

大丽轮枝菌假定蛋白 VDAG_07165 的功能

王大会¹, 张丽华¹, 赵志博¹, 龙友华¹, 胡小平², 樊荣^{1*}

1 贵州大学农学院, 贵州 贵阳 550025

2 西北农林科技大学植物保护学院 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100

摘 要: 土传病原真菌大丽轮枝菌寄主范围广, 引起的黄萎病危害程度重、防控难度大。对病菌重要致病蛋白的挖掘和功能研究有望为病害防治提供新思路。本研究通过前期蛋白质组测序鉴定到一个未知功能结构域 DUF1620 家族蛋白 VDAG_07165 在大丽轮枝菌对马铃薯根部初侵染阶段高表达。缺失 VDAG_07165 基因导致大丽轮枝菌产孢量、分生孢子萌发率和穿透力均显著降低, 对马铃薯植株的致病力显著减弱。由此说明, 假定蛋白 VDAG_07165 可在侵染早期通过调控大丽轮枝菌分生孢子的产生、萌发和穿透能力参与该菌对寄主的致病过程。本研究首次探明了 DUF1620 家族蛋白在土传病原真菌大丽轮枝菌分生孢子产生和侵染中的作用, 为挖掘未知功能的新基因及其在真菌发育和致病过程中的功能研究提供了借鉴和参考。

关键词: 大丽轮枝菌; 马铃薯黄萎病; DUF1620 家族蛋白; 分生孢子

[引用本文]

王大会, 张丽华, 赵志博, 龙友华, 胡小平, 樊荣, 2023. 大丽轮枝菌假定蛋白 VDAG_07165 的功能. 菌物学报, 42(7): 1588-1600
Wang DH, Zhang LH, Zhao ZB, Long YH, Hu XP, Fan R, 2023. Functional analyses of the hypothetical protein VDAG_07165 of *Verticillium dahliae*. Mycosystema, 42(7): 1588-1600

Functional analyses of the hypothetical protein VDAG_07165 of *Verticillium dahliae*

WANG Dahui¹, ZHANG Lihua¹, ZHAO Zhibo¹, LONG Youhua¹, HU Xiaoping², FAN Rong^{1*}

1 College of Agriculture, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Region, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: The soil-borne pathogenic fungus *Verticillium dahliae* has a broad host range, and can

资助项目: 国家自然科学基金(31901836, 32260658); 贵州省自然科学基金([2020]1Y104); 贵州省教育厅青年人才成长项目([2021]080)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31901836, 32260658), the Natural Science Foundation of Guizhou Province ([2020]1Y104), and the Talent Development Program of Guizhou Province ([2021]080).

*Corresponding author. E-mail: hongyanfaned@126.com

Received: 2022-09-20; Accepted: 2022-09-30

cause severe *Verticillium* wilt disease which is difficult to control. Discovery and functional study of important pathogenic proteins of pathogens are expected to provide an insight for disease management. In this study, the hypothetical protein VDAG_07165 containing an unknown functional domain DUF1620 was identified by proteomic analysis, which is highly expressed in *V. dahliae* during its initial infection of potato root. Deletion of *VDAG_07165* gene resulted in a significant decrease of *V. dahliae* sporulation, conidial germination and penetration, leading to significant reduction of virulence on potato plants. These results indicated that VDAG_07165 could be involved in the early infection process of *V. dahliae* by regulating the production, germination and penetration of conidia. The role of DUF1620 family proteins in the production and infection of conidia of the soil-borne pathogenic fungus *V. dahliae* was first explored, and this finding provided a reference for the discovery of new genes with unknown functions and their roles in the development and pathogenesis of fungi.

Keywords: *Verticillium dahliae*; potato wilt; DUF1620 protein family; conidia

大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 是一种危害严重的土传病原真菌, 寄主范围广泛, 可侵染棉花、马铃薯及番茄等 600 多种植物, 引起植株萎蔫、维管束变褐及生长缓慢等症状, 造成严重的经济损失(Davis *et al.* 2010; 樊荣等 2017)。该病菌变异性强, 生理生化差异明显, 且存在对寄主的适应性进化现象, 因此其致病机理复杂, 对农业生产威胁较大(白应文等 2011; Zhang *et al.* 2021a)。大丽轮枝菌可通过由分生孢子和微菌核萌发所形成的侵染菌丝侵入寄主组织, 其侵染过程主要分为 3 个阶段: 分生孢子被接种到植物根部 2–6 h 后即吸附在根表面, 12–24 h 后开始萌发形成芽管和菌丝为侵入前期; 菌丝成功侵入根部表皮细胞后, 2–5 d 在根部组织内纵向和横向扩展到达皮层为侵入中期; 5–14 d 后侵入维管束组织定殖并大量繁殖, 地上部分开始出现萎蔫症状为寄主体内扩展及症状形成时期(Jiménez-Ruiz *et al.* 2017; Jin *et al.* 2022)。

近年来, 一些蛋白质被报道参与大丽轮枝菌的侵染过程, 加深了对该菌致病机制的认识。现已鉴定到的致病相关蛋白, 按照功能主要分为细胞壁水解酶类、表达调控类及分泌蛋白类等(Cheng *et al.* 2017; 刘涛等 2022; Ren *et al.* 2022)。其中, 细胞壁水解酶能降解寄主植物细胞壁成分, 帮助大丽轮枝菌完成侵染, 如对大丽

轮枝菌果胶裂解酶编码基因 *VdPL3.1* 和 *VdPL3.3* 分别进行敲除后, 敲除突变体的致病力均显著下降(Kubicek *et al.* 2014; Chen *et al.* 2016); 表达调控类如转录因子 *VdAtf1* 通过调控大丽轮枝菌硝酸和铵的代谢平衡而影响致病力(Tang *et al.* 2020); 分泌蛋白被认为是病菌侵染植物的重要武器, 是大丽轮枝菌致病的重要组成部分之一, 最近鉴定到的分泌蛋白糖苷水解酶 Vd424Y、蛋白激酶 PevD1 和核糖核酸酶 VdRTX1 等均在在大丽轮枝菌的致病过程中发挥重要作用(Liu *et al.* 2021; Zhang *et al.* 2021b; Yin *et al.* 2022)。因此, 不断挖掘鉴定大丽轮枝菌侵染过程中的关键致病因子, 明确其在侵染过程中的作用, 对了解大丽轮枝菌致病机制, 制定黄萎病有效防治措施具有重要意义。

未知功能结构域蛋白家族(domains of unknown function protein families, DUFs)是一群尚无功能注释或虽有命名但仍没有功能特征的蛋白家族, 以 DUF 加数字的形式被收录到 pfam 数据库, 其在所有生物中普遍存在, 但仅有 20% 分布于真核生物中(Li *et al.* 2021; Ying & Scheible 2022)。有的 DUFs 仅存在于植物中, 是植物特有蛋白; 而有些 DUFs 则在植物、动物和真菌中均有分布, 是真核生物细胞壁形成、线粒体裂变和信号转导等生物学过程的重要参与者(Bateman *et al.*

2010; 罗成科等 2015)。因此, 研究 DUFs 的基因功能有助于拓展并加深人们对生物体复杂生命活动机制的认识, 具有十分重要的科学意义。DUF1620 蛋白家族存在于植物和真菌中, 其在植物生长发育过程中的功能不断被揭示(Kodama *et al.* 2011; Kondou *et al.* 2013; Qin *et al.* 2016), 但在病原真菌发育过程的作用却鲜有报道。

本实验室通过蛋白质组测序大丽轮枝菌对马铃薯根部早期侵染的样品, 发现 DUF1620 家族的一个假定蛋白 VDAG_07165 在侵染初期表达量较高。本研究通过敲除 VDAG_07165 基因, 明确了其对大丽轮枝菌孢子产生、萌发及致病力的影响, 不仅丰富了人们对大丽轮枝菌致病机制的认识, 而且首次探究了 DUF1620 家族蛋白在土传病原真菌大丽轮枝菌产孢量和侵染过程中的作用, 为挖掘未知功能的新基因及其在真菌发育和致病过程中的功能研究提供了借鉴和参考。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

野生型大丽轮枝菌 JY 菌株、敲除质粒 pA-Hyg-OSCAR 和过表达载体 pFL2 均由西北农林科技大学植物保护学院胡小平教授惠赠; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞购自全氏金生物技术有限公司; 农杆菌 AGL1 感受态细胞购自上海唯地生物科技有限公司。

1.2 生物信息学分析

从 JGI 数据库(<https://genome.jgi.doe.gov/>)中查找大丽轮枝菌基因组数据, 根据 VDAG_07165 核酸序列设计引物, 以 JY 菌株 DNA 为模板扩增该基因全长序列并测序。利用在线分析工具 ProtParam、SignalP-4.1、TMHMM-2.0、Cell-PLoc-2.0、PredGPI 和 SOPMA 分别对 VDAG_07165 氨基酸序列进行理化性质分析、信号肽、跨膜结构域、亚细胞定位、锚定蛋白和蛋白二级结构预测。通过 BlastP 进行氨基酸序列比对并下载同源蛋白

序列, 利用 MEGA7.0 软件中的邻接法构建系统发育树。

1.3 基因敲除、互补突变体的获得

1.3.1 VDAG_07165 基因的敲除

根据同源重组的原理构建敲除载体(Paz *et al.* 2011)。以野生型菌株基因组 DNA 为模板, 使用引物 U-F/R 和 D-F/R 进行 PCR 扩增, 获得 VDAG_07165 基因的上、下游片段; 以 pOSCAR 质粒为模板, hph-F/R 为引物进行扩增, 获得潮霉素抗性基因片段并与线性化载体连接获得敲除载体 pOSCAR-hph-01765。通过农杆菌介导的遗传转化法和 50 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素获得并筛选转化子, 采用引物 hph-F/R 和 Q-tgB-F/R 验证敲除突变体。本研究所用引物见表 1。

1.3.2 VDAG_07165 基因的互补

以野生型菌株基因组 DNA 为模板, 使用引物 HB-F/R 扩增 VDAG_07165 基因起始密码子上游 1.5 kb 序列, 与 *Xho* I 酶切线性化的载体 pFL2 连接获得互补载体 pFL2-C-07165。通过 PEG 介导的遗传转化法将互补载体导入敲除突变体的原生质体中, 利用 100 $\mu\text{g/mL}$ 遗传霉素筛选转化子。采用引物 *neo*-F/R、C-tgB-F/R 和荧光观察验证互补突变体。

1.4 突变体生物学性状分析

1.4.1 菌落生长速率测定

野生型菌株和突变体在 PDA 培养基上生长 7 d 后, 用直径 5 mm 的打孔器在边缘打孔, 取菌饼接种于新的 PDA 平板上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养, 分别在第 3、6、9、12 和 15 天用“十字交叉法”测量菌落直径计算菌落生长速率并观察菌落形态。试验重复 3 次。

1.4.2 分生孢子产量和萌发率测定

分别将野生型菌株和突变体分生孢子悬浮液浓度调节至 10^7 个/mL, 吸取 200 μL 接种至 50 mL PDB 培养基中, 25 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 黑暗摇培 7 d。收集分生孢子, 血球计数板计数并统计分生孢子产量, 同时观察分生孢子形态并拍照。

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

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	目的 Purpose
U-F	<u>GGGGACAGCTTTCTTG</u> TACAAAGTGGAAAGGAACATGAGCAA GCGTCA	扩增 <i>VDAG_07165</i> 基因侧翼 Amplification of <i>VDAG_07165</i> gene flanks
U-R	<u>GGGGACTGCTTTTTTGT</u> TACAAACTTGCTGCCCCATATCCAAGC CAA	
D-F	<u>GGGGACA</u> ACTTTGTATAGAAAAGTTGTTGCTGGAGACGTGACG AGTAG	
D-R	<u>GGGGACA</u> ACTTTGTATAATAAAAGTTGTGCTGGAGACGTGA CGAGTAG	
hph-F	CCTGAACTCACCGCGACGTC	验证 <i>VDAG_07165</i> 敲除突变体 Verification of <i>VDAG_07165</i> deletion mutants
hph-R	CTATTCCTTTGCCCTCGGACGAGTG	
Q-tgB-F	CCACCACTGTCTTCAACTT	
Q-tgB-R	GAGTCTGCTGGTAATTCTGA	
HB-F	<u>CGACTCACTATAGGGCG</u> AATTGGGTACTCAAATTGGGAGAGGG GAAACCGACAAGG	验证 <i>VDAG_07165</i> 互补突变体 Verification of <i>VDAG_07165</i> complementary mutants
HB-R	<u>CACCACCCCGGTGAACAG</u> CTCCTCGCCCTTGCTCACCGCCATC TCGTGCATCT	
C-tgB-F	TCTTGGTGTTGATGCTCTC	
C-tgB-R	AGTTGCGTCGTAGGATTC	
neo-F	TCGGCTATGACTGGGCACAACA	
neo-R	GAGCGGCGATACCGTAAAGCAC	
qPCR-B-F	ACAACCTCGCTACTACAACG	检测 <i>VDAG_07165</i> 基因表达量 Detection of the <i>VDAG_07165</i> gene expression
qPCR-B-R	CGTTGTAGTAGCGAGTTGT	
β -tubulin-F	TTTCCAGATCACCCACTCC	
β -tubulin-R	ACGACCGAGAAGGTAGCC	
Vd-F	CCGCCGGTCCATCAGTCTCTCTGTTTATA	检测大丽轮枝菌生物量 Detection of the biomass of <i>Verticillium dahliae</i>
Vd-R	CGCCTGCGGGACTCCGATGCGAGCTGTAAC	
actin-F	GCTTCCCGATGGTCAAGTCA	
actin-R	GGATTCCAGCTGCTTCCATTC	

下划线对应引物序列为重组序列
Underlined text in primer sequences represent recombination sequence.

将获得的分生孢子悬浮液浓度调节至 10^3 个/mL，分别吸取 50 μ L 滴在无菌载玻片上，置于 25 $^{\circ}$ C 保湿培养 16 h，取样观察分生孢子萌发情况。试验重复 3 次。

1.4.3 分生孢子穿透能力测定

分别吸取 20 μ L 浓度为 10^7 个/mL 的野生型菌株和突变体分生孢子，接种于铺有无菌玻璃纸的 PDA 平板上，于 25 $^{\circ}$ C 暗培养 3 d 后揭掉玻璃纸，分别继续培养 5 d，观察接种点是否有菌落长出。试验重复 3 次。

1.5 致病力测定

1.5.1 初侵染过程中 *VDAG_07165* 基因表达量测定

将六叶期马铃薯幼苗(品种为荷兰 15 号)根部浸入浓度为 10^7 个/mL 的野生型菌株分生孢子悬浮液，25 $^{\circ}$ C、80 r/min 条件下培养，分别于 0、12 和 24 h 收集马铃薯根部，无菌水冲洗根表面后进行样品 RNA 提取，反转录为 cDNA，以大丽轮枝菌 β -tubulin 作为内参基因，0 h 分生孢子作为对照进行 qRT-PCR 测定，并采用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方

法计算 *VDAG_07165* 野生型大丽轮枝菌对马铃薯根部初侵染过程中的基因表达量。试验重复 3 次。

1.5.2 盆栽试验

将六叶期马铃薯幼苗(品种为荷兰 15 号)根部拔出,在浓度为 10^7 个/mL 的大丽轮枝菌分生孢子悬浮液中浸泡 10 min,重新栽至含有无菌土的营养钵中,每个菌株接种 20 株幼苗(Xiong *et al.* 2015)。以接种无菌水的植株作为对照。在接种后第 4 周观察发病情况并计算病情指数。收集接种 4 周的马铃薯根、茎、叶组织,以马铃薯 *actin* 作为内参基因,按照 Fan *et al.* (2017)的方法检测接种组织内的大丽轮枝菌生物量。

2 结果与分析

2.1 *VDAG_07165* 生物信息学分析

PCR 扩增野生型菌株 *VDAG_07165* 基因序列并与 JGI 数据库中大丽轮枝菌 *VdLs.17* 菌株 *VDAG_07165* 基因序列进行比对,发现二者序列完全相同。对 *VDAG_07165* 蛋白理化性质分析发现,其相对分子质量为 46 444.90 Da,理论等电点 $pI=5.09<7.0$,不稳定指数 61.65,脂肪系数 56.18,总平均亲水性 -0.415,说明该蛋白为不稳定的弱酸性亲水蛋白。信号肽预测结果表明,该蛋白存在剪切位点及信号肽结构(图 1A)。跨膜结构预测发现该蛋白有 1 个跨膜螺旋,存在跨膜结构(图 1B)。亚细胞定位预测显示其定位于胞外,GPI 预测为非 GPI 锚定蛋白。以上生物信息学预测结果说明 *VDAG_07165* 蛋白符合胞外分泌蛋白的特征。将 *VDAG_07165* 蛋白序列先后 BLASTp 检索 Swiss-Prot 蛋白数据库和 NCBI 蛋白质数据库,发现其与 *Colletotrichum higginsianum*、*C. truncatum*、*C. musicola*、*Fusarium albosuccineum*、*C. plurivorum* 和 *C. orbiculare* 中描述为 DUF1620 domain-containing protein 的蛋白序列特征相似(图 1C);系统发育

分析结果表明 *VDAG_07165* 与蛋白描述含有 DUF1620 结构域的炭疽属真菌亲缘关系较近(图 1D)。

2.2 *VDAG_07165* 基因敲除和互补突变体的获得

将 *VDAG_07165* 基因敲除载体利用农杆菌介导转化至野生型菌株的孢子中,使用筛选培养基进行抗性筛选,最终获得 3 个稳定的转化子用于 PCR 检测,发现 3 个转化子均能扩增出 999 bp 的潮霉素片段,且未能扩增出 921 bp 的目的片段(图 2A),说明 *VDAG_07165* 基因已被成功敲除。随机选择 1 号和 3 号泳道 DNA 对应的转化子进行后续研究,分别命名为 $\Delta VDAG_07165-1$ 和 $\Delta VDAG_07165-2$ 。同理,对在含有 100 $\mu\text{g/mL}$ 培养基上生长的 2 个互补转化子进行 PCR 筛选,发现 2 个转化子均能扩增出 748 bp 的遗传霉素基因片段,且能扩增出 1 860 bp 的目的基因片段(图 2B),说明已成功互补 *VDAG_07165* 基因,并命名为 $\Delta VDAG_07165-C1$ 和 $\Delta VDAG_07165-C2$ 。荧光观察结果表明,两个互补突变体分生孢子和菌丝均能发射明亮的绿色荧光(图 2C)。

在 PDA 培养基上培养 10 d,发现敲除突变体与野生型菌株和互补突变体的菌落生长速率无显著差异($P>0.05$,图 2D),菌落形态和颜色一致(图 2E)。

2.3 *VDAG_07165* 基因调控分生孢子的产生及萌发过程

收集培养 7 d 的分生孢子进行显微观察,发现敲除突变体分生孢子与野生型菌株和互补突变体分生孢子形态一致(图 3A)。产孢量分析结果表明,敲除突变体的产孢量显著低于互补突变体和野生型菌株的产孢量,而后两者间差异不显著(图 3B)。与野生型菌株和互补突变体相比,敲除突变体分生孢子萌发率显著下降(图 3C,3D)。以上结果表明,*VDAG_07165* 基因参与大丽轮枝菌分生孢子的产生及萌发过程。

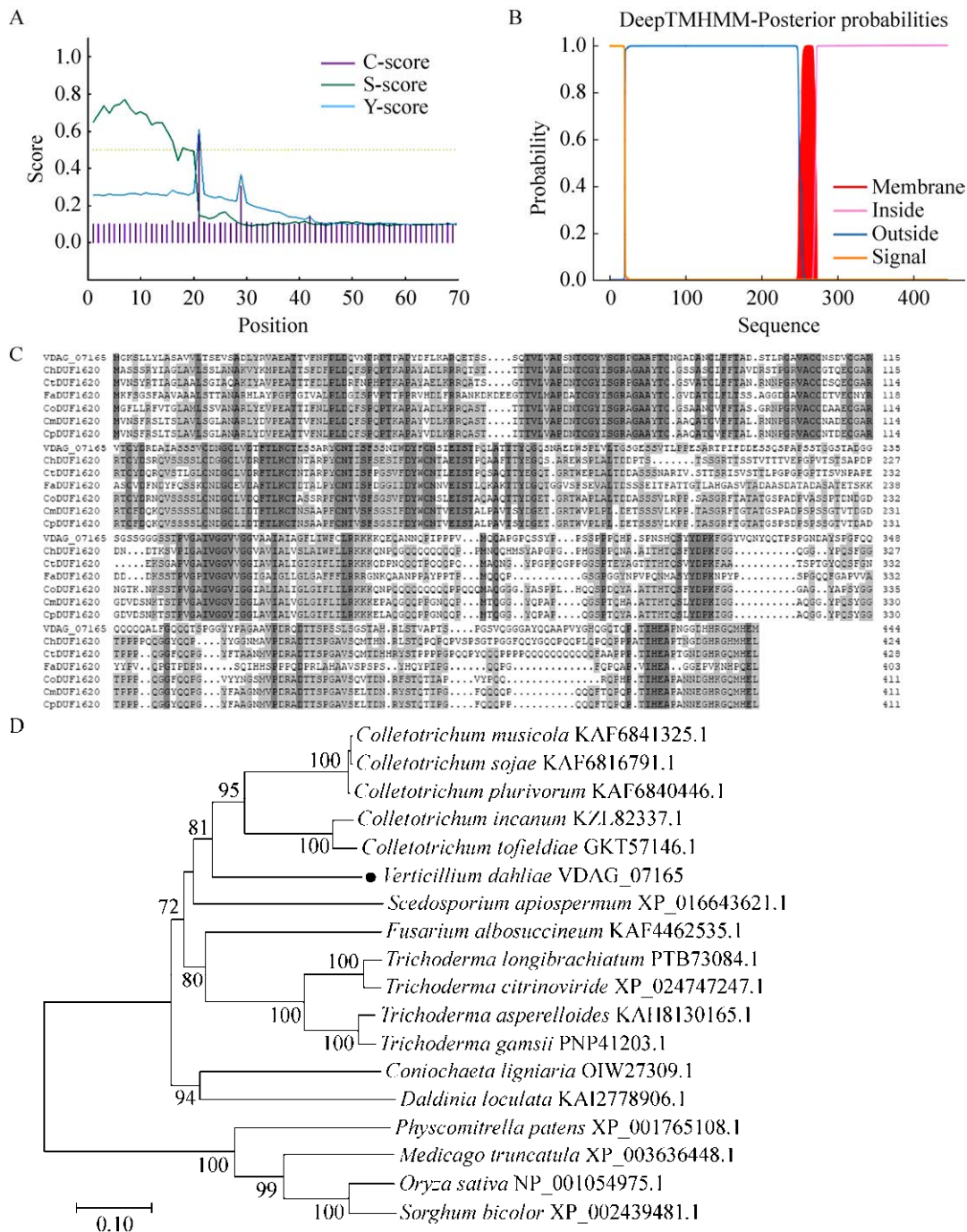


图 1 V DAG_07165 蛋白的生物信息学及系统发育分析 A: V DAG_07165 信号肽预测. B: 跨膜结构预测. C: 与同源蛋白 *Colletotrichum higginsianum* ChDUF1620、*C. truncatum* CtDUF1620、*Fusarium albosuccineum* FaDUF1620、*C. orbiculare* CoDUF1620、*C. musicola* CmDUF1620 和 *C. plurivorum* CpDUF1620 进行的多序列比对. D: 系统发育分析

Fig. 1 Bioinformatics and phylogenetic analysis of V DAG_07165 protein. A: V DAG_07165 signal peptide prediction. B: Transmembrane structure prediction. C: Multiple sequences alignment of V DAG_07165 and its homologs of ChDUF1620, CtDUF1620, FaDUF1620, CoDUF1620, CmDUF1620 and CpDUF1620 from *Colletotrichum higginsianum*, *C. truncatum*, *Fusarium albosuccineum*, *C. orbiculare*, *C. musicola* and *C. plurivorum*, respectively. D: Phylogenetic analysis.

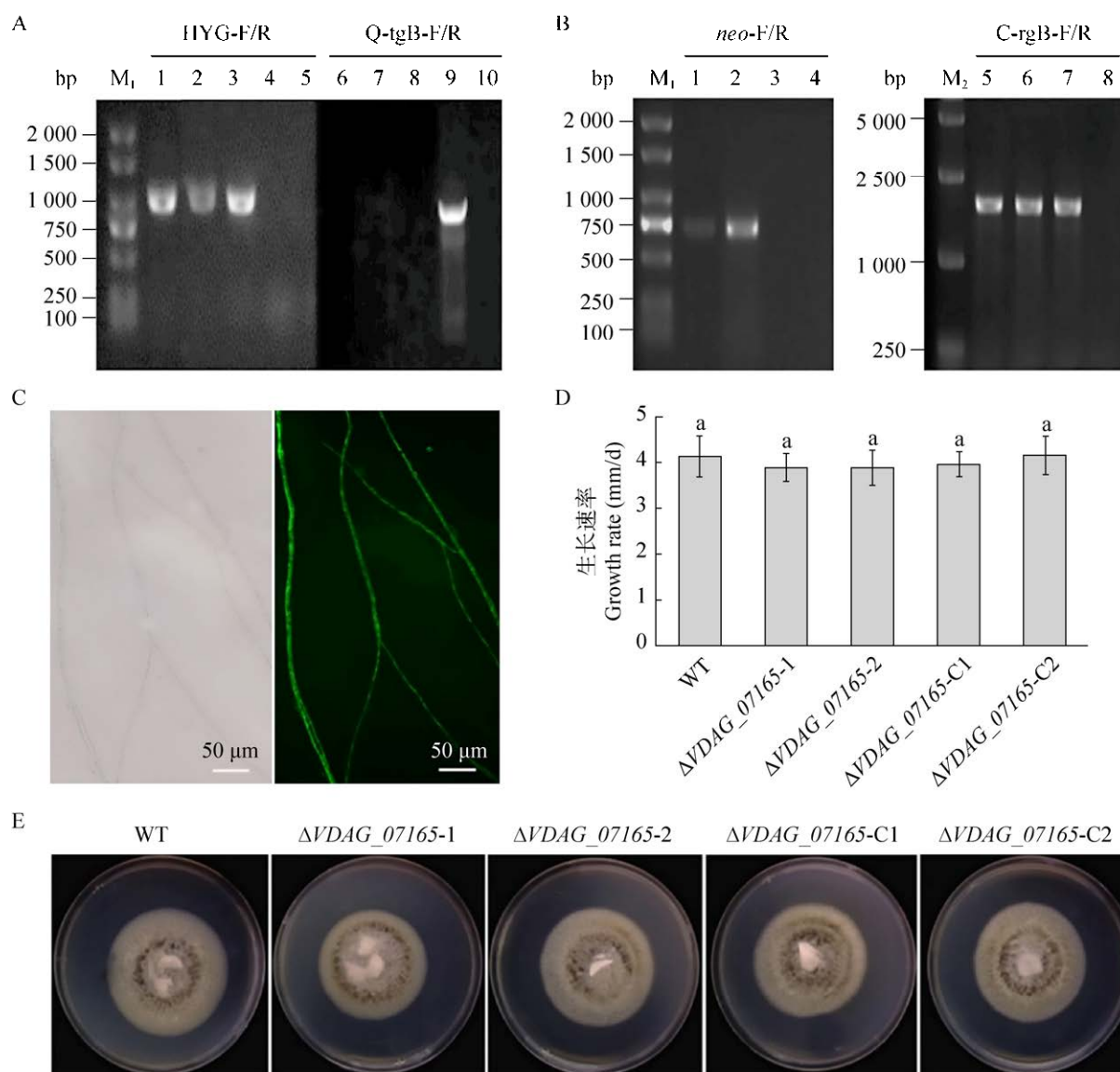


图2 *VDAG_07165* 基因敲除和互补突变体的获得 A: PCR 验证敲除突变体. 泳道 1-3 和 6-8 分别为 3 个转化子 DNA, 泳道 4 和 9 分别为野生型菌株 DNA, 泳道 5 和 10 分别为阴性对照. B: PCR 验证互补突变体. 泳道 1-2 和 5-6 分别为 2 个互补转化子 DNA, 泳道 3 和 7 分别为野生型菌株 DNA, 泳道 4 和 8 分别为阴性对照, M_1 为 DL2000 DNA marker, M_2 为 DL15000 DNA marker. C: 互补突变体 $\Delta VDAG_07165-C1$ 发射绿色荧光(Bars=50 μm). D: 野生型菌株与敲除和互补突变体在 PDA 培养基生长 10 d 的菌落生长速率. 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$). 下同. E: 菌落形态

Fig. 2 Generation of *VDAG_07165* gene knockout and complementary mutants. A: PCR was used to verify the knockout mutants. Lanes 1-3 and 6-8 were three transformants DNA, lanes 4 and 9 were genomic DNA of wild type (WT) strain, and lanes 5 and 10 were negative controls. B: PCR was used to verify the complementary mutants. Lanes 1-2 and 5-6 were the DNA of two complementary transformants, lanes 3 and 7 were the genomic DNA of WT strain, and lanes 4 and 8 were the negative controls, M_1 is DL2000 DNA marker, M_2 is DL15000 DNA marker. C: The complementary mutant $\Delta VDAG_07165-C1$ showed green fluorescence (Bars=50 μm). D: Colony growth rates of wild-type strain, knockout and complementary mutants grown in PDA plates for 10 days. Different lowercase letter indicates significantly difference ($P<0.05$). The same below. E: Colony morphology.

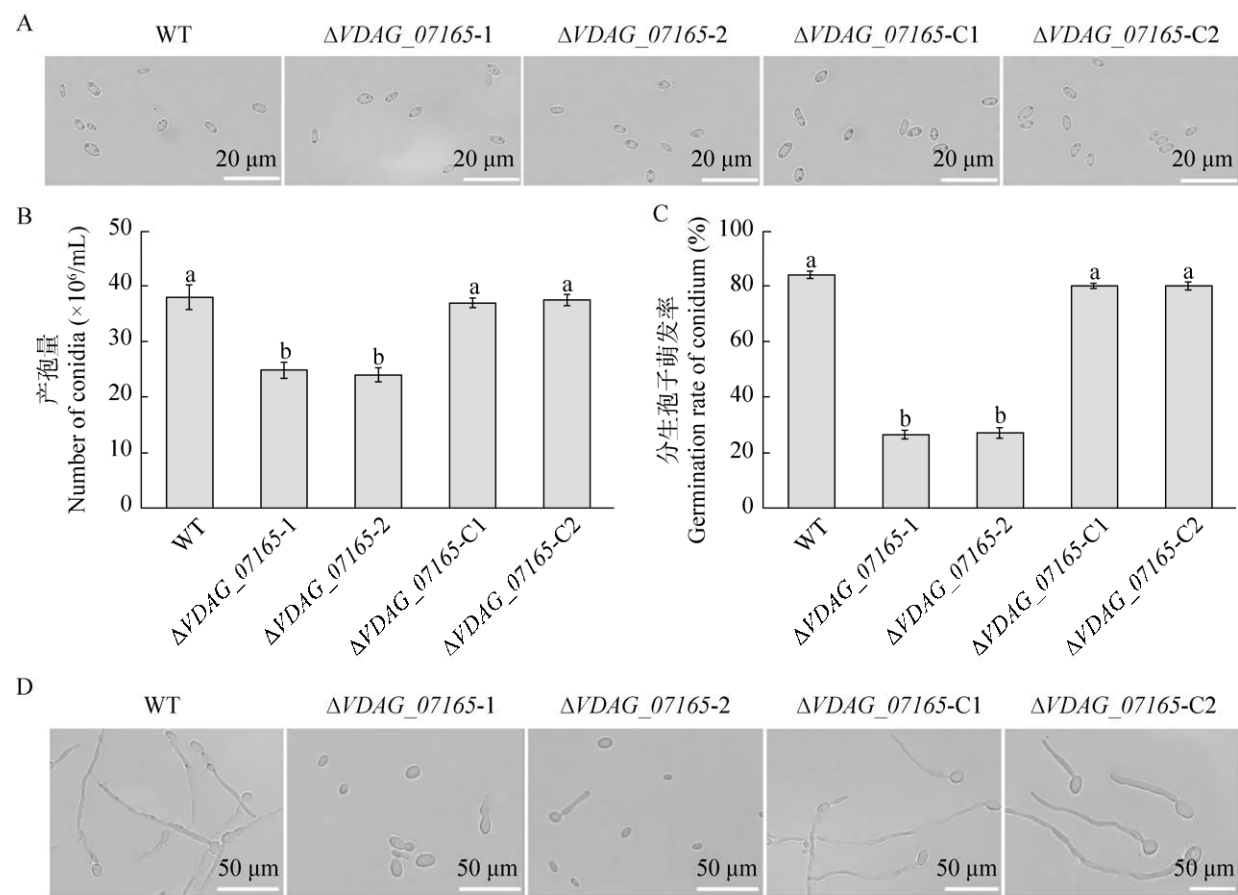


图 3 突变体分生孢子形态、产量与萌发率分析 野生型菌株、敲除突变体和互补突变体在 PDB 培养基中生长 7 d 的分生孢子形态(A)、产孢量(B)、分生孢子萌发率(C)及在水中萌发 16 h 的形态(D)

Fig. 3 Analysis of conidial morphology, yield and germination rate of mutants. Conidial morphology (A), spore quantity (B), conidial germination rate (C) and germination morphology (D) of wild type (WT) strain, knockout mutants and complementary mutants grown in PDB medium for 7 days.

2.4 *V D A G_{07165}* 基因调控分生孢子穿透能力

将分生孢子在含有玻璃纸的平板培养 3 d 后移除玻璃纸, 检测分生孢子对玻璃纸的穿透能力, 结果显示, 移除玻璃纸 5 d 后, 敲除突变体没有菌落长出, 而野生型菌株和互补突变体均有新菌落长出(图 4)。表明 *V D A G_{07165}* 基因缺失导致大丽轮枝菌穿透能力下降, 不能穿透玻璃纸生长。

2.5 *V D A G_{07165}* 基因参与大丽轮枝菌的致病过程

用野生型菌株分生孢子悬浮液接种马铃薯

根部, 分别在接种后 0、12 和 24 h 检测样品中 *V D A G_{07165}* 基因的表达情况, 发现该基因在接种后 12 h 和 24 h 均显著上调表达(图 5A)。接种 4 周后, 野生型菌株和互补突变体可引起典型的马铃薯黄萎病症状, 导致植株萎蔫, 而敲除突变体引起的马铃薯黄萎病症状较轻, 植株仍可生长; 纵剖马铃薯植株维管束, 发现接种敲除突变体的马铃薯维管束褐变程度明显弱于接种野生型菌株和互补突变体的植株, 而稍强于接种清水对照的马铃薯植株(图 5B)。此外, 敲除突变体引起的马铃薯黄萎病病情指数显著降低(图 5C), 且其马铃薯株高显著大于接种野生型菌株的马铃薯

薯株高,但与互补突变体引起的株高无显著差异(图 5D),说明互补突变体部分恢复了大丽轮枝菌的致病力。在接种 4 周的马铃薯根、茎、叶部样品中均能检测到大丽轮枝菌,但敲除突变体在根、茎和叶部的定殖量显著低于野生型菌株和互补突变体(图 5E)。上述结果表明, *VDAG_07165* 基因参与大丽轮枝菌的初侵染过程,缺失该基因降低了大丽轮枝菌对马铃薯的致病力。

3 讨论

大丽轮枝菌作为一种寄主范围广泛且极具破坏性的植物病原真菌,可对多种作物产生严重的产量和经济威胁,其致病蛋白是导致寄主植物发病的关键因子(Shao *et al.* 2022)。为进一步挖掘大丽轮枝菌的重要致病蛋白,本研究对前期蛋白组数据中筛选到一个 DUF1620 家族的假定蛋白 *VDAG_07165* 进行了功能探索。结果表明,该蛋白属于分泌蛋白,缺失该蛋白的编码基因可导致大丽轮枝菌分生孢子产量和萌发率显著下降,降低了该菌对马铃薯的致病力。

分泌蛋白在大丽轮枝菌生长发育和致病过程中发挥着重要作用(Mara & Martijn 2015;

Cheng *et al.* 2017; Ren *et al.* 2022)。本研究通过信号肽预测、跨膜结构预测、亚细胞定位和锚定蛋白预测分析,均表明 *VDAG_07165* 是一个假定的分泌蛋白,其缺失虽不影响大丽轮枝菌分生孢子形态,但却显著降低了其产孢量和分生孢子萌发率。大丽轮枝菌的分泌蛋白对菌体生长繁殖、抵抗逆境胁迫和诱发寄主免疫反应均具有重要作用(Mara & Martijn 2015; 田李等 2022)。许多分泌蛋白可作为致病因子直接参与大丽轮枝菌对寄主的侵染过程,但也有一些分泌蛋白主要调控大丽轮枝菌的菌体形态、分生孢子产生与抗逆、微菌核形成等过程。如大丽轮枝菌一个预测的分泌蛋白编码基因 *VdHPI* 被敲除后,突变体产孢量下降,且其中与产孢相关的 7 个基因表达量也显著降低,但调控产孢的具体机制尚不明确(孙琦等 2020);分泌蛋白 *VDH1* 缺失后不影响其对寄主番茄的致病力,敲除突变体仍能产生正常的分生孢子但分生孢子对于干旱胁迫的抵抗能力显著下降(Klimes & Dobinson 2006)。此外,在真菌对寄主初侵染的早期阶段,分生孢子萌发过程中伴随着一些分泌蛋白表达量的增加(Duplessis *et al.* 2011); *Alternaria* 萌发的分生孢子比未萌发



图 4 野生型菌株、敲除突变体和互补突变体分生孢子穿透能力测定

Fig. 4 Determination of conidial penetration of wild type (WT) strain, knockout mutants and complementary mutants.

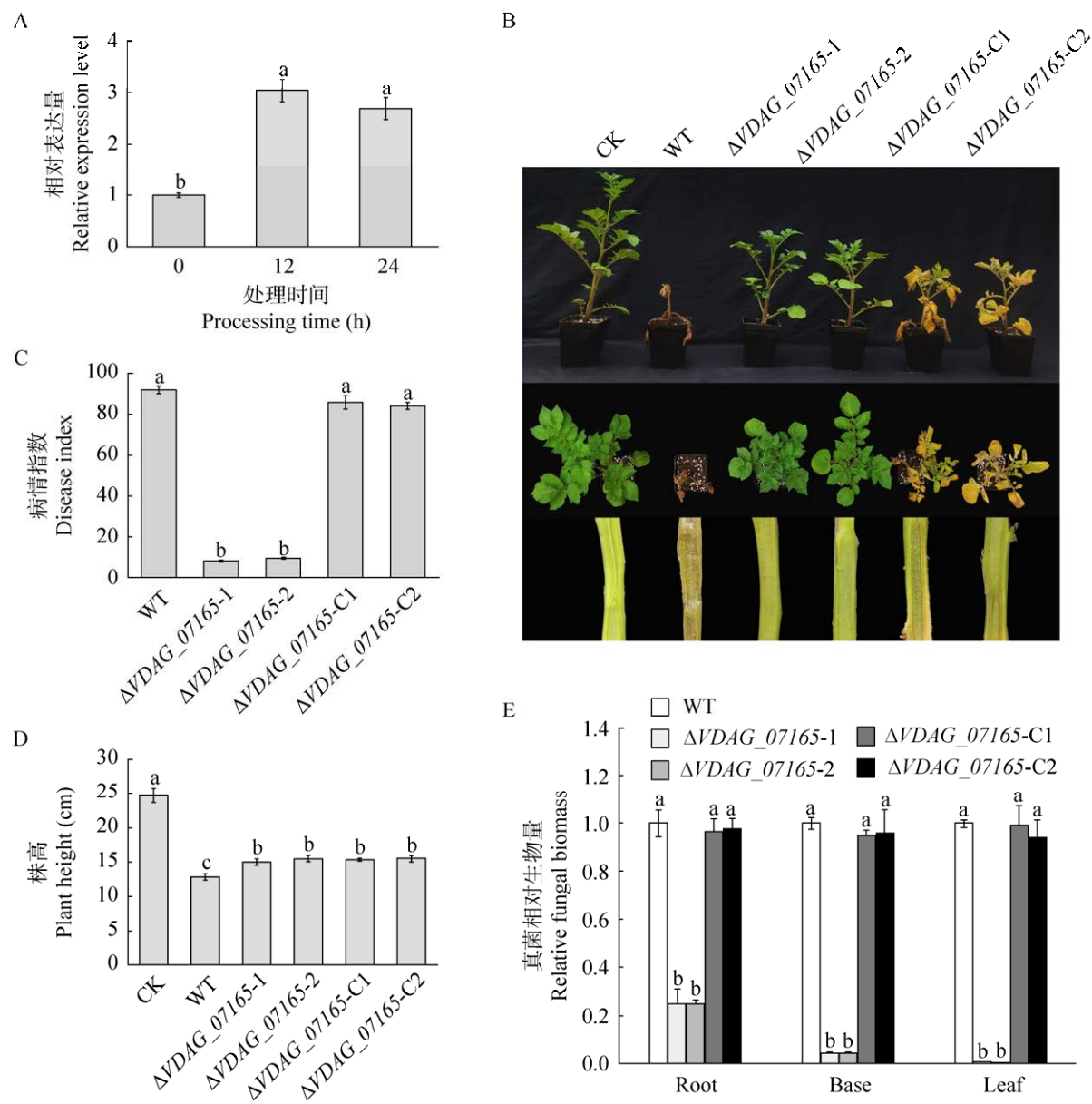


图 5 突变体致病力分析 A: 野生型菌株对马铃薯根部初侵染过程中 *V DAG_07165* 基因的表达量. B: 马铃薯植株在接种野生型菌株、敲除和互补突变体 4 周后的发病情况. C: 黄萎病情指数. D: 株高. E: 组织中大丽轮枝菌的相对生物量

Fig. 5 Pathogenicity analysis of the mutants. A: Gene expression of *V DAG_07165* during initial infection of *Verticillium dahliae* on potato roots. B: Potato wilt symptoms and discoloration of plant vascular system in 4 weeks post inoculation. C: Disease index of potato wilt. D: Plant height. E: Relative biomass of *V. dahliae* in tissues.

的分生孢子能释放更多的过敏原引致病害 (Mitakakis *et al.* 2001)。因此，分生孢子的产生与萌发对真菌侵染具有重要的促进作用,并且大丽轮枝菌的分生孢子不仅是短期存活结构,更是该菌致病的关键因子,产孢量越多的菌株致病力越强(Fradin & Thomma 2006)。考虑到大丽轮枝菌分生孢子产生和萌发过程受到多基因与 cAMP、MAPK 等多信号通路的调控(Luo *et al.* 2016; Bui

et al. 2019; 田李等 2022), 后续将采用转录组测序和基因功能研究技术构建 *VDAG_01765* 参与大丽轮枝菌分生孢子产生和萌发的调控网络。

大丽轮枝菌分生孢子被接种后 12–24 h 开始萌发形成芽管或菌丝, 穿透植物表皮并侵入寄主组织完成初侵染, 在侵入成功后, 通过菌丝穿透皮层组织或侵入皮层细胞中向维管束组织生长, 产生分生孢子并通过导管运输作用向植物顶端侵染, 完成对寄主植物整个维管束组织的侵染和定殖(Tian & Kong 2022)。本研究发现 *VDAG_01765* 基因表达量在接种后 12–24 h 显著上调, 表明该基因参与了大丽轮枝菌对马铃薯的初侵染阶段。通过玻璃纸模拟植物组织检测大丽轮枝菌分生孢子的穿透能力, 发现缺失 *VDAG_01765* 基因后, 分生孢子的穿透能力产生缺陷, 不能穿透玻璃纸生长, 这可能与敲除突变体显著降低的分生孢子萌发率有一定关系。由此推测 *VDAG_01765* 敲除突变体对马铃薯根部组织的穿透能力减弱, 导致正常穿透马铃薯根部的菌量减少; 加之敲除突变体产孢量的显著降低, 由此使检测到的马铃薯根、茎及叶等组织中大丽轮枝菌的生物量显著下降, 表现出接种敲除突变体的马铃薯维管束褐变程度弱于接种野生型菌株或互补突变体的马铃薯植株; 呈现出敲除突变体引起的马铃薯黄萎病典型症状少, 病情指数低, 危害程度弱。

越来越多的蛋白质组分析发现, DUFs 蛋白在生物体的生命活动中发挥着重要作用, 因此, 研究 DUFs 的基因功能不仅有助于挖掘新基因, 而且有助于在全新层面上了解生命活动的发生和调控机制(Kondou *et al.* 2013; 罗成科等 2015)。虽然 DUF1620 家族蛋白在真菌和植物中均有分布(Qin *et al.* 2016), 但 BlastP 结果显示 *VDAG_01765* 的同源蛋白主要分布于 *Colletotrichum incanum*、*Scedosporium apiospermum*、*Fusarium solani* 和 *Trichoderma citrinoviride* 等真菌中。故本研究首

次在病原真菌中开展 DUF1620 家族蛋白的功能探索, 为全面理解大丽轮枝菌致病机制提供了支撑。

[REFERENCES]

- Bai YW, Hu DF, Hu XP, Zhao JX, Zhu HQ, Yang JR, 2011. Formation conditions for microsclerotia of *Verticillium dahliae*. *Mycosystema*, 30(5): 695-701 (in Chinese)
- Bateman A, Coghill P, Finn RD, 2010. DUFs: families in search of function. *Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications*, 66(10): 1148-1152
- Bui TT, Harting R, Braus-Stromeier SA, Tran VT, Leonard M, Höfer A, Abelmann A, Bakti F, Valerius O, Schlüter R, Stanley CE, Ambrósio A, Braus GH, 2019. *Verticillium dahliae* transcription factors *Som1* and *Vta3* control microsclerotia formation and sequential steps of plant root penetration and colonization to induce disease. *The New Phytologist*, 221(4): 2138-2159
- Chen JY, Xiao HL, Gui YJ, Zhang DD, Li L, Bao YM, Dai XF, 2016. Characterization of the *Verticillium dahliae* exoproteome involves in pathogenicity from cotton-containing medium. *Frontiers in Microbiology*, 7: 1709
- Cheng XX, Zhao LH, Steven JK, Feng HJ, Feng ZL, Feng WF, Shi YQ, Li ZF, Zhu HQ, 2017. The endo chitinase VDECH from *Verticillium dahliae* inhibits spore germination and activates plant defense responses. *Plant Science*, 259: 12-23
- Davis JR, Huisman OC, Everson DO, 2010. Ecological relationships of *Verticillium* wilt suppression of potato by green manures. *American Journal of Potato Research*, 87(4): 315-326
- Duplessis S, Hacquard S, Delaruelle C, Tisserant E, Frey P, Martin F, Kohler A, 2011. *Melampsora larici-populina* transcript profiling during germination and timecourse infection of poplar leaves reveals dynamic expression patterns associated with virulence and biotrophy. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 24(7): 808-818
- Fan R, Klosterman SJ, Wang CH, Subbarao KV, Xu XM, Shang WJ, Hu XP, 2017. *Vaygl* is required for microsclerotium formation and melanin production in *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 98: 1-11
- Fan R, Xu XH, Cao YS, Shang WJ, Zhu HQ, Hu XP, 2017. The role of DHN melanin biosynthesis genes in microsclerotium formation in *Verticillium dahliae*. *Mycosystema*, 36(12): 1608-1615 (in Chinese)
- Fradin EF, Thomma BPHJ, 2006. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae*

- and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 7(2): 71-86
- Jiménez-Ruiz J, Leyva-Pérez MDLO, Schilirò E, Barroso JB, Bombarely A, Mueller L, Mercado-Blanco J, Francisco L, 2017. Transcriptomic analysis of *Olea europaea* L. roots during the *Verticillium dahliae* early infection process. *The Plant Genome*, 10(1): 1-15
- Jin YY, Fan LQ, Zhang YH, Hu W, Han X, Yan QD, Yang JX, Li FG, Yang ZE, 2022. Functional divergence of GLP genes between *G. barbadense* and *G. hirsutum* in response to *Verticillium dahliae* infection. *Genomics*, 114(5): 110470
- Klimes A, Dobinson KF, 2006. A hydrophobin gene, *VDH1*, is involved in microsclerotial development and spore viability in the plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 43(4): 283-294
- Kodama Y, Suetsugu N, Wada M, 2011. Novel protein-protein interaction family proteins involved in chloroplast movement response. *Plant Signaling & Behavior*, 6(4): 483-490
- Kondou Y, Noguchi K, Kutsuna S, Kawashima M, Yoneda A, Ishibashi M, Muto S, Ichikawa T, Nakazawa M, Matsui M, Katsushi M, 2013. Overexpression of dwarf and lesion formation 1 (*dle1*) causes altered activation of plant defense system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology*, 30: 385-392
- Kubicek CP, Starr TL, Glass NL, 2014. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology*, 52: 427-451
- Li Y, Huang YJ, Wen YZ, Wang D, Liu HF, Li YF, Zhao J, An LJ, Yu F, Liu XY, 2021. The domain of unknown function 4005 (DUF4005) in an *Arabidopsis* IQD protein functions in microtubule binding. *The Journal of Biological Chemistry*, 297(1): 100849
- Liu LS, Wang ZH, Li JN, Wang Y, Yuan JC, Zhan JJ, Wang P, Lin YJ, Li FG, Ge XY, 2021. *Verticillium dahliae* secreted protein Vd424Y is required for full virulence, targets the nucleus of plant cells, and induces cell death. *Molecular Plant Pathology*, 22(9): 1109-1120
- Liu T, Qin J, Wang CS, Shang WJ, Hu XP, 2022. Functional analysis of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase gene in *Verticillium dahliae*. *Mycosystema*, 41(2): 248-259 (in Chinese)
- Luo CK, Xiao JG, Li M, 2015. Biological functions of different domains of unknown function protein families (DUFs) genes in plants. *Plant Physiology Journal*, 51(2): 153-158 (in Chinese)
- Luo X, Mao H, Wei Y, Cai J, Xie C, Sui A, Yang X, Dong J, 2016. The fungal-specific transcription factor *Vdpf* influences conidia production, melanized microsclerotia formation and pathogenicity in *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant Pathology*, 17(9): 1364-1381
- Mara DS, Martijn R, 2015. The role of pathogen-secreted proteins in fungal vascular wilt diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10): 23970-23993
- Mitakakis TZ, Barnes C, Tovey ER, 2001. Spore germination increases allergen release from *Alternaria*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 107(2): 388-390
- Paz Z, García-Pedrajas MD, Andrews DL, Klosterman SJ, Baeza-Montañez L, Gold SE, 2011. One step construction of *Agrobacterium*-recombination-ready plasmids (OSCAR), an efficient and robust tool for ATMT based gene deletion construction in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 48: 677-684
- Qin XJ, Huang Q, Xiao HJ, Zhang QN, Ni CZ, Xu YH, Liu G, Yang DH, Zhu YG, Hu J, 2016. The rice DUF1620-containing and WD40-like repeat protein is required for the assembly of the restoration of fertility complex. *New Phytologist*, 210: 934-945
- Ren H, Li XB, Li YJ, Li MJ, Sun JY, Wang FL, Zeng JY, Chen Y, Wang L, Yan XY, Fan YH, Jin D, Pei Y, 2022. Loss of function of *VdDrs2*, a P4-ATPase, impairs the toxin secretion and microsclerotia formation, and decreases the pathogenicity of *Verticillium dahliae*. *Frontiers in Plant Science*, 13: 944364
- Shao SN, Li B, Sun Q, Guo PR, Du YJ, Huang JF, 2022. Acetolactate synthases regulatory subunit and catalytic subunit genes *VdILV*s are involved in BCAA biosynthesis, microsclerotial and conidial formation and virulence in *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 159: 103667
- Sun Q, He F, Shao SN, Liu Z, Huang JF, 2020. Cloning and functional analysis of *VdHPI* in *Verticillium dahliae* from cotton. *Scientia Agricultura Sinica*, 53(14): 2872-2884 (in Chinese)
- Tang C, Jin XJ, Klosterman SJ, Wang YL, 2020. Convergent and distinctive functions of transcription factors *VdYap1*, *VdAtf1*, and *VdSkn7* in the regulation of nitrosative stress resistance, microsclerotia formation, and virulence in *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant Pathology*, 21(11): 1451-1466
- Tian J, Kong ZS, 2022. Live-cell imaging elaborating epidermal invasion and vascular proliferation/colonization strategy of *Verticillium dahliae* in host plants. *Molecular Plant Pathology*, 23(6): 895-900
- Tian L, Li JJ, Dai XF, Zhang DD, Chen JY, 2022. From functional genes to biological characteristics: the molecular basis of pathogenicity in *Verticillium dahliae*. *Biotechnology Bulletin*, 38(1): 51 (in Chinese)

- Wang YL, Xiao SX, Xiong DG, Tian CM, 2012. Genetic transformation, infection process and qPCR quantification of *Verticillium dahliae* on smoke-tree *Cotinus coggygria*. *Australasian Plant Pathology*, 42(1): 33-41
- Xiong D, Wang Y, Tang C, Fang Y, Zou J, Tian C, 2015. *VdCrz1* is involved in microsclerotia formation and required for full virulence in *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 82: 201-212
- Yin CM, Li JJ, Wang D, Zhang DD, Song J, Kong ZQ, Wang BL, Hu XP, Klosterman SJ, Subbarao KV, Chen JY, Dai XF, 2022. A secreted ribonuclease effector from *Verticillium dahliae* localizes in the plant nucleus to modulate host immunity. *Molecular Plant Pathology*, 23(8): 1122-1140
- Ying S, Scheible WR, 2022. A novel calmodulin-interacting domain of unknown function 506 protein represses root hair elongation in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 45(6): 1796-1812
- Zhang Y, Gao YH, Wang HL, Kan CC, Li Z, Yang XF, Yin WL, Xia XL, Nam HG, Li ZH, Guo HW, 2021a. *Verticillium dahliae* secretory effector PevD1 induces leaf senescence by promoting ORE1-mediated ethylene biosynthesis. *Molecular Plant*, 14(11): 1901-1917
- Zhang YL, Chen W, Sang XH, Wang T, Gong HY, Zhao YL, Zhao P, Wang HM, 2021b. Genome-wide identification of the thaumatin-like protein family genes in *Gossypium barbadense* and analysis of their responses to *Verticillium dahliae* infection. *Plants*, 10(12): 2647

[附中文参考文献]

- 白应文, 胡东芳, 胡小平, 赵俊兴, 朱荷琴, 杨家荣, 2011. 大丽轮枝孢微菌核的形成条件. *菌物学报*, 30(5): 695-701
- 樊荣, 徐小鸿, 曹亚松, 商文静, 朱荷琴, 胡小平, 2017. 大丽轮枝菌黑色素合成相关基因与微菌核形成的关系. *菌物学报*, 36(12): 1608-1615
- 刘涛, 秦君, 王春生, 商文静, 胡小平, 2022. 大丽轮枝菌甘油-3-磷酸脱氢酶的功能分析. *菌物学报*, 41(2): 248-259
- 罗成科, 肖国举, 李明, 2015. 不同未知功能结构域蛋白家族(DUFs)基因在植物中的生物学功能. *植物生理学报*, 51(2): 153-158
- 孙琦, 何芳, 邵胜楠, 刘政, 黄家风, 2020. 棉花黄萎病菌 *VdHPI* 的克隆及功能分析. *中国农业科学*, 53(14): 2872-2884
- 田李, 李俊娇, 戴小枫, 张丹丹, 陈捷胤, 2022. 从功能基因到生物学性状: 大丽轮枝菌致病性形成的分子基础. *生物技术通报*, 38(1): 51