

CsSSK1 基因调控暹罗炭疽菌胁迫应答和致病性的功能分析

鲁婧文, 关小灵, 李 潇, 张 宇, 缪卫国, 林春花*

海南大学热带农林学院/热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海南海口 570228

摘 要: 暹罗炭疽菌 (*Colletotrichum siamense*) 是热带、亚热带地区许多农林作物炭疽病的主要病原菌。SSK1 是双组分系统中的应答调节蛋白, 已有研究显示病原真菌中的 SSK1 与病原菌的形态建成、胁迫反应、耐药性和致病力有关, 但在不同菌中其功能存在差异。为了解暹罗炭疽菌中同源基因 *CsSSK1* 的功能, 本研究利用同源重组法构建了 *CsSSK1* 基因缺失突变体 $\Delta CsSSK1$ 和回补菌株 $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$, 对其进行表型观察。结果显示: 与野生型菌株相比, 形态发育上, 缺失突变体 $\Delta CsSSK1$ 的菌丝生长速率略有降低, 分生孢子较短且产孢量低, 孢子萌发率也降低; 胁迫应答上, $\Delta CsSSK1$ 显著提高了炭疽菌对 NaCl、山梨醇、蔗糖、葡萄糖、刚果红胁迫的敏感性, 提高了对氟康唑和戊唑醇的敏感性, 但降低了对咯菌腈的敏感性; 致病功能方面, *CsSSK1* 基因缺失明显降低了致病力。研究结果表明 *CsSSK1* 基因参与调控暹罗炭疽菌的形态建成, 应答盐胁迫、渗透胁迫、刚果红胁迫反应, 参与药剂敏感性调控, 影响暹罗炭疽菌的致病能力。本研究结果为深入了解暹罗炭疽菌 *CsSSK1* 基因功能, 解析病原真菌应答胁迫反应的分子机理奠定基础。

关键词: 暹罗炭疽菌; *CsSSK1* 基因; 功能分析; 药剂敏感性; 致病性

中图分类号: S763.7

文献标识码: A

Functional Analysis of *CsSSK1* Gene in Response to Stress Response and Virulence in *Colletotrichum siamense*

LU Jingwen, GUAN Xiaoling, LI Xiao, ZHANG Yu, MIAO Weiguo, LIN Chunhua*

College of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University / Key Laboratory of Green Prevention and Control of Tropical Plant Diseases and Pests, Ministry of Education, Haikou, Hainan 570228, China

Abstract: *Colletotrichum siamense* is the main pathogen of anthracnose in many crops in tropical and subtropical regions. SSK1 is a response regulator protein of the two-component system. Studies have shown that SSK1 in pathogenic fungi is related to the morphogenesis, stress response, drug resistance and pathogenicity of pathogens, but SSK1 homologues have distinct functions in different fungi. In order to understand the function of *CsSSK1* in *C. siamense*, the *CsSSK1* gene deletion mutant $\Delta CsSSK1$ and the complement strain $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$ were constructed and phenotypically observed. The results showed that the deletion mutant $\Delta CsSSK1$ showed slightly retarded mycelial growth, shorter conidia, lower sporulation and conidial germination rate. $\Delta CsSSK1$ significantly increased the sensitivity of *C. siamense* to NaCl, sorbitol, sucrose, glucose and Congo red, and the sensitivity to fluconazole and tebuconazole, but decreased the sensitivity to fludioxonil. The pathogenicity of $\Delta CsSSK1$ was significantly reduced. The results showed that *CsSSK1* gene was involved in the regulation of *C. siamense* morphogenesis, response to salt stress, osmotic stress, Congo red stress and fungicide stress, affecting the pathogenicity of *C. siamense*. The results would lay a foundation for further understanding the function of *CsSSK1* gene in *C. siamense* and analyzing the molecular mechanism of pathogenic fungi response to stress.

Keywords: *Colletotrichum siamense*; *CsSSK1* gene; functional analysis; fungicide sensitivity; virulence

DOI: 10.3969/j.issn.1000-2561.2024.03.020

收稿日期 2022-11-30; 修回日期 2022-12-28

基金项目 海南省自然科学基金项目 (No. 320RC477); 国家自然科学基金项目 (No. 32160613); 现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (No. CARS-33-BC1)。

作者简介 鲁婧文(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 植物病理学。*通信作者 (Corresponding author): 林春花 (LIN Chunhua), E-mail: lin3286320@126.com。

微生物在环境中生长发育和繁殖,必须通过一系列复杂的细胞信号网络来感知并适应各种环境压力。双组分系统(two-component signaling system, TCS)是细菌、真菌、粘菌及高等植物中普遍存在的一类信号传递调节系统,在细胞应答胁迫响应、调控病原菌药剂敏感性和毒力中发挥重要作用^[1]。真核生物的TCS通常由组氨酸激酶(histidine kinase, HK)、组氨酸基团的磷酸转移蛋白(phosphotransferase, HPt)及应答调节蛋白(response regulator, RR)三部分构成^[2],如模式生物酵母的双组分系统由Sln1-Ypd1-Ssk1组成^[3]。已有研究显示双组分信号蛋白对真菌病原体胁迫反应和抗药性的重要性,如尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)中组氨酸激酶FHK1缺失对高渗胁迫和氧胁迫敏感,增强对吡咯类药剂的抗性^[4];稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)中同源的组氨酸激酶HIK1的缺失突变体对高渗透压有影响,但对致病力影响不大。同时发现稻瘟菌(*M. oryzae*)双组分系统2个RR基因(*MoSSK1*和*MoSKN7*)共同调控稻瘟菌对渗透压和咯菌腈的敏感性^[5-6]。

SSK1是双组分系统的应答调控蛋白,在真核细胞中充当接收和传递信号的功能^[7-8]。大量研究显示,病原真菌中的SSK1与病原菌的形态建成、胁迫反应、耐药性和致病力有关,但在不同病原菌中其功能存在差异。如在稻瘟菌(*M. oryzae*)中的*MoSSK1*参与对渗透胁迫的响应以及对咯菌腈的敏感性调控^[9];在灰霉菌(*Botrytis cinerea*)中,*SSK1*同源基因的缺失丧失产孢能力,对渗透胁迫和氧胁迫敏感,并且对异菌脲、咯菌腈和三唑酮敏感性增强^[10];在大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)中*VdSsk1*基因与病原菌的压力胁迫反应、黑色素的合成和致病力相关,还与咯菌腈、异菌脲等杀菌剂敏感性调控有关^[11];而在白念珠菌(*Candida albicans*)中*SSK1*缺失突变体对高盐敏感并且参与氟康唑敏感性调控^[12-13];但在克鲁氏乳酸酵母菌(*Kluyveromyces lactis*)中*SSK1*基因不影响高渗敏感性^[14];在丝状真菌柄孢霉(*Podospora anserina*)中*PaSSK1*基因也不影响氟康唑敏感性^[15]。此外,*SSK1*在炭疽菌中的功能尚无报道。

炭疽菌(*Colletotrichum* spp.)是一类重要的植物病原丝状真菌,引起许多果树、蔬菜等重要经济作物的炭疽病^[16]。暹罗炭疽菌(*C. siamense*)是胶孢炭疽菌复合群中的一个种,是我国橡胶树炭疽病的田间优势病原种,也是许多热带、亚热

带作物的主要病原菌,如芒果^[17]、荔枝^[18]、咖啡^[19]、槟榔^[20]等。本课题组前期已克隆了暹罗炭疽菌*CsSSK1*基因序列,本研究基于已有基础,利用同源重组替换技术,构建暹罗炭疽菌的双组分系统中*CsSSK1*基因缺失突变体和回补菌株,并进行表型观察,研究结果不仅有助于进一步了解暹罗炭疽菌中的*CsSSK1*基因功能,还可为深入了解病原菌如何应答胁迫反应的分子机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和质粒:暹罗炭疽菌(*C. siamense*) HN08菌株分离自海南省琼中新进农场橡胶树病叶,由本实验室分离、鉴定、保存,重组载体pCX62-S(含抗性基因*ILV1*)由本实验室前期构建并保存;酵母感受态XK-125、回补载体pXY203(S-tag标签、潮霉素抗性基因*HPH*)由本实验室保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 感受态细胞购自上海唯地生物技术有限公司。

培养基:PDA培养基、PDS培养基、CM培养基、DCM培养基、TB₃培养基、YPD培养基、SD/-Trp培养基、LB培养基,配置方法参照参考文献[8]。

供试药剂:99.5%氯化钠(NaCl)、98%山梨醇(sorbitol)、98%葡萄糖(glucose)、99.7%蔗糖(sucrose),均购自西陇科学股份有限公司;Congo red(刚果红)购于北京拜尔迪生物技术有限公司。使用前将99.3%咯菌腈原药(广州硕普生物科技有限公司)用无菌水溶解,配置成50 mg/mL的母液;99%氟康唑原药(海南正业中农高科股份有限公司)用无菌水溶解,配置成5 mg/mL的母液;97%戊唑醇原药(海南正业中农高科股份有限公司)用无菌水溶解,配置成50 mg/mL的母液。

试剂:限制性内切酶*Xho* I、*Eco*R I、T₄连接酶购自宝生物工程(大连)有限公司;通用型DNA纯化回收试剂盒、DNA提取试剂盒及质粒提取试剂盒购自美国Omega公司;溶壁酶购自广州微生物研究所;潮霉素、DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I购于Roche公司;引物合成和测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

主要仪器:高速冷冻离心机,Eppendorf公司(德国);PCR扩增仪,BIO-RAD公司(美国);台式恒温振荡器,美国精骐有限公司。

1.2 方法

1.2.1 $\Delta CsSSK1$ 基因缺失突变菌株构建及验证
根据前人的研究方法^[21], 利用基因同源重组法, 构建缺失突变体 $\Delta CsSSK1$ (图 1), 引物序列见表 1。首先用带有 *ILV1* 基因接头的引物对 SSK1-UF/UR、SSK1-DF/DR 从野生型 HN08 DNA 中扩增出 *CsSSK1* 目的基因上下游片段, 用引物 S2R/S1F 从 pCX62-S 载体中扩增出 *ILV1* 基因全长, 再利用融合 PCR 体系将扩增出的基因上下游片段与 *ILV1* 基因片段连接起来, 最后以连接的片段作为模板, 用引物 SSK1-UF/SSK1-DR 大量扩增融合片段, 使用通用型 DNA 纯化回收试剂盒回收后, 获得同源重组片段。利用 PEG 介导的原生质体和同源重组的方法^[22], 将片段转入野生型 HN08 原生质体中, 在含有 50 $\mu\text{g/mL}$ 氯喹磺隆的 DCM 平板培养基上进行筛选。

初筛得到的转化子再在含 100 $\mu\text{g/mL}$ 氯喹磺隆的 DCM 平板上复筛后, 提取转化子 DNA 进行 PCR 检测(引物所在位置见图 1, 引物序列见表 1), 分别利用外部引物对 SSK1-UouF/DouR、基因内

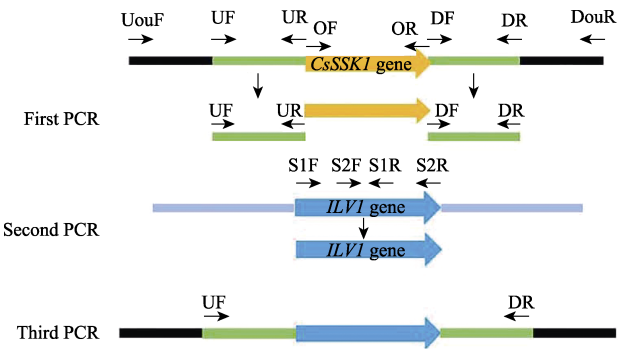


图 1 $CsSSK1$ 基因缺失突变体构建示意图

Fig. 1 Construction diagram of *CsSSK1* gene deletion mutant

部引物对 SSK1-OF/OR, 以及和 *ILV1* 基因内部引物 S1R、S2F 组合进行 PCR 验证。此外, 利用 Southern Blot 技术对敲除转化子内整合的 *ILV1* 基因拷贝数进行验证, 提取野生型和 $\Delta CsSSK1$ 突变体转化子 DNA, 用 *EcoR* I 内切酶进行酶切, 以 *ILV1* 基因的 PCR 片段为探针进行杂交, 杂交步骤参照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I。

表 1 本研究所用引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
SSK1-UF	ACGTACGTTGTCTGTCGG
SSK1-UR	AGATGTGGGGCACTGTGGCGTTGGCACAGAAGCTCACATCCAGTGCG
SSK1-DF	TATTGCACGGGAATTGCATGCTCTCACCGTTCTAATTGTTGAGGAC
SSK1-DR	GCATGCAACCCCACTCCATG
SSK1-UouF	GGTTAGGTGCCTCGAATTTCG
SSK1-DouR	CAACACAGACTGGCTTCTG
SSK1-OF	GGTGCTGCTGGTGATATC
SSK1-OR	ATAGGCGGCACCCCGCCGTT
S1F	GTGCCAACGCCACAGTGCCCCACA
S2R	GTGAGAGCATGCAATTCCTGCAATA
S2F	GGCGGTGCTATCCTTCCCGTGTT
S1R	GTTCAACGCCGCTTCCGACAAAAT
Stag-R	TACGTGCGCAGAGGAGCCTGAAT
HB-SSK1-UouF	TTTCGTAGGAACCCAATCTTCAAAGTGAGCGTAGGTACCTTACC
HB-SSK1-DouR	TTCGAATTTAGCAGCAGCGGTTTCTTCCCCAGTCCAAGATTCTGTTGA

1.2.2 回补菌株 $\Delta CsSSK1$ (*CsSSK1*) 的获得 以野生型 HN08 DNA 为模板, 用引物 HB-SSK1-UouF/UouR 扩增 *CsSSK1* 基因及其自身启动子序列 (3282 bp), 将 PCR 扩增片段与经 *Xho* I 内切酶酶切回收的 pXY203 载体一同转化到酵母菌 XK-125 中, 然后涂布于 SD/-Trp 平板上, 置于

30 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3 d 后挑取酵母单克隆进行菌落 PCR 验证。验证正确的质粒再转入大肠杆菌 DH5 α , 获得回补载体 pXY203-*CsSSK1*, 将回补载体转入缺失突变体 $\Delta CsSSK1$ 的原生质体中 (原生质体转化步骤同上), 在含有 300 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素的 PDS 平板培养基上进行筛选。待长出转化子后, 挑取转

化子到新的含有 400 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素的 PDS 平板培养基上进行复筛,用引物 HB-SSK1-UouF 与载体 pXY203 引物 stag-R 对回补转化子进行 PCR 验证(引物位置见图 2),最终获得含有重组质粒 pXY203-CsSSK1 的回补转化子 ΔCsSSK1 (CsSSK1)。12.5 μL PCR 反应体系:6 μL 2 $\times$ Taq PCR Master Mix, 10 $\mu\text{mol/L}$ 引物各 0.5 μL , 0.5 μL 模板,加 ddH₂O 补足至 12.5 μL 。PCR 反应条件:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

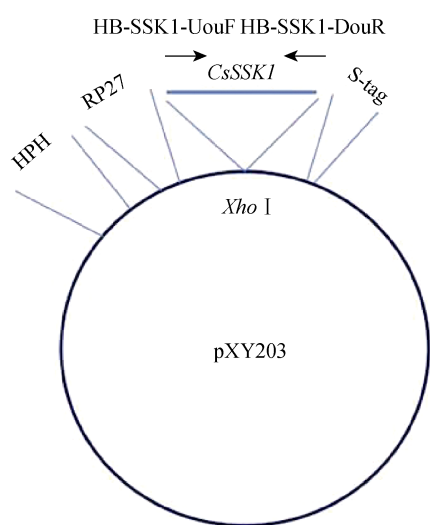


图2 pXY203-CsSSK1 回补载体构建示意图

Fig. 2 Construction diagram of complementary vector pXY203-CsSSK1

1.2.3 菌落形态观察及生长速率测定 将野生型 HN08、突变体 ΔCsSSK1 及回补菌株 ΔCsSSK1 (CsSSK1)分别接种于 PDA 平板,培养 3 d 后刮取菌丝置于 PD 液体培养基中于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 5 d,用灭菌 Mira cloth 过滤,5000 g 离心 3 min 后用无菌水重悬孢子。利用血球计数板调整孢子悬浮液浓度至 10^5 个/mL,接种于 CM 培养基上,置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d 后测量菌落直径。

1.2.4 分生孢子形态观察及产孢量和萌发率测定 分生孢子形态观察:用上述方法培养野生型 HN08 (WT-HN08)、 ΔCsSSK1 、 ΔCsSSK1 (CsSSK1)分生孢子,分生孢子悬浮液浓度调至 5×10^5 个/mL,备用。吸取供试菌株的分生孢子悬浮液 20 μL 滴于载玻片表面,用显微镜观察孢子形态,并分别选取 100 个分生孢子,测量长度和宽度,重复 3 次。

产孢量统计:用 4 mL 无菌水洗下平板表面的分生孢子,再用灭菌 Mira cloth 过滤至 2 mL 离心管中,用无菌水将孢子液定容至 1 mL。吸取 10 μL 孢子液于血球计数板上,用血球计数板在显微镜下统计分生孢子数目。

萌发率统计:用无菌水收集孢子液并将浓度调至 10^5 个/mL 左右。取 10 μL 孢子液滴至疏水玻片表面,置于保湿盒中进行保湿处理,分别在 0、2、4、6、8 h 在显微镜下观察孢子萌发情况并记录,重复 3 次,根据试验数据进行计算和处理。

1.2.5 胁迫响应及药剂敏感性测定 配制含药的 CM 培养基,使其分别含 0.5 mol/L NaCl、1.0 mol/L NaCl、1.0 mol/L 山梨醇、1.0 mol/L 蔗糖、1.0 mol/L 葡萄糖、100 $\mu\text{g/mL}$ 刚果红,以及不同浓度药剂咯菌腈(0.1、0.5、1.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$)、2.5 $\mu\text{g/mL}$ 氟康唑、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 戊唑醇。分生孢子悬浮液配制方法同上,取 10 μL 分生孢子悬浮液(10^5 个/mL)接种于含药培养基平板中央,置于 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5 d,采用“十”字交叉法测量菌落直径并拍照记录。计算抑制率,抑制率=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径 $\times 100\%$ 。

1.2.6 致病力测定 用血球计数板将分生孢子悬浮液浓度调至 10^6 个/mL,将其接种于未刺伤和刺伤的离体橡胶树叶片上,每次接种 10 μL ,重复 30 张叶片,在接种后 5 d 左右观察发病情况,拍照并测量病斑面积。

1.3 数据处理

采用 SPSS 软件对试验数据进行统计分析,应用 Duncan's 新复极差法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

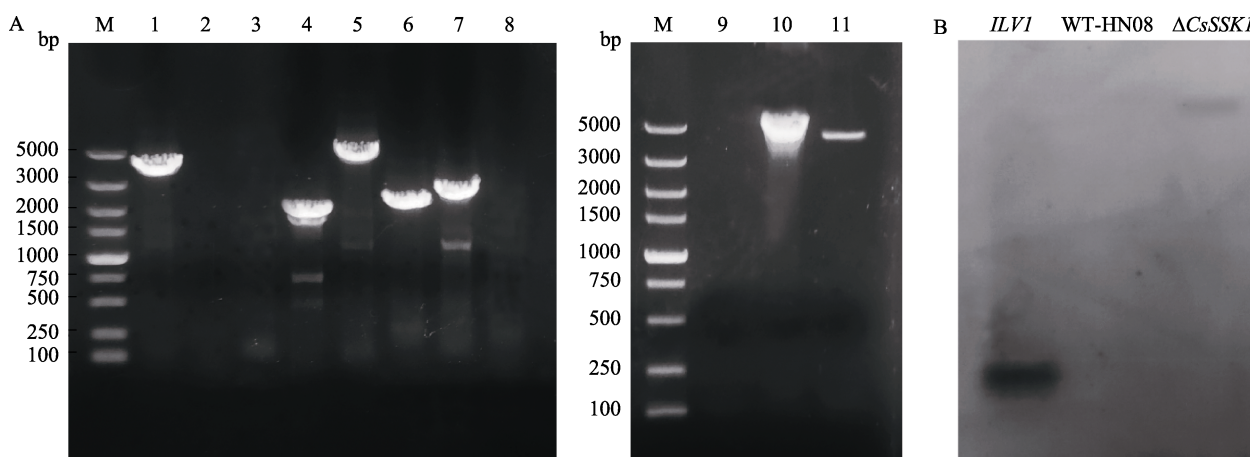
2.1 暹罗炭疽菌 CsSSK1 基因敲除突变体及其回补菌株的获得

利用基因同源重组法,构建缺失突变体 ΔCsSSK1 。在含氯嘧啶隆药剂平板上筛选获得 36 个转化子,经过多对引物 PCR 验证,筛选获得 1 个缺失突变体 ΔCsSSK1 。PCR 验证结果见图 3A,利用引物对 SSK1-OF/SSK1-OR 在野生型菌株中可扩增获得 1 条大小为 2018 bp 的条带(泳道 4),在 ΔCsSSK1 突变体转化子中未检测到该序列条带(泳道 8);在 ΔCsSSK1 中,利用引物 SSK1-UouF 和 ILV1 基因内部 S1R 在 ΔCsSSK1 突变体中可扩增到 1 条大小为 2280 bp 的条带(泳道 6),利用

SSK1-DouR 与 *ILV1* 基因 S2F 扩增到 1 条大小为 2548 bp 的条带 (泳道 7), 而野生型中未扩增出相应大小的条带 (泳道 2 和 3); 用外部引物 SSK1-UouF 及 SSK1-DouR 在野生型菌株中可扩出 1 条大小为 3413 bp 的条带 (泳道 1), 在 $\Delta CsSSK1$ 突变体中扩增出 1 条大小为 4212 bp 的条带 (泳道 5)。经测序分析, 显示目的基因 *CsSSK1* (2018 bp) 被 *ILV1* 基因 (2817 bp) 所替换。通过 Southern blot 分析显示 (图 3B), 以 *ILV1* 基因内部序列为探针, 在 $\Delta CsSSK1$ 基因组 DNA 中杂交仅产生 1 条条带, 而与野生型 HN08 基因组 DNA 杂交未产生条带, 说明 $\Delta CsSSK1$ 基因组内仅整合 1 个拷贝的 *ILV1*

基因序列。研究结果说明 $\Delta CsSSK1$ 确实是 *CsSSK1* 基因缺失突变体。

通过原生质体转化法, 将构建的 pXY203-*CsSSK1* 质粒载体转入 $\Delta CsSSK1$ 突变体中获得回补转化子 $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$, 利用引物 HB-SSK1-UouF 与载体 pXY203 引物 stag-R 进行验证 (图 3A)。在缺失突变体 $\Delta CsSSK1$ 中未检测到扩增条带 (泳道 9), 而回补转化子 $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$ 及回补载体 pXY203-*CsSSK1* 可扩增到 1 条大小为 3382 bp 的目的条带 (泳道 10 和 11), 说明目的序列已重新转入, 获得基因回补菌株 $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$ 。



A: $\Delta CsSSK1$ 基因缺失突变体及 $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$ 回补菌株的 PCR 验证; B: $\Delta CsSSK1$ 基因缺失突变体 Southern blot 分析。
M: DL5000 DNA marker; 1~4: 野生型 HN08; 5~9: $\Delta CsSSK1$ 基因缺失突变体; 10: pXY203-*CsSSK1* 回补载体;
11: $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$ 回补转化子。

A: PCR verification of gene deletion mutant $\Delta CsSSK1$ and the complementary strains $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$; B: Southern blot analysis.
M: DL5000 DNA marker; 1~4: Wild-type HN08; 5~9: $\Delta CsSSK1$ mutant; 10: pXY203-*CsSSK1* recombinant plasmid vector;
11: $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$ complemented strain.

图 3 基因缺失突变体 $\Delta CsSSK1$ 及其回补菌株验证

Fig. 3 Verification of gene deletion mutant $\Delta CsSSK1$ and complementary transformant $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$

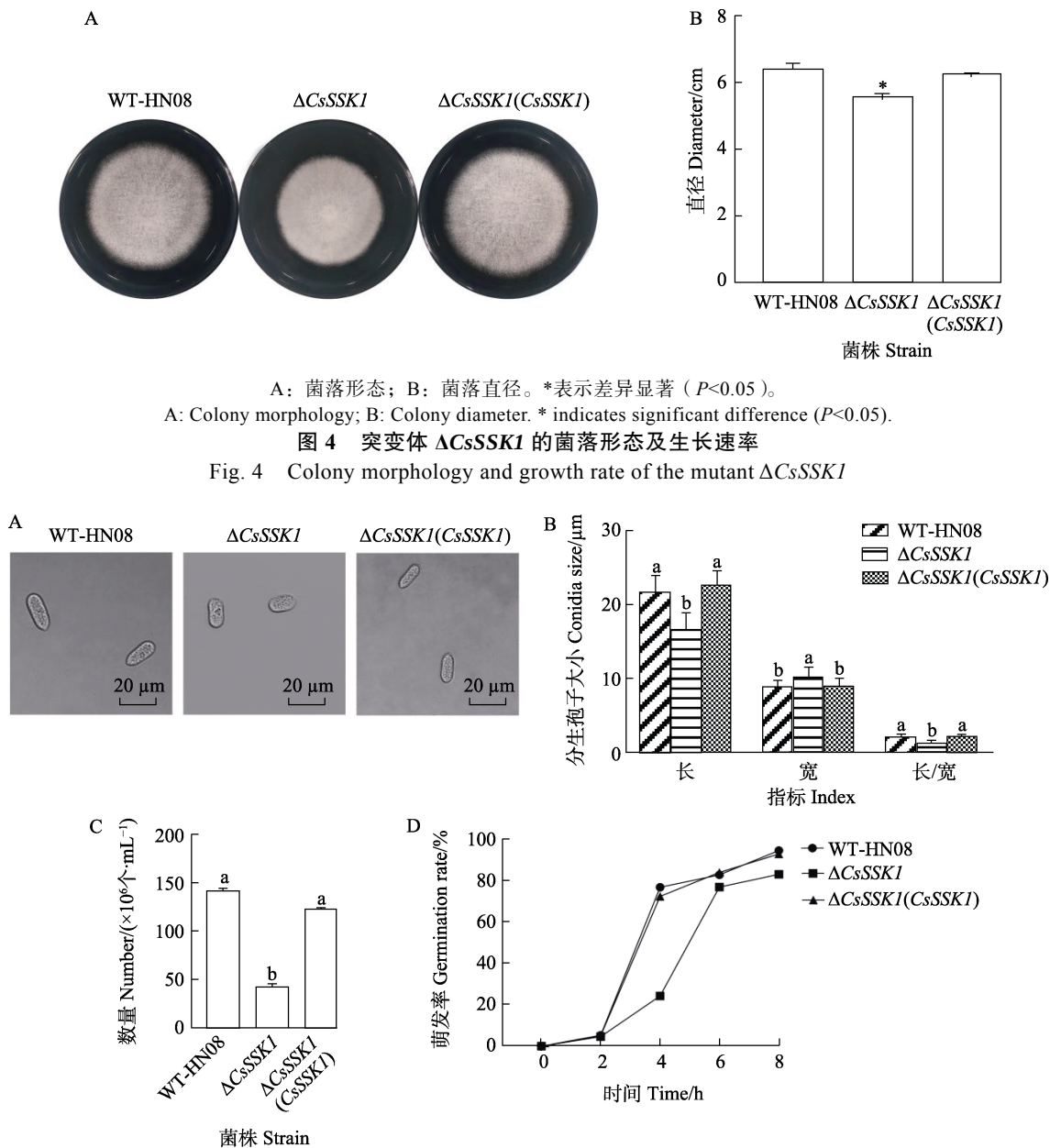
2.2 暹罗炭疽菌突变体 $\Delta CsSSK1$ 菌株的表型观察

2.2.1 对菌落形态及生长速率的影响 在 CM 培养基上突变体 $\Delta CsSSK1$ 菌株的菌落形态和野生型菌株无明显差异, 但菌落直径较小, 菌落直径测定结果显示, $\Delta CsSSK1$ 菌株较野生型 HN08 小 12.50% (图 4)。结果说明 *CsSSK1* 基因影响暹罗炭疽菌菌落的生长速率。

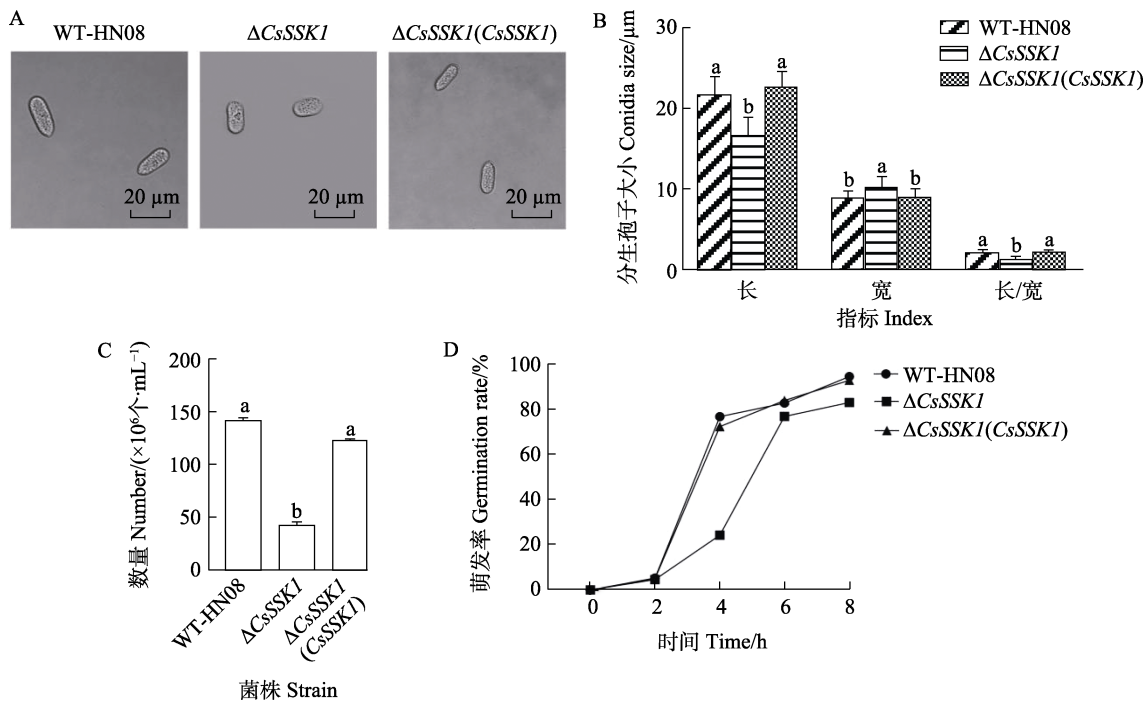
2.2.2 对产孢量、分生孢子形态及萌发率的影响 经显微观察, $\Delta CsSSK1$ 的分生孢子比 WT-HN08 明显较短圆 (图 5A), 长度比 WT-HN08 短 22.80%, 宽度增 14.01% (图 5B)。分生孢子产量测定结果显示, WT-HN08 的孢子浓度约为 $(1.43 \pm 0.056) \times$

10^6 个/mL, 而 $\Delta CsSSK1$ 敲除突变体的孢子浓度约为 $(0.43 \pm 0.043) \times 10^6$ 个/mL, 回补菌株 $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$ 的孢子浓度约为 $(1.13 \pm 0.032) \times 10^6$ 个/mL, $\Delta CsSSK1$ 敲除突变体的产孢量明显减少 (图 5C)。结果说明 *CsSSK1* 基因影响暹罗炭疽菌分生孢子的产孢量及分生孢子的大小。

孢子萌发率测定结果显示, 在接种后 0~8 h 内, $\Delta CsSSK1$ 的分生孢子萌发率低于 WT-HN08 和回补菌株 $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$, 其中接种 6 h 后, WT-HN08 分生孢子萌发率为 $82.75\% \pm 0.097\%$, $\Delta CsSSK1$ 的萌发率为 $76.84\% \pm 0.10\%$, $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$ 的萌发率为 $83.95\% \pm 0.045\%$ (图 5D)。说明 *CsSSK1* 的缺失会降低暹罗炭疽菌分生孢子的萌发。



A: 菌落形态; B: 菌落直径。*表示差异显著 ($P<0.05$)。
A: Colony morphology; B: Colony diameter. * indicates significant difference ($P<0.05$).
图 4 突变体 $\Delta CsSSK1$ 的菌落形态及生长速率
Fig. 4 Colony morphology and growth rate of the mutant $\Delta CsSSK1$

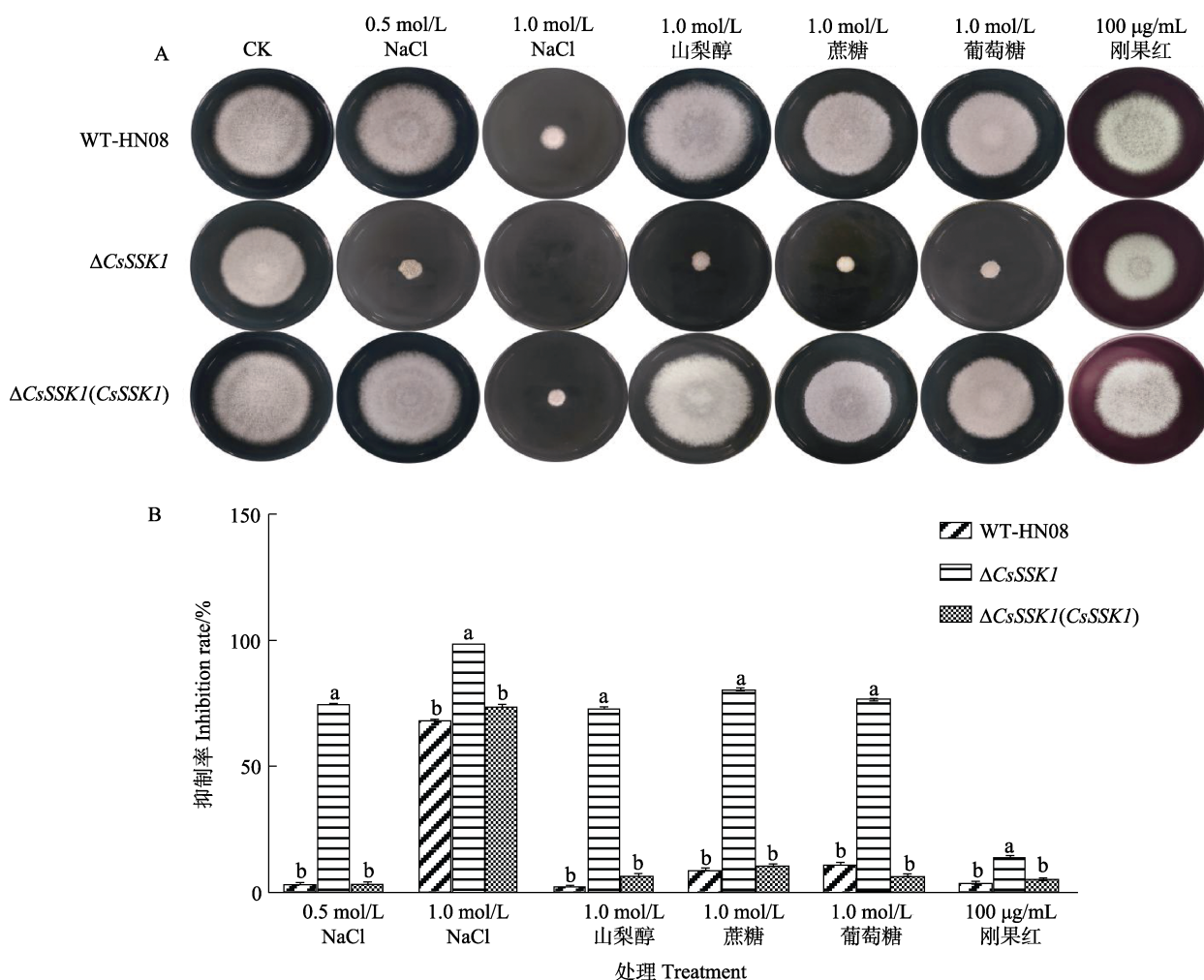


A: 分生孢子形态; B: 分生孢子大小; C: 产孢量; D: 孢子萌发率。不同小写字母表示差异极显著 ($P<0.01$)。
A: Morphology of conidia ; B: Size of conidia; C: Sporulation capacity; D: Spore germination rates. Different lowercase letters indicate extremely significant difference ($P<0.01$).

图 5 突变体 $\Delta CsSSK1$ 的分生孢子形态 (A)、大小 (B)、产孢量 (C) 及萌发率 (D)
Fig. 5 Conidia morphology (A), conidia size (B), sporulation (C) and conidial germination rate (D) of the mutant $\Delta CsSSK1$

2.2.3 对盐胁迫、渗透胁迫及刚果红胁迫的反应
在含有 0.5、1.0 mol/L NaCl, 1.0 mol/L 山梨醇、1.0 mol/L 蔗糖、1.0 mol/L 葡萄糖、100 $\mu g/mL$ 刚果红的培养基上测量供试菌株菌落直径, 与 WT-HN08 相比, $\Delta CsSSK1$ 在含 0.5、1.0 mol/L NaCl 的平板上菌落直径减小, 抑制率分别为 75.3%和 100%, 说明 $\Delta CsSSK1$ 对高盐胁迫反应敏感; $\Delta CsSSK1$ 在 1.0 mol/L 山梨醇、1.0 mol/L 蔗糖、1.0 mol/L 葡萄糖平板上菌落直径减小, 抑制率依

次为 74.0%、81.5%、77.4%, 说明 $\Delta CsSSK1$ 对高渗透胁迫反应敏感; 此外, 在 100 $\mu g/mL$ 刚果红平板上 $\Delta CsSSK1$ 菌落直径也减小, 抑制率为 15.1%, 说明 $\Delta CsSSK1$ 对刚果红胁迫反应敏感, 推测该基因影响细胞壁完整性 (图 6)。结果表明, $CsSSK1$ 基因参与应答盐胁迫和渗透胁迫, 可能影响细胞壁完整性。
2.2.4 对药剂胁迫反应 通过测定化学药剂咯菌腈、氟康唑和戊唑醇对供试菌株的影响, 结果显示,



A: 菌落生长情况; B: 菌株生长抑制率。不同小写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

A: Colony growth status; B: Strain growth inhibition rate. Different lowercase letters indicate extremely significant difference ($P < 0.01$).

图 6 突变体 $\Delta CsSSK1$ 应答不同胁迫反应的比较分析

Fig. 6 Comparative analysis of mutant $\Delta CsSSK1$ responses to different stress responses

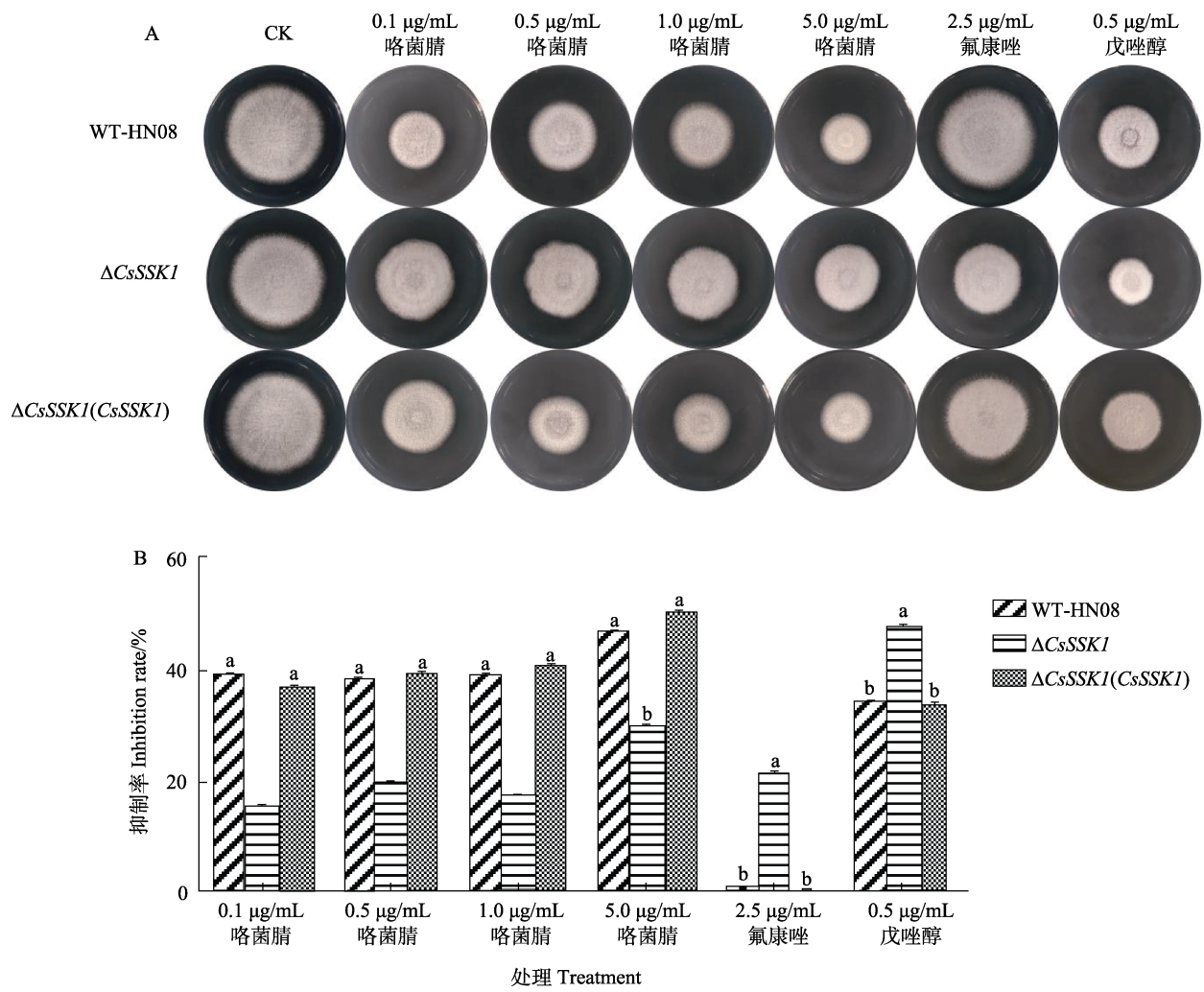
在含咯菌腈平板上, 与 WT-HN08 相比, $\Delta CsSSK1$ 突变体的菌落直径均极显著增加, $\Delta CsSSK1$ 在咯菌腈浓度梯度为 0.1、0.5、1.0、5.0 $\mu\text{g/mL}$ 的平板上, 其抑制率依次为 15.6%、20.0%、17.5%、30.0%; 在三唑类杀菌剂氟康唑和戊唑醇平板上, $\Delta CsSSK1$ 突变体的菌落直径减小, 抑制率分别为 21.6% 和 48.1% (图 7)。显著性分析结果表明, $CsSSK1$ 基因负调控炭疽菌对咯菌腈的敏感性, 但正调控其对氟康唑、戊唑醇的敏感性。

2.2.5 致病力测定 在刺伤和未刺伤的橡胶树叶片上分别接种供试菌株, 5 d 后测量病斑面积。结果显示, 在刺伤和未刺伤叶片上, $\Delta CsSSK1$ 突变体的病斑面积均比 WT-HN08 极显著减小, 分别减少 79.8% 和 86.9% (图 8)。表明 $CsSSK1$ 基因参与暹罗炭疽菌的致病力调控。

3 讨论

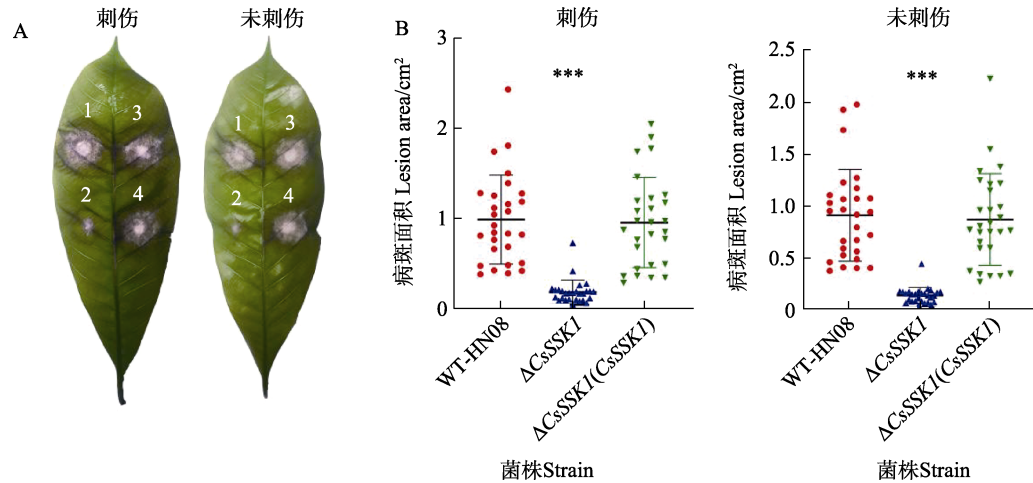
炭疽病是橡胶树重要的叶部病害之一, 目前国内外对橡胶树炭疽菌的耐药性分子机制及致病力的研究基础还较薄弱。本研究构建了 $CsSSK1$ 基因敲除突变体及回补菌株, 表型观察证实了暹罗炭疽菌 $CsSSK1$ 基因影响炭疽菌的菌落生长速率、分生孢子大小、产孢量及分生孢子萌发率, 参与盐胁迫、渗透胁迫和刚果红胁迫反应, 负调控炭疽菌对咯菌腈药剂的敏感性, 正调控其对氟康唑和戊唑醇的敏感性, 且影响致病力。

SSK1 作为双组分系统的应答调节蛋白, 在病原菌中具有许多功能, 但不同病原真菌的 $SSK1$ 基因功能存在差异。很多研究均显示, $SSK1$ 可参与渗透胁迫反应, 如稻瘟菌 (*Magnaporthe oryzae*) 与灰霉菌 (*Botrytis cinerea*) 中的 $SSK1$ 同源基因



A: 菌落生长情况; B: 菌株生长抑制率, 不同小写字母表示差异极显著 ($P < 0.01$)。
A: Colony growth status; B: Strain growth inhibition rate. Different lowercase letters indicate extremely significant difference ($P < 0.01$).
图 7 突变体 $\Delta CsSSK1$ 对 3 种化学药剂的胁迫反应

Fig. 7 Stress response of mutants $\Delta CsSSK1$ to three chemical pesticides



A: 发病症状, 1 为 WT-HN08, 2 为 $\Delta CsSSK1$, 3~4 为 $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$; B: 病斑面积散点图, ***表示差异极显著 ($P < 0.001$)。
A: Symptoms, 1 is WT-HN08, 2 is $\Delta CsSSK1$, 3~4 are $\Delta CsSSK1(CsSSK1)$; B: Scatter plot of lesion area, *** means extremely significant difference ($P < 0.001$).

图 8 供试菌株在橡胶叶片上的致病力测定

Fig. 8 Pathogenicity assays of tested strains on rubber tree leaves

等^[9-10]；但克鲁氏乳酸酵母菌（*Kluyveromyces lactis*）中的 *SSK1* 基因缺失对高渗透压的敏感性无影响^[14]。在药剂敏感性调控方面，不同病原菌中该基因缺失对药剂敏感性的表型也不尽相同。有研究显示该基因缺失可对吡咯类等药剂表现抗性，如稻瘟菌中的 *MoSSK1*^[9]和链格孢菌（*Alternaria alternata*）中的 *SSK1*^[23]；但在部分真菌中的表现却相反，如灰霉菌中 *SSK1* 的缺失对异菌脲、咯菌腈和三唑酮 3 种杀菌剂更敏感，在白念珠菌（*Candida albicans*）中 *CaSSK1* 突变体对氟康唑敏感^[12-13]；也有些病原菌，如丝状真菌柄孢霉（*Podospira anserina*）中， $\Delta PaSSK1$ 突变株对氟康唑不敏感^[15]。并且不同病原菌在致病力方面也存在差异，灰霉菌中的 *SSK1* 同源基因 *Brrg-1* 不参与毒力调控；而大丽轮枝菌（*Verticillium dahliae*）中的 *VdSsk1*、莱氏野村菌（*Nomuraea rileyi*）中的 *Nrsk1*、禾谷镰刀菌（*Fusarium graminearum*）中的 *FgRrg-1*（同源酿酒酵母的 *Ssk1*）均参与致病力的调控^[11, 24-25]。本研究对暹罗炭疽菌的 *CsSSK1* 基因功能进行分析发现，*CsSSK1* 基因的缺失不仅对盐胁迫和渗透胁迫敏感，对咯菌腈抗性增强，还对刚果红、氟康唑和戊唑醇敏感性增强，并且使炭疽菌致病力降低，研究结果说明在不同病原真菌中的 *SSK1* 基因功能存在一定差异。但 *CsSSK1* 基因的这些功能对调控炭疽菌的胁迫响应、耐药性、致病力等分子机制尚无相关研究，后续可进一步分析 *CsSSK1* 的互作蛋白及上下游调控因子，可为深入了解 *CsSSK1* 如何影响相关功能进行深入分析，为解析炭疽菌致病机理和应答抗逆反应的分子机理奠定基础。

参考文献

- [1] 刘凯悦. 双组分系统基因 *MoSLN1* 和 *MoSKN7* 在稻瘟病菌生长发育与致病过程中的功能研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2011.
LIU K Y. Functional analysis of two-component system genes *MoSLN1* and *MoSKN7* in the development and pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011. (in Chinese)
- [2] BAHN Y S. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway[J]. Eukaryotic Cell, 2008, 7(12): 2017-2036.
- [3] 吴雪昌, 胡森杰. 酵母 HOG-MAPK 途径[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(3): 247-252.
- WU X C, HU S J. Yeast HOG-MAPK pathway[J]. Journal of Cell Biology, 2005, 27(3): 247-252. (in Chinese)
- [4] RISPAIL N, PIETRO A D. The two-component histidine kinase Fhk1 controls stress adaptation and virulence of *Fusarium oxysporum*[J]. Molecular Plant Pathology, 2010, 11(3): 395-407.
- [5] MOTOYAMA T, OCHIAI N, MORITA M, IIDA Y, USAMI R, KUDO T. Involvement of putative response regulator genes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* in osmotic stress response, fungicide action, and pathogenicity[J]. Current Genetics, 2008, 54(4): 185-195.
- [6] MOTOYAMA T, KADOKURA K, OHIRA T, ICHIISHI A, FUJIMURA M, YAMAGUCHI I, KUDO T. A two-component histidine kinase of the rice blast fungus is involved in osmotic stress response and fungicide action[J]. Fungal Genetics & Biology, 2005, 42(3): 200-212.
- [7] BRANSCUM K M, MENON S K, FOSTER C A, WEST A H. Insights revealed by the co-crystal structure of the *Saccharomyces cerevisiae* histidine phosphotransfer protein Ypd1 and the receiver domain of its downstream response regulator Ssk1[J]. Protein Science, 2019, 28(12): 2099-2111.
- [8] 方思齐, 李泽栋, 王记圆, 何其光, 李潇, 刘文波, 张宇, 林春花, 缪卫国. 利用酵母双杂交技术筛选炭疽菌中与 *CsSSK1* 相互作用的蛋白质[J]. 热带作物学报, 2021, 42(1): 198-204.
FANG S Q, LI Z D, WANG J Y, HE Q G, LI X, LIU W B, ZHANG Y, LIN C H, MIAO W G. Screening of proteins interacting with *CsSSK1* in *Colletotrichum* by yeast two-hybrid system[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2021, 42(1): 198-204. (in Chinese)
- [9] BALTANAS R, BUSH A, COUTO A, DURRIEU L, HOHMANN S, COLMAN-LERNER A. Pheromone-induced morphogenesis improves osmoadaptation capacity by activating the HOG MAPK pathway[J]. Science Signaling, 2013, 6(272): ra26.
- [10] YAN L, YANG Q, JIANG J, MICHAILIDES T J, MA Z. Involvement of a putative response regulator Brrg-1 in the regulation of sporulation, sensitivity to fungicides, and osmotic stress in *Botrytis cinerea*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(1): 215-226.
- [11] ZHENG J, TANG C, DENG C, WANG Y. Involvement of a response regulator *VdSsk1* in stress response, melanin biosynthesis and full virulence in *Verticillium dahliae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 606.
- [12] 李筱芳, NEERAJ C, RICHARD C, 刘维达. 白念珠菌 *SSK1* 突变株对氟康唑敏感性的初步研究[J]. 中国真菌学杂志, 2010, 5(5): 4.
LI X F, NEERAJ C, RICHARD C, LIU W D. Preliminary study on the sensitivity of *Candida albicans SSK1* mutant to

- fluconazole[J]. Chinese Journal of Mycology, 2010, 5(5): 4. (in Chinese)
- [13] CALERA J A, ZHAO X J, CALDERONE R. Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*[J]. Infection and Immunity, 2000, 68(2): 518-525.
- [14] MAEDA T, TAKEKAWA M, SAITO H. Activation of yeast PBS₂ MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH₃-containing osmosensor[J]. Science, 1995, 269(5223): 554-558.
- [15] 邓嘉雯. 丝状真菌柄孢霉(*Podospora anserina*)蛋白激酶 SNF1 及响应调节因子 SSK1 的功能分析[D]. 深圳: 深圳大学, 2019.
- DENG J W. Functional analysis of the filamentous fungus *Podospora anserina* protein kinase SNF1 and response regulator SSK1[D]. Shenzhen: Shenzhen University, 2019. (in Chinese)
- [16] 林春花, 杨欢, 赵晓宇, 潘潇涵, 刘文波, 缪卫国, 郑服丛. 海南橡胶树炭疽菌 *Colletotrichum siamense* 和 *C. fructicola* 的鉴定和系统发育分析[J]. 热带作物学报, 2018, 39(1): 129-136.
- LIN C H, YANG H, ZHAO X Y, PAN X H, LIU W B, MIAO W G, ZHENG F C. Identification and phylogenetic analysis of *Colletotrichum siamense* and *C. fructicola* from rubber tree in Hainan[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(1): 129-136. (in Chinese)
- [17] QIN L P, ZHANG Y, SU Q, CHEN Y L, NONG Q, XIE L, YU G M, HUANG S L. First report of anthracnose of *Mangifera indica* caused by *Colletotrichum scovillei* in China[J]. Plant Disease, 2019, 103: 1043.
- [18] 何宁, 江立群, 司徒俊键, 李亭璐, 习平根, 姜子德. 荔枝炭疽病菌的种类鉴定[C]//中国菌物学会 2015 年学术年会论文摘要集, 2015: 225.
- HE N, JIANG L Q, SITU J J, LI T L, XI P G, JIANG Z D. Species Identification of litchi anthrax[C]//Proceedings of 2015 Mycological Society of China Annual Meeting, 2015: 225. (in Chinese)
- [19] 黄根深, 赖剑雄. 海南省小粒种咖啡炭疽病病原菌型及流行规律研究[J]. 热带作物研究, 1994(4): 24-32.
- HUANG G S, LAI J X. Study on pathotype and epidemic rule of coffee anthracnose disease in Hainan province[J]. Research on Tropical Crops, 1994(4): 24-32. (in Chinese)
- [20] CAO X, XU X, CHE H, WEST J S, LUO D. Eight *Colletotrichum* species, including a novel species, are associated with areca palmanthracnose in Hainan, China[J]. Plant Disease, 2020, 104: 1369-1377.
- [21] 黄云艳. HOG-MAPK 途径调控禾谷镰刀菌三唑类杀菌剂敏感性机制研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- HUANG Y Y. Study on the mechanism of HOG-MAPK pathway regulating the sensitivity of *Fusarium graminearum* to triazole fungicides[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2019. (in Chinese)
- [22] 王记圆. 橡胶树炭疽菌 *Colletotrichum siamense* 脂滴包被蛋白 CsCap20 互作蛋白的筛选以及疏水蛋白 CsHydr 的功能鉴定[D]. 海口: 海南大学, 2020.
- WANG J Y. Screening of lipid droplet coating protein CsCap20 interaction protein and functional identification of hydrophobin CsHydr of *Colletotrichum siamense* from *Hevea brasiliensis*[D]. Haikou: Hainan University, 2020. (in Chinese)
- [23] YU P L, CHEN L H, CHUNG K R. How the pathogenic fungus *Alternaria alternata* copes with stress via the response regulators SSK1 and SHO1[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0149153.
- [24] 钟强. 莱氏野村菌 *Nrssk1* 与 *Nrpbs2* 基因的克隆和功能研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2017.
- ZHONG Q. The gene cloning and functional analysis of *Nrssk1* and *Nrpbs2* in *Nomuraea rileyi*[D]. Chongqing: Chongqing University, 2017. (in Chinese)
- [25] JIANG J H, YUN Y Z, YANG Q Q, SHIM W B, WANG Z Y, MA Z H. A type 2C protein phosphatase FgPtc3 is involved in cell wall integrity, lipid metabolism, and virulence in *Fusarium graminearum*[J]. PLoS One, 2011, 6(9): e25311.