



## 丝裂原活化蛋白激酶基因 *CfMCK1* 调控果生炭疽菌的生长发育和致病力

肖宇, 李河\*

南方人工林病虫害防控国家林草局重点实验室, 森林有害生物防控湖南省重点实验室, 经济林培育与保护教育部重点实验室, 中南林业科技大学, 湖南 长沙 410004

**摘要:** 【目的】由果生炭疽菌引起的炭疽病是油茶的主要病害, 造成油茶产量下降。本文研究果生炭疽菌中丝裂原活化蛋白激酶CfMkk1的生物学功能, 旨在为解析油茶炭疽病菌的致病机理提供依据。【方法】根据同源重组原理构建*CfMCK1*基因敲除载体片段, 采用PEG介导法将载体导入原生质体中筛选获得突变体菌株 $\Delta Cfmkk1$ ; PCR扩增果生炭疽菌含有启动子的*CfMCK1*基因回补片段, 构建回补载体pYF11::*CfMCK1*; 采用PEG介导法把回补载体转化至突变体的原生质体中, 荧光筛选回补菌株 $\Delta Cfmkk1$ -C。测定野生型菌株、突变体菌株 $\Delta Cfmkk1$ 及基因回补菌株 $\Delta Cfmkk1$ -C在营养生长、附着胞形成、胁迫应答和致病力等生物学表型。【结果】与野生型和回补菌株相比, *CfMCK1*基因敲除突变体 $\Delta Cfmkk1$ 菌丝生长速率明显减缓; 在含刚果红的PDA培养基上菌丝生长受到明显抑制, 无法穿透玻璃纸, 丧失了侵染寄主的能力; 而且无法形成附着胞。【结论】研究结果表明*CfMCK1*基因参与调控油茶果生炭疽菌的生长发育、附着胞形成、致病力以及响应外界胁迫过程。

**关键词:** 油茶, 果生炭疽菌, 丝裂原活化蛋白激酶, CfMkk1, 致病力

油茶(*Camellia oleifera*)是我国特有的木本油料树种, 因其在食用和制药等方面的广泛用途而具有极高的经济价值<sup>[1]</sup>。由炭疽菌属真菌(*Colletotrichum* spp.)引起的炭疽病是油茶的主要病害<sup>[2]</sup>。课题组研究表明果生炭疽菌(*Colletotrichum fructicola*)是引起我国油茶炭疽病的优势流行病

原菌<sup>[3-5]</sup>。

MAPK (mitogen-activated protein kinases)是一类普遍存在于真核生物中的丝/苏氨酸蛋白激酶, 由激酶 MAPKKK、MAPKK 和 MAPK 组成的级联通路, 它们在调控真菌的有性生殖、生长发育、细胞壁完整性和致病力等方面起着重要的

基金项目: 湖南省自然科学基金(2019JJ40531); 国家自然科学基金(31570641)

\*通信作者。Tel/Fax: +86-731-85623450; E-mail: csuftlihe@163.com

收稿日期: 2020-03-07; 修回日期: 2020-04-28; 网络出版日期: 2020-06-15

作用<sup>[6-7]</sup>。植物病原真菌存在 3 条 MAPK 级联通路, 分别是调节有性生殖和侵染生长的 Fus3/Kss1-MAPK 级联通路、调控细胞壁完整性的 Slt2-MAPK 级联通路和介导高渗反应的 Hog1-MAPK 级联通路<sup>[8]</sup>。研究发现 Fus3/Kss1-MAPK 级联通路 MAPK 蛋白激酶 CfPmk1 调控病原菌 *C. fructicola* 生长发育和致病性<sup>[9]</sup>; Slt2-MAPK 级联通路的 MAPK 激酶 Mps1 影响稻瘟菌的致病力<sup>[10]</sup>; 稻瘟菌中 Hog1-MAPK 级联通路的 MAPK 激酶 OSM1, 调控菌体内甘油积聚和渗透压<sup>[11]</sup>。

MAPKK 通过磷酸化激活 MAPK 完成上游信号传递, 进而激活转录因子调控相关基因的表达来应答环境胁迫<sup>[12-13]</sup>。本文拟以细胞壁完整性 Slt2-MAPK 级联通路的 MAPKK 蛋白激酶 CfMkk1 为对象, 研究其在油茶果生炭疽菌中的生物学功能, 为揭示该病菌的致病机理奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 供试菌株:** 在本项实验中, 采用由本实验室分离保存的油茶果生炭疽菌 CFLH16 为野生型 (wild type, WT) 菌株。CfMkk1 基因的敲除和回补菌株是基于野生型菌株 CFLH16 获得。所有菌株均在 PDA 培养基上于 28 °C 下生长。

**1.1.2 培养基:** (1) PDA 培养基(g/L): 马铃薯去皮 200, 葡萄糖 20, 琼脂 20, pH 自然。(2) MM 培养基(g/L): NaNO<sub>3</sub> 6, KCl 0.52, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.152, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.52, 维生素 B<sub>1</sub> 0.01, 微量元素 1 mL, 葡萄糖 10, 琼脂 15, pH 为 7.0。

### 1.2 果生炭疽菌中的 CfMkk1 序列分析

根据酒酿酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中 Mkk1 蛋白的氨基酸序列 (CAA99451.1) 在 *C. fructicola* 基因组中进行 BLASTp 搜索, 获得 CfMkk1 氨基酸序列。基于 CfMkk1 和其他真菌 Mkk1 蛋白的氨基酸序列采用 MEGA 7.0 软件进行系统发育分析。

### 1.3 果生炭疽菌中 CfMKK1 基因的敲除

从数据库 (www.ncbi.nlm.nih.gov) 中下载果生炭疽菌 (*C. fructicola*) ANPB00000000.1 基因组序列, 根据 CfMKK1 基因及侧翼序列设计引物。CfMKK1-1F/CfMKK1-2R 引物从野生型菌株 CFLH16 的 DNA 中 PCR 扩增 5'非编码区 893 bp 上臂片段, CfMKK1-3F/CfMKK1-4R 引物从野生型菌株 CFLH16 的 DNA 中 PCR 扩增 3'非编码区 822 bp 下臂片段, 使用引物 Hyg-F 和 Hyg-R 扩增潮霉素抗性表达基因 HPH (约 1.4 kb)。使用引物 CfMKK1-1F 和 CfMKK1-4R 将这 3 个不同 DNA 片段 Overlap 成一个敲除载体片段。PCR 扩增后, 取 5 μL 反应混合液电泳分析验证是否扩增成功。PCR 产物溶解在 10 μL TE 缓冲液中用于转化。

使用 PEG 介导法将敲除载体片段导入到果生炭疽菌的原生质体中, 并在含有潮霉素的 TB<sub>3</sub> 培养基中培养 2-3 d。使用基因内探针引物 CfMKK1-7F 和 CfMKK1-8R 以及 CfMKK1-5F 和 H855R 通过 PCR 验证 CfMKK1 基因是否敲除成功。满足引物 CfMKK1-7F 和 CfMKK1-8R 无法扩增出条带而引物 CfMKK1-5F 和 H855R 可扩增出目标条带的菌株即为 CfMKK1 基因敲除突变体菌株。本文涉及引物见表 1。

表 1. 本研究涉及的引物序列  
Table 1. Primers used in current study

Primer	Sequence (5'→3')	Purpose
<i>CfMkk1</i> -1F	AATTAGCGCCCAAGCTCAAGT	Amplify <i>CfMkk1</i> 5' flank sequence
<i>CfMkk1</i> -2R	TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCGCGCCA GAAGATGGTTGTTGAA	Amplify <i>CfMkk1</i> 5' flank sequence
<i>CfMkk1</i> -3F	CAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGTGTTC GGTGCCTCACCATT	Amplify <i>CfMkk1</i> 3' flank sequence
<i>CfMkk1</i> -4R	AAGCCCGAGGCTGAAGACAA	Amplify <i>CfMkk1</i> 3' flank sequence
<i>CfMkk1</i> -5F	CGCATTTTGCCCTGAGCCAGA	Validation of <i>CfMkk1</i> gene deletion
H855R	GCTGATCTGACCAGTTGC	Validation of <i>CfMkk1</i> gene deletion
<i>CfMkk1</i> -7F	CCACCTTCGCCAAATGCAA	Amplify <i>CfMkk1</i> gene sequence
<i>CfMkk1</i> -8R	CGCACTCCTTGTTGAAACCG	Amplify <i>CfMkk1</i> gene sequence
<i>CfMkk1</i> -9F	ACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACTCAAATTG GTTGTCCATGCTTCAAGTCGAT	Amplify complemented sequence
<i>CfMkk1</i> -10R	CACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCT CACCTTGGTCTCCAGCCCCATA	Amplify complemented sequence
Hyg-F	GGCTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTCAA	Amplify <i>HPH</i> sequence
Hyg-R	CGGTCGGCATCTACTCTATTCCTTG	Amplify <i>HPH</i> sequence

#### 1.4 *CfMkk1* 基因敲除突变体回补菌株的获得

为了得到突变体回补菌株, 使用引物 *CfMkk1*-9F 和 *CfMkk1*-10R 从野生型 CFLH16 中扩增得到完整的 *CfMkk1* 基因。将扩增获得的 PCR 产物纯化后, 与线性化的 pYF11 质粒载体共同转入 XK-125 酵母细胞<sup>[3]</sup>。使用引物 *CfMkk1*-7F 和 GFP-R 通过 PCR 对在 SD-Trp 培养基上生长的酵母进行验证。将验证成功的质粒转入大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 感受态细胞中, 利用引物 *CfMkk1*-9F 和 GFP-R 分别进行测序。将测序正确的质粒转入  $\Delta CfMkk1$  突变体菌株的原生质体中, 对具有博来霉素抗性的转化子进行荧光检查、PCR 验证鉴定回补菌株  $\Delta CfMkk1$ -C, 用于后续生物学表型测定。

#### 1.5 *CfMkk1* 基因敲除突变体的生物学表型测定

**1.5.1 在不同培养基上生长测定:** 将野生型 CFLH16、突变体  $\Delta CfMkk1$ 、回补菌株 *CfMkk1*-C

的菌落边缘切取约 2 mm×2 mm 的菌饼分别接种于基本培养基 MM 及 PDA 培养基上, 28 °C 暗培养 5 d 后观察菌落形态并测量菌落直径。以野生型菌株为对照, 每个菌株设 3 个重复, 试验重复 3 次。

**1.5.2 外界胁迫敏感性测定:** 在野生型菌株 CFLH16、突变体菌株  $\Delta CfMkk1$ 、回补菌株  $\Delta CfMkk1$ -C 菌落边缘用经灭菌的打孔器 ( $\Phi=8$  mm) 切取菌饼, 分别接种于添加了 200、400、600  $\mu\text{g/mL}$  细胞壁胁迫因子 Congo red 的 PDA 平板中央, 28 °C 暗培养 4 d 后测量菌落直径, 并统计抑制率。每个菌株设置 3 个重复, 试验重复 3 次。

**1.5.3 玻璃纸穿透实验:** 将灭菌的边长 2.5 cm 的正方形玻璃纸贴在 PDA 平板上, 然后吸取野生型 CFLH16、突变体  $\Delta CfMkk1$  以及回补菌株  $\Delta CfMkk1$ -C 调为等浓度 ( $1 \times 10^5$  个/mL) 的分生孢子液各取 20  $\mu\text{L}$  置于玻璃纸膜上, 置于 28 °C 恒温培养, 3 d 后, 除去玻璃纸膜再放回培养箱培养 2 d,

观察培养基上菌丝的生长情况。试验重复 3 次。

**1.5.4 致病力测定:** 采摘油茶嫩叶 9 片, 无菌水清洗干净后置于透明聚苯乙烯盒中, 内衬无菌水湿润的棉花以保证盒内潮湿的环境。在培养 3 d 的野生型 CFLH16、突变体 $\Delta CfMkk1$  以及回补菌株 $\Delta CfMkk1-C$  的菌落边缘, 使用经灭菌的打孔器 ( $\Phi=8$  mm) 切取菌饼, 无菌 PDA 培养基作为空白对照, 将有菌体的一面接种在针刺的有伤叶片上。28 °C 下暗培养, 观察叶片发病情况。每次实验 3 个重复, 试验重复 3 次。

**1.5.5 附着胞形成试验:** 首先将野生型 CFLH16、突变体 $\Delta CfMkk1$  以及回补菌株 $\Delta CfMkk1-C$  分别接种在 PD 液体培养基中, 28 °C 振荡培养 3 d 后, 从菌液中收集各菌株的分生孢子, 并使用血球计

数板统计产孢量。通过无菌水稀释得到等浓度 ( $1 \times 10^5$  个/mL) 的 3 种菌株的分生孢子悬浮液 10  $\mu$ L, 置于疏水玻片 (fisherband) 上, 将载玻片放在培养皿中, 28 °C 保湿暗培养, 8 h 后观察附着胞形成率和形态。每次实验 3 个重复, 试验重复 3 次。

## 2 结果和分析

### 2.1 CfMkk1 的鉴定及系统进化分析

根据酿酒酵母中 ScMkk1 蛋白的氨基酸序列 (CAA99451.1), 在油茶果生炭疽菌全基因组中鉴定到一个同源蛋白 CfMkk1。CfMkk1 基因全长 1723 bp, 编码 521 个氨基酸, 含有一个 S\_TKc 结构域 (图 1-A)。系统发育分析表明, 该蛋白是

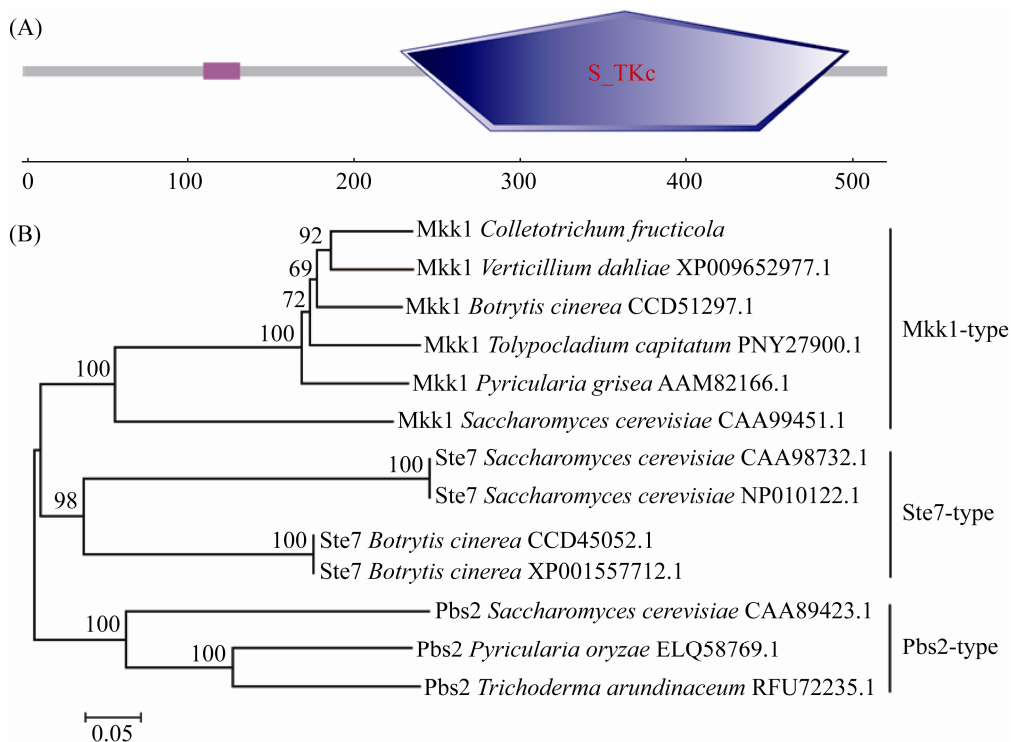


图 1. CfMkk1 结构域预测以及系统发育分析

Figure 1. Domain prediction and phylogenetic analysis of CfMkk1. A: The structure of CfMkk1. S\_TKc: Serine/Threonine domain, the number represents the serial number of the amino acid; B: The neighbour-joining phylogenetic tree. The number after each reference taxon is GenBank accession number of amino acid sequence orthologous to CfMkk1.

属于 Mkk 型 MAPKK 进化枝的成员, 与 Pbs2 型或 Ste7 型进化枝不同。CfMkk1 氨基酸序列与大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)的 Mkk1 氨基酸序列同源性最高, 而与酿酒酵母(*S. cerevisiae*)距离较远(图 1-B)。

## 2.2 CfMKK1 基因敲除突变体及回补菌株的获得

为了阐明 CfMkk1 的生物学功能, 根据同源重组原理构建 CfMKK1 基因敲除载体片段, 敲除策略参考文献[14]所描述的方法。综合 CfMKK1-7F/CfMKK1-8R 和 CfMKK1-5F/H855R 两对引物的检测结果, 成功获得 Cf*mkk1* 基因敲除突变体菌株  $\Delta$ Cf*mkk1*。对具有博来霉素抗性的转化子进行荧光筛选和 PCR 验证, 成功获得回补菌株

$\Delta$ Cf*mkk1*-C。

## 2.3 CfMKK1 参与调控果生炭疽菌的营养生长

为了研究 CfMKK1 基因对油茶果生炭疽菌营养生长的影响, 我们将野生型菌株 CFLH16、突变体菌株  $\Delta$ Cf*mkk1*、回补菌株 Cf*mkk1*-C 分别接种于 PDA、MM 培养基上, 观察菌落形态, 测量菌落直径。结果表明, 突变体菌落大小无论是在 PDA 培养基上还是在 MM 培养基上, 均小于野生型及回补菌株, 且其生长速率也远小于野生型及回补菌株(图 2-A, 图 2-B)。纵切之后, 可以明显观察到突变体的气生菌丝比野生型及回补菌株少(图 2-C)。结果表明 CfMKK1 基因参与调控油茶果生炭疽菌的菌丝生长过程。

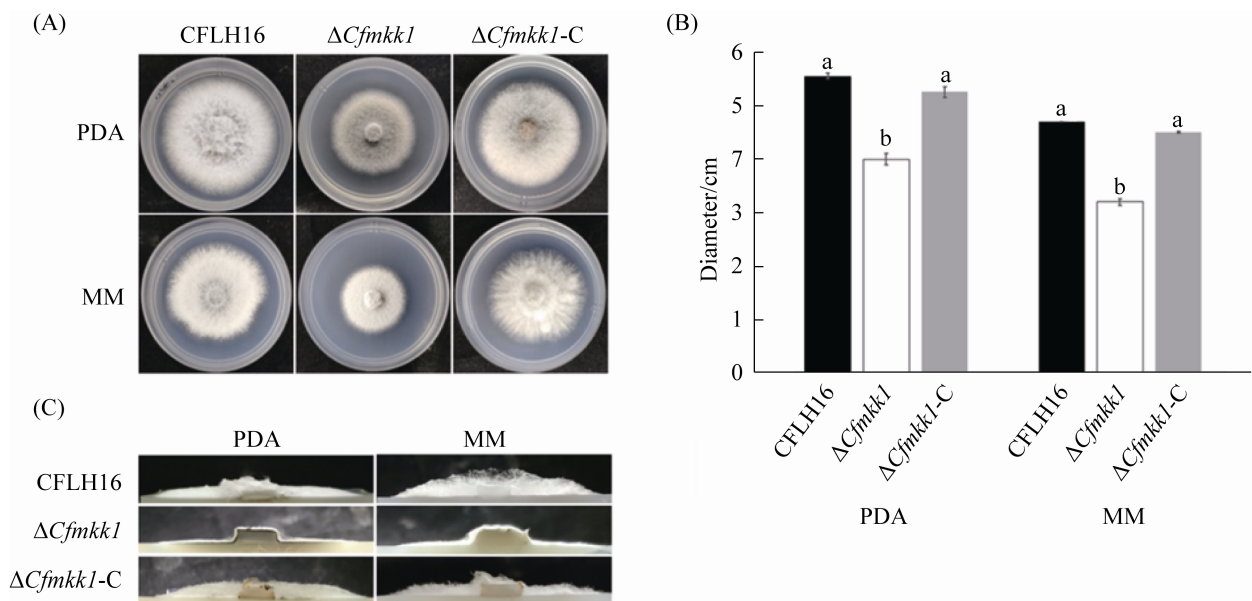


图 2. 突变体  $\Delta$ CfMkk1 在培养基上的菌落形态

Figure 2. The colony morphology of the mutant  $\Delta$ CfMkk1 on culture medium. A: The wild-type CFLH16, the mutant  $\Delta$ Cf*mkk1* and the supplementary strain Cf*mkk1*-C inoculating on PDA and MM media at 28 °C in the dark (5 days); B: Statistical analysis of differences in colony diameter. Error bars indicate standard deviation and different capital letters represent significant difference on  $P < 0.05$ ; C: Aerial hyphae reduced significant in the mutant.

## 2.4 *CfMKK1* 基因参与病菌细胞壁对外界胁迫应答

将野生型菌株 CFLH16、突变体菌株  $\Delta Cfmkk1$ 、回补菌株 *Cfmkk1*-C 分别接种于含有不同浓度细胞壁胁迫因子刚果红(200、400、600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Congo red)

的培养基中, 培养 4 d 后统计抑制率。结果显示, 突变体在添加了细胞壁胁迫因子 Congo Red 的培养基中生长抑制率较野生型和回补菌株显著提高, 耐受性明显下降(图 3), 表明 *CfMKK1* 基因参与调控果生炭疽菌细胞壁对外界胁迫的应答过程。

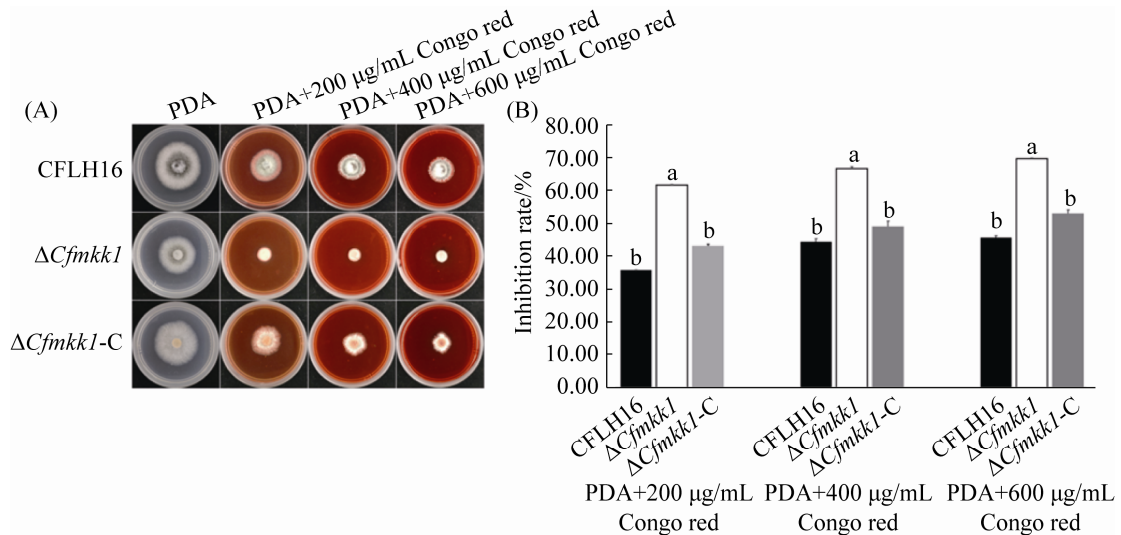


图 3. 突变体  $\Delta Cfmkk1$  对细胞壁胁迫因子敏感性测定

Figure 3. Sensitivity test to the cell wall stress factor CR of the mutant  $\Delta Cfmkk1$ . A: Fungal colonies growing on PDA media containing 200, 400, 600  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Congo red in dark at 28 °C (4 days); B: Statistical analysis of inhibition rate at different concentrations of Congo red. Error bars indicate standard deviation and different lowercases represent significant difference on  $P < 0.01$ .

## 2.5 玻璃纸穿透试验

玻璃纸的成分类似于植物细胞壁, 用玻璃纸模拟植物细胞壁研究病菌穿透状况, 以此推断病原菌是否对寄主具有致病性<sup>[3,15-16]</sup>。玻璃纸穿透试验结果表明, 野生型及回补菌株在揭掉玻璃纸后, 继续培养 2 d 后长出了菌落, 说明它们能够穿透玻璃纸, 而突变体菌株则未长出新的菌落, 说明突变体不能穿透玻璃纸(图 4)。试验结果表明, *CfMKK1* 基因的缺失使果生炭疽菌穿透能力丧失, 以此推断其致病力可能会受到影响。

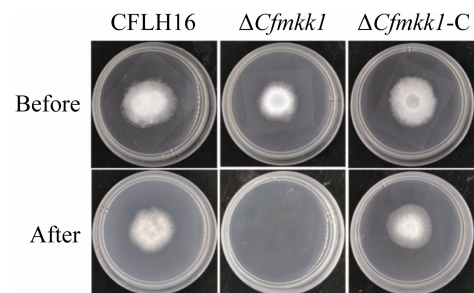


图 4. 玻璃纸穿透试验

Figure 4. Penetration of mutant into cellophane membrane. Before: Fungal colonies of wild-type strain CFLH16, mutant strain  $\Delta Cfmkk1$  and complementary strain *Cfmkk1*-C growing on cellophane membranes at a constant temperature of 28 °C under dark conditions (3 days); After: the plates culturing at a constant temperature of 28 °C under dark conditions (2 days).



## 2.6 致病力测定

为了探究 *CfMKK1* 基因对致病力的影响, 我们采用菌丝块有伤接种油茶离体叶片进行测定。结果表明, 在有伤条件下, 5 d 后野生型菌株 CFLH16、回补菌株 *Cfmkk1-C* 均引起发病, 且产生明显的病斑, 而突变体只能在针尖部分形成无法扩展的小斑点(图 5)。结果表明 *CfMKK1* 基因影响果生炭疽菌的致病力。

## 2.7 *CfMKK1* 基因参与调控附着胞的形成

附着胞是果生炭疽菌侵染寄主的过程中至关重要的结构。本试验对 *CfMKK1* 基因是否影响附着胞的形成进行了试验, 结果表明, 野生型 CFLH16、突变体  $\Delta Cfmkk1$ 、回补菌株 *Cfmkk1-C* 都能萌发形成芽管, 且差别不大。野生型及回补附着胞正常形成, 但突变体无法形成附着胞(图 6)。说明 *CfMKK1* 参与调控油茶果生炭疽菌分生孢子附着胞的形成。

## 3 讨论

油茶炭疽病是我国油茶产区的主要病害。该病害是由多种炭疽菌侵染所致, 病原菌种类主要有果生炭疽菌、暹罗炭疽菌、胶孢炭疽菌、山茶炭疽菌和卡斯特炭疽菌等, 其中果生炭疽菌分离频率最高(70%左右), 分布在全国 90% 以上的油茶种植区, 且对油茶叶的致病力最强<sup>[3-5]</sup>。本试验研究了油茶果生炭疽菌中丝裂原活化蛋白(MAP) 激酶基因 *CfMKK1* 在病菌生长发育、外界胁迫、附着胞及致病力等方面的生物学功能, 对阐明其作用的分子机制提供了依据。

本研究中的蛋白激酶 *CfMkk1* 是一个 MAPKK 蛋白, 是丝裂原活化蛋白激酶 MAPK 三级联信号途径中的中间蛋白, 受到上一级蛋白激酶 MAPKKK 的激活后磷酸化下游的 MAPK 蛋白激酶<sup>[17-18]</sup>。酵母菌中含有 *Ste7*、*Mkk* 和 *Pbs2* 等 3 个 MAPKK 蛋白, 其中 *Ste7* 从真菌到人类中具

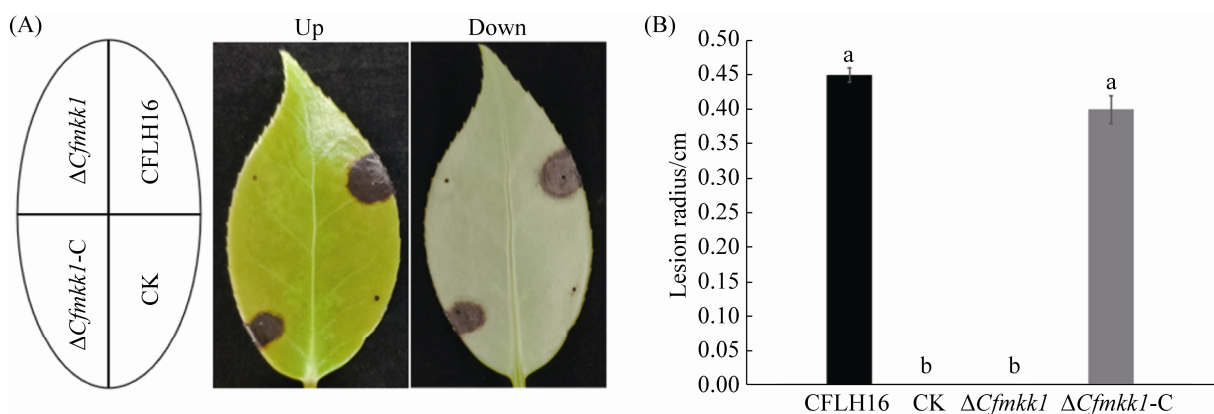


图 5. 突变体  $\Delta Cfmkk1$  的致病力测定

Figure 5. Testing of mutant  $\Delta Cfmkk1$  pathogenicity. A: Wild type strain CFLH16, mutant strain  $\Delta Cfmkk1$  and complementary strain *Cfmkk1-C* inoculating on the injured leaves. CK: PDA medium; B: Statistical analysis of lesion radius of injured leaves. Error bars indicate standard deviation and different lowercases represent significant difference on  $P < 0.01$ .

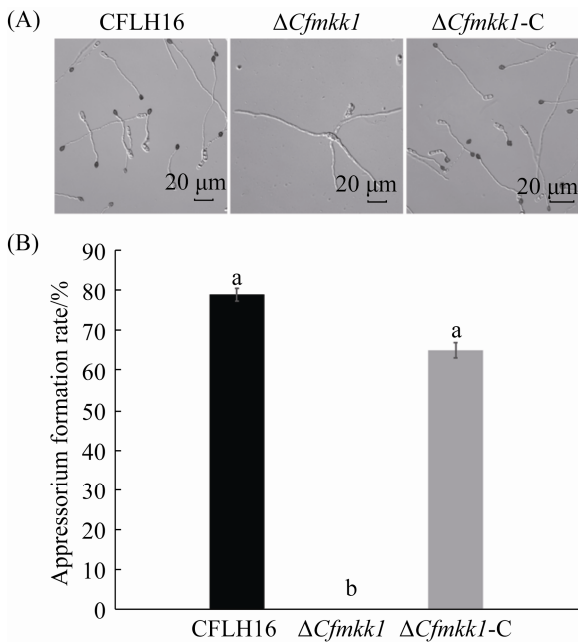


图 6. 突变体 $\Delta Cfmkk1$ 附着胞观察

Figure 6. Observation of mutant  $\Delta Cfmkk1$  appressoria. A: The mutant  $\Delta Cfmkk1$  not forming appressoria; B: Statistical analysis of the rate of appressorium formation. Error bars indicate standard deviation and different lowercases represent significant difference on  $P < 0.01$ .

有高度保守的位点，而在 Pbs2 和 Mkk1/Mkk2 中则没有类似的保守位点，这说明 3 个 MAPKK 蛋白可能执行着不同的生物学功能<sup>[19]</sup>。

本试验对突变体 $\Delta Cfmkk1$ 和野生型 CFLH16 以及回补菌株 *Cfmkk1-C* 营养生长情况进行了对比，发现突变体菌株菌丝生长速率及气生菌丝体数量明显低于野生型及回补菌株，说明 *CfMKK1* 基因影响果生炭疽菌的生长状况。对外界胁迫的应答能力也是病原菌致病力的重要衡量标准，病原菌侵染寄主，首先要在外界各种胁迫环境中存活下来。我们进一步对突变体对外界胁迫的敏感性进行了测定，发现突变体对细胞壁胁迫因子 Congo red 的耐受性显著降低，表明 *Cfmkk1* 参

与调控果生炭疽菌细胞壁对外界胁迫应答过程。在模式生物酿酒酵母中的 Slt2-MAPK 通路中的 Rom2 感知外界信号并传递给 Pkc1 和 Bck1-Mkk-Slt2 级联途径进而调控真菌细胞壁的完整性<sup>[20-24]</sup>。

附着胞是病原菌侵染寄主的重要结构，在病原菌侵染植物过程中起着非常重要的作用。有研究发现在 Fus3/Kss1-MAPK 级联通路中，在玉米小斑病菌中 MAPKK 蛋白基因 *STE7* 敲除突变体无法形成附着胞，致病力显著减弱<sup>[25]</sup>；果生炭疽菌的 *CfPMK1* 基因缺失导致油茶果生炭疽病菌不能形成附着胞，完全丧失了致病力<sup>[26]</sup>。在 Slt2-MAPK 级联通路中，稻瘟菌中 MAPK 激酶 *MPS1* 基因敲除突变体可以形成附着胞，但对植物没有致病力<sup>[10]</sup>。*Mycosphaerella graminicola* 的 MgSlt2 突变菌株能正常穿透小麦气孔，但侵染菌丝不能在植物组织内生长扩展，毒力下降<sup>[27]</sup>。在 *C. orbiculare* 中的一个 Slt2 同源基因 *MAF1*，其缺失突变体芽管变长，不能形成附着胞<sup>[28]</sup>。在本研究中，*Cfmkk1* 是 Slt2-MAPK 级联通路中的一个 MAPKK 激酶同源蛋白，通过磷酸化 MAPK 激酶传递信号。*CfMKK1* 基因敲除突变体不能形成附着胞，无法穿透玻璃纸，在有伤的叶片中菌丝不能侵染生长，这可能是 *CfMKK1* 基因敲除突变体致病力丧失的主要原因。

本研究从油茶炭疽病优势致病菌果生炭疽菌中，鉴定出一个丝裂原活化蛋白激酶基因，命名为 *CfMKK1*。研究发现 *CfMKK1* 参与调控果生炭疽菌的营养生长、侵染生长、附着胞形成和致病力。本文研究结果可为理解果生炭疽菌致病分子机理和以 *CfMKK1* 基因为潜在靶标开发新型杀菌剂提供理论依据。



## 参考文献

- [1] Liu YJ, Ou RM, Chen YZ. The research current situation and countermeasures for development of camellia industry. *China Forestry Science and Technology*, 2007, 21(4): 1–4. (in Chinese)  
刘跃进, 欧日明, 陈永忠. 我国油茶产业发展现状与对策. 林业科技开发, 2007, 21(4): 1–4.
- [2] Jin AX, Zhou GY, Li H. Progress, problem and prospect of oil camelliae anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) research. *Forest Pest and Disease*, 2009, 28(2): 27–31. (in Chinese)  
靳爱仙, 周国英, 李河. 油茶炭疽病的研究现状、问题与方向. 中国森林病虫, 2009, 28(2): 27–31.
- [3] Yao Q, Guo Y, Wei FY, Li SZ, Zhang SP, Li H. A bZIP-type transcription factor CfHac1 is involved in regulating development and pathogenesis in *Colletotrichum fructicola*. *Mycosystema*, 2019, 38(10): 1643–1652. (in Chinese)  
姚权, 郭源, 魏丰园, 李司政, 张盛培, 李河. bZIP 转录因子 CfHac1 参与调控果生刺盘孢菌的生长发育和致病力. 菌物学报, 2019, 38(10): 1643–1652.
- [4] Li H, Li Y, Jiang SQ, Liu JY, Zhou GY. Pathogen of oil-tea trees anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. in Hunan Province. *Scientia Silvae Sinicae*, 2017, 53(8): 43–53. (in Chinese)  
李河, 李杨, 蒋仕强, 刘君昂, 周国英. 湖南省油茶炭疽病病原鉴定. 林业科学, 2017, 53(8): 43–53.
- [5] Li H, Li SZ, Wang YC, Liu JA, Xu JP, Zhou GY. Identification of the pathogens causing anthracnose of *Camellia oleifera* in nursery and their resistance to fungicides. *Scientia Silvae Sinicae*, 2019, 55(5): 85–94. (in Chinese)  
李河, 李司政, 王悦辰, 刘君昂, 徐建平, 周国英. 油茶苗圃炭疽病原菌鉴定及抗药性. 林业科学, 2019, 55(5): 85–94.
- [6] Rispaill N, Soanes DM, Ant C, Czajkowski R, Grünler A, Huguet R, Perez-Nadales E, Poli A, Sartorel E, Valiante V, Yang M, Beffa R, Brakhage AA, Gow NAR, Kahmann R, Lebrun MH, Lenasi H, Perez-Martin J, Talbot NJ, Wendland J, Di Pietro A. Comparative genomics of MAP kinase and calcium–calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(4): 287–298.
- [7] Peng JJ. Research progress of MAPK cascade pathways in phytopathogenic fungi. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2014, 42(9): 11–15. (in Chinese)  
彭静静. 植物病原真菌中 MAPK 级联通路研究进展. 江苏农业科学, 2014, 42(9): 11–15.
- [8] Hamel LP, Nicole MC, Duplessis S, Ellis BE. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *The Plant Cell*, 2012, 24(4): 1327–1351.
- [9] Liang XF, Wei TY, Cao MY, Zhang X, Liu WK, Kong YY, Zhang R, Sun GY. The MAP kinase CfPMK1 is a key regulator of pathogenesis, development, and stress tolerance of *Colletotrichum fructicola*. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1070, doi: 10.3389/fmicb.2019.01070.
- [10] Xu JR, Staiger CJ, Hamer JE. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95(21): 12713–12718.
- [11] Dixon KP, Xu JR, Smirnov N, Talbot NJ. Independent signaling pathways regulate cellular turgor during hyperosmotic stress and appressorium-mediated plant infection by *Magnaporthe grisea*. *The Plant Cell*, 1999, 11(10): 2045–2058.
- [12] Zhao XH, Mehrabi R, Xu JR. Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(10): 1701–1714.
- [13] Jiang SQ, Li H. First report of leaf anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* on tea-oil trees (*Camellia oleifera*) in China. *Plant Disease*, 2018, 102(3), doi: 10.1094/PDIS-08-17-1195-PDN.
- [14] Zhang HF, Tang W, Liu KY, Huang Q, Zhang X, Yan X, Chen Y, Wang JS, Qi ZQ, Wang ZY, Zheng XB, Wang P, Zhang ZG. Eight RGS and RGS-like proteins orchestrate growth, differentiation, and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(12): e1002450.

- [15] López-Berges MS, Rispaill N, Prados-Rosales RC, Di Pietro A. A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The Plant Cell*, 2010, 22(7): 2459–2475.
- [16] Wu FH, Zeng T, Chen HQ, Zeng HC, Peng M. Phenotype analysis of the T-DNA insertion mutant Focr4-1562 of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4 and its gene-knockout mutant. *Mycosystema*, 2012, 31(4): 584–592. (in Chinese)  
吴飞宏, 曾涛, 陈汉清, 曾会才, 彭明. 尖镰孢古巴专化型 4 号小种 T-DNA 插入突变体 Focr4-1562 及其基因敲除子的生物学表型研究. *菌物学报*, 2012, 31(4): 584–592.
- [17] Wilkinson MG, Millar JBA. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *The FASEB Journal*, 2000, 14(14): 2147–2157.
- [18] Fukuda M, Gotoh Y, Nishida E. Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *The EMBO Journal*, 1997, 16(8): 1901–1908.
- [19] Bardwell L, Thorner J. A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends in Biochemical Sciences*, 1996, 21(10): 373–374.
- [20] Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998, 62(4): 1264–1300.
- [21] Heinisch JJ. Bake's yeast as a tool for the development of antifungal kinase inhibitors—targeting protein kinase C and the cell integrity pathway. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2005, 1754(1/2): 171–182.
- [22] Jung US, Sobering AK, Romeo MJ, Levin DE. Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Molecular Microbiology*, 2002, 46(3): 781–789.
- [23] Tatjer L, Sacristán-Reviriego A, Casado C, González A, Rodríguez-Porrata B, Palacios L, Canadell D, Serra-Cardona A, Martín H, Molina M, Ariño J. Wide-Ranging effects of the yeast Ptc1 protein phosphatase acting through the MAPK kinase Mkk1. *Genetics*, 2016, 202(1): 141–156.
- [24] Hu P, Zhang YF, Cui HF, Ying R, Liu JP, Ye ZH. Full length cloning and expression of mitogen-activated protein kinase homolog gene *Uemkk1* in *Ustilago esculenta*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2016, 24(3): 406–415. (in Chinese)  
胡鹏, 张雅芬, 崔海峰, 应荣, 刘俊平, 叶子弘. 菰黑粉菌 MAPKK 同源基因 *UeMkk1* 的全长克隆及表达. *农业生物技术学报*, 2016, 24(3): 406–415.
- [25] Kitade Y, Sumita T, Izumitsu K, Tanaka C. MAPKK-encoding gene *Ste7* in *Bipolaris maydis* is required for development and morphogenesis. *Mycoscience*, 2015, 56(2): 150–158.
- [26] 李河. 油茶炭疽病菌群体遗传及 MAPK 基因 *CfPMK1* 功能研究. 中南林业科技大学博士论文, 2018: 73–76.
- [27] Mehrabi R, Zwiers LH, De Waard MA, Kema GHJ. *MgHog1* regulates dimorphism and pathogenicity in the fungal wheat pathogen *Mycosphaerella graminicola*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(11): 1262–1269.
- [28] Kojima K, Kikuchi T, Takano Y, Oshiro E, Okuno T. The mitogen-activated protein kinase gene *MAF1* is essential for the early differentiation phase of appressorium formation in *Colletotrichum lagenarium*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2002, 15(12): 1268–1276.

# MAPKK-encoding gene *CfMKK1* in *Colletotrichum fructicola* is required for its growth and pathogenicity

Yu Xiao, He Li\*

Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration for Control of Diseases and Pests of South Plantation, Hunan Provincial Key Laboratory for Control of Forest Diseases and Pests, Key Laboratory for Non-Wood Forest Cultivation and Conservation of Ministry of Education, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan Province, China

**Abstract:** [Objective] *Colletotrichum fructicola* is an important pathogen that results in yield loss of *Camellia oleifera*. We studied the functions of the mitogen-activated protein kinase gene *CfMKK1* in *C. fructicola* for analyzing the pathogenic mechanism of oil-tea tree anthracnose. [Methods] The homologous recombination method was used to construct the *CfMKK1* gene-deleted fragment, which was transformed into the protoplasts generated by using PEG-mediated method to obtain the mutant strain  $\Delta Cfmkk1$ . The PCR-amplified *CfMKK1* gene-containing complement of the promoter of *C. fructicola* was taken to construct a complementary vector pYF11::*CfMKK1*, then the complementary vector was transformed into the mutant protoplasts by using PEG-mediated method to screen the complementary strain  $\Delta Cfmkk1$ -C. The biological phenotypes of the wild-type strain CFLH16, the mutant strain  $\Delta Cfmkk1$ , and the complementary strain  $\Delta Cfmkk1$ -C were measured in vegetative growth, appressorium formation, stress response and pathogenicity. [Results] The mycelial growth rate of  $\Delta Cfmkk1$  was significant slowed down compared to the wild-type strain CFLH16 and the complementary strain  $\Delta Cfmkk1$ -C, more sensitive to Congo red, lost the ability to infect hosts and was unable to form appressoria. [Conclusion] *CfMkk1* is involved in regulating the growth, response to external stress and appressorium formation of *C. fructicola*, affecting the pathogenicity.

**Keywords:** *Camellia oleifera*, *Colletotrichum fructicola*, mitogen-activated protein kinases, *CfMkk1*, pathogenicity

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (2019JJ40531) and by the National Natural Science Foundation of China (31570641)

\*Corresponding author. Tel/Fax: +86-731-85623450; E-mail: csuftlihe@163.com

Received: 7 March 2020; Revised: 28 April 2020; Published online: 15 June 2020