

文章编号: 1674-7054(2012)02-0138-04

香蕉枯萎病菌 *fgb2* 基因的克隆与序列分析魏巍^{1,2} 杨腊英² 周端咏^{1,2} 谢德啸^{1,2} 黄小娟^{1,2} 刘一贤^{1,2} 黄俊生²

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

海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海南 儋州 571737)

摘要: 为了解 *fgb2* 基因在尖孢镰刀菌古巴专化型侵染香蕉过程中的作用, 及其与尖孢镰刀菌古巴专化型 1 号和 4 号生理小种之间的致病力差异关系, 采用 PCR 和 RT-PCR 方法扩增了 2 个生理小种的 *fgb2* 基因, 并对其扩增产物进行了测序及相似序列搜索和比对, 同时还对其基因编码的蛋白进行了氨基酸序列比对和功能分析。结果表明 2 个生理小种 *fgb2* 基因开放阅读框分别为 1 466 bp 和 1 452 bp, 基因同源性为 96.33%; 其编码的氨基酸数量分别为 299 个和 316 个; 从 *fgb2* 基因序列及其编码蛋白的氨基酸序列来看, 2 个生理小种的致病力差异与 *fgb2* 基因并无明显对应关系。

关键词: 尖孢镰刀菌古巴专化型; 生理小种; *fgb2* 基因; 致病性; 序列分析

中图分类号: S 668.1; S 432.4

文献标志码: A

香蕉枯萎病又称香蕉巴拿马病、黄叶病, 是破坏香蕉维管束导致植株死亡的毁灭性病害。其病原菌为尖孢镰刀菌古巴专化型 [*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder et Hasen], 在世界香蕉种植区均有分布, 是目前影响香蕉种植和产量最重要的病害之一^[1]。该病害最早于 1874 年在澳大利亚被发现, 1910 年巴拿马香蕉生产因该病造成极大损失。20 世纪 50 年代, 该病在巴拿马、哥斯达黎加、洪都拉斯、哥伦比亚等地发生严重, 约有 4 万 hm^2 蕉园遭毁灭^[2]。香蕉枯萎病菌主要靠带菌的吸芽和病株及被污染的流水、土壤和农具等传播, 并可通过根部及受伤的地下球茎侵入植株, 沿维管束向假茎及叶片蔓延, 堵塞导管, 最终导致植株死亡^[3]。调查发现, 在一些香蕉的主产区, 香蕉枯萎病正在快速蔓延, 给香蕉产业带来了重大损失和危害。前国际香蕉改良网络组织主席 EMILE FRISON 在《New Scientists》杂志上曾经给香蕉产业提出过警示: 香蕉很可能会因为尖孢镰刀菌古巴专化型第 4 生理小种的危害, 而在地球上逐渐消亡。目前, 还没有防治香蕉枯萎病的特效药, 也没有培育出十分有效的抗病品种, 生物防治也才刚刚起步, 并无重大进展。

对香蕉枯萎病菌致病相关基因的研究, 有助于从分子水平了解其致病机理。G 蛋白即鸟苷酸结合蛋白 (GTP binding proteins) 是细胞内与信号传导有关的一类信号蛋白, 参与调节基因表达、细胞生长分化等生理过程。它们作为分子介质, 循环于无活性的 GDP 结合态和有活性的 GTP 结合态, 同时将信号从质膜传递到细胞内^[4-7]。G 蛋白都由 α β γ 3 个亚基组成。其中 β 亚单位在多数 G 蛋白中都非常类似, 相对分子质量约为 3.6×10^4 。*fgb2* 基因是香蕉枯萎病病原菌尖孢镰刀菌中编码 G 蛋白 β 亚基的 1 个基因。在真菌中, G 蛋白与许多生物进程的调节相关, 包括细胞的生长、变异和毒性^[8]。G 蛋白 α 亚基的基因克隆和功能分析已经在许多丝状真菌中有过报道, 但是 G 蛋白其他亚基的基因结构和功能方面的信息却是十分有限的。从粟疫病菌 (*Cryphonectria parasitica*) 中克隆得到 G 蛋白 β 亚基的基因 *cpgb1*, 并且研究该基因缺失后发现, 真菌毒性下降、孢子形成、色素沉积, 以及在合成培养基上营养生长会增加^[8]。*sfaD* 基因克隆自构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) G 蛋白 β 亚基, 该基因缺失后, 构巢曲霉在浸没培养中生长减缓, 其孢子的形成变得活跃^[9]。在新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 中, G 蛋白 β 亚基上的 *gpb1* 基因缺失

收稿日期: 2012-03-04

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (200903049); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2008HZS1J003); 农业部农作物病虫害疫情监测与防控项目 (ZBC200803)

作者简介: 魏巍 (1986-), 男, 江西九江人, 海南大学农学院 2009 级硕士研究生。

通信作者: 黄俊生, 研究员, 博士生导师. Tel: 0898-23300209; E-mail: H888111@126.com

后,会影响该菌在繁殖过程中对信息素的应答反应^[10]。综上所述,G蛋白 β 亚基在功能上与营养生长、分生孢子产生和附着、附着孢的形成、性发育、致病性相关,另外也具备一些独特的功能。本研究通过分析尖孢镰刀菌古巴专化型生理小种1号和生理小种4号 *fgb2* 基因序列信息和所编码的氨基酸序列信息,期望能够从中探索 *fgb2* 基因在香蕉枯萎病菌侵染香蕉过程中的作用,以及不同生理小种间 *fgb2* 基因差异与致病力差异的关系,为该病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株 香蕉枯萎病菌尖孢镰刀菌古巴专化型生理1号小种 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1(以下简称 FOC1)和生理4号小种 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4(以下简称 FOC4)的菌株,由海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室提供。

1.1.2 试剂 *rTaq* 酶、TaKaRa RNA PCR Kit 购自 TaKaRa 公司; PCR Product Purification Kit 购自申能博彩生物公司;引物由上海生工合成。

1.1.3 仪器 DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂);Thermocycler(Biometra)。

1.1.4 培养基 选用 PDA 培养基(马铃薯葡萄糖琼脂培养基)培养菌株。

1.2 方法

1.2.1 供试菌株的培养 从 PDA 平板上分别挑取 FOC1 和 FOC4 的菌块,接入装有 500 mL 的 PDA 液体培养基的三角瓶(规格为 1 000 mL)中,于 28 °C、150 r·min⁻¹ 的摇床上培养 5 d,然后离心收集菌体。

1.2.2 菌株基因组 DNA 和总 RNA 的提取 香蕉枯萎病菌菌株基因组的 DNA 提取参照文献[11]的方法进行,菌体总 RNA 的提取采用异硫氰酸胍法^[12]。将经检测为完整的 RNA 反转录成 cDNA,具体步骤见 TaKaRa RNA PCR Kit 说明书。

1.2.3 香蕉枯萎病菌 *fgb2* 基因的 PCR 扩增 根据已发表的尖孢镰刀菌黄瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum*) *fgb2* 基因(GenBank 登录号: AB180244.1)设计引物,正向引物: S-*fgb2*(5'-TTATGC-CCTCGACATGACACCC-3');反向引物: A-*fgb2*(5'-ATGGCCGAACAATTGATCCTGAAG-3'),分别对尖孢镰刀菌古巴专化型的2个生理小种的 cDNA 和基因组 DNA 进行 PCR 扩增,反应体系为: TaKaRa *Taq* DNA polymerase(5 U· μ L⁻¹) 0.25 μ L, 10×PCR buffer(Mg²⁺ plus) 5 μ L, dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹) 4 μ L, 模板 1 μ L, 20 μ mol·L⁻¹ 上下游引物各 2 μ L,加水补足至 50 μ L。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 40 s; 58 °C 退火 40 s; 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。

1.2.4 *fgb2* 基因的测序及序列分析 将 PCR 产物经 $w = 1\%$ 的琼脂糖电泳检测后,用 OMEGA 生物公司的 PCR 产物回收试剂盒回收,并送往深圳华大基因研究院测序,重复 3 次。测序结果采用 NCBI 网站的 Blast 和 DNASTAR(version 6.0) 软件进行序列分析。

2 结果与分析

2.1 香蕉枯萎病菌 *fgb2* 基因的扩增 利用 S-*fgb2* 和 A-*fgb2* 引物对 1 号和 4 号生理小种的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,均扩增到约 1 450 bp 大小的条带(见图 1 中泳道 1 和泳道 2),与预期的 *fgb2* 基因大小吻合;以 FOC1 和 FOC4 的 cDNA 为模板均扩增到约 900 bp 大小的条带(见图 1 中泳道 3 和泳道 4),与预期的 *fgb2* 基因的 cDNA 序列大小吻合。表明 *fgb2* 基因存在内含子。

2.2 香蕉枯萎病菌 *fgb2* 基因序列分析 测序结果表明,以基因组 DNA 为模板,FOC1 和 FOC4 的 PCR 扩增产物大小分别为 1 466 bp 和 1 452 bp;以 cDNA 为模板,FOC1 和 FOC4 的 PCR 扩增产物大小分别为 900 bp 和 951 bp。经 DNA star(version 6.0) 序列比对后发现,FOC1 和 FOC4 的 *fgb2* 基因序列相似性较高,基因同源性

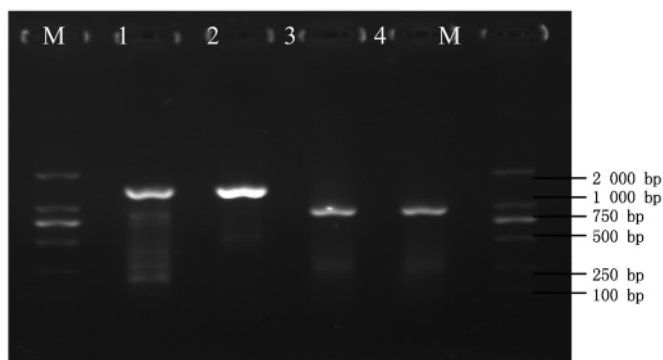


图1 FOC1 和 FOC4 *fgb2* 基因的 PCR 和 RT-PCR 结果
M: DNA marker DL2000; 1~2 泳道: 以 FOC1 和 FOC4 的基因组 DNA 为模板; 3~4 泳道: 以 FOC1 和 FOC4 的 cDNA 为模板。

为 96.33%。

2.3 香蕉枯萎病菌 *fgb2* 基因氨基酸序列分析 用 DNASTAR (version 6.0) 软件将 FOC1 和 FOC4 的 CDS 核酸序列翻译成氨基酸序列,同时通过 NCBI BLAST 网站搜索 *fgb2* 同源菌属的氨基酸序列,再用 DNASTAR (version 6.0) 软件分析它们的氨基酸序列。FOC1 和 FOC4 的 *fgb2* 基因分别编码 299 个和 316 个氨基酸。相比于赤霉菌 (*Gibberella zeae*)、丛赤壳属 (*Nectria haematococca*)、大孢粪壳 (*Sordaria macrospora*)、金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、柄孢霉 (*Podospora anserina*) 和轮枝菌 (*Verticillium albo-atrum*) 等,该基因的编码产物相似性介于 83%~99% 之间(见表 1),表明不同种间该基因的翻译产物存在一定程度的差异。同时可以看出,FOC4 的 *fgb2* 基因编码氨基酸序列的同源性要高于 FOC1,说明 *fgb2* 基因在 FOC4 中的表达比 FOC1 更接近于同源菌属。

表 1 与 *fgb2* 基因序列有同源性的基因的 CDS 核酸序列及氨基酸序列同源性比较

类 型	基 因	登录号	CDS 核 酸的长 度/bp	编码的 氨基酸 数/个	<i>fgb2</i> 基因 CDS 核酸 序列同源性/%		<i>fgb2</i> 基因编码氨 基酸序列同源性/%	
					FOC1	FOC4	FOC1	FOC4
<i>Gibberella zeae</i>	PH-1	XM_390046.1	989	328	98	95	88	99
<i>Nectria haematococca</i>	mpVI 77-43-4	XM_003051033.1	955	317	94	94	87	98
<i>Sordaria macrospora</i>	SMAC_07639	XM_003351392.1	806	267	89	89	83	95
<i>Metarhizium anisopliae</i>	G-protein beta subunit	DQ393574.1	789	262	89	89	85	96
<i>Neurospora crassa</i>	OR74A	XM_954977.2	784	260	89	89	83	95
<i>Podospora anserina</i>	PODANSg678	XM_001903628.1	778	258	89	89	85	96
<i>Verticillium albo-atrum</i>	VaMs. 102	XM_003002429.1	761	252	89	89	84	95
<i>Chaetomium globosum</i>	CBS 148.51	XM_001226349.1	730	242	87	88	86	97

2.4 香蕉枯萎病菌 *fgb2* 编码蛋白特性分析 根据 PROTPARAM 程序分析的结果,预测 FOC1 和 FOC4 的 *fgb2* 氨基酸相对分子质量分别为 32 740.3 和 35 030.5;理论 PI 分别为 7.07 和 6.55;正电荷氨基酸残基 (Arg + Lys) 分别为 31 个和 32 个;负电荷氨基酸残基 (Asp + Glu) 分别为 31 个和 34 个。

利用 PROSITE 进行蛋白质功能位点预测,2 个生理小种的 *fgb2* 基因编码蛋白均存在多个 WD 基元和 WD 重复蛋白位点(见图 2)。

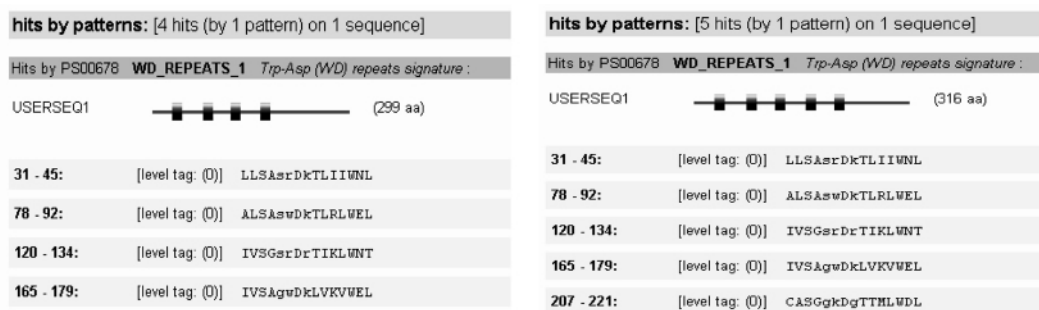


图 2 FOC1 和 FOC4 的 *fgb2* 基因编码蛋白功能分析

信号肽 (signal peptide) 是可被细胞转运系统识别的氨基酸序列,通常由 10 多个至 40 多个氨基酸残基组成。根据 SIGNALP 程序分析结果,可以预测 FOC1 和 FOC4 都不含有信号肽。

3 讨 论

FOC1 和 FOC4 在侵染香蕉的种类上存在着较大的差异^[13],其中 FOC1 只能侵染粉蕉,而 FOC4 对所有的香蕉种类均有侵染作用,决定这些差异的关键因素是 2 个生理小种之间的基因的差异。笔者对香蕉枯萎病菌 FOC1 和 FOC4 的 *fgb2* 基因进行了克隆,并对克隆到的 *fgb2* 基因进行核苷酸序列和氨基酸序列的比对和分析。结果表明 2 个生理小种的 *fgb2* 基因序列差异很小;该基因的编码产物氨基酸存在一些差异。根据本研究结果,还不能确定 2 个生理小种的寄主选择性差异是否与 *fgb2* 基因直接相关。

SONA J 等^[8]在黄瓜专化型上的研究发现 *fgb2* 基因缺失的突变菌株,其细胞内的环磷酸腺苷水平会下降,这表明该基因很可能参与了细胞内物质代谢和生物学功能的调节;而且进一步的研究表明 *fgb2* 基

因缺失的突变菌株在生理学性质上也会发生一些改变,如耐热性、菌落形态、分生孢子形成和萌发频率等;致病性实验也表明 *fgb2* 基因缺失突变菌株对其宿主的致病性也是明显地下降。这表明该基因的功能还与病原菌侵害寄主以及致病性相关。

本研究通过克隆香蕉枯萎病菌 1 号和 4 号生理小种的 *fgb2* 基因,利用生物学软件分析了 2 个生理小种 *fgb2* 基因的 cDNA 序列和表达产物的差异。根据现有的研究结果,可以推测该基因在病原菌入侵寄主和致病性上发挥了作用。2 个生理小种的 *fgb2* 基因在氨基酸水平上存在一些差异,这种差异是否会导致寄主选择性差异还需要进一步的实验验证。

参考文献:

- [1]魏岳荣,黄秉智,杨护,等.香蕉镰刀菌枯萎病研究进展[J].果树学报,2005,22(2):154-159.
- [2]唐复润.香蕉枯萎病菌 *FPD1* 基因的克隆、表达及其生防菌分离、筛选[D].儋州:华南热带农业大学,2007.
- [3]张海水,陈荣章.香蕉枯萎病发生与防治[J].中国南方果树,2004,33(3):33.
- [4]MEHRABI R. Signaling pathways involved in pathogenicity and development of the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola* [D]. Wageningen: Wageningen University, 2006.
- [5]ORUN O. A structural approach to G-protein signaling mechanisms: α -subunits [J]. Marmara Medical Journal, 2006, 19(1): 41-45.
- [6]VETTER I R, WITTINGHOFFER A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions [J]. Science, 2001, 294: 1299-1304.
- [7]LANIA A, MANTOVANI G, SPADA A. G protein mutations in endocrine diseases [J]. European Journal of Endocrinology, 2001, 145: 543-559.
- [8]SONA J, KOUICHI A, TAKUYA K, et al. The G protein β subunit *FGB1* regulates development and pathogenicity in *Fusarium oxysporum* [J]. Curr Genetics, 2003, 43: 79-86.
- [9]SONA J, KOUICHI A, KENJIRO M, et al. Targeted disruption of a G protein α subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum* [J]. Curr Genetics, 2002, 41: 407-413.
- [10]JAIN S, AKIYAMA K, AKATA R, et al. Signaling via the G protein α subunit *FGA2* is necessary for pathogenesis in *Fusarium oxysporum* [J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 243(1): 165-172.
- [11]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,2004,14(6):32-34.
- [12]汤祖辉,赖卫华,许杨.红曲霉 RNA 的提取方法[J].江西科学,2006,20(2):118-120.
- [13]谢艺贤,漆艳香,张欣,等.香蕉枯萎病菌的培养性状和治病性研究[J].植物保护,2005,31(4):71-73.

Cloning and Sequence Analysis of *fgb2* Gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

WEI Wei^{1,2}, YANG La-ying², ZHOU Duan-yong^{1,2}, XIE De-xiao^{1,2},
HUANG Xiao-juan^{1,2}, LIU Yi-xian^{1,2}, HUANG Jun-sheng²

(1. College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China; 2. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science/ Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Danzhou 571737, China)

Abstract: It is very important to know the roles of *fgb2* genes in invasion process of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) into banana and its relationship in pathogenic difference between the races 1 and 4 of FOC attacking the same banana cultivar. The *fgb2* genes were amplified by using Polymerase Chain Reaction and Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction, and the amplified products were then sequenced and aligned with DNASTar Megalign software. The functions of the proteins encoded by *fgb2* genes were also analyzed. The results revealed that the open reading frames of *fgb2* genes from races of FOC were 1 466 bp and 1 452 bp, encoding 299 and 316 amino acids. FOC race 1 showed a 96.33% similarity of *fgb2* gene to FOC race 4. The sequences of *fgb2* genes and amino acid sequences of the two FOC races showed no relationship between the pathogenic difference and the *fgb2* gene. These results would help to understand the function of *fgb2* genes in follow-up research activities.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; race; *fgb2* gene; pathogenicity; comparative analysis