

文章编号: 1674-7054(2019)02-0127-08

香蕉枯萎镰刀菌4号生理小种 *mon1* 基因 敲除转化子的表型分析及致病力测定

李恒^{1,2}, 畅文军², 陈汉清², 乔帆^{1,2}, 曾会才²

(1 海南大学 热带农林学院 海口 570228; 2 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所以农业农村部热带作物生物学与遗传资源重点实验室/海南省热带微生物资源重点实验室 海口 571101)

摘要: 根据笔者实验室前期蛋白质组学研究成果,发现尖孢镰刀菌古巴专化型4号生理小种(Foc4)中的 *mon1* 基因影响了尖孢镰刀菌的致病性,为了研究 *mon1* 基因在 Foc4 侵染香蕉过程中的具体作用,利用同源重组方法敲除了 Foc4 的 *mon1* 基因,并对获得的敲除突变体开展表型分析和致病性测定。结果表明,与 Foc4 野生型菌株相比,敲除突变体生长缓慢、菌丝变细、分支减少及产孢量降低,菌株抵抗外源氧胁迫、细胞壁穿透能力、纤维素利用能力减弱,对巴西蕉苗的致病力明显减弱。由此推测 *mon1* 基因在 Foc4 的生长发育、产孢及致病力等方面具有一定的作用。

关键词: *mon1*; 尖孢镰刀菌; 基因敲除; 致病性

中图分类号: S 432.4 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2019.02.005

香蕉是我国热区的主要农业类经济作物之一,主要分布于我国海南、云南、福建、广东、广西等地,并且逐年迅速发展^[1-2]。香蕉枯萎病是一种土传病害,由尖孢镰刀菌古巴专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc)引起,是香蕉生产种植中的一种毁灭性病害。土壤中,病原菌主要从香蕉的根系或者球茎侵入,沿着维管束组织扩散,在生长发育代谢过程中产生毒素物质,引起植株组织病变坏死,堵塞导管,阻断植株水分和营养物质的运输,导致香蕉植株的枯萎死亡^[3]。香蕉枯萎镰刀菌根据寄主香蕉的品种分为1, 2和4号3个生理小种,1号生理小种(Foc1)主要侵染大蜜哈、龙牙蕉和矮香蕉,4号生理小种(Foc4)几乎可以侵染香蕉的所有品种^[4]。液泡融合蛋白 Mon1 也被称为 sAND 蛋白,在酿酒酵母(*saccharomyces cerevisiae*)中,Mon1 和囊泡融合蛋白 Cez1 复合物与小 GTP 酶 Ypt7 起作用以介导囊泡运输至液泡^[5-7]。研究发现,Mon1 同源蛋白 Mon1a 在酵母细胞中的主要功能是参与细胞囊泡运输,在内质网到高尔基体、高尔基体到质膜的蛋白质运输过程中发挥着重要作用^[8]。*mon1* 基因作为囊泡运输相关基因,对维持细胞的相关功能起着重要的作用^[5-7],但其在香蕉枯萎镰刀菌生长过程中的功能未见报道。本实验室前期研究发现,香蕉枯萎镰刀菌4号生理小种中 *mon1* 基因在侵染巴西蕉过程中上调表达,由此推测其可能在 Foc4 的致病过程中发挥作用。为了探究 *mon1* 基因在香蕉枯萎镰刀菌生长过程中的具体功能,笔者通过同源置换的方法,对香蕉尖孢镰刀菌 *mon1* 基因功能进行敲除,旨在明确 *mon1* 基因在尖孢镰刀菌与香蕉植株互作过程中的具体功能,为研究其致病机理提供新的方向和思路。

收稿日期: 2019-03-08

修回日期: 2019-05-10

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项“作物枯萎病综合治理技术方案(201503110); 海南省自然科学基金(No. 317258)

作者简介: 李恒(1993-),男,海南大学热带农林学院2016级硕士研究生。E-mail: 1107702155@qq.com

通信作者: 曾会才(1964-),男,博士,研究员,研究方向: 植物与病原微生物互作研究。E-mail: zenghuicai@itbb.org.cn

1 材料与方法

1.1 材料 供试菌株为尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种 (Foc4) F4-161-2 野生型菌株,质粒为 pCT74,均由本实验室保存。STC 溶液和 PTC 溶液按黄东杰等^[9]的方法进行配制。Lysing Enzyme 溶壁酶 ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 和 Driselase 崩溃酶 ($20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, sigma) 均购自北京索莱宝生物技术有限公司。供试香蕉品种为巴西蕉 (*Musasp.* AAA. cv. Baxi) 购于中国热带农业科学院组织培养中心高约 20 cm 的健康植株。培养基为 PDB 培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,蒸馏水 1 000 mL) 和 PDA 培养基(马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 20 g,蒸馏水 1 000 mL)。

1.2 真菌基因组的提取 将野生型菌株接种到装有 50 mL PDB 培养基的锥形瓶中, $150 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 28°C 摇床振荡培养 4 d 2 层擦镜纸过滤收集菌丝,按照 E. Z. N. A. ® Fungal DNA mini kit 说明书提取基因组 DNA。

1.3 *mon1* 基因敲除线性片段的构建 在 NC-BI 上找到尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号小种的全基因组序列,根据蛋白登录号 (GenBank 登录号: EMT65280. 1) 定位到 *mon1* 基因,利用重叠 PCR 的方法构建基因敲除线性片段,利用同源置换的方法对基因的前面 741 bp 的碱基进行部分敲除。基因敲除片段的上下游同源臂记为同源臂 A 和同源臂 B,分别根据 1 000 bp 左右设计引物 (见表 1)。引物对 *mon1*-AF/*mon1*-AR、*mon1*-BF/*mon1*-BR 以野生型菌株 F4-161-2 基因组 DNA 为模板,引物对 *hyg*-F/*hyg*-R 以质粒 pCT74 为模板对潮霉素片段进行 PCR 扩增。

表 1 实验所用的引物序列

Tab.1 Sequence of the primers

引物名称 Name	引物序列 (5'-3') Primer sequence
<i>mon1</i> -AF	TTATCGTCCACCTCTACCGC
<i>mon1</i> -AR	agtagatgccgaccgggaaAAGTTTCCCACCAGCCACA
<i>mon1</i> -BF	agggctaagggtgccgtcctCGAGCAGAAACAAAGTGCCT
<i>mon1</i> -BR	TGTCATTCAACTGGTCACCGT
<i>hyg</i> -F	TTCCCGGTCGGCATCTACT
<i>hyg</i> -R	AGGACGGACACCTTAGCCCT
T ₁	GCCAAGAAATGCGACGAGTG
T ₄	TCACAACTCAAATGCCCTCGGC
<i>mon1</i> -F	AAGGGTGGTGGTGGAGAGAA
<i>mon1</i> -R	TGTTTGCCGTGAATGGATGC

PCR 扩增采用 $2 \times \text{Taq PCR master Mix}$ (TIANGEN) 反应条件为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 55°C 退火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min, 16°C 保存。经 $w = 1.0\%$ 的琼脂糖凝胶电泳后回收 PCR 产物。

将第 1 轮 PCR 产物的 3 条带分别回收,测浓度后按比例进行第 2 轮 PCR (3 条片段摩尔数比 1: 1: 1, 50 μL 体系) 结束后继续以第 2 轮 PCR 的融合片段为模版,以 *mon1*-AF/*mon1*-BR 为引物进行第 3 轮 PCR 扩增,即得到所要的目的基因敲除片段 A + hph + B。PCR 扩增采用 $2 \times \text{Taq PCR master Mix}$ (TIANGEN), 反应条件为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 3.6 min, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min, 16°C 保存。最后回收纯化,使质量浓度达到 $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 以上。

1.4 尖孢镰刀菌原生质体的制备及其遗传转化 参照黄东杰等^[8]和李春强等^[10]的方法进行。

1.5 *mon1* 基因敲除突变体的鉴定 以 *mon1* 转化子和野生型菌株基因组 DNA 为模板,根据基因组序列设计特异引物。引物对 *hyg*-F/*hyg*-R 检测潮霉素 hph 片段是否整合到基因组中; 引物对 T₁/*hyg*-R 检测转化子是否在 *mon1* 基因的 5'端发生同源重组,引物 *hyg*-F/T₄ 检测转化子是否在 *mon1* 基因的 3'端发生同源重组 (引物 T₁ 和 T₄ 均设计在 A、B 同源臂外侧的相邻基因序列上); 引物对 *mon1*-F/*mon1*-R 检测转化子是否敲掉了 *mon1* 基因。这 4 对引物预计分别扩增 1 664 2 679 2 714 458 bp DNA 片段。PCR 反应条件为: 95°C 预变性 5 min; 95°C 变性 30 s, 58°C 退火 30 s, 72°C 延伸 3 min, 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min; 16°C 保存。

1.6 敲除突变体生长特性分析 取 *mon1* 基因敲除突变体和野生型菌株的 5 mm 新鲜菌饼,接种到 PDA 平板上,3 个重复, 28°C 培养,分别在接种后的 2 4 6 d 进行菌落直径测量,并拍照。

1.6.1 菌丝和孢子形态观察 从 *mon1* 基因敲除突变体和野生型菌株的菌落边缘分别挑取少量菌丝到滴加少量无菌水的载玻片上,制片进行显微观察。

1.6.2 产孢量测定 分别各取 *mon1* 基因敲除突变体和野生型菌株的 5 mm 新鲜菌饼,加入 3 mL 无菌水

中振荡悬浮混匀,然后用血球计数板计数,计算每毫升的孢子数,3个重复。

1.6.3 胁迫因子敏感性实验 氧化胁迫实验利用添加不同浓度 H_2O_2 的 PDA 平板,体积百分比分别为 0.1%、0.25%、0.5%,每个梯度做 3 个重复;渗透胁迫利用添加不同浓度 NaCl 的 PDA 平板,浓度分别为 $1 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 、 $2 \text{ mol} \cdot L^{-1}$;细胞壁选择压力实验利用添加不同浓度($1 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 、 $2 \text{ mol} \cdot L^{-1}$)山梨醇的 PDA 平板;纤维素利用实验利用纤维素刚果红培养基;对菌株影响的测定方法与上述营养生长测定方法相同。

1.6.4 玻璃纸穿透实验 用玻璃纸替代植物细胞壁对镰刀菌进行穿透能力测试。取 *mon1* 基因敲除突变体和野生型菌株的 5 mm 新鲜菌饼,倒置放置于 PDA 平板中央,将半径为 4 cm 的半圆形玻璃纸灭菌后贴在培养基上,并使其覆盖住 3/4 的菌块,3 个重复,28 °C 倒置培养 5 d,拍照记录。

1.7 致病性测定分析 将 *mon1* 基因敲除突变体和野生型菌株分别接种于装有 100 mL 的 PDB 培养基的锥形瓶中,150 $r \cdot \text{min}^{-1}$ 28 °C 摇床振荡培养 5 d,过滤收集孢子,滤液用 50 mL 离心管多次离心,倒掉上清液并用无菌水重悬孢子,利用血球计数板将孢子悬浮液稀释至每毫升 10^6 个孢子。然后采用盆栽伤根淋灌法测定菌株的致病性。具体方法为野生型菌株与敲除突变体均处理 5 株巴西蕉苗,在每株苗的根部从根尖开始每隔 1 cm 左右处用大头针扎 1 个小孔进行伤根处理,之后移栽回盆内,每株苗浇 20 mL 孢子悬浮液,以无菌水作为对照。25 d 后切开球茎,观察球茎褐变程度及外部叶片黄化情况,拍照记录,并参考许文耀等^[11]的病情调查分析标准,对数据采用 Excel 软件进行统计分析。蕉苗的发病情况按以下标准^[11]进行分级:0 级:没有任何发病症状;1 级:叶片出现轻微的失水状;2 级:部分叶片出现萎垂;3 级:叶片萎垂,且叶片呈暗黄色;4 级:部分叶片枯死;5 级:全株枯死。

香蕉苗病情指数 = $[\sum(\text{发病级数} \times \text{该级叶片数})] / (\text{最高级数} \times \text{总叶片数}) \times 100$ 。

2 结果与分析

2.1 构建成功 *mon1* 基因敲除线性片段 采用同源重组的方法对 *mon1* 基因进行敲除(图 1)。以质粒 pCT74 为模板,以 Hyg-F/Hyg-R 为潮霉素引物进行 PCR 扩增,得到大小为 1 664 bp 的潮霉素基因片段。以野生型菌株基因组 DNA 为模板,以 *mon1*-AF/*mon1*-AR、*mon1*-BF/*mon1*-BR 为引物进行 PCR 扩增,分别得到大小为 1 015 bp 的 A 臂和 1 050 bp 的 B 臂;以第 2 轮 PCR 的融合片段为模版,以 *mon1*-AF/*mon1*-BR 为引物进行第 3 轮 PCR 扩增得到了 3 700 bp 左右的 DNA 条带,与预计条带大小一致,经送出测序,结果与目的条带序列一致, A-hph-B 敲除线性片段构建成功。

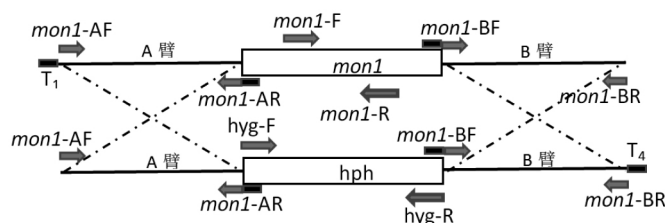


图1 利用3对引物PCR合成 *mon1* 基因敲除片段示意图

Fig. 1 Schematic diagram of PCR synthesis of *mon1* gene knockout fragments using three pairs of primers

2.2 *mon1* 基因敲除突变体的 PCR 鉴定 将 *mon1* 基因敲除线性片段转化野生型菌株 F4-161-2 原生质体,后经再生培养,获得若干转化子,在含有潮霉素抗性的 PDA 平板上 2 次再生培养后,任取其中 4 个转化子进行 PCR 鉴定。提取转化子及其野生型菌株基因组。以提取的基因组、pCT74 质粒和 ddH₂O 作为模板,以引物对 hyg-F/hyg-R 对潮霉素抗性基因进行 PCR 扩增,结果显示 4 个转化子和 pCT74 质粒均能扩增出 1 条约 1 664 bp 的目的条带,而野生型菌株基因组 DNA 和 ddH₂O 对照没有条带(图 2 - A)。以引物对 *mon1*-F/*mon1*-R 对 *mon1* 基因进行 PCR 扩增,结果显示 4 个转化子基因组和 ddH₂O 均没有扩出条带,野生型菌株 F4-161-2 基因组扩增出 1 条约 458 bp 的条带(图 2 - B)。以引物对 T1/hyg-R 和引物对 hyg-F/T4 分别进行 PCR 扩增,结果显示 4 个转化子均扩增出了 2 700 bp 左右的条带,而 ddH₂O 和野生型菌株 F4-161-2 基因组没有出现条带(图 2 - C)。结果表明,挑选的 4 个转化子都是 *mon1* 基因敲除突变体。

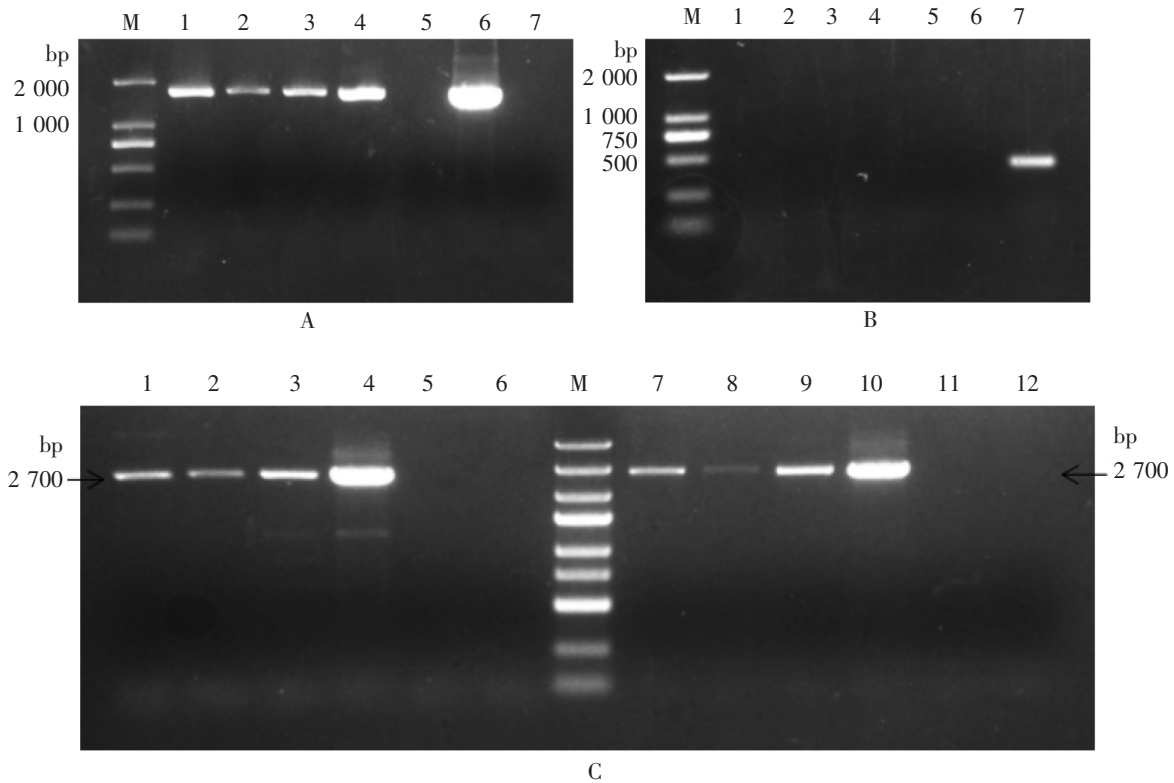


图2 *mon1* 基因敲除突变体 PCR 鉴定

A: 转化子 *hph* 基因的 PCR 扩增(1~4: 1~4 号转化子; 5: 清水对照; 6: pCT74 载体; 7: 野生型; M: DNA Marker DL 2 000); B: 转化子目的基因 PCR 扩增(1~4: 1~4 号转化子; 5: 清水对照; 6: pCT74 载体; 7: 野生型; M: DNA Marker DL 2000); C: 转化子插入片段 PCR 扩增(1~6: 用 T1/hyg-R 引物进行 PCR 扩增; 1~4: 1~4 号转化子; 5: 野生型; 6: 清水对照; M: DNA Marker DL 5000; 7~12: 用 hyg-F/T4 引物进行 PCR 扩增; 7~10: 1~4 号转化子; 11: 野生型; 12: 清水对照)

Fig. 2 Identification of *mon1* knockout mutants by PCR

A: PCR amplification of *hph* gene from transformants (1-4): 1-4 transformants; 5: Water control; 6: pCT74 vector; 7: Wild type; M: DNA Marker DL 2 000); B: PCR amplification of the target gene from transformants(1-4): 1-4 transformants; 5: Water control; 6: pCT74 vector; 7: Wild type; M: DNA Marker DL 2000; C: PCR amplification of inserted fragment from transformants (1-6: PCR amplification with T1/hyg-R primers; 1-4: 1-4 transformants; 5: wild type; 6: Water control; M: DNA Marker DL 5000; 7-12: PCR amplification with hyg-F/T4 primer; 7-10: 1-4 transformants; 11: Wild type; 12: Water control).

2.3 *mon1* 基因敲除突变体表型分析

2.3.1 生长特性分析 将 $\Delta mon1$ 和野生型菌株分别接种于 PDA 平板上并培养 6 d, 通过观察发现 2 种菌落均以平铺为主, $\Delta mon1$ 比野生型长势较慢, 且菌丝较稀疏(图 3-A)。每隔 1 d 测量 1 次菌落直径, 结果分析表明 $\Delta mon1$ 菌落生长相对较慢(图 3-B)。



图3 *mon1* 敲除突变体菌株的菌落形态和生长速度

A: Foc4 野生型菌株和 $\Delta mon1$ 菌株在 PDA 培养基上的菌落形态; B: Foc4 野生型菌株和 $\Delta mon1$ 菌株菌落生长直径对比(1-6 d)

Fig. 3 Colony morphology and growth rate of *mon1* knockout mutant strain

A: colony morphology of Foc4 wild type strain and $\Delta mon1$ strain on PDA medium; B: colony growth diameter comparison of Foc4 wild type strain and $\Delta mon1$ strain (1-6 d)

2.3.2 菌丝形态观察 通过光学显微镜观察野生型菌株和 $\Delta mon1$ 的菌丝,发现正常野生型菌株的菌丝分支较多,菌丝较粗; $\Delta mon1$ 的菌丝几乎为线型,极少出现分支,并且菌丝较细(图4)。

2.3.3 产孢率测定 通过血球计数板观察,计算平板菌落生长边缘菌块的孢子产量,结果表明,野生型菌株的孢子产量约为 1.743×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, $\Delta mon1$ 的孢子产量约为 0.627×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ (图5)。

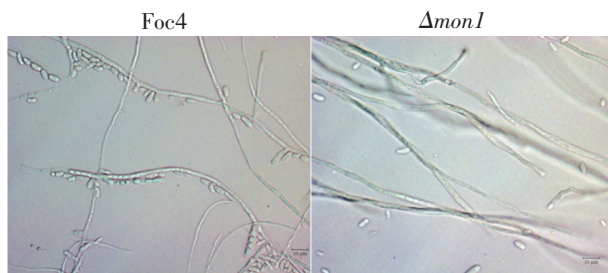


图4 Foc4 野生型菌株和 $\Delta mon1$ 的菌丝形态

Fig.4 hyphal morphology of Foc4 wild type strain and $\Delta mon1$

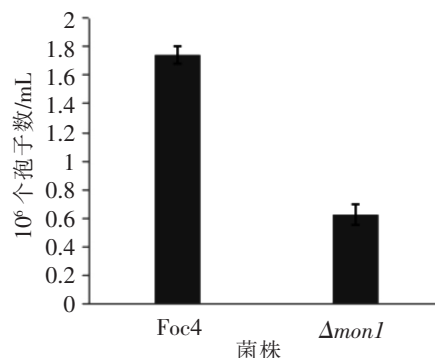


图5 Foc4 和 $\Delta mon1$ 产孢量比较

Fig.5 Comparison of sporulation of Foc4 and $\Delta mon1$

2.3.4 胁迫因子敏感性实验

1) 渗透压胁迫和细胞壁压力胁迫实验: 观察发现 28 °C 条件下生长 4 d 后,在加有 NaCl 和山梨醇的 PDA 平板上,野生型长势均要比敲除子要旺盛,并且两者均在 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下比 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度下生长得要慢,但是敲除子受到抑制要比野生型更明显(图6-A/B)。

2) 氧化胁迫实验: 观察发现,随着 H_2O_2 浓度的增大,敲除子和野生型受到的抑制也呈现不同程度的增强,敲除子较野生型更明显,在 0.5% 的 H_2O_2 浓度下已经停止生长(图6-C)。

3) 纤维素利用实验: 观察发现 28 °C 条件下培养 4 d,野生型可以在纤维素刚果红培养基上生长旺盛,菌丝茂密,而敲除子虽然在纤维素刚果红培养基上也能生长,但是菌丝稀薄,纤维素利用能力明显降低(图6-D)。

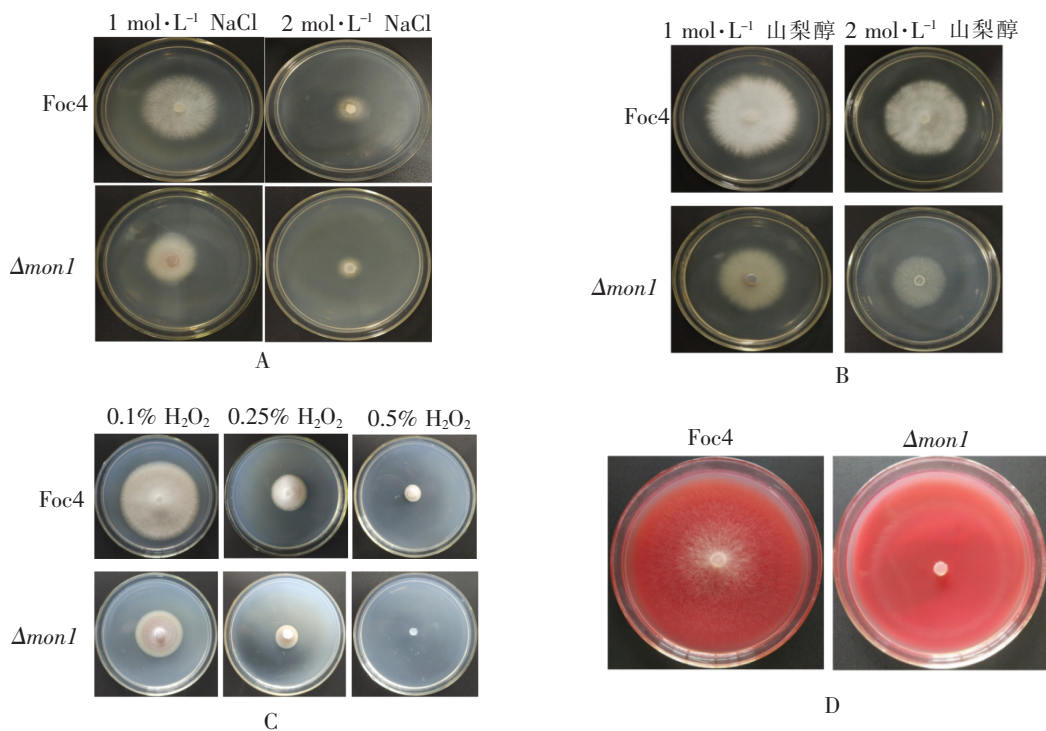


图6 胁迫因子敏感性实验

Fig.6 Stress factor sensitivity experiment

2.3.5 玻璃纸穿透性实验 $\Delta mon1$ 基因敲除突变体和野生型菌株 F4-161-2 培养 5 d 后发现,野生型菌株可以透过玻璃纸进行生长,而 $\Delta mon1$ 敲除子菌株几乎不能透过玻璃纸生长(图 7)。说明 *mon1* 基因能够影响镰刀菌的穿透能力。

2.3.6 致病性测定结果 利用巴西蕉盆栽苗对 $\Delta mon1$ 进行致病性测定。接种培养 25 d 后观察发现,接种野生型菌株的巴西蕉苗表现出了严重的发病现象,植株的叶片大面积黄化,植株下部叶片大部分变黄、枯死,且切开球茎观察到球茎部位褐化严重,病害严重度达到了 3~4 级;而接种 $\Delta mon1$ 菌株的

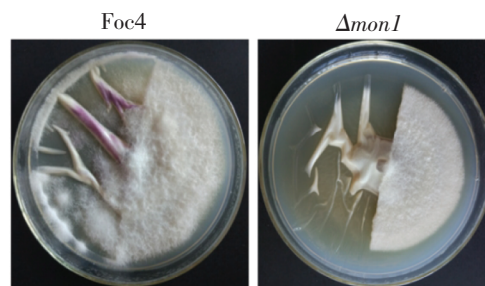


图 7 玻璃纸的穿透能力测定

Fig.7 Penetrability test of cellophane membranes

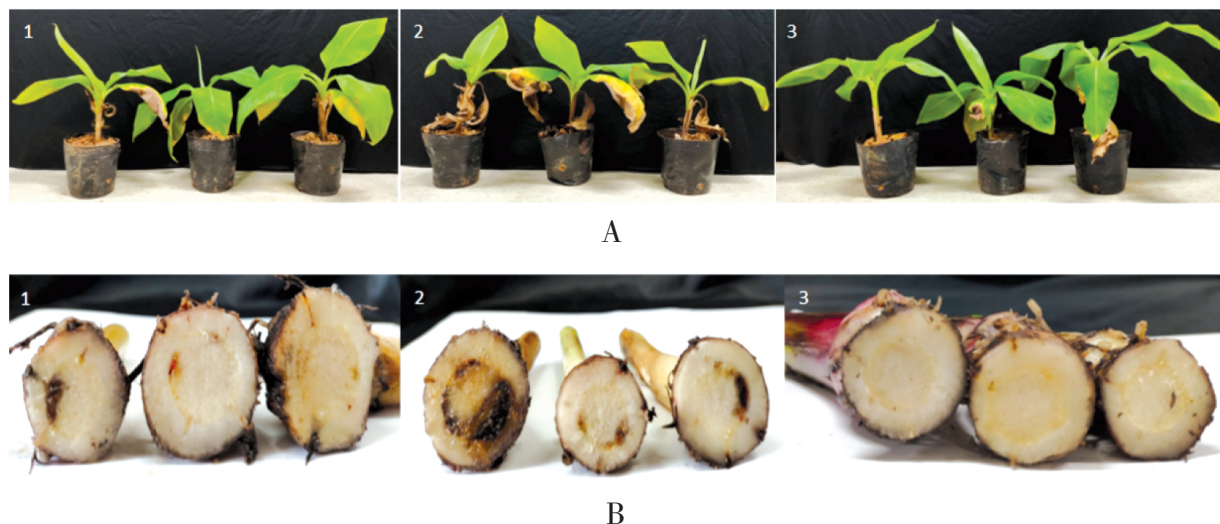


图 8 *mon1* 基因敲除突变体菌株的致病性测定

A: 野生型和 $\Delta mon1$ 菌株侵染巴西蕉的观察对比(1: $\Delta mon1$ 菌株侵染的巴西蕉;2: 野生型菌株侵染的巴西蕉;3: 清水对照); B: 野生型和 $\Delta mon1$ 菌株侵染的巴西蕉的球茎观察对比(1: $\Delta mon1$ 菌株侵染的巴西蕉球茎;2: 野生型菌株侵染的巴西蕉球茎;3: 清水对照)

Fig. 8 Pathogenicity test of *mon1* mutant strain

A: Phenotype of banana inoculated by the wild type and $\Delta mon1$ strains (1: Phenotype of banana inoculated with $\Delta mon1$ strain; 2: Phenotype of banana inoculated with wild type strain; 3: Water control); B: The corm phenotype of banana inoculated with the wild type and $\Delta mon1$ strain (1: The corm phenotype of banana inoculated with $\Delta mon1$ strain; 2: The corm phenotype of banana inoculated with the wild-type strains; 3: Water control)

巴西蕉苗则表现出轻微的黄化现象,仅叶片边缘出现黄化现象,切开球茎观察,发现球茎有黄线,发病症状在 2~3 级;接种 H_2O 的对照巴西蕉苗未出现叶片黄化,且球茎无褐化现象,球茎发病症状为 0 级(图 8-A/B)。根据病情指数统计结果显示,接种 $\Delta mon1$ 菌株的巴西蕉植株平均病情指数(27.8)显著低于 Foc4 野生型菌株的平均病情指数(42.7)(图 9)。结果表明 *mon1* 基因缺失突变体对巴西蕉的致病性减弱。

3 讨论

由于 Foc 的遗传背景比较复杂,国内外对其致病机理的研究主要集中在信号转导相关基因、转录因子相关基因、克服植物防御系统相关基因、毒素相关基因、果胶酶基因以及镰刀菌自身定殖能力相关基因等方面^[12-16]。Foc 的致病性也可能与其他方面相关,比如,囊泡运输是保证细胞物质信息交流的重要基础, *mon1* 作为囊泡运输相关基因,对细胞的功能发挥着非常重要的作用^[8],还有生长因子和激素分泌、神经递质的释放、信号转导、细胞生长、分化和稳态维持等重要生命活动也都依赖高效精确的囊泡运输^[17]。本研究利用重叠 PCR 的方法构建基因敲除线

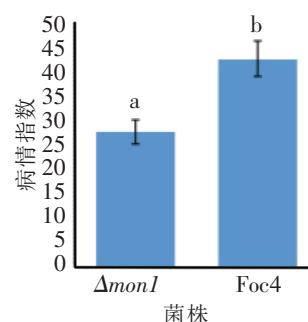


图 9 巴西蕉苗病情指数

Fig.9 banana seed disease index

性片段对 *mon1* 基因进行敲除,发现 *mon1* 基因敲除突变体致病性严重减弱,然后从其生理特性、抗胁迫能力、穿透能力以及致病性等方面探究其致病性变化的可能性机制。结果发现,相比野生型菌株,突变体菌株的生长较弱,产孢量下降,抗氧化胁迫和抗高渗透压胁迫能力减弱,纤维素利用能力减弱。本研究结果与已经报道过的 *mon1* 基因在酵母细胞中影响蛋白质的运输,影响细胞的生长基本一致^[8]。由此推测,*mon1* 基因通过影响香蕉枯萎镰刀菌的生长发育进而影响了致病性,或其他机制。这些推测有待下一步的实验证实。综上所述,本研究利用同源置换的方法对 *mon1* 基因进行敲除,并通过对 *mon1* 基因敲除菌株的表型和致病性的变化进行分析,发现 *mon1* 基因在香蕉枯萎镰刀菌的生长发育及致病力方面发挥着重要作用。其结果为揭示尖孢镰刀菌致病机理奠定了良好基础。

参考文献:

- [1] 张志红,李华兴,韦翔华,等. 生物肥料对香蕉枯萎病及土壤微生物的影响[J]. 生态环境,2008(6):2421-2425.
- [2] 覃柳燕,李朝生,韦绍龙,等. 广西香蕉枯萎病4号生理小种发生特点调查[J]. 中国南方果树,2016,45(3):93-97.
- [3] 唐东林. 香蕉枯萎病发生及其防治技术[J]. 农业科技通讯,2006(9):49-53.
- [4] PERSLEY G J, DE LANGHE E A. Banana and plantain breeding strategies: Proceedings of an International Workshop Held at Cairns State [C]. Mutual Book & Periodical Service, 1987.
- [5] HOFFMAN-SO MMER MARTA, MIGDALSKI ANDRZEJ, RYTKA JOANNA, et al. Multiple functions of the vacuolar sorting protein Ccz1p in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 329(1): 197-204.
- [6] WANG C W, STROMHAUG P E, KAUFFMAN E J, et al. Yeast homotypic vacuole fusion requires the Ccz1-Mon1 complex during the tethering/docking stage [J]. The Journal of Cell Biology, 2003, 163(5): 973-985.
- [7] MARTA HOFFMAN-SO MMER, KUCHARCZYK R, PIEKARSKA I, et al. Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* vacuolar fusion proteins Ccz1, Mon1 and Ypt7 cause defects in cell cycle progression in a *num1* Delta background [J]. European Journal of Cell Biology, 2009, 88(11): 639-652.
- [8] 张程,牛洋,刘佳佳. 囊泡运输的功能与调控机制[J]. 中国细胞生物学学报,2014(9):1218-1226.
- [9] 黄东杰,彭明,李春强. 几株尖孢镰刀菌的绿色荧光蛋白基因转化[J]. 热带农业科学,2014(1):59-62.
- [10] 李春强,梁慧施,彭明,等. GFP标记的尖孢镰刀菌西瓜专化型侵染西瓜过程观察[J]. 热带作物学报,2011,32(10):1935-1939.
- [11] 许文耀,亢旭辉,林成辉. 香蕉枯萎病菌粗毒素的毒性及其模型[J]. 热带作物学报,2014,25(4):25-29.
- [12] VISSER M, GORDON T R, WINGFIELD B D, et al. Transformation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causal agent of Fusarium wilt of banana, with the green fluorescent protein (GFP) gene [J]. Australasian Plant Pathology, 2004, 33(1): 69-75.
- [13] DONG Z, WANG Z. Isolation and characterization of an exopolysaccharuronase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and race 4 [J]. BMC Biochemistry, 2011, 12(1): 51-51.
- [14] LI M H, XIE X L, LIN X F, et al. Functional characterization of the gene FoOCH1 encoding a putative α -1,6-mannosyltransferase in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2014, 65: 1-13.
- [15] CAROLINE B. MICHIELS E, MARTIJN REP. Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum* [J]. Molecular Plant Pathology, 2009, 10(3): 311-324.
- [16] DI PIETRO A, MADRID M P, CARACUEL Z, et al. *Fusarium oxysporum*: Exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus [J]. Mol Plant Pathol, 2003, 4: 315-325.
- [17] Lin Fangming. Kidney-specific inactivation of the KIF3A subunit of kinesin-II inhibits renal ciliogenesis and produces polycystic kidney disease [J]. Proceedings of the National Academy of sciences of the United States of America, 2003, 100(9): 5286-5291.

Functional Analysis of the *mon1* Gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Race 4

LI Heng^{1,2}, CHANG Wenjun², CHEN Hanqing², QIAO Fan^{1,2}, ZENG Huicai²

(1. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Tropical Crop Biology and Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Sciences, Hainan Key Laboratory of Tropical Microbial Resources, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: Based on the clues obtained from our previous proteomics studies, the *mon1* gene from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4 (Foc4) was found to play a role in pathogenic infection. To further characterize the functions of the *mon1* in the infection of Foc4, the *mon1* gene was knocked out through homologous recombination method and the phenotype and pathogenicity of the mutant strains analyzed. The results showed that the mutant strains of Foc4 grew slowly, produced less spores and thinner mycelia with fewer branches, and was lower in their resistance to exogenous oxygen stress, their capacity of cell wall penetration and their cellulose utilization, as compared with the wild strains. Pathogenicity test showed the mutant strains exhibited a significantly low infection against the banana seedlings. All the results suggested that the *mon1* gene played a certain role in the growth, development, sporulation and pathogenicity of the Foc4.

Keywords: *mon1*; *Fusarium oxysporum*; gene knockout; pathogenicity

(责任编辑: 叶 静)

(上接第 110 页)

Subcellular Localization and Expression of *OsNHX5* in Rice

WANG Danyang, FAN Yafei, ZHOU Yang, LUO Minghua, JIANG Xingyu, LUO Yuehua, XIA Youquan

(Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Hainan Key Laboratory for Biotechnology of Salt Tolerant Crops, Haikou, Hainan 570228, China)

Abstract: Salt stress suppresses growth and development of rice. Cloning salt tolerant related genes in rice for analysis of their functions might lay a foundation for research in rice salt tolerance mechanism and for salinity resistance breeding. A Na^+/H^+ antiporter gene *OsNHX5* was cloned from *Oryza sativa* by polymerase chain reaction (PCR) method, and its localization expressing vector was constructed and observed through tobacco injection mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The expression patterns of *OsNHX5* under salinity were analyzed by using real-time PCR. Phylogenetic analysis revealed that *OsNHX5* was homologous to *Arabidopsis AtNHX5* and *AtNHX6*. The results showed that *OsNHX5* protein was localized in the intracellular membranes. The *OsNHX5* gene was induced by KCl stress and its expression was upregulated in leaves but was not significantly different in roots under NaCl or KCl stress. Our results illustrated that *OsNHX5* was an endosomal K^+/H^+ antiporter, and this finding would give a theoretical basis for molecular breeding of salt tolerant rice in the future.

Keywords: *Oryza sativa*; K^+/H^+ antiporter; *OsNHX5* gene; expression analysis; subcellular localization

(责任编辑: 钟云芳)