

灰葡萄孢产孢相关基因 BC1G_03293 功能的初步研究

申德民^{1,2} 谢甲涛^{1,2} 陈桃¹ 付艳苹¹ 姜道宏^{1,2} 程家森^{1,2}

1. 华中农业大学湖北省作物病害监测和安全控制重点实验室, 武汉 430070;
2. 华中农业大学农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 据灰葡萄孢菌丝发育和菌核形成时期的 RNA-seq 数据, 挑选出在这 2 个时期表达量差异较大的基因 BC1G_03293 进行基因功能的研究。结果发现, BC1G_03293 在菌核发育时期表达明显上调, 表达量比菌丝生长时期上调了 70 倍以上。该基因编码的蛋白质含有 229 个氨基酸, N 端包含信号肽, 但不含有任何已知保守结构域。通过同源重组的方法得到了 BC1G_03293 的敲除转化子 Δ BC1G_03293-2 和 Δ BC1G_03293-4, 并运用农杆菌转化技术得到了互补转化子 Δ BC1G_03293-2-C2 和 Δ BC1G_03293-2-C3。BC1G_03293 基因敲除后生长、致病及菌核形成等表型无明显变化, 但敲除转化子的分生孢子产量显著下降, 仅为野生型菌株 B05.10 分生孢子产量的 45%, 并且 BC1G_03293 基因互补可使敲除转化子的产孢量得到明显恢复。结果说明 BC1G_03293 基因与灰葡萄孢的分生孢子形成相关。

关键词 灰葡萄孢; 分生孢子; BC1G_03293; 基因敲除与互补

中图分类号 S 432 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2018)01-0038-08

灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 可危害多种蔬果, 是一种全球范围内的重要病菌, 给蔬果种植造成了巨大的损失^[1-2]。灰葡萄孢侵染寄主后会在发病组织形成分生孢子作为再侵染源。无光环境下培养的灰葡萄孢几乎不形成分生孢子, 可发育出菌核^[3]。菌核是灰葡萄孢的菌丝休眠体, 能帮助灰葡萄孢度过极端环境, 自然条件下越冬, 成为来年灰霉病的初侵染源^[4]。灰葡萄孢菌核抵抗恶劣环境的能力极强, 可在农田中保持生命力达数年之长。残留在农田或寄主发病组织上的菌核越冬后, 条件适宜时发育出菌丝, 菌丝受到光照刺激产生分生孢子梗, 进而形成较多的分生孢子通过空气流动、降水或农业活动传播。分生孢子从寄主衰败的花瓣或受伤的表皮侵入, 在寄主表面萌发出芽管, 芽管通过气孔或伤口侵入, 或发育成附着胞侵染植物的表皮细胞^[4], 因此, 分生孢子在灰葡萄孢的传播中发挥关键的作用。此外, 灰葡萄孢的菌丝还可在生长中的果实或花朵中潜伏侵染, 只有在环境适宜时, 才会使寄主表现症状^[5]。

随着分子生物学技术的发展, 有关灰葡萄孢致

病、菌核形成及分生孢子产生的分子机制研究日益深入, 如今已鉴定出大量在灰葡萄孢侵染中发挥作用的毒性因子, 大致包含细胞壁降解酶^[6-7]、以葡双醛毒素 (botrydial) 和草酸为代表的毒素^[8-10]、MAP 激酶信号转导因子、cAMP 信号转导因子以及依赖钙调蛋白的信号转导因子等^[11-13]。灰葡萄孢的菌核形成相关基因也被大量鉴定, 如 MAPK 信号转导通路中的表达第 3 个 MAPK 的基因 *bmp3* 缺失后, 菌株在低渗培养基上生长速度变慢, 产孢下降, 无法产生菌核^[14], cAMP 信号通路中的腺苷酸环化酶 (adenylate cyclase, bac) 缺失后, 菌株生长变慢且不能形成菌核^[15]。有报道显示灰葡萄孢分生孢子的产生与光照刺激反应有关, 如光反应转录因子 (light-responsive transcription factors, LTFs) BcLTF1 和 BcLTF2 均参与了诱导分生孢子梗及分生孢子发育的过程。BcLTF2 是灰葡萄孢产孢的正向调控因子, 并且其转录受 BcLTF1 的负向调控^[3, 16], 而 BcLTF3 的缺失导致灰葡萄孢在黑暗条件下形成较多的分生孢子, 并可使灰葡萄孢在光照

收稿日期: 2017-05-31

基金项目: 国家公益性行业 (农业) 科研专项 (201303025)

申德民, 硕士研究生, 研究方向: 分子植物病理学, E-mail: sdsdm01@163.com

通信作者: 程家森, 博士, 教授, 研究方向: 分子植物病理学, E-mail: jiasencheng@mail.hzau.edu.cn

条件下产生分生孢子的时间提前和数量增加^[17]。此外,灰葡萄孢的产孢过程还受到自身信号通路的调控,如基因 *bmp1* 和 *BcSAK1* 编码的蛋白质是 MAP 激酶的同族体,这 2 个基因的缺失均会使该菌的孢子产量大幅降低^[18-19];表达 G 蛋白 $G\alpha$ 亚基的基因 *BCG3* 敲除之后,产孢量显著降低^[18],表达腺苷酸环化酶的基因 *bac* 缺失后,转化子的产孢量也大幅减少^[15]。

目前灰霉病的防治仍然以化学防治为主^[20],但面临着病菌产生抗药性和环境残留的问题^[21],缺乏绿色环保的防治方法。深入研究灰葡萄孢的菌核生长、分生孢子形成或致病机制可以为灰霉病防治提供新的理论依据。笔者根据灰葡萄孢转录组测序结果挑选了在灰葡萄孢菌核发育过程中表达显著上调的基因 *BC1G_03293* 进行研究,运用同源片段重组技术敲除了该基因,并对 *BC1G_03293* 敲除转化子进行了互补,同时深入分析了不同转化子在菌丝生长、菌核发育和分生孢子形成及致病等方面的生物学表型,初步探究了基因的功能,旨在为深入探究 *BC1G_03293* 在灰葡萄孢中的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 菌株和培养基

灰葡萄孢出发菌株 B05.10;4 °C 保存有菌核和菌丝块,-80 °C 保存孢子液于甘油中;大肠杆菌感受态细胞;农杆菌 EHA105 菌株;培养灰葡萄孢的 PDA 培养基;农杆菌和灰葡萄孢分生孢子共培养使用的 IM 或 Co-IM 培养基。

1.2 基因表达分析

以灰葡萄孢菌株 B05.10 菌丝生长和菌核发育时期的转录组测序数据为依据,挑选出表达差异量较大的基因 *BC1G_03293*。在 NCBI 中获得碱基序列。活化出发菌株 B05.10,20 °C,无光培养箱中生长 2 d 后,倒 PDA 平板,覆盖玻璃纸,用直径 5 mm 打孔器打取新鲜菌丝块接种至平板中央。在 3、6、9、12、15、18 和 21 d 时对灰葡萄孢生长各时期的菌丝进行收集,提取 RNA(RNase Reagent),RT-PCR 检测基因表达水平, β -*tubulin* 作为内参对照。

1.3 BC1G_03293 基因同源重组片段的获得

提取 B05.10 菌株的 DNA,以基因组 DNA 为模板,用引物 2UF/R 和 2DF/R 扩增获得 *BC1G_03293* 基因的上下游侧翼序列 U 和 D。同时以 pKS1004 质粒作为 PCR 模板,以 HYG-F/HY-R 和

YG-F/HYG-R 为引物扩增获取 HY 和 YG 片段。运用融合 PCR 的方法使 U 和 HY 融合获取同源重组片段 UHY,使 D 和 YG 融合获取同源重组片段 YGD。PCR 设计为 2 轮不同的 PCR,第一轮的 PCR 不加引物,引物需在下一轮 PCR 时加入。回收 PCR 产物,即可得到转化片段 UHY 和 YGD。分别对 UHY 和 YGD 进行 TA 克隆,得到无突变的质粒保存待用。

1.4 敲除转化及验证

用 PEG 介导同源转化片段转化灰葡萄孢的原生质体,通过潮霉素抗性平板的筛选后再进行单孢纯化^[22]。根据目的基因序列设计验证引物 *zg293-F/R*,该引物可在目的基因区域扩增到 1 条 777 bp 的条带。以发生同源重组后的碱基序列为模板设计 3 对引物用于 PCR 验证,*z293-1F/2R* 证明上游侧翼片段 U 的存在,*z293-3F/4R* 证明下游侧翼片段 D 的存在,*zhyg-F/R* 证明潮霉素基因的存在。抽提 B05.10 和单孢纯化的敲除转化子的 DNA,用以上 4 对引物验证。由于发生三重同源重组,纯合的敲除转化子能用 *z293-1F/2R*、*z293-3F/4R* 和 *zhyg-F/R* 扩增出条带,大小分别为 1 279、1 424、和 1 287 bp,*zg293-F/R* 扩增不出条带;B05.10 的 PCR 结果正好相反。同时以 β -*tubulin* 作为内参基因,分别以引物 RT2-F/R 为引物对 *BC1G_03293* 基因敲除转化子的 cDNA 进行扩增,在 RNA 水平上 1 次验证转化子的正确性。

1.5 基因互补转化子的获得与验证

使用网络分析软件 BDGP(http://www.fruit-fly.org/seq_tools/other.html)预测 *BC1G_03293* 基因的启动子,在预测启动子上游序列设计引物 C2-F,在终止子后设计引物 C2-R,并且在引物 C2-F/R 的 5' 端引入酶切位点 *BamH I*,以出发菌株 B05.10 的 DNA 为模板进行 PCR,获得基因 *BC1G_03293* 的互补片段 C2。TA 克隆 C2,检测片段 C2 有无碱基突变,选择 100% 无突变者用于以后试验。使用内切酶 *BamH I* 分别对 neo3300-III 载体和克隆片段 C2 的 T 质粒进行酶切,回收。载体酶切后需经去磷酸化处理,随后连接酶切回收得到的 C2 片段,得到互补质粒,互补质粒再电击转化农杆菌^[22]。农杆菌介导转化敲除转化子的分生孢子^[22],提取可继代培养互补突变体的 DNA,分别用 *zg293-F/R*(证明目的基因)、*zhyg-F/R*(证明潮霉素基因)和 *neo-2F/2R*(证明互补质粒上的新霉素基

因)进行 PCR 验证。如果用以上 3 对验证引物都能扩到对应大小的片段,就能证明该菌株为纯合目的条带。

表 1 试验所用引物

Table 1 Primers used in this study

| 引物名称 Primer name | 引物序列 Primer sequence |
|--|--|
| RT-PCR For RT-PCR analysis | |
| BC-tubulin-F | 5'-ATGTACGACCCTAAGAAC-3' |
| BC-tubulin-R | 5'-ATCCACTCAACGAAGTAG-3' |
| RT2-F | 5'-TGAGTGGAATAGTACGGTGACGA-3' |
| RT2-R | 5'-ACCAACACGCCCGTAACTG-3' |
| 构建基因重组片段 For construction of <i>BC1G_03293</i> recombinant fragments | |
| 2UF | 5'-GGATTTCGGATACAACCTTCTATTTCGG-3' |
| 2UR | 5'-AGGGCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGTCAAAAGAAAACCTCAATCTCCAC-3' |
| 2DF | 5'-GACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCGTTTTATTGGATTGTGGTGTGGTGA-3' |
| 2DF | 5'-TAGGGATCCGACGAAACCTAAAGTA-3' |
| HYG-F | 5'-CGGCATCTACTCTATTCTTTGCCCT-3' |
| HYG-R | 5'-GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCT-3' |
| YG-F | 5'-GTATTGACCGATTTCCTTGCGGTCCG-3' |
| HYG-R | 5'-GGCTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTC-3' |
| 验证敲除转化子 For PCR verification of the knockout mutants | |
| z293-1F | 5'-CTTGAAGAAGTTGGATGGTTTGGAT-3' |
| z293-2R | 5'-GCAAGGAATCGGTCAATACACTACA-3' |
| z293-3F | 5'-CACCAAGCAGCAGATGATAATAATG-3' |
| z293-4R | 5'-TACCACTTCTATGGATTCCGAACCTC-3' |
| zhyg-F | 5'-CATCTACTCTATTCTTTGCCCTCG-3' |
| zhyg-R | 5'-GTTTGACAAGATGGTTCATTTAGGC-3' |
| zg293-F | 5'-ATGTATGTCAATCTTTTGACGGCGG-3' |
| zg293-R | 5'-CTACAAAACCCACACCAATCCCACC-3' |
| 构建互补转化子 For construction of the complemented mutants | |
| C2-F | 5'-CGGGATCCACTTTCTGTCTACATCGTTGCCCTC-3' |
| C2-R | 5'-CGGGATCCGAACAAATCCGTGAGAGGACAGCTA-3' |
| zg293-F | 5'-ATGTATGTCAATCTTTTGACGGCGG-3' |
| zg293-R | 5'-CTACAAAACCCACACCAATCCCACC-3' |
| zhyg-F | 5'-CATCTACTCTATTCTTTGCCCTCG-3' |
| zhyg-R | 5'-GTTTGACAAGATGGTTCATTTAGGC-3' |
| neo-2F | 5'-AAGGCTATTGGTGTATTATGGCTCTC-3' |
| neo-2R | 5'-GGTATGCGTTTTGACACATCCACTA-3' |

1.6 转化子的菌丝生长速度,菌丝尖端形态,菌落形态观察,菌核产量测定和产孢量的测定

参考 Zhang 等^[22]和薛晓梦^[23]的试验方法。

1.7 孢子萌发率测定

收集分生孢子,稀释各菌株孢子液至 5×10^5 个/mL 左右的浓度。吸取 100 μ L 的孢子液涂 PDA 平板,每皿 5 mL PDA。涂板 6 h 后计数孢子的萌发率,每次计数 200 个分生孢子中萌发的孢子数。各菌株设置 3 次重复。

1.8 致病力测定

离心富集分生孢子,用 PDB 悬浮调节浓度到 5×10^5 个/mL 上下。在生长 2 个月的番茄 A57 离体叶片的主叶脉左侧滴加 5 μ L 的 B05.10 分生孢子液,主叶脉右侧滴加 5 μ L 的敲除转化子的分生孢子液,20 $^{\circ}$ C 光暗交替恒定湿度培养,观测叶片发病状

况。各菌株设置 3 次重复。

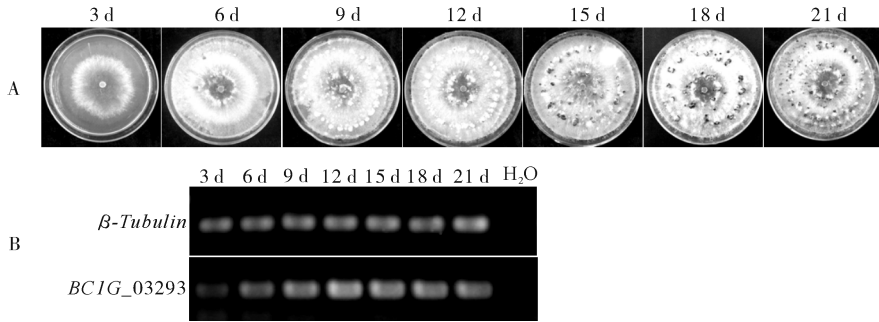
2 结果与分析

2.1 灰葡萄孢基因 *BC1G_03293* 的表达模式分析

RNA-seq 结果显示基因 *BC1G_03293* 在菌核形成时期表达上调高达 70 倍以上,该基因的开放阅读框由 777 个碱基组成,编码 1 个包含 229 个氨基酸的蛋白质,SignalP 4.1 Server 分析发现该蛋白的 N 端前 17 个氨基酸构成一个信号肽,初步推断此蛋白属于分泌蛋白,但在 NCBI 上未比对到任何已知保守结构域。

为了进一步明确 *BC1G_03293* 在灰葡萄孢菌丝生长和菌核发育时期基因表达量的差异,分别收集了黑暗条件下生长 3、6、9、12、15、18 和 21 d 的菌丝和菌核(图 1A)。提取 RNA 进行 RT-PCR,结果

证实基因 *BC1G_03293* 在菌核形成阶段表达量明显上调(图 1B)。



A:不同发育时期灰葡萄孢 B05.10 的菌落形态; B:*BC1G_03293* 基因在菌丝生长和菌核形成各阶段的表达水平。A:Colony morphology of *B. cinerea* B05.10 in different development stages; B:Expression level of *BC1G_03293* in mycelial growth and sclerotial formation stage.

图 1 基因 *BC1G_03293* 的表达模式

Fig.1 Expression pattern of gene *BC1G_03293*

2.2 *BC1G_03293* 基因的敲除及互补

基于同源重组原理的基因敲除及其验证策略如图 2A、2B 所示,首先基因上游片段 U 和潮霉素基因中中游片段 HY 融合 PCR 得到 UHY;基因下游片段 D 和潮霉素基因中下游片段 YG 融合 PCR 得到 YGD(图 2C)。回收纯化同源转化片段 UHY 和 YGD 后,连接 pMD19-T(Simple)载体。进行质粒 PCR 获得高浓度的同源转化片段,再转化 B05.10 的原生质体,得到了敲除转化子。纯合的敲除转化子能用 z293-1F/2R、z293-3F/4R 和 zhyg-F/R 扩增出目的条带,而 zg293-F/R 扩增不出条带;B05.10 的 PCR 结果与之相反。如图 2D,验证筛选出 2 株纯合的敲除转化子 $\Delta BC1G_03293-2$ 和 $\Delta BC1G_03293-4$ 。并且我们对敲除转化子在转录水平也进行了验证,结果发现在出发菌株 B05.10 的 cDNA 中能扩增到目的基因条带,而敲除转化子 $\Delta BC1G_03293-2$ 和 $\Delta BC1G_03293-4$ 的 cDNA 中则扩增不到任何条带,表明目的基因在转录水平上没有表达(图 2E),进一步证实了目的基因已被完全敲除。

在获得敲除转化子的基础上,我们以 $\Delta BC1G_03293-2$ 菌株为基础进行了基因互补。对候选互补转化子用引物 zg293-F/R、zhyg-F/R 和 neo-2F/2R 进行 PCR 扩增。如果用以上 3 对验证引物都能扩到相应片段,则证明该菌株为纯合的互补转化子,而 B05.10 只能用 zg293-F/R 扩到条带。如图 2F 所

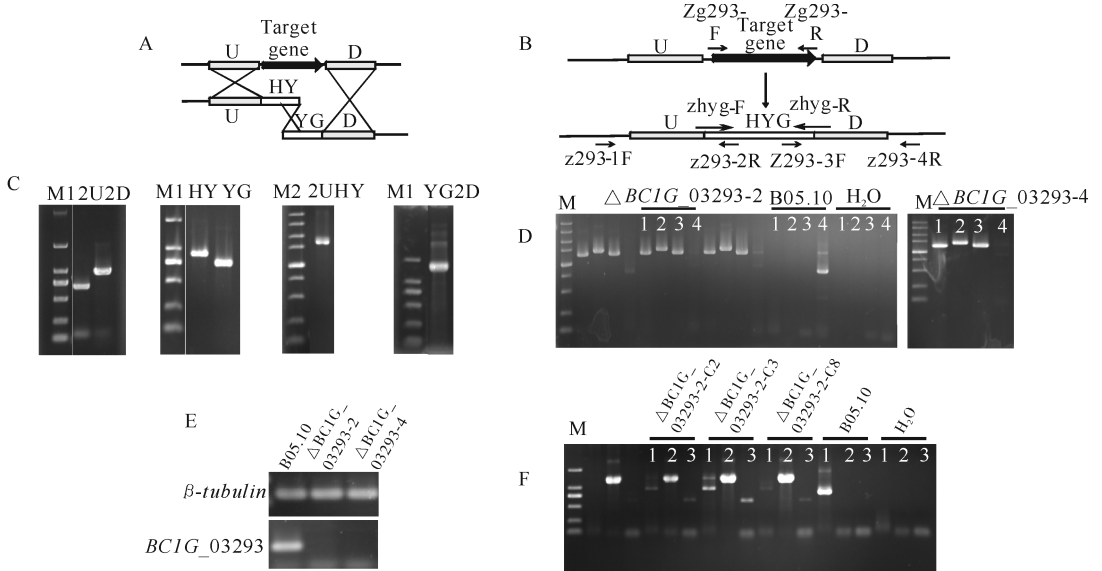
示,共得到 3 株纯合的互补转化子 $\Delta BC1G_03293-2-C2$ 、 $\Delta BC1G_03293-2-C3$ 和 $\Delta BC1G_03293-2-C8$ 。

2.3 *BC1G_03293* 敲除转化子的生长速度、菌丝尖端形态及致病力观测

在获得 *BC1G_03293* 敲除转化子后,活化不同菌株并接种于 PDA 培养基进行生长速度测试,结果表明在 PDA 培养基上出发菌株和敲除转化子的生长速度无显著差异(图 3A)。在 20 倍镜下观察 $\Delta BC1G_03293-2$ 和 $\Delta BC1G_03293-4$ 的菌丝尖端,其在尖端的分支、粗度、弯曲及密集程度上表现的与 B05.10 相比无明显差异。接种 B05.10 和 $\Delta BC1G_03293-2$ 的孢子液至番茄叶片主叶脉的左右两侧,发现 B05.10 与 $\Delta BC1G_03293-2$ 所导致的病斑大小无显著差异(图 3C、D),结果显示敲除该基因对灰葡萄孢的生长及致病均未表现明显影响。

2.4 *BC1G_03293* 敲除转化子的菌落形态和菌核干质量统计

观察记录 B05.10 和敲除转化子 $\Delta BC1G_03293-2$ 和 $\Delta BC1G_03293-4$ 在生长第 8、16 和 24 天的菌落形态,如图 4A 所示,各菌株的菌落形态和菌核发育状况无明显差异。收集培养至 30 d 的菌核,烘干称质量后对各菌株菌核干质量进行差异显著性分析,结果表明敲除转化子 $\Delta BC1G_03293-4$ 的菌核干质量与 B05.10 相比无显著区别,但转化子 $\Delta BC1G_03293-2$ 的菌核干质量与 B05.10 相比略有降低(图 4B),该基因总体对菌核形成的影响并不显著。



A:同源重组原理示意图; B:敲除转化子的 PCR 验证思路, *zg293-F/R*; 目标基因验证引物, *z293-1F/2R*; 上游验证引物, *z293-3F/4R*; 下游验证引物, *zhyg-F/R*; 扩增潮霉素基因片段; C: *BC1G_03293* 基因同源重组片段的获得, M1: DL2000 marker, M2: DL5000 marker; D: *BC1G_03293* 敲除突变体的 PCR 筛选, M: DL5000 marker; 泳道 1: 片段 U 的验证; 泳道 2: 片段 D 的验证; 泳道 3: HYG 的 PCR 验证; 泳道 4: 基因 *BC1G_03293* 的 PCR 验证; E: *BC1G_03293* 基因敲除转化子 RT-PCR 验证; F: *BC1G_03293* 基因互补转化子 PCR 验证, L1, 2, 3: 分别用引物 *zg293-F/R*、*zhyg-F/R* 和 *neo-2F/2R* 进行 PCR 扩增。A: The principle of homologous recombination; B: The strategy for PCR verification of knockout mutants, *zg293-F/R*; Identification of gene *BC1G_03293*; *z293-1F/2R*; Identification of the upstream; *z293-3F/4R*; Identification of the downstream; *zhyg-F/R*; Identification of HYG; C: The preparation of *BC1G_03293* recombinant fragments, M1: DL2000 marker; M2: DL5000 marker; D: The certification of the *BC1G_03293* knockout mutants by PCR, M: DL5000 marker; Lane 1: Identification of U; Lane 2: Identification of D; Lane 3: Identification of HYG; Lane 4: Identification of gene *BC1G_03293*; E: Identification of the *BC1G_03293* knockout mutants by RT-PCR; F: Test and verify the *BC1G_03293* complemented transformants by PCR, Lane 1, 2, 3: PCR amplification by the primer of *zg293-F/R*, *zhyg-F/R*, *neo-2F/2R*.

图 2 *BC1G_03293* 基因敲除转化子及互补转化子的获得

Fig.2 Generation of *BC1G_03293* gene knockout mutants and complemented transformants

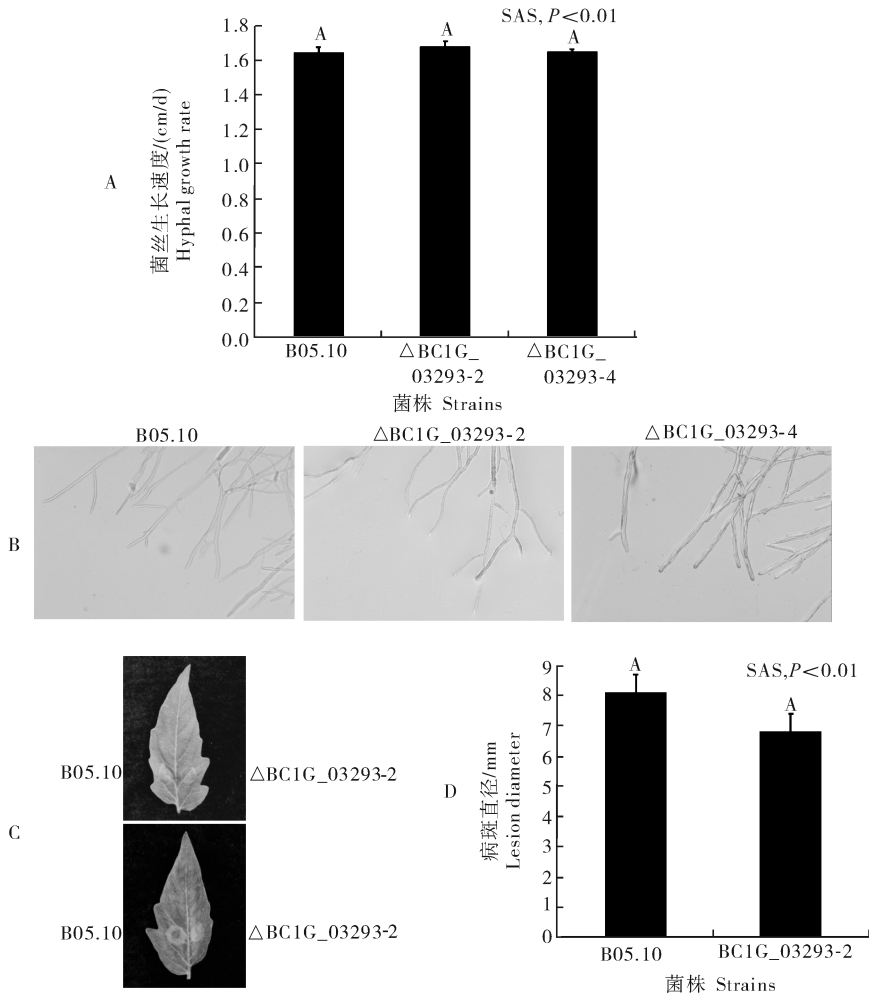
2.5 *BC1G_03293* 敲除转化子分生孢子产生及孢子萌发率测定

光暗交替培养第 7 天时, 敲除转化子 $\Delta BC1G_03293-2$ 产孢明显降低, 而基因互补可以恢复菌株的产孢能力(图 5A), 用 10 mL 的无菌水收集各菌株产生的分生孢子, 用血球计数板计数分生孢子的浓度。统计分析各菌株的产孢量, 发现 B05.10 的产孢量每皿可达到 18.17×10^7 个左右, 敲除转化子 $\Delta BC1G_03293-2$ 的产孢量为每皿 8.11×10^7 个左右, 仅相当于 B05.10 产孢量的 45%。*BC1G_03293* 基因互补则使其产孢能力明显恢复, 互补转化子 $\Delta BC1G_03293-2-C2$ 和 $\Delta BC1G_03293-2-C3$ 的产孢量分别为每皿 16.22×10^7 个和 14.44×10^7 个左右(图 5B), 结果说明基因 *BC1G_03293* 在灰葡萄孢的产孢过程中发挥一定的作用。但 *BC1G_03293* 对分生孢子的萌发无明显影响, 涂抹在 PDA 上 6 h 后计数孢子的萌发率, 发现敲除转化子的孢子萌发率

与 B05.10 和互补转化子相比无明显差异, 各菌株的孢子萌发率均在 85% 附近(图 5C)。

3 讨论

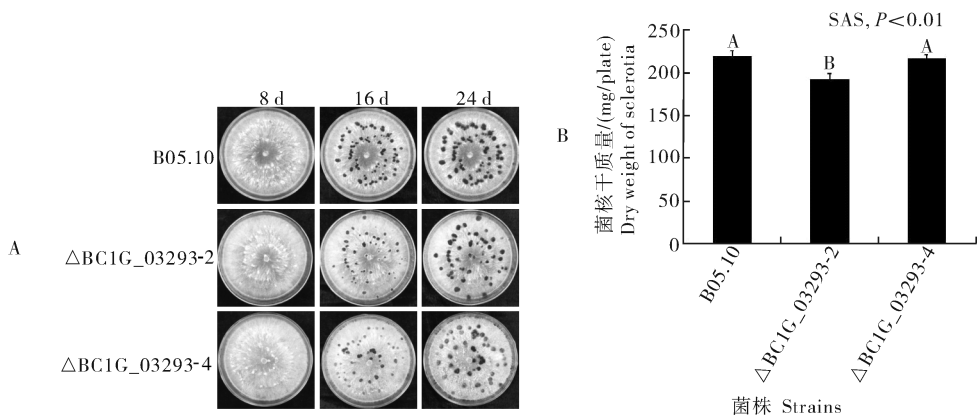
前期研究我们通过转录组测序获得了灰葡萄孢 B05.10 在菌丝生长和菌核发育时期的基因表达谱。本研究选择了在菌核发育时期表达明显上调的 *BC1G_03293* 进行基因功能研究。该基因编码 1 个含 229 个氨基酸的蛋白质, 预测 N 端包含信号肽。为了研究该基因对灰葡萄孢的作用, 通过同源重组技术敲除了该菌的 *BC1G_03293* 基因, 得到了纯合的敲除转化子 $\Delta BC1G_03293-2$ 和 $\Delta BC1G_03293-4$, 并获得了互补转化子 $\Delta BC1G_03293-2-C2$ 和 $\Delta BC1G_03293-2-C3$ 。*BC1G_03293* 基因的敲除对灰葡萄孢的生长、菌核发育及对番茄叶片的毒性等均未产生显著的影响, 但转化子的产孢量大幅下降, 大约为 B05.10 产孢量的 45%, 而基因互补可使产



A:不同菌株的生长速度测定; B:菌丝尖端形态的观察; C:PDB 孢子悬浮液接种番茄叶片后 48 h; D:对病斑直径的统计分析。A: The growth rate of different strains; B: The morphological character of mycelium tip; C: Disease symptoms on tomato leaves inoculated with conidia suspended in PDB after 48 hours; D: Calculation and comparison of lesion diameter.

图 3 不同菌株的生长速度、菌丝尖端表型及致病力检测

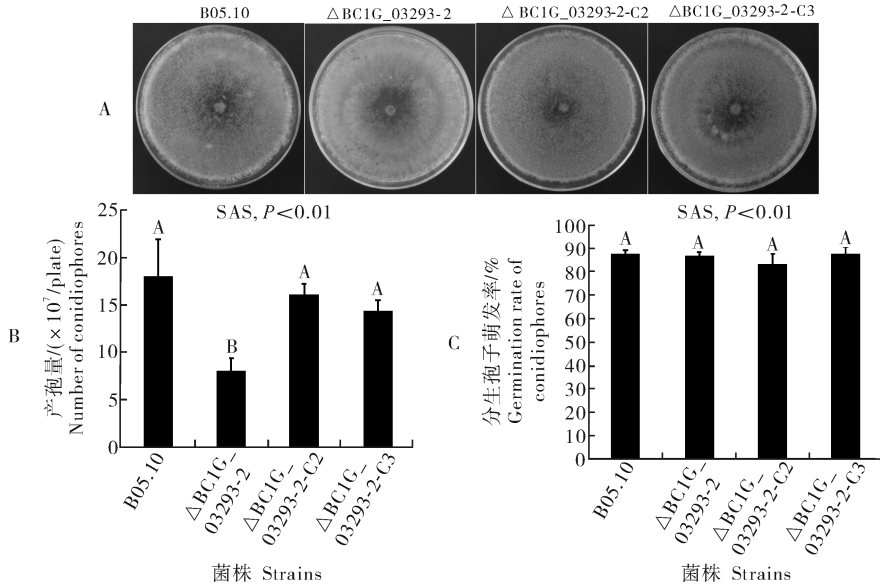
Fig.3 Growth rate, morphological character of mycelium tip and pathogenicity test of different strains



A:转孢子菌核形成过程; B:第 30 天转孢子菌核质量统计。A: Sclerotia formation process of transformants; B: Sclerotia weight of strains at 30 d.

图 4 各菌株菌落形态和菌核干质量统计

Fig.4 Colonial morphology and sclerotia weight of strains



A:培养第 7 天时产孢情况; B:每皿分生孢子数量; C:第 6 小时分生孢子的萌发率。A:Distribution of the conidia at 7 d; B:The number of the spores in each plate; C:The germination rate of conidia at 6 h.

图 5 菌株分生孢子产量和萌发率的观测

Fig.5 Observation of the conidiation and germination rate

孢量得到较大程度的恢复。研究结果表明 BC1G_03293 基因在灰葡萄孢中与分生孢子产生密切相关。

BC1G_03293 基因是根据菌丝生长和菌核形成阶段的转录组筛选出来的,该基因在菌核形成阶段的表达量明显上调,但基因敲除后对菌核形成并无显著影响。可能是因为该基因虽然在菌核形成阶段发挥一定作用,但其在菌核形成方面的功能并不是必须的;也有可能其他基因互补了其于菌核形成相关的功能。此外,我们获得的基因敲除转化子可能存在多拷贝问题,影响了对基因功能的深入分析,因此需要对敲除转化子进行 Southern blot 验证以确定同源转化片段未发生多拷贝插入。本研究结果证明基因 BC1G_03293 参与调控了灰葡萄孢的产孢过程,但具体机制还不明确,可进一步探究敲除转化子在不同条件下的产孢情况,并研究该基因的互作靶标或参与的信号通路,明确其在产孢过程中的调控机制。

参 考 文 献

- [1] WILLIAMSON B, TUDZYNSKI B, TUDZYNSKI P, et al. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease [J]. *Molecular plant pathology*, 2007, 8: 561-580.
- [2] WEIBERG A, WANG M, LIN F M, et al. Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways [J]. *Science*, 2013, 342: 118-123.
- [3] SCHUMACHER J, SIMON A, COHRS K C, et al. The transcription factor BeLTf1 regulates virulence and light responses in the necrotrophic plant pathogen *Botrytis cinerea* [J]. *PLoS genetics*, 2014, 10: e1004040.
- [4] AMSELEM J, CUOMO C A, VAN KAN J A L, et al. Genomic analysis of the necrotrophic fungal pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea* [J]. *PLoS genetics*, 2011, 7(8): 1-27.
- [5] MCNICOL R J, WILLIAMSON B, DOLAN A. Infection of red raspberry styles and carpels by *Botrytis cinerea* and its possible role in post-harvest grey mould [J]. *Annals of applied biology*, 1985, 106: 49-53.
- [6] TEN HAVE A, MULDER W, VISSER J, et al. The endopolygalacturonase gene *Bcpg1* is required for full virulence of *Botrytis cinerea* [J]. *Molecular plant-microbe interactions*, 1998, 11: 1009-1016.
- [7] ESPINO J J, BRITO N, NODA J, et al. *Botrytis cinerea* endo- β -1,4-glucanase Cel5A is expressed during infection but is not required for pathogenesis [J]. *Physiological molecular plant pathology*, 2005, 66: 213-221.
- [8] COLMENARES A J, ALEU J, DURAN-PATRON R, et al. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea* [J]. *Journal of chemical ecology*, 2002, 28: 997-1005.
- [9] DEIGHTON N, MUCKENSCHNABEL I, COLMENARES A J, et al. Botrydial is produced in plant tissues infected by *Botrytis cinerea* [J]. *Phytochemistry*, 2001, 57: 689-692.

- [10] KARS I, KROOSHOF G, WAGEMAKERS C A M, et al. Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pastoris* [J]. *Plant journal*, 2005, 43: 213-225.
- [11] MARSCHALL R, TUDZYNSKI P. BeIqg1, a fungal IQGAP homolog, interacts with NADPH oxidase, MAP kinase and calcium signaling proteins and regulates virulence and development in *Botrytis cinerea* [J]. *Molecular microbiology*, 2016, 101(2): 281-298.
- [12] SCHULZE GRONOVER C, KASULKE D, TUDZYNSKI P, et al. The role of G protein alpha subunits in the infection process of the gray mold fungus *Botrytis cinerea* [J]. *Molecular plant-microbe interactions*, 2001, 14: 1293-1302.
- [13] GIOTI A, SIMON A, LE PECHEUR P, et al. Expression profiling of *Botrytis cinerea* genes identifies three patterns of up-regulation in planta and an FKBP12 protein affecting pathogenicity [J]. *Molecular biology*, 2006, 358: 372-386.
- [14] RUI O, HAHN M. The Slr2-type MAP kinase *bmp3* of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plantsurface sensing, and host tissue colonization [J]. *Molecular plant pathology*, 2007, 8: 173-184.
- [15] KLIMPEL A, GRONOVER C S, WILLIAMSON B, et al. The adenylate cyclase (BAC) in *Botrytis cinerea* is required for full pathogenicity [J]. *Molecular plant pathology*, 2002, 3: 439-450.
- [16] COHRS K C, SIMON A, VIAUD M, et al. Light governs asexual differentiation in the grey mould fungus *Botrytis cinerea* via the putative transcription factor BeLTF2 [J]. *Environmental microbiology*, 2016, 18: 4068-4086.
- [17] BRANDHOFF B, SIMON A, DORNIEDEN A, et al. Regulation of conidiation in *Botrytis cinerea* involves the light-responsive transcriptional regulators BeLTF3 and BeREG1 [J]. *Current genetics*, 2017, 3: 1-19.
- [18] DOHLEMANN G, BERNDT P, HAHN M. Different signalling pathways involving a G-alpha protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia [J]. *Molecular microbiology*, 2006, 59: 821-835.
- [19] SEGMULLER N, ELLENDORF U, TUDZYNSKI B, et al. BeSAKI, a stress activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea* [J]. *Eukaryotic cell*, 2007, 6: 211-221.
- [20] 石延霞, 唐明, 晋知文, 等. 蔬菜作物灰葡萄孢菌对不同类型杀菌剂的抗性评价 [J]. *中国蔬菜*, 2016(3): 60-65.
- [21] 陈月凤, 马丽敏, 高豫汝, 等. 几种新型杀菌剂对葡萄灰霉病的防治效果 [J]. *南京农专学报*, 2002, 18(2): 39-40.
- [22] ZHANG X L, LIU X Q, ZHAO Y L, et al. Histone H3 lysine 9 methyltransferase DIM5 is required for the development and virulence of *Botrytis cinerea* [J]. *Frontier in microbiology*, 2016, 7: 1-11.
- [23] 薛晓梦. 灰葡萄孢致病和菌核形成相关基因功能的初步研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2016.

Function of conidiation related gene *BC1G_03293* in *Botrytis cinerea*

SHEN Demin^{1,2} XIE Jiatao^{1,2} CHEN Tao¹
FU Yanping¹ JIANG Daohong^{1,2} CHENG Jiasen^{1,2}

1. Provincial Key Laboratory of Plant Pathology of Hubei Province,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;

2. State Key Laboratory of Agricultural Microbiology, Huazhong Agricultural
University, Wuhan 430070, China

Abstract According to the RNA-Seq mycelium growth and sclerotia formation stage, was selected to study in *B. cinerea*. The transcript level of *BC1G_03293* during sclerotial formation stage was higher than that during mycelium growth stage. The *BC1G_03293* of 229 aa signal peptide on the N end and no known conserved domain. The knockout mutants $\Delta BC1G_03293-2$ and $\Delta BC1G_03293-4$ were obtained using the homologous recombination method. The complemented transformants $\Delta BC1G_03293-2-C2$ and $\Delta BC1G_03293-2-C3$ were also by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation technique. The deletion of *BC1G_03293* did not affect the growth, pathogenicity and formation of sclerotia. The conidia production of the knockout mutants obviously decreased and was approximately 45% of the wild type strain. And the conidia production of the complemented transformants recovered obviously. Our research results suggested that *BC1G_03293* is involved the regulation of conidiation of *B. cinerea*.

Keywords *Botrytis cinerea*; conidia; *BC1G_03293*; gene knockout and complement

(责任编辑: 边书京)