植物保护学报 Journal of Plant Protection，2023，50(1)：231-239 DOI：10.13802/j.cnki.zwbhxb.2021.2021038

果生刺盘孢*Crz1*基因对DMI类杀菌剂抗性、外界胁迫应答、附着胞形成和致病力的影响

马梦婷 李 河*

（中南林业科技大学林学院，经济林培育与保护省部共建教育部重点实验室，长沙 410004）

摘要：为明确钙调磷酸酶应答锌指转录因子1（calcineurin responsive zinc finger transcription factor 1，Crz1）在果生刺盘孢*Colletotrichum fructicola*中的生物学功能，进而有效防控油茶炭疽病，该研究构建果生刺盘孢*Crz1*基因敲除突变体*ΔCfcrz1*和回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*，并测定突变体*ΔCfcrz1*、回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*和野生型菌株的生长发育、附着胞形成、外界胁迫应答、致病力以及对唑类杀菌剂的敏感性。结果显示，果生刺盘孢Crz1蛋白氨基酸序列与暹罗刺盘孢*C. siamense*的同源性最高，支持率高达100%；在马铃薯葡萄糖琼脂（potato dextrose agar，PDA）和基本培养基上，野生型菌株、回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*和突变体*ΔCfcrz1*的菌落直径分别为5.7、5.5、5.1 cm和5.3、5.1、2.8 cm，突变体*ΔCfcrz1*菌丝直径均极显著低于其他2株菌株；在含$CaCl_2$和二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）的PDA培养基上，突变体*ΔCfcrz1*菌丝生长抑制率分别为100.0%和46.3%，极显著高于其他2株菌株；突变体*ΔCfcrz1*形成的分生孢子量和附着胞形成率分别为7.2×10^5个/mL和17.3%，极显著小于其他2株菌株；突变体*ΔCfcrz1*对油茶叶的致病力明显减弱，病斑直径仅为0.06 cm，极显著低于其他2株菌株；当抑霉唑浓度大于0.1 μg/mL、苯醚甲环唑浓度大于0.5 μg/mL、三唑酮浓度大于4 μg/mL、戊唑醇浓度大于0.5 μg/mL时，突变体*ΔCfcrz1*菌丝生长抑制率分别大于34%、80%、39%和22%，极显著高于野生型菌株和回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*。表明转录因子Crz1参与调控油茶果生刺盘孢的生长、产孢、外界胁迫应答、致病力和对DMI类杀菌剂的抗性。

关键词：油茶；果生刺盘孢；杀菌剂；致病力；胁迫响应

Effects of *Crz1* gene on resistance to DMI fungicides, stress response, appressorium formation and pathogenesis of filamentous fungus *Colletotrichum fructicola*

Ma Mengting Li He*

（Key Laboratory for Non-Wood Forest Cultivation and Conservation of Ministry of Education; College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan Province, China）

Abstract: To study the biological functions of calcineurin responsive zinc finger transcription factor 1 (Crz1) in fruit rot pathogen *Colletotrichum fructicola*, and to control anthracnose of *Camellia oleifera* effectively, a gene knockout mutant *ΔCfcrz1* and its complementary strain *ΔCfcrz1*/*Crz1* of *C. fructicola* were generated, then the biological functions of the mutant strain *ΔCfcrz1*, complementary strain *ΔCfcrz1*/*Crz1* and wild strain were determined, including growth, appressorium formation, stress response, pathogenicity and resistance to DMI fungicides. This result indicated that Crz1 protein from *C. fructicola* had the highest amino acid sequence homology, 100% identify, with that of *C. siamense*; the colony diameters of wild type, complement strain *ΔCfcrz1*/*Crz1* and mutant *ΔCfcrz1* cultured on the potato dex-

基金项目：国家自然科学基金（32071765）

* 通信作者（Author for correspondence），E-mail：csuftlihe@163.com

收稿日期：2021-02-01

trose agar (PDA) and minimal medium (MM) were 5.7, 5.5, 5.1 cm and 5.3, 5.1, 2.8 cm, respectively, significantly lower for the mutant than for the other two strains; the inhibition rates on the PDA medium supplemented with $CaCl_2$ and dithiothreitol (DDT) were 100.0% and 46.3%, respectively, for the mutant strain *ΔCfcrz1* of *C. fructicola*, which was significantly higher than those for the other two strain; the percent conidia produced appressorium and conidia volume for mutant *ΔCfcrz1* was 17.3% or 7.2×10^5/mL, which that was significantly lower than those for the other two strains; the mutant strain *ΔCfcrz1* showed weaker pathogenicity, with a mean lesion diameter of 0.06 cm, on wounded tea-oil than the other two strains; when the concentration of imazolium was greater than 0.1 μg/mL, the concentration of difenoconazole was greater than 0.5 μg/mL, the concentrations of triazolone greater than 4 μg/mL, and the concentration of tebuconazole greater than 0.5 μg/mL, the inhibition rates of mutant *ΔCfcrz1* were 34%, 80%, 39% and 22%, respectively, which were significantly higher than that of wild type and supplement strain. These results revealed that the transcription factor Crz1 was involved in regulating the growth, conidiation, response to external stresses, pathogenicity, and resistance to DMI fungicides in *C. fructicola*.

Key words: *Camellia oleifera*; *Colletotrichum fructicola*; fungicide; pathogenicity; stress response

油茶是我国重要的木本油料树种，主要分布于长江流域以南的14个省区（李河等，2017）。茶油含有丰富的不饱和脂肪酸，可预防高血压和动脉硬化，有“中国橄榄油”之称（Zhang et al.，2019）。近年来，病害发生严重，致使油茶产量严重下降，经济损失巨大，其中炭疽病是油茶的主要病害之一（李河，2018），其由刺盘孢属 *Colletotrichum* 真菌引起的。目前关于油茶炭疽病的研究大多集中在病原菌鉴定、防治、生物学特性以及群体遗传等方面（朱英芝等，2015；李河等，2019）。本课题组前期研究发现油茶炭疽病的优势致病菌为果生刺盘孢 *C. fructicola*（李河等，2014；2019），但其致病机制和抗药性分子机制尚不清楚。

钙调磷酸酶应答锌指转录因子1（calcineurin responsive zinc finger transcription factor 1，Crz1）是真菌中普遍存在的一种转录因子，参与细胞中 Ca^{2+} 信号传导，调控 Ca^{2+} 泵进入内质网、液泡和高尔基体中，进而参与各种生物学过程（赵运英和蒋伶活，2013）。如在酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中存在着一条 Ca^{2+} 信号途径，当受到外界环境刺激后，细胞质内 Ca^{2+} 浓度升高，与钙调素一起激活钙调磷酸酶，钙调磷酸酶通过去磷酸化使得转录因子Crz1移位到细胞核中，进一步诱导有关 Ca^{2+} 敏感基因的表达，其中包含真菌对外界环境胁迫的响应、内质网压力应答、蛋白质降解、小分子运输以及致病性等过程（Stathopoulos-Gerontides et al.，1999；Cyert，2003）；在丝状真菌中转录因子Crz1对病原菌的生长发育、渗透调节和致病性等有重要作用，如在灰霉菌 *Botrytis cinerea* 和稻瘟菌 *Magnaporthe oryzae* 中，敲除 *Crz1* 基因会影响病菌菌丝生长发育、孢子萌发以及致病力等（Schumacher et al.，2008；Choi et al.，2009；Zhang et al.，2019）；此外张天园（2013）研究发现Crz1转录因子参与调控柑橘绿霉病菌 *Penicillium digitatum* 对苯醚甲环唑和抑霉唑的抗性。

目前，林业生产主要采用戊唑醇等甾醇脱甲基抑制剂类杀菌剂（demethylation inhibitor，DMI）防治油茶炭疽病，但油茶果生刺盘孢菌已对戊唑醇等DMI类杀菌剂产生严重抗性（李河等，2019），且抗性机制尚不清楚。同源重组是利用带有目标基因同源序列的DNA对目标位点实现精确基因编辑，是目前广泛应用的一种基因敲除方法（Zhang et al.，1998；Yi et al.，2009）。本研究采用同源重组基因敲除方法获得果生刺盘孢 *Crz1* 基因敲除突变体 *ΔCfcrz1*，构建果生刺盘孢回补菌株 *ΔCfcrz1*/*Crz1*，并测定突变体 *ΔCfcrz1*、回补菌株 *ΔCfcrz1*/*Crz1* 和野生型菌株的生长发育、附着胞形成、外界胁迫应答、致病力以及对唑类杀菌剂的敏感性，以期为油茶炭疽病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试菌株和植物：果生刺盘孢野生型菌株是经筛选、鉴定的果生刺盘孢CFLH16菌株，该菌株由本实验室分离并保存；油茶品种海科大2号，3年树龄，采集健康的幼嫩油茶叶片供试。

培养基：马铃薯葡萄糖琼脂（potato dextrose

agar，PDA）培养基成分为马铃薯200 g、葡萄糖20 g、琼脂15 g，加蒸馏水定容至1 L；马铃薯葡萄糖（potato dextrose，PDB）培养基为不加琼脂的PDA固体培养基；TB_3培养基成分为酵母提取物3 g、酪蛋白氨基酸3 g、蔗糖200 g、琼脂15 g，加蒸馏水定容至1 L；SD-Trp培养基成分为Trp 0.74 g、酵母氮基6.7 g、D-山梨醇182.2 g、琼脂20 g、50%葡萄糖40 mL，调节pH至5.8，加蒸馏水定容至1 L；酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂（yeast extract peptone dextrose，YEPD）培养基成分为酵母提取物10 g、蛋白胨20 g、葡萄糖20 g，加蒸馏水定容至1 L；基本培养基（minimal medium，MM）成分为$NaNO_3$ 6 g、KCl 0.52 g、$MgSO_4·7H_2O$ 0.152 g、KH_2PO_4 1.52 g、VB_1 0.01 g、1 000×微量元素溶液1 mL、葡萄糖10 g、琼脂15 g，加蒸馏水定容至1 L。所有培养基均高温高压灭菌后使用。

供试药剂：43%戊唑醇（tebuconazole）原药，烟台绿云生物科技有限公司；20%苯醚甲环唑（difenoconazole）原药，青岛瀚生生物科技股份有限公司；20%抑霉唑（imazole）原药，江西禾益化工股份有限公司；20%三唑酮（triazolon）原药，四川润尔科技有限公司；二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT）粉末，北京索莱宝科技有限公司。

试剂和仪器：潮霉素，北京索莱宝科技有限公司；博来霉素，美国Invitrogen公司；DL5000 Marker、2×*Taq* Master Mix、大肠杆菌*Escherichia coli* JM109、PCR回收试剂盒，湖南擎科生物技术有限公司；质粒Pbc1003、质粒pYF11和酵母*Saccharomyces cerevisiae*感受态细胞XK-125，南京农业大学惠赠；其他试剂均为国产分析纯。SK210显微镜，厦门麦克奥迪有限公司；9700 PCR仪，美国ABI有限公司；SPX-280恒温培养箱，宁波江南仪器厂；IS-RDD3台式恒温振荡器，美国精琪公司；DYY-2C电泳仪，北京六一仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 果生刺盘孢Crz1蛋白鉴定及系统发育分析

根据酿酒酵母中Crz1蛋白的氨基酸序列（GenBank登录号为NP 014371.1）在油茶果生刺盘孢全基因组数据库（ANPB00000000.1）中进行搜索，获得同源蛋白氨基酸序列。根据果生刺盘孢Crz1蛋白的氨基酸序列在NCBI数据库中获得其他4种物种同源蛋白的氨基酸序列。使用Mega 7.0（Kumar et al.，2016）软件采用双参数模型（Kimura，1980）计算距离矩阵，用邻接法建立果生刺盘孢Crz1蛋白氨基酸序列的系统发育树，自举检验重复1 000次。

1.2.2 果生刺盘孢*Crz1*基因敲除突变体的获得

采用同源重组基因敲除方法构建果生刺盘孢基因敲除载体*Cfcrz1*。野生型菌株CFLH16于28℃恒温培养箱中培养3 d后切取20个左右的菌丝块置于PDB培养基中，于28℃、160 r/min下恒温振荡培养2 d，采用溴化十六烷三甲基铵（cetyltrimethyl ammonium bromide，CTAB）法提取其基因组DNA。分别在果生刺盘孢*Crz1*全基因组序列起始密码子ATG前1 000 bp和20 bp及终止密码子TGA后20 bp和1 000 bp位置设计引物对*CfCrz1*-1F（5′-ACAACTGTCAGGTACTGCGT-3′）/*CfCrz1*-2R（5′-TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCGTAAATGGATGCCGGGAGTC-3′）和*CfCrz1*-3F（5′-CAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGTGTTCGAACACGGCTGGTTG-3′）/*CfCrz1*-4R（5′-TCGTCAGAGCTTACAAATGC-3′），所用引物均由湖南擎科生物技术有限公司合成。以获得的野生型菌株CFLH16基因组DNA为模板，分别用引物对*CfCrz1*-1F/*CfCrz1*-2R和*CfCrz1*-3F/*CfCrz1*-4R进行PCR扩增获得约1 kb左右的上、下臂片段。100 μL PCR扩增体系：引物各4 μL、DNA模板4 μL、2×*Taq* Master Mix 50 μL，加ddH_2O至100 μL。PCR扩增程序：95℃预变性5 min；95℃变性30 s，56℃退火30 s，72℃延伸30 s，共32个循环；72℃再延伸10 min，4℃保存。以质粒Pbc1003为模板利用引物对Hyg F（5′-GGCTTGGCTCCAGCTAGTGGAGGT-3′）/HygR（5′-CTCTATTCCTTTGCCCTCG-3′）扩增潮霉素抗性筛选基因*HPH*，PCR扩增体系和程序同上。所有PCR扩增产物均使用PCR回收试剂盒进行回收。以果生刺盘孢*Crz1*基因的上、下臂片段和*HPH*基因片段为模板，利用引物对*CfCrz1*-1F/*CfCrz1*-4R进行PCR扩增。50 μL PCR扩增体系：3个模板DNA片段各4 μL、2×*Taq* Master Mix 25 μL、10 pmol/L *CfCrz1*-1F引物2 μL、10 pmol/L *CfCrz1*-4R引物2 μL，ddH_2O补充至50 μL。PCR扩增程序：95℃预变性5 min；95℃变性30 s，56℃退火30 s，72℃延伸3.5 min，共32个循环；72℃再延伸10 min，4℃保存。取10 μL PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳验证，电泳验证后用DL5000 marker筛选含有潮霉素基因*HPH*的敲除载体。参考钱恒伟等（2018）方法制备果生刺盘孢原生质体，并采用PEG介导法把敲除载体片段转化至原生质体中，在含潮霉素的TB_3培养基中培养至长出转化子。利用目的基因内500~800 bp位置的引物对*CfCrz1*-7F（5′-AACGGCCAGTCATTCAACCA-3′）/*Cf-*

Crz1-8R(5′-TCCCATACCTCGGTCAGGAG-3′)和目的基因起始密码子前1 200 bp位置的引物对*CfCr z1*-5F(5′-GAAGGTACGATACTCACTTC-3′)/H885R(5′-TCCCATACCTCGGTCAGGAG-3′)分别进行PCR扩增筛选潮霉素抗性转化子,扩增体系及程序同上。电泳验证后获得果生刺盘孢*Crz1*基因敲除突变体*ΔCfcrz1*。

1.2.3 果生刺盘孢回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*的获得

在果生刺盘孢Crz1全基因组序列起始密码子前1 500 bp和终止密码子前20 bp的位置设计引物对 *CfCrz1*-9F (5′-ACTCACTATAGGGCGAATTGG-GTACTCAAATTGGTTTGCTAGGCTTGCAGCAT-AGC-3′)/*CfCrz1*-10R(5′-CACCACCCCGGTGAAC-AGCTCCTCGCCCTTGCTCACCCGACCGCCGTA-GTCGCTGG-3′),利用设计引物对PCR扩增含有启动子*Cfcrz1*基因互补片段,扩增体系及程序同上。与线性化的pYF11质粒共转入酵母感受态细胞XK-125中,并在SD-Trp培养基上培养2 d,利用YEPD培养基振荡培养转化成功的酵母12 h,利用引物对*CfCrz1*-7F/GFPR (5′-GACACGCTGAACTTGTGG-CCGTT-3′)进行PCR扩增,扩增体系及程序同上。并参考高亚兰等(2020)方法筛选获得大肠杆菌质粒,将质粒回转到*ΔCfcrz1*突变体原生质体中,在含博来霉素的TB_3培养基上培养,对生长出的转化子进行绿色荧光筛选获得果生刺盘孢基因回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*。

1.2.4 果生刺盘孢*Crz1*基因敲除突变体的生物学表型

测定果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*的生长特性。将果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*、回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*和野生型菌株CFLH16菌丝块放置在PDA培养基中央,在28℃恒温培养箱中培养3 d后,在每个菌落边缘打取直径为8 mm的菌饼,将其分别接种至MM和新的PDA培养基上,培养3 d后测量各菌株的菌落直径,试验重复3次。

测定果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*对Ca^{2+}敏感性的响应情况。果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*、回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*和野生型菌株CFLH16纯化培养同上,在每个菌落边缘打取直径为8 mm的菌饼,将其分别接种至含0和0.3 mmol/L $CaCl_2$的PDA培养基中,倒置培养3 d后测量各菌株的菌落直径,计算菌丝生长抑制率。生长抑制率=(在PDA培养基上菌落生长直径−在含$CaCl_2$的PDA培养基上菌落生长直径)/(在PDA培养基上菌落生长直径−8 mm)×100%,试验重复3次。

测定果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*对内质网压力胁迫的响应情况。果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*、回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*和野生型菌株CFLH16纯化培养同上,在每个菌落边缘打直径为8 mm的菌饼,将其分别接种到含5 mmol/L二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)的PDA培养基中央,培养3 d后测量各菌株菌落直径,计算菌丝生长抑制率,公式同上。

测定果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*分生孢子量及附着胞形成情况。果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*、回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*和野生型菌株CFLH16纯化培养同上,在每个菌落边缘打5个直径为8 mm的菌饼,将其分别转接到PDB培养基上,于28℃恒温振荡培养2 d促使其产孢,在显微镜下采用血球计数板计数分生孢子量,试验重复3次。将分生孢子分别用无菌水洗涤5次,调节分生孢子液浓度至1×10^4个/mL,分别取10 μL分生孢子液滴至疏水玻片中央,保湿培养24 h后,于显微镜下观察附着胞的形成并统计其数量,试验重复3次。

果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*致病力的测定。果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*、回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*和野生型菌株CFLH16纯化培养同上,采用有伤接种方式接种。采集3片健康的幼嫩油茶叶,用无菌牙签在油茶叶背面上下左右等距离刺破4个点,每株菌株分别取3 mm×3 mm的菌丝块接种至同一油茶叶背面的3个点上,以接种3 mm×3 mm PDA培养基的点为对照,保湿培养2 d后观察并测量不同接种处所形成的病斑直径,试验重复3次。

果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*对唑类药剂敏感性的测定。用二甲基亚砜将抑霉唑、苯醚甲环唑、三唑酮和戊唑醇分别配制成浓度为0.2、0.04、1.0和0.06 mg/mL的母液,分别取50、250 、300、400、500 μL抑霉唑药剂,50、250、1 250、2 500 μL苯醚甲环唑药剂,50、100、200、400、800、1 600 μL三唑酮药剂和50、200、800、3 200 μL戊唑醇药剂加入到100 mL PDA培养基中,使得抑霉唑浓度分别为0.1、0.5、0.6、0.8和1.0 μg/mL,苯醚甲环唑浓度分别为0.02、0.1、0.5和1.0 μg/mL,三唑酮浓度分别为0.5、1.0、2.0、4.0、8.0和16.0 μg/mL和戊唑醇浓度分别为0.031、0. 125、0.5和2.0 μg/mL。将果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*、回补菌株*ΔCfcrz1/Crz1*和野生型菌株CFLH16在PDA培养基中培养4 d,在每个菌落边缘打取直径为8 mm的菌饼,将其分别接种到含不同浓度抑霉唑、苯醚甲环唑、三唑酮和戊唑醇的PDA培养基上培养,以不含药剂的PDA培养基为对照,

观察并测量菌落直径，计算抑制率，公式同上。试验重复3次。

1.3 数据分析

使用SPSS 23.0软件对试验数据进行统计分析，采用最小显著差数（LSD）法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 果生刺盘孢Crz1蛋白的鉴定及系统发育分析

根据酿酒酵母中Crz1蛋白的氨基酸序列，在油茶果生刺盘孢全基因组数据库中鉴定到1个同源蛋白。系统发育树分析结果显示果生刺盘孢Crz1蛋白与其他丝状子囊真菌转录因子Crz1的同源序列具有较高的相似性，其中与暹罗刺盘孢*C. siamense*的同源性最高，支持率高达100%，而与酿酒酵母Crz1蛋白的氨基酸序列遗传距离最远（图1）。

2.2 果生刺盘孢*Crz1*基因敲除突变体*ΔCfcrz1*的获得

目标基因内引物*CfCrz1*-7F/*CfCrz1*-8R能在果生刺盘孢野生型菌株基因组中扩增出750 bp左右单一目的条带，而在突变体*ΔCfcrz1*中未扩增出目的条带；目标基因上游引物*CfCrz1*-5F和潮霉素基因上游引物H855R能在突变体*ΔCfcrz1*基因组中检测出一条1 000 bp左右的目的条带，而在野生型菌株中未检测到目的条带（图2），表明成功获得果生刺盘孢基因敲除突变体*ΔCfcrz1*。

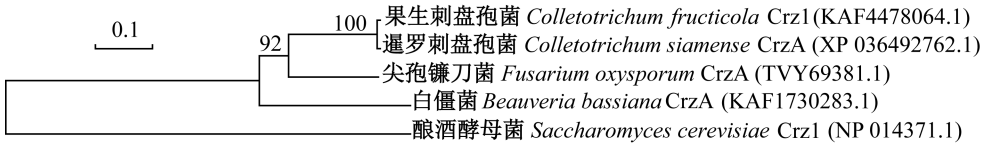
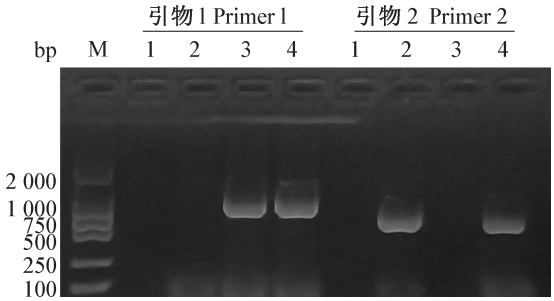


图1 基于氨基酸序列采用距离法构建果生刺盘孢Crz1蛋白与其他4种蛋白的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree of Crz1 protein from *Colletotrichum fructicola* and four other proteins constructed by distance method based on amino acid sequences



引物1：*CfCrz1*-5F/H855R；引物2：*CfCrz1*-7F/*CfCrz1*-8R；M：DL5000 marker；1：H_2O；2：野生型菌株；3：突变体；4：回补菌株。Primer 1: *CfCrz1*-5F/H855R; primer 2: *CfCrz1*-7F/*CfCrz1*-8R; M: DL5000 marker; 1: H_2O; 2: wild type strain; 3: mutant; 4: complement strain.

图2 果生刺盘孢基因敲除突变体及回补菌株的PCR检测

Fig. 2 PCR detection of gene knockout mutant and its complement strain of *Colletotrichum fructicola*

2.3 果生刺盘孢回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*的获得

通过PCR扩增验证抗博来霉素的转化子，目标基因内引物*CfCrz1*-7F/*CfCrz1*-8R能在果生刺盘孢基因回补菌株基因组中扩增出1条750 bp左右的目的条带；同时目标基因上游引物*CfCrz1*-5F和潮霉素基因上游引物H855R也能在果生刺盘孢回补菌株基因组中检测出一条1 000 bp左右的目的条带（图2），表明最终获得果生刺盘孢回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*。

2.4 果生刺盘孢突变体的生物学表型

2.4.1 在MM和PDA培养基上的生长特性

在PDA培养基上培养3 d后，果生刺盘孢野生型菌株、回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*和突变体*ΔCfcrz1*的菌落直径分别为5.7、5.5和5.1 cm，前两者极显著高于后者（$P<0.01$）；在MM培养基上培养3 d后，其菌落直径分别为5.3、5.1和2.8 cm，前两者极显著高于后者（$P<0.01$，图3），表明*Crz1*基因参与调控油茶果生刺盘孢生长。

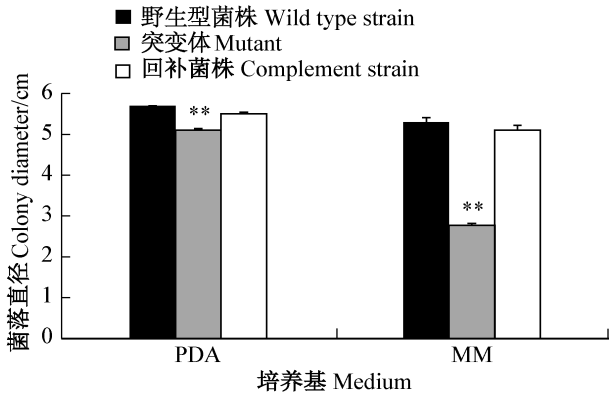


图3 *Crz1*基因敲除对果生刺盘孢菌丝生长的影响

Fig. 3 Effects of *Crz1* gene knockout on mycelial growth of *Colletotrichum fructicola*

图中数据为平均数±标准误。**表示同培养基上不同菌株经LSD法检验差异显著（$P<0.01$）。Data are mean±SD. ** indicates significant difference by LSD method ($P<0.01$).

2.4.2 对Ca^{2+}胁迫压力的响应

在含0.3 mmol/L $CaCl_2$的PDA培养基上，果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*菌丝生长受到完全抑制，抑制率达100.0%，而野生型菌株菌丝生长的抑制率仅为9.5%，前者极显著高于后者（$P<0.01$，图4-A），表明*Crz1*基因参与调控果生刺盘孢对外界Ca^{2+}胁迫的响应。

2.4.3 对内质网压力胁迫的响应

在含5 mmol/L DTT的PDA培养基上，果生刺盘孢野生型菌株、回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*和突变体*ΔCfcrz1*菌丝生长的抑制率分别为31.6%、20.5%和46.3%，前两者极显著小于后者（$P<0.01$，图4-B），表明*Crz1*基因参与调控果生刺盘孢菌对内质网压力胁迫的响应。

2.4.4 对果生刺盘孢分生孢子量的影响

果生刺盘孢野生型菌株、回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*和突变体*ΔCfcrz1*形成的分生孢子量分别为1.3×10^6、1.1×10^6和7.2×10^5个/mL，且前两者极显著高于后者（$P<0.01$，图5-A），表明*Crz1*基因参与调控果生刺盘孢菌分生孢子形成。

2.4.5 对果生刺盘孢附着胞形成的影响

果生刺盘孢野生型菌株、回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*和突变体*ΔCfcrz1*附着胞形成率分别为75.8%、70.0%和17.3%，前两者极显著高于后者（$P<0.01$，图5-B），表明*Crz1*基因参与调控果生刺盘孢菌附着胞形成。

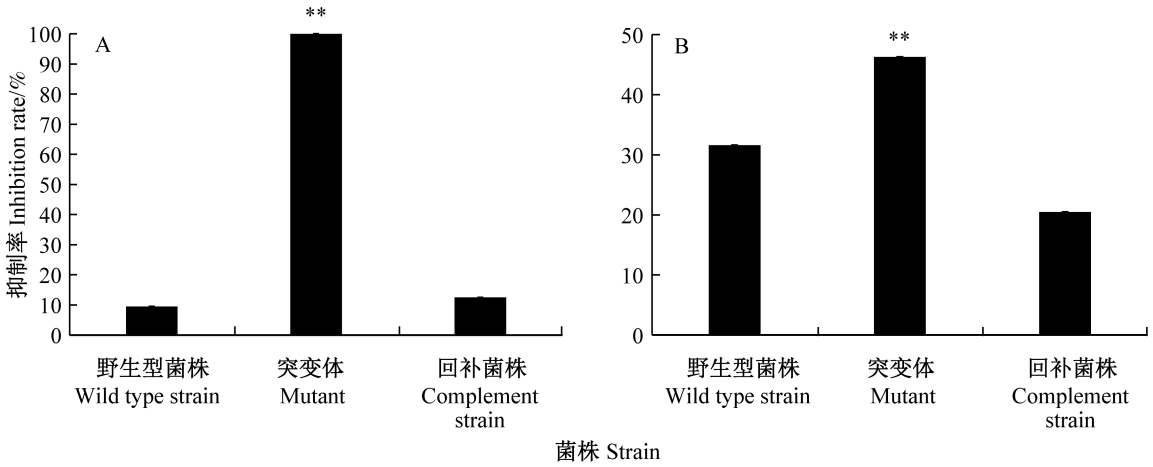


图4 在含$CaCl_2$（A）和DTT（B）的PDA培养基上果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*菌丝生长抑制率

Fig. 4 Inhibition rate of mycelial growth for knockout mutant *ΔCfcrz1* of *Colletotrichum fructicola* on PDA medium containing $CaCl_2$ (A) and DTT (B)

图中数据为平均数±标准差。**表示经LSD法检验差异显著（$P<0.01$）。Data are mean±SD. ** indicates significant difference by LSD method ($P<0.01$).

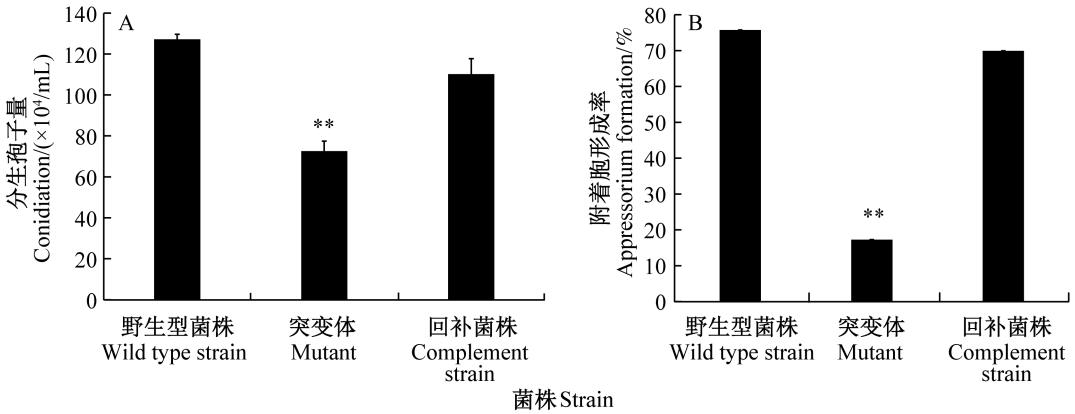


图5 *Crz1*基因敲除对果生刺盘孢分生孢子量（A）和附着胞形成率（B）的影响

Fig. 5 Effects of *Crz1* gene knockout on conidiation (A) and appressorium formation (B) of *Colletotrichum fructicola*

图中数据为平均数±标准差。**表示经LSD法检验差异显著（$P<0.01$）。Data are mean±SD. ** indicates significant difference by LSD method ($P<0.01$).

2.4.6　致病力

新鲜油茶叶背面接种果生刺盘孢野生型菌株、回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*和突变体*ΔCfcrz1* 3 d后，前2种菌株接种处观察到典型病斑，病斑直径分别为0.93 cm和0.83 cm，而在突变体*ΔCfcrz1*接种处仅观察到较小病斑，病斑直径为0.06 cm（图6），表明*Crz1*基因参与调控果生刺盘孢菌的致病力。

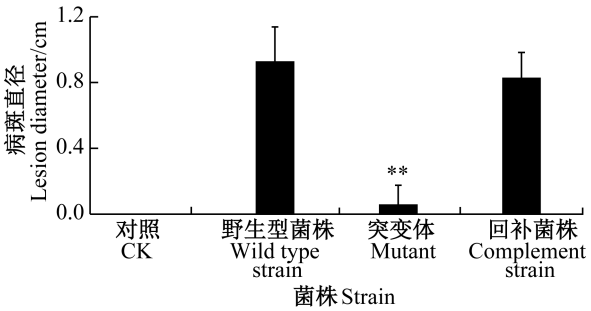


图6　接种果生刺盘孢不同菌株后油茶叶片的病斑直径

Fig. 6　Lesion diameter of *Camellia oleifera* leaves inoculated with different strains of *Colletotrichum fructicola*

图中数据为平均数±标准差。**表示经LSD法检验差异显著（$P<0.01$）。Data are mean±SD. ** indicates significant difference by LSD method ($P<0.01$).

2.4.7　对DMI类药剂的敏感性

当抑霉唑浓度大于0.1 μg/mL时，果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*菌丝生长抑制率大于34%，极显著大于野生型菌株和回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*（$P<0.01$，图7-A）；当苯醚甲环唑浓度为0.1 μg/mL时，果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*菌丝生长抑制率为54%，显著高于野生型菌株和回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*（$P<0.05$），当浓度大于0.5 μg/mL时，果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*菌丝生长抑制率大于80%，极显著高于野生型菌株和回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*（$P<0.01$，图7-B）；当三唑酮浓度为2 μg/mL时，果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*菌丝生长抑制率为22%，显著大于野生型菌株和回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*（$P<0.05$），当浓度大于4 μg/mL时，突变体*ΔCfcrz1*菌丝生长抑制率大于39%，极显著高于野生型菌株和回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*（$P<0.01$，图7-C）；当戊唑醇浓度大于0.5 μg/mL时，果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*菌丝生长抑制率大于22%，极显著高于野生型菌株和回补菌株*ΔCfcrz1*/*Crz1*（$P<0.01$，图7-D）。表明*Crz1*基因参与调控果生刺盘孢对这4种DMI类杀菌剂的抗性。

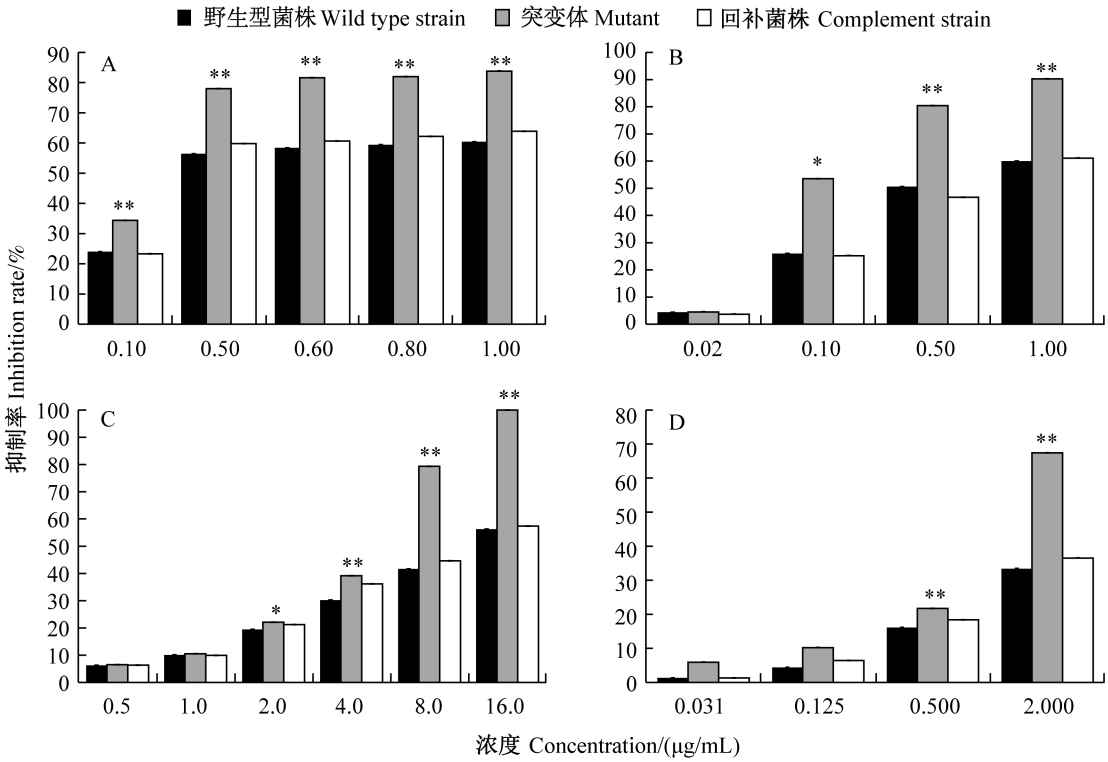


图7　果生刺盘孢突变体*ΔCfcrz1*对抑霉唑（A）、苯醚甲环唑（B）、三唑酮（C）和戊唑醇（D）的敏感性

Fig. 7　Sensitivity of gene deletion mutant *ΔCfcrz1* of *Colletotrichum fructicola* to imazole (A), difenoconazole (B), triazolon (C) and tebuconazole (D)

图中数据为平均数±标准差。*、**分别表示经LSD法检验差异显著（$P<0.05$或$P<0.01$）。Data are mean±SD. *, ** indicate significant difference by LSD method ($P<0.05$ or $P<0.01$).

3 讨论

病原菌的生长发育是其侵染寄主植物的重要前提。本研究结果发现果生刺盘孢 *Crz1* 基因敲除会导致果生刺盘孢生长功能部分丧失，而本课题组前期也报道了 *ATG8*、*HAC1* 和 *SNF1* 等基因参与调控果生刺盘孢的生长发育，即多个基因共同调控果生刺盘孢的生长（姚权等，2019；Zhang et al.，2019；郭源等，2021）。

外界环境 Ca^{2+} 浓度的变化能够影响 *Crz1* 基因在病原真菌中正常表达。在丝状真菌中，敲除 *Crz1* 基因会导致柑橘绿霉病菌 *Penicillium digitatum*（张天园，2013）和稻瘟病菌 *Magnaporthe grisea* 对 Ca^{2+} 的耐受性下降，菌丝生长受到较强抑制（Zhang et al.，2009），而本研究结果显示果生刺盘孢 *Crz1* 基因敲除后，其也对 $CaCl_2$ 高度敏感，菌丝生长完全受到抑制。虽然 *Crz1* 基因在不同病原真菌中均参与调控对 Ca^{2+} 的胁迫，但在不同种类病原菌中其调控程度存在差异。另外，DTT 会影响内质网内的蛋白质错误折叠，进而引起内质网应激反应（冯若等，2005），果生刺盘孢敲除 *Crz1* 基因后，其对 DTT 的敏感性显著增加，可能是 *Crz1* 基因敲除后，果生刺盘孢菌中调控 Ca^{2+} 等物质泵入内质网的 *PMR1* 等相关基因的表达异常，造成内质网压力胁迫应答不正常。

分生孢子的产生和附着胞的形成是植物病原真菌侵染寄主的关键因素，果生刺盘孢中分生孢子通过形成附着胞并产生侵入钉刺破寄主表皮，进而致病（Weir et al.，2012）。本研究结果发现果生刺盘孢 *Crz1* 基因敲除后，其分生孢子形成能力较野生型菌株显著下降，附着胞形成率也较野生型菌株显著下降 50% 左右，基本丧失了致病能力。Choi et al.（2009）研究结果显示，稻瘟病菌 *Crz1* 基因敲除后分生孢子和附着胞减少，与本研究结果一致。

DMI 类杀菌剂能够通过抑制病原菌细胞膜上甾醇的生物合成来有效抑制病原菌生长（陈淑宁，2017）。本研究结果发现果生刺盘孢 *Crz1* 基因敲除后，其对抑霉唑、苯醚甲环唑、三唑酮和戊唑醇等 DMI 类杀菌剂的敏感性均较野生型菌株显著增加。梁凌星（2015）研究结果发现 *CYP51* 基因突变会引起杧果胶孢炭疽菌 *Colletotrichum gloeosporioides* 对咪鲜胺产生抗药性；刘尊勇（2017）研究结果显示转录因子 FgTeb 参与调控禾谷镰刀菌 *Fusarium garminearum* 对 DMI 类杀菌剂的敏感性。此外，张天园（2013）研究发现柑橘绿霉病菌 *Crz1* 基因敲除后，其对高浓度抑霉唑、苯醚甲环唑的敏感性增强，而本研究结果显示低浓度抑霉唑、苯醚甲环唑就能引起基因敲除突变体高度敏感，说明 *Crz1* 基因在不同病原真菌对 DMI 类杀菌剂的抗性影响中起到的作用不完全相同，这可能与不同病原菌的调控网络差异有关。

本研究揭示了油茶果生刺盘孢转录因子 Crz1 的生物学功能，但关于转录因子 Crz1 如何调控果生刺盘孢对 DMI 类杀菌剂敏感以及对内质网压力的响应机制尚不清楚，需要进一步研究。

参 考 文 献（References）

Chen SN. 2017. Study on the resistance to DMI fungicides in *Monilinia fructicola* and *Colletotrichum* spp. from peach. PhD thesis. Wuhan: Huazhong Agricultural University (in Chinese) [陈淑宁. 2017. 桃褐腐病菌和炭疽病菌对DMI杀菌剂的抗性研究. 博士学位论文. 武汉: 华中农业大学]

Choi J, Kim Y, Kim S, Park J, Lee YH. 2009. *MoCRZ1*, a gene encoding a calcineurin-responsive transcription factor, regulates fungal growth and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. Fungal Genetics and Biology, 46(3): 243−254

Cyert MS. 2003. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. Biochemical and Biophysical Research Communications, 311(4): 1143−1150

Feng R, Zhang W, Yang JY, Liu GH, Zhang QX. 2005. Detection of phosphorylated P38 MAP kinase in human esophageal carcinoma Eca109 apoptotic cells induced by DTT. Journal of Zhengzhou University (Medical Science), 40(5): 833−834 (in Chinese) [冯若, 张娓, 杨继要, 刘国红, 张钦宪. 2005. 二硫苏糖醇诱导Eca109细胞凋亡及P38磷酸化检测. 郑州大学学报(医学版), 40(5): 833−834]

Gao YL, He YH, Li H. 2020. Biological function bZIP-type transcription factor CfAp1 in *Colletotrichum fructicola*. Scientia Silvae Sinicae, 56(9): 30−39 (in Chinese) [高亚兰, 何苑皋, 李河. 2020. 调控油茶果生刺盘孢bZIP转录因子CfAp1的生物学功能 林业科学, 56(9): 30−39]

Guo Y, Li H, Zhou GY, Liu JA, Zhang SP. 2021. Functional analysis of the autophagy-related protein CfAtg8 in *Colletotrichum fructicola*. Mycosystema, 40(3): 592−602 (in Chinese) [郭源, 李河, 周国英, 刘君昂, 张盛培. 2021. 自噬相关蛋白CfAtg8在果生刺盘孢中的功能分析. 菌物学报, 40(3): 592−602]

Kimura M. 1980. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution, 16(2): 111−120

Kumar S, Stecher G, Tamura K. 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. Molecular Biology and Evolution, 33(7): 1870−1874

Li H. 2018. Population genetic analyses of the fungal pathogen *Colletotrichum* on tea-oil trees in China and characterization of a

MAPK gene *CfPMK1* in the pathogen. PhD thesis. Shangsha: Central South University of Forestry and Technology (in Chinese) [李河. 2018. 油茶炭疽病菌群体遗传及MAPK基因*CfPMK1*功能研究. 博士学位论文. 长沙: 中南林业科技大学]

Li H, Li SZ, Wang YC, Liu JA, Xu JP, Zhou GY. 2019. Identification of the pathogens causing anthracnose of *Camellia oleifera* in nursery and their resistance to fungicides. Scientia Silvae Sinicae, 55(5): 85−94 (in Chinese) [李河, 李司政, 王悦辰, 刘君昂, 徐建平, 周国英. 2019. 油茶苗圃炭疽病原菌鉴定及抗药性. 林业科学, 55(5): 85−94]

Li H, Li Y, Jiang SQ, Liu JA, Zhou GY. 2017. Pathogen of oil-tea trees anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. in Hunan Province. Scientia Silvae Sinicae, 53(8): 43−53 (in Chinese) [李河, 李杨, 蒋仕强, 刘君昂, 周国英. 2017. 湖南省油茶炭疽病病原鉴定. 林业科学, 53(8): 43−53]

Li H, Zhou GY, Xu JP, Zhu DX. 2014. Pathogen identification of a new anthracnose of *Camellia oleifera* in China based on multiple-gene phylogeny. Journal of Plant Protection, 41(5): 602−607 (in Chinese) [李河, 周国英, 徐建平, 朱丹雪. 2014. 一种油茶新炭疽病原的多基因系统发育分析鉴定. 植物保护学报, 41(5): 602−607]

Liang LX. 2015. The functional study of mutated *CYP51* in *Colletotrichum gloeosporioides* for resistance to prochloraz. Master thesis. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University (in Chinese) [梁凌星. 2015. 抗咪鲜胺杧果胶孢炭疽菌突变的*CYP51*基因功能探究. 硕士学位论文. 福州: 福建农林大学]

Liu ZY. 2017. The study of fungicide sensitivity regulated by transcription factor FgTeb and microtubule-associated protein FgEBI in *Fusarium graminearum*. PhD thesis. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese) [刘尊勇. 2017. 转录因子FgTeb及微管末端结合蛋白FgEB1调控禾谷镰刀菌药剂敏感性机制研究. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学]

Qian HW, Chi MY, Zhao Y, Zhao YX, Huang JG. 2018. Effect of CYP51A gene of *Fusarium graminearum* on sensitivity to five triazole fungicides. Journal of Plant Protection, 45(6): 1381−1388 (in Chinese) [钱恒伟, 迟梦宇, 赵颖, 赵彦翔, 黄金光. 2018. 禾谷镰刀菌CYP51A基因对五种三唑类杀菌剂敏感性的影响. 植物保护学报, 45(6): 1381−1388]

Schumacher J, de Larrinoa IF, Tudzynski B. 2008. Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants. Eukaryotic Cell, 7(4): 584−601

Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS. 1999. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. Genes & Development, 13(7): 798−803

Weir BS, Johnston PR, Damm U. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology, 73: 115−180

Yao Q, Guo Y, Wei FY, Li SZ, Zhang SP, Li H. 2019. A bZIP-type transcription factor CfHac1 is involved in regulating development and pathogenesis in *Colletotrichum fructicola*. Mycosystema, 38(10): 1643−1652 (in Chinese) [姚权, 郭源, 魏丰园, 李司政, 张盛培, 李河. 2019. bZIP转录因子CfHac1参与调控果生刺盘孢菌的生长发育和致病力. 菌物学报, 38(10): 1643−1652]

Yi M, Chi MH, Khang CH, Park SY, Kang S, Valent B, Lee YH. 2009. The ER chaperone LHS_1 is involved in asexual development and rice infection by the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. The Plant Cell, 21(2): 681−695

Zhang HF, Zhao Q, Liu KY, Zhang ZG, Wang YC, Zheng XB. 2009. MgCRZ1, a transcription factor of *Magnaporthe grisea*, controls growth, development and is involved in full virulence. FEMS Microbiology Letters, 293(2): 160−169

Zhang SP, Guo Y, Li SZ, Zhou GY, Liu JN, Xu JP, Li H. 2019. Functional analysis of CfSnf1 in the development and pathogenicity of anthracnose fungus *Colletotrichum fructicola* on tea-oil tree. BMC Genetics, 20(1): 94

Zhang TY. 2013. Functional analysis of transcription factory PacC, Crz1, and protein kinase SNF1 in *Penicillium digitatum*. PhD thesis. Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese) [张天园. 2013. 柑橘绿霉病菌转录因子PacC、Crz1及蛋白激酶SNF1的功能分析. 博士学位论文. 杭州: 浙江大学]

Zhang YM, Buchholz F, Muyrers JPP, Stewart AF. 1998. A new logic for DNA engineering using recombination in *Escherichia coli*. Nature Genetics, 20(2): 123−128

Zhao YY, Jiang LH. 2013. Calcium/calcineurin signal transduction pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Chinese Journal of Cell Biology, 35(10): 1504−1513 (in Chinese) [赵运英, 蒋伶活. 2013. 酿酒酵母细胞中钙离子信号传导途径的研究进展. 中国细胞生物学学报, 35(10): 1504−1513]

Zhu YZ, Liao WJ, Zou DX, Wu YJ, Deng Y. 2015. Identification and biological characteristics of the pathogen from *Camellia oleifera* anthracnose in Guangxi. Journal of Plant Protection, 42(3): 382−389 (in Chinese) [朱英芝, 廖旺姣, 邹东霞, 吴耀军, 邓艳. 2015. 广西油茶炭疽病病原菌鉴定及生物学特性. 植物保护学报, 42(3): 382−389]

（责任编辑：张俊芳）