

韦运谢,蒲金基,张贺,等. 胶孢炭疽菌漆酶基因 *Lac2* 的序列特征与表达分析[J]. 江苏农业科学,2015,43(9):35-38.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.009

胶孢炭疽菌漆酶基因 *Lac2* 的序列特征与表达分析

韦运谢¹, 蒲金基², 张贺², 魏丽沙子¹, 刘娅楠¹, 邢梦玉³, 刘晓妹¹

(1. 海南大学环境与植物保护学院/海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海南海口 570228;

2. 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;

3. 海南大学应用科技学院, 海南海口 571101)

摘要:为了探明分离自芒果的胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)漆酶同工酶基因的序列特征,进一步研究该菌的分子致病机理。以该菌为材料,采用同源克隆和 RT-PCR 法获得胶孢炭疽菌漆酶基因 *Lac2*(KF924625)。结果表明,其编码区大小为 1 785 bp,编码 594 个氨基酸,分子量为 65.53 ku,等电点是 6.56,含 4 个铜离子结合保守结构域;聚类分析发现,其预测蛋白与西瓜炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)的漆酶 laccase-1 (ENH77191.1) 同源性最高,达到 79%;半定量 RT-PCR 分析表明,在分生孢子不同萌发时段,*Lac2* 的表达量有明显的升降趋势,接种后 6 h 表达量最低,9 h 最高。可见 *Lac2* 具备真菌漆酶基因家族的序列特征,初步推测它可能与 *C. gloeosporioides* 分生孢子萌发侵染寄主有关,也可能参与调控芒果胶孢炭疽菌的漆酶活性和抗氧化反应等。

关键词:胶孢炭疽菌;*Lac2* 基因;克隆;表达分析

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)09-0035-04

漆酶是含铜的多酚氧化酶,能够催化多种酚类化合物及其衍生物,使之生成相应的苯醌和水,且其催化底物具有广谱性,在环保、食品、医药、纺织等各个领域具有潜在的应用价值^[1]。最早在漆树上发现漆酶,随后发现其也广泛存在于昆虫、高等植物、细菌及真菌中^[2]。真菌漆酶与致病力、营养生长、增殖生长、孢子和黑色素的形成、氧化胁迫及渗透调节能力相关^[3-5]。真菌中存在多种漆酶同工酶,且在不同生长期表达,功能也存在差异^[6],如 *Colletotrichum orbiculare* 的 *Lac1* 与 *Lac2* 的功能截然不同,与野生型相比,*Lac2* 突变体失去了致病力、黑色素含量下降及分生孢子颜色变浅,而 *Lac1* 突变体的黑色素含量略微减少、漆酶酶活却有所上升^[7-8]。序列

分析表明,不同漆酶基因氨基酸序列相似性不高,但在铜原子结合区域的保守性相当高,因此可以根据这些保守区设计简并引物同源克隆漆酶基因。

芒果(*Mangifera indica* L.) 隶属漆树科芒果属,是世界五大著名热带水果之一。由胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)引起的芒果炭疽病是芒果最严重的病害之一,在整个生育期均可发病,且在贮运期危害最重,是限制芒果产业发展的主要因素之一。炭疽病菌的致病过程主要是通过病原菌分生孢子附着在寄主表面,萌发形成附着胞,附着胞内沉积一层黑色素,前端产生侵染钉侵入寄主并在寄主体内扩展,黑色素在病原菌穿透寄主组织中起着非常重要的作用,细胞壁降解酶起着软化细胞的辅助作用^[9-10],而漆酶又是形成 DHN 黑色素必不可少的氧化酶^[11],因此推测在芒果炭疽菌中漆酶可能通过干扰附着胞黑色素的合成而影响着该菌的致病力。目前,关于芒果胶孢炭疽菌的漆酶基因仅见笔者所在实验室报道的 *Lac1*^[12],为了系统研究各漆酶在芒果炭疽菌中的功能,本研究采用同源克隆策略,从芒果胶孢炭疽菌中又克隆获得了漆酶新基因 *Lac2*,这为进一步研究其功能打下了材料基础。

收稿日期:2014-09-11

基金项目:教育部博士点基金(编号:20134601120001);公益性行业(农业)科研专项(编号:201203092-2)。

作者简介:韦运谢(1989—),女,硕士研究生,主要从事热带果树病理学研究。E-mail:weiyunxie1989@126.com。

通信作者:刘晓妹,博士,副教授,主要从事热带作物病理学研究。E-mail:lxmp11@126.com。

[28] Zhao H C, An F Y, Du D Z. New idioplasmic resource *B. napus* L. with multi-loculus founded by interspecific hybridization[C]//Fu T D. Proceedings of the 12th International Rapeseed Congress, 2007:294-295.

[29] 史华清,龚瑞芳,庄丽莲,等. 芥菜型油菜(*Brassica juncea*)杂种优势利用的研究[J]. 作物学报,1991(1):32-41.

[30] 赵洪朝,杜德志,刘青元,等. 芥菜型多室油菜与甘蓝型油菜的种间远缘杂交[J]. 西北植物学报,2003,23(9):1587-1591.

[31] 刘显军,袁谋志,官春云,等. 芥菜型油菜黄籽性状的遗传、基因定位和起源探讨[J]. 作物学报,2009,35(5):839-847.

[32] 赵洪朝. 芥菜型油菜多室性状的遗传表现及其与甘蓝型油菜的种间远缘杂交[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2003.

[33] 刘忠松. 油菜远缘杂交遗传育种研究进展[J]. 作物研究,1995(增刊1):17-19,14.

[34] 方宣钧,吴为人,唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京:科学出版社,2001.

[35] 孟金陵,吴江生,刘兴梁,等. 甘蓝型油菜种间可交配品系的选育[J]. 中国农学通报,1994,10(1):1-4.

[36] 孟金陵,甘莉,程必芳. 由种间杂交创建的两个新的甘蓝型油菜细胞质雄性不育系[J]. 华中农业大学学报,1995,14(1):21-25.

[37] 李媛媛,沈金雄,王同华,等. 利用 SRAP,SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱[J]. 中国农业科学,2007,40(6):1118-1126.

1 材料与方法

1.1 供试菌株

芒果胶胞炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)单孢菌株 A2 由中国热带农业科学院环境与植物保护研究所鉴定并提供。

1.2 方法

1.2.1 病原菌菌丝的收集和核酸提取 将 A2 接种至 PDA 上培养收集菌丝。gDNA 的提取按照 OMEGA HP Fungal DNA Kit 说明书操作。RNA 的提取按照 OMEGA Fungal RNA Kit 说明书操作。

1.2.2 *Lac2* 基因的 PCR 扩增 采用同源克隆策略。经本地查找橡胶树胶胞炭疽菌全基因组测序数据,设计特异引物对 *Lac2*-F(5'-ATGCTCGCCATCAAAGACCTTATGAA-3')和 *Lac2*-R(5'-TTACTGACCGCTGTCAATGAC-3')扩增漆酶基因,以 *C. gloeosporioides* 基因组 gDNA 为模板,扩增体系(50 μL):10×PCR Buffer 5 μL;dNTP Mixture(各 2.5 mmol/L)4 μL;*Lac2*-F(10 μmol/L)和 *Lac2*-R(10 μmol/L)各 2 μL;TaKaRa *Taq* HS 0.5 μL;DNA 模板 1 μL;加 ddH₂O 补至 50 μL。扩增程序:95℃ 5 min;95℃ 50 s,60℃ 40 s,72℃ 2 min,35 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物的凝胶回收、连接分别按照 OMEGA 和 TaKaRa 相应试剂盒操作。用载体通用引物 M13-47 和 RV-M 进行 PCR 鉴定后,选择阳性克隆测序(华大基因生物有限公司)。

1.2.3 *Lac2* 基因的 RT-PCR 扩增 用 DNAMAN 1.0 软件对所得 *Lac2* 基因全序列与 GenBank 中的嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*) *lac* 基因 cDNA 序列(索取号:XM-003659795.1)比对分析后,用推定的 cDNA 序列设计引物对 *RLac2*-F(5'-TCGCCATCAAAGACCTTATGAAA-3')和 *RLac2*-R(5'-ACCTGGTCAACCTTGGACGGGAT-3')用于扩增 *Lac2* 的 cDNA。RT-PCR 按照 PrimeScript™ II High Fidelity RT-PCR Kit 说明书操作,其余同上。

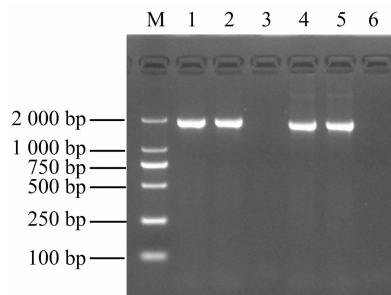
1.2.4 *Lac2* 序列分析 用 ExPASy 的 ProtParam 在线分析软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析该蛋白序列组分;利用 Clustal X 1.81 软件进行多重序列比对,采用 MEGA 5.1 软件通过 neighbor-joining 方法构建系统进化树,其中 bootstrap 设为 1000 replicates。其余参考文献[12]。

1.2.5 *Lac2* 基因在分生孢子不同萌发时段的半定量表达分析 通过筛选,选用真菌 18S rRNA 通用引物作为内参基因(SR5:5'-GTGCCCTTCCGCTCAATT-3',SR7R:5'-AGTTAAAAGCTCGTAGTTG-3');根据已获得的 *Lac2* cDNA 序列,设计半定量引物对 *qLac2*-F(5'-ACAACGGTAGCGTTCGTGTTATTG-3')和 *qLac2*-R(5'-ACCTGGTCAACCTTG-GACGGGAT-3')。参考文献[13],配制 1×10⁷/mL 的孢子悬浮液,取 6 mL 均匀涂布于保鲜膜上,保湿密闭,置于 28℃ 黑暗培养,分别收集处理 0、1、2、4、6、9、12、18 h 后的分生孢子,提取总 RNA。扩增体系(25 μL):Primer STAR HS 12.5 μL;*qLac2*-F(10 μmol/L)和 *qLac2*-R(10 μmol/L)各 1 μL;cDNA 模板 1 μL;加 ddH₂O 补至 25 μL。扩增程序:95℃ 3 min;95℃ 30 s,65℃ 40 s,72℃ 40 s,34 个循环;72℃ 7 min。

2 结果与分析

2.1 芒果胶胞炭疽菌 *Lac2* 基因的克隆

用设计的特异引物对 *Lac2*-F 和 *Lac2*-R,以芒果胶胞炭疽菌 gDNA 为模板扩增获得了约 2 000 bp 的片段(图 1),与预期的序列大小一致。双向测序结果表明,插入的目的片段大小为 1 966 bp。经 BLASTN 分析发现,该片段与多个不同物种的漆酶基因序列有很高的相似性,最高达 81%,但与已报道的芒果胶胞炭疽菌 *Lac1*[12]的同源性仅为 24.58%,说明该片段为芒果胶胞炭疽菌的另一个漆酶基因,命名为 *Lac2* 基因。用 Primer 5.0 软件推测 *Lac2* 基因编码的氨基酸序列,发现目的片段含完整的开放阅读框。



M—DL2000 DNA marker; 1~2—gDNA PCR产物;
4~5—gRNA PCR产物; 3, 6—空白对照

图1 *Lac2* 基因扩增结果

2.2 RT-PCR 扩增获得 *Lac2* 的 cDNA 序列

经 RT-PCR 扩增获得约 1 800 bp 的 cDNA 片段(图 1),测序表明大小为 1 785 bp。该序列已提交 GenBank,登录号为 KF924625。

2.3 *Lac2* 序列分析

2.3.1 *Lac2* 基因全长 DNA 与 cDNA 序列分析 比对分析 *Lac2* 基因 DNA 和 cDNA 序列,发现含 1 个 1 785 bp 大小的开放阅读框,起始密码子 ATG 位于第 1~3 bp 处,终止密码子 TAA 位于第 1 964~1 966 bp 处,自 ATG 到 TAG 的 DNA 全长 1 966 bp,其中存在 3 个大小分别 57、71、53 bp 的内含子(位于第 86~143、565~636 和 1 564~1 617 碱基处),是典型的真菌内含子的长度(49~85 bp),所有内含子均符合 GT-AG 法则。用 BioEdit 软件分析结果表明:*Lac2* 基因编码序列的双链核苷酸分子量大小为 1 087.22 ku,(G+C)摩尔百分含量为 56.86%,(A+T)摩尔百分含量为 43.14%,可见该编码区富含 GC 碱基,其中 C 的摩尔百分含量最高,为 34.01%。

2.3.2 *Lac2* 基因预测蛋白的生化特征分析 用 Primer 5.0 软件预测 *Lac2* 基因编码 594 个氨基酸,其中参考文献[14]发现其中含有 5 个可能的 N-糖基化位点(Asn-X-Thr/Ser)(分别位于第 9~11、152~154、394~396、401~403、580~582 氨基酸处),分子量约为 65.53 ku,包括 59 个强碱性氨基酸(KRH)、47 个强酸性氨基酸(DE)、242 个非极性氨基酸(AV-LIPFWM)、352 个极性氨基酸(GSTCYNQKRHDE),等电点(pI)为 6.56,可见是一种偏酸性蛋白质,富含极性氨基酸,特别是天冬酰胺(Asn)、甘氨酸(Gly)的含量分别达 9.1% 和 8.2%。在真菌漆酶中,由于 Cu 原子结合保守区的 Cys 残基下游的第 10 个氨基酸残基种类对漆酶氧化还原潜能具有重

要作用,Shin 据此将漆酶分为 3 类:1 型(Met)、2 型(Leu)和 3 型(Phe)^[15],按此分类标准,Lac2 属于 2 型漆酶。漆酶属含铜的多酚氧化酶,对 Lac2 的氨基酸序列分析发现它具有 4 个铜离子结合区域(His - X - His)、10 个铜离子结合位点(图 2)。

2.3.3 Lac2 基因预测蛋白的同源性分析 将该基因编码的氨基酸序列提交 NCBI 进行 BLASTP 同源比对,分析表明该漆酶与已发表的 *C. orbiculare* MAFF 240422 laccase - 1 precursor (ENH77191. 1)、*C. higginsianum* multicopper oxidase (CCF34868. 1)、*C. graminicola* M1. 001 multicopper oxidase

(EFQ36357. 1)、*Trichoderma* sp. T01 laccase (ACS45199. 1)、*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* R3 - 111a - 1 laccase - 1 (EJT70878. 1)、*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 Laccase - 2 (ENH66075. 1)、*Metarhizium acridum* CQMa 102 Lcc1 (EFY87101. 1)、*F. proliferatum* laccase (AAK72901. 1) 和 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* Lcc1 (ABS19938. 1) 基因编码的蛋白同源性较高,相似性分别为 79%、78%、70%、63%、61%、61%、61% 和 60%。系统聚类结果表明(图 3):Lac2 预测蛋白可能与西瓜炭疽菌(*C. orbiculare*)的 laccase 类或禾生炭疽菌(*C. graminicola*)的 multicopper oxidase 聚为一类。

		L1		L2		L3		L4
		T2T3		T3T3		T1 T2 T3		T3T3 T1
A2-Lac1 JQ762259	:123	HWGHQRNTNDQAGNGVTECP	162	GTSYSHSFSSQYGNVVGITQIN	461	HPHLLIGH	531	GAWPMCHIAWHSAGLSVQFL
A2-Lac2 KF924625	:135	HWGHGRQNTQWEDQVPAISQCP	174	GTSYSHSYSSQYAGLTGPIVY	480	HPMLIGF	535	GAWPFCHIAWHSAGLSVQFL
<i>A. auricula-judae</i> -Lcc1 KC991150	:125	HWGHGRFENSKDQVNGVTECP	164	GTSYSHSYSAQYGDVVGAIIVN	460	HPHLLIGH	515	GAWLMCHIAWHSAGLSVQFL
<i>A. auricula-judae</i> -Lcc2 KC991151	:124	HWGHGRQLQNTIADQVNGVTECP	163	GTSYSHSYSAQYGDVVGAIIVN	459	HPHLLIGH	514	GVVVMCHIAWHSAGLSVQFL
<i>A. auricula-judae</i> -Lcc3 KC991152	:76	HWGHGRFLTPWSQVPGITQFP	115	GAIVYSHHHMQMDGLQGVFLK	489	HPHLLIGH	557	MVTIMCHIDPHLAGNSFIMME
<i>A. auricula-judae</i> -Lcc4 KC991153	:137	HWGHLYQRGTIFYDGTHTGTCQ	177	GTIVVSHYMTQYTDGVDGAFIVH	491	HPHLLIGH	545	GAWAFCHISWMAIGLGLVQFYT
<i>A. auricula-judae</i> -Lcc5 KC991154	:127	HWGHGLQLHTNKYDQAGVTECP	166	GTSYSHSYSVQYGDVVGAIIVN	470	HPHLLIGH	528	GAWLLCHIAWHSAGLSVQFL
<i>A. auricula-judae</i> -Lcc6a KC991155	:77	HHGMFFNKTSYFDQALGVSCQ	119	GTIVVIAHSGHYVDGLIAPVIVH	425	HPHLLIGH	485	GAWLFCHIEWHLEAGLAVTLFE
<i>A. auricula-judae</i> -Lcc7a KC991157	:124	HWGHGRQLQNSINDQVNGVTECP	163	GTSYSHSYSAQYGDVVGAIIVN	458	HPHLLIGH	513	GVVVMCHIAWHSAGLSVQFL
<i>A. delicata</i> EJD35841	:78	HWGHGRFLTPWSQVPGITQFP	117	GAIVYSHHHMQMDGLQGVFLK	491	HPHLLIGH	559	MVTIMCHIDPHLAGNSFIMME
<i>A. delicata</i> EJD46356	:98	HWGHGRQLQNTIADQVNGVTECP	137	GTSYSHSYSAQYGDVVGAIIVN	433	HPHLLIGH	488	GVVVMCHIAWHSAGLSVQFL
<i>A. delicata</i> EJD49419	:119	HWGHGRMLQNSINDQVNGVTECP	158	GTSYSHSYSAQYGDVVGAIIVN	455	HPHLLIGH	510	GVVVMCHIAWHSAGLSVQFL
<i>A. delicata</i> EJD50415	:127	HWGHGRFENSKDQVNGVTECP	166	GTSYSHSYSAQYGDVVGAIIVN	462	HPHLLIGH	517	GAWLMCHIAWHSAGLSVQFL
<i>A. delicata</i> EJD54575	:77	HHGMFFNGTSYEDQAGVSCQ	119	GTIVVIAHSGHYVDGLIAPVIVH	425	HPHLLIGH	485	GAWLFCHIEWHLEAGLAVTLFE

T1-T3: 铜离子类型; L1-L4: 铜离子结合区域

图2 Lac2 基因推测氨基酸序列的铜离子结合位点

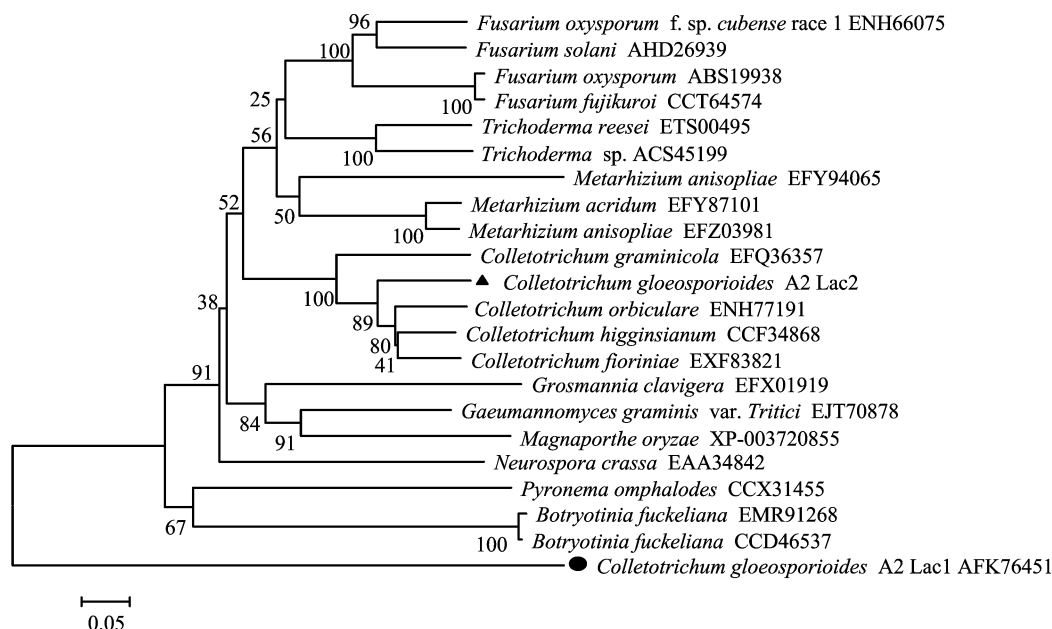


图3 LAC2预测蛋白与其他真菌漆酶蛋白的系统树

2.3.4 Lac2 基因预测蛋白的保守结构域分析 利用 NCBI 的 Blast 软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure/cdd/wrpsb.cgi>) 进行 Lac2 基因预测蛋白的结构域分析(图 4),发

现该蛋白中含有 Cu - oxidase 保守结构域,说明 Lac2 蛋白属于含铜的氧化物酶类。

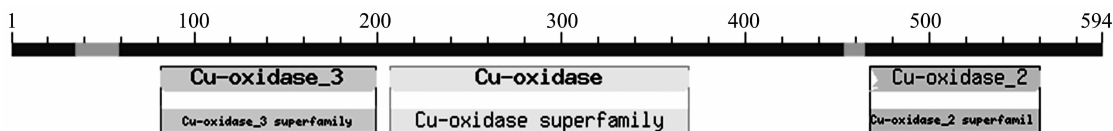


图4 Lac2 基因预测蛋白的保守结构域

2.4 Lac2 基因在分生孢子不同萌发时段的半定量表达分析 在胶孢炭疽菌分生孢子萌发过程中,Lac2 在不同时期表

达量不尽相同(图 5),有明显的升降趋势,总体呈“升—降—升—降”趋势,0 h Lac2 的表达比较弱,0 ~ 4 h 表达量逐渐上

升,至 4 h 达到第 1 个波峰,而 6 h 时突然减弱,9 h 又突然达到第 2 个波峰,随后逐渐减弱;总体上在处理 6 h 后表达量最低,9 h 后达到最高。据此初步推测 *Lac2* 与 *C. gloeosporioides* 分生孢子萌发后侵染寄主有关。

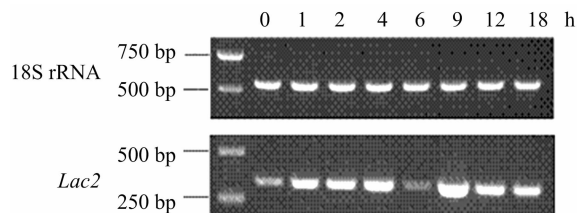


图5 *Lac2* 基因在不同侵染阶段的转录水平

3 讨论

漆酶一般含有 4 个铜离子结合区,不同漆酶基因所编码的氨基酸序列的同源性较低,但铜原子结合区保守性高,该区是鉴定获得基因是否为漆酶基因的主要依据^[7]。笔者所在实验室先后发现的胶胞炭疽菌的 2 个漆酶基因 *Lac1* 和 *Lac2* 的氨基酸序列同源性仅 24.58%,而对应的铜原子结合区保守性较高。可见,根据铜原子结合区保守序列设计简并引物是克隆漆酶基因有效途径。

漆酶基因广泛存在于子囊菌和担子菌中,在不同的生长条件、生长周期及侵染过程的表达量不同。在不同培养条件下,小麦全蚀病菌(*Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*)的 3 种同工漆酶的表达量存在明显差别,其中 *Lac1* 均表达,*Lac2* 只在含有 CuSO_4 的培养基上表达,而 *Lac3* 的表达仅在含寄主滤液的基础培养基上才能检测到^[16];番茄枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*)的 *Lac2*、*Lac4* 和 *Lac5* 在整个侵染过程中均不表达,而 *Lac1*、*Lac3* 和 *Lac9* 能表达,但时间上存在差异^[3]。*C. gloeosporioides* 孢子悬浮液处理 9 h 后,80% 以上的炭疽菌分生孢子萌发并形成附着胞,开始侵染寄主^[17];本试验 *Lac2* 在侵染 0~18 h 时段中,9 h 表达量最高,因此推测 *Lac2* 可能与 *C. gloeosporioides* 分生孢子萌发侵染寄主相关。

在不同植物病原真菌中的漆酶的功能差异较大。番茄枯萎病菌(*F. oxysporum* f. sp. *lycopersici*)的 3 个漆酶基因(*lac1*、*lac3* 和 *lac5*)的缺失突变体对致病力均无影响,而 $\Delta lac3$ 与氧化胁迫能力及对酚类化合物的敏感性相关, $\Delta lac1$ 与氧化胁迫能力及漆酶酶活相关^[3];玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)的漆酶基因(*StLAC1*)缺失突变体不能形成分生孢子,附着胞膨压、致病力、黑色素合成明显减弱,菌落颜色由灰黑色变为灰白色^[4];与本研究克隆的 *Lac2* 基因编码的蛋白同源性达 70% 以上的 *C. orbiculare* laccase - 1 precursor (ENH77191.1)、*C. higginsianum* multicopper oxidase (CCF34868.1) 和 *C. graminicola* multicopper oxidase (EFQ36357.1) 未见相应基因功能鉴定的报道,而 *Lac2* 编码蛋白与 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* 的 *Lac1* 编码的漆酶有较高的序列相似性,且 *Lac1* 与抗氧化反应及漆酶酶活有关,因此推测芒果胶胞炭疽菌的 *Lac2* 基因可能也有相似的功能。

但由于芒果胶胞炭疽菌与上述真菌在生活史、侵入寄主的方式、致病因子等方面均存在差异,该基因的具体功能还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 靳 蓉,张飞龙. 漆酶的应用技术[J]. 中国生漆,2013,32(2): 35-42.
- [2] Widsten P, Kandelbauer A. Laccase applications in the forest products industry: a review[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42(4): 293-307.
- [3] Cordoba C D, Roncero M I. Functional analyses of laccase genes from *Fusarium oxysporum*[J]. Phytopathology, 2008, 98(5): 509-518.
- [4] 詹 旭. 玉米大斑病菌漆酶基因 *StLAC1* 在黑色素合成中的功能分析[D]. 保定:河北农业大学,2011.
- [5] Fan X, Zhou Y, Xiao Y, et al. Cloning, expression and phylogenetic analysis of a divergent laccase multigene family in *Auricularia auricula-judae*[J]. Microbiological Research, 2014, 169(5/6): 453-462.
- [6] 肖书笑,田呈明,王永林. 黄栌枯萎病菌漆酶基因的鉴定及其在微菌核形成过程中的表达研究[J/OL]. [2013-12-20]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201312-625>.
- [7] Tsuji G, Fujikawa J, Ishida H. Laccase gene *LAC1* of *Colletotrichum lagenarium* is not essential for melanin biosynthesis and pathogenicity[J]. Journal of General Plant Pathology, 2001, 67(3): 182-190.
- [8] Lin S Y, Okuda S, Ikeda K, et al. *Lac2* encoding a secreted laccase is involved in appressorial melanization and conidial pigmentation in *Colletotrichum orbiculare*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012, 25(12): 1552-1561.
- [9] 王葵娣,王文华,郑服丛. 炭疽菌附着胞的研究进展[J]. 中国农学通报, 2007, 23(1): 265-270.
- [10] 王洪凯,林福呈,王政逸. 植物病原真菌附着胞的机械穿透力[J]. 菌物学报, 2004, 23(01): 151-157.
- [11] Butler M J, Gardiner R B, Day A W. Melanin synthesis by *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Mycologia, 2009, 101(3): 296-304.
- [12] 韦运谢,刘晓妹,张 贺,等. 芒果炭疽病菌漆酶基因 *lac1* 的克隆与序列特征分析[J]. 果树学报, 2013, 30(2): 202-206.
- [13] Takano Y, Kubo Y, Kuroda I, et al. Temporal transcriptional pattern of three melanin biosynthesis genes, *PKSI*, *SCD1*, and *THR1*, in appressorium-differentiating and nondifferentiating conidia of *Colletotrichum lagenarium*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(1): 351-354.
- [14] 李剑凤,洪宇植,肖亚中. 栓菌 420 漆酶同工酶 B 基因克隆及异源表达[J]. 生物学杂志, 2007, 24(3): 25-28.
- [15] Shin K S, Lee Y J. Purification and characterization of a new member of the laccase family from the white-rot basidiomycete *Coriolus hirsutus*[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2000, 384(1): 109-115.
- [16] Litvinseva A P, Henson J M. Cloning, characterization, and transcription of three laccase genes from *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*, the take-all fungus[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(3): 1305-1311.
- [17] 王 科. 黄栌炭疽病(*Colletotrichum gloeosporioides*)的研究[D]. 雅安:四川农业大学,2010.