

番茄枯萎病菌转录因子 FolMsn2 的生物学功能



王如锋¹ 陈江峰¹ 林定山² 云英子¹ 王宗华^{1,3} 汤蔚^{1*}

(1. 福建农林大学, 闽台作物有害生物生态防控国家重点实验室, 福州 350002; 2. 福建省永春县植保植检站, 泉州 362600; 3. 闽江学院海洋研究院, 福州 350108)

摘要: 为探究转录因子 FolMsn2 在番茄枯萎病菌 *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 生长发育及致病过程中的作用, 以番茄枯萎病菌野生型菌株 4287 为材料, 利用基因敲除方法获得 *FolMSN2* 基因缺失突变体 Δ *Folmsn2* 及回补体菌株 Δ *Folmsn2-C*, 通过测定菌株的生长速率、孢子产量及致病力等表型初步分析番茄枯萎病菌中 *FolMSN2* 的生物学功能。结果显示, 与野生型菌株 4287 相比, *FolMSN2* 基因敲除突变体 Δ *Folmsn2* 生长速率显著减慢, 菌株产孢量显著下降, 仅为野生型菌株 4287 产孢量的 6.7%; 外界环境压力胁迫试验结果显示, *FolMSN2* 基因缺失突变体 Δ *Folmsn2* 对渗透压、盐胁迫的敏感性显著提高, 而对细胞壁、氧化压力胁迫变得更加耐受。此外, *FolMSN2* 基因缺失突变体 Δ *Folmsn2* 对番茄苗及果实的致病力显著下降, 进一步分析发现 *FolMSN2* 基因缺失影响其对玻璃纸的穿透能力; 亚细胞定位结果表明, FolMsn2 蛋白定位于细胞核内。表明 *FolMsn2* 参与调控番茄枯萎病菌的营养生长、无性繁殖以及对不同环境胁迫的应答过程, 其可能通过影响菌丝对寄主的穿透能力来影响番茄枯萎病菌的致病力。

关键词: 番茄枯萎病菌; FolMsn2; 无性繁殖; 穿透; 致病力

Biological function of transcription factor FolMsn2 in fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

Wang Rufeng¹ Chen Jiangfeng¹ Lin Dingshan² Yun Yingzi¹ Wang Zonghua^{1,3} Tang Wei^{1*}

(1. State Key Laboratory of Ecological Pest Control for Fujian and Taiwan Crops, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China; 2. Plant Protection and Quarantine Station, Yongchun, Quanzhou 362600, Fujian Province, China; 3. Institute of Oceanography, Minjiang University, Fuzhou 350108, Fujian Province, China)

Abstract: To determine the function of transcription factor FolMsn2 in development and pathogenesis of fungal plant pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, deletion mutant Δ *Folmsn2* was obtained from the wild type strain 4287 and the complemented strain Δ *Folmsn2-C* was generated from mutant. Phenotypic analysis about growth rate, conidiation, and pathogenicity revealed that, compared with the wild-type strain, the *FolMSN2* gene knock-out mutant displayed a significantly decrease in hyphal growth rate and a dramatic reduction in conidiation (only 6.7% of the wild type strain); external environmental stress assays found that the *FolMSN2* gene knock-out mutant was more sensitive to osmotic, and salt stress but was more tolerant to cell wall and oxidative stresses. Moreover, the mutant had a significant reduction in pathogenicity and compromised penetration ability on the cellophane paper; the cellular localization of *FolMsn2* revealed that *FolMsn2* localized to the nuclear of *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*. The results indicated that *FolMsn2* contributed to vegetative growth, asexual reproduction, and external environmental stress response, and might be involved in the pathogenicity of *F. oxysporum* f. sp.

基金项目: 国家自然科学基金(31601584), 福建农林大学杰出青年科研人才计划资助项目(xjq201720)

* 通信作者 (Author for correspondence), E-mail: tangw@fafu.edu.cn

收稿日期: 2020-06-15

lycopersici by regulating the penetration process.

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*; FolMsn2; asexual reproduction; penetration; pathogenicity

番茄是一类世界广泛种植的蔬菜作物,是日常食物的重要组成部分(Srinivas et al., 2019)。随着人们对番茄的需求量日益增长,其经济价值不断提高,种植面积逐渐扩大。由番茄枯萎病菌*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*引起的番茄枯萎病是番茄生产上的毁灭性病害之一,常造成番茄大量减产,造成了严重的经济损失(张斌等, 2015; Carmona et al., 2020)。番茄枯萎病菌作为一种典型的土传兼性寄生真菌,从寄主根部的伤口或者根部尖端侵入,随后通过维管组织扩散到植物木质部导管中,造成导管堵塞影响水分等物质的运输,最终导致植株萎蔫甚至死亡(Pietro et al., 2001; Srinivas et al., 2019; Carmona et al., 2020)。

在自然界中,温度、养分和水分等环境因素是动态变化的,感知并应对不利的环境变化是生物体的一种固有特性(Martínez-Pastor et al., 1996; Görner et al., 1998)。在受到环境干扰时,细胞主要通过调节基因的表达水平针对性地表达靶标蛋白,以此响应环境压力(Stewart-Ornstein et al., 2013)。转录因子对基因的调控主要是在特定条件下,上游激酶活性发生改变,如雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)、蛋白激酶A(protein kinase A, PKA)等,这些激酶在一定条件下可调节一系列转录因子的活性,激活并调节靶基因的表达(Cai et al., 2008)。激酶、转录因子以及靶基因所形成的信号转导通路是机体维持动态环境下细胞内稳态的重要保证(Stewart-Ornstein et al., 2013)。Msn2和Msn4是调节酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae*应激反应的2个功能冗余锌指转录因子(Boy-Marcotte et al., 2006),两者共同应答多种不同类型的外界胁迫(Moskvina et al., 1998; Boy-Marcotte et al., 2006; Stewart-Ornstein et al., 2013)。在压力胁迫下,Msn2通过位于羧基端的锌指结构域识别并结合靶基因启动子中的胁迫响应元件(stress-response element, STRE),激活下游基因的转录表达响应胁迫(Schmitt & Mcentee, 1996; Liu et al., 2013)。在丝裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联信号通路中,STRE驱动的转录受高渗透压(high osmolarity glycerol, HOG)通路调控(Schüller et al., 1994)。Msn2是高渗透压通路中的

应激响应转录因子(Tian et al., 2017),参与调节渗透压,维持细胞稳态,该转录因子也是环腺苷酸(cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate, cAMP)信号通路的负调控元件。cAMP信号通路被激活后,则会抑制与胁迫响应元件相关基因的表达(Martínez-Pastor et al., 1996; Boy-Marcotte et al., 1998)。

已有研究表明,土传植物病原真菌转录因子能够通过调控基因的时空表达变化应对来自环境的信号变化,实现成功侵染(Rep & Kistler, 2010; Srinivas et al., 2019)。在番茄枯萎病菌的研究中发现多个转录因子在病菌生长发育阶段均具有重要作用。例如,FolSge1在根部侵染阶段大量上调表达,并影响系列效应蛋白的表达,进而参与调控病菌的致病过程(Michielse et al., 2009);FolCtf1和FolCtf2通过调控病菌脂质代谢介导致病过程(Bravo-Ruiz et al., 2013);FolPacC影响pH信号通路负调控病菌的致病力(Caracuel et al., 2003);FolCzf1在病菌无性繁殖、镰孢菌酸产生以及早期侵染过程中具有重要作用(Yun et al., 2019);Con7-1和Fost12通过调控菌丝形态影响病菌致病过程(García-Sánchez et al., 2009; Ruiz-Roldán et al., 2015);FolFtf1和FolFtf2参与调节效应蛋白的表达最终影响病菌的致病力(Niño-Sánchez et al., 2016)。Msn2作为MAPK级联和cAMP途径中的关键性转录因子,其在部分病原真菌中的生物学功能已被报道。在稻瘟病菌*Magnaporthe oryzae*中,MoMsn2在菌丝生长、孢子形态发育、耐胁迫能力及致病过程中发挥着重要作用(Zhang et al., 2014);在大丽轮枝菌*Verticillium dahliae*中,VdMsn2参与调控病菌生长、微菌核产生及致病力(Tian et al., 2017);在昆虫致病菌绿僵菌*Metarhizium rileyi*和球孢白僵菌*Beauveria bassiana*中,MrMsn2和BbMsn2均对病菌无性繁殖、耐胁迫能力及致病力具有重要的调控作用(Liu et al., 2013)。但目前Msn2在番茄枯萎病菌中的具体作用尚不清楚。

本研究使用原生质体转化法对番茄枯萎病菌野生型菌株中FolMSN2基因进行敲除,并获得基因缺失突变体及其回补体菌株,明确FolMSN2在番茄枯萎病菌中的功能,以期为番茄枯萎病菌新型农药靶标的开发提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和番茄植株及果实:番茄枯萎病菌野生型菌株4287由本实验室保存并提供。番茄品种为天宝牌,购于本地超市,番茄种子经催芽后种植,生长10 d后的幼苗供试;用于接种的健康圣女果番茄果实也购于本地超市。

供试培养基:完全培养基(complete medium, CM)成分为20×氮盐50 mL、微量元素溶液1 mL、葡萄糖10 g、蛋白胨10 g、酵母提取物1 g、酸水解酪蛋白1 g、维生素溶液1 mL, pH 6.5, 配制固体培养基时添加琼脂粉15 g;马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基成分为去皮马铃薯300 g、葡萄糖20 g、琼脂粉20 g;基本培养基(minimal medium, MM)成分为NaNO₃ 6 g、KCl 0.52 g、MgSO₄·7H₂O 0.152 g、KH₂PO₄ 1.52 g、维生素B1 0.01 g、微量元素溶液1 mL、葡萄糖10 g、琼脂粉15 g;复苏培养基(recovery medium, RM)成分为酸水解酪蛋白1 g、酵母提取物1 g、蔗糖274 g, pH 7.0;酵母色氨酸缺陷型培养基成分为无氨基酵母氮源6.7 g、D-山梨糖醇182.2 g、缺色氨酸氨基酸粉末0.74 g、葡萄糖20 g、琼脂粉15 g, pH 5.8;上述培养基均使用去离子水定容至1 L(汤蔚, 2015)。

试剂及仪器:潮霉素B,北京索莱宝科技有限公司;博来霉素,美国Innivogen公司;遗传霉素(G418),北京索莱宝科技有限公司;Digoxigenin High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I Southern blot试剂盒,美国罗氏公司;rTaq酶、Hind III、EcoR V、Xho I、RNase, 宝日医生物技术(北京)有限公司;2×Taq PCR预混试剂II(KT211),天根生化科技(北京)有限公司;pCX62质粒、pGF11载体由本实验室保存;荧光增白剂(calcofluor white, CFW)、刚果红(congo red, CR)、4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)、山梨醇(sorbitol),西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;其余试剂均为国产分析纯。T100 PCR仪,美国Bio-Rad公司;GXZ430型智能光照培养箱,宁波江南仪器厂;奥林巴斯DP80荧光显微镜,日本奥林巴斯公司;Nikon E200生物显微镜、Nikon TiE-A1 plus激光扫描共聚焦显微镜,日本尼康公司;血球计数板,北京索莱宝科技有限公司;Centrifuge 5420离心机,德国艾本德股份公司;DYCP-31CN型琼脂糖水

电泳仪,北京六一生物科技有限公司;PowerShot G7 X Mark II相机,佳能(中国)有限公司。

1.2 方法

1.2.1 突变体的获得与鉴定

利用真菌细胞中的同源重组机制,通过构建一个敲除片段,即由*FolMSN2*基因上下游的各1 000 bp的片段和潮霉素磷酸转移酶基因全长片段构成的重组片段,来置换*FolMSN2*基因。利用十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTAB)方法裂解细胞提取野生型菌株4287基因组DNA(Talbot et al., 1993),并以DNA模板,用引物*FolMSN2*-F1/*FolMSN2*-F2和*FolMSN2*-F3/*FolMSN2*-F4(表1)进行PCR扩增,引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。100 μL PCR反应体系:2×Taq PCR预混试剂II 50 μL、10 μmol/L正反向引物各4 μL、模板1 μL,加无菌去离子水补足至100 μL。两对引物PCR反应程序均为:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸60 s,30个循环;72℃延伸7 min;4℃保存。另外以pCX62质粒为模板,利用引物HYH-F/HYH-R(表1)对潮霉素磷酸转移酶基因全长进行扩增,反应程序与上述相同,延伸时间为90 s。PCR产物经纯化回收后进行融合PCR(Yu et al., 2004),获得长度为3 400 bp的重组片段。再以该片段为模板,利用引物*FolMSN2*-F/*FolMSN2*-F(表1)进行PCR扩增,产物回收后用于原生质体转化(Hou et al., 2002),用含600 μg/mL潮霉素的CM平板对转化子进行筛选。

待原生质体转化后在CM平板上长出转化子,用灭菌的牙签将转化子转接至含有300 μg/mL潮霉素的CM平板上培养3 d后,采用CTAB法快速提取其DNA(Talbot et al., 1993),用得到的转化子基因组DNA为模板,分别用臂外引物*FolMSN2*-BY-F/HY-R和基因内部引物*FolMSN2*-id-F/*FolMSN2*-id-R(表1)进行PCR验证,20 μL PCR反应体系:2×Taq PCR预混试剂II 10 μL、10 μmol/L正反向引物各1 μL、模板1 μL,加无菌去离子水补足至20 μL。*FolMSN2*-id-F/R引物的PCR反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,30个循环;72℃延伸7 min。*FolMSN2*-BY-F/HY-R引物的反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸1 min 30 s,30个循环;72℃延伸7 min。挑选出前者扩增呈阳性而后者呈阴性的转化子作为候选*FolMSN2*突变体菌株。

表1 本试验中所用的引物
Table 1 Primers used in this study

| 引物名称 Primer name | 序列(5'-3') Sequence (5'-3') | 退火温度 $T_m/^\circ\text{C}$ | 用途 Function |
|---------------------|--|------------------------------|---|
| FolMSN2-F1 | TTGTTCCGAGTGGACAGTTT | 62.13 | 扩增 <i>FolMSN2</i> 上游片段 Amplifying <i>FolMSN2</i> upstream fragment |
| FolMSN2-F2 | CATTCATTGTTGACCTCCACTAGCTCCAAAAG-GCCTGTCACTCGCAA | 67.20 | 扩增 <i>FolMSN2</i> 上游片段 Amplifying <i>FolMSN2</i> upstream fragment |
| FolMSN2-F3 | GCAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGAGC-GACTTGACAGTACGTTGA | 67.90 | 扩增 <i>FolMSN2</i> 下游片段 Amplifying <i>FolMSN2</i> downstream fragment |
| FolMSN2-F4 | TAGCGGAGTTTGGTGGTGAA | 65.44 | 扩增 <i>FolMSN2</i> 下游片段 Amplifying <i>FolMSN2</i> downstream fragment |
| HYH-F | TGGAGCTAGTGGAGGTCAACAATGAATG | 72.05 | 扩增潮霉素磷酸转移酶 Amplifying <i>HPH</i> fragment |
| HYH-R | CGGTCGGCATCTACTCTATTCTTTGTC | 72.19 | 扩增潮霉素磷酸转移酶 Amplifying <i>HPH</i> fragment |
| FolMSN2-BY-F | AGCACATCCAGAGATGCA | 60.58 | 验证敲除突变体菌株 Validation of gene deletion mutant |
| HY/R | GTATTGACCGATTTCCTTGCGGTCCGAA | 76.34 | 验证敲除突变体菌株 Validation of gene deletion mutant |
| FolMSN2-id-F | TCAGCATGCTCGAACCCAT | 66.88 | 验证敲除突变体菌株 Validation of gene deletion mutant |
| FolMSN2-id-R | TTTATGGTGGTTCGTTGTCGT | 62.79 | 验证敲除突变体菌株 Validation of gene deletion mutant |
| FolMSN2-F | GCGAGTCTAATGCACCTTGAT | 63.04 | 扩增敲除片段 Amplifying knock-out fragment |
| FolMSN2-R | CTGGGCTTCCAACCATCAA | 65.99 | 扩增敲除片段 Amplifying knock-out fragment |
| GFP-R | CGGTGGTGCAGATGAACTTC | 65.67 | 验证回补载体 Verifying the vector for complementation |
| FolMSN2.com-F | ACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACTCAAATT-GGTTCCATGGCCCGTACTGGCAAGACTGC | 70.90 | 扩增回补片段 Amplifying the fragment for complementation |
| FolMSN2.com-R | CACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTG-CTCACTCAGAGCGCTTGCCTTCTT | 74.81 | 扩增回补片段 Amplifying the fragment for complementation |

为验证 *FolMSN2* 基因是否被敲除以及潮霉素磷酸转移酶基因的拷贝数,进行 Southern blot 分析。将候选突变体和野生型菌株接入 CM 液体培养基中,25℃、180 r/min 条件下培养 2 d 后,采用 CTAB 方法提取菌株的基因组 DNA(汤蔚,2015)。取所需的野生型和候选突变体菌株的基因组 DNA 各 5~10 μg,利用限制性内切酶 *Hind* III 和 *EcoR* V 对野生型 4287 和候选突变体的基因组进行酶切。同时,分别以 pCX62 质粒和野生型 4287 菌株的基因组为模板,利用引物 FolMSN2-id-F/FolMSN2-id-R 和 HYH-F/HYH-R(表 1)进行 PCR 扩增,100 μL PCR 反应体系:2×*Taq* PCR 预混试剂 II 50 μL、10 μmol/L 正反向引物各 4 μL、模板 1 μL,加无菌去离子水补足至 100 μL。FolMSN2-id-F/FolMSN2-id-R 引物的 PCR 反应程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,

72℃延伸 30 s,30 个循环;72℃延伸 7 min。HYH-F/HYH-R 引物的 PCR 反应程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,60℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,30 个循环;72℃延伸 7 min。分别扩增出 *FolMSN2* 的片段(Probe 1)和潮霉素磷酸转移酶基因(Probe *HPH*)作为探针并用地高辛标记后备用。将经限制性内切酶 *Hind* III 和 *EcoR* V 酶切消解后的野生型 4287 和候选突变体转化子的基因组 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳分离,然后转印到尼龙膜上。

将转印完成的尼龙膜置于洁净的培养皿中进行中和及固定,置于杂交管中进行预杂交,再与地高辛标记后的探针进行杂交反应。反应结束后用缓冲液洗涤尼龙膜,最终将膜置于显色溶液中,黑暗条件下静置,直至所需条带的亮度达到要求后,用 50 mL 无菌双蒸水或 pH 8 的 1×TE 洗膜 5 min 以终止显色反

应;拍照记录尼龙膜显色图像。

1.2.2 回补体菌株的构建与鉴定

以野生型菌株4287的基因组DNA为模板,用引物FolMSN2.com-F/FolMSN2.com-R(表1)扩增FolMSN2基因的上游启动子和全长回补片段,100 μ L PCR反应体系:2 \times Taq PCR预混试剂II 50 μ L、10 μ mol/L正反向引物各4 μ L、模板1 μ L,加无菌去离子水补足至100 μ L。PCR反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸30 s,30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸7 min。产物纯化回收后与经Xho I线性化的pGF11载体片段共转化至酵母中,在酵母色氨酸缺陷型培养基上进行筛选。用引物FolMSN2-id-F/GFP-R进行菌落PCR鉴定阳性克隆,20 μ L PCR反应体系:2 \times Taq PCR预混试剂II 10 μ L、10 μ mol/L正反向引物各1 μ L、菌落模板1 μ L,加无菌去离子水补足至20 μ L。PCR反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸90 s,30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸7 min,取阳性菌落扩培提取质粒,进行大肠杆菌*Escherichia coli*转化。待长出转化子后,再用引物FolMSN2-id-F/GFP-R进行PCR鉴定,PCR反应体系及反应条件同上,取阳性菌株测序以检测回补载体的准确性,获得回补载体pGF11::FolMSN2::GFP。将测序正确的载体质粒经原生质体转化转入突变体菌株中,并使用博来霉素和遗传霉素(G418)进行筛选,用荧光显微镜对转化子进行荧光筛选。对具有绿色荧光的转化子提取DNA进行PCR验证和相关生物学表型的测定,PCR引物为FolMSN2-id-F/GFP-R,20 μ L PCR反应体系:2 \times Taq PCR预混试剂II 10 μ L、10 μ mol/L正反向引物各1 μ L、模板1 μ L,加无菌去离子水补足至20 μ L。PCR反应程序:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸90 s,30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸7 min,PCR结果呈阳性且表型恢复至与野生型一致的即为回补体菌株(王如锋等,2020)。

1.2.3 FolMSN2基因缺失突变体的生长和产孢分析

生长速率测定:将野生型菌株4287、FolMSN2基因缺失突变体及回补体菌株活化接种至CM培养基上,在28 $^{\circ}$ C黑暗培养2 d后,分别从不同菌株菌落边缘取约2 mm \times 2 mm的菌丝块接种于PDA、MM、CM培养基上,于28 $^{\circ}$ C黑暗培养3 d后观察菌落形态,测量菌落直径并拍照,每种菌株设4个重复,试验重复3次。

产孢量测定:将在CM培养基上生长良好的野生型4287、FolMSN2基因缺失突变体及回补体菌株

接种至PDB液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、150 r/min条件下培养2 d后,收集孢子,并将其浓度调至 10^4 个/mL。将3 mL孢子悬浮液接种于50 mL PDB液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、150 r/min条件下培养3~4 d后,收集孢子液用血球计数板统计孢子浓度(Mes et al., 1999)。试验重复3次。

1.2.4 FolMSN2基因缺失突变体对环境胁迫应答测定

为探究FolMSN2基因缺失突变体对不同环境胁迫因子的应答情况,设置5种胁迫因子,分别为盐胁迫因子(0.5 mol/L NaCl)、渗透压胁迫因子(0.8 mol/L山梨醇)、细胞壁胁迫因子(0.2 g/L CFW、0.2 g/L CR)和氧化压力胁迫因子(20 mmol/L H₂O₂)。分别从已活化的野生型菌株4287、FolMSN2基因缺失突变体及回补体菌株菌落的边缘取大小为2 mm \times 2 mm的菌丝块接种于含有不同胁迫剂的CM平板上,于28 $^{\circ}$ C黑暗培养3 d后测量其菌落直径并拍照。每个处理4个重复,试验重复3次。

1.2.5 FolMSN2基因缺失突变体的致病性分析

测定FolMSN2基因缺失突变体对番茄幼苗的致病性。于CM平板上活化的野生型菌株4287、FolMSN2基因缺失突变体及回补体菌株菌落边缘取大小为2 mm \times 2 mm的菌丝块接种于50 mL PDB液体培养基中,28 $^{\circ}$ C、150 r/min条件下摇培2 d后,收集孢子,离心后用无菌水悬浮,将孢子浓度用血球计数板调至 5×10^6 个/mL。同时将长至2叶1心期健壮的番茄幼苗从土壤中挖出,将幼苗根部用清水洗干净,再将幼苗根部置于浓度为 5×10^6 个/mL的孢子悬浮液中进行浸泡接种(Wellman, 1939; Mes et al., 1999),放置于摇床上,在70 r/min下浸泡40 min,随后将接种好的番茄幼苗重新移栽回土壤中,置于28 $^{\circ}$ C、光照周期12 L:12 D条件下培养,观察死亡情况,以接种无菌水的番茄幼苗为对照,分别计算植株的死亡率,死亡率=接种植物死亡株数/接种植物总数,并及时进行拍照。每株菌株接种10株番茄幼苗,试验重复3次。

测定FolMSN2基因缺失突变体对番茄果实的致病性。收集上述3种菌株的孢子,并配制浓度为 1×10^6 个/mL的孢子悬浮液。同时挑选大小一致、果肉饱满的番茄果实,清洗干净后用75%酒精进行表面消毒。随后用灭菌牙签在番茄果实上扎出1个深度约为1 cm的伤口,再向其中注入5 μ L孢子悬浮液,于28 $^{\circ}$ C保湿避光培养6 d,观察果实发病情况并拍照记录。每个处理4个重复,试验重复3次。

取上述接种21 d后的番茄幼苗进行真菌恢复试

验,将植株清洗干净并去除叶片和根,将茎剪成1.5~2 cm的小段。将这些茎段置于70%酒精中消毒1 min,随后转入10% H₂O₂中并于20 r/min条件下摇培1 h,用无菌水冲洗3次,接种至PDA培养基上,28℃避光培养4 d(Zhao et al., 2017)。观察茎段上菌丝的生长情况,并拍照记录。每株菌株使用2株番茄幼苗,试验重复3次。

玻璃纸穿透试验:将灭菌的玻璃纸平铺在MM平板上,分别取新鲜活化的野生型菌株4287、*FolMSN2*基因缺失突变体及回补体菌株大小2 mm×2 mm的菌块接种于玻璃纸上,后置于28℃黑暗培养4 d,在超净台中撕去玻璃纸,再放回培养箱中,28℃黑暗培养4~5 d(Zhao et al., 2017)。观察菌落的生长情况,并拍照记录。每株菌株4个重复,试验重复3次。

1.2.6 *FolMsn2* 蛋白的定位观察

取少许新鲜活化的回补体菌株菌落接种于CM液体培养基中,28℃、150 r/min条件下摇培12 h,并用细胞核染色剂4',6-二脒基-2-苯基吡啶对菌丝、孢子进行染色,然后于激光共聚焦显微镜下观察菌丝、孢子中细胞核和绿色荧光的定位情况。共观察6个视野,每个视野5根菌丝、10个孢子。

1.3 数据分析

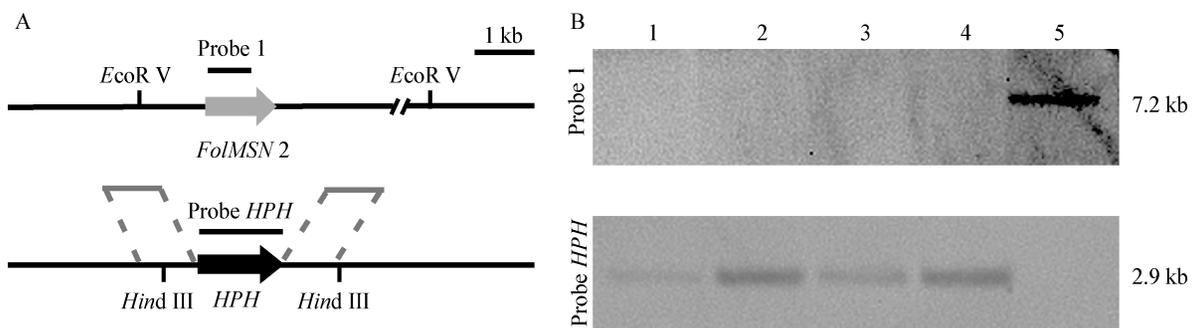
试验数据采用Excel 2010和DPS 18.10软件进行单因素方差分析,采用Duncan氏新复极差法进行

差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 *FolMSN2* 基因缺失突变体的鉴定

利用同源重组方法构建了与*FolMSN2*基因上下臂同源的重组片段来敲除该基因(图1-A)。经原生质体转化后,用潮霉素进行筛选,并对得到的转化子进行PCR验证,最终获得4个正确的转化子,分别为*FolMSN2*基因候选突变体3号、8号、9号和10号。对这4个候选突变体进行Southern blot试验,以Probe 1(*FolMSN2*内部基因片段)为探针的杂交结果显示,野生型菌株4287显示出7.2 kb大小的条带,4个候选突变体均无条带,表明4个转化子中的*MSN2*基因均被成功敲除;以Probe *HPH*为探针的杂交结果显示,野生型菌株4287中无条带,4个候选突变体均扩增出1条单一的2.9 kb大小的条带,表明4个转化子中的*HPH*基因均为单拷贝(图1-B)。表明这4个候选突变体均为*FolMSN2*基因缺失突变体菌株,且4个突变体菌株在表型上无明显差异,故仅选取*FolMSN2*的8号基因缺失突变体用于后续试验,并命名为 $\Delta Folmsn2$ 。将测序正确的回补质粒pGF11::*FolMSN2*::*GFP*转化至 $\Delta Folmsn2$ 突变体中,筛选获得已恢复表型的回补荧光菌株,并命名为 $\Delta Folmsn2-C$ 。



A: *FolMSN2* 基因敲除原理及进行 Southern blot 时的酶切位点; B: 4 个候选突变体的 Southern blot 杂交结果分析。Probe 1: *FolMSN2* 基因探针; Probe *HPH*: 潮霉素基因探针; *EcoR V*、*Hind III*: 限制性内切酶。1~4: *FolMSN2* 基因突变体 3 号、8 号、9 号、10 号; 5: 野生型菌株 4287。A: Strategy of knocking out *FolMSN2* gene and restriction site performing Southern blot; B: Southern blot analysis of four suspected mutants. Probe 1: Probe of *FolMSN2* gene; Probe *HPH*: probe of *HPH* gene; *EcoR V*, *Hind III*: restriction endonuclease. 1~4: The *FolMSN2* gene deletion mutant no. 3, no. 8, no. 9 and no. 10; 5: the wild type strain 4287.

图1 *FolMSN2* 基因的敲除及鉴定

Fig. 1 The targeted deletion of *FolMSN2* gene and identification of mutants

2.2 番茄枯萎病菌的营养生长及产孢量

FolMSN2 基因缺失突变体 $\Delta Folmsn2$ 在 CM、PDA、MM 培养基上的生长速率较野生型菌株 4287 和 $\Delta Folmsn2-C$ 菌株均显著减小(图 2-A、B),表明

FolMSN2 参与调控番茄枯萎病菌的营养生长过程。突变体的产孢量显著减少,仅为野生型菌株的 6.7%(图 2-C),表明 *FolMSN2* 参与调控番茄枯萎病菌的无性繁殖。

2.3 *FolMSN2*参与番茄枯萎病菌环境胁迫的应答过程

将野生型菌株 4287、 $\Delta Folmsn2$ 和 $\Delta Folmsn2-C$ 菌株分别接种在含有 NaCl、山梨醇、CFW、CR 以及 H_2O_2 的 CM 平板上。NaCl 和山梨醇对 $\Delta Folmsn2$ 的菌丝抑制率比野生型菌株 4287 分别高 74.85% 和 95.01%; CFW、CR、 H_2O_2 对 $\Delta Folmsn2$ 的菌丝抑制率

比野生型菌株 4287 分别低 11.52%、21.41% 和 8.94%, 表明 $\Delta Folmsn2$ 菌株对 NaCl、山梨醇的敏感性显著高于野生型和回补体菌株, 而对 CFW、CR、 H_2O_2 表现出更强的耐受性(图 3-A、B)。说明 *FolMSN2* 参与了番茄枯萎病菌对环境胁迫的应答过程。

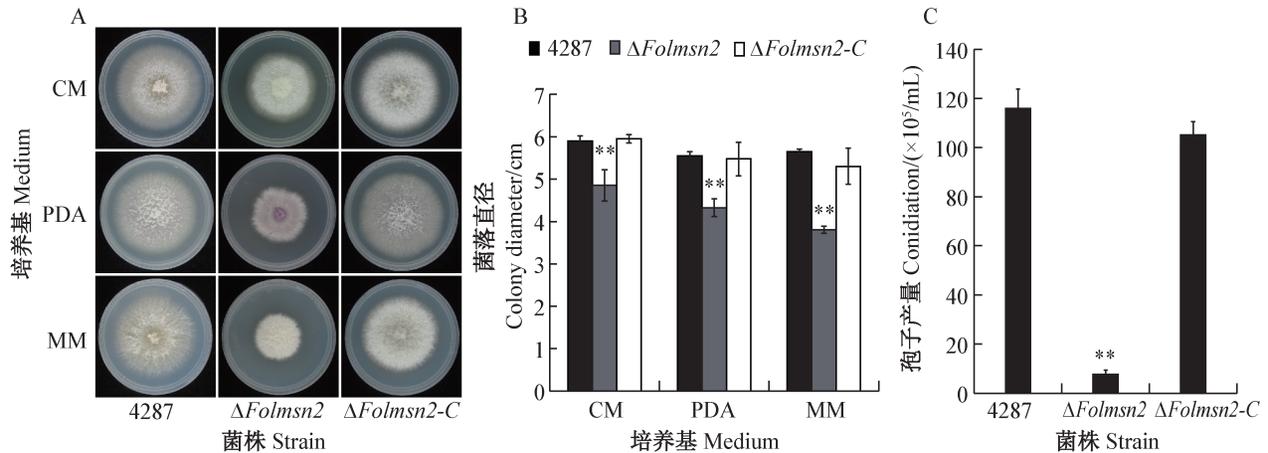
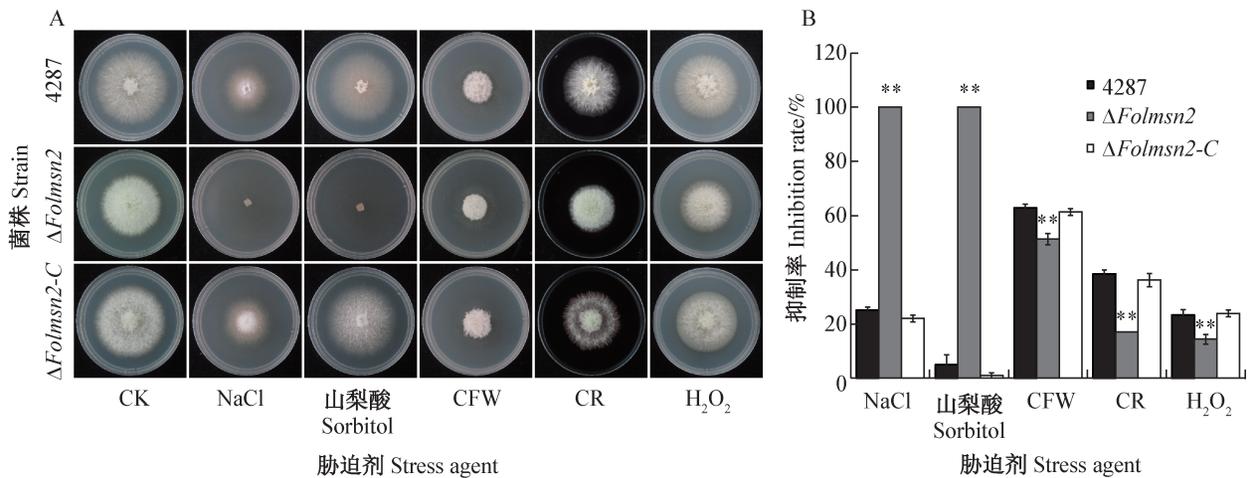


图 2 番茄枯萎病菌野生型 4287、 $\Delta Folmsn2$ 、 $\Delta Folmsn2-C$ 菌株在不同培养基上的菌丝形态(A)、菌丝生长(B)以及产孢量(C)

Fig. 2 The colony morphology (A), hyphal growth (B) and conidiation (C) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287, $\Delta Folmsn2$ and $\Delta Folmsn2-C$ strains

图中数据均为平均数 \pm 标准误。**表示不同菌株间经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.01$ 水平差异显著。Data are mean \pm SE. ** indicate significant difference among different strains at $P < 0.01$ level by Duncan's new multiple range test.



CFW: 荧光增白剂; CR: 刚果红。CFW: Calcoflour white; CR: congo red.

图 3 番茄枯萎病菌野生型 4287、 $\Delta Folmsn2$ 、 $\Delta Folmsn2-C$ 菌株在含有不同胁迫因子的平板上的菌落形态(A)以及抑制率(B)

Fig. 3 The colony morphology (A) and growth inhibition (B) of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287, $\Delta Folmsn2$, and $\Delta Folmsn2-C$ strains on CM plates containing different stressors

图中数据均为平均数 \pm 标准误。**表示不同菌株间经 Duncan 氏新复极差法检验在 $P < 0.01$ 水平差异显著。Data are mean \pm SE. ** indicates significant difference among different strains at $P < 0.01$ level by Duncan's new multiple range test.

2.4 *FolMSN2*参与调控番茄枯萎病菌的致病过程

与野生型菌株 4287 和 $\Delta Folmsn2-C$ 菌株相比, 接种突变体 $\Delta Folmsn2$ 的番茄幼苗发病程度明显减

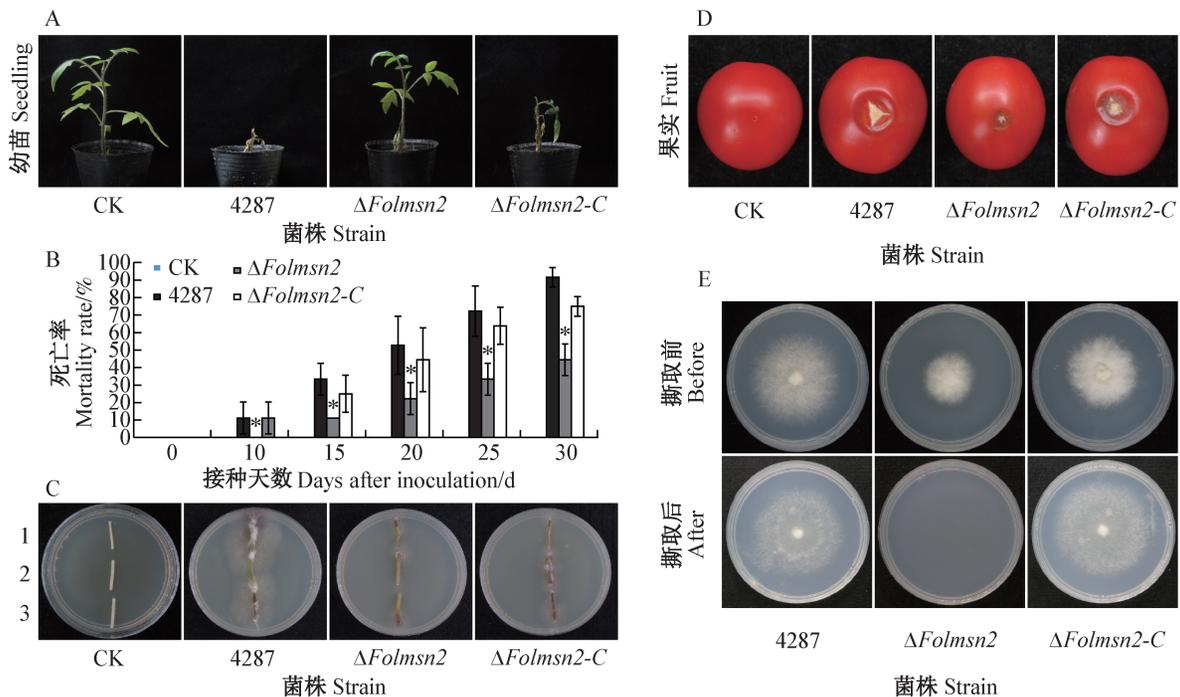
弱(图 4-A); 且接种突变体 $\Delta Folmsn2$ 的番茄幼苗死亡率小于接种野生型 4287 和 $\Delta Folmsn2-C$ 菌株的番茄幼苗(图 4-B), 接种突变体 $\Delta Folmsn2$ 的番茄幼苗

的死亡率在第10、15、20、25、30天分别比野生型菌株的死亡率低11.11%、22.22%、30.56%、38.89%和47.22%;在真菌恢复试验中,在3种菌株接种的整个茎中均有番茄枯萎病菌定殖,但突变体 $\Delta Folmsn2$ 在培养基上恢复生长的菌丝量明显少于野生型菌株4287和 $\Delta Folmsn2-C$ 菌株(图4-C)。表明在番茄枯萎病菌侵染番茄幼苗的过程中, $FolMSN2$ 基因的缺失导致番茄枯萎病菌的致病力下降,定殖在植物组织内的菌丝量明显减少,说明 $FolMSN2$ 参与调控番茄枯萎病菌的致病过程。

接种突变体 $\Delta Folmsn2$ 的果实腐烂程度明显低

于野生型菌株4287和 $\Delta Folmsn2-C$ 菌株,突变体 $\Delta Folmsn2$ 对植物果实组织浸润(软化)能力显著下降,且果实表面的菌丝量明显减少(图4-D),表明 $FolMSN2$ 基因在番茄枯萎病菌侵染果实的过程中起着重要作用。

在铺有灭菌玻璃纸的平板上,野生型、突变体和回补体菌株均有菌落长出;撕去玻璃纸培养4 d后,突变体 $\Delta Folmsn2$ 在培养基上没有菌落长出,野生型4287和 $\Delta Folmsn2-C$ 菌株则产生菌落(图4-E),说明野生型和回补体菌株已穿透玻璃纸,表明 $FolMSN2$ 基因缺失显著影响了番茄枯萎病菌对玻璃纸的穿透能力。



A: 番茄幼苗在接种后的发病症状; B: 接种后的番茄幼苗的发病情况统计; C: 真菌恢复试验中茎段在PDA平板上的菌丝生长情况,1为茎部上段,2为茎部中段,3为茎部下段; D: 菌株孢子悬浮液接种番茄果实后的发病症状; E: 菌株穿透玻璃纸的能力测定。CK为无菌水对照。A: Disease symptoms of tomato seedlings inoculated with conidial suspension. B: Statistical analysis of the mortality rate of tomato seedlings after inoculation. C: The mycelium growth from the tomato seedling stems pieces on the PDA plates in the fungal recovery assays, 1: upper stem; 2: middle stem; 3: bottom stem. D: The symptoms of tomato fruits inoculated with the conidial suspension of each strain. E: Penetration of cellophane by fungal hyphae. CK: ddH₂O.

图4 番茄枯萎病菌野生型菌株4287、 $\Delta Folmsn2$ 和 $\Delta Folmsn2-C$ 菌株对番茄的致病性及其玻璃纸穿透能力

Fig. 4 Pathogenicity assays on tomato seedlings and penetration of cellophane with *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* 4287, $\Delta Folmsn2$, and $\Delta Folmsn2-C$ strains

图中数据均为平均数±标准误。*表示不同菌株间经Duncan氏新复极差法检验在 $P<0.05$ 水平差异显著。Data are mean±SE. * indicates significant difference among different strains at $P<0.05$ level by Duncan's new multiple range test.

2.5 FolMsn2定位于细胞核

将回补荧光载体pGF11:: $FolMSN2$:: GFP 导入突变体中获得回补荧光菌株,将该菌株的孢子、菌丝制成玻片,并用细胞核染料DAPI进行染色,于激光共聚焦显微镜下观察绿色荧光的定位。结果显示,

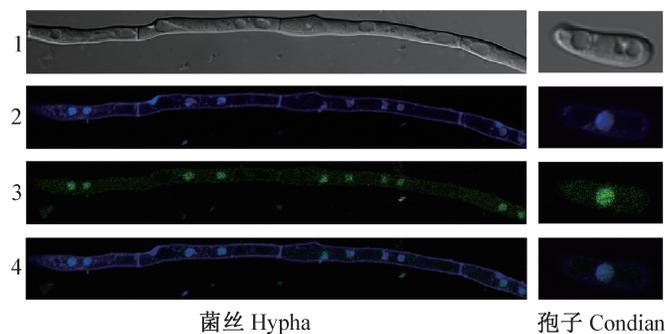
绿色荧光聚集的位置与DAPI标记的位置重叠(图5),表明FolMsn2在细胞内定位于细胞核中。

3 讨论

病原真菌在与寄主的互作过程中需要面对来

自寄主和自然环境的压力应激(Pietro et al., 2001)。在受到外界压力刺激后,细胞会激活一系列应激反应相关基因的表达,激活环境应激反应(Görner et al., 1998; Domitrovic et al., 2006; Stewart-Ornstein et al., 2013)。环境应激反应是由不同压力引起的共同响应,在压力刺激期间保护关键细胞功能,并且在不同压力条件下提供交叉保护(Gasch et al., 2000; Domitrovic et al., 2006)。在酿酒酵母中, Msn2/4 是应激反应中基因表达的关键调控因子,在环境应激反应中扮演着主导作用(Stewart-Ornstein et al., 2013)。本研究从番茄枯萎病菌中鉴定到1个与酿酒酵母 *MSN2* 的同源基因 *FolMSN2*, 通过基因敲除

方法获得了 *FolMSN2* 基因缺失突变体并进行功能回补,对其在番茄枯萎病菌中的生物学功能进行了初步分析,结果发现, *FolMsn2* 蛋白定位于细胞核中,缺失 *FolMSN2* 后,突变体生长速率和孢子产量显著降低,对外界环境响应发生显著变化,致病力和穿透玻璃纸能力显著下降;回补体菌株均能在一定程度上回补突变体的表型缺陷。这种部分恢复的表型缺陷可能是由于回补的基因片段是随机插入在基因组的某一位置,并不是原位回补,可能存在位置效应,导致没有完全恢复到野生型水平。本研究表明, *FolMsn2* 在番茄枯萎病菌生长发育及致病过程中具有重要作用。



1: 微分干涉成像通道; 2: 紫外激发细胞核染料 DAPI 染色通道; 3: 绿色荧光通道; 4: 2 和 3 荧光叠加通道。1: Differential interference contrast channel; 2: DAPI staining under the UV channel; 3: GFP channel; 4: merged by channel 2 and 3.

图5 番茄枯萎病菌中 *FolMsn2* 的亚细胞定位

Fig. 5 The subcellular localization of *FolMsn2* of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*

在稻瘟病菌和大丽轮枝菌的研究中发现 *MSN2* 基因的缺失均导致了病原菌在菌丝生长、分生孢子产生上出现缺陷(Zhang et al., 2014; Tian et al., 2017)。本研究与此结果一致, Δ *Folmsn2* 的生长速率和分生孢子产量较野生型、回补体菌株均显著下降,表明 *FolMSN2* 基因参与了番茄枯萎病菌的营养生长和无性繁殖的过程,说明 *Msn2* 蛋白在调控植物病原真菌生长及无性繁殖过程中的作用较为保守。但是,在虫生真菌球孢白僵菌和绿僵菌 *Metarhizium robertsii* 中的研究表明, *MSN2* 的缺失基本不影响真菌气生菌丝的生长,但是分生孢子的产量显著减少(Liu et al., 2013)。上述结果说明在不同寄主类别的病原真菌中 *MSN2* 基因的功能可能出现了分化。

在对各类胁迫因子的应答测定试验中,相较于野生型菌株 4287 和 Δ *Folmsn2-C* 菌株,突变体 Δ *Folmsn2* 对盐胁迫因子、渗透压胁迫因子更加敏感,这也与对稻瘟病菌、白僵菌和绿僵菌的研究结果相一致(Liu et al., 2013; Zhang et al., 2014)。已知 *Msn2* 是高渗透压通路下游的转录因子,本研究中由于

FolMSN2 基因的缺失, MAPK 途径调控的高渗透压通路对外界盐胁迫和渗透压胁迫的应答受到了严重影响,从而变得更加敏感;同时本研究也发现 Δ *Folmsn2* 对细胞壁胁迫因子、氧化压力胁迫因子均表现出更强的耐受性,此结果与稻瘟病菌中 *MoMSN2* 基因的缺失导致突变体对细胞壁胁迫因子的耐受性更强的结论相一致(Zhang et al., 2014),表明缺失 *FolMSN2* 后显著影响了病原菌感知外界渗透压、细胞壁和氧化压力胁迫信号。但在大丽轮枝菌和白色念珠菌 *Candida albicans* 中发现 *MSN2* 基因并不参与调控对渗透压和细胞壁胁迫的应答过程(Nicholls et al., 2004; Tian et al., 2017)。因此本研究推测在不同丝状真菌中 *MSN2* 调控胁迫应答的功能可能出现了分化。在酿酒酵母中, *Msn2* 和 *Msn4* 两个转录因子的组成结构基本相似,两者功能具有冗余性,2 个单基因缺失突变体在面对压力应激时没有明显的表型缺陷,而双基因缺失突变体对于营养饥饿、热应激、渗透压以及氧化压力等胁迫敏感性显著升高(Görner et al., 1998; 李潇等, 2018)。与酿酒酵母相似,在白色念珠菌中,缺失 *CaMsn4* 和 *CaMnl1*

(Msn2- and Msn4-like)后,突变体在面对各种压力刺激时,由于两者存在功能冗余,单基因缺失突变体不表现出明显的表型缺陷。在番茄枯萎病菌中,仅存在MSN2的同源基因,并不存在MSN4的同源基因。此外, $\Delta Folmsn2$ 菌株对细胞壁胁迫表现更加敏感。在真菌中,细胞壁完整性途径与渗透压响应途径并不是相对独立的,而是存在交叉对话且相互影响的(Fuchs & Mylonakis, 2009)。结合本研究结果推测FolMsn2作为渗透压响应途径下游转录因子,缺失后显著破坏了其对渗透压的响应过程;同时可能影响了突变体细胞壁完整性途径的稳态平衡,造成相关表型的缺陷。但其具体的调控机制还有待进一步深入研究。

本研究对番茄幼苗和果实的致病性试验发现 $\Delta Folmsn2$ 的致病力明显减弱,浸润果实和侵袭生长的能力显著下降。番茄枯萎病菌在侵入宿主植物的过程中,必然会受到来自宿主的防御反应所带来的各种压力信号,如pH变化、细胞壁压力、氧化胁迫和渗透压等(Fuchs & Mylonakis, 2009)。由于FolMSN2基因的缺失,导致编码具有应激响应功能的靶基因表达受阻,这可能是导致突变体致病力下降的原因之一。同时玻璃纸穿透试验结果显示,突变体的穿透力显著下降,表明FolMSN2可能通过调控番茄枯萎病菌的穿透生长影响致病过程。另外,对FolMsn2进行定位观察发现其定位于细胞核,这也与FolMSN2作为转录因子在细胞核中发挥转录调控功能相吻合。但在酿酒酵母中,Msn2/4定位在细胞质中,在压力刺激时向细胞核中迁移(Görner et al., 1998)。这也说明Msn2/4在不同真菌中的定位具有一定差异。

综上,本研究结果初步解析了转录因子FolMsn2在番茄枯萎病菌中的生物学功能,为进一步深入研究丝状真菌中Msn2参与调控细胞的应激反应机制提供了基础,同时也为以该基因为靶标开发新型绿色防控农药和方法提供了理论支持,FolMSN2基因是如何参与调控细胞对外界压力刺激的应答以及关于致病性具体机制还尚待进一步研究。

参 考 文 献 (References)

- Boy-Marcotte E, Garmendia C, Garreau H, Lallet S, Mallet L, Jacquet M. 2006. The transcriptional activation region of Msn2p, in *Saccharomyces cerevisiae*, is regulated by stress but is insensitive to the cAMP signalling pathway. *Molecular Genetics and Genomics*, 275(3): 277–287
- Boy-Marcotte E, Perrot M, Bussereau F, Boucherie H, Jacquet M. 1998. Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 180(5): 1044–1052
- Bravo-Ruiz G, Ruiz-Roldán C, Roncero MIG. 2013. Lipolytic system of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 26(9): 1054–1067
- Cai L, Dalal CK, Elowitz MB. 2008. Frequency-modulated nuclear localization bursts coordinate gene regulation. *Nature*, 455(7212): 485–490
- Caracuel Z, Roncero MIG, Espeso EA, García-Verdejo CI, García-Maceira FI, Di Pietro A. 2003. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology*, 48(3): 765–779
- Carmona SL, Burbano-David D, Gómez MR, Lopez W, Ceballos N, Castano-Zapata J, Simbaqueba J, Soto-Suárez M. 2020. Characterization of pathogenic and nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates associated with commercial tomato crops in the Andean region of Colombia. *Pathogens*, 9(1): 70
- Domitrovic T, Fernandes CM, Boy-Marcotte E, Kurtenbach E. 2006. High hydrostatic pressure activates gene expression through Msn2/4 stress transcription factors which are involved in the acquired tolerance by mild pressure precondition in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 580(26): 6033–6038
- Fuchs BB, Mylonakis E. 2009. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryotic Cell*, 8(11): 1616–1625
- García-Sánchez MA, Martín-Rodrigues N, Ramos B, de Vega-Bartol JJ, Perlin MH, Díaz-Minguez JM. 2010. *fos12*, the *Fusarium oxysporum* homolog of the transcription factor Ste12, is upregulated during plant infection and required for virulence. *Fungal Genetics and Biology*, 47(3): 216–225
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12): 4241–4257
- Görner W, Durchschlag E, Martínez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, Schüller C. 1998. Nuclear localization of the C₂H₂ zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes & Development*, 12(4): 586–597
- Hou ZM, Xue CY, Peng YL, Katan T, Kistler HC, Xu JR. 2002. A mitogen-activated protein kinase gene (*MGVI*) in *Fusarium graminearum* is required for female fertility, heterokaryon formation, and plant infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 15(11): 1119–1127
- Li X, Dong SS, Fu XM, Wang PF, Dong J. 2018. Investigation on stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* of overexpression of transcription factor MSN2 gene. *Modern Food Science and Technology*, 34(9): 95–101 (in Chinese) [李潇, 董胜胜, 付肖蒙, 王鹏飞, 董健. 2018. 转录因子MSN2基因过表达对酿酒酵母耐受性的影响. *现代食品科技*, 34(9): 95–101]

- Liu Q, Ying SH, Li JG, Tian CG, Feng MG. 2013. Insight into the transcriptional regulation of Msn2 required for conidiation, multi-stress responses and virulence of two entomopathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 54(1): 42–51
- Martínez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F. 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO Journal*, 15(9): 2227–2235
- Mes JJ, Weststeijn EA, Herlaar F, Lambalk JJM, Wijbrandi J, Haring MA, Cornelissen BJC. 1999. Biological and molecular characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* divides race 1 isolates into separate virulence groups. *Phytopathology*, 89(2): 156–160
- Michielse CB, van Wijk R, Reijnen L, Manders EMM, Boas S, Olivain C, Alabouvette C, Rep M. 2009. The nuclear protein Sge1 of *Fusarium oxysporum* is required for parasitic growth. *PLoS Pathogens*, 5(10): e1000637
- Moskvina E, Schüller C, Maurer CT, Mager WH, Ruis H. 1998. A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast*, 14(11): 1041–1050
- Nicholls S, Traffon M, Enjalbert B, Nantel A, Macaskill S, Whiteway M, Brown AJP. 2004. Msn2- and Msn4-like transcription factors play no obvious roles in the stress responses of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Eukaryotic Cell*, 3(5): 1111–1123
- Niño-Sánchez J, Castillo VCD, Tello V, Devesga-Bartol JJ, Ramos B, Sukno SA, Mínguez JMD. 2016. The FTF gene family regulates virulence and expression of six effectors in *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant Pathology*, 17(7): 1124–1139
- Pietro AD, García-Maceira FI, Mègelecz E, Roncero MIG. 2001. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 39(5): 1140–1152
- Rep M, Kistler HC. 2010. The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(4): 420–426
- Ruiz-Roldán C, Pareja-Jaime Y, González-Reyes J, Roncero MIG. 2015. The transcription factor Con7-1 is a master regulator of morphogenesis and virulence in *Fusarium oxysporum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 28(1): 55–68
- Schmitt AP, Mcentee K. 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12): 5777–5782
- Schüller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, Ruis H. 1994. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *The EMBO Journal*, 13(18): 4382–4389
- Srinivas C, Devi DN, Murthy KN, Mohan CD, Lakshmeesha TR, Singh B, Kalagatur NK, Niranjana SR, Hashem A, Alqarawi AA, et al. 2019. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* causal agent of vascular wilt disease of tomato: biology to diversity: a review. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(7): 1315–1324
- Stewart-Ornstein J, Nelson CS, Derisi JL, Weissman JS, Elsamad H. 2013. Msn2 coordinates a stoichiometric gene expression program. *Current Biology*, 23(23): 2336–2345
- Talbot NJ, Salch YP, Ma M, Hamer JE. 1993. Karyotypic variation within clonal lineages of the rice blast fungus, *Magnaporthe grisea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(2): 585–593
- Tang W. 2015. Functional analysis of unfolded protein response associated genes *MoHAC1* and *MoIRE1* in *Magnaporthe oryzae*. PhD thesis. Nanjing: Nanjing Agricultural University (in Chinese) [汤蔚. 2015. 非折叠蛋白反应相关基因 *MoHAC1* 和 *MoIRE1* 在稻瘟病菌生长发育和致病过程中的功能分析. 博士学位论文. 南京: 南京农业大学]
- Tian LY, Yu J, Wang YL, Tian CM. 2017. The C₂H₂ transcription factor VdMsn2 controls hyphal growth, microsclerotia formation, and virulence of *Verticillium dahliae*. *Fungal Biology*, 121(12): 1001–1010
- Wang RF, Wen J, Zhao GY, Wang M, Chen XH, Osakina A, Wang ZH, Tang W. 2020. *MoHRD3* is important in the regulation of the fungal development and pathogenesis of *Magnaporthe oryzae*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 50(1): 68–79 (in Chinese) [王如锋, 文佳, 赵桂媛, 王敏, 陈雪杭, Osakina A, 王宗华, 汤蔚. 2020. *MoHRD3* 基因参与调控稻瘟病菌的生长发育和致病力. 植物病理学报, 50(1): 68–79]
- Wellman FL. 1939. A technique for studying host resistance and pathogenicity in tomato *Fusarium* wilt. *Phytopathology*, 29: 945–956
- Yu JH, Hamari Z, Hank KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C. 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11): 973–981
- Yun YZ, Zhou X, Yang S, Wen Y, You HX, Zheng YR, Norvinyeku J, Shim WB, Wang ZH. 2019. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* C₂H₂ transcription factor FolCzfl1 is required for conidiation, fusaric acid production, and early host infection. *Current Genetics*, 65(3): 773–783
- Zhang B, Qiao JQ, Liang XJ, Liu YZ, Chen ZY. 2015. Evaluation of antagonistic bacteria against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *Ralstonia solanacearum*. *Journal of Plant Protection*, 42(3): 353–361 (in Chinese) [张斌, 乔俊卿, 梁雪杰, 刘邮洲, 陈志谊. 2015. 番茄枯萎病菌和青枯病菌拮抗细菌的评价. 植物保护学报, 42(3): 353–361]
- Zhang HF, Zhao Q, Guo XX, Guo M, Qi ZQ, Tang W, Dong YH, Ye WW, Zheng XB, Wang P. 2014. Pleiotropic function of the putative zinc-finger protein MoMsn2 in *Magnaporthe oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(5): 446–460
- Zhao YL, Zhang T, Guo HS. 2017. Penetration assays, fungal recovery and pathogenicity assays for *Verticillium dahliae*. *Bio-protocol*, 7(4): e2133

(责任编辑:王璇)