酶酶切, 用 Cycle Pure Kit 纯化试剂盒纯化回收。用 FoSSP20SP-F/FoSSP20SP-R 引物 KeyPo Master Mix 聚合酶扩增 FoSSP20 的信号肽全长, Gel Extraction Kit 纯化试剂盒纯化回收。用 ClonExpress II

One Step Cloning Kit 将纯化后的 SP 片段克隆到 pSUC2 载体中得到 pSUC2-*FoSSP20^{SP}* 酵母分泌载体。操作方法和反应体系均参考产品使用说明书。所有载体均通过 PCR 检测和上海生工测序验证其准确性。

1.7 植物表达载体构建 用 Eastep R Super total RNA Extraction Kit 总 RNA 提取试剂盒(Promega Biotech)提取 *Foc4* 的总 RNA。用 RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific)将总 RNA 反转录为 cDNA。将 pGR107-*GFP* 载体用 *Cla I* 限制性内切酶酶切, 用 Cycle Pure Kit 纯化试剂盒纯化回收。以 *Foc4* 的 cDNA 为模板, 用 pGR107-GFP-FoSSP20-F、pGR107-GFP-FoSSP20^{ASP}-F 分别与 pGR107-GFP-FoSSP20-R 引物扩增 FoSSP20 全长、FoSSP20^{ASP} 片段。用 ClonExpress II One Step Cloning Kit 将纯化后的片段分别克隆到 pGR107-*GFP* 载体中得到 pGR107-*FoSSP20-GFP*、pGR107-*FoSSP20^{ASP}-GFP* 植物表达载体。将 pBin-*eGFP* 载体用 *Kpn I* 限制性内切酶酶切, 用 Cycle Pure Kit 纯化试剂盒纯化回收。用 pBin-FoSSP20-F、pBin-FoSSP20^{ASP}-F 分别与 pBin-FoSSP20-R 引物扩增 FoSSP20 全长、FoSSP20^{ASP} 片段。用 ClonExpress II

One Step Cloning Kit 将纯化后的片段分别克隆到 pBin-*eGFP* 载体中得到 pBin-*FoSSP20-eGFP*、pBin-*FoSSP20^{ASP}-eGFP* 植物表达载体。pGR107-*GFP*、pBin-*eGFP* 载体由笔者所在实验室保存并提供。用 Phanta Max Super- Fidelity DNA 聚合酶扩增目的基因。操作方法和反应体系均参考产品使用说明书。所有载体均通过 PCR 检测和上海生工测序验证其准确性。

1.8 酵母分泌实验 用酵母分泌系统对 FoSSP-20 的信号肽功能进行验证^[28]。将 YTK12 菌株接种在 YPDA 平板上划线培养, 挑取单菌落接种到 YPDA 液体培养基中 30 °C 培养过夜。取适当菌液接种于新的 YPDA 液体培养基中培养至 $OD_{600} = 0.4 \sim 0.5$ 。将菌液 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 去除上清, 并用灭菌的 ddH₂O 重新悬浮后用 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 去上清。将菌体用 $1.5\ \text{mL}\ 1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LiAc 重新悬浮后用 $3\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min 去上清, 最后用 $1\ \text{mL}\ 1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ LiAc 悬浮得到 YTK12 感受态。将 pSUC2、pSUC2-*Avr1b*、pSUC2-*Mg87* 和 pSUC2-*FoSSP20^{SP}* 载体用经典酵母转化试剂盒进行转化得到含有相应载体的酵母菌株, 操作步骤参考使用说明书。将含有不同载体的酵母菌株分别接种在 CMD-W 和 YPRAA 培养基的平板上, 以验证 YTK12 是否含有转化酶的活性。转化酶可将 TTC(2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride)还原为 TPF(1,3,5-Triphenylformazan)形成不可溶性红色沉淀, 可以进一步验证信号肽的功能。含有 pSUC2-*Avr1b*、pSUC2-*Mg87* 和 pSUC2 的 YTK12 分别作为阳性对照、阴性对照和空白对照, 实验设 3 个生物学重复和 3 个机械重复。

1.9 农杆菌介导的烟草的瞬时表达 将构建好的植物表达载体通过电击法转入农杆菌 GV3101 的感受态中。在含有 $50\ \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 卡那霉素(kanamycin)和 $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ 利福平(rifampicin)的 LB 培养基中 28 °C 振荡培养。反复离心($5\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5 min)悬浮菌液, 待培养基洗净后用接种缓冲液重新悬浮, 并将 OD_{600} 调至 0.6, 室温静止 2 h 后用注射器将菌液接种在 4~6 周的本氏烟叶片背部。实验设 3 个生物学重复和 3 个机械重复, pGR107-*BAX* 和 pGR107-*GFP* 分别作为阳性对照和阴性对照, 注射后 5 d 用 UV 灯观察并拍照记录。注射缓冲液配方: $10\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MgCl}_2$ 、 $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{MES}$

(pH 5.6)和 $150\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{AS}$ (acetosyringone)。

1.10 共聚焦显微镜观察 利用共聚焦显微镜对 FoSSP20 的亚细胞定位进行测定, 在 5 周大的本氏烟中分别注射含有 pBin-*eGFP*、pBin-*FoSSP20-eGFP*、pBin-*FoSSP20^{ASP}-eGFP* 的农杆菌, $OD_{600} = 0.01$ 。在注射后 36 h 利用激光共聚焦显微镜(Olympus microscope TH4-200, Tokyo, Japan)观察融合蛋白的绿色荧光并拍照记录, 激发波长为 488 nm, 接受波长为 505~530 nm。

1.11 FoSSP20 的亚细胞定位 (western blot) 收集本氏烟叶片样品, 液氮速冻, 用研磨仪研磨后加入植物总蛋白裂解缓冲液(Sangon Biotech), 按说明书操作提取本氏烟叶片的总蛋白。将与蛋白 loading buffer 混合的蛋白样品煮沸 5 min 后加入用 12.5% SDS-PAGE 变性丙烯酰胺彩色凝胶快速制备试剂盒制备 12.5% SDS-PAGE 蛋白胶中, 电泳完成后用转膜仪转移到 $0.22\ \mu\text{m}$ 的 PVDF 膜中。用一抗 Rabbit anti-GFP pAb 和二抗 HRP Goat anti-rabbit IgG (Abclonal, Biotech)对蛋白进行杂交, 用 ECL 检测试剂盒(KeyGEN Biotech)进行检测。操作步骤参考使用说明书。

1.12 FoSSP20 的表达模式 用 PDB 培养基振荡培养 *Foc4* 5 d, 过滤菌丝得到孢子悬浮液, 将孢子悬浮液调到 1×10^7 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 。选取长势良好根系发达的水培香蕉, 对根系进行伤根处理后浸泡于 *Foc4* 的孢子悬浮液中 2 h, 清洗根部后重新移栽到花盆中, 在温室中进行培养。收集 *Foc4* 接种后 12、24、48 和 72 h 的香蕉苗根部和 *Foc4* 的菌丝和分生孢子, 用 Eastep R Super total RNA Extraction Kit 总 RNA 提取试剂盒(Promega Biotech)提取所有样品的总 RNA。用 RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒(Thermo Fisher Scientific)将总 RNA 反转录为 cDNA。香蕉的 Actin 基因作为内参, 使用 QuantStudio™5 Real-Time PCR 仪器(Thermo Fisher Scientific)和 Super-Real PreMix Plus 荧光定量试剂盒(TianGen Biotech)进行 qRT-PCR 检测, 利用 QuantStudio™ Design&Analysis Software v1.5.2 软件对基因表达量进行分析。操作方法参考使用说明书。

2 结果与分析

2.1 FoSSP20 蛋白结构分析 FoSSP20(FOIG_10940)基因全长 1 086 bp, 编码 1 个含 82 个氨基

酸的假定蛋白, 序列登录号: NW_022158705.1。生物信息学软件预测 FoSSP20 的 N 端含有 1 个 19 个氨基酸的信号肽(Signal peptide, SP), 无跨膜结构域。将 FoSSP20 的氨基酸序列通过 BlastP

对 NCBI 和 Ensemble Fungi 数据库进行比对。分析结果发现 FoSSP20 在其他镰刀菌属(*Fusarium*) 的真菌中比对出大量同源蛋白(图 1-a), 这些蛋白的氨基酸序列具有高度相似性(图 1-b)。

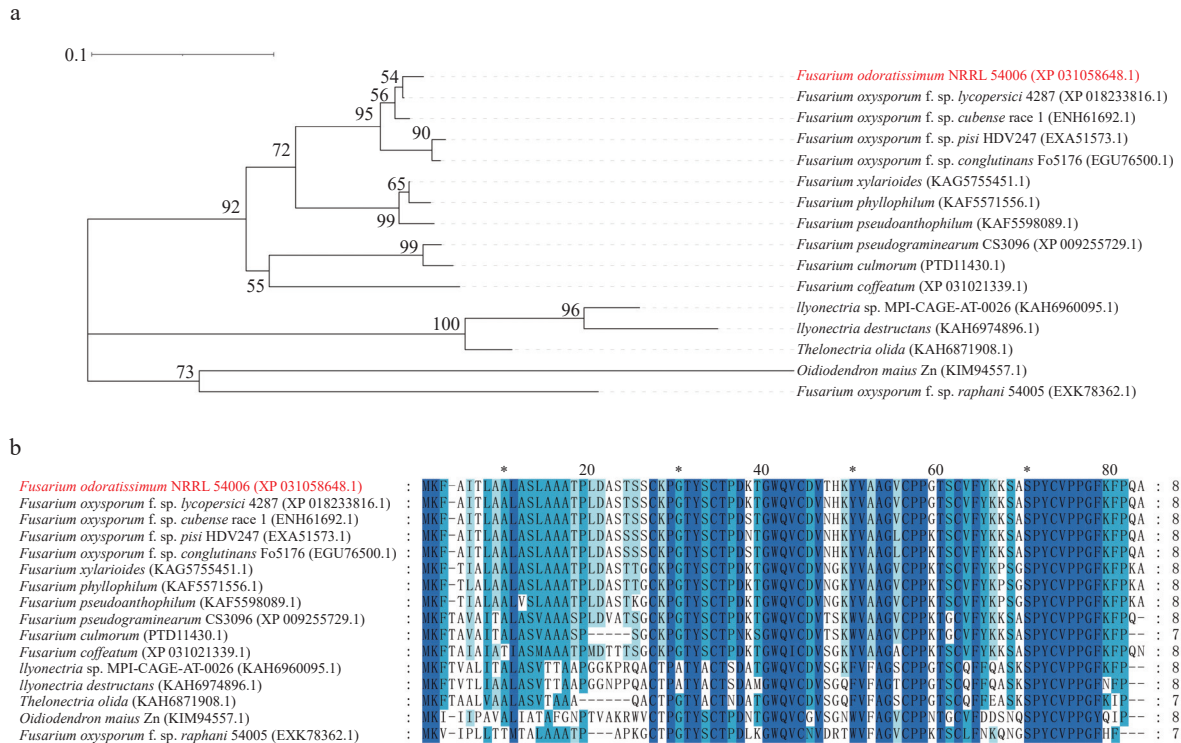


图 1 FoSSP20 及其同源物的系统发育树和氨基酸比对

a. FoSSP20 的系统发育树, 使用 MEGA11 采用 ML 法构建, 比例尺对应 0.01 遗传距离。b. FoSSP20 的氨基酸序列比对。

2.2 FoSSP20 信号肽功能验证 生物信息学分析表明, FoSSP20 可能是 N 端具有 SP 的经典分泌蛋白。为了验证其 SP 具有分泌活性, 我们利用酵母分泌系统来验证 FoSSP20 的 SP 功能。FoSSP20 的 SP 全长含有 19 个氨基酸, 我们将 SP 的全长克隆到 pSUC2 载体中, 得到信号肽分泌载体 pSUC2-FoSSP20^{SP}, 并将 pSUC2-FoSSP20^{SP} 转入酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) YTK12 中, Mg87 作为阴性对照为含有稻瘟菌 (*Magnaporthe oryzae*) Mg87 蛋白的 SP 的 pSUC2 载体的 YTK12; Avr1b 作为阳性对照为含有大豆疫霉菌 (*Phytophthora sojae*) Avr1b 蛋白的 SP 的 pSUC2 载体的 YTK12。实验结果表明, FoSSP20 的 SP 可以使 YTK12 分泌转化酶使得酵母菌株在 YPRAA 平板上生长, 并且可以将 TTC(2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride) 还原为 TPF(1,3,5-Triphenylformazan) 形成不可溶解的红色沉淀(图 2)。综上所述, FoSSP20 是一种经典分泌蛋白, 其 SP 具有分泌功能。

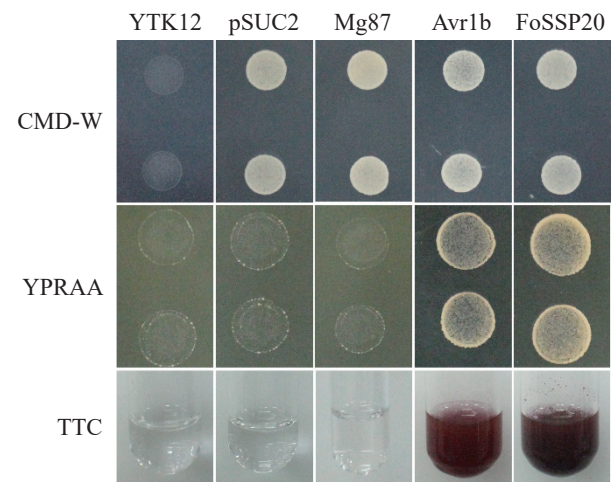


图 2 通过酵母分泌系统验证 FoSSP20 的分泌功能

YTK12: 酿酒酵母菌株; pSUC2: 空白对照(含有空载的 YTK12); Mg87: 阴性对照(含有 pSUC2-Mg87 载体的 YTK12); Avr1b: 阳性对照(含有 pSUC2-Avr1b 载体的 YTK12)。

2.3 FoSSP20 的亚细胞定位 为了验证 FoSSP20 在植物细胞内的定位, 对 FoSSP20 进行亚细胞定位实验。将 FoSSP20 和 FoSSP20^{ΔSP} 克隆到 pBin-

eGFP 植物表达载体中, 成功构建 pBin-FoSSP20-eGFP 和 pBin-FoSSP20^{ASP}-eGFP 绿色荧光表达载体并将其转入农杆菌中, 并将携带载体的农杆菌注射到烟草叶片中(GFP 作为对照)。注射 2 d 后, 用激光共聚焦显微镜观察 eGFP 融合蛋白的定位情况, 结果表明 FoSSP20:eGFP 和 FoSSP20^{ASP}:

eGFP 均定位于烟草细胞的细胞核和质膜上(图 3-a)。为了验证烟草叶片中蛋白的表达情况, 提取了叶片的总蛋白, 利用 Western blot 免疫杂交检测到 FoSSP20:eGFP、FoSSP20^{ASP}:eGFP 蛋白的表达(图 3-b)。

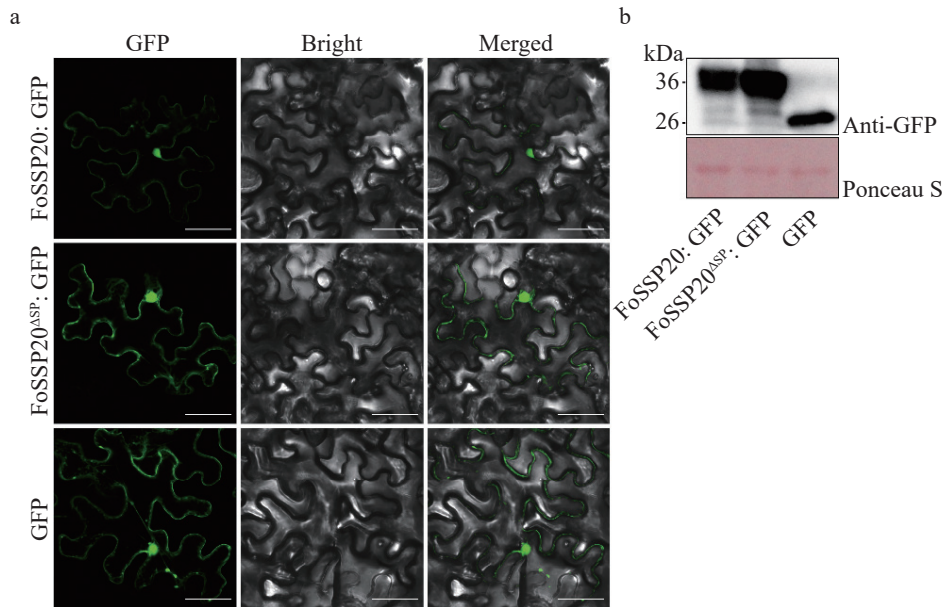


图 3 FoSSP20 和 FoSSP20^{ASP} 的亚细胞定位

a. 通过共聚焦显微镜观察本氏烟中 GFP、FoSSP20:eGFP 和 FoSSP20^{ASP}:eGFP 融合蛋白的定位情况。GFP 作为对照。不可溶性蛋白质复合物用红色箭头标注。比例尺为 50 μm 。b. western blot 检测 GFP、FoSSP20:eGFP 和 FoSSP20^{ASP}:eGFP 融合蛋白的表达。实验结果至少含有 3 次生物学重复并获得相同结果。

2.4 FoSSP20 抑制 BAX 在本氏烟草叶片上诱导的细胞坏死 利用烟草瞬时表达系统对 FoSSP20 的功能进行验证, 由于 FoSSP20 为经典分泌蛋白, 其 SP 具有分泌活性, 进一步验证 SP 的缺失是否会影响 FoSSP20 的细胞死亡抑制活性。扩增 FoSSP20 的全长和缺失 SP 的 FoSSP20 (FoSSP20^{ASP}), 将 2 个片段分别克隆到 pGR107-GFP 载体中, 并成功转入根瘤农杆菌中。利用烟草瞬时表达系统, 分别在本氏烟中瞬时表达 FoSSP20 和 FoSSP20^{ASP} 的 GFP 融合蛋白 ($OD_{600} = 0.6$), 并在 24 h 后在相同位置注射含有 pGR107-BAX 的农杆菌。注射 5 d 后, BAX、BAX 与 GFP 共注射部位开始出现细胞坏死, 而 FoSSP20、FoSSP20^{ASP} 与 BAX 共注射部位没有出现细胞坏死, 当用 UV 灯照射叶片时, 坏死部位产生黑色病斑, 而未坏死部位出现绿色荧光(图 4-a)。为了验证烟草叶片中蛋白的表达情

况, 提取了叶片的总蛋白, 利用 Western blot 免疫杂交对 GFP 融合蛋白进行检测, 杂交结果表明共注射不影响蛋白的表达(图 4-b)。实验结果表明, FoSSP20 和 FoSSP20^{ASP} 都可以完全抑制 BAX 诱导的 PCD。

2.5 FoSSP20 基因表达模式 为了确定 FoSSP20 基因在 Foc4 侵染时的表达变化, 通过 qRT-PCR 检测 FoSSP20 的表达模式。以 Foc4 的分生孢子 (conidia, CON) 作为侵染后 0 h 的样本, 以 FoSSP20 在 Foc4 的分生孢子时期的表达量作为对照。与 CON 样品相比, Foc4 的菌丝 (hyphae, HYP) 样品中 FoSSP20 基因表达无显著差异, 而 FoSSP20 基因在侵染后 12 h 表达量开始出现显著差异, 在侵染后 24 h 达到峰值 (25.8 倍)(图 5)。随后 FoSSP20 的表达量开始逐渐降低。qRT-PCR 结果表明, 候选效应蛋白 FoSSP20 可能在病原菌的侵染阶段发挥作用。

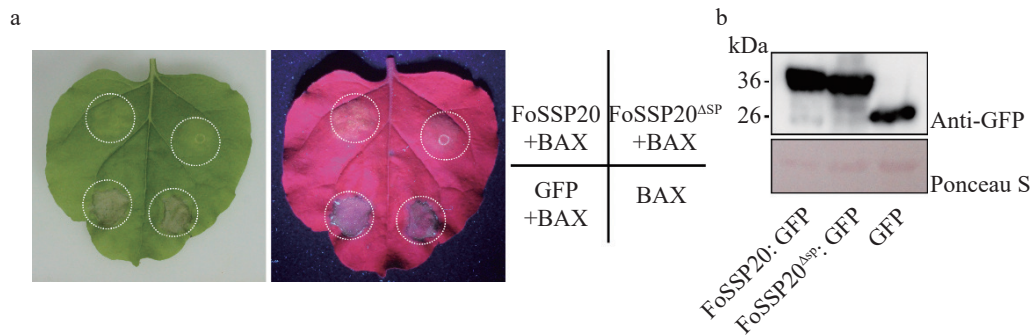


图 4 FoSSP20 和 FoSSP 在烟草中瞬时表达

a. FoSSP20 和 FoSSP20^{ASP} 均能抑制烟草中由 BAX 诱导的 PCD。含有 pGR107-FoSSP20-GFP、pGR107-FoSSP20^{ASP}-GFP 和 pGR107-GFP(阴性对照)的农杆菌注射烟草叶片, 24 h 后在相同位置注射含有 BAX 的农杆菌; 白色圆圈表示注射部位; 照片在注射后第 5 d 拍摄; 使用 UV 灯检测烟草 HR 反应。b. Western blot 检测含有 GFP 标签的 FoSSP20 和 FoSSP20^{ASP} 蛋白。实验结果至少含有 3 次生物学重复并获得相同结果。

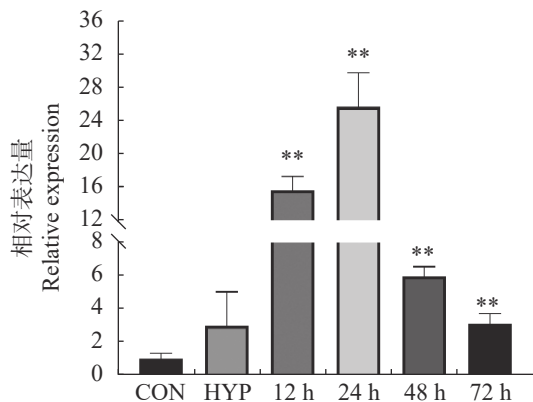


图 5 不同侵染时间的香蕉根部候选效应蛋白 FoSSP20 的基因表达量

提取被野生型 *Foc4* 侵染的香蕉根的总 RNA。12、24、48、72 h 代表接种后 12、24、48、72 h 的香蕉根。以菌株中的 *Actin* 基因作为内参基因。将 CON 中 FoSSP20 基因的表达量设为 1。

3 讨论

目前对镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*, *Fo*) 效应蛋白研究较少, 研究主要集中在一类会分泌进入寄主植物的木质部中发挥作用帮助病原菌侵染的效应蛋白中, 这一类效应蛋白称之为 SIX (secreted-in-xylem) 蛋白。在番茄枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fol*) 中共鉴定出 14 个 SIX 蛋白 (SIX1~SIX14)。在所有 SIX 蛋白中, SIX1 是番茄 (*Lycopersicon esculentum*) 中 I-3 介导的抗性所必需的, 因此也被称为 Avr3, 并且 *Foc* TR4 中 *SIX1* 同源基因的缺失会导致 *Foc* TR4 对香蕉致病力降低^[29-30]。SIX3 蛋白也作为一种无毒基因 (Avr2) 能被植物的 I-2 介导的抗性识别^[31]。*FocSgel* 基因可以调控 *Foc4* 中效应蛋白基因的表

达, 而 SIX8 被证明对 *Foc* TR4 的毒力有贡献^[32]。除了已被研究的 SIX 蛋白外, *Foc4* 中还有很多其他类型的效应蛋白仍功能未知未被报道。*FocM35_1* 是一种金属蛋白酶类效应蛋白有助于 *Foc* TR4 毒性在病原菌侵染早期表达量上调^[16]。FoSSP1 是本课题组前期研究的一个候选效应蛋白, 能激发植物免疫并负调控 *Foc4* 的侵染^[33]。分泌蛋白根据其分泌途径的不同可以分为经典分泌蛋白和非经典分泌蛋白。其中, 经典分泌蛋白依靠 N 端的信号肽引导蛋白合成分泌^[34], 而非经典分泌蛋白通过胞吞胞吐或其他方式分泌到细胞外, 是病原菌对分泌途径进行有益的补充和替代^[35]。在本研究中, 鉴定了一种非 SIX 蛋白的新蛋白 FoSSP20, 该蛋白的信号肽具有分泌功能, 但信号肽的有无不影响该蛋白抑制 BAX 诱导本氏烟的 PCD。通过亚细胞定位实验, 发现 FoSSP20 定位于植物细胞的细胞核和细胞膜中, 并且该蛋白在 *Foc4* 侵染过程中表达量显著上调。这些结果都表明 FoSSP20 可能作为 *Foc4* 的一个新的毒力因子在侵染过程中发挥作用。

通过对数据库中的序列进行比对, 筛选 FoSSP20 的同源蛋白并构建系统发育树。分析结果表明 FoSSP20 在整个镰刀菌属中保守, 并且不同物种之间 FoSSP20 的同源物的序列存在差异。因此, 猜测 FoSSP20 蛋白及其同源物可能与 *Fo* 的进化相关。在后续的研究中, 将会克隆不同种的 FoSSP20 蛋白的同源蛋白, 构建烟草瞬时表达载体, 将 FoSSP20 的同源蛋白在烟草中进行瞬时表达, 验证其功能与 FoSSP20 的异同。在亚细胞定

位实验中,发现 SP 的缺失对 FoSSP20 的定位没有影响,可能是由于真菌的 SP 不能在植物中发挥作用,后续会进一步构建含植物信号肽的 FoSSP-20 表达载体对该蛋白的定位。此外,全长的 FoSSP20 荧光强度明显弱于 FoSSP20^{ASP},也可能是由于 FoSSP20 的 SP 发挥了功能,导致 FoSSP20 被分泌至植物细胞外使得荧光强度降低。在未来的研究中,将会对 *FoSSP20* 基因进行敲除回补实验,验证 FoSSP20 蛋白是否是 *Foc4* 毒力所必需的,并且验证其对 *Foc4* 生长发育的影响。FoSSP-20 可以抑制本氏烟中由 BAX 诱导的 PCD,说明该蛋白可能会通过调控植物免疫来帮助 *Foc4* 侵染香蕉;验证 FoSSP20 是否能抑制本氏烟中活性氧和胍胍质的积累,及其对植物信号通路相关基因的影响,从而明确该蛋白在 *Foc4* 调控寄主免疫反应中的作用。

参考文献:

- [1] ORDONEZ N, SEIDL M F, WAALWIJK C, et al. Worse comes to worst: bananas and Panama disease: when plant and pathogen clones meet[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(11): e1005197.
- [2] 王田, 陈代朋, 高雅, 等. 香蕉枯萎病菌效应蛋白研究进展[J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(8): 1614 – 1621.
- [3] PLOETZ R C. Fusarium wilt of banana[J]. *Phytopathology*, 2015, 105(12): 1512 – 1521.
- [4] PLOETZ R C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. *Phytopathology*, 2006, 96(6): 653 – 656.
- [5] KEMA G H J, DRENTH A, DITA M, et al. Editorial: Fusarium wilt of banana, a recurring threat to global banana production[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 11: 628888.
- [6] PLOETZ R C. Management of Fusarium wilt of banana: a review with special reference to tropical race 4[J]. *Crop Protection*, 2015, 73: 7 – 15.
- [7] SPOELS H, DONG X. How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2012, 12(2): 89 – 100.
- [8] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system[J]. *Nature*, 2006, 444(7117): 323 – 329.
- [9] DUBERY I A, SANABRIA N M, HUANG J C. Nonspecific perception in plant innate immunity [M]. New York: Springer, 2012: 79 – 107.
- [10] JONES J D G, VANCE R E, DANGL J L. Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals[J]. *Science*, 2016, 354(6316): aaf6395.
- [11] NEWMAN M A, SUNDELIN T, NIELSEN J T, et al. MAMP (microbe-associated molecular pattern) triggered immunity in plants[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2013, 4: 139.
- [12] WANG Y, PRUITT R N, NÜRNBERGER T, et al. Evasion of plant immunity by microbial pathogens[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20(8): 449 – 464.
- [13] GHAG S B, SHEKHAWAT U K S, GANAPATHI T R. Native cell-death genes as candidates for developing wilt resistance in transgenic banana plants[J]. *AoB PLANTS*, 2014, 6: plu037.
- [14] PAUL J Y, BECKER D K, DICKMAN M B, et al. Apoptosis-related genes confer resistance to Fusarium wilt in transgenic ‘Lady Finger’ bananas[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2011, 9(9): 1141 – 1148.
- [15] GUO L, HAN L, YANG L, et al. Genome and transcriptome analysis of the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* causing banana vascular wilt disease[J]. *PLoS One*, 2014, 9(4): e95543.
- [16] ZHANG X, HUANG H, WU B, et al. The M35 metalloprotease effector FocM35_1 is required for full virulence of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* tropical race 4[J]. *Pathogens*, 2021, 10(6): 670.
- [17] WANG Q, HAN C, FERREIRA A O, et al. Transcriptional programming and functional interactions within the *Phytophthora sojae* RXLR effector repertoire[J]. *The Plant Cell*, 2011, 23(6): 2064 – 2086.
- [18] LACOMME C, SANTA CRUZ S. Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(14): 7956 – 7961.
- [19] JAMIR Y, GUO M, OH H S, et al. Identification of *Pseudomonas syringae* type III effectors that can suppress programmed cell death in plants and yeast[J]. *The Plant Journal*, 2004, 37(4): 554 – 565.
- [20] SHANG S, WANG B, ZHANG S, et al. A novel effector CfEC92 of *Colletotrichum fructicola* contributes to glomerella leaf spot virulence by suppressing plant defences at the early infection phase[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(7): 936 – 950.
- [21] KAMOUN S, VAN W P, VLEESHOUWERS V G, et al. Resistance of *Nicotiana benthamiana* to *Phytophthora infestans* is mediated by the recognition of the elicitor protein INF1[J]. *The Plant Cell*, 1998, 10(9): 1413 – 1426.
- [22] XIANG J, LI X, WU J, et al. Studying the mechanism of *Plasmopara viticola* RxLR effectors on suppressing plant immunity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 709.
- [23] LEI X, LAN X, YE W, et al. *Plasmopara viticola* effector PvRXLR159 suppresses immune responses in *Nicotiana benthamiana*[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2019, 14(12): 1682220.

- [24] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022 – 3027.
- [25] LARKIN M A, BLACKSHIELDS G, BROWN N P, et al. Clustal W and clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947 – 2948.
- [26] ALMAGRO ARMENTEROS J J, TSIRIGOS K D, SØNDERBY C K, et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(4): 420 – 423.
- [27] KROGH A, LARSSON B, VON HEIJNE G, et al. Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 305(3): 567 – 580.
- [28] YIN W, WANG Y, CHEN T, et al. Functional evaluation of the signal peptides of secreted proteins[J]. *BIO-PROTOCOL*, 2018, 8(9): e2839.
- [29] REP M, VAN DER DOES H C, MEIJER M, et al. A small, cysteine-rich protein secreted by *Fusarium oxysporum* during colonization of xylem vessels is required for I-3-mediated resistance in tomato[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(5): 1373 – 1383.
- [30] WIDINUGRAHANI S, NIÑO-SÁNCHEZ J, VAN DER DOES H C, et al. A SIX1 homolog in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4 contributes to virulence towards Cavendish banana[J]. *PLoS One*, 2018, 13(10): e0205896.
- [31] HOUTERMAN P M, MA L, VAN OOIJEN G, et al. The effector protein Avr2 of the xylem-colonizing fungus *Fusarium oxysporum* activates the tomato resistance protein I-2 intracellularly[J]. *The Plant Journal*, 2009, 58(6): 970 – 978.
- [32] GURDASWANI V, GHAG S B, GANAPATHI T R. FocSge1 in *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* race 1 is essential for full virulence[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 255.
- [33] WANG Y, ZHANG X, WANG T, et al. The small secreted protein FoSsp1 elicits plant defenses and negatively regulates pathogenesis in *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* (Foc4)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2022, 13: 873451.
- [34] LEE M C S, MILLER E A, GOLDBERG J, et al. Bi-directional protein transport between the er and Golgi[J]. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004, 20: 87 – 123.
- [35] KANG Q, ZHANG D. Principle and potential applications of the non-classical protein secretory pathway in bacteria[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(3): 953 – 965.

Identification and functional analysis of candidate effector FoSSP20 in *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*

WANG Tian, FU Liying, ZHAO Yang, LIU Shuang, ZHANG Yufang, CHEN Daipeng, ZHENG Li
(School of Plant Protection/ Ministry of Education Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: *Fusarium* wilt of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* (Foc) is destructive to banana (*Musa* spp.) industry. Effector proteins play a key role in the interaction between Foc and banana. Previously researches screened the candidate effector FoSSP20 in Foc race 4 (Foc4) which could suppress BAX-triggered programmed cell death (PCD). In this study, yeast secretion system was used to verify the secretory function of signal peptide of FoSSP20. Subcellular localization assay showed that the FoSSP20 was localized in the nucleus and plasma membranes in *Nicotiana. benthamiana* cells. qRT-PCR assay showed that the expression levels of FoSSP20 was significantly up-regulated at the early infection phase. All the results showed that effector FoSSP20 is a classic secretory protein which may function well in the infection process of pathogens.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*; effector; subcellular localization; cell death