

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
52(11):1335-1343; 4 November 2012
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

高毒力大丽轮枝菌特异片段 SCF73 突变株的构建及其致病力测定

王金龙, 陈捷胤, 柳少燕, 李蕾, 戴小枫*

中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081

摘要: 【目的】初步明确高毒菌株 VDG1 特异片段 SCF73 与大丽轮枝菌致病力的关系。【方法】通过比较基因组学分析和 PCR 鉴定, 明确大丽轮枝菌高毒菌株 VDG1 相对于低毒菌株 VDG2 的特异片段 SCF73; 构建 SCF73 片段敲除质粒, 导入农杆菌 AGL-1, 应用农杆菌介导法转化大丽轮枝菌 VDG1, 抗性筛选和 PCR 扩增鉴定 SCF73 敲除转化子; 利用果胶、纤维素和淀粉培养基模拟分析 Δ SCF73 降解细胞壁组分的能力, 采用定量蘸根接种法鉴定其对感病棉种军棉 1 号的致病力。【结果】确定了大丽轮枝菌 VDG1 的特异片段 SCF73, 长度为 27.1 kb, 预测编码 5 个基因, 推测 2 个基因具有水解酶功能; 筛选获得了 3 个 Δ SCF73 突变株; 突变株利用细胞壁组分的能力与野生型菌株 VDG1 相比无显著差异; 突变株对感病棉种军棉 1 号的致病力显著减弱。【结论】高毒力菌株 VDG1 特异片段 SCF73 在大丽轮枝菌致病过程中具有重要作用。

关键词: 大丽轮枝菌, 特异片段, 基因敲除, 致病力

中图分类号: Q933 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2012) 11-1335-09

大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 是引起棉花、番茄、马铃薯、辣椒、草莓等重要经济作物黄萎病的病原菌, 常年在世界范围内造成重大经济损失^[1]。有研究表明, 大丽轮枝菌的致病机理与信号传导密切相关, 如大丽轮枝菌丝裂原活化蛋白激酶基因 *VMK1* (*Verticillium* MAP Kinase 1) 与大丽轮枝菌生长、发育和致病性相关, 缺失该基因的突变株致病力显著下降^[2]。大丽轮枝菌 PKA (cAMP-dependent protein kinase A) 催化亚基基因 *VdPKAC1* (*V. dahliae* gene encoding PKA catalytic subunit) 缺失后乙烯合成的能力较野生型菌株明显减弱, 导致对番茄和茄子的侵染能力降低^[3]。敲除大丽轮枝菌 1 号生理小种的编码蔗糖非发酵蛋白激酶基因

VdSNF1 (*V. dahliae* sucrosonfermenting 1 gene) 可显著降低其对番茄和茄子的致病力^[4]。番茄大丽轮枝菌 1 号生理小种 G 蛋白 β 亚基编码基因缺失后, 突变株较野生型的致病力显著减弱, 乙烯合成量降低^[5]。因此, 信号传导与基因表达调控是大丽轮枝菌侵染寄主的重要生物学过程。

另一方面, 大丽轮枝菌胞外毒素可引起寄主发病并最终表现萎蔫病症。前人研究表明, 大丽轮枝菌培养液中含有多个不同分子量的具有致萎活性的蛋白/糖蛋白^[6-14], 可以破坏寄主细胞的细胞骨架和细胞核^[15-16]。通过筛选大丽轮枝菌表达序列标签文库, 发现了 1 个能够引发棉花脱水萎蔫的坏死和乙烯诱导蛋白基因 *VdNEP* (*V. dahliae* necrosis-

基金项目: 科技基础性工作专项 (2008FY240100); 国家“973 项目” (2011CB100700)

* 通信作者。Tel/Fax: +86-10-62815976; E-mail: dxf@caas.net.cn

作者简介: 王金龙 (1987-), 男, 山东日照人, 硕士研究生, 主要从事大丽轮枝菌致病机理研究。E-mail: jlwang201@163.com

收稿日期: 2012-05-06; 修回日期: 2012-06-21

and ethylene-inducing protein)^[17]。此外,胞外蛋白中的细胞壁降解酶也是大丽轮枝菌侵染寄主的重要因子,研究发现大丽轮枝菌侵入寄主后能够产生果胶酶、糖基水解酶等,分解细胞壁中的胶状物质和果胶物质,引起组织解体,从而堵塞导管。分泌蛋白中的果胶裂解酶、多聚半乳糖苷酶和果胶酯酶可以在体外导致植物组织枯死或出现黄萎症状,并且其产生量的多少和轮枝菌的毒力水平相关^[18]。对大丽轮枝菌基因组分析发现,与其它病原真菌相比,果胶酶、糖基水解酶等碳水化合物活性酶类发生了显著的扩增,进化出了复杂的植物细胞壁降解机制^[19]。因此,大丽轮枝菌分泌的胞外蛋白可能通过降解植物细胞壁参与了对寄主的侵染作用,并且可以作为一种毒力因子转运到寄主胞内起作用。

新近研究发现,大丽轮枝菌的毒力或者致病类型差异可能是由菌株之间的特异基因引起的。对1号和2号生理小种基因组测序发现,1号生理小种含有的特异基因 *Ave1* (for *Avirulence on Ve1* tomato) 可以激发由 *Ve1* (A locus responsible for resistance against race 1 strains of *V. dahliae*) 基因介导的番茄抗病反应^[20]。本研究,通过高毒力大丽轮枝菌 VDG1 和低毒力菌株 VDG2 基因组比较分析,筛选高毒力菌株特有的基因组片段,通过构建特异片段的缺失突变体并鉴定其致病力变化,进一步确证菌株之间特异基因对大丽轮枝菌毒力的贡献。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 实验使用的菌株和质粒见表1。

1.1.2 培养基: LB 培养基用于大肠杆菌培养, 37℃。YEB 培养基用于农杆菌 AGL-1 的常规培养, 28℃。大丽轮枝菌于 25℃ 条件下培养, CM 培养基和 PDA 培养基用于大丽轮枝菌常规培养, MM 培养基用于大丽轮枝菌遗传转化预培养, IM 培养基用于大丽轮枝菌遗传转化共培养。察氏培养基 (Czapek)、果胶培养基 (察氏盐, 果胶 10 g/L)、纤维素培养基 (察氏盐, 纤维素 10 g/L) 和淀粉培养基 (察氏盐, 淀粉 10 g/L) 用于突变体表型鉴定, 培养基配方参照文献^[21]。

表 1 菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this study		
Strains and plasmids	Characteristics	Source
VDG1	<i>Verticillium dahliae</i> Kleb	Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences
AGL-1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	This lab
Trans1-T1	<i>Escherichia coli</i> competent cell	TransGen Biotech Company
Δ SCF73	SCF73 knockout mutant	This lab
pEASY-T3	Cloning vector	TransGen Biotech Company
pUC-Hyg	Plasmid carrying Hyg resistant cassette	Guangxi University
pGKO2-Gateway	Gene knockout plasmid	Pennsylvania State University
pKO-SCF73	Homologous recombination plasmid	This lab

1.1.3 主要试剂和仪器: Gateway BP 克隆酶购自 Invitrogen 公司, *Taq* 酶、dNTP 和限制性内切酶购自宝生物工程 (大连) 有限公司。pEASY-T3 载体试剂盒和胶回收试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。乙酰丁香酮、5-氟脱氧尿苷 (F₂ dU)、氨苄青霉素 (Amp)、头孢霉素 (Cef)、卡那霉素 (Kan)、利福平 (Rif)、果胶和纤维素购自美国 Sigma 公司, 潮霉素 B 购自德国 Merck 公司, 可溶性淀粉购自北京奥博星生物技术有限公司。其他试剂购自北京化学试剂公司。PCR 仪购自德国 Biometra 公司。凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 鉴定特异性片段 SCF73

根据本实验室完成的大丽轮枝菌高毒菌株 VDG1 与低毒菌株 VDG2 基因组测序结果 (未发表), 通过 Blastn 比对分析确定 VDG1 相对于 VDG2 的特异片段, 其中 1 个特异片段位于组装序列 Scfold 73 上, 故命名为 SCF73。根据 SCF73 序列设计引物 (表 2), 以 VDG1 和 VDG2 基因组为模板, 通过 PCR 确认 SCF73 为 VDG1 特有的片段, 扩增条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 4 min, 循环 36 次; 72℃ 10 min。应用 3 种基因预测方法 (从头预测, 同源预测和基于表达序列标签预测) 对特异片段进行预测发现, 特异片段 SCF73 上共有 5 个编码基因。分泌蛋白预测方法参考文献^[22]。

表 2 本研究所用引物信息

Table 2 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
S73-A-F	GCGGCTCTTATCTTAGCATTAA
S74-A-R	CCTCTATCCAAGTATTTGTTCATCAT
S73-B-F	TTGATGCGATTTCTTCCACC
S73-B-R	TCCAACCTGACTTAGTTTACCTTT
S73-C-F	GACGATAGTGACAACGATAACAAG
S73-C-R	AAATGGCAGAGGGTGAGGTA
S73-D-F	CTTATGGAGTCTGGGTAATGCG
S73-D-R	GGTTGATGAGTATGCCGAGTT
VDG1_1014F	TTGCCAAGTTTGAGAAGACTAATG
VDG1_1014R	AAGAAACGCCCTCCTGAACTGA
VDG1_1015F	ACTATTGACACCGCTGCTCC
VDG1_1015R	TTCCGCCAGTTCTTGCTTT
VDG1_1016F	CGATCCCTCCCTTCTCGTTTT
VDG1_1016R	TCTCCCTCTTGTCTGTGCGTCT
VDG1_1017F	CCCAACGGCGGCAAGGTCAAT
VDG1_1017R	TAGTTCACGGCGTGGAGGTGT
VDG1_1018F	TATTCGCTCAATGACTTCGC
VDG1_1018R	TGACGCTCTTCCACTGTTC
SCF73-P1	TTCTTAGCGGCTCTTATCT
SCF73-P3	GCCCAAAAATGCTCCTTCAACTATCCA GGCTGCGTATC
SCF73-P4	CCCTGGGTTGCGAAAGATAATGTGGTACA GTTGACGTGCTGG
SCF73-P6	ACTCTATTTCTTTGCGATGGGG
Hyg-F	TTGAAGGAGCATTTTTGGGC
Hyg-R	TTATCTTTGCGAACCAGGG
SCF73-P2	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT CGACCCGTGGTTATTTTATCCT
SCF73-P5	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTT GTCCAAGGAACCAGCGTAAC
SCF73-Test F	ATAGGTTTTCGGCGGCATACAAG
SCF73-Test R	TCTACTGTTTACGCCAACGACA
Hyg-F1	GCAGACAGGAACGAGGACAT
Hyg-R1	GCTCCATACAAGCCAACCAC

1.3 构建敲除载体

根据 SCF73 上游 1 kb 序列设计引物 SCF73-P1 和 SCF73-P3, 从野生型菌株 VDG1 的基因组中扩增获得目的片段, 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 循环 36 次; 72℃ 10 min。以 SCF73-P4 和 SCF73-P6 为引物, 采用同样的方法获得 SCF73 下游 1 kb 序列。以质粒 pUC-Hyg 为模板, 通过引物 Hyg-F 和 Hyg-R 扩增获得 1.8 kb 的潮霉素抗性基因盒序列, 延伸时间为 2 min。SCF73-P3 和 Hyg-F 及 SCF73-P4 和 Hyg-R 含有反向互补的接头, 进行 PCR 获得上游片段、潮霉素抗性基因盒和下游片段 3 片段融合产物, 反应条件为: 94℃ 30 s, 60℃ 2 min, 72℃ 4 min, 循环 20 次。以 3 片段产物为模

板, 采用含有 Gateway BP 反应接头的 SCF73-P2 和 SCF73-P5 巢式引物扩增已获得融合片段, 反应条件为: 94℃ 30 s, 60℃ 40 s, 72℃ 4 min, 循环 30 次。融合片段通过 Gateway BP 反应整合到 pGK02-Gateway 载体并转化大肠杆菌 Trans 1, 筛选阳性克隆并测序验证, 获得敲除载体 pKO-SCF73, 引物见表 2。

1.4 农杆菌介导的基因敲除转化

采用冻融法将敲除载体 pKO-SCF73 转入农杆菌 AGL-1, 用于大丽轮枝菌 VDG1 的遗传转化, 转化参照 Mullins 等的方法进行^[23]。大丽轮枝菌接种于 CM 液体培养基, 25℃, 150 r/min 振荡培养 4 d, 制备 5 × 10⁶ CFU/mL 孢子悬浮液。农杆菌接种于 MM 液体培养基中, 28℃ 振荡培养 48 h, 离心收集菌体并用 IM 液体培养基重悬并稀释至 OD₆₀₀ = 0.15, 加入乙酰丁香酮至 200 μmol/L, 继续振荡培养至 OD₆₀₀ = 0.5 - 0.7 之间。于 1.5 mL 离心管中等体积混合制备好的大丽轮枝菌孢子悬浮液和农杆菌, 取 200 μL 混合菌液涂布于含有微孔滤膜和乙酰丁香酮 (200 μmol/L) 的 IM 固体培养基, 25℃ 培养 48 h 后将微孔滤膜转移至 PDA 培养基 (200 μg/mL Cef, 30 μg/mL Hyg 和 50 μmol/L F₂dU), 25℃ 继续培养 5 d 以上, 直至转化子菌落出现。

1.5 基因敲除转化子的筛选和鉴定

转化子于 PDA 培养基 (200 μg/mL Cef, 30 μg/mL Hyg 和 50 μmol/L F₂dU) 中单孢纯化 3 代后, 挑取转化子于 CM 液体培养基中, 25℃ 振荡培养 7 d, 收集菌丝并提取基因组。以大丽轮枝菌 VDG1 为对照, 根据潮霉素磷酸转移酶基因设计引物 Hyg-F1 和 Hyg-R1, SCF73 上/下游序列设计引物 SCF73-Test-F 和 SCF73-Test-R (表 2), 分别 PCR 扩增验证, 反应条件为: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 - 2 min, 循环 36 次; 72℃ 10 min, 筛选获得缺失突变体 ΔSCF73。

1.6 突变体 ΔSCF73 表型测定

将突变体 ΔSCF73 接种于 CM 液体培养基中, 25℃ 振荡培养 5 d, 制备 1 × 10⁶ CFU/mL 孢子悬浮液, 取 1 μL 置于不同碳源 (蔗糖、果胶、纤维素和淀粉) 培养基中, 25℃ 培养 12 d, 野生型菌株 VDG1 为对照, 观察突变体生长形态变化, 隔天测量菌落大小。

1.7 突变体 ΔSCF73 致病力测定

采用定量蘸根接种法测定突变体的致病力变化^[24]。将制备的 1 × 10⁶ CFU/mL 孢子悬浮液涂布

于 PDA 培养基中, 25℃ 培养 7 d 后用无菌水洗脱孢子并用双层纱布过滤, 稀释并调整孢子悬浮液浓度至 5×10^6 CFU/mL。感病棉种军棉 1 号播种于直径为 6 cm 的营养钵中, 每钵 6-8 粒棉种, 待棉苗长至 2-3 片真叶时, 定量接种孢子悬浮液, 每株棉苗 3 mL, 野生型大丽轮枝菌 VDG1 和无菌水为对照, 每个突变体处理 30 株棉苗, 重复 3 次。接种后 10 d、14 d、21 d 和 28 d 调查并计算棉株病情指数、棉株发病率。病情指数为棉苗病情级别乘以各级样本数之和除以调查总样本数与最高病情级别的乘积, 最后乘以 100。棉株病级划分标准为: 0 级病害子叶、真叶无病状, 1 级病害 1-2 片子叶发病, 2 级病害 2 片子叶和 1 片真叶发病, 3 级病害 2 片子叶和 2 片及 2 片以上真叶发病, 4 级病害棉苗所有叶片发病, 生长点枯死。棉株发病率为发病棉苗 (至少 1 片子叶发病) 在相应调查总棉苗中所占的比例。

2 结果

2.1 高毒力大丽轮枝菌 VDG1 特异片段 SCF73 分析

在高毒力菌株 VDG1 和低毒力菌株 VDG2 全基因组测序的基础上, 通过 Blastn 方法获得了 1 个高毒力菌株 VDG1 特有的片段 SCF73, 该特异片段全长 27.1 kb。为确证 SCF73 为 VDG1 的特异序列, 设

计 4 对引物分别扩增 SCF73, 在 VDG1 基因组中获得了 4 个预期大小的末端重叠片段, 分别为 4.5 kb、4.4 kb、5.1 kb 和 6.2 kb, 而 VDG2 基因组中则未获得扩增条带 (图 1)。结果表明, 相对于低毒菌株 VDG2, 高毒菌株 VDG1 基因组中存在特异片段 SCF73。进一步预测发现, 该特异片段编码 5 个基因 (VDG1_1014-VDG1_1018), 其中 VDG1_1016 和 VDG1_1018 推测功能为糖基水解酶, 且 VDG1_1016 推测为分泌蛋白, 其它 3 个基因为假定蛋白 (图 2, 表 3)。进一步对编码基因进行 PCR 鉴定, 结果显示 5 个基因均存在于 VDG1 基因组, 而在 VDG2 基因组中表现为缺失 (图 1)。

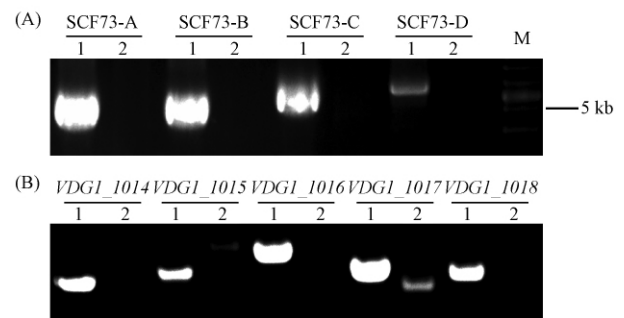


图 1 SCF73 特异片段及其编码基因 PCR 验证

Fig. 1 PCR verification of the specific fragment SCF73 and its genes, 1: VDG1, 2: VDG2. (A) PCR verification of SCF73, A-4.5 kb, B-4.4 kb, C-5.1 kb, D-6.2 kb; (B) PCR of genes verification.

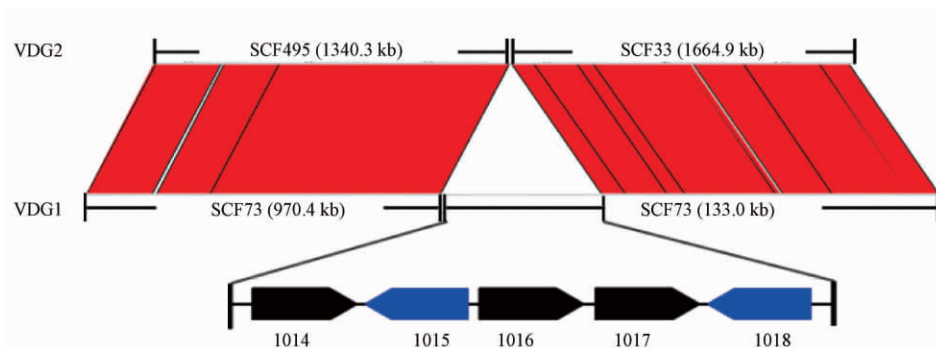


图 2 SCF73 特异片段基因组定位信息

Fig. 2 SCF73 relative positioning information in VDG1 genome.

2.2 基因敲除载体构建与鉴定

PCR 扩增获得 SCF73 上游片段 1.0 kb, 下游片段 1.2 kb 和潮霉素抗性基因盒 1.8 kb, 通过融合 PCR 和巢式 PCR 获得 4 kb 同源重组片段, 与预期片段大小一致 (图 3)。通过 Gateway BP 反应将

SCF73 同源重组片段整合到 pGK02-Gateway 载体 T-DNA 区段中致死基因单纯疱疹病毒胸苷激酶基因的上游, 经测序验证获得 T-DNA 区段含有融合的同源重组片段和致死基因的敲除载体 pKO-SCF73。

表 3 SCF73 特异片段编码基因注释

Table 3 The annotation of specific genes in SCF73 specific fragment

Gene ID	Amino acids length	Sec. (Y/N)	nr annotation
VDG1_1014	313	N	hypothetical protein
VDG1_1015	335	N	hypothetical protein
VDG1_1016	506	Y	glycosyl hydrolase
VDG1_1017	316	N	hypothetical protein
VDG1_1018	805	N	glycosyl hydrolase

nr: non-redundant protein sequences database

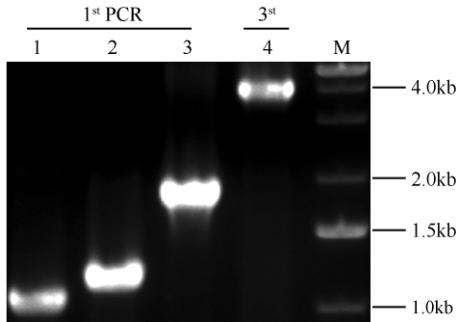


图 3 SCF73 同源重组片段构建

Fig. 3 Electrophoresis patterns of the construction of SCF73 homologous recombination fragment. Line 1: upstream fragment; line 2: downstream fragment; line 3: *hpt* cassette; line 4: homologous recombination fragment.

2.3 ΔSCF73 突变株的构建与验证

敲除载体 pKO-SCF73 含有单纯疱疹病毒胸苷激酶基因,在随机插入的转化子中,带入基因组的致死基因可以表达单纯疱疹病毒胸苷激酶并将添加的 F₂dU 转化为对大丽轮枝菌有毒的物质,抑制生长。而同源整合的转化子未将致死基因整合到基因组中,能够在含有 F₂dU 的培养基上生长。通过农杆菌介导的大丽轮枝菌遗传转化,共得到 11 个能够在 F₂dU 培养基上生长的转化子,经单孢分离和纯化之后,提取基因组进行分子验证,3 个转化子均能够扩增到潮霉素磷酸转移酶基因(图 4),分别命名为 ΔSCF73-2、ΔSCF73-3 和 ΔSCF73-4。

2.4 ΔSCF73 突变株表型鉴定

植物细胞壁是大丽轮枝菌侵染过程中的第一道障碍。相对于低毒力菌株 VDG2,高毒力菌株 VDG1 特异片段 SCF73 编码 2 个可能的糖基水解酶,表明该片段可能和植物细胞壁降解活性相关。以不同细胞壁组分培养基测定 SCF73 缺失对大丽轮枝菌生长的影响。结果表明,突变株 ΔSCF73 在 4 种碳源培养基(蔗糖、纤维素、果胶、淀粉)中的菌落形态和生长速率与对照菌株 VDG1 相比均无显著差异(图 5)。

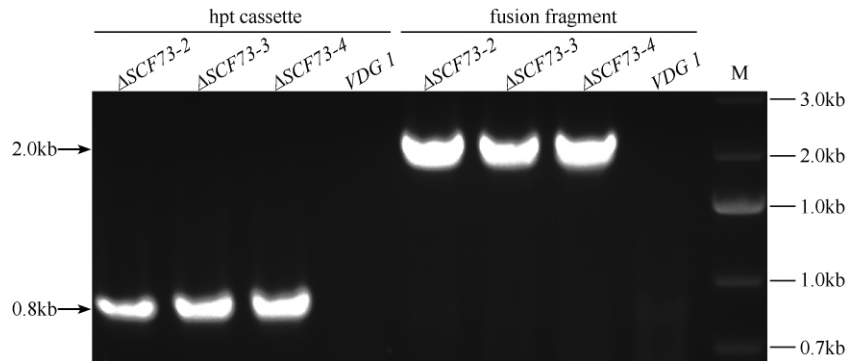


图 4 SCF73 突变株分子鉴定

Fig. 4 PCR verification of the mutant ΔSCF73.

2.5 ΔSCF73 致病力鉴定

通过定量蘸根接种法鉴定突变株 ΔSCF73 对寄主棉花致病力的影响。结果表明,野生型菌株 VDG1 接种后仅 10 d 即出现真叶发病,4 周之后病情指数即高达 57.3,棉株发病率为 98%。而 3 个 SCF73 缺失突变株对棉花的致病力均显著减弱,突变株 ΔSCF73 在第 14 d 才出现真叶发病,4 周之后病情指数为 27.2 ± 0.54 (P < 0.01),棉株发病率为

61% (P < 0.01) (图 6)。结果表明,突变体 ΔSCF73 对寄主棉花的致病力显著下降,SCF73 与大丽轮枝菌的致病力密切相关。同时,细胞壁组分模拟实验显示突变体 ΔSCF73 在基本培养基(察氏培养基)中可正常生长,说明突变体致病力下降的原因并不是由于其自身营养缺陷所致,因此,SCF73 适于作为致病关键基因研究的候选研究对象。

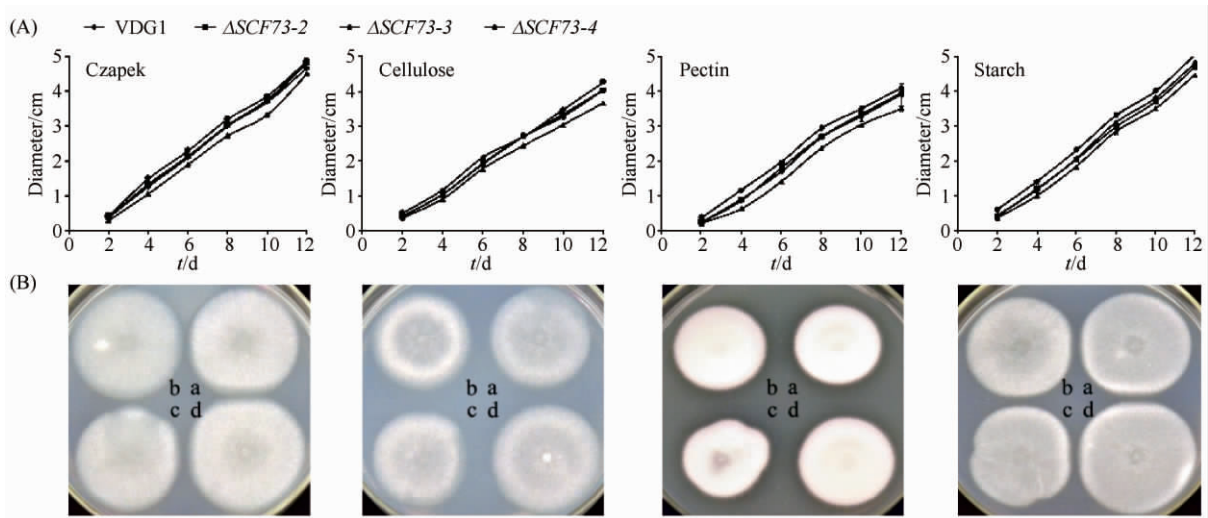


图 5 突变体 $\Delta SCF73$ 在不同碳源培养基上生长示意图

Fig. 5 Growth rate of the mutant $\Delta SCF73$ on different carbon source media. (A) Growth rate of the mutant $\Delta SCF73$; (B) Phenotype of the mutant $\Delta SCF73$, photos were taken 12 days after inoculation. a: VDG1, b: $\Delta SCF73-2$, c: $\Delta SCF73-3$, d: $\Delta SCF73-4$.

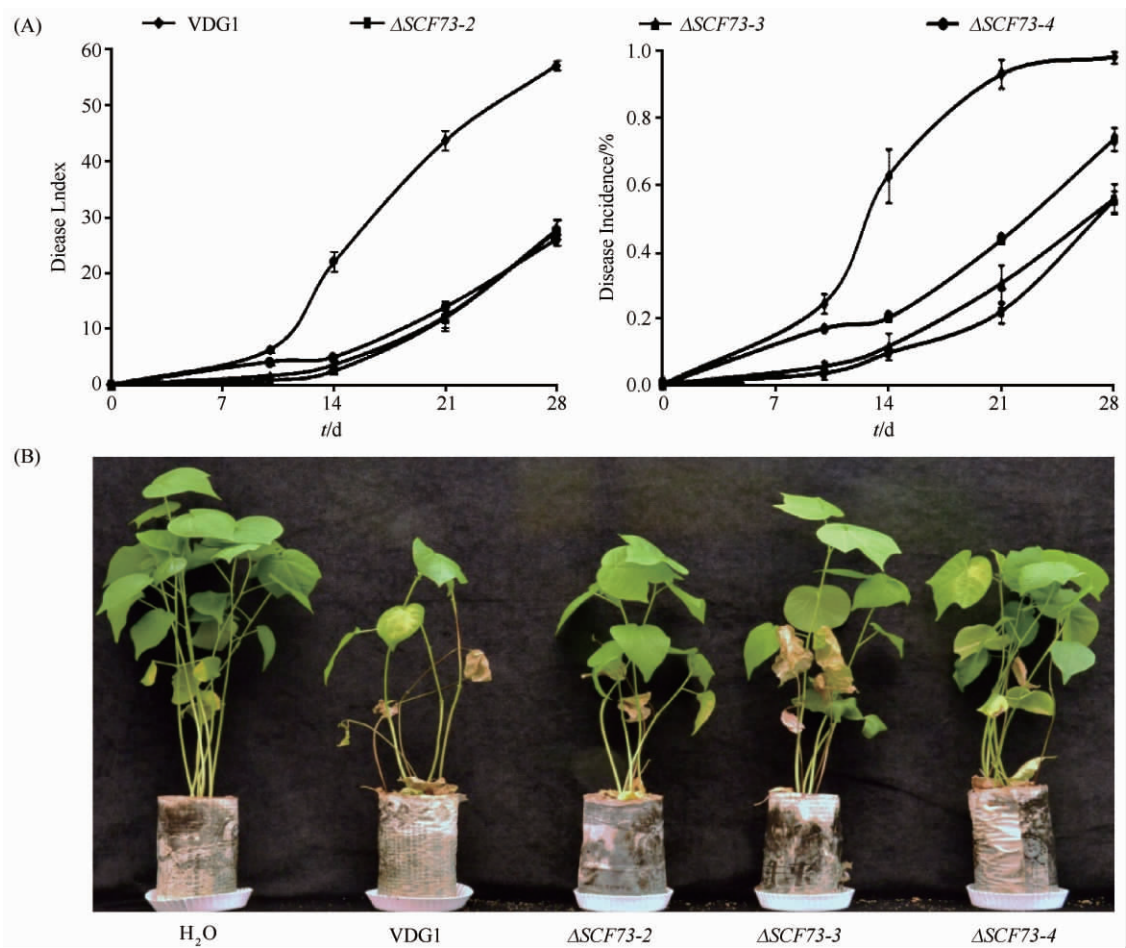


图 6 突变体 $\Delta SCF73$ 对军棉 1 号致病力测定

Fig. 6 Virulence of the mutant $\Delta SCF73$ to the susceptible cotton *Gossypium hirsutum* cv. Junmian1. (A) Disease severity and incidence on cotton; (B) The symptoms of the disease caused by $\Delta SCF73$.

3 讨论

大丽轮枝菌是一类寄主范围广泛、致病力极强的植物病原真菌,严重破坏农作物的生产。多年来,研究工作者从生理生化、蛋白组学、致病相关基因功能鉴定、基因组学等多角度入手,初步解析了大丽轮枝菌致病的基本生理特性,但尚未发现其致病的毒力因子和阐明致病分子机理。新近研究发现,番茄大丽轮枝菌生理小种 1 存在 1 个 50 kb 的基因组片段决定了其对寄主的致病力,该片段含有 1 个无毒基因 *Ave1*, 编码蛋白通过识别寄主有无抗病基因 *Ve1* 来决定病原菌的致病力^[20]。

本研究根据实验室已经完成的大丽轮枝菌高毒力菌株 VDG1 和低毒力菌株 VDG2 全基因组测序数据,通过比较基因组学分析和 PCR 实验确证了高毒力菌株 VDG1 存在 1 个 27.1 kb 的特异片段 SCF73 (图 1, 图 2)。基因敲除实验表明,缺失该片段的 Δ SCF73 突变体对寄主棉花的致病力显著下降,发病时间延缓,接种突变株的棉株病情指数和发病率仅为野生型的一半(图 6)。因此,高毒力菌株特异片段 SCF73 呈现出和大丽轮枝菌毒力显著相关的特征,该片段可能编码决定大轮枝菌致病力的毒力因子。

前人研究表明,大丽轮枝菌胞外蛋白含有多个致萎活性因子,如培养液中不同分子量的致萎活性蛋白、坏死和乙烯诱导蛋白 VdNEP 等^[14,17]。此外,大丽轮枝菌胞外蛋白中含有多种植物细胞壁降解酶,如果胶酶、糖基水解酶、纤维素酶、淀粉酶等,衍生出复杂的细胞壁降解机制^[18-19]。因此,大丽轮枝菌胞外蛋白是引起寄主叶片萎蔫并最终全株发病的重要因素之一。本研究发现的高毒力菌株特异片段 SCF73 共编码 5 个基因,其中 *VDG1_1016* (推测为分泌蛋白)和 *VDG1_1018* 具有糖基水解酶结构域,可能和水解多糖相关,然而,细胞壁组分模拟培养表明突变株 Δ SCF73 利用果胶、纤维素和淀粉的能力与野生型菌株 VDG1 无显著差异(图 5)。因此,推测 SCF73 上 2 个可能具有糖基水解酶功能的基因并不直接参与细胞壁降解作用,它们可能和其它细胞壁降解酶协同作用参与对寄主的侵染,或者作为毒力因子转运到寄主胞内起作用,如推测为分泌蛋白的 *VDG1_1016* 基因。此外,SCF73 上的其它 3 个功能

未知的基因也可能在大丽轮枝菌的致病过程中发挥重要作用。

大丽轮枝菌致病机理异常复杂,目前的研究主要集中在生理生化、T-DNA 突变体筛选、蛋白质组学等方面,而通过基因组学对特异基因与毒力关系的研究鲜有报道。本研究发现了大丽轮枝菌高毒力菌株相对于低毒力菌株存在 1 个特异片段,且该片段与菌株致病力密切相关,为进一步筛选鉴定决定大丽轮枝菌毒力的基因提供了基础,下阶段将通过基因敲除、功能互补、表达特性分析等实验筛选鉴定特异片段的毒力基因,为解析大丽轮枝菌特异片段 SCF73 的致病机理提供理论依据。

参考文献

- [1] Klosterman SJ, Atallah ZK, Vallad GE, Subbarao KV. Diversity, pathogenicity, and management of *verticillium* species. *Annual Review of Phytopathology*, 2009, 47: 39-62.
- [2] Rauyaree P, Ospina-Giraldo MD, Kang S, Bhat RG, Subbarao KV, Grant SJ, Dobinson KF. Mutations in *VMKI*, a mitogen-activated protein kinase gene, affect microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae*. *Current Genetics*, 2005, 48 (2) : 109-116.
- [3] Tzima A, Paplomatas EJ, Rauyaree P, Kang S. Roles of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase A in virulence and development of the soilborne plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47: 406-415.
- [4] Tzima A, Paplomatas EJ, Rauyaree P, Ospina-Giraldo MD, Kang S. *VdSNF1*, the sucrose nonfermenting protein kinase gene of *Verticillium dahliae*, is required for virulence and expression of genes involved in cell-wall degradation. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24 (1) : 129-142.
- [5] Tzima A, Paplomatas EJ, Tsitsigiannis DI, Kang S. The G protein β subunit controls virulence and multiple growth and development-related traits in *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 2012, 49: 271-283.
- [6] Buchner V, Nachmias A, Burstein Y. Isolation and partial characterization of a phytotoxic glycopeptide from a protein-lipopolysaccharide complex produced by a potato isolate of *Verticillium dahliae*. *FEBS Letters*, 1982, 138 (2) : 261-264.

- [7] 章元寿, 王坚信, 方中达. 大丽轮枝菌毒素致萎活性成分的研究. *真菌学报 (Mycosystema)*, 1990, 9(1): 69-72.
- [8] 吕金殿, 甘莉, 阎龙飞. 棉花黄萎病菌毒素的纯化与特性研究. *植物病理学报 (Acta Phytopathologica Sinica)*, 1991, 21(2): 129-133.
- [9] Meyer R, Slater V, Dubery IA. A phytotoxic protein-lipopolysaccharide complex produced by *Verticillium dahliae*. *Phytochemistry*, 1994, 35: 1449-1453.
- [10] Mansoori B, Milton JM, Smith CJ. Isolation and partial purification of a phytotoxin related to pathogenic *Verticillium* species. *Journal of Phytopathology*, 1995, 143: 33-36.
- [11] Davis DA, Low PS, Heinsteins P. Purification of a glycoprotein elicitor of phytoalexin formation from *Verticillium dahliae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1998, 52: 259-273.
- [12] 储昭庆, 贾军伟, 周向军, 陈晓亚. 大丽轮枝菌分泌糖蛋白的分离及其致萎性研究. *植物学报 (Acta Botanica Sinica)*, 1999, 41(9): 972-976.
- [13] 陈旭升, 陈永曹, 黄骏麒. 棉花黄萎病菌致萎峰蛋白氨基酸组分及其有关生化特性分析. *江苏农业学报 (Jiangsu Journal of Agricultural Sciences)*, 2000, 16(1): 10-14.
- [14] 王炳楠, 杨秀芬, 曾洪梅, 邱德文. 大丽轮枝菌分泌蛋白激发子的分离纯化及生物功能研究. *生物技术通报 (Biotechnology Bulletin)*, 2011, 14(11): 166-171.
- [15] Yuan HY, Yao LL, Jia ZQ, Li Y, Li YZ. *Verticillium dahliae* toxin induced alterations of cytoskeletons and nucleoli in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *Protoplasma*, 2006, 229(1): 75-82.
- [16] Yao LL, Zhou Q, Pei BL, Li YZ. Hydrogen peroxide modulates the dynamic microtubule cytoskeleton during the defence responses to *Verticillium dahliae* toxins in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 2011, 34(9): 1586-1598.
- [17] Wang JY, Cai Y, Gou JY, Mao YB, Xu YH, Jiang WH, Chen XY. VdNEP, an elicitor from *Verticillium dahliae*, induces cotton plant wilting. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 4989-95.
- [18] Carder JH, Hignett RC, Swinburne TR. Relationship between the virulence of hop isolates of *Verticillium albo-atrum* and their in vitro secretion of cell-wall degrading enzymes. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1987, 31: 441-452.
- [19] Klosterman SJ, Subbarao KV, Kang S, Veronese P, Gold SE, Thomma BP, Chen Z, Henrissat B, Lee YH, Park J, Garcia-Pedrajas MD, Barbara DJ, Anchieta A, de Jonge R, Santhanam P, Maruthachalam K, Atallah Z, Amyotte SG, Paz Z, Inderbitzin P, Hayes RJ, Heiman DI, Young S, Zeng Q, Engels R, Galagan J, Cuomo CA, Dobinson KF, Ma LJ. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(7): e1002137.
- [20] de Jonge R, Peter van Esse H, Maruthachalam K, Bolton MD, Santhanam P, Saber MK, Zhang Z, Usami T, Lievens B, Subbarao KV, Thomma BP. Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(13): 5110-5115.
- [21] 汪佳妮. 大丽轮枝菌 Vd991 T-DNA 插入突变体库的构建及致病相关基因的筛选. “中国农业科学院”的“学位论文”, 2011 年.
- [22] 田李, 陈捷胤, 陈相永, 汪佳妮, 戴小枫. 大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae* VdLs.17) 分泌组预测及分析. *中国农业科学 (Scientia Agricultura Sinica)*, 2011, 44(15): 3142-3153.
- [23] Mullins ED, Kang S. Transformation: a tool for studying fungal pathogens of plants. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2001, 58(14): 2043-2052.
- [24] 朱荷琴, 冯自立, 李志芳, 赵丽红, 师勇强. 蛭石沙土无底纸钵定量蘸菌液法鉴定棉花品种(系)的抗黄萎病性. *中国棉花 (China Cotton)*, 2010, 12: 15-17.

Construction and pathogenicity tests of a mutated specific fragment SCF73 in *Verticillium dahliae*

Jinlong Wang, Jieyin Chen, Shaoyan Liu, Lei Li, Xiaofeng Dai*

Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [Objective] To identify preliminarily the specific fragment SCF73's function in *Verticillium dahlia* virulence. [Method] The specific fragment SCF73 exposed to be existed in the high-virulent *V. dahliae* strain VDG1 and not in the mild one VDG2. The SCF73 fragment was obtained from comparatively aligned genome sequences of the two strains and its existence was confirmed using PCR method. According to SCF73's DNA sequence, a homologous recombination plasmid was constructed to knock out the fragment. The *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation technique was used to initiate the mutant Δ SCF73, followed by antibiotic resistance screening, and PCR verification. The mutant's ability to secrete carbohydrate hydrolase was analyzed using pectin, cellulose and starch media and its virulence to the susceptible cotton cultivar *Gossypium hirsutum* cv. Junmian1 was assessed. [Result] SCF73 (27.1 kb) contains 5 genes, two of them have glycosyl hydrolase activity. Although the mutant Δ SCF73's carbohydrate hydrolase secretion was not significantly different from the control VDG1, virulence of the mutant to cotton plants decreased significantly accompanied with disease outburst delay. [Conclusion] The specific fragment SCF73 plays an important role in the virulence of *V. dahlia* towards its cotton host plants.

Keywords: *Verticillium dahliae*, specific fragment, gene knock-out, virulence

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Basic Program of Science and Technology (2008FY240100)

* Corresponding author. Tel: +86-10-62815976; E-mail: dxf@caas.net.cn

Received: 6 May 2012/Revised: 21 June 2012

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、期统计表

2012 年 11 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 - 1956	半年刊	1 - 4	1 - 2
1957 - 1958	季刊	5 - 6	1 - 4
1959	季刊	7	1 - 2
1959 - 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 - 4
1963 - 1965	季刊	9 - 11	1 - 4
1966	季刊	12	1 - 2
1966 - 1972	停刊 6 年半		
1973 - 1988	季刊	13 - 28	1 - 4
1989 - 2007	双月刊	29 - 47	1 - 6
2008 - 2011	月刊	48 - 51	1 - 12
2012	月刊	52	11