

# 玉米新月弯孢叶斑病研究进展

王新华, 高金欣, 高士刚, 刘铜, 陆志翔, 李雅乾, 陈捷\*

(上海交通大学农业与生物学院, 农业农村部都市农业重点实验室, 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

**摘要:** 玉米弯孢叶斑病是一种世界性玉米病害, 也是中国玉米产区的主要病害之一。20 多年来, 国内外在该病害发生规律、致病性分化与诱导抗性机理、生物防治技术等方面开展了深入研究。本文主要就该病害优势致病菌新月弯孢菌 [*Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn] 的生物学特性、致病因子与生理分化机理、毒素结构鉴定、毒素合成与调控、诱导抗病性分子机理等方面的研究进展进行综述, 以期对玉米弯孢叶斑病防控技术的创新提供参考。

**关键词:** 玉米; 弯孢叶斑病; 新月弯孢菌; 致病机理; 基因组

## Research progress on maize *Curvularia* leaf spot caused by *Curvularia lunata*

WANG Xin-hua, GAO Jin-xin, GAO Shi-gang, LIU Tong, LU Zhi-xiang, LI Ya-qian, CHEN Jie (School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University; Key Laboratory of Urban Agriculture, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; State Key Laboratory of Microbial Metabolism, SJTU, Shanghai 200240, China)

**Abstract:** *Curvularia* leaf spot of maize is an important maize disease worldwide and one of the main diseases in maize producing areas in China. Over the past 20 years, the occurrence regularity, mechanism of pathogenicity differentiation and inducing resistance as well as biocontrol technology of the disease have been studied deeply in the world. In this paper, the biological characteristics, pathogenic factors, physiological differentiation mechanism, toxin synthesis and regulation of *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn and molecular mechanism of inducing resistance against the pathogen were extensively reviewed in order to provide reference for the innovation of control technique against curvularia leaf spot in maize.

**Key words:** maize; *Curvularia* leaf spot; *Curvularia lunata*; pathogenic mechanism; genome

中图分类号: S435.13

文献标识码: A

文章编号: 0412-0914(2019)04-0433-12

玉米弯孢叶斑病又称黄斑病、拟眼斑病, 是一种重要的世界性病害, 在美洲、欧洲、亚洲及非洲的玉米产区都有发生, 可由多种弯孢霉菌引起, 其病原菌属于有丝分裂孢子真菌弯孢霉属, 其中新月弯孢菌 [*Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn] 为最优种<sup>[1,2]</sup>。20 世纪 80 年代初, 国内报道在玉米自交系黄早 4 上首次发现了“黄斑病”<sup>[3]</sup>, 后经 Zhao

等 (1995) 鉴定病原菌为新月弯孢菌 (*Curvularia lunata*), 与 90 年代以来大发生的弯孢霉叶斑病属同一种病害<sup>[4]</sup>。

新月弯孢菌属无性型真菌弯孢霉属, 其有性态为新月旋孢腔菌 (*Cochliobolus lunata* Nelson & Haasis), 属于子囊菌门旋孢腔菌属真菌 (*Cochliobolus*), 二者是异源的<sup>[5]</sup>。新月弯孢菌

收稿日期: 2018-10-18; 修回日期: 2019-01-14; 网络出版时间: 2019-01-14

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2184.Q.20190114.1649.002.html>

基金项目: 上海市鲜食玉米产业体系 (沪农科产字 (2017) 第 10 号); 国家玉米产业体系 CARS-02; 国家自然科学基金 (31471734、31672072)

通讯作者: 陈捷, 博士, 教授, 主要从事植物病理学研究; E-mail: jiechen59@sjtu.edu.cn

第一作者: 王新华, 博士, 副研究员, 主要从事作物病害机理研究、生物防治; E-mail: xhwang@sjtu.edu.cn。

(*Curvularia lunata*) (有性态: *Cochliobolus lunata*) 是一种已知的植物和人类病原体,是单子叶作物的兼性病原菌,引起玉米叶斑病、高粱叶枯病、大麻叶斑病、甘蔗幼苗枯萎病等<sup>[6]</sup>。国外开展防控研究较早,Fajemisin 等(1976)研究了6种杀菌剂对玉米弯孢菌的抑菌效果<sup>[7]</sup>。

自我国发生玉米新月弯孢叶斑病以来,主要开展了玉米新月弯孢菌的生物学特性<sup>[8-10]</sup>、生理分化<sup>[11,12]</sup>、致病分化<sup>[13-15]</sup>、致病相关基因与蛋白质<sup>[16-18]</sup>、抗性种质资源鉴定与筛选<sup>[19,20]</sup>和防控技术<sup>[21]</sup>等方面的研究工作。国外工作主要集中在新月弯孢菌防治方面<sup>[22-26]</sup>。本文主要综述玉米新月弯孢菌生物学特性、致病因子与生理分化机理、毒素合成与调控、诱导抗病性分子机理等的研究进展与阶段性成果,以期对玉米弯孢叶斑病防控技术的创新提供参考。

## 1 病菌生物学特性

我国对新月弯孢菌的生物学特性和有性生殖进行了深入的研究。Bai 等<sup>[8]</sup>(1998)研究了采自辽宁省葫芦岛市的病叶样品,发现分生孢子萌发的最适 pH 值为 6~7,相对湿度在 90%以上,最适萌发温度为 28℃~30℃,菌丝生长最适温度为 30℃~32℃,最适 pH 值为 5~6。Zhu 等<sup>[9]</sup>(2004)研究了采自陕西省眉县的病叶样品,表明分生孢子萌发最适温度为 25℃~30℃,菌丝生长最适温度为 25℃~30℃,病原菌对酸碱度适应范围较广,以 pH 6~8 为最适。Li 等<sup>[10]</sup>(2005)研究了采自山东的病叶样品,发现分生孢子萌发最适温度为 25℃~35℃,菌丝生长最适温度为 28℃~32℃,病残体产孢随温度升高而加快。光暗交替有利于孢子的形成,光线对孢子萌发有抑制作用,光照对菌丝体生长无显著影响;最适碳源为六碳糖,如葡萄糖;氮源以  $\text{NH}_4^+$  形态为好;弯孢菌在 10℃~38℃都可以感染玉米,但在 30℃时,病害的潜育期最短,病情发展最快<sup>[8-10]</sup>。弯孢菌株的生长速率与致病性呈负相关,产孢率与致病性之间呈正相关,菌落颜色与致病力之间无相关性<sup>[14]</sup>。Li 等<sup>[27]</sup>(2016)发现新月弯孢菌存在 2 种交配型 Mating type 1-1(MAT1-1)和 Mating type 1-2(MAT1-2),所有供试新月弯孢菌菌株中,MAT1-1 菌株占 40.74%;MAT1-2 菌株占 42.33%,二者比率接近 1:1。Liu 等<sup>[28]</sup>(2018)发现

过高或过低的  $\text{Fe}^{3+}$  浓度对新月弯孢菌的有性世代发育均有一定抑制作用,胞内铁载体生物合成酶基因 *CINPS2* 缺失后导致子囊及子囊孢子发育不良。

## 2 病菌致病性分化与鉴定

### 2.1 鉴别寄主系统的建立

玉米弯孢叶斑病病原菌在我国普遍存在致病性分化现象,与寄主品种互作明显,Yan 等<sup>[11]</sup>(2002)通过大量筛选我国主要推广玉米品种的亲本和骨干玉米自交系,确定的鉴别寄主包括自交系沈 135、Mo17、E28、78599-1、黄早 4、C8605、7922、477。

### 2.2 致病性分化

Yan 等<sup>[12]</sup>(2009)利用该鉴别寄主系统鉴定了采自辽宁、吉林、山东、河北、北京、河南、四川、黑龙江等地具新月弯孢菌典型特征的 20 株菌株。根据致病性差异和病斑反应型,将其分为 6 个致病类型。其中,致病类型 A 菌株致病性强,主要分布在辽宁南部沿海、北京、河北保定、河南新乡、山东东部。

### 2.3 分子辅助鉴定技术

新月弯孢菌的分子鉴定技术报道较少,Ning 等<sup>[29]</sup>(2003)用新月弯孢菌可溶性蛋白质作为免疫抗原免疫家兔,获得对新月弯孢菌菌株可溶性蛋白质具有特异性的抗血清(APAbs),可用于新月弯孢菌菌株鉴定。Yan<sup>[12]</sup>(2009)通过随机扩增多态性(RAPD)将 22 个供试菌株在 DNA 水平上进行聚类分析,在连锁距离 0.4 范围分成 6 组,与寄主鉴别系统获得的结果一致;又以病原菌可溶性蛋白、酯酶、苹果酸脱氢酶、淀粉酶、多酚氧化酶、超氧化物歧化酶、过氧化物酶等同工酶谱多态性建立鉴别系统,该鉴定系统对强致病类型鉴定的结果与鉴别寄主的结果吻合率较高<sup>[12,13]</sup>。Hou 等<sup>[30]</sup>(2013)建立了一种快速、灵敏的基于 *Clg2p* 基因的半巢式多聚酶链反应(PCR)检测方法,可用于新月弯孢菌引起叶斑病的诊断和监测。

## 3 病原菌致病因子

### 3.1 角质酶

角质酶(cutinase,E.C. 3.1.1.74)属于丝氨酸酯

酶,是一种  $\alpha/\beta$  水解酶<sup>[31]</sup>,对病原真菌的致病性具有重要作用<sup>[32]</sup>。Liu 等<sup>[33]</sup>在新月弯孢菌基因组中确定了 13 个角质酶基因,多序列比对表明,大多数具有一个高度保守的 GYSQG 基序和类似的 DxVCxG[ST]-[LIFMF](3)-x(3)H 基序,来自新月弯孢菌的每一组角质酶具有共同的基序。

Skamnioti 等<sup>[34]</sup>发现稻瘟病菌角质酶基因 *Cut2* 在附着胞成熟及侵入时显著上调,*Cut2* 突变体对水稻的致病性减弱。新月弯孢菌角质酶基因也有类似的现象,*Clcut7* 的转录水平在发病初期逐渐升高,在接种 3 h 后上调最显著,当 *Clcut7* 被敲除时,突变体的致病力减弱<sup>[33]</sup>。

### 3.2 细胞壁降解酶

植物病原真菌侵入寄主植物时,首先分泌的细胞壁降解酶(cell wall-degrading enzymes, CWDEs)破坏寄主细胞壁<sup>[35]</sup>。新月弯孢菌能产生各种 CWDE,包括果胶酶(pectinase),如多聚半乳糖醛酸酶(PG)、聚甲基半乳糖醛酸酶(PMG)、多聚半乳糖醛酸反式消除酶(PGTE)、果胶甲基酯酶(PE)、果胶甲基反式消除酶(PMTE)和纤维素酶(Cx)等,都是重要的致病因子<sup>[36]</sup>。

Ni 等<sup>[37]</sup>研究发现强致病性突变株 CLM-801、CLM-1648 的 Cx 酶活性显著增强,弱致病菌株中突变株 CLM-2 和 CLM-393 的 Cx 酶活性明显降低,说明纤维素酶对强致病性菌株的诱导效应更为敏感。Gao 等<sup>[38]</sup>连续继代接种 6 代,发现玉米弯孢叶斑病菌的致病性和细胞壁降解酶活性存在正相关,其中纤维素降解酶的活性变化幅度较大(C107:32.0%, WS18:72.2%)且与病菌致病性相关性最显著(C107:  $r = 0.843$ ; W18:  $r = 0.923$ )。Jiang 等<sup>[19]</sup>研究发现,玉米弯孢叶斑病菌在抗性玉米种质的连续选择压力下,纤维素酶活性及致病性显著增加,而果胶酶活性增加不明显,说明抗性寄主定向选择作用引起的病菌致病性增加与 Cx 活性的升高有一定关系。De 等<sup>[39]</sup>研究发现 PG 是病原菌致病因子,在病原真菌侵染寄主细胞壁时,PG 酶是最先被释放出来的酶。Feng 等<sup>[36]</sup>研究也发现玉米弯孢叶斑病菌侵染过程中,PG 和 PMG 的产生早于 Cx,PG 的活性比 PMG 高,Cx 的活性没有明显变化,这 3 种细胞壁降解酶对感病品种叶片的损伤程度高于抗病品种,且 PG 对抗感玉米品种

叶片的损伤程度明显高于 PMG 和 Cx。Ni 等<sup>[37]</sup>发现弯孢菌 ATMT 突变株产孢量和致病性下降,但 PG 酶活性普遍增强,Cx 酶活性没有明显变化。

### 3.3 毒素

3.3.1 毒素理化性质与寄主选择性 Macri 等<sup>[40]</sup>用层析法从玉米弯孢叶斑病菌的培养液中分离出 2 种毒素,其中一个分子量约为 350 Da,分子中有芳香环,不属于蛋白质类化合物,含有蛋白质和可溶性糖,其中主要成分为可溶性糖。Lv 等<sup>[41]</sup>对弯孢菌毒素进行紫外光谱测试,发现毒素在 190 nm 处有吸收峰,判断该毒素可能不是蛋白质类化合物。Xiao 等<sup>[42]</sup>研究认为玉米弯孢菌毒素内可溶性糖含量高于蛋白质,该毒素是玉米弯孢叶斑菌主要致病因素之一,但不一定是寄主选择性毒素。毒素具有热稳定性和光稳定性,在酸性条件下可透析、耐热和活性更高;毒素能溶于水 and 甲醇,不溶于三氯甲烷和乙醚,但没有明确具体化学结构<sup>[40-43]</sup>。

2009 年 Liu 等<sup>[44]</sup>利用多种方法成功从玉米弯孢叶斑病菌培养液中分离、纯化提取出了玉米弯孢叶斑病菌的毒素,将该毒素鉴定为一种咪喃型毒素,化学名为甲基-(5-羟甲基)咪喃-2-羧酸盐(methyl 5-(hydroxymethyl) furan-2-carboxylate, M5HF2C),分子式为  $C_7O_4H_8$ ,分子量为 156.1 Da。目前普遍认为 M5HF2C 属于非寄主专化性毒素,是对玉米弯孢叶斑病菌主要毒力因子<sup>[45]</sup>。

3.3.2 毒素的致病作用及其利用 玉米弯孢叶斑病菌毒素对寄主的叶绿体膜、基粒及基质片层、线粒体有破坏作用<sup>[41]</sup>,能破坏寄主叶片细胞膜导致电解质外渗,影响寄主叶绿素的合成而导致叶片坏死<sup>[44]</sup>,经毒素处理后的寄主亲和组织中丙二醛(MDA)的含量上升,细胞膜透性增大,且这种对寄主组织的破坏作用与毒素浓度、处理时间呈正相关<sup>[46]</sup>。Tang 等<sup>[47]</sup>(2011)测定了玉米弯孢叶斑病菌毒素的除草活性,结果表明毒素对马唐种子的萌发有明显的抑制作用,抑制率可达 100%,但对稗草、狗尾草种子萌发的抑制作用较小;该毒素具有生物除草剂的开发潜力。

### 3.4 黑色素

3.4.1 黑色素成分 黑色素可以保护病原真菌不被溶解,同时降低微生物及植物防御素进入真菌细

胞内<sup>[48]</sup>。病原真菌通过形成附着胞,在附着胞壁积累黑色素,通过膨压的机械力量进入植物组织<sup>[49]</sup>,黑色素划分为4种:多聚二萜萘(DHN)、多巴(DOPA)、儿茶酚和 $\gamma$ -谷氨酰胺酰-3,4-对苯二酚(GBDH)。

Wang等<sup>[50]</sup>利用酸碱沉淀法提取出玉米弯孢叶斑病菌胞内外黑色素,黑色素在紫外和可见光区没有吸收峰,在红外光谱上存在一定差异。Gao等<sup>[51]</sup>发现玉米弯孢叶斑病菌的胞内外黑色素类型不同,胞内黑色素主要是DHN黑色素,胞外为DOPA黑色素。黑色素能破坏玉米叶片的细胞质膜系统,导致叶片电解质渗漏,但致病性不如毒素明显<sup>[50]</sup>。

**3.4.2 黑色素合成相关酶系** DHN黑色素的生物合成需要5个关键酶的参与,包括聚酮合酶(polyketide synthase,PKS)、三羟基萘还原酶(1,3,8-tri-HN reductase,3HNR,Brn1)、四羟基萘还原酶(1,3,6,8-tetra-HN reductase,4HNR,Brn2)、小柱孢酮脱水酶(scytalone dehydratase,SCD)和漆酶(laccase)<sup>[6]</sup>。Gao等<sup>[51]</sup>在致病性增强菌株中检测到16个显著差异表达的蛋白,包括黑色素合成相关蛋白Brn1,Brn2和小柱孢酮脱水酶、胁迫耐受相关蛋白HSP70等,认为可用于反映新月弯孢菌的毒力。

### 3.5 致病相关基因

**3.5.1 基因组测序与分泌蛋白分析** 新月弯孢菌的CX-3基因组组装大小为35.5 Mb,包含11 234个蛋白编码基因,其中分泌蛋白840个;CX-3基因组含有2 830个保守蛋白家族,共包含8 471个蛋白,其中161个转座酶、129个G蛋白偶联受体、153个蛋白激酶、76个富含半胱氨酸分泌小肽、235个糖苷水解酶、47个ABC和252个MFS转运蛋白、146个P450,36个次生代谢骨架基因。鉴定出1 904个病菌-寄主互作相关基因,其中包括127个蛋白激酶、70个糖苷水解酶、40个ABC转运蛋白、167个MFS转运蛋白和112个P450等。CX-3有较高的C→T和G→A碱基转换频率,该病原菌全基因组编码蛋白中共发现804个具有典型信号肽的分泌蛋白,占全基因组蛋白总数的7.8%,70个具有功能描述的分泌蛋白主要是和细胞代谢与转运、信号转导有关的酶类;还有一些降解细胞壁组

分及与致病相关的酶类,可能与玉米弯孢叶斑病菌的毒性有关<sup>[52]</sup>。

**3.5.2 *Clt-1* 基因** Liu等<sup>[44]</sup>克隆了弯孢叶斑病菌毒素相关基因,明确了*Clt-1*基因(accession: GQ292557)不仅参与调控该病原真菌毒素(M5HF2C)合成,也参与了色素的合成;*Clt-1*单拷贝定位于基因组中,编码含有745个氨基酸的蛋白质,具有BTB结构域<sup>[53]</sup>,该结构域是一个进化保守的蛋白交互模型,可以与其他结构域结合产生多重功能<sup>[54]</sup>。Ni等<sup>[55]</sup>研究表明,*Clt-1*基因编码的蛋白CLT-1定位于细胞核内,为亲水性、非分泌性蛋白,包含1个膜外区域,含有多个苏氨酸、丝氨酸和酪氨酸激酶磷酸化位点,能够被激酶磷酸化。进一步研究表明,*Clt-1*基因对毒素产生、黑色素形成和分生孢子产生有明显调控作用,*Clt-1*基因缺失以后, $\Delta Clt-1$ 不能产生毒素M5HF2C,且菌落颜色变浅,产孢能力及侵染寄主能力均减弱<sup>[53]</sup>。

Gao等研究发现与CLT-1互作的功能蛋白主要是木聚糖酶(ClXyn24)、木聚糖乙酰转移酶(ClAxe43)<sup>[56]</sup>和乙酰木聚糖酯酶(ClAxe56)<sup>[16]</sup>,均与木糖代谢有关;基因敲除株 $\Delta Clxyn24$ 、 $\Delta Claxe43$ 、 $\Delta Clxyn24$  &  $\Delta Claxe43$ 致病力明显下降。BTB结构域是CLT-1与ClXyn24、ClAxe43互作的关键区域;在以木聚糖为唯一碳源培养条件下, $\Delta Clxyn24$ 、 $\Delta Claxe43$ 、 $\Delta Clxyn24$  &  $\Delta Claxe43$ 与 $\Delta Clt-1$ 的M5HF2C毒素合成能力显著下降。研究发现M5HF2C毒素合成与乙酰辅酶A和丙二酰辅酶A密切相关,推测CLT-1通过调控木糖/木聚糖代谢途径,为毒素的合成提供必要的前体物质<sup>[56]</sup>。

**3.5.3 *ClvelB* 基因** Velvet蛋白在调节真菌次生代谢和生长发育的过程中起重要作用。Gao等<sup>[57]</sup>利用酵母双杂交(Y2H)cDNA文库发现编码VelB蛋白的cDNA克隆,控制丝状真菌黑色素和毒素的次生代谢。2017年Gao等<sup>[58]</sup>从玉米弯孢叶斑病菌中同源克隆得到了Velvet家族*ClvelB*基因(accession number: KY435512),DNA全长1 011 bp,不含内含子,编码336个氨基酸,以单拷贝形式存在;并证明*ClvelB*基因参与调控弯孢菌分生孢子形成、M5HF2C毒素的合成及致病性,并能影响*Clt-1*的表达,说明*ClvelB*基因为调控弯孢菌M5HF2C毒素产生的重要因子。

**3.5.4 *Pks* 基因簇** 大多数真菌次生代谢产物的

骨架首先是由聚酮合酶(PKSs)催化合成,Gao等<sup>[59]</sup>从弯孢菌CX-3基因组中鉴定得到了18个聚酮合酶基因,其中12属于还原性PKS,参与毒素合成。2018年Gao等<sup>[60]</sup>在*Pks18*中鉴定出137个过表达的基因和221个低表达的基因,其中NADPH-细胞色素P450还原酶基因*C100874*、醇脱氢酶基因*C102247*和L-乳酸脱氢酶基因*C108767*可能是黑色素和毒素产生所必需的。

2017年Gao等<sup>[61]</sup>在新月弯孢菌中克隆并鉴定了*Clpkst8*基因,它包含6571个碱基对(bp)和6276bp的开放阅读框,编码2091个氨基酸;*Clpkst8*基因缺失突变体表现出白化表型,几乎丧失了产生M5HF2C毒素的能力,证明*Clpkst8*基因不仅参与1,8-二羟基萘黑色素合成,而且还与M5HF2C毒素合成有关。陆志翔、陈捷(2018)研究发现,*Pks18*负调控弯孢菌糠醛产生,而糠醛结构与M5HF2C极为类似(数据未发表)。*Clpkst8*基因在调节新月弯孢菌致病性中起重要作用。

**3.5.5 *Brn1* 基因** Xu等<sup>[62]</sup>研究了玉米弯孢叶斑病菌在寄主选择压力下致病性演化过程中蛋白质组消长动态、强弱致病株系间的蛋白质图谱差异,鉴定出了与病原真菌致病性分化密切相关的BRN1蛋白和小柱孢酮脱氢酶(SCD),BRN1与DHN黑色素合成途径中的1,3,8-三羟基萘还原酶(3HNR)有很高的同源性(93.7%)。Lanisknik等<sup>[6]</sup>发现*3Hnr*基因的表达与新月弯孢病菌的黑化作用同步发生,当*3Hnr*不表达时,该病原菌也不发生黑化作用。

Liu等<sup>[63]</sup>从弯孢菌强致病株突变体库中筛选获得一株白化菌株,为黑色素合成相关基因*Brn1*的突变株,其致病性比野生型菌株显著降低;利用RACE技术从玉米弯孢叶斑病菌中成功克隆出一个DHN黑色素合成过程中的关键酶——1,3,8三羟基萘还原酶基因*Brn1*(GenBank: DQ358052),全长cDNA含有1001bp,开放阅读框全长801bp,编码267个氨基酸;在菌株接种培养96h后该基因的转录水平明显高于培养24h和72h时;与野生型相比,*Brn1*沉默转化体在培养滤液中呈浅棕色,毒素产量显著降低,在感病玉米上的毒力降低。*Brn1*基因不仅参与1,8-二羟基萘黑色素的合成,而且也参与毒素的生物合成<sup>[63,64]</sup>。

Gao等<sup>[65]</sup>鉴定了野生型CX-3和*Brn1*沉默突

变体T5中*Brn1*表达相关的特异性蛋白;其中反式醛缩酶、依赖NADP的甘露醇脱氢酶、甲酸脱氢酶和UTP-葡萄糖-1-磷酸尿苷酰基转移酶参与能量代谢,延伸因子3促进黑色素、应激耐受相关蛋白(HSP30和HSP70)和过氧化氢酶(CAT)的合成,有助于病原菌提高致病性。

*Brn1*与*Clt1*在弯孢菌中的表达调控存在一定的关联性。*Brn1*沉默后,突变株产生毒素的能力降低<sup>[63]</sup>,*Clt1*被敲除后,突变株产生黑色素能力也受到抑制<sup>[52]</sup>。

**3.5.6 *Scd* 基因** 小柱孢酮脱水酶基因(*Scd*)是黑色素生物合成中的关键酶<sup>[6]</sup>。Zhai等<sup>[66]</sup>用玉米弯孢叶斑病菌的弱致病性分化型WS18在抗性玉米自交系上反复继代接种,发现SCD1、SOD、BRN1等蛋白表达量均发生了变化。Zhou等<sup>[67]</sup>研究继代接种后所得的各个世代菌株中*Scd1*、*Sod*、*Brn1*3种基因表达量的变化。在同一世代菌株中*scd1*与*brn1*2种基因的表达量比较接近,这可能与*Scd1*、*Brn1*基因都是黑色素DHN合成通路中的关键酶基因有关<sup>[68]</sup>。

**3.5.7 其它致病相关基因** 铁离子是维持玉米弯孢叶斑病菌致病力的必需营养元素。Lu等<sup>[69]</sup>(2018)采用生物信息学方法确定玉米弯孢叶斑病菌中含有6个非核糖体肽合成酶(*NRPS*)基因,铁离子通道关键酶基因*CINPS6*和*ClFtr1*对玉米弯孢叶斑病菌致病力有明显上调作用;研究明确了铁离子对产孢和菌丝生长无明显影响,外施铁离子(20 μmol · L<sup>-1</sup>)后,致病力明显增强,但对毒素产生无明显影响。Mao等<sup>[70]</sup>(2018)明确了玉米弯孢菌NADPH氧化酶Nox1、Nox2正调控弯孢菌的产孢量、分生孢子萌发率、附着胞形成率和黑色素产生和活性氧释放。

**3.5.8 黑色素和毒素相关基因的关联性** 玉米弯孢叶斑病菌毒素(M5HF2C)和黑色素合成过程是由很多共同基因调控的,例如*Clt-1*、*Brn1*、*Pks18*、*VelB*、*Clxyn24*、*Claxe43*等基因即参与黑色素合成调控,同时又参与调控呋喃型毒素的合成,表明两者合成代谢通路至少有一部分是共同的,如PKS系统,甚至有共同的合成前体。PKS系统、木糖/木聚糖代谢系统可能均与毒素合成有关,至少在呋喃型毒素前体物质合成中发挥了重要作用。

## 4 致病性相关信号通路

### 4.1 MAPK 信号通路

MAPK 途径位于 G 蛋白下游,是一系列高度保守的信号级联反应,可以将胞外信号传送到胞内<sup>[71]</sup>,Gao 等<sup>[72]</sup>比较了新月弯孢菌 CX-3 编码蛋白与酵母菌 (*S. cerevisia*)、水稻稻瘟病菌 (*M. grisea*)MAPK 通路中各关键基因,发现 CX-3 中存在 3 个与稻瘟病菌同源的 MAPK 通路关键基因:与 *Pmk1* 基因同源的 *Clk1* 基因 (*Cl06419*)、与 *Mps1* 基因同源的 *Clm1* 基因 (*Cl11087*)、与 *Hog1* 基因同源的 *Clh1* 基因 (*Cl05432*);并进行了克隆:*Clk1* 基因 cDNA 全长 1.271 kb,编码 352 个氨基酸;*Clm1* 基因 cDNA 全长 1.251 kb,编码 416 个氨基酸;*Clh1* 基因 cDNA 全长 2.782 kb,编码 377 个氨基酸。敲除试验表明,*Clk1* 调节弯孢菌营养生长和孢子的产生,影响病菌对寄主的毒力;*Clm1* 调控了分生孢子的产生、细胞壁降解酶活性和侵染能力;*Clh1* 基因不仅调控了弯孢菌的抗渗透压能力、毒素和黑色素的合成,还影响了纤维素酶、果胶酶和角质酶的活性<sup>[72,73]</sup>。

2018 年 Ni 等<sup>[73]</sup>证明乙酰辅酶 A 参与 MAPK 信号转导,正向调控毒素、黑色素基因的表达,影响新月弯孢菌的致病性;通过 RT-qPCR 分析发现,与野生型 CX-3 比较,乙酰辅酶 A 相关基因 *Mfp* (*Mfe1*) 和 *Pex6* 在  $\Delta Clh1$  &  $\Delta Clm1$  中表达量显著下调。

RAS 蛋白家族是一个调节细胞发育和形态发生过程的小 GTPase。2016 年 Liu 等<sup>[74]</sup>阐明了新月弯孢菌中关键 RAS 蛋白 Clg2P 的调控机制,在 7 个 Clg2P 相互作用蛋白中,对应于稻瘟病菌的 MAPK 的 CLF(同源于 *Mst11*)、尿酸氧化酶(CIUrase)功能得到鉴定,Clg2P 通过其 Ra 结构域特异性与 CLF 相互作用,调节附着胞的形成和致病性,而 Clg2P-CIUrase 相互作用调节了孢子的形态,而不影响真菌致病性。

Fus3/Kss1-MAPK 途径在对病菌附着胞形成、分生孢子产生和致病性等方面有重要的调控作用<sup>[75]</sup>。2017 年 Zhao 等<sup>[76]</sup>对玉米弯孢叶斑病菌基因组的 Fus3/Kss1-MAPK 途径相关蛋白进行了分析与鉴定,从玉米弯孢叶斑病菌中鉴定出 Fus3/Kss1-MAPK 级联途径中 3 个蛋白激酶基因 *Clf*、*Map2k*、*Clk1* 和一个锚定蛋白基因 *Clste50*,它们都

参与分生孢子形成和致病性。

### 4.2 cAMP-PKA 信号通路

cAMP 信号通路包括两个主要部分:蛋白激酶 A (Protein kinase A, PKA) 和腺苷环化酶 (Adenylyl cyclase, AC)<sup>[77]</sup>。Gao 等<sup>[59]</sup>在新月弯孢菌 CX-3 基因组中发现 2 个 PKA 催化亚基 (CL03564、CL01641),参与 cAMP 途径的调控。Liu 等<sup>[78]</sup>从新月弯孢菌中分离了一个 PKA 调节亚基,命名为 PKAr (GenBank Acc. KF675744),包含 2 个高度保守的 cAMP 结合位点结构域,多肽序列长 2.9 kb,含有 1 383 bp 的 ORF,无内含子,编码了 460 个氨基酸,分子量为 50.1 kDa,等电点为 5.51;在营养生长菌丝体中,PKAr 表达水平最高,表明它对新月弯孢菌丝营养生长起重要作用。

### 4.3 G 蛋白- PKC 信号通路

新月弯孢菌具有扩展的蛋白家族,包括 MFS 转运蛋白、G 蛋白偶联受体、蛋白激酶和蛋白酶,参与运输和信号转导等过程;还有收缩的蛋白家族,包括细胞色素 P450、脂肪酶、糖苷水解酶、聚酮合成酶,参与解毒、水解或次生代谢产物生物合成<sup>[59]</sup>。构巢曲霉基因组编码 2 个蛋白激酶 C (PKC) 基因——*PkcA* 和 *PkcB*,其中 *PkcA* 表达下降可导致青霉素合成基因的抑制<sup>[79]</sup>。目前只有 Gao 等<sup>[59]</sup>在新月弯孢菌 CX-3 基因组中发现了 1 个和 *PkcA* 高度同源的 *Pkc* 基因,尚无更深入的研究报道。

## 5 诱导玉米抗弯孢叶斑病机理

### 5.1 非编码 RNA 在玉米抗弯孢菌叶斑病中的作用

Liu<sup>[80]</sup>(2018)分析了 mi RNA 介导玉米抗弯孢叶斑病的可能途径,在感病反应的对照和接种处理中分别鉴定出 2 004 和 1 879 个 mi RNA,处理比对照少 125 个 mi RNA,表明感病反应中部分 miRNA 表达受到抑制;在抗病反应对照组和接种处理组中分别鉴定出 1 304 和 2 199 个 mi RNA,处理组比对照组多 895 个 mi RNA,表明抗病反应促进了 mi RNA 表达;大部分靶基因与其相应的 mi RNA 表达模式呈现负相关。

### 5.2 弯孢菌毒素诱导抗性作用

毒素作为激发子诱导植物的防御基因表达报

道较少。Lin 等<sup>[81]</sup>研究玉米弯孢叶斑病菌毒素粗提液分别处理玉米抗病和感病品种后,发现较低浓度的毒素就可以诱导感病品种的 SOD 活性增加,抗病品种 PAL 和 POD 对毒素的敏感性比感病品种高。Guo 等<sup>[82]</sup>用新月弯孢毒素处理玉米自交系幼苗,发现 PAL 与抗性呈极显著线性相关,POD 与抗性呈正相关,SOD 与抗性呈极显著负相关。Chen 等<sup>[83]</sup>研究发现,抗病品种的 PAL 和 POD 活性比感病品种易被玉米弯孢叶斑病菌毒素激活,但是被毒素处理后抗病品种的 SOD 活性明显比感病品种低,且峰值出现的较晚。

玉米弯孢叶斑病菌 Cu/Zn-SOD 基因序列全长 978 bp,共编码 154 个氨基酸,共有 3 个内含子分别位于 13、193、345 bp 处,其长度分别为 377、71、65 bp<sup>[84]</sup>。2017 年 Gao 等<sup>[85]</sup>研究了超氧化物歧化酶基因 *Sod* 在真菌毒力分化中的作用,发现 *Sod* 基因与新月弯孢菌早期侵染玉米有关,不仅能阻止感染部位的 ROS 积累,而且具有多种功能。在抗性玉米品种上继代接种新月弯孢菌,*sod* 基因变化比较灵敏<sup>[67]</sup>。*sod* 基因没有改变细胞壁降解酶 CX、PG 和 PMG 的生物合成。在早期感染阶段,*sod* 基因通过调节黑色素生成而影响病原菌毒力<sup>[85]</sup>。

### 5.3 木霉菌诱导玉米抗性机理

5.3.1 *Thc6* 基因 Fan 等<sup>[86]</sup>(2015)通过构建哈茨木霉菌(*Trichoderma harzianum*)的插入突变体文库,研究发现 T-DNA 插入到一个基因的 ORF 中,导致野生型(WT)菌株和突变体 T66 之间的功能差异;与野生型(WT)菌株相比,包衣 T66 的玉米种子对新月弯孢菌的敏感性更高;从该菌株克隆获得一个基因,并命名为 *Thc6*,编码 327 个氨基酸蛋白,为 C6 型锌指转录因子。*Thc6* 通过调控玉米茉莉酸代谢相关通路,从而调控玉米对弯孢叶斑病的抗性。

5.3.2 *Paf-ah* 基因 Yu 等<sup>[87]</sup>(2015)成功克隆来自哈茨木霉菌(*Trichoderma harzianum*)磷脂酶 A2 超家族成员类血小板激活因子乙酰水解酶基因(Platelet-activating factor acetylhydrolase like gene, *paf-ah-like* gene, PAF-AH),原核表达分析明确了 PAF-AH 酶活性,其最适 pH 为 6,并且活性不依赖 Ca<sup>2+</sup>;该基因定位于木霉菌细胞质,其表达促进了

木霉菌对立枯丝核菌的拮抗活性;哈茨木霉菌 PAF-AH 主要通过调控茉莉酸(JA)信号诱导玉米对弯孢叶斑病的系统抗性。

5.3.3 *Hyd1* 基因 Yu 等<sup>[88]</sup>(2016)从哈茨木霉菌克隆获得 II 类疏水蛋白 *hyd1* 基因,发现该基因定位在木霉菌的细胞膜上,具有跨膜域,其编码蛋白能分泌到根系皮层细胞,促进木霉菌定殖玉米根系和抗病性的系统诱导。从玉米根系 cDNA 文库中筛选到与 HYD1 互作的玉米根系类泛醌蛋白(Ubiquilin1-like protein, UBQLN1),通过酵母双杂交技术、pull-down 和双分子荧光技术等方法在模式植物上明确 HYD1 和 UBQLN1 可共定位在寄主细胞膜,激发对叶斑病的抗性;点突变证实木霉菌 HYD1 的 C 端信号肽(即跨膜区)半胱氨酸与根系 UBQLN1 的 N 端特异性互作。RNAseq 分析表明:木霉菌 HYD1 主要通过根系互作诱导油菜素内酯(BR)通路信号长距离转导,从而激发叶片对弯孢叶斑病的抗性。

### 5.4 其它生物防治因子

Basha 等<sup>[22]</sup>从高粱根际中分离到一株土壤细菌——芽胞杆菌 BC121,对新月弯孢菌具有较高的拮抗活性。Priya 等<sup>[23]</sup>研究了水茄(*Solanum torvum*)果、蜂巢草(*Leucas aspera*)叶的甲醇提取物、刺茉莉(*Azima tetraantha*)、水黄皮(*Pongamia glabra*)、萎叶(*Piper betle*)的乙醇提取物,都对新月弯孢菌具有抑制作用。Brunskole 等研究了新月弯孢菌三羟萘还原酶(3HNR)的抑制剂<sup>[24,25]</sup>。Choudhary 等<sup>[26]</sup>(2017)研究发现铜壳聚糖纳米粒(NPs)能增强玉米对弯孢菌的防御反应,并促进玉米生长。

## 6 存在问题及研究展望

目前,我国已对玉米弯孢叶斑病发生规律、致病性分化、毒素和黑色素合成相关基因克隆和表达规律开展了国际领先的研究工作,但关于弯孢叶斑病菌与玉米互作早期分子识别机理、致病性分化的遗传学、毒素合成和降解过程,以及生物防治玉米叶斑病机理和技术尚有很多工作需要深入研究。

### 6.1 从基因组尺度进一步探究玉米弯孢叶斑病菌致病性分化相关基因

玉米弯孢叶斑病菌全基因组分析表明:玉米弯

孢叶斑病菌致病性分化可能与众多基因差异表达有关,需要在全基因组水平上进一步筛选病菌不同致病类型标记基因组,从病菌繁殖、营养代谢、毒素与黑色素合成等过程全局性认识病菌致病性分化相关基因,验证其功能,从而全面揭示它们对致病分化的贡献,同时为田间预警弯孢叶斑病分化风险提供标记基因。通过有性杂交明确病菌分子标记的稳定性;利用已知标记基因检测我国主产区玉米弯孢叶斑病菌的致病性分化的动态,不仅可以进一步验证该标记基因的特异性,还可以评估不同种质资源引起病菌发生适应性变异的风险。

## 6.2 毒素合成通路调控

尽管已鉴定出弯孢叶斑病菌产生的毒素分子的化学性质和寄主选择性,并通过病菌基因组和转录组分析,预测出一系列毒素合成可能相关基因,如 *Clt-1*、*Brn1*、*Clk1*、*Cln1*、*Clh1*、*ClVelB*、*Pks18* 等,发现了一些可能的毒素合成前体,但关于直接参与毒素合成的前体和中间体及合成相关基因鉴定工作还不够深入。目前研究表明 PKS 通路的乙酰辅酶 A、丙二酰辅酶 A 和木聚糖/木糖代谢途径均可能与毒素前体合成相关,但它们之间的相互关系及对毒素合成前体或中间体形成的贡献、酶学基础和调控过程等都缺少研究。

## 6.3 木霉菌系统诱导玉米抗叶斑病机理

通过生防菌处理种子或土壤诱导玉米抗全株病害是国内外生物防控技术发展方向之一。目前关于木霉菌 II 类疏水蛋白与玉米根系受体类泛醌蛋白识别分子过程研究仍不深入,需要利用基因编辑等技术构建针对木霉菌 HYD1 激发子的玉米根系受体突变株以及 BR 信号系统的突变株,以揭示激发子与受体互作的分子过程和效应,进一步研究木霉菌系统诱导根系产生防御反应信号长距离转导的时空动态,明确其与玉米抗弯孢叶斑病的相互关系。

## 参考文献

- [1] Shurtleff M C. Compendium of corn diseases [M]. Saint Paul, Minnesota, USA: APS Press, 1980.
- [2] Ito M F, Paradela F, Soave J, et al. Leaf spot caused in maize (*Zea mays* L.) by *Curvularia lunata* (Wark-ker) Boedijn [J]. Summa Phytopathologica, 1979, 5: 181-184.
- [3] Duan S K. An investigation and research of "yellow spot" on maize inbred line Huangzao 4 (in Chinese) [J]. Plant Protection (植物保护), 1984, 10(6): 12.
- [4] Zhao L S, Tian X J, Li Y Q, et al. A study on the maize yellow spot identification of pathogen (in Chinese) [J]. Journal of Agricultural University of Hebei (河北农业大学学报), 1995, 18(2): 43-45.
- [5] Nelson R R, Haasis F A. The perfect stage of *Curvularia lunata* [J]. Mycologia, 1964, 56(2): 316-317.
- [6] Lanisnik R T, Wheeler M H. Melanin biosynthesis in the fungus *Curvularia lunata* (teleomorph: *Cochliobolus lunatus*) [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2003, 49(2): 110-119.
- [7] Fajemisin J M, Okuyemi O. Fungicidal control of curvularia leaf spot of maize [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1976, 22(2): 234-238.
- [8] Bai Y J, Chen Y, Li B H, et al. Biological characteristics of maize curvularia leaf spot (in Chinese) [J]. Liaoning Agricultural Sciences (辽宁农业科学), 1998, 5: 9-13.
- [9] Zhu M Q, Zhao L P, Fan L. Study on the biological characteristics of *Curvularia lunata* from Shanxi Province (in Chinese) [J]. Journal of Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forest [西北农林科技大学学报(自然科学版)], 2004, 32(4): 44-45.
- [10] Li F H, Ye H Z. Effect of temperature regulation on the infection of *Curvularia lunata* to maize (in Chinese) [J]. Journal of Maize Sciences (玉米科学), 2005, 13(4): 109-111, 123.
- [11] Yan H H, Chen J. Physiological differentiation and molecular biology of *Curvularia lunata* in maize leaf spot (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2002, 32(3): 288.
- [12] Yan H H. Pathogenic differentiation and identification technique of *Curvularia lunata* on maize (in Chinese) [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin (中国农学通报), 2009, 25(18): 338-343.
- [13] Xue C S, Xiao S Q, Zhai Y H, et al. Pathogenicity

- differentiation of *Curvularia lunata* (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2008, 38(1): 6-12.
- [14] Liu T, Zhao F Z, Wang Y Y, *et al.* Comparative analysis of phylogenetic relationships, morphologies, and pathogenicities among *Curvularia lunata* isolates from maize in China [J]. *Genetics and Molecular Research*, 2015, 14(4): 12537-12546.
- [15] Liu T, Liu L X, Jiang X, *et al.* Agrobacterium-mediated transformation as a useful tool for the molecular genetic study of the phytopathogen *Curvularia lunata* [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2010, 126(3): 363-371.
- [16] Gao J X, Chen J. Construction of a yeast two-hybrid library derived from *Curvularia lunata* grown in fries 3 medium and its application in the identification of *Clt-1* interacting proteins [J]. *Tropical Plant Pathology*, 2018, 43(1): 85-89.
- [17] Huang X L, Liu L X, Chen J, *et al.* Comparative proteomic analysis of the response in resistant and susceptible maize inbred lines to infection by *Curvularia lunata* [J]. *Progress in Natural Science*, 2009, 19(7): 845-850.
- [18] Hou J, Xing Y X, Zhang Y, *et al.* Identification of quantitative trait loci for resistance to *Curvularia* leaf spot of maize [J]. *Maydica*, 2013, 58(3-4): 266-273.
- [19] Jiang X, Zhai Y H, Yan H H, *et al.* Effect of different maize germplasms on activities of cell-wall-degrading enzymes from *Curvularia lunata* (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica* (植物病理学报), 2010, 40(3): 325-328.
- [20] Chen J. Differential proteins and genes related to *Curvularia lunata* potential virulence variation induced continuously by resistant maize germplasm [J]. *Phytopathology*, 2011, 101(6 supplement): s33.
- [21] Wang X M, Dai F C, Zhu Z D. Occurrence and control of *Curvularia* leaf spot in maize (in Chinese) [J]. *Plant Protection Technology and Extension* (植保技术与推广), 2003, 23(4): 37-39.
- [22] Basha S, Ulaganathan K. Antagonism of *Bacillus* species (strain BC121) towards *Curvularia lunata* [J]. *Current Science*, 2002, 82(12): 1457-1463.
- [23] Priya K S, Prabakaran M, Thennarasu V, *et al.* Effect of some medicinal plants against *Fusarium oxysporum* & *Curvularia lunata* [J]. *Plant Archives*, 2008, 8(1): 53-56.
- [24] Brunskole M, Stefane B, Zorko K, *et al.* Towards the first inhibitors of trihydroxynaphthalene reductase from *Curvularia lunata*: Synthesis of artificial substrate, homology modeling and initial screening [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2008, 16(11): 5881-5889.
- [25] Brunskole M, Zorko K, Kerbler V, *et al.* Trihydroxynaphthalene reductase of *Curvularia lunata*--A target for flavonoid action? [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2009, 178:1-3.
- [26] Choudhary R C, Kumaraswamy R V, Kumari S, *et al.* Cu-chitosan nanoparticle boost defense responses and plant growth in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 9754.
- [27] Li G F. Cloning, analysis and detection of the *Mating-type* genes in *Curvularia lunata* (in Chinese) [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University (沈阳: 沈阳农业大学), 2016.
- [28] Liu K X. Effects for iron on the perfect stage of *Curvularia lunata* (in Chinese) [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University (沈阳: 沈阳农业大学), 2018.
- [29] Ning H, Qin Z, Wang L H, *et al.* Studies on blockade of immunoabsorption to the non-specific antibodies of *Curvularia lunata* (in Chinese) [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University* (四川农业大学学报), 2003, 1(2): 132-134.
- [30] Hou J M, Ma B C, Zuo Y H, *et al.* Rapid and sensitive detection of *Curvularia lunata* associated with maize leaf spot based on its *Clg2p* gene using semi-nested PCR [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2013, 56(4): 245-250.
- [31] Chen S, Su L, Chen J, *et al.* Cutinase: characteristics, preparation, and application [J]. *Biotechnology Advances*, 2013, 31(8): 1754-1767.
- [32] Dean R A, Talbot N J, Ebbole D J, *et al.* The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*

- [J]. *Nature*, 2005, 434 (7036): 980-986.
- [33] Liu T, Hou J M, Wang Y Y, *et al.* Genome-wide identification, classification and expression analysis in fungal-plant interactions of cutinase gene family and functional analysis of a putative CICUT7 in *Curvularia lunata* [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2016, 291(3): 1105-1115.
- [34] Skamnioti P, Gurr S J. *Magnaporthe grisea* cutinase 2 mediates appressorium differentiation and host penetration and is required for full virulence [J]. *The Plant Cell*, 2007, 19(8): 2674-2689.
- [35] De Lorenzo G, Castoria R, Bellincampi D, *et al.* Fungal invasion enzymes and their inhibition [J]. *Plant Relationships*, 1997, 5: 61-83.
- [36] Feng J, Gao Z G, Xue C S, *et al.* The pathogenesis of the cell-degrading enzymes produced by *Curvularia lunata* (in Chinese) [J]. *Rain Fed Crops (杂粮作物)*, 2002, 22 (3): 164-166.
- [37] Ni X, Jiang X, Li Y Q, *et al.* Construction and pathogenicity analysis of ATMT mutant of *Curvularia lunata* (in Chinese) [J]. *China Biotechnology (中国生物工程杂志)*, 2016, 36(1): 23-28.
- [38] Gao S G, Chen J. Differential expression of pathogenic genes and proteins in maize *Curvularia* leaf spot induced by resistant maize germplasm [A]. *Proceedings of 2010 Academic Annual Conference of Chinese Society of Plant Pathology (in Chinese) [C]*. Beijing: Chinese Society of Plant Pathology (北京: 中国植物病理学会), 2010. 525.
- [39] De L G, Ferrari S. Polygalacturonase-inhibiting proteins in defense against phytopathogenic fungi [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(4): 295-299.
- [40] Macri F, Vianello A. Isolation and partial characterization of phytotoxins from *Curvularia lunata* (Wakk.) Boed [J]. *Physiological Plant Pathology*, 1976, 8 (3): 325-331.
- [41] Lv G Z, Xue Y M. Bioassay of the Toxin from *Curvularia lunata* and Its effect on ultra-structure of maize leaves (in Chinese) [J]. *Journal of Shenyang Agricultural University (沈阳农业大学学报)*, 1999, 6 (3): 212-214.
- [42] Xiao S Q, Xue C S, Shi Y, *et al.* Nature of physical and chemical and pathogenic function of toxin of *Curvularia lunata* (Wakker) Boed (in Chinese) [J]. *Journal of Maize Sciences (玉米科学)*, 2006, 14 (4): 138-140.
- [43] Tang S G, Mou L, Zheng Q G, *et al.* Studies on the stability of *Curvularia lunata* toxin (in Chinese) [J]. *Plant Protection (植物保护)*, 2009, 35(1): 111-113.
- [44] Liu T, Liu L, Jiang X, *et al.* A new furanoid toxin produced by *Curvularia lunata*, the causal agent of maize *Curvularia* leaf spot [J]. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 2009, 31(1): 22-27.
- [45] Gao J X, Liu T, Chen J, *et al.* Identification of proteins associated with the production of methyl 5-(hydroxymethyl) furan-2-carboxylate toxin in *Curvularia lunata* [J]. *Tropical Plant Pathology*, 2015, 40 (2): 119-126.
- [46] Tang S G, Wang F, Gao Z G, *et al.* Influence of toxin by *Curvularia lunata* on superoxidation of membrane lipid in corn cell (in Chinese) [J]. *Journal of Maize Sciences (玉米科学)*, 2007, 15(3): 84-86.
- [47] Tang S G, Zheng Q G, Mou L, *et al.* Study of herbicidal activity of toxin produced by *Curvularia lunata* (in Chinese) [J]. *Journal of Jilin Agricultural University (吉林农业大学学报)*, 2011, 33(1): 23-25.
- [48] Nosanchuk J D, Casadevall A. The contribution of melanin to microbial pathogenesis [J]. *Cellular Microbiology*, 2003, 5(4): 203-223.
- [49] Mendgen K, Hahn M, Deising H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi [J]. *Phytopathology*, 1996, 34(34): 367-386.
- [50] Wang X F, Xue C S, Xue S F, *et al.* Research on melanin characters and its effect on pathogenicity of *Curvularia lunata* in maize (in Chinese) [J]. *Journal of Anhui Agriculture Science (安徽农业科学)*, 2007, 35(21): 6476-6478.
- [51] Gao S G, Liu T, Li Y Y, *et al.* Understanding resistant germplasm-induced virulence variation through analysis of proteomics and suppression subtractive hybridization in a maize pathogen *Curvularia lunata* [J]. *Proteomics*, 2012, 12(23-24): 3524-3535.

- [52] Gao J X, Gao S G, Li Y Q, *et al.* Genome-wide prediction and analysis of the classical secreted proteins of *Curvularia lunata* (in Chinese) [J]. Journal of Plant Protection (植物保护学报), 2015, 42(6): 869-876.
- [53] Gao J X, Liu T, Chen J. Insertional mutagenesis and cloning of the gene required for the biosynthesis of the non-host-specific toxin in *Cochliobolus lunatus* that causes maize leaf spot [J]. Phytopathology, 2014, 104(4): 332-339.
- [54] Perez-Torrado R, Yamada D, Defossez P A. Born to bind; the BTB protein-protein interaction domain [J]. Bioessays, 2006, 28(12): 1194-1202.
- [55] Ni X, Gao J X, Yu C J, *et al.* Bioinformatic analysis and promoter identification of *clt-1* gene in *Curvularia lunata* (in Chinese) [J]. China Biotechnology (中国生物工程杂志), 2017, 37(3): 37-42.
- [56] Gao J X, Chen J. Regulation of toxin, melanin synthesis and pathogenicity by Clt-1 protein of *Curvularia* leaf spot [A]. Proceedings of 2017 Academic Annual Conference of Chinese Society for Plant Protection (in Chinese) [C]. Beijing: Chinese Society for Plant Protection (北京: 中国植物保护学会), 2017. 24.
- [57] Gao J X, Jing J, Yu C J, *et al.* Construction of a high-quality yeast two-hybrid library and its application in identification of interacting proteins with *Brn1* in *Curvularia lunata* [J]. Plant Pathology Journal, 2015, 31(2): 108-114.
- [58] Gao J X, Yu C J, Wang M, *et al.* Involvement of a velvet protein *Clv1B* in the regulation of vegetative differentiation, oxidative stress response, secondary metabolism, and virulence in *Curvularia lunata* [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 46054.
- [59] Gao S G, Li Y Q, Gao J X, *et al.* Genome sequence and virulence variation-related transcriptome profiles of *Curvularia lunata*, an important maize pathogenic fungus [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 627
- [60] Gao J X, Chen J. Transcriptome analysis identifies candidate genes associated with melanin and toxin biosynthesis and pathogenicity of the maize pathogen, *Curvularia lunata* [J]. Journal of Phytopathology, 2018, 166(4): 233-241.
- [61] Gao J X, Chen J. Involvement of a Polyketide Synthetase CIPKS18 in the Regulation of Vegetative Growth, Melanin and Toxin Synthesis, and Virulence in *Curvularia lunata* [J]. Plant Pathology Journal, 2017, 33(6): 597-601.
- [62] Xu S F, Chen J, Liu L X, *et al.* Proteomics associated with virulence differentiation of *Curvularia lunata* in maize in China [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2007, 49(4): 487-496.
- [63] Liu T, Xu S F, Liu L X, *et al.* Cloning and characteristics of *Brn1* gene in *Curvularia lunata* causing leaf spot in maize [J]. European Journal of Plant Pathology, 2011, 131(2): 211-219.
- [64] Zhang L, Li H, Xiao S Q, *et al.* Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated target gene disruption in the maize pathogen *Curvularia lunata* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 145(1): 155-165.
- [65] Gao J X, Jing J, Liu T, *et al.* Identification of proteins associated with the production of melanin and with pathogenicity in maize pathogen *Curvularia lunata* [J]. Australasian Plant Pathology, 2015, 44(6): 599-603.
- [66] Zhai Y H, Chen J, Liu L X, *et al.* The dynamic changes of pathogenesis-related proteins of a low virulent *Curvularia lunata* isolate after reinoculating maize inbreds (in Chinese) [J]. Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报), 2008, 38(2): 203-207.
- [67] Zhou F H, Liu L X, Chen J, *et al.* Analysis of pathogenicity related proteins and gene expression in maize *curvularia* leaf spot under host resistance stress (in Chinese) [J]. Progress in Natural Science (自然科学进展), 2009, 19(9): 936-941.
- [68] Kimura N, Tsuge T. Gene cluster involved in melanin biosynthesis of the filamentous fungus *Alternaria alternata* [J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(14): 4427-4435.
- [69] Lu Y Y. Molecular mechanism of *CINPS6* and *ClIFtr1* regulating pathogenicity in *Curvularia lunata* (in Chinese) [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University (沈阳: 沈阳农业大学), 2018.
- [70] Mao X W. Function of *CINox1* and *CINox2* oxidase genes in the pathogenicity of *Curvularia lunata* (in Chinese) [D]. Shenyang: Shenyang Agricultural University (沈阳: 沈阳农业大学), 2018.
- [71] Meng X, Zhang S. MAPK cascades in plant disease resistance signaling [J]. Annual Review of Phytopathology, 2013, 51(1): 245-266.

- [72] Gao S G, Zhou F H, Liu T, *et al.* A MAP kinase gene, *Clk1*, is required for conidiation and pathogenicity in the phytopathogenic fungus *Curvularia lunata* [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2013, 53(3): 214-223.
- [73] Ni X, Gao J X, Yu C J, *et al.* MAPKs and acetyl-CoA are associated with *Curvularia lunata* pathogenicity and toxin production in maize [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2018, 17(1): 139-148.
- [74] Liu T, Wang Y Y, Ma B C, *et al.* Clg2p interacts with Clf and ClUrase to regulate appressorium formation, pathogenicity and conidial morphology in *Curvularia lunata* [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(24047): 1-14.
- [75] Zhao X H, Kim Y S, Park G S, *et al.* A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe grisea* [J]. *Plant Cell*, 2005, 17(4): 1317-1329.
- [76] Zhao F Z, Liu Z, Hou J M, *et al.* Identification and structure characteristics of related genes of Fus3/Kss1-MAPK pathway from *Curvularia lunata* (in Chinese) [J]. *Journal of Agriculture (农学学报)*, 2017, 7(1): 84-90.
- [77] Shen S, Hao Z M, Gu S Q, *et al.* The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase A *StPKA-c* contributes to conidiation and early invasion in the phytopathogenic fungus *Setosphaeria turcica* [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 343: 135-144.
- [78] Liu T, Ma B C, Hou J M. Isolation and characterization of the PKAr gene from a plant pathogen, *Curvularia lunata* [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2014, 54(3): 310-314.
- [79] Herrmann M, Spröte P, Brakhage A A. Protein kinase C (PkcA) of *Aspergillus nidulans* is involved in penicillin production [J]. *Applied and environmental microbiology*, 2006, 72(4): 2957-2970.
- [80] Liu Z. Screening and identification of maize miRNA-Mediated resistance to *Curvularia lunata* (in Chinese) [D]. Daqing: Heilongjiang Bayi Agricultural University (大庆: 黑龙江八一农垦大学), 2018.
- [81] Lin R M, Chen J, Gao Z G, *et al.* Effects of curvularia toxin on activity of main defense enzymes in maize (in Chinese) [J]. *Liaoning Agricultural Sciences (辽宁农业科学)*, 2000, (6): 20-23.
- [82] Guo X M, Ye K C, Song X Y. An evaluation method of resistance to curvularia leaf spot disease by physiological indexes in *Zea mays* L. [J]. *Plant Physiology Journal*, 2012, 48(9): 881-886.
- [83] Chen J, Lin R M, Gao Z G, *et al.* The influence of maize curvularia leaf spot toxin on host defense enzyme activity and induced resistance effect (in Chinese) [J]. *Acta Phytopathologica Sinica (植物病理学报)*, 2002, 32(2): 43-48.
- [84] Yan L B, Xiao S Q, Li H, *et al.* Construction of Cu/Zn-SOD gene knockout vector of curvularia leaf spot in maize [A]. *Proceedings of 2015 Academic Annual Conference of Chinese Society of Plant Pathology (in Chinese) [C]*. Beijing: Chinese Society of Plant Pathology (北京: 中国植物病理学会), 2015: 228.
- [85] Gao S G, Ni X, Li Y Y, *et al.* Sod gene of *Curvularia lunata* is associated with the virulence in maize leaf [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(4): 874-883.
- [86] Fan L L, Fu K H, Yu C J, *et al.* Thc6 protein, isolated from *Trichoderma harzianum*, can induce maize defense response against *Curvularia lunata* [J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2015, 55(5): 591-600.
- [87] Yu C J, Fan L L, Gao J X, *et al.* The platelet-activating factor acetylhydrolase gene derived from *Trichoderma harzianum* induces maize resistance to *Curvularia lunata* through the jasmonic acid signaling pathway [J]. *Journal of Environmental Science and Health, (Part B)*, 2015, 50(10): 708-717.
- [88] Yu C J, Gao J X, Dou K, *et al.* Induction of maize resistance to *Curvularia* leaf spot by *hyd1* gene system of *Trichoderma* [A]. *Proceedings of 2016 Academic Annual Conference of Chinese Society for Plant Protection (in Chinese) [C]*. Beijing: Chinese Society for Plant Protection (北京: 中国植物保护学会), 2016: 443.