

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
55(7):873–881; 4 July 2015
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.20140557

膜泡运输蛋白 VdSec22 参与大丽轮枝菌胞外蛋白的分泌和致病性

田李¹, 徐荣旗^{2*}, 王转斌¹, 刘娜¹, 冯凤鹃¹, 曲志才¹

¹曲阜师范大学生命科学学院, 山东 曲阜 273165

²中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

摘要:【目的】验证大丽轮枝菌分泌途径中一个膜泡运输蛋白 VdSec22 的功能, 为防治棉花黄萎病提供潜在的生物靶点。【方法】利用“正负双向筛选法”的方法, 构建大丽轮枝菌 VdSec22 蛋白编码基因缺失的突变体菌株 ΔQF 。通过农杆菌介导的转化, 将其编码基因 VdSec22 重新导入 ΔQF 构建了功能回补菌株 $C\Delta QF$ 。以野生型菌株为对照, 检测上述菌株分泌胞外蛋白(果胶酶、纤维素酶和毒素蛋白)的能力; 采用蘸根接种的方法, 检测上述菌株对棉花致病性的差异。同时通过定量 PCR 检测内质网分子伴侣表达量的方法, 推断突变体菌株 ΔQF 中是否发生了内质网应激反应。【结果】成功构建了基因敲除突变体 ΔQF 和功能回补菌株 $C\Delta QF$ 。突变体菌株 ΔQF 的果胶酶、纤维素酶、毒素蛋白的分泌能力和对棉花的致病性均较野生型减弱, 并且产生了内质网应激反应。重新导入 VdSec22 基因可弥补突变体菌株 ΔQF 的上述缺陷。【结论】VdSec22 是大丽轮枝菌的一个重要分泌途径蛋白, 在大丽轮枝菌诸多胞外致病蛋白的分泌和棉花致病性中起重要作用。VdSec22 可作为防治棉花黄萎病的潜在生物靶点。

关键词: 大丽轮枝菌, 分泌蛋白, 分泌途径, 基因敲除

中图分类号: Q933 **文章编号:** 0001-6209(2015)07-0873-09

大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)是引起棉花黄萎病的病原菌。已有研究表明, 大丽轮枝菌的分泌蛋白是造成棉花发病的主要因素^[1]。致病分泌蛋白主要包括植物细胞壁降解酶类和毒素蛋白类。植物细胞壁降解酶中, 果胶酶和纤维素酶被证明与大丽轮枝菌致病密切相关^[2]。大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* VdLs. 17)菌株基因组中含有 10

个果胶水解酶、14 个果胶裂解酶和 35 个纤维素降解酶的编码基因, 这可能与需要降解棉花富含果胶和纤维素的细胞壁, 从而进入维管束并在其内大量繁殖的生活史特点密切相关^[3,4]。毒素蛋白成分复杂, 包括研究人员通过蛋白分离纯化方法得到的 PevD1^[5], 根据蛋白同源性预测并经过功能验证的 VdNLP1 和 VdNLP2^[6], 和通过比较基因组学研究发

基金项目: 国家自然科学基金项目(31170080); 中国博士后科学基金(2014T70621); 山东省自然科学基金(ZR2013CQ018)

* 通信作者。Tel: +86-10-82106402; E-mail: qirongxu@sohu.com

作者简介: 田李, (1984–), 男, 山东曲阜人, 副教授, 博士, 主要研究方向为植物病原真菌的致病机理及功能基因组学。E-mail: tianlister@163.com

收稿日期: 2014-11-24; **修回日期:** 2015-01-23

现的 Ave1^[7] 和 VdSSP1^[8]。除此之外,大丽轮枝菌分泌蛋白组(Secretome)含有大量潜在的毒素蛋白,主要包括 127 个富含半胱氨酸的小分子量蛋白和 7 个 LysM 类激发子蛋白^[3]等。综上所述,大丽轮枝菌致病相关分泌蛋白众多,因此从防治棉花黄萎病的角度来看,单一的分泌蛋白较难成为防治棉花黄萎病的生物靶点。

在大丽轮枝菌中,分泌蛋白需要在信号肽引导下进入内质网,通过内质网和高尔基体一系列的运输囊泡,最终被运输到细胞膜并与其相融合,从而把分泌蛋白释放到细胞外,完成蛋白的分泌过程。在这个复杂的过程中,参与了分泌蛋白运输的蛋白统称为分泌途径(secretory pathway)蛋白^[9]。因此,抑制某一分泌途径蛋白的活性可能会对诸多分泌蛋白的运输和分泌产生影响。将分泌途径蛋白作为潜在的生物防治靶点,有可能为防治黄萎病提供新的思路。

稻瘟病菌是研究植物病原真菌的模式菌株。Song 等研究了稻瘟病菌中一个重要的分泌途径蛋白 MoSec22 的生物学功能^[10]。该蛋白属于 SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)类膜泡运输蛋白,负责分泌蛋白从内质网到高尔基体的膜泡转运,在稻瘟病菌致病蛋白的分泌中起了重要作用,其编码基因缺失的突变体菌株丧失了诸多致病蛋白的分泌能力和对寄主植物的致病性。模式菌株稻瘟病菌中取得的研究成果可用于指导大丽轮枝菌相关问题的研究。因此,为了确定分泌途径蛋白 Sec22 在大丽轮枝菌胞外蛋白分泌和致病性中的作用,本研究通过基因敲除和功能互补实验,对其生物学功能进行了验证。拟从分泌途径的角度入手,探究防治棉花黄萎病的生物靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:大丽轮枝菌野生型菌株 Vd991 和农杆菌 AGL-1 由本实验室保存,大肠杆菌感受态细胞 Top10 购自北京全式金公司;基因敲除骨架载体 pGK02-Gateway 由美国宾夕法尼亚州立大学惠赠,pMD18-T 载体购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 主要试剂:DNA 提取试剂盒、PCR 产物纯

化试剂盒、RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒、qPCR 试剂和 Taq polymerase 购自 TaKaRa 公司;5-氟脱氧尿苷(F2dU)、潮霉素 B、遗传霉素、乙酰丁香酮、果胶、羧甲基纤维素、二氨基联苯胺(DAB)购自 Sigma 公司;Gateway BP 酶和 Trizol 购自 Invitrogen 公司。

1.2 大丽轮枝菌 Vd991 中 VdSec22 基因的克隆

根据稻瘟病菌 MoSec22 蛋白序列,在大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* VdLs. 17)菌株基因组数据库(http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/verticillium_dahliae)中进行 BLASTp 搜索。找到同源性较高的蛋白序列后,根据数据库中该蛋白的编码基因序列,设计可扩增该基因全长的引物 VdSec22-F/R(表 1)。分别以大丽轮枝菌 Vd991 的基因组 DNA 和 cDNA 为模板,扩增该基因的全长序列和编码框序列。反应程序为:30 × (94℃ 30 s, 58℃ 1 min, 72℃ 1 min)。PCR 产物连接到 pMD18-T 载体上,送交上海生工生物工程有限公司测序。

1.3 大丽轮枝菌 VdSec22 基因缺失突变体菌株 ΔQF 的构建

按照作者构建的大丽轮枝菌高效基因敲除体系^[11]操作。

1.3.1 突变载体的构建:利用融合 PCR 的方法,构建 VdSec22 基因的同源重组片段(长度均为 1.2 kb 的 VdSec22 基因上下游 DNA 片段中间连接有长度为 1.8 kb 的潮霉素抗性基因盒),具体实验参数参见文献[11]。引物序列见表 1。利用 Gateway BP 反应将 VdSec22 基因的同源重组片段克隆到基因敲除的骨架载体 pGK02-Gateway 载体上,构建成基因敲除载体 pGK02-VdSec22。

1.3.2 大丽轮枝菌的遗传转化:利用冻融法将基因敲除质粒 pK02-VdSec22 转化到农杆菌 AGL-1 中,然后通过农杆菌介导的方法转化大丽轮枝菌^[11]。在添加有 50 μg/mL 头孢霉素、30 μg/mL 潮霉素和 50 μmol/L F2dU 的培养基中筛选基因敲除转化子,并对转化子进行单孢分离,即得到候选 VdSec22 基因敲除突变体。

1.3.3 基因敲除转化子的分子鉴定:以野生型菌株 Vd991 和 6 个候选 VdSec22 基因敲除突变体的基因组 DNA 为模板,设计检测引物 Test-1/2 和 Test-3/4 (引物在基因组上的相对位置见图 1-A),PCR 筛选突变体菌株。以野生型菌株和候选突变体的 cDNA

为模板,设计检测引物 Test-5/6(引物在基因组上的相对位置见图 1-A),RT-PCR 检测 *VdSec22* 基因的表达是否在候选 *VdSec22* 基因敲除突变体中丧失。引物序列见表 1。

1.4 功能互补菌株 *CΔQF* 的构建

1.4.1 功能互补载体 p-*CΔQF* 的构建:以菌株 Vd991 基因组为模板, CVdSec22-F/R 为引物,扩增 2 kb 的 *VdSec22* 基因表达片段(包括 1 kb *VdSec22* 基因上游片段, 0.8 kb *VdSec22* 基因编码区序列和

0.2 kb *VdSec22* 基因下游片段)。以载体 pII99 为模板, Geneticin-F/R 为引物,扩增得到遗传霉素抗性基因盒。将上述两 DNA 片段通过融合 PCR 连接在一起,并引入双元载体 pCAMBIA1300 的 T-DNA 中 *Xba* I/*Xho* I 酶切位点,构建成功能互补载体 p-*CΔQF*。引物序列见表 1。

1.4.2 遗传转化:将载体 p-*CΔQF* 转入突变体菌株 *ΔQF*(转化方法同 1.3.2),从而获得功能回补菌株 *CΔQF*。

表 1. 本研究所使用的引物
Table 1. Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
Primers for amplification of <i>VdSec22</i>	
VdSec22-F	ATGAAGTCTATTTCGGTCAACAC
VdSec22-R	TCAGAAGAAGCGCCACCAGAGG
Primers for gene knockout of <i>VdSec22</i>	
5F	TTTGCGTAGGAGACTTGTGC
5R	<u>CCCCAAAAATGCTCCTTCAAAGTCGAGCCTCGCTATTGT</u>
3F	<u>CCCTGGGTTTCGCAAAGATAA</u> CCTGGCCTGTTCATCATCT
3R	GGTGCGTTTCTCGTCTACCG
Nest-F	<u>GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGAGACTCTTCGAGCTGGGTT</u>
Nest-R	<u>GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTGGCTGCCGAAGCATCCAAG</u>
Hygromycin-F	TTGAAGGAGCATTTTITGGGC
Hygromycin-R	TTATCTTTGCCGAACCCAGGG
Test-1	ATTCCCACGCACCACAACC
Test-2	TCCACGACTGGTTCCCTCC
Test-3	GTTTGCTCGGGCGATAGAG
Test-4	GCAGGAAGCTTCCTCGAGC
Test-5	TGCTCCGCAAGGTCACCCG
Test-6	TGAACGTGTCAAACGCCAT
Primers for construction of complementation strain <i>CΔQF</i>	
Geneticin-F	GTTTGCGGGCTGTCTTGACG
Geneticin-R	<u>CTCGAGTACCTGTGCATTCTGGGTAA</u>
CVdSec22-F	<u>TCTAGAAAGAAGTGCCGTTTCCTCC</u>
CVdSec22-R	<u>CGTCAAGACAGCCCGCAAACCAT</u> TGTGTCTTGACGCTG
Primer for Real-time PCR	
KAR-F	GAAGGGCAAGGTTGAGATCTTTGTC
KAR-R	CGTGTTGTAAGGGTTAGCGGCG
LHS-F	CTCGCACCCCTTTGTCCAG
LHS-R	GCTGACATCAGCTCCGCAC
SCJ-F	TCTTGTCACCAATTGCCCTTTGCG
SCJ-R	TGGTATTCTTGTCTGAGCTTGCCGT
SIL-F	TCCTTCTCGTTCCTCTCACATCTGCT
SIL-R	CCTTGGGGTAACATTCTGCTGGGT
β-tubulin-F	GGCCGCCTCTGACTTCCGTAAC
β-tubulin-R	CTCGACCTCCTTCATGGCAACCTT

The underlined regions are the complementary sequence to the primer Hygromycin-F/R or Geneticin-F/R respectively for fusion PCR. Waved lines refer to *attB1* and *attB2* for Gateway BP reaction. The dotted lines refer to restriction enzyme site of *Xba* I/*Xho* I for introducing *VdSec22* into pCAMBIA1300.

1.5 突变体菌株果胶酶与纤维素酶分泌能力分析

1.5.1 定性分析:分别取 5 μL 浓度为 1×10^6 个/mL 野生型菌株 Vd991、突变体菌株 ΔQF 和功能互补菌株 $C\Delta QF$ 的孢子点接至 1% 果胶作为唯一碳源的固体查比克盐 (NaNO_3 2 g/L, KCl 0.50 g/L, FeSO_4 0.01 g/L, KH_2PO_4 1.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.50 g/L) 平板上, 25℃ 恒温培养箱中培养 7 d 拍照, 根据菌落大小定性推测各菌株分泌果胶酶的差异。采用同样的方法推测各菌株分泌纤维素酶的差异。

1.5.2 定量分析:将上述菌株分别培养在 1% 果胶作为碳源的液体查比克盐培养基中, 7 d 后采用 DNS 法^[12]测定果胶酶酶活。具体方法如下:将 1.5 mL 浓度为 0.5% 的果胶溶液加入到 1.5 mL 待测酶液中, 50℃ 反应 0.5 h 后, 在沸水浴中加热 30 min 后冷却。取 1.5 mL 上述反应液加入含有 1.5 mL DNS 试剂的试管中, 沸水浴中加热 5 min。冷却后用分光光度计测定 540 nm 处的吸光度值。相似的方法进行纤维素酶活性测定。实验进行 3 次重复。

1.6 突变体菌株分泌总蛋白分析

1.6.1 菌株的培养与分泌总蛋白提取与定量:分别取 1×10^7 个野生型菌株 Vd991、突变体菌株 ΔQF 和功能回补菌株 $C\Delta QF$ 的孢子在 200 mL 液体查比克盐培养基中培养 12 d, 将培养液通过 0.22 μm 的滤器过滤, 得到各菌株的分泌总蛋白溶液。缓慢地加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 使 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液终浓度为 80%, 离心弃去上清液, 将蛋白沉淀溶解于 500 μL PBS 缓冲液中。考马斯亮蓝法对上述分泌总蛋白定量测定。实验进行 3 次重复。

1.6.2 分泌总蛋白诱发冀棉 11 叶片产生 H_2O_2 的过敏反应分析:将棉苗置于光照培养箱培养, 期间适量浇水。在叶片两侧用注射器轻扎数个小孔, 取 1.5 μL 总蛋白样品滴在叶片的小孔上, 培养 48 h。取下叶片, 浸没在 DAB 染液中暗处染色 8 h, 再放入无水乙醇中加热脱色直至叶片褪去叶绿素。

1.7 突变体菌株的内质网应激反应检测

将野生型菌株 Vd991 和突变体菌株 ΔQF 培养在常规培养条件下 (液体查比克盐培养基中, 150 r/min, 25℃, 12 d)。提取 RNA 并反转录后, 通过定量 PCR 检测各菌株 4 个内质网分子伴侣编码基因 (*LHS1*、*KAR2*、*SCJ1* 和 *SIL1*) 的相对表达量, 分析突变体菌株是否发生了内质网应激反应。具体操作参照试剂盒说明书。引物序列见表 1。实验进行 3 次重复。

1.8 致病性鉴定

用蘸根接种法^[13], 检测野生型菌株 Vd991、突变体菌株 ΔQF 和功能回补菌株 $C\Delta QF$ 对冀棉 11 的致病性, 并进行病情指数统计。每个菌株的致病性试验均选取 15 株棉苗, 实验进行 3 次重复。

2 结果

2.1 大丽轮枝菌 VdSec22 基因的序列分析

根据稻瘟病菌中的 MoSec22 蛋白序列, 在大丽轮枝菌 VdLs. 17 基因组数据库中进行 BLASTp 搜索, 得到大丽轮枝菌 VdLs. 17 中的一个名称为 protein transport protein sec22 的同源蛋白, Broad Institute 编号为 VDAG_08386.1。根据上述蛋白的编码基因序列, 设计了可扩增该基因全长的引物 VdSec22-F/R, 克隆了大丽轮枝菌 Vd991 中 VdSec22 基因。基因测序结果显示, 大丽轮枝菌 Vd991 中 VdSec22 基因的 DNA 序列与大丽轮枝菌 VdLs. 17 基因组数据库中的序列完全一致。该基因全长 776 bp, 含有 2 个内含子, 编码 217 个氨基酸残基。蛋白质保守功能域预测表明, 在该蛋白的 C 端有 1 个保守的 SNARE 结构域和 1 个跨膜结构域, 说明 VdSec22 蛋白是一个典型的 SNARE 型分泌途径蛋白。大丽轮枝菌 VdSec22 蛋白与稻瘟病菌 MoSec22 蛋白具有 70% 的氨基酸序列同源性, 其中 C 端的 SNARE 结构域的同源性高达 92%。

2.2 获得大丽轮枝菌突变体菌株 ΔQF 和功能回补菌株 $C\Delta QF$

PCR 扩增获得了长度分别为 1.2、1.8 和 1.2 kb 的 VdSec22 基因上游片段、潮霉素抗性基因盒和 VdSec22 基因下游片段 (图 1-B lane 1, 2, 3), 通过融合 PCR 和巢式 PCR 获得长度为 4.2 kb 的上述 3 个 DNA 片段的融合 DNA 片段 (图 1-B 中的 lane 4)。Gateway BP 连接后, 经 DNA 测序验证, 得到含有 VdSec22 基因同源重组片段的基因敲除载体 pGK02-VdSec22。

通过农杆菌介导的方法, 将 pGK02-VdSec22 的 T-DNA 导入野生型菌株 Vd991 进行遗传转化, 共得到 32 个转化子。随机挑选其中 6 个候选 VdSec22 基因敲除的转化子, 对其进行 PCR 验证。如图 1-C 所示, 以野生型菌株 Vd991 基因组作为模板, 以 Test-1/2 作为引物, 扩增出预期约 0.8 kb 的 VdSec22

基因的全长 DNA 片段(图 1-C 中的 lane 1);同样条件下以 6 个候选突变体 DNA 作为模板,以 Test-1/2 作为引物,其中 2 个(2 号和 5 号)候选突变体扩增出了 1.8 kb 的 DNA 片段(图 1-C 中的 lane 2,3)。说明这 2 个转化子中 *VdSec22* 基因 0.8 kb 的全长 DNA 片段被 1.8 kb 的潮霉素抗性基因所替代,使引物 Test-1/2 在基因组中的距离增加到 1.8 kb。以 2 号和 5 号候选突变体基因组 DNA 为模板,以 Test-3/4(设计在基因组上重组双臂外侧)作为引物,扩增出了 4.2 kb(1.2 + 1.8 + 1.2 = 4.2)的 DNA 片段(图 1-D 中的 lane 1,2);而同样条件下,以野生型菌株 Vd991 基因组作为模板,扩增出了 3.2 kb(1.2 + 0.8 + 1.2 = 3.2)的 DNA 片段(图 1-D 中的 lane 3)。进一步说明了 2 号和 5 号候选突变体中 *VdSec22* 基因 0.8 kb 的全长 DNA 片段被 1.8 kb 的潮霉素抗性基因所替代。基因表达分析显示,以野生型菌株 cDNA 作为模板,以 Test-5/6 为引物,PCR 扩增出了预期 *VdSec22* 的表达产物条带(图 1-E 中的 lane 1);

以上述 2 个候选突变体 cDNA 作为模板,相同条件下进行 PCR 实验,均无任何扩增产物产生(图 1-E 中的 lane 2,3)。因此 2 号和 5 号转化子即为 *VdSec22* 基因的缺失突变体 ΔQF ,分别命名为 ΔQF -1 和 ΔQF -2。

为进一步证明下文突变体菌株 ΔQF 相对于野生型的表型变化是由于 *VdSec22* 缺失所造成的,本研究将 *VdSec22* 重新导入 ΔQF ,构建功能回补菌株 $C\Delta QF$ 。同样的方法将功能回补载体 p- $C\Delta QF$ 转入突变体 ΔQF -1,得到 19 个转化子。以第 6 号转化子的基因组 DNA 为模板,Test-1/2 作为引物,同时扩增出了预期的 1.8 kb 潮霉素抗性基因片段和 0.8 kb 的 *VdSec22* 基因的 DNA 片段(图 1-C 中的 lane 4),说明 0.8 kb 的 *VdSec22* 被重新转入突变体 ΔQF -1。基因表达分析也显示该转化子中重新获得了 *VdSec22* 基因的表达(图 1-E 中的 lane 4)。因此 6 号转化子即为 *VdSec22* 的基因回补菌株,命名为 $C\Delta QF$ 。

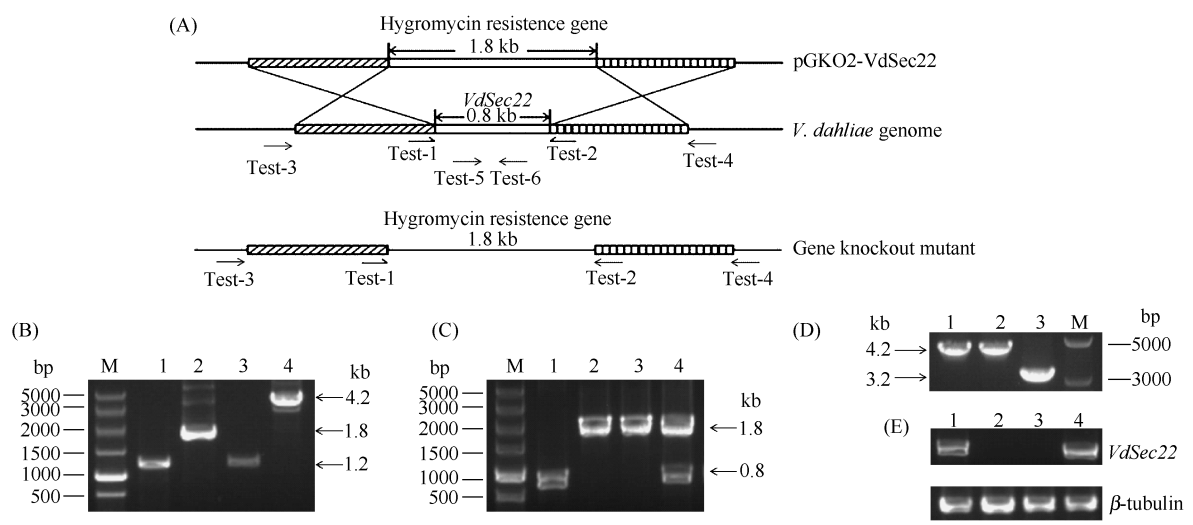


图 1. 大丽轮枝菌突变体菌株 ΔQF 和功能回补菌株 $C\Delta QF$ 的构建

Figure 1. Construction of *VdSec22* deletion mutant ΔQF and complementation strain $C\Delta QF$ of *V. dahlia*. A: Partial map of the *VdSec22* gene fragment on the wild type chromosome and the deletion plasmid. The 0.8 kb ORF of target gene was replaced by the 1.8 kb hygromycin resistance gene through homologous recombination between the genomic DNA and the deletion plasmid. B: Electrophoresis pattern of the construction of gene replacement plasmid pGKO2-*VdSec22*. C-E: Characterization of the *VdSec22* deletion mutant and complementation strain $C\Delta QF$ by PCR and RT-PCR.

2.3 突变体 ΔQF 分泌果胶酶和纤维素酶的能力减弱

定性分析显示,突变体 ΔQF -1 和 ΔQF -2 在果胶培养基上的菌落直径明显小于野生型菌株 Vd991,提示突变体 ΔQF 分泌果胶酶的能力减弱。为进一

步确认上述推断,进行了酶活测定的定量分析。结果显示,突变体菌株 ΔQF -1 和 ΔQF -2 果胶酶活性仅有野生型菌株 Vd991 的 36% 和 39% (图 2-C)。功能互补菌株 $C\Delta QF$ 可弥补突变体菌株的上述缺陷。因此,说明突变体 ΔQF 分泌果胶酶

的能力减弱, *VdSec22* 基因参与了大丽轮枝菌果胶酶的分泌。

由于大丽轮枝菌在羧甲基纤维素培养基上不能形成白色致密的菌落, 所拍摄照片不能清晰显示菌落大小, 因此对培养后的平板用刚果红染色。刚果红能与平板上的羧甲基纤维素结合, 形成红色复合物; 当羧甲基纤维素被菌株产生的纤维素酶分解后, 培养基中会出现透明圈, 该透明圈的直径即为菌落直径。结果显示, 突变体 ΔQF -1 和 ΔQF -2 在纤维素培养基上的菌落直径(图 2-B 以白色圆圈显示)明显小于野生型菌株 *Vd991*。提示突变体 ΔQF 分泌纤维素酶的能力减弱。DNS 法测定的纤维素酶酶活显示, 突变体菌株 ΔQF -1 和 ΔQF -2 纤维素酶活性仅有野生型菌株 *Vd991* 的 40% 和 45% (图 2-D)。功能互补菌株 *CΔQF* 可弥补突变体菌株的上述缺陷。因此, 说明突变体 ΔQF 分泌纤维素酶的能力减弱, *VdSec22* 基因参与了大丽轮枝菌纤维素酶的分泌。

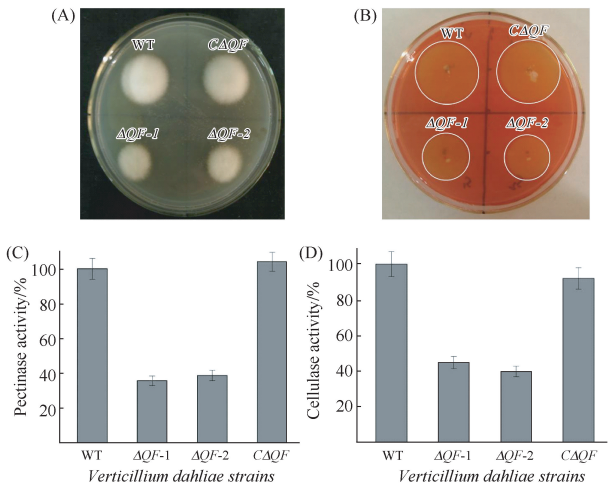


图 2. *VdSec22* 的缺失对果胶酶与纤维素酶分泌能力的影响

Figure 2. Pectinase and cellulase production ability in *VdSec22* deletion background. A-B: Colony appearance of wild type, mutant strains of ΔQF and complementation strain *CΔQF* on media supplemented with pectin and cellulose. C-D: Relative enzymatic activities (%) in the *VdSec22* deletion mutant and complementation strain *CΔQF* compared with those of the wild type. Error bars indicate standard errors calculated from three replicates.

2.4 突变体菌株 ΔQF 分泌总蛋白的能力减弱

野生型菌株 *Vd991* 分泌总蛋白浓度为 10.2 $\mu\text{g/mL}$, 而突变体菌株 ΔQF -1 和 ΔQF -2 的分泌总蛋

白浓度明显下降, 分别仅有 3.63 $\mu\text{g/mL}$ 和 3.31 $\mu\text{g/mL}$ (如图 3-A), 功能互补菌株 *CΔQF* 的分泌总蛋白浓度为 9.29 $\mu\text{g/mL}$, 与野生型菌株相似。上述实验说明了 *VdSec22* 基因的丧失造成了大丽轮枝菌分泌蛋白总量下降。

2.5 突变体菌株 ΔQF 分泌总蛋白毒力减弱

已经有报道证明, 大丽轮枝菌的分泌蛋白在侵染寄主叶片使其萎焉的过程中, 可诱发叶片产生过敏反应, 在这一过程中, 叶片细胞周围 H_2O_2 浓度剧增。上述叶片经二氨基联苯胺 (DAB) 染色, 脱去叶绿素后, 可以观察到 DAB 在 H_2O_2 产生和积累处形成褐色斑点^[14]。本研究运用上述模型检测 *VdSec22* 基因的缺失是否影响菌株的分泌蛋白侵染棉花叶片的能力。结果显示, 棉花叶片经 ΔQF -1 和 ΔQF -2 的分泌蛋白处理后, 所产生的褐色斑点远小于用野生型菌株 *Vd991* 和功能回补菌株 *CΔQF* 的分泌蛋白处理后所产生的褐色斑点(图 3-B)。说明突变体菌株 ΔQF 的分泌蛋白诱导棉花叶片产生 H_2O_2 的能力下降, 推测突变体菌株 ΔQF 的分泌蛋白侵染棉花叶片能力减弱, *VdSec22* 基因参与了大丽轮枝菌某些毒素蛋白的分泌。

2.6 *VdSec22* 基因的缺失造成菌株细胞产生内质网 (Endoplasmic reticulum, ER) 应激反应

蛋白的分泌受阻会导致大量蛋白积攒在内质网中, 从而引发内质网应激反应。其表现为细胞会过量表达内质网中分子伴侣的编码基因, 以促进内质网中过量的蛋白的折叠。因此内质网应激反应模型可提供分泌蛋白是否积累在内质网中的分子生物学证据^[15]。采用该模型分析后, 结果显示在突变体 ΔQF -1 中, 4 个内质网分子伴侣蛋白 (Hsp70 家族蛋白 LHS1 和 KAR2、Hsp40 家族蛋白 SCJ1 和核苷酸交换因子 SIL1) 编码基因的表达量较野生型菌株明显提高, 其中以 Hsp70 家族蛋白基因 *LHS1* 和 *KAR2* 的表达量升高尤为明显, 分别较野生型菌株提高了 5.2 和 4.7 倍(图 4)。突变体 ΔQF -2 的上述基因表达量亦发生了相似水平的提高; 功能回补菌株 *CΔQF* 的相应基因的表达量又恢复到野生型菌株水平(结果未显示)。 *VdSec22* 基因的缺失使大丽轮枝菌细胞在常规的培养条件下即产生了内质网应激反应, 说明突变体菌株 ΔQF 中某些由 *VdSec22* 介导分泌的蛋白无法顺利地由内质网运输到高尔基体, 从而积累在内质网中。

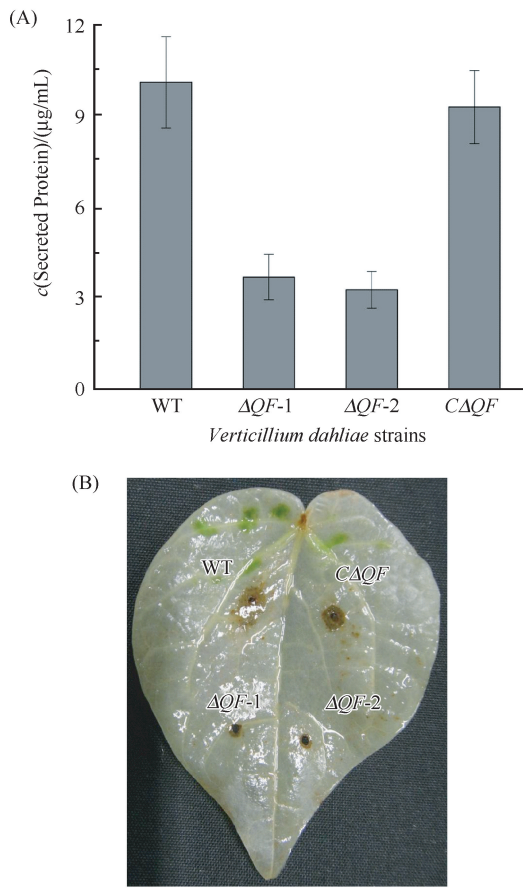


图 3. 缺失 *VdSec22* 使菌株分泌总蛋白的能力减弱
Figure 3. Deletion of *VdSec22* impaired phytotoxic protein secretion ability. A: Concentration of phytotoxic protein of Vd991, ΔQF and $C\Delta QF$ strains. Error bars indicate standard errors calculated from three replicates. B: H_2O_2 production of cotton leaves induced by phytotoxic protein of Vd991, ΔQF and $C\Delta QF$ strains.

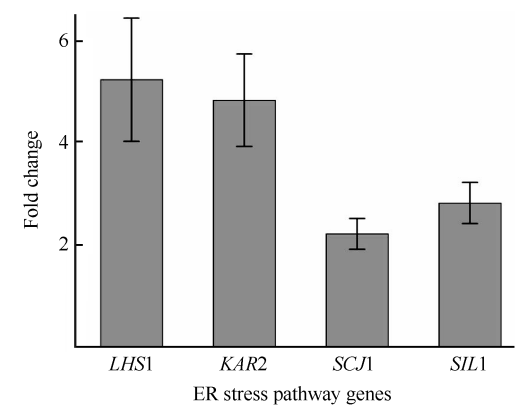


图 4. 突变体 ΔQF 中内质网应激反应相关基因的表达量
Figure 4. Expression profiles of genes involved in ER stress pathway in the ΔQF background. Error bars indicate standard errors calculated from three replicates.

2.7 突变体 ΔQF 对棉株的致病性明显减弱

致病性实验表明,接种野生型 Vd991 的棉株表现出典型的叶片萎蔫、褪绿、坏死和植株株高变矮的黄萎病发病症状(图 5-B),在第 3 周病情指数达到 51.4 ± 7.7 ;而接种突变体菌株 ΔQF -1 和 ΔQF -2 的棉株仅显示出轻微的发病症状,病情指数分别为 28.7 ± 3.6 和 26.3 ± 4.2 (图 5-C、D)。接种功能互补菌株 $C\Delta QF$ 的棉株病情指数为 53.6 ± 6.8 ,与野生型菌株相似(图 5-E)。上述结果说明,*VdSec22* 基因参与了大丽轮枝菌的致病性。

3 讨论

Sec22 蛋白是酵母中一个 SNARE 类膜泡运输蛋白,负责分泌蛋白从内质网到高尔基体的膜泡转运^[9]。在植物病原性真菌的模式菌株稻瘟病菌中,其同源蛋白 *MoSec22* 在稻瘟病菌胞外蛋白过氧化物酶和漆酶的分泌中起重要作用,且该蛋白是致病性所必需的^[10]。由于 *Sec22* 蛋白在真菌中的功能高度保守^[9],本文研究了大丽轮枝菌 Vd991 中 *Sec22* 同源蛋白的编码基因 *VdSec22*,通过实验表明 *VdSec22* 参与了大丽轮枝菌诸多胞外致病蛋白的分泌和菌株对棉花的致病性。主要有以下 3 方面证据:

第一,突变体 ΔQF 菌株分泌胞外果胶酶和纤维素酶的能力减弱。果胶和纤维素是大丽轮枝菌寄主植物细胞壁的主要组成成分,突变体菌株 ΔQF 产生果胶酶和纤维素酶的能力减弱可能会造成大丽轮枝菌突破寄主植物细胞壁的困难,从而无法进行有效的侵染。

第二,突变体菌株 ΔQF 分泌某些毒素蛋白能力的减弱。大丽轮枝菌基因组中含有大量潜在的病原菌-寄主互作蛋白、*RxLx* [EDQ] 类效应蛋白和富含半胱氨酸的小分子量蛋白等毒素蛋白编码基因^[4]。因此,突变体菌株 ΔQF 分泌毒素蛋白能力的减弱可能是其致病性下降的另一原因。另外,如采用质谱技术对野生型菌株和突变体菌株 ΔQF 分泌蛋白进行比较分析,找出两者差异的蛋白斑点,也可作为筛选大丽轮枝菌毒性分泌蛋白提供新思路。

第三,缺失 *VdSec22* 使突变体菌株在常规的培养条件下即产生了内质网应激反应。该模型提供了分泌蛋白积累在突变体菌株的内质网中,无法顺利分泌到胞外的分子生物学证据。

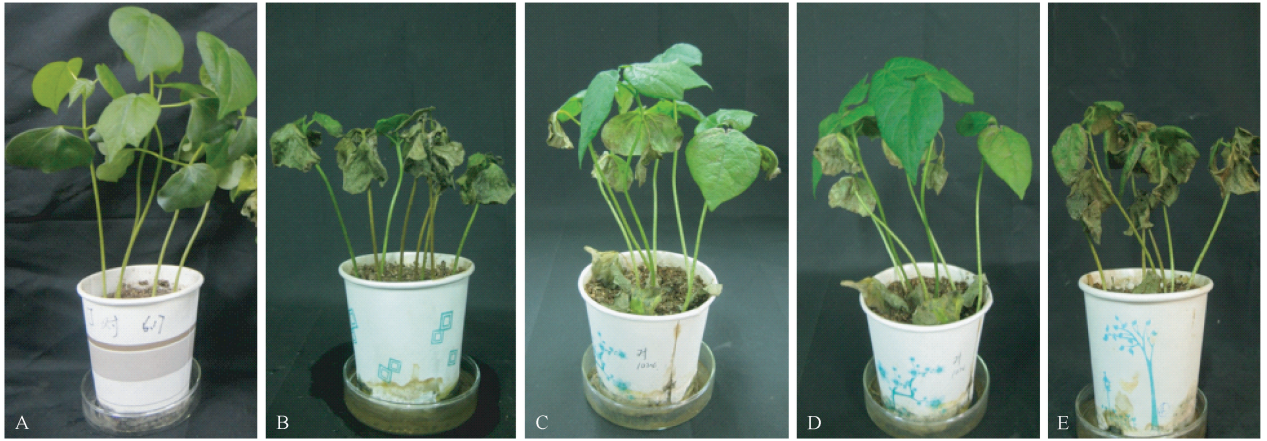


图5. 菌株 Vd991、 ΔQF 和 $C\Delta QF$ 对冀棉 11 致病性

Figure 5. Virulence of the Vd991, ΔQF and $C\Delta QF$ strains to the susceptible cotton Jimian11. A: H_2O ; B: Vd991; C: ΔQF -1; D: ΔQF -2; E: $C\Delta QF$.

大丽轮枝菌可产生成分复杂的分泌蛋白。这些蛋白可能协同发挥作用,共同构成了大丽轮枝菌的致病性。所以,从防治棉花黄萎病的角度来看,很难将单一的分泌蛋白作为防治该病的生物学靶点。本研究发现大丽轮枝菌分泌途径蛋白 VdSec22 对多种致病相关蛋白的分泌都会产生影响,因此分泌途径蛋白 VdSec22 可作为一个潜在的生物防治的靶点,抑制其功能可能提供一种防治棉花黄萎病的潜在手段。

参考文献

- [1] Fradin EF, Thomma BP. Physiology and molecular aspects of *Verticillium* wilt diseases caused by *V. dahliae* and *V. albo-atrum*. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7(2): 71-86.
- [2] Klosterman SJ, Atallah ZK, Vallad GE, Subbarao KV. Diversity, pathogenicity and management of *Verticillium* species. *Annual Review of Phytopathology*, 2009, 47(9): 39-62.
- [3] Klosterman SJ, Subbarao KV, Kang S, Veronese P, Gold SE, Thomma BP, Chen Z, Henrissat B, Lee YH, Park J, Garcia-Pedrajas MD, Barbara DJ, Anchieta A, de Jonge R, Santhanam P, Maruthachalam K, Atallah Z, Amyotte SG, Paz Z, Inderbitzin P, Hayes RJ, Heiman DI, Young S, Zeng Q, Engels R, Galagan J, Cuomo CA, Dobinson KF, Ma LJ. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS Pathogen*, 2011, 7(7): e1002137.
- [4] Tian L, Chen J, Chen X, Wang J, Dai X. Prediction and analysis of *Verticillium dahliae* VdLs.17 secretome. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(15): 3142-3153.

(in Chinese)

田李, 陈捷胤, 陈相永, 汪佳妮, 戴小枫. 大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae* VdLs.17)分泌组预测及分析. *中国农业科学*, 2011, 44(15): 3142-3153.

- [5] Wang B, Yang X, Zeng H, Liu H, Zhou T, Tan B, Yuan J, Guo L, Qiu D. The purification and characterization of a novel hypersensitive-like response-inducing elicitor from *Verticillium dahliae* that induces resistance responses in tobacco. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(6): 191-201.
- [6] Zhou B, Jia P, Gao F, Guo H. Molecular characterization and functional analysis of a necrosis- and ethylene-inducing, protein-encoding gene family from *Verticillium dahliae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25(7): 964-975.
- [7] de Jonge R, van Esse HP, Maruthachalam K, Bolton MD, Santhanam P, Saber MK, Zhang Z, Usami T, Lievens B, Subbarao KV, Thomma BP. Tomato immune receptor Ve1 recognizes effector of multiple fungal pathogens uncovered by genome and RNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(13): 5110-5115.
- [8] Liu SY, Chen JY, Wang JL, Li L, Xiao HL, Adam SM, Dai XF. Molecular characterization and functional analysis of a specific secreted protein from highly virulent defoliating *Verticillium dahliae*. *Gene*, 2013, 529(2): 307-316.
- [9] Yang X, Ben S, Sun Y, Fan X, Tian C, Wang Y. Genome-wide identification, phylogeny and expression profile of vesicle fusion components in *Verticillium dahliae*. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68681.

- [10] Song W, Dou X, Qi Z, Wang Q, Zhang X, Zhang H, Guo M, Dong S, Zhang Z, Wang P, Zheng X. R-SNARE homolog MoSec22 is required for conidiogenesis, cell wall integrity, and pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13193.
- [11] Tian L, Chen J, Wang J, Wang J, Dai X. High efficient gene knockout in *Verticillium dahliae*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(7): 906-913. (in Chinese)
田李, 陈捷胤, 汪佳妮, 王金龙, 戴小枫. 高效大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 基因敲除体系的构建. 微生物学报, 2011, 51(7): 906-913.
- [12] Yi M, Chi MH, Khang CH, Park SY, Kang S, Valent B, Lee YH. The ER chaperone LHS1 is involved in asexual development and rice infection by the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell*, 2009, 21(2): 681-695.
- [13] Tzima A, Paplomatas EJ, Rauiyaree P, Kang S. Roles of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase A in virulence and development of the soilborne plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(5): 406-415.
- [14] Jia Z, Yuan H, Li Y. NO and H₂O₂ induced by *Verticillium dahliae* toxins and its influence on the expression of *GST* gene in cotton suspension cells. *Chinese Science Bulletin*, 2007, 52(10): 1347-1354.
- [15] Guillemette T, Calmes B, Simoneau P. Impact of the UPR on the virulence of the plant fungal pathogen *A. brassicicola*. *Virulence*, 2014, 5(2): 357-364.

Vesicular transport protein VdSec22 is involved in secretion of extracellular protein and pathogenicity in *Verticillium dahliae*

Li Tian¹, Rongqi Xu^{2*}, Zhuanbin Wang¹, Na Liu¹, Fengjuan Feng¹, Zhicai Qu¹

¹College of Life Science, Qufu Normal University, Qufu 273165, Shandong Province, China

²Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China

Abstract: [Objective] The aim of this study was to characterize VdSec22 of *Verticillium dahliae*, which is an intracellular vesicle fusion protein involved in fungal secretory pathway, and to provide a potential gene target for controlling *Verticillium* wilt disease. [Methods] VdSec22 deletion mutant ΔQF and functional complementation strain $C\Delta QF$ by reintroducing the VdSec22 into ΔQF were constructed. Secretion ability of extracellular protein (including pectinase, cellulose, and phytotoxin protein) and pathogenicity of ΔQF and $C\Delta QF$ were studied compared with that of wild type strain Vd991. Expression level of ER molecular chaperones by quantitative PCR was also performed to infer whether ER stress was induced in ΔQF . [Results] We successfully constructed VdSec22 deletion mutant strain ΔQF and functional complementation strain $C\Delta QF$. VdSec22 deficiencies did disturb secretion ability of extracellular protein such as pectinase, cellulose, and phytotoxin protein. Pathogenicity of ΔQF was dramatically reduce accordingly. We also found loss of VdSec22 resulted in ER stress in *V. dahliae* cells. Reintroducing functional VdSec22 into ΔQF can compensate for the deficiencies mentioned above. [Conclusion] VdSec22 is an important secretion pathway protein involved in secretion of extracellular protein and pathogenicity in *V. dahliae*. VdSec22 provides a potential gene target for controlling the devastating disease.

Keywords: *Verticillium dahliae*, secretory protein, secretion pathway, gene knockout

(本文责编:王晋芳,李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31170080), by the China Postdoctoral Science Foundation (2014T70621) and by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2013CQ018)

* Corresponding author. Tel: +86-10-82106402; E-mail: qirongxu@sohu.com

Received: 24 November 2014/Revised: 23 January 2015