

灰葡萄孢致病力增强突变体 BCt98 的突变基因分析

王 敏,董丽萍,赵 斌,郑 旭,司贺龙,张 靖,时翠平,邢继红,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:为获得灰葡萄孢的致病相关基因并研究其基因功能,筛选灰葡萄孢的 T-DNA 插入突变体库,获得了一株致病力增强的突变体 BCt98。利用 PCR 和 Southern Blotting 技术,对突变体 BCt98 进行鉴定。利用 TAIL-PCR 技术结合生物信息学方法,确定了突变体 BCt98 中 T-DNA 插入位点位于 *BC1G_07014.1* 基因的第3个外显子上。利用 RT-PCR 技术,确定了突变体 BCt98 的突变基因为 *BC1G_07014.1*。突变体 BCt98 生长速度较快,菌落颜色较浅,菌丝较为致密,不产生分生孢子和菌核,且胞壁降解酶(PMG、PG 和 Cx)及毒素活性较野生型明显增强。表明 *BC1G_07014.1* 基因在灰葡萄孢生长、发育和致病力调控方面发挥重要作用,且参与调控病菌的胞壁降解酶活性和毒素活性。

关键词:灰葡萄孢;突变体 BCt98;致病力;突变基因

中图分类号:S432.1;Q78 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)03-0037-05

doi:10.7668/hbxb.2015.03.007

Analysis of Mutant Gene in BCt98 Mutant Enhanced Pathogenicity of *Botrytis cinerea*

WANG Min,DONG Li-ping,ZHAO Bin,ZHENG Xu,SI He-long,ZHANG Jing,
SHI Cui-ping,XING Ji-hong,DONG Jin-gao

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

Abstract:The objective of this study was to obtain pathogenicity-related genes of *Botrytis cinerea* and to investigate the function of pathogenicity-related genes. An enhanced pathogenicity mutant,named BCt98,was found by screening T-DNA insertional mutant library of *Botrytis cinerea* and it was testified by PCR and Southern Blotting techniques. T-DNA insertion site was defined in the third exon of *BC1G_07014.1* gene by using TAIL-PCR and bioinformatics methods. The mutant gene was identified as *BC1G_07014.1* by RT-PCR technology. Compared to the wild type strain,the mutant BCt98 grew quickly,colony was white,did not produce conidium and sclerotia,but showed stronger on cell wall degrading enzyme activity and toxin activity. These results showed that the *BC1G_07014.1* gene was involved in growth,development,pathogenicity and involved in regulating cell wall degradation enzyme activity and toxin activity in *B. cinerea*.

Key words:*Botrytis cinerea*;Mutant BCt98;Pathogenicity;Mutant gene

灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)是一种重要的植物病原真菌,寄主范围广泛,能够侵染水果、蔬菜等230多种植物,常给农业生产造成重大的经济损失^[1-3]。发掘灰葡萄孢的致病相关基因并明确其功能,为阐明灰葡萄孢致病的调控机制奠定基础。灰葡萄孢是典型的死体营养型的非专性寄生真菌,该菌的致病机制主要是产生胞壁降解酶和毒素类物质

来破坏宿主细胞,从而侵入宿主产生病斑^[4-5]。近年来,随着灰葡萄孢菌株 B05.10 (http://www.broad.mit.edu/annotation/genome/botrytis_cinerea/Home.html)和 T4 (<http://urgi.versailles.inra.fr/projects/Botrytis/>)基因组测序的完成,灰葡萄孢已成为发育生物学、分子植物病理学研究的模式生物之一。目前,对于灰葡萄孢的研究主要集中于其生

收稿日期:2015-01-26

基金项目:河北省科技支撑计划项目(12226507)

作者简介:王 敏(1990-),女,河北保定人,在读硕士,主要从事植物与病原物互作研究。王敏、董丽萍为同等贡献作者。

通讯作者:邢继红(1977-),女,河北东光人,教授,博士,主要从事植物与病原物互作研究。

董金皋(1963-),男,河北平乡人,教授,博士,主要从事植物病理学研究。

长、发育及致病性的机制上。迄今为止,已经获得了 100 多个致病相关基因,其中涉及病菌生长、分生孢子的萌发及次生代谢产物的产生等方面^[6]。河北省农业大学真菌毒素与植物分子病理学实验室前期借助农杆菌 AGL-1(携带双元载体 pBhdI)构建了灰葡萄孢的 ATMT 突变体库。从灰葡萄孢 ATMT 突变体库中筛选获得一株对番茄致病力明显增强的菌株(BC198),但该突变体的突变基因及其功能尚未明确。本试验利用 PCR、Southern Blotting 和 RT-PCR 等技术,对突变体的 T-DNA 插入位点和突变基因进行分析、鉴定;对突变体的表型和致病力进行分析,确定突变基因的功能;对突变体的胞壁降解酶活性和毒素活性进行分析,探讨突变基因调控病菌致病力的机制,为阐明灰葡萄孢致病的分子机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

灰葡萄孢野生型菌株 BC22、灰葡萄孢 ATMT 突变体库由河北农业大学植物分子病理学实验室保存。

1.2 致病变异突变体的筛选

将在 PDA 培养基上生长 7 d 的野生型 BC22 和突变体菌株打菌盘($\Phi=0.6$ cm)接种到番茄果实上进行致病力测定,每个处理接种 3 个西红柿果实,4 d 后观察并记录结果。试验均重复 3 次。

1.3 灰葡萄孢基因组 DNA 及总 RNA 提取

选取在 PDA 培养基上生长 7 d 的灰葡萄孢菌株,采用 CTAB 法^[7]提取基因组 DNA,根据 Sangon 的 UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒和 M-MLV 反转录酶的使用说明,提取真菌组织的总 RNA 并合成第一链 cDNA。

1.4 突变体的 PCR 鉴定

根据 T-DNA 上潮霉素抗性基因序列设计特异性引物(P1: 5'-CGCCCCAAGCTGCATCATCGAA-3'; P2: 5'-CGACAGCGTCTCCGACCTGA3'),以野生型菌株 BC22 和突变体菌株的基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,检测突变体中 T-DNA 的插入。

1.5 突变体的 Southern Blotting 鉴定

将野生型菌株 BC22 和突变体菌株的基因组 DNA 分别用 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切,电泳后转膜,并以潮霉素抗性基因序列为探针(DIG DNA Labeling and Detection Kit; Cat. No. 1 093 657; Roche Applied Science, Germany),利用 Southern Blotting 技术检测突变体基因组 DNA 上的 T-DNA 插入数。

1.6 突变体 T-DNA 插入位点分析

利用 TAIL-PCR 技术^[8],扩增突变体 T-DNA 插入位点的侧翼序列。以突变体基因组 DNA 为模板,分别以 RB1/RB2/RB3 与 AD4(5'-TCGTNCGNAC NTAGGA-3')组合进行 PCR 扩增。扩增产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测,对第 3 轮特异性扩增条带进行回收(Agarose Gel DNA Purification Kit; Code No. DV805A(TaKaRa)、克隆(pMD-19T Simple Vector; Code No. D104A(TaKaRa))。

将阳性菌液送中科西林测序部进行测序,获得突变体 T-DNA 插入位点的侧翼序列。将所获得的序列与灰葡萄孢基因数据库(http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/botrytis_cinerea)进行比对,确定 T-DNA 在突变体基因组中的插入位置。

1.7 突变基因的 RT-PCR 鉴定

以野生型菌株 BC22 和突变体菌株的 cDNA 为模板,选取 *Tubulin* 基因作为内参(F: 5'-ACTGGG CTAAGGGTCATT-3'; R: 5'-TCTCCGTAAGATGGGTT G-3'),根据突变体中 T-DNA 插入基因的序列设计基因特异性引物,利用 RT-PCR 技术检测突变体中 T-DNA 插入基因的表达情况。

1.8 突变体的表型分析

将野生型菌株 BC22 和突变体 BC198 分别接种到 PDA 平板上,培养 10 d 后观察灰葡萄孢野生型和突变体的菌落颜色、形态、分生孢子和菌核的产生等表型特征^[9]。

1.9 突变体的胞壁降解酶活性测定

参照吴洁云等^[10]报道的方法,分别提取野生型菌株 BC22 和突变体菌株的多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)、多聚甲基半乳糖醛酸酶(Poly-methylgalacturonase PMG)、纤维素酶(Cellulase, Cx),并测定其酶活性。试验均重复 3 次。

1.10 突变体的毒素活性测定

将野生型菌株 BC22 和突变体菌株分别定量接种到 150 mL 改良 Fries 培养液中,22 ℃ 黑暗中静置培养 22 d。按照徐扩等^[11]报道的方法,进行菌株毒素的提取。将各菌株的毒素粗提取物定量接种到番茄果实上,检测野生型菌株 BC22 和突变体菌株的毒素活性。

2 结果与分析

2.1 致病力增强突变体的获得

将野生型菌株 BC22 和突变体在番茄果实上接种 4 d 后,筛选获得了一株致病力较野生型明显增强的菌株 BC198(图 1)。

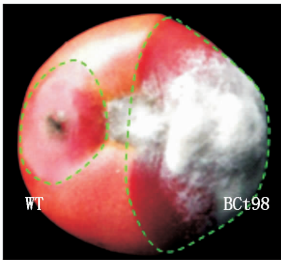


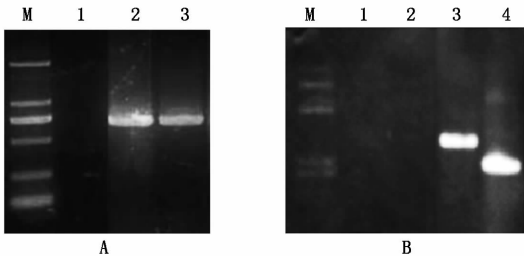
图 1 离体果实接种筛选结果

Fig. 1 The screening result of vaccinated fruit *in vitro*

2.2 突变体 BCt98 的鉴定

利用 T-DNA 上已知潮霉素抗性基因的特异性引物 P1、P2，以野生型菌株 BC22 和突变体菌株 BCt98 的 DNA 为模板，进行 PCR 扩增。结果发现，突变体 BCt98 中扩增获得一条约 800 bp 的条带，而野生型菌株 BC22 中未能扩增出相应条带（图 2-A），表明突变体 BCt98 中有 T-DNA 的插入。

利用 Southern Blotting 技术，以潮霉素抗性基因的特异性序列为探针，检测突变体中 T-DNA 的插入情况。结果发现，突变体 BCt98 中出现单一的杂交条带，而在野生型菌株 BC22 中无杂交条带，表明 T-DNA 以单拷贝的形式插入到突变体 BCt98 的基因组中（图 2-B）。



A. 突变体 BCt98 的 PCR 鉴定：M. Marker DL2000；1. BC22；2, 3. BCt98；B. 突变体 BCt98 的 Southern Blotting 鉴定：M. DNA Marker；1. BC22/*EcoR* I；2. BC22/*Hind* III；3. BCt98/*EcoR* I；4. BCt98 *Hind* III。
A. Identification of mutant BCt98 using PCR；M. Marker DL2000；1. BC22；2, 3. BCt98；B. Identification of mutant BCt98 using Southern Blotting；M. DNA Marker；1. BC22/*EcoR* I；2. BC22/*Hind* III；3. BCt98/*EcoR* I；4. BCt98 *Hind* III。

图 2 突变体 BCt98 的 PCR 和 Southern Blotting 鉴定

Fig. 2 Identification of mutant BCt98 using PCR and Southern Blotting

2.3 突变体 BCt98 的 T-DNA 插入基因分析

利用 TAIL-PCR 技术，对突变体 BCt98 的基因组 DNA 进行扩增。结果发现，第 3 轮扩增获得了特异性的单一条带（图 3-A）。将第 3 轮特异性的扩增产物进行回收、克隆和测序。将所获得的序列与灰葡萄孢基因组数据库进行比对，发现试验所获得的序列为灰葡萄孢 *BC1G_07014.1* 基因的序列，*BC1G_07014.1* 基因编码质膜 ATP 酶（Plasma membrane ATPase）；进一步分析发现，T-DNA 插入位点位于 *BC1G_07014.1* 基因的第 3 个外显子上（图 3-B）。



A. TAIL-PCR 结果：M. Marker DL2000；1, 2. TAIL-PCR 第 3 轮扩增；3. TAIL-PCR 第 2 轮扩增；B. 突变体 BCt98 中 *BC1G_07014.1* 基因的结构。
A. Result of TAIL-PCR；M. Marker DL2000；1, 2. Results of the third cycle TAIL-PCR；3. Results of the second cycle TAIL-PCR；B. Structure of *BC1G_07014.1* gene in mutant BCt98。

图 3 突变体 BCt98 的 T-DNA 插入位点分析

Fig. 3 Analysis of T-DNA insertion site in mutant BCt98

2.4 突变体 BCt98 的突变基因鉴定

利用 RT-PCR 技术，以 *Tubulin* 基因为内参，利用特异性引物 P3（5'-CGTTGTCTATCGTATCGCTCTG-3'）和 P4（5'-TGTGGAGACACGCTGAAGTG-3'）对突变体 BCt98 中 *BC1G_07014.1* 基因的表达情况进行分析。结果发现，突变体 BCt98 中 *BC1G_07014.1* 基因的表达水平明显低于野生型（图 4），表明突变体 BCt98 中的 *BC1G_07014.1* 基因为突变基因。

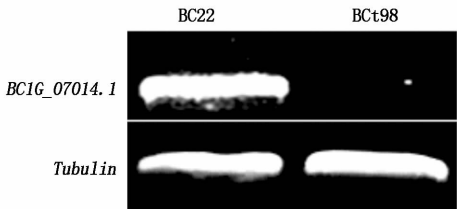


图 4 *BC1G_07014.1* 基因的表达分析

Fig. 4 Expression analysis of *BC1G_07014.1* gene

2.5 突变体 BCt98 的表型分析

对突变体 BCt98 表型进行分析，发现 BCt98 突变体的生长速度较快，菌落颜色较浅，菌丝较为致密，不产生分生孢子和菌核（图 5）。

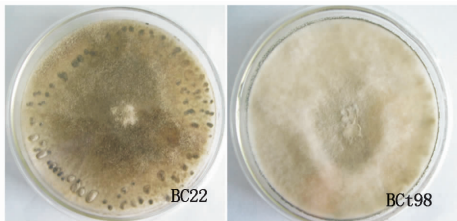


图 5 突变体 BCt98 的表型分析

Fig. 5 Phenotypic analysis of mutant BCt98

2.6 突变体 BCt98 的胞壁降解酶活性测定

提取灰葡萄孢野生型菌株 BC22 和突变体 BCt98 的 PMG、PG 和 Cx，并测定其酶活力。结果发现，突变体 BCt98 中 PMG、PG 和 Cx 的酶活性均较野生型明显增强（图 6）。

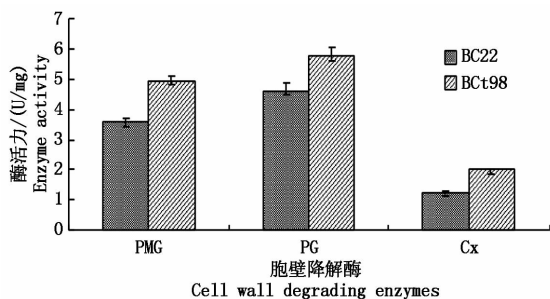


图6 突变体 BCt98 和野生型 BC22 的胞壁降解酶活性分析

Fig.6 Cell wall degrading enzyme activity of mutant BCt98 and wild type BC22

2.7 突变体 BCt98 的毒素活性测定

分别提取野生型菌株 BC22 和突变体 BCt98 的粗毒素,将各菌株的粗毒素接种到刺伤的番茄果实上。结果发现,突变体 BCt98 的毒素活力较野生型明显增强(图7)。

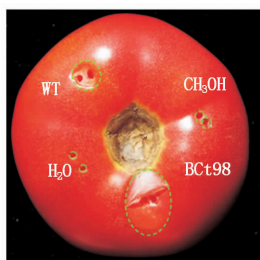


图7 突变体 BCt98 和野生型 BC22 的毒素活性分析

Fig.7 Toxin activity of mutant BCt98 and wild type BC22

3 讨论

灰葡萄孢作为植物病原真菌致病机理研究的模式系统之一,已经克隆和分析了 *Xyn11A*、*BcPls1*、*Bc-atrB*、*BcSAK1*、*Bcbot1*、*Bcchs3a*、*Bcchs1* 和 *Bcpme1* 等 100 余个致病相关的基因^[12-23],这些基因的阐释为明确灰葡萄孢致病机理奠定了基础。本实验室前期利用 ATMT 技术,构建了灰葡萄孢 T-DNA 插入突变体库。本研究通过离体接种方法,筛选灰葡萄孢突变体库,得到一株致病力增强的菌株 BCt98,该突变体生长速度较快,菌落颜色较浅,菌丝较为致密,不产生分生孢子和菌核。表明突变基因 *BC1G_07014.1* 可能参与灰葡萄孢的生长、发育和致病力的调控。

BC1G_07014.1 基因编码质膜 ATPase。文献报道,质膜 ATPase 是真菌质膜上转运质子的重要功能蛋白,目前对真菌质膜 ATPase 的研究主要集中在其结构、功能及活性调节方面^[24]。本研究发现灰葡萄孢的质膜 ATPase(*BC1G_07014.1*)可能参与调控病菌发育和致病力,但其调控的具体机理尚不明确,有待进一步的深入研究。下一步将构建该基因的同源重组载体和敲除突变体,并通过功能互补试验明确该基因的具体功能,为明确该基因调控病菌发育和

致病力的机制奠定基础。

灰葡萄孢的主要致病机制是产生胞壁降解酶和毒素类物质。为探讨 *BC1G_07014.1* 基因调控病菌致病的可能机制,本研究对野生型菌株 BC22 和突变体 BCt98 的胞壁降解酶 PMG、PG 和 Cx 活性及毒素活性。结果发现,突变体 BCt98 的 PMG、PG 和 Cx 活性及毒素活性均较野生型明显增强,表明突变体 BCt98 致病力的增强与胞壁降解酶和毒素活性相关,由此推测 *BC1G_07014.1* 基因参与调控病菌的胞壁降解酶和毒素代谢过程。但其调控机制尚不明确,需要进一步的深入研究。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Giraud T, Fortini D, Levis C, et al. RFLP markers show genetic recombination in *Botrytis fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) and transposable elements reveal two sympatric species[J]. Molecular Biology and Evolution, 1997, 14: 1177 - 1185.
- [4] Van Kan J A. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen[J]. Trends in Plant Science, 2006, 11(5): 247 - 253.
- [5] 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.
- [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] 安鑫龙,董金皋,韩建民. 玉米大斑病菌的 RAPD 分析 I. 应用 CTAB 法提取玉米大斑病菌 DNA[J]. 河北农业大学学报, 2001, 24(1): 38 - 41.
- [8] Mullins E D, 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.
- [9] 李培芬,赵福鑫,董丽萍,等. 灰葡萄孢 BcKMO 在病菌生长、发育和致病过程中的功能[J]. 中国农业科学, 2014, 47(15): 2971 - 2979.
- [10] 吴洁云. 灰葡萄孢角酯酶,胞壁降解酶种类及其对番茄植株的致病作用[D]. 扬州:扬州大学, 2007: 26 - 31.
- [11] 徐扩,张金林,侯淑英,等. BK2-灰葡萄孢产生的一种有除草活性的毒素组分[J]. 植物保护学报, 2006,

- 33(1):111–112.
- [12] Brito N, Espino J J, 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.
- [13] Cui Z, Ding Z, Yang X, *et al.* Gene disruption and characterization of a class V chitin synthase in *Botrytis cinerea* [J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2009, 55(11):1267–1274.
- [14] Gourgues M, Brunet-Simon A, Lebrun M H, *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.
- [15] Schoonbeek H, Del S G, De waard M A. The ABC Transporter BcatrB affects the sensitivity of *Botrytis cinerea* to the phytoalexin resveratrol and the fungicide fenpiclonil [J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2001, 14(4):562–571.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Soulié M C, Perino C, Piffeteau A, *et al.* *Botrytis cinerea* virulence is drastically reduced after disruption of chitin synthase class III gene (*Bcchs3a*) [J]. *Cellular Microbiology*, 2006, 8(8):1310–1321.
- [19] Soulie M C, Piffeteau A, Choquer M, *et al.* Disruption of *Botrytis cinerea* class I chitin synthase gene *bchsl* results in cell wall weakening and reduced virulence [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2003, 40(1):38–46.
- [20] Valette-Collet O, Cimerman A, Reignault P, *et al.* Disruption of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase gene *bcpmel* reduces virulence on several host plants [J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2003, 16(4):360–367.
- [21] Viaud M, Brunet-Simon A, Brygoo Y, *et al.* Cyclophilin a and calcineurin functions investigated by gene inactivation, cyclosporin a inhibition and cDNA arrays approaches in the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea* [J]. *Molecular Microbiology*, 2003, 50(5):1451–1465.
- [22] Viaud M, Fillinger S, Liu W, *et al.* A class III histidine kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea* [J]. *Molecular Plant-microbe Interactions*, 2006, 19(9):1042–1050.
- [23] Yamane Y I, Fujita J, Shimizu R I, *et al.* Production of cellulose-and xylan-degrading enzymes by a koji mold, *Aspergillus oryzae*, and their contribution to the maceration of rice endosperm cell wall [J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2002, 93(1):9–14.
- [24] 李万昌, 王俊伟, 彭 陈, 等. 真菌质膜 H⁺-ATPase 的研究进展 [J]. *江苏农业科学*, 2013, 41(11):16–18, 19.