

大豆疫霉菌 *PsSed5* 编码基因转录分析及功能研究赵伟<sup>1</sup>, 迟元凯<sup>1</sup>, 汪涛<sup>1</sup>, 陈晴晴<sup>1</sup>, Ei Phyu Kyaw<sup>2</sup>, 戚仁德<sup>1\*</sup>

(1. 安徽省农业科学院植物保护与农产品质量安全研究所, 安徽合肥 230031; 2. 缅甸教育部研究与创新部生物技术研究系, 缅甸皎克西 05151)

**摘要** [目的]研究大豆疫霉菌(*Phytophthora sojae*)SNARE 家族之一的编码基因 *PsSed5* 转录及功能。[方法]利用实时定量 PCR 分析 *PsSed5* 在大豆疫霉不同生活史及侵染时间段的转录, 利用 PEG 介导的原生质体稳定转化法, 将该基因沉默后分析沉默转化子的表型。[结果] *PsSed5* 是组成性表达, 在侵染早期表达量较高, *PsSed5* 的 2 个沉默转化子菌丝生长减慢, 致病力减弱。[结论] *PsSed5* 在大豆疫霉的生长发育及致病性方面都发挥着重要的调控作用。

**关键词** 大豆疫霉; SNARE; *PsSed5*; 基因沉默

中图分类号 S188 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2018)08-0105-03

**Transcriptional Analysis and Functional Study of *PsSed5* Gene of *Phytophthora sojae*****ZHAO Wei, CHI Yuan-kai, WANG Tao et al** (Institute of Plant Protection and Product Quality and Safety, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei, Anhui 230031)

**Abstract** [Objective] To analyze the transcription and the gene function of *PsSed5*, one of the SNARE proteins in *Phytophthora sojae*. [Method] Using the real-time PCR analyzed the *PsSed5* expression in different developmental and infection stages. Using the PEG-mediated DNA transformation obtained the *PsSed5* silencing transformants to research its phenotype. [Result] The *PsSed5* is constitutively expressed during various life stages and the course of infection, with the relatively highest expression levels in early infection, while the hypha from the silencing transformants growth slowly with weak pathogenicity. [Conclusion] The results show that *PsSed5* is important for growth and contributes to the full virulence of *P. sojae*.

**Key words** *Phytophthora sojae*; SNARE; *PsSed5*; Gene silencing

大豆疫病是由大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)引致的大豆毁灭性病害之一, 在大豆不同生育时期均能发病, 给大豆产业带来严重威胁。植物病原菌若要成功侵染寄主, 必须破坏寄主植物的系列防卫反应系统, 而寄主植物在感知病原菌侵染后, 会产生主动的防卫反应, 以达到破坏寄主侵入的目的。在这种漫长的相互斗争、克制与反克制过程中, 病原菌进化出了复杂的侵染机制。病原菌通常使用某种毒性策略, 如通过分泌一系列的外泌蛋白来改变寄主细胞的代谢途径, 从而达到成功侵染的目的<sup>[1-2]</sup>。在真核生物中外泌蛋白的分泌需要膜泡运输参与调控, 而 SNARE(soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors)蛋白是真核生物细胞膜泡运输过程中发生膜融合最重要的调控蛋白家族, 在真核生物中较为保守。SNARE 作为调控细胞生长发育必不可少的蛋白家族, 在人类、酵母及植物病原真菌中得到了大量的研究。Sed5 是 SNARE 蛋白家族成员之一, 为 Qa-SNARE 亚基, 是高尔基器膜泡转运系统的中心组分。在顺向运输过程中, Sed5 与 Sec22、Bos1、Bet1 形成 SNARE 四聚复合体介导膜泡融合<sup>[3-4]</sup>。笔者利用实时定量 PCR 分析 *PsSed5* 在大豆疫霉不同生活史及侵染时间段的转录, 并利用 PEG 介导的原生质体稳定转化的方法将该基因沉默后分析沉默转化子的表型, 明确其功能, 以期揭示 SNARE 蛋白对大豆疫霉生长发育及对大豆致病过程的分子机理提供理论依据。

**1 材料与方****1.1 材料****1.1.1 菌株**。大豆疫霉菌株 P6497, 由美国俄勒冈州立大学

Brett M. Tyler 教授馈赠, 系大豆疫霉全基因组测序菌株, 保存在 10 °C 条件下的 10% V8 固体培养基上。

**1.1.2 大豆品种**。大豆品种 Williams, 由南京农业大学国家大豆改良中心提供, 该品种对大豆疫霉菌株 P6497 表现为感病。

**1.2 方法** 大豆疫霉转化方法如下<sup>[5-6]</sup>: 收集菌丝, 将菌丝放入含有 0.8 mol/L 甘露醇的培养皿中漂洗, 将漂洗过后的菌丝移入盛有 0.8 mol/L 甘露醇的离心管中室温摇洗 10 min; 用灭过菌的 50 mL 烧杯快速称取 0.1 g 溶解酶和 0.06 g 纤维素, 盖紧杯口迅速放回超净台。依次加入 10 mL 0.8 mol/L 甘露醇、8 mL H<sub>2</sub>O、800 μL 0.5 mol/L KCl、800 μL 0.5 mol/L MES (pH 5.7) 和 400 μL 0.5 mol/L CaCl<sub>2</sub>, 充分溶解酶液后将其倒入 50 mL 离心管, 并加入已洗好的菌丝, 25 °C 40 r/min 酶解 45 ~ 60 min; 用 20 mL 针筒和细菌过滤器过滤 40% PEG, 将盛有 PEG 的烧杯封口后放于冰上备用; 用 2 层 Mira Cloth 和烧杯过滤收集原生质体, 收集好后倒入新的离心管中, 1 500 r/min、3 min 后轻轻倒去上清液; 用 35 mL W5 溶液洗涤原生质体, 1 500 r/min、4 min 后轻轻倒去上清液; 用 5 mL W5 溶液重悬原生质体至浓度为 2 × 10<sup>6</sup> 个/mL, 冰置 30 min 后, 1 500 r/min、4 min, 轻轻倒去上清液; 用 5 mL MMg 溶液重悬原生质体, 室温放置 10 min; 在每个含有质粒的离心管中加入 1 mL 原生质体, 冰置 5 ~ 10 min; 每个离心管加 1.74 mL PEG, 冰置 2 min; 往离心管中加 8 mL Pea/0.5 mol/L 甘露醇缓慢颠倒 1 次; 次日上午加热溶化 Pea/0.5 mol/L 甘露醇琼脂, 降温至 40 °C 以下后加入 G418 至浓度为 30 μg/mL, 混匀后倒入培养皿中 25 °C 黑暗培养; 待新生菌丝长出后, 用含 30 μg/mL G418 的 Pea/0.5 mol/L 甘露醇覆盖平板, 25 °C 黑暗培养; 待菌丝从覆盖的 Pea/0.5 mol/L

**基金项目** 安徽省自然科学基金项目(1508085MC43)。**作者简介** 赵伟(1980—), 男, 安徽寿县人, 副研究员, 博士, 从事植物病理学研究。\* 通讯作者, 研究员, 博士, 从事真菌病害及综合治理技术研究。**收稿日期** 2018-01-22

甘露醇上长出后,用含 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 的 Pea/0.5 mol/L 甘露醇或利马豆培养基再次覆盖平板,25  $^{\circ}\text{C}$  黑暗培养;挑取最终从平板上长出的菌落,于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 利马豆培养基上继代培养。

用 OMEGA Total RNA Kit I 提取大豆疫霉菌不同生长阶段及侵染阶段的总 RNA。提取的候选转化子的总 RNA 经 DNAase 消解后按照 invitrogen M-MLV 逆转录试剂盒使用指南合成单链 cDNA, -20  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存供实时定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qRT-PCR) 使用。所用实时定量引物分别为 qRTF1:5'-GGAGTTAGTGCCAGCGAGTC-3' 和 qRTR1:5'-AAGAGCTGTCCGATGTCCAC-3',所用的内参基因为肌动蛋白编码基因,引物为 PsactA-F:5'-ACTGCACCTTCCAGACCATC-3' 和 PsactA-R:5'-CCACCACCTTGATCTTCATG-3',定量分析及沉默转化子的筛选。用于验证外源转化子是否插入基因组的引物为载体上游引物 HAMF1:5'-TTCTCCTTTTCACTCTCAGC-3' 和 *PsSed5* 基因的上游引物 *PsSed5*F:5'-ATGGCGGCGAACCAGCACGG-3'。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆疫霉菌 *PsSed5* 基因的克隆及序列结构分析

大豆疫霉中 *PsSed5* 基因 (ID:303106, <https://genome.jgi.doe.gov/Physo3/Physo3.home.html>) DNA 和 CDS 全长序列分别从 DNA 和 cDNA 中被扩增出来,分别为 1 214、996 bp,其中有 3 个内含子,蛋白序列由 331 个氨基酸组成。通过氨基酸生物信息学分析及结构预测,*PsSed5* 氨基酸的 234~301 位氨基酸为 SNARE 核心保守功能区域,该区域与其他 SNARE 蛋白形成复合体,促进不同细胞膜间的融合;321~329 位氨基酸为跨膜区域,将 SNARE 蛋白结合在细胞膜上。

### 2.2 *PsSed5* 在生活史阶段及侵染阶段的转录分析

为了更进一步了解及预测这些 *PsSed5* 编码基因可能具有的功能,对该基因在无性生活史及侵染阶段的转录谱进行了详细分析,所选阶段分别是 V8 液培的菌丝、产孢子囊的菌丝、游动孢子、休止孢、萌发的休止孢、侵染感病大豆品种 1.5、3、6、12 和 24 h 的菌丝。通过实时定量 PCR 分析可以发现,*PsSed5* 在不同阶段均有较高的表达量,属于组成性表达基因,在侵染早期上调表达,说明其对疫霉菌的侵染或许有一定的调控作用(图 1)。

### 2.3 *PsSed5* 沉默突变体的获得

为了进一步研究 *PsSed5* 在大豆疫霉生长发育及致病过程等方面的具体功能,利用 PEG 介导的原生质体稳定转化的方法将该基因沉默后进行基因功能分析。将 *PsSed5* 反向基因片段构建到 pHAM34 的启动子后,同时将其与含有抗遗传霉素 (G418) 的 pTH209 载体共转化到大豆疫霉的原生质体中。将 *PsSed5* 反向基因片段构建到载体上,选用 pHAM34 启动子的一段引物作为上游引物,*PsSed5* 基因中靠近 5'端的序列作为下游引物,这样就可以扩增出转化子插入片段。在试验中,将只单独转进含有抗性载体 pTH209 而获得的转化子作为对照 (CK)。通过试验可以看到 T12、T17 和 T20 都能扩增出目的片段,而野生型菌株和对照菌株没有扩增出目的片段(图 2)。进一步提取

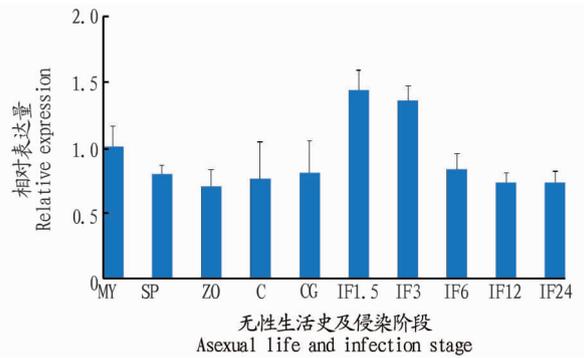


图 1 实时定量 PCR 分析大豆疫霉 *PsSed5* 基因的转录表达谱

Fig. 1 qRT-PCR analysis the transcription of *PsSed5* of *Phytophthora sojae*

上述转化子菌丝阶段的 RNA,利用实时定量 PCR 方法筛选沉默的转化子。相比较野生型的受体菌株 (WT),对照菌株 (CK) 的表达量没有显著差异,T12 和 T17 的表达量显著降低,分别为野生型的 41% 和 45%,而另一个转化子 T20 的表达量与野生型菌株没有差异。因此得到 T12 和 T17 这 2 个部分沉默的突变体(图 3)。

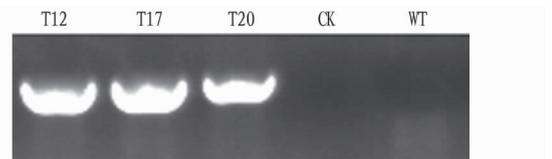


图 2 外源基因整合验证

Fig. 2 Verification of the exogenous gene integration

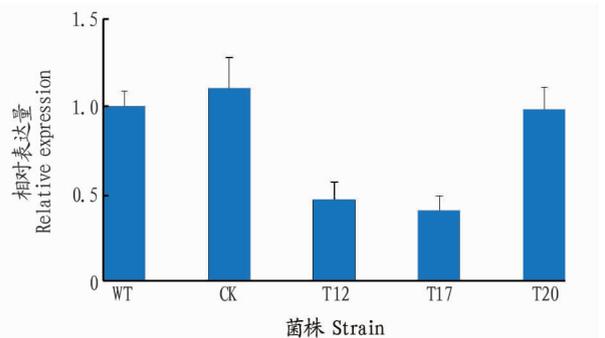


图 3 实时定量 PCR 筛选 *PsSed5* 沉默突变体

Fig. 3 Screening for *PsSed5*-silenced mutants by real-time PCR

### 2.4 *PsSed5* 沉默突变体表型分析及致病力测定

进一步分析 T12 和 T17 这 2 个部分沉默的突变体在疫霉生活史的各个阶段表型上的变化。将在含遗传霉素培养基生长的转化子转接活化 2 代后在 V8 培养基上观察生长速率,3 d 后测量菌落直径,得到的平均值分别为 WT:3.8 cm、CK:3.7 cm、T12:2.8 cm、T17:2.9 cm,由此可以发现 *PsSed5* 沉默突变体生长速率受到一定的影响。在 LBA 培养基上生长 10 d 后,观测有性生殖产生卵孢子的情况,从菌落生长中心接种点附近随机挑取 2 cm × 2 cm 的琼脂块,记录卵孢子个数,随机取 3 个点,平均值分别为 WT:258、CK:267、T12:45、T17:33,这说明 *PsSed5* 沉默突变体在有性生殖过程中受到严重影响。为了进一步证实沉默转化子的稳定性,将 *PsSed5* 沉默突变体

的转化子在不含遗传毒素的 V8 培养基上连续继代培养 10 代后,重复上述试验,结果同上面的统计数据趋势相一致。

进一步分析 *PsSed5* 沉默突变体在致病性方面的变化。用野生型菌株和 *PsSed5* 沉默突变体菌株接种生长 10 d 的 Williams 大豆。大豆疫霉在含 1% 琼脂的 V8 培养基上培养 3 d,在菌落边缘切取 2 mm × 2 mm 的菌丝块作为接种体接种没有创伤的叶片,2 d 后发现野生型菌株在大豆叶片上形成明显的扩展,发病显著,而 *PsSed5* 沉默突变体菌株几乎没有扩展,说明其丧失了致病性(图 4)。同样将继代培养 10 代的突变体菌株进行上述致病性测定,得到同上述试验相同的结果。

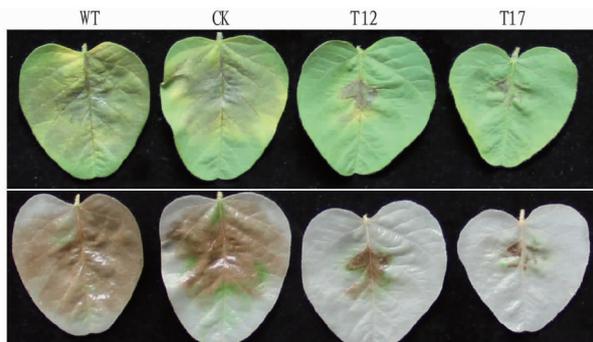


图 4 *PsSed5* 沉默突变体致病性测定

Fig. 4 Pathogenicity identification of *PsSed5*-silenced mutants

### 3 结论与讨论

细胞内及细胞间的物质交换需要膜泡参与运输,而 SNARE 蛋白是膜泡间融合的必要因子,SNARE 蛋白家族之一的 Sed5 参与多种运输膜泡之间的融合,其在酵母中是细胞存活所必需的因子之一<sup>[4]</sup>。在大豆疫霉中,*PsSed5* 基因是组成性高表达,说明其参与了大豆疫霉生长发育及侵染的各个过程,而其沉默突变体表型的变化也证明了该基因在大豆疫霉菌中起到重要作用。*PsSed5* 沉默突变体的致病性几乎

丧失,但考虑到其生长速率有所减慢,菌丝生长势弱,因此不能排除其致病性下降是生长速率减弱所引起的。但近期的研究报道中,真菌一系列和外泌相关基因的功能解析表明,这些基因的缺失会导致一系列致病因子的外泌受到破坏,从而导致致病性的丧失<sup>[7]</sup>。疫霉属植物病原菌中包含大量的 RxLR 类外泌效应因子,其中很多被证明在侵染过程中发挥着重要的作用<sup>[8]</sup>,因此推测,*PsSed5* 沉默突变体致病性的丧失可能是由于致病因子在外泌过程中被阻断,从而导致大豆疫霉不能成功侵染寄主。在后续研究中,拟通过分析野生型菌株和 *PsSed5* 沉默突变体菌株在外泌蛋白的分泌上是否有质和量的差异,以揭示其致病力减弱的主要原因,并找出大豆疫霉菌关键性的致病因子,为大豆疫霉菌的防控提供理论依据。

### 参考文献

- [1] BIRCH P R J, ARMSTRONG M, BOS J, et al. Towards understanding the virulence functions of RXLR effectors of the oomycete plant pathogen *Phytophthora infestans* [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(4): 1133 - 1140.
- [2] MA Z C, ZHU L, SONG T Q, et al. A paralogous decoy protects *Phytophthora sojae* apoplastic effector PsXEG1 from a host inhibitor [J]. *Science*, 2017, 355(6326): 710 - 714.
- [3] ZHAO W, DONG S M, YE W W, et al. Genome-wide identification of *Phytophthora sojae* SNARE genes and functional characterization of the conserved SNARE PsYKT6 [J]. *Fungal Genet Biol*, 2011, 48(3): 241 - 251.
- [4] BURRI L, LITHGOW T. A complete set of SNAREs in yeast [J]. *Traffic*, 2004, 5(1): 45 - 52.
- [5] 赵伟. 大豆疫霉 GPCR - PIPKs 基因家族及 PsYKT6 功能分析 [D]. 南京: 南京农业大学, 2010: 129 - 150.
- [6] 李爱宁, 邱金龙. 大豆疫霉促有丝分裂原蛋白激酶 PsSAKI 和 PsMPK1 的功能分析 [C] // 2010 年中国科学院微生物研究所博士后学术年会暨第二届博论论坛论文集摘要集. 北京: 中国植物保护学会生物入侵分会, 2011.
- [7] YI M, CHI M H, KHANG C H, et al. The ER chaperone LHS1 is involved in asexual development and rice infection by the blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. *Plant cell*, 2009, 21(2): 681 - 695.
- [8] DOU D L, KALE S D, WANG X, et al. RXLR-mediated entry of *Phytophthora sojae* effector Avr1b into soybean cells does not require pathogen-encoded machinery [J]. *Plant cell*, 2008, 20(7): 1930 - 1947.

(上接第 87 页)

在饲用油菜整个生长周期中,适合的种植密度有助于饲用油菜单株的生长,进而提高整个饲用油菜的生物产量。由此可见,适宜的种植密度和施肥水平下饲用油菜产量的生产潜力才能发挥到最大。同时,一次性收割饲用油菜的生物产量明显高于分次收割产量。

因此,根据实际生产需求应当适当调整饲用油菜种植方式,如果需要冬季鲜食饲喂,可考虑在较高种植密度水平下适当提高施肥水平;若采取一次性收获,可在较高施肥水平下适当调整种植密度。饲用油菜的适宜种植密度为 30 万 ~ 45 万株/hm<sup>2</sup>,适宜施肥水平为 600 kg/hm<sup>2</sup>,且在油菜开花收割产量最高,甘光华等<sup>[8]</sup>研究也表明饲用油菜开花期收割鲜草产量最高。

### 参考文献

- [1] 杨在宾. 非常规饲料资源的特性及应用研究进展 [J]. *饲料工业*, 2008, 29(7): 1 - 4.
- [2] 董小英, 唐胜球. 饲用油菜生物学特性及应用研究进展 [J]. *饲料与畜牧*, 2014(7): 9 - 11.
- [3] 杨华, 熊明清, 余陵峰, 等. 青贮饲用油菜对肉牛增重效果的研究 [J]. *中国饲料*, 2017(2): 16 - 18.
- [4] 邱玉朗, 罗斌, 于维, 等. 发酵全混合日粮对肉羊生长性能与血液生化指标的影响 [J]. *饲料研究*, 2013(12): 46 - 48.
- [5] 王亚犁. 利用饲用油菜复合青贮肥秦川牛试验研究 [J]. *中国草食动物*, 2005, 25(3): 37 - 38.
- [6] 王亚犁. 饲用油菜与枯黄玉米秸秆复合青贮饲喂滩羊试验 [J]. *中国畜牧杂志*, 2005, 41(2): 57.
- [7] 孙鸿良, 杜子端. 草地生态农业与产品革新是西北地区农业的出路 [J]. *农村生态环境*, 2002, 18(3): 43 - 44, 55.
- [8] 甘兴华, 李雯, 刘水华, 等. 7 种饲用油菜的品比试验与分析 [J]. *江西畜牧兽医杂志*, 2012(6): 33 - 36.