

# 灰葡萄孢分生孢子产生相关基因的 克隆及功能分析

王璇<sup>Δ</sup> 邢继红<sup>Δ</sup> 赵斌 韩建民\* 董金皋\*

(河北农业大学 真菌毒素与植物分子病理学实验室 河北 保定 071001)

**摘要:**【目的】克隆灰葡萄孢分生孢子产生相关基因,并研究其功能,为进一步研究灰葡萄孢分生孢子产生机理和灰葡萄孢侵染及致病机理奠定基础。【方法】通过筛选灰葡萄孢 ATMT 突变体库,获得一株不能产生分生孢子的突变菌株 BCt78,采用 PCR 和 Southern Blotting 技术,对突变菌株 BCt78 进行分子鉴定。利用 TAIL-PCR 技术获得 T-DNA 插入位点的侧翼序列;将所获得侧翼序列与灰葡萄孢基因组数据库中的已知基因序列进行 BLAST 分析,推测出 T-DNA 的插入位点;通过 PCR 进一步验证 T-DNA 的插入位点,利用 RT-PCR 技术确定突变基因;最后对突变菌株的菌落形态、生长速度、胞壁降解酶活力、粗毒素的生物活性、对番茄叶片的致病能力及部分致病相关基因的表达情况进行研究。

【结果】TAIL-PCR 结果证实 T-DNA 插入到灰葡萄孢 *BCIG\_12707.1* 基因的 ATG 起始密码子区;RT-PCR 结果证实突变基因为 *BCIG\_12707.1*,该基因 DNA 全长为 135 bp,编码一个 44 个氨基酸的假定蛋白(Hypothetical protein)。突变菌株在 PDA 培养基上菌落呈灰白色,生长速度减慢,不能产生分生孢子及菌核;对番茄叶片的致病性增强,且胞壁降解酶(PG、PMG 和 Cx)活力增强;突变菌株中参与细胞壁降解的角质酶基因 *cutA* 和多聚半乳糖醛酸酶基因 *Bcpg1*,信号转导途径基因(*PKA1*、*PKA2*、*Bac*、*Bmp3*),产毒素基因 *BcBOT2* (Sesquiterpene synthase),漆酶基因 *Lac1*,跨膜蛋白基因 *Btp1* 表达都增强。【结论】*BCIG\_12707.1* 基因在灰葡萄孢分生孢子产生、菌核形成及致病力等方面起重要作用。

**关键词:** 灰葡萄孢, T-DNA 插入突变体, TAIL-PCR, 孢子发育

基金项目: 河北省科技支撑计划项目(NO. 12226507); 河北农业大学青年科学基金项目(NO. QJ201235)

\*通讯作者: 韩建民: Tel: 86-312-7528246; 信箱: hanjianmin64@tom.com

董金皋: Tel: 86-312-7528266; 信箱: dongjingao@126.com

<sup>Δ</sup> 共同第一作者

收稿日期: 2012-04-17; 接受日期: 2012-05-25

## Cloning and functional analysis of a gene related to conidiospore formation in *Botrytis cinerea*

WANG Xuan<sup>Δ</sup> XING Ji-Hong<sup>Δ</sup> ZHAO Bin HAN Jian-Min\* DONG Jin-Gao\*

(Agricultural University of Hebei, Mycotoxin and Plant Molecular Pathology Laboratory, Baoding, Hebei 071001, China)

**Abstract: [Objective]** To further investigate molecular mechanism of conidiospore formation, infection and pathogenicity of *Botrytis cinerea*, the gene related to conidiospore formation was cloned and characterized. **[Methods]** A mutant with no conidiospore, named BCt78, was found by screening T-DNA insertional mutant library of *B. cinerea* and it was testified by PCR and Southern Blotting techniques. The flanking sequence of T-DNA insertion site was acquired by using TAIL-PCR. The sequence of the T-DNA inserted gene was obtained by scanning the *B. cinerea* gene bank. The mutant was further identified by PCR and RT-PCR respectively. The function of the gene was studied by analysing the colony morphology, growth rate, cell wall degrading enzyme activity, biological activity of crude toxin and pathogenicity of the mutant strain on tomato leaves as well as the expression level of genes related to pathogenicity. **[Results]** T-DNA insertion site was defined in the initiation codon of *BC1G\_12707.1* gene, and the mutant gene was identified as *BC1G\_12707.1* by RT-PCR technology. The full-length DNA sequence of *BC1G\_12707.1* was 135 bp, and encoded a 44 amino acids hypothetical protein. Compared to the wild type strain, the mutant strain colony was white, grew slowly, did not produce conidium and sclerotia on PDA medium, but showed stronger pathogenicity on tomato leaves and cell wall degrading enzyme activity, higher expression level of genes related to pathogenicity, such as cell wall degrading enzyme gene *cutA* and *Bcpg*, genes (*PKA1*, *PKA2*, *Bmp3* and *Bac*) involved in signal pathway, gene (*BcBOT2*) encoding sesquiterpene synthase, gene (*Lac1*) encoding melanin and transmembrane protein gene *Btp1*. **[Conclusion]** The *BC1G\_12707.1* gene was involved in conidiation, sclerotia formation and pathogenicity in *B. cinerea*.

**Keywords:** *Botrytis cinerea*, T-DNA insertional mutant, TAIL-PCR, Conidiation

灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)是半知菌亚门葡萄孢属的一种植物病原真菌,由灰葡萄孢引起的灰霉病已成为世界性病害,它可危害番茄、草莓、黄瓜、葡萄、苹果等多种蔬菜、果树以及观赏植物,引起植物幼苗猝倒、落叶、花及果实腐烂,给农业生产带来巨大的经济损失<sup>[1-3]</sup>。灰霉病是目前我国温室蔬菜生产上最主要的病害之一,一般年

份造成减产 20%–25%,严重时达到 40%以上<sup>[4]</sup>。我国黄淮、东北、西北等温室集中的地区,番茄灰霉病发生严重,田间产量损失 30%左右,严重时达 50%–70%。灰葡萄孢是典型的死体营养型非专性寄生病原真菌,致病过程被分为以下几个阶段:穿透寄主表皮,杀死寄主细胞,形成初始病斑,病斑进一步扩大,产生分生孢子,扩散后

的分生孢子可以再次侵染寄主, 因此, 病菌的分生孢子在病害循环和流行过程中起关键作用, 通过抑制病菌分生孢子的产生和发育能有效地控制或减轻病害的发生<sup>[5]</sup>。研究发现, 灰葡萄孢的分生孢子在寄主表面萌发后, 也形成附着胞, 但附着胞并没有高度黑色素化, 而且连接附着胞与分生孢子的芽管中间也缺乏隔膜, 致使附着胞内缺少足够的膨压穿透寄主表皮; 而灰葡萄孢分泌的胞外酶(角质酶、果胶甲基酯酶、寡聚半乳糖醛酸酶)通过降解寄主细胞壁可能在侵染过程中起着重要的作用<sup>[6]</sup>。灰葡萄孢产生的草酸、Botrydial 和 Botcinolides 等毒素在杀死寄主细胞过程中可能也起着重要的作用<sup>[7-8]</sup>。接种到寄主表面的菌丝体, 在生长过程中产生大量短的分枝, 并分化出球状的细胞聚合体(Bulbous cell aggregates), 一种类似于油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)在植物表面形成的侵染垫(Infection cushions)或复合附着胞(Complex appressoria)的结构, 该结构在灰葡萄孢菌丝穿透寄主表皮过程中的作用尚缺乏研究<sup>[6]</sup>。研究还发现, 灰葡萄孢信号转导途径成员的一些基因突变影响到分生孢子产生, 如: 腺苷酸环化酶编码基因<sup>[9]</sup>、异源三体 G 蛋白的  $\alpha$  亚基基因<sup>[8]</sup>、MAP 激酶编码基因<sup>[10]</sup>的突变体都丧失了分生孢子产生能力, 致病能力也发生了变化。迄今为止, 尽管人们获得的涉及附着胞穿透寄主<sup>[11]</sup>、寄主细胞壁降解<sup>[12-14]</sup>、毒素合成<sup>[15]</sup>、分生孢子产生及萌发<sup>[16-17]</sup>等方面的致病相关基因 30 多个, 但是, 人们对位于信号转导途径下游直接影响分生孢子产生的功能基因尚缺乏了解。本试验从灰葡萄孢 ATMT 突变体库中筛选到一株不能产生分生孢子的突变体, 利用 TAIL-PCR 技术获得了 T-DNA 插入位点的侧翼序列; 应用生物信息学方法, 将所获得序列与灰葡萄孢基因组数据库中基因序列进行了同源性分析, 推测出该序列所属的基因; 然后利用 PCR 技术获得了其

T-DNA 的插入位点, 并利用 RT-PCR 技术确定了突变基因; 最后通过对突变菌株的菌落形态、生长速率、几种主要细胞壁降解酶活力、粗毒素的生物活性、对番茄叶片致病能力及部分致病相关基因的表达情况等方面的分析, 初步确定突变基因的功能。为进一步研究灰葡萄孢分生孢子产生机理和灰葡萄孢侵染及致病机理奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试菌株及培养条件

灰葡萄孢: 野生型菌株 BC22 和 ATMT 转化的灰葡萄孢转化子 BCt78 均由河北农业大学真菌毒素与植物分子病理学实验室保存。培养条件: 20 °C 恒温黑暗培养。

### 1.2 灰葡萄孢分生孢子产生情况观测

分别选取 PDA 培养基上培养 3、5、7 d 的灰葡萄孢菌株, 制成孢悬液, 用血球计数板观察分生孢子数量, 试验设 3 次重复。

### 1.3 灰葡萄孢基因组 DNA 及 RNA 提取

将灰葡萄孢菌种接种于 PDA 培养基上, 20 °C 黑暗培养 7 d 后进行真空冷冻干燥, 用于基因组 DNA 和 RNA 提取。基因组 DNA 提取采用 CTAB-NaCl 法<sup>[18]</sup>, 基因组 RNA 提取采用 Trizol 提取法<sup>[19]</sup>。

### 1.4 灰葡萄孢突变菌株的鉴定

**1.4.1 突变菌株的 PCR 鉴定:** 根据 T-DNA 中潮霉素磷酸转移酶基因设计特异引物 hph-S 和 hph-AS (表 1), 利用 PCR 技术分别对灰葡萄孢野生型 BC22 和突变体 BCt78 的 DNA 进行扩增, 检测突变体中外源 T-DNA 的存在。

**1.4.2 突变菌株的 Southern blotting 分析:** 将野生型 BC22 和突变体 BCt78 的基因组 DNA 分别用 *Hind* III 酶切, 电泳后转膜, 并以潮霉素磷酸转移酶基因片段为探针利用 Southern blotting 技术分析突变体 BCt78 基因组 DNA 上的 T-DNA 插入

表 1 PCR 和 RT-PCR 引物序列及检测基因  
Table 1 PCR and RT-PCR primers sequence and detection gene names used

基因名称 Gene name	基因 ID 号 ID of gene	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
<i>HPH</i>	NM_141268	hph-S	CGACAGCGTCTCCGACCTGA
		hph-AS	CGCCCAAGCTGCATCATCGAA
<i>BC1G_12707.1</i>	XM_001548679.1	07PCR-L	GGATTGATGAAGGGTGAGTGC
		07PCR-R	TGGGCGTTGAAGAAATGACG
		07RT-L	ATGACGGTGAGATGGTAC
		07RT-R	TCTCGCCGTCTACCAA
<i>Tubulin</i>	JQ268163.1	Tubulin-L	TCTCCGTAAGATGGGTTG
		Tubulin-R	ACTGGGCTAAGGGTCATT
<i>PKA1</i>	AM948966.1	PKA1-L	GGCCAAATTCTATGCTGCT
		PKA1-R	CATCTGGGTGAATGTAGGGA
<i>PKA2</i>	AM948967.1	PKA2-L	TCAGAAGAGGACGATGAGGATG
		PKA2-R	TTGCCACGAAGTTGAAACCA
<i>PKAR</i>	AM948968.1	PKAR-L	CATTGAGCCTGGTGGATCT
		PKAR-R	TCTGGGTCTCCAAAGCATC
<i>Bac</i>	HQ435335.1	Bac-L	GGCTACTTTCAGGGTTCATCA
		Bac-R	GAAGAGGCTATCGCTGTTGG
<i>cutA</i>	Z69264.1	CutA-L	CAATGGTCACATCAACCTTATCC
		Cut-R	AACAAATGCCGCTGCTGC
<i>Bcp1</i>	AY665552.1	Bcp1-L	TACCACCACCTTCGGCTAC
		Bcp1-R	CCAAGTTTACCAGCATCTCC
<i>Bcp2</i>	EF195878.1	Bcp2-L	TCGCTCATAATACCTAACC
		Bcp2-R	ATCCCTAAGACCTTTCCTC
<i>Ras2</i>	XM_001555085.1	Ras2-L	CCCTCTGGACTCTTGTGAAAC
		Ras2-R	CACGCCCAACTATAACCTTTC
<i>Bmp3</i>	DQ986330.1	Bmp3-L	GGCAGACCTGCAAGGAAGA
		Bmp3-R	AGTGAGGGGTTGACCGGAT
<i>BcBOT2</i>	AY277723.2	BcBOT2-L	GTTGAATGGGCAGGTTGTTG
		BcBOT2-R	GCCGACGCATTTGCTGTTA
<i>Bcp1</i>	AY277722.1	Bcp1-L	ACTTACTTCGATGTTACCTGGG
		Bcp1-R	ACCTGGACGGGTGTGCT
<i>Lac1</i>	U20192.1	Lac1-L	ACCACCAACGCTCTTGACTG
		Lac1-R	GCTGTTTGCCATCTGCTCT
<i>Btp1</i>	AJ605723.1	Btp1-L	CCCCGACCACACGATGAA
		Btp1-R	ACTAGACATGTGCTGACGTCCTT

拷贝数(DIG DNA Labeling and Detection Kit, Cat. No. 1 093 657, Roche Applied Science, Germany)。

### 1.5 T-DNA 插入位点和突变基因的确 定

**1.5.1 突变体 T-DNA 插入位点侧翼序列的获得:** 用TAIL-PCR 扩增突变体 T-DNA 插入位点的侧翼序列。T-DNA 随机引物、左右边界嵌套引物的合成及 PCR 程序参照 Mullins 等<sup>[20]</sup>的方法。PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测后克隆、测序。将所获得的序列与灰葡萄孢 B05.10 基因组数据库进行 BLAST 比对, 以确定 T-DNA 的插入位点。

**1.5.2 T-DNA 插入位点的 PCR 验证:** 根据突变体中 T-DNA 插入位点的上下游序列设计一对特异性引物 07PCR-F 和 07PCR-R, 以野生型菌株和突变菌株的基因组 DNA 为模板, 利用特异引物 07PCR-F 和 07PCR-R 及 T-DNA 上的特异引物 RB3 进行 PCR 扩增, 验证外源 T-DNA 的插入。

**1.5.3 突变基因的 RT-PCR 鉴定:** 将野生型菌株和突变菌株的基因组 RNA 反转录成 cDNA, 分别以野生型菌株和突变菌株的 cDNA 为模板, 以 *Tubulin* 作为内参, 利用 T-DNA 插入基因设计的特异引物 07RT-L、07RT-R 进行 RT-PCR 扩增, 检测突变基因的表达水平。

### 1.6 突变基因的功能分析

**1.6.1 突变菌株的表型观察及生长速率测定:** 分别将野生型菌株 BC22 和突变菌株 BCt78 的菌丝接种到 PDA 培养基上, 5 d 后用 9.0 mm 打孔器分别取其菌落边缘的菌丝, 接种到 PDA 培养基上, 每 24 h 观察并量取菌落直径, 测定菌落的生长速率, 重复 3 次。

**1.6.2 突变菌株的致病性测定:** 采用离体叶片接种法测定突变菌株的致病性。从温室中培养 2 个月的番茄植株上, 剪取第 3 分枝上的顶端叶片, 在超净工作台上紫外照射 15 min。从培养 5 d 的野生型菌株和突变菌株的 PDA 培养基上的相同部位取直径 6.0 mm 的菌丝块, 分别接种于番茄

叶片上, 每个菌株接种 5 个番茄叶片。接种后的番茄叶片 20 °C 保湿培养, 5 d 后测量病斑直径<sup>[21]</sup>, 并照相记录发病症状。

**1.6.3 突变菌株的毒素活性测定:** 野生型菌株和突变菌株在 PDA 培养基上培养 5 d, 用内径 9.0 mm 打孔器选择菌落相同部位打孔, 挑取 5 块菌丝块移至 150 mL 改良 Fries III 号培养液中, 于 20 °C 黑暗培养 16 d, 按照郑晓莲等的方法<sup>[22]</sup>, 分别提取菌株的粗毒素。取 10 μL 毒素接种到针刺伤口的叶片表面, 置于 20 °C 恒温培养, 5 d 后观察番茄叶片的发病情况并测量病斑直径, 照相记录发病症状。

**1.6.4 突变菌株的细胞胞壁降解酶活力测定:** 野生型菌株和突变菌株在 PDA 培养基上培养 5 d, 用内径 9.0 mm 打孔器选择菌落相同部位打孔, 挑取 5 块菌丝块移至 100 mL 纤维素酶培养液和果胶酶培养液中, 于 20 °C 黑暗培养 10 d, 按照吴洁云的方法<sup>[23]</sup>, 分别提取其多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶甲基半乳糖醛酸酶(PMG)、多聚半乳糖醛酸反式消除酶(PGTE)、果胶甲基反式消除酶(PMGE)和纤维素酶(Cx), 并测定其酶活力。

### 1.7 部分致病相关基因的表达检测

据 Elad 等研究<sup>[24-26]</sup>, 根据水解酶基因[*cutA* (角质酶基因)、*Bcpg1* (多聚半乳糖醛酸内切酶)、*Bcpg2* (多聚半乳糖醛酸内切酶)], 信号转导途径基因[cAMP 途径相关基因 *PKA1* (cAMP 依赖的蛋白激酶)、*PKA2* (cAMP 依赖的蛋白激酶)、*PKAR* (cAMP 依赖的蛋白激酶的调节亚基)、*Bac* (腺苷酸环化酶基因)、调控菌丝生长以及附着胞形成的基因 *Ras2* (小 G 蛋白基因)], 钙信号途径相关基因 *Bcp1* (亲环蛋白基因), MAPK 途径相关基因 *Bmp3* (MAPK 激酶基因), 产毒素基因 *BcBOT2* (Sesquiterpene synthase), 黑色素合成相关基因 *Lac1* (漆酶基因), 跨膜蛋白 *Btp1* 基因, 设计引物, 引物序列如表 1 所示, 对来自野生型菌株 BC22、

突变菌株 BCt78 的 cDNA 分别进行 RT-PCR 扩增。PCR 程序为: 95 °C 5 min; 94 °C 30 s, 51 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 28 个循环; 72 °C 10 min。扩增产物进行凝胶电泳检测。

## 2 结果与分析

### 2.1 灰葡萄孢突变体 BCt78 分生孢子产生情况

将保存的野生型菌株 BC22 和突变体菌株 BCt78 接种到 PDA 培养基上, 20 °C 黑暗静置培养, 分别于 3、5 和 7 d 收集培养物, 制成孢悬液, 用血球计数板观察分生孢子数量。结果发现, 野生菌株分生孢子数分别为  $1.5 \times 10^6$ 、 $2.33 \times 10^7$  和  $7.33 \times 10^7$  个/mL, 而突变菌株孢悬液中始终未检测到分生孢子(图 1)。

### 2.2 突变基因的确定

以突变菌株基因组 DNA 为模板, 进行 TAIL-PCR 扩增, 并将产物回收后克隆、测序, 获得了 323 bp 的侧翼序列(图 2A)。将所获得侧翼序列与灰葡萄孢数据库比对, 结果发现该序列属于灰葡萄孢的 *BC1G\_12707.1* 基因, 并发现 T-DNA 插入到该基因的 ATG 起始密码子区。

利用突变体中 T-DNA 插入位点的上下游引物(PCR-F 和 PCR-R), 对灰葡萄孢野生型和突变体基因组进行扩增。结果发现, 以突变体 DNA 为模板没有扩增到任何条带, 以野生型 DNA 为模板获得了一条 1 000 bp 条带, 与预期片段大小相符; 用基因下游引物 PCR-R 和 T-DNA 上的特异

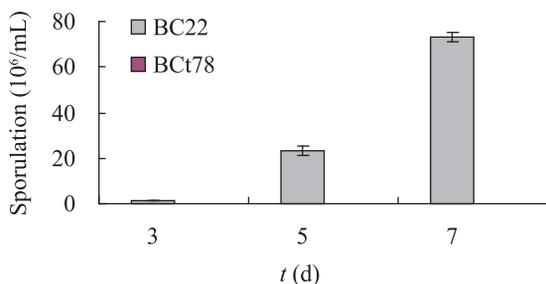


图 1 野生型和突变菌株在 PDA 培养基上分生孢子产量  
Fig. 1 The conidial production of wild-type and mutant strains on PDA medium

引物 LB3 对灰葡萄孢野生型和突变体进行扩增, 结果发现, 以野生型 DNA 为模板没有扩增到任何条带, 以突变体 DNA 为模板扩增到一条 135 bp 条带, 与预期片段大小相符(图 2B)。结果进一步证实 T-DNA 插入位点位于 *BC1G\_12707.1* 基因上。

### 2.3 突变菌株的 DNA 水平验证

以野生型和突变菌株的基因组 DNA 为模板, 根据 T-DNA 上潮霉素磷酸转移酶基因特异引物进行 PCR 扩增, 在突变菌株中得到 800 bp 的扩增片段, 与预期的片段大小一致, 而野生型菌株中没有任何扩增条带(图 3A)。证明了突变体中外源 T-DNA 的存在。

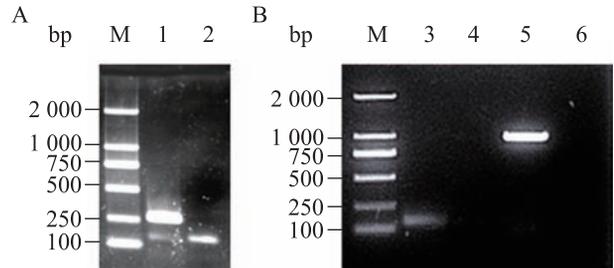


图 2 突变体 BCt78 的 TAIL-PCR 分析(A)及 T-DNA 插入位点的 PCR 验证(B)

Fig. 2 Results of TAIL-PCR (A) and identification with T-DNA insertion site of the mutant by PCR (B)

Note: M: Trans 2 K DNA marker; 1: The result of the secondary PCR; 2: The result of the tertiary PCR; 3, 4: Amplification with primers RB3 and 07PCR-R; 5, 6: Amplification with primers 07PCR-L and 07PCR-R; 3, 6: Mutant BCt78; 4, 5: Wide-type BC22.

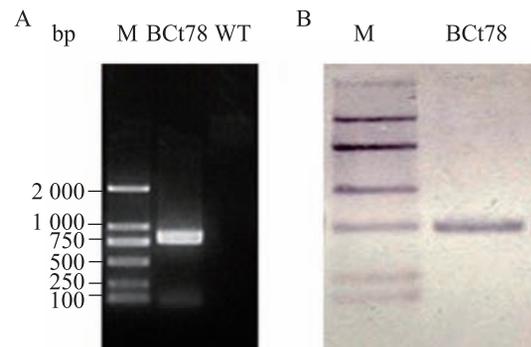


图 3 突变体 BCt78 的 PCR 验证(A)及 Southern blotting 验证(B)

Fig. 3 Results of PCR (A) and Southern blotting (B) of the mutant BCt78

收集突变体菌丝体, 提取其总 DNA, 取 25  $\mu$ L 基因组 DNA, 用 *Hind* III (其在 T-DNA 无酶切位点) 37  $^{\circ}$ C 酶切过夜。产物电泳后进行转膜, 转膜后与制备好的探针杂交。结果发现突变体 BCt78 有单一的杂交信号, 表明 T-DNA 以单拷贝的方式整合到 BCt78 的基因组 DNA 中 (图 3B)。

## 2.4 突变菌株的 RNA 水平的验证

以 *Tubulin* 为内参, 检测 *BCIG\_12707.1* 基因的表达情况。结果发现, 突变菌株中 *BCIG\_12707.1* 基因的表达水平明显低于野生型 (图 4)。对该基因进行生物信息学分析发现, 该基因 DNA 全长为 135 bp, 编码 1 个 44 个氨基酸的假定蛋白(Hypothetical protein), 其功能未知。

## 2.5 突变菌株的生物学特征

**2.5.1 突变菌株表型观察及生长速率:** 野生菌株 BC22 在 PDA 培养基上培养初期菌落为灰白色, 从第 3 天开始, 逐渐变为灰褐色, 并且有大量菌核产生。而突变体 BCt78 菌落始终为灰白色, 菌丝致密, 不产生菌核, 且生长速率明显低于野生型(图 5)。

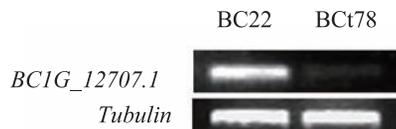


图 4 突变体中 *BCIG\_12707.1* 基因的 RT-PCR 结果  
Fig. 4 RT-PCR results of the gene *BCIG\_12707.1* in mutant BCt78

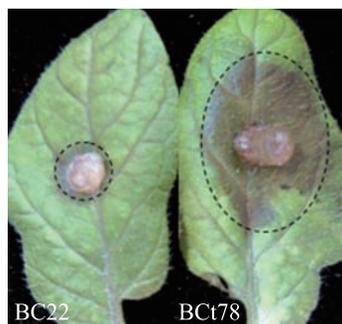


图 6 突变体 BCt78 在番茄叶片上的致病性

Fig. 6 The pathogenicity of the mutant BCt78 on detached tomato leaf

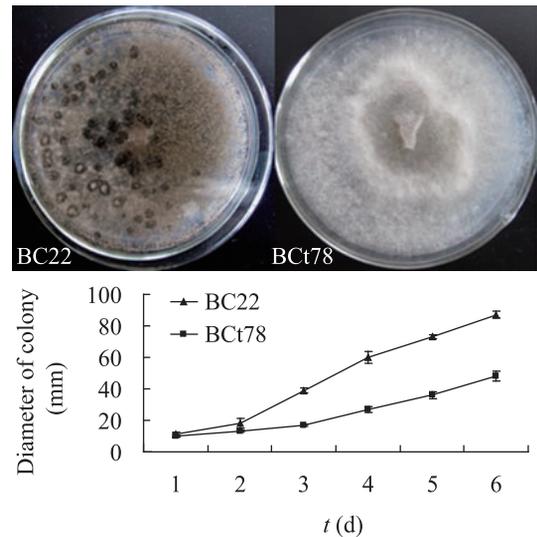
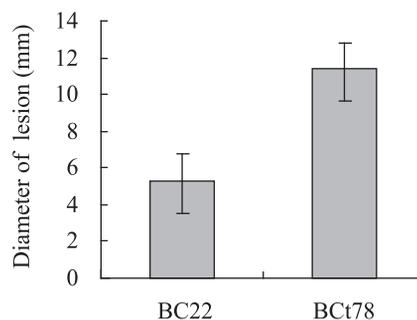


图 5 突变体 BCt78 菌落形态和菌落生长速率

Fig. 5 Colony and growth rate of the mutant BCt78

**2.5.2 突变菌株的致病性测定:** 对突变菌株进行致病性分析发现, 接种 1 d, 野生型和突变体接种的叶片正面未发现扩展的病斑, 但叶片背面均可观察到面积较小的病斑, 且突变体接种的叶片背面已出现的病斑面积明显大于野生型; 接种 2 d, 接种的叶片正面可观察到病斑, 且突变体接种叶片的病斑面积明显大于野生型; 接种 3 d, 接种的叶片病斑面积均有扩展, 且突变体接种叶片的病斑面积扩展速度明显大于野生型(图 6)。表明突变体在番茄叶片上的致病力明显强于野生型。

**2.5.3 突变菌株的毒素活性测定:** 提取野生型菌株和突变体菌株的粗毒素, 接种于番茄叶片, 接



种 4 d 后观察发现, 野生型和突变菌株的毒素在番茄叶片上均能产生黄褐色病斑, 突变体 BCt78 的病斑面积明显大于野生型(图 7)。

**2.5.4 突变菌株细胞壁降解酶活力测定:** 分别测定野生型菌株和突变体菌株的多聚半乳糖醛酸酶(PG)、果胶甲基半乳糖醛酸酶(PMG)、多聚半乳糖醛酸反式消除酶(PGTE)、果胶甲基反式消除酶(PMGE)和纤维素酶(Cx)的酶活力。结果发现, 突变菌株的 PG、PMG、Cx、PGTE 和 PMGE 酶活力均高于野生型菌株, 其中 PMG 和 Cx 差异显著, 而 PG、PGTE 和 PMGE 差异不显著(图 8)。

## 2.6 部分致病相关基因的表达

通过 RT-PCR 技术对野生型 BC22 和突变菌株 BCt78 细胞壁降解酶基因 *cutA*、*Bcp1*、*Bcp2*、

*cAMP* 途径相关基因 *PKA1*、*PKA2*、*PKAR*、*Bac*、*MAPK* 途径相关基因 *Bmp3*、产毒基因 *BcBOT2*、调控菌丝生长以及附着胞形成的基因 *Ras2*、钙信号途径相关基因 *Bcp1*、黑色素途径相关基因 *Lac1*、跨膜蛋白 *Btp1* 基因的表达水平进行分析。结果发现, 突变菌株中参与细胞壁降解的角质酶基因 *cutA*、多聚半乳糖醛酸酶基因 *Bcp1* 表达增强, 但是, 另外一个多聚半乳糖醛酸酶基因 *Bcp2* 表达减弱(图 9A); 信号转导途径基因 (*PKA1*、*PKA2*、*Bac*、*Bmp3*) 表达增强, 但是, 小 G 蛋白编码基因 *Ras2* 表达减弱(图 9B); 而 *cAMP* 依赖蛋白激酶的调节亚基 *PKAR*、亲环蛋白基因 *Bcp1* 表达无显著变化(图 9B)。产毒素基因 *BcBOT2* (Sesquiterpene synthase)、漆酶基因 *Lac1*、跨膜蛋白基因 *Btp1* 表达增强(图 9C)。

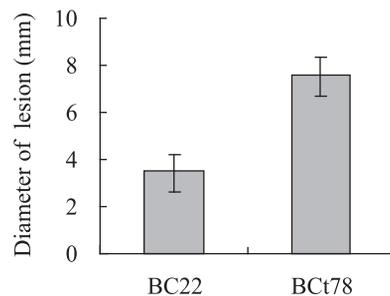


图 7 野生型菌株与突变菌株粗毒素生物活性

Fig. 7 Toxicity of crude toxin extracted from the mutant BCt78 and wild-type

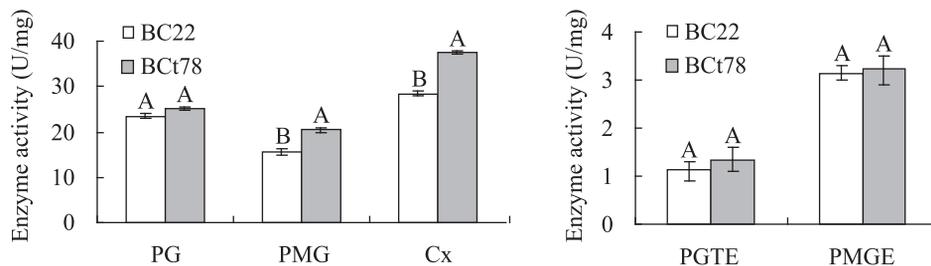


图 8 突变体与野生型的细胞壁降解酶活力

Fig. 8 The activity of enzyme extracted from the mutant BCt78 and wild-type

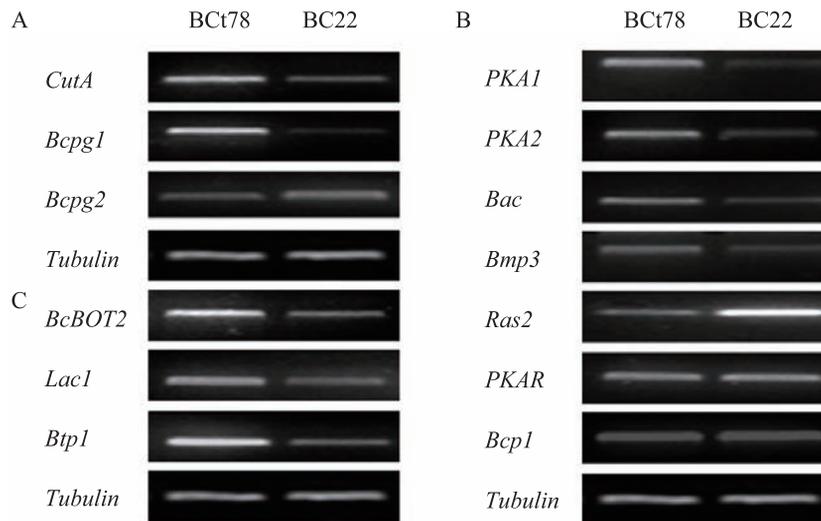


图9 突变体与野生型致病相关基因的表达

Fig. 9 Expression of pathogenetic genes in the mutant BCt78 and wild-type

### 3 结论与讨论

#### 3.1 灰葡萄孢分生孢子产生相关基因

研究表明, DNA 插入突变是标记和获得植物病原真菌功能基因的有效途径之一, Segmuller 等<sup>[27]</sup>已构建了 2 800 多个灰葡萄孢 T-DNA 插入突变体, 其中 30 多个突变体的致病能力发生了改变。目前, 涉及灰葡萄孢分生孢子产生的基因主要是一些编码 MAPK 信号途径和 cAMP 信号途径成员的基因: 灰葡萄孢异源三体 G 蛋白  $\alpha$  亚基因突变体  $\Delta bcg3$  分生孢子产生量大大低于野生型, 而且分生孢子萌发率也远低于野生型<sup>[10]</sup>; 灰葡萄孢腺苷酸环化酶基因突变体  $\Delta bac$  在寄主体内不能产生分生孢子, 但在培养基中生长时产孢能力几乎不受影响<sup>[4]</sup>。灰葡萄孢 PKA 催化亚基因突变体  $\Delta bcpk1$  菌丝生长缓慢, 不能在寄主叶片上引起软腐症状, 但在寄主叶片上的产孢能力丝毫不受影响<sup>[26]</sup>。可见同一条信号途径(cAMP 信号途径)中不同成员基因的突变对分生孢子产生情况的影响不同, 为什么腺苷酸环化酶基因突变(突变体  $\Delta bac$ )影响了灰葡萄孢在寄主体内产

孢, 但不影响在培养基上的产孢能力; 而 PKA 催化亚基因突变(突变体  $\Delta bcpk1$ )对在寄主叶片上的产孢能力丝毫没有影响, 这些问题都有待于进一步研究。我们获得的分生孢子产生能力丧失突变菌株 BCt78 中, cAMP 信号途径相关基因 *PKA1* (cAMP 依赖的蛋白激酶)、*PKA2* (cAMP 依赖的蛋白激酶)、*Bac* (腺苷酸环化酶基因), MAPK 信号途径相关基因 *Bmp3* (MAPK 激酶基因)表达都增强。由于 *BC1G\_12707.1* 基因编码蛋白身份未知, 为什么该基因突变会改变这些信号途径相关基因的表达, 进而影响到分生孢子产生, 也有待于进一步研究。

#### 3.2 细胞壁降解酶在灰葡萄孢致病过程中的作用

灰葡萄孢在侵入植物组织的过程中会分泌多种细胞壁降解酶<sup>[7]</sup>, 包括角质酶、脂酶、果胶酶(多聚半乳糖醛酸酶、果胶甲基半乳糖醛酸酶、多聚半乳糖醛酸反式消除酶、果胶甲基反式消除酶)、纤维素酶、木聚糖酶等。然而, 这些酶类在灰葡萄孢致病过程中所起的作用存在争议。灰葡萄孢脂酶基因突变体  $\Delta Bcpls1$  可形成正常的附着胞,

不能侵入未受伤的植物组织<sup>[12]</sup>，一个角质酶基因和一个脂酶基因同时缺失的突变体对寄主的穿透能力丝毫没有影响<sup>[28]</sup>。灰葡萄孢含有 6 个多聚半乳糖醛酸酶基因，2 个基因缺失的突变体对几种寄主植物的致病能力显著下降，其它 4 个基因缺失的突变体致病能力无明显变化<sup>[13]</sup>。灰葡萄孢菌株 B05.10 中，果胶甲基半乳糖醛酸酶基因 *Bcpme* 的突变对致病性没有影响<sup>[14]</sup>，纤维素酶基因的突变对致病性也没有影响<sup>[29]</sup>。 $\beta$ -1,4-木聚糖酶基因的突变使致病性显著下降，病斑扩展缓慢<sup>[30]</sup>。我们获得的突变菌株 BCt78 对番茄叶片的致病性增强；所产胞壁降解酶中的果胶甲基半乳糖醛酸酶(PMG)和纤维素酶(Cx)活性显著增强；参与细胞壁降解的角质酶基因 *cutA*、多聚半乳糖醛酸酶基因 *Bcpg1* 表达显著增强(另一个多聚半乳糖醛酸酶基因 *Bcpg2* 表达减弱)；似乎表明胞壁降解酶在灰葡萄孢致病过程中起作用。值得注意的是几种细胞壁降解酶均为多基因编码，基因之间可能存在功能上的互补。因此，使编码基因同时突变可能是研究各种酶在致病过程中是否起作用的有效途径。

## 参 考 文 献

- [1] Kauffman HF, van der Heide S, de Vries K. *Botrytis cinerea*: a study of the immunological properties during growth. Incidence of antibodies against *B. cinerea* in a group of patients with aspergillosis[J]. International Archives of Allergy and Applied Immunology, 1987, 83(4): 359-365.
- [2] Giraud T, Fortini D, Levis C, et al. RFLP markers show genetic recombination in *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species[J]. Molecular Biology and Evolution, 1997, 14(11): 1177-1185.
- [3] Levis C, Giraud T, Dutertre M, et al. Telomeric DNA of *Botrytis cinerea*: a useful tool for strain identification[J]. FEMS Microbiology Letters, 1997, 157(2): 267-272.
- [4] Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease[J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8(5): 561-580.
- [5] Van Kan JAL. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen[J]. Trends in Plant Sciences, 2006, 11(5): 247-253.
- [6] Choquer M, Fournier E, Kunz C, et al. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 277(1): 1-10.
- [7] Stahmann KP, Pielken P, Schimz KL, et al. Degradation of extracellular  $\beta$ -(1,3) (1,6)-d-glucan by *Botrytis cinerea*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(10): 3347-3354.
- [8] Klimpel A, Gronover CS, Williamson B, et al. The adenylate cyclase (BAC) in *Botrytis cinerea* is required for full pathogenicity[J]. Molecular Plant Pathology, 2002, 3(6): 439-450.
- [9] Doehlemann G, Berndt P, Hahn M. Different signalling pathways involving a Galpha protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(3): 821-835.
- [10] Rui O, Hahn M. The SlT2-type MAP kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing and host tissue colonization[J]. Molecular Plant Pathology, 2007, 8(2): 173-184.
- [11] Gourgues M, Brunet-Simon A, Lebrun MH, et al. The tetraspanin BcPls1 is required for appressorium-mediated penetration of *Botrytis cinerea* into host plant leaves[J]. Molecular Microbiology, 2004, 51(3): 619-629.
- [12] Kars I, Krooshof GH, Wagemakers L, et al. Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris*[J]. The Plant Journal, 2005, 43(2): 213-225.
- [13] Kars I, McCalman M, Wagemakers L, et al. Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: *Bcpme1* and *Bcpme2* are dispensable for virulence of strain B05.10[J]. Molecular Plant Pathology, 2005, 6(6): 641-652.

- [14] Brito N, Espino JJ, González C. The endo- $\beta$ -1,4-xylanase xyn11A is required for virulence in *Botrytis cinerea*[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2006, 19(1): 25–32.
- [15] Siewers V, Viaud M, Jimenez-Teja D, et al. Functional analysis of the cytochrome P450 monooxygenase gene *bcbot1* of *Botrytis cinerea* indicates that botrydial is a strain-specific virulence factor[J]. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 2005, 18(6): 602–612.
- [16] Schamber A, Lerocq M, Diwo J, et al. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling components and the Ste12 transcription factor in germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(1): 105–119.
- [17] Turrion-Gomez JL, Eslava AP, Benito EP. The flavohemoglobin BCFHG1 is the main NO detoxification system and confers protection against nitrosative conditions but is not a virulence factor in the fungal necrotroph *Botrytis cinerea*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(5): 484–496.
- [18] 郑蒙. 根癌农杆菌介导灰葡萄孢遗传转化及 T-DNA 侧翼序列分析[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2009: 9–11.
- [19] 赵斌. 灰葡萄孢致病力丧失突变体的筛选及其数字基因表达谱分析[D]. 保定: 河北农业大学硕士学位论文, 2011: 6–18.
- [20] Mullins ED, Chen X, Romaine P, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Fusarium oxysporum*: an efficient tool for insertional mutagenesis and gene transfer[J]. *Phytopathology*, 2001, 91(2): 173–180.
- [21] 李喜玲, 高智谋, 李艳梅, 等. 不同寄主来源的灰葡萄孢对番茄的致病力分化研究[J]. *菌物学报*, 2008, 27(3): 343–350.
- [22] 郑晓莲, 董金皋, 齐秋锁, 等. 灰葡萄孢毒素的组分分析和生物测定[J]. *植物病理学报*, 1998, 28(3): 269–274.
- [23] 吴洁云. 灰葡萄孢胞壁降解酶、角质酶及其对番茄植株的致病作用[D]. 扬州: 扬州大学硕士学位论文, 2007, 26–31.
- [24] Elad Y, Williamson B, Tudzynski P, et al. *Botrytis: Biology, Pathology and Control*[M]. *Botrytis: Published by Springer*, 2007: 67–94.
- [25] Segmüller N, Ellendorf U, Tudzynski B, et al. BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(2): 211–221.
- [26] Pinedo C, Wang CM, Pradier JM, et al. The sesquiterpene synthase from the botrydial biosynthetic gene cluster of the phytopathogen *Botrytis cinerea*[J]. *ACS Chemical Biology*, 2008, 3(12): 791–801.
- [27] Segmüller N, Kokkelink L, Giesbert S, et al. NADPH oxidases are involved in differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea*[J]. *Mol Plant Microbe Interact*, 2008, 21(6): 808–819.
- [28] Reis H, Piffi S, Hahn M. Molecular and functional characterization of a secreted lipase from *Botrytis cinerea*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2005, 6(3): 257–267.
- [29] Espino JJ, Brito N, Noda J, et al. *Botrytis cinerea* endo- $\beta$ -1,4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2005, 66(6): 213–221.
- [30] Broome JC, English JT, Marois JJ, et al. Development of an infection model for *Botrytis* bunch rot of grapes based on wetness duration and temperature[J]. *Phytopathology*, 1995, 85(1): 97–102.