

# 可可毛色二孢 $\beta$ -1,4-葡聚糖内切酶L<sub>t</sub>Eg1信号肽的鉴定及其酶活性分析

彭军波 李兴红 张 玮 刘 梅 邢启凯 燕继晔\*

(北京市农林科学院植物保护环境研究所, 北方果树病虫害绿色防控北京市重点实验室, 北京 100097)

**摘要:** 为明确可可毛色二孢 $\beta$ -1,4-葡聚糖内切酶L<sub>t</sub>Eg1是否能够分泌至胞外及其活性,采用酵母互补试验分析了内切酶L<sub>t</sub>Eg1的信号肽活性,利用3,5-二硝基水杨酸法检测了内切酶L<sub>t</sub>Eg1活性,通过实时荧光定量PCR测定了L<sub>t</sub>Eg1基因在不同侵染阶段的表达量。内切酶L<sub>t</sub>Eg1的信号肽和酵母蔗糖酶的融合表达能够引起酵母蔗糖酶的外泌,使得酵母转化子能够在以棉子糖为唯一碳源的培养基上生长。内切酶L<sub>t</sub>Eg1能够以羧甲基纤维素钠为底物,发挥其酶活功能。与营养菌丝阶段相比,L<sub>t</sub>Eg1基因在病原菌侵染阶段的表达水平显著升高;且在接种后48 h,L<sub>t</sub>Eg1基因的表达量达到高峰,约为营养菌丝阶段的12倍,表明内切酶L<sub>t</sub>Eg1作为重要的外泌蛋白酶,在可可毛色二孢侵染致病过程中发挥了重要作用。

**关键词:** 可可毛色二孢;  $\beta$ -1,4-葡聚糖内切酶; 信号肽; 酶活性

## Identification of the signal peptide and enzymatic activity analysis of the endo- $\beta$ -1,4-glucanase L<sub>t</sub>Eg1 of fungal pathogen *Lasiodiplodia theobromae*

PENG Junbo LI Xinghong ZHANG Wei LIU Mei XING Qikai YAN Jiye\*

(Beijing Key Laboratory of Environment-Friendly Management of Diseases and Pests of North China Fruits, Institute of Plant and Environmental Protection, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

**Abstract:** To investigate the exocrine characteristics and enzymatic activity of the endo- $\beta$ -1,4-glucanase L<sub>t</sub>Eg1 of fungal pathogen *Lasiodiplodia theobromae*, the signal peptide of L<sub>t</sub>Eg1 was identified by yeast complementary assay, and the enzymatic activity of L<sub>t</sub>Eg1 was examined by using the 3,5-dinitrosalicylic acid method. Furthermore, the transcriptional profiles of L<sub>t</sub>Eg1 gene at different infectious stages were detected by real-time fluorescent quantitative PCR. Yeast complementary investigation showed that fusion expression of the signal peptide of L<sub>t</sub>Eg1 with yeast invertase that lacked its own signal peptide induced the secretion of invertase and afterwards, enabled yeast transformants to grow on media with raffinose as the sole carbon resource. Moreover, enzymatic activity tests indicated that L<sub>t</sub>Eg1 protein could degrade the sodium carboxymethyl cellulose. The results of real-time fluorescent quantitative PCR showed that transcription levels of L<sub>t</sub>Eg1 gene at infectious stages were significantly higher than that in vegetative hyphae. Besides, the transcription level of L<sub>t</sub>Eg1 gene almost reached the peak at 48 h post inoculation, which was nearly 12 times as high as that of vegetative hyphae, indicating that L<sub>t</sub>Eg1, as an important exocrine protease, played significantly roles during the infection process of *L. theobromae*.

**Key words:** *Lasiodiplodia theobromae*; endo- $\beta$ -1,4-glucanase; signal peptide; enzymatic activity

基金项目:国家现代农业(葡萄)产业技术体系(CARS-29),北京市农林科学院院储备项目(KJCX20170412)

\* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: jiyan@vip.163.com

收稿日期: 2019-02-28

葡萄座腔菌科 *Botryosphaeriaceae* 真菌是一类危害严重的机会病原真菌,该类病原菌能够在寄主体内长时间潜伏生存,如遇外界环境条件变化,其能够由内生菌转变为致病菌,侵染包括梨、苹果、葡萄、桃及杨树等多种木本植物,破坏寄主体内营养及水分的运输,最终导致植物死亡(Chethana et al., 2016; Yan et al., 2018)。近年来,由该类病原菌引起的葡萄溃疡病在我国多个葡萄主产区广泛发生,一般年份造成的损失达3%~8%,严重时达10%~20%,当遇到持续高温、强降雨等极端天气时,造成的产量损失高达100%(Yan et al., 2012; 2013)。世界范围内已报道有20种葡萄座腔菌科真菌能够引起葡萄溃疡病(Yan et al., 2013),国内已发现的可引起葡萄溃疡病的真菌有6种,分别是可可毛色二孢 *Lasiodiplodia theobromae*(Yan et al., 2011a)、色二孢属真菌 *Diplodia seriata*(Yan et al., 2011b)、葡萄座腔菌 *Botryosphaeria dothidea* (Yan et al., 2012)、小新壳梭孢 *Neofusicoccum parvum*(Yan et al., 2013)、*Lasiodiplodia pseudotheobromae* (Dissanayake et al., 2015a) 和 *Neofusicoccum mangiferae*(Dissanayake et al., 2015b),其中可可毛色二孢是致病力最强的优势种,近年来受到高度关注。目前,关于葡萄溃疡病的研究主要集中在病原菌的分离鉴定(张玮等,2017a)、基因组测序及数据组装(Yan et al., 2018)、其杀菌剂的抑菌作用分析(宋雅琴等,2015)及葡萄品种的抗性评价(张玮等,2017b)等方面,关于葡萄溃疡病菌侵染寄主植物的方式及机制并不清楚。

病原菌在侵染寄主植物过程中,通常会分泌一些胞外酶来降解寄主细胞壁的组分,以获取自身代谢需要的养分,并实现对寄主的成功侵入及菌丝的扩繁(An et al., 2005; Kikot et al., 2010)。目前,胞壁水解酶包括果胶酶、多聚半乳糖醛酸酶、葡聚糖酶、纤维素酶、木葡聚糖酶等在植物病原菌致病过程中的作用及重要性被广泛报道。Ben-Daniel et al.(2012)发现番茄炭疽病菌 *Colletotrichum coccodes* 外泌果胶裂解酶编码基因 *Ccpel4* 缺失后,会导致该病原菌对番茄果实的致病力明显下降;Ma et al.(2015)报道了大豆疫霉 *Phytophthora sojae* 糖苷水解酶12家族的1个外泌蛋白 XEG1 在侵染寄主过程中,既能发挥酶活功能同时又能作为病原相关分子模式引起植物的免疫反应。灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 编码的多个多聚半乳糖醛酸内切酶既具酶解活性,也可引起植物叶片的坏死(Kars et al., 2005; Zhang et al., 2014)。Zhu et al.(2017)报道了灰葡萄孢糖苷水解酶12家族1个木葡聚糖酶BcXYG1能够引起被侵染部位的坏死及寄主

的免疫反应。尽管植物病原菌分泌的各种胞外酶已被证明能够水解不同的底物,但可可毛色二孢外泌胞外酶的功能及作用机理并不清楚。

本课题组前期在鉴定可可毛色二孢致病相关基因时,克隆了1个 $\beta$ -1,4-葡聚糖内切酶编码基因 *LtEg1*,其编码产物 LtEg1 属于糖苷水解酶第5家族。而且内切酶 LtEg1 是可可毛色二孢一个重要的致病因子,过表达 *LtEg1* 基因时能够增强可可毛色二孢的致病力(Yan et al., 2018),但有关内切酶 LtEg1 的活性及其是否能够分泌至胞外并不清楚。为了深入研究内切酶 LtEg1 的活性及功能,本研究采用酵母互补转化试验(Gu et al., 2011; 孔祥久等, 2016)分析内切酶 LtEg1 的信号肽活性;通过蛋白纯化及酶活性测定试验探究内切酶 LtEg1 对底物羧甲基纤维素钠的酶解活性;通过实时荧光定量 PCR 解析 *LtEg1* 基因在不同侵染阶段的表达量,以期为深入解析 *LtEg1* 基因在可可毛色二孢侵染致病过程中的作用机理提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株、载体及植物:大肠杆菌 *Escherichia coli* 克隆菌株 Trans1-T1 感受态细胞和表达菌株 BL21(DE3),北京全式金生物技术有限公司;可可毛色二孢野生型菌株 CSS-01s 由本实验室保存;酵母菌株 YTK12, *pSUC2*载体、阳性对照 *pSUC2-Avr1b* 载体及阴性对照 *pSUC2-Mg87* 载体由中国农业大学孙文献教授馈赠; pET-32a 表达载体和 *pSUC2-LtEg1* 融合载体由本实验室构建和保存。供试葡萄品种为夏黑,来自顺义香逸葡萄园。

试剂及仪器:各种限制性内切酶、*Taq*聚合酶和T4 DNA连接酶,New England Biolabs公司;Bradford溶液、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)标准品及氨苄青霉素,北京索莱宝科技有限公司;植物RNA快速提取试剂盒,北京艾德莱生物科技有限公司;反转录试剂盒,北京全式金生物技术有限公司; Yeastmaker™ yeast Transformation System 2 试剂盒,宝日医生物技术(北京)有限公司;2×RealStar Green Fast Mixture with ROX II,北京康润诚业生物科技有限公司;苯甲基碘酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)及二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT),北京酷来搏科技有限公司;异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside, IPTG),生工生物工程(上海)股份有限公司;羧甲基纤维素钠(sodium carboxymethyl cellulose, CMC),美国 Sigma-Aldrich 公司; Ni-NTA His-Bind® Resin,美国 Novagen 公司; TRIZol,美国 Invitro-

gen公司;其余试剂均为国产分析纯。Poly-Prep<sup>®</sup>层析柱,美国Bio-Rad公司;紫外可见分光光度计,美国GE Amersham Biosciences; Applied Biosystems 7500 荧光定量PCR仪,美国ABI公司。

培养基:酵母膏胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose,YPD)琼脂培养基:酵母提取物10 g、蛋白胨20 g、葡萄糖20 g、硫酸腺嘌呤0.03 g、琼脂20 g,调节pH至6.5,蒸馏水定容至1 L;色氨酸一缺(complete minimal plates lacking tryptophan,CMD-W)琼脂培养基:不含氨基酸的酵母氮源6.7 g、色氨酸省却成分添加剂0.75 g、蔗糖20 g、葡萄糖1 g和琼脂4 g,蒸馏水定容至1 L;酵母膏胨棉子糖(yeast extract peptone raffinose antimycin A,YPR)琼脂培养基:酵母提取物10 g、蛋白胨20 g、棉子糖20 g、琼脂20 g,蒸馏水定容至1 L,使用时加入2  $\mu$ g/mL的抗霉素A;完全培养基(complete medium,CM):酵母膏6 g、酶水解酪素3 g、酸水解酪素3 g、蔗糖10 g,定容至1 L;LB(Luria-Bertani)液体培养基:胰蛋白胨10 g、酵母提取物5 g、氯化钠10 g,用5 N氢氧化钠调节pH至7.0,定容至1 L。

## 1.2 方法

### 1.2.1 氨基酸序列保守性分析

根据本实验室完成的可可毛色二孢全基因组及转录组测序信息,获取Lteg1基因的cDNA序列,使用Lasergene软件中的EditSeq工具预测其编码的氨基酸序列。利用SignalP-5.0 Server(<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/index.php>)在线预测内切酶Lteg1的信号肽切割位点及氨基酸序列。以内切酶Lteg1的氨基酸序列为查询序列,通过NCBI BLASTP比对,获取尖孢镰刀菌*Fusarium oxyphorum*、稻瘟菌*Magnaporthe oryzae*、构巢曲霉*Aspergillus nidulans*及粗糙脉孢霉*Neurospora crassa*等真菌中Lteg1同源蛋白的氨基酸序列。利用ClustalX2软件进行多序列比对,输出并保存比对结果。

### 1.2.2 pSUC2-Lteg1融合载体的构建及酵母转化

酵母菌株YTK12是一个蔗糖酶外泌缺陷型菌株,

该菌株常被用来检测蛋白质信号肽活性(Jacobs et al., 1997; Gu et al., 2011; 孔祥久等,2016)。构建内切酶Lteg1信号肽与缺失起始密码子及信号肽的蔗糖酶融合表达载体

SUC2-Lteg1

;采用Yeastmaker<sup>TM</sup> Yeast Transformation System 2试剂盒,将

SUC2-Lteg1

融合载体、阴性对照

SUC2-Mg87

载体、阳性对照

SUC2-Avr1b

载体分别转入菌株YTK12中,在CWD-W琼脂培养基上培养3 d后筛选转化子;将在CWD-W琼脂培养基上生长的转化子,划线至YPR培养基上,通过观察酵母转化子在YPR培养基上的生长情况来验证内切酶Lteg1信号肽的分泌功能;同时,将转化子划线至YPD和CMD-W琼脂培养基上作为对照。

### 1.2.3 Lteg1基因在不同侵染阶段的表达量检测

取1年生葡萄的茎秆,采用直径4 mm的打孔器划取大小一致的伤口,然后用打孔器打取直径相同的可可毛色二孢野生型CSS-01s的菌饼,并接种至划伤的葡萄茎秆伤口处,25℃黑暗保湿培养。在接种后12、24、48、72 h选取葡萄发病部位的茎秆,采用植物RNA快速提取试剂盒提取被侵染组织的RNA。同时,将可可毛色二孢接种至CM液体培养基中,25℃、160 r/min条件下培养36 h,然后收集菌丝在液氮中磨碎,采用TRIzol试剂参照说明书提取菌丝的RNA。采用反转录试剂盒将RNA反转录为第一链cDNA,用于相关基因的克隆及表达量检测。

依据可可毛色二孢的Lteg1基因序列,设计特异性引物对Lteg1-F和Lteg1-R及内参基因Actin特异性引物对Actin-F和Actin-R(表1)。通过实时荧光定量PCR检测基因表达量,16  $\mu$ L PCR反应体系:cDNA 1  $\mu$ L、10  $\mu$ mol/L上下游引物各0.32  $\mu$ L、2×RealStar Green Fast Mixture (with ROX II) 8  $\mu$ L,补灭菌ddH<sub>2</sub>O至总体积为16  $\mu$ L。实时荧光定量PCR反应程序采用两步法:95℃预变性2 min;95℃变性15 s,58℃退火延伸30 s,40个循环。得到的C<sub>t</sub>值取平均值,根据2<sup>-△△Ct</sup>法计算营养菌丝及病原菌接种后12、24、48、72 h阶段Lteg1基因的相对表达量。

表1 本研究使用到的引物名称及其序列

Table 1 The names and sequences of primers used in this study

引物 Primer	引物序列(5'-3') Sequence (5'-3')	引物的用途 Use of primers	退火温度/℃ Annealing temperature	大小 Size/bp
Ex-F	CAGGATCCATGCGTGGTCGACTC	内切酶Lteg1表达载体的构建	58	1 005
Ex-R	TAACCCGGGTAAATGTAGCTGACG	Construction of Lteg1 expression vector		
Actin-F	CCAAGTCCAACCGTGAGAAG	Actin基因转录水平的检测	58	100
Actin-R	GAAGCGTACAGCGACAGAAC	Detection of Actin transcript level		
Lteg1-F	CACCTACCTTGCCGACCTTA	Lteg1基因转录水平的检测	58	108
Lteg1-R	GCTGATGATGTTGCCGTGTA	Detection of Lteg1 transcript level		

下划线标识的碱基表示限制性酶切位点。Nucleotides underlined indicate restriction enzyme sites.

### 1.2.4 重组蛋白酶活性测定

内切酶L<sub>t</sub>Eg1表达载体的构建:采用pET-32a作为目标蛋白的表达载体,根据L<sub>t</sub>Eg1基因cDNA序列及酶切位点,设计扩增引物Ex-F和Ex-R,在引物序列5'端和3'端分别加上Bam HI和Sma I酶切位点(表1),以cDNA为模板进行PCR扩增,50 μL反应体系:cDNA 1 μL、10 μmol/L上下游引物各1 μL、高保真PCR Mix 25 μL,补充灭菌ddH<sub>2</sub>O至总体积50 μL。PCR反应程序:98℃预变性2 min;98℃变性10 s,58℃退火20 s,72℃延伸15 s,35个循环;最后72℃延伸10 min。将酶切PCR产物和pET-32a表达载体连接。连接反应总体系为10 μL:PCR产物6.5 μL,pET-32a载体2 μL、10×T4 Ligase Buffer 1 μL、T4 Ligase 0.5 μL,16℃连接过夜。将连接产物转化至大肠杆菌*Escherichia coli* Trans1-T1感受态细胞,涂布于含氨苄青霉素的LB平板上,37℃过夜培养。待单克隆长出后,挑取单克隆菌落进行摇培,然后将经过PCR验证和双酶切验证正确的质粒,送至北京博迈德基因技术有限公司测序。

重组蛋白诱导表达及纯化:将测序正确的内切酶L<sub>t</sub>Eg1表达载体转化至表达菌株BL21(DE3)中;待细菌单克隆长出后,挑取LB平板上的菌落至2 mL LB液体培养基(含对应抗生素)中,37℃、220 r/min条件下培养过夜,然后接种2 mL菌液至300 mL LB液体培养基中,37℃、160 r/min条件下摇培至OD<sub>600 nm</sub>为0.4~0.6,加入终浓度为0.1 mmol/L的IPTG溶液,16℃、160 r/min条件下诱导7 h。诱导完成后收集菌体,用Tris-HCl缓冲液(pH 8.0 20 mmol/L的Tris-HCl、500 mmol/L NaCl、40 mmol/L咪唑)重悬菌体细胞,加入终浓度为1 mmol/L的PMSF和1 mmol/L的DTT,采用超声破碎法裂解细胞,1次超声2.5 min(功率300 W、2 s on、4 s off),重复3次。超声完成后,将菌液于4℃、12 000 r/min离心30 min,收集上清液。取1 mL Ni-NTA His·Bind® Resin于Poly-Prep®层析柱中,加入5倍体积的蛋白缓冲液平衡柱子,然后将收集的上清液流过层析柱,最后采用不同梯度的咪唑缓冲液洗脱层析柱,蛋白随洗脱液一起流出层析柱,留在洗脱液中,重组蛋白用于酶活试验测定。

标准曲线的制作及重组蛋白浓度的测定:取0.0、0.1、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mg/mL等浓度的BSA标准品溶液30 μL加至1 mL Bradford工作液中,轻轻颠倒混匀,静止5 min;使用紫外可见分光光度计测定A<sub>595 nm</sub>,重复3次;以标准品浓度为横坐标,吸光

度值为纵坐标,制作标准曲线;采用同样的方法测定纯化蛋白吸光度值,根据建立的标准曲线计算纯化蛋白的浓度。

参考Salinas et al.(2011)和Li & Walton(2017)方法测定β-1,4葡聚糖内切酶活性,将终浓度为10 mg/mL的羧甲基纤维素钠和pH 4.8、50 mmol/L的醋酸钠与重组蛋白溶液混匀,37℃孵育30 min。酶解反应产生还原糖,并且酶解反应依赖重组酶的活性,因此可通过检测反应产物中的还原糖来测定重组酶的活性。反应产物中的还原糖可通过DNS试剂(3,5-二硝基水杨酸6.3 g、氢氧化钠21.0 g、酒石酸钾钠182.0 g、苯酚5.0 g、偏重亚硫酸钠5.0 g,定容至1 L)检测(Miller, 1959),溶液颜色越深说明蛋白酶活性越强。

### 1.3 数据分析

试验数据采用Excel 2013软件进行统计分析,应用最小显著差数(LSD)法进行差异显著性检验,采用Excel 2013及Adobe Photoshop CS5软件制图。

## 2 结果与分析

### 2.1 LtEg1及其同源蛋白氨基酸序列保守性分析

LtEg1基因cDNA开放阅读框架为1 005 bp,编码的蛋白含有334个氨基酸,通过SignalP-5.0 Server预测,该蛋白N端具有一个假定的信号肽序列。通过序列比对及功能预测,该基因的编码产物为β-1,4-葡聚糖内切酶,属于糖苷水解酶第5家族。序列比对显示,内切酶L<sub>t</sub>Eg1与尖孢镰刀菌(NCBI Accession number: TVY70683.1)、构巢曲霉(NCBI Accession number: Q1HFS8.1)、粗糙脉孢霉(NCBI Accession number: XP\_964159.1)和稻瘟菌(NCBI Accession number: XP\_003717422.1)编码的葡聚糖内切酶氨基酸序列一致性分别为61%、60%、57%及58%(图1),推测该蛋白的结构及功能在不同物种间具有一定的保守性。

### 2.2 内切酶LtEg1信号肽的鉴定

融合载体pSUC2-LtEg1或pSUC2-Avr1b转入酵母菌株YTK12后,导致酵母转化子能够在以棉子糖为唯一碳源的YPR培养基上生长,表明L<sub>t</sub>Eg1和Avr1b的信号肽均能够引起酵母蔗糖酶的外泌,从而将培养基中的棉子糖分解为酵母转化子可以利用的单糖;pSUC2-Mg87的表达产物不能外泌,因此导致表达pSUC2-Mg87的酵母转化子不能够在YPR琼脂培养基上生长(图2)。



LtEg1: 可可毛色二孢 $\beta$ -1,4-葡聚糖内切酶; FoEgB: 尖孢镰刀菌古巴专化型 $\beta$ -1,4-葡聚糖内切酶; AnEgB: 构巢曲霉 $\beta$ -1,4-葡聚糖内切酶 B; NcEg3: 粗糙脉孢霉内切葡聚糖酶 3; MoEg3: 稻瘟并菌内切葡聚糖酶 3。- 表示空隙, \*表示该列氨基酸完全一致, : 和 . 表示该列含有不同程度的保守氨基酸, 其中前者保守程度大于后者。不同氨基酸采用各种彩色标记。Lteg1: endo- $\beta$ -1,4-glucanase in *L. theobromae*; FoEgB: putative endo- $\beta$ -1,4-glucanase in *F. oxysporum* f. sp. *cubense*; AnEgB: endo- $\beta$ -1,4-glucanase in *A. nidulans* B; NcEg3: endoglucanase 3 in *N. crassa*; MoEg3: endoglucanase 3 in *M. oryzae*; - denotes a gap; \* indicates that amino acids in the column are completely consistent; : and . indicate that the amino acids in the column are conserved with varying degrees. The amino acids are marked with various colors.

图1 内切酶Lteg1氨基酸序列保守性分析

Fig. 1 Conservation analysis of amino acid sequences among Lteg1 homologs

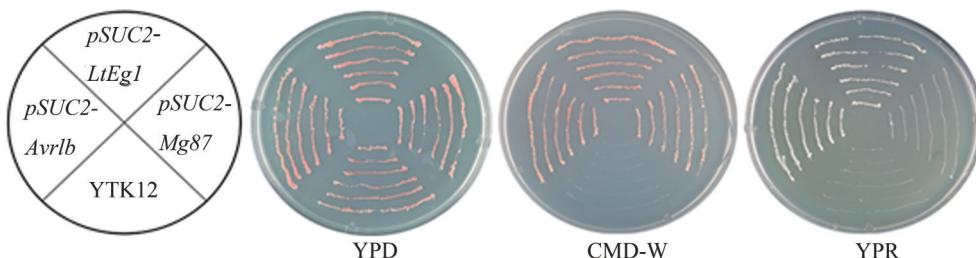


图2 不同酵母转化子在YPD、CMD-W和YPR琼脂培养基上的生长情况检测

Fig. 2 The growth of different yeast transformants on YPD, CMD-W, and YPR media, respectively

### 2.3 LtEg1基因表达模式分析

通过实时荧光定量PCR检测Lteg1基因在病原菌营养菌丝及侵染寄主后12、24、48、72 h的表达情况,结果显示,与营养菌丝阶段相比,Lteg1基因在

病原菌侵染阶段的表达量显著升高,并且在病原菌侵染后48 h,其表达量高达营养菌丝阶段的12倍(图3)。推测Lteg1基因在病原菌侵染过程中发挥了重要的作用,它的表达受到精确的调控。

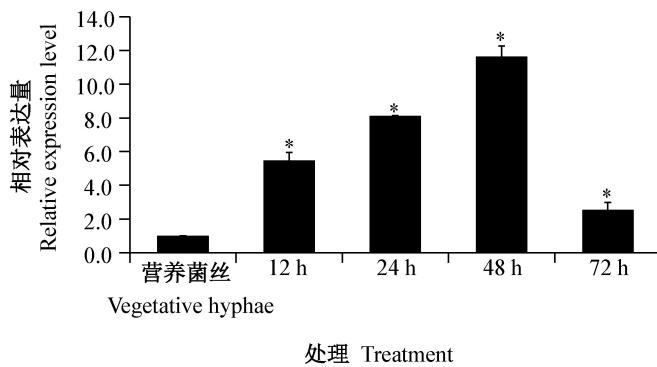


图3 *LtEg1*基因在病原菌营养菌丝及侵染阶段的表达量分析

Fig. 3 The transcript levels of *LtEg1* in vegetative hyphae and infectious stages

图中数据为平均数±标准误。\*表示不同阶段*LtEg1*基因的转录水平经LSD法检验在P<0.05水平差异显著。Data are means±SE. \* indicates significant difference in the transcript levels of *LtEg1* gene among different stages at P<0.05 level by LSD test.

#### 2.4 内切酶*LtEg1*活性的测定

测定结果显示,纯化的内切酶*LtEg1*浓度为0.1 mg/mL(图4)。将不同体积纯化的蛋白与底物羧甲基纤维素钠混匀,37℃孵育30 min后,DNS试剂检测结果显示,随着内切酶*LtEg1*体积的增加,

酶解产物与DNS试剂反应后,溶液的吸光度值呈现增加趋势(图5-A),并且溶液的颜色也逐渐加深(图5-B),证明内切酶*LtEg1*能够以羧甲基纤维素钠作用底物,发挥其活性功能。

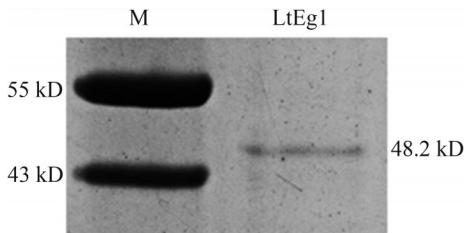
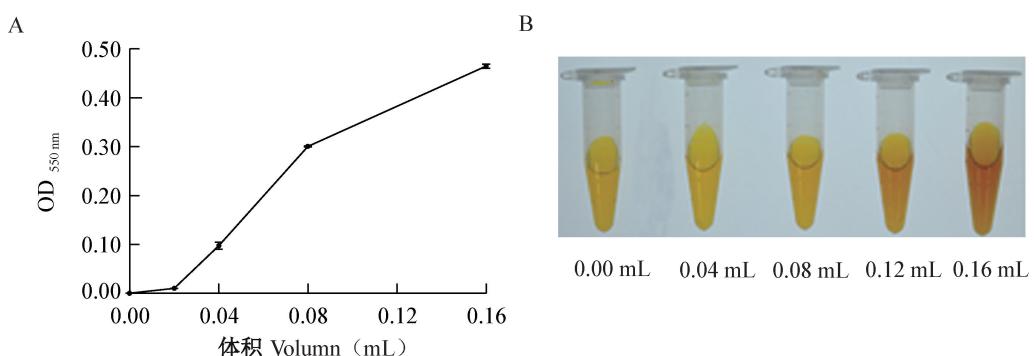


图4 内切酶*LtEg1*在大肠杆菌BL21中的表达纯化

Fig. 4 Expression and purification of *LtEg1* recombinant protein in *Escherichia coli* BL21



A: DNS试剂与酶解产物反应后溶液的吸光度值;图中数据均为平均数±标准误。B: DNS试剂与酶解产物反应后溶液的颜色变化。A: The absorbance value of DNS solution; data are mean±SE. B: The change of DNS solution color.

图5 内切酶*LtEg1*活性的测定  
Fig. 5 Enzymatic activity of purified *LtEg1* protein

### 3 讨论

植物病原真菌在侵染寄主的过程中,通常会遇到寄主植物一些固有的物理屏障如蜡质层、角质层及厚壁细胞等。为了克服这些先天的屏障,病原菌

会向寄主植物中分泌大量的水解酶类,以突破植物的防卫反应,从而实现自身的成功侵入及扩展(Yan et al., 2018)。关于病原菌外泌水解酶的功能及作用机理在植物病原真菌和卵菌中已被广泛研究

(Sprockett et al., 2011; Zhang et al., 2014; Yang et al., 2019),但在植物机会性病原真菌可可毛色二孢中报道很少。本研究克隆了可可毛色二孢中1个 $\beta$ -1,4-葡聚糖内切酶Lteg1,通过多序列比对分析发现Lteg1同源物在可可毛色二孢、稻瘟病菌、尖孢镰刀菌及构巢曲霉等不同真菌间的保守程度较高,但Lteg1同源物这些保守位点或保守基序是否会影响其酶活还需要进一步深入分析。

本试验利用互补蔗糖酶分泌缺陷型酵母YTK12,采用其它病原菌如条锈病菌(Gu et al., 2011)、葡萄霜霉菌*Plasmopara viticola*(孔祥久等,2016)和稻曲病菌*Ustilaginoidea virens*(Fang et al., 2016)等外泌蛋白信号肽鉴定方法,证明内切酶Lteg1的信号肽能够引起酵母蔗糖酶的外泌,与本研究预测结果相一致,这说明内切酶Lteg1也可能是1个外泌蛋白,同时也表明该酵母系统可用于植物病原真菌外泌蛋白信号肽的鉴定。酶活性测定试验表明,内切酶Lteg1对羧甲基纤维素钠具有一定的酶解活性,这与其它研究结果相似,如Salinas et al.(2011)发现Lteg1在云芝*Trametes versicolor*中的同源蛋白TvEG能够水解木质纤维素;Li & Walton(2017)认为嗜热侧孢霉*Sporotrichum thermophile*中的 $\beta$ -1,4-葡聚糖内切酶能够酶解低黏度羧甲基纤维素、甘露聚糖、半乳甘露聚糖等糖类物质。以上研究表明来源于不同真菌的葡聚糖内切酶可能具有相似的底物选择性。综合考虑Lteg1的水解酶活性及外泌特性,推测在可可毛色二孢侵染寄主植物的过程中,Lteg1被分泌至胞外后,能以寄主植物组织成分为底物,发挥其酶活功能。前期Yan et al.(2018)研究结果表明内切酶Lteg1是一个重要的致病因子,但是Lteg1在可可毛色二孢侵染致病过程中的作用机制并不清楚。内切酶Lteg1的活性可能有助于病原菌侵染致病,但Lteg1是否仅仅通过其酶活功能来影响病原菌致病还是通过扮演其它角色如效应子来调控病原菌与寄主之间的相互作用并不清楚,内切酶Lteg1的活性与其致病功能之间的联系有待进一步分析。

不同侵染阶段基因表达量分析结果显示,Lteg1基因在病原菌侵染阶段的表达量较营养菌丝阶段显著增高,这与Yan et al.(2018)报道的Lteg1影响可可毛色二孢的致病力结果一致,同时也说明Lteg1基因在病原菌体内的表达受到精确的调控。从营养生长阶段转变为侵染阶段,病原菌为了从寄主植物中获取自身生存必需的营养,可能会主动上调相关

胞外酶编码基因的表达;病原菌在侵染寄主时,如遇到寄主植物的天然屏障,也会诱导胞外酶编码基因的高表达,以促进对寄主组织的降解,达到成功侵染植物的目的,这些因素均可能会导致Lteg1基因在病原菌侵染阶段表达量的升高。本研究初步分析了内切酶Lteg1的活性、外泌特性及基因表达模式,这为后续分析可可毛色二孢乃至植物内生真菌中类似胞外酶的功能及特性提供了借鉴,但是关于内切酶Lteg1发挥其毒性功能的机制还需要进一步深入研究。

## 参 考 文 献 (References)

- AN HJ, LURIE S, GREVE LC, ROSENQUIST D, KIRIMIZ C, LAVITCH JM, LEBRILLA CB. 2005. Determination of pathogen-related enzyme action by mass spectrometry analysis of pectin breakdown products of plant cell walls. *Analytical Biochemistry*, 338(1): 71–82.
- BEN-DANIEL BH, BAR-ZVI D, TSROR L. 2012. Pectate lyase affects pathogenicity in natural isolates of *Colletotrichum coccodes* and in *pelA* gene-disrupted and gene-overexpressing mutant lines. *Molecular Plant Pathology*, 13(2): 187–197.
- CHETHANA KWT, LI X, Zhang W, HYDE KD, YAN JY. 2016. Trail of decryption of molecular research on Botryosphaeriaceae in woody plants. *Phytopathologia Mediterranea*, 55(2): 147–171.
- DISSANAYAKE AJ, ZHANG W, LI XH, ZHOU Y, KANDAWATTE TC, CHUKEATIROTE E, HYDE KD, YAN JY, ZHANG GZ, ZHAO WS. 2015b. First report of *Neofusicoccum mangiferae* associated with grapevine dieback in China. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2): 414–419.
- DISSANAYAKE AJ, ZHANG W, LIU M, CHUKEATIROTE E, YAN JY, LI XH, HYDE KD. 2015a. *Lasiodiplodia pseudotheobromae* causes pedicel and peduncle discolouration of grapes in China. *Australasian Plant Disease Notes*, 10(1): 21.
- FANG A, HAN YQ, ZHANG N, ZHANG M, LIU LJ, LI S, LU F, SUN WX. 2016. Identification and characterization of plant cell death-inducing secreted proteins from *Ustilaginoidea virens*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 29(5): 405–416.
- GU B, KALE SD, WANG QH, WANG DH, PAN QN, CAO H, MENG YL, KANG ZS, TYLER BM, SHAN WX. 2011. Rust secreted protein Ps87 is conserved in diverse fungal pathogens and contains a RXLR-like motif sufficient for translocation into plant cells. *PLoS ONE*, 6(11): e27217.
- JACOBS KA, COLLINS-RACIE LA, COLBERT M, DUCKETT M, GOLDEN-FLEET M, KELLEHER K, KRIZ R, LAVALLIE ER, MERBERG D, SPAULDING V, et al. 1997. A genetic selection for isolating cDNAs encoding secreted proteins. *Gene*, 198(1/2): 289–296.
- KARS I, KROOSHOFF GH, WAGEMAKERS L, JOOSTEN R, BENEN JAE, VAN KAN JAL. 2005. Necrotizing activity of five *Botrytis cinerea* endopolygalacturonases produced in *Pichia pasto-*

- ris.* The Plant Journal, 43: 213–225
- KIKOT GE, HOURS RA, ALCONADA TM. 2010. Contribution of cell wall degrading enzymes to pathogenesis of *Fusarium graminearum*: a review. Journal of Basic Microbiology, 49(3): 231–241
- KONG XJ, SHI J, KONG FF, WANG ZY, ZHANG H. 2016. Identification of the signal peptide of candidate effector protein RXLR5 from *Plasmopara viticola*. Plant Protection, 42(1): 40–44 (in Chinese) [孔祥久, 石洁, 孔繁芳, 王忠跃, 张昊. 2016. 葡萄霜霉菌候选效应子RXLR5信号肽的鉴定. 植物保护, 42(1): 40–44]
- LI BY, WALTON JD. 2017. Functional diversity for biomass deconstruction in family 5 subfamily 5 (GH5\_5) of fungal endo- $\beta$ -1,4-glucanases. Applied Microbiology & Biotechnology, 101(10): 4093–4101
- MA ZC, SONG TQ, ZHU L, YE WW, WANG Y, SHAO YY, DONG SM, ZHANG ZG, DOU DL, ZHENG XB, et al. 2015. A *Phytophthora sojae* glycoside hydrolase 12 protein is a major virulence factor during soybean infection and is recognized as a PAMP. The Plant Cell, 27(7): 2057–2072
- MILLER GL. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Biochemistry, 31(3): 426–428
- SALINAS A, VEGA M, LIENQUEO ME, GARCIA A, CARMONA R, SALAZAR O. 2011. Cloning of novel cellulases from cellulolytic fungi: heterologous expression of a family 5 glycoside hydrolase from *Trametes versicolor* in *Pichia pastoris*. Enzyme and Microbial Technology, 49(6/7): 485–491
- SONG YQ, LOU BH, CHEN AJ, BAI XJ, LI XH, ZHANG Y, HE JJ, FAN QJ. 2015. Inhibitory effect of 25 kinds of fungicides to grape canker fungi and the evaluation of its applicability to grape. South China Fruits, 44(4): 83–87 (in Chinese) [宋雅琴, 娄兵海, 陈爱军, 白先进, 李兴红, 张瑛, 何建军, 范七军. 2015. 25种杀菌剂对葡萄溃疡病菌抑制作用及其对葡萄适用性评价. 中国南方果树, 44(4): 83–87]
- SPROCKETT DD, PIONTKIVSKA H, BLACKWOOD CB. 2011. Evolutionary analysis of glycosyl hydrolase family 28 (GH28) suggests lineage-specific expansions in necrotrophic fungal pathogens. Gene, 479(1/2): 29–36
- YAN JY, LI XH, KONG FF, WANG ZY, GONG LZ, HE HP. 2011a. Occurrence of grapevine trunk disease caused by *Botryosphaeria rhodina* in China. Plant Disease, 95(2): 219
- YAN JY, PENG YL, XIE Y, LI XH, YAO SW, TANG ML, WANG ZY. 2011b. First report of grapevine trunk disease caused by *Botryosphaeria obtusa* in China. Plant Disease, 95(5): 616
- YAN JY, XIE Y, YAO SW, WANG ZY, LI XH. 2012. Characterization of *Botryosphaeria dothidea*, the causal agent of grapevine canker in China. Australasian Plant Pathology, 41(4): 351–357
- YAN JY, XIE Y, ZHANG W, WANG Y, LIU JK, HYDE KD, SEEM RC, ZHANG GZ, WANG ZY, YAO SW, et al. 2013. Species of Botryosphaeriaceae involved in grapevine dieback in China. Fungal Diversity, 61(1): 221–236
- YAN JY, ZHAO WS, CHEN Z, XING QK, ZHANG W, CHETHANA KWT, XUE MF, XU JP, PHILLIPS AJL, WANG Y, et al. 2018. Comparative genome and transcriptome analyses reveal adaptations to opportunistic infections in woody plant degrading pathogens of Botryosphaeriaceae. DNA Research, 25(1): 87–102
- YANG C, YU YQ, HUANG JK, MENG FK, PANG JH, ZHAO QQ, ISLAM MA, XU N, TIAN Y, LIU J. 2019. Binding of the *Magnaporthe oryzae* chitinase MoCh1 by a rice tetratricopeptide repeat protein allows free chitin to trigger immune responses. The Plant Cell, 31: 172–188
- ZHANG LS, KARS I, ESSENSTAM B, LIEBRAND TWH, WAGEMAKERS L, ELBERSE J, TAGKALAKI P, TJOITANG D, VAN DEN ACKERVEKEN G, VAN Kan JAL. 2014. Fungal endopolygalacturonases are recognized as microbe-associated molecular patterns by the *Arabidopsis* receptor-like protein responsiveness to *Botrytis* polygalacturonases1. Plant Physiology, 164(1): 352–364
- ZHANG W, LI XH, GUO FF, LIU M, HUANG JB, YAN JY. 2017b. Establishment and application of duplex PCR assay for grape canker pathogens *Botryosphaeria dothidea* and *Neofusicoccum parvum*. Journal of Plant Protection, 44(4): 636–642 (in Chinese) [张玮, 李兴红, 郭飞飞, 刘梅, 黄金宝, 燕继晔. 2017a. 两种葡萄溃疡病菌双重PCR检测方法的建立与应用. 植物保护学报, 44(4): 636–642]
- ZHANG W, YAO SW, ZHANG GJ, XIE Y, LI XH, XU HY. 2017b. Resistance evaluation of main grape cultivars in China to *Botryosphaeria dothidea*. Plant Protection, 43(3): 177–180 (in Chinese) [张玮, 姚伟伟, 张国军, 谢悦, 李兴红, 徐海英. 2017b. 中国葡萄主要品种对葡萄座腔菌的抗性评价. 植物保护, 43(3): 177–180]
- ZHU WJ, RONEN M, GUR Y, MINZ-DUB A, MASRATI G, BEN-TAL N, SAVIDOR A, SHARON I, EIZNER E, VALERIUS O, et al. 2017. BcXYG1, a secreted xyloglucanase from *Botrytis cinerea* induces cell death and triggers plant defense. Plant Physiology, 175(1): 438–456

(责任编辑:王璇)