可可毛色二孢效应子 *LT_397* 基因的克隆及转录分析

曹 阳[1]， 邢启凯[2]， 李铃仙[2]， 徐品三[1*]

（1. 大连理工大学生物工程学院，大连 116024；2. 北京市农林科学院植物保护环境保护研究所，北方果树病虫害绿色防控北京市重点实验室，北京 100097）

摘要 可可毛色二孢 *Lasiodiplodia theobromae* 是引起葡萄溃疡病的主要致病菌之一。病原菌会分泌许多效应子抑制植物的防御反应。本试验对可可毛色二孢特有的效应子 *LT_397* 基因进行克隆，开放阅读框（open reading frame，ORF）全长 1 140 bp，含有 11 个半胱氨酸。生物信息学软件预测显示：效应子 LT_397 信号肽为位于 N 端的 1～16 个氨基酸。qRT-PCR 结果表明：*LT_397* 受可可毛色二孢诱导下，在侵染 24 h 的基因相对转录水平最高；在逆境胁迫处理方面：*LT_397* 在营养、氧化、离子、酸碱和 UV 胁迫下基因的相对转录水平都上升。烟草瞬时表达表明，效应子 LT_397 可抑制水稻细菌性谷枯病菌 *Burkholderia glumae* 引发的过敏反应（hypersensitive response，HR）。以上结果为进一步分析效应子对寄主的致病机制奠定了基础。

关键词 可可毛色二孢； *LT_397* 基因； 生物信息学； 逆境胁迫； 过敏反应

中图分类号： S 432.42，S 436.631 **文献标识码**： A **DOI**： 10.16688/j.zwbh.2019658

Cloning and transcription analysis of *LT_397* effector in *Lasiodiplodia theobromae*

CAO Yang[1]， XING Qikai[2]， LI Lingxian[2]， XU Pinsan[1*]

（1. *School of Biological Engineering，Dalian University of Technology，Dalian* 116024，*China*；2. *Beijing Key Laboratory of Environment-Friendly Management of Fruit Diseases and Pests in North China，Institute of Plant and Environmental Protection，Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences，Beijing* 100097，*China*）

Abstract *Lasiodiplodia theobromae* is one of the important pathogens causing grapevine canker. The effectors produced by the pathogens usually act as inhibitors of plant defense responses and promote successful colonization of the pathogen in plants cells. In this study，the full open reading frame of *LT_397*（1 140 bp）was cloned，which included 11 cysteine residues. Bioinformatics analysis predicted that a signal peptide of 1-16 amino acids was located at the N terminus. The results of qRT-PCR showed that *LT_397* was induced by *L. theobromae* and its relative transcription level was the highest at 24 h after infection. Under stress conditions，the transcription level of *LT_397* gene was increased under nutritional stress，oxidative stress，high-temperature stress and UV treatment. The transient expression of *Nicotiana benthamiana* indicated that the effector *LT_397* could inhibit the hypersensitive response（HR）induced by *Burkholderia glumae*. These results provide a reference for further analysis of pathogenesis and the effector interaction with the host.

Key words *Lasiodiplodia theobromae*； *LT_397* gene； bioinformatics； adversity stress； hypersensitive response

葡萄 *Vitis vinifera* 属于葡萄科葡萄属木质藤本植物。葡萄因具有营养价值高、易加工等特点，深受人们的喜爱[1]。2018 年，我国葡萄的种植面积约 87 万 hm^2（国家葡萄产业技术体系）。但葡萄病害长期制约葡萄产业的健康发展，其中由葡萄座腔菌科 Botryosphaeriaceae 真菌引起的葡萄溃疡病（Botryosphaeria dieback）是一种重要的葡萄枝干病害。该病害引起枝干溃疡、果梗干枯、掉粒等病征，严重

收稿日期： 2019-11-28 **修订日期**： 2020-01-09
基金项目： 北京市自然科学基金（6184041）；国家自然科学基金（31801686）；国家葡萄产业技术体系（CARS-30）
* 通信作者 E-mail：xupinsan@dlut.edu.cn

时会造成整株植株枯死[2-3]。在我国葡萄产区共发现 6 种葡萄座腔菌科真菌可引起葡萄溃疡病,分别是 *Botryosphaeria dothidea*、*Diplodia seriata*、*Lasiodiplodia theobromae*、*Neofusicoccum parvum*、*L. pseudotheobromae* 和 *Neofusicoccummangiferae*,优势病原菌为葡萄座腔菌 *B. dothidea* 和可可毛色二孢 *L. theobromae*,致病性最强的是可可毛色二孢[4-7]。目前对葡萄溃疡病的研究主要集中在病原真菌的分离鉴定、种群结构和化学防治等方面,对主要致病菌可可毛色二孢 *L. theobromae* 的致病机制尚不明晰[8]。

在植物与病原物的长期协同互作过程中,植物形成了多种免疫机制来阻止病原物的侵染;同时病原物也进化出多种致病机制来克服宿主的防卫反应,最终使宿主发病[9]。效应子是一类由病原菌产生,通常富含半胱氨酸的蛋白分子,可分泌到寄主植物细胞间或细胞内,抑制寄主的防御反应,从而促使病原菌在寄主植物上定殖、侵入和扩展[10-11]。已发现真菌效应子主要通过靶标蛋白来影响植物的 PTI (PAMP triggered immunity)防御反应,如小麦条锈菌 *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* 效应基因 *PEC*6 可以与拟南芥和小麦中的腺苷激酶互作,从而抑制寄主 PTI,促进小麦条锈菌在寄主中的侵染[12]。稻瘟菌 *Magnaporthe oryzae* 效应基因 *SLP*1 与番茄叶霉病菌 *Cladosporium fulvum* 效应基因 *ECP*6 含有保守的 LysM 结构域,能与植物几丁质结合受体竞争结合几丁质,从而逃避 PTI 防御反应[13-14]。植物激素对调控植物的防御机制起着重要的作用,真菌效应基因也通过影响植物激素的合成来调控植物的防御反应。例如玉米黑粉菌 *Ustilago maydis* 分泌的效应子 Cmu1 能够催化水杨酸的前体物质分支酸转为预苯酸(prephenic acid),抑制水杨酸的生物合成,影响水杨酸信号传导途径[15]。某些真菌效应子通过干扰宿主植物的活性氧生成来抑制植物的防御反应,玉米黑粉菌的效应子 Pep1 直接与玉米的过氧化物酶 POX12 互作抑制活性氧介导的免疫反应[16]。病原真菌效应蛋白也可以通过抑制 RNA 沉默来抑制植物的防御反应,小麦秆锈菌 *P. graminis* f. sp. *tritici* 效应子 PgtSR1 通过改变防御调节因子小 RNA 的丰富度来抑制植物 RNA 沉默诱导的防御机制[17]。总之效应子可以通过不同的信号途径来抑制寄主的免疫反应,从而使病原物能够完成侵染、定殖寄主植物的过程[18]。Yan 等[19]对 *L. theobromae* 进行全基因测序组装分析,并结合生物信息学方法预测发现:共 359 个具有效应子特征的基因。但目前对可可毛色二孢效应子的功能研究还未见报道,效应子与寄主葡萄之间的互作机制并不明晰。

探究效应子基因的转录模式及致病性对研究病原菌效应子与寄主植物的作用机制有重要意义。本试验对可可毛色二孢特有的效应子基因 *LT_397* 进行克隆,得到目的基因 ORF 全长并进行生物信息学分析,对 *LT_397* 基因受可可毛色二孢诱导转录分析和逆境胁迫转录分析,利用烟草毒力测定体系对效应子 LT_397 进行毒力测定。研究结果为进一步分析病原菌对寄主的作用机制提供了理论基础。

1　材料与方法

1.1　试验材料

可可毛色二孢菌株 CSS-01s 由本实验室分离并保存。水稻谷枯病菌(颖壳伯克氏菌)*Burkholderia glumae* 菌株 106619 和 pEDV5 载体由中国农业大学孙文献课题组馈赠。本氏烟 *Nicotiana benthamiana* 培养条件为 26℃,L//D=14 h//10 h,取生长 4 周烟草进行接种试验。

完全培养基(CM):6 g/L 酵母提取物、3 g/L 酪蛋白、10 g/L 葡萄糖和 0.1%(*V*/*V*)微量元素混合液[20-21];基础培养基(MM):6 g/L $NaNO_3$、0.5 g/L KCl、1.5 g/L KH_2PO_4、0.5 g/L $MgSO_4$、10 g/L 葡萄糖;缺碳源基础培养基(MM-C):6 g/L $NaNO_3$、0.5 g/L KCl、1.5 g/L KH_2PO_4、0.5 g/L $MgSO_4$;缺氮源基础培养基(MM-N):0.5 g/L KCl、1.5 g/L KH_2PO_4、0.5 g/L $MgSO_4$、10 g/L 葡萄糖;培养基 pH 均调至 6.5。

LA *Taq* DNA 聚合酶、pMD18-T 载体、SYBR Premix Ex *Taq*™购自宝生物工程有限公司。Trizol 和反转录酶 SuperScript® Ⅲ购自 Invitrogen 公司。大肠杆菌 *Escherichia coli* Trans5α 感受态购自全式金生物技术有限公司。其他常规化学药品均为分析纯。

1.2　试验方法

1.2.1　*LT_397* 基因的克隆

采用 TRIzol 法(Invitrogen)提取可可毛色二孢

CSS-01s 总 RNA，利用 SuperScript® Ⅲ反转录体系合成 cDNA。设计 *LT*_397 特异性引物（登录号 GenBank：KAB2577062.1），上游引物为 Lt397-F：5′-ATGCGCGCCGCAGCCCTCATTC-3′；下游引物为 Lt397-R：5′-GTTGGCGTCTTCGTAAACGAAGTC-3′，由上海生物工程股份有限公司合成。以反转录生成的可可毛色二孢 cDNA 为模板 PCR 扩增 *LT*_397 基因，反应体系（50 μL）：10×PCR buffer 5 μL，2.5 mmol/L dNTPs 2 μL，10 μmol/L 上游和下游引物各 1 μL，LA *Taq* 0.4 μL，cDNA 模板 2 μL，补水至 50 μL。PCR 扩增程序为：94℃预变性 5 min；94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 1 min，共 32 个循环；72℃延伸 10 min[22]。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶进行电泳检测，采用 DNA 凝胶回收试剂盒对目的基因进行纯化回收，并与 pMD18-T 载体连接，转化大肠杆菌 Trans5α，挑取单克隆进行菌液 PCR 验证，阳性克隆送至北京擎科新业生物技术有限公司进行测序。

1.2.2 效应子 LT_397 的生物信息学分析

利用 Edit Seq 和 ExPAsy 软件对 LT_397 进行氨基酸序列分析；Signal P 4.1 Server 预测 LT_397 氨基酸序列信号肽[23-24]；使用 Protscale 和 SOPMA 软件测定 LT_397 跨膜螺旋等二级结构和蛋白质表面氨基酸分布；Swiss-Model 预测 LT_397 蛋白的结构模型[25]。

1.2.3 逆境胁迫处理对 *LT*_397 基因转录水平的影响

检测不同胁迫处理条件下可可毛色二孢 CSS-01s 效应子 *LT*_397 基因的转录情况。营养胁迫处理：将 CSS-01s 菌株于 CM 液体培养基上 26℃ 160 r/min摇培 24 h，离心收集菌丝，随后将菌丝分别置于缺碳源 MM-C 和缺氮源 MM-N 培养基上生长 4 h[26-27]。氧化胁迫处理：将 CSS-01s 在 CM 液体培养基上培养 24 h 后，向培养基里分别加入 H_2O_2 至终浓度为 5 mmol/L 和 10 mmol/L 处理 4 h[28]。高温胁迫处理：CSS-01s 在 CM 液体培养基上培养 24 h，转移到 42℃培养箱静止 45 min[29]。离子胁迫处理：CSS-01s 在 CM 液体培养基上培养 24 h，离心收集菌丝，分别转移到浓度为 1 mol/L NaCl 和浓度为 0.1 mol/L LiCl 的 MM 培养基中处理 4 h。酸碱胁迫处理：CSS-01s 在 CM 液体培养基上培养 24 h，离心收集菌丝，转移到 pH 分别为 4 和 8 的 MM 培养基中处理 4 h。紫外线 UV 胁迫处理：将 CSS-01s 在 CM 液体培养基上培养 24 h 后，用 UV-B 辐射测定仪（北京师范大学光电仪器厂）进行测定，辐射强度为 5 kJ/m²，分别设处理时间为 5 min 和10 min[30-32]。处理完毕后，将离心收集的菌丝置于液氮中速冻，−80℃保存。

1.2.4 qRT-PCR 检测 *LT*_397 基因的转录水平

液氮研磨菌丝后，采用 TRIzol（Invitrogen）法对处理样本 RNA 进行提取。RNA 经 DNase I（TaKaRa）消化处理后，运用 SuperScript Ⅲ（Invitrogen）反转录合成第一链 cDNA 为模板进行实时定量 PCR 扩增（qRT-PCR）。设计 qRT-PCR 特异性引物，*LT*_397 基因（登录号 GenBank：KAB2577062.1）（F：5′-CATCACCTACACCACCTAC-3′；R：5′-CTCCTTGTCGTATTCAGTCT-3′）；*LtActin* 基因（登录号 GenBank：AY846879.1），（F：5′-TCTTCGCTCGAGAAGTCGTA-3′；R：5′-ACAATGGAAGGTCCGCTCTC-3′）。参照 TaKaRa 说明书，采用 SYBR Green I 染料法进行荧光定量 PCR，反应在 ABI7500 Real-time PCR 检测系统上进行。PCR 反应体系：10 μL SYBR Premix Ex *Taq*™、0.5 μL上游引物（10 μmol/L）、0.5 μL 下游引物（10 μmol/L）、0.4 μL ROX ReferenceDye Ⅱ，0.5 μL cDNA 模板、补水至 20 μL。反应程序为：95℃ 预变性 3 min；95℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃30 s 共 40 个循环。每批检测 3 次，设 3 个生物学重复。根据实时荧光定量 PCR 得到的 *Ct* 值以及标准曲线，采用 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 法分析试验数据[33]。以接种可可毛色二孢时间 0 h 作为参照（转录水平为 1），计算 *LT*_397 基因受可可毛色二孢不同侵染时间的相对转录水平。以未做胁迫处理的样本 CK 作为参照（转录水平为 1），计算 *LT*_397 基因逆境胁迫处理时的相对转录水平。

1.2.5 效应蛋白 LT_397 毒力测定

以 397-T 为模板，用引物 397F（5′-ACTCGAGGGCCCTGTGGAAAAGCGTC-3′）和 397R（5′-AGGATCCGTTGGCGTCTTCGTAAACG-3′）进行 PCR 扩增（扩增反应 1.2.1），扩增得到的片段连接到 T 载体上，得到的重组载体命名为 397XB-T。由北京擎科新业生物技术有限公司进行测序验证。用 *Xho* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ双酶切 397XB-T 载体，回收小片段插入到 pEDV5 载体的 *Xho* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ酶切位点间，得到的重组载体命名为 pEDV-397。

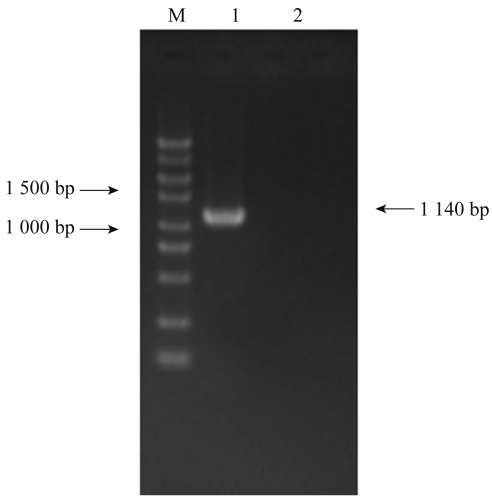
参照 Sharma 等[34]和 Zhang 等[35]的方案,挑取颖壳伯克氏菌单菌落接种于 LB 液体培养基,28℃振荡培养至 OD_{600}=0.8。4℃下 800 g 离心 10 min,弃去上清。用 25 mL 预冷的 10%甘油溶液轻轻悬浮细胞,4℃下 800 g 离心 10 min,弃上清,重复上述步骤一次。最后加入 700 μL 预冷的 10% 甘油溶液悬浮细胞,即为颖壳伯克氏菌感受态细胞。采用电激转化方法,将 pEDV-397 载体转入颖壳伯克氏菌感受态细胞。取 200 μL 培养液,涂布于含 25 mg/L 庆大霉素(gentamicin)的 LB 固体平板上,28℃倒置培养筛选获得转化子,并利用 PCR 验证转化子是否构建成功。

将转化子和空载菌株接种于 10 mL 含有 25 mg/L GM 的 LB 液体培养基中,28℃,180 r/min 振荡培养过夜。用 0.9% NaCl 调整 OD_{600}=0.1。用 1 mL 注射器将菌液注射入烟草叶片下表皮。2～3 d 后观察细胞坏死情况。

2　结果与分析

2.1　*LT_397* 基因 PCR 结果分析

设计特异性引物,以可可毛色二孢的 cDNA 为模板,克隆 *LT_397* 基因,测序分析结果表明,*LT_397* 开放阅读框(ORF)全长 1 140 bp(图 1)。



M:BM 5000+ Marker; 1:*LT_397*基因; 2:空白对照
M:BM 5000+ Marker; 1: *LT_397* gene; 2: Negative control

图 1　*LT_397* 基因的扩增

Fig. 1　Amplification of the *LT_397* gene

2.2　LT_397 蛋白的基本性质与功能分析

2.2.1　LT_397 蛋白的氨基酸序列分析

以 NCBI 中基因登录号 KAB2577062.1 序列为参照序列,利用 ExPAsy 在线软件分析 *LT_397* 的开放阅读框。如图 2 所示:*LT_397* 基因是编码 379 个氨基酸的多肽。Edit Seq 软件分析该多肽相对分子质量约为 40.8 kD,有 17 个碱性氨基酸、51 个酸性氨基酸、131 个疏水性氨基酸和 137 个极性氨基酸,含有 11 个 Cys。等电点为 3.79,在 pH 为 7 时,电荷为－34.06。

```
1     ATGCGCGCCGCAGCCCTCATTCCTCTCGCCATTGGCCTCGTTGCCGCCGGCCCTGTGGAA
1      M  R  A  A  A  L  I  P  L  A  I  G  L  V  A  A  G  P  V  E
61    AAGCGTCAGAACTTCAACTTTGCAGCTATTGCGGCTGACCGTGCCGATGAAATCGCCGCT
21     K  R  Q  N  F  N  F  A  A  I  A  A  D  R  A  D  E  I  A  A
121   ATCAGCGCCGACAACCTCGGCCCTGTCGACCCTGTTGTCCTGGCCACGACTGTCGTTGAG
41     I  S  A  D  N  L  G  P  V  D  P  V  V  L  A  T  T  V  V  E
181   GCCACCTCCGCCTACGATGCTACGGCTGCCATTGCTGCTGCTACGAGCGCCGTCACGGCT
61     A  T  S  A  Y  D  A  T  A  A  I  A  A  A  T  S  A  V  T  A
241   GTTGTCGAGAAGCGCGAGGCCTGCCAGACCTACTCTGGTGCTGGCCCTGTGGTCACCAGC
81     V  V  E  K  R  E  A  C  Q  T  Y  S  G  A  G  P  V  V  T  S
301   GGTCCTAGCGATTGGGTCAATGCTGAGGTTTTGACCAACCCGGCCCTCACTGCCGACGTC
101    A  P  S  D  W  V  N  A  E  V  L  T  N  P  A  L  T  A  D  V
361   CCGTCCGGTTACGAAGCCGCCCCTAGCTTCACCAACCTCCAGGGCCCGTTCAGCAAATG
121    P  S  G  Y  E  A  A  P  S  F  T  N  L  Q  G  A  V  Q  Q  M
421   GGTTACCTGACTGTCAAGACCCTGGACTCCTACAGCCCGGCCCAGTGTGCCAGCTATTGC
141    G  Y  L  T  V  K  T  L  D  S  Y  S  P  A  Q  C  A  S  Y  C
481   GACGACGAGCCCCTCTGCATGGGCTTCAATGTCTACTTTGAGCGTGACCCCTCGGAGGAC
161    D  D  E  P  L  C  M  G  F  N  V  Y  F  E  R  D  P  S  E  D
541   ACGTCTTGCGCTAGCGATGGAAACCCTGACAGCATTACCACCATTGCATGCACCCTGTAC
181    T  S  C  A  S  D  G  N  P  D  S  I  T  T  I  A  C  T  L  Y
601   GCTTACCACGTTGCTGCCTCCAAGGCTACCAACACCGGCCAGTACCGCGACAACTTCCAG
201    A  Y  H  V  A  A  S  K  A  T  N  T  G  Q  Y  R  D  N  F  Q
661   GTCGTCATCACCGGCTCCAACGGCTACAACAAGGACAGCAGCAAGCAGTCGTTCACGTCC
221    V  V  I  T  G  S  N  G  Y  N  K  D  S  S  K  Q  S  F  T  S
721   ATTGATGGTTACCAGGCCCCTCAGAAGTTCGAAGATGCCTGCATCAACGCCCCGACCTAC
241    I  D  G  Y  Q  A  P  Q  N  F  E  D  A  C  I  N  A  P  T  Y
781   AACGACTTCGACAGCTACATCACCTACACCACCTACACTGACGCCTACGATCCTCGCGTC
261    N  D  F  D  S  Y  I  T  Y  T  T  Y  T  D  A  Y  D  P  R  V
841   TGCGGCCAAGGCTTGCGATGCTCAGACTGAATACGACAAGGAGCACCCCAACGATGACCAG
281    C  A  K  A  C  D  A  Q  T  E  Y  D  K  E  H  P  N  D  D  Q
901   GAGTACAAGGCGTGCAACTACTTCGTCGCATACGTCATGGCCAAGAACGAAGAGCCCCAA
301    E  Y  K  A  C  N  Y  F  V  A  Y  V  M  A  K  N  E  E  P  Q
961   GGTCTGTTCTGTGCCCTGTACTCCCTTCCCTGGAACTCCACCTATGCTGTCAACACGGGC
321    G  L  F  C  A  L  Y  S  L  P  W  N  S  T  Y  A  V  N  T  G
1021  TACTCGTGGAGCTCGGACGTCTACACCATCTACAACTCGCTCGCCTACACTGTCAGCGGG
341    Y  S  W  S  S  D  V  Y  T  I  Y  N  S  L  A  Y  T  V  S  G
1081  GACCTTGATTTTGGTAACAACGAGGAAATTGAGGACTTCGTTTACGAAGACGCCAACTAA
361    D  L  D  F  G  N  N  E  E  I  E  D  F  V  Y  E  D  A  N  *
```

图 2　*LT_397* 基因序列与氨基酸组成图

Fig. 2　A diagram of the *LT_397* gene sequence and amino acid composition

2.2.2　LT_397 信号肽分析

信号肽指的是一段通常位于蛋白质 N 端,在新合成的多肽链中指导蛋白质合成及跨膜转移,大小为 15～30 个的氨基酸多肽。它一般由 3 部分组成,即疏水核心区、信号肽的 C 端和 N 端[36]。使用 Signal P 4.1 Server 在线软件对可可毛色二孢效应子 LT_397 蛋白序列进行分析,预测其信号肽由 16 个氨基酸组成(图 3)。

2.2.3　LT_397 蛋白的亲水性和疏水性分析

维持蛋白质结构特征的主要因素是疏水和亲水间的平衡。疏水作用有利于与氨基酸的基团形成氢键等作用力使蛋白质结构稳定,因而蛋白质的稳定性很大程度上依赖于分子内的疏水相互作用[37]。使用在线软件 Protscale 分析 LT_397 蛋白分子的亲水性和疏水性,并根据蛋白的得分数(Score)来计算蛋白的亲、疏水性。结果表明,该蛋白的氨基酸

Score 值在 3～－3.5(图 4)。疏水性质用正值来表示,亲水性质用负值表示,且绝对值越大,亲、疏水的性质则越明显[37]。用 Protscale 工具统计分析显示 GRAVY 值为－0.244(最小值:－3.300,最大值:2.711),表明 LT_397 为具有较强亲水性的蛋白质。LT_397 蛋白前 15～20 个氨基酸均为疏水性氨基酸,表明在 N 端有一典型的疏水区域,可能与信号肽的组成相关。

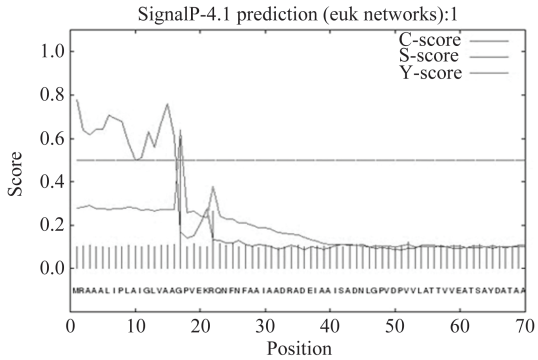


图 3 LT_397 信号肽分析

Fig. 3 Signal peptide analysis of LT_397 protein

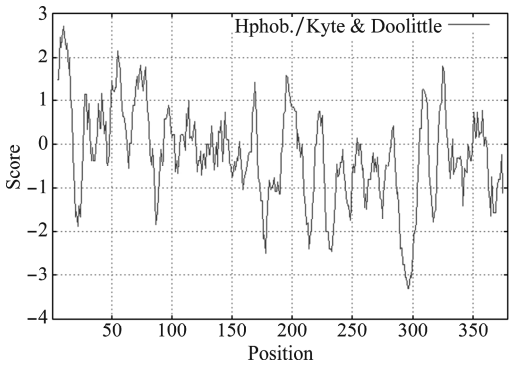


图 4 LT_397 蛋白的亲水性和疏水性分析

Fig. 4 Hydrophily and hydrophobicity analysis of LT_397 protein

2.2.4 LT_397 蛋白二级结构分析

使用在线软件 SOPMA 对 LT_397 蛋白的二级结构进行分析,结果显示 LT_397 氨基酸序列的二级结构是由 31.13%的 α 螺旋、15.83%的延伸链区和 49.39%的无规则卷曲并通过 3.43%的 β 转角进行连接构成。

2.2.5 LT_397 蛋白三级结构分析

使用 Blast P 对 LT_397 蛋白进行同源序列比对,选择同源序列 E 值低的氨基酸序列 OMP81863.1 作为预测模板,并使用 Swiss-Model 查询同源序列的蛋白质三级结构,从而预测得到 LT_397 蛋白三级结构。结果如图 5 所示:LT_397 是单体,没有与其结合的配体;该蛋白质三级结构主要由 2 个螺旋结构并通过 α 螺旋和无规则的残基片段构成,并且通过 β 转角连接、折叠形成这种“背包形”的蛋白结构。



图 5 可可毛色二孢 LT_397 蛋白三级结构预测

Fig. 5 Prediction of the three-dimensional model of LT_397 protein in *Lasiodiplodia theobromae*

2.3 *LT_397* 受逆境胁迫诱导转录分析

以 *LtActin* 基因作为内参基因,利用 qRT-PCR 分析不同侵染时间下可可毛色二孢对 *LT_397* 基因转录水平的影响。*LT_397* 受到可可毛色二孢诱导上调表达,相对转录水平在 24 h 达到最高,是对照的 2.85 倍,之后转录水平逐渐下降(图 6)。可可毛色二孢胁迫处理后效应子 *LT_397* 基因的相对转录水平均高于未胁迫处理样本(图 7)。在营养吸收方面,氮元素的缺少诱导 *LT_397* 基因的相对转录水平上升明显,相对转录水平为 18.86;氧化胁迫处理中,基因的相对转录水平随 H_2O_2 浓度的增加呈上升趋势,10 mmol/L H_2O_2 处理下基因的相对转录水平为 15.20;热胁迫处理中,45℃高温处理的样本相对转录水平为 3.98;在离子胁迫下,NaCl 处理的样本中 *LT_397* 基因的相对转录水平是 4.75,而 LiCl 处理下相对转录水平与对照水平相比,转录水平微上调,相对转录水平为 2.30;酸碱胁迫处理发现:与适宜的 pH 值 5～7 相比,弱酸弱碱都会造成 *LT_397* 基因转录水平的上升,但碱性条件下基因的转录水平更高,相对转录水平为 8.66;UV 胁迫发现:紫外线照射时间越长,*LT_397* 基因相对转录水平越高,UV 照射 10 min 的 *LT_397* 基因相对转录水平为 18.78。

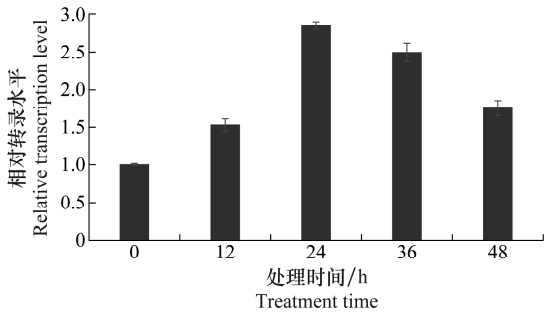


图 6　可可毛色二孢侵染后不同时间 *LT_397* 的相对转录水平

Fig. 6　Relative transcription levels of *LT_397* at different time points upon infection by *Lasiodiplodia theobromae*

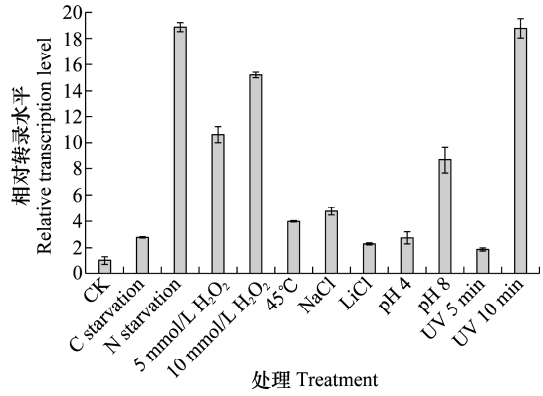
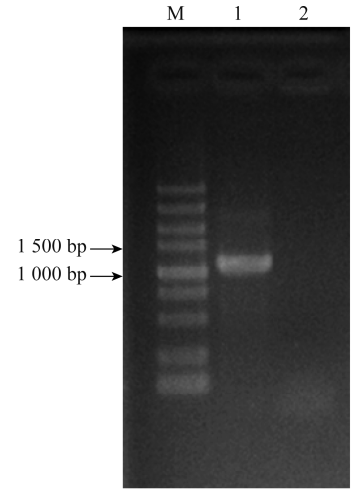


图 7　*LT_397* 基因在不同逆境处理下的转录模式

Fig. 7　Transcription patterns of *LT_397* under different stress conditions

2.4　效应子 LT_397 可抑制颖壳伯克氏菌诱导的 HR 反应

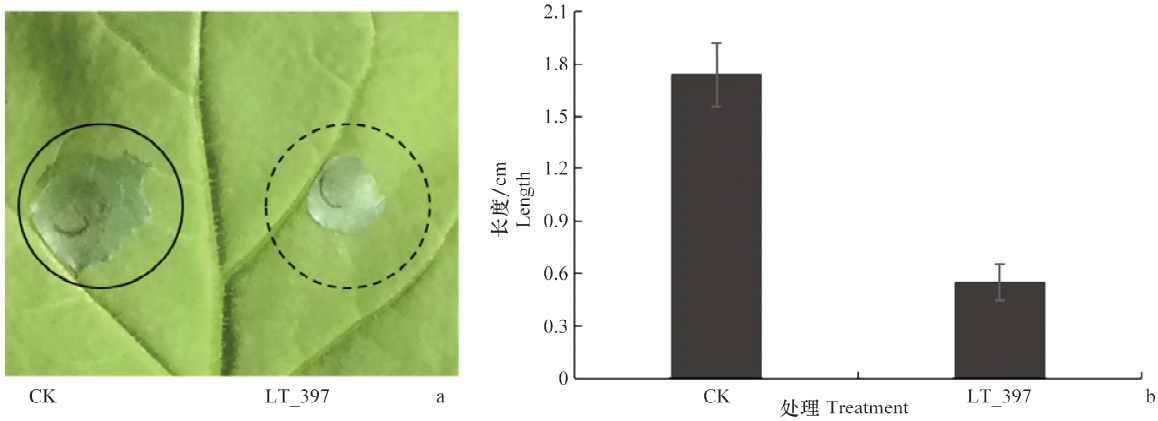
效应子 LT_397 转入颖壳伯克氏菌感受态细胞后,在含有 25 mg/L 庆大霉素的 LB 固体平板上挑取生长的单克隆转化子,进行菌液 PCR 验证。如图 8 所示:阳性转化子 PCR 扩增得到约 1 000 bp 大小片段,阴性对照 pEDV 空载体无假阳性的条带出现。将验证成功的转化子进行测序验证,也证明重组质粒 pEDV-397 构建成功。



M: DL5000 1: pEDV-397 2: pEDV空载体
M: DL5000 1: pEDV-397 2: pEDV vector

图 8　pEDV-397 转化子验证

Fig. 8　PCR verification of pEDV-397 transformant



a: 效应子LT_397抑制颖壳伯克氏菌诱导的HR反应; b: 烟草叶片HR反应细胞坏死大小统计
a: Effector LT_397 suppresses HR induced by *Burkholderia glumae*; b: Statistical measurement of HR cellular necrosis sizes in *Nicotiana benthamiana* leaves

图 9　效应子 LT_397 可抑制颖壳伯克氏菌在本生烟中诱导的 HR 反应

Fig. 9　Effector LT_397 suppresses HR in *Nicotiana benthamiana* induced by *Burkholderia glumae*

植物病原真菌通常通过效应因子克服宿主免疫。颖壳伯克氏菌自身能够在本生烟上诱导很强的过敏性坏死反应[34]。因此我们构建了 pEDV-397 载体,利用颖壳伯克氏菌三型分泌系统将效应子 LT_397 分泌到植物细胞内。结果如图 9a 所示,在本生烟上瞬时表达效应子 LT_397,正常条件下生长

3 d后观察发现：瞬时表达效应子 LT_397 的叶片 HR 面积小于对照。选取 10 组处理样品测量 HR 反应直径，统计结果如图 9b 所示，在烟草叶片中，表达效应子 LT_397 的 HR 反应平均长度为 0.55 cm，而对照组平均长度为 1.74 cm，说明该效应子可抑制颖壳伯克氏菌诱导的 HR 反应。

3 讨论

大量研究报道发现，植物病原真菌效应子通过多种途径抑制寄主植物的防卫反应，使病原真菌成功在寄主体内定殖、侵入和扩展[35,38-40]。然而关于葡萄枝干病害的病原效应子功能的研究还未见报道。本试验克隆了可可毛色二孢特有的效应子 *LT_397* 基因，并利用生物信息学手段对该蛋白进行理化性质、二级结构和功能结构域预测分析，其编码的氨基酸 N 端具有一个典型的信号肽区段，含有 11 个 Cys 属于分泌蛋白。利用实时定量 PCR 技术分析 *LT_397* 基因在不同胁迫处理的转录模式发现：高温、H_2O_2、UV 处理均可诱导该基因转录水平的提高。

病原真菌效应子对植物免疫系统的调控作用，可通过烟草的细胞坏死反应进行快速检测[41]。部分效应子在烟草的超表达可以引起烟草细胞坏死，另外的效应子可抑制不同激发子诱导的细胞坏死[38,42-43]。本研究通过烟草毒力试验证实：效应子 LT_397 可抑制颖壳伯克氏菌诱导的 HR 反应，可能对可可毛色二孢的毒性有一定的促进作用。

可可毛色二孢是一种半活体营养型真菌，在侵染植物的早期需要从活体中吸取营养物质，而在侵染后期，则要杀死寄主植物，转换到死体营养，从死体植物组织中吸收营养物质。在可可毛色二孢中可能存在大量功能特异的效应子，它们可能在该病原侵染寄主过程中发挥重要作用[19,44]。有关可可毛色二孢效应子的作用机制研究有待进一步通过基因编辑、蛋白互作等进行深入分析。通过探索 LT_397 等效应子的生物学功能以及作用机制研究，将有利于揭示可可毛色二孢的致病机制，进一步寻找和设计药物新靶点，为创建持久、高效的绿色防治技术提供理论基础。

参考文献

[1] 罗斯怡. 中国葡萄产业及其旅游开发研究[D]. 武汉：湖北大学，2017.

[2] URBEZTORRES J R, GUBLER W D. Pathogenicity of Botryosphaeriaceae species isolated from grapevine cankers in California [J]. Plant Disease, 2009, 93(6): 584-592.

[3] QIU Yu, SAVOCCHIA S, STEEL C C, et al. *Botryosphaeria dothidea* associated with grapevine trunk disease in south-eastern Australia [J]. Australasian Plant Pathology, 2008, 37(5): 482-485.

[4] YAN Jiye, XIE Yue, YAO Shengwei, et al. Characterization of *Botryosphaeria dothidea*, the causal agent of grapevine canker in China [J]. Australasian Plant Pathology, 2012, 41(4): 351-357.

[5] YAN Jiye, XIE Yue, ZHANG Wei, et al. Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China [J]. Fungal Diversity, 2013, 61(1): 221-236.

[6] DISSANAYAKE A J, ZHANG Wei, LI Xinghong, et al. First report of *Neofusicoccum mangiferae* associated with grapevine dieback in China [J]. Phytopathologia Mediterranea, 2015, 54(2): 414-419.

[7] DISSANAYAKE A J, ZHANG Wei, LIU Mei, et al. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causes pedicel and peduncle discolouration of grapes in China [J]. Australasian Plant Disease Notes, 2015, 10(1): 1-5.

[8] 程燕林，梁军，吕全，等. 葡萄座腔菌科研究进展—鉴定，系统发育学和分子生态学[J]. 生态学报，2011，31(11)：3197-3207.

[9] DOU Daolong, ZHOU Jianming. Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground [J]. Cell Host & Microbe, 2012, 12(4): 484-495.

[10] WANG Xuli, JIANG Nan, LIU Jinling, et al. The role of effectors and host immunity in plant-necrotrophic fungal interactions [J]. Virulence, 2014, 5(7): 722-732.

[11] STOTZ H U, MITROUSIA G K, DE WIT P J G M, et al. Effector-triggered defence against apoplastic fungal pathogens [J]. Trends in Plant Science, 2014, 19(8): 491-500.

[12] LIU Changhai, PEDERSEN C, SCHULTZ-LARSEN T, et al. The stripe rust fungal effector PEC6 suppresses pattern-triggered immunity in a host species-independent manner and interacts with adenosine kinases [J/OL]. New Phytologist, 2016. DOI: 10.1111/nph.14034.

[13] MENTLAK T A, KOMBRINK A, SHINYA T, et al. Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease [J]. The Plant Cell, 2012, 24(1): 322-335.

[14] JONGE R, PETERV E H, et al. Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants [J]. Science, 2010, 329(5994): 953-955.

[15] DJAMEI A, SCHIPPER K, RABE F, et al. Metabolic priming by a secreted fungal effector [J]. Nature, 2011, 478(7369): 395-398.

[16] HEMETSBERGER C, HERRBERGER C, ZECHMANN B, et al. The *Ustilago maydis* effector Pep1 suppresses plant immunity by inhibition of host peroxidase activity [J/OL]. PLoS Pathogens, 2012, 8(5): e1002684. DOI: 10.1371/journal.ppat.1002684.

[17] YIN Chuntao, RAMACHANDRAN S R, ZHAI Ying, et al.

A novel fungal effector from *Puccinia graminis* suppressing RNA silencing and plant defense responses [J]. New phytologist, 2019, 222(3): 1561 - 1572.

[18] SELIN C, DE KIEVIT T R, BELMONTE M F, et al. Elucidating the role of effectors in plant-fungal interactions: progress and challenges [J/OL]. Frontiers in Microbiology, 2016, 7: 600. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00600.

[19] YAN Jiye, ZHAO Wensheng, CHEN Zheng, et al. Comparative genome and transcriptome analyses reveal adaptations to opportunistic infections in woody plant degrading pathogens of Botryosphaeriaceae [J]. DNA Research, 2017, 25(1): 87 - 102.

[20] HE Min, XU Youping, Chen Jinhua, et al. MoSnt2-dependent deacetylation of histone H3 mediates MoTor-dependent autophagy and plant infection by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. Autophagy, 2018, 14(9): 1543 - 1561.

[21] 周欣, 云英子, 郭谱胜, 等. 尖孢镰刀菌番茄专化型中 APSES 转录因子 FolStuA 的功能分析[J]. 分子植物育种, 2018, 16(3): 772 - 780.

[22] 单丽伟, 宋鹏, 刘夏燕, 等. 小麦胁迫响应转录因子基因 *TaSNAC1* 的克隆与表达分析[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(5): 489 - 496.

[23] PETERSEN T N, SØREN B, HEIJNE G V, et al. SIGNALP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions [J]. Nature Methods, 2011, 8(10): 785 - 786.

[24] WILKINS M R, GASTEIGER E, BAIROCH A, et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy Server [J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 112(112): 531 - 552.

[25] 庞博, 刘何春. 西藏一种芥菜型油菜 *PGIP* 基因的克隆与序列分析[J]. 植物保护, 2018, 44(2): 94 - 99.

[26] KONG S, PARK S, LEE Y H. Systematic characterization of the bZIP transcription factor gene family in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae* [J]. Environmental Microbiology, 2015, 17(4): 1425 - 1443.

[27] RIUS N, DEMAINA. Regulation of lysine epsilon-aminotransferase by carbon source and lack of control by phosphate in *Streptomyces clavuligerus* [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 1997, 48(6): 735 - 737.

[28] CHOUDHURY F K, RIVERO R M, BLUMWALDE, et al. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination [J]. The Plant Journal, 2017, 90(5): 856 - 867.

[29] BITA C E, ZENONI S, VRIEZEN W H, et al. Temperature stress differentially modulates transcription in meiotic anthers of heat-tolerant and heat-sensitive tomato plants [J/OL]. BMC Genomics, 2011, 12(1): 384. DOI: 10.1186/1471-2164-12-384.

[30] PARK S Y, CHOI J, LIM S E, et al. Global expression profiling of transcription factor genes provides new insights into pathogenicity and stress responses in the rice blast fungus [J/OL]. PLoS Pathogens, 2013, 9(6): e1003350. DOI: 10.1371/journal.ppat.1003350.

[31] ELLOUZI H, HAMED K B, ASENSI-FABADO M A, et al. Drought and cadmium may be as effective as salinity in conferring subsequent salt stress tolerance in *Cakile maritima* [J]. Planta, 2013, 237(5): 1311 - 1323.

[32] LI Ping, LIU Wenhua, GAO Kunshan. Effects of temperature, pH, and UV radiation on alkaline phosphatase activity in the terrestrial cyanobacterium *Nostoc flagelliforme* [J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(4): 1031 - 1038.

[33] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. Nature Protocols, 2008, 3(6): 1101 - 1108.

[34] SHARMA S, SHARMA S, HIRABUCHI A, et al. Deployment of the *Burkholderia glumae* type Ⅲ secretion system as an efficient tool for translocating pathogen effectors to monocot cells [J]. The Plant Journal, 2013, 74(4): 701 - 712.

[35] ZHANG Yong, ZHANG Kang, FANG Anfei, et al. Specific adaptation of *Ustilaginoidea virens* in occupying host florets revealed by comparative and functional genomics [J/OL]. Nature Communications, 2014, 5(1): 3849. DOI: 10.1038/ncomms4849.

[36] 韩春乐, 王志航, 王经强, 等. 十字花科部分蔬菜 *HRD* 基因的克隆与生物信息学分析[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2014,47(1): 61 - 71.

[37] 张春兰, 满丽莉, 向殿军, 等. 菘蓝 *ItSnRK2.1* 基因的克隆及其序列特性分析[J]. 生物技术通报, 2018, 34(1): 119 - 128.

[38] FANG Anfei, HAN Yanqing, ZHANG Nan, et al. Identification and characterization of plant cell death-inducing secreted proteins from *Ustilaginoidea virens* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2016, 29(5): 405 - 416.

[39] LAN Xia, LIU Yunxiao, SONG Shiren, et al. *Plasmopara viticol*a effector PvRXLR131 suppresses plant immunity by targeting plant receptor-like kinase inhibitor BKI1 [J]. Molecular Plant Pathology, 2019, 20(6): 765 - 783.

[40] MA Zhenchuan, ZHU Lin, SONG Tianqiao, et al. A paralogous decoy protects *Phytophthora sojae* apoplastic effector PsXEG1 from a host inhibitor [J]. Science, 2017, 355(6326): 710 - 714.

[41] SHARPEE W, OH Y, Yi M, et al. Identification and characterization of suppressors of plant cell death (SPD) effectors from *Magnaporthe oryzae* [J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(6): 850 - 863.

[42] LI Zhengpeng, YIN Zhiyuan, FAN Yanyun, et al. Candidate effector proteins of the necrotrophic apple canker pathogen *Valsa mali* can suppress BAX-induced PCD [J/OL]. Frontiers in Plant Science, 2015, 6: 579. DOI: 10.3389/fpls.2015.00579.

[43] QI Mingsheng, GRAYCZYK J P, SEITZ J M, et al. Suppression or activation of immune responses by predicted secreted proteins of the soybean rust pathogen *Phakopsora pachyrhizi* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2017, 31(1): 163 - 174.

[44] CHETHANA K W T, LI Xinghong, ZHANG Wei, et al. Trail of decryption of molecular research on Botryosphaeriaceae in woody plants [J]. Phytopathologia Mediterranea, 2016, 55(2): 147 - 171.

(责任编辑: 田　喆)