

致病疫霉 PiSAK1 的生物学功能分析

王娜^{1,2}, 徐裴^{1,2}, 唐唯^{1,2}, 刘晶^{*1,2}

1 云南师范大学云南省马铃薯生物学重点实验室, 云南 昆明 650500

2 云南师范大学云南省高校马铃薯生物学重点实验室, 云南 昆明 650500

王娜, 徐裴, 唐唯, 刘晶. 致病疫霉 PiSAK1 的生物学功能分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(11): 4910-4924.

WANG Na, XU Pei, TANG Wei, LIU Jing. Biological roles of *Phytophthora infestans* PiSAK1[J]. Microbiology China, 2023, 50(11): 4910-4924.

摘要: 【背景】致病疫霉是引起世界范围内马铃薯晚疫病的重要病原菌。Stress-activated protein kinases (SAPKs) 是一类胁迫激活的 mitogen-activated protein kinases (MAPKs), 研究表明真菌 SAPKs 在调控细胞应答外界胁迫等方面有重要作用。致病疫霉中存在一个 SAPK, 即 PiSAK1, 其生物学功能并不明确。【目的】探究 PiSAK1 在致病疫霉生长发育、抵抗外界胁迫及侵染马铃薯过程中发挥的生物学功能。【方法】利用生物信息学手段分析 PiSAK1 的特性, 通过 RT-qPCR 分析明确致病疫霉 *PiSAK1* 在不同发育阶段及侵染马铃薯不同时期的表达量, 最后构建 *PiSAK1* 沉默、过表达菌株并测定其各项生物学表型。【结果】PiSAK1 具有丝裂原活化蛋白激酶典型的 Ser/Thr 蛋白激酶催化结构域, 并且与其他卵菌的 SAPKs 同属一个进化分支。致病疫霉 *PiSAK1* 分别在休止孢阶段、侵染马铃薯 48 h 时表达量最高, 且 0.3 mol/L NaCl 及 3 mmol/L H₂O₂ 胁迫刺激 0.5 h 后 *PiSAK1* 的表达量均显著升高。构建 *PiSAK1* 沉默、过表达菌株并测定其表型, 结果表明基因沉默菌株在菌落生长、孢子囊产量、抵御 NaCl 及 H₂O₂ 胁迫、清除活性氧、致病性方面均比野生型菌株显著减弱, 而基因过表达菌株除菌落生长与野生型菌株无显著差异外, 其他表型相较野生型菌株均显著增强。【结论】致病疫霉 PiSAK1 在生长发育、渗透压调节、氧化胁迫应答和侵染马铃薯的过程中发挥重要作用。该结果为后续研究新的杀菌剂作用靶标、选育马铃薯抗病新品种提供了理论依据。

关键词: 致病疫霉; PiSAK1; 基因沉默; 基因过表达; 胁迫应答

资助项目: 云南省基础研究计划(202001AU070091, 202201AT070026); 国家自然科学基金(32101665); 广东省基础与应用基础研究重大项目(2021B0301030004)

This work was supported by the Basic Research Projects of Yunnan Province (202001AU070091, 202201AT070026), the National Natural Science Foundation of China (32101665), and the Major Project of Basic and Applied Basic Research of Guangdong Province (2021B0301030004).

*Corresponding author. E-mail: liujing@ynnu.edu.cn

Received: 2023-03-30; Accepted: 2023-07-19; Published online: 2023-08-29

Biological roles of *Phytophthora infestans* PiSAK1

WANG Na^{1,2}, XU Pei^{1,2}, TANG Wei^{1,2}, LIU Jing^{*1,2}

1 Yunnan Key Laboratory of Potato Biology, Yunnan Normal University, Kunming 650500, Yunnan, China

2 Key Laboratory of Potato Biology in Universities of Yunnan Province, Yunnan Normal University, Kunming 650500, Yunnan, China

Abstract: **[Background]** *Phytophthora infestans* is a major pathogen causing potato late blight. Stress-activated protein kinases (SAPKs), a class of mitogen-activated protein kinases (MAPKs), play a role in regulating cell responses of fungi to external stress factors. The biological functions of a SAPK in *P. infestans*, i.e., PiSAK1, remain unknown. **[Objective]** To explore the biological roles of PiSAK1 in the growth and development, the responses to external stress factors, and the infection in potato. **[Methods]** The bioinformatics tools were used to characterize PiSAK1. The expression levels of *PiSAK1* at different development and infection stages were determined by RT-qPCR. Finally, the *PiSAK1*-silenced and -overexpressed strains were constructed and characterized. **[Results]** PiSAK1 had a typical Ser/Thr protein kinase catalytic domain of MAPKs and shared the same evolutionary branch with the SAPKs of other oomycetes. The expression level of *PiSAK1* was the highest at the stage of cysts or 48 h after infecting potato. Moreover, it was significantly up-regulated after exposure to 0.3 mol/L NaCl or 3 mmol/L H₂O₂ for 0.5 h. The results showed that the *PiSAK1*-silenced strains were significantly weaker than the wild type in terms of colony growth, sporangium production, resistance to NaCl and H₂O₂, scavenging of reactive oxygen species, and pathogenicity. However, the *PiSAK1*-overexpressed strains showed significantly enhanced phenotypic characteristics compared with the wild type, except for no significant difference in colony growth. **[Conclusion]** PiSAK1 plays a role in the growth and development, osmotic regulation, oxidative stress response, and infection in potato. Our results provide a theoretical basis for further research on new targets of fungicides and breeding of resistant potato varieties.

Keywords: *Phytophthora infestans*; PiSAK1; gene silencing; gene overexpression; stress response

马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)是世界四大主要粮食作物之一, 中国是世界马铃薯主产区之一。马铃薯晚疫病由病原卵菌致病疫霉(*Phytophthora infestans*)引起, 严重时可导致马铃薯绝收, 是马铃薯生产上的毁灭性病害^[1]。19世纪中期, 马铃薯晚疫病大暴发导致马铃薯产量锐减, 大量爱尔兰人因饥饿而流亡他国^[2]。近年来, 马铃薯晚疫病在世界各马铃薯主产区

频繁发生且危害逐年加重, 严重威胁全球粮食安全。解析致病疫霉如何侵染寄主植物对防控病原菌的侵染至关重要。近年来, 关于致病疫霉侵染机制的研究大多集中在病原菌分泌的效应蛋白方面, 效应蛋白能够与植物靶标蛋白结合进而干扰植物免疫^[3-5]。然而病原菌在释放效应蛋白进入植物细胞前要先克服一系列的逆境胁迫。例如, 病原菌在侵入植物细胞汲取营养

前需要维持自身细胞的渗透平衡,抵御植物先天免疫反应(如活性氧迸发等)引发的多种胁迫刺激等。由此可见,研究病原菌如何克服多种外界胁迫刺激对全面解析其致病机理至关重要。

胁迫激活的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs),即 SAPKs (stress-activated MAPKs, SAPKs)是一类负责传递外界环境胁迫信号的丝裂原活化蛋白激酶,它能够被高渗透压胁迫、热胁迫、氧化胁迫和紫外线辐射等激活^[6]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) Hog1、裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*) Sty1 及哺乳动物 p38、JNK 都属于 SAPKs。研究表明,植物致病真菌的 SAPKs 功能具有差异性和多样性,SAPKs 的功能缺失会影响病原菌的生长发育、破坏其多胁迫应答反应、降低其侵染能力等^[7-13]。在禾生球腔菌(*Mycosphaerella graminicola*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)、黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum lagenarium*)、栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)、水稻胡麻斑病菌(*Bipolaris oryzae*)、梨果黑斑病菌(*Alternaria alternata*)和结瘤副单孢菌(*Parastagonospora nodorum*)中都有 SAPKs 的相关报道,这些病原真菌的 SAPKs 都能够调节细胞应答高渗透压胁迫,有些还能够应答氧化胁迫、热胁迫等胁迫刺激,但其功能并不完全一致^[7-13]。

在分类上,卵菌与真菌的亲缘关系较远,而与褐藻和硅藻的亲缘关系较近^[14-15]。卵菌和真菌在细胞壁成分、细胞代谢方式、rRNA 序列、侵染方式、菌丝形态和生活史方面都存在差异,表明卵菌和真菌在侵染寄主植物时具有不同的遗传和侵染机制^[16-17]。植物致病卵菌主要依靠孢子、孢子囊及其释放的游动孢子在寄主植物间传播,如何维持细胞内渗透压的稳定对游动孢子极为重要^[18]。目前,有关病原卵菌 SAPKs

在侵染植物时发挥的生物学功能研究较少^[19-20]。Liu 等^[19]在培养基中添加 SAPK 所在通路的抑制剂,发现辣椒疫霉(*Phytophthora capsici*)的生长被显著抑制,重金属诱导的细胞脂质过氧化及细胞总抗氧化能力受到影响,重金属离子对辣椒疫霉毒力的抑制作用增强。在大豆疫霉(*Phytophthora sojae*)中也存在一个 SAPK 即 PsSAK1,其基因在游动孢子阶段、休止孢阶段及早期侵染阶段上调表达,同时在氧化胁迫及渗透压胁迫处理后上调表达;将该基因沉默后,游动孢子发育异常且菌株致病力显著下降^[20]。虽然大豆疫霉与致病疫霉同属疫霉属,但二者在生长条件、有性生殖方式和寄主范围等方面存在较大差异。

目前针对植物致病真菌 SAPKs 的研究较多,其功能具有差异性和多样性,然而植物病原卵菌中相关的研究报道较少。因此,研究病原卵菌如何克服外界不良环境的影响从而成功侵染寄主植物对解析其致病机制意义重大。截至目前鲜见有关致病疫霉中 SAPK 的报道,其在生长发育、抵抗外界胁迫及侵染寄主植物过程中所发挥的作用并不清楚。因此,探究致病疫霉中 SAPK 的生物学功能及其在致病过程中所起的作用有助于深入理解其致病机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、植物及质粒

致病疫霉 88069 及大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株均由本实验室保存。本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)及四倍体马铃薯 Desiree 由本实验室提供,种植于人工恒温气候室中(22 °C, 16 h 光照/8 h 黑暗),生长 3-6 周后备用。质粒 pTOR-mRFP 由南京农业大学王源超教授惠赠。

1.1.2 培养基

黑麦-V8 培养基: 黑麦 60.0 g, 蒸馏水定容至 1 L, 121 °C 灭菌 20 min, 经两层纱布过滤得到黑麦汁(约 0.8 L)。黑麦汁 0.8 L, V8 蔬菜汁 0.1 L, 碳酸钙 1.2 g, 蔗糖 20.0 g, 琼脂 20.0 g, pH 7.0, 蒸馏水定容 1 L。

青豆汁培养基: 青豆 120.0 g, 蒸馏水定容 1 L。

1.1.3 主要试剂和仪器

ClonExpress II One Step Cloning Kit, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; PrimeScript RT Reagent Kit 和 TB Green Premix *Ex Taq* II, 宝日医生物技术(北京)有限公司。恒温培养箱, 上海博讯医疗生物仪器股份有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司; 漩涡振荡仪, Scilogex 公司。

1.2 生物信息学分析

以 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中酿酒酵母、裂殖酵母和大豆疫霉等的 SAK1 蛋白序列为参考, 在线 BLAST 比对搜索致病疫霉菌基因组数据库, 获得同源蛋白 PiSAK1。随后将所得同源蛋白的氨基酸序列与酿酒酵母、裂殖酵母、智人(*Homo sapiens*)、稻瘟病菌、橡树疫霉(*Phytophthora ramorum*)、寄生霜霉(*Hyaloperonospora parasitica*)、辣椒疫霉和大豆疫霉的同源蛋白序列用 ClustalW 软件(<http://www.genome.jp/tools/clustalw>) 进行多重序列比对并分析其氨基酸保守序列。再利用 MEGA 7 软件(<http://www.megasoftware.net>) 对上述蛋白进行系统聚类分析。

1.3 PiSAK1 在致病疫霉各发育阶段及侵染马铃薯不同时期的表达量测定

1.3.1 致病疫霉不同样品的收集

致病疫霉菌株接种于黑麦-V8 培养基上并在 18 °C 黑暗条件下培养 7 d 后, 用手术刀切取大小约为 0.5 cm×0.5 cm 的菌块放置于青豆汁培

养液中, 18 °C 静置培养 3.5 d 后收获菌丝, -80 °C 保存备用。向黑麦-V8 培养基上 18 °C 黑暗培养 15 d 的致病疫霉中加入无菌水并用涂布棒刮洗孢子囊, 取部分孢子囊悬浮液于 18 °C、5 000 r/min 离心 5 min, 去除上清后-80 °C 保存备用。将剩余孢子囊悬浮液在 10 °C 静置 30 min 后再在 18 °C 静置 30 min, 经滤布(Mira cloth)过滤后得到游动孢子悬浮液。一部分游动孢子悬浮液于 18 °C、5 000 r/min 离心 5 min 后去上清, -80 °C 保存备用; 另一部分漩涡振荡仪充分振荡 30 s 后得到休止孢悬浮液, 于相同条件下离心, 去上清后-80 °C 保存备用。

摘取温室培养 6 周的马铃薯叶片并用 75% 乙醇表面消毒后晾干备用。收集培养 15 d 的致病疫霉孢子囊制备成悬浮液(5×10^4 个/mL), 按照上述方法再制备成游动孢子悬浮液。采用离体叶片接种法, 将 10 μ L 游动孢子悬浮液均匀接种于马铃薯叶片背面, 于 22 °C 分别保湿培养 0、6、12、24 和 48 h, 取样并置于-80 °C 保存备用。

为研究 PiSAK1 是否受 NaCl 或 H₂O₂ 诱导表达, 将致病疫霉 88069 菌株在青豆汁培养液中 18 °C 黑暗静置培养 3.5 d 后, 转入含 0.3 mol/L NaCl 或 3 mmol/L H₂O₂ 的青豆汁培养液中胁迫培养 0.5 h, 收集菌丝后吸干水分并置于-80 °C 保存备用。

1.3.2 总 RNA 提取及 RT-qPCR 分析

将上述样品分别用液氮迅速研磨成粉末后, 利用 TRIzol 提取法提取菌丝总 RNA。分别用 PrimeScript RT Reagent Kit 及 TB Green Premix *Ex Taq* II 试剂盒进行 cDNA 的合成及 RT-qPCR 反应, 反应体系、条件参见试剂盒说明书, 采用 2^{- $\Delta\Delta C_t$} 法计算基因相对表达量。所用引物见表 1。

表 1 PCR 扩增引物

Table 1 PCR amplification primer

Primer	Sequence (5'→3')	Product length (bp)
PiSAK1 RT-F/R	CTCCACCGCGTCATCTACTC/AGTGCACGTACTTCATGGCA	94
PiActA RT-F/R	CGGAGCGTGGTTACTCGTTC/CTTCTCCAGACCCGACGACT	134
PiSAK1S-F/R	ctcgaggtcgacggtatcgaTTATGCGACTTCCCGAGCTGGT/ caagaagtaggcacc <u>ccgcgg</u> ATGAGCTCACAGGACGGCG	2 049
PiSAK1OE-F/R	ctcgaggtcgacggtatcgaATGAGCTCACAGGACGGCG/ ggaggccatgatatcgaTGCGACTTCCCGAGCTGGT	2 046
PiCAT2 RT-F/R	GCGTTTATCGACCACATGGC/TAATGTCTGCGTGCGTCACT	112
PiGPD1 RT-F/R	TTTGATAACCGCCCAACGTCA/CTGATGATCCGCTCCAGGTC	128

小写字母表示无缝克隆接头序列；小写字母加下划线表示引入的酶识别位点

Lowercase letters represent seamless cloned splice sequences; Lowercase letters underlined represent introduced restriction endonuclease sites.

1.4 *PiSAK1* 基因沉默、过表达菌株的构建及鉴定

根据 NCBI 中公布的 *PiSAK1* 基因 cDNA 序列设计引物，扩增其全长 cDNA 序列(表 1)。以 pTOR-mRFP 作为骨架载体，用合适的限制性内切酶酶切后利用无缝克隆连接法(ClonExpress II One Step Cloning Kit)连接到 pTOR-mRFP 载体上，构建 *PiSAK1* 的沉默及过表达载体。其中，构建基因沉默载体时，用 *Cla* I 及 *Sac* II 双酶切骨架载体将 mRFP 的序列从 pTOR-mRFP 载体上切除，再将 *PiSAK1* 基因的 cDNA 序列用相同的酶切后反向连接到酶切后的载体上。构建基因过表达载体时，用 *Cla* I 单酶切 pTOR-mRFP 载体，再将 *PiSAK1* 的 cDNA 序列用相同酶切后连接到载体上，使 *PiSAK1* 的 cDNA 序列刚好处于 mRFP 序列的前端。载体构建成功后转化大肠杆菌，用菌落 PCR 法筛选出阳性克隆(所用引物见表 1)，挑取阳性克隆送昆明擎科生物科技有限公司测序，提取测序正确菌株的质粒保存备用。随后，利用 PEG 介导的原生质体转化法将上述质粒导入致病疫霉中，具体操作参考马振川^[21]的方法。待转化子长出后，用手术刀切取菌丝块在青豆汁培养液中 18 °C 静置培养

3.5 d，收集菌丝后吸干水分，液氮研磨至粉末状后提取菌丝总 RNA，反转录成 cDNA 后用于 RT-qPCR 分析，所用引物见表 1。

1.5 *PiSAK1* 基因沉默、过表达菌株的表型测定

1.5.1 菌落生长及孢子囊产量测定

致病疫霉在黑麦-V8 培养基上培养 7 d 后，用直径为 5 mm 的打孔器在致病疫霉菌落边缘处打孔，并将该菌丝块接种于含黑麦-V8 培养基的培养皿中央，18 °C 黑暗条件下培养，培养 7 d 后测量菌落直径，培养 14 d 后用无菌水刮洗培养皿并统计孢子囊产量。

1.5.2 胁迫敏感性测定及相关基因表达量检测

致病疫霉在黑麦-V8 培养基上培养 7 d 后，用直径为 5 mm 的打孔器在致病疫霉菌落边缘处打孔并将该菌丝块分别接种于黑麦-V8 培养基、含 0.3 mol/L NaCl 或 3 mmol/L H₂O₂ 的黑麦-V8 培养基上，18 °C 黑暗条件下培养 7 d 后测量各菌株的菌落直径并计算相对抑制率(relative growth inhibition, RGI)。

$$RGI (\%) = (D_c - D_s) / D_c \times 100$$

式中： D_c 为对照平板上的菌落直径； D_s 为胁迫平板上的菌落直径。

为检测胁迫后菌株中相关响应基因的表达情况,将致病疫霉 88069 菌株在青豆汁培养液中培养 3.5 d 后,转入含 0.3 mol/L NaCl 或 3 mmol/L H₂O₂ 的青豆汁培养液中胁迫培养 0.5 h,收集菌丝后吸干水分并参照 1.3.2 中的方法提取菌丝总 RNA 并进行 RT-qPCR 分析,所用引物对为 PiGPD1 RT-F/R 和 PiCAT2 RT-F/R (表 1)。

1.5.3 菌株致病性测定

收集在黑麦-V8 培养基上培养 14 d 的不同菌株致病疫霉孢子囊并制备成悬浮液,调整其浓度为 5×10⁴ 个/mL, 10 °C 及 18 °C 依次静置 30 min 后,取 10 μL 接种马铃薯 Desiree 叶片。接种后的叶片于 22 °C、16 h 光照/8 h 黑暗的条件下保湿培养,4 d 后统计病斑面积。

$$\text{病斑面积} = 1/4 \times \pi \times L \times W$$

式中: L 和 W 分别代表病斑的长及宽。

1.5.4 活性氧检测

将致病疫霉接种在黑麦-V8 培养基上,18 °C 黑暗培养 14 d 并收集其孢子囊制备成浓度为 2×10⁵ 个/mL 的悬浮液,10 °C 及 18 °C 依次静置 30 min 后取 10 μL 接种本氏烟草叶片,并于 22 °C、16 h 光照/8 h 黑暗的条件下保湿培养 48 h。随后将叶片浸于适量二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 染色液(浓度为 0.1%) 中,常温下避光染色 8 h。之后放入无水乙醇溶液中煮沸 15 min 脱色,随后将叶片于 50% 乙醇溶液中漂洗 10 min,置于蒸馏水中漂洗 10 s,取出叶片拍照。以野生型菌株接种后活性氧的积累量作为对照,利用 ImageJ 软件统计接种点

活性氧积累量。

1.6 数据处理及分析

研究中所有试验均经过至少 3 次生物学重复,数据使用 Data Processing System (DPS) 软件进行统计分析,采用单因素方差分析及 Tukey's HSD 多重比较检验 ($P < 0.05$),使用 GraphPad Prism 9 绘图。

2 结果与分析

2.1 生物信息学分析结果

根据酿酒酵母、裂殖酵母、稻瘟病菌和大豆疫霉中 SAPKs 的相关研究结果结合 NCBI 数据库中已公布的上述各蛋白的氨基酸序列,在线 BLAST 比对搜索到致病疫霉中有一个同源蛋白,命名为 PiSAK1,蛋白登录号为 XP_002902236,该基因全长 2 007 bp,无内含子。使用在线分析工具 InterProScan 结合 BLAST 比对结果分析蛋白结构域。结果表明,PiSAK1 由 668 个氨基酸组成,其中第 51–150 位氨基酸为 PH 结构域,第 233–525 位氨基酸为 Ser/Thr 蛋白激酶催化结构域(图 1)。用 ExPASy 预测该蛋白分子量为 75.17 kDa,等电点为 5.85。

将 PiSAK1 与酿酒酵母、裂殖酵母、智人、稻瘟病菌、橡树疫霉、寄生霜霉、辣椒疫霉、大豆疫霉中的 SAK1 同源蛋白进行多重序列比对并分析其氨基酸保守序列(图 2)。结果表明,PH 同源结构域仅存在于卵菌中,是卵菌 SAPKs 所特有的。不同于真菌及人类 SAPKs 的 TGY 保守性磷酸化基序,PiSAK1 及其他病原卵菌均

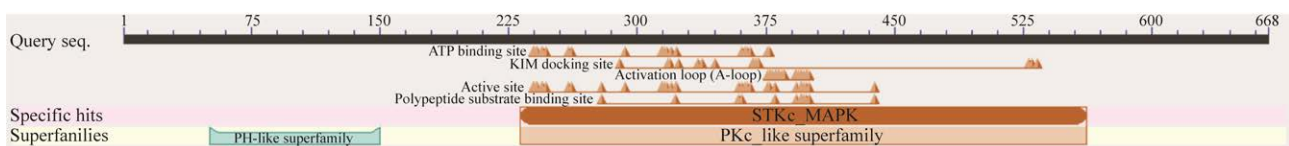


图 1 PiSAK1 蛋白结构域示意图

Figure 1 Schematic diagram of PiSAK1 protein domain.

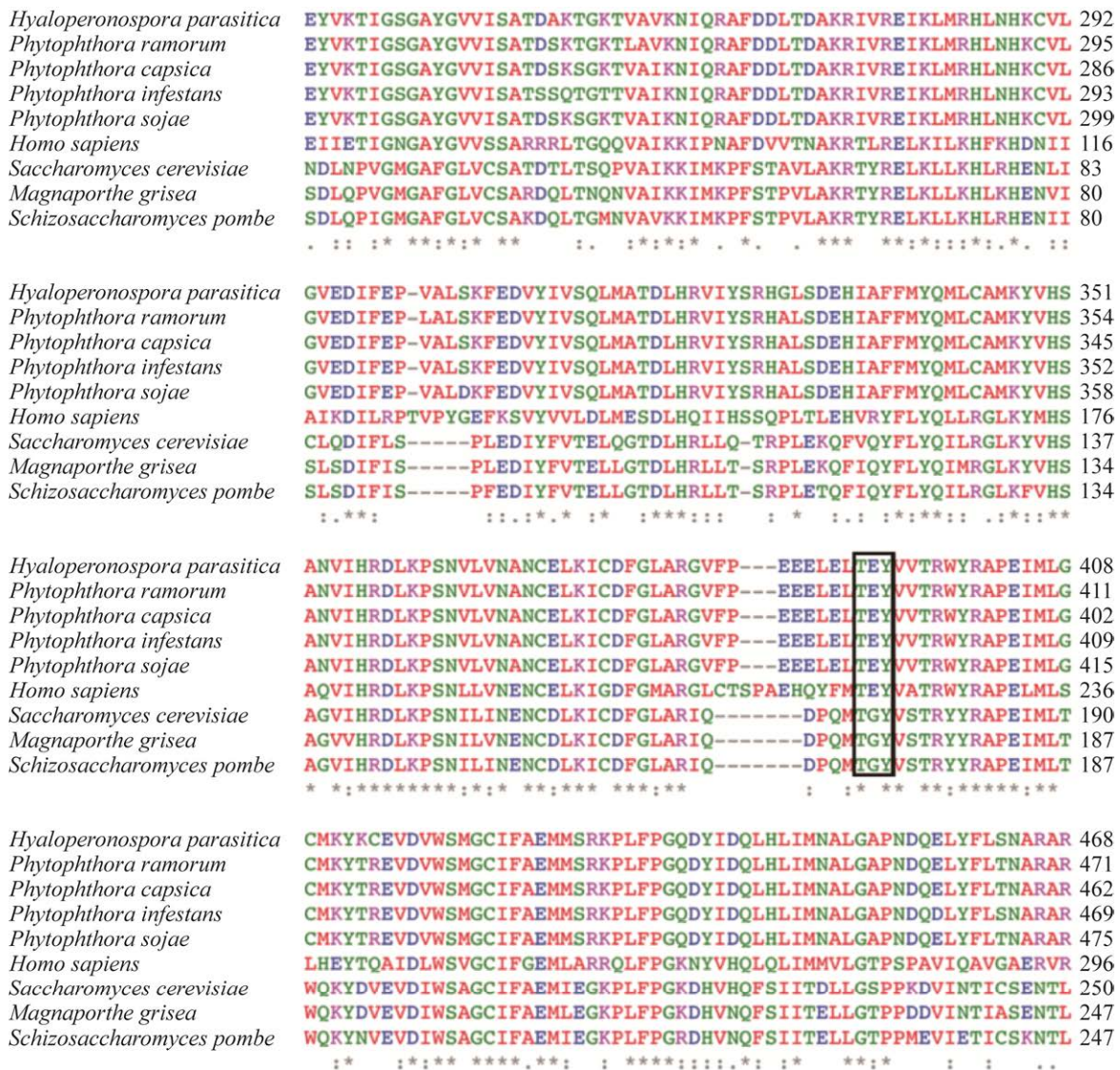


图 2 PiSAK1 与其他卵菌、真菌及人类的 SAPKs 蛋白激酶结构域的比对 利用 ClustalW 对 SAPKs 的全长氨基酸序列进行多重序列比对及分析. 星号表示该位点氨基酸完全相同, 黑色方框内表示保守性磷酸化基序

Figure 2 Comparison of PiSAK1 with SAPKs protein kinase domains of other oomycetes, fungi, and humans. Multiple sequence alignment analysis of the full length amino acid sequence of SAPKs using ClustalW. The asterisk indicates that the amino acids at this site are identical, and the black box indicates a conservative phosphorylation motif.

为 TEY 保守性磷酸化基序。此外, 利用 MEGA 7 软件(<http://www.megasoftware.net>)进行系统聚类分析, 结果表明不同卵菌的 SAPKs 聚成一支, 而哺乳动物与真菌 SAPKs 则各自聚成一支 (图 3)。

2.2 PiSAK1 在菌株各发育阶段、侵染马铃薯薯及胁迫应答时的表达量

提取致病疫霉总 RNA, 反转录成 cDNA 后用 RT-qPCR 技术分别检测 PiSAK1 在营养菌丝、无性孢子囊、游动孢子、休止孢阶段和侵

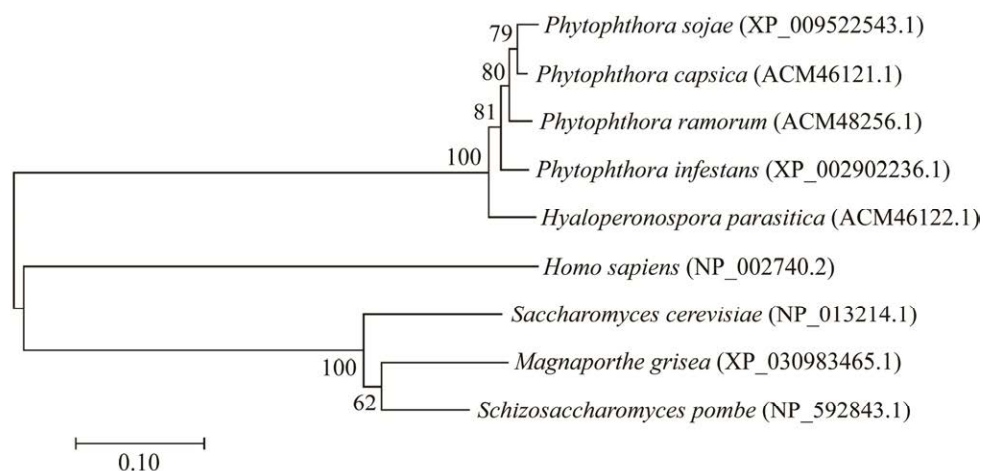


图 3 PiSAK1 与其他卵菌、真菌及人类 SAPKs 的系统聚类分析 括号中为 GenBank 登录号; 分支点上的数字为 bootstrap 值; 标尺 0.10 是序列差异的分支长度

Figure 3 Systematic cluster analysis of PiSAK1 with other oomycete, fungi, and human SAPKs. GenBank accession numbers are shown in parentheses; Bootstrap values are shown at branch points; The scale 0.10 is the branch length of the sequence difference.

染马铃薯不同时期的表达量。以 *PiActA* 作为内参基因, 分别以营养菌丝、侵染马铃薯叶片 0 h、胁迫刺激 0 h 的 *PiSAK1* 表达量为对照, 结果显示, *PiSAK1* 的表达量在无性孢子囊、游动孢子和休止孢阶段均有显著上调, 其中休止孢阶段的表达量达到最高, 其次为无性孢子囊和游动孢子, 营养菌丝中 *PiSAK1* 的表达量最低(图 4A); 致病疫霉侵染马铃薯叶片后 *PiSAK1* 的表达量显著升高, 并在侵染 48 h 时达到高峰(图 4B); 0.3 mol/L NaCl 和 3 mmol/L H₂O₂ 胁迫刺激致病疫霉菌丝 0.5 h 后 *PiSAK1* 的表达量均显著升高(图 4C)。 *PiSAK1* 在上述多个阶段大量表达, 说明 *PiSAK1* 在侵染马铃薯及抵御外界高渗透压胁迫、氧化胁迫的过程中均发挥重要作用。

2.3 *PiSAK1* 基因沉默、过表达菌株的构建

从致病疫霉的 cDNA 中成功克隆到 *PiSAK1* 的编码序列, 并成功构建 *PiSAK1* 基因沉默及过表达载体。将上述载体分别转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经菌落 PCR 鉴定筛选出阳性克隆菌落后送去昆明擎科生物科技有限公司测序,

最终分别获得了含正确克隆序列载体的大肠杆菌转化子(图 5A)。提取质粒后利用 PEG 介导的原生质体转化方法将基因沉默及过表达载体分别导入致病疫霉中, 待转化子长出后提取总 RNA, 经 RT-qPCR 检测共筛选出 3 个 *PiSAK1* 基因沉默菌株(S2、S3 和 S8)和 3 个基因过表达菌株(OE5、OE16 和 OE35) (图 5B)。其中, 3 个基因沉默菌株 *PiSAK1* 基因表达量为野生型菌株的 47%–54%, 3 个基因过表达菌株 *PiSAK1* 基因表达量为野生型菌株的 128%–180%。本实验选取了 3 个 *PiSAK1* 基因沉默菌株及一个 *PiSAK1* 表达量最高的过表达菌株(OE5)进行后续试验。

2.4 *PiSAK1* 调控菌株生长及孢子囊产量

将野生型致病疫霉菌株 88069 及 *PiSAK1* 基因沉默菌株、过表达菌株分别接种于黑麦-V8 培养基上, 待菌株生长 7 d 及 14 d 时分别测量菌落直径及孢子囊产量。试验结果表明, 3 个基因沉默菌株的菌落直径显著小于野生型菌株, 其菌丝与野生型相比较稀薄; 基因沉默菌

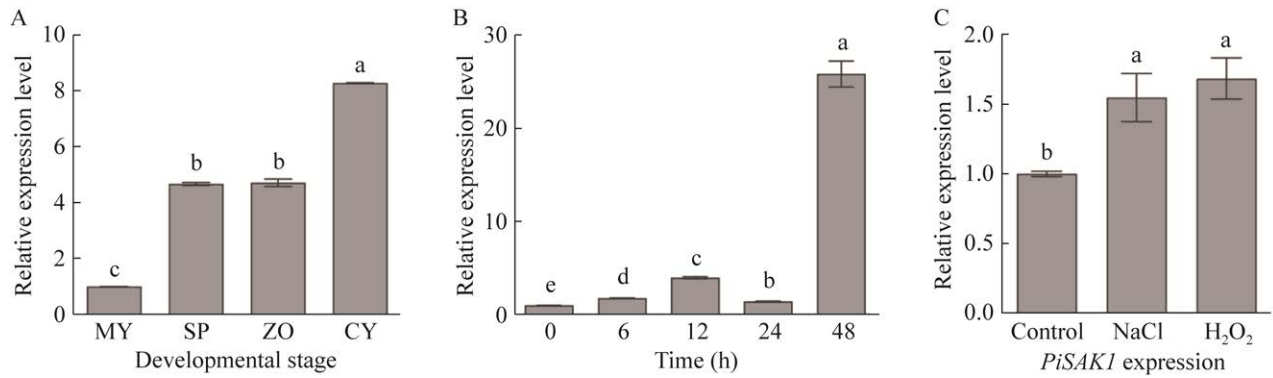


图4 *PiSAK1* 在各发育阶段及侵染马铃薯叶片不同时期的表达量 A: *PiSAK1* 在营养菌丝(MY)、无性孢子囊(SP)、游动孢子(ZO)、休止孢(CY)阶段的表达量. B: *PiSAK1* 在侵染马铃薯叶片 0、6、12、24 和 48 h 时的表达量. C: 致病疫霉菌丝被 0.3 mol/L NaCl 和 3 mmol/L H₂O₂ 胁迫刺激 0 h (Control)、0.5 h 时 *PiSAK1* 的表达量. 标记不同小写字母的组间差异显著($P<0.05$)

Figure 4 Expression of *PiSAK1* at various developmental stages and different stages of infected potato leaves. A: Expression of *PiSAK1* at vegetative hyphae (MY), asexual sporangia (SP), zoospores (ZO), and resting spores (CY) stages. B: The expression of *PiSAK1* in infected potato leaves at 0, 6, 12, and 24 h, and 48 h. C: The expression of *PiSAK1* was detected after the hyphae of *P. infestans* were stressed with 0.3 mol/L NaCl and 3 mmol/L H₂O₂ for 0 h and 0.5 h. Significantly different groups marked with different lowercase letters ($P<0.05$).

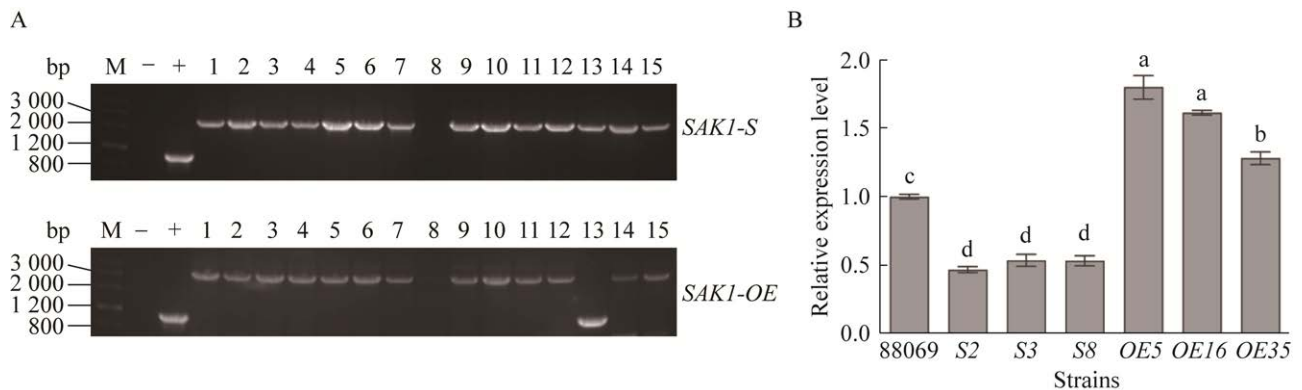


图5 大肠杆菌转化子鉴定及基因沉默菌株的 *PiSAK1* 表达量检测 A: 大肠杆菌转化子菌落 PCR 鉴定. *SAK1-S* 及 *SAK1-OE* 分别为基因沉默转化子和基因过表达转化子. M: DNA Marker; -: 阴性对照; +: 阳性对照; 1-15: 不同大肠杆菌转化子. B: 野生型及基因沉默菌株 *PiSAK1* 表达量检测. 标记不同小写字母的组间差异显著($P<0.05$)

Figure 5 Identification of *Escherichia coli* transformants and detection of *PiSAK1* expression of gene silencing strains. A: PCR identification of *E. coli* transformants. *SAK1-S* and *SAK1-OE* represent gene silencing transformants and gene overexpression transformants, respectively. M: DNA Marker; -: Negative control; +: Positive control; 1-15: Different transformants. B: *PiSAK1* expression of wild type and gene silencing strains. Significantly different groups marked with different lowercase letters ($P<0.05$).

株的孢子囊产量均显著下降, 产量约为野生型菌株的 10%–41% (图 6)。过表达菌株的菌落大小、形态与野生型菌株无明显差异, 而过表达菌株的孢子囊产量则显著高于野生型菌株, 为野生型菌株的 221% (图 6)。以上结果说明, *PiSAK1* 基因参与了病原菌的菌丝生长及孢子囊产生。

2.5 *PiSAK1* 调控菌株渗透压平衡及氧化胁迫应答

为检测 *PiSAK1* 基因沉默、过表达后菌株对渗透压及氧化胁迫的敏感性, 将野生型菌株、基因沉默菌株及过表达菌株分别接种于黑麦-V8 培

养基、含 0.3 mol/L NaCl 或 3 mmol/L H₂O₂ 的黑麦-V8 培养基上, 培养 7 d 后统计各菌株的相对抑制率。结果显示, 3 个基因沉默菌株对 NaCl 及 H₂O₂ 胁迫的敏感性均显著增强, 基因沉默菌株的生长分别被抑制了 65%–73%、38%–64%, 抑制率显著高于野生型菌株(54%、20%) (图 7A、7B)。上述结果说明, *PiSAK1* 基因在致病疫霉调控细胞渗透压平衡以及氧化胁迫应答方面发挥重要作用。

细胞在受到高渗透压胁迫时会在细胞内合成并积累甘油等小分子可溶性物质, 而甘油-3-磷

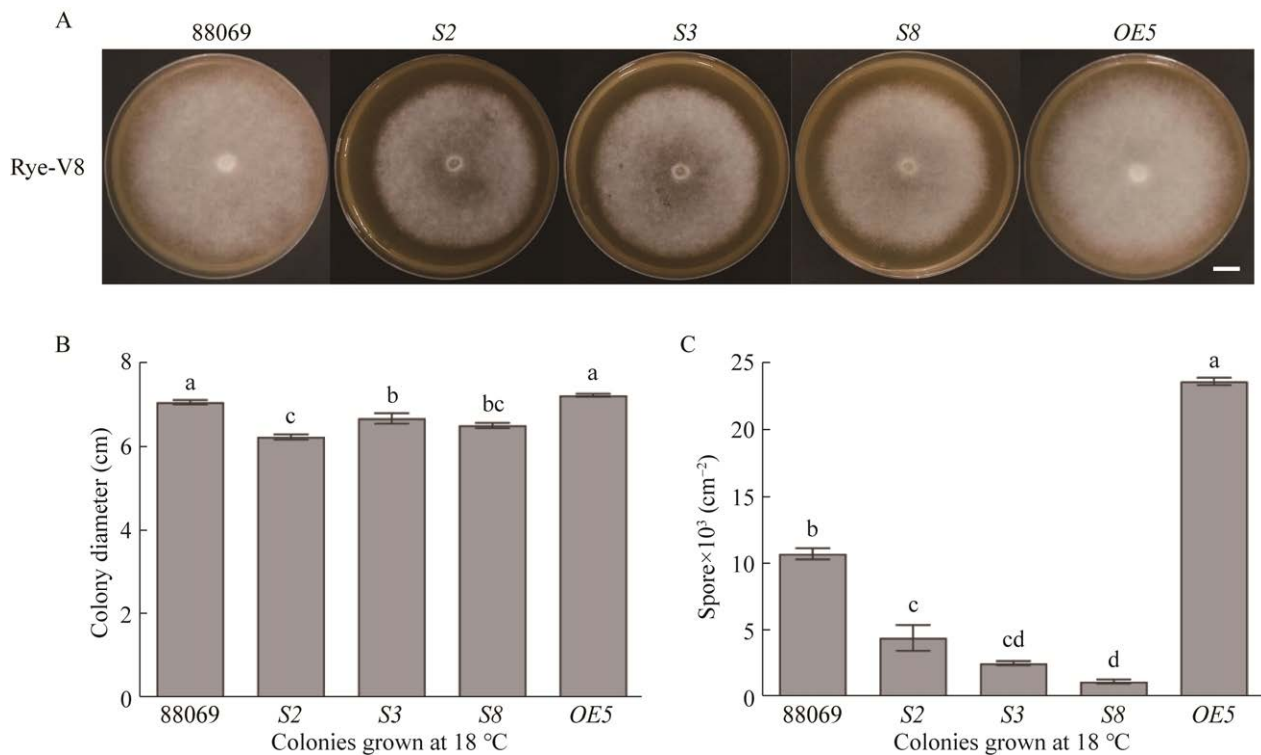


图 6 *PiSAK1* 基因沉默菌株的生长及孢子囊产量测定 A: 各菌株在黑麦-V8 培养基上培养 7 d 的菌落生长状况。标尺: 1 cm。B: 各菌株在黑麦-V8 培养基下培养 7 d 后的菌落直径统计。C: 各菌株在黑麦-V8 培养基上培养 14 d 时的孢子囊产量。标记不同小写字母的组间差异显著($P < 0.05$)

Figure 6 Determination of growth and sporangium yield of *PiSAK1* gene silencing strains. A: Colony growth status of each strain cultured on Rye-V8 medium for 7 days. Scale bars: 1 cm. B: The colony diameter statistics of each strain after 7 days of cultivation on Rye-V8 medium. C: The sporangium yield of each strain cultured on Rye-V8 medium for 14 days. Significantly different groups marked with different lowercase letters ($P < 0.05$).

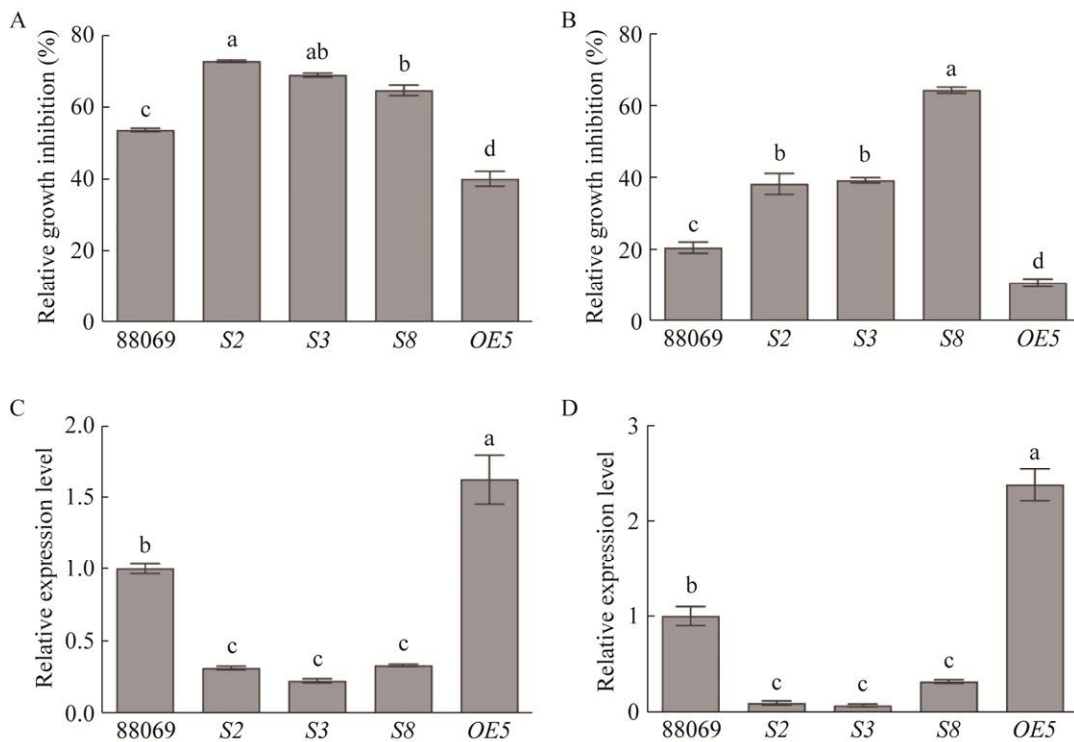


图7 *PiSAK1* 参与渗透压胁迫及氧化胁迫应答 A: 0.3 mol/L NaCl 胁迫下培养 7 d 后各菌株的相对抑制率. B: 3 mmol/L H₂O₂ 胁迫下培养 7 d 后各菌株的相对抑制率. C: 0.3 mol/L NaCl 胁迫 0.5 h 后各菌株中 *PiGPD1* 的相对表达量. D: 3 mmol/L H₂O₂ 胁迫 0.5 h 后各菌株中 *PiCAT2* 的相对表达量. 标记不同小写字母的组间差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 7 *PiSAK1* is involved in osmotic pressure stress and oxidative stress response. A: The relative growth inhibition rates of each strain after 7 days of cultivation under 0.3 mol/L NaCl stress. B: The relative growth inhibition rates of each strain after 7 days of cultivation under 3 mmol/L H₂O₂ stress. C: The relative expression level of *PiGPD1* in each strain after 0.5 h of 0.3 mol/L NaCl stress. D: The relative expression level of *PiCAT2* in each strain after 0.5 h of 3 mmol/L H₂O₂ stress. Significantly different groups marked with different lowercase letters ($P < 0.05$).

酸脱氢酶 1 (glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1, GPD1) 基因就是甘油合成过程中的关键基因^[22]。有研究报道, 致病疫霉过氧化氢酶 *PiCAT2* 在细胞遭受氧化胁迫等非生物胁迫时起重要作用^[23]。为进一步探究 *PiSAK1* 基因沉默、过表达对渗透压平衡及氧化胁迫应答相关基因的影响, 本研究检测了 *PiSAK1* 基因沉默、过表达菌株在 0.3 mol/L NaCl 和 3 mmol/L H₂O₂ 胁迫 0.5 h 后 *PiGPD1* 及 *PiCAT2* 的表达情况。试验结果表明,

基因沉默菌株中 *PiGPD1* 及 *PiCAT2* 的表达被抑制, 其表达量显著低于野生型菌株; 而基因过表达菌株中 *PiGPD1* 及 *PiCAT2* 的表达量则显著高于野生型菌株(图 7C、7D)。这说明, 沉默 *PiSAK1* 导致 *PiGPD1* 及 *PiCAT2* 表达量降低, 进而使病原菌抵抗高渗透压胁迫和氧化胁迫的能力显著降低, 而过表达 *PiSAK1* 则相反。该结果表明, *PiSAK1* 通过影响 *PiGPD1* 及 *PiCAT2* 的表达量来调控病原菌对高渗透压胁迫和氧化

胁迫的应答。

2.6 PiSAK1 与病原菌致病力紧密相关

将野生型菌株、基因沉默及过表达菌株在黑麦-V8 培养基上培养 14 d, 分别收集各菌株的孢子囊制备成孢子囊悬浮。采用离体叶片接种法接种马铃薯 Desiree 叶片, 4 d 后测定叶片的病斑面积。结果表明, 3 个基因沉默菌株对马铃薯的致病性显著降低, 基因沉默菌株引起的病斑面积相较野生型菌株减少 54%–84%; 基因过表达菌株的病斑面积则显著大于野生型菌株, 其病斑面积相较野生型菌株增大 31% (图 8)。该结果说明, PiSAK1 基因的表达式与致病疫霉的致病能力相关, 该基因在病原菌侵染马铃薯过程中发挥正调控作用。

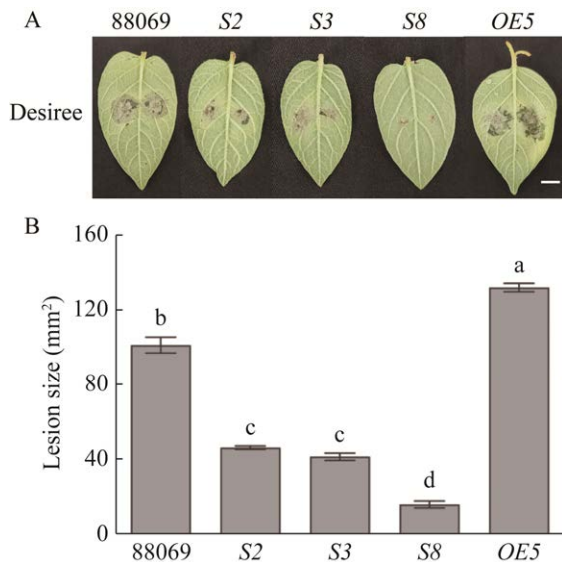


图 8 各菌株对马铃薯的致病力测定 A: 各菌株孢子囊悬浮液侵染马铃薯 Desiree 叶片 4 d 后的发病情况. 标尺: 1 cm. B: 叶片病斑面积统计. 标记不同小写字母的组间差异显著($P < 0.05$)

Figure 8 Determination of pathogenicity of various strains to potatoes. A: Pathogenic status of Desiree leaves infected with sporangium of different strains for 4 days. Bar: 1 cm. B: Statistics of lesion area. Significantly different groups marked with different lowercase letters ($P < 0.05$).

2.7 PiSAK1 影响病原菌清除活性氧的能力

病原菌侵染植物时, 植物的先天免疫首先被激活, 而活性氧迸发就是植物的先天防御反应之一。植物在病原菌侵染位点附近的细胞内积累大量的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 进而通过 ROS 降低病原菌的存活率。为了分析 PiSAK1 沉默、过表达菌株侵染植物时清除活性氧的能力, 本研究利用 DAB 染色法对侵染叶片进行染色并观察侵染位点附近活性氧的积累情况。结果显示, PiSAK1 沉默菌株侵染点附近的活性氧积累显著多于野生型菌株, 而过表达菌株则刚好相反(图 9)。上述结果说明, 沉默 PiSAK1 破坏了病原菌清除活性氧的能力, 而过表达 PiSAK1 则提高了病原菌清除活性氧的能力。因此推测, PiSAK1 通过调控病原菌侵染植物时清除活性氧的能力, 进而影响病原菌的致病性。

3 讨论与结论

致病疫霉是引起世界范围内马铃薯晚疫病大面积传播的首要原因, 每年由马铃薯晚疫病引起的产量损失和管理成本高达 100 亿美元^[24]。致病疫霉在侵染马铃薯的过程中会受到各种不利条件的刺激, 病原菌如何克服外界不利影响并成功侵染马铃薯这一机制至今仍未被完全揭示。全面解析这一科学问题对研究病原菌的侵染机制、开发新的杀菌剂作用靶标意义重大。

SAPKs 是一类胁迫激活的 MAPK, 在细胞抵御外界不良环境维持细胞内环境稳态方面有重要作用^[25]。植物致病真菌 SAPKs 的相关研究比卵菌多, 其功能具有差异性和多样性。前人研究报道显示, 破坏 SAPKs 的功能会阻碍病原菌的生长发育、影响病原菌对外界不良环境的适应性以及减弱病原菌的致病力等^[7-13]。有关植物病原卵菌中 SAPKs 的报道较少, 本研究从致

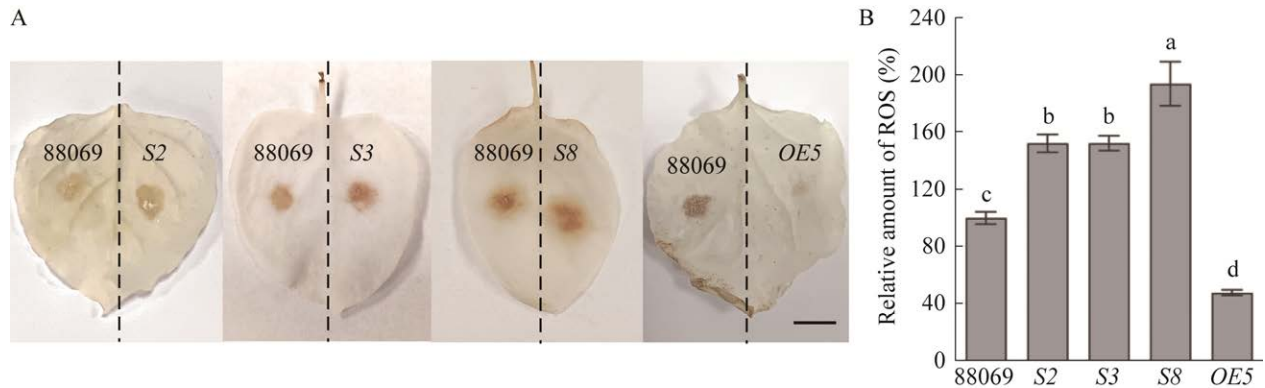


图9 各菌株侵染位点处活性氧的测定 A: 各菌株孢子囊悬浮液侵染本氏烟叶片 48 h 后 DAB 染色情况. B: DAB 染色后接种部位 ROS 积累量统计. 标记不同小写字母的组间差异显著($P<0.05$)

Figure 9 Determination of reactive oxygen species at the infection sites of each strain. A: DAB staining of *Nicotiana benthamiana* leaves infected with different strains for 48 h. B: Statistics of ROS accumulation at the inoculation site after DAB staining. Significantly different groups marked with different lowercase letters ($P<0.05$).

病疫霉中找到了一个 SAPK, 即 PiSAK1。系统聚类分析表明, 致病疫霉的 SAPK 与其他卵菌的 SAPKs 聚成一支, 而与哺乳动物及真菌的 SAPKs 相距较远。本研究发现, 在致病疫霉休止孢阶段、侵染马铃薯早期以及 NaCl、H₂O₂ 胁迫刺激后 PiSAK1 的表达量均显著升高, 说明 PiSAK1 在侵染马铃薯、调控高渗透压胁迫及氧化胁迫应答过程中起到重要作用。本研究进一步构建了 PiSAK1 基因沉默及过表达菌株, 研究结果表明, PiSAK1 沉默后菌株生长受限、无性孢子囊产量显著下降; 而 PiSAK1 过表达菌株的生长与野生型菌株无显著差异, 其无性孢子囊产量则显著高于野生型。此外, PiSAK1 基因沉默菌株对 NaCl 及 H₂O₂ 的敏感性显著增强, 沉默菌株中 PiGPD1 及 PiCAT2 的表达被抑制, 而 PiSAK1 过表达菌株则刚好相反。该结果提示 PiSAK1 在菌株生长发育、无性孢子囊形成及调控细胞胁迫应答方面发挥重要作用。致病性检测及活性氧清除能力检测结果表明, PiSAK1 的表达量与病原菌的致病性、清除活性氧的能力

紧密相关, 沉默 PiSAK1 导致病原菌的致病性及清除活性氧的能力均显著降低, 而过表达菌株则相反, 说明该基因正调控病原菌的致病性。结合以上结果推断, PiSAK1 的功能缺失影响了病原菌无性孢子囊、游动孢子及休止孢内的渗透压平衡, 且病原菌无法很好地抵御植物的免疫屏障——活性氧暴发, 因此病原菌无法正常侵染马铃薯, 导致其侵染能力显著降低。

本研究从致病疫霉中找到了一个胁迫激活的丝裂原活化蛋白激酶, 即 PiSAK1。初步研究结果表明, PiSAK1 对致病疫霉的生长发育、无性孢子囊产生、渗透压调节、氧化胁迫应答和病原菌致病性至关重要。该结果为后续开发新的杀菌剂作用靶标、选育马铃薯抗病新品种奠定了理论基础。

REFERENCES

- [1] FRY W. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer[J]. Molecular Plant Pathology, 2008, 9(3): 385-402.
- [2] ZESS EK, DAGDAS YF, PEERS E, MAQBOOL A,

- BANFIELD MJ, BOZKURT TO, KAMOUN S. Regressive evolution of an effector following a host jump in the Irish potato famine pathogen lineage[J]. *PLoS Pathogens*, 2022, 18(10): e1010918.
- [3] DU Y, CHEN XK, GUO YL, ZHANG XJ, ZHANG HX, LI FF, HUANG GY, MENG YL, SHAN WX. *Phytophthora infestans* RXLR effector PITG20303 targets a potato MKK1 protein to suppress plant immunity[J]. *The New Phytologist*, 2021, 229(1): 501-515.
- [4] CHEN XK, WANG WB, CAI PP, WANG ZW, LI TT, DU Y. The role of the MAP kinase-kinase protein StMKK1 in potato immunity to different pathogens[J]. *Horticulture Research*, 2021, 8: 117.
- [5] REN YJ, ARMSTRONG M, QI YT, McLELLAN H, ZHONG C, DU BW, BIRCH PRJ, TIAN ZD. *Phytophthora infestans* RXLR effectors target parallel steps in an immune signal transduction pathway[J]. *Plant Physiology*, 2019, 180(4): 2227-2239.
- [6] BROWN AJP, BUDGE S, KALORITI D, TILLMANN A, JACOBSEN MD, YIN ZK, ENE IV, BOHOVYCH I, SANDAI D, KASTORA S, POTRYKUS J, BALLOU ER, CHILDERS DS, SHAHANA S, LEACH MD. Stress adaptation in a pathogenic fungus[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 2014, 217(Pt 1): 144-155.
- [7] MEHRABI R, ZWIERS LH, de WAARD MA, KEMA GHJ. *MgHog1* regulates dimorphism and pathogenicity in the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(11): 1262-1269.
- [8] DIXON KP, XU JR, SMIRNOFF N, TALBOT NJ. Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*[J]. *The Plant Cell*, 1999, 11(10): 2045-2058.
- [9] KOJIMA K, TAKANO Y, YOSHIMI A, TANAKA C, KIKUCHI T, OKUNO T. Fungicide activity through activation of a fungal signalling pathway[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(6): 1785-1796.
- [10] PARK SM, CHOI ES, KIM MJ, CHA BJ, YANG MS, KIM DH. Characterization of HOG1 homologue, CpMK1, from *Cryphonectria parasitica* and evidence for hypovirus-mediated perturbation of its phosphorylation in response to hypertonic stress[J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 51(5): 1267-1277.
- [11] MORIWAKI A, KUBO E, ARASE S, KIHARA J. Disruption of *SRMI*, a mitogen-activated protein kinase gene, affects sensitivity to osmotic and ultraviolet stressors in the phytopathogenic fungus *Bipolaris oryzae*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2006, 257(2): 253-261.
- [12] 王调兰. Hog1、Slt2-MAP 激酶对梨果蜡质及疏水性诱导 *Alternaria alternata* 侵染结构分化的调控作用[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2020.
- WANG DL. Regulation role of Hog1 and Slt2 MAP kinases on infection structural differentiation of *Alternaria alternata* induced by pear cuticular wax and hydrophobicity[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [13] JOHN E, LOPEZ-RUIZ F, RYBAK K, MOUSLEY CJ, OLIVER RP, TAN KC. Dissecting the role of histidine kinase and HOG1 mitogen-activated protein kinase signalling in stress tolerance and pathogenicity of *Parastagonospora nodorum* on wheat[J]. *Microbiology*, 2016, 162(6): 1023-1036.
- [14] BALDAUF SL, ROGER AJ, WENK-SIEFERT I, DOOLITTLE WF. A Kingdom-level phylogeny of eukaryotes based on combined protein data[J]. *Science*, 2000, 290(5493): 972-977.
- [15] HARPER JT, WAANDERS E, KEELING PJ. On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes[J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2005, 55(1): 487-496.
- [16] BLAIR JE, COFFEY MD, MARTIN FN. Species tree estimation for the late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, and close relatives[J]. *PLoS One*, 2012, 7(5): e37003.
- [17] COCK JM, STERCK L, ROUZÉ P, SCORNET D, ALLEN AE, AMOUTZIAS G, ANTHOUARD V, ARTIGUENAVE F, AURY JM, BADGER JH, BESZTERI B, BILLIAU K, BONNET E, BOTHWELL JH, BOWLER C, BOYEN C, BROWNLEE C, CARRANO CJ, CHARRIER B, CHO GY, et al. The *Ectocarpus* genome and the independent evolution of multicellularity in brown algae[J]. *Nature*, 2010, 465(7298): 617-621.
- [18] WALKER CA, van WEST P. Zoospore development in the oomycetes[J]. *Fungal Biology Reviews*, 2007, 21(1): 10-18.
- [19] LIU PQ, WEI MY, ZHANG JZ, WANG RB, LI BJ, CHEN QH, WENG QY. Changes in mycelia growth, sporulation, and virulence of *Phytophthora capsici* when challenged by heavy metals (Cu^{2+} , Cr^{2+} and Hg^{2+})

- under acid pH stress[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 235: 372-380.
- [20] LI AN, WANG YL, TAO K, DONG SM, HUANG Q, DAI TT, ZHENG XB, WANG YC. PsSAK1, a stress-activated MAP kinase of *Phytophthora sojae*, is required for zoospore viability and infection of soybean[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, 23(8): 1022-1031.
- [21] 马振川. 疫霉菌一个新病原相关模式分子 PsXEG1 的鉴定和功能分析[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2015.
- MA ZC. Identification and functional characterizations of a novel PAMP PsXEG1 in *Phytophthora*[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2015 (in Chinese).
- [22] REN MM, LI RL, HAN B, YOU YL, HUANG WD, DU G, ZHAN JC. Involvement of the high-osmolarity glycerol pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in protection against copper toxicity[J]. *Antioxidants*, 2022, 11(2): 200.
- [23] WANG TH, WANG XW, ZHU XQ, HE Q, GUO LY. A proper PiCAT2 level is critical for sporulation, sporangium function, and pathogenicity of *Phytophthora infestans*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(4): 460-474.
- [24] DONG SM, ZHOU SQ. Potato late blight caused by *Phytophthora infestans*: from molecular interactions to integrated management strategies[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21(12): 3456-3466.
- [25] de NADAL E, POSAS F. The HOG pathway and the regulation of osmoadaptive responses in yeast[J]. *FEMS Yeast Research*, 2022, 22(1): foac013.