

## 稻曲病菌 PMK1 类同源基因克隆及在稻瘟病菌遗传互补中的功能验证

张震, 杜新法, 柴荣耀, 王教瑜, 邱海萍, 毛雪琴, 孙国昌\*

(浙江省农业科学院植物保护与微生物研究所, 杭州 310021)

**摘要:**【目的】克隆稻曲病菌 PMK1 类 MAPK (Mitogen-activated protein kinase) 同源基因。【方法】根据丝状真菌 MAPK 蛋白保守性设计简并引物扩增稻曲病菌 MAPK 基因部分片段, 进而利用 TAIL-PCR 进行染色体步移和 RT-PCR 获得 *UVMK1* 基因全长和 cDNA 全长。构建互补载体, 交叉互补稻瘟病菌  $\Delta PMK1$  突变体菌株 nn78 进行功能验证, 包括附着胞分化和致病性测定。【结果】*UVMK1* 基因全长 1435 bp, 包含 3 个内含子, 编码 355 氨基酸的蛋白。*UVMK1* 推导蛋白与丝状真菌 *Magnaporthe grisea* *PMK1*, *Fusarium oxysporum* *FMK1*, *Fusarium solani* *FSMAPK*, *Colletotrichum lagenarium* *CMK1*, *Botrytis cinerea* *BMK1*, *Claviceps purpurea* *CMPK1* 等编码蛋白高度同源。转化稻瘟病菌菌株 nn78, 获得 5 个转化子。其中选取的转化子恢复了稻瘟病菌正常的附着胞分化和对大麦叶片的致病能力。【结论】本研究成功分离了首个稻曲病菌 MAPK 基因, 而且 *UVMK1* 基因是稻瘟病菌 *PMK1* 的同源基因。

**关键词:** 稻曲病菌; *UVMK1*; 稻瘟病菌; MAPK

中图分类号: Q786, Q936 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2008) 11-1473-06

水稻稻曲病是由稻绿核菌 [*Ustilaginoidea virens* (Cooke) Tak] 引起的水稻穗部真菌病害。病害的发生往往使得邻近谷粒蛋白质和病穗粒重下降, 造成水稻产量的损失; 同时病粒可产生对人畜有害的毒素, 混杂于谷粒中影响稻米的品质<sup>[1,2]</sup>。目前国内外对稻曲病的研究尚停留在病害防治、侵染循环和种群结构等研究范围<sup>[3-6]</sup>, 且研究进展缓慢。鉴于稻曲病在水稻生产中的潜在危害性, 逐步开展稻曲病菌分子生物学研究, 有利于加深对稻曲病菌致病机制的认知程度。

MAPK (Mitogen activated protein kinase) 在真核生物中是一类非常保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白, 与胞外信号传导相关, 可以将环境信号或发育信号传递给细胞核, 引发特异基因的表达<sup>[7-9]</sup>。在许多植物病原真菌中, MAPK 基因在侵染早期发挥重要的作用<sup>[9-13]</sup>。稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 作为病原真菌研究模式物

种<sup>[14]</sup>, MAPK 信号途径的研究开展较为深入, 已鉴定的 3 个关键基因 *PMK1*, *MPS1* 和 *OSMI*, 参与了病原菌的发育、分化和致病过程<sup>[9]</sup>。基于这些研究结果, 推测稻曲病菌在侵染水稻花器的过程中 MAPK 信号途径同样起着重要作用。根据 MAPK 蛋白高度同源的理论, 本研究采用简并引物和染色体步移的策略克隆了稻曲病菌 PMK1 类 MAPK 同源基因, 并利用稻瘟病菌  $\Delta PMK1$  突变体交叉互补进行了功能验证。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 主要试剂和仪器:** Trizol 为 Invitrogen 公司产品; 普通 Taq DNA 聚合酶、各种限制型内切酶、RNA PCR Kit 为 TaKaRa 公司产品; Hybond<sup>TM</sup>-N+尼龙膜和 DIG DNA Labeling and Detection Kit 为 Roche 公

基金项目: 浙江省科技计划项目(2007C12905, 2005C22012)

\*通讯作者: Tel: +86-571-86404073; E-mail: sungc@zaas.org

作者简介: 张震(1978-), 男, 浙江嘉兴人, 助理研究员, 研究方向植物病原真菌分子生物学。E-mail: zzhangcn@gmail.com

收稿日期: 2008-04-18; 修回日期: 2008-07-03

公司产品。Rinzi Vinyl 盖玻片购自北京鼎国；PTC-200 型 PCR 仪为 Bio-Rad 公司产品；H1200-SA 型分子杂交炉为 Labnet 公司产品；DM2500 型荧光显微镜为 Leica 公司产品。

**1.1.2 引物** :PCR 引物合成及序列测定由上海生工完成(见后面的表 1)。

**1.1.3 菌株与培养条件** :本研究所用稻瘟病菌菌株为 uv-j01, 从采自浙江杭州的稻曲球分离获得。接种菌丝块于 25 mL 液体土豆蔗糖培养基(PS)中, 28 °C 黑暗轻摇培养 8 d 后收集培养物, 用于 DNA 和 RNA 的提取。

供试稻瘟病菌菌株为 Guy11 及其  $\Delta PMK1$  突变体 nn78<sup>[10]</sup>。切取菌丝块于 25 mL 完全培养基(CM)<sup>[15]</sup>, 于 28 °C 黑暗轻摇培养 4 d 后, 用于提取 DNA。切取菌丝块置于 CM 平板培养基上, 于 28 °C 黑暗培养 10 d 后刮取培养物, 用于提取 RNA 和收集分生孢子。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$  用于质粒操作; 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) AGL1

用于农杆菌介导转化 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, AtMT)。

## 1.2 DNA 和 RNA 提取

丝状真菌 DNA 提取参照 Talbot 等(1993)方法<sup>[15]</sup>。总 RNA 提取采用 Trizol 法。

## 1.3 稻曲病菌 UVMK1 克隆及序列分析

采用简并引物 JM2 和 JM5<sup>[16]</sup>, 以稻曲病菌基因组 DNA 为模板扩增 *PMK1* 同源片段。根据扩增片段序列设计引物, 利用 TAIL-PCR(Thermal Asymmetric Interlaced-PCR)法延伸该片段上、下游邻接序列, 最终获得稻曲病菌 *PMK1* 类 MAPK 同源基因的全长基因组序列。TAIL-PCR 法参照 Liu 等(1995)的方法<sup>[17]</sup>。基于所得基因组序列, 设计引物以稻曲病菌总 RNA 为模板扩增全长 cDNA 序列(表 1)。

相似性比对采用 NCBI 网站 BLAST 程序完成。蛋白序列系统分析采用 DNASTar 软件包 MegAlign 程序完成。

表 1 引物列表

Table 1 Primers applied in the research

Name	Sequence (5' 3')*	Function
JM2	CARGARYTNATGGARAC	Degenerate primer used to amplification a partial MAPK gene
JM5	TCRTTNGGRTCRIGRTA	
AD1	WGTGNAGWANCANAGA	Arbitrary degenerate primer used for TAIL-PCR
AD2	NGTCGASWGANAWGAA	
AD3	GTNCGASWCANAWGTT	
DR1	ACGGCATCAGGTCGCGACGTGCCCGAGA	Used for cloning the 3' end of <i>UVMK1</i>
DR2	GGACGCTGTTCCCAAGACGTCAGACCT	
DR3	GTCAAGCGCATCACCGTCAAGAAGCCT	
UR1	GTTGTCCTCTTGGCAGGCAGCCGAACGA	Used for cloning the 5' end of <i>UVMK1</i>
UR2	GCAGGTTGGACGGTTTCAGATCACGGTGA	
UR3	GGCAATGGTCGTCGGAAAGGTCTTGTTG	
UR4	GGCGTGAAGCGAAGCCTGTCTACAGGA	
UR5	GCTCACCTGGATGAGGTAGACCTCGCTGA	
UR6	GGCTTCTGAATGTCAAGGATCGAAATGAT	
Bar-FX	GCCTCGAGAAGATGATATTGAAGGAGCAC	Used for amplifying the <i>BAR</i> cassette
Bar-RX	GCCTCGAGCTAAATCTCGGTGACGGGCAGG	
MK-FH	GAC <u>AAGCTT</u> CACTGCCGACTGCCTCCCA	Used for amplifying the complete <i>UVMK1</i> cDNA
MK-RB	GT <u>GGATCC</u> TTGCTGCCATCGGTACACA	
mpg-FP	GACGATCGGGCCGGACTGTCAACTACTG	Used for amplifying the <i>M. grisea MPG1</i> promoter
mpg-RH	GAC <u>AAGCTT</u> AGGTTGGGTTGAGAGGGGTC	
RT1	AGAAGCCCCGAAGCTATGAT	Used for RT-PCR analysis of <i>UVMK1</i>
RT2	ACGTCCAGAATGAGGGTACG	

\* R=A or G, S=G or C, Y=C or T, W=A or T; N=A, T, C or G; Underlining indicates the additional restriction site: CTCGAG, *Xho* I; AAGCTT, *Hind* III; GGATCC, *Bam*H I; CGATCG, *Pvu* II.

## 1.4 交叉互补载体构建和稻瘟病菌的转化

采用引物 Bar-FX/Bar-RX, 从质粒 pBARGPE1<sup>[18]</sup> 扩增 *BAR* 基因表达盒, 插入质粒 pCamBIA1300 *Xho* 酶切位点之间, 获得中间质粒 pCamBar; 以引物 mpg-FP/mpg-RH 从稻瘟病菌 Guy11 基因组扩增 *MPG1* 启动子<sup>[19]</sup>, 以引物 MK-FH/MK-RB 扩增稻曲病菌 *UVMK1* 全长 cDNA, 回收目的片段分别用 *Pvu* II 和 *Hind* III 及 *Hind* III 和 *Bam*H I 进行酶切, 与 *Pvu* II 和

*Bam*H I 消化后的 pCamBar 质粒片段进行连接, 以获得目的质粒 pCamBarMK1。

稻瘟病菌转化采用 AtMT<sup>[20]</sup>。大致过程如下: 收集稻瘟病菌  $\Delta PMK1$  突变体 nn78 的分生孢子, 经与农杆菌共培养后, Basta 平板筛选, 获得  $\Delta PMK1/UVMK1$  转化子。转化子在 Basta 平板上连续筛选 2 次。

## 1.5 Southern 杂交与 RT-PCR 分析

按 DIG DNA Labeling and Detection Kit 提供的操

作说明, 进行 Southern 杂交分析。回收质粒 pCamBARMK1 *Hind* /*Kpn* 双酶切后 540bp 的 *BAR* 基因片段, 用地高辛标记作为探针, 使用终浓度为 25 ng/mL。基因组 DNA 经 *EcoR* 和 *Pst* 双酶切消解后, 取 10  $\mu$ g 于 0.8% 琼脂糖凝胶中电泳过夜、充分分离酶解片段, 然后转移至带正电的尼龙膜上, 与地高辛标记的探针于 54  $^{\circ}$ C 杂交过夜。杂交后的尼龙膜依试剂盒说明进行免疫学显色。

RT-PCR 分析以稻瘟病菌转化子总 RNA 为模板, 以 MK1/MK2 为引物, 按 RNA PCR Kit (AMV) 试剂盒说明进行。

### 1.6 稻瘟病菌附着胞分化和致病性分析

收集 CM 培养基上培养 10 d 的稻瘟病菌菌株 Guy11,  $\Delta$ PMK1 突变体 nn78 和转化子  $\Delta$ PMK1/*UVMK1* 的分生孢子, 并配制  $2 \times 10^4$  个/mL 的孢子悬浮液, 待用。

稻瘟病菌附着胞分化测试, 采用 Rinzi Vinyl 盖玻片作为疏水表面。在每张盖玻片上滴 30~50  $\mu$ L 的孢子悬浮液 1 滴, 于平皿内室温保湿 24 h, 显微镜下观察附着胞的形成。每菌株设 3 重复。

大麦叶片致病性测定, 剪取 3cm 长的大麦幼苗叶, 至于平皿内湿润的滤纸上。在叶片表面间隔点滴 20  $\mu$ L 的孢子液。26  $^{\circ}$ C 光照保湿培养 4~7 d 进行检查。每菌株设 3 重复。

## 2 结果

### 2.1 *UVMK1* 基因的克隆与序列分析

利用简并引物 JM2 和 JM5, 以稻曲病菌基因组

DNA 为模板扩增得到约 780 bp 的片段, 序列测定后经 Blast 分析表明其序列与稻瘟病菌 *PMK1* 基因高度同源, 推测该片段为稻曲病菌 *PMK1* 同源基因的一部分。根据其序列设计合成引物组 DR1/DR2/DR3 和 UR1/UR2/UR3, 采用 TAIL-PCR 方法分步扩增上下游邻接序列, 结果获得 3 端片段长度约 550 bp, 5 端片段长度约 300 bp, 序列测定后上述三片段能正确拼接; 根据拼接序列在 5 端再次合成引物组 UR4/UR5/UR6, 继续延伸 5 端序列, 结果扩增所得片段长约 600 bp, 序列测定后进行正确拼接, 最终获得一段长约 1980 bp 的稻曲病菌基因组片段。序列分析显示该片段包含一个 1435 bp 的稻曲病菌 MAPK 全长基因, 暂命名为 *UVMK1* (GenBank 登录号: EU647503)。

为进一步分析 *UVMK1* 的结构特征, 根据基因组序列设计合成引物 MK-FH/MK-RB, 并以稻曲病菌总 RNA 反转录合成的第一链反应物为模板进行扩增反应, 结果获得约为 1100 bp 的特异性片段, 序列分析显示其为 1068 bp 的 *UVMK1* 全长 cDNA 序列 (GenBank 登录号: EU647504), 编码 355 个氨基酸的蛋白。基于 cDNA 和 DNA 序列, *UVMK1* 基因含有 3 个内含子, 分别为 137 bp, 97 bp 和 133 bp。由 *UVMK1* 推导的蛋白序列与 *Magnaporthe grisea* *PMK1*, *Fusarium oxysporum* *FMK1*, *Fusarium solani* *FsMAPK*, *Claviceps purpurea* *CMPK1*, *Gaeumannomyces graminis* *GMK1* 等基因编码蛋白高度同源, 同源率分别为 97%、98%、97%、97%、和 95%。利用 MegAlign 程序对几种真菌 (包括酵

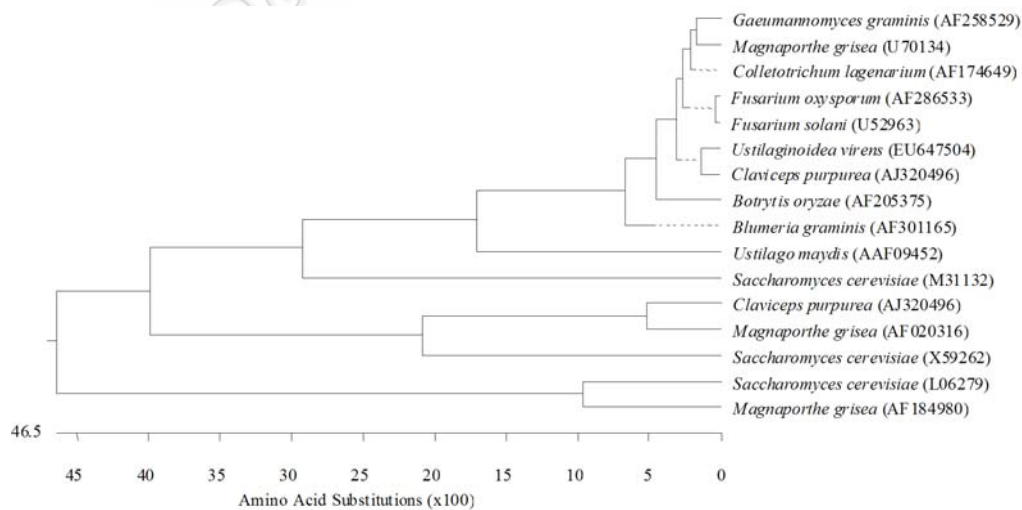


图 1 *UVMK1* 蛋白与其它真菌 MAPK 蛋白的系统树

Fig. 1 Phylogenetic comparison of *UVMK1* to other fungal mitogen-activated protein (MAP) kinases.

The length of each pair of branches represents the distance between sequence pairs, while the units at the bottom of the tree indicate the number of substitution events. The deduced peptidic sequence of *UVMK1* from *Ustilagoidea virens* was compared with the MAP kinases *PMK1* (U70134), *MPS1* (AF020316), and *OSM1* (AF184980) from *Magnaporthe grisea*; *GMK1* from *Gaeumannomyces graminis* (AF258529); *CMK1* (AF174649) from *Colletotrichum lagenarium*; *FMK1* from *Fusarium oxysporum* (AF286533); *FsMAPK* from *Fusarium solani* (U52963); *BMP1* from *Botrytis cinerea* (AF205375); *MAP1* from *Blumeria graminis* (AF301165); *UBC3* from *Ustilago maydis* (AAF09452); *CMPK1* (AJ318517) and *CMPK2* (AJ320496) from *Claviceps purpurea* and *FUS3* (M31132), *SLT2* (X59262), and *HOG1* (L06279) from *Saccharomyces cerevisiae*.

母)的 MAPK 蛋白进行系统聚类,结果表明 UVMK1 推导蛋白属于 PMK1 类 MAPK (图 1)。

## 2.2 UVMK1 互补稻瘟病菌 $\Delta PMK1$ 突变体

**2.2.1 互补载体的构建:**由于当前稻曲病接种体系不稳定,不能满足于基因敲除突变体的表型分析,因此本研究采用稻瘟病菌  $\Delta PMK1$  突变体进行 UVMK1 基因功能互补验证。以质粒 pCambia1300 为骨架,经抗性标记的替换 (BAR 表达盒替换 HPH 基因) 和 UVMK1 表达盒 (UVMK1 基因由稻瘟病菌 MPG1 启动子控制) 的插入,成功获得了用于稻瘟病菌 AtMT 转化的互补载体 pCamBarMK1 (图 2)。

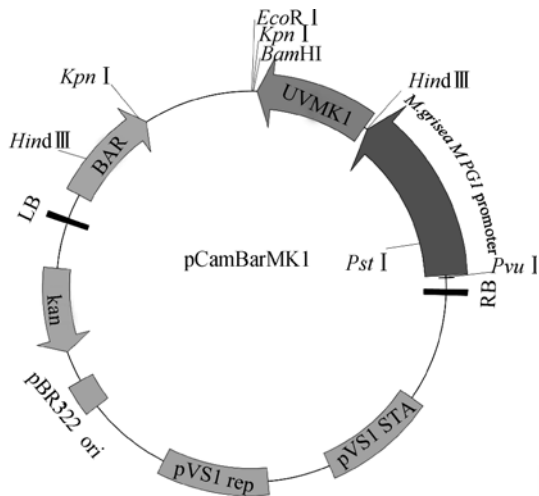


图 2 基于 pCambia1300 骨架的稻瘟病菌互补载体  
Fig. 2 Map of vector complementary to *Magnaporthe grisea*  $\Delta PMK1$  strain, completed with a pCambia1300 backbone.

**2.2.2 稻瘟病菌转化子 Southern 和 RT-PCR 分析:**质粒 pCamBarMK1 导入农杆菌 AGL1 后,转化稻瘟病菌  $\Delta PMK1$  菌株 nn78, 经 Basta 抗性筛选随机挑取了 5 个转化子。提取各转化子和 nn78 基因组 DNA, 均用 EcoR 和 Pst 进行双酶切, 以 540 bp 的 BAR 基因片段作为探针进行 Southern 杂交, 结果显示转化子 T1, T4 和 T5 基因组中外源片段可能以单拷贝插入,

而转化子 T2 和 T3 则为多拷贝插入 (图 3-A)。为进一步验证 UVMK1 基因是否在稻瘟病菌中得以正常转录, 从各转化子和菌株 nn78 的菌丝与分生孢子混合物中提取总 RNA, 以引物对 RT1/RT2 进行 RT-PCR, 电泳结果显示各转化子均有 460 bp 大小的特异性条带出现, 表明 UVMK1 基因在稻瘟病菌中正常转录 (图 3-B)。

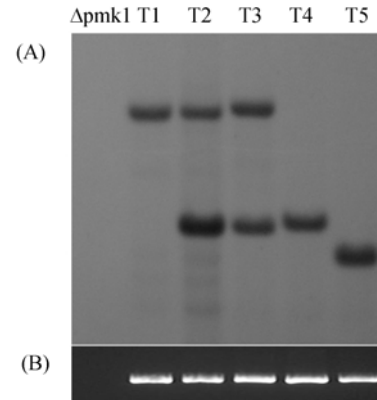


图 3 稻瘟病菌互补转化子的 Southern(A)和 RT-PCR(B)分析

Fig. 3 A: Southern blot analysis of genomic DNA extracted from the the *Magnaporthe grisea* mutants; B: RT-PCR analysis of UVMK1 expression in *M. grisea*, *M. grisea*  $\Delta PMK1$  strain nn78 as a control

**2.2.3 稻瘟病菌附着胞分化和致病性测定:**选取稻瘟病菌  $\Delta PMK1/UVMK1$  菌株 T1 和 T5 进行附着胞分化测试和大麦叶片致病性测定, 并以稻瘟病菌株 Guy11 和 nn78 为对照。结果显示各菌株分生孢子在疏水表面室温保湿 24 h 后, 分生孢子均基本萌发, 其中菌株 nn78 与 Xu 等报道一致<sup>[10]</sup>, 分生孢子萌发只形成长长的芽管; 而菌株 T1, T5 和 Guy11 的分生孢子萌发后在芽管顶端均形成黑色的膨大的附着胞 (图 4)。大麦叶片的致病性结果也显示, 转化子 T1 和 T5 与 nn78 相比, 基本恢复了对大麦叶片的致病能力 (图 5)。结果进一步表明, 稻曲病菌 UVMK1 基因与稻瘟病菌 PMK1 同源。

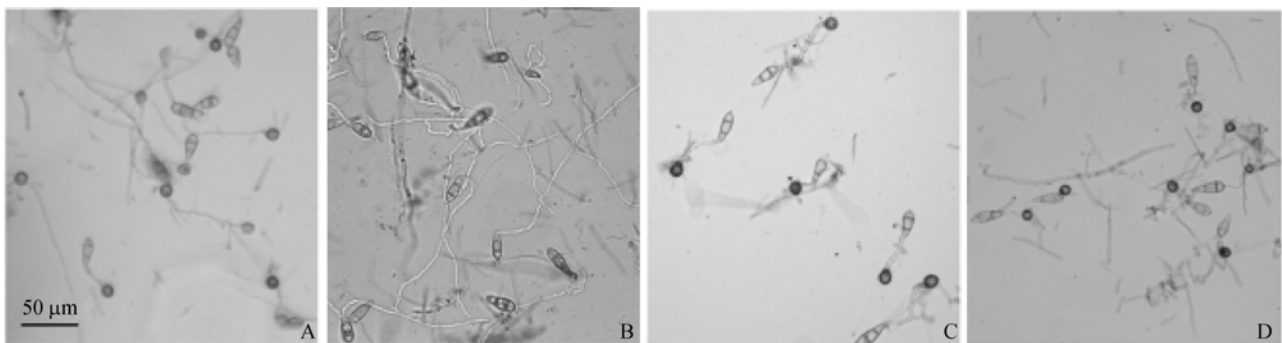


图 4 稻曲病菌 UVMK1 基因互补稻瘟病菌  $\Delta PMK1$  菌株后附着胞分化测试

Fig. 4 Complementation of the appressoria differentiation defect of the  $\Delta PMK1$  mutant strain of *Magnaporthe grisea* by *Ustilaginoides virens* UVMK1. A: *M. grisea* strains Guy 11 (wild type); B: nn78 ( $\Delta PMK1$ ); C/D: the nn78 transformants (T1 and T5). Bar = 50  $\mu$ m.

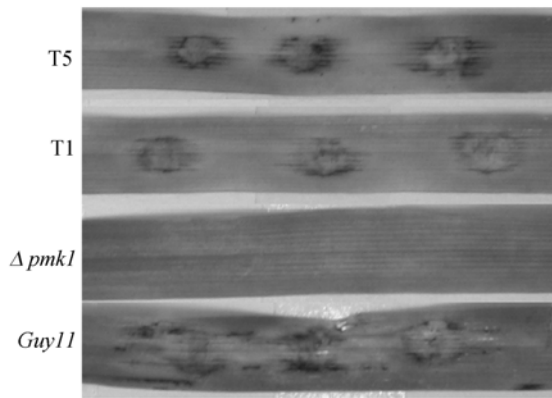


图 5 稻曲病菌 *UVMK1* 基因互补稻瘟病菌  $\Delta PMK1$  菌株后大麦叶片致病性测定

Fig. 5 Complementation of the pathogenicity defect of the  $\Delta PMK1$  mutant strain from *Magnaporthe grisea* on barley by *Ustilagoidea virens UVMK1*.

### 3 讨论

稻曲病作为水稻穗期重要病害,其病原分子生物学研究尚属空白,这与稻曲病在水稻生产中所具有的潜在危害性不相称。当前对稻曲病菌的研究难以深入,这很大程度上受其侵染循环的不明确和接种体系的不稳定所限制。加强稻曲病菌生物学和遗传学研究,有利于对稻曲病菌的认识,以便于最终对稻曲病的有效控制。利用其它植物病原真菌如稻瘟病菌等成熟的研究方法和突变体,可以开展稻曲病菌功能基因的研究,从而有利于逐步揭示其致病机制。

TAIL-PCR 是一种染色体步移策略,广泛应用于插入突变体插入位点侧翼序列扩增<sup>[17]</sup>。根据真核生物间功能基因的同源性,利用 TAIL-PCR 染色体步移策略克隆全长基因,对于目前分子生物学研究基础薄弱的稻曲病菌是一种相对简便的方法。目前,采用这样的策略我们在稻曲病菌研究中已经成功克隆了多个基因,如 *UVMK1*、*UVSOD*、*UVGPD* 等(后两个基因见后续报道)。

MAPK 在真核生物中高度保守<sup>[7-9]</sup>。据报道,啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 有五条 MAPK 信号途径,其中 FUS3/KSS1 信号途径为酵母信息素反应途径,其介导的功能包括交配特异性基因表达和细胞融合等系统功能<sup>[7]</sup>。植物病原真菌稻瘟病菌中 *FUS3/KSS1* 同源基因 *PMK1* 表达产物可能是侵染机构形成的组分,参与控制细胞表面识别<sup>[10]</sup>。*PMK1* 在病菌发育和致病过程中均为组成型表达,其中尤以附着胞形成阶段表达最为活跃,相应缺失突变体分生孢子

不能分化形成附着胞,稻叶喷雾或伤口接种均不能致病,但是其营养生长和产孢不受影响。对于非附着胞介导侵染类的植物病原真菌(如镰刀菌、麦角菌),其 *PMK1* 同源基因在侵染早期具有与 *PMK1* 相似的功能,参与了寄主细胞表面识别机制,还具有调控菌丝生长,无性和有性生殖等生物学功能<sup>[13,21,22]</sup>。本研究基于真核生物 MAPK 蛋白的同源性,成功克隆了稻曲病菌 *UVMK1* 基因,交叉互补稻瘟病菌  $\Delta PMK1$  菌株能恢复其缺失的野生型功能。可见, *UVMK1* 基因是稻瘟病菌 *PMK1* 的同源基因。但是稻曲病菌与稻瘟病菌在生活史和致病机制方面均存在着差异,同源基因在这两者间所参与的代谢过程可能有所不同。因此, *UVMK1* 基因在稻曲病菌中的具体功能还有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 徐传雨, 谢关林. 稻曲病国内外研究现状. 种子(*Seed*), 2001, (6): 31-33.
- [2] Nakamura KI, Izumiyama N, Ohtsubo K, et al. Apoptosis induced in the liver, kidney and urinary bladder of mice by the fungal toxin produced by *Ustilagoidea virens*. *Mycotoxins*, 1993, 38: 25-30.
- [3] 王国良. 影响稻曲病厚垣孢子萌发因素的研究. 植物保护学报(*Acta Phytophylacica Sinica*), 1998, 15(4): 241-245.
- [4] 代光辉, 赵杰, 何润梅, 等. 稻曲病不同抗性水稻品种的组织化学及分生孢子侵染途径的初步观察. 植物病理学报(*Acta Phytopathologica Sinica*), 2005, 35(1): 37-42.
- [5] 潘雅姣, 樊金娟, 付彬英, 等. 采用 AFLP 技术分析稻曲病菌的遗传多样性 I: 同一块稻田中稻曲病菌的遗传结构. 植物病理学报(*Acta Phytopathologica Sinica*), 2006, 36(4): 337-341.
- [6] 张震, 杜新法, 柴荣耀, 等. 根癌农杆菌介导遗传转化稻曲病菌. 中国水稻科学(*Chinese Journal of Rice Science*), 2006, 20(4): 440-442.
- [7] Dickman MB, Yarden O. Serine/ threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol*, 1999, 26: 99-117.
- [8] Schaeffer HJ, Webber MJ. Mitogen-activated protein kinases: Specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 2435-2444.
- [9] Xu JR. MAP kinases in fungal pathogens. *Fungal Genet Biol*, 2000, 31: 137-152.
- [10] Xu JR, Hamer JE. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev*, 1996, 10: 2696-2706.
- [11] Lev S, Sharon A, Hadar R, et al. A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity: Diverse roles for mitogen-activated protein kinase ho-

- mologs in foliar pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96: 13542–13547.
- [12] Takano Y, Kikuchi T, Kubo Y, *et al.* The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene *CMK1* regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *MPMI*, 2000, 13: 374–383.
- [13] Mey G, Oeser B, Lebrun MH, *et al.* The biotrophic, non-appressoria forming grass pathogen *Claviceps purpurea* needs a Fus3/Pmk1 homologous MAPkinase for colonization of rye ovarian tissue. *MPMI*, 2002, 5, 303–312.
- [14] Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, *et al.* The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Nature*, 2005, 434: 980–986.
- [15] Talbot NJ, Ebbole DJ, Hamer JE. Identification and characterization of *MPG1*, a gene involved in pathogenicity from the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 1993, 5: 1575–1590.
- [16] Zheng L, Campbell M, Murphy J, *et al.* The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *MPMI*, 2000, 13(7): 724–732.
- [17] Liu Y, Mitsukawa N, Oosumi T, *et al.* Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, 1995, 8: 457–463.
- [18] Pall ML, Brunelli JP. A series of six compact fungal transformation vectors containing polylinkers with multiple unique restriction sites. *Fungal Genet Newsl*, 1993, 40: 59–62.
- [19] Kershaw MJ, Wakley G, Talbot NJ. Complementation of the *Mpg1* mutant phenotype in *Magnaporthe grisea* reveals functional relationships between fungal hydrophobins. *The EMBO Journal*, 1998, 17: 3838–3849.
- [20] Rho HS, Kang S, Lee YH. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the plant pathogenic fungus, *Magnaporthe grisea*. *Mol Cells*, 2001, 12(3): 407–411.
- [21] Di Pietro A, Garcia-MacEira FI, Meglecz E, *et al.* A MAP kinase of the vascular wild fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Mol Microbiol*, 2001, 39: 1140–1152.
- [22] Menotta M, Pierleoni R, Amicucci A, *et al.* Characterization and complementation of a Fus3/Kss1 type MAPK from *Tuber borchii*, TBMK. *Mol Gen Genomics*, 2006, 276: 126–134.

## Cloning of a Homologous Gene of *Magnaporthe grisea* PMK1 Type MAPK from *Ustilaginoidea virens* and Functional Identification by Complement in *Magnaporthe grisea* Corresponding Mutant

Zhen Zhang, Xinfu Du, Rongyao Chai, Jiaoyu Wang, Haiping Qiu, Xueqin Mao, Guochang Sun\*

(Institute of Plant Protection and Microbiology, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

**Abstract:** [Objective] Cloning of a Homologous Gene of PMK1 Type Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) from the rice false smut fungus *Ustilaginoidea virens*. [Methods] According to the conserved amino acid sequence of several filamentous fungus MAPKs, which were homologous to *Magnaporthe grisea* *PMK1*, degenerate PCR primers were designed to amplify the MAPK internal DNA fragment from *Ustilaginoidea grisea*. The complete *UVMK1* DNA and cDNA sequences were obtained using Thermal Asymmetric Interlaced-PCR (TAIL-PCR) and RT-PCR methods. Functional Identification was done by using the *M. grisea*  $\Delta$ *PMK1* mutant stain nn78, including appressoria differentiation assay and barley infection test. [Results] The total length of *UVMK1* was 1435 bp. It contained 3 introns and encoded 355 amino acids. The induced amino acid sequence showed identical to *Magnaporthe grisea* *PMK1*, *Fusarium oxysporum* *FMK1*, *Fusarium solani* *FsMAPK*, *Colletotrichum lagenarium* *CMK1*, *Botrytis cinerea* *BMK1*, *Claviceps purpurea* *CMPK1*. After transformation of the  $\Delta$ *PMK1* mutant of *M. grisea* using a complement vector with the complete cDNA of *UVMK1* (under the *M. grisea* *MPG1* promoter), five transformants were obtained. Furthermore, the selected two transformants fully restored their ability to form appressoria and infect a barley leaf. [Conclusion] In this study, we characterized the first MAPK protein from *U. virens*, and that *UVMK1* is a homologue of *M. grisea* *PMK1*.

**Keywords:** *Ustilaginoidea virens*; *UVMK1*; *Magnaporthe grisea*; Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

Supported by the Projects of Science and Technology Program of Zhejiang province (2007C12905, 2005C22012)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-86404073; E-mail: sungc@zaas.org

Received: 18 April 2008/ Revised: 3 July 2008