

张承康, 黄欣, 李希荣, 等. 百香果果生炭疽菌小 GTP 酶基因 *Rab7* 的鉴定与功能分析[J]. 江苏农业学报, 2025, 41(6): 1107-1115.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2025.06.007

百香果果生炭疽菌小 GTP 酶基因 *Rab7* 的鉴定与功能分析

张承康^{1,2}, 黄欣^{1,2}, 李希荣¹, 郭彦超¹, 郭田龙^{1,2}, 陈美霞¹

(1. 宁德师范学院生物科学与工程学院省级产学研合作示范基地, 福建 宁德 352100; 2. 福建农林大学生物农药与化学生物学教育部重点实验室, 福建 福州 350002)

摘要: 由果生炭疽菌(*Colletotrichum fructicola*)引起的百香果炭疽病是影响百香果(*Passiflora edulis*)产量和品质的重要病害, 解析果生炭疽菌致病分子机制对病害防控具有重要意义。本研究鉴定得到百香果果生炭疽菌小 GTP 酶 *Rab7*, 并将其与多种真菌的 *Rab7* 蛋白氨基酸序列进行比对。系统发育分析结果表明, 果生炭疽菌 *Rab7* 蛋白与酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) *Rab7* 蛋白的亲缘关系最远, 而与胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、禾谷炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*) *Rab7* 蛋白的亲缘关系较近。利用同源重组技术构建 *Rab7* 基因敲除菌株 $\Delta Rab7$ 及 *Rab7* 基因回补菌株 $\Delta Rab7/Rab7$ 。表型分析发现, 与野生型和 $\Delta Rab7/Rab7$ 相比, $\Delta Rab7$ 在 PDAY 和 MM 培养基中的菌落直径显著下降, 黑色素积累量显著增加, 分生孢子产量显著减少。但 $\Delta Rab7$ 与野生型 N425 对 H_2O_2 胁迫的敏感性无显著差异。激光共聚焦显微镜观察发现 *Rab7*-GFP 融合蛋白定位于液泡膜, 且 $\Delta Rab7$ 液泡呈现碎片化分布, 表明 *Rab7* 基因通过调控果生炭疽菌液泡融合维持其正常液泡形态。本研究结果为解析果生炭疽菌的致病分子机制提供理论依据。

关键词: 百香果; 果生炭疽菌; 小 GTP 酶基因 *Rab7*; 致病性

中图分类号: S436.639 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2025)06-1107-09

Identification and functional analysis of the small GTPase gene *Rab7* in *Colletotrichum fructicola* of *Passiflora edulis*

ZHANG Chengkang^{1,2}, HUANG Xin^{1,2}, LI Xirong¹, GUO Yanchao¹, GUO Tianlong^{1,2}, CHEN Meixia¹

(1. Provincial Demonstration Base for Industry-University-Research Cooperation, College of Biological Science and Engineering, Ningde Normal University, Ningde 352100, China; 2. Key Laboratory of Biopesticide and Chemical Biology, Ministry of Education, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Anthracnose of *Passiflora edulis* caused by *Colletotrichum fructicola* is a significant disease affecting the yield and quality of passion fruit. Elucidating the pathogenic molecular mechanisms of *Colletotrichum fructicola* is of great significance for disease control. In this study, we identified the small GTPase *Rab7* from *C. fructicola* and compared its amino acid sequences with those of *Rab7* proteins from various fungi. Phylogenetic analysis revealed that the *Rab7* protein of *C. fructicola* had the most distant relationship with the *Rab7* protein of *Saccharomyces cerevisiae*, while it was closely related to the *Rab7* proteins of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Colletotrichum graminicola*. Using

收稿日期: 2024-11-06

基金项目: 福建省自然科学基金项目(2021J05254); 宁德师范学院创新团队项目(2022T01)

作者简介: 张承康(1988-), 男, 福建宁德人, 博士, 副教授, 主要从事植物病原菌致病分子机理的研究。(E-mail) shin_ichi@126.com

通讯作者: 陈美霞, (E-mail) cmx_101019@163.com

homologous recombination technology, we constructed the *Rab7* gene knockout strain $\Delta Rab7$ and the complemented strain $\Delta Rab7/Rab7$. Phenotypic analysis showed that compared with the wild type and $\Delta Rab7/Rab7$, the $\Delta Rab7$ mutant exhibited significantly reduced colony diameter on PDAY and MM media, significantly increased melanin accumula-

tion, and significantly decreased conidial production. However, Δ Rab7 and the wild type N425 did not show significant differences in sensitivity to H_2O_2 stress. Confocal laser scanning microscopy observations indicated that the Rab7-GFP fusion protein was localized to the vacuolar membrane, and the vacuoles in Δ Rab7 appeared fragmented, suggesting that *Rab7* gene maintained normal vacuolar morphology in *C. fruticola* by regulating vacuolar fusion. This study provides a theoretical basis for elucidating the molecular mechanisms of pathogenicity in *C. fruticola*.

Key words: *Passiflora edulis*; *Colletotrichum fruticola*; small GTPase gene *Rab7*; pathogenicity

百香果 (*Passiflora edulis*), 又称西番莲、鸡蛋果, 是西番莲科西番莲属的多年生常绿攀缘草质藤本植物, 主要分布于热带和亚热带地区, 在中国广西、福建、广东和海南等地广泛种植, 其果汁色泽鲜艳, 酸甜可口, 富含营养, 具有较高的食用价值、观赏价值、药用价值, 深受消费者喜爱^[1-3]。炭疽病是百香果的重要病害之一, 已成为百香果产业发展的限制因素。因此, 深入研究百香果炭疽病的发病机理具有重要意义。已有研究表明, 果生炭疽菌是引起百香果炭疽病的主要病原菌之一^[4]。近年来, 关于果生炭疽菌功能基因的研究逐渐增多。研究发现, Homeobox 家族转录因子 Htf2 调控菌株的营养生长、分生孢子形态建成以及黑色素合成; 半胱氨酸蛋白酶 *Atg4* 与 *Atg8* 相互作用, 共同调控果生炭疽菌的生长、自噬和致病性; 双特异性磷酸酶 *Msg5* 受转录因子 *Ap1* 调控, 其调节着果生炭疽菌对油茶的致病性^[5-7]。然而, 与稻瘟病菌、禾谷镰刀菌等模式病原真菌相比, 针对果生炭疽菌功能基因的系统性研究仍然较少, 尤其是关于其致病基因在百香果宿主中的作用尚未深入探索。因此, 进一步研究果生炭疽菌的功能基因, 有助于揭示其致病分子机制, 为百香果炭疽病的防治提供理论依据。

Rab 蛋白是 Ras 超级家族成员, 也被称为小 G 蛋白, 是一类相对分子量为 $2 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ 的单体蛋白, 具有内源 GTP 酶活性, 主要参与囊泡运输过程, 包括胞吞和胞吐。其中, Rab7 蛋白参与了早期内涵体向晚期内涵体的转变过程^[8]。在丝状真菌中, Rab7 与液泡融合密切相关, 其缺失会导致菌丝液泡碎片化^[9-11]。此外, 在植物病原真菌中, Rab7 不仅参与囊泡运输, 还调控病原菌的生长发育和致病性。例如, FgRab7 缺失会导致禾谷镰刀菌的菌落生长减缓、菌丝分枝增多、分生孢子产量降低、有性发育受阻、毒素合成减少、致病性几乎完全丧失^[9]。在稻瘟病菌中, Rab7 同源蛋白 MoYpt7 的缺失会导致菌株的营养生长变缓、产孢能力下降、液泡融合受阻

以及自噬体形成异常。此外, 由于附着胞形成受阻, 该菌株对水稻的侵染能力也显著降低^[10,12]。目前, 针对炭疽菌属 Rab 蛋白的研究较少, 因此有必要对该家族蛋白的功能进行深入探究, 以明确其在炭疽菌致病过程中的作用。本研究拟以 Rab7 蛋白为研究对象, 旨在揭示其在果生炭疽菌中的生物学功能及其在侵染百香果过程中的作用机制, 从而为解析果生炭疽菌的致病分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

果生炭疽菌野生型菌株 N425、质粒 pCZ003 和 pCZ025 由宁德师范学院生物科学与工程学院保存。病原菌接种试验所用百香果品种为金元宝。马铃薯葡萄糖琼脂酵母培养基 (PDAY): 马铃薯 200 g, 酵母粉 1 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂粉 20 g, 蒸馏水定容到 1 L。基础培养基 (MM): Na_2HPO_4 1.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g, NaCl 1.0 g, 葡萄糖 5.0 g, NH_4NO_3 1.0 g, 用 NaOH 将 pH 值调至 7.2, 固体培养基另添加琼脂粉 20.0 g, 蒸馏水定容到 1 L。原生质体再生培养基 (TB3): 酵母提取物 3 g, 酪氨酸水解蛋白 3 g, 蔗糖 200 g, 固体培养基另添加琼脂粉 20 g, 蒸馏水定容到 1 L。完全培养基 (CM): 酵母提取物 6 g, 酪氨酸水解蛋白 6 g, 蔗糖 10 g, 琼脂粉 20 g, 蒸馏水定容到 1 L。以上培养基均经高压灭菌, 室温保存。

1.2 试验方法

1.2.1 Rab7 蛋白氨基酸序列分析与系统发育树的构建 从果生炭疽菌 N425 基因组数据库中获取 Rab7 基因序列^[13], 通过 NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 比对获得其氨基酸序列。同时下载胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、禾谷炭疽菌 (*Colletotrichum graminicola*)、稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*)、粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*)、禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)、构巢曲霉

(*Aspergillus nidulans*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) 7 种真菌的 *Rab7* 同源蛋白氨基酸序列。使用 Clustal X1.83 软件进行多序列比对,使用 ENDScript 软件进行序列着色。采用 MEGA 11 软件的邻接法(Neighbor-joining)进行 1 000 次 bootstrap 检验构建系统发育树。

1.2.2 果生炭疽菌 *Rab7* 基因的敲除与回补 利用 SDS 法^[14]提取果生炭疽菌 N425 基因组 DNA,并以其为模板,使用引物 AF/AR 和 BF/BR 分别扩增 *Rab7* 基因上下游同源臂片段 A 和 B;以 pCZ025 为模板,分别使用引物 G418F/G41R 和 G18F/G418R 扩增新霉素磷酸转移酶基因(*GEN*)的前 2/3 片段(Ga)和后 2/3 片段(Gb),通过融合 PCR 将 A 与 Ga 片段连接获得 AG 片段,B 与 Gb 片段连接获得 GB 片段,将 AG 和 GB 片段共转化至 N425 原生质体中,原生质体的制备及转化参照彭成彬等^[15]的方法。利用终质量浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的新霉素 G418 筛选转化子,提取这些转化子的基因组 DNA 为模板,利用 3 对引物 OF/OR、UAF/UAR 和 DBF/DBR 进行 PCR 扩增,以验证转化子是否为 *Rab7* 基因缺失突变体。

利用引物 CF/CR 从 N425 基因组中扩增 *Rab7* 基因开放阅读框片段 C,引物 CF/CR 分别含有 *Bam* H I 和 *Not* I 酶切位点,将 C 片段连接至 pCZ003 质粒的 *GFP* 基因下游,构建回补载体,将回补载体转化至 Δ *Rab7* 突变体原生质体中,利用终质量浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的潮霉素筛选转化子,提取这些转化子的基因组 DNA 作为模板,利用 3 对引物 OF/OR、UAF/UAR 和 DBF/DBR 进行 PCR 扩增,以验证转化子是否为 *Rab7* 基因回补菌株。引物序列如表 1 所示。

1.2.3 果生炭疽菌菌落形态观察 将各菌株接种于 PDAY 和 MM 平板培养基上,26 $^{\circ}\text{C}$ 光照培养 5 d 后,测量菌落直径并观察菌丝形态。继续培养 3 d 后,观察黑色素合成情况。将各菌株接种于 CM 固体培养基(添加 H_2O_2 ,终浓度为 9.79 mmol/L)上,暗培养 3 d 后,测量菌落半径并计算 H_2O_2 对各菌株的抑制率。

1.2.4 分生孢子产量统计与孢子形态观察 将直径 5 mm 的菌丝块接种于 100 mL CM 液体培养基中,26 $^{\circ}\text{C}$ 条件下 150 r/min 振荡培养 5 d。过滤收集分生孢子,用血细胞计数板计数,通过显微镜观察分生孢子形态。用 ddH₂O 将孢子含量调节至至 1 mL 5×10^4 个,滴于疏水盖玻片上,暗培养 12 h 后观察附着胞形态。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	序列(5'→3')
AF	CCGAAGTCTTTGTTGCGAT
AR	CCACGATTCGAAGCCGCGAGGGGTGGTTGGTTGGTGTAG
G418F	CTACACCAACCAACCACCCCTCCGCGGCTTCGAATCGTGG
G41R	GAAAAGCGGCCATTTTCCACCATGA
G18F	GAACTGCAAGACGAGGCAGCG
G418R	AAACACCATTACACCAGTGCTCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGCCGATAG
BF	CGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGAGCACTGGTGTGAATGGTGTIT
BR	GGTTTGTGTCTCTGGGTCTT
CF	CGCGGATCCATGTCATCGAGAAAGAAGGTCC
CR	ATAAGAATGCGGCCGCTTAGCAGGCCGACCCGTCC
OF	CTCAAGGTGGCCTTATCGG
OR	ATGGGAAGTGTGCGGGTC
UAF	GAATCATTGCGGCTTCGTAA
UAR	TGGTCGGTGTCTGTTTTG
DBF	TATCATGTTGGAAAATGGCC
DBR	TCGTGAGGAAGAGAGGGAGG

1.2.5 致病性分析 取新鲜百香果叶片,清水洗净后,在叶片上制造十字伤口。将菌丝块接种于伤口处,保湿培养 3~7 d 后观察病斑形成情况,以接种无菌琼脂块的叶片为对照。

1.2.6 *Rab7* 蛋白亚细胞定位观察 取 *Rab7* 基因互补菌株的菌丝块置于载玻片上,分别滴加无菌水和 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ FM4-64 染料,保湿孵育 30 min。使用激光共聚焦显微镜分别在明场、蓝光激发(检测 FM4-64 荧光)和绿光激发(检测 GFP 荧光)条件下进行 *Rab7*-GFP 融合蛋白的亚细胞定位观察。

1.2.7 菌丝液泡形态观察 分别取野生型和 Δ *Rab7* 突变体菌丝,用 4 $\mu\text{mol}/\text{L}$ FM4-64 染料染色,保湿孵育 30 min 后用激光共聚焦显微镜观察菌丝中液泡形态。

2 结果与分析

2.1 *Rab7* 蛋白亲缘关系与结构域分析

如表 2 所示,将果生炭疽菌与胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、禾谷炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)、稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)、粗

糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*)、禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 的 Rab7 蛋白的氨基酸序列一致度较高,与酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的 Rab7 蛋白的氨基酸序列一致度较低。如图 1 所示,8 个真菌的 Rab7 蛋白均包含小分子 GTP 酶特征性结构域 G1~G5、5 个保守结构域 F1~F5 以及 C 端膜定位信号序列,这些区域在不同真菌中也显示出较高的序列一致性,表明 Rab7 蛋白在真菌进化过程中具有高度保守性。系

统发育分析结果表明,果生炭疽菌 Rab7 蛋白与酿酒酵母 Ypt7 蛋白的氨基酸序列相差较大,亲缘关系最远,而与同属真菌(胶孢炭疽菌、禾谷炭疽菌) Rab7 蛋白的氨基酸序列高度相似,其中与胶孢炭疽菌 Rab7 蛋白的氨基酸序列完全一致。值得注意的是,稻瘟病菌能够产生附着胞,其 Rab7 蛋白与果生炭疽菌的 Rab7 蛋白亲缘关系较近;禾谷镰刀菌、构巢曲霉、粗糙脉孢菌均不能产生附着胞,其 Rab7 蛋白与果生炭疽菌的 Rab7 蛋白亲缘关系较远。

表 2 果生炭疽菌 Rab7 蛋白与不同真菌 Rab7 蛋白的氨基酸序列比对

Table 2 Comparison of the amino acid sequences of Rab7 proteins from *Colletotrichum fructicola* and various fungi

物种	氨基酸序列号	序列覆盖度(%)	序列一致度(%)
胶孢炭疽菌(<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)	XP_045270506.1	100.0	100.0
禾谷炭疽菌(<i>Colletotrichum graminicola</i>)	XP_008092063.1	100.0	99.5
稻瘟病菌(<i>Pyricularia oryzae</i>)	XP_003715107.1	100.0	97.1
粗糙脉孢霉(<i>Neurospora crassa</i>)	XP_961487.1	100.0	96.6
禾谷镰刀菌(<i>Fusarium graminearum</i>)	XP_011323641.1	100.0	94.1
构巢曲霉(<i>Aspergillus nidulans</i>)	XP_050469339.1	100.0	87.8
酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	NP_013713.1	100.0	65.9

2.2 果生炭疽菌 Rab7 基因敲除菌株与 Rab7 基因回补菌株的验证

本研究利用同源重组技术将 Rab7 基因替换为新霉素磷酸转移酶基因 (*GEN*)^[16]。如图 2 所示,通过原生质体转化获得 4 个转化子,使用引物 OF/OR 进行检验,仅 1 个转化子未扩增出 Rab7 基因,将其命名为 Δ Rab7(图 2B)。进一步使用引物 UAF/UAR 和 DBF/DBR 进行验证,确认 Δ Rab7 为 Rab7 基因缺失突变体。随后,将 Rab7 基因的回补载体导入 Δ Rab7 中,获得回补菌株 Δ Rab7/Rab7。

2.3 Rab7 基因对果生炭疽菌营养生长的影响

如图 3 所示, Δ Rab7 在 PDAY 和 MM 培养基上的生长速率显著低于野生型 N425,其中 MM 培养基上 Δ Rab7 的菌落直径仅为野生型 N425 的 1/3。 Δ Rab7 气生菌丝量明显减少,该表型缺陷在 Δ Rab7/Rab7 中得到恢复。 H_2O_2 胁迫试验结果表明, Δ Rab7 与野生型 N425 对氧化胁迫的敏感性无显著差异。

2.4 Rab7 基因对果生炭疽菌黑色素形成的影响

如图 4 所示,培养 7 d, Δ Rab7 在 PDAY 培养基

上产生明显的黑色素积累,而野生型 N425 和 Δ Rab7/Rab7 仅产生少量黑色素,表明 Rab7 基因负调控黑色素的合成。

2.5 Rab7 基因对果生炭疽菌分生孢子产量和附着胞的影响

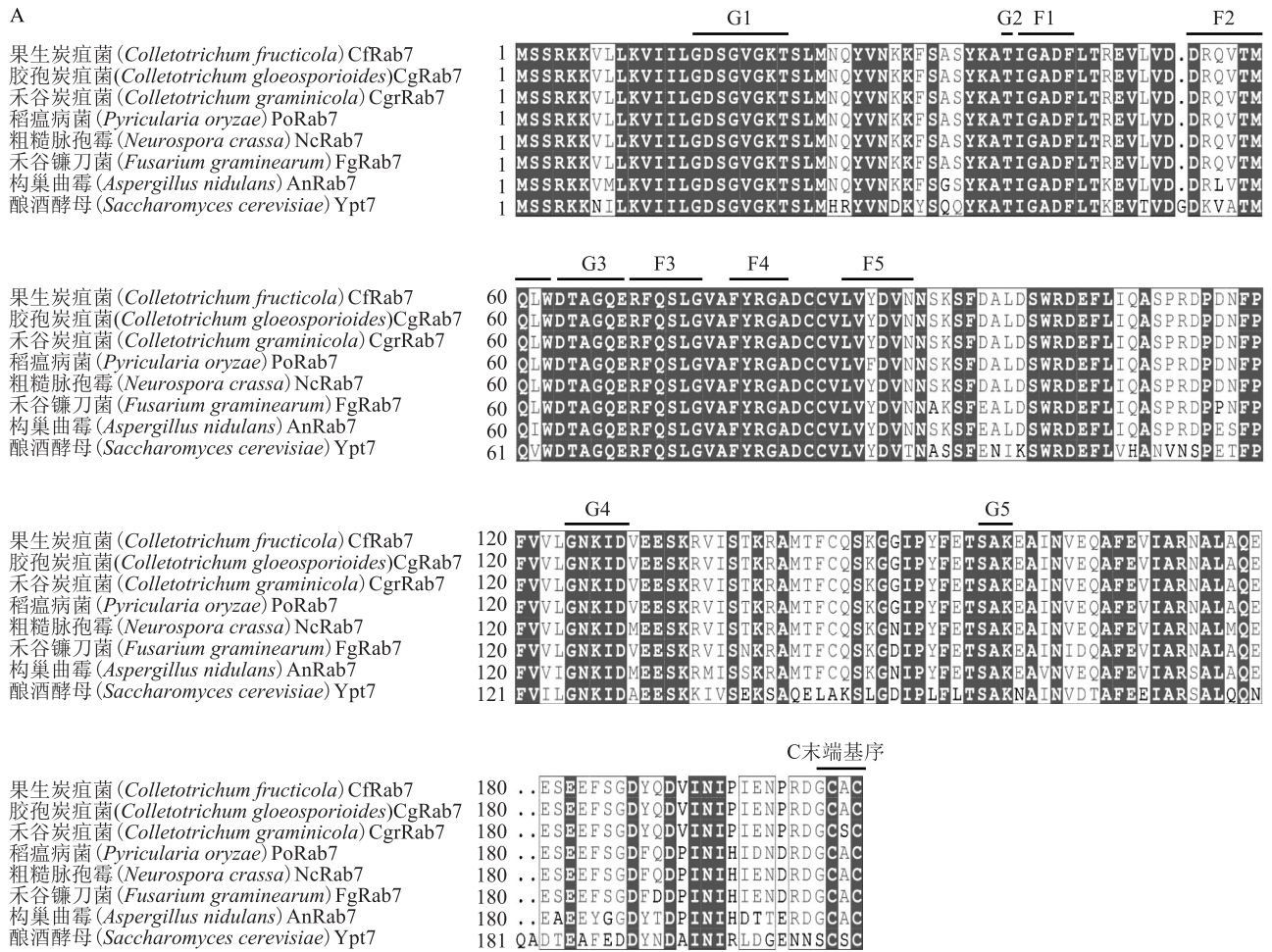
如图 5 所示,Rab7 基因的缺失造成果生炭疽菌分生孢子产量显著下降, Δ Rab7 分生孢子产量约为野生型 N425、 Δ Rab7/Rab7 的 1/10,但 Δ Rab7 分生孢子的形态与野生型 N425 和 Δ Rab7/Rab7 无显著差异,表明 Rab7 基因调控果生炭疽菌分生孢子产量但不影响分生孢子的形态建成。

2.6 Rab7 基因对果生炭疽菌致病性的影响

如图 6 所示, Δ Rab7 在百香果叶片上并没有产生明显病斑。而野生型 N425、 Δ Rab7/Rab7 均在叶片上产生典型病斑,表明 Rab7 是果生炭疽菌的重要致病因子。

2.7 果生炭疽菌 Rab7 蛋白亚细胞定位

如图 7 所示,Rab7-GFP 与 FM4-64 染料共定位于液泡膜。 Δ Rab7 的液泡呈现碎片化分布,而 Rab7 基因回补菌株 Δ Rab7/Rab7 的液泡完整,表明 Rab7 基因通过调控液泡融合维持正常液泡形态。



B

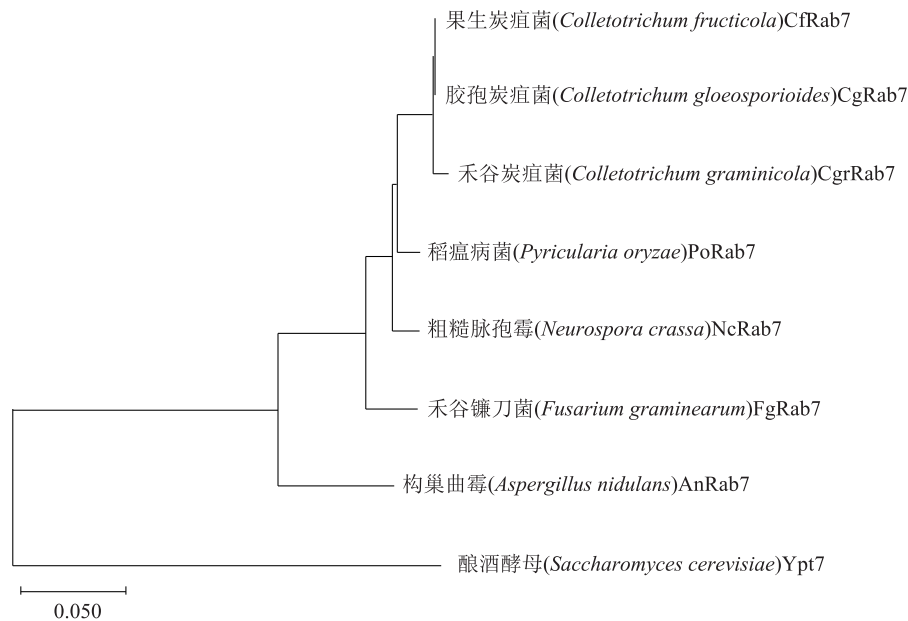
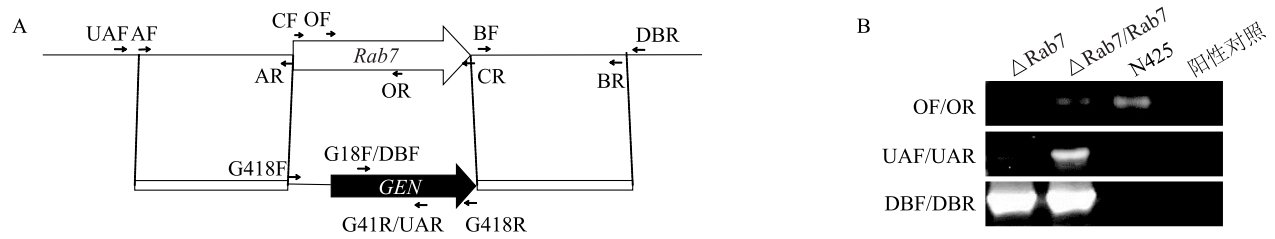


图1 果生炭疽菌 Rab7 蛋白与不同真菌 Rab7 蛋白的氨基酸序列比对 (A) 和系统发育树 (B)

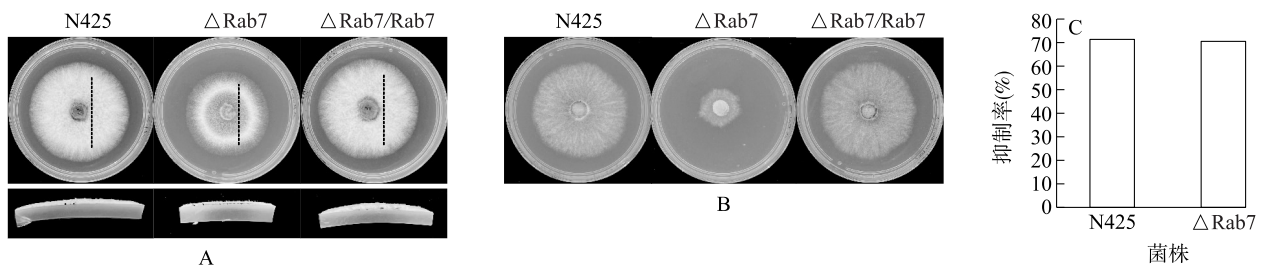
Fig.1 Comparison of the amino acid sequences of Rab7 proteins from *Colletotrichum fruticola* and various fungi (A) and the phylogenetic tree (B)



A: 果生炭疽菌 *Rab7* 基因的敲除策略, *GEN* 为新霉素磷酸转移酶基因, 引物 AF/AR、G418F/G418R、G18F/G418R、BF/BR、CF/CR、OF/OR、UAF/UAR、DBF/DBR 序列见表 1; B: 果生炭疽菌 *Rab7* 基因敲除菌株和 *Rab7* 基因回补菌株的验证, $\Delta Rab7$ 为 *Rab7* 基因敲除菌株, $\Delta Rab7/Rab7$ 为 *Rab7* 基因回补菌株, N425 为野生型果生炭疽菌。

图 2 果生炭疽菌 *Rab7* 基因敲除菌株和 *Rab7* 基因回补菌株的构建

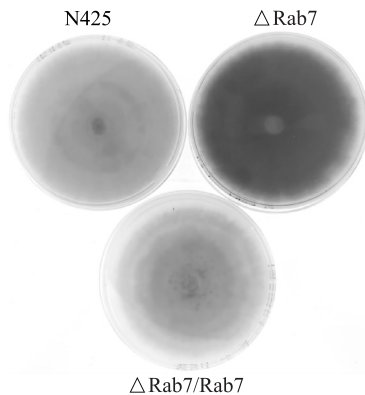
Fig.2 Construction of the *Rab7* gene knockout strain and complementary strain of *Colletotrichum fructicola*



A: 各菌株在 PDAY 培养基上的菌落形态, 虚线为菌落切割位置; B: 各菌株在 MM 培养基上的菌落形态; C: H_2O_2 对各菌株营养生长的抑制率。 $\Delta Rab7$ 为 *Rab7* 基因敲除菌株, $\Delta Rab7/Rab7$ 为 *Rab7* 基因回补菌株, N425 为野生型果生炭疽菌。

图 3 果生炭疽菌 *Rab7* 基因敲除菌株与 *Rab7* 基因回补菌株的营养生长

Fig.3 Vegetative growth of the *Rab7* gene knockout strain and complementary strain of *Colletotrichum fructicola*



$\Delta Rab7$ 为 *Rab7* 基因敲除菌株, $\Delta Rab7/Rab7$ 为 *Rab7* 基因回补菌株, N425 为野生型果生炭疽菌。

图 4 果生炭疽菌 *Rab7* 基因敲除菌株与 *Rab7* 基因回补菌株的黑色素形成

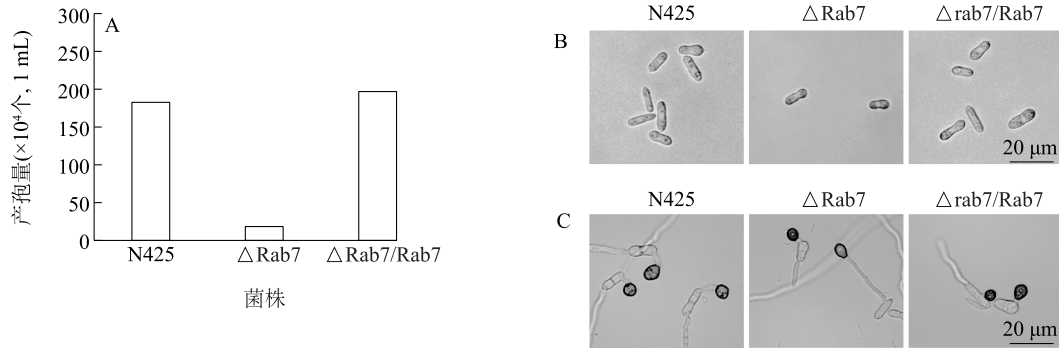
Fig.4 Melanin formation in the *Rab7* gene knockout strain and complementary strain of *Colletotrichum fructicola*

3 讨论与结论

Rab 蛋白在真核生物中高度保守, 特别是在丝状

真菌中。研究结果表明, 与禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*) *Rab7* 相比, 果生炭疽菌 (*Colletotrichum fructicola*) *Rab7* 与稻瘟病菌 (*Pyricularia oryzae*) *Rab7* 的亲缘关系更近。禾谷镰刀菌和稻瘟病菌的 *Rab7* 蛋白均为其致病性必需因子^[9-10]。果生炭疽菌和稻瘟病菌的 *Rab7* 基因不仅参与营养生长的调控, 还参与黑色素合成的负调控^[10]。*Rab7* 基因缺失的禾谷镰刀菌菌落生长速率降低, 且其受到的生长抑制程度较果生炭疽菌和稻瘟病菌更为显著, 但是禾谷镰刀菌中 *Rab7* 基因缺失并未对色素合成产生明显影响^[9]。

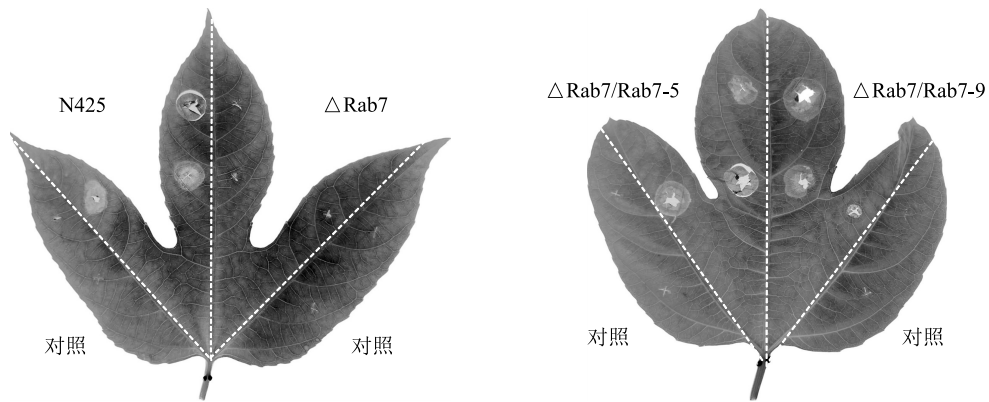
亚细胞定位研究结果表明, 果生炭疽菌 *Rab7* 定位于液泡膜, 与酵母、稻瘟病菌和禾谷镰刀菌中的 *Rab7* 同源蛋白定位一致^[9, 12, 17-18]。在禾谷镰刀菌中, *FgRab7* 是液泡融合过程中的关键因子, *FgRab7* 基因的缺失会导致液泡难以融合^[9]。在构巢曲霉和苹果腐烂病菌中, *Rab7* 基因缺失也会导致液泡碎片化^[19-20]。本研究发现, 果生炭疽菌 $\Delta Rab7$ 突变体, 同样表现出液泡融合缺陷, 证明 *Rab7* 基因的液泡调控功能在不同植物病原真菌中高度保守。



A:各菌株分生孢子产量;B:各菌株的分生孢子形态;C:各菌株的附着胞形态。 $\Delta Rab7$ 为 *Rab7* 基因敲除菌株, $\Delta Rab7/Rab7$ 为 *Rab7* 基因回补菌株,N425 为野生型果生炭疽菌。

图5 果生炭疽菌 *Rab7* 基因敲除菌株和 *Rab7* 基因回补菌株的分生孢子与附着胞

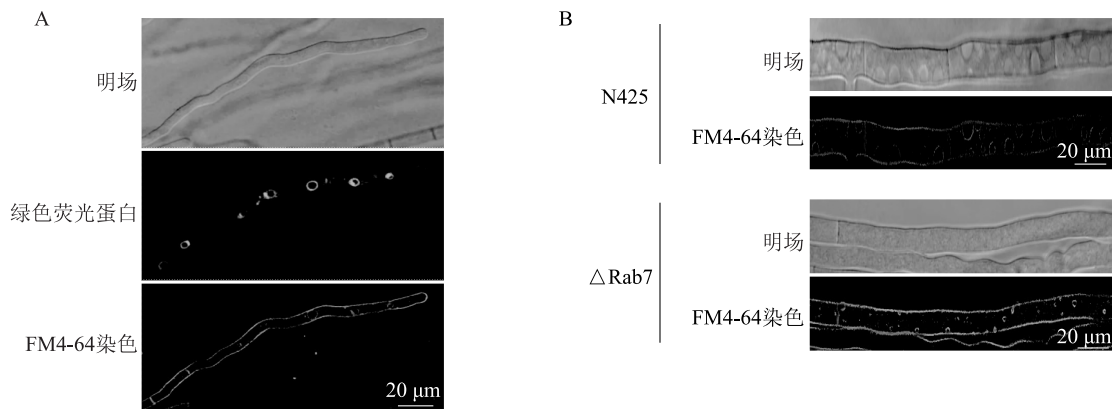
Fig.5 Conidia and appressoria of the *Rab7* gene knockout strain and complementary strain of *Colletotrichum fructicola*



$\Delta Rab7$ 为 *Rab7* 基因敲除菌株, $\Delta Rab7/Rab7$ 为 *Rab7* 基因回补菌株,N425 为野生型果生炭疽菌。

图6 果生炭疽菌 *Rab7* 基因敲除菌株和 *Rab7* 基因回补菌株的致病性

Fig.6 Pathogenicity of the *Rab7* gene knockout strain and complementary strain of *Colletotrichum fructicola*



A: $\Delta Rab7/Rab7$ 的 *Rab7* 蛋白亚细胞定位;B:*Rab7* 基因敲除菌株和 *Rab7* 基因回补菌株的液泡形态观察。 $\Delta Rab7$ 为 *Rab7* 基因敲除菌株, $\Delta Rab7/Rab7$ 为 *Rab7* 基因回补菌株,N425 为野生型果生炭疽菌。

图7 果生炭疽菌 *Rab7* 蛋白的亚细胞定位(A)与 *Rab7* 基因敲除菌株的液泡形态(B)

Fig.7 Subcellular localization of *Rab7* protein of *Colletotrichum fructicola* (A) and vacuolar morphology of the *Rab7* gene knockout strain (B)

果生炭疽菌可以通过附着胞穿透宿主细胞表面结构侵入宿主细胞,也可通过叶片伤口侵入宿主细胞。本研究发现, Δ Rab7 菌株无法在机械损伤的百香果叶片上形成病斑,这可能与 Δ Rab7 菌株对宿主防御机制更加敏感有关,也可能与 Δ Rab7 菌株自身营养生长受限有关。植物通过产生超氧化物抵御病原菌的入侵^[21-22],受禾谷炭疽菌侵染时,玉米体内会产生大量活性氧^[23]。 Δ Rab7 菌株可能对宿主产生的活性氧更加敏感,从而造成致病力丧失。然而本研究中 H_2O_2 对野生型 N425 和 Δ Rab7 菌株的抑制率无显著差异,表明 Δ Rab7 菌株致病性的丧失可能与宿主的其他防御机制相关。在本研究中,*Rab7* 基因的缺失引起果生炭疽菌营养生长减慢,尤其是在营养贫乏的 MM 培养基中, Δ Rab7 菌株的营养生长缺陷更加明显,表明*Rab7* 基因的缺失使菌株对外界营养物质吸收能力下降。 Δ Rab7 菌株菌丝在进入宿主细胞后,可能无法利用宿主细胞中的营养物质,从而导致致病力丧失。前人研究发现,*Rab7* 基因的缺失造成病原菌致病性显著下降,同时其营养生长也存在缺陷,表明致病性的减弱可能是由营养生长缺陷造成的^[24-27],该结果与本研究结果一致。本研究首次揭示了果生炭疽菌 Rab7 蛋白在致病过程中的重要作用,为深入解析百香果果生炭疽菌的致病分子机制提供了理论依据。

参考文献:

- [1] VIGANÓ J, COUTINHO J P, SOUZA D S, et al. Exploring the selectivity of supercritical CO_2 to obtain nonpolar fractions of passion fruit bagasse extracts [J]. *Journal of Supercritical Fluids*, 2016, 110: 1-10.
- [2] 袁启凤,严佳文,王红林,等. 百香果品种‘紫香 1 号’果实糖、酸和维生素成分分析[J]. *中国果树*, 2019(4): 43-47.
- [3] 许海棠,廖华珍,张金彦,等. 百香果叶提取物的体外抗氧化活性和抑制 α -葡萄糖苷酶的作用[J]. *食品科技*, 2019, 44(7): 256-261.
- [4] LI W Z, RAN F, LONG Y H, et al. Evidences of *Colletotrichum fructicola* causing anthracnose on *Passiflora edulis* Sims in China [J]. *Pathogens*, 2022, 11(1): 6.
- [5] ZHANG C K, ZHOU Z W, GUO T L, et al. *CFHTF2* is needed for vegetative growth, conidial morphogenesis and the osmotic stress response in the tea plant anthracnose (*Colletotrichum fructicola*) [J]. *Genes*, 2023, 14(12): 2235.
- [6] GAO Y L, ZHANG S P, SHENG S, et al. A *Colletotrichum fructicola* dual specificity phosphatase CfMsg5 is regulated by the CfAp1 transcription factor during oxidative stress and promotes virulence on *Camellia oleifera* [J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2413851.
- [7] GUO S F, ZHANG S P. The cysteine protease CfAtg4 interacts with CfAtg8 to govern the growth, autophagy and pathogenicity of *Colletotrichum fructicola* [J]. *Journal of Fungi*, 2024, 10(6): 431.
- [8] HUOTARI J, HELENIUS A. Endosome maturation [J]. *EMBO Journal*, 2011, 30(17): 3481-3500.
- [9] ZHENG H W, ZHENG W H, WU C X, et al. Rab GTPases are essential for membrane trafficking-dependent growth and pathogenicity in *Fusarium graminearum* [J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(11): 4580-4599.
- [10] LIU X H, CHEN S M, GAO H M, et al. The small GTPase MoYpt7 is required for membrane fusion in autophagy and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae* [J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(11): 4495-4510.
- [11] ABENZA J F, GALINDO A, PINAR M, et al. Endosomal maturation by Rab conversion in *Aspergillus nidulans* is coupled to dynein-mediated basipetal movement [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2012, 23(10): 1889-1901.
- [12] CHEN X, SELVARAJ P, LIN L L, et al. Rab7/Retromer-based endolysosomal trafficking is essential for proper host invasion in rice blast [J]. *New Phytologist*, 2023, 239(4): 1384-1403.
- [13] 张承康,周子文,郭田龙,等. 茶树炭疽菌 N425 全基因组测序与基因功能注释 [J]. *福建农业学报*, 2023, 38(12): 1437-1444.
- [14] XIA Y M, CHEN F S, DU Y, et al. A modified SDS-based DNA extraction method from raw soybean [J]. *Bioscience Reports*, 2019, 39(2): 1-10.
- [15] 彭成彬,陈美霞,魏日凤,等. 茶树炭疽菌分离鉴定与遗传转化体系建立 [J]. *西南农业学报*, 2021, 34(10): 2167-2173.
- [16] HOU Z M, XUE C Y, PENG Y L, et al. A mitogen-activated protein kinase gene (*MGV1*) in *Fusarium graminearum* is required for female fertility, heterokaryon formation, and plant infection [J]. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2002, 15(11): 1119-1127.
- [17] SCHIMMÖLLER F, RIEZMAN H. Involvement of Ypt7p, a small GTPase, in traffic from late endosome to the vacuole in yeast [J]. *Journal of Cell Science*, 1993, 106: 823-830.
- [18] HAAS A, SCHEGLMANN D, LAZAR T, et al. The GTPase Ypt7p of *Saccharomyces cerevisiae* is required on both partner vacuoles for the homotypic fusion step of vacuole inheritance [J]. *EMBO Journal*, 1995, 14(21): 5258-5270.
- [19] ABENZA J F, GALINDO A, PINAR M, et al. Endosomal maturation by Rab conversion in *Aspergillus nidulans* is coupled to dynein-mediated basipetal movement [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2012, 23(10): 1889-1901.
- [20] 张小龙,吴淇,田润泽,等. 苹果树腐烂病菌小 G 蛋白 *Vm-Rab7* 基因的功能分析 [J]. *西北林学院学报*, 2021, 36(2): 158-163.
- [21] 张燕,徐延平,邱佳佳,等. 多黏类芽孢杆菌 NX6 对感染炭疽病西瓜幼苗抗氧化酶的影响 [J]. *江苏农业科学*, 2024, 52(18): 147-154.

- [22] 何建杨,吴鑫雨,周 懂,等. 间作调控小麦抗氧化酶活性及丙二醛含量降低小麦白粉病发生率[J]. 江苏农业科学,2023,51(11):113-119.
- [23] GU X Y, CAO Z Y, LI Z Q, et al. Plant immunity suppression by an β -1,3-glucanase of the maize anthracnose pathogen *Colletotrichum graminicola*[J]. BMC Plant Biology,2024,24(1):339.
- [24] ZHANG S P, GUO Y, CHEN S Q, et al. The histone acetyltransferase CfGcn5 regulates growth, development, and pathogenicity in the anthracnose fungus *Colletotrichum fructicola* on the tea-oil tree [J]. Frontiers in Microbiology,2021,12:680415.
- [25] LI X Y, ZHANG S P, LI H. Retromer subunit, CfVps35 is required for growth development and pathogenicity of *Colletotrichum fructicola*[J]. BMC Genomic Data,2022,23(1):68.
- [26] GUO Y, CHEN Z H, LI H, et al. The CfSnt2-dependent deacetylation of histone H3 mediates autophagy and pathogenicity of *Colletotrichum fructicola*[J]. Journal of Fungi,2022,8(9):974.
- [27] GAN R C, ZHANG S P, LI H. Cell wall integrity mediated by Cf-CHS1 is important for growth, stress responses and pathogenicity in *Colletotrichum fructicola*[J]. Journal of Fungi,2023,9(6):643.

(责任编辑:成纾寒)