

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240019



主持人: 缪卫国

香蕉枯萎病菌候选效应蛋白FoSSP80 能抑制植物免疫反应

赵 阳^{1,2#}, 刘 爽^{1,2}, 王志彪^{1,2}, 伍俊宇^{1,2}, 陈代朋^{2*}, 郑 丽^{1*}

(1. 海南大学 南繁学院/三亚南繁研究院, 海南 三亚 572025 中国; 2. 海南大学 热带农林学院, 海南 儋州 571737 中国)

摘 要: 香蕉枯萎病是香蕉的主要病害之一。香蕉枯萎病菌 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Foc*) 产生的效应蛋白在其侵染香蕉的过程中发挥了重要作用。实验室前期在 *Foc* 中筛选到候选效应蛋白 FoSSP80, 生物信息学分析发现 FoSSP80 含有信号肽、无跨膜结构域; 利用酵母分泌系统证实了 FoSSP80 具有分泌功能; 在烟草中瞬时表达能够抑制由 BAX 引起的细胞程序性死亡 (PCD), 且 FoSSP80 可以抑制活性氧 (ROS) 的积累和胼胝质的沉积; 与野生型和回补菌株相比敲除突变体 Δ FoSSP80 在菌落形态、生长速率和分生孢子产生和致病性方面都没有显著差异。研究结果表明 FoSSP80 是一个经典分泌蛋白, 且可以抑制植物的免疫反应。

关键词: 香蕉; 枯萎病; 效应蛋白; 植物免疫

中图分类号: S 432.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054 (2025) 01-0087-11

赵阳, 刘爽, 王志彪, 等. 香蕉枯萎病菌候选效应蛋白 FoSSP80 能抑制植物免疫反应 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(1): 87-97. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20240019

香蕉 (dwarf banana, *Musa nana* Lour.) 是世界上第二大食用水果, 同时也是第四大粮食作物, 在经济贸易中占有重要地位^[1]。香蕉枯萎病 (*Fusarium Wilt of banana*) 是一种土传维管束病害, 可造成香蕉减产甚至绝收, 严重威胁香蕉产业。香蕉枯萎病是由尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Foc*) 引起的。根据尖孢镰刀菌古巴专化型对不同香蕉品种的致病力差异将 *Foc* 分为 3 个生理小种 (*Foc1*、*Foc2*、*Foc4*), 其中 *Foc1* 和 *Foc4* 分布最广, 对香蕉的危害最严重。19 世纪末 *Foc1* 的大流行, 造成了香蕉品种的更替, 由感病的香蕉品种 ‘Gros Michel’ 更换为抗 *Foc1* 的香蕉品种 ‘Cavendish’^[2]。随后流行的 *Foc4* 毒性更强, 并在世界范围内广泛传播, *Foc4* 可以侵染包括 ‘Cavendish’ 香蕉在内的所有香蕉主栽品种, 对香蕉种植产业

造成严重打击^[3]。

植物生长发育过程中会受到来自外部生物或非生物的胁迫^[4]。植物在长期的演化过程中形成了一套复杂的免疫系统以抵御病原微生物的入侵, 当病原微生物入侵并感染植物时, 植物中的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs) 能够识别出病原微生物的特定病原或微生物相关分子模式 (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs), 触发第一层免疫反应, 即模式触发免疫 (pattern-triggered immunity, PTI)。病原菌分泌的效应蛋白可抑制植物的 PTI, 这些效应蛋白被植物细胞内的核苷酸结合的富含亮氨酸重复受体 (nucleotide-binding leucine-rich repeat receptors, NLRs) 识别后所触发的免疫反应称为效应子触发免疫 (effector-triggered immunity,

收稿日期: 2024-02-01

修回日期: 2024-03-08

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (32360642); 海南省重点研发项目 (ZDYF2022XDNY242); 海南大学协同创新中心项目 (XTCX2022NYB10)。

第一作者: 赵阳 (1997—), 男, 海南大学热带农林学院 2021 级硕士研究生。E-mail: zy155956@163.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

ETI)^[5-6]。

效应蛋白在尖孢镰刀菌与寄主互作的过程中发挥重要作用。番茄枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Fol*)在侵染番茄植株的过程中会将效应蛋白分泌到宿主木质部中,这些效应因子被称为SIX (secreted in xylem)蛋白。目前已经有14个SIX蛋白被鉴定出来^[7-8]。其中SIX1^[9]、SIX3^[10]、SIX5^[11]和SIX6^[12]被证实是*Fol*完全毒力所必需的。*Foc* TR4的SGE1(SIX Gene Expression 1)基因缺失突变体的毒力完全丧失^[13]。SIX8也被证实是*Foc*完全毒力所必需的^[14]。除了SIX蛋白以外还有效应蛋白Fosp9有助于*Foc*的完全毒力^[15]。但是目前基于*Foc*中效应蛋白的研究还比较少。本实验室在前期研究发现小分泌蛋白FoSSP1是1个激发子,能够负向调控*Foc4*的致病性^[16]。效应蛋白FoSSP17能够抑制植物免疫,是*Foc4*必需的毒力因子^[17]。

本研究基于本实验室前期筛选到的候选效应蛋白FoSSP80的功能进行了初步分析。通过酵母分泌系统、烟草瞬时表达、活性氧积累和胼胝质沉积等实验来证实FoSSP80为经典效应蛋白,且FoSSP80能够抑制植物免疫反应,为进一步探究*Foc*的致病机制奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和植物 本研究使用的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DH5 α ;酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)菌株YTK12。以上菌株均由本实验室保存。

本研究所用香蕉品种为巴西蕉(*Musa* AAA Cavendish var. *Brazilian*)购自海南东科农业科技有限公司。本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)由本实验室保存。

1.2 试验引物 本研究使用的引物序列均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列见表1。

1.3 生物信息学分析 从NCBI数据库下载FoSSP80的氨基酸序列。利用SignalP5.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)和TMHMM2.0 (<https://services.healthtech.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)对FoSSP80进行信号肽和跨膜结构域预测。使用BlastP在NCBI NR数据库中搜索FoSSP80的同源蛋白。使用MEGA11进行氨基酸序列比对,并采用最大似然法构建系统发育树^[18],序列比对结果使用GeneDoc软件分析。

1.4 酵母表达载体的构建 将pSUC2载体酶切后纯化回收。使用FoSSP80SP-F/FoSSP80SP-R引物扩增出FoSSP80信号肽全长,纯化回收。通过无缝克隆的方法,将纯化后的信号肽片段与纯化后的线性化载体pSUC2进行重组,以构建pSUC2-FoSSP80^{SP}酵母分泌载体。

1.5 植物表达载体的构建 将pGR107-GFP载体使用Cla I酶切后纯化回收。以*Foc4*的cDNA为模板,分别使用pGR107-GFP-FoSSP80-F和pGR107-GFP-FoSSP80^{ΔSP}-F引物与pGR107-GFP-FoSSP80-R引物进行扩增以获得FoSSP80全长和FoSSP80^{ΔSP}信号肽缺失片段。通过无缝克隆方法将纯化后的片段分别克隆到pGR107-GFP载体中,并最终得到pGR107-FoSSP80-GFP和pGR107-FoSSP80^{ΔSP}-GFP植物表达载体。使用Sal I对pBin-eGFP载体进行酶切后纯化回收FoSSP80全长和FoSSP80^{ΔSP}信号肽缺失片段。用pBin-FoSSP80-F和pBin-FoSSP80^{ΔSP}-F与pBin-FoSSP80-R引物扩增FoSSP80全长和FoSSP80^{ΔSP}信号肽缺失片段。将纯化后得到的片段分别构建到pBin-eGFP载体中用以获得pBin-FoSSP80-eGFP和pBin-FoSSP80^{ΔSP}-eGFP植物表达载体^[19]。

1.6 信号肽分泌活性的验证 将pSUC2-FoSSP80^{SP}酵母分泌载体转至YTK12酵母菌株中^[20]。使用CMD-W培养基从所有转化子中筛选阳性菌株。将FoSSP80^{SP}、Avr1b以及pSUC2酵母菌株用CMD-W液体培养基于30℃培养箱中摇培36 h。取1.5 mL菌液经13 000 g离心1 min,将上清液吸除,加入1.5 mL无菌水后经13 000 g离心1 min,反复清洗3次,用750 μ L无菌水重悬,在YPRAA培养基上培养以验证FoSSP80信号肽的分泌功能。

1.7 农杆菌介导的烟草瞬时表达实验 将载体质粒通过化学转化法转入农杆菌GV3101。将农杆菌于终质量浓度为50 μ g $\cdot$ mL⁻¹卡那霉素和25 μ g $\cdot$ mL⁻¹利福平的LB培养基中28℃振荡培养12 h。经

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

引物名 Primers	序列(5'-3') Sequences (5'-3')
FoSSP80-1F	TCGCAAAGCAACAAATCCCG
FoSSP80-2R	TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCGCGGAGGAGGCTGTGATG
FoSSP80-3F	CAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGCTCAAGACCCCCATCCAAGC
FoSSP80-4R	GAAGATGGCCAGGATAGGAGC
FoSSP80-UF	TTAGTTGGGCATTAACAGGAGCT
FoSSP80-DR	CGACGTGGTTTTTGATCGCC
FoSSP80-NF	CGCTTCTTCTCAGTCGTCTGT
FoSSP80-NR	CGTGTCCGACAAAATCAATGCTC
FoSSP80-HB-F	GAATTGGGTACTCAAATTGGTCGTGTCCACGCGTCAAG
FoSSP80-HB-R	CAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCTTGGGGCAGACGGGCTTC
HYG-F	GGCTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTCAA
HYG-R	AACCCGCGGTTCGGCATCTACTCTATTC
YG-F	GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCT
HY-R	GTATTGACCGATTCCTTGCGGTCCGAA
FoSSP80SP-F	CGGAATTTTAATTAAGAATTCCAAACGAATCTCAAGCAATCAAGC
FoSSP80SP-R	CACTATAGGGAGAACCTCGAGAGCAGAGACATAGCCAGCAACG
pBin-FoSSP80-F	TACCCCCGGGGTCGACATGCATTCTACAATCTTTGCTCTTGTTG
pBin-FoSSP80-R	TCACCATGGATCCGTCGACCTTGGGGCAGACGGGC
pBin-FoSSP80 ^{ASP} -F	GGTACCCCCGGGGTCGACATGGGACCTACCGCCCGCTC
pBin-FoSSP80-R	TCACCATGGATCCGTCGACCTTGGGGCAGACGGGC
pGR107-GFP-FoSSP80-F	CACCAGCTAGCATCGATATGCATTCTACAATCTTTGCTCTTGTTGC
pGR107-GFP-FoSSP80-R	ACGTCTTTAAATTTATCGATCTTGGGGCAGACGGGC
pGR107-GFP-FoSSP80 ^{ASP} -F	CAGCACCAGCTAGCATCGATATGGGACCTACCGCCCGCTCTC
pGR107-GFP-FoSSP80-R	ACGTCTTTAAATTTATCGATCTTGGGGCAGACGGGC

2 500 g 离心 5 min 后收集菌体,吸除上清液,用缓冲液重悬浮沉淀,重悬液经 2 500 g 离心 5 min 后,将沉淀反复清洗。菌液浓度调整至 OD₆₀₀ 为 0.6,室温静置 2 h 后接种本氏烟^[21]。

1.8 蛋白质免疫印迹(Western Blot)实验 取 30 mg 本氏烟叶片样品加液氮研磨,研磨后加入 100 μL 植物总蛋白混合裂解液,冰上静置 4 h,每小时漩涡振荡 30 s,经 4 ℃、13 000 g 离心 20 min,取上清液分装冻存。取制备好的蛋白样品按比例与上样缓冲液(loading buffer)混合,98 ℃处理 10 min 后加入到 12.5% SDS-PAGE 蛋白胶中进行电泳,电泳结束后,将蛋白条带用转膜仪转移到 PVDF 膜上。

封闭 2 h,孵育一抗 4 ℃过夜,室温孵育二抗 2 h,ECL 检测试剂盒(KeyGEN Biotech)、化学发光成像分析仪检测显影。

1.9 胍胍质、活性氧染色实验 将含有 pBin-eGFP、pBin-FoSSP80-eGFP 的农杆菌在 28 ℃培养箱中振荡培养,用注射缓冲液配制菌悬液并调节浓度到 OD₆₀₀=0.4,从烟草背面注射菌液,48 h 后在相同部位注射 20 μmol·L⁻¹ 的 Flg22,12 h 后取注射部位的叶片。活性氧染色:取注射部位的叶片,加到 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-Diaminobenzidine,DAB)染液中避光染色 12 h。然后用脱色液(V_{乙醇}:V_{乙酸}=3:1)将叶绿素脱去,将样品放置载玻片上置

于显微镜下拍照记录。胼胝质染色:取注射部位叶片,用脱色液将叶片脱色至透明,用0.1%的苯胺蓝染色液浸泡染色4 h,将样品放置载玻片上置于荧光显微镜下观察^[22]。

1.10 *FoSSP80*的敲除及回补实验 使用 *Foc4* 的DNA作为模板,使用1F/2R和3F/4R引物扩增 *FoSSP80* 基因的上下游片段,以HYG-F/R引物、pEX2载体为模板,扩增潮霉素抗性基因。通过重叠PCR构建用于转化的融合片段^[23]。使用聚乙二醇(PEG)介导原生质体转化的方法^[24],将融合片段转至野生型 *Foc4* 的原生质体中,获得突变体菌株($\Delta FoSSP80$)。使用 *FoSSP80*-HB-F/R引物从 *Foc* 基因组DNA中扩增 *FoSSP80* 的编码区和启动子序列,并将其克隆到pFL2载体中,以获得回补载体pFL2-HB^[25]。再将pFL2-HB转至 *FoSSP80* 敲除突变体菌株的原生质体中,获得回补菌株($\Delta FoSSP80$ -C)。

1.11 菌株的生长速率和产孢量的测定 接种 *Foc4* 野生型(wild type, WT)、缺失突变体 $\Delta FoSSP80$ 和回补菌株 $\Delta FoSSP80$ -C到PDA培养基上进行活化,3 d后在菌落边缘打取新鲜的菌饼并重新接种到新的PDA培养基上,在28 °C恒温黑暗条件下培养。每天采用十字交叉法记录菌落直径,计算菌株的生长速率,待菌丝长满平板后拍照记录菌落形态。将待测菌株在PDA培养基上进行活化,3 d后在菌落边缘打取新鲜的菌饼并接种到

50 mL PDB 培养基中,在28 °C恒温黑暗160 r·min⁻¹振荡培养,每天吸取菌液用血球计数板计算产孢量。

1.12 致病力的测定 收集WT、 $\Delta FoSSP80$ 和 $\Delta FoSSP80$ -C菌株孢子并制成孢子悬浮液,调整孢子浓度至10⁷ 个·mL⁻¹^[16]。选取生长状况良好的四叶期香蕉苗,清洗根部后浸泡在孢子液中2 h,之后将香蕉苗转移至花盆中继续培养,30 d后拍照记录并统计病情指数。病情指数=Σ(发病级×相关植株的数量)/(植株总数量×最大发病级)^[26]。

2 结果与分析

2.1 *FoSSP80*生物信息学分析 利用信号肽预测工具SignalP5.0和蛋白质的跨膜结构域预测工具TMHMM2.0对 *FoSSP80* 进行信号肽和跨膜结构域预测,结果显示 *FoSSP80* 具有N端信号肽,且不具有跨膜结构域。为了探究在其他真菌中是否存在 *FoSSP80* 的同源蛋白,在NCBI的NR数据库中进行BlastP搜索,结果显示在镰刀菌属中鉴定到 *FoSSP80* 的同源蛋白,而在其他真菌中没有发现 *FoSSP80* 的同源蛋白。 *FoSSP80* 蛋白及其同源物的氨基酸序列比对结果揭示了 *FoSSP80* 在镰刀菌属中高度保守(图1-A)。系统发育分析结果显示与 *FoSSP80* 亲缘关系最近的是来自 *Fol* 的同源物(FOXG_05878,XP 018241393.1)(图1-B)。

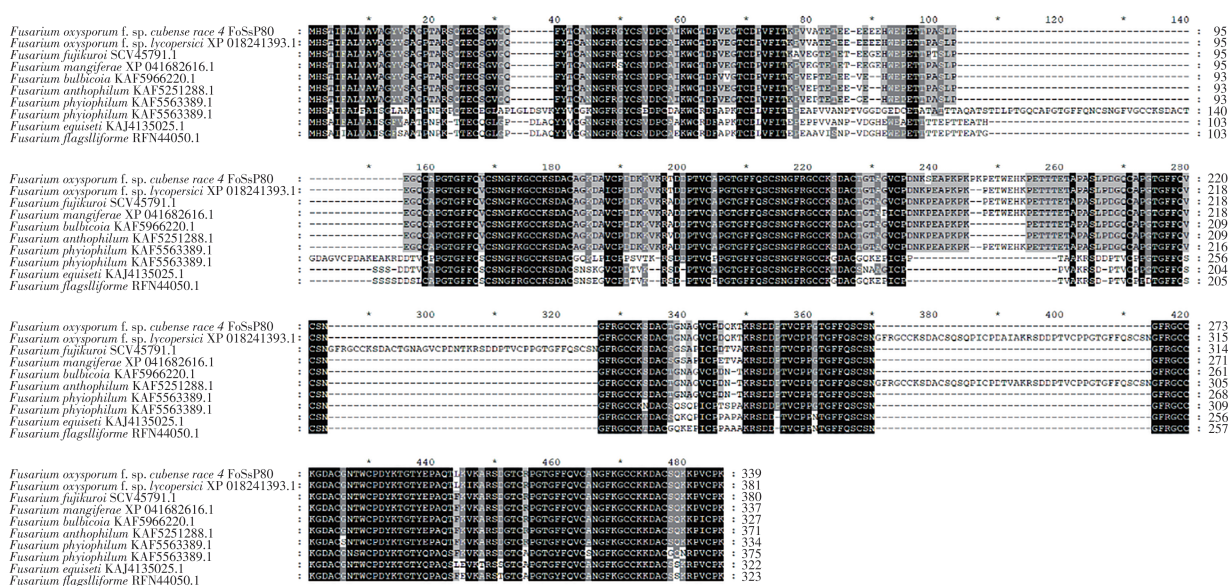


图1-A *FoSSP80* 蛋白及其同源物的氨基酸序列比对

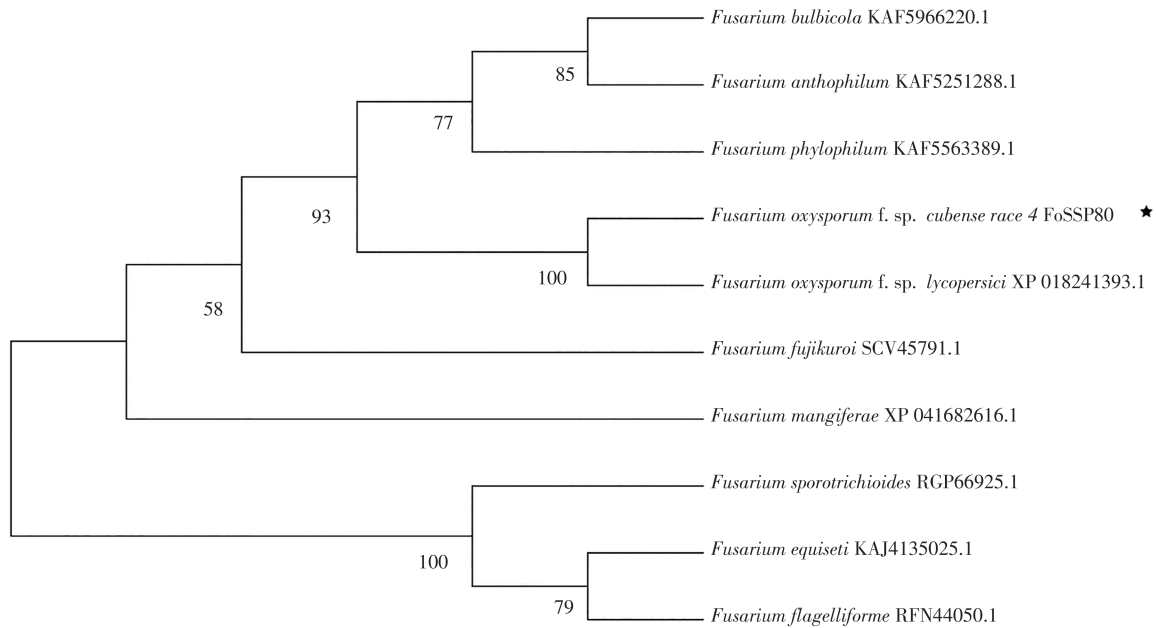


图1-B FoSSP80 蛋白及其同源物的系统发育树

A: 使用 BlastP 搜索 FoSSP80 同源蛋白; 使用 GeneDoc 软件对序列比对结果分析。B: 使用 MEGA11 最大似然法构建系统发育树。

A: *FoSSP80* homologous protein was searched using BlastP. The results of sequence comparison were analyzed using GeneDoc software. B: Phylogenetic tree was constructed using MEGA11 maximum likelihood.

图1 FoSSP80 蛋白及其同源物的氨基酸序列比对及系统发育树

Fig. 1 Amino acid sequence comparison and phylogenetic tree of *FoSSP80* protein and its homologs

2.2 FoSSP80 信号肽功能的验证 生物信息学分析结果预测 FoSSP80 的 N 端具有 1 个 17 个氨基酸的信号肽, 使用酵母分泌系统验证其信号肽的分泌功能。将构建好的酵母表达载体 pSUC2-FoSSP80^{SP} 转入到酵母菌株 YTK12 中, Avr1b 为阳

性对照, 结果显示 FoSSP80^{SP} 与 Avr1b 均可在 YPRAA 培养基上生长, 而 YTK12 和 pSUC2 菌株则无法生长(图2)。以上结果表明, FoSSP80 信号肽具有分泌功能, FoSSP80 是一个经典分泌蛋白。

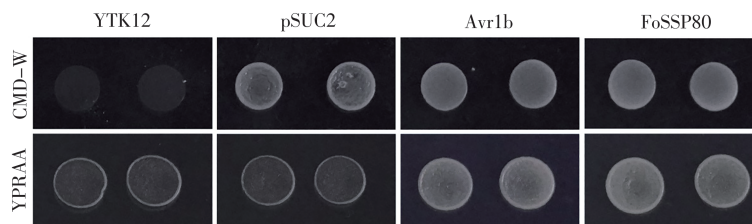


图2 酵母分泌系统对 FoSSP80 信号肽分泌功能的验证

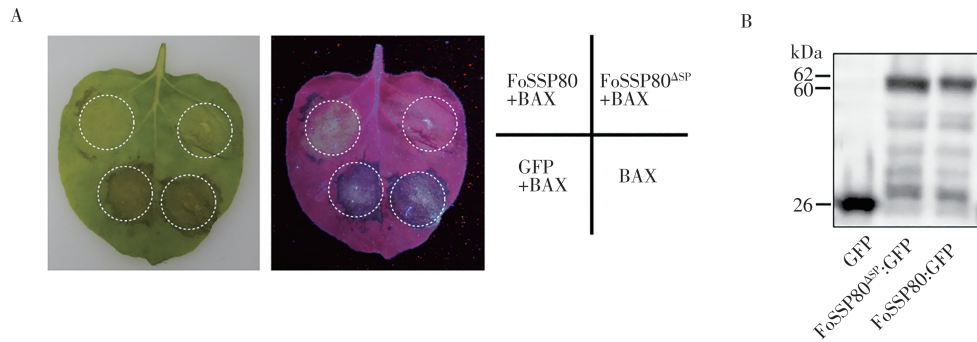
通过酵母转化将 FoSSP80^{SP}、Avr1b 以及空载体 pSUC2 转入酵母菌株 YTK12。Avr1b 为阳性对照, pSUC2 为阴性对照。

Fig. 2 Verification of the secretion function of *FoSSP80* signal peptide by yeast secretion system

FoSSP80SP, *Avr1b*, and the empty vector *pSUC2* were transferred into yeast strain YTK12 by yeast transformation. The *avr1b* was the positive control, and the *pSUC2* was the negative control.

2.3 FoSSP80 抑制由 BAX 诱导的本氏烟叶片细胞坏死 为了探究 FoSSP80 对植物的免疫反应的影响, 将构建好的 pGR107-FoSSP80-GFP 和 pGR107-FoSSP80^{ΔSP}-GFP 植物表达载体转入农杆菌中, 并注射入本氏烟叶片 (OD₆₀₀ = 0.6), 在本氏烟中瞬时表达 FoSSP80: GFP 和 FoSSP80^{ΔSP}: GFP 蛋

白。24 h 后在相同注射位置注射 pGR107-BAX 农杆菌菌液。5 d 后 BAX 单独注射区域、BAX 和 GFP 共注射的区域均发生细胞坏死, 而 FoSSP80: GFP 和 FoSSP80^{ΔSP}: GFP 与 BAX 共注射部位没有出现细胞坏死(图3-A)。进一步对蛋白的表达进行了 Western blot 验证(图3-B)。综上所述, FoSSP80 可



A: FoSSP80 抑制 PCD。将含有 pGR107-FoSSP80-GFP、pGR107-FoSSP80^{ASP}-GFP 以及 pGR107-GFP 的农杆菌到本氏烟叶片中, 24 h 后在同一位置注射 BAX; GFP 为阴性对照; 使用紫外灯进行检测(健康部位呈红色, 坏死部位为黑色), 白色虚线圈为注射部位; 共注射 5 d 后拍摄照片。B: 使用 Western Blot 检测蛋白表达情况。

A: FoSSP80 inhibits PCD. *Agrobacterium* containing pGR107-FoSSP80-GFP, pGR107-FoSSP80^{ASP}-GFP, and pGR107-GFP were injected into Ben's tobacco leaf slices, and BAX was injected at the same location Twenty four hours later. GFP was used as a negative control. Detection was performed using a UV lamp (healthy sites were red; necrotic sites were black), and the white dotted circle was the injection site. Photographs were taken after 5 d of injection. B: Protein expression was detected using Western Blot.

图3 FoSSP80和FoSSP80^{ASP}在烟草中的瞬时表达

Fig. 3 Transient expression of FoSSP80 and FoSSP80^{ASP} in *Nicotiana benthamiana*

以抑制 BAX 诱导的本氏烟草叶片细胞坏死, 且 FoSSP80 信号肽的缺失并不影响其抑制活性。

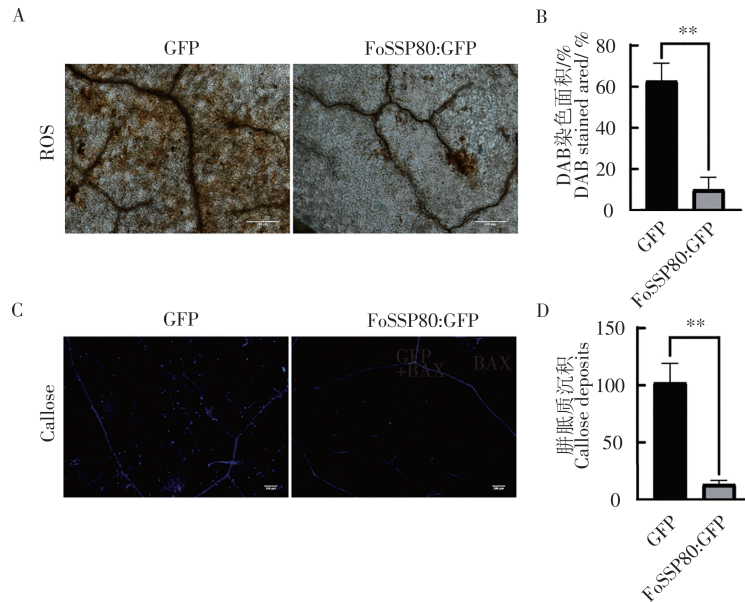
2.4 FoSSP80 抑制活性氧的积累和胼胝质的沉积 由于 FoSSP80 抑制 BAX 诱导的 PCD, 笔者决定进一步研究其抑制宿主免疫的功能。用含有重组载体 pBin-FoSSP80-eGFP 的农杆菌菌液注射烟草, 48 h 后将 Flg22 注射入相同部位, 12 h 后通过 DAB 染色和苯胺蓝染色观察活性氧和胼胝质的积累情况, GFP 蛋白做阴性对照。实验结果显示, 与 GFP 相比, 融合蛋白的注射区域产生的活性氧和胼胝质的量有显著降低(图4)。以上结果表明, FoSSP80 可抑制植物活性氧的积累和胼胝质的沉积。

2.5 敲除突变体菌株与回补菌株的获得 将含潮霉素的 FoSSP80 敲除片段通过 PEG 介导法转入野生型菌株的原生质体中, 经过筛选培养基筛选获得转化子。提取敲除转化子 DNA, 分别使用 HYG-F/R, FoSSP80-1F/HY-R, YG-F/ FoSSP80-4R, FoSSP80-NF/R 四对引物对转化子进行验证。PCR 结果(图5-A)显示以突变体菌株 DNA 为模板可扩增出潮霉素片段以及上下游重组片段, 但并未扩增出 FoSSP80 基因片段, 这与野生型的扩增结果相反, 说明在 Foc 中潮霉素基因成功替换了 FoSSP80 基因。之后将 FoSSP80 基因通过回补载体 pFL2-HB 回补入突变体菌株, 提取回补转化子 DNA, 用 FoSSP80-NF/R 引物进行 PCR 验证, 结果

(图5-B)显示在阳性回补菌株中扩增出了 FoSSP80 基因的条带, 这与野生型对照结果一致, 说明 FoSSP80 基因回补成功。

2.6 FoSSP80 生物学性状测定 将 WT、 Δ FoSSP80 和 Δ FoSSP80-C 在 PDA 培养基上培养 6 d, 观察发现三者在菌落形态方面均无明显差异(图6-A)。每天测定菌落直径, 显著性方差分析结果(图6-B)显示, 野生型菌株与突变体菌株和回补菌株在生长速率方面并无明显差异。将 WT、 Δ FoSSP80 和 Δ FoSSP80-C 接种到 PDB 培养基中, 28 °C 振荡培养 2 d, 统计分生孢子量。显著性方差分析结果(图6-C)显示 WT、 Δ FoSSP80 和 Δ FoSSP80-C 三者在产孢量方面也无显著性差异。以上结果表明 FoSSP80 的缺失并不会影响到 Foc4 的营养生长。

2.7 FoSSP80 基因敲除对 Foc4 的致病力没有显著影响 为了探究 FoSSP80 基因敲除是否会影响到 Foc4 的致病力, 将相同浓度的 WT、 Δ FoSSP80 和 Δ FoSSP80-C 的孢子液接种至香蕉根部, 30 d 后进行致病性测定。接种 Δ FoSSP80 菌株的香蕉植株与接种野生型的植株生长状况相似(图7-A)。利用球茎的病斑面积统计了接种香蕉植株的病情指数, 结果显示敲除突变体的病情指数与野生型相比并未显现出显著差异(图7-B)。以上结果表明 FoSSP80 基因的缺失并没有显著影响 Foc4 的致病力。

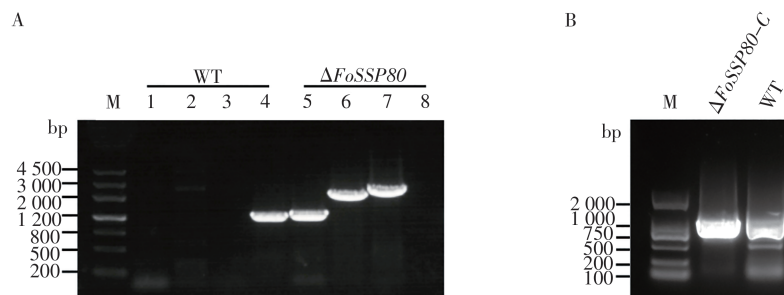


A: 活性氧染色观察。将含有 pBin-FoSSP80-eGFP 以及 pBin-eGFP 的农杆菌菌液注射烟草, 48 h 相同部位注射 Flg22; 12 h 后 0.1% DAB 染色 8 h, 显微镜观察。B: 活性氧面积统计。使用 ImageJ 软件计算每 1 mm² 的 DAB 染色面积。C: 胼胝质染色观察。将含有 pBin-FoSSP80-eGFP 以及 pBin-eGFP 的农杆菌菌液注射烟草, 48 h 相同部位注射 Flg22; 12 h 后 0.1% 苯胺蓝染色 4 h, 显微镜观察。D: 胼胝质数量统计。使用 ImageJ 软件计算每 1 mm² 的胼胝质数量。实验重复 3 次计算平均数和 SDs, t 检验分析, **表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

A: Observation of reactive oxygen species staining. *Agrobacterium tumefaciens* solution containing pBin-FoSSP80-eGFP as well as pBin-eGFP was injected into *Nicotiana benthamiana*, and Flg22 was injected into the same site at 48 h. After 12 h, 0.1% DAB staining was performed for 8 h, and observed by microscope. B: Statistics of reactive oxygen area. DAB staining area per 1 mm² was calculated using ImageJ software. C: Callose staining observation. *A. tumefaciens* containing pBin-FoSSP80-eGFP as well as pBin-eGFP was injected into *Nicotiana benthamiana*, and Flg22 was injected into the same site at 48 h. After 12 h 0.1% aniline blue staining was performed for 4 h, and observed by microscope. D: Callose number counting. The number of callose per 1 mm² was calculated using ImageJ software. The experiment was repeated 3 times to calculate the mean and SDs, and analyzed by t-test. ** indicates highly significant difference ($P < 0.01$).

图 4 FoSSP80 抑制活性氧积累和胼胝质沉积

Fig. 4 FoSSP80 inhibits reactive oxygen species accumulation and callose deposition

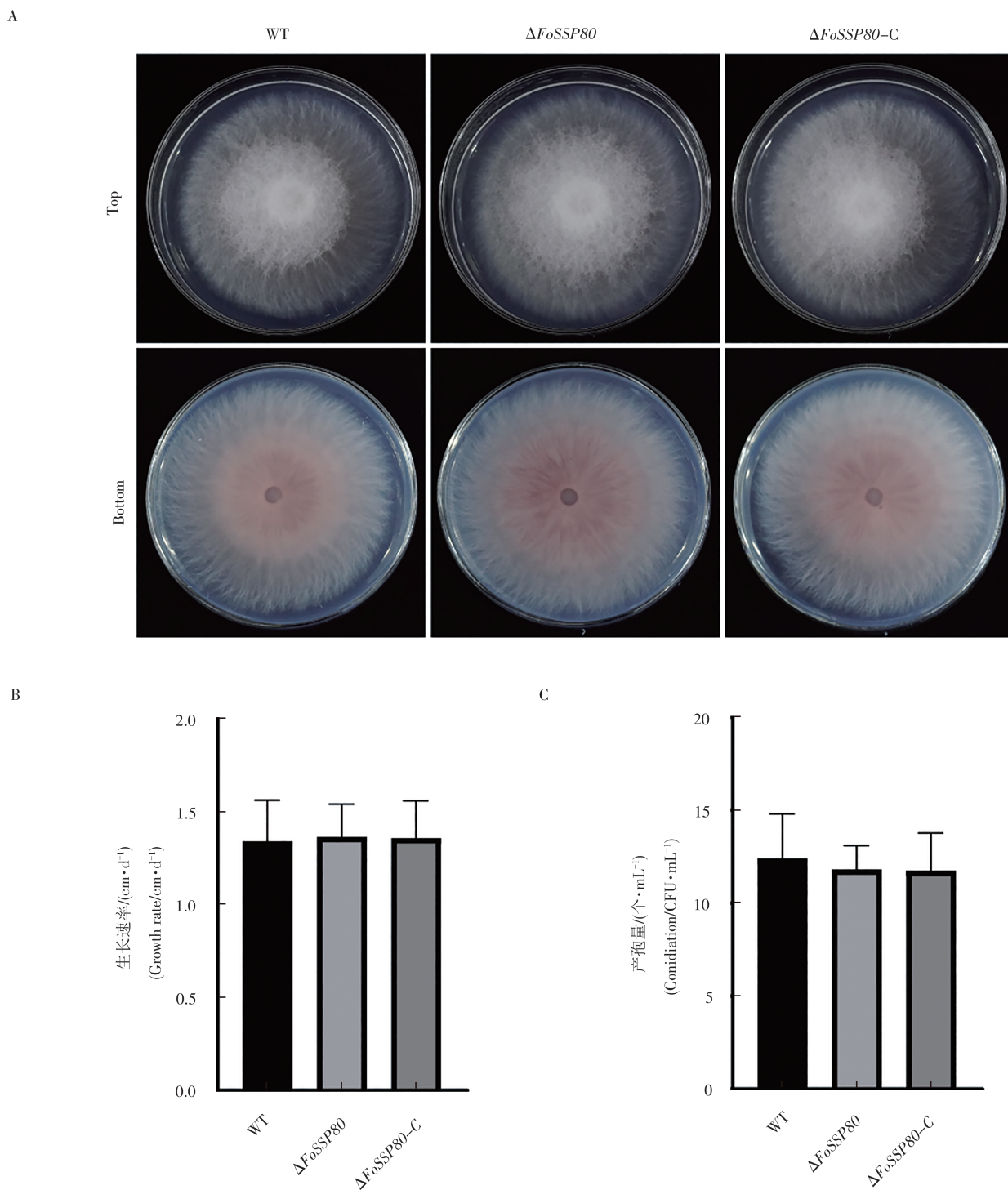


A: 敲除突变体验证。使用引物 HYG-F/R 扩增 HYG 片段(泳道 1, 5); FoSSP80-1F/HY-R 扩增 FoSSP80 上游区域(泳道 2, 6); YG-F/FoSSP80-4R 扩增 FoSSP80 下游区域(泳道 3, 7); FoSSP80-NF/R 扩增 FoSSP80 部分片段(泳道 4, 8)。B: 回补菌株验证。使用 FoSSP80-NF/R 引物扩增 FoSSP80 部分片段。

A: Knockout mutant validation. Primers HYG-F/R were used to amplify the HYG fragment (lanes 1, 5); FoSSP80-1F/HY-R was used to amplify the upstream region of FoSSP80 (lanes 2, 6); YG-F/FoSSP80-4R was used to amplify the downstream region of FoSSP80 (lanes 3, 7); FoSSP80-NF/R was used to amplify the partial fragment of FoSSP80 (lanes 4, 8). B: Backfill strain validation. FoSSP80 partial fragments were amplified using FoSSP80-NF/R primers.

图 5 PCR 检测 FoSSP80 基因敲除及回补

Fig. 5 PCR detection of FoSSP80 knockout and complementary



A: 菌落形态观察。在PDA上接种6 d后的WT、 ΔF_0SSP80 和 $\Delta F_0SSP80-C$ 的菌落形态。B: 生长速率测定。在PDA上WT、 ΔF_0SSP80 和 $\Delta F_0SSP80-C$ 接种5 d的平均生长速率。C: 分生孢子量测定。在PDB中接种2 d的WT、 ΔF_0SSP80 和 $\Delta F_0SSP80-C$ 的分生孢子量。从3次实验重复中计算平均值和SDs。t检验进行统计分析。

A: Observation of colony morphology. Colony morphology of WT, ΔF_0SSP80 and $\Delta F_0SSP80-C$ on PDA after 6 d of inoculation. B: Growth rate measurement. Mean growth rate of WT, ΔF_0SSP80 and $\Delta F_0SSP80-C$ on PDA after 5 days of inoculation. C: Counting of number of conidia. Conidiation of WT, ΔF_0SSP80 and $\Delta F_0SSP80-C$ inoculated for 2 d in PDB. Means and SDs were calculated from three experimental replicates. A t-test was used for statistical analysis.

图6 *FoSSP80* 敲除突变体的菌落形态、生长速率和产孢量

Fig. 6 Colony morphology, growth rate and spore production of *FoSSP80* knockout mutants



A: 香蕉植株致病性试验。将香蕉苗根部浸泡在孢子浓度 10^7 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 的菌液中进行接种, 照片拍摄于接种后 30 d。B: 香蕉病害指数。利用球茎病斑面积占据球茎面积的百分比计算病情指数。(病害分级: 0 级, 球茎病斑面积小于球茎面积的 1%; 1 级, 病斑面积约为球茎面积的 1%~10%; 2 级, 病斑面积约为球茎面积的 11%~20%; 3 级, 病斑面积约为球茎面积的 21%~30%; 4 级, 病斑面积约为球茎面积的 31%~40%; 5 级, 病斑面积约为球茎面积的 40% 以上)。从 3 个实验重复中计算平均值和 SD。t 检验用于统计分析。

A: Banana plant pathogenicity test. Roots of banana young plants were inoculated by immersing them in a bacterial solution with a spore concentration of 10^7 mL^{-1} , and photographs were taken 30 d after inoculation. B: Banana disease index. Disease index was calculated using the percentage of corm lesion area over the total corm area. (Disease classification. Grade 0: Corm spot area is less than 1% of the corm area; Grade 1: Spot area is about 1% to 10% of the corm area; Grade 2: Spot area is about 11% to 20% of the corm area; Grade 3: Spot area is about 21% to 30% of the corm area; Grade 4: Spot area is about 31% to 40% of the corm area; Grade 5: Spot area is more about 40% or more of the corm area. Mean and SD were calculated from three experimental replicates. A t-test was used for statistical analysis.

图 7 *FoSSP80* 敲除突变体对香蕉的致病性

Fig. 7 Pathogenicity of *FoSSP80* knockout mutant in banana

3 讨论

本研究在对 *FoSSP80* 进行序列比对时发现 *FoSSP80* 在镰刀菌属中保守。通过生物信息学预测 *FoSSP80* 的 N 端具有 1 个 17 个氨基酸的信号肽, 且不具有跨膜结构域。依照效应蛋白运输方式的不同, 可将效应蛋白分为经典分泌蛋白和非经典分泌蛋白。经典分泌蛋白的 N 端具有信号肽, 可以引导蛋白分泌^[27], 依赖的是内质网-高尔基体(ER-Golgi)分泌途径。而非经典分泌蛋白则可通过囊泡等方式进行运输。本研究通过酵母分泌系统验证了 *FoSSP80* 的信号肽具有分泌功能。综上所述, *FoSSP80* 是 1 个在镰刀菌属中保守的经典分泌蛋白。

BAX 属于 Bcl-2 蛋白家族, 在植物中表达时会引发细胞程序性死亡(PCD), 而且 BAX 诱导的细胞死亡表型与野生型烟草花叶病毒在植株中诱导的过敏性坏死反应非常相似^[28], 所以可通过验证

是否抑制 BAX 引起的细胞死亡来进行效应蛋白的筛选^[29]。有许多真菌的效应蛋白都能够抑制 BAX 诱导的 PCD, 比如, 大麦白粉菌效应蛋白 CSEP0139 和 CSEP0182 能够抑制 BAX 引起的 PCD, 促进病原菌的侵染^[30]。通过农杆菌介导的瞬时表达发现 *FoSSP80* 能够抑制 BAX 诱导的 PCD, 且有无信号肽均不影响其抑制活性, 这表明 *FoSSP80* 可能会抑制植物免疫反应。活性氧的积累和胍胍质的沉积作为植物免疫应答的早期信号经常被用作探究是否引起植物免疫反应的依据^[31]。为了探究 *FoSSP80* 是否会抑制植物的免疫反应, 将 *FoSSP80* 与 Flg22 共表达, 结果显示 *FoSSP80* 可以抑制 Flg22 诱导的活性氧的积累和胍胍质的沉积。这些结果表明 *FoSSP80* 能够抑制植物免疫反应。

为了探究 *FoSSP80* 对 *Foc4* 的影响, 将 *FoSSP80* 基因敲除后测定 *Foc4* 的分生孢子产量和生长速率, 结果显示敲除突变体菌株的菌落形

态、生长速率和分生孢子产量与野生型及回补菌株相比并无明显差异。将 $\Delta FoSSP80$ 菌株接种到香蕉植株上后,香蕉的生长状态、球茎的病斑面积以及最后统计的病情指数都与野生型和回补株的没有显著差异。故推测 *Foc4* 中的效应蛋白存在功能冗余,且 *FoSSP80* 并不是 *Foc4* 致病的关键效应蛋白。综上所述,香蕉枯萎病菌效应蛋白 *FoSSP80* 可抑制寄主的免疫反应。本实验室将继续探究 *FoSSP80* 抑制免疫反应的机制以及靶标的筛选,为揭示香蕉枯萎病菌的致病机理奠定基础。

参考文献:

- [1] 李华平, 李云锋, 聂燕芳. 香蕉枯萎病的发生及防控研究现状 [J]. 华南农业大学学报, 2019, 40(5): 128–136.
- [2] GHAG S B, SHEKHAWAT U K S, GANAPATHI T R. *Fusarium* wilt of banana: biology, epidemiology and management [J]. International Journal of Pest Management, 2015, 61(3): 250–263.
- [3] 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.
- [4] ATKINSON N J, URWIN P E. The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(10): 3523–3543.
- [5] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system [J]. Nature, 2006, 444(7117): 323–329.
- [6] BOLLER T, HE S Y. Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens [J]. Science, 2009, 324(5928): 742–744.
- [7] HOUTERMAN P M, SPEIJER D, DEKKER H L, et al. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants [J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8(2): 215–221.
- [8] SCHMIDT S M, HOUTERMAN P M, SCHREIVER I, et al. MITEs in the promoters of effector genes allow prediction of novel virulence genes in *Fusarium oxysporum* [J]. BMC Genomics, 2013, 14: 119.
- [9] 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.
- [10] 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: for Cell and Molecular Biology, 2009, 58(6): 970–978.
- [11] MA L, HOUTERMAN P M, GAWEHNS F, et al. The AVR2-SIX5 gene pair is required to activate I-2-mediated immunity in tomato [J]. The New Phytologist, 2015, 208(2): 507–518.
- [12] GAWEHNS F, HOUTERMAN P M, ICHOU F A, et al. The *Fusarium oxysporum* effector Six6 contributes to virulence and suppresses I-2-mediated cell death [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2014, 27(4): 336–348.
- [13] HOU X, AN B, WANG Q, et al. SGE1 is involved in conidiation and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2018, 64(5): 349–357.
- [14] AN B, HOU X, GUO Y, et al. The effector SIX8 is required for virulence of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4 to Cavendish banana [J]. Fungal Biology, 2019, 123(5): 423–430.
- [15] GUO L, WANG J, LIANG C, et al. Fosp9, a novel secreted protein, is essential for the full virulence of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense on banana (*Musa* spp.) [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(6): e0060421.
- [16] 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. cubense (Foc4) [J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 873451.
- [17] WANG T, XU Y, ZHAO Y, et al. Systemic screening of *Fusarium oxysporum* candidate effectors reveals FoSSP17 that suppresses plant immunity and contributes to virulence [J]. Phytopathology Research, 2023, 5(1): 42.
- [18] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022–3027.
- [19] 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.
- [20] GU B, KALE S D, WANG Q, et al. Rust secreted protein Ps87 is conserved in diverse fungal pathogens and contains a RXLR-like motif sufficient for translocation into plant cells [J]. PLoS One, 2011, 6(11): e27217.
- [21] WEI Y, LIU W, HU W, et al. The chaperone MeHSP90 recruits MeWRKY20 and MeCatalase1 to regulate drought stress resistance in cassava [J]. The New Phytologist, 2020, 226(2): 476–491.
- [22] DONG J, CHEN W. The role of autophagy in chloroplast degradation and chlorophagy in immune defenses during Pst DC3000 (AvrRps4) infection [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e73091.
- [23] GOSWAMI R S. Targeted gene replacement in fungi using a split-marker approach [J]. Methods in Molecular Biology, 2012, 835: 255–269.
- [24] YUN Y, LIU Z, ZHANG J, et al. The MAPKK FgMkk1 of

- Fusarium graminearum* regulates vegetative differentiation, multiple stress response, and virulence via the cell wall integrity and high-osmolarity glycerol signaling pathways [J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(7): 2023–2037.
- [25] CHEN D, WANG Y, ZHOU X, et al. The Sch9 kinase regulates conidium size, stress responses, and pathogenesis in *Fusarium graminearum* [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105811.
- [26] ZHANG L, CENCI A, ROUARD M, et al. Transcriptomic analysis of resistant and susceptible banana corms in response to infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 [J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 8199.
- [27] 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.
- [28] 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.
- [29] ABRAMOVITCH R B, KIM Y J, CHEN S, et al. *Pseudomonas* type III effector AvrPtoB induces plant disease susceptibility by inhibition of host programmed cell death [J]. *The EMBO Journal*, 2003, 22(1): 60–69.
- [30] LI X, JIN C, YUAN H, et al. The barley powdery mildew effectors CSEP0139 and CSEP0182 suppress cell death and promote *B. graminis* fungal virulence in plants [J]. *Phytopathology Research*, 2021, 3(1): 7.
- [31] LING T, VANDELLE E, BELLIN D, et al. Nitric oxide produced during the hypersensitive response modulates the plant signaling network and inhibits the pathogen's virulence machinery [J]. *Nitric Oxide*, 2012, 27: S9.

Functional characterization of candidate effector *FoSSP80* in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

ZHAO Yang^{1,2#}, LIU Shuang^{1,2}, WANG Zhibiao^{1,2}, WU Junyu^{1,2}, CHEN Daipeng^{2*}, ZHENG Li^{1*}

(1. Nanfan College/Sanya Nanfan Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China; 2. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: *Fusarium* wilt of banana is one of the major diseases infecting banana. Effectors produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (*Foc*) play an important role during its infection of banana. Previously, a candidate effector *FoSSP80* in *Foc* was screened. Bioinformatics analysis revealed that the *FoSSP80* contained a signal peptide without transmembrane structural domains. Furthermore, the *FoSSP80* was confirmed to have a secretory function by using the yeast secretion system. Transient expression of *FoSSP80* in *Nicotiana benthamiana* led to inhibition of programmed cell death (PCD) induced by BAX. Moreover, *FoSSP80* inhibited the accumulation of reactive oxygen species (ROS) and the callose deposition. The knockout mutant $\Delta FoSSP80$ did not show significant differences in colony morphology, growth rate, and conidial production and pathogenicity compared with the wild-type and complement strains. These results suggested that *FoSSP80* is a typical secretory protein and can inhibit plant defense responses.

Keywords: banana; *Fusarium* wilt; effector; plant immunity

(责任编辑:叶 静)