

谷子弯孢病菌 *Clg α -1* 基因克隆及特征分析

李志勇¹, 谢夏青², 董金皋³, 董志平¹

(1. 河北省农林科学院 谷子研究所, 河北 石家庄 050031; 2 南京农业大学 生命学院, 江苏 南京 210095;

3. 河北农业大学 生命科学学院, 河北 保定 071001)

摘要: 谷子弯孢病菌 (*Cochliobolus lunatus*) 引起的谷子叶斑病是谷子生产上的重要病害之一, 常造成严重经济损失。本研究利用候选基因法和 RACE 技术克隆了谷子弯孢病菌中的 1 个 $G\alpha$ 基因, 命名为 *Clg α -1*, 在 GeneBank 登陆号为 HQ699081。 *Clg α -1* 基因开放阅读框为 1 062 bp 编码 353 个氨基酸多肽, 该开放阅读框被 3 个大小分别为 57 49 59 bp 的内含子隔开。聚类分析结果表明, 谷子弯孢病菌 *Clg α -1* 基因与其他植物病原真菌 $G\alpha$ 基因的同源性很高, Southern 杂交结果表明该基因以单拷贝形式存在。 *Clg α -1* 基因具有其他病原真菌 $G\alpha$ 基因具有的保守结构, 如在氮端有豆蔻酰化位点, 碳端具有 ADP 核糖基化位点。谷子弯孢病菌 *Clg α -1* 基因的克隆, 为进一步研究 *Clg α -1* 基因在该菌致病过程中的功能奠定基础。

关键词: 谷子弯孢病菌; 异三聚体 G 蛋白; RACE 序列分析

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2011)02-0039-04

Molecular Cloning and Characterization of *Clg α -1* in *Cochliobolus lunatus*

LI Zhi-yong¹, XIE Xia-qing², DONG Jin-gao³, DONG Zhi-ping¹

(1. Millet Institute of Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences Shijiazhuang 050031, China

2. College of Life Science, Nanjing Agricultural University Nanjing 210095, China 3. College of Life Science, Agricultural University of Hebei Baoding 071001, China)

Abstract: *Cochliobolus lunatus* is a destructive pathogen of foxtail millet and causes significant yield losses. A G protein α protein genes named *Clg α -1* (Genbank accession number HQ699081) was cloned using degenerate PCR and RACE method from *Cochliobolus lunatus*. The predicated *Clg α -1* gene contains a 1 062 bp ORF and it was interrupted by three small introns of 57 49 59 bp. The *Clg α -1* gene encodes a polypeptide of 353 amino acids and phylogenetic analysis showed *Clg α -1* gene was similarity to the $G\alpha$ subunit of other fungi. The analysis of Southern blotting indicated that there was a single copy of *Clg α -1* gene in the genome. *Clg α -1* gene also contained conservative motifs among the $G\alpha$ protein family such as sites for myristoylation at the N-terminus, ADP-ribosylation by pertussis toxin at the C-terminus. The cloning of the gene will lay a foundation for further functional analysis of heterotrimeric G-protein signal transduction pathway in *Cochliobolus lunatus*.

Key words: *Cochliobolus lunatus*; Heterotrimeric G protein; RACE; Sequence analysis

植物病原真菌接收外界信号后通过细胞内信号传递, 激活相应基因表达, 从而调控其孢子发育、致病性和有性生殖等过程^[1]。异三聚体 G 蛋白介导的细胞信号转导是植物病原真菌中研究最多的信号转导途径之一^[2]。异三聚体 G 蛋白是由 α 、 β 和 γ 3 个亚基构成的, 其中 $G\alpha$ 亚基具有 GTP 酶的活性, 在该信号途径中起关键作用。迄今为止, 已通过基于

基因同源性的 PCR 扩增技术克隆得到了大量的植物病原真菌 $G\alpha$ 基因, 如玉米小斑病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*)^[3]、小麦壳针孢菌 (*Mycosphaerella graminicola*)^[4]、颖枯壳多孢 (*Stagonospora nodorum*)^[5]、柑橘链格孢 (*Alternaria alternata*)^[6] 和大豆疫霉 (*Phytophthora sojae*)^[7] 等。在玉米小斑菌中 $G\alpha$ 基因调控附着胞形成及有性交配。小麦壳针孢菌

收稿日期: 2011-01-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30771354); 河北省自然科学基金项目 (C2004000699)

作者简介: 李志勇 (1976-) 男, 河北邯郸人, 助理研究员, 主要从事谷子病害研究。

通讯作者: 董志平 (1964-) 女, 河北平乡人, 研究员, 主要从事谷子病害研究。

Gα基因通过调控 cAMP途径而影响孢子发育及致病性。颖枯壳多孢 Gα 基因缺失突变体,不能产孢子,致病力下降,对渗透胁迫更敏感,在培养基中分泌新的多巴黑色素。大豆疫霉通过负调控钙信号传导途径,从而调控游动孢子囊对大豆异黄酮趋性,该基因缺失突变体丧失趋性,从而无致病性。谷子弯孢叶斑菌 (*Cochliobolus lunatus*)是谷子的一个重要叶部病害,该病害发生严重影响谷子规模化生产及无公害生产,本研究将利用候选基因法克隆谷子弯孢菌的 Gα基因,为深入研究该基因的功能及防控该病害奠定基础。

1 材料和方法

1.1 菌株与试剂

谷子弯孢病菌和大肠杆菌 (*Eschrichia coli*)菌株 DH5α由河北农科院谷子研究所植保实验室保存。pMD19-T vector, Taq DNA 聚合酶、3'RACE 试剂盒和 5'RACE 试剂盒等购自大连宝生物有限公司,分子杂交试剂盒购于 Roche公司,引物合成及测序由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2 Clgα-1 基因的克隆与生物信息学分析

1.2.1 基因组 DNA 和总 RNA 的提取 将 PDA 培养基上生长 10 d 的弯孢病菌打菌盘接种于液体 PD 培养基, 25℃黑暗静止培养 7 d 后将菌盘压干。用 CTAB 法提取基因组 DNA Trizol 法提取总 RNA, 参照宝生物反转录试剂盒合成第一链 cDNA。

1.2.2 Clgα-1 基因片段的克隆及同源性分析 根据已报道的植物病原真菌 G 蛋白 α 亚基基因保守结构域,设计一段简并引物 G-F: 5'-GTRTACCATH-CTCAARCARA-3'和 G-R: 5'-GCRGTHTATCCRYT-TCTRAC-3'用于扩增基因同源片段。以谷子弯孢病菌菌株 cDNA 为模板,按下列反应体系进行常规 PCR 扩增。PCR 反应条件: 95℃ 5 min 94℃ 30 s 55℃ 30 s 72℃ 1 min 35 个循环; 72℃ 10 min 纯化 PCR 产物并与 pMD19-T Vector 连接,转化大肠杆菌 DH5α感受态细胞。将阳性单克隆送样测序。所得测序结果通过 BLAST 软件将与 GenBank 中的已知基因进行同源性比对。

1.2.3 Clgα-1 基因 cDNA 全长序列的克隆 根据已克隆得到的 Clgα-1 基因片段序列,利用 Primer 5.0 软件设计引物 GSP1: 5'-CATCGACTGCACCGT-GTTGCTGAAG-3'和 GSP2: 5'-TGGCGATCTCAC-CTACCGCATGTTT-3'用来扩增 Clgα-1 基因 5'和 3'两端序列。以 5'RACE 和 3'RACE 试剂盒合成的第一链 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件:

95℃ 6 min 94℃ 1 min 63℃ 1 min 72℃ 2 min 35 个循环; 72℃ 10 min 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,将目的条带回收后克隆、测序,经拼接后得到 cDNA 全长序列。把克隆测序得到的 Clgα-1 序列提交到 Genbank 上,NCBI 在线分析谷子弯孢病菌 Clgα-1 基因的保守结构域。根据谷子弯孢病菌 Clgα-1 基因的 cDNA 序列,以菌的基因组 DNA 为模板扩增结构基因全长。利用 DNAMAN 软件构建植物病原真菌 Gα 亚基系统进化树。

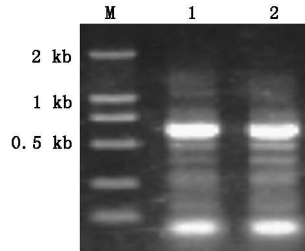
1.3 Clgα-1 基因的拷贝数分析

应用 Southern Blotting 技术,对 Clgα-1 基因的拷贝数进行分析。以 Clgα-1 基因的特异基因片段作为探针,选择探针序列中没有酶切位点的酶 (Kpn I Hind III, Apa I)对基因组进行酶切,应用 DIG DNA Labeling and Detection Kit 进行 Southern 杂交,验证谷子弯孢病菌 Clgα-1 基因在基因组中的拷贝数。

2 结果与分析

2.1 Clgα-1 基因的克隆及序列分析

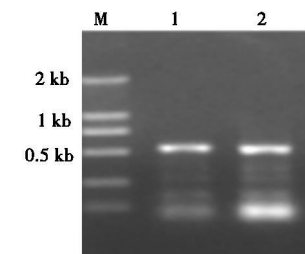
利用简并引物 G-F 和 G-R 对谷子弯孢病菌 cDNA 进行扩增,扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。结果得到约 0.5 kb 的扩增产物,符合预期结果,将其回收并克隆测序。Blastn 结果表明,该基因片段与其他真菌 Gα 基因有较高同源性。因此,初步推测该片段为谷子弯孢病菌 Gα 基因片段。以反转录合成的谷子弯孢病菌 5'末端和 3'末端 cDNA



1 2 5'RACE PCR 产物; M. DL 2000
1. 2. Product of 5'RACE PCR M. DL 2000.

图 1 5'RACE 扩增电泳图

Fig 1 Electrophoresis result of 5'RACE product



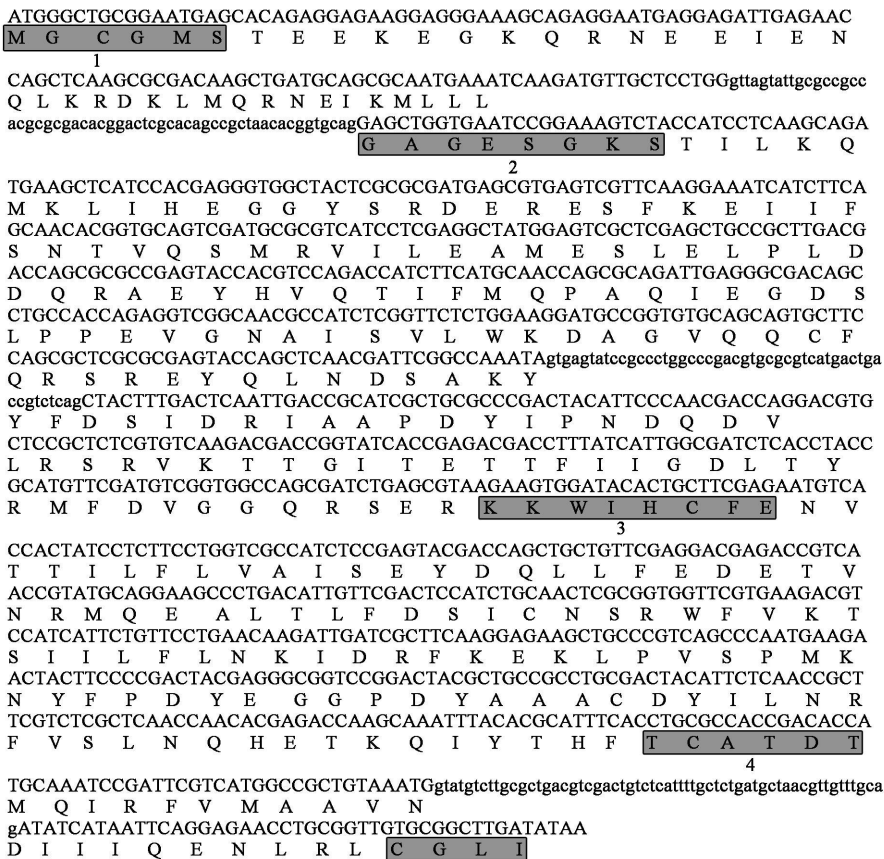
1 2 3'RACE PCR 产物; M. DL 2000
1. 2. Product of 3'RACE PCR M. DL 2000.

图 2 3'RACE 扩增电泳图

Fig 2 Electrophoresis result of 3'RACE product

为模板,进行 5'RACE和 3'RACE扩增。5'端扩增获得长度约 600 bp的条带(图 1),3'端扩增获得长度约 500 bp的条带(图 2)。将扩增条带进行回收、克隆测序。测序结果与原始序列进行拼接,获得谷子弯孢病菌 *Clgα-1* 基因的全长序列,把克隆得到的 *Clgα-1* 基因提交到 GenBank 序列登陆号为

HQ699081。该序列长度为 1 062 bp 编码 353个氨基酸。利用 DNAMAN 软件将 *Clgα-1* 基因的 cDNA 序列与 DNA 序列进行比对,从图 3可以看出 *Clgα-1* 基因含有 3个内含子,长度分别为 57 49 59 bp 3个内含子的核苷酸序列都是以 GT开始,并且以 AG 结束。



1 豆蔻酰化位点; 2 P-LOOP 位点; 3 腺苷酸环化酶互作位点; 4 G区; 5 ADP核糖基化位点; 内含子小写字母标出。

1 Sites for myristylation 2 P-LOOP site 3 Adenyl cyclase interaction site 4 G region 5. ADP-ribosylation site

Lowercase letter indicate intron sequence

图 3 谷子弯孢病菌 *Clgα-1* 基因结构

Fig 3 The sequence and structure of *Clgα-1* gene in *C. lunatus*

2.2 *Clgα-1* 基因同源性分析

BLASTn结果表明,谷子弯孢菌 *Clgα-1* 基因与玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*)、柑橘链格孢 (*Alternaria alternata*)、颖枯壳多孢 (*Sclerotinia nodorum*)、玉蜀黍赤霉 (*Gibberella zeae*)、稻梨孢 (*Magnaporthe grisea*)、灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*)、核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) *Gα* 基因同源性在 76.8%~89.7%。谷子弯孢菌 *Clgα-1* 基因与玉米大斑病菌 *Gα* 基因同源性最高,与核盘菌 *Gα* 基因同源性最低。利用 DNAMAN 构建 *Gα* 基因系统进化树,发现谷子弯孢菌与玉米大斑病菌、柑橘链格孢和颖枯壳多孢菌聚在一个分支上,玉蜀黍赤霉和稻梨孢聚在另一个分支上,而灰葡萄孢和核盘菌则与其他真菌聚在不同的分支上(图 4)。

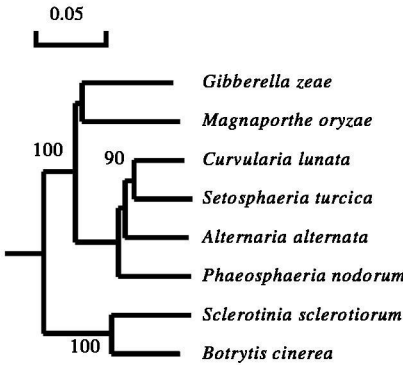


图 4 谷子弯孢病菌与其他真菌 *Gα* 基因聚类图

Fig 4 Phylogenetic analysis of *Gα* gene between *C. lunatus* and other fungi

2.3 *Clgα-1* 基因编码的氨基酸的特征分析

利用 DNASTAR 对 *Clgα-1* 基因编码产物计算分

子量为 40.8 kDa 等电点为 4.54。在线软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) 分析表明,其氨基酸序列中包含豆蔻酰化位点、P-LOOP位点、腺苷酸环化酶互作位点、G区及 ADP核糖基化位点等 $G\alpha$ 亚基保守结构域。腺苷酸环化酶互作位点是 $G\alpha$ 亚基调控 cAMP途径的互作区域,而 ADP核糖基化位点则是百日咳毒素作用位点。

2.4 $Clg\alpha 1$ 基因的拷贝数分析

应用 Southern Blotting 技术,验证 $Clg\alpha 1$ 基因的拷贝数。结果如图 5 在基因中无酶切位点的 3 种限制性内切酶 (Kpn I Hind III 和 Apa I) 的酶切产物中均出现清晰的单一阳性条带,表明 $Clg\alpha 1$ 基因在谷子弯孢基因组中以单拷贝形式存在。

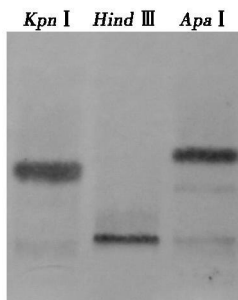


图 5 $Clg\alpha 1$ 基因 Southern 杂交图谱

Fig 5 Southern blotting of $Clg\alpha 1$ in the genome of *C. lunatus*

3 讨论

$G\alpha$ 亚基由于其含有 GTP/GDP 结合位点、GTPase 活性位点、质膜受体识别与结合位点、胞内效应器结合位点等功能位点,所以一般被认为是 G 蛋白的功能亚基^[8]。真菌中 $G\alpha$ 亚基基因一般有 3 个亚型,如在小麦壳针孢菌 $G\alpha$ 亚型基因分别为 $MgGpa1$ 、 $MgGpa2$ 、 $MgGpa3$,在灰葡萄孢中亚 $G\alpha$ 基因亚型分别为 $bcg1$ 、 $bcg2$ 、 $bcg3$ ^[9]。本试验克隆的 $G\alpha$ 亚基由于具有腺苷酸环化酶互作位点、豆蔻酰化位点、ADP核糖基化位点,并且与其他真菌第 1 亚型 $G\alpha$ 基因同源性较高,因而属于亚型 1 $G\alpha$ 基因家族,与 $Clg\alpha 1$ 同属第一类群的 $Bcg1$ 、 $Cga1$ 、 $magB$ 等植物病原真菌 G 蛋白 α 亚基基因间的同源性最高,且均与病原菌的致病性调控有关,因此可以推测在该基因在致病性调控过程中可能存在着相同或相似的信号转导机制^[10]。

在真菌中内含子两端均符合 GT/AG 法则,谷子弯孢病菌 $Clg\alpha$ 基因 3 个内含子均符合该规则^[11]。从系统进化树中可以看出 $G\alpha 1$ 基因能反映真菌亲缘关系。玉米大斑病菌与谷子弯孢菌均为半知菌亚门丛梗孢目,因而它们聚在一起。同样灰葡萄孢有

性世代是葡萄核盘菌与核盘菌亲缘关系最近,因而它们也聚类在一起。

本试验对谷子弯孢病菌 $Clg\alpha 1$ 基因进行 Southern 杂交分析,结果表明该基因在基因组中以单拷贝形式存在,下一步可以构建该基因的同源重组载体,转化谷子弯孢原生质体,创建 $Clg\alpha 1$ 基因缺失突变体,以便更加详尽地研究该基因功能,明确异三聚体 G 蛋白介导的细胞信号转导对谷子弯孢分生孢子发育、致病性及毒素产生的调控机理,为该病害的防治提供理论指导。

参考文献:

- [1] Nicolas R, Darren M S, Cemile A, et al. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calmodulin signaling components in plant and human pathogenic fungi[J]. Fungal Genetics and Biology 2009, 46: 287–298.
- [2] McCudden C R, Hains M D, Kimple R J, et al. G-protein signaling back to the future[J]. Cellular and Molecular Life Science 2005, 62: 551–577.
- [3] Horwitz B A, Sharon A, Lu S, et al. A G protein α subunit from *Cochliobolus heterostrophus* involved in mating and appressorium formation [J]. Fungal Genetics and Biology 1999, 26: 19–32.
- [4] Rahim M, Sarah B M, Theo A J, et al. $G\alpha$ and $G\beta$ proteins regulate the cyclic AMP Pathway that is required for development and pathogenicity of the phytopathogen *Mycosphaerella graminicola* [J]. Eukaryotic Cell 2009, 8 (7): 1001–1013.
- [5] Peter S S, Kar C T, Pedro S, et al. The disruption of a $G\alpha$ subunit sheds new light on the pathogenicity of *Stagonospora nodorum* on wheat [J]. Molecular Plant-microbe Interactions 2004, 17(5): 456–466.
- [6] Wang N Y, Lin C H, Chung K R. A $G\alpha$ subunit gene is essential for conidiation and potassium efflux but dispensable for pathogenicity of *Alternaria alternata* on citrus [J]. Current Genetics 2010, 56: 43–51.
- [7] Hua C L, Wang Y L, Zheng X B, et al. A *Phytophthora sojae* G-protein α subunit is involved in chemotaxis to soybean isoflavones [J]. Eukaryotic Cell 2008, 7(12): 2133–2140.
- [8] Simon M I, Stratmann M R, Gautam N. Diversity of G proteins in signal transduction [J]. Science 1991, 252: 802–808.
- [9] Julia S, Muriel V, Adeline S, et al. The $G\alpha$ subunit BCG1, the phospholipase C (BcPLC1) and the calcineurin phosphatase co-ordinately regulate gene expression in the grey mould fungus *Botrytis cinerea* [J]. Molecular Microbiology 2008, 67(5): 1027–1050.
- [10] Field T A, Casey P J. Signaling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins [J]. Biochem 1997, 321: 561–571.
- [11] Maria J A, Amorim J, Bruno S D, et al. Functional and genetic characterization of calmodulin from the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* [J]. Fungal Genetics and Biology 2003, 39: 204–210.