苹果树腐烂病菌 VmMFS1~VmMFS3 基因的 功能分析

张琼1 刘昭阳2 高承宇2 杜 旋2 冯 浩1.2* 黄丽丽1.2*

(1. 西北农林科技大学作物抗逆与高效生产全国重点实验室,陕西杨凌 712100;2. 西北农林科技大学植物保护学院,陕西杨凌 712100)

摘要:为绿色持久防控苹果树腐烂病,该研究分析苹果树腐烂病菌 Valsa mali 的3个主要协同转运 蛋白超家族(major facilitator superfamily, MFS)编码基因的氨基酸序列特征,利用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR, RT-qPCR)技术分析这3个基因在苹果树腐烂病菌侵染阶段的表达 水平,通过构建这3个基因的缺失突变体和回补菌株分析其在病原菌营养生长、致病力和非生物胁 迫应答等方面的功能。结果表明,这3个基因的氨基酸序列均具有 MFS 保守结构域,将其命名为 VmMFS1~VmMFS3; VmMFS1 和 VmMFS2 的进化距离较近,均与 VmMFS3 的进化距离较远;在苹 果树腐烂病菌侵染过程中 VmMFS1~VmMFS3 基因表达均显著上调;与野生型 03-8 菌株相比, VmMFS1~VmMFS3 基因缺失突变体的菌落形态无明显差异,但生长速度下降; VmMFS1~VmMFS3 基因缺失突变体的致病力均显著降低; VmMFS1~VmMFS3 基因缺失突变体对H₂O₂胁迫的敏感性无 明显变化,但对 NaC1 胁迫更敏感; 基因回补后基因缺失突变体的表型缺陷能恢复到野生型菌株的 水平。

关键词:非生物胁迫;主要协同转运蛋白超家族;苹果黑腐皮壳菌;致病力;H,O,胁迫;NaCl胁迫

Functional analysis of three facilitator superfamily protein genes *VmMFS1–VmMFS3* in apple *Valsa* canker pathogen *Valsa mali*

 Zhang Qiong¹ Liu Zhaoyang² Gao Chengyu² Du Xuan² Feng Hao^{1,2*} Huang Lili^{1,2*}
(1. State Key Laboratory for Crop Stress Resistance and High-Efficiency Production, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China; 2. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi Province, China;

Abstract: For integrated and durable control of apple *Valsa* canker, the amino acid sequence characteristics of three MFS-coding genes of pathogen *V. mali* were analyzed. Quantitative real-time PCR (RT-qPCR) technology was used to analyze the expression levels of these three genes during the infection of *V. mali*. Additionally, the function of these three MFS genes in vegetative growth, pathogenicity, and abiotic stress responses was analyzed using gene knockout and complementation approaches. The results showed that the deduced amino acid sequences of polyproteins encoded by all the three genes possess a conserved MFS domain, named as *VmMFS1–VmMFS3*. VmMFS1 and VmMFS2 are closely related in evolution, whereas they are distant from VmMFS3 based on the phylogenetic analysis. The expression of *VmMFS1–VmMFS3* during *V. mali* infection was further determined and all were upregulated significantly. Compared with that of wild-type strain 03-8, the deletion mutants of *VmMFS1–*

基金项目:陕西省科技重大专项(2020zdzx03-03-01)

^{*} 通信作者 (Authors for correspondence), E-mail: xiaosong04005@163.com, huanglili@nwsuaf.edu.cn 收稿日期: 2022-12-23

51卷

VmMFS3 show no noticeable difference in colony morphology, while the growth rate of deletion mutants was reduced to some extent. Importantly, the pathogenicity of *VmMFS1–VmMFS3* deletion mutants was significantly reduced. In addition, *VmMFS1–VmMFS3* deletion mutants exhibited no significant variation in their tolerance to H_2O_2 stress; however, they were more susceptible to NaCl stress. The gene complementation test showed that the complemented strains could restore the phenotypic defect of the gene deletion mutants to the level of the wild-type strain 03-8.

Key words: abiotic stress; major facilitator superfamily; Valsa mali; pathogenicity; H₂O₂ stress; NaCl stress

苹果树腐烂病是苹果上最具破坏性的病害,主要由子囊菌门苹果黑腐皮壳菌 Valsa mali 引起 (Wang XL et al., 2014; 2020)。该病害主要危害果 树主干的树皮组织,导致树皮腐烂,严重时枝枯树 死,给苹果产业造成巨大的经济损失。长期以来生 产上主要采取发病后刮除烂皮的被动治疗技术,效 率低、效果差。夏季药液淋干技术实现了病害的高 效应急防控,但化学药剂过量使用不仅污染环境,而 且容易引起病菌的抗药性。为了实现该病害的绿色 持久防控,亟需加强分子抗病育种以及靶向杀菌剂 开发等研究,而这些研究的关键前提和重要基础是 全面深入地了解病菌的致病机制。

主要协同转运蛋白超家族(major facilitator superfamily,MFS)是从细菌到哺乳动物中都保守存在的 一类典型的膜转运蛋白家族(Pao et al., 1998; Yan, 2015; Chen et al., 2019)。MFS由74个家族15000多 个成员组成,每个家族通常负责在生物膜上运输特 定类型的底物,如寡糖、氨基酸、肽、有机和无机阴、 阳离子等(Reddy et al., 2012)。MFS可参与生物体 多个生命过程,如酿酒酵母 Saccharomyces cerevisiae MFS基因DHA1家族和DAG家族通过改变膜 脂质的平衡来间接控制膜电位,从而参与对药物的 抗性(Dos Santos et al., 2014);里氏木霉菌 Trichoderma reesei的MFS糖转运基因Crt1缺失后导致纤 维素酶基因的表达能力降低(Zhang et al., 2013);绳 状青霉菌 Penicillium funiculosum 的 PfMFS 基因在 维持细胞pH平衡过程中发挥着重要作用(Xu et al., 2014)。关于植物病原真菌中MFS基因的研究主要 集中在对杀菌剂的抗性和致病力方面,如灰葡萄孢 菌 Botrytis cinerea 的 MFS 基因 Bcmfs1 在对天然毒 性化合物的耐受性和对杀菌剂的抗性方面有重要作 用(Hayashi et al., 2002);禾生球腔菌 Mycosphaerella graminicola中的MFS基因MgMfs1也具有类似 的功能(Roohparvar et al., 2007);禾谷镰孢菌Fusarium graminearum的 MFS 基因 FGRRES 01997 和 FGRRES_03033参与了对自身产生的脱氧雪腐镰刀 菌烯醇毒素的自我防御过程(Wang et al., 2018);指 状青霉菌 P. digitatum 的 3 个 MFS 基因 PdMfs1、Pd-MFS2和PdMFS1除了参与对杀菌剂的抗性外,同时 对自身致病力也有重要作用(Wu et al., 2016; de Ramón-Carbonell et al., 2019);交链格孢菌 Alternaria alternata 的 MFS 基因 AaMFS19缺失后会导致 病原菌对许多杀菌剂的敏感性提高,并且影响了其 对柑橘叶片的致病力(Chen et al., 2017);果生刺盘 孢菌 Colletotrichum fructicola 的 MFS 基因 CfMfs1 在 糖运输、产孢和致病力方面均有重要作用(Chen et al., 2019),而关于苹果树腐烂病菌中 MFS 基因的功 能未见报道。

本课题组前期通过转录组分析发现,在苹果树 腐烂病菌侵染阶段有3个被注释为MFS的基因明 显上调表达,为明确这3个基因的功能,本研究分析 这3个基因的氨基酸序列特征,利用实时荧光定量 PCR(quantitative real-time PCR,RT-qPCR)技术分析 在苹果树腐烂病菌侵染阶段这3个基因的表达水 平,通过构建这3个基因的缺失突变体和回补菌株 分析其在病原菌营养生长、致病力和非生物胁迫应 答等方面的功能,以期为全面解析苹果黑腐皮壳菌 致病机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试病菌、植物和主要载体:苹果黑腐皮壳菌野 生型03-8菌株由本实验室保存。粗细均匀、横截面 直径约为6mm的1年生苹果枝条采自西北农林科 技大学实验农场,品种为富士。含有氨基糖苷磷酸 转移酶基因的pFL2载体和含有潮霉素抗性的pDL2 载体由西北农林科技大学刘慧泉教授团队惠赠。

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200g、葡萄糖 20g、琼脂15g,ddH₂O定容至1L;酵母浸出粉蛋白 胨葡萄糖(yeast extract peptone dextrose, YEPD)液 体培养基成分为酵母提取物10g、蛋白胨20g、葡萄 糖20g、琼脂粉15g,ddH₂O定容至1L。

试剂及仪器: ChamQ SYBR qPCR Master Mix Kit, ClonExpress II One Step Cloning Kit, Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase, 南京诺唯赞生 物科技股份有限公司; QuickCut 限制酶, 日本 Ta-KaRa公司; TRIpure总RNA快速提取试剂盒,北京 华越洋生物科技有限公司; RevertAid RT 逆转录试 剂盒,美国Thermo Scientific公司;大肠杆菌 Escherichia coli DH5a 感受态细胞,北京擎科生物科技股 份有限公司;农杆菌Agrobacterium GV3101 感受态 细胞,北京康为世纪生物科技有限公司;BY-R0100 西班牙琼脂糖,法国Biowest公司;其他试剂均为国 产分析纯。Eporator型电转化仪,德国Eppendorf公 司; ProFlex 型 PCR 仪、NanoDrop 2000 超微量紫外 分光光度计,美国ThermoFisher公司;LightCycler 96 Life Technologies Real-Time PCR 仪, 德国 Roche 公司;EPS600电泳仪,上海天能生命科学有限公司; D6500尼康单反相机,日本尼康;SPX-420B恒温培 养箱,上海南荣实验室设备有限公司;AP-0650010 血球计数板,德国MARIENFELD公司。

1.2 方法

1.2.1 苹果树腐烂病菌3个MFS基因的序列特征分析

从NCBI网站(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/)下 载苹果树腐烂病菌侵染阶段高度表达的3个基因 (GenBank 登录号分别为VM1G_03590、VM1G_ 05304和VM1G_09517)相应的氨基酸序列。采用 Pfam_scan 1.6软件对这3个基因编码的蛋白结构域 进行分析。采用最大似然法使用IQ-tree 2软件构建 苹果树腐烂病菌所有具有MFS_1结构域蛋白的全 长氨基酸序列的系统发育树,自举值设为1000次。 使用MUSCLE 3.8.15对这3个基因的全长序列进行 多重序列比对分析,并使用trimAl 1.4.rev15软件进 行调整。

1.2.2 苹果树腐烂病菌侵染过程中3个基因的表达测定

用直径为5mm的打孔器在苹果树枝条上打 孔,同时用打孔器取苹果黑腐皮壳菌野生型菌株03-8 菌饼接种于枝条上,分别于接种后0(对照)、6、12、24 和48h,在病健交界处刮取1cm的枝条作为样品。 利用TRIpure总RNA快速提取试剂盒提取各样品的 总RNA,使用超微量分光光度计测定其浓度,用1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量,按照RevertAid RT 逆 转录试剂盒说明书合成 cDNA。使用 SnapGene 软 件设计引物 qVmMFS1-RT-F/qVmMFS1-RT-R、 qVmMFS2-RT-F/qVmMFS2-RT-R qVmMFS3-RT-F/ qVmMFS3-RT-R(表1),引物均委托生工生物工程 (上海)股份有限公司合成。以苹果黑腐皮壳菌 G6PDH 基因为内参基因,利用 qVmMFS1-RT-F/ qVmMFS1-RT-R, qVmMFS2-RT-F/qVmMFS2-RT-R, qVmMFS3-RT-F/qVmMFS3-RT-R 引物对 VmMFS1~ *VmMFS3*基因进行RT-qPCR扩增。20 µL RT-qPCR 体系: cDNA 模板 1 µL、2×RealStar Green Fast Mixture 10 µL、10 mmol/L 引物 F/R 各 1 µL、超纯水 7 µL。 反应程序:95 ℃预变性10 min;95 ℃变性15 s, 60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 45 s,45 个循环;95 ℃熔解 15 s,65 ℃熔解 60 s,97 ℃熔解 1 s,37 ℃冷却 30 s。 利用2-ΔΔα法计算 VmMFS1~VmMFS3 基因在不同时 间点的相对表达量(Livak & Schmittgen, 2001)。试 验重复3次。

1.2.3 VmMFS1~VmMFS3基因缺失突变体的构建

为进一步解析苹果树腐烂病菌 VmMFS1~VmMFS3 基因的功能,构建 VmMFS1~VmMFS3 基因缺失突变 体,以构建 VmMFSI 基因缺失突变体为例。采用 CTAB方法提取苹果黑腐皮壳菌野生型菌株03-8基 因组 DNA,分别利用引物 VmMFS1-1F/VmMFS1-2R 和 VmMFS1-3F/VmMFS1-4R(表1)来扩增目标基因 的上游和下游序列,利用EX-G418-F/EX-G418-R引 物(表1)来扩增标记基因 neo。利用 Double-joint PCR方法构建 VmMFSI 的基因敲除盒(Yu et al., 2004)。使用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介 导的真菌转化方法,将 VmMFSI 的基因敲除盒转入 到苹果黑腐皮壳菌野生型菌株03-8原生质体中(高 静等,2011)。在含有250 μg/mL G418 的 PDA 培养 基上筛选 VmMFS1 基因缺失突变体。为了确认目 的基因是否被敲除,以转化子基因组 DNA 为模板, 分别用4对引物 VmMFS1-5F/VmMFS1-6R、EX-G418-F/EX-G418-R、VmMFS1-7F/G418-R和G418-F/ *VmMFS1-8*R(表1)检测*VmMFS*基因的敲除、neo基 因的插入以及 VmMFS1 上游和下游侧翼的定向同 源重组。20 µL PCR 检测体系:检测样品 cDNA 1 µL、2×Taq Fast Mixture 10 µL、10 mmol/L引物F/引 物R各1µL、超纯水7µL。PCR检测程序:95℃预 变性10 min;95 ℃变性15 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸 45 s,35个循环;72 ℃终延伸10 min,16 ℃保存。当目 的基因无扩增条带、neo基因以及上下游侧翼出现 相应扩增条带,则认为目的基因被成功敲除。VmMFS2 和VmMFS3两个基因缺失突变体的构建同上。

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

引物Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Purpose
qVmMFS1-RT-F	GTTTTCGTGGGATCGTTGCT	检测基因表达量
qVmMFS1-RT-R	AAGAGGCCCCAGTACGAATC	Detection of gene expression levels
qVmMFS2-RT-F	TTTGCCTTCGTAGTCTGGGT	
qVmMFS2-RT-R	CAGGACGGACATGTAAAGCG	
qVmMFS3-RT-F	TCGCAGAGTATGAAGGTGCC	
qVmMFS3-RT-R	TGCAGGGCGAAGAACATCAA	
G6PDH-F	TCAGAACAAGTTCGAGGGCGACAA	
G6PDH-R	TGAGGGCAATAGAGGGCTTGTTCA	
VmMFS1-1F	CGATGGCAAACTGGATT	构建基因缺失突变体
VmMFS1-2R	$\underline{CAGATACGGCAGAGAAATCGCAACCTC}CGTGGCTGACTGTAGGG$	Construction of gene deletion
VmMFS1-3F	$\underline{GTTTAGATTCCAAGTGTCTACTGCTGGC} CATTGCCTCTTAGTTGCC$	mutants
VmMFS1-4R	TTGGTAGGAGTGGGTGC	
VmMFS1-5F	TTACGCTGACAGTGGGTG	
VmMFS1-6R	ACGGGATCATAGACAGAAGA	
VmMFS1-7F	TCTGGACGTGACCAATTTGGA	
VmMFS1-8R	GCTGTGAGCCCTGATTTGTA	
VmMFS2-1F	GGCACTGCGAGCCTTAG	
VmMFS2-2R	<u>CAGATACGGCAGAGAAATCGCAACCTC</u> ACGGCGAATCTTGTCCT	
VmMFS2-3F	<u>GTTTAGATTCCAAGTGTCTACTGC</u> TGGTAATGGAAACCACCTGTGA	<u>.</u>
VmMFS2-4R	CGATGGCATTGATAAACC	
VmMFS2-5F	CGACCTTGTCACCTTTACG	
VmMFS2-6R	CGACCTTGTCACCTTTACG	
VmMFS2-7F	ACGCAGGTAAAAGGTAGAAAAGT	
VmMFS2-8R	ACAAGGACCAACACCAAGACT	
VmMFS3-1F	TGGCACAATCGAACGAA	
VmMFS3-2R	$\underline{CAGATACGGCAGAGAAATCGCAACCTC}CTGGGCAGTAGGCAAAA$	
VmMFS3-3F	<u>GTTTAGATTCCAAGTGTCTACTGCTGGCA</u> CCCCTGAATGCAACTA	
VmMFS3-4R	AAGCACTGCCAATCTATG	
VmMFS3-5F	CCAGGGATGCCGAATACA	
VmMFS3-6R	CAACCCCACAGCAAGAATG	
VmMFS3-7F	AAGCGTGGTTTGTTCTGGC	
VmMFS3-8R	CCGATAAACAGGGAAACAGAGT	
HB-VmMFS1-F	TCTCATCACCATCACCATCACAACATCGGTGTCATTTACG	构建回补菌株 Construction of complementary stains
HB-VmMFS1-R	TCGCCCTTGCTCACCCTCGACGCTATTATCCAAATCTTGAT	
HB-VmMFS2-F	TCTCATCACCATCACCATCACACGCAGGTAAAGGTAGAAAAGT	
HB-VmMFS2-R	TCGCCCTTGCTCACCCTCGACTTGCTTCTAAAGTCTAATA	
HB-VmMFS3-F	TCTCATCACCATCACCATCACTGTTAGTTCGGCTGAGGG	
HB-VmMFS3-R	TCGCCCTTGCTCACCCTCGA TCGAAAAAGTGATCTCTA	
G418-F	TCAAACCCAACAAAACACAG	扩增潮霉素抗性基因片段G418 Amplification of G418
G418-R	TTCAGCAATATCACGGGTAG	
EX-G418-F	GAGGTTGCGATTTCTCTGCCGTATCTG	扩增标记基因 neo
EX-G418-R	GCCAGCAGTAGACACTTGGAATCTAAAC	Amplification of marker gene neo

下划线为引物接头序列。 The underline represents the primer splice sequence.

1.2.4 VmMFS1~VmMFS3基因回补菌株的构建

回补载体的构建:首先利用 HB-*VmMFS1*-F/ HB-*VmMFS1*-R、HB-*VmMFS2*-F/HB-*VmMFS2*-R 和 HB-*VmMFS3*-F/HB-*VmMFS3*-R引物(表1)分别从苹 果树腐烂病菌野生型菌株03-8基因组 DNA 中扩增 获得 *VmMFS1~VmMFS3*基因。50 µL PCR 扩增体 系:5×Phanta Max Buffer 10 µL、dNTPs 1 µL、Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 1 µL、上下游引 物各 2 µL、Template 2 µL, ddH₂O补足。PCR 扩增程 序:95 ℃预变性4 min;95 ℃变性30 s,58 ℃退火5 min, 72 ℃延伸2 min,35个循环;72 ℃终延伸10 min,16 ℃ 保存。并将扩增基因片段连接到含有潮霉素抗性基 因的载体 pDL2 上构建回补载体。

原生质体制作:将 VmMFS1~VmMFS3 基因缺失 突变体菌株分别接种到铺有玻璃纸的 PDA 平板上, 培养3d后刮取新鲜菌丝,将其分别转移至100 mL YEPD 液体培养基中, 于25 ℃、100 r/min 条件下摇 培2d;用灭菌纱布过滤菌体,收集菌丝,用1.2 mol/L KCl溶液冲洗收集的菌丝并滤干,将其转移至无菌 50 mL离心管中。向灭菌 50 mL离心管中加入1.05 g 崩溃酶和0.23g裂解酶,用30mL1.2mol/LKCl溶解, 封口膜封口后于30℃、110 r/min条件下摇匀30 min, 于常温以4000 r/min离心10 min即获得酶解液,用 细菌过滤器过滤酶解液,将其加入到上述含有菌丝 的离心管内,封口膜封口,于30℃、110 r/min条件下 酶解2~3h,于显微镜下观察菌丝酶解程度;待显微 镜视野内观察到许多圆球形原生质体时,酶解完成。 将酶解后液体用灭菌3层滤布过滤至灭菌50mL离心 管中,并用1.2 mol/L KCl 溶液冲洗滤布至满管,于 常温以5000 r/min离心10 min, 弃上清液; 用20 mL 浓度为1.2 mol/L KCl 溶液清洗原生质体2次,每次 以5000 r/min离心10 min,弃上清液;加入1 mL 蔗 糖-三羟甲基氨基甲烷盐酸-二水合氯化钙(sucrose-Tris-HCl-CaCl, 2H,O, STC)缓冲剂,用移液器轻轻 吹散,在显微镜下用血球计数板确定其浓度,根据视 野下原生质体浓度确定 STC Buffer 添加量;向所得 原生质体加入7%二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)后分装至1.5 mL灭菌离心管中,每管分装 200 µL,-80 ℃保存备用。

回补菌株的检测:将回补载体转到原生质体中, 在含有90μg/mL潮霉素抗性基因的PDA培养基上 筛选 VmMFS1~VmMFS3 回补菌株。以 VmMFS1~ VmMFS3基因缺失突变体为阴性对照,以苹果树腐 烂病菌野生型菌株03-8为阳性对照,利用VmMFS1-5F/ *VmMFS1*-6R、*VmMFS2*-5F/*VmMFS2*-6R和*VmMFS3*-5F/*VmMFS3*-6R引物(表1)进行PCR检测,检测体 系及方法同1.2.3,以确定获得回补菌株。

1.2.5 VmMFS1~VmMFS3对菌丝营养生长的影响测定

将苹果树腐烂病菌野生型菌株03-8、VmMFS1~ VmMFS3基因缺失突变体和回补菌株分别接种到 PDA培养基上,于25℃恒温培养箱中避光培养2d, 用打孔器在菌落边缘打取直径为5mm的菌饼,将 其分别接种到PDA培养基上,于25℃下黑暗培养, 48h后测量菌落直径。每株菌设3个重复,试验重 复3次。

1.2.6 VmMFS1~VmMFS3对病菌致病力的影响测定

选取粗细均匀、横截面直径约为6~7 mm的1年 生苹果枝条,用次氯酸钠溶液消毒,无菌水冲净后风 干,用石蜡封住剪口,并用直径为5 mm的打孔器在 枝条表面制造伤口;将苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8、VmMFS1~VmMFS3 基因缺失突变体和回补菌 株分别接种到PDA培养基上,于25 ℃恒温培养箱 中避光培养2 d,用打孔器在菌落边缘打取直径为 5 mm的菌饼,将其分别接种到PDA培养基上,2 d 后再用打孔器在菌落边缘打取直径为5 mm的菌 饼,将其分别接种到伤口处,于25 ℃下黑暗保湿培 养,4 d后测量病斑长度。每个菌株接种3 根枝条, 试验重复3次。

1.2.7 VmMFS1~VmMFS3对非生物胁迫的响应测定

将苹果树腐烂病菌野生型菌株03-8、VmMFS1~ VmMFS3基因缺失突变体和回补菌株分别接种到 PDA培养基上,于25℃恒温培养箱中避光培养2d, 用打孔器在菌落边缘打取直径为5mm的菌饼,将 其分别接种到PDA培养基上,2d后再用打孔器在 菌落边缘打取直径为5mm的菌饼,将其分别接种 到含12mmol/LH₂O₂和0.1mol/LNaC1的PDA平板 上,48h后采用十字交叉法测量菌落直径。每组设3个 重复,试验重复2次。

1.3 数据分析

采用 SPSS 20.0 软件对试验数据进行统计分析, 应用 *t*检验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 VmMFS1~VmMFS3基因的序列特征

信号肽预测表明3个基因的氨基酸序列均没有 信号肽。结构域分析显示其编码的3个蛋白均具有 1个MFS_1结构域,符合MFS的特征(图1),因此将 这3个基因分别命名为苹果树腐烂病菌 VmMFS1、 VmMFS2和VmMFS3基因。系统发育树结果显示, 苹果树腐烂病菌VmMFS1和VmMFS2蛋白的进化 关系较近, 而均与VmMFS3有一定的距离(图2)。



图1 苹果树腐烂病菌 VmMFS1~VmMFS3 蛋白的 保守结构域分析





*VmMFS1~VmMFS3*基因的登录号分别为VM1G_03590、 VM1G_05304和VM1G_09517。The accession numbers of *VmMFS1-VmMFS3* are VM1G_03590, VM1G_05304 and VM1G_09517, respectively.

图2 苹果黑腐皮壳菌 302 个潜在 MFS 蛋白之间的 系统发育关系

Fig. 2 Phylogenetic relationships among 302 potential MFS proteins of *Valsa mali*

2.2 苹果树腐烂病菌侵染过程中3个基因的表达

在苹果树腐烂病菌侵染过程中*VmMFS1~VmMFS3* 三个基因的相对表达量均较对照显著上调(*P*< 0.05),均在接种后6h达到峰值,分别为对照的47.4倍、 41.9倍和23.5倍,接种后48h,3个基因的相对表达 量有所下降,但仍较对照显著上调(P<0.05),分别为 对照的6.5倍、11.5倍和15.3倍;除接种后48h外,其 他时间下 VmMFSI和 VmMFS2基因的相对表达量 均高于 VmMFS3基因的相对表达量(图3),表明 VmMFS1~VmMFS3基因可能在苹果树腐烂病菌侵 染过程中发挥着重要作用,特别是在侵染的早期 阶段。



图3 苹果树腐烂病菌侵染过程中 VmMFS1~VmMFS3 基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression levels of *VmMFS1-VmMFS3* during the *Valsa mali* infection process

图中数据为平均数±标准差。*表示处理与对照之间经t检验法检验差异显著(P<0.05)。Data are mean±SD.* indicates significant difference between treatments and CK by t test (P<0.05).

2.3 VmMFS1~VmMFS3基因缺失突变体的构建

经检测共获得12个 VmMFS1 基因缺失突变体、 12个 VmMFS2 基因缺失突变体和11个 VmMFS3 基 因缺失突变体(图4)。

2.4 VmMFS1~VmMFS3基因回补菌株的构建

经检测成功构建了*VmMFS1~VmMFS3*基因的回补菌株(图5)。

2.5 VmMFS1~VmMFS3对菌丝营养生长的影响

苹果树腐烂病菌 VmMFS1~VmMFS3 基因缺失 突变体和回补菌株的菌落形态与苹果树腐烂病菌野 生型菌株 03-8 相似(图 6), VmMFS1~VmMFS3 基因 缺失突变体的菌落直径分别较苹果树腐烂病菌野生 型菌株 03-8 菌株显著下降了 32.44%、17.30% 和 13.28%(P<0.05), 而 VmMFS1~VmMFS3 基因回补菌 株的菌落直径均与野生型菌株 03-8 无显著差异(图 7), 表明 VmMFS1~VmMFS3 基因参与了苹果树腐烂 病菌菌丝的营养生长。

2.6 VmMFS1~VmMFS3对病菌致病力的影响

与接种苹果树腐烂病菌野生型菌株03-8(对照) 相比,接种苹果树腐烂病菌 VmMFS1~VmMFS3 基因 缺失突变体后枝条上病斑明显变小(图8),病斑长 度分别较野生型菌株03-8显著降低68.17%、66.10% 和72.23%(P<0.05,图9),而VmMFS1~VmMFS3回 补菌株的致病力与野生型菌株03-8的致病力水平相当,表明VmMFS1~VmMFS3在病原菌致病力方面发挥着重要作用。



1: 引物 VmMFS1-5F/VmMFS1-6R; 2: neo 引物 EX-G418-F/EX-G418-R; 3~4: 上下游侧翼引物 VmMFS1-7F/G418-R和 G418-F/VmMFS1-8R; 5: 引物 VmMFS2-5F/VmMFS2-6R; 6~7: 上下游侧翼引物 VmMFS2-7F/G418-R和 G418-F/VmMFS2-8R; 8: 引物 VmMFS3-5F/VmMFS3-6R; 9~10: 上下游侧翼引物 VmMFS3-7F/G418-R和 G418-F/VmMFS3-8R; M: marker。03-8: 野生型菌株。 △: 基因缺失突变体。1: Primers VmMFS1-5F/VmMFS1-6R; 2: neo primers EX-G418-F/EX-G418-R; 3-4: primers of upstream and downstream flanks VmMFS1-7F/G418-R and G418-F/VmMFS2-8R; 5: primers VmMFS2-5F/VmMFS2-6R; 6-7: primers of upstream and downstream flanks VmMFS1-7F/G418-R and G418-F/VmMFS2-7F/G418-R and G418-F/VmMFS2-8R; 8: primers VmMFS2-5F/VmMFS3-6R; 9-10: primers of upstream and downstream flanks VmMFS2-7F/G418-R and G418-F/VmMFS2-8R; 8: primers VmMFS3-5F/VmMFS3-6R; 9-10: primers of upstream and downstream flanks VmMFS3-7F/G418-R and G418-F/VmMFS3-8R; M: marker. 03-8: Wild-type strain. △: Gene deletion mutants.

图4 苹果树腐烂病菌 VmMFS1(A)、VmMFS2(B)和 VmMFS3(C)基因缺失突变体的检测

Fig. 4 Detection of gene deletion mutants of VmMFS1 (A), VmMFS2 (B) and VmMFS3 (C) of Valsa mali

2.7 VmMFS1~VmMFS3对非生物胁迫的响应

在12 mmol/L H₂O₂胁迫下,苹果树腐烂病菌 VmMFS1~VmMFS3 基因缺失突变体的菌落直径均 与苹果树腐烂病菌野生型菌株03-8无明显差异,但 在 0.1 mol/L NaC1 胁迫下,苹果树腐烂病菌 VmMFS1~VmMFS3 基因缺失突变体的菌落生长明 显变缓,菌落直径平均分别较野生型菌株03-8 显 著下降 26.47%、27.91% 和 26.84% (P<0.05,图 10); 在 12 mmol/L H₂O₂ 和 0.1 mol/L NaCl 胁迫下, *VmMFS1~VmMFS3* 基因回补菌株的菌落直径均与 野生型菌株 03-8 的菌落直径相当(图 10),表明 *VmMFS1~VmMFS3* 基因在 NaCl 胁迫应答反应方面 有重要作用。



03-8: 野生型菌株; Δ03590-5和 Δ03590-124: VmMFS1 基因缺失突变体; Δ05304-8和 Δ05304-53: VmMFS2 基因缺失突 变体; Δ09517-33和 Δ09517-90: VmMFS3 基因缺失突变体。HB-03590-5、HB-03590-124、HB-05304-8、HB-05304-53、HB-09517-33和 HB-09517-90: 回补菌株。03-8: Wild-type strain; Δ03590-5 and Δ03590-124: VmMFS1 gene deletion mutants; Δ05304-8 and Δ05304-53: VmMFS2 gene deletion mutants; Δ09517-33 and Δ09517-90: VmMFS3 gene deletion mutants. HB-03590-5, HB-03590-124, HB-05304-8, HB-05304-53, HB-09517-90: Complementary strain.

图5 苹果树腐烂病菌 VmMFS1(A)、VmMFS2(B)和 VmMFS3(C)基因回补菌株的检测

Fig. 5 Detection of complementary stains of VmMFS1 (A), VmMFS2 (B) and VmMFS3 (C) of Valsa mali



03-8: 野生型菌株; Δ03590-5和Δ03590-124: VmMFS1基因缺失突变体; Δ05304-8和Δ05304-53: VmMFS2基因缺失突变体; Δ09517-33和Δ09517-90: VmMFS3基因缺失突变体。HB-03590-5、HB-03590-124、HB-05304-8、HB-05304-53、HB-09517-33和HB-09517-90: 回补菌株。03-8: Wild-type strain; Δ03590-5 and Δ03590-124: VmMFS1 gene deletion mutants; Δ05304-8 and Δ05304-53: VmMFS2 gene deletion mutants; Δ09517-33 and Δ09517-90: VmMFS3 gene deletion mutants. HB-03590-5, HB-03590-124, HB-05304-8, HB-05304-53, HB-09517-33, and HB-09517-90: Complementary strain.

图6 苹果树腐烂病菌 VmMFS1~VmMFS3(A~C)基因缺失突变体及其回补菌株的菌落形态

Fig. 6 Colony morphologies of VmMFS1-VmMFS3 (A-C) deletion mutants and their complementary strains of Valsa mali

3 讨论

256

MFS是一类重要的转运蛋白,对于真菌吸收必需的营养物质和离子以及外排代谢产物和有害物质均有重要作用(Del Sorbo et al.,2000)。在真菌基因组中,有很大一部分基因编码了MFS(Reddy et al.,

2012), Goffeau et al. (1997) 基于系统发育分析将 MFS 基因分为17个不同的家族。不同物种含有 MFS 基因的数量不同, 如异旋孢腔菌 Cochliobolus heterostrophus 有 232个 MFS 基因, 构巢曲霉菌 Aspergillus nidulans 有 356个 MFS, 烟曲霉菌 A. fumigatus 有 275个 MFS, 颖枯壳针孢菌 Stagonospora nodorum有301个MFS,灰葡萄孢菌有204个MFS,灰色大角间壳菌Magnaporthe grisea有251个MFS,禾谷镰孢菌有335个MFS,绳状青霉菌有416个MFS(Xu et al.,2014)。本研究首次从苹果黑腐皮壳菌中鉴定出了3个MFS基因,这3个基因均具有1个MFS1保守结构域,苹果黑腐皮壳菌中共有302个具

有MFS_1结构域的基因,与其他真菌中MFS基因的 数量相近;此外通过系统发育分析发现VmMFS1和 VmMFS2的距离较近,而与VmMFS3的距离较远, 表明真菌MFS家族转运蛋白具有进化多样性,同一 亚家族成员也可能具有不同的功能。



03-8: 野生型菌株; Δ03590-5和 Δ03590-124: VmMFS1 基因缺失突变体; Δ05304-8和 Δ05304-53: VmMFS2基因缺失突变体; Δ05517-33和 Δ09517-90: VmMFS3 基因缺失突变体。HB-03590-5、HB-03590-124、HB-05304-8、HB-05304-53、HB-09517-33和 HB-09517-90: 回补菌株。03-8: Wild-type strain; Δ03590-5 and Δ03590-124: VmMFS1 gene deletion mutants; Δ05304-8 and Δ05304-53: VmMFS2 gene deletion mutants; Δ09517-33 and Δ09517-90: VmMFS3 gene deletion mutants. HB-03590-5, HB-03590-124, HB-05304-8, HB-05304-53, HB-09517-33, and HB-09517-90: Complementary strain.

图7 苹果树腐烂病菌 VmMFS1~VmMFS3(A~C)基因缺失突变体及其回补菌株的菌落直径

Fig. 7 Colony diameters of *VmMFS1-VmMFS3* (A-C) deletion mutants and their complementary strains of *Valsa mali* 图中数据为平均数±标准差。*表示各菌株与野生型菌株03-8之间经t检验法检验差异显著(P<0.05)。Data are mean±SD.
* indicates significant difference between strains and wild-type strain 03-8 by *t* test (P<0.05).



03-8: 野生型菌株; Δ03590-5、Δ03590-17、Δ03590-37和Δ03590-124: *VmMFS1*基因缺失突变体; Δ05304-8、Δ05304-53、 Δ03590-69、Δ03590-132和Δ03590-156: *VmMFS2*基因缺失突变体; Δ09517-29、Δ09517-33、Δ09517-82、Δ09517-90和 Δ09517-98: *VmMFS3*基因缺失突变体。HB-03590-5、HB-03590-124、HB-05304-8、HB-05304-53、HB-09517-33和 HB-09517-90: 回补菌株。03-8: Wild-type strain; Δ03590-5, Δ03590-17, Δ03590-37 and Δ03590-124: *VmMFS1* gene deletion mutants; Δ05304-8, Δ05304-53, Δ03590-69, Δ03590-132 and Δ03590-156: *VmMFS2* gene deletion mutants; Δ09517-29, Δ09517-33, Δ09517-82, Δ09517-90 and Δ09517-98: *VmMFS3* gene deletion mutants. HB-03590-5, HB-03590-124, HB-05304-8, HB-05304-53, HB-09517-33, and HB-09517-90: Complementary strain.

图8 接种苹果树腐烂病菌 VmMFS1~VmMFS3(A~C)基因缺失突变体及其回补菌株后枝条表型

Fig. 8 Phenotype of twigs inoculated VmMFS1-VmMFS3 (A-C) deleted mutants and their complementary strains of Valsa mali



03-8: 野生型菌株; Δ03590-5、Δ03590-17、Δ03590-37和Δ03590-124: VmMFS1基因缺失突变体; Δ05304-8、Δ05304-53、 Δ03590-69、Δ03590-132和Δ03590-156: VmMFS2基因缺失突变体; Δ09517-29、Δ09517-33、Δ09517-82、Δ09517-90和 Δ09517-98: VmMFS3基因缺失突变体。HB-03590-5、HB-03590-124、HB-05304-8、HB-05304-53、HB-09517-33和 HB-09517-90: 回补菌株。03-8: Wild-type strain; Δ03590-5, Δ03590-17, Δ03590-37 and Δ03590-124: VmMFS1 gene deletion mutants; Δ05304-8, Δ05304-53, Δ03590-69, Δ03590-132 and Δ03590-156: VmMFS2 gene deletion mutants; Δ09517-82, Δ09517-90 and Δ09517-98: VmMFS3 gene deletion mutants. HB-03590-5, HB-03590-124, HB-05304-8, HB-05304-53, HB-09517-33, and HB-09517-90: Complementary strain.

图9 接种苹果树腐烂病菌 VmMFS1~VmMFS3(A~C)基因缺失突变体及其回补菌株后枝条上病斑长度 Fig. 9 Lesion lengths on twigs inoculated VmMFS1-VmMFS3 (A-C) deletion mutants and their complementary strains of Valsa mali 图中数据为平均数±标准差。*表示各菌株与野生型菌株03-8之间经t检验法检验差异显著(P<0.05)。Data are mean±SD.



03-8: 野生型菌株; Δ03590-5和 Δ03590-124: VmMFS1 基因缺失突变体; Δ05304-8和 Δ05304-53: VmMFS2 基因缺失突 变体; Δ09517-33和 Δ09517-90: VmMFS3 基因缺失突变体。HB-03590-5、HB-03590-124、HB-05304-8、HB-05304-53、HB-09517-33和 HB-09517-90: 回补菌株。03-8: Wild-type strain; Δ03590-5 and Δ03590-124: VmMFS1 gene deletion mutants; Δ05304-8 and Δ05304-53: VmMFS2 gene deletion mutants; Δ09517-33 and Δ09517-90: VmMFS3 gene deletion mutants. HB-03590-5, HB-03590-124, HB-05304-8, HB-05304-53, HB-09517-33, and HB-09517-90: Complementary strain.

图 10 苹果树腐烂病菌 VmMFS1~VmMFS3(A~C)基因缺失突变体及其回补菌株对非生物胁迫的响应 Fig. 10 Responses of VmMFS1-VmMFS3 (A-C) deletion mutants and their complementary strains of Valsa mali to abiotic stresses 图中数据为平均数±标准差。*表示各菌株与野生型菌株03-8之间经t检验法检验差异显著(P<0.05)。Data are mean±SD. * indicates significant difference between strains and wild-type strain 03-8 by t test (P<0.05).

作为一类转运蛋白,MFS的功能主要涉及底物运输。在植物病原真菌中,MFS的功能被证明与其

自身对天然有毒化合物和杀真菌剂的抗性有关 (Hayashi et al., 2002; Roohparvar et al., 2007)。本研 究结果显示,在苹果树腐烂病菌侵染过程中 VmMFS1~VmMFS3基因均上调表达,表明它们可能 在病菌致病过程中发挥着重要作用;VmMFS1~VmMFS3 基因缺失会导致病原菌致病力下降,同时菌丝的营 养生长也受到了一定影响。与之类似的是,交链格 孢菌和胶胞炭疽菌 Colletotrichum gloeosporioides 中 AaMFS19和 CgMFS1 基因缺失也导致营养生长变 缓,致病力下降(Chen et al., 2017; Liu et al., 2021), 因此MFS主要负责一些离子和物质的运输,推测 VmMFS1~VmMFS3基因缺失可能影响了菌丝吸收 营养的能力,导致突变体生长下降,从而导致侵染速 度减慢;但是从菌落生长直径和枝条病斑长度下降 比例来看,接种 VmMFS1~VmMFS3 基因缺失突变体 后枝条上病斑长度变小不仅是菌丝生长变缓导致 的,其可能还作为毒性调节因子参与了病原菌的侵 染过程,但具体致病机制还需要进一步研究。

在灰葡萄孢菌中MFS蛋白mfsG通过增强病原 菌对葡糖醇类的耐受性来发挥致病功能(Vela-Corcía et al., 2019)。同时,一些植物病原真菌的 MFS蛋白也参与了向寄主植物中分泌内源代谢物 甚至是毒素物质。如在拟轮枝镰孢菌 F. sporotrichioides中MFS转运体TRI12被认为与单端孢霉烯族 真菌毒素的分泌有关(Alexander et al., 1999);菊池 氏尾孢菌 Cercospora kikuchii 中的 MFS 可以产生尾 孢菌素,尾孢菌素在菊池氏尾孢菌对大豆产生毒力 的过程中发挥着重要作用(Callahan et al., 1999);当 哈茨木霉菌 Trichoderma harzianum 中 MFS 基因 Thmfs1被敲除后,毛孢菌素的产生量减少至野生型 菌株的17%以下(Liu et al., 2012)。毒素也是苹果 黑腐皮壳菌的一类重要致病因子,目前已分离出原 儿茶酸、异香豆素衍生物等20多种毒素(Natsume et al., 1982; Wang CX et al., 2014), VmMFS1~VmMFS3 基因缺失是否通过影响毒素的分泌来降低致病力还 有待进一步研究。

植物体产生活性氧用于激活自身免疫反应(Averyanov et al.,2009)。在与植物长期的共同进化过程中,病原菌已经进化出相应的反应系统来清除过多的活性氧(Molina & Kahmann,2007; Samalova et al.,2014)。本研究结果显示,苹果树腐烂病菌*VmMFS1~VmMFS3*基因缺失突变体对H₂O₂胁迫的敏感性较野生型菌株无明显变化,而其他真菌的MFS与氧化应激反应有关(Chen et al.,2017; Lin et al.,2018),尤其是在胶胞炭疽菌中,*CgMFS1*基因缺失导致该菌对H₂O₂的敏感性显著增强(Chen et al.,

2021)。推测本研究中*VmMFS1~VmMFS3*基因可能 不像*CgMFS1*那样具有代谢活性氧的核心功能,这 可能与苹果黑腐皮壳菌属于死体营养型弱寄生菌有 关,特别是与其和树皮组织长期建立的独特互作关 系有关。此外,本研究结果显示*VmMFS1~VmMFS3*基 因缺失突变体对NaCl的敏感性较野生型菌株更强。 MFS的一个关键功能是充当外流泵,如MFS通过编 码Na⁺/H⁺反向输送器可将钠离子排出细胞外 (Abdel-Motaal et al., 2018),这有助于提升细胞的抗 压能力(Pao et al., 1998),推测当*VmMFS1~VmMFS3*基 因被敲除后,可能导致行使Na⁺外流泵的功能受到 影响,从而使其对盐胁迫的耐受性降低。

本研究鉴定了苹果黑腐皮壳菌的3个MFS基因 VmMFS1~VmMFS3,并揭示了这3个基因在营养 生长、致病力以及抗盐和氧化胁迫方面的功能,然而 对于MFS这样一个基因群体,生物体中MFS基因 的数量为什么会这么多,它们在功能上是否存在冗 余,其发挥功能的机制是什么,这些均需要在未来研 究中不断解析。

参考文献 (References)

- Abdel-Motaal H, Meng L, Zhang ZL, Abdelazez AH, Shao L, Xu T, Meng FK, Abozaed S, Zhang R, Jiang JQ. 2018. An uncharacterized major facilitator superfamily transporter from *Planococcus maritimus* exhibits dual functions as a Na⁺ (Li⁺, K⁺)/H⁺ antiporter and a multidrug efflux pump. Frontiers in Microbiology, 9: 1601
- Alexander NJ, McCormick SP, Hohn TM. 1999. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast. Molecular and General Genetics, 261(6): 977–984
- Averyanov A. 2009. Oxidative burst and plant disease resistance. Frontiers in Bioscience, 1(1): 142–152
- Callahan TM, Rose MS, Meade MJ, Ehrenshaft M, Upchurch RG. 1999. CFP, the putative cercosporin transporter of Cercospora kikuchii, is required for wild type cercosporin production, resistance, and virulence on soybean. Molecular Plant-Microbe Interactions, 12(10): 901–910
- Chen LH, Tsai HC, Yu PL, Chung KR. 2017. A major facilitator superfamily transporter-mediated resistance to oxidative stress and fungicides requires Yap1, Skn7, and MAP kinases in the citrus fungal pathogen.*Alternaria alternata*. PLoS ONE, 12(1): e0169103
- Chen Q, Lei L, Liu CH, Zhang YZ, Xu QA, Zhu J, Guo ZR, Wang Y, Li QC, Li Y, et al. 2021. Major facilitator superfamily transporter gene *FgMFS1* is essential for *Fusarium graminearum* to deal with salicylic acid stress and for its pathogenicity towards wheat. International Journal of Molecular Sciences, 22(16): 8497
- Chen YY, Zhou GY, Liu JN. 2019. A major facilitator superfamily

transporter in *Colletotrichum fructicola* (*CfMfs1*) is required for sugar transport, appressorial turgor pressure, conidiation and pathogenicity. Forest Pathology, 49(6): e12558

- de Ramón-Carbonell M, López-Pérez M, González-Candelas L, Sánchez-Torres P. 2019. PdMFS1 transporter contributes to Penicilliun digitatum fungicide resistance and fungal virulence during citrus fruit infection. Journal of Fungi, 5(4): 100
- Del Sorbo G, Schoonbeek HJ, De Waard MA. 2000. Fungal transporters involved in efflux of natural toxic compounds and fungicides. Fungal Genetics and Biology, 30(1): 1–15
- Dos Santos SC, Teixeira MC, Dias PJ, Sá-Correia I. 2014. MFS transporters required for multidrug/multixenobiotic (MD/MX) resistance in the model yeast: understanding their physiological function through post-genomic approaches. Frontiers in Physiology, 5: 180
- Gao J, Li YB, Ke XW, Kang ZS, Huang LL. 2011. Development of genetic transformation system of *Valsa mali* of apple mediated by PEG. Acta Microbiologica Sinica, 51(9): 1194–1199 (in Chinese) [高静, 李艳波, 柯希望, 康振生, 黄丽丽. 2011. PEG 介导 的苹果腐烂病菌原生质体转化. 微生物学报, 51(9): 1194–1199]
- Goffeau A, Park J, Paulsen IT, Jonniaux JL, Dinh T, Mordant P, Saier MH Jr. 1997. Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames within the major facilitator superfamily. Yeast, 13(1): 43–54
- Hayashi K, Schoonbeek HJ, De Waard MA. 2002. *Bcmfs1*, a novel major facilitator superfamily transporter from *Botrytis cinerea*, provides tolerance towards the natural toxic compounds camptothecin and cercosporin and towards fungicides. Applied and Environmental Microbiology, 68(10): 4996–5004
- Lin HC, Yu PL, Chen LH, Tsai HC, Chung KR. 2018. A major facilitator superfamily transporter regulated by the stress-responsive transcription factor *Yap1* is required for resistance to fungicides, xenobiotics, and oxidants and full virulence in *Alternaria alternata*. Frontiers in Microbiology, 9: 2229
- Liu M, Liu J, Wang WM. 2012. Isolation and functional analysis of *Thmfs1*, the first major facilitator superfamily transporter from the biocontrol fungus *Trichoderma harzianum*. Biotechnology Letters, 34(10): 1857–1862
- Liu N, Wang QN, He CZ, An B. 2021. CgMFS1, a major facilitator superfamily transporter, is required for sugar transport, oxidative stress resistance, and pathogenicity of Colletotrichum gloeosporioides from Hevea brasiliensis. Current Issues in Molecular Biology, 43(3): 1548–1557
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Methods, 25(4): 402–408
- Molina L, Kahmann R. 2007. An *Ustilago maydis* gene involved in H₂O₂ detoxification is required for virulence. The Plant Cell, 19 (7): 2293–2309
- Natsume H, Seto H, Otake N. 1982. Studies on apple canker disease. The necrotic toxins produced by *Valsa ceratosperma*. Agricul-

tural and Biological Chemistry, 46(8): 2101-2106

- Pao SS, Paulsen IT, Saier MH Jr. 1998. Major facilitator superfamily. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62(1): 1–34
- Reddy VS, Shlykov MA, Castillo R, Sun EI, Saier MH Jr. 2012. The major facilitator superfamily (MFS) revisited. The FEBS Journal, 279(11): 2022–2035
- Roohparvar R, De Waard MA, Kema GHJ, Zwiers LH. 2007. MgMfs1, a major facilitator superfamily transporter from the fungal wheat pathogen Mycosphaerella graminicola, is a strong protectant against natural toxic compounds and fungicides. Fungal Genetics and Biology, 44(5): 378–388
- Samalova M, Meyer AJ, Gurr SJ, Fricker MD. 2014. Robust antioxidant defences in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* confer tolerance to the host oxidative burst. New Phytologist, 201(2): 556–573
- Vela-Corcía D, Aditya Srivastava D, Dafa-Berger A, Rotem N, Barda O, Levy M. 2019. MFS transporter from *Botrytis cinerea* provides tolerance to glucosinolate-breakdown products and is required for pathogenicity. Nature Communications, 10: 2886
- Wang CX, Li C, Li BH, Li GF, Dong XL, Wang GP, Zhang QM. 2014. Toxins produced by *Valsa mali* var. *mali* and their relationship with pathogenicity. Toxins, 6(3): 1139–1154
- Wang QH, Chen DP, Wu MC, Zhu JD, Jiang C, Xu JR, Liu HQ. 2018. MFS transporters and GABA metabolism are involved in the self-defense against DON in *Fusarium graminearum*. Frontiers in Plant Science, 9: 438
- Wang XL, Shi CM, Gleason ML, Huang LL. 2020. Fungal species associated with apple Valsa canker in East Asia. Phytopathology Research, 2(1): 35
- Wang XL, Zang R, Yin ZY, Kang ZS, Huang LL. 2014. Delimiting cryptic pathogen species causing apple *Valsa* canker with multilocus data. Ecology and Evolution, 4(8): 1369–1380
- Wu Z, Wang SQ, Yuan YZ, Zhang TF, Liu J, Liu DL. 2016. A novel major facilitator superfamily transporter in *Penicillium digitatum* (*PdMFS2*) is required for prochloraz resistance, conidiation and full virulence. Biotechnology Letters, 38(8): 1349–1357
- Xu XX, Chen JY, Xu HJ, Li DC. 2014. Role of a major facilitator superfamily transporter in adaptation capacity of *Penicillium funiculosum* under extreme acidic stress. Fungal Genetics and Biology, 69: 75–83
- Yan N. 2015. Structural biology of the major facilitator superfamily transporters. Annual Review of Biophysics, 44: 257–283
- 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
- Zhang WX, Kou YB, Xu JT, Cao YL, Zhao GL, Shao J, Wang H, Wang ZX, Bao XM, Chen GJ, et al. 2013. Two major facilitator superfamily sugar transporters from *Trichoderma reesei* and their roles in induction of cellulase biosynthesis. The Journal of Biological Chemistry, 288(46): 32861–32872