

孟祥春, 郑肖祎, 黄泽鹏, 等. *CgCDA3* 基因缺失对胶孢炭疽菌生长和侵染致病的影响[J]. 江苏农业学报, 2018, 34( 5 ): 1013-1021.  
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2018.05.007

## *CgCDA3* 基因缺失对胶孢炭疽菌生长和侵染致病的影响

孟祥春<sup>1</sup>, 郑肖祎<sup>1,2</sup>, 黄泽鹏<sup>1</sup>, 王小菁<sup>2</sup>

(1. 广东省农业科学院果树研究所/农业部南亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室, 广东 广州 510640; 2. 华南师范大学生命科学院, 广东 广州 510631)

**摘要:** 为了明确 *CgCDA3* 基因在胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*) 生长及侵染致病过程中的功能, 从 *C. gloeosporioides* 基因组中克隆 *CgCDA3* 基因, 首先进行生物信息学分析, 然后利用基因同源重组的方法获得 *CgCDA3* 基因缺失突变体( $\Delta cda3$ ), 最后分析了  $\Delta cda3$  的孢子萌发、附着胞形成和侵染致病性变化。结果表明, *CgCDA3* 基因 ORF 全长 1 470 bp, 编码含 489 个氨基酸的蛋白质, 其含有一个聚多糖去乙酰化酶保守结构域。*CgCDA3* 蛋白与已知的西瓜炭疽菌(*C. orbiculare*)、禾生炭疽菌(*C. graminicda*) 和睡莲炭疽菌(*C. nymphaeae*) 的 CDA 蛋白同源性较高, 同源性分别为 63%、60% 和 80%。*CgCDA3* 基因缺失突变体同野生型相比, 生长及产孢正常, 但表现为孢子萌发能力下降, 附着胞形成率降低, 同时侵染芒果的致病性也显著减弱。推测 *CgCDA3* 基因参与调控胶孢炭疽菌孢子萌发和附着胞形成等形态生长和建成过程, 从而对其致病性产生一定的影响。

**关键词:** 胶孢炭疽菌; 几丁质脱乙酰酶; 孢子萌发; 附着胞; 突变体; 致病性

**中图分类号:** S436.67 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2018)05-1013-09

## Effects of knocking out *CgCDA3* gene on growth and pathogenesis of *Colletotrichum gloeosporioides*

MENG Xiang-chun<sup>1</sup>, ZHENG Xiao-yi<sup>1,2</sup>, HUANG Ze-peng<sup>1</sup>, WANG Xiao-jing<sup>2</sup>

(1. Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of South Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture, Guangzhou 510640, China; 2. College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

**Abstract:** In order to know functions of *CgCDA3* in *Colletotrichum gloeosporioides* development, inoculation and pathogenesis, chitin deacetylase gene *CgCDA3* was firstly in silico cloned and analyzed by bioinformatics methods. Then *CgCDA3* gene deficient strains ( $\Delta cda3$ ) in which *CgCDA3* gene was disrupted were obtained through homologous recombination way. Finally, spore germination, appressoria formation and pathogenicity of the  $\Delta cda3$  strains were evaluated compared with the wild type. Results showed that the complete gene contained an open reading frame of 1 470 nucleotides which encoded a sequence of 489 amino acid residues. The gene sequence consisted of nucleotides encoding a conserved polysac-

charide deacetylase function domain. The deduced amino acid sequence of the mature enzyme revealed 63%, 60% and 80% similarity with a chitin deacetylase from *C. orbiculare*, *C. graminicda* and *C. nymphaeae* respectively. Null mutants of *CgCDA3* gene were stable and showed patterns similar to the wild-type with respect to growth rate and

收稿日期: 2018-01-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31301824); 广东省农业厅项目(2017LM4161)

作者简介: 孟祥春(1976-), 女, 安徽萧县人, 博士, 副研究员, 主要从事果实采后生物学及贮运保鲜技术研究。(Tel) 020-38694961; (E-mail) gerbera\_mxc@126.com

sporulation, but decreased efficiency of spore germination and appressoria formation decreased, which was accompanied with weakened pathogenicity on mango fruit. Speculation from this research is *CgCDA3* gene involved in regulating spore germination and appressoria formation of *C. gloeosporioides*, which is partly the reason of the decreased pathogenicity of *CgCDA3* gene deficient mutant.

**Key words:** *Colletotrichum gloeosporioides*; chitin deacetylase; spore germination; appressoria; mutant; pathogenicity

芒果 (*Mangifera indica* L.) 是世界著名的热带水果之一,深受消费者和果农的喜爱,也是中国主要栽培水果之一。胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 是世界性的、广谱的、潜伏性侵染芒果的常发性病原菌之一<sup>[1-2]</sup>,主要危害嫩叶、新梢、花及果实,尤其是引起贮运期的果实腐烂,降低果实的品质和外观质量,造成采后重大损失。由于胶孢炭疽菌的寄主范围广泛,侵染策略多样,目前还没有安全有效的防治策略<sup>[3-5]</sup>。挖掘该菌在侵染致病过程中的功能基因,并了解其在胶孢炭疽菌与寄主互作过程中的机制,对于有效防治胶孢炭疽病菌引起的采后病害具有重要的理论和实践意义。这也是植物病原真菌研究的热点领域之一<sup>[6]</sup>。

几丁质脱乙酰酶 (*CDA*) 是一种糖蛋白,可催化植物病原真菌细胞壁几丁质分子脱去乙酰基生成壳聚糖。目前,已从多种真菌中分离纯化获得 *CDA* 蛋白,也已从鲁氏毛霉 (*Mucor rouxii*)、菜豆炭疽菌 (*Colletotrichum lindemuthianum*)、布克须霉 (*Phycomyces blakesleeanus*)、裂褶菌 (*Schizophyllum commune*)、麦类白粉病菌 (*Blumeria graminis*) 及酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 等微生物中克隆得到 *CDA* 基因<sup>[7-8]</sup>。已有研究结果证明 *CDA* 基因在病原真菌生长发育及侵染致病过程中有多种功能。例如鲁氏毛霉 (*M. rouxii*) 和蓝色犁头霉 (*A. coerulea*) 的 *CDA* 参与细胞壁壳聚糖的合成,酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 的 *CDA* 可维持子囊孢子细胞壁的硬度<sup>[9]</sup>,*cda1* 基因缺失的裂褶酵母 (*S. pombe*) 产孢及孢子形态异常<sup>[10]</sup>。菜豆炭疽菌 (*C. lindemuthianum*)、黄瓜炭疽菌 (*C. langenarium*) 和构巢曲霉 (*A. nidulans*) 的 *CDA* 参与其对植物的侵染致病过程<sup>[8,11-12]</sup>。

在植物和病原菌的互作过程中,致病力大小由病原菌自身产生的致病因子和寄主植物的抗性两方面的因素决定<sup>[13-14]</sup>。有研究结果显示,高乙酰化程度的几丁寡糖和寡肽同乙酰化程度低的复合物相

比,可有效增加植物对病原真菌的抗性<sup>[15]</sup>。Siegrist 等<sup>[16]</sup>和李春娟等<sup>[17]</sup>研究认为,病原菌产生 *CDA* 降解自身细胞壁几丁质产生多糖聚合物,多糖聚合物可逃避植物的几丁质酶对病原菌细胞壁的水解,同时脱乙酰化产物壳聚糖可能起抗性反应激发子的功能,抑制植物体致病因子激发的免疫反应,从而促进定殖。这一相互作用在黄瓜炭疽菌 (*C. langenarium*) 中首次被证实。虽然认为病原真菌的 *CDA* 决定了其对宿主的致病性,但至今无更多可靠证据证明几丁质的乙酰化程度对植物抗性和病原菌致病力的重要性<sup>[18]</sup>。另外,根瘤菌 *nodB* 蛋白和多数真菌的 *CDA* 都具有一个典型的多糖脱乙酰酶结构域<sup>[19-21]</sup>,因此也推测真菌的 *CDA* 基因在功能上与 *NodB* 类似,参与几丁质酶激发的防御反应。目前关于芒果胶孢炭疽菌 *CDA* 基因的生物学功能知之甚少。Alkan 等发现 *C. gloeosporioides* 存在 3 个 *CDA* 相似基因,*CDA1* 基因的缺失对菌株的致病性没有显著影响<sup>[22]</sup>。本研究对其中的 *CgCDA3* 基因进行生物信息学分析,并通过基因敲除策略研究基因缺失对 *C. gloeosporioides* 生长及侵染致病力的影响,为明确 *CDA* 基因在炭疽病菌致病过程中的功能提供更多的实验证据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 菌株和果实 野生型 *C. gloeosporioides* 菌株为从芒果果实上分离的具有强致病性的单孢培养物,*CgCDA3* 基因缺失突变株的构建由本实验室完成。用于胶孢炭疽病菌接种及致病力分析的芒果果实材料为广东、海南等地的栽培种象牙芒。

1.1.2 培养基及缓冲液 ①  $M_3S$  培养基:  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.5 g/L、 $KH_2PO_4$  2.7 g/L、胰化蛋白胨 1.0 g/L、酵母提取物 1.0 g/L、蔗糖 10.0 g/L、氯霉素 250.0 mg/L、琼脂粉 20.0 g/L。② 诱导培养基:  $K_2HPO_4$  4.0 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  2.0

g/L、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.3 g/L、 $\text{FeCl}_3$  10.0 mg/L、葡萄糖 50.0 mmol/L, pH4.0 或者 pH7.0。③再生(REG)培养基:甘露醇 145.7 g/L、酵母提取物 4.0 g/L、可溶性淀粉 1.0 g/L(固体培养基添加琼脂粉 16.0 g/L)。④豌豆汁培养基:取 1 L 的大烧杯,加入从超市购买的冷冻豌豆至 400 ml 处左右,加蒸馏水至 500 ml,高压灭菌使豆子软化,待冷却后将豌豆捣碎,用 Microcloth 过滤,过滤后约得到 250 ml 豌豆汁,分装至 50 ml 离心管,13 000 r/min 离心 20 min 后取上清液,再次灭菌,备用。⑤电击缓冲液(pH7.5):甘露醇 9.109 g/L、羟乙基哌嗪乙硫磺酸(HEPES)0.238 g/L。

1.1.3 抗生素及主要试剂 潮霉素 B (Hyg B) 购自 Roche Diagnostics 公司,基因组 DNA 提取试剂盒、Prime Script™ RT reagent Kit (Perfect Real Time) 反转录试剂盒、限制性内切酶 (*Not* I) 及 PCR 相关试剂购自 TaKaRa 公司, RNA 提取试剂盒购自北京天恩泽公司, DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 TIANGEN 公司。引物的合成与测序工作均由上海生工生物工程有限公司完成。含有潮霉素 (HYG) 抗性基因的中间入门载体 (Entry clone) 由以色列农业研究组织凡卡尼研究中心 DOV PROSKY 实验室提供。培养基及缓冲液中的常规试剂均为分析纯。

## 1.2 试验方法

1.2.1 *C. gloeosporioides* 的培养及继代方法 用  $\text{M}_3\text{S}$  培养基进行各菌株的常规继代培养和保存。菌丝的离体初培养:将  $1 \times 10^6$  CFU/ml 的各菌株孢子接种于 40 ml 液体  $\text{M}_3\text{S}$  培养基中,在 26~28 °C 条件下 150 r/min 振荡培养 3 d。进行诱导培养时,将初培养 3 d 的菌丝体清洗过滤后转移至 40 ml 诱导培养基中,然后在同样条件下进行振荡培养。以上操作均在超净台中进行。收集各菌丝样品置液氮中速冻保存备用。

1.2.2 *C. gloeosporioides* 在离体致病过程中 *CgCDA3* 的表达检测 将离体培养 3 d 的胶孢炭疽菌的菌丝,诱导培养 2 d 的孢子及玻璃平板孵育 8 h 和 12 h 的萌发态孢子和附着胞 4 个时期的材料,液氮速冻,按照柱式真菌 RNAout 试剂盒使用说明提取 RNA。采用 Bio-RadiCycler CFX96Touch Deepwell 仪和 SYBR Premix *Ex Taq* 试剂盒,按照说明书进行荧光定量 PCR 试验,比较分析 *C. gloeosporioides* 在离体

培养的 4 个时期 *CgCDA3* 基因的表达量,以 *18S rRNA* 为内参对照。

### 1.2.3 *C. gloeosporioides* 的果实接种及致病力检测

挑选果形、果实大小和成熟度一致的芒果果实,自来水清洗并进行果实表面浸泡消毒处理,晾干备用。在果实表面创伤深 2~3 mm、直径 10 mm 的伤口,将菌株孢子液稀释至  $1 \times 10^6$  CFU/ml,取 10  $\mu\text{l}$  滴加在伤口上。然后置于室温 (22±3) °C、相对湿度 (RH) 90% 的环境下,定期观察发病情况,测量芒果果实的病斑直径。每个处理的果实数为 8 个,试验重复 3 次。在分析 *CgCDA3* 基因在 *C. gloeosporioides* 活体侵染过程中的表达量时,以接种伤口为中心,取直径 40 mm 大小的芒果果皮组织,液氮速冻后保存。取样时间分别为:接种病原菌后 22 h、48 h、3 d、5 d、6 d。CTAB 法提取 RNA,按照反转录试剂盒和 SYBR Premix *Ex Taq* 试剂盒说明书进行荧光定量 PCR 试验,以芒果 *Actin* 为内参对照。

### 1.2.4 孢子萌发及附着胞形成的检测和统计方法

菌株在  $\text{M}_3\text{S}$  液体培养基中 150 r/min、28 °C 培养 3 d,抽真空过滤后转移到诱导培养基中再培养 2 d,4 层纱布过滤收集孢子,离心后用灭菌水洗涤定容,用血球计数板在显微镜下对孢子计数。将孢子浓度稀释至  $1 \times 10^5$  CFU/ml,滴加 10  $\mu\text{l}$  孢子液于干净的载玻片上,28 °C 黑暗高湿条件下诱导其萌发,培养 8 h 和 12 h 后显微镜下分别观察统计孢子萌发率和附着胞形成率,试验重复 3 次。

### 1.2.5 *C. gloeosporioides* 的 *CgCDA3* 基因敲除策略

*CgCDA3* 基因的敲除策略见图 1。以胶孢炭疽菌基因组 DNA 为模板,首先利用引物对 1 和 2、3 和 4 (表 1) 分别扩增 *CgCDA3* 基因的 5'端和 3'端侧翼序列。将获得的 5'端和 3'端侧翼序列分别进行凝胶回收纯化,分别依次通过 BP 反应连接到载体 pDONR™P4-P1r 和 pDONR™P2r-P3,形成 5'端和 3'端的 Entry clone。通过抗生素筛选、PCR 鉴定及序列测定后挑选阳性的 5'端和 3'端的 Entry clone,提取 5'端和 3'端阳性及含 HYG 抗性基因的 Entry clone 质粒 DNA,然后将其与 pDEST™R4-R3 载体通过 LR 反应生成用于转化的重组质粒。采用抗生素、PCR 鉴定及序列测定筛选正确的重组质粒。最后获得的重组质粒经扩大培养、质粒抽提和纯化后用 *Not* I 酶切回收线性重组质粒,用于野生型 *C. gloeosporioides* 的电击转化。

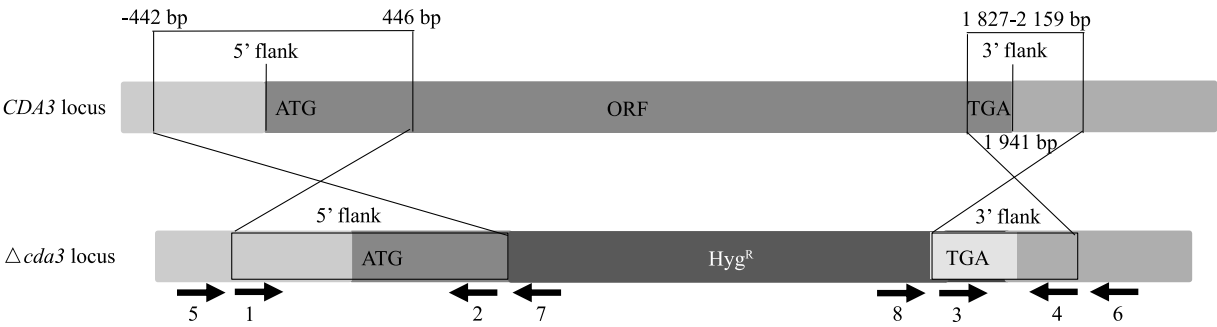


图 1 胶孢炭疽菌 *CgCDA3* 基因敲除策略示意图  
Fig.1 Schematic representation of the strategy used to knockout *CgCDA3* gene from *Colletotrichum gloeosporioides*

表 1 *CgCDA3* 基因敲除及突变株 PCR 检测所用引物  
Table 1 Primer used in *CgCDA3* gene knocking out and mutants PCR detection

序号	引物名称	引物序列(5'→3')
1	attB4- <i>CgCDA3</i> -5F	GGGGACAACCTTTGTATAGAAAAGTTGGCGGCCGCGAGACACTGTGACACGGAGGT
2	attB1r- <i>CgCDA3</i> -5R	GGGGACTGCTTTTGTACAAACTTGTGTCTGGGAGTGTCTGTGCC
3	attB2r- <i>CgCDA3</i> -3F	GGGGACAGCTTCTTGTACAAAGTGGACGCTCATCACTAACATCAAAATAG
4	attB3- <i>CgCDA3</i> -3R	GGGGACAACCTTTGTATAATAAAGTTGGCGGCCGCTTTTCAGGTCACATTTACAGT
5	<i>CgCDA3</i> -212Fctrl	GCCCATGCAGCGAGACACT
6	<i>CgCDA3</i> -212Rctrl	CTCATGTGTGCTTTTCGTCTGA
7	HygR	GCCTGGACGACTAAACCAAA
8	HygF	TCAACCTACTACTGGGCTGC

1.2.6 *C.gloeosporioides* 感受态的制备及电击转化  
参考 Robinson 等<sup>[23]</sup> 的方法制备电击感受态 *C.gloeosporioides*。首先收集在 M<sub>3</sub>S 固体平板上生长 14 d 的野生型孢子,然后加入到碗豆汁培养基中,28 ℃ 下 200 r/min 预培养 2.5~3.0 h。预培养后的孢子用预冷的电击缓冲液洗涤 3 次,再用电击缓冲液浓缩至 100 μl。电击时将电击缓冲液中的 100 μl 孢子转入电击杯中,立即加入 1 μg 经 *Not* I 酶切后的线性重组质粒,然后在电击仪(Gene Pulser Xcell)上立即进行电击转化。电击条件为电压 1.4 kV,电容 25 μF,电阻 800 Ω,时间常数(Time constant) 16~18 ms。电击后立即加入 1/20 体积的预冷碗豆汁培养基,混匀后涂布至含 100 μg/ml 潮霉素 B 的 REG 固体筛选平板上,室温培养 3~4 d 后进行抗性突变体的筛选、纯化和鉴定。

1.2.7 抗性突变体的筛选鉴定 将在筛选平板上生长出的单菌落(候选阳性基因缺失突变株)分别转至含 100 μg/ml 潮霉素 B 的 M<sub>3</sub>S 固体培

养基上,待菌圈扩展至足够大时,分别提取各候选株的菌丝基因组 DNA。以各候选株的基因组 DNA 为模板,采用表 1 中的引物对 1 和 2、5 和 7 分别扩增 5'端侧翼序列及其两端各约 100 bp 的片段,采用引物对 3 和 4、6 和 8 分别扩增 3'端侧翼序列及其两端各约 100 bp 的片段。能同时扩增出与 5'和 3'端目的片段大小一致的条带,且经序列测定后与目的片段序列一致的菌株即为 *CgCDA3* 基因缺失突变株。一次电击转化可获得多个正确的相应基因缺失突变株,本研究随机选取其中 2 个(Δ*CgCDA3*-2 和 Δ*CgCDA3*-3)进行后续相关试验。

1.2.8 数据统计与分析 数据用 SPSS 13.0 和 Excel 进行处理和分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 *CgCDA3* 基因的序列分析及同源比对

根据转录组测序得到的 *CgCDA3* 基因片段序



列,利用同源检索、聚类、序列延伸等方法从 *C. gloeosporioides* 基因组中获得 *CgCDA3* 基因全长(结果未显示)。进一步对序列进行生物信息学分析,结果显示, *CgCDA3* 基因含有完整的开放阅读框(ORF), ORF 全长1 470 bp,预测编码含 489 个氨基酸的蛋白质,位于基因组 Contig 00117。预测蛋白质的结构域分析结果显示,该蛋白质 N 端含有 CE4\_SF/CICDA 结构域,存在于第 289~440 位氨基酸处(图 2),占整个蛋白质序列的 30% 以上。这是菜豆炭疽菌 (*Colletotrichum lindemuthianum*) 几丁质脱乙

酰酶具有的典型结构,具有催化活性,与苜蓿根瘤菌 (*S. meliloti*) 的 NodB 结构域同源,属于 Carbohydrate esterase 4 (CE4) 超级家族成员。

将该基因编码的氨基酸序列提交 NCBI 进行 BLASTP 同源比对,结果表明该 *CgCDA3* 蛋白质与已发表的西瓜炭疽菌 *C. orbiculare* (ENH86782)、禾生炭疽菌 *C. graminicola* (XP-008096791.1) 和睡莲炭疽菌 *C. nymphaeae* (KXH27886.1) 的乙酰几丁质蛋白质同源性较高,同源性分别为 63%、60% 和 80% (图 3)。

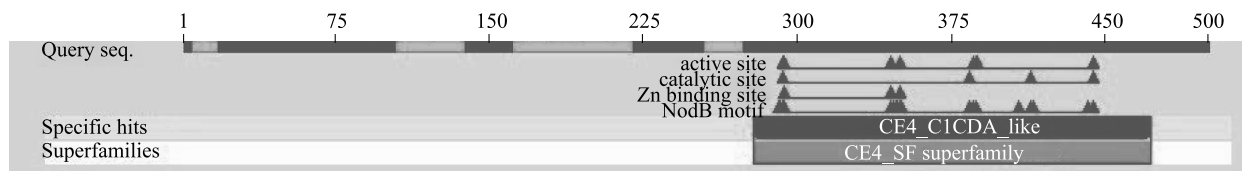


图 2 *CgCDA3* 基因编码的蛋白质保守结构域

Fig.2 Conserved polysaccharide deacetylase domain of protein encoded by *CgCDA3* gene

EQB59400/ <i>CgCDA3</i>	.....EQBNH.....YKTVAAATLLVAGATASFFRRQTSNETFCEEDAPETQF..TTSVHFSAFFPVNTTVPGVPSRPGT..ENFGS	74
ENH86782	CLLETTRICHUMRBICULAREMAFFENHMLKTVAATLLVAGAAAPYRRAPNPNSNETTCDEDLPESTQTSIHYF..PFPVNTTVPGVPSTPG..SDSPA.	96
XP-008096791.1	CLLETTRICHUMGRAM...INICLAMXPMHFKTVASLLVAGAVATFRRQTSNETFCDEGLVPAESTTKLHF..PYPVNTTVPGVPSNPG..SSYPG.	93
KXH27886.1	CLLETTRICHUMN.....YMBHAEAES..ENB..	27
EQB59400/ <i>CgCDA3</i>	YPGKPVNPGNETPSYPVPTNAGETPSSPSKASSGGY..SNTGYSGSGSGSGSGNSGNGTSPKGGDYPVKNDTPSKGNASPSYEQPSAPGVST..EST	174
ENH86782	YPGKPTGPGDNSAYPVKPVNPGGETPAHPG....KPSNPGGETPAQSGKPSNPGKPSNPGGETPAQSGKPSNPGKPSNPGGETPYNPGKPSNPGGETPYN	192
XP-008096791.1	SASKPGN.....GGSPGSGSGSKPGHGSSEVPGPNTESDHSSTDNFSGSRPGSGSN.....SGSKPSK	154
KXH27886.1	.ANKKX.....HSYPGGG.....KPGSG.....GSWS.	49
EQB59400/ <i>CgCDA3</i>	PGGTGNTPFYPSY..SYPGKPSNPGNGGNNVPSYPSKAAEAASS.....	217
ENH86782	PGKPSNP..GGETPYNPGKPSNP...GGETPSHPKPSKGDSEYKPSQAATPENPGKGNYNPAHPGKPSPAASHPATNPGGEKPSYEPKPSPSVPS	287
XP-008096791.1	DSSGSDA..SAPLPSNPAQPPSA...GGNVPSYPPKPAAG.....	189
KXH27886.1	.....AAPSAAASAP.....AGNVPSYPPKPPAG.....	73
EQB59400/ <i>CgCDA3</i>	.....ABYIPPEMNTSTPS..VAPSFTTVPGVALPTPIAAS..ATLEVASNNASAPIPS.....TAPATTIPY	277
ENH86782	NPGGDSFVPGNPSYPGKPSVPGASSHPYIPVFLNTSVFS..VAPSFTTVPGALPTPIAIPVSTTIPSGNNGTASVPAPS.....STAPATTIPY	376
XP-008096791.1	.....SSYVPPELNTTVPPTAPAPSFTTIPGVALPTPIAIPSTTIPVSSNNTATTVSSS.....SAASSATAPATTIPY	259
KXH27886.1	.....SSYIPPEMNTSTIPT..VAPSFTTVPGVALPTPIAIPVSTTIPAGNNDTIPASTSSASGSASATAPATTIPY	145
EQB59400/ <i>CgCDA3</i>	GVAITRKTVEGDFALTDDGPFYTYTHVLDLLAEAGAKATFFVNGENFGNINNEQDVVKRMADGHQIGSHTSHEDLATLGADADIPEMTTLEDALINI	377
ENH86782	GVAITRKTVEGDFALTDDGPFYTYTHVLDLLAEAGAKATFFVNGENFGNINNEQDVVKRMADGHQIGSHTSHEDLATLGADADIPEMTTLEDALINI	476
XP-008096791.1	GVAISSCTLEGDFALTDDGPFYTYTHVLDLLAEAGAKATFFVNGENFGNINNEQDVVKRMADGHQIGSHTSHEDLATLGADADIPEMTTLEDALINI	359
KXH27886.1	GVAITRKTVEGDFALTDDGPFYTYTHVLDLLAEAGAKATFFVNGENFGNINNEQDVVKRMADGHQIGSHTSHEDLATLGADADIPEMTTLEDALINI	245
EQB59400/ <i>CgCDA3</i>	IGKYPTMYMRPFFSWNDNTLSILKALEYHVIHADVDSLDYANNAPLGNLTSVGIFEECKKGGISALAHVVS..AISRLSSTLITNIK.....	463
ENH86782	VGKYPTMYMRPFFSWNDNTLSILKALEYHVIHADVDSLDYANNAPLGNLTSVGIFEECVNAGGSIALAHVHONTAEYLVPEFLRVIKKGLRAVPVGE	576
XP-008096791.1	VGKYPTMYMRPFFSWNDNTLSILKALEYHVIHADVDSLDYANNAPLGNLTSVGIFEECVNAGGSIALAHVHONTAEYLVPEFLRVIKKGLRAVPVGE	459
KXH27886.1	IGKYPTMYMRPFFSWNDNTLSILKALEYHVIHADVDSLDYANNAPLGNLTSVGIFEECVNAGGSIALAHVHONTAEYLVPEFLRVIKKGLNAVPVGE	345
EQB59400/ <i>CgCDA3</i>	gkyptymrpp fswndntlsilkaleyhvihad dslldyann aplgnltsvgifeg ggsialah v l ik	
EQB59400/ <i>CgCDA3</i>	IGSP.....EHRVPCPRVPHHQGEQPERRRR.....	492
ENH86782	LGDPEANWYKTRTSTPTATASRVVVSITSTATPTGVIGPDGACGGSEGYVCEAGFCCSEYGFCCASQSYCGTGCCQPLFGVCAAPAAPSPSGGSATT	676
XP-008096791.1	LGDPEANWYKTRTSTPTATASKITVSIITSTATPTGVIGPDGACGGSEGYVCEAGACCSEYGYCGYSQAYCAAGCQPLFGVCGV..AGFVASGGSAT	555
KXH27886.1	LGDPEANWYKTRTSTPTATASKIVVSIITSTATPTGVIGPDGACGGSNVYVCEAGACCSEYGYCGTSQAYCGTGCCQPLFGVCGV..AGFVASGGDAT	440

EQB59400/*CgCDA3* 为 *C. gloeosporioides* *CDA3* 基因编码的蛋白质, ENH86782、XP-008096791.1 和 KXH27886.1 分别为西瓜炭疽菌 (*C. orbiculare*)、禾生炭疽菌 (*C. graminicola*) 和睡莲炭疽菌 (*C. nymphaeae*) 的乙酰几丁质酶在 GenBank 中的序列号。

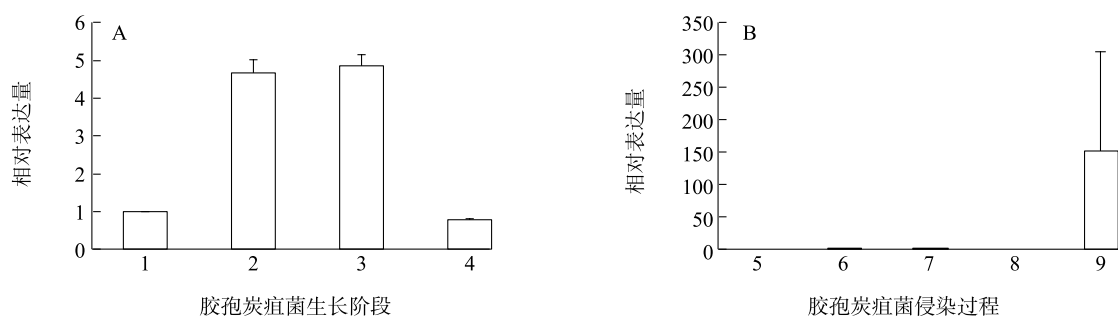
图 3 *CgCDA3* 基因编码的氨基酸序列及与其他炭疽病菌 *CDA* 基因编码的氨基酸序列的同源性比对

Fig.3 The amino acid sequence encoded by *CgCDA3* gene and its homologous comparison to the amino acid sequence encoded by other *CDA* genes from different anthracnose pathogen

## 2.2 *CgCDA3* 基因在 *C. gloeosporioides* 离体生长及活体侵染过程中的表达

对 *C. gloeosporioides* 孢子 (Spore)、萌发期孢子 (G-spore)、附着胞 (Appressorium)、菌丝 (Smycelium) 各时期离体条件下 *CgCDA3* 基因的表达量进行 qRT-PCR 定量分析, 结果 (图 4) 显示, *CgCDA3* 基因在胶孢炭疽菌离体生长的不同时期都有不同水平的表达, 在萌发期的孢子及附着胞中的相对表达量分

别为 4.67 和 4.85, 表达量最高, 而在孢子和菌丝中的相对表达量分别为 1.00 和 0.78, 显著降低。在 *C. gloeosporioides* 侵染芒果的致病过程中, 仅在侵染致病期已感病的果皮和病斑的混合组织中检测到 *CgCDA3* 基因的高水平表达, 而在接种后至感病前的各个阶段 *CgCDA3* 基因的表达水平几乎为 0 (图 4)。说明 *CgCDA3* 基因表达与后期的致病力密切相关。



1: 孢子; 2: 萌发期孢子; 3: 附着胞; 4: 菌丝; 5: 创伤接种后 22 h; 6: 创伤接种后 48 h; 7: 从潜伏侵染到死体营养型转换期; 8: 死体营养型晚期; 9: 侵染果实致病期。

图 4 *CgCDA3* 基因在胶孢炭疽菌离体生长 (A) 和侵染芒果致病过程 (B) 中的表达变化

Fig.4 The expression of *CgCDA3* gene in *C. gloeosporioides* in vitro growing periods (A) and inoculating stages on mango fruit (B)

## 2.3 胶孢炭疽菌 *CgCDA3* 基因敲除缺失突变体

要证明 *CgCDA3* 基因在 *C. gloeosporioides* 离体生长及侵染果实致病过程中的作用, 获得其基因缺失突变体是最直接的证据。因此, 我们通过基因敲除策略, 用潮霉素 B 抗性基因替换 *CgCDA3* 基因 ORF 获得 2 个基因缺失突变菌株, 分别为  $\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$ 。以各菌株的基因组 DNA 为模板, 用引物对 6、8 和引物对 5、7 分别从潮霉素 B 抗性基因序列两端扩增 3' 端和 5' 端侧翼序列, 结果 (图 5) 显示, 在野生型菌株及纯水对照中没有扩增产物, 而在 *CgCDA3* 基因缺失突变菌株  $\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$  中, 3' 端和 5' 端分别扩增出大于 500 bp 和 1 000 bp 的片段; 同时用引物对 3、4 和引物对 1、2 也分别从  $\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$  中扩增出了 3' 端和 5' 端的相应插入基因片段, 而野生型菌株中没有相应扩增产物。对扩增的 3' 端和 5' 端片段产物的测序结果显示, 其与设计敲除 *CgCDA3* 基因时采用的同源重组片段序列完全一致。另外, 与野生型相比较, 缺失突变菌株  $\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$  中 *CgCDA3* 基因的表达量几乎为 0 (图 5)。PCR 扩增测序及基因表达检测结果证明  $\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$  两个菌株中的 *CgCDA3* 基因被潮霉素 B 抗性基因取代, 为 *CgCDA3* 基因缺失突

变菌株。

## 2.4 *CgCDA3* 基因缺失突变体在培养基上的菌圈生长变化

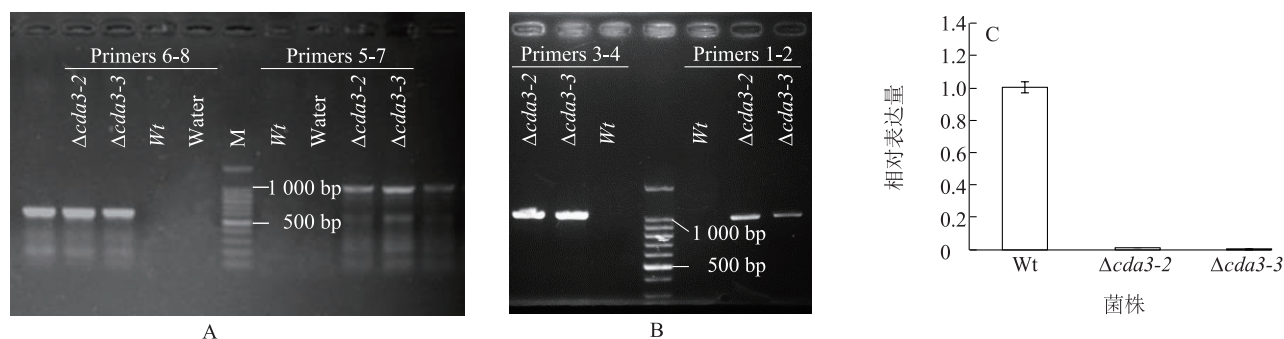
图 6 显示 *CgCDA3* 基因缺失突变菌株  $\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$  在添加 150  $\mu\text{g/ml}$  潮霉素 B 的  $M_3S$  培养基上, 菌圈可正常生长扩展, 一定时间后产生分生孢子, 而野生型 *C. gloeosporioides* 菌圈扩展至直径 3 cm 左右时即停止生长, 产孢过程也被抑制, 表明突变株具有潮霉素 B 的抗性。在不含潮霉素的  $M_3S$  培养基上, *CgCDA3* 基因缺失突变菌株  $\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$  的生长速率与野生型无差异, 菌圈可正常生长扩展。说明潮霉素 B 抗性基因取代 *CgCDA3* 基因造成的缺失对 *C. gloeosporioides* 的离体生长、菌圈扩展和产孢过程没有明显影响。

## 2.5 *CgCDA3* 基因缺失突变体的孢子萌发与附着胞形成变化

离体条件下培养 *C. gloeosporioides* 获得的孢子在 28  $^{\circ}\text{C}$  孵育 8 h 和 12 h 分别观察孢子萌发和附着胞形成情况。结果 (图 7) 显示, 野生型的孢子萌发率为 85.9%, *CgCDA3* 基因缺失突变菌株  $\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$  的孢子萌发率分别为 59.6% 和 63.4%, 与野生型相比较分别下降了 26.3 个百分点和 22.5

个百分点;野生型 *C. gloeosporioides* 萌发的孢子分化形成附着胞的比率为 73.38%, 而 *CgCDA3* 基因缺失突变菌株  $\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$  的附着胞形成率明显下降, 分别下降至 50.51% 和 51.53%。与野生型

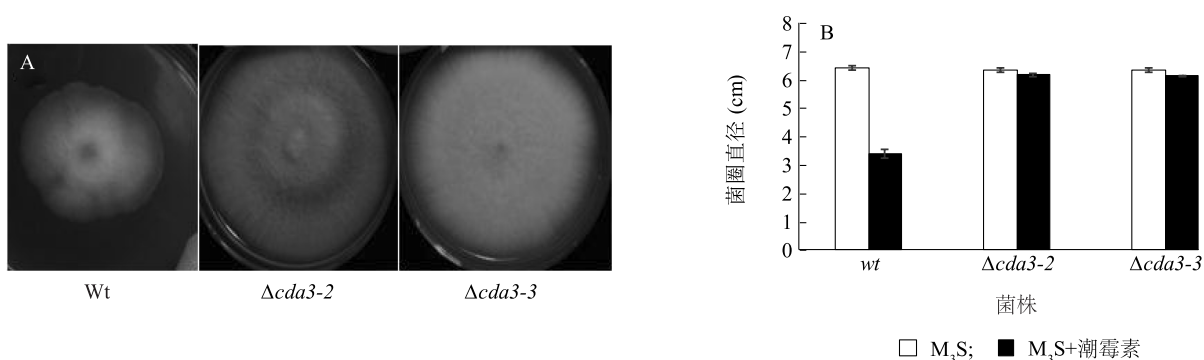
相比, *CgCDA3* 基因缺失突变菌株  $\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$  的孢子萌发率和附着胞形成率均明显降低, 说明 *CgCDA3* 基因参与 *C. gloeosporioides* 孢子萌发和附着胞形成。



$\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$ : *CgCDA3* 基因缺失突变菌株; Wt: 野生型菌株; Water: 纯水对照。

图 5 *CgCDA3* 基因缺失突变菌株的 PCR (A、B) 及基因表达水平 (C) 检测验证

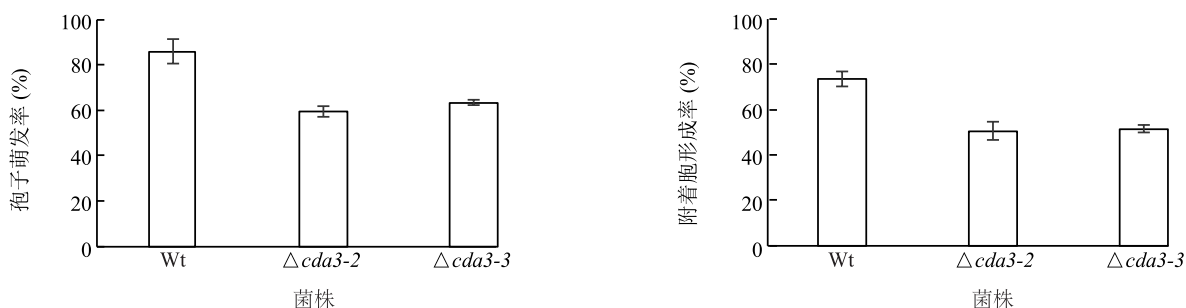
Fig.5 Verification of the *CgCDA3* gene deficient mutant strains by PCR (A, B) and expression level analysis (C)



$\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$ : *CgCDA3* 基因缺失突变菌株; Wt: 野生型菌株。

图 6 胶孢炭疽菌在 M<sub>3</sub>S+潮霉素培养基上的菌落形态 (A) 及菌圈直径变化 (B)

Fig.6 Colonial morphology (A) and colony diameter change (B) of *C. gloeosporioides* wild type and mutant strains  $\Delta cda3-2$  and  $\Delta cda3-3$  on M<sub>3</sub>S medium containing hygromycin



$\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$ : *CgCDA3* 基因缺失突变菌株; Wt: 野生型菌株。

图 7 胶孢炭疽菌野生型和 *CgCDA3* 基因缺失突变菌株的孢子萌发率和附着胞形成率

Fig.7 Spore germination and appressorium formation rate of *C. gloeosporioides* wild type and *CgCDA3* gene deficient mutant strains

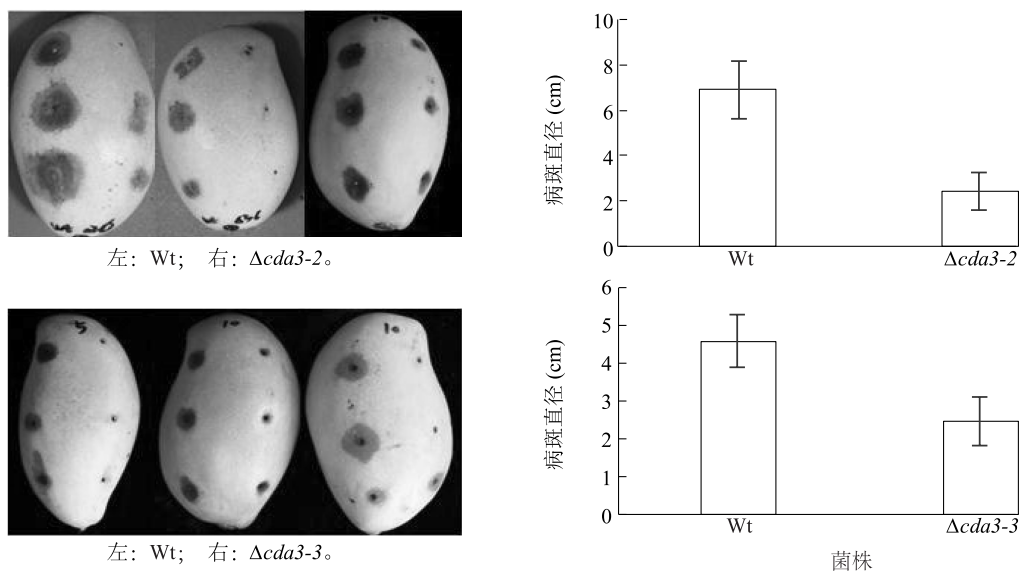
## 2.6 *CgCDA3* 基因缺失突变体对芒果果实的致病力变化

对芒果进行创伤接种胶孢炭疽菌, 在果实的

左侧创伤接种野生型菌株作对照, 右侧接种缺失突变菌株  $\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$ , 在接种后的不同时间观察统计病斑直径变化。结果 (图 8) 显示, 接

种后第 6 d 野生型菌株侵染诱导的病斑直径平均扩大至 6.93 cm, 而  $\Delta cda3-2$  侵染诱导的病斑直径平均值为 2.42 cm, 与野生型比较降低达 65.1%, 差异显著, 缺失突变菌株  $\Delta cda3-3$  的病斑直径也呈现同样的变化趋势。在另一个重复的基因缺失

单细胞株系中, *CgCDA3* 基因的缺失导致 *C. gloeosporioides* 致病性降低 46%。*CgCDA3* 基因缺失突变菌株  $\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$  的致病力降低, 说明 *CgCDA3* 基因的功能与 *C. gloeosporioides* 的侵染致病力密切相关。



$\Delta cda3-2$  和  $\Delta cda3-3$ : *CgCDA3* 基因缺失突变菌株; Wt: 野生型菌株。

图 8 胶孢炭疽菌野生型及 *CgCDA3* 基因缺失突变菌株侵染芒果果实病斑大小变化

Fig.8 Lesion size change of *C. gloeosporioides* wild-type and *CgCDA3* gene deficient mutant strains infected with mango fruits

### 3 讨论

*C. gloeosporioides* 基因组中存在 3 个 *CDA* 相似基因, 它们在染病芒果果皮坏死组织中有不同程度的表达, 敲除 *CDA1* 基因对菌株的致病性没有显著影响, 说明不同 *CDA* 基因的功能存在差异, *CDA2* 和 *CDA3* 基因可能对其致病性起关键功能作用<sup>[22]</sup>。本研究对其中的 *CgCDA3* 基因进行生物信息学分析, 结果显示编码的氨基酸序列 N 端含有催化真菌细胞壁中的几丁质脱乙酰化为壳聚糖的 CICDA 结构域, 这也是鲁氏毛霉 (*M. rouxii*)、酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 和菜豆炭疽菌 (*C. lindemuthianum*) 等病原菌 *CDA* 具有的典型结构。在这些病原真菌中, 几丁质的脱乙酰化对其生长发育和侵染致病性均有不同的作用<sup>[8-9, 11]</sup>。目前关于芒果胶孢炭疽菌 *CDA* 基因的生物功能知之甚少。本研究通过基因敲除策略直接证明 *CgCDA3* 的缺失导致 *C. gloeosporioides* 孢子萌发和附着胞形成率降低, 同时侵染芒果的致病性

也显著减弱, 说明 *CgCDA3* 基因在侵染致病过程中起着重要的作用。这与菜豆炭疽菌 (*C. lindemuthianum*)、黄瓜炭疽菌 (*C. lagenarium*) 和构巢曲霉 (*A. nidulans*) 中 *CDA* 参与致病过程的研究结果<sup>[11-12, 16]</sup>一致, 这为了解 *CDA* 基因在采后病原真菌中的功能提供了新的证据。

在植物与微生物互作的研究中发现, 植物体中几丁质酶是一种重要的水解酶, 在植物抵抗病原菌的防御反应中发挥着重要的作用。它通过降解病原真菌细胞壁中的几丁质致使病原体死亡, 降解产生的细胞壁碎片和寡糖产物还具有诱导作用, 刺激寄主植物诱发一系列抗病反应。同时, 病原菌可通过分泌产生 *CDA* 水解自身的几丁质脱去乙酰基, 从而增加寄主识别几丁质底物的困难, 并降低寄主几丁质寡糖的激发子活性, 继而拮抗寄主中的几丁质酶<sup>[15-17]</sup>。在病原菌侵染部位乙酰化的几丁质由于病原菌 *CDA* 的产生快速脱乙酰化, 病原真菌的几丁质乙酰化程度影响植物细胞的抗性功能<sup>[18]</sup>。为了



了解 *C. gloeosporioides* 侵染致病过程中宿主几丁质酶活性变化,我们预试验中检测了芒果果实几丁质酶基因表达的变化,但结果并无规律可循。说明病原菌 *CDA* 水解自身几丁质以抵抗宿主的防御反应及与宿主几丁质酶的水解产生抗性之间存在非常复杂的相互作用关系,可进一步采用生理生化手段直接观察病原菌几丁质的脱乙酰化程度与植物的抗性和病原菌致病力的关系,以明确 *CgCDA3* 是否通过脱乙酰化自身几丁质以抵抗寄主的防御反应而参与致病力的形成。本研究 *CgCDA3* 基因缺失突变体与野生型相比,生长及产孢正常,但孢子萌发和附着胞形成能力下降,因此至少可以推测 *CgCDA3* 基因参与调控胶孢炭疽菌孢子萌发和附着胞形成等生长和形态建成过程,从而促进其致病性产生。

#### 参考文献:

- [1] 胡 伟,张德生,刘康德. 中国芒果产业发展变迁及影响因素研究[J]. 中国农业资源与区划, 2015, 36(6): 53-59.
- [2] 黄忠兴,安玉兴,黄锦福,等. 海南芒果炭疽菌的发生规律与综合防治[J]. 热带农业科技, 2008, 3(2): 20-23.
- [3] 毕方铤,戴宏芬,孟祥春. 农杆菌介导的芒果胶孢炭疽菌遗传转化及致病性缺陷突变体的筛选[J]. 热带农业科学, 2014, 34(8): 47-51.
- [4] 韩长志. 胶孢炭疽菌侵染过程相关基因研究进展[J]. 广东农业科学, 2014, 41(9): 165-169.
- [5] 贾 静,蒲金基,张 贺,等. 芒果炭疽病菌环境 pH 信号调控基因 *PalF* 的克隆与分析[J]. 热带作物学报, 2014, 35(4): 753-757.
- [6] KOECK M, HARDHAM A R, DODDS P N. The role of effectors of biotrophic and hemibiotrophic fungi in infection [J]. Cellular Microbiology, 2011, 13(12): 1849-1857.
- [7] MISHRA C, SEMINO C E, MCCREACH K J, et al. Cloning and expression of two chitin deacetylase genes of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Yeast, 1997, 13(4): 327-336.
- [8] TSIGOS I, MARTINO A, KAFETZPOULOS D, et al. Chitin deacetylase: new, versatile tools in biotechnology [J]. Trends in Biotechnology, 2000, 18(7): 305-312.
- [9] CHRISTODOULIDOU A, BRIZA P, ELLINGER A, et al. Yeast ascospore wall assembly requires two chitin deacetylase isozymes [J]. FEBS Letters, 1999, 460(2): 275-279.
- [10] MATSUO Y, TANAKA K, MATSUDA H, et al. *cdaI*<sup>+</sup>, encoding chitin deacetylase is required for proper spore formation in *Schizosaccharomyces pombe* [J]. FEBS Letters, 2005, 579(12): 2737-2743.
- [11] TSIGOS I, BOURIOTIS V. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Colletotrichum lindemuthianum* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1995, 270(44): 26286-26291.
- [12] WANG Y, SONG J Z, YANG Q, et al. Cloning of a heat-stable chitin deacetylase gene from *Aspergillus nidulans* and its functional expression in *Escherichia coli* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2010, 162(3): 843-854.
- [13] 陈琦光,舒灿伟,杨 媚,等. 植物病原真菌效应分子的研究进展[J]. 基因组学与应用生物学, 2016, 35(11): 3105-3114.
- [14] VAN H A, HARRISON S J, JOOSTEN M H, et al. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2006, 19(12): 1420-1430.
- [15] RANDOUX B, RENARD M D, MULARD G, et al. Distinct defenses induced in wheat against powdery mildew by acetylated and nonacetylated oligogalacturonides [J]. Phytopathology, 2010, 100(12): 1352-1363.
- [16] SIEGRIST J, KAUS H. Chitin deacetylase in cucumber leaves infected by *Colletotrichum lagenarium* [J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1990, 36(4): 267-275.
- [17] 李春娟,单世华,许婷婷,等. 几丁质酶和  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因研究进展[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(5): 502-505.
- [18] MAKSIMOV I V, VALEEV A S H, SAFIN R F. Acetylation degree of chitin in the protective response of wheat plants [J]. Biochemistry, 2011, 76(12): 1342-1346.
- [19] 闵 婷,倪孟祥. 几丁质脱乙酰酶(*CDA*)的研究进展[J]. 药物生物技术, 2011, 18(1): 89-94.
- [20] 梁晓飞. 小麦条锈菌几丁质代谢相关基因的特征分析与真空中聚多糖去乙酰化酶基因的序列分析[D]. 杨凌:西北农林科技大学, 2010.
- [21] PAREEK N, VIVEKANAND V, SAROJ S, et al. Purification and characterization of chitin deacetylase from *Penicillium oxalicum* SAE M-51 [J]. Carbohydrate Polymers, 2012, 87(2): 1091-1097.
- [22] ALKAN N, MENG X, FRIEDLANDER G, et al. Global aspects of *pacC* regulation of pathogenicity genes in *Colletotrichum gloeosporioides* as revealed by transcriptome analysis [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2013, 26(11): 1345-1358.
- [23] ROBINSON M, SHARON A. Transformation of the bioherbicide *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *aeschynomene* by electroporation of germinated conidia [J]. Current Genetics, 1999, 36(2): 98-104.

(责任编辑:张震林)