

康氏木霉 PLA₂ 基因的生物学功能及诱导 玉米抗弯孢霉叶斑病作用

许志华^{2,3}, 余传金^{1,2}, 傅科鹤^{1,2}, 林振亚^{1,2}, 荆晶^{1,2}, 王兵², 董金皋³, 陈捷^{1,2}

(1. 国家玉米产业技术体系研发中心, 北京 100081; 2. 上海交通大学 农业与生物学院, 农业部都市农业(南方)重点开放实验室, 上海 200240; 3. 河北农业大学 真菌毒素实验室, 河北 保定 071001)

摘要: 本研究从康氏木霉 T30 的 cDNA 中克隆了 PLA₂ 基因, 然后用 PLA₂ 敲除突变株为材料在玉米接弯孢霉叶斑病菌的条件下研究此基因的生物学功能。敲除突变株 P82(ΔPLA₂) 所分泌的胞外几丁质酶和 β-1,3-半乳糖苷酶的酶活要比野生型低。玉米接种弯孢霉叶斑病菌条件下, 突变株的生防实验表明其具有较好的诱抗作用。此基因大肠杆菌表达产物在离体玉米叶片上同对照相比产生更大的叶斑。PLA₂ 基因在木霉对抗弯孢霉叶斑病菌同玉米互作可能是一种负调控方式, 要对此基因与玉米的非亲和互作还需对此基因互补进行功能验证。

关键词: PLA₂ 基因; PLA₂ 敲除突变株; 弯孢霉叶斑病; 诱导抗性

中图分类号: S435.131

文献标识码: A

Biological Functions of the Gene PLA₂ of *T. koningii* and its Induced Resistance Against *Curvularia lunata*

XU Zhi-hua^{2,3}, YU Chuan-jin^{1,2}, FU Ke-he^{1,2}, LIN Zhen-ya^{1,2}, JING Jing^{1,2},
WANG Bing², DONG Jin-gao³, CHEN Jie^{1,2}

(1. The National Maize Industry Technology RD Center, Beijing, 100081, China; 2. Key Laboratory of Urban Agriculture (South) of Ministry of Agriculture, School of Agriculture & Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China; 3. Mycotoxin Laboratory of Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei Province, China)

Abstract: In this study, we cloned the gene of PLA₂ from cDNA of the wide type *T. koningii* T30, and then investigated the biological functions of the PLA₂-deletion mutant and the role of PLA₂ demonstrated the interaction between maize and *T. koningii* after challenged inoculation with *Curvularia lunata*. The activity of exo-chitinase and β-1,3-glucanase of the mutant was a little lower than that of the wild type. Furthermore, the mutant provided a higher control of *Curvularia* leaf spot on the potted maize in comparison with the wild type strain. Similarly, it had been infiltrated with prokaryotic expression protein of PLA₂ got larger lesions on the detached leaves than the controls. Thus we speculated that PLA₂ might be involved in the *Trichoderma*-induced maize defensive pathway against *Curvularia* leaf spot in a negative

收稿日期: 2011-05-29

基金项目: 现代农业产业技术体系(CARS-02); 国家自然科学基金项目(30971949); 上海市科委重点攻关项目(09391910900)

作者简介: 许志华(1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物学, E-mail: xzh7415086@163.com;

余传金(1983-)为共同第一作者, 男, 博士研究生, 研究方向: 植物学, E-mail: yuchuanjin1013@163.com;

陈捷(1959-)为本文通讯作者, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物病害生物防治, Email: jiechen59@sjtu.edu.cn

regulation. The function of PLA₂ in detail to non-compatible interaction between *Trichoderma* spp. and maize need to be further studied through its complemental experiments.

Key words: PLA₂; PLA₂-deletion mutant; *Curvularia lunata*; Induced resistance

木霉(*Trichoderma*)是对多种病原菌具有拮抗作用的一类生防菌,其分布的生态系统非常广泛,是由许多的根际丝状真菌组成,按照经典分类系统其属于半知菌亚门(Deuteromycotina)、丝孢纲(Hyphomycetes)、丝孢目(Hyphomycetales)、丝孢科(Hyphomycetaceae)。木霉菌与植物作用的机制模型也相继被学者提出,其中 Harman^[1-2]初步阐述了 *T. Harzianum* T-22 与植物的机理,其中包括抑制病原菌分泌侵染植物相关酶的活性以及对病原菌在植物体或者种子附近萌发所需营养的竞争,但是这些模型都非常局限,不具备通用性。人们研究发现木霉在实际应用的过程中,尤其处理玉米过程中发现木霉与玉米存在非常复杂的相互作用关系。有些木霉与玉米品种互作表现出促进生长或者提高抗病能力的正向调控,但有的组合则是抑制玉米生长负向调控抗病,人们通过一系列的研究表明此特性是由显性基因所调控^[3-4]。因此鉴定调控木霉菌中与玉米互作的相关基因,对于更好地利用木霉菌防治作物病害以及评估和提前预防病害具有重要意义。

本实验室在前期工作中以 *T. koningii* T30 为出发菌采用 REMI 方法(限制性内切酶介导的基因整合),从阳性转化子中克隆了一个类似于乙酰水解酶 PLA₂ 家族成员的基因 PLA₂。为了更进一步验证该基因的功能,采用原生质体融合的方法,经过一系列的初筛复筛及分子鉴定后得到一株敲除子 P82(Δ PLA₂)。本文着重对敲除突变株的生物学特性以及诱抗机理进行初步的探索,为进一步明确此基因在木霉的生防机理中的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株与材料

康氏木霉(*T. koningii* T30)、敲除子 P82(Δ PLA₂)、弯孢霉叶斑病菌(*Curvularia lunata*)CX-3(强致病菌株)来自上海交通大学农业与生物学院农业部都市农业(南方)重点开放实验室;玉米自交系(黄早4)取自河北农业大学真菌毒素实验室;PDA 培养基(200 g 去皮煮沸土豆过滤液,20 g 葡萄

糖,琼脂 8 g,最后定容 1 000 mL 摇匀分装于小瓶);发酵用培养液(几丁质 0.5 g,七水硫酸亚铁 0.01 g,硝酸铵 0.3 g,磷酸二氢钾 0.2 g,七水硫酸镁 0.06 g,最后加入 ddH₂O 至 1 000 mL)。

1.2 康氏木霉 PLA₂基因的克隆

根据敲除子的序列进行基因 Walking,从而得到了在 T30 上基因组的序列,分析之后设计引物从 T30 的 cDNA 序列中克隆 PLA₂。

1.3 木霉菌胞外几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶活性的测定

使用无菌 ddH₂O 悬浮培养一周的野生型木霉菌 T30 和敲除菌 P82(Δ PLA₂)的孢子,血球计数板确定孢子数并调制使二者浓度一致,然后等量接到发酵培养基中,200 r/min,28 °C 发酵培养 4 d,然后 12 000 r/min,离心 15 min,分光光度计测量上清中胞外几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶的活性,重复 3 次^[5-6]。规定一个酶活单位(U/mg)为:每分钟每毫克蛋白水解底物产生 1 微摩尔葡萄糖所需酶量。

1.4 敲除子诱导玉米抗弯孢霉叶斑病菌的效应

野生型 T30 与敲除子 P82(Δ PLA₂)在 PDA 上培养 1 周后,用无菌 ddH₂O 配制孢子悬液,调制其浓度为 10⁷/mL,实验的玉米为 3~4 叶龄,分别将 T30 和 P82(Δ PLA₂)等浓度(10⁷/mL)孢子悬液 5 mL 针刺接种于玉米根系。同理,也将生长 1 周的 *C. lunata* 制成 10⁷/mL 孢子悬液备用。实验的 3 种组合:(I)用 ddH₂O 处理玉米根 4 d 之后将 10⁷/mL *C. lunata* 孢子悬液喷洒于该组的玉米叶片上;(II)用 T30 处理玉米根 4 d 之后将 10⁷/mL *C. lunata* 孢子悬液喷洒于该组的玉米叶片上;(III)此处理同 II 组相同,只是玉米根先用 P82(Δ PLA₂)孢子悬液预处理 4 d。每个处理 4 盆 3~4 叶期玉米,每盆内 3 颗生长相当的玉米,3 个重复,即每种处理共 12 盆玉米 36 颗 3~4 叶期玉米苗,玉米在接 *C. lunata* 后黑暗保湿 1 d,于植物培养箱 28±2 °C,然后于接种的 2、5、10、15、20 天后调查相对防效。

相对防治效果=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数×100%

1.5 PLA₂原核表达物对玉米抗弯孢霉叶斑病的影响

PLA₂基因在大肠杆菌原核表达后,证实了表达产物具有乙酰水解酶特性。此表达蛋白液处理离体玉米叶片的浓度梯度为5、10、50、100、250 μg/mL,同时设置 ddH₂O 和 pET30 空载体表达产物做阴性对照。处理所用的玉米叶子皆为3~4叶期的第2轮叶子,接种的位置在玉米叶子的背面,将要处理的玉米叶尖和叶尾都去掉留下所有叶子的中部10 cm,然后在10 cm离体玉米叶片5 cm处(即中部附近)背面的大叶脉左右等距离位置用刀片稍微划破蜡质层(有利于蛋白液的吸收和病菌的侵染),接着把上述处理叶片放入 ddH₂O 和 pET30 空载体表达产物阴性对照以及 PLA₂ 蛋白各浓度梯度溶液中浸泡5 min后,晾干。最后在划伤大叶脉左右等距离位置分别接种 20 μL 10⁷/mL 的 *C. lunata* 孢子悬液,各组处理都为10片离体玉米叶片,3次重复,然后将所有的处理样品于 28±2 °C 保湿培养5 d后评估病斑面积。

病斑面积 = 长(cm) × 宽(cm) × 叶面积系数(0.75)

2 结果与分析

2.1 PLA₂基因的胶回收片段

以 T30 的总 RNA 扩增的 cDNA 为模板,设计 PLA₂ 的引物扩增其全长,PCR 扩增产物片段进行琼脂糖凝胶电泳并胶回收。如图1所示,回收片段为1719 bp,然后送上海生工公司测序,得到的序列与基因组上的序列进行比对后,此基因在基因组上存在一个65 bp的内含子,然后将此基因提交到 Genebank,登录号为:ACQ83643.1。

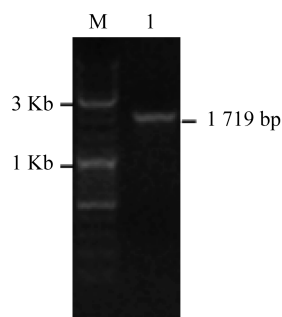


图1 PCR 扩增 PLA₂ 基因产物片段

注:M;DNA Marker; 1;PCR 扩增产物

Fig.1 Electrophoresis of PCR products of PLA₂ gene

Note:M;DNA Marker; 1;PCR products of the gene

2.2 胞壁降解酶活性

野生型木霉菌 T30 和敲除菌 P82(ΔPLA₂) 于 200 r/min, 28 °C 发酵培养 4 d 后,其胞外几丁质酶和 β-1,3 葡聚糖酶活性如图2,敲除子 P82(ΔPLA₂) 的胞外几丁质酶和 β-1,3 葡聚糖酶活性相对于 T30 都要低许多,因此,PLA₂ 调控 β-1,3 葡聚糖酶和胞外几丁质酶的方式可能为正向调控。

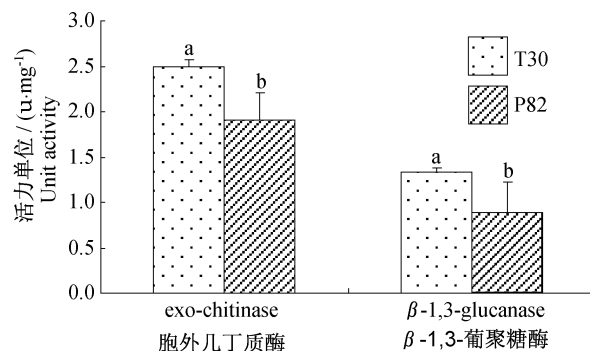


图2 T30 和 P82(ΔPLA₂) 胞外几丁质酶和 β-1,3 葡聚糖酶活性

注:T30:野生型; P82(ΔPLA₂):PLA₂ 敲除子;小写字母表示具有5%的明显差异(Duncans 检测)

Fig.2 The activity of exo-chitinase and β-1,3- glucanase secreted by strains T30 and P82(ΔPLA₂) of *T. koningii*

Note: T30: Wild type; P82 (ΔPLA₂): PLA₂-deletion mutant; The lower cases represent the significance levels of difference at 5%(Duncans test)

2.3 敲除子在诱导玉米抗弯孢菌叶斑病中的作用

黄早4玉米根在木霉处理后,接种2、5、10、15、20天后调查黄早4的弯孢霉叶斑病的病情指数,数据分析表明,敲除子 P82(ΔPLA₂) 可诱导玉米对弯孢霉叶斑病的抗性,同用 T30 和 ck 处理玉米相比,用 P82(ΔPLA₂) 处理玉米5 d 后诱导抗弯孢霉叶斑病菌 CX-3 效果最明显,如图3所示经过 P82(ΔPLA₂) 处理过的玉米病情指数比 T30 和 ck 处理的玉米病情指数都低,说明了 P82(ΔPLA₂) 具有诱抗弯孢霉叶斑病的作用。经过 P82(ΔPLA₂) 处理过5 d 之后的实验组玉米病情指数慢慢增加,最后, P82(ΔPLA₂) 处理玉米二十天后同两对照组病情相当,也即表明 PLA₂ 诱导玉米抗性是在病菌侵染的激发条件之下而产生的。

2.4 PLA₂ 原核表达产物对离体玉米叶片抗弯孢菌叶斑病的诱导效性

对离体的黄早4玉米叶片按照前面材料与方法中所述的原核表达产物 PLA₂ 浓度梯度来处理离体的玉米叶片,对第5 d 接种弯孢霉叶斑病菌后的离体玉米病斑面积的数据分析之后,结果表明只有浓度为10 μg/mL 的 PLA₂ 处理玉米组例外,剩下的

实验组玉米叶片病斑面积是显著大于只用 pET30 空载菌表达产物处理组和双蒸无菌水处理组,如图 4 所示,用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PLA₂ 处理组离体玉米病斑最大,大概是对照组(CK)的 2.7 倍,如图 5 所示。这就说明了 PLA₂ 基因能产生诱导玉米感病的功能,综上可知,康氏木霉菌中 PLA₂ 在对抗弯孢霉叶斑病的抗性极可能是以一种负调控方式产生功能。

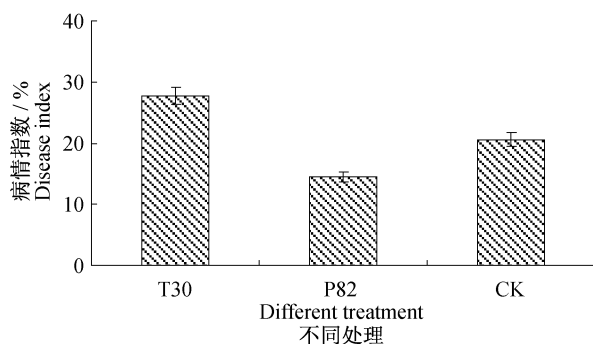


图3 T30 和 P82(ΔPLA_2)处理玉米 5 d 后的病情指数

注: T30: T30+弯孢菌 CX-3; P82(ΔPLA_2): PLA₂敲除子+弯孢菌 CX-3; CK: 双蒸水+弯孢菌 CX-3

Fig. 3 The disease index of maize leaves after inoculation for 5 days with strains T30 and P82 (ΔPLA_2) of *T. koningii*

Note: T30: *T. koningii* T30+*C. lunata* CX-3; *T. koningii* P82(ΔPLA_2): PLA₂-deletion mutant+*C. lunata* CX-3; CK: ddH₂O+*C. lunata* CX-3

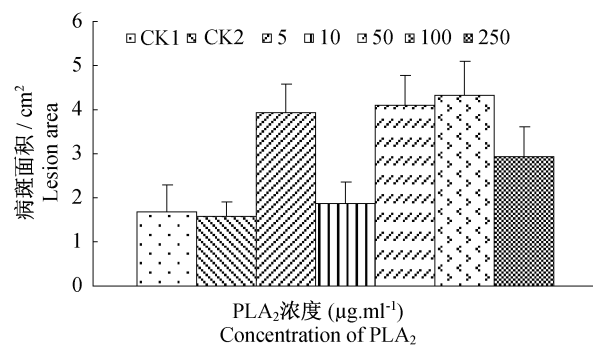


图4 PLA₂原核表达产物对离体玉米叶片弯孢叶斑病枯斑大小的效应

注: CK1: pET30; CK2: 双蒸水; 5, 10, 50, 100, 250: PLA₂的使用浓度为: 5, 10, 50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$

Fig. 4 The effect of expressed protein of PLA₂ in *E. coli* on formation of *Curvularia* lesions on the detached leaves

Note: CK1: pET30 vector; CK2: ddH₂O; 5, 10, 50, 100, 250: The concentration of PLA₂ is 5, 10, 50, 100, 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectively

3 讨论

木霉菌是重要的生物防治菌之一,其产生的初级以及次级代谢产物能拮抗植物病原菌从而达到生物防治的作用,这其中就有一些重要的具有生防作用的基因的表达,因此寻找木霉菌重要生防作用基因或者作用因子是生物防治的热点及难点^[7-9]。基于此目的,本研究采用 REMI 方法得到了 1 株 1 个与 PLA₂ 家族成员之一的乙酰水解酶相似的基因 PLA₂,并获得此基因的敲除子 P82(ΔPLA_2)。为了进一步研究此基因的功能,克隆了此基因为下一步的功能研究作准备。

在木霉菌的对抗植物病原菌的互作过程中,一些相关与生防作用相关的基因或者代谢产物一般都上调,如:几丁质酶、葡聚糖酶、抗生素和抗菌肽等等^[10-12]。因此,本研究中也对野生型菌株 T30 和敲除 PLA₂ 突变株 P82(ΔPLA_2) 的胞外几丁质酶和葡聚糖酶的活性进行了测定,结果表明敲除 PLA₂ 突变株 P82(ΔPLA_2) 相对于野生型 T30 酶活差异显著,也就是说此基因影响了这两种酶的表达,即表明 PLA₂ 为生防作用相关的重要基因。

虽然我们的研究结果指出:PLA₂ 基因大肠杆菌表达产物能诱导离体黄早 4 玉米叶片对弯孢霉叶斑病菌具有感病性,我们却还不能机械地理解康氏木霉菌 PLA₂ 表达物可直接抑制宿主植物防御基因及相关基因的表达,还需要将 PLA₂ 表达产物在活玉米株的叶、根器官上皆进行一系列相关的生理生化实验,全面系统分析之后才能对该基因表达调控关系进行综合归纳。本实验室对康氏木霉菌的 PLA₂ 基因负调控玉米对抗弯孢霉叶斑病的研究结果,在玉米上还是首次,关于此基因全方面的认识具有十分重要的功能。通常情况下,无论在植物或动物体内的 PLA₂ 已有的研究结果表明其利于人们对 PLA₂ 的功能的理解,即其有促进免疫反应的发生,Lim 等^[13] 研究表明 PLA₂ 基因表达有利于动物和植物花生四烯酸和活性氧的释放和产生,而此两种物质皆是被人们认为是诱导生物体产生免疫反应的物质,但这些特意的研究结果均不是在研究一种微生物的 PLA₂ 对另一生物互作后免疫反应得到的,所以就简单地说明一种生物的 PLA₂ 基因的表达必定会使得另外一种生物的免疫反应,这所牵涉的互作是两个系统,是多元互作的范畴。本文对 PLA₂ 的研究还只是个初步分析,康氏木霉 PLA₂ 定

殖玉米根后在其体内的分泌机制、与 PLA₂ 互作的调控因子、玉米本身的 PLA₂ 与康氏木霉的 PLA₂ 之间的联系以及康氏木霉菌诱导玉米抗逆性等等诸方面均有待进一步的探索。本研究对于揭示木霉菌诱导玉米抗弯孢霉叶斑病机制和多层次理解 PLA₂ 的功能提供了依据,也为全面认识木霉菌与植物互作的机制提供参考。

参考文献:

- [1] Harman G E. Myths and dogmas of biocontrol, Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22 [J]. **Plant Disease**, 2000, 84:377-393.
- [2] Harman G E, Howell C R, Viterbo A, *et al.* *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts [J]. **Nat Rev Microbiol**, 2004, 2:43-56.
- [3] Harman G E. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. [J]. **Phytopathology**, 2006, 96:190-194.
- [4] 朱双杰,高智谋. 木霉对植物的促生作用及其机制 [J]. **菌物研究**, 2006, 4:107-111.
- [5] Boller T, Gehri A, Mauch F, *et al.* Chitinase in bean leaves: Induction by ethylene, purification, properties and possible function [J]. **Planta**, 1983, 157:22-31.
- [6] He G Q, Zhang X Y, Tang X J, *et al.* Partitioning and purification of extracellular β -1,3-1,4- glucanase in aqueous two-phase systems [J]. **J Zhejiang Univ Sci B**, 2005, 6:825-831.
- [7] Segarra G, Casanova E, Bellido D, *et al.* Proteome, salicylic acid, and jasmonic acid changes in cucumber plants inoculated with *Trichoderma asperellum* strain T34 [J]. **Proteomics**, 2007, 7:3943-3952.
- [8] Viterbo A, Montero M, Ramot O, *et al.* Expression regulation of the endochitinase chit36 from *Trichoderma asperellum* (*T. harzianum* T-203) [J]. **Curr Genet**, 2002, 42:114-122.
- [9] Yedidia I I, Benhamou N, Chet I. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) By the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1999, 65:1061-1070.
- [10] Reihner B, Schuhmacher R, Stoppacher N, *et al.* Signaling via the *Trichoderma atroviride* mitogen-activated protein kinase Tmk 1 differentially affects mycoparasitism and plant protection [J]. **Fungal Genet Biol**, 2007, 44:1123-1133.
- [11] Reihner B, Brunner K, Schuhmacher R, *et al.* The G protein alpha subunit Tga1 of *Trichoderma atroviride* is involved in chitinase formation and differential production of antifungal metabolites [J]. **Fungal Genet Biol**, 2005, 42:749-760.
- [12] Benítez T, Rincón A M, Limón M C, *et al.* Biocontrol mechanisms of *Trichoderma strains* [J]. **Int Microbiol**, 2004, 7:249-260.
- [13] Lim W, Lee S, Kim I, *et al.* The anti-inflammatory mechanism of 635 nm light-emitting-diode irradiation compared with existing COX inhibitors [J]. **Lasers Surg Med**, 2007, 39:614-621.