

基于RNAi和蛋白质组学研究 胶孢炭疽菌 *CgCDC2* 基因的功能

夏 杨^{1,2}, 苏初连^{1,2}, 叶 子^{1,2}, 刘晓妹^{1,2}, 蒲金基^{1,2*}, 张 贺^{1,2*}

(¹海南大学, 海口 570228; ²中国热带农业科学院环境与植物保护研究所·农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室·海南省热带农业有害生物监测与控制重点实验室, 海口 571101)

摘要:【目的】*CDC2*是调控细胞周期的主要因子之一,对植物病原菌的生长发育有着重要作用,但目前还未有胶孢炭疽菌 *CDC2* 蛋白生物学功能方面的研究。本试验的目的是获得胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*) *CgCDC2* 的 RNAi 突变体菌株,并分析 *CgCDC2* 基因的功能。【方法】利用 RNAi 技术和 PEG 介导法获得 *CgCDC2* 的 RNAi 突变体菌株,通过表型分析、TMT 蛋白质组学分析和酶活性测定来确定该基因的生物学功能。【结果】通过 PCR 扩增获得 *CgCDC2* 基因,编码一个 326 个氨基酸的蛋白,其 RNAi 突变体菌株与野生型相比,生长速率减缓、分生孢子产量显著下降、对 H₂O₂ 敏感性增强,PG、PL 蛋白质含量、基因相对表达量和酶活性均显著降低,致病力减弱。【结论】*CgCDC2* 参与调控胶孢炭疽菌的生长,分生孢子产量,氧化应激反应以及 PG、PL 的酶活性,从而降低病原菌的致病力。

关键词:杧果;胶孢炭疽菌;*CDC2*;RNAi;TMT 蛋白质组学;致病力

中图分类号:S667.1 文献标志码:A 文章编号:1009-9980(2019)11-1483-11

Research on the function of *CgCDC2* gene in *Colletotrichum gloeosporioides* with RNAi and TMT-based proteomic analysis

XIA Yang^{1,2}, SU Chulian^{1,2}, YE Zi^{1,2}, LIU Xiaomei^{1,2}, PU Jinji^{1,2*}, ZHANG He^{1,2*}

(¹Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China; ²Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Integrated Pest Management on Tropical Grops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Hainan Key Laboratory for Monitoring and Control of Tropical Agricultural Pests, Haikou 571101, Hainan, China)

Abstract:【Objective】*CDC2* is one of the main factors in cell cycle regulation, which plays an important role in the growth and development of plant pathogens. However, there are few studies on the biological function of *CDC2* in *Colletotrichum gloeosporioides*. The purpose of this study was to obtain and analyze the *CgCDC2* RNAi mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* and provide some information about the function of *CgCDC2*.【Methods】The *CgCDC2* gene was cloned by RT-PCR. RNA interference and the *CgCDC2* RNAi mutants were obtained by using PEG-mediated protoplast transformation system. PCR amplification, agarose gel electrophoresis, along with qRT-PCR were used to determine whether the transformant obtained were RNAi mutants. The biological phenotypes including colony growth rate, spore yield and sensitivity to stress factors were tested to understand the phenotypic differences between mutants and wild-type strain. TMT-based proteomic analysis and enzyme activity assay were performed in order to analyze the differential proteins in the mutants and the wild-type strain. The pathogenicity of the mutants and the wild-type strain were determined by inoculating them on the mango. The diameter of the lesion was observed and measured every other day.【Results】The *CgCDC2* gene encoded a protein containing 326 amino acids. It was found that through sequence alignment analysis

收稿日期:2019-05-06 接受日期:2019-07-01

基金项目:国家重点研发专项(2017YFD0202100);海南省重大科技计划项目(ZDKJ2017003);中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金(1630042017019);农业农村部农业技术试验示范与服务支持项目“滇桂黔石漠化地区特色作物产业发展关键技术集成示范”

作者简介:夏杨,男,在读硕士研究生,研究方向:病原微生物。Tel:0898-66969240, E-mail:xiayeung@163.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel:0898-66969240, E-mail:atzzhef@163.com; E-mail:simmonpj@163.com

the protein sequence of CgCDC2 was highly conserved. Compared with other plant pathogenic fungi, CgCDC2 was highly homologous. RNAi mutants were obtained by constructing RNAi expression vector and PEG-mediated protoplast transformation system. After the mutants and the wild-type strain inoculated on PDA and Czapek plates for several days, the colony growth rate of the mutants was found lower than that of the wild-type strain by observing and measuring the diameter of lesion. The collected conidia were counted by the hemocytometer and it was found that the conidia yield of mutants significantly decreased compared with the wild-type strain, it was about 1/8 of that of the wild-type strain. The sensitivity test of the mutants and the wild type strain to stress factors showed that both of them were not inhibited on the medium containing $0.7 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl or $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Congo Red. However, the growth of the mutants was inhibited to varying degrees, while the growth of the wild-type strain was not inhibited on the medium containing $5 \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ H₂O₂. TMT-based proteomic analysis showed that 5 420 proteins were identified both in the mutants and the wild-type strain. In pSilent-1: *CgCDC2-1* vs WT, 86 significant differential proteins were identified, of which 47 were up-regulated and 39 were down-regulated. In pSilent-1: *CgCDC2-2* vs WT, 73 significant differential proteins were identified, of which 37 were up-regulated and 36 were down-regulated. GO enrichment analysis showed that in pSilent-1: *CgCDC2-1* vs WT, the biological processes involved in differential proteins were mainly concentrated in the carbohydrate metabolic process, the regulation of transcription from RNA polymerase III promoter, nucleosome assembly and amino acid transmembrane transport. The molecular function were mainly concentrated in lyase activity, substrate-specific transmembrane transporter activity. The cellular components were mainly concentrated in chromatin. In pSilent-1: *CgCDC2-2* vs WT, the biological processes involved in differential proteins were mainly concentrated in the aromatic amino acid family metabolic process. The molecular functions were mainly concentrated on oxidoreductase activity, carbon-sulfur lyase activity and antioxidant activity. The expression levels of *PG* and *PL* genes in the mutants the wild-type strain were determined by qRT-PCR. The results showed that the expression levels of *PG* and *PL* genes were significantly down-regulated in the mutants compared with the wild-type strain. The results of enzyme activity assay showed that the enzyme activities of *PG* and *PL* in mutants were significantly lower than those of the wild-type strain, which was consistent with the results of TMT-based proteomic analysis. The result of pathogenicity test showed that after inoculating mango for 5 days, the diameter of lesion caused by mutants was significantly smaller than that of the wild-type strain. This indicated that the pathogenicity of the mutants was weakened.【Conclusion】Sequence alignment results showed that the CgCDC2 protein was highly conserved. The biological phenotypic determination of the mutants indicated that the *CgCDC2* gene was involved in the regulation of the colony growth rate, conidia yield, oxidative stress response, the expression levels of *PG* and *PL* genes, the expression levels of *PG* and *PL* proteins and enzyme activities in *Colletotrichum gloeosporioides*, thereby reducing the pathogenicity.

Key words: Mango; *Colletotrichum gloeosporioides*; CDC2; RNAi; TMT-based proteomic analysis; Pathogenicity

真核细胞中,有丝分裂和细胞周期的进程受许多细胞周期蛋白依赖性激酶CDK(cyclin-dependent kinases)的调控,它们能够与周期蛋白结合,形成cyclin-CDK复合体,进而实现对细胞周期不同时相的推进和转化作用^[1]。CDC2(CDK1)便是细胞周期调

控的主要因子之一,由Nurse等^[2]首次在裂殖酵母中发现。它广泛存在于丝状真菌和酵母中,可以使多种蛋白底物磷酸化,基因突变会导致细胞停留在G1/S或G2/M期交界处,进而影响DNA复制和细胞的有丝分裂^[3-5]。胡澄等^[6]发现麦冬皂苷B能通过

Myt/Cdc2信号通路使细胞周期停滞在G0/G1期,从而抑制H460细胞有丝分裂。Liu等^[7]的研究发现,对于丝状真菌禾谷镰刀菌中鉴定到的2个CDC2蛋白,CDC2A和CDC2B基因敲除结果表明,CDC2A和CDC2B在营养生长和无性生殖阶段功能冗余,但只有CDC2A在生长和有性生殖的细胞周期调控中发挥着阶段特异性作用,这说明同一种真菌中可能存在多个CDC2同源基因,且它们之间的功能有所不同。

*Colletotrichum*是典型的丝状真菌,被Molecular Plant Pathology评为分子植物病理学研究中十大模式真菌之一,主要用于病原菌的致病机理、病原菌与寄主之间的互作机制等方面的研究,如吴曼莉等^[8]利用同源重组的方法对胶孢炭疽菌G蛋白信号调控因子CgRGS2基因进行敲除并回补,通过对敲除突变体和互补株表型分析后发现,CgRGS2蛋白参与调控胶孢炭疽菌的营养生长、细胞壁完整性、致病性等多个方面。Alkan等^[9]通过对胶孢炭疽菌感染番茄果实过程进行转录组分析,发现果实持续大规模上调防御基因来应对胶孢炭疽菌的侵染,而在死体营养阶段,真菌代谢显著变化,致病因子显著上调。为了阐明胶孢炭疽菌CgCDC2基因是否在其致病过程中发挥作用,笔者利用RNAi技术^[10]和PEG介导法对胶孢炭疽菌CgCDC2基因进行沉默,对沉默突变体的生长速率、产孢量和对胁迫因子的敏感性进行了测定。运用TMT(Tandem Mass Tag,串联质谱标签)定量蛋白质组学技术研究了沉默突变体的差异表达蛋白,同时进行了致病性试验,综合比较分析,最终确定和完善了该基因的生物学功能,为深入了解胶孢炭疽菌和寄主之间的互作机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和杧果品种 胶孢炭疽菌野生型WT为171-1菌株,由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带果树病害研究组鉴定,保存。致病力测定所用杧果品种为‘台农1号’。

1.1.2 主要试剂 E.Z.N.M.TM Fungal RNA Kit(购自Omega), PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit(购自TaKaRa), UltraSYBR Mixture(购自康为世纪), 二硫苏糖醇(DTT^{red}, 购自Sigma), 碘乙酸

(IAA, 购自Sigma), 质谱级胰酶(购自Promega), Bradford蛋白定量试剂盒(购自Bio-Rad), TMT[®] Mass Tagging Kits and Reagents(购自Thermo), 酶活性测定试剂盒(购自苏州科铭生物), 引物由Invitrogen公司合成,其他试剂为国产分析纯。

1.2 胶孢炭疽菌总RNA的提取和cDNA第一链的合成

参照E.Z.N.M.TM Fungal RNA Kit试剂盒说明书提取总RNA,使用超微量紫外分光光度计(Nano-drop 2000C)测定总RNA浓度,利用PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒反转录合成cDNA第一链,10倍稀释后保存备用。

1.3 CgCDC2基因的克隆

从胶孢炭疽菌全基因组序列中获得CDC2(cell division control protein 2, 登录号:EQB57285.1)的蛋白序列,通过Primer Premier 5.0软件设计克隆引物,其正向引物为CgCDC-F,反向引物为CgCDC-R(表1)。以cDNA为模板,扩增获得CgCDC2全长基因,电泳检测,切胶回收,连接pMD19-T载体,转化到大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,挑选阳性克隆送至Thermo Fisher公司测序、分析。

表1 本研究所用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

| 引物名称 Primer name | 序列 Sequence (5'—3') |
|------------------|--------------------------|
| CgCDC-F | ATGGAGAACTACCAGAACGCT |
| CgCDC-R | TAGTGACCATAGTATCCGT |
| Hyg-F | TGATATTGAAGGAGCATTTC |
| Hyg-R | TTCCCGGTCGGCATCTA |
| CgCDC2-F | CTCTCAACATCGTCCACGC |
| CgCDC2-R | GAGAAGTTGTAGCAGGTGCG |
| Cg2S-F | GAGCCTTCTTCTTGCCCTCTC |
| Cg2S-R | GCCAACAAATCTCCAGTGGG |
| qCgCDC2-F | GAGGTTGTCACGCTGTGGTA |
| qCgCDC2-R | GGGGAAGGAGCTTGAAGT |
| qACT-F | AGCGGAAAGCCTCGCAGT |
| qACT-R | TGTCGTTACCATCTGACCCA |
| qCgPG-F | ATCAAGACCATCGCTAAAGAACCC |
| qCgPG-R | TCCTGCTGGATCACGATGC |
| qCgPL-F | CTCTGGTCGCTACGGTGCAT |
| qCgPL-R | TGGTCGTTGTCTTCCTCCCC |

1.4 CgCDC2基因RNAi沉默载体的构建

利用真菌转化载体pSilent-1^[11]构建CgCDC2沉默载体,构建策略见图1。序列的正向引物5'端添加Xho I和Apa I酶切位点,反向引物5'端添加Hind III和Kpn I酶切位点。CgCDC2正向序列经限制性内切

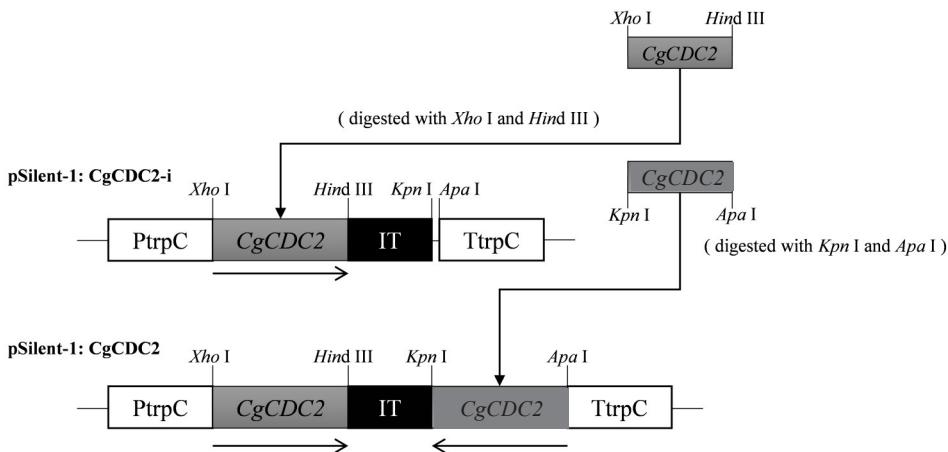


图 1 基因沉默载体 pSilent-1:CgCDC2 的构建策略

Fig. 1 The construction strategy of gene silencing vector pSilent-1:CgCDC2

酶 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切后克隆至 pSilent-1 的 *Xho* I 和 *Hind* III 位点, 得到中间载体 pSilent-1:CgCDC2-i, 反向序列经内切酶 *Kpn* I 和 *Apa* I 双酶切后克隆至中间载体 pSilent-1:CgCDC2-i 的 *Kpn* I 和 *Apa* I 位点, 得到 RNAi 沉默载体 pSilent-1:CgCDC2。

1.5 原生质体制备及转化

胶孢炭疽菌菌株原生质体的制备和 PEG 介导的原生质体转化参考韦运谢^[12]的方法进行。

1.6 CgCDC2 基因 RNAi 转化子的鉴定

采用 CTAB 法^[13]提取 CgCDC2 基因沉默转化子的 DNA, 根据 *Hyg B* 基因和 IT 上下游片段序列设计特异性引物 Hyg-F/Hyg-R、CgCDC2-F/Cg2S-R、Cg2S-F/CgCDC2-R、CgCDC2-F/CgCDC2-R 对转化子进行 PCR 鉴定。以空载 pSilent-1:CgCDC2 为阳性对照, 野生型 WT 为阴性对照, 4 对引物均能扩增出目的条带的初步鉴定为阳性转化子, 克隆转化后送 Thermo Fisher 公司测序、比对分析, 初步鉴定获得突变体。

利用实时荧光定量 PCR 分析突变体菌株与野生型菌株 CgCDC2 基因的表达差异。采用 Quant Studio 6 Flex 的实时荧光定量 PCR 检测系统进行实时荧光定量 PCR 操作, 设计荧光定量引物 qCgCDC2-F/qCgCDC2-R, 以 *ACT* 作为内参基因, 引物为 qACT-F/qACT-R, 建立 20 μL 反应体系: 2×Ultra-SYBR Mixture 10 μL, 引物各 1 μL, cDNA 1 μL, ddH₂O 7 μL, 每个处理样本设置 3 个重复。qRT-PCR 反应程序为: 95 °C 预变性 10 min; 95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火/延伸 1 min, 40 个循环; 在 60 °C 时收集

荧光信号。采用 2^{-ΔΔCT} 法进行数据统计^[14], 并通过邓肯新复极差法对数据进行方差分析。

1.7 CgCDC2 沉默突变体生长特性分析

1.7.1 生长速率测定 用直径 0.5 cm 打孔器分别沿野生型和 CgCDC2 沉默突变体的菌落边缘打取菌饼, 接种于 PDA 和 Czapek 平板上, 28 °C 培养, 分别在接种后 2、3、5、7 d 观察拍照, 测量菌落直径, 试验设 3 次重复, 每次设 3 个重复。

1.7.2 产孢量测定 分别从 CgCDC2 沉默突变体和野生型的 PDA 平板上打 0.5 cm 菌饼 3 个, 接种于 PD 培养液, 28 °C、180 r·min⁻¹ 摆床培养 3 d, 经无菌滤纸过滤, 收集分生孢子, 用血球计数板计算分生孢子数量, 试验设 3 次重复。

1.7.3 胁迫因子敏感性测定 CgCDC2 沉默突变体菌株和野生型菌株在 PDA 平板上活化 7 d 后, 打取 0.5 cm 菌饼分别接种于含有 NaCl(0.7 mol·mL⁻¹)、Congo Red(100 μg·mL⁻¹)、H₂O₂(5 mmol·mL⁻¹) 的 PDA 平板上。28 °C 培养 7 d 后观察、拍照记录, 计算抑菌率, 试验重复 3 次, 每次设 3 个重复。

1.8 TMT 定量蛋白质组学分析

1.8.1 蛋白提取与酶解 总蛋白提取参考曹方彬^[15]的方法进行, 称取适量样品, 液氮研磨成粉, 加入适量蛋白裂解液(8 mol·mL⁻¹ 尿素、50 mmol·mL⁻¹ Tris-HCl、0.2% SDS, pH=8), 冰水浴超声裂解 5 min, 4 °C、12 000 g 离心 15 min, 取上清。加入终浓度 2 mmol·mL⁻¹ DTT^{ed} 于 56 °C 反应 1 h, 之后加入足量 IAA, 室温避光反应 1 h。加入适量冷丙酮, -20 °C 沉淀 2 h, 4 °C、12 000 g 离心 15 min, 弃上清液, 加入适

量蛋白溶解液($8\text{ mol}\cdot\text{mL}^{-1}$ 尿素、 $100\text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ TEAB, pH=8.5)溶解蛋白沉淀。蛋白质量检测参考Bradford蛋白质定量试剂盒中的说明书完成。每个样品按照定量结果准确取出 $100\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白,按照 $m_{\text{酶}}:m_{\text{蛋白}}=1:50$ 比例加入胰酶, 37°C 酶切过夜,再以 $m_{\text{酶}}:m_{\text{蛋白}}=1:100$ 比例加入胰酶, 酶切 4 h , 蛋白酶解液经C18固相萃取柱除盐后冻干。

1.8.2 TMT 标记和肽段分离 以 $100\text{ mmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ TEAB缓冲液复溶,并加入 $41\text{ }\mu\text{L}$ 乙腈溶解的TMT标记试剂,室温放置 1 h ,加入终浓度 2.7% 氨水终止反应,取等体积标记后的样品混合,除盐后冻干。使用XBridge Peptide BEH C18($250\text{ mm}\times 4.6\text{ mm}, 5\text{ }\mu\text{m}$)色谱柱进行液相分离,梯度洗脱 50 min 。流动相A为 2% 乙腈水溶液,流动相B为 98% 乙腈水溶液,氨水调至pH=10。合并成 15 个组分,冻干后备用。

1.8.3 液质联用分析 肽段用 0.1% 甲酸溶解,每个组分上样约 $2\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白,流动相A为 0.1% 甲酸水溶液,流动相B为 0.1% 甲酸和 80% 乙腈水溶液,洗脱过程在EASY-nLC™ 1200纳升级UHPLC系统上进行。使用Q Exactive™ HF-X质谱仪,离子源喷雾电压为 2.3 kV ,采用数据依赖型采集模式,一级质谱扫描范围设为m/z 350~1 500,分辨率设为 $60\ 000$,选取全扫描中离子强度前 40 的母离子使用高能碰撞裂解(HCD)方法碎裂,进行二级质谱检测,二级质谱分辨率设为 $15\ 000$,碎裂碰撞能量设为 32% ,阀强度设为 8.3×10^3 ,动态排阻范围设为 60 s ,生成质谱检测原始数据。

1.9 差异表达蛋白分析

将质谱原始数据导入到Proteome Discoverer2.2软件进行数据库检索,本研究中采用的是胶孢炭疽菌对应的UniProt数据库,共计 $15\ 380$ 条序列。酶切类型为胰酶酶切,固定修饰类型为半胱氨酸烷基化,可变修饰类型为甲硫氨酸的氧化修饰,肽段N端TMT标记。设置允许最大的酶漏切位点数目为 2 ,前体离子质量偏差为 10 ppm ,碎片离子质量偏差为 0.02 Da 。本研究中,当FC(蛋白表达差异倍数) ≥ 1.5 ,同时p-value ≤ 0.05 ,蛋白表现为表达量上调,当FC ≤ 0.67 ,同时p-value ≤ 0.05 时,蛋白表现为表达量下调,对每个蛋白质差异倍数以 2 为底取对数,将p-value值以 10 为底取对数的绝对值,做出差异蛋白火山图。

对鉴定出的差异蛋白进行GO功能注释,把所有差异蛋白质向Gene Ontology数据库(<http://www.geneontology.org/>)的各个term映射,计算每个term的蛋白质数目,应用超几何检验,找出与所有蛋白质背景相比,在差异蛋白质中显著富集的GO条目。根据富集结果,绘制富集到的GO条目的柱状图。

1.10 CgCDC2沉默突变体的PG、PL表达分析

1.10.1 PG、PL蛋白质含量分析 PG、PL蛋白质含量根据TMT蛋白质组学分析结果得出。

1.10.2 PG、PL基因的表达分析 通过qRT-PCR分析突变体和野生型菌株中PG(*polygalacturonase*,多聚半乳糖醛酸酶)、PL(*pectinate lyases*,果胶裂解酶)基因的表达情况。根据胶孢炭疽菌PG、PL基因序列,设计qRT-PCR引物qCgPG-F/qCgPG-R、qCgPL-F/qCgPL-R,以*ACT*作为内参基因,内参基因引物和反应程序同1.6。

1.10.3 PG、PL酶活性测定分析 参考PG、PL酶活性测定试剂盒说明书,采用微量法进行酶活性测定,比较分析突变体和野生型菌株PG、PL的酶活差异。

1.11 CgCDC2沉默突变体的致病性测定分析

选取表面光滑、无病斑的杧果,用灭菌好的束针刺伤杧果果皮,在菌株活化 7 d 后,打取 0.5 cm 菌饼接种于果皮表面, 28°C 保湿,逐天观察并记录病斑直径。试验设 3 次重复,每次 3 个重复。

2 结果与分析

2.1 CgCDC2基因的扩增

通过PCR扩增获得了CgCDC2基因的ORF框,全长 981 bp ,编码一个含 326 个氨基酸的蛋白。氨基酸序列比对发现,CgCDC2与*Colletotrichum chlorophyti*(OLN85260.1)、*Colletotrichum incanum*(KZL-81795.1)、*Colletotrichum tofieldiae*(KZL76309.1)等真菌的CDC2(cell division control protein 2)蛋白序列高度同源,一致性为 83.28% ,其中与*Colletotrichum chlorophyti*同源性最高,为 95.09% ,与*Schizosaccharomyces pombe*同源性较低,为 62.12% 。

采用MEGA 6.0软件中的Neighbor-jointing法构建了CgCDC2与其他 10 种真菌CDC2蛋白的系统进化树(图2),这 10 种真菌包括病原真菌和裂殖酵母,进化树结果显示,CgCDC2蛋白与*Colletotrichum chlorophyti*同源性最高,从而确认所获得的

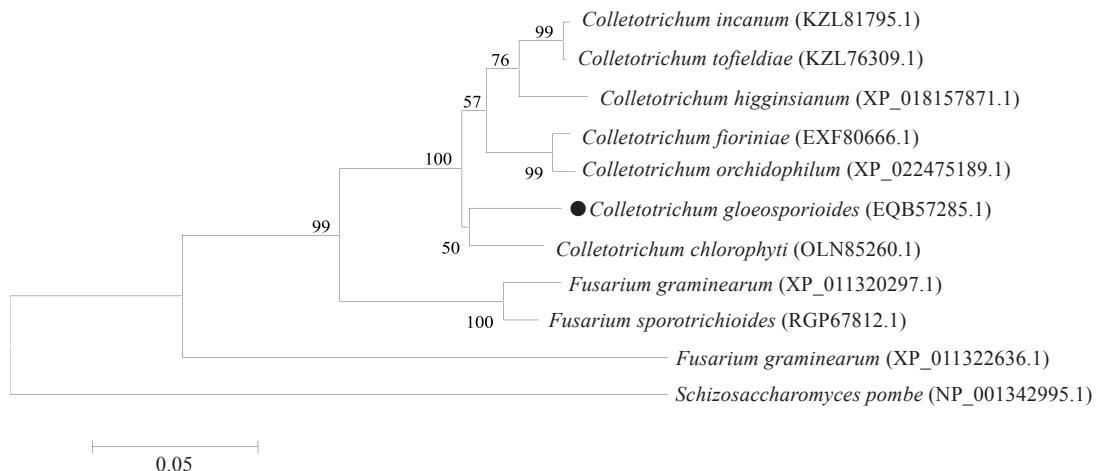


图2 CgCDC2与其他真菌CDC2蛋白的系统进化分析

Fig. 2 Phylogenetic analysis of CgCDC2 with other CDC2 proteins from different fungi

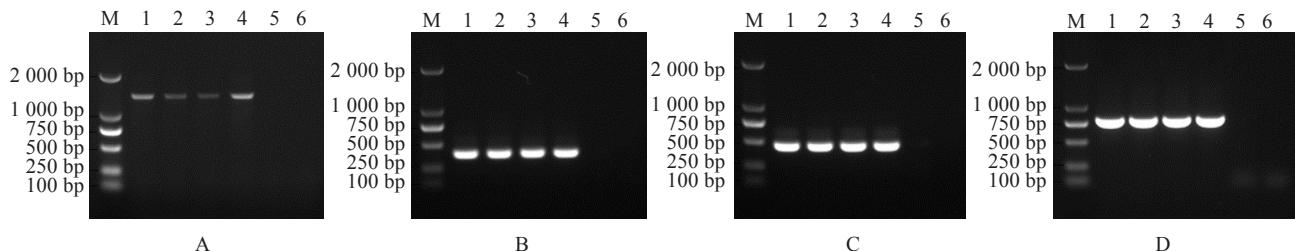
CgCDC2蛋白为*Colletotrichum gloeosporioides* cell division control protein 2。

2.2 CgCDC2沉默突变体的鉴定

为验证RNAi所获得的转化子是否为CgCDC2沉默突变体,设计了4对引物进行了PCR鉴定。电泳结果见图3,结果表明,获得4种大小分别为1 406 bp、405 bp、474 bp和802 bp的单一条带(图3-A;图3-B;图3-C;图3-D),与预期大小一致。PCR产物送

Thermo Fisher公司测序,测序结果正确。

通过实时荧光定量PCR分析突变体菌株与野生型菌株CgCDC2基因的表达差异,结果表明(图4),pSilent-1:CgCDC2-1和pSilent-1:CgCDC2-2菌株CgCDC2基因的表达量均下调,分别为野生型菌株的0.62和0.38倍,说明所获得的pSilent-1:CgCDC2-1和pSilent-1:CgCDC2-2菌株是RNAi突变体,可用于后续试验。



A. 转化子 $Hyg\ B$ 基因的PCR鉴定;B. 转化子正向序列CgCDC2至IT区段的PCR鉴定;C. 转化子IT区段至CgCDC2反向序列的PCR鉴定;D. 转化子跨越IT区段的PCR鉴定;M. DL 2 000 DNA Marker;1. 基因沉默载体pSilent-1:CgCDC2;2~4. 转化子pSilent-1:CgCDC2-1,pSilent-1:CgCDC2-2,pSilent-1:CgCDC2-3;5. 野生型WT;6. 空白对照。

A. PCR identification of $Hyg\ B$ gene; B. PCR identification from forward sequence to IT fragments; C. PCR identification from IT fragments to reverse sequences; D. PCR identification across IT fragments; M. DL 2 000 DNA Marker; 1. Gene silencing vector pSilent-1:CgCDC2; 2~4. Transformant pSilent-1:CgCDC2-1, pSilent-1:CgCDC2-2, pSilent-1:CgCDC2-3; 5. Wild type (WT); 6. Control.

图3 CgCDC2沉默突变体的PCR鉴定

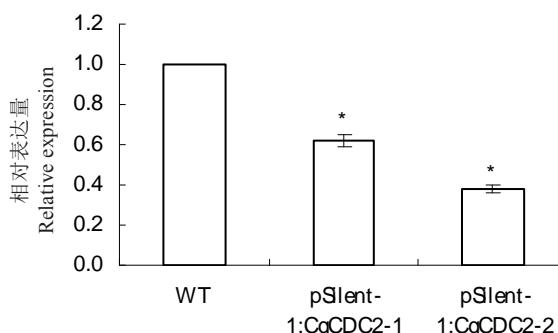
Fig. 3 Identification of CgCDC2 mutants by PCR

2.3 CgCDC2沉默突变体生长特性分析

2.3.1 生长速率分析 将野生型菌株和CgCDC2突变体菌株分别接种于PDA和Czapek培养基上,观察其生长情况,结果显示(图5),2个沉默突变体菌株在PDA和Czapek培养基上的生长速率较野生型均有所下降。

2.3.2 产孢量分析 血球计数板计数结果表明,与

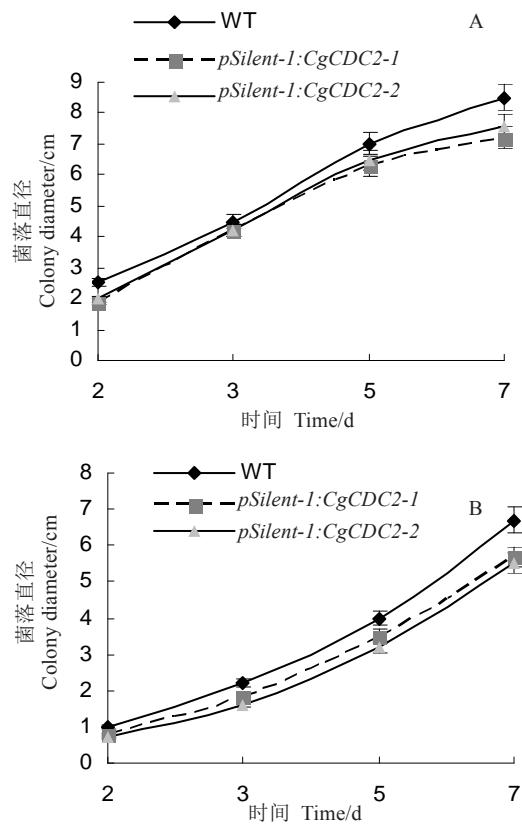
野生型菌株相比,2个突变体菌株pSilent-1:CgCDC2-1和pSilent-1:CgCDC2-2的产孢量显著下降,其中野生型菌株的产孢量平均为 1.6×10^6 个 $\cdot mL^{-1}$,而pSilent-1:CgCDC2-1的产孢量为 2.4×10^5 个 $\cdot mL^{-1}$,pSilent-1:CgCDC2-2的产孢量为 2.0×10^5 个 $\cdot mL^{-1}$,约为野生型产孢量的1/8。



*表示在 0.05 水平上差异显著。

* indicates significant difference between mutants and the wild-type strain at 0.05 level.

图 4 沉默突变体菌株 *CgCDC2* 基因的表达差异
Fig. 4 Differential expression levels of *CgCDC2* gene in mutants



A. PDA 平板上菌落生长速率; B. Czapek 平板上菌落生长速率。

A. Colony growth rate on the PDA plates; B. Colony growth rate on the Czapek plates.

图 5 突变体和野生型菌株的生长速率分析

Fig. 5 Growth rate analysis between mutants and the wild-type strain

2.3.3 胁迫因子敏感性分析 以不加任何胁迫因子的 PDA 平板为对照(图 6), 在含有 $0.7 \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ NaCl 和 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Congo Red 的培养基上, 野生型菌株和突变体菌株的生长均没有受到抑制; 在含有 5

$\text{mmol} \cdot \text{mL}^{-1}$ H_2O_2 的培养基上, 野生型菌株没有受到抑制, 而突变体菌株 pSilent-1:*CgCDC2-1* 和 pSilent-1:*CgCDC2-2* 的生长均受到不同程度的抑制, 其中, pSilent-1:*CgCDC2-1* 的抑制率为 23.4%, pSilent-1:*CgCDC2-2* 的抑制率为 25.2%。以上结果表明 *CgCDC2* 参与调控胶孢炭疽菌的氧化应激反应。

2.4 差异表达蛋白分析

为分析 *CgCDC2* 沉默突变体菌株与野生型菌株在蛋白质水平上的差异, 进行了 TMT 定量蛋白质组学分析。分析结果表明, 突变体菌株 pSilent-1:*CgCDC2-1* 和 pSilent-1:*CgCDC2-2* 与野生型菌株共同鉴定到的蛋白有 5 420 个, 其中 pSilent-1:*CgCDC2-1* vs WT 中, 鉴定出 86 个差异显著蛋白, 其中上调表达 47 个, 下调表达 39 个; pSilent-1:*CgCDC2-2* vs WT 中, 鉴定出 73 个差异显著蛋白, 其中上调表达 37 个, 下调表达 36 个(图 7)。

为进一步研究 *CgCDC2* 突变体菌株与野生型菌株的生物学功能, 对差异蛋白进行了 GO 富集分析, 从生物过程(Biological process)、分子功能(Molecular function)及细胞组分(Cellular Component)三个方面进行分析。结果表明 pSilent-1:*CgCDC2-1* vs WT 中(图 8), 差异蛋白参与的生物过程主要集中在碳水化合物代谢过程(carbohydrate metabolic process)、RNA 聚合酶 III 启动子转录调控(regulation of transcription from RNA polymerase III promoter)、核小体组装(nucleosome assembly)和氨基酸跨膜转运(amino acid transmembrane transport); 分子功能主要集中在裂解酶活性(lipase activity)、底物特异性跨膜转运蛋白活性(substrate-specific transmembrane transporter activity)和细胞组分主要集中在染色质(chromatin)。pSilent-1:*CgCDC2-2* vs WT 中, 差异蛋白参与的生物过程主要集中在芳香族氨基酸代谢过程(aromatic amino acid family metabolic process), 分子功能主要集中在氧化还原酶活性(oxidoreductase activity)、碳硫裂解酶活性(carbon-sulfur lyase activity)和抗氧化活性(antioxidant activity)。

2.5 *CgCDC2* 沉默突变体的 PG、PL 表达分析

选取差异表达蛋白 PG 和 PL, 采取 qRT-PCR 检测 PG、PL 基因的表达水平, 同时采用微量法对 PG、PL 的酶活性进行了测定。qRT-PCR 结果显示(图 9), 与野生型菌株相比, 突变体菌株 pSilent-1:*CgCDC2-1* 和 pSilent-1:*CgCDC2-2* 的 PG、PL 基因表

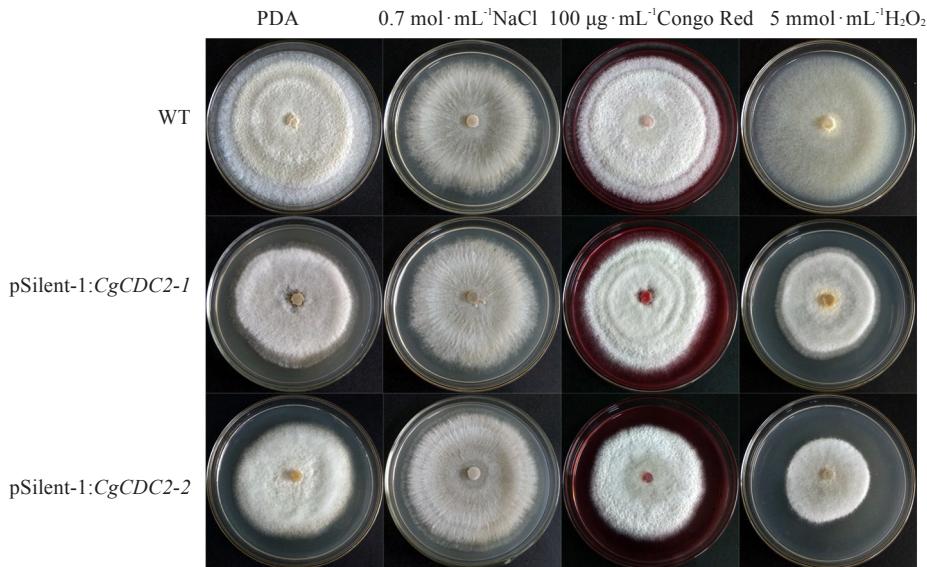


图 6 不同胁迫因子对野生型和突变体菌株的菌落生长影响

Fig. 6 Effects of stress factors on colony growth of the wild-type strain and mutants

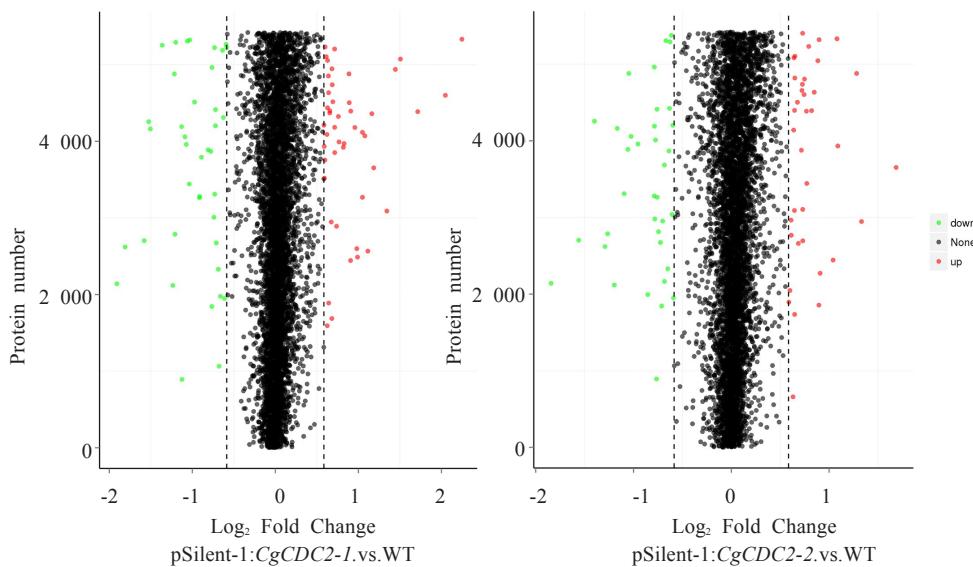


图 7 突变体与野生型菌株之间的差异蛋白火山图

Fig. 7 Differentially expressed protein between mutants and the wild-type strain

达均显著下调;酶活性测定结果表明,突变体菌株的PG、PL的酶活性较野生型均显著降低,这与TMT蛋白定量分析结果变化趋势一致,说明CgCDC2参与调控PG、PL基因的表达量、蛋白质含量和酶活性。

2.6 CgCDC2沉默突变体的致病性

将野生型和沉默突变体菌株接种杧果,观察致病效果。接种5 d后(图10),野生型菌株的病斑直径为1.03 cm,突变体菌株pSilent-1:CgCDC2-1的病斑直径为0.78 cm,pSilent-1:CgCDC2-2的病斑直径为0.79 cm,方差分析表明两个突变体菌株的病斑直

径显著小于野生型菌株,说明CgCDC2影响胶孢炭疽菌的致病力。

3 讨 论

细胞周期蛋白依赖性激酶CDKs普遍存在于真核生物细胞中,属于Ser/Thr激酶家族,是细胞周期调控的重要因子。笔者克隆并鉴定了胶孢炭疽菌CgCDC2基因,通过序列比对发现,CgCDC2基因所编码的蛋白与其他病原真菌的CDC2蛋白具有很高的同源性,说明该蛋白高度保守。夏晓峰等^[16]的研

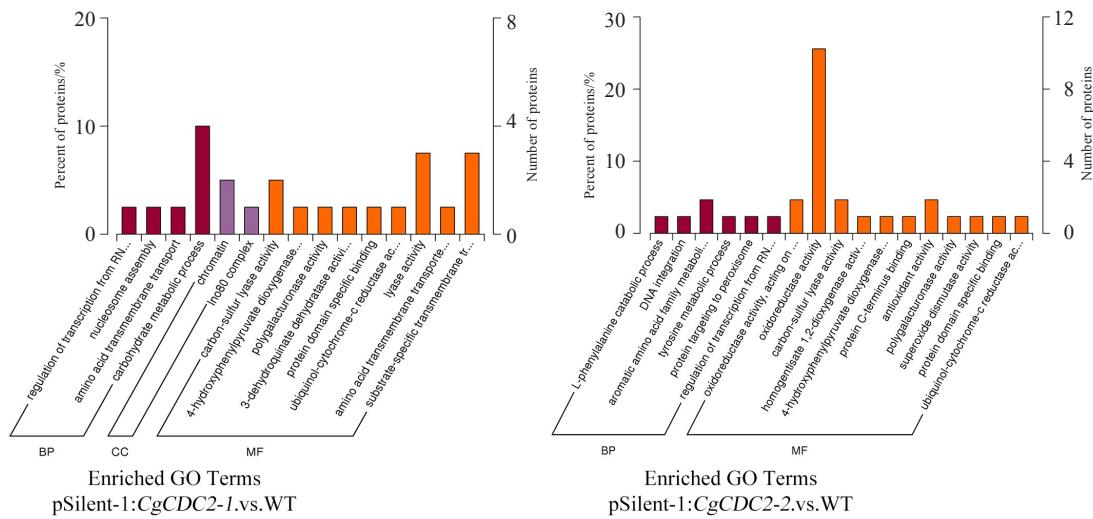
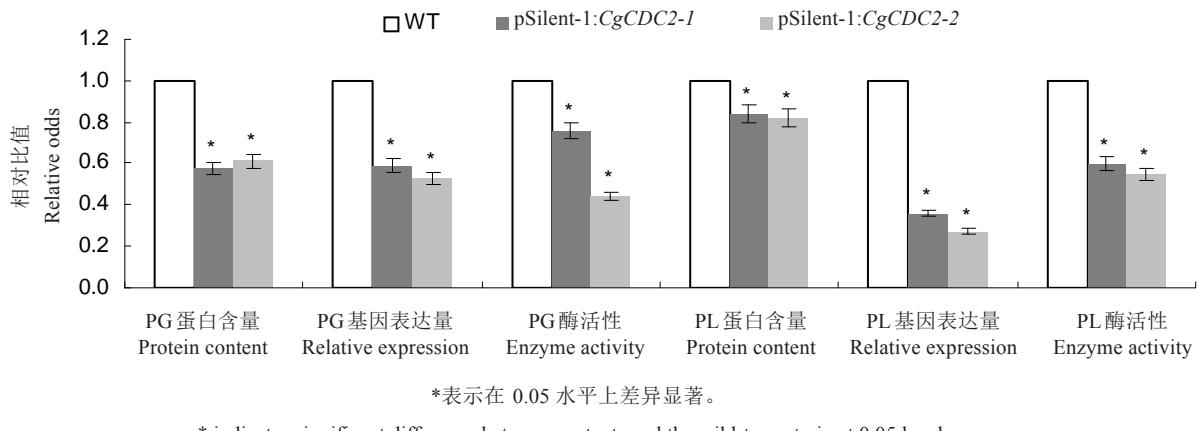


图 8 突变体与野生型菌株之间差异蛋白的 GO 富集分析

Fig. 8 GO enrichment analysis of differentially expressed proteins between mutants and the wild-type strain



* indicates significant difference between mutants and the wild-type strain at 0.05 level.

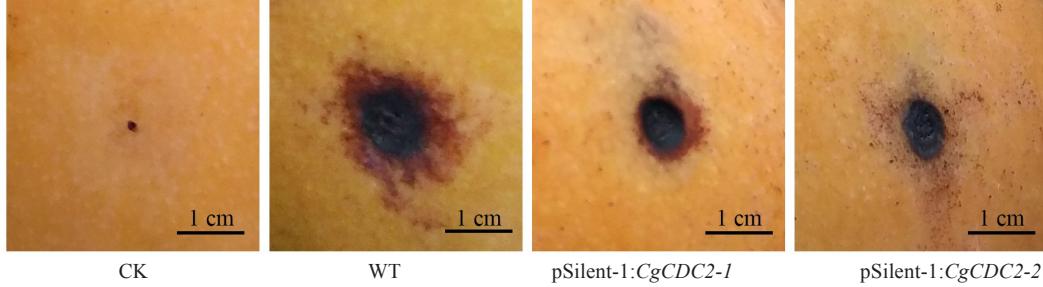
图 9 突变体与野生型菌株 *PG*、*PL* 基因的表达差异Fig. 9 Differential expression levels of *PG*、*PL* gene between mutants and the wild-type strain

图 10 突变体与野生型菌株的致病力试验

Fig. 10 Pathogenicity test of mutants and the wild-type strain on mangos

究表明,CDC2蛋白在各个物种中是非常保守的;代西维等^[17]的研究发现,小麦条锈菌CDC2蛋白高度保守,这与本研究结果相一致。

病原菌入侵时,植物会迅速做出防御反应,活性

氧迸发便是植物对病原菌应答的最早期反应之一,植物会在病原菌入侵的地方产生活性氧(ROS),如超氧化物和H₂O₂,以抵抗病原菌的侵入^[18-19]。而病原菌为了达到侵染的目的,会调节体内的ROS解毒

酶基因产生解毒酶来降解植物表面的ROS^[20]。本研究中沉默突变体菌株对H₂O₂胁迫的敏感性增强,说明CgCDC2基因参与调控胶孢炭疽菌的氧化应激反应,间接影响其致病力。

CDC2可以与周期蛋白结合,形成的cyclin-CDK复合体能够催化底物磷酸化,从而推进细胞周期进程的转变,因而又被称作细胞周期引擎。Minz-Dub等^[21]的研究发现,灰霉菌BcRac/BcCla4通过改变细胞周期蛋白依赖性激酶BcCdk1的磷酸化状态的改变来控制有丝分裂。细胞壁对植物细胞具有支持和保护作用,降解细胞壁的酶如果胶酶、纤维素酶在侵染过程和发病机制中起着重要作用^[22]。在胶孢炭疽菌死体营养阶段,植物细胞壁降解酶如多聚半乳糖醛酸酶(PG)和果胶裂解酶(PL)明显高度表达^[23]。Yakoby等^[24]的研究发现,胶孢炭疽菌果胶裂解酶pelB基因的缺失会引起对鳄梨致病力的下降,这与本研究结果相类似。本研究中沉默突变体菌株的致病力较野生型明显降低,推测这是由于CgCDC2基因的下调使CgCDC2蛋白表达量下降,有丝分裂的进行受到抑制,菌丝生长缓慢,ROS的清除能力下降;同时突变体菌株的PG、PL基因表达下调,PG、PL蛋白表达量下降、酶活性降低,病原菌侵染寄主时对细胞壁的降解能力减弱;两者共同作用最终削弱了病原菌的致病力。

4 结 论

胶孢炭疽菌CgCDC2蛋白高度保守,CgCDC2基因参与调控胶孢炭疽菌的生长,分生孢子产量,氧化应激反应以及PG、PL的酶活性,从而降低病原菌的致病力。

参考文献 References:

- [1] 高燕,林莉萍,丁健.细胞周期调控的研究进展[J].生命科学,2005,17(4):318-322.
GAO Yan, LIN Liping, DING Jian. A review: cell cycle regulation[J]. Chinese Bulletin of Life Sciences, 2005, 17(4):318-322.
- [2] NURSE P, THURIAUX P, NASMYTH K. Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1976, 146 (2):167-178.
- [3] 陈长恒.Cdc2基因与细胞周期调控[J].中国实用医药,2007,2 (13):105-107.
CHEN Changheng. Cdc2 gene and cell cycle regulation[J]. China Practical Medicine, 2007, 2(13):105-107.
- [4] GOULD K L, NURSE P. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis[J]. Nature, 1989, 342(6245):39-45.
- [5] FANG F, NEWPORT J W. Evidence that the G1-S and G2-M transitions are controlled by different cdc2 proteins in higher eukaryotes[J]. Cell, 1991, 66(4):731-742.
- [6] 胡澄,蒋日磊,郭园园,张旭,陈美娟.麦冬皂苷B通过Myt/Cdc2信号通路抑制H460细胞有丝分裂[J].中国药理学通报,2017,33(12):1736-1739.
HU Cheng, JIANG Rilei, GUO Yuanyuan, ZHANG Xu, CHEN Meijuan. Ophiopogonin-B inhibited cell mitosis by Myt/Cdc2 pathway in H460 cells[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2017, 33(12):1736-1739.
- [7] LIU H Q, ZHANG S J, MA J W, DAI Y F, LI C H, LYU X L, WANG C F, XU J R. Two cdc2 kinase genes with distinct functions in vegetative and infectious hyphae in *Fusarium graminearum*[J]. PLoS Pathogens, 2015, 11(6):e1004913.
- [8] 吴曼莉,李晓宇,张楠,徐爽,柳志强.胶孢炭疽菌CgRGS2基因的克隆及生物学功能[J].微生物学报,2017,57(1):66-76.
WU Manli, LI Xiaoyu, ZHANG Nan, XU Shuang, LIU Zhiqiang. Gene cloning and biological function of CgRGS2 in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2017, 57(1):66-76.
- [9] ALKAN N, FRIEDLANDER G, MENT D, PRUSKY D, FLUHR R. Simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* and tomato fruit pathosystem reveals novel fungal pathogenicity and fruit defense strategies[J]. New Phytologist, 2015, 205(2):801-815.
- [10] NAKAYASHIKI H. RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications[J]. Febs Lett, 2005, 579(26):5950-5957.
- [11] NAKAYASHIKI H, HANADA S, NGUYEN B Q, KADOTANI N, TOSA Y, MAYAMA S. RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42(4):275-283.
- [12] 韦运谢.芒果炭疽病菌漆酶基因Lac1的克隆与致病相关功能鉴定[D].海口:海南大学,2014.
WEI Yunxie. Colonizing and functional identification of laccase gene (Lac1) in Pathogenicity from *Colletotrichum gloeosporioides*- the pathogen of mango anthracnose disease[D]. Haikou: Hainan University, 2014.
- [13] 漆艳香,谢艺贤,张欣,张辉强.香蕉枯萎菌基因组DNA提取方法的研究[J].生物技术,2004,14(6):32-34.
QI Yanxiang, XIE Yixian, ZHANG Xin, ZHANG Huiqiang. Study of DNA extraction methods in *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*[J]. Biotechnology, 2004, 14(6):32-34.
- [14] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} Method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [15] 曹方彬.水稻重金属积累的品种与环境效应及调控技术研究

- [D]. 杭州:浙江大学,2014.
- CAO Fangbin. Cultivar and environmental effects and regulation of heavy metal accumulation in rice[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2014.
- [16] 夏晓峰,黄云鹏,江贤章,田宝玉,舒正玉,黄建忠. 裂殖壶菌EST文库 $cdc2$ 基因的筛选与分析[J]. 微生物学杂志,2008,28(3):7-14.
- XIA Xiaofeng, HUANG Yunpeng, JIANG Xianzhang, TIAN Baoyu, SHU Zhengyu, HUANG Jianzhong. Screening and analysis $cdc2$ gene in EST library from *Schizochytrium* sp. FJU-512 [J]. Journal of Microbiology, 2008, 28(3):7-14.
- [17] 代西维,郭军,陈玥颖,段迎辉,夏宁,魏国荣,黄丽丽,康振生. 小麦条锈菌 $PsCdc2$ 基因的克隆及在条锈菌侵染小麦后的转录表达分析[J]. 微生物学报,2010,50(2):174-181.
- DAI Xiwei, GUO Jun, CHEN Yueying, DUAN Yinghui, XIA-Ning, WEI Guorong, HUANG Lili, KANG Zhensheng. Cloning and transcriptional profiling of a cell division cycle gene $PsCdc2$ from stripe rust fungus during incompatible and compatible interaction between wheat and *Puccinia striiformis* f.sp. *tritici*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2010, 50(2):174-181.
- [18] APOSTOL I, HEINSTEIN P F, LOW P S. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells: role in defense and signal transduction[J]. Plant Physiology, 1989, 90(1):109-116.
- [19] 郭玉双,李祥羽,任学良. 植物体内的活性氧(ROS)的产生及其作用研究进展[J]. 黑龙江农业科学,2011(8):146-148.
- GUO Yushuang, LI Xiangyu, REN Xueliang. Metabolism and functions of reactive oxygen species in plants[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2011(8):146-148.
- [20] MOLINA L, KAHMANN R. An *Ustilago maydis* gene involved in H_2O_2 detoxification is required for virulence[J]. The Plant Cell, 2007, 19(7):2293-2309.
- [21] MINZ-DUB A, SHARON A. The *Botrytis cinerea* PAK kinase BcCla4 mediates morphogenesis, growth and cell cycle regulating processes downstream of BcRac[J]. Molecular Microbiology, 2017, 104(3):487-498.
- [22] LEBEDA A, LUHOVÁ L, SEDLÁŘOVÁ M, JANCOVÁ D. The role of enzymes in plant-fungal pathogens interaction[J]. Zeitschrift Für Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz, 2001, 108(1):89-111.
- [23] PERFECT S E, HUGHES H B, O'CONNELL R J, GREEN J R. *Colletotrichum*: A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions[J]. Fungal Genetics and Biology, 1999, 27:186-198.
- [24] YAKOBY N, BENO-MOUALEM D, KEEN N T, DINOOR A, PINES O, PRUSKY D. *Colletotrichum gloeosporioides* pelB is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14(8):988-995.

欢迎订阅 2020 年《北方园艺》

中文核心期刊(1992—2017)

美国化学文摘社(CAS)收录期刊

中国农业核心期刊

2015、2016、2018年期刊数字影响力100强

《北方园艺》是由黑龙江省农业科学院主管,黑龙江省园艺学会、黑龙江省农业科学院主办的园艺类综合性学术期刊。创刊以来,《北方园艺》始终与时代同频,策划新栏目,报道行业热点,不断推出具有创新价值、学术价值和实用价值的科研成果,在全国园艺类核心期刊中排名第三;在新时代背景下,《北方园艺》积极推动传统媒体与新兴媒体的融合发展,探索新型出版模式,设有专属投稿网站和微信公众号,学术传播力不断提升。

为增加文章的可读性和更好的体现研究成果,本刊增加了内文和封二新品种彩版宣传;作者也可将团队试验成果以音视频形式在本刊微信公众号传播,具体事宜联系编辑部。

栏目设置:研究论文、研究简报、设施园艺、园林花卉、资源环境生态、贮藏加工检测、中草药、食用菌、专题综述、产业论坛、农业信息技术、农业经济、农业经纬、实用技术、新品种(彩版封二)。

国际标准刊号:ISSN 1001-0009

半月刊 每月15、30日出版

国内统一刊号:CN 23-1247/S

单价:20.00元

邮发代号:14-150

全年:480.00元

投稿网址:www.haasep.cn

地址:150086 黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路368号《北方园艺》编辑部

电话:0451-86694145

信箱:bfyybjb@vip.163.com

