

· 植物保护 ·

DOI: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250009



主持人: 缪卫国, 吴少英

Open Access



胶孢炭疽菌 Pth11-like 型 CFEM 蛋白 CgCFEM17 的功能分析

何二秀^{1,2#}, 罗红丽^{1,2*}

(1. 海南大学 热带农林学院, 海南 儋州 571737 中国; 2. 海南大学 三亚南繁研究院, 海南 三亚 572025 中国)

摘要: 胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是引起橡胶树炭疽病的主要病原。CFEM(common in fungal extracellular membrane)结构域是真菌特有的基序, 含有 CFEM 和跨膜结构域的蛋白属于 Pth11-like 型 CFEM 蛋白, 在调控病原真菌生长发育和致病力中发挥重要作用。为了研究橡胶树胶孢炭疽菌的致病机制, 从胶孢炭疽菌转录组中筛选出 1 个编码 Pth11-like 型 CFEM 蛋白的基因, 将其命名为 *CgCFEM17*。该基因的编码区全长 1 341 bp, 编码 446 个氨基酸。生物信息学分析显示, *CgCFEM17* 蛋白 N 端具有长度为 26 个氨基酸的信号肽和 1 个保守的 CFEM 结构域, C 端包含 6 个跨膜结构域。为了分析 *CgCFEM17* 基因的功能, 构建了该基因的敲除突变体($\Delta CgCFEM17$)及回补突变体($\Delta CgCFEM17-C$), 并对其生长发育和致病性表型进行了分析。结果表明, 与野生型和回补突变体相比, $\Delta CgCFEM17$ 的分生孢子萌发和入侵结构的形成延迟, 致病力减弱, 但菌落生长速率、产孢能力及附着胞的形成率与形态发生没有变化。*CgCFEM17* 可能通过调控分生孢子萌发进程, 延缓侵染结构形成, 影响胶孢炭疽菌对橡胶树的致病力, 这为探究胶孢炭疽菌的致病机制及建立新的橡胶树炭疽病防治策略奠定了一定的理论基础。

关键词: 橡胶树; 胶孢炭疽菌; *CgCFEM17*; 功能分析

中图分类号: S432.4 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-7054(2025)05-0682-10

何二秀, 罗红丽. 胶孢炭疽菌 Pth11-like 型 CFEM 蛋白 *CgCFEM17* 的功能分析 [J]. 热带生物学报, 2025, 16(5): 682-691. doi: 10.15886/j.cnki.rdswwb.20250009

天然橡胶是重要的工业原料和战略物资, 主要来源于巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*), 其产量受到橡胶树病害的影响。胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是引起橡胶树胶孢炭疽病的主要病原菌^[1-2], 对小苗、幼树及成年开割胶树均能造成危害, 导致橡胶树嫩芽回枯、叶片脱落和割胶时间延迟, 给橡胶产业造成巨大的经济损失^[3-5]。胶孢炭疽菌是典型的半活体营养寄生真菌, 其对寄主植物的侵染包括入侵、定植的活体寄生营养阶段和破坏、分解植物组织的坏死寄生营养阶段^[6]。在活体寄生阶段的入侵过程中, 分生孢子的萌发、附着胞和入侵菌丝的形成起关键作用^[7]。

CFEM(common in fungal extracellular membrane)结构域是真菌所特有的基序, 约由 60 个氨基酸残基组成, 其中含有呈规律性间隔分布的 8 个保守的半胱氨酸残基(Cx3Cx10-12Cx6-7Cx11-14Cx4Cx15-16C)^[8-10]。根据是否存在跨膜结构域, 真菌 CFEM 蛋白被分为两种类型: Pth11-like 型和 Non-Pth11-like 型^[6, 11]。Non-Pth11-like 型 CFEM 蛋白除了 CFEM 结构域外缺乏跨膜结构域, 只含有信号肽序列或含有信号肽和 GPI 锚定位点, 被认为是病原真菌的重要致病因子——效应蛋白^[12-13]。Pth11-like 型 CFEM 蛋白除了保守的 CFEM 结构域外还含多个跨膜结构域, 可能作为信号受体在寄主-病原菌相互作用中发挥重

收稿日期: 2025-01-07

修回日期: 2025-03-01

基金项目: 国家自然科学基金地区项目(32060591)

*第一作者: 何二秀(1997—), 女, 海南大学热带农林学院 2022 级硕士研究生。E-mail: 2208821942@qq.com

*通信作者: 罗红丽(1973—), 女, 博士, 研究员。研究方向: 植物与病原真菌的互作机制。E-mail: hlluo@hainanu.edu.cn

要作用^[12-14]。

在植物病原真菌中, Pth11-like 型 CFEM 蛋白以稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*) Pth11 蛋白为典型代表, 该蛋白含有 7 个跨膜结构域, 可作为 G 蛋白偶联受体发挥作用, 调控稻瘟菌附着胞形成及致病性^[11, 14]。稻瘟菌中另外 1 个结构相似的 CFEM 蛋白 WISH 也是 1 个典型的 Pth11-like 型 CFEM 蛋白, 同样含有 7 个跨膜结构域, 不仅与病菌的附着胞形成和致病性有关, 还参与调控稻瘟菌对疏水表面的识别和细胞壁的完整性^[9]。在灰霉菌(*Botrytis cinerea*)中, 鉴定了 3 个 Pth11-like 型 CFEM 蛋白, 分别是 Bcin05g02420、Bcin15g02580 和 BCIN 07g03260, 其中 Bcin05g02420 和 Bcin15g02580 分别含有 6 个和 8 个跨膜结构域, BCIN 07g03260 含有 1 个跨膜结构域, 而 BCIN 07g03260 的缺失导致灰霉病菌的分生孢子萌发率和芽管伸长率降低约 20%~30%, 对番茄的致病力显著降低, 但是不影响灰霉病菌的生长和分生孢子产量^[15]。此外, 在禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、杨树黑斑病菌(*Marssonina brunnea*)、四川新小滴孢腔菌(*Neostagonospora sichuanensis*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、深绿木霉(*Trichoderma atroviride*)、里氏木霉(*T. reesei*)和绿色木霉(*T. viride*)中鉴定到了多个 Pth11-like 型 CFEM 蛋白, 但对其功能缺乏研究^[13, 16-20]。

在炭疽菌中, Non-Pth11-like 型 CFEM 蛋白的功能研究较多^[6, 21-25], 但关于 Pth11-like 型 CFEM 蛋白的功能研究较少。已有的研究表明, 杨树胶孢炭疽菌中 Pth11 的同源蛋白 CgPth11 参与疏水表面附着胞形成的调控, 但并不是致病性所必需^[26]。在希金斯炭疽菌(*Colletotrichum higginsamum*)中也鉴定到了 6 个 Pth11-like 型 CFEM 蛋白, 但其功能未知^[27]。在前期研究中, 本研究团队对橡胶树胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)进行了转录组序列测定, 并从中搜索到了 1 个编码 Pth11-like 型 CFEM 蛋白的基因, 将其命名为 CgCFEM17。本研究团队对该基因进行了克隆和分析, 通过构建该基因的敲除突变体 Δ CgCFEM17 和回补突变体 Δ CgCFEM17-C, 分析 Δ CgCFEM17 和 Δ CgCFEM17-C 在生长发育和致病性方面的表型变化, 解析了 CgCFEM17 在胶孢炭疽菌致病过程

中的功能, 为橡胶树炭疽病防控和新型农药设计开发提供新靶点提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)野生型菌株(WT)由本实验分离、鉴定并保存。巴西橡胶树品种为‘Reyan 7-33-97’。大肠杆菌(*Escherichia coli*)TOP10 菌株(CC96105)购于上海吐露港生物科技有限公司。

1.2 主要培养基及配方 马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA): 称 12.5 g PDA 粉末, 200 mL ddH₂O 溶解。完全培养基(complete medium, CM): 蛋白胨 1 g, 酵母提取物 0.5 g, 微量元素 0.5 mL, 酪蛋白水解物 0.5 g, 葡萄糖 5 g, 维生素 0.5 mL, 硝酸盐 25 mL, 400 mL 蒸馏水溶解, 调 pH 至 6.5, 定容到 500 mL。0.5%(v/v)ME: 称 0.5 g MALT EXTRACT 粉末, ddH₂O 溶解, 定容到 100 mL。2%(v/v) YCS 液体培养基: 称酵母提取物 0.1 g, 酸水解酪蛋白 0.1 g, 蔗糖 2 g, ddH₂O 溶解并定容到 100 mL。

1.3 实验方法

1.3.1 生物信息学分析 使用 DNAMAN 软件对 CgCFEM17 进行翻译; SignalP6.0(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-6.0/>)进行信号肽预测; SMART(<https://smart.embl.de/smart/>)进行 CFEM 结构域预测; TMHMM2.0(TMHMM 2.0-DTU Health Tech-Bioinformatic Services)进行跨膜结构域预测; MEGA6.0 软件进行系统发育树的构建。

1.3.2 菌株及分生孢子的培养 将不同的菌株分别接种在马铃薯葡萄糖培养基(PDA)上, 28 °C 恒温培养箱培养 4~6 d, 将培养好的菌株用手术刀切适量菌块于 20 mL 的 CM 液体培养基中, 28 °C 摇床培养 2 d, 用滤膜过滤, 5 000 r·min⁻¹ 离心 1 min, 得到分生孢子。

1.3.3 CgCFEM17 基因敲除突变体与回补株的构建 根据同源重组的敲除原理, 使用表 1 中的引物对 CFEM17-5F/CFEM17-M5R、CFEM17-M3F/CFEM17-3R、CFEM17-M5F/CFEM17-M3R 分别扩增 CgCFEM17 基因的上游同源臂、下游同源臂和抗性基因片段。使用引物对 CFEM17-5F/SUR-SLR、SUR-SLF/CFEM17-3R 将上下游同源臂与抗

性基因片段分别融合得到融合片段,利用 PEG 介导的转化法将融合片段转入胶孢炭疽菌野生型原生质体中^[28],用氯嘧磺隆进行筛选。使用引物对 CFEM17-JC5F/SUR-JC5R 和 SUR-JC3F/CFEM17-

JC3 分别鉴定基因上下游,获得阳性转化子并对其进行单孢分离。使用引物对 CFEM17-F(*Xba*I)/CFEM17-R(*Sma*I)检测 *CgCFEM17* 是否被敲除,从而获得 *CgCFEM17* 基因的敲除突变体。

表 1 引物信息

Tab. 1 Primer information

引物名称Primer	引物序列 Primer sequence(5'-3')
<i>CFEM17-5F</i>	CGACGTGTAGAGCTATGACC
<i>CFEM17-M5F</i>	CTTGTGCGTTTCAAGAAGTGCCAACGCCACAGTG
<i>CFEM17-M5R</i>	CACTGTGGCGTTGGCACTTCTTGAAACGCACAAG
<i>CFEM17-M3F</i>	GAATTGCATGCTCTCACGCGTTTGAGTTTTGTTT
<i>CFEM17-M3R</i>	AAACAAAACCTCAAACGCGTGAGAGCATGCAATTC
<i>CFEM17-3R</i>	TTTGTCAATTCTGAAGTCCC
<i>SUR-SLR</i>	ATGTTGGCATAAGCCGAACCGT
<i>SUR-SLF</i>	CCTCTGATATTGGAAGCGACGC
<i>CFEM17-JC5F</i>	GCCGCTCGCATTTTCATTCC
<i>SUR-JC5R</i>	GCGTTTGTAACCTCTGCCTGTTTG
<i>SUR-JC3F</i>	ACGAGGACCGCTACTCACATAC
<i>CFEM17-JC3R</i>	ACACCCCAAAAGGTCCCAC
<i>CFEM17-F(XbaI)</i>	TCTAGAATGTTTACCAACGCCAGAAA
<i>CFEM17-R(SmaI)</i>	CCCGGGTACTTTATTTGAATGGCCAA
<i>CFEM17-OF(XbaI)</i>	TCTAGACATAACTGATGCGACACCT

使用引物对 *CFEM17-OF(XbaI)/CFEM17-R(SmaI)*扩增 *CFEM17* 基因及其启动子,通过酶切连接的方式构建由 *CgCFEM17* 基因自身启动子驱动的表达载体,将构建好的表达载体线性化后转入 *CgCFEM17* 基因敲除突变菌株的原生质体中,使用潮霉素筛选出阳性转化子进行单孢分离。使用引物对 *CFEM17-F(XbaI)/CFEM17-R(SmaI)*检测 *CgCFEM17* 是否回补成功,获得 *CgCFEM17* 基因的敲除回补菌株。

1.3.4 生长速率分析 取待测菌株直径为 6 mm 的菌块,分别接种于 PDA 培养基上,28 ℃ 培养 5 d,用十字交叉法测量菌落直径并拍照。实验独立重复 3 次,每次 4 个重复。

1.3.5 致病性分析 按照 1.2.2 中的方法得到不同菌株的分生孢子,用 0.5%(v/v)ME 液体培养基重悬孢子,使用血球计数板在显微镜下计数,将孢子悬浮液浓度调整到 2×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,取 5 μL 接种于嫩绿

期的橡胶树叶片,密封保湿,于 28 ℃ 培养 4 d 后,测量病斑直径并拍照记录。实验设置 30 个重复。

1.3.6 分生孢子萌发率分析 按照 1.2.2 中的方法得到不同菌株的分生孢子,用 2%(v/v)的 YCS 液体培养基重悬孢子,调整孢子液浓度到 5×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,取 20 μL 接种于载玻片,28 ℃ 保湿培养,分别在 0、1.0、1.5 和 2 h 时于显微镜下观察并统计分生孢子的萌发率。实验独立重复 3 次,每次重复不少于 100 个孢子。

1.3.7 附着胞形成率分析 按照 1.2.2 中的方法得到不同菌株的分生孢子,调整孢子液为 5×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,取 5 μL 接种于疏水平板上,28 ℃ 保湿培养,分别在 0、2、4、8 h 于显微镜下观察附着胞的形成过程并统计附着胞形成率。实验独立重复 3 次,每次重复不少于 100 个孢子。

1.3.8 洋葱表皮侵染结构分析 按照 1.2.2 中的方法得到不同菌株的分生孢子,分生孢子用无菌

水洗两次, 稀释孢子液到 3×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 将洋葱内表皮揭下置于培养皿中, 将稀释好的孢子液取 5 μL 接种于洋葱表皮上, 28 $^{\circ}\text{C}$ 保湿培养, 分别于 8、12 h 在显微镜下观察入侵菌丝的形态并统计入侵结构的形成率。实验独立重复 3 次。

1.3.9 数据统计与分析 使用 Graphpad Prism 6.0 软件进行数据统计及显著性分析, 通过单因素方差分析具有单个变量的数据, 并通过 Duncan 氏多范围检验进行均值分离。 $P < 0.05$ 时差异被认为是显著的。

2 结果与分析

2.1 CgCFEM17 基因的扩增和生物信息学分析 以橡胶树胶孢炭疽菌的 cDNA 为模板, 通过 RT-PCR 的方法对 CgCFEM17 基因的编码区进行了扩增, 测序结果显示, 该基因的编码区包含 1 341 bp, 编码 446 aa 的肽链。对 CgCFEM17 蛋白的结构

进行分析发现, 该蛋白的 N 端含有 1 个信号肽序列和 (1 ~ 26 aa) 1 个 CFEM 保守结构域 (35 ~ 103 aa), C 端含有 6 个跨膜结构域 (149 ~ 171 aa, 191 ~ 213 aa, 233 ~ 255 aa, 270 ~ 292 aa, 305 ~ 327 aa, 342 ~ 364 aa) (图 1), 符合 Pth11-like 型 CFEM 蛋白的结构特征。利用 MEGA 6.0 软件对 CgCFEM17 与其他 CFEM 类蛋白的氨基酸序列进行系统进化树的构建 (图 2), 结果显示, CgCFEM17 与其他已知功能的 Pth11-like 型 CFEM 蛋白聚在一起, 与稻瘟菌 Pth11 和杨树的 CgPth11 的亲缘关系较近。

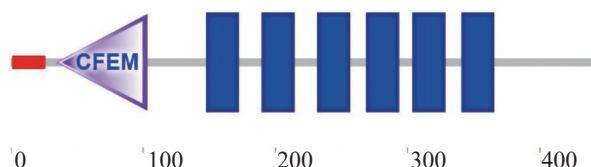


图 1 胶孢炭疽菌 CgCFEM17 结构分析
Fig. 1 The structure analysis of CgCFEM17 of *Colletotrichum gloeosporioides*

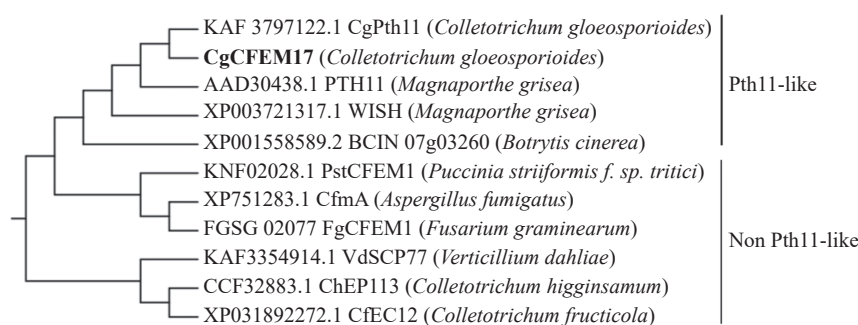
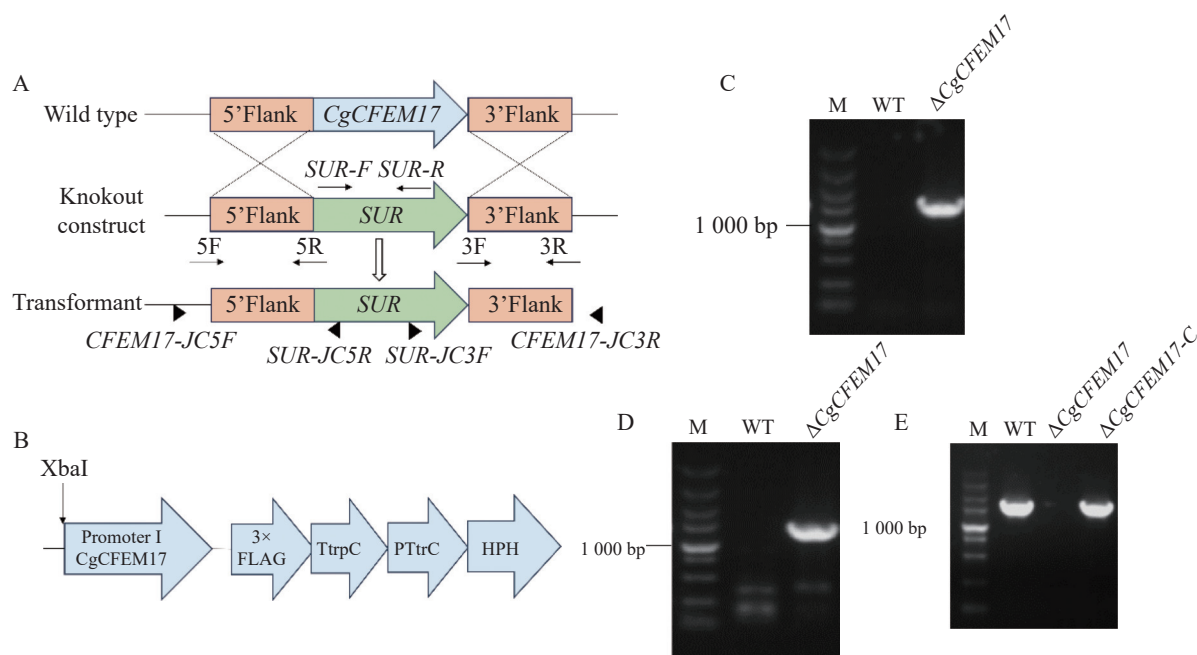


图 2 胶孢炭疽菌 CgCFEM17 与其他病原真菌的 CFEM 类蛋白的氨基酸序列的系统发育关系
Fig. 2 Phylogenetic relationship of the amino acid sequence between CgCFEM17 and CFEM protein of other pathogenic fungi

2.2 CgCFEM17 敲除突变体及互补株的构建

为了研究 CgCFEM17 的生物学功能, 根据同源重组的原理构建 CgCFEM17 的基因敲除突变菌株 (图 3-A)。利用 PCR 技术分别扩增了 CgCFEM17 的上游同源臂 (857 bp)、下游同源臂 (851 bp) 和氯嘧磺隆抗性基因 (SUR) 片段 (2 807 bp), 用融合 PCR 的方式得到带有 CgCFEM17 上游同源臂-SUR-CgCFEM17 下游同源臂的重组 DNA 片段, 使用 PEG 介导法将该重组 DNA 片段转入胶孢炭疽菌野生型原生质体中, 利用氯嘧磺隆筛选出阳性转化子进行单孢分离, 获得纯合株系。通过 PCR 方法在纯合株系的基因组中使用引物对 CFEM17-JC5F/SUR-JC5R 可检测到上游片段 (图 3-C), 使用引物对 SUR-JC3F/CFEM17-JC3R

可检测到下游片段 (图 3-D), 并对上下游片段进行测序与序列比对, 结果表明测序序列与预测序列一致, 而使用引物对 CFEM17-F(XbaI)/CFEM17-R(SmaI) 检测不到基因的存在 (图 3-E), 表明 CgCFEM17 基因已经成功被敲除, 并将该基因敲除菌株命名为 $\Delta\text{CgCFEM17}$ 。接着构建了由自身启动子驱动的 CgCFEM17 的回补表达载体 (图 3-B), 将其转化到敲除突变体 $\Delta\text{CgCFEM17}$ 后获得抗性转化子进行回补。对抗性转化子的 PCR 检测结果显示, 与野生型相似, 在回补菌株中可扩增到与 CgCFEM17 基因大小一致的片段, 进行测序与序列比对分析发现测序序列与预测序列一致, 而在 $\Delta\text{CgCFEM17}$ 中则扩增不到 (图 3-E), 表明 $\Delta\text{CgCFEM17}$ 的回补菌株构建成功, 将其命



A. *CgCFEM17* 的基因重组敲除原理; B. $\Delta CgCFEM17-C$ 的回补原理; C. 上游片段的 PCR 检测; D. 下游片段 PCR 检测; E. *CgCFEM17* 基因的 PCR 检测; M. DL 5 000 bp DNA Maker。

A. The principle of genetic recombination knockout of *CgCFEM17*; B. The complement principle of $\Delta CgCFEM17-C$; C. The PCR detection of the upstream fragment; D. The PCR detection of the downstream fragment downstream; E. The PCR detection of *CgCFEM17* gene; M. DL 5 000 bp DNA Maker.

图 3 *CgCFEM17* 敲除突变体的构建与分子鉴定

Fig. 3 Construction and molecular characterization of *CgCFEM17* knockout mutant strain

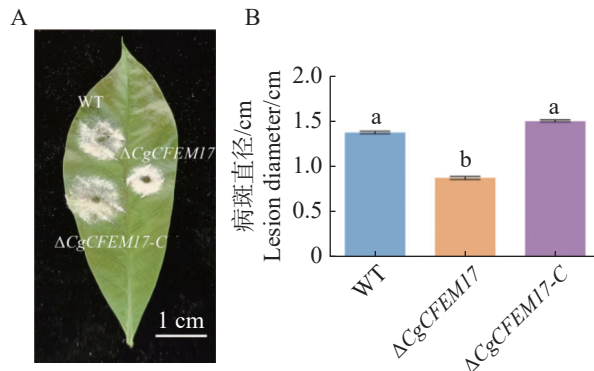
名为 $\Delta CgCFEM17-C$ 。

2.3 *CgCFEM17* 对胶孢炭疽菌致病力的影响

为了探究 *CgCFEM17* 对胶孢炭疽菌致病力的影响, 利用 WT、 $\Delta CgCFEM17$ 、 $\Delta CgCFEM17-C$ 的分生孢子悬浮液分别接种在离体的橡胶树叶片上, 3 d 后观察到 WT、 $\Delta CgCFEM17$ 、 $\Delta CgCFEM17-C$ 在橡胶树叶片上都能够引起典型的病斑(图 4-A), 对病斑直径进行测量和统计分析的结果显示, $\Delta CgCFEM17$ 引起的病斑直径显著小于 WT 和 $\Delta CgCFEM17-C$ 引起的病斑直径(图 4-B), 结果表明 *CgCFEM17* 的缺失导致胶孢炭疽菌对橡胶叶片的致病能力降低, 说明 *CgCFEM17* 参与调节胶孢炭疽菌对橡胶树的致病力。

2.4 *CgCFEM17* 对胶孢炭疽菌菌落生长及产孢能力的影响

为了探究 *CgCFEM17* 是否影响胶孢炭疽菌菌落的生长情况, 将 WT、 $\Delta CgCFEM17$ 和 $\Delta CgCFEM17-C$ 分别接种于 PDA 培养基上, 5 d 后观察到 WT、 $\Delta CgCFEM17$ 和 $\Delta CgCFEM17-C$ 的菌落形态没有明显差异(图 5-A)。菌落生长直径的统计分析结果显示, WT、 $\Delta CgCFEM17$ 和 $\Delta CgCFEM17-C$ 的菌落直径无显著差异(图 5-B)。



A. 病斑症状图, 标尺为 1 cm; B. 病斑直径统计分析图。不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

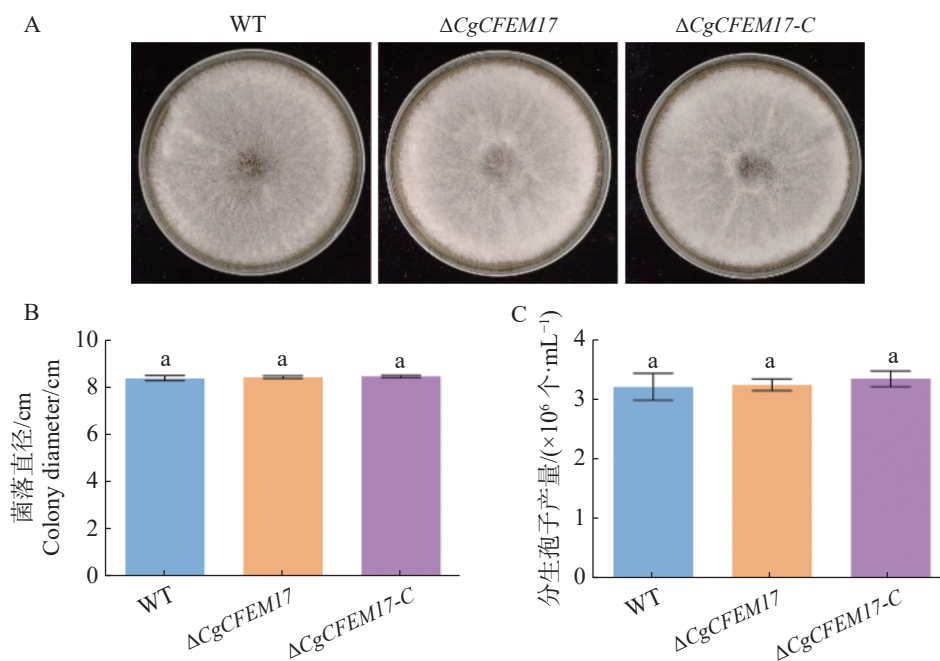
A. Disease symptom, scale bar=1 cm; B. Statistical analysis of the disease lesion. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$)

图 4 *CgCFEM17* 对橡胶树叶片的致病性分析

Fig. 4 Pathogenicity analysis of *CgCFEM17* on rubber tree leaves

孢子产量的分析结果显示, WT、 $\Delta CgCFEM17$ 和 $\Delta CgCFEM17-C$ 之间的孢子产量无明显差异(图 5-C)。以上结果表明 *CgCFEM17* 不参与调控胶孢炭疽菌的菌落生长和产孢能力。

2.5 *CgCFEM17* 对胶孢炭疽菌分生孢子萌发的影响 为了探究 *CgCFEM17* 是否影响了胶孢炭疽菌分生孢子的萌发, 本研究团队分析了 WT、



A. WT、 $\Delta CgCFEM17$ 及 $\Delta CgCFEM17-C$ 在葡萄糖琼脂 (PDA) 培养基上培养 6 d 的菌落形态; B. 对 WT、 $\Delta CgCFEM17$ 及 $\Delta CgCFEM17-C$ 的菌落直径进行统计分析; C. WT、 $\Delta CgCFEM17$ 及 $\Delta CgCFEM17-C$ 的孢子产量分析。不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

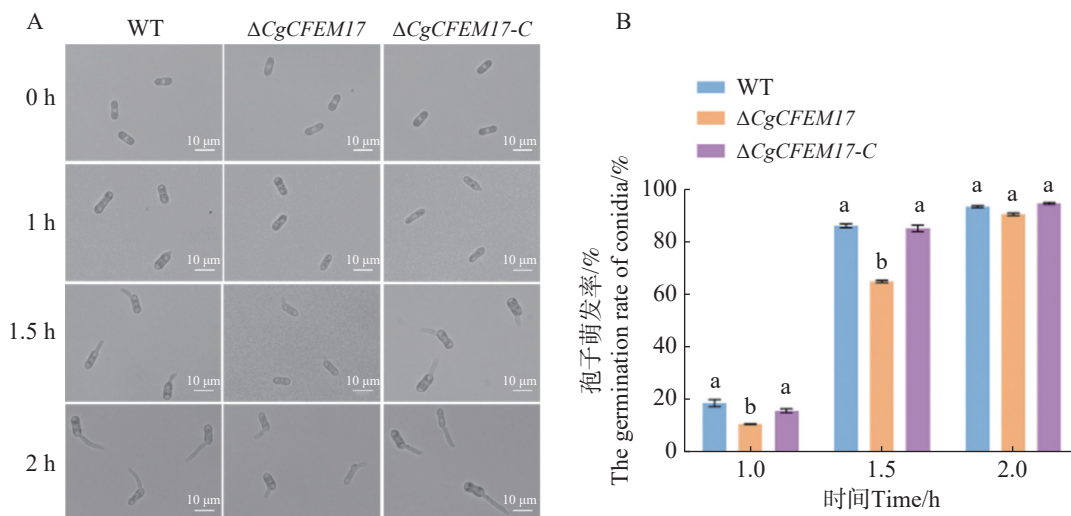
A. Colony growth of $\Delta CgCFEM17$, $\Delta CgCFEM17$ and $\Delta CgCFEM17-C$ on PDA for 6 days; B. Statistical analysis of colony diameter of WT, $\Delta CgCFEM17$ and $\Delta CgCFEM17-C$; C. The analysis of conidia productivity of WT, $\Delta CgCFEM17$ and $\Delta CgCFEM17-C$. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图 5 $\Delta CgCFEM17$ 的菌落生长及产孢能力分析

Fig. 5 Colony growth and conidia production analysis of $\Delta CgCFEM17$

$\Delta CgCFEM17$ 和 $\Delta CgCFEM17-C$ 的分生孢子的萌发过程 (图 6-A)。结果显示, 在孢子萌发诱导 1 和 1.5 h 时, $\Delta CgCFEM17$ 的分生孢子萌发率显著低于 WT 和 $\Delta CgCFEM17-C$ (图 6-B); 当萌发诱导

2 h 时, 尽管 $\Delta CgCFEM17$ 的芽管长度显著小于 WT 和 $\Delta CgCFEM17-C$ (图 6-A), 但 $\Delta CgCFEM17$ 的分生孢子萌发率与 WT 和 $\Delta CgCFEM17-C$ 没有明显差异 (图 6-B)。以上结果表明, $CgCFEM17$



A. WT、 $\Delta CgCFEM17$ 及 $\Delta CgCFEM17-C$ 的形态观察; B. 对 WT、 $\Delta CgCFEM17$ 及 $\Delta CgCFEM17-C$ 的萌发率进行统计分析。不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

A. Morphological observation of $\Delta CgCFEM17$, $\Delta CgCFEM17$ and $\Delta CgCFEM17-C$; B. Statistical analysis of germination rate of WT, $\Delta CgCFEM17$ and $\Delta CgCFEM17-C$; C. Statistical analysis of germ tube length of WT, $\Delta CgCFEM17$ and $\Delta CgCFEM17-C$ at 2 hours. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

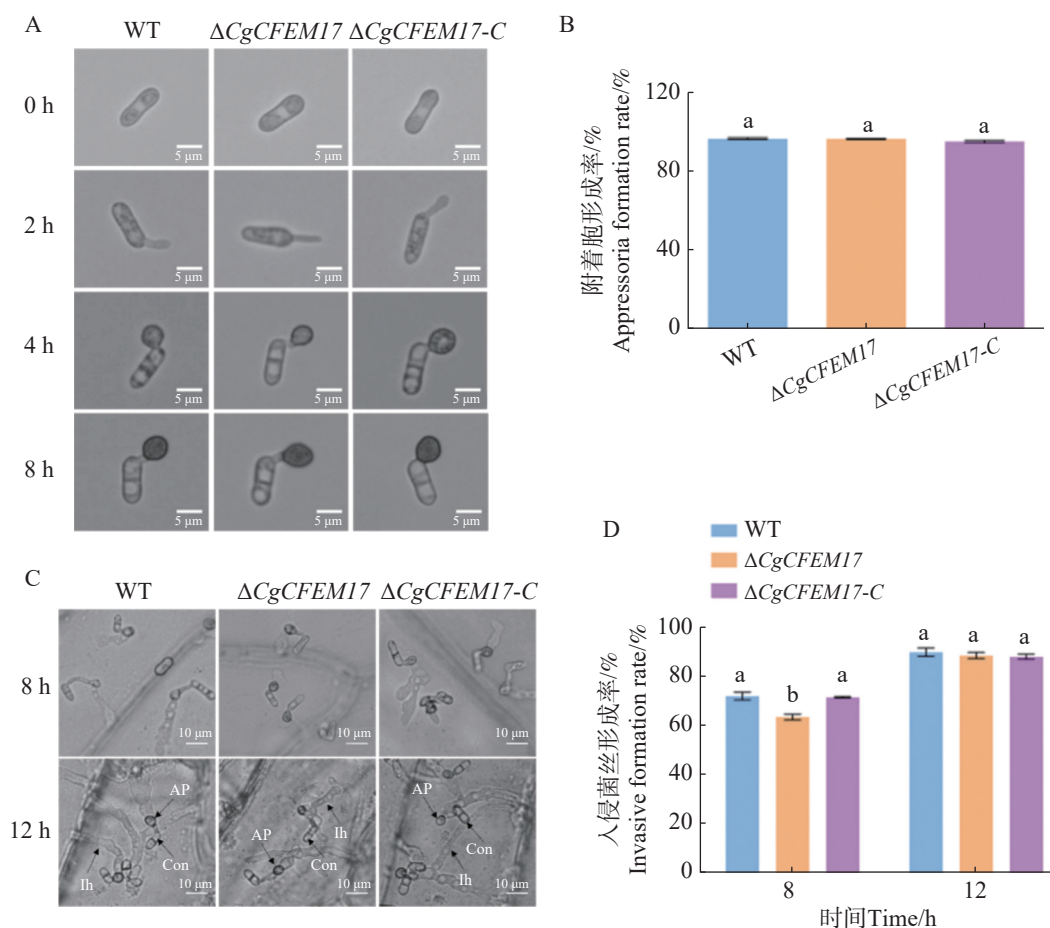
图 6 $\Delta CgCFEM17$ 的孢子萌发能力分析

Fig. 6 The nutritional germination analysis of $\Delta CgCFEM17$

的缺失导致胶孢炭疽菌分生孢子的萌发迟缓, *CgCFEM17* 参与胶孢炭疽菌的萌发进程。

2.6 *CgCFEM17* 对胶孢炭疽菌侵染结构形成的影响 为了进一步探究 *CgCFEM17* 是否影响胶孢炭疽菌侵染结构的形成, 观察并分析分生孢子在疏水表面上附着胞的形成过程和对洋葱表皮的侵染过程, 结果表明, 在疏水表面上 WT、 $\Delta CgCFEM17$

和 $\Delta CgCFEM17-C$ 的附着胞形态(图 7-A)及形成率均没有明显差异(图 7-B)。洋葱表皮接种实验结果显示, 在侵染过程中 $\Delta CgCFEM17$ 的分生孢子能正常形成附着胞及入侵菌丝(图 7-C), 但早期入侵菌丝的形成率低于 WT 和 $\Delta CgCFEM17-C$ (图 7-D)。以上结果表明, *CgCFEM17* 不影响附着胞的形成, 但延缓了入侵结构的形成。



A. WT、 $\Delta CgCFEM17$ 及 $\Delta CgCFEM17-C$ 在疏水表面附着胞形成过程 (标尺为 5 μm); B. 对 WT、 $\Delta CgCFEM17$ 及 $\Delta CgCFEM17-C$ 的附着胞形成率进行统计分析; C. WT、 $\Delta CgCFEM17$ 和 $\Delta CgCFEM17-C$ 入侵菌丝形态观察; D. WT、 $\Delta CgCFEM17$ 和 $\Delta CgCFEM17-C$ 的入侵菌丝形成率统计分析 (标尺为 20 μm)。Con. 孢子; AP. 附着胞; Ih. 入侵菌丝。不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。

A. The process of appressorium formation of WT, $\Delta CgCFEM17$ and $\Delta CgCFEM17-C$ on hydrophobic surfaces (scale bar = 5 μm); B. Statistical analysis of germination rates of WT, $\Delta CgCFEM17$ and $\Delta CgCFEM17-C$; C. Statistical analysis of appressorium formation rates of WT, $\Delta CgCFEM17$ and $\Delta CgCFEM17-C$; D. Observation of the hyphal morphology of WT, $\Delta CgCFEM17$ and $\Delta CgCFEM17-C$ (scale bar = 20 μm); E. Statistical analysis of invasive hyphae formation of WT, $\Delta CgCFEM17$ and $\Delta CgCFEM17-C$. Con. Conidium; AP. Appressorium; Ih. invasive hyphae. Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

图 7 $\Delta CgCFEM17$ 的附着胞形成率分析和对洋葱表皮的入侵分析

Fig. 7 Analysis of appressorium formation rate of $\Delta CgCFEM17$ and invasion onion epidermis

3 讨论

CFEM 蛋白是真菌特有的一类蛋白, 一般都有 1 个信号肽、1 个或多个 CFEM 结构域, 有的还含有 GPI 锚定位点或跨膜结构域^[29], 其中含有

跨膜结构域的 CFEM 蛋白被定义为 Pth11-like 类 CFEM 蛋白^[11, 14]。在本研究中, 从橡胶树胶孢炭疽菌中扩增到 1 个编码区长度为 1 341bp 的 *CgCFEM17* 基因, 编码的蛋白除了含有 N 端信号

肽和 1 个保守的 CFEM 结构域外, 还包含 6 个跨膜结构域, 符合 Pth11-like 类 CFEM 蛋白的结构特征。系统进化树分析结果显示, CgCFEM17 与稻瘟菌的 Pth11、WISH 和灰霉菌的 CFEM-Bcin 07g03260 等蛋白聚在一起, 这些蛋白都属于已知功能的 Pth11-like 型 CFEM 蛋白^[9, 14-15], 结果说明 CgCFEM17 属于胶孢炭疽菌的 1 个 Pth11-like 型 CFEM 蛋白。

在植物病原真菌中, Pth11-like 型 CFEM 蛋白参与调控病原真菌的生长和侵染结构的发育。在稻瘟菌中, Pth11 的缺失导致附着胞形成率显著降低, 但附着胞的形态没有发生变化, 说明 Pth11 参与调控附着胞的分化而不是形态建成^[14]。进一步的研究结果证明其中的 CFEM 结构域是附着胞正常发育和致病性所必需^[11], 而另一个 Pth11-like 型 CFEM 蛋白 WISH 除了影响附着胞形态发生外还影响细胞壁的完整性。在灰霉菌中, Pth11-like 型 CFEM 蛋白 BCIN 07g03260 则影响病菌分生孢子萌发率和芽管伸长^[15]。在杨树炭疽病菌中, Pth11 同源蛋白 CgPth11 参与附着胞形成的调控, 但并不是病菌致病力所必需^[26]。本研究结果显示, 橡胶树胶孢炭疽菌 CgCFEM17 的缺失引起胶孢炭疽菌对橡胶树致病力降低, 进一步研究发现 CgCFEM17 的缺失延缓了孢子萌发和入侵结构的形成, 但对于病菌的菌落生长速率和产孢能力, 以及附着胞的形成与形态发生没有影响, 暗示 CgCFEM17 通过调控分生孢子萌发时间进而影响侵染结构形成时间来影响胶孢炭疽菌对橡胶树的致病力。以上研究结果说明不同植物病原真菌的 Pth11-like 型 CFEM 蛋白的功能各不相同, 通过不同的作用方式和途径在病菌的致病过程中发挥作用。

Pth11-like 类 CFEM 蛋白大多数是丝状子囊菌特有的 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs), 含有典型的 7 个跨膜结构域, 在对外界信号识别中扮演重要的角色。分生孢子萌发和附着胞形成是病原菌成功入侵寄主的关键, 受营养条件和疏水表面的调节^[30]。稻瘟菌中的研究发现, 可溶性植物角质单体和疏水表面是附着胞形成所必需^[31]。作为典型的 GPCR, Pth11 被认为是环磷酸腺苷 (cAMP) 途径上游的一个表面传感器, 该基因的缺失导致病菌在角质素单体和疏水表面条件下的附着胞形成受损^[14]。稻瘟菌

的另外一个 GPCR 蛋白 WISH 也参与了寄主表面信号识别, 能够感知多种细胞外信号, 调控附着胞的分化^[32]。本研究中, CgCFEM17 基因缺失突变体的分生孢子萌发和侵染结构形成与野生型菌株相比均表现出延迟发生, 但附着胞的形成在疏水表面上不受影响, 这种表现是否与植物表面的信号识别有关, 还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] 张春霞, 何明霞, 李加智, 等. 云南西双版纳地区橡胶炭疽病原鉴定[J]. 植物保护, 2008, 34(1): 103-106.
- [2] 赵晓宇, 王记圆, 廖小森, 等. 橡胶树炭疽菌蛋白激酶 A 催化亚基基因的克隆及表达[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(8): 3622-3628.
- [3] 林春花, 孙董董, 韩丹, 等. 中国橡胶树苗圃 2 种炭疽病菌分子鉴定及分布分析[J]. 热带作物学报, 2014, 35(9): 1802-1808.
- [4] 李文杨, 郑春耀, 李超萍, 等. 中国橡胶树主栽品系和部分种质对尖孢炭疽病的室内抗性评价[J]. 热带农业工程, 2009, 33(5): 31-36.
- [5] 郭云峰, 安邦. 橡胶树胶孢炭疽菌 NADPH 氧化酶功能研究[J]. 生物技术通报, 2018, 34(10): 165-171.
- [6] FENG L P, DONG M X, HUANG Z R, et al. CgCFEM1 is required for the full virulence of *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(5): 2937.
- [7] 李娴, 陈思思, 谢剑波. 杨树响应胶孢炭疽菌侵染的转录组学研究[J]. 北京林业大学学报, 2024, 46(4): 91-102.
- [8] ZHANG Z N, WU Q Y, ZHANG G Z, et al. Systematic analyses reveal uniqueness and origin of the CFEM domain in fungi[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 13032.
- [9] KULKARNI R D, THON M R, PAN H Q, et al. Novel G-protein-coupled receptor-like proteins in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*[J]. Genome Biology, 2005, 6(3): R24.
- [10] 谢薇. 稻瘟病菌诱导植物细胞死亡基因 MoCFEM 的功能分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2015.
- [11] KOU Y J, TAN Y H, RAMANUJAM R, et al. Structure-function analyses of the Pth11 receptor reveal an important role for CFEM motif and redox regulation in rice blast[J]. New Phytologist, 2017, 214(1): 330-342.
- [12] CAI N, LIU R, YAN D Z, et al. Bioinformatics analysis and functional characterization of the CFEM proteins of *Metarhizium anisopliae*[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(7): 661.
- [13] ZUO N, BAI W Z, WEI W Q, et al. Fungal CFEM effectors negatively regulate a maize wall-associated kinase by interacting with its alternatively spliced variant to dampen resistance[J]. Cell Reports, 2022, 41(13): 111877.

- [14] DEZWAAN T M, CARROLL A M, VALENT B, et al. *Magnaporthe grisea* pth11p is a novel plasma membrane protein that mediates appressorium differentiation in response to inductive substrate cues[J]. *The Plant Cell*, 1999, 11(10): 2013 – 2030.
- [15] ARYA G C, SRIVASTAVA D A, PANDARANAYAKA E P J, et al. Characterization of the role of a non-GPCR membrane-bound CFEM protein in the pathogenicity and germination of *Botrytis cinerea*[J]. *Microorganisms*, 2020, 8(7): 1043.
- [16] CHEN L Q, WANG H Y, YANG J H, et al. Bioinformatics and transcriptome analysis of CFEM proteins in *Fusarium graminearum*[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(10): 871.
- [17] QIAN Y L, ZHENG X Y, WANG X Y, et al. Systematic identification and functional characterization of the CFEM proteins in poplar fungus *Marssonina brunnea*[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2022, 12: 1045615.
- [18] LIANG F, LIU L J, LI C S, et al. Systematic identification and functional characterization of the CFEM proteins in fishscale bamboo rhombic-spot pathogen *Neostagonospora sichuanensis*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2024, 15: 1396273.
- [19] GRUBER S, OMANN M, ZEILINGER S. Comparative analysis of the repertoire of G protein-coupled receptors of three species of the fungal genus *Trichoderma*[J]. *BMC Microbiology*, 2013, 13: 108.
- [20] DILKS T, HALSEY K, DE VOS R P, et al. Non-canonical fungal G-protein coupled receptors promote *Fusarium* head blight on wheat[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(4): e1007666.
- [21] WANG J X, LONG F, ZHU H, et al. Bioinformatic analysis and functional characterization of CFEM proteins in *Setosphaeria turcica*[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2021, 20(9): 2438 – 2449.
- [22] SHANG S P, LIU G L, ZHANG S, et al. A fungal CFEM-containing effector targets NPR1 regulator NIM-IN2 to suppress plant immunity[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(1): 82 – 97.
- [23] 刘思珍, 欧阳超, 满益龙, 等. 辣椒胶孢炭疽菌 CFEM 效应因子鉴定及转录组分析[J]. *南京农业大学学报*, 2021, 44(6): 1074 – 1082.
- [24] 张丽勃, 段可, 邹小花, 等. 草莓胶孢炭疽菌 CFEM 候选效应子的生物信息学鉴定及其侵染过程中的转录分析[J]. *植物保护*, 2017, 43(5): 43 – 51.
- [25] 井忠英. 玉米炭疽病菌 CFEM 效应子的系统鉴定与功能分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2015.
- [26] WANG X L, LU D X, TIAN C M. Mucin Msb2 cooperates with the transmembrane protein Sho1 in various plant surface signal sensing and pathogenic processes in the poplar anthracnose fungus *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(12): 1553 – 1573.
- [27] XU X H, LI G P, LI L, et al. Genome-wide comparative analysis of putative Pth11-related G protein-coupled receptors in fungi belonging to Pezizomycotina[J]. *BMC Microbiology*, 2017, 17(1): 166.
- [28] WANG Q N, AN B, HOU X R, et al. Dicer-like proteins regulate the growth, conidiation, and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 8: 2621.
- [29] PENG J B, WU L N, ZHANG W, et al. Systemic identification and functional characterization of common in fungal extracellular membrane proteins in *Lasioidiplodia theobromae*[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2021, 12: 804696.
- [30] SCHAMBER A, LEROCH M, DIWO J, et al. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling components and the Ste12 transcription factor in germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(1): 105 – 119.
- [31] LIU W D, ZHOU X Y, LI G T, et al. Multiple plant surface signals are sensed by different mechanisms in the rice blast fungus for appressorium formation[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(1): e1001261.
- [32] SABNAM N, ROY BARMAN S. *WISH*, a novel CFEM GPCR is indispensable for surface sensing, asexual and pathogenic differentiation in rice blast fungus[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2017, 105: 37 – 51.

Functional analysis of the Pth11-like CFEM protein *CgCFEM17* in *Colletotrichum gloeosporioides* from rubber tree

HE Erxiu^{1,2#}, LUO Hongli^{1,2*}

(1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737; 2. Sanya Nanfan Research Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China)

Abstract: *Colletotrichum gloeosporioides* is the main pathogen causing anthracnose of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). The common in fungal extracellular membrane (CFEM) domain is a unique motif of fungi, and the proteins containing CFEM and transmembrane domains are defined as Pth11-like CFEM protein, which plays important roles in regulating the development and pathogenicity of pathogenic fungi. In order to study the pathogenesis of *C. gloeosporioides*, a gene encoding Pth11-like CFEM protein was screened from the transcriptome of *C. gloeosporioides* and named as *CgCFEM17*. The encoding region of the gene *CgCFEM17* is 1341bp in length and encodes a peptide with 446 amino acids. Bioinformatics analysis showed that the N-terminus of *CgCFEM17* has a signal peptide with 26 amino acids and a conserved CFEM domain, and the C-terminus contained six transmembrane domains. The knockout mutant strain ($\Delta CgCFEM17$) and complementary strain ($\Delta CgCFEM17-C$) of the gene *CgCFEM17* were constructed to analyze the function of *CgCFEM17*. The results showed that the conidium germination and invasion structure of $\Delta CgCFEM17$ were delayed compared with the wild type and complementary strain, but the colony growth rate, conidiation, appressorium formation rate, and morphogenesis were not changed. These results indicated that the gene *CgCFEM17* could affect the pathogenicity of *C. gloeosporioides* on rubber tree by regulating the germination process of conidia and delaying the formation of infection structure, which lays a theoretical foundation for exploring of the pathogenic mechanism of *C. gloeosporioides* and establishing of a new control strategy for anthracnose of rubber trees.

Keywords: rubber tree; *Colletotrichum gloeosporioides*; *CgCFEM17*; functional analysis

(责任编辑: 钟云芳)