

柑橘采后病原菌意大利青霉 creA 基因的克隆及表达分析

王 萌 杨书珍 刘寒寒 张美红 彭丽桃

华中农业大学食品科学技术学院, 武汉 430070

摘要 为初步分析柑橘采后病原菌意大利青霉(*Penicillium italicum*)碳代谢调控因子 CreA 的功能,克隆到意大利青霉的 *creA* 基因。*PicreA* 基因全长 1 236 bp, 无内含子, PiCreA 蛋白由 411 个氨基酸组成, 含有 2 个转录因子典型的锌指结构域。系统进化分析表明, PiCreA 蛋白与扩展青霉(*Penicillium expansum*)亲缘性最高。采用荧光定量 PCR 方法, 观察到 *PicreA* 基因面对不同碳源诱导具有不同的表达响应。对于单糖一般在短时间内诱导得到较高表达, 随着时间延长, 抑制碳源葡萄糖诱导 *PicreA* 呈现先下降再上升的趋势, 推测发生了 *PicreA* 的自我抑制; 而在去抑制碳源木糖环境中, *PicreA* 的表达量略有下降并逐渐保持相当高的水平。对于非糖类的去抑制碳源乙醇, *PicreA* 基本维持稳定的较高表达状态。*PicreA* 基因在整个意大利青霉侵染柑橘过程中稳定表达。

关键词 柑橘; 意大利青霉; *creA*; 碳代谢抑制; 生物信息学分析; RT-PCR

中图分类号 S 436.661.1⁺9 : Q 786 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)04-0045-10

柑橘采后病害青霉病由意大利青霉(*Penicillium italicum*)引发, 可造成采后经济损失的 10%~30%^[1]。目前控制青霉病的方法主要依赖化学农药防治, 但由于农药种类相对单一, 且长期使用会导致病原菌的抗药性显著增强^[2], 生产上药剂使用量的不断加大, 也会极大增加食品安全风险和环境污染风险^[3]。寻找高效、安全的控制技术措施, 成为防治柑橘病害、实现绿色保鲜的迫切问题。深入了解意大利青霉与柑橘果实在采后贮藏期间的相互作用, 是控制果实腐烂问题的关键理论基础。

研究表明, 果实采收后, 病原菌的感染与宿主的抗性是不断变化的动态过程^[4-5]。在宿主成熟期间, 由果实伤口侵入并逐渐活跃的定植过程, 病原菌需要克服宿主的防御活动, 适应不同时期的宿主营养条件^[6]。而对于柑橘类水果, 伴随不同成熟阶段, 果实中的可溶性糖含量和种类不同^[7]。为了利用寄主中的糖类作为碳源, 微生物中存在一套全局监控调节机制, 以优先利用简单的碳源, 此机制即碳代谢抑制(carbon catabolite repression, CCR)。CCR 可以

确保微生物优先利用快速代谢的糖类如葡萄糖, 而不利用复杂的次级碳源, 同时抑制与次级碳源利用的相关基因表达^[8]。

目前已经对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中的 CCR 进行了大量研究, 包括葡萄糖存在时对其碳代谢的影响, 及葡萄糖缺失时替代碳源的解除抑制过程^[9]。在丝状真菌中, 对遗传模式生物构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中的 CCR 进行了最广泛的研究^[10]。在 *A. nidulans* 中的 CCR 已被确定与 CreA (catabolite responsive elements, Cre)、CreB、CreC 和 CreD 相关^[11]。其中 CreA/Cre1 作为一种核心调控因子, 通过与丝状真菌中靶基因的启动子区域结合直接调节 CCR。含有 2 个 Cys₂ His₂ 锌指结构域^[12]的负调控因子 CreA/Cre1 在多个丝状真菌中被报道, 包括黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[13]、核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)^[14]、镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)^[15]、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)^[16]、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)^[17]等。

收稿日期: 2019-03-06
基金项目: 国家自然科学基金项目(31871850)
王 萌, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬贮藏与保鲜. E-mail: 1403118035@qq.com
通信作者: 彭丽桃, 博士, 教授, 研究方向: 农产品贮藏与加工. E-mail: penglt12@mail.hzau.edu.cn

CCR 被广泛报道可调节真菌生长和致病过程。CCR 机制中的关键转录因子 CreA 在真菌生长和发育中具有显著的影响,缺失 *creA* 基因后,禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)的生长速率相比野生型下降了 90%^[18]。在黄曲霉(*Aspergillus flavus*)中,CreA 缺失影响其菌落形态,气生菌丝产生能力明显减弱,在细胞分化中隔膜数量显著减少,表明 CreA 影响黄曲霉的营养生长和发育^[19]。对球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)的 *creA* 缺失突变体的研究表明,CreA 调节因子的缺失导致其氨基酸毒性,致病力部分丧失^[20]。

本试验克隆 *PicreA* 基因,并观察 *PicreA* 在不同碳源环境下和致病过程中的表达情况,为进一步研究该基因在意大利青霉与柑橘果实互作中的调控作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与培养基

意大利青霉(*Penicillium italicum*)菌株 P-5,从自然发病柑橘果实上分离,接种表现出典型的青霉病症状。

PDA 培养基:马铃薯 200 g,加入 1 L 蒸馏水,煮沸后取滤液加入蔗糖 10 g,琼脂 20 g。

PDB 培养基:马铃薯 200 g,加入 1 L 蒸馏水,煮沸后取滤液加入蔗糖 10 g。

LB 培养基:胰蛋白胨 10 g,酵母浸粉 5 g,NaCl 10 g,用 2 mol/L NaOH 溶液调 pH 至 7.4,加双蒸水(ddH₂O)至 1 L。

MM(minimal medium)培养基:KH₂PO₄ 11 mmol/L,NaNO₃ 70 mmol/L,KCl 7 mmol/L,MgSO₄·7H₂O 2 mmol/L,ZnSO₄·7H₂O 76 μmol/L,FeSO₄·7H₂O 18 μmol/L,CuSO₄·5H₂O 6.4 μmol/L,H₃BO₃ 178 μmol/L,MnSO₄·H₂O 25 μmol/L,Na₂MoO₄·H₂O 6.2 μmol/L,CaCl₂ 0.45 μmol/L。

完全培养基:MM 培养基,加入 20 g/L 葡萄糖。

1.2 试剂

胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒、真菌 RNA 抽提试剂盒,购自上海生工有限公司;反转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒、DNA Marker、ex Taq 聚合酶、T4 连接酶,购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.3 PicreA 基因的克隆

从 GenBank 上分别下载 *Aspergillus niger* (GenBank 登录号:AAA32690.1)、*Trichoderma reesei* (GenBank 登录号:BAA09784.1)、*Botrytis cinerea* (GenBank 登录号:CAA76329.1)和 *Penicillium decumbens* (GenBank 登录号:AGY46356.1)的 CreA 同源序列,并用 DNAMAN 软件进行多序列比对,获得 CreA 蛋白序列在不同物种间的保守结构域。根据保守区域设计 1 对简并引物 CreA2-F/R,见表 1。

抽提意大利青霉的 RNA,并反转录得到 cDNA,以此 cDNA 为模板,CreA2-F/R 为引物进行 PCR 扩增,并进行电泳检测。将扩增得到的 700 bp 片段进行纯化回收,由上海生工有限公司完成测序。将测得的序列利用 BioEdit 软件进行本地 DNA 序列比对(blastn),将这段 700 bp 序列定位于 NCBI 已公布的意大利青霉基因组中,参考基因组序列,设计引物 CreA-U-F/R、CreA-D-F/CreA2-R-new(表 1)对 *PicreA* 基因及其上下游序列进行克隆并测序。

表 1 PCR 扩增所用引物序列

Table 1 Primer sequences used for PCR amplification	
引物 Primer	引物序列 Primer sequence
CreA2-F	TTCCACCGNYTNGAGCACC
CreA2-R	GCNARNGGRGTGTGGTC
CreA-U-F	CGGGGTACCATCGTCGTCTCCAGGTTC
CreA-U-R	GCTCTAGAATGTGGTTGGCGTAGTTG
CreA-D-F	CGGGGTACCTCCAACCTACGCCAACCAC
CreA2-R-new	GCTCTAGAGGATAGAGCGG-GAAATACATAC
Actin-F	CATTGAGCACGGTGTGTGCA
Actin-R	CTGGGTCATCTTCTCACGGT
Q-creA-F	GCTTGTTACGCGCTCTCATG
Q-creA-R	TTCTGTCAACCAGGGAATTG

1.4 PicreA 基因的生物信息学分析

对 *PicreA* 基因上游序列进行启动子区域和顺式调控元件预测(http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html; <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)。利用 MEGA 软件构建 PiCreA 蛋白的系统进化树,并对其相关结构域进行预测(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)。在线分析 PiCreA 蛋白一级结构和理化性质(<https://web.expasy.org/protparam/>),利用 SOPMA 在线预测 PiCreA 蛋白的二级结构(https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html),在线预测 PiCreA 蛋白的三级结构(

model.expasy.org/# opennewwindow),同时预测蛋白磷酸化修饰位点(<http://kinasephos.mbc.nc-tu.edu.tw/predict.php>; <http://www.dabi.temple.edu/disphos/pred/predict>)以及亚细胞定位(<https://psort.hgc.jp/form2.html>)、跨膜结构域(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)和信号肽分析(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。

1.5 *PicreA* 基因的定量表达分析

以意大利青霉肌动蛋白基因(β -*Actin*)作为内参基因,检测在不同碳源条件下 *PicreA* 基因在转录水平上的相对表达量。将在完全培养基中培养 48 h 的意大利青霉于基础培养基中培养 60 min,分别转入含有 20 g/L *D*-葡萄糖、20 g/L *D*-果糖、20 g/L *L*-木糖、体积分数 2%乙醇的基础培养基中,继续培养 10、30、60、120 min。收集各时间段的菌丝,抽提总 RNA,反转录得到单链 cDNA。qRT-PCR 反应体系为:SYBR Green PCR Master Mix 10 μ L,不同样本的 cDNA(稀释 10 倍) 2 μ L,2 μ mol/L 的 β -*Actin*(*Actin*-F/R,见表 1)和 *PicreA*(*Q*-*creA*-F/R,见表 1)上下游引物 DNA 各 2 μ L,双蒸水补足体积至 20 μ L。反应程序为:预变性 95 $^{\circ}$ C 30 s;变性 95 $^{\circ}$ C 5 s,延伸 60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环收集荧光信号。每个样品 3 次重复,采用相对定量法公式 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算相关基因表达量,数据为“平均值 $\pm$ 标准差”。利用 SPSS21.0 进行方差分析,Excel 软件绘图。

1.6 *PicreA* 基因在侵染果实过程中表达情况

新鲜橙子在体积分数 0.1%次氯酸钠溶液中浸泡 2 min,用蒸馏水冲洗 2 遍并晾干。使用接种针在果实腰部造伤 20 针,深度约 3 mm。将长势一致的意大利青霉菌丝饼反贴至果实伤口处。将果实放置于 26 $^{\circ}$ C 环境下,分别于 5、10、15、20 d 收集病健部组织,并抽提 RNA,反转录得到 cDNA。以 cDNA 为模板,利用意大利青霉 β -*Actin* 和 *PicreA* 引物进行半定量 PCR,循环数设置为 26,确保扩增处于对数期。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s;58 $^{\circ}$ C 30 s;72 $^{\circ}$ C 10 s;72 $^{\circ}$ C 5 min。对不同样品

cDNA 分别扩增 β -*Actin* 和 *PicreA*,PCR 扩增产物在含有溴化乙锭的 10 g/L 琼脂糖凝胶中电泳,并进行拍照。

2 结果与分析

2.1 *PicreA* 基因的克隆及生物信息学分析

利用简并引物 *CreA2*-F/R 以意大利青霉 cDNA 为模板进行扩增,结果获得 1 条 700 bp 左右的条带,见图 1。将目的条带割胶回收并克隆测序。将获得的碱基序列与 NCBI 公布的意大利青霉 PHI-1 基因组序列(GenBank 登录号:GCA_000769765.1)进行本地 blastn,将其定位于基因组中。参考基因组序列,设计引物对 *PicreA* 基因及其上下游序列进行克隆并测序,得到 *PicreA* 基因完整序列及其上下游部分序列信息。

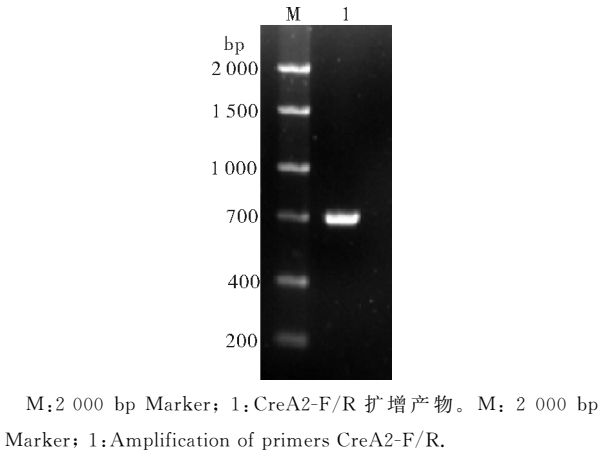


图 1 简并引物对 *CreA2*-F/R 扩增产物

Fig.1 Amplification of degenerate primers *CreA2*-F/R

与其他丝状真菌^[21-22]一致,意大利青霉菌基因组中只有单一的 *creA* 基因。*PicreA* 基因序列和 cDNA 开放阅读框(ORF)确定为 1 236 bp 长,并编码 1 个含 411 个氨基酸的蛋白质。预测 *PiCreA* 含有 2 个 Cys₂His₂ 锌指蛋白结构域,1 个富含丙氨酸的区域(AAAAAAA),一些在丝状真菌中保守的 SPXX/TPXX 重复基序^[20],1 个在丝状真菌中高度保守的区域,以及已报道的与碳代谢抑制相关区域,见图 2。

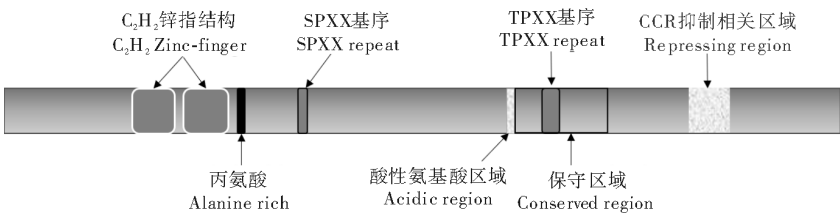


图 2 意大利青霉 *CreA* 蛋白结构域

Fig.2 Protein domain of *PiCreA*

根据所获得的 1 691 bp 长的 *PicreA* 基因上游序列,使用 BDGP 在线预测 *PicreA* 基因的核心启动子,推测其可能位于-610 bp(-ATG)至-660 bp (-ATG)范围内。同时,利用 PlantCARE 分析启动子序列的部分顺式调控元件,发现在该基因 ATG 上游序列中,存在多个启动真核生物基因表达的核

心启动子元件 TATA-box、增强子元件 CAAT-box。在此 1 691 bp 的基因 5'上游区域内发现了 3 个 *PicreA* 基因的 DNA 结合位点 5'-GTGGAG-3'和 5'-CTGGAC-3',见图 3。这表明作为一种 DNA 结合蛋白,PiCreA 可能与自身启动子区域结合,并进行自我抑制调控。

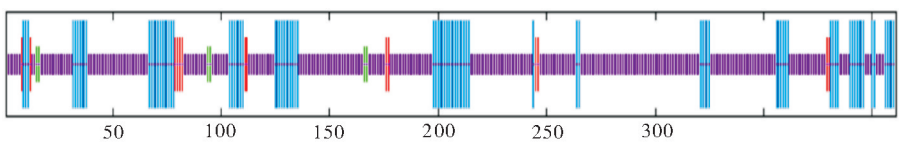


红色区域为假定的核心启动子区域,划线部分表示顺式作用元件;蓝色区域为假定的 *PicreA* 基因 DNA 结合位点。翻译起始密码子 ATG 用“+0”表示。The red region is the putative core promoter region,the underlined portion indicates the cis-acting element;The blue region is the putative *PicreA* gene DNA binding site.The translation initiation codon ATG is represented by “+0”.

图 3 *PicreA* 基因生物信息学分析
Fig.3 Bioinformatics analysis of *PicreA*

在线分析 PiCreA 蛋白一级结构和理化性质,结果显示,PiCreA 蛋白分子质量约 44.26 ku,共 411 个氨基酸,其中带负电荷的天冬氨酸和谷氨酸共 32 个,带正电荷的精氨酸和赖氨酸共 40 个。该蛋白质的不稳定指数(Ⅱ)为 64.25,为不稳定蛋白。

PiCreA 蛋白的理论等电点为 9.48。利用 SOPMA 在线预测 PiCreA 蛋白的二级结构,发现存在 21.65% α-螺旋,3.41% 链延伸,1.46% β-转角,73.48%无规卷曲,见图 4。预测蛋白三级结构如图 5 所示。



蓝色:α-螺旋;红色:链延伸;绿色:β-转角;橙色:无规卷曲。Blue color:α-helix; red color:chain extension; green color:β-turn; orange color:random curl.

图 4 意大利青霉 CreA 蛋白二级结构预测
Fig.4 Secondary structure prediction of PiCreA

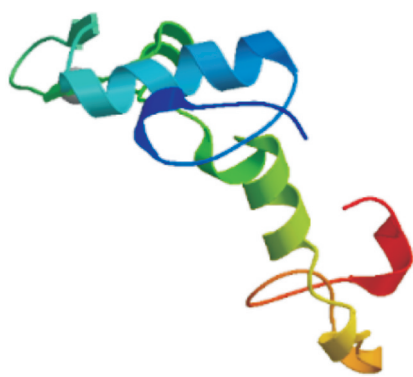


图 5 PiCreA 蛋白三级结构预测

Fig.5 Tertiary structure prediction of PiCreA

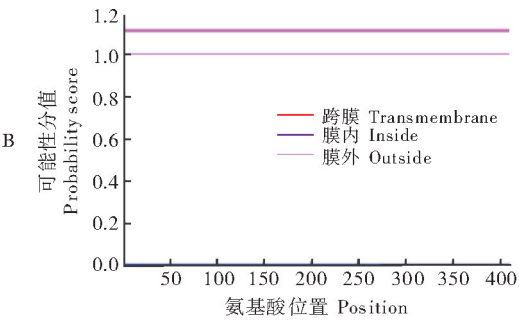
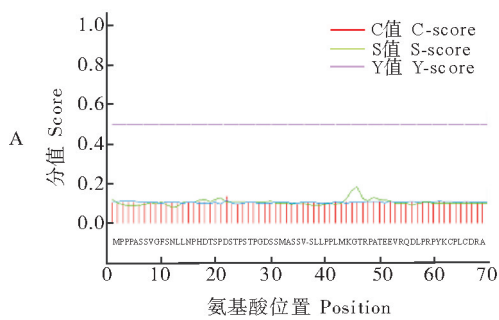


图 6 PiCreA 蛋白跨膜结构域(A)及信号肽预测(B)

Fig.6 Protein transmembrane domain (A) and signal peptide prediction (B) of PiCreA

将 *PicreA* 的翻译蛋白质序列进行蛋白比对 (blastp), 结果显示, PiCreA 与扩展青霉 *Penicillium expansum* CreA 蛋白同源 99%, 与构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* CreA 蛋白同源 79%。根据氨基酸比对结果, 采用邻接法构建系统进化树, 发现 PiCreA 与扩展青霉序列具有最高的同源性, 与曲霉属的 CreA 蛋白高度同源, 见图 7。

2.2 *PicreA* 定量表达分析

将处于无碳源环境中的意大利青霉转入不同碳源条件下, 发现 *PicreA* 基因对不同碳源响应情况不同。对于广泛报道的抑制碳源葡萄糖, 由饥饿状态转入含有葡萄糖的环境后, *PicreA* 基因表达量迅速升高, 后急剧下降, 再随着培养时间延长表达量不断提高(图 8A)。而在果糖环境, *PicreA* 基因表达总体偏高, 在很短时间内引起基因表达量激增, 后略有下降而趋于平缓(图 8B)。对于去抑制碳源木糖, 短时间内最大地激发了 *PicreA* 基因的表达, 后表达量小幅下降但始终保持高表达状态(图 8C)。非糖类的去抑制碳源乙醇, 情况区别于单糖(己糖或者

戊糖), 在这种环境中 *PicreA* 基因的表达微量上调, 且诱导一定的表达水平(图 8D)。

2.3 *PicreA* 基因在侵染柑橘过程中表达情况

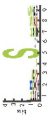
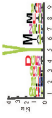
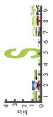
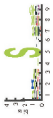
为了解意大利青霉碳代谢抑制调控因子 PiCreA 在其侵染柑橘果实过程中的转录情况, 分析了不同侵染时期意大利青霉 *PicreA* 基因的表达情况。结果发现, 在意大利青霉中, *PicreA* 基因从侵染初期到侵染后期一直存在稳定的表达, 见图 9。

3 讨 论

转录调控机制的研究是表征真菌控制其生长、对寄主适应性和致病力的一个重要手段。青霉病是柑橘贮藏期间常见的采后病害, 由意大利青霉引起。意大利青霉一般由果实伤口处侵入, 不存在潜伏期, 芽管直接萌发成菌丝, 进而产生病害^[23]。在侵染过程中, 宿主中的营养物质是意大利青霉的生长发育来源, 面对复杂多变的寄生环境, 微生物必须迅速应对并及时调节以进行最适生长。目前在许多病原微

表 2 PiCreA 蛋白磷酸化修饰位点预测

Table 2 Phosphorylation modification site prediction of PiCreA

磷酸化位置 Locations (AA)	磷酸化位点 Phosphorylated sites	HMM bit 分值 HMM bit score	E 值 E value	催化酶类型 Catalytic kinases	预测模型 Predictive models	磷酸化位置 Locations (AA)	磷酸化位点 Phosphorylated sites	HMM bit 分值 HMM bit score	E 值 E value	催化酶类型 Catalytic kinases	预测模型 Predictive models
20	PHDTSPDST	-0.6	13	IKK		264	DDDGYGHRV	-4.3	85	INSR	
23	TSPDTPST	-0.1	9	IKK		271	RVKRSRPNS	-0.9	9.4	PKG	
27	STPSTPGDS	1.6	3.6	MAPK		275	SRPNSPNST	3.2	0.7	IKK	
32	PGDSSMASS	-0.5	11	IKK		283	TAPSSPTFS	-2.7	38	cdc2	
38	ASSVSLPP	-2.3	41	IKK		292	HDSLSPTPD	-1.7	16	ATM	
122	NSRRSNKAQ	-5.1	44	PKG		294	SLSPTPDHT	-0.3	6.7	MAPK	
162	SAPVSQVGS	1.1	3.5	IKK		302	TPLATPAHS	1.5	3.8	MAPK	
166	SQVGSQDVVS	-0.4	15	cdc2		345	EGPNYYSPY	-1.3	64	INSR	
170	SPDVSPPHS	4.1	1.1	Other MDD		346	GPNNYYSPY	-2.4	23	Svk	
178	SFSNYANHM	-3.5	82	INSR		362	SDIMSKPDG	-1.0	15	CKI	
257	TRSHSNDDD	3.2	1.8	CKII							

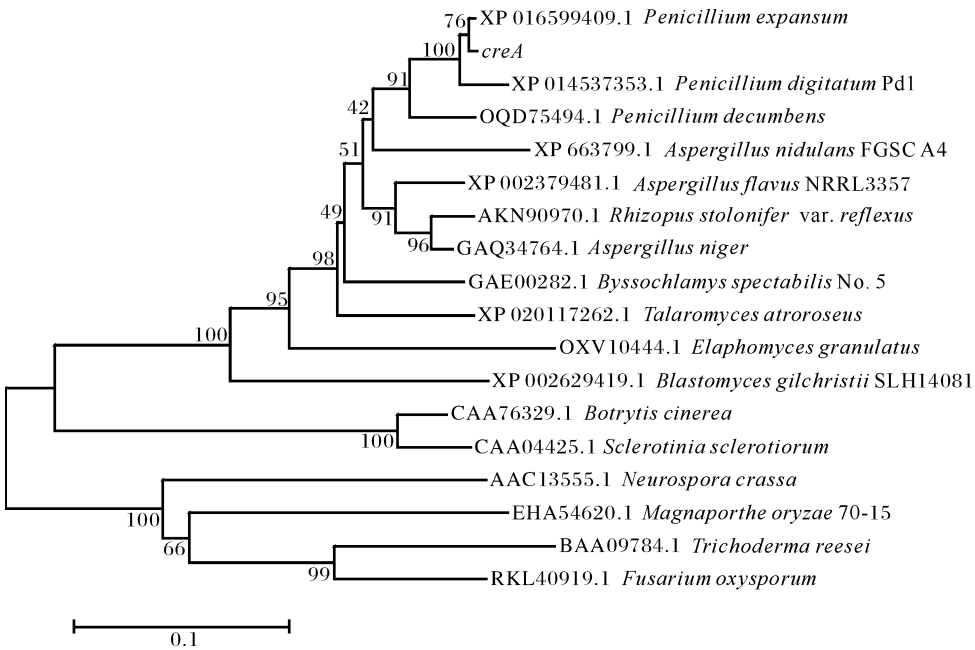
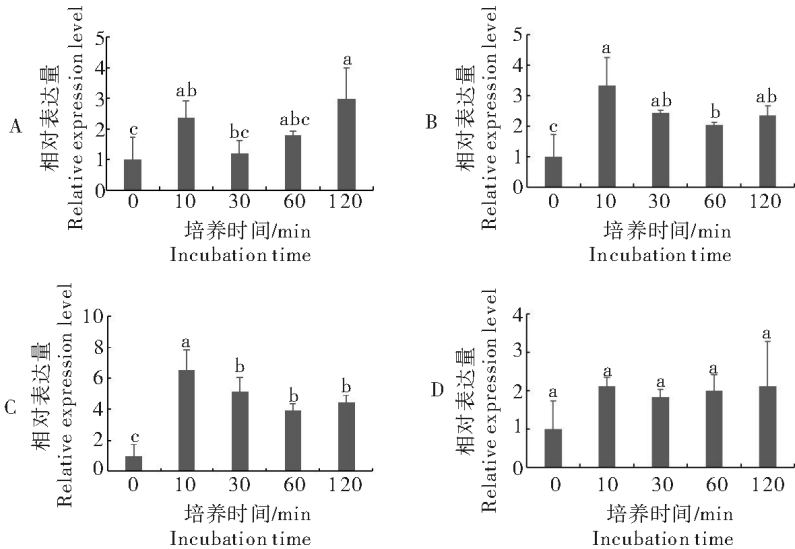


图 7 PiCreA 系统进化树分析
Fig.7 Phylogenetic tree analysis of PiCreA



A、B、C、D 分别代表以 *D*-葡萄糖、*D*-果糖、*L*-木糖和乙醇为碳源。图中相同处理中不同字母代表 0.05 水平差异显著。A、B、C and D represent *D*-glucose, *D*-fructose, *L*-xylose, and ethanol, respectively. The different letters in the same treatments represent significant differences at 0.05 level.

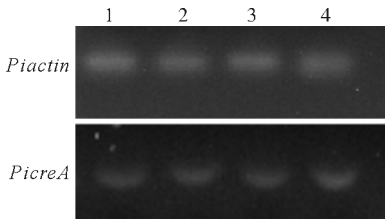
图 8 *PicreA* 在不同碳源环境中定量表达分析

Fig.8 Quantitative expression analysis of *PicreA* in different carbon source environments

生物中发现,存在一套对环境碳源响应的机制,将葡萄糖作为优选碳源,这个机制通常由 CreA/Mig1 因子全局调控。

在本试验中笔者成功克隆到意大利青霉 *creA* 基因,并对其生物信息学特性进行了初步分析。

PicreA 基因全长 1 236 bp,编码 1 个含 411 个氨基酸的蛋白,该蛋白含有 2 个锌指结构。PiCreA 中存在多个 SPXX/TPXX 重复基序,目前已确定氨基酸序列 S(T)PXX 在结合 DNA 的调节蛋白中,相比其他蛋白更常出现^[20]。PiCreA 中存在连续的丙氨酸



不同侵染阶段 *PicreA* 基因的半定量 PCR; 1、2、3、4 分别代表侵染 5、10、15、20 d。Semi-quantitative PCR of *PicreA* gene in different stage of the infection process; 1,2,3 and 4 represent 5,10,15 and 20 d, respectively.

图 9 *PicreA* 基因在侵染柑橘过程中表达情况

Fig.9 Expression of *PicreA* gene during the infection process of citrus fruits

区域,有报道称 DNA 转录阻遏物在其对应蛋白中存在独立结构域,这一结构域可能为富含丙氨酸的区域^[24],这表明 PiCreA 蛋白可能也具有抑制功能。目前在部分丝状真菌中发现,CreA 蛋白可作为碳代谢过程抑制物与一些目的基因的启动子特异性结合,从而抑制这些基因的表达^[25]。

CreA 介导的 CCR 依赖于葡萄糖转运和随后的磷酸化^[26]。目前存在很多关于 CreA 蛋白磷酸化的报道,主要发生在翻译后修饰过程中,通过磷酸化和去磷酸化来控制 CreA 的定位和功能。在酪氨酸激酶 II 催化下,里氏木霉 Cre1 转录因子在其酸性结构域内 Ser²⁴¹ 处被磷酸化,这种翻译后修饰对于 DNA 结合是必需的,并且确保 Cre1 被完全抑制^[27]。在 *S. cerevisiae* 中,CreA 的同源物 Mig1 也受到蛋白激酶 Snf1p 的磷酸化调控^[28]。对 PiCreA 蛋白磷酸化位点进行预测,发现大多可能发生在丝氨酸处。

对于多数报道的丝状真菌,当存在抑制碳源如葡萄糖时,去磷酸化的 CreA 定位于细胞核,而当生长环境中缺少葡萄糖时,次级碳源被利用,CreA 发生磷酸化并定位于细胞质,伴随碳代谢抑制的解除^[29]。预测 PiCreA 蛋白的亚细胞定位,发现了其在细胞核和细胞质中存在的可能性。

在意大利青霉中,迄今尚未见关于 CreA 调控真菌碳源利用的报道。笔者观察了添加不同碳源对 *PicreA* 基因表达的影响,以明确在意大利青霉中 CreA 介导的碳代谢抑制的可能机制。在转录水平上,面对不同碳源,*PicreA* 以不同的方式进行调节。在缺少碳源的情况下,*PicreA* 表达水平较低,而当环境中存在单糖时,在几分钟内诱导表达水平的提高,对于抑制碳源如葡萄糖,时间延长导致表达水平

的下调,这表明可能存在 CreA 在意大利青霉中的自我抑制^[19]。在 *PicreA* 基因 1 691 bp 启动子区域内发现 3 个 *PicreA* 基因结合位点,进一步表明这种自我抑制的可能性。对于去抑制单糖如木糖,*PicreA* 一直维持高的表达量。对于去抑制碳源如乙醇,表达量在整个诱导过程基本维持稳定,在 120 min 时,其诱导的 *PicreA* 表达量与抑制碳源葡萄糖基本一致。这种表达模式类似于在构巢曲霉和里氏木霉中观察到的情况^[22,30]。

目前已发现 CreA 影响某些植物病原菌的致病性。CreA 介导的 CCR 可以控制柑橘链格孢菌 (*Alternaria citri*) 的毒力,creA 的过度表达导致病原菌在柑橘果实果肉处的定殖,这是一种在野生型菌株中未观察到的现象^[31]。缺失 creA,导致扩展青霉几乎完全丧失毒力^[32]。关于 *PicreA* 是否可能参与意大利青霉侵染柑橘的活动,笔者观察了侵染过程中 *PicreA* 基因的表达量。在整个侵染过程中,*PicreA* 基因存在稳定表达,猜测可能与致病性相关。

目前已有很多关于 creA 基因在丝状真菌中控制生长、水解酶基因表达、毒力等的报道,而 *PicreA* 基因的具体功能还未见报道,克隆 *PicreA* 基因并观察其在侵染果实过程中及不同碳源环境中的表达情况,有利于进一步研究 *PicreA* 在意大利青霉致病过程所起作用。

参 考 文 献

[1] 刘浩强,李鸿筠,向可海,等.保鲜剂对柑橘贮藏病菌的敏感性
及贮藏保鲜效果[J].食品科学,2014,35(4):210-214.

[2] ERASMUS A, LENNOX C L, KORSTEN L, et al. Imazalil resistance in *Penicillium digitatum* and *P. italicum* causing citrus postharvest green and blue mould: impact and options[J]. Postharvest biology & technology, 2015, 107: 66-76. DOI: 10.1016/j.postharvbio.2015.05.008.

[3] ZHU J, XIE Q, LI H. Occurrence of imazalil-resistant biotype of *Penicillium digitatum* in China and the resistant molecular mechanism[J]. Journal of Zhejiang University-science A, 2006, 7(2): 362-365.

[4] BOLTON M. Wheat leaf rust caused by *Puccinia tritricina* [J]. Molecular plant pathology, 2010, 9(5): 563-575.

[5] DELLER S, HAMMOND-KOSACK K E, RUDD J J. The complex interactions between host immunity and non-biotrophic fungal pathogens of wheat leaves[J]. Journal of plant physiology

- gy, 2011, 168(1): 63-71.
- [6] PRUSKY D B, BI F, MORAL J, et al. How does host carbon concentration modulate the lifestyle of postharvest pathogens during colonization? [J]. *Frontiers in plant science*, 2016, 7: 1306. DOI: 10.3389/fpls.2016.01306.
- [7] BI F, BARAD S, MENT D, et al. Carbon regulation of environmental pH by secreted small molecules that modulate pathogenicity in phytopathogenic fungi [J]. *Molecular plant pathology*, 2016, 17(8): 1178-1195.
- [8] RIES L N, BEATTIE S R, ESPESO E A, et al. Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans* [J]. *Genetics*, 2016, 203(1): 335-352.
- [9] KAYIKCI O, NIELSEN J. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* [J/OL]. *Fems yeast research*, 2015, 15(6) [2019-02-28]. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov068>.
- [10] ALAM M A, KELLY J M. Proteins interacting with CreA and CreB in the carbon catabolite repression network in *Aspergillus nidulans* [J]. *Current genetics*, 2016, 63(4): 1-15.
- [11] ADNAN M, ZHENG W, ISLAM W, et al. Carbon catabolite repression in filamentous fungi [J]. *International journal of molecular sciences*, 2017, 19(1): 48.
- [12] TUDZYNSKI B, LIUS, KELLY J M. Carbon catabolite repression in plant pathogenic fungi: isolation and characterization of the *Gibberella fujikuroi* and *Botrytis cinerea creA* genes [J]. *Fems microbiology letters*, 2000, 184(1): 9-15.
- [13] MACH-AIGNER A R, OMONY J, JOVANOVIĆ B, et al. D-Xylose concentration-dependent hydrolase expression profiles and the function of CreA and XlnR in *Aspergillus niger* [J]. *Appl environ microbiol*, 2012, 78(9): 3145-3155.
- [14] VAUTARD G, COTTON P, FEVRE M. The glucose repressor CRE1 from *Sclerotinia sclerotiorum* is functionally related to CREA from *Aspergillus nidulans* but not to the Mig proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. [J]. *Febs letters*, 1999, 453(1/2): 54-58.
- [15] JONKERS W, REP M. Mutation of CRE1 in *Fusarium oxysporum* reverts the pathogenicity defects of the FRP1 deletion mutant [J]. *Molecular microbiology*, 2010, 74(5): 1100-1113.
- [16] PORTNOY T, MARGEOT A, LINKE R, et al. The CRE1 carbon catabolite repressor of the fungus *Trichoderma reesei*: a master regulator of carbon assimilation [J]. *BMC genomics*, 2011, 12(1): 269.
- [17] BEATTIE S R, MARK M K, ARSA T, et al. Filamentous fungal carbon catabolite repression supports metabolic plasticity and stress responses essential for disease progression [J]. *PLoS pathogens*, 2017, 13(4): e1006340. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006340.
- [18] 侯瑞, 王晨芳. 禾谷镰孢碳源代谢调控因子 FgCreA 的功能 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51(2): 257-267.
- [19] ESTHER F O, WANG B, QIU M, et al. Carbon catabolite repression gene, *creA*, regulates morphology, aflatoxin biosynthesis and virulence in *Aspergillus flavus* [J]. *Fungal genetics and biology*, 2018, 115: 41-51.
- [20] LUO Z, QIN Y, PEI Y, et al. Ablation of the *creA* regulator results in amino acid toxicity, temperature sensitivity, pleiotropic effects on cellular development, and loss of virulence in the filamentous fungus *Beauveria bassiana* [J]. *Environmental microbiology*, 2014, 16(4): 1122-1136.
- [21] DOWZER C E, KELLY J M. Analysis of the *creA* gene, a regulator of carbon catabolite repression in *Aspergillus nidulans* [J]. *Molecular and cellular biology*, 1991, 11(11): 5701-5709.
- [22] ILMEN M, THRANE C, PENTTILÄ M. The glucose repressor gene *cre1* of *Trichoderma*: isolation and expression of a full-length and a truncated mutant form [J]. *Molecular and general genetics*, 1996, 251(4): 451-460.
- [23] YANG S, LIU L, LI D, et al. Use of active extracts of poplar buds against *Penicillium italicum* and possible modes of action [J]. *Food chemistry*, 2015, 196: 610-618. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.09.101
- [24] LICHT J D, GROSSEL M J, FIGGE J, et al. Drosophila Krüppel protein is a transcriptional repressor [J]. *Nature*, 1990, 346(6279): 76-79.
- [25] KUNITAKE E, LI Y, UCHIDA R, et al. CreA-independent carbon catabolite repression of cellulase genes by trimeric G-protein and protein kinase A in *Aspergillus nidulans* [J/OL]. *Current genetics*, 2019 [2019-02-28]. <https://doi.org/10.1007/s00294-019-00944-4>.
- [26] FERNANDEZ J, WRIGHT J D, HARTLINE D, et al. Principles of carbon catabolite repression in the rice blast fungus: Tps1, Nmr1-3, and a MATE-family pump regulate glucose metabolism during infection [J]. *PLoS genetics*, 2012, 8(5): e1002673-e1002673. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002673.
- [27] CZIFERSZKY A. Phosphorylation positively regulates DNA binding of the carbon catabolite repressor Cre1 of *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) [J]. *Journal of biological chemistry*, 2002, 277(17): 14688-14694.
- [28] BROWM N A, RIES L N A, GOLDMAN G H. How nutritional status signalling coordinates metabolism and lignocellulolytic enzyme secretion [J]. *Fungal genetics and biology*, 2014, 72: 48-63.
- [29] LEANDRO J A, LAURE N A R, MARCELA S, et al. *Aspergillus nidulans* protein kinase A plays an important role in cellulase production [J]. *Biotechnology for biofuels*, 2015, 8(1): 213.
- [30] DOWZER C E, KELLY J M. Cloning of the *creA* gene from *Aspergillus nidulans*: a gene involved in carbon catabolite repression [J]. *Current genetics*, 1989, 15(6): 457-459.
- [31] KATO H, OHTANI K, YAMAMOTO H, et al. Overexpression of a gene encoding a catabolite repression element in *Al-*

ternaria citri causes severe symptoms of black rot in citrus fruit[J].Phytopathology,2007,97(5):557.

[32]TANNOUS J,KUMAR D.Fungal attack and host defence path-

ways unveiled in near-avirulent interactions of *Penicillium expansum creA* mutants on apples[J].Molecular plant pathology,2018,19(12):2635-2650.

Cloning and expression analysis of *creA* from *Penicillium italicum* ,
a postharvest pathogen of citrus fruits

WANG Meng YANG Shuzhen LIU Hanhan ZHANG Meihong PENG Litao

College of Food Science and Technology ,Huazhong Agricultural University ,
Wuhan 430070,China

Abstract In order to analyze the function of CreA,a carbon metabolism regulator of *Penicillium italicum* ,which is a postharvest pathogen of citrus fruits,the *PicreA* gene was successfully cloned.The gene has 1 236 bp cDNA length without intron,which encodes 411 amino acids and contains two typical zinc finger domains of transcription factors.Phylogenetic tree analysis showed that the PiCreA protein had the highest homology with *Penicillium expansum*.Transcriptional analysis of *PicreA* revealed a complex express profile in response to different carbon sources.For monosaccharide,higher expression was induced in a short period of time.With the prolongation of time,in the case of repressing carbon source such as glucose,*PicreA* expression showed a gradual decline and then increased.It was presumed that self-inhibition of *PicreA* occurred.In term of the depressing carbon source like xylose,*PicreA* expression level lightly decreased and gradually remained fairly high.For non-monosaccharide carbon source such as ethanol,high level of *PicreA* expression was maintained.The *PicreA* gene is stably expressed throughout the infection process of *Penicillium italicum* on citrus fruits.

Keywords citrus fruits; *Penicillium italicum* ; *creA* ; carbon catabolite repression; bioinformatics analyses; RT-PCR

(责任编辑:赵琳琳)