



胶孢炭疽菌 *CgRGS2* 基因的克隆及生物学功能

吴曼莉, 李晓宇, 张楠, 徐爽, 柳志强*

海南大学环境与植物保护学院, 海南 海口 570228

摘要:【目的】G 蛋白信号调控因子(Regulators of G-protein signaling, RGS)是 G 蛋白的一类负调控因子, 在植物病原菌生长发育及致病过程中发挥着重要的作用, 然而目前还未有关于胶孢炭疽菌 RGS 蛋白生物学功能的研究。本试验的目的是克隆胶孢炭疽菌的一个 RGS 基因 *CgRGS2*, 并分析其生物学功能。【方法】利用 PCR 技术扩增 *CgRGS2* 的基因并进行生物信息学分析, 利用同源重组的方法获得 *CgRGS2* 基因的敲除突变体, 并在突变体的基础上获得互补株, 通过表型分析确定该基因的生物学功能。【结果】通过 PCR 扩增获得了 *CgRGS2* 的基因, 其编码一个 574 个氨基酸的蛋白, 在 N 末端含有一个 RGS 功能域。该基因敲除突变体同野生型相比, 表现为营养生长缓慢, 气生菌丝浓密, 分生孢子产量降低且孢子呈多端萌发, 对氧化压力及 SDS 敏感, 致病性减弱等。【结论】*CgRGS2* 蛋白参与调控胶孢炭疽菌的营养生长, 分生孢子产量及萌发, 氧化应激反应及细胞壁完整性, 对其致病性也具有一定的影响。

关键词: 胶孢炭疽菌, G 蛋白信号调控因子, 基因敲除, 表型分析

炭疽菌(*Colletotrichum* spp.)是一类重要的植物病原真菌, 其分布广泛且种内变异较多^[1]。胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是一种重要的炭疽病菌, 可以侵染多种作物, 特别是热带及亚热带地区的水果、蔬菜、林木等经济作物, 造成严重的损失^[2]。例如由该病菌引起的芒果炭疽病是全世界芒果种植区发生最普遍、危害最严重的病害之一, 由于其潜伏侵染的特性, 在采后贮藏过程中也极易造成果实腐烂, 严重影响芒果的产量和品质^[3-4]。胶孢炭疽菌不仅寄主范围非常广

泛, 其侵染策略也多种多样, 目前对于该病菌的防治也较为困难^[5]。因此, 深入解析该菌在致病过程中相关基因的功能及调控网络, 对于了解胶孢炭疽菌与宿主的互作机制, 进而有效的防治该病菌具有重要的理论和实践意义。

G 蛋白信号途径是真核细胞感受及传递外源信号的重要途径之一, 参与调控真菌的生长发育、生殖、交配、侵染以及致病等相关过程^[6-7]。G 蛋白由其偶联的受体蛋白(G protein-coupled receptor, GPCR)激活^[8], 当信号配体结合到 GPCR

基金项目: 国家自然科学基金(31560045); 海南省自然科学基金(20153132)

*通信作者。Tel/Fax: +86-898-66192915; E-mail: liuzhiqiang80@126.com

收稿日期: 2016-05-04; 修回日期: 2016-08-25; 网络出版日期: 2016-09-05

时,与 $G\alpha$ 亚基结合的 GDP 转变为 GTP,引起异三聚体的构象发生改变,促使 $G\alpha$ 与异二聚体 $G\beta\gamma$ 解离^[9]。 $G\alpha$ 和 $G\beta\gamma$ 分别作为有活性的信号分子激活下游的靶蛋白,从而引起一系列生理活动。激活的 G 蛋白随后经 $G\alpha$ 自身的 GTP 酶水解活性水解 GTP 为 GDP, $G\alpha$ 与 $G\beta\gamma$ 又重新聚合到一起形成失活的异三聚体。G 蛋白信号调控因子(Regulators of G-protein signaling, RGS)是 G 蛋白的负调控因子,作为 GTP 酶激活蛋白促进 $G\alpha$ 亚基对 GTP 的水解,使 G 蛋白失活,从而迅速关闭 G 蛋白信号途径^[10-11]。不同类型的 RGS 蛋白在分子大小、氨基酸同源性和结构域等方面存在很大的差异,但是大多数家族成员都共同拥有一个保守的 RGS 结构域^[12]。RGS 结构域是 RGS 蛋白发挥 GTPase 激活作用的结构基础和关键所在,它的缺失将导致蛋白丧失 GTPase 激活活性^[13]。相关实验结果表明,RGS 蛋白参与包括细胞增殖、细胞分化、质膜运输、细胞运动和胚胎发育等多个 G 蛋白信号通路介导的细胞内过程^[14]。RGS 蛋白在稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)、玉米赤霉菌(*Gibberella zeae*)等多种植物病原真菌中得到鉴定,参与调控包括营养菌丝生长、孢子形成、有性生殖、毒素及色素的产生和致病性等重要生理过程^[11,15-16]。然而,目前还未有关于胶孢炭疽菌 RGS 蛋白生物学功能的研究。在前期研究中,我们从胶孢炭疽菌中鉴定了 10 个潜在的 RGS 蛋白,它们都包含 RGS 功能域,本研究克隆并鉴定了其中一个 RGS 基因,经比对发现其与稻瘟病菌中 *MoRGS2* 为同源基因,所以将该基因命名为 *CgRGS2*,利用同源重组的方法获得了该基因的敲除突变体,并在突变体的基础上获得了互补株,通过表型分析确定了 *CgRGS2* 的生物学功能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株:胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)野生型菌株(WT)由海南大学环境与植物保护学院保存。

1.1.2 培养基:(1) PDA 培养基:马铃薯 200 g/L、葡萄糖 20 g/L,琼脂粉 18 g/L。(2) LB 培养基:胰蛋白胨 10 g、酵母粉 5 g、NaCl 10 g,琼脂粉 18 g/L。(3) CM 培养基:胰蛋白胨 6 g、酵母提取物 6 g、蔗糖 10 g,琼脂粉 18 g/L。(4) CZAPEK 培养基:蔗糖 30.00 g、NaNO₃ 3.00 g、MgSO₄ 0.50 g、K₂HPO₄ 1.00 g、FeSO₄ 0.01 g、KCl 0.50 g,琼脂粉 18.00 g/L。(5) MM 培养基:K₂HPO₄ 7.0 g、KH₂PO₄ 3.0 g、(NH₄)SO₄ 1.0 g、MgSO₄ 0.1 g、柠檬酸钠 0.5 g、葡萄糖 5.0 g,琼脂粉 18.0 g/L。

1.1.3 主要试剂:RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、限制性内切酶(*Pst* I, *Kpn* I, *Xba* I, *Bam*H I)及 PCR 相关试剂等均购自 TaKaRa 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;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 *CgRGS2* 基因的克隆及序列分析

胶孢炭疽菌总 RNA 提取采用 TaKaRa MiniBEST Plant RNA Extraction Kit (TaKaRa, 中国),利用 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, 中国)合成 cDNA。以胶孢炭疽菌 cDNA 为模板,利用引物 *CgRGS2F* 和 *CgRGS2R* (表 1)扩增 *CgRGS2* 的 ORF 框,PCR 产物经切胶回收、连接、转化、鉴定后送上海生工测序公司测序。利用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)工具对 *CgRGS2* 进行蛋白结构

表 1. 引物名称及序列

Table 1. Primers and sequences

Primers	Sequences (5'→3')
CgRGS2upF	AACTGCAGCGCCTGATTGACACTAT TGGAG
CgRGS2upR	GGGGTACCGGAAGGGTAGATGACC TGGAAG
CgRGS2F	ATGTCGAGATCCAGGCCACC
CgRGS2R	TAACTAGAGGTGCTGCTTGCG GCTCTAGACGGCGTTCAGTTCCTTA CCTT
CgRGS2downF	AACTGCAGACATCATGTCGGAGGA GTTGG
CgRGS2downR	ACGCTACCATTTCCTTGCCCTACGG CAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTG GTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
CgRGS2DD	ATCGAGACCGAAGTAGCAAAGCATC CGGGATCCCCTCCACCTGAGCGAC ACGACTTAT
CgRGS2hbF	AACTGCAGTCTTTGTTACACGACGC AACTATCT
CgRGS2hbR	

域分析,通过 GenBank 中 BLASTp 工具对 CgRGS2 进行蛋白同源性分析,用 Clustal X (1.83)软件进行多序列比对,利用 MEGA 5.0 软件以邻近相接法 (Neighbor-Joining, NJ)构建系统进化树。

1.3 CgRGS2 基因的敲除与互补

CgRGS2 基因敲除原理见图 1。参照文献[17]方法提取胶孢炭疽菌基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,分别利用引物 CgRGS2upF 和

CgRGS2upR, CgRGS2downF 和 CgRGS2downR (表 1)扩增 CgRGS2 基因的上下游序列。将扩增得到的基因上下游片段通过回收纯化后分次连接到 pCB1532 上,通过酶切验证,获得敲除载体 pCB1532-CgRGS2。将 pCB1532-CgRGS2 通过 *Pst* I 酶切进行线性化,转化到胶孢炭疽菌野生型菌株的原生质体中,原生质体制备及转化的方法步骤参照文献[18]。转化子在含有氯喹磺隆(100 μg/mL)的平板中进行筛选,提取抗性转化子的基因组,根据 CgRGS2 基因上游片段的上翼序列和下游片段的下翼序列分别设计引物 CgRGS2UU 和 CgRGS2DD,并根据 pCB1532 靠近上下游片段的内部序列设计引物 PI 和 PI1,利用 3 对引物 (CgRGS2F+CgRGS2R、CgRGS2UU+PI、CgRGS2DD+PI1) (表 1)对转化子进行 PCR 鉴定,通过引物 CgRGS2F+CgRGS2R 无扩增条带而引物 CgRGS2UU+PI、CgRGS2DD+PI1 能扩增出目的条带的转化子为阳性转化子。

以野生型基因组为模版,利用引物 CgRGS2hbF 和 CgRGS2hbR 扩增基因互补片段(包含 CgRGS2 基因上游 1500 bp、基因编码区和下游 500 bp),将之与表达潮霉素磷酸转移酶基因(HPT)的 DNA 片段(来自质粒 pCB1003)连接,然后克隆

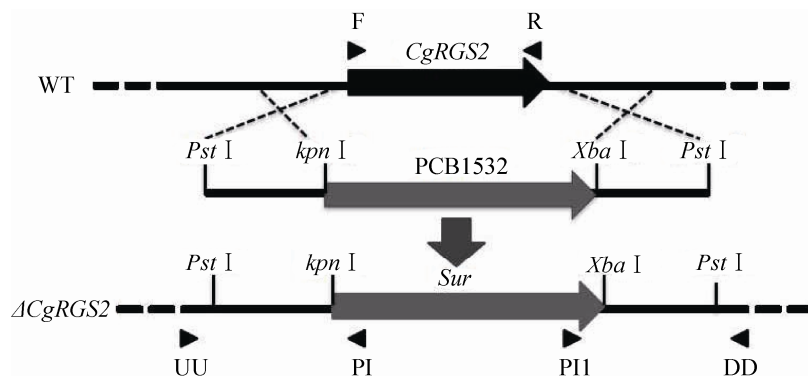


图 1. CgRGS2 基因敲除原理

Figure 1. Gene knockout principle of CgRGS2.

到 pUC18 上, 得到互补载体 pUC18-CgRGS2, 以 CgRGS2 敲除突变体制备原生质体, 原生质体转化方法同上, 转化子在含潮霉素(300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的平板中进行筛选, 提取抗性转化子的基因组, 利用 CgRGS2 基因引物 CgRGS2F 和 CgRGS2R 进行 PCR 验证, 能扩增出 CgRGS2 基因目的条带的为互补转化子。

1.4 突变体表型分析

1.4.1 营养生长及菌丝形态观察: 胶孢炭疽菌野生型菌株、突变体及互补株于 PDA 平板上活化 7 d 后, 用打孔器打取 5 mm 的菌饼分别接种于 PDA、CM、CZAPEK 和 MM 固体培养基中, 28 °C 黑暗培养 7 d。测量菌落生长直径并观察菌落形态特征, 每处理设 3 个重复。菌丝形态观察是将野生型菌株、突变体及互补株于 CM 平板上活化 4 d, 打取 5 mm 菌饼接种于铺有 CM 培养基薄层的载玻片上, 28 °C 培养 2 d, 显微镜观察并拍照。

1.4.2 分生孢子产量及萌发: 菌株在 PDA 平板上 28 °C 黑暗培养 10 d 左右, 待菌丝体大致铺满平板后用无菌涂布棒轻轻将表面气生菌丝刮除, 再转移至光照培养箱连续光照 3 d 诱导产孢, 取 10 mL 含 0.2% 吐温 80 的无菌水冲洗平板, 经灭菌的脱脂棉过滤至离心管, 并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 50 μL 孢子悬浮液于干净的载玻片上, 28 °C 黑暗保湿条件下诱导其萌发, 统计孢子萌发率及附着孢形成率, 试验设 3 个重复。

1.4.3 胁迫因子敏感性分析: 野生型、突变体及互补株在 PDA 平板活化 7 d, 打取 5 mm 菌饼分别接种于含有 NaCl (浓度分别为 0、0.5、0.8、1.0 mol/L)、 H_2O_2 (浓度分别为 0、5、10、20 mmol/L) 及 0.01% SDS 的 MM 平板上, 28 °C 培养 7 d 后观察并拍照记录, 计算抑制率, 试验设 3 个重复。

1.4.4 致病性分析: 选取无病斑、表面均匀光滑的芒果, 用已灭菌的大头针在芒果表面形成伤口, 于活化 7 d 的 PDA 平板上打取 5 mm 菌饼, 分别以无伤口及伤口的方式接种芒果, 28 °C 保湿培养, 5 d 后观察发病情况并记录。

2 结果和分析

2.1 基因的克隆及序列分析

通过 PCR 扩增获得了 CgRGS2 基因的 ORF 框, 生物信息学分析发现, CgRGS2 基因 ORF 框全长 1725 bp (GenBank 登录号: KX180047), 编码 1 个 574 个氨基酸的蛋白, 在蛋白质的 N 末端第 22–157 位氨基酸含有一个 RGS 功能域(图 2-A)。将 CgRGS2 在 GenBank 中利用 BLASTp 工具进行比对, 选取 13 个来自不同真菌的 RGS 蛋白序列构建系统发育树(图 2-B)。CgRGS2 与 *C. gloeosporioides* Nara gc5 的 RGS 蛋白 (XP_007282783) 相似度达到 91%, 此外 CgRGS2 与希金斯刺盘孢(*C. higginsianum*)、油菜黄萎菌(*Verticillium longisporum*)、苹果树腐烂病菌(*Valsaria mali*)、小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis*) 和稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*) 相关 RGS 蛋白的同源性较高, 相似度在 38% 以上。

2.2 CgRGS2 基因的敲除与互补

将 CgRGS2 基因的敲除载体转化野生型原生质体, 共获得 164 个转化子, 利用 3 对引物 CgRGS2F+CgRGS2R、CgRGS2UU+PI、PII+CgRGS2DD(表 1) 进行筛选, 结果显示转化子 27 的 CgRGS2F+CgRGS2R 无法扩增出 CgRGS2 基因片段(图 3-A), 通过 CgRGS2UU+PI、PII+CgRGS2DD 引物进行鉴定, 分别能扩增出 1500 bp 左右的条带(图 3-B), 确定 27 号为阳性转化子, 命名为 $\Delta\text{CgRGS2-27}$ 。

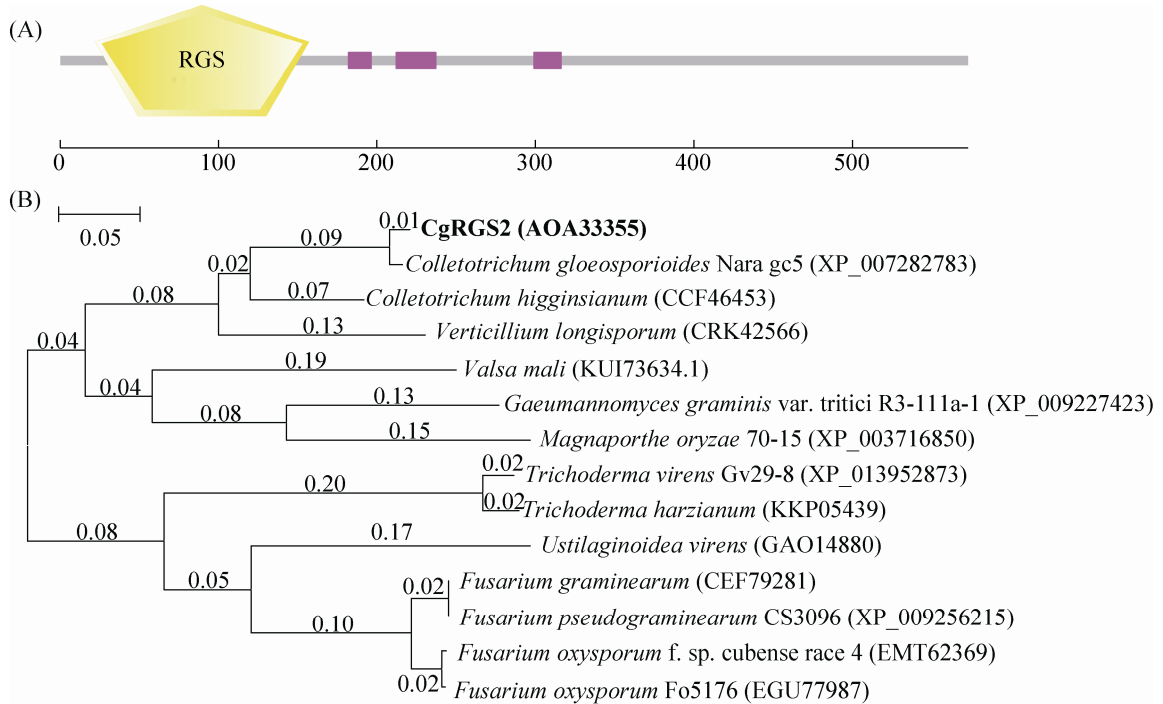


图 2. CgRGS2 蛋白结构域和系统进化树分析

Figure 2. Protein domain and phylogenetic tree analysis of CgRGS2. A: protein domain analysis of CgRGS2; B: phylogenetic tree analysis of CgRGS2. The phylogenetic tree was constructed by using Clustal X and MEGA 5.0 with homologous sequences of CgRGS2 from various strains, with their sequence IDs in the parentheses; the numbers on the horizontal lines represent evolutionary distances.

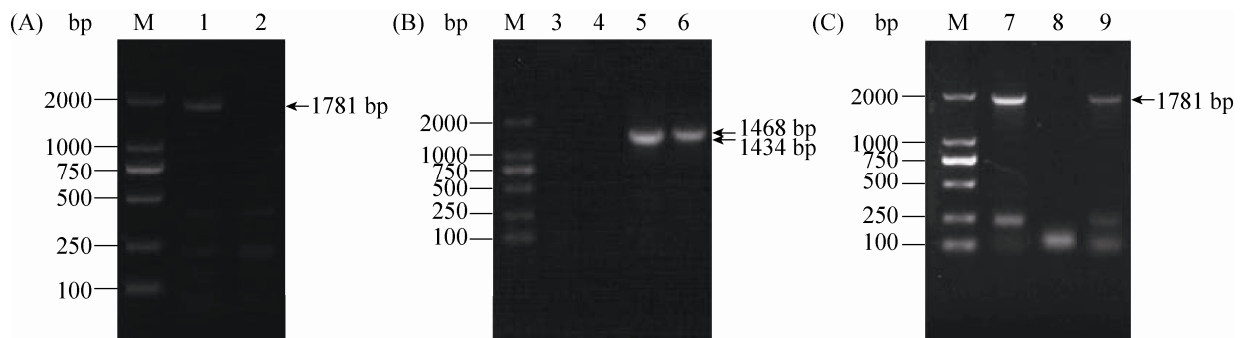


图 3. CgRGS2 基因的敲除和互补验证

Figure 3. Verification of CgRGS2 gene knockout and complementation. lane 1: PCR amplification result using primers CgRGS2F and CgRGS2R of wild type; lane 2: PCR amplification result using primers CgRGS2F and CgRGS2R of Δ CgRGS2-27; lane 3: PCR amplification result using primers CgRGS2UU and PI of wild type; lane 4: PCR amplification result using primers PI1 and CgRGS2DD of wild type; lane 5: PCR amplification result using primers CgRGS2UU and PI of Δ CgRGS2-27; lane 6: PCR amplification result using primers PI1 and CgRGS2DD of Δ CgRGS2-27; lane 7: PCR amplification result using primers CgRGS2F and CgRGS2R of wild type; lane 8: PCR amplification result using primers CgRGS2F and CgRGS2R of Δ CgRGS2-27; lane 9: PCR amplification result using primers CgRGS2F and CgRGS2R of Δ CgRGS2/rgs2; M: DL2000 DNA marker.

将互补载体 pUC18-CgRGS2 转化敲除突变体 Δ CgRGS2-27 的原生质体, 在含潮霉素的平板上进行筛选, 共获得 48 个抗性转化子, 通过 PCR 验证, 发现转化子 31 号能够扩增出 CgRGS2 基因片段(图 3-C), 确定为互补转化子, 将该互补株命名为 Δ CgRGS2/*rgs2*。

2.3 突变体表型分析

2.3.1 CgRGS2 影响胶孢炭疽菌的营养生长: 将野生型菌株、敲除突变体 Δ CgRGS2-27 及互补株分别接种到不同培养基上观察其生长情况, 结果见图 4。在不同培养基上, Δ CgRGS2-27 较野生型及互补株生长缓慢, 尤其在营养较贫瘠的 MM 培养基上野生型菌株培养 7 d 的平均直径为 6.0 cm, 而突变体的菌落直径仅为 3.4 cm, 约为野生型菌株的 56%, 互补株的生长速率与野生型相似。由此可见, CgRGS2 参与调控胶孢炭疽菌的营养生长。

菌株在 CM 平板上活化 4 d 后, 打取 5 mm 菌饼接种于铺有 CM 培养基的载玻片上, 2 d 后显微镜观察显示敲除突变体 Δ CgRGS2-27 气生菌丝较浓厚茂密, 而野生型菌株和互补菌株菌落边缘

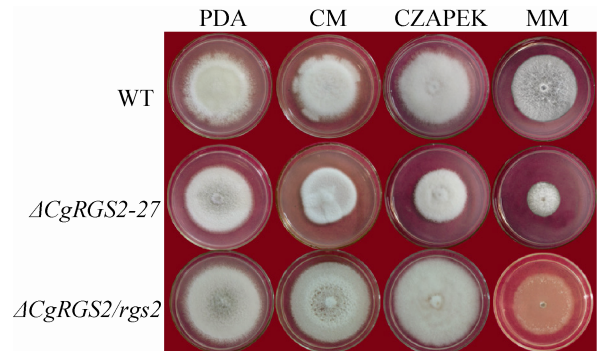


图 4. 菌株在 4 种培养基上生长情况比较
Figure 4. Comparison of the growth on 4 media of strains.

较稀疏(图 5), 推测 CgRGS2 可能参与调控气生菌丝的生长。

2.3.2 CgRGS2 参与调控分生孢子产量及萌发: 通过血球计数板计数, 发现 Δ CgRGS2-27 的产孢量与野生型相比有显著差异, 野生型菌株分生孢子浓度平均为 8.05×10^6 个/mL, Δ CgRGS2-27 分生孢子浓度为 3.85×10^5 个/mL, 仅为野生型的 1/20。同时野生型菌株分生孢子多为单端或双端萌发, 而 Δ CgRGS2-27 的分生孢子呈现多端萌发现象, 且 12 h 后大部分芽管膨大粗壮, 分支增多(图 6)。



图 5. 野生型、 Δ CgRGS2-27 与互补株菌落边缘形态比较

Figure 5. Comparison of colony edge between wild type, Δ CgRGS2-27 and complementary strain.

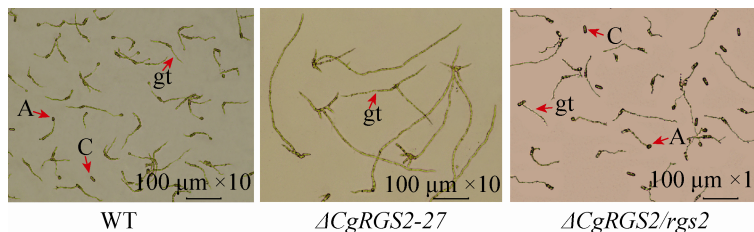


图 6. 野生型菌株、 Δ CgRGS2-27 与互补菌株分生孢子萌发形态

Figure 6. Conidium germination morphology of wild type, Δ CgRGS2-27 and complementary strain. A: appressorium; gt: germ tube; C: conidium.

$\Delta CgRGS2-27$ 分生孢子萌发率和附着胞形成率同野生型及互补株相比无显著差异。可见, $CgRGS2$ 参与调控分生孢子的产量及萌发。

2.3.3 $CgRGS2$ 参与调控氧化应激反应与细胞壁完整性: 在 MM 培养基中加入 NaCl、 H_2O_2 及 SDS 等胁迫因子, 比较野生型菌株、突变体菌株及互补株在生长上的差异。试验结果表明, 三者中含

不同 NaCl 浓度的培养基上生长均受到不同程度的抑制, 计算抑制率发现三者无显著差异(图 7-A); 在 H_2O_2 试验中, 随着 H_2O_2 浓度的增大, $\Delta CgRGS2-27$ 相较于野生型及互补株对 H_2O_2 更加敏感, 如 20 mmol/L H_2O_2 下, 野生型菌株的生长抑制率为 38.2%, 互补株抑制率为 40.8%, 而 $\Delta CgRGS2-27$ 的生长几乎完全受到抑制(图 7-B);

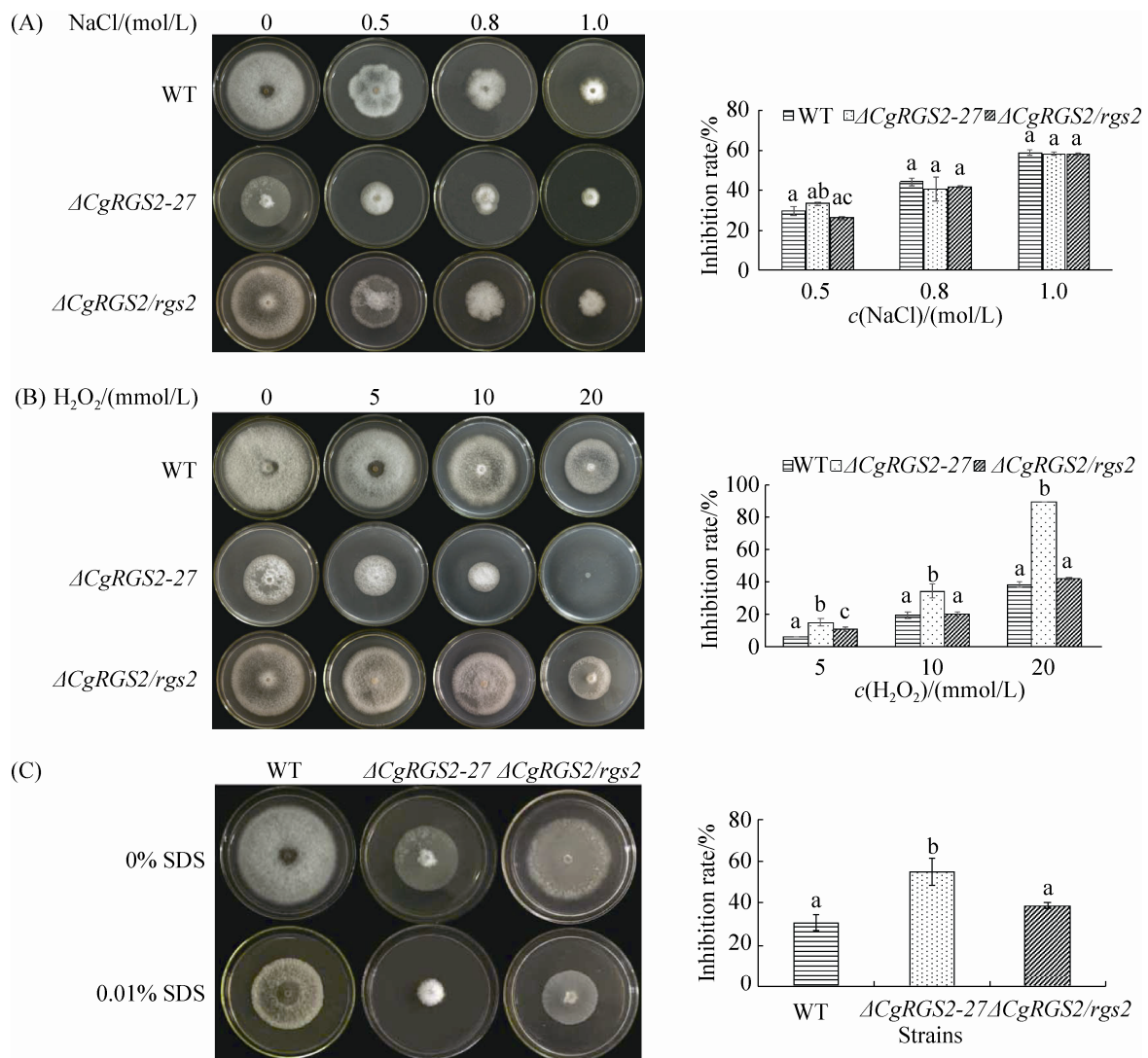


图 7. 胁迫因子对野生型、 $\Delta CgRGS2-27$ 及互补株生长的影响

Figure 7. Effects of stress factors on the growth of wild type, $\Delta CgRGS2-27$ and complementary strain. A: effect of NaCl on the growth of wild type, $\Delta CgRGS2-27$ and complementary strain; B: effect of H_2O_2 on the growth of wild type, $\Delta CgRGS2-27$ and complementary strain; C: effect of SDS on the growth of wild type, $\Delta CgRGS2-27$ and complementary strain; a, b, c: significant level, $P < 0.05$.

在含 0.01% SDS 的平板上, 突变体菌株生长抑制率约为野生型菌株的两倍, 差异显著(图 7-C)。由此可见, CgRGS2 可能参与调控胶孢炭疽菌氧化应激反应与细胞壁完整性。

2.3.4 致病性: 将野生型菌株、 Δ CgRGS2-27 和互补株接种芒果, 观察致病效果。由图所示, 以无伤口方式接种, Δ CgRGS2-27 几乎不形成病斑; 而以伤口方式接种时, Δ CgRGS2-27 形成的病斑明显小于野生型菌株和互补株(图 8)。由此可见, CgRGS2 影响胶孢炭疽菌的致病性, 其敲除突变体致病力减弱。

3 讨论

G 蛋白信号途径在真菌营养生长、产孢、侵染相关结构的分化及致病过程中扮演重要角色^[19-20]。RGS 蛋白作为 G 蛋白的负调控因子, 在植物病原菌生长发育及致病过程中发挥着重要的作用。本研究成功获得了胶孢炭疽菌 CgRGS2 基因的敲除突变体及互补株, 表型分析发现, 敲除突变体在 4 种培养基上表现为营养生长缓慢, 在 MM 培养基上尤为明显, 推测是因为 MM 培养基营养最为贫瘠, 使突变体在营养生长上的缺陷表现的更为突出; CgRGS2 参与调控分生孢子的产量及萌发, 其敲除突变体的分生孢子产量明显低

于野生型菌株, 在孢子萌上也表现出差异; 胁迫因子敏感性试验发现敲除突变体对 H₂O₂ 更加敏感, 对 SDS 的耐受力明显低于野生型菌株, 说明 CgRGS2 参与调控胶孢炭疽菌的氧化应激反应, 并可能引起细胞壁完整性的改变; 致病性试验发现, 敲除突变体的致病力明显低于野生型菌株, 我们推测突变体营养生长缓慢, 孢子产量减少以及氧化应激反应减弱可能是导致其致病性减弱的主要原因。以上表型缺陷在互补株中都能得到较好的恢复, 由此可见 CgRGS2 蛋白参与调控胶孢炭疽菌的营养生长, 分生孢子产量及萌发, 氧化应激反应, 细胞壁完整性及致病性等多个方面。

与其他植物病原真菌 RGS 蛋白的功能相比, 胶孢炭疽菌 CgRGS2 的功能在很多方面有相似之处, 如稻瘟病菌 RGS 蛋白参与调控该病菌的营养生长、细胞壁完整性、气生菌丝疏水性、有性/无性产孢、附着胞分化和侵染菌丝的生长等生理过程, 其中 MoRGS2 参与调控无性产孢, 芽管的生长和附着胞的形成, 并且通过负调控 Ga 亚基影响该病菌的致病性^[16]。在 *G. zeae* 中, RGS 蛋白在营养生长、分生孢子形成、毒素产生、有性生殖及致病等过程中发挥着不同的作用, 其中 CgRGS2 的同源蛋白 FgFibB 参与营养菌丝的生长、并影响分生孢子的产量及孢子形态^[11]; *Fusarium*



图 8. 野生型菌株、 Δ CgRGS2-27 与 Δ CgRGS2/rgs2 致病性试验

Figure 8. Pathogenicity test of wild type, Δ CgRGS2-27 and Δ CgRGS2/rgs2. 1: no wound inoculation; 2: wound inoculation.

verticillioides 中 RGS 蛋白参与调控病原菌分生孢子发生及毒素合成等生命过程^[15]。

本研究中, CgRGS2 与胶孢炭疽菌的致病性相关, 是该病菌的一个致病因子。目前, 多个与胶孢炭疽菌致病相关的基因得到鉴定。胶孢炭疽菌在侵染过程中, 与分生孢子中氨的生成、运输及分泌相关的基因 *gdh2*、*AMET*、*GLT*、*MEPB*, 在附着胞的形成及致病过程中起着重要作用^[21-22]; PacC 作为一个重要的 pH 调控的转录因子, 调控大量在碱性条件下表达的基因, 其中多个基因与致病性相关^[23-24]。MAPK 途径中 *CgMEK1* 基因影响到细胞分裂的极化及芽管的分化, 其突变体不能形成附着胞, 完全丧失致病性^[25]; *Cgl-slt2* 基因影响到营养菌丝生长及附着胞的形成, 其突变体附着胞形成率显著下降, 且丧失致病性^[2]。cAMP-PKA 途径中 *CgPKAC* 基因得到鉴定, 其突变体附着胞形成被延迟, 且在疏水表面的附着能力减弱, 致病性也减弱^[26]。*Cgctr2* 基因调节细胞内铜离子平衡, 其突变体表现出孢子萌发率降低, 致病性减弱^[27]。*CgOpt1* 基因沉默突变体可以阻断生长素(IAA)诱导的发育过程, 与野生型相比产孢量减少, 黑色素减少, 致病性也减弱^[28]。总的来说, 目前关于胶孢炭疽菌致病的分子机理研究尚处于起步阶段, 至今还未有关于胶孢炭疽菌 G 蛋白信号途径中 RGS 蛋白功能的研究, 本研究为胶孢炭疽菌分子致病机理的研究奠定了一定的基础。

参 考 文 献

- [1] Dean R, Van Kan JAL, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, Rudd JJ, Dickman M, Kahmann R, Ellis J, Foster GD. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(4): 414-430.
- [2] Yong HY, Bakar FDA, Illias RM, Mahadi NM, Murad AMA. *Cgl-SLT2* is required for appressorium formation, sporulation and pathogenicity in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2013, 44(4): 1241-1250.
- [3] Bi FC, Dai HF, Meng XC. Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of mango *Colletotrichum gloeosporioides* and screening of the mutants defective in pathogenicity. *Chinese Journal of Tropical Agriculture*, 2014, 34(8): 47-51. (in Chinese)
毕方铨, 戴宏芬, 孟祥春. 农杆菌介导的芒果胶孢炭疽菌遗传转化及致病性缺陷突变体的筛选. *热带农业科学*, 2014, 34(8): 47-51.
- [4] Jia J, Pu JJ, Zhang H, Qi YX, Xie YX. Cloning and characterization of ambient pH signal regulatory gene from mango anthracnose. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2014, 35(4): 753-757. (in Chinese)
贾静, 蒲金基, 张贺, 漆艳香, 谢艺贤. 芒果炭疽病菌环境 pH 信号调控基因 PalF 的克隆与分析. *热带作物学报*, 2014, 35(4): 753-757.
- [5] Han CZ. Research advances on genes in infection process of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, (9): 165-169. (in Chinese)
韩长志. 胶孢炭疽菌侵染过程相关基因研究进展. *广东农业科学*, 2014, (9): 165-169.
- [6] Yu JH. Heterotrimeric G protein signaling and RGSs in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Microbiology*, 2006, 44(2): 145-154.
- [7] Wang YC, Geng ZY, Jiang DW, Long FF, Zhao Y, Su H, Zhang KQ, Yang JK. Characterizations and functions of regulator of G protein signaling (RGS) in fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(18): 7977-7987.
- [8] Malbon CC. G proteins in development. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2005, 6: 689-701.
- [9] Dohlman HG, Thorner J. Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annual Review of Biochemistry*, 2001, 70: 703-754.
- [10] Siderovski DP, Willard FS. The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *International Journal of Biological Sciences*, 2005, 1(2): 51-66.
- [11] Park AR, Cho AR, Seo JA, Min K, Son H, Lee J, Choi GJ, Kim JC, Lee YW. Functional analyses of regulators of G

- protein signaling in *Gibberella zeae*. *Fungal Genetics and Biology*, 2012, 49(7): 511–520.
- [12] Ross EM, Wilkie TM. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. *Annual Review of Biochemistry*, 2000, 69(1): 795–827.
- [13] Fang WG, Scully LR, Zhang L, Pei Y, Bidochka MJ. Implication of a regulator of G protein signalling (BbRGS1) in conidiation and conidial thermotolerance of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 279(2): 146–156.
- [14] De Vries D, Farquhar MG. RGS proteins: more than just GAPs for heterotrimeric G proteins. *Trends in Cell Biology*, 1999, 9(4): 138–144.
- [15] Mukherjee M, Kim JE, Park YS, Kolomiets MV, Shim WB. Regulators of G-protein signalling in *Fusarium verticillioides* mediate differential host-pathogen responses on nonviable versus viable maize kernels. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(5): 479–491.
- [16] Zhang HF, Tang W, Liu KY, Huang Q, Zhang X, Yan X, Chen Y, Wang JS, Qi ZQ, Wang ZY, Zheng XB, Wang P, Zhang ZG. Eight RGS and RGS-like proteins orchestrate growth, differentiation, and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens*, 2011, 7: e1002450.
- [17] Talbot NJ, Ebbole DJ, Hamer JE. Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 1993, 5(11): 1575–1590.
- [18] Sweigard JA, Carroll AM, Kang S, Farrall L, Chumley FG, Valent B. Identification, cloning, and characterization of *PWL2*, a gene for host species specificity in the rice blast fungus. *The Plant Cell*, 1995, 7(8): 1221–1233.
- [19] Bölker M. Sex and crime: heterotrimeric G proteins in fungal mating and pathogenesis. *Fungal Genetics and Biology*, 1998, 25(3): 143–156.
- [20] Liu SH, Dean RA. G protein α subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10(9): 1075–1086.
- [21] Miyara I, Shafran H, Davidzon M, Sherman A, Prusky D. pH regulation of ammonia secretion by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on appressorium formation and pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, 23(3): 304–316.
- [22] Shnaiderman C, Miyara I, Kobiler I, Sherman A, Prusky D. Differential activation of ammonium transporters during the accumulation of ammonia by *Colletotrichum gloeosporioides* and its effect on appressoria formation and pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26(3): 345–355.
- [23] Alkan N, Meng XC, Friedlander G, Reuveni E, Sukno S, Sherman A, Thon M, Fluhr R, Prusky D. Global aspects of *pacC* regulation of pathogenicity genes in *Colletotrichum gloeosporioides* as revealed by transcriptome analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26(11): 1345–1358.
- [24] Ment D, Alkan N, Luria N, Bi FC, Reuveni E, Fluhr R, Prusky D. A role of AREB in the regulation of PACC-dependent acid-expressed-genes and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2015, 28(2): 154–166.
- [25] Kim YK, Kawano T, Li DX, Kolattukudy PE. A mitogen-activated protein kinase kinase required for induction of cytokinesis and appressorium formation by host signals in the conidia of *Colletotrichum gloeosporioides*. *The Plant Cell*, 2000, 12(8): 1331–1343.
- [26] Priyatno TP, Abu Bakar FD, Kamaruddin N, Mahadi NM, Murad AMA. Inactivation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase a causes delayed appressorium formation and reduced pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides*. *The Scientific World Journal*, 2012, 2012: ID 545784.
- [27] Barhoom S, Kupiec M, Zhao XH, Xu JR, Sharon A. Functional characterization of CgCTR2, a putative vacuole copper transporter that is involved in germination and pathogenicity in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Eukaryotic Cell*, 2008, 7(7): 1098–1108.
- [28] Chagué V, Maor R, Sharon A. CgOpt1, a putative oligopeptide transporter from *Colletotrichum gloeosporioides* that is involved in responses to auxin and pathogenicity. *BMC Microbiology*, 2009, 9: 173.

Gene cloning and biological function of *CgRGS2* in *Colletotrichum gloeosporioides*

Manli Wu, Xiaoyu Li, Nan Zhang, Shuang Xu, Zhiqiang Liu*

College of Environment and Plant Protection, Hainan University, Haikou 570228, Hainan Province, China

Abstract: [Objective] Regulators of G-protein signaling (RGS) are negative regulatory factors of G protein and play important roles in growth development and pathogenicity of plant pathogen. However, biological functions of RGS in *Colletotrichum gloeosporioides* have not been studied so far. We cloned an RGS gene of *CgRGS2* in *C. gloeosporioides* and analyzed its biological function. [Methods] Gene *CgRGS2* was cloned using PCR and analyzed. The gene-knockout mutant of *CgRGS2* was obtained by homologous recombination, and the complementary strain was also built based on the mutant. Biological function of *CgRGS2* was determined through phenotypic analysis. [Results] *CgRGS2* encoded a 574-amino acids protein, containing an RGS function domain in the N terminal. Comparing to the wild type, the knockout mutant of *CgRGS2* had slow growth, thick aerial hyphae, reduced conidia with multi-end germination, sensitive to oxidative stress and SDS, decreased pathogenicity. [Conclusion] Protein *CgRGS2* was involved in regulation of vegetative growth, conidium production and germination, oxidative stress response, cell wall integrity and pathogenicity of *C. gloeosporioides*.

Keywords: *Colletotrichum gloeosporioides*, regulators of G-protein signaling, gene knockout, phenotypic analysis

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31560045) and by the Natural Science Foundation of Hainan Province (20153132)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-898-66192915; E-mail: liuzhiqiang80@126.com

Received: 4 May 2016; Revised: 25 August 2016; Published online: 5 September 2016