

香蕉枯萎镰刀菌 4 号生理小种 *FoSP1* 基因功能的初步分析

赵久娟^{1,2}, 李 敏¹, 胡美姣¹, 杨锦玉^{1,3}, 何 颖^{1,4}, 柳志强², 孙进华^{1*}

1. 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 海南海口 571101; 2. 海南大学生命健康学院, 海南海口 570228; 3. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 4. 贵州大学精细化工研究开发中心, 贵州贵阳 550025

摘 要: 香蕉枯萎病是我国香蕉生产中危害最大, 且难以防治的一种真菌病害。由于香蕉枯萎病的影响, 我国近年来香蕉种植面积逐年减少, 给我国亚热带、热带香蕉产业带来了巨大的经济损失。该病害是由于香蕉的维管束受到病原菌尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc) 入侵而发生, 其繁殖速度快, 引起香蕉叶片黄化和植株萎蔫。通过比较 Foc1 号生理小种 (Foc1) N2 菌株和 4 号生理小种 (Foc4) B2 菌株的基因组及转录组序列, 筛选出位于基因组特异区间并且表达量较高的分泌蛋白 *FoSP1*。结果表明: *FoSP1* 基因开放阅读框为 387 bp, 编码 129 个氨基酸, 其信号肽切割位点位于第 20~21 位氨基酸残基之间, 且该蛋白无任何已知的结构域和功能位点, 因此推断出 *FoSP1* 是一个新的分泌蛋白。为了研究该蛋白在 Foc4 菌株中的生物学作用, 本研究利用 split-marker 的方法敲除了 B2 菌株的 *FoSP1* 基因, 并对获得的正确敲除突变体进行表型分析和致病性测定。结果表明: 相比野生型 B2 菌株, *FoSP1* 基因敲除突变体菌丝的营养生长无显著差异, 对 NaCl、山梨醇和 H₂O₂ 等外源胁迫均表现不敏感, 但敲除突变体的产孢量和分生孢子萌发率显著降低, 且对巴西蕉苗的致病力明显减弱。由此推测分泌蛋白 *FoSP1* 不参与 Foc4 菌株 B2 的营养生长, 但在其产孢及致病的过程中发挥着重要作用。此结果为进一步研究 Foc4 基因组特异区间分泌蛋白的致病机制奠定基础。

关键词: 尖孢镰刀菌古巴专化型; *FoSP1*; 分泌蛋白; 基因敲除; 致病性

中图分类号: Q945.8 文献标志码: A

Preliminary Analysis of *FoSP1* Gene Function of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* Race4

ZHAO Jiujuan^{1,2}, LI Min¹, HU Meijiao¹, YANG Jinyu^{1,3}, HE Ying^{1,4}, LIU Zhiqiang², SUN Jinhua^{1*}

1. Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou, Hainan 571101, China; 2. School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 3. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China; 4. Center for Research and Development of Fine Chemicals, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025, China

Abstract: Banana Fusarium wilt is a fungal disease which is the most harmful and difficult to control in banana production in China. Due to the influence of banana Fusarium wilt, the banana planting area in China has been decreasing year by year in recent years, which has brought huge economic losses to the subtropical and tropical banana industries in China. The disease occurred because the vascular bundle of banana was invaded by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc), and its propagation speed was fast, which caused the yellowing of banana leaves and plant wilting. By comparing the genome and transcriptome sequences of Foc race 1 (Foc1, N2) and race 4 (Foc4, B2), a secreted protein *FoSP1* located in the lineage-specific region with high expression was screened out. The results showed that the open reading frame of *FoSP1* gene was 387 bp, encoding 129 amino acids, and its signal peptide cleavage site was located between the 20th and 21st amino acid residues, and the protein had no known domain and functional site, so it was inferred that

收稿日期 2023-10-22; 修回日期 2023-11-09

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 320RC696); 国家自然科学基金项目 (No. 31872088); 农业农村部财政专项 (No. NFZX-2021)。

作者简介 赵久娟 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 尖孢镰刀菌分泌蛋白筛选。*通信作者 (Corresponding author): 孙进华 (SUN Jinhua), E-mail: Jinhuasun_hk@163.com。

FoSP1 was a new secreted protein. In order to study the biological function of the protein in Foc4 strain, the split-marker method was used to knock out the *FoSP1* gene of B2 strain, and the phenotype analysis and pathogenicity determination of the correctly knocked-out mutant were carried out. The results showed that compared with wild-type B2 strain, there was no significant difference in the vegetative growth of *FoSP1* gene knockout mutants, and they were insensitive to exogenous stresses such as NaCl, D-sorbitol and H₂O₂, but the conidial yield and germination rate of knockout mutants were significantly reduced, and their pathogenicity to Brazilian banana was significantly weakened. It is inferred that the secreted protein FoSP1 does not participate in the vegetative growth of B2 strain, but plays an important role in the process of sporulation and pathogenicity. This result lays a foundation for further study on the pathogenic mechanism of secreted proteins in the genome lineage-specific region of Foc4.

Keywords: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; *FoSP1*; secreted protein; gene knockout; pathogenicity

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.07.004

作为香蕉的主产国之一，我国有着悠久的香蕉种植史。目前，香蕉是我国热带地区重要的经济支柱产业之一^[1]。香蕉枯萎病是我国香蕉生产中危害最大，且难以防治的一种真菌病害，由于香蕉枯萎病的影响，我国近年来香蕉种植面积逐年减少，给我国亚热带、热带香蕉产业带来了巨大的经济损失。该病害是由于香蕉的维管束受到病原菌尖孢镰刀菌古巴专化型（*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Foc）入侵而发生。作为一种土传病害，该病原菌可从根系侵入，定殖维管束而引起香蕉叶片黄化和植株萎蔫。其繁殖速度快，能随带病蕉苗传播扩散，致病力极强，并且能够在土壤中存活几十年^[2]。尖孢镰刀菌古巴专化型有 4 个生理小种，其中，4 号生理小种（Foc4）能够侵染几乎所有品种的香蕉，对香蕉的危害性与毁灭性最大^[3-4]。

分泌蛋白是一类在生物体内合成和加工成熟的多肽，经过细胞膜分泌到胞外，参与对周围环境的感知和生物间的相互作用^[5]。分泌蛋白一般具有 4 个基本特征，最主要特征是它的氨基酸序列具有 N 端信号肽序列，其次是分泌蛋白不存在跨膜结构域，不具有将蛋白输送到线粒体以及其他胞内细胞器的预测定位信号序列，并且没有糖基磷脂酰肌醇（Glycosylphosphatidylinositol, GPI）锚定位点^[6]。植物病原真菌的一些分泌蛋白在其致病过程中起着重要的作用。郭立佳等^[7]发现假定分泌蛋白 SP10 参与 Foc4 对香蕉致病性的调控；DOEHLEMAN 等^[8]研究发现，敲除玉米黑穗病菌分泌蛋白基因 *pep1* 的敲除突变体菌株无法正常侵入宿主细胞；SAITOH 等^[9]研究结果发现，稻瘟病菌侵染水稻时，分泌蛋白 MC69 对病原菌侵染菌丝的形成是必需的。

在前期的研究中，本研究团队基于三代

Pacbio CCS 测序技术组装完成了 Foc1（菌株编号：N2）和 Foc4（菌株编号：B2）T2T 完整基因组（结果待发表）。通过比较二者染色体 DNA 序列，在 Foc4 菌株的 1 号染色体的末端鉴定到 Foc4 菌株特有而 Foc1 菌株缺失的约 1 Mb 大小的基因组特异区间（Lineage-specific genomic region, LSGR）。进一步分析发现，该基因组特异区间相对于染色体其它区域，预测的分泌蛋白（N 端带信号肽且无跨膜结构域）显著富集。结合转录组测序，从中选择 1 个具有一定表达值且富含半胱氨酸（含量为 8.5%）的分泌蛋白 Foc4_01G021900.1 作为研究对象，命名为 FoSP1。本研究采用 split-marker 方法对 *FoSP1* 基因进行敲除，通过比较突变体与野生型的表型和致病力差异，明确分泌蛋白 FoSP1 在 B2 菌株中的生物学功能，以期为研究基因组特异区间分泌蛋白的致病机制提供新的方向和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试香蕉品种 巴西蕉（*Musa* sp. AAA）试管苗由中国热带农业科学院组织培养中心提供。试管苗经沙床炼苗 1 个月，后移栽到椰糠和砂土 1:1 的基质上。待蕉苗达 5~6 叶龄，且株高 20~30 cm 时进行接种试验。

1.1.2 菌株、质粒 Foc4 B2 菌株及质粒 pCT74 [含潮霉素磷酸转移酶基因（*hyg*）] 均由本实验室保存。

1.1.3 引物设计 从测序结果中查找并提取 *FoSP1* 基因及其上、下游 1500 bp 的碱基序列，根据目的基因上、下游基因序列以及 *hyg* 的碱基序列，设计构建基因敲除融合片段所需的 PCR 引物和目的基因内、外部验证引物，该引物由生工

生物工程(上海)股份有限公司合成,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Tab. 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') Primer sequence (5'-3')
FoSP1-AF	GCATTCTGAATAGACGCTCCG
FoSP1-AR	CTCCTTCAATATCAGTTAACGGAACGTTA TGGAGCTCTGC
FoSP1-BF	GTCCGAGGGCAAAGGAATAGGTGCTTGG CCTTGAGGAGTA
FoSP1-BR	AGGGATCCCGAGTCGCTTTTG
HYF	TATCGGCACTTTGCATCGGC
YGR	GGATGTTGGCGACCTCGTAT
HygF-pCT74	ATTGCGCGTACAGAACTCCT
HygR-pCT74	ACGTAACTGGTTCCCGGTC
FoSP1-insideF	TGCGCAAACATATCCCTCGT
FoSP1-insideR	ACGGCCAGATCCTTAGACT
FoSP1-outsideF	TCCAATAAACCAACCATCGGT
FoSP1-outsideR	GTCTCTTTAGAATGCCAGCAGC
FoSP1-KL-F	ATGCATCTTAAAGCAACCATCGC
FoSP1-KL-R	TTAATTACGGCCAGATCCTTAGA

1.1.4 试剂、酶及培养基 潮霉素 B(Hygromycin B, 50 mg/mL)、氨苄青霉素(Amp)、溶壁酶、蜗牛酶、高保真酶、MightyScript 第一链 cDNA 合成 Master Mix 及 50×TAE 电泳缓冲液及 DNA marker 均购于生工生物工程(上海)股份有限公司;多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(离心柱型)、2×Taq PCR Master Mix 及真菌基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)均购于天根(北京)生化科技有限公司;普通质粒小提试剂盒(离心柱型)购于 Omega Bio-Tek 公司;山梨醇(D-Sorbitol)购于北京索莱宝生物技术有限公司;2×A8 Fast-HiFi PCR MasterMix 购于北京艾德莱生物科技有限公司;胶回收试剂盒(TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver.4.0)购于宝日医生物技术(北京)有限公司;其他具体试剂详见试验步骤。试验所用培养基包括 PDA 培养基、TB3 液体培养基、TB3 固体培养基、LB 液体培养基、LB 固体培养基、CM 培养基、MM 培养基和 CZAPEK 培养基等。

1.2 方法

1.2.1 pCT74 质粒 DNA 的提取 将质粒 pCT74 转移至 DH5 α 中,培养后接入 LB 固体培养基,

挑取单菌落接种于 3 mL 含有 Amp 抗性的 LB 液体培养基中,37 ℃、250 r/min 振荡培养 12 h 左右。随后将菌液转移至 1.5 mL 离心管,12 000 r/min 离心 1 min,保留沉淀。参照普通质粒小提试剂盒的方法提取质粒 DNA,并对其进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 B2 菌株基因组 DNA 的提取 将野生型菌株 B2 接种到装有 100 mL PDB 培养基的锥形瓶中,180 r/min、28 ℃摇床振荡培养 3 d,3 层擦镜纸过滤收集菌丝,按照植物基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取基因组 DNA。

1.2.3 目的基因的克隆 根据 B2 菌株基因组注释的信息获取目的基因的全长序列信息。采用多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒提取 B2 菌株总 RNA,然后利用 MightyScript 第一链 cDNA 合成 Master Mix 合成 cDNA。根据基因序列设计引物(表 1),以 B2 菌株 cDNA 为模板,对目的基因进行 PCR 扩增,获得的 PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测出条带单一且大小正确的条带后测序,将得到的测序结果与目的基因的原始序列分别在 NCBI 网站上进行 BLAST 比对,确定序列的正确性。

1.2.4 *FoSP1* 基因敲除融合片段的构建 以提取的 B2 基因组 DNA 为模板,FoSP1-AF/FoSP1-AR 和 FoSP1-BF/FoSP1-BR 为引物分别对 *FoSP1* 基因上、下游序列进行 PCR 扩增;以提取的 pCT74 质粒 DNA 为模板,HygF-pCT74/HygR-pCT74 为引物对 *hyg* 基因序列进行 PCR 扩增。split-marker 重叠 PCR 扩增时分别以 *FoSP1* 基因上游 PCR 扩增产物(A 臂)和 *hyg* 基因 PCR 扩增产物为模板,FoSP1-AF/YGR 为引物;以 *FoSP1* 基因下游 PCR 扩增产物(B 臂)和 *hyg* 基因 PCR 扩增产物为模板,HYF/FoSP1-BR 为引物进行 PCR 扩增。所有 PCR 过程选择适宜的退火温度及延伸时间,优化 PCR 程序条件,对得到的 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 原生质体的制备与转化 B2 菌株在 PDA 固体培养基上培养 3 d 后,挑取菌丝在 PDB 液体培养基中摇培 2 d,收集孢子悬浮液转移至新的 PDB 液体培养基中培养 18 h,过滤,收集菌丝并用 0.7 mol/L NaCl 冲洗 2 遍。挑取菌丝加入酶解液(含 10 mg/mL 溶壁酶和 20 mg/mL 蜗牛酶),90 r/min 摇床裂解 3 h。用 1×STC 调整原生质体浓度为 $5 \times 10^7 \sim 5 \times 10^8$ 个/mL。将原生质体(200 μ L)

和上、下游 PCR 重叠片段 (各 10 μ L) 混匀, 冰上静置 30 min, 逐滴加入 1 mL 40% PTC, 轻摇混匀, 室温下静置 20 min。原生质体用加有 5 μ L Amp 的 5 mL TB3 液体培养基进行转化, 28 $^{\circ}$ C、50 r/min 振荡培养 12 h。将菌液和含 *hyg* 抗性的 TB3 下层固体培养基混匀, 倒平板, 28 $^{\circ}$ C 培养 12 h, 倒入含 *hyg* 的 TB3 上层培养基, 28 $^{\circ}$ C 培养 2~5 d。

1.2.6 *FoSP1* 敲除突变体的筛选与验证 挑取转化子于含 *hyg* 的 PDA 平板, 28 $^{\circ}$ C 培养 5 d, 刮取菌丝提取基因组。以提取的转化子基因组 DNA 及野生型 B2 基因组 DNA 为模板, *FoSP1*-outsideF/*FoSP1*-outsideR 作引物进行 PCR 正筛, *FoSP1*-insideF/*FoSP1*-insideR 作引物进行 PCR 负筛, 并对得到的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 只有正、负筛选扩增出的条带均符合预期结果的转化子才能被确定为正确的敲除突变体。

1.2.7 敲除突变体营养生长表型分析 取野生型菌株和敲除突变体直径为 5 mm 的菌饼, 分别接种到 PDA、CM、MM 及 CZAPEK 培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养 5 d, 测量菌落直径, 每个处理设 3 个重复。

1.2.8 分生孢子产生及萌发 取野生菌株和敲除突变体直径为 5 mm 的菌饼, 分别加入 3 mL 无菌水中, 震荡悬浮混匀, 计算每毫升的孢子数并统计及比较孢子萌发率, 每个处理 3 个重复。

1.2.9 胁迫因子敏感性试验 渗透压胁迫试验: 打取直径为 5 mm 的野生型和敲除突变体的菌饼分别接种于不同浓度 NaCl (1、2 mol/L) 和山梨醇 (1、2 mol/L) 的 PDA 平板上, 每个梯度做 3 个重复, 28 $^{\circ}$ C 培养 5 d 后观察菌落形态, 并拍照记录。过氧化氢耐受性试验: 打取直径为 5 mm 的敲除突变体和野生菌的菌饼, 分别接种于含有不同浓度 H_2O_2 (0.1%、0.25%、0.5%) 的 PDA 平板上, 每个梯度 3 个重复, 28 $^{\circ}$ C 培养 5 d 后观察菌落直径大小, 并拍照记录。

1.2.10 致病性测定 将 *FoSP1* 基因野生型菌株和敲除突变体菌株分别接种于 100 mL 的 PDB 液体培养基中, 180 r/min、28 $^{\circ}$ C 摇床振荡培养 3 d, 过滤收集分生孢子并用无菌水重悬, 将孢子悬浮液调至 10^6 个/mL。野生型菌株与敲除突变体菌株孢子悬浮液分别接种 10 株巴西蕉幼苗, 刺伤根部后每株苗浇 50 mL 孢子悬浮液, 以清水作为对照。30 d 后观察外部叶片黄化情况, 切开球茎, 观察球茎褐变程度, 拍照记录并记录幼苗发病级数, 病害分级及病情指数计算参照郭立佳等^[10]的方

法。数据采用 Excel 和 SPSS 软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 *FoSP1* 基因预测编码产物生物信息学分析

本试验克隆出 *FoSP1* 基因的全长, 其开放阅读框长为 387 bp, 其蛋白编码 129 个氨基酸, 等电点 (pI) 为 8.29, 其中半胱氨酸含量为 8.5%。原子总数为 1869, 蛋白分子式为 $C_{593}H_{911}N_{169}O_{182}S_{14}$, 其不稳定指数为 51.04, 总平均亲水性系数为 -0.321, 表明该蛋白为亲水蛋白, 不具有稳定性。使用 TargetP 和 SingalP 软件预测该蛋白为分泌蛋白, 其信号肽切割位点位于第 20~21 位氨基酸残基之间; TMHMM 软件预测结果显示, *FoSP1* 蛋白没有跨膜结构域; 用 big-Pi Predictor 软件预测结果显示, 该蛋白没有 GPI 位点; 用 PROSITE 软件分析结果显示, 该蛋白无任何已知的结构域和功能位点。因此, *FoSP1* 是一个新的分泌蛋白。

2.2 构建基因敲除线性片段

采用 split-marker 方法对 *FoSP1* 基因进行敲除 (图 1)。PCR 扩增得到 1390 bp 的潮霉素基因片段以及 1297 bp 的 A 臂和 1367 bp 的 B 臂; 第 2 轮 PCR 扩增融合片段 A-*hyg* 和 *hyg*-B, 分别扩增出 2338、2138 bp 的 DNA 条带, 经测序, 结果与目的条带序列一致, A-*hyg* 和 *hyg*-B 敲除线性片段构建成功。

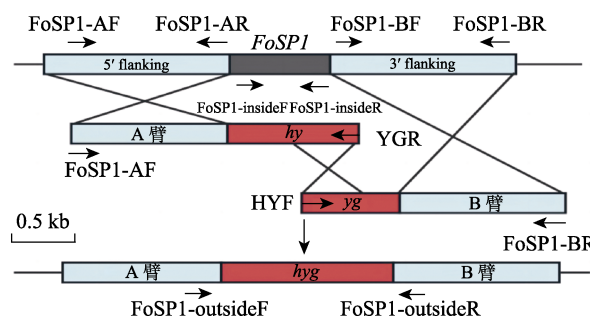


图 1 *FoSP1* 基因敲除片段示意图

Fig. 1 Schematic diagram of *FoSP1* knockout fragment

2.3 敲除突变体的 PCR 鉴定

将 *FoSP1* 基因敲除线性片段转化至野生型菌株 B2 原生质体, 后经再生培养及复筛, 获得若干转化子, 任取其中 10 个转化子进行 PCR 鉴定。正筛结果显示, 10 个转化子均能扩增出 1 条约 1590 bp 的目的条带, 而野生型菌株基因组 DNA 扩增出 735 bp 的目的条带 (图 2A); 负筛结果显

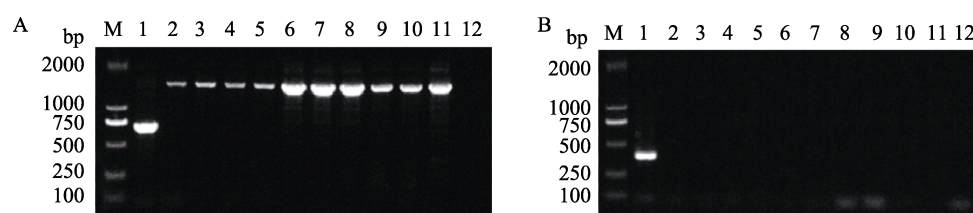
示 10 个转化子基因组均未扩出条带,野生型菌株 B2 基因组扩增出 1 条约 416 bp 的条带(图 2B)。将转化子 PCR 产物送出测序,测序结果与目的片段序列一致。以上结果表明,所挑选的 10 个转化子均为 *FoSP1* 基因敲除突变体,选取 1 株用于后续试验,命名为 $\Delta FoSP1$ 。

2.4 基因敲除突变体营养生长表型分析

在 4 种不同的营养培养基上,突变株 $\Delta FoSP1$ 的菌落形态特征与野生型菌株的菌落形态特征相似(图 3A),并且突变株的菌落直径大小与野生型无显著差异(图 3B),说明 *FoSP1* 蛋白不影响 B2 菌株的菌落形态和营养生长。

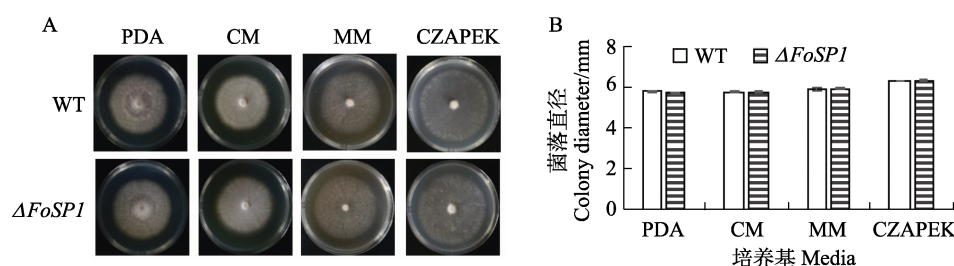
2.5 基因敲除突变体分生孢子的产生及萌发

计算平板菌落生长边缘菌块的孢子产量,结果表明,突变株的分生孢子产量极显著低于野生型菌株($P<0.01$),野生型菌株的孢子产量约为 9.2×10^5 个/mL, $\Delta FoSP1$ 的孢子产量约为 3.6×10^5 个/mL(图 4A)。在分生孢子萌发过程中,突变株的分生孢子萌发率极显著低于野生型($P<0.01$)。8 h 时野生型菌株的分生孢子萌发率达到 70%左右,突变株的萌发率在 40%~50%之间(图 4B)。综合研究表明,与野生型相比, *FoSP1* 基因敲除突变体产孢量减少、分生孢子萌发率降低,由此可见, *FoSP1* 基因对 B2 菌株的产孢过程有影响。



1: 野生型菌株; 2~11: 10 株转化子; 12: ddH₂O; M: DL2000 DNA marker。
1: Wild-type strain; 2~11: 10 knockout mutants; 12: ddH₂O; M: DL2000 DNA marker.
图 2 野生型 (WT) 与敲除突变体 $\Delta FoSP1$ 的 PCR 鉴定

Fig. 2 PCR identification of wild-type (WT) and knockout mutant $\Delta FoSP1$

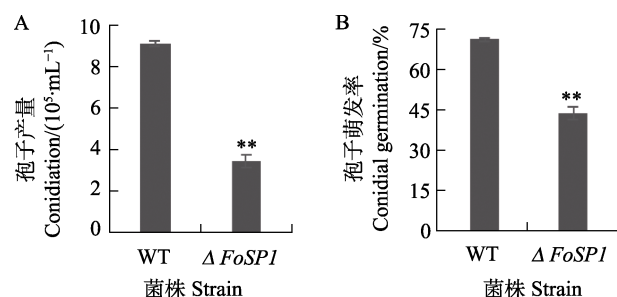


A: 菌株在营养培养基中的菌落形态; B: 菌落直径统计。

A: Colony morphology of strain in nutrient medium; B: Statistical of colony diameter.

图 3 野生型 (WT) 与敲除突变体 $\Delta FoSP1$ 的菌落生长表型观察

Fig. 3 Observation on colony growth phenotype of wild-type (WT) and knockout mutant $\Delta FoSP1$



**表示差异极显著 ($P<0.01$)。

** indicates extremely significant difference ($P<0.01$).

图 4 野生型 (WT) 与敲除突变体 $\Delta FoSP1$ 的分生孢子产量 (A) 及萌发率 (B)

Fig. 4 Conidial yield (A) and germination of (B) wild-type (WT) and knockout mutant $\Delta FoSP1$

2.6 胁迫因子敏感性分析

分别选择在加有不同浓度的 NaCl 和山梨醇的 PDA 平板上进行渗透压胁迫试验, 28 °C 恒温培养 5 d 后, 敲除突变体和野生型菌株菌落生长情况在加有 NaCl 和山梨醇的 PDA 平板上无明显差异。氧化胁迫分别选择在加入不同浓度 H₂O₂ 的 PDA 平板上进行试验, 28 °C 恒温培养 4 d 后发现, 随着 H₂O₂ 浓度的增大, 敲除突变体和野生型受到的抑制均呈现不同程度的增强, 敲除突变体和野生型菌株生长无明显差异(图 5)。说明 *FoSP1* 蛋白不参与 B2 菌株对于外源胁迫压力的适应性。

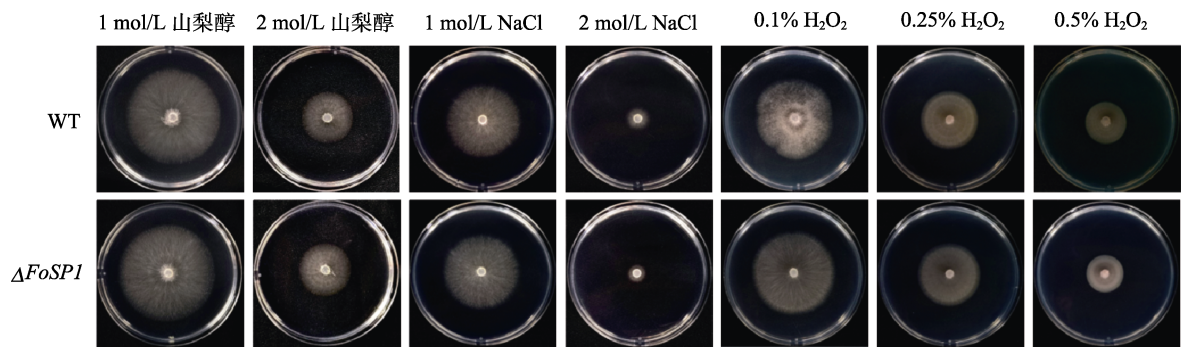


图 5 不同胁迫条件下野生型 (WT) 与敲除突变体 $\Delta FoSP1$ 的生长情况

Fig. 5 Growth condition of wild-type (WT) and knockout mutant $\Delta FoSP1$ with different stress factors

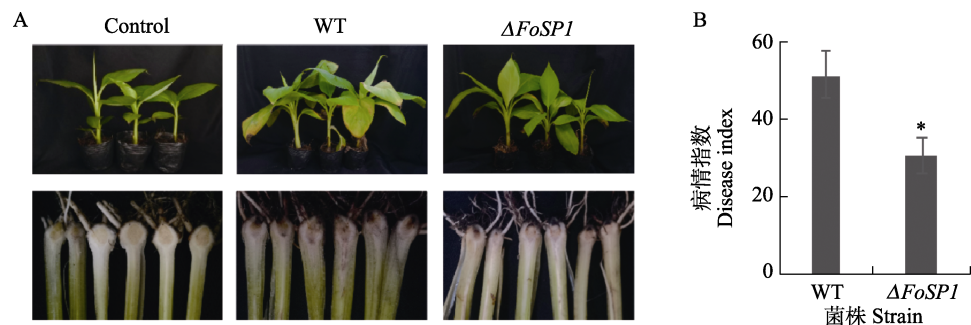
2.7 基因敲除突变体对巴西蕉的致病性

在巴西蕉幼苗上对 $\Delta FoSP1$ 突变株进行致病性测定。接种培养 30 d 后观察发现：对照组蕉苗无发病症状，其余蕉苗均呈现不同程度的发病情况；试验组中，接种野生型菌株的蕉苗，大部分叶片出现大面积的黄化现象，部分植株下部叶片已经枯死，纵切球茎后可以观察到其维管束褐化较为严重，发病部位呈黑褐色；接种 $\Delta FoSP1$ 菌株的蕉苗发病程度较轻，植株部分叶片边缘出现黄化，切开球茎后发现其褐化面积较少或者未出现褐化现象（图 6A）。病情指数统计结果表明，接种敲除突变体菌株 $\Delta FoSP1$ 的巴西蕉幼苗平均病情指数（30.7）显著低于野生型菌株 B2（51.7）（图 6B， $P<0.05$ ）。由此可见，敲除 *FoSP1* 基因导致 B2 菌株对巴西蕉的致病性减弱。

3 讨论

近年来，植物真菌全基因组序列的解析为植物病原的分泌蛋白组提供了重要的研究基础。于钦亮等^[11]基于生物信息学的方法对禾谷镰刀菌(*F. graminearum*)全基因组进行信号肽分析，预测出

606 个潜在的分泌蛋白编码基因，其中有 79 个分泌蛋白具有可预测的功能性描述。MA 等^[12]以镰刀菌属中 3 个不同寄主范围的生理小种，包括禾谷镰刀菌、轮枝镰刀菌 (*F. verticillioides*) 和尖孢镰刀菌番茄专化型 (*F. oxysporum* f. sp. *Lycopersici*) 为研究对象，对其分泌蛋白组进行差异比较，发现了强毒菌株特有的 4 条谱系特异性 (LS) 基因组区域的 LS 染色体可将弱毒株转化为强毒株，LS 染色体中含有大量的激发子类和细胞壁降解酶类分泌蛋白基因，从而证明分泌蛋白类群在镰刀菌生物学毒性中起重要作用。黄影华^[13]通过基因组和转录组测序的方法对菌株 Foc TR4-14013 进行全基因组表达量测定，并通过对所选的 5 个分泌蛋白进行基因克隆、基因敲除和致病性分析，首次对其功能进行了研究。病原真菌分泌蛋白的研究进展，一方面增进了对病原真菌分泌蛋白的分泌机制的了解，另一方面进一步阐明了病原真菌对植物的致病过程^[11]。真菌的分泌蛋白分子量一般较小，半胱氨酸含量较高。在尖孢镰刀菌 SIX 家族蛋白质中，所有 SIX6 分泌蛋白均具有 8 个保守的半胱氨酸残基，其中 1 个位于信号肽中^[14]；



A: 巴西蕉幼苗发病症状；B: 病情指数统计分析；*表示差异显著 ($P<0.05$)。

A: Disease symptoms of bananas; B: Statistical analysis of disease index; * indicates significant difference ($P<0.05$).

图 6 *FoSP1* 基因敲除突变体和野生型 (WT) 菌株致病性比较

Fig. 6 Comparing pathogenicity of *FoSP1* deletion mutants and wild-type (WT) strains against Brazilian bananas

Foc 菌株中 *flh2* 基因编码蛋白的半胱氨酸含量占总氨基酸序列的 3%^[6]。本研究的 FoSP1 蛋白与该研究相比,半胱氨酸含量更高,为 8.5%,因此具有分泌蛋白的特性。本研究中, *FoSP1* 基因敲除突变菌株 $\Delta FoSP1$ 的营养生长、菌落形态特征均未产生明显变化,这表明其不参与 Foc4 B2 菌株营养生长过程的调控。分生孢子是大多数真菌的无性繁殖方式,对真菌形成侵染循环至关重要^[15]。镰刀菌在孢子萌发后形成菌丝体,可侵染作物根尖或新鲜伤口组织,在寄主体内繁殖并产生大量的致病性相关分泌物^[16]。魏晨星^[17]研究发现 Foc4 菌株 *FoCaMK* 基因敲除突变体生长速率及菌落形态与野生型菌株相比无显著差异,但产孢量明显降低,致病性显著降低;聂燕芳等^[18]的研究表明, Foc4 菌株敲除突变体 $\Delta Foupe1$ 的菌丝和孢子形态无明显差异,并且对 NaCl、山梨醇胁迫不敏感,但菌株菌落生长和产孢量显著下降,并且对巴西蕉的致病力显著降低;GUO 等^[19]发现 *Fosp9* 基因敲除突变体可能对真菌生长和发育无影响,且对渗透胁迫的耐受性、细胞壁降解酶的分泌无影响,本研究结果与其相似。

综上所述, FoSP1 蛋白是一个新的分泌蛋白,使用 split-marker 基因敲除获得了 *FoSP1* 敲除突变菌株,通过分析 *FoSP1* 基因敲除菌株表型和致病性的变化,初步揭示 FoSP1 蛋白参与尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种 B2 的产孢、孢子萌发及其对香蕉致病性的调控。此结果为进一步研究基因组特异区间分泌蛋白在尖孢镰刀菌致病过程的作用奠定了良好基础。

参考文献

- [1] 王芳, 邹青鹤, 柯佑鹏, 过建春, 刘秋冬. 中国香蕉产业的全要素生产率、技术进步与效率变化[J]. 广东农业科学, 2016, 43(12): 168-175.
WANG F, HUAN Q H, KE Y P, GUO J C, LIU Q D. Changes of total factor productivity, technological progress and efficiency in Chinese banana industry[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2016, 43(12): 168-175. (in Chinese)
- [2] 郭云峰. 香蕉尖孢镰刀菌效应蛋白 E1 功能研究[D]. 海口: 海南大学, 2019.
GUO Y F. Function analysis of E1 effector from *Fusarium oxysporum*[D]. Haikou: Hainan University, 2019. (in Chinese)
- [3] WANG Y, XIA Q, WANG G, ZHANG H, LU X, SUN J, ZHANG X. Differential gene expression in banana roots in response to *Fusarium* wilt[J]. Canadian Journal of Plant Pathology, 2017, 39(2): 163-175.
- [4] ORDONEZ N, GARCIA F A, LAGHARI H, AKKARY M, KEMA G H. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 causing Panama disease in Cavendish bananas in Pakistan and Lebanon[J]. Plant Disease, 2016, 100(1): 209.
- [5] VAN DEN BRINK J, DE VRIES R P. Fungal enzyme sets for plant polysaccharide degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 91: 1477-1492.
- [6] 李恒. 香蕉枯萎镰刀菌四号生理小种 *flh2* 和 *mon1* 基因的功能分析[D]. 海口: 海南大学, 2019.
LI H. Functional analysis of *flh2* and *mon1* gene in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[D]. Haikou: Hainan University, 2019. (in Chinese)
- [7] 郭立佳, 王飞燕, 梁昌聪, 杨腊英, 汪军, 刘磊, 黄俊生. 香蕉枯萎病菌假定分泌蛋白 SP10 的功能分析[J]. 热带作物学报, 2016, 37(3): 525-531.
GUO L J, WANG F Y, LIANG C C, YANG L Y, WANG J, LIU L, HUANG J S. Functional analysis of the putative secretory protein SP10 in the fungal pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* causing *Fusarium* wilt[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2016, 37(3): 525-531. (in Chinese)
- [8] DOEHLEMAN G, VAN DER LINDE K, ABMANN D, SCHWAMMBACH D, HOF A, MOHANTY A, JACKSON D A, KAHMANN R. Pep1, a secreted effector protein of *Ustilago maydis*, is required for successful invasion of plant cells[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(2): e1000290.
- [9] SAITOH H, FUJISAWA S, MITSUOKA C, ITO A, HIRABUCHIL A, IKEDA K, IRIEDA H, YOSHINO K, YOSHIDAL K, MATSUMURAL H, TOSA Y, WIN J, KAMOUN S, TAKANO Y, TERAUCHIL R. Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens[J]. PLoS Pathogens, 2012, 8(5): e1002711.
- [10] 郭立佳, 彭军, 杨腊英, 王国芬, 梁昌聪, 刘磊, 黄俊生. 大蕉枯萎病原菌的分离、鉴定和致病性测定[J]. 热带作物学报, 2013, 34(1): 105-110.
GUO L J, PENG J, YANG L Y, WANG G F, LIANG C C, LIU L, HUAGN J S. Isolation and Identification of plantain (*Musa paradisiaca* Linn.) *Fusarium* wilt disease pathogen and pathogenicity test[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2013, 34(1): 105-110. (in Chinese)
- [11] 于钦亮, 马莉, 刘林, 杨静, 苏源, 王云月, 朱有勇, 李成云. 禾谷镰刀菌基因组中含寄主靶向模体分泌蛋白功能的初步分析[J]. 生物技术通报, 2008(1): 160-165.

- YU Q L, MA L, LIU L, YANG J, SU Y, WANG Y Y, ZHU Y Y, LI C Y. Primary analysis of host-targeting-motif harbored secreted proteins in genome of *Fusarium graminearum*[J]. Biotechnology Bulletin, 2008(1): 160-165. (in Chinese)
- [12] MA L J, VAN DER DOES H C, BORKOVICH K A, COLEMAN J J, DABOUSSI M J, DI PIETRO A, DUFRESNE M, FREITAG M, GRABHERR M, HENRISSAT B, HOUTERMAN P M, KANG S, SHIM W B, WOLOSUK C, XIE X, XU J R, ANTONIW J, BAKER S E, BLUHM B H, BREAKSPEAR A, BROWN D W, BUTCHKO R A, CHAPMAN S, COULSON R, COUTINHO P M, DANCHIN E G, DIENER A, GALE LR, GARDINER D M, GOFF S, HAMMOND-KOSACK K E, HIBURN K, HUA-VAN A, JONKERS W, KAZAN K, KODIRA C D, KOEHRSEN M, KUMAR L, LEE Y H, LI L, MANNERS J M, MIRANDA-SAAVEDRA D, MUKHERJEE M, PARK G, PARK J, PARK S Y, PROCTOR R H, REGEV A, RUIZ-ROLDAN M C, SAIN D, SAKTHIKUMAR S, SYKES S, SCHWARTZ D C, TURGEON B G, WAPINSKI I, YODER O, YOUNG S, ZENG Q, ZHOU S, GALAGA J, CUOMO C A, KISTLER HC, REP M. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in *Fusarium*[J]. Nature, 2010, 464(7287): 367-373.
- [13] 黄影华. 香蕉枯萎病菌 5 个分泌蛋白的基因克隆和功能分析[D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2022.
- HUANG Y H. Gene cloning and function analysis of five secreted proteins in *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense*[D]. Guangzhou: Zhongkai University of Agriculture and Engineering, 2022. (in Chinese)
- [14] DE SAIN M, REP M. The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16(10): 23970-23993.
- [15] YAN X, LI Y, YUE X F, WANG C C, QUE Y W, KONG D D, MA Z H, TALBOT N, WANG Z Y. Two novel transcriptional regulators are essential for infection-related morphogenesis and pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(12): e1002385.
- [16] 林羽立. 尖孢镰刀菌效应蛋白研究进展[J]. 农业与技术, 2021, 41(20): 77-80.
- LIN Y L. Research progress of *Fusarium oxysporum* effector protein[J]. Agriculture and Technology, 2021, 41(20): 77-80. (in Chinese)
- [17] 魏晨星. 尖孢镰刀菌 *FoYjeF* 和 *FoCaMK* 基因的可变剪接及其功能分析[D]. 郑州: 河南农业大学, 2023.
- WEI C X. Alternative splicing and functional analysis of *FoYjeF* and *FoCaMK* genes of *Fusarium oxysporum*[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University, 2023. (in Chinese)
- [18] 聂燕芳, 刘春奇, 李华平, 李云锋. 香蕉枯萎病菌分泌蛋白 *FoUPE1* 的基因功能研究[C]//中国植物病理学会. 植物病理科技创新与绿色防控: 中国植物病理学会 2021 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2021.
- NIE Y F, LIU C Q, LI H P, LI Y F. Study on gene function of secretory protein *FoUPE1* of banana *Fusarium oxysporum*[C]//Scientific and Technological Innovation and Green Prevention and Control of Plant Pathology: Proceedings of the 2021 Annual Conference of China Society of Plant Pathology. Beijing: China Agricultural Science and Technology Press, 2021. (in Chinese)
- [19] GUO L J, WANG J, LIANG C C, YANG L Y, ZHOU Y, LIU L, HUANG J S. Fosp9, a novel secreted protein, is essential for the full virulence of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on banana (*Musa* spp.)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2022, 88(6): e0060421.