

研究报告

Research Report

草莓果生刺盘孢菌候选效应子基因 *CfE15* 对孢子产量的影响

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

1 上海市农业科学院林木果树研究所, 上海, 201403; 2 上海市设施园艺技术重点实验室, 上海, 201403

* 通信作者, zhangxueying@saas.sh.cn

摘要 草莓炭疽病是由炭疽菌引起的草莓生产中重要的真菌病害之一。果生炭疽菌为华东地区草莓炭疽病菌的优势种。效应子在真菌与植物互作中发挥重要作用, 其致病机制是目前研究的热点。团队前期结合转录组学结果对草莓果生炭疽菌的效应蛋白进行了预测, 其中一个在侵染过程中上调表达的编码候选效应蛋白的基因被命名为 *CfE15*。该基因编码一个小分子量富含半胱氨酸的分泌蛋白。生物信息学分析结果表明, 该基因编码一条含有 109 个氨基酸, 分子量约为 11.6 kD, 等电点 pI 为 4.45 的多肽。N 端含有一段 24 个氨基酸的信号肽序列。构建了 *CfE15* 的敲除载体 pKH-*CfE15* 和互补载体 pKN-*CfE15*, 并通过 PEG 介导的原生质体转化法获得 *CfE15* 基因的突变菌株 $\Delta CfE15$ 和互补菌株 $\Delta CfE15C$ 。野生型菌株、突变菌株 $\Delta CfE15$ 和互补菌株 $\Delta CfE15C$ 在菌落直径及孢子形态无显著差异, 但 *CfE15* 的缺失导致产孢量降低, 互补菌株 $\Delta CfE15C$ 的孢子产量与野生型菌株无显著差异。本研究结果为阐明果生炭疽菌的致病机理, 深入解析果生炭疽菌与草莓互作提供了一定理论依据。

关键词 果生炭疽菌; 效应子; *CfE15* 基因; 产孢量

The Effect of Effector Gene *CfE15* on Conidia Production of *Colletotrichum fructicola* in Strawberry

Zhang Liqing^{1,2} Yu Yongting^{1,2} Fang Xianping^{1,2} Li Shuigen^{1,2} Zhang Xueying^{1,2*}

1 Forest & Fruit Research Institute, Shanghai Academy of Agriculture Science, Shanghai, 201403; 2 Shanghai Key Laboratory of Protected Horticultural Technology, Shanghai, 201403

* Corresponding author, zhangxueying@saas.sh.cn

DOI: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0018

Abstract Strawberry anthracnose, caused by *Colletotrichum* species, is one of the most serious diseases of strawberry production worldwide. *C. fructicola* was the dominant species of strawberry anthracnose in East China. Effectors play important roles in the interaction between fungus and plants, and the pathogenicity mechanism of effectors is a research hotspot. In our previous studies, the effectors of *C. fructicola* were predicted based on the results of transcriptome. One candidate effector named as *CfE15*, which was significantly up-regulated in strawberry infected by *C. fructicola*, was chosen for further study. *CfE15* encodes a small secreted cysteine-rich protein. Bioinformatics analysis showed that *CfE15* encodes a 109-amino-acid (aa) polypeptide with the molecular mass of 11.6 kD and isoelectric point of 4.45. The N-terminal of *CfE15* protein contains a 24-aa signal peptide sequence. The secondary structure of *CfE15* was mainly composed of α -helix (3%), β strands

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2021 年 5 月 7 日; 接受日期: 2021 年 5 月 7 日; 发表日期: 2021 年 5 月 14 日

引用格式: 张丽勍, 余永婷, 方献平, 李水根, 张学英, 2021, 草莓果生刺盘孢菌候选效应子基因 *CfE15* 对孢子产量的影响, 分子植物育种(网络版), 19(18): 1-7 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0018) (Zhang L.Q., Yu Y.T., Fang X.P., Li S.G., and Zhang X.Y., 2021, The Effect of Effector Gene *CfE15* on Conidia Production of *Colletotrichum fructicola* in Strawberry, *Fengzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding (online)), 19(18): 1-7 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0018))

(33%), extended strands (17.43%), β -turns (7.34%) and random coils (66.97%). *CfE15* gene knockout vector pKH-*CfE15* and complementary vector pKN-*CfE15* were constructed. The gene deletion and complementary strains, Δ *CfE15* and Δ *CfE15C*, respectively, were obtained by PEG mediated protoplast transformation and homologous recombination. No significant differences were observed in mycelial growth, morphology and conidia morphology among wild type (WT), Δ *CfE15* and Δ *CfE15C* strains. The amount of conidia production of Δ *CfE15* strain was significantly lower than that of WT and Δ *CfE15C* strain, and there was no difference between the wild type and Δ *CfE15C*. Our results provide a theoretical basis for elucidating the pathogenicity mechanism of *C. fructicola* and the interaction between *C. fructicola* and strawberry.

Keywords *Colletotrichum fructicola*; Effectors; *CfE15* gene; Conidial production

草莓(*Fragaria x ananasa* Duch.)属蔷薇科(Rosaceae), 多年生草本植物, 为中国传统的优秀果品之一。中国已经成为世界上最大的草莓生产国和出口国之一。2016年, 全球草莓产量为920万吨, 其中中国占41%。然而, 随着草莓产业的发展, 草莓病害有逐年上升趋势, 尤其以草莓炭疽病为代表的草莓主要病害, 危害严重的年份直接导致减产50~80% (Xie et al., 2010), 甚至绝产。

“草莓炭疽病”指所有炭疽菌属(*Colletotrichum* spp.)真菌引起的草莓病害。以往报道草莓炭疽病的炭疽菌属真菌主要为: 尖孢炭疽菌(*C. acutatum*)、胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)和草莓炭疽菌(*C. fragariae*) (Denoyes-Rothan et al., 2003)。后经多基因序列分析和形态学鉴定, *C. acutatum* 和 *C. gloeosporioides* 已被定义为复合种, 分别包含36和38个菌种(Damm et al., 2012; Weir et al., 2012; Marin-Felix et al., 2017)。草莓炭疽菌(*C. fragariae*)更名为 *C. theobromicola*, 属于 *C. gloeosporioides* 复合种(Denoyes-Rothan et al., 2003)。其中, 果生炭疽菌 *C. fructicola* (属 *C. gloeosporioides* 复合种)为华东地区草莓炭疽病菌的优势种(Zhang et al., 2020)。

效应子是由病原菌分泌的一类外泌型蛋白分子, 一方面促进病原菌的成功侵染、另一方面诱导寄主的防卫反应(Kamoun, 2007)。目前已经对一些效应子的功能进行了深入地研究。如玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)效应子CMU1, 能够催化寄主的莽草酸途径中分支酸变换为预苯酸, 从而干扰水杨酸的合成。许多病原真菌会分泌具有LysM(赖氨酸基序)结构域的效应子, 以保护真菌细胞壁免受植物的几丁质酶作用或隔离释放的壳寡糖, 从而避免被植物的防御系统识别(Liu et al., 2019), 如稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)效应子SLP1和番茄叶霉菌(*Cladosporium fulvum*)效应子ECP6和AVR4 (de Jonge et al., 2010; Mentlak et al., 2012)。

在已知的炭疽菌属真菌基因组中, 果生炭疽菌编码数量最多的候选效应子基因。有关果生炭疽菌效应子的功能研究还相对较少。目前报道的效应子*CfEC92*对果生炭疽菌的致病力有影响, 在侵染早期作为植物免疫抑制剂起作用(Shang et al., 2020)。到目前为止, 大多数真菌效应蛋白的大小相对较小(通常小于200个氨基酸), 并且含有较高的半胱氨酸(cysteine, Cys)残基百分比(2~20%), 由此可见这类小分子量富含半胱氨酸的分泌蛋白(small secreted cysteine-rich proteins, SSCP)是真菌效应子的重要组成部分(Lu and Edwards, 2016)。

前期研究中通过转录组测序, 发现了一个在侵染过程中上调表达的具有SSCP特征的效应子候选基因*CfE15*, 该效应子的同源基因在其他炭疽菌中尚未见报道, 本研究对*CfE15*进行了克隆及生物信息学分析, 采用同源重组和原生质体转化, 获得了*CfE15*的基因缺失突变菌株和互补菌株, 并对野生型菌株、*CfE15*的基因缺失突变菌株和互补菌株的基本生长情况及孢子形态和产量进行了分析。本研究结果为进一步分析该候选效应子的生物学功能提供一定基础。

1 结果与分析

1.1 果生炭疽菌 *CfE15* 基因的克隆和生物信息学分析

以果生炭疽菌cDNA为模板, 扩增得到*CfE15*全长CDS(图1A), 与理论分子量一致(330 bp)。*CfE15*基因编码总长109个氨基酸(aa), 分子量约11.6 kD, 等电点pI为4.45的多肽, 且该蛋白不含任何已知的蛋白结构域(表1)。利用Signal P 4.0 Server对*CfE15*的信号肽分析表明*CfE15*蛋白N端含有一段24个aa的信号肽序列, 其24位的丙氨酸(A)和25位的丝氨酸(S)之间存在一个剪切位点(图1B)。二级结构预

测结果 (图 1C) 表明, 主要由 α -螺旋 (3%)、 β 股 (33%)、延伸链 (17.43%)、 β -转角 (7.34%) 及无规则卷曲 (66.97%) 组成该蛋白的二级结构。利用 NetNGly1.0 和 NetPhos 3.1 进行蛋白质的 N-糖基化和 N-磷酸化预测, 发现 *CfE15* 蛋白含有一个糖基化位点 (图 1D), 且存在磷酸化位点, 共包括 4 个丝氨酸、2 个苏氨酸和 1 个酪氨酸存在磷酸化活性位点 (图 1E)。

1.2 果生炭疽菌 *CfE15* 基因敲除载体的构建

参照果生炭疽菌 (*C. fructicola*) Nara gc5 菌株全基因组序列 (GenBank 登录号: ASM31963v2) 的基因组为模板, 根据同源重组的原理 (图 2A), 利用 *CfE15* 基因的上、下游同源臂序列左臂引物 E15UF/UR 和右臂引物 E15DF/DR 分别进行扩增, 得到左臂片段 850 bp 和右臂片段 874 bp (图 2B)。通过 USER 酶将基因左臂序列、右臂序列连接到酶切处理后的 pKH-CfE15 载体后送样测序, 结果与预测序列一致, 从而获得 *CfE15* 基因敲除载体。

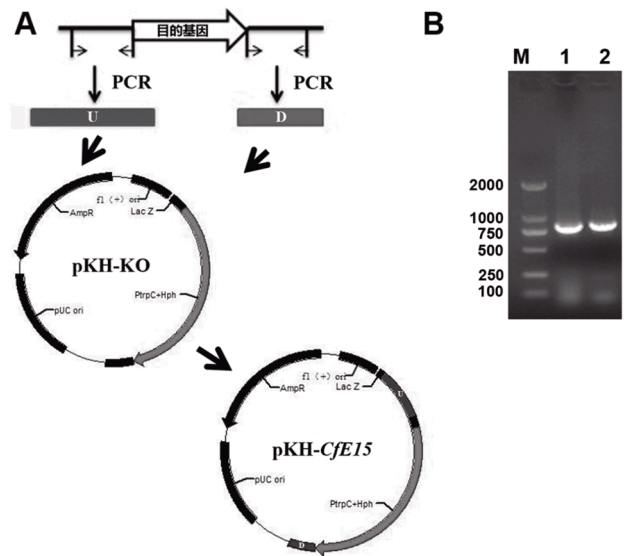


图 2 *CfE15* 基因敲除载体的构建及 *CfE15* 基因上下游同源臂序列的 PCR 扩增

注: A: *CfE15* 基因敲除载体构建模式图; B: *CfE15* 基因上下游同源臂序列的 PCR 扩增; M: DS2000 Marker; 泳道 1: *CfE15* 基因上游同源臂序列 PCR 扩增; 泳道 2: *CfE15* 基因下游同源臂序列 PCR 扩增

Figure 2 Construction of *CfE15* gene knockout vector and amplification of *CfE15* gene upstream sequence and downstream sequence

Note: A: Schematic of construction of *CfE15* gene knockout vector; B: Amplification of *CfE15* upstream sequence and downstream sequence; M: DS2000 Marker; lane 1: PCR amplification of *CfE15* gene upstream sequence; lane 2: PCR amplification of *CfE15* gene downstream sequence

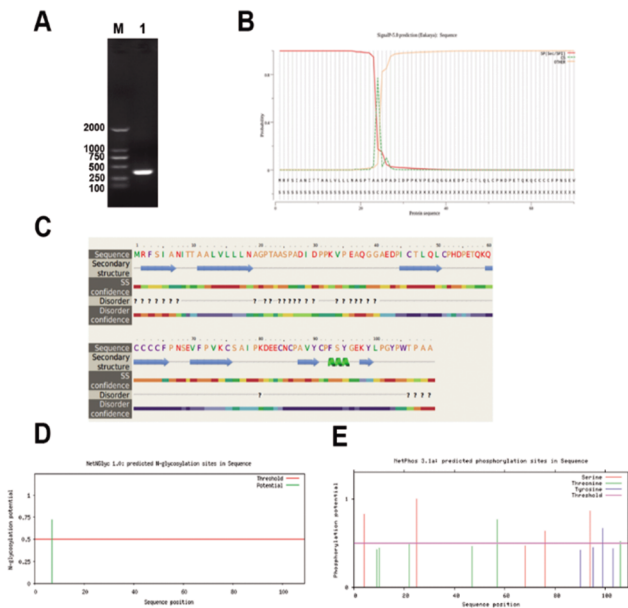


图 1 *CfE15* 基因的克隆和生物信息学分析

注: A: *CfE15* 基因 PCR 扩增片段; M: DS2000 Marker; 泳道 1 以野生型菌株 cDNA 为模板; B: *CfE15* 蛋白信号肽分析; C: *CfE15* 蛋白二级结构预测; D: *CfE15* 蛋白糖基化位点预测; E: *CfE15* 蛋白 N-磷酸化位点预测

Figure 1 Molecular cloning and bioinformatics analysis of *CfE15* gene

Note: A: PCR amplification of *CfE15* gene, M: DS2000 Marker; The cDNA of WT strain was used as a template in lane 1; B: Signal peptide analysis of *CfE15* protein; C: Secondary structure prediction of *CfE15* 2; D: NetNGly1.0 predicted N-glycosylation of *CfE15*; E: NetPhos 3.1 predicted phosphorylation sites of *CfE15*

1.3 *CfE15* 基因缺失突变株的筛选与鉴定

敲除载体 pKH-CfE15 经过 Kpn I 线性化后, 通过原生质体转化法转化至野生型菌株的原生质体中, 利用同源重组的原理分别将野生型菌株中的 *CfE15* 基因替换成潮霉素基因 *Hph*。通过向培养基中添加潮霉素选出潮霉素抗性转化子并利用基因特异的引物来检测目的基因是否被敲除 (*CfE15F/CfE15R*, *E15UF/E15DR*, *H850/H852*) (图 3)。

1.4 *CfE15* 基因互补载体的构建与鉴定

以果生炭疽菌基因组 DNA 为模板, 利用特异性引物 *E15F+*/*E15R+* 扩增 *CfE15* 全长及其启动子和终止子序列, 连接到 pKN 载体的 Kpn I/BamHI 位点上, 获得 *CfE15* 基因的互补载体 (图 4A), 电泳检测结果表明扩增的产物条带单一, 序列长度 2 991 bp (图 4B), 测序验证正确。选取 Δ *CfE15* 为回复对象, 通过 pKN-CfE15C 互补载体进行原生质体转化, 并向培养

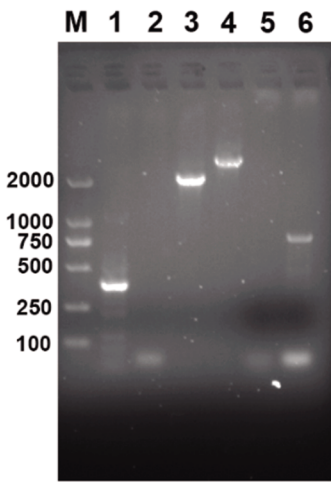


图3 *CfE15* 基因突变菌株的 PCR 鉴定
注: M: DS2000 Marker; 泳道 1, 3, 5 分别以野生型菌株为模板; 泳道 2, 4, 6 分别以 $\Delta CfE15$ 为模板; 泳道 1, 2 为引物 CfE15F/CfE15R 扩增 PCR 产物; 泳道 3, 4 为引物 E15UF/E15DR 扩增 PCR 产物; 泳道 5, 6 为引物 H850/H852 扩增 PCR 产物。

Figure 3 PCR detection of $\Delta CfE15$

Note: M: DS2000 Marker; The genomic DNA of wild type strain were used for PCR detection in lane 1, 3, 5; The genomic DNA of $\Delta CfE15$ strain were used for PCR detection in lane 2, 4, 6; lane 1, 2: PCR products were amplified using primers CfE15F/CfE15R; Lane 3, 4: PCR products were amplified using primers E15UF/E15DR; Lane 5, 6: PCR products were amplified using primers H850/H852

基中添加遗传霉素(G418)选出具有遗传霉素抗性的转化子, 利用特异的引物(CfE15F/CfE15R)对其进行 PCR 验证(图 4C), 确定获得 CfE15 基因的互补菌株。

1.5 野生型菌株、*CfE15* 突变菌株及互补菌株基本生长情况的测定

菌落培养生长 7 d 后 (图 5A), $\Delta CfE15$ 的菌落直径与野生型菌株和互补菌株 $\Delta CfE15C$ 相比无显著差异, 总体上生长情况比较一致(图 5B)。

1.6 孢子形态和产孢能力分析

野生型菌株、 $\Delta CfE15$ 以及互补菌株 $\Delta CfE15C$ 在孢子形态方面无显著差异(图 6A)。为了明确 $\Delta CfE15$ 对分生孢子产孢能力的影响, 对果生炭疽菌野生型菌株、 $\Delta CfE15$ 和互补菌株 $\Delta CfE15C$ 进行产孢量测定, 结果发现 $\Delta CfE15$ 的孢子产量明显低于野生型菌株和互补菌株 $\Delta CfE15C$ 的孢子产量($P < 0.05$) (图 6B)。由此推测, *CfE15* 基因在调节果生炭疽菌分生孢子的产量中发挥重要作用。

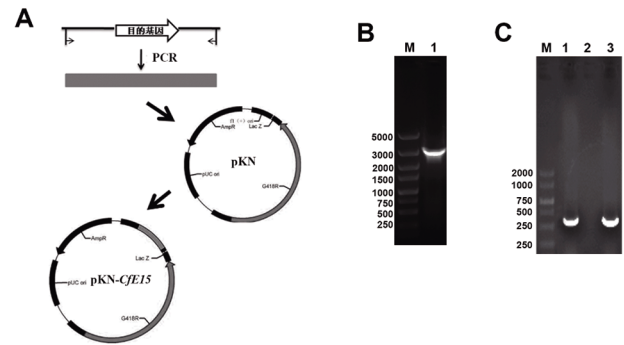


图4 *CfE15* 基因互补载体和互补菌株的 PCR 鉴定

注: A: *CfE15* 基因互补载体构建模式图; B: *CfE15* 基因 (含启动子和终止子序列) 扩增; M: DL5000 Marker; C: *CfE15* 基因互补菌株的 PCR 验证; M: DS 2000 Marker; 泳道 1 以野生型菌株为模板; 泳道 2 以 $\Delta CfE15$ 为模板, 泳道 3 以 $\Delta CfE15C$ 为模板, 分别用引物 CfE15F/R 扩增 PCR 产物

Figure 4 PCR identification of *CfE15* complementary vector and strain

Note: A: Schematic of construction of *CfE15* gene complementary vector; B: Amplification of *CfE15* gene (including promoter and terminator of *CfE15* sequence); M: DL5000 marker; C: PCR detection of *CfE15* complementary strain; M: DS2000 marker; The genomic DNA of wild type strain were used for PCR detection in lane 1; The genomic DNA of $\Delta CfE15$ strain were used for PCR detection in lane 2; The genomic DNA of *CfE15* complementary strain in lane 3. All the PCR products were amplified using primers CfE15F/CfE15R

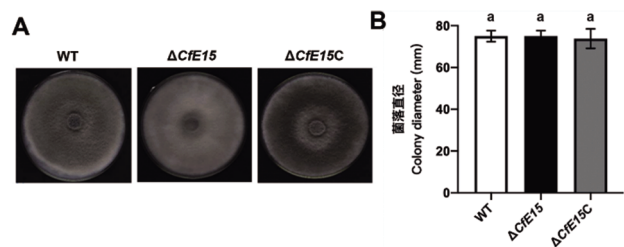


图5 野生型菌株、*CfE15* 突变菌株及互补菌株的基本生长情况
注: A: PDA 培养基上的生长情况; B: 菌落直径比较, 误差线表示标准偏差; 相同字母表示在 $P = 0.05$ 时, 无显著差异

Figure 5 Growing states of the WT strain, *CfE15* gene deletion strains and complementary strains

Note: A: Growing states on PDA; B: Colony diameter comparison. Error bars indicated standard deviation. Values on the bars followed by the same letter are not significantly different at $P = 0.05$

2 讨论

近十年来, 植物病原真菌产生的具有 SSCP 特征的效应子成为了研究的热点。在子囊菌纲的一些真菌中, 已经证明了此类效应子在调控真菌致病性及寄

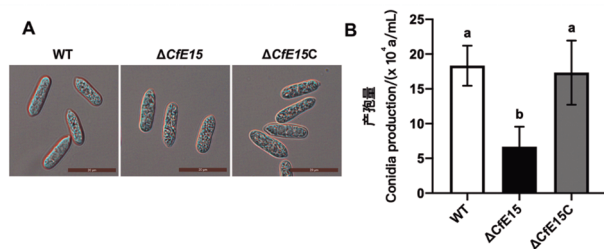


图6 野生型菌株、*CfE15* 突变菌株及互补菌株的孢子形态和产量分析

注: A: 野生型菌株, $\Delta CfE15$ 和 $\Delta CfE15C$ 孢子形态观察; B: 野生型菌株, $\Delta CfE15$ 和 $\Delta CfE15C$ 孢子产量分析; 误差线表示标准偏差, 不同字母表示在 $P=0.05$ 时有显著差异

Figure 6 Analysis of Conidia shape and conidia production of the WT strain, *CfE15* gene deletion strains and complementary strains

Note: A: Morphological observation of WT, $\Delta CfE15$ and $\Delta CfE15C$; B: Conidia production of WT, $\Delta CfE15$ and $\Delta CfE15C$. Values on the bars followed by the same letter are not significantly different at $P=0.05$

主植物抗性中的作用 (Stergiopoulos and de Wit 2009; Oliver et al., 2012)。但在果生炭疽菌中还未开展广泛的研究。

本研究结合前期转录组测序结果及 SSCP 的特征筛选获得了一个在侵染过程中上调表达的具有 SSCP 特征的效应子候选基因 *CfE15*。对 *CfE15* 进行了克隆及生物信息学分析, 发现该基因编码的蛋白含有 109 个氨基酸, 该蛋白 N 端含有一段 24 个氨基酸的信号肽序列, 不含任何跨膜结构域, 此外该蛋白不含任何已知的蛋白结构域。该蛋白的二级结构主要由 α -螺旋(3%)、 β 股(33%)、延伸链(17.43%)、 β -转角(7.34%)及无规则卷曲(66.97%)组成。含有一个糖基化位点, 且存在磷酸化位点, 共包括 4 个丝氨酸、2 个苏氨酸和 1 个酪氨酸存在磷酸化活性位点。

果生炭疽菌为半活体营养型真菌, 在侵染前期开始在寄主草莓的表皮下和细胞间生长, 并在接种后 3 天左右转为细胞内坏死型生长 (Zhang et al., 2020)。前期转录组测序结果表明 *CfE15* 基因在果生炭疽菌侵染草莓叶片过程中上调表达, 由此推断该基因除了参与果生炭疽菌与草莓互作外, 还可能与果生炭疽菌的生长发育有关。本研究构建了 *CfE15* 基因的缺失突变菌株 $\Delta CfE15$ 及互补菌株 $\Delta CfE15C$, 孢子形态及产孢量测定发现, $\Delta CfE15$ 的产孢量显著低于野生型菌株和互补菌株 $\Delta CfE15C$, 互补菌株 $\Delta CfE15C$ 的孢子产量与野生型菌株无显著差异。菌落直径测量数据表明 $\Delta CfE15$ 的菌落直径与野生型菌株及互补菌株 $\Delta CfE15C$ 相比无显著差异。说明 *CfE15* 基因

与果生炭疽菌的产孢能力有关。

由于 *CfE15* 蛋白不含任何已知的保守结构域, 其生化功能还需要进一步分析。同时, 关于 *CfE15* 基因在果生炭疽菌的生长发育及果生炭疽菌-草莓互作等方面具有的作用还有待进一步研究。

3 材料与方法

3.1 试验材料

本研究采用的果生炭疽菌 (*C. fructicola*) 野生型菌株由本实验室进行分离鉴定并保存; 构建敲除载体及互补载体所用的质粒 pKH-KO 和 pKN 由中国农业科学院植物保护研究所张昊副研究员所在实验室提供。限制性内切酶购自 New England Biolab 公司; 原生质体转化试剂自 Sigma-ALDRICH 公司。

3.2 *CfE15* 基因片段的扩增

以实验室前期提取并保存的果生炭疽菌野生型 RNA 反转录得到的 cDNA 为模版, 根据全基因组中的 *CfE15* 基因编码区序列, 设计特异性引物 *CfE15F*/*CfE15R* (表 1) 扩增 *CfE15* 基因序列, 回收该片段并测序。引物合成和测序工作均由上海生工生物工程有限公司完成。

3.3 生物信息学分析

用 ProtParam 对 *CfE15* 蛋白的分子量大小及等电点进行分析; 利用蛋白质家族数据库 Pfam 对 *CfE15* 蛋白的结构域进行分析, E-value 设为 $1e-05$ 。通过 SignalP 4.0 预测 *CfE15* 蛋白的 N 端信号肽; 通过 PHYRE2 Server 和 SOPMA 预测 *CfE15* 蛋白的二级结构; 通过 NetNGly1.0 和 NetPhos 3.1 进行蛋白质的 N-糖基化和 N-磷酸化预测。

3.4 果生炭疽菌 *CfE15* 基因敲除载体的构建

采用 USER (uracil-specific excision reagent) 技术一步构建敲除载体 (Frandsen et al., 2008)。根据果生炭疽菌基因组信息设计 *CfE15* 基因上游序列扩增引物 E15UF/E15UR 和下游引物 E15DF/E15DR, 并在引物的 5' 端分别添加 O1、O2 和 O3、O4 序列 (表 1)。以果生炭疽菌野生型菌株的 DNA 为模板, 对上下游片段进行扩增, 利用 Pac I 和 Nt. BbvCI 消化含有 UCS 序列的 pKH-KO 载体, 通过 USER 酶在同一个连接体系中将上下游片段同源重组至 pKH-KO 载体中, 反应体系及反应条件参照王晓亮等 (2014) 进行, 从而获得 *CfE15* 基因的缺失载体。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

引物名称 Primers name	引物序列(5'-3') Primers secquence (5'-3')
<i>Cfe15</i>	Cfe15F: ATGAGATTCTCCATCGCCAA Cfe15R: TCAAGCAGCCGGGGTCCA
上游同源序列臂 Upstream homologous arm	E15UF: GGTCTTAAUCGGCCCTTCTTCCGAGAAA E15UR: GGCATTAAUTTTGGTAGTTTTGAGGTGGTTGG
下游同源序列臂 Downstream homologous arm	E15DF: GGACTTAAUATGGGTTGATCAAAGAGAGGGA E15DR: GGGTTTAAUCCATGTTTGCCTTATCAACT
互补引物 Complementary primers	E15F+: CGGCGGGGTACCTGTGGCGTCATCGGCAAC E15R+: CGCGGATCCCGTCAGCAAAAATGATCCCC
<i>Hph</i>	H852: ATGTTGGCGACCTCGTATTGG H850: TTCCTCCCTTTATTTCAGATTCAA

3.5 果生炭疽菌 *Cfe15* 基因互补载体的构建

从 NCBI 数据库中获得 Cfe15 基因的全长及其启动子和终止子信息,设计引物 E15F+/E15R+(表 1)扩增整个片段,两端加上载体接头。以果生炭疽菌的基因组 DNA 为模板扩增目的基因全长后连接到 pKN 载体的 Kpn I/BamHI 位点上,从而得到 Cfe15 基因的互补载体。

3.6 原生质体转化

参考 Turgeon 等(1987) PEG 介导的原生质体转化方法,将线性化后的重组质粒进行原生质体转化,获得的转化子使用相应的抗生素(基因缺失载体:潮霉素 B/ 基因互补载体:遗传霉素)进行抗性筛选。待相应的转化子长出,挑出转化子接到相应抗性的 PDA 平板上继续进行培养,转化子在 PDA 平板上长出后进行单孢分离,分离单孢方法参照张昊等(2008),新长出的单个菌落转接到含相应抗生素的 PDA 平板上继续生长,后提取基因组利用特异性检测引物进行 PCR 鉴定。

3.7 *Cfe15* 基因敲除和互补转化子的 PCR 验证

选取阳性敲除转化子提取 DNA,基因组 DNA 提取方法参照罗文(2015)。以 *C. fructicola* 野生型菌株为对照,进行 PCR 检测。检测方法如下:引物 Cfe15F 和 Cfe15R: 检测目的基因;引物 H850 和 H852: 检测替代目的基因的 *Hph* 基因;引物 E15UF 和 E15DR: 检测重组左右臂。

选取阳性互补转化子提取 DNA,以 *C. fructicola* 野生型菌株和 *Cfe15* 基因敲除菌株基因组为对照,利用特异的引物 Cfe15F/Cfe15R 进行 PCR 验证。

3.8 野生型菌株、*Cfe15* 突变菌株及互补菌株基本生长情况的测定

用打孔器分别在野生型菌株、 $\Delta Cfe15$ 和 $\Delta Cfe15C$ 菌株上打取直径为 9 mm 的新鲜菌饼,接种于 PDA 培养基中心位置,每个菌株设置五个重复。在 28℃ 恒温培养箱中培养 7 d 后用十字交叉法测量菌落直径,并记录菌落的生长形态。

3.9 野生型菌株、*Cfe15* 突变菌株及互补菌株分生孢子形态及产量测定

用打孔器取 9 mm 大小的野生型菌株、 $\Delta Cfe15$ 和 $\Delta Cfe15C$ 菌株的新鲜菌饼若干,分别接种到含 30 mL PDB 培养基的 50 mL 锥形瓶中,28℃ 振荡培养 2 d,过滤 5000 rpm 离心 8 min,收集分生孢子,将 1×10^3 个分生孢子液转接至 30 mL PDB 培养基中,28℃ 振荡培养 4~5 d,过滤收集分生孢子,对每个菌株产生分生孢子的数量进行计数。每个菌株都设置五个技术重复。

作者贡献

张丽勃是本研究的实验设计者和实验研究的执行人,完成数据分析,论文初稿的写作;余永婷是原生质体转化试验的执行人,负责该部分的数据分析。方献平和李水根参与实验设计,试验结果分析;张学英负责指导实验设计、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由上海市科委启明星人才计划(18QB140 2800)资助。

参考文献

- Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H., and Crous P.W., 2012, The *Colletotrichum acutatum* species complex, *Studies in Mycology*, 73(1): 37-113.
- de Jonge R., van Esse H.P., Kombrink A., Shinya T., Desaki Y., Bours R., and Thomma B.P., 2010, Conserved fungal LysM effector Ecp6 prevents chitin-triggered immunity in plants, *Science*, 329(5994): 953-955.
- Denoyes-Rothan B., Guérin G., Délye C., Smith B., Minz D., Maymon M., and Freeman S., 2003, Genetic diversity and pathogenic variability among isolates of *colletotrichum* species from strawberry, *Phytopathology*, 93(1): 219-228.
- Frandsen R.J., Andersson J.A., Kristensen M.B., and Giese, H., 2008, Efficient four fragment cloning for the construction of vectors for targeted gene replacement in filamentous fungi, *BMC Molecular Biology*, 9(1): 1-11.
- Kamoun S., 2007, Groovy times: filamentous pathogen effectors revealed, *Current Opinion in Plant Biology*, 10(4): 358-365.
- Liu L., Xu L., Jia Q., Pan R., Oelmüller R., Zhang W., and Wu C., 2019, Arms race: diverse effector proteins with conserved motifs, *Plant Signaling Behavior*, 14(2): 1557008.
- Lu S., and Edwards M.C., 2016, Genome-wide analysis of small secreted cysteine-rich proteins identifies candidate effector proteins potentially involved in *Fusarium graminearum*? wheat interactions, *Phytopathology*, 106(2): 166-176.
- Luo W., 2015, Function Analysis of Peroxisome Genes FgPex14 and FgPex14/17 in *Fusarium graminearum*, Thesis for M.S., Chinese Academy of Agricultural Sciences, Supervisors: Feng J., pp.16. (罗文, 2015, 禾谷镰刀菌过氧化物酶体基因 FgPex14 与 FgPex14/17 的功能分析, 硕士学位论文, 中国农业科学院, 导师: 冯洁, pp.16.)
- Marin-Felix Y., Groenewald J.Z., Cai L., Chen Q., Marincowitz S., Barnes I., Bensch K., Braun U., Camporesi E., Damm U., de Beer Z.W., Dissanayake A., Edwards J., Giraldo A., Hernandez-Restrepo M., Hyde K.D., Jayawardena R.S., Lombard L., Luangsa-Ard J., McTaggart A.R., Rossman A.Y., Sandoval-Denis M., Shen M., Shivas R.G., Tan Y.P., van der Linde E.J., Wingfield M.J., Wood A.R., Zhang J.Q., Zhang Y., and Crous P.W., 2017, Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1, *Studies in Mycology*, 86(1): 99-216.
- Mentlak T.A., Kombrink A., Shinya T., Ryder L. S., Otomo I., Saitoh H., Terauchi R., Nishizawa Y., Shibuya N., and Thomma B.P., 2012, Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease, *The Plant Cell*, 24(1): 322-335.
- Oliver R.P., Friesen T.L., Faris J.D., and Solomon P.S., 2012, *Stagonospora nodorum*: From pathology to genomics and host resistance, *Annual Review of Phytopathology*, 50(1): 23-43.
- Shang S., Wang B., Zhang S., Liu G., Liang X., Zhang R., and Sun G., 2020, A novel effector CfEC92 of *Colletotrichum fructicola* contributes to glomerella leaf spot virulence by suppressing plant defences at the early infection phase, *Molecular Plant Pathology*, 21(7): 936-950.
- Stergiopoulos I., and de Wit P.J.G.M., 2009, Fungal effector proteins, *Annual Review of Phytopathology*, 47(1): 223-263.
- Turgeon B.G., Garber R.C., and Yoder O.C., 1987, Development of a fungal transformation system based on selection of sequences with promoter activity, *Molecular and Cellular Biology*, 7(9): 3297-3305.
- Wang X.L., Zhang H., Pan Y., Xu J.H., Xu J., and Feng J., 2014, Effective universal vectors building for gene knockout and fluorescent expression in *Fusarium graminearum*, *Zhiwu Baohu (Plant Protection)*, 3(1): 106-112. (王晓亮, 张昊, 潘逸, 许景升, 徐进, 冯洁, 2014, 适用于镰刀菌基因敲除和荧光融合蛋白表达的高效通用载体的构建, *植物保护*, 3(1): 106-112.)
- Weir B.S., Johnston P.R., and Damm U., 2012, The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex, *Studies in Mycology*, 73(1): 115-180.
- Xie L., Zhang J.Z., Wan Y., and Hu D.W., 2010, Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China, *Journal of Zhejiang University Science B*, 11(1): 61-70.
- Zhang H., Zhang Z., Xu J.H., Xu J., Zhang L.Q., Pan Z.C., Tian Q., and Feng J., 2008, A rapid and simple method for obtaining single-spore isolates of *Fusarium* species-agar dilution lineation separation, *Zhiwu Baohu (Plant Protection)*, 34(6): 134-135. (张昊, 张争, 许景升, 徐进, 张丽勃, 潘哲超, 田茜, 冯洁, 2008, 一种简单快速的赤霉病菌单孢分离方法 - 平板稀释划线分离法, *植物保护*, 34(6): 134-135.)
- Zhang L., Song, L., Xu X., Zou X., Duan K., and Gao Q., 2020, Characterization and fungicide sensitivity of *colletotrichum* species causing strawberry anthracnose in Eastern China, *Plant Disease*, 104(7): 1960-1968.