

文章编号: 1674-7054(2014)03-0233-06

# 巴西橡胶树胶胞炭疽病菌 *CgE6* 基因 RNAi 突变体的构建

何 芬, 罗红丽

(海南大学 海南省热带作物资源可持续利用重点实验室 海南 海口 570228)

**摘 要:** 为了研究橡胶树胶胞炭疽病菌效应蛋白基因 *CgE6* 的功能, 笔者利用 RNAi 技术原理, 构建了可用于转化丝状真菌的 RNAi 二元重组载体 pSilent-*CgE6*-FR, 通过 PEG 介导法遗传转化橡胶树胶胞炭疽病菌原生质体, 在抗性培养基上获得了 *CgE6* 的 RNAi 转化子并任意选取抗性转化子进行分子鉴定。结果表明, 所检测的转化子基因组中都有抗性标记的整合; 与野生型菌株相比, 所检测的转化子中目标基因 *CgE6* 的表达均出现不同程度的降低, 其中 127 号转化子的表达水平最低; 本实验成功构建了有效的 *CgE6* 效应蛋白基因的 RNAi 突变体, 为进一步研究该效应蛋白的功能奠定了基础。

**关键词:** 橡胶树胶胞炭疽病菌; *CgE6*; RNAi 突变体; 分子鉴定

中图分类号: S 763.7

文献标志码: A

随着越来越多丝状真菌全基因组测序工作的完成, 解读真菌基因功能成为丝状真菌研究的热点<sup>[1]</sup>。基因功能的研究有正向遗传学和反向遗传学 2 种方法<sup>[2-4]</sup>。随着高通量测序技术的应用日益普遍, 通过生物信息学的方法能够容易获得大量基因的序列信息, 这使反向遗传学方法在基因功能研究方面的运用越来越广泛。RNA 干涉 (RNA interference, RNAi) 属于反向遗传学的研究方法之一, 由于其具有靶向性高、通用性强、快速简便等特点而被广泛应用<sup>[5]</sup>。RNAi 现象指的是由内源或外源性双链 RNA 介导的细胞内 mRNA 特异性降解, 最终导致相应的转录后基因沉默<sup>[6]</sup>。迄今为止, RNAi 技术在植物和动物中已经得到了广泛的应用<sup>[7-8]</sup>, 但在丝状真菌研究中的应用却十分有限。2007 年, YAMADA 等<sup>[9]</sup>在米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 中用 RNAi 技术使 *brlA* 基因的表达降低, 其突变体产生分生孢子的时间推迟; 同时单一的  $\alpha$ -淀粉酶 RNAi 遗传转化导致有 3 个拷贝  $\alpha$ -淀粉酶的活性下降 90%。此外, 在稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*)<sup>[10]</sup>、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)<sup>[11]</sup> 和构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)<sup>[12]</sup> 等丝状真菌中也有应用 RNAi 诱发基因沉默的报道, 但在胶胞炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 中尚未见相关报道。橡胶树胶胞炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 是引起胶园中橡胶树炭疽病的主要病原菌, 对橡胶产量影响很大<sup>[13]</sup>。病原菌分泌的效应蛋白是重要的致病因子, 它们对于病原菌侵染寄主植物并在其上定殖及随后的病害发生都至关重要。目前关于炭疽病菌效应蛋白的报道不多, 主要有菜豆炭疽病菌中的 *CgDN3* 和 *CIH1*<sup>[14-17]</sup>, 但橡胶树炭疽病菌中的效应蛋白研究还未见报道。在前期研究中, 笔者分离到了 1 株橡胶树强致病胶胞炭疽菌并进行了基因组序列的测定, 预测到了一系列致病相关的效应蛋白基因。笔者在本实验中扩增了其中的 1 个效应蛋白基因 *CgE6*, 并以其为靶标构建了它的 RNAi 突变体, 旨在为后续这些效应蛋白基因的功能研究打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料 橡胶树胶胞炭疽病菌菌株由本实验室分离保存; 感受态大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株

收稿日期: 2014-03-04

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31360424); 2011 “新世纪优秀人才支持计划” (NCET-11-0928)

作者简介: 何芬 (1987-), 女, 海南大学农学院 2011 级硕士研究生. E-mail: 373358007@qq.com

通信作者: 罗红丽 (1973-), 女, 博士, 研究员, 从事植物与病原微生物互作研究. E-mail: hlluo@live.com

DH5 $\alpha$  购于北京鼎国昌盛生物有限公司; RNAi 载体 pSilent 由本实验室保存。

实验所用的限制性内切酶购自 NEB 公司、DNA 聚合酶和 T4 连接酶购自 TaKaRa 公司; 溶壁酶、链霉素、氨苄青霉素、卡那霉素、潮霉素均购自 Sigma 公司; 真菌 RNA 提取所用的 Trizol 购自 Invitrogen 公司; RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo 公司; DNA 凝胶回收试剂盒购自 AxyPrep 公司; pGEM-Teasy Vector Kit 购自 Promega 公司; 引物合成和测序均由北京鼎国昌盛生物有限公司完成。

1.2 橡胶树胶孢炭疽病菌基因组 DNA 的提取 胶孢炭疽病菌基因组 DNA 的提取参照吴志红等<sup>[18]</sup>的 CTAB 法。具体操作步骤如下: 将培养在平板上的菌丝体转移到研钵中, 加适量的液氮研磨成白色粉末, 把粉末加入到事先 65 °C 预热的 2-ME/CTAB 抽提液中混匀后离心, 取上清液用等体积氯仿/异戊醇去杂后, 吸取水相加入等体积预冷的异丙醇进行沉淀, 沉淀物用  $\varphi = 70\%$  的乙醇洗涤。风干沉淀后加入适量去离子水溶解,  $-80$  °C 保存备用。

1.3 橡胶树胶孢炭疽病菌总 RNA 的提取 利用 Trizol 法提取胶孢炭疽病菌总 RNA, 具体操作参照 Invitrogen 公司 Trizol 提取 RNA 的说明书进行。提取的总 RNA 样品经 Nanodrop 仪器确定其浓度和纯度。

1.4 *CgE6* 基因的扩增及 RNAi 载体 pSilent-F-R 的构建 根据胶孢炭疽病菌效应蛋白 *CgE6* 基因序列, 设计扩增 *CgE6* 基因的正向和反向特异性引物 *CgE6-F* (5'-GGGGTACCCCTCGAGATGCAGTTCTC-CATCTTCACTGTCC-3') 和 *CgE6-R* (5'-GGCCTACGTAGAAGGCCTTTAGCAAACAGGGACCTTGATG-3')。其中引物 *CgE6-F* 中含有 *Stu* I 和 *Xho* I 的酶切位点, 引物 *CgE6-R* 中含有 *Sna*B I 和 *Kpn* I 的酶切位点。以总 RNA 为模板, 按照 Thermo 公司的 cDNA 试剂盒说明书, 将 RNA 反转录成 cDNA; 再以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。 $w = 1\%$  的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果, 将目标片段切胶回收后送样测序。

先用限制性内切酶 *Xho* I 和 *Sna*B I 分别双酶切 RNAi 空载体 pSilent 和 *CgE6* 片段, 将酶切后的片段和载体 pSilent 用 T4 DNA 连接酶连接, 转化 DH5 $\alpha$ , 通过菌落 PCR 和酶切法鉴定获得的中间载体 pSilent-*CgE6-F* 质粒; 同样再用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Stu* I 分别双酶切 pSilent-F 中间载体和 *CgE6* 片段, 通过连接、转化和鉴定后获得 *CgE6* 基因的 RNAi 转化载体 pSilent-*CgE6-FR*。

1.5 胶孢炭疽病菌对潮霉素的敏感性检测 pSilent 载体中是用潮霉素磷酸转移酶做筛选标记, 为了确定胶孢炭疽病菌对潮霉素 B 的最低抑菌浓度, 将活化后的病菌配置成  $1 \times 10^4$  cfu  $\cdot$  mL<sup>-1</sup> 孢子悬浮液, 各取 20  $\mu$ L 孢子悬浮液点接到分别含 0, 100, 200, 300, 400 和 500 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 潮霉素 B 的 PDA 平板上, 置于 28 °C 培养箱中培养 3 d, 观察并记录其生长情况。

1.6 胶孢炭疽病菌的遗传转化 参考文献 [19] 的方法通过氯化铯密度梯度离心法大量提取重组入 *CgE6* 基因的质粒 pSilent-*CgE6-FR*。

胶孢炭疽病菌原生质体的制备和遗传转化参照李思蒙等<sup>[20]</sup>的方法, 并根据橡胶树胶孢炭疽病菌的生长特性加以调整。具体操作步骤如下: 从 PDA 平板上挑取一定量的菌丝加入装有 50 mL PD 培养液的 250 mL 三角瓶中, 28 °C 摇床培养 30 h, 过滤除去菌丝, 获得孢子悬浮液。再取一定量的孢子悬浮液到盛有 200 mL PD 培养液的 500 mL 三角瓶中, 28 °C 140 r  $\cdot$  min<sup>-1</sup> 摇床培养 14 ~ 16 h, 获得幼嫩的菌丝体。用溶壁酶溶解菌丝体的细胞壁, 获得原生质体。用 PEG 法将 pSilent-*CgE6-FR* 转化原生质体, 经过筛选培养基培养后, 挑选从上层培养基中最先长出的转化子, 将其转接到潮霉素浓度为 400 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 的 PDA 平板上进行 2 次筛选, 28 °C 培养 6 ~ 8 d 后用于后续的相关鉴定。

1.7 胶孢炭疽病菌 *CgE6* 基因 RNAi 转化子的分子鉴定 从基因组和转录表达 2 个方面鉴定转化子。

转化子中潮霉素磷酸转移酶基因的鉴定。以转化子总 DNA 为模板, 参照 1.4 的方法, 利用潮霉素 B 基因的特异性扩增引物 *Hyg-F* (5'-AGAATCTCGTGCTTTTCAGCTTC-3') 和 *Hyg-R* (5'-ACTTCTACACAGC-CATCGGTC-3') 进行 PCR 扩增。

*CgE6* 基因转录表达情况检测。以 *CgActin* 基因的表达作为内参, 以转化子总 RNA 为模板, 参照 1.4 的方法, 用引物 *CgE6-F* 和 *CgE6-R* 进行 PCR 表达鉴定。

## 2 结果与分析

2.1 *CgE6* 基因的扩增 利用 RT-PCR 方法扩增橡胶树炭疽病菌的 *CgE6* 基因, 在约 500 bp 位置得到 1

条特异性的条带(见图1)。测序结果表明该片段与已知序列相同,可以用于 RNAi 载体的构建。

**2.2 RNAi 载体 pSilent-CgE6-FR 的构建** 将 *CgE6* 基因片段通过 *Xho* I 和 *Sna*B I 正向插入 RNAi 载体 pSilent 的内含子 5'端,构建中间载体 pSilent-CgE6-F。酶切鉴定结果(见图2A)表明,*CgE6* 基因片段已经正向连入 pSilent 中。然后在中间载体 pSilent-CgE6-F 上,通过限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Stu* I 将 *CgE6* 基因片段反向插入 pSilent-CgE6-F 的内含子 3'端,构建最终 RNAi 转化载体 pSilent-CgE6-FR。对 pSilent-CgE6-FR 用 *Kpn* I 和 *Xho* I 进行双酶切鉴定(见图2B),切下一段包括正反向插入 *CgE6* 基因序列和它们之间内含子序列在内的约 1 300 bp 片段,这与预测片段大小相符,表明 pSilent-CgE6-FR 构建成功。

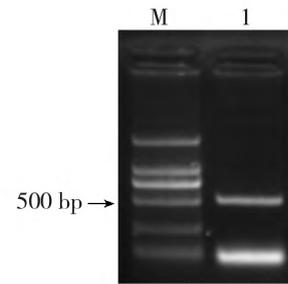


图1 橡胶树胶胞炭疽病菌 *CgE6* 基因的扩增  
M: DNA Marker 2000; 1: *CgE6* 基因的 PCR 扩增

Fig. 1 *CgE6* amplification of *Colletotrichum gloeosporioides*

M: DL2000 marker; 1: *CgE6* amplification by PCR

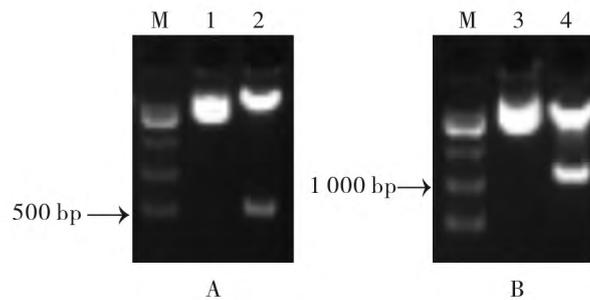


图2 重组质粒的酶切鉴定结果

M: DNA Marker 10 kb; 1: pSilent 载体; 2~3: pSilent-CgE6-F; 4: pSilent-CgE6-FR

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by digestion

M: DNA Marker 10 kb; 1: pSilent vector; 2~3: pSilent-CgE6-F; 4: pSilent-CgE6-FR

**2.3 橡胶树胶胞炭疽病菌对潮霉素 B 的敏感性检测** 从图3可以看出,当潮霉素 B 质量浓度达到 400 ~ 500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时(见图3-E~F),菌丝的生长受到明显的抑制,因此,潮霉素 B 对胶胞炭疽病菌转化子的筛选质量浓度确定为 400  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

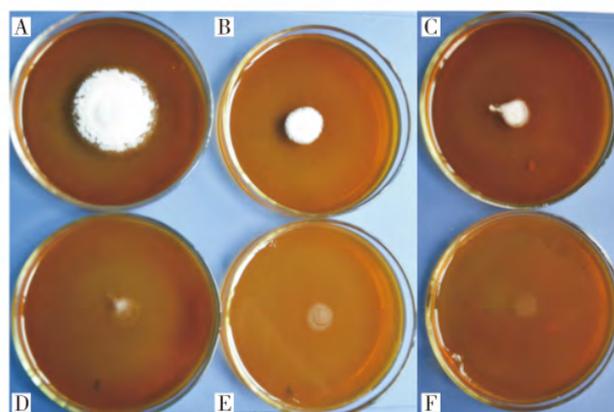


图3 胶胞炭疽病菌对潮霉素 B 的敏感性的测定

A~F: 潮霉素浓度分别为 0, 100, 200, 300, 400, 500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

Fig. 3 The sensitivity detection of *C. gloeosporioides* to hygromycin B

A~F: Hygromycin B concentrations at 0, 100, 200, 300, 400, 500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

**2.4 转化子的获得和筛选** 由图4可知,橡胶树胶胞炭疽病菌原生质体外观完整饱满,浓度达到  $1.6 \times 10^7 \text{cuf} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,完全可以用于遗传转化。将 *CgE6* 基因的 RNAi 转化载体 pSilent-CgE6-FR 通过 PEG 介导

法转化胶孢炭疽病菌的原生质体,在含有 400 mg · L<sup>-1</sup>潮霉素的平板上进行筛选,获得了大量的转化子(见图 5)。随机挑取若干转化子转接到新的含有潮霉素的平板上进行复筛,复筛出的转化子用于分子鉴定。

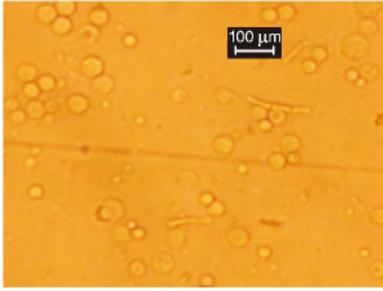


图 4 橡胶树胶孢炭疽病菌原生质体  
Fig. 4 Protoplast of *C. gloeosporioides*

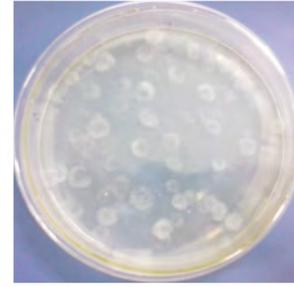


图 5 橡胶树胶孢炭疽病菌 *CgE6* 的 RNAi 突变体初筛  
Fig. 5 Screening of *CgE6* RNAi mutants

2.5 橡胶树炭疽病菌阳性转化子的鉴定 随机挑取 7 个转化子进行基因组 DNA 的提取。用 PCR 方法检测筛选标记潮霉素磷酸转移酶基因是否插入基因组中。用潮霉素磷酸转移酶基因特异性引物 Hyg-F 和 Hyg-R 进行 PCR 扩增,结果表明,在被检测的 7 个转化子中均能扩增出预期条带,而在野生型 WT(阴性对照)中没有相应条带出现(见图 6),说明潮霉素 B 抗性基因已经插入到转化子基因组中。

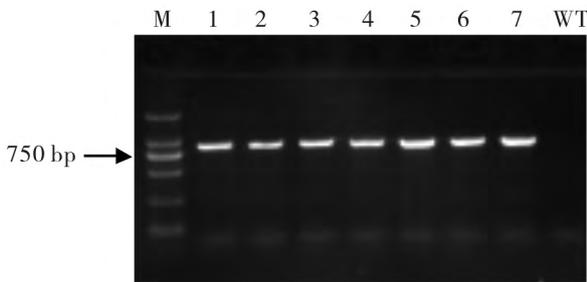


图 6 阳性转化子潮霉素基因的 PCR 鉴定  
M: DNA Marker; 1~7: 不同的转化子; WT: 野生型菌株  
Fig. 6 Identification of the positive transformants by PCR  
M: DL2000 marker; 1~7: Different transformants; WT: Wild type strain

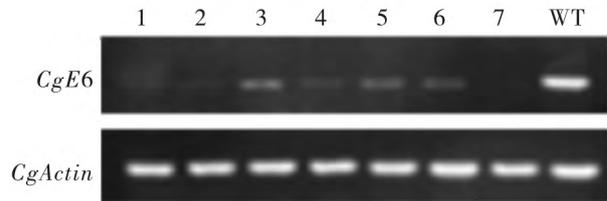


图 7 *CgE6* 在炭疽病菌 RNAi 不同转化子中的表达分析  
Fig. 7 The expression of *CgE6* in RNAi transformants

2.6 *CgE6* 基因在不同转化子中的表达分析 以炭疽病菌 *CgActin* 基因为内参,通过 RT-PCR 方法检测 *CgE6* 基因在不同转化子中的表达情况(见图 7)。结果表明,*CgE6* 基因在 7 个 RNAi 转化子中的表达水平均比野生型要低,其中在 7 号转化子中的表达最低,表明已经成功构建了 *CgE6* 效应蛋白基因的 RNAi 突变体。

### 3 讨论

为了研究效应蛋白的功能,笔者首先建立了炭疽病菌的遗传转化体系。筛选标记在遗传转化体系中起着关键的作用,合适有效的筛选标记可以降低假阳性率,减少工作量<sup>[21]</sup>。真菌的遗传转化筛选标记可以分为 2 大类,即营养缺陷性标记和抗药性标记,其中抗药性标记的使用更普遍。在抗药性标记中,潮霉素抗性基因的应用最广泛。根据已有报道,黄瓜炭疽菌(*C. lagenarium*)<sup>[22]</sup>、辣椒炭疽病菌(*C. acutatum*)<sup>[23-24]</sup>、有节黧豆炭疽菌(*C. gloeosporioides*)<sup>[25]</sup>、鳄梨炭疽菌(*C. gloeosporioides*)<sup>[26]</sup>等对潮霉素都比较敏感,潮霉素质量浓度为 50~100 mg · L<sup>-1</sup>时具有良好的抑制效果。本试验中,橡胶树炭疽病菌对潮霉素的敏感度不高,当潮霉素质量浓度为 500 mg · L<sup>-1</sup>时不能完全抑制病菌的生长,导致试验成本加大。由此看来,潮霉素抗性在橡胶树炭疽病菌的遗传转化筛选系统并非一个理想的筛选标记,需要通过改变抗性筛选标记或更换菌株来加以优化。

真菌效应蛋白的功能和致病机理千变万化,已有的研究表明,同一菌株中的同源效应蛋白之间也存在明显的不同,如引起小麦叶枯病的病原真菌 *Mycosphaerella graminicola* 有 3 个同源效应蛋白,分别为 Mg3LysM、Mg1LysM 和 MgxLysM,其中只有 Mg3LysM 对致病性有贡献<sup>[27]</sup>。一些弱毒性效应蛋白本身对致病性没有直接贡献,但可以通过干涉其他效应蛋白或 Avr 因子诱导的防卫反应信号途径起作用,如来自 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersiciv* 的 Avr1 主要通过抑制由 I-3 介导抗病性发挥作用<sup>[28]</sup>。此外,多数效应蛋白之间存在协同作用,其中单个效应蛋白的致病性往往较弱,缺失时并不表现出明显的表型缺陷和致病性的变化<sup>[29-30]</sup>。*CgE6* 效应蛋白基因是橡胶树炭疽病菌中新发现的 1 个候选效应蛋白基因,其功能和作用方式尚不清楚。本研究利用 RNA 干涉技术,获得了橡胶树炭疽病菌效应蛋白基因 *CgE6* 的 RNAi 突变体,这为 *CgE6* 基因功能分析提供了研究材料。今后,还需要通过后续的研究来明确 *CgE6* 在病原菌致病过程中的作用。

此外,尽管 RNAi 技术已经成为生物改良和基因功能研究强有力的手段<sup>[31]</sup>,并且因其具有靶向性高、通用性强、快速简便等优势被迅速应用到真菌基因功能研究中<sup>[5]</sup>,特别是对一些生长发育关键基因和对生物体细胞具有致死性基因的研究十分有利<sup>[32]</sup>。但是,由于 RNAi 突变体对基因表达水平的抑制是不完全的,一般不能完全阻断目标基因的表达,有时会导致突变体不表现表型或表型不明显<sup>[5]</sup>,因此,必要时还需要借助基因敲除技术来对基因功能进行验证。

## 参考文献:

- [1] 张艳华,贺丹,王丽. 根癌农杆菌介导烟曲霉遗传转化的研究[J]. 中国实验诊断学,2010,14(9):1507-1508.
- [2] 杨歧生. 分子生物学[M]. 浙江:浙江大学出版社,2004.
- [3] 宋尔卫. RNA 干扰的生物学原理与应用[M]. 北京:高等教育出版社,2005.
- [4] 程从升,舒跃龙,张智清. 流感病毒的反向遗传学研究进展[J]. 病毒学报,2007,23(1):68-71.
- [5] 樊荣辉,武治印,王永强,等. RNAi 技术及其在真菌基因功能研究中的应用[J]. 菌物学报,2010,29(3):315-320.
- [6] 郑亚婷,段勇,王玉明. RNA 干扰技术及其应用[J]. 医学综述,2010,16(5):641-644.
- [7] 赵臻,邱凯,蒯本科. 人工 microRNA 干扰拟南芥 *AtCDKC;1* 和 *AtCDKC;2* 基因表达的初步研究[J]. 植物生理学通报,2007,46(7):693-700.
- [8] 陈杰民,兰军,涂昌,等. RNA 干扰 *GPR14* 对自发性高血压大鼠血压和心血管重构的影响[J]. 临床和实验医学杂志,2012,11(1):1-6.
- [9] YAMADA O, IKEDA R, OHKITA Y, et al. Gene silencing by RNA interference in the koji mold *Aspergillus oryzae* [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2007, 71(1): 138-144.
- [10] KADOTANI H, NAKAYASHIKI H, TOSA Y, et al. RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. Mol. Plant-Microbe Interact., 2003, 16: 769-776.
- [11] MOUZYNA I, HENRY C, DOERING T L, et al. Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* [J]. FEMS Microbiol. Lett., 2004, 237: 317-324.
- [12] HAMMOND T M, KELLER N P. RNA silencing in *Aspergillus nidulans* is independent of RNA-dependent RNA polymerase [J]. Genetics, 2005, 169: 607-617.
- [13] 罗大全,郑作飞,范鸿雁,等. 海南垦区橡胶炭疽病菌对多菌灵抗性的室内测定[J]. 热带农业科学,2003,23(1):8-10.
- [14] KLEEMANN J, TAKAHARA H, STÜBER K, et al. Identification of soluble secreted proteins from appressoria of *Colletotrichum higginsianum* by analysis of expressed sequence tags [J], Microbiology, 2008, 154(4): 1204-1217.
- [15] STEPHENSON S A, HATFIELD J, RUSU A, et al. *CgDN3*: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis* [J]. Mol. Plant Microbe Interact., 2000, 13: 929-941.
- [16] TAKAHARA H, DOLF A, ENDL E, et al. Flow cytometric purification of *Colletotrichum higginsianum* biotrophic hyphae from Arabidopsis leaves for stagespecific transcriptome analysis [J]. Plant J., 2009, 59: 672-683.
- [17] KLEEMANN J, RINCON-RIVERA L J, TAKAHARA H, et al. Sequential delivery of host-induced virulence effectors by appressoria and intracellular hyphae of the phytopathogen *Colletotrichum higginsianum* [J], PLoS Pathog., 2012, 8(4): e1002643. doi:10.1371.
- [18] ROONEY H C, VAN T KLOOSTER J W, VAN DER HOORN R A, et al. Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance [J]. Science, 2005, 308(5729): 1783-1786.
- [19] REP M, MEIJER M, HOUTERMAN P M, et al. *Fusarium oxysporum* evades I-3-mediated resistance without altering the

- matching avirulence gene [J]. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2005, 18(1): 15–23.
- [20] BIRCH P R, REHMANY A P, PRITCHARD L, et al. Trafficking arms: oomycete effectors enter host plant cells [J]. *Trends Microbiol.*, 2006, 14(1): 8–11.
- [21] HOGENHOUT S A, VAN DER HOORN R A, TERAUCHI R, et al. Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms [J]. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2009, 22(2): 115–122.
- [22] RIVAS S, THOMAS C M, Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum* [J]. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 2005, 43: 395–436.
- [23] KHANG C H, BERRUYER R, GIRALDO M C, et al. Translocation of *Magnaporthe oryzae* effectors into rice cells and their subsequent cell-to-cell movement [J]. *Plant Cell*, 2010, 22: 1388–1403.
- [24] 吴志红, 汪天虹, 黄卫, 等. 简便易行的丝状真菌染色体 DNA 提取法 [J]. *菌物系统* 2001, 20(4): 575–577.
- [25] ZHOU Z Z, LI G H, LIN C H, et al. Conidiophore stalk-less encodes a putative zinc-finger protein involved in the early stage of conidiation and mycelial infection in *Magnaporthe oryzae* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interacts.*, 2009, 22(4): 401–402.
- [26] 李思蒙, 王永林, 黄冬辉, 等. 杨树炭疽病菌原生质体遗传转化的建立及绿色荧光蛋白的表达 [J]. *林业科学* 2013, (49) 5: 121–127.
- [27] MARSHALL R, KOMBRINK A, MOTTERAM J, et al. Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(2): 756–769.
- [28] HOUTERMAN P M, CORNELISSEN B J C, REP M. Suppression of plant resistance gene-based immunity by a fungal effector [J]. *PLoS Pathog.*, 2008, 4(5): e1000061.
- [29] SCHURCH S, LINDE C C, KNOGGE W, et al. Molecular population genetic analysis differentiates two virulence mechanisms of the fungal avirulence gene *NIP1* [J]. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2004, 17: 1114–1125.
- [30] STEPHENSON S A, HATFIELD J, RUSU A, et al. CgDN3: an essential pathogenicity gene of *Colletotrichum gloeosporioides* necessary to avert a hypersensitive-like response in the host *Stylosanthes guianensis* [J]. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2000, 13: 929–941.
- [31] 王绍文, 刘刚, 邢苗, 等. 丝状真菌中的 RNA 干扰及其应用技术 [J]. *生物技术通报* 2011, 10: 77–83.
- [32] KOJIMA K, KIKUCHI T, TAKANO Y, et al. The mitogen-activated protein kinase gene *MAF1* is essential for the early differentiation phase of appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium* [J]. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 2002, 15(12): 1268–1276.

## Construction and Expression Analysis of *CgE6* RNAi Mutant in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis*

HE Fen, LUO Hongli

(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources, Hainan University, Haikou 570228, China)

**Abstract:** RNA interference (RNAi) technology is one of the important methods for studying gene function, but it is not widely used in filamentous fungi. The RNAi binary vector pSilent-*CgE6*-FR was constructed based on the principle of RNAi technology to investigate the function of effector gene *CgE6* in *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis*. Transformation was done by using the PEG mediated method, and *CgE6* RNAi transformants were screened on culture medium with hygromycin. Seven transformants randomly selected were identified resistant at a molecular level. The results of PCR amplification for hygromycin gene were positive, and the semi-quantitative RT-PCR analysis demonstrated that the transformants had a lower expression of *CgE6* but at different levels than those of the wild type strain, of which the transformants 2 and 7 showed a minimum expression of *CgE6*. All these data showed that *CgE6* RNAi mutants were successfully constructed, which would help to further study the functions of *CgE6*.

**Key words:** *Colletotrichum gloeosporioides*; *CgE6*; RNAi mutant; molecular identification