

# 漆酶基因 *Cglac10* 的缺失对杧果炭疽病菌无性繁殖和侵染能力的影响

肖春丽<sup>1</sup>, 钟昌开<sup>1</sup>, 张梦婷<sup>1</sup>, 余姿蓉<sup>1</sup>, 董玲玲<sup>1</sup>,  
谭晴<sup>1</sup>, 张贺<sup>2</sup>, 蒲金基<sup>2\*</sup>, 刘晓妹<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>海南大学植物保护学院·热带农林生物灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228; <sup>2</sup>中国热带农业科学院环境与植物保护研究所·农业农村部热带作物有害生物综合治理重点实验室, 海口 571101)

**摘要:**【目的】揭示漆酶基因 *Cglac10* 在杧果炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*) 生长及侵染致病过程中的功能。【方法】利用 qPCR 技术对 *Cglac10* 在该菌侵染过程中的表达进行分析, 并通过同源重组和 PEG 介导的原生质体转化法获得敲除突变体  $\Delta Cglac10H$  和回复菌株 *C- $\Delta Cglac10H$* 。【结果】*Cglac10* 基因在侵染过程中的表达量是侵染前的 8.02~13.66 倍。回复菌株 *C- $\Delta Cglac10H$*  的表型与野生型菌株的无显著差异; 突变体  $\Delta Cglac10H$  除在菌丝生长速率方面与野生型菌株差异不明显外, 菌落颜色变为白色, 培养 10 d 时菌丝中黑色素含量下降了 67.33%, 产孢量显著下降; 在水膜中培养至 24 h 时,  $\Delta Cglac10H$  才偶见形成附着胞, 36 h 时的形成率仅为野生型菌株的 44.85%; 在 PDB 中培养 6 d 后,  $\Delta Cglac10H$  的胞内漆酶活性较野生型菌株下降了 57.61%; 不刺伤时,  $\Delta Cglac10H$  几乎不致病, 刺伤接种 6 d 后, 观察到  $\Delta Cglac10H$  的致病力比野生型菌株下降了 52.94%。【结论】*Cglac10* 在 *C. gloeosporioides* 无性繁殖及侵染致病过程中起着重要作用。

**关键词:** 杧果炭疽病菌; 漆酶基因; 敲除; 致病力

中图分类号: S667.7

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2021)07-1066-11

## Effects of deletion of laccase gene *Cglac10* on the asexual reproduction and infection ability of *Colletotrichum gloeosporioides*

XIAO Chunli<sup>1</sup>, ZHONG Changkai<sup>1</sup>, ZHANG Mengting<sup>1</sup>, YU Zirong<sup>1</sup>, DONG Lingling<sup>1</sup>, TAN Qing<sup>1</sup>, ZHANG He<sup>2</sup>, PU Jinji<sup>2\*</sup>, LIU Xiaomei<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Plant Protection, Hainan University / Key Laboratory of Tropical Biological Resources/Ministry of Education Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China; <sup>2</sup>Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences/Key Laboratory of Integrated Pest Management of Tropical Crops, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Haikou 571101, Hainan, China)

**Abstract:** 【Objective】Mango (*Mangifera indica* Linn.) is the second largest tropical fruit in China. *Colletotrichum gloeosporioides* is an important plant pathogen with large host-range and wide distribution. Anthracnose mainly caused by *C. gloeosporioides* is one of the most serious diseases that reduce mango production. Identifying the pathogenesis-related genes and revealing their roles in fungal growth and infection, and further understanding the interaction between *C. gloeosporioides* and its host, will help to find new control targets and improve control effects. In previous work, we found out 13 laccase family members from *C. gloeosporioides* in a reference genome databases. Sequences alignment showed great difference. Therefore, we speculated that their function might be quite different. So far, only the functions of *lacI* have been identified at the molecular level, and it affected mycelial growth and develop-

收稿日期: 2021-01-27 接受日期: 2021-03-29

基金项目: 国家自然科学基金(31860479); 国家重点研发计划资助(2017YFD0202100)

作者简介: 肖春丽, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为植物病理学。Tel: 13337513739, E-mail: 2112587460@qq.com

\*通信作者 Author for correspondence. E-mail: lxmpll@126.com; E-mail: simmonpjj@163.com

ment, melanin deposition, conidia production, laccase activity, stress tolerance and virulence to the host. In order to further explore the role of *Cglac10*, another member of the laccase family, *Cglac10* was disrupted and complemented, and its phenotype was analyzed in this paper. 【Methods】The expression of *Cglac10* gene in the process of infection of *C. gloeosporioides* on leaves was analyzed by qPCR. The knockout vector of the *Cglac10* gene was constructed by inserting a *hygB* cassette into the coding region, and transforming it into *E. coli* DH5. Hygromycin B was used as a marker to screen transformant, and the minimum inhibitory concentration of Hygromycin B on *C. gloeosporioides* was  $400 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The knocked out mutants were obtained using PEG-mediated protoplast transformation. PCR amplification, Southern blot and qPCR were used to determine whether the transformants were *Cglac10* deletion mutants. Then *Cglac10* gene was complemented in mutants by a similar way. Basta resistance and PCR detection were used to determine whether the transformants were the complementary strains of mutant  $\Delta Cglac10$ . The biological phenotypes including colony growth rate, sporulation, the formation of appressorium, intracellular melanin content and laccase activity were tested. In addition, after inoculating the wild-type strain,  $\Delta Cglac10$  and the complementary strain *C- $\Delta Cglac10H$*  on the PDA plate with 0.04% guaiacol, the extracellular laccase activity was tested by the plate color reaction. The virulence was assessed on the mango fruits using unwounded and wounded inoculation method, respectively. The diameters of the lesions were observed and measured every day. 【Results】The complete DNA and cDNA sequences of the laccase gene *Cglac10* are 1989 bp and 1878 bp in length, respectively, encoding a putative protein with 625 amino acid. The *Cglac10* gene was highly expressed during infection process, which was 8.02-13.66 times as high as that before infection. The phenotype indicated that there was no significant difference between the complementary strain *C- $\Delta Cglac10H$*  and the wild type, but the deletion of *Cglac10* affected the asexual reproduction and virulence of *C. gloeosporioides*. In contrast to darkish color of the wild-type strain, the colony of mutant  $\Delta Cglac10H$  turned pale, and melanin content of mycelium decreased by 67.33% after 10 d of culture. The mycelium growth rate of  $\Delta Cglac10H$  was nearly the same as the wild-type strain. The sporulation was 57.61% less than that of wild-type strain. Observation showed that the wild-type strain formed appressorium on the wet glass 4 h after inoculation, then melanized and matured at 6 h. However,  $\Delta Cglac10H$  occasionally formed appressorium 24 h after incubation, and the formation rate was only 44.85% of that of the wild type at 36 h. On the PDA medium containing 0.04% guaiacol, the wild-type strain could produce red-brown oxidative band around the colony 4 d after incubation, while  $\Delta Cglac10H$  had no oxidative band during the whole observation period. The intracellular laccase activity of  $\Delta Cglac10H$  was 57.61% lower than that of the wild-type strain 6 d after incubation in PDB. After inoculation on the unwounded ripe fruits of the mango cultivar Tainong,  $\Delta Cglac10H$  did not cause necrosis, while the wild-type strain could cause typical anthracnose necrotic spots. Six days after inoculation on wounded mango,  $\Delta Cglac10H$  caused lesion spot which was significantly smaller than that of the wild-type strain, and the lesion diameter of  $\Delta Cglac10H$  was 52.94% less than that of wild-type strain. 【Conclusion】The laccase gene *Cglac10* of *C. gloeosporioides* on mango was cloned and identified. This gene was highly expressed during the process of infection of *C. gloeosporioides* on mango leaves. Deletion of *Cglac10* gene affected the colony pigmentation, mycelium melanin content, sporulation, appressorium formation, laccase secretion and activity as well as virulence, indicating that *Cglac10* played an important role in the *C. gloeosporioides* asexual reproduction and infection. This discovery would deepen our understanding of the roles of laccase in fungal biology and virulence.

**Key words:** *Colletotrichum gloeosporioides*; Laccase gene; Gene knockout; Virulence

原产于东南亚热区的杧果 (*Mangifera indica* Linn.) 是漆树科 (Anacardiaceae) 杧果属常绿植物, 因其色丽、肉甘、营养价值高, 被誉为世界第二大热带水果。杧果产业是我国热区重要的特色农业产业, 近年来种植面积不断扩大, 已成为热区果农收入的支柱<sup>[1]</sup>。由胶孢炭疽菌 (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz. & Sacc.) 引起的杧果炭疽病, 是影响杧果产业最为严重的病害之一, 它分布广、危害重、传播快, 严重降低了杧果产业的经济效益。探讨该病原菌在生长和侵染过程中的致病基因, 了解其在胶孢炭疽菌与寄主互作过程中的机制, 对于发展新的防治靶点具有重要的理论和实践意义。

漆酶 (laccase) 是一种含铜的多酚氧化酶与抗坏血酸氧化酶, 属于蓝色多铜氧化酶家族, 在植物、真菌、细菌和昆虫等多种生物中广泛存在, 其生物学功能与来源密切相关<sup>[2]</sup>。在某些植物病原菌中, 漆酶是重要的毒力因子, Zhang 等<sup>[3]</sup>在新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*) 中敲除漆酶基因 *lac1* 的转录因子 *Ssa1* 后, 发现病菌与毒性相关的表型发生变化, 间接证明了漆酶基因 *lac1* 在毒性化合物降解过程中的作用。刘宁等<sup>[4]</sup>发现漆酶基因 *FGSG\_02328* 参与调控禾谷镰孢菌 (*Fusarium graminearum* Schw.) 致病相关毒素的合成。漆酶基因还与真菌的生长发育、分生孢子形成、致病力和黑色素合成有关。吕志远<sup>[5]</sup>利用 RNAi 技术证实桑椹缩小性菌核病的病原菌核地杖菌 [*Sclerotinia shiraiana* (P. Henn.) Ito et al.] 漆酶基因 *ShLAC1* 调控菌丝生长和黑色素合成, 且通过调控致病因子草酸的合成影响该菌的致病性。

就炭疽菌属而言, 不同漆酶基因的功能也存在差异。杧果炭疽病菌的漆酶基因 *lac1* 突变后, 菌落颜色变淡、菌丝生长速率和产孢量明显下降, 不能形成附着胞、胞内黑色素含量、致病力显著下降<sup>[6]</sup>; 西瓜炭疽病菌 (*C. orbiculare* Berk. & Ment.) 的 *LAC2* 突变体虽然能够形成附着胞但不能成熟黑化, 且不能侵入无伤口的寄主组织<sup>[7]</sup>; 而黄瓜炭疽病菌 [*C. lagenarium* (Pass.) Ell. et Halst.] 的 *LAC1* 突变体仅漆酶活性降低, 并非是黑色素合成和侵染致病的必要因素<sup>[8]</sup>。

还有一些漆酶基因在植物病原真菌中并未发挥与致病相关的作用。棉花黄萎病菌 (*Verticillium dahliae* Kleb.) 漆酶基因 *VdLac* 不参与 DHN 黑色素

的合成, 也不影响菌株的营养生长、产孢及致病力<sup>[9]</sup>。番茄枯萎病菌 [*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sass.) Snyder et Hansen] 的 3 个漆酶基因 (*lcc1*、*lcc3* 和 *lcc5*) 被敲除后, 致病力正常, *lcc3* 仅参与调控该菌营养生长、碳源代谢和氧化胁迫等<sup>[10]</sup>。

笔者实验室前期参考橡胶炭疽病菌全基因组信息, 利用 Blast 在线工具搜索比对共发现了 13 个漆酶基因, 其中 *Cglac10* 的 DNA 全长 1989 bp, 含 2 个内含子, 开放读码框 1878 bp, 编码 625 个氨基酸, 与多个漆酶相似性达 80%, 与 Wei 等<sup>[6]</sup>已报道杧果炭疽病菌 (*C. gloeosporioides*) 漆酶基因 *lac1* 序列差异很大, 且在杧果炭疽病菌侵染叶片过程中持续高效表达, 显示其与杧果炭疽病菌致病力相关性较高。为了从分子水平进一步确定, 笔者利用基因敲除和互补技术研究了该基因缺失后对生长发育和侵染致病的影响, 揭示了 *Cglac10* 在该菌无性繁殖和侵染过程中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 供试菌株及载体 分离自杧果的胶孢炭疽菌 (*C. gloeosporioides* Penz. & Sacc.) 强致病力野生型菌株 A2 和含 *Bar* 基因的质粒 pCAMBIA3300, 由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所热带果树病害研究组提供。抗性基因潮霉素基因 (*hygB*) 来源于载体 pGH14, 由质粒 pCT74<sup>[11]</sup> 改造而来。

1.1.2 供试试剂 Prime Script™ RT reagent Kit、In-Fusion® HD Cloning Kit、*E. coli* DH 5α 及 PCR 相关试剂购自 TaKaRa, Fungal gDNA Kit 购自 OMAGA。植物 RNA 提取试剂盒、凝胶回收试剂盒、TIAN-Script cDNA First-Strand Kit 购自 Tiangen。漆酶酶活试剂盒购自苏州科铭生物技术有限公司。引物 (表 1) 合成和测序由北京六合华大基因公司完成。其余常规试剂为分析纯。

### 1.2 利用 qPCR 分析 *Cglac10* 基因在杧果炭疽病菌侵染离体叶片过程中表达的变化

参照李鸿鹏等<sup>[12]</sup>的方法, 将培养 5 d 的杧果炭疽病菌野生型菌株菌饼接种到马铃薯葡萄糖培养液 (potato dextrose broth, PDB) 中, 在 28 °C、180 r·min<sup>-1</sup> 条件下培养 3 d, 然后取三角瓶壁与培养液交界处的粉红色黏状分生孢子堆, 用无菌水稀释成分生孢子悬浮液 (浓度为 4×10<sup>6</sup> 个·mL<sup>-1</sup>)。选取生长状况一致

表1 本研究引物信息  
Table 1 The primers used in this study

引物名称 Primers name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	退火温度 T <sub>m</sub> /°C	预期片段长度 Expected length/bp
LAC10-qPCR-F1	ctctccactgccatatt	54.0	194
LAC10-qPCR-R1	ggcttgttctcacccttc		
5LAC10-MF	<u>cggtaccggggatc</u> aaagacggagcgaatcggcagta	59.7	657
5LAC10-MR	gaccgggaaccagttggcgcaactggcgatgaaaa		
3LAC10-MF	<u>cttcaatatcagtt</u> tcaccatctgatctgcgaccaa	58.4	551
3LAC10-MR	<u>cgactctagaggatc</u> gcactggaacgctccaagga		
hygB-F1	aactggttcccgtcggc	57.0	1412
hygB-R1	aactgatattgaaggagcattttt		
LAC10 H-F	ctggctgctgcgtgtttgatt	63.0	2321(Mutant) 2977(Wild-type)
LAC10 H-R	gtgggtggttgggttgatgt		
H852	ttgccctcaggacattgt	56.0	610(Mutant) 0(Wild-type)
H850	aactaccgcgacgtctgtc		
QLAC10-F	ggatacaggctctcact	55.0	1054(Mutant) 0(Wild-type)
HLAC10-R	tatatgctccgattggt		
HLAC10-F	atgcctcgtccagta	57.0	1835(Mutant) 0(Wild-type)
QLAC10-R	ctcaacaccgcacccc		
LAC10 probe-F1	gcttgtgttgagtcttga	56.0	517
LAC10 probe-R1	gatgtgtgacctctgt		
5LAC10-CF2	<u>cggtaccggggatc</u> ttgtgttgagtcttga	52.0	2157
5LAC10-CR2	<u>gtcaccgagatttga</u> ttggatgatgtttgta		
3LAC10-CF2	<u>tcgttctggctcat</u> atgctcgaccaagactg	54.0	264
3LAC10-CR2	<u>cgactctagaggatc</u> ctcgttgcctccaacgac		
Bar-R-F2	tcaatctcggtgacg	58.0	554(Complementary strain) 0(Mutant; Wild-type)
Bar-R-R2	atgagcccagaacgacgc		
LAC10 BAR-F1	cccgactcatacactcacac	55.0	2374(Complementary strain) 1901(Wild-type) 0(Mutant)
LAC10 BAR-R1	ctttactcaagccatcctac		

注:边框部分序列为与 pUC19 载体同源的序列,单线部分为与 *hygB* 片段同源的序列,双线部分为与 *Bar* 片段同源的序列。

Note: The bases in the frame are homologous sequence to the pUC19 vector, and the underlined bases are a homologous sequence to *hygB* gene, the double-line bases are a homologous sequence to *Bar* gene.

的台农杧淡绿期叶片,用无菌水冲洗干净,1%( $\varphi$ ) NaClO 溶液浸泡 5 min,再用无菌水冲洗 3 遍,自然晾干。用针轻轻刺伤叶脉后滴加 25  $\mu$ L 孢子悬浮液,叶柄处涂抹医用凡士林以阻止叶片失水早枯,置于保鲜盒内保湿,28 °C 黑暗静置培养。从 0 h 开始,每隔 6 h 取 1 次样,到 72 h 为止。用打孔器( $\Phi=1$  cm)在接种处打取叶片,每个处理取 12 个样,置于液氮速冻后放入 -80 °C 冰箱备用。每组处理 3 次重复。

利用 RNA 提取试剂盒提取接种点叶片的总 RNA,并用 TIANScript cDNA First-Strand Kit 反转录成 cDNA,用 RNase-free Water 将 cDNA 质量浓度稀释至 200 ng  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>, -20 °C 冰箱保存。再用 qPCR 仪(QIAGEN)及 Prime Script™ RT reagent Kit,用引物 LAC10-qPCR-F1/R1 分析侵染 0、6、12、24、36、48、

72 h 后 *Cglac10* 的相对表达量差异。以 *18s rRNA* 为内参基因。

### 1.3 *Cglac10* 基因敲除与互补

1.3.1 *Cglac10* 基因敲除及  $\Delta$ *Cglac10H* 突变体鉴定 按图 1 构建 *Cglac10* 敲除载体。从野生型菌株基因组中扩增 *Cglac10* 的 5LAC10-M 和 3LAC10-M 片段,从 pGH14 上扩增 *hygB* 基因,利用 In-Fusion® HD Cloning Kit 将其连入 pUC19-T,再转化进 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,挑取阳性克隆测序,测序正确的即为敲除载体 pCglac10H。参照韦运谢<sup>[13]</sup>的方法转化,对获得的转化子用检测 *hygB* 基因的引物 H852/850 和特异性引物 LAC10 H-F/R、QLAC10-F/R、HLAC10-F/R 进行 PCR 验证。提取野生型菌株与突变体菌株的总 RNA 并反转录为 cDNA 第一链,用 qPCR 分析

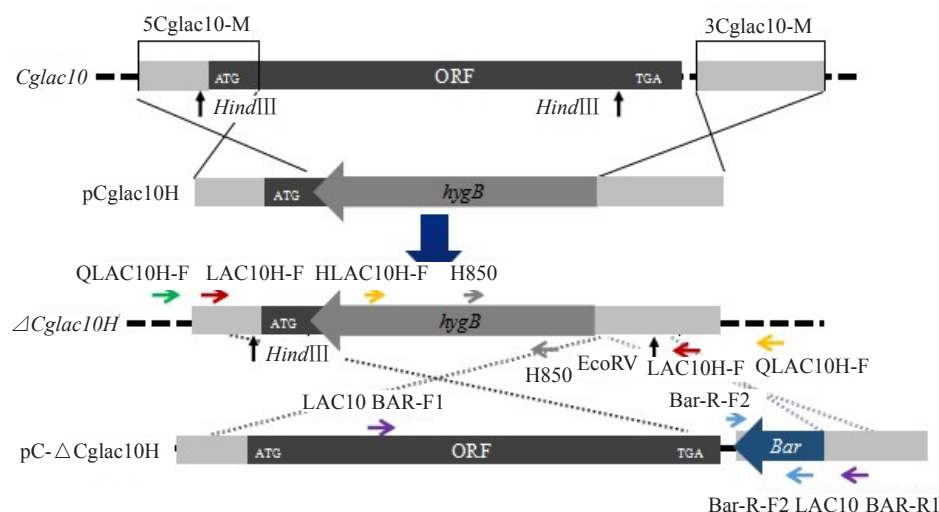


图 1 柱果炭疽病菌 *Cglac10* 基因敲除和互补载体构建

Fig. 1 Construction of disruption and complementary vector of *Cglac10* gene of *C. gloeosporioides*

*Cglac10* 在野生型菌株与突变体菌株中的表达量差异。用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Eco* R V 酶切野生型和突变体菌株总基因组,用引物 LAC10 probe-F1/R1 制备 Dig 探针,进行 Southern 杂交,分析 *Cglac10* 在 *C. gloeosporioides* 中的拷贝量和敲除情况。选择符合各项验证且测序完全正确的突变体  $\Delta Cglac10H$  分析表型。

1.3.2 *Cglac10* 基因互补及回复菌株鉴定 同理,以野生型菌株的 gDNA 和含 *Bar* 基因的质粒 pCAM-BIA3300 为模板,分别扩增 *Cglac10* 基因 5' 端片段 5LAC10-C (包含 *Cglac10* 基因编码区上游序列和 *Cglac10* 基因编码区全长序列)、3' 端片段 3LAC10-C (*Cglac10* 基因终止密码子后的一段序列)及完整的 *Bar* 基因,纯化扩增产物后,同样采用 In-Fusion<sup>®</sup> HD Cloning Kit 连接、热激转化等,获得序列正确的载体并命名为 pC- $\Delta Cglac10H$ ,转化敲除突变体原生质体,经过 Basta 平板抗性筛选以及 *Bar* 基因检测引物和特异性检测引物 LAC10BAR-F1/R1 进行 PCR 验证,用 qPCR 分析 *Cglac10* 在回复突变体菌株中的相对表达量,确定用于测试表型的回复菌株。

#### 1.4 突变体 $\Delta Cglac10H$ 和回复菌株 *C-ΔCglac10H* 表型分析

1.4.1 菌落形态及菌落生长速率的测定 将培养 6 d 的野生型、 $\Delta Cglac10H$  和 *C-ΔCglac10H* 菌株菌饼 ( $\Phi=5$  mm) 接种至马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (potato dextrose agar, PDA) 平板中央,28 °C 黑暗培养,2 d 后逐日用十字交叉法测量菌落直径,并观察菌落形态。每处理 3 次重复,下同。

1.4.2 产孢量测定和附着胞形成观察 将等量相同菌龄的野生型、 $\Delta Cglac10H$  和 *C-ΔCglac10H* 菌株分别接种到等体积 PDB 中,28 °C、180 r·min<sup>-1</sup> 黑暗培养 3 d,用两层无菌纱布过滤后,分别吸取等量的菌液在 20 倍显微镜 (Leica DM2500) 下,用血球计数板计数分生孢子,3 次重复。按照 1.2 的方法收集孢子悬浮液,吸取 50  $\mu$ L 涂抹于洁净的载玻片上,28 °C 黑暗保湿培养,从 1 h 开始观察附着胞的形成。

1.4.3 胞内黑色素含量测定 参照韦运谢<sup>[13]</sup>的方法,提取纯化野生型、 $\Delta Cglac10H$  和 *C-ΔCglac10H* 菌株菌丝胞内黑色素,再用 5 mL NaOH (1 mol·L<sup>-1</sup>) 溶解所提取的黑色素,并于 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min 后取上清液,用分光光度法测量 OD<sub>400</sub> 值,再参照曹志艳等<sup>[14]</sup>的方法计算黑色素质量浓度 (g·L<sup>-1</sup>) = OD<sub>400</sub> × 0.105 × N (N 表示稀释倍数)。

1.4.4 漆酶显色反应和漆酶酶活测定 通过克隆技术获得 *Cglac10* 的 cDNA 序列,并通过生物信息学分析,发现其编码蛋白存在信号肽,为分泌蛋白。参考王宜磊等<sup>[15]</sup>的方法,接种野生型、 $\Delta Cglac10H$  和 *C-ΔCglac10H* 菌株菌饼至含 0.04% (w) 愈创木酚的 PDA 平板中央,28 °C 黑暗培养,逐日拍照,观察显色反应。将野生型、 $\Delta Cglac10H$  和 *C-ΔCglac10H* 菌株分别接种到含 50 mL PDB 的三角瓶中,28 °C、静置黑暗培养,6 d 后用两层无菌纱布过滤,称取等量的干菌丝,迅速用液氮冰冻,并研磨成细粉,加入适量体积的提取液 (1:5~10),冰浴匀浆,12 000 r·min<sup>-1</sup> 4 °C 离心 30 min,取上清液,置于冰上待测。按照漆酶酶活试剂盒说明书操作测定胞内漆酶活性。

1.4.5 致病力测定 在台农1号芒果成熟的果实表面,一边刺伤、另一边不刺伤,从上到下接种无菌琼脂饼、野生型、 $\Delta Cglac10H$  和  $C-\Delta Cglac10H$  菌株菌饼,滴加 20  $\mu$ L 无菌水保湿。共接种大小基本一致的 10 个果实,28  $^{\circ}$ C 黑暗保湿培养,24 h 后挑去琼脂饼或菌饼,继续保湿培养,逐日测量病斑直径。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Cglac10* 基因在芒果炭疽病菌侵染过程中表达的变化

qPCR 分析(图 2)显示, *Cglac10* 基因在侵染过程中的表达量是侵染前的 8.02~13.66 倍,在 6~12 h 时段,病菌分生孢子萌发开始形成附着胞,表达量逐渐升高,12 h 达到第一个小高峰,之后在 48 h 又达到高峰,表达量高至侵染前的 13.66 倍,由此推测 *Cglac10* 与芒果炭疽病菌侵染叶片过程存在一定内在联系。为进一步确定漆酶基因 *Cglac10* 在该菌中的作用,将该基因进行敲除及功能解析,深入阐明其与病原真菌致病性之间的关系。

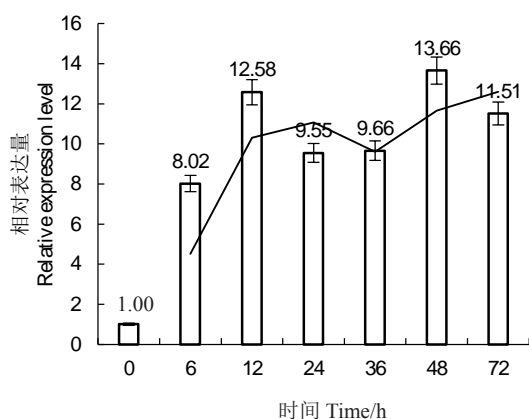
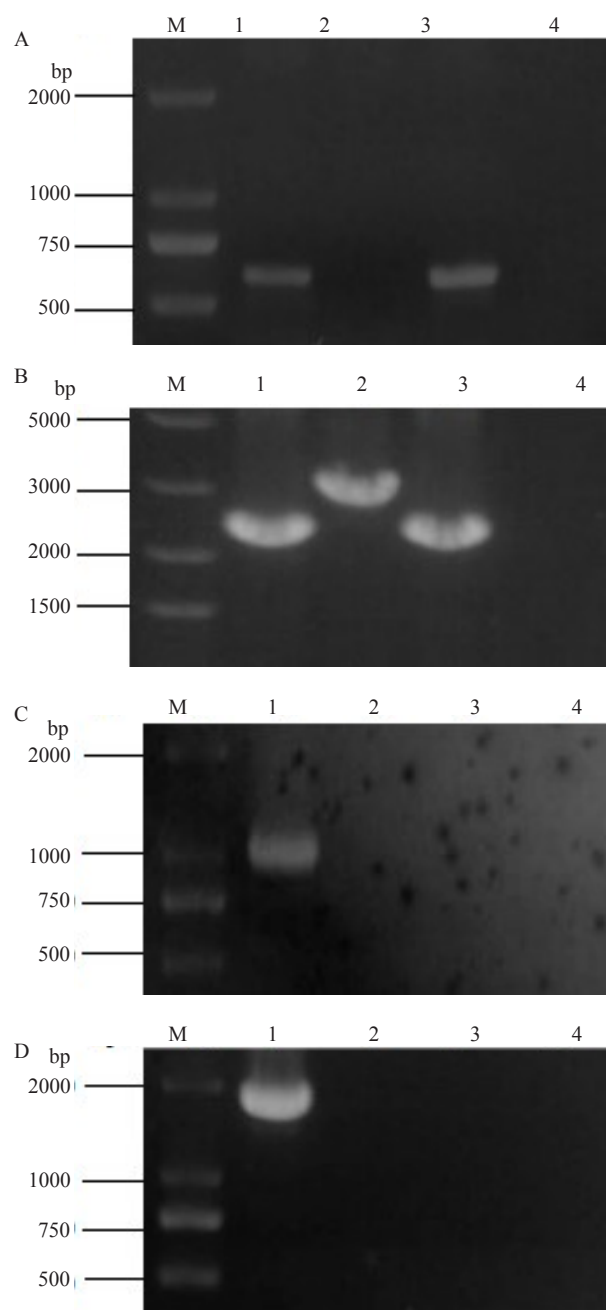


图 2 *Cglac10* 在芒果炭疽病菌侵染叶片过程中的表达  
Fig. 2 The expression of *Cglac10* gene in the process of *C. gloeosporioides* infecting leaves

### 2.2 *Cglac10* 基因敲除突变体与回复菌株的获得

以抗性平板上筛选到的转化子基因组 DNA 为模板,用 *hyg B* 特异引物 H852/850 检测,扩增出了 610 bp 预期条带,而在野生型菌株中未扩增出条带(图 3-A),说明这个阳性转化子中成功插入了 *hyg B* 基因。用特异引物 LAC10H-F/R 扩增测序,发现转化子和敲除载体中有 2321 bp 的单一亮带,野生型菌株中有 2977 bp 的条带,说明经过  $5LAC10-M::hygB::3LAC10-M$  片段左右臂同源重组后, *Cglac10H* 中间



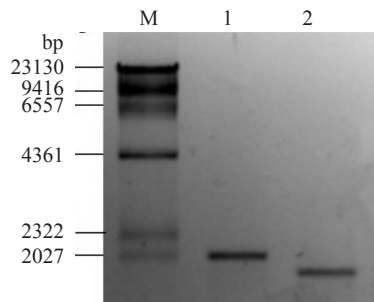
A. 检测潮霉素基因(引物 H852/850); B. 检测 *hygB* 重组取代 *Cglac10*(引物 LAC10H-F/R); C、D. 交叉检测确定敲除位置(引物 QLAC10-F/HLAC10-R 和 HLAC10-F/QLAC10-R)。M. DNA marker; 1. 转化子; 2. 野生型菌株; 3. p*Cglac10H*; 4. ddH<sub>2</sub>O。

A. Detection of *hygB* gene using primers H852/850; B. Detection of *hygB* recombination to replace *Cglac10* using primers LAC10H-F/R; C, D. Determine the knockout position by cross detection using primers QLAC10-F/HLAC10-R and HLAC10-F/QLAC10-R. M. DNA marker; 1. Transformant; 2. Wild-type strain; 3. p*Cglac10H*; 4. ddH<sub>2</sub>O.

图 3 突变体  $\Delta Cglac10H$  的 PCR 验证  
Fig. 3 PCR identification of the  $\Delta Cglac10H$  mutant

的 2068 bp 序列被 1412 bp 的 *hygB* 替代,即转化子较野生型菌株的少了 656 bp 序列(图 3-B)。用特异引

物QLAC10-F、HLAC10-R和HLAC10-F、QLAC10-R扩增检测,发现转化子有1054 bp和1835 bp的单一一条带,敲除载体与野生型菌株均未扩增出条带(图3-C、D),这2对内、外部引物交叉检测显示敲除位置正确。Southern杂交显示,*Cglac10*基因在*C. gloeosporioides*中是单拷贝且已被敲除(图4)。qPCR分析(图5)显示,转化子中*Cglac10*基因的表达量为0,确定所得 $\Delta Cglac10H$ 是*Cglac10*基因缺失突变菌株。



M. DL23130 DNA marker; 1. 野生型菌株; 2.  $\Delta Cglac10H$ 。

M. DL23130 DNA marker; 1. Wild-type strain; 2.  $\Delta Cglac10H$ 。

图4 突变体 $\Delta Cglac10H$ 的Southern杂交分析

Fig. 4 Southern hybridization analysis of mutant

#### $\Delta Cglac10H$

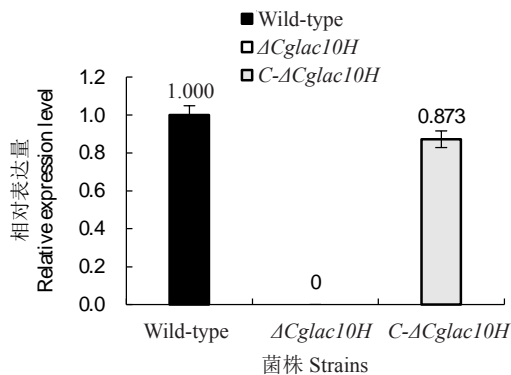
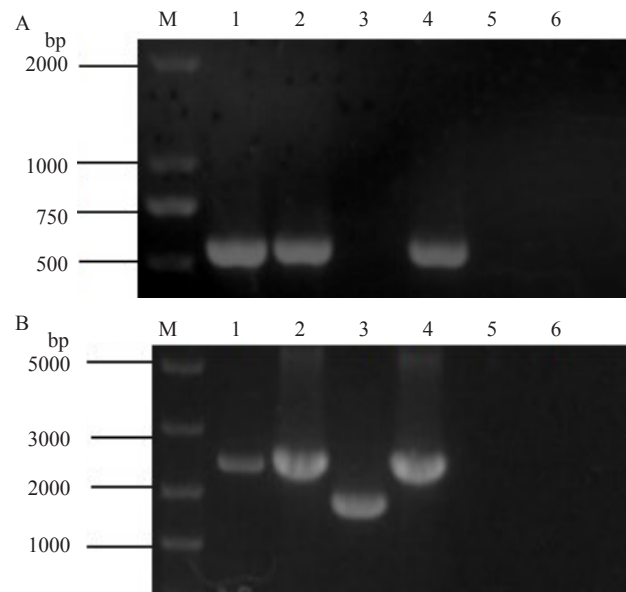


图5 *Cglac10*基因在野生型、突变体、回复菌株中的表达水平

Fig. 5 Expression levels of *Cglac10* gene in wild-type strain, mutant  $\Delta Cglac10H$  and complementary strain *C-ΔCglac10H*

在互补试验中,将载体pC- $\Delta Cglac10H$ 转化到敲除突变体 $\Delta Cglac10H$ 中,共获得13株转化子,选取其中2株提取基因组DNA,用*Bar*基因检测引物和特异性引物LAC10 BAR H-F1/R1进行PCR验证,结果显示,均能够扩增出*Bar*基因(图6-A)和*Cglac10*基因片段(图6-B)。qPCR分析(图5)显示,*Cglac10*基因在回复菌株中表达与野生型菌株中的接近,确定*C-ΔCglac10H*为突变体 $\Delta Cglac10H$ 的互补菌株。



A. 检测*Bar*基因(引物 Bar-R-F2/R2); B. 检测确定互补位置(引物 LAC10 BAR-F1/R1)。M. DNA marker; 1~2. 互补转化子; 3. 野生型菌株; 4. pC- $\Delta Cglac10H$ ; 5.  $\Delta Cglac10H$ ; 6. ddH<sub>2</sub>O。

A. Detection of *Bar* gene using primers Bar-R-F2/R2; B. Confirm the correct of complementary position using primers LAC10 BAR-F1/R1. M. DNA marker; 1-2. Complementary transformants; 3. Wild-type strain; 4. pC- $\Delta Cglac10H$ ; 5.  $\Delta Cglac10H$ ; 6. ddH<sub>2</sub>O.

图6 回复菌株*C-ΔCglac10H*的PCR验证

Fig. 6 PCR identification of the *Cglac10* complementary transformants

## 2.3 突变体 $\Delta Cglac10H$ 和回复菌株*C-ΔCglac10H*表型分析

2.3.1 菌落形态及生长速率测定 如图7所示,突变体 $\Delta Cglac10H$ 、回复菌株*C-ΔCglac10H*与野生型菌株生长速率无显著差异。培养4 d时,回复菌株*C-ΔCglac10H*与野生型菌株菌落形态较相近,正面灰白色,背面棕褐色,培养13 d时,颜色进一步加深;但突变体 $\Delta Cglac10H$ 菌落始终为白色,气生菌丝较少。可见*Cglac10*调控该菌黑色素沉积,但不影响菌丝营养生长。

2.3.2 产孢量测定和附着胞观察 观察产孢量发现,摇培至第3天,野生型菌株和*C-ΔCglac10H*可观察到大量分生孢子,野生型菌株产孢量约 $5.70 \times 10^5$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,*C-ΔCglac10H*产孢量约 $5.65 \times 10^5$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,与野生型菌株差异不大,而 $\Delta Cglac10H$ 产孢量约 $2.41 \times 10^5$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,较野生型菌株下降了57.71%,可见*Cglac10*缺失显著影响该菌产孢。

镜检观察附着胞形成(图8),发现野生型菌株和回复菌株*C-ΔCglac10H*水培4 h后开始就开始形

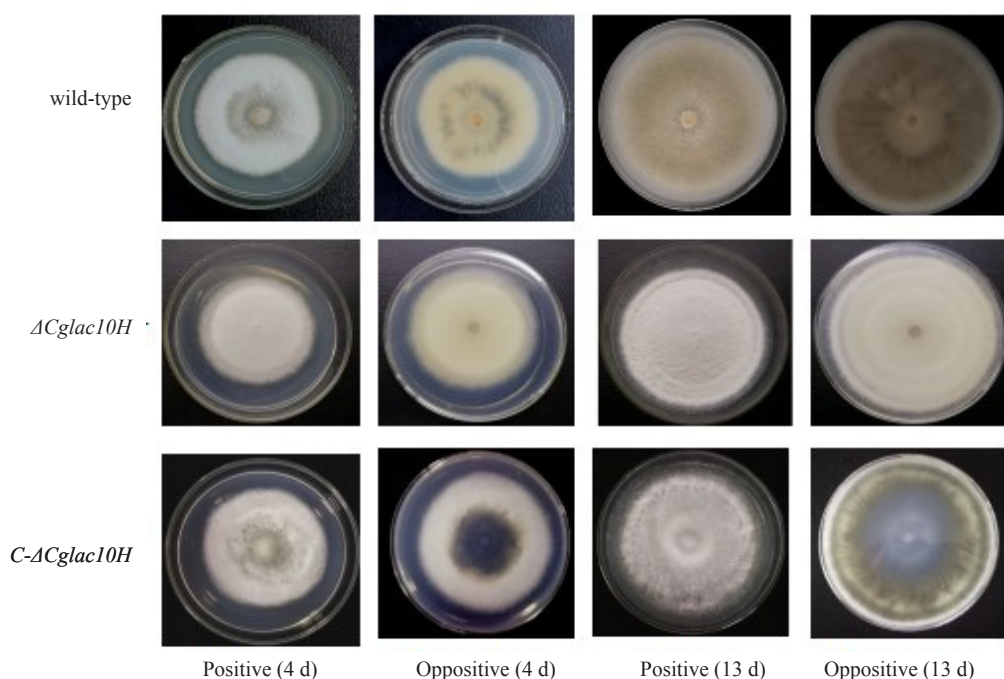


图7 野生型菌株、突变体  $\Delta Cglac10H$  和回复菌株  $C-\Delta Cglac10H$  菌落形态比较

Fig. 7 Comparison of colony morphology in wild-type strain, mutant  $\Delta Cglac10H$  and complementary strain  $C-\Delta Cglac10H$

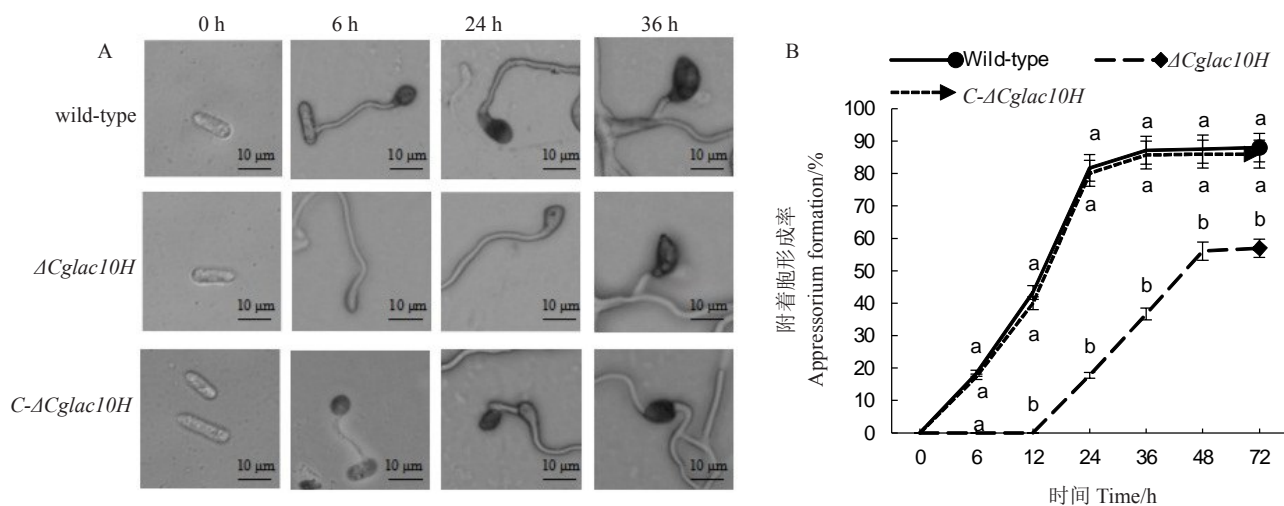


图8  $\Delta Cglac10H$  附着胞形成观察

Fig. 8 Observation of appressorium formation of  $\Delta Cglac10H$

成附着胞,6 h 后已有黑化成熟的附着胞出现。 $\Delta Cglac10H$  的分生孢子形态及大小与野生型菌株差异不大,且可以正常萌发产生芽管;萌发过程中, $\Delta Cglac10H$  分生孢子从双侧萌发产生芽管;6 h 后野生型菌株和回复菌株  $C-\Delta Cglac10H$  黑化成熟的附着胞形成率达到 18.40%,敲除突变体  $\Delta Cglac10H$  芽管顶端刚刚才开始膨大,还未形成附着胞;24 h 后  $\Delta Cglac10H$  才有少量的附着胞出现;36 h 后  $\Delta Cglac10H$  附着胞逐渐黑化成熟,此时,野生型菌株、回复菌株附着胞形成率约为 81.76% 和 80.12%,

突变体为 36.67%。由此推测,*Cglac10* 基因的敲除会延迟芒果炭疽病菌附着胞形成,且会显著降低形成率。

2.3.3 胞内黑色素含量测定 培养 10 d 时,回复菌株  $C-\Delta Cglac10H$  黑色素质量分数平均值为  $14.79 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,  $\Delta Cglac10H$  为  $4.58 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ,较野生型菌株 ( $14.02 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) 下降了约 67.33%,在  $p < 0.05$  水平达到了显著差异,表明 *Cglac10* 基因参与调控黑色素合成。

2.3.4 漆酶显色反应和漆酶胞内酶活测定 在含 0.04% 愈创木酚 PDA 平板上培养(图 9),第 3 天野生



型菌株菌落边缘出现红圈,随后红圈直径扩大且颜色加深,第6天红圈很明显,之后红圈逐天减弱;*C-ΔCglac10H*显色圈变化过程与野生型菌株的一样,但红圈略淡,说明互补菌株胞外漆酶的含量略低于野生型菌株;而 $\Delta Cglac10H$ 始终未见显色圈,说明突变体较野生型菌株胞外漆酶分泌能力下降。胞内漆酶酶活测定表明,6 d时,野生型菌株和*C-ΔCglac10H*的酶活分别为78.64和72.22 U·mL<sup>-1</sup>,而 $\Delta Cglac10H$ 的是33.33 U·mL<sup>-1</sup>,较野生型菌株的下降了57.61%。可见*Cglac10*缺失会影响漆酶的分泌和活性。

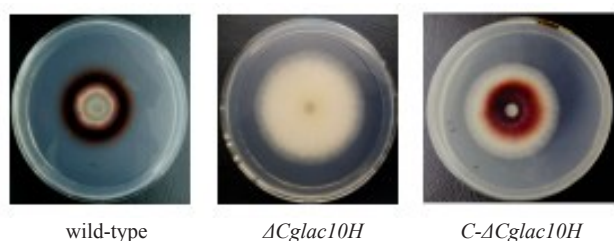


图9 平板显色反应检测野生型菌株、 $\Delta Cglac10H$ 和*C-ΔCglac10H*胞外漆酶活力(6 d)

Fig. 9 Extracellular laccase activity test in wild-type,  $\Delta Cglac10H$  and *C-ΔCglac10H* by plate color reaction (6 d)

2.3.5 致病力测定 如图10所示,接种菌饼至熟果皮培养3 d后,刺伤接种的野生型菌株和回复菌株的果皮组织损伤明显严重,而接种缺失突变体的病斑明显减小,病斑直径平均分别为8.50 mm(野生型菌株)、8.10 mm(*C-ΔCglac10H*)和4.00 mm

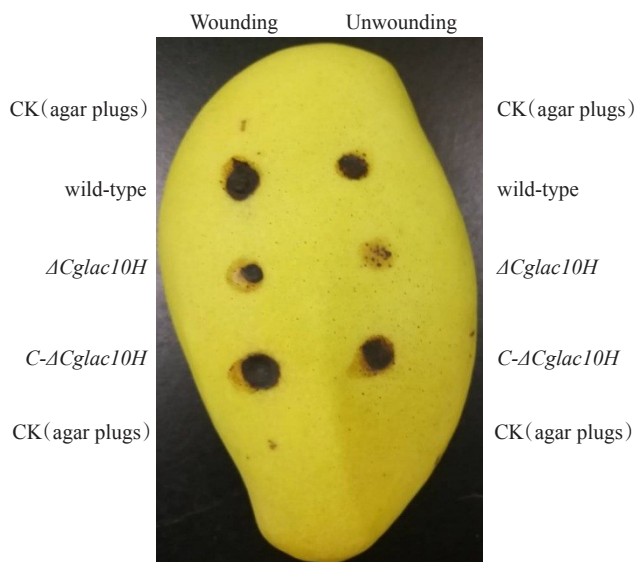


图10 野生型菌株、 $\Delta Cglac10H$ 和*C-ΔCglac10H*致病力测定(接种后3 d)

Fig. 10 Virulence test of wild-type strains,  $\Delta Cglac10H$  and *C-ΔCglac10H* (3 d after inoculation)

( $\Delta Cglac10H$ ),突变体的致病力较野生型菌株下降了52.94%,在 $p < 0.05$ 水平达到显著差异;不刺伤接种的野生型菌株和回复菌株的病斑直径为6.17 mm和6.10 mm,但 $\Delta Cglac10H$ 无明显褐化症状。可见*Cglac10*基因参与了杧果炭疽病菌对杧果的侵染。

### 3 讨论

本实验中,回复菌株*C-ΔCglac10H*在菌落形态、生长速率、菌丝黑色素含量、产孢量方面与野生型菌株几乎无差异,但胞外漆酶的含量略低于野生型菌株,显色圈没有野生型菌株的深,胞内漆酶酶活性为72.22 U·mL<sup>-1</sup>,也较野生型菌株的78.64 U·mL<sup>-1</sup>低;qPCR结果显示,回复菌株的相对表达量为0.87,也没有完全恢复到野生型菌株1的水平,这或许是回复菌株中抗性标记*Bar*基因的表达干扰了相邻基因*Cglac10*的表达。在橡胶树棒孢霉落叶病病菌[*Corynespora cassiicola* (Berk. Curt.) Wei]蛋白激酶基因*CCK1*突变体的回复菌株中也有类似结果<sup>[16]</sup>。

*C. gloeosporides* 主要靠芽管顶端产生黑色素化的附着胞直接穿透表皮侵入寄主,再分泌大量细胞壁降解酶破坏细胞获取营养,从而引起炭疽病发生<sup>[17]</sup>。附着胞的黑化成熟与DHN黑色素的合成直接相关,DHN的合成途径包括聚酮体合成酶、还原酶、脱水酶以及漆酶<sup>[18]</sup>,换句话说漆酶在DHN黑色素合成的最后一步起着重要作用。植物病原真菌的漆酶常以家族形式存在,家族各成员的功能存在差异。玉米大斑病病原菌大斑刚毛座腔菌[*Setosphaeria turcica* (Luttr.) Leonard & Suggs]的漆酶基因*StLAC1*、*StLAC2*缺失均能降低该菌漆酶活性、黑色素含量,改变菌丝的形态,疏水性也发生不同程度的变化,不能正常产生附着胞及分生孢子,使病菌丧失了传播及侵染能力;*StLAC4*缺失后,虽然该菌在生长速度、疏水性、产孢量等方面与*StLAC1*、*StLAC2*相似,却在漆酶酶活性方面截然相反,能升高该菌胞内外的漆酶酶活性<sup>[19-21]</sup>。在杧果炭疽病菌中,漆酶基因*Cglac1*缺失后胞外漆酶分泌能力显著下降<sup>[13]</sup>,与该文相似,*Cglac10*后缺失后病原菌胞内和胞外漆酶都显著下降,推测漆酶家族成员之间存在协同作用,某个基因的缺失也会影响其他同工酶的表达或分泌能力,尚需进一步证实。

笔者实验室已从杧果炭疽病菌中克隆鉴定了2个漆酶基因*lac1*<sup>[13]</sup>和*Cglac10*,2个基因在杧果炭疽

病菌侵染寄主的过程中均高效表达,缺失 *lac1* 和 *Cglac10* 后,虽然在菌丝生长速率、菌落颜色、菌丝黑色素含量、产孢量、附着胞形成和致病性等方面表现出相似的调控,但与野生型菌株相比,二者调控的程度有差异,缺失 *lac1* 后,菌落生长速率一开始就表现出显著降低,菌丝黑色素含量下降了约 58%,5 d 时偶见产孢,始终未见附着胞形成,刺伤接种芒果时致病力降低了 80%;缺失 *Cglac10* 后,菌落生长速率与野生型菌株无明显差异,但菌丝黑色素含量野生型菌株相比,下降了约 67.33%,3 d 时分生孢子产量约为  $2.41 \times 10^5$  个  $\cdot \text{mL}^{-1}$ ,在水膜中培养至 6 h 时,菌丝顶端膨大,24 h 时,偶见黑化附着胞,刺伤接种芒果时致病力降低了 52.94%。可见同为芒果炭疽病菌的漆酶家族成员,虽然都参与了调控侵染寄主的过程,但调控时空和程度存在差异。*lac1* 还调控芒果炭疽病菌对部分碳氮源的利用、渗透胁迫、抗氧化能力以及细胞壁降解酶的分泌<sup>[13]</sup>,*Cglac10* 在这些方面是否与 *lac1* 有差异,尚待后续证实。

玉米大斑病菌的漆酶基因 *StLAC2* 的表达与黑色素合成酶 (*St3HNR*、*St4HNR*、*StSCD*) 基因的表达水平及趋势一致,表现出同时增加或同时减少的态势,说明漆酶基因与真菌黑色素的合成有关<sup>[20-22]</sup>。同样芒果炭疽病菌的 *lac1* 的表达与黑色素合成相关酶如羟基萘还原酶 *THN* 和小柱孢酮脱水酶 *SCD* 基因的表达变化趋势相似,聚铜体合成酶 *PKS* 延后 3 h。*Cglac10* 是否也参与调控其他黑色素合成酶基因的表达,与 *lac1* 是否存在协同或互补关系,待证实。此外,玉米大斑病菌的漆酶基因 *StLAC1*、*StLAC2* 在附着胞和分生孢子形成等方面具有重要作用<sup>[21]</sup>。*StLAC1* 基因缺失后不产生分生孢子,且附着胞穿透能力基本丧失<sup>[19]</sup>。*StLAC2* 突变后菌丝在玻璃纸上不能形成附着胞,长出的新菌丝不能穿透玻璃纸膜,能侵染刺伤的玉米叶片,但不能侵入完整的玉米叶片<sup>[20]</sup>。而与 *StLAC1* 和 *StLAC2* 基因不同,*StLAC6* 基因的缺失对玉米斑大病菌生长、形态、产孢及侵染能力没有影响,但其对玉米感病品种致病性增加<sup>[23]</sup>。可见,即使在同一种病原菌中,漆酶家族成员之间功能也各有不同。在芒果炭疽病菌中,*lac1* 敲除后始终未见附着胞形成,突变体  $\Delta Cglac10H$  仍能形成附着胞,但形成时间延迟,说明同为胶孢炭疽菌漆酶家族成员的 *lac1*、*Cglac10* 的功能间具有明显区别。

分生孢子产量、黑色素化附着胞的形成是影响

炭疽病菌传播和能否侵入寄主的关键因素<sup>[17]</sup>。本文结果显示 *Cglac10* 虽然不影响菌丝生长,但因其明显调控黑色素的产生、附着胞的形成以及产孢量,进而影响其致病性,可见 *Cglac10* 与芒果炭疽病菌的致病性密切相关,有作为药剂新靶标的潜力。

#### 参考文献 References:

- [1] 高爱平,罗睿雄,黄建峰,赵志常,陈业渊. 南亚国家芒果产业发展现状[J]. 中国热带农业,2019(1): 19-21.  
GAO Aiping, LUO Ruixiong, HUANG Jianfeng, ZHAO Zhichang, CHEN Yeyuan. The development status of mango industry in South Asian countries[J]. China Tropical Agriculture, 2019(1): 19-21.
- [2] 宁娜,谭慧军,孙新新,倪金凤. 真核生物来源漆酶的异源表达研究进展[J]. 生物工程学报,2017,33(4):565-577.  
NING Na, TAN Huijun, SUN Xinxin, NI Jinfeng. Advance of heterologous expression study of eukaryote-origin laccases[J]. Chinese Journal of Bioengineering, 2017, 33(4): 565-577.
- [3] ZHANG S R, HACHAM M, PANEPINTO J, HU G W, SHIN S, ZHU X D, WILLIAMSON P R. The Hsp70 member, *Ssal*, acts as a DNA-binding transcriptional coactivator of laccase in *Cryptococcus neoformans*[J]. Molecular Microbiology, 2010, 62(4): 1090-1101.
- [4] 刘宁,渠清,李丽娜,庞茜,柳建虎,张垚,曹志艳,董金皋. 禾谷镰孢漆酶样多铜氧化酶的鉴定及其表达模式[J]. 植物病理学报,2019,49(6):763-772.  
LIU Ning, QU Qing, LI Lina, PANG Qian, LIU Jianhu, ZHANG Yao, CAO Zhiyan, DONG Jin' gao. Identification of laccase-like multicopper oxidases in *Fusarium graminearum* and expression profiling during maize stalk infection[J]. Phytopathology, 2019, 49(6): 763-772.
- [5] 吕志远. 核地杖菌漆酶基因 *ShLAC1* 和桑树几丁质识别受体的功能研究[D]. 重庆:西南大学,2018.  
LÜ Zhiyuan. Functional analysis of lace case gene *ShLAC1* in *Sclerotinia shiraiana* and chitin recognition receptor in mulberry[D]. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [6] WEI Y X, PU J J, ZHANG H, LIU Y N, ZHOU F X, ZHANG K L, LIU X M. The laccase gene (*LAC1*) is essential for *Colletotrichum gloeosporioides* development and virulence on mango leaves and fruits[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 2017, 99: 55-64.
- [7] LIN S Y, OKUDA S, IKEDA K, OKUNO T, TAKANO Y. *LAC2* encoding a secreted laccase is involved in appressorial melanization and conidial pigmentation in *Colletotrichum orbiculare*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012, 25(12) : 1552-1561.
- [8] TSUJI G, FUJIKAWA J, ISHIDA H, HORINO O, KUBO Y. Laccase gene *LAC1* of *Colletotrichum lagenarium* is not essential for melanin biosynthesis and pathogenicity[J]. Journal of Gener-

- al Plant Pathology, 2001, 67(3):182-190.
- [9] 曹亚松, 王春生, 李海源, 徐小鸿, 商文静, 杨家荣, 胡小平. 大丽轮枝菌 *VdLac* 基因克隆与功能分析[J]. 西北农业学报, 2018, 27(2):275-282.  
CAO Yasong, WANG Chunsheng, LI Haiyuan, XU Xiaohong, SHANG Wenjing, YANG Jiarong, HU Xiaoping. Cloning and functional analysis of the *VdLac* in *Verticillium dahliae*[J]. Journal of Northwest Agricultural Sciences, 2018, 27(2):275-282.
- [10] CAÑERO D C, RONCERO M I. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*[J]. Phytopathology, 2008, 98(5): 509-518.
- [11] LORANG J M, TUORI R P, MARTINEZ J P, SAWYER T L, REDMAN R S, ROLLINS J A, WOLPERT T J, JOHNSON K B, RODRIGUEZ R J, DICKMAN M B, CIUFFETTI L M. Green fluorescent protein is lighting up fungal biology[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(5):1987-1994.
- [12] 李鸿鹏, 钟昌开, 吴秋玉, 张艳杰, 张贺, 蒲金基, 刘晓妹. 杧果炭疽病菌 3 个果胶裂解酶基因序列特征及受漆酶基因 *LacI* 影响的分析[J]. 热带作物学报, 2018, 39(12):2458-2464.  
LI Hongpeng, ZHONG Changkai, WU Qiuyu, ZHANG Yanjie, ZHANG He, PU Jinji, LIU Xiaomei. Analysis of the characteristics of three pectate lyase gene sequences and the effect of laccase gene *LacI* on pectin lyase genes from *Colletotrichum gloeosporioides* on mango[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2018, 39(12): 2458- 2464.
- [13] 韦运谢. 杧果炭疽病菌漆酶基因 *lacI* 的克隆与致病相关功能鉴定[D]. 海口:海南大学, 2014.  
WEI Yunxie. Cloning and functional identification of laccase gene (*lacI*) in pathogenicity from *Colletotrichum gloeosporioides*- the pathogen of mango anthracnose disease[D]. Haikou: Hainan University, 2014.
- [14] 曹志艳, 董金皋, 杨胜勇, 姚晓霞. 玉米大斑病菌黑色素的一些理化性质和光谱吸收特征[J]. 植物病理学报, 2007, 37(4): 410-417.  
CAO Zhiyan, DONG Jin 'gao, YANG Shengyong, YAO Xiaoxia. Characteristics and spectral analysis of melanin in *Setosphaeria turcica*[J]. Acta Phytopathology, 2007, 37(4):410-417.
- [15] 王宜磊, 朱陶, 邓振旭. 愈创木酚法快速筛选漆酶产生菌[J]. 生物技术, 2007, 17(2):40-42.  
WANG Yilei, ZHU Tao, DENG Zhenxu. Using o-methoxyphenol to fast screen laccase produced fungus[J]. Biotechnology, 2007, 17(2):40-42.
- [16] 曹申文. 巴西橡胶树棒孢霉落叶病菌蛋白激酶基因(*CCK1*) 突变体功能互补分析[D]. 海口:海南大学, 2015.  
CAO Shenwen. Functional complementation of a MAPK homologous gene (*CCK1*)-deficient mutants in *Corynespora brasiliensis*[D]. Haikou: Hainan University, 2014.
- [17] 韦运谢, 刘晓妹, 张贺, 张欣, 漆艳香, 谢艺贤, 陆英, 曹申文, 蒲金基. 杧果炭疽病菌漆酶基因 *lacI* 的克隆与序列特征分析[J]. 果树学报, 2013, 30(2):202-206.  
WEI Yunxie, LIU Xiaomei, ZHANG He, ZHANG Xin, QI Yanxiang, XIE Yixian, LU Ying, CAO Shenwen, PU Jinji. Cloning and sequence analysis of laccase gene *lacI* from *Colletotrichum gloeosporioides* on mango[J]. Journal of Fruit Science, 2013, 30(2): 202-206.
- [18] 祝友朋, 陈摇, 韩长志. 胶孢炭疽菌黑色素合成途径中漆酶蛋白生物信息学分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(6):48-51.  
ZHU Youpeng, CHEN Yao, HAN Changzhi. Bioinformatics analysis of laccase protein in melanin synthesis pathway of *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2019, 47(6):48-51.
- [19] 詹旭. 玉米大斑病菌漆酶基因 *StLAC* 在黑色素合成中的功能分析[D]. 保定:河北农业大学, 2011.  
ZHAN Xu. Function analysis of laccase genes (*StLAC*) in melanin biosynthesis pathway of *Setosphaeria turcica*[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2011.
- [20] 孟川. 玉米大斑病菌 *StLAC2* 基因与黑色素合成及致病性关系研究[D]. 保定:河北农业大学, 2013.  
MENG Chuan. The function analysis of *StLAC2* gene on melanin biosynthesis and pathogenicity in *Setosphaeria turcica*[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2013.
- [21] MA S, CAO K, LIU N, MENG C, CAO Z, DAI D, JIA H, ZANG J, LI Z, HAO Z, GU S, DONG J. The *StLAC2* gene is required for cell wall integrity, DHN- melanin synthesis and the pathogenicity of *Setosphaeria turcica*[J]. Fungal Biology, 2017, 121(6/7): 589-601.
- [22] 贾慧, 孟庆江, 李志勇, 巩校东, 藏金萍, 郝志敏, 曹志艳, 董金皋. 玉米大斑病菌黑色素合成酶基因的全基因组定位及表达模式分析[J]. 中国农业科学, 2015, 48(14):2767-2776.  
JIA Hui, MENG Qingjiang, LI Zhiyong, GONG Xiaodong, ZANG Jinping, HAO Zhimin, CAO Zhiyan, DONG Jin 'gao. Localization of melanin biosynthesis enzyme genes in the genome and expression pattern analysis of *Setosphaeria turcica*[J]. Chinese Agricultural Sciences, 2015, 48(14):2767-2776.
- [23] 刘宁. 玉米大斑病菌漆酶基因家族鉴定及关键基因的功能解析[D]. 保定:河北农业大学, 2019.  
LIU Ning. Identification and functional analysis of laccase genes family in *Setosphaeria turcica*[D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2019.