

柑橘绿霉病菌中多聚半乳糖醛酸酶基因 (*PdPG2*)的表达分析

由书妍¹, 于瑞君¹, 刘红霞¹, 李红叶^{2*}

(1. 大连市农业科学研究院, 大连 116036; 2. 浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310058)

摘要 柑橘绿霉病菌 *Penicillium digitatum* 是储藏期柑橘腐烂病最主要的病原之一, 严重影响柑橘产业的发展。已有研究表明, 柑橘绿霉病菌中多聚半乳糖醛酸酶(*PdPG2*)对其致病性有重要作用, *PdPG2* 基因功能缺失突变株的致病性会下降, 然而有关 *PdPG2* 基因的表达研究尚不完善。本文研究了 *PdPG2* 基因在不同条件下的表达情况, 结果表明 *PdPG2* 是酸性表达基因, 其表达量随着 pH 的升高而降低, pH 为 3.0 时其表达量为对照条件下的 10 倍, pH 为 8.0 时其表达量为对照条件下的 0.36 倍。柑橘果胶能够诱导 *PdPG2* 的表达, 其表达量为对照的 3.6 倍。因此, 在侵染过程中 *PdPG2* 表达的升高是由于发病部位酸化以及橘皮降解物诱导共同引起的。

关键词 柑橘绿霉病菌; 多聚半乳糖醛酸酶; 基因表达

中图分类号: S 432.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.0529-1542.2017.02.023

Expression profiles of polygalacturonase (*PdPG2*) in *Penicillium digitatum*

You Shuyan¹, Yu Ruijun¹, Liu Hongxia¹, Li Hongye²

(1. Dalian Academy of Agricultural Sciences, Dalian 116036, China; 2. College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract *Penicillium digitatum* is the most important pathogen causing green mold disease of postharvest citrus. Previous studies indicated that *PdPG2* played an important role in pathogenicity, and disruption of *PdPG2* resulted in attenuated virulence of *P. digitatum*. However, the expression profiles of *PdPG2* were not well characterized. In this study, we investigated the expression profiles of *PdPG2*. The results indicated that *PdPG2* was up-regulated under acidic conditions. The expression level of *PdPG2* was approximately 10 fold at pH 3.0 and 0.36 fold at pH 8.0 compared with that in the control. Pectin could induce the expression of *PdPG2* and the expression level was about 3.6 fold of that in the control. These results indicated that acidic condition and pectin could induce *PdPG2* expression. The decreased pH of citrus rind during infection was suitable for *PdPG2* expression, and pectin might be also helpful during infection.

Key words *Penicillium digitatum*; polygalacturonase; gene expression

柑橘绿霉病菌引起的柑橘腐烂病是贮藏期柑橘的主要病害之一, 其造成的损失通常占有所有损失的 90% 以上, 严重影响了我国柑橘的经济效益^[1-2]。柑橘绿霉病菌不形成特定的侵染结构, 主要通过采摘等农事操作形成的伤口侵入。在侵入寄主的过程中, 细胞壁水解酶起到了重要的作用^[3-4]。目前, 关于细胞壁水解酶对病原菌致病性的作用在许多真菌中都有报道, 在灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 中, 内切多聚半乳糖醛酸酶基因缺失突变株对番茄的致病性

降低^[5], 果胶甲酯酶基因缺失突变株对几种作物的致病性均有所下降^[6]; 紫麦角菌 *Claviceps purpurea* 中, 两个多聚半乳糖醛酸酶基因缺失突变株对黑麦花组织致病性严重下降^[7]; 在黄曲霉 *Aspergillus flavus* 中, 内切多聚半乳糖醛酸酶基因缺失突变株对棉铃的致病性降低^[8]; 在红球丛赤壳 *Nectria hematococca* 中, 果胶裂解酶 A 及果胶裂解酶 D 同时缺失其致病性降低, 而单一突变其中任何一个基因都对致病性没有影响^[9]; 在胶孢炭疽菌 *Colle-*

收稿日期: 2016-04-18 修订日期: 2016-06-07

基金项目: 国家自然科学基金(31371961); 国家现代农业产业技术体系(CARS-27)

* 通信作者 E-mail: hyli@zju.edu.cn

totrichum gloeosporioides 中,果胶裂解酶基因缺失突变株的致病性下降^[10-11],可见细胞壁水解酶对病原菌的致病性有重要意义。

研究表明柑橘绿霉病菌中多聚半乳糖醛酸酶基因(*PdPG2*)对其致病性有重要的作用^[12],该基因编码 378 个氨基酸,属于内切多聚半乳糖醛酸酶(endo-PG, EC 3. 2. 1. 15)。目前,关于 *PdPG2* 表达模式尚不清楚,本试验对柑橘绿霉病菌 *PdPG2* 基因的表达进行研究,以探究该基因在侵染过程中表达量变化的原因,增加对柑橘绿霉病菌致病性分子机制的了解。

1 材料与方法

1.1 材料

柑橘绿霉病菌菌株 Pd01(CBS 130525)由本实验室从浙江衢州发生腐烂病的柑橘上分离^[13],保存于本实验室;本试验使用的引物为自己设计(表 1),由上海桑尼生物科技有限公司合成,其中 *PdPG2* 的扩增片段为 184 bp, *Actin* 的扩增片段为 218 bp。

表 1 本试验所用引物

Table 1 Primers for this study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequence
PdPG2-qF	GAAGGAACCACCACTTTTCGG
PdPG2-qR	TCAGGCTGTGAGCGTAGAAGAA
Actin-qF	TCCACTACTGCCGAGCGTGAAAT
Actin-qR	CCGCCAGACTCAAGACCAAGAAC

1.2 方法

1.2.1 *PdPG2* 在侵染过程中的相对表达量分析

从市场上购买成熟蜜橘 *Citrus nobilis* 果实,在次氯酸中浸泡 10 min 后用无菌水冲洗并吹干备用。将 PDA 培养基上培养 7 d 的野生型菌株 Pd01 孢子用双蒸水洗脱,配制成 1.0×10^6 个/mL 的孢子悬浮液。在蜜橘果实上用针簇(5 根针围成)刺 1 个 1~2 mm 深的伤口,取 3 μ L 孢子悬浮液接种到伤口上,于 25℃ 保湿培养,每组试验 3 个重复,分别在接种后 12、24、48 和 96 h 采用 AxyPrep™ multisource total RNA miniprep kit(Xygen, 杭州)提取病斑组织的总 RNA,并利用 RNA PCR (AMV) 3. 0 kit (TaKaRa, 大连)反转录成 cDNA。以 cDNA 为模板, PdPG2-qF/PdPG2-qR 为引物,采用 SYBR Premix Ex Taq™ (Perfect Real Time) 试剂盒配制

PCR 反应液,随后在 7300 Real-time PCR 系统(ABI, 美国)上完成 PCR 反应。PCR 反应以 γ -*Actin* 基因(GenBank, AB030227)为内参,相对表达量的计算方法参考文献^[14]。

1.2.2 果胶对 *PdPG2* 相对表达量的影响

柑橘绿霉病菌的野生型菌株孢子悬浮液制作方法同 1.2.1,吸取 10 μ L 孢子悬浮液到 50 mL PDB 中培养 3 d,过滤菌丝并用无菌水冲洗 3 次,将菌丝转入以果胶为单一碳源的 SM 培养基中继续培养 60 h,按 1.2.1 的方法提取菌丝总 RNA,测定 *PdPG2* 的相对表达量,以相同条件下,用葡萄糖为单一碳源的 SM 培养基培养的菌丝为对照。

1.2.3 *PdPG2* 在不同 pH 条件下的相对表达量

按 1.2.2 的方法收集在 PDB 中培养 3 d 的菌丝,将菌丝转入 pH 分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0 的 PDB 中继续培养 12 h, pH 用磷酸柠檬酸缓冲液调节。按 1.2.1 的方法提取总 RNA,测定 *PdPG2* 的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *PdPG2* 在侵染过程中的相对表达量

在柑橘发病过程中, *PdPG2* 的表达如图 1 所示,在侵染发病 24 h 后, *PdPG2* 的相对表达量升高,为对照条件下的 10 倍,在侵染发病 48 h 后为对照条件下的 14 倍,在侵染发病 72 h 后, *PdPG2* 的相对表达量最高,为对照条件下的 18 倍,在侵染发病 96 h 后, *PdPG2* 的表达降低。这些结果表明 *PdPG2* 基因在侵染发病的过程中迅速升高,对致病性起到了重要的作用。

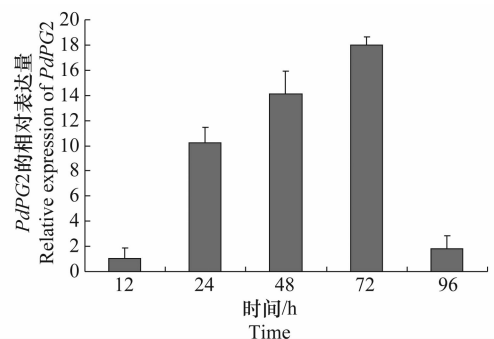


图 1 在侵染柑橘过程中 *PdPG2* 基因的表达

Fig. 1 Expression of *PdPG2* during infection

2.2 果胶对 *PdPG2* 相对表达量的影响

试验结果(图 2)表明,柑橘绿霉病菌野生型菌

株 Pd01 在含果胶的培养基中培养 60 h 之后, *PdPG2* 的相对表达量明显升高, 其表达量为对照条件下的 3.6 倍, 可见果胶能够诱导 *PdPG2* 的表达。

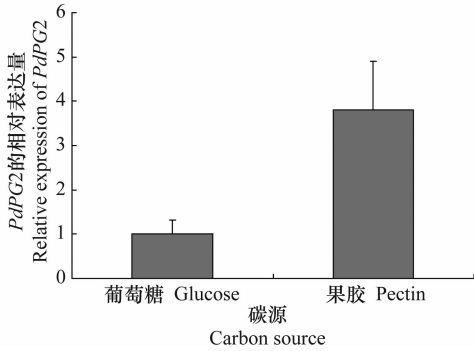


图 2 不同碳源下 *PdPG2* 的表达

Fig. 2 Expression of *PdPG2* under different carbon source

2.3 不同 pH 条件对 *PdPG2* 表达的影响

PdPG2 的表达与环境 pH 相关, 在酸性的条件下, *PdPG2* 的表达明显升高, 在 pH 为 3.0 时其表达量为对照条件下的 10 倍, 而在 pH 为 8.0 时其表达量为对照条件下的 0.36 倍(图 3), 表明 *PdPG2* 的表达依赖于外界环境的酸性条件。

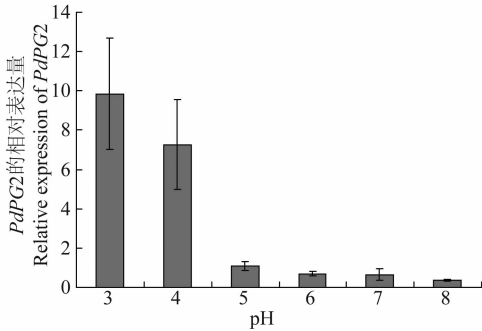


图 3 *PdPG2* 基因在不同 pH 条件下的表达

Fig. 3 Expression of *PdPG2* at different pH values

3 讨论

柑橘绿霉病菌 *P. digitatum* 引起的柑橘腐烂病是贮藏期柑橘最重要的病害, 给柑橘产业造成了严重的损失。研究柑橘绿霉病菌致病的分子机制, 有助于增加对柑橘绿霉病菌防控的理论基础。

本研究对 *PdPG2* 的表达模式进行研究, 在侵染过程中 *PdPG2* 的表达呈现出先升高后下降的趋势, 表明在侵染过程中 *PdPG2* 起到了重要的作用。*PdPG2* 的表达依赖于环境的酸性条件, 在侵染的过程中, 发病部位的 pH 会降低, 特别是在接种后 48 h 内^[12], 而这段时期也正是 *PdPG2* 相对表达量升高

的时期, 可见在柑橘绿霉病菌侵染过程中的酸化有利于 *PdPG2* 的表达, 从而提高病原菌的致病性。*PdPG2* 是一个诱导表达的基因, 本试验发现果胶也能够诱导 *PdPG2* 的表达, 果胶是柑橘果皮的重要组成部分^[15], 因此接种后 *PdPG2* 表达量的提高可能与发病部位的果皮降解物相关。在侵染过程中, *PdPG2* 的表达呈现先升高后下降, 而在接种后第 48 h pH 最低, 此后, 发病部位的 pH 基本不变^[12], 而 *PdPG2* 的表达却继续升高, 因此我们推测橘皮果胶在诱导过程中也起了重要的作用。

参考文献

- [1] Kanetis L, Förster H, Adaskaveg J E. Comparative efficacy of the new postharvest fungicides azoxystrobin, fludioxonil, and pyrimethanil for managing citrus green mold[J]. Plant Disease, 2007, 91(11): 1502 - 1511.
- [2] Macarasin D, Cohen L, Eick A, et al. *Penicillium digitatum* suppresses production of hydrogen peroxide in host tissue during infection of citrus fruit [J]. Pathology, 2007, 97(11): 1491 - 1500.
- [3] Annis S L, Goodwin P H. Recent advances in the molecular genetics of plant cell wall-degrading enzymes produced by plant pathogenic fungi[J]. European Journal of Plant Pathology, 1997, 103(1): 1 - 14.
- [4] Collmer A, Keen N T. The role of pectic enzymes in plant pathogenesis[J]. Annual Review of Phytopathology, 1986, 24: 383 - 409.
- [5] ten Have A, Mulder W, Visser J, et al. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 1998, 11 (10): 1009 - 1016.
- [6] Valette-Collet O, Cimerman A, Reignault P, et al. Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *Bcpme1* reduces virulence on several host plants[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2003, 16(4): 360 - 367.
- [7] Oeser B, Heidrich P M, Müller U, et al. Polygalacturonase is a pathogenicity factor in the *Claviceps purpurea*/rye interaction [J]. Fungal Genetics and Biology, 2002, 36(3): 176 - 186.
- [8] Shieh M T, Brown R L, Whitehead M P, et al. Molecular genetic evidence for the involvement of a specific polygalacturonase, P2c, in the invasion and spread of *Aspergillus flavus* in cotton bolls [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(9): 3548 - 3552.
- [9] Rogers L M, Yeon-Ki Kim Y K, Guo Wenjin, et al. Requirement for either a host-or pectin-induced pectate lyase for infection of *Pisum sativum* by *Nectria hematococca* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(17): 9813 - 9818.

- [6] 顾海南. 大螟越冬特性的初步研究[J]. 生态学报, 1985, 5(1): 64-70.
- [7] 金翠霞, 吴亚. 大螟与寄主植物关系的研究[J]. 植物保护学报, 1986, 13(4): 259-265.
- [8] 欧克芳, 董立坤, 熊育剑, 等. 香蒲新害虫稻蛙茎夜蛾生物学特性研究[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(2): 319-320.
- [9] 徐红莲, 严兆龙, 仇广灿, 等. 大螟的转移为害规律及其测报技术探讨[J]. 植保技术与推广, 2001, 21(5): 5-7.
- [10] Santosh H B, Sekhar J C, Rakshit S, et al. Detection of epistatic interaction for susceptibility towards pink stem borer (*Sesamia inferens* Walker) in maize (*Zea mays* L.)[J]. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 2012, 72(3): 284-289.
- [11] 谢大赉, 蔡如希, 赵福臻, 等. 大螟为害玉米的生物学特性与药剂防治试验[J]. 四川农学院学报, 1985, 3(5): 33-40.
- [12] 黄建荣, 封洪强. 河南北部稻蛙茎夜蛾为害夏玉米苗初报[J]. 植物保护, 2015, 41(2): 231-233.
- [13] Wu Kongming, Lu Yanhui, Feng Hongqiang, et al. Suppression of cotton bollworm in multiple crops in China in areas with Bt toxin-containing cotton [J]. Science, 2008, 321(5896): 1676-1678.
- [14] Parmesan C N, Ryrholm C, Steganesco C, et al. Poleward shifts in geographical ranges of butterfly species associated with regional warming [J]. Nature, 1999, 399(6736): 579-583.
- [15] Hickling R, Roy D B, Hill J K, et al. A northward shift of range margins in British Odonata [J]. Global Change Biology, 2005, 11(3): 502-506.
- [16] Böhme W, Geissler P, Wagner P. A remarkable record of *Phaneroptera falcata* (Poda, 1761) (Saltatoria: Phaneropteridae) from north-eastern Poland [J]. Bonn Zoological Bulletin, 2011, 60(1): 109-111.
- [17] Musolin D L. Insects in a warmer world: ecological, physiological and life-history responses of true bugs (Heteroptera) to climate change [J]. Global Change Biology, 2007, 13(8): 1565-1585.
- [18] Mantyka-pringle C S, Martin T G, Rhodes J R. Interactions between climate and habitat loss effects on biodiversity: a systematic review and meta-analysis [J]. Global Change Biology, 2012, 18(4): 1239-1252.
- [19] Parmesan C. Ecological and evolutionary responses to recent climate change [J]. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics, 2006, 37(1): 637-669.
- [20] Sánchez-Guillén R A, Córdoba-Aguilar A, Hansson B, et al. Evolutionary consequences of climate-induced range shifts in insects [J]. Biological Reviews, 2016, 91(4): 1050-1064.
- [21] 章士美. 从某些农业昆虫的分布来讨论古北、东洋两地区在我国秦岭以东的分界线问题[J]. 昆虫学报, 1965, 14(4): 411-419.
- [22] 宁波专区农业科学研究所植保组. 宁波地区水稻大螟生活史观察和防治试验初报[J]. 浙江农业科学, 1965(5): 243-248.
- [23] 李洪山, 李慈厚, 李红阳, 等. 苏北稻区水稻大螟种群消长特点及在寄主间的转换规律[J]. 植保技术与推广, 2002, 22(10): 13-16.
- [24] 陈龙稳, 欧阳享决, 吕锡麟. 大螟性诱剂应用于虫情测报[J]. 昆虫知识, 1987, 24(1): 8-10.
- [25] 徐丽娜, 李昌春, 胡本进, 等. 中国大螟研究历史、现状与展望[J]. 中国农学通报, 2011, 27(24): 244-248.
- [26] 陈晓娟, 卢代华. 多食性害虫大螟发生与防治研究进展[J]. 中国农学通报, 2015, 31(25): 171-175.
- [27] Feng H Q, Wu K M, Cheng D F, et al. Radar observations of the autumn migration of the beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) and other moths in northern China [J]. Bulletin of Entomological Research, 2003, 93(2): 115-124.
- [28] 韩兰芝, 彭于发, 吴孔明. 大螟幼虫田间扩散及成虫飞行能力研究[J]. 植物保护, 2012, 38(4): 9-13.
- [29] 孙建中, 张建新, 沈雪生. 三化螟、二化螟及大螟成虫的飞翔能力[J]. 昆虫学报, 1993, 36(3): 315-322.
- [30] 齐会会, 张云慧, 王健, 等. 稻纵卷叶螟在探照灯下的扑灯节律[J]. 中国农业科学, 2014, 47(22): 4436-4444.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 140 页)

- [10] Yakoby N, Beno-Moualem D, Keen N T, et al. *Colletotrichum gloeosporioides pelB* is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14(8): 988-995.
- [11] Yakoby N, Freeman S, Dinooor A, et al. Expression of pectate lyase from *Colletotrichum gloeosporioides* in *C. magna* promotes pathogenicity [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(8): 887-891.
- [12] Zhang Tianyuan, Sun Xuepeng, Xu Qian, et al. The pH signaling transcription factor PacC is required for full virulence in *Penicillium digitatum* [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(20): 9087-9098.
- [13] Zhu Jinwen, Xie Qingyun, Li Hongye. Occurrence of imazalil-resistant biotype of *Penicillium digitatum* in China and the resistant molecular mechanism [J]. Journal of Zhejiang University-Science A, 2006, 7: 362-365.
- [14] Pfaffl M W, Horgan G W, Dempfle L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR [J]. Nucleic Acids Research, 2002, 30(9): e36.
- [15] Mahmood A U, Greenman J, Scragg A H. Orange and potato peel extracts: Analysis and use as *Bacillus* substrates for the production of extracellular enzymes in continuous culture [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1998, 22(1): 130-137.

(责任编辑: 杨明丽)