

草莓果生炭疽菌 LysM 效应子 CfLysM2 的致病功能分析

余永婷¹, 李水根¹, 方献平¹, 张昊², 安海山¹,
张学英^{1*}, 张丽勍^{1*}

(1. 上海市农业科学院林木果树研究所, 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海 201403;

2. 中国农业科学院植物保护研究所, 北京 100193)

摘要 果生炭疽菌 *Colletotrichum fructicola* 侵染引起的草莓炭疽病是草莓生产中的重要病害。前期研究发现一个在果生炭疽菌侵染阶段高表达的含 LysM 结构域的候选效应子 CfLysM2。为进一步研究 CfLysM2 的致病功能, 运用同源重组方法构建 CfLysM2 缺失突变株 Δ CfLysM2 和回补菌株 CfLysM2c。致病力测定结果表明, 接种后 15 d, Δ CfLysM2 接种的草莓叶片病情指数显著下降。荧光定量 PCR 分析表明 CfLysM2 基因在果生炭疽菌接种草莓叶片后 24 h 相对表达量最高。利用转录组技术对野生型菌株 (wild-type strain, WT) 和 Δ CfLysM2 接种后 24 h 的草莓叶片样品进行比较分析, 获得差异表达基因 109 个。CfLysM2 的缺失导致宿主代谢途径尤其是次生代谢物生物合成通路的激活, 说明 CfLysM2 可能在果生炭疽菌侵染草莓过程中通过靶向黄酮醇合成酶等代谢相关基因, 抑制植物次生代谢产物合成及其介导的抗真菌免疫, 保证其顺利侵染。该研究为揭示 CfLysM2 机理及对果生炭疽菌和草莓互作研究奠定了理论基础。

关键词 果生炭疽菌; LysM 结构域; 致病性; 转录组

中图分类号: S 436.68 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2022074

Functional analysis of the LysM effector CfLysM2 in the pathogenicity of *Colletotrichum fructicola* on strawberry

YU Yongting¹, LI Shuigen¹, FANG Xianping¹, ZHANG Hao², AN Haishan¹,
ZHANG Xueying^{1*}, ZHANG Liqing^{1*}

(1. Forest & Fruit Tree Research Institute, Shanghai Academy of Agriculture Sciences, Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai 201403, China; 2. Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing 100193, China)

Abstract Strawberry anthracnose caused by *Colletotrichum fructicola* is an important disease in strawberry production. A candidate effector CfLysM2 containing LysM domain highly expressed during the infection of *Colletotrichum fructicola* was identified in the previous study. To further study the pathogenic function of CfLysM2, a CfLysM2 deletion mutant Δ CfLysM2 and a complementary strain CfLysM2c were constructed by homologous recombination. The results of pathogenicity assay showed that the disease index decreased significantly 15 days post inoculation with the mutant strain. Real-time quantitative PCR analysis showed that the relative expression of CfLysM2 was the highest 24 h post infection by *C. fructicola* in strawberry leaves. The transcriptome technology was used to compare and analyze strawberry leaf samples 24 h after inoculation of wild-type strain and mutant strain Δ CfLysM2, respectively. The results showed that there were 109 differentially expressed genes. Knockout of CfLysM2 led to the activation of host metabolic pathways, especially the biosynthetic pathway of secondary metabolites, indicating that CfLysM2 might inhibit the synthesis of plant secondary metabolites and metabolite-mediated antifungal immunity to ensure its successful infection by targeting metabolism-related

收稿日期: 2022-02-14 修订日期: 2022-05-22

基金项目: 上海市科委启明星人才计划(18QB1402800)

* 通信作者 E-mail: 张学英 zhangxueying@saas.sh.cn; 张丽勍 zhangliqing@saas.sh.cn

genes such as flavonol synthase during infection. This study lays a theoretical foundation for revealing the functional mechanism of *CfLysM2* and for the study of the interaction between *C. fructicola* and strawberry.

Key words *Colletotrichum fructicola*; LysM domain; pathogenicity; transcriptome

草莓 *Fragaria* × *ananassa* Duch. 属蔷薇科草莓属多年生草本植物,是我国传统的优秀果品之一^[1]。然而,草莓病害一直制约草莓产业的发展,草莓炭疽病在我国乃至世界各地的草莓主产区一直是制约草莓产业持续稳定发展的主要瓶颈。草莓炭疽病指由炭疽菌属 *Colletotrichum* spp. 真菌引起的草莓病害。在我国草莓生产中,炭疽病危害严重的年份直接导致草莓减产 50%~80%,甚至绝产^[2]。团队前期研究结果表明果生炭疽菌 *Colletotrichum fructicola* 为华东地区草莓炭疽病菌的优势种^[3]。

细胞溶解酶基序(lysin motif, LysM)最初在芽胞杆菌噬菌体的溶菌酶中发现^[4]。LysM 结构域存在于原核生物和真核生物的蛋白质中^[5],由大约 40 个氨基酸残基组成^[6]。在真核生物的 LysM 结构域中存在多个半胱氨酸残基和二硫键,以维持蛋白质的结构稳定性^[7]。迄今为止,已在真菌中鉴定出 783 种含 LysM 的蛋白^[8]。

效应子是病原菌分泌的,通过干扰寄主植物细胞的活动来促进病原菌成功侵染和定殖的一类外泌型蛋白分子^[9]。含有 LysM 结构域的效应子被称为 LysM 效应子。几丁质(chitin)是真菌细胞壁的重要组成部分之一,病原真菌在侵染寄主植物过程中释放的几丁质寡糖是重要的病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns),能够被寄主植物细胞膜表面的受体识别并激发寄主植物的先天免疫反应。病原真菌则分泌 LysM 效应子,通过竞争性结合游离几丁质寡糖,阻断其与寄主植物受体结合等手段,抑制几丁质诱导的寄主植物免疫反应^[10-11]。该机制在番茄叶霉 *Cladosporium fulvum* 中已经得到了充分的研究:番茄叶霉在侵染过程中分泌具有无脊椎动物几丁质结合域(CBM14)的效应子 Avr4,结合番茄叶霉自身细胞壁几丁质,从而保护菌丝免受番茄几丁质酶的水解^[12]。此外,番茄叶霉分泌的效应子 Ecp6 含有 3 个 LysM 结构域,能够结合几丁质抑制其诱导的植物免疫。Ecp6 的晶体结构显示其 3 个 LysM 结构域中的 2 个通过底物诱导的内链二聚化(intrachain dimerization)建立了具有超高几丁质结合亲和力的凹槽,使 Ecp6 能够与植物受体竞争结合几丁质^[13]。此外,LysM 效应

子也被证明是病原真菌致病过程中的关键因素。不同真菌中 LysM 效应子的功能也不尽相同。小麦壳针孢叶枯菌 *Mycosphaerella graminicola* LysM 效应子在病原菌的定殖过程中发挥作用^[14]。希金斯炭疽菌 *Colletotrichum higginsianum* LysM 效应子 ChELP1 和 ChELP2 能够控制附着胞的形成^[15]。大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* VdLs17 菌株中的 LysM 效应子基因 VDAG_05180 的缺失能够导致菌株对番茄的致病力显著下降^[16]。

目前对果生炭疽菌致病相关基因已有研究,但其致病机理仍不清楚,尚未见果生炭疽菌 LysM 效应子的相关报道。研究组在前期工作的基础上筛选获得一个在果生炭疽菌侵染阶段高表达的候选效应子 CfLysM2^[17]。本研究拟以 *CfLysM2* 基因为研究对象,通过构建 *CfLysM2* 缺失突变菌株($\Delta CfLysM2$),比较分析了野生型菌株(wild-type strain, WT)和 $\Delta CfLysM2$ 侵染的草莓叶片的转录组,观察二者侵染后草莓叶片在代谢途径和防御反应上的差异,旨在揭示果生炭疽菌侵染宿主过程中,CfLysM2 通过何种途径影响果生炭疽菌-草莓互作,进一步影响果生炭疽菌致病性的机制。

1 材料与方法

1.1 试验材料

果生炭疽菌 *Colletotrichum fructicola* 野生型菌株 SH-01 由上海市农业科学院林木果树研究所保存。构建敲除载体和回补载体的 pKH-KO 和 pKN 质粒由中国农业科学院植物保护研究所张昊副研究员惠赠。植物材料为草莓栽培品种‘红颜’。

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 20 g,定容到 1 L。CMC 培养基:羧甲基纤维素钠 15 g,磷酸二氢钾 1 g,七水合硫酸镁 0.5 g,硝酸铵 1 g,酵母提取物 1 g,加蒸馏水到 1 L。TB3 培养基:酵母提取物 3 g,酪氨酸水解蛋白 3 g,蔗糖 200 g,加蒸馏水到 1 L。以上培养基均经高压灭菌,室温保存。

1.2 试验方法

1.2.1 *CfLysM2* 基因序列分析

利用 SMART(<http://smart.embl-heidelberg>).

de/)在线生物信息学工具对 *CfLysM2* 效应子的结构域进行分析。通过 UNIPROT ([https:// www. uniprot. org/](https://www.uniprot.org/))在线网站中的 BLAST 工具获得其他病原真菌的 *LysM* 效应子的氨基酸序列。利用 MEGA 7.0.26 软件中的邻接法 (neighbor-joining method, NJ)构建系统发育树。

1.2.2 *CfLysM2* 基因的敲除与回补

利用 E. Z. N. A.[®] Fungal DNA Kit (Omega, 美国)提取果生炭疽菌基因组 DNA。以果生炭疽菌菌株的 DNA 为模板采用上游序列扩增引物 (L2UF/L2UR),下游序列扩增引物 (L2DF/L2DR),分别扩增出 900 bp 的上游片段和 900 bp 的下游片段。引物序列见表 1。在 USER 酶的作用下,将上游片段连接到敲除载体 pKH-KO 的 *Bam*H I/

*Eco*R I位点上,下游片段连接到 pKH-KO 质粒的 *Xho*I /*Kpn*I 位点上。从而得到 *CfLysM2* 基因的敲除载体。将敲除载体用内切酶线性化,转化至果生炭疽菌野生型菌株的原生质体中。原生质体的制备及转化参照 Desmond 等^[18]的方法。转化子在潮霉素浓度为 100 μg/mL 的 PDA 培养基上筛选。提取抗性转化子基因组 DNA,分别用引物 *CfL2OF/CfL2OR* 检测目的基因 *CfLysM2*;引物 H850/H852 检测替代 *CfLysM2* 基因的潮霉素基因 (*Hph*) ;引物 *CfL2TF/H850* 检测重组左臂;引物 H852/*CfL2TR* 检测重组右臂。

分析 *CfLysM2* 基因序列,设计引物 *CfL2F/CfL2R*(表 1),以野生型菌株的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,获得带有 *Kpn*I 和 *Bam*H I 位点的

表 1 本研究所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列 (5'-3') Sequence of primer	产物长度/bp Length of amplicon	退火温度/℃ Annealing temperature	用途 Purpose
L2UF	GGCATTAAUAACCAACTTCTTGGGTCTACTAC	900	55	扩增 <i>CfLysM2</i> 基因上游序列
L2UR	GGTCTTAAUTTTGAACGATTTGGATGGTATC			
L2DF	GGGTTTAAUGCAGGCCGTTGCGGTTGATGA	900	58	扩增 <i>CfLysM2</i> 基因下游序列
L2DR	GGACTTAAUCACCGTCGAGATTCTCCCCTACA			
CfL2F	CGGGGTACCCCG CGTCCGTTTCCGCGGAAGTGT	3 309	55	扩增 <i>CfLysM2</i> 全基因序列
CfL2R	CGCGGATCCGCG GCTCGGAATTGAGCAGTTGGA			
H852	TTCTCCCTTTATTTTCAGATTCAA	750	53	检测替代 <i>CfLysM2</i> 的 <i>Hph</i> 基因
H850	ATGTTGGCGACCTCGTATTGG			
CfL2OF	ATGCAGACCTCTTACATCTTCA	510	55	检测 <i>CfLysM2</i> 基因
CfL2OR	TTTGCAGACGGGGATGTTGAT			
CfL2TF	GGATGGTTGGGACAGTATG	1 650	55	引物 CfL2TF/H850 检测重组左臂序列
CfL2TR	ACATCGTTATGGCCGAAGTC	1 650	53	引物 H852/CfL2TR 检测重组右臂序列
CfLysM2F	GGCGACACTTTCTTCATCGT	110	52	RT-qPCR 检测 <i>CfLysM2</i> 基因表达量
CfLysM2R	GTTGATAACCTGGCCCTCCT			
β-actinF	ATGTGCAAGGCCGTTTTCGC	125	52	内参基因(果生炭疽菌)
β-actinR	TACGAGTCCTTCTGGCCCAT			
FLSF	CCAATATCCCACATCATCGAC	169	52	RT-qPCR 检测 <i>FLS</i> 基因表达量
FLSR	TTCTGCGTCTTGTCATCAG			
POX12F	CCTGAGTTTGAGAGCCAAGG	172	52	RT-qPCR 检测 <i>POX12</i> 基因表达量
POX12R	TCCATCCTTTCTTCCCAGTG			
β-GluF	ACGAAACGCGACAATTTAC	224	52	RT-qPCR 检测 <i>βGlu</i> 基因表达量
β-GluR	CCGAGTAGGGTTGCACATTT			
WRKY70F	GTCCAACAGAAGAGGGTGA	249	52	RT-qPCR 检测 <i>WRKY70</i> 基因表达量
WRKY70R	GCAGAACCAGAACCAGAAGC			
WRKY53F	CCAATCCAAAGAGGCACCTA	160	52	RT-qPCR 检测 <i>WRKY53</i> 基因表达量
WRKY53R	ATGGAAGTAGCTTGCGAGGA			
qCYPF	TGGCAGCGCTACAGTATGAC	221	52	RT-qPCR 检测 <i>CYP</i> 基因表达量
qCYPR	GCTTCTGTGGCCTTTTGTTT			
actinF	ACCCAACCCATTCTATTCT	137	52	内参基因(草莓)
actinR	ATCATCTCCAGCAAACCT			

3 309 bp 的片段,其中 510 bp 为 *CfLysM2* 基因的 ORF 序列。PCR 产物纯化后用 *Kpn* I /*Bam*H I 双酶切,酶切产物连接到同样经 *Kpn* I /*Bam*H I 双酶切的 pKN 中,获得 *CfLysM2* 的回补载体。将回补载体用内切酶线性化后转化到由 *CfLysM2* 敲除突变体制备的原生质体中,利用 G418 抗性 PDA 培养基筛选,以抗性转化子的基因组 DNA 为模板,用引物 Cfl2OF/Cfl2OR 进行 PCR 验证,能扩增出 *CfLysM2* 完整 ORF 的抗性转化子为回补菌株 *CfLysM2c*。

1.2.3 果生炭疽菌对草莓的致病性测定

参照柯智健等^[19]的方法配制孢子悬浮液,将浓度为 10⁶ 个/mL 的果生炭疽菌野生型菌株 SH-01、突变菌株 Δ *CfLysM2* 和回补菌株 *CfLysM2c* 的分生孢子悬浮液(含 0.05% tween-20)用喷雾器均匀喷洒到草莓植株‘红颜’叶片上,直至雾滴滴下为止,各菌株分别接种 10 株,3 次重复。以含有 0.05% tween-20 的无菌水为对照。覆膜黑暗 28℃ 保湿 24 h 后于光周期 L//D=12h//12h,相对湿度大于 80% 的条件下培养。接种后 15 d 调查叶片的发病情况。病情分级参考 Wang 等^[20](表 2)。

病情指数(DI)=[$\sum$ (各级发病株数×病级值)/(最高发病级值×调查株数)]×100。

利用 Excel 2016 和 SAS 软件对试验数据进行汇总、处理和分析,通过单因素方差分析和 LSD 法比较草莓植株接种野生型菌株、 Δ *CfLysM2* 和 *CfLysM2c* 后病情指数的差异,结果用 Excel 2016 作图。

表 2 病情分级标准

Table 2 Standards for grading disease on leaves

病级 Grade	描述 Description
0 级 Grade 0	无病斑
1 级 Grade 1	0%<病斑覆盖叶片面积 ≤5%
3 级 Grade 3	5%<病斑覆盖叶片面积 ≤15%
5 级 Grade 5	15%<病斑覆盖叶片面积 ≤30%
7 级 Grade 7	30%<病斑覆盖叶片面积 ≤50%
9 级 Grade 9	50%<病斑覆盖叶片面积 ≤100%

1.2.4 病原菌侵染过程中 *CfLysM2* 基因表达量变化

以果生炭疽菌野生型菌株接种草莓‘红颜’叶片,采集接种后 0、6、12、24、48 h 和 72 h 叶片组织,液氮速冻后于-80℃ 保存备用。利用植物总 RNA

提取试剂盒(天根,中国)提取叶片总 RNA,用 RNA 反转录试剂盒(全式金,中国)反转录成 cDNA 作为荧光定量 PCR 模板。依据基因 CDS 区序列,利用软件 Primer 5.0 设计引物 CflYsM2F/CflYsM2R (表 1)。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。以果生炭疽菌 β -actin 基因为内参基因,按照 SYBR Premix Ex Taq Kit (TaKaRa,中国)说明书进行荧光定量 PCR,用相对阈值法($2^{-\Delta\Delta C_t}$)计算侵染后不同时期组(6、12、24、48 h 和 72 h)与对照组(0 h)中 *CfLysM2* 基因表达差异,使用软件 Graph-Pad Prism 5 分析并作图。

1.2.5 样品准备

用果生炭疽菌野生型菌株及 Δ *CfLysM2* 的分生孢子悬浮液(10⁶ 个/mL)分别接种草莓植株各 10 株,设置 3 次生物学重复。分别采集接种后 24 h 的草莓叶片,液氮速冻后保存于-80℃,用于转录组测序及差异表达基因的验证。

1.2.6 RNA 提取及文库构建和测序

采用 TRIzol 法(Invitrogen 公司)分别提取 1.2.5 准备的草莓叶片样本总 RNA。利用 Nano-drop 2000 检测 RNA 的浓度和纯度,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,Agilent 2100 测定 RIN 值。文库构建及测序工作均委托上海美吉生物医药科技有限公司完成。使用美吉生物云平台完成数据分析。

1.2.7 转录组数据质控及序列比对分析

对原始测序数据进行过滤得到高质量的测序数据(clean data)。使用 TopHat2 软件(<http://tophat.cbcb.umd.edu/>)^[21]将质控后的数据,即 clean data(reads)与草莓参考基因组(https://www.rosaceae.org/species/fragaria_x_ananassa/genome_v1.0.a1)进行比对分析,获得用于后续分析的 mapped data(reads),同时对本次测序的比对结果进行质量评估。

1.2.8 差异基因筛选

利用软件 RSEM 对转录本的表达量进行分析,定量指标为 TPM(transcripts per million)值,以转录本的条数为计算单位。同组重复样本的最终表达量为所有重复样本数据的平均值。使用基于负二项分布的 DESeq2 软件进行分析,以 |fold change|≥2 和 $P_{adj}<0.05$ 为筛选条件得到差异表达基因(differentially expressed genes,

DEGs)。

1.2.9 功能注释和富集分析

采用软件 Goatoools(<https://github.com/tang-haibao/GOatoools>)^[22] 对差异基因进行 GO 富集分析,使用 Fisher 精确检验得到 *P* 值,采用 BH 检验进行校正,当经过校正的 *P* 值(*P*_{adj})<0.05 时,认为此 GO 功能存在显著富集情况。

将差异基因与 KEGG 数据库进行比对,默认当 *P* 值(*P* value_{uncorrected})<0.05 时,认为此 KEGG 通路存在显著富集情况。

1.2.10 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

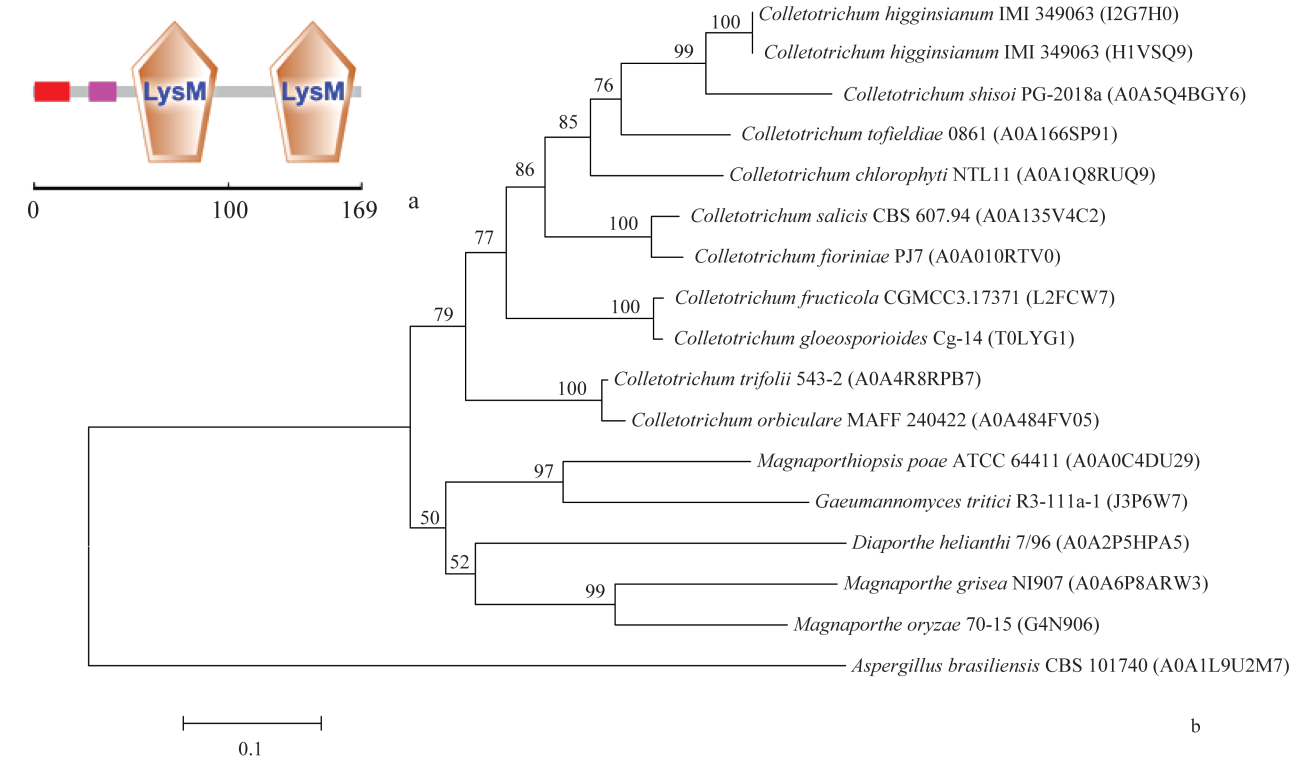
以 1.2.5 准备的草莓叶片为材料提取 RNA,选取 6 个差异表达基因进行 RT-qPCR 验证,包括 2 个显著差异表达的次生代谢相关基因,黄酮醇合成酶基因(*FLS*)和过氧化物酶 12 基因(*POX12*)。用目的基因 ID 检索蔷薇科基因组数据库 GDR(<https://www.rosaceae.org/>),获得目的基因序列。草莓 *actin* 基因作为内参基因。引物设计及 RT-qPCR 方法同 1.2.4。每份样品 3 次生物学重复。使用软件

GraphPad Prism 5 分析并作图。

2 结果与分析

2.1 CfLysM2 生物信息学分析

利用 SMART 网站预测 CfLysM2 的结构域,发现其在 N 端(第 51 至 95 位,122 至 166 位)具有 2 个典型的 LysM 结构域(图 1a)。对 CfLysM2 的氨基酸序列及其同源序列的系统进化树分析发现,LysM2 在炭疽菌属内相对保守,与同属的胶孢炭疽菌 *C. gloeosporioides* Cg-14 LysM2 氨基酸序列的一致性为 99%,与同属的杨柳炭疽菌 *C. salicis*、瓜类炭疽菌 *C. orbiculare*、油茶炭疽病菌 *C. fiorinia*、大豆炭疽病菌 *C. chlorophyti*、*C. tofieldiae* 和希金斯炭疽菌 *C. higginsianum* 中的 LysM2 氨基酸序列的一致性分别为 79.6%、77.6%、73.8%、73.2%、73.1% 和 72.6%;与早熟禾夏季斑枯病菌 *Magnaporthiopsis poae*、向日葵茎溃疡病菌 *Diaporthe helianthi*、马唐瘟病菌 *Magnaporthe grisea*、小麦全蚀病菌 *Gaeumannomyces tritici* 和稻瘟病菌 *Magnaporthe oryzae*



a: CfLysM2蛋白的结构域分析。图中红色方块代表信号肽;粉红色方块代表蛋白的低复杂度结构域。LysM 代表LysM 结构域。b: CfLysM2蛋白的系统发育分析。括号中的编号为<https://www.uniprot.org/>的登录号。
a: Domain analysis of CfLysM2. The red box represents signal peptide; the pink box represents low complexity region. LysM represents LysM domain. b: Phylogenetic analysis of CfLysM2. The numbers in brackets are accession numbers at the website <https://www.uniprot.org/>.

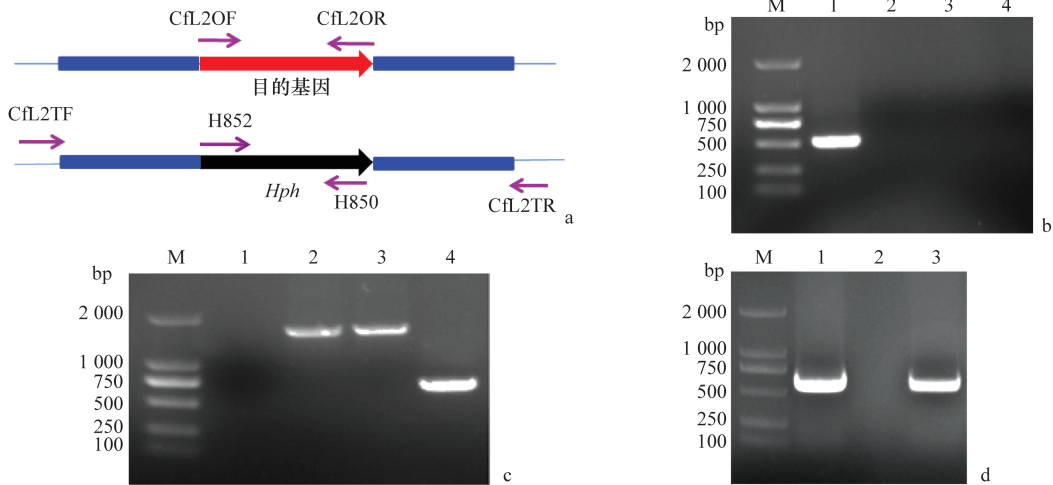
图 1 CfLysM2 结构域和系统发育分析
Fig. 1 Protein domain and phylogenetic analysis of CfLysM2

等 *LysM2* 氨基酸序列的一致性相对较高,分别为 64.4%、61.6%、60.9%、60.1%和 61.1%(图 1b)。

2.2 *CfLysM2* 基因的敲除及回补

CfLysM2 敲除、回补菌株构建策略如图 2a 所示,野生型菌株仅能扩增出 *CfLysM2* 基因,以左右臂和 *Hph* 基因引物扩增无法获得目的条带(图 2b);将敲除载体线性化后转入以果生炭疽菌野生型菌株制备的原生质体中,共获得 40 个转化子,其中 27 号转化子利用引物 *CfL2OF/CfL2OR* 不能扩增出 *CfLysM2* 基因目的条带,而利用引物

CfL2TF/H850、*H852/CfL2TR* 和 *H850/H852* 能够分别扩增出目的条带(图 2c)。由此确定第 27 号转化子为敲除突变体,并将其命名为 $\Delta CfLysM2$ 。将回补载体 *pKN-CfLysM2* 转化到以敲除突变体 $\Delta CfLysM2$ 制得的原生质体中,经潮霉素培养筛选后,共得到 20 个转化子。利用 *CfL2OF/CfL2OR* 引物对转化子进行 PCR 鉴定,其中 3 号转化子可以扩增出 *CfLysM2* 的 ORF 片段 510 bp(图 2d),由此证明回补菌株构建成功,并将其命名为 *CfLysM2c*。



a: 基因敲除策略示意图。红色和黑色箭头分别代表目的基因和潮霉素抗性基因 *Hph*, 紫色箭头代表引物 *CfL2OF/CfL2OR*、*CfL2TF/CfL2TR*、*H852/H850* 的结合位点。b-c: 分别为野生菌株和突变菌株 $\Delta CfLysM2$ 的扩增产物。M: DNA marker *DS*TM 2000; 泳道 1-4: 引物 *CfL2OF/CfL2OR*、*CfL2TF/H850*、*H852/CfL2TR*、*H850/H852* 的扩增产物。d: 以 *CfL2OF/CfL2OR* 为引物对回补株 *CfLysM2c* 的 PCR 验证。M: DNA marker *DS*TM 2000; 泳道 1-3: 分别为野生型菌株、 $\Delta CfLysM2$ 、*CfLysM2c* 的扩增产物。
a: Schematic diagram of gene knockout strategy. Red and black arrows indicate the target gene and hygromycin B phosphotransferase gene (*Hph*), respectively, and purple arrows indicate the binding sites of primers *CfL2OF/CfL2OR*, *CfL2TF/CfL2TR*, *H852/H850*. b-c: Amplified product of the wild-type strain and mutant strain $\Delta CfLysM2$ DNA. M: DNA marker *DS*TM 2000; lanes 1-4: The amplified products using primers *CfL2OF/CfL2OR*, *CfL2TF/H850*, *H852/CfL2TR*, *H850/H852*, respectively. d: PCR verification of complementary strains using primer *CfL2OF/CfL2OR*. M: DNA marker *DS*TM 2000; lanes 1-3: The amplified products of wild-type strain, $\Delta CfLysM2$ and *CfLysM2c*, respectively.

图 2 *CfLysM2* 基因突变菌株及回补菌株的筛选与鉴定

Fig. 2 Screening and verification of *CfLysM2* mutant and complementary strains

2.3 *CfLysM2* 基因的缺失影响果生炭疽菌的致病性

将野生型菌株、突变菌株 $\Delta CfLysM2$ 和回补菌株 *CfLysM2c* 采用喷雾法分别接种至草莓植株,接种后 15 d, $\Delta CfLysM2$ 的致病力明显减弱,病情指数显著低于野生型菌株和 *CfLysM2c* ($P < 0.05$) (图 3),说明 *CfLysM2* 的缺失对果生炭疽菌的致病力造成了一定影响。

2.4 *CfLysM2* 基因的表达分析

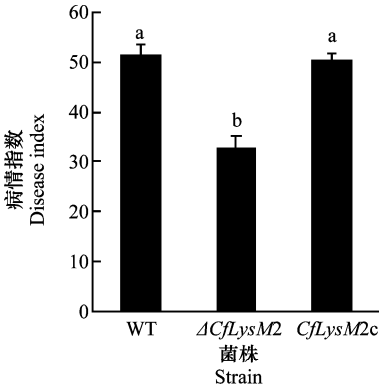
采用 RT-qPCR 研究 *CfLysM2* 基因在接种后 0、6、12、24、48 h 和 72 h 的表达水平。结果(图 4)显示, *CfLysM2* 基因在接种后 24 h 表达量达到最高,

24 h 后开始下调。因此选取野生型菌株和突变菌株 $\Delta CfLysM2$ 接种草莓叶片后 24 h 的样本进行后续转录组测序。

2.5 转录组测序数据分析

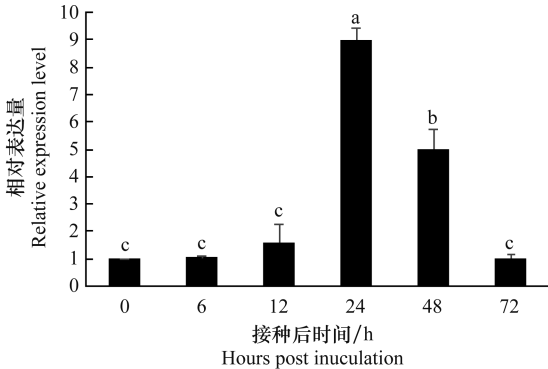
通过 RNA-seq 技术对果生炭疽菌野生型菌株和 $\Delta CfLysM2$ 分别接种草莓叶片后 24 h 的 6 个样品 (WT-1, WT-2, WT-3 和 LM2-1, LM2-2, LM2-3) 进行分析。各样品用于组装的测序数据 Q30 均高于 94%。本次转录组测序结果可满足后续组装分析的质量要求。将序列进行拼接和分析,与参考基因组比对,获得用于后续表达量计算等的 mapped data (reads) (表 3),与 6 大数据库 (NR, Swiss-Prot, Pfam, EggNOG,

GO 和 KEGG)进行比对,获得基因的注释信息。



将野生型菌株、*CfLysM2* 基因突变菌株及回补菌株接种的草莓叶片分为3组,不同小写字母表示接种不同菌株后的病情指数差异显著(LSD, $P<0.05$)。Strawberry leaves inoculated with wild-type, *CfLysM2* mutant and complementary strains are divided into three groups. Different lowercase letters indicate significant differences in disease index at 0.05 level after inoculation with different strains (LSD).

图 3 野生型菌株、*CfLysM2* 基因突变菌株及回补菌株的致病性测定
Fig. 3 Pathogenicity tests of wild-type, *CfLysM2* mutant and complementary strains on strawberry



以果生炭疽菌野生型菌株接种草莓叶片后不同时间点分组,不同小写字母表示经最小显著性差异检验(LSD),*CfLysM2* 基因在不同时间的相对表达量在0.05水平差异显著($P<0.05$)。Strawberry leaves inoculated with wild-type strain of *C. fructicola* at different time points are divided into groups. Different lowercase letters on the bar indicate significant differences in the relative expression of *CfLysM2* in strawberry leaves at different time points at 0.05 level (LSD).

图 4 果生炭疽菌野生型菌株接种草莓叶片后 *CfLysM2* 的表达模式
Fig. 4 Expression patterns of *CfLysM2* in strawberry leaves after inoculated with wild-type *Colletotrichum fructicola* SH-01

表 3 野生型菌株和突变菌株 $\Delta CfLysM2$ 侵染草莓叶片总 RNA 转录组测序质控数据和比对结果统计¹⁾
Table 3 Statistics of quality control data and alignment results of transcriptome sequencing of total RNA from strawberry leaves infected by wild-type and $\Delta CfLysM2$ strains

样品 Sample	原始测序数据的 总条目数/条 Raw reads	质控后测序数据 的总条目数/条 Clean reads	质控后测序 总数据量/bp Clean base	碱基平均 错误率/% Error rate	Q20/%	Q30/%	定位到基因组的 条目数(占比) Total reads mapped to the genome (proportion)
WT-1	99 225 766	98 519 206	14 508 769 252	0.024 7	98.18	94.39	102 157 144 (90.18%)
WT-2	101 019 290	100 400 962	14 739 549 420	0.024 5	98.28	94.64	85 005 754 (90.88%)
WT-3	96 813 036	96 151 374	14 113 614 174	0.024 4	98.28	94.67	81 377 565 (90.9%)
LM2-1	96 512 156	95 888 666	14 084 593 765	0.024 8	98.15	94.27	86 335 725 (90.04%)
LM2-2	101 285 910	100 651 526	14 767 260 995	0.024 7	98.20	94.43	90 863 880 (90.28%)
LM2-3	112 919 198	112 268 642	16 462 991 096	0.024 6	98.23	94.50	100 154 035 (89.21%)

1) WT: 野生型菌株; LM: $\Delta CfLysM2$; Q20、Q30: 分别表示对质控后测序数据进行质量评估,测序质量在 99%和 99.9%以上的碱基占总碱基的百分比,一般 Q20 在 85%以上, Q30 在 80%以上。
WT: Wild type strain; LM: $\Delta CfLysM2$; Q20 and Q30: The percentage of bases with a sequencing quality score of more than 99% and 99.9% in the total bases based on evaluation of the quality of sequencing data after quality control, respectively (Q20: >85%; Q30: >80%).

2.6 差异表达基因的 GO 分析结果

比较野生型菌株和 $\Delta CfLysM2$ 侵染草莓叶片转录本,共筛选出 109 个差异表达基因。以接种野生型菌株 24 h 后的草莓叶片为对照,其中上调表达基因的有 79 个(其中上调倍数最多的达 233 倍),下调表达的基因有 30 个(其中下调倍数最多的达 167 倍)。将差异表达基因进行 GO 功能分类,本研究中野生型菌株和 $\Delta CfLysM2$ 接种草莓叶片后 24 h 差

异表达基因按 GO 功能分类归为 3 类基因集:生物过程(biological process)、分子功能(molecular function)、细胞组分(cellular component)(图 5)。在所有类别中,催化活性、代谢过程和结合 3 个类别是含有差异表达基因最多的 3 类。在各个类别中,生物过程方面主要富集在代谢过程、细胞过程、定位;细胞组分方面主要富集在细胞组分、膜组分;分子功能方面主要富集在催化活性、结合等功能类别。

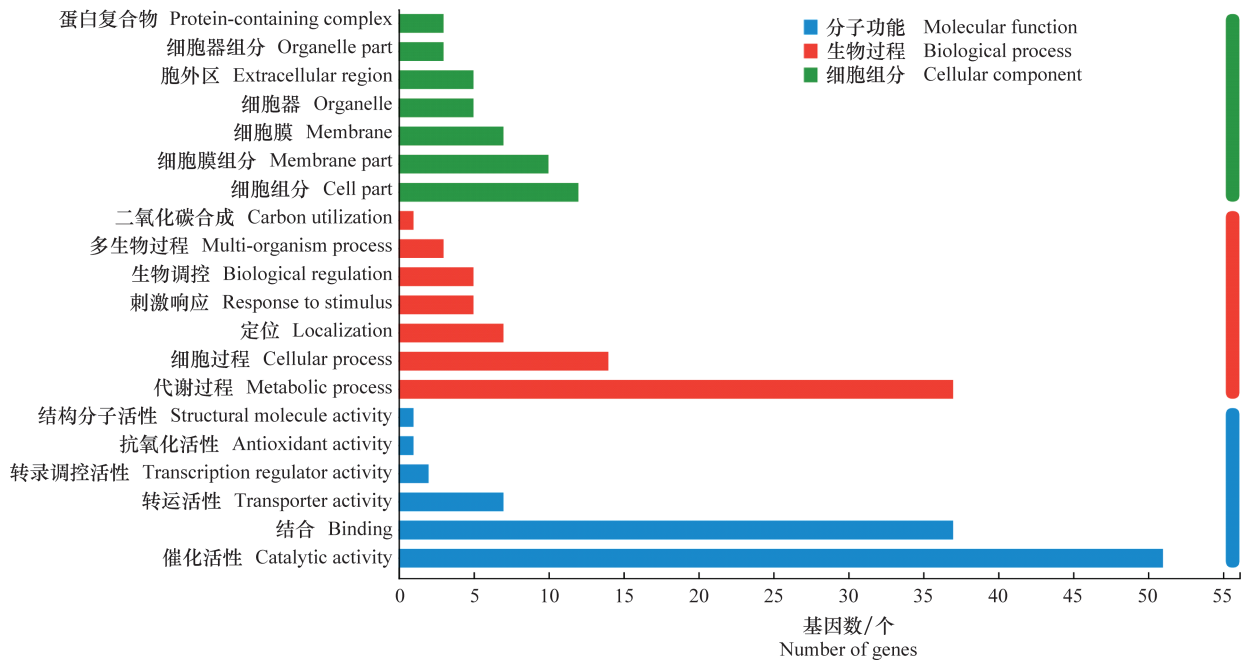


图 5 野生型菌株和突变菌株 $\Delta CfLysM2$ 侵染的草莓叶片总 RNA 转录组测序差异表达基因 GO 功能富集结果

Fig. 5 GO classification of differentially expressed genes by transcriptome sequencing of total RNA from strawberry leaves infected by wild-type and $\Delta CfLysM2$ strains

2.7 差异表达基因的 KEGG 分析结果

对差异表达基因进行 KEGG 功能分类,野生型菌株和 $\Delta CfLysM2$ 分别接种草莓叶片后 24 h 的差异表达基因中,共 47 个差异表达基因注释到 10 个 KEGG 通路。KEGG 总共有 3 类基因集,分别描述基因参与的代谢 (metabolism)、遗传信息处理 (genetic information processing) 和生物系统 (organismal systems)(图 6)。与野生型菌株相比, $\Delta CfLysM2$ 侵染草莓叶片后,上调基因占所有差异表达基因的 87%(41/47),在所有上调基因中,代谢相关基因占所有差异表达基因的 93%(38/41),说明果生炭疽菌侵染草莓叶片后, $CfLysM2$ 广泛抑制了宿主的代谢途径。在所有上调的代谢基因中,次生代谢途径中的其他次生代谢物生物合成 (biosynthesis of other secondary metabolites),萜类和聚酮类化合物代谢 (metabolism of terpenoids and polyketides)是包含差异表达基因最多的两大类, 占有上调基因的 54%(22/41)。除此之外,氨基酸代谢 (amino acids metabolism) 和其他氨基酸代谢 (metabolism of other amino acids) 中富集的差异表达基因仅次于次生代谢类别,占有上调基因的 24%(10/41)。另外,与野生型菌株相比, $\Delta CfLysM2$ 侵染

草莓叶片后,下调基因仅占有所有差异表达基因的 13%(6/47),分别在环境适应、翻译、辅助因子和维生素代谢、聚糖生物合成和代谢类别中富集,其中,聚糖生物合成和代谢仅富集到下调基因,说明 $CfLysM2$ 在果生炭疽菌侵染过程中除了广泛抑制次生代谢、氨基酸代谢之外,还能一定程度上激活特异性次生代谢通路。

2.8 差异基因荧光定量 PCR 验证

选取 6 个差异表达基因对转录组结果进行 RT-qPCR 验证,包括 2 个显著差异表达的次生代谢相关基因 FLS 和 $POX12$ 。其他 4 个基因分别为: β -1,3-葡聚糖酶基因 (βGlu),是一种主要存在于植物中的水解酶,能催化真菌细胞壁的重要成分葡聚糖的水解; $WRKY70$ 和 $WRKY53$ 是 $WRKY$ 转录因子家族的成员,在植物抗病免疫的茉莉酸和水杨酸信号传导中发挥重要作用; $CYP(71B34-like)$ 是细胞色素 P450 酶超家族成员之一,细胞色素 P450 酶广泛存在于哺乳动物、植物、真菌等中,参与多种代谢途径,合成的许多次生代谢物能够保护植物应对各种生物和非生物胁迫。结果(图 7)显示,选取的 6 个差异基因的表达情况与转录组测序结果一致,说明转录组分析结果可靠。

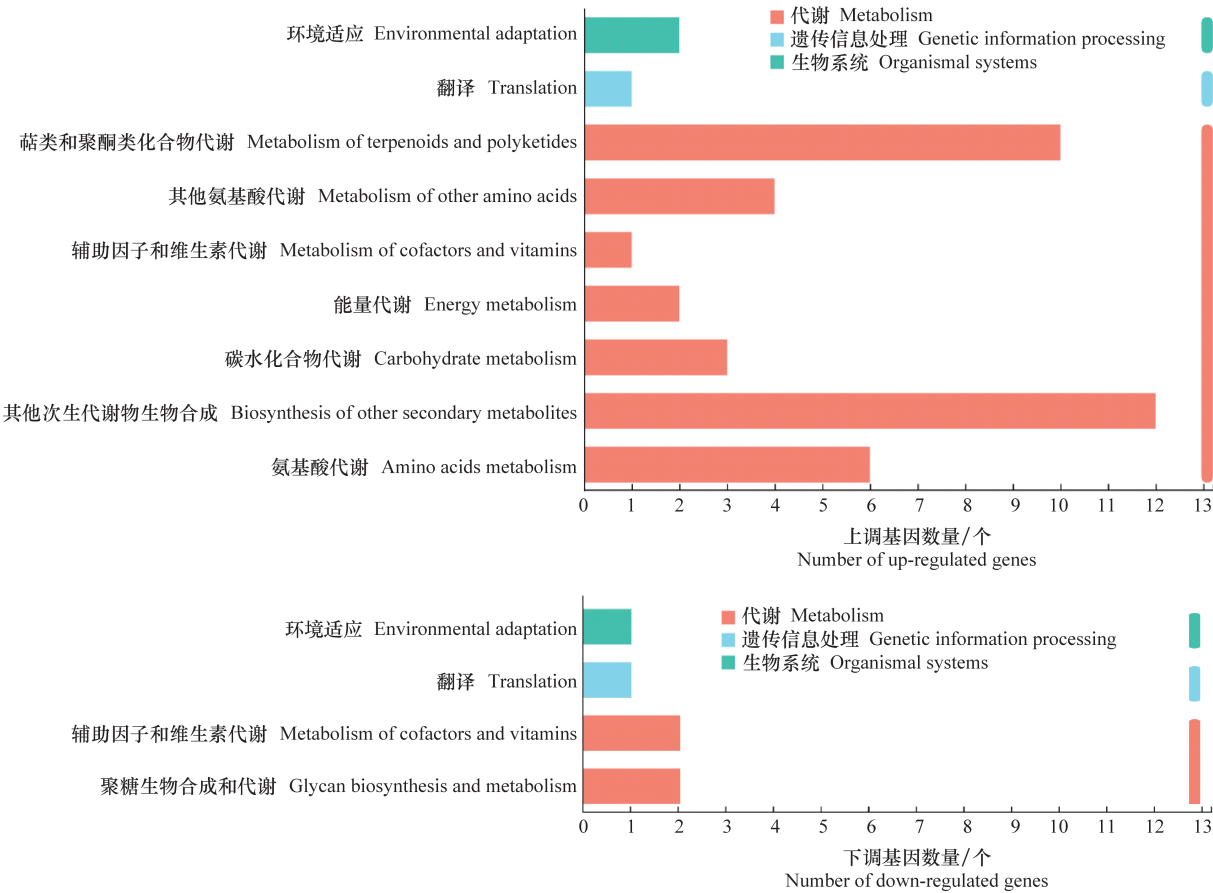
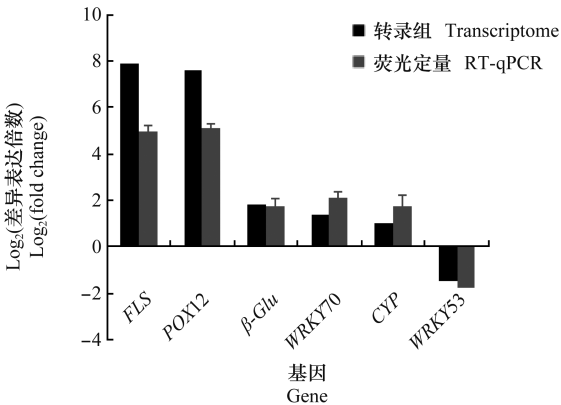


图 6 野生型菌株和突变菌株 $\Delta CfLysM2$ 侵染的草莓叶片总 RNA 转录组测序差异表达基因 KEGG 功能注释结果

Fig. 6 KEGG classification of differentially expressed genes by transcriptome sequencing of total RNA from strawberry leaves infected by wild-type and $\Delta CfLysM2$ strains



FLS: 黄酮醇合成酶基因; POX12: 过氧化物酶12基因; β -Glu: β -1,3葡聚糖酶基因; WRKY70: WRKY转录因子70基因; CYP: 细胞色素P450 71B34基因; WRKY53: WRKY转录因子53基因。

FLS: Flavonol synthase gene; POX12: Peroxidase 12 gene; β -Glu: β -1,3-glucanase gene; WRKY70: WRKY transcription factor 70 gene; CYP: Cytochrome P450 71B34-like gene; WRKY53: WRKY transcription factor 53 gene.

图 7 野生型菌株和突变菌株 $\Delta CfLysM2$ 侵染的草莓叶片转录组测序中差异表达基因的荧光定量 PCR 验证

Fig. 7 Verification of differentially expressed genes by transcriptome sequencing of total RNA from strawberry leaves infected with wild-type and $\Delta CfLysM2$ strains by RT-qPCR

3 结论与讨论

本研究在前期工作基础上,研究了果生炭疽菌侵染草莓过程中上调表达的候选效应子 *CfLysM2* 的致病功能。*CfLysM2* 效应子具有典型的信号肽序列和 2 个 *LysM* 保守结构域,不含任何跨膜结构域。同源性比对分析发现,不同病原菌中的 *LysM* 具有一定的同源性,但差异较大。*CfLysM2* 与同属的胶胞炭疽菌的 *LysM* 的一致性最高,为 99%,与不同种属 *LysM* 一致性相对较低,仅有 60.1%~64.4%。根据同源重组成功获得了 *CfLysM2* 的突变菌株 $\Delta CfLysM2$ 及回补菌株 *CfLysM2c*。致病性测定结果表明, $\Delta CfLysM2$ 的致病力与野生型菌株和回补菌株 *CfLysM2c* 相比明显减弱。RT-qPCR 检测结果显示,该基因在果生炭疽菌侵染草莓叶片后的 24 h 相对表达量最高,推测 *CfLysM2* 可能在果生炭疽菌侵染的早期阶段发挥作

用。取野生型菌株和 $\Delta CflYsM2$ 接种草莓叶片后 24 h 的样本进行转录组测序,共筛选出 109 个差异表达基因。GO 分析显示,差异基因显著富集在催化活性、代谢过程和结合 3 个类别,其中,次生代谢物生物合成和氨基酸代谢通路中上调基因显著富集。

植物次生代谢由初生代谢衍生而来,初生代谢合成碳水化合物、核酸、蛋白质等初生代谢产物。初生代谢产物在特定酶的作用下转化为次生代谢产物,这一过程被称为次生代谢。次生代谢产物多是分子结构较复杂的化合物,如萜类化合物、抗生素、生物碱等^[23]。尽管次生代谢产物是植物非必需小分子化合物,但其是植物与环境中的生物和非生物因素长期共存进化的结果。在应对环境胁迫、病原微生物侵染等过程中起重要作用^[24-25]。本研究中,转录组学 KEGG 分析结果显示, $CflYsM2$ 基因敲除后次生代谢物质的生物合成、萜类和聚酮类化合物代谢是上调转录本最多的两大类,说明 $CflYsM2$ 可能在抑制植物次生代谢生物合成过程中发挥关键作用。

在所有植物次生代谢产物中,黄酮类化合物是植物抵御外界恶劣环境、微生物侵害等过程中形成的一大类次生代谢产物,目前已发现 4 000 多种黄酮类化合物,分为黄酮醇、黄酮、异黄酮和花色素苷^[26]。其中,黄酮醇的生物合成过程中需要苯丙氨酸解氨酶(PAL)、肉桂酸-4-羟化酶(C4H)、4-香豆酸辅酶 A 连接酶(4CL)、查尔酮合成酶(CHs)、黄酮醇合成酶(FLS)等多个酶的共同参与。FLS 是黄酮醇生物合成最后一步的关键限速酶^[27]。本研究中,转录组差异表达基因中上调倍数最高的是黄酮醇合成酶基因(233 倍),表现为极其显著上调,说明 $CflYsM2$ 可能通过抑制黄酮醇合成酶活性,抑制次生代谢产物黄酮醇的合成,帮助真菌侵染。

除了次生代谢相关基因之外,植物过氧化物酶(peroxidase,POX)也被广泛认为在植物应对病原侵染过程中发挥关键作用,POX 是病原菌侵染寄主植物后诱导的一类病原相关(pathogenesis-related,PR)蛋白,除此之外,POX 还在激素调节、活性氧代谢、细胞壁形成过程中发挥关键作用^[28]。本研究鉴定到的差异表达基因中除了黄酮醇合成酶,还鉴定

到 POX12 基因显著上调(191 倍),由于 POX 在细胞中发挥多种功能,因此 $CflYsM2$ 调控 POX 的具体机制有待进一步研究。

本研究运用转录组学技术,对野生型菌株和突变菌株 $\Delta CflYsM2$ 分别侵染后草莓叶片的转录组进行比较,发现 $CflYsM2$ 的敲除导致宿主代谢途径,尤其是次生代谢物生物合成通路的激活,说明 $CflYsM2$ 可能在果生炭疽菌侵染草莓过程中通过靶向黄酮醇合成酶、7-甲基黄嘌呤合成酶等基因,抑制植物次级代谢产物合成及其介导的抗真菌免疫,保证其顺利侵染。该结果为揭示 $CflYsM2$ 机理及对果生炭疽菌和草莓互作研究奠定了理论基础。

参考文献

- [1] 尹淑萍. 草莓栽培品种离体再生及遗传转化的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [2] XIE Liu, ZHANG Jingze, WAN Yao, et al. Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang province and Shanghai city, China [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2010, 11(1): 61–70.
- [3] ZHANG Liqing, SONG Lili, XU Xiangming, et al. Characterization and fungicide sensitivity of *Colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in eastern China [J]. Plant Disease, 2020, 104(7): 1960–1968.
- [4] GARVEY K J, SAEDI M S, ITO J. Nucleotide sequence of *Bacillus* phage $\Phi 29$ genes 14 and 15: homology of gene 15 with other phage lysozymes [J]. Nucleic Acids Research, 1986, 14(24): 10001–10008.
- [5] VISWESWARAN G R, LEENHOUTS K, VAN ROOSMALEN M, et al. Exploiting the peptidoglycan-binding motif, LysM, for medical and industrial applications [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(10): 4331–4345.
- [6] BUIST G, STEEN A, KOK J, et al. LysM, a widely distributed protein motif for binding to (peptido)glycans [J]. Molecular Microbiology, 2008, 68(4): 838–847.
- [7] AKCAPINAR G B, KAPPEL L, SEZERMAN O U, et al. Molecular diversity of LysM carbohydrate-binding motifs in fungi [J]. Current Genetics, 2015, 61(2): 103–113.
- [8] DE JONGE R, THOMMA B P. Fungal LysM effectors: extinguishers of host immunity [J]. Trends in Microbiology, 2009, 17(4): 151–157.
- [9] KAMOUN S. Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2007, 10(4): 358–365.
- [10] DE JONGE R, PETER VAN ESSE H, KOMBRINK A, et al. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants [J]. Science, 2010, 329(5994): 953–955.

- [11] KOMBRINK A, SÁNCHEZ-VALLET A, THOMMA B P H J. The role of chitin detection in plant-pathogen interactions [J]. *Microbes and Infection*, 2011, 13: 1168–1176.
- [12] VAN DEN BURG H A, HARRISON S J, JOOSTEN M H, et al. *Cladosporium fulvum* Avr4 protects fungal cell walls against hydrolysis by plant chitinases accumulating during infection [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19 (12): 1420–1430.
- [13] SANCHEZ-VALLET A, SALEEM-BATCHA R, KOMBRINK A, et al. Fungal effector Ecp6 outcompetes host immune receptor for chitin binding through intrachain LysM dimerization [J/OL]. *eLife*, 2013, 2: e00790. DOI: 10.7554/eLife.00790.
- [14] MARSHALL R, KOMBRINK A, MOTTERAM J, et al. Analysis of two in planta expressed LysM effector homologs from the fungus *Mycosphaerella graminicola* reveals novel functional properties and varying contributions to virulence on wheat [J]. *Plant Physiology*, 2011, 156(2): 756–769.
- [15] TAKAHARA H, HACQUARD S, KOMBRINK A, et al. *Colletotrichum higginsianum* extracellular LysM proteins play dual roles in appressorial function and suppression of chitin-triggered plant immunity [J]. *New Phytologist*, 2016, 211 (4): 1323–1337.
- [16] KOMBRINK A, ROVENICH H, SHI-KUNNE X, et al. *Verticillium dahliae* LysM effectors differentially contribute to virulence on plant hosts [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2017, 18(4): 596–608.
- [17] ZHANG Liqing, HUANG Xin, HE Chengyong, et al. Novel fungal pathogenicity and leaf defense strategies are revealed by simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum fruticola* and strawberry infected by this fungus [J/OL]. *Frontiers in Plant Science*, 2018, 9: 434. DOI: 10.3389/fpls.2018.00434.
- [18] DESMOND O J, MANNERS J M, STEPHENS A E, et al. The *Fusarium* mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2008, 9(4): 435–445.
- [19] 柯智健, 张月凤, 艾莹飞, 等. 胶孢炭疽菌 G 蛋白 α 亚基 CgG α 2 的生物学功能[J]. *植物保护*, 2018, 44(1): 37–44.
- [20] WANG Feng, MA Yue, GAO Xiuyan, et al. Study on the identification techniques for determining strawberry cultivar's resistance to anthracnose [J]. *Journal of Fruit Science*, 2008, 4: 542–547.
- [21] KIM D, PERTEA G, TRAPNELL C, et al. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions [J/OL]. *Genome Biology*, 2013, 14 (4): R36. DOI: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.
- [22] KLOPFENSTEIN D V, ZHANG Liangsheng, PEDERSEN B S, et al. GOATOOLS: A Python library for Gene Ontology analyses [J/OL]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 10872. DOI: 10.1038/s41598-018-28948-z.
- [23] WINK M. Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution [J]. *Natural Product Communications*, 2008, 3(8): 1205–1216.
- [24] ITO K, TANAKA T, HATTA R, et al. Dissection of the host range of the fungal plant pathogen *Alternaria alternata* by modification of secondary metabolism [J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 52(2): 399–411.
- [25] OH M M, TRICK H N, RAJASHEKAR C B. Secondary metabolism and antioxidants are involved in environmental adaptation and stress tolerance in lettuce [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(2): 180–191.
- [26] TAYLOR L P, GROTEWOLD E. Flavonoids as developmental regulators [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2005, 8 (3): 317–323.
- [27] XU Feng, LI Linling, ZHANG Weiwei, et al. Isolation, characterization, and function analysis of a flavonol synthase gene from *Ginkgo biloba* [J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39 (3): 2285–2296.
- [28] ALMAGRO L, GÓMEZ ROS L, BELCHI-NAVARRO S, et al. Class III peroxidases in plant defence reactions [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60(2): 377–390.

(责任编辑: 杨明丽)

(上接 12 页)

- [15] 许周源, 许道源, 金昌烈, 等. 稻叶毛眼水绳 *Hydrellia sinica* Fan et Xia 及其识别雌雄的新方法[J]. *吉林农业科学*, 1993 (1): 40–42.
- [16] 阿提开姆·艾海提. 棉花苗期棉蚜马的防治方法[J]. *北京农业*, 2015(14): 73.
- [17] 高宇, 刘延超, 夏婷婷, 等. 黄蓍马的寄主范围、生物学特性及危害特点综述[J]. *江苏农业科学*, 2018, 46(17): 87–90.
- [18] 肖强. 中国茶园小绿叶蝉的种名是小贯小绿叶蝉[J]. *茶叶科学*, 2015, 35(6): 604.
- [19] HAWKSWORTH D L, CROUS P W, REDHEAD S A, et al.

The Amsterdam declaration on fungal nomenclature [J]. *IMA Fungus*, 2011, 2(1): 105–112.

- [20] 朱相云, 刘全儒. 2018 版《国际藻类、菌物和植物命名法规》(深圳法规)的主要变化[J]. *生物学通报*, 2020, 55(4): 11–15.
- [21] 王科, 刘芳, 蔡磊. 中国农业植物病原菌物常见种属名录[J]. *菌物学报*, 2022, 41(3): 361–386.
- [22] 中国农业科学院植物保护研究所, 中国植物保护学会. 中国农作物病虫害[M]. 北京: 中国农业出版社, 2015.

(责任编辑: 杨明丽)