

谷子弯孢病菌 *Clmk-1* 基因克隆和初步分析

李志勇¹ 郝志敏² 刘磊¹ 董志平¹ 董金皋²

(1. 河北省农林科学院 谷子研究所 河北 石家庄 050031; 2. 河北农业大学 生命科学学院 河北 保定 071001)

摘要: 谷子弯孢病菌(*Cochliobolus lunatus*)为谷子上重要的叶部病害,发生严重时会影响谷子的产量及品质。为了解 MAPK 级联途径在谷子弯孢病菌发育及致病性中的作用,根据已知植物病原真菌 MAPK 基因的保守结构域设计简并引物,通过 PCR 扩增法获得了谷子弯孢病菌 MAPK 基因的同源片段,并利用 RACE 技术获得了基因的全长 cDNA 序列,该基因命名为 *Clmk-1*。*Clmk-1* 基因开放阅读框为 1 065 bp,编码 354 个氨基酸,并且含有 MAPK 基因的保守的 TGY 和 CD 基序。聚类分析结果表明,谷子弯孢病菌 *Clmk-1* 基因与其他植物病原真菌 Hog1 类似 MAPK 基因的同源性很高。利用 Promoterscan 软件发现,*Clmk-1* 基因启动子区含有热激转录因子(HSF)、ADR 转录因子和 GCR 转录因子的结合元件。MAPK 途径特异性抑制剂 U0126 抑制谷子弯孢的孢子萌发及芽管发育。研究初步表明,*Clmk-1* 基因为 Hog1 类似 MAPK 基因,可能与渗透胁迫相关,并且 MAPK 级联途径参与病菌孢子萌发及芽管形态建成。克隆的 *Clmk-1* 基因为进一步研究谷子弯孢病菌 MAPK 基因的功能奠定基础。

关键词: 谷子弯孢病菌; MAPK 基因; 基因克隆; U0126

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2012)03-0041-05

Molecular Cloning and Preliminary Analysis of *Clmk-1* Gene in *Cochliobolus lunatus*

LI Zhi-yong¹ ,HAO Zhi-min² ,LIU Lei¹ ,DONG Zhi-ping¹ ,DONG Jin-gao²

(1. Millet Institute of Agricultural Academy of Hebei Province ,Shijiazhuang 050031 ,China;

2. College of Life Science ,Agricultural University of Hebei ,Baoding 071001 ,China)

Abstract: *Cochliobolus lunatus* ,a fungal pathogen of foxtail millet leaf disease ,affect the yield and quality when it is epidemic. In order to understand the function of MAPK signal transduction in *Cochliobolus lunatus* ,a MAPK gene was cloned by polymerase chain reaction(PCR) amplification from degenerated primer sets designed on the basis of the conserved domain of other fungal MAPK gene and the gene was called as *Clmk-1*. The full length cDNA sequence of *Clmk-1* in *Cochliobolus lunatus* was cloned by RACE methods. The *Clmk-1* gene contains a 1065 bp ORF and the deduced protein consist of 354 amino acid residues ,which has the conserved TGY motif and the CD motif. Phylogenetic analysis showed *Clmk-1* gene was high similar to Hog1-type MAPK of other filamentous fungi. The promoter region contain the binding site of transcription factor such as HSF ,ADR and GCR by the bioinformatic analysis with Promoterscan software. The chemical of U0126 inhibited the conidial germination and development of germinating tubes. The study showed *Clmk-1* was stress-activated Hog1-type MAPK and MAPK cascades regulate the conidial germination and development of germinating tubes. The cloning of the gene will benefit the understanding of the MAPK gene functional in *Cochliobolus lunatus*.

Key words: *Cochliobolus lunatus*; MAPK gene; Gene cloning; U0126

促分裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase ,MAPK)是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,也称细胞外信号调节激酶。在植物病原菌中发现,有 Fus3/Kss1、Slr2 及 Hog1 共 3 类保守的 MAPK

基因,它们在真菌生长、发育及致病性等方面具有非常重要作用。任璐等^[1]研究发现,番茄早疫病菌(*Alternaria solani*) Hog1 类似 MAPK 基因表达特征与其对杀菌剂异菌脲抗药性相关。Akihiro 利用基因

收稿日期: 2012-02-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30771354); 河北省自然科学基金项目(C2004000699)

作者简介: 李志勇(1976-),男,河北邯郸人,副研究员,博士,主要从事谷子病害研究。

通讯作者: 董志平(1964-),女,河北平乡人,研究员,硕士,主要从事谷子病害研究。

董金皋(1963-),男,河北平乡人,教授,博士,主要从事分子植物病理研究。

敲除技术获得水稻胡麻斑病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*) 中 *Fus3/Kss1* 同源的 *MAPK* 基因突变体,发现该基因调控菌丝生长、分生孢子产生及对水稻的致病性^[2]。腐生模式真菌灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 中共克隆得到 3 个 *MAPK* 基因。通过功能互补研究发现, *Fus3/Kss1* 途径中 *bmp* 基因与分生孢子产生、对植物组织的侵入能力及菌丝的生长速度相关。*Slr2* 途径的 *bmp3* 缺失突变体生长变缓、分生孢子形成受阻及不能形成菌核。而当病菌遇到农药、高渗胁迫和过氧化物胁迫时, *Hog1* 途径中 *BcSAK1* 基因磷酸化, 并且 *BcSAK1* 突变体产生更少孢子及菌核发育变缓和不能侵入未受伤组织^[3-5]。

谷子新月弯孢病菌 (*Cochliobolus lunatus*) 是谷子叶部的一种重要丝状病原真菌, 引起的谷子叶斑病可使谷子叶片提前衰老和枯黄, 严重影响后期叶片光合作用及谷粒灌浆, 该病的发生和流行可显著降低谷子的品质及产量。目前, 尚未有谷子弯孢病菌的 *MAPK* 途径参与其分生孢子发育、致病性及形态等方面的报道。本研究根据与谷子新月弯孢亲缘关系较近的玉米大斑 (*Setosphaeria turcica*)、玉米小斑 (*Cochliobolus heterostrophus*) 和水稻胡麻斑 (*Cochliobolus miyabeanus*) 等 *MAPK* 基因保守结构, 利用同源序列法和 RACE 技术克隆了其 *MAPK* 基因, 并利用 *MAPK* 途径特异性抑制剂 U0126 研究了谷子弯孢病菌 *MAPK* 基因在其孢子发育过程中的作用, 为进一步研究谷子弯孢病菌 *MAPK* 基因的功能及防控该病害奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试菌株: 谷子新月弯孢病菌菌株 Cl-Sjz, 大肠杆菌菌株 DH5 α (由河北省农林科学院谷子所植保室保存)。主要试剂: pMD18-T 克隆载体, M-MLV RTase cDNA 合成试剂盒, 3'-full RACE 试剂盒等购自大连宝生物有限公司; Trizol 总 RNA 提取试剂盒 (Invitrogen); SMARTTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech); *MAPK* 途径特异性抑制剂 U0126 (Promega)。引物合成和测序由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.2 谷子新月弯孢病菌总 RNA 和基因组 DNA 的提取

将谷子新月弯孢病菌菌株 Cl-Sjz 菌株接种于 PDA (马铃薯 200 g、葡萄糖 20 g、琼脂粉 13 g 加水定容至 1 L) 培养基, 平皿中活化 1 周后, 打菌盘接种于液体 PD 培养基中静置培养 10 d, 接种针挑取菌片, 滤

纸压干。根据传统 CTAB 法和 Invitrogen Trizol 总 RNA 提取试剂盒说明提取谷子弯孢病菌基因组 DNA 及总 RNA, 再由总 RNA 反转录合成第 1 链 cDNA。

1.3 谷子弯孢病菌 *Clmk-1* 基因克隆

1.3.1 谷子弯孢病菌 *Clmk-1* 基因同源片段克隆

根据玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*)、玉米小斑病菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) 及水稻胡麻斑病菌 (*Cochliobolus miyabeanus*) *MAPK* 基因保守结构域设计 1 对寡核苷酸简并引物。上游引物 *Clmk-L*: 5'-AAGAAGATYATGAAGCCYTTC-3'; 下游引物 *Clmk-R*: 5'-GTCYGCCTCCTTGAACGACC-3'。以反转录后合成的第 1 链 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增。1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果, 回收目的片段后连接到 pMD18-T 克隆载体中, 转化大肠杆菌后选取阳性克隆测序。在 GenBank 中利用 BLAST 软件比对所得测序结果与其它真菌 *MAPK* 基因同源性。

1.3.2 RACE 技术获得 *Clmk-1* 基因片断的 cDNA 全序列 根据已测序获得的谷子弯孢病菌 *Clmk-1* 基因同源片段, 利用 Oligo6 软件设计 RACE 特异性引物。*Clmk-GSP1* 5'-GTGAGCAGACGGTG-GAGATCGGTTC-3' 用来进行 5' RACE 扩增; *Clmk-GSP2* 5'-CAACAAGTTCAAGAACGCCGAGCCA-3' 用来进行 3' RACE 扩增。按照 3'-Full RACE Core Set Ver. 2.0 试剂盒和 SMARTTM RACE cDNA Amplification 试剂盒说明分别反转录合成谷子弯孢病菌 3'-末端和 5'-末端 cDNA。根据试剂盒说明扩增谷子弯孢病菌 *Clmk-1* 基因 3' 末端和 5' 末端 cDNA 末端。通过 DNAMAN 软件把测序得到的 3' 末端和 5' 末端 cDNA 序列与原来克隆得到的片段进行拼接, 得到了 cDNA 全长序列。在 Genebank 利用 OFFinder 软件找到最大开放阅读框, 并将 cDNA 序列翻译成相应的氨基酸序列, 同时利用 Blasx 软件比对与其它病原真菌 *MAPK* 基因同源性。利用 Scanprosite 软件分析谷子弯孢病菌 *Clmk-1* 基因的保守结构域, 应用 Promoterscan 软件分析 *Clmk-1* 基因上游启动子, 基于 *Clmk-1* 基因同源性分析, 利用 DNAMAN 软件构建系统进化树。

1.4 *MAPK* 途径特异性抑制剂 U0126 对谷子弯孢孢子萌发的影响

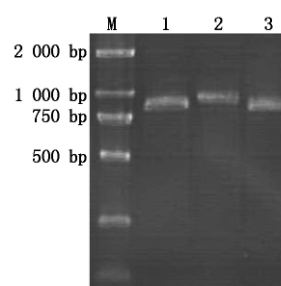
谷子弯孢病菌在 PDA 培养基上 28℃ 恒温培养一周后, 在皿内加入少量灭菌水, 用毛笔轻刷谷子弯孢病菌气生菌丝, 擦镜纸过滤去除大量断裂菌丝, 孢悬液 4 000 r/min 离心 5 min, 用适量无菌水悬浮沉淀, 调整孢子浓度达到 1×10^6 个/mL 备用。取适量孢悬液, 加入 U0126 母液至终浓度为 50, 40, 30, 20,

10 $\mu\text{mol/L}$ 。将含有不同浓度的 U0126 孢悬液滴加到疏水投影薄膜片上,并置于保湿缸内 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养 12 h,观察各浓度处理下谷子弯孢分生孢子的萌发。以不含有 U0126 的分生孢子悬浮液为对照,每个处理重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 *Clmk-1* 基因的克隆及序列分析

利用简并引物 *Clmk-L* 和 *Clmk-R* 扩增反转录合成的 cDNA,扩增产物经电泳检测可见到约 0.8 kb 的单一一条带,与预期结果相符,割胶回收目的片段后



1. 同源片段扩增产物; 2. 5' RACE 扩增结果; 3. 3' RACE 扩增结果

1. Amplification of *Clmk* homologous fragment; 2. Product of 5' RACE PCR; 3. Product of 3' RACE PCR

图 1 谷子弯孢病菌 *Clmk-1* 基因扩增

Fig. 1 PCR amplification of *Cochliobolus*

lunatus Clmk-1 gene

```

GCGCGTGT TTTGGGTCGGCAGGAAACTCTACATGTATTACGAATTCGAGCTCGGTACCGGGGATCTT
                                ADR
CTAGAGATTCTAATACGACTCACAAATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGAGACTT
                                HSF                                ADR
CTCTCTCCTCTGCTCTCCCTCGCATCCACCCTCCCGTCTTCCCTGAGCCCTTCGTGTGCTGCATCTAG
                                GCR
GTGCTTCGCGCGCCGCCGCTACTTCCTCGCCCCAACGCTTGCTCTGACCTGACGCGGCTCC
                                GCR
CACACACGGCTACAGCACCTCCGCCCGTCTTCCGCCCTGGTGCAAACTCTGAGCTCTGGCAACCA
AGTCCCTCGGAGCCCGTGTGCGCAATCGCCTCTGTGCCGGAACCTGCCACCGAATCCAATAAGACCCG
                                HSF
TCTGCATTCAGCTCCCTCGCCGTGCGACTGCAGTGCCCGTGTATTGCGGACTGCCCCACGCTCTCCAG
CCTGCCCTTCTCCACCACCACCAACCCCAAAACCTCTGAAAAGTCTCACCCCTCGCGCCTGTGCGAG
                                HSF                                ADR
CACCAGAACCACCAGAACCACCATGGCGGAGTTGTACGCGCCAGATTTTGGCACCACCTTCGAG
                                M A E F V R A Q I F G T T F E
ATTACAGCAGGTACACCGACTTGCAGCCTGTGCGCATGGCGCATTGGCCTCGTTTGTCTCAGCAAA
I T S R Y T D L Q P V G M G A F G L V C S A K
GGACCAAGCTCACCAACGAGCGCGTGGCTGTCAAGAAGATCATGAAGCCTTTCAGCACGCCGCTCCTG
D Q L T N Q A V A V K K I M K P F S T P V L
TCCAAGCGCACATATCGAGAGCTGAAGCTCCTGAAGCACCTCCGACACGAAAATATCATCAGCTTGAG
S K R T Y R E L K L L K H L R H E N I I S L S
CGACATCTTCATCTCTCCCTTTGAGGACATTTACTTCTGTCACCGAACTCCTGGGAACCGATCTCCACCG
D I F I S P L E D I Y F V T E L L G T D L H R
TCTGCTACCTCGAGGCCGCTCGAGAAGCAGTTTATTCAATACTTACTCTATCAGATCCTGCGTGACT
L L T S R P L E K Q F I Q Y L L Y Q I L R G L
GAAATACGTCCACTCTGCGGTGTAGTGCACCGCGATCTCAAGCCCAGCAACATCCTGGTCAACGAGA
K Y V H S A G V V H R D L K P S N I L V P N R
ACTGCGATCTTAAGATCTGTGACTTCGGTCTCGCCCGTATACAAGACCCCGATGACGGGCTACGTCT
N C D L K I C D F G L A R I Q D P Q M T G Y V
                                TGY motifs
CAACACGATACTACCGAGCCCCGAAATTATGCTCACGTGGCAAAAGTACGACGTGAGGTGGACATT
S T R Y Y R A P E I M L T W Q K Y D V E V D I
TGGAGCGCTGGATGTATCTTTGCCGAGATGCTCGAGGGCAAGCCCTTTTCCCTGGAAAGGACCAGT
W S A G C I F A E M L E G K P L F P G K D H V
GAACCAATCTCCATCATCACGGAGCTTCTGGGTACTCCCCAGATGACGTGATCCAGACCATCTGCA
N Q F S I I T E L L G T P P D D V I Q T I C
GTGAGAACACATTGCGATTCTGTCATCCCTCCCCAAGCGCGAGCGGCAACCATTTGGCCAACAGTTT
S E N T L R F V Q S L P K R E R Q P L A N K F
AAGAACGCCGAGCCAGAGGCCGCTCGATCTTCTAGAAAACATGTGGTATTTGACCCAGGAAGCGCG
K N A E P E A V D L L E N M L V F D P R K R
TCCGAGCAGAGCAGGCTCTCGCTCACCATACCTTGCCCCCTACACGCCCCGACCGACGAGCCCGTG
V R A E Q A L A H P Y L A P Y H A P T D E P V
                                CD motifs
GCCGAAGAAAGTTGATTGGTGTTCACGACGACAGACTTGCCAGTTGACACTTGAAGATCATGAT
A E E K F D W S F N D A D L P V D T W K I M M
GTACTCGGAGATTCTGGATTACCAATGTCTGATGCGGCACAGGAGCCGAGAACACGGCAGCTAAT
Y S E I L D Y H N V D A A Q E P E N N G S *
CCAGCCATGGCTGTCCAGAATCGAGGCCATAATACTTTGACGCTCCGGCACCGAGTTATGTAGTTTACC
AACGTTTCAGCTATCATCTGCGTGGAGCATGCGGATTTGGATTTTCTCAATGATTTCCAAAGGTCTCGTT
CAGTGGACCCATGGCATGAAGATGGGAGTTAGATGGACACGGCTATGTCTCTGTCATTTGGATTAGCA
CTGCTGGTACACGAAGGAAATGTTTCATGACGCGATTGGGGCATGGCCCAGCTTAGGTAGCAATATG
AGATTATGTTGTCAAAAAAAAAAACTATAGTGAAATCACTAGTGGAACGACGGTAAATCGT
                                PolyA

```

图 2 谷子弯孢病菌 *Clmk-1* 基因结构

Fig. 2 The sequence and structure of *Clmk-1* gene in *Cochliobolus lunatus*

连接 T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞后挑取阳性克隆送上海生工生物工程有限公司测序。在 NCBI 网上比对结果表明, 该基因片段与其他真菌 MAPK 基因同源性很高。因此, 克隆得到的基因片段为谷子弯孢病菌 MAPK 基因片段。以反转录后得到的谷子弯孢病菌 5'-末端和 3'-末端 cDNA 为扩增模板, 进行 5'-RACE 和 3'-RACE 扩增。5'-端扩增获得长度约 900 bp 的条带, 3'-端扩增获得长度约 800 bp 的条带(图 1)。

把 RACE 扩增条带回收、克隆测序, 然后将测序结果与已获得的基因片段进行拼接, 获得谷子弯孢病菌 *Clmk-1* 基因的全长序列, 将克隆得到的 *Clmk-1* 基因在 GenBank 注册, 获得序列登陆号为 JQ585926。 *Clmk-1* 基因全长 1 065 bp, 编码 354 个氨基酸, 该基因与其它真菌 Hog1 类似的 MAPK 基因具有很高的同源性。ATG 起始密码子附近符合 Kozak 规则 (AXXATGG), 3'-端具有真核生物典型的 poly A 尾(图 2)。利用 Scanprosite 软件发现在 *Clmk-1* 基因中间和 3'-端分别发现了 Hog1 类似 MAPK 基因的特异 TGY 基序和 CD 基序。TGY 基序为 MAPK 基因激活所必须的磷酸化位点, 而 CD 基序为与上游 MAPKK 互作的位点。在获得的启动子序列中, 利用 Promoter-scan 软件发现了热激转录因子 (HSF) 结合元件、ADR 转录因子结合元件和 GCR 转录因子的结合元件, 这些转录因子与热胁迫、糖类、甘油及脂类代谢相关^[6-7]。

2.2 *Clmk-1* 基因同源性分析及进化树构建

利用 BLASTX 软件, 将 *Clmk-1* 基因编码氨基酸序列与 GenBank 中的已知序列进行同源性分析, 发现 *Clmk-1* 蛋白与玉米小斑病菌 (*C. heterostrophus*)、水稻胡麻斑病菌 (*C. miyabeanus*)、玉米大斑病菌 (*S. turcica*)、灰葡萄孢菌 (*Botrytis cinerea*) 和核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) MAPK 蛋白的同源性分别为 93%~98%。基于真菌中 Hog1 类似的 MAPK 基因, 利用 DNAMAN 构建系统进化树, 由图 3 可知, 谷子弯孢菌 (*C. lunatus*) 与水稻胡麻斑 (*C. miyabeanus*) 和玉米小斑病菌 (*C. heterostrophus*) 亲缘关系最近, 其次为玉米大斑病菌 (*S. turcica*)、大麦黄斑病菌 (*Pyrenophora tritici*)、甘蓝链格孢菌 (*Alternaria brassicicola*) 和小麦颖枯病菌 (*Phaeosphaeria nodorum*), 它们聚在一个分枝内。而玉蜀黍赤霉 (*Gibberella zeae*) 和稻梨孢 (*Pyricularia grisea*) 及灰葡萄孢 (*B. cinerea*) 和核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 则分别聚在另外的不同分枝上。

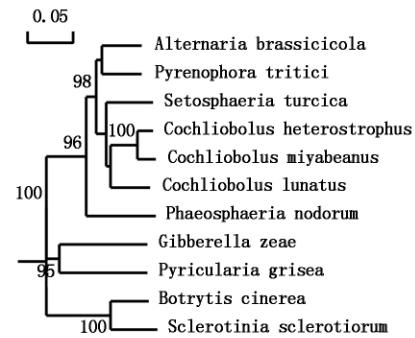
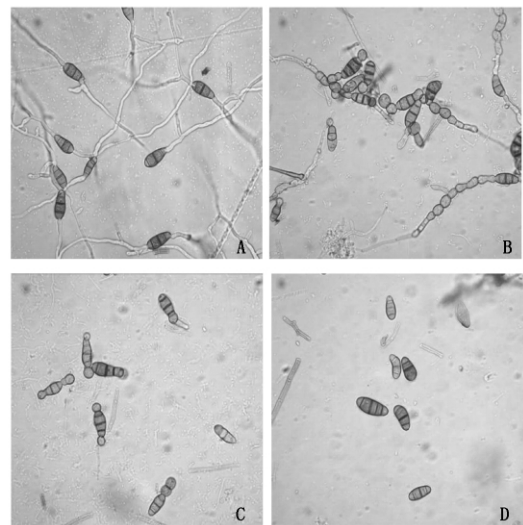


图 3 谷子弯孢病菌与其他真菌 MAPK 基因系统进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic analysis of MAPK gene between *C. lunatus* and other fungi



A. 对照; B. 20 $\mu\text{mol/L}$ U0126 处理;
C. 40 $\mu\text{mol/L}$ U0126 处理; D. 50 $\mu\text{mol/L}$ U0126 处理。
A. CK; B. 20 $\mu\text{mol/L}$ U0126 treatment; C. 40 $\mu\text{mol/L}$ U0126 treatment; D. 50 $\mu\text{mol/L}$ U0126 treatment.

图 4 U0126 对谷子弯孢萌发的影响

Fig. 4 Effect of U0126 treatment on conidial germination in *C. lunatus*

2.3 U0126 对谷子弯孢病菌分生孢子萌发的影响

25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗培养 12 h, 未用药剂处理的谷子弯孢病菌分生孢子在疏水投影薄膜片上完全萌发, 分生孢子一端或两端同时萌发, 生长出较长的菌丝, 有的生长到一定长度有不同程度分枝(图 4-A)。而孢子悬浮液中加入 MAPK 特异性抑制剂 U0126 后, 孢子萌发后形态及萌发率都受到不同程度影响。总的趋势为随着抑制剂浓度的增加, 谷子弯孢病菌分生孢子萌发率下降。显微观察结果表明, 抑制剂浓度为 20 $\mu\text{mol/L}$ 时, 部分萌发的分生孢子形成的芽管分隔增多变粗, 不能正常放射状生长, 而形成不正常串珠状(图 4-B); 而当 U0126 的浓度升至 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 分生孢子不能正常萌发, 仅形成很短的芽管, 芽管不能继续生长(图 4-C); 当 U0126 终浓度为 50 $\mu\text{mol/L}$ 时, 完全抑制了谷子弯孢病菌分生孢

子的萌发(图 4-D),部分孢子出现了明显的质壁分离现象。说明 MAPK 途径调控谷子弯孢病菌分生孢子的萌发及芽管的形态建成。

3 讨论

根据基因保守结构域进行同源克隆是目前克隆未知基因应用最广泛、最快速、最有效的方法之一,许多植物病原真菌的 MAPK 基因都是根据同源序列法克隆的^[8]。在此种方法中获得与研究菌种亲缘关系较为密切真菌同源的基因尤为重要,本研究就是选取丝孢纲中与谷子新月弯孢亲缘关系较近的玉米小斑病菌(*C. heterostrophus*)和水稻胡麻斑病菌(*C. miyabeanus*)已克隆的同源基因为基础,设计简并性低的简并引物,克隆成功的几率会更大。本研究利用候选基因法克隆了谷子弯孢病菌 Hog1 类似 MAPK 基因同源的 *Clmk-1* 基因,与其他植物病原真菌的同源基因比对,编码区数目基本一致。推测 *Clmk-1* 基因氨基酸的编码序列长度为 1 065 bp,共编码 354 个氨基酸的多肽。

Clmk-1 基因预测的编码序列与高渗透甘油途径的 MAPK 基因同源性很高,聚类分析处在同一个类群中。因此,可以推测该基因与渗透胁迫相关。最初该途径的 MAPK 基因认为与真菌的渗透胁迫相关,但是近年来研究发现,Hog1 类似 MAPK 基因还可行使其他功能。如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)中 Hog1 类似 MAPK 基因参与热胁迫、紫外线照射、冷胁迫及氧化胁迫的调控^[9]。在构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中 Hog1 类似 MAPK 基因调控碳和氮营养缺乏的感知^[10]。而在灰葡萄孢(*B. cinerea*)和禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)中 Hog1 类似 MAPK 基因分别调控病菌的致病性及次生产物的代谢^[11]。由此可知,这种类型 MAPK 基因在不同真菌中功能不同,而谷子弯孢病菌中 *Clmk-1* 基因具体功能还有待进一步研究。

通过 RACE 技术获得 *Clmk-1* 基因部分上游启动子区序列,利用生物信息学软件发现其启动子区包含 ADR、GCR 和 HSF 转录因子的顺势作用元件。ADR 转录因子参与真菌甘油及脂类代谢,而 GCR 转录因子及 HSF 转录因子分别参与真菌糖类代谢及热激反应。由此可推测当谷子弯孢病菌遇到胁迫时,这些转录因子激活 *Clmk-1* 基因,通过调控糖类、甘油及脂类代谢等生理过程来应对胁迫。

本试验克隆了谷子弯孢病菌 *Clmk-1* 基因,并利用 MAPK 基因特异性抑制剂初步分析了 MAPK 信号传递途径在谷子弯孢病菌分生孢子发育中的作

用。为了明确该基因的具体功能,下一步可以通过真菌基因敲出技术,获得谷子弯孢病菌 *Clmk-1* 基因缺失突变体,可以获知 Hog 同源的 MAPK 基因在谷子弯孢生长、发育及致病性中作用,为该病害的防治提供理论依据。

参考文献:

- [1] 任璐,刘惠平,韩巨才. 番茄早疫病菌 Hog1 MAPK 同源基因 *AsHog1* 的表达特性及其与抗药性的关联性[J]. 菌物学报 2010 29(4): 542–547.
- [2] Akihiro M,Junichi K,Chie M, et al. A MAPK kinase gene, BMK1, is required for conidiation and pathogenicity in the rice leaf spot pathogen *Bipolaris oryzae* [J]. Microbiological Research 2007 162: 108–114.
- [3] Segmüller N, Ellendorf U, Tudzynski B, et al. BcSAK1, a stress-activated mitogen-activated protein kinase, is involved in vegetative differentiation and pathogenicity in *Botrytis cinerea* [J]. Eucaryot Cell 2007 6: 211–221.
- [4] D hlemann G, Berndt P, Hahn M. Different signalling pathways involving a G-alpha protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia [J]. Mol Microbiol 2006 59: 821–835.
- [5] Rui O, Hahn M. The Slr2-type Map kinase Bmp3 of *Botrytis cinerea* is required for normal saprotrophic growth, conidiation, plant surface sensing, and host tissue colonization [J]. Mol Plant Pathol 2007 8: 173–184.
- [6] Salazar M, Vongsangnak W, Panagiotou G, et al. Uncovering transcriptional regulation of glycerol metabolism in *Aspergilli* through genome-wide gene expression data [J]. Molecular Genetics and Genomics 2009 282(6): 571–586.
- [7] Yang F, Liu R R, Lin J F, et al. Sequence analysis and cloning of gpd promoter from *Volvariella volvacea* [J]. Chinese Journal of Tropical Crops 2004 25(4): 72–77.
- [8] Yan J, Song W M, Eviatar N. A MAPK gene from dead sea fungus confers stress tolerance to lithium salt and freezing-thawing [J]. PNAS 2005 102(52): 18992–18997.
- [9] Gacto M, Soto T, Vicente-Soler J, et al. Learning from yeasts: intracellular sensing of stress conditions [J]. Int Microbiol 2003 6: 211–219.
- [10] Kawasaki L, Sanchez O, Shiozaki K, et al. SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans* [J]. Mol. Microbiol 2002 45: 1153–1163.
- [11] Ochiai N, Tokai T, Nishiuchi T, et al. Involvement of the osmosensor histidine kinase and osmotic stress-activated protein kinases in the regulation of secondary metabolism in *Fusarium graminearum* [J]. Biochem Biophys Res Commun 2007 363: 639–644.