



大豆胞囊线虫效应蛋白 Hg16B09 对植物免疫反应的抑制作用

王 宇¹, 尤 佳^{2,3}, 陈傲霜¹, 徐利剑¹, 胡岩峰²

(1. 黑龙江大学 现代农业与生态环境学院, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081; 3. 黑龙江省农业科学院 草业研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:为明确大豆胞囊线虫效应蛋白 Hg16B09 是否对植物免疫反应具有调控作用,本研究借助本氏烟草叶片瞬时表达 Hg16B09,利用免疫激发子触发 PTI 和 ETI 反应,考察激发子诱导烟草叶片细胞过敏性坏死反应发生、活性氧爆发以及防御相关基因的表达变化情况。结果表明:Hg16B09 在烟草细胞中瞬时表达能够显著抑制鞭毛蛋白 flg22 诱导 H₂O₂ 的产生及防御基因 *PTI5*、*WRKY22-A*、*WRKY22-B* 和 *ACRE31* 的表达,其表达量相比对照分别降低了 45%、61%、67% 和 61%。Hg16B09 也能抑制由丁香假单胞杆菌 *Pst* DC3000 和线虫无毒效应子 Rbp-1 触发的 HR 发生,并减少了细胞坏死面积;qRT-PCR 分析显示,Hg16B09 对 *Pst* DC3000 激活的 SA 途径防御基因 *PR1a*、*PR2*、*WRKY51* 及 *PII* 上调表达具有显著抑制作用,与对照相比表达量分别降低了 67%、71%、48% 和 81%。以上结果表明 Hg16B09 对植物的 PTI 和 ETI 免疫反应具有双重抑制作用,说明调控寄主免疫防御是 Hg16B09 促进 SCN 寄生的一个关键毒性功能。

关键词:大豆;大豆胞囊线虫;效应蛋白;Hg16B09;PTI 免疫反应;ETI 免疫反应;防御相关基因

The *Heterodera glycines* Effector Hg16B09 Suppresses Plant Innate Immunity

WANG Yu¹, YOU Jia^{2,3}, CHEN Ao-shuang¹, XU Li-jian¹, HU Yan-feng²

(1. College of Modern Agriculture and Ecological Environment, Heilongjiang University, Harbin 150080, China; 2. Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Harbin 150081, China; 3. Institute of Pratacultural Science, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: To test whether the effector Hg16B09, identified from the soybean cyst nematode (SCN), *Heterodera glycines*, plays an important role in manipulating host defense responses, we used *Nicotiana benthamiana* to transiently express recombinant *Hg16B09* plasmid, and different immune elicitors which can trigger defense responses (PTI and ETI). Then, the effects of Hg16B09 on PTI and ETI suppression were investigated by determining the reactive oxygen species (ROS) burst, hypersensitive response (HR), and the expression of defense marker genes. Transient expression of Hg16B09 in *Nicotiana benthamiana* leaves significantly suppressed the production of hydrogen peroxide and the expression levels of defense-related genes (*PTI5*, *WRKY22-A*, *WRKY22-B* and *ACRE31*) triggered by flg22. The transcript levels of *PTI5*, *WRKY22-A*, *WRKY22-B* and *ACRE31* significantly decreased 45%, 61%, 67% and 61% in *N. benthamiana* leaves expressing *Hg16B09* when compared to that in the control leaves, respectively. Hg16B09 could also inhibit HR induced by *Pseudomonas syringae* DC 3000 and an avirulent effector Rbp-1, which resulted in the smaller areas of cell death on the *N. benthamiana* leaves. qRT-PCR analysis further showed that Hg16B09 caused significant down-regulation of defense genes in salicylic acid signaling during *Pst* DC3000 infection, and the expression levels of *PR1a*, *PR2*, *WRKY51* and *PII* induced by *Pst* DC3000 decreased approximately 67%, 71%, 48% and 81% in the leaves expressing *Hg16B09* compared to the control leaves, respectively. In conclusion, our data indicated that Hg16B09 acts as PTI and ETI suppressors to perform its toxic biological functions during SCN-host interactions.

Keywords: Soybean; Soybean cyst nematode; Effector; Hg16B09; PAMP-triggered immunity (PTI); Effectors-triggered immunity (ETI); Defense-related genes

大豆是全球重要的经济和油料作物,但其产量一直深受病虫害制约。由大豆胞囊线虫 (Soybean Cyst Nematode, SCN) 引起的植物线虫病是限制大豆生产的主要病害之一,世界范围内每年因 SCN 造成的经济损失达 15 亿美元^[1-2]。前期调查显示 SCN 在我国东北、黄淮海等大豆主产区广泛发生^[2],且近年来逐渐向我国西北、西南省份蔓延^[3-4],严重制约了大豆产业的健康发展。SCN 与寄主植物在长

期“斗争”中形成了复杂的共进化关系,导致 SCN 在抗性品种的选择压力下出现遗传变异^[5]。有研究报道,一些具有适应性的新 SCN 毒性生理小种可打破源于 PI88788、Peking、PI437654 等(携带 R 基因)基因型大豆品种的抗性^[6-7]。因此,当前 SCN 抗病育种工作面临巨大挑战,解析 SCN 的致病机理对抗病防治及遗传育种工作具有重要的理论和指导意义。

收稿日期:2021-05-28

基金项目:黑龙江省自然科学基金(YQ2019C026);中国科学院青年创新促进会人才项目(2020236)。

第一作者:王宇(1998—),女,在读硕士,主要从事资源利用与植物保护研究。E-mail:1119372970@qq.com。

通讯作者:胡岩峰(1985—),男,博士,副研究员,主要从事植物寄生线虫与寄主互作机理研究。E-mail:huyanfeng@iga.ac.cn。

植物在遭受病原物侵染时会激活自身免疫防御系统,主要涉及两个层面免疫反应。第一层即由植物细胞表面的免疫受体 (Pattern Recognition Receptor, PRR) 识别各种不同的病原微生物模式分子 (Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs) 进而触发的一系列抗病反应 (PAMPs-Triggered Immunity, PTI), 其中典型的 PTI 反应包括质膜离子通道活化、钙离子内流、活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 迸发、胼胝体沉积、MAPK 级联通路激活及大量防御相关基因的诱导表达^[8]。第二层的免疫反应是由植物细胞内部一类包含核苷酸结合结构域及亮氨酸富集重复区的受体类蛋白 (Nucleotide-Binding Domain and Leucine-Rich Repeat Receptor, NLR) 通过有效识别病原菌分泌的效应蛋白, 进而激活的免疫反应被称为 ETI (Effector-Triggered Immunity)^[8]。在 ETI 反应部位植物细胞常会产生大量 ROS, 并诱导剧烈的高敏反应 (Hypersensitive Response, HR), 最终引起病原物侵染部位的细胞坏死^[8]。为应对植物病原线虫的威胁, 植物也会利用模式识别受体 PRR 或类受体激酶 (Receptor-Like Kinases, RLK) 感知线虫相关模式分子 (Nematode-Associated Molecular Patterns, NAMPs), 继而启动由 NAMPs 触发的 PTI 反应^[9-11]。与病原菌类似, 与寄主互作的过程中线虫会利用口针注射多种效应蛋白作为“有效武器”进入植物细胞, 从而调节寄主生理状态, 抑制或逃避寄主植物的免疫防御, 从而帮助其侵染和建立寄生关系^[12-13]。同时, 寄主植物也会进化出相应的抗病蛋白去识别线虫的效应蛋白, 在受侵染的部位发生明显的 HR 反应, 激发更强烈的 ETI 免疫反应从而限制线虫发育^[14-16]。

相较其它植物寄生线虫而言, 对 SCN 效应蛋白功能的研究较为缓慢。自 2003 年以来, 利用腺体 cDNA 文库及高通量测序技术已鉴定出超过 400 多种 SCN 效应子^[17-20], 但仅个别效应子功能得到解析。此外, 在毒性和非毒性 SCN 小种中某些效应子存在拷贝数不同、特定功能区序列缺失、碱基变异等特点^[21-23]。最近 Ste-Croix 等^[24] 对能克服 PI88788 和 Peking 抗性的毒性 SCN 作了全长转录组分析, 鉴定到 48 个效应蛋白与 SCN 毒力进化有关, 其中有 40 个效应子出现了新的蛋白变异体, 11 个效应子基因发生了基因多态性变异。以上研究暗示了 SCN 通过不断进化效应子来增强致病性, 这可能也是导致 SCN 克服寄主免疫防御及寄主抗性丧失的主要原因。因此, 在分子层面深入解析 SCN 效应蛋白的毒性机制是当前亟待解决的科学问题, 是

认识 SCN 致病机理和针对性地开发新抗病资源的迫切需求。

Hg16B09 是从 SCN 中鉴定到的一个毒性效应蛋白, 在大豆中异源表达后能显著提升 SCN 的繁殖率, 并且该蛋白在 *Heterodera avenae*、*Heterodera schachtii*、*Globodera pallida* 等胞囊线虫属内具有广泛保守性, 对线虫寄生至关重要^[25-26]。此外, 过表达 Hg16B09 能明显抑制由细菌鞭毛蛋白 flg22 诱导的大豆防御相关基因上调表达, 暗示 Hg16B09 可能通过影响植物防御反应来帮助 SCN 完成寄生^[25], 但关于该效应子调控植物免疫应答的具体作用尚不明确。本研究拟采用农杆菌介导的烟草叶片瞬时表达系统, 以 flg22 作为激发子与注射 Hg16B09 的烟草叶片共孵育^[27], 通过检测 ROS 含量以及防御相关基因 *PTI5*、*WRKY22-A*、*WRKY22-B* 和 *ACRE31* 的表达变化情况, 明确 Hg16B09 对 PTI 反应的调节作用。丁香假单胞杆菌 *Pst* DC3000 是一种广谱性的毒性病原菌, 能够侵染多种植物, 也是研究植物免疫机制的常用病原菌。野生型 *Pst* DC3000 菌株因包含 HopQ1 等效应蛋白, 能被烟草 R 基因识别, 常被用于触发植物的 HR 反应^[28]。Rbp-1 是马铃薯胞囊线虫分泌的无毒效应蛋白, 进入植物细胞后能被寄主的 R 基因 *Gpa-2* 识别进而激活 ETI 反应, 如发生 HR^[29]。因此, 本研究进一步以瞬时表达 Hg16B09 的烟草叶片为材料, 通过注射 *Pst* DC3000 及能表达免疫激发子 *Gpa-2*/Rbp-1 的农杆菌, 分析烟草叶片细胞 HR 发生及 SA 途径防御相关基因 *PR1a*、*PR2*、*WRKY51* 和 *PII* 的表达情况, 验证 Hg16B09 是否能够抑制植物的 ETI 反应。研究旨在为揭示 Hg16B09 蛋白家族的毒性机制提供理论基础, 也为解析 SCN 的致病机理及开发该病害综合防控策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试植物 供试的本氏烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 由本实验室保存。

1.1.2 供试菌株及载体 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自北京博迈德公司。表达 *Gpa-2*/Rbp-1 蛋白的 GV3101 农杆菌菌株由康奈尔大学王晓红教授提供。丁香假单胞菌株 *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 (*Pst* DC3000) 由中国农业科学院烟草研究所提供。pJL-RFP-35S::GUS 植物表达载体用于注射烟草叶片试验, 由田纳西大学农学院 Tarek Hewezi 实验室提供。

1.2 试验设计

根据前期从 SCN 中克隆到 *Hg16B09* 基因的 ORF 序列^[25], 构建测序正确的重组载体 Hg16B09^{-SP}-RFP(不包含信号肽 SP), 并将其转化至农杆菌 GV3101 感受态细胞中, 用于烟草叶片瞬时表达试验。

Hg16B09 抑制植物 PTI 反应验证试验: 挑选长势相似且完整的烟草叶片, 用一次性针头在每个叶片背面分别注射携带 Hg16B09^{-SP} 和空载体的农杆菌悬液。将烟草置于培养箱暗处理 24 h 后, 收集注射点位置的烟草叶盘进行 6 h 暗处理。将处理后的叶盘转移到 flg22 (100 nmol·L⁻¹) 溶液中孵育 40 min, 随后收集样品, 分别测定其 H₂O₂ 含量, 提取 RNA, 并采用 qRT-PCR 分析防御相关基因 (*PTI5*、*ACRE31*、*WRKY22-A*、*WRKY22-B*) 的表达情况。每次试验共注射 48 株烟草, 每株烟草至少注射 2 片叶子。H₂O₂ 的含量测定和 qRT-PCR 分析试验设置 3 个生物学重复及 4 个技术重复。

Hg16B09 抑制植物 HR 和 ETI 反应验证试验: 分别注射 Hg16B09^{-SP}-RFP 或空载体 (EV) 的农杆菌悬液后, 将烟草置于培养箱暗处理 24 h, 并在相同注射位置分别注射含 Pst DC3000 和 GV3101 的菌悬液, 以单独注射 GV3101 农杆菌作为阳性对照组, 注射 MgCl₂ 缓冲液 (Buffer) 作为阴性对照组。注射完成后, 将烟草植株放置于光照培养箱中继续生长 3~5 d, 观察烟草叶片是否出现细胞程序性死亡情况, 记录结果并拍照。另外, 用打孔器收集各处理组 (Buffer、Pst DC3000 + Hg16B09、Pst DC3000 + EV) 烟草叶盘, 提取 RNA 并用 qRT-PCR 方法分析防御相关基因 (*PR1a*、*PR2*、*WRKY51* 和 *PII*) 的表达情况。每次试验共注射 48 株烟草, 每株烟草至少注射 2 个叶片, 至少进行 3 个独立的试验。qRT-PCR 分析设置 3 个生物学重复及 4 个技术重复。

1.3 方法

1.3.1 重组载体的构建 根据已知序列, 利用特异性引物进行 PCR, 扩增去信号肽的 Hg16B09^{-SP} 基因片段, 并通过 *Bam*H I 和 *Sac* I (NEB, 伊普斯威奇, 马萨诸塞州, 美国) 双酶切方法^[25] 将目的片段导入 pJL-RFP-35S::GUS 质粒。利用冻融法^[30] 将重组质粒转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 在含有卡那霉素 (100 μg·mL⁻¹) LB 平板上筛选阳性克隆, 经菌落 PCR 验证后, 挑选阳性克隆进行测序验证^[25]。选择测序正确的 Hg16B09^{-SP} 重组质粒, 采用冻融法转化至农杆菌 GV3101 感受态细胞, 在含有卡那霉

素 (100 μg·mL⁻¹) 和利福平 (50 μg·mL⁻¹) LB 培养基上选择阳性克隆。

1.3.2 注射法转化烟草叶片 参考 Chen 等^[27] 方法, 挑选生长 28~42 d 状态良好的烟草, 选取较大且完整无破损的 2~4 片叶子做好标记。用一次性针头在叶片下表皮划一小伤口 (避免刺破叶片), 使用注射器将携带 Hg16B09^{-SP}-RFP 或空载体的农杆菌悬液 (10 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 缓冲液重悬至 OD₆₀₀ 为 0.2) 注入叶片背面。烟草放置培养箱中黑暗环境培养 24 h 后用于 Hg16B09 抑制植物 PTI 和 ETI 反应验证试验。

1.3.3 免疫抑制试验 PTI 试验: 利用打孔器 (0.5 cm 孔径打孔器) 收集注射点位置的烟草叶盘, 无菌水冲洗 3 次后暗处理 6 h。转移叶盘至 flg22 (100 nmol·L⁻¹) 溶液中孵育 40 min, 收集样品分别用于活性氧含量测定以及 RNA 提取。

HR 和 ETI 试验: 参考 Noon 等^[31] 的方法进行 Pst DC3000/免疫激发子 Gpa-2/Rbp-1 诱导烟草 HR 和 ETI 反应^[29]。将 Pst DC3000 菌株活化后, 转接至包含利福平 (50 μg·mL⁻¹) 的金氏 B 培养液中 28 ℃ 过夜培养, 收集菌体并用 MgCl₂ (10 mmol·L⁻¹) 重悬至 OD₆₀₀ 为 0.02 备用。另外, 将 GV3101 农杆菌过夜培养, 沉降菌体后用 MgCl₂ (10 mmol·L⁻¹) 稀释至 OD₆₀₀ 为 0.2, 注射前将相同 OD₆₀₀ 的 GV3101 菌悬液 1:1 充分混匀备用。农杆菌介导 Hg16B09^{-SP} 重组质粒转化烟草叶片 24 h 后, 在相同注射位置分别注射 Pst DC3000 和 GV3101 农杆菌悬液。

1.3.4 植物 RNA 提取与 qRT-PCR 分析 将收集的烟草叶片 (0.1 g) 在液氮中速冻后研磨成粉末, 使用 RNAprep pure Plant Kit 植物总 RNA 提取试剂盒 (天根) 提取总 RNA 样品。以 0.5 μg RNA 为模板, 使用天根 FastKing DNA Dispelling RT SuperMix FastKing Kit 反转录试剂盒 (含去除基因组 DNA) 合成 cDNA。

采用 AceQ qPCR SYBR Green Master Mix 试剂盒 (诺唯赞) 在荧光定量 PCR 仪 (罗氏 LightCycler® 480 System) 上进行 qRT-PCR 分析。反应体系为: 2×Super Real PreMix Plus 10 μL、正反向引物 (10 μmol·L⁻¹) 各 0.6 μL、cDNA 模板 1 μL, 最后加 ddH₂O 至 20 μL。循环条件为: 预变性 95 ℃ 持续 15 min, 变性 95 ℃ 持续 10 s, 退火/延伸 60 ℃ 持续 30 s, 共 40 个循环。以烟草 *NbActin1* 基因为内参基因, 使用 2^{-ΔΔCT} 法计算防御相关基因的相对表达量 (表 1)。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Table 1 The qRT-PCR primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5′-3′) Prime sequence (5′-3′)	备注 Remark	参考文献 Reference
NbPR1a_F	CGACCAGGTAGCAGCCTATG	<i>Pst</i> DC 3000 诱导	[31]
NbPR1a_R	TCTCAACAGCCTTAGCAGCC	<i>Pst</i> DC 3000 诱导	
NbPR2_F	GGGCTGTTAATTTGCAGTATCC	<i>Pst</i> DC 3000 诱导	
NbPR2_R	GCTTTATAACATCTTGGTCTGATGG	<i>Pst</i> DC 3000 诱导	
NbWRKY51_F	CTCATCAGCTAGTTCATTTGATGC	<i>Pst</i> DC 3000 诱导	[32]
NbWRKY51_R	AGCTCGGTCTTTGTTCTAAAAGC	<i>Pst</i> DC 3000 诱导	
NbPII_F	CTTCAAAGACTATGGTGAAGTTTGC	<i>Pst</i> DC 3000 诱导	
NbPII_R	CAGACTGAGACACATCAAGTTGC	<i>Pst</i> DC 3000 诱导	
NbPti5_F	CCTCCAAGTTTGAGCTCGGATAGT	flg22 诱导	[31]
NbPti5_R	CCAAGAAATTCTCCATGCACTCTGTG	flg22 诱导	
NbAcre31_F	AATTCGGCCATCGTGATCTTTGGTC	flg22 诱导	
NbAcre31_R	GAGAAACTGGGATTGCCTGAAGGA	flg22 诱导	
NbWrky22-A_F	ATCTCAACCACAACAACAGCCACC	flg22 诱导	[31]
NbWrky22-A_R	ACAGACAGAGACTGCTTGGGTGT	flg22 诱导	
NbWrky22-B_F	CGAATCTCCGTTACAGAAATCGCCTC	flg22 诱导	
NbWrky22-B_R	ATGACAGGGATCGTTTGATGGGCT	flg22 诱导	
NbActin1_F	GTTGCTATACAAGCTGTTCTCTCG	内参	[31]
NbActin1_R	GTCAAGACGAAGAATGACATGTGG	内参	

1.3.5 H₂O₂ 含量测定 参照 Veljovic-Jovanovic 等^[33]的方法测定 H₂O₂ 的含量。称取 0.1 g 烟草叶盘加 2 mL 1 mol·L⁻¹的 HClO₄ (含 5% PVP) 在 4 ℃ 条件下研磨成匀浆, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min (4 ℃)。收集上清液, 加入 0.3 mol·L⁻¹ pH5.6 的磷酸缓冲液 100 μL, 并用 5 mol·L⁻¹ K₂CO₃ 调节至 pH5.6, 12 000 r·min⁻¹ 离心 1 min 后加入 1 μmol·min⁻¹ 抗坏血酸氧化酶孵育 10 min。反应混合液包括 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液 (pH6.5), 3.3 mol·mL⁻¹ DMAB, 0.07 mol·mL⁻¹ MBTH 及 0.3 μmol·min⁻¹ 过氧化物酶, 加入 200 μL H₂O₂ 提取液启动反应, 测量 595 nm 波长下的吸光值, 以 10 ~ 50 μmol·mL⁻¹ H₂O₂ 作标准曲线计算 H₂O₂ 的含量。

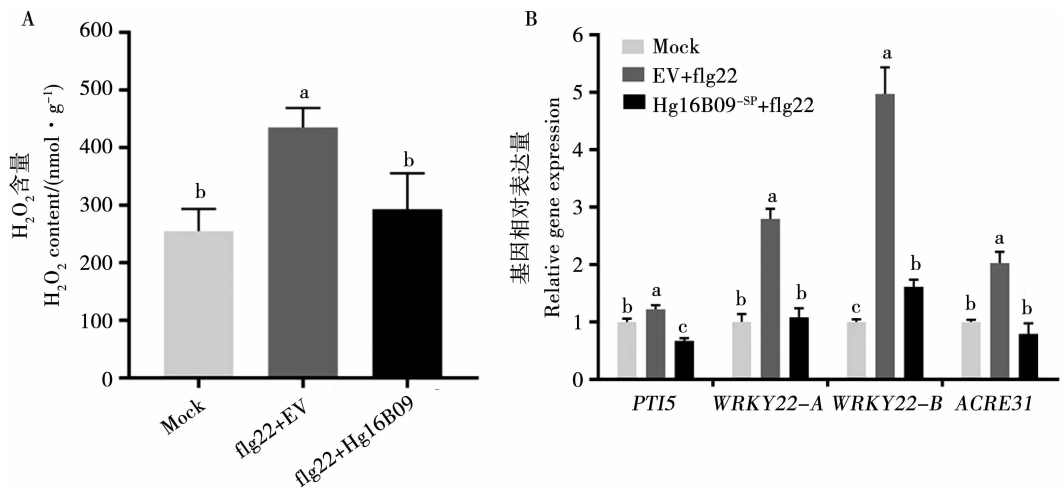
1.4 数据分析

试验数据采用 SPSS version 17.0 进行单因素方差分析, 应用 Tukey's HSD 检验法进行对照组和处理组间差异显著性分析^[34]。

2 结果与分析

2.1 Hg16B09 抑制细菌鞭毛蛋白 flg22 诱导的 PTI 反应

与对照 Mock 相比, flg22 处理后, 注射空载体的叶片中 H₂O₂ 含量上升了约 7 倍, 但是表达 Hg16B09 的烟草叶盘中 H₂O₂ 水平仅升高了 2.4 倍 (图 1A), 这表明 Hg16B09 能够抑制 flg22 诱导 ROS 的产生。为了进一步验证 Hg16B09 对 flg22 诱导 PTI 反应的抑制作用, qRT-PCR 方法分析 flg22 响应基因表达情况的结果显示, flg22 处理 40 min 后能显著激活空载体组叶片中防御相关基因 *PTI5*、*WRKY22-A*、*WRKY22-B* 和 *ACRE31* 上调表达, 注射 Hg16B09 则显著降低了 flg22 对 4 个防御基因表达的诱导作用 (图 1B), 表明 Hg16B09 可以抑制由 flg22 激活的 PTI 免疫反应。



A. H₂O₂ 含量变化;B. qRT-PCR 分析 flg22 响应基因表达变化。图中数据为平均值±标准误差;不同字母表示不同处理组之间差异显著($P < 0.05$)。

A. The content of H₂O₂; B. Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) expression analysis of defense marker genes induced by flg22. Data are the mean ± SE; Different letters indicated significant difference between different treatments($P < 0.05$).

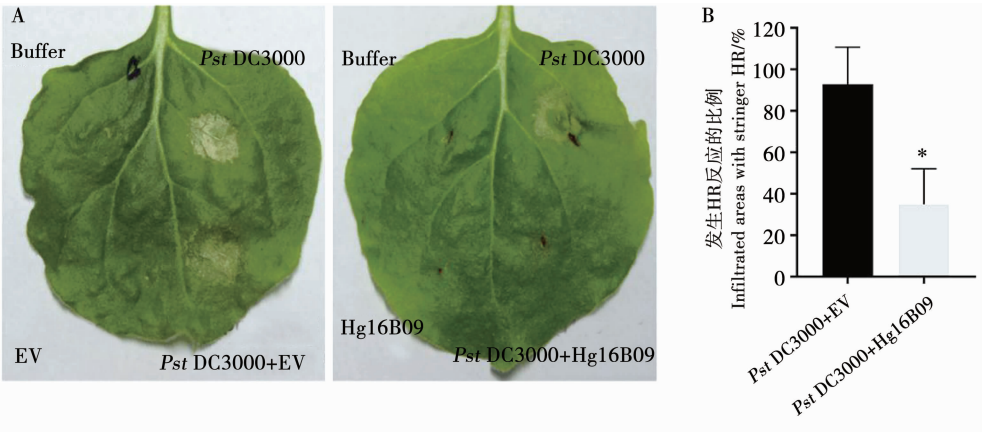
图 1 Hg16B09 对 flg22 诱导 H₂O₂ 产生和防御基因表达的抑制作用

Fig.1 The inhibition of Hg16B09 on flg22 induced H₂O₂ production and defense gene expression

2.2 Hg16B09 抑制丁香假单胞杆菌 *Pst* DC3000 诱导的 HR 反应验证

结果表明,单独注射 Buffer 或含有空载体 GV3101 农杆菌后并未引起 HR 反应,而接种 *Pst* DC3000则显著诱导细胞坏死。尽管在注射 Hg16B09 重组质粒的部位未发现 HR,但接种 *Pst* DC3000 后其诱导的 HR 因注射 Hg16B09 而显著减少(图 2A)。统计学结果也显示,单独接种 *Pst*

DC3000 可引起约 93% 注射位点产生 HR 反应,但在 Hg16B09 表达位点由 *Pst* DC3000 诱导的 HR 反应的比例下降至 35% (图 2B)。qRT-PCR 结果显示, *Pst* DC3000 侵染能显著激活 SA 途径防御基因 *PR1a*、*PR2*、*PII* 以及 *WRKY51* 上调表达;但注射 Hg16B09 后 4 种防御基因的表达则被不同程度的抑制(图 3)。以上试验结果表明,Hg16B09 能够抑制由 *Pst* DC3000 诱导 HR 爆发和植物 ETI 反应。



A. 烟草中瞬时表达 Hg16B09 后 *Pst* DC3000 诱导细胞 HR 反应的表型特征;B. 烟草叶片注射点发生 HR 反应的数目占总注射点的百分比。* 表示不同处理组之间差异显著($P < 0.05$)。

A. The phenotypic characteristics of HR response induced by *Pst* DC3000 after transient expression of Hg16B09 in tobacco leaves; B. The number of HR reaction in tobacco leaves accounted for the percentage of total injection points. * indicated that there was significant difference between different treatments($P < 0.05$).

图 2 Hg16B09 抑制 *Pst* DC3000 诱导细胞发生 HR 反应验证试验

Fig.2 The Hg16B09 inhibits the HR response induced by *Pst* DC3000

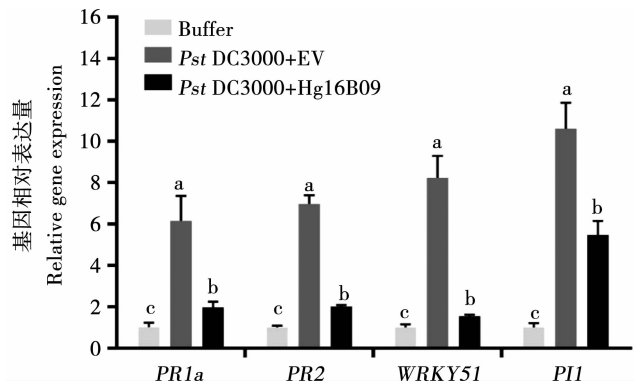
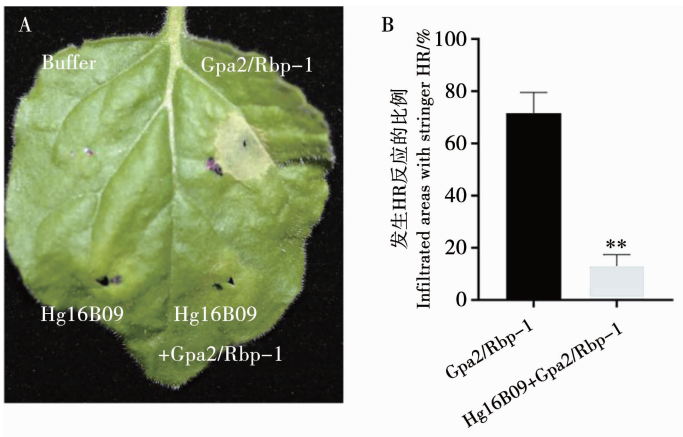


图3 qRT-PCR 分析 Hg16B09 对 *Pst* DC3000 诱导防御相关基因表达的影响

Fig.3 The qRT-PCR analysis of the effects of Hg16B09 on the defense gene related genes expression induced by *Pst* DC3000

2.3 Hg16B09 抑制 Gpa-2/Rbp-1 诱导的 ETI 反应验证

研究结果显示,单独注射 GV3101 菌液后能显著诱导烟草叶片发生 HR,但在注射 Hg16B09 的位点重新接种 GV3101 后,细胞的坏死现象被明显抑制(图 4A)。对 3 次生物学试验中 HR 发生比例做了进一步的统计分析,结果显示同时注射空载体和 GV3101 的位置发生 HR 反应的比例约为 72%,但在 Hg16B09 注射点 GV3101 诱导细胞发生 HR 的比例降至 13% (图 4B)。以上结果表明,效应蛋白 Hg16B09 能够有效抑制由 Gpa-2/Rbp-1 激发的 ETI 反应。



A. Gpa-2/Rbp-1 在烟草中诱导细胞发生 HR 反应的表型特征;B. 烟草叶片注射点发生 HR 反应的数目占总注射点的百分比; * 表示不同处理组之间差异显著 ($P < 0.05$)。

A. Gpa-2/Rbp-1 induced HR response in tobacco cells; B. The number of HR reaction in tobacco leaves accounted for the percentage of total injection points; * indicated that there was significant difference between different treatment groups ($P < 0.05$) .

图4 Hg16B09 抑制由 Gpa-2/Rbp-1 激发的 HR 反应

Fig.4 The Hg16B09 inhibits HR response stimulated by Gpa-2/Rbp-1

3 讨论

线虫效应蛋白的生物学功能主要包括改变寄主细胞结构、功能及代谢,促进取食位点形成^[18],而操纵植物免疫防御(PTI 和 ETI)则是植物寄生线虫完成寄生的另一种重要生存策略^[14,35]。目前,通过建立烟草叶片瞬时表达系统,将非线虫类 PAMP 作为激发子与效应蛋白共注射,是探究线虫效应蛋白对 PTI 反应的调节作用的主要方法。有研究报道 Annexin 类效应蛋白对 PTI 信号通路上关键激酶 NPK1 和 MKK1 触发的细胞死亡以及 flg22 诱导 PTI5、ACRE31 等防御基因表达具有显著抑制作用^[36];Gr-VAP1、Hs-VAP1^[37]、MiCRT^[38]、MjTTL5^[39]及 Mg01965^[40]等效应蛋白能明显抑制 PAMP 激发

子触发的 ROS 产生、胼胝体积累及防御基因的表达。本研究通过烟草瞬时表达试验也证实了 Hg16B09 可以抑制由 flg22 诱导的 ROS 爆发和防御基因 PTI5、WRKY22-A、WRKY22-B 及 ACRE31 的上调表达。该结果进一步验证了先前 Hg16B09 限制大豆发根响应 flg22 激发 PTI 免疫反应的研究结果^[25]。此外,Yang 等^[26]通过蛋白序列进化分析发现胞囊线虫属中存在一类 16B09 效应蛋白超家族,并在拟南芥中证实过表达 Hg16B09 的同源蛋白 Hs16B09(相似度 86%)和 Ha16B09(相似度 61%)均能抑制 flg22 触发的胼胝体沉积和 ROS 产生,以及 PTI 响应基因的表达。以上结果说明胞囊线虫 16B09 效应蛋白家族的毒性作用之一就是抑制植物的 PTI 反应。

SCN 基因组中存在大量效应蛋白编码基因,有些基因家族表现出序列多态性和结构多样化^[18-20,24]。已有研究报道,在 SCN 中鉴定到几个具有抑制或克服寄主基础免疫反应的毒性效应蛋白,如 HgGland1、HgGland9、HgGland18 及 Hg4F01 均能抑制或延迟 *Pst* DC3000 触发的 ETI 反应^[31,41-42],表明利用效应蛋白来抑制寄主防卫反应是 SCN 进化出的重要寄生策略。因此,某些 SCN 毒性生理小种的快速变异及能克服 PI88788、Peking 等(携带 R 基因)基因型大豆品种的抗性可能是依赖这些效应蛋白逃避和破坏寄主 ETI 反应来实现^[6-7]。本研究结果显示 Hg16B09 能抑制由 *Pst* DC3000 及无毒效应蛋白 Rbp-1 触发的 HR 超敏反应,证实了 Hg16B09 对植物 PTI 和 ETI 防御反应具有双重抑制作用。此外,Hg16B09 也减少了 *Pst* DC3000 对 ETI 途径相关防御基因 *PR1a*、*PR2*、*WRKY51* 和 *PII* 表达的诱导作用。许多研究发现,植物特有的 WRKY 转录因子家族成员是 MPK3/MPK6 级联途径下游底物,被磷酸化后通过调控下游防御途径相关基因表达(如 *PR*)来提高植物对病原菌的抗病性^[43-45]。根据在大豆及拟南芥中过表达 Hg16B09 及同源蛋白增加线虫敏感性的表型^[25-26]可推断,16B09 效应蛋白家族可能在植物中具有保守的靶向蛋白,通过间接抑制寄主的 PTI 和 ETI 多重防御反应促进胞囊线虫寄生。另外,有多个研究发现其他植物线虫也存在一些可通过抑制寄主多个免疫反应途径增加其致病性的关键效应蛋白^[46-47]。

鉴定效应蛋白在寄主植物体内靶向蛋白对于揭示其生物学功能和与寄主的相互作用极为重要。有学者提出利用 SCN 效应蛋白的互作蛋白作为靶标,借助现有成熟的基因沉默或基因编辑技术对大豆进行遗传改良,在 SCN 防治上具有极大应用前景^[48]。鉴于 16B09 蛋白家族在胞囊线虫的保守性以及其对植物免疫反应的重要调节作用,后续可利用酵母双杂交、免疫沉淀等技术鉴定 Hg16B09 在寄主中的潜在靶向蛋白,以深入解析 Hg16B09 蛋白家族如何与主靶标蛋白互作来促进胞囊线虫寄生的分子机制。

4 结 论

本研究探究 SCN 效应蛋白 Hg16B09 是否对植物免疫反应具有调控作用,研究结果证实了 Hg16B09 能够有效抑制由 flg22 诱导 ROS 爆发及相关防御基因 *PTI5*、*WRKY22-A*、*WRKY22-B* 和 *ACRE31* 的上调表达,同时 Hg16B09 对由 *Pst* DC3000 和 Gpa-2/Rbp-1 触发的高敏反应、抗性相关基因(*PR1a*、*PR2*、*WRKY51* 和 *PII*)的表达也具有明显抑制作用,揭示了Hg16B09 通过干扰植物 PTI 和 ETI

防御反应帮助 SCN 完成寄生。综上所述,该研究有助于揭示 SCN 靶向寄主特定免疫途径的新致病机理,对抗 SCN 的大豆育种具有非常重要的指导意义和应用价值。

参考文献

[1] Koenning S R, Wrather J A. Suppression of soybean yield potential in the continental United States by plant diseases from 2006 to 2009[EB/OL]. Plant Health Progress, 2010, 11(1). DOI:10.1094/PHP-2010-1122-01-RS.

[2] 段玉玺. 植物线虫学[M]. 北京: 科学出版社, 2011. (Duan Y X. Plant nematology [M]. Beijing: Science Press, 2011.)

[3] Wang D,Duan Y X, Wang Y Y, et al. First report of soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*, on soybean from Guangxi, Guizhou, and Jiangxi Provinces, China[J]. Plant Disease, 2015, 99(6): 893.

[4] Peng D L, Peng H, Wu D Q, et al. First report of soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) on soybean from Gansu and Ningxia China[J]. Plant Disease, 2015, 100(1): 229.

[5] 刘世名, 彭德良. 大豆的胞囊线虫抗性研究新进展[J]. 中国科学:生命科学, 2016, 46(5): 535-547. (Liu S M, Peng D L. Recent progresses on soybean resistance to soybean cyst nematode [J]. Scientia Sinica Vitae, 2016, 46(5): 535-547.)

[6] Niblack T L, Colgrove K B, Colgrove A C. Soybean cyst nematode in Illinois from 1990 to 2006: Shift in virulence phenotype of field populations[J]. Journal of Nematology, 2006, 38(2): 285.

[7] Acharya K, Tande C, Byamukama E. Determination of *Heterodera glycines* virulence phenotypes occurring in South Dakot[J]. Plant Disease, 2016, 100(11): 281-286.

[8] Jones J,Dangl J. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444(7117): 323-329.

[9] Manosalva P, Manohar M, Von Reuss S H, et al. Conserved nematode signaling molecules elicit plant defenses and pathogen resistance[J]. Nature Communications, 2015, 6: 7795.

[10] Mendy B, Ombe M W W, Radakovic Z S, et al. *Arabidopsis* leucine-rich repeat receptor-like kinase NILR1 is required for induction of innate immunity to parasitic nematodes [J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(4): e1006284.

[11] Klessig D F, Manohar M, Baby S, et al. Nematode ascarioside enhances resistance in a broad spectrum of plant-pathogen systems [J]. Journal of Phytopathology, 2019,167: 265-272.

[12] 赵洁, 彭德良, 刘世名. 植物寄生线虫效应子研究进展[J]. 植物保护学报, 2020, 47(2): 245-254. (Zhao J, Peng D L, Liu S M. Progresses in the researches on the effectors of plant parasitic nematodes [J]. Journal of Plant Protection, 2020, 47(2): 245-254.)

[13] Ali M A,Azeem F, Li H, et al. Smart parasitic nematodes use multifaceted strategies to parasitize plants[J]. Frontiers in Plant Science, 2017, 8: 1699.

[14] 姚珂, 郑经武, 黄文坤, 等. 植物寄生线虫效应蛋白调控寄主防卫反应分子机制研究进展[J]. 植物病理学报, 2020, 50(5): 517-530. (Yao K, Zheng J W, Huang W K, et al. Research progress on the regulation of host defense by plant parasitic nematode effectors [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2020, 50(5): 517-530.)

[15] Riggs R D. Ultrastructural changes in Peking soybeans infected with *Heterodera glycines*[J]. Phytopathology, 1973, 63(1): 76-84.

[16] Kandoth P K, Ithal N, Recknor J, et al. The soybean *Rhgl* locus for resistance to the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*

- regulates the expression of a large number of stress- and defense-related genes in degenerating feeding cells[J]. *Plant Physiology*, 2011, 155(4): 1960-1975.
- [17] Gao B L, Allen R, Maier T, et al. The parasitome of the phytonematode *Heterodera glycines* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(8): 720-726.
 - [18] Noon J B, Hewezi T, Maier T R, et al. Eighteen new candidate effectors of the phytonematode *Heterodera glycines* produced specifically in the secretory esophageal gland cells during parasitism[J]. *Phytopathology*, 2015, 105(10): 1362-1372.
 - [19] Gardner M, Dhroso A, Johnson N, et al. Novel global effector mining from the transcriptome of early life stages of the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 2505.
 - [20] Masonbrink R, Maier T R, Muppirala U, et al. The genome of the soybean cyst nematode (*Heterodera glycines*) reveals complex patterns of duplications involved in the evolution of parasitism genes[J]. *BioMed Central*, 2019, 20(1): 119.
 - [21] Lambert K N, Bekal S, Domier L L, et al. Selection of *Heterodera glycines* chorismate mutase-1 alleles on nematode-resistant soybean [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(6): 593-601.
 - [22] Bekal S, Niblack T L, Lambert K N. A chorismate mutase from the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* shows polymorphisms that correlate with virulence [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(5): 439-446.
 - [23] Bekal S, Domier L L, Gonfa B, et al. A SNARE-like protein and biotin are implicated in soybean cyst nematode virulence [J]. *PLoS One*, 2015, 10(12): e0145601.
 - [24] Ste-Croix D T, St-Marseille A F G, Lord E, et al. Genomic profiling of virulence in the soybean cyst nematode using single-nematode sequencing[J]. *Phytopathology*, 2020, 111(1): 137-148.
 - [25] Hu Y, You J, Li C, et al. The *Heterodera glycines* effector Hg16B09 is required for nematode parasitism and suppresses plant defense response[J]. *Plant Science*, 2019, 289: 110271.
 - [26] Yang S S, Dai Y R, Chen Y P, et al. A novel G16B09-like effector from *Heterodera avenae* suppresses plant defenses and promotes parasitism[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10:66.
 - [27] Chen S, Chronis D, Wang X. The novel GrCEP12 peptide from the plant-parasitic nematode *Globodera rostochiensis* suppresses flg22-mediated PTI[J]. *Plant Signal Behavior*, 2013, 8(9): e25359.
 - [28] Wei C, Kvitko B H, Shimizu R, et al. A *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 mutant lacking the type III effector HopQ1-1 is able to cause disease in the model plant *Nicotiana benthamiana* [J]. *Plant Journal*, 2010, 51(1): 32-46.
 - [29] Sacco M A, Koropacka K, Grenier E, et al. The cyst nematode SPRYSEC protein RBP-1 elicits Gpa2- and RanGAP2-dependent plant cell death[J]. *PLoS Pathogens*, 2009, 5(8): e1371.
 - [30] Holsters M, de Waele D, Depicker A, et al. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Molecular & General Genetics*, 1978, 163(2): 181-187.
 - [31] Noon J B, Qi M, Sill D N, et al. A plasmodium-like virulence effector of the soybean cyst nematode suppresses plant innate immunity[J]. *New Phytologist*, 2016, 212: 444-460.
 - [32] Yeam I, Nguyen H P, Martin G B. Phosphorylation of the *Pseudomonas syringae* effector AvrPto is required for FLS2/BAK1-independent virulence activity and recognition by tobacco[J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 2010, 61(1): 16-24.
 - [33] Veljovic-Jovanovic S, Noctor G, Foyer C H. Are leaf hydrogen peroxide concentrations commonly overestimated? The potential influence of artefactual interference by tissue phenolics and ascorbate[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2002, 40(6-8): 501-507.
 - [34] Tukey J W. Some selected quick and easy methods of statistical analysis[J]. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, 1954, 16(2): 88-97.
 - [35] Mitchum M G, Hussey R S, Baum T J, et al. Nematode effector proteins: An emerging paradigm of parasitism [J]. *New Phytologist*, 2013, 199(4): 879-894.
 - [36] Chen C L, Liu S S, Liu Q, et al. An ANNEXIN-like protein from the cereal cyst nematode *Heterodera avenae* suppresses plant defense[J]. *Plos One*, 2015, 10(4): e0122256.
 - [37] Lozano-Torres J L, Wilbers Ruud H P, Warmerdam S, et al. Apoplastic venom allergen-like proteins of cyst nematodes modulate the activation of basal plant innate immunity by cell surface receptors [J]. *PLoS Pathogens*, 2014, 10(12): e1004569.
 - [38] Jaouannet M, Perfus-Barbeoch L, Deleury E, et al. A root-knot nematode-secreted protein is injected into giant cells and targeted to the nuclei[J]. *New Phytologist*, 2012, 194(4): 924-931.
 - [39] Lin B R, Zhuo K, Chen S, et al. A novel nematode effector suppresses plant immunity by activating host reactive oxygen species-scavenging system[J]. *New Phytologist*, 2016, 209: 1159-1173.
 - [40] Zhuo K, Naalden D, Nowak S, et al. A *Meloidogyne graminicola* C-type lectin, Mg01965, is secreted into the host apoplast to suppress plant defence and promote parasitism [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(3): 346-355.
 - [41] Wang J Y, Yeckel G, Kandath P K, et al. Targeted suppression of soybean BAG6-induced cell death in yeast by soybean cyst nematode effectors[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(9): 1227-1239.
 - [42] Pogorelko G, Wang J Y, Juvalle P S, et al. Screening soybean cyst nematode effectors for their ability to suppress plant immunity[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2020, 21(9): 1240-1247.
 - [43] Adachi H, Nakano T, Miyagawa N, et al. WRKY transcription factors phosphorylated by MAPK regulate a plant immune NADPH oxidase in *Nicotiana benthamiana*[J]. *The Plant Cell*, 2015, 27(9): 2645-2663.
 - [44] Adachi H, Ishihama N, Nakano T, et al. *Nicotiana benthamiana* MAPK-WRKY pathway confers resistance to a necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2016, 11(6): e1183085.
 - [45] Li S, Han X, Yang L, et al. Mitogen-activated protein kinases and calcium-dependent protein kinases are involved in wounding-induced ethylene biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Cell and Environment*, 2017, 41(1): 134-147.
 - [46] Kud J, Wang W J, Gross R, et al. The potato cyst nematode effector RHA1B is a ubiquitin ligase and uses two distinct mechanisms to suppress plant immune signaling [J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(4): e1007720.
 - [47] Naalden D, Verbeek R, Gheysen G. *Nicotiana benthamiana* as model plant for *Meloidogyne graminicola* infection [J]. *Nematology*, 2018, 20(5): 491-499.
 - [48] Guo X, Chronis D, De La Torre C M, et al. Enhanced resistance to soybean cyst nematode *Heterodera glycines* in transgenic soybean by silencing putative CLE receptors [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2015, 13(6): 801-810.