

苹果轮纹病菌 (*Botryosphaeria dothidea*) 果胶裂解酶基因 *Bdpl1* 的致病功能分析

洪坤奇¹, 赵莹², 尹新明¹, 习慧君², 刘闯², 文才艺^{2*}, 臧睿^{1*}

(¹河南农业大学植物保护学院 菌物研究所, 郑州 450002; ²河南农业大学植物保护学院 植物病害生物防治研究中心, 郑州 450002)

摘要:由葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)引起的苹果轮纹病是影响我国苹果安全生产的重大病害之一。因此,本研究基于受苹果轮纹菌侵染的苹果组织中果胶裂解酶基因 *Bdpl1* 表达上调这一现象,通过 Split-marker PCR 技术构建 *Bdpl1* 基因敲除载体,并通过 PEG 介导的原生质体转化获得转化子,经常规 PCR 和 qRT-PCR 对所获得的转化子进行筛选,成功获得 1 个 *Bdpl1* 基因缺失阳性突变子。该转化子在 PDA 上的培养基性状与野生型没有明显差异,但在果胶培养基上菌落直径明显小于野生型。其胞外果胶酶活相比野生型明显下降,但在离体“早富”苹果枝条上的致病力并没有明显的下降。通过 qRT-PCR 技术发现在基因 *Bdpl1* 敲除后,其家族内有 3 个基因在病菌侵染过程中相比野生型明显上调表达(>3 倍)。这些现象表明果胶裂解酶基因 *Bdpl1* 与病原菌的营养生长过程关系不大,但其参与对寄主果胶类物质的降解。*Bdpl1* 基因对轮纹病菌致病力的影响较小,有可能是 *Bdpl1* 基因敲除后,该基因家族内其他基因的上调表达补偿了 *Bdpl1* 基因的功能。

关键词:苹果轮纹病菌;果胶裂解酶;基因敲除;qRT-PCR

Pathogenic function analysis of pectin lyase gene *Bdpl1* of *Botryosphaeria dothidea* in apple tree

HONG Kun-qi¹, ZHAO Ying², YIN Xin-ming¹, Xi Hui-jun², LIU Chuang², WEN Cai-yi^{2*}, ZANG Rui^{1*} (¹College of Plant Protection, The Laboratory of Fungal Research, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; ² College of Plant Protection, The Plant Disease Bio-control Research Center, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Apple ring rot caused by *Botryosphaeria dothidea* is one of the devastating diseases in China, which has become a major threat to apple production. In preliminary experiments, we found the expression of pectin lyase gene (*Bdpl1*) was obviously up-regulated in diseased tissues than that in fungal mycelia. Therefore, the *Bdpl1* was considered as a virulence gene involved in the pathogenic processes. In order to analyze its pathogenic function, the knockout vector of *Bdpl1* was constructed by the split-marker method and the transformants were obtained through PEG-mediated protoplast transformation. One mutant, Δ *Bdpl1-3*, was confirmed with four pairs of primers. Compared with the wild-type strain, the Δ *Bdpl1-3* morphology had no significant differences on PDA medium, whereas the colony diameter on pectin medium was much smaller than the wild-type one. The extracellular pectinase activity of the Δ *Bdpl1-3* isolate was lower than the wild type. Nevertheless, pathogenicity of the Δ *Bdpl1-3* isolate on excised one-year-old ‘Fuji’ apple twigs had no significant differences with the wild-type strain. Relative expression levels of several other pectin lyase (PL) family genes in the Δ *Bdpl1-3* and wild-type strains were detected by qRT-PCR. The results showed that the expression of three other PL family genes

收稿日期: 2018-07-31; 修回日期: 2018-11-18; 网络出版时间: 2018-11-19

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20181119.1704.004.html>

基金项目: 河南省自然科学基金(U170411346); 河南现代农业产业技术体系(S2014-11-G03)

通讯作者: 文才艺, 教授, 主要从事植物病害生物防治研究; E-mail: cywen080@hotmail.com

臧睿, 讲师, 主要从事果树与病原菌互作机理研究; E-mail: zangxirui@163.com

第一作者: 洪坤奇, 男, 硕士生, 主要研究方向为果树与病原菌互作机理; E-mail: kunqi2018@163.com。

were up-regulated (over three folds than the wild-type strain). These data indicated that the *Bdpl1* had no obviously effects on fungal growth and pathogenicity, but it had significant acceleration to degrade pectin. In the $\Delta Bdpl1$ -3 strain, other PL family genes might compensate the functions of *Bdpl1* by up-regulated expression.

Key words: apple ring rot pathogen; pectin lyase; gene knockout; qRT-PCR

中图分类号: S436.611

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2019)03-0314-12

苹果轮纹病(Apple ring rot)是影响我国苹果生产最为重要的病害之一。据调查,我国辽宁、山东、陕西等苹果主产区苹果枝干轮纹病总体发病率已经高达 77.6%^[1]。该病害主要危害果树的主枝、主干的皮层部分,导致果树韧皮部严重受损,从而影响果树对矿质元素和碳水化合物向树体各个部位的输送,继而造成果树产量和果品品质的严重下降^[2,3],此外,该病害还可以直接危害苹果果实,尤以收获前,货架期和贮藏期的果实最为严重,常年烂果率为 20%~30%,病害流行年份甚至高达 50%~60%^[4]。国内外已经报道可引起苹果轮纹病的病原菌主要有葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)^[5,7]、树花地衣葡萄座腔菌(*B. obtusa*)^[8,9]、斯氏葡萄座腔菌(*B. stevensii*)^[8]和粗皮葡萄座腔菌(*B. kuwatsukai*)^[10]等,其中葡萄座腔菌 *B. dothidea* 是我国苹果轮纹病的优势致病菌^[10]。

目前,对于该病害主要采用化学药剂和植物抗性诱导剂进行防治,筛选到了诸如多菌灵、戊唑醇、甲基硫菌灵、代森锰锌等药剂和硝普钠、茉莉酸甲酯、水杨酸等多种诱导剂^[11,12]。然而杀菌剂的大量使用不仅污染了环境,而且在一定程度上使得病菌的抗药性得到增强^[13,14],同时,果实上的残留药剂也会对消费者的身体造成一定的影响。要从根本上有效防治苹果轮纹病,关键是要清楚轮纹病菌与寄主-苹果树之间的互作机制^[2]。但是,轮纹病菌与苹果之间互作的相关研究刚刚起步,研究的焦点主要集中在果树受到病原菌侵染以后的细胞组织学变化和相关抗病基因、抗病蛋白的功能研究^[6,7],而对于病原菌在致病过程中的致病机制尚不完全清楚。

果胶是植物细胞壁的重要组分,大多数植物病原真菌通过分泌果胶裂解酶(Pectin Lyase, PL),催化降解果胶聚合物中的 α -1,4-糖苷键,从而达到破坏植物细胞壁的目的^[15]。植物病原菌产生的这些酶类物质,在病原菌的致病过程中起到了重要的作用^[15]。1989年,Dean等^[16]首次从构巢曲霉(*As-*

pergillus nidulans)的 cDNA 文库中克隆到了真核生物的 PL(*pectate lyase*)基因。随后,Yakob等^[17]通过同源重组的方法破坏胶孢炭疽病菌的果胶裂解酶基因 *pelB*,该基因缺失突变体的毒性降低 36%~45%。最近,Cho等^[18]发现链格孢菌(*Alternaria brassicicola*)的果胶裂解酶基因 *PL1332* 缺失后,其毒力与野生型相比降低了约 30%。近年来,有研究发现 *B. dothidea* 在侵染果实过程中,能够分泌降解果实表面角质层和细胞壁中果胶的相关酶类物质^[19,20]。然而,究竟是哪些果胶裂解酶基因在病原菌侵染寄主过程中发挥了作用目前还不清楚。对该问题的科学回答,不仅可以明确苹果轮纹病菌(*B. dothidea*)的致病机理,而且可以为苹果轮纹病的有效防治提供理论依据。

在前期的实验中,我们完成了一株葡萄座腔菌 *B. dothidea* 的全基因组测序工作,同时完成了该分离株与感病苹果品种(早富)的转录组分析,发现被苹果轮纹病菌侵染的树皮组织中,病原菌的果胶裂解酶基因(*Bdpl1*)在侵染过程中显著上调表达,推测其可能是病原菌的致病关键基因。因此,本研究拟通过构建 *Bdpl1* 基因敲除突变体,并通过敲除突变体致病力的检测、在果胶培养基上的表型观察,以及 *Bdpl1* 基因缺失后家族内其他基因的表达,明确 *Bdpl1* 在苹果轮纹病菌致病过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物 苹果轮纹病菌野生型菌株 PGLW-I-5 分离自富士苹果(*Malus domestica*)枝干部位,现保存于河南农业大学植物病害综合防治实验室。质粒 PCB1003 由西北农林科技大学-普渡大学联合研究中心许金荣教授惠赠。PCR 扩增引物均由上海生工生物工程有限公司合成,见表 1。

1.1.2 培养基的配制 (1)马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),配制方法:称取去皮马铃薯 200 g,切

成小块用蒸馏水煮 20 min,接着用四层纱布过滤,然后在滤液中加入 20 g 葡萄糖,15 g 琼脂,充分溶解后,用蒸馏水定容至 1 L,然后于 0.103 MPa 灭菌 25 min。(2) CMC 培养基,配制方法:分别称取羧甲基纤维素钠 15 g, NH_4NO_3 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, KH_2PO_4 1 g, 酵母浸粉 1 g, 将其溶于 1 L 蒸馏水中,分装后于 0.103 MPa, 121°C, 灭菌 25 min。(3) 果胶培养基,配制方法:果胶 2 g, NaNO_3 1 g, K_2HPO_4 1 g, MgSO_4 0.5 g, FeSO_4 0.01 g, 琼脂粉 15 g, 溴酚蓝 0.06 g, 加水定容至 1 L, 0.103 MPa 灭菌 25 min。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的种类鉴定 采用 CTAB 法提取 PGLW-I-5 分离株的 DNA, 并以其为模板, 用引物对 ITS1/ITS4, EF1-728F/EF1-986R, HisF3/HisR 和 HspF3/HspR 分别扩增病原菌的核糖体转录间隔区(rDNA-ITS), *EF-1 α* (延长因子), *His* (组蛋白) 和 *Hsp* (热休克蛋白) 基因片段。扩增均采用 25.0 μL 的体系, 其中包括 10 \times Taq buffer 2.5 μL , 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl_2 2.0 μL , 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ 的 dNTP 0.25 μL , 耐热的 Taq 酶 (5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.25 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的引物各 1.0 μL , DNA 模板 1.0 μL (\approx 20 ng), 其余不足的部分用无菌 ddH₂O 补足。rDNA-ITS 区段的 PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 30 s, 51°C 退火 30 s, 72°C 延伸 40 s, 共 35 个循环; 然后 72°C 再延伸 10 min, 最后于 4°C 保存。*EF-1 α* 、*Hsp* 和 *His* 基因片段的退火温度分别为 55°C、62°C 和 60°C, 其余步骤与 rDNA-ITS 扩增程序相同。扩增产物经琼脂糖凝胶检测无非特异性条带后, 送上海生工生物工程有限公司双向测序。获得序列后, 首先进行 Blastn 比对, 然后分别以 rDNA-ITS 和 *EF-1 α* 构成的联合基因和这 4 个基因片段构成的联合基因序列数据集为基础, 分别以 *Guignardiaphiloprina* 和 *Dichomera versiformis* 为外群 (表 2), 用 PAUP4.0b10 软件构建 MP (Maximum Parsimony) 系统发育树, 确定病原菌种类。

1.2.2 基因敲除载体的构建 以 PGLW-I-5 分离株的 DNA 为模板, 分别用引物 Bdpl-1F/2R、Bdpl-3F/4R 扩增出目的基因的上、下游片段, 以质粒 PCB1003 为模板, 潮霉素通用引物 HYG/F、HYG/

R 扩增出 *hph* (潮霉素磷酸转移酶基因) 全长片段。利用 split-marker PCR 方法构建出基因敲除载体, 然后将构建好的载体连接到 pMD 19-T Vector (TaKaRa) 上, 转化大肠杆菌 *DH5 α* , 用加有氨苄青霉素 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 LB 固体培养基筛选阳性克隆, 提取质粒, 并以质粒为模板, 用引物对 Bdpl-1F、HY/R 和 YG/F、Bdpl-4R 进行 PCR 扩增, 大量富集目的片段, 切胶回收目的片段。

1.2.3 PEG 介导的原生质体转化与突变体的验证 原生质体的制备方法参考 Chen 等方法^[21], 略有改动。将得到的原生质体浓度稀释到 10⁷ 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$, 将敲除载体 (5~10 μg) 与 200 μL 的原生质体于 50 mL 离心管中混合均匀, 室温静置 20 min。加入 1 mL 的 40% PEG, 轻微混合均匀于室温下静置 20 min, 然后加入含有氨苄青霉素 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 TB3 培养基, 在温度为 25°C, 转速为 90 rpm 的摇床中摇培过夜。将摇培过夜的原生质体在室温下, 3 500 rpm, 离心 6 min, 弃上清, 用剩余大约 1 mL 的残液将复生后的原生质体悬浮, 加入冷却至 55°C 含有潮霉素 (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 和氨苄青霉素 (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 bottom 培养基, 快速倒平板, 25°C 倒置培养 10 h, 在 bottom 上覆盖一层 Top 培养基, 继续培养 2~3 d, 待长出转化子后, 挑取转化子于加有潮霉素 (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的 PDA 培养基继续筛选, 待转化子长出菌丝后, 提取 DNA 进行 PCR 验证。

用 CTAB 的方法提取转化子 DNA, 并以其为模板分别用引物对 PL-F/H855R、H856F/PL-R、Bdpl-in-F/Bdpl-in-R 和 H850/H852 进行 PCR 扩增, 引物 PL-F/H855R 与 H856F/PL-R 分别检测基因上、下游是否发生同源重组; 引物 Bdpl-in-F/Bdpl-in-R 检测目的基因是否被敲除; H850/H852 检测 *hph* 基因是否插入。若凝胶电泳显示目的基因不存在, *hph* 基因与上、下游均发生了同源重组, 则可以确定为阳性转化子。

1.2.4 RT-PCR 验证突变体基因 *Bdpl1* 的表达 采用 Trizol 法提取突变体与野生型的 RNA, 利用反转录试剂盒 (全式金生物技术有限公司) 合成第一链 cDNA, 用 *Bdpl1* 基因的编码序列设计特异性引物, 用 β -tubulin (正向引物: TGTTCCGTCG-CAAGGCTTTCTT, 反向引物: TCGTTCATGTTG-GACTCAGCCT) 作为内参基因, 验证 *Bdpl1* 基因在突变体中是否表达。

Table 1 The sequences of primers used in this study

Primers	Sequences(5'-3')	Function
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCG	Amplify rDNA-ITS fragment
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATAT	
HisF3	CAAGCAGACTGCCCGTAAG	
HisR	GGCGAGCTGGATGTCCTT	
HspF3	CACAAGGTACGACTCCATTG	Amplify Hsp fragment
HspR	ACAGTGGCGGTRGTGGTACCGT	
EF1-728F	CATCGAGAAGTTCGAGAAGG	Amplify EF-1 α fragment
EF1-986R	TACTTGAAGGAACCCCTTACC	
PL-F	TTTCAAGCAGCCCTCACCGCGTCCG	Detecting whether the homologous recombination happened between the upstream fragment with <i>hph</i>
H855R	GCTGATCTGACCAGTTGC	
YG/F	GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCT	
HY/R	GTATTGACCGATTCTTGC GG TCCGAA	Amplify the fusion fragment
HYG/F	GGCTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTCAA	
HYG/R	AACCCGCGTTCG GC ATCTACTCTATTC	Amplify <i>hph</i> gene
H852	AACTCACCGCGACGTCTGTC	
H850	TTGTCCGTCAGGACATTGTT	Detecting <i>hph</i> gne
H856F	GTCGATGCGACGCAATCGT	
PL-R	GGATGTTGTGGTTTTGATGTGCC	Detecting whether the homologous recombination happened between the downsteam fragment with <i>hph</i>
Bdpl -1F	GCTCACCACTGGCCAACTAGG	
Bdpl-2R	TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCCGAA	Amplify the upstream fragment
	-AGAGTGGCTTTGGCCGTGG	
Bdpl-3F	GAATAGAGTAGATGCCGACCGGGTTCCG	Amplify the downstream fragment
	-AACACTAGCATCAGCACGGG	
Bdpl- 4R	GTGAAGTGCTGGGGTTCGGAGTGGC	Detecting <i>Bdpl1</i> gene
Bdpl-in-F	ATGGTGAACATGGCTGCTGTCTG	
Bdpl-in-R	GTTCTACTGTCTATGCGTTCAGG	
Bdpl RtF	CGTTATCATT CAGA ACATCCA	<i>Bdpl1</i> expression detection in qPCR
Bdpl RtR	CCTTGTCGTAGCCAGTAA	

1.2.5 致病力检测 参考 Zang 等的方法^[22],选取粗细均匀的一年生早富苹果枝条,用自来水冲洗干净,将其截为 30 cm 长的小段,每隔 8 cm 用电烙铁(30 w)烫伤枝条表皮。用直径为 5 mm 的打孔器,在野生型菌株 PGLW-I-5 与突变体菌落边缘打取菌饼,然后将菌饼生长有菌丝的一面贴于枝条烫伤处,于伤口上方缠绕少量无菌脱脂棉,将其和菌饼一同用塑料薄膜固定,接着用移液器向脱脂棉添加少量无菌水进行保湿,2 d 后取掉塑料薄膜。以不接种菌饼做为空白对照,每个菌株 3 个重复,试验重复 3 次。

1.2.6 突变体的表型观察 分别将野生型菌株 PGLW-I-5 和突变体菌株接种于果胶和 PDA 平板

的中央,在 25℃ 条件下倒置培养,3 d 后观察菌落形态并测量菌落直径,每个菌株 3 个重复,试验重复 3 次。

1.2.7 胞外酶活的测定 采用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色法,分别对突变体和野生型菌株(对照)的胞外果胶酶活力进行检测^[23],每个菌株 3 个重复,实验重复 3 次。

1.2.8 qRT-PCR 分析果胶裂解酶家族内其他基因的表达量 将野生型菌株 PGLW-I-5 和突变体分别接种于一年生的离体早富苹果枝条上,接种一周后,用无菌解剖刀切去接种孔周围 3 cm 的植物组织,采用 Trizol 法提取 RNA,反转录后,以 PGLW-I-5 侵染早富枝条的互作组作为对照, β -*tubulin*作

Table 2 *Botryosphaeria* sequences from different hosts used for phylogenetic analysis

Species	Isolates	Geographic origin	Host	GenBank accession number			
				rDNA-ITS	EF1 α	Hsp	His
<i>Botryosphaeria dothidea</i>	PGLW-I-5	Zhengzhou, China	<i>Malus domestica</i>	MH891106	MH891109	MH998521	MH998520
<i>B. dothidea</i>	PG331	Shaanxi, China	<i>M. domestica</i>	KJ433406	KJ433428	KJ433474	KJ433450
<i>B. dothidea</i>	PG329	Jiangsu, China	<i>M. domestica</i>	KJ433405	KJ433427	KJ433473	KJ433449
<i>B. dothidea</i>	PG293	Shandong, China	<i>M. domestica</i>	KJ433402	KJ433424	KJ433470	KJ433446
<i>B. dothidea</i>	ICMP8019	New Zealand	<i>Populus nigra</i>	AY236950	AY236899	KJ433476	KJ433452
<i>B. dothidea</i>	MAFF410826	Japan	<i>Prunus</i> sp.	KJ433408	KJ433430	KJ433478	KJ433454
<i>B. kuwatsukai</i>	CBS135219	Shaanxi, China	<i>M. domestica</i>	KJ433388	KJ433410	KJ433456	KJ433432
<i>B. kuwatsukai</i>	PG55	Shaanxi, China	<i>M. domestica</i>	KJ433389	KJ433411	KJ433457	KJ433433
<i>B. kuwatsukai</i>	PG259	Henan, China	<i>M. domestica</i>	KJ433390	KJ433412	KJ433458	KJ433434
<i>B. kuwatsukai</i>	PG297	Shandong, China	<i>M. domestica</i>	KJ433391	KJ433413	KJ433459	KJ433435
<i>B. kuwatsukai</i>	PG330	Jiangsu, China	<i>M. domestica</i>	KJ433393	KJ433415	KJ433461	KJ433437
<i>B. berengeriana</i> f.sp. <i>piricola</i>	MAFF645002	Japan	<i>M. domestica</i>	KJ433397	KJ433419	KJ433465	KJ433441
<i>Lastodiopodia theobromae</i>	PD20	USA	Prune	GU251120	GU251252	GU251648	GU251516
<i>L. theobromae</i>	PD161	USA	Pistachio	GU251122	GU251254	GU251650	GU251518
<i>Diplodia seriata</i>	PD13	USA	Peach	GU251109	GU251241	GU251637	GU251505
<i>D. seriata</i>	PD50	USA	Almond	GU251113	GU251245	GU251641	GU251509
<i>D. mutila</i>	PD46	USA	Christmas tree	GU251116	GU251248	GU251644	GU251512
<i>D. mutila</i>	PD75	USA	Holly	GU251119	GU251251	GU251647	GU251515
<i>Neofusicoccum ribis</i>	PD288	Australia	<i>Eucalyptus pellita</i>	GU251127	GU251259	GU251655	GU251523
<i>N. ribis</i>	PD254	USA	<i>Ribes</i> sp.	GU251126	GU251258	GU251654	GU251522
<i>N. parvum</i>	PD286	New Zealand	Poplar	GU251125	GU251257	GU251653	GU251521
<i>N. parvum</i>	PD250	South Africa	<i>Eucalyptus</i> sp.	GU251123	GU251255	GU251651	GU251519
<i>B. fusispora</i>	MFLUCC11-0507	Thailand	<i>Caryota</i> sp.	JX646788	JX646853	N/A	N/A
<i>B. fusispora</i>	MFLUCC10-0098	Thailand	<i>Entada</i> sp.	JX646789	JX646854	N/A	N/A
<i>B. fabierciana</i>	CMW41226	South Africa	<i>Avicennia marina</i>	KP860875	KP860718	N/A	N/A
<i>B. fabierciana</i>	CMW27094	China Fujian	<i>Eucalyptus</i> sp.	HQ332197	HQ332213	N/A	N/A
<i>B. fabierciana</i>	CMW27121	China Fujian	<i>Eucalyptus</i> sp.	HQ332198	HQ332214	N/A	N/A
<i>B. corticis</i>	SENC96b	USA	Blueberry	JN607083	JN607106	N/A	N/A
<i>B. corticis</i>	ATCC22927	USA	<i>Vaccinium</i> sp.	DQ299247	EU673291	N/A	N/A
<i>B. corticis</i>	CBS119047	USA	<i>V. corymbosum</i>	DQ299245	EU017539	N/A	N/A
<i>Guignardia philoprina</i>	CBS447	Netherlands	<i>Taxus baccata</i>	FJ824768	FJ824773	N/A	N/A
<i>Dichomera versiformis</i>	PD295	Australia	<i>Eucalyptus</i> sp.	GU251222	GU251354	GU251750	GU251618

为内参基因,进行实时荧光定量 PCR,检测突变体与植物互作后,PL 家族内其他基因的表达情况。PCR 反应体系:2×Ultra SYBR Mixture(CWBIO)5 μL、模板 cDNA 1 μL、引物各 0.5 μL、ddH₂O 补充至 10 μL。每个处理 3 个重复,PCR 程序为:95℃ 10 min,然后 40 个循环的 95℃ 变性 10 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,熔解曲线 95℃ 15 s,60℃ 1 min,95℃ 15 s,60℃ 15 s。PL 家族内其他基因的相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算。

2 结果与分析

2.1 病原菌的种类鉴定

病原菌的核糖体转录间隔区(rDNA-ITS),*EF-1α*,*His* 和 *Hsp* 基因片段经 PCR 扩增分别获得 530、280、550、和 430 bp 的 DNA 片段,通过 Blastn 比对,发现其与 NCBI 中已发表的 *B. dothidea* 菌株的 rDNA-ITS、*EF-1α*、*His* 和 *Hsp* 序列的一致性均达到了 99% ~ 100%,初步确定分离株 PGLW-I-5 为葡萄座腔菌(*Botryosphaeria dothidea*)。rDNA-ITS 和 *EF1α* 联合序列数据集的 MP 系统发育树拓扑结构表明(图 1-A),所有菌株在以 *Guignardiaphiloprina* 为外群的有根系统发育树中形成两个较大的分枝,其中第一分枝(Clade I)包括 *Diplodia mutila*、*D. seriata* 和 *Lasiodiplodia theobromae* 3 个种,其节点支持率分别为 100、98 和 100。第二分枝(Clade II)包含两个亚分枝(Clade A 和 Clade B)。Clade A 分枝由 *B. fusispora*、*B. fabicerciana*、*B. corticis*、*B. kuwatsukai* 和 *B. dothidea* 五个种类组成。供试分离株 PGLW-I-5 与来自于苹果、黑杨和李属植物上的 *B. dothidea* 菌株聚为一个分枝,而与 *Botryosphaeria* 其他近缘属、种分属于不同的分枝,表明该分离株的种类是 *B. dothidea*。Clade B 分枝由 *N. parvum* 和 *N. ribis* 两个种组成,表明这两者之间具有比较近的亲缘关系。由 rDNA-ITS、*EF1α*、*His* 和 *Hsp* 联合序列数据集构建的 MP 系统发育树与由 rDNA-ITS 和 *EF1α* 构建的 MP 系统发育树拓扑结构类似,供试分离株 PGLW-I-5 同样与其他寄主来源的 *B. dothidea* 聚在同一个分枝,而其他属、种分属不同的分枝,这一结果表明该分离株的种类仍然为葡萄座腔菌(图 1-B)。由此,结合 Blastn 比对的结果,最终确定分离株 PGLW-I-5 的种类为葡萄座腔菌(*Botryosphaeria*

dothidea)。

2.2 敲除载体的构建

用 PGLW-I-5 的基因组 DNA 作为模板,用引物对 *Bdpl-1F/Bdpl-2R* 和 *Bdpl-3F/Bdpl-4R* 扩增 *Bdpl1* 基因的上游片段和下游片段,其大小分别为 1 185 bp 和 1 114 bp。同时,以 PCB1003 质粒为模板,以 *HYG/F* 和 *HYG/R* 扩增出 *hph* 的全长基因,其大小为 1 379 bp(图 2-A)。最后以上、下游片段和潮霉素全长基因为模板,分别以 *Bdpl-1F+HY/R* 和 *YG/F+Bdpl-4R* 为引物,利用 split-marker PCR 构建出敲除载体,上游片段与潮霉素片段融合大小为 1 847 bp,下游片段与潮霉素片段融合大小为 1 918 bp(图 2-B)。

2.3 突变体的验证

通过 PEG 介导的遗传转化共获得 3 个转化子,通过 4 对引物进行 PCR 检测,得到一个阳性转化子 $\Delta Bdpl1-3$ 。在其基因组中没有检测到 *Bdpl1* 基因,但却可以检测到 *hph* 基因的存在。同时在该转化子中也扩增到了 1 310 bp 和 1 327 bp 的片段(图 3-A),证明 *Bdpl1* 基因的上、下游片段已经与潮霉素基因片段发生融合,初步证明 *Bdpl1* 基因已成功被敲除。RT-PCR 结果显示在野生型分离株 PGLW-I-5 和突变体 $\Delta Bdpl1-3$ 中, β -*tubulin* 基因的表达量没有明显差异,而 *Bdpl1* 基因在突变体中没有表达,进一步证明了 *Bdpl1* 基因被敲除(图 3-B)。

2.4 突变体培养性状观测

在 PDA 培养基上, $\Delta Bdpl1-3$ 的培养性状和生长速率与野生型分离株相比变化不明显(图 4-A);在果胶培养基上,虽然 $\Delta Bdpl1-3$ 的培养性状变化不大,但菌落直径的 *t* 测验结果表明其与野生型差异显著($t=2.42, P=0.0415 < 0.05$), $\Delta Bdpl1-3$ 菌落明显降低(图 4-B)。该现象表明 *Bdpl1* 基因与病原菌的营养生长过程关系不大,但其可能参与病菌对寄主果胶类物质的降解。

2.5 突变体胞外果胶酶活检测

以 D-半乳糖醛酸为标准品,通过比色法获得标准曲线,方程为 $Y=0.6399X-0.0021$,其确定系数 R^2 为 0.9995,表明该曲线对观测值的拟和效果

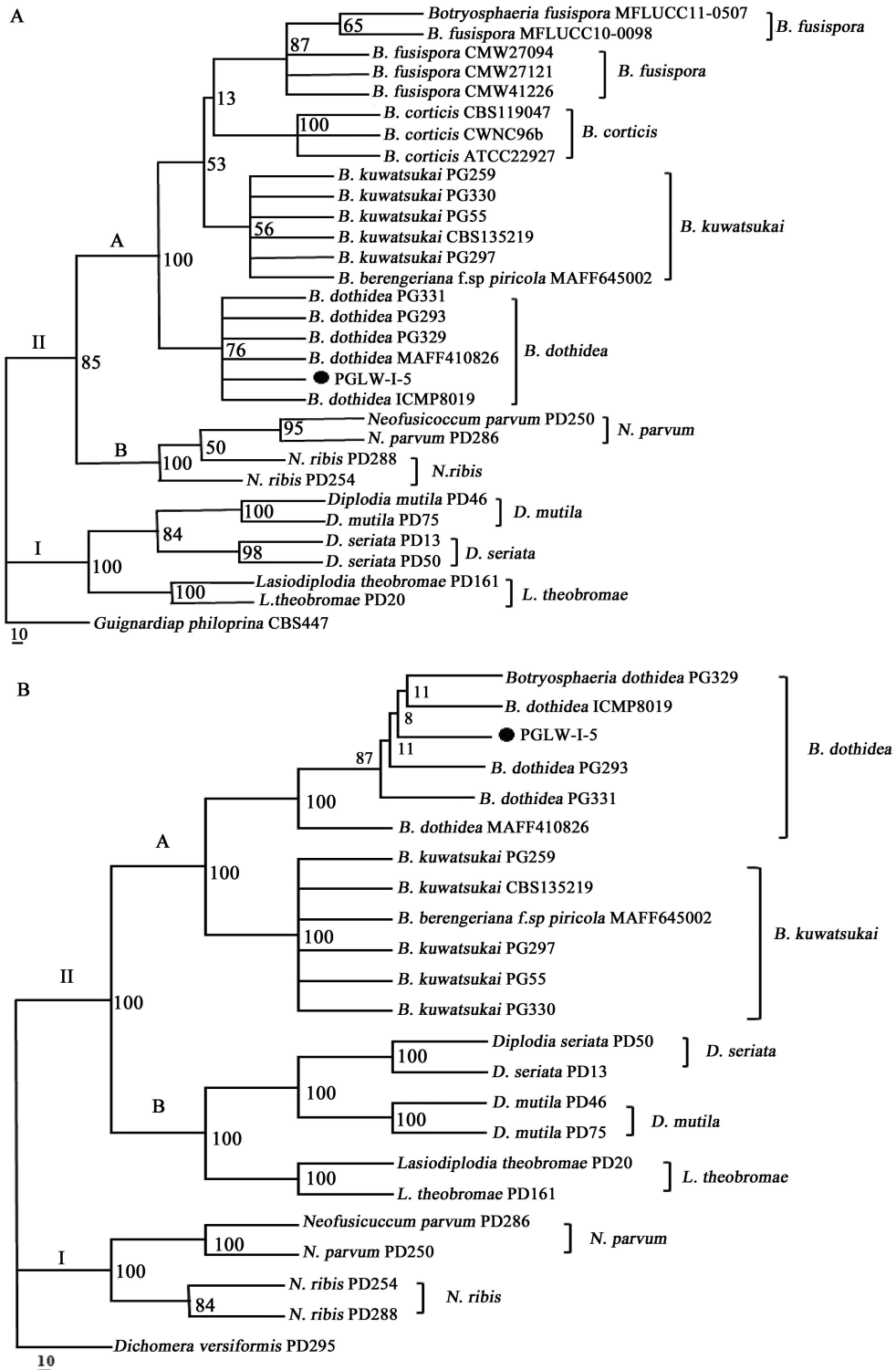


Fig. 1 The most parsimonious phylogenetic trees of tested isolate and related species

A: The maximum parsimony tree with bootstrap value using 1 000 replicates generated in PAUP 4.0b10 using combined rDNA-ITS and *EF1α* sequences. The *Guignardiap philoprina* isolate CBS447 was used as outgroup; B: The maximum parsimony tree with bootstrap value using 1 000 replicates generated in PAUP 4.0b10 using combined rDNA-ITS, *EF1α*, *His* and *Hsp* sequences. The tree was rooted with *Dichomera versiformis* isolate PD295.

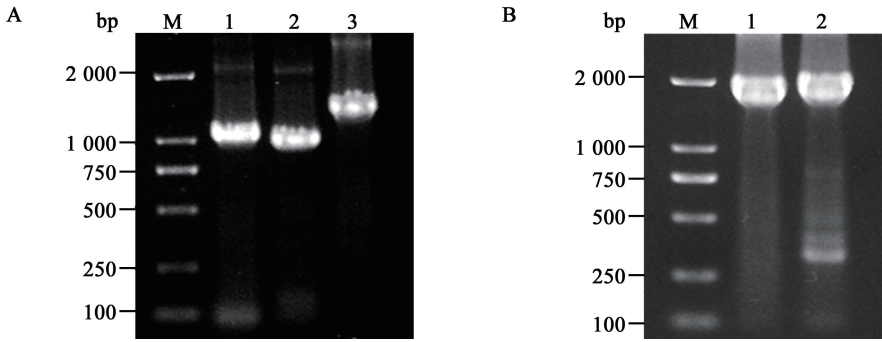


Fig. 2 Knockout vector construction

A: Using PCR to amplify the *Bdpl1* gene (1: The upstream fragment; 2: The downstream fragment; 3: Hygromycin gene; M: DNA marker DL2000); B: Construction of *Bdpl1* deletion cassette (1: The upstream fragment with *hph*; 2: The downstream fragment with *hph*; M: DNA marker DL 2000).

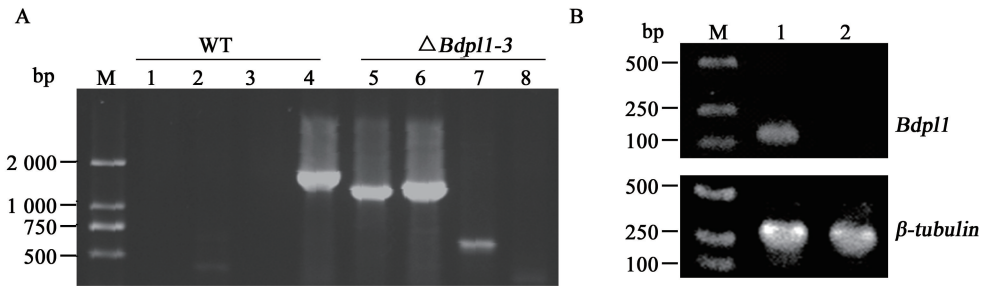


Fig. 3 PCR detection of the deletion mutants

A: Identification of *Bdpl1* knock out mutant ($\Delta Bdp11-3$) by PCR with four pairs of primers (1 and 5: Detect the upstream with *hph*; 2 and 6: Detect the downstream with *hph*; 3 and 7: Detect the gene *hph*; 4 and 8: Detect the gene *Bdpl1*; M: DNA marker DL 2000); B: RT-PCR to detect *Bdpl1* expression (1: The wild type strain PGLW-I-5; 2: The mutant $\Delta Bdp11-3$; M: DNA marker DL 2000).

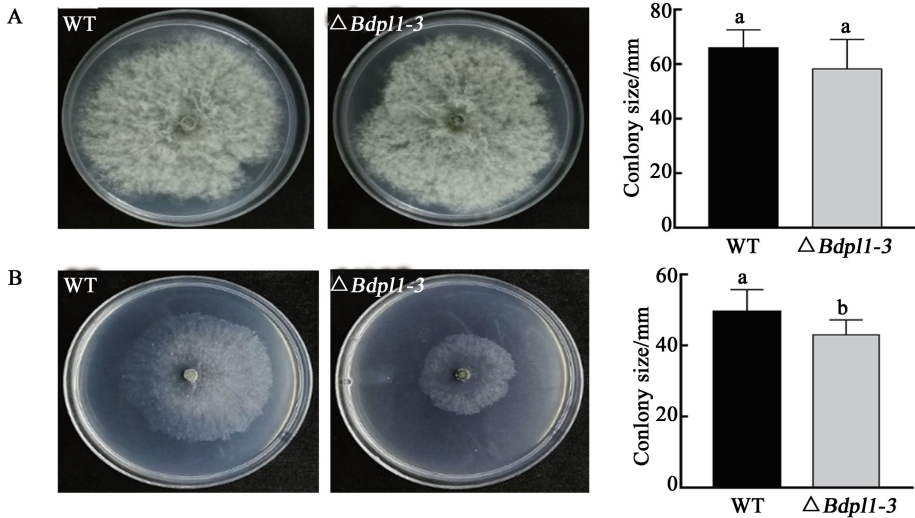


Fig. 4 Cultural characteristics of the wild type (WT) and mutant isolate ($\Delta Bdp11-3$) on PDA (A) and pectin medium (B)

The different lowercase indicated significant difference ($P < 0.05$).

较好,可以用来检测轮纹病菌胞外果胶酶的活性(图 5-A)。实验结果表明,野生型菌株 PGLW-I-5 和 $\Delta Bdp11-3$ 胞外果胶酶活分别为 3.972 U 和 1.113 U, $\Delta Bdp11-3$ 敲除突变体胞外果胶酶活较野生型明显降低($t=-0.49, P=0.008 < 0.05$), *Bdp11* 基因的缺失能够影响苹果轮纹病菌的胞外果胶酶活性(图 5-B)。

2.6 突变体的致病性测定

将野生菌株 PGLW-I-5 和突变体 $\Delta Bdp11-3$ 接种到 1 年生离体“早富”苹果枝条上,结果显示,野生型菌株和 $\Delta Bdp11-3$ 突变体都可以引体苹果离体枝条产生明显症状。病斑外表为水浸状、稍皱缩,剥去病部表皮后,枝条韧皮部明显变为黄褐色,具有明显的病健交界(图 6-A)。7 d 后,野生型菌株和 $\Delta Bdp11-3$ 突变体在枝条上产生的病斑的平均

长度分别为 29.33 和 32.26 mm,通过统计分析发现, $\Delta Bdp11-3$ 突变体与野生型菌株产生的病斑大小无明显差异($t=-0.93, P=0.3806 > 0.05$), $\Delta Bdp11-3$ 突变体的致病力没有明显下降(图 6-B)。

2.7 突变体 PL 家族内其他基因的表达量

以 β -*tubulin* 基因为内参,对 $\Delta Bdp11-3$ 果胶酶基因家族内其他基因表达量进行研究,发现在 $\Delta Bdp11-3$ 侵染寄主的过程中,果胶酶基因家族内有 3 个基因(AppleLW-I-5A13869、AppleLW-I-5A09414 和 AppleLW-I-5A13858)明显上调表达,其表达量超过了野生型菌株表达量 3 倍以上(图 7)。这些数据说明, *Bdp11* 基因缺失后引起了该家族内其他基因的上调表达,而这些上调表达的基因在一定程度上弥补了由于 *Bdp11* 基因缺失导致致病性的下降。

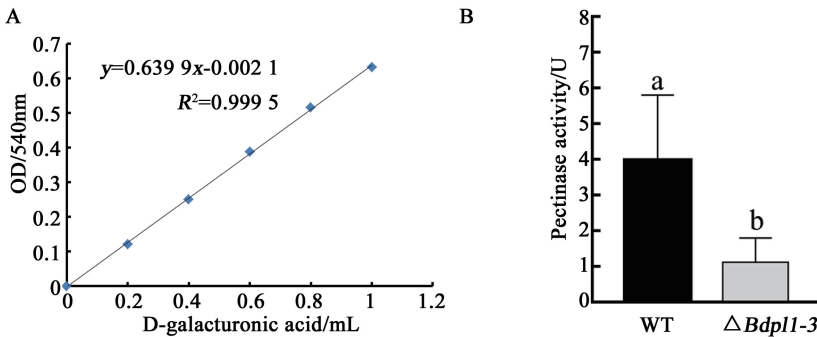


Fig. 5 Using DNS method to detect extracellular pectinase activity

A; D-galacturonic acid standard curve; B; Pectinase activity of PGLW-I-5 and $\Delta Bdp11-3$. The different lowercase indicated significant difference ($P < 0.05$).

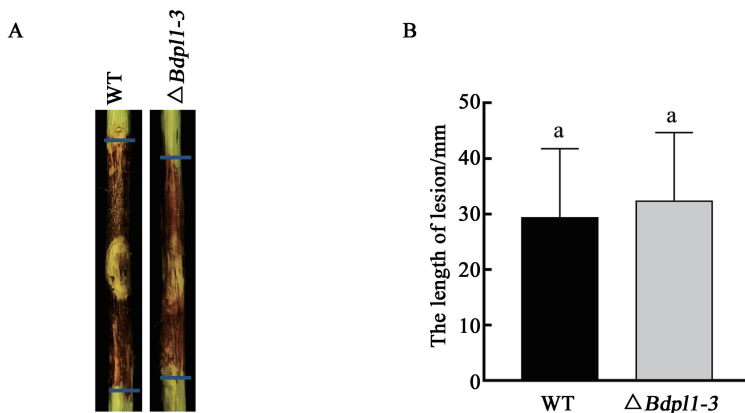


Fig. 6 Canker symptoms caused by the wild type and mutant isolate on excised one-year-old apple twigs (A) and their average lengths (B)

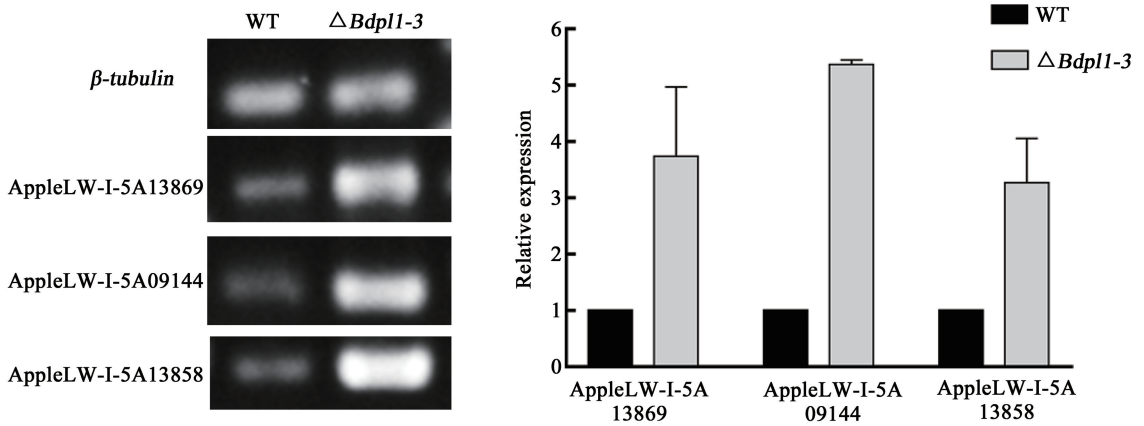


Fig. 7 Relative expression levels of other PL family genes during the $\Delta Bdp11-3$ infection

3 结论与讨论

苹果轮纹病菌在侵染寄主的过程中可以分泌一系列的果胶酶,这些酶是引起果树轮纹病重要致病因子之一^[15]。本课题组从轮纹病菌侵染苹果枝条的转录组数据库中发现,轮纹病菌的果胶裂解酶基因 *Bdpl1* 的表达量明显上调,由此推测该果胶裂解酶可能在病菌侵染过程中发挥了一定的作用。在本研究中,通过 Split-marker 的方法成功构建出基因敲除载体,并且通过 PEG 介导的原生质体转化获得一个 *Bdpl1* 缺失的敲除突变体 $\Delta Bdp11-3$ 。继而,采用 4 对引物和 qRT-PCR 对该突变体进行验证,证明其为目的基因缺失的阳性转化子。该转化子在 PDA 培养基上的培养性状与野生型菌株没有明显差异,但在果胶培养基上菌落直径明显小于野生型菌株。同时,其胞外果胶裂解酶活性相比野生型也明显下降。然而,该基因的缺失突变体在离体枝条上的致病力并没有明显的下降。产生这一现象的原因有可能是 *Bdpl1* 基因敲除后影响了该基因家族内其他基因的表达。为此,我们采用 qRT-PCR 方法检测突变体与寄主苹果树互动后,果胶酶基因家族中其他基因的表达情况,结果发现突变体 $\Delta Bdp11-3$ 的果胶裂解酶家族中有 3 个果胶裂解酶基因表达量较对对照明显上调表达(3 倍以上)。

果胶裂解酶对植物病原菌致病性的影响,不同的研究者得出的结论不尽相同。Yao 等^[24]对禾谷镰孢菌果胶酶 *Pela* 基因的功能研究中发现 *Pela* 单基因突变体对小麦胚芽鞘的毒力没有发生明显

改变。Fu^[25]研究辣椒疫霉病菌的果胶裂解酶时发现,在 12 个果胶裂解酶基因沉默的转化子中,只有 3 个转化子在辣椒幼苗叶片上的病斑明显减小,而其余大部分转化子的病斑没有发生明显改变。这些结果与我们的实验结果基本一致。由于果胶裂解酶基因是以多基因家族的形式存在,因此单个果胶裂解酶基因的缺失可能会受到家族内其他基因的补偿^[24]。然而,也有报道指出单个果胶裂解酶基因的缺失会导致病原菌对其寄主致病性的降低。Bendaniel 等^[26]发现炭疽菌(*Colletotrichum coccodes*)中果胶裂解酶基因 *CcPela* 缺失导致其对番茄的侵染能力下降。Xu 等^[27]发现苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)的果胶裂解酶 *Vmpl4* 缺失后,其对苹果枝条的致病性下降 10% 左右。Cho 等^[18]发现链格孢菌(*A. brassicicola*)的果胶裂解酶基因 *PL1332* 缺失后,其毒力与野生型相比降低了约 30%。这些结果与我们的实验结果相矛盾,究其产生这种矛盾结论的原因可能是不同病原菌的致病机理不同,有的病原菌单纯以果胶裂解酶作为降解寄主细胞壁的武器,而一些病菌有可能是果胶裂解酶、毒素、生长调节物质等多因素作用的结果。另外,虽然植物病原真菌的果胶裂解酶大多以基因家族的方式存在,但各基因家族的成员功能却存在较大的差异,即使有相同结构域的基因之间也可能存在巨大的功能差异,对基因家族功能的研究不能只分析个别基因^[25]。在这种情况下,有必要在后续的工作中对不同种类病原菌的果胶裂解酶进行相似性分析,同时采用双敲除、多敲除或基因编辑的方法对基因家族内的其他基因同时进行敲除,这样

才能得到更加准确、可靠的结果。

简言之,*Bdpl1* 基因对苹果轮纹病菌对果胶质的降解有明显的促进作用,*Bdpl1* 基因缺失后其胞外果胶酶活性显著下降,但其对苹果枝条的致病力没有明显降低,果胶裂解酶基因家族内其他基因有可能在 *Bdpl1* 基因缺失后部分补偿了其在致病性方面的作用。这些研究结果的获得不仅有利于揭示果胶裂解酶基因在病原菌侵染宿主过程中的作用,同时也为该病害的有效防治提供了一定的理论依据。

参考文献

- [1] Guo L Y, Li J Y, Zang X Z, *et al.* Investigations on the occurrence and chemical control of *Botryosphaeria* canker of apple in China (in Chinese) [J]. *Plant Protection* (植物保护), 2009, 35(4):120-123.
- [2] Han Q M, Gao X N, Wang J Q, *et al.* Cytological and histological studies of the interaction between *Botryosphaeria dothidea* and apple twigs [J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, 202(2):142-149.
- [3] Kim K W, Park E W, Kim Y H, *et al.* Latency- and defense-related ultrastructural characteristics of apple fruit tissues infected with *Botryosphaeria dothidea* [J]. *Phytopathology*, 2001, 91(2):165-172.
- [4] Kang L, Hao H M, Yang Z Y, *et al.* The advances in the research of apple ring rot (in Chinese) [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin* (中国农学通报), 2009, 25(9):188-191.
- [5] Tang W, Ding Z, Zhou Z Q, *et al.* Phylogenetic and pathogenic analyses show that the causal agent of apple ring rot in China is *Botryosphaeria dothidea* [J]. *Plant Disease*, 2012, 96(4):486-496.
- [6] Xiao L, Zhang C X, Zong Z R, *et al.* Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from the chloroplast of apple leaves induced by *Botryosphaeria dothidea* (in Chinese) [J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), 2016, 33(11):1357-1366.
- [7] Zhang C X, Tian Y, Zhang L Y, *et al.* Proteomic analysis of pathogen-responsive proteins from the bark of apple branches induced by *Botryosphaeria dothidea* (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2015, 45(3):280-287.
- [8] Zhao N, Zhang W W, Gao X N, *et al.* Phylogenetic relationships of *Botryosphaeria dothidea* and its allies in China (in Chinese) [J]. *Journal of Northwest A & F University (Natural Science Edition)* 【西北农林科技大学学报(自然科学版)】, 2011, 39(10):123-133.
- [9] Sun X Y. Pathogen identification and diversity of apple white rot in Shaanxi province (in Chinese) [D]. Yangling: Northwest A&F University (杨凌:西北农林科技大学), 2010.
- [10] Xu C, Wang C S, Ju L L, *et al.* Multiple locus genealogies and phenotypic characters reappraise the causal agents of apple ring rot in China [J]. *Fungal Diversity*, 2015, 71(1):215-231.
- [11] An J D, Guo L Y, Zhu X Q, *et al.* Susceptibility of *Botryosphaeria dothidea* to tebuconazole and thiophanate-methyl (in Chinese) [J]. *Plant Protection* (植物保护), 2016, 42(2):187-191.
- [12] Liu Z, Zhang H L, Xie X B, *et al.* Induction of defensive response against *Botryosphaeria berengiana* f. sp. *piricola* by four elicitors in harvested Fuji apple fruit (in Chinese) [J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), 2009, 26(5):666-670.
- [13] Wang Y Z, Zhang W, Liu B Y, *et al.* Research on resistance and geographical distribution of *Botryosphaeria dothidea* from apple to Tebuconazole in Shandong province (in Chinese) [J]. *Journal of Fruit Science* (果树学报), 2010, 27(6):961-964.
- [14] Yang W H, Liu K Q. Resistance detection of *Botryosphaeria berengeriana* f. sp. *piricola* to carbendazim and thiophanate-methyl (in Chinese) [J]. *Acta Phytophylacica Sinica* (植物保护学报), 2002, 29(2):191-192.
- [15] Alghisi P, Favaron F. Pectin-degrading enzymes and plant-parasite interactions [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 1995, 101:365-375.
- [16] Dean R A, Timberlake W E. Regulation of the *Aspergillus nidulans* pectate lyase gene (*pelA*) [J]. *Plant Cell*, 1989, 1(3):275-284.
- [17] Yakoby N, Benomoualem 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.
- [18] Cho Y, Jang M, Srivastava A, *et al.* A Pectate lyase-coding gene abundantly expressed during early stages of infection is required for full virulence in *Alternaria brassicicola* [J]. PLoS One, 2015, 10(5):1-18.
- [19] Li G X, Shen Y B, Gao Y Y, *et al.* Study on the infection mechanism of apple ring rot disease (in Chinese) [J]. Journal of Fruit Science (果树学报), 2007, 24(1):16-20.
- [20] Li G X, Shen Y B, Gao Y M, *et al.* Infection process of *Botryosphaeria dothidea* in apple fruit (in Chinese) [J]. Journal of Fruit Science (果树学报), 2006, 23(1):69-72.
- [21] Chen L, Sun G W, Wang H K, *et al.* Protoplast preparation and gfp transformation of *Botryosphaeria dothidea* (in Chinese) [J]. Scientia Silvae Sinicae (林业科学), 2014, 50(6):131-137.
- [22] Zang R, Huang L L, Kang Z S, *et al.* Biological characteristics and pathogenicity of different isolates of *Cytospora* spp. Isolated from apple trees in Shanxi province (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2007, 37(4):343-351.
- [23] Xu C J. Pathogenic function of three pectinase genes in *Valsa mali* (in Chinese) [D]. Yangling: Northwest A&F University (杨凌:西北农林科技大学), 2016.
- [24] Yao S H, Jia L J, Zhang X W, *et al.* Analysis of a pectate lyase *PelA* in *Fusarium graminearum* (in Chinese) [J]. Plant Physiology Journal (植物生理学报), 2014, 50(3):243-252.
- [25] Fu L. Cloning and functional analysis of *PEL* (Pectate Lyase) gene from *Phytophthora capsici* (in Chinese) [D]. Tai'an: Shandong Agricultural University (泰安:山东农业大学), 2012.
- [26] Bendaniel B H, Barzvi D, Tsror L L. Pectate lyase affects pathogenicity in natural isolates of *Colletotrichum coccodes* and in *pelA* gene-disrupted and gene-overexpressing mutant lines [J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(2):187-197.
- [27] Xu C J, Sun Y C, Wu Y X, *et al.* Pathogenic function of pectate lyase gene *Vmpl4* of *Valsa mali* in apple (in Chinese) [J]. Journal of Fruit Science (果树学报), 2017, 34(1):19-25.

责任编辑:曾晓葳