

文章编号: 1674-7054(2020)02-0200-10

香蕉枯萎病菌 4 号生理小种中性海藻糖酶 *NTH1* 基因敲除和功能分析

梁峻玮^{1,2}, 曾凡云², 漆艳香², 彭 军², 张 欣², 谢培兰², 谢艺贤²

(1. 海南大学 植物保护学院, 海口 570228; 2. 中国热带农业科学院 环境与植物保护研究所, 海口 571101)

摘要: 为了研究中性海藻糖酶在香蕉枯萎病菌 4 号生理小种(Foc4-37)致病和耐受不良环境中的作用, 笔者构建了中性海藻糖酶编码基因敲除突变体 $\Delta nth1$, 并对敲除突变体的致病力、生物学特性和对氰烯菌酯的抗药性开展测定分析。结果表明: 与野生型相比, $\Delta nth1$ 菌落生长缓慢、孢子萌发率下降, 对巴西蕉苗致病力明显减弱, 但产孢量没有显著差异, 对氰烯菌酯的敏感性($EC_{50}=6.07 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)也无明显变化。由此推断 *NTH1* 基因参与调控香蕉枯萎病菌的分生孢子萌发和生长, 参与细胞壁合成和氧化应激反应的应答, 不参与 FOC 对渗透压力、高糖和高低温胁迫的应答。

关键词: 香蕉枯萎病菌; 中性海藻糖酶; 基因敲除; 致病力

中图分类号: S 188.2; S 436.68⁺¹

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2020.02.010

香蕉枯萎病又称巴拿马病或黄叶病, 其病原菌为尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*), 其中 4 号生理小种(Foc4)危害最严重。香蕉枯萎病是典型的真菌维管束病害, 主要通过土壤、染病的繁殖材料、灌溉水和农具等传播, 已造成了全球香蕉产业的严重经济损失^[1-2]。目前香蕉枯萎病的主要防治措施有生物防治^[3-5]、化学防治^[6]、抗病品种选育^[7-8]等。香蕉枯萎病的致病相关基因在致病过程中的作用也得到了研究, 如过氧化氢酶、氯离子电导蛋白、多聚半乳糖醛酸酶和丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 等方面取得的研究进展^[9-13], 为筛选靶向药物防控香蕉枯萎病提供了借鉴。海藻糖 (trehalose) 是一种非还原性二糖, 在细菌、真菌和植物中广泛存在, 可作为储能物质, 为细胞代谢提供能量, 并涉及对各种外界环境胁迫的应答, 以协助生物体顺利度过逆境^[14-17]。海藻糖酶是真菌中海藻糖唯一的水解酶, 在代谢过程中起着关键作用, 而人和动物体中均无此代谢途径。以海藻糖酶为靶标位点设计杀菌剂, 可以提高农药的作用效率和对非靶标生物的安全性。根据其最适 pH 和调节特性, 真菌海藻糖酶分为酸性 (非调节性) 和中性 (调节性) 海藻糖酶^[18]。在酵母细胞中, 海藻糖是由中性海藻糖酶分解而非酸性海藻糖酶, 并且两者之前不具有同源性^[19-20]。目前在不同真菌中对中性海藻糖酶基因的功能也得到了系列研究, 如在构巢曲霉、根内球囊霉、灰葡萄孢和酿酒酵母等真菌中获得中性海藻糖酶基因敲除突变体, 并对突变体的功能进行了研究分析^[21-24]。氰烯菌酯是一类对镰刀菌具有特异抑菌活性的新型氰基丙烯酸酯类杀菌剂, 具有保护、治疗、内吸、输导等作用, 能有效抑制镰刀菌菌丝生长, 使分生孢子生长畸形, 有望替代其他多类杀菌剂^[25-28]。氰烯菌酯对禾谷镰刀菌有较强的抑制活性, 以对氰烯菌酯具有抗性的禾谷镰刀菌 YP-1 为材料, 对其进行测序, 发现 YP-1 中有 132 个基因发生突变, 其中包括中性海藻糖酶基因^[29]。为了探索中性海藻糖酶 *NTH1* 基因在香蕉枯萎病菌致病过程中的作用及其是否参与尖孢镰刀菌对氰烯菌酯的抗药性, 笔者采用基因敲除技术敲除了香蕉枯萎病菌的中性海藻糖酶基因 *NTH1*, 并通过敲除突变

收稿日期: 2020-02-10

修回日期: 2020-03-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(31661143003); 现代农业产业技术体系建设专项(CARS-31-07); 热科院托举工程项目(1630042018010)

第一作者: 梁峻玮(1994-), 男, 海南大学植物保护学院 2017 级硕士研究生. E-mail: ljw15103021750@126.com

通信作者: 谢艺贤(1963-), 男, 研究员. 研究方向: 植物病理学. E-mail: yixian81@126.com

体的表型及对氰烯菌酯的敏感性进行测定分析,旨在丰富该基因的具体功能知识,并为开发农药防治的靶标基因提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验菌株和香蕉苗 香蕉枯萎病 4 号生理小种(*F. oxysporum* f. sp. *cubense* race 4, Foc4)野生型菌株 37,大肠杆菌 *E. coli* DH5a, pCT 74 质粒均由本实验室保存。盆栽巴西蕉幼苗(株高 20~30 cm, 4~5 枚叶片)。

1.2 药剂、试剂和培养基 94.9% 氰烯菌酯原药(西北农林科技大学刘西莉教授赠)用 DMSO(二甲基亚砜)溶解,配成 10 g·L⁻¹ 贮存液。Congo Red(刚果红, CR)购于 BIO BASIC INC 公司; Calcofluor White Stain(荧光增白剂, CFW)购于 sigma-aldrich 公司; Hygromycin B(潮霉素 B, 50 mg·L⁻¹)溶液购于 Wako 公司。

Chitinase(几丁质酶)、Driselase(崩溃酶)、Lysing enzyme(溶壁酶)均购自 sigma-aldrich 公司; LA Taq、Premix TaqTM、克隆载体 pMDTM19-T Vector 购自 TaKaRa 公司; 真菌 DNA 提取试剂盒和总 RNA 提取试剂盒购自 OMEGA 公司; 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 TIANGEN 公司。

培养基: PDA 培养基、PDB 培养基、LB 培养基、MM 培养基、LR 培养基、SR 培养基、Top Agar 培养基。

1.3 主要仪器 PTC200 PCR 仪(MJ RESEARCH); Quantstudio 6 荧光定量 PCR 仪; 电泳仪 DY CP-31E; 微量紫外可见分光光度计 Thermo Scientific NanoDrop 2000c; 涡旋振荡器 IKA MS3 basic; 全自动样品快速研磨仪 Tissueiyser-64; Eppendorf 台式高速离心机 5417R / 5810R; 双目生物显微镜 XCP-2 C、尼康生物智能荧光显微镜 Ni-E; 生物大分子分析仪 Fusion FX7。

1.4 香蕉枯萎病野生型菌株基因组 DNA 的提取 将野生型菌株在 PDA 培养基上培养 7 d 后,收集菌丝。按照 Fungal DNA Kit(OMEGA)说明书提取基因组 DNA。

1.5 香蕉枯萎病菌 *NTH1* 基因克隆与分析 用 DNAMAN7.0 软件进行引物设计,并由北京六合华大基因科技股份有限公司合成引物(表 1)。

在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库中通过 *F. graminearum* PH-1 neutral trehalase *NTH1* 基因(GenBank 登录号: XM_011320499.1)在香蕉枯萎病菌热带 4 号生理小种菌株的全基因组数据库(GenBank 登录号: JH658279.1)中进行 Blast 分析,并设计 cDNA 全长引物对: FOC4NTH1-F/FOC4NTH1-

表 1 本实验的引物序列

Tab. 1 Sequences of the primers used in the study

引物名称 Primer	序列 Sequence(5'→3')
HYG-F	CTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGT
HYG-R	CCCGGTCGGCATCTACTCTATTC
HYG-R1	GGATGCCTCCGCTCGAAGTA
HYG-F1	CGTTGCAAGACCTGCCTGAA
HPT-LBCK	GACAGACGTCGCGGTGAGTT
HPT-RBCK	TCTGGACCGATGGCTGTGTAG
FOC4NTH1-LBCK	TAAACCCAGCCACGACAC
FOC4NTH1-HPH-LB-R	ACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCGTTGACTTACACCAGCAG
FOC4NTH1-HPH-RB-F	GAATAGAGTAGATGCCGACCGGGCTGACCTACCAGCACTCTCG
FOC4NTH1-RBCK	GGCAAGCCACTCATCTTCA
FOC4NTH1-LB-F	ACATTGAGCAACATCCGAGT
FOC4NTH1- RB-R	TGATGTCCTCCAAACTCACG
FOC4NTH1-CKFP	ACCTCTTCGTGGTCTGTCTCT
FOC4NTH1-CKRP	ATCTGTTTCCGCCATACTC
FOC4NTH1-F	CTCCTTCTCACCGCTCTATTA
FOC4NTH1-R	CGTATGTGTTCCGGCTCAA

R, 扩增出香蕉枯萎病4号生理小种的 *NTH1* 基因。

将连接转化后的阳性克隆产物送至深圳华大基因科技有限公司测序。测序结果在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库中进行同源性序列分析, 使用 MEGA7.0 软件以 Neighbor-Joining (NJ) 构树法构建系统进化树。

1.6 香蕉枯萎病菌 *NTH1* 基因敲除片段扩增 采用 Split-Marker 重组技术构建基因敲除片段。以野生型菌株基因组 DNA 为模板, 扩增 *NTH1* 基因上下游片段, 引物为 FOC4NTH1-LBCK 和 FOC4NTH1-HPH-LB-R、FOC4NTH1-HPH-RB-F 和 FOC4NTH1-RBCK(表 1)。以 pCT74 质粒的 DNA 为模板, 用引物 HYG-F 和 HYG-R 扩增潮霉素(HYG)抗性基因片段。将扩增得到的 *NTH1* 基因上游和下游片段分别与扩增的潮霉素(HYG)抗性基因片段混合为模板, 引物 FOC4 NTH1-LB-F 和 HYG-R1、HYG-F1 和 FOC4NTH1-RB-R(表 1)扩增用于同源重组的上游和下游片段。

1.7 原生质体的制备及转化 参照王飞燕等^[30]的方法, 稍作改进, 制备香蕉枯萎病菌的原生质体。将在 PDB 培养基中振荡培养 3 d 的野生型菌株, 用 3 层灭菌擦镜纸过滤菌液, 37 °C, 150 r·min⁻¹ 振荡酶解菌丝 3 h, 过滤收集原生质体。原生质体转化参照徐齐军等^[31]的方法, 稍作改进。各取 100 μL 的上下游扩增重组片段, 加入到 300 μL 的原生质体中(1.0×10^8 个·mL⁻¹), 混匀后, 缓慢滴加 2 mL 40% PTC 溶液。最后加入到再生培养基(含有 100 mg·L⁻¹ Ampicillin 和 100 mg·L⁻¹ Hygromycin B)中, 随后将长出的单菌落挑取到新的含潮霉素抗性的 PDA 平板上, 待转化子在含有潮霉素抗性平板上培养 3 代后可进行后续实验。

1.8 *NTH1* 基因敲除转化子的鉴定及单孢分离 采用 CTAB^[32]法提取 *NTH1* 敲除转化子的基因组 DNA 和野生型菌株基因组 DNA 为模板, 以 HYG-F/HYG-R、FOC4NTH1-LBCK/HPT-LBCK、HPT-RBCK/FOC4NTH1-RBCK(表 1)为正筛引物, 以 FOC4NTH1-CKFP/FOC4NTH1-CKRP(表 1)为负筛引物, 进行 PCR 扩增, 并将得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 根据扩增的条带鉴定出 $\Delta nth1$ 敲除突变体。

参照杨军等^[33]的方法, 稍作改进。将 $\Delta nth1$ 接种到 PDB 培养基中, 28 °C, 180 r·min⁻¹ 振荡培养 3 d。过滤收集孢子, 制备分生孢子悬浮液, 并将孢子浓度调至 10^6 , 10^7 , 10^8 个·mL⁻¹, 并分别涂布到 TOP 培养基(含有 100 mg·L⁻¹ Ampicillin 和 100 mg·L⁻¹ Hygromycin B)上, 28 °C 培养 10 h, 在显微镜下, 用挑针将单个分生孢子挑取到新的 PDA 培养基(含有 100 mg·L⁻¹ Ampicillin 和 100 mg·L⁻¹ Hygromycin B)上。

1.9 $\Delta nth1$ 致病力的测定 分别在 PDB 培养基中振荡培养 3 d 的野生型菌株和 $\Delta nth1$ 菌株, 用 3 层灭菌擦镜纸过滤收集分生孢子, 使用血球计数板计数, 加入适量的无菌水重悬分生孢子并调整孢子浓度至 2×10^6 个·mL⁻¹。采用伤根侵菌的盆栽致病性测定法。每个菌株接种 15 株蕉苗, 并以水作为对照, 试验重复 3 次。接种 45 d 后参照 MOHAMED 等^[34]的病情分级标准, 进行病情指数统计分析。

1.10 $\Delta nth1$ 氰烯菌酯的敏感性测定 分别将野生型菌株和 $\Delta nth1$ 菌株接种于含有不同浓度氰烯菌酯的 PDA 培养中, 28 °C 培养 7 d, 每个处理重复 3 个培养皿, 试验重复 3 次, 最终计算野生型菌株和 $\Delta nth1$ 的抑制中浓度 EC_{50} 。

1.11 $\Delta nth1$ 生物学表型观察 (1)生长速率: 将野生型菌株和 $\Delta nth1$ 菌株接种到 MM 培养基平板上, 28 °C 培养 6 d, 并每隔 1 天进行拍照观察和测量菌落直径, 每次 3 个平板, 重复 3 次。(2)产孢量: 将在 PDA 培养基上培养 7 d 的野生型菌株和 $\Delta nth1$ 菌株, 用 10 mL 的无菌水从平板上收集新鲜的分生孢子, 然后使用血球计数板计数, 每次 3 个平板, 重复 3 次。(3)孢子萌发: 参照 Feng 等^[35]的方法, 稍作改进。用 10 mL 的无菌水分别收集野生型菌株和 $\Delta nth1$ 菌株在 PDA 平板上的分生孢子(培养 7 d), 并将孢子浓度调至 10^6 个·mL⁻¹, 置于 28 °C 潮湿培养箱中培养。分别于 8, 12, 24 h 用显微镜进行观察并记录, 试验重复 3 次, 最后测定分生孢子萌发率。

1.12 $\Delta nth1$ 胁迫因子的敏感性测定 在 PDA 培养基上活化 7 d 的野生型菌株和 $\Delta nth1$ 菌株, 用打孔器制取菌落边缘处 6 mm 的菌块, 分别接种于含有 Congo Red(终浓度 100 mg·L⁻¹), D-Glucose(终浓度 1 mol·L⁻¹), SDS(十二烷基硫酸钠, 终浓度 0.1 mmol·L⁻¹), Calcofluor White Stain(终浓度 100 mg·L⁻¹), Sorbitol(山梨醇, 终浓度 1.2 mol·L⁻¹), NaCl(终浓度 0.7 mol·L⁻¹), MgCl₂(终浓度 0.1 mol·L⁻¹), KCl(终浓度

1 mol·L⁻¹)和 H₂O₂(终浓度 4 mmol·L⁻¹)的基本培养基(minimal medium, MM)平板上,以未做任何处理的 MM 平板作对照,28 °C 培养箱中培养 6 d,每隔 1 天观察测量菌落直径大小并拍照,计算抑制率,每个处理重复 3 个培养皿,试验重复 3 次。

将在 PDA 培养基上活化 7 d 的野生型菌株和 $\Delta nth1$ 菌株,接种于 MM 培养基上,并分别置于 20 °C, 32 °C 培养箱中培养 6 d,以 28 °C 为对照,每个处理重复 3 个培养皿,试验重复 3 次,观察在低温和高温条件下对菌株生长的影响。

2 结果与分析

2.1 *NTH1* 基因的序列分析 香蕉枯萎病菌的 *NTH1* 基因全长 4 383 bp, cDNA 全长 2 217 bp, 编码 738 个氨基酸,序列登录号: XM_031206259。在 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)数据库通过 Blast 搜索,利用 GenBank 中已知的氨基酸序列进行同源性分析,发现香蕉枯萎病菌中性海藻糖酶基因的氨基酸序列,与禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)和假禾谷镰刀菌(*F. pseudograminearum*)等多种真菌的中性海藻糖 *NTH1* 基因具有高度相似性(图 1)。

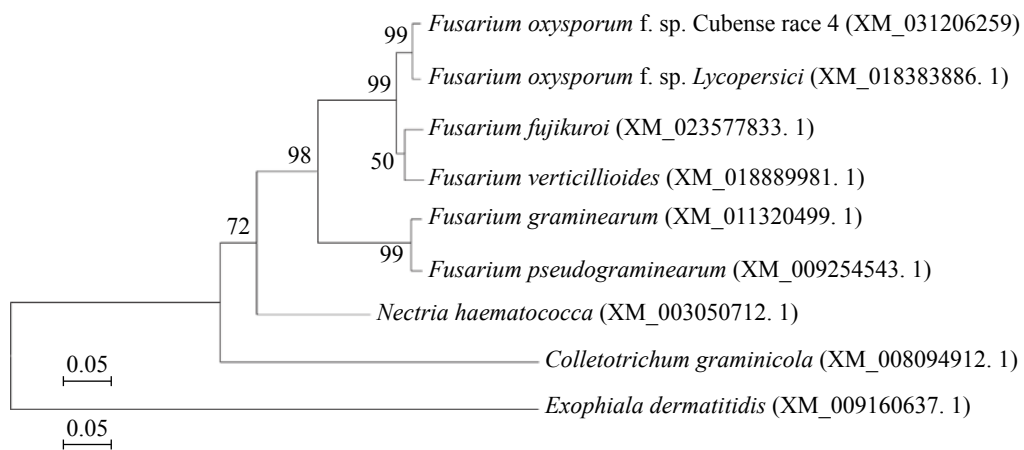


图 1 *NTH1* 基因系统进化分析

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *NTH1*

2.2 Split-Marker 重组技术的片段扩增 第 1 轮 PCR 扩增的 *NTH1* 基因上下游片段和潮霉素(HYG)抗性基因片段:以野生型菌株基因组 DNA 为模板,以引物 FOC4NTH1-LBCK 和 FOC4NTH1-HPH-LB-R、FOC4NTH1-HPH-RB-F 和 FOC4NTH1-RBCK,扩增 *NTH1* 基因的上下游片段,大小为 1 903 bp 和 2 055 bp,同时以 pCT 74 质粒的 DNA 为模板,用引物 HYG-F 和 HYG-R 扩增出潮霉素(HYG)抗性基因片段,大小为 1 376 bp(图 2-B)。

第 2 轮 PCR 重叠片段扩增:*NTH1* 基因上游扩增片段和潮霉素(HYG)抗性基因扩增片段混合物为模板,以引物 FOC4NTH1-LB-F 和 HYG-R1,扩增重叠的上游片段,大小为 2 379 bp;*NTH1* 基因下游扩增片段和潮霉素(HYG)抗性基因扩增片段混合物为模板,再用引物 HYG-R1 和 FOC4NTH1-RB-R,扩增重叠的下游片段,大小为 2 138 bp(图 2-B)。

2.3 *NTH1* 敲除突变体的筛选鉴定 *NTH1* 敲除转化子在潮霉素抗性培养基上培养 3 代后,提取基因组 DNA 并以此为模板进行 PCR 扩增,以野生型基因组 DNA 为对照,用正筛引物 HYG-F/HYG-R, FOC4NTH1-LBCK/HPT-LBCK, HPT-RBCK/FOC4NTH1-RBCK 进行 PCR 扩增,阳性 *NTH1* 基因敲除转化子应有条带,大小分别为 1 376, 2 297, 2 160 bp, 对照组野生型 DNA 模板无条带(图 3-A, B)。负筛引物 FOC4NTH1-CKFP/ FOC4NTH1-CKRP 进行 PCR 扩增,阳性 *NTH1* 敲除转化子应没有条带,而对照组野生型 DNA 模板有条带,大小为 737 bp(图 3-C)。从图 3 可知,3 个转化子已被鉴定为阳性,分别命名为 $\Delta nth1-1$, $\Delta nth1-2$, $\Delta nth1-3$, 选取其中的 $\Delta nth1-1$ 菌株进行后续实验。

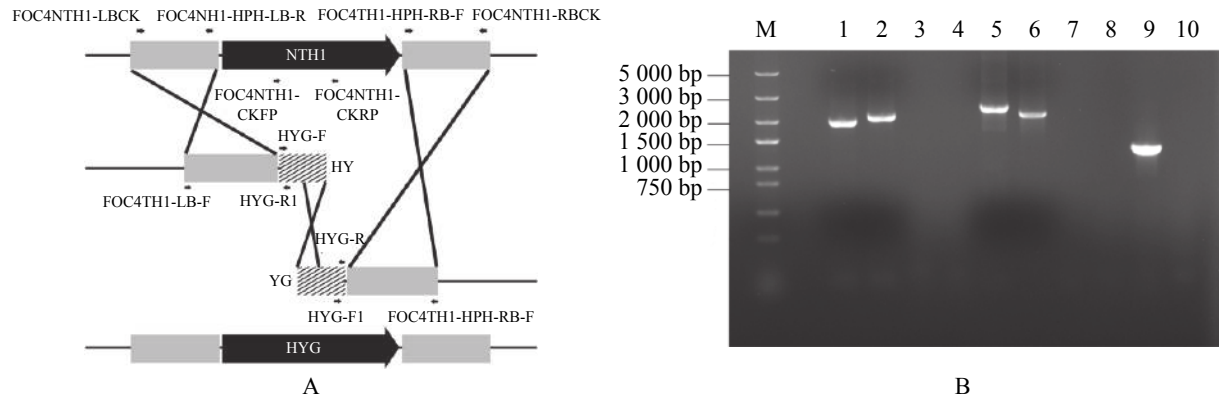


图2 Split-Marker 重组技术的片段扩增

A. *NTH1* 基因敲除原理示意图; B. 两轮 PCR 的片段扩增: 1~2. 第 1 轮 PCR 扩增的 *NTH1* 基因上下游片段, 条带大小分别为 1 903, 2 055 bp; 5~6. 第 2 轮 PCR 扩增重叠片段, 条带大小分别为 2 379, 2 138 bp; 9. 第 1 轮 PCR 扩增的潮霉素 (HYG) 抗性基因片段, 条带大小为 1 376 bp; 3~4, 7~8, 10. 水对照; M. DNA Marker DL 5000。

Fig. 2 Fragment amplification in Split-Marker recombination

A. Schematic diagram of *NTH1* gene knockout; B. Fragment amplification of two rounds of PCR: 1~2. The first round of PCR amplification of the upstream and downstream fragments of *NTH1* gene with their band sizes being 1 903 bp and 2 055 bp, respectively; 5-6. The second round of PCR amplification of overlapping fragments with their band sizes being 2 379 bp and 2 138 bp, respectively; 9. The first round of PCR amplification of hygromycin (HYG) resistance gene fragments, with its band size being 1 376 bp; 3-4, 7-8, 10. H₂O was used as control; M. DNA Marker DL 5000.

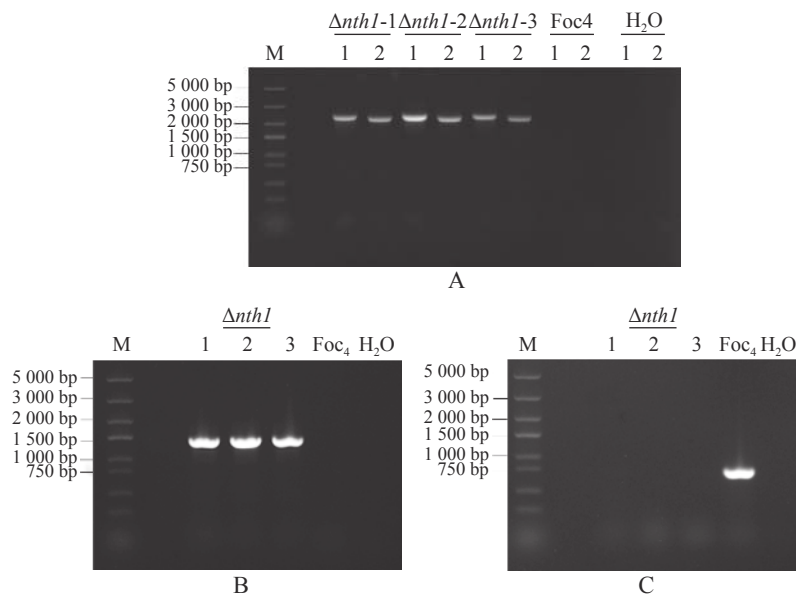


图3 *NTH1* 敲除突变体的筛选验证

A. *NTH1* 敲除突变体上下游重组片段的正筛选: 1~2. *NTH1* 基因敲除突变体重组片段的 PCR 扩增, 条带分别为 2 297, 2 160 bp (3 个 *NTH1* 敲除转化子, $\Delta nth1-1$, -2, -3), H₂O 和野生型为对照, M. DNA Marker DL 5000; B. *NTH1* 敲除突变体 HYG 片段的正筛选: *NTH1* 敲除突变体潮霉素片段的 PCR 扩增, 条带大小为 1 376 bp ($\Delta nth1-1$, -2, -3), H₂O 和野生型为对照, M. DNA Marker DL 5000; C. *NTH1* 敲除突变体内源基因的负筛选: *NTH1* 敲除突变体内源基因的 PCR 扩增 ($\Delta nth1-1$, -2, -3), H₂O 和野生型为对照, 条带大小为 737 bp, M. DNA Marker DL 5000。

Fig. 3 Screening and validation of *NTH1* knockout mutant

A. Positive screening of upstream and downstream recombinant fragments of the *NTH1* knockout mutant: 1~2. PCR amplification of the *NTH1* knockout mutant recombinant fragments, their band sizes 2 297 bp and 2 160 bp, (Three *NTH1* knockout transformants, $\Delta nth1-1$, -2, -3), respectively, H₂O and WT used as controls, M. DNA Marker DL 5 000; B. Positive screening of the *NTH1* knockout mutant HYG fragment: PCR amplification of hygromycin fragment of the *NTH1* knockout mutant, its band size 1 376 bp ($\Delta nth1-1$, -2, -3), H₂O and WT used as controls, M. DNA Marker DL 5 000; C. Negative screening of endogenous genes from the *NTH1* knockout mutant: PCR amplification of endogenous genes from the *NTH1* knockout mutant ($\Delta nth1-1$, -2, -3), H₂O and WT used as controls, its band size 737 bp, M. DNA Marker DL 5 000.

2.4 $\Delta nth1$ 致病力的测定 分别将野生型菌株和 $\Delta nth1$ 菌株接种巴西蕉苗, 45 d 后观察发病情况。发现对照组巴西蕉苗无病害症状出现, 而接种野生型菌株的巴西蕉苗外围叶片黄化, 出现枯萎现象, 且植株假茎下部出现褐色斑点状或条状斑块, 球茎切开后观察到严重的褐化现象, 有的植株枯萎死亡, 接种突变体的部分巴西苗少数叶片出现小面积黄色斑块, 球茎有部分褐化现象(图 4-A)。结果(图 4-B)显示, 在病情指数方面, $\Delta nth1$ 菌株(56.6)低于野生型菌株(72.6)。

2.5 $\Delta nth1$ 对氰烯菌酯的敏感性测定分析 将野生型菌株和 $\Delta nth1$ 菌株分别接种于含有 2, 4, 8, 10, 20, 50, 100 mg·L⁻¹ 氰烯菌酯的 PDA 平板中, 培养 7 d, 分别测定野生型菌株和 $\Delta nth1$ 菌株对氰烯菌酯的敏感性, 并计算在不同氰烯菌酯浓度的生长抑制率(图 5, 6)。结果表明, $\Delta nth1$ 对氰烯菌酯的敏感性($EC_{50}=6.07$ mg·L⁻¹)与野生型对氰烯菌酯的敏感性($EC_{50}=6.22$ mg·L⁻¹)相比没有明显差异。

2.6 $\Delta nth1$ 的表型观察 将野生型菌株和 $\Delta nth1$ 菌株接种到 MM 培养基平板上, 每隔一天测量记录菌落生长直径(图 7-A)。结果表明, $\Delta nth1$ 菌株与野生型菌株相比, 菌落生长速度下降, 差异显著(图 7-B)。产孢量计算结果表明 $\Delta nth1$ 的孢子数(0.9×10^7 个·mm⁻²)与野生型的孢子数(1.073×10^7 个·mm⁻²)差异不显著。孢子萌发率测定显示 $\Delta nth1$ 菌株的孢子萌发率显著降低(图 7-C)。

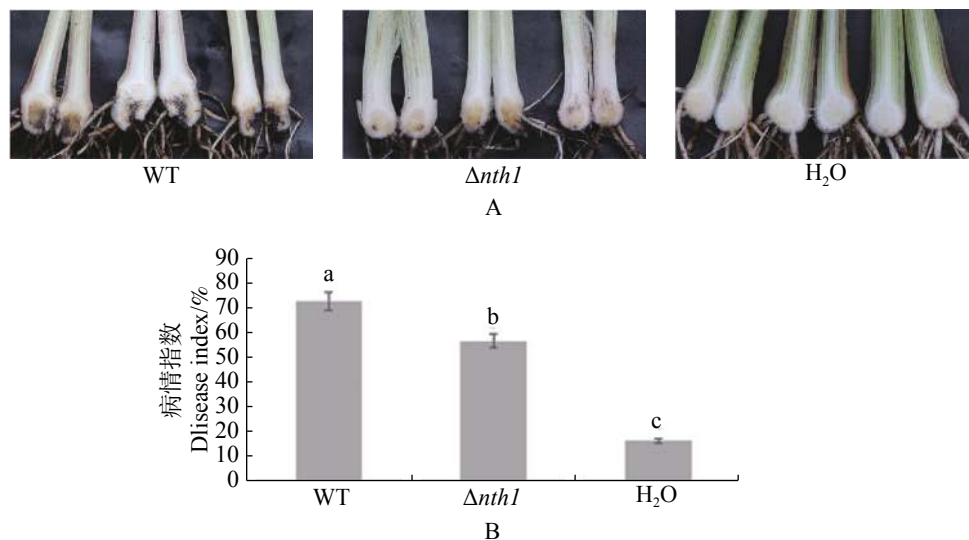


图 4 $\Delta nth1$ 的致病力测定

A: 野生型和 $\Delta nth1$ 侵染巴西蕉苗后的球茎发病症状, H₂O 为对照(45 d); B: 巴西蕉的病情指数, H₂O 为对照(45 d); 图中误差线代表 3 次生物学重复的标准误差, 不同小写字母代表在 $P < 0.05$ 显著差异; WT: 香蕉枯萎病菌 4 号生理小种野生型菌株 37。下同。

Fig. 4 Pathogenicity test of $\Delta nth1$

A: Infection of banana corms inoculated by wild type strain WT and $\Delta nth1$, with H₂O as control (45 days); B: The disease indexes of the banana with H₂O as control (45 days); The error bars in the figure represent the standard errors of 3 biological replicates. Different lowercase letters represent significant differences at $P < 0.05$; WT: *F. oxysporum* f. sp. *ubense* race 4 wild type strain 37. Similarly hereinafter.

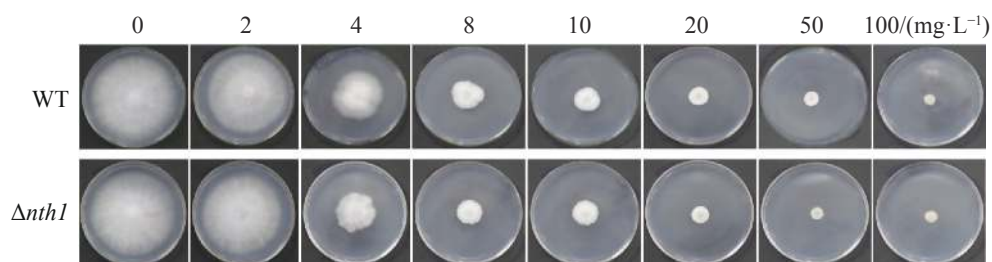


图 5 野生型和 $\Delta nth1$ 在含有不同浓度氰烯菌酯的 PDA 平板上的菌落生长情况

Fig. 5 Colony growth of WT and $\Delta nth1$ on PDA supplemented with phenamacril at different concentrations

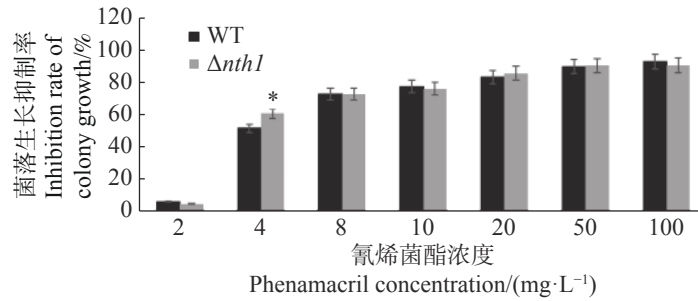


图6 野生型和 $\Delta nth1$ 在不同氰烯菌酯浓度下的菌落生长抑制率

*代表在 $P < 0.05$ 水平下差异显著,下同。

Fig. 6 Inhibition rates of WT and $\Delta nth1$ under different concentrations of phenamacril

* represents significant differences at $P < 0.05$, similarly hereinafter.

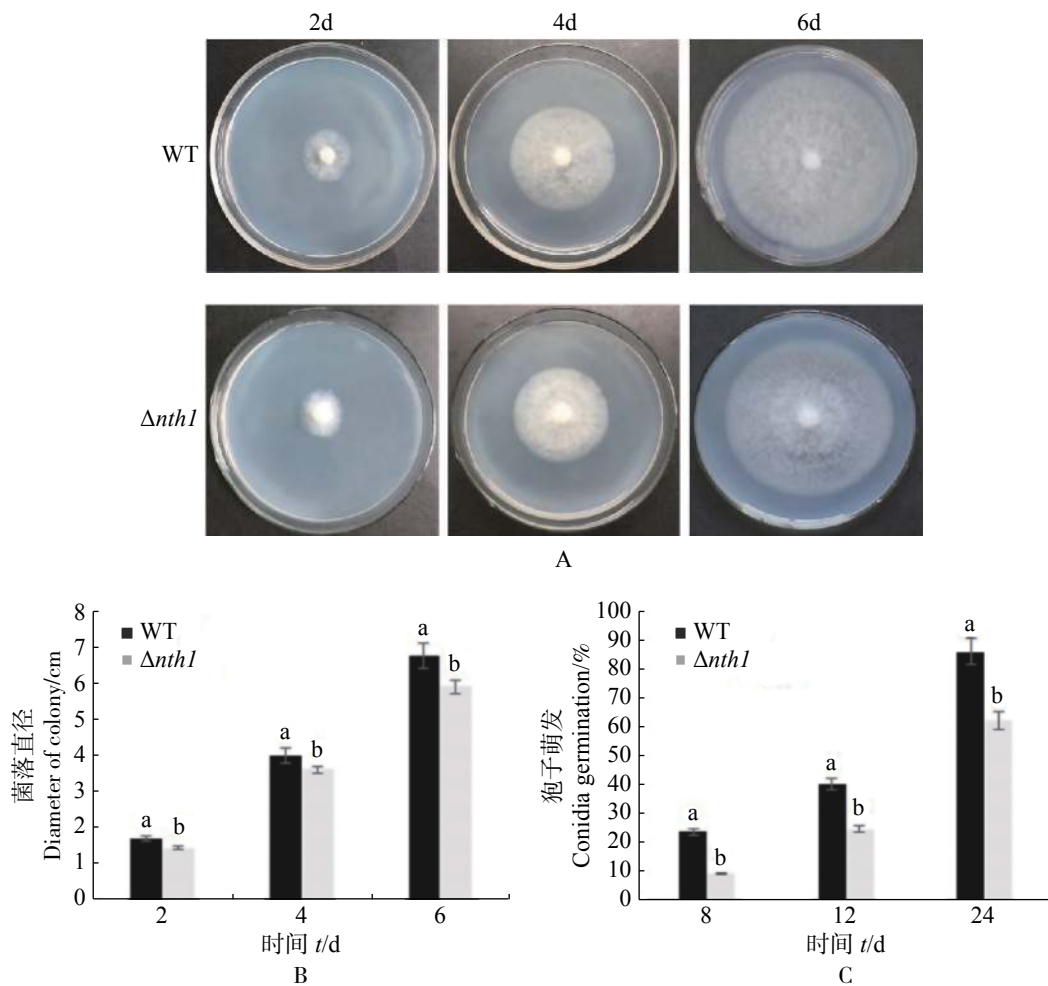


图7 $\Delta nth1$ 的生物学表型分析

A: 野生型和 $\Delta nth1$ 在 PDA 上的菌落生长情况(2, 4, 6 d); B: 野生型和 $\Delta nth1$ 菌落生长直径对比(2, 4, 6 d); C: 野生型和 $\Delta nth1$ 的分生孢子萌发率对比(8, 12, 24 h)。

Fig. 7 Biological phenotypic analysis of $\Delta nth1$

A: The colony growth of WT and $\Delta nth1$ on PDA (2, 4, 6 d); B: Comparison of colony growth diameter between WT and $\Delta nth1$ (2, 4, 6 d); C: Comparison of conidial germination rates between WT and $\Delta nth1$ (8, 12, 24 h).

2.7 $\Delta nth1$ 胁迫因子的敏感性分析 在含有 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CR(Congo Red), $0.7 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 和 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KCl 的胁迫因子存在时,野生型与 $\Delta nth1$ 的生长均受到相同程度的抑制,差异不明显;在含有 $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ D-Glucose 和 $1.2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Sorbitol 的培养基中,野生型与 $\Delta nth1$ 的生长均受到相同程度

的抑制; 在含有 $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ CFW(Calcofluor White), $4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ H_2O_2 , $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SDS 的培养基上, 野生型与 $\Delta nth1$ 的生长均受到不同程度的抑制, 与野生型相比, 突变体受抑制程度更明显(图 8); 在 20°C 低温和 32°C 高温条件下, $\Delta nth1$ 的菌落生长形态和大小, 与野生型相比无明显差异(图 9)。结果表明, $\Delta nth1$ 对细胞壁选择性压力和氧化压力敏感, 但对渗透压、高糖和高、低温胁迫的敏感度与野生型没有差异。

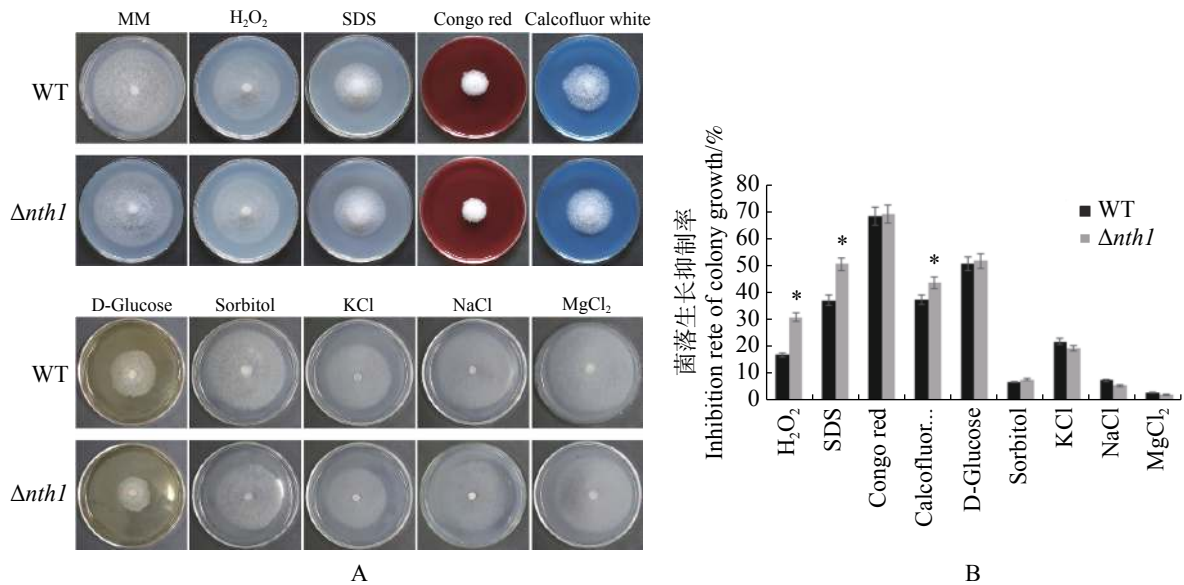


图 8 $\Delta nth1$ 对胁迫因子的敏感性测定

A: 野生型和 $\Delta nth1$ 在不同胁迫因子下的菌落生长情况(生长 6 d); B: 野生型和 $\Delta nth1$ 在不同胁迫因子下的受抑制率。

Fig. 8 Determination of $\Delta nth1$ sensitivity to stress factors

A: Colony growth of WT and $\Delta nth1$ under different stress factors (6 d); B: Inhibition rates of WT and $\Delta nth1$ under different stress factors.

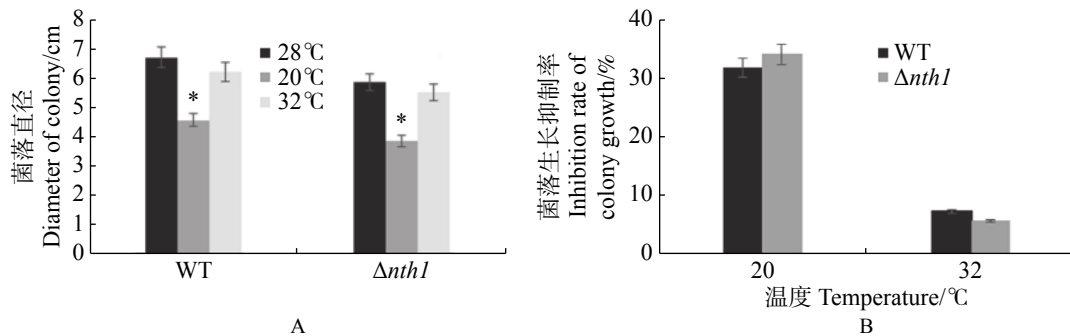


图 9 $\Delta nth1$ 的高、低温胁迫敏感性分析

A: 野生型和 $\Delta nth1$ 在高、低温条件下的菌落生长情况(6 d); B: 野生型和 $\Delta nth1$ 在高、低温胁迫因子下的受抑制率。

Fig. 9 Sensitivity analysis of $\Delta nth1$ to high or low temperature stress

A: Colony growth of WT and $\Delta nth1$ under high or low temperature (6 d); B: Inhibition rates of WT and $\Delta nth1$ under the stress factor of high or low temperature.

3 讨论

本研究通过 Split-Marker 同源重组技术获得香蕉枯萎病菌的中性海藻糖 *NTH1* 基因敲除突变体 $\Delta nth1$, 表型鉴定结果表明, 与野生型菌株相比, $\Delta nth1$ 菌株对氰烯菌酯抗性没有明显差异, 但 *NTH1* 基因的缺失导致香蕉枯萎病菌的致病力减弱, 与 FOSTER^[36]“稻瘟病菌的该基因缺失会引起致病力下降”的研

究结果一致。与野生型菌株相比, $\Delta nth1$ 菌株的生长速度和孢子萌发率均下降, 这与 DOEHLEMANN^[23] “在灰葡萄孢中 *NTH1* 基因缺失导致孢子萌发率下降”的研究结果一致。与野生型菌株相比, $\Delta nth1$ 菌株对 H_2O_2 的氧化应激作用更明显, 这与 PEDREÑ^[37] “酿酒酵母中 *NTH1* 基因缺失对 H_2O_2 引起的氧化应激响应较强, 突变体的菌落生长受到更明显抑制”的研究结果一致。同时, $\Delta nth1$ 菌株在高糖、低温和高温条件下的生长, 与野生型菌株相比没有明显差异, 这与吕焯等^[38] 测试的酵母 *NTH1* 基因缺失突变株耐冷冻、耐高糖和耐高温能力优于野生型的结果不一致。编码海藻糖酶基因的数量会由于在不同菌中而存在差异, 而发挥不同的功能, 如在稻瘟病菌中, 中性海藻糖酶的缺失使其定植于植物组织的能力降低, 而致病力下降^[33]。与之相反的是, 在白色丝状酵母和隐球菌中, 中性海藻糖酶突变体并没有明显的致病力差异, 该基因并不是抗真菌药的潜在靶标^[39-40]。尽管海藻糖酶是海藻糖唯一的水解酶, 但由于影响真菌适应性的因素和其他酶的存在, 使得不同真菌的表型存在差异。

综上所述, *NTH1* 基因具有高度保守性, 但由于在不同菌中, 使其发挥了不同的功能。目前, 国内关于植物病原真菌海藻糖酶基因的功能研究尚少。在香蕉枯萎病菌中, *NTH1* 基因缺失突变体对氰烯萜酯的敏感性和野生型相比不存在明显差异, 而对巴西蕉苗致病力显著下降。 $\Delta nth1$ 菌株对细胞壁选择性压力和氧化压力敏感, 但在高糖、高盐和高低温胁迫条件下与野生型菌株相比没有明显差异。因此, 笔者推测该基因可能调控香蕉枯萎病菌的分生孢子萌发和生长, 参与细胞壁合成和氧化应激反应, 并且在致病力方面发挥重要作用, 因为海藻糖的储存不是细胞防御高盐、高糖和高低温胁迫的唯一保护剂, *NTH1* 在香蕉枯萎病菌中的具体调控机制还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 钟群有, 郑卓辉, 彭增明, 等. 香蕉枯萎病生物防治研究概述[J]. *广东农业科学*, 2007(7): 64-65.
- [2] PLOETZ R C. Fusarium wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* [J]. *Phytopathology*, 2006, 96(6): 648.
- [3] NEL B, STEINBERG C, LABUSCHAGNE N, et al. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana [J]. *Plant Pathology*, 2006, 55(2): 217-223.
- [4] THANGAVELU R, PALANISWAMI A, VELAZHAHAN R. Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing fusarium wilt of banana. *Agriculture* [J]. *Ecosystems and Environment*, 2004, 103(1): 259-263.
- [5] 汪军, 王国芬, 杨腊英, 等. 施用淡紫拟青霉与套作对香蕉枯萎病控病作用的影响[J]. *果树学报*, 2013, 30(5): 857-864.
- [6] 刘磊, 梁昌聪, 覃和业, 等. 香蕉枯萎病田间发病株的高效灭菌方法筛选[J]. *植物保护学报*, 2015, 42(3): 362-369.
- [7] 孙雪丽, 郝向阳, 王天池, 等. 香蕉枯萎病防控和抗病育种研究进展[J]. *果树学报*, 2018, 35(7): 870-879.
- [8] 蒲金基, 刘晓妹, 曾会才. 香蕉抗枯萎病育种研究进展[J]. *中国南方果树*, 2003(1): 31-34.
- [9] 齐兴柱, 杨腊英, 黄俊生. *Foc4* 的 2 个过氧化氢酶基因的克隆与表达分析及其引起的香蕉苗活性氧迸发研究[J]. *中国农学通报*, 2012, 28(15): 163-169.
- [10] 王飞燕. 香蕉尖孢镰刀菌 *fpd1* 基因敲除与功能研究[D]. 海口: 海南大学, 2015.
- [11] DONG Z, WANG Z. Isolation and characterization of an exopolysaccharide from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* race 1 and race 4 [J]. *BMC Biochemistry*, 2011, 12(1): 51.
- [12] PIETRO A D, GARCIA-MACEIRA F I, MEGLECZ E, et al. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis [J]. *Molecular Microbiology*, 2001, 39(5): 1140-1152.
- [13] DING Z J, LI M, SUN F, et al. Mitogen-activated protein kinases are associated with the regulation of physiological traits and virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. *Plos One*, 2015, 10(4): e0122634.
- [14] 杨平, 李敏惠, 潘克俭, 等. 海藻糖的生物合成与分解途径及其生物学功能[J]. *生命的化学*, 2006(3): 233-236.
- [15] GANCEDO C, FLORES C L. The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi [J]. *FEMS Yeast Research*, 2004, 4(4-5): 351-359.
- [16] 谢夏青, 李志勇, 马继芳, 等. 谷子弯孢菌海藻糖酶基因 (*CITRE*) 及其启动子的克隆和序列分析[J]. *生物技术通报*, 2011(7): 154-159.
- [17] WOLSKA-MITASZKO B, MOLESTAK E. Properties of trehalase from different organs of alfalfa, *Medicago sativa* [J].

- Acta Physiologiae Plantarum*, 2005, 27(1): 53 – 60.
- [18] 任媛媛, 刘景芳, 戴秀玉, 等. 海藻糖代谢途径相关基因及生物工程[J]. *微生物学报*, 2003(6): 821 – 825.
- [19] MITTENBÜHLER K, HOLZER H. Purification and characterization of acid trehalase from the yeast *suc2* mutant [J]. *The Journal of biological chemistry*, 1988, 263(17): 8537 – 8543.
- [20] KOPP M, MÜLLER H, HOLZER H. Molecular analysis of the neutral trehalase gene from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *The Journal of biological chemistry*, 1993, 268(7): 4766 – 4774.
- [21] RUIJTER G, FILLINGER S, THEVELEIN J, et al. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans* [J]. *Microbiology*, 2001, 147(7): 1851 – 1862.
- [22] AURORA OCÓN, RÜDIGER HAMPP, REQUENA N. Trehalose turnover during abiotic stress in *arbuscular mycorrhizal* fungi [J]. *New Phytologist*, 2007, 174(4): 879 – 891.
- [23] DOEHLEMANN G. Trehalose metabolism is important for heat stress tolerance and spore germination of *Botrytis cinerea* [J]. *Microbiology*, 2006, 152(9): 2625 – 2634.
- [24] GARRE E, MATALLANA E. The three trehalases *Nth1p*, *Nth2p* and *Ath1p* participate in the mobilization of intracellular trehalose required for recovery from saline stress in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Microbiology*, 2009, 155(Pt 9): 3092 – 3099.
- [25] 郎玉成, 倪珏萍. 新型杀菌剂——氰烯菌酯(JS399-19)[J]. *世界农药*, 2007(5): 52 – 53.
- [26] 李恒奎, 周明国, 王建新, 等. 氰烯菌酯防治小麦赤霉病及治理多菌灵抗药性研究[J]. *农药*, 2006(2): 92 – 94.
- [27] 王龙根, 倪珏萍, 王风云, 等. 新杀菌剂 JS399-19 的生物活性研究[J]. *农药*, 2004(8): 380 – 383.
- [28] 迟梦宇, 王健力, 黄金光. 禾谷镰刀菌肌球蛋白(Myosin I) 生物信息学分析及原核表达与纯化[J]. *青岛农业大学学报: 自然科学版*, 2018, 35(2): 111 – 118.
- [29] ZHENG Z, HOU Y, CAI Y, et al. Whole-genome sequencing reveals that mutations in myosin-5 confer resistance to the fungicide phenamacril in *Fusarium graminearum* [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8248.
- [30] 王飞燕, 郭立佳, 杨腊英, 等. 尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种 *fpd1* 基因敲除与表型分析[J]. *热带作物学报*, 2015, 36(8): 1462 – 1468.
- [31] 徐齐君, 胡小平, 陈婷, 等. PEG 介导的棉花枯萎病菌原生质体转化体系的建立[J]. *棉花学报*, 2012, 24(3): 222 – 228.
- [32] 漆艳香, 谢艺贤, 张欣, 等. 香蕉枯萎菌基因组 DNA 提取方法的研究[J]. *生物技术*, 2004(6): 32 – 34.
- [33] 杨军, 薛芳, 王海凤, 等. 水稻稻瘟病菌单孢分离技术及常见问题分析[J]. *山东农业科学*, 2017, 49(2): 132 – 135.
- [34] MOHAMED A A, MAK C, LIEW K W, et al. Early evaluation of banana plants at nursery stage for fusarium wilts tolerance[C]// Molina A B, Masdek N H, Liew K W. Banana fusarium wilt management: towards sustainable cultivation. Rome: INIBAP Press, 2001: 174 – 185.
- [35] FENG H Q, LI G H, SHUN-WEN D, et al. The septin protein Sep4 facilitates host infection by plant fungal pathogens via mediating initiation of infection structure formation [J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 19(5): 1730 – 1749.
- [36] FOSTER A J. Trehalose synthesis and metabolism are required at different stages of plant infection by *Magnaporthe grisea* [J]. *EMBO (European Molecular Biology Organization) Journal*, 2003, 22(2): 225 – 235.
- [37] PEDREÑO O Y, GIMENO-ALCAÑIZ J V, MATALLANA E, et al. Response to oxidative stress caused by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in trehalase genes [J]. *Archives of Microbiology*, 2002, 177(6): 494 – 499.
- [38] 吕焯, 肖冬光, 和东芹, 等. 酵母海藻糖酶缺失菌株的构建及其耐性[J]. *微生物学报*, 2008(10): 1301 – 1307.
- [39] PENDREÑO Y, GONZÁLEZ - PÁRRAGA P, CONESA S., et al. The cellular resistance against oxidative stress (H₂O₂) is independent of neutral trehalase (*Ntc1p*) activity in *Candida albicans* [J]. *FEMS Yeast Research*, 2006, 6(1): 57 – 62.
- [40] BOTTS M R, HUANG M, BORCHARDT R K, et al. Developmental cell fate and virulence are linked to trehalose homeostasis in *Cryptococcus neoformans* [J]. *Eukaryotic Cell*, 2014, 13(9): 1158 – 1168.