

# 苹果炭疽叶枯病菌 GcAP1 复合体 $\beta$ 亚基基因的克隆及功能分析

张俊祥, 冀志蕊, 王娜, 徐成楠, 迟福梅, 周宗山

(中国农业科学院果树研究所, 辽宁兴城 125100)

**摘要:** 【目的】明确衔接蛋白 (adaptor protein) GcAP1 复合体  $\beta$  亚基在苹果炭疽叶枯病菌 (*Glomerella cingulata*) 生长发育和致病过程中的功能, 检测 GcAP1  $\beta$  在该菌中的时空表达模式, 并揭示其是否调控多聚半乳糖醛酸内切酶 (endopolygalacturonase) 基因 *CgPG1* 和 *CgPG2*、果胶裂解酶 (pectin lyase) 基因 *pnl-1* 和 *pnl-2* 以及果胶酯裂解酶 (pectate lyase) 基因 *pe1A* 和 *pe1B* 的表达, 为深入开展苹果炭疽叶枯病菌衔接蛋白在致病信号传导途径中的分子机制研究打下基础。【方法】通过构建 GcAP1  $\beta$  基因敲除载体和 GcAP1  $\beta$ -gfp 融合表达载体, 利用农杆菌介导的遗传转化技术 (ATMT) 获得  $\Delta$ gcap1  $\beta$  突变体和 GcAP1  $\beta$  恢复菌株  $\Delta$ gcap1  $\beta$ -GcAP1  $\beta$ , 并由 RT-PCR 和 Southern 杂交分析进行鉴定。以野生型菌株 W16 为对照, 对  $\Delta$ gcap1  $\beta$  突变体和 GcAP1  $\beta$  恢复菌株  $\Delta$ gcap1  $\beta$ -GcAP1  $\beta$  的生长速度、产孢能力、分生孢子萌发率及附着胞形成率和致病性进行测定。利用生物信息学软件 ProtComp 9.0 和 TMHMM 对 GcAP1  $\beta$  蛋白进行结构分析, 并结合 GcAP1  $\beta$ -GFP 信号观测, 进行 GcAP1  $\beta$  的亚细胞定位。利用 qRT-PCR 技术, 检测 GcAP1  $\beta$  在菌丝、分生孢子、芽管、附着胞和侵染阶段的表达量, 并检测 *CgPG1*、*CgPG2*、*pnl-1*、*pnl-2*、*pe1A* 和 *pe1B* 在野生型菌株和  $\Delta$ gcap1  $\beta$  突变体中的表达量。【结果】GcAP1  $\beta$  基因全长 2 321 bp, 含有 3 个内含子, 编码 720 个氨基酸。与野生型菌株 W16 相比,  $\Delta$ gcap1  $\beta$  突变体菌落成褶皱状, 菌丝生长速度明显减慢, 而分生孢子产量、分生孢子萌发率、附着胞形成率无显著差异。 $\Delta$ gcap1  $\beta$  致病力明显降低, 仅在苹果叶片上引起极小的点状斑。GcAP1  $\beta$  基因恢复菌株  $\Delta$ gcap1  $\beta$ -GcAP1  $\beta$  完全修复了因 GcAP1  $\beta$  基因缺失造成的表型缺陷。荧光检测显示, 融合蛋白 GcAP1  $\beta$ -GFP 分布于细胞质中。qRT-PCR 检测结果表明, GcAP1  $\beta$  在苹果炭疽叶枯病菌各个发育阶段都有表达, 且在侵染后表达量相对最高。GcAP1  $\beta$  的缺失导致 *CgPG1* 表达量降低至 20.3%, *CgPG2* 表达量降低至 16.5%, *pnl-1* 表达量降低至 8.2%, *pnl-2* 表达量降低至 14.4%, *pe1A* 表达量降低至 4.4%, *pe1B* 表达量降至 0.8%。【结论】衔接蛋白 GcAP1 复合体分布于细胞质中, 是苹果炭疽叶枯病菌生长发育所需要的; GcAP1 调控 *CgPG1*、*CgPG2*、*pnl-1*、*pnl-2*、*pe1A* 和 *pe1B* 的表达, 是苹果炭疽叶枯病菌一个重要的毒力因子。

**关键词:** 衔接蛋白; 果胶酶; 苹果; 炭疽菌; 致病力

## Gene Cloning and Functional Analysis of GcAP1 Complex Beta Subunit in *Glomerella cingulata*

ZHANG JunXiang, JI ZhiRui, WANG Na, XU ChengNan, CHI FuMei, ZHOU ZongShan

(Research Institute of Pomology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Xingcheng 125100, Liaoning)

**Abstract:** 【Objective】The objectives of this study are to determine the function of  $\beta$  subunit of adaptor protein GcAP1 complex in growth and pathogenicity of *Glomerella* leaf spot of apple pathogen *Glomerella cingulata*, investigate expression patterns of the GcAP1 $\beta$  in the fungal growth and pathogenicity, decipher whether or not GcAP1 $\beta$  regulate the expression of endopolygalacturonase genes *CgPG1* and *CgPG2*, pectin lyase genes *pnl-1* and *pnl-2*, pectate lyase genes *pe1A* and *pe1B*, and to lay a foundation for further studies of adaptor protein in pathogenic signal transduction pathways of *G. cingulata*. 【Method】Based on the

收稿日期: 2016-12-26; 接受日期: 2017-02-06

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金 (31501596)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (1610182016002)、中国农业科学院科技创新工程

联系方式: 第一作者、共同通信作者张俊祥, E-mail: zhangjunxiang@caas.cn. 通信作者周宗山, E-mail: zszhouqrj@163.com

*GcAP1 $\beta$*  deletion vector and *GcAP1 $\beta$ -gfp* fused expression vector, the *Δgcap1 $\beta$*  mutant and the *GcAP1 $\beta$*  complementation strain *Δgcap1 $\beta$ -GcAP1 $\beta$*  were structured using ATMT, respectively, verified by RT-PCR and Southern blot analysis. Colony growth rate, sporulation, germination rate, appressorial formation rate and pathogenicity of the *Δgcap1 $\beta$*  mutant and the *GcAP1 $\beta$*  complementation strain *Δgcap1 $\beta$ -GcAP1 $\beta$*  were assayed, compared with the wild-type strain W16. *GcAP1 $\beta$*  subcellular localization was carried out with the bioinformatics softwares ProtComp 9.0 and TMHMM, along with signal observation of *GcAP1 $\beta$ -GFP*. The *GcAP1 $\beta$*  expression levels in hyphae, conidia, appressoria and pathogenicity stage were identified by qRT-PCR. Moreover, the expression levels of *CgPG1*, *CgPG2*, *pnl-1*, *pnl-2*, *pelA* and *pelB* in the wild-type strain W16 and the *Δgcap1 $\beta$*  mutant were detected, respectively. 【Result】 *GcAP1 $\beta$*  is 2 321 bp in length, including 3 introns, which encodes a 720 amino acids. Compared with the wild-type strain W16, the *Δgcap1 $\beta$*  mutant showed a rill-like fold colony and decreased growth, while sporulation, germination rate and appressorial formation rate were unaffected. Virulence of the *Δgcap1 $\beta$*  mutant reduced significantly, which induced tiny spots on the leaves. Moreover, the *GcAP1 $\beta$*  complementation strain *Δgcap1 $\beta$ -GcAP1 $\beta$*  fully restored the phenotype flaws by reintroducing *GcAP1 $\beta$*  to the *Δgcap1 $\beta$*  mutant. Fluorescent signal showed that the fused protein *GcAP1 $\beta$ -GFP* was distributed to the cytoplasm. qRT-PCR analysis showed that *GcAP1 $\beta$*  expresses through the lifecycle of *G. cingulata*, and the highest expression level of *GcAP1 $\beta$*  occurred at the post-invasion to leaves. Compared with WT, the *Δgcap1 $\beta$*  mutant showed a drastic reduction of *CgPG1* transcripts (20.3%), *CgPG2* transcripts (16.5%), *pnl-1* transcripts (8.2%), *pnl-2* transcripts (14.4%), *pelA* transcripts (4.4%) and *pelB* transcripts (0.8%). 【Conclusion】 The adaptor protein GcAP1 complex is distributed to the cytoplasm and is necessary for growth and development of *G. cingulata*; GcAP1 regulates the expression of *CgPG1*, *CgPG2*, *pnl-1*, *pnl-2*, *pelA* and *pelB* and is a vital virulence factor of *G. cingulata*.

Key words: adaptor protein; pectinase; apple; *Colletotrichum*; virulence

## 0 引言

【研究意义】衔接蛋白 (adaptor protein, AP) 在哺乳动物细胞内信号的传递、蛋白质的分拣及向囊泡转运过程中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>, 但关于 AP 蛋白在真菌中的功能鲜有报道。以 GcAP1 复合体  $\beta$  亚基基因为出发点, 揭示其在苹果炭疽叶枯病菌生长发育和致病过程中的功能, 可为植物病害防治的新途径、新方法提供线索, 并对植物病原真菌致病机理研究具有重要意义。【前人研究进展】近几年, 苹果一种重要的新病害——苹果炭疽叶枯病 (*Glomerella leaf spot of apple*), 在中国苹果主产区连年大发生, 给苹果产业带来巨额损失<sup>[2]</sup>。现已发现, 围小丛壳菌 (*Glomerella cingulata*) (无性态: 胶胞炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides*)<sup>[3-5]</sup>、尖孢炭疽菌 (*C. acutatum*)<sup>[6]</sup>、喀斯特炭疽菌 (*C. karstii*)<sup>[7]</sup>、果生刺盘孢 (*C. fructicola*) 和隐秘刺盘孢 (*C. aenigma*)<sup>[8]</sup>均可引起苹果炭疽叶枯病。炭疽菌通过分生孢子萌发, 产生芽管和附着胞, 附着胞下形成的侵染钉可直接侵入寄主<sup>[4]</sup>。像其他植物病原真菌一样, 炭疽菌 (*Colletotrichum*) 侵染过程受 cAMP 和 MAPK 路径调控<sup>[9]</sup>。胶胞炭疽菌通过分泌果胶酶, 例如聚半乳糖醛酸酶 (polygalacturonase, PG)、果胶裂解酶 (pectin lyase, PNL) 和果胶酸酯裂解酶 (pectate lyase, PEL), 克服寄主细胞壁中的果胶, 使其成功在寄主体内定殖。研究表明, *PG1*、

*PG2*、*pnl-1*、*pnl-2*、*pelA* 和 *pelB* 单个基因突变或双基因突变均明显地降低病原菌的致病力<sup>[10-14]</sup>。最近的研究表明, 在碱性条件下, 转录因子 *pacC* 调控 *pelB* 的表达<sup>[15]</sup>, 但关于果胶酶基因的调控机制尚需进一步研究。AP 蛋白以复合体形式存在于生物体中, 具有重要的功能<sup>[16-17]</sup>。在哺乳动物中, 现已发现 5 种类型的 AP 复合体, 即 AP-1、AP-2、AP-3、AP-4 和 AP-5<sup>[18-19]</sup>。AP 蛋白由 4 个不同的亚基构成 ( $\delta$ 、 $\beta$ 、 $\mu$  和  $\sigma$ ), 2 个大亚基 ( $\delta$  和  $\beta$ ) 具有识别和结合网格蛋白的功能, 1 个中亚基 ( $\mu$ ) 负责蛋白的分拣和跨膜装配, 小亚基 ( $\sigma$ ) 具有稳定复合体的作用<sup>[18,20-21]</sup>。目前, 胶胞炭疽菌菌株 23 的基因组测序已完成, 其 Contig 序列公布在 “Comparative Fungal Genomics Platform”。此外, 博德研究所 (<http://www.broadinstitute.org>) 还公布了玉米炭疽菌 (*C. graminicola*) 和希金斯刺盘孢 (*C. higginsiamim*) 全基因序列。这些基因组信息为炭疽菌的致病机理研究创造了条件。【本研究切入点】为开展苹果炭疽叶枯病菌致病机制研究, 笔者课题组之前利用农杆菌介导的遗传转化 (ATMT) 方法, 构建了苹果炭疽叶枯病菌强致病力菌株 W16 的 T-DNA 插入突变体库<sup>[5]</sup>。在对一些 T-DNA 插入突变体进行致病性测验中, 发现一株突变体 A7346 对苹果叶片及果实致病力明显降低。进一步揭示突变体 A7346 致病力降低的分子机制, 将是研究苹果炭疽叶枯病菌致病机制的一个很好契机。【拟解决的关键问题】阐明 GcAP1

复合体  $\beta$  亚基在苹果炭疽叶枯病菌致病过程中的功能,明确 GcAP1 复合体是否调控 *CgPG1*、*CgPG2*、*pnl-1*、*pnl-2*、*pelA* 和 *pelB* 的表达,为深入开展 AP 蛋白在苹果炭疽叶枯病菌致病信号传导途径中的分子机制研究打下基础。

## 1 材料与方 法

试验于 2015—2016 年在中国农业科学院果树研究所完成。

### 1.1 供试菌株及培养条件

苹果炭疽叶枯病菌 (*G. cingulata*) 强致病力菌株 W16,由笔者课题组 2014 年分离自辽宁省绥中市一个病害重发生果园<sup>[5]</sup>,W16 和由其衍生的转化子采用 PDA 培养基进行培养。农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 LBA4404 (由云南农业大学何月秋教授惠赠) 采用 LB 培养基进行培养,用于 ATMT。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 TG1 采用 LB 培养基进行培养,用作质粒的宿主。为检测 *GcAP1 $\beta$*  的表达模式, RNA 提取样品分别取自菌丝 (PDA 培养 3 d 的菌丝体)、分生孢子 (无菌蒸馏水刮洗 PDA 平板 10 d 的培养物,2 层擦镜纸过滤除去菌丝后,离心收集分生孢子)、芽管 (用毛笔将  $10^6$  个/mL 分生孢子悬浮液涂在叶片正面,28℃ 条件下保湿培养 6 h 后,用灭菌刀片轻刮叶子叶面,收集萌发的分生孢子)、附着胞 (方法同芽管,保湿培养 10 h,收集叶片表面形成的附着胞) 和叶片接种 48 h (方法同芽管,保湿培养 48 h,将整个叶片液氮速冻后研磨)。为检测 *CgPG1*、*CgPG2*、*pnl-1*、*pnl-2*、*pelA* 和 *pelB* 在 *GcAP1 $\beta$*  突变体中的表达量, RNA 提取样品分别取自 PDA 培养 6 d 的菌丝体。

### 1.2 核酸操作

基因组 DNA 的提取采用 HE<sup>[22]</sup>的方法进行。PCR 扩增体系和程序按 ZHANG 等<sup>[23]</sup>的方法进行。PCR 产物的纯化采用生工生物工程(上海)股份有限公司(简称:生工生物)的 PCR 产物纯化试剂盒进行。质粒的小量提取采用生工生物的质粒提取试剂盒进行。Southern blot 分析采用 ZHANG 等<sup>[24]</sup>的方法进行。总 RNA 的提取采用北京天根生化科技有限公司的植物总 RNA 提取试剂盒 (HL 缓冲液) 进行。RT-PCR 分析采用大连宝生物工程股份有限公司的反转录试剂盒进行。qRT-PCR 分析采用北京全式金生物技术有限公司的荧光定量 PCR 试剂盒进行。qRT-PCR 每个反应包含 2xTransStart Tip Green qPCR SuperMix 10  $\mu$ L,引物

(10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>) 各 0.4  $\mu$ L, cDNA (RT-PCR 产物 100 倍稀释液) 1  $\mu$ L, RNase-free H<sub>2</sub>O 8.2  $\mu$ L。qRT-PCR 采用美国 BIO-RAD 公司的荧光定量 PCR 分析系统 (Real-Time PCR System) 进行检测,扩增程序为 1 个循环 (94℃ 30 s), 40 个循环 (94℃ 5 s, 60℃ 15 s, 72℃ 10 s), 并以  $\beta$ -微管蛋白基因 ( *$\beta$ -tubulin*) 作为内参基因,用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 方法<sup>[25]</sup>计算各被检测基因的相对表达量。PCR 引物 (表 1) 由生工生物合成。

表 1 PCR 引物序列

Table 1 The primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
S2G2	AAAGAATTTCGAAGGATCCACCCAGCTCTG <sup>#</sup>
S2Df2	AAAGTCGACGCAATGGGGCAACAGGTAGTAGTAG
S2Dr1	ATAGTCGACAAAACATGGGCCAGAAGGAGAGG
S3S1	AAAAGTAGTGATGATGTAGCGGAAATTAGC
HB1	AAAGTCGACCCAGCACGAGCAGGTCCCC
HB2	TTTGGATCCTTGACCTTCAACGTGTCCATC
S2F	TCACAGCACGAGCAGGTCC
S2R	ATGTTTCATGGCCTATGTGCC
S2R1	ATCCTCTGCCACTTTCGTAC
S2Q1	CGCATCCTGGCATAGTTGAC
S2Q2	CGTTGTTCCTCCGACATCATCG
TubF	CTTCCGGCAACAAGTACGT
TubR	GCGTCCTGGTATTGTGGT
H-F1	CGTTATGTTTATCGGCACT
H-R1	TTGGCGACCTCGTATTGG
P-f	TACGAAAGTCGGCAGAGGAT
P-r	CTTAGCAGCAACTGGAGGTCA
CgPG1F	TACCACCCTCGACATGACCG
CgPG1R	CACTCCTGTAGCCGAAGGT
CgPG2F	TCCTGCACCGACATCGTG
CgPG2R	GGTGCCGCTCTTCAGGCC
Pnl-1F	AAGGGCGCTATCAAGGGCA
Pnl-1R	GGGTTCAAGTCGGAGACCTGAAT
Pnl-2F	GCATCACCAACTCAGCGAAG
Pnl-2R	ATCACCTCCCCAGACGTA
PelAF	GGCACTGGTCACATCTACA
PelAR	TGCTCTGAATGAGGACCTGC
PelBF	TGTCCGCAACATGAAGATCTCC
PelBR	AGTGGTCAACCCAGACCTTGG
TubQF	TGATGGCTGCTTCTGACTCC
TubQR	TCCTCGACATCCTTCATAGCG

限制性酶切位点用下划线标注

Restriction enzymes cut sites were marked with underline

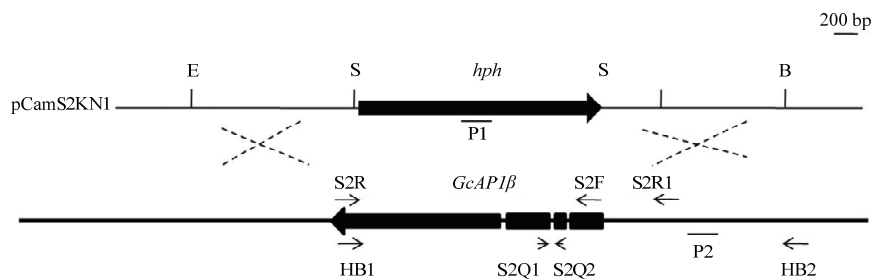
### 1.3 突变体 A7346 T-DNA 右翼序列分析

以质粒 pCamhybgfp1 (GenBank accession number: KX223837) 为模板, 用引物 H-F1 和 H-F2 进行 PCR 扩增, 产物纯化后作为探针 (P1) 进行 A7346 T-DNA 插入拷贝数的 Southern blot 分析。A7346 T-DNA 右翼序列采用 *hiTAIL-PCR* 方法<sup>[26]</sup>进行 PCR 扩增, 产物连接到 pUCm-T 载体 (生工生物), 由北京三博远志生物技术有限责任公司测序。获得的 T-DNA 右翼序列参考围小从壳菌菌株 23 基因组 (<http://genome.jgi.doe.gov/Gloci1/Gloci1.home.html>), 进行本地 blast 分析。目的 *GcAP1* 复合体  $\beta$  亚基因 (*GcAP1 $\beta$* ) 利用比较真菌基因组平台<sup>[27]</sup>进一步进行分析, 并提取基因结构及其上下游序列和蛋白序列信息。

### 1.4 *GcAP1* 复合体 $\beta$ 亚基因的敲除与恢复

以野生型菌株 W16 基因组为模板, 用引物 S2Dr1 和 S3S1 扩增 *GcAP1 $\beta$*  基因上游序列, *Sal* I / *Spe* I 酶切后, 连接到 *Sal* I / *Spe* I 酶切的 pCambiaMX9 (GenBank accession number: KX755248), 生成质粒 pCamS1。再以野生型菌株 W16 基因组为模板, 用引物 S2G2 和 S2DF2 扩增 *GcAP1 $\beta$*  基因下游序列, *Eco*R I / *Sal* I 酶切后, 连接到 *Eco*R I / *Sal* I 酶切的 pCambiaMX9 (GenBank accession number: KX755248), 生成质

粒 pCamS2。约 2.0 kb 的潮霉素抗性基因 (*hph*) 序列从质粒 pTFCM<sup>[28]</sup> (由华中农业大学姜道宏教授惠赠) *Sal* I 酶切得到后, 连接到 *Sal* I 酶切的 pCamS2, 形成 *GcAP1 $\beta$*  基因敲除载体 pCamS2KN1 (图 1)。pCamS2KN1 被电转到农杆菌 LBA4404 中后, 利用 ATMT 方法<sup>[29]</sup>将 *GcAP1 $\beta$*  从 W16 基因组中敲除。筛选潮霉素 B (生工生物, 终浓度 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 抗性转化子, 对假定的 *GcAP1 $\beta$*  基因突变体用引物 HB1 和 S2R1 进行特定位点的 PCR 扩增分析 (图 1), 并以探针 P2 (以野生型菌株 W16 基因组为模板, 由引物 P-f 和 P-r 进行 PCR 扩增及纯化获得) 进行 Southern blot 鉴定。以 W16 基因组为模板, 用引物 HB1 和 HB2 扩增 *GcAP1 $\beta$*  及其假定的启动子序列, *Bam*H I / *Sal* I 酶切后, 连接到载体 pGapneoR12 (GenBank accession number: KY363244), 生成的 *GcAP1 $\beta$*  基因恢复载体 pCamGcAP1 $\beta$  (形成 *GcAP1 $\beta$ -gfp* 融合表达结构) 被电转到农杆菌 LBA4404 中, 利用 ATMT<sup>[29]</sup>将 *GcAP1 $\beta$ -gfp* 融合基因转移到 *Δgcap1 $\beta$*  突变体基因组中, 筛选 G418 (生工生物, 终浓度 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) 抗性转化子, 对假定的 *GcAP1 $\beta$*  基因恢复菌株用引物 S2F 和 S2R 进行 PCR 扩增分析和 GFP 信号检测 (DM5000B 型荧光显微镜, 德国 Leica) 进行确定。



*hph*: 潮霉素磷酸转移酶基因 Hygromycin phosphotransferase gene; 探针 P1, 用于 A7346 的 T-DNA 插入拷贝数鉴定 Probe P1 served as identification of T-DNA copy numbers in A7346; 探针 P2, 用于  $\Delta gcap1\beta$  突变体的 T-DNA 插入拷贝数鉴定 Probe P2 served as identification of T-DNA copy numbers in the  $\Delta gcap1\beta$  mutants; 引物 S2F/S2R 用于扩增 *GcAP1 $\beta$*  的 cDNA The primer pairs S2F/S2R served as amplification of *GcAP1 $\beta$*  cDNA; 引物 HB1/S2R1 用于特定位点的 PCR 检测分析 The primer pairs HB1/S2R1 served as PCR amplification of the special sites; 引物 S2Q1/S2Q2 用于 *GcAP1 $\beta$*  的 qRT-PCR 分析 The primer pairs S2Q1/S2Q2 served as qRT-PCR analysis of *GcAP1 $\beta$*  expression

图 1 *GcAP1 $\beta$*  的克隆和鉴定

Fig. 1 The cloning and identification of *GcAP1 $\beta$*

### 1.5 表型分析

真菌的生长速度和产孢能力测验采用 WU 等<sup>[30]</sup>的方法进行。挑取气生菌丝接种于 PDA 平板上 (直径 9 cm), 培养 6 d 后, 测量菌落直径; 平板继续培养至 10 d, 用 10 mL 无菌水刮洗平板, 用擦镜纸

滤去菌丝后, 采用血球计数板进行测定, 计算每毫升孢子悬浮液中的产孢量。分生孢子的萌发、附着胞的形成能力测验采用 XU 等<sup>[31]</sup>的方法。将无菌的疏水载玻片至于水琼脂 (8%) 平板上, 将 10  $\mu\text{L}$  分生孢子悬浮液 ( $10^4$  个/mL) 滴于载玻片, 28 $^{\circ}\text{C}$  黑暗

条件下, 保湿培养至 8 h, 观测生孢子萌发情况, 保湿培养至 20 h, 观测附着胞形成情况。每个重复观测 100 个分生孢子。计算公式: 孢子萌发率 (%) = 萌发的孢子数/检测的孢子总数 × 100; 附着胞形成率 (%) = 形成附着胞的萌发孢子数/检测的萌发孢子总数 × 100。

叶片致病性测定: 摘取成熟度一致的金冠(感病品种)叶片, 无菌水冲洗后, 用 2 μL 分生孢子悬浮液 (1 × 10<sup>5</sup> 个/mL) 滴在叶片正面, 每个叶片接种 6 个悬滴, 接种后, 置于塑料盒中冷凝的 10% 水琼脂上。28℃ 条件下, 黑暗培养 10 h 后, 转入光照 14 h, 以此循环。每天观察发病情况。苹果致病性测定: 苹果果实被 75% 酒精消毒后, 用牙签刺约 3 mm 深的伤口, 2 μL 分生孢子悬浮液 (1 × 10<sup>5</sup> 个/mL) 接种于伤口处, 28℃ 条件下, 接种 10 d 后观测果实发病情况。野生型菌株 W16 作为阳性对照。每个处理重复 3 次, 用 DPS 软件进行差异显著性分析。

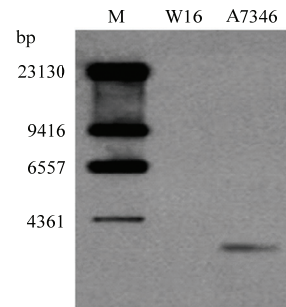
## 1.6 生物信息学分析

应用 ClustalX 对 *GcAPIβ* 基因序列及其 cDNA 序列进行比对, 以确定 *GcAPIβ* 基因内含子的有无。应用 InterProScan<sup>[32-33]</sup> 对 *GcAPIβ* 进行保守结构域 (Conserved Domain) 分析。应用 SignalP 4.1<sup>[34]</sup> 对 *GcAPIβ* 的 N 端进行信号肽分析。应用 ProtComp 9.0 (<http://www.softberry.com>) 对 *GcAPIβ* 进行亚细胞定位分析。应用 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对 *GcAPIβ* 进行跨膜螺旋结构分析。

## 2 结果

### 2.1 *GcAPIβ* 的克隆与分析

Southern blot 分析结果表明, T-DNA 插入突变体 A7346 经过酶切的泳道只杂交出一个条带, 推测其表型是由 T-DNA 以单拷贝插入至基因组所致 (图 2)。运用 *hiTail*-PCR 技术克隆得到的 T-DNA 右翼序列与围小从壳菌菌株 23 基因组进行比对, 发现 T-DNA 插入位点位于一个注释但功能尚未解析的基因 (*e\_gwl.11.622.1*) 的第一个外显子内。InterProScan 分析显示该基因蛋白序列含有典型的衔接蛋白 AP1 复合体 β 亚基结构域 (IPR026739)。因此, 将这一基因命名为 *GcAPIβ* (*GcAPI* 复合体 β 亚基基因)。*GcAPIβ* 基因全长 2 321 bp, 含有 3 个内含子, 编码 720 个氨基酸。SignalP 预测该基因蛋白序列无信号肽, 表明其可能不是分泌蛋白。



基因组总 DNA 用 *Hind* III 进行酶切 Total genomic DNA was digested with *Hind* III

图 2 T-DNA 插入突变体 A7346 Southern 杂交分析

Fig. 2 Southern hybridization analysis of T-DNA insertional mutant A7346

### 2.2 *Δgcap1β* 突变体和 *GcAPIβ* 基因恢复菌株的分子鉴定

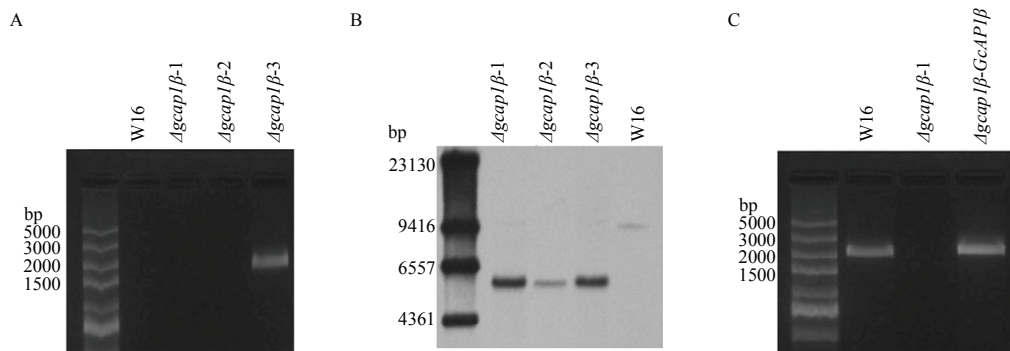
特定位置的 PCR 检测结果 (图 3-A) 显示, *Δgcap1β* 突变体 *Δgcap1β-1*、*Δgcap1β-2* 和 *Δgcap1β-3* 基因组中的 *GcAPIβ* 均被敲除。Southern blot 分析结果显示, *Δgcap1β-1*、*Δgcap1β-2* 和 *Δgcap1β-3* 均杂交出一条带, 而野生型菌株 W16 杂交出与敲除突变体长度不同的一条带 (图 3-B), 表明外源的 *hph* 在 *Δgcap1β* 突变体基因组中为单位点、单拷贝的插入, 也证实 *GcAPIβ* 被 *hph* 替换。RT-PCR 检测结果 (图 3-C) 表明, *GcAPIβ* 被导入到突变体 *Δgcap1β-1* 基因组中, 且能在恢复菌株 *Δgcap1β-GcAPIβ* 中表达。

### 2.3 *GcAPIβ* 缺失对菌丝生长的影响

在 PDA 平板上, 与野生型菌株 W16 相比, *Δgcap1β* 突变体 *Δgcap1β-1*、*Δgcap1β-2* 和 *Δgcap1β-3* 菌落成褶皱状, 菌丝生长速度明显减慢 (图 4、表 2), 但分生孢子产量、分生孢子萌发率、附着胞形成率则无显著差异 (表 2)。

### 2.4 *GcAPIβ* 的缺失对致病力的影响

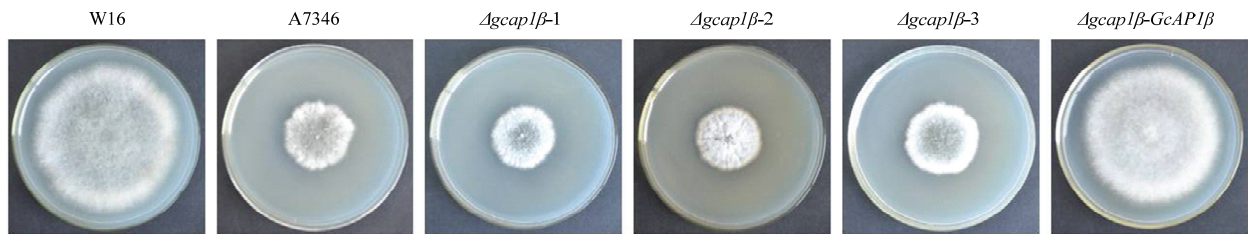
致病测验结果显示, *Δgcap1β* 在苹果叶片上引起极小的点状斑, 与 A7346 极为相似, 然而同条件下, W16 引起明显的坏死斑 (图 5-A); *Δgcap1β* 在苹果果实上引起较小的凹陷斑, 而 W16 引起的病斑明显比 *Δgcap1β* 大的多 (图 5-B)。此外, *GcAPIβ* 基因恢复菌株 *Δgcap1β-GcAPIβ* 完全修复了因 *GcAPIβ* 基因缺失造成的表型缺陷 (图 5、表 2)。这些结果表明 *GcAPIβ* 的缺失导致苹果炭疽叶枯病菌菌丝生长减慢和致病力降低。



A: 野生型菌株 W16 和  $\Delta gcap1\beta$  突变体特定位点的 PCR 分析 PCR amplification of special site of the wild type strain W16 and the  $\Delta gcap1\beta$  mutants; B:  $\Delta gcap1\beta$  突变体 Southern 杂交分析。基因组总 DNA 用 *Hind* III 进行酶切 Southern hybridization for confirmation of the  $\Delta gcap1\beta$  mutants. Total genomic DNA was digested with *Hind* III; C:  $\Delta gcap1\beta$  突变体、野生型菌株 W16 和 *GcAP1* $\beta$  恢复菌株  $\Delta gcap1\beta$ -*GcAP1* $\beta$  的 *GcAP1* $\beta$  表达分析 Transcription of *GcAP1* $\beta$  in the wild type strain W16, the  $\Delta gcap1\beta$  mutant  $\Delta gcap1\beta$ -1 and the *GcAP1* $\beta$  complementation transformant  $\Delta gcap1\beta$ -*GcAP1* $\beta$

图 3  $\Delta gcap1\beta$  突变体和 *GcAP1* $\beta$  基因恢复菌株的分子鉴定

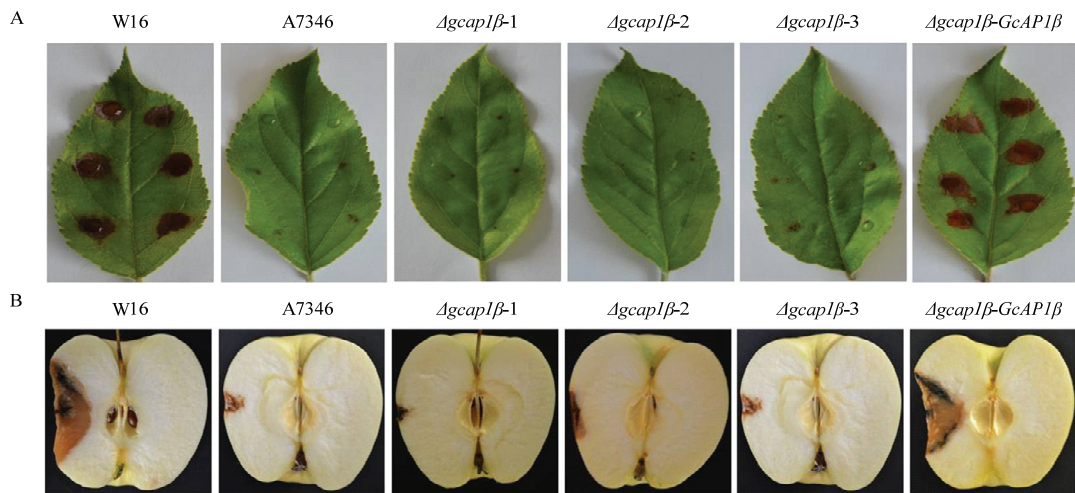
Fig. 3 Molecular confirmation of the  $\Delta gcap1\beta$  mutants and the *GcAP1* $\beta$  complementation strain  $\Delta gcap1\beta$ -*GcAP1* $\beta$



野生型菌株 W16 及其衍生的转化子接种到 PDA 平板上, 25℃ 黑暗条件下培养 6 天  
Wild type strain W16 and its derived transformants were inoculated onto PDA plates and incubated at 25℃ for 6 days in the dark

图 4 苹果炭疽叶枯病菌野生型菌株及其衍生的转化子菌落形态

Fig. 4 Colony morphology of *G. cingulata* strain W16 and its derived transformants



A: 野生型菌株 W16 和 *GcAP1* $\beta$  恢复菌株  $\Delta gcap1\beta$ -*GcAP1* $\beta$  为接种后 3 天; T-DNA 插入突变体 A7346 和  $\Delta gcap1\beta$  突变体 ( $\Delta gcap1\beta$ -1、 $\Delta gcap1\beta$ -2 和  $\Delta gcap1\beta$ -3) 为接种后 4 天 The wild type strain W16 and the *GcAP1* $\beta$  complementation transformant  $\Delta gcap1\beta$ -*GcAP1* $\beta$  were inoculated for 3 days; the T-DNA insertional mutant A7346 and the  $\Delta gcap1\beta$  mutant ( $\Delta gcap1\beta$ -1,  $\Delta gcap1\beta$ -2 and  $\Delta gcap1\beta$ -3) were inoculated for 4 days; B: 所有菌株均为接种后 10 天 All the strains were inoculated for 10 days

图 5 苹果炭疽叶枯病菌野生型菌株及其衍生的转化子致病力测定

Fig. 5 Pathogenicity assay of *G. cingulata* strain W16 and its derived transformants

表 2 苹果炭疽叶枯病菌野生型菌株及其衍生的转化子表型分析

Table 2 Phenotypic analysis of *G. cingulata* strain W16 and its derived transformants

菌株 Strain	菌落直径 Colony diameter (cm)	产孢量 Conidiation ( $\times 10^6$ )	萌发率 Germination rate (%)	附着胞形成率 Appressoria formation rate (%)
W16	8.6 $\pm$ 0.13	5.3 $\pm$ 1.2	96.5 $\pm$ 0.5	96.3 $\pm$ 0.5
<i><math>\Delta</math>gcap1<math>\beta</math>-1</i>	3.1 $\pm$ 0.09**	3.5 $\pm$ 2.5	95.3 $\pm$ 0.4	94.9 $\pm$ 0.9
<i><math>\Delta</math>gcap1<math>\beta</math>-2</i>	3.3 $\pm$ 0.12**	4.7 $\pm$ 1.2	94.8 $\pm$ 0.6	94.1 $\pm$ 0.6
<i><math>\Delta</math>gcap1<math>\beta</math>-3</i>	3.3 $\pm$ 0.11**	4.4 $\pm$ 1.3	95.5 $\pm$ 0.9	94.7 $\pm$ 0.3
<i><math>\Delta</math>gcap1<math>\beta</math>-GcAPI<math>\beta</math></i>	8.4 $\pm$ 0.15	3.6 $\pm$ 1.8	95.3 $\pm$ 0.8	95.1 $\pm$ 0.6

\*\*表示在  $P=0.01$  水平与野生型的差异显著

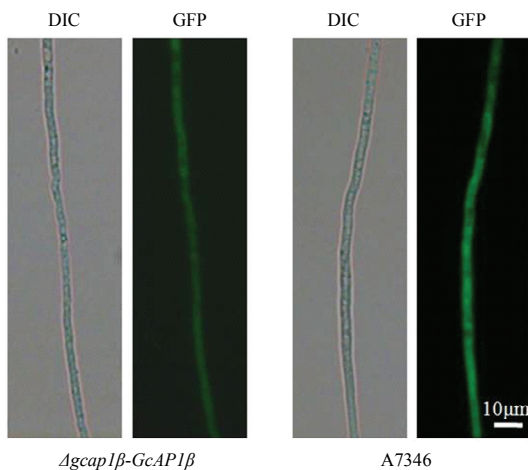
\*\* represented statistically significant difference compared with W16,  $P=0.01$

## 2.5 GcAPI $\beta$ 亚细胞定位

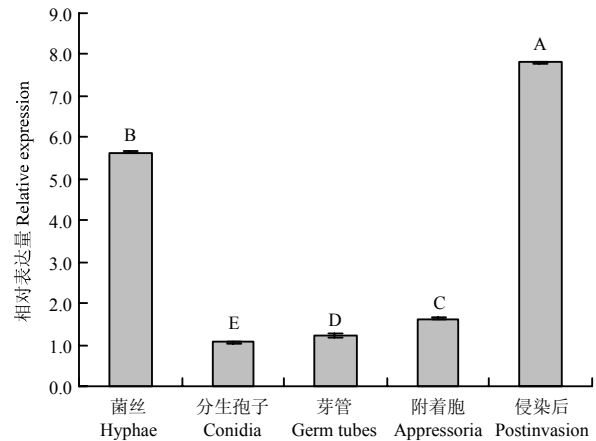
TMHMM Server v. 2.0 分析结果表明, GcAPI $\beta$  不具有跨膜螺旋结构; ProtComp 9.0 分析结果表明, GcAPI $\beta$  没有明确的定位信号。为了确定该蛋白的亚细胞定位, 构建了 *GcAPI $\beta$ -gfp* 融合表达的 *GcAPI $\beta$*  恢复菌株  *$\Delta$ gcap1 $\beta$ -GcAPI $\beta$* 。荧光显微镜下检测结果表明, 融合蛋白 GcAPI $\beta$ -GFP 分布于细胞质中, 与 T-DNA 插入突变体 A7346 中 GFP 蛋白 (*gfp* 的表达由 GAPDH 启动子控制) 分布特点相似 (图 6)。

## 2.6 GcAPI $\beta$ 在苹果炭疽叶枯病菌发育各阶段表达情况

qRT-PCR 检测结果表明, *GcAPI $\beta$*  在苹果炭疽

图 6 融合蛋白 GcAPI $\beta$ -GFP 分布于细胞质中Fig. 6 The fused protein GcAPI $\beta$ -GFP is distributed to cytoplasm

叶枯病菌各个发育阶段均有表达。相对于菌丝阶段 (PDA 培养 3 d 时) 的表达量, *GcAPI $\beta$*  在分生孢子、芽管和附着胞阶段表达量均有不同程度的降低, 而在侵染后 (叶片接种 48 h) 表达量却明显提高 (图 7)。



柱上不同大写字母表示在  $P=0.01$  水平差异显著。β-微管蛋白基因作为内参基因, 用引物对 TubQF/TubQR 进行 PCR 扩增。Difference uppercases marked at the top of standard deviation bars represented statistically significant difference,  $P=0.01$ . β-tubulin as a reference gene was amplified with the primer pairs TubQF/TubQR

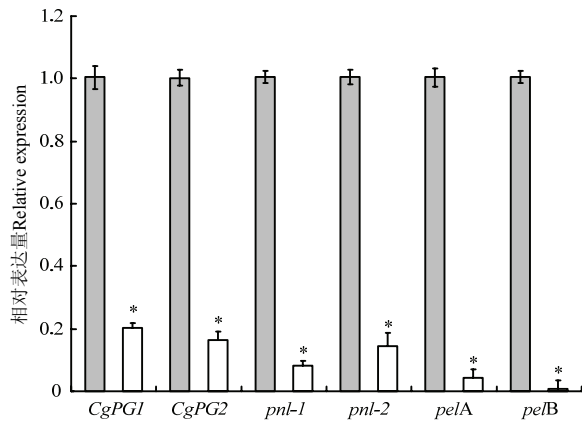
图 7 *GcAPI $\beta$*  在各发育阶段的表达情况Fig. 7 The expression of *GcAPI $\beta$*  at different development stages

## 2.7 GcAPI $\beta$ 的缺失对 *CgPG1*、*CgPG2*、*pnl-1*、*pnl-2*、*pelA* 和 *pelB* 表达量的影响

由于  *$\Delta$ gcap1 $\beta$*  突变体导致苹果炭疽叶枯病菌致病力的降低 (图 7), 笔者假设  *$\Delta$ gcap1 $\beta$*  突变体中果胶酶相关基因的转录受阻。因此, 利用 qRT-PCR 技术检测了 *CgPG1*、*CgPG2*、*pnl-1*、*pnl-2*、*pelA* 和 *pelB* 在  *$\Delta$ gcap1 $\beta$*  突变体中的表达情况。相比于野生型菌株 W16, 在  *$\Delta$ gcap1 $\beta$*  突变体中, *CgPG1* 表达量降低至 20.3%, *CgPG2* 表达量降低至 16.5%, *pnl-1* 表达量降低至 8.2%, *pnl-2* 表达量降低至 14.4%, *pelA* 表达量降低至 4.4%, *pelB* 表达量降低了至 0.8% (图 8)。这些结果显示 *GcAPI $\beta$*  正调控基因 *CgPG1*、*CgPG2*、*pnl-1*、*pnl-2*、*pelA* 和 *pelB* 的表达。

## 3 讨论

真菌菌丝的生长与囊泡 (vesicles) 的营养运输密切相关<sup>[35]</sup>。本研究结果表明, GcAPI 复合体 β 亚基的



\*表示  $P=0.01$  水平上,  $\Delta gcap1\beta$  突变体 (白柱) 与野生型菌株 W16 (灰柱) 差异显著。CgPG1、CgPG2、pnl-1、pnl-2、pelA 和 pelB 分别用引物对 CgPG1F/CgPG1R、CgPG2F/CgPG2R、Pnl-1F/Pnl-1R、Pnl-2F/Pnl-2R、PelAF/PelAR 和 PelBF/PelBR 进行 PCR 扩增。CgPG1、CgPG2、pnl-1、pnl-2、pelA 和 pelB 的 cDNA 序列 GenBank 收录号分别为 KY363250、KY363251、KY363247、KY363248、KY363245 和 KY363246。β-微管蛋白基因作为内参基因, 用引物对 TubQF/TubQR 进行 PCR 扩增。\* represented statistically significant difference between the  $\Delta gcap1\beta$  mutant (white column) and wild-type strain W16 (gray column),  $P=0.01$ . CgPG1, CgPG2, pnl-1, pnl-2, pelA and pelB were amplified with the primer pairs CgPG1F/CgPG1R, CgPG2F/CgPG2R, Pnl-1F/Pnl-1R, Pnl-2F/Pnl-2R, PelAF/PelAR and PelBF/PelBR, respectively. The cDNA sequences of CgPG1, CgPG2, pnl-1, pnl-2, pelA and pelB were deposited in the GenBank with accession number KY363250, KY363251, KY363247, KY363248, KY363245 and KY363246, respectively. β-tubulin as a reference gene was amplified with the primer pairs TubQF/TubQR.

图 8  $\Delta gcap1\beta$  突变体 CgPG1、CgPG2、pnl-1、pnl-2、pelA 和 pelB 的表达量分析

Fig. 8 The expression analyses of CgPG2, pnl-1, pnl-2, pelA and pelB in the  $\Delta gcap1\beta$  mutant

缺失导致苹果炭疽叶枯病菌菌丝生长缓慢; qRT-PCR 检测结果表明,  $GcAP1\beta$  在菌丝生长阶段表达量相对较高 (图 7)。值得注意的是, 在哺乳动物中, 衔接蛋白 AP-1 复合体负责运输蛋白至网格蛋白包被的囊泡 (clathrin-coated vesicles) 中<sup>[18,36]</sup>。因此, 笔者推测真菌菌丝的生长与 GcAP1 复合体负责运输蛋白至囊泡的功能密切相关。胶胞炭疽菌侵入寄主后, 先保持活体营养型生长, 然后转为死体营养型生长<sup>[30]</sup>。苹果炭疽叶枯病菌发病速度特别快, 从感染叶片到发病落叶仅需 3—4 d<sup>[37]</sup>。本研究中, 苹果炭疽叶枯病菌叶片接种 48 h 时已出现病斑。qRT-PCR 检测结果显示, GcAP1 复合体  $\beta$  亚基因在苹果炭疽叶枯病菌各个发育阶段均有表达, 但是以感染后 (叶片接种 48 h 时) 表达量相对最高 (图 7)。这些结果说明, GcAP1 复合体  $\beta$  亚基因在苹果炭疽叶枯病菌死体营养型生长阶段中发挥着重要作用。

在植物病原真菌中, 由附着胞调节的侵入寄主方式在其致病过程起到重要作用。在炭疽菌中, 丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联信号途径调控其分生孢子的萌发、附着胞的形成<sup>[9]</sup>。在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中, 衔接蛋白 Ste50 与 G 蛋白有关的 Cdc42-Ste20 激酶复合体互作后, 激活 MAPKKK 基因 Ste11 的转录, 进而激活 MAPK 级联信号传递链<sup>[38]</sup>。在胶胞炭疽菌中, MAPK 途径基因中的 CgMEK1 或 Cgl-SLT2 的缺失, 导致萌发的分生孢子不能形成附着胞。本研究中, GcAP1 复合体  $\beta$  亚基因的缺失对分生孢子的萌发、附着胞的形成无影响 (表 2)。这一结果暗示, GcAP1 复合体可能对基因 CgMEK1 和 Cgl-SLT2 的转录无直接或间接的影响。

在植物病原菌和寄主相互作用中, 病原菌分泌果胶酶降解寄主细胞壁的果胶聚合物, 促进病原菌的侵入和定殖<sup>[10-14]</sup>。此外, 病原菌的果胶酶分泌量不仅决定其致病力的强弱, 还决定其致害的症状<sup>[39]</sup>。因为  $\Delta gcap1\beta$  突变体仅在苹果叶片上引起极小的点状斑以及在苹果果实 (有伤接种) 上引起较小的凹陷斑 (图 5), 笔者假设  $\Delta gcap1\beta$  突变体果胶酶有关基因 (CgPG1、CgPG2、pnl-1、pnl-2、pelA 和 pelB) 转录可能受阻。qRT-PCR 检测结果表明,  $\Delta gcap1\beta$  突变体果胶酶有关基因的表达量与野生型菌株的相比明显降低 (图 8)。这些结果表明,  $\Delta gcap1\beta$  突变体致病力下降的一个重要原因是, GcAP1 蛋白  $\beta$  亚基因的缺失阻遏果胶酶有关基因的表达。但是, GcAP1 蛋白是否直接或间接调控果胶酶有关基因的转录, 有待进一步研究。

## 4 结论

衔接蛋白 GcAP1 复合体分布于细胞质中。GcAP1 $\beta$  在分生孢子、芽管和附着胞阶段均表达, 但表达量明显低于菌丝生长阶段, 是苹果炭疽叶枯病菌生长发育所需要的。GcAP1 调控 CgPG1、CgPG2、pnl-1、pnl-2、pelA 和 pelB 的表达, 是苹果炭疽叶枯病菌一个重要的毒力因子。

## References

- JACKSON L P, KELLY B T, MCCOY A J, GAFFRY T, JAMES L C, COLLINS B M, HONING S, EVANS P R, OWEN D J. A large-scale conformational change couples membrane recruitment to cargo binding in the AP2 clathrin adaptor complex. *Cell*, 2010, 141(7):



- 1220-1229.
- [2] 李保华, 王彩霞, 董向丽. 我国苹果主要病害研究进展与病害防治中的问题. 植物保护, 2013, 39(5): 46-54.  
LI B H, WANG C X, DONG X L. Research progress in apple diseases and problems in the disease management in China. *Plant Protection*, 2013, 39(5): 46-54. (in Chinese)
- [3] WANG C X, ZHANG Z F, LI B H, WANG H Y, DONG X L. First report of *Glomerella* leaf spot of apple caused by *Glomerella cingulata* in China. *Plant Disease*, 2012, 96(6): 912.
- [4] 任斌, 高小宁, 韩青梅, 黄丽. 苹果炭疽叶枯病原 *Glomerella cingulata* 及其侵染过程. 植物保护学报, 2014, 41(5): 608-614.  
REN B, GAO X N, HAN Q M, HUANG L L. Etiology and infection process of *Glomerella cingulata* causing *Glomerella* leaf spot of apple. *Acta Phytologica Sinica*, 2014, 41(5): 608-614. (in Chinese)
- [5] 张俊祥, 吴建圆, 冀志蕊, 迟福梅, 蒋晓玲, 董庆龙, 周宗山. 农杆菌介导的苹果炭疽叶枯病菌遗传转化及插入突变体的筛选. 基因组学与应用生物学, 2014, 33(6): 1261-1267.  
ZHANG J X, WU J Y, JI Z R, CHI F M, JIANG X L, DONG Q L, ZHOU Z S. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Glomerella cingulata* and screening pathogenicity-deficient mutants. *Genomics and Applied Biology*, 2014, 33(6): 1261-1267. (in Chinese)
- [6] GONZÁLEZ E, SUTTON T B. Population diversity within isolates of *Colletotrichum* spp. causing *Glomerella* leaf spot and bitter rot of apples in three orchards in north Carolina. *Plant Disease*, 2004, 88(12): 1335-1340.
- [7] VELHO A C, STADNIK M J, CASANOVA L, MONDINO P, ALANIZ S. First report of *Colletotrichum karstii* causing *Glomerella* leaf spot on apple in Santa Catarina State, Brazil. *Plant Disease*, 2014, 98(1): 157.
- [8] 王薇, 符丹丹, 张荣, 孙广宇. 苹果炭疽叶枯病原学研究. 菌物学报, 2015, 34(1): 13-25.  
WANG W, FU D D, ZHANG R, SUN G Y. Etiology of apple leaf spot caused by *Colletotrichum* spp. *Mycosystema*, 2015, 34(1): 13-25. (in Chinese)
- [9] KUBO Y, TAKANO Y. Dynamics of infection-related morphogenesis and pathogenesis in *Colletotrichum orbiculare*. *Journal of General Plant Pathology*, 2013, 79(4): 233-242.
- [10] CENTIS S, DUMAS B, FOURNIER J, MAROLDA M, ESQUERRE-TUGAYE M T. Isolation and sequence analysis of *Clpg1*, a gene coding for an endopolygalacturonase of the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Gene*, 1996, 170(1): 125-129.
- [11] LI J, GOODWIN P H. Expression of *cgmpg2*, an endopolygalacturonase gene of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae*, in culture and during infection of *Malva pusilla*. *Journal of Phytopathology*, 2002, 150(4/5): 213-219.
- [12] SHIH J, WEI Y, GOODWIN P H. A comparison of the pectate lyase genes, *pel-1* and *pel-2*, of *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* and the relationship between their expression in culture and during necrotrophic infection. *Gene*, 2000, 243(1/2): 139-150.
- [13] WEI Y D, SHIH J, LI J R, GOODWIN P H. Two pectin lyase genes, *pnl-1* and *pnl-2*, from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *malvae* differ in a cellulose-binding domain and in their expression during infection of *Malva pusilla*. *Microbiology*, 2002, 148: 2149-2157.
- [14] YAKOBY N, BENO-MOUALEM D, KEEN N T, DINOOR A, PINES O, PRUSKY D. *Colletotrichum gloeosporioides pelB* is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(8): 988-995.
- [15] ALKAN N, MENG X, FRIEDLANDER G, REUVENI E, SUKNO S, SHERMAN A, THON M, FLUHR R, PRUSKY D. Global aspects of *pacC* regulation of pathogenicity genes in *Colletotrichum gloeosporioides* as revealed by transcriptome analysis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2013, 26(11): 1345-1358.
- [16] OHNO H. Clathrin-associated adaptor protein complexes. *Journal of Cell Science*, 2006, 119(18): 3719-3721.
- [17] OWEN D J, COLLINS B M, EVANS P R. Adaptors for clathrin coats: structure and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 2004, 20: 153-191.
- [18] BOEHM M, BONIFACINO J S. Adaptors - The final recount. *Molecular Biology of the Cell*, 2001, 12(10): 2907-2920.
- [19] HIRST J, BARLOW L D, FRANCISCO G C, SAHLENDER D A, SEAMAN M N J, DACKS J B, ROBINSON M S. The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biology*, 2011, 9(10): e1001170.
- [20] ROBINSON M S, BONIFACINO J S. Adaptor-related proteins. *Current Opinion in Cell Biology*, 2001, 13(4): 444-453.
- [21] ROBINSON M S, SAHLENDER D A, FOSTER S D. Rapid inactivation of proteins by rapamycin-induced rerouting to mitochondria. *Developmental Cell*, 2010, 18(2): 324-331.
- [22] HE Y Q. An improved protocol for fungal DNA preparation. *Mycosystema*, 2000, 19(3): 434.
- [23] ZHANG J X, WU X X, BI Y Q, WU Y X, LIN G H, HE Y Q, MAO Z C. First report of *Fusarium proliferatum* infecting carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in China. *Journal of Phytopathology*, 2013, 161(11/12): 850-854.
- [24] ZHANG J X, WU Y X, HO H H, ZHANG H, HE P F, HE Y Q. *BZcon1*, a SANT/Myb-type gene involved in the conidiation of *Cochliobolus carbonum*. *G3-Genes Genomes Genetics* 2014, 4(8):

- 1445-1453.
- [25] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [26] LIU Y G, CHEN Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences. *Biotechniques*, 2007, 43(5): 649-656.
- [27] CHOI J, CHEONG K, JUNG K, JEON J, LEE G W, KANG S, KIM S, LEE Y W, LEE Y H. CFDP 2.0: a versatile web-based platform for supporting comparative and evolutionary genomics of fungi and Oomycetes. *Nucleic Acids Research*, 2013, 41: D714-D719.
- [28] LI M X, GONG X Y, ZHENG J, JIANG D H, FU Y P, HOU M S. Transformation of *Coniothyrium minitans*, a parasite of *Sclerotinia sclerotiorum*, with *Agrobacterium tumefaciens*. *FEMS Microbiology Letters*, 2005, 243(2): 323-329.
- [29] LEE M H, BOSTOCK R M. *Agrobacterium* T-DNA-mediated integration and gene replacement in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola*. *Current Genetics*, 2006, 49(5): 309-322.
- [30] WU J, JI Z, WANG N, CHI F, XU C, ZHOU Z, ZHANG J. Identification of conidiogenesis-associated genes in *Colletotrichum gloeosporioides* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Current Microbiology*, 2016, 73(6): 802-810.
- [31] XU J R, URBAN M, SWEIGARD J A, HAMER J E. The *CPKA* gene of *Magnaporthe grisea* is essential for appressorial penetration. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10(2): 187-194.
- [32] HUNTER S, JONES P, MITCHELL A, APWEILER R, ATTWOOD T K, BATEMAN A, BERNARD T, BINNS D, BORK P, BURGE S, DE CASTRO E, COGGILL P, CORBETT M, DAS U, DAUGHERTY L, DUQUENNE L, FINN RD, FRASER M, GOUGH J, HAFT D, HULO N, KAHN D, KELLY E, LETUNIC I, LONSDALE D, LOPEZ R, MADERA M, MASLEN J, MCANULLA C, MCDOWALL J, MCMENAMIN C, MI H Y, MUTOWO-MUELLENET P, MULDER N, NATALE D, ORENGO C, PESSEAT S, PUNTA M, QUINN AF, RIVOIRE C, SANGRADOR-VEGAS A, SELENGUT JD, SIGRIST C J A, SCHEREMETJEV M, TATE J, THIMMAJANARTHANAN M, THOMAS P D, WU C H, YEATS C, YONG S Y. InterPro in 2011: new developments in the family and domain prediction database. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40: D306-D312.
- [33] MITCHELL A, CHANG H Y, DAUGHERTY L, FRASER M, HUNTER S, LOPEZ R, MCANULLA C, MCMENAMIN C, NUKA G, PESSEAT S, SANGRADOR-VEGAS A, SCHEREMETJEV M, RATO C, YONG SY, BATEMAN A, PUNTA M, ATTWOOD TK, SIGRIST C J A, REDASCHI N, RIVOIRE C, XENARIOS I, KAHN D, GUYOT D, BORK P, LETUNIC I, GOUGH J, OATES M, HAFT D, HUANG H Z, NATALE DA, WU C H, ORENGO C, SILLITOE I, MI HY, THOMAS P D, FINN R D. The InterPro protein families database: the classification resource after 15 years. *Nucleic Acids Research*, 2015, 43: D213-D221.
- [34] PETERSEN T N, BRUNAK S, VON HEIJNE G, NIELSEN H. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. *Nature Methods*, 2011, 8(10): 785-786.
- [35] STEINBERG G. Hyphal growth: a tale of motors, lipids, and the Spitzenkorper. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(3): 351-360.
- [36] ROBINSON M S, SAHLENDER D A, FOSTER S D. Rapid inactivation of proteins by rapamycin-induced rerouting to mitochondria. *Developmental Cell*, 2010, 18(2): 324-331.
- [37] 吴建圆, 冀志蕊, 李壮, 程存刚, 周宗山, 张俊祥. *nptII* 基因真菌表达载体的构建及在苹果炭疽叶枯病菌遗传转化中的应用. 基因组学与应用生物学, 2015, 34(10): 2156-2160.
- WU J Y, JI Z R, LI Z, CHENG C G, ZHOU Z S, ZHANG J X. Construction of the fungus expression vector of *nptII* gene and applying to the genetic transformation in *Glomerella cingulata*. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(10): 2156-2160. (in Chinese)
- [38] RAMEZANI-RAD M. The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signalling pathways of yeast. *Current Genetics*, 2003, 43(3): 161-170.
- [39] REIGNAULT P H, KUNZ C, DELAGE N, MOREAU E, VEDEL R, HAMADA W, BOMPEIX G, BOCCARA M. Host- and symptom-specific pectinase isozymes produced by *Botrytis cinerea*. *Mycological Research*, 2000, 104(4): 421-428.

(责任编辑 岳梅)