*MfMel1*基因参与调控桃褐腐病菌对桃果实的致病力

谷文倩[1] 阴伟晓[2] 罗朝喜[1,2*]

（1. 华中农业大学，果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室，武汉 430070；2. 华中农业大学植物科技学院，湖北省作物病害监测及安全控制重点实验室，武汉 430070）

摘要：为明确*MfMel1*基因在桃褐腐病菌*Monilinia fructicola*中的功能，利用生物信息学软件对该基因的结构、所编码蛋白的保守结构域以及进化关系进行分析；通过遗传转化方法对该基因进行敲除，并进行表型分析。结果显示，敲除转化子△*MfMel1*菌株的菌丝生长速率、孢子萌发率与野生型菌株Bmpc7均无显著差异，但产孢量显著降低。△*MfMel1*菌株在0.01% SDS、600 μg/mL刚果红、150 g/L甘油、200 g/L蔗糖、6 mmol/L H_2O_2、4% NaCl和1.2 mmol/L山梨醇培养基上的生长速率、菌丝形态均无显著变化，但对200 g/L葡萄糖的渗透胁迫敏感性增强。敲除转化子△*MfMel1*菌株的*α*-半乳糖苷酶活性明显降低，对桃果实的致病力显著下降。表明*MfMel1*基因在桃褐腐病菌中可能通过参与调控*α*-半乳糖苷酶酶活，从而参与病原菌的致病。

关键词：桃褐腐病菌；*MfMel1*基因；糖苷水解酶；侵染机制；*α*-半乳糖苷酶

MfMel1 gene participates in the pathogenicity of pathogen fungus *Monilinia fructicola* on peach fruits

Gu Wenqian[1] Yin Weixiao[2] Luo Chaoxi[1,2*]

（1. National Key Laboratory for Germplasm Innovation & Utilization of Horticultural Crops, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China; 2. Hubei Key Laboratory of Plant Pathology, College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, Hubei Province, China）

Abstract: In order to illustrate the functions of *MfMel1* in pathogen fungus *Monilinia fructicola*, the gene structure, conserved domain and evolutionary relationships of the predicted protein were analyzed using bioinformatic software. The gene was knocked out through the genetic transformation, and the phenotypes of the mutants were investigated. No significant difference was observed for the mycelial growth and spore germination between knockout transformants △*MfMel1* and wild type strain Bmpc7. However, the sporulation of △*MfMel1* strains decreased significantly compared to Bmpc7. △*MfMel1* strains showed increased sensitivity to 200 g/L glucose, but not to 0.01% SDS, 600 μg/mL congo red, 150 g/L glycerol, 200 g/L sucrose, 6 mmol/L H_2O_2, 4% NaCl, or 1.2 mmol/L sorbitol. △*MfMel1* strains exhibited significantly decreased virulence on peach fruit and reduced activity of *α*-galactosidase. The results indicated that *MfMel1* was involved in regulating the *α*-galactosidase activity, thus playing an important role during the infection of *M. fructicola* on peach fruit.

Key words: peach brown rot; *MfMel1* gene; glycoside reductase; infection mechanism; *α*-galactosidase

桃褐腐病是由美澳型核果链核盘菌*Monilinia fructicola*引起的一种世界性真菌病害，褐腐病菌不仅能危害桃、李、杏、樱桃等核果类果树（Zhu et al.，2011），还能侵染苹果、梨等仁果类果树（罗朝喜，2017）。褐腐病在桃树上的危害日趋严重，造成极大的经济损失。深入研究病原菌的致病机制，不仅能为该病的防治提供理论依据，而且有望为开发新型杀菌剂提供靶标。

基金项目：财政部和农业农村部国家现代农业产业技术体系（CARS-30）

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

收稿日期：2021-04-04

半乳糖苷酶是细胞壁半乳甘露聚糖降解的关键酶之一，*α*-半乳糖苷酶能够水解来自与低聚半乳糖、半乳葡萄甘露聚糖和半乳糖脂连接的半乳糖基残基，其广泛分布于动物、植物和微生物中。*α*-半乳糖苷酶可分为糖苷水解酶（glycoside hydrolases，GH）家族GH4、GH27、GH36、GH57、GH97和GH110，来自真核生物的*α*-半乳糖苷酶具有高度序列保守性，通常分类为GH27。植物病原真菌或卵菌会分泌大量的糖苷酶来帮助侵染。Xu et al.（2020）研究发现，稻瘟病菌*Magnaporthe oryzae*的GH61蛋白家族的MoCDIP4能够靶向水稻线粒体相关的OsDjA9-OsDRP1E蛋白复合体，从而减弱植物的免疫反应；Tan et al.（2020）认为大豆疫霉*Phytophthora sojae*的糖苷水解酶PsGH7a能够水解*β*-1，4-葡聚糖和微纤维素，该基因敲除后能够减弱病原菌的致病力。糖苷水解酶家族在病原菌侵染过程中发挥着重要作用，但是其在桃褐腐病菌中的作用不清楚。

目前，桃褐腐病菌致病相关基因的研究报道较少。在桃褐腐病菌中发现4个角质酶基因（Wang et al.，2000），其中*MfCUT1*与致病性相关（Lee et al.，2010）。 Lee et al.（2010）研究发现将*MfCUT1*融合*β*-葡萄糖苷酸酶（*β*-glucuronidase，GUS）报告基因后，在*MfCUT1*本底启动子作用下将表达的突变体菌株接种至桃和苹果果实、桃花瓣和洋葱表皮上后可以检测到*GUS*表达；同时*MfCUT1*-GUS转化子的表达水平是野生型菌株的2倍，并且在花瓣上引起更严重的症状，说明*MfCUT1*参与了桃褐腐病菌的致病过程。Chou et al.（2015）也发现，多聚半乳糖醛酸酶基因*MfPG1*的过表达能使病原菌致病力降低。Yu et al.（2017）研究认为，桃褐腐病菌中沉默和过表达氧化还原应激转录因子MfAP1均可导致其致病力降低；进一步研究发现，为了应对植物侵染部位的氧化压力，桃褐腐病菌能够激活*MfAP1*转录，提高活性氧（reactive oxygen species，ROS）解毒和真菌毒力所需基因的表达量。在感染位点产生强烈的ROS后，过表达菌株中*MfAP1*表达受到抑制，从而改变了ROS解毒和毒力相关基因的表达。Zhang et al.（2020）研究结果显示，与氧化还原反应相关的*MfOfd1*基因敲除对桃褐腐病菌生长没有影响，但导致产孢量下降以及对氧化压力等胁迫耐受性减弱，同时其敲除突变体的致病力下降。

张明明（2019）研究发现，通过对桃褐腐病菌侵染桃果实的转录组数据分析，侵染1 h后，在KEGG途径富集的差异基因分析中，过氧化物酶体、半乳糖代谢等相关基因明显下调表达。因此本研究对半乳糖代谢相关的糖苷水解酶家族成员*MfMel1*基因的功能进行研究，以期揭示桃褐腐病菌的致病机理，为褐腐病的防控提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株、质粒及载体：桃褐腐病菌野生菌株Bmpc7由克莱姆森大学Guido Schnabel实验室馈赠，该菌株为单孢分离菌株，本课题组已获得基因组和侵染阶段的转录组数据（张明明，2019）。含潮霉素磷酸转移酶基因的pSKH质粒，由本实验室保存。载体pmCas9由西北农林科技大学许金荣教授馈赠。致病性接种试验所用桃果实品种为山东春雪桃，于当地市场购买。

供试培养基：马铃薯葡萄糖琼脂（potato dextrose agar，PDA）培养基成分为去皮马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂粉17 g，用纯水定容到1 000 mL；PDA不加琼脂即为PDB培养基；水琼脂培养基（water agar，WA）成分为琼脂粉17 g，纯水定容到1 000 mL；V8培养液成分为V8果蔬汁200 mL，纯水定容到1 000 mL。再生培养基成分为蔗糖342 g、酵母提取物1 g、酪蛋白水解物1 g、琼脂粉17 g，纯水定容至1 000 mL。以上培养基均121 ℃灭菌20 min后使用。

试剂及仪器：Trizol试剂、2×SybrGreen qPCR Mix，上海碧云天生物技术有限公司；裂解酶，美国Sigma公司；*α*-半乳糖苷酶活性检测试剂盒，北京索莱宝科技有限公司；PC5401反转录试剂盒、RNA提取试剂盒Total RNA Extraction Kit、DNA凝胶回收试剂盒、T4 DNA ligase、pMD18-T载体、Esp3I Fast-Digest酶，日本TaKaRa公司；JM109大肠杆菌*Escherichia coli*细菌感受态细胞，上海唯地生物技术有限公司；其他试剂均为国产分析纯。实时荧光定量PCR仪，美国Bio-Rad公司；GXZ-260A恒温培养箱，宁波东南仪器有限公司；NanoDrop 2000紫外−可见分光光度计，德国Thermo Scientific公司；96孔板多功能酶标仪，瑞士TECAN公司；COIC XSZ-4G普通光学显微镜，重庆光电仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 菌株培养与保存

在菌株Bmpc7的菌落边缘打取直径为5 mm的菌碟，用接种针转接至新的PDA平板中央，菌碟有菌丝的一面向下，置22 ℃黑暗培养3 d。在PDA平板上放置灭菌后的直径为5 mm的滤纸片，将新鲜菌丝块接种到PDA平板中央，22 ℃黑暗培养4 d后，将滤纸片置于干净的新培养皿中干燥15 d。干燥后

将滤纸片转入底部放置少量灭菌硅胶的离心管中，做好标记，封口膜封口，−20 ℃保存备用。

1.2.2 *MfMel1* 基因序列分析

取0.15 g菌丝使用液氮磨成粉末状，采用CTAB法提取病菌gDNA，−20 ℃保存待用。取0.15 g菌丝使用液氮磨成粉末状，采用Trizol法提取菌株RNA，用PC5401反转录试剂盒获得cDNA备用。

根据本实验室测得的转录组和基因组数据获得*MfMel1*基因序列。为进一步明确*MfMel1*基因序列及其结构，使用Primer Select 7.1软件设计引物，以桃褐腐病菌野生型菌株Bmpc7的gDNA/cDNA为模板，MfMel1-For-cDNA/MfMel1-Rev-cDNA作为引物（表1）进行PCR扩增，引物均由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。50 μL的gDNA/cDNA反应体系：正反向引物各2 μL、模板gDNA或cDNA 2 μL、10 mmol/L dNTP 4 μL、10×*Taq* Buffer 5 μL、*Taq* DNA polymerase 1 μL、ddH_2O 34 μL；反应程序：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，55 ℃退火30 s，72 ℃延伸120 s，34个循环；72 ℃终延伸10 min；16 ℃保持10 min。产物纯化后，连接pMD18-T载体并转化至JM109大肠杆菌感受态细胞中，过夜培养后挑选单菌落进行菌落验证。选择阳性单菌落进行测序验证，并进行序列比对，明确其基因结构。采用最大似然法对*MfMel1*序列进行系统进化分析。

表1 本试验所用引物

Table 1 The primers used in this study

引物名称Primer name	序列（5′−3′）Sequence (5′−3′)	用途Purpose
5-MfMel1-For	GCACTGCCTCCAACATCTAAACC	*MfMel1*基因上游片段扩增 Amplification of 5-flanking fragment of *MfMel1*
5-MfMel1-Rev	TCAATATCATCTTCTGTCGAAGACTTGAGA-GCCCCGACACC	*MfMel1*基因上游片段扩增 Amplification of 5-flanking fragment of *MfMel1*
3-MfMel1-For	AGATGCCGGATCCACTTAACTTGGGTAGTTT-AACGGGCACAGT	*MfMel1*基因下游片段扩增 Amplification of 3-flanking fragment of *MfMel1*
3-MfMel1-Rev	GAAAATTCCTCACTGCGGCTCA	*MfMel1*基因下游片段扩增 Amplification of 3-flanking fragment of *MfMel1*
5-Nest-MfMel1-For	GGACCCCGCGACAGAGTGA	*MfMel1*基因敲除片段扩增 Amplification of knockout fragment of *MfMel1*
Up-Nest-R	TCGCCTCGCTCCAGTCAATG	*MfMel1*基因敲除片段扩增 Amplification of knockout fragment of *MfMel*
3-Nest-MfMel1-Rev	GGTTTCGTTCCCTTCCCCATC	*MfMel1*基因敲除片段扩增 Amplification of knockout fragment of *MfMel1*
Down-Nest-F	AGGGCGAAGAATCTCGTGCTTT	*MfMel1*基因敲除片段扩增 Amplification of knockout fragment of *MfMel*
GrnaMfMel1-For	ACCTTGGTGCCGCTACTGCCTTAT	*MfMel1*基因gRNA片段扩增 Amplification for gRNA fragment of *MfMel1*
GrnaMfMel1-Rev	AAACATAAGGCAGTAGCGGCACCA	*MfMel1*基因gRNA片段扩增 Amplification for gRNA fragment of *MfMel1*
Check-hyg-For	AGGAATCGGTCAATACACTACAT	*HYG*抗性标记基因验证 Verification of *HYG* gene
Check-hyg-Rev	ATGTAGTGTATTGACCGATTCCT	*HYG*抗性标记基因验证 Verification of *HYG* gene
CK-MfMel1-Rev	ATGTTAGGATTGCGATGTGGATT	*MfMel1*基因敲除转化子纯杂合验证 Verification of homozygosity/heterozygosity of *MfMel1* transformants
CK-MfMel1-For	CGTTCTCGTGCGGGGCTT	*MfMel1*基因敲除转化子纯杂合验证 Verification of homozygosity/heterozygosity of *MfMel1* transformants
NF	AACCTTGAAGCTCAGCAACC	内参基因*tubulin*扩增 Amplification of internal reference *tubulin* gene
NR	GAAATGGAGACGTGGGAATG	内参基因*tubulin*扩增 Amplification of internal reference *tubulin* gene
HF	TCGACAGAAGATGATATTGAAGGAG	*HYG*抗性标记基因扩增 Amplification of *HYG* gene
HR	GTTAAGTGGATCCGGCATCT	*HYG*抗性标记基因扩增 Amplification of *HYG* gene

续表1 Continued

引物名称Primer name	序列（5′–3′）Sequence (5′–3′)	用途Purpose
MfMel1-For-cDNA	ATGTCACCAAGAAATATATTTGGTGCC	*MfMel1*基因cDNA全长扩增 Amplification of full cDNA of *MfMel1* gene
MfMel1-Rev-cDNA	CTACAACTCATCTCTCTTCCTCTT	*MfMel1*基因cDNA全长扩增 Amplification of full cDNA of *MfMel1* gene
MfMel1-RtFor	TATTTGGTGCCGCTACTGCCTTAT	*MfMel1*基因实时荧光定量PCR扩增 Real-time amplification of *MfMel1* gene
MfMel1-RtRev	CCATAGTCGACAATCAAATCAGCA	*MfMel1*基因实时荧光定量PCR扩增 Real-time amplification of *MfMel1* gene

1.2.3 敲除转化片段和CRISPR载体的构建

在桃褐腐病菌的转化试验中，敲除效率较低。因此，本研究使用真菌CRISPR（clustered regularly interspaced short palindromic repeats）敲除载体pmCas9提高效率，载体具有氨苄青霉素抗性。转化前需构建含潮霉素的上下游敲除转化片段和CRISPR载体。

敲除转化片段构建分为3步，首先以桃褐腐病菌野生型菌株Bmpc7的DNA为模板，以5-MfMel1-For/5-MfMel1-Rev为引物扩增*MfMel1*基因的上游片段5-MfMel1。3-MfMel1-For/3-MfMel1-Rev为引物扩增*MfMel1*基因的下游片段3-MfMel1。以HF/HR为引物扩增潮霉素抗性基因片段。50 μL上下游片段及潮霉素抗性基因片段扩增体系：模板DNA 2 μL、10 mmol/L正反向引物各2 μL、10 mmol/L dNTP 4 μL、10×*Taq* Buffer 5 μL、*Taq* DNA polymerase 1 μL、ddH_2O 34 μL。反应条件：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，58 ℃退火30 s，72 ℃延伸2 min，共34个循环；72 ℃稳定产物10 min，16 ℃保持10 min。用DNA凝胶回收试剂盒对第1轮的PCR产物纯化，得到所需的同源上臂片段、同源下臂片段和潮霉素抗性基因片段于–20 ℃保存备用。然后将基因上下游片段分别和潮霉素抗性基因片段通过融合PCR连接。25 μL反应体系：上下游片段各1 μL、潮霉素片段3 μL、10 mmol/L dNTP 2 μL、10×*Taq* Buffer 2.5 μL、*Taq* DNA polymerase 0.25 μL、ddH_2O 15.25 μL。反应条件：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，60 ℃退火30 s，72 ℃延伸2 min，共10个循环；72 ℃稳定产物10 min，16 ℃保持10 min。最后以PCR反应所得产物为模板，分别用引物对5-Nest-MfMel1-For/Up-Nest-R和3-Nest-MfMel1-Rev/Down-Nest-F扩增得到替换同源片段。50 μL反应体系：第2轮PCR产物1 μL、10 mmol/L正反向引物各2 μL、10 mmol/L dNTP 4 μL、10×*Taq* Buffer 5 μL、*Taq* DNA polymerase 1 μL、ddH_2O 35 μL。反应条件：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，58 ℃退火30 s，72 ℃延伸2 min，共35个循环；72 ℃稳定产物5 min，16 ℃保持10 min。得到*MfMel1*基因替换同源片段与桃褐腐病菌同源的序列需大于500 bp，以保证重组成功率（Yu et al.，2004）。当DNA片段浓度大于或等于300 ng/μL时，后续试验验成功率较高。

构建CRISPR敲除载体。选取*MfMel1*基因中NGG（2个鸟苷酸前面有个可变的核苷酸）前20 bp的特异性序列，分别以正反引物的形式合成相应序列，并在5′端分别引入黏性末端，退火形成双链片段gRNA。酶切gRNA片段和pmCas9载体后通过T4 DNA ligase连接。将重组载体和pmCas9空载体分别转入JM109大肠杆菌感受态细胞中，挑选阳性克隆，测序验证。

1.2.4 *MfMel*基因敲除及敲除转化子验证

参考薛伟等（2010）方法进行聚乙二醇（polyethylene glycol，PEG）介导的桃褐腐病菌原生质体转化。在野生型菌株Bmpc7菌落边缘取大小为2 mm×2 mm的菌丝块接入50 mL的PDB培养基中，于22 ℃、150 r/min摇培36 h；裂解酶裂解菌丝，制备原生质体，加入800 μL STC溶液（山梨醇21.86 g、1 mol/L Tris-HCl溶液1 mL、1 mol/L $CaCl_2$溶液5 mL，去离子水定容至100 mL），去离子水定容至100 mL，浓度调至1×10^8个/mL；取160 μL原生质体悬浮液，加入转化片段和质粒（含*MfMel1*基因的gRNA）各40 μL；然后依次分别加入200、200、800 μL 60% PEG溶液（PEG 60 g、1 mol/L Tris-HCl溶液1 mL、1 mol/L $CaCl_2$溶液1 mL，去离子水定容至100 mL）以及1 mL STC溶液后混匀；取450 μL转化混合液加入到直径为9 cm的培养皿中，倒入再生培养基混匀，凝固后密封，22 ℃黑暗条件下培养。16~24 h后，含150 μg/mL潮霉素的WA培养基覆盖，22 ℃培养4~6 d，挑取培养基表面的单菌落菌丝尖端至含100 μg/mL潮霉素的PDA平板上筛选培养。获得能够在筛选培养基上生长的转化子菌株，采用CTAB法提取所获得转化子菌株的DNA。

以提取转化子菌株的DNA为模板，通过引物对HF和HR扩增验证潮霉素抗性基因片段，目标条带

大小1 414 bp；引物对5-MfMel1-For和Check-hyg-Rev验证上游结合区特异性条带；引物对Check-hyg-For和3-MfMel1-Rev验证下游结合区的特异性条带。野生型菌株Bmpc7不含有潮霉素抗性基因，引物5-MfMel1-For和3-MfMel1-Rev均不在转化片段的范围内，所以野生型菌株上下游验证、潮霉素验证均扩增不出特异性条带，而敲除成功的转化子能够扩增出特异性条带，这可用于证明*MfMel1*基因发生同源置换。由于桃褐腐病菌是多核，需验证敲除成功的转化子是否为纯合子。在*MfMel1*基因上下游片段上nest引物外分别设计引物CK-MfMel1-For、CK-MfMel1-Rev以进行纯杂合验证。野生型菌株扩增出单一条带，敲除纯合转化子会扩增出另一条带，杂合转化子则扩增出以上2条带。

1.2.5 敲除转化子及野生型*MfMel1*基因表达量测定

亲本菌株及敲除转化子新鲜菌丝各称取0.15 g，加入装有小钢珠的2 mL离心管中，液氮速冻，研磨成粉末状，加入预冷的1 mL Trizol试剂，剧烈振荡1 min，冰上静置2 min，12 000 r/min、4 ℃离心10 min。取500 μL上清液，加入等体积的氯仿混匀，剧烈振荡，12 000 r/min、4 ℃离心2 min。取上清液加入2倍体积的异丙醇混匀，−20 ℃静置20 min，12 000 r/min、4 ℃离心2 min，弃上清液。加入50 μL无RNA酶的ddH_2O溶解RNA，于−70 ℃保存备用。利用PC5401反转录试剂盒获得菌株的cDNA。

为了检测*MfMel1*敲除转化子的敲除情况，验证基因表达量是否下降，采用实时荧光定量PCR技术进行检测。以cDNA为模板按需求进行稀释，以设计引物MfMel1-RtFor/MfMel1-RtRev进行实时荧光定量PCR扩增，以*β*-tublin作为内参基因。10 μL实时荧光定量PCR反应体系：模板cDNA 1 μL、2×SybrGreen qPCR Mix 5 μL、10 μmol/L引物各0.25 μL、超纯水3.5 μL。反应程序：94 ℃预变性3 min；94 ℃变性20 s，60 ℃退火20 s，72 ℃变性20 s，40个循环；65 ℃逐步升温至95 ℃，每0.5 ℃保持5 s，15 ℃延伸10 min。

1.2.6 菌株环境适合度测定

打取大小均为5 mm×5 mm的亲本菌株和敲除转化子菌丝分别接种于PDA平板上，22 ℃黑暗培养4 d，用十字交叉法测量菌株直径，计算菌株平均生长速率。每株菌株3个重复，每个试验进行3次独立生物学重复。

将亲本菌株和敲除转化子菌株分别接种到V8培养基平板上，22 ℃黑暗培养8 d，将2 mL无菌水加到平板上，用灭菌棉签刮下培养基表面孢子，得到孢子悬浮液，利用血球计数板于显微镜下计数。每株菌株3个重复，每个试验进行3次独立生物学重复。

将亲本菌株和敲除转化子菌株的孢子悬浮液稀释至1×10^5个/mL，吸取100 μL均匀涂布到WA平板上，22 ℃黑暗培养6 h。随机选取100个孢子，在显微镜下观察孢子萌发情况，统计萌发孢子数，计算孢子萌发率。每株菌株3个重复，每个试验进行3次独立生物学重复。孢子萌发率=萌发孢子数/100×100%。

打取直径5 mm的菌丝块分别接种在含有浓度为0.01%十二烷基苯磺酸钠（sodium dodecyl sulfate，SDS）、600 μg/mL刚果红、150 g/L甘油、200 g/L葡萄糖、200 g/L蔗糖、6 mmol/L H_2O_2和4% NaCl的PDA平板上，于22 ℃培养4 d，采用十字交叉法测量菌落直径，计算抑制率。每株菌株3个重复，每个试验进行3次独立生物学重复。抑制率=（野生型菌株菌落直径−敲除转化子菌落直径）/（野生型菌株菌落直径−5 mm）。

1.2.7 *α*-半乳糖苷酶活性测定

α-半乳糖苷酶能专一催化*α*-半乳糖苷键的水解，*α*-半乳糖苷酶可将对−硝基苯-*α*-D-吡喃半乳糖苷分解生成对−硝基苯酚，对-硝基苯酚在波长400 nm有最大吸收峰，通过测定吸光值升高速率来计算*α*-半乳糖苷酶活性。参照*α*-半乳糖苷酶活性检测试剂盒操作步骤测定*α*-半乳糖苷酶活性。每株菌株3个重复，每个试验进行3次独立生物学重复。每克组织每小时产生1 nmol对−硝基苯酚定义为1个酶活力单位。

1.2.8 致病性测定

选取色泽大小相近的春雪桃果实进行致病力测定。先将桃子用清水洗净，然后用1%次氯酸钠浸泡桃果实1 min，纯水冲洗2次，充分晾干。桃果实表面用接种针刺伤，每个桃果2个小孔，每株菌株3个果实，每个果实接种野生型菌株和敲除转化子△*MfMel1*菌株浓度为1×10^4个/mL的孢子悬浮液10 μL，接种完成放入大小为50 cm×30 cm×20 cm的育苗盒中，保鲜膜封口，锡箔纸封闭，于避光、温度22 ℃、相对湿度100%条件下培养4 d，观察并记录病斑大小。

1.3 数据分析

试验数据使用SPSS 21.0软件进行分析，采用ANOVA方法进行方差分析，用最小显著差数法（LSD）进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 *MfMel1*基因结构和序列信息

分别以gDNA和cDNA为模板，通过引物MfMeL1-For-cDNA/MfMeL1-Rev-cDNA对*MfMel1*基因片段进行扩增（图1-A）。片段测序后进行分

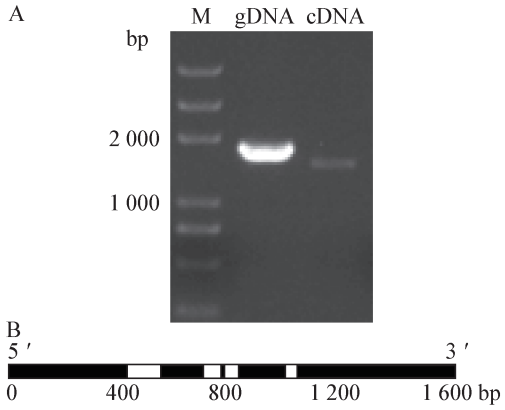
析，结果表明*MfMel1*基因全长共1 793 bp，包含5个外显子和4个内含子。编码区长1 509 bp，编码502个氨基酸（图1-B）。

2.2 *MfMel1*基因编码蛋白结构及系统发育分析

*MfMel1*基因编码蛋白序列分析发现，该基因编码蛋白在29~320位具有GH27家族糖苷水解酶保守结构，氨基酸序列31~114具有*α*-半乳糖苷酶保守结构（图2-A），推断*MfMel1*基因可能编码*α*-半乳糖苷酶。系统进化树分析显示，*MfMel1*基因在真菌中比较保守，与蚕豆葡萄孢*Botrytis fabae*的同源基因相似度最高（图2-B）。信号肽分析发现MfMel1前20个氨基酸为信号肽序列，预示该蛋白能够分泌到细胞外发挥功能。

2.3 敲除转化子验证

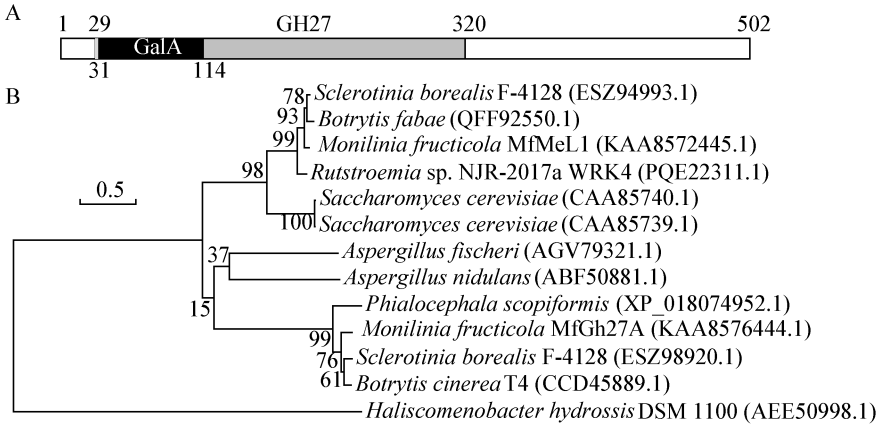
野生型菌株Bmpc7不能在含潮霉素PDA上生长，而敲除转化子△*MfMel1-1*、△*MfMel1-2*、△*MfMel1-3*、△*MfMel1-4*、△*MfMel1-6*、△*MfMel1-7*、△*MfMel1-11*、△*MfMel1-20*、△*MfMel1-21*和△*MfMel1-22*可正常生长（图3）。



A：野生型菌株Bmpc7的基因组gDNA和cDNA分别作为模板，扩增*MfMel1*基因全长。B：依据测序结果绘制*MfMel1*基因的基因结构图，黑色表示CDS区，白色表示内含子。A: Genomic DNA and cDNA of wild-type strain Bmpc7 were used as templates to amplify the *MfMel1* gene. B: Diagram of the *MfMel1* gene structure based on the sequencing results; the black shading shows CDS and white regions show introns.

图1 *MfMel1*基因结构图

Fig. 1 Structure of *MfMel1* gene



A：*MfMel1*基因编码蛋白结构，文本框中数字表示褐腐病菌MfMel1氨基酸序列位置；B：基于*α*-半乳糖苷酶氨基酸序列采用最大似然法构建褐腐病菌*MfMel1*与其他病菌的系统进化树。A: Structure of the *MfMel1* gene encoded protein. Numbers in text box represent the positions of amino acid sequence of MfMel1; B: phylogenetic tree of *MfMel1* and corresponding homologous α-galactosidase amino acid sequences constructed using the maximum likelihood method.

图2 *MfMel1*基因编码蛋白结构及系统发育分析

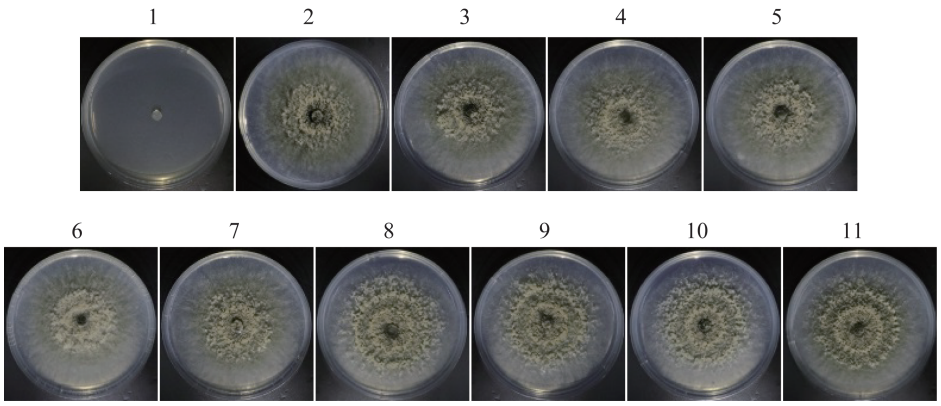
Fig. 2 Structure and phylogenetic analysis of *MfMel1* gene encoded protein

提取敲除转化子DNA，进行PCR验证，结果显示，引物对HF和HR从敲除转化子中扩增到大小为1 414 bp的目标片段，野生型菌株无扩增；上游验证引物对和下游验证引物对5-MfMel1-For/Check-hyg-Rev和Check-hyg-For/3-MfMel1-Rev分别从敲除转化子中扩增到大小为2 226 bp和1 442 bp的目标条带，野生型菌株无扩增（图4），从而明确了*MfMel1*基因发生同源置换。使用纯杂合验证引物对CK-MfMel1-Rev/CK-MfMel1-For从敲除转化子中扩增到大小为2 609 bp和2 031 bp的目标条带，从野生型菌株Bmpc7仅扩增到大小为2 031 bp的目标条带（图4）。表明敲除转化子△*MfMel1*中*MfMel1*基因敲除成功，但均为杂合子。

2.4 敲除转化子中*MfMel1*基因表达量分析

选*β*-tubulin作内参基因，引物NF和NR扩增157 bp的片段。与野生型菌株Bmpc7相比，10个敲除

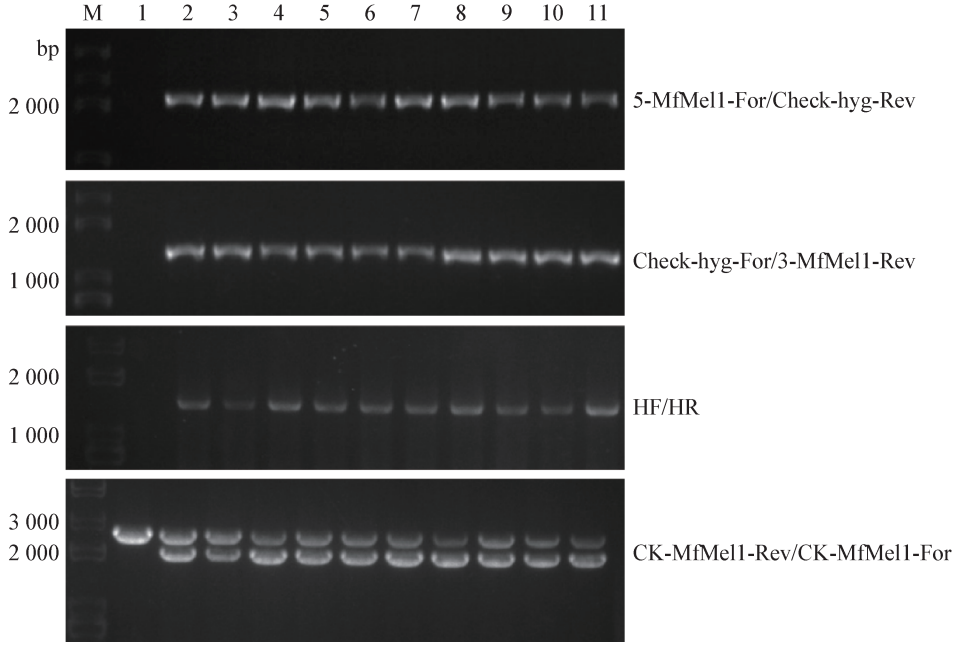
转化子的*MfMel1*基因表达量均显著下降(图5),可用于下一步研究。



1：野生型菌株Bmpc7；2~11：敲除转化子△*MfMel1-1*、△*MfMel1-2*、△*MfMel1-3*、△*MfMel1-4*、△*MfMel1-6*、△*MfMel1-7*、△*MfMel1-11*、△*MfMel1-20*、△*MfMel1-21*和△*MfMel1-22*。1: Wild type isolate Bmpc7; 2−11: knockout transformants △*MfMel1-1*, △*MfMel1-2*, △*MfMel1-3*, △*MfMel1-4*, △*MfMel1-6*, △*MfMel1-7*, △*MfMel1-11*, △*MfMel1-20*, △*MfMel1-21* and △*MfMel1-22*, respectively.

图3 Bmpc7和*MfMel1*基因敲除转化子在潮霉素平板上的菌落形态

Fig. 3 Colony morphology of Bmpc7 and *MfMel1* gene knockout transformants



M：DNA分子标记。1：野生型菌株Bmpc7；2~11：敲除转化子△*MfMel1-1*、△*MfMel1-2*、△*MfMel1-3*、△*MfMel1-4*、△*MfMel1-6*、△*MfMel1-7*、△*MfMel1-11*、△*MfMel1-20*、△*MfMel1-21*和△*MfMel1-22*。M: DNA marker. 1: Wild type isolate Bmpc7; 2−11: knockout transformants △*MfMel1-1*, △*MfMel1-2*, △*MfMel1-3*, △*MfMel1-4*, △*MfMel1-6*, △*MfMel1-7*, △*MfMel1-11*, △*MfMel1-20*, △*MfMel1-21* and △*MfMel1-22*, respectively.

图4 敲除转化子PCR验证

Fig. 4 PCR verification of knockout transformants

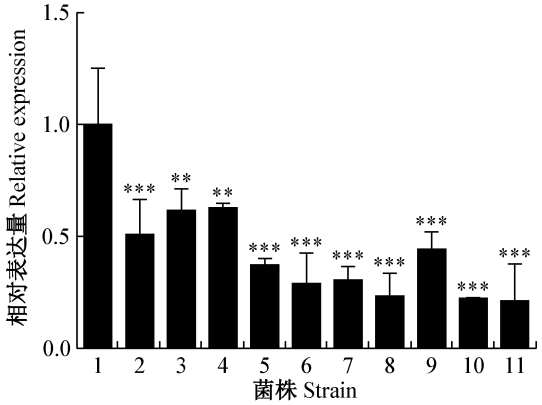
2.5 基因敲除转化子*α*-半乳糖苷酶活性降低

依据标准品测定*α*-半乳糖苷酶的吸光度和浓度的标准曲线,得到标准曲线为y=0.004x−0.004,其中R^2=0.999,结果可信(图6-A)。*α*-半乳糖苷酶活性测定结果显示,野生型菌株的*α*-半乳糖苷酶活为6 715.94 U/g,△*MfMel1*菌株的*α*-半乳糖苷酶活为729.44~4 384.05 U/g,酶活下降约34.72%~89.14%。表明敲除*MfMel1*基因使桃褐腐菌株*α*-半乳糖苷酶的活性降低(图6-B)。

2.6 *MfMel1*基因敲除对桃褐腐病菌生长发育的影响

△*MfMel1*菌株在PDA培养基上生长速率在1.77~1.83 cm/d之间,与野生型菌株无差异,同时在

菌丝形态、颜色等方面也无明显差异。△*MfMel1* 菌株比野生型菌株产孢量下降约41.70%~68.94%（表2），孢子萌发率与野生型菌株无显著差异。表明 *MfMel1* 参与调控桃褐腐病菌的产孢。



1：野生型菌株 Bmpc7；2~11：敲除转化子△*MfMel1-1*、△*MfMel1-2*、△*MfMel1-3*、△*MfMel1-4*、△*MfMel1-6*、△*MfMel1-7*、△*MfMel1-11*、△*MfMel1-20*、△*MfMel1-21* 和△*MfMel1-22*。1: Wild type isolate Bmpc7; 2−11: knockout transformants △*MfMel1-1*, △*MfMel1-2*, △*MfMel1-3*, △*Mf-Mel1-4*, △*MfMel1-6*, △*MfMel1-7*, △*MfMel1-11*, △*Mf-Mel1-20*, △*MfMel1-21* and △*Mf-Mel1-22*, respectively.

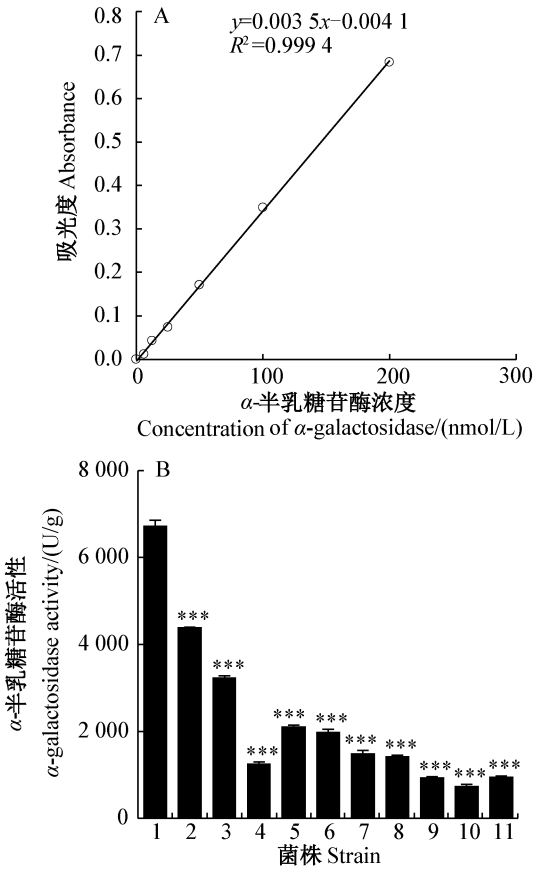
图5 野生型菌株Bmpc7和敲除转化子中*MfMel1*基因相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *MfMel1* gene in Bmpc7 and knockout transformants

图中数据为平均数±标准误。*，**，***表示经LSD法检验差异显著（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$）。Data are mean± SE. *, **, *** indicate significant difference by LSD test ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$).

2.7 基因敲除对桃褐腐病菌逆境适应能力的影响

结果显示，在含150 g/L甘油的PDA培养基上，野生型菌株Bmpc7抑制率为41.83%，△*MfMel1* 菌株抑制率为42.62%~45.86%，除△*MfMel1-4* 以外，其他 *MfMel1* 基因敲除转化子与野生型菌株Bmpc7的抑制率均无显著差异。在含1.2 mmol/L山梨醇的PDA培养基上，Bmpc7菌株抑制率为19.06%，△*MfMel1* 菌株抑制率为19.30%~22.52%，*MfMel1* 基因敲除转化子与野生型菌株Bmpc7的抑制率均无显著差异。在含4% NaCl的PDA培养基上，野生型菌株Bmpc7抑制率为71.76%，△*MfMel1* 菌株的抑制率为64.49%~76.42%，*MfMel1* 基因敲除转化子与野生型菌株Bmpc7的抑制率也均无显著差异（表3）。



A: 标准曲线绘制；B: 野生型菌株Bmpc7与△*MfMel1* 菌株α-半乳糖苷酶活性测定。1：野生型菌株Bmpc7；2~11：敲除转化子△*MfMel1-1*、△*MfMel1-2*、△*MfMel1-3*、△*MfMel1-4*、△*MfMel1-6*、△*MfMel1-7*、△*MfMel1-11*、△*MfMel1-20*、△*MfMel1-21*和△*Mf-Mel1-22*。A: Standard curve; B: determination of α-galactosidase activity in Bmpc7 and △*MfMel1* transformants. 1: Wild type isolate Bmpc7; 2−11: knockout transformants △*MfMel1-1*, △*MfMel1-2*, △*Mf-Mel1-3*, △*MfMel1-4*, △*MfMel1-6*, △*MfMel1-7*, △*Mf-Mel1-11*, △*MfMel1-20*, △*MfMel1-21* and △*MfMel1-22*, respectively.

图6 敲除转化子及野生型菌株Bmpc7中α-半乳糖苷酶活性

Fig. 6 Determination of α-galactosidase activity in Bmpc7 and knockout transformants

图中数据为平均数±标准误。*，**，***表示经LSD法检验差异显著（$P<0.05$，$P<0.01$，$P<0.001$）。Data are mean± SE. *, **, *** indicate significant difference by LSD test ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$).

在含6 mmol/L刚果红的PDA培养基上，野生型菌株Bmpc7抑制率为15.49%，△*MfMel1* 菌株抑制率为13.40%~16.39%。在含0.01% SDS的PDA培养基上，野生型菌株Bmpc7抑制率为60.34%，△*MfMel1* 菌株抑制率为57.64%~63.18%，*MfMel1* 基因敲除转化子对刚果红和SDS的敏感性与野生型菌株

无显著差异。在含浓度为6 mmol/L H_2O_2的PDA培养基上，野生型菌株Bmpc7的抑制率为58.53%，△*MfMel1*菌株的抑制率为57.08%~67.00%，△*MfMel1-2*菌株变得更敏感外，其余△*MfMel1*菌株对H_2O_2的敏感性与Bmpc7无显著差异（表3）。

表2 *MfMel1*敲除转化子的生长速率、产孢量及孢子萌发率测定

Table 2 Mycelium growth rate, sporulation and spore germination rate of *MfMel1* knockout transformants

菌株 Strain	生长速率 Growth rate/（cm/d）	产孢量 Sporulation/（×10^{5}个/cm^2）	孢子萌发率 Spore germination rate/%
Bmpc7	1.78±0.01 abc	6.85±0.93 a	89.33±3.21 a
△*MfMel1-1*	1.78±0.01 abc	3.06±0.95 b	87.33±12.22 a
△*MfMel1-2*	1.77±0.03 c	3.53±0.39 b	90.33±0.58 a
△*MfMel1-3*	1.80±0.03 abc	3.91±0.79 b	92.67±3.21 a
△*MfMel1-4*	1.78±0.04 abc	4.00±0.39 b	89.67±3.06 a
△*MfMel1-6*	1.78±0.01 bc	3.38±0.53 b	91.33±0.58 a
△*MfMel1-7*	1.78±0.03 abc	3.38±2.11 b	92.67±6.11 a
△*MfMel1-11*	1.82±0.03 ab	2.33±0.96 b	93.67±3.21 a
△*MfMel1-20*	1.83±0.03 ab	3.70±0.67 b	90.67±0.58 a
△*MfMel1-21*	1.83±0.02 ab	3.35±1.09 b	92.00±2.65 a
△*MfMel1-22*	1.83±0.00 a	2.13±0.50 b	91.00±2.65 a

表中数据为平均数±标准误。同列后不同小写字母表示经LSD法检验差异显著（P<0.05）。Data are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by LSD test (P<0.05).

表3 不同环境下野生型菌株Bmpc7和△*MfMel1*菌株的生长抑制率

Table 3 Inhibition rate of Bmpc7 and transformants on glycerol, congo, sorbitol, NaCl, SDS, H_2O_2, glucose, sucrose amended PDA %

菌株 Strain	150 g/L 甘油 150 g/L glycerol	1.2 mmol/L 山梨醇 1.2 mmol/L sorbitol	4% NaCl	6 mmol/L 刚果红 6 mmol/L congo red	0.01% 十二烷基苯磺酸钠 0.01% SDS	6 mmol/L H_2O_2	200 g/L 葡萄糖 200 g/L glucose	200 g/L 蔗糖 200 g/L sucrose
Bmpc7	41.83±1.01b	19.06±1.84 a	71.76±1.97 abc	15.49±2.39 a	60.34±1.59 abc	58.53±4.50 bc	24.19±1.88 c	−6.26±1.51 ab
△*MfMel1-1*	42.84±0.68 ab	19.86±1.92 a	67.84±3.73 bc	14.60±1.28 a	60.42±1.52 abc	61.43±2.21 abc	31.72±1.45 ab	−8.48±1.31 a
△*MfMel1-2*	44.55±4.31 ab	22.36±1.64 a	73.80±2.50 ab	16.39±1.75 a	61.99±1.81 ab	67.00±5.62 a	27.82±0.91 bc	−4.44±2.11 b
△*MfMel1-3*	43.78±2.12 ab	22.16±1.27 a	69.80±5.10 abc	13.70±2.21 a	60.91±0.94 abc	59.42±4.64 abc	30.72±3.14 ab	−4.25±0.34 b
△*MfMel1-4*	45.86±1.63 a	21.80±2.75 a	67.50±2.57 bc	16.16±0.44 a	57.64±1.28 c	57.08±5.06 abc	29.43±1.89 b	−7.59±2.76 ab
△*MfMel1-6*	44.11±1.82 ab	22.19±1.08 a	64.49±1.31 c	14.33±2.94 a	59.12±1.45 abc	63.45±1.05 abc	30.79±1.65 ab	−8.07±1.55 a
△*MfMel1-7*	44.69±1.72 ab	22.52±1.82 a	73.79±2.63 ab	15.28±2.22 a	61.55±3.35 ab	57.28±2.15 bc	31.95±5.14 ab	−8.76±1.30 a
△*MfMel1-11*	45.77±2.69 ab	22.10±2.98 a	69.21±7.60 abc	14.19±2.02 a	60.09±1.81 abc	65.13±5.95 bc	33.25±0.52 a	−8.76±1.90 a
△*MfMel1-20*	42.62±2.13 ab	20.24±1.71 a	74.15±3.67 ab	14.74±0.75 a	60.67±0.88 abc	61.15±1.71 abc	31.52±4.13 ab	−6.18±2.71 ab
△*MfMel1-21*	42.63±1.70 ab	19.30±2.60 a	66.86±6.08 bc	13.40±0.59 a	58.92±2.77 bc	60.69±5.61 abc	31.42±1.90 ab	−6.31±1.87 ab
△*MfMel1-22*	44.02±2.87 ab	21.13±2.97 a	76.42±2.29 a	14.34±2.81 a	63.18±2.14 a	66.72±6.18 abc	33.92±1.37 a	−6.84±2.20 ab

表中数据为平均数±标准误。同列后不同小写字母表示经LSD法检验差异显著（P<0.05）。Data are mean±SE. Different lowercase letters in the same column indicate significant difference by LSD test (P<0.05).

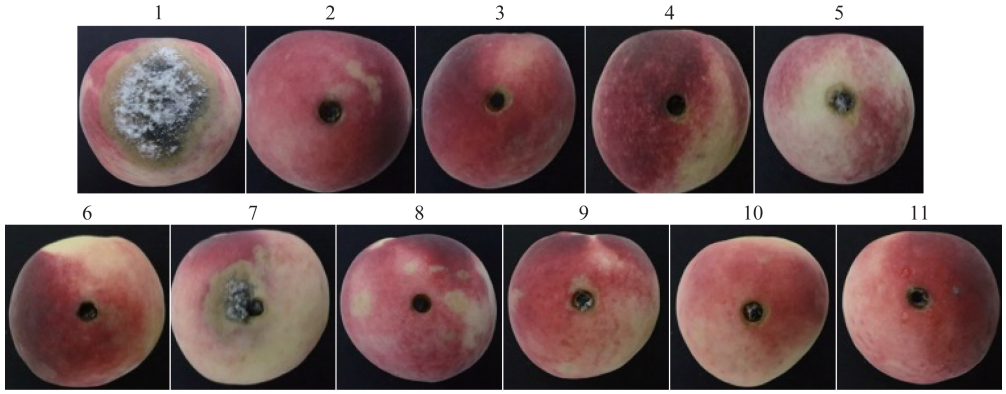
在含200 g/L葡萄糖的PDA培养基上，野生型菌株Bmpc7的抑制率为24.19%，△*MfMel1*菌株的抑制率为27.82%~33.92%，除菌株△*MfMel1-2*、*MfMel1*外，基因敲除均使△*MfMel1*菌株对高浓度葡萄糖敏感性显著增加。在含200 g/L蔗糖的PDA培养基上，所有菌株的生长均被促进，野生型菌株Bmpc7促进率为6.26%，△*MfMel1*菌株促进率为4.25%~8.76%，*MfMel1*基因敲除对△*MfMel1*菌株对高浓度蔗糖敏感性无显著变化（表3）。

总体来看，*MfMel1*基因敲除后对桃褐腐病菌的细胞壁完整性以及盐胁迫、高渗胁迫均无影响。但菌株△*MfMel1*对高浓度葡萄糖敏感性增加（表3）。

2.8 *MfMel1*基因敲除对桃褐腐病菌的致病力影响

致病力测定结果表明，接种1~2 d时，野生型菌株形成褐色腐烂病斑，产生水渍状，3~4 d时病斑逐渐延展

扩大呈圆形，中间产生灰色霉层，外缘腐烂状褐色病斑（图7）。△*MfMel1*菌株几乎不发病或病斑大小始终小于接种野生型菌株的桃果实上的病斑（图7）。表明敲除*MfMel1*基因使菌株致病力减弱，说明*MfMel1*基因在桃褐腐病菌致病过程中发挥着重要作用。



1：野生型菌株Bmpc7；2~11：敲除转化子Δ*MfMel1-1*、Δ*MfMel1-2*、Δ*MfMel1-3*、Δ*MfMel1-4*、Δ*MfMel1-6*、Δ*MfMel1-7*、Δ*MfMel1-11*、Δ*MfMel1-20*、Δ*MfMel1-21*和Δ*MfMel1-22*。1: Wild type isolate Bmpc7; 2−11: knockout transformants Δ*MfMel1-1*, Δ*MfMel1-2*, Δ*MfMel1-3*, Δ*MfMel1-4*, Δ*MfMel1-6*, Δ*MfMel1-7*, Δ*MfMel1-11*, Δ*MfMel1-20*, Δ*MfMel1-21* and Δ*MfMel1-22*, respectively.

图7 *MfMel1*敲除转化子及野生型菌株对桃果实的致病性测定

Fig. 7 Pathogenicity of Bmpc7 and *MfMel1* knockout transformants on peach fruits

3 讨论

分泌植物细胞壁降解酶类是植物病原菌致病的原因之一（张明明，2019）。角质酶催化植物表皮的角质多聚物水解，帮助病原菌侵染（谈彬，2019）。Liu et al.（2016）研究发现，引起玉米弯孢菌叶斑病的新月弯孢菌*Curvularia lunata*的角质酶基因*Cl-CUT7*与新月弯孢菌致病性相关，实时荧光定量PCR检测结果发现*ClCUT7*基因转录水平从发病早期开始逐渐提高，接种3 h后出现明显上调。桃果实在感知桃褐腐病菌入侵后会分泌大量的酚类和ROS等物质来抑制病菌的水解酶类对自身细胞壁的降解，导致桃褐腐病菌半乳糖苷酶活性下降（张明明，2019）。本研究对桃褐腐病菌侵染果实的转录组数据进行分析发现，*MfMel1*基因在侵染1、3、6 h的基因表达量与0 h（对照）相比显著降低，因此选定*MfMel1*基因进行研究。由于桃褐腐病菌是多核真菌，PEG介导的原生质体转化技术很难获得纯合子的敲除转化子。Katayama et al.（2016）研究发现在米曲霉*Aspergillus oryzae*中使用CRISPR技术可提高敲除转化子的阳性率，为得到纯合子，本试验中加入CRISPR载体，敲除转化效率略有提高，但依然无法得到纯合子，因此选定10个敲除杂合菌株进行后续试验，期望通过群体研究增加结果可信度。实时荧光定量结果也表明，△*MfMel1*菌株与野生型菌株相比，*MfMel1*基因的表达量显著降低。酶活分析表明，△*MfMel1*菌株α-半乳糖苷酶酶活显著下降约34.72%~89.14%，显示转化子群体可用于进一步的基因功能研究。

α-半乳糖苷酶在植物病原菌致病方面研究较少。粉红螺旋聚孢霉*Clonostachys rosea*是重要生防寄生菌。刘静雨（2016）研究结果表明，敲除该菌株的α-半乳糖苷酶基因后，Δ*Aga67*生长和产孢量与野生型菌株无差异，但寄生能力下降，对黄瓜枯萎病的防效降低。本研究表明，敲除*MfMel1*基因后菌株的生长速率不变，但产孢量有所下降，因此该基因影响桃褐腐病菌产孢。与Δ*Aga67*寄生能力下降类似，△*MfMel1*菌株的致病力下降，说明α-半乳糖苷酶基因敲除抑制了病菌对寄主的侵染。Lee et al.（2010）研究发现在桃褐腐病菌中过表达*MfCUT1*能增强桃褐腐病菌的致病力。角质酶可以催化植物表皮的角质多聚物水解，进而帮助病原菌侵染。在桃褐腐病菌中，*MfPG1*基因与病菌致病力相关（Chou et al.，2015），其编码的果胶降解酶可降解植物细胞壁，帮助病原菌侵入，促进病菌在细胞间繁殖。半乳糖在植物界常以多糖形式存在于果胶中，*MfMel1*基因编码的α-半乳糖苷酶可以分解α-半乳糖苷键，破坏寄主植物表皮细胞，进而帮助寄主侵入寄主植物，使其感病。本试验中环境适合度结果表明，在含200 g/L葡萄糖的PDA培养基上，*MfMel1*基因敲除使△*MfMel1*菌株对高浓度葡萄糖敏感性增强。

同时，敲除转化子产孢量下降，致病力降低。因此，*MfMel1*基因可能通过影响桃褐腐病菌的葡萄糖代谢通路来影响菌株产孢，致使病原菌对桃果实致病力下降。以上结果表明，*α*-半乳糖苷酶基因*MfMel1*在桃褐腐病菌的致病过程中具有重要作用，有望做为潜在的药物或生物防治药剂的靶标。

在帮助侵染的同时，病原菌分泌的糖苷水解酶GH家族蛋白也能够被识别，触发植物的免疫反应。大豆疫霉产生的GH12蛋白XEG1具有木葡聚糖酶和*β*-葡聚糖酶的活性，在侵染期间，该蛋白是重要的毒力因子；在大豆和茄科物种中，XEG1也是模式识别受体识别的病原相关分子模式，可以触发包括细胞死亡在内的防御反应（Ma et al.，2015）。灰葡萄孢*Botrytis cinerea* GH16蛋白家族的Crh1蛋白能够被多种植物识别，产生防御反应；该基因敲除后，病原菌的致病力降低（Bi et al.，2021）。本研究中，敲除*MfMel1*基因导致桃褐腐的致病力降低；但是该蛋白能否触发植物的抗病反应仍需要进一步研究，同时也需要对MfMel1蛋白所在的GH27家族进行深入研究。

参 考 文 献（References）

Bi K, Scalschi L, Jaiswal N, Mengiste T, Fried R, Sanz AB, Arroyo J, Zhu WJ, Masrati G, Sharon A. 2021. The *Botrytis cinerea* Crh1 transglycosylase is a cytoplasmic effector triggering plant cell death and defense response. Nature Communications, 12: 2166

Chou CM, Yu FY, Yu PL, Ho JF, Bostock RM, Chung KR, Huang JW, Lee MH. 2015. Expression of five endopolygalacturonase genes and demonstration that *MfPG1* overexpression diminishes virulence in the brown rot pathogen *Monilinia fructicola.* PLoS ONE, 10(6): e0132012

Katayama T, Tanaka Y, Okabe T, Nakamura H, Fujii W, Kitamoto K, Maruyama JI. 2016. Development of a genome editing technique using the CRISPR/Cas9 system in the industrial filamentous fungus *Aspergillus oryzae*. Biotechnology Letters, 38(4): 637−642

Lee MH, Chiu CM, Roubtsova T, Chou CM, Bostock RM. 2010. Overexpression of a redox-regulated cutinase gene, *MfCUT1*, increases virulence of the brown rot pathogen *Monilinia fructicola* on *Prunus* spp. Molecular Plant-Microbe Interactions, 23(2): 176−186

Liu JY. 2016. Cloning and functional identification of biocontrol-related genes in *Clonostachys rosea* 67-1. Master thesis. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences (in Chinese) [刘静雨. 2016. 粉红螺旋聚孢霉67-1生防相关基因的克隆与功能验证. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院]

Liu T, Hou JM, Wang YY, Jin YZ, Borth W, Zhao FZ, Liu Z, Hu J, Zuo YH. 2016. Genome-wide identification, classification and expression analysis in fungal-plant interactions of cutinase gene family and functional analysis of a putative *ClCUT7* in *Curvularia lunata*. Molecular Genetics and Genomics, 291(3): 1105−1115

Luo CX. 2017. Advances and prospects on researches of brown rot disease on fruits. Acta Phytopathologica Sinica, 47(2): 145−153 (in Chinese) [罗朝喜. 2017. 果树褐腐病的研究现状及其展望. 植物病理学报, 47(2): 145−153]

Ma ZC, Song TQ, Zhu L, Ye WW, Wang Y, Shao YY, Dong SM, Zhang ZG, Dou DL, Zheng XB, et al. 2015. A *Phytophthora sojae* glycoside hydrolase 12 protein is a major virulence factor during soybean infection and is recognized as a PAMP. The Plant Cell, 27 (7): 2057−2072

Tan B. 2019. Identification and diversity of peach brown rot pathogens and cloning and expression of *PG* gene. Master thesis. Yangzhou: Yangzhou University (in Chinese) [谈彬. 2019. 桃褐腐病病原鉴定与多样性研究及其*PG*基因的克隆与表达. 硕士学位论文. 扬州: 扬州大学]

Tan XW, Hu YY, Jia YL, Hou XY, Xu Q, Han C, Wang QQ. 2020. A conserved glycoside hydrolase family 7 cellobiohydrolase PsGH7a of *Phytophthora sojae* is required for full virulence on soybean. Frontiers in Microbiology, 11: 1285

Wang GY, Michailides TJ, Hammock BD, Lee YM, Bostock RM. 2000. Affinity purification and characterization of a cutinase from the fungal plant pathogen *Monilinia fructicola* (Wint.) honey. Archives of Biochemistry and Biophys, 382(1): 31−38

Xu GJ, Zhong XH, Shi YL, Liu Z, Jiang N, Liu J, Ding B, Li ZQ, Kang HX, Ning YS, et al. 2020. A fungal effector targets a heat shock-dynamin protein complex to modulate mitochondrial dynamics and reduce plant immunity. Science Advances, 6(48): eabb7719

Xue W, Zhao XM, Liu SH, Zhao XY, Liu ZP. 2010. Protoplast preparation and regeneration of *Monilia fructigena*. Microbiology China, 37(1): 71−77 (in Chinese) [薛伟, 赵筱萌, 刘素花, 赵晓燕, 刘正坪. 2010. 桃褐腐病菌(*Monilia fructigena*)原生质体制备及再生条件. 微生物学通报, 37(1): 71−77]

Yu JH, Hamari Z, Han 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

Yu PL, Wang CL, Chen PY, Lee MH. 2017. *YAP1* homologue-mediated redox sensing is crucial for a successful infection by *Monilinia fructicola*. Molecular Plant Pathology, 18(6): 783−797

Zhang MM. 2019. Genomics of *Monilinia* spp. and the functions of *MfOfd1* gene in *Monilinia fructicola*. Master thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [张明明. 2019. 桃褐腐病菌基因组及*MfOfd1*基因功能研究. 硕士学位论文. 武汉: 华中农业大学]

Zhang MM, Wang ZQ, Xu X, Huang S, Yin WX, Luo CX. 2020. *MfOfd1* is crucial for stress responses and virulence in the peach brown rot fungus *Monilinia fructicola*. Molecular Plant Pathology, 21(6): 820−833

Zhu XQ, Chen XY, Guo LY 2011. Population structure of brown rot fungi on stone fruits in China. Plant Disease, 95(10): 1284−1291

（责任编辑：王 璇）