



研究报告

梨果黑斑病菌 *AaCaMK* 基因克隆、生物信息学分析及其在侵染结构分化中的表达分析

蒋倩倩 毛仁燕 李永才* 毕阳 刘勇翔 黄怡 张苗 王调兰

甘肃农业大学食品科学与工程学院 甘肃 兰州 730070

摘要:【背景】钙/钙调素依赖型蛋白激酶(Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase, CaMK)是真核生物细胞钙信号途径中钙调素下游的一类重要靶蛋白,对病原物生长、胁迫响应及致病性等具有重要的调控作用。【目的】对梨果黑斑病菌互隔交链孢(*Alternaria alternata*) *AaCaMK* 基因进行克隆、生物信息学分析,并对其在侵染结构分化过程中的基因表达情况进行分析,为进一步研究梨果黑斑病菌钙离子信号途径中 *AaCaMK* 对 *A. alternata* 侵染结构分化调控的分子机制提供一定的理论依据。【方法】采用同源克隆法从 *A. alternata* JT-03 中克隆得到 3 个 *AaCaMK* 基因;通过 TMHMM、ProtScale、SOPMA 等软件对 *AaCaMK* 基因进行生物信息学分析;利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术分析 *AaCaMK* 在梨果黑斑病菌侵染结构分化过程中的表达情况。【结果】克隆得到片段分别为 1 212、1 200、2 349 bp 的 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 基因;生物信息学分析表明, *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 均含有典型的蛋白激酶超家族催化结构域(PKC_Like Superfamily),并且 *AaCaMK1* 和 *AaCaMK2* 共同含有 CaMK 类丝/苏氨酸蛋白激酶催化结构域(STKc_CaMK), *AaCaMK3* 含有 LKB1/CaMKK 类丝/苏氨酸蛋白激酶催化结构域(STKc_LKB1_CaMKK);同源性分析表明, *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 分别与玉米大斑病菌 *CAK1*、*CAK2* 和 *CAK3* 的相似性高达 94.32%、97.49%和 86.57%; RT-qPCR 分析表明, *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 在疏水及果蜡诱导 *A. alternata* 侵染结构分化过程中均显著上调表达($P < 0.05$),而且果蜡诱导作用更显著。其中 *AaCaMK1* 和 *AaCaMK2* 在附着胞形成时期(6 h)表达量为对照的 1.51 倍和 3.05 倍,而 *AaCaMK3* 在侵染菌丝形成阶段(8 h)表达量最高,为对照的 2.86 倍,并且在果蜡诱导下,这 3 个基因在芽管伸长阶段(4 h)的上调表达量显著高于疏水界面。【结论】钙信号中 *AaCaMK* 基因在疏水及果蜡诱导 *A. alternata* 侵染结构分化过程中发挥重要的调控作用。

关键词: 互隔交链孢, 钙/钙调素依赖型蛋白激酶(CaMK), 生物信息学分析, 侵染结构分化

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (31860456)

***Corresponding author:** E-mail: lyc@gsau.edu.cn

Received: 12-04-2021; **Accepted:** 11-05-2021; **Published online:** 31-05-2021

基金项目: 国家自然科学基金(31860456)

***通信作者:** E-mail: lyc@gsau.edu.cn

收稿日期: 2021-04-12; **接受日期:** 2021-05-11; **网络首发日期:** 2021-05-31

Cloning, bioinformatics and expression analysis of *AaCaMK* gene on infection structure differentiation of *Alternaria alternata*, causal agent of pear black spot

JIANG Qianqian MAO Renyan LI Yongcai* BI Yang LIU Yongxiang
HUANG Yi ZHANG Miao WANG Tiaolan

College of Food Science and Engineering, Gansu Agricultural University, Lanzhou, Gansu 730070, China

Abstract: [Background] Calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK), an important downstream target protein of calmodulin in the calcium signaling pathway of eukaryotic cells, plays an important role in pathogen growth, stress response and pathogenicity. [Objective] Cloning, bioinformatics and expression analysis of *AaCaMK* gene on infection structure differentiation of *Alternaria alternata*, casual agent of pear black spot, for further clarifying the molecular regulatory role of the *AaCaMK* gene in the calcium signal pathway on the infection structure differentiation of *A. alternata*. [Methods] The *AaCaMK* gene was cloned from *Alternaria alternata* JT-03 by homologous cloning; The *AaCaMK* gene was analyzed by TMHMM, ProtScale, SOPMA and other software; Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to analysis of the expression of *AaCaMK* on infection structure differentiation of *A. alternata*. [Results] Three isotypes of calcium/calmodulin-dependent protein kinase designated *AaCaMK1*, *AaCaMK2* and *AaCaMK3* were identified in *A. alternata* with length of 1 212, 1 200 and 2 349 bp; The bioinformatics analysis revealed that these three CaMK all contain the PKC_like superfamily domains (PKC_Like Superfamily). The conserved kinase domains of both *AaCaMK1* and *AaCaMK2* belonged to the catalytic domain of CaMK ser/thr protein kinase (STKc_CaMK) while that of *AaCaMK3* belonged to the catalytic domain of liver kinase B1 (LKB1) and calmodulin dependent protein kinase kinase (CaMKK)(STKc_LKB1_CaMKK); The homology analysis showed that the homology of *AaCaMK1*, *AaCaMK2* and *AaCaMK3* with *Setosphaeria turcica* CAK1, CAK2 and CAK3 were as high as 94.32%, 97.49% and 86.57%, respectively; RT-qPCR analysis showed that genes expression of *AaCaMK1*, *AaCaMK2* and *AaCaMK3* were all significantly upregulated during infection structure differentiation of *A. alternata* induced by hydrophobic and fruit wax coating surfaces ($P < 0.05$), and fruit wax showed more significant stimulus effects. Among them, the expression of *AaCaMK1* and *AaCaMK2* during the appressorium formation period (6 h) were 1.51 and 3.05 folds, respectively, while *AaCaMK3* had the highest expression in the infection hyphae formation period (8 h), which was 2.86 folds that of the control. Under fruit wax induction, the up-regulated expression of these three genes was significantly higher at the germ tube elongation stage (4 h) on fruit wax coating surfaces than the hydrophobic surface. [Conclusion] *AaCaMK* in calcium signaling pathway play an important regulatory role on the infection structure differentiation of *A. alternata* induced by hydrophobic and fruit wax.

Keywords: *Alternaria alternata*, calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaMK), bioinformatics analysis, infective structure differentiation

早酥梨(*Pyrus bretschneideri* 'Zaosu')是我国西北地区主要栽培的一种早熟梨品种,其果色翠绿,口感脆嫩,因此深受广大消费者的喜爱^[1]。然而其极易被互隔交链孢侵染而造成严重腐烂变质,导致大量的经济损失。互隔交链孢(*Alternaria alternata*)是引起梨果黑斑病的一种优势潜伏侵染菌,其可在芒果^[2]、柑橘^[3]、梨^[4]等多种水果的花期和果实发育

期通过各种途径侵入潜伏至果实贮藏期间发病^[5]。已有研究表明 *A. alternata* 首先通过孢子粘附于果实表面,孢子萌发形成芽管,芽管继续伸长至顶端膨大形成附着胞,附着胞进一步分化形成侵染菌丝,进而通过皮孔或表皮伤口进入寄主植物细胞,完成侵染过程^[6],但其如何感知果实表皮物化信号进而启动侵染的调控机制仍需进一步阐明。

植物病原真菌侵染初期,粘附的孢子首先感知和识别寄主表面物化信号,然后通过信号级联通路将信号传递到细胞核,激活侵染或致病相关基因表达,进而启动侵染。目前主要的信号传导通路包括G蛋白耦联信号通路、Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)级联信号通路、Cyclic Adenosine Monophosphate (cAMP)信号途径及钙离子信号通路。已有大量研究表明,MAPK级联信号、cAMP/Protein Kinase A (PKA)等信号途径参与了稻瘟病菌等植物病原真菌的菌丝生长、孢子萌发、附着胞形成、次生代谢产物诸如毒素、黑色素的产生和致病性等^[7-12]。钙离子信号途径作为真核生物重要的细胞传导途径,当病原真菌响应外界环境胁迫,G蛋白接受刺激后激活细胞核上的磷脂酶C (Phospholipase C, PLC),PLC活化后水解磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate, PIP₂),产生肌醇三磷酸(Inositol 1,4,5-Triphosphate, IP₃)和二酰甘油(Diacylglycerol, DAG),IP₃可动员胞内钙库释放钙离子,导致胞质内游离Ca²⁺浓度瞬时增加,钙调素(Calmodulin, CaM)与Ca²⁺结合后其构象发生改变,形成Ca²⁺/CaM复合物,复合物进一步激活下游钙/钙调素依赖性蛋白激酶(Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinase, CaMK)和钙调磷酸酶(Calcineurin, CaN),蛋白激酶通过磷酸化和去磷酸化作用于各种效应靶蛋白,从而促进代谢的关键酶和相关转录因子的表达,进而调控真菌细胞内的各种生理代谢活动^[13]。目前已通过药理学和遗传学方法证明钙信号途径参与了稻瘟病菌等植物病原真菌附着胞的形成^[14-18]。

CaMK作为钙信号途径中CaM下游的丝/苏氨酸蛋白激酶,其N端含有ATP结合位点、底物结合位点和特定蛋白作用位点,其为激酶的催化结构域,可催化磷酸化反应;C端含有自抑制结构域,是激酶的调节结构域。在CaM与Ca²⁺结合之前激酶始终处于抑制状态,但当两者结合后该结构域能够催化磷酸化反应,从而激活其活性。通过CaMK缺失突变株研究发现CaMK在脉孢菌分生孢子萌

发、生长发育、耐热性、氧化胁迫耐受性、生物钟和光诱导分化等生物进程中起着重要的作用^[19]。同时研究表明,CaMK参与了稻瘟病菌^[20]、构巢曲霉^[21]等真菌的孢子萌发、附着胞形成、芽管伸长、附着胞黑色素的产生和致病性等。在小麦颖枯病菌的研究中发现,CpkA基因被敲除后出现严重的产孢缺陷,而突变体CpkB的致病性没有明显变化,CpkC突变体在侵染小麦的过程中病斑扩展速度变缓,表明CaMK参与了该菌的生长发育过程^[22]。另外使用CaMK抑制剂KN93处理,发现其对盘长孢状刺盘孢菌孢子萌发、芽管伸长和附着胞形成均有一定程度的抑制,并且可阻断黑色素的产生^[23]。

尽管大量研究表明钙信号途径中CaMK参与真菌生长、次生代谢和致病性的调控,但其调控作用因病原物而异,存在多样性和复杂性。本实验室前期通过转录组学方法及钙离子通道不同途径抑制剂证明钙信号途径参与了梨果蜡质诱导的*A. alternata*孢子萌发和附着胞形成过程,并且抑制剂处理对果蜡诱导*A. alternata*附着胞形成的抑制作用大于孢子萌发。同时发现PLC活性抑制剂新霉素处理显著降低了梨果皮蜡质提取物诱导*A. alternata*附着胞的形成率,表明PLC介导的Ca²⁺信号途径参与了梨果黑斑病菌响应寄主表皮蜡质及疏水性信号^[24]。然而*A. alternata*钙离子信号途径下游CaMK的具体编码基因和调控功能尚未见报道。因此,本研究通过克隆得到了*A. alternata*中的3个AaCaMK基因,并利用生物信息学方法对该基因序列信息及编码蛋白的理化性质、结构域等进行预测。此外,还通过RT-qPCR分析其在疏水及果蜡诱导*A. alternata*侵染结构分化过程中的表达情况,为进一步深入研究钙信号途径下游激酶CaMK在疏水及果蜡诱导*A. alternata*侵染结构分化及致病性中的具体作用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

A. alternata JT-03菌株为本实验室分离保存菌

种; pEASY®-Blunt 克隆载体、大肠杆菌感受态 DH5 α 和 DNA Marker, 北京全式金生物技术有限公司。PCR 胶回收试剂盒, 南京诺维赞生物技术有限公司; TRNzol 总 RNA 提取试剂, 天根生化科技(北京)有限公司; PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser, TaKaRa 公司。

1.2 *A. alternata* 总 RNA 的提取

称取 0.1 g 在 PDA 培养基中 28 °C 培养 5 d 的 *A. alternata* 新鲜菌丝, 冰浴充分研磨后用 TRNzol 法进行总 RNA 的提取, 采用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 反转录 cDNA, 并在 -20 °C 下保存备用。

1.3 *A. alternata* 中 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 基因的克隆

根据已测序的 *Alternaria alternata* (*SRC1lrK2f*, taxon: 5599) 基因组序列, 使用软件 DNAMAN 6.0 设计 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 的扩增引物(表 1), 利用 RT-qPCR 技术, 以 *A. alternata* JT-03 的 cDNA 为模板进行扩增。PCR 反应体系(20 μ L): cDNA 1 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L, 2 \times Phanta Max Master Mix 10 μ L, ddH₂O 8 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 58–64 °C 30 s, 72 °C 1 kb/min, 33 个

循环; 72 °C 5 min。反应结束后将扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并将目的条带进行切胶回收。将胶回收产物与克隆载体 pEasy-Blunt 连接, 连接产物与大肠杆菌感受态 DH5 α 轻弹混合后转化、培养和涂板, 之后挑取单克隆培养后进行菌液 PCR 验证, 然后提取质粒送至西安擎科生物科技有限公司进行测序。

1.4 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 基因的生物信息学分析

利用 BLAST 在线分析工具进行氨基酸序列同源性分析, 以 MEGA 7.0 中的邻接(Neighbor-Joining, NJ)法构建系统发育树(Bootstrap=1 000)。*AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 生物信息学分析预测软件及网址如表 2 所示。

表 1 扩增目的基因引物序列

Table 1 Primers used for amplification of target gene

| Gene | Sequences | Length (bp) |
|----------------|--------------------------|-------------|
| <i>AaCaMK1</i> | F: ATGCTCAACAAGCTGCACGG | 1 212 |
| | R: TCACTTCTTCACGGGCTCCG | |
| <i>AaCaMK2</i> | F: ATGGCGACAAGGACTTCGAA | 1 200 |
| | R: TCATCGCTTACCCACAGGC | |
| <i>AaCaMK3</i> | F: ATGTCACCCTCCCCTACGCC | 2 349 |
| | R: CTAACCTACCAACCGGCGTCC | |

表 2 预测软件及网址

Table 2 Online prediction software and website

| Online software | Internet site | Use |
|-------------------|---|--|
| GSDS | http://gsds.gao-lab.org/ | 基因结构 Gene structure |
| ProtParam | http://web.expasy.org/protparam/ | 理化性质 Physical and chemical properties |
| TMHMM | http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/ | 跨膜结构域 Transmembrane domain |
| ProtScale | http://web.expasy.org/protscale/ | 亲/疏水性 Hydrophilic and hydrophobic |
| ProtComp 9.0 | http://linux1.softberry.com/cgi-bin/programs/ | 亚细胞定位 Subcellular localization |
| KinasePhos | http://kinasephos.mbc.nctu.edu.tw/ | 磷酸化位点 Phosphorylation site |
| SignalP 4.1 | http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ | 信号肽 Signal peptide |
| SOPMA | https://www.predictprotein.org/ | 蛋白二级结构 Protein secondary structure |
| SWISS-MODEL | https://swissmodel.expasy.org/ | 蛋白三级结构 Protein tertiary structure |
| Conserved Domains | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/ | 保守结构域 Conserved domain |

1.5 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 基因在 *A. alternata* 侵染结构分化中的表达分析

1.5.1 样品制备

称取 0.1 g 果蜡提取物溶于 10 mL 氯仿中, 配制成 0.1% 的蜡质溶液, 将配好的蜡质溶液均匀涂于疏水膜上。取 PDA 上培养 5 d 的 *A. alternata*, 加入适量无菌水配置成孢子悬浮液, 振荡混匀后分别滴加在疏水膜和已涂果蜡的疏水膜上, 分别在 28 °C 培养 2、4、6、8 h 后取样。

1.5.2 样品总 RNA 的提取

采用 TRNzol 总 RNA 提取试剂进行样品 RNA 提取, 使用 PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser 进行 cDNA 反转录, 具体操作按产品说明书进行。

1.5.3 PCR 反应条件

使用 Primer 5.0 软件设计引物, 用于 RT-qPCR (表 3)。RT-qPCR 反应体系(20 μ L): 2 \times Master Mix 10 μ L, 引物 F (10 μ mol/L) 0.5 μ L, 引物 R (10 μ mol/L) 0.5 μ L, ddH₂O 7 μ L, cDNA 2 μ L。反应条件: 95 °C 30 s; 95 °C 5 s, 60 °C 40 s, 40 个循环; 扩增反应结束后, 设置 95 °C 10 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s 来建立 PCR 产物的熔解曲线; 并从 60 °C 缓慢升温至 99 °C, 每上升 0.05 °C 检测一次荧光值, 绘制熔解

曲线。各基因转录水平分别用内参 *GAPDH* 调平, 通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法对数据进行分析, 每个样品重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 基因的克隆

从 *A. alternata* 中提取总 RNA 并反转录为 cDNA, 以 cDNA 为模板, 使用引物 *AaCaMK1*-F/R、*AaCaMK2*-F/R 和 *AaCaMK3*-F/R 进行 PCR 扩增, 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后得到目的条带 (图 1), 回收测序、比对后分别得到大小为 1 212、1 200 和 2 349 bp 的 *AaCaMK* 基因的 cDNA 序列, 分别编码 403、399 和 782 个氨基酸。

表 3 定量引物设计

Table 3 The primers used for RT-qPCR of genes

| Gene | Sequences |
|----------------|--------------------------|
| <i>AaCaMK1</i> | F: ATACCGCTTCGAAAGACAC |
| | R: CTCCAACATCATCGTAGACCA |
| <i>AaCaMK2</i> | F: CGCCAAGGTCATCAACAAGC |
| | R: CACCAGCGTCAGATTCGTAA |
| <i>AaCaMK3</i> | F: CTACACCTCGCAACCTTCTC |
| | R: GCCAATCTCCTGCTTGACTA |

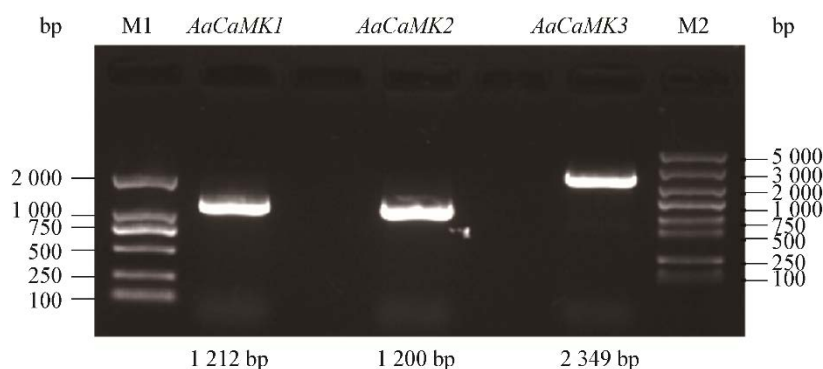


图 1 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 基因扩增电泳图

Figure 1 Amplification electrophoretogram of *AaCaMK1*, *AaCaMK2* and *AaCaMK3*

Note: M1: DL2000 DNA Marker; M2: DL5000 DNA Marker

2.2 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 基因的生物信息学分析

2.2.1 序列特征分析

对 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 这 3 个基因片段测序比对发现 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 与 NCBI 中 *A. alternata* (*SRC1lrK2f*) 中 *CaMK* 基因序列相似性分别为 99.07%、98.14% 和 99.53%，因此根据 *A. alternata* (*SRC1lrK2f*) 中 *CaMK* 基因序列，对 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 序列特征进行预测分析。使用 GSDS 软件可知 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 分别含有 4、3 和 6 个内含子。通过 ProtParam 分析可得 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 带正电荷残基数分别为 64、47 和 114，带负电荷残基数分别为 61、52 和 110，理论等电点分别为 8.40、6.24 和 8.38，因此 *AaCaMK1* 和 *AaCaMK3* 蛋白带正电，*AaCaMK2* 蛋白带负电；*AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 总平均亲水性分别为 -0.544、-0.446 和 -0.642，不稳定系数分别为 33.64、33.66 和 62.94，由此可知 *AaCaMK1* 和 *AaCaMK2* 为稳定亲水蛋白，*AaCaMK3* 为不稳定亲水蛋白。ProtComp 9.0 亚细胞定位结果表明

AaCaMK1 定位在细胞质和细胞核中，*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 分别定位于线粒体和细胞核中。

2.2.2 保守结构域

通过 Conserved Domain 软件分析可知，这 3 个 *AaCaMK* 基因所编码的蛋白均含有典型的蛋白激酶超家族催化结构域(PKC_Like Superfamily)，而且 *AaCaMK1* 和 *AaCaMK2* 共同含有 CaMK 类丝/苏氨酸蛋白激酶催化结构域(STKc_CaMK)，*AaCaMK3* 含有 LKB1/CaMKK 类丝/苏氨酸蛋白激酶催化结构域(STKc_LKB1_CaMKK) (图 2)，并且这 3 个蛋白均含有典型的 ATP 结合位点和 ACT 位点，因此这 3 个蛋白激酶均属于 CaMKs 家族。

2.2.3 跨膜结构域、信号肽和亲/疏水性分析

TMHMM 软件预测结果表明 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 均不具有跨膜结构域，属于非跨膜蛋白。SignalP 4.1 信号肽预测结果显示 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 均不存在明显的信号肽剪切位点，属于非分泌蛋白。使用 ProtScale 进行亲/疏水性分析，结果表明这 3 条蛋白序列均存在明确的亲疏水区域，并且亲水区域明显多于疏水区域(图 3)，结合前期预测结果，判定这 3 个蛋白均为亲水蛋白。

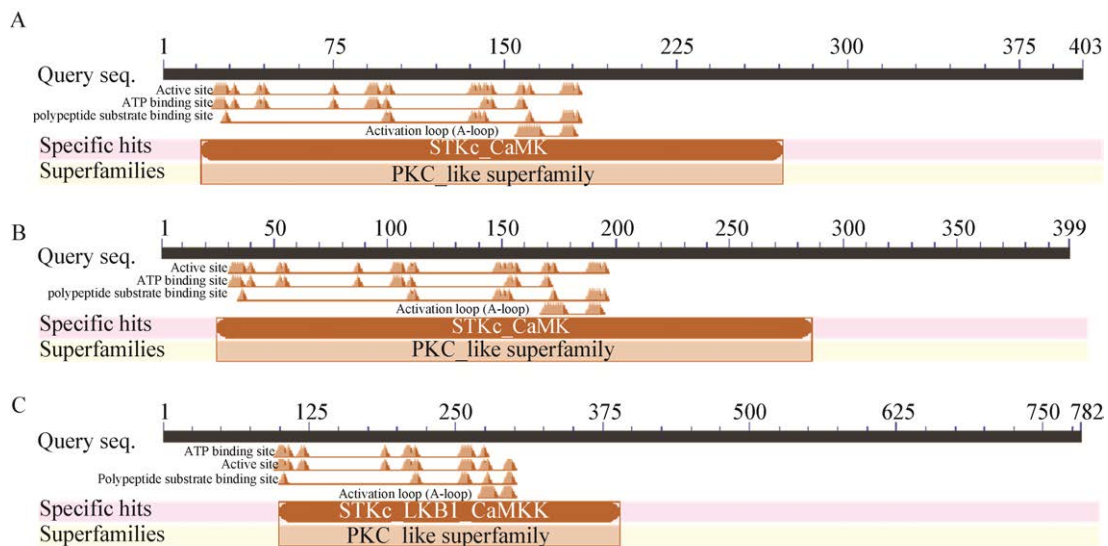


图 2 *AaCaMK1* (A)、*AaCaMK2* (B)和 *AaCaMK3* (C)保守结构域

Figure 2 Conserved domain of *AaCaMK1* (A), *AaCaMK2* (B) and *AaCaMK3* (C)

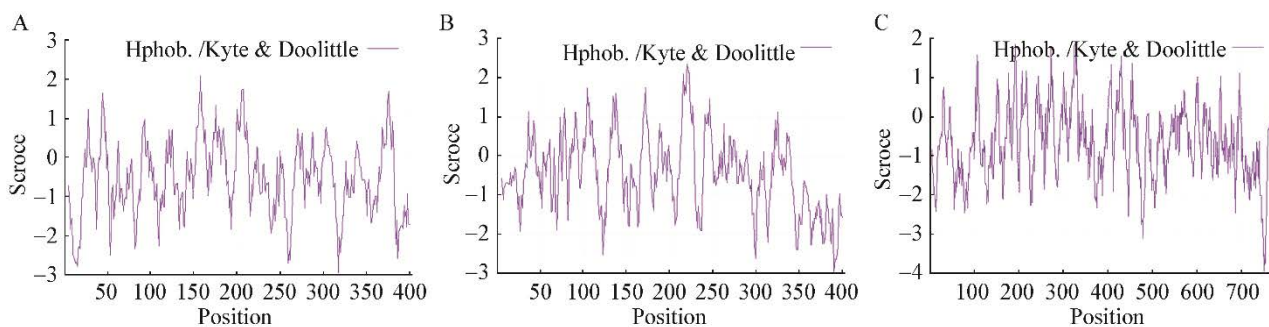


图3 AaCaMK1 (A)、AaCaMK2 (B)和 AaCaMK3 (C)亲/疏水性分析

Figure 3 Hydrophilic analysis of AaCaMK1 (A), AaCaMK2 (B) and AaCaMK3 (C)

注：水平线表示氨基酸残基数；垂直线代表相对的亲水区；零点以上为疏水区，正值越大疏水性越强；零点以下为亲水区，负值越小亲水性越强

Note: The horizontal scale indicated the number of amino acid residues; The vertical one was the relative hydrophilic scale; Points above the zero-horizontal line corresponded to hydrophilic region, the greater the positive value is, the greater the hydrophobicity is; Points below the line were hydrophilic, and the smaller the negative value is, the greater the hydrophilicity is

2.2.4 蛋白二级、三级结构预测

使用 PredictProtein 对蛋白二级结构进行预测，可知 AaCaMK1 二级结构中 α 螺旋、 β 转角、延伸链和无规则卷曲分别占 47.64%、6.45%、14.39%和 31.51%。AaCaMK2 二级结构中 α 螺旋、 β 转角、延伸链和无规则卷曲分别占 38.60%、7.02%、15.29%和 39.10%。AaCaMK3 二级结构中 α 螺旋、 β 转角、延伸链和无规则卷曲分别占 35.81%、4.48%、10.87%和 48.5%。这 3 个蛋白中二级结构的类型均以 α 螺旋结构和无规则卷曲为

主，其次为延伸链，最少的是 β 转角(图 4)。使用 SWISS-MODEL 进行蛋白三级结构同源建模分别得到 AaCaMK1、AaCaMK2 和 AaCaMK3 蛋白三级结构预测模型(图 5)。

2.2.5 磷酸化位点预测

采用 NetPhos 3.1 预测蛋白磷酸化位点，结果表明这 3 个蛋白中丝氨酸(S)和苏氨酸(T)磷酸化位点较多，酪氨酸(Y)磷酸化位点最少。进一步分析可得 AaCaMK1、AaCaMK2 和 AaCaMK3 分别含有 31、41 和 96 个潜在磷酸化位点(表 4)。

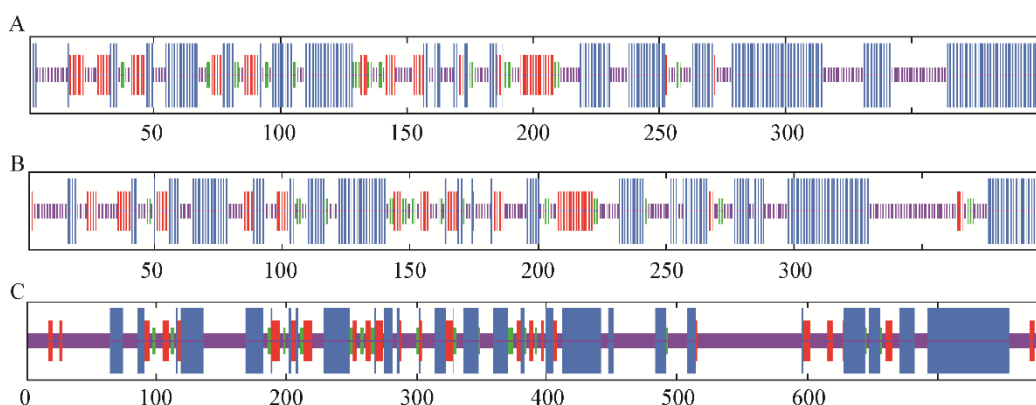


图4 AaCaMK1 (A)、AaCaMK2 (B)和 AaCaMK3 (C)二级结构预测图

Figure 4 Protein secondary structure prediction of AaCaMK1 (A), AaCaMK2 (B) and AaCaMK3 (C)

注：蓝色： α -螺旋；绿色： β -转角；红色：延伸链；紫色：无规则卷曲

Note: Blue: Alpha helix; Green: Beta turn; Red: Extended strand; Purple: Random coil

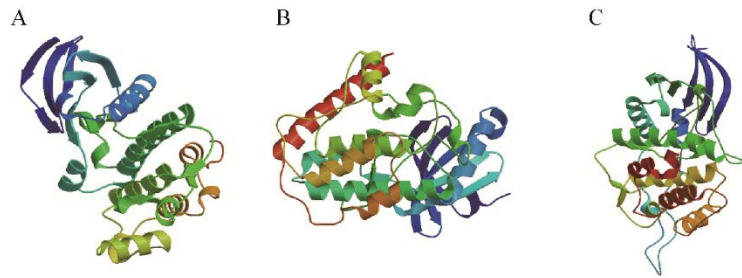


图 5 AaCaMK1 (A)、AaCaMK2 (B)和 AaCaMK3 (C)蛋白空间构象

Figure 5 The conformation simulated maps of AaCaMK1 (A), AaCaMK2 (B) and AaCaMK3 (C)

表 4 AaCaMK1、AaCaMK2 和 AaCaMK3 蛋白磷酸化位点分析

Table 4 Phosphorylation site analyses on AaCaMK1, AaCaMK2 and AaCaMK3 protein

| Name | 丝氨酸 Serine (S) | 苏氨酸 Threonine (T) | 酪氨酸 Tyrosine (Y) |
|---------|-------------------|----------------------|---------------------|
| AaCaMK1 | 15 | 9 | 7 |
| AaCaMK2 | 13 | 24 | 4 |
| AaCaMK3 | 56 | 32 | 8 |

2.2.6 AaCaMK1、AaCaMK2 和 AaCaMK3 与其他物种 CaMK 的氨基酸序列分析及系统发育分析

使用 DNAMAN 6.0 将 AaCaMK1、AaCaMK2 和 AaCaMK3 与其他物种 CaMK 氨基酸序列进行比对, 结果表明 AaCaMK1 与玉米大斑病菌 CAK1 (*Setosphaeria turcica*, ACC69195.1) 具有很高的相似性, 为 94.32%; 与稻瘟病菌 MgCaMK1 (*Pyricularia grisea*, ACB41779.1) 相似性为 66.91%; 与申克孢子丝菌 SsCaMK (*Sporothrix schenckii*, AAV80434) 相似性为 70.66%; 与构巢曲霉 AnCaMK (*Aspergillus nidulans*, XP_660016) 相似性为 70.42%; 与脉胞菌 NcCaMK (*Neurospora crassa*, XP_958895) 相似性为 71.67%。

AaCaMK2 与玉米大斑病菌 CAK2 (*Setosphaeria turcica*, ACC69196.1) 的氨基酸序列相似性最高, 为 97.49%; 与灰葡萄孢 CMK2 (*Botrytis cinerea* T4, CCD43309.1) 相似性为 71.20%; 与绿僵菌 CaMK (*Metarhizium robertsii*, EFY99670.1) 相似性为 68.63%; 与稻瘟病菌 MgCaMK2 (*Pyricularia grisea*, ACB41780.1) 相似性为 70.14%; 与构巢曲霉 AnCaMK3 (*Aspergillus nidulans*, AAD38850.1) 相

似性为 71.43%; 与脉胞菌 NcCaMK1 (*Neurospora crassa* OR74A, XP_959927.3) 相似性为 62.21%; 与盘长孢状刺盘孢菌 CgCaMK (*Colletotrichum gloeosporioides*, AAC62515.1) 相似性为 66.90%; 与捕食线虫真菌 AdCaMK (*Arthrobotrys dactyloides*, AAG43970) 相似性为 71.00%; 与棒曲霉 AcCaMK (*Aspergillus clavatus*, XP_001270915.1) 相似性为 76.43%。

AaCaMK3 与上述真菌的 CaMK 氨基酸序列相似性均很低, 但其与番茄匍柄霉 (*Stemphylium lycopersici*, KNG45111.1)、玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*, ACC69197.1)、燕麦叶枯病菌 (*Bipolaris victoriae* FI3, XP_014554105.1) 和小麦叶斑病菌 (*Pyrenophora tritici-repentis*, PZD14386.1) 的相似性分别为 89.77%、86.57%、81.96% 和 79.93%。

通过 ClustalX 软件将 AaCaMK1、AaCaMK2 和 AaCaMK3 氨基酸序列与玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*)、脉胞菌 (*Neurospora crassa*)、盘长孢状刺盘孢菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、稻瘟病菌 (*Pyricularia grisea*) 和灰葡萄孢 (*Botrytis cinerea*) 等的 CaMK 氨基酸序列进行比对分析, 使用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树 (图 6)。结果表明 AaCaMK1、AaCaMK2 和 AaCaMK3 之间在进化上亲缘关系较远, AaCaMK1 和 AaCaMK2 在进化上与 CaMK 类蛋白亲缘关系较近, 而 AaCaMK3 则与部分 CaMKK 类蛋白有较近的亲缘关系。

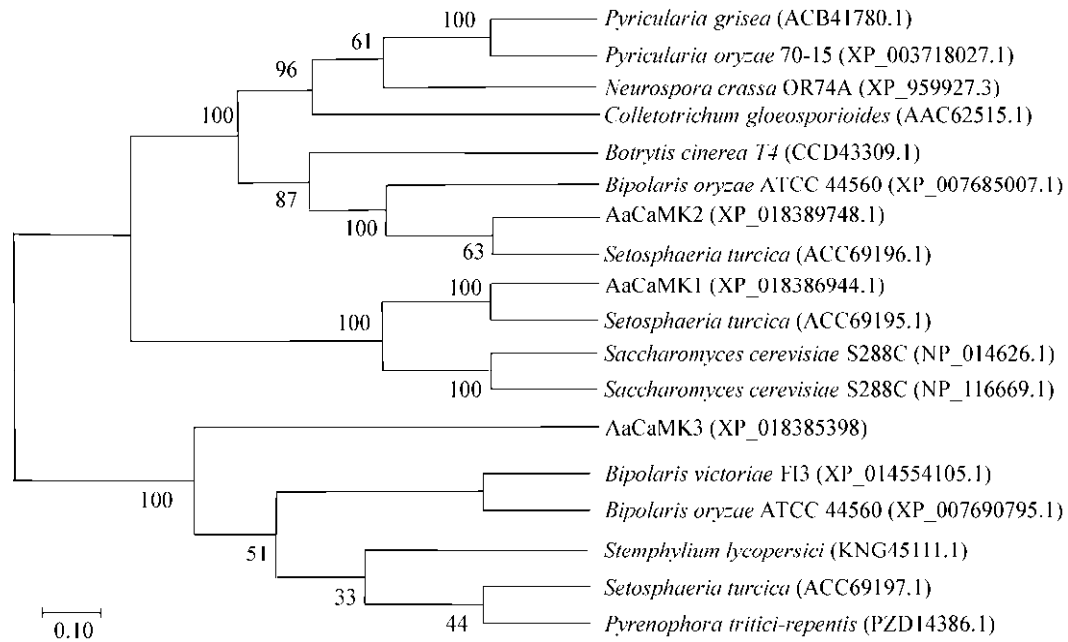


图6 AaCaMK1、AaCaMK2和AaCaMK3与其他真菌CaMK同源蛋白的系统发育分析

Figure 6 Phylogenetic analysis of AaCaMK1, AaCaMK2 and AaCaMK3 and other fungal CaMK homologous proteins

注：括号中为不同真菌CaMK蛋白登录号；距离标尺表示为单位长度置信值；分支节点上的数字为Bootstrap自展值

Note: The accession numbers of different fungal CaMK protein are in parentheses; At the branch nodes are 1 000 bootstrap replicates represented as percentage values; The distance scale is expressed as the confidence value of unit length

2.3 AaCaMK1、AaCaMK2和AaCaMK3在*A. alternata* 侵染结构分化中的基因表达分析

为了解AaCaMK1、AaCaMK2和AaCaMK3基因在*A. alternata*侵染结构不同分化阶段的表达情况，从*A. alternata*中提取总RNA，通过RT-qPCR技术分析其在*A. alternata*侵染结构不同分化时期的表达量变化情况。RT-qPCR结果显示，在疏水界面诱导下这3个AaCaMK基因在附着胞形成时期(6 h)和侵染菌丝形成时期(8 h)均显著上调表达($P < 0.05$)，其中AaCaMK1和AaCaMK2在附着胞形成时期(6 h)基因表达量达到最大，分别为对照的1.51倍和3.05倍；AaCaMK3在侵染菌丝形成时期(8 h)表达量达到最大，为对照的2.86倍，推测疏水界面诱导下AaCaMK1和AaCaMK2可能在附着胞形成时期(6 h)发挥主要作用，而AaCaMK3在侵染结构分化后期起主要作用。在果蜡诱导下，这3个基因表达水平在芽管伸长阶段(4 h)均显著高于疏水界面，诱导4 h后，其表达量分别是疏水介质下的

1.58、2.21和4.05倍。在附着胞形成阶段(6 h)，果蜡诱导均显著提高了AaCaMK的表达水平(图7)。

3 讨论

本研究首次从*A. alternata* JT-03中克隆得到了AaCaMK1、AaCaMK2和AaCaMK3基因，通过多序列比对及系统发育分析，发现AaCaMK1、AaCaMK2、AaCaMK3之间同源性较低，而且亲缘关系较远，而AaCaMK1和AaCaMK2分别与稻瘟病菌、脉胞菌、构巢曲霉等真菌CaMK具有较高的同源性，与马志斌^[25]报道稻瘟病菌MgCaMK1与脉胞菌等其他真菌CaMK相似性较高结果一致。AaCaMK3与上述真菌相似性均很低，然而其与真菌的CaMKK类具有较高的相似性，推测可能与其特定的STKc_LKB1_CaMKK结构域有关。CaMKs是一个庞大的丝/苏氨酸蛋白激酶超家族，主要包括CaMK I、CaMK II、CaMK III和CaMK IV这4种类型的成员及其他多种类型的激酶，如磷酸化酶激酶 γ

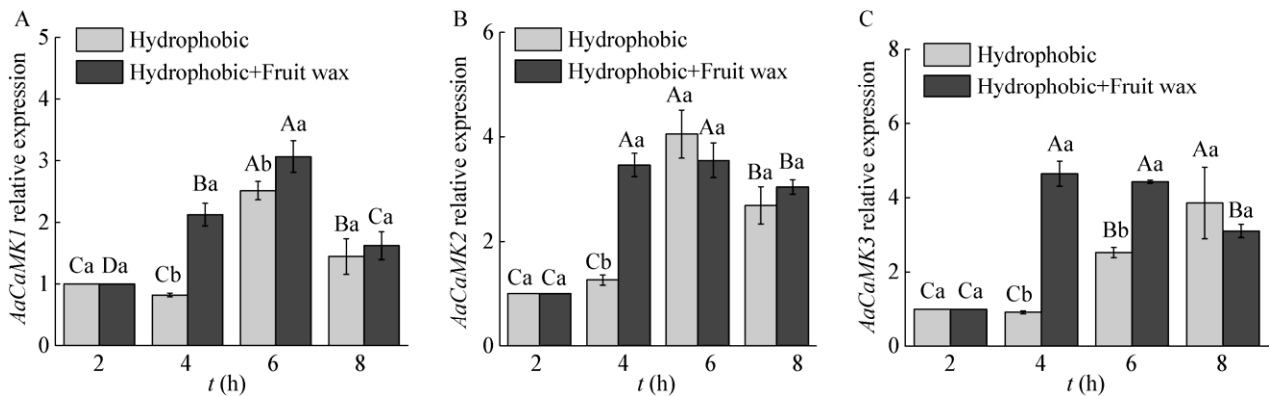


图7 *AaCaMK1* (A)、*AaCaMK2* (B)和 *AaCaMK3* (C)在疏水及果蜡诱导下表达水平

Figure 7 Relative expression analysis of *AaCaMK1* (A), *AaCaMK2* (B) and *AaCaMK3* (C) under the induction of hydrophobic and fruit wax

注: 不同大写和小写字母分别代表处理间和处理内存在显著性差异($P < 0.05$)

Note: Different capital and lowercase letters indicate significant difference between and within treatments, respectively ($P < 0.05$)

亚基(PhKG)、双皮质素样激酶(DCKL)、CaMKK 和 MAPK 活化蛋白激酶等。PKC_Like Superfamily 主要由丝/苏氨酸特异性和酪氨酸特异性蛋白激酶催化结构域组成; STKs 可催化 γ -磷酸基从结合位点转移到特定底物蛋白的丝、苏氨酸或酪氨酸残基中的羟基上。STKc_CaMK 受钙及钙调素的调控, 其通过激活 STK 结构域来调控真菌的增殖和分化过程。LKB1/CaMKK 亚家族是 CaMKs 超家族的一部分, CaMKK 与 LKB1 均为腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 的上游激酶, 其活性均依赖于 Ca^{2+} /CaM 复合物, 二者在细胞极性生长、增殖及 T 细胞代谢中发挥关键作用^[26]。这些高度保守的结构域表明 *AaCaMK* 在调控真菌侵染结构分化中具有重要的作用。但由于同一个基因家族中的不同基因所包含的结构域及作用位点不同, 因此可推断 *AaCaMK* 各基因在细胞中所起的生物学功能有所差异。

前期研究表明 *A. alternata* 在梨果表皮上的侵染过程包括孢子萌发、芽管伸长、附着胞及侵染菌丝形成 4 个阶段, 体内试验表明, 完整果皮能有效促进 *A. alternata* 附着胞和侵染菌丝的形成, 进一步通过体外洋葱表皮及载玻片涂膜技术分析表明果皮蜡质提取物及疏水性对 *A. alternata* 侵染结构的形成具有促进作用^[27]。本研究发现, 在疏水和果蜡

诱导 *A. alternata* 侵染结构分化的各个时期, 这 3 个 *AaCaMK* 基因均上调表达, 而且在附着胞(6 h)及侵染菌丝形成阶段(8 h)其表达量均显著高于对照 ($P < 0.05$), 因此表明钙信号中 *AaCaMK* 参与了疏水及果蜡诱导的 *A. alternata* 附着胞及侵染菌丝形成的调控。吴迪等^[28]研究表明, 在玉米大斑病菌分生孢子萌发及侵染结构形成过程中, *CAK1* 和 *CAK2* 分别在诱导 6 h 和 24 h 时, 表达量显著上调, 并且 *CAK2* 表达量始终高于孢子萌发时期。*CAK2* 和 *CAK3* 在诱导孢子萌发并形成附着胞的过程中表达量均高于对照, 并且在诱导 6 h 和 24 h 时, 表达显著上调 ($P < 0.05$), 这与本研究中 3 个 *AaCaMK* 基因在诱导 6 h 和 8 h 时表达量均显著上调结果类似, 因此推测这 3 个 *AaCaMK* 基因均在 *A. alternata* 附着胞及侵染菌丝形成过程中发挥积极作用。同样前期研究发现, 酿酒酵母^[29](*Saccharomyces cerevisiae*) *cmk2* 基因缺失导致孢子萌发率降低; 小麦条锈菌 *PsCaMKL1* 基因在小麦条锈菌侵染初期被高度诱导表达, 并在 6 h 时达到 20.7 倍^[30]; 盘长孢状刺盘孢菌 *CaMK* 基因在芽管伸长及附着胞形成过程中具有重要作用^[31]。秦娟等^[32]的研究发现 *PscamK* 在条锈菌芽管发育及侵染菌丝形成时期显著上调表达, 并且在诱导 6 h 时表达量最高, 为对照的 20.74 倍,

表明 *Pscamk* 基因参与了小麦条锈菌夏孢子萌发、芽管发育以及侵染结构的形成。另外, 研究还发现玉米圆斑病菌^[33](*Cochliobolus carbonum*)和尖孢镰刀菌^[34](*F. oxysporum*) *Snf1* 的缺失导致细胞壁降解酶基因表达量降低及生长缺陷。通过对捕食线虫真菌中 *CaMK* 缺失突变株的研究发现, *CaMK* 参与调节细胞生长、毒素产生和对环境胁迫的耐受性, 并且可降低产生分生孢子的能力^[35]; 同样稻瘟病菌 *CaMK* 基因缺失后产孢量下降, 孢子萌发和附着胞形成延迟, 并且致病性减弱^[36]。通过药理学实验证明 *CaMK* 特异性抑制剂 KN-62 能抑制灰霉病菌 BC4 菌株的分生孢子萌发, 降低致病性^[37], 表明 *CaMK* 参与了真菌病原物侵染结构的形成。可见 *CaMK* 作为细胞钙信号途径中钙调素下游的一类重要靶蛋白对真菌病原物的生长发育和致病性具有重要的调控作用, 但由于其调控作用因病原物及外界刺激的不同而存在差异, 因此钙信号途径下游 *AaCaMK* 在梨果黑斑病菌侵染及致病中分子机制尚需进一步揭示。

4 结论

本研究从梨果黑斑病菌中克隆得到片段分别为 1 212、1 200 和 2 349 bp 的 *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 基因, 其均含有典型的蛋白激酶超家族催化结构域(PKC_Like Superfamily), 系统发育分析表明, *AaCaMK1*、*AaCaMK2* 和 *AaCaMK3* 分别与真菌的 *CaMK* 和 *CaMKK* 有较近的亲缘关系。同时这 3 个 *AaCaMK* 基因在疏水及果蜡诱导 *A. alternata* 侵染结构分化过程中表达量均显著上调, 并且果蜡比疏水界面诱导作用更强, 可见钙离子信号途径下游激酶 *CaMK* 对疏水和果蜡诱导下 *A. alternata* 附着胞及侵染菌丝的形成具有调控作用, 该结果将为进一步通过分子手段揭示 *AaCaMK* 调控梨果黑斑病菌侵染结构分化及致病性的机制提供一定的理论依据。

REFERENCES

[1] Yang SX, Zhang HJ. Cultivation techniques of high quality

- Zaosu pear[J]. Shaanxi Journal of Agricultural Sciences, 2005, 51(1): 128-129 (in Chinese)
 杨世选, 张宏建. 优质早酥梨栽培技术[J]. 陕西农业科学, 2005, 51(1): 128-129
- [2] Prusky D. Assessment of latent infections as a basis for control of postharvest disease of mango[J]. Plant Disease, 1983, 67(7): 816
- [3] Tsai HC, Chung KR. Calcineurin phosphatase and phospholipase C are required for developmental and pathological functions in the *Citrus* fungal pathogen *Alternaria alternata*[J]. Microbiology, 2014, 160(7): 1453-1465
- [4] Li YC, Bi Y. Occurrence and infection of *Alternaria* rot of Pingguoli pear, *Pyrus pyrifolia*[J]. Acta Phytophylacica Sinica, 2006, 33(2): 131-135 (in Chinese)
 李永才, 毕阳. 苹果梨黑斑病的发生及侵染过程[J]. 植物保护学报, 2006, 33(2): 131-135
- [5] Zhang WY, Bi Y. Postharvest Diseases Control of Fruit and Vegetables[M]. Beijing: Chinese Agriculture Press, 1996. (in Chinese)
 张维一, 毕阳. 果蔬采后病害与控制[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996
- [6] Huang Q. Understanding of the infection process of plant pathogens[J]. Science & Technology Information, 2008(27): 656 (in Chinese)
 黄强. 植物病原物侵染过程的认识[J]. 科技信息, 2008(27): 656
- [7] Zhang HF. Functional analysis of G protein and MAPK signaling pathway associated genes in *Magnaporthe oryzae*[D]. Nanjing: Doctoral Dissertation of Nanjing Agricultural University, 2011 (in Chinese)
 张海峰. 稻瘟病菌 G 蛋白及 MAPK 信号途径相关基因的功能分析[D]. 南京: 南京农业大学博士学位论文, 2011
- [8] Lin CH, Yang SL, Wang NY, Chung KR. The FUS₃ MAPK signaling pathway of the *Citrus* pathogen *Alternaria alternata* functions independently or cooperatively with the fungal redox-responsive AP1 regulator for diverse developmental, physiological and pathogenic processes[J]. Fungal Genetics and Biology, 2010, 47(4): 381-391
- [9] Kawasaki L, Sanchez O, Shiozaki K, Aguirre J. SakA MAP kinase is involved in stress signal transduction, sexual development and spore viability in *Aspergillus nidulans*[J]. Molecular Microbiology, 2002, 45(4): 1153-1163
- [10] Xu JR, Hamer JE. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*[J]. Genes & Development, 1996, 10(21): 2696-2706
- [11] Zhu WJ, Zhou M, Xiong ZY, Peng F, Wei W. The cAMP-PKA signaling pathway regulates pathogenicity, hyphal growth, appressorial formation, conidiation, and

- stress tolerance in *Colletotrichum higginsianum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1416
- [12] Lee YH, Dean RA. cAMP regulates infection structure formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*[J]. *The Plant Cell*, 1993: 693-700
- [13] Thines E, Eilbert F, Sterner O, Anke H. Signal transduction leading to appressorium formation in germinating conidia of *Magnaporthe grisea*: effects of second messengers diacylglycerols, ceramides and sphingomyelin[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, 156(1): 91-94
- [14] Lee SC, Lee YH. Calcium/calmodulin-dependent signaling for appressorium formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*[J]. *Molecules and Cells*, 1998, 8(6): 698-704
- [15] Wang LA, Wang YC, Li CW, Zheng XB. Ca²⁺ signaling pathway involved in *Magnaporthe grisea* conidium germination and appressorium formation[J]. *Mycosystema*, 2003, 22(3): 457-465 (in Chinese)
王立安, 王源超, 李昌文, 郑小波. Ca²⁺信号途径参与稻瘟病菌分生孢子萌发及附着胞形成的调控[J]. *菌物系统*, 2003, 22(3): 457-465
- [16] Ma X, Shi J, Li Y, Han Y. Ascospore germination characteristics and the ultrastructure observation of fruit body of *Pseudopeziza medicaginis*[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(11): 3564-3576 (in Chinese)
马新, 史娟, 李杨, 韩宇. 苜蓿假盘菌子囊孢子萌发特性及子实体超微结构观察[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3564-3576
- [17] Zhao JX, Chen Y, Wang LA. Ca²⁺ signaling pathway involved in *Bipolaris maydis* conidium germination and appressorium formation[J]. *Microbiology China*, 2005, 32(4): 1-4 (in Chinese)
赵俊霞, 陈颖, 王立安. 钙信号途径参与小斑病菌致病过程的调控[J]. *微生物学通报*, 2005, 32(4): 1-4
- [18] Wang J, Xie YX, Pu JJ, Zhang X, Qi YX, Huang JS. Calcium/calmodulin-dependent signaling for prepenetration development in *Phyllosticta musarum*[J]. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 2008, 29(5): 641-647 (in Chinese)
汪军, 谢艺贤, 蒲金基, 张欣, 漆艳香, 黄俊生. 香蕉黑星病菌侵入前发育的 Ca²⁺/CaM 依赖信号研究[J]. *热带作物学报*, 2008, 29(5): 641-647
- [19] Kumar R, Tamuli R. Calcium/calmodulin-dependent kinases are involved in growth, thermotolerance, oxidative stress survival, and fertility in *Neurospora crassa*[J]. *Archives of Microbiology*, 2014, 196(4): 295-305
- [20] Hu F, Wang CL, Lu JP, Lin FC. Analysis on cloning and function of dependent *CaMK* gene of *Magnaporthe oryzae*[J]. *Journal of Xinjiang Agricultural University*, 2008, 31(4): 20-24 (in Chinese)
胡峰, 王纯利, 卢建平, 林福呈. 稻瘟病菌病程相关基因 *CaMK* 的克隆与功能分析[J]. *新疆农业大学学报*, 2008, 31(4): 20-24
- [21] Joseph JD, Means AR. Identification and characterization of two Ca²⁺/CaM-dependent protein kinases required for normal nuclear division in *Aspergillus nidulans*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(49): 38230-38238
- [22] Solomon PS, Rybak K, Trengove RD, Oliver RP. Investigating the role of calcium/calmodulin-dependent protein kinases in *Stagonospora nodorum*[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(2): 367-381
- [23] Kim YK, Li D, Kolattukudy PE. Induction of Ca²⁺-calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(19): 5144-5150
- [24] Huang Y, Li YC, Li DM, Bi Y, Prusky DB, Dong YP, Wang TL, Zhang M, Zhang XM, Liu YX. Phospholipase C from *Alternaria alternata* is induced by physicochemical cues on the pear fruit surface that dictate infection structure differentiation and pathogenicity[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1279
- [25] Ma ZB. Study on the clone and expression of Ca²⁺/CaM dependent protein kinase genes of *Magnaporthe grisea*[D]. Shijiazhuang: Master's Thesis of Hebei Normal University, 2008 (in Chinese)
马志斌. 稻瘟病菌钙/钙调素依赖蛋白激酶基因的克隆及表达研究[D]. 石家庄: 河北师范大学硕士学位论文, 2008
- [26] Marchler-Bauer A, Bo Y, Han LY, He J, Lanczycki CJ, Lu SN, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR, et al. CDD/SPARCLE: functional classification of proteins via subfamily domain architectures[J]. *Nucleic Acids Research*, 2017, 45(D1): D200-D203
- [27] Tang Y. Effect of cuticular wax of pingguoli pear from developing and storage on *Alternaria alternata* pre-penetration process[D]. Lanzhou: Master's Thesis of Gansu Agricultural University, 2016 (in Chinese)
唐瑛. 发育及贮藏期苹果梨果皮蜡质对 *Alternaria alternata* 侵染的影响[D]. 兰州: 甘肃农业大学硕士学位论文, 2016
- [28] Wu D, Zhao ZT, Li ZY, Yang Z, Tan YH, Shen S, Cao ZY, Dong JG, Tian FF, Hao ZM. Identification and expression pattern analysis of calcium/calmodulin-dependent protein kinases(CaMKs) gene family in *Setosphaeria turcica*[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(8): 1020-1030 (in Chinese)
吴迪, 赵梓彤, 李志勇, 杨峥, 檀迎会, 申坤, 曹志艳, 董

- 金皋, 田菲菲, 郝志敏. 玉米大斑病菌钙/钙调素依赖性蛋白激酶(CaMK)基因家族的鉴定与表达模式分析[J]. 农业生物技术学报, 2015, 23(8): 1020-1030
- [29] Pausch MH, Kaim D, Kunisawa R, Admon A, Thorner J. Multiple Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase genes in a unicellular eukaryote[J]. The EMBO Journal, 1991, 10(6): 1511-1522
- [30] Jiao M, Yu D, Tan CL, Guo J, Lan DY, Han ES, Qi T, Voegelé RT, Kang ZS, Guo J. Basidiomycete-specific *PsCaMKLI* encoding a CaMK-like protein kinase is required for full virulence of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*[J]. Environmental Microbiology, 2017, 19(10): 4177-4189
- [31] Flaishman MA, Hwang CS, Kolattukudy PE. Involvement of protein phosphorylation in the induction of appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides* by its host surface wax and ethylene[J]. Physiological and Molecular Plant Pathology, 1995, 47(2): 103-117
- [32] Qin J, Huang CM, He FX, Zhu XG, Zhang Y, Kang ZS, Guo J. Function of a calcium-dependent protein kinase gene *PsCaMK* in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2014, 54(11): 1296-1303 (in Chinese)
秦娟, 黄传明, 何付新, 朱晓果, 张阳, 康振生, 郭军. 小麦条锈菌钙调素依赖蛋白激酶基因 *PsCaMK* 的功能[J]. 微生物学报, 2014, 54(11): 1296-1303
- [33] Tonukari NJ, Scott-Craig JS, Walton JD. The *Cochliobolus carbonum* *SNF1* gene is required for cell wall-degrading enzyme expression and virulence on maize[J]. The Plant Cell, 2000, 12(2): 237
- [34] Ospina-Giraldo MD, Mullins E, Kang S. Loss of function of the *Fusarium oxysporum* *SNF1* gene reduces virulence on cabbage and *Arabidopsis*[J]. Current Genetics, 2003, 44(1): 49-57
- [35] Zhen ZY, Zhang GS, Yang L, Ma N, Li Q, Ma YX, Niu XM, Zhang KQ, Yang JK. Characterization and functional analysis of calcium/calmodulin-dependent protein kinases (CaMKs) in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2019, 103(2): 819-832
- [36] Gu Y. Cloning and functional analysis of *CMK*, *PLA2* and *PLC* genes in *Magnaporthe oryzae* involving in Ca^{2+} signaling pathway[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2008 (in Chinese)
顾轶. 稻瘟病菌 Ca^{2+} 信号途径相关基因 *CMK*、*PLA2* 以及 *PLC* 的克隆和功能分析[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2008
- [37] Dong YX, Xing JH, Jia J, Weng QY, Hao ZM, Dong JG. Cloning and pharmaceutical analysis of *CaMK* gene of *Botrytis cinerea*[J]. Frontiers of Agriculture in China, 2011, 5(3): 299-304