

文章编号: 1674-7054(2015)01-0041-06

橡胶树胶孢炭疽病菌 *CgBASP2* 基因敲除突变体构建及其致病力分析

汪 倩, 何朝族, 罗红丽

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

摘 要: 在前期对橡胶树胶孢炭疽病菌分泌蛋白组进行预测的基础上, 通过 RT-PCR 的方法克隆了 1 个候选分泌蛋白基因并命名为 *CgBASP2* (Biotrophy-associated Secreted Proteins 2 of *Colletotrichum gloeosporioides*)。该基因编码 100 个氨基酸, 相对分子质量约为 9.85×10^3 。生物信息学分析结果表明, 该蛋白含有 1 个 18 氨基酸的信号肽序列, 不含任何跨膜结构域。氨基酸序列比对结果表明, *CgBASP2* 与草莓胶孢炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Nara gc5)、西瓜炭疽菌 (*Colletotrichum orbiculare* MAFF)、玉米炭疽菌 (*Colletotrichum graminicola*)、菜豆炭疽菌 (*Colletotrichum higginsianum*) 和稻瘟菌 (*Magnaporthe oryzae* 70-15) 的 *BASP2* 同源, 同源性分别为 100%, 90%, 87%, 87% 和 67%。为了研究该基因的功能, 本研究通过同源重组技术构建了橡胶树胶孢炭疽病菌 *CgBASP2* 基因的敲除突变株 $\Delta CgBASP2$ 。进一步的分析发现, 与野生型菌株相比 $\Delta CgBASP2$ 突变菌株不能对橡胶树叶片产生致病性, 由此可见, *CgBASP2* 基因在胶孢炭疽病菌的致病过程中起重要作用。

关键词: 橡胶树胶孢炭疽菌; *CgBASP2*; 致病力

中图分类号: S 794.1

文献标志码: A

橡胶树炭疽病是橡胶园的重要真菌病害之一, 危害橡胶小苗、大田幼树及成龄开割树, 其侵染叶片、叶柄和果实, 引起橡胶树重复落叶和嫩梢回枯, 推迟开割时间, 从而影响胶乳产量^[1-2]。橡胶树炭疽病主要由胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 引起^[3]。胶孢炭疽菌营养兼性寄生生活, 对植物的侵染采用双阶段侵染策略: 第 1 阶段营养活体寄生生活, 利用类似于活体寄生真菌的附着胞结构直接穿透植物角质层和细胞壁, 随后生成活体侵染菌丝从寄主细胞中摄取营养; 第 2 阶段转为具有毁灭性的腐生阶段, 利用形成的次生菌丝杀死植物细胞后在死细胞上摄取营养^[4]。效应蛋白 (Effector) 是植物病原真菌重要的致病因子之一, 对于病原真菌的毒力以及成功侵染具有重要作用^[5]。真菌效应蛋白都含有信号肽序列, 可经内质网分泌至病菌细胞质外体空间和宿主细胞发挥功能^[6]。依据效应蛋白在植物细胞的靶标位点, 可将其分为胞间效应蛋白 (apoplastic effector) 和胞内效应蛋白 (cytoplasmic effector)^[7]。分泌到细胞内的效应蛋白可以抑制植物细胞的免疫反应, 有利于病原真菌养分的获得、菌体的增殖和生长^[8]。目前, 已经从稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*)、小麦白粉病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *Hordei*) 等多种病原真菌中克隆出几十个效应蛋白^[9], 其中, 明确在侵染菌丝中特异表达的效应蛋白有水稻稻瘟菌中的 AVR-Pita1^[10-11], AVR-CO39^[12], PWL1-2^[13-14] 和活体寄生相关分泌蛋白 BAS1-4^[15]。关于 *BASP* 分泌蛋白的研究仅限于稻瘟菌中。稻瘟菌中有 4 个 *BASP* (Biotrophy-associated Secreted Proteins) 成员, 它们在水稻细胞中的定位各不相同, 与稻瘟菌的生长、产胞能力、附着胞形成和致病性等均没有明显关系^[16]。笔者在前期研究中分离得到 1 个橡胶树胶孢炭疽病菌的致病菌株并在基因组序列测定基础上, 预测到 1 个与

收稿日期: 2015-01-21

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: 汪倩 (1989-), 女, 海南大学农学院 2012 级硕士研究生。E-mail: 1321433799@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@hainu.edu.cn

BASP2 同源的分泌蛋白基因序列,命名为 *CgBASP2*,通过构建该基因的敲除突变株系,对其致病性进行分析,旨在明确其生物学功能。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养 橡胶树胶孢炭疽病菌野生型菌株(WT)由本实验室分离纯化。固体培养使用 PDA 培养平板,液体培养使用马铃薯-葡萄糖培养液(马铃薯 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,D-葡萄糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $28\text{ }^{\circ}\text{C}$, $150\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡培养。

1.2 方法

1.2.1 *CgBASP2* 基因的扩增 根据胶孢炭疽病菌基因组 DNA 序列,设计引物 F(5'-ATGGTCCGCAT-CACTCTCTTC-3')和 R(5'-TTAGAAACCTTGCTTCTTG-3')。通过 RT-PCR 的方法扩增 *CgBASP2* 基因片段,该基因片段回收后进行序列测定。

1.2.2 基因序列分析 运用 ProtParam 工具分析蛋白大小和等电点等特性;运用 SignalP-V4.0 工具分析信号肽位点;运用 Protcomp-V9 工具分析定位序列;运用 TMHMM-v2.0 工具分析跨膜序列;运用 big-PI Predictor 工具分析 GPI 锚定位点;运用 TargetP-V1.1 工具分析线粒体或其他定位序列;利用 DNAMAN 软件进行氨基酸序列分析;运用 BLASTX 序列比对工具对 *CgBASP2* 进行在线检索分析,获得同 *CgBASP2* 相似性显著的同源序列。

1.2.3 $\Delta CgBASP2$ 突变株的构建 根据胶孢炭疽病菌基因组的 DNA 序列,在基因 *CgBASP2* 起始密码子上游 1 000 bp 和终止密码子下游 1 000 bp 处,分别设计引物 *CgBASP2*-F1,*CgBASP2*-R1 和 *CgBASP2*-F2,*CgBASP2*-R2 以扩增上游和下游片段。上游片段回收后用限制性内切酶 Hind III 和 Bgl II 进行双酶切,下游片段回收后用限制性内切酶 Bgl II 和 Kpn I 进行双酶切,然后,将酶切后的上下游片段与经 Hind III 和 Kpn I 酶切的载体 pCB1532 进行连接转化,获得敲除载体 pCB1532-*CgBASP2*。所用引物序列如下:

CgBASP2-F1: 5'-AGAAAGCTTAGAATTCATCGTAAATGAAGCAC-3'; *CgBASP2*-R1: 5'-GCGAGATCT-CGCG-GTAGTTGAGTGAAAG-3'; *CgBASP2*-F2: 5'-AGAAGATCTGGCTGGAATGCAGAACTAAGG-3'; *CgBASP2*-R2: 5'-GCGGTACCTGTGCGCTCGAACGACTGAT-3'。

1.2.4 原生质体的制备和转化 胶孢炭疽病菌的原生质体制备和转化参照文献 [4]。

1.2.5 $\Delta CgBASP2$ 突变株的鉴定 抗性转化子在含氯嘧啶隆抗性的 PDA 平板中进行复筛后,提取基因组 DNA [6]。通过引物 UPR3 和 DNF4(根据氯嘧啶隆基因序列设计),与 *CgBASP2* 基因上下游同源臂的引物 F3 和 R4 进行多重 PCR 扩增进行鉴定。所用引物序列如下:

UPR3: 5'-CAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'; DNF4: 5'-AAGCGGAAGAGCGCCCAATACGGCAA-ACC-3'; F3: 5'-GCCTTGTGTTTGCCCTCCTAC-3'; R4: 5'-TGTTTGAAGAATCATCGTCGC-3'。

1.2.6 致病性分析 取浅绿期的橡胶树叶片,用打孔器分别取待测菌株的 5 mm 大小的菌块接种于叶片上,置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下保湿,持续光照 2~3 d 后观察病斑生成情况,并测量直径,进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 *CgBASP2* 基因扩增及序列分析 通过 RT-PCR 技术扩增得到 *CgBASP2* 基因片段,然后进行序列测定,结果表明,*CgBASP2* 基因编码 100 个氨基酸,由 56 个疏水性残基和 44 个亲水性残基组成,相对分子质量约为 9.85×10^3 ,等电点 pI 为 7.55(图 1)。利用 SignalP-V4.0,Protcomp-V9,TMHMM-V2.0,big-PI Predictor 和 TargetP-V1.1 等程序进行蛋白定位分析,结果显示,该蛋白含有 1 个 18 氨基酸的信号肽序列,为胞外分泌蛋白,不含任何跨膜结构域(表 1 和图 1)。

利用 *CgBASP2* 蛋白的氨基酸序列在 Genebank 蛋白数据库中进行 BLAST 比对,结果发现,橡胶树胶孢炭疽的 *CgBASP2* 与玉米炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)、菜豆炭疽菌(*Colletotrichum higginsiaum*)、西瓜炭疽菌(*Colletotrichum orbiculare* MAFF)、草莓胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Nara gc5)和稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae* 70-15)的 *BASP2* 蛋白具有同源性(图 2)。其中,与同属同种的草莓胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* Nara gc5) *CgBASP2* 基因同源性为 100%;与同属不同种的西瓜炭疽菌(*Colle-*

totrichum orbiculare MAFF)、玉米炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*) 和菜豆炭疽菌(*Colletotrichum higginsianum*) 的同源性较高,分别达到 90% ,87% 和 87%; 与不同属的稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae* 70 – 15) 的同源性相对较低,为 67% 。尽管在蛋白序列中没有发现任何已知的保守结构域,但都含有 6 个保守的半胱氨酸残基(图 2 中 “* ”所示) 。

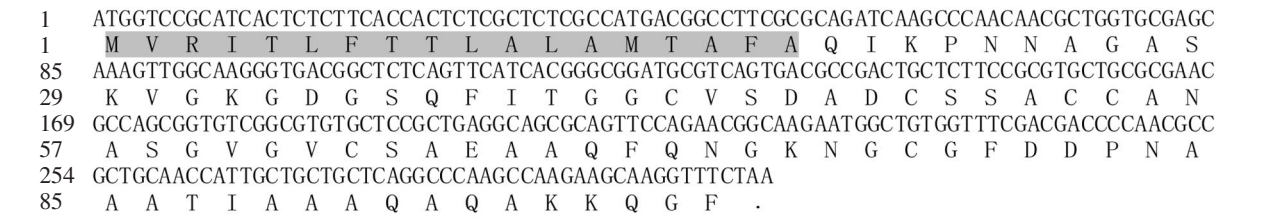


图 1 *CgBASP2* 的全长 cDNA 核苷酸序列及推测氨基酸序列阴影部分表示 18 个氨基酸的信号肽序列
Fig. 1 The full-length cDNA sequence of *CgBASP2* and its deduced amino acid sequence
Letters with grey background show the sequence of signal peptide

表 1 *CgBASP2* 分泌蛋白的预测程序及结果
Tab. 1 The sequencing programs and results of prediction of secreted protein *CgBASP2*

所用预测程序	预测对象	预测结果
Program used for prediction	Target of prediction	Results of prediction
SignalP-V4. 0	信号肽 Signal peptide	1 ~ 18 位氨基酸 1 – 18 amino acids
Protcomp-V9	定位序列 Localization sequence	胞外蛋白(Extracellular protein)
TMHMM-V2. 0	跨膜域 Transmembrane domain	无 No
big-PI Predictor	GPI 锚定位点 GPI-anchored sites	无 No
TargetP-V1. 1	线粒体或其他细胞器定位序列 Localization sequence for mitochondria or other organelles	无 No

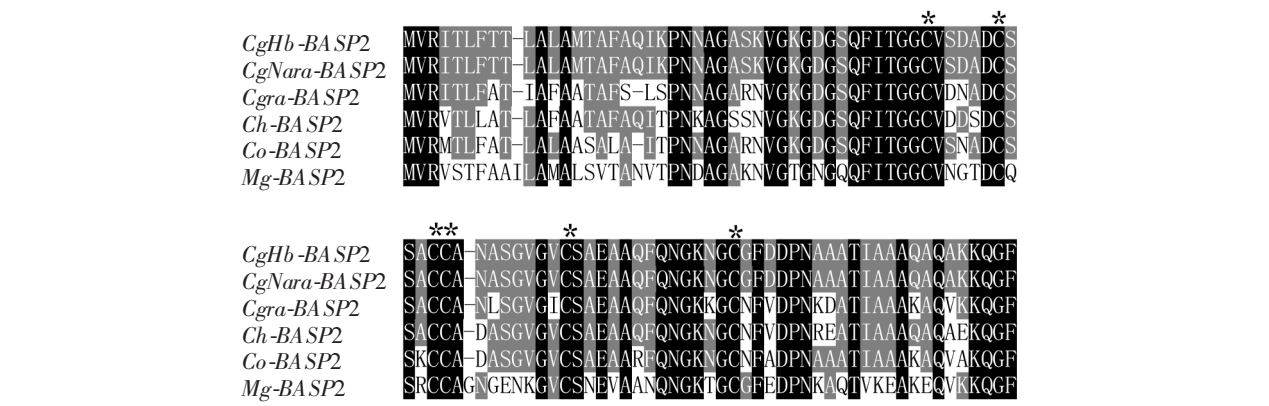


图 2 *CgBASP2* 与其他真菌同源基因的氨基酸序列比对
注: 序列中黑色阴影标注的表示氨基酸残基完全一致,灰色阴影标注的表示与 *CgBASP2* 氨基酸序列一致; - 表示软件最佳比对结果所产生的间隔; * 表示保守的半胱氨酸残基

Fig. 2 Alignment of amino acid sequences of *CgBASP2* and other fungal *BASP2*
Note: Black shades mean the same amino acid residue; gray shades mean the same amino acid with *CgBASP2*; - the gap generated by the best alignment; * means the conserved cysteine residues.

2.2 *CgBASP2* 基因的敲除突变体构建与验证 通过同源重组技术将含有 *CgBASP2* 基因上、下游 DNA 片段的载体(图 3A) 转入野生型胶孢炭疽菌株中,共获得 25 个抗性转化子。分别以 F + R、F3 + UPR3 和 DNF4 + R4 为引物对进行筛选,鉴定 *CgBASP2* 基因的敲除突变体。其中,使用 F + R 引物对不能扩增出

300 bp 左右的条带(图 3B), 而使用 F3 + UPR3 和 DNF4 + R4 引物对能够扩增出 1 400 bp 和 1 600 bp 左右的条带(图 3C) 且其抗性转化子为阳性 *CgBASP2* 基因敲除转化子, 用 $\Delta CgBASP2$ 来表示。

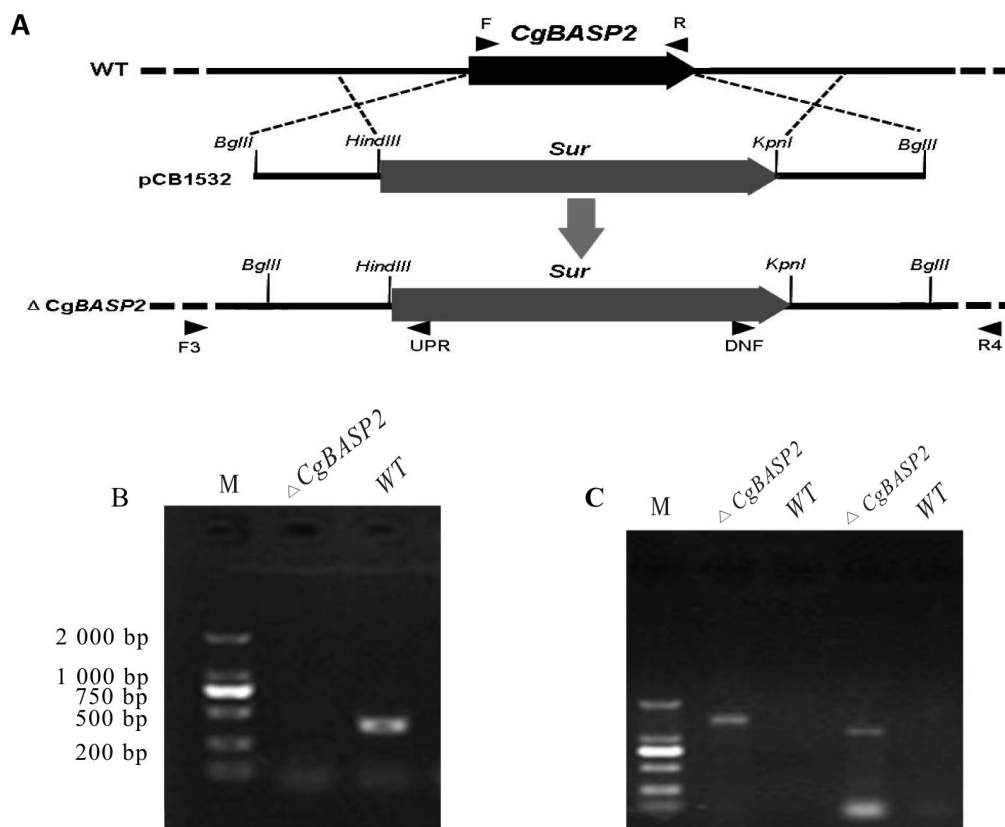


图 3 基因敲除原理及敲除突变体的 PCR 检测

A. 敲除原理图。其中, *CgBASP2* 代表胶孢炭疽菌中要敲除的基因, *Sur* 代表敲除载体中的选择标记基因氯喹磺隆; B. 引物 F + R 的 PCR 扩增结果; C. 引物 DNF + R4 和 F3 + UPR 的 PCR 扩增结果。M. DNA marker (2 000 bp)

Fig. 3 Schematic diagram of *CgBASP2* knockout and PCR detection of $\Delta CgBASP2$

A: Schematic diagram of *CgBASP2* knockout. *CgBASP2* represents the knockout gene in *C. gloeosporioides*; *Sur* represents sulfonylurea resistance gene; B: The PCR amplification with primer pairs F + R; C: The PCR amplification with primer pairs DNF + R4 and F3 + UPR. M represents DNA marker (2 000 bp)

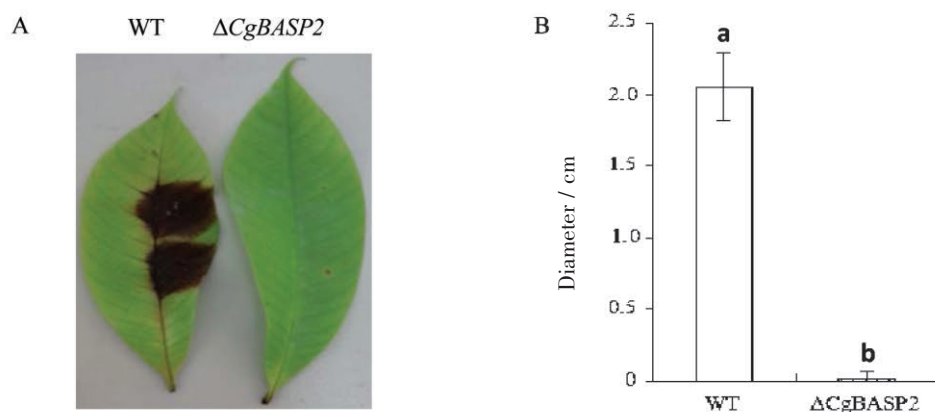


图 4 $\Delta CgBASP2$ 对橡胶树叶片的致病力分析

A. 病斑症状图; B. 病斑直径统计分析

Fig. 4 Pathogenicity analysis of $\Delta CgBASP2$ on rubber tree leaves

A: Disease symptom; B: Statistical analysis of the size of disease lesions

2.3 $\Delta CgBASP2$ 丧失对橡胶树叶片的致病力 将生长在固体培养基上的野生型菌株、 $\Delta CgBASP2$ 突变菌株打成菌液后,分别接种到离体橡胶树叶片上,4 d 后发病情况如图4所示。野生型菌株在橡胶树叶片上可以引起典型的病斑,而在 $\Delta CgBASP2$ 接种部位看不到明显的病斑,表明胶胞炭疽菌的 *CgBASP2* 基因对于该菌的致病力具有重要作用。

3 讨 论

生物信息学分析发现,橡胶树胶胞炭疽病菌的 *CgBASP2* 蛋白与分类上同属同种的草莓胶胞炭疽病菌同源性最高,达100%;与分类上同属不同种的玉米炭疽、菜豆炭疽和西瓜炭疽病菌的同源性稍低一些,介于85%~90%之间;而对于分类上不同属不同种的稻瘟病菌来说同源性只有67%,说明该蛋白在不同物种中保守性与物种的亲缘关系有关。进一步的分析发现,尽管该蛋白的氨基酸序列在不同属真菌中存在较大差异,也没有发现存在已知的保守结构域,但其中存在6个十分保守的半胱氨酸残基,它们的生物学功能还不清楚。

目前,国内外关于病原真菌 *BASP* 蛋白的功能研究不多,仅见到 Gloria 等^[8]关于水稻稻瘟菌 *BAS1-4* 蛋白的初步研究。稻瘟病菌 *BAS2* 蛋白能够在活性营养界面复合体(BIC)处富集,但敲除 *BAS2* 基因的稻瘟菌突变菌株的致病性没有明显变化。本研究结果表明,敲除 *CgBASP2* 基因的胶胞突变菌株不能侵染橡胶树叶片。推测 *CgBASP2* 基因参与胶胞致病力的调控。这一现象也说明,不同真菌 *BASP2* 蛋白的功能存在明显差异。本研究只是对 *CgBASP2* 基因敲除后导致的致病力变化进行了初步分析,关于该基因影响致病力变化的作用机理还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] 方中达. 植病研究方法 [M]. 3版. 北京: 中国农业出版社, 1998.
- [2] 蔡志英, 黄贵修. 巴西橡胶树炭疽病研究进展 [J]. 西南林业大学学报, 2011, 31(2): 89-93.
- [3] 黄贵修, 许灿光. 中国天然橡胶病虫害识别与防治 [M]. 北京: 中国农业出版, 2012.
- [4] FLYNN A, CHEN X, O'CONNELL E, et al. A comparison of the efficacy of transplantation of bone marrow derived mesenchymal stem cells and unrestricted somatic stem cells on outcome after acute myocardial infarction [J]. Stem Cell Research & Therapy, 2012(3): 36-44.
- [5] PIERRE J G M, DEWIT, MEHRABI R, HARROLD A, et al. Fungal effector protein: past, present and future [J]. Molecular Plant Pathology, 2009, 10(6): 735-747.
- [6] DEJONGE R, BOLTON M D, THOMMA B P. How filamentous pathogens co-opt plants: the ins and outs of fungal effectors [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2011, 14(4): 400-406.
- [7] KAMOUN S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes [J]. Annual Review of Phytopathology, 2006, 44: 41-60.
- [8] HOGENHOUT S A, RENIER A L, TERAUCHI R, et al. Emerging concepts in effector biology of plant associated organisms [J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2009, 22(2): 115-122.
- [9] BHADARIA V, BANNIZA S, WANG L X, et al. Proteomic studies of phytopathogenic fungi, oomycetes and their interactions with hosts [J]. European Journal Plant Pathol, 2010, 126(1): 81-95.
- [10] JIA Y, MCADAMS S A, BRYAN G T, et al. Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance [J]. EMBO J., 2000, 19(15): 4004-4014.
- [11] KHANG C H, PARK S Y, LEE Y H, et al. Genome organization and evolution of the AVR-Pita avirulence gene family in the *Magnaporthe grisea* species complex [J]. Molecular Plant-microbe Interactions, 2008, 21(5): 658-670.
- [12] PEYYALA R, FARMAN M L. *Magnaporthe oryzae* isolates causing gray leaf spot of perennial ryegrass possess a functional copy of the AVR1-CO39 avirulence gene [J]. Mol. Plant Pathol, 2006, 7(3): 157-165.
- [13] KANG S, SWEIGARD J A, VALENT B. The PWL host specificity gene family in the blast fungus *Magnaporthe grisea* [J]. Mol Plant Microbe Interact, 1995, 8(6): 939-948.
- [14] SWEIGARD J A, CARROLL A M, KANG S, et al. Identification, cloning, and characterization of PWL2, a gene for host species specificity in the rice blast fungus [J]. Plant Cell, 1995, 7(8): 1221-1233.

- [5] MOSQUERA G, GIRALDO M C, KHANG C H, et al. Insertion transcriptome analysis identifies *Magnaporthe oryzae* BAS1-4 as biotrophy-associated secreted proteins in rice blast disease [J]. *Plant Cell*, 2009, 21(4): 1273–1290.
- [6] TALBOT N J, SALCH Y P, MA M HAMER, et al. Karyotypic variation within clonal lineages of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59(2): 585–593.

Pathogenicity analysis and construction of *CgBASP2* knockout mutant of *Colletotrichum gloeosporioides* infecting *Hevea brasiliensis*

WANG Qian, HE Chaozu, LUO Hongli

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

Abstract: Based on the prediction result of secreted proteome of *Colletotrichum gloeosporioides* infecting rubber tree (*Hevea brasiliensis*), one of the candidate genes was cloned by RT-PCR and named as Biotrophy – associated Secreted Protein 2 of *C. gloeosporioides* (*CgBASP2*). This gene was sequenced and found to encode 100 amino acids with a relative molecular weight of about 9.85×10^3 . Bioinformatics analysis showed that the gene contains an 18aa signal peptide at N terminal, but without any transmembrane domain. Alignment analysis showed that the amino acid sequence of the gene *CgBASP2* from *H. brasiliensis* is 100%, 90%, 87%, 87% and 67% similar to that of the *CgBASP2* from *Colletotrichum gloeosporioides* Nara gc5, *Colletotrichum orbiculare* MAFF, *Colletotrichum graminicola*, *Colletotrichum higginsianum* and *Magnaporthe oryzae* 70–15, respectively. The *CgBASP2* gene knockout mutant strain $\Delta CgBASP2$ was constructed by using homologous recombination to study its biological functions. This $\Delta CgBASP2$ mutant strain inoculated onto the leaves of rubber tree was found to lose pathogenicity while the wild type strain had good pathogenicity. This result implied that the *CgBASP2* gene might probably play an important role in the pathogenicity of *C. gloeosporioides*.

Key words: *Colletotrichum gloeosporioides*; *Hevea brasiliensis*; *CgBASP2*; pathogenicity