



## 油茶果生炭疽菌小分子 GTP 酶 Rab7 的功能研究

吴泳仪, 李琳, 李河\*

中南林业科技大学, 南方人工林病虫害防控国家林草局重点实验室, 森林有害生物防控湖南省重点实验室, 经济林培育与保护教育部重点实验室, 湖南 长沙 410004

吴泳仪, 李琳, 李河. 油茶果生炭疽菌小分子 GTP 酶 Rab7 的功能研究. 微生物学报, 2022, 62(7): 2509–2520.  
Wu Yongyi, Li Lin, Li He. Function of small GTPase Rab7 in *Colletotrichum fructicola*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2022, 62(7): 2509–2520.

**摘要:**【目的】炭疽病是油茶的一种重要病害, 果生炭疽菌是油茶炭疽病的主要致病菌。本文对果生炭疽菌小分子 GTP 酶 Rab7 进行研究, 为油茶炭疽病的防控治理提供依据。【方法】构建 *CfRAB7* 基因敲除载体, 通过 PEG 介导的原生质体转化、抗性筛选和 PCR 电泳验证获得果生炭疽菌突变体菌株  $\Delta CfRab7$  和互补菌株  $\Delta CfRab7/CfRAB7$ 。进一步分析 *CfRAB7* 基因敲除突变体  $\Delta CfRab7$  的生长、产孢、附着孢的形成、胁迫应答、液泡融合和致病力等生物学表型。【结果】在 PDA 和 MM 培养基上, 突变体  $\Delta CfRab7$  的菌落直径显著减小, 产孢量和附着孢形成率显著降低, 且不能穿透玻璃纸; 在 10 mmol/L  $H_2O_2$  条件下,  $\Delta CfRab7$  生长受到明显抑制; 进一步研究发现突变体  $\Delta CfRab7$  液泡无法正常融合, 在油茶有伤和无伤的幼叶上均不发病。【结论】*CfRAB7* 基因参与调控果生炭疽菌生长产孢、附着孢形成、 $H_2O_2$  胁迫应答、液泡融合和致病力。

**关键词:** 油茶; 果生炭疽菌; Rab7; 致病力

基金项目: 国家自然科学基金(32071765)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32071765)

\*Corresponding author. E-mail: csuftlihe@163.com

Received: 5 September 2021; Revised: 21 February 2022; Published online: 7 March 2022

## Function of small GTPase Rab7 in *Colletotrichum fructicola*

WU Yongyi, LI Lin, LI He\*

Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Control of Diseases and Pests of South Plantation, Hunan Provincial Key Laboratory for Control of Forest Diseases and Pests, Key Laboratory for Non-Wood Forest Cultivation and Conservation of Ministry of Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China

**Abstract:** [Objective] Anthracnose, a major disease of tea-oil tree (*Camellia oleifera*), is mainly caused by *Colletotrichum fructicola*. In this study, we investigated the biological function of the small-molecule GTPase Rab7 of *C. fructicola*, aiming to provide a theoretical basis for the prevention and control of anthracnose. [Methods] The *CfRAB7* gene knockout vector was constructed based on the principle of homologous recombination. After PEG-mediated protoplast transformation, resistance screening, and verification by PCR and electrophoresis, the mutant strain  $\Delta CfRab7$  and the complementary strain  $\Delta CfRab7/CfRAB7$  were obtained. The growth, sporulation, appressorium formation, stress response, and other biological characteristics of  $\Delta CfRab7$  were explored. [Results] On the PDA and MM plates,  $\Delta CfRab7$  showcased significantly decreased colony diameter, spore production, and appressorium formation.  $\Delta CfRab7$  failed to penetrate cellophane. The oxidative stress ( $H_2O_2$ ) had higher inhibition rate on the growth of  $\Delta CfRab7$  than on that of WT and  $\Delta CfRab7/CfRAB7$ .  $\Delta CfRab7$  did not cause disease spot on the leaves of *Ca. oleifera*. Furthermore, CfRab7 was required for homotypic vacuole fusion, which was essential for pathogen invasion. [Conclusion] Our findings reveal that *CfRAB7* gene plays a vital role in the growth, sporulation, appressorium formation, oxidative stress response, homotypic vacuole fusion, and pathogenicity of *C. fructicola*.

**Keywords:** *Camellia oleifera*; *Colletotrichum fructicola*; Rab7; pathogenicity

油茶树(*Camellia oleifera*)主要分布在中国南方丘陵山地, 具有极高的经济、生态和社会效益<sup>[1]</sup>。茶油是油茶籽的重要产物, 拥有高达90%的不饱和脂肪酸, 是一种营养价值丰富的食用油<sup>[2]</sup>。贫困山区大面积种植油茶能带动社会的脱贫致富, 实现乡村振兴<sup>[3]</sup>。炭疽病是油茶的主要病害, 导致巨大的经济损失<sup>[4]</sup>。阐明致病菌的作用机制对防控油茶炭疽病和促进油茶产业的健康发展具有十分重要的意义。

囊泡是真核细胞中十分常见的膜泡结构。在真核细胞中, 囊泡通过与目标细胞膜融合进行物质传递运输和信息交流<sup>[5-6]</sup>。小分子 GTP 酶的作用是在内体与液泡系统之间引导物质, Rab 蛋白是一种小分子 GTP 酶, 是调节囊泡形

成、运输、束缚和融合的分子开关, 特定的 Rab 蛋白募集效应因子在膜运输途径中执行不同功能<sup>[7-8]</sup>。真菌中 Rab 家族中有 Ypt1、Ypt3、Ypt4、Ypt5、Ypt6、Ypt7、Ypt8、Ypt10 和 Ypt11 等十几个亚家族<sup>[7]</sup>。研究表明, *FgRAB7* 基因参与调控禾谷镰刀菌 *Fusarium graminearum* 的生长速度、产孢、致病力以及毒素脱氧雪腐镰刀菌烯醇(deoxynivalenol, DON)的合成<sup>[9]</sup>。张小龙等研究表明, VmRab7 调控苹果树腐烂病菌 *Valsa mali* 营养生长、产孢、液泡融合和致病力<sup>[10]</sup>。粟酒裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 中 Rab7 蛋白的同源物 Ypt7 蛋白调控从内体到液泡的运输和同型液泡融合的过程<sup>[11]</sup>。

前期研究发现, 果生炭疽菌 *Colletotrichum*

*fructicola* 是油茶炭疽病的优势致病菌<sup>[12-14]</sup>。本研究在果生炭疽菌中鉴定到囊泡运输相关小 G 蛋白 Rab7, 通过同源重组原理, 敲除该蛋白编码基因, 测定突变体的生物学表型, 为进一步阐明 CfRab7 调控果生炭疽菌致病的分子机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

*C. fructicola* 野生型菌株 CFLH16 由本实验室分离保存。突变体菌株  $\Delta$ Cfrab7 和互补菌株  $\Delta$ Cfrab7/CfRAB7 由本研究获得。大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞购于上海唯地生物技术有限公司。酵母菌株 XK-125 由本实验室保存。

### 1.2 Rab7 系统发育分析

采用姚权等<sup>[1]</sup>描述的方法, 在果生炭疽菌全基因组数据库 (ANPB00000000.2) 中获得了 *Saccharomyces cerevisiae* 中 ScYpt7 同源蛋白 CfRab7 的氨基酸序列, 并进行系统发育分析。

### 1.3 基因敲除突变体的获得

#### 1.3.1 构建目的基因敲除载体

根据同源重组原理构建果生炭疽菌 CfRAB7 基因敲除载体。以 CFLH16 的全基因组为模板, 用引物 Rab7-1F/Rab7-2R 和 Rab7-3F/Rab7-4R 分别进行 PCR 扩增, 得到 CfRAB7 基因编码区上、下游各 1 kb 左右的 DNA 片段, 把这 2 个 DNA 片段作为外源抗性基因 HPH 的上、下臂; 以潮霉素基因为模板, 利用 Hyg-F/Hyg-R 引物通过 PCR 扩增出潮霉素抗性基因片段。再以 Rab7-1F、Rab7-4R 为引物, 以上、下臂和潮霉素基因片段为模板, 通过 PCR 融合扩增出 CfRAB7 基因敲除载体片段。

#### 1.3.2 CFLH16 原生质体转化和 PCR 电泳验证

原生质体制备以 0.7 mol/L 氯化钠为稳渗剂, 混合溶解溶壁酶、崩溃酶和几丁质酶 3 种

酶, 30 °C 条件下 60 r/min 酶解培养 2 d 的菌丝球 4 h, 获得大量原生质体。遗传转化采用肖宇等<sup>[15]</sup>描述的方法。用 CfRAB7 基因内部引物 Rab7-7F/Rab7-8R 和臂外引物 Rab7-5F/H855R 分别扩增并进行电泳验证。引物 Rab7-7F/Rab7-8R 不能扩增出条带, 而引物 Rab7-5F/H855R 能扩增出单一目的条带的转化子为 CfRAB7 基因敲除突变体。本文所用引物见表 1。

### 1.4 $\Delta$ Cfrab7/CfRAB7 互补菌株的获得

#### 1.4.1 构建 GFP-目的基因片段

以野生型菌株 CFLH16 为模板, 利用 Rab7-9F/Rab7-10R 和 Rab7-11F/Rab7-12R 引物 PCR 扩增 CfRAB7 基因的启动子和基因序列。利用引物 GFPF/GFPR 扩增出 GFP 基因片段。采用 Rab7-9F/Rab7-12R 引物通过 PCR 融合扩增出 GFP-目的基因片段。

#### 1.4.2 酵母转化

采用姚权等<sup>[1]</sup>描述的方法将 GFP-CfRab7 基因与 pYF11 质粒载体共转化至 XK-125 酵母。将长出的酵母转化子接种于 YPD 液体培养基在 30 °C、200 r/min 摇床上振荡培养 12 h, 提取酵母转化子质粒, 利用目标基因内部引物 Rab7-7F/Rab7-8R 进行 PCR 扩增、电泳验证鉴定阳性克隆。

#### 1.4.3 大肠杆菌转化

提取阳性克隆酵母体内的质粒, 将其转化进入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中, 利用含氨苄抗生素的 LB 培养基筛选培养, 将长出的大肠杆菌转化子置于 LB 液体培养基在 37 °C、220 r/min 摇床上振荡培养 12 h, 提取质粒, 用引物 Rab7-7F/Rab7-8R 进行 PCR 扩增、电泳验证鉴定并测序。

#### 1.4.4 荧光验证

用灭菌牙签挑取少量转化子菌落边缘菌丝到干净的玻片上和接种到 PDA 培养基上, 在荧

表 1 本研究涉及的引物序列

Table 1 Primer sequences used in the study

Primer name	Primer sequences (5'→3')	Purpose
Rab7-1F	TTGCGGAGTGCAATCCACTA	Amplify <i>CfRAB7</i> 5' flank sequence
Rab7-2R	TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCCGTGGATCTGGTGCGT CGGG	Amplify <i>CfRAB7</i> 5' flank sequence
Rab7-3F	CAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGGCAGATTCTTGGTTGAG CAG	Amplify <i>CfRAB7</i> 3' flank sequence
Rab7-4R	CATGCAGTCGGCACGATTAT	Amplify <i>CfRAB7</i> 3' flank sequence
Rab7-5F	AAGAACCTGGATCTGAACGG	Validation of <i>CfRAB7</i> gene deletion
H855R	GCTGATCTGACCAGTTGC	Validation of <i>CfRAB7</i> gene deletion
Rab7-7F	TGTCGGCAAGACGAGTTTGA	Amplify <i>CfRAB7</i> gene sequence
Rab7-8R	TGCTCGACGTTGATAGCCTC	Amplify <i>CfRAB7</i> gene sequence
Rab7-9F	ACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACTCAAATTGGTTATCAGCAG CGTCGTACGCGTC	Amplify complemented sequence
Rab7-10R	CCTCGCCCTTGCTCACCATCGTGGATCTGGTGCGTCGG	Amplify complemented sequence
Rab7-11F	GCATGGACGAGCTGTACAAGATGTCATCGAGAAAGAAGGTCC	Amplify complemented sequence
Rab7-12R	CACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACTTAGCAG GCGCAGCCGTCC	Amplify complemented sequence
GFPF	ATGGTGAGCAAGGGCGAGG	Amplify <i>GFP</i> gene sequence
GFPR	CTTGACAGCTCGTCCATGC	Amplify <i>GFP</i> gene sequence
Hyg-F	CTCTATTCTTTGCCCTCG	Amplify <i>HPH</i> gene sequence
Hyg-R	GCTGATCTGACCAGTTGC	Amplify <i>HPH</i> gene sequence

光显微镜下观察菌丝荧光表达的情况，选取荧光最亮的转化子作为本研究的互补菌株  $\Delta Cf_{rab7}/CfRAB7$ 。

## 1.5 突变体生物学表型测定

### 1.5.1 在不同培养基上的生长速率测定

使用打孔器( $\Phi=6$  mm)分别在野生型、*CfRAB7* 基因敲除突变体和互补菌株  $\Delta Cf_{rab7}/CfRAB7$  菌落边缘切取菌饼，将其分别接种于 PDA 和 MM (minimal medium) 培养基上。28 °C 培养 3 d 后，测量菌落直径大小，横切 PDA 上的菌落观察菌丝生长状况，记录数据并拍照。每个菌株设 3 个重复，每个试验重复 3 遍。

### 1.5.2 不同外界胁迫对突变体的影响

使用打孔器( $\Phi=6$  mm)切取野生型、突变体  $\Delta Cf_{rab7}$  和互补菌株  $\Delta Cf_{rab7}/CfRAB7$  菌落边缘的菌饼，将其分别接种于含 1 mol/L NaCl、10 mmol/L  $H_2O_2$  和空白的 PDA 培养基上，以空

白的 PDA 培养基上接种的菌落为试验对照组，然后将其置于 28 °C 条件下培养 3 d，测量每个菌落的直径大小，记录数据并拍照。每个菌株设 3 个重复，每个试验重复 3 次。

### 1.5.3 玻璃纸穿透试验

在无菌环境下，将灭菌后的玻璃纸平整贴在 PDA 培养基上。使用打孔器( $\Phi=6$  mm)切取野生型、*CfRAB7* 基因敲除突变体和互补菌株  $\Delta Cf_{rab7}/CfRAB7$  菌落边缘的菌饼，将其分别接种于玻璃纸上。于 28 °C 黑暗条件下培养 2 d 后，拍照记录，去除玻璃纸，继续培养 2 d，拍照记录。每个菌株设 3 个重复，每个试验重复 3 次。

### 1.5.4 基因敲除突变体致病力试验

使用打孔器切取野生型、突变体  $\Delta Cf_{rab7}$ 、互补菌株  $\Delta Cf_{rab7}/CfRAB7$  菌落边缘的菌饼和空白 PDA 圆饼，将 3 种菌饼和空白对照分别接种

于针尖刺伤或无伤的另一油茶幼嫩叶片边缘, 共接种 6 片嫩叶(有伤和无伤叶片各 3 片)。28 °C 恒温、保湿培养 3 d 后, 测量 3 个菌株的病斑大小, 记录数据并拍照。该试验重复 3 次。

### 1.5.5 分生孢子的生长状况和附着孢的形成

对野生型菌株、突变体 $\Delta Cfrab7$  和互补菌株 $\Delta Cfrab7/CfRAB7$  用手术刀各切取 30 块约 1 mm×1 mm 大小的菌块, 分别置于装有 100 mL PDB 的三角瓶中, 28 °C 黑暗培养 2 d。野生型、突变体 $\Delta Cfrab7$  和互补菌株的培养液各取 10  $\mu$ L 于血球计数板上, 统计分子孢子数。每个菌株 3 组重复, 每个试验重复 3 次。过滤培养液, 12 000 r/min 离心 1 min 沉淀分生孢子, 用无菌水洗涤残留的营养液 5 次, 取分生孢子液于疏水玻片上, 使用显微镜观察附着孢的形态并统计其形成数量。

### 1.5.6 突变体液泡融合实验

将上述菌株的菌丝块置于 PDB 培养基中,

28 °C、160 r/min 条件下培养 2 d, 对 3 种菌株的菌丝进行中性红染色 5–10 min; 接着用 0.5 mol/L NaCl 溶液处理 15 min; 进一步使用无菌水处理 3 种菌株的菌丝 2–4 h, 观察比较每一种处理的结果。

### 1.6 数据分析

图表数据通过 Excel 2013 进行差异显著性分析并作数据图<sup>[16]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 CfRab7 蛋白的鉴定及系统发育树分析

在果生炭疽菌的全基因组中鉴定到一个 ScRab7 的同源蛋白 CfRab7, 基因全长 981 bp, 共编码 205 个氨基酸(GenBank: KAF4489452.1), 含有一个 RAB 结构域(图 1A)。系统发育分析表明, 果生炭疽菌 CfRab7 氨基酸序列与暹罗炭疽菌 CsRab7 氨基酸序列同源性最高, 与酿酒酵母遗传距离较远(图 1B)。

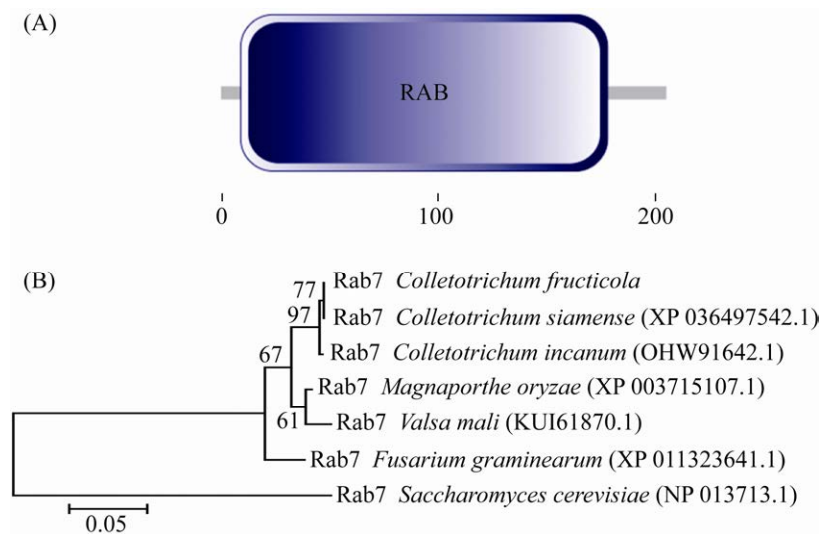


图 1 CfRab7 结构域预测以及系统发育分析

Figure 1 Domain prediction and phylogenetic analysis of CfRab7. A: the structure of CfRab7 was predicted using by the SMART website (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). B: the phylogenetic tree was constructed using Mega 7.0 software. The number on the evolutionary tree branch indicates the support rate, 0.05 is the scale bar, indicating the branch length. The number after each reference taxon is GenBank accession number of amino acid sequence orthologous to CfRab7.

## 2.2 $\Delta Cfrab7$ 突变体的获得

根据同源重组原理构建基因敲除载体片段, 构建策略参考文献[15]所述方法(图 2A)。通过野生型原生质体转化获得转化子, 用引物 Rab7-7F/Rab7-8R 和 Rab7-5F/H855R 进行验证。目标基因内部引物 Rab7-7F/Rab7-8R 在转化子基因组中扩增不出条带, 且在野生型基因组中能扩增出单一条带。目标基因上游引物 Rab7-5F 和潮霉素基因内部引物 H855R 在转化子基因组中扩增出单一条带, 而在野生型菌株上未扩增出条带(图 2B)。综合上述检测结果, 成功获得果生炭疽菌的突变体  $\Delta Cfrab7$ 。荧光显微镜下筛选获得互补菌株  $\Delta Cfrab7/CfRAB7$ ; 进一步利用引物进行 PCR 验证, Rab7-7F/Rab7-8R 和 Rab7-5F/H855R 2 对引物均能以互补菌株  $\Delta Cfrab7/CfRAB7$  基因组 DNA 为模板扩增出相应的条带, 说明互补成功(图 2B)。

## 2.3 $CfRAB7$ 基因的缺失影响果生炭疽菌的营养生长

对野生型 CFLH16、突变体  $\Delta Cfrab7$  和互补菌株  $\Delta Cfrab7/CfRAB7$  的生长情况进行观察(图 3A)。结果显示突变体  $\Delta Cfrab7$  的气生菌丝显著减少(图 3B), 野生型、突变体  $\Delta Cfrab7$  和互

补菌株  $\Delta Cfrab7/CfRAB7$  在 PDA 培养基上生长 3 d 的菌落平均直径分别为 5.65、3.78 和 5.36 cm, 在 MM 培养基上生长 3 d 的菌落平均直径分别为 4.85、1.14 和 4.67 cm。统计学分析表明, 在 PDA 和 MM 培养基上, 突变体  $\Delta Cfrab7$  的菌落直径显著减小, 与野生型和互补菌株的菌落直径差异极显著 ( $P < 0.01$ , 图 3C)。实验结果表明  $CfRAB7$  基因的缺失影响果生炭疽菌的营养生长。

## 2.4 $CfRAB7$ 基因的缺失影响果生炭疽菌分生孢子和附着孢的形成

对野生型、突变体  $\Delta Cfrab7$  和互补菌株  $\Delta Cfrab7/CfRAB7$  的分生孢子和附着孢形成率进行了研究, 结果见图 4A–B。结果显示, 野生型 CFLH16 的分生孢子数约为  $1.01 \times 10^7$  个, 互补菌株的分生孢子数约为  $0.72 \times 10^7$  个, 而突变体  $\Delta Cfrab7$  的分生孢子数约为  $4.85 \times 10^5$  个, 表明  $CfRAB7$  基因的敲除导致菌株产孢量极显著减少(图 4C)。进一步研究发现, 突变体  $\Delta Cfrab7$  附着孢形成率为 9.64%, 显著低于野生型和互补菌株附着孢形成率 83.53% 和 77.25% (图 4D)。研究结果表明  $CfRAB7$  基因的缺失影响果生炭疽菌分生孢子和附着孢的形成。

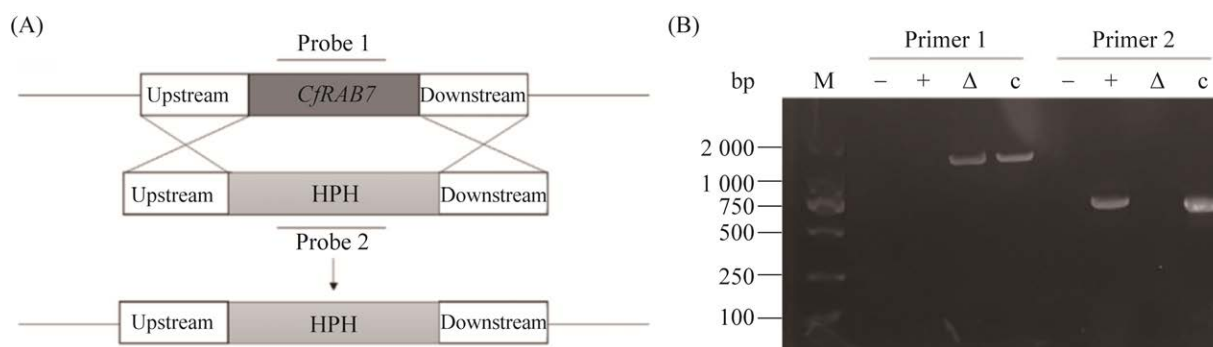


图 2  $CfRAB7$  基因敲除突变体的获得

Figure 2 Acquisition of the gene deletion mutants of  $CfRAB7$ . A: schematic diagram of the deletion strategy for the  $CfRAB7$  gene. B: primer1 is Rab7-5F/H855R, primer2 is Rab7-7F/Rab7-8R; M: DL2000 marker; -:  $H_2O$  negative control; +: WT positive control;  $\Delta$ : mutant  $\Delta Cfrab7$ ; c: complemented strain  $\Delta Cfrab7/CfRAB7$ .

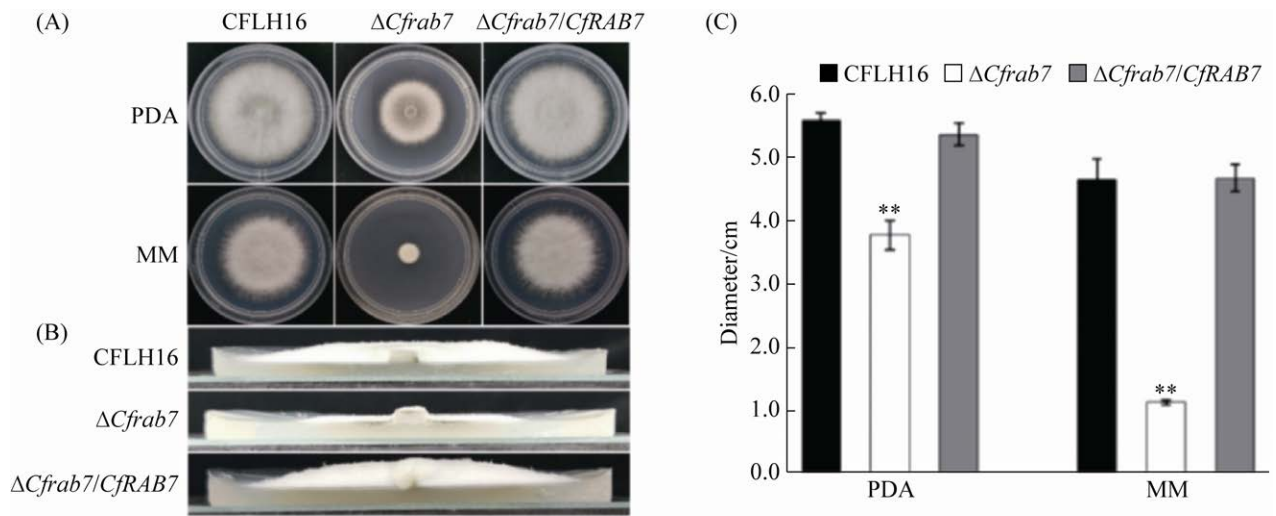


图3 不同菌株的生长速率测定

Figure 3 Growth rate determination of different strains of *Colletotrichum fructicola*. A: growth of wild type,  $\Delta Cfrab7$  mutant and  $\Delta Cfrab7/CfRAB7$  complementary strain on PDA and MM media. B: the aerial mycelium growth of wild type,  $\Delta Cfrab7$  mutant and  $\Delta Cfrab7/CfRAB7$  complementary strain on PDA media. C: statistical analysis of mycelium growth rate (\*\*:  $P < 0.01$ ). Error bars represent means  $\pm$  SD from three independent replicates.

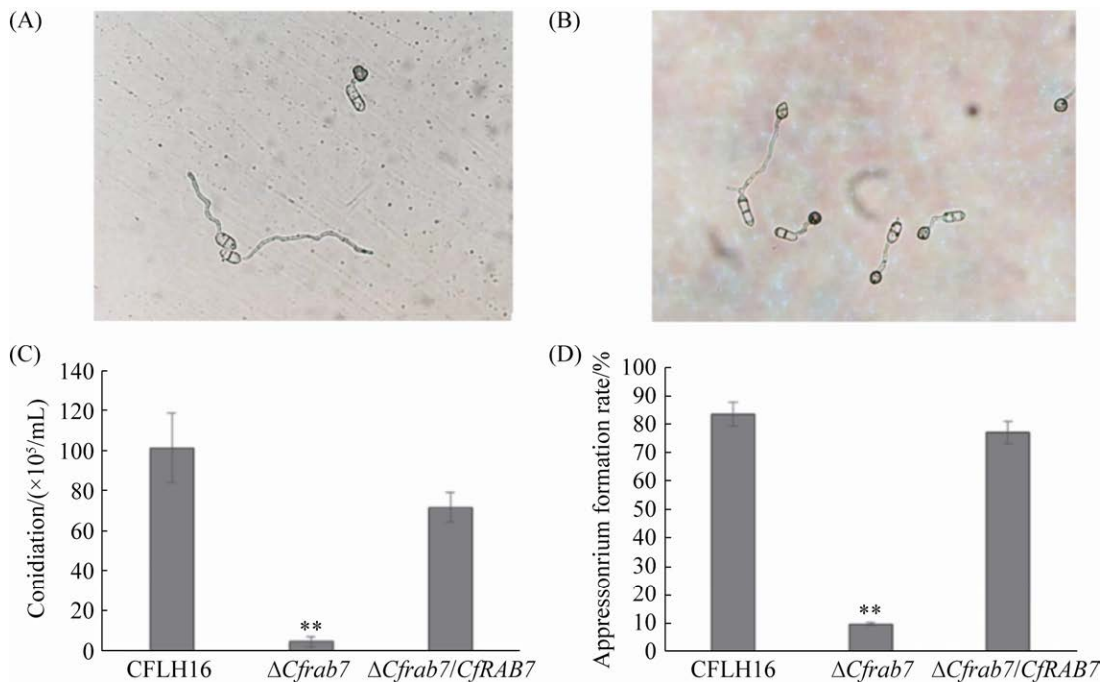


图4 突变体 $\Delta Cfrab7$ 的产孢量和附着孢形成率统计分析

Figure 4 Statistical analysis of spore production and the appressorium formation of mutant  $\Delta Cfrab7$ . A: the appressorial formation of  $\Delta Cfrab7$ . B: the appressorial formation of wild type. C: statistical analysis of the conidia production. D: statistical analysis of the appressorium formation rate. Asterisks indicate significant differences ( $P < 0.01$ ). Error bars represent means  $\pm$  SD from three independent replicates.

## 2.5 *CfRAB7* 基因的缺失影响果生炭疽菌响应 $H_2O_2$ 胁迫

氧化胁迫结果表明, 在含 10 mmol/L  $H_2O_2$  的 PDA 培养基上, 野生型、互补菌株  $\Delta CfRAB7/CfRAB7$  和突变体  $\Delta CfRAB7$  的抑制率分别为 41.82%、42.75% 和 63.99%, 突变体  $\Delta CfRAB7$  的生长抑制率显著高于野生型和互补菌株, 差异极显著(图 5A–B), 表明 *CfRAB7* 基因的缺失影响果生炭疽菌响应  $H_2O_2$  的胁迫过程。

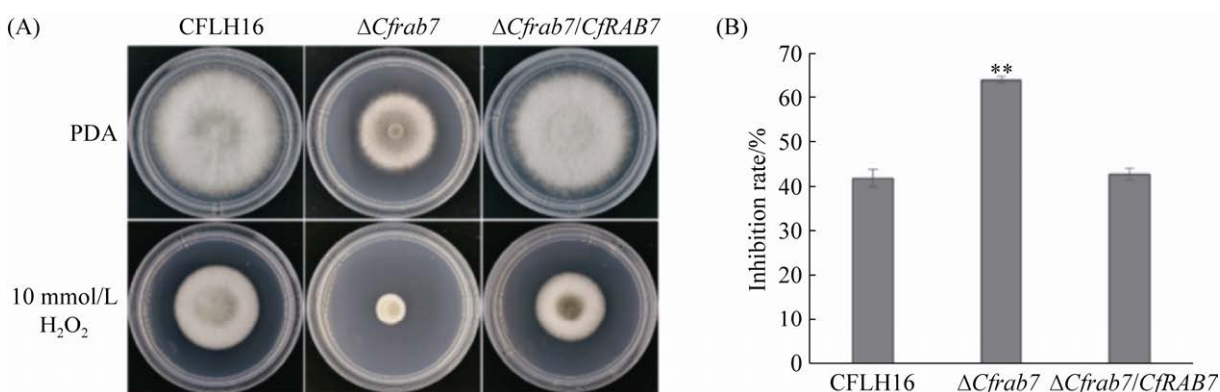


图 5 突变体  $\Delta CfRAB7$  的氧化胁迫敏感性测定

Figure 5 Oxygen stress sensitivity test of  $\Delta CfRAB7$  mutant. A: the growth of wild type, mutant  $\Delta CfRAB7$  and complementary strain  $\Delta CfRAB7/CfRAB7$  on PDA medium containing 10 mmol/L  $H_2O_2$ . B: statistical analysis of growth inhibition rate of strains (\*\*:  $P < 0.01$ ). Error bars represent means  $\pm$  SD from three independent replicates.

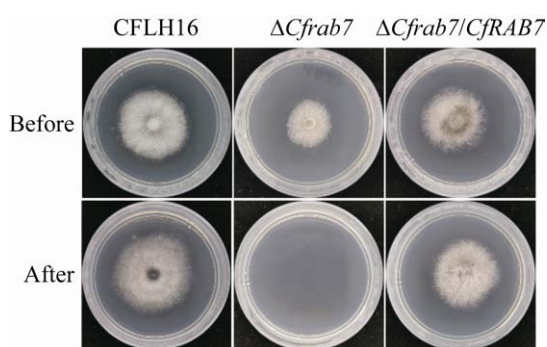


图 6 突变体  $\Delta CfRAB7$  的玻璃纸穿透试验

Figure 6 Cellophane penetration of mutant  $\Delta CfRAB7$  into cellophane membrane. Before: the growth status of wild type, mutant  $\Delta CfRAB7$  and complementary strain  $\Delta CfRAB7/CfRAB7$  on cellophane for 2 d; After: the growth status of colonies of the strains after removing the cellophane.

## 2.6 $\Delta CfRAB7$ 突变体不能穿透玻璃纸

果生炭疽菌穿透油茶叶细胞壁是其致病的首要条件。以玻璃纸模拟油茶叶的细胞壁, 将野生型、突变体  $\Delta CfRAB7$  和互补菌株  $\Delta CfRAB7/CfRAB7$  的菌饼分别接种至玻璃纸上培养, 结果发现玻璃纸去除后, 野生型和互补菌株均能继续长出菌落, 而  $\Delta CfRAB7$  突变体则没有长出菌落(图 6), 说明 *CfRAB7* 基因的缺失影响果生炭疽菌的穿透力。

## 2.7 $\Delta CfRAB7$ 突变体致病力丧失

野生型、突变体  $\Delta CfRAB7$  和互补菌株  $\Delta CfRAB7/CfRAB7$  致病力测定结果表明, 突变体  $\Delta CfRAB7$  在有伤或无伤的叶子上均不能形成病斑, 而野生型和互补菌株  $\Delta CfRAB7/CfRAB7$  均能引起明显的病斑(图 7)。说明 *CfRAB7* 基因的缺失影响果生炭疽菌的致病力。

## 2.8 *CfRAB7* 基因的缺失影响果生炭疽菌液泡融合

液泡正常的分裂和融合帮助细胞内物质正常运输。使用中性红染色观察果生炭疽菌突变体  $\Delta CfRAB7$  菌丝中液泡及其融合过程。在野生型 CFLH16 和互补菌株  $\Delta CfRAB7/CfRAB7$  中, 观察



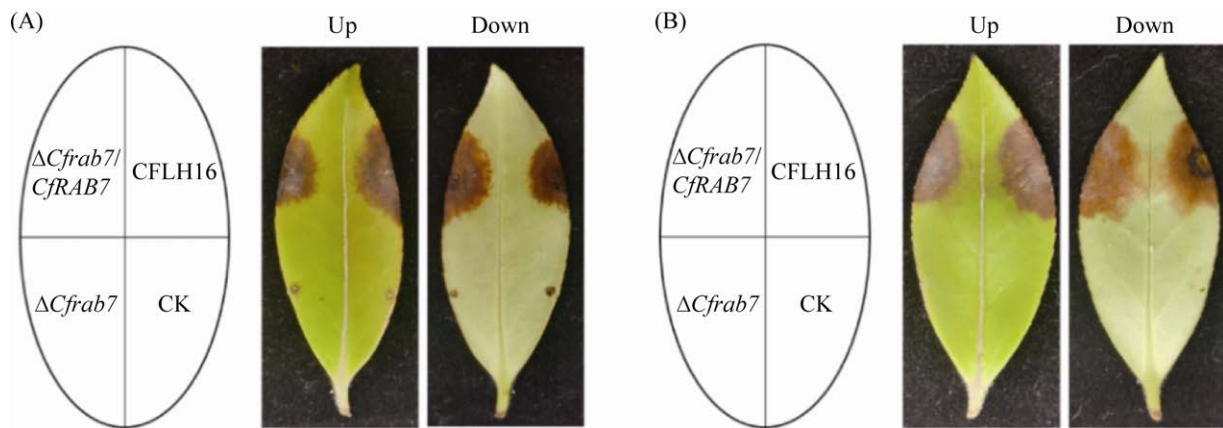


图 7 突变体 $\Delta Cfrab7$ 对油茶叶片的致病力

Figure 7 Pathogenicity of mutant  $\Delta Cfrab7$  to oil-tea leaves. A, B: pathogenicity of wild type, mutant  $\Delta Cfrab7$  and complementary strain  $\Delta Cfrab7/CfRAB7$  inoculated on injured (A) and non-injured (B) leaves. Up: up of the leaf; Down: down of the leaf.

到菌丝液泡直径约 2–5  $\mu\text{m}$ , 较均匀排列。而在突变体 $\Delta Cfrab7$  的菌丝细胞中充满了许多直径小于 0.5  $\mu\text{m}$  的小囊泡(图 8)。为了确定 $\Delta Cfrab7$  在调节液泡融合过程中的作用, 使用 0.5 mol/L NaCl 溶液和无菌水研究菌丝液泡的分裂和融合过程。结果显示, 在 NaCl 溶液处理后, 野生型和互补菌株的液泡数量更多且更小, 突变体 $\Delta Cfrab7$  囊泡大小则无明显变化(图 8)。无菌水中处理后, 野生型和互补菌株中液泡融合成较

大的液泡, 然而突变体 $\Delta Cfrab7$  的小囊泡不能融合。结果说明  $CfRAB7$  基因的缺失影响果生炭疽菌液泡融合过程。

### 3 讨论与结论

Rab7 蛋白(酵母 *ypt7* 的同源蛋白)是 Rab 蛋白家族的重要组分, 作用于晚期内体与溶酶体之间, 主要募集互作蛋白参与膜运输, 在真核生物的生长发育中起重要的作用<sup>[17-18]</sup>。本研究

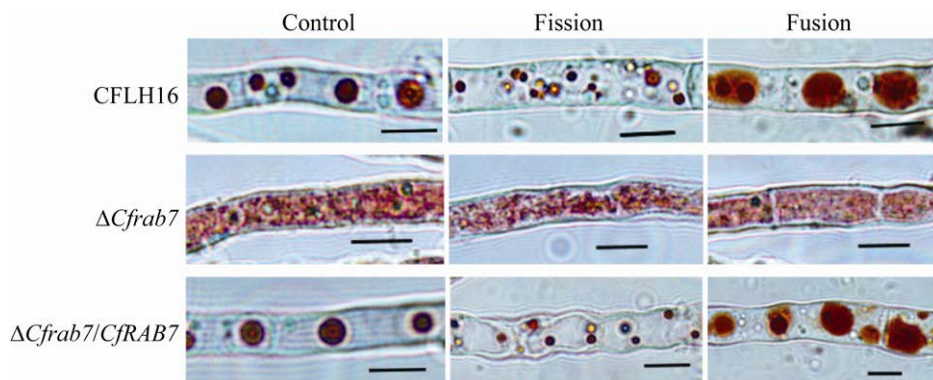


图 8 液泡融合实验

Figure 8 Homotypic vacuolar fusion assay. Control: vacuoles were labelled with neutral red; Fission: in 0.5 mol/L NaCl solution; Fusion: hyphae were further incubated in water. Scale bar=10  $\mu\text{m}$ .

对油茶果生炭疽菌的 *CfRAB7* 基因进行敲除, 并测定  $\Delta Cf\text{rab}7$  菌株的生物学功能, 为阐明其参与调控致病的分子机制提供理论依据。研究发现, 果生炭疽菌 *CfRAB7* 基因敲除突变体  $\Delta Cf\text{rab}7$  菌株在 PDA 和 MM 培养基上生长速率极显著下降、气生菌丝稀疏, 表明 *CfRAB7* 基因参与调控果生炭疽菌菌丝生长过程; 其中, 突变体  $\Delta Cf\text{rab}7$  菌株在 MM 基本培养基上生长更慢, 可能是该基因的缺失导致突变体菌株丧失了合成某种(或某些)物质的能力, 例如氨基酸、碱基和维生素等, 导致在 MM 培养基中生长变得更加困难, 而在营养较丰富的 PDA 培养基上含有相应的生长因子, 生长速率则相对大一些。Liu 等<sup>[19]</sup>研究发现稻瘟菌 *M. oryzae* 突变体  $\Delta Mo\text{ypt}7$  的气生菌丝稀疏。李颖<sup>[20]</sup>研究发现, 在禾谷镰刀菌中 *RAB7* 基因敲除突变体的生长速率下降。在苹果树腐烂病菌 *Valsa mali* 中, *VMRAB7* 基因缺失后同样导致突变体  $\Delta V\text{mrab}7$  的生长速率下降<sup>[9]</sup>。这些结果表明, *RAB7* 基因在不同的植物病原真菌中均调控菌丝生长过程, 功能比较保守。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)在植物抗病反应中起着十分重要作用, 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )是主要的活性氧成分<sup>[21]</sup>。当寄主植物受到病原菌侵染时, 会快速产生和累积 ROS, 形成活性氧并促进寄主产生过敏反应(hypersensitivity response, HR)和(或)直接杀死病原菌进而抑制其侵染<sup>[22]</sup>。在侵染寄主植物的过程中, 病原菌必须迅速的响应活性氧胁迫。在稻瘟病菌 *M. oryzae* 中, 转录因子 MoAp1 在病菌侵染过程中最重要的作用就是参与活性氧的清除<sup>[21]</sup>。本实验室前期研究也发现, 果生炭疽菌的转录因子 CfAp1 参与调控了病菌对外界氧压胁迫的应答过程<sup>[23]</sup>。本研究结果表明, 果生炭疽菌 *CfRAB7* 基因敲除突变体  $\Delta Cf\text{rab}7$  对  $\text{H}_2\text{O}_2$  胁迫

十分敏感, 表明小 G 蛋白 Rab7 参与果生炭疽菌响应活性氧胁迫过程。

附着胞是病原真菌侵染寄主植物的关键结构, 可形成针状侵染钉, 以侵入宿主的角质表皮而吸取养料。Liu 等<sup>[19]</sup>对稻瘟病菌 *M. oryzae* 研究发现,  $\Delta Mo\text{ypt}7$  突变体附着胞发育缺陷, 在水稻叶子、根部和大麦叶子上致病力丧失。本实验室前期研究也发现, *CfHAC1*、*CfMKK1*、*CfAPI* 和 *CfATG8* 基因通过调控果生炭疽菌的附着胞的形成进而影响致病力<sup>[1,15,23-24]</sup>。本研究发现, *CfRAB7* 基因敲除后果生炭疽菌致病力丧失, 进一步研究发现突变体  $\Delta Cf\text{rab}7$  附着胞形成率下降且不能穿透玻璃纸, 这可能是果生炭疽菌丧失致病力的主要原因。

液泡是一种由生物膜包被的细胞器, 对真核生物的营养储存、大分子物质降解和离子平衡具有十分重要的作用<sup>[25]</sup>。在丝状真菌中, 液泡对真菌生长、分化、自噬和致病性具有十分重要的作用<sup>[26]</sup>。液泡的形成需要一系列的囊泡融合和分裂。Yang 等<sup>[27]</sup>的研究发现, CmVps39 调控盾壳霉的囊泡融合过程。在本研究中, 突变体  $\Delta Cf\text{rab}7$  的囊泡也不能正常融合较大的液泡, 说明 *CfRAB7* 基因可能通过参与调控果生炭疽菌的液泡融合过程, 进而参与调控其生物学功能。

果生炭疽菌是油茶的优势流行致病菌, 本研究在该病菌的全基因组数据库中鉴定到了一个分子 GTP 酶 CfRab7 蛋白基因, 通过对该蛋白基因的功能进行研究, 我们提出了 CfRab7 的作用机制: CfRab7 可能通过参与果生炭疽菌的液泡融合过程, 进而影响其生长发育并调控侵染结构附着胞的形成以及应答寄主活性氧胁迫, 最终完成对寄主植物的侵染过程。研究结果为进一步深入阐明 CfRab7 调控油茶果生炭疽菌致病的分子机理奠定了基础, 同时

为以 CfRab7 及其调控的基因网络为药物靶标开发新型杀菌剂提供理论依据。

## 参考文献

- [1] 姚权, 郭源, 魏丰园, 李司政, 张盛培, 李河. bZIP 转录因子 CfHac1 参与调控果生刺盘孢菌的生长发育和致病力. 菌物学报, 2019, 38(10): 1643–1652.  
Yao Q, Guo Y, Wei FY, Li SZ, Zhang SP, Li H. A bZIP-type transcription factor CfHac1 is involved in regulating development and pathogenesis in *Colletotrichum fructicola*. *Mycosystema*, 2019, 38(10): 1643–1652. (in Chinese)
- [2] 李志钢, 马力, 陈永忠, 彭邵锋, 李美群, 张震, 许彦明, 唐炜. 我国油茶籽的综合利用现状概述. 绿色科技, 2018 (6): 191–194.  
Li ZG, Ma L, Chen YZ, Peng SF, Li MQ, Zhang Z, Xu YM, Tang W. Study on the comprehensive utilization of oil-tea *Camellia* seed. *Journal of Green Science and Technology*, 2018(6): 191–194. (in Chinese)
- [3] 李志萌, 张宜红, 杨志诚. 乡村振兴战略背景下我国油茶产业发展研究. 农林经济管理学报, 2017, 16(6): 809–816.  
Li ZM, Zhang YH, Yang ZC. Research on the development of oil tea industry in the background of rural revitalization strategy. *Journal of Agro-Forestry Economics and Management*, 2017, 16(6): 809–816. (in Chinese)
- [4] 靳爱仙, 周国英, 李河. 油茶炭疽病的研究现状、问题与方向. 中国森林病虫, 2009, 28(2): 27–31.  
Jin AX, Zhou GY, Li H. Progress, problem and prospect of oil camelliae anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) research. *Forest Pest and Disease*, 2009, 28(2): 27–31. (in Chinese)
- [5] Stenmark H. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(8): 513–525.
- [6] Zheng HW, Zheng WH, Wu CX, Yang J, Xi Y, Xie QR, Zhao X, Deng XL, Lu GD, Li GP, Ebbola D, Zhou J, Wang ZH. Rab GTPases are essential for membrane trafficking-dependent growth and pathogenicity in *Fusarium graminearum*. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(11): 4580–4599.
- [7] Hutagalung AH, Novick PJ. Role of Rab GTPases in membrane traffic and cell physiology. *Physiological Reviews*, 2011, 91(1): 119–149.
- [8] 杨永敏, 郭建, 李玉宏, 黄晓玮. Rab 蛋白在囊泡转运中的作用及影响. 中国科学: 生命科学, 2019, 49(7): 788–797.  
Yang YM, Guo J, Li YH, Huang XW. Roles of Rab proteins in vesicle transport. *Scientia Sinica: Vitae*, 2019, 49(7): 788–797. (in Chinese)
- [9] 刘新影. 禾谷镰刀菌 Rab7 基因调控 DON 毒素生物合成的分子机制研究. 河南工业大学硕士学位论文, 2016.
- [10] 张小龙, 吴淇, 田润泽, 徐亮胜, 黄丽丽. 苹果树腐烂病菌小 G 蛋白 VmRab7 基因的功能分析. 西北林学院学报, 2021, 36(2): 158–163.  
Zhang XL, Wu Q, Tian RZ, Xu LS, Huang LL. Functional analysis of small G protein VmRab7 in *Valsa mali*. *Journal of Northwest Forestry University*, 2021, 36(2): 158–163. (in Chinese)
- [11] Kashiwazaki J, Iwaki T, Takegawa K, Shimoda C, Nakamura T. Two fission yeast rab7 homologs, ypt7 and ypt71, play antagonistic roles in the regulation of vacuolar morphology. *Traffic: Copenhagen, Denmark*, 2009, 10(7): 912–924.
- [12] 李河, 周国英, 徐建平, 朱丹雪. 一种油茶新炭疽病原的多基因系统发育分析鉴定. 植物保护学报, 2014, 41(5): 602–607.  
Li H, Zhou GY, Xu JP, Zhu DX. Pathogen identification of a new anthracnose of *Camellia oleifera* in China based on multiple-gene phylogeny. *Journal of Plant Protection*, 2014, 41(5): 602–607. (in Chinese)
- [13] 李河, 李杨, 徐建平, 周国英. 海南省油茶及其他寄主植物果生刺盘孢菌群体遗传结构分析. 林业科学, 2016, 52(10): 80–88.  
Li H, Li Y, Xu JP, Zhou GY. Population genetic structure of *Colletotrichum fructicola* from oil-tea and other host plants in Hainan Province. *Scientia Silvae Sinicae*, 2016, 52(10): 80–88. (in Chinese)
- [14] 李河, 李杨, 蒋仕强, 刘君昂, 周国英. 湖南省油茶炭疽病原鉴定. 林业科学, 2017, 53(8): 43–53.  
Li H, Li Y, Jiang SQ, Liu JA, Zhou GY. Pathogen of oil-tea trees anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. in Hunan Province. *Scientia Silvae Sinicae*, 2017, 53(8): 43–53. (in Chinese)
- [15] 肖宇, 李河. 丝裂原活化蛋白激酶基因 *CfMKK1* 调控果生炭疽菌的生长发育和致病力. 微生物学报, 2021, 61(1): 141–151.  
Xiao Y, Li H. MAPKK-encoding gene *CfMKK1* in *Colletotrichum fructicola* is required for its growth and pathogenicity. *Acta Microbiologica Sinica*, 2021, 61(1): 141–151. (in Chinese)
- [16] 白俊艳, 杨又兵, 李广录. Excel 在生物统计学单因

- 素方差分析中的应用. 现代农业科技, 2017(2): 271–272.
- Bai JY, Yang YB, Li GL. The application of Excel in the one-way analysis of variance in biostatistics. *Modern Agricultural Science and Technology*, 2017(2): 271–272. (in Chinese)
- [17] Pylypenko O, Hammich H, Yu IM, Houdusse A. Rab GTPases and their interacting protein partners: structural insights into Rab functional diversity. *Small GTPases*, 2018, 9(1/2): 22–48.
- [18] Stroupe C. This is the end: regulation of Rab7 nucleotide binding in endolysosomal trafficking and autophagy. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2018, 6: 129.
- [19] Liu XH, Chen SM, Gao HM, Ning GA, Shi HB, Wang Y, Dong B, Qi YY, Zhang DM, Lu GD, Wang ZH, Zhou J, Lin FC. The small GTPase MoYpt7 is required for membrane fusion in autophagy and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(11): 4495–4510.
- [20] 李颖. 囊泡运输相关蛋白 FgMon1 及其结合蛋白 FgRab5/7 在小麦赤霉菌生长发育及致病过程中的功能研究. 南京农业大学研究生论文, 2016: 45–49.
- [21] Guo M, Chen Y, Du Y, Dong YH, Guo W, Zhai S, Zhang HF, Dong SM, Zhang ZG, Wang YC, Wang P, Zheng XB. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(2): e1001302.
- [22] 张咏梅, 马晖玲, 唐云智. 豌豆白粉菌侵染对活性氧迸发规律和紫花苜蓿叶片结构的影响. 草业学报, 2016, 25(11): 34–42.
- Zhang YM, Ma HL, Tang YZ. The effect of *Erysiphe pisi* infection on the pattern of oxidative burst and on anatomic structure of leaves in *Medicago sativa*. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(11): 34–42. (in Chinese)
- [23] 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.
- Gao YL, He YG, Li H. Biological function bZIP-type transcription factor CfAp1 in *Colletotrichum fructicola*. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, 56(9): 30–39. (in Chinese)
- [24] 郭源, 李河, 周国英, 刘君昂, 张盛培. 自噬相关蛋白 CfAtg8 在果生刺盘孢中的功能分析. 菌物学报, 2021, 40(3): 592–602.
- Guo Y, Li H, Zhou GY, Liu JA, Zhang SP. Functional analysis of the autophagy-related protein CfAtg8 in *Colletotrichum fructicola*. *Mycosystema*, 2021, 40(3): 592–602. (in Chinese)
- [25] Bröcker C, Engelbrecht-Vandré SS, Ungermaun C. Multisubunit tethering complexes and their role in membrane fusion. *Current Biology*, 2010, 20(21): R943–R952.
- [26] Veses V, Richards A, Gow NA. Vacuoles and fungal biology. *Current Opinion in Microbiology*, 2008, 11(6): 503–510.
- [27] Yang XX, Cui H, Cheng JS, Xie JT, Jiang DH, Hsiang T, Fu YP. A HOPS protein, CmVps39, is required for vacuolar morphology, autophagy, growth, conidiogenesis and mycoparasitic functions of *Coniothyrium minitans*. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(11): 3785–3797.

(本文责编 张晓丽)