



蛋白-O-岩藻糖基转移酶 1 基因 *CfPOFUT1* 在果生炭疽菌中的功能分析

朱俊子^{1,2}, 黎萍¹, 邱泽澜¹, 李晓刚^{1,2*}, 钟杰^{1*}

1 湖南农业大学植物保护学院, 湖南 长沙 410128

2 湖南省农业有害生物预警与防控工程研究中心, 湖南 长沙 410128

朱俊子, 黎萍, 邱泽澜, 李晓刚, 钟杰. 蛋白-O-岩藻糖基转移酶 1 基因 *CfPOFUT1* 在果生炭疽菌中的功能分析. 微生物学报, 2022, 62(10): 3801–3812.

Zhu Junzi, Li Ping, Qiu Zelan, Li Xiaogang, Zhong Jie. Functions of *CfPOFUT1* in *Colletotrichum fruticola*. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(10): 3801–3812.

摘要:【目的】蛋白-O-岩藻糖基转移酶 1 (protein O-fucosyltransferase 1, POFUT1)是催化蛋白质 O-岩藻糖基化的关键酶, 在动物和人体内被证明调控一系列的生理病理过程, 然而 *POFUT1* 基因在果生炭疽菌乃至真菌中还未见报道。本研究旨在克隆果生炭疽菌中 *CfPOFUT1* 基因, 并分析其生物学功能。【方法】利用 RT-PCR 技术扩增 *CfPOFUT1* 的基因并进行生物信息学分析, 构建了 *CfPOFUT1* 基因的沉默和过表达载体, 通过 PEG 介导法将载体导入原生质体中获得 *CfPOFUT1* 基因的沉默和过表达突变体。测定了野生型菌株、*CfPOFUT1* 沉默菌株和过表达菌株在 PDA 上的菌丝生长、分生孢子产生、萌发与附着胞形成、胁迫应答和致病力、杀菌剂敏感性等生物学表型。【结果】与野生型菌株相比, 基因过表达突变体产孢量显著增加, 致病力增强, 对啞菌酯敏感性降低, 但对多菌灵和咪鲜胺敏感性增强。基因沉默突变体产孢量减少, 细胞壁完整性、内质网应激敏感性提高, 致病力减弱, 对啞菌酯敏感性提高, 但对多菌灵和咪鲜胺敏感性降低。【结论】*CfPOFUT1* 基因参与调控果生炭疽菌分生孢子产量, 细胞壁完整性、内质网对应激和药剂敏感性, 并对其致病性也具有一定的影响。

关键词: 果生炭疽菌; 蛋白-O-岩藻糖基转移酶 1; *CfPOFUT1*; 药剂敏感性; 致病力

基金项目: 湖南省教育厅科研基金重点项目(20A257)

Supported by the Key Project of Scientific Research Fund of Education Department of Hunan Province (20A257)

*Corresponding authors. E-mail: ZHONG Jie, wzzhtx@sina.com; LI Xiaogang, lxxgang@aliyun.com

Received: 16 February 2022; Revised: 31 March 2022; Published online: 13 April 2022

Functions of *CfPOFUT1* in *Colletotrichum fructicola*

ZHU Junzi^{1,2}, LI Ping¹, QIU Zelan¹, LI Xiaogang^{1,2*}, ZHONG Jie^{1*}

1 College of Plant Protection, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

2 Hunan Provincial Engineering Research Center of Pest Early Warning and Control, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, Hunan, China

Abstract: [Objective] Protein O-fucosyltransferase 1 (POFUT1), a key enzyme catalyzing protein O-fucosylation, has been verified to regulate a series of physiological and pathological processes in animals and humans. However, *POFUT1* gene in *Colletotrichum fructicola* or even fungi has not been reported. This study aims to clone the *CfPOFUT1* gene from *C. fructicola* and analyze its biological functions. [Methods] RT-PCR was employed to amplify the *CfPOFUT1* gene and then the bioinformation of the gene was analyzed. We constructed the *CfPOFUT1* silencing and overexpression vectors, which were then transformed into the protoplasts with the PEG-mediated method to yield the *CfPOFUT1*-silenced and -overexpressing mutants. The biological phenotypes of the wild-type LY5-1, and the *CfPOFUT1*-silenced and -overexpressing mutants were determined, such as the mycelia growth, conidial production, conidial germination, appressorium formation, stress response, pathogenicity, and fungicide sensitivity. [Results] *CfPOFUT1*-overexpressing mutant showed higher conidial production, stronger pathogenicity, lower sensitivity to azoxystrobin, but higher sensitivity to carbendazim and prochloraz than the wild-type LY5-1. *CfPOFUT1*-silenced mutant demonstrated lower conidial production, intact cell wall, higher sensitivity to endoplasmic reticulum (ER) stress and azoxystrobin, lower pathogenicity, and lower sensitivity to carbendazim and prochloraz. [Conclusion] *CfPOFUT1* is involved in conidial production, cell wall integrity, ER stress, and fungicide sensitivity of *C. fructicola*, affecting the pathogenicity.

Keywords: *Colletotrichum fructicola*; protein O-fucosyltransferase 1; *CfPOFUT1*; fungicide sensitivity; pathogenicity

炭疽菌(*Colletotrichum* spp.)是一类具有重要经济意义的植物病原真菌,可引起多种作物炭疽病^[1]。其中果生炭疽菌(*Colletotrichum fructicola*)可引起多种作物的叶斑和果腐病,包括苹果、梨子、芒果、柑橘和葡萄和油茶等^[2-7]。目前防治果生炭疽菌主要依赖于化学杀菌剂,但由于该病原菌寄主范围广泛,侵染策略多样,易产生抗药性,防治相对困难。因此,挖掘和解析病原菌重要功能基因,对阐明病原菌的分子致病机制,寻找新的防治靶标具有重要意义。

糖基化是一种重要的蛋白质翻译后修饰方式,可影响蛋白质的溶解性、稳定性和催化活

性,同时也与蛋白的折叠、定位和转运有关,具有重要的生物学功能^[8]。糖基化可分为多种形式,其中O-岩藻糖基化是一种重要的糖基化类型。临床研究中揭示了O-岩藻糖基化与肿瘤发生、病灶转移、细胞迁徙、胚胎发育等生理和病理过程密切相关^[9-11]。蛋白-O-岩藻糖基转移酶1 (protein O-fucosyltransferase 1, POFUT1)是催化蛋白质O-岩藻糖基化的关键酶,在动物和人体内被证明调控一系列的生理病理过程。有研究表明 *POFUT1* 基因是 Notch 信号通路的重要组成元件^[10],人体中 *POFUT1* 对 Notch 蛋白的折叠、配体识别及内吞具有调控作用,

当该基因被敲除后 Notch 信号通路介导的细胞间信息交流与细胞迁徙等生物学过程受到影响^[12-13]。近年来有少量的关于植物中 O-岩藻糖基化的修饰及 *POFUT1* 基因功能的报道。拟南芥中 *POFUT1* 同源基因 *AtPOFUT1* 对拟南芥细胞粘附和花粉管生长具有重要的调控作用^[14]。有研究表明 *POFUT-SPY* 与 *PRR5* 互作促进 *PRR5* 的水解从而调整拟南芥的分子钟^[15]。到目前为止,关于真菌中 O-岩藻糖基化及 *POFUT1* 的功能还未见报道。本研究以果生炭疽菌的 *CfPOFUT1* 基因为研究对象,构建 *CfPOFUT1* 基因的过表达和沉默突变体,通过表型分析确定其生物学功能,为揭示该病原菌的致病分子机制提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 供试菌株

本实验所用菌株 LY5-1 为分离自油茶上的野生型(wild type, WT)菌株,由湖南农业大学植物保护学院保存。*CfPOFUT1* 基因的沉默和过表达菌株基于野生型菌株 LY5-1 获得。所有菌株均在 PDA(potato dextrose agar)培养基上于 28 °C 下生长。

1.1.2 培养基

PDA 培养基(g/L): 马铃薯去皮 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20。

1.1.3 主要试剂

RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒购自 TransGen Biotech 生物公司; DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Omega Bio-Tek 公司; 限制性内切酶(*EcoR* V、*Xho* I、*Hind* III、*Kpn* I、*Stu* I)及 PCR 相关试剂等均购自 ThermoFisher Scientific 公司; 引物合成和测序均由上海生工生物工程股份有限公司完成; 其他试剂为国产

分析纯。

1.2 果生炭疽菌中的 *CfPOFUT1* 基因的克隆及序列分析

果生炭疽菌总 RNA 用 TransZol Up Plus RNA Kit 提取,利用 TransScript[®] One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 合成 cDNA。以果生炭疽菌的 cDNA 为模板扩增 *CfPOFUT1* 基因的 CDS 区域。PCR 产物经过切胶回收、连接、转化并送上海生工测序公司测序。将获得的序列利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)工具进行保守区分析,采用 GenBank 中 BLASTp 工具进行蛋白同源性分析,利用 MEGA 6 软件进行多重序列比对后,利用邻接法(neighbor-joining, NJ)构建系统发育树。

1.3 果生炭疽菌中 *CfPOFUT1* 基因的过表达

利用同源重组技术构建 *CfPOFUT1* 的过表达载体,利用带有同源臂的引物 CfOFUT1-F (5'-AGCATCGATAAGCTTGATATCATGTCTCTACTAAGTA-3')和 CfOFUT1-R (5'-GGGCTGCA GGAATTCGATATCCTATGGAAACATCCCT-3')从果生炭疽菌 LY5-1 的 cDNA 模板中扩增 *CfPOFUT1* 基因 CDS 区,载体 KSTNP 用 *EcoR* V 酶切后,利用同源重组连接到载体上,经大肠杆菌转化及菌落 PCR 扩增验证,获得正确的质粒,并进行测序验证,构建过表达载体 KSTNP-CfOFUT1。利用 PEG 介导法将过表达载体导入到果生炭疽菌原生质体中,在含有 G418 的培养基中培养 2-3 d 后,通过引物 G418-JCF (5'-ATGATTGAACAAGATGGATTGCACGC-3')和 G418-JCR (5'-TCAGAAGAAGCTCGTCAAGAAGGCG-3')检测 G418 抗性转化子,筛选阳性转化子用于后续生物学研究。

1.4 果生炭疽菌中 *CfPOFUT1* 基因的沉默

以 pSlient 载体为骨架构建基因沉默载体。利用果生炭疽菌的 cDNA 为模板,根据 *CfPOFUT1* 基因序列设计引物 Si-CfOFUT1-fp (5'-CCGC

TCGAGTACCCGTCTCCGACTACCAG-3') 和 Si-CfOFUT1-rp (5'-CCCAAGCTTCTTGTCAGGGCTCTTGTC-3') 扩增 *CfPOFUT1* 基因内部片段。扩增片段的 5' 和 3' 端含有 *Xho* I 和 *Hind* III 酶切位点; 将扩增 PCR 产物经 *Xho* I 和 *Hind* III 双酶切后与同样双酶切的 pSlient 载体连接, 经大肠杆菌转化及菌落 PCR 扩增验证获得正确的质粒, 并进行测序验证, 获得 pSlient-aCfOFUT1。用引物 Si-CfOFUT1-afp (5'-GGGGTACCTACCCGTCTCCGACTACCAG-3') 和 Si-CfOFUT1-arp (5'-GAAGGCCTTCTTGTCAGGGCTCTTGTC-3'), 扩增片段的 5' 和 3' 端含有 *Kpn* I 和 *Stu* I 酶切位点。采用同样的方法用 *Kpn* I 和 *Stu* I 双酶切 PCR 产物和质粒 pSlient-aCfOFUT1, 分别纯化 PCR 产物和质粒 pSlient-T1, 并连接、克隆、测序验证。将测序验证正确的质粒命名为 pSlient-*CfOFUT1*。用同样的方法将质粒 pSlient-CfOFUT1 导入到果生炭疽菌原生质体中, 并在含潮霉素的培养基中培养 2-3 d 后, 通过引物 Hyg-JCF (5'-CTGTCGAGAAGTTTCTGATCG-3') 和 Hyg-JCR (5'-CTGATAGAGTTGGTCAAGACC-3') 检测潮霉素磷酸转移酶基因(*HPT*)抗性转化子, 筛选阳性转化子用于后续生物学研究。

1.5 突变体表型分析

1.5.1 营养生长及菌丝形态观察

将野生型菌株 LY5-1、过表达突变体 *OCfOFUT1* 和沉默转化子 *SiCfOFUT1* 在 PDA 平板上活化 5 d 后, 用打孔器打取 5 mm 直径的菌饼接种于 PDA 培养基上, 28 °C 下黑暗培养 5 d。观察菌落形态并测量菌落直径, 每个处理设置 3 个重复, 以野生型菌株为对照。

1.5.2 分生孢子产量及萌发

将野生型菌株 LY5-1、过表达突变体 *OCfOFUT1* 和沉默转化子 *SiCfOFUT1* 在 PDA 平板上活化 5 d 后, 用打孔器打取 5 mm 直径的菌饼接种于

PD 培养基中, 180 r/min、28 °C 振荡培养 5 d。用灭菌纱布过滤后收集孢子液。用血球计数板对孢子计数, 试验设 3 个重复, 结果取平均值。滴加 20 μL 孢子悬浮液于干净的疏水玻片上, 28 °C 黑暗保湿条件下诱导孢子萌发, 统计孢子萌发率及附着孢形成率, 试验设 3 个重复。

1.5.3 外界胁迫敏感性测定

野生型菌株 LY5-1、过表达突变体 *OCfOFUT1* 和沉默转化子 *SiCfOFUT1* 在 PDA 平板上活化 5 d 后, 用打孔器打取 5 mm 直径的菌饼接种于含有 800 μg/mL 刚果红、1 mol/L NaCl、30 mmol/L H₂O₂、0.01% SDS、1 mol/L 山梨醇和 5 mmol/L DTT 的 PDA 平板上, 28 °C 下黑暗培养 5 d, 观察并拍照记录, 计算抑制率, 试验设 3 个重复。

1.5.4 致病力测定

选取健康、无病斑、表面均匀光滑的苹果进行菌饼接种。将苹果用 75% 的乙醇表面消毒, 无菌水漂洗, 晾干, 用已灭菌的大头针在苹果表面形成伤口。在培养 5 d 的新鲜野生型菌株 LY5-1、过表达突变体 *OCfOFUT1* 和沉默转化子 *SiCfOFUT1* 平板边缘打取 5 mm 菌饼接种于苹果上。将接种体置于干净的透明聚苯乙烯盒中, 以无菌水湿润的棉花保湿。每个处理 5 个重复, 试验重复 3 次。

1.5.5 药剂敏感性测定

采用菌丝生长速率法对野生型菌株 LY5-1、过表达突变体 *OCfOFUT1* 和沉默转化子 *SiCfOFUT1* 进行咪鲜胺、啞菌酯和多菌灵 3 种杀菌剂的抑菌活性测定。将咪鲜胺、啞菌酯和多菌灵 3 种杀菌剂分别配置成 0.05、10.00 和 0.05 mg/L 的终浓度。以未加杀菌剂的 PDA 培养基接种为空白对照。每个浓度重复 3 次, 配制培养基时, 将灭菌后的 50 °C 的 PDA 培养基中分别加入不同浓度的杀菌剂制成不同终浓度的含药剂培养基。用直径 5 mm 打孔器从新培养 5 d 的菌落

边缘打取菌饼接种于不同药剂的含药及对照 PDA 平板上。接种后置于 28 °C 恒温培养箱中培养 5 d, 用十字交叉法测量各处理的菌落直径, 计算菌丝生长抑制率。生长抑制率(%)=(对照菌落直径-药剂处理菌落直径)/(对照菌落直径-0.5)×100。

1.5.6 敏感药剂处理及致病力测定

参照上述方法准备消毒的苹果, 用已灭菌的大头针在苹果表面形成伤口后在伤口表面滴入 10 μL 浓度为 10 mg/L 的嘧菌酯, 待药剂完全吸收后, 将培养 5 d 的新鲜野生型菌株 LY5-1、过表达突变体 *OCfOFUT1* 和沉默转化子 *SiCfOFUT1* 平板边缘打取 5 mm 菌饼接种于苹果上。以未用敏感药剂处理的苹果作为对照, 每个处理 5 个重复, 试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 基因的克隆及序列分析

CfPOFUT1 基因的全长为 1 452 bp, 编码 484 个氨基酸, 保守区分析该蛋白含有 1 个 O-FucT-like 保守区。将 *CfPOFUT1* 的氨基酸序列在 GenBank 中利用 BLASTp 工具进行比对, 发现果生炭疽菌 *CfPOFUT1* 氨基酸序列与胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* 23) K456DRAFT_43402 氨基酸序列同源性最高, 为 98.14%。选取来自于不同真菌、动物、植物的该蛋白类似序列构建系统发育树, 结果显示这 3 类聚为不同的大簇, *CfPOFUT1* 与炭疽菌属的同源蛋白亲缘关系较近, 并与胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides* 23) K456DRAFT_43402 的亲缘关系最近(图 1)。

2.2 *CfPOFUT1* 基因的沉默与过表达

将 *CfPOFUT1* 基因的沉默载体用 PEG 介导法转入野生型菌株 LY5-1 的原生质体, 共获得 28 个转化子。*HPT* 抗性基因检测发现突变体中

能扩增出目的条带, 而野生型菌株基因组中不能扩增出目的条带。实时荧光 RT-PCR 检测野生型与转化子中 *CfPOFUT1* 基因的相对表达量。结果显示, 与野生型菌株 LY5-1 相比, *CfPOFUT1* 基因在转化子 *SiCfOFUT1-2* 和 *SiCfOFUT1-6* 中表达水平显著性下降, 分别下调 49.5% 和 64.5% (图 2A)。因此选择沉默转化子 *SiCfOFUT1-2* 和 *SiCfOFUT1-6* 进行后续生物学研究。

将过表达载体 KSTNP-CfOFUT1 导入野生型菌株 LY5-1 的原生质体中, 通过 G418 筛选将 G418 抗性菌株进行 PCR 验证, 获得 *CfPOFUT1* 基因过表达转化子。实时荧光 RT-PCR 检测野生型与转化子中 *CfPOFUT1* 基因的相对表达量。结果显示与野生型菌株 LY5-1 相比, *CfPOFUT1* 基因在转化子 *OCfOFUT1-9* 和 *OCfOFUT1-22* 中表达水平显著性提高, 分别上调 554.1 和 717.2 倍(图 2B)。因此选择过表达转化子 *OCfOFUT1-9* 和 *OCfOFUT1-22* 进行后续生物学研究。

2.3 突变体表型分析

检测了野生型菌株 LY5-1、过表达突变体 *OCfOFUT1-9* 和 *OCfOFUT1-22* 和沉默转化子 *SiCfOFUT1-2* 和 *SiCfOFUT1-6* 菌株在 PDA 培养基上营养生长情况。结果显示菌株间生长速度与菌落形态无明显差异。这说明 *CfPOFUT1* 基因不影响果生炭疽菌的营养生长。

2.4 外界胁迫应答测定

将野生型菌株 LY5-1、过表达突变体 *OCfOFUT1-9* 和 *OCfOFUT1-22* 和沉默转化子 *SiCfOFUT1-2* 和 *SiCfOFUT1-6* 菌株分别接入含有细胞壁胁迫因子 800 μg/mL 刚果红和 0.01% SDS、渗透压胁迫因子 1 mol/L NaCl 和 1 mol/L 山梨醇、活性氧胁迫因子 30 mmol/L H₂O₂ 以及内质网胁迫因子 5 mmol/L DTT 的 PDA 培养基中, 培养 5 d 后统计抑制率。试验结果表明三者能

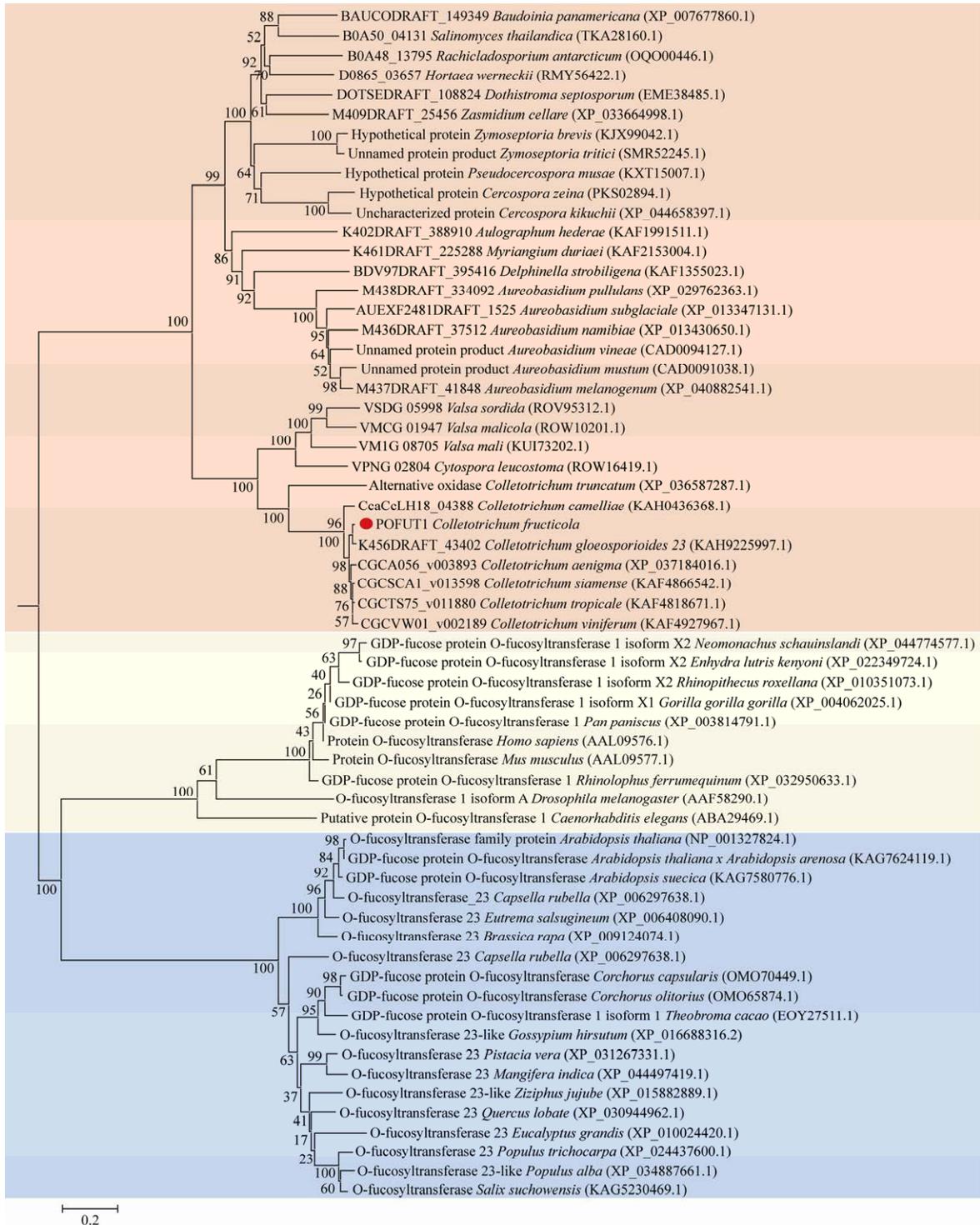


图 1 *CfPOFUT1* 基因系统发育分析

Figure 1 Phylogenetic analysis of *CfPOFUT1*. The numbers in the parentheses indicate the GenBank accession number of amino acid sequences used for phylogenetic tree construction. The notes at the branch points mean the bootstrap values supporting the branches. The scale bar means the estimated number of substitutions per amino acid.

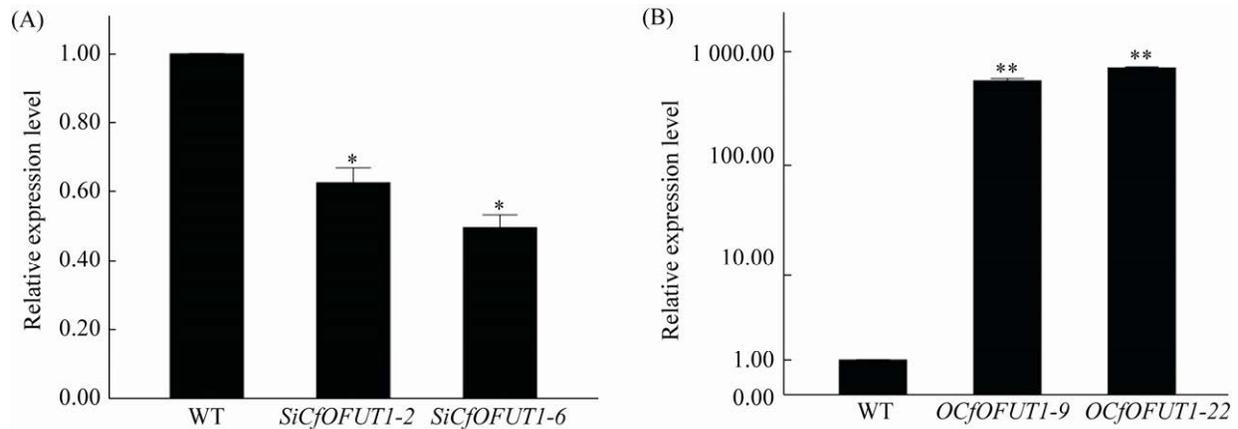


图 2 *CfPOFUT1* 沉默转化子、过表达转化子的实时荧光 RT-PCR 鉴定

Figure 2 Real Time RT-PCR identification of *CfPOFUT1* in silencing transformants and over expression transformants. A: relative expression level of *CfPOFUT1* in silencing transformants; B: relative expression level of *CfPOFUT1* in over expression transformants. Error bars represent SD of three replicates and asterisks indicate significant differences (**: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$).

不同培养基上菌丝生长均受到不同程度的抑制, 相对于野生型菌株 LY5-1, 过表达突变体与野生型菌株 LY5-1 无明显差异, 但沉默转化子 *SiCfOFUT1-2* 和 *SiCfOFUT1-6* 菌株对 SDS、DTT 更加敏感(图 3)。这表明 *CfPOFUT1* 基因参与调控果生炭疽菌细胞壁完整性和内质网应激过程。

2.5 *CfPOFUT1* 基因参与调控分生孢子产量

通过血球计数板, 发现过表达突变体 *OCfOFUT1* 产孢量与野生型相比差异显著, 野生型菌株分生孢子产量为 1.41×10^7 个/mL, *OCfOFUT1* 过表达菌株分生孢子产量分别为 2.86×10^7 个/mL 和 2.34×10^7 个/mL。沉默菌株 *SiCfOFUT1* 的分生孢子产量分别为 1.24×10^7 个/mL 和 1.29×10^7 个/mL (图 4)。该研究结果说明 *CfPOFUT1* 基因参与调控果生炭疽菌的分生孢子形成。用疏水玻片进行分生孢子萌发和附着胞形成观察, 发现野生型与过表达和沉默突变体菌株间分生孢子萌发率和附着胞形成率比无显著差异。

2.6 致病力测定

为了确定 *CfPOFUT1* 基因对果生炭疽菌致病力的影响, 将野生型菌株 LY5-1、过表达突变体 *OCfOFUT1* 和沉默转化子 *SiCfOFUT1* 的菌饼接种苹果(图 5)。结果显示, 在有伤接种条件下 10 d 后, 所有菌株均能引起明显的病斑, 但过表达突变体 *OCfOFUT1* 致病力明显强于野生型菌株, 沉默突变体 *SiCfOFUT1* 致病力低于野生型菌株。由此可见, *CfPOFUT1* 影响果生炭疽菌致病力。

2.7 药剂敏感性测定

为了确定 *CfPOFUT1* 基因对果生炭疽菌对 3 种杀菌剂敏感性的影响。分析了咪鲜胺、多菌灵和啞菌酯对野生型菌株 LY5-1、过表达突变体 *OCfOFUT1* 和沉默转化子 *SiCfOFUT1* 的菌丝生长抑制率。与野生型菌株 LY5-1 相比, 过表达突变体 *OCfOFUT1* 对咪鲜胺和多菌灵的敏感性显著增强而对啞菌酯敏感性减弱。沉默转化子 *SiCfOFUT1* 对咪鲜胺和多菌灵的敏感性显著减弱, 对啞菌酯敏感性显著增强(图 6)。该结

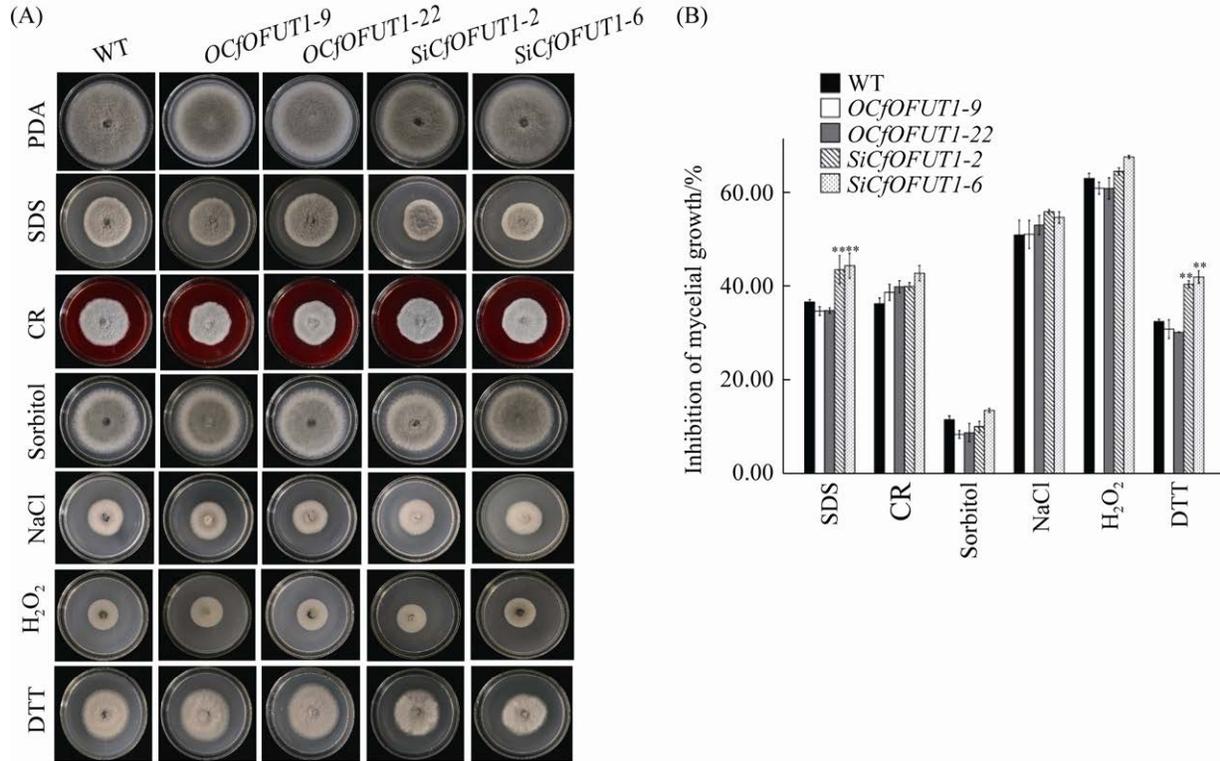


图3 *CfPOFUT1* 沉默转化子、过表达转化子胁迫敏感性测定

Figure 3 Sensitivity test to the stress factor of *CfPOFUT1* in silencing transformants and over expression transformants. A: WT, *OCjOFUT1-9*, *OCjOFUT1-22*, *SiCjOFUT1-2* and *SiCjOFUT1-6* were grown on PDA and PDA with 0.01% SDS, 800 µg/mL CR, 1 mol/L sorbitol, 1 mol/L NaCl, 30 mmol/L H₂O₂ and 5 mmol/L DTT; B: statistical analysis of inhibition rates of the strains to indicate significant differences. Error bars represent SD of three replicates and asterisks indicate significant differences ($P < 0.01$).

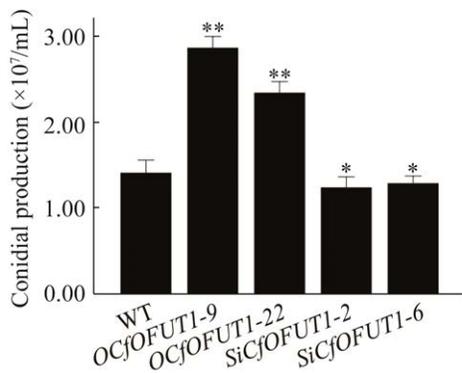


图4 *CfPOFUT1* 沉默转化子、过表达转化子产孢量

Figure 4 Conidial production of *CfPOFUT1* in silencing transformants and over expression transformants were measured and statistically analyzed. Error bars represent SD of three replicates and asterisks indicate significant differences (**: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$).

果说明 *CfPOFUT1* 基因正向调控果生炭疽菌对咪鲜胺和多菌灵的药剂敏感性，而反向调节对啞菌酯敏感性。

2.8 敏感药剂对 *CfPOFUT1* 基因调控果生炭疽菌致病力的影响

为了验证敏感药剂对 *CfPOFUT1* 基因调控果生炭疽菌致病力的影响，本研究在进行菌株致病力测定时，引入敏感药剂啞菌酯。在苹果表面用 10 mg/L 的啞菌酯处理后，再分别接种野生型菌株 LY5-1、过表达转化子 *OCjOFUT1-9* 和 *OCjOFUT1-22*、沉默转化子 *SiCjOFUT1-2* 和 *SiCjOFUT1-6*。结果表明，在有伤接种苹果 10 d 后，药剂处理组三者致病力相对未用药剂处理

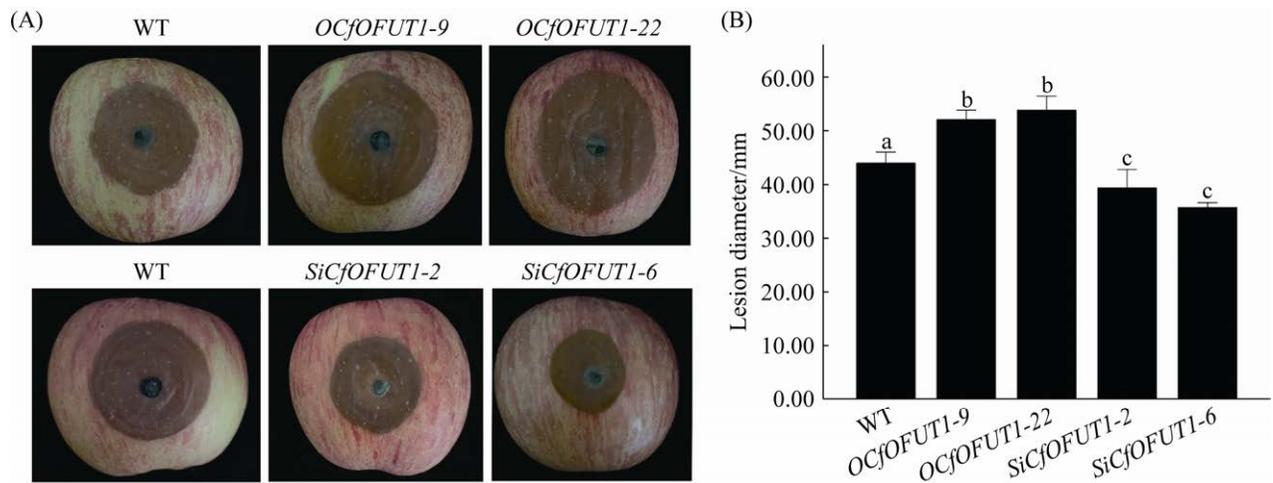


图 5 *CfPOFUT1* 沉默转化子、过表达转化子致病力比较

Figure 5 Pathogenicity analysis of *CfPOFUT1* in silencing transformants and over expression transformants. A: diseased symptoms of wounded apples inoculated with different mycelial plugs at 10 dpi; B: lesion diameter of wounded apples inoculated with different mycelial plugs ($P < 0.05$).

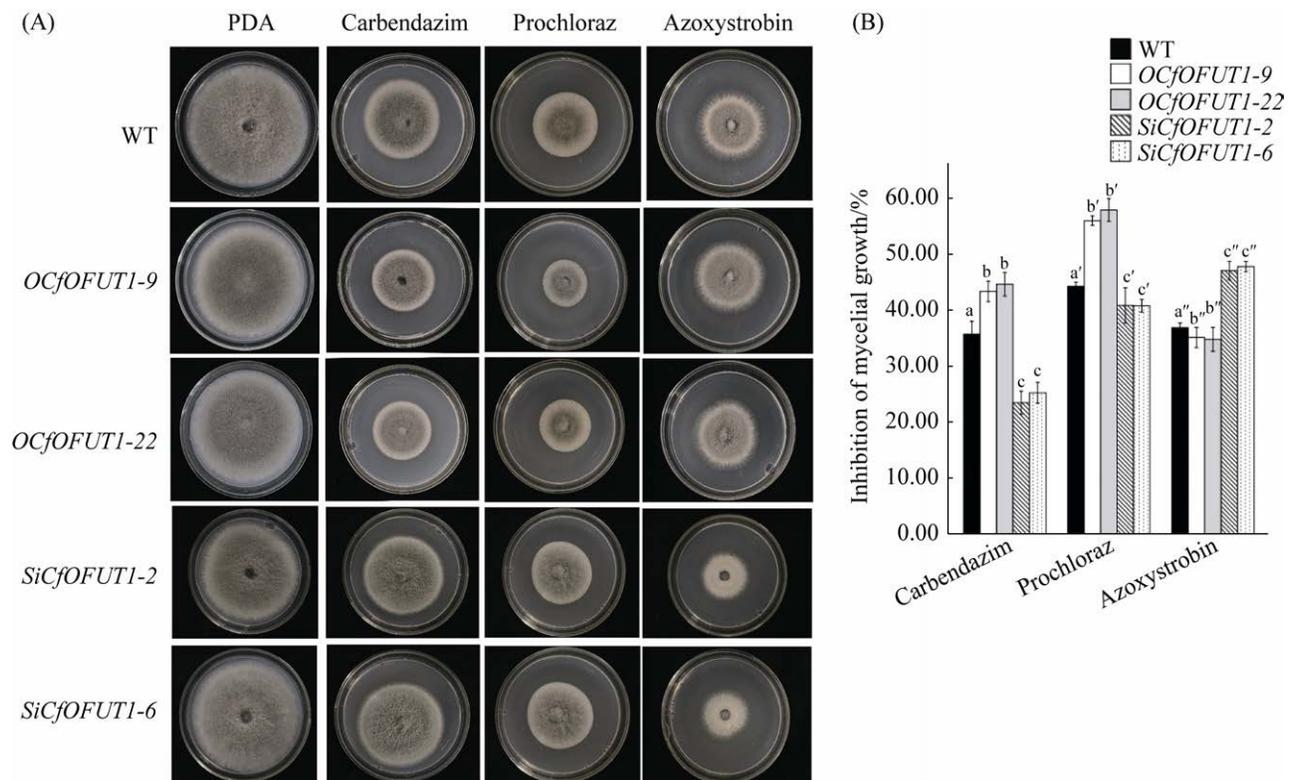


图 6 *CfPOFUT1* 沉默转化子、过表达转化子不同药剂敏感性

Figure 6 Sensitivities of *CfPOFUT1* in silencing transformants and over expression transformants in different drug. A: WT, *OCjOFUT1-9*, *OCjOFUT1-22*, *SiCjOFUT1-2* and *SiCjOFUT1-6* were grown on PDA and PDA with 0.05 mg/L carbendazim, 0.05 mg/L prochloraz, 10 mg/L azoxystrobin; B: statistical analysis of inhibition rates of the strains to indicate significant differences ($P < 0.05$).

组都受到了抑制,与野生型菌株 LY5-1 相比,无论是否用药剂处理,过表达突变体 *OCfOFUT1* 致病力明显强于野生型菌株,沉默突变体 *SiCfOFUT1* 致病力低于野生型菌株(图 7)。因此敏感药剂咪菌酯对 *CfPOFUT1* 调控果生炭疽菌致病力产生影响。

3 讨论

果生炭疽菌是油茶炭疽病的主要致病菌,分布范围广,对油茶致病力强。对果生炭疽菌中重要功能基因进行鉴定,将为阐明其致病分

子机理提供基础。本研究在果生炭疽菌中克隆了一个 *CfPOFUT1* 基因,成功获得了 *CfPOFUT1* 基因的过表达和沉默突变菌株,对该基因进行了生物学功能鉴定。研究发现该 *CfPOFUT1* 基因可以调控果生炭疽菌分生孢子产生、致病力、细胞壁、内质网对外界胁迫的应答过程及药剂敏感性。

表型分析发现,虽然过表达突变菌株与野生型菌株在 PDA 培养基以及在含有刚果红、SDS、NaCl、山梨醇、 H_2O_2 、DTT 的胁迫培养基上生长无显著差异,但是 *SiCfOFUT1* 沉默菌

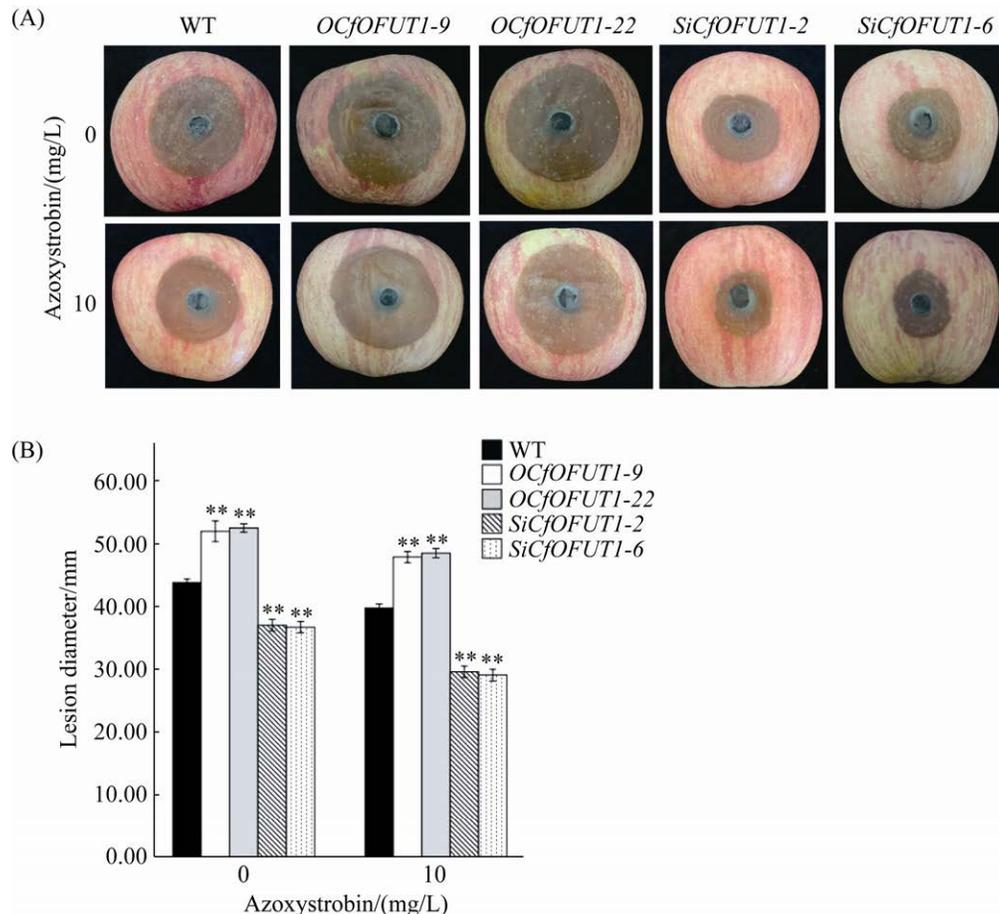


图 7 敏感药剂处理后 *CfPOFUT1* 沉默转化子、过表达转化子致病力影响

Figure 7 Pathogenicity of *CfPOFUT1* in silencing transformants and over expression transformants in drug treatment. A: WT, *OCfOFUT1-9*, *OCfOFUT1-22*, *SiCfOFUT1-2* and *SiCfOFUT1-6* on the azoxystrobin-treated apples; B: lesion diameter of azoxystrobin-treated apples inoculated with different mycelial plugs ($P < 0.01$).

株对 SDS、DTT 更加敏感, 这表明 *CfPOFUT1* 基因参与调控果生炭疽菌细胞壁完整性、内质网应激过程。致病力试验发现 *CfPOFUT1* 沉默转化子的致病力与野生型相比显著降低, 而过表达转化子致病力增强, 因此 *CfPOFUT1* 影响果生炭疽菌致病力。

本研究发现, *CfPOFUT1* 基因过表达转化子产孢量明显高于野生型, 而沉默转化子产孢量低于野生型, 说明 *CfPOFUT1* 参与调控了分生孢子形成。分生孢子是炭疽菌侵染循环中的关键因子, 对病原菌的繁殖和侵染致病起到重要作用^[16]。目前在果生炭疽菌中已有部分基因被报道参与调控分生孢子的形成, 如高亚兰等^[17]发现油茶果生刺盘孢 *bZIP* 转录因子 *CfAp1* 调控分生孢子的形成。

药剂敏感性分析发现过表达突变体 *OCfOFUT1* 对咪鲜胺和多菌灵的敏感性显著增强, 对啞菌酯敏感性显著减弱, 而沉默转化子 *SiCfOFUT1* 对咪鲜胺和多菌灵的敏感性显著减弱, 对啞菌酯敏感性显著增强。啞菌酯属于 QoIs 杀菌剂, 其作用机制为药剂与细胞色素 *bc1* 复合物中的 Qo 位点(即线粒体内膜外壁位点)结合, 阻止复合物 III 中电子从细胞色素 *b* 传到细胞色素 *c1*, 从而阻止 ATP 的产生而干扰病原菌的能量循环^[18-19]。研究表明交替氧化酶基因突变可增强灰葡萄孢对 QoIs 杀菌剂的敏感性^[20], 这与本研究中 *CfPOFUT1* 基因沉默转化子对啞菌酯敏感性增强一致。咪鲜胺为 14 α -脱甲基酶抑制剂类杀菌剂, 其作用机制为抑制 14 α -脱甲基酶的活性, 从而阻碍麦角甾醇的合成, 最终起到杀菌的作用^[21]。多菌灵为苯并咪唑类杀菌剂, 其作用机制主要是通过与真菌微管蛋白的结合破坏纺锤丝的形成, 最终阻碍细胞的正常有丝分裂^[22]。多菌灵和咪鲜胺作用机制不同, 但在

本研究中, *CfPOFUT1* 基因沉默后咪鲜胺和多菌灵的敏感性显著减弱而对啞菌酯敏感性显著增强, *CfPOFUT1* 基因过表达后对咪鲜胺和多菌灵的敏感性显著增强而对啞菌酯敏感性减弱, 由此推测 *CfPOFUT1* 基因可能影响了 AOX 途径, 或者病原真菌中受 *CfPOFUT1* 基因调控的通路广泛地参与了对多种杀菌剂的敏感性调控。用敏感药剂啞菌酯处理后进行致病力测定, 结果表明过表达突变体 *OCfOFUT1* 致病力明显强于野生型菌株, 沉默突变体 *SiCfOFUT1* 致病力低于野生型菌株, 与未用药剂处理组趋势一致, 说明敏感药剂啞菌酯对 *CfPOFUT1* 调控果生炭疽菌致病力产生影响, 由此推测果生炭疽菌抗药性与致病力可能由部分相同或交叉的信号通路调控。

总之, 本研究从油茶炭疽病的病原菌果生炭疽菌中克隆和鉴定了一个蛋白-O-岩藻糖基转移酶基因, 将其命名为 *CfPOFUT1*。通过基因过表达和沉默以及生物学分析发现该基因可调控果生炭疽菌的分子孢子产生、致病力、细胞壁完整性、内质网应激以及对药剂的敏感性。该研究结果可为阐述果生炭疽菌分子致病机理及开发潜在的防治靶标提供理论依据。

参考文献

- [1] Cannon PF, Damm U, Johnston PR, Weir BS. *Colletotrichum*-current status and future directions. *Studies in Mycology*, 2012, 73: 181–213.
- [2] Liao CY, Chen MY, Chen YK, Wang TC, Sheu ZM, Kuo KC, Chang PFL, Chung KR, Lee MH. Characterization of three *Colletotrichum acutatum* isolates from *Capsicum* spp. *European Journal of Plant Pathology*, 2012, 133(3): 599–608.
- [3] Vieira WAS, Michereff SJ, Morais MA, Hyde KD, Câmara MPS. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal Diversity*, 2014, 67(1): 181–202.

- [4] Velho AC, Alaniz S, Casanova L, Mondino P, Stadnik MJ. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with apple diseases in southern Brazil and Uruguay. *Fungal Biology*, 2015, 119(4): 229–244.
- [5] Lima NB, Lima WG, Tovar-Pedraza JM, Michereff SJ, Câmara MPS. Comparative epidemiology of *Colletotrichum* species from mango in northeastern Brazil. *European Journal of Plant Pathology*, 2015, 141(4): 679–688.
- [6] Zhang PF, Zhai LF, Zhang XK, Huang XZ, Hong N, Xu WX, Wang GP. Characterization of *Colletotrichum fruticola*, a new causal agent of leaf black spot disease of sandy pear (*Pyrus pyrifolia*). *European Journal of Plant Pathology*, 2015, 143(4): 651–662.
- [7] Li H, Zhou GY, Liu JA, Xu JP. Population genetic analyses of the fungal pathogen *Colletotrichum fruticola* on tea-oil trees in China. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0156841.
- [8] Holdener BC, Haltiwanger RS. Protein O-fucosylation: structure and function. *Current Opinion in Structural Biology*, 2019, 56: 78–86.
- [9] Okajima T, Xu AG, Lei L, Irvine KD. Chaperone activity of protein O-fucosyltransferase 1 promotes Notch receptor folding. *Science*, 2005, 307(5715): 1599–1603.
- [10] Shi SL, Stanley P. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways. *PNAS*, 2003, 100(9): 5234–5239.
- [11] Ajima R, Suzuki E, Saga Y. Pofut1 point-mutations that disrupt O-fucosyltransferase activity destabilize the protein and abolish Notch1 signaling during mouse somitogenesis. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187248.
- [12] Stahl M, Uemura K, Ge CH, Shi SL, Tashima Y, Stanley P. Roles of Pofut1 and O-fucose in mammalian Notch signaling. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(20): 13638–13651.
- [13] Takeuchi H, Haltiwanger RS. Role of glycosylation of Notch in development. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2010, 21(6): 638–645.
- [14] Smith DK, Jones DM, Lau JBR, Cruz ER, Brown E, Harper JF, Wallace IS. A putative protein O-fucosyltransferase facilitates pollen tube penetration through the *Stigma*-style interface. *Plant Physiology*, 2018, 176(4): 2804–2818.
- [15] Wang Y, He YQ, Su C, Zentella R, Sun TP, Wang L. Nuclear localized O-fucosyltransferase SPY facilitates PRR5 proteolysis to fine-tune the pace of *Arabidopsis* circadian clock. *Molecular Plant*, 2020, 13(3): 446–458.
- [16] Weir BS, Johnston PR, Damm U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, 2012, 73: 115–180.
- [17] 高亚兰, 何苑皋, 李河. 调控油茶果生刺盘孢 bZIP 转录因子 CfAp1 的生物学功能. *林业科学*, 2020, 56(9): 30–39.
- [17] Gao YL, He YG, Li H. Biological function bZIP-type transcription factor CfAp1 in *Colletotrichum fruticola*. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, 56(9): 30–39. (in Chinese)
- [18] Fernández-Ortuño D, Torés JA, De Vicente A, Pérez-García A. Mechanisms of resistance to QoI fungicides in phytopathogenic fungi. *International Microbiology*, 2008, 11(1): 1–9.
- [19] 詹家绥, 吴娥娇, 刘西莉, 陈凤平. 植物病原真菌对几类重要单位点杀菌剂的抗药性分子机制. *中国农业科学*, 2014, 47(17): 3392–3404.
- [19] Zhan JS, Wu EJ, Liu XL, Chen FP. Molecular basis of resistance of phytopathogenic fungi to several site-specific fungicides. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(17): 3392–3404. (in Chinese)
- [20] Lin ZS, Wu JY, Jamieson PA, Zhang CQ. Alternative oxidase is involved in the pathogenicity, development, and oxygen stress response of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 2019, 109(10): 1679–1688.
- [21] Siegel MR. Sterol-inhibiting fungicides: effects on sterol biosynthesis and sites of action. *Plant Disease*, 1981, 65(12): 986.
- [22] Howard RJ, Aist JR. Effects of MBC on hyphal tip organization, growth, and mitosis of *Fusarium acuminatum*, and their antagonism by D₂O. *Protoplasma*, 1977, 92(3/4): 195–210.