



重寄生真菌盾壳霉 pH 信号通路中 Pal 相关基因的功能鉴定

方迪, 楼轶, 吴明德, 张静, 李国庆, 杨龙*

华中农业大学植物科学技术学院, 湖北省作物病害监测与安全控制重点实验室, 湖北 武汉 430070

摘要:【目的】研究 pH 信号通路(Pal)在重寄生真菌盾壳霉与寄主核盘菌互作过程中的作用。【方法】从盾壳霉全基因组信息中分析获得了 6 个 Pal 相关基因 *CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC*、*CmpalF*、*CmpalH* 和 *CmpalI* 的全编码序列和氨基酸序列,通过 PEG 介导的原生质转化技术获得了 *CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC*、*CmpalF* 和 *CmpalH* 等 5 个基因的敲除突变体,分析这些敲除突变体与野生型在菌落培养性状、重寄生能力、降解草酸能力、产生抗真菌物质能力等方面的差异。【结果】与野生型相比,在 pH 6–8 的条件下,5 个 Pal 相关基因敲除突变体的菌丝生长受到显著抑制,这说明缺失 Pal 相关基因使盾壳霉对高 pH 值环境更加敏感。菌核重寄生试验发现 5 个 Pal 相关基因敲除突变体的重寄生能力均显著低于野生型。qRT-PCR 试验结果表明,敲除 Pal 相关基因之后导致重寄生相关酶基因 *Cmch1*、*Cmg1* 和 *Cmsp1* 的表达量显著降低,而且 pH 信号通路下游的 *CmpacC* 基因的表达量也显著降低。Pal 相关基因敲除突变体在 pH 6 条件下对草酸盐的降解能力显著高于野生型,同时这 5 个突变体在 pH 8 条件下产生抗真菌物质能力也显著高于野生型。【结论】pH 信号通路相关基因的缺失影响盾壳霉对环境 pH 的响应。pH 信号通路在盾壳霉与核盘菌互作中发挥重要作用,不仅影响盾壳霉的重寄生作用,而且还影响盾壳霉的草酸降解作用和抗真菌作用。

关键词: 盾壳霉, 核盘菌, pH 信号通路, 重寄生作用, 草酸降解作用, 抗真菌活性

盾壳霉 (*Coniothyrium minitans*) 是核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 的一种生防真菌。这种真菌的生防机制包括重寄生作用^[1–2]和抗真菌作用^[3–4],即产生抗真菌物质(antifungal substances, AFS)。此外,我们小组发现盾壳霉还能降解核盘菌产生的草酸毒素^[5]。草酸(oxalic acid)是一种酸性很强的有机酸,它的存在营造酸性 pH 环境,

有利于核盘菌侵染植物。在盾壳霉与核盘菌的互作过程中,草酸可以诱导盾壳霉产生 AFS^[4]。与此同时,草酸诱导盾壳霉草酸脱羧酶(oxalate decarboxylase, OXDC)基因表达,并最终降解草酸^[6]。草酸的降解导致环境 pH 值升高,促进盾壳霉重寄生相关基因(几丁质酶基因 *Cmch1*、葡聚糖酶基因 *Cmg1* 和胞外蛋白酶基因 *Cmsp1*)的表达^[5–6],

基金项目: 国家自然科学基金(31272084, 31471813, 31672073)

*通信作者。Tel: +86-27-87280117; Fax: +86-27-87280670; E-mail: yanglong@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2016-10-30; 修回日期: 2017-01-23; 网络出版日期: 2017-03-02

从而有利于盾壳霉寄生溃解核盘菌。可见, pH 信号调控在盾壳霉-核盘菌互作系统中扮演重要角色。

前人对丝状真菌(如构巢曲霉)和酵母感应环境 pH 信号的分子机制进行了深入研究。研究结果表明: 真菌感应环境 pH 信号主要由 *palA*、*palB*、*palC*、*palF*、*palI*、*palH* 和 *pacC* 这 7 个基因介导^[7]。其中 *palA*、*palB*、*palC*、*palF*、*palI* 和 *palH* 组成了信号通路, 转录调控因子 *pacC* 则是这一 pH 信号通路(Pal)的核心, 它能直接促进碱性环境下表达的基因, 抑制酸性环境下表达的基因^[7-9]。

本课题组前期对盾壳霉 *pacC* 基因(即 *CmpacC*)的研究结果表明: 该基因对盾壳霉降解草酸毒素和抗生 AFS 具有负调控作用, 而对盾壳霉寄生核盘菌具有正调控作用^[2]。但是目前对于盾壳霉的 pH 信号通路, 以及该信号通路对盾壳霉重寄生作用、降解草酸作用和抗真菌作用的影响等问题尚不明确。本研究从盾壳霉全基因组信息中分析获得了 6 个 Pal 基因, 分别命名为 *CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC*、*CmpalF*、*CmpalH* 和 *CmpalI*。对其进行了敲除, 比较了各敲除突变体和野生型菌株 Chy-1 在培养特性、重寄生能力、草酸降解能力以及产生 AFS 等方面的差异。研究目的在于阐明盾壳霉 pH 信号通路在盾壳霉与核盘菌互作过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 供试菌株、培养基以及系统进化树分析

供试盾壳霉野生型菌株 Chy-1 采自湖北省长阳县, 本实验室保存^[10]。供试核盘菌菌株为 Ep-1PNA5 (简称 A5), 均分离自茄子^[11]。从盾壳霉的全基因组信息(姜道宏老师实验室提供, 尚未公开)中分析获得了 6 个 Pal-pH 上游相关基因(*CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC*、*CmpalF*、*CmpalH*、*CmpalI*)的全编码序列和氨基酸序列; 将相对应的

同源基因的氨基酸序列输入 NCBI 数据库(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 查找并提取其他真菌中同源基因的氨基酸序列, 用 MEGA 软件来分析盾壳霉中 6 个 Pal-like 同源基因的系统进化树。

供试培养基包括常规马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)、二倍 PDA (2×PDA)和改良的查氏培养液(modified Czapek Dox, MCD)^[2]。

胡萝卜培养基: 将胡萝卜洗净后切成片状置于三角瓶中, 灭菌。

dPDB 培养基: 去皮马铃薯 400 g、葡萄糖 40 g、加蒸馏水定容至 1000 mL。

不同 pH 缓冲液配方如下: dpH 3 缓冲液(500 mL): 柠檬酸 17.23 g, 柠檬酸三钠 5.29 g; dpH 4 缓冲液(500 mL): 柠檬酸 12.4 g, 柠檬酸三钠 12.05 g; dpH 5 缓冲液(500 mL): 柠檬酸 7.35 g, 柠檬酸三钠 19.11 g; dpH 6 缓冲液(500 mL): 柠檬酸 2.42 g, 柠檬酸三钠 26.02 g; dpH 7 缓冲液(500 mL): Tris-base 6.06 g, 用浓盐酸调节 pH 至 7; dpH 8 缓冲液(500 mL): Tris-base 6.06 g, 用浓盐酸调节 pH 至 8。

以上培养基均经过 121 °C 高压灭菌 20 min 后使用。

1.2 原生质 PEG 介导 Pal 相关基因的敲除

根据同源重组原理, 采用 PEG 介导的原生质体转化技术^[12], 用潮霉素基因替换 pH 信号通路各基因部分序列, 获得了 5 个基因的敲除突变体。分别命名为 $\Delta CmpalA$ -33、 $\Delta CmpalB$ -13、 $\Delta CmpalC$ -5、 $\Delta CmpalF$ -50 和 $\Delta CmpalH$ -26。但是没有获得 *CmpalI* 敲除突变体。

1.3 不同 pH 下菌丝生长的测定

活化培养盾壳霉野生型菌株 Chy-1 和各突变体, 菌落边缘打孔菌丝块(直径 0.5 cm)分别接种于 pH 为 3、4、5、6、7、8 的 PDA 固体平板培养基上培养, 接种后第 6 天采用十字交叉法测量菌落

直径。每个处理设立 2 个平行试验, 并重复 5 次。

1.4 不同突变体产孢量的测定

活化培养盾壳霉野生型菌株 Chy-1 和各突变体, 菌落边缘打孔菌丝块(直径 0.5 cm)分别接种到 PDA 平板中央, 在 20 °C 下光照培养 14 d 后用 0.5 cm 的打孔器在靠近中心菌丝块的周围取 4 个菌丝块, 置于 1 mL 水中, 剧烈振荡 1 min 后用血球计数板测量孢子产量, 每个处理设立 3 个平行试验, 并重复 3 次。

1.5 寄生菌核试验

将野生型菌株 Chy-1 和各突变体分别接种至 PDA 培养基上, 20 °C 培养 30 d, 然后用无菌水洗净菌落表面的分生孢子, 制备成分生孢子悬浮液。用血球计数板测定孢子浓度, 并用无菌水将其稀释成 1×10^7 个孢子/mL。将核盘菌菌株 A5 接种在胡萝卜培养基上, 在 20 °C 下培养 30 d, 收集菌核。菌核风干后, 选取大小均匀的菌核(4.5 mm×3.5 mm, 长×宽), 用 75% 的酒精消毒 30 min, 然后用无菌水洗涤 3 次, 每次 1 min。最后将 50 粒菌核分别浸泡各菌株分生孢子悬浮液或无菌水(对照)中 30 min。将各处理菌核置于灭过菌的潮湿砂表面。在 20 °C 下培养 30 d, 然后取出菌核, 逐一检查菌核腐烂情况。参考姜道宏等^[13]对菌核腐烂程度进行分级, 并计算菌核腐烂指数。每个处理设立 2 个平行试验, 并重复 3 次。

1.6 基因表达试验

在 PDA 平板上铺一层灭过菌的玻璃纸, 取上述盾壳霉野生型和突变体菌株分生孢子悬浮液(1×10^7 个孢子/mL), 涂在玻璃纸上。将平板置于 20 °C 下培养 3 d。然后将融化的 2×PDA 与 pH 3、pH 5 或 pH 7 的缓冲液以等体积混匀, 制备不同缓冲 pH 值的 PDA 平板。掀起含盾壳霉菌丝的玻璃纸, 转移至含缓冲液的 PDA 平板上, 在 20 °C 下

黑暗培养 12 h, 刮取菌丝, 提取总 RNA, 采用定量反转录 PCR (qRT-PCR) 方法检测重寄生相关基因 *Cmg1* (编码葡聚糖酶)、*Cmch1* (编码几丁质酶) 和 *Cmsp1* (编码蛋白酶), 以及 *CmpacC* 的表达。检测 *Cmg1* 表达的 PCR 引物是: Glu-F: 5'-TCGGCAAGCAGACAGGTGAT-3', Glu-R: 5'-TTCTCGGCGTTGATGTTCCA-3'。检测 *Cmch1* 基因表达的 PCR 引物是: Chitin-F: 5'-CGGCTCCTGGGATACTACTTC-3', Chitin-R: 5'-TGCGGCAACACCATTAGAG-3'。检测 *Cmsp1* 表达的 PCR 引物是: Sp1-F: 5'-CCTTCTCCAACACTACGGCTCCTC-3', Sp1-R: 5'-ACTGGATGCGGGTGGTAAGA-3'。以肌动蛋白基因 *Cmactin* 为内参基因, 检测其表达的 qRT-PCR 引物为 Act7-F: 5'-TCGTGACTTGACCGACTACCTC-3', Act8-R: 5'-TTGCCAATGGTGATGACCTGA-3'。检测 *CmpacC* 表达的 PCR 引物是: pacA-F: 5'-TCTGAGTATGGACACGGAGGCA-3', pacA-R: 5'-CCAAGAAGACTGGTCGATGTTGAGG-3'。以野生型菌株 Chy-1 在 pH 3 的条件下各基因的表达量为 1, 其他突变体以之为标准进行计算, 得出各基因相对表达量(relative expression)值。

1.7 降解草酸盐能力测定

将 25 mL 的 dPDB (双倍浓度的 PDB) 培养液与 25 mL 的草酸钠(16 mmol/L)均匀混合于 250 mL 的三角瓶中(命名为 PDB-SO), 同时另外再做一个处理: 在上述培养基中添加 20 mmol/L 的盐酸, 然后分别接种 100 μL 盾壳霉野生型菌株或者各突变体菌株的分生孢子悬浮液(1×10^7 孢子/mL), 并于 20 °C 摇床振荡培养 12 d (150 r/min), 以不接种盾壳霉分数孢子液的培养基为初始对照。摇培 12 d 后, 用已称重(Wh1)的滤纸分离每个三角瓶中的盾壳霉菌丝和培养液, 然后将有菌丝的滤纸置于 80 °C 烘箱中烘干后再称重(Wh2), 扣除滤纸干

重后就能得到各个处理的菌丝干重(Wh2–Wh1)。用 pH 计测定每种培养滤液的 pH 值,收集这些滤液并用细菌过滤器(0.45 μm)过滤,然后采用高效液相色谱(HPLC)法测定滤液中草酸根离子的含量,并计算盾壳霉野生型菌株和各突变体对草酸盐的降解率^[6, 14]。每个处理设立 2 个平行试验,并重复 3 次。

1.8 抑制核盘菌菌丝生长测定

取 1 mL 盾壳霉菌株 Chy-1 和各突变体孢子悬浮液(1×10^6 个孢子/mL)。接种至 100 mL 缓冲的 MCD 培养液中(pH 4 或 8)。将培养物在 20 °C 下振荡培养(150 r/min) 12 d。用滤纸将各培养物过滤,收集滤液。将滤液按 10% 体积比添加至 PDA 培养基中,在对照 PDA 中添加等量 MCD 培养液,制成平板,并将活化的核盘菌菌丝接种至各平板中央。最后将培养物置于 20 °C 下培养 60 h,测定各平板中核盘菌菌落直径。通过与对照平板菌落直径对比,计算盾壳霉培养物滤液对核盘菌菌丝生长的抑制作用。每个处理设立 2 个平行试验,并重复 3 次。

1.9 数据统计分析

采用 SAS 8.0 软件中的方差分析程序(ANOVA)分析上述试验中不同处理之间的差异显著性。不同处理之间的差异采用最小显著差异法(LSD)比较($\alpha=0.05$),分析前将盾壳霉孢子产量数据通过对数(Log_{10})进行转换,核盘菌菌丝生长抑制百分率

通过反正弦转化后再进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 系统进化树分析

从盾壳霉的全基因组信息(姜道宏老师实验室提供,尚未公开)中分析获得了 6 个 pal-like 同源基因 *CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC*、*CmpalF*、*CmpalH*、*CmpalI* 的全编码序列和氨基酸序列,并且将其提交 NCBI 数据库,分别获得相对应的序列登录号。这 6 个基因分别命名为 *CmpalA* (GenBank 登录号: KP747602)、*CmpalB* (GenBank 登录号: KP747603)、*CmpalC* (GenBank 登录号: KP747604)、*CmpalF* (GenBank 登录号: KP747605)、*CmpalH* (GenBank 登录号: KP747606)、*CmpalI* (GenBank 登录号: KP747607)。分别对 6 个 Pal-like 同源基因做了序列分析,获得了相对应同源基因的内含子以及外显子的序列,对其相应的氨基酸组属性也进行了分析(表 1)。系统进化分析结果显示:这 6 个基因 *CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC*、*CmpalF*、*CmpalH* 和 *CmpalI* 均与油菜黑胥病(*Leptosphaeria maculans*)以及小麦黄斑叶枯病菌(*Pyrenophora tritici-repentis*)的同源基因编码的氨基酸亲缘关系最近(图 1)。在真菌的 Pal-like 蛋白中,*PalA* 蛋白和 *PalC* 蛋白的亲缘关系较近(图 1)。

表 1. *CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC*、*CmpalF*、*CmpalH*、*CmpalI* 的 ORF 序列和氨基酸序列分析

Table 1. The ORF sequences and the amino acid sequence analysis of *CmpalA*, *CmpalB*, *CmpalC*, *CmpalF*, *CmpalH* and *CmpalI*

Genes	Feature of nucleotide sequence			Feature of amino acid sequence		
	ORF length/bp	Number of intron	Number of exon	Deduced protein length	Molecular weight/kDa	Isoelectric point
<i>CmpalA</i>	2565	2	3	821	92.0	7.04
<i>CmpalB</i>	3604	4	5	1111	123.5	7.95
<i>CmpalC</i>	1581	1	2	474	51.7	6.44
<i>CmpalF</i>	2554	1	2	833	89.2	6.22
<i>CmpalH</i>	1836	2	3	570	62.6	8.86
<i>CmpalI</i>	1837	2	3	548	61.0	11.06

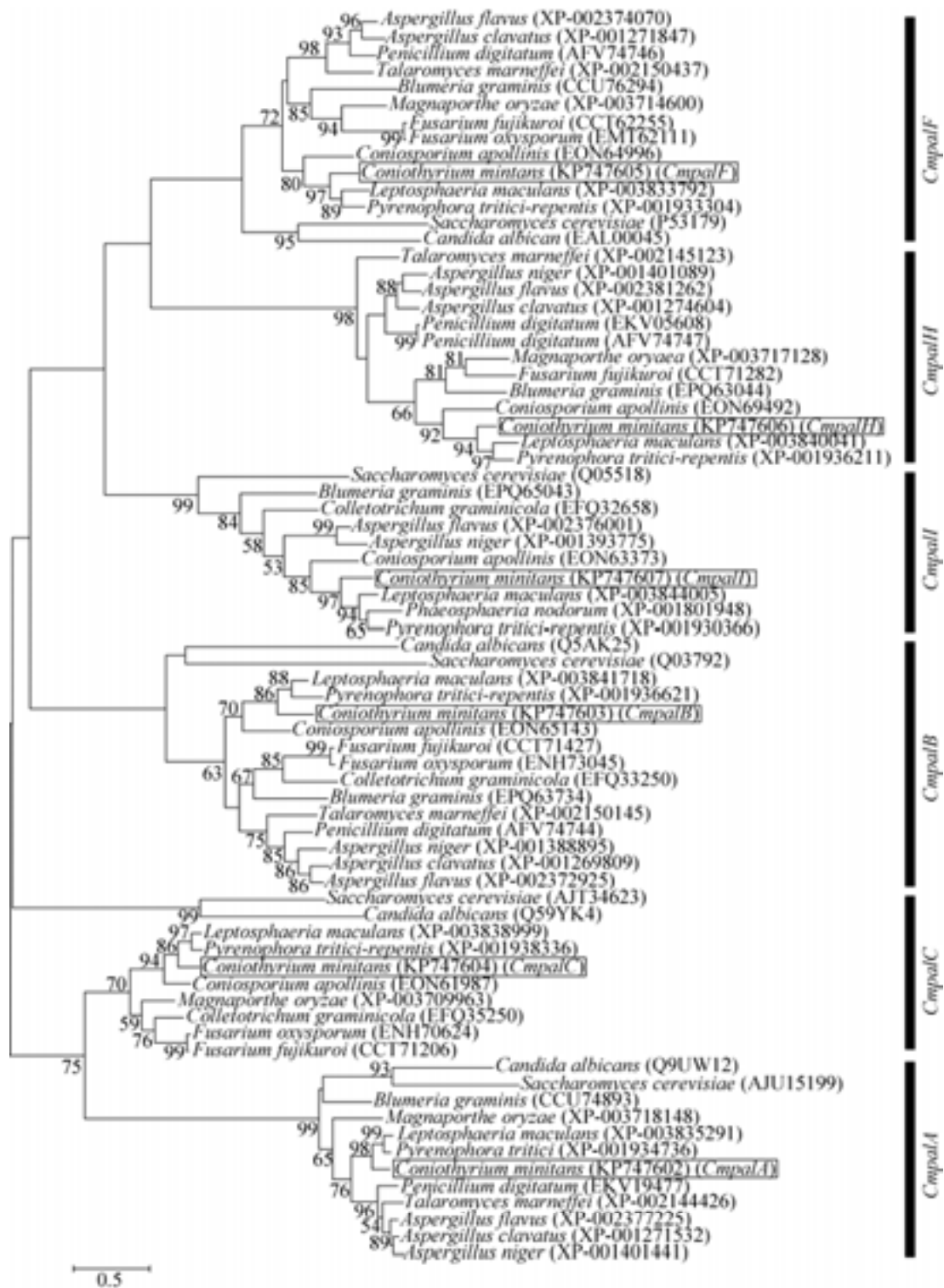


图 1. *CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC*、*CmpalF*、*CmpalH* 和 *CmpalI* 的系统进化树分析

Figure 1. Phylogenetic tree analysis of *CmpalA*, *CmpalB*, *CmpalC*, *CmpalF*, *CmpalH* and *CmpalI*. The phylogenetic tree was constructed by using MEGA 5.0 with homologous sequences of *CmpalA*, *CmpalB*, *CmpalC*, *CmpalF*, *CmpalH* and *CmpalI* from various strains, with their sequence IDs in the parentheses; the numbers on the horizontal lines represent evolutionary distances.

2.2 Pal 相关基因的敲除

我们通过 PEG 介导原生质体转化的方法以及 Southern blot (罗氏地高辛 DNA 标记和检测试剂盒)验证^[6]获得了 5 个 Pal 同源基因的敲除突变体, 分别是 $\Delta CmpalA$ -33、 $\Delta CmpalB$ -13、 $\Delta CmpalC$ -5、 $\Delta CmpalF$ -50 和 $\Delta CmpalH$ -26 (图 2)。

2.3 Pal 相关基因敲除对盾壳霉菌丝生长的影响

敲除突变体 $\Delta CmpalA$ -33、 $\Delta CmpalB$ -13、 $\Delta CmpalC$ -5、 $\Delta CmpalF$ -50 和 $\Delta CmpalH$ -26 在 pH 3–8 缓冲的 PDA 培养基上培养 6 d 后的菌落直径均小于野生型菌株(图 3, 图 4)。在 pH 4 和 pH 5 的条件下, 各敲除突变体的菌落直径能够达到 4.87–5.65 cm,

而野生型菌株在 pH 4 和 pH 5 条件下的菌落直径分别达到了 5.99 cm 和 6.06 cm。与野生型菌株 Chy-1 相比较, 各敲除突变体的菌落直径下降了 5.68%–19.64%。在 pH 7 和 pH 8 的条件下, 野生型菌株的菌落直径为 2.35–3.81 cm, 而各敲除突变体的菌落直径仅为 0.89–1.93 cm, 菌落直径下降了 30.64%–76.64% (图 4)。这 5 个 Pal 相关基因敲除突变体中, $\Delta CmpalF$ -50 在 pH 3 条件下, 菌落直径 (2.77 cm) 显著小于其他 4 个突变体 (3.42–3.89 cm), 而在 pH 6–8 条件下, $\Delta CmpalF$ -50 的菌落直径 (3.27、1.93、1.63) 显著大于其他 4 个突变体 (1.29–1.97、0.89–1.50、0.98–1.16 cm)。

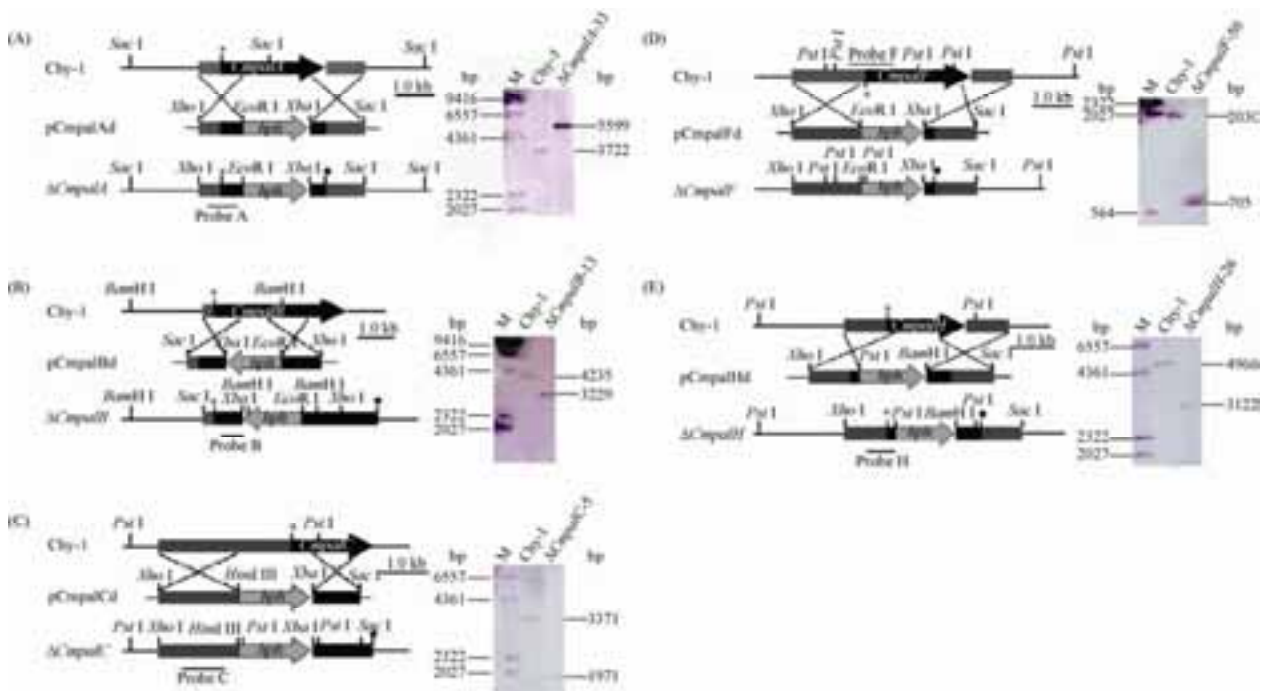


图 2. 盾壳霉 Pal 相关基因敲除突变体的 Southern blot 验证

Figure 2. Southern blotting confirmation of the mutants of Pal-related genes. The symbols * and ★ indicate the start codon (ATG) and the stop codon (TAA) respectively. A: southern blotting confirmation of the mutant of *CmpalA* gene; B: southern blotting confirmation of the mutant of *CmpalB* gene; C: southern blotting confirmation of the mutant of *CmpalC* gene; D: southern blotting confirmation of the mutant of *CmpalF* gene; E: southern blotting confirmation of the mutant of *CmpalH* gene.

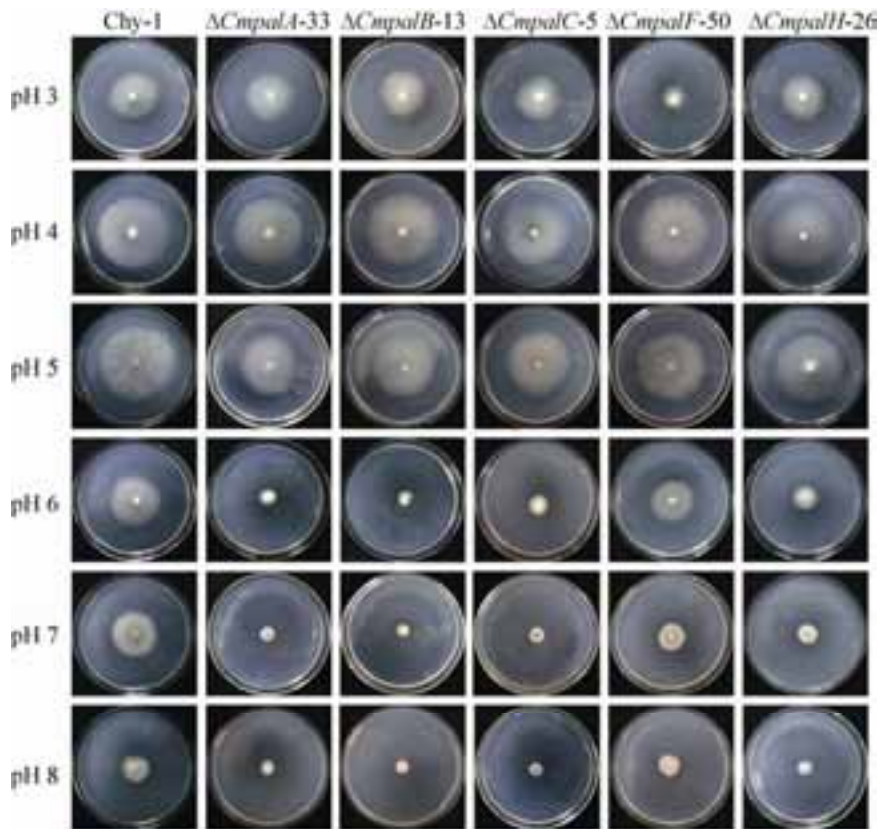


图 3. 盾壳霉 Pal 相关基因敲除突变体在不同 pH 条件下的菌落生长形态(20 °C, 6 d)

Figure 3. Colonies of the Pal-related genes mutants of *C. minitans* on PDA with different pH (20 °C, 6 days).

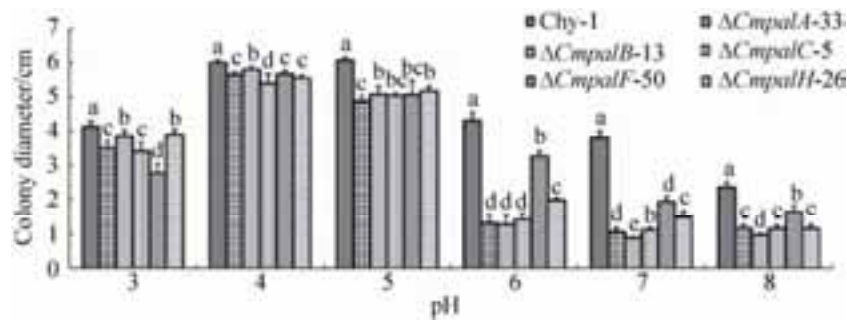


图 4. 盾壳霉 Pal 相关基因敲除突变体在不同 pH 下培养 6 d 的菌落直径(20 °C)

Figure 4. Colony diameters of 6-day-old cultures of the Pal-related genes mutants of *C. minitans* on PDA buffered under different pH (20 °C). Bars in each figure headed with the same letters are not significantly different ($P>0.05$) according to least significant difference test.

通过不同 pH 条件下菌丝生长测定, 结果表明 *CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC*、*CmpalF* 和 *CmpalH* 的敲除突变体在较低 pH 值(3-5)生长受抑制程度显著低于在较高 pH 值(6-8)生长受抑制程度, 说明 Pal 相关基因敲除突变体对较高 pH 值(6-8)更敏

感。但是在这 5 个 Pal 相关基因敲除突变体中, *CmpalF* 敲除突变体与其他 4 个(*CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC* 和 *CmpalH*)敲除突变体在不同 pH 条件下生长受抑制作用存在明显差异。在 pH 3 条件下, $\Delta CmpalF-50$ 生长受抑制作用比其他 4 个敲除突变

体更显著,而在 pH 6–8 条件下, $\Delta CmpalF-50$ 生长受抑制作用显著低于其他 4 个敲除突变体。

2.4 Pal 相关基因敲除对盾壳霉产孢的影响

敲除突变体 $\Delta CmpalA-33$ 、 $\Delta CmpalB-13$ 、 $\Delta CmpalC-5$ 、 $\Delta CmpalF-50$ 和 $\Delta CmpalH-26$ 在 PDA 平板上培养 14 d 后的产孢量分别为 3.37×10^7 、 3.07×10^7 、 2.72×10^7 、 0.97×10^7 和 0.37×10^7 个孢子/cm²,与野生型菌株 Chy-1 (3.41×10^7 个孢子/cm²) 相比较,敲除突变体 $\Delta CmpalC-5$ 、 $\Delta CmpalF-50$ 和 $\Delta CmpalH-26$ 的产孢量均有显著下降,而突变体 $\Delta CmpalA-33$ 和 $\Delta CmpalB-13$ 的产孢量与野生型菌株没有显著差异(图 5)。

2.5 Pal 相关基因敲除对盾壳霉寄生核盘菌菌核的影响

寄生核盘菌菌核试验结果表明,敲除突变体 $\Delta CmpalA-33$ 、 $\Delta CmpalB-13$ 、 $\Delta CmpalC-5$ 、 $\Delta CmpalF-50$ 和 $\Delta CmpalH-26$ 对核盘菌菌核的寄生

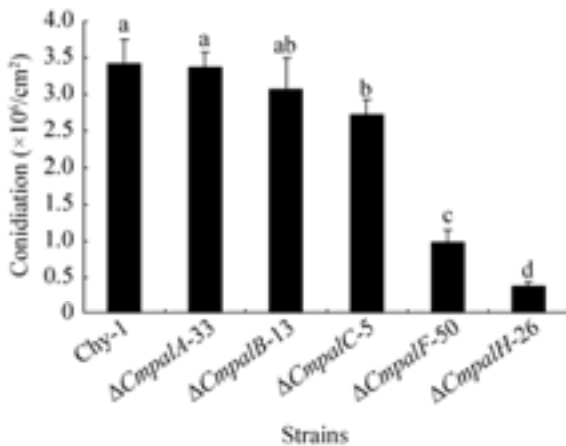


图 5. 盾壳霉 Pal 相关基因敲除突变体和野生型菌株产孢量比较(20 °C, 14 d)

Figure 5. Comparison of conidial production among the Pal-related genes mutants and the wild type strain Chy-1 of *C. minitans* (20 °C, 14 days). Bars in each figure headed with the same letters are not significantly different ($P > 0.05$) according to least significant difference test.

能力均显著低于野生型菌株 Chy-1。野生型菌株 Chy-1 寄生核盘菌菌核的致腐指数达到了 81.33,而敲除突变体 $\Delta CmpalA-33$ 、 $\Delta CmpalB-13$ 、 $\Delta CmpalC-5$ 、 $\Delta CmpalF-50$ 和 $\Delta CmpalH-26$ 寄生核盘菌菌核的致腐指数分别为 51.24、55.3、60.89、52.97 和 49.74(图 6)。与野生型菌株 Chy-1 相比,敲除突变体 $\Delta CmpalA-33$ 、 $\Delta CmpalB-13$ 、 $\Delta CmpalC-5$ 、 $\Delta CmpalF-50$ 和 $\Delta CmpalH-26$ 的腐烂指数分别下降了 36.9%、32.01%、25.13%、34.87% 和 38.84%。由此可以说明以 CmpalA、CmpalB、CmpalC、CmpalF 和 CmpalH 为主要组分的 pH 信号通路对盾壳霉寄生核盘菌菌核至关重要。

2.6 Pal 相关基因敲除对 Cmch1、Cmg1、Cmsp1 和 CmpacC 表达的影响

在 pH 值为 3、5 和 7 的条件下,野生型菌株 Chy-1 的 *Cmch1* 相对表达量分别为 1.00、1.23 和 1.44,而 $\Delta CmpalA-33$ 、 $\Delta CmpalB-13$ 、 $\Delta CmpalC-5$ 、 $\Delta CmpalF-50$ 和 $\Delta CmpalH-26$ 的 *Cmch1* 相对表达量分别降低至 0.09–0.13、0.11–0.19 和 0.11–0.35(图 7-A)。在野生型菌株 Chy-1 中, *Cmg1* 在 pH 3、5 和 7 下的相对表达量分别为 1.00、1.52 和 1.48;

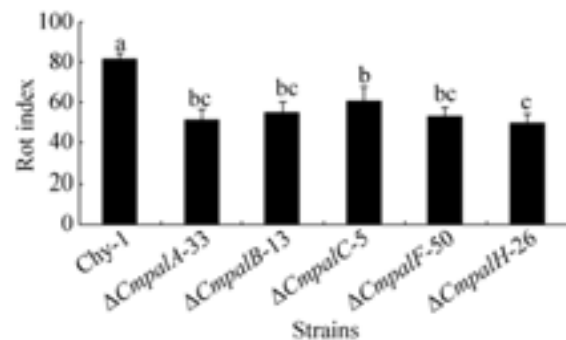


图 6. 盾壳霉 Pal 相关基因敲除突变体对核盘菌菌核的寄生

Figure 6. Mycoparasitism of the Pal-related genes mutants and the wild-type of *C. minitans* on sclerotia of *S. sclerotiorum*. Bars in each figure headed with the same letters are not significantly different ($P > 0.05$) according to least significant difference test.

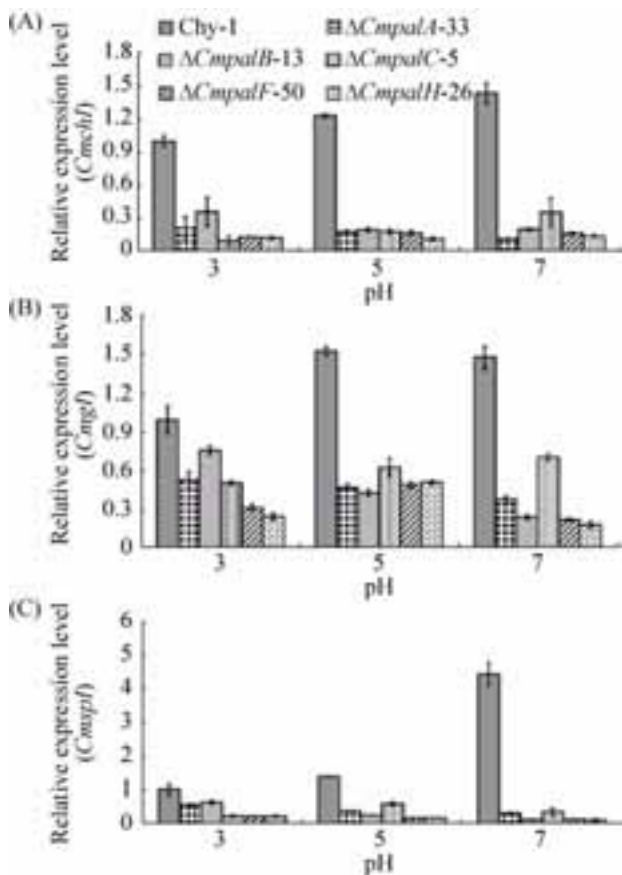


图 7. 盾壳霉 Pal 相关基因敲除突变体和野生型重寄生相关酶基因在不同 pH 条件下表达分析

Figure 7. Relative transcript levels of three mycoparasitism-associated genes (*Cmch1*, *Cmg1* and *Cmsp1*) in the Pal-related genes mutants and the wild-type of *C. minitans* under different pH. A: Relative transcript levels of *Cmch1* in the Pal-related genes mutants and the wild-type of *C. minitans* under different pH; B: Relative transcript levels of *Cmg1* in the Pal-related genes mutants and the wild-type of *C. minitans* under different pH; C: Relative transcript levels of *Cmsp1* in the Pal-related genes mutants and the wild-type of *C. minitans* under different pH. Bars in each figure headed with the same letters are not significantly different ($P>0.05$) according to least significant difference test.

而 $\Delta CmpalA-33$ 、 $\Delta CmpalB-13$ 、 $\Delta CmpalC-5$ 、 $\Delta CmpalF-50$ 和 $\Delta CmpalH-26$ 的 *Cmg1* 相对表达量分别降低至 0.24–0.76、0.43–0.63 和 0.18–0.71 (图 7-B)。在野生型菌株 Chy-1 中, *Cmsp1* 在 pH 3、5 和 7 下的相对表达量分别为 1.00、1.38 和 4.45,

随着 pH 上升, *Cmsp1* 的相对表达量显著增加。而 $\Delta CmpalA-33$ 、 $\Delta CmpalB-13$ 、 $\Delta CmpalC-5$ 、 $\Delta CmpalF-50$ 和 $\Delta CmpalH-26$ 的 *Cmsp1* 在 pH 3、5 和 7 下的相对表达量却显著降低至 0.22–0.64、0.18–0.59 和 0.11–0.35 (图 7-C)。可见, 敲除 Pal 基因之后导致重寄生相关酶基因 *Cmch1*、*Cmg1* 和 *Cmsp1* 的表达量显著降低。这说明盾壳霉重寄生相关酶基因(*Cmch1*、*Cmg1* 和 *Cmsp1*)的表达可能受 pH 信号通路的正调控。

对 pH 信号通路下游的 *CmpacC* 而言, 当 pH 为 3、5 和 7 时, *CmpacC* 的相对表达量分别为 1.00、2.45 和 4.66。而 $\Delta CmpalA-33$ 、 $\Delta CmpalB-13$ 、 $\Delta CmpalC-5$ 、 $\Delta CmpalF-50$ 和 $\Delta CmpalH-26$ 中 *CmpacC* 的相对表达量分别降低至 0.17–0.29、0.15–0.35 和 0.20–1.03 (图 8)。可见, Pal 相关基因的敲除显著降低了 *CmpacC* 的表达。

2.7 Pal 相关基因敲除对盾壳霉降解草酸盐能力的影响

在含 HCl 和不含 HCl 的 PDB-SO 培养基中摇培 12 d 后, 盾壳霉野生型菌株 Chy-1 和敲除突变体 $\Delta CmpalA-33$ 、 $\Delta CmpalB-13$ 、 $\Delta CmpalF-50$ 和 $\Delta CmpalH-26$ 的菌丝生物量没有显著性差异

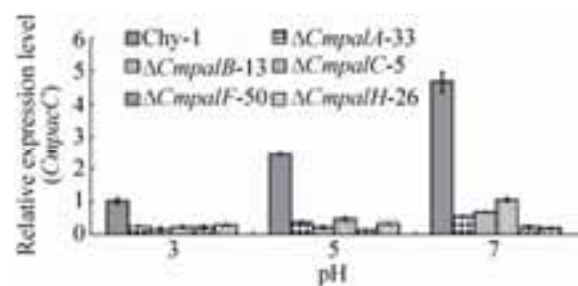


图 8. 盾壳霉 Pal 相关基因敲除突变体和野生型 *CmpacC* 基因在不同 pH 条件下的表达分析

Figure 8. Relative transcript levels of *CmpacC* in the Pal-related genes mutants and the wild-type of *C. minitans* under different pH. Bars in each figure headed with the same letters are not significantly different ($P>0.05$) according to least significant difference test.

(5.1–6.5 mg/mL), 仅与 $\Delta CmpalC-5$ 的菌丝生物量有显著差异(图 9-B)。但是与初始培养基的 pH 相比(含 HCl 和不含 HCl 的 PDB-SO 培养基的初始 pH 值分别为 3.3 和 6.2), 在添加 HCl 条件下的培养滤液 pH 值明显上升(pH 6.4–6.9)(图 9-A), 而且对草酸根离子的降解率也显著升高(图 9-C)。在添加 HCl 的 PDB-SO 培养基下, 野生型菌株 Chy-1 和各敲除突变体对草酸根离子的降解率达到 76.0%–84.4%, 显著高于不添加 HCl 的 PDB-SO 的培养基(草酸根离子的降解率为 12%–48%)(图 9-C)。而在不添加 HCl 的 PDB-SO 培养基下, 各敲除突变体和野生型菌株 Chy-1 对草酸根离子的降解能力也存在明显的差异, 野生型菌株 Chy-1 的降解率只有 12%, 而各敲除突变体的降解率却能达到 33%–48%, 比野生型菌株 Chy-1 提高了 21%–36% (图 9-C)。这些结果表明 Pal 相关基因的敲除显著增强了盾壳霉在 pH 6 条件下(不添加 HCl)降解草酸盐的能力。这说明 Pal 相关基因对盾壳霉降解草酸盐具有负调控作用。

2.8 Pal 相关基因敲除对盾壳霉抑制核盘菌菌丝生长的影响

当 pH 为 4 时, 盾壳霉野生型菌株 Chy-1 和敲除突变体 $\Delta CmpalA-33$ 、 $\Delta CmpalB-13$ 、 $\Delta CmpalC-5$ 、 $\Delta CmpalF-50$ 和 $\Delta CmpalH-26$ 在 MCD 培养基中的生物量为 12–16 mg/mL (图 10-B)。培养物滤液对核盘菌菌丝生长的抑菌率为 86%–91% (图 10-C)。但在 pH 8 的条件下, 野生型菌株 Chy-1 和各敲除突变体对核盘菌菌丝生长的抑制作用存在差异显著。菌株 Chy-1 培养滤液对核盘菌菌丝生长的抑菌率为 15%, 而敲除突变体培养物滤液对核盘菌菌丝生长的抑菌率为 73%–77% (图 10-C)。可见敲除 Pal 相关基因之后, 盾壳霉在高 pH (如 pH 8)条

件下对核盘菌菌丝生长的抑制作用显著增强。这说明 Pal 相关基因对盾壳霉抑制核盘菌菌丝生长具有负调控作用。

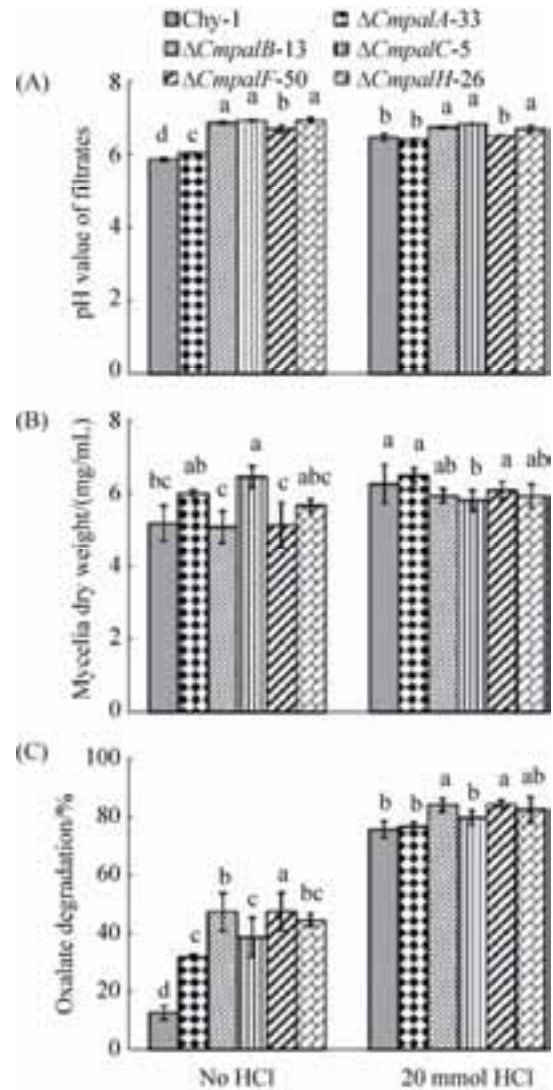


图 9. 盾壳霉 Pal 相关基因敲除突变体和野生型在添加草酸钠的 PDB (HCl 存在或者不存在)中对草酸盐的降解 Figure 9. Oxalate degradation by the Pal-related genes mutants and the wild-type of *C. minitans* in PDB amended with sodium oxalate in absence or presence of 20 mmol/L HCl. A: pH values of the *C. minitans* cultures in different media; B: Mycelial dry biomass in different *C. minitans* cultures; C: Percentages of oxalate degradation in different *C. minitans* cultures. Bars in each figure headed with the same letters are not significantly different ($P>0.05$) according to least significant difference test.

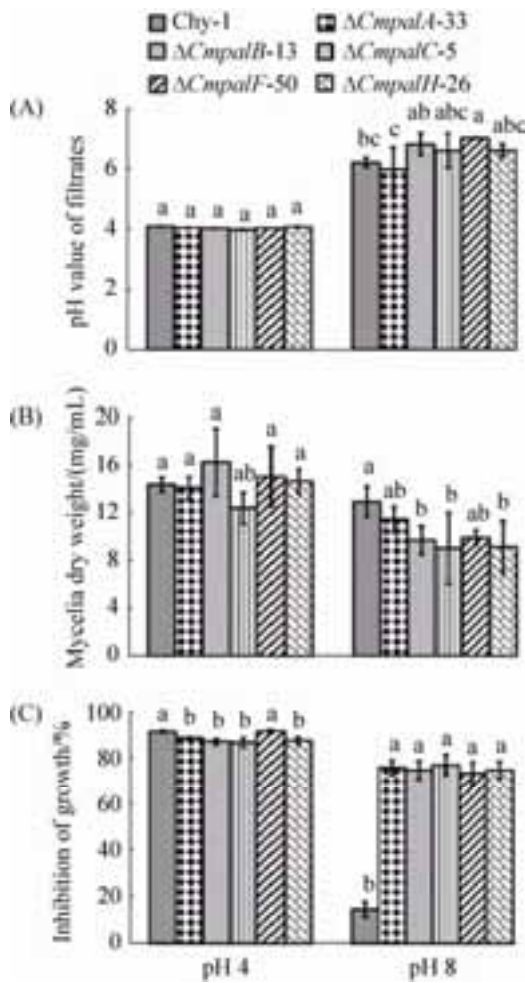


图 10. 盾壳霉 Pal 相关基因敲除突变体和野生型在 pH 4 和 pH 8 的 MCD 培养滤液对核盘菌的抗真菌活性 Figure 10. Antifungal activity of the filtrates from the Pal-like genes mutants and the wild-type of *C. minitans* cultures in the MCD medium buffered under pH 4 and pH 8 against *S. sclerotiorum*. A: pH values of the *C. minitans* cultures in different media; B: mycelial dry biomass in different *C. minitans* cultures; C: percentages of inhibition of *S. sclerotiorum* growth in PDA amended with different *C. minitans* cultures. Bars in each figure headed with the same letters are not significantly different ($P>0.05$) according to least significant difference test.

3 讨论

目前对真菌 pH 信号通路的研究报道中, 构巢曲霉的 pH 信号通路研究得最为系统。在构巢曲霉

中, pH 信号通路主要包括 7 个 Pal 基因, 分别是 *pacC*、*palA*、*palB*、*palC*、*palF*、*palH* 和 *pali*。在盾壳霉菌株中, 我们仍然没有获得 *pali* 同源基因 *CmpalI* 的敲除突变体, 但是系统进化树分析结果可以为我们提供一个较为清晰的证据, 在盾壳霉菌株中确实存在着以 *CmpacC* 为核心的 pH 信号传导途径。通过对这 5 个敲除突变体的菌丝生长试验的分析, 结果表明 *CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC*、*CmpalF* 和 *CmpalH* 的敲除突变体在较低 pH 值 (3-5) 生长受抑制作用不明显, 而在较高 pH 值 (6-8) 生长受抑制明显。这跟已报道的研究中发现 *palF* 和 *palC* 的敲除突变体对碱性 pH 非常敏感的结果是一致的^[15-17]。同时, 构巢曲霉 pH 信号通路的上游相关基因敲除突变体在碱性 pH 下的敏感表型也基本类似^[7], 说明以 *CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC*、*CmpalF* 和 *CmpalH* 为主要组分的盾壳霉 pH 信号通路可能是盾壳霉适应较高 pH 值 (6-8) 环境的重要机制。

在 Pal 相关基因敲除突变体对核盘菌的重寄生能力、降解草酸和抑制核盘菌菌丝生长的试验中发现各敲除突变体对核盘菌菌核的寄生能力均具有不同程度的下降, 在 pH 6 下降解草酸的能力和 pH 8 条件下对核盘菌菌丝生长的抑制作用均有显著性的增强。表达量试验为我们提供了进一步的证据表明敲除突变体 $\Delta CmpalA-33$ 、 $\Delta CmpalB-13$ 、 $\Delta CmpalC-5$ 、 $\Delta CmpalF-50$ 和 $\Delta CmpalH-26$ 对核盘菌寄生能力的降低可能是由于 pH 信号通路上游相关基因 *CmpalA*、*CmpalB*、*CmpalC*、*CmpalF* 和 *CmpalH* 的敲除显著降低了核心转录因子 *CmpacC* 的转录表达, 从而进一步下调与寄生核盘菌相关胞外酶基因 (*Cmch1*、*Cmg1* 和 *Cmsp1*) 的表达水平。前人研究报道发现构巢曲霉的同源 *palF* 基因 *PRR1* 调控着白假丝酵母中依赖 pH 的基因表达、

丝状形成以及形态发育^[18-19]。研究也发现 PacC 蛋白也含有核定位信号, 在酸性条件下, 核定位信号关闭导致 PacC 全蛋白不能进入细胞核中, 从而不能调控靶标基因的表达。随着 pH 值升高, 胞外的 pH 信号通过上游 PalH 和 PalI 膜受体传递给 PalF 和 PalC, 从而诱导 PalA 和 PalB 与 Vps32 蛋白形成蛋白复合体参与 PacC 全蛋白的剪切, 形成核定位信号开放的 PacC 蛋白, 进入细胞核参与下游基因的调控^[9]。

很多研究已经报道了 pH 信号通路调控病原真菌致病性、毒素合成以及相关的次生代谢途径。在很多病原真菌中都存在着类似的同源 PacC 基因以及上游相关的基因, 说明在很多病原真菌中也存在着类似的 pH 信号通路。比如在植物病原真菌核盘菌中, 草酸的分泌受到 PacC 的调控, 从而影响核盘菌对寄主的致病能力^[20]。环境 pH 值也调控着白色念珠菌的致病能力, 并且在白色念珠菌中也克隆到了同源的 PacC 基因 RIM101, RIM101 介导的 pH 信号通路对白色念珠菌与寄主的互作是必要的^[21]。马铃薯炭疽菌(*Colletotrichum coccodes*) 能够分泌氨类物质调节寄主的 pH 值来增强炭疽菌对寄主的毒性^[22]。在构巢曲霉中, 葡糖糖化酶的产生、糖基化以及细胞内化学平衡均受到环境 pH 值的影响^[23]。在 pH 调控次生代谢产物的合成方面, 也有很多类似的报道, 比如在镰刀菌中也发现类似的 pH 信号通路抑制镰刀菌在中性 pH 下合成伏马菌素^[24]; 环境 pH 调控曲霉属病原菌合成柄曲霉素和黄曲霉毒素^[25]。因此, 对盾壳霉 pH 信号通路的研究对于我们了解环境 pH 如何调控盾壳霉重寄生、草酸毒素降解以及抗真菌物质的合成非常必要。将来, 我们需要深入研究 pH 信号通路对次生代谢途径的调控, 为建立盾壳霉 pH 调控

网络奠定基础。

参考文献

- [1] Whipps JM, Gerlagh M. Biology of *Coniothyrium minitans* and its potential for use in disease biocontrol. *Mycological Research*, 1992, 96(11): 897-907.
- [2] Lou Y, Han YC, Yang L, Wu MD, Zhang J, Cheng JS, Wang MY, Jiang DH, Chen WD, Li GQ. CmpacC regulates mycoparasitism, oxalate degradation and antifungal activity in the mycoparasitic fungus *Coniothyrium minitans*. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(11): 4711-4729.
- [3] McQuilken MP, Budge SP, Whipps JM. Effects of culture media and environmental factors on conidial germination, pycnidial production and hyphal extension of *Coniothyrium minitans*. *Mycological Research*, 1997, 101(1): 11-17.
- [4] Yang R, Han YC, Li GQ, Jiang DH, Huang HC. Effects of ambient pH and nutritional factors on antifungal activity of the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Biological Control*, 2008, 44(1): 116-127.
- [5] Ren L, Li GQ, Han YC, Jiang DH, Huang HC. Degradation of oxalic acid by *Coniothyrium minitans* and its effects on production and activity of β -1,3-glucanase of this mycoparasite. *Biological Control*, 2007, 43(1): 1-11.
- [6] Zeng LM, Zhang J, Han YC, Yang L, Wu MD, Jiang DH, Chen WD, Li GQ. Degradation of oxalic acid by the mycoparasite *Coniothyrium minitans* plays an important role in interacting with *Sclerotinia sclerotiorum*. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(8): 2591-2610.
- [7] Peñalva MA, Tilburn J, Bignell E, Arst HN Jr. Ambient pH gene regulation in fungi: making connections. *Trends in Microbiology*, 2008, 16(6): 291-300.
- [8] Díez E, Álvaro J, Espeso EA, Rainbow L, Suárez T, Tilburn J, Arst HN Jr, Peñalva MÁ. Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *The EMBO Journal*, 2002, 21(6): 1350-1359.
- [9] Mingot JM, Espeso EA, Díez E, Peñalva MA. Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Molecular and Cellular Biology*, 2001, 21(5): 1688-1699.
- [10] Li GQ, Wang DB, Zhang SH, Dan HH. Characterization of the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans* I. Biological characteristics and natural distribution in Hubei province. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1995, 14(2):

- 125–130. (in Chinese)
- 李国庆, 王道本, 张顺和, 但汉鸿. 菌核寄生菌盾壳霉的研究 I. 生物学特性及在湖北省的自然分布. 华中农业大学学报, 1995, 14(2): 125–130.
- [11] Li GQ, Wang DB, Huang HZ, Zhou Q. Polymorphisms of *Sclerotinia sclerotiorum* isolated from eggplant in Jiamusi, Heilongjiang province. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1996, 26(3): 237–242. (in Chinese)
- 李国庆, 王道本, 黄鸿章, 周启. 来源于佳木斯茄子上的核盘菌菌株多样性的研究. 植物病理学报, 1996, 26(3): 237–242.
- [12] Wei YD, Shen WY, Dauk M, Wang F, Selvaraj G, Zou JT. Targeted gene disruption of Glycerol-3-phosphate dehydrogenase in *Colletotrichum gloeosporioides* reveals evidence that glycerol is a significant transferred nutrient from host plant to fungal pathogen. *The Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(1): 429–435.
- [13] Jiang DH, Li GQ, Yi XH, Wang DB. Characterization of the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*: II. Comparison of the cultural characteristics and the abilities to parasitize the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1996, 15(3): 229–232. (in Chinese)
- 姜道宏, 李国庆, 易先宏, 王道本. 菌核寄生菌盾壳霉的研究 II. 不同菌株培养特性及寄生致腐菌核能力的比较. 华中农业大学学报, 1996, 15(3): 229–232.
- [14] Ren L, Li G, Jiang D. Characterization of some culture factors affecting oxalate degradation by the mycoparasite *Coniothyrium minitans*. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 108(1): 173–180.
- [15] Denison SH, Orejas M, Arst HN Jr. Signaling of ambient pH in *Aspergillus* involves a cysteine protease. *The Journal of Biological Chemistry*, 1995, 270(48): 28519–28522.
- [16] Negrete-Urtasun S, Reiter W, Diez E, Denison SH, Tilburn J, Espeso EA, Peñalva MA, Arst HN Jr. Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Molecular Microbiology*, 1999, 33(5): 994–1003.
- [17] Babst M, Katzmann DJ, Estepa-Sabal EJ, Meerloo T, Emr SD. ESCRT-III: an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for MVB sorting. *Developmental Cell*, 2002, 3(2): 271–282.
- [18] Porta A, Ramon AM, Fonzi WA. *PRR1*, a homolog of *Aspergillus nidulans palF*, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(24): 7516–7523.
- [19] Ramon AM, Porta A, Fonzi WA. Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(24): 7524–7530.
- [20] Rollins JA. The *Sclerotinia sclerotiorum pac1* gene is required for sclerotial development and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2003, 16(9): 785–795.
- [21] Davis D, Wilson RB, Mitchell AP. *RIM101*-dependent and -independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(3): 971–978.
- [22] Prusky D, McEvoy JL, Leverenz B, Conway WS. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(9): 1105–1113.
- [23] Wallis GLF, Swift RJ, Atterbury R, Trappe S, Rinas U, Hemming FW, Wiebe MG, Trinci APJ, Peberdy JF. The effect of pH on glucoamylase production, glycosylation and chemostat evolution of *Aspergillus niger*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2001, 1527(3): 112–122.
- [24] Flaherty JE, Pirttilä AM, Bluhm BH, Woloshuk CP. *PAC1*, a pH-regulatory gene from *Fusarium verticillioides*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(9): 5222–5227.
- [25] Keller NP, Nesbitt C, Sarr B, Phillips TD, Burow GB. pH regulation of sterigmatocystin and Aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp.. *Phytopathology*, 1997, 87(6): 643–648.

Identification of pH-signaling pathway-related genes in mycoparasitic fungus *Coniothyrium minitans*

Di Fang, Yi Lou, Mingde Wu, Jing Zhang, Guoqing Li, Long Yang*

Hubei Province Key Laboratory of Plant Pathology, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China

Abstract: [Objectives] To identify pH-signalling pathway (Pal)-related genes in mycoparasitic fungus *Coniothyrium minitans* and to understand the role of these genes in interaction between *C. minitans* and its host *Sclerotinia sclerotiorum*. [Methods] Six Pal-related homologues were obtained from the whole genome of *C. minitans* and designated as *CmpalA*, *CmpalB*, *CmpalC*, *CmpalF*, *CmpalH* and *CmpalI*. PEG-mediated protoplast transformation was used to create the deletion mutants of Pal-related genes. Five Pal-related genes were knocked out individually and the mutants designated as $\Delta CmpalA$ -33, $\Delta CmpalB$ -13, $\Delta CmpalC$ -5, $\Delta CmpalF$ -50 and $\Delta CmpalH$ -26. The biological characteristics, including colony morphology, mycoparasitism, oxalate degradation and antifungal activity, were compared between knock-out mutants and the wild-type strain. [Results] Compared to the wild type strain, five Pal-related genes-deletion mutants showed significantly reduced mycelia growth between pH 6 and 8. These results indicated that the disruption of these Pal-related genes increases sensitivity to neutral or alkaline pH. The sclerotia-infection assay showed that the parasitic activities of the five Pal-related genes-deletion mutants were dramatically reduced. qRT-PCR results showed that these Pal-related genes-deletion mutants suppressed expression levels of three mycoparasitism-associated genes *Cmch1*, *Cmg1* and *Cmsp1*. Meanwhile, expression of *CmpacC*, the pH signaling pathway downstream gene, was also reduced in the Pal-related genes-deletion mutants. The oxalate degradation of the five Pal-related genes-deletion mutants at pH 6 were increased under pH 8, and the antifungal activity of those mutants were also increased at pH 8 comparison with the wild type. [Conclusion] Disruption of the Pal-related genes resulted in impaired *C. minitans* responses to ambient pH. The pH-signalling pathway (Pal) plays an important role in interaction between *C. minitans* and *S. sclerotiorum*, including mycoparasitism, oxalate degradation and antifungal activity in *C. minitans* against *S. sclerotiorum*.

Keywords: *Coniothyrium minitans*, *Sclerotinia sclerotiorum*, pH-signalling pathway, mycoparasitism, oxalate degradation, antifungal activity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31272084, 31471813, 31672073)

*Corresponding author. Tel: +86-27-87280117; Fax: +86-27-87280670; E-mail: yanglong@mail.hzau.edu.cn

Received: 30 October 2016; Revised: 23 January 2017; Published online: 2 March 2017