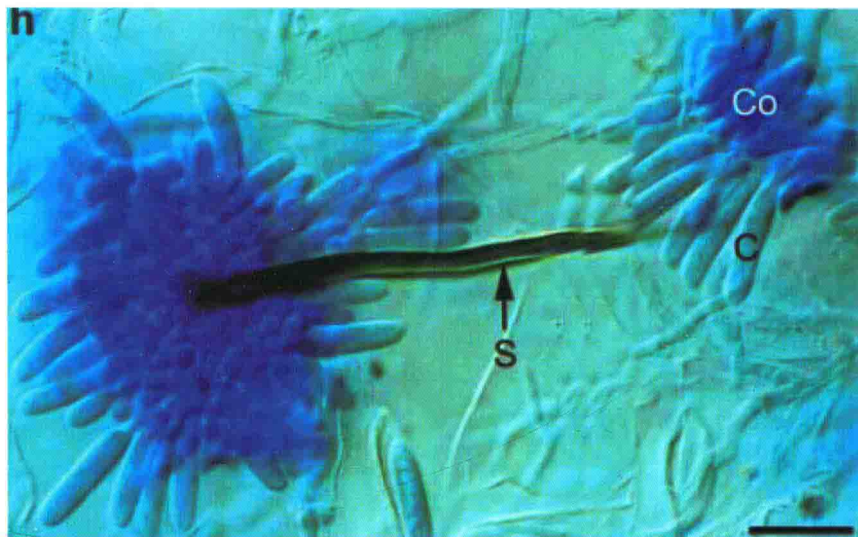


云南省优势特色重点学科生物学一级学科建设项目 (50097505)
云南省高校林下生物资源保护及利用科技创新团队 (2014015)
云南省森林灾害预警与控制重点实验室
国家自然科学基金项目 (31560211)
云南省教育厅科学研究基金项目 (2014Y330)

共同资助

Mapping and bioinformatics
analysis on G protein signaling
pathway related protein of
Colletotrichum higginsianum



希金斯炭疽菌G蛋白信号途径绘制及相关蛋白

生物信息学分析

Mapping and bioinformatics analysis on G protein signaling
pathway related protein of *Colletotrichum higginsianum*

韩长志 编著

中国林业出版社

云南省优势特色重点学科生物学一级学科建设项目(50097505)

云南省高校林下生物资源保护及利用科技创新团队(2014015)

云南省森林灾害预警与控制重点实验室

共同资助

国家自然科学基金项目(31560211)

云南省教育厅科学研究基金项目(2014Y330)

希金斯炭疽菌 G 蛋白信号 途径绘制及相关蛋白 生物信息学分析

Mapping and bioinformatics analysis on G protein signaling pathway
related protein of *Colletotrichum higginsianum*

韩长志 编著

HAN CHANGZHI

中国林业出版社

China Forestry Publishing House

图书在版编目(CIP)数据

希金斯炭疽菌 G 蛋白信号途径绘制及相关蛋白生物信息学分析/韩长志编著. —北京: 中国林业出版社, 2016. 7

ISBN 978-7-5038-8652-2

I. ①希… II. ①韩… III. ①炭疽病—研究 IV. ①S432.4

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 199575 号

中国林业出版社·生态保护出版中心

责任编辑: 张 锴

出 版: 中国林业出版社 (100009 北京西城区德内大街刘海胡同 7 号)

网 址: <http://lycb.forestry.gov.cn> 电话: 010-83143533

发 行: 中国林业出版社

印 刷: 三河市祥达印刷包装有限公司

版 次: 2016 年 7 月第 1 版

印 次: 2016 年 7 月第 1 次

开 本: 787mm × 1092 mm 1/16

印 张: 9

字 数: 300 千字

定 价: 42.00 元

前 言

生物信息学 (Bioinformatics) 作为生命科学与计算机学科的交叉学科, 是通过综合利用生物学、计算机科学和信息技术来揭示生命体中大量而复杂的蛋白序列以及基因序列数据所隐含的生物学信息的学科, 其以蛋白质序列为研究对象, 以生物信息学预测软件为研究方法, 涉及数据采集、处理、存储、传播、分析和解释等多方面内容。生物信息学分析作为探索生命世界中未知过程的一种方法, 不仅需要收集、整理大量的原始氨基酸序列以及 ATCG 碱基数据, 而且还要对这些看似无序的原始数据进行深入解析, 以探索基因、蛋白所具有的功能, 并有助于揭示更多大自然生命的奥秘。对科研工作者而言, 生物信息学分析工作作为后续科学试验研究的开展提供了诸多便利, 它可以基于已知蛋白相关信息预测未知蛋白所具有的基本特征和功能, 更好地服务于生物学试验的开展。与传统实验室中开展试验相同, 生物信息学分析所采用的原始研究材料、所开展的研究对象以及所使用的研究方法均有严格要求。因此, 通过生物信息学进行分析对开展后续研究具有重要的理论价值和指导意义。

作为重要的植物病原真菌, 炭疽菌属真菌包括约 600 个种, 可以侵染 3200 多种单子叶植物和双子叶植物。希金斯炭疽菌 (*Colletotrichum higginsianum* Sacc.), 作为该属中重要的病原菌之一, 可以侵染诸如小油菜、菜心、羽衣甘蓝、结球甘蓝、大白菜、萝卜等多种十字花科蔬菜植物而引起炭疽病。2012 年, 随着该菌与禾谷炭疽菌 [*Colletotrichum graminicola* (Cesati) Wilson] 全基因组序列的公布, 人们对于上述炭疽菌开展了多方面的研究工作, 特别是近些年诸多学者利用生物信息学方法对于全基因组序列进行分析, 取得了较多研究成果。

G 蛋白 (Guanine nucleotide binding protein, 鸟嘌呤核苷酸结合蛋白) 信号途径作为真核生物中最保守的信号传导途径之一, 涉及若干个重要酶蛋白, 其中, G 蛋白偶联受体 (GPCR) 作为 G 蛋白信号转导途径上接收外源信号、传递信号重要的表面受体, 在植物与病原菌互作过程中发挥着诸多重要的作用; G 蛋白信号调控因子 (RGS)、磷酸肌醇特异磷脂酶 C (PI-PLC)、腺苷酸环化酶 (AC) 作为 $G\alpha$ -GTP 的效应分子, 可信号进一步向下游传递, 从而发挥重要作用。近些年, 关于 *C. graminicola* 的 MAPK 途径蛋白预测、致病基因鉴定、基因功能、分泌蛋白预测, 以及 RGS、14-3-3 蛋白、磷酸二酯酶、AC、PITP 等 G 蛋白信号途径相关蛋白的生物信息学分析已见报道, 同时对于 *C. higginsianum* 中 GPCR、RGS、AC、PDE 等蛋白开展了诸多生物信息学分析。然而, 目前学术界尚缺乏对

C. higginsianum 中 G 蛋白信号途径较为系统的论述。特别是在国家大力倡导发展林下经济的背景条件下, 经济林木、花卉以及中药材等诸多植物炭疽病发生逐年增加。本研究工作为进一步开展同属于炭疽菌属但其基因组序列尚未公布的胶孢炭疽菌的研究提供了重要的理论指导, 也为实现林下经济植物炭疽病防治药剂的开发提供了重要的新思路。

鉴于作者水平有限, 加之时间有限, 本书难免出现一些错误, 请各位读者及时提出宝贵意见, 以便更正。

韩长志
2016. 3. 28

目 录

前 言

第一章 希金斯炭疽菌的研究进展	(1)
一、经济危害及分布情况	(1)
(一) 经济危害情况	(1)
(二) 分布情况	(2)
二、形态特征及分类地位	(2)
(一) 形态特征	(2)
(二) 分类地位	(3)
三、生活史及侵染过程	(3)
四、遗传关系	(7)
五、防治措施	(8)
第二章 G 蛋白信号途径相关蛋白介绍	(10)
一、GPCR	(11)
二、G α 、G β 、G γ 以及 PhLPS	(13)
(一) G α 、G β 、G γ	(13)
1. G α	(13)
2. G β	(13)
3. G γ	(14)
(二) PhLPS	(14)
三、调控蛋白 RGS	(15)
四、G 蛋白信号下游效应分子	(15)
(一) cAMP-PKA 途径	(16)
1. AC	(17)
2. PKA-R 及 PKA-C	(17)
3. PDE	(18)
(二) MAPK 途径	(18)
1. MAPKKK	(18)
2. MAPKK	(19)
3. MAPK	(19)

(三) IP ₃ -Ca ²⁺ /DAG-PKC 途径·····	(20)
1. PI-PLC ·····	(20)
2. PKC ·····	(20)
第三章 希金斯炭疽菌 G 蛋白信号途径图绘制 ·····	(22)
一、G 蛋白信号途径图绘制 ·····	(22)
(一) G 蛋白信号途径相关蛋白获取·····	(22)
1. GPCR 获取·····	(22)
2. G α 、G β 、G γ 以及 PhLPS 获取·····	(23)
3. RGS 获取·····	(24)
4. AC 获取·····	(25)
5. PKA-R 以及 PKA-C 获取·····	(26)
6. PDE 获取·····	(28)
7. MAPK 获取·····	(28)
8. PI-PLC 获取·····	(29)
9. PKC 获取·····	(30)
(二) G 蛋白信号途径绘制·····	(32)
二、问题 ·····	(33)
三、展望 ·····	(34)
第四章 希金斯炭疽菌 GPCR 生物信息学分析 ·····	(36)
一、GPCR 保守结构域分析 ·····	(36)
二、GPCR 理化性质分析 ·····	(37)
三、GPCR 疏水性分析 ·····	(39)
四、GPCR 信号肽、转运肽分析 ·····	(40)
五、GPCR 亚细胞定位分析 ·····	(41)
六、GPCR 二级结构分析 ·····	(41)
七、GPCR 遗传关系分析 ·····	(42)
第五章 希金斯炭疽菌 Gα、Gβ、Gγ 生物信息学分析 ·····	(44)
一、Gα、Gβ、Gγ 保守结构域分析 ·····	(44)
二、Gα、Gβ、Gγ 理化性质分析 ·····	(45)
三、Gα、Gβ、Gγ 疏水性分析 ·····	(47)
四、Gα、Gβ、Gγ 信号肽、转运肽分析 ·····	(48)
五、Gα、Gβ、Gγ 亚细胞定位分析 ·····	(49)
六、Gα、Gβ、Gγ 二级结构分析 ·····	(49)
七、Gα、Gβ、Gγ 遗传关系分析 ·····	(50)
第六章 希金斯炭疽菌 PhLPS 生物信息学分析 ·····	(54)
一、PhLPS 保守结构域分析 ·····	(54)

二、PhLPS 理化性质分析	(54)
三、PhLPS 疏水性分析	(55)
四、PhLPS 信号肽、转运肽分析	(56)
五、PhLPS 亚细胞定位分析	(57)
六、PhLPS 二级结构分析	(57)
七、PhLPS 遗传关系分析	(57)
第七章 希金斯炭疽菌 RGS 生物信息学分析	(59)
一、RGS 保守结构域分析	(59)
二、RGS 理化性质分析	(60)
三、RGS 疏水性分析	(61)
四、RGS 信号肽、转运肽分析	(63)
五、RGS 亚细胞定位分析	(64)
六、RGS 二级结构分析	(65)
七、RGS 遗传关系分析	(65)
第八章 希金斯炭疽菌 AC 生物信息学分析	(68)
一、AC 保守结构域分析	(68)
二、AC 理化性质分析	(68)
三、AC 疏水性分析	(70)
四、AC 信号肽、转运肽分析	(71)
五、AC 亚细胞定位分析	(71)
六、AC 二级结构分析	(71)
七、AC 遗传关系分析	(72)
第九章 希金斯炭疽菌 PKA-R 以及 PKA-C 生物信息学分析	(73)
一、PKA-R 以及 PKA-C 保守结构域分析	(73)
二、PKA-R 以及 PKA-C 理化性质分析	(74)
三、PKA-R 以及 PKA-C 疏水性分析	(77)
四、PKA-R 以及 PKA-C 信号肽、转运肽分析	(79)
五、PKA-R 以及 PKA-C 亚细胞定位分析	(80)
六、PKA-R 以及 PKA-C 二级结构分析	(81)
七、PKA-R 以及 PKA-C 遗传关系分析	(82)
第十章 希金斯炭疽菌 PDE 生物信息学分析	(85)
一、PDE 保守结构域分析	(85)
二、PDE 理化性质分析	(85)
三、PDE 疏水性分析	(87)
四、PDE 信号肽、转运肽分析	(88)
五、PDE 亚细胞定位分析	(89)

六、PDE 二级结构分析	(90)
七、PDE 遗传关系分析	(90)
第十一章 希金斯炭疽菌 MAPK 信号通路上蛋白生物信息学分析	(92)
一、MAPK 信号通路上蛋白保守结构域分析	(92)
二、MAPK 信号通路上蛋白理化性质分析	(93)
三、MAPK 信号通路上蛋白疏水性分析	(93)
四、MAPK 信号通路上蛋白信号肽、转运肽分析	(97)
五、MAPK 信号通路上蛋白亚细胞定位分析	(98)
六、MAPK 信号通路上蛋白二级结构分析	(98)
七、MAPK 信号通路上蛋白遗传关系分析	(99)
第十二章 希金斯炭疽菌 PI-PLC 生物信息学分析	(103)
一、PI-PLC 保守结构域分析	(103)
二、PI-PLC 理化性质分析	(104)
三、PI-PLC 疏水性分析	(105)
四、PI-PLC 信号肽、转运肽分析	(106)
五、PI-PLC 亚细胞定位分析	(108)
六、PI-PLC 二级结构分析	(109)
七、PI-PLC 遗传关系分析	(109)
第十三章 希金斯炭疽菌 PKC 生物信息学分析	(111)
一、PKC 保守结构域分析	(111)
二、PKC 理化性质分析	(111)
三、PKC 疏水性分析	(113)
四、PKC 信号肽、转运肽分析	(114)
五、PKC 亚细胞定位分析	(114)
六、PKC 二级结构分析	(114)
七、PKC 遗传关系分析	(115)
参考文献	(117)
附录	(125)
附录 1 希金斯炭疽菌 PKA-C BLASTP 比对结果	(125)
附录 2 希金斯炭疽菌 PKC BLASTP 比对结果	(129)
附录 3 希金斯炭疽菌 G 蛋白亚基遗传关系分析结果	(131)
致谢	(134)

第一章 希金斯炭疽菌的研究进展

炭疽菌属真菌包括约 600 个种, 可以侵染 3200 多种单子叶植物和双子叶植物^[1]。作为该属中重要的病菌——希金斯炭疽菌(*Colletotrichum higginsianum* Sacc.) 可以侵染诸如小油菜、菜心、羽衣甘蓝、结球甘蓝、大白菜、萝卜等多种十字花科蔬菜植物而引起炭疽病^[2,3], 是一类重要的世界性植物真菌病害。

国内外对该菌的研究主要集中在病菌的生物学特性^[4]、生防菌筛选^[5]、遗传转化^[6,7]以及不同营养元素(硅、氮、钾等)对其的作用^[8-11]、外源酚酸类物质 pHBA^[12] 控制病害等方面, 同时, 随着该基因组序列的公布^[13], 国内学者对其开展了 MAPK 途径相关基因的找寻及信号通路简图的绘制工作^[14]。就该菌致病基因的研究而言, 国内已经建立根癌农杆菌介导的转化(*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 及直接重复重组介导的基因打靶(Direct repeat recombination-mediated gene targeting, DRGT) 等技术^[6,7]。华中农业大学黄俊斌教授实验室已经建立了希金斯炭疽菌转化子的突变体库, 为进一步对这些转化子基因功能研究提供了技术支持^[15-17]。

此外, 前期利用候选效应分子所具有的典型特征, 基于生物信息学预测软件对该菌中的候选效应分子进行预测^[18], 并对该菌中诸多重要蛋白如 GPCR^[19]、RGS^[20]、AC^[21,22]、PITP^[23]、14-3-3^[24]、septin^[25]、PDE^[26] 等进行了生物信息学分析, 而关于该菌中 G 蛋白信号通路效应酶的系统报道尚未见报道。

一、经济危害及分布情况

(一) 经济危害情况

希金斯炭疽菌可以引起芸薹属和萝卜属植物炭疽病, 特别是菜心、白菜、甘蓝、萝卜等十字花科蔬菜炭疽病^[13,27]。其中, 白菜类、菜心类炭疽病在我国各地发生严重, 蔬菜大棚内的高温、高湿环境以及我国南方地区高温、高湿的气候更加适宜该病发生, 发病严重时可使蔬菜产生巨大的产量损失^[8]。作为重要的模式生物, 该病菌可在实验室条件侵染模式植物拟南芥, 产生典型的侵染结构和水渍状病斑^[13](图 1-1)。

就该菌引起大白菜炭疽病而言, 种植大白菜的地区常有发生, 多雨地区或年份该病害发生一般较重, 其症状主要表现为叶片受害, 开始时叶片正面产生苍白色或褪绿色水浸状小斑点, 后来逐渐扩大成灰褐色、稍凹陷、圆形或近圆形的病斑, 最后病斑中央变成灰白色, 1~2 mm 或稍大, 半透明, 呈薄纸状, 容易穿孔, 严重时病斑多联合在一起, 叶片变

黄干枯。叶片背面一般危害叶脉，出现长短不一的褐色条状病斑。叶柄、花梗、种荚受害时，产生长椭圆形或纺锤形至梭形、褐色或灰褐色凹陷的病斑，危害严重时大量病斑汇合，可引起植株早枯。在天气潮湿时，病部常常溢出呈淡红色的黏状物。

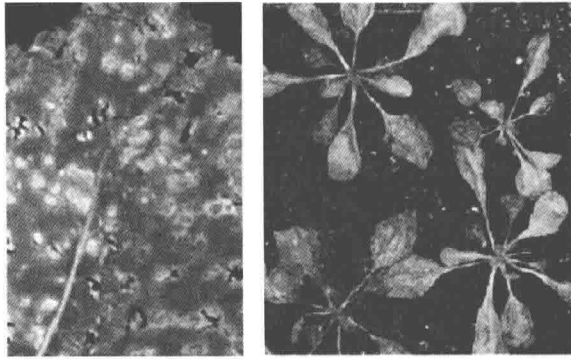


图 1-1 希金斯炭疽菌危害芸薹属植物以及拟南芥的病害症状^[13]

Figure 1-1 The stalk-rot symptoms caused by *Colletotrichum higginsianum* on *Brassica* and *Arabidopsis*

此外，在北方，早熟梅菜先发病，主要是叶片受害，产生近圆形斑点，直径 0.5~3 mm，中间坏死部分灰白色，边缘明显，有时病部破裂，产生小孔。*C. higginsianum* 通常以菌丝体随病残体在土中或附着在植物种子上越冬。翌年，分生孢子借风或雨水飞溅传播，潜育期 3~5 d，长出芽管侵染，后在病部继续形成分生孢子进行再侵染。一般早熟梅菜种植过密或地势低洼，通风透光差的田块发病较重。每年发生期主要受温度影响，而发病程度则受适温期降水量及降水次数多少影响，属高温高湿型病害。

(二) 分布情况

C. higginsianum 主要分布于美国以及中国、日本、印度等东亚和南亚国家^[2,3,28]。在我国，由该病菌侵染菜心引起的炭疽病是菜心上最常见和发生最严重的病害之一，该菌也成为限制菜薹产量和质量的重要因素^[29]。特别是对广东省种植菜心的地区具有重要的影响，菜心炭疽菌病不仅降低菜心的产量，也对菜心的品质产生了较大影响^[30,31]。目前，国内对于该菌在我国分布的具体位置报道有宁夏回族自治区的原州、彭阳、银川、永宁、惠农、平罗等地^[3]，但是其他地区分布的具体位置尚未见报道。

二、形态特征及分类地位

(一) 形态特征

希金斯炭疽菌的菌丝无色、透明，有隔膜；其分生孢子盘小，直径 25~42 μm ，埋生于寄主表皮下，黑褐色，散生。刚毛散生其上，量少，暗褐色，顶端色淡，较尖，基部稍膨大，有 1~3 个隔膜，48~70 $\mu\text{m} \times 3 \sim 5 \mu\text{m}$ 。分生孢子梗顶端窄，基部较宽，无色，单

胞，洋梨形，大小 $9\sim 16\ \mu\text{m}\times 4\sim 5\ \mu\text{m}$ ；分生孢子无色、圆筒形、单胞，大小 $13\sim 18\ \mu\text{m}\times 3\sim 5.5\ \mu\text{m}$ ，内有1~2个油球^[17]（图1-2）。

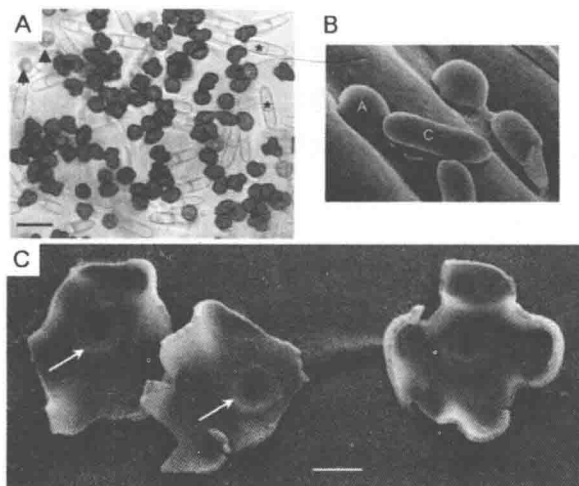


图1-2 希金斯炭疽菌分生孢子和附着胞形态特征^[32,33]

Figure 1-2 Morphological characteristics of spores and appressoria in *C. higginsianum*

A, 经光学显微镜观察，在聚苯乙烯培养皿中孵育18 h后所形成的单层、暗色的黑色素化的附着胞，标尺为10 mm。星号所示为已经萌发的孢子出现空囊并具有清晰的纵隔；箭头所示则为不成熟的、未黑色素化的附着胞，数量较少。B, 分生孢子萌发形成黑色素化的附着胞。C, 经扫描电子显微镜观察，成熟的附着胞遭受到机械破坏后，部分组织依然附着在聚苯乙烯培养皿表面。附着胞顶端，圆顶部分已经去除，露出附着在基质的基底细胞壁穿透孔依然存在。箭头所示为穿透孔周围有一个环形的增厚壁。标尺为2 mm。

(A) Light micrographs showing the monolayer of darkly melanized appressoria formed on a polystyrene Petri dish after incubation for 18 h. Bars, 10 mm. Germinated conidia appear empty and are clearly septate (asterisks). Immature (nonmelanized) appressoria are very infrequent (arrowheads). (B) Conidium germinates and forms melanised appressorium. (C) Scanning electron micrograph showing fragments of mature appressoria remaining attached to the surface of a polystyrene Petri dish after mechanical disruption by scraping. The upper, domed part of the cell has been removed, revealing the presence of a penetration pore in the basal cell wall attached to the substratum. The pore is surrounded by an annular wall thickening (arrows). Bar, 2 mm.

(二) 分类地位

依据 Ainsworth (1973) 分类系统^[34]，该菌属于半知菌亚门 (Deuteromycotina) 腔孢纲 (Coelomycetes) 黑盘孢目 (Melanconiales) 黑盘孢科 (Melanconiaceae) 炭疽菌属 (*Colletotrichum*)。

三、生活史及侵染过程

希金斯炭疽菌可在人工培养基上进行生长，其菌丝生长的最适温度为 $25\ ^\circ\text{C}$ ，在生长后期产生分生孢子。鉴于该病原菌所具有的诸如易培养、易保存以及常规遗传转化、致病

性明显等诸多特性,使得该病菌成为研究植物与病原菌互作的模式生物^[13]。就大白菜炭疽病而言,病菌随病残体在土壤中越冬,种子也能带菌,病菌在田间经风雨传播,从植物组织伤口侵入或直接穿透表皮侵入,经3~5天潜育期即可发病。高温、高湿是发病的重要条件,尤其是时晴时雨的天气更易诱发此病害。

希金斯炭疽菌作为一种半活体营养型寄生真菌,其分生孢子首先萌发产生芽管,芽管顶端膨大形成黑色素化的附着胞,黑色素化的附着胞会分化产生侵染钉,侵染钉可穿透寄主表皮细胞,并在侵入的第一个寄主细胞内产生膨大的初生菌丝。此时,该病菌并不杀死寄主细胞,而是与寄主植物建立类似活体营养寄生的关系。随后,在初生菌丝尖端产生细长的次生菌丝,次生菌丝穿透寄主细胞壁,进入相邻细胞,并迅速在细胞内定殖、杀死寄主细胞。此时,该菌与寄主植物建立死体营养寄生关系(图1-3)。病原菌以菌丝体或分生孢子在病残体或种子上越冬,通过雨水的冲洗和雨滴飞溅传播,从伤口、气孔或直接穿透表皮侵入,从而引起植株发病,并进行再侵染,适宜生长温度为26~30℃,最高38℃,最低10℃;碱性条件有利于产孢,酸性条件则有利于孢子萌发;光照可刺激菌丝生长。

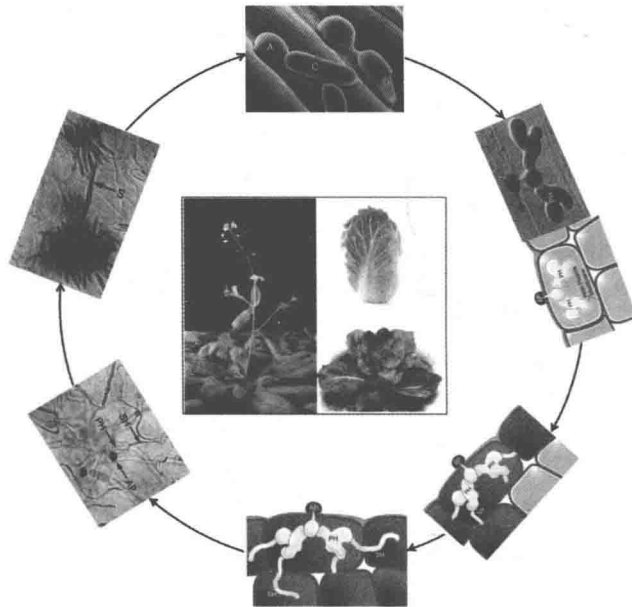


图1-3 希金斯炭疽菌生活史^[33,35]

Figure 1-3 Life cycle of *C. higginsianum*

病原菌的分生孢子在十字花科植物表面萌发,形成一个短芽管和特异化附着胞,并由此产生所需的膨压形成渗透压力。侵入钉直接穿透宿主表皮细胞。在与植物互作的初始阶段,病菌形成一个活体的初生菌丝(PH),一般限制在初层表皮细胞。之后转换到死体营养阶段,产生次生菌丝(SH)不断延伸到宿主细胞间。该病菌再次开始无性繁殖,即从含有黑色素化的、像头发一样刚毛(S)的分生孢子盘中产生分生孢子,而这些刚毛则可以破坏寄主植物角质层和细胞壁,并最终从坏死组织表面突出。

A conidium (C) germinates on the plant surface, forms a short germ tube and differentiates an appressorium (A) in which the turgour pressure required for penetration is generated. A penetration peg penetrates the host epidermal cell directly. In the initial stage of the interaction, *C. higginsianum* forms a biotrophic primary hypha (PH) restricted to the first penetrated epidermal cell. The fungus then switches to a necrotrophic mode of growth, when long secondary hyphae (SH) grow extensively within and between host cells. *C. higginsianum* reproduces asexually by the production of conidia from acervuli containing melanised hair-like setae (S) which breach the cuticle and the host cell wall and erupt onto the surface of the dead tissue.

该病菌可侵染多种十字花科植物(白菜、甘蓝和拟南芥)等引起炭疽病,一般发生在叶背面中肋、叶柄、叶茎和叶面上,偶尔能够侵染花序和种荚。病斑纺锤形或椭圆形,呈褐色凹陷,发生严重时病斑联合,叶片枯死。若连续5天平均气温在20℃以上且相对湿度在80%以上时,则有利于十字花科蔬菜炭疽病的发生和流行。病斑上产生的粉红色的黏质物和黑色的小点,即分生孢子和分生孢子盘。产生的分生孢子通过风雨溅散,进行再侵染,也可寄生于其他越冬的十字花科植物(图1-3)。

根据希金斯炭疽菌利用寄主植物的营养情况,可以将其侵染过程划分为前期活体营养阶段、中期兼性营养阶段以及后期死体营养阶段。该菌侵染过程一般分为5个主要步骤,即分生孢子附着在寄主表面、分生孢子萌发形成芽管、芽管伸长形成附着胞以及侵染钉形成、菌丝在寄主组织中扩展等步骤(图1-4A)。具体而言,在前期,其分生孢子可以分泌一些胶状物质从而实现附着于寄主组织表面的目的,初步建立接触期,而后分生孢子萌发形成芽管,芽管伸长形成附着胞,附着胞进一步分化形成侵入钉,而侵入钉可以直接穿过植物表皮侵入到植物细胞中(图1-4B),上述过程,对于病菌而言,其需要获取自身生长发育所需的大量营养成分,这个时期的植物组织并不发生死亡现象,病原菌的营养方式主要为活体营养;而在后期,随着病原菌在寄主细胞内进行不断扩展,其产生大量的次生菌丝,而这些菌丝又分泌出大量的细胞壁降解酶,从而使得寄主植物组织发生降解,为其进一步生长发育获取营养来源,该时期的营养方式主要为死体营养(图1-4A)。介于上述两者之间的营养时期是处于中间类型的兼性营养阶段,该时期植物组织并没有完全死亡,然而,其已经受到大量菌丝体的扩展、破坏,病菌在利用该时期植物组织营养时,涉及死体、活体营养方式(图1-4)。

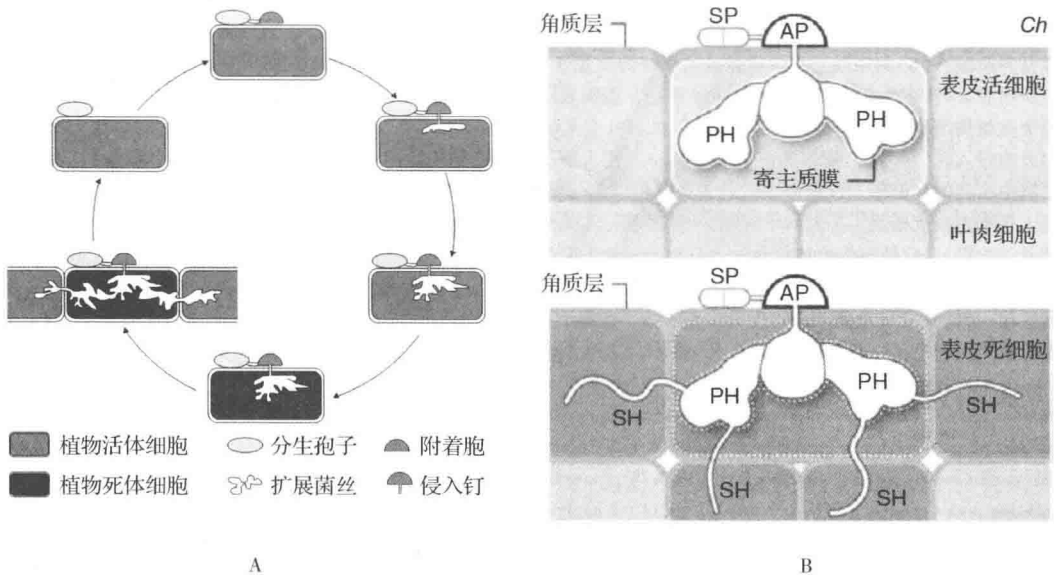


图1-4 希金斯炭疽菌的侵染进程模式图^[13,38]

Figure 1-4 Infection process of *C. higginsianum*

SP、AP、PH、SH 分别表示为希金斯炭疽菌中分生孢子、附着胞、初生菌丝、次生菌丝。A, 整体; B, 局部。

SP, AP, PH and SH is spore, appressorium, biotrophic primary hyphae and necrotrophic secondary hyphae, respectively.

A, Overall; B, Local.

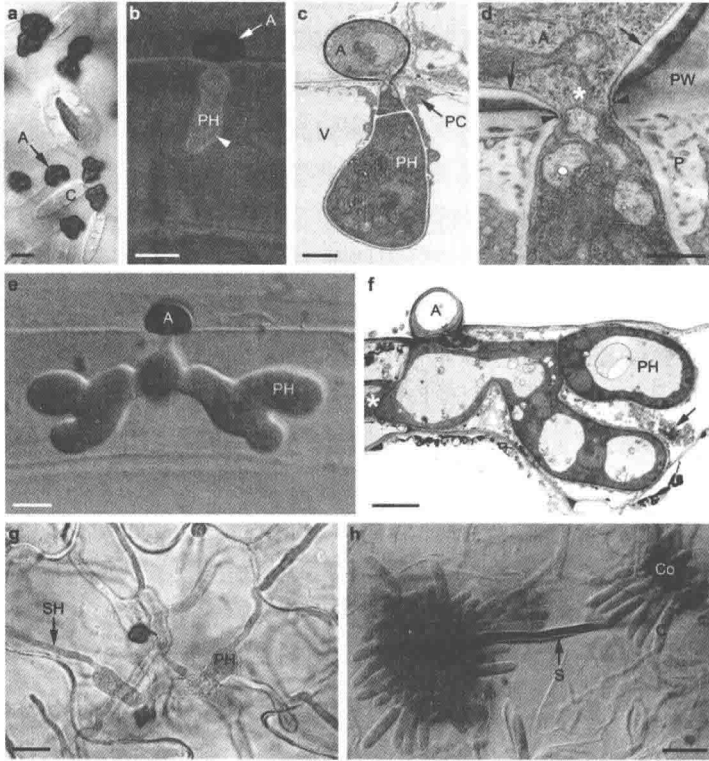


图 1-5 希金斯炭疽菌的侵染拟南芥进程^[13,39]

Figure 1-5 Infection on *Arabidopsis* process of *C. higginsianum*.

萌发过程：(a) 在叶片表面分生孢子萌发形成黑色化了的附着胞。C 表示分生孢子，A 表示附着胞。标尺为 5 μm。

活体营养阶段：(b) 利用激光共聚焦显微镜获得的定殖于叶片表面细胞初生菌丝，其周围是利用 PEN1-GFP 标记的寄主组织质膜。PH 表示初生菌丝，A 表示附着胞，箭头表示寄主组织质膜。标尺为 5 μm。(c) 经扫描电镜获得的初生菌丝被完整植物细胞质包围的截面。V 表示液泡，PC 表示植物细胞质。标尺为 2 μm。(d) 是(c)图的局部放大照片，显示附着胞侵入孔(星号)，附着胞内壁层(箭头)与侵入菌丝细胞壁是连续的。植物表皮向下变形(小箭头)，以及在宿主细胞中出现的病菌侵入位点形成的乳头状沉积(P)。PW 为植物细胞壁。标尺为 500 nm。(e) 成熟，初生菌丝充分扩大进入植物内表皮细胞。A 表示附着胞，PH 表示初生菌丝。标尺为 5 μm。

死体营养阶段：(f) 经扫描电镜获得的通过空泡的初生菌丝产生死体营养的次生菌丝截面(星号)。箭头所示为受感染细胞的细胞质遭到破坏。标尺为 5 μm。(g) 球状初生菌丝形成薄的、丝状次生菌丝(SH)。标尺为 10 μm。

产孢阶段：(h) 从死体组织表面产生分生孢子盘，包括表黑色素化的刚毛，分生孢子梗和无性孢子(分生孢子)。S 表示黑色素化的刚毛，C 表示分生孢子，CO 表示分生孢子梗。标尺为 10 μm。

Germination: (a) Conidia (C) germinating on the leaf surface to form melanised appressoria (A). Bar = 5 μm.
 Biotrophic phase: (b) Confocal micrograph showing epidermal cell penetrated by young primary hypha (PH) surrounded by an intact host plasma membrane (arrow head) labelled with PEN1-GFP. Bar = 5 μm. (c) TEM cross-section through young primary hypha surrounded by intact plant cytoplasm (PC). V, vacuole. Bar = 2 μm. (d) Enlargement from (c) showing appressorial penetration pore (asterisk). The inner wall layer of the appressorium (arrows) is continuous with the penetration hypha cell wall. Note downward deformation of plant cuticle (arrowheads) and papilla (P) deposited by host cell at fungal entry site. PW = plant cell wall. Bar = 500 nm. (e) Mature, fully expanded primary hyphae inside epidermal cell. Bar = 5 μm.
 Necrotrophic phase: (f) TEM section through vacuolated primary hyphae producing necrotrophic secondary hypha (asterisk). Cytoplasm of the infected cell is disrupted (arrow). Bar = 5 μm. (g) Thin, filamentous secondary hyphae (SH) emerging from bulbous primary hyphae. Bar = 10 μm.
 Sporulation: (h) Acervuli erupting from surface of dead tissue comprise melanised setae (S), conidiophores (Co) and asexual spores (conidia, C). Bar = 10 μm.

萌发过程：(a) 在叶片表面分生孢子萌发形成黑色化了的附着胞。C 表示分生孢子，A 表示附着胞。标尺为 5 μm。

活体营养阶段：(b) 利用激光共聚焦显微镜获得的定殖于叶片表面细胞初生菌丝，其周围是利用 PEN1-GFP 标记的寄主组织质膜。PH 表示初生菌丝，A 表示附着胞，箭头表示寄主组织质膜。标尺为 5 μm。(c) 经扫描电镜获得的初生菌丝被完整植物细胞质包围的截面。V 表示液泡，PC 表示植物细胞质。标尺为 2 μm。(d) 是(c)图的局部放大照片，显示附着胞侵入孔(星号)，附着胞内壁层(箭头)与侵入菌丝细胞壁是连续的。植物表皮向下变形(小箭头)，以及在宿主细胞中出现的病菌侵入位点形成的乳头状沉积(P)。PW 为植物细胞壁。标尺为 500 nm。(e) 成熟，初生菌丝充分扩大进入植物内表皮细胞。A 表示附着胞，PH 表示初生菌丝。标尺为 5 μm。

死体营养阶段：(f) 经扫描电镜获得的通过空泡的初生菌丝产生死体营养的次生菌丝截面(星号)。箭头所示为受感染细胞的细胞质遭到破坏。标尺为 5 μm。(g) 球状初生菌丝形成薄的、丝状次生菌丝(SH)。标尺为 10 μm。

产孢阶段：(h) 从死体组织表面产生分生孢子盘，包括表黑色素化的刚毛，分生孢子梗和无性孢子(分生孢子)。S 表示黑色素化的刚毛，C 表示分生孢子，CO 表示分生孢子梗。标尺为 10 μm。

Germination: (a) Conidia (C) germinating on the leaf surface to form melanised appressoria (A). Bar = 5 μm.
 Biotrophic phase: (b) Confocal micrograph showing epidermal cell penetrated by young primary hypha (PH) surrounded by an intact host plasma membrane (arrow head) labelled with PEN1-GFP. Bar = 5 μm. (c) TEM cross-section through young primary hypha surrounded by intact plant cytoplasm (PC). V, vacuole. Bar = 2 μm. (d) Enlargement from (c) showing appressorial penetration pore (asterisk). The inner wall layer of the appressorium (arrows) is continuous with the penetration hypha cell wall. Note downward deformation of plant cuticle (arrowheads) and papilla (P) deposited by host cell at fungal entry site. PW = plant cell wall. Bar = 500 nm. (e) Mature, fully expanded primary hyphae inside epidermal cell. Bar = 5 μm.
 Necrotrophic phase: (f) TEM section through vacuolated primary hyphae producing necrotrophic secondary hypha (asterisk). Cytoplasm of the infected cell is disrupted (arrow). Bar = 5 μm. (g) Thin, filamentous secondary hyphae (SH) emerging from bulbous primary hyphae. Bar = 10 μm.
 Sporulation: (h) Acervuli erupting from surface of dead tissue comprise melanised setae (S), conidiophores (Co) and asexual spores (conidia, C). Bar = 10 μm.

真菌为了实现侵染定殖寄主植物体内的目的,一般会通过向植物细胞内分泌毒素、角质酶、果胶酶、纤维素酶等致病因子的方式,破坏寄主植物的免疫反应,从而在其上建立寄生关系。基于对炭疽菌属真菌侵染过程的研究成果,已经明确该属真菌具有胞内半营养型寄生定殖和表皮下定殖两种侵染策略^[36]。前人研究发现,胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)在侵染不同寄主植物时,所表现的侵染策略兼有炭疽菌属所具有的模式,具体而言,在侵染诸如紫花苜蓿(*Medicago sativa*)、圭亚那笔花豆(*Stylosanthes guianensis*)、西卡柱花草(*Stylosanthes scabra*)等植物时,表现为胞内半营养型寄生定殖策略;而在侵染诸如番木瓜(*Carica papaya*)、麝香葡萄(*Muscadinia rotundifolia*)、油梨(*Persea americana*)等植物时,则表现出表皮下定殖策略^[37],而在侵染诸如橘属(*Citrus* spp.)、笔花豆属(*Stylosanthes* spp.)植物时,则会出现上述两种侵染方式^[36]。然而,对于同属于炭疽菌属的希金斯炭疽菌而言,尚未见其具有上述侵染策略的研究报道,有待于今后进一步明确。该病菌寄生范围较广,推测其在侵染不同植物的策略上方式也具有一定的多样性特点,因此,深入解析该菌在侵染过程中相关基因的功能具有重要的理论和实践意义。

四、遗传关系

炭疽菌属中种间甚至种内菌株间形态变异大,近似种之间的分类特征差异又较小,从而造成该属在分类上较为困难。国内外学者对炭疽菌的鉴定主要以传统的形态鉴定为基础,并结合 rDNA 保守间隔区(rDNA ITS)和随机扩增 DNA 多态性(RAPD)等分子生物学技术进行^[40,41]。前期对胶孢炭疽菌与同属于炭疽菌属的其他真菌之间的遗传关系进行分析,从 NCBI(National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中搜索炭疽菌属的 rDNA ITS 序列,共获得 239 条,其中尤以胶孢炭疽菌所含序列最多,为 114 条,其次为尖孢炭疽菌(*C. acutatum*)24 条,黄瓜(西瓜)炭疽病菌(*C. orbiculare*)18 条,利用 ClusterW 1.8 和 MEGA 4.0 聚类分析软件对其进行初步分析,明确同一属的不同真菌之间的亲缘关系,但是对于形态学较为相似的炭疽菌属真菌而言,除了依赖于 ITS 数据分析明确不同真菌之间亲缘关系外,还应借助于其他试验数据,才能得出更为准确的结论^[42]。同样,前人利用 ITS、ACT、CHS-1、TUB2、HIS3 等基因对炭疽菌属中 27 个真菌开展遗传关系分析,基于多位点对准的最大简约法分析,结果显示希金斯炭疽菌与 *C. fuscum*、*C. tabacum*、*C. destructivum*、*C. linicola* 亲缘关系密切^[13](图 1-6)。

目前,学术界对于炭疽菌属真菌分类的研究多采用一些真菌上常用的分子标记基因,尚缺乏对于来自于不同物种中保守信号通路方面的标记基因的探索研究。随着 *C. higginsianum*、*C. graminicola* 全基因组序列的释放^[13],为进一步开展炭疽菌属真菌分类研究提供了重要的数据支持。前期,通过对 *C. higginsianum* 与其他炭疽菌属真菌中的 β -微管蛋白以及 G 蛋白信号调控因子(Regulators of G-protein Signaling, RGS)的分析,明确 *C. higginsianum* 与其他炭疽菌属病菌 *C. graminicola*、*C. orbiculare* 亲缘关系均较近^[20,43],可以作为炭疽菌属区别于其他属真菌的标记基因。同时,RGS 在上述所分析的炭疽菌中又具有一定的遗传距离差异性,推测 RGS 可以作为炭疽菌属真菌分类的标记基因。此外,通过对 *C. higginsianum*、*C. graminicola* 中的 14-3-3 蛋白序列分析^[24,44],明确 *C. gloeosporioides* 与 *C.*

graminicola、*C. higginsianum* 亲缘关系较近^[45]，可以作为炭疽菌属区别于其他属真菌的标记基因。同时，14-3-3 在属内又具有一定的遗传距离差异性，推测该蛋白的编码基因也可以作为炭疽菌属真菌分类的标记基因。上述分析结果对于进一步开发以保守细胞信号转导途径所涉及的基因作为炭疽菌属分类的标记基因研究，以及开展炭疽菌属真菌的分类研究提供了重要的理论支撑。

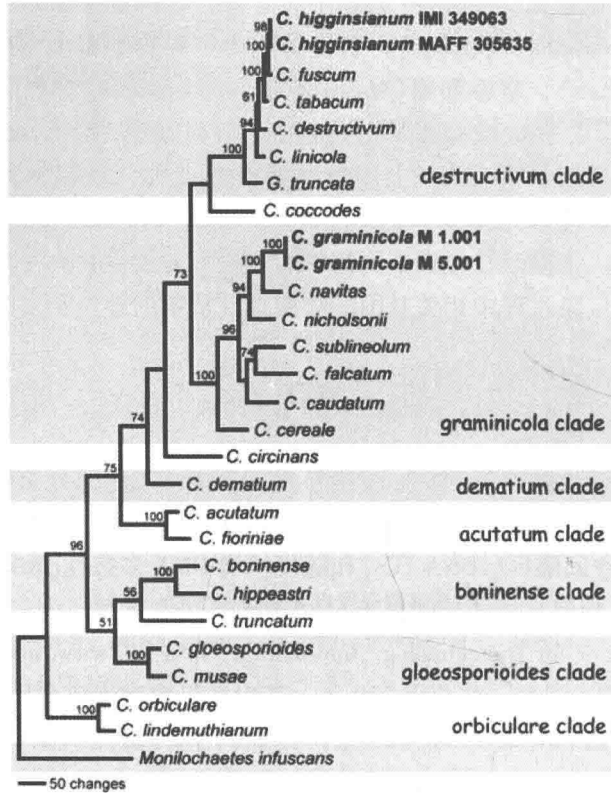


图 1-6 炭疽菌属不同真菌的遗传关系分析^[13]

Figure 1-6 Phylogeny of *Colletotrichum* species

高于 70% 的 Bootstrap 支持率(500 重复)在节点处得以显示。薯毛链孢(*Monilochaetes infuscans*)作为外部群体。Bootstrap support values (500 replicates) above 70 % are shown at the nodes. *Monilochaetes infuscans* was used as an outgroup.

五、防治措施

针对大白菜炭疽病防治而言，通常采用以下防治方法：①选用一些较为抗病的大白菜品种，如青杂 3 号、青杂 5 号等。②对大白菜种子采用温水浸种的方法进行消毒，将种子用 50 ℃ 温水浸种 15 min，或者对大白菜种子采用其重量 0.4% 的 50% 多菌灵可湿性粉剂拌种进行消毒。③该病发生严重的地块，应加强农业防治措施，即采用非十字花科蔬菜和十字花科蔬菜交替种植，一般采用两年轮作方式进行；同时，对于大白菜应适时晚播，并施足粪肥，增施磷、钾肥；合理灌水，雨后应注意及时排水。注意田间卫生，及时清除病