

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230143



主持人: 缪卫国, 吴少英

橡胶树白粉病菌效应蛋白 CSEP00565 的 筛选及其作用机理初步研究

刘丽娟[#], 刘玉涵, 方雨萧, 单佳馨, 左明浩, 缪卫国^{*}, 李 潇^{*}

(海南大学 热带农林学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海南 儋州 571737 中国)

摘 要: 巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)是中国热区重要的经济作物, 白粉病菌(*Erysiphe quercicola*)侵染引起的白粉病是危害橡胶树最严重的病害。大多数植物病原菌通过分泌效应蛋白并干扰植物免疫系统, 以促进侵染和定殖。但目前效应蛋白在橡胶树白粉菌致病过程中作用机理的相关研究较少, 限制了抗病育种及相关防控工作的开展。橡胶树白粉菌基因编码 24 个较高保守性的候选效应蛋白, 在其他多个白粉菌中有同源, 可能这类蛋白是白粉菌致病所需的。为了从中鉴定到致病关键的毒性因子, 选取了 2 个保守蛋白进行功能分析, 通过在烟草(*Nicotiana benthamiana*)上的异源表达发现仅有候选效应蛋白 CSEP00565 抑制疫霉 INF1 诱导的植物过敏性坏死, 在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中表达 CSEP00565 能够抑制真菌几丁质和细菌 flg22 诱导的胼胝质积累, 结果表明 CSEP00565 具有抑制植物免疫的功能。进一步对编码 CSEP00565 基因沉默后, 白粉菌对橡胶树叶片的侵染能力显著下降。CSEP00565 基因表达水平在病菌侵染的吸器形成阶段(接种后 24 h)显著升高, 且该蛋白编码基因的信号肽具有引导蛋白分泌的活性。研究结果表明效应蛋白 CSEP00565 是促进白粉病菌在橡胶树上侵染的关键毒性因子。研究结果有利于对该病菌和橡胶树互作机理的进一步了解。

关键词: 橡胶树白粉菌; 效应蛋白; 植物免疫

中图分类号: S432.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-7054(2025)03-0389-11

刘丽娟, 刘玉涵, 方雨萧, 等. 橡胶树白粉病菌效应蛋白 CSEP00565 的筛选及其作用机理初步研究 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(3): 389-399. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20230143

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)是热带和亚热带地区的重要经济作物, 是重要工业原料天然橡胶的主要来源^[1-2]。白粉病菌(*Erysiphe quercicola*)引起的橡胶树白粉病严重影响天然橡胶产量^[3-4], 作为一类专性寄生真菌, 还可侵染多种粮食和经济作物。白粉菌在侵染后形成吸器, 以获得寄主营养并释放毒性因子效应蛋白^[5], 对效应蛋白功能的研究有利于阐明白粉菌致病机理, 为抗病育种及相关防控工作提供理论依据。

通过分析白粉病菌全基因组或蛋白质组, 研究人员从橡胶树白粉菌(*Erysiphe quercicola*)、大

麦白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, Bgh)、小麦白粉菌(*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*, Bgt)、葡萄白粉菌(*Erysiphe necator*)等病原中预测出一系列候选效应蛋白(Candidate Secreted Effector Proteins, CSEPs)^[6-8]。这些 CSEPs 含有 N 端信号肽、无跨膜结构域, 在其他非白粉菌物种中无同源序列^[9]。已有研究报道了一些小麦(及大麦)白粉菌效应蛋白功能, 例如效应蛋白 CSEP0055 能够抑制植物病程相关蛋白 PR17 活性^[10], CSEP0264 可以抑制病原菌诱导的细胞死亡^[11], CSEP0105 和 CSEP0162 与大麦热激蛋白 Hsp16.9 和 Hsp17.5 互作^[12]。

收稿日期: 2023-12-29

修回日期: 2024-03-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31960518)

[#]第一作者: 刘丽娟(1999-), 海南大学热带农林学院 2021 级硕士研究生。E-mail: 1349718371@qq.com

^{*}通信作者: 缪卫国(1969-), 男, 博士, 教授。研究方向: 分子植物病理学研究。E-mail: miao@hainanu.edu.cn;

李潇(1989-), 男, 博士, 副教授。研究方向: 分子植物病理学研究。E-mail: 993773@hainanu.edu.cn

本研究团队前期在橡胶树白粉菌效应蛋白功能研究上也取得了一定进展,已在该菌中鉴定出 133 个 CSEPs 类型的候选效应蛋白^[13]。部分效应蛋白的功能已得到了鉴定,发现效应蛋白 EqCSEP01276 可以干扰脱落酸合成所需的 9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(NCED)在叶绿体中聚集,抑制了脱落酸介导的免疫反应^[14]。另外,鉴定效应蛋白 EqCmu 具分支酸变位酶活性,可作用于水杨酸合成前体(分支酸),从而抑制植物中水杨酸介导的免疫反应^[15]。但前期一直缺乏橡胶树白粉菌基因研究方法,比如未开发基因沉默的技术,导致这些效应蛋白在致病过程中所扮演的角色尚未被完全了解。但最近研究表明,使用喷施体外合成的双链 RNA(double-stranded RNA, dsRNA)分子可以有效诱导基因沉默(spray induced gene silencing, SIGS)^[16]。目前,有关橡胶树白粉菌致病分子机理,特别是效应蛋白作用机理还缺少研究。在本研究中,通过利用烟草和拟南芥异源表达待测 CSEPs 和免疫抑制试验,从两个高保守性的效应蛋白中筛选到效应蛋白 CSEP00565。通过致病性测定、侵染过程中表达量分析和信号肽的活性验证,初步分析了该效应蛋白在侵染中的作用机理,为深入解析致病机理提供了依据。

1 材料与方法

1.1 试验植株 橡胶树(*Hevea brasiliensis*)品种:‘热研 7-33-97’(嫁接苗),培养条件为温度 22 ℃,光照 16 h 黑暗 8 h;

烟草(*Nicotiana benthamiana*)品种:本氏烟草,培养条件为温度 25 ℃,光照 16 h,黑暗 8 h;拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)品种:‘哥伦比亚’野生型,培养条件为温度 25 ℃,光照 16 h,黑暗 8 h。

1.2 试验菌株及载体 橡胶树白粉菌(*Erisiphe quercicola*)(菌株 HO-73),酵母 YTK12 菌株,由热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室提供。大肠杆菌(DH5 α)、农杆菌(GV3101),购于天根生化科技有限公司。

pBIN-GFP 载体, pSUC2 载体均由热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室提供。

1.3 培养基及主要试剂 CMD-W 培养基、YPAA 培养基均按照常规方法配制^[17]。LB 培养基、YPD 培养基按常规方法配制^[18-19]。

Taq Pro Universal SYBR qPCR Master Mix、RNA isolater Total RNA Extraction Reagent、T7 RNAi Transcription Ki 试剂盒、DNA 纯化试剂盒、同源重组酶、高保真酶均购买自诺唯赞生物公司;质粒提取试剂盒购买自 Omage 公司;苯胺蓝、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)、几丁质类似物(GlcNAc)₇ 购买自生工生物有限公司;其他试剂购自 TaKaRa 公司及北京索莱宝科技有限公司。

1.4 候选效应因子的生物信息学分析 使用候选效应蛋白 CSEPs 的氨基酸序列,在 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)BlastP 在线系统搜索同源蛋白,高于 30% 相似度即认为具有同源性,并统计含同源蛋白的物种数目。

使用 SignalP(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)在线系统预测效应蛋白 CSEP00565 信号肽并确定信号肽序列位置。

使用单因素方差分析和 Duncan 法进行数据分析,确定显著性差异。数据至少来自 3 个生物学重复。

1.5 候选效应因子的功能鉴定

1.5.1 目的基因的克隆与载体构建 选取橡胶树古铜期叶片,使用毛笔刷接种新鲜橡胶树白粉菌孢子于叶片表面,培养 14 d 后,收集新鲜的橡胶树白粉菌孢子进行后续实验。使用 RNA 提取试剂盒提取橡胶树白粉菌 HO-73 的 RNA,反转录合成 cDNA。利用 Primer 5.0 设计引物(表 1),以橡胶树白粉菌 cDNA 为模板,进行目的片段的扩增。在获得目的片段之后,通过同源重组将片段重组到相关表达载体中。使用质粒提取试剂盒进行质粒提取,最终获得重组载体。

1.5.2 农杆菌介导的本氏烟草瞬时表达 利用限制性内切酶 *Bam*HI 对 pBIN-GFP 载体进行单酶切,并使用 DNA 纯化试剂盒回收载体。用表 1 中的 5 个效应蛋白引物扩增目的片段,并将目的片段与酶切后的载体通过同源重组连接并转入大肠杆菌 DH5 α 中,最终获得重组的表达体质粒,将构建好的载体导入农杆菌 GV3101 中。将长出的单菌落转移至新的固体培养基,并进行 PCR 验证,获得阳性转化子。将阳性转化子加入质量浓度为 50 mg·L⁻¹ 利福平和 50 mg·L⁻¹ 硫酸卡那霉素的 LB 培养基中培养过夜。离心(3 500 r·min⁻¹, 2 min)收集菌体,用 1 mL 10 mmol·L⁻¹ 氯化镁重悬。悬浮液

表 1 本实验所用引物

Tab. 1 Primers used in the experiment

引物 Primer	引物序列(5'—3') Primer sequence(5'—3')	限制性内切酶 Restriction endonuclease
<i>CSEP00565</i> -F	ATGTTTTTCAGTTCTGTCTTC	
<i>CSEP00565</i> -R	TTCGGTTTCTTTGTCAGACTC	
<i>CSEP01106</i> -F	ATGCATTTTATGAAGATATCG	
<i>CSEP01106</i> -R	CATGTTTTGAAGGATCCAACC	
<i>CSEP04728</i> -F	ATGAATACTGTTCCAGTCGAA	
<i>CSEP04728</i> -R	AGCCCCATAAGCTAATAGGAC	
<i>CSEP01329</i> -F	ATGCGTACTTCATTACTCTCG	
<i>CSEP01329</i> -R	CAAAGCCAGTGCTAAACCAAG	
<i>CSEP02231</i> -F	ATGCGGCTCAATATCTTAACT	
<i>CSEP02231</i> -R	CCATATTGCTAAGGCTGCCAT	
<i>CSEP00565-GFP</i> -F	acccccggggtcgacggatccATGTTTTTCAGTTCTGTCTTC	<i>Bam</i> HI
<i>CSEP00565-GFP</i> -R	gcccttgctcaccatggatccTTCGGTTTCTTTGTCAGACTC	
<i>CSEP02231-GFP</i> -F	acccccggggtcgacggatccATGCGGCTCAATATCTTAACT	<i>Bam</i> HI
<i>CSEP02231-GFP</i> -R	gcccttgctcaccatggatccCCATATTGCTAAGGCTGCCAT	
<i>CSEP01106-GFP</i> -F	acccccggggtcgacggatccATGCATTTTATGAAGATATCG	<i>Bam</i> HI
<i>CSEP01106-GFP</i> -R	gcccttgctcaccatggatccCATGTTTTGAAGGATCCAACC	
<i>CSEP01329-GFP</i> -F	acccccggggtcgacggatccATGCGTACTTCATTACTCTC	<i>Bam</i> HI
<i>CSEP01329-GFP</i> -R	gcccttgctcaccatggatccCAAAGCCAGTGCTAAACCAAG	
<i>CSEP04728-GFP</i> -F	acccccggggtcgacggatccATGAATACTGTTCCAGTCGAA	<i>Bam</i> HI
<i>CSEP04728-GFP</i> -R	gcccttgctcaccatggatccAGCCCCATAAGCTAATAGGAC	
<i>CSEP00565^{Δsp}-GFP</i> -F	acccccggggtcgacggatccATGATTCCACTTAATATCAAC	<i>Bam</i> HI
	cccggggtcgacggatccATGAATTTTACTGGCTATTCTCGA	
<i>CSEP00565nbsp-GFP</i> -F	TTTTTAATCGTCTTTGTAGCTCTTGTAAGGTGCTTTT	<i>Bam</i> HI
	TTCAGTTCTGTC	
<i>CSEP00565sp-pSUC2</i> -F	CGGAATTCGATGTTTTTTCAGTTCTGTC	<i>Eco</i> RI
<i>CSEP00565sp-pSUC2</i> -R	CCCTCGAGGGTGAGATTTACCATCACC	<i>Xho</i> I
<i>CSEP00565</i> -Pet28a-F	CGGGATCCCAGATGTTTTTTCAGTTCTGTC	<i>Bam</i> HI
<i>CSEP00565</i> -Pet28a-R	CGGAATTCGGTTCGGTTTCTTTGTCAGA	<i>Eco</i> RI
Pet28a-F	TAATACGACTCACTATAGGG	
Pet28a-R	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	
dsRNA- <i>CSEP00565</i> -F	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGATGAGAGGGAAG GAAGAGGTA	
dsRNA- <i>CSEP00565</i> -R	TAATACGACTCACTATAGGGGTGTCAATGAATCAGAGGC	
dsRNA- <i>GFP</i> -F	GATCACTAATACGACTCACTATAGGGATGCAGTGCTTC AGCCGCTAC	
dsRNA- <i>GFP</i> -R	TAATACGACTCACTATAGGGGTTACCTTGATGCCGTTT	
<i>CSEP00565</i> -RT-F	GGGAAGATTATTACTCAA	
<i>CSEP00565</i> -RT-R	TTCACCCCTTACACCAACA	
<i>GFP</i> -RT-F	TGGGGCACAAGCTGGAGT	
<i>GFP</i> -RT-R	TCTGCTGGTAGTGGTCGG	
<i>EF1a</i> -RT-F	GAACCTTCATCTAACTGC	
<i>EF1a</i> -RT-R	GTCGTAGTGGTTTGTCAG	
<i>AtAct2</i> -RT-F	ACTACGAGCAGGAGATGGAA	
<i>AtAct2</i> -RT-R	TTAATCTTCATGCTGCTTGG	
<i>CSEP00565</i> -MCS-F	GAGCTCGGTACCCGGGGATCCATGTTTTTCAGTTCTGTCTTC	
<i>CSEP00565</i> -MCS-R	CATGTCGACTCTAGAGGATCCTTCGGTTTCTTTGTCAGACTC	<i>Bam</i> HI

注: 小写字母表示用于融合线性载体的序列。

Note: The sequences used in the fusion with linearized vectors were marked by lowercase letters.

浓度被调整到 OD_{600} 值为 0.5^[20]。将含有效应蛋白载体的农杆菌用针孔注射器注入烟草叶片, 24 h 后, 共表达含有致病疫霉激发子(*INF1*)基因的农杆菌, 3~4 d 后, 观察注射区域的坏死情况。*INF1* 具有诱导烟草叶片产生免疫反应过敏性坏死(Hypersensitive response)的作用^[21-22]。

1.5.3 农杆菌蘸花法介导的拟南芥转化 将 1.5.2 构建完成的 CSEP00565-GFP 阳性转化子在含有 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平和 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫酸卡那霉素的 LB 培养基中 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。离心($3\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 2 min)收集菌体, 使用悬浮液(菌体悬浮液包含 $50\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ Sucrose、 $2.2\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MS Salt 和 $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ MES)对菌体进行悬浮, 并调整 OD_{600} 值为 0.8~1.0。对培养四周的拟南芥进行果荚修剪, 然后将其上部浸泡在菌体悬浮液中持续 5 min, 用保鲜膜将拟南芥的花序包裹, 在黑暗环境中进行 48 h 的保湿培养, 然后正常培育拟南芥并收集其种子^[23]。

1.5.4 胼胝质积累的测定 烟草或拟南芥在接种农杆菌 48 h 后, 将注射叶片剪下放于脱色液($V_{\text{乙醇}}:V_{\text{乙酸}}=3:1$)中脱色至透明, 将脱色叶片表面脱色液洗净, 使用 0.01% 苯胺蓝溶液(苯胺蓝溶于 $0.067\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{K}_2\text{HPO}_4$)进行避光染色 4 h, 通过荧光显微镜检测胼胝质积累情况, 使用 ImageJ 软件在 1 mm^2 范围内计算胼胝质积累情况^[19]。

1.6 效应蛋白 CSEP00565 的功能验证

1.6.1 双链 dsRNA 的合成及纯化 使用 T7 RNAi Transcription Kit 试剂盒合成 dsRNA, 以 pBin-GFP 质粒中的 GFP 基因为模板, 扩增 GFP-dsRNA; 使用含有 CSEP00565 编码序列的质粒, 扩增 CSEP00565-dsRNA。设计用于 dsRNA 扩增的正向和反向引物, 5'端为 T7 启动子序列(表 1)。

1) dsRNA 的合成

- ① 根据 T7 试剂盒说明书配置反应体系
- ② PCR 仪里 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 2 h
- ③ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应结束后, 当双链长度超过 800 bp, 需经过 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min, 再自然冷却退火形成 dsRNA

④ 用 RNase T1 Dilution Buffer 将 $100\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ RNase T1 稀释成 $10\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

⑤ 配制双酶消化体系

⑥ $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min, 电泳检测转录产物。

2) 产物纯化

按照 T7 试剂盒说明书, 将试剂 RNA Clean Beads 加入 RNA 转录产物中, 置于磁力架上弃去上清。干燥后, 加入无酶水, 获得纯化后的产物, 保存于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

1.6.2 双链 dsRNA 喷雾诱导基因沉默 使用 dsRNA 处理橡胶树白粉菌: 选择生长周期为 10 d 左右的橡胶树叶片, 进行白粉孢子悬浮液的接种($1\times 10^5\text{ 个}\cdot\text{mL}^{-1}$)后, 将 dsRNA 用无酶水稀释, 调整至最终质量浓度为 $20\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 喷洒于叶片表面接种孢子处, 将处理后的幼苗在 $24\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、每天 12 h 光照, 10 h 黑暗的室内。3 d 后对吸器数量统计分析, 7 d 后观察发病情况并对病斑面积进行统计分析。

吸器数量: 使用 ImageJ 软件对每 1 mm^2 的吸器数量计数, 数据来自 3 次生物重复。

病斑面积: 使用 ImageJ 软件对叶片上病斑面积进行计算, 数据来自 3 次生物重复。

1.7 效应因子 CSEP00565 的作用机理

1.7.1 目的基因在侵染过程的表达特性分析 将野生型橡胶树白粉菌接种在叶龄基本一致的古铜期叶片上, 并在接种后 4、12、24、48 h 对叶片进行样本采集。用 RNA isolater Total RNA Extraction Reagent 试剂盒提取总 RNA。荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qRt-PCR) 采用 SYBR Green I 荧光染料法进行检测, PCR 扩增引物如表 1 所示。以 *EFla* 作为内参基因。每个样本进行 3 次独立重复。反应完成后, 使用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法分析 CSEP00565 基因在橡胶树白粉菌侵染橡胶树不同阶段的相对表达水平。

1.7.2 CSEP00565 信号肽分泌活性验证 将 CSEP00565 的信号肽序列构建到含有色氨酸合成基因但缺失蔗糖转化酶基因的载体 pSUC2 中, 将构建好的载体转化至酵母菌株 YTK12 中^[24]并涂布于 CMD-W 培养基上, 挑取阳性克隆在 YPAA 培养基上观察菌落生长情况。

通过将 2,3,5-三苯基氯化四氮唑 (2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride, TTC) 还原为不溶的红色化合物, 检测信号肽分泌活性。挑取转化成功的酵母转化子于 CMD-W 液体培养基中培养, 将 YTK12 和转入 pSUC2 空载体的 YTK12 酵母菌株加入 YPD 液体培养基中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h。 $12\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 收集菌体, ddH₂O 清洗 2 次, 用

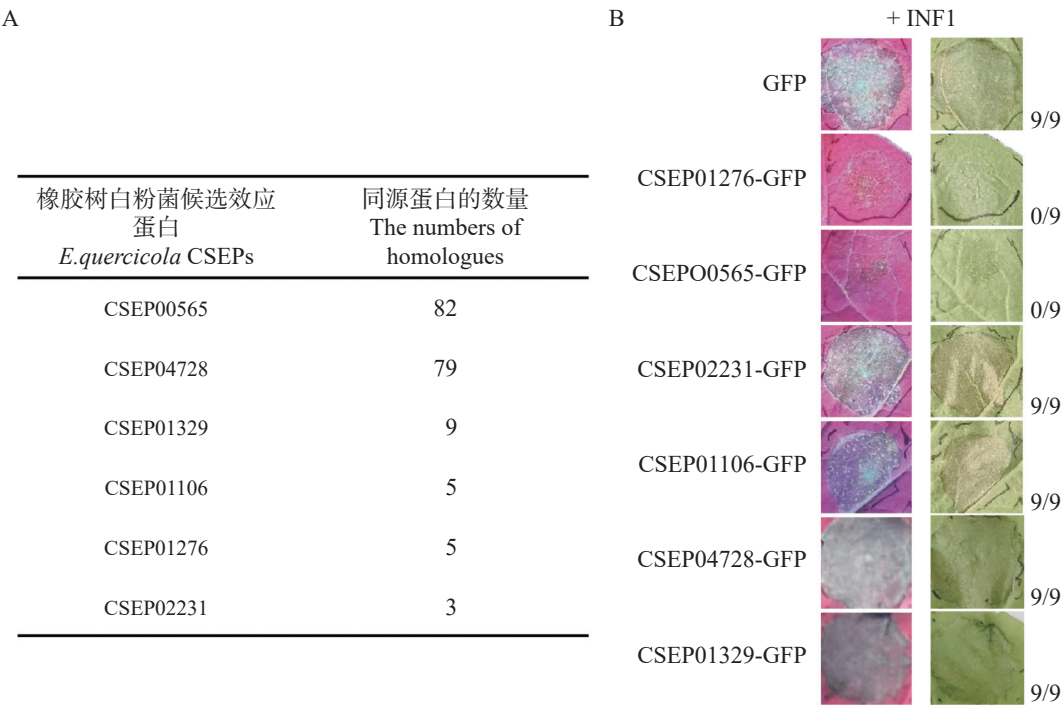
750 μL 的 ddH_2O 对菌体进行重悬, 加入 500 μL 的 10%(质量分数)蔗糖溶液和 250 μL 的醋酸-醋酸钠缓冲液, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 10 min。12 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心收集上清液, 放入含有 0.1% TTC 溶液的试管中。室温下静置 15 min, 以观察其颜色变化情况。

2 结果与分析

2.1 在烟草表达 CSEP00565 抑制 INF1 诱导的过敏性反应 在很多种白粉菌中都具有同源的保守效应蛋白, 可能在致病过程中扮演重要角色, 因而遗传中被保留下来。因此, 通过将橡胶树白粉菌 CSEPs 效应蛋白氨基酸序列与其他白粉菌的进行对比, 找到了该菌中的 24 个高保守性的蛋白(在 75 个及以上的白粉菌菌种中存在同源蛋白)。本次研究选取其中 2 个蛋白 CSEP00565 和 CSEP04728 在本氏烟草上表达和测定抑制植物过敏性反应的功能, 并同时选取 4 个低保守的 CSEPs(低于 10

个白粉菌种中存在同源蛋白)作为对照(图 1-A)。通过农杆菌介导转化在烟草叶片细胞表达待测效应蛋白(GFP 标签), 同时共表达卵菌激发子 INF1^[21-22]。并于 3~4 d 后检测叶片状况, 发现 CSEP00565 抑制了 INF1 诱导的过敏性坏死(图 1-B)。低保守性的 CSEP01276^[14] 也产生了同样的效果, 与前期报道一致。因此, 通过该烟草上的功能测定, 筛选到了潜在的致病因子 CSEP00565。

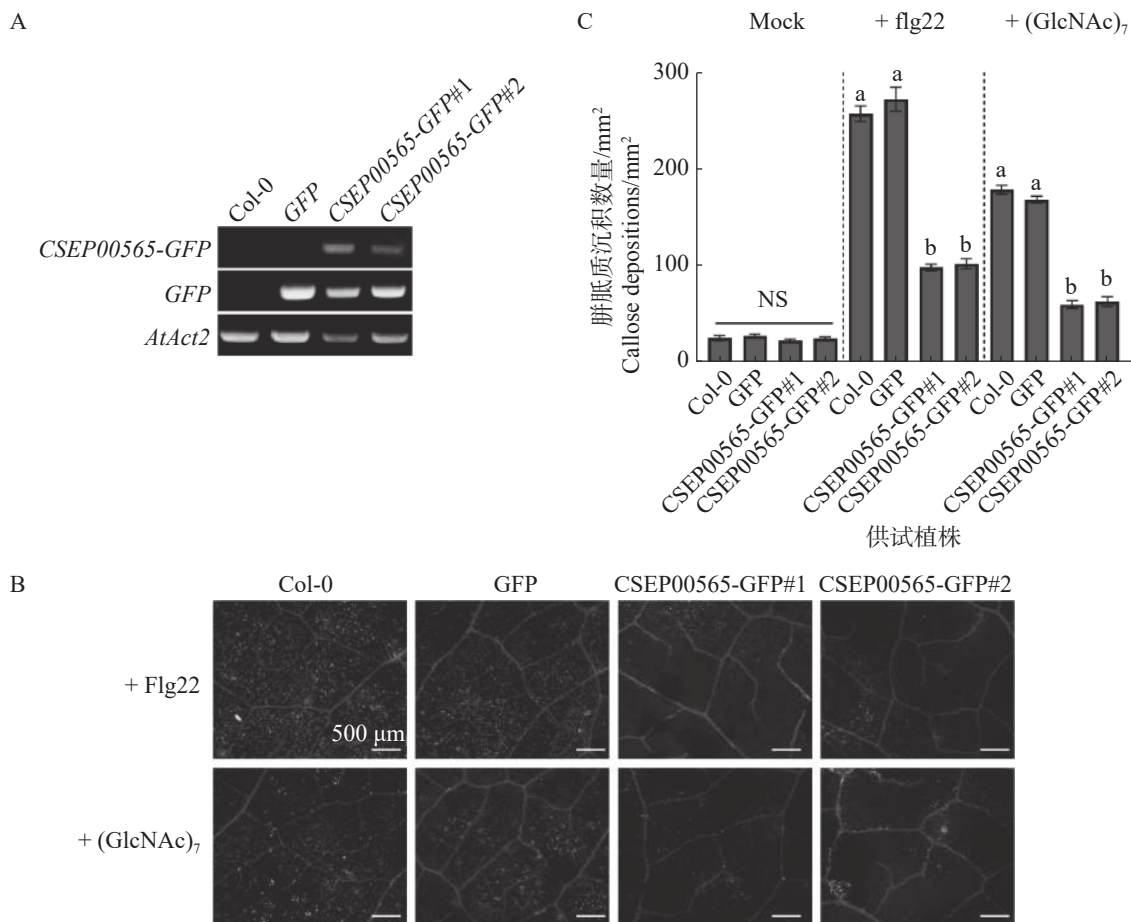
2.2 在拟南芥表达 CSEP00565 抑制胼胝质形成 为了确认 CSEP00565 具有植物免疫反应抑制的功能, 利用农杆菌转化获得稳定 CSEP00565 转基因拟南芥植株, 并测试 CSEP00565 对病原物相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns)诱导免疫是否具有抑制作用。通过 qRT-PCR 分析验证了植物中转化基因的表达(图 2-A)。病原物相关分子模式如细菌鞭毛蛋白(flagellin)和真菌几丁质(chitin)^[25-26] 可触发拟南芥产生胼胝质沉



A: 候选效应蛋白含同源蛋白的菌种数量, 利用 NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)BlastP 在线工具系统进行蛋白同源性比对, 蛋白之间氨基酸相似度高于 30 % 被认为两者为同源; B: CSEP00565 在本氏烟草中表达抑制了 INF1 诱导的过敏性坏死, 阳性对照为 CSEP01276-GFP, 阴性对照为 GFP, 右侧数字表示“坏死叶片/生物学实验重复数”。

A: The number of species containing homologous proteins of candidate effector proteins, Protein homology comparison was conducted using the NCBI(www.ncbi.nlm.nih.gov)BlastP online tool system, The amino acid similarity between the two proteins was higher than 30%, which was considered to be homologous; B: The expression of CSEP00565 in *N. benthamiana* inhibited the hypersensitive necrosis induced by INF1, GFP serves as a negative control, and the effector protein CSEP01276 serves as a positive control, The numbers on the right indicate “necrotic leaves/biological replicates”.

图 1 效应蛋白在本氏烟草上的抑制 INF1 诱导坏死的测试
Fig. 1 The activity of *E. quercicola* CSEPs in suppressing INF1-induced hypersensitive response was tested in *Nicotiana benthamiana*



A: RT-PCR 验证拟南芥 Col-0 中 GFP 和 CSEP00565-GFP 两个株系的基因表达, *AtAct2* 作为内参基因; B: 对拟南芥 Col-0 植株及 GFP 和 CSEP00565-GFP 的转基因拟南芥植株, 注射 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 细菌 flg22 和几丁质 (GlcNAc)₇ 诱导的叶片胼胝质积累 (标尺 $500\text{ }\mu\text{m}$); C: 柱状图显示均值和标准差, a 和 b 代表差异显著性 ($P<0.01$), NS 代表无显著差异。

A: RT-PCR was used to verify the gene expression of *GFP* and *CSEP00565-GFP* in *A. thaliana* Col-0, and *AtAct2* was used as an internal reference gene; B: Callose deposition in *A. thaliana* Col-0 plants and transgenic plants with *GFP* and *CSEP00565-GFP*, following injection of $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ bacterial flg22 and chitin (GlcNAc)₇ in leaves (scale bar $500\text{ }\mu\text{m}$). After 24 h, *A. thaliana* leaves were stained with aniline blue, and its callose was observed under a microscope. *GFP* was used as a negative control, The red arrows indicate callose; C: The amount of callose per 1 mm^2 was calculated by using ImageJ software version 1.49v, The bar graph showed mean values and standard deviations, with a and b representing statistically significant differences ($P<0.01$), NS represents no significant difference.

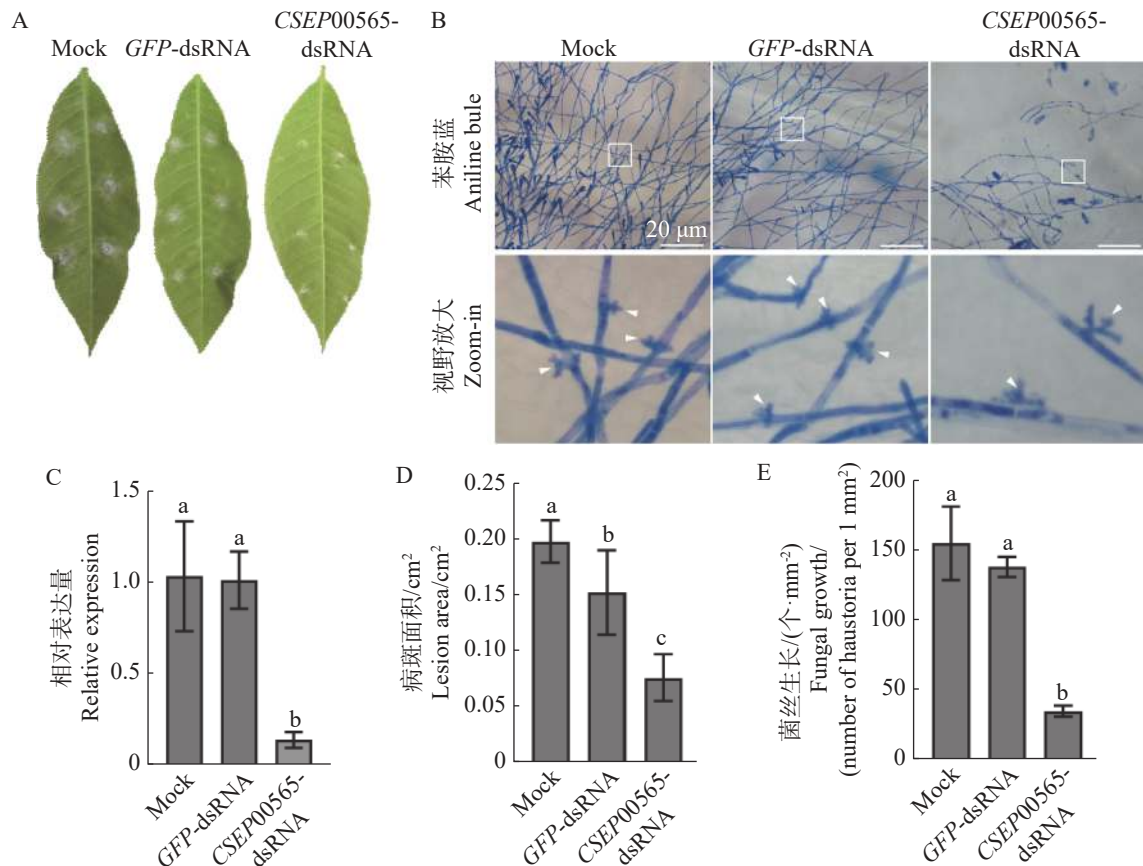
图 2 效应蛋白 CSEP00565 在拟南芥 Col-0 植株上的表达抑制胼胝质沉积

Fig. 2 The *CSEP00565* expression inhibited callose deposition in *Arabidopsis thaliana* Col-0 plant

积, 使用 $20\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的几丁质单体 (GlcNAc)₇ 和 flagellin 肽段 flg22 处理拟南芥叶片, 观察不同植株胼胝质的沉积情况。试验结果表明, 与对照组野生型植株 Col-0 及阴性对照 GFP 转基因植株相比, CSEP00565-GFP 转基因植株 (CSEP00565-GFP#1、CSEP00565-GFP#2) 叶片中的胼胝质数量下降了 60%~64%, 以上结果表明 CSEP00565 可抑制拟南芥产生的免疫反应 (图 2-B, C)。

2.3 SIGS 诱导橡胶树白粉菌 CSEP00565 沉默导致致病力下降 为了证明 CSEP00565 是致病关键的, 将通过 SIGS 诱导橡胶树白粉菌中靶基因沉默并测

定菌株致病性。以 *CSEP00565* 和 *GFP* 的编码序列为模板, 利用 T7 启动子进行体外转录, 合成质量浓度为 $500\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 *CSEP00565*-dsRNA 和 *GFP*-dsRNA 产物。在古铜期橡胶树叶片表面接种孢子悬浮液 (1×10^5 个 mL^{-1}) 后, 使用 dsRNA ($100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 溶液进行喷洒处理。3 d 后, 和对照 (无酶水 Mock)、*GFP*-dsRNA 处理相比, *CSEP00565*-dsRNA 处理导致吸器数量减少了 82.7% (图 3-C, E); 7 d 后, *CSEP00565*-dsRNA 处理导致病斑面积降低了 58.1% (图 3-A, D), qRT-PCR 检测发现, *CSEP00565*-dsRNA 处理后的叶片中 *CSEP00565* 基因表达量



A: 沉默 *CSEP00565* 的菌株在橡胶树叶片上的致病力测定, *GFP* 的双链 RNA(*GFP*-dsRNA)和沉默 *CSEP00565* 的双链 RNA(*CSEP00565*-dsRNA)分别处理白粉菌分生孢子,并在橡胶树叶片上接种分生孢子,7 d 后测定致病性,Mock(无酶水处理),*GFP*-dsRNA 指阴性对照;B: 图片显示 *CSEP00565*-dsRNA 处理使白粉菌菌丝生长受到了抑制(接种 3 d 后测定,使用苯胺蓝对菌丝染色,标尺 20 μ m),Zoom-in 代表白色框区域的放大,白色箭头代表吸器;C: 实时相对荧光定量法(qRT-PCR)测定 *GFP*-dsRNA 和 *CSEP00565*-dsRNA 处理 7 d 后白粉菌中 *CSEP00565* 表达量,柱状图显示平均值和标准差, a 和 b 代表差异显著性($P<0.01$);D 和 E 分别为分生孢子侵染 7 d 后的病斑面积大小和侵染 3 d 后菌丝吸器数量的统计结果, *CSEP00565*-dsRNA 处理后抑制了病斑扩展和菌丝生长,柱状图显示均值和标准差, a、b、c 代表差异显著性($P<0.01$)。

A: Pathogenicity determination of strain silencing *CSEP00565* on rubber tree leaves. Conidia of *E. quercicola* were treated with *GFP*-dsRNA and *CSEP00565*-dsRNA, respectively, Conidia were inoculated on rubber leaves, and pathogenicity was determined after 7 days, Mock(no enzyme water treatment), *GFP*-dsRNA refers to the negative control; B: Images show that treatment with *CSEP00565*-dsRNA inhibited the growth of powdery mildew mycelia(measured 3 days after inoculation, mycelium stained with aniline blue,scale bar 20 μ m), “Zoom-in” represents a magnified view of the area within the white box; white arrows indicate haustoria;C: quantitative real-time PCR(qRT-PCR)was used to determine the expression level of *CSEP00565* in *Erysiphe quercicola* 7 days after treatment with *GFP*-dsRNA and *CSEP00565*-dsRNA, The bar graph showed mean values and standard deviations, with a and b indicating statistically significant differences($P<0.01$); D and E: Statistical results of the lesion area size after 7 days of infection and haustorium number of conidia after 3 days of infection, respectively, showing that treatment with *CSEP00565*-dsRNA inhibited lesion expansion and mycelial growth,The bar graph showed mean values and standard deviations, with a, b, and c indicating statistically significant differences($P<0.01$).

图 3 沉默 *CSEP00565* 基因使白粉菌侵入寄主后不能扩展

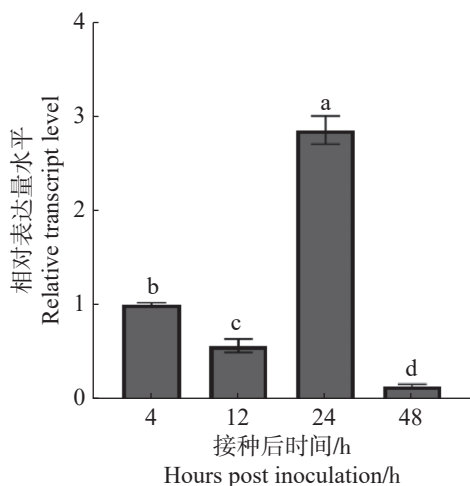
Fig. 3 *CSEP00565* silencing inhibited hyphal extension after the pathogen of the powdery mildew was penetrated into host

下调约 87.0%(图 3-B)。结果表明 *CSEP00565* 沉默病菌致病力显著下降。

2.4 *CSEP00565* 基因在侵染过程中的表达特性分析 根据前期研究报导的橡胶树白粉菌 HO-73 菌株在接种后侵染几个关键时间节点(包括 4 h 分生孢子萌发的高峰期、12 h 侵染的高峰期、24 h

吸器的形成期、48 h 菌丝的扩展阶段及二次侵染的时期)^[15],分析 *CSEP00565* 基因在与寄主互作过程中表达特性。分别从整个感染橡胶树白粉菌的橡胶树叶片中提取接种后 4、12、24 和 48 h 的橡胶树白粉菌的总 RNA。通过 qRT-PCR 分析橡胶树白粉菌侵染过程中 *CSEP00565* 基因表达水平。

结果显示:与 4 h *CSEP00565* 基因表达量水平相比, *CSEP00565* 在白粉菌侵染 12 h 时表达量降低,但在 24 h 升高,是 4 h 的 2.8 倍,而 48 h 又大幅度降低(图 4),说明 *CSEP00565* 可能主要在侵染过程中吸器形成时期发挥作用。



4 h 时的基因表达量水平设置为 1,并将其他时间点的基因表达量水平与 4 h 时进行比较,橡胶树白粉菌 *EF1a* 作为内参基因。每个时间点包括 3 个独立生物学重复。柱状图显示均值和标准差, a、b、c、d 代表差异显著性 ($P < 0.01$)。

The expression level at 4 h was set to 1, and the expression levels at other time points were compared to the level at 4 h. The rubber tree powdery mildew *EF1a* was used as an internal reference gene. Each time point included three independent biological replicates. The bar graph shows mean and standard deviation, and a, b, c and d represent significant difference ($P < 0.01$).

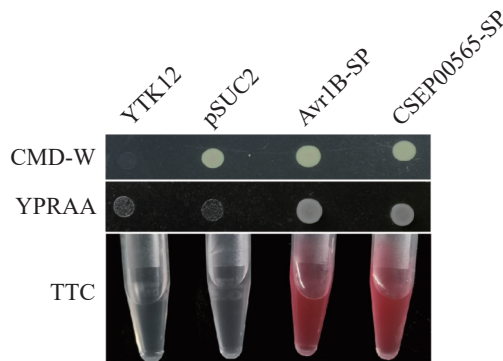
图 4 *CSEP00565* 在侵染过程的基因相对表达量水平

Fig. 4 The relative expression level of *CSEP00565* at the infection stage

2.5 *CSEP00565* 的信号肽活性分析 SignalP 在线服务系统(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)对 *CSEP00565* 的蛋白氨基酸序列分析表明, *CSEP00565* 携带含有 18 个氨基酸的 N 端信号肽。本研究中使用酵母蔗糖转化酶分泌试验检测了该信号肽的分泌活性。

将 *CSEP00565* 信号肽序列片段插入 pSUC2 载体的 *EcoRI*、*XhoI* 酶切位点(pSUC2-*CSEP00565*-SP),并将 pSUC2-*CSEP00565*-SP 和 pSUC2 转入 YTK12 菌株。以已知分泌蛋白 *Avr1b* 信号肽作为阳性对照,而未转化的 YTK12 和转化了空载 pSUC2 的 YTK12 作为阴性对照^[17]。与 *Avr1b* 信号肽相似, pSUC2-*CSEP00565*-SP 转化的 YTK12 可以在 YPRAA 培养基上生长(图 5)。同时 *CSEP00565*

信号肽转化菌株具有蔗糖转化酶活性,可将 2,3,5-三苯基氯化四氮唑(TTC)还原为红色化合物(图 5)。实验结果表明 *CSEP00565* 是分泌蛋白,且其信号肽序列能够有效地引导蛋白的分泌。



CSEP00565 信号肽可引导酵母蔗糖转化酶分泌。酵母菌株在 CMD-W 培养基上的生长,证明载体已成功被转入酵母 YTK12 菌株中,在 YPRAA 培养基上的生长和 TTC 的颜色变化验证信号肽分泌功能。作为阳性对照的是分泌蛋白 *Avr1b* 的信号肽,而未转化的 YTK12 和转入空载的 pSUC2 则作为阴性对照。SP: 信号肽。

CSEP00565 signal peptide can guide the secretion of yeast sucrose invertase. The growth of the yeast strain on the CMD-W medium proved that the vector had been successfully transferred into the yeast strain *YTK12*. The growth on the YPRAA medium and the color change of TTC verified the signal peptide secretion function. The predicted signal peptide of *Avr1b* was used as a positive control. The *YTK12* strain and *YTK12* carrying the empty *pSUC2* vector were used as negative controls. SP: Signal peptide.

图 5 酵母蔗糖转化酶分泌实验验证 *CSEP00565* 信号肽功能

Fig. 5 Yeast invertase secretion assay to determine the function of *CSEP00565* signal peptide

3 讨论

在多个白粉菌中都有同源的 CSEPs 效应蛋白可能源自共同的祖先^[27],并可能是致病或适应寄主所需的因子被继承下来。橡胶树白粉菌含有 24 个高保守性的 CSEPs,它们在其他 75 种以上白粉菌都有同源。本研究通过烟草表达 CSEPs 效应蛋白抑制 INF1 诱导过敏性坏死的测试,筛选到 *CSEP00565* 表现出了抑制坏死反应的活性。INF1 被烟草细胞表面受体 NbEIR1 识别,激活下游 BAK1 和 BSK1 受体,传导过敏性反应信号^[28]。其他一些研究中,也将病原真菌效应蛋白在本氏烟草上异源表达并测试其对过敏性坏死的抑制水平,据此鉴定出具有促进致病功能的毒性效应蛋白。比如,小麦条锈菌效应蛋白 Pst_12806、Pst_8713、

小麦镰刀菌的效应蛋白 OsP24 在烟草中瞬时表达可以抑制 BAX 或 INF1 诱导的过敏性坏死^[29-31]。在拟南芥表达 CSEP00565 也使 flg22 和 (GlcNAc)₇ 诱导的胼胝质沉积被抑制, 进一步验证了 CSEP00565 具有抑制植物免疫的功能。细菌鞭毛蛋白 flg22 被拟南芥细胞表面受体激酶 FLS2 识别, FLS2 可对类受体胞内蛋白激酶 BIK1 进行磷酸化, 激活 NADPH 氧化酶及其他信号通路, 从而产生免疫反应^[32-33]; 而几丁质被细胞表面受体 CERKI 识别, 激活了丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号传递途径, 从而触发免疫反应^[34-35]。也有研究表明 FLS2 和 CERKI 下游途径都与 BIK1 受体有关^[36]。根据本文研究结果, 推测 CSEP00565 可能影响了烟草中 NbEIR1 下游信号通路, 或拟南芥中 FLS2 和 CERK1 下游信号通路的共同节点, 从而干扰了植物免疫。

为了进一步研究效应蛋白 CSEP00565 是否是橡胶树白粉菌侵染所必需, 通过 SIGS 对 CSEP00565 进行沉默, 发现沉默菌株吸器数量减少, 菌丝扩展率大幅度下降, 表明 CSEP00565 功能对橡胶树白粉菌侵染非常重要。寄主诱导基因沉默 (Host-induced gene silencing)^[37] 技术被应用于评估专性寄生菌 (包括白粉菌和小麦条锈菌) 的基因功能^[11,38], 然而, 该方法并不适用于橡胶树白粉菌, 因为橡胶树难以转化, 不适于表达基因沉默载体。目前研究发现, 使用 SIGS 技术诱导基因沉默也是有效的^[16]。SIGS 已被应用于核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*)、禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) 及专性寄生菌瓜类白粉菌 (*Podosphaera xanthii*)^[39-40]。最近研究表明使用 SIGS 可以沉默橡胶树白粉菌 CYP5 基因, 将体外合成荧光素标记的 β -tubulin 基因 dsRNA 与白粉菌分生孢子孵育, 检测荧光发现孢子中出现荧光, 说明橡胶树白粉菌吸收了外源 dsRNA。将 CYP5 基因的 dsRNA 喷施到发病橡胶树叶片中, 发现基因表达量也下降了 40.3%–59.7%^[41], 表明 SIGS 也可用于研究橡胶树白粉菌基因功能。本研究中 CSEP00565 基因的表达量也下降了 87%, 说明 SIGS 干扰橡胶树白粉菌基因表达效果显著。

通过 qRT-PCR 分析, 发现 CSEP00565 在接种后 24 h 上调表达, 说明该蛋白可能在吸器形成阶段影响白粉菌和寄主的互作。类似地, 通过对小

麦白粉菌侵染阶段的转录组分析, 发现吸器形成阶段有大量 CSEPs 效应蛋白基因上调^[42]; 利用寄主诱导基因沉默技术干扰这些 CSEPs 基因, 导致病菌吸器形成率和扩展能力显著降低。在麦白粉菌中, 通过分离吸器组分, 也鉴定到其中富集许多效应蛋白^[43]。这些结果也揭示白粉菌效应蛋白对于侵入和定殖具有重要作用。

效应蛋白 CSEP00565 被预测含有 N 端信号肽, 通过酵母蔗糖转化酶分泌实验验证该信号肽具有引导蛋白分泌功能, 因此 CSEP00565 属于经典分泌型蛋白 (依赖内质网—高尔基体分泌途径)。此外, 有一些分泌蛋白不含有信号肽, 可能通过非经典途径分泌。有的非经典分泌型效应蛋白, 也在植物与病原互作中发挥重要作用。如大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*) 和大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 的 ISC 类型效应蛋白^[5]、橡胶树白粉菌 EqCmu^[15]。

在下一步研究中, 将分析效应蛋白转运至植物中的定位和所干扰的免疫信号途径, 开发将 CSEP00565 作为靶点的 SIGS 技术, 为发展病害防控策略提供理论支撑。

参考文献:

- [1] BERTHELOT K, PERUCH F, LECOMTE S. Highlights on *Hevea brasiliensis* (pro) hevein proteins[J]. *Biochimie*, 2016, 127: 258–270.
- [2] 刘锐金, 刘东, 莫业勇. 海南省天然橡胶边境保护和产业政策研究[J]. *南海学刊*, 2023, 9(2): 80–89.
- [3] 郭刚, 黄华孙, 张伟算, 等. 几种橡胶新品系对白粉病的抗性初步评价[J]. *华南热带农业大学学报*, 2000, 6(4): 5–9.
- [4] 刘静. 橡胶树白粉病的研究进展[J]. *热带农业科技*, 2010, 33(3): 1–5.
- [5] LIU T L, SONG T Q, ZHANG X, et al. Unconventionally secreted effectors of two filamentous pathogens target plant salicylate biosynthesis[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 4686.
- [6] JONES L, RIAZ S, MORALES-CRUZ A, et al. Adaptive genomic structural variation in the grape powdery mildew pathogen, *Erysiphe necator*[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15(1): 1081.
- [7] SPANU P D, ABBOTT J C, AMSELEM J, et al. Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism[J]. *Science*, 2010, 330(6010): 1543–1546.
- [8] WICKER T, OBERHAENSLI S, PARLANGE F, et al. The wheat powdery mildew genome shows the unique evolution of an obligate biotroph[J]. *Nature Genetics*, 2013, 45(9): 1092–1096.
- [9] PEDERSEN C, VER LOREN VAN THEMAAT E,

- MCGUFFIN L J, et al. Structure and evolution of barley powdery mildew effector candidates[J]. *BMC Genomics*, 2012, 13: 694.
- [10] ZHANG W J, PEDERSEN C, KWAAITAAL M, et al. Interaction of barley powdery mildew effector candidate CSEP0055 with the defence protein PR17c[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(9): 1110 – 1119.
- [11] PLIEGO C, NOWARA D, BONCIANI G, et al. Host-induced gene silencing in barley powdery mildew reveals a class of ribonuclease-like effectors[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26(6): 633 – 642.
- [12] AHMED A A, PEDERSEN C, SCHULTZ-LARSEN T, et al. The barley powdery mildew candidate secreted effector protein CSEP0105 inhibits the chaperone activity of a small heat shock protein[J]. *Plant Physiology*, 2015, 168(1): 321 – 333.
- [13] LIANG P, LIU S Y, XU F, et al. Powdery mildews are characterized by contracted carbohydrate metabolism and diverse effectors to adapt to obligate biotrophic lifestyle[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 3160.
- [14] LI X, LIU Y H, HE Q G, et al. A candidate secreted effector protein of rubber tree powdery mildew fungus contributes to infection by regulating plant ABA biosynthesis[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 591387.
- [15] HE Q G, LIU Y, LIANG P, et al. A novel chorismate mutase from *Erysiphe quercicola* performs dual functions of synthesizing amino acids and inhibiting plant salicylic acid synthesis[J]. *Microbiological Research*, 2021, 242: 126599.
- [16] VETUKURI R R, DUBEY M, KALYANDURG P B, et al. Spray-induced gene silencing: an innovative strategy for plant trait improvement and disease control[J]. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 2021, 21(S1): e387921S11.
- [17] YIN W X, WANG Y F, CHEN T, et al. Functional evaluation of the signal peptides of secreted proteins[J]. *Bio-protocol*, 2018, 8(9): e2839.
- [18] 董林朋, 殷金瑶, 赵文渊, 等. 启动子 WY172 和 WY195 在暹罗炭疽菌中的活性研究[J]. *热带生物学报*, 2023, 14(5): 506 – 513.
- [19] 聂雪纯, 李思鹏, 刘玉涵, 等. 橡胶树 HbLFG2 蛋白对植物免疫防卫的调控机理[J]. *热带生物学报*, 2023, 14(4): 380 – 388.
- [20] 张悦婧, 李颖, 王娟娟, 等. 不同转化条件对 3 种农杆菌 GFP 基因在本氏烟草中瞬时表达的影响[J]. *植物研究*, 2022, 42(1): 121 – 129.
- [21] KAMOUN S. Extracellular protein elicitors from *Phytophthora*: host-specificity and induction of resistance to bacterial and fungal phytopathogens[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1993, 6(1): 15.
- [22] BONNET P, BOURDON E, PONCHET M, et al. Acquired resistance triggered by elicitors in tobacco and other plants[J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1996, 102(2): 181 – 192.
- [23] 齐雯雯, 宫晓琳, 王洋, 等. 蘸花法在植物遗传转化上的应用研究进展[J]. *现代农业科技*, 2014(24): 9 – 10.
- [24] GIETZ R D. Yeast transformation by the LiAc/SS carrier DNA/PEG method[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1205: 1 – 12.
- [25] COUTO D, ZIPFEL C. Regulation of pattern recognition receptor signalling in plants[J]. *Nature Reviews Immunology*, 2016, 16(9): 537 – 552.
- [26] WAN W L, FRÖHLICH K, PRUITT R N, et al. Plant cell surface immune receptor complex signaling[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2019, 50: 18 – 28.
- [27] MENARDO F, PRAZ C R, WICKER T, et al. Rapid turnover of effectors in grass powdery mildew (*Blumeria graminis*) [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2017, 17(1): 223.
- [28] ZHANG Y F, YIN Z Y, PI L, et al. A *Nicotiana benthamiana* receptor-like kinase regulates *Phytophthora* resistance by coupling with BAK1 to enhance elicitor-triggered immunity[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2023, 65(6): 1553 – 1565.
- [29] XU Q, TANG C L, WANG X D, et al. An effector protein of the wheat stripe rust fungus targets chloroplasts and suppresses chloroplast function[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 5571.
- [30] ZHAO M X, WANG J F, JI S, et al. Candidate effector Pst_8713 impairs the plant immunity and contributes to virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* [J]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 1294.
- [31] JIANG C, HEI R, YANG Y, et al. An orphan protein of *Fusarium graminearum* modulates host immunity by mediating proteasomal degradation of TaSnRK1α[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 4382.
- [32] NÜHSE T S, PECK S C, HIRT H, et al. Microbial elicitors induce activation and dual phosphorylation of the *Arabidopsis thaliana* MAPK 6[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(11): 7521 – 7526.
- [33] LI L, LI M, YU L P, et al. The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity[J]. *Cell Host & Microbe*, 2014, 15(3): 329 – 338.
- [34] KAKU H, NISHIZAWA Y, ISHII-MINAMI N, et al. Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(29): 11086 – 11091.
- [35] MIYA A, ALBERT P, SHINYA T, et al. CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis* [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007, 104(49): 19613 – 19618.
- [36] ZHOU J M, ZHANG Y L. Plant immunity: danger perception and signaling[J]. *Cell*, 2020, 181(5): 978 – 989.
- [37] KOCH A, WASSENEGGER M. Host-induced gene silencing—mechanisms and applications[J]. *New Phytologist*, 2021, 231(1): 54 – 59.
- [38] ZHU W J, WEI W, WU Y Y, et al. BcCFEM1, a CFEM domain-containing protein with putative GPI-anchored site, is involved in pathogenicity, conidial production, and stress tolerance in *Botrytis cinerea* [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1807.
- [39] RUIZ-JIMÉNEZ L, POLONIO Á, VIELBA-FERNÁNDEZ A, et al. Gene mining for conserved, non-annotated proteins of *Podosphaera xanthii* identifies novel

- target candidates for controlling powdery mildews by spray-induced gene silencing[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(9): 735.
- [40] QIAO L L, LAN C, CAPRIOTTI L, et al. Spray-induced gene silencing for disease control is dependent on the efficiency of pathogen RNA uptake[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2021, 19(9): 1756 – 1768.
- [41] CAO X R, HAN Q H, WEST J S. Spray-induced gene silencing as a potential tool to control rubber tree powdery mildew disease[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2024, 129: 102182.
- [42] HACQUARD S, KRACHER B, MAEKAWA T, et al. Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and conservation of transcriptional programs in divergent hosts[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(24): E2219 – E2228.
- [43] GODFREY D, ZHANG Z G, SAALBACH G, et al. A proteomics study of barley powdery mildew haustoria[J]. *Proteomics*, 2009, 9(12): 3222 – 3232.

Screening of effector protein *CSEP00565* of *Erysiphe quercicola* and preliminary analysis of its mechanism

LIU Lijuan[#], LIU Yuhan, FANG Yuxiao, SHAN Jiabin, ZUO Minghao, MIAO Weiguo*, LI Xiao*

(School of Tropical Agriculture and Forestry/Ministry of Education Key Laboratory of Green Prevention and Control of Biological Pests of Tropical Plants, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China)

Abstract: The rubber tree (*Hevea brasiliensis*) is an important economic crop in tropical areas of China, and its related industries play an important role in the local agricultural economy. The powdery mildew fungus *Erysiphe quercicola* is the most severe disease infecting *H. brasiliensis*. The effector proteins secreted by phytopathogenic microbes play important roles in the pathogenesis, but how effector proteins promote the infection by *E. quercicola* is less documented, which has limited disease resistance breeding programme and disease control strategies. The *E. quercicola* has 24 highly conserved candidate effector proteins, which has homologous in many other powdery mildews. It is possible that these proteins are required for the pathogenicity of powdery mildew. In order to find the important virulence factor among the 24 CSEPs, two conserved effector proteins were selected for functional analysis and found that only the effector *CSEP00565* suppressed hypersensitive responses induced by *Phytophthora infestans* *INF1* when these effectors were expressed in *Nicotiana benthamiana*. The effector *CSEP00565* suppressed callose deposition induced by fungal chitin and bacteria flg22 when this effector was expressed in *Arabidopsis thaliana*, further supporting that *CSEP00565* has a function to inhibit plant immunity. When *CSEP00565* was further silenced by using spray-induced gene, the pathogenicity of the fungus significantly decreased. And the expression level of *CSEP00565* was up-regulated at the haustorium formation stage (24 h) after inoculation with *E. quercicola*. Further research has discovered that the signal peptide of *CSEP00565* possesses the activity of direct protein secretion. All these results indicate that *CSEP00565* is a key virulence factor in promoting the infection by *E. quercicola*, which is conducive to understanding of the molecular mechanisms underlying *H. brasiliensis*-*E. quercicola* interaction.

Keywords: powdery mildew; effector proteins; plant immunity

(责任编辑: 钟云芳)