

网络出版时间:2018-03-09 17:09

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2018.07.011

网络出版地址:http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20180309.1708.022.html

STK1 基因对山梨醇高渗胁迫下玉米大斑病菌 菌丝生长和发育的调控

张淑红,张运峰,范永山

(唐山师范学院 生命科学系,河北 唐山 063000)

【摘要】【目的】明确 STK1 基因在山梨醇高渗胁迫条件下对玉米大斑病菌菌丝生长和发育的调控作用。【方法】将野生型菌株(WT)与 STK1 基因敲除突变体(KO)分别接种在不同山梨醇浓度的葡萄糖-蛋白胨(DPA)培养基上,对比其生长速度、菌落形态、菌丝形态的差异变化;并通过油红 O 染液进行菌丝细胞脂肪染色,观察脂类物质沉积的形态学变化。【结果】山梨醇高渗胁迫显著抑制了野生型菌株(WT)的菌落生长速度,但 1.0 mol/L 山梨醇对 STK1 基因敲除 KO 菌株的生长有显著的促进作用,这种促进作用随着山梨醇浓度的增加而迅速降低,山梨醇浓度增加至 1.5~2.0 mol/L 时,菌落生长速度受到显著抑制,并且抑制程度显著高于 WT 菌株。显微观察菌丝细胞内容物,发现山梨醇高渗胁迫后,KO 菌株的颗粒状物明显少于 WT 菌株。利用油红 O 染色观察菌丝细胞的脂类物质沉积情况,发现在山梨醇高渗胁迫条件下,KO 菌株的脂滴数量远远少于 WT 菌株。【结论】山梨醇胁迫具有与盐胁迫不同的渗透调节机制,STK1 基因可能通过调节脂类物质的合成及分布调控对山梨醇高渗胁迫的调节。

【关键词】玉米大斑病菌;STK1 基因;渗透胁迫;山梨醇

【中图分类号】S432.1

【文献标志码】A

【文章编号】1671-9387(2018)07-0080-07

Regulation of mycelium growth and development of *Setosphaeria turcica* by STK1 gene under sorbitol hypertonic stress

ZHANG Shuhong,ZHANG Yunfeng,FAN Yongshan

(Department of Life Science,Tangshan Normal University,Tangshan,Hebei 063000,China)

Abstract:【Objective】The STK1 gene is one important MAPK gene regulating the conidial development,osmotic stress and pathogenicity of *Setosphaeria turcica*. In this paper,its role in regulating hypha growth and development of *S. turcica* under sorbitol hypertonic stress was analyzed.【Method】Both the wild type strain (WT) and the knockout mutant (KO) of STK1 gene were grown on Dextrose Peptone Agar (DPA) medium with different concentrations of sorbitol to compare the differences in colony growth speed,colony morphism,and mycelia morphology. The lipid deposition on mycelium cells was observed by the oil red O staining method.【Result】The sorbitol hypertonic stress significantly inhibited the colony growth of the wild type strain (WT),but that of KO mutant was accelerated under 1.0 mol/L sorbitol stress. The acceleration was rapidly decreased with the increase of sorbitol concentration. When the sorbitol concentration increased to 1.5—2.0 mol/L,the inhibition to KO mutant was much stronger than that to the WT strain. The granular material in mycelium cells of KO mutant was less than that of WT strain un-

【收稿日期】2017-05-12

【基金项目】河北省自然科学基金项目(C2014105067);河北省高等学校科学技术研究计划项目(QN2017415);河北省归国留学人才计划启动项目(C2015005009)

【作者简介】张淑红(1978—),女,河北石家庄人,副教授,硕士,主要从事微生物遗传研究。E-mail: zsh3535@163.com

【通信作者】范永山(1971—),男,河北唐山人,教授,主要从事分子植物病理学研究。E-mail: fanyongshan@126.com

der sorbitol hypertonic stress under microscopic observation. The lipid deposition on mycelium cells was observed by the oil red O staining method, and the results showed that the number of lipid droplets in KO strains was far less than that of WT strain under sorbitol hypertonic stress. 【Conclusion】 Sorbitol stress and salt stress had different osmotic regulation mechanisms and STK1 gene possibly regulated the sorbitol hypertonic stress by controlling lipid synthesis.

Key words: *Setosphaeria turcica*; STK1 gene; osmotic stress; sorbitol

玉米大斑病(Northern Corn Leaf Blight)是由玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)所引起的以叶部产生大型病斑症状为主的玉米病害,其分布广、危害重,是世界性的真菌病害^[1-2]。玉米大斑病菌利用无性分生孢子传播,以侵染性菌丝在玉米寄主组织内扩展,并通过产生 HT 毒素(*Helminthosporium turcicum* toxin)抑制寄主的防御体系,从而引起病害症状^[3-4]。MAPK 信号转导途径对玉米大斑病菌分生孢子萌发、附着胞产生、致病性和 HT 毒素活性都有重要的调控作用^[5-8]。巩校东等^[9-10]研究发现,玉米大斑病菌至少存在 Hog1、Slt2、Fus3/Kss1 和 Ime2 等 4 条 MAPK 途径。谷守芹^[11]利用候选基因法克隆了 3 个 MAPK 基因 STK1、STK2 和 STK3,其中 STK1 基因属于 Hog1-MAPK 途径,主要与渗透胁迫和应激胁迫调节有关;STK2 基因属于 Slt2-MAPK 途径,主要与病原菌的致病性和孢子发育有关;STK3 基因属于 Fus3/Kss1-MAPK 途径,主要与细胞壁合成有关。Li 等^[12]研究发现,STK1 基因不仅调控玉米大斑病菌的渗透胁迫调节,而且与菌丝、分生孢子和附着胞发育、毒素合成及致病性都有关。因此,STK1 基因是调控玉米大斑病菌生长、发育和致病性的重要 MAPK 基因。

王梅娟等^[13]研究发现,在 1.0 mol/L NaCl 高渗胁迫条件下玉米大斑病菌生长受到抑制,甘油浓度增加,同时 STK1 基因的表达量稳定增加,从而明确甘油是玉米大斑病菌主要的一种渗透调节物质。谷守芹^[11]和 Li 等^[12,14]的研究也证明,在 NaCl、KCl、LiCl 等盐胁迫条件下 STK1 基因具有重要的渗透调节功能。植物病原真菌进化了多条信号应答途径来适应环境中的渗透压变化,其中高渗透性甘油促分裂原激酶信号转导途径(HOG-MAPK)是植物病原真菌中最主要的渗透胁迫调节途径。该途径通过促进甘油积累、延缓细胞生长及调节其他生理条件抵抗渗透胁迫刺激^[15]。在稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)、炭疽病菌(*Colletotrichum lagenarium*)、稻平脐蠕孢菌(*Bipolaris oryzae*)、栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)、小

麦壳针孢(*Mycosphaerella graminicola*)、灰葡萄孢菌(*Botrytis cinerea*)等植物病原真菌中均发现 MAPK 途径,并克隆了相应的 Hog-MAPK 同源基因^[16]。但是在植物病原真菌高渗胁迫研究中,主要研究的是盐胁迫对生长、发育和致病性的影响,对山梨醇等有机分子的渗透胁迫研究却鲜见报道。

本研究利用玉米大斑病菌 STK1 基因的敲除突变体(knockout mutants, KO),比较该突变体与野生型菌株(WT)在山梨醇胁迫下菌落生长速度、菌丝形态及脂类物质在菌丝细胞内沉积情况等方面的差异,分析玉米大斑病菌在山梨醇高渗胁迫下的渗透调节机制,为进一步明确 STK1 基因对玉米大斑病菌渗透胁迫调节的分子机理,以及 STK1 基因在玉米大斑病菌生长、发育和致病性等方面的调控功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

玉米大斑病菌野生菌株(WT)01-23 及其 STK1 基因敲除突变体(KO)STM-35,均由河北农业大学谷守芹教授提供。

1.2 试验材料和供试培养基

油红 O 染液^[17]:取油红 0.5 g,加异丙醇至 100 mL,60 ℃水浴中加温溶解 30 min,配成油红 O 储备液,置于棕色小磨沙口瓶保存。临用前取 0.6 mL 油红 O 加蒸馏水 0.4 mL,混合静置 10 min 后用 0.45 μm 滤膜过滤除菌。

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 12 g,水 1 000 mL。

DPA 培养基:葡萄糖 20 g,蛋白胨 5 g,琼脂粉 12 g,水 1 000 mL。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株培养和活化 将试管内保存的野生菌株 01-23 和突变体 STM-35 分别接种到 PDA 培养基上,25 ℃黑暗倒置培养 6 d 后,再次转接到 PDA 平皿上,培养至菌落直径达到 5 cm 左右。

1.3.2 适宜高渗胁迫分析培养基的筛选 将野生

菌株 01-23 分别接种于 PDA 和 DPA 培养基上,25℃ 黑暗倒置培养 6 d 后,挑取菌丝于洁净载玻片上,滴入适量 PBS 缓冲液,置于显微镜下观察。

1.3.3 高渗胁迫处理 无菌条件下,用打孔器(直径为 7 mm)在 01-23 和 STM-35 菌落外缘打取菌盘,然后接种至 3 种不同山梨醇浓度(1.0,1.5,2.0 mol/L)的 DPA 培养基平板上,置于恒温培养箱中 25℃ 黑暗培养,以在无山梨醇的 DPA 培养基上生长的菌株为对照(CK)。

1.3.4 菌落、菌丝形态观察及生长速率测定 将菌株在高渗固体培养基上培养 8 d 后,观察菌落形态,采用十字交叉法测量菌落直径,计算抑制率,显微镜观察菌丝的形态特征及发育情况。

抑制率=(对照菌落直径-高渗处理菌落直径)/(对照菌落直径)×100%。

1.3.5 脂类物质沉积的形态学观察 将 2.0 mol/L 山梨醇处理的 WT 和 KO 菌株利用油红 O 染液进行脂肪染色、制片,并在显微镜下观察脂类物质沉积的形态学变化。染色参照陈侃等^[17]的方法略作修改,具体步骤:取培养 10 d 的菌株,向培养皿中加入 3 mL 无菌水,轻轻刮取菌丝,用双层擦镜纸过滤,滤液经 12 000 r/min 离心 5 min 后去掉上清,收集沉淀,用液氮反复冻融 5 次,转入 4% 中性甲醛中固定 12 h,取出用 PBS 漂洗后放入 60% 异丙醇中浸泡 30 min,取出后加入 50 μL 油红 O 染液,黑暗条件下染色 24 h,置于 60% 异丙醇中脱色,显微镜下观察染色情况并照相。

1.4 数据统计分析

利用 IBM SPSS Statistics (version 19) 软件 (SPSS Inc.) 对试验数据进行 ANOVA 方差分析。

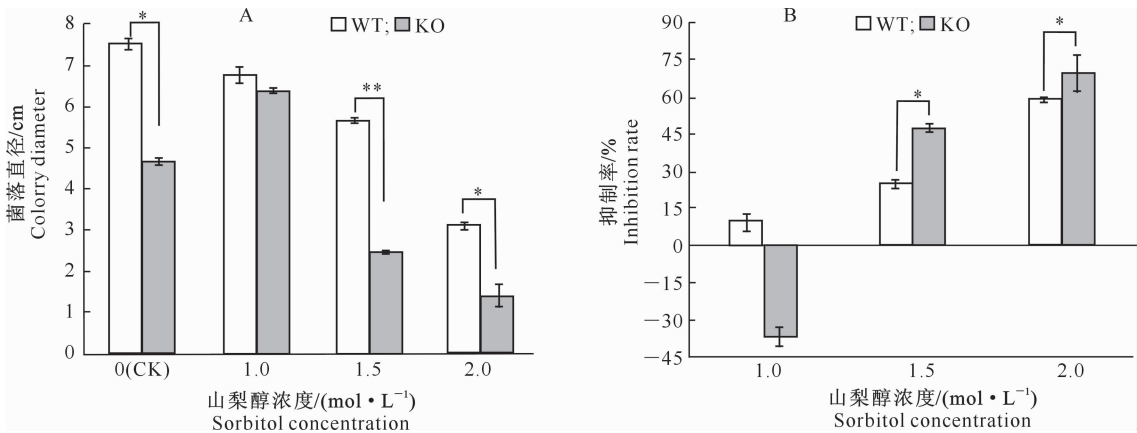
2 结果与分析

2.1 玉米大斑病菌高渗胁迫培养基的筛选

由于 PDA 培养基中马铃薯浸提液中含有盐离子,并且不同马铃薯品种及熬煮时间都可能对其浸提液中盐离子浓度产生影响,从而干扰本试验中高渗胁迫分析结果。而蛋白胨作为一种化学产品,不仅排除了生产工艺的干扰,而且蛋白胨中不含盐离子或盐离子非常少,不会影响本试验中高渗胁迫分析结果,因此本研究采用蛋白胨代替马铃薯浸提液的 DPA 培养基进行高渗胁迫分析。通过比较 WT 菌株与 KO 菌株在 PDA 和 DPA 培养基上的菌丝形态,结果发现,在 PDA 培养基上 WT 菌株与 KO 菌株生长菌丝形态有较明显的区别,WT 菌株的菌丝细胞内有明显颗粒状内容物出现,而 KO 菌株的菌丝细胞内无明显颗粒状内容物。在 DPA 培养基上,WT 菌株与 KO 菌株的菌丝细胞内均有明显的颗粒状物出现,2 种菌株的菌丝状态相似。因此,DPA 培养基更适于分析 STK1 基因对渗透胁迫的调控作用。

2.2 山梨醇高渗胁迫对玉米大斑病菌菌落生长的影响

山梨醇高渗胁迫对玉米大斑病菌菌落生长速度的影响见图 1。



* 表示 WT 和 KO 菌株间差异显著($P<0.05$); ** 表示 WT 和 KO 菌株间差异极显著($P<0.01$)
* indicates significant difference between strain WT and KO ($P<0.05$);
** indicates extremely significant difference between strain WT and KO ($P<0.01$)

图 1 山梨醇高渗胁迫对玉米大斑病菌菌落生长的影响

Fig. 1 Effects of sorbitol hypertonic stress on colony growth of *Setosphaeria turcica*

由图 1 可以看出,在 1.0 mol/L 山梨醇胁迫条件下,KO 菌株与 WT 菌株的菌落生长速度没有显著差异,但在 1.5 和 2.0 mol/L 山梨醇胁迫条件下,KO 菌株的菌落生长速度都显著低于 WT 菌株,表明 KO 菌株对较高浓度山梨醇的渗透胁迫比 WT 菌株更敏感。

对 WT 菌株,未加山梨醇和山梨醇浓度为 1.0 mol/L 的 DPA 培养基中,WT 菌株的菌落生长速度基本上一致;当山梨醇浓度大于 1.0 mol/L 时,浓度越大,菌落生长速度越慢(图 1-A),即高浓度山梨醇对 WT 菌株菌落生长速度有显著抑制作用。

对 KO 菌株,在 1.0 mol/L 山梨醇高渗胁迫条件下,KO 菌株的生长速度显著加快,当山梨醇浓度增加到 1.5 和 2.0 mol/L 时,菌落生长速度又显著减慢,说明一定浓度山梨醇高渗胁迫对 KO 菌株的菌落生长速度有促进作用,但高浓度山梨醇却有抑

制作用(图 1-A)。

由图 1-B 可以看出,除在 1.0 mol/L 山梨醇胁迫条件下 KO 菌株的菌落生长速度得到显著的促进作用以外,其它处理的菌落生长速度均受到显著的抑制作用。在 1.5 和 2.0 mol/L 山梨醇渗透胁迫下,KO 菌株菌落生长速度的抑制率显著高于 WT 菌株。

2.3 山梨醇高渗胁迫对玉米大斑病菌菌落形态和颜色的影响

在山梨醇高渗胁迫条件下,WT 菌株和 KO 菌株的菌落形态没有显著变化,但菌落颜色变化非常明显。在山梨醇高渗胁迫条件下,WT 菌株的菌落颜色由黑色变为灰白色,而 KO 菌株则在 1.5 mol/L 山梨醇胁迫条件下菌落颜色变深,在 1.0 和 2.0 mol/L 山梨醇胁迫条件下菌落颜色变浅(图 2)。

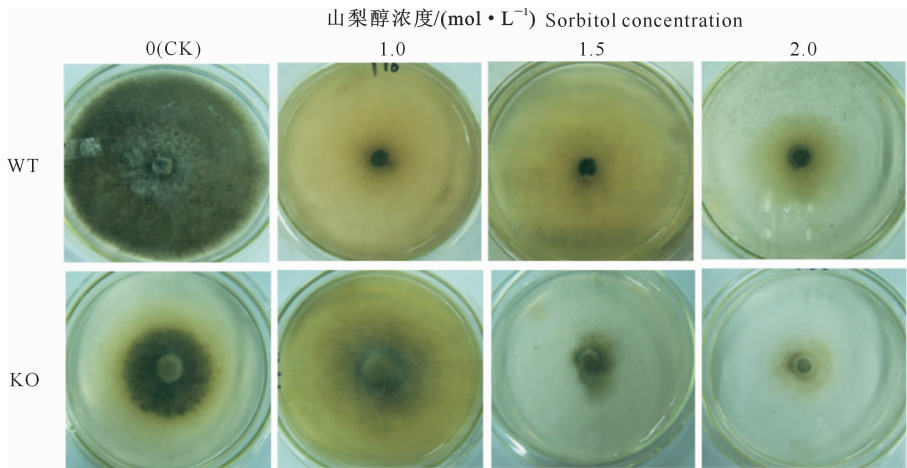


图 2 山梨醇高渗胁迫对玉米大斑病菌菌落形态和颜色的影响

Fig. 2 Effects of sorbitol hypertonic stress on colony morphology and color of *Setosphaeria turcica*

2.4 山梨醇高渗胁迫对玉米大斑病菌菌丝形态的影响

山梨醇高渗胁迫对玉米大斑病菌菌丝形态的影响结果见图 3。由图 3 可以看出,在无山梨醇添加的 DPA 培养基上,WT 菌株和 KO 菌株的菌丝形态无明显差别。在 1.0 mol/L 山梨醇胁迫条件下,KO 菌株的菌丝形态没有明显变化,而 WT 菌株的菌丝细胞内出现了大量的小型颗粒状物质。在 1.5 mol/L 山梨醇胁迫条件下,KO 菌株的菌丝细胞内也出现了大量的小型颗粒状物质,而 WT 菌株的菌丝细胞内出现了较多的大型颗粒状物质。在 2.0 mol/L 山梨醇胁迫条件下,KO 菌株的菌丝变粗,原生质体浓缩成颗粒状,而 WT 菌株的菌丝细胞内出现很多空隙。

2.5 山梨醇高渗胁迫对玉米大斑病菌菌丝细胞内脂类物质沉积的影响

由于脂类物质是玉米大斑病菌菌丝内主要的渗透胁迫调节物质^[13],在图 3 中出现的颗粒状物质极有可能是脂类物质的积累。因此,本研究利用油红 O 染色剂,对 WT 菌株和 KO 菌株在 2.0 mol/L 山梨醇高渗胁迫条件下菌丝细胞内脂类物质的沉积情况进行显微观察,结果(图 4)发现,与高渗胁迫处理前相比,2.0 mol/L 山梨醇高渗胁迫后,WT 菌株菌丝细胞内的脂滴数量明显增多,并且脂滴体积明显增加,而 KO 菌株的菌丝细胞变粗膨大,脂滴数量有所减少,但脂滴体积显著变大。脂滴的分布情况也明显不同,在高渗胁迫处理前,WT 菌株和 KO 菌株的脂滴分布都不均匀,但山梨醇高渗胁迫处理后,

WT 菌株的脂滴大小及分布都比较均匀一致,而 KO 菌株大脂滴和小脂滴并存且分布极不均匀,位于中部或偏于某一侧。该试验结果与图 3 的表现基本一致。

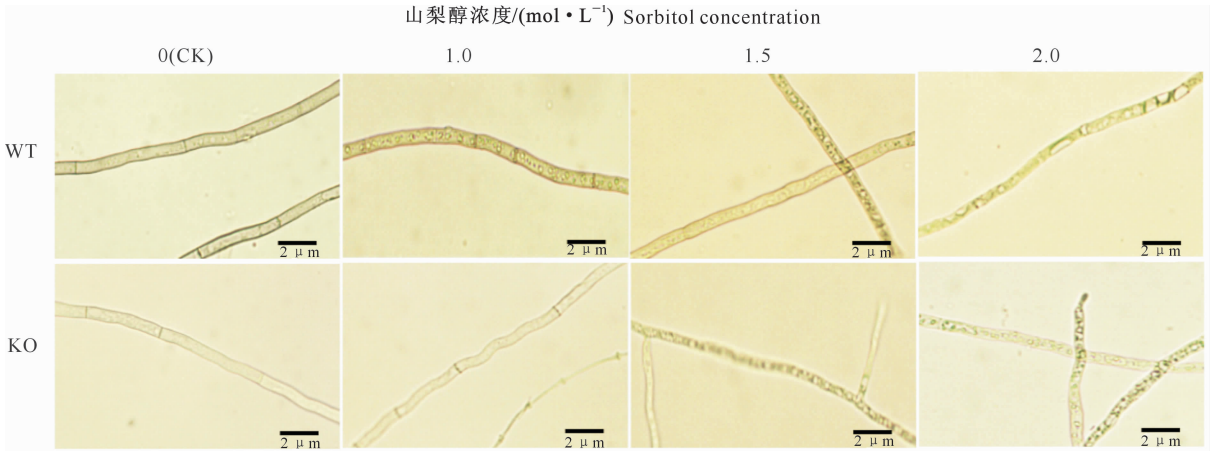


图 3 山梨醇高渗胁迫对玉米大斑病菌菌丝形态的影响
Fig. 3 Effects of sorbitol hypertonic stress on hypha morphology of *Setosphaeria turcica*

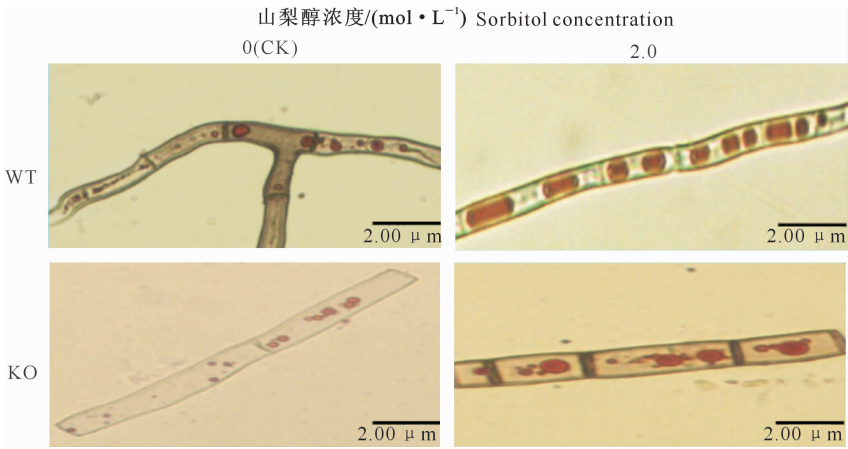


图 4 山梨醇高渗胁迫对玉米大斑病菌菌丝细胞内脂类物质沉积的影响
Fig. 4 Effects of sorbitol hypertonic stress on lipid deposition in hypha cells of *Setosphaeria turcica*

3 讨论与结论

山梨醇是一种重要的渗透胁迫调节物质,它可以与水、甘油和丙二醇混溶,因此具有与 NaCl、KCl 等盐分子不同的化学性质^[18]。在植物的耐盐胁迫研究中,200 μg/mL 山梨醇浸种处理可促进无花果种子萌发,加速可溶性糖和脯氨酸积累,增强无花果幼苗渗透调节,有效降低盐胁迫对幼苗细胞造成的伤害,提高无花果幼苗耐盐性^[19]。因此,山梨醇渗透胁迫与盐胁迫具有不同的渗透调节机制。在本课题组的前期研究中发现,在相同的盐离子浓度条件下,与野生型(WT)菌株相比,STK1 基因敲除突变体(KO)菌株的菌丝生长缓慢,细胞内容物减少,生理状况降低^[12,14]。但是本试验的研究结果表明,在 1.0 mol/L 山梨醇渗透胁迫条件下,玉米大斑病菌

KO 菌株生长状况与 WT 菌株没有显著差异,只有当山梨醇浓度提高到 1.5 mol/L 以上时,才显著抑制了 KO 菌株的菌丝生长速度。因此,STK1 基因在山梨醇高渗胁迫调节过程中存在一个滞后的信号应答过程。另外,与非渗透胁迫相比,在 1.0 mol/L 山梨醇渗透胁迫条件下,KO 菌株菌丝生长速度不但未受到抑制,反而得到促进,说明 1.0 mol/L 山梨醇处理使玉米大斑病菌菌丝恢复了部分渗透胁迫调节功能,即 1.0 mol/L 山梨醇处理可能增强了菌丝的渗透胁迫调节能力,“补偿”了 STK1 被敲除后造成的某些功能障碍。该试验结果与山梨醇是桃^[20]、烟草^[21]等植物渗透调节物质和医药领域渗透剂^[22]的结论是一致的,并且 Stavnichuk 等^[23]研究表明,山梨醇通路与 MAPK 通路可协同调控糖尿病的发生。但是,更高浓度的山梨醇对这一未知途径也产

生了一定的阻遏作用,使玉米大斑病菌的渗透胁迫调节能力受到了不可逆的抑制作用,不仅菌落生长速度受到抑制,而且细胞壁色素的合成受到干扰,菌丝颜色变浅;细胞内物质的降解能力下降,出现颗粒状物质积累。研究表明,参与渗透胁迫调节的细胞壁色素物质为黑色素,而这些颗粒状物质极有可能是渗透胁迫调节物质^[24-25]。王梅娟等^[13]研究表明,玉米大斑病菌的渗透胁迫调节物质主要为甘油,而真菌细胞内甘油主要来自于脂肪的降解。因此,菌丝细胞内脂类物质沉积形成的脂滴大小和分布与渗透胁迫调节能力密切相关。在本试验中发现,山梨醇高渗胁迫条件下,脂类物质的沉积与颗粒状物质的分布基本一致。利用油红 O 染色观察脂类物质在菌丝内的沉积情况,发现 STK1 基因缺失后脂滴的大小及分布均与野生型菌株不同,因此,STK1 基因很可能通过调控脂类物质合成进行渗透胁迫调节。

[参考文献]

- [1] 王晓鸣,晋齐鸣,石洁,等. 玉米病害发生现状与推广品种抗性对未来病害发展的影响 [J]. 植物病理学报,2006,36(1): 1-11.
Wang X M, Jin Q M, Shi J, et al. The status of maize diseases and the possible effect of variety resistance on disease occurrence in the future [J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2006, 36(1): 1-11.
- [2] 苏前富,贾娇,李红,等. 玉米大斑病暴发流行对玉米产量和性状表征的影响 [J]. 玉米科学,2013,21(6):145-147.
Su Q F, Jia J, Li H, et al. Effect of heavy damage caused by *Exserohium turicum*, to corn yield and characteristics [J]. Journal of Maize Sciences, 2013, 21(6): 145-147.
- [3] Hamer J E, Howard R J, Chumley F G, et al. A mechanism for surface attachment in spores of a plant pathogenic fungus [J]. Science, 1988, 239: 288-290.
- [4] 郝志敏,郝杰,李志勇,等. 磷脂酶 C 特异性抑制剂 U-73122 对玉米大斑病菌分生孢子萌发及毒素活性的影响 [J]. 华北农学报,2010,25(6):118-121.
Hao Z M, Hao J, Li Z Y, et al. Effects of phospholipase C inhibitor U-73122 on conidial germination and HT-toxin activity of *Setosphaeria turcica* [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010, 25(6): 118-121.
- [5] 范永山,谷守芹,董金皋,等. MAPK 途径对玉米大斑病菌 HT-毒素产生和生物学活性的调控作用 [J]. 中国农业科学,2008,41(1):86-92.
Fan Y S, Gu S Q, Dong J G, et al. Regulation of MAPK signal pathway on the production and biological activity of HT-toxin in *Setosphaeria turcica* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(1): 86-92.
- [6] 范永山,谷守芹,董金皋,等. 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 [J]. 中国农业科学,2006,39(1):66-73.
Fan Y S, Gu S Q, Dong J G, et al. Effects of the MEK-specific inhibitor U0126 on the conidial germination, appressorium production and pathogenicity of *Setosphaeria turcica* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2006, 39(1): 66-73.
- [7] 范永山,刘颖超,谷守芹,等. 植物病原真菌的 MAPK 基因及其功能 [J]. 微生物学报,2004,44(4):547-551.
Fan Y S, Liu Y C, Gu S Q, et al. Mitogen activated protein kinase genes and its functions in phytopathogenic fungus [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2004, 44(4): 547-551.
- [8] 张盼,田兰,王玥,等. 特异性 MAPK 抑制剂 U0126 对玉米大斑病菌细胞膜透性及防御酶活性的影响 [J]. 玉米科学,2015,23(5):142-145.
Zhang P, Tian L, Wang Y, et al. Effects of specific MAPK inhibitor U0126 on the cell membrane permeability and defense enzyme activity of *Setosphaeria turcica* [J]. Journal of Maize Sciences, 2015, 23(5): 142-145.
- [9] 巩晓东,张晓玉,田兰,等. 玉米大斑病菌 MAPK 超家族的全基因组鉴定及途径模型建立 [J]. 中国农业科学,2014,47(9):1715-1724.
Gong X D, Zhang X Y, Tian L, et al. Genome-wide identification MAPK superfamily and establishment of the model of MAPK cascade pathway in *Setosphaeria turcica* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(9): 1715-1724.
- [10] 巩晓东,范钰,李坡,等. 玉米大斑病菌 STK2 的基因组定位、蛋白质结构预测及其表达 [J]. 中国农业科学,2013,46(12):2599-2606.
Gong X D, Fan Y, Li P, et al. Localization of STK2 of *Setosphaeria turcica* in the genome, characterization of its protein structure and expression in Eukaryotic cells [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(12): 2599-2606.
- [11] 谷守芹. 调控玉米大斑病菌生长发育和致病性的 STK 基因的克隆与功能分析 [D]. 河北保定:河北农业大学,2007.
Gu S Q. Cloning and functional analysis of STK genes regulating the growth, development and pathogenicity of *Setosphaeria turcica* [D]. Baoding, Hebei: Agricultural University of Hebei, 2007.
- [12] Li P, Gong X D, Jia H, et al. MAP kinase gene STK1 is required for hyphal, conidial, and appressorial development, toxin biosynthesis, pathogenicity, and hypertonic stress response in the plant pathogenic fungus *Setosphaeria turcica* [J]. Journal of Integrative Agriculture, 2016, 15(12): 2786-2794.
- [13] 王梅娟,李坡,吴敏,等. 高渗胁迫对玉米大斑病菌生长发育及 STK1 表达的影响 [J]. 中国农业科学,2012,45(19):3965-3970.
Wang M J, Li P, Wu M, et al. Effect of hyperosmotic stress on the growth, development and STK1 expression of *Setosphaeria turcica* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(19): 3965-3970.
- [14] Li P, Gu S Q, Shen S, et al. STK1, a MAP kinase gene from *Setosphaeria turcica*, confers preferable tolerance to sodium

- salt stress [J]. African Journal of Microbiology Research, 2012, 6(40): 6830-6837.
- [15] De Nadal E, Aplepuz P M, Posas F. Dealing with osmstress through MAP kinase activation [J]. EMBO Reports, 2002, 3(8): 735-740.
- [16] Krantz M, Becit E, Hohmann S. Comparative genomics of the HOG signaling system in fungi [J]. Current Genetics, 2006, 49(3): 137-151.
- [17] 陈 侃, 王长谦, 范虞琪, 等. 油红 O 染色在斑马鱼体内脂质染色中的应用 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2016, 25(4): 358-360.
- Chen K, Wang C Q, Fan Y Q, et al. Application of oil red O in the staining of lipids in Zebrafish [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2016, 25(4): 358-360.
- [18] 冯小磊, 苏 旭, 赵治海, 等. 山梨醇在植物中的研究进展 [J]. 河北农业科学, 2014, 18(3): 67-70.
- Feng X L, Su X, Zhao Z H, et al. Research progresses of sorbitol in plants [J]. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2014, 18(3): 67-70.
- [19] 赵京刚, 张苍梅. 山梨醇浸种对盐胁迫下无花果发芽及幼苗生长的影响 [J]. 中国果菜, 2016, 36(7): 19-22.
- Zhao J G, Zhang C M. Effect of sorbitol on growth under salt stress germination and seedlings of fig [J]. China Vegetables, 2016, 36(7): 19-22.
- [20] Lo Biancoa R, Riegera M, Sung S S. Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach [J]. Physiologia Plantarum, 2000, 108(1): 71-78.
- [21] 王瑞刚, 张艳春, 张子义, 等. 3 种渗透剂对转基因烟草根系枯草芽孢杆菌纤溶酶(BSFE)分泌的调节 [J]. 植物资源与环境学报, 2005, 14(2): 1-5.
- Wang R G, Zhang Y C, Zhang Z Y, et al. Regulation of three penetrants on secretion of *Bacillus subtilis* fibrinolytic enzyme from transgenic tobacco's root system [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2005, 14(2): 1-5.
- [22] 李 嵘, 沈建平, 李梦秋, 等. 国产 5-单硝异山梨醇酯缓释胶囊在正常人体的药物动力学和相对生物利用度研究 [J]. 中国药科大学学报, 2000, 31(4): 273-277.
- Li R, Shen J P, Li M Q, et al. Pharmacokinetics and relative bioavailability of domestic sustained release capsules of 5-isosorbide mononitrate in healthy volunteers [J]. Journal of China Pharmaceutical University, 2000, 31(4): 273-277.
- [23] Stavniichuk R, Shevalye H, Hirooka H, et al. Interplay of sorbitol pathway of glucose metabolism, 12/15-lipoxygenase, and mitogen-activated protein kinases in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy [J]. Biochemical Pharmacology, 2012, 83(7): 932-940.
- [24] 曹志艳, 贾 慧, 朱显明, 等. DHN 黑色素与玉米大斑病菌附着胞膨压形成的关系 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(5): 925-932.
- Cao Z Y, Jia H, Zhu X M, et al. Relationship between DHN melanin and formation of appressorium turgor pressure of *Setosphaeria turcica* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2011, 44(5): 925-932.
- [25] 贾 慧, 孟庆江, 李志勇, 等. 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 H, Meng Q J, Li Z Y, et al. Localization of melanin biosynthesis enzyme genes in the genome and expression pattern analysis of *Setosphaeria turcica* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015, 48(14): 2767-2776.