



黄曲霉 Ste50 衔接子蛋白对生长发育及致病性的影响

袁军[#], 秦岭[#], 赵家儒, 王银春, 汪世华^{*}

福建农林大学生命科学学院, 福建省病原真菌与真菌毒素重点实验室, 福建 福州 350002

摘要: 【目的】Ste50 是真菌中重要的衔接子蛋白, 在多个 MAPK 级联通路中起重要的信号衔接与传递作用。本研究鉴定出了黄曲霉 AflSte50 蛋白, 并发现了其对黄曲霉的生长、产孢、致病能力和响应渗透压胁迫等方面的影响。【方法】首先通过生物信息学方法在黄曲霉 NRRL 3357 中鉴定出 *ste50* 基因, 并通过同源重组的方法构建了 *ste50* 基因的敲除和互补突变体菌株。而后, 对基因敲除在黄曲霉生长发育、次级代谢产物合成和胁迫响应等方面的作用进行了研究。【结果】与野生型相比, $\Delta Aflste50$ 菌株生长速度和 AFB₁ 合成量降低且不能产生菌核, 同时对花生、玉米种子的致病能力下降。该基因在渗透胁迫条件下正调控 MAP 激酶的磷酸化水平, 但对细胞壁胁迫无响应。【结论】Ste50(AFLA_002340)是黄曲霉衔接子蛋白, 影响黄曲霉的生长、发育和 AFB₁ 的合成, 能够响应渗透压胁迫, 在 HOG 通路中发挥作用。

关键词: 黄曲霉, 衔接子蛋白, AFB₁, 致病性

黄曲霉(*Aspergillus flavus*)是一种广泛分布于自然界中的动物和植物致病丝状真菌, 它能够寄生在主要经济农作物(花生, 玉米等)上, 并产生黄曲霉毒素(aflatoxins)^[1]。黄曲霉毒素是黄曲霉产生的主要次级代谢产物, 其中黄曲霉毒素 B₁ (aflatoxins B₁, AFB₁)是目前发现的致病性最强的真菌毒素^[2]。人类或动物在食用被黄曲霉污染后的食品或饲料后, 容易造成黄曲霉毒素中毒, 严重的可能会导致肝癌的产生^[3]。黄曲霉在营养条件充

足的情况下, 能够通过无性繁殖产生大量分生孢子。分生孢子具有体积小易于传播的特点, 能够侵染植物造成曲霉病^[4]。而菌核是黄曲霉产生的用来适应恶劣生长环境的菌丝团体, 在适宜的条件下能够重新萌发^[5]。

丝裂原活化蛋白激酶级联(mitogen-activated protein kinase cascades, MAPKs)是存在于真核生物中保守的磷酸化信号逐级传递网络, 对维持真菌包括病原真菌的生长、分化和次级代谢产物的形成至

基金项目: 国家自然科学基金(31600118)

[#]并列第一作者。

^{*}通信作者。Tel: +86-591-83787126; E-mail: wshyyl@sina.com

收稿日期: 2020-09-23; 修回日期: 2020-12-11; 网络出版日期: 2021-03-23

关重要^[6]。在模式真菌酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,目前已经鉴定出包括高渗透压甘油信号通路(high osmolarity glycerol signaling pathway, HOG pathway)在内的4条利用MAPK级联的通路^[7]。其中,衔接子ScSte50p在3个MAPK介导的信号传导途径中起重要作用,交配信息素反应(mating/pheromone-response)、侵袭/丝状生长(invasive/filamentous growth)和渗透压应激(HOG pathway)通路^[8-9]。还有研究表明,罗伯茨绿僵菌(*Metarhizium robertsii*)Ste50p在细胞完整性通路(cell-wall integrity pathway, CWI)中起信号传导作用^[10]。酿酒酵母膜蛋白Opy2p感受到外界渗透压信号时,位于其N端的CR(conserved regions)结构域能够与Ste50p的RA(ras-association)结构域结合,将磷酸化信号传递给Ste50p-Ste11p蛋白复合体^[11]。Ste11p是酿酒酵母中典型的MAP激酶激酶激酶(MAP kinase kinase kinase, MAPKKK),磷酸化的Ste11p转而将信号传递到HOG和Fus3/Kss1通路中,激活MAP激酶Hog1和Fus3来调控细胞的生长与增殖^[12]。此外,罗伯茨绿僵菌中MrSte50p能够与CWI通路的MAPKKK MrBck1p直接相互作用,从而激活MAP kinase MrSlt2p^[10]。衔接子蛋白Ste50在新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)中正调控无性孢子的生成^[13]。在植物病原体禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)中,Ste50p的缺失对其生长与次级代谢产物脱氧雪腐烯醇(deoxynivalenol, DON)的生物合成会造成严重影响^[14]。在模式丝状真菌构巢曲霉中,由AnSte50-Ste11-Ste7-Fus3组成的MAPK级联控制了其菌丝生长与次生代谢。其中Ste50p作为衔接子蛋白,在将细胞外信号传递给MAPK级联过程中起到至关重要的作用^[15]。

炭疽病菌(*Colletotrichum fructicola*)中ste50对

其生长、无性繁殖以及附着孢的形成是不可或缺的,同时还影响其致病性^[16]。黄曲霉中已经成功鉴定出MAPK级联通路中3个重要的MAP kinase(*sakA*, *slt2*, *mpkB*)^[17-19],但缺少对MAPK通路的衔接子Aflste50的研究。在本研究中,我们鉴定出了AflSte50p,通过同源重组技术构建了Aflste50的基因敲除与互补菌株,发现Aflste50的缺失影响了黄曲霉的生长、产孢和菌核形成。更重要的是, Δ Aflste50菌株表现出侵染和毒素合成能力的降低。同时,实验结果表明,Aflste50参与渗透胁迫的响应,但是对细胞壁胁迫不敏感。这些结果将加深我们对黄曲霉生长发育分子机制的理解,为开发新的抗真菌药物提供潜在的靶标。

1 材料和方法

1.1 供试菌株和培养基

本研究所用的黄曲霉菌株及来源见表1。利用同源重组技术,以*A. flavus* CA14 PTS为出发菌株构建Aflste50基因缺失与互补突变体菌株。PDA(BD, USA)培养基用于菌丝生长、产孢量统计,CM(6 g/L 蛋白胨, 6 g/L 酵母粉, 10 g/L 蔗糖)用于菌核培养,YES(150 g/L 蔗糖, 20 g/L 酵母膏,

表1. 本研究所使用及构建的菌株

Table 1. Fungal strains used and constructed in this study

Strains	Genotypes	Sources
<i>A. flavus</i> Wild-type (WT)	$\Delta ku70, \Delta pyrG$	[20]
<i>A. flavus</i> CA14 PTS	$\Delta ku70, \Delta pyrG::AfpYrG$	[21]
<i>A. flavus</i> $\Delta ste50$	$\Delta ku70, \Delta pyrG, \Delta ste50::AfpYrG$	This study
<i>A. flavus</i> $\Delta ste50^C$	$\Delta ku70, \Delta pyrG, \Delta ste50::AfpYrG; ste50(p)::ste50::ptrA$	This study

1 g/L MgSO₄·7H₂O)用作黄曲霉毒素合成培养基, 固体培养基通过添加 15 g/L 琼脂配制。

1.2 生物信息学分析

在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的数据库中通过 BLAST (basic local alignment search tool) 工具, 用 *S. cerevisiae* 的 Ste50 (NP_009898.1) 氨基酸序列比对出黄曲霉 Ste50 (XP_002382435.1) 氨基酸序列。然后用黄曲霉 Ste50 氨基酸序列进行 BLAST, 比对出米曲霉 (*A. oryzae*) Ste50 (XP_001822344.1)、烟曲霉 (*A. fumigatus*) Ste50 (XP_756047.1)、构巢曲霉 (*A. nidulans*) Ste50 (XP_680521.1) 等的氨基酸序列。使用 MEGA7.0 软件中的 Clustal W 功能先进行蛋白序列多重比对, 然后通过 Maximum likelihood 法构建进化树。采用在线网站 SMART (<http://smart.emblheidelberg.de>) 用来预测 Ste50 蛋白功能结构域。

1.3 黄曲霉 *ste50* 基因敲除与互补突变体菌株构建

利用同源重组技术构建突变体, 以黄曲霉基因组为模板, 使用引物 P1 和 P3 扩增 *ste50* 基因上游 5' UTR 同源臂, 使用引物 P6 和 P8 扩增下游 3' UTR 同源臂。使用 *pryG-F* 和 *pryG-R* 引物扩增烟曲霉 *AfpYrG* 基因作为筛选标记, 通过巢式引物 P2 和 P7, 采用 Double-Joint PCR 构建同源重组片段^[22], 然后利用 PEG 转化法将重组片段转入 *A. flavus* CA14 PTS 原生质体。将转化子挑入新的 PDA 培养基中, 并提取基因组进行 PCR 验证, ORF (open reading frame) 片段通过 P9 和 P10 引物进行扩增, AP 片段通过 P1 和 P907R 引物进行扩增, BP 片段通过 P919R 和 P8 引物进行扩增。突变体初步验证成功后, 提取其总 RNA, 反转录为 cDNA, 使用 qPCR-P9 和 qPCR-P10 引物扩增 cDNA 片段, 并且通过 qPCR-F 和 qPCR-R 引物在转录水平验证

ste50 基因的相对表达量。最后通过 Southern blotting 验证野生型与敲除突变体 *AfpYrG* 基因插入区域。使用同源重组技术进行互补菌株的构建, 以黄曲霉基因组为模板, 使用引物 P11 和 P13 扩增出包含 5' UTR 同源臂和完整 *ste50* 基因片段。使用 *ptrA-F* 和 *ptrA-R* 引物扩增出 *ptrA* 基因片段。使用引物 P16 和 P18 扩增出作为 3' UTR 同源臂 *pyrG* 基因片段。利用巢式引物 P12 和 P17 将以上 3 个片段相连接构建同源重组片段, 然后利用 PEG 转化法将重组片段转入 $\Delta ste50$ 菌株的原生质体, 在 10 mL 上层复苏培养基中添加 1 μ g 吡啶硫胺。将转化子挑入新的 PDA 培养基中, 并提取基因组进行 PCR 验证, ORF 片段通过 P9 和 P10 引物进行扩增, AP 片段通过 P1 和 S1116R 引物进行扩增, BP 片段通过 P2053F 和 P17 引物进行扩增。突变体初步验证成功后, 提取其总 RNA, 反转录为 cDNA, 使用 qPCR-P9 和 qPCR-P10 引物扩增 cDNA 片段, 并且通过 qPCR-F 和 qPCR-R 引物在转录水平验证 *ste50* 基因的相对表达量。本研究所使用引物序列见表 2。

1.4 黄曲霉 $\Delta ste50$ 菌株生长发育测定

将 1 μ L 浓度为 10⁷ 个孢子/mL 的 WT、 $\Delta ste50$ 和 $\Delta ste50^C$ 菌株孢子悬浮液点在 PDA 培养基的中央, 37 °C 暗培养 4 d 后测量菌落生长直径, 并统计孢子生产量。另取在 PDA 培养基上培养 3 d 后的平皿, 刮去表面菌丝, 切取规则形状带有菌落的培养基, 放置在铺有滤纸的载玻片上。37 °C 暗培养 10 h 后显微 (Leica, Germany) 观察拍取分生孢子梗。将同样数量的上述菌株孢子悬浮液接种在 CM 培养基上, 37 °C 暗培养 7 d 后用酒精喷洗平皿表面菌落, 拍照并统计菌核生产量。实验设置 3 个平行, 重复 3 次。

表 2. 本研究中所使用到的引物
Table 2. PCR primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Characteristics
$\Delta ste50$ -p1	GAGATTGATCCGCAAGAGG	For 5'UTR of $\Delta ste50$
$\Delta ste50$ -p3	GGGTGAAGAGCATTGTTTGAGGC GACACGACACAACGAAGG	
<i>pyrG</i> -F	GCCTCAAACAATGCTCTTCACCC	For <i>A. fumigatus pyrG</i>
<i>pyrG</i> -R	GTCTGAGAGGAGGCACTGATGC	
$\Delta ste50$ -p6	GCATCAGTGCCTCCTCTCAGAC CATTACTACCTGTTGCTTGAG	For 3'UTR of $\Delta ste50$
$\Delta ste50$ -p8	CGGATAGCGAGGATAATACG	
$\Delta ste50$ -p2	CTGGACAAGTAGGAATAGACA	For fusion PCR
$\Delta ste50$ -p7	AGACAAGAGACAGAAGCAAT	
<i>pyrG</i> -907-R	ATGACGGCGATGTAGGGA	For $\Delta ste50$ mutant screen
<i>pyrG</i> -919-F	CGACATCCTCACCGATTTC	
<i>ste50^C</i> -p11	TCGCTTCCTTACTCTATTGA	For 5'UTR of <i>ste50^C</i>
<i>ste50^C</i> -p13	TAGGAAGTGTGGAGAGACAT TTATAGCACTCCGCCGGGTAGA	
<i>ptrA</i> -F	TTAGTGCTTTACGGCACCTCG	For <i>ptrA</i>
<i>ptrA</i> -R	ACTTTATCCGCCTCCATCCAG	
<i>ste50^C</i> -p16	CTGGATGGAGGCGGATAAAGT GCCTCAAACAATGCTCTTCACCC	For 3'UTR of <i>ste50^C</i>
<i>ste50^C</i> -p18	GTCTGAGAGGAGGCACTGATGC	
<i>ste50^C</i> -p12	CCTATCTCAAGTCTCACTATCT	For fusion PCR
<i>ste50^C</i> -p17	TCCTCCACAACACTCGTA	
<i>ste50</i> -1116-R	TGGGGGCTGCGGCTAGTGTT	For $\Delta ste50C$ mutant screen
<i>ptrA</i> -2053-F	AAGGAGGGGTTGAGTTAAAT	
qRT- <i>abaA</i> -F	TCTTCGGTTGATGGATGATTC	qRT-PCR for conidial biosynthesis
qRT- <i>abaA</i> -R	CCGTTGGGAGGCTGGGT	
qRT- <i>brlA</i> -F	GCCTCCAGCGTCAACCTTC	
qRT- <i>brlA</i> -R	TCTCTTCAAATGCTCTTGCCTC	
qRT- <i>nsdC</i> -F	GCCAGACTTGCCAATCAC	qRT-PCR for sclerotial formation
qRT- <i>nsdC</i> -R	CATCCACCTTGCCCTTTA	
qRT- <i>nsdD</i> -F	GGACTTGCGGGTCGTGCTA	
qRT- <i>nsdD</i> -R	AGAACGCTGGGTCTGGTGC	
qRT- <i>aflR</i> -F	AAAGCACCTGTCTCCCTAAC	qRT-PCR for AFB ₁ biosynthesis
qRT- <i>aflR</i> -R	GAAGAGGTGGGTCAGTGTGTTGAG	
qRT- <i>aflS</i> -F	CCAGACTCGGCCTTAGCTTC	
qRT- <i>aflS</i> -R	CGTGGAGGATACGCTCACTC	
qRT- <i>aflK</i> -F	GAGCGACAGGAGTAACCGTAAG	
qRT- <i>aflK</i> -R	CCGATTCCAGACACCATTAGCA	
$\Delta ste50$ -qPCR-p9	TTGCGAGATGAGCGAATT	ORF validates primers
$\Delta ste50$ -qPCR-p10	AGGATTGACTGGCGGATA	
<i>ste50</i> -qPCR-F	GCACTGTATATCGTGATGG	qRT-PCR for <i>ste50</i> expression level
<i>ste50</i> -qPCR-R	GGATTGACTGGCGGATAG	
$\Delta ste50$ -probe-p9	GGACAGCAATACCAGACTC	For Southern blotting probe
$\Delta ste50$ -probe-p10	CGATTACCACGCTCAAGT	
<i>actin</i> -F	ACGGTGTCGTCACAAACTGG	For <i>actin</i>
<i>actin</i> -R	GCGTATCGTTCGTTACCTCATC	

1.5 黄曲霉 $\Delta ste50$ 菌株 AFB₁ 合成测定

20 μL 浓度为 10^7 个孢子/mL 的 WT、 $\Delta ste50$ 和 $\Delta ste50^C$ 菌株孢子悬浮液接种于 10 mL YES 液体培养基中, 29 °C 黑暗条件下培养 7 d。吸取 1.5 mL 含有次级代谢产物的培养基, 添加等体积的二氯甲烷进行抽提。置于通风橱风干后, 加入 50 μL 的二氯甲烷复溶。利用薄层色谱法 (thin-layer chromatography, TLC) 检测菌株 AFB₁ 的合成量^[23]。实验设置 3 个平行, 重复 3 次。

1.6 黄曲霉 $\Delta ste50$ 菌株致病性测定

选取相似体积与形状的花生、玉米种子, 用 75% 酒精 (0.02% 曲拉通水配制) 浸泡洗涤 5 min, 洗涤后的种子用曲拉通水冲洗 3 次。在平皿中铺两张滤纸, 均匀摆放花生与玉米种子。3 μL 浓度为 10^7 个孢子/mL 的 WT、 $\Delta ste50$ 、 $\Delta ste50^C$ 孢子悬浮液接种于种子表面, 29 °C 条件下每 12 h 更换暗/亮环境培养。每隔 24 h 向平皿滤纸上添加 500 μL 曲拉通水, 保持湿润。7 d 后观察拍照, 统计孢子生产量, 并提取侵染后种子中的黄曲霉毒素 AFB₁。实验设置 3 个平行, 重复 3 次。

1.7 黄曲霉 $\Delta ste50$ 菌株对胁迫的响应

1 μL 浓度为 10^7 个孢子/mL 的 WT、 $\Delta ste50$ 、 $\Delta ste50^C$ 菌株孢子悬浮液接种于含有渗透压胁迫 1.2 mol/L NaCl 的固体 YES 培养基, 37 °C 黑暗条件下培养 4 d, 测量菌落直径并拍照。在细胞壁胁迫实验中, 孢子悬浮液接种于含有 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的荧光增白剂 (calcofluor white, CFW)、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 SDS (sodium dodecyl sulfate) 固体 PDA 培养基上, 37 °C 黑暗条件下培养 4 d, 测量菌落直径并拍照。胁迫抑制率 = [(对照组菌落直径 - 胁迫组菌落直

径)/对照组菌落直径] × 100%。实验设置 3 个平行, 重复 3 次。

1.8 RNA 提取与 real-time PCR

20 μL 浓度为 10^7 个孢子/mL 的 WT、 $\Delta ste50$ 和 $\Delta ste50^C$ 菌株孢子悬浮液接种于铺有玻璃纸的 PDA、YES 和 CM 培养基, 37 °C 黑暗条件下培养 24 h。刮取玻璃纸表面菌丝, 液氮研磨菌丝直至粉末。使用 RNA 试剂盒 (Tian mo, China) 抽提 total-RNA, 通过反转录试剂盒 (Trans, China) 将 RNA 反转录为 cDNA。通过 PikoReal 96 荧光定量 PCR 仪 (Thermo scientific, USA) 检测相关基因相对表达量^[24]。

2 结果和分析

2.1 黄曲霉 *ste50* 的生物信息学分析

在 *A. flavus* NRRL3357 基因组数据库中, 通过 *S. cerevisiae* S288C 的 Ste50 (NP_009898.1) 氨基酸序列比对推断的 AflSte50 (XP_002382435.1) 蛋白序列。然后通过黄曲霉 Ste50 氨基酸序列 BLAST 筛选出亲缘关系较近的米曲霉 (*A. oryzae* RIB40, XP_001822344.1)、烟曲霉 (*A. fumigatus* AF293, XP_756047.1)、构巢曲霉 (*A. nidulans* FGSC A4, XP_680521.1) 等丝状真菌的氨基酸序列。将黄曲霉 Ste50 蛋白的氨基酸序列与比对出的其他真菌的 Ste50 蛋白的氨基酸序列进行系统发育进化分析 (图 1-A)。同时通过在线网站 SMART 预测上述物种 Ste50 蛋白的功能结构域 (图 1-B)。结果显示 Ste50 蛋白在真菌中具有高度保守性, 且 *A. flavus* 中的 Ste50 与 *A. oryzae* 和 *A. fumigatus* 具有 100% 相似性。

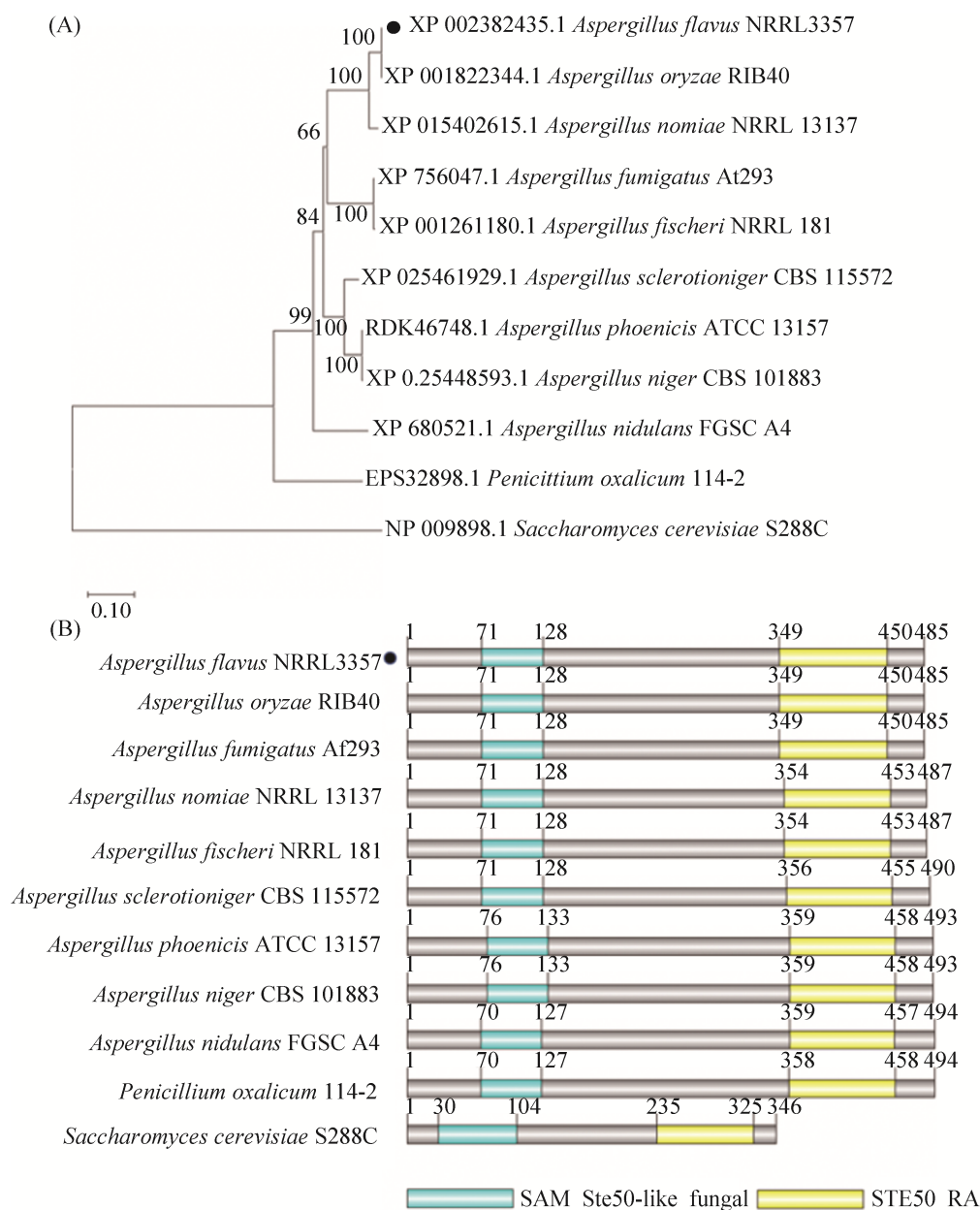


图 1. Ste50 蛋白的生物信息学分析

Figure 1. Bioinformatic analysis of Ste50 proteins from different fungi. A: phylogenetic analysis of Ste50 homologous proteins in different species; B: homologue domain analysis of Ste50 proteins in different species.

2.2 黄曲霉 *ste50* 基因缺失与互补菌株构建

为了研究黄曲霉衔接子 *ste50* 基因的功能, 我们通过同源重组技术, 对 *ste50* 基因的开放阅读框 ORF 进行了基因敲除与互补, 构建原理分别如图 2-A、D。利用烟曲霉 *pyrG* 基因替换黄曲霉目

标基因 *ste50*, 挑取敲除与互补菌株阳性转化子, 提取其基因组, 通过多对引物进行 PCR 初步验证, 野生型和互补菌株中存在的 ORF 在敲除菌株中未能检测到, 且敲除和互补菌株中都能检测到 AP 与 BP 片段(图 2-B)。然后提取敲除与互补阳性转

化子菌株的总 RNA, 并反转录为 cDNA, 在 cDNA 水平上进行 PCR 验证, 以 *Actin* 为内参, $\Delta ste50$ 菌株的 cDNA 中未能检测到 ORF (图 2-C)。我们还通过 Southern blotting 验证野生型与 *ste50* 敲除菌株的 *AfupyrG* 插入区域, 敲除菌株中能够杂交出大小为 3574 bp 的目标条带, 野生型则没有条带, 表明 *AfupyrG* 插入到了指定位置(图 2-E)。qRT-PCR 测定 *ste50* 基因在 WT、 $\Delta ste50$ 和 $\Delta ste50^C$ 中的相对表达量, 在敲除菌株中未能检测到 *ste50* 基因的表达, 且其在 WT 和 $\Delta ste50^C$ 菌株中具有相似的表达量。以上结果皆在分子水平上证明了 *ste50* 基因的成功敲除与互补菌株的正确构建。

2.3 *ste50* 影响黄曲霉的生长发育

黄曲霉在营养充足条件下产生的分生孢子是

其重要的无性繁殖的方式之一^[4]。将 WT、 $\Delta ste50$ 和 $\Delta ste50^C$ 孢子悬浮液接种于 PDA 培养基, 在黑暗条件下 37 °C 培养 4 d 后, 统计菌落直径与孢子生产量, 发现 $\Delta ste50$ 菌株生长速率小于野生型 (图 3-C)。显微观察生长 10 h 时分生孢子梗形态, 发现此时 $\Delta ste50$ 菌株还未能产生分生孢子, 但是野生型和互补菌株分生孢子梗上已经产生分生孢子(图 3-D)。通过 qRT-PCR 检测了孢子合成相关基因 *abaA* 和 *brlA* 的表达水平, 结果表明所测基因的相对表达量在各菌株中均明显降低(图 3-E)。将平皿上孢子收集到 EP 管中并拍照, 由图 3-F 可看出, $\Delta ste50$ 菌株孢子液与野生型明显不同, 分别呈浅绿色和深绿色。将菌株接种在 CM 培养基上 37 °C 培养 7 d 后, 用酒精喷洗平皿表面菌丝,

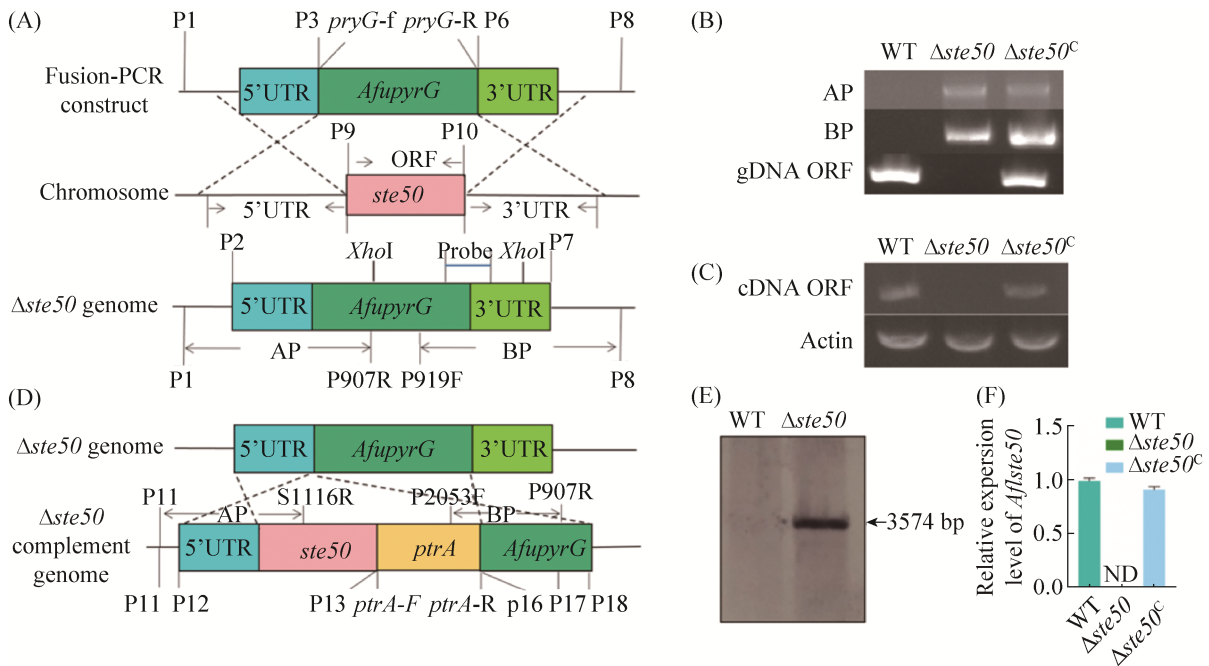


图 2. 黄曲霉 *ste50* 基因敲除与互补菌株构建

Figure 2. Construction of *ste50* deletion and complement mutants in *A. flavus*. A, D: schematic illustration for *ste50* disruption and complement; B: verification of $\Delta ste50$ and $ste50^C$ mutants by diagnostic PCR; C: verification of *ste50* deletion and complement mutants with reverse transcription-PCR; E: verification of *ste50* deletion strain by Southern blotting; F: expression levels of *ste50* in WT, $\Delta ste50$ and $\Delta ste50^C$ strains detected by qRT-PCR. ND: not detectable.

统计菌核数量同时显微观测皿局部。实验结果表明, 与野生型产生大量菌核不同的是, *ste50* 缺失菌株不再产生菌核(图 3-G, H)。qRT-PCR 测定菌核生产相关基因 *nsdC* 和 *sclR* 的相对表达量, 两者在敲除株中均极显著降低(图 3-I)。以上结果表明, *ste50* 基因影响黄曲霉的生长且与无性孢子及孢子色素的合成相关。同时, *ste50* 基因对黄曲霉的菌核形成起着不可或缺的作用。

2.4 *ste50* 参与黄曲霉 AFB₁ 的合成

微生物次级代谢产物如青霉素、洛伐他汀等对人类生活至关重要^[25-26], 但是黄曲霉次级代谢产物

AFB₁ 却因其严重危害人体健康而备受关注。为了探究 *ste50* 基因对黄曲霉毒素 AFB₁ 合成的影响, 我们将 WT、 $\Delta ste50$ 和 $\Delta ste50^c$ 孢子悬浮液接种于 YES 液体培养基中, 黑暗条件下 29 °C 培养 7 d。采用 TLC 法检测提取的黄曲霉毒素, 并通过半定量法检测 AFB₁ 产量。实验结果表明, $\Delta ste50$ 中 AFB₁ 产量显著低于野生型与互补菌株(图 4-A, B)。目前, 黄曲霉 AFB₁ 合成的基因簇已经被清晰地鉴定出来, 我们通过 qRT-PCR 测定了该基因簇中毒素合成的调控基因 *aflR*、*aflS* 和结构基因 *aflK* 的相对表达量, 结果表明 3 个基因的表达均显著降低(图 4-C)。

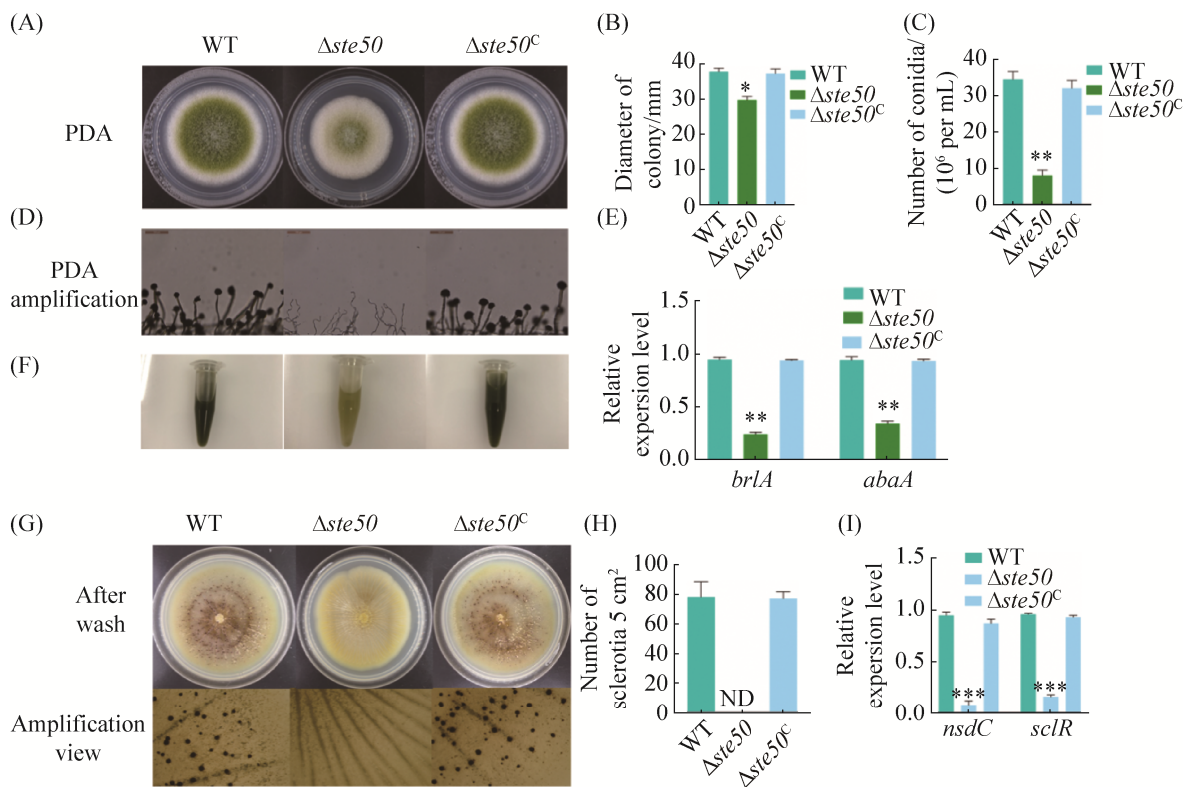


图 3. *ste50* 缺失对菌株生长发育的影响

Figure 3. Influence of *ste50* deletion on the development of *A. flavus*. A: colony morphology of WT, $\Delta ste50$ and $\Delta ste50^c$ in PDA; B: colony diameters of A; C: the number of conidia produced; D: microscopic analysis of conidial structures (magnification: $\times 200$); E: relative expression levels of *brlA* and *abaA* genes in indicated strains; F: different colors of indicated strains' conidial suspension; G: colony morphology of indicated strains after washed; H: number of Sclerotial in G; I: relative expression levels of *nsdC* and *sclR* genes in indicated strains. ND: not detectable. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

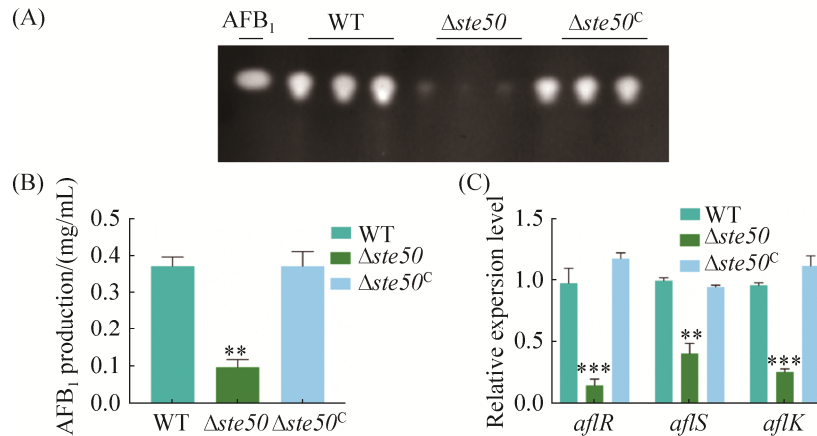


图 4. *ste50* 对黄曲霉 AFB₁ 合成的影响

Figure 4. Roles of *ste50* in AFB₁ biosynthesis in *A. flavus*. A: AFB₁ production of WT, $\Delta ste50$ and $\Delta ste50^C$ strains detected by TLC assay; B: data analysis of AFB₁ production in indicated strains; C: relative expression levels of aflatoxin biosynthesis structural gene and regulatory genes in different strains. ND: not detectable. **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

2.5 *ste50* 影响黄曲霉对作物种子的致病能力

黄曲霉能够寄生在农作物上，导致严重的经济损失^[1]。我们的研究发现，*ste50* 可影响黄曲霉生长以及 AFB₁ 的合成，于是推测 *ste50* 和黄曲霉的致病能力可能也存在关联。将 WT、 $\Delta ste50$ 和

$\Delta ste50^C$ 孢子悬浮液接种于经无菌处理过花生、玉米表面，置于黑暗条件下 29 °C 培养 7 d。将感染后的种子进行观察并拍照，发现接种 $\Delta ste50$ 菌株的种子表面菌丝量明显减少(图 5-A, B)。收集种子表面的分生孢子进行统计发现， $\Delta ste50$ 菌株

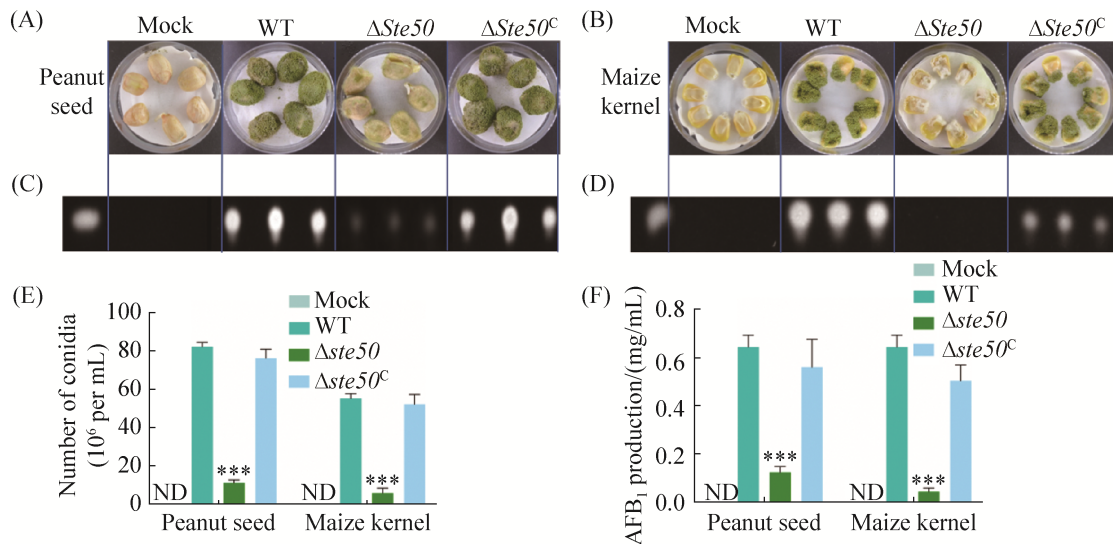


图 5. *ste50* 缺失对菌株致病力的影响

Figure 5. Effect of *ste50* deletion on pathogenicity of strains. A, B: phenotype analysis of indicated strains cultured on peanuts and maize, respectively; C, D: AFB₁ production in infected peanut and maize seeds detected by TLC assay, respectively; E: quantification of conidia collected from the infected peanut and maize seeds; F: quantification of AFB₁ production from the infected peanut and maize seeds. ND: not detectable. ***: $P < 0.001$.

在花生与玉米表面的产孢量显著低于野生型与互补菌株，侵染传播能力下降(图 5-E)。通过二氯甲烷提取侵染后种子中的黄曲霉毒素，并采用 TLC 法检测 AFB₁ 的合成量。检测结果显示，在侵染花生和玉米后，野生型和互补菌株中的 AFB₁ 合成量显著高于 *ste50* 基因敲除菌株(图 5-C, D, F)。

2.6 Ste50 参与黄曲霉 HOG 通路对渗透压的响应

酿酒酵母中，Ste50 是 HOG 通路中的重要衔接子蛋白，响应外界渗透压刺激^[8]。为了验证黄曲霉 Ste50 是否参与 HOG 通路响应渗透胁迫，将 WT、 $\Delta ste50$ 和 $\Delta ste50^c$ 孢子悬浮液接种于含有 1.2 mol/L NaCl 的 YES 培养基上，并以正常 YES 培养生长为对照，黑暗条件下 37 °C 培养 4 d。测量平皿上菌落直径并计算生长抑制率，同时对平皿进行拍照(图

6-A, B)。提取培养在 YES 培养基上的 WT 和 $\Delta ste50$ 的蛋白，设置对照组和处理组(1.2 mol/L NaCl)。通过 Western blotting 检测 HOG 通路中蛋白激酶 Hog1 的磷酸化水平，以 Hog1 蛋白为上样对照(图 6-C)。结果显示，*ste50* 基因参与对 HOG 通路渗透压胁迫的响应，并正调控 Hog1 蛋白的磷酸化水平(图 6-C)。

2.7 ste50 缺失不影响细胞壁完整性通路

衔接子蛋白 Ste50 在罗伯茨绿僵菌中与 CWI 通路的 MAPK 激酶 Bck1 互作^[10]，黄曲霉中 Ste50 是否也能够接收外界细胞壁胁迫刺激，从而传递磷酸化信号至 CWI 通路还未知。将 WT、 $\Delta ste50$ 和 $\Delta ste50^c$ 菌株孢子悬浮液接种于含有细胞壁胁迫试剂 100 μ g/mL CFW 和 50 μ g/mL SDS 的 PDA 培养基上，以正常 PDA 培养为对照，黑暗条件下

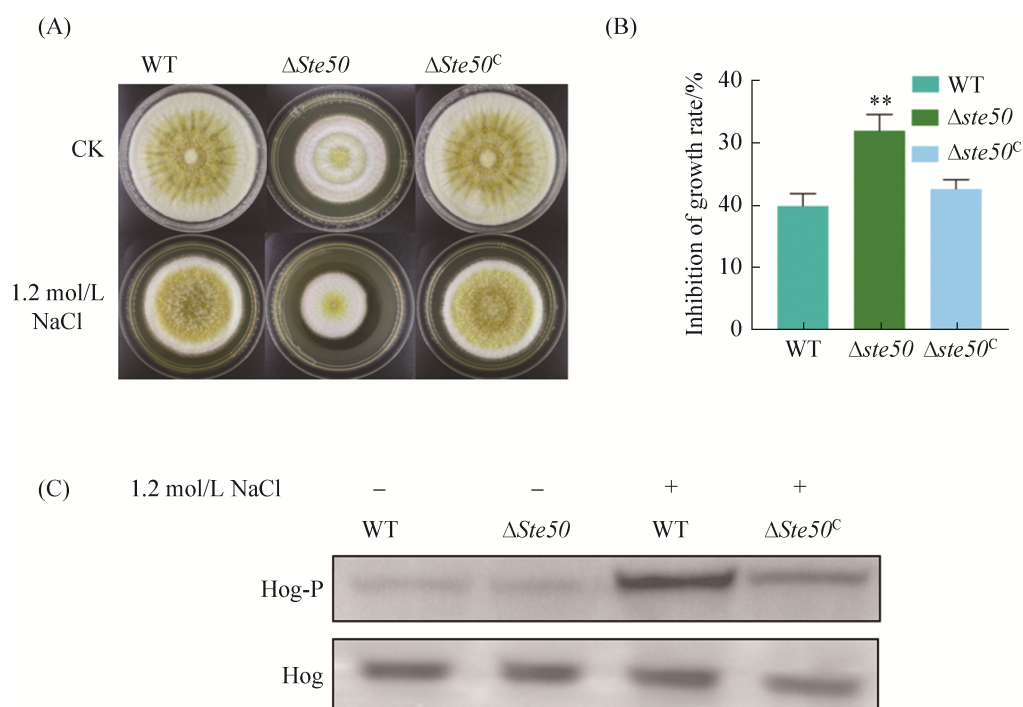


图 6. $\Delta ste50$ 菌株对渗透压胁迫的响应

Figure 6. Response of strains to osmotic stress. A: colony phenotype of indicated strains under 1.2 mol/L NaCl; B: growth inhibition rate in A; C: phosphorylation level of Hog1 in WT and $\Delta ste50$ strains under 1.2 mol/L NaCl. **: $P < 0.01$.

37 °C 培养 4 d。测量菌落直径并计算相关抑制率, 同时进行拍照(图 7-A)。结果显示, $\Delta ste50$ 菌株在

细胞壁胁迫条件下的生长抑制率与 WT 和 $\Delta ste50^C$ 菌株相比没有显著差异(图 7-B)。

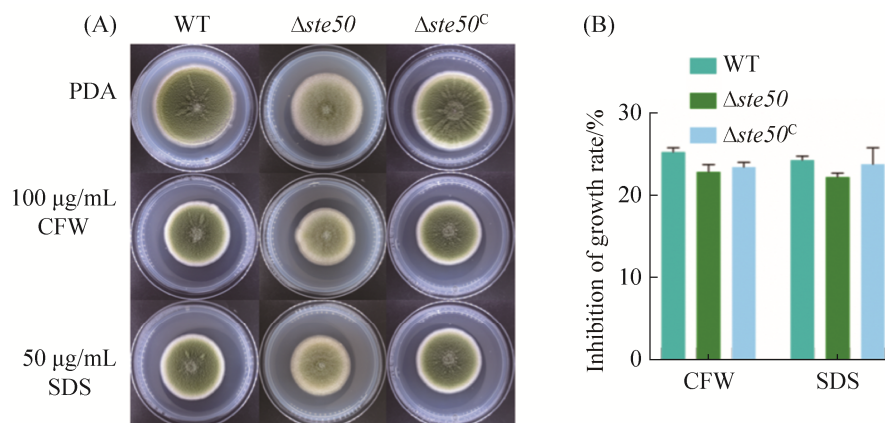


图 7. $\Delta ste50$ 菌株对细胞壁胁迫的响应

Figure 7. Response of strains to cell-wall stress. A: colony phenotype of indicated strains under different cell-wall stresses; B: growth inhibition rate in A.

3 讨论

HOG 通路是酵母中利用 MAPK 级联传递磷酸化信号的经典通路之一, MAPK 级联在真核生物中非常保守^[6-7]。在感受外界渗透、氧化和细胞壁等胁迫时, 能够通过 MAPK 级联通路将信号从膜传递到细胞核, 并调节转录和翻译等过程从而影响细胞周期进程^[7]。前期研究发现, Ste50p 是多种真菌中重要的衔接子蛋白。因其能够衔接上游膜蛋白或 ATP 酶等传递的信号至 MAPK 级联, 且其不只专属于某一特定通路^[8-9], 因而具有重要的研究意义。本研究对致病真菌黄曲霉中 *ste50* 基因的生物学功能, 通过基因敲除和互补进行了相关功能的研究。

在本项研究中我们发现 $\Delta Aflste50$ 菌落生长直径及无性孢子的产量均显著小于野生型, 同时发现孢子合成相关基因 *brlA* 和 *abaA* 相对表达量均显著下调。更引起我们注意的是, $\Delta Aflste50$ 孢

子呈现浅绿色, 这与我们课题组已经报道的属于黄曲霉交配信息素反应通路的 $\Delta Aflste11$ 和 $\Delta Aflfus3$ 菌株生产的孢子颜色相似^[27-28]。据报道, 在动物致病模式真菌 *A. nidulans* 的研究中发现, 交配信息素反应通路中的 *Anste50* 对其无性繁殖非常重要, 且其与 AnSte11p 和 AnSte7p 能够共定位于细胞膜与细胞质中, 但是不能随着 AnFus3p 进入细胞核。有趣的是 $\Delta Anste11$ 和 $\Delta Anste7$ 菌株产生颜色相似但不同于野生型的孢子^[15]。在植物致病真菌 *F. graminearum* 中, FgSte50p-Ste11p-Ste7p 能够形成蛋白复合体, 且他们的基因缺失不仅影响菌株的生长, 还均会引起与野生型不同的孢子颜色变化^[14]。在 *C. neoformans* 中, Cnste50 通过交配信息素反应通路直接控制其性别分化^[13]。通过以上结果我们推测, *Aflste50* 极有可能通过交配信息素反应通路与 MAPK 级联激酶存在协同作用, 从而控制黄曲霉的有性生殖, 但是还需要进一步的实验验证。

本研究发现, $\Delta Aflste50$ 菌株合成次级代谢产物 AFB₁ 的能力与野生型相比显著下降, qRT-PCR 结果也显示出黄曲霉毒素合成基因簇上的调节基因 *aflR* 与 *aflS*, 结构基因 *aflK* 的相对表达量均下调。类似的, 在 *F. graminearum* 中 *Fgste50* 的缺失菌株几乎不能产生呕吐毒素 (deoxynivalenol, DON), 且其也表现出对重要农作物小麦致病能力的缺失^[14]。我们的研究结果还发现, 黄曲霉中 *ste50* 基因的缺失会导致菌株对经济作物花生和玉米的侵染和致病力下降, 同时 AFB₁ 合成能力也明显降低。*ste50* 基因在 *C. fructicola* 中的缺失, 与黄曲霉中致病能力的影响方面也具有相似的情况^[16]。据研究表明, 黑曲霉 (*A. niger*) 中 AniFus3p 和其上游激酶 AniSte7p 影响其营养生长和次级代谢产物的形成, 而 *A. nidulans* 则通过 AnSte50p-Ste11p-Ste7p-Fus3p 组成的 MAPK 级联, 控制了其菌丝生长与次级代谢产物合成^[29]。有趣的是, 在 *A. nidulans* 中发现 AniFus3p 和细胞核内转录因子 AnSte12p 相互作用, AnSte12p 能够磷酸化全局调控因子 AnVeAp, 从而影响真菌的有性发育和次级代谢产物的合成^[15]。真菌中编码交配信息素反应通路的基因具有高度保守性^[30], 黄曲霉中 *ste50* 基因缺失所表现出的生长发育和次级代谢产物的合成方面的缺陷, 可能主要是通过交配信息素反应 MAPK 通路进行调控。

$\Delta Aflste50$ 菌株在渗透压胁迫刺激下, 具有比 WT 菌株更高的生长抑制率和更低的 MAP 激酶 Hog1p 的磷酸化水平, 表明其参与黄曲霉的 HOG 通路, 且在胁迫条件下正调控 Hog1 的磷酸化。*S. cerevisiae* 中磷酸化的 Hog1 蛋白会进入细胞核, 启动一个复杂的自适应程序, 包括暂时停止细胞周期、调节转录和翻译模式、启动甘油合成基因 *Gpd1* 的表达等^[31]。在黄曲霉中 Hog1p 的同源蛋白

SakA 在山梨醇渗透胁迫的刺激下, 也能够转运进入细胞核^[17], 所以这可能是造成 $\Delta Aflste50$ 菌株在渗透压胁迫刺激下生长抑制率更高的原因之一。ScSte50 蛋白的 RA 结构域是 HOG 通路中将 MAPKK 激酶 Ste11p 定位到质膜上所必需的, 从而使 *S. cerevisiae* SHO1 支路膜信号受体接收到的信号传递到 Hog1, 说明 ScSte50p 在 HOG MAPK 级联中发挥重要作用^[32]。虽然在 *M. robertsii* 中 MrSte50 能够与 CWI 通路的 MAPKK 激酶 Bck1 发生相互作用^[10], 但是我们发现 $\Delta Aflste50$ 菌株并不响应细胞壁胁迫刺激, 这可能是因为 Ste50p 在黄曲霉中主要响应外界渗透压信号, 并且参与交配信息素反应通路, 也可能与物种的差异性有关。

总的来说, *ste50* 对黄曲霉生长发育和次级代谢产物的合成具有重要影响, 同时作为衔接子蛋白参与了 HOG 通路的调控, 更重要的是 *ste50* 的缺失能够显著降低黄曲霉对植物的致病能力。这些研究结果将为黄曲霉污染的防治提供一定的理论基础。

参 考 文 献

- [1] Amaike S, Keller NP. *Aspergillus flavus*. *Annual Review of Phytopathology*, 2011, 49: 107–133.
- [2] Sudhakar P, Latha P, Sreenivasulu Y, Reddy BVB, Hemalatha TM, Balakrishna M, Reddy KR. Inhibition of *Aspergillus flavus* colonization and aflatoxin (AflB1) in peanut by methyleugenol. *Indian Journal of Experimental Biology*, 2009, 47(1): 63–67.
- [3] Yang KL, Shadkchan Y, Tannous J, Landero Figueroa JA, Wiemann P, Osherov N, Wang SH, Keller NP. Contribution of ATPase copper transporters in animal but not plant virulence of the crossover pathogen *Aspergillus flavus*. *Virulence*, 2018, 9(1): 1273–1286.
- [4] Krijgsheld P, Bleichrodt R, van Veluw GJ, Wang F, Müller WH, Dijksterhuis J, Wösten HAB. Development in *Aspergillus*. *Studies in Mycology*, 2013, 74: 1–29.

- [5] Wicklow DT. Survival of *Aspergillus flavus* Sclerotia and conidia buried in soil in Illinois or Georgia. *Phytopathology*, 1993, 83(11): 1141.
- [6] Chen RE, Thorner J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA - Molecular Cell Research*, 2007, 1773(8): 1311–1340.
- [7] Saito H, Posas F. Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 2012, 192(2): 289–318.
- [8] Tatebayashi K, Yamamoto K, Tanaka K, Tomida T, Maruoka T, Kasukawa E, Saito H. Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *The EMBO Journal*, 2006, 25(13): 3033–3044.
- [9] Hao N, Zeng YX, Elston TC, Dohlmans HG. Control of MAPK specificity by feedback phosphorylation of shared adaptor protein Ste50. *Journal of Biological Chemistry*, 2008, 283(49): 33798–33802.
- [10] Guo N, Qian Y, Zhang QQ, Chen XX, Zeng GH, Zhang X, Mi WB, Xu C, St Leger RJ, Fang WG. Alternative transcription start site selection in Mr-OPY₂ controls lifestyle transitions in the fungus *Metarhizium robertsii*. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1565.
- [11] Yamamoto K, Tatebayashi K, Tanaka K, Saito H. Dynamic control of yeast MAP kinase network by induced association and dissociation between the Ste50 scaffold and the Opy2 membrane anchor. *Molecular Cell*, 2010, 40(1): 87–98.
- [12] Lee BN, Elion EA. The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999, 96(22): 12679–12684.
- [13] Jung KW, Kim SY, Okagaki LH, Nielsen K, Bahn YS. Ste50 adaptor protein governs sexual differentiation of *Cryptococcus neoformans* via the pheromone-response MAPK signaling pathway. *Fungal Genetics and Biology*, 2011, 48(2): 154–165.
- [14] Gu Q, Chen Y, Liu Y, Zhang CQ, Ma ZH. The transmembrane protein FgSho1 regulates fungal development and pathogenicity via the MAPK module Ste50-Ste11-Ste7 in *Fusarium graminearum*. *New Phytologist*, 2015, 206(1): 315–328.
- [15] Bayram Ö, Bayram ÖS, Ahmed YL, Maruyama JI, Valerius O, Rizzoli SO, Ficner R, Irniger S, Braus GH. The *Aspergillus nidulans* MAPK module AnSte11-Ste50-Ste7-Fus3 controls development and secondary metabolism. *PLoS Genetics*, 2012, 8(7): e1002816.
- [16] Chen YY, Liu JN, Jiang SQ, Li H, Zhou GY. *Colletotrichum fructicola* STE50 is required for vegetative growth, asexual reproduction, appressorium formation, pathogenicity and the response to external stress. *Journal of Plant Pathology*, 2020, 102(2): 335–342.
- [17] Tumukunde E, Li D, Qin L, Li Y, Shen JJ, Wang SH, Yuan J. Osmotic-adaptation response of sakA/hogA gene to aflatoxin biosynthesis, morphology development and pathogenicity in *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 2019, 11(1): 41.
- [18] Zhang F, Geng LP, Deng JL, Huang LH, Zhong H, Xin SJ, Fasoyin OE, Wang SH. The MAP kinase AflSlt2 modulates aflatoxin biosynthesis and peanut infection in the fungus *Aspergillus flavus*. *International Journal of Food Microbiology*, 2020, 322: 108576.
- [19] Frawley D, Greco C, Oakley B, Alhussain MM, Fleming AB, Keller NP, Bayram Ö. The tetrameric pheromone module SteC-MkkB-MpkB-SteD regulates asexual sporulation, *Sclerotia* formation and aflatoxin production in *Aspergillus flavus*. *Cellular Microbiology*, 2020, 22(6): e13192.
- [20] Chang PK, Scharfenstein LL, Wei QJ, Bhatnagar D. Development and refinement of a high-efficiency gene-targeting system for *Aspergillus flavus*. *Journal of Microbiological Methods*, 2010, 81(3): 240–246.
- [21] Hu YL, Yang G, Zhang DP, Liu YJ, Li Y, Lin GL, Guo ZQ, Wang SH, Zhuang ZH. The PHD transcription factor Rum1 regulates morphogenesis and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 2018, 10(7): E301.
- [22] Yu JH, Hamari Z, Han KH, Seo JA, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(11): 973–981.
- [23] Liu YH, Yang KL, Qin QP, Lin GN, Hu TR, Xu ZL, Wang SH. G protein α subunit GpaB is required for asexual development, aflatoxin biosynthesis and pathogenicity by regulating cAMP signaling in *Aspergillus flavus*. *Toxins*, 2018, 10(3): E117.
- [24] Zhang P, Wang XN, Fan AL, Zheng YJ, Liu XZ, Wang SH, Zou HX, Oakley BR, Keller NP, Yin WB. A cryptic pigment biosynthetic pathway uncovered by heterologous expression is essential for conidial development in *Pestalotiopsis fici*. *Molecular Microbiology*, 2017, 105(3): 469–483.
- [25] Quinn R. Rethinking antibiotic research and development: world war II and the penicillin collaborative. *American Journal of Public Health*, 2013, 103(3): 426–434.
- [26] Hoffmeister D, Keller NP. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. *Natural Product Reports*, 2007, 24(2): 393–416.
- [27] Ren SL, Yang MK, Li Y, Zhang F, Chen Z, Zhang J, Yang G, Yue YW, Li ST, Ge F, Wang SH. Global phosphoproteomic analysis reveals the involvement of phosphorylation in aflatoxins biosynthesis in the pathogenic fungus *Aspergillus flavus*. *Scientific Reports*, 2016, 6: 34078.

- [28] Yang G, Cao XH, Ma GL, Qin L, Wu YZ, Lin J, Ye P, Yuan J, Wang SH. MAPK pathway-related tyrosine phosphatases regulate development, secondary metabolism and pathogenicity in fungus *Aspergillus flavus*. *Environmental Microbiology*, 2020, 22(12): 5232–5247.
- [29] Priegnitz BE, Brandt U, Pahirulzaman KAK, Dickschat JS, Fleißner A. The AngFus3 mitogen-activated protein kinase controls hyphal differentiation and secondary metabolism in *Aspergillus niger*. *Eukaryotic Cell*, 2015, 14(6): 602–615.
- [30] Rispaill N, Soanes DM, Ant C, Czajkowski R, Grünler A, Huguet R, Perez-Nadales E, Poli AN, Sartorel E, Valiante V, Yang M, Beffa R, Brakhage AA, Gow NAR, Kahmann R, Lebrun MH, Lenasi H, Perez-Martin J, Di Pietro A. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calmodulin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 2009, 46(4): 287–298.
- [31] Hohmann S. Osmotic adaptation in yeast-control of the yeast osmolyte system. *International Review of Cytology*, 2002, 215: 149–187.
- [32] Truckses DM, Bloomekatz JE, Thorner J. The RA domain of Ste50 adaptor protein is required for delivery of Ste11 to the plasma membrane in the filamentous growth signaling pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 2006, 26(3): 912–928.

Effects of adaptor protein Ste50 on growth, development and pathogenicity of *Aspergillus flavus*

Jun Yuan[#], Ling Qin[#], Jiaru Zhao, Yinchun Wang, Shihua Wang^{*}

Fujian Key Laboratory of Pathogenic Fungi and Mycotoxins, School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian Province, China

Abstract: [Objective] Ste50 is an important adaptor protein in fungi, which plays important roles in signal connection and transmission in multiple MAPK pathways. In this study, Aflste50 protein of *Aspergillus flavus* was identified and its effects on growth, conidiation, pathogenicity and response to osmotic stress were found. [Methods] Firstly, the *ste50* gene was identified in *A. flavus* NRRL 3357 by bioinformatics method. Then, the effect of gene knockout on growth, secondary metabolite synthesis and stress response of *A. flavus* were tested. [Results] Compared with the wild type, the growth rate and AFB₁ synthesis of Δ Aflste50 strain were decreased. And sclerotia formation of *A. flavus* was blocked when *ste50* was absent. At the same time, the pathogenicity to peanut and maize seeds was impaired in Δ Aflste50. Also, AflSte50 regulated the phosphorylation of MAP kinase under osmotic stress, but did not respond to cell wall stress. [Conclusion] Ste50 (AFLA_002340) is an adaptor protein of *A. flavus*, which affects the growth and development, as well as the synthesis of AFB₁ in this fungus. It can respond to osmotic stress and play a role in the HOG pathway.

Keywords: *Aspergillus flavus*, adaptor protein, AFB₁, pathogenicity

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31600118)

[#]Those authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. Tel: +86-591-83787126; E-mail: wshyy1@sina.com

Received: 23 September 2020; Revised: 11 December 2020; Published online: 23 March 2021