

姚传飞, 张 昕, 邓 晟, 等. 大丽轮枝菌微菌核发育相关基因 *VdPKS* 的功能分析[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(6): 1299-1307.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2019.06.005

大丽轮枝菌微菌核发育相关基因 *VdPKS* 的功能分析

姚传飞^{1,2}, 张 昕², 邓 晟², 林 玲², 戴亦军¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046; 2. 江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为阐明与大丽轮枝菌微菌核发育相关的聚酮合成酶基因 *VdPKS* 的功能, 在前期获得 *VdPKS* 被单拷贝 T-DNA 插入的微菌核发育异常突变体 2H3 的基础上, 通过基因敲除和回补技术, 经分子鉴定和表型验证, 获得了 2 株 *VdPKS* 基因敲除突变体和 3 株回补突变体。研究发现野生型菌株孢子在接种到 PDA 培养基上培养的第 6 d 开始积累黑色素, 而此时 *VdPKS* 基因的表达量也最高。敲除突变体虽然没有形成黑色素, 却也观察到微菌核的初始结构, 表明 *VdPKS* 基因不是微菌核形成的必须基因, 仅参与微菌核发育后期黑色素的形成。致病力测定结果表明 *VdPKS* 基因与菌株的致病力无关。杀菌剂啞菌酯和咯菌腈对敲除突变体菌丝生长的抑制率相对于野生型菌株和回补突变体有显著提高, 表明 *VdPKS* 基因与大丽轮枝菌的抗逆性相关。

关键词: 大丽轮枝菌; 微菌核; 聚酮合成酶; 黑色素; 致病力

中图分类号: S432.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2019)06-1299-09

Functional analysis of *VdPKS* related to microsclerotia development of *Verticilliumdahliae*

YAO Chuan-fei^{1,2}, ZHANG Xin², DENG Sheng², LIN Ling², DAI Yi-jun¹

(1. College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China; 2. Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: A single T-DNA insertion mutant 2H3 that showed abnormal microsclerotia development was selected from the T-DNA insertion mutant library of a *Verticilliumdahliae* sclerotium-type strain V08DF1. The inserted gene in the mutant 2H3 was *VdPKS* which encoded a conidial yellow pigment biosynthesis polyketide synthetase. Based on these results, the experiments of gene knockout and genetic complement were carried out in order to confirm the function of the gene *VdPKS*. Two deletion mutants $\Delta VdPKS1$, $\Delta VdPKS2$ and three complementary mutants 2H3-PKS6, 2H3-PKS8, 2H3-PKS9 were obtained through molecular and colonial morphological identification. After six days cultured on the PDA medium, the spores of the wildtype strain V08DF1 began to accumulate melanin of microsclerotia, and the *VdPKS* gene expression level detected by qRT-PCR was also the highest. The initial structure of the microsclerotia was also observed in the $\Delta VdPKS1$

and $\Delta VdPKS2$ although they did not form melanin. These results showed that the *VdPKS* gene was involved in the formation of microsclerotia melanin, but it was not an essential gene for microsclerotia formation. The results of the pathogenicity assay indicated that the *VdPKS* gene had nothing to do with the pathogenicity. The inhibition rate of azoxystrobin and fludioxonil on the mycelial growth of $\Delta VdPKS1$ and $\Delta VdPKS2$ was significantly higher than that of the wildtype strain and complementary mutants. The results showed that the *VdPKS* gene was related to the

收稿日期: 2019-02-28

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项(201503109); 国家棉花产业技术体系项目(CARS-18-16); 国家重点研发计划项目(2017YFD0201900)

作者简介: 姚传飞(1991-), 男, 安徽寿县人, 硕士研究生, 从事大丽轮枝菌微菌核发育分子机理研究。(Tel) 025-84390769; (E-mail) 822716441@qq.com

通讯作者: 林 玲, (Tel) 025-84390769; (E-mail) linling@jaas.ac.cn; 戴亦军, (Tel) 025-85891731; (E-mail) daiyijun@njnu.edu.cn

stress resistance of *Verticilliumdahliae*.

Key words: *Verticilliumdahliae*; microsclerotia; polyketide synthase; melanin; pathogenicity

黄萎病是温带双子叶植物的主要病害,导致棉花、番茄、草莓等经济作物发生严重的经济损失^[1-3]。当前,对于黄萎病仍然没有有效的控制方法,其主要原因为除了缺乏抗病品种和对环境安全的有效药剂之外,病区土壤中残留着大量、抗逆性很强的微菌核(*Microsclerotia*)^[4]。微菌核是大丽轮枝菌(*Verticilliumdahliae*) 在土壤中的主要存活结构和黄萎病的初侵染菌源,在病害循环中起重要作用,也是病害防治的直接靶标^[5-6]。因此,明确微菌核形成、发育机制对于深入研究黄萎病流行规律和制定防治措施具有重要意义。

前人对于大丽轮枝菌微菌核的研究大多集中于微菌核的形态、大小、分布,微菌核的形成条件、微菌核的分离培养技术,以及影响微菌核存活与萌发的外界土壤环境因素等^[7]。已有研究结果表明,微菌核形成的最初阶段单根或数根菌丝膨大,并产生大量的隔膜,然后具有隔膜的细胞继续增大,成为球状并产生侧芽,最后外层菌丝细胞膨大,分泌出黑色素(Melanin) 粒子,填充细胞间隙,大量黑色素颗粒成纤维状包裹在菌丝的细胞壁上,最外层菌丝细胞自溶形成紧密结构,即形成成熟的微菌核。微菌核能保护大丽轮枝菌度过低温等严酷的外界环境^[8]。自大丽轮枝菌基因组数据库公布以来,国内外同行对大丽轮枝菌微菌核形成机理的研究主要包括黑色素合成与微菌核形成两个方面。大丽轮枝菌微菌核的黑色素属于 DHN-melanin 类黑色素^[9]。在微菌核的形成过程中,黑色素合成相关基因的表达明显上调。

江苏省农业科学院植物保护研究所土传种传病害实验室已经从大丽轮枝菌菌核型菌株 V08DF1 的 T-DNA 插入突变体库中,筛选到 1 株单拷贝插入的微菌核发育异常的突变体 2H3^[10],该突变体在 PDA、Cazepek 固体培养基上培养 14 d 都没有黑色素的积累。通过 TAIL-PCR 获得 T-DNA 插入位点的侧翼序列,与美国 BROAD 研究所公布的大丽轮枝菌 VDLs.17 全基因组序列进行比对,得到 T-DNA 插入的位点,T-DNA 破坏的基因是位于第 2 条染色体上的 VDAG_00190 基因,为聚酮合成酶(PKS) 基因^[11]。PKS 是传统 DHN 黑色素合成途径中的一个

关键酶^[12],在 *Aspergillusfumigatus* 菌株中,PKS 催化乙酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 合成一种多聚酮类化合物 YWA1,该化合物经过 *Aayg1*、*TH4R*、*SCD*、*TH3R*、*LAC* 一系列酶的催化反应,最终合成 DHN 黑色素^[13-14]。本研究在此基础上,通过对基因 *VdPKS* 进行敲除与回补,以期验证该基因在微菌核黑色素合成中的作用,以及与大丽轮枝菌的致病力和对杀菌剂敏感性的相关性,为寻求新的黄萎病防治方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株、质粒和棉花品种 大丽轮枝菌菌核型菌株 V08DF1,从江苏省大丰棉区发病棉花植株中分离得到,保存于江苏省农业科学院植物保护研究所。感受态大肠杆菌 DH5 α 从南京擎科生物有限公司购得。农杆菌菌株 AGL-1 由江苏省农业科学院农业种质资源与生物技术研究所张保龙研究员提供。用于构建同源重组敲除质粒 pOSCAR-*VdPKS*-*Del* 的 pA-Hyg-OSCAR 和 pOSCAR 质粒均购自 FG-SC 公司。用于构建回补载体的 1300-ble 载体保存于江苏省农业科学院植物保护研究所。致病力测定所用棉花品种为泗棉 3 号,由江苏省农业科学院经济作物研究所肖松华研究员提供。

1.1.2 试剂 Golden_Star_T6_Super_PCR_Mix 购于南京擎科生物科技有限公司,潮霉素 B(Hygromycin B) 和 Southern 杂交试剂盒购于 Roche 公司, BP 重组酶购于 Invitrogen 公司, *Bst* XI、*Hind* III 酶购于 NEB 公司, ClonExpressTM II One Step Cloning Kit 购于诺维赞公司,博莱霉素购于 ThermoFisher 公司, RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒 PrimeScripTM RT reagent Kit with Gdna Eraser(Perfect Real Time) 以及用于荧光定量 PCR 的试剂盒 SuperMix 购于 TaKaRa 公司,97.4% 噻菌酯原药购于江苏耕耘化学公司,96% 咯菌腈原药购于江西禾益化工股份有限公司,97.3% 戊唑醇原药购于北京拜耳公司。其他常规试剂及抗生素均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *VdPKS* 基因敲除突变体的获得 按照 Paz

等^[15]报道的方法,构建 *VdPKS* 基因敲除所需要的同源重组敲除质粒,所用上游同源臂的引物为 pOSCAR-*VdPKS*-attB2r、pOSCAR-*VdPKS*-attB1r,下游同源臂的引物引物为 pOSCAR-*VdPKS*-attB4、pOSCAR-*VdPKS*-attB3 (表 1)。然后,参考邓晟等^[16-17]报道的方法进行农杆菌介导的大丽轮枝菌 V08DF1 的转化以及转化子的 PCR 验证,将能够检测到潮霉素抗性基因但无法正常扩增到 *VdPKS* 的转化子判断为该基因的敲除突变体 $\Delta VdPKS$,潮霉素抗性基因和 *VdPKS* 基因的 PCR 检测引物见表 1。通过 Southern 杂交进行敲除突变体中 T-DNA 插入拷贝数的分析,用 *Bst* XI 和 *Hind* III 两种酶对敲除突变体基因组进行酶切,以潮霉素抗性基因探针进行杂交。采用 qRT-PCR 检测敲除突变体中 *VdPKS* 基因的表达情况,内参基因 β -*tubulin* 和 *VdPKS* 基因的 qRT-PCR 检测引物见表 1。转化子表型验证方法:将敲除突变体接种到 PDA 培养基上,28 °C、黑暗条件下培养 14 d,观察平板上的菌落形态,以野生型菌株 V08DF1 作为对照。

1.2.2 *VdPKS* 基因回补突变体的获得 采用引物 *PKS* 回补-5S、*PKS* 回补-3A (表 1) 在野生菌株基因组中扩增 *VdPKS* 基因序列,并用 ClonExpressTM II 无缝连接方法连接至经 *Hind* III 酶切后的 1300-ble 载体上,构建回补质粒,然后用农杆菌介导的方法对插入突变体 2H3 进行转化,筛选抗生素选用 100 μ g/ml 博来霉素和潮霉素。将同时能 PCR 检测到 *VdPKS* 基因、博来霉素抗性基因和潮霉素抗性基因的转化子判断为回补突变体, *VdPKS* 基因、博来霉素抗性基因和潮霉素抗性基因的 PCR 检测引物见表 1。

1.2.3 微菌核的显微观察以及 *VdPKS* 基因表达量检测 参考 Xiong 等报道的方法^[18],将在 PDB 培养基中培养 7 d 的敲除突变体 $\Delta VdPKS$ 及野生型菌株 V08DF1 的分生孢子悬浮液用无菌水调至 1 ml 1×10^6 个的孢子悬浮液,分别吸取 20 μ l 均匀涂布在铺有玻璃纸的 PDA 平板上,28 °C 黑暗培养。分别在 1 d、3 d、6 d、9 d、14 d 时显微观察微菌核发育情况。同时,收集野生型菌株的孢子以及培养不同时间的菌丝样品,提取 RNA,反转录获取 cDNA, qRT-PCR 检测微菌核发育不同时期 *VdPKS* 基因的表达量,内参基因 β -*tubulin* 和 *VdPKS* 基因的 qRT-PCR 检测引物见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物名称	序列 (5'→3')	说明
pOSCAR- <i>VdPKS</i> -attB2r	GGGGACAGCTTCTTGTGTA- CAAAGTGGAACTAATC- GGCTGCCTGTCTGTC	敲除质粒上 <i>VdPKS</i> 的 5'侧翼同源臂序列引物
pOSCAR- <i>VdPKS</i> -attB1r	GGGGACTGCTTTTTTGTGTA- CAAAGTGTCTCTCGGCC- AGTGAAGCGACAT	
pOSCAR- <i>VdPKS</i> -attB4	GGGGACAACCTTTGTGATA- GAAAAGTTGTTCGTGTAT- GGGATGGCTGTCAAG	敲除质粒上 <i>VdPKS</i> 的 3'侧翼同源臂序列引物
pOSCAR- <i>VdPKS</i> -attB3	GGGGACAACCTTTGTGATA- ATAAAGTTCTTCACGCCT- ACTGCCCTATCGCTA	
<i>HYG</i> -5S	GACAGCGTCTCCGACCT- GATGC	潮霉素抗性基因 PCR 检测引物
<i>HYG</i> -3A	TGGGGCGTCGGTTTCCAC- TATC	
<i>PKS</i> -5S	GATGTCACCGAGGCAGAT	<i>PKS</i> 基因 PCR 检测引物
<i>PKS</i> -3A	CTAGGGTCGAAGAGTCC- AG	
<i>BLE</i> -5S	ATGCCGACGGATTGCA- CTG	博来霉素抗性基因 PCR 检测引物
<i>BLE</i> -3A	AGCAGACAGGAACGAGG- ACAT	
β - <i>tubulin</i> -5S	GCCTCAAGATGTCTCCA- CCTT	内参基因 β - <i>tubulin</i> qRT-PCR 检测引物
<i>TUBLIN</i> -3A	GACTCAGCCTCAGTGAA- CTCCAT	
<i>PKS</i> 荧光-5S	GCCGCACTTGGTATGGA	<i>PKS</i> 基因 qRT-PCR 检测引物
<i>PKS</i> 荧光-3A	GCCTTCTCAACTGGGAC- A	
<i>PKS</i> 回补-5S	GGCCAGTGCCAAGCTTA- GGCGATCCCACGTCGTT- T	回补 <i>PKS</i> 基因的引物
<i>PKS</i> 回补-3A	GCAGGCATGCAAGCTTC- TCTCCAGTCTCATCAGGC- AAA	

引物中添加下划线的部分为保守序列,是构建敲除载体所必须的 BP 重组酶识别位点。

1.2.4 致病力的测定 按照喻秀秀等^[19]报道的方法,测定 *VdPKS* 基因敲除突变体、回补突变体及野生型菌株 V08DF1 的致病力,以无菌水为对照。所用棉花品种为泗棉 3 号,每个菌株对应接种的总苗数控制在 100 株左右。接种的孢子液含孢子量为 1 ml 5×10^6 个,在接种后第 8 d 开始进行病情分级调查,每隔 7 d 调查 1 次,一直到第 56 d 调查结束。

1.2.5 杀菌剂对菌丝生长抑制率的测定 采用平皿法测定 0.48 μ g/ml 噻菌酯、1.29 μ g/ml 咯菌腈对

敲除突变体、回补突变体及野生型菌株 V08DF1 的菌丝生长抑制率^[20]。

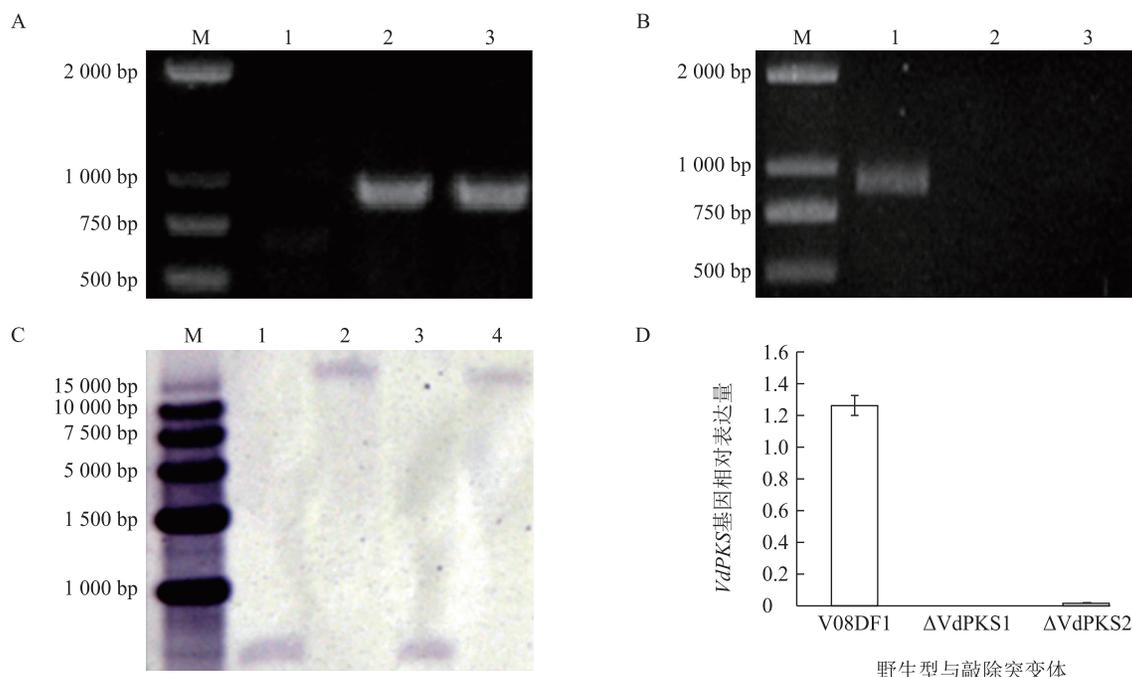
1.2.6 数据分析 用 SPSS 统计软件对试验数据进行方差分析(ANOVA),用新复极差法(Duncan's multiple range test, Duncan)对各处理的平均值进行组间比较。

2 结果

2.1 *VdPKS* 敲除突变体的获得

通过同源重组转化,在添加潮霉素的 PDA 筛选培养基上,挑取到 4 个转化子,分别用 HYG-5S、

HYG-3A 和 PKS-5S、PKS-3A 检测引物对转化子进行 PCR 验证,其中 $\Delta VdPKS1$ 、 $\Delta VdPKS2$ 基因组中含有潮霉素抗性基因,不含 *VdPKS* 基因(图 1-A、图 1-B)。为验证 T-DNA 是否为单拷贝插入,对 $\Delta VdPKS1$ 、 $\Delta VdPKS2$ 进行 Southern 杂交,选用 *Bst* XI、*Hind* III 两种酶对 2 个转化子的基因组进行酶切,以潮霉素抗性基因探针进行杂交,结果显示 $\Delta VdPKS1$ 、 $\Delta VdPKS2$ 所含有的潮霉素抗性基因均为单拷贝插入(图 1-C)。qRT-PCR 结果显示,除了野生型菌株 V08DF1 有 *VdPKS* 基因的表达, $\Delta VdPKS1$ 、 $\Delta VdPKS2$ 均无 *VdPKS* 基因的表达(图 1-D)。



A:潮霉素抗性基因的 PCR 验证,M:Marker,1:野生型菌株 V08DF1,2:敲除突变体 $\Delta VdPKS1$,3:敲除突变体 $\Delta VdPKS2$ 。B:*VdPKS* 基因的 PCR 验证,1:野生型菌株 V08DF1,2:敲除突变体 $\Delta VdPKS1$,3:敲除突变体 $\Delta VdPKS2$ 。C:敲除突变体潮霉素抗性基因插入拷贝数的 Southern 检测,1,2:敲除突变体 $\Delta VdPKS1$ 基因组分别用 *Bst* XI、*Hind* III 酶切后产生的条带,3,4:敲除突变体 $\Delta VdPKS2$ 基因组分别用 *Bst* XI、*Hind* III 酶切后产生的条带。D:qRT-PCR 检测 *VdPKS* 基因的表达。

图 1 敲除突变体的分子鉴定

Fig.1 Molecular identification of the deletion mutants

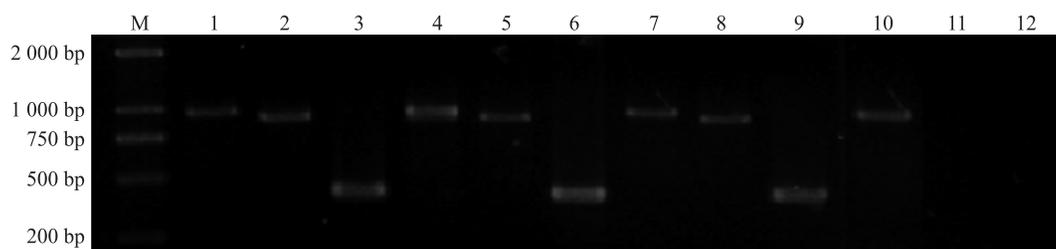
2.2 *VdPKS* 回补突变体的获得

将 *VdPKS* 基因回补转化插入突变体 2H3,在添加潮霉素和博来霉素的 PDA 筛选培养基上,挑取到 9 个转化子,分别用引物 HYG-5S 和 HYG-3A、*VdPKS*-5S 和 *VdPKS*-3A、BLE-5S 和 BLE-3A 进行 PCR 验证,结果显示 2H3-PKS6、2H3-PKS8、2H3-PKS9 含有潮霉素抗性基因、*VdPKS* 基因和博来霉素抗性基

因(图 2)。

2.3 敲除突变体与回补突变体的表型验证

通过肉眼观察 *VdPKS* 基因对微菌核发育的影响,将敲除突变体 $\Delta VdPKS1$ 、 $\Delta VdPKS2$ 和回补突变体 2H3-PKS6、2H3-PKS8、2H3-PKS9 接种到 PDA 培养基上,以野生型菌株 V08DF1 作为对照,28 °C、黑暗条件下培养 14 d,观察平板上的菌落形态。结果

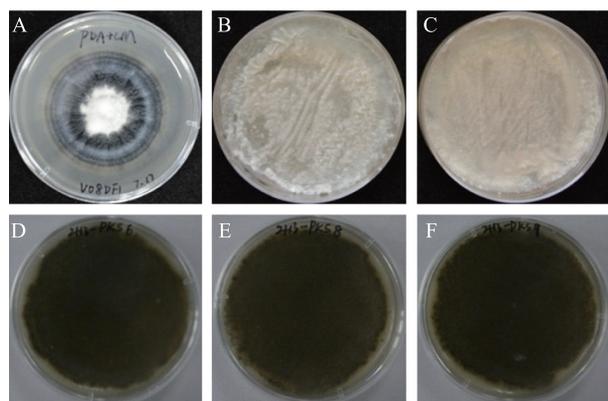


M: Marker; 1~3 分别为回补突变体 2H3-PKS6 潮霉素抗性基因片段、*VdPKS* 基因片段、博莱霉素抗性基因片段; 4~6 分别为回补突变体 2H3-PKS8 潮霉素抗性基因片段、*VdPKS* 基因片段、博莱霉素抗性基因片段; 7~9 分别为回补突变体 2H3-PKS9 潮霉素抗性基因片段、*VdPKS* 基因片段、博莱霉素抗性基因片段; 10~12 分别为插入突变体 2H3 潮霉素抗性基因片段验证、*VdPKS* 基因片段验证、博莱霉素抗性基因片段验证。

图2 回补突变体的 PCR 验证

Fig.2 PCR detection of the complementary mutants

显示野生型菌株培养 14 d 产生黑色素, 2 个 *VdPKS* 基因敲除突变体均不产黑色素, 而 3 个回补突变体恢复了产黑色素的能力(图 3)。



A: 野生型菌株 V08DF1; B: 敲除突变体 $\Delta VdPKS1$; C: 敲除突变体 $\Delta VdPKS2$; D: 回补突变体 2H3-PKS6; E: 回补突变体 2H3-PKS8; F: 回补突变体 2H3-PKS9。

图3 敲除突变体与回补突变体的表型验证

Fig.3 Colonial morphology of the deletion mutants and the complementary mutants

2.4 大丽轮枝菌微菌核的发育形态以及 *VdPKS* 基因表达水平

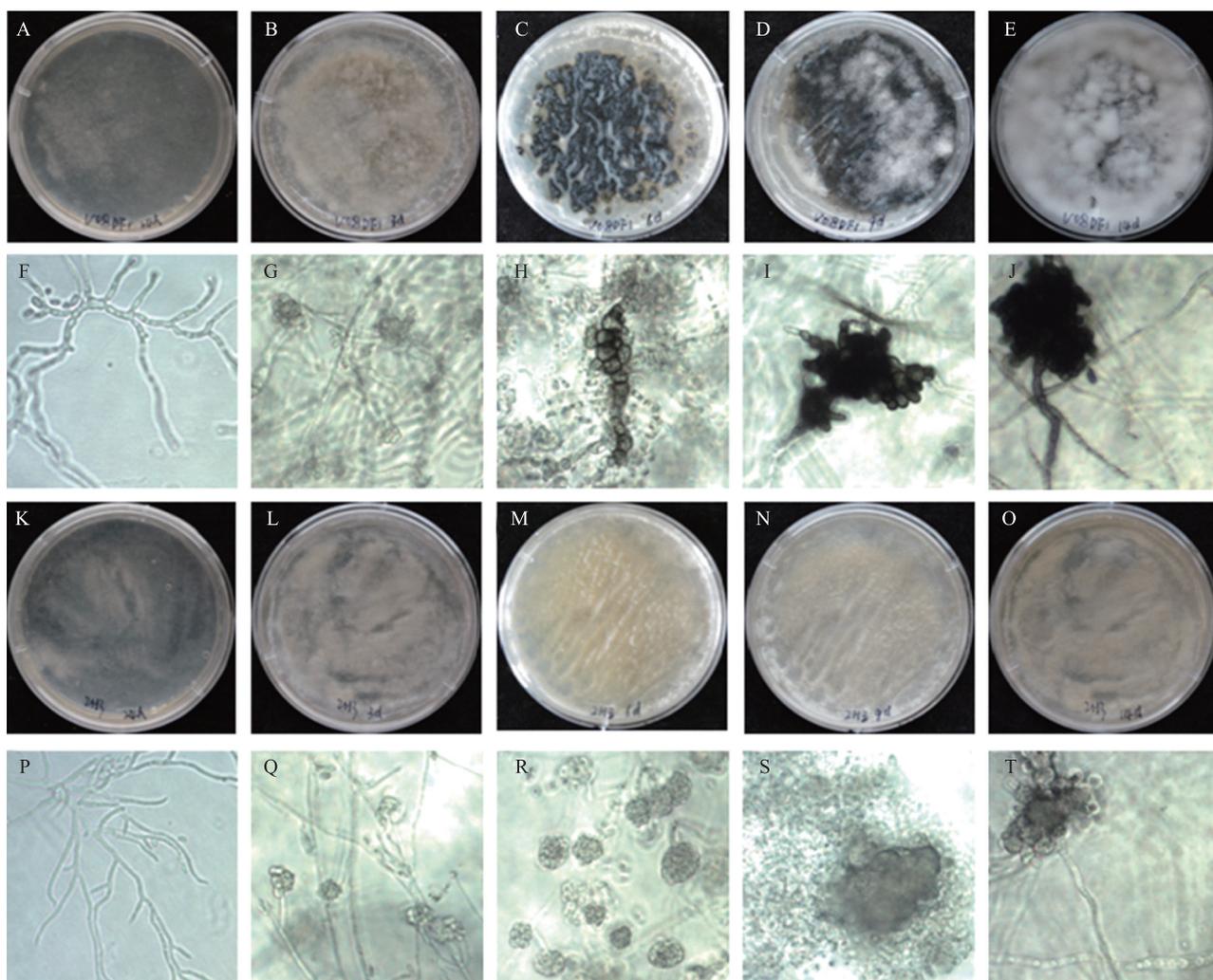
为了解 *VdPKS* 基因在微菌核发育过程中的作用, 分别在野生型和敲除突变体菌株生长的不同时间段观察菌落的形态, 同时用光学显微镜观察微菌核的发育情况。结果显示, 野生型菌株 V08DF1 的孢子在 PDA 培养基上第 1 d 开始萌发形成菌丝; 第 3 d 显微观察到由单根或数根菌丝膨大产生隔膜后形成球状多细胞结构, 但此时菌落仍然为白色; 到第

6 d, 菌落开始呈现黑色, 通过显微镜观察到球状多细胞结构开始产生侧芽, 并且外层菌丝细胞膨大, 分泌出黑色素粒子; 第 9 d, 菌落黑色加深, 通过显微镜观察到球状多细胞结构细胞数增多, 并且仍在长出侧芽, 黑色也逐渐加深, 分泌出黑色素粒子, 填充在细胞间隙; 第 14 d, 菌落基质中黑色进一步加深, 表面覆盖白色的气生菌丝, 通过显微镜观察到球状多细胞结构进一步增大, 大量黑色素颗粒包裹在菌丝的细胞壁上, 最外层菌丝细胞自溶形成紧密的结构, 成为成熟的微菌核(图 4)。敲除突变体 $\Delta VdPKS1$ 则不能产生黑色素, 但也能完成微菌核发育的最初阶段, 形成球状多细胞结构, 菌落则一直呈现浅黄色(图 4)。

此外, qRT-PCR 结果显示, 野生型菌株 V08DF1 从分生孢子萌发到微菌核黑色素开始积累的过程中, 即在 PDA 培养基上生长的第 1 d 至第 6 d, *VdPKS* 基因表达量逐渐增加, 之后, 表达量开始下调, 一直到形成成熟的微菌核结构, *VdPKS* 基因呈低表达状态。

2.5 *VdPKS* 基因对大丽轮枝菌致病力的影响

为了检测 *VdPKS* 基因是否影响大丽轮枝菌的致病性, 我们检测了 2 个敲除突变体 $\Delta VdPKS1$ 、 $\Delta VdPKS2$, 3 个回补突变体 2H3-PKS6、2H3-PKS8、2H3-PKS9 以及野生型菌株 V08DF1 对泗棉 3 号的致病力。结果显示, 棉苗在接种后第 14 d 开始陆续出现病症, 之后病情逐渐加重。到接种后第 35 d 时, 接种野生型菌株 V08DF1 的棉苗病情指数达到了 58.3, 接种敲除突变体 $\Delta VdPKS1$ 、 $\Delta VdPKS2$ 的病情指数分别为 60.3、53.9, 接种回补突变体 2H3-



A~E:野生型菌株 V08DF1 在 PDA 培养基上生长 1 d、3 d、6 d、9 d、14 d 的菌落形态;F~J:野生型菌株 V08DF1 在 PDA 上生长 1 d、3 d、6 d、9 d、14 d 光学显微镜下微菌核的发育情况;K~O:敲除突变体 Δ VdPKS1 在 PDA 上生长 1 d、3 d、6 d、9 d、14 d 的菌落形态;P~T:敲除突变体 Δ VdPKS1 在 PDA 上生长 1 d、3 d、6 d、9 d、14 d 光学显微镜下微菌核的发育情况。

图 4 野生型菌株 V08DF1 和敲除突变体 Δ VdPKS1 微菌核的发育形态

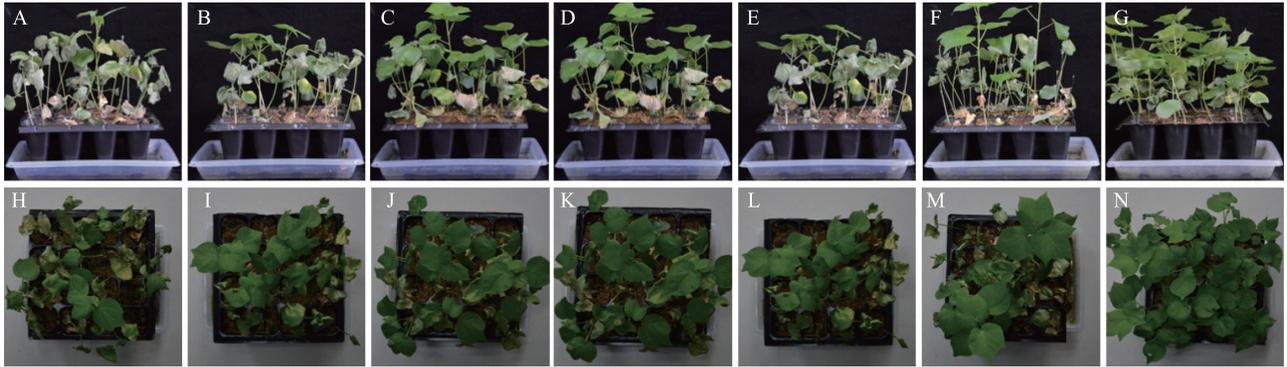
Fig.4 Microsclerotial characterization of the wild type strain V08DF1 and the deletion mutant Δ VdPKS1

PKS6、2H3-PKS8、2H3-PKS9 对应的病情指数分别为 55.7、60.9、54.9,而接种无菌水的对照组无发病症状(图 5)。到第 56 d 时,接种野生型、敲除突变体以及回补突变体菌株的棉苗病情指数均达到 90.0 以上(图 6)。各菌株处理后植株的病情指数接近,方差分析结果显示各菌株之间不存在显著性差异。

2.6 真菌杀菌剂对 V08DF1、 Δ VdPKS1 和 Δ VdPKS2 菌丝生长的抑制率

通过测定 0.48 μ g/ml 嘧菌酯、1.29 μ g/ml 咯菌腈对野生型菌株 V08DF1、敲除突变体 (Δ VdPKS1、

Δ VdPKS2) 和回补突变体 (2H3-PKS6、2H3-PKS8、2H3-PKS9) 菌丝生长的抑制率,发现敲除突变体、回补突变体和野生型菌株在 PDA 培养基上的生长速度一致,而在添加嘧菌酯和咯菌腈的 PDA 培养基上,敲除突变体的菌落直径比野生型菌株和回补突变体小,嘧菌酯和咯菌腈对敲除突变体的菌丝生长抑制率相对于野生型菌株和回补突变体有所提高。方差分析结果表明,嘧菌酯和咯菌腈对敲除突变体 Δ VdPKS1、 Δ VdPKS2 菌丝生长的抑制率与野生型菌株 V08DF1 和回补突变体之间存在显著差异,而野生型菌株与回补突变体之间差异不显著(图 7)。



棉花品种为泗棉3号,照片拍摄于接种后第35 d。A,H:野生型菌株 V08DF1;B,I:敲除突变体 Δ VdPKS1;C,J:敲除突变体 Δ VdPKS2;D,K:回补突变体 2H3-PKS6;E,L:回补突变体 2H3-PKS8;F,M:回补突变体 2H3-PKS9;G,N:无菌水对照。

图5 接种野生型菌株、敲除突变体及回补突变体的棉苗发病情况

Fig.5 Response of the cotton seedlings after inoculation with the wild type strain, the deletion mutants and the complementary mutants

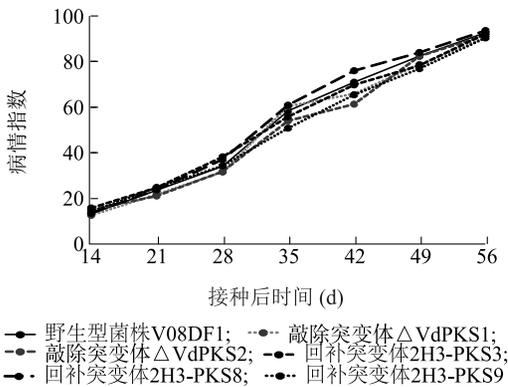
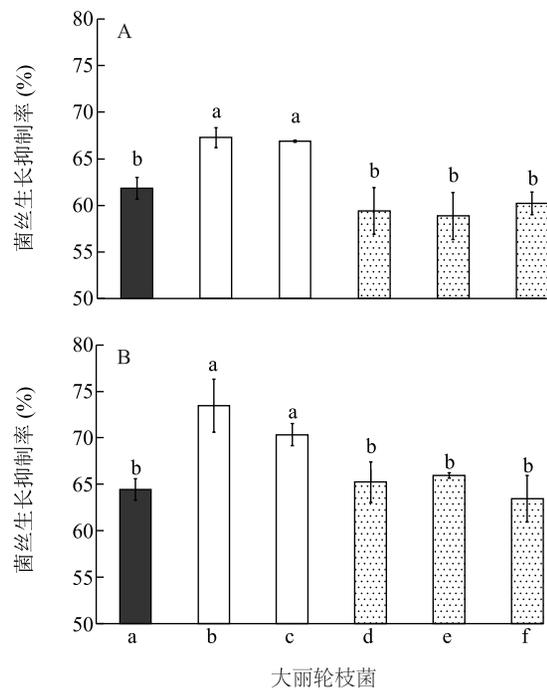


图6 野生型菌株、敲除突变体及回补突变体的致病力

Fig.6 Pathogenicity of the wild type strain, the deletion mutants and the complementary mutants

3 讨论

在前期研究中,江苏省农业科学院植物保护研究所土传种传病害实验室已经从大丽轮枝菌 V08DF1 菌株中克隆了 *VdPKS* 基因全长,与大丽轮枝菌 *VdLs. 17* 的基因组中的 *VDAG_00190* 达到 100%同源。通过在 NCBI 数据库的保守结构域比对,预测该基因主要包含 Acyl transferase domain(酰基转移酶结构域, AT)、Iterative type I PKS product template domain、ACP transacylase(酰基载体蛋白结构域, ACP)、Beta-ketoacyl synthase(β -酮合成酶结构域, KS)、alpha/beta hydrolases、Phosphopantetheine attachment site 这些结构域。已有文献报道,不同真菌中的 PKS 功能域组成有所差异,但都含有最基本



A:啉菌酯;B:咯菌腈。a:野生型菌株 V08DF1;b:敲除突变体 Δ VdPKS1;c:敲除突变体 Δ VdPKS2;d:回补突变体 2H3-PKS6;e:回补突变体 2H3-PKS8;f:回补突变体 2H3-PKS9。

图7 真菌杀菌剂对野生型菌株、敲除突变体及回补突变体菌丝生长的抑制率

Fig.7 Fungicide inhibition rate on mycelial growth of the wild type strain, the deletion mutants and the complementary mutants

的结构域,即 β -酮合成酶结构域(KS)、酰基载体蛋白(ACP)结构域、酰基转移酶(AT)结构域^[21]。酮

基合成酶(KS)负责催化双碳单位的缩合反应使聚酮链得以延长,酰基载体蛋白(ACP)结合延长的聚酮链,酰基转移酶(AT)负责底物选择、激活和转运^[22]。其中,KS结构域的序列比基因全序列具有更高的序列保守性^[23]。这些酶与蛋白质构成了聚酮合成酶这一复杂的体系,聚酮合成酶对于大丽轮枝菌微菌核DNH黑色素的合成至关重要。本研究证实了VdPKS基因对于大丽轮枝菌微菌核黑色素的形成是必须的。野生型菌株在微菌核的形成过程中,VdPKS基因表达明显上调;VdPKS基因敲除突变体不能产生黑色素,而回补突变体则恢复了产黑色素的能力。我们还发现,敲除突变体 Δ VdPKS1、 Δ VdPKS2虽然没有形成黑色素,却能够启动微菌核结构的形成,说明VdPKS基因不是微菌核形成的必须基因,仅影响微菌核发育后期黑色素的产生。

本研究发现,PKS基因的敲除并没有明显改变菌株的致病力,这与Puhalla等^[24]的研究结论一致,大丽轮枝菌的致病力和菌落形态之间一般不存在明显的相关性。但是与Zhang等^[25]报道的PKS基因参与了大丽轮枝菌的致病过程的结论不一致。Zhang等^[25]以大丽轮枝菌菌核型菌株V952为野生型,PKS基因敲除突变体致病力比野生型菌株显著下降,回补突变体致病力则有所回升。为此,我们将致病力测定试验重复了3次,连续35d调查棉苗的病情指数,结果都表明PKS基因与菌株的致病力无关。比较我们与Zhang等^[25]的试验方法,发现致病力测定所用的棉花品种和菌株均不相同,本试验中V08DF1菌株的PKS基因序列在100、353、704等多个位点与Zhang等所用的V952菌株存在差异。

由于微菌核的抗逆性与其含有丰富的黑色素密切相关,为此,我们试图探究PKS基因与杀菌剂敏感性之间的关系。最初我们选择了5种杀菌剂,包括嘧菌酯、咯菌腈、戊唑醇、噻呋酰胺和氰烯菌酯,发现野生型菌株V08DF1对嘧菌酯、咯菌腈、戊唑醇这3种杀菌剂表现为高度敏感,而对噻呋酰胺和氰烯菌酯不敏感。最终,我们测定了0.48 μ g/ml嘧菌酯、1.29 μ g/ml咯菌腈对敲除突变体 Δ VdPKS的菌丝生长抑制率。其中,咯菌腈通过抑制葡萄糖磷酸化的有关转移,并抑制真菌菌丝体的生长,最终导致病原菌死亡;嘧菌酯为甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂,高效、广谱,对几乎所有的真菌界病害有良好的活性。VdPKS基因敲除突变体的微菌核没有黑色素的积累,

敲除突变体在添加这2种杀菌剂的培养基上生长速度相对于野生型和回补突变体菌株有所下降,其中嘧菌酯和咯菌腈对敲除突变体的菌丝生长抑制率相对于野生型菌株和回补突变体有显著升高,这提示PKS基因与大丽轮枝菌的抗逆性相关。

参考文献:

- [1] 赵君,张大伟,徐剑文,等.陆地棉VRO18抗黄萎病QTL定位[J].江苏农业学报,2018,34(6):1232-1238.
- [2] PEGG G F, BRADY B L. *Verticillium*wilts[M]. United Kingdom:CABI Publishing,2002:432.
- [3] 李文雯,庞学兵,易小龙,等.新疆部分棉区棉花黄萎病菌致病力分化的遗传多样性分析[J].江苏农业科学,2018,46(17):83-87.
- [4] MARUTHACHALAM K, KLOSTERMAN S J, KANGS, et al. Identification of pathogenicity-related genes in the vascular wilt fungus *Verticilliumdahliae* by *Agrobacteriumtumefaciens*-mediated T-DNA insertional mutagenesis[J]. *Molecular Biotechnology*, 2011, 49:209-221.
- [5] 林玲,张昕,邓晟.棉花黄萎病研究进展[J].棉花学报,2014,26(3):260-267.
- [6] ISAAC I, MACGRRIVE Q D.Germination of resting bodies in *Verticillium*species[J]. *Nature*, 1962,195:826-827.
- [7] LÓPEZ-ESCUDERO F J, MWANZA C, BLANCO-LÓPEZ M A. Reduction of *Verticilliumdahliae*microsclerotia viability in soil by dried plant residues[J]. *Crop Protection*, 2007, 26:127-133.
- [8] FRADIN E F, THOMMA B P.Physiology and molecular aspects of *verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. alboatrum* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7(2):71-86.
- [9] NEUMANN M J, DOBINSON K F.Sequence tag analysis of gene expression during pathogenic growth and microsclerotia development in the vascular wilt pathogen *Verticilliumdahliae*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, 38(1):54-62.
- [10] 梁曼,邓晟,张昕,等.大丽轮枝菌菌核型菌株T-DNA插入突变文库的构建及微菌核发育异常突变体的筛选[J].江苏农业学报,2015,31(3):520-525.
- [11] 梁曼.大丽轮枝菌微菌核发育异常突变体的筛选及其相关基因的鉴定[D].南京:南京师范大学,2015.
- [12] COPPIN E, SILAR P.Identification of PaPKSI, a polyketide synthase involved in melanin formation and its use as a genetic tool in *Podosporaanserina* [J]. *Mycological Research*, 2007, 111:901-908.
- [13] FUJII I, YASUOKA Y, TSAI H F, et al. Hydrolytic polyketide shortening by Ayl1p, a novel enzyme involved in fungal melanin biosynthesis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(43):44613-44620.
- [14] TSAI HF, FUJII I, WATANABE A, et al.Pentaketide melanin biosynthesis in *Aspergillusfumigatus* requires chain-length shortening of

- a heptaketideprecursor[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(31): 29292-29298.
- [15] PAZ Z, GARCÍA-PEDRAJAS M D, ANDREWS D L, et al. One step construction of *Agrobacterium*-recombination-ready-plasmids (OSCAR), an efficient and robust tool for ATMT based gene deletion construction in fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2011, 48:677-684.
- [16] 邓 晟, 王彩月, 张 昕, 等. 大丽轮枝菌的绿色荧光蛋白标记[J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(5): 1197-1199.
- [17] 邓 晟, 张 昕, 林 玲. 蛋白激酶 A 催化亚基 *VdPKAC1* 对菌丝型大丽轮枝菌 V07DF2 培养性状及致病力的调控[J]. *中国农业科学*, 2014, 47(17): 3382-3391.
- [18] XIONG D G, WANG Y L, MA J, et al. Deep mRNA sequencing reveals stage-specific transcriptome alterations during microsclerotia development in the smoke tree vascular wilt pathogen, *Verticillium dahliae*[J]. *BMC Genomics*, 2014, 15:324-342.
- [19] 喻秀秀, 王 卿, 张 昕, 等. 江苏省大丽轮枝菌的培养、遗传及致病特性分析[J]. *植物病理学报*, 2018, 48(3): 378-388.
- [20] 朱春雨, 吴新平, 徐文平, 等. 农药室内生物测定实验准则杀菌剂第 2 部分: 抑制病原真菌菌丝生长试验平皿法: NT/Y 1156.2—2006[S]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
- [21] ROJAS J D, SETTEL D, ARAUJO W L, et al. The Diversity of polyketide synthase genes from sugarcane-derived fungi[J]. *Fungal Microbiology*, 2012, 63:565-577.
- [22] 杨凯瑞, 高向东, 顾觉奋. 聚酮合成酶应用研究进展[J]. *国外医药抗生素分册*, 2012, 33(3): 99-103.
- [23] 王 胜, 高 峰, 黄家风. 棉花黄萎菌聚酮合成酶基因的克隆与序列分析[J]. *新疆农业科学*, 2013, 50(9): 1724-1729.
- [24] PUHALLA J E, BELL A A. Genetics and biochemistry of wilt pathogens[M] // MACE M A, BELL A A. *Fungi wilt diseases of plant*. New York, USA: Academic Press, 1981: 145-192.
- [25] ZHANG T, ZAHNG B, HUA C, et al. *VdPKS1* is required for melanin formation and virulence in a cottonwilt pathogen *Verticillium dahliae*[J]. *Science China Life Sciences*, 2017, 60(8): 868-879.

(责任编辑:张震林)