

研究报告

灰葡萄孢丝裂原活化蛋白激酶编码基因 *bmp1* 和 *bmp3* 的功能袁雪梅[△] 王敏[△] 张强 白华 周帆 刘鹏飞 张康 邢继红* 董金皋*

河北省植物生理与分子病理学重点实验室 河北农业大学真菌毒素与植物分子病理学实验室 河北 保定 071000

摘要:【背景】植物病原真菌丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号途径参与病菌有性生殖、细胞壁完整、菌丝侵染、致病力、胁迫响应等过程,灰葡萄孢 MAPK 信号途径参与病菌生长发育、致病力以及胁迫响应,但 MAPK 信号途径基因在灰葡萄孢中的功能尚未完全阐明,该信号途径对灰葡萄孢的生长发育和致病力的调控机制尚不明确。【目的】明确灰葡萄孢 MAPK 编码基因 *bmp1*、*bmp3* 在病菌生长发育、致病力以及氧化胁迫响应过程的功能,为进一步阐明 MAPK 信号途径调控灰葡萄孢生长发育和致病力的分子机制奠定基础。【方法】利用 RNAi 技术构建灰葡萄孢 MAPK 编码基因 *bmp1* 和 *bmp3* 的 RNAi 突变体,并以野生型 BC22 菌株为对照,对 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的 RNAi 突变体的表型、致病力以及对氧化胁迫的敏感性进行分析。【结果】灰葡萄孢 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的 RNAi 突变体其菌落形态、菌丝形态均与野生型 BC22 菌株没有明显差别;*bmp1* 基因的 RNAi 突变体生长速率明显减慢,分生孢子产量明显降低;*bmp3* 基因的 RNAi 突变体的生长速率与野生型 BC22 菌株没有明显差别,不能产生分生孢子。*bmp1* 和 *bmp3* 基因的 RNAi 突变体在番茄果实的表面均不能产生明显的致病症状,而且不能穿透玻璃纸。*bmp1* 基因的 RNAi 突变体在含有 H₂O₂ 的培养基上受抑制的程度显著低于野生型,而在含甲萘醌的培养基上受抑制的程度显著高于野生型;*bmp3* 基因的 RNAi 突变体在含有 H₂O₂ 和甲萘醌的培养基受抑制的程度均显著高于野生型。【结论】灰葡萄孢 *bmp1* 基因正调控病菌生长、分生孢子形成、致病力和穿透能力,参与调控病菌对氧化胁迫的响应;灰葡萄孢 *bmp3* 基因正调控病菌分生孢子形成、致病力、穿透能力以及对氧化胁迫的响应。

关键词: 灰葡萄孢, *bmp1*, *bmp3*, 生长发育, 致病力, 氧化胁迫

Foundation items: Natural Science Foundation of Hebei Province (C2018204045); Higher Education Research Fund of Hebei Province (ZD2016001); Scientific Research Foundation for Returned Chinese Scholars of Hebei Province (0316012)

[△]These authors equally contributed to this work

*Corresponding authors: E-mail: XING Ji-Hong: xingjihong2000@126.com; DONG Jin-Gao: dongjingao@126.com

Received: 28-06-2018; Accepted: 30-08-2018; Published online: 11-09-2018

基金项目: 河北省自然科学基金(C2018204045); 河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2016001); 河北省留学人员科技活动择优资助项目(0316012)

[△]对本文贡献相同

*通信作者: E-mail: 邢继红: xingjihong2000@126.com; 董金皋: dongjingao@126.com

收稿日期: 2018-06-28; 接受日期: 2018-08-30; 网络首发日期: 2018-09-11

Function of mitogen-activated protein kinase encoding genes *bmp1* and *bmp3* in *Botrytis cinerea*

YUAN Xue-Mei^Δ WANG Min^Δ ZHANG Qiang BAI Hua ZHOU Fan LIU Peng-Fei
ZHANG Kang XING Ji-Hong* DONG Jin-Gao*

Key Laboratory of Hebei Province for Plant Physiology and Molecular Pathology, Mycotoxin and Molecular Plant Pathology Laboratory, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071000, China

Abstract: [Background] Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway of plant pathogenic fungi is involved in sexual reproduction, cell wall integrity, mycelial infection, pathogenicity, stress response and other processes. The MAPK signaling pathway is involved in the growth, development, pathogenicity and stress response in *Botrytis cinerea*. However, the function of MAPK signaling pathway gene has not been fully elucidated in *B. cinerea*. [Objective] The objective of this study is to analyze the function of *B. cinerea* MAPK encoding genes *bmp1* and *bmp3* in growth, development, pathogenicity and response to oxidative stress, and to lay a foundation for clarifying the molecular mechanism of the MAPK signaling pathway in growth, development and pathogenicity in *B. cinerea*. [Methods] RNAi mutants of *bmp1* and *bmp3* genes were successfully constructed using RNAi technology. Compared with the wild-type strain BC22 (WT), phenotype, pathogenicity, and sensitivity to oxidative stress of *bmp1* and *bmp3* genes RNAi mutants were analyzed. [Results] The colony morphology and mycelia morphology of *bmp1* and *bmp3* gene RNAi mutants showed no obvious difference with WT. The *bmp1* gene RNAi mutants grew slowly and produce fewer conidia. The growth rate of *bmp3* gene RNAi mutants showed no obvious difference with WT. The *bmp3* gene RNAi mutants did not produce conidia. RNAi mutants of *bmp1* and *bmp3* genes showed no pathogenicity and penetrating ability. RNAi mutants of *bmp1* gene were significantly less inhibited than those of WT in the media containing H₂O₂, while the degree of inhibition was significantly higher in the media containing menadione than that of WT. RNAi mutants of *bmp3* gene were significantly inhibited in H₂O₂ and menadione media than that of WT. [Conclusion] The *bmp1* gene positively regulated growth, conidial formation, pathogenicity and penetrability, and was involved in the regulation of the response to oxidative stress in *B. cinerea*. The *bmp3* gene positively regulates conidial formation, pathogenicity, penetrability, and response to oxidative stress in *B. cinerea*.

Keywords: *Botrytis cinerea*, *bmp1*, *bmp3*, Growth and development, Pathogenicity, Oxidative stress

丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号途径在植物病原真菌有性生殖、细胞壁完整性、菌丝侵染、附着胞形成、致病力和胁迫响应等方面起到非常重要的调控作用^[1]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)有 5 条 MAPK 信号途径,分别调控有性生殖、菌丝侵入性生长、细胞壁完整性、高渗胁迫响应和子囊孢子的形成^[2]。玉米瘤黑粉(*Ustilago maydis*)的 MAPK 信号途径参与调控有性生殖和寄生生长过程^[3]。稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)的 MAPK 信号途径调控附着胞形成的后期阶段及侵入阶段^[4]。灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*) MAPK 信号途径参与调控病菌生长发育、致病力以及响应胁迫过程,其主要包括

3 种类型的 MAPK 编码基因 *bmp1*^[5-6]、*bmp3*^[7]和 *bcsak1*^[8-9]。*bmp1* 基因的缺失突变体 $\Delta bmp1$ 生长速率减慢,分生孢子的产量降低,不能穿透寄主组织,分生孢子可以在寄主植物的表面萌发,但即使在受伤的植物上也不能在宿主组织中定殖,在康乃馨的花朵和西红柿叶片上均不致病^[5-6]; *bmp3* 基因的缺失突变体 $\Delta bmp3$ 的生长速率减慢,分生孢子形成受阻,不能产生菌核,对低渗胁迫、氧化胁迫和苯吡咯的敏感性增强^[7]; *bcsak1* 基因的缺失突变体 $\Delta bcsak1$ 的生长速度下降,不能产生分生孢子,菌核产生量增加,不能穿透未受伤的植物组织,致病力明显降低,对低渗胁迫和氧化胁迫敏感性增强^[8-9]。*bmp3* 和 *bcsak1* 下游的 *bcregl* 基因与致病力

也密切相关, *Δbcregl* 突变体不产生分生孢子, 能够穿透植物组织但不能形成致病斑^[10]。TCHK-MAPK 信号途径中 *BOS4*、*BOS5*、*BOS2* 与致病性密切相关, 其敲除突变体致病力均完全丧失, *BOS5* 敲除突变体菌丝的生长速率远远低于野生型菌株, 虽能够穿透寄主细胞, 但是菌丝的形态发生严重畸形^[11]。此外, 编码 MAPK 激酶(MAPKK) *Ste7*、MAPKK 激酶(MAPKKK) *Ste11*、假定 MAPK 衔接蛋白 *Ste50* 的基因和 *Bmp1* 下游的 *Ste12* 转录因子也影响病菌的致病力、分生孢子的萌发、营养生长和菌核的形成等方面^[7,12]。以上结果均说明灰葡萄孢 MAPK 信号途径在病菌的生长发育、致病力以及响应胁迫过程中发挥重要的功能。但 MAPK 信号途径基因在灰葡萄孢中的功能尚未完全阐明, 该信号途径对灰葡萄孢的生长发育和致病力的调控机制尚不明确。

为明确灰葡萄孢 MAP 激酶编码基因 *bmp1* 和 *bmp3* 在病菌生长发育、致病和响应胁迫过程中的功能, 本研究利用 RNAi 技术构建 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的 RNAi 突变体, 通过将 RNAi 突变体的表型、致病力和对胁迫处理的敏感性与野生型 BC22 菌株进行比较, 确定 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的功能, 为阐明 MAPK 信号途径对灰葡萄孢生长发育和致病力的调控机制奠定基础, 同时为其它植物病原真菌中 MAPK 信号途径的研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和载体

灰葡萄孢野生型 BC22 菌株、RNAi 载体 pK7GW1WG2、根癌农杆菌 AGL-1 菌株, 均由河北农业大学真菌毒素与植物分子病理学实验室保存。

1.1.2 主要试剂和仪器

pCRTM8/GW/TOPO[®] TA Cloning Kit、Gateway[®] LR ClonaseTM II Enzyme Mix, Invitrogen 公司; 高保真聚合酶 *LA-Taq*、dNTPs、大肠杆菌 DH5 α 感受

态细胞、PrimeScriptTM RT Reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), TaKaRa 公司; RNA 提取试剂 Trizol up、壮观霉素、卡那霉素, 北京全式金生物技术有限公司; 头孢噻肟、草铵膦, Roche 生物公司。SPX 智能型生化培养箱, 宁波江南仪器厂; 基因扩增仪, 东胜创新生物科技有限公司。

1.2 *bmp1* 和 *bmp3* 基因 RNAi 载体的构建

根据 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的 cDNA 序列设计基因特异性引物(表 1)。提取灰葡萄孢野生型菌株的 RNA, 反转录合成 cDNA, 用高保真的 *LA-Taq* 对 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的特异片段进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L): 模板 cDNA 2 μ L, 10 \times PCR buffer (含 Mg²⁺) 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 8 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, *LA-Taq* (5 U/ μ L) 1 μ L, ddH₂O 32 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 共 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 进行目的条带的回收、克隆。将目的基因片段与 Gateway 克隆载体 pCR8 进行连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 利用载体特异性引物 M13 进行阳性克隆的 PCR 检测, PCR 检测为阳性的克隆进行测序验证, 将测序鉴定正确的质粒 pCR8-*bmp1* 和 pCR8-*bmp3* 分别与 RNAi 载体 pK7GW1WG2 进行 LR 重组反应, 反应产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 阳性克隆进行 PCR 检测和测序验证后进行重组质粒 pK7GW1WG2-*bmp1* 和 pK7GW1WG2-*bmp3* 的提取。

1.3 农杆菌介导的遗传转化

将重组质粒 pK7GW1WG2-*bmp1*、pK7GW1WG2-*bmp3* 分别转化农杆菌 AGL-1 的感受态细胞后, 与灰葡萄孢野生型 BC22 菌株的分生孢子悬浮液(1×10^6 个/mL)混合, 涂布于 IAM 培养基上的硝酸纤维素膜上, 20 $^{\circ}$ C 培养 48 h, 将硝酸纤维素膜转移至含有 200 μ g/mL 头孢噻肟和 100 μ g/mL 草铵膦的 LCA 培养基上, 20 $^{\circ}$ C 培养 7–12 d, 直至长出转化子。

表 1 实验所用引物信息
Table 1 Primers used in this study

基因名称 Genes name	引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequence (5'→3')	产物大小 Product size (bp)
<i>bmp1</i>	<i>bmp1</i> -F	AGCTCGTGCGCCTAATCCCGCCTCG	279
	<i>bmp1</i> -R	ACTCATAGTTTCTTGGCTTCTGGATGT	
<i>bmp3</i>	<i>bmp3</i> -F	ATGGCAGACCTGCAAGGAAGAAAGGTC	272
	<i>bmp3</i> -R	ATATCCATATCATAAAGGCAGGTAA	
<i>Kan</i>	<i>Kan</i> -F	TGTAACACGACGGCCAG	620
	<i>Kan</i> -R	TTACGCCCCGCCCTGCCACTCAT	
<i>Tubulin</i>	<i>Tubulin</i> -F	TCTGGCGAGCACGGTCTTGACGGTT	141
	<i>Tubulin</i> -R	CTGGCTCCAAATCGACGAGGACGGCA	
M13	M13-F	TGTAACACGACGGCCAG	316
	M13-R	CCAGGAACAGCTATGACC	

1.4 转化子的筛选与鉴定

利用 LCA 筛选培养基对转化子进行多次抗性筛选。利用 PCR 和 Real-time PCR 技术对所获得的转化子进行分子鉴定。以各转化子的 DNA 为模板，利用 RNAi 载体的 *kan* 基因特异引物进行 PCR 检测。同时，以各转化子的 cDNA 为模板，利用 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的特异引物进行 Real-time PCR 检测，以确定转化子中 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的表达水平是否受到干扰。

1.5 RNAi 突变体的表型分析

将灰葡萄孢野生型 BC22 菌株和 *bmp1*、*bmp3* 基因的 RNAi 突变体分别接种到 PDA 培养基上，20 °C 黑暗条件下培养，每隔 24 h 测量一次菌落直径，计算各菌株的生长速率。同时进行菌落形态和菌丝形态的观察。

在培养 15 d 的各菌株培养皿中分别加入 10 mL 无菌去离子水，并以毛笔轻刷菌落表面，获得各菌株的菌体悬浮液，4 层纱布过滤去除菌丝体，获得其分生孢子悬浮液，用血球计数板统计各菌株的分生孢子产量。

1.6 RNAi 突变体的致病力测定

将灰葡萄孢野生型 BC22 菌株和 *bmp1*、*bmp3* 基因的 RNAi 突变体的菌盘($\Phi=8$ mm)分别接种到番

茄果实的表面，进行致病力测定。接种后的番茄果实置于 20 °C 保湿处理，每天观察番茄接种部位的发病情况，重复 3 次。

1.7 RNAi 突变体的穿透能力测定

将灰葡萄孢野生型 BC22 菌株和 *bmp1*、*bmp3* 基因的 RNAi 突变体菌株分别定量接种到铺有玻璃纸的水琼脂培养上，在 20 °C 条件下黑暗培养，显微镜下观察各菌株穿透玻璃纸的情况。

1.8 RNAi 突变体对氧化胁迫的敏感性测定

将灰葡萄孢野生型 BC22 菌株和 *bmp1*、*bmp3* 基因的 RNAi 突变体菌株分别接种于含 10 mmol/L H₂O₂ 和 250 μ mol/L 甲萘醌的 PDA 培养基上，观察各菌株对氧化胁迫的敏感性情况，并进行抑制率计算。

2 结果与分析

2.1 *bmp1* 和 *bmp3* 基因 RNAi 载体的构建及农杆菌的遗传转化

利用 Gateway 技术成功获得 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的 RNAi 载体 pK7GW1WG2-*bmp1* 和 pK7GW1WG2-*bmp3* (图 1A)。将 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的 RNAi 载体分别转化农杆菌 AGL-1，菌落 PCR 检测均获得了目的条带(图 1B、C)，表明 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的 RNAi 载体成功转入农杆菌 AGL-1 中。

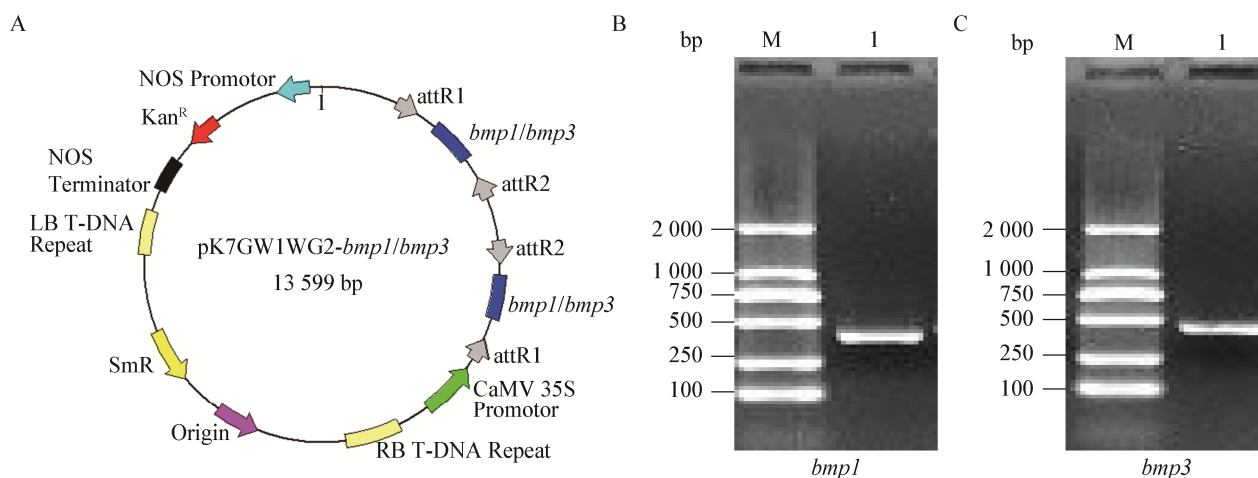


图1 *bmp1* 和 *bmp3* 基因 RNAi 载体的构建及农杆菌转化的 PCR 鉴定

Figure 1 Construction and *Agrobacterium* transformation of *bmp1* and *bmp3* genes RNAi vectors

注: A: *bmp1* 和 *bmp3* 基因的 RNAi 载体图谱; B: pK7GW1WG2-*bmp1* 转化农杆菌的 PCR 鉴定; C: pK7GW1WG2-*bmp3* 转化农杆菌的 PCR 鉴定。M: DNA marker.

Note: A: RNAi vector of *bmp1* and *bmp3* gene; B: PCR identification of *Agrobacterium* transformed pK7GW1WG2-*bmp1*; C: PCR identification of *Agrobacterium* transformed pK7GW1WG2-*bmp3*. M: DNA marker.

2.2 RNAi 转化子的筛选与鉴定

利用农杆菌介导的遗传转化方法, 将 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的 RNAi 载体 pK7GW1WG2-*bmp1* 和 pK7GW1WG2-*bmp3* 分别转化灰葡萄孢野生型 BC22 菌株, 经过多次的抗性筛选后分别获得了 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的 3 株 RNAi 转化子 ibmp1-1、ibmp1-2 和 ibmp1-3 以及 ibmp3-1、ibmp3-2 和 ibmp3-3。PCR 鉴定转化子发现各转化子中均获得了单一的目的条带, 而野生型 BC22 菌株中无扩增产物(图 2A、B)。进一步利用 Real-time PCR 技术检测 RNAi 转化子中 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的表达水平, 发现转化子中 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的表达水平均显著低于野生型, 转化子 ibmp1-1、ibmp1-2 和 ibmp1-3 中 *bmp1* 基因的表达水平分别为野生型的 0.47、0.49 和 0.29 倍(图 2C), 转化子 ibmp3-1、ibmp3-2 和 ibmp3-3 中 *bmp3* 基因的表达水平分别为野生型的 0.01、0.68 和 0.49 倍(图 2D), 表明 *bmp1* 和 *bmp3* 基因的 RNAi 突变体构建成功。

2.3 RNAi 突变体的表型分析

对 *bmp1* 和 *bmp3* 基因 RNAi 突变体的菌落形

态、菌丝形态、生长速率、分生孢子产量进行分析的结果发现, 与野生型 BC22 菌株相比, 培养 3 d 的 *bmp1* 基因 RNAi 突变体的菌落和菌丝形态没有明显变化(图 3A), 菌丝的生长速率明显减慢(图 3B), 分生孢子产量显著降低(图 3C); *bmp3* 基因 RNAi 突变体的菌落和菌丝形态也没有明显变化(图 3D), 生长速率与野生型没有明显差别(图 3E), 不产生分生孢子(图 3F)。结果表明, *bmp1* 基因正调控病菌的生长、分生孢子的形成; *bmp3* 基因正调控病菌分生孢子的形成, 对病菌的生长没有影响。

2.4 RNAi 突变体的致病力测定

将野生型 BC22 和 *bmp1*、*bmp3* 基因的 RNAi 突变体分别接种到番茄果实的表面进行了致病力测定, 结果发现, 接种 3 d 后, 野生型 BC22 的番茄果实表面出现了大面积的水渍状病斑, 而接种 *bmp1* 和 *bmp3* 基因 RNAi 突变体的番茄果实表面均未出现明显的病斑(图 4), 表明 *bmp1* 和 *bmp3* 基因正调控灰葡萄孢的致病力。

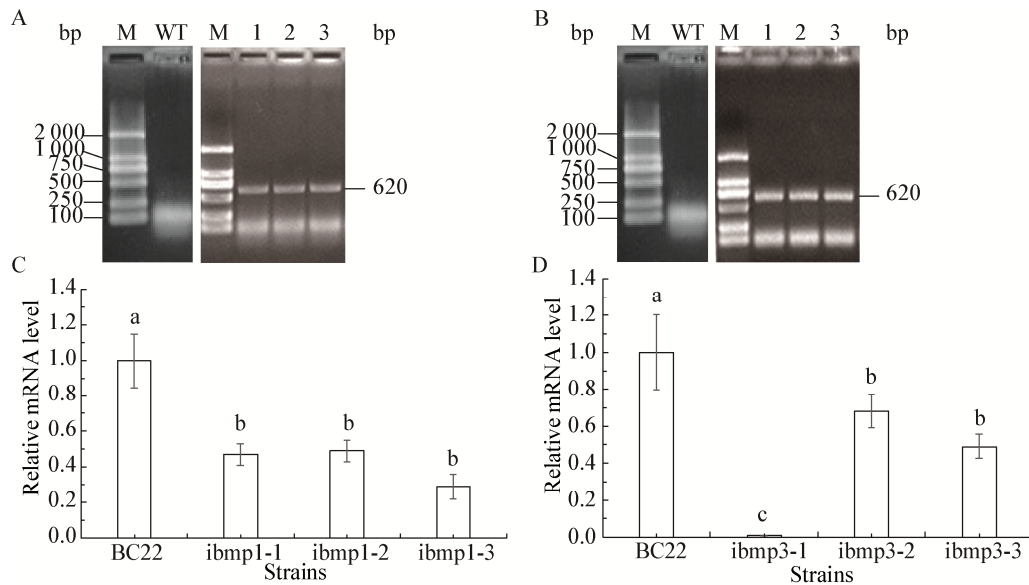


图2 *bmp1* 和 *bmp3* 基因 RNAi 转化子的鉴定

Figure 2 Identification of *bmp1* and *bmp3* genes RNAi transformants

注: A: *bmp1* 基因 RNAi 转化子的 PCR 鉴定; M: Marker; WT: 野生型 BC22; 1: 转化子 ibmp1-1; 2: 转化子 ibmp1-2; 3: 转化子 ibmp1-3. B: *bmp3* 基因 RNAi 转化子的 PCR 鉴定; M: Marker; WT: 野生型 BC22; 1: 转化子 ibmp3-1; 2: 转化子 ibmp3-2; 3: 转化子 ibmp3-3. C: *bmp1* 基因 RNAi 转化子中 *bmp1* 基因的表达分析. D: *bmp3* 基因 RNAi 转化子中 *bmp3* 基因的表达分析.

Note: A: PCR identification of *bmp1* gene RNAi transformants; M: Marker; WT: Wild type BC22; 1: Transformant ibmp1-1; 2: Transformant ibmp1-2; 3: Transformant ibmp1-3. B: PCR identification of *bmp3* gene RNAi transformants; M: Marker; WT: Wild-type BC22; 1: Transformant ibmp3-1; 2: Transformant ibmp3-2; 3: Transformant ibmp3-3. C: Expression analysis of *bmp1* gene in RNAi transformants. D: Expression analysis of *bmp3* gene in RNAi transformants.

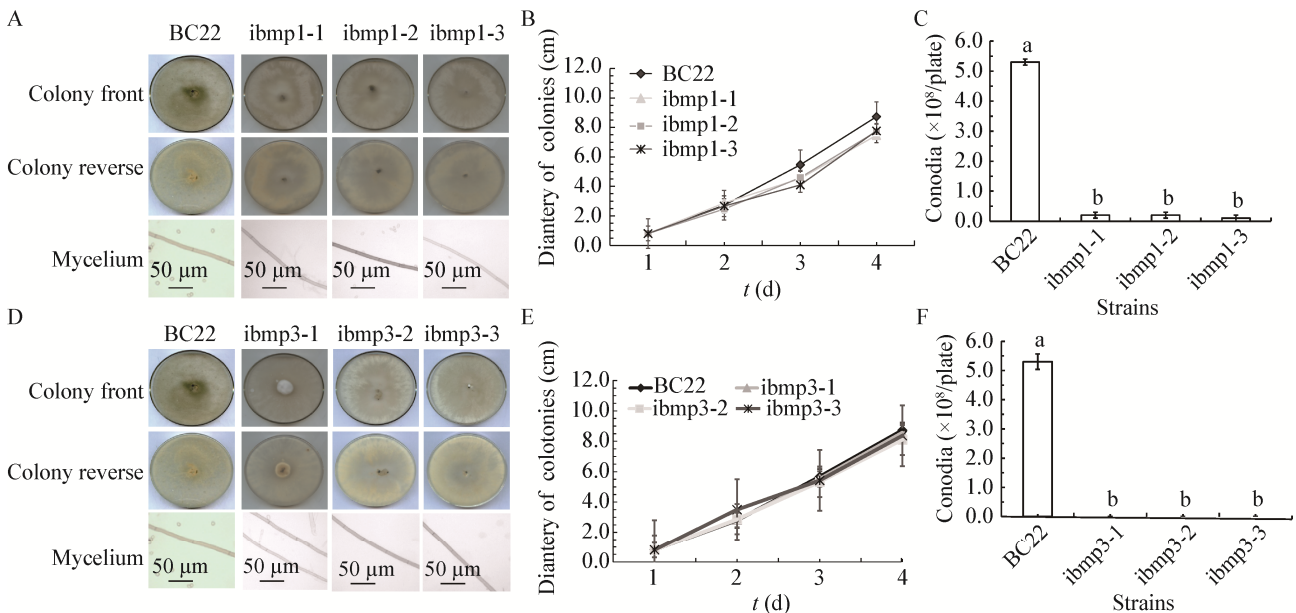
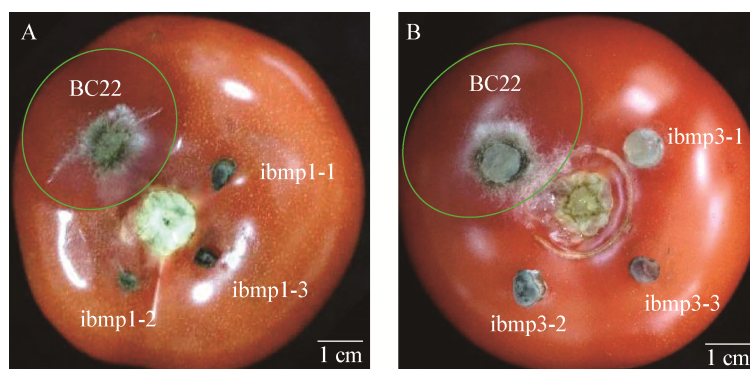


图3 *bmp1* 和 *bmp3* 基因 RNAi 突变体的表型分析

Figure 3 Phenotype analysis of *bmp1* and *bmp3* genes RNAi mutants

注: A: *bmp1* 基因 RNAi 突变体的菌落和菌丝形态; B: *bmp1* 基因 RNAi 突变体的生长速率; C: *bmp1* 基因 RNAi 突变体的产孢量; D: *bmp3* 基因 RNAi 突变体的菌落和菌丝形态; E: *bmp3* 基因 RNAi 突变体的生长速率; F: *bmp3* 基因 RNAi 突变体的产孢量.

Note: A: Colony and mycelial morphology of *bmp1* gene RNAi mutants; B: Growth rate of *bmp1* gene RNAi mutants; C: Conidiation of *bmp1* gene RNAi mutants; D: Colony and mycelial morphology of *bmp3* gene RNAi mutants; E: Growth rate of *bmp3* gene RNAi mutants; F: Conidiation of *bmp3* gene RNAi mutants.

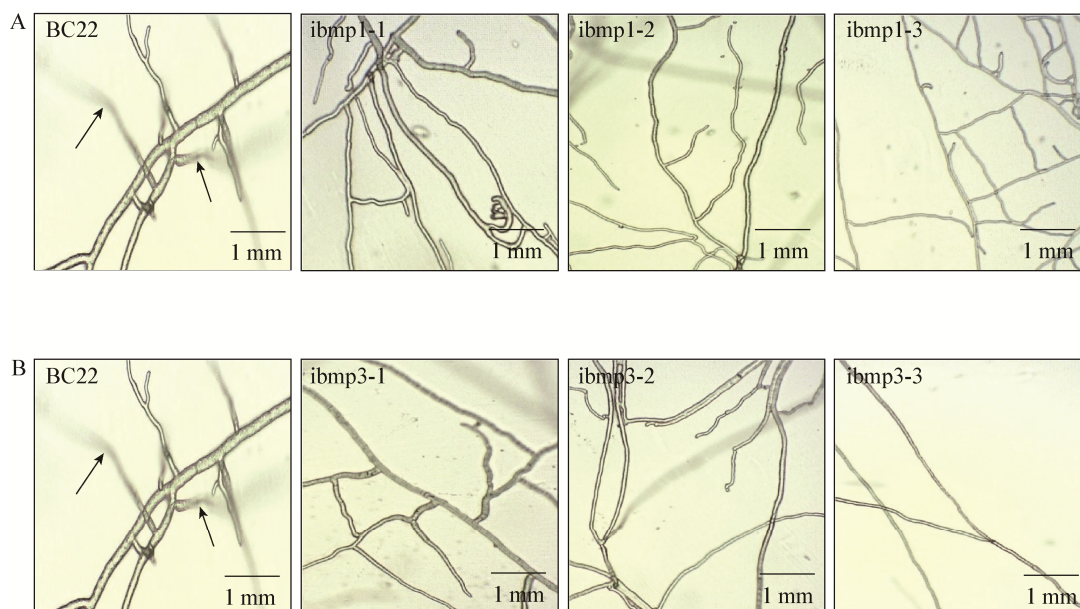
图 4 *bmp1* (A)和 *bmp3* (B)基因 RNAi 突变体的致病力测定Figure 4 Pathogenicity analysis of *bmp1* (A) and *bmp3* (B) genes RNAi mutants

2.5 RNAi 突变体的穿透能力测定

利用玻璃纸检测野生型 BC22 和 *bmp1*、*bmp3* 基因 RNAi 突变体的穿透能力, 结果(图 5)发现, 野生型 BC22 菌株能穿透玻璃纸, 产生侵入菌丝, 而 *bmp1* 和 *bmp3* 基因 RNAi 突变体均不能穿透玻璃纸, 表明 *bmp1* 和 *bmp3* 基因突变影响病菌的穿透能力。

2.6 RNAi 突变体对氧化胁迫的敏感性测定

将野生型 BC22 和 *bmp1*、*bmp3* 基因的 RNAi 突变体分别接种到含有 H_2O_2 和甲萘醌的 PDA 培养基上, 检测 *bmp1*、*bmp3* 基因 RNAi 突变体对氧化胁迫的敏感性。结果(图 6)发现, 接种 3 d 后, 野生型 BC22 和 *bmp1*、*bmp3* 基因 RNAi 突变体在含有 H_2O_2 和甲萘醌的 PDA 培养基上均受到明显抑制,

图 5 *bmp1* (A)和 *bmp3* (B)基因 RNAi 突变体的穿透能力测定Figure 5 Penetrability analysis of *bmp1* (A) and *bmp3* (B) genes RNAi mutants

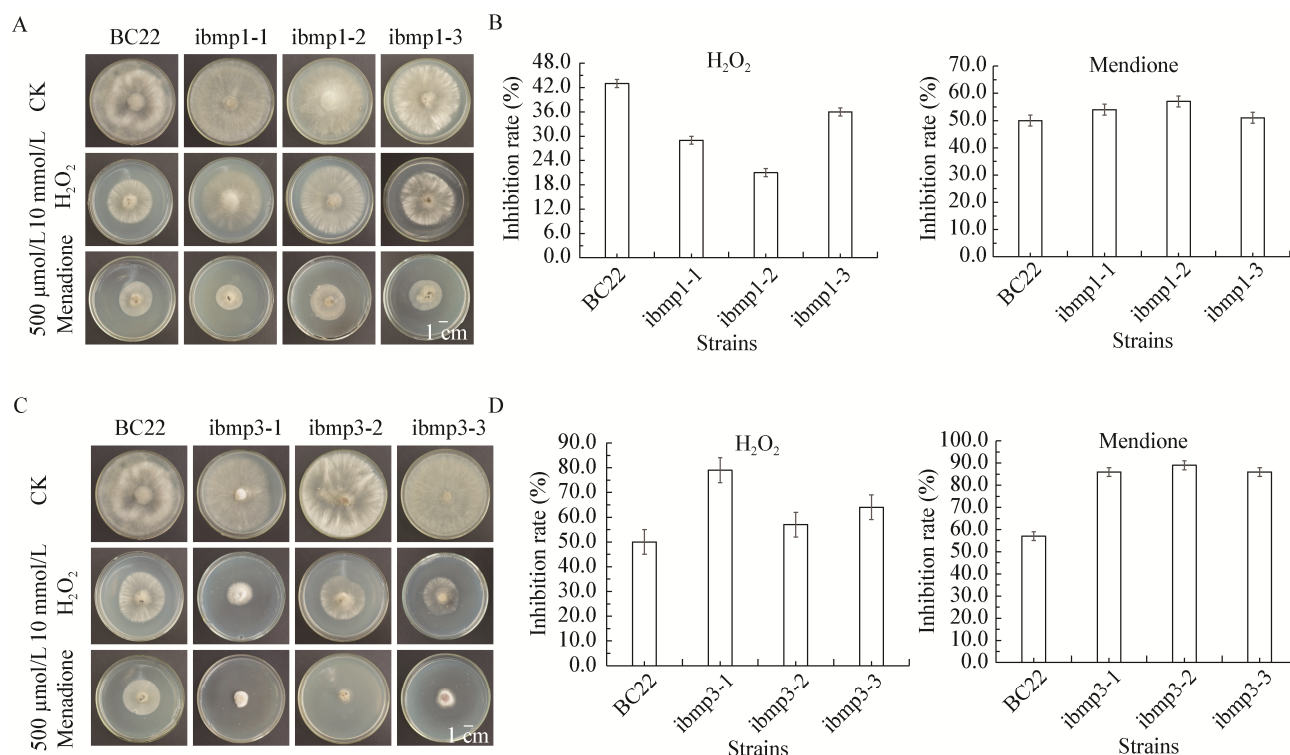


图6 *bmp1* 和 *bmp3* 基因 RNAi 突变体对 H_2O_2 和甲萘醌的敏感性测定

Figure 6 Sensitivity of *bmp1* and *bmp3* genes RNAi mutants to H_2O_2 and menadione

注: A、C: RNAi 突变体过氧化氢和甲萘醌的敏感性测定; B、D: 抑制率测定

Note: A, C: Sensitivity of RNAi mutants to H_2O_2 and menadione; B, D: Determination of inhibition rate.

bmp1 基因的 RNAi 突变体在含有 H_2O_2 的 PDA 培养基上受抑制的程度显著低于野生型,而在含甲萘醌的 PDA 培养基上受抑制的程度显著高于野生型; *bmp3* 基因的 RNAi 突变体在含有 H_2O_2 和甲萘醌的 PDA 培养基上受抑制的程度均显著高于野生型,表明 *bmp1*、*bmp3* 基因突变影响病菌对氧化胁迫的响应。

3 讨论与结论

灰葡萄孢 MAPK 信号途径参与病菌的生长、发育和致病过程^[13-15], MAP 激酶编码基因 *bmp1* 参与调控菌丝生长、分生孢子形成、附着胞形成与穿透^[6,13], MAP 激酶编码基因 *bmp3* 参与调控菌丝生长、分生孢子和菌核形成^[7,14-15]。本研究中, *bmp1* 基因的 RNAi 突变体的表型和致病力与 $\Delta bmp1$ 突变体(野生型菌株为 B05.10)基本一致, *bmp1* 基因的

RNAi 突变体生长速率明显减慢,分生孢子产量明显降低,在番茄果实的表面均不能产生明显的致病症状,此结果与 $\Delta bmp1$ 突变体一致,表明 *bmp1* 基因正调控灰葡萄孢生长、分生孢子形成和致病力。 *bmp3* 基因的 RNAi 突变体的生长速率与野生型 BC22 菌株没有明显差别,不能产生分生孢子,在番茄果实的表面均不能产生明显的致病症状,这与 $\Delta bmp3$ 突变体(野生型菌株为 B05.10)的表型和致病力不完全相同; $\Delta bmp3$ 突变体生长速率减慢,分生孢子数量显著降低,不能产生菌核,致病力减弱^[7],表明 *bmp3* 基因缺失突变体和表达水平降低引起的表型具有一定的差异。

灰葡萄孢 MAP 激酶编码基因 *bmp3* 参与病菌对渗透胁迫和氧化应激的响应^[7]。 $\Delta bmp3$ 突变体在渗透胁迫培养基上的生长速率明显降低^[7]。 H_2O_2 作为一种强氧化剂,是生物体内最丰富的活性氧分子;

甲萘醌能在有氧代谢细胞内产生 O_2^- 或者通过消耗 NADPH 减少分子氧产生超氧化物歧化酶, 而胞内的超氧化物歧化酶是 O_2^- 的专一清除剂, 可以将 O_2^- 转变为内源的 H_2O_2 ^[16]。此外, 研究已经证明甲萘醌可诱导真菌产生氧化应激反应^[9,16-20]。本研究发现 *bmp1* 基因的 RNAi 突变体对 H_2O_2 的敏感性显著降低, 对甲萘醌的敏感性显著增强; *bmp3* 基因的 RNAi 突变体对 H_2O_2 和甲萘醌的敏感性均显著增强, 结果表明灰葡萄孢 *bmp1* 和 *bmp3* 基因参与病菌对氧化胁迫的响应, 但 *bmp1* 和 *bmp3* 基因调控病菌对氧化胁迫响应的机制尚未明确, 需进一步深入研究。

REFERENCES

- [1] Hamel LP, Nicole MC, Duplessis S, et al. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers[J]. *The Plant Cell*, 2012, 24(4): 1327-1351
- [2] Chen RE, Thorner J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2007, 1773(8): 1311-1340
- [3] Brefort T, Doehlemann G, Mendoza-Mendoza A, et al. *Ustilago maydis* as a pathogen[J]. *Annual Review of Phytopathology*, 2009, 47: 423-445
- [4] Zhao XH, Kim Y, Park G, et al. A mitogen-activated protein kinase cascade regulating infection-related morphogenesis in *Magnaporthe oryzae*[J]. *The Plant Cell*, 2005, 17(4): 1317-1329
- [5] Leroy M, Mueller N, Hinsenkamp I, et al. The signalling mucin Msb2 regulates surface sensing and host penetration via BMP1 MAP kinase signalling in *Botrytis cinerea*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2015, 16(8): 787-798
- [6] Zheng L, Campbell M, Murphy J, et al. The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2000, 13(7): 724-732
- [7] 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]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(2): 173-184
- [8] Heller J, Ruhnke N, Espino JJ, et al. The mitogen-activated protein kinase BcSak1 of *Botrytis cinerea* is required for pathogenic development and has broad regulatory functions beyond stress response[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2012, 25(6): 802-816
- [9] 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]. *Eukaryotic Cell*, 2007, 6(2): 211-221
- [10] Michiels CB, Becker M, Heller J, et al. The *Botrytis cinerea* Reg1 protein, a putative transcriptional regulator, is required for pathogenicity, conidiogenesis, and the production of secondary metabolites[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(9): 1074-1085
- [11] Yan LY, Yang QQ, Sundin GW, et al. The mitogen-activated protein kinase kinase BOS5 is involved in regulating vegetative differentiation and virulence in *Botrytis cinerea*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(9): 753-760
- [12] Schamber A, Leroy M, Diwo J, et al. The role of mitogen-activated protein (MAP) kinase signalling components and the Ste12 transcription factor in germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2010, 11(1): 105-119
- [13] Doehlemann G, Berndt P, Hahn M. Different signalling pathways involving a Gα protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 59(3): 821-835
- [14] Choquer M, Fournier E, Kunz C, et al. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphagous pathogen[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 277(1): 1-10
- [15] Nakajima M, Akutsu K. Virulence factors of *Botrytis cinerea*[J]. *Journal of General Plant Pathology*, 2014, 80(1): 15-23
- [16] Zhao W, Panepinto JC, Fortwendel JR, et al. Deletion of the regulatory subunit of protein kinase A in *Aspergillus fumigatus* alters morphology, sensitivity to oxidative damage, and virulence[J]. *Infection and Immunity*, 2006, 74(8): 4865-4874
- [17] Temple MD, Perrone GG, Dawes IW. Complex cellular responses to reactive oxygen species[J]. *Trends in Cell Biology*, 2005, 15(6): 319-326
- [18] Sun JS, Tsuang YH, Huang WC, et al. Menadione-induced cytotoxicity to rat osteoblasts[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 1997, 53(11/12): 967-976
- [19] Viaud M, Fillinger S, Liu WW, et al. A class III Histidine Kinase acts as a novel virulence factor in *Botrytis cinerea*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2006, 19(9): 1042-1050
- [20] Hong JK, Kim HJ, Jung H, et al. Differential control efficacies of vitamin treatments against bacterial wilt and grey mould diseases in tomato plants[J]. *The Plant Pathology Journal*, 2016, 32(5): 469-480