



## 苹果树腐烂病菌细胞色素 P450 基因 *Vmcyp5* 的功能

高明煜, 吴玉星, 朱百涛, 高小宁, 冯浩, 黄丽丽\*

西北农林科技大学植物保护学院, 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100

**摘要:**【目的】研究表明, 细胞色素 P450 (CYP)在死体营养型真菌的毒素合成代谢中发挥重要作用, 预测可能与病原菌致病相关。论文对苹果树腐烂病菌(*Valsa mali*)毒素合成基因簇中的 1 个上调表达的 CYP 基因 *Vmcyp5* 进行生物学功能研究, 明确 CYP 基因对病原菌致病力影响, 为细胞色素 P450 基因家族对苹果树腐烂病菌致病机理的进一步研究提供依据。【方法】通过 Double-joint PCR 和 PEG 介导的原生质体转化技术获得具有 G418 抗性的突变体, 并对突变体进行 PCR 检测及 Southern blotting 验证得到单拷贝敲除突变体。将目的基因片段重新导入敲除突变体, 筛选获得互补突变体。最终对野生型菌株及敲除突变体、互补突变体进行菌落、产孢及致病力观察, 利用 SPSS 软件对数据进行差异显著性分析, 并利用 qRT-PCR 技术分析突变体黑色素基因簇的表达水平。【结果】通过基因敲除技术获得 1 个 *Vmcyp5* 基因的敲除突变体。与野生型菌株相比, *Vmcyp5* 基因的敲除突变体菌落呈白色, 产孢量减少 51.3%。qRT-PCR 分析发现敲除突变体黑色素基因簇基因表达量降低。重要的是, 敲除突变体致病力较野生型菌株降低 24.5%。互补突变体菌落颜色、产孢及致病力近似恢复至野生型菌株水平。【结论】*Vmcyp5* 基因与病原菌黑色素合成、子实体的产生和致病力相关。

**关键词:** 苹果树腐烂病菌, 细胞色素 P450, 基因敲除, 致病力

苹果树腐烂病(Apple tree valsa canker)由死体营养型真菌黑腐皮壳属 *Valsa mali* Mayabe et Yamada 引起<sup>[1]</sup>。该病原菌可致树势衰弱, 严重时造成死树毁园, 极大地影响和制约着苹果产量和品质, 造成严重的经济损失。苹果树腐烂病的相关研究涉及病原学研究、病原菌侵染过程、发病规律及防治技术等<sup>[2-4]</sup>, 但致病机理尚不明确。很

多的死体寄生菌如 *Alternaria*、*Botrytis*、*Cercospora*、*Fusarium*、*Sclerotinia* 等均可在病菌侵染过程中不断产生毒素杀死寄主细胞<sup>[5]</sup>。研究表明, 细胞色素 P450 基因与病原真菌毒素的合成代谢相关<sup>[6]</sup>。因此, 明确该类基因在苹果树腐烂病菌致病过程中的生物学功能, 可为进一步解析致病机理奠定基础。

基金项目: 国家自然科学基金(31471732, 31671982)

\*通信作者。Tel: +86-29-87091312; E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn

收稿日期: 2017-03-19; 修回日期: 2017-04-24; 网络出版日期: 2017-05-16

细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP) 是广泛存在于自然界生物体中的一组结构和功能相关的超家族基因编码的同工酶。真菌细胞色素 P450 在许多次级代谢产物合成路径中具有重要的催化活性<sup>[7]</sup>, 可参与多种真菌毒素的生物合成<sup>[8-11]</sup>。而真菌毒素作为植物病原真菌产生的具有致病活性的小分子代谢产物, 通常与植物病原菌致病过程密切相关<sup>[12]</sup>。前期研究表明, 细胞色素 P450 可催化禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、拟分枝孢镰刀菌(*F. sporotrichioides*)的单端孢霉烯族毒素合成中的某些羟基化反应<sup>[13]</sup>; Wen 等<sup>[14]</sup>研究发现, 黄曲霉毒素基因簇上的 CYP 基因 *cypX* 参与了黄曲霉毒素的合成, 该基因的缺失会影响中间产物的进一步转化; Siewers 等<sup>[15]</sup>研究证实, CYP 基因 *bcbot* 与灰霉菌葡双醛毒素的合成相关, 该基因的缺失突变体引起致病力的显著降低。根据苹果树腐烂病菌全基因组及其转录组数据分析, 获得了 1 个位于苹果树腐烂病菌 *V. mali* 的毒素代谢基因簇、在病原菌与寄主互作过程中上调表达的 CYP 基因 *Vmcp5*<sup>[16]</sup>, 推测该基因参与苹果树腐烂病菌毒素合成, 与病原菌致病相关。

本研究以细胞色素 P450 基因 *Vmcp5* 为研究对象, 利用基因敲除技术和 PEG 介导的遗传转化技术获得敲除突变体, 通过对敲除突变体的生物学观察(包括颜色、生长速度、子实体等)以及致病性的检测, 明确该基因在苹果树腐烂病菌致病过程中的影响, 进一步为细胞色素 P450 基因家族在苹果树腐烂病菌致病作用中的功能研究提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

苹果树腐烂病菌(*V. mali*)的分离株 03-8, 由西

北农林科技大学植物保护学院植物病害综合治理研究室分离并保存。质粒 pHIG2RHPH2-GFP-GUS (含潮霉素磷酸转移酶基因 *hph*, Kana 抗性), 由浙江大学宋凤鸣教授惠赠。质粒 pFL<sub>2</sub> (含氨基糖苷磷酸转移酶基因 *neo*, G418 抗性)、酵母菌株 XK1-25 由西北农林科技大学许金荣教授惠赠。大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ , 由西北农林科技大学植物病害综合治理实验室保存。苹果枝条选取隔离温室培养的富士(*Malus domestica* Borkh. cv. Fuji)苹果树粗细均匀的 1-2 年生枝条。

### 1.2 主要试剂

Fastpfu (Transgene)、崩溃酶(Sigma)、溶壁酶(Sigma)、G418 (MP)、地高辛 DNA 标记检测试剂盒(Roche)、定量 Mix (Genstar)、胶回收提取试剂盒(BioTeke)、质粒小量提取试剂盒(OMEGA)、核酸提取试剂盒(华越洋)及其他实验常规化学试剂及药品。引物合成自生工生物工程(上海)股份有限公司。

### 1.3 序列获得及引物设计

从苹果树腐烂病菌基因组序列中获得 *Vmcp5* 基因序列, 利用 Premier 5.0 软件设计引物。引物序列及其相关参数见表 1。

### 1.4 敲除载体的构建

以苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8 的基因组 DNA 为模板, 分别利用引物 *Vmcp5*-1F/2R 和 *Vmcp5*-3F/4R 扩增目的基因的上游和下游片段, 再以质粒 pFL<sub>2</sub> 作为模板, 利用引物 *neo*-F/R 扩增得到 *neo* 片段。回收各片段, 并通过 Double-joint PCR 方法构建基因敲除载体<sup>[17]</sup>。

### 1.5 PEG 介导的遗传转化

对构建完成的基因敲除载体进行 PCR 产物浓缩, 随后制备苹果树腐烂病菌原生质体并进行

表 1. 试验所用引物序列  
Table 1. Primers used in the test

Primers	Sequences (5'→3')
<i>Vmcyp5-1F</i>	GCTGAAATCTGGCTCTGGG
<i>Vmcyp5-2R</i>	<i>CAGATACGGCAGAGAAATCGCAACCTCCGCTGCAAATTGACTTGGT</i>
<i>Vmcyp5-3F</i>	<i>GTTAGATTCCAAGTGTCTACTGCTGGCACTACCACCATCCGAACCTC</i>
<i>Vmcyp5-4R</i>	GCGCTATGTATGCAAGATAAGC
<i>Vmcyp5-5F</i>	AAGCCTGGCAGTGGTTTT
<i>Vmcyp5-6R</i>	GGATTGTTGGCAAGATGGA
<i>Vmcyp5-7F</i>	ATAGCCTGGAGTGTCGGTAGA
<i>Vmcyp5-8R</i>	TTCAAAGGGGCAGCATT
<i>Vmcyp5-CF</i>	ACCGGAAATGAAGAGTAACGA
<i>Vmcyp5-CR</i>	TTGCTTTGATGACCCTACGA
<i>Vmcyp5-qF</i>	CGTTGAGTACAAGGGCCATATC
<i>Vmcyp5-qR</i>	TTATGACCCAACACGCTTCG
<i>Vmcyp5-cF</i>	CGACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACTCAAATTGGTGTAGGTCGTTGGGAATCAA
<i>Vmcyp5-cR</i>	CACCACCCGGTGAACAGCTCTCCGCCCTTGCTCACGTACGACACCATACCGTTCA
<i>neo-F</i>	GAGGTTGCGATTTCTCTGCCGTATCTG
<i>neo-R</i>	GCCAGCAGTAGACACTTGAATCTAAAC
G852	TCGGCTATGACTGGGCACAACA
G850	GAGCGGCGATACCGTAAAGCAC
G856F	GAATGGTCAAATCAAAGTCTAGATAT
G855R	TGTTGGGTTTGGAGCTAGGTGGG
pFL2-F	TAACGCCAGGGTTTTCCAGTAC
pFL2-R	CGTGCTGCTTCATGTGGTCCG
<i>VM00287-F</i>	ATGATAGCCGCAATGAGC
<i>VM00287-R</i>	CCAGGCACCCAGTAAAGTA
<i>VM00288-F</i>	GCTCATCCTCACCTCGTCCAT
<i>VM00288-R</i>	TGCCAGGCGTTCTCATCG
<i>VM00289-F</i>	AGTCCATCACGGAGTCAATC
<i>VM00289-R</i>	GCAGAACTGAACGAGGGTG
<i>VM00290-F</i>	GGATGGCAGGGCTCTAC
<i>VM00290-R</i>	TGTCATTGCGAAAGGTGT
<i>VM00291-F</i>	ACGGGAGCGAGCAGGATA
<i>VM00291-R</i>	GTCACTGGCGGACAGAACAC
<i>VM00292-F</i>	TTTCTTCCGCCTATCCCA
<i>VM00292-R</i>	CGTCATACCGTTGAGCAGC
G6PDH-F	TCAGAACAAGTTCGAGGGCGACAA
G6PDH-R	TAGGGGCAATAGAGGGCTTGTTC

Italics represented homologous sequences.

PEG 介导的原生质体转化<sup>[18]</sup>。将复生的原生质体与含 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 的 Bottom Agar 培养基均匀混合后倒入培养皿( $\Phi=9$  cm, 下同)中, 25  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 12 h 后, 用冷却至 60  $^{\circ}\text{C}$ 、含 150  $\mu\text{g}/\text{mL}$  G418 的 Top Agar 培养基覆盖, 继续置于 25  $^{\circ}\text{C}$  培养 4–5 d 后挑取转化子。

## 1.6 突变体检测

**1.6.1 PCR 检测阳性转化子:** 提取转化子 DNA, 以此为模板, 利用引物 *Vmcyp5*-5F/6R、G856F/*Vmcyp5*-8R、*Vmcyp5*-7F/G855R、G852/G850 进行 PCR 检测<sup>[19]</sup>。通过是否扩增出片段大小正确的条带判断该转化子是否为阳性转化子。

**1.6.2 Southern blotting 验证敲除突变体:** 利用 CTAB 法提取阳性转化子和野生型菌株 03-8 的基因组 DNA, 使用内切酶 *Cla* I 对基因组 DNA 进行酶切, 经电泳、转膜后, 以 *neo* 基因片段为探针进行 Southern blotting 杂交, 最后利用蛋白照相系统照相, 确定敲除突变体。具体试验方法参考地高辛 DNA 标记检测试剂盒(Roche)说明书。

## 1.7 基因敲除回复

以基因组 DNA 为模板, 利用互补引物 *Vmcyp5*-cF/cR 扩增 *Vmcyp5* 基因片段。回收 PCR 产物, 以质粒 pDL<sub>2</sub> 为载体, 构建 *Vmcyp5* 基因互补载体。试验方法参考郑大伟<sup>[20]</sup>, 略有改动。通过 PEG 介导的原生质体转化法将回复载体转入敲除突变体 *Vmcyp5*-5, 以潮霉素作为筛选抗生素, 最终获得互补敲除突变体。遗传转化步骤及互补突变体筛选方法同 1.5。

## 1.8 苹果树腐烂病菌生物学性状测定

**1.8.1 营养生长观察:** 将敲除突变体、互补敲除突变体及野生型菌株 03-8 在 PDA 培养基上培养 2 d

后, 挑取菌落边缘处的菌饼( $\Phi=5$  mm, 下同)分别接到含有 10 mL PDA 培养基的培养皿的正中, 于 25  $^{\circ}\text{C}$  避光倒置培养 48 h 后观察菌落颜色、形状及菌丝生长等情况, 运用十字交叉法测量菌落直径。继续培养 7 d 后, 将培养皿转至 25  $^{\circ}\text{C}$  光暗交替条件(光照: 黑暗=12 h: 12 h), 观察子实体产生情况并于 40 d 后统计子实体数量。每个菌株设置 3 个重复, 试验重复 3 次。利用 SPSS 软件对测量所得数据进行差异性分析( $P=0.05$ )。

**1.8.2 致病性分析:** 致病力检测方法参照臧睿等<sup>[21]</sup>, 略有改动。对消毒灭菌的健康离体苹果枝条进行烫伤处理后, 分别取敲除突变体、互补敲除突变体和野生型菌株的菌饼以及无菌 PDA 块接种于伤口处, 并将枝条于 25  $^{\circ}\text{C}$  保湿静置培养 5 d 后测量病斑大小。每个菌株设置 9 个重复, 试验重复 3 次。利用 SPSS 软件对测量所得数据进行差异性分析( $P=0.05$ )。

## 1.9 qRT-PCR 分析黑色素基因簇表达量

**1.9.1 样品制备:** 挑取野生型菌株 03-8 和敲除突变体的菌饼置于含 100 mL 灭菌马铃薯葡萄糖培养基(PDB)的三角瓶中, 25  $^{\circ}\text{C}$ 、100 r/min 摇培 3 d 后用灭菌纱布收集菌丝。具体方法参照许春景等<sup>[22]</sup>。菌丝样品装入锡箔袋-80  $^{\circ}\text{C}$  保存备用。

**1.9.2 总 RNA 提取和第一链 cDNA 合成:** 按照华越洋核酸提取试剂盒的方法说明, 提取菌丝样品。随后以 5  $\mu\text{g}$  RNA 为模板, 使用引物 Oligo d(T)<sub>18</sub> 反转录合成第一链 cDNA, 方法参照 Thermo 反转录试剂盒说明书。

**1.9.3 实时荧光定量 PCR:** 分别以稀释 10 倍的野生型菌株和敲除突变体的菌丝样品的 cDNA 为模板, 以苹果树腐烂病菌 *G6PDH* 为内参基因<sup>[23]</sup>, 利用特异性引物 *VM00287*-F/R、*VM00288*-F/R、

VM00289-F/R、VM00290-F/R、VM00291-F/R 和 VM00292-F/R,通过 CFX Connect™ 实时定量 PCR 仪(Bio-Rad)对苹果树腐烂病黑色素基因簇 6 个基因(VM00287、VM00288、VM00289、VM00290、VM00291 和 VM00292)<sup>[24]</sup>进行定量 PCR 检测。每次 3 个平行试验,重复 3 次。采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  方法计算目的基因相对表达量。具体 PCR 体系及程序见表 2。

## 2 结果和分析

### 2.1 敲除载体的构建

分别扩增 *Vmcyp5* 的上下游和抗性基因 *neo*, 片段大小分别为 1227、1488、1433 bp (图 1-A)。利用 Double-joint PCR 对上游片段、下游片段和 *neo* 片段进行融合,得到大小为 4148 bp 的融合片段(图 1-B)。再以 *Vmcyp5*-CF/CR 为引物进行巢式 PCR,获得大小为 3868 bp 的目的条带(图 1-B),即基因敲除载体构建完成。

### 2.2 敲除突变体鉴定

以转化子 DNA 为模板,利用 4 对引物进行 PCR 检测。对鉴定为阳性的突变体进行 Southern blotting 验证,最终得到 1 个单拷贝敲除突变体  $\Delta Vmcyp5-5$ ,目的条带为 2436 bp (图 2-A、B)。用引物 *Vmcyp5*-5F/6R 对基因回复转化子进行 PCR 检测,获得 3 个互补敲除突变体,分别为  $\Delta Vmcyp5-A$ 、 $\Delta Vmcyp5-B$  和  $\Delta Vmcyp5-C$  (图 2-C)。

### 2.3 突变体营养生长观察

在 PDA 培养基上恒温静置培养的敲除突变体  $\Delta Vmcyp5-5$  与野生型菌株 03-8 相比,菌落颜色变白(图 3-A、B),菌落形态及生长速率等并无显著性差异(图 3-C)。继续光暗交替条件下培养, $\Delta Vmcyp5-5$  与 03-8 皆于 14–16 d 产生黑色子实体。统计培养 40 d 后的成熟子实体数量发现, $\Delta Vmcyp5-5$  产孢量相较于 03-8 减少 51.3% ( $P=0.05$ ) (图 3-D)。互补突变体在营养生长和产孢方面近似

表 2. qRT-PCR 体系和程序

Table 2. qRT-PCR reaction system and amplification procedure

PCR reaction system (20 $\mu$ L)	V/ $\mu$ L	T/ $^{\circ}$ C	Time
2 $\times$ SYBR green fluorescent dye (GenStar)	10.0	95	10 min
ddH <sub>2</sub> O	7.4	95	10 s
cDNA template	1.0	55	20 s
		95	10 s
		65	5 s
<i>Vmcyp5</i> -qF/qR(G6PDH-F/R)	0.8	95	-0.5 $^{\circ}$ C gradient cooling

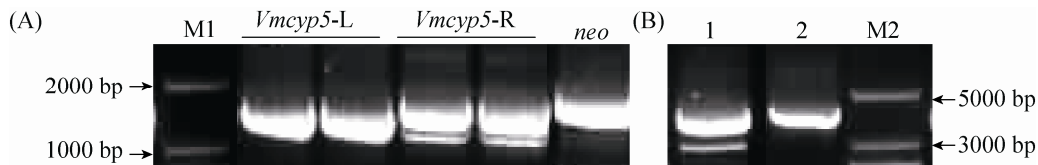


图 1. 敲除载体构建的 PCR 检测

Figure 1. PCR detections of the gene knockout vector. A: PCR amplification of upstream, downstream fragments and *neo*. Lane L: Target upstream; lane R: Target downstream; M1: DL2000. B: Construction of the gene knockout vector. Lane 1: Fusion fragment of Double-joint PCR; Lane 2: Nested PCR fragment; M2: DL5000.

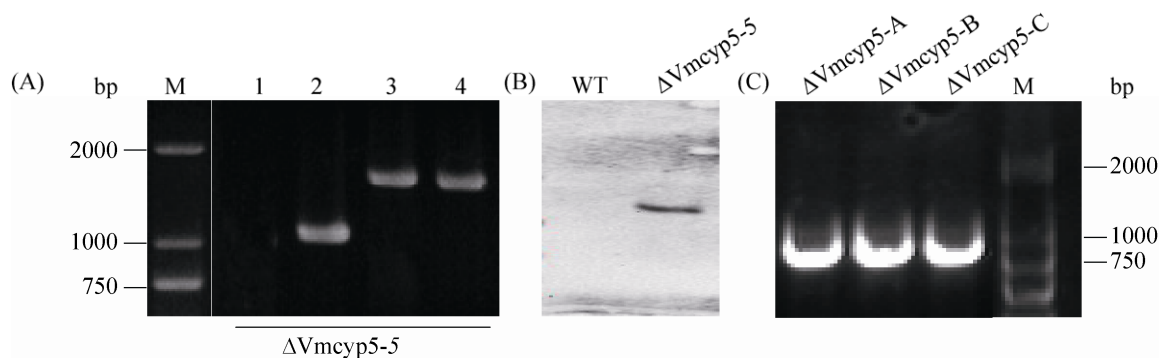


图 2. 突变体的检测和验证

Figure 2. PCR and Southern blotting detections of the mutants. A: PCR detection of the putative deletion mutant using four pairs of primers. Lane 1: Primer pairs *Vmcyp5-5F/6R* (targeted gene); lane 2: Primer pairs *G850/G852* (*neo* cassette); lane 3: Primer pairs *Vmcyp5-7F/G855R* (upstream region); lane 4: Primer pairs *G856F/ Vmcyp5-8R* (downstream region); M: DL2000. B: Southern blotting detection of the putative deletion mutant. C: PCR screening of the complementation mutants. M: DL2000.

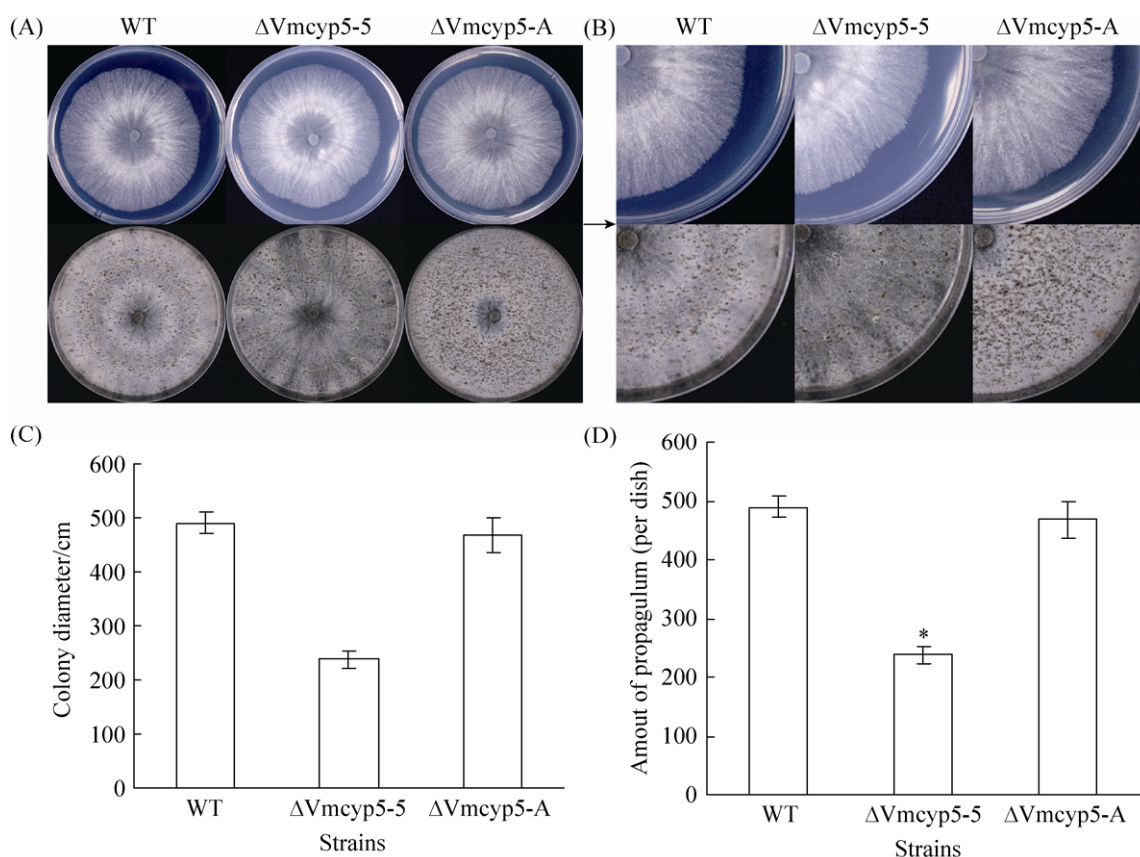


图 3. 野生型菌株 03-8 和突变体在 PDA 培养基上的菌落形态(25 °C 恒温静置 48 h)和产孢情况(25 °C 恒温静置 40 d)  
Figure 3. Colony morphology (After 48 hours' standing at 25 °C) and propagulum formation (After 40 days' standing at 25 °C) of the wild-type strain 03-8 (WT) and the mutants inoculate on PDA medium. A: Colony morphology and propagulum formation of WT, ΔVmcyp5-5 and ΔVmcyp5-A; B: 4 times magnified image of A; C: Colony diameter of WT, ΔVmcyp5-5 and ΔVmcyp5-A; D: Propagulum analysis of WT, ΔVmcyp5-5 and ΔVmcyp5-A. The asterisk indicates a significant difference from the wild-type ( $P=0.05$ ).

恢复至野生型菌株水平。表明 *Vmcyp5* 对苹果树腐烂病营养生长及子实体产生有一定的影响。

## 2.4 突变体致病力检测

将接种完成的苹果树枝条于 25 °C 保湿培养 5 d 后, 测量病斑直径发现(图 4-A),  $\Delta Vmcyp5-5$  的致病力较野生型菌株 03-8 显著下降 24.5% ( $P=0.05$ )。同时, 互补突变体的致病力与野生型菌株相比无差异(图 4-B)。表明该基因与苹果树腐烂

病菌致病过程相关。

## 2.5 黑色素基因簇表达量的实时定量 PCR 分析

qRT-PCR 结果显示, 与野生型菌株 03-8 相比, 黑色素基因簇上的 6 个基因在突变体  $\Delta Vmcyp5-5$  中的表达量均下调, 下调倍数分别为 4.0、8.9、1.8、2.2、4.8 和 2.9 倍(图 5)。表明 *Vmcyp5* 的缺失引起黑色素基因簇表达水平的变化, 该基因可能与黑色素合成相关。

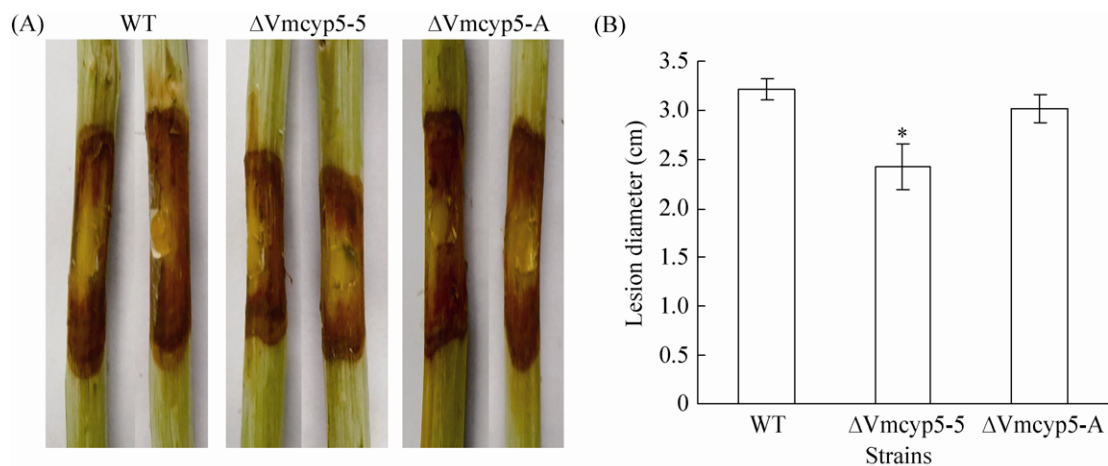


图 4. 野生型菌株 03-8 和突变体的致病力测定和分析(5 d)

Figure 4. Virulence experiments and analysis of the wild-type strain 03-8 and the mutants (5 d). A: Virulence experiments of WT,  $\Delta Vmcyp5-5$  and  $\Delta Vmcyp5-A$ ; B: Virulence analysis of WT,  $\Delta Vmcyp5-5$  and  $\Delta Vmcyp5-A$ . The asterisk indicates a significant difference from the wild-type ( $P=0.05$ ).

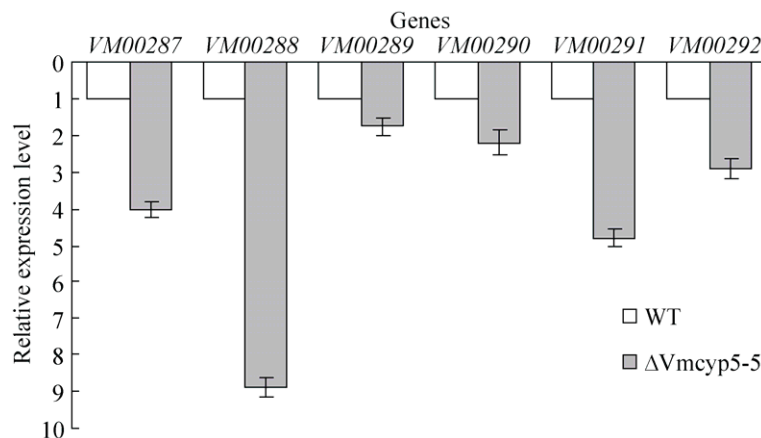


图 5. 野生型菌株 03-8 和  $\Delta Vmcyp5-5$  的黑色素基因簇基因相对表达量

Figure 5. Relative expression levels of melanin gene cluster in the wild-type strain 03-8 and  $\Delta Vmcyp5-5$ . The expression levels of melanin gene cluster in the wild-type strain 03-8 were treated as one fold, then the relative expression levels of the genes in melanin gene cluster of  $\Delta Vmcyp5-5$  were obviously down-regulated as shown.

### 3 讨论

真菌毒素是一类由病原菌产生、在一定浓度下可以引起寄主植物发病的致病因子。前期研究表明,真菌细胞色素 P450 可催化真菌毒素代谢途径中疏水中间体的转化<sup>[25-27]</sup>,参与病原菌致病过程,对致病力产生影响<sup>[15,28]</sup>。本研究基于前期研究,证实 *Vmcyp5* 基因在病原菌侵染初期上调表达,推测其与病原菌致病相关。为确定该基因生物学功能,本研究利用基因敲除技术及 PEG 介导的遗传转化获得目的基因的敲除突变体和回复突变体,通过一系列生物学试验研究基因 *Vmcyp5* 对苹果树腐烂病菌营养生长及致病力的影响。结果表明, *Vmcyp5* 与病原菌子实体的产生以及黑色素的合成代谢相关,并参与病原菌的致病过程。

本研究所选取的 *CYP* 基因 *Vmcyp5* 来自于 *V. mali* 毒素代谢基因簇,虽经试验证实该基因与病原菌致病相关,但并非决定性因素。究其原因,可能在于真菌细胞色素 P450 数量丰富,因其酶家族的多样性而拥有多种功能<sup>[29]</sup>,但在现有研究背景下,仅有极少量的 *CYP* 基因显示为病原菌致病关键基因。此外, *CYP* 基因通常以基因簇的形式编码细胞色素 P450 单加氧酶,因其多基因家族特征导致各基因间功能冗余现象的存在,从而通过协同作用引起功能互补。

本研究为细胞色素 P450 基因对苹果树腐烂病菌致病力作用的研究提供了一定的基础研究依据。而病原真菌毒素的合成代谢是一个相当复杂的过程,对于苹果树腐烂病菌而言,仍有诸多问题未解,亟待在未来的研究中进一步探索苹果树腐烂病菌基因调控毒素合成代谢的机理,为揭示病原菌致病机制奠定基础。

### 参考文献

- [1] Wang XL, Wei JL, Huang LL, Kang ZS. Re-evaluation of pathogens causing Valsa canker on apple in China. *Mycologia*, 2011, 103(2): 317-324.
- [2] Ke XW, Huang LL, Han QM, Gao XN, Kang ZS. Histological and cytological investigations of the infection and colonization of apple bark by *Valsa mali* var. *mali*. *Australasian Plant Pathology*, 2013, 42(1): 85-93.
- [3] Li ZP, Gao XN, Du ZT, Hu Y, Kang ZS, Huang LL. Survey of apple Valsa canker in Weibei area of Shaanxi province. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 2013, 22(1): 174-178. (in Chinese)  
李正鹏, 高小宁, 杜战涛, 胡杨, 康振生, 黄丽丽. 陕西渭北地区苹果树腐烂病发生情况调查. *西北农业学报*, 2013, 22(1): 174-178.
- [4] Li ZP. Study on the biological control of *Saccharothrix yanglinggensis* *Hhs.015* on apple Valsa canker. Master Dissertation of Northwest A&F University, 2012. (in Chinese)  
李正鹏. 杨凌糖丝菌 *Hhs.015* 对苹果树腐烂病的生物防治研究. 西北农林科技大学硕士学位论文, 2012.
- [5] Qi GF, Yang B, Ye JR. Research advances on the toxin of the plant pathogenic fungus. *Journal of Nanjing Forestry University*, 2000, 24(2): 66-70. (in Chinese)  
祁高富, 杨斌, 叶建仁. 植物病原真菌毒素研究进展. *南京林业大学学报*, 2000, 24(2): 66-70.
- [6] McLean KJ, Leys D, Munro AW. Microbial cytochromes P450//de Montellano PRO. *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry*. Switzerland: Springer International Publishing, 2015: 261-407.
- [7] Črešnar B, Petrič Š. Cytochrome P450 enzymes in the fungal kingdom. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2011, 1814(1): 29-35.
- [8] Ehrlich KC, Chang PK, Yu JJ, Cotty PJ. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(11): 6518-6524.
- [9] Proctor RH, Plattner RD, Desjardins AE, Busman M, Butchko RAE. Fumonisin production in the maize pathogen *Fusarium verticillioides*: genetic basis of naturally occurring chemical variation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(6): 2424-2430.
- [10] Bhatnagar D, Ehrlich KC, Cleveland TE. Molecular genetic analysis and regulation of aflatoxin biosynthesis. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(2): 83-93.
- [11] Yu JJ, Chang PK, Ehrlich KC, Cary JW, Bhatnagar D,



- Cleveland TE, Payne GA, Linz JE, Woloshuk CP, Bennett JW. Clustered pathway genes in aflatoxin biosynthesis. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(3): 1253–1262.
- [12] Desjardins AE, Hohn TM. Mycotoxins in plant pathogenesis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10(2): 147–152.
- [13] Kimura M, Tokai T, Takahashi-Ando N, Ohsato S, Fujimura M. Molecular and genetic studies of *Fusarium* trichothecene biosynthesis: pathways, genes, and evolution. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2007, 71(9): 2105–2123.
- [14] Wen Y, Hatabayashi H, Arai H, Kitamoto HK, Yabe K. Function of the *cypX* and *moxY* genes in aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(6): 3192–3198.
- [15] Siewers V, Viaud M, Jimenez-Teja D, Collado IG, Gronover CS, Pradier JM, Tudzynski B, Tudzynski P. Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2005, 18(6): 602–612.
- [16] Yin ZY, Liu HQ, Li ZP, Ke XW, Dou DL, Gao XN, Song N, Dai QQ, Wu YX, Xu JR, Kang ZS, Huang LL. Genome sequence of *Valsa* canker pathogens uncovers a potential adaptation of colonization of woody bark. *New Phytologist*, 2015, 208(4): 1202–1216.
- [17] Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(11): 973–981.
- [18] Gao J, Li YB, Ke XW, Kang ZS, Huang LL. Development of genetic transformation system of *Valsa mali* of apple mediated by PEG. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(9): 1194–1199. (in Chinese)  
高静, 李艳波, 柯希望, 康振生, 黄丽丽. PEG 介导的苹果腐烂病菌原生质体转化. *微生物学报*, 2011, 51(9): 1194–1199.
- [19] Song N, Dai QQ, Huang LL, Han QM. Construction of knockout vector of GTP cyclohydrolase II gene and mutant's biological characteristics of *Valsa mali*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47(15): 2980–2989. (in Chinese)  
宋娜, 戴青青, 黄丽丽, 韩青梅. 苹果树腐烂病菌 GTP-环化水解酶 II 基因敲除载体构建及其突变体的表型分析. *中国农业科学*, 2014, 47(15): 2980–2989.
- [20] Zheng DW. Construction of gene knock-out approach for *Ustilagoidea virens* and the function analysis of *HOG1* in *Ustilagoidea virens* and *Fusarium graminearum*. Doctor Dissertation of Northwest A&F University, 2015. (in Chinese)  
郑大伟. 稻曲病菌基因敲除体系的建立及 *HOG1* 基因在稻曲病菌和禾谷镰刀菌中功能验证. 西北农林科技大学博士学位论文, 2015.
- [21] Zang R, Huang LL, Kang ZS, Wang XL. Biological characteristics and pathogenicity of different isolates of *Cytospora* spp. isolated from apple trees in Shaanxi province. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007, 37(4): 343–351. (in Chinese)  
臧睿, 黄丽丽, 康振生, 王旭丽. 陕西苹果树腐烂病菌 (*Cytospora* spp.) 不同分离株的生物学特性与致病性研究. *植物病理学报*, 2007, 37(4): 343–351.
- [22] Xu CJ, Wu YX, Dai QQ, Li ZP, Gao XN, Huang LL. Function of polygalacturonase genes *Vmpg7* and *Vmpg8* of *Valsa mali*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2016, 49(8): 1489–1498. (in Chinese)  
许春景, 吴玉星, 戴青青, 李正鹏, 高小宁, 黄丽丽. 苹果树腐烂病菌多聚半乳糖醛酸酶基因 *Vmpg7* 和 *Vmpg8* 的功能. *中国农业科学*, 2016, 49(8): 1489–1498.
- [23] Yin ZY, Ke XW, Huang DX, Gao XN, Voegelé RT, Kang ZS, Huang LL. Validation of reference genes for gene expression analysis in *Valsa mali* var. *mali* using real-time quantitative PCR. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2013, 29(9): 1563–1571.
- [24] Bashyal BM, Chand R, Kushwaha C, Sen D, Prasad LC, Joshi AK. Association of melanin content with conidiogenesis in *Bipolaris sorokiniana* of barley (*Hordeum vulgare* L.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26(2): 309–316.
- [25] Farkas J, Schrickler R, Briza P, Eckerstorfer M, Breitenbach M. The enzymatic properties of Dlt2p (CYP56) from *Saccharomyces cerevisiae*. *FASEB Journal*, 1997, 11(9): A827.
- [26] Tsitsigiannis DI, Keller NP. Oxylipins as developmental and host-fungal communication signals. *Trends in Microbiology*, 2007, 15(3): 109–118.
- [27] Bömke C, Rojas MC, Gong F, Hedden P, Tudzynski B. Isolation and characterization of the gibberellin biosynthetic gene cluster in *Sphaceloma manihoticola*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(17): 5325–5339.
- [28] Koch A, Kumar N, Weber L, Keller H, Imani J, Kogel KH. Host-induced gene silencing of cytochrome P450 lanosterol C14 $\alpha$ -demethylase-encoding genes confers strong resistance to *Fusarium* species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(48): 19324–19329.
- [29] Ichinose H. Molecular and functional diversity of fungal cytochrome P450s. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2012, 35(6): 833–837.

## Characterization of cytochrome P450 gene *Vmcyp5* in *Valsa mali*

Mingyu Gao, Yuxing Wu, Baitao Zhu, Xiaoning Gao, Hao Feng, Lili Huang\*

State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China

**Abstract:** [Objective] Cytochrome P450 (CYP) plays a significant role in mycotoxin metabolism of necrotrophic fungus and may be related to pathogenicity. The objective of the study was to reveal the function of CYP genes in infection process. [Methods] The knockout cassette was constructed using Double-joint PCR and mutants were obtained and confirmed by PEG-mediated transformation of protoplasts, PCR and Southern blotting analysis. Gene complemented mutants were constructed by gap repair technology. The PDA routine culture was selected to analyze the vegetative growth of mutants. *In vitro* inoculation to apple twigs was used to detect the pathogenicity. Salient differences were analyzed by SPSS and qRT-PCR was used to detect the expression of melanin gene cluster. [Results] Compared with the original strain 03-8, the colony color of deletion mutant changed from light yellow to white, and the amount of propagulum reduced by 51.3%. The relative expression level of *Vmcyp5*-knockout mutant was assayed by qRT-PCR, and mutant's melanin gene cluster was down-regulated. More importantly, the pathogenicity of deletion mutant was decreased by 24.5%. Complementation mutant was almost back to the level of the original strain 03-8 in colony color, propagulum and pathogenicity. [Conclusion] *Vmcyp5* may be related to melanin biosynthesis and propagulum formation, and participates in pathogen process of *Valsa mali*.

**Keywords:** *Valsa mali*, Cytochrome P450, gene knockout, pathogenicity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31471732, 31671982)

\*Corresponding author. Tel: +86-29-87091312, E-mail: huanglili@nwsuaf.edu.cn

Received: 19 March 2017; Revised: 24 April 2017; Published online: 16 May 2017