

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54 (11): 1267–1278; 4 November 2014  
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.11.004

# 香蕉枯萎病菌中 Hog1 MAPK 同源基因 *FoHog1* 敲除突变体的生物学特性

毛超<sup>1,2</sup>, 陈平亚<sup>1</sup>, 戴青冬<sup>1,2</sup>, 杨腊英<sup>1</sup>, 黄俊生<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 中国热带农业科学院环境与植物保护研究所, 农业部热带作物有害生物综合治理重点实验室, 海南 海口 571101

<sup>2</sup> 海南大学农学院, 海南 海口 570228

**摘要:** 【目的】研究香蕉枯萎病菌 4 号生理小种中促分裂原活化蛋白激酶基因 *FoHog1* 的结构特点及其功能【方法】通过 PCR 和 RT-PCR 的方法获得了 *FoHog1* 基因序列并进行生物信息学分析, 利用 PEG 介导的原生质体转化法得到了 *FoHog1* 基因缺失突变体, 分析敲除突变体与野生型的生物学特性差异【结果】*FoHog1* 基因编码一个含有 357 个氨基酸的蛋白, 该蛋白在不同种镰刀菌中高度保守。通过对敲除突变体的研究发现, 该基因缺失后菌丝密度下降, 产孢量与菌丝干重明显降低, 对乙酸钠和氯化铵的利用率下降, 对温度、pH 及渗透压等外源胁迫更为敏感。通过致病力实验发现, 基因敲除突变体的定殖能力有所降低【结论】尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种中 *FoHog1* 基因参与调控菌丝生长、分生孢子生成、乙酸钠和氯化铵代谢、渗透压胁迫反应及致病相关过程。

**关键词:** 香蕉枯萎病菌, 基因敲除, 生物学特性, 促分裂原活化蛋白激酶基因 *FoHog1*, 促分裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-Activated Protein Kinase, MAPK)

中图分类号: Q933 文章编号: 0001-6209 (2014) 11-1267-12

香蕉枯萎病 (*Fusarium wilt of banana*) 又称黄叶病、巴拿马病 (Panama disease), 因其 20 世纪 50 年代在巴拿马大面积流行而得名<sup>[1]</sup>。该病的病原菌为尖孢镰刀菌古巴专化型 (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, Foc), 其有 4 个生理小种, 其中 4 号生理小种 (Foc4) 几乎能侵染所有的香蕉和大蕉品种, 危害最大<sup>[2]</sup>。香蕉枯萎病菌可以通过带菌土壤传播, 在侵染香蕉植株根部之后迅速向植株上部生长, 通过分泌毒素、水解酶类等方式破坏植株维管束, 导致植株水分供应不畅, 引起植株死亡<sup>[3-4]</sup>。目前, 对于

香蕉枯萎病菌功能基因的研究较少, 对该病致病机理缺乏了解, 导致了对该病的防治方法缺乏针对性。

MAPK (促分裂原活化蛋白激酶, Mitogen-Activated Protein Kinase) 是一类广泛存在于真核生物中参与胞外信号传导的蛋白激酶, 其在进化途径上高度保守<sup>[5]</sup>。MAPK 级联信号途径是由 MAPKKK (MAP kinase kinase kinase)、MAPKK (MAP kinase kinase) 和 MAPK 组成, 其中 MAPK 的活性受 MAPKKK-MAPKK-MAPK 组成的三酶级联反应系统

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项 (200903049); 国家自然科学基金项目 (31371900); 海南省研究生创新科研课题 (S201308)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-898-66969269; E-mail: H888111@126.com

作者简介: 毛超 (1987–), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生, 主要研究方向为微生物功能基因组学。E-mail: mc111666@163.com

收稿日期: 2014-01-25; 修回日期: 2014-03-06

调控<sup>[6]</sup>。在模式真菌酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中,存在着 5 类不同的 MAPK 信号途径,分别为 *Fus3*、*Kss1*、*Slf2*、*Hog1* 和 *Smk1* 途径,其控制着酿酒酵母的配接反应、菌丝生长、细胞壁完整性、高渗环境下的生长及孢子的形成等<sup>[7-10]</sup>。目前,通过同源克隆和基因敲除等手段,丝状真菌中已有多个 MAPK 信号通路的同源基因被发现并研究。Rafael 等通过将番茄枯萎病菌中的 MAPK 信号通路基因 *FoFso1* 敲除后发现,该基因虽然调控着病原菌菌丝融合结构的形成,但该基因敲除的突变体致病力只有轻微的减弱<sup>[11]</sup>。Zhang 等研究发现,在轮枝镰孢菌 (*Fusarium verticillioide*) 中 *FvMK1* 基因调控着分生孢子形成、伏马毒素 (Fumonisin) 的合成,对该基因敲除以后发现,该突变体的致病力丧失<sup>[12]</sup>。Elena 等通过对番茄枯萎病菌中 *FoFmk1* 上游基因 *FoMsb2* 研究后发现,该基因调控着病原菌的入侵,并且与细胞壁完整性有关<sup>[13]</sup>。高渗透压环境是自然界中普遍存在的一种环境胁迫因子,其通过引起细胞失水,破坏胞内正常的代谢过程,从而引起细胞死亡<sup>[14]</sup>。HOG-MAPK 途径 (High Osmolarity Glycerol Mitogen Activated Protein Kinase signaling transduction pathway) 又称高渗透压甘油促分裂原活化蛋白激酶途径,在细胞处于高渗透压环境下时,该途径通过激活与甘油合成的相关基因,使细胞内积累高浓度的甘油,从而提高细胞内的渗透压,防止其应外界高渗环境所导致的细胞失水、死亡<sup>[15-16]</sup>。

本研究拟通过反向遗传学方法,利用同源重组、

PEG 介导的原生质体转化等手段,在香蕉枯萎病菌 4 号生理小种中敲除 *FoHog1* 基因,并对该基因敲除突变体的表型、生理生化性质及致病力等特征进行研究,从而探明该基因在病原菌中的功能,为该病的防治提供理论参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株和质粒:供试尖孢镰刀菌古巴专化型 4 号生理小种野生型菌株 Foc4-B<sub>2</sub> 为本实验室 2005 年分离自海南乐东并鉴定。质粒 pCT74 (含有真菌启动子驱动的潮霉素 B 抗性基因和绿色荧光蛋白 GFP 基因) 由本实验室保存。

1.1.2 培养基:察氏培养基 (g/L)<sup>[17]</sup>:硝酸钠 3、磷酸氢二钾 1、硫酸镁 0.5、氯化钾 0.5、硫酸亚铁 0.01、蔗糖 30、琼脂 20。YEPD 培养基 (g/L)<sup>[18]</sup>:酵母粉 10、蛋白胨 20、葡萄糖 20。

1.1.3 主要试剂和仪器:总 RNA 提取使用天根公司 RNAprep pure Plant Kit 试剂盒;反转录采用 TaKaRa 公司 PrimeScript RT reagent Kit With gDNA Erase 试剂盒。Eppendorf 微量移液器、Eppendorf Mastercycler PCR 仪、UVITEC 凝胶成像系统、Eppendorf 5417R 离心机、LABCONCO 冻干机、PolyScience 恒温水浴锅、Leica 倒置荧光显微镜等。

1.1.4 引物:PCR 引物 (表 1) 合成及测序由上海生工公司完成。

表 1. 本研究中所用引物  
Table 1. Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Restriction site	Size/bp
FoHog1-F	CCCAGATCTTTGGCACCACATTCGA		1650/1100
FoHog1-R	TGCTCCTGCATGTTAGTAACTCCGG		
FoHog1-A-F	CGGGCCCTAGCCAATACCCAGATTTCCTCCC	<i>Apa</i> I	1150
FoHog1-A-R	CCCTCGAGTTGGACGAGAGGTTTGAGGGTGAAG	<i>Xho</i> I	
FoHog1-B-F	CGGAATTCTGGGATGTGTTAATAACGGAGGAGG	<i>Eco</i> RI	1100
FoHog1-B-R	GCTCTAGACGAAGCCACGGCAAGCATGGATTAT	<i>Xba</i> I	
Hyg + GFP-F	CGCCATGTAGTGATTGACCGATTTC		2200
Hyg + GFP-R	ATGACACCGCGCGGATAATTTATC		
FoHog1-F1	CATCCCAGATGCTAACCTCTTCTTC		2400
FoHog1-F2	CATACCTTCTTAAGTTCCGCCCTTCC		
FoHog1-F3	GTCCGGCTACCTAGCAATAAGATTC		2400
FoHog1-F4	CAGCGATAATGATACGCAATCTCCG		

## 1.2 *FoHog1* 基因克隆及生物信息学分析

基因组 DNA 的提取参照 CTAB 法<sup>[19]</sup>。参照层出镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*) 中的 *FpHog1* 基因序列 (GenBank: EF467357.1) 设计引物 *FoHog1*-F/*FoHog1*-R, 分别以 *Foc4*-B<sub>2</sub> 菌株基因组 DNA 和 cDNA 为模板, 克隆并测序得到了 *Foc4*-*Hog1* 基因的 DNA 及 cDNA 序列。利用 DNASTar7.1 (<http://www.dnastar.com/>) 进行序列拼接与氨基酸序列推导; 利用 ProtParam 程序 (<http://web.expasy.org/protparam/>) 预测蛋白理化性质; 运用 NCBI 的 Conserved Domain Search 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) 对蛋白功能域进行预测; 利用 BLAST 程序 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 分析蛋白同源性; 利用 ClustalX2 (<http://www.clustal.org/clustal2/>) 程序和 MEGA4 程序 (<http://www.megasoftware.net/>) 构建

系统进化树。

## 1.3 *Foc4*-*Hog1* 基因的敲除及突变体鉴定

以 *Foc4*-B<sub>2</sub> 基因组 DNA 为模板, 分别用设计有酶切位点的两对引物 *FoHog1*-A-F/*FoHog1*-A-R、*FoHog1*-B-F/*FoHog1*-B-R PCR 扩增得到 *FoHog1* 基因上游 1150bp 与下游 1100bp 的序列, 将上下游序列分别构建到基因敲除载体 pCT74 的潮霉素 B 与 GFP 基因两端, 提取质粒后双酶切得到基因敲除片段 A-Hyg + GFP-B, 通过 PEG 介导的原生质体转化法将敲除片段转化到病原菌 *Foc4*-B<sub>2</sub> 中, 获得带有潮霉素抗性的突变体, 将不同突变体分别摇菌提取 DNA 后用 *FoHog1*-F/*FoHog1*-R、Hyg-GFP-F/Hyg-GFP-R、*FoHog1*-F1/*FoHog1*-F2、*FoHog1*-F3/*FoHog1*-F4 4 对引物 (图 1) 鉴定得到  $\Delta$ *Foc4*-*Hog1* 基因缺失突变体。

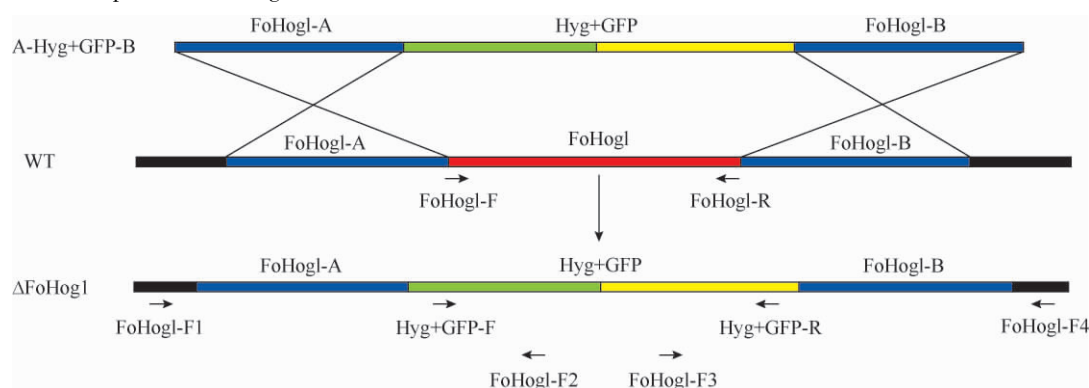


图 1. 敲除突变体  $\Delta$ *Foc4*-*Hog1* 的 4 对引物 PCR 鉴定示意图

Figure 1. PCR identifying of knock-out mutants  $\Delta$ *Foc4*-*Hog1* with 4 pair primers.

## 1.4 敲除突变体 $\Delta$ *Foc4*-*Hog1* 的表型观察

使用直径 10 mm 的打孔器分别在 *Foc4*-B<sub>2</sub> 与  $\Delta$ *Foc4*-*Hog1* 的菌落边缘打孔后将菌饼接种到 YEPD 平板上, 27℃ 暗培养 5 d 后拍照; 在菌落边缘插上盖玻片, 1 d 后在显微镜下观察盖玻片上的菌丝形态; 用无菌水将平板上的分生孢子洗下后在显微镜下观察分生孢子形态。将 20 mL 液体 YEPD 培养基倒在直径 9 cm 的培养皿内, 分别接种 10 mm 菌饼, 5 d 后拍照记录其在液体培养基中的形态。

## 1.5 液体培养基中敲除突变体 $\Delta$ *Foc4*-*Hog1* 的产孢量及菌丝干重测定

将 *Foc4*-B<sub>2</sub> 与敲除突变体  $\Delta$ *Foc4*-*Hog1* 的直径 10 mm 菌饼分别接种在装有 100 mL 液体 YEPD 的三角瓶中, 27℃ 下 180 r/min 摇瓶培养, 在 5 d 时分别

取菌液用 3 层擦镜纸过滤, 取滤液用血球计数板计算分生孢子数量, 其中分生孢子数/mL = 80 小格内分生孢子数/80 × 400 × 10000 × 稀释倍数。将过滤得到的菌丝冻干后称重, 每个处理 3 次重复。

## 1.6 不同营养条件下敲除突变体 $\Delta$ *Foc4*-*Hog1* 生长速率及菌落形态观察

使用直径 10 mm 打孔器分别取菌饼接种在含有不同碳、氮源的察氏培养基上, 27℃ 暗培养 5 d 后测量菌落直径并拍照记录。其中碳源分别为: 葡萄糖、麦芽糖、半乳糖、木糖、甘露糖、乳糖、蔗糖、果糖、海藻糖、阿拉伯糖、淀粉、果胶、羧甲基纤维素钠、山梨醇、甘油、乙酸钠。氮源分别为: 硝酸钠、硝酸铵、硫酸铵、氯化铵、尿素、谷氨酸、赖氨酸、天门冬酰胺、细菌学蛋白胨、胰蛋白胨、牛肉膏<sup>[20]</sup>。

1.7 温度及培养基 pH 对敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 生长及菌落形态影响

将直径 10mm 的 Foc4-B<sub>2</sub> 与突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 的菌饼分别接种于不同温度梯度与不同 pH 值梯度的 YEPD 培养基上,暗培养 5d,观察菌落形态变化,每个处理 3 次重复,分别量取菌落直径并拍照记录。其中温度梯度分别为:12℃、17℃、22℃、27℃、32℃、37℃。使用 80% 乳酸与过饱和 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调节 pH 值梯度至 4、5、6、7、8、9、10。

1.8 渗透压胁迫对敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 生长的影响

将 Foc4-B<sub>2</sub> 与突变体  $\Delta$ FoHog1 的 10 mm 菌饼分别接种在含有 0、0.5 mol/L、1.0 mol/L 的 NaCl、KCl、甘油或山梨醇的 YEPD 培养基上,27℃ 暗培养 5 d 后测量菌落直径并拍照记录。

1.9 敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 定殖能力测定

分别采用活体叶片接种法,苹果组织定殖实验对编号分别为 2、5、8 的 3 个敲除突变体  $\Delta$ FoHog1 定殖能力进行研究。活体叶片接种法:采集叶片长度约为 20 cm 左右的巴西蕉嫩叶一枚,使用 75% 乙醇擦拭叶片表面消毒后,用无菌水清洗干净,将直径 10 mm 菌饼反贴于叶片上,期间注意喷水保湿,27℃

培养 10 d 后观察。苹果组织定殖实验:将苹果表面清洗干净后,切成厚度约为 5 mm 的薄片,分别将 1 $\mu$  浓度为 10<sup>6</sup>/mL 的孢子悬浮液接种于苹果薄片上,以无菌水作为对照,27℃ 暗培养 3 d 后拍照记录。

2 结果

2.1 FoHog1 基因克隆及生物学信息学分析

参照层出镰刀菌 (*Fusarium proliferatum*) 中的 *FpHog1* 基因序列 (GenBank: EF467357.1),克隆并测序得到了 *FoHog1* 基因的基因组及 cDNA 序列,并提交 GenBank 得到登录序列号 KJ025074。*FoHog1* 基因全长 1632 bp,其中 cDNA 全长 1074 bp,编码 357 个氨基酸。通过预测其理化性质后发现, FoHog1 蛋白分子量为 41147.1,等电点 pI 为 5.46,亲水系数 -0.286,为亲水蛋白。通过对其保守结构域进行分析, FoHog1 蛋白主要含有一个 STKc\_Sty1\_Hog1 保守结构域,拥有该结构域的蛋白通常为丝/苏氨酸蛋白激酶家族成员。用 Neighbor-Joining 法构建系统进化树发现,该蛋白在不同种属镰刀菌中的保守程度较高 (图 2)。

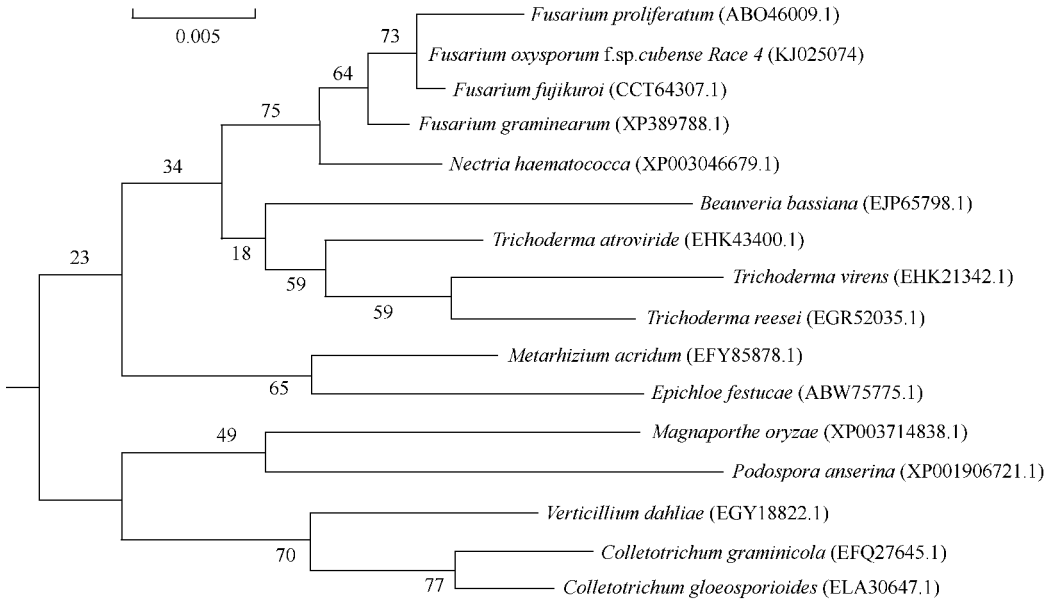


图 2. FoHog1 蛋白生物进化树分析

Figure 2. The phylogenetic tree based on alignment of amino acid among FoHog1 protein. Numbers in parentheses represent the sequences' accession number in GenBank. The number at each branch points indicate the percentage of bootstrap supporting with bootstrap values calculated from 1000 resampling. Bar, 5% sequence divergence.

## 2.2 *FoHog1* 基因缺失突变体鉴定

为了研究 *FoHog1* 基因在香蕉枯萎病菌中的功能,通过构建得到了基因敲除载体 pCT74-*FoHog1*, 并通过双酶切等手段得到了基因敲除片段 A-Hyg + GFP-B,将该片段转化 *Foc4-B<sub>2</sub>* 菌株得到了 151 个具有潮霉素抗性的突变体,连续转接 3 代后,随机取 10 个突变体提 DNA,使用 4 对引物 *FoHog1*-F/*FoHog1*-R、Hyg-GFP-F/Hyg-GFP-R、*FoHog1*-A-F/*FoHog1*-A-R、*FoHog1*-B-F/*FoHog1*-B-R 进行 PCR 验证,结果表明有 9 个突变体均为 *FoHog1* 基因缺失突变体,同源重组的效率较高;而 3 号突变体经验证后发现其基因组中有潮霉素抗性和绿色荧光基因存在,但目的基因并未被敲除,推测敲除片段随机插入到了其基因组中。通过对随机选取的 2、5、8 号突变体进行初步研究后发现,这 3 个突变体的表型趋于

一致,结合电泳结果,说明目的基因在该 3 个突变体中已经被成功敲除。

## 2.3 敲除突变体 $\Delta$ *Foc4-Hog1* 的表型观察

通过对敲除突变体  $\Delta$ *Foc4-Hog1* 的菌丝进行显微观察后发现,敲除突变体的菌丝与野生型相比略微稀疏(图 3-A、图 3-B),而两者分生孢子的形态没有差别(图 3-C、图 3-D)。在固体 YEPD 平板上野生型菌株比敲除突变体  $\Delta$ *Foc4-Hog1* 的生长速度略快,菌丝更为致密;敲除突变体  $\Delta$ *Foc4-Hog1* 的菌丝表面有许多深沟状凹陷,并且呈向外辐射状;野生型菌株虽也有沟状凹陷,但其凹陷处较浅(图 3-E、图 3-F)。在液体 YEPD 培养基中,*Foc4-B<sub>2</sub>* 能形成完整的菌膜,而敲除突变体  $\Delta$ *Foc4-Hog1* 形成的菌膜疏松,并且有菌丝团形成(图 3-G、图 3-H)。

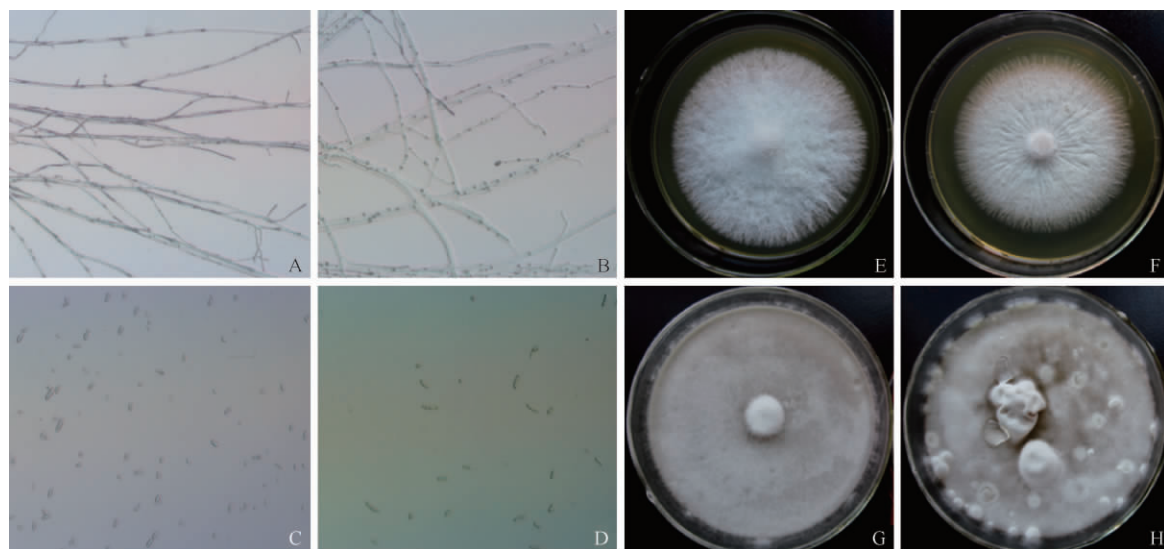


图 3. *Foc4-B<sub>2</sub>* 与敲除突变体  $\Delta$ *Foc4-Hog1* 的表型观察

Figure 3. The phenotype of *Foc4-B<sub>2</sub>* and knockout mutant  $\Delta$ *Foc4-Hog1*. A: *Foc4-B<sub>2</sub>* hypha; B:  $\Delta$ *Foc4-Hog1* hypha; C: *Foc4-B<sub>2</sub>* spores; D:  $\Delta$ *Foc4-Hog1* spores; E: *Foc4-B<sub>2</sub>* on YEPD plate; F:  $\Delta$ *Foc4-Hog1* on YEPD plate; G: *Foc4-B<sub>2</sub>* in liquid YEPD; H:  $\Delta$ *Foc4-Hog1* in liquid YEPD.

## 2.4 敲除突变体 $\Delta$ *Foc4-Hog1* 产孢量及菌丝干重测定

产孢量测定结果表明,在使用液体 YEPD 培养基培养的条件下,相对于野生型 *Foc4-B<sub>2</sub>* 来说,敲除突变体  $\Delta$ *Foc4-Hog1* 的产孢量明显下降,其中野生型菌株的产孢量约  $1.94 \times 10^9$  cfu/mL,而敲除突变体  $\Delta$ *Foc4-Hog1* 的产孢量为  $0.49 \times 10^9$  cfu/mL,约为野生型产孢量的 1/4(图 4-A)。而在菌丝干重方面,突变体  $\Delta$ *Foc4-Hog1* 的菌丝干重约为  $0.70 \times 10^{-2}$  g/mL,相比野生型的  $1.05 \times 10^{-2}$  g/mL 有所下

降(图 4-B)。

## 2.5 不同营养条件下敲除突变体 $\Delta$ *Foc4-Hog1* 的菌落形态比较

通过对含不同碳源的培养基上野生型 *Foc4-B<sub>2</sub>* 及敲除突变体  $\Delta$ *Foc4-Hog1* 的生长速率及表型进行观察后发现,在不同碳源条件下,野生型及突变体的菌丝均为白色,在以麦芽糖、甘露糖、蔗糖、海藻糖、阿拉伯糖、羧甲基纤维素钠、甘油及乙酸钠为碳源的情况下,敲除突变体  $\Delta$ *Foc4-Hog1* 的气生菌丝明显少于野生型 *Foc4-B<sub>2</sub>*;在以半乳糖作为碳源的培养基

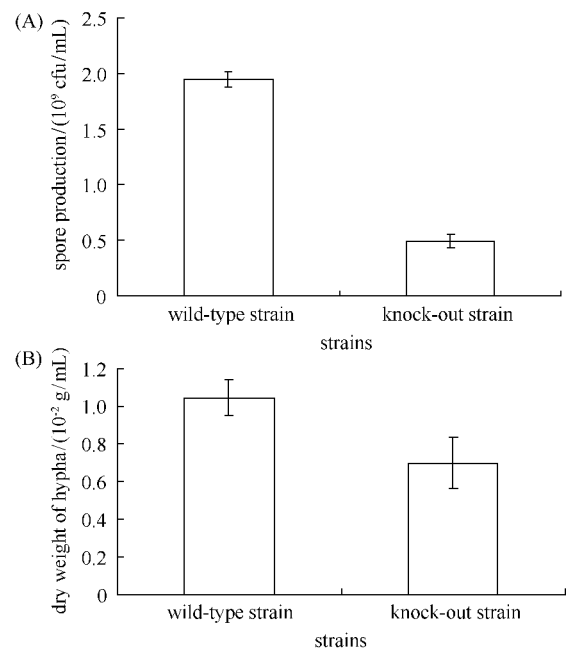


图 4. Foc4-B<sub>2</sub> 与敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 的产孢量 (A) 和菌丝干重 (B) 测定

Figure 4. The spore production (A) and the dry weight hypha (B) of Foc4-B<sub>2</sub> and knock-out mutant  $\Delta$ Foc4-Hog1.

上,敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 的菌落直径约为 4.67 cm,超过了野生型的 3.98 cm;而在以乙酸钠作为碳源的培养基上,敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 的菌落直径明显下降,为 1.82 cm;野生型 Foc4-B<sub>2</sub> 及敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 在以可溶性淀粉为碳源的培养基上生长速率最快,分别为 7.03 cm 和 6.72 cm,野生型 Foc4-B<sub>2</sub> 在以半乳糖为碳源的培养基上生长速度最慢,而敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 在以乙酸钠为碳源的培养基上生长速率最慢。因此推测该基因与病原菌对乙酸钠的分解利用有关(表 2)。

在含有不同氮源的培养基上,野生型 Foc4-B<sub>2</sub> 及敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 的菌丝均为白色,两者均在以细菌学蛋白胨为氮源的培养基上生长菌落直径最大,分别为 7.13 cm 和 6.73 cm,在以尿素作为氮源的培养基上菌落直径最小,分别为 3.07 cm 和 2.93 cm;在以硝酸铵作为氮源的培养基上,敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 的菌落直径明显大于野生型,为 6.23 cm;而以氯化铵为氮源时,野生型 Foc4-B<sub>2</sub> 的菌落直径 3.82 cm,明显大于敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 的 3.07 cm(表 3)。

表 2. 突变型菌株与野生型菌株在不同碳源上的菌落形态比较

Table 2. The comparison of colony morphology of knock-out strain and wild-type strain on the media with different carbon sources

Carbon sources	Foc4-B <sub>2</sub>		$\Delta$ Foc4-Hog1	
	Morphology	Diameter/cm	Morphology	Diameter/cm
glucose	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	5.68 ± 0.08	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	5.43 ± 0.06
maltose	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	5.58 ± 0.10	white, dentate growth, less aerial mycelium, neat edge	5.03 ± 0.06
galactose	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, edge irregular	3.98 ± 0.03	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, edge irregular	4.67 ± 0.06
xylose	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	5.62 ± 0.08	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, edge irregular	5.48 ± 0.10
mannose	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	5.75 ± 0.09	white, dentate growth, less aerial mycelium, neat edge	5.75 ± 0.05
lactose	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	6.27 ± 0.06	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	5.98 ± 0.18
sucrose	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	5.77 ± 0.03	white, dentate growth, less aerial mycelium, edge irregular	5.35 ± 0.13
fructose	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	5.87 ± 0.15	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	5.20 ± 0.10
trehalose	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	6.53 ± 0.06	white, dentate growth, no aerial mycelium, neat edge	5.78 ± 0.08
arabinose	white, dentate growth, less aerial mycelium, neat edge	5.78 ± 0.03	white, dentate growth, less aerial mycelium, neat edge	5.18 ± 0.10
amyloextrine	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	7.03 ± 0.03	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, edge irregular	6.72 ± 0.03
pectin	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	6.53 ± 0.06	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	5.90 ± 0.10
sodium carboxymethyl cellulose	white, dentate growth, less aerial mycelium, neat edge	5.12 ± 0.10	white, no dentate growth, no aerial mycelium, neat edge	4.52 ± 0.03
sorbitol	white, dentate growth, less aerial mycelium, neat edge	6.07 ± 0.15	white, dentate growth, less aerial mycelium, neat edge	6.18 ± 0.03
glycerin	white, dentate growth, abundant aerial mycelium, neat edge	6.37 ± 0.03	white, dentate growth, less aerial mycelium, neat edge	4.72 ± 0.13
sodium acetate	white, dentate growth, less aerial mycelium, neat edge	6.08 ± 0.08	white, no dentate growth, no aerial mycelium, edge irregular	1.82 ± 0.08

表 3. 突变型菌株与野生型菌株在不同氮源上的菌落形态比较

Table 3. The comparison of colony morphology of knock-out strain and wild-type strain on the media with different nitrogen sources

Nitrogen sources	Foc4-B <sub>2</sub>		Δ Foc4-Hog1	
	Morphology	Diameter/cm	Morphology	Diameter/cm
sodium nitrate	white, dentate growth, abundant aerial	5.68 ± 0.03	white, dentate growth, abundant aerial	5.43 ± 0.03
	mycelium, neat edge		mycelium, neat edge	
ammonium nitrate	white, dentate growth, abundant aerial	5.00 ± 0.10	white, dentate growth, abundant aerial	6.23 ± 0.06
	mycelium, neat edge		mycelium, edge irregular	
ammonium sulfate	white, dentate growth, abundant aerial	3.12 ± 0.03	white, dentate growth, abundant aerial	3.17 ± 0.06
	mycelium, edge irregular		mycelium, edge irregular	
ammonium chloride	white, dentate growth, abundant aerial	3.82 ± 0.03	white, dentate growth, abundant aerial	3.07 ± 0.15
	mycelium, edge irregular		mycelium, edge irregular	
urea	white, dentate growth, abundant aerial	3.07 ± 0.06	white, dentate growth, abundant aerial	2.93 ± 0.06
	mycelium, neat edge		mycelium, edge irregular	
glutamate	white, dentate growth, abundant aerial	5.48 ± 0.03	white, dentate growth, abundant aerial	5.52 ± 0.03
	mycelium, neat edge		mycelium, neat edge	
lysine	white, dentate growth, abundant aerial	4.77 ± 0.12	white, dentate growth, abundant aerial	4.83 ± 0.12
	mycelium, neat edge		mycelium, edge irregular	
asparagine	white, dentate growth, abundant aerial	5.18 ± 0.03	white, dentate growth, abundant aerial	4.47 ± 0.06
	mycelium, neat edge		mycelium, neat edge	
bacteriological	white, dentate growth, abundant aerial	7.13 ± 0.06	white, dentate growth, abundant aerial	6.73 ± 0.06
	mycelium, neat edge		mycelium, neat edge	
peptone	white, dentate growth, abundant aerial	5.72 ± 0.03	white, dentate growth, abundant aerial	5.33 ± 0.06
	mycelium, neat edge		mycelium, neat edge	
tryptone	white, dentate growth, abundant aerial	6.87 ± 0.06	white, dentate growth, less aerial	6.03 ± 0.06
	mycelium, neat edge		mycelium, neat edge	

2.6 敲除突变体 ΔFoc4-Hog1 在不同温度及 pH 条件下生长动力模型

不同温度下的的生长速率测定结果表明，野生型 Foc4-B<sub>2</sub> 与敲除突变体 ΔFoc4-Hog1 的最适生长温度都为 27℃，在 17℃ 与 32℃ 时，突变体 ΔFoc4-Hog1 的生长速率与野生型相比明显下降，培养 5 d 后的菌落直径分别为 1.97 cm 与

4.13 cm，而在 12℃ 与 37℃ 时，突变体 ΔFoc4-Hog1 已经不能生长（图 5-A），推测该基因与病原菌对温度的耐受性有关。而通过分析不同 pH 条件下的生长动力模型发现，在 pH = 10 的强碱性环境下，突变体 ΔFoc4-Hog1 的生长速率明显下降，野生型菌落直径为 4.37 cm，而突变体 ΔFoc4-Hog1 为 1.10（图 5-B）。

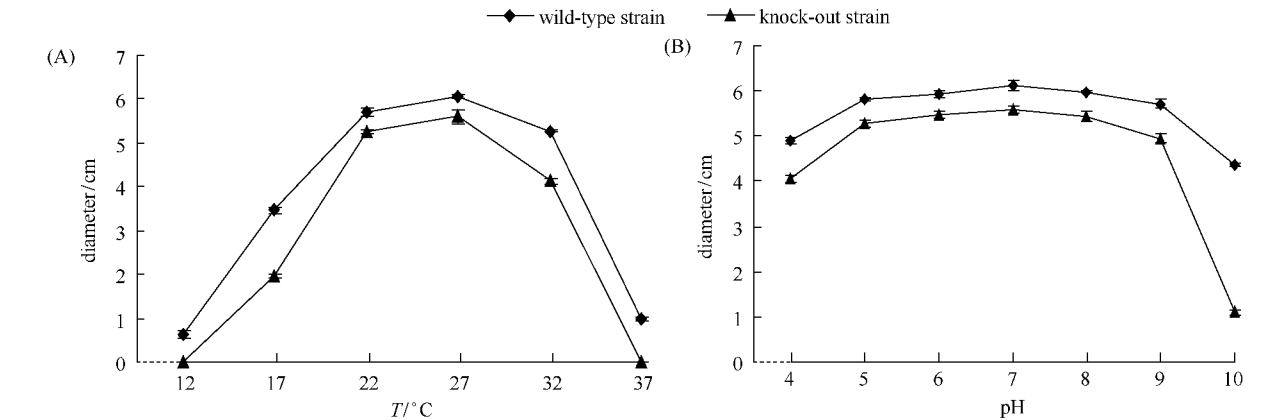


图 5. 不同温度 (A) 和不同 pH (B) 条件下野生型与敲除突变体的生长速率

Figure 5. The growth rate of wild-type strain and knock-out strain in different temperature(A) and in different pH medium(B).



2.7 渗透压胁迫下敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 的生长模型

通过观察不同浓度胁迫条件下敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 的生长情况发现,在 0.5 mol/L NaCl、KCl 或山梨醇存在的条件下,敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 的生长受到强烈抑制,只能在菌饼周围生长出

一小圈菌丝;在 1.0 mol/L NaCl、KCl 或山梨醇存在时,敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 已经不能在该培养基上生长(图 6-A、图 6-B、图 6-C);而在培养基中存在 1 mol/L 甘油时,突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 的生长受到抑制,气生菌丝变少,菌落直径与野生型相比明显减小(图 6-D)。

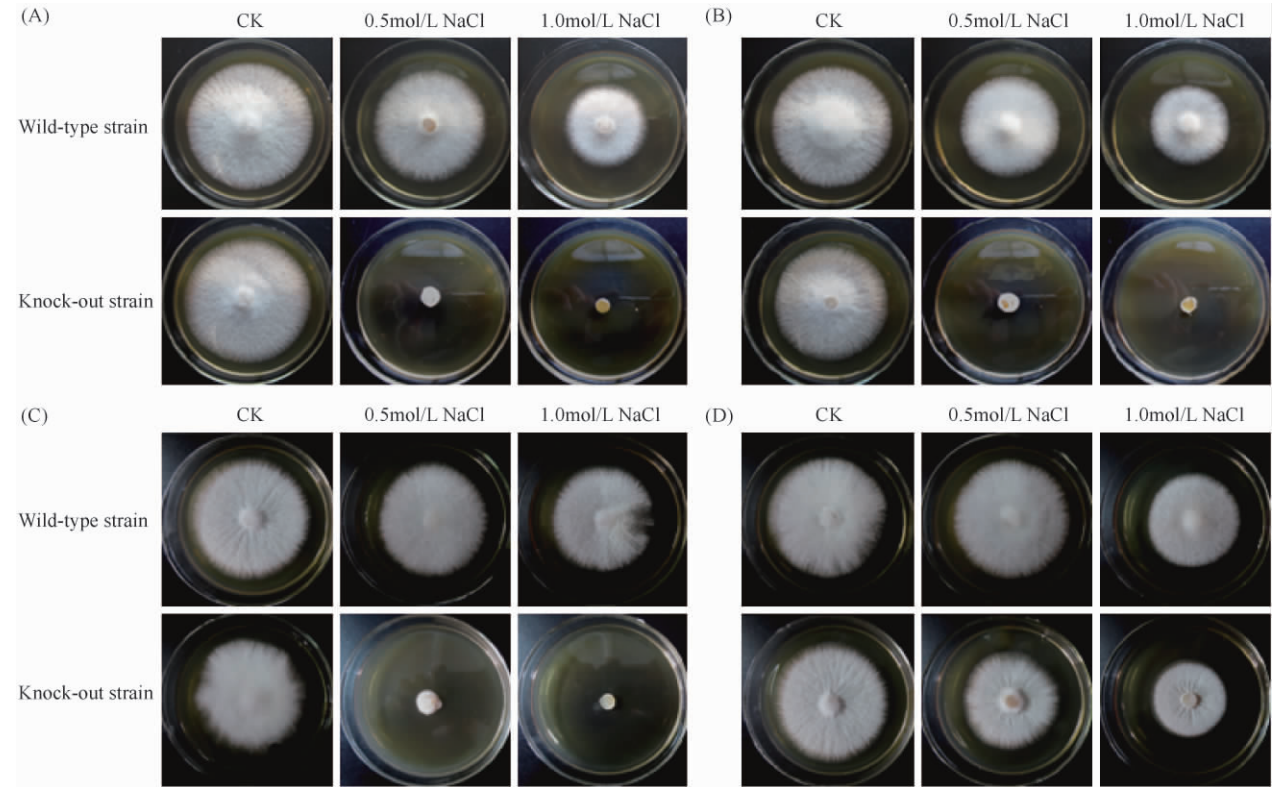


图 6. 不同胁迫条件下野生型与敲除突变体的生长情况

Figure 6. The growth condition of wild-type strain and knock-out strain with different stress factors. A: NaCl; B: KCl; C: Sorbitol; D: Glycerin.

2.8 敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 致病力测定

通过活体叶片定殖能力测定发现,接种菌饼 10d 后,野生型 Foc4-B<sub>2</sub> 与 3 个敲除突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 都能在巴西蕉叶片上形成病斑,但突变体  $\Delta$ Foc4-Hog1 形成的病斑要小于野生型(图 7-A),说明 *FoHog1* 基因敲除后突变体在活体叶片上的致病力有所减弱。通过苹果上的定殖能力检测后发现,突变体与野生型相比定殖能力明显减弱,形成的病斑明显减小(图 7-B)。通过对 3 个不同突变体的病斑直径进行比较后发现,不同突变体之间形成的病斑直径没有显著性差异,但突变体与野生型菌株之间形成的病斑大小有显著性差异,各突变体形成的病斑都明显小于野生型(表 4)。

表 4. 突变型菌株与野生型菌株病斑直径比较

Table 4. The lesion diameter comparison of knock-out strain and wild-type strain

Strain	Diameter/cm	
	Living leaf assays	Apple slices
Wild-type strain	1.83 ± 0.20 <sup>a</sup>	2.17 ± 0.08 <sup>a</sup>
Knock-out strain No. 2	1.05 ± 0.15 <sup>b</sup>	1.65 ± 0.18 <sup>b</sup>
Knock-out strain No. 5	1.12 ± 0.10 <sup>b</sup>	1.72 ± 0.08 <sup>b</sup>
Knock-out strain No. 8	0.98 ± 0.12 <sup>b</sup>	1.70 ± 0.13 <sup>b</sup>

Data in the table are mean ± SD. Different letters in the same column indicate significant different at P < 0.05 level by Duncan's multiple range test.



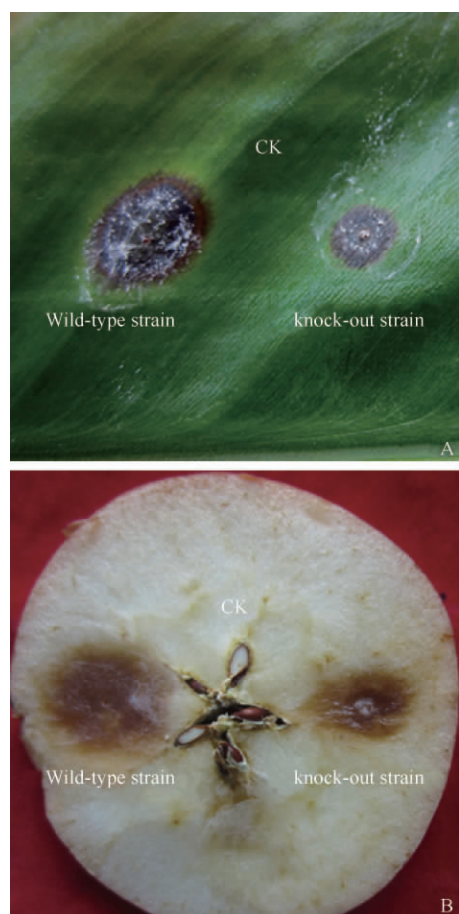


图 7. 敲除突变体的定殖能力测定

Figure 7. Colonization ability of knock-out strain. A: in living leaf assays; B: in apple slices.

### 3 讨论

尖孢镰刀菌是农业生产中的一种危害巨大的病原真菌,其不同的专化型能侵染香蕉、瓜类、豆科、茄科、棉等 100 余种经济作物<sup>[22]</sup>。香蕉枯萎病病原菌是尖孢镰刀菌古巴专化型,作为一种典型的土传维管束病害,由于其对外源胁迫,如渗透压、温度、pH 等并不敏感,能在许多极端环境下生存等特点<sup>[23]</sup>,成为了香蕉生产中危害最大的一种病害,被称为“香蕉癌症”。目前,关于该病的防治主要是进行抗菌农药的研制及生防菌的筛选<sup>[24]</sup>,但由于对该病原菌生长规律、致病机理的了解不足,使得目前对该病的防治缺乏针对性。MAPK 信号通路是一种广泛存在于真菌中的信号通路,其主要参与真菌菌丝生长、孢子形成及对外源胁迫的应答反应等,是真菌中

最重要的一类信号传导途径之一<sup>[25]</sup>。目前,关于尖孢镰刀菌中的 MAPK 通路基因的研究还很少,使得该类基因在尖孢镰刀菌中的具体功能还没有被了解清楚。

本研究通过基因克隆的手段,从尖孢镰刀菌古巴专化型中鉴定得到了一个 MAPK 信号通路基因 *FoHog1*,通过构建生物进化树发现,*FoHog1* 基因编码蛋白在不同种属镰刀菌种高度保守。为了进一步了解 *FoHog1* 基因的功能,利用同源重组的手段在 *Foc4-B<sub>2</sub>* 中敲除了该基因。通过对敲除突变体与野生型的生物学特性比较后发现,突变体  $\Delta Foc4-Hog1$  与 *Foc4-B<sub>2</sub>* 相比,菌丝相对稀疏,在液体培养基中形成菌膜的能力明显下降; $\Delta Foc4-Hog1$  的产孢量约只有野生型的 1/4 左右,而在液体培养基中的菌丝干重约为野生型的 7/10;在以乙酸钠为碳源或氯化铵为氮源存在的情况下,敲除突变体的生长速率明显慢于野生型,说明该基因与乙酸钠和氯化铵的代谢有关;通过不同温度与 pH 下的生长速率实验发现,该基因参与调控尖孢镰刀菌在高温、低温及高碱性环境下的生长;在不同的渗透压胁迫条件下, $\Delta Foc4-Hog1$  的生长明显受到抑制,说明 *FoHog1* 基因在病原菌中起抵抗渗透压胁迫的作用;从致病力实验发现,*FoHog1* 基因的缺失使病原菌的定殖能力下降。

目前,对于植物病原真菌功能基因的研究主要通过两种方法:基因定点敲除和突变体库筛选。唐改娟等人通过对香蕉枯萎病 1 号生理小种中一个与致病力相关的基因 *Focr1-328* 敲除后发现,该基因参与了病原菌的致病过程,突变体无法穿透玻璃纸,说明该突变体致病力下降的原因与其穿透能力的丧失有关<sup>[20]</sup>。齐兴柱等通过对病原菌中的 *FoAP1* 基因进行敲除后发现,该基因主要参与病原菌对外源氧胁迫的反应,该基因敲除后,突变体的致病力减弱<sup>[26]</sup>。吴飞宏等通过对香蕉枯萎病 4 号生理小种的突变体库进行筛选后得到突变体 *Focr4-I562*,该突变体的产孢能力下降并且致病力降低,这与本研究中的结果相一致,说明病原菌的致病力与产孢能力密切相关<sup>[27]</sup>。在本研究中,虽然得到了一系列敲除突变体与野生型相比生物学特性上的变化,但引起这些变化的分子机制还没有被了解,这也是下一

步研究中的重点。

综上所述,本研究第一次在尖孢镰刀菌中鉴定了 MAPK 信号通路基因 *FoHog1*, 并利用反向遗传学的方法研究了该基因在病原菌中的功能, 为研究尖孢镰刀菌中的 MAPK 信号通路基因功能及该通路基因打下基础, 并第一次通过苹果定殖能力实验来衡量香蕉枯萎病菌的致病力强弱, 通过本研究所得到的结论, 同时也为下一步新型农药的研制提供了作用靶标。

## 参考文献

- [1] Pegg KG, Moore NY, Bentley S. *Fusarium* wilt of banana in Australia: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 1996, 47 (5) : 637-650.
- [2] Ploetz RC. *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Phytopathology*, 2006, 96 (6) : 653-656.
- [3] Dong Z, Wang Q, Qin S, Wang Z. Comparison of cellwall degrading enzymes produced by *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1 and race 4. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2010, 40 (5) : 463-468. (in Chinese)  
董章勇, 王琪, 秦世雯, 王振中. 香蕉枯萎病菌 1 号和 4 号生理小种细胞壁降解酶的比较. *植物病理学报*, 2010, 40 (5) : 463-468.
- [4] Reignault P, Valette CO, Boccara M. The importance of fungal pectinolytic enzymes in plant invasion, host adaptability and symptom type. *European Journal of Plant Pathology*, 2008, 120 (1) : 1-11.
- [5] Wang C, Zhuge B, Fang H, Zong H, Song J, Zhuge J. Cloning and characterization of an HOG1 MAPK homologous gene CgHOG1 from *Candida glycerinogenes*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53 (10) : 1103-1110. (in Chinese)  
王晨莹, 诸葛斌, 方慧英, 宗红, 宋健, 诸葛健. 产甘油假丝酵母 HOG1 MAPK 同源基因 CgHOG1 的克隆及特征分析. *微生物学报*, 2013, 53 (10) : 1103-1110.
- [6] Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature*, 2001, 410 (6824) : 37-40.
- [7] Fan Y, Liu Y, Gu S, Gui X, Dong J. Mitogen activated protein kinase genes and its functions in phytopathogenic fungus. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44 (4) : 547-551. (in Chinese)  
范永山, 刘颖超, 谷守芹, 桂秀梅, 董金皋. 植物病原真菌的 MAPK 基因及其功能. *微生物学报*, 2004, 44 (4) : 547-551.
- [8] Di Pietro A, García-MacEira FI, Mègelecz E, Roncero MI. A MAP kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is essential for root penetration and pathogenesis. *Molecular Microbiology*, 2001, 39 (5) : 1140-1152.
- [9] Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ. Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene*, 2003, 27 (320) : 3-21.
- [10] Jenczmionka NJ, Schifer W. The Gpmk1 MAP kinase of *Fusarium graminearum* regulates the induction of specific secreted enzymes. *Current Genetics*, 2005, 47 (1) : 29-36.
- [11] Prados Rosales RC, Di Pietro A. Vegetative hyphal fusion is not essential for plant infection by *Fusarium oxysporum*. *Eukaryot Cell*, 2008, 7 (1) : 162-171.
- [12] Zhang Y, Choi YE, Zou X, Xu JR. The FvMK1 mitogen-activated protein kinase gene regulates conidiation, pathogenesis and fumonisin production in *Fusarium verticillioides*. *Fungal Genetics Biology*, 2011, 48 (2) : 71-79.
- [13] Pérez-Nadales E, Di Pietro A. The membrane mucin Msb2 regulates invasive growth and plant infection in *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell*, 2011, 23 (3) : 1171-1185.
- [14] Wang Y, Lin C, Shi T, Li B, Huang G. Cloning and sequence analysis of *Hog1* gene from *Corynespora cassiicola* of *Hevea brasiliensis*. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2013, 34 (3) : 424-428. (in Chinese)  
王延丽, 林春花, 时涛, 李博勋, 黄贵修. 巴西橡胶树棒孢霉落叶病菌 *Hog1* 同源基因的克隆和序列分析. *热带作物学报*, 2013, 34 (3) : 424-428.
- [15] Igbaria A, Lev S, Rose MS, Lee BN, Hadar R, Degani O, Horwitz BA. Distinct and combined roles of the MAP kinases of *Cochliobolus heterostrophus* in virulence and stress responses. *Molecular Plant-Microbe Interact*, 2008, 21 (6) : 769-780.
- [16] Reng L, Liu H, Han J. Expression analysis of *Alternaria solani* *Hog1* MAPK homologous gene *AsHog1* and correlation between the gene and fungicidal resistance of the pathogenic fungus. *Mycosystema*, 2010, 29 (4) : 542-547. (in Chinese)  
任璐, 刘慧平, 韩巨才. 番茄早疫病病菌 *Hog1* MAPK 同源基因 *AsHog1* 的表达特性及其与抗药性的关联性. *菌物*

- 学报, 2010, 29 (4) : 542-547.
- [17] Luo Z, Jin K, Zhang Y, Wu Z, Pei Y. Cloning and expression of the osmotic tolerance gene Bbmpd of *Beauveria bassiana*. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50 (6) : 724-728. (in Chinese)
- 罗志兵, 金凯, 张永军, 武增强, 裴炎. 球孢白僵菌高渗透适应性相关基因 Bbmpd 的克隆与表达分析. 微生物学报, 2010, 50 (6) : 724-728.
- [18] Yang R, Liu X, Zhao X, Xu Y, Ma R. Enhanced mycelial biomass production of the hairy bracket mushroom, *Trametes hirsuta* (Higher Basidiomycetes), by optimizing medium component with Plackett-Burman design and response surface methodology. *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 2013; 15 (6) : 595-605.
- [19] Qi Y, Xie Y, Zhang X, Zhang H. Study of DNA Extraction Methods in *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Biotechnology*, 2004, 14 (6) : 32-34. (in Chinese)
- 漆艳香, 谢艺贤, 张欣, 张辉强. 香蕉枯萎菌基因组 DNA 提取方法的研究. 生物技术, 2004, 14 (6) : 32-34.
- [20] Tang G, Zeng T, Zeng H, Lin F, Guo G, Peng M. Biological characteristics of the pathogenic-related deletion mutant  $\Delta$ Focr1-328 of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 1. *Mycosystema*, 2012, 31 (4) : 593-607. (in Chinese)
- 唐改娟, 曾涛, 曾会才, 林妃, 郭刚, 彭明. 尖镰孢古巴专化型 1 号生理小种致病相关基因敲除突变体  $\Delta$ Focr1-328 的生物学特性. 菌物学报, 2012, 31 (4) : 593-607.
- [21] López-Berges MS, Rispail N, Prados-Rosales RC, Di Pietro A. A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *Plant Cell*, 2010, 22 (7) : 2459-75.
- [22] Liu Y, Zhu Y, Chen Q, Li C, Hu G, Yu X, Liu B. The Study on antifungal activity of griseofulvin against *Fusarium oxysporum*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27 (27) : 282-287. (in Chinese)
- 刘芸, 朱育菁, 陈清西, 李智聪, 胡桂萍, 于晓杰, 刘波. 灰黄霉素对尖孢镰刀菌抑制作用的研究. 中国农学通报, 2011, 27 (27) : 282-287.
- [23] Lan J, Xiao R, Liu B, Zhu Y, Che J, Lin K. Growth kinetic model of *Fusarium oxysporum* under different pH. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2012, 20 (11) : 1532-1538. (in Chinese)
- 蓝江林, 肖荣凤, 刘波, 朱育菁, 车建美, 林抗美. pH 胁迫下尖孢镰刀菌生长动力学模型. 中国生态农业学报, 2012, 20 (11) : 1532-1538.
- [24] Ying X, Zheng F, He C, Ma W, Zeng H, Wang J, Xu B, Jin Z. Test of the biocontrol effect of *Bacillus subtilis* B215 on banana vascular wilt. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2010, 31 (8) : 1416-1419. (in Chinese)
- 殷晓敏, 郑服从, 贺春萍, 马蔚红, 曾会才, 王家保, 徐碧玉, 金志强. 枯草芽孢杆菌 B215 生物学特性及对香蕉枯萎病的生防效果评价. 热带作物学报, 2010, 31 (8) : 1416-1419.
- [25] Yang Y, Dong Z, Wang Z. Cloning and Comparative Analysis of MAPK Gene from *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Race 1 and 4. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2011, 32 (1) : 94-98. (in Chinese)
- 杨旸, 董章勇, 王振中. 香蕉枯萎病菌 2 个生理小种 MAPK 基因的克隆及序列分析. 热带作物学报, 2011, 32 (1) : 94-98.
- [26] Qi X, Yang L, Guo L, Huang J. Functional analysis of *FoAP1* in *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense infecting the host *Musa paradisica*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2013, 43 (6) : 596-605. (in Chinese)
- 齐兴柱, 杨腊英, 郭立佳, 黄俊生. *FoAP1* 基因在香蕉枯萎病致病过程中的功能分析. 植物病理学报, 2013, 43 (6) : 596-605.
- [27] Wu F, Zeng T, Chen H, Zeng H, Peng M. Phenotype analysis of the T-DNA insertion mutant Focr4-1562 of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense race 4 and its gene-knockout mutant. *Mycosystema*, 2012, 31 (4) : 584-592. (in Chinese)
- 吴飞宏, 曾涛, 陈汉清, 曾会才, 彭明. 尖镰孢古巴专化型 4 号小种 T-DNA 插入突变体 Focr4-1562 及其基因敲除子的生物学表型研究. 菌物学报, 2012, 31 (4) : 584-592.

# Biological characteristics of an Hog1 MAPK homologous gene *FoHog1* knock-out mutant of *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense

Chao Mao<sup>1,2</sup>, Pingya Chen<sup>1</sup>, Qingdong Dai<sup>1,2</sup>, Laying Yang<sup>1</sup>, Junsheng Huang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Environment and Plant Protection Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Science/Key Laboratory of Pests Comprehensive Governance for Tropical Crops, Ministry of Agriculture, Haikou 571101, Hainan Province, China

<sup>2</sup> College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, Hainan Province, China

**Abstract:** [Objective] This study was aimed to obtain a mitogen-activated protein kinase (MAPK) gene namely *FoHog1* from *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense and to verify its function. [Methods] We amplified *FoHog1* gene by PCR and RT-PCR methods and analyzed it through bioinformatics method. PEG-mediated protoplast transformation was used to create the deletion mutants of *FoHog1* gene. We analyzed different biological characteristics between knock-out strain and wild-type strain. [Results] *FoHog1* gene encoding a putative protein of 357 amino acids and its genetic relationship with different *Fusarium*'s protein. Compared with the wild-type strain, *FoHog1* deletion mutants have loose hyphae colony, less spores production, lower dry weight of hyphae and more sensitive to temperature, pH and osmotic stress. *FoHog1* deletion mutants also have reduced colonization ability compared with the wild-type strain. [Conclusion] *FoHog1* gene participated in mycelial growth, sporulation, catabolism of sodium acetate and ammonium chloride, osmotic stress response and pathogenic process with *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense Race 4.

**Keywords:** *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense, gene knock-out, biological characteristics, gene *FoHog1*, MAPK (mitogen-activated protein kinase)

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (200903049), by the National Natural Sciences Foundation of China (31371900) and by the Graduate Research and Innovation Projects in Hainan Province (S201308)

\* Corresponding author. Tel/Fax: +86-898-66969269; E-mail: H888111@126.com

Received: 25 January 2014/ Revised: 6 March 2014

## 1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页 (<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、卷、期统计表

2014 年 11 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 – 1956	半年刊	1 – 4	1 – 2
1957 – 1958	季刊	5 – 6	1 – 4
1959	季刊	7	1 – 2
1959 – 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 – 4
1963 – 1965	季刊	9 – 11	1 – 4
1966	季刊	12	1 – 2
1966 – 1972	停刊 6 年半		
1973 – 1988	季刊	13 – 28	1 – 4
1989 – 2007	双月刊	29 – 47	1 – 6
2008 – 2013	月刊	48 – 53	1 – 12
2014	月刊	54	1 – 11