

特异性 MEK 抑制剂 U0126 对玉米大斑病菌孢子萌发、附着胞产生和致病性的影响

范永山^{1,2}, 谷守芹¹, 董金皋¹, 董秉芳¹

(¹河北农业大学真菌毒素实验室, 保定 071001; ²唐山师范学院生物科学技术系, 唐山 063000)

摘要: 【目的】研究 MAPK 信号转导途径对玉米大斑病菌生长、发育和致病性的调控作用, 为明确玉米大斑病菌和玉米之间互作的分子机制奠定基础, 对玉米大斑病的有效防治也有重要的理论意义。【方法】利用 MEK 特异性抑制剂 U0126 处理玉米大斑病菌, 观测该抑制剂对玉米大斑病菌孢子萌发、附着胞发育和致病性的影响。【结果】U0126 对玉米大斑的菌落形态和生长速度没有显著影响, 可以形成正常的菌丝、分生孢子, 但分生孢子萌发时间晚, 芽管短, 分生孢子萌发百分率和附着胞产生数目下降, 玉米叶片的发病时间延迟 2~3 d, 发病率下降 30%左右。在一定浓度范围内, U0126 对分生孢子萌发和附着胞产生的抑制程度随着浓度增加而上升, 但随着处理时间的延长而下降。【结论】玉米大斑病菌的分生孢子萌发、附着胞产生和对感病玉米叶片的致病能力受 U0126 抑制的 MAPK 信号转导途径调节。

关键词: 玉米大斑病菌; MAPK; U0126; 分生孢子萌发; 附着胞产生; 致病性

Effects of the MEK-Specific Inhibitor U0126 on the Conidial Germination, Appressorium Production and Pathogenicity of *Setosphaeria turcica*

FAN Yong-shan^{1,2}, GU Shou-qin¹, DONG Jin-gao¹, DONG Bing-fang¹

(¹Mycotoxin Laboratory, Agricultural University of Hebei, Baoding, 071001;

²Biological Science and Technology Department, Tangshan Teacher's College, Tangshan 063000)

Abstract: 【Objective】Systematic studies on the effects of MAPK (Mitogen activated protein kinase) signal transduction pathway on the growth, development and pathogenicity of *Setosphaeria turcica* will not only help us to understand the molecular mechanism of pathogen-host interaction, but also benefit the effective control of the diseases caused by *S. turcica*. 【Method】U0126, the specific MEK inhibitor, was used to treat *S. turcica* before observing the conidial germination, appressorium production and pathogenicity of the pathogen. 【Result】There was no significant effect of U0126 on the pathogen's colony morphology and mycelium growth. After treatment with U0126, the mycelium and conidia were normal, but the conidial germination, appressorium production and pathogenicity to susceptible corn leaves were significantly inhibited. Under the definite concentration scope, U0126 increased the inhibition degree to conidial germination and appressorium production with the increase of U0126 concentration, but the inhibition degree decreased with elongation of the treatment time. 【Conclusion】The conidial germination, appressorium production and pathogenicity to susceptible corn leaves are regulated by the MAPK pathway inhibited by U0126.

Key words: *Setosphaeria turcica*; MAPK; U0126; Conidial germination; Appressorium production; Pathogenicity

0 引言

【本研究的重要意义】目前的研究表明, 许多植

物病原真菌的生长、发育都受细胞外信号转导途径调控, 如 MAPK、cAMP 及 Ca²⁺途径等都有与之相关的报道^[1,2], 尤其是 MAPK 途径对植物病原真菌发育和

收稿日期: 2005-10-10; 接受日期: 2005-12-02

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471126)和河北省科技厅博士基金项目(05547007D-2)

作者简介: 范永山(1971-), 男, 河北滦县人, 副教授, 博士研究生, 研究方向为分子植物病理学。Tel: 0315-3863173; E-mail: fanyongshan@126.com。通讯作者, 董金皋, Tel: 0312-7528266; Fax: 0312-7528266; E-mail: dongjingao@126.com

致病性调节作用的研究最多^[3]。深入研究 MAPK 信号转导途径对玉米大斑病菌生长和发育的调控作用, 有利于研究病菌的发生、发展和侵入机制, 对研究病原真菌和寄主植物之间的互作以及植物病害防治也有重要的理论意义。【前人研究进展】真菌和动物中的许多 MAPK 基因是同源的^[4], 说明真菌在进化上与动物更接近。实践证明, 研究动物中 MAPK 信号转导途径的技术完全可以应用到植物病原真菌的研究中来, 目前研究动物 MAPK 途径的功能时最常用的一个方法就是利用 MAPK 途径的特异性抑制剂。其中, MEK 特异性抑制剂 U0126 (1,4-二氨基-2,3-氧基-1,4-双[2-氨基苯基硫代]丁二烯) 是目前应用最广泛、最有效的一种抑制剂, 如利用它研究 MAPK 途径对鼠卵母细胞减数分裂周期的调控作用^[5]、急性白血病引起的细胞凋亡现象^[6]、病灶性脑贫血炎症反应因子的基因表达^[7]等等。U0126 可以与 MEK 非竞争结合, 抑制其催化活力, 从而阻止下游 MAPK 的磷酸化。它最突出的特点是无论 MEK 的活化状态如何, U0126 都会抑制下游 MAPK 的活化, 其它一些抑制剂只能与没有活化的 MEK 结合, 从而限制了它们的应用。【本研究切入点】玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*) 是玉米上的重要病原菌, 引起的玉米大斑病是玉米上的重要叶部病害, 在流行年份常造成重大的经济损失。玉米大斑病的发生依赖于玉米大斑病菌的成功侵入和产生致病毒素-HT-毒素^[8], 目前的研究主要集中在病菌的侵入方式和致病的病理、生理机制等方面, 对玉米大斑病菌如何感受细胞外信号刺激, 将信号传导到细胞内, 并调控与侵入或致病性有关基因表达的细胞信号转导途径还不清楚。【拟解决的关键问题】拟利用 U0126 研究 MAPK 途径对玉米大斑病菌生长发育和致病性的调节作用, 以探索玉米大斑病菌 MAPK 途径的可能功能。

1 材料与方法

1.1 试验时间、地点

本研究于 2003~2004 年在河北农业大学真菌毒素实验室进行。

1.2 试验材料

1.2.1 玉米自交系 玉米大斑病鉴别寄主: B37, B37Ht1 和 B37Ht2, 由中国农业科学院玉米种质中心提供。

1.2.2 病菌样本 本研究使用的 2 个病菌菌株 (01-11 和 01-23) 均为玉米大斑病菌 1 号生理小种, 毒力公式为 *Ht2,Ht3,HtN/Ht1*, 由河北农业大学真菌毒

素实验室保存。

1.3 试验方法

1.3.1 药品规格 本研究室使用的 U0126 购自 Promega 公司, 编号为 V112A, 首先用 DMSO (二甲基亚砜, HPLC grade, Sangon, 编号 DT0163) 将其溶解, 配制成 $100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的母液 (高浓度的母液有助于减少 DMSO 对试验的影响), 再用无菌水配制成试验浓度。其它药品和染色剂均为化学纯。

1.3.2 U0126 对玉米大斑病菌菌丝发育的影响 在灭菌后约 40°C 的 PDA 培养基中加入 U0126 母液, 使 U0126 终浓度分别为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 然后接种培养 7 d 的玉米大斑病菌菌盘 (直径为 5 mm), 25°C 条件下培养, 观测病菌的菌落形态、生长速率和分生孢子、附着胞的发育情况。以在 PDA 培养基中加入与 U0126 母液等量的 DMSO 处理为空白对照。每个处理至少重复 3 次。

1.3.3 U0126 对玉米大斑病菌分生孢子萌发的影响

在浓度为 10^5 孢子 $\cdot\text{ml}^{-1}$ 的分生孢子悬浮液中加入 U0126 母液, 使 U0126 的终浓度分别达到 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $60 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 25°C 下不同处理时间取样, 显微镜下观测分生孢子的萌发百分率。以在分生孢子悬浮液中加入与 U0126 母液等量的 DMSO 处理为空白对照。每个处理重复 3 次。按以下公式计算 U0126 对分生孢子萌发的抑制百分率 (%)。

$$\text{抑制百分率}(\%) = (\text{CK}_{\text{孢子萌发率}} - \text{处理}_{\text{孢子萌发率}}) / \text{CK}_{\text{孢子萌发率}} \times 100$$

1.3.4 U0126 对玉米大斑病菌附着胞产生的影响

制备含有 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 的玉米大斑病菌分生孢子悬浮液, 按范永山等^[9]的方法分别在载玻片 (Sangon) 和 3 种 4~6 叶期供试玉米自交系的离体叶片上观测附着胞数目和形态。以分生孢子悬浮液中加入与 U0126 母液等量的 DMSO 处理为空白对照。每个处理至少重复 3 次。按以下公式计算 U0126 对附着胞产生的抑制百分率 (%)。

$$\text{抑制百分率}(\%) = (\text{CK}_{\text{附着胞数}} - \text{处理}_{\text{附着胞数}}) / \text{CK}_{\text{附着胞数}} \times 100$$

1.3.5 U0126 对玉米大斑病菌致病性的影响 制备浓度为 10^5 孢子 $\cdot\text{ml}^{-1}$ 的菌株 01-11 的新鲜分生孢子悬浮液, 加入 U0126 母液使终浓度分别为 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 U0126, 25°C 放置 30 min, 混匀后取 20 μl 滴加到 2 层 5 mm^2 的定性滤纸片上,

温室内定点接种 4~6 叶期感病玉米自交系 B37 和 B37*Ht1* 的叶片, 每株玉米接种 3 个叶片, 每个叶片只接种 1 点, 接种部位在叶子中部, 每个处理至少接种 3 株玉米。接种后保湿 24 h, 定期测定叶片的发病率和病斑面积。发病率(%)=发病叶片数/接种叶片数×100, 病斑面积(mm²)=病斑长(mm)×病斑宽(mm)×叶面积系数 0.7。以孢子悬浮液中加入与 U0126 母液等量的 DMSO 处理为空白对照。

1.3.6 统计分析 对原始数据用 Microsoft Excel 软件中的统计分析工具进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 U0126 对玉米大斑病菌菌丝发育的影响

在 PDA 培养基中加入 U0126 后, 定时观察玉米大斑病菌的菌落形态, 并对菌落的生长速率进行测定。试验结果表明, 10~30 μmol·L⁻¹ U0126 对玉米大斑病菌的菌落形态没有明显的影响, 各处理间菌落的生长速率没有显著差异(表 1), 可以产生正常的分生孢子, 分生孢子也可以正常萌发和产生附着胞。

表 1 U0126 对玉米大斑病菌菌丝生长速率的影响(菌落直径, mm)

Table 1 Effect of the MEK-specific inhibitor (U0126) on mycelium growth of *Setosphaeria turcica* (colony diameter, mm)

菌株 Isolate	U0126 (μmol·L ⁻¹)	培养时间 Incubation time (d)							
		1	2	3	4	5	6	7	
01-11	10	5.2	6.2	10.2	19.0	36.7	61.8	80.2	a**
	20	5.2	6.0	9.8	18.8	35.0	58.3	78.3	a
	30	5.2	6.0	9.7	18.3	34.5	58.8	79.5	a
	CK1*	5.2	6.5	11.0	21.3	39.5	65.2	86.5	a
	CK2	5.5	6.7	11.0	20.2	36.2	64.0	84.8	a
01-23	10	5.2	6.5	10.7	20.2	35.3	62.0	84.3	a
	10	5.0	5.5	8.2	17.2	23.8	46.7	61.7	a
	20	5.0	5.7	8.7	18.2	25.3	52.0	67.7	a
	30	5.0	5.2	8.0	16.3	25.2	49.7	65.7	a
	CK1	5.0	5.7	9.5	18.3	25.5	52.7	68.8	a
	CK2	5.0	6.0	9.7	20.2	29.8	54.8	76.7	a
	CK3	5.0	5.7	8.8	17.3	26.0	51.7	74.3	a

*CK1、CK2 和 CK3 分别为 10、20 和 30 μmol·L⁻¹ U0126 处理的对照处理; **在 0.05 水平上的差异显著性分析

*CK1, CK2 and CK3 are controls of 10, 20 and 30 μmol·L⁻¹ U0126 treatment respectively; **Variance analysis at level 0.05

2.2 U0126 对玉米大斑病菌分生孢子萌发的影响

在玉米大斑病菌 01-11 和 01-23 菌株的分生孢子悬浮液中加入一定浓度的 U0126, 观测不同处理时间下分子孢子的萌发百分率(图 1)。结果表明:(1)

10~60 μmol·L⁻¹ U0126 对玉米大斑病菌 01~11 和 01~23 菌株的分生孢子萌发都有较强的抑制能力, 抑制程度达 30%~100%。(2) 菌株间的表现不同。在 10~30 μmol·L⁻¹ 范围内, U0126 对菌株 01~11 分生孢子萌发的抑制百分率迅速上升, 在 30~60 μmol·L⁻¹ 范围内, 抑制百分率趋于稳定。在 10~60 μmol·L⁻¹ 范围内, U0126 对菌株 01~23 分生孢子萌发的抑制百分率缓慢上升, 浓度为 60 μmol·L⁻¹ 时, 抑制百分率趋于稳定。(3) 在相同浓度下, 在处理时间为 1~2 d 时, U0126 的抑制作用最强, 随着处理时间的延长, 抑制能力逐渐下降, 到第 6 天时抑制能力下降了 20%~50%。

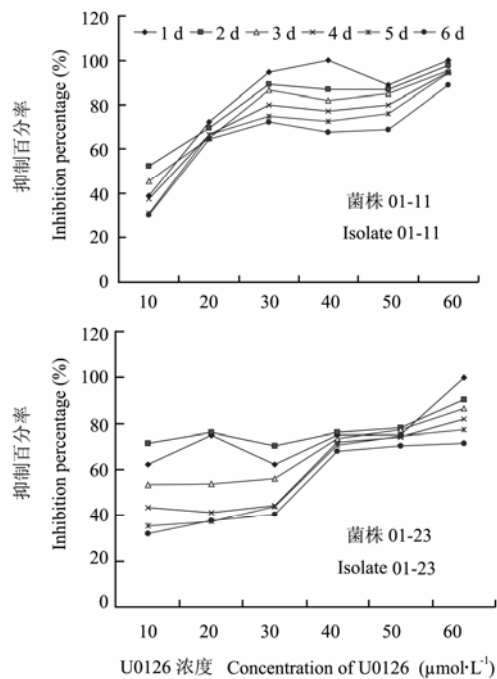


图 1 U0126 对玉米大斑病菌菌株分生孢子萌发的抑制作用 [抑制百分率%=孢子萌发率(CK-处理)/CK×100]

Fig.1 Inhibited effect of U0126 on the conidial germination of *Setosphaeria turcica* (Inhibition percentage(%) = Germination rate (CK-Treatment)/CK×100)]

2.3 U0126 对玉米大斑病菌附着胞产生的影响

U0126 处理菌株 01-11 的分生孢子, 观测不同处理时间时, 附着胞在载玻片上的产生数目。结果表明, 10~30 μmol·L⁻¹ 的 U0126 对载玻片上玉米大斑病菌附着胞的产生有较强的抑制作用, 抑制程度达 34%~100%, 随着浓度的增加, 抑制能力增强, 但随着处理

时间的延长, 抑制作用开始减弱, 第 1~2 天时, 抑制作用最强, 第 3 天时抑制作用显著下降, 第 3~6 天时, U0126 的抑制作用比较稳定, 到第 7 天时, 抑制作用再次下降 (图 2)。

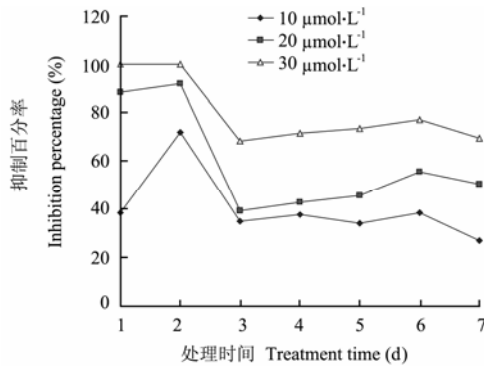


图 2 U0126 对玉米大斑病菌菌株 01-11 在载玻片上附着胞产生的抑制作用(抑制百分率%=附着胞数(CK-处理)/CK×100)

Fig.2 Inhibited effect of U0126 on the appressorium production of isolate 01-11 of *Setosphaeria turcica* on glass plate (Inhibition percentage(%) = Appressorium number (CK-Treatment)/CK×100)

在离体叶片上, (1) U0126 对 01-11 菌株在 3 种玉米自交系上附着胞的产生都有一定的抑制作用, 随着浓度的增加, U0126 的抑制能力有所增强, 但随着处理时间的延长, 抑制作用开始减弱; (2) 不同玉米自交系的表现不同。U0126 对 01-11 菌株在 B37 和 B37Ht1 玉米叶片上附着胞产生的抑制作用要强于在 B37Ht2 玉米叶片上。U0126 对 01-11 菌株在 B37 和 B37Ht1 玉米叶片上附着胞产生的抑制作用可达 31.3%~100.0%, 而对 01-11 菌株在 B37Ht2 玉米叶片上附着胞产生的抑制作用仅为 6.5%~50.0%, 10 μmol·L⁻¹ U0126 对 B37Ht2 玉米叶片上 01-11 菌株附着胞的产生几乎没有抑制作用 (表 2)。

离体接种的玉米叶片经过染色透明后, 显微观察发现, 经抑制剂处理的孢子悬浮液接种后, 分生孢子不能萌发或很少萌发 (图 3-a)。萌发的分生孢子产生的附着胞有的不能侵入到寄主组织中 (图 3-b), 即使侵入到寄主组织内, 在寄主组织内也难以扩展 (图 3-c), 肉眼观察到的仅为一个小的、不扩展的侵染点。

2.4 U0126 对玉米大斑病菌致病性的影响

U0126 处理菌株 01-11 的分生孢子后活体接种感病玉米自交系叶片, 结果发现 U0126 处理后玉米叶片的发病时间延迟 2~3 d, 发病率下降 30%左右, 处理

表 2 U0126 对玉米大斑病菌菌株在玉米叶片上附着胞产生的影响 (100 倍视野下的附着胞平均数目)

Table 2 Effect of U0126 on the appressorium production of isolate 01-11 of *Setosphaeria turcica* on corn leaves (Average appressorium number of five 100 fold visual fields under microscope)

U0126 (μmol·L ⁻¹)	处理时间 2d Treatment time: 2d			处理时间 4d Treatment time: 4d			处理时间 6d Treatment time: 6d		
	B37	B37Ht1	B37Ht2	B37	B37Ht1	B37Ht2	B37	B37Ht1	B37Ht2
10	1.2	1.4	3.8	2.0	4.2	6.5	6.6	7.0	11.5
20	0.0	0.0	3.5	1.6	2.7	5.5	3.0	3.5	9.0
30	0.0	0.0	3.2	1.2	1.6	4.4	1.5	1.4	6.7
CK1	2.4	4.6	4.5	4.8	8.5	9.2	9.6	10.4	12.3
CK2	2.4	4.6	4.5	4.8	8.5	9.2	9.6	10.4	12.3
CK3	2.4	4.6	4.5	4.8	8.5	9.2	9.6	10.4	12.3

时间大于 2~3 d 后, U0126 对发病率的抑制作用迅速下降, 但 3 种供试浓度间差异不显著 (表 3)。

表 3 U0126 对玉米大斑病菌致病性的影响 [(发病率(%)=发病叶片数/接种叶片数×100)]

Table 3 Effect of U0126 on the pathogenicity of *Setosphaeria turcica* on corn leaves [(Disease percentage (%)=diseased leaf number/inoculated leaf number×100)]

接种时间 Inoculation time (d)	B37				B37Ht1			
	CK	10 μmol·L ⁻¹	20 μmol·L ⁻¹	30 μmol·L ⁻¹	CK	10 μmol·L ⁻¹	20 μmol·L ⁻¹	30 μmol·L ⁻¹
1	11.1	0.0	0.0	0.0	22.2	0.0	0.0	0.0
2	22.2	0.0	0.0	0.0	22.2	0.0	0.0	0.0
3	22.2	11.1	0.0	0.0	22.2	22.2	0.0	0.0
4	33.3	22.2	22.2	11.1	33.3	33.3	22.2	22.2
5	55.6	44.4	44.4	33.3	44.4	33.3	22.2	33.3
6	55.6	44.4	55.6	44.4	44.4	44.4	22.2	33.3
7	66.7	55.6	55.6	55.6	66.7	55.6	44.4	33.3
8	77.8	55.6	55.6	55.6	88.9	66.7	66.7	44.4
9	88.9	55.6	55.6	55.6	100.0	66.7	66.7	44.4

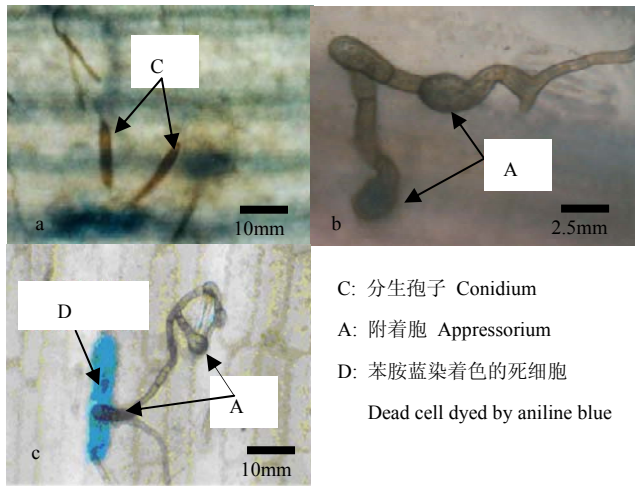
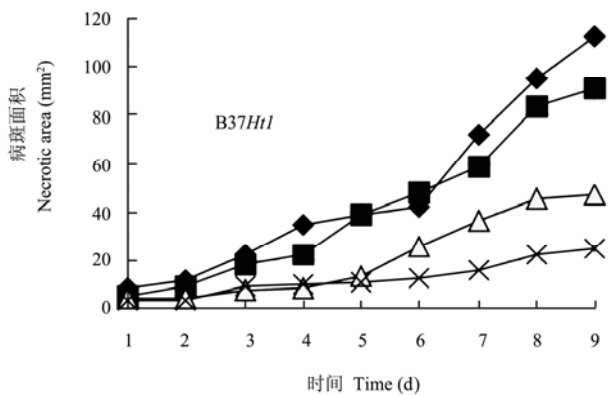
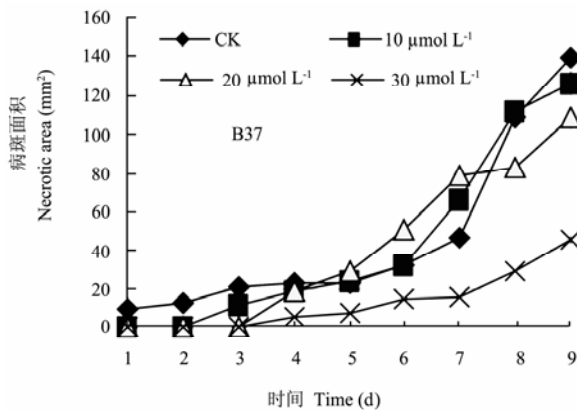


图 3 $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 处理玉米大斑病菌菌株 01-11 的分生孢子后在 B37 离体玉米叶片上分生孢子萌发和附着胞侵染情况

Fig.3 *In vitro* observation of conidium germination and appressorium invasion of isolate 01-11 on the B37 corn leaves after treated by $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126



病斑面积(mm^2)=侵染长度(mm)×侵染宽度(mm)×0.7 Necrotic area (mm^2)=lesion length (mm)×lesion width×0.7

图 4 U0126 对玉米大斑病菌 01-11 菌株在感病寄主上所致病斑面积的影响

Fig. 4 Effect of U0126 on the necrotic area on susceptible corn leaves inoculated with isolate 01-11 of *Setosphaeria turcica*

叶病菌 (*A. mali*)、葱黑斑病菌 (*A. porri*)、万寿菊灰霉 (*Botrytis cinerea*)、白菜黑斑病菌 (*A. brassicae*) 等其它 9 种病原真菌进行试验, $10\sim 30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 也没有显著影响 (数据未列出)。

由于动物中许多生长因子都可以激活其体内的 MAPK 途径, 因此 U0126 可抑制某些细胞如 PC12、催乳素细胞腺瘤 (lactotroph adenoma) 的生长或分化,

试验还发现, 不同浓度的 U0126 处理 01-11 菌株后在感病寄主上的病斑面积不同, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 处理对 01-11 菌株在两种寄主上的致病性影响都较小, $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 处理对 01-11 菌株在 B37 上的致病性影响较小, 但对 01-11 菌株在 B37Ht1 上的致病性有较强的抑制作用, $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 对 01-11 菌株在两种感病寄主上的致病性都表现了非常强的抑制作用 (图 4)。

3 讨论

3.1 U0126 对玉米大斑病菌菌落形态和生长速度的影响

试验结果表明, $10\sim 30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 处理对玉米大斑病菌在 PDA 培养基上的菌落形态和生长速度没有显著影响, 可以形成正常的菌丝、分生孢子。另外, 对玉米黄斑病菌 (*Curvularia lunata*)、小麦根腐病菌 (*Cochliobolus sativus*)、棉枯萎病菌 (*Fusarium oxysporium*)、番茄早疫病病菌 (*Alternaria solani*)、葡萄白腐病菌 (*Coniothyrium diplodiella*)、苹果斑点落

并且 U0126 还对某些病毒, 如 Cocksackievirus B3 (CVB3)、Borna disease virus (BDV) 的复制有抑制作用, 所以在肿瘤治疗上也有潜在的应用价值^[10-14]。在真菌中发现了多个与菌丝生长和发育有关的 MAPK 途径, 如 *Saccharomyces cerevisiae* 的 Ste11-Ste7-Fus3/Kss1 通路^[15]、*Candida albicans* 的 CST20-HST7/CPH1-CEK1 通路^[16], 中止这些 MAPK 通路,

都会引起菌丝生长不良, 也发现了一些与分生孢子产生有关的 MAPK 基因, 如 *S. cerevisiae* 的 *SMK1*^[17]、*Pyrenophora teres* 的 *PTK1*^[18]、*Trichoderma virens* 的 *TmkA*^[19] 等。本试验表明, 10~30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 调控的 MAPK 途径对供试植物病原真菌的菌丝和分生孢子发育没有显著影响。

3.2 U0126 对玉米大斑菌分生孢子萌发和附着胞产生的影响

在植物病原真菌中鉴定了一些与分生孢子萌发有关的 MAPK 基因, 如 *Aspergillus nidulans* 的 *MAPKA*^[20]、*Colletotrichum lagenarium* 的 *CMK1*^[21], 但多数 MAPK 基因的突变体都可以产生能够正常萌发的分生孢子, 如 *Magnaporthe grisea* 中的 *PMK1*^[22]、*B. cinerea* 的 *BMP1*^[23]、*Ustilago maydis* 的 *KPP6*^[24]。本试验表明, U0126 调控的 MAPK 基因对玉米大斑病菌的分生孢子萌发有一定的调控作用。另外, 通过试验还发现, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ U0126 对苹果斑点落叶病菌、葡萄白腐病菌、小麦根腐病菌和棉花枯萎病菌的分生孢子萌发也有一定的调控作用, 但对番茄早疫病菌、葱黑斑病菌、玉米黄斑病菌、白菜黑斑病菌、万寿菊灰霉病菌没有显著影响(数据未列出)。

试验结果表明, U0126 对玉米大斑病菌附着胞产生有一定的抑制作用, 在玻璃平板上的抑制程度达 34.0%~100.0%, 在亲和性寄主叶片上的抑制程度为 31.3%~100.0%, 在非亲和性寄主叶片上仅为 6.5%~50.0%。随着抑制剂的浓度增加, 抑制能力增强, 但随着处理时间的延长, 抑制作用减弱。

在 *Colletotrichum gloeosporioides*、*B. cinerea*、*Cochliobolus heterostrophus*、*Colletotrichum lagenarium*、*M. grisea*、*P. teres* 等多种植物病原真菌中相继鉴定了多个与附着胞产生有关的 MAPK 基因^[18,21-23], 其中有些基因的突变体不能形成附着胞和进行侵染性生长, 如 *M. grisea* 的 *PMK1*^[22], 有些基因的突变体可以形成不能穿透植物细胞的表皮的附着胞, 但能引起植物的防卫反应, 如 *MPS1* 基因^[25], 有些基因的突变体与附着胞的成熟有关, *Ukc1* 基因控制 *U. maydis* 附着胞的黑色素形成^[26]。因此在同一真菌内完全有可能存在多种调控附着胞发育的 MAPK 基因, 它们协同或分别调节附着胞发育的不同阶段。

3.3 U0126 对玉米大斑菌致病性的影响

在植物病原真菌中鉴定的与致病性有关的 MAPK 基因的突变体, 多数能够产生正常的分生孢子或附着胞, 但不能侵染健康的寄主叶片, 如 *Colletotrichum*

lagenarium 的 *CST1*^[27]、*B. cinerea* 的 *BMP1* 基因^[23]。还有一些突变体虽然不能形成附着胞, 但一样能产生小的、不扩展的坏死斑, 如 *Cochliobolus heterostrophus* 的 *CHK1* 基因^[28], 这说明 MAPK 基因可能与侵入后菌丝的扩展有关, 如在 *M. grisea* 中 *PMK1* 基因主要负责调节附着胞形成和菌丝在寄主体内的扩展^[22], 或病菌存在多种侵入途径, 如分生孢子萌发产生的芽管能够产生毒素。有些 MAPK 基因则调控菌丝和分生孢子在寄主表面的吸附能力, 如 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 的 *FMK1* 基因突变体在番茄根围萌发的分生孢子不能形成穿透菌丝, 对根的附着能力大大下降^[29]。

试验结果表明, U0126 处理的玉米大斑菌分生孢子活体接种感病玉米叶片后, 发病时间延迟 2~3 d, 发病率下降 30%左右, 并且发现部分接种叶片不发病, 只形成小的侵染点或形成扩展速度很慢的小病斑, 说明 U0126 对玉米大斑病的发生、发展有一定的抑制作用, 但是由于采用滤纸片接种法, U0126 长时间接触玉米叶片, 因此这种抑制作用既包括 U0126 对玉米大斑病菌致病性的作用, 也可能有 U0126 对玉米叶片抗病性的抑制作用, 但从前面的实验结果来看, 对附着胞产生的抑制可能是发病率降低的主要原因。U0126 没有使病菌完全丧失致病性也使我们想到, 可能存在其它的信号转导途径, 如 cAMP 途径、 Ca^{2+} 途径等, 协同控制着该病菌的致病性, 因此, 研究控制玉米大斑菌致病性的不同信号转导途径, 以及这些信号转导途径间的关系, 是深入探讨该病菌致病机制的关键。

4 结论

MAPK 途径对许多植物病原真菌的致病性都有重要的调节作用, 有可能是一种普遍的细胞外信号转导途径。MEK 特异性抑制剂 U0126 对玉米大斑菌分生孢子萌发、附着胞产生和致病性都有一定的抑制作用, 这一试验结果, 有力地说明了 MAPK 途径在玉米大斑菌发育和致病过程中的重要性。对该途径的进一步分析, 不但有利于对玉米大斑菌和寄主玉米之间的相互识别、分子互作机制的研究, 而且该途径的一些成分也有可能作为病害防治的靶标, 从而为植物病害的有效防治提供依据。

References

- [1] Wang P, Pan X, Waugh M, Heitman J. Signal transduction cascades regulating fungal development and virulence. *Microbiology Molecular Biology Review*, 2000, 64, 746-785.

- [2] Warwar V, Dickman M B. Effects of calcium and calmodulin on spore germination and appressorium development in *Colletotrichum trifolii*. *Apply of Environmental Microbiology*, 1996, 62: 74-79.
- [3] 范永山, 刘颖超, 谷守芹, 桂秀梅, 董金泉. 植物病原真菌的 MAPK 基因及其功能. *微生物学报*, 2004, 44(4): 547-551.
Fan Y S, Liu Y C, Gu S Q, Gui X M, Dong J G. Mitogen activated protein kinase genes and its functions in phytopathogenic fungus. *Acta Microbiologica Sinica*, 2004, 44(4): 547-551. (in Chinese)
- [4] Lewis T S, Shapiro P S, Ahn N G. Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advance of Cancer Research*, 1998, 74: 49-139.
- [5] Tong C, Fan H Y, Chen D Y, Song X F, Schatten H, Sun Q Y. Effects of MEK inhibitor U0126 on meiotic progression in mouse oocytes: microtuble organization, asymmetric division and metaphase II arrest. *Cell Research*, 2003, 13(5): 375-383.
- [6] James J A, Smith M A, Court E L, Yip C, Ching Y, Willson C, Smith J G. An investigation of the effects of the MEK inhibitor U0126 on apoptosis in acute leukemia. *Hematology Journal*, 2003, 4(6): 427-432.
- [7] Wang Z Q, Wu D C, Huang F P, Yang G Y. Inhibition of MEK/ERK 1/2 pathway reduces pro-inflammatory cytokine interleukin-1 expression in focal cerebral ischemia. *Brain Research*, 2004, 996(1): 55-66.
- [8] FAN Y S, Gui X M, An X L, Dong J G. Genetic diversity of *Setosphaeria turcica* and HT-toxin. Proceedings of the 15th international plant protection congress, Beijing, China. 2004: 372.
- [9] 范永山, 曹志艳, 谷守芹, 董金泉. 不同诱导因素对玉米大斑病菌附着胞产生的影响. *中国农业科学*, 2004, 37: 769-772.
FAN Y S, Cao Z Y, Gu S Q, Dong J G. Effect of different induction factors on appressorium of *Setosphaeria turcica*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2004, 37: 769-772. (in Chinese)
- [10] Yano S, Komine M, Fujimoto M, Okochi H, Tamaki K. Mechanical stretching *in vitro* regulates signal transduction pathways and cellular proliferation in human epidermal keratinocytes. *Journal of Invest Dermatology*, 2004, 122: 783-790.
- [11] Yamakawa K, Arita J. Cross-talk between the estrogen receptor-, protein kinase A-, and mitogen-activated protein kinase-mediated signaling pathways in the regulation of lactotroph proliferation in primary culture. *Journal of Steroid Biochemistry Molecular Biology*, 2004, 88(2): 123-130.
- [12] Luo H, Yanagawa B, Zhang J, Luo Z, Zhang M, Esfandiarei M, Carthy C, Wilson J E, Yang D, McManus B M. Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *Journal of Virology*, 2002, 76: 3365-3373.
- [13] Planz O, Pleschka S, Ludwig S. MEK-specific inhibitor U0126 blocks spread of Borna disease virus in cultured cells. *Journal of Virology*, 2001, 75: 4871-4877.
- [14] Rice P L, Goldberg R J, Ray E C, Driggers L J, Ahnen D J. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation and induction of apoptosis by sulindac metabolites. *Cancer Research*, 2001, 61: 1541-1547.
- [15] Madhani H D, Fink G R. The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends of Cell Biology*, 1998, 8: 348-353.
- [16] Csank C, Schroppel K, Leberer E, Harcus D, Mohamed O, Me-loche S, Thomas D Y, Whiteway M. Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homologue, Cek1p, in hyphal development and systemic candidacies. *Infective Immunology*, 1998, 66: 2713-2721.
- [17] Krisak L, Strich R, Winters R S, Hall J P, Mallory M J, Kreitzer D, Tuan R S, Winter E. SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Development*, 1994, 8: 2151-2161.
- [18] Ruiz-Roldán M C, Maier F J, Schäfer W. *PTK1*, a mitogen activated protein kinase gene, is required for conidiation, appressorium formation, and pathogenicity for *Pyrenophora teres* on barley. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 2001, 14: 116-125.
- [19] Mukherjee P K, Latha J, Hadar R, Horwitz B A. TmkA, a mitogen-activated protein kinase of *Trichoderma virens*, is involved in biocontrol properties and repression of conidiation in the dark. *Eukaryotic Cell*, 2003, 2: 446-455.
- [20] Bussink H J, Osmani S A. A mitogen-activated protein kinase (MAPK) is involved in polarized growth in the filamentous fungus *Alternaria nidulans*. *FEMS Microbiology Letter*, 1998, 173: 117-125.
- [21] Takano Y, Kikucki T, Kubo Y, Hamer J E, Mise K, Furusawa I. The *Colletotrichum lagenarium* MAP kinase gene *CMK1* regulates diverse aspects of fungal pathogenesis. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 2000, 13: 374-383.
- [22] Xu J R, Hamer J E. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Development*, 1996, 10: 2696-2706.
- [23] Zheng L, Campbell M, Murphy J, Lam S, Xu J R. The *BMP1* gene is essential for pathogenicity in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Microbe Interaction*, 2000, 13: 724-732.
- [24] Brachmann A, Schirawski J, Müller P, Kahmann R. An unusual

- MAP kinase is required for efficient penetration of the plant surface by *Ustilago maydis*. *EMBO Journal*, 2003, 22: 2199-2210.
- [25] Xu J R, Staiger C J, Hamer J E. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95: 12713-12718.
- [26] Dürrenberger F, Kronstad J. The *ukc1* gene encodes a protein kinase involved in morphogenesis, pathogenicity and pigment formation in *Ustilago maydis*. *Molecular Gene Genetics*, 1999, 261: 281-289.
- [27] Tsuji G, Fujii S, Tsuge S, Shiraishi T, Kubo Y M. The *Colletotrichum lagenarium* Ste12-like gene *CST1* is essential for appressorium penetration. *Plant Microbe Interact*, 2003; 16: 315-325.
- [28] Lev S, Sharon A, Hadar R, Ma H, Horwitz B A. A mitogen-activated protein kinase of the corn leaf pathogen *Cochliobolus heterostrophus* is involved in conidiation, appressorium formation, and pathogenicity, diverse roles for mitogen-activated protein kinase homologs in foliar pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96: 13542-13547.
- [29] Di Pietro A, Garcia-Maceira F I, Meglecz E, Roncero M I G. A mitogen-activated protein kinase of the vascular wilt fungus *Fusarium oxysporum* is dispensable for vegetative growth but essential for pathogenicity. Abstract of The 5th European Conference on Fungal Genetics, Arcachon, France, 2000: 227.

(责任编辑 王红艳)