

细胞分裂蛋白激酶 PICdc15 调控荔枝霜疫霉致病力的机制研究

陈 伟^{1#}, 吕 毅¹, 洪丹露¹, 廖国良¹, 冯婉珍^{1,2*}, 陈庆河^{1,2*}

(1. 海南大学 热带农林学院, 海南 儋州 571737 中国; 2. 海南大学 南繁学院/ 三亚南繁研究院, 海南 三亚 572025 中国)

摘 要: 荔枝霜疫霉(*Peronophythora litchii*)引起的荔枝霜疫病在荔枝生产及采后储运过程中造成产量损失及品质下降等问题, 严重威胁荔枝产业的健康发展。荔枝霜疫霉隶属二倍体病原卵菌, 目前关于其致病机制的研究鲜有报道。在细胞分裂过程中各信号途径的协同调控对于病原菌的生长发育及其侵染寄主的能力有重要影响。本研究鉴定到了荔枝霜疫霉在细胞分裂过程中的关键蛋白激酶 PICdc15, 功能域预测分析发现 PICdc15 包含保守的 STKc 激酶功能域。通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 获得 PICdc15 的 N 端 STKc 功能域端缺失突变体 Δ PICdc15-Stk 和 C 端缺失突变体 Δ PICdc15-Back, 发现这两个突变体的营养菌丝生长速率显著降低; 孢子囊的产生能力和侵染寄主的能力均显著下降。DAPI 染色观察发现这两个突变体单位菌丝长度内的细胞核显著减少, 细胞分裂过程紊乱。对产生的孢子囊进行低温诱导后, 发现 Δ PICdc15-Stk 无法割裂, 且丧失了产生卵孢子的能力。本研究结果表明 PICdc15 的 N 端(激酶功能域端)及其 C 端(无明确功能域端)在荔枝霜疫霉生长发育及侵染寄主过程中均发挥重要功能。本研究结果可为病原卵菌相关研究提供新的理论基础。

关键词: 荔枝; 霜疫霉; 细胞分裂; 激酶; PICdc15

中图分类号: S432.4⁴ **文献标志码:** A **文章编号:** 1674–7054(2026)04–0665–08

陈伟, 吕毅, 洪丹露, 等. 细胞分裂蛋白激酶 PICdc15 调控荔枝霜疫霉致病力的机制研究[J]. 热带生物学报(中英文), 2026, 17(4): 665–672. DOI: [10.15886/j.cnki.rdswwb.20250059](https://doi.org/10.15886/j.cnki.rdswwb.20250059) CSTR: 32425.14. j.cnki.rdswwb.20250059



荔枝作为“南国四大果品”之一, 是中国南方重要的经济作物, 因其果肉鲜美多汁、营养丰富, 深受国内外消费者喜爱, 享有“中华珍品、岭南果王”之美誉^[1–3]。荔枝病害造成的产量减少和品质下降等问题严重制约荔枝产业发展, 其中, 由荔枝霜疫霉(*Peronophythora litchii*)引起的荔枝霜疫病是荔枝生产及采后储运过程中最重要的病害; 荔枝霜疫霉可侵染荔枝的嫩叶、嫩枝、花穗及果实, 引起花穗和果实腐烂, 流行年份甚至可造成荔枝减产 80%^[4]。

由于荔枝种植地区受限, 且荔枝霜疫霉隶属于二倍体病原卵菌, 基因敲除难度较大, 故关于荔枝霜疫霉的研究起步较晚且分子致病机制相关研

究非常有限。随着 Guo 等^[5]和 Ye 等^[6]先后对荔枝霜疫霉基因组的系统发育、基因组大小、基因数量、序列同源性、蛋白质家族大小、效应子等信息的公布分析及完善, 荔枝霜疫霉分子致病机制方面的研究逐步展开。首个关于荔枝霜疫霉致病功能基因的研究是在 2017 年, Jiang 等^[7]的研究结果表明, PIM90 的沉默导致荔枝霜疫霉卵孢子产量显著下降且游动孢子的释放受到阻碍, 阐述了 PIM90 在调节有性分化和无性分化方面发挥重要作用; 随后 Jiang 等^[8]又对 PIMAPK10 沉默使得病原菌的生长速率减慢、孢子囊产量下降、胞外漆酶活性下降且侵染寄主的能力显著降低, 说明 PIMAPK10 在荔枝霜疫霉生长发育及致病过程中发挥重要作

© CC BY 4.0 收稿日期: 2025–04–15

修回日期: 2025–04–25

基金项目: 海南省自然科学基金青年基金项目(322QN237); 海南大学科研启动基金项目(KYQD(ZR)-22090); 国家自然科学基金地区基金项目(32160614); 海南省荔枝产业技术体系项目(HNARS-08)

***第一作者:** 陈伟(1998—), 女, 海南大学热带农林学院 2021 级硕士研究生, E-mail: 1923467210@qq.com

***通信作者:** 冯婉珍(1993—), 女, 博士研究生, 讲师, 硕士生导师。研究方向: 植物病理学。E-mail: fwz@hainanu.edu.cn
陈庆河(1971—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师。研究方向: 植物病理学。E-mail: qhchen@hainanu.edu.cn

用,但是对 PIM90 和 PIMAPK10 的分子致病机制均未做深入解析。随着 CRISPR/Cas9 技术的推广与改进,该技术为荔枝霜疫霉的基因敲除提供了技术支持,近年来关于荔枝霜疫霉的分子致病相关的研究正在积极推进。

有丝分裂是多细胞生物生长发育的重要生命过程。有丝分裂过程需要大量相关蛋白进行精密的监测及调控,以保证细胞生长及分裂的适时开始及结束。其中细胞分裂退出过程在酵母及多个病原真菌中已有大量的相关研究^[9-10]。在这个过程中,GTP 水解酶 Tem1 激活蛋白激酶 Cdc15,磷酸化 Mob1-Dbf2 蛋白激酶复合体,从而通过调节蛋白磷酸酶 Cdc14 的磷酸化修饰以保证其适时进行核质穿梭,进而精准调控下游蛋白的磷酸化水平以保证细胞分裂过程适时退出^[11-14]。虽然在已报道的多个病原真菌中,该调控机制存在功能的保守性,这些蛋白均在细胞分裂退出过程中发挥重要作用,但在不同的病原真菌中也存在着特异性的调控机制。Tem1 功能的丧失导致禾谷镰刀菌致病力显著下降,而在稻瘟病菌中 Tem1 的缺失,并不影响致病力^[15]。在酿酒酵母中,Cdc15 通过直接磷酸化 Dbf2 而激活 Mob1-Dbf2 的激酶活性,进而调控下游蛋白磷酸酶 Cdc14 的磷酸化修饰,但是在稻瘟病菌中,Cdc15 可以直接与 Mob1 互作,且其对 Mob1 的磷酸化修饰作用对稻瘟病菌侵染寄主过程发挥重要作用^[16]。虽然细胞分裂退出相关调控蛋白在多个物种中存在其保守蛋白,但在不同物种中,其作用机制仍存在特异性。故本研究对细胞分裂在荔枝霜疫霉生长发育及致病过程中的重要性进行研究,同时进一步对荔枝霜疫霉中细胞分裂相关蛋白激酶 Cdc15 进行鉴定及功能分析,以期揭示荔枝霜疫霉的分子致病机制提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株 本研究用的荔枝霜疫霉(*P. litchii*)野生型菌株为 Shs3 菌株。试验荔枝叶片和果实品种均为妃子笑。基因编辑载体 pYF515 和 pBS 由本实验室保存。

1.2 PICdc15 结构域预测和系统发育分析 通过 NCBI 的 BLASTP(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)收集 5 个病原卵菌和 5 个病原真菌及模

式真菌酿酒酵母中 Cdc15 的同源蛋白序列,并使用 MEGA v10.1.7 软件进行进化关系分析。5 个病原卵菌分别为 *Phytophthora litchii*、*P. sojae*、*P. nicotianae*、*P. cinnamomi*、*P. megakarya*, 5 个病原真菌分别为 *Magnaporthe oryzae*、*Aspergillus flavus*、*Fusarium graminearum*、*F. oxysporum*、*Colletotrichum graminicola*, 及模式真菌酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*。通过 SMART 网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分别进行功能域预测分析。高级结构通过在线网站 Swiss model(<https://swissmodel.expasy.org/>)进行分析获得。

1.3 荔枝霜疫霉基因敲除 利用在线网站 EuPaGDT(http://grna.ctegd.uga.edu/batch_tagging.html)选取构建 CRISPR-Cas9 载体的 SgRNA 序列,并将序列送至生物公司进行合成,将合成的序列通过同源重组的方式连接至 pYF515 载体上。每个待敲除的基因构建两个不同位点的 pYF515 载体以提高敲除效率;同时扩增待敲除基因的上游、下游的 800 ~ 1 000 bp 片段及潮霉素片段,并通过同源重组的方式将其按照上游片段-潮霉素-下游片段的顺序连接至 pBS 载体上。将构建好的两个 pYF515 载体及 pBS 载体的质粒通过 PEG 介导的原生质体转化方式转入野生型菌株 Shs3 原生质体内过夜静置孵育,将孵育后的原生质体与含有 G418($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)PM 培养基混匀后倒平板培养,待平板长出菌丝后再用含有 G418($100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)PM 培养基进行覆盖,继续培养至平板上长出菌落后进行转接并提取基因组进行验证,并将基因组送至生物公司进行测序。本方法中提到的生物公司均为生工生物工程股份有限公司。

1.4 营养菌丝生长测定 将待测定菌株活化于 V8 固体培养基上生长至菌落直径约为 3 cm 时,切取菌落边缘 3 mm × 3 mm 的菌丝块接种于 V8 固体培养基上,在 25 °C 恒温培养箱中黑暗培养 6 d,观察菌丝状态,用十字交叉测量法测量菌株的直径并拍照记录,每个处理设置 3 个生物学重复。

1.5 孢子囊数量统计 将待测定菌株活化于 V8 固体培养基上生长至菌落直径约为 3 cm 时,切取菌落边缘 3 mm × 3 mm 的菌丝块接种于 V8 固体培养基上,在 25 °C 恒温培养箱中黑暗培养 6 d 后收集孢子囊,制备孢子囊悬浮液,将孢子囊悬浮液定容至 3 mL,吸取 10 μL 孢子囊悬浮液于血

球计数板上计数统计,每个平板计数6次,每个供试菌株设置3个生物学重复。

1.6 致病力测定 将待测定菌株活化于V8固体培养基上生长至菌落直径约3 cm备用。叶片致病力选取大小叶龄及生长状态相近的新鲜‘妃子笑’嫩叶,切取上述备用菌株菌落边缘5 mm × 5 mm菌丝块接种到‘妃子笑’嫩叶上,25 ℃条件下黑暗培养36 h后观察并拍照,利用Image J软件统计病斑面积,每个供试菌株设置3个生物学重复。果实致病力则选用新鲜‘妃子笑’果实,用无菌水清洗3遍后,晾干表面水分,切取上述备用菌株菌落边缘5 mm × 5 mm菌丝块接种到果实表皮上,25 ℃条件下黑暗培养96 h后观察并拍照,将果实表皮平铺后,利用Image J软件统计发病面积,计算占发病面积比例,每个供试菌株设置3个生物学重复。

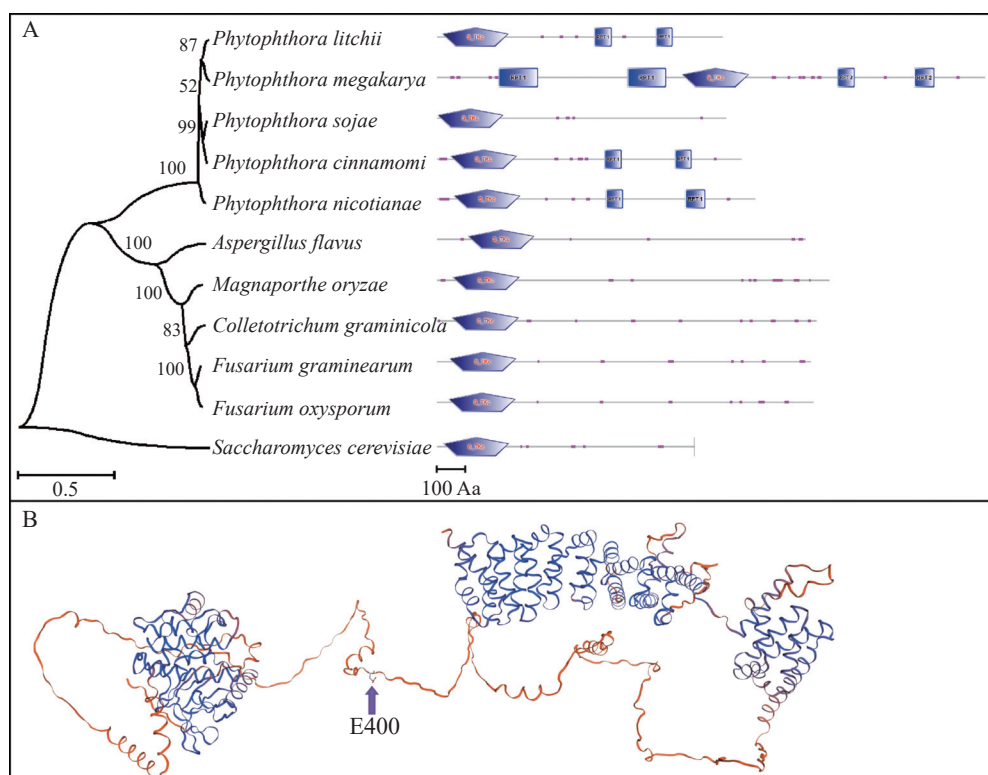
1.7 DAPI染色观察 将待测定菌株活化于V8固体培养基上生长至菌落直径约为3 cm时,切取菌落边缘3 mm × 3 mm的菌丝块于V8液体培养基中震荡培养36~48 h,用无菌水清洗菌丝球表面培养基,后置于质量浓度为10 μg·mL⁻¹的DAPI染料中在黑暗条件下染色3 min,再用无菌水清洗

菌丝球表面多余染料后,挑取少量菌丝于荧光显微镜下观察细胞核分布情况,每次观察50根菌丝,每个供试菌株设置3个生物学重复。

1.8 孢子囊割裂观察 取上述孢子囊悬浮液于12 ℃条件下低温诱导1 h后,置于25 ℃条件下根据试验菌株取不同的时间点进行FM4-64染色,于荧光显微镜下观察孢子囊割裂情况,并拍照记录,每次观察100个孢子囊,每个供试菌株设置3个生物学重复。

2 结果与分析

2.1 荔枝霜疫霉中细胞分裂相关蛋白激酶 PICdc15 的鉴定 通过同源性比对分析鉴定到了荔枝霜疫霉中 Cdc15 的同源蛋白 PICdc15, 基因 *PICDC15* 长度为3 940 bp, 编码1 082个氨基酸。进化关系分析结果显示, Cdc15 在真菌和卵菌中均高度保守存在, 且真菌与卵菌之间可能存在 Cdc15 特异性(图 1-A)。功能域预测分析结果显示, PICdc15 有一个 S_TKc 激酶功能域, 该功能域保守地存在于病原卵菌、病原真菌及酿酒酵母中(图 1-A)。进一步蛋白高级结构分析发现 PICdc15



A. Cdc15 进化分析及功能域预测分析; B. PICdc15 蛋白高级结构预测分析。

A. Evolutionary relationships and functional domain analysis of Cdc15; B. Tertiary structure prediction of PICdc15 protein.

图1 PICdc15 的进化分析、功能域和高级结构预测分析

Fig. 1 Evolutionary analysis, functional domains, and tertiary structure prediction of PICdc15

N 端激酶功能域和 C 端尾端之间依靠线状结构相连(图 1-B)。

2.2 荔枝霜疫霉感染寄主阶段 *PICDC15* 表达量显著上调 为探究蛋白激酶 *PlcDc15* 在荔枝霜疫霉感染寄主过程中的作用, 首先通过 qRT-PCR 对 *PICDC15* 在不同感染时期的表达量进行测定。以荔枝霜疫霉孢子囊接种到寄主叶片上 0 h 为对照组, 对荔枝霜疫霉营养生长阶段和感染不同时期的转录水平分析结果显示, *PICDC15* 在孢子囊与寄主接触初期, 处于低表达水平, 6 h 转录水平开始升高, 在 12 h 以后转录水平显著高于营养菌丝阶段, 且一直保持持续上调表达趋势, 直到 48 h 仍处于高表达水平(图 2-A)。这表明 *PlcDc15* 在荔枝霜疫霉生长发育及感染寄主过程中处于活跃状态, 为探索 *PICDC15* 作用机制, 进一步对其进行基因敲除。在本实验过程中, 荔枝霜疫霉为二倍体病原卵菌且 *PICDC15* 基因长度较长, 难以获得 *PICDC15* 基因全长的缺失突变体。结合功能域及高级结构分析, 将 *PICDC15* 在连接 N 端和 C 端的线性区域(E400)截为两段进行敲除, 并利用 CRISPR-Cas9 技术分别对这两段进行基因敲除。对多次验证获得的 $\Delta PlcDc15-Stk$ 突变体三个阳性转化子再次进行 PCR 验证, 其中, 验证引物 BN1 为 *PICDC15-Stk* 基因(对应的蛋白长度为第 1~400 个氨基酸)内部的验证引物, BW1 为 *PICDC15-Stk* 基因上游和潮霉素内部的验证引物, 结果显示 3 个转化子 $\Delta PlcDc15-StkT138$ 、 $\Delta PlcDc15-StkT221$ 、 $\Delta PlcDc15-StkT251$ 均为 $\Delta PlcDc15-Stk$ 的基因缺失突变体(图 2-B)。对多次验证获得的 $\Delta PlcDc15-Back$ 突变体 3 个阳性转化子再次进行 PCR 验证, 其中, 验证引物 BN2 为 *PICDC15-Back* 基因(对应的蛋白长度为第 401~1082 个氨基酸)内部的验证引物, BW2 为 *PICDC15-Back* 基因上游和潮霉素内部的验证引物, 结果显示 3 个转化子 $\Delta PlcDc15-BackT86$ 、 $\Delta PlcDc15-BackT153$ 、 $\Delta PlcDc15-BackT192$ 均为 $\Delta PlcDc15-Back$ 的基因缺失突变体(图 2-C)。

2.3 *PlcDc15* 功能的发挥对于的营养生长和孢子囊的形成至关重要 野生型菌株 Shs3、转化空白对照菌株 EV、 $\Delta PlcDc15-Stk$ 突变体的 3 个阳性转化子菌株 T138、T221、T251 和 $\Delta PlcDc15-Back$ 突变体的 3 个阳性转化子菌株 T86、T153、T192 的营养生长速率测定结果显示, 野生型菌株 Shs3 的平均菌落直径为 6.73 cm, 而 $\Delta PlcDc15-Stk$ 和

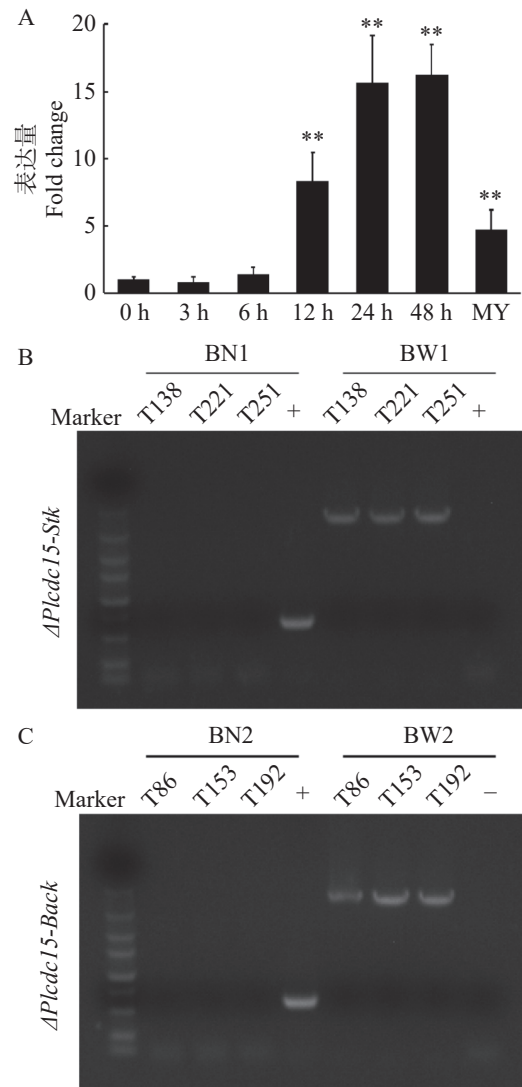


图 2 *PICDC15* 的表达量分析(A)及 $\Delta PlcDc15-Stk$ (B)和 $\Delta PlcDc15-Back$ (C)突变体的验证

Fig. 2 Expression analysis of *PICDC15* (A) and validation of the $\Delta PlcDc15-Stk$ (B) and $\Delta PlcDc15-Back$ (C) mutants

注: 差异显著性分析采用单因素方差分析法(**: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$), 下同。

Note: Significance analysis was conducted using one-way ANOVA (**: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$), similarly hereinafter.

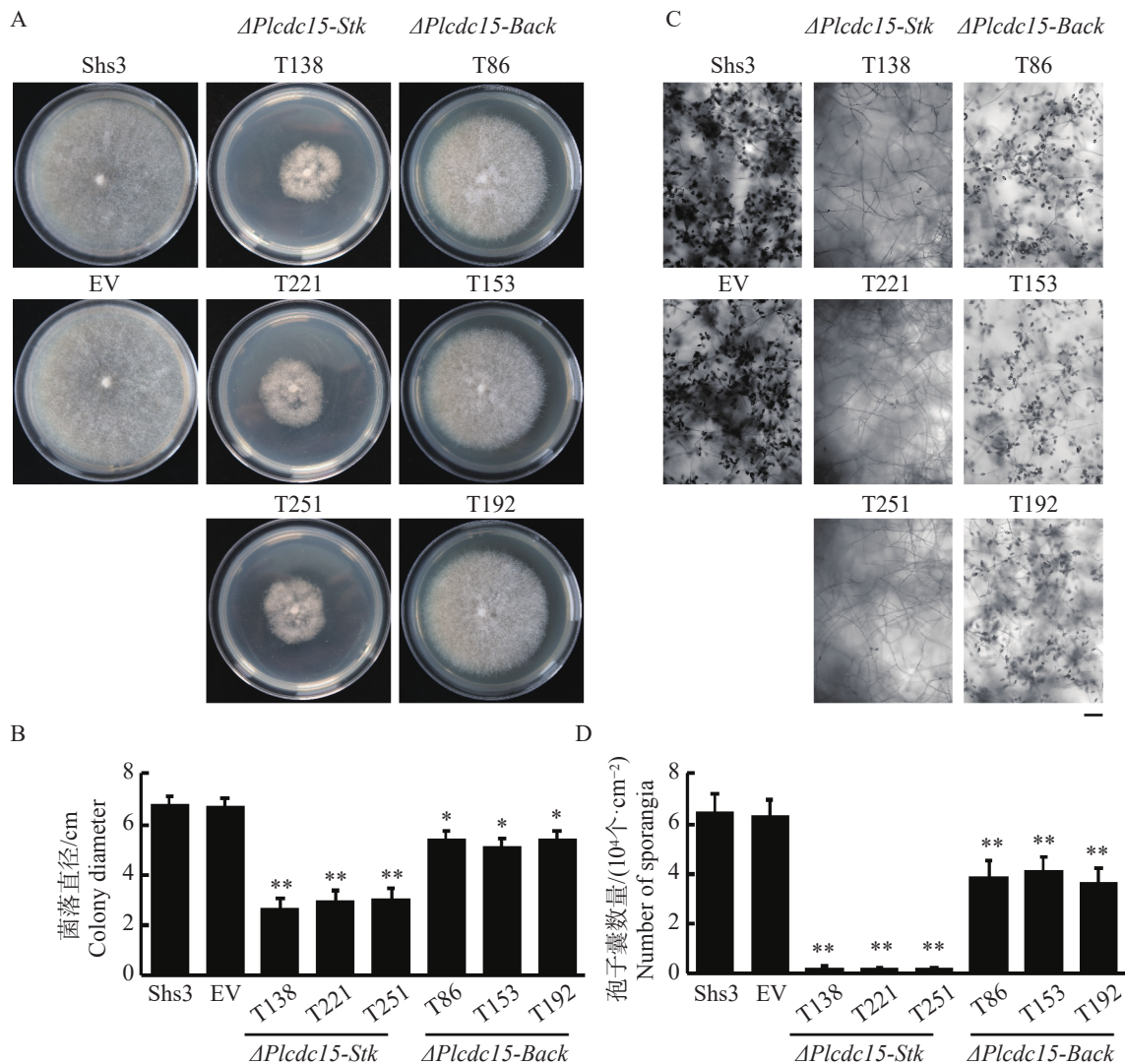
$\Delta PlcDc15-Back$ 突变体的平均菌落直径分别为 2.89 cm 和 5.32 cm, 均显著小于野生型(图 3-A—B)。而孢子囊产量统计结果显示, $\Delta PlcDc15-Stk$ 突变体孢子囊数量为 0.18×10^4 个 $\cdot \text{cm}^{-2}$, $\Delta PlcDc15-Back$ 突变体为 3.88×10^4 个 $\cdot \text{cm}^{-2}$, 野生型菌株 Shs3 为 6.53×10^4 个 $\cdot \text{cm}^{-2}$, 显著高于 2 个突变体(图 3-C—D)。上述结果表明, *PlcDc15* 的 N 端 STKc 功能域和 C 端 Back 端在荔枝霜疫霉生长及产孢过程中均发挥重要作用。

2.4 *PlcDc15* 功能丧失导致荔枝霜疫霉侵染寄主的能力下降 叶片致病力结果显示, 接种菌丝块于

荔枝嫩叶 36 h 后, $\Delta Plcdc15$ -Stk 突变体和 $\Delta Plcdc15$ -Back 突变体的病斑面积显著低于野生型菌株 (图 4-A)。果实致病力结果显示, $\Delta Plcdc15$ -Stk 突变体和 $\Delta Plcdc15$ -Back 突变体接种 96 h 后虽然可以侵染寄主, 但是与菌丝布满整个果实表面且已发育形成大量孢子囊的野生型相比, 2 个突变体的侵染果实的能力显著下降 (图 4-B), 上述结果说明 Plcdc15 功能的正常形式对于荔枝霜疫霉的侵染寄主是必要的。

2.5 Plcdc15 在细胞分裂调控过程中发挥重要功能 DAPI 染色结果显示, 与野生型均一有序的细胞核排布相比, $\Delta Plcdc15$ -Stk 突变体和 $\Delta Plcdc15$ -Back 突变体的细胞核密度降低, 且排布紊乱

(图 5-A)。这说明 Plcdc15 的 N 端 STKc 功能域和 C 端 Back 端在荔枝霜疫霉细胞分裂过程中均发挥重要作用。荔枝霜疫霉侵染寄主过程中孢子囊割裂和卵孢子的形成尤为重要, 且这些发育阶段的调控均与细胞分裂密切相关, 为进一步明确 Plcdc15 的作用机制, 通过 FM4-64 对低温诱导后的孢子囊染色, 诱导后 5 min 野生型菌株已经有超过 95% 的孢子囊处于割裂状态, 而同一阶段的 $\Delta Plcdc15$ -Stk 突变体和 $\Delta Plcdc15$ -Back 突变体的孢子囊无法进行割裂; 随着时间的延迟, 在 30 min 时 $\Delta Plcdc15$ -Back 突变体约 63% 孢子囊处于割裂状态, 而 $\Delta Plcdc15$ -Stk 突变体仍无法进行割裂 (图 5-B)。并且 $\Delta Plcdc15$ -Back 突变体卵孢子数

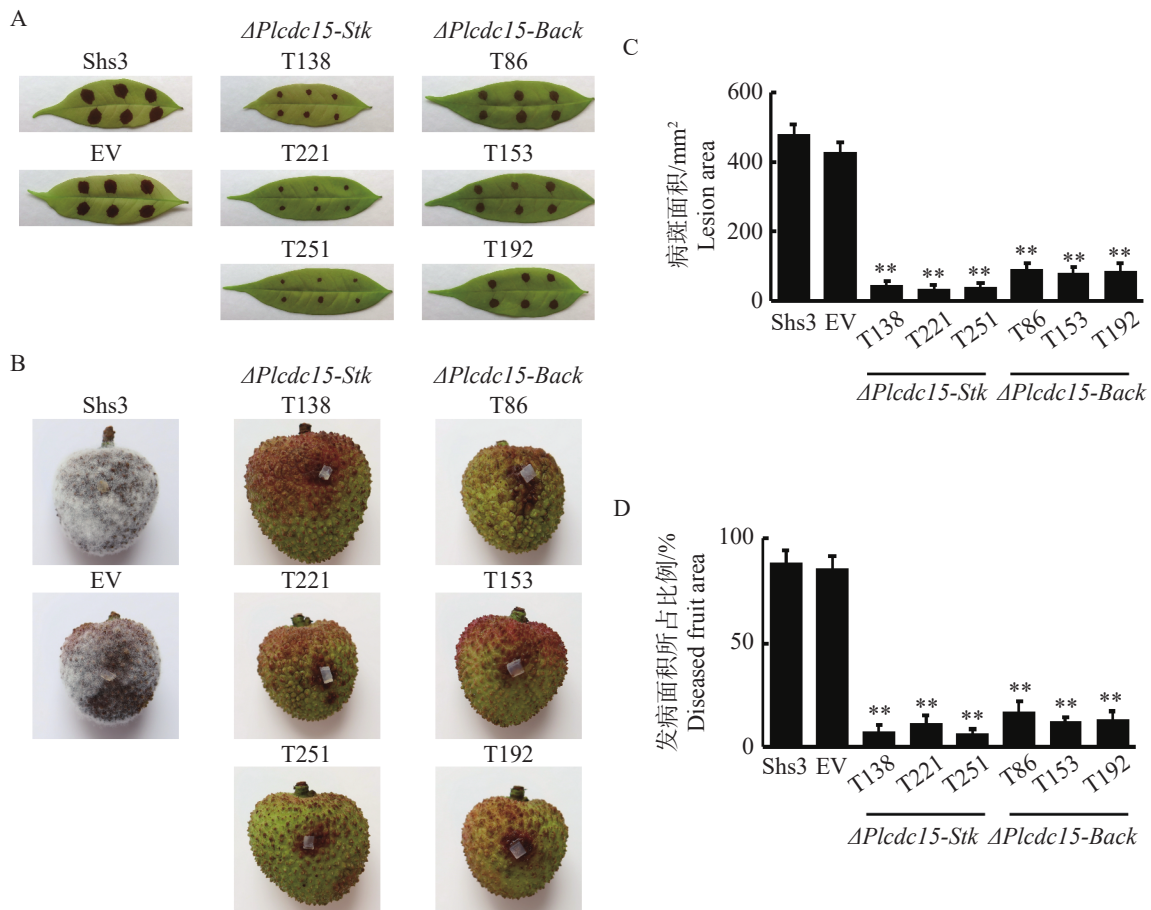


A. 营养生长速率测定; B. 营养生长速率的统计分析; C. 孢子囊数量测定; D. 孢子囊数量的统计分析。

A. Measurement of vegetative growth rate; B. Statistical results of vegetative growth rate using a one-way ANOVA; C. Quantification of sporangia; D. Statistical analysis of sporangia quantity.

图3 营养生长速率测定和孢子囊数量统计

Fig. 3 Measurement of vegetative growth rate and quantification of sporangia



A. 叶片致病力; B. 果实致病力; C、D. 叶片及果实致病力的统计分析。

A. Pathogenicity on leaves; B. Pathogenicity on fruits; C, D. Statistical analysis of pathogenicity on leaves and fruits.

图 4 致病力测定

Fig. 4 Pathogenicity assay

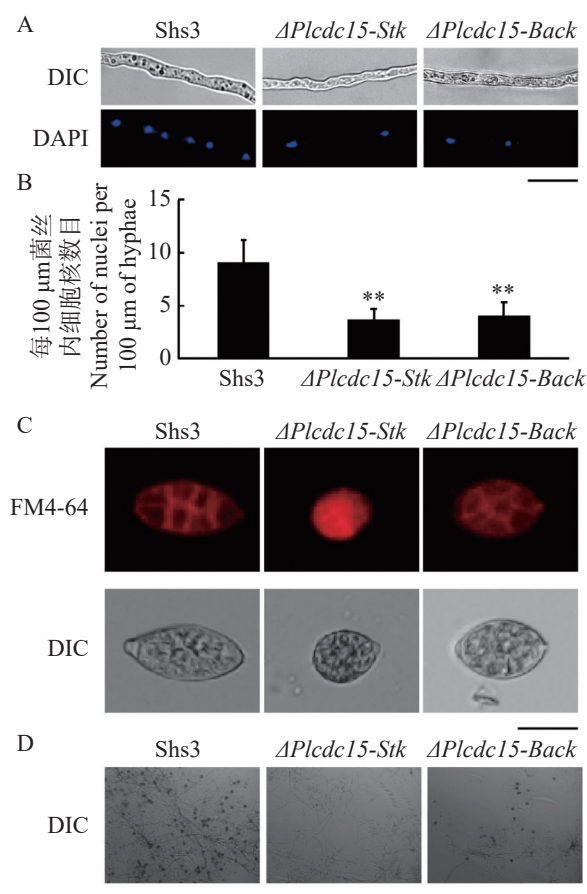
量显著下降而 $\Delta Plcdc15-Stk$ 突变体丧失了形成孢子的能力(图 5-C), 说明细胞分裂异常使得荔枝霜疫霉有性生殖无法进行。这说明 PICdc15 参与调控荔枝霜疫霉细胞分裂, 且在孢子囊割裂及形成卵孢子过程中发挥重要功能。

3 讨论

荔枝生产及采后储运过程中病害的发生制约荔枝产业健康发展, 其中荔枝霜疫病危害最为严重。荔枝霜疫霉属于二倍体病原卵菌, 由于其寄主种植范围局限, 以及其全基因组测序较晚等原因, 其分子致病机制研究较为有限。随着中国对热带特色高效农业的大力扶持以及基于 CRISPR-Cas9 的敲除技术的发展, 荔枝霜疫霉的分子致病机制开始逐渐受到相关行业和科研人员的关注。目前虽然已有相关文章报道鉴定到了荔枝霜疫霉致病相关的功能基因, 但是在细胞分裂相关方面尚无相关研究报道^[17-21]。因此本研究致力于探索

荔枝霜疫霉细胞分裂相关的调控机制。

荔枝霜疫霉在荔枝的生长及采后储运过程中, 可以通过其营养菌丝和孢子囊感染寄主植物, 所以营养生长和孢子囊的异常将使荔枝霜疫霉感染寄主的能力受到影响。同源性比对分析及多种生物信息学分析鉴定到了荔枝霜疫霉中 Cdc15 的同源蛋白 PICdc15, 该蛋白在多个卵菌中都保守存在, 且都拥有保守的磷酸酶功能域, 提示卵菌中 Cdc15 可能也是通过发挥磷酸酶功能参与调控细胞分裂过程。而通过进化关系推测真菌与卵菌之间还是可能存在其特异性的。并且在侵染阶段 PICdc15 的持续上调表达, 说明 PICdc15 可能在侵染寄主过程中发挥重要功能。本研究通过对 PICdc15 的 N 端激酶功能域和 C 端区域分别进行功能分析, 发现 PICdc15 的 N 端激酶功能域和 C 端区域在荔枝霜疫霉中均参与调控细胞分裂过程, 且其功能的正常进行对于荔枝霜疫霉的生长发育及侵染寄主的过程均至关重要。该项研究明



A. DAPI 染色 (标尺为 20 μm); B. DAPI 染色的统计分析; C. 卵孢子形成观察 (标尺为 50 μm); D. FM4-64 孢子囊割裂染色 (标尺为 10 μm)。

A. DAPI staining (Scale bar = 20 μm); B. Statistical analysis of DAPI staining; C. FM4-64 staining of sporangial cleavage (Scale bar = 10 μm); D. Observation of oospore formation (Scale bar = 50 μm).

图5 细胞核 DAPI 染色、孢子囊割裂及卵孢子形成观察
Fig. 5 DAPI staining, sporangial cleavage and oospore formation

确了 PICdc15 激酶功能域及其没有明确的功能域 C 端对于 PICdc15 功能发挥均至关重要, 为病原卵菌的研究提供了科学的理论基础, 可望为病原卵菌的特异性杀菌剂的研发提供潜在的靶位点。

参考文献:

- [1] 祝前峰, 陆荣鑑, 鲁峻, 等. 荔枝采摘机械的研究现状与发展趋势[J]. 林业机械与木工设备, 2021, 49(8): 11–19. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-2953.2021.08.002>
- [2] 张名位, 董丽红, 张瑞芬. 荔枝果肉的主要活性物质及其健康效应研究进展[J]. 食品科学技术学报, 2019, 37(3): 1–12. <https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-6002.2019.03.001>
- [3] 丁莉, 张益, 金琰, 等. 乡村振兴背景下海南荔枝产业发展分析[J]. 农业展望, 2021, 17(5): 31–35. <https://doi.org/10.3969/j.issn.1673-3908.2021.05.006>

- [4] 孔广辉, 冯迪南, 李雯, 等. 荔枝霜疫病的研究进展[J]. 果树学报, 2021, 38(4): 603–612. <https://doi.org/10.13925/j.cnki.gsx.20200385>
- [5] Guo H Y, Bao J D, Lin L Y, et al. Genome sequence data of *Peronophythora litchii*, an oomycete pathogen causing litchi downy blight[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2021, 34(6): 707–710. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-20-0303-A>
- [6] Ye W W, Wang Y, Shen D Y, et al. Sequencing of the litchi downy blight pathogen reveals it is a *Phytophthora* species with downy mildew-like characteristics[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2016, 29(7): 573–583. <https://doi.org/10.1094/MPMI-03-16-0056-R>
- [7] Jiang L Q, Ye W W, Situ J J, et al. A Puf RNA-binding protein encoding gene *PIM90* regulates the sexual and asexual life stages of the litchi downy blight pathogen *Peronophythora litchii*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2017, 98: 39–45. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.12.002>
- [8] Jiang L Q, Situ J J, Deng Y Z, et al. PIMAPK10, a mitogen-activated protein kinase (MAPK) in *Peronophythora litchii*, is required for mycelial growth, sporulation, laccase activity, and plant infection[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 426. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00426>
- [9] Massagué J. G1 cell-cycle control and cancer[J]. *Nature*, 2004, 432(7015): 298–306. <https://doi.org/10.1038/nature03094>
- [10] Takahashi S, Miura H, Shibata T, et al. Genome-wide stability of the DNA replication program in single mammalian cells[J]. *Nature Genetics*, 2019, 51(3): 529–540. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0347-5>
- [11] Rock J M, Amon A. Cdc15 integrates tem1 GTPase-mediated spatial signals with polo kinase-mediated temporal cues to activate mitotic exit[J]. *Genes & Development*, 2011, 25(18): 1943–1954. <https://doi.org/10.1101/gad.17257711>
- [12] Simanis V. Events at the end of mitosis in the budding and fission yeasts[J]. *Journal of Cell Science*, 2003, 116: 4263–4275. <https://doi.org/10.1242/jcs.00807>
- [13] Visintin R, Stegmeier F, Amon A. The role of the polo kinase Cdc5 in controlling Cdc14 localization[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2003, 14(11): 4486–4498. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-02-0095>
- [14] Stegmeier F, Visintin R, Amon A. Separase, polo kinase, the kinetochore protein Slk19, and Spo12 function in a network that controls Cdc14 localization during early anaphase[J]. *Cell*, 2002, 108(2): 207–220. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00618-9](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00618-9)
- [15] Miao P F, Mao X Z, Chen S, et al. The mitotic exit mediated by small GTPase Tem1 is essential for the patho-

- genicity of *Fusarium graminearum*[J]. *PLoS Pathogens*, 2023, 19(3): e1011255. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011255>
- [16] Feng W Z, Wang J S, Liu X Y, et al. Distinctive phosphorylation pattern during mitotic exit network (MEN) regulation is important for the development and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*[J]. *Stress Biology*, 2022, 2(1): 41. <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00063-0>
- [17] Lv L, Yang C D, Zhang X, et al. Autophagy-related protein PLATG2 regulates the vegetative growth, sporangial cleavage, autophagosome formation, and pathogenicity of *Peronophythora litchii*[J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2322183. <https://doi.org/10.1080/21505594.2024.2322183>
- [18] Li W, Li P, Deng Y Z, et al. Litchi aspartic protease LcAP1 enhances plant resistance via suppressing cell death triggered by the pectate lyase PIPe18 from *Peronophythora litchii*[J]. *New Phytologist*, 2024, 242(6): 2682–2701. <https://doi.org/10.1111/nph.19755>
- [19] Situ J J, Song Y, Feng D N, et al. Oomycete pathogen pectin acetylesterase targets host lipid transfer protein to reduce salicylic acid signaling[J]. *Plant Physiology*, 2024, 194(3): 1779–1793. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad638>
- [20] Li P, Li W, Zhou X F, et al. *Peronophythora litchii* RXLR effector *P. litchii* avirulence homolog 202 destabilizes a host ethylene biosynthesis enzyme[J]. *Plant Physiology*, 2023, 193(1): 756–774. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiad311>
- [21] Yu G, Li W Q, Yang C D, et al. PIAtg8-mediated autophagy regulates vegetative growth, sporangial cleavage, and pathogenesis in *Peronophythora litchii*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2024, 12(1): e0353123. <https://doi.org/10.1128/spectrum.03531-23>

Mechanism of the cell division protein kinase PICdc15 regulates the pathogenicity of *Peronophythora litchii*

Chen Yi^{1#}, Lyu Yi¹, Hong Danlu¹, Liao Guoliang¹, Feng Wanzhen^{1,2*}, Chen Qinghe^{1,2*}

(1. School of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. Nanfan School/Sanya Nanfan Institute, Hainan University, Sanya, Hainan 572025, China)

Abstract: *Peronophythora litchii* causes the most destructive disease on litchi, litchi downy blight. PICdc15, a key protein kinase involved in the cell division process of *P. litchii*, was identified. Domain prediction analysis revealed that PICdc15 contains a conserved STKc kinase domain. The CRISPR-Cas9 system, a genome editing tool, was used to produce the N-terminal STKc kinase domain-deletion mutant $\Delta\text{PICdc15-Stk}$ and the C-terminal deletion mutant $\Delta\text{PICdc15-Back}$. Both mutants exhibited significant reduction in vegetative growth rate, sporulation capacity, and pathogenicity. DAPI staining revealed disrupted cell division processes in both mutants. After induced at low temperature, $\Delta\text{PICdc15-Stk}$ failed to undergo cleavage and lost the ability to produce oospores. All the results highlights the essential roles of both the N-terminal kinase domain and the C-terminal region of PICdc15 in the growth, development, and pathogenicity of *P. litchii*. These findings provide new theoretical insights for research on pathogenic oomycetes.

Keywords: *Peronophythora litchii*; cell division; kinase; PICdc15; pathogenicity

(责任编辑:叶 静)