

玉米大斑病菌亲环素基因的克隆及表达规律分析

赵玉兰¹, 李盼¹, 魏宁¹, 郝志敏¹, 曹志艳¹, 李志勇², 董金皋¹

(1. 河北农业大学生命科学学院/河北省植物生理与分子病理学重点实验室, 河北保定 071001;

2. 河北省农林科学院谷子研究所, 石家庄 050031)

摘要: 利用简并引物PCR结合RACE技术获得*S. turcica*中亲环素基因的全长, 并通过Real-time PCR技术检测该基因在病菌侵染结构发育过程中的表达模式。结果表明, 玉米大斑病菌亲环素基因开放阅读框全长1 125 bp, 3'UTR 154 bp, 5'UTR 93 bp, 编码374个氨基酸, 将此基因命名为*CyPsI*, 并将其cDNA序列提交GenBank, 获得登录号EU679371.1, Protein ID为ACD62431.1。系统发育树分析显示, *CyPsI*与玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、蓝莓枯枝病菌(*Neofusicoccum parvum*)等物种的亲环素同源性可达到90%以上。该基因在病菌分生孢子萌发、附着胞形成及侵染阶段均有表达, 至附着胞形成和侵染菌丝形成阶段, 转录水平分别升至分生孢子时期的2倍和3倍。

关键词: 玉米; 玉米大斑病菌; 亲环素; Ca^{2+} 信号途径; 附着胞

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Cloning and Expression Analysis of *Setosphaeria turcica* Cyclophilin Gene

ZHAO Yu-lan¹, LI Pan¹, WEI Ning¹, HAO Zhi-min¹, CAO Zhi-yan¹,

LI Zhi-yong², DONG Jin-gao¹

(1. Key Laboratory of Hebei Province for Plant Physiological and Molecular Pathology,

College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000;

2. Millet Institute of Agricultural Academy of Hebei Province, Shijiazhuang 050031, China)

Abstract: Cyclophilin is a highly conserved protein family and involved in the development and function of pathogenic fungi. This study aimed to obtain the cyclophilin gene and clarify cyclophilin regulating mechanism during the morphogenesis and pathogenicity of *Setosphaeria turcica*. The full length of the cyclophilin gene was obtained through degenerate polymerase chain reaction(PCR) combined with rapid-amplification of cDNA ends (RACE) technique and its expression patterns were detected at different developmental stages of *S. turcica* based on quantitative real-time PCR(qRT-PCR) analysis. The main results were as follows, the full-length open reading frame (ORF) of the cyclophilin gene was 1 125 bp[with a 3'-untranslated region(UTR) of 154 bp and a 5'-UTR of 93 bp] and encoded a protein of 374 amino acids. The gene was named as *CyPsI* and submitted to GenBank with the accession no. EU679371.1 and Protein ID ACD62431.1. phylogenetic tree analysis showed that it contained more than 90% of the homologues in *Bipolaris maydis* and *Neofusicoccum parvum* respectively; in addition, *CyPsI* continuously expressed during the developmental process of *S. turcica*, with the transcription levels at appressorium formation and invasive mycelial morphogenesis stages were respectively increased to 2 and 3 times of that at conidia.

Key words: Maize; *Setosphaeria turcica*; Cyclophilin; Ca^{2+} signaling; Appressorium

录用日期: 2018-06-21

基金项目: 国家自然科学基金项目(31601598)、国家现代农业(玉米)产业技术体系(CARS-02-12)、河北省自然科学基金项目(C2016204160)、河北省高等学校青年拔尖人才计划项目(BJ2014349Y)

作者简介: 赵玉兰(1992-), 女, 河北海兴人, 硕士, 研究方向为微生物与宿主互作的分子机制。Tel: 18233138122

E-mail: 18233138122@163.com

董金皋和李志勇为本文通讯作者。E-mail: shmdjg@hebau.edu.cn E-mail: lizhiyongds@126.com

大斑刚毛座腔菌(*Setosphaeria turcica*)俗称玉米大斑病菌,属于囊菌门刚毛座腔菌属真菌。该菌引起的玉米大斑病多发生于全球低温潮湿地域的玉米产区,严重威胁着玉米生产安全。目前,对该病害的防治主要以抗病品种为主,但由于病菌变异频繁,导致玉米品种抗性迅速丧失。因此,明确病原菌致病性的调控机制,寻找新的病害防控策略已成为倍受人们关注的研究热点。

作为典型的叶部病害,玉米大斑病菌主要通过分生孢子附着于寄主叶片表面,萌发并产生附着胞后,在附着胞中积累高膨压,最终促使侵入钉形成并穿透寄主表皮,完成侵染^[1]。在许多病原真菌中,感染相关的形态学变化都与信号转导通路有关。如稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)中,cAMP信号途径对于附着胞形成是至关重要的;黄瓜炭疽病菌(*Colletotrichum orbiculare*)中,cAMP-PKA信号通路介导分生孢子萌发,但不是附着胞分化所必需的;MAFI(酿酒酵母SLT2的直系同源物)基因敲除突变体表现出附着胞发育缺陷及致病性的降低^[2]。除此之外,钙离子信号对于附着胞的形成是十分重要的。研究表明,多种病原真菌的附着胞发育是由Ca²⁺信号触发的^[3]。抑制剂阻断试验发现,Ca²⁺信号途径与玉米大斑病菌、玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、稻瘟病菌、盘长孢状刺盘孢(*Colletotrichum gloeosporioides*)、三叶草刺盘孢(*Colletotrichum trifolii*)、桃腐病菌(*Monilinia fructicola*)等病原真菌的附着胞形成关系密切^[4-7]。禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)和粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)中,Ca²⁺还可作为菌丝分支的信号。但Ca²⁺信号途径的作用机制尚缺少深入研究。

亲环素(cyclophilin, CyP)作为环孢素A的作用靶蛋白,在内质网内与Ca²⁺结合蛋白-钙网蛋白共存,是Ca²⁺信号途径的重要组成部分,从低等原核生物到哺乳动物都有这类蛋白,该类蛋白的共同特征是具有肽脯氨酰顺反异构酶(peptidyl-lprolylcis-trans isomerase, PPIase)活性^[8,9]。文献报道,亲环素参与细胞内多个过程,如环境胁迫效应、细胞周期控制、钙信号和转录调控等,参与病原真菌的形态建成和致病过程^[10,11]。在新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)中,CPA1和CPA2蛋白能够调控细胞生长、交配及致病力^[12]。稻瘟病菌中,CYP1调控附着胞形成及膨压产生、脂类物质合成等致病相关过程^[13]。球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)中的亲环素蛋白可能与细胞增殖以及在侵染寄主时的信号转导有关^[14]。在植物病原真菌板栗疫病菌(*Cryphonectria parasitica*)中,亲环素编码基因cyp1表达下调伴随毒力减弱,该基

因缺失突变体,接种板栗茎,致病力减弱^[15]。本课题组前期利用Ca²⁺信号途径特异性抑制剂TFP^[16]、U-73122^[17],初步明确了该信号途径调控病菌的附着胞发育及毒素的生物合成,但其中的各保守元件具体发挥哪些作用尚不明晰。

本研究克隆玉米大斑病菌亲环素编码基因,并分析其表达模式,为进一步研究该基因在玉米大斑病菌生长发育及致病过程中的作用机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

玉米大斑病菌野生型菌株01-23,保存于河北农业大学生命科学学院真菌毒素与分子植物病理学实验室。

1.2 供试培养基

PDA培养基:马铃薯200 g,葡萄糖20 g,琼脂粉13 g,加水定容至1 L。

1.3 主要试剂

UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒购于上海生工生物工程技术有限公司;反转录酶、Oligo dT Primer(PrimeScript™ Reverse Transcriptase)、SMART™ RACE cDNA Amplification Kit(CLONTECH, Catalog #: K1811-1)、3-Full RACE Core Set (TaKaRa, Code No.D6121)等购自大连宝生物技术有限公司;DNA回收纯化试剂盒购于全式金生物技术有限公司;引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.4 玉米大斑病菌DNA和RNA提取

将玉米大斑病菌接种于PDA培养基上,25℃黑暗培养10 d,刮取菌丝体,分别采用CTAB法和UNIQ-10柱式Trizol总RNA抽提试剂盒提取玉米大斑病菌的基因组DNA和总RNA,用于基因克隆及RACE。

1.5 不同发育时期病菌材料的收集

向PDA培养基平板上25℃黑暗培养10 d的玉米大斑病菌中加入10 mL无菌水,轻刮菌落表面,经双层纱布过滤获得分生孢子悬浮液,调整浓度至1×10⁴个/mL。在水琼脂培养基表面放置消毒玻璃纸,表面滴加孢悬液25 μL,25℃黑暗诱导附着胞形成。分别选取诱导0 h(分生孢子时期)、3 h(芽管形成时期)、6 h(附着胞形成初期)、12 h(附着胞成熟时期)、24 h(侵染菌丝形成阶段)的分生孢子进行材料收集^[18]。Trizol法提取以上材料总RNA,并反转录为cDNA,用于实时定量PCR(Real-time quantitative PCR, qRT-PCR)分析。

1.6 亲环素基因扩增

根据丝状真菌亲环素保守结构域的基因序列,设计简并引物(表 1),以玉米大斑病菌 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。总反应体系为 25 μL,包括:10× PCR Buffer 2.5 μL、TaKaRa *Taq* DNA 聚合酶 5 U/μL 0.3 μL、cDNA 20 ng/μL 1 μL、上下游引物 10 μmol/L 各 1 μL、dNTP Mixture(2.5 mmol/L) 2 μL、dd H₂O 17.2 μL。PCR 反应条件为,95℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,45℃~55℃退火 30 s,72℃延伸 90 s,共进行 32 个循环;72℃延伸 10 min。取 PCR 扩增产物

10 μL,1%TAE 琼脂糖凝胶、1.5~2 V/cm 电泳检测,胶回收产物测序。

根据所获得的亲环素同源基因片段设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物(表 1),按照 SMARTTM RACE cDNA Amplification 试剂盒说明书扩增,根据 3'RACE 和 5'RACE 扩增产物的测序结果进行拼接获得全长 cDNA。根据全长 cDNA 中的 ORF 设计特异性引物,以玉米大斑病菌基因组 DNA 为模板,扩增亲环素全长基因。

表 1 试验所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	用途 Purpose
SCP1/SCP3	CMAAGACBGCCSRSAACTTC/ACCTCRCCRAAGACGACGTG	同源片段扩增
3'RACE /5'RACE	TTGAGAAGATCCACGACAGGCCGTTC/TGTAGTGGAGGGTTTGCCAGATGC	3'RACE/5'RACE 扩增
SCPD4/SCPD5	CTGTACTTGCGCGATCATGG/CCAGATATGGGCCAAAATGC	基因全长扩增
CyPs1-QRTF/R	AGTACAGCGACGCGATAGAGAAC/TTTTCCTGTATGCCCTCAA	Real-time PCR
18S-F/R	GGCATCAGTATTCAGGTGTGC/GTTAAGACTACGACGGTATC	Real-time PCR

1.7 生物信息学分析

利用 ProtParam(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析目的蛋白的理化性质。SMART 在线软件分析蛋白保守结构域,ClustalX 软件对相应氨基酸序列进行比对分析。利用 MEGA5.0 软件对玉米大斑病菌及其他物种同源蛋白氨基酸序列进行多重序列比对及着色处理,进而通过 Neighbor-joining method 构建系统发育树,Bootstrap 值为 1 000。

1.8 qRT-PCR 检测基因表达模式

选用 18S rRNA 作为内参基因。将不同发育阶段的材料总 RNA 反转录为 cDNA 做模板,SYBR Premix Ex *Taq*TM II (perfect real time)试剂盒进行 qRT-PCR 扩增。qRT-PCR 扩增总体系为 20 μL,ROX (50×)0.4 μL,2×SYBR Premix Ex *Taq* 10 μL,上下游引物 0.8 μL,模板 cDNA 50 ng/μL 2 μL,ddH₂O 6 μL,每个样品重复 3 次。qRT-PCR 反应程序为,95℃预变性 30 s;95℃变性 15 s,60℃退火 30 s,共进行 40 个循环。采用 ABI Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪进行扩增,分析亲环素基因在分生孢子萌发形成侵染结构过程中的表达情况。

的 cDNA 为模板扩增得到一段全长约为 0.35 kb 的扩增产物。将该片段核酸序列在 NCBI 网站上进行 BLASTX 比对,结果表明,该片段与其他病原菌中的亲环素蛋白氨基酸序列具有高度 90% 以上的相似性,初步确定该基因为亲环素同源基因,命名为 *CyPs1*。

根据该基因片段设计特异性引物,利用 RACE 技术对其进行 3'和 5'方向的延伸,获得 cDNA 全长。电泳检测表明,3'RACE 获得约 1 kb 和 0.75 kb 的扩增产物,5' RACE 获得约 0.6 kb 和 0.25 kb 的扩增产物(图 1),测序结果表明,3' RACE 的 1 kb 片段和 5' RACE 的 0.25 kb 片段可以与上述同源片段拼接成功。将产物测序结果及基因片段拼接,ORF finder 分析表明,拼接完成的 cDNA 中包含完整的 *CyPs1* ORF(Open Reading Frame),共 1 125 bp,3'UTR 154 bp,5'UTR 93 bp,编码 374 个氨基酸,将 *CyPs1* 的 cDNA 序列提交 GenBank,获得登录号 EU679371.1,Protein ID 为 ACD62431.1。与 ORF DNA 比对发现,*CyPs1* 由 3 个外显子和 2 个内含子组成,外显子分别为 13、68、1 044 bp,内含子均符合“GT-AG”法则。

2.2 CyPs1 的生物信息学分析

CyPs1 蛋白二级结构以 α-螺旋(Alpha helix, Hh)为主,占 41.71%;延伸链、β-转角、无规则卷曲的含量都较低,分别占 17.11%、12.03%和 29.14%。*CyPs1*

2 结果与分析

2.1 玉米大斑病菌亲环素基因全长的克隆

利用简并引物 SCP1 和 SCP3,以玉米大斑病菌

的相对分子质量为41 543.67 D,氨基酸残基中带负电荷氨基酸残基总数为61,带正电荷氨基酸残基总数为54,等电点(pI)为5.71。其7-173位氨基酸为cyclophilin_ABH_like保守结构域,e-value为8.79e-108,关键位点分别为His⁵⁴、Arg⁵⁵、Phe⁶⁰、Gln¹¹²、Phe¹¹⁴和His¹²²,其中,His¹²²在丝状真菌中高度一致,而在动物及酵母菌等其他生物类群中则以Trp最常见,少

数物种中为Phe;174-332位氨基酸包含Tetratricopeptide (TPR) repeat结构域,e-value为1.16e-05。氨基酸序列比对分析结果显示,玉米大斑病菌亲环素蛋白CyPs1与玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、油菜茎基溃疡病菌(*Leptosphaeria maculans*)、蓝莓枯枝病菌(*Neofusicoccum parvum*)等物种的相应蛋白氨基酸序列同源性可达到90%以上(图2)。

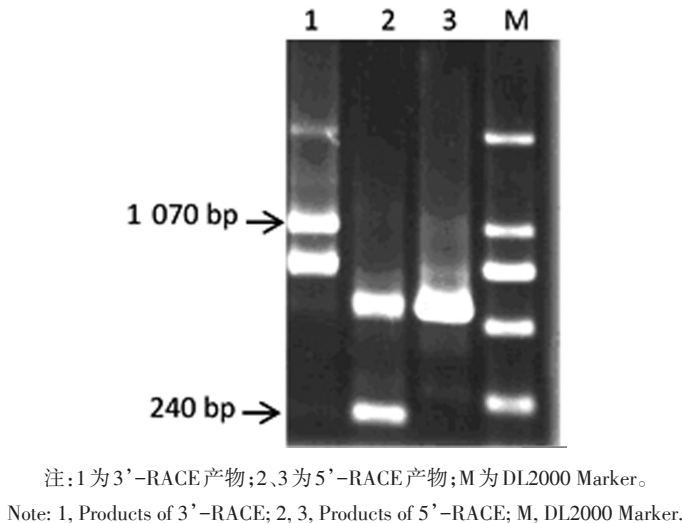


图1 玉米大斑病菌 *CyPs1* 基因的3'-RACE和5'-RACE
Fig.1 The results of 3'-RACE and 5'-RACE of *Setosphaeria Turcica CyPs1*



图2 cyclophilin_ABH_like保守结构域分析
Fig.2 The analysis of cyclophilin_ABH_like domain

2.3 CyPs1蛋白的系统发育分析

将玉米大斑病菌CyPs1氨基酸序列与其他真菌同源蛋白序列构建系统发育树(图3),发现同属物种在发育树中均聚于相同进化支,说明亲环素在属内具较高的保守性。玉米大斑病菌(*S. turcica*)与 *Bipolaris* 属的物种玉米小斑病菌(*Bipolaris maydis*)、水稻平脐蠕孢(*Bipolaris oryzae*)、小麦根腐病菌(*Bipolaris sorokiniana*)、维多利亚平脐蠕孢(*Bipolaris victoriae*)、玉米圆斑病菌(*Bipolaris zeicola*)在系统发育树中聚在同一进化支,具有较近的亲缘关系。

2.4 CyPs1在玉米大斑病菌侵染结构发育过程中的表达模式分析

*CyPs1*在病菌分生孢子萌发形成附着胞过程中持续表达。在分生孢子萌发初期芽管形成阶段,该基因表达水平未发生明显变化,与分生孢子持平;随着芽管的延伸,转录水平上升,至附着胞形成阶段,达到分生孢子时期的2倍,且平稳持续到附着胞成熟阶段;随后,附着胞进一步生长产生侵染菌丝,该基因表达进一步升高,24 h达到分生孢子的3倍(图4)。初步表明,该基因与病菌侵染结构的发育关

系密切,尤其在附着胞形成及侵染菌丝的生长过程中表现活跃,推测其对病菌致病性发挥重要调控作用。

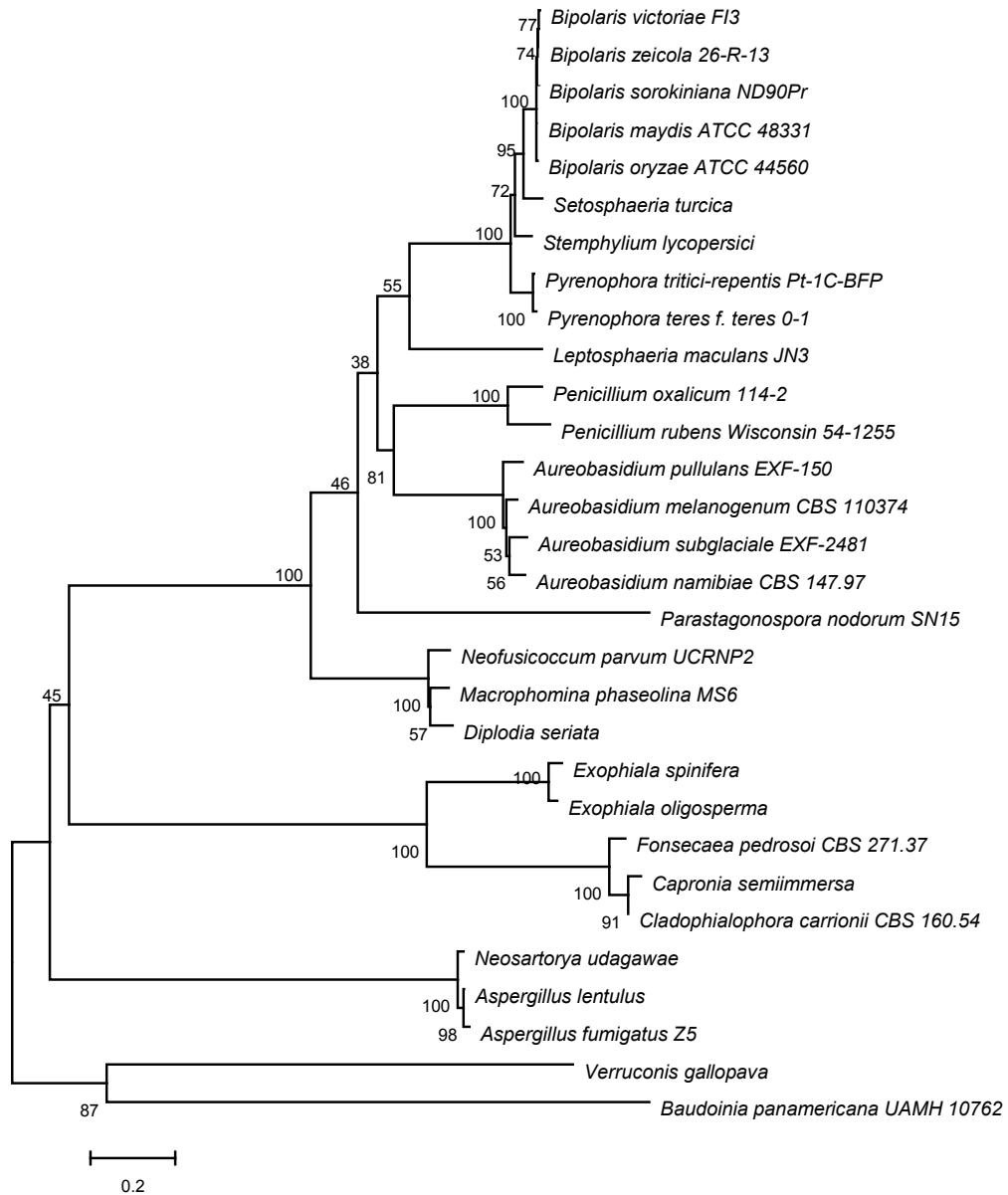


图3 玉米大斑病菌 *CyPs1* 与其他真核生物同源蛋白的系统发育分析

Fig.3 The phylogenetic analysis of *CyPs1* in *Setosphaeria turcica* and the homologs in other eukaryotes

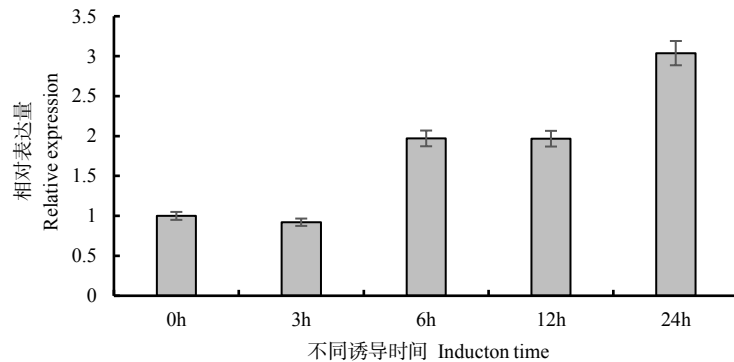


图4 玉米大斑病菌 *CyPs1* 基因表达模式的qRT-PCR分析

Fig.4 The qRT-PCR analysis of the expression patterns of *CyPs1* in *S. turcica*

3 结论与讨论

亲环蛋白是亲环素蛋白家族的肽基脯氨酰顺反异构酶,在许多真核细胞类型中活跃表达,参与信号转导、细胞分裂、转录调节以及胁迫应答等多种生理过程。研究发现,CyPA可以通过与内质网中钙离子结合蛋白结合,调节细胞内钙离子浓度从而参与 Ca^{2+} 信号转导过程^[19]。此外,亲环素能够与免疫抑制剂环孢霉素A(cyclosporine A, CsA)特异结合,形成CyP-CsA复合体,在人体中通过钙调磷酸酶抑制免疫反应^[20]。Liu等^[21]证明了CyP-CsA复合物的靶蛋白是依赖于 Ca^{2+} 的钙调素Ser/Thr蛋白磷酸酶(Calcineurin, CaN, 又称神经钙蛋白)。Lee等^[22]发现,在蚕豆中CyP-CsA复合体还可以作为1种蛋白磷酸化的抑制剂和阻断钙离子和钾离子进出保卫细胞的通道。

越来越多的证据表明,病原菌亲环蛋白在植物宿主的感染中起着重要的作用。稻瘟病菌的CYPI(*MgCYPI*)在营养生长和发病过程中表达水平的上调,是渗透栓形成、膨压生成和孢子形成所必需的。灰霉病菌中,*BCPI*表现出侵入宿主植物后的表达上调,是病菌穿透植物表皮细胞和植物体内生长所必需的。板栗疫病菌的 ΔcypI 菌株对CsA具有高度耐受性,将其接种到栗子茎上发现其毒力明显降低,此外,转录分析显示,*cypI*的缺失还降低了编码异三聚鸟苷三磷酸结合蛋白信号通路关键组件基因的转录水平。本研究所获得的亲环素基因与其他病原真菌的亲环素具有较高的同源性,表达模式分析发现,在玉米大斑病菌附着胞形成的中后期,*CyPsI*基因表现出明显的表达上调,暗示其在该病菌附着胞及感染菌丝的发育过程中发挥重要的调控作用。本课题组将在后续研究中进一步从分子水平揭示该基因调控病菌发育及侵染过程的作用机制。

参考文献:

- [1] 范永山,曹志艳,谷守芹,等. 不同诱导因素对玉米大斑病菌附着胞产生的影响[J]. 中国农业科学, 2004, 37(5): 769-772.
Fan Y S, Cao Z Y, Gu S Q, et al. Effect of different induction factors on appressorium of *setosphaeria turcica*[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(5): 769-772. (in Chinese)
- [2] Sakaguchi A, Miyaji T, Tsuji G, et al. Kelch repeat protein Clakel2p and calcium signaling control appressorium development in *Colletotrichum lagenarium*[J]. Eukaryotic Cell, 2008, 7(1): 102-111.
- [3] Lee S C, Lee Y H. Calcium/calmodulin-dependent signaling for appressorium formation in the plant pathogenic fungus *Magnaporthe grisea*[J]. Molecules & Cells, 1998, 8(6): 698-704.
- [4] 李俊霞,陈 颖,王立安. 钙信号途径参与小斑病菌致病过程的调控[J]. 微生物通报, 2005, 32(4): 1-4.
Li J X, Chen Y, Wang L A. Ca^{2+} Signaling pathway involved in *bipolaris maydis* conidium germination and appressorium formation[J]. Microbiology China, 2005, 32(4): 1-4. (in Chinese)
- [5] 王立安,王源超,李昌文,等. Ca^{2+} 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.
Wang L A, Wang Y C, Li C W, et al. Ca^{2+} signaling pathway involved in *Magnaporthe grisea* conidia and the regulation of the formation of adherent cells[J]. Bacterial System, 2003, 22(3): 457-465. (in Chinese)
- [6] Lee M H, Bostock R M. Induction, regulation, and role in pathogenesis of appressoria in *Monilinia fructicola*[J]. Phytopathology, 2006, 96(10): 1072-1080.
- [7] Ahn I P, Suh S C. Calcium restores prepenetration morphogenesis abolished by Methylglyoxal-Bis-Guanyl Hydrazone in *Cochliobolus miyabeanus* infecting rice[J]. Phytopathology, 2007, 97(3): 331-337.
- [8] Fisher G, Whittman Liebold B, Lang K, et al. Cyclophilin and peptidyl-prolyl cis-trans isomerase are probably identical proteins[J]. Nature, 1989, 337(6206): 476-478.
- [9] Takahashi N, Hayano T, Suzuki M. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase is the cyclosporin A-binding protein cyclophilin[J]. Nature, 1989, 337(6206): 473-475.
- [10] Andreeva L, Heads R, Green C J. Cyclophilins and their possible role in the stress response[J]. International Journal of Experimental Pathology, 1999, 80(6): 305-315.
- [11] Lu K P, Hanes S D, Hunter T. A human peptidyl-prolyl isomerase essential for regulation of mitosis[J]. Nature, 1996, 380(6574): 544-547.
- [12] Wang P, Cardenas M E, Cox G M, et al. Two cyclophilin A homologs with shared and distinct functions important for growth and virulence of *Cryptococcus neoformans*[J]. EMBO Reports, 2001, 2(6): 511-518.
- [13] Viaud M C, Balhadère P V, Talbot N J. A *Magnaporthe grisea* cyclophilin acts as a virulence determinant during plant infection[J]. Plant Cell, 2002, 14(4): 917-930.
- [14] 杜 茜,徐文静,赵洪锐,等. 白僵菌亲环素蛋白基因*BbCPLA*的克隆与分析[J]. 玉米科学, 2008, 16(6): 117-120.
Du Q, Xu W J, Zhao H K, et al. Cloning and analysis of a cyclophilin gene *BbCPLA* from *beauveria bassiana*[J]. Journal of Maize Sciences, 2008, 16(6): 117-120. (in Chinese)
- [15] Chen M, Jiang M, Shang J, et al. CYPI, a hypovirus-regulated cyclophilin, is required for virulence in the chestnut blight fungus[J]. Molecular Plant Pathology, 2011, 12(3): 239-246.
- [16] 李志勇,郝志敏,司贺龙,等. 玉米大斑病菌*CaM*基因的克隆及三氟拉嗪的抑菌作用[J]. 植物病理学报, 2008, 38(3): 277-282.
Li Z Y, Hao Z M, Si H L, et al. Cloning *CaM*(Calmodulin) gene and inhibitory effect of trifluoperazine on *Setosphaeria turcica*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2008, 38(3): 277-282. (in Chinese)
- [17] 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 *Seto-*

- sphaeria turcica*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010, 25(6): 118-121. (in Chinese)
- [18] Hao Z M, Tong Y M, Han Y, et al. Molecular characterization of *StpkaC2* and expression patterns of both PKA-c isoforms during the invasive growth of *Setosphaeria turcica*[J]. Tropical Plant Pathology, 2015, 40(4): 244-250.
- [19] Zhang X C, Wang W D, Wang J S, et al. PPlase independent chaperone-like function of recombinant human Cyclophilin A during arginine kinase refolding[J]. Febs Letters, 2013, 587(6): 666-672.
- [20] Walsh C T, Zydowsky L D, Mckee F D. Cyclosporin A, the cyclophilin class of peptidylprolyl isomerases, and blockade of T cell signal transduction[J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(19): 13115-13118.
- [21] Liu J, Jr F J, Lane W S, et al. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes[J]. Cell, 1991, 66(4): 807-815.
- [22] Lee Y K, Hong C B, Suh Y, et al. A cDNA clone for cyclophilin from *Griffithsia japonica* and phylogenetic analysis of cyclophilins[J]. Molecules & Cells, 2002, 13(1): 12-20.
- (责任编辑:朴红梅)

(上接第20页)

- Han Y T, Jiang L, Fan Y L, et al. Research progress on folate biofortification[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2009, 11(4): 23-28. (in Chinese)
- [17] 邵丽华,王莉,白文文,等. 山西谷子资源叶酸含量分析及评价[J]. 中国农业科学, 2014, 47(7): 1265-1272.
- Shao L H, Wang L, Bai W W, et al. Evaluation and analysis of folic acid content in millet from different ecological regions in Shanxi province[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(7): 1265-1272. (in Chinese)
- [18] 齐敏. 菠菜品种间品质评价及其叶酸含量测定方法的研究[D]. 南京农业大学, 2009.
- [19] 梁颖,张毅,李艺,等. 烹饪及贮藏对八种常见叶菜中叶酸含量的影响[J]. 现代食品科技, 2018(3): 1-5.
- Liang Y, Zhang Y, Li Y, et al. Effects of cooking methods and storage on folates in leafy vegetables[J]. Modern Food Science and Technology, 2018(3): 1-5. (in Chinese)
- (责任编辑:朴红梅)

(上接第28页)

- [33] 庞红喜,亢福仁,王成社,等. 大穗型小麦主要农艺性状配合力分析[J]. 西北农业学报, 2000, 9(2): 78-81.
- Pang H X, Kang F R, Wang C S, et al. Analysis on the combining ability of major agronomic characters of large spike wheat[J]. Northwest Agricultural Journal, 2000, 9(2): 78-81. (in Chinese)
- [34] 李伟,郑有良,兰秀锦,等. 小麦新品种(系)配合力和遗传力分析[J]. 四川农业大学学报, 2003, 21(3): 201-204.
- Li W, Zheng Y L, Lan X J, et al. Analysis of combining ability and heritability of new wheat varieties(lines)[J]. Journal of Sichuan Agricultural University, 2003, 21(3): 201-204. (in Chinese)
- [35] 张向群. 关于不完全双列杂交法估算配合力的研究[J]. 玉米科学, 2002, 10(增刊): 10-13.
- Zhang X Q. A study on the estimation of the combining ability of incomplete diallel hybridization[J]. Journal of Maize Sciences, 2002, 10(S): 10-13. (in Chinese)
- (责任编辑:朴红梅)