研 究 报 告
Research Reports

稻瘟病菌效应蛋白 MoIEEP1 功能初探

张茜茜， 刘文德*， 李智强*

（中国农业科学院植物保护研究所，北京 100193）

摘要 由稻瘟病菌引起的稻瘟病是全球最严重的植物真菌病害之一，严重威胁水稻生产安全。效应蛋白是病原菌与植物对抗过程中分泌产生的一种蛋白质，可作为毒力因子促进侵染或作为无毒因子触发防御反应。本研究对实验室前期筛选到的在稻瘟病菌侵染早期诱导表达的效应蛋白（infection-induced expression effector protein 1，MoIEEP1）进行了功能验证与分析。结果表明：*MoIeep*1 在稻瘟病菌侵染初期 8 h 表达量最高；信号肽和亚细胞定位分析验证该蛋白 N 端含有 17 个氨基酸的信号肽且在水稻原生质体中呈明亮点状的定位信号，初步推测该定位信号为过氧化物酶体或线粒体等细胞器；与野生型菌株 Guy11 相比，*MoIeep*1 基因敲除突变体菌丝生长无明显差异，但其致病性受到影响。以上研究结果为进一步探究该蛋白质的作用机理打下良好基础，也为揭示其他效应蛋白在稻瘟病菌侵染水稻过程中的功能提供新的理论依据。

关键词 稻瘟病菌； 诱导表达； 效应蛋白

中图分类号： S 435.111.41 **文献标识码：** A **DOI：** 10.16688/j.zwbh.2020118

Functional analysis of MoIEEP1 effector in *Magnaporthe oryzae*

ZHANG Xixi， LIU Wende*， LI Zhiqiang*

（*Institute of Plant Protection*，*Chinese Academy of Agricultural Sciences*，*Beijing* 100193，*China*）

Abstract Rice blast disease caused by *Magnaporthe oryzae* is one of the most severe plant fungal diseases in the world and seriously threatens the safety of rice production. The effectorsis a type of protein secreted by the pathogen in the process of fighting against plants. It can be used as a virulence factor to promote infection or a non-toxic factor to trigger defense response. In this study, we performed a functional screening and analysis of an effector (infection-induced expression effector protein 1, MoIEEP1) that is specifically expressed during the early infection stage of *M. oryzae*. The results showed that *MoIeep*1 had the highest expression at 8 h in the early infection stage of *M. oryzae*; signal peptide and subcellular localization analysis verified that MoIEEP1 contained a 17-amino acid signal peptide at the N-terminus and showed a bright spot-like localization signal in rice protoplasts. It was presumed that the localization was in peroxisome or mitochondria. Compared with the wild-type strain Guy11, *MoIeep*1 knockout mutants showed no significant difference in mycelium growth, but affected its pathogenicity. These results established the foundation for further exploring the functional mechanism of this protein, and also provide a new theoretical basis for revealing the function of other effectors during the process of rice blast infection by *M. oryzae*.

Key words *Magnaporthe oryzae*； induced expression； effector

水稻是最重要的粮食作物之一，供养着全世界 50%以上的人口。然而，由稻瘟病菌引起的水稻全生育期病害极其严重且难以控制。研究显示，稻瘟病造成的水稻年均减产量可大约供给 6 000 万人口的稻米需求[1]。稻瘟病菌无性态为灰梨孢 *Pyricularia oryzae* Sacc，属半知菌亚门，丛梗孢纲，丛梗孢目，丛梗孢科，梨形孢属；有性态为 *Magnaporthe oryzae* Barr Yaegash，子囊菌亚门。其侵染阶段分为：首先，在适宜温湿度条件下，稻瘟病菌分生孢子梗产生分生孢子，作为侵染循环的接种体；其次，借助空气和风雨的传播，分生孢子利用尖端的黏液附着在植物组织表面，2 h 后萌发形成芽管，8 h 后特异性分化产

收稿日期： 2020-03-10 **修订日期：** 2020-04-27
基金项目： 国家自然科学基金青年科学基金(31701750)；中国博士后科学基金(2018T110165)
* 通信作者 E-mail：刘文德 wendeliu@126.com；李智强 zhiqiangdo_771@163.com

生附着胞;成熟的附着胞随即形成侵染钉穿透植物表皮细胞,侵入植物体内;最后,稻瘟病菌菌丝在寄主细胞内和组织间生长,并在侵染 4～5 d 后形成病斑,寄主细胞死亡。空气湿度较高的情况下,稻瘟病菌侵染菌丝再次产生分生孢子梗和分生孢子,形成新一轮侵染循环,造成病害的不断产生与扩散[2]。自稻瘟病菌全基因组测序完成以来,已有上百个基因被预测并证明可能与稻瘟病菌的致病性相关[3]。如敲除稻瘟病菌 *MoDuo*1 基因后,发现其突变体分生孢子发育异常,营养菌丝生长减缓,致病力明显减弱[4]。有些基因则与稻瘟病菌附着胞和侵染钉的形成有关,如 *Pmk*1、*MoMSB*2、*MoSHO*1、*Con*1 等,进而影响其致病性[5]。因此,稻瘟病菌致病相关基因及其与水稻的互作研究是寻找新的防病途径的关键,具有重要的科学意义和实践价值。

为了顺利侵入寄主植物,病原菌需要经历一系列形态和生理变化,其中包括抑制或克服植物免疫系统,扰乱寄主新陈代谢和信号传导,促进其自身生长。相应地,植物体内进化出一套相对完善的防御系统[6]。该系统包括两个层面。第一是植物细胞表面模式识别受体识别保守的病原菌相关分子模式(PAMP)激发植物基础防卫反应 PTI(PAMP-triggered immunity);第二是植物抗病蛋白直接或间接识别病原菌分泌的效应蛋白产生的更强烈的免疫防卫反应 ETI(Effector-triggered immunity)[7],通常在侵染位点引起寄主细胞死亡。在植物和病原菌激烈的"军备竞赛"中,PTI 是寄主植物先天免疫的基础防线。寄主植物模式识别受体识别到鞭毛蛋白、碳水化合物、脂质和小分子等病原菌相关分子模式即可抵御病原菌侵染[8]。随之病原菌协同进化出多种途径直接或间接抑制植物 PTI 反应,其中最重要的是通过分泌效应蛋白干扰免疫反应[9]。大多数真菌效应蛋白 N 端具有信号肽,利用内质网—高尔基体蛋白分泌系统分泌到细胞外基质,或被转运至植物细胞特定空间发挥作用[10]。基因组、转录组和蛋白质组等相关生物技术的不断发展,使越来越多与水稻互作的稻瘟病菌效应蛋白先后被鉴定。稻瘟病菌 *Slp*1 基因编码一个具有分泌功能的 LysM 效应蛋白,通过与水稻模式识别受体几丁质激发子结合蛋白(CEBIP)竞争结合几丁质,抑制植物免疫反应[11]。AVR-PITA 和 PWL2 含有分泌信号肽且在真菌侵入、定殖和晚期感染过程中特异表达[2]。*ace*1 是已克隆无毒基因中唯一编码非分泌蛋白的基因,控制合成一种次生代谢物,侵染水稻时特异性积累在附着胞细胞质中[12]。

鉴定更多的稻瘟病菌效应蛋白并明确其在寄主细胞中的可能作用位置及其致病性不仅是当前研究"水稻-稻瘟病菌"分子互作机制的热点内容,而且对稻瘟病防治及培育抗性品种等工作具有极其重要的意义。前期研究中,本实验室应用 RL-SAGE、MPSS 与 SBS 转录组高通量分析技术,检测到 *MoIeep*1 分泌蛋白基因在稻瘟病菌侵染寄主植物时诱导表达[13]。为进一步了解该基因的功能,本文对 MoIEEP1(MGG_00083)蛋白的预测信号肽进行了分析与功能验证,亚细胞定位分析与验证了该蛋白的定位,并构建该基因的敲除突变体,解析其生长表型与致病性,为进一步研究该效应蛋白的功能奠定了基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

水稻品种为'日本晴'和'CO39'。稻瘟病菌菌株为 Guy11,农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株为 EHA105,克隆菌株为大肠杆菌 *Escherichia coli* 菌株 DH5α 和 JM109,酵母突变体菌株为 YTK12。试验用载体为用于信号肽验证的 pSUC2 和用于水稻亚细胞定位的 pYBA1132,以上试验材料均由本实验室保存。用于酵母菌培养的 SD/-T 培养基、蔗糖培养基、YPD 培养基的配制参考文献[14]。

1.2　试验方法

1.2.1　效应蛋白基因克隆与载体构建

根据真菌数据库(https://fungidb.org/fungidb/)中 *MoIeep*1(Gene ID: MGG_00083)基因编码区(CDS)序列信息,采用 Primer Premier 5.0 软件设计包含全长开放阅读框(full length,FL)和不含预测信号肽的截短编码区(no signal peptide,NS)目的基因引物,正反向引物前端加上合适的酶切位点及同源序列,用于载体构建;以稻瘟病菌菌株 Guy11 菌丝 cDNA 为模板,PCR 扩增目的基因并进行琼脂糖凝胶检测和纯化回收;对 pSUC2 和 pYBA1132 载体相应酶切位点进行双酶切,胶回收后分别与 *MoIeep*1 基因不同片段重组连接并转化至大肠杆菌感受态细胞中,挑取适量单克隆菌落进行 PCR 筛选和测序验证;确认序列准确的单菌落经扩大培养后提取质粒,−20℃保存备用。引物合成和测序由北京擎科生物技术公司完成。

1.2.2 效应蛋白转录分析

参照吴立叶等[15]的稻瘟病菌菌丝和孢子样品收集方法，获得 Guy11 新鲜菌丝和孢子样品，液氮速冻，−80℃保存备用。喷雾接种法将 Guy11 分生孢子接种于生长 1 周的大麦叶片背面，分别在接种后 2 h(芽管形成阶段)、8 h(附着胞形成阶段)、18、24、42 h 撕取叶片下表皮，液氮速冻，−80℃保存备用。

TRIzol 法提取稻瘟病菌 Guy11 菌丝、孢子及不同侵染时期大麦样品总 RNA，获得的总 RNA 用全式金生物公司 RNA 反转录试剂盒合成 cDNA 作为荧光定量 PCR(qRT-PCR)模板。本试验使用引物见表 1。内参基因 *MoActin*(MGG_03982)作为对照，基因表达量用相对阈值法($2^{-\Delta\Delta CT}$)计算，软件 GraphPad Prism 5 分析并作图。

表 1 稻瘟菌效应蛋白功能分析所用引物[1)]

Table 1 Primers for functional analysis of effector protein

引物名称 Primer	引物序列(5′-3′) Sequence of primer	备注 Remark
Actin-qF	TGACGTCCGAAAGGATCTGT	内参基因 CDS 特异区段正向引物
Actin-qR	CCTGCTTCGAGATCCACATC	内参基因 CDS 特异区段反向引物
MoIEEP1-QF	ATGAACGGAGACGGAGCC	目的基因 CDS 特异区段正向引物
MoIEEP1-QR	TCGCTAAACATGTCCTTGGC	目的基因 CDS 特异区段反向引物
pSUC2_ MoIEEP1_FL-F	CGGAATTTTAATTAAGAATTCATGAGATTCGAGACTCTGA	目的基因 CDS 全长克隆到 pSUC2 载体正向引物
pSUC2_ MoIEEP1_NS-F	CGGAATTTTAATTAAGAATTCATGGTCCCCATGAACGGAG	目的基因 CDS 去信号肽克隆到 pSUC2 载体正向引物
pSUC2_ MoIEEP1-R	CACTATAGGGAGAACCTCGAGGAACATGGCGGGCAGCCTG	目的基因 CDS 克隆到 pSUC2 载体反向引物
pYBA1132_ MoIEEP1_FL-F	CGCTCTAGAACTAGTGGATCCATGAGATTCGAGACTCTGATC	目的基因 CDS 全长克隆到 pYBA1132 载体正向引物
pYBA1132_ MoIEEP1_NS-F	CGCTCTAGAACTAGTGGATCCATGGTCCCCATGAACGGAG	目的基因 CDS 去信号肽克隆到 pYBA1132 载体正向引物
pYBA1132_ MoIEEP1-R	GATAAGCTTGATATCGAATTCGAACATGGCGGGCAGCCT	目的基因 CDS 克隆到 pYBA1132 载体反向引物
HYG-F	CTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGT	目的基因敲除第一轮 PCR 扩增 *hyg* 基因正向引物
HYG-R	CCCGGTCGGCATCTACTCTATTC	目的基因敲除第一轮 PCR 扩增 *hyg* 基因反向引物
LBCK	CGACGAGCGAATAAA	目的基因敲除第一轮 PCR 扩增上游 LB 正向引物
LB-R	ACCTCCACTAGCTCCAGCCAACGTACACGCACAACC	目的基因敲除第一轮 PCR 扩增上游 LB 反向引物
RB-F	GAATAGAGTAGATGCCGACCGGGCTTTGTTTCTTGTTTCGTC	目的基因敲除第一轮 PCR 扩增下游 RB 正向引物
RBCK	TTGCTGCCTTTCTGC	目的基因敲除第一轮 PCR 扩增下游 RB 反向引物
HYG-F1	GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCT	目的基因敲除第二轮 PCR 扩增 YG+RB 融合基因正向引物
HYG-R1	GTATTGACCGATTCCTTGCGGTCCG	目的基因敲除第二轮 PCR 扩增 LB+HY 融合基因反向引物
LB-F	CCAGCCGAAACAGAT	目的基因敲除第二轮 PCR 扩增 LB+HY 融合基因正向引物
RB-R	AGGCGTGCCATTCTC	目的基因敲除第二轮 PCR 扩增 YG+RB 融合基因反向引物
H708	GCCGTGGTTGGCTTGTAT	目的基因敲除突变体 DNA 鉴定潮霉素正向引物
H853	ACAGACGTCGCGGTGAGTT	目的基因敲除突变体 DNA 鉴定潮霉素反向引物
MoIEEP1-UA	ATGCATAACAGCTTGTGGCTAGAC	目的基因敲除突变体 DNA 鉴定基因上游正向引物
MoIEEP1-DB	CAGTTCGTGGCCACAGAGC	目的基因敲除突变体 DNA 鉴定基因下游反向引物
MoIEEP1-NF	ATGAACGGAGACGGAGCC	目的基因敲除突变体 DNA/RNA 鉴定基因内部正向引物
MoIEEP1-NR	TCGCTAAACATGTCCTTGGC	目的基因敲除突变体 DNA/RNA 鉴定基因内部反向引物

1) F 代表正向引物，R 代表反向引物，*hyg* 代表潮霉素基因，LB 代表目的基因上游片段，RB 代表目的基因下游片段，HY 代表潮霉素基因前 2/3 段，YG 代表潮霉素基因后 2/3 段；引物中的下划线序列代表添加的限制性内切酶的酶切位点序列。*Eco*R Ⅰ：GAATTC，*Xho* Ⅰ：CTCGAG，*Bam*H Ⅰ：GGATCC。

F represents forward primers, and R represents reverse primers, *hyg* represents hygromycin gene, LB represents the upstream fragment of the target gene, RB represents the downstream fragment of the target gene, HY represents the first 2/3 segment of hygromycin, YG represents the last 2/3 segment of hygromycin; The underlined sequence in the primer represents the restriction site. *Eco*R Ⅰ: GAATTC; *Xho* Ⅰ: CTCGAG; *Bam*H Ⅰ: GGATCC.

1.2.3 效应蛋白生物信息学分析

利用 Signal P(http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0/)在线平台预测 MoIEEP1 氨基酸序列信号肽的有无和具体位置；WoLF PSORT(https://wolfpsort.hgc.jp/)在线平台预测 MoIEEP1 在植物中的亚细胞定位。网站预测过程中，均需首先输入 MoI-

EEP1 氨基酸序列 Fasta 格式，信号肽分析选择“Organism group”为“Eukarya”，亚细胞定位分析选择相应物种类型为“Plant”，然后直接提交即可获得预测结果。

1.2.4 效应蛋白信号肽验证

LiAc 法[16]制备酵母突变体菌株 YTK12 感受态细胞，并将构建好的含有目的基因 *MoIeep1* 的 pSUC2 载体质粒进行转化。挑取转化成功的酵母单克隆于 SD/-T 液体培养基中，28℃，180 r/min 过夜培养。当 OD_{600} 达到 0.8 时，菌液稀释 1 000 倍划线于蔗糖筛选培养基上，观察酵母菌株在培养基上的生长情况。

1.2.5 效应蛋白亚细胞定位验证

高渗透压下，利用以纤维素酶和果胶酶为主要成分配制的酶解液消化生长 10 d 的‘日本晴’水稻黄化苗细胞壁，使之结构松散破坏；随后移除酶解液，用普通渗透压，浓度为 0.6 mol/L 的缓冲液使细胞吸水，原生质体冲破细胞壁释放出来，离心收集原生质体。再将构建好的含有目的基因 *MoIeep1* 的 pYBA1132 载体质粒转化到水稻原生质体中，光照培养箱 28℃，L//D=12 h//12 h 条件下孵育 48 h 后，激光共聚焦显微镜观察。

1.2.6 *MoIeep1* 基因敲除突变体的构建

依据改进的 Split PCR[17]方法进行目的基因敲除。首先根据稻瘟病菌 *MoIeep1* 基因组 DNA 序列信息，设计两轮 PCR 扩增引物；然后以稻瘟病菌 Guy11 基因组 DNA 为模板，LBCK/LB-R 和 RB-F/RBCK 两对引物，分别扩增目的基因上游 LB 片段和下游 RB 片段，并以 pCX62 载体为模板，HYG-F/HYG-R 扩增完整潮霉素(HYG)基因；再分别以片段 LB 和 HYG 共同作为模板，LB-F 和 HYG-R1 为引物，扩增出片段 LB+HY，以片段 RB 和 HYG 共同作为模板，HYG-F1 和 RB-R 为引物，扩增出片段 YG+RB；最后将两个 DNA 融合片段共同转化至稻瘟病菌 Guy11 原生质体；用含有潮霉素抗性的培养基筛选转化子并进行 DNA 和 RNA 水平的验证，最终获得阳性敲除菌株。

1.2.7 *MoIeep1* 突变体生长表型分析

用孔径 6 mm 打孔器从生长一周左右的稻瘟病菌野生型菌株 Guy11 和 2 个 *MoIeep1* 敲除突变体菌落边缘取同等大小的菌块，同时接种于完全培养基(CM)正中央，28℃黑暗培养 7 d 后观察菌落生长形态并测量菌落直径。

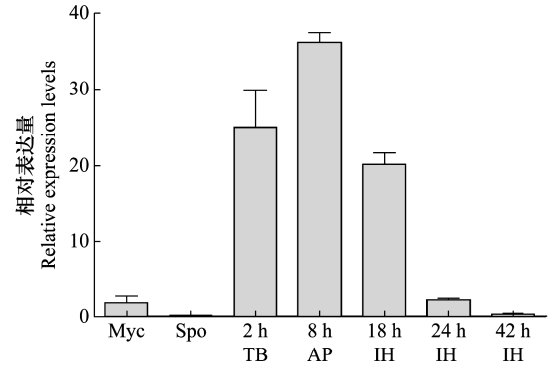
1.2.8 *MoIeep1* 突变体致病力检测

稻瘟病菌野生型菌株 Guy11 和突变体菌株于 25℃养菌室暗培养 3 d 后恢复光照，7～10 d 后产生大量孢子。用 0.05%的 Tween-20 水溶液洗下分生孢子，并调整孢子悬浮液浓度为 1.5×10^5 个/mL，再均匀喷施在三叶一心期‘CO39’水稻叶片上，避免孢子悬浮液液滴凝聚，影响接种效果。接种后于植物光照培养箱中 26～28℃，覆膜黑暗保湿培养 24 h，然后恢复正常光照，温度不变，光照和黑暗各 12 h，湿度为 80%～90%，7 d 后调查病情并统计病斑密度。即统计叶片上一定面积的病斑数，计算不同病原菌接种后的平均病斑数(个/cm^2)。

2 结果与分析

2.1 稻瘟病菌效应蛋白基因 *MoIeep1* 转录分析

稻瘟病菌侵染水稻过程中，黏附在水稻表面的分生孢子先产生芽管，再逐渐分化出一种特殊的圆顶状休眠结构——附着胞，附着胞通过积累高浓度的相容性溶质产生巨大的膨压，细胞膨压再转换成机械动力，促使侵染钉穿透叶角质和表皮细胞壁。稻瘟病菌侵染早期表达的效应蛋白更有可能与致病性相关。我们利用 qRT-PCR 技术，验证了稻瘟病菌 *MoIeep1* 在不同生长和侵染时期的表达水平。如图 1 所示，*MoIeep1* 在侵染初期 8 h(附着胞形成阶段)表达量最高，而在菌丝、孢子等营养生长阶段表达量较低，侵染寄主 8 h 后的表达量呈逐渐降低趋势。推测该基因可能在稻瘟病菌被寄主植物识别或进行活体营养侵染阶段发挥重要作用。



Myc: 菌丝; Spo: 孢子; TB: 芽管; AP: 附着胞; IH: 侵染菌丝
Myc: Mycelium; Spo: Spore; TB: Tube; AP: Appressorium; IH: Invasive hypha

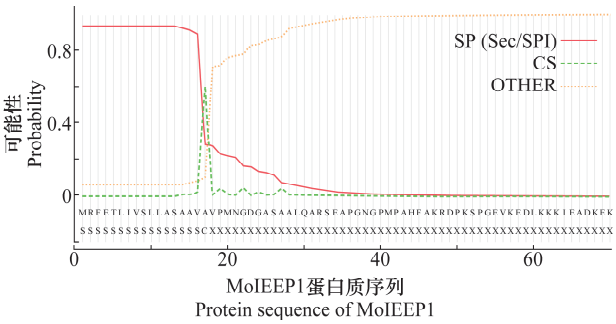
图 1 *MoIeep1* 在稻瘟病菌不同生长和侵染时期的表达量分析

Fig. 1 Expression analysis of *MoIeep1* in different growth and infection stages of *Magnaporthe oryzae*

2.2 稻瘟病菌效应蛋白 MoIEEP1 信号肽分析与验证

信号肽是真菌效应蛋白 N 端的一段氨基酸序列，使效应蛋白在病原菌入侵寄主植物时具有分泌性。首先利用 Signal P 在线分析软件预测了 MoIEEP1 蛋白的信号肽，结果表明，该蛋白 N 端氨基酸序列具有

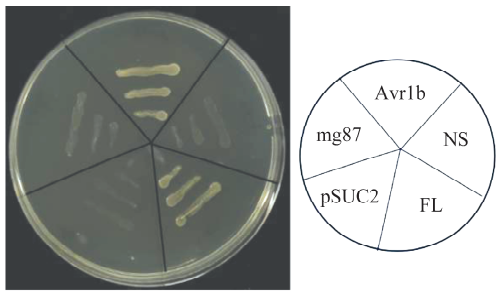
信号肽，且其信号肽切割位点为 17/18（图 2）。随后构建了 2 个 *MoIeep*1 基因的 pSUC2（含蔗糖转化酶基因）转化质粒并分别转化到酵母突变体菌株 YTK12 中。YTK12 菌株不含蔗糖转化酶基因，仅能在 YPD 培养基上生长，而不能在以蔗糖为唯一碳源的筛选培养基上生长。试验结果表明（图 3），转化 Avr1b_pSUC2（阳性对照）的 YTK12 菌株能在蔗糖筛选培养基上正常生长，但含有 mg87_pSUC2（阴性对照）的 YTK12 菌株因 mg87 不具有分泌性，不能在蔗糖筛选培养基上生长。含 MoIEEP1_FL_pSUC2 序列的菌株能在蔗糖筛选培养基上生长，而含 MoIEEP1_NS_pSUC2 序列的菌株不能在蔗糖筛选培养基上生长，说明该效应蛋白含有信号肽序列，为分泌蛋白。



SP(Scc/SPI): 信号肽，取决于预测的信号肽类型; CS:剪切位点; OTHER: 预测序列不含信号肽的可能性
SP(Sec/SPI): Signal peptide, depending on what type of signal peptide is predicted; CS: The cleavage site; OTHER: The probability that the sequence does not have any kind of signal peptide

图 2 稻瘟病菌效应蛋白 MoIEEP1 信号肽预测分析

Fig. 2 Bioinformatic analysis of signal peptide of MoIEEP1 effector in *Magnaporthe oryzae*



Avr1b: 阳性对照; mg87: 阴性对照; pSUC2: 空载体; FL: 含*MoIeep*1全长序列菌株; NS: 含*MoIeep*1去信号肽截短序列菌株
Avr1b: Positive control; mg87: Negative control; pSUC2: Strain cantaining empty vector; FL: Strain containing the *MoIeep*1 full-length sequence; NS: Strain containing the *MoIeep*1 truncated coding region without the signal peptide sequence

图 3 酵母分泌试验验证 MoIEEP1 信号肽功能

Fig. 3 Yeast secretion test validates the function of MoIEEP1 signal peptide

2.3 稻瘟病菌效应蛋白 MoIEEP1 亚细胞定位分析与验证

病原菌效应蛋白在水稻细胞中的亚细胞定位与其功能的发挥密切相关。采用 WoLF PSORT[18] 软件对 MoIEEP1 蛋白进行亚细胞定位分析。该软件数据库来源于 UniProt 网站，分为真菌、植物和动物 3 个方面，各包含 2 113、2 333 和 12 771 个蛋白质。基于分类信号、氨基酸组成和功能修饰（如 DNA 结合基序），WoLF PSORT 将蛋白质氨基酸序列转换为数字定位特征，然后使用 k 近邻分类法预测其亚细胞定位。预测结果以两种方式显示：Ⅰ）与查询序列最相似定位特征的已知定位蛋白质个数；Ⅱ）关于各个已知定位蛋白的详细特征信息。如表 2、表 3 所示，该软件共筛选到 14 个 MoIEEP1 最相似定位蛋白。其中与定位在内质网、内质网和质膜、过氧化物酶体、细胞质和过氧化物酶体中的相似蛋白质个数相等且最多；其次是叶绿体和细胞外基质。所以 MoIEEP1 蛋白极

表 2 经 WoLF PSORT 软件分析 MoIEEP1 与数据库中相似定位的蛋白质数量

Table 2 Number of proteins similar to those in the database based on WoLF PSORT

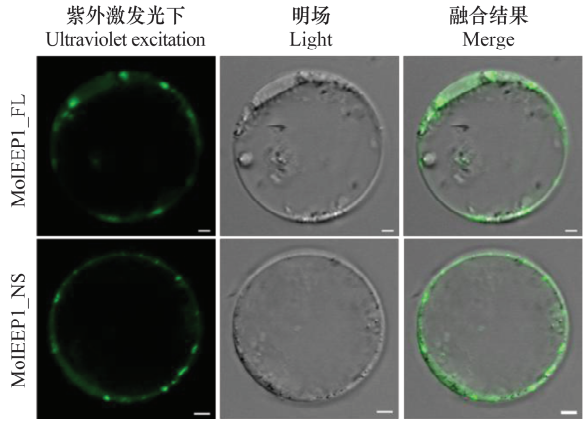
细胞器 Organelle	相似定位蛋白数量/个 Number of similar proteins
内质网 Endoplasmic reticulum	2.5
过氧化物酶体 Peroxisome	2.5
细胞质_过氧化物酶体 Cytoplasm_peroxisome	2.5
内质网_细胞膜 Endoplasmic reticulum_plasma membrane	2.5
叶绿体 Chloroplast	2
细胞外 Extracellular	2
细胞质 Cytoplasm	1.5
细胞膜 Plasma membrane	1.5
细胞核 Nucleus	1
线粒体 Mitochondrion	1

表 3 稻瘟病菌 MoIEEP1 效应蛋白亚细胞定位预测分析

Table 3 Subcellular localization prediction of MoIEEP1 effector in *Magnaporthe oryzae*

基因号 Gene code	定位 Localization	距离 Distance	一致性/% Identity
ADT_CHLRE	线粒体	331.298	12.662 3
At2g39970.1	过氧化物酶体	374.010	14.970 1
PGKY_WHEAT	细胞质	392.573	14.962 6
At5g53470.1	细胞膜	400.527	12.721 9
At4g27780.1	内质网_细胞膜	414.810	14.406 8
At1g20330.1	内质网	442.716	13.573 4
MPO1_ORYSA	细胞外	456.696	14.041 1
At5g62810.1	细胞质_过氧化物酶体	462.255	13.017 8
GSA_SOYBN	叶绿体	469.660	15.021 5
NCPR_CATRO	内质网	475.597	11.764 7
MFPA_CUCSA	过氧化物酶体	482.494	12.275 9
CKX1_MAIZE	细胞外	491.586	13.108 6
At3g12480.1	细胞核	494.620	11.745 0
CB22_ORYSA	叶绿体类囊体膜	498.674	14.433 0

有可能定位在内质网或过氧化物酶体等细胞器。激光共聚焦观察亚细胞定位结果显示：MoIEEP1 蛋白质全长或去信号肽均在水稻原生质体中呈明亮点状的定位信号，排除内质网定位，初步推测该定位信号为过氧化物酶体或线粒体等细胞器（图 4）。该结果与软件预测内容相互辅正，可信度较高。



MoIEEP1_FL: 目的基因全长序列; MoIEEP1_NS: 目的基因去信号肽截短序列; 标尺=5 μm
MoIEEP1_FL: Target gene containing the full-length sequence; MoIEEP1_NS: Target gene containing the truncated coding region without the signal peptide sequence; bar=5 μm

图 4　MoIEEP1 在水稻原生质体中的亚细胞定位

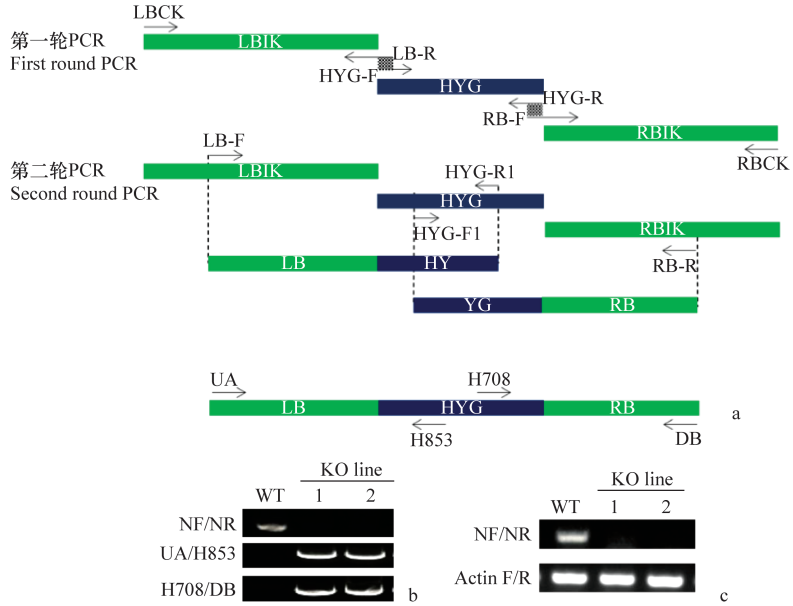
Fig. 4　Subcellular localization of MoIEEP1 in rice protoplasts

2.4　*MoIeep*1 基因敲除突变体的获得

本研究利用 Split PCR 方法构建 *MoIeep*1 基因敲除突变体。通过两轮 PCR 扩增待敲除基因两侧的同源片段分别融合部分潮霉素基因，再将两个 DNA 片段直接转化至稻瘟病菌 Guy11 原生质体，两个片段经过同源重组构成完整的潮霉素基因，进而替换目的基因，获得阳性敲除菌株（图 5a）。整个试验过程操作方便，转化效率高。潮霉素抗性培养基上筛选的阳性转化子，需分别提取菌丝 DNA 和 RNA 进一步验证。DNA 水平上，目的基因内部引物 MoIEEP1-NF/NR 和基因上下游 1.5 kb 处的正反向引物 UA/DB 与潮霉素基因的正反向引物 H708/H853 同时验证（图 5b）；RNA 水平上，仅用基因内部正反向引物鉴定即可（图 5c）。结果如图所示。本试验成功获得 2 个目的基因敲除突变体，后续试验中分别命名为 MoIEEP1-KO1、MoIEEP1-KO2。

2.5　*MoIeep*1 敲除突变体表型鉴定

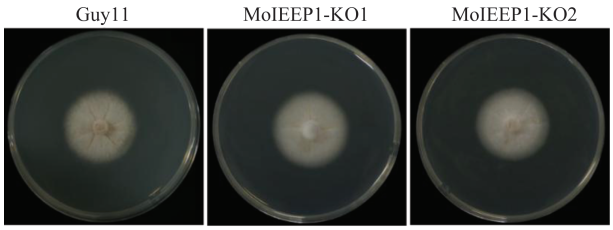
生长表型方面，稻瘟病菌野生型菌株 Guy11 和 *MoIeep*1 敲除突变体在 CM 培养基生长一周的表型如图 6 所示，突变体和野生型在菌落形态和生长速率方面无明显差异，和图 7 中菌落生长直径测量结果一致，表明 *MoIeep*1 基因可能不直接参与稻瘟病菌的营养生长过程；致病性方面，水稻叶片发病情况和病斑密度统计结果见图 8 和图 9，相比于野生型菌株，*MoIeep*1 敲除突变体致病性轻微减弱。因此，该基因可能对稻瘟病菌的致病性产生一定的影响。



a: 基因敲除突变体构建示意图; b: DNA水平验证突变体; c: RNA水平验证突变体。WT: 野生型菌株; 1~2: *MoIeep*1基因敲除突变体菌株; NF: 目的基因CDS内部正向引物; NR: 目的基因CDS内部反向引物; UA: 目的基因上游正向引物; DB: 目的基因下游反向引物; H708: 潮霉素基因内部正向引物; H853: 潮霉素基因内部反向引物; Actin F: *MoActin*内参基因正向引物; Actin R: *MoActin*内参基因反向引物
a: Schematic diagram showing the construction of knockout mutants; b: Mutant verification at DNA level; c: Mutant verification at RNA level. WT: Wild-type strain; 1–2: *MoIeep*1 gene knockout mutants; NF: Internal forward primer for the coding sequence of target gene; NR: Internal reverse primer for the coding sequence of target gene; UA: Forward primer upstream of the target gene; DB: Reverse primer downstream of the target gene; H708: Internal forward primer for *hyg* gene; H853: Internal reverse primer for *hyg* gene; Actin F: Forward primer of *MoActin* internal reference gene; Actin R: Reverse primer of *MoActin* internal reference gene

图 5　*MoIeep*1 敲除突变体的构建与验证

Fig. 5　Construction and verification of *MoIeep*1 knockout mutants



Guy11: 野生型菌株; MoIEEP1-KO1/ MoIEEP1-KO2: *MoIeep*1基因敲除突变体菌株。下同
Guy11: Wild-type strain; MoIEEP1-KO1/ MoIEEP1-KO2: *MoIeep*1 gene knockout mutants. The same applies below

图 6 稻瘟病菌 *MoIeep*1 敲除突变体菌落生长形态
Fig. 6 Growth morphology of *MoIeep*1 knockout mutants

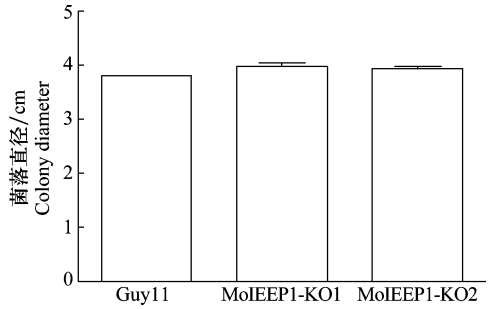


图 7 稻瘟病菌 *MoIeep*1 敲除突变体菌落生长直径
Fig. 7 Colony growth diameters of *MoIeep*1 knockout mutants

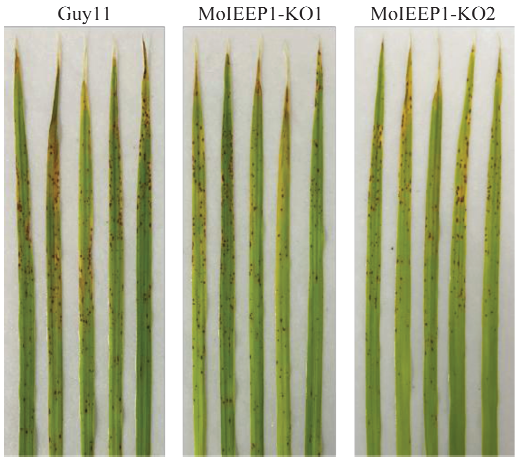


图 8 稻瘟病菌 *MoIeep*1 敲除突变体接种水稻‘CO39’后的发病情况
Fig. 8 Symptom on rice leaves of ‘CO39’ inoculated by *MoIeep*1 knockout mutants

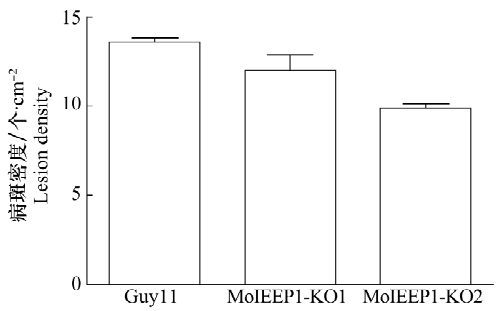


图 9 稻瘟病菌 *MoIeep*1 敲除突变体接种水稻后病斑数统计
Fig. 9 Lesion numbers of inoculated rice leaves caused by *MoIeep*1 knockout mutants

3 讨论

稻瘟病是最具破坏性的植物病害之一，每年可造成 10%～30%的产量损失，严重时甚至造成颗粒无收，俗称水稻的癌症[19]。目前，施用化学农药和培育抗性品种是防治稻瘟病的主要方法。随着生态环境建设思想的贯彻执行和人民综合素质的不断提高，化学农药的使用逐渐减少，水稻抗性品种的选育和种植成为最经济有效的措施[20]。深入了解水稻和稻瘟病菌的分子互作机制，有助于培育更加优质高效的水稻抗病品种。稻瘟病菌是最早完成全基因组测序的病原真菌。Dean 等[2]解析了稻瘟病菌实验室菌株 70－15 总长度 38.8 Mb 的序列，分析表明其含有 11 109 个预测基因，其中包含 1 032 个编码分泌蛋白的基因[21]。事实上，稻瘟病菌侵染水稻是一个复杂的过程，大量分泌蛋白参与其中。例如，稻瘟病菌 *MC*96 基因编码一个分泌蛋白。研究显示，该基因突变后，不仅会显著降低其致病性，而且会影响稻瘟病菌侵染菌丝的扩展[22]。Mosquera 等[23]研究表明，真菌侵染早期分泌的效应蛋白具有较高的研究价值。已发表的稻瘟病菌 *GAS*1 和 *GAS*2 基因在附着胞形成过程中特异表达且编码蛋白定位于细胞质，预测有信号肽，表示它们可能从附着胞移动到侵染菌丝，或运送到寄主植物细胞内发挥作用[24]；Catanzariti 等[25]还通过筛选亚麻锈菌吸器 cDNA 文库，鉴定了 21 个特异表达的分泌蛋白。因此，本研究对在稻瘟病菌侵染初期 8 h 诱导表达的 *MoIeep*1 基因进行了初步的功能鉴定和分析，期望为进一步开展该基因在后续水稻-稻瘟病菌分子互作机制研究中提供借鉴。

信号肽位于分泌蛋白的 N 端，引导分泌蛋白离开其合成所在的细胞到其他组织细胞[26]。侵染寄主植物期间，病原真菌分泌蛋白干扰寄主免疫防卫反应[27]。本研究采用酵母系统验证目的基因的信号肽。酵母是一种高效真核表达体系，本身含有较少的分泌蛋白，且酵母 *suc*2 基因编码蔗糖转换酶，可在以蔗糖为唯一碳源的筛选培养基上生长，而酵母突变体菌株 YTK12 因缺乏 *suc*2 基因，不能将蔗糖或棉籽糖转化为可直接吸收利用的单糖，因此不能在蔗糖或棉籽糖培养基上生长[28]。利用该特性，我们分别将含有全长和不含信号肽的 *MoIeep*1 基因的 pSUC2 载体（含有 *suc*2 基因）转化至 YTK12 酵母突

变体菌株感受态细胞并挑取单菌落涂板,若该基因含有信号肽,则只有含有该基因全长的 pSUC2 载体(MoIEEP1_ FL_pSUC2)可将蔗糖转换酶分泌至胞外,并把培养基中的蔗糖转化为葡萄糖或果糖,从而在蔗糖培养基上正常生长,而不含信号肽的 pSUC2 载体(MoIEEP1_NS_pSUC2)则不能在蔗糖培养基上生长。本文研究结果与该假设一致,表明 *MoIeep*1 基因的信号肽具有分泌活性,可能通过分泌到胞外执行生物学功能。

蛋白质的合成在核糖体上进行,信号肽是蛋白质的一个片段。"信号假说"认为信号肽引导核糖体定位并附着于内质网上,并使不断伸长的蛋白质链通过水溶性通道,随后信号肽被切割,合成的蛋白质被释放进内质网腔,随蛋白分泌系统转运到胞外[29]。因此,信号肽不仅与蛋白质的分泌特性相关,也与蛋白质在细胞内的定位有关。近年来,原生质体瞬时表达系统广泛应用于水稻功能基因组学研究。为进一步探究 MoIEEP1 效应蛋白在水稻细胞中的作用位点,结合在线平台 WoLF PROST 的亚细胞定位预测结果,将目的基因构建到含有绿色荧光蛋白基因的表达载体 pYBA1132 上并转化至水稻原生质体细胞,激光共聚焦观察。该方法可以保持效应蛋白的天然特性,灵敏度高,易于操作,试验周期相对较短。试验结果表明,该蛋白定位于水稻细胞的过氧化物酶体或线粒体上,初步证明 MoIEEP1 可能通过影响寄主植物过氧化物酶体或线粒体上的蛋白受体或其他抗性相关蛋白,进而调控植物抗病反应。

4　结论

本研究首先通过转录分析 *MoIeep*1 基因在稻瘟病菌野生型菌株 Guy11 菌丝、孢子和不同侵染时期的表达量,发现其在侵染初期 8 h 表达量最高;信号肽和亚细胞定位分析结果表明 MoIEEP1 N 端含有 17 个氨基酸的信号肽,为分泌蛋白且定位于水稻细胞过氧化物酶体或线粒体上;通过构建 *MoIeep*1 基因敲除突变体,证明其与稻瘟病菌野生型 Guy11 相比在生长表型方面无明显差异,但影响其致病性。因此推测该基因可能参与调控稻瘟病菌的致病性。

参考文献

[1] RAO K M. Rice blast disease [M]. Delhi: Daya Publishing House, 1994.

[2] DEAN R A, TALBOT N J, EBBOLE D J, et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* [J]. Nature, 2005, 434(7036): 980 - 986.

[3] JEON J, PARK S Y, CHI M H, et al. Genome-wide functional analysis of pathogenicity genes in the rice blast fungus [J]. Nature Genetics, 2007, 39(4): 561 - 565.

[4] PENG Haowen, FENG Youjun, ZHU Xiaohui, et al. MoDUO1, a Duo1-like gene, is required for full virulence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. Current Genetics, 2011, 57(6): 409 - 420.

[5] LIU Wende, ZHOU Xiaoying, LI Guotian, et al. Multiple plant surface signals are sensed by different mechanisms in the rice blast fungus for appressorium formation [J/OL]. PLoS Pathogens, 2011, 7(1): e1001261. DOI: 10.1371/journal.ppat.1001261.

[6] BOLLER T, FELIX G. A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors [J]. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60(1): 379 - 406.

[7] JONES J D G, DANGL J L. The plant immune system [J]. Nature, 2006, 444(7117): 323 - 329.

[8] DODDS P N, RATHJEN J P. Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions [J]. Nature Reviews Genetics, 2010, 11(8): 539 - 548.

[9] BUTTNER D. Protein export according to schedule: architecture, assembly, and regulation of type Ⅲ secretion systems from plant- and animal-pathogenic bacteria [J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2012, 76(2):262 - 310.

[10] KAMOUN S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes [J]. Annual Review of Phytopathology, 2006, 44(1): 41 - 60.

[11] MENTLAK T A, KOMBRINK A, SHINYA T, et al. Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease [J]. The Plant Cell, 2012, 24(1): 322 - 335.

[12] FUDAL I, COLLEMARE J, BOHNERT H U, et al. Expression of *Magnaporthe grisea* avirulence gene *ace*1 is connected to the initiation of appressorium-mediated penetration [J]. Eukaryotic Cell, 2007, 6(3): 546 - 554.

[13] CHEN Songbiao, SONGKUMARN P, VENU R C, et al. Identification and characterization of in planta-expressed secreted effector proteins from *Magnaporthe oryzae* that induce cell death in rice [J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2013, 26(2): 191 - 202.

[14] 谢鑫. 稻瘟菌效应蛋白 MoNLE1 的功能分析和水稻泛素化蛋白质组学研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2016.

[15] 吴立叶, 王国梁, 刘文德. 稻瘟病菌不同生长期蛋白精氨酸甲基转移酶基因的表达分析[J]. 生物技术通报, 2017, 33(6): 104 - 111.

(下转 27 页)

sues [J]. Plant Science, 1999, 147(2): 93 - 100.

[25] XING Qikai, ZHANG Wei, LIU Mei, et al. Genome-wide identification of long non-coding RNAs responsive to *Lasiodiplodia theobromae* infection in grapevine [J/OL]. Evolutionary Bioinformatics Online, 2019, 15: 1176934319841362. DOI: 10.1177/1176934319841362. eCollection 2019.

[26] JIAO Yuntong, WANG Dan, WANG Lan, et al. VqMAPKKK38 is essential for stilbene accumulation in grapevine [J/OL]. Horticulture Research, 2017, 4: 17058. DOI: 10.1038/hortres.2017.58.

[27] SRIVASTAVA A C, GANESAN S, ISMAIL I O, et al. Functional characterization of the *Arabidopsis* AtSUC2 sucrose/H+symporter by tissue-specific complementation reveals an essential role in phloem loading but not in long-distance transport [J]. Plant Physiology, 2008, 148(1): 200 - 211.

[28] SCHMITT B, STADLER R, SAUER N. Immunolocalization of solanaceous SUT1 proteins in companion cells and xylem parenchyma: new perspectives for phloem loading and transport [J]. Plant Physiology, 2008, 148(1): 187 - 199.

[29] WILLIAMS L E, LEMOINE R, SAUER N. Sugar transporters in higher plants—a diversity of roles and complex regulation [J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(7): 283 - 290.

[30] 张雅丽，孟庆勇，曲桂芹，等. 葡萄蔗糖转运蛋白在烟草中的反义表达及其对转基因烟草的影响[J]. 生物化学与生物物理进展，2006,33(7): 699 - 705.

[31] 于菲，卢江，张雅丽. 葡萄中蔗糖转运蛋白家族的序列分析及功能推测[J]. 生物信息学，2011, 9(1): 35 - 38.

[32] 袁进成，刘颖慧. 植物糖转运蛋白研究进展[J]. 中国农学通报，2013, 29(36): 287 - 294.

[33] 齐素坤，侯夫云，秦桢，等. 植物蔗糖转运蛋白研究进展[J]. 山东农业科学，2016, 48(2): 149 - 153.

[34] HUAI Baoyu, YANG Qian, QIAN Yingrui, et al. ABA-induced sugar transporter TaSTP6 promotes wheat susceptibility to stripe rust [J]. Plant Physiology, 2019, 181(3): 1328 - 1343.

[35] CORNÉ M J P, DOES D V D, ZAMIOUDIS C, et al. Hormonal modulation of plant immunity [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2012, 28(1): 489 - 521.

[36] DENANCE N, SANCHEZVALLET A, GOFFNER D, et al. Disease resistance or growth: the role of plant hormones in balancing immune responses and fitness costs [J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2013, 4: 155. DOI: 10.3389/fpls.2013.00155.

[37] BOLLER T, FELIX G. A Renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors [J]. Annual Review of Plant Biology, 2009, 60(1): 379 - 406.

（责任编辑：杨明丽）

（上接 19 页）

[16] WOOD E J. Molecular cloning: A laboratory manual [J]. Biochemical Education, 1983, 11(2): 182 - 183.

[17] LI Lianwei, CHEN Xiaolin, ZHANG Shengpei, et al. MoCAP proteins regulated by MoArk1-mediated phosphorylation coordinate endocytosis and actin dynamics to govern development and virulence of *Magnaporthe oryzae* [J/OL]. PLoS Genetics, 2017, 13(5): e1006814. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006814.

[18] PAUL H, KEUN-JOON P, TAKESHI O, et al. WoLF PSORT: protein localization predictor [J/OL]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(Web Server issue): W585 - 7. DOI: 10.1093/nar/gkm259.

[19] MADDEN L V, WHEELIS M. The threat of plant pathogens as weapons against U. S. crops [J]. Annual Review of Phytopathology, 2003, 41(1): 155 - 176.

[20] ZHANG Qifa. Strategies for developing green super rice [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2007, 104(42): 16402 - 16409.

[21] YOSHIDA K, SAITOH H, FUJISAWA S, et al. Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae* [J]. The Plant Cell, 2009, 21(5): 1573 - 1591.

[22] SAITOH H, FUJISAWA S, MITSUOKA C, et al. Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens [J/OL]. PLoS Pathogens, 2012, 8(5): e1002711. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002711.

[23] MOSQUERA G, GIRALDO M C, KHANG C H, et al. Interaction transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease [J]. The Plant Cell, 2009, 21(4): 1273 - 1290.

[24] XUE Chaoyang. Two novel fungal virulence genes specifically expressed in appressoria of the rice blast fungus [J]. The Plant Cell, 2002, 14(9): 2107 - 2119.

[25] CATANZARITI A M. Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors [J]. The Plant Cell, 2006, 18(1): 243 - 256.

[26] 郑斌，詹希美. 信号肽序列及其在蛋白质表达中的应用[J]. 生物技术通讯，2005, 16(3): 296 - 298.

[27] XIAO Xueqiong, XIE Jiatao, CHENG Jiasen, et al. Novel secretory protein Ss-Caf1 of the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* is required for host penetration and normal sclerotial development [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2014, 27(1): 40 - 55.

[28] JACOBS K A, COLLINSRACIE L A, COLBERT M, et al. A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins [J]. Gene, 1997, 198(1/2): 289 - 296.

[29] 叶方寅. 信号肽假说的提出及证实：1999 年诺贝尔生理学医学奖获得者 Günter Blobel 简介[J]. 国外医学：分子生物学分册，1999, 21(6): 377 - 379.

（责任编辑：杨明丽）