



转录因子 PaPho 与丝状真菌 *Podospora anserina* 中磷元素的吸收和利用研究

陈绮艺¹, 李晓², 杜文珍¹, 申令¹, 刘刚¹, 谢宁^{1*}

1 深圳大学生命与海洋科学学院 深圳市微生物基因工程重点实验室, 广东 深圳 518071

2 深圳大学《深圳大学学报(理工版)》编辑部, 广东 深圳 518060

陈绮艺, 李晓, 杜文珍, 申令, 刘刚, 谢宁. 转录因子 PaPho 与丝状真菌 *Podospora anserina* 中磷元素的吸收和利用研究[J]. 微生物学报, 2023, 63(3): 1072-1087.

CHEN Qiyi, LI Xiao, DU Wenzhen, SHEN Ling, LIU Gang, XIE Ning. Phosphorus absorption and utilization in the transcription factor PaPho and the filamentous fungus *Podospora anserina*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(3): 1072-1087.

摘要: 作为生物体必需的营养元素之一, 磷在物质代谢、信号传导和能量储存中起着关键作用。

【目的】 研究丝状真菌 *Podospora anserina* 中调控磷酸盐代谢相关转录因子的作用, 可进一步阐明真核微生物中磷元素吸收的调控机制。**【方法】** 利用同源重组的方法定点敲除 *P. anserina* 中 2 个磷代谢相关转录因子 PaPho1 和 PaPho2, 遗传杂交构建双重突变体 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$; 通过表型分析、无机磷含量测定和酸性磷酸酶活性测定分析各突变菌株的变化; 利用实时定量聚合酶链反应(real-time quantitative polymerase chain reaction, RT-qPCR)分析磷代谢相关基因的表达情况。**【结果】** 在无机磷作为唯一磷来源的培养基上, $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 无法生长; 在添加有机磷的培养基中, $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 和野生型菌株生长无显著性差异。在同时添加有机磷和无机磷的培养基中, $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 的无机磷含量和酸性磷酸酶活性比野生型菌株的分别下降了 25.0%和 61.9%, $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 中无机磷酸盐转运蛋白基因的表达水平显著降低。**【结论】** 在 *P. anserina* 中, PaPho1 和 PaPho2 作为调控磷酸盐代谢信号通路转录因子, 对无机磷的吸收起到关键作用, 但并不参与有机磷的代谢调控。该研究可为阐释丝状真菌 *P. anserina* 对无机磷吸收的调控机制提供参考。

关键词: 丝状真菌; *Podospora anserina*; 转录因子; 基因敲除; 磷代谢; 无机磷

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFA0910800); 广东省自然科学基金(2121A1515012166); 深圳市高校稳定支持项目(20200812173625001)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFA0910800), the Natural Science Foundation of Guangdong Province (2121A1515012166), and the Stability Support Project for Universities in Shenzhen (20200812173625001).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-755-86955803, E-mail: ning.xie@szu.edu.cn

Received: 2022-07-12; Accepted: 2022-09-26; Published online: 2022-10-08

Phosphorus absorption and utilization in the transcription factor PaPho and the filamentous fungus *Podospira anserina*

CHEN Qiyi¹, LI Xiao², DU Wenzhen¹, SHEN Ling¹, LIU Gang¹, XIE Ning^{1*}

¹ Shenzhen Key Laboratory of Microbial Genetic Engineering, College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518071, Guangdong, China

² Editorial Office of Journal of Shenzhen University (Science & Engineering), Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong, China

Abstract: As one of the essential nutrients of living organisms, phosphorus plays a key role in substance metabolism, signal transduction, and energy storage. **[Objective]** To explore the role of transcription factors related to phosphate metabolism in the filamentous fungus *Podospira anserina* and further study the regulatory mechanism of phosphorus uptake in eukaryotic microorganisms. **[Methods]** Two phosphorus-metabolization-related transcription factors PaPho1 and PaPho2 in *P. anserina* were knocked out by homologous recombination, and a double mutant $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ was constructed by genetic hybridization. The changes in mutant strains were analyzed by phenotypic analysis, inorganic phosphorus content determination, and acid phosphatase activity determination. The expression of phosphorus metabolism-related genes was analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR). **[Results]** The double mutant $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ could not grow in the medium with inorganic phosphate as the only source of phosphorus. There was no significant difference in the growth of $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ and the wild-type strain in the medium with organic phosphate. In the medium supplemented with organic and inorganic phosphates, the inorganic phosphate content and acid phosphatase activity of $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ were decreased by 25.0% and 61.9%, respectively, as compared with the wild-type strain. The expression level of inorganic phosphate transporter genes in $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ decreased significantly. **[Conclusion]** In *P. anserine*, PaPho1 and PaPho2, as transcription factors regulating phosphate metabolism signaling pathway, play a vital role in the absorption of inorganic phosphate, but they do not participate in the metabolic regulation of organic phosphate. This study provides references for the regulatory mechanism of the filamentous fungus *P. anserine* in the absorption of inorganic phosphate.

Keywords: filamentous fungus; *Podospira anserine*; transcription factors; gene deletion; phosphorus metabolism; inorganic phosphate

磷是生物体内必需的营养元素之一,广泛存在于生物体内大分子有机物中^[1],在物质代谢、信号传导和能量储存中起着关键作用^[2]。磷酸盐获取系统可使微生物从环境中获取有机磷(organic phosphate)和无机磷(inorganic phosphate)。微生物利用磷酸盐转运蛋白将可溶性的无机磷

酸盐转运至细胞内,合成有机磷化合物,成为生命物质结构组分^[3]。微生物利用自身合成或分泌的植酸酶^[4-5]或磷酸酶^[6]将有机磷化合物水解、释放为无机磷酸盐吸收利用。

根据环境中磷浓度的变化,微生物可调控对磷的摄取、运输和储存,维持胞内磷酸盐稳态。

细胞内的磷含量不平衡会影响微生物的生长代谢活动,如细胞增殖分化、骨架形成和代谢功能等^[7],因此,细胞内维持磷酸盐稳态的信号通路(phosphate responsive signaling pathway, PHO)^[8]受到广泛研究。在外界磷充足条件下,细胞以多聚磷酸盐(polyphosphate, polyP)的形式将磷酸盐储存在液泡或其他细胞器中。在外界磷缺乏条件下,细胞先利用胞内储存的 polyP 维持细胞内的磷需求,进一步的磷饥饿会激活 PHO 信号通路。PHO 信号通路由上游信号成分和下游转录的磷酸盐转运蛋白及磷酸盐分泌蛋白组成,上游信号成分包括细胞周期蛋白、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin dependent kinase, CDK)、CDK 抑制剂(cyclin dependent kinase inhibitor, CKI)和转录因子(transcription factor, TF)^[8]。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、光滑念珠菌(*Candida glabrata*)和粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)的 PHO 信号通路如图 1 所示。*S. cerevisiae* 中,PHO 信号通路的激活由转录因子 Pho4 的活性和定位决定,Pho4 的定位受细胞周期蛋白 Pho80 和 CDK Pho85 组成的 Pho80-Pho85 复合物的磷酸化活性控制。在低磷条件下,CKI Pho81 作用于 Pho80-Pho85 复合物使其失活,去磷酸化的 Pho4 定位于细胞核并与转录因子 Pho2 结合,从而诱

导 PHO 信号通路相关基因的表达,主要产物为磷酸盐分泌蛋白 Pho5,属于酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)^[8]。在 *C. glabrata* 中,低磷酸盐水平也会导致复合物 Pho81-Pho80-Pho85 失活,从而激活 Pho4^[9],然而,与 *S. cerevisiae* 不同的是,Pho2 不是 PHO 信号通路上调所必需的。在 *N. crassa* 中,低磷条件下锚蛋白 NUC-2 抑制细胞周期蛋白 PREG 和分裂原活化蛋白激酶 PGOV 结合的 PREG-PGOV 复合物,使转录因子 NUC-1 定位于细胞核,从而激活 PHO 信号通路相关基因的转录^[10]。*S. cerevisiae*、*C. glabrata* 和 *N. crassa* 中均含有关键的转录因子 Pho4 和 NUC-1,调控 PHO 信号通路^[9]。

丝状真菌 *Podospora anserina* 生命周期短,全基因组序列已知,遗传转化体系成熟,已作为模式生物应用于细胞衰老和凋亡、孢子萌发和成熟释放、菌丝分化、受精过程中配子识别,以及子实体形成等生理学现象的研究中^[11-13]。PHO 信号通路虽然在模式真菌 *S. cerevisiae* 和 *N. crassa*^[9-10]中已有初步研究,但是该信号通路的转录因子对无机磷吸收的调控机制研究仍较欠缺,如调控磷酸盐代谢信号通路的转录因子如何影响无机磷代谢途径,以及影响哪些基因的表达等。为了探究关键的转录因子是如何影响无机磷

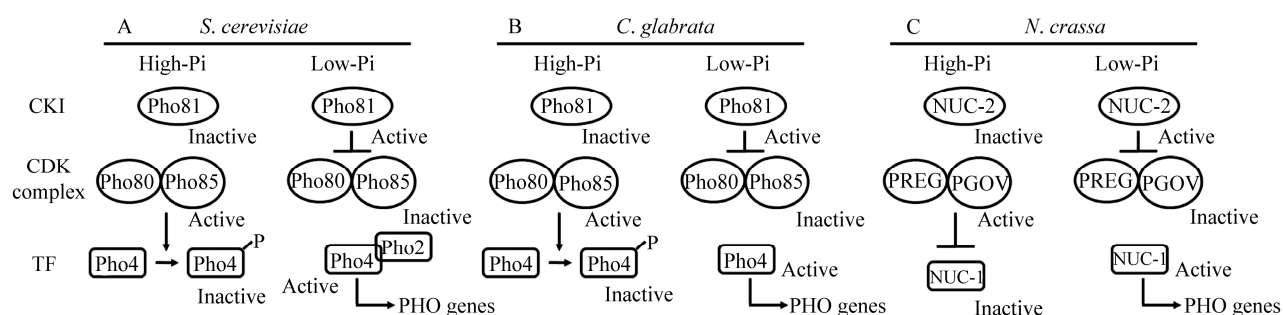


图 1 酿酒酵母(A)、光滑念珠菌(B)和粗糙脉孢菌(C)中的 PHO 信号通路示意图^[3]

Figure 1 Schematic representation of comparison of PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae* (A), *Candida glabrata* (B) and *Neurospora crassa* (C)^[3]. Schematic representation of PHO pathway in *S. cerevisiae* (A) is consistent with Figure 1 of reference [3], but the content is different. Schematic representations of PHO pathway in *C. glabrata* (B) and *N. crassa* (C) are redrawn in the form of Figure 1 in reference [3].

的吸收, 本研究选取 *P. anserina* 为实验菌株, 通过构建转录因子 PaPho 突变菌株, 探究调控磷酸盐稳态信号通路的转录因子的作用, 以期研究真核微生物在无机磷吸收方面的调控机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

P. anserina 野生菌株 (WT)、 $\Delta mus51::nourseoR$ 菌株 [$\Delta mus51::nourseoR$ 是用诺尔斯菌素 (nourseothricin) 抗性标记基因替代 *mus51* 基因的菌株, 使同源重组效率大幅提高]、pBC-Phleomycin、pBC-Nourseothricin 和 pBC-Hygromycin 载体由本实验室保存。

1.1.2 培养基

M2 基础培养基和萌发培养基的配制方法、菌株培养条件参考 *Podospora anserina* Genome Project (<http://podospora.i2bc.paris-saclay.fr/methods.php>)。有机磷培养基: 称取大豆磷脂 (soybean lecithin)、葵花磷脂 (sunflower lecithin) 和卵磷脂 (lecithin) 各 10 g, 分别溶于无水乙醇后添加于 1 L M2 培养基中, 制备 3 种不同成分的有机磷培养基。

1.1.3 主要试剂和仪器

Go Taq[®] DNA Polymerase、Ex Taq[®] DNA Polymerase 和 PrimeSTAR[®] Max 均由 TaKaRa 公司生产; M5 Fungal Genomic DNA Kit 购自北京聚合美生物科技有限公司; 2×Phanta Max Master Mix、Plasmid Mini Kit、BCA Protein Quantification Kit 和 HiScript[®] RT SuperMix for qPCR 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; Hieff UNICON[®] Universal Blue qPCRSYBR Green Master Mix 购自翌圣生物科技股份有限公司; TRIzol[®] RNA reagent 购自 Invitrogen 公司; Phleomycin 购自南京都莱生物技术有限公司; Nourseothricin 购自上海吉至生化科技有限公

司; 溶壁酶购自 Sigma 公司; 大豆磷脂、葵花磷脂和卵磷脂购自上海麦克林生化科技有限公司; 无机磷检测试剂盒和酸性磷酸酶 (ACP) 检测试剂盒购自上海源叶生物科技有限公司; 潮霉素 (hygromycin) 与其他试剂购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。荧光定量 PCR 仪购自 Applied Biosystems 公司。

1.2 进化分析

从 *P. anserina* 基因组数据库中获得了 2 个磷代谢相关基因 *Pa_1_23460* 和 *Pa_1_12400*, 分别命名为 *PaPho1* 和 *PaPho2*, 对其进行蛋白结构预测。从 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得的 *S. cerevisiae* Pho4 ID (QHB08372.1)、*N. crassa* NUC-1 ID (AAA33603.1) 与 *P. anserina* 的蛋白质组数据进行 BLAST。从 NCBI 的基因组数据库中获得 11 条来自真菌的 Pho4 氨基酸序列分别是: QHB08372.1 (*S. cerevisiae* Pho4), VBB72712.1 (*Podospora comata*), AAA33603.1 (*N. crassa* NUC-1), AAT02190.1 (*Aspergillus nidulans*), RKF65350.1 (*Oidium neolycopersici*), AEY96095.1 (*Eremothecium gossypii*), AQZ14724.1 (*Zygosaccharomyces parabailii*), EGZ77610.1 (*Neurospora tetrasperma*), KXX76992.1 (*Madurella mycetomatis*), CUS23564.1 (*Lachancea quebecensis*) 和 XP_002553686.1 (*Lachancea thermotolerans*)。使用 MEGA 11.0 (<https://www.megasoftware.net/>) 软件中的 CLUSTALW 算法对 13 个蛋白质序列进行序列比对, 手动优化对齐, 集中删除序列对齐模糊位点, 使用 MEGA 11.0 的最大似然法对总共 13 个蛋白质序列构建系统进化树。

1.3 构建磷转录因子突变体

图 2 为构建敲除磷转录因子突变体的流程图。采用 Split-marker 方法^[14]在野生型菌株中分别敲除基因 *PaPho1* 和 *PaPho2*, 常规 PCR 分别扩增 *PaPho1* 和 *PaPho2* 两侧的同源臂 (约 1 000 bp) 和抗性筛选标记基因 [*PaPho1* 选用腐草霉素标

记], *PaPho2* 选用潮霉素(hygromycin)标记, 利用融合 PCR (fusion PCR)分别将第 1 轮 PCR 纯化后的基因 *PaPho1* 和 *PaPho2* 两侧的同源臂和抗性筛选标记基因融合(引物序列见表 1), 将融合片段转化 $\Delta mus51::nourseoR$ 菌株的原生质体。分别使用腐草霉素和潮霉素抗性培养基筛选抗性稳定的转化子。转化子与野生型菌株杂交, 筛选具有目的基因抗性而不带诺尔丝菌素抗性的小孢子, 即可稳定遗传的突变菌株。PCR 和基因测序验证单重突变菌株 $\Delta PaPho1$ 和 $\Delta PaPho2$ 。

对 $\Delta PaPho1$ 和 $\Delta PaPho2$ 进行遗传杂交, 杂

交后筛选同时具有潮霉素和腐草霉素抗性的小孢子, PCR 验证双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 。

1.4 构建 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 回补菌株

PCR 扩增野生型菌株的 *PaPho2* 完整编码区和两侧区域(至少 500 bp) (引物序列见表 1), 将 *PaPho2* 回补片段 *PaPho2*-hb 和诺尔丝菌素抗性质粒同时转化 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 的原生质体, 使用诺尔丝菌素抗性培养基筛选回补转化子。PCR 验证回补菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2^{com}$ 。观察回补菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2^{com}$ 表型是否恢复。

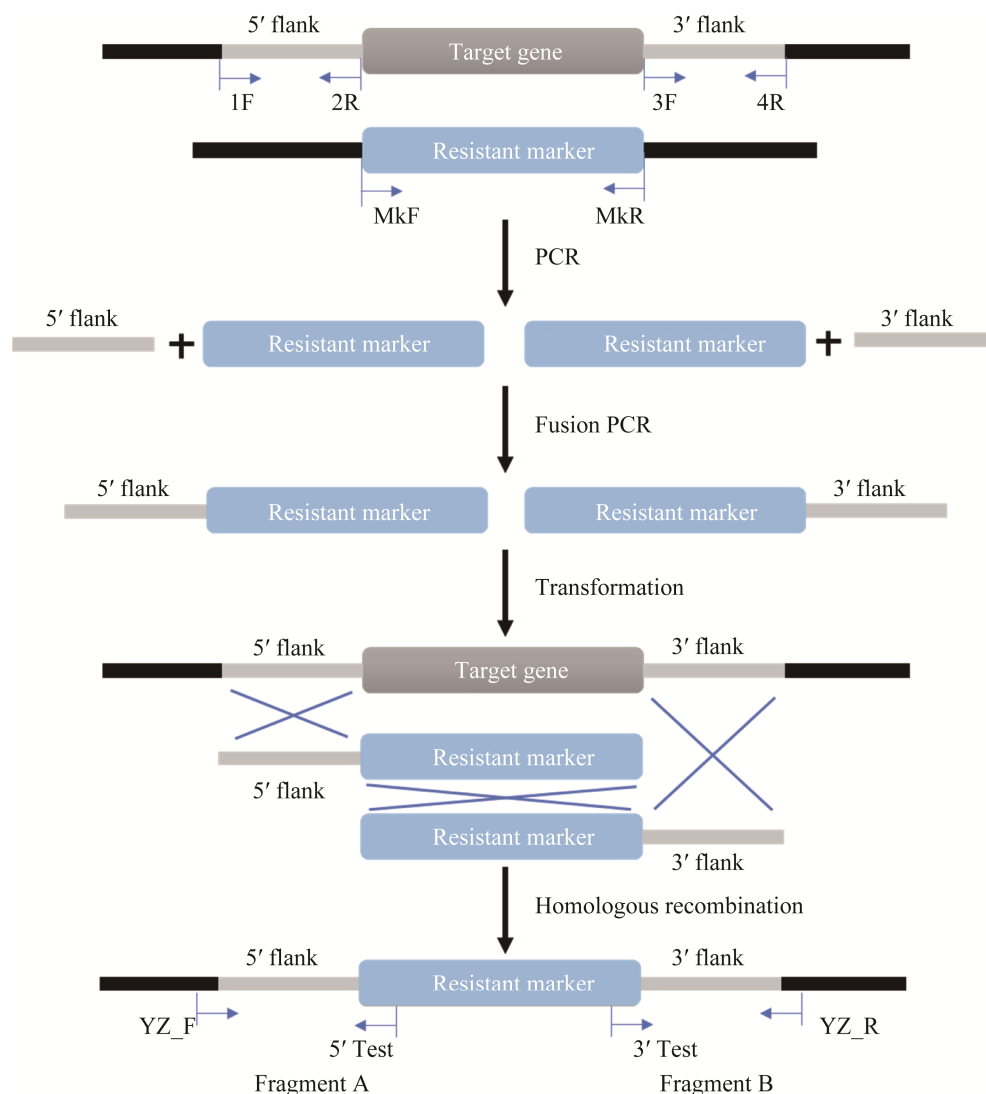


图 2 磷转录因子突变体的构建流程图

Figure 2 Flow diagram of gene knockout of phosphorus transcription factor mutants.

表 1 本研究使用的引物序列

Table 1 Primers used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Annotation
<i>PaPho1</i> _1F	TGGCCTGGGTCTGGAGCAAGCGT	Deletion of <i>PaPho1</i>
<i>PaPho1</i> _2R	CTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGAAGGGGAGTCCATCGGGTCGT	
<i>PaPho1</i> _MkF	ACGACCCGATGGACTCCCCTTCGGTTCAGGGCAGGGTCGTAAATAG	
<i>PaPho1</i> _MkR	AGCGAGGGGACTCGCCAACGTCCATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG	
<i>PaPho1</i> _3F	CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGGACGTTGGCGAGTCCCCTCGCT	
<i>PaPho1</i> _4R	ATCGGTCACCGGGATACGGCT	
5'Test	TGAGAAGCACACGGTCAC	Detection of the deletion mutant
3'Test	TCGGGGCGAAAACCTCTC	
<i>PaPho1</i> _YZ_F	GGATTTGAGGGGTCGGTGATGT	Detection of the deletion of <i>PaPho1</i>
<i>PaPho1</i> _YZ_R	AGTCAACATCGTGGCCAGGGGT	
<i>PaPho2</i> _1F	GGGGCATAACATCTAACCCATCT	Deletion of <i>PaPho2</i>
<i>PaPho2</i> _2R	CTATTTAACGACCCTGCCCTGAACCGGATGATCCGTGGGTGTGAGAC	
<i>PaPho2</i> _MkF	GTCTCACAAACCCACGGATCATCCGGTTCAGGGCAGGGTCGTAAATAG	
<i>PaPho2</i> _MkR	TGGATGCTGGATTAGGCACCCATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAG	
<i>PaPho2</i> _3F	CTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGGGTGCCTAATCCAGCATCCA	
<i>PaPho2</i> _4R	CGTCAACGATCTCCTGTTTGC	
<i>PaPho2</i> _YZ_F	CGGGAGTTGAAAAAGCAACCAC	Detection of the deletion of <i>PaPho2</i>
<i>PaPho2</i> _YZ_R	GGAGGGTTGTGAGGAATAGCC	
<i>PaPho2</i> _hb_F	CCCAAGCTTCGCCCCGAGAACGATACAGA	Complement of <i>PaPho2</i>
<i>PaPho2</i> _hb_R	AAGTGAGGACGGGACAGTCAGAATTCCGG	
<i>PaPDF2</i> _F	GCAGACAGGTTGAAAAGATTG	RT-qPCR
<i>PaPDF2</i> _R	CAGATGATCAATGGTTTCTTGC	
<i>PaPho3</i> _F	TGCTTCGGTGACGTATTTGGA	
<i>PaPho3</i> _R	GCATAGCAGATAACCCAGCCA	
<i>PaPho89</i> _F	AGTTGCCGTCATGGACAGAG	
<i>PaPho89</i> _R	TACGTCAACTGAACTGGGGC	
<i>PaPho90</i> _F	TACCGACCAAGGCGATAAGC	
<i>PaPho90</i> _R	CACCAGAATGGCCAGACAGT	
<i>PaPho81</i> _F	GAGGCTGGATATGCTGGACAA	
<i>PaPho81</i> _R	ACAAGCCAGATTCAACGGCA	
<i>PaPho80</i> _F	CCAGAACAGTTGCCGTCGAA	
<i>PaPho80</i> _R	GGAGAGTAGAAGTGGTGGGC	
<i>PaPho-2</i> _F	TCTTCTACATGGACTCGGCG	
<i>PaPho-2</i> _R	CAGACATGGAGAGCGTGTGG	

1.5 表型分析

1.5.1 M2 培养基培养

在 27 °C 光照条件下, 将不同交配型的野生型菌株、突变菌株和回补菌株在 M2 培养基上培养 7 d。观察并记录各菌株在生长形态、生长速度、菌落大小、菌丝状态和子实体萌发成熟的情况。每个实验重复 3 次。

1.5.2 有机磷培养基培养

在 27 °C 光照条件下, 将不同交配型的野生型菌株、突变菌株和回补菌株分别接种于添加大豆磷脂、葵花磷脂和卵磷脂的 M2 培养基上培养 7 d。观察并记录各菌株在生长形态、生长速度、菌落大小、菌丝状态和子实体萌发成熟的情况。其中, 添加大豆磷脂的实验组设置浓度梯度分别为 2、5 和 10 g/L, 每个实验重复 3 次。

1.6 无机磷质量浓度测定

利用无机磷检测试剂盒(硫酸亚铁钼蓝微板法)测定菌丝中的无机磷质量浓度。将不同交配型的野生型菌株、突变菌株和回补菌株分别接种于添加 5 g/L 大豆磷脂的 M2 液体培养基中, 27 °C 培养 3 d。取破碎菌丝的上清液置于 96 孔板, 显色后测量 640 nm 处的光密度值。具体步骤见试剂盒说明。以标准管光密度值计算样品管的无机磷质量浓度。每样品设置 3 个重复。

1.7 酸性磷酸酶活性测定

酸性磷酸酶检测试剂盒(PNP 微板法)测定菌丝的 ACP 活性。将不同交配型的野生型菌株、突变菌株和回补菌株接种于添加 5 g/L 大豆磷脂的 M2 液体培养基中, 27 °C 培养 5 d。取破碎菌丝的上清液和反应液于 96 孔板, 37 °C 孵育 30 min, 终止反应后测量 410 nm 处的光密度值。具体步骤见试剂盒说明。在冰上迅速混合菌丝上清液和反应液作为样品对照组。每样品设置 3 个重复。

1.8 磷代谢相关基因表达分析

在 *P. anserina* 中通过与 *S. cerevisiae* 的 PHO 信号通路的相关蛋白质 BLAST, 比对得到 *P.*

anserina 磷代谢相关蛋白, 分别为无机磷酸盐转运蛋白编码基因 *Pa_1_17920* (命名为 *PaPho3*)、*Pa_6_11600* (命名为 *PaPho89*)、*Pa_3_5190* (命名为 *PaPho90*)、CDK 抑制剂 *Pho81* 编码基因 *Pa_3_8920* (命名为 *PaPho81*)、细胞周期蛋白 *Pho80* 编码基因 *Pa_3_7020* (命名为 *PaPho80*) 和转录因子 *Pho2* 编码基因 *Pa_2_6460* (命名为 *PaPho-2*)。参考 Li 等^[15]的 RNA 提取、反转录及荧光定量 PCR 方法分析 *P. anserina* 磷代谢相关基因的表达情况, 选取 *PaPDF2* (蛋白磷酸酶 PP2A 调节亚基 A, *Pa_7_6690*) 作为荧光定量 PCR 的内参基因。实验中所需的引物序列见表 1。

2 结果与分析

2.1 进化分析

蛋白结构预测发现, *PaPho1* 和 *PaPho2* 均含螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix, HLH)结构域。分析不同物种中调控磷代谢相关基因表达的转录因子的蛋白结构可知, 这些转录因子均具有 HLH 结构域, 是与磷代谢相关基因启动子结合的关键结构域。BLAST 比对得出, *PaPho1* 的 HLH 与 *S. cerevisiae* *Pho4* 的 HLH 具有较高的一致性(35.6%); *PaPho2* 的 HLH 与 *N. crassa* *NUC-1* 的 HLH 一致性更高(54.2%)。因此, 推测 *PaPho1* 和 *PaPho2* 编码的蛋白是与 *Pho4*、*NUC-1* 类似的转录因子。使用 MEGA 11.0 和最大似然法对总共 13 个蛋白质序列进行序列比对和构建系统进化树(图 3A)。系统进化分析显示, 调控磷代谢相关基因表达的转录因子的 HLH 结构域主要分为 2 大家族, *PaPho1*、*PaPho2* 与 *N. crassa* *NUC-1* 属于同一家族, 具有较高的亲缘关系。其中, *PaPho2* 与 *N. crassa* *NUC-1* 的亲缘关系更接近。图 3B *PaPho1* 和 *PaPho2* 所在家族的序列比对中 *PaPho2* 的 HLH 中间位置(红框)与 *N. crassa* *NUC-1* 的更相似; *PaPho1* 无此特征, 位于该家族进化树的最外侧。

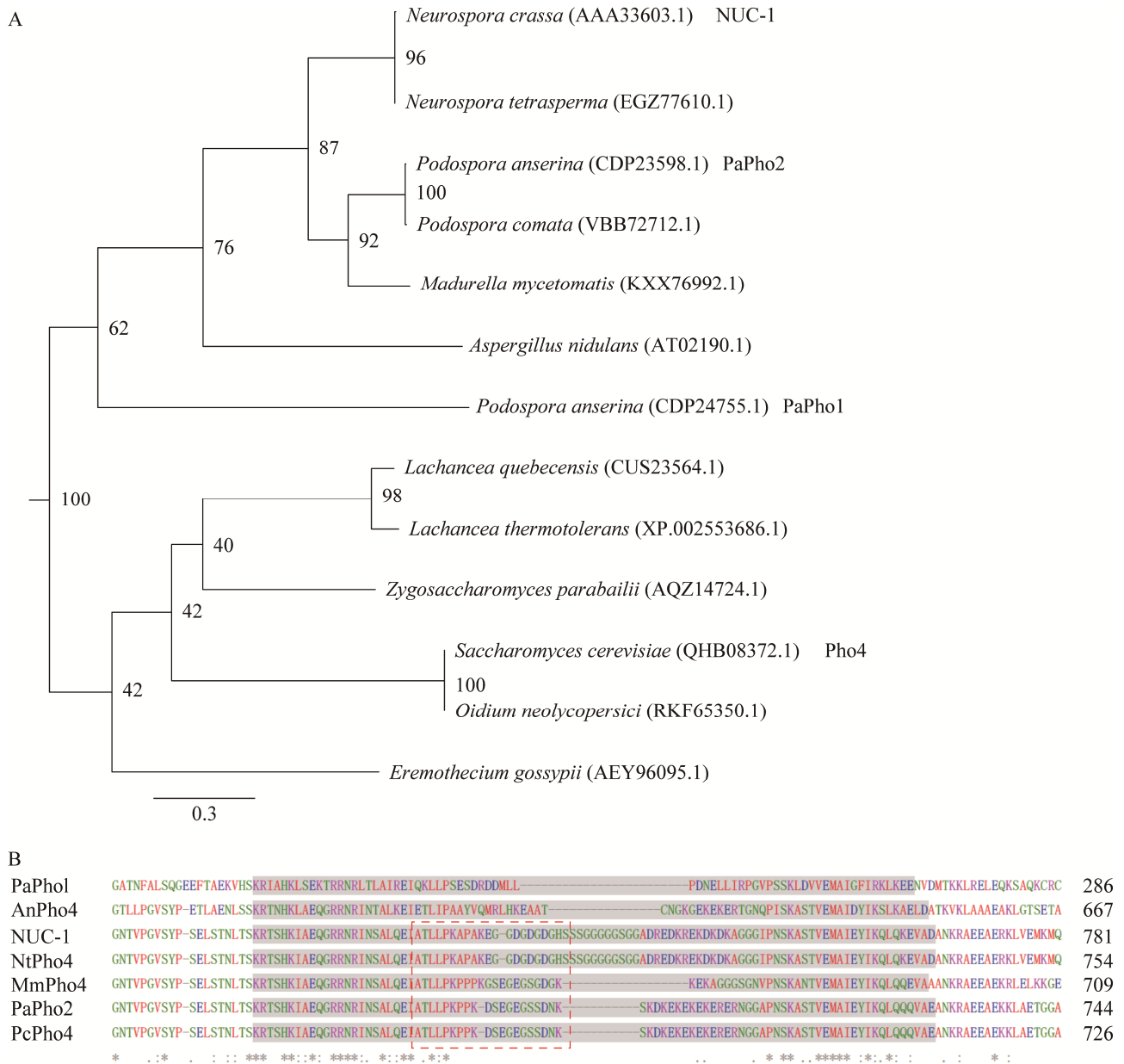


图 3 系统发育分析和氨基酸序列比对

Figure 3 Phylogenetic tree and amino-acid sequences alignment analysis. A: The phylogenetic tree between PaPho1 and PaPho2 in *P. anserina* and transcription factors related to phosphate metabolism in the fungus. The species name and GenBank serial numbers (in the brackets) are shown in the phylogenetic tree. Bootstrap values are for 100 replicas and the evolutionary distance scale is shown at the lower left of the figure. B: Sequence alignment in a family of PaPho1 and PaPho2. The HLH domain is shaded.

2.2 单重突变菌株的构建与鉴定

以 *P. anserina* 野生型基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到 *PaPho* 基因(约 1 000 bp)的上

游片段 *PaPho*-5' 和下游片段 *PaPho*-3', 以 pBC-phleomycin 或 pBC-hygromycin 质粒 DNA 为模板扩增抗性筛选标记基因片段 *PhleR* 或

HygroR, 结果如图 4A 和 4B。通过融合 PCR 构建 *PaPho1* 的敲除表达盒 *PaPho1*-5'-PhleR 和 PhleR-*PaPho1*-3' (图 4C), 并构建 *PaPho2* 的敲除表达盒 *PaPho2*-5'-HygroR 和 HygroR-*PaPho2*-3' (图 4D)。将敲除表达盒转化 $\Delta mus51::nourseoR$ 菌株的原生质体后, 筛选含有腐草霉素或潮霉素抗性的转化子。首次验证中, 通过引物 YZ_F 和 YZ_R (引物所在位置见图 2) 扩增转化子得到同源重组后的片段并测序, 序列比对结果与目标序列一致, 表明抗性筛选标记基因在 *PaPho* 基因座中成功整合。二次验证中, 通过 2 对引物 YZ_F 和 5'Test、YZ_R 和 3'Test (图 2) 扩增转化子得到同源重组后的抗性筛选标记基因与 *PaPho* 基因上下游的特异性连接处 fragment A 和 fragment B

(图 2), 进一步证明抗性筛选标记基因仅被敲除基因位点进行同源重组。

2.3 双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 的构建与鉴定

将 $\Delta PaPho1$ 和 $\Delta PaPho2$ 的不同交配型进行遗传杂交, 挑选含有腐草霉素和潮霉素抗性的小孢子, 并对小孢子进行 PCR 验证, 通过 *PaPho1* 的验证引物 *PaPho1*_YZ_F 和 5'Test、*PaPho1*_YZ_R 和 3'Test (图 2) 扩增得到 *PaPho1*-fragment A 和 *PaPho1*-fragment B; 通过 *PaPho2* 的验证引物 *PaPho2*_YZ_F 和 5'Test、*PaPho2*_YZ_R 和 3'Test (图 2) 扩增得到 *PaPho2*-fragment A 和 *PaPho2*-fragment B, 双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 构建成功。

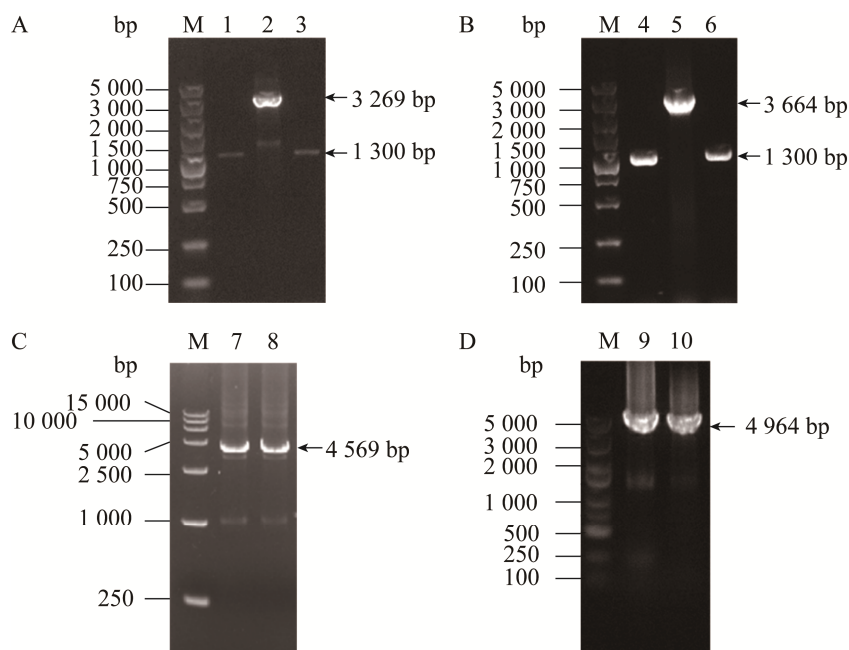


图 4 *PaPho* 基因的上下游片段和选择标记基因的扩增(A、B)与融合片段的扩增(C、D)

Figure 4 The expansion of upstream and downstream fragments and selectable marker genes and fusion fragment acquisition. A: Agarose gel electrophoresis map of *PaPho1*-5', PhleR and *PaPho1*-3' (1, 2, 3). B: Agarose gel electrophoresis map of *PaPho2*-5', HygroR and *PaPho2*-3' (4, 5, 6). C: Agarose gel electrophoresis map of *PaPho1*-5'-PhleR and PhleR-*PaPho1*-3' (7, 8). D: Agarose gel electrophoresis map of *PaPho2*-5'-HygroR and HygroR-*PaPho2*-3' (9, 10). M: DNA marker.

2.4 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 回补菌株的构建与鉴定

以 *P. anserina* 野生型基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到回补基因片段 *PaPho2*-hb。挑选含有诺尔丝菌素抗性的转化子进行 PCR 验证, 扩增得到 *PaPho2* 基因片段条带, 在 M2 基础培养基上回补菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2^{com}$, 可恢复野生型菌株的表型 (图 5), 表明 *PaPho2* 在 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 中成功回补。

2.5 菌株在 M2 培养基上的生长情况

M2 培养基为 *P. anserina* 的基础培养基, 该培养基中只含以 K_2HPO_4 和 KH_2PO_4 形式存在的无机磷, 不含有机磷。野生型菌株、突变菌株和回补菌株在 M2 培养基培养 3 d (图 5), 单重突变菌株 $\Delta PaPho1$ 和 $\Delta PaPho2$ 与野生型菌株 WT 相比没有明显的差异, 双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 不生长。7 d 后观察单重突变菌株与野生型菌株相比没有明显的差异, 双重突变菌株仍

然不生长。作为生物体必需的营养元素之一, 磷对生物的生长发育必不可少。在无机磷作为唯一磷来源时, $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 不能吸收无机磷, 因此无法生长。

2.6 菌株在萌发培养基上的生长情况

萌发培养基以酵母提取物和蛋白胨等营养物质为主, 同时含有有机磷和无机磷。将野生型菌株、突变菌株和回补菌株分别接种于萌发培养基培养 3 d, 结果见图 5。单重突变菌株 $\Delta PaPho1$ 和 $\Delta PaPho2$ 与野生型菌株 WT 相比没有明显的差异, 双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 生长缓慢, 菌丝量少。7 d 后观察单重突变菌株与野生型菌株相比没有明显的差异, 双重突变菌株仍然生长缓慢, 菌丝量少, 菌落范围小。有机磷作为生物体磷元素的来源, 在体内无机磷不足时起补充作用。在无机磷和有机磷作为共同磷来源时, $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 通过吸收有机磷, 转化为体内可用磷, 因此可以正常生长。

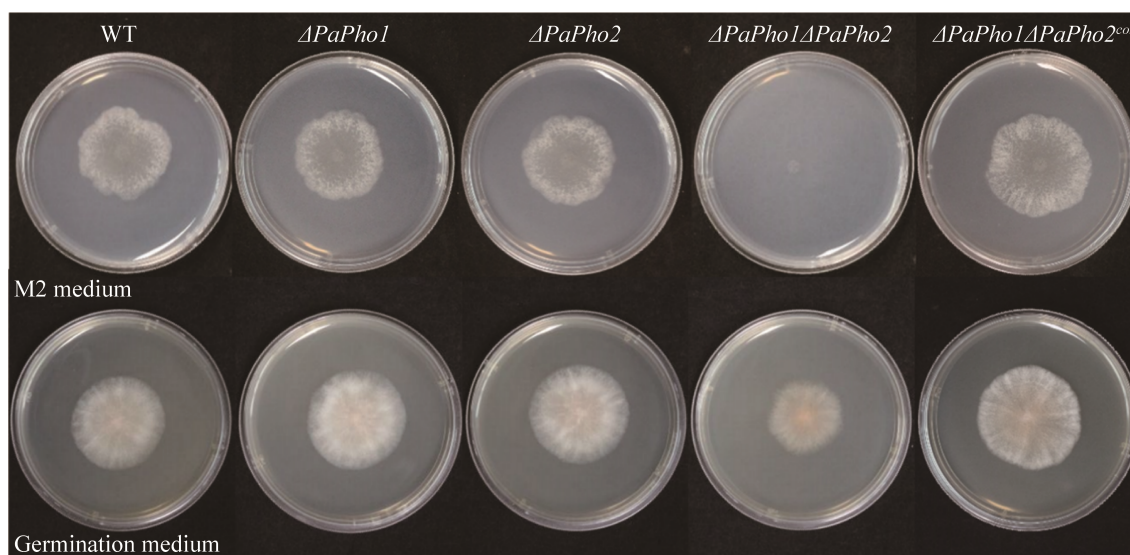


图 5 野生型菌株、突变菌株与回补菌株在 M2 培养基和萌发培养基上 3 d 的生长情况

Figure 5 The growth of WT, mutant and complementary strains in the M2 medium and germination medium on the 3rd day.

2.7 菌株在有机磷培养基的生长情况

2.7.1 菌株在含不同质量浓度大豆磷脂培养基的生长情况

在添加 2、5 和 10 g/L 大豆磷脂的 M2 培养基上,野生型菌株、突变菌株和回补菌株分别培养 3 d 的结果如图 6 所示。由图 6 可见,单重突变菌株 $\Delta PaPho1$ 、 $\Delta PaPho2$ 与野生型菌株 WT 相比没有明显的差异,双重突变菌株 $\Delta PaPho1 \Delta PaPho2$ 能恢复生长,并且随着大豆磷脂质量浓度的增加, $\Delta PaPho1 \Delta PaPho2$ 生长速度变快,逐渐表现出与野生型菌株相似的表型。结果表明, $\Delta PaPho1 \Delta PaPho2$ 影响了 *P. anserina* 吸收

无机磷的途径,双重突变菌株仅能在含有机磷的培养基上生长。

2.7.2 菌株在其他有机磷培养基的生长情况

图 7 为野生型菌株、突变菌株和回补菌株分别在添加 10 g/L 葵花磷脂和卵磷脂的 M2 培养基上的生长情况。与野生型菌株 WT 相比,单重突变菌株 $\Delta PaPho1$ 和 $\Delta PaPho2$ 没有显著的差异,双重突变菌株 $\Delta PaPho1 \Delta PaPho2$ 能恢复生长,但在含卵磷脂培养基的 $\Delta PaPho1 \Delta PaPho2$ 生长速度缓慢。结果表明,双重突变菌株 $\Delta PaPho1 \Delta PaPho2$ 在含葵花磷脂或卵磷脂的有机磷培养基上均能生长。

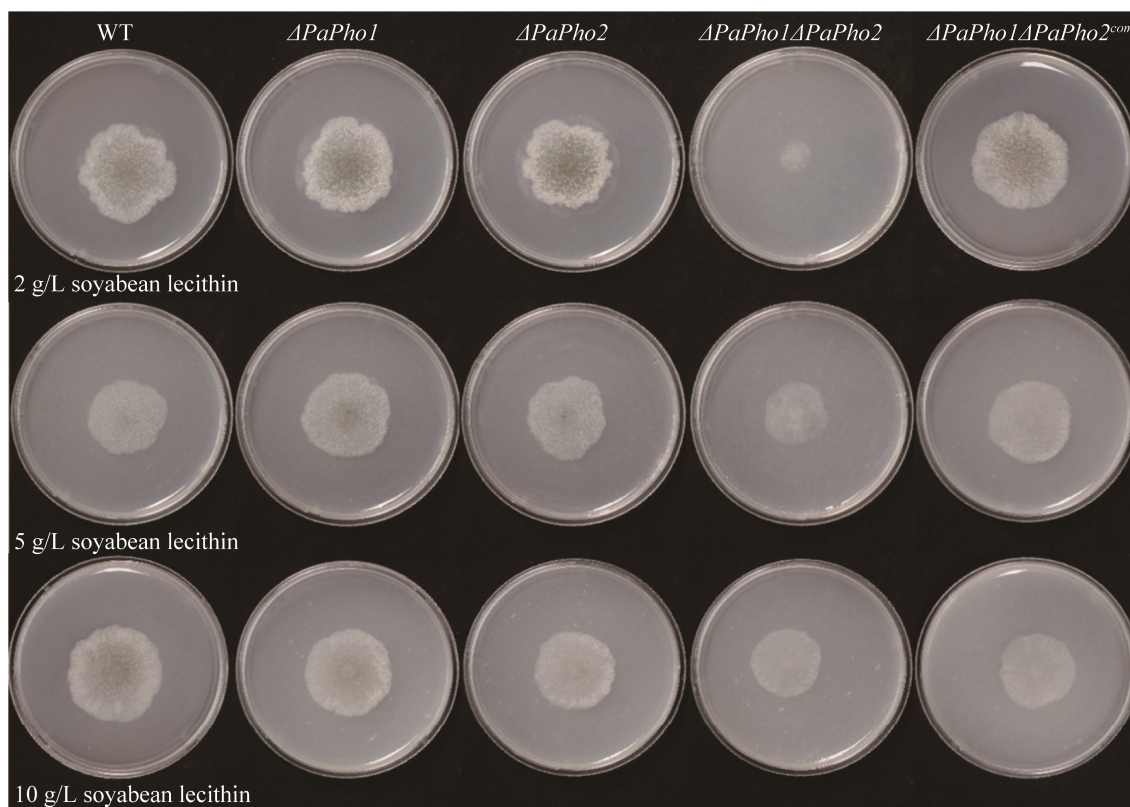


图 6 野生型菌株、突变菌株与回补菌株在添加大豆磷脂的 M2 培养基上 3 d 的生长情况

Figure 6 The growth of WT, mutant and complementary strains in the M2 medium supplemented with soybean lecithin on the 3rd day.

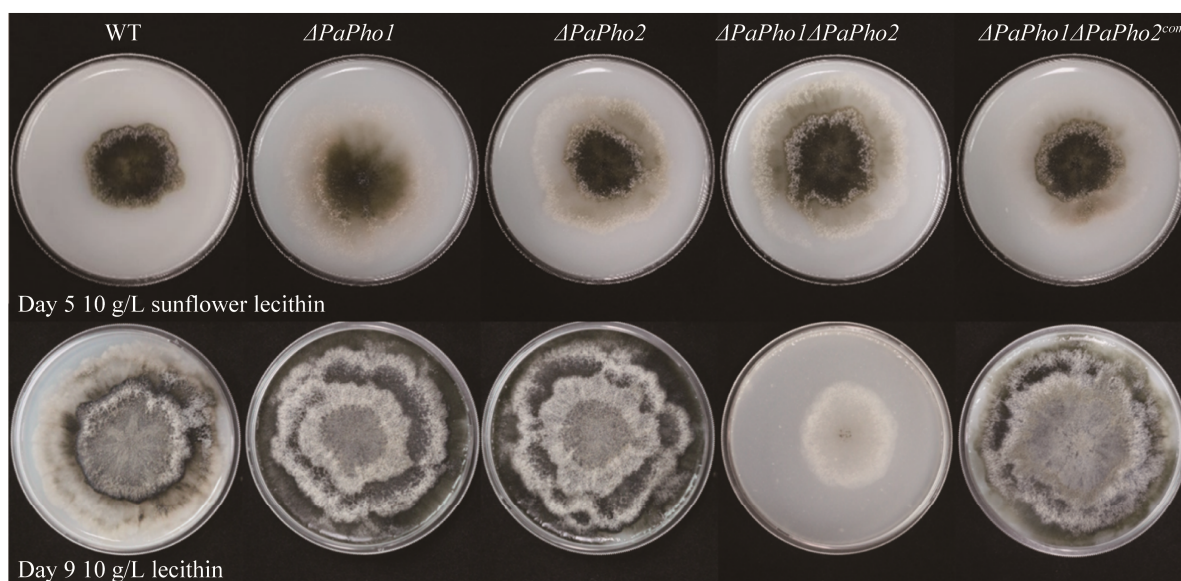


图 7 野生型菌株、突变菌株与回补菌株在添加葵花磷脂和卵磷脂的 M2 培养基上的生长情况

Figure 7 The growth of WT, mutant and complementary strains in the M2 medium supplemented with sunflower lecithin and lecithin.

2.8 无机磷含量和酸性磷酸酶活性测定

测定野生型和突变菌株菌体内无机磷的含量可推测转录因子 PaPho 是否影响 *P. anserina* 体内无机磷的吸收(图 8)。野生型菌株和突变菌株在添加 5 g/L 大豆磷脂的 M2 培养基上培养 3 d, 与野生型菌株相比, 单重突变菌株 $\Delta PaPho1$ 和 $\Delta PaPho2$ 中的无机磷含量无显著性差异, $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 的无机磷含量下降了 25.0%, 具有显著性差异。结果表明同时敲除 *PaPho1* 和 *PaPho2* 基因可阻碍菌体对无机磷的吸收。

酸性磷酸酶是 PHO 信号通路的转录因子调控编码的主要产物, 是一种在酸性条件下催化磷酸单酯水解生成无机磷酸盐的水解酶, 其活性情况可作为检测 PHO 信号通路的转录因子调控程度的指标^[16]。为了研究双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 对转录因子 PaPho 表达调控的影响, 本实验测定野生型菌株和突变菌株在添加 5 g/L 大豆磷脂的 M2 培养基上培养 3 d 的 ACP 活性。与野生型菌株相比, 单重突变菌株

$\Delta PaPho1$ 和 $\Delta PaPho2$ 的 ACP 活性分别下降了 37.9% 和 10.3% ; 双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 的 ACP 活性下降了 61.9%(图 8)。结果表明, 同时敲除 *PaPho1* 和 *PaPho2* 基因降低了 *P. anserina* 转录因子 PaPho 的表达水平。

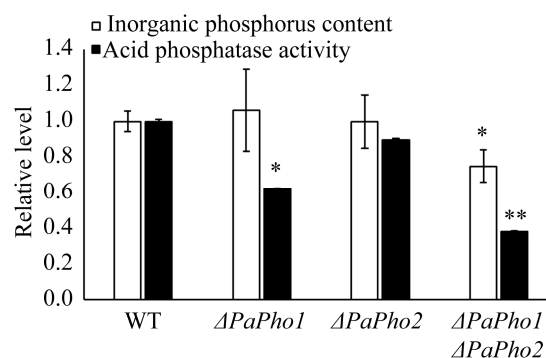


图 8 野生型和突变菌株在添加大豆磷脂的 M2 液体培养基上无机磷含量和酸性磷酸酶活性

Figure 8 The inorganic phosphorus content and the acid phosphatase activity of WT and mutant strains in the M2 liquid medium with soybean phospholipid. Error bars shown are standard deviations of triplicate samples. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$.

2.9 菌株中磷代谢相关基因表达分析

为了探讨 PHO 信号通路的转录因子对 *P. anserina* 的无机磷代谢相关基因表达的影响, 本实验对野生型菌株和突变菌株进行 RT-qPCR 分析, 其结果如图 9 所示。在双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 中, 无机磷酸盐转运蛋白编码基因 *PaPho3*、*PaPho89* 和 *PaPho90* 均表达下调, 其中下调最显著的是 *PaPho3*, 下调 47.6%, 这表明敲除 *PaPho1* 和 *PaPho2* 基因降低了无机磷酸盐转运蛋白编码基因的表达水平, *PaPho1* 和 *PaPho2* 参与了 *P. anserina* 中无机磷吸收和转运的调控。CDK 抑制剂 *Pho81* 编码基因 *PaPho81* 和转录因子 *Pho2* 编码基因 *PaPho-2* 表达上调, 细胞周期蛋白 *Pho80* 编码基因 *PaPho80* 表达下调, 但无显著差异, 这表明 *PaPho1* 和 *PaPho2* 可能对 PHO 信号通路的上游信号成分的影响较小。

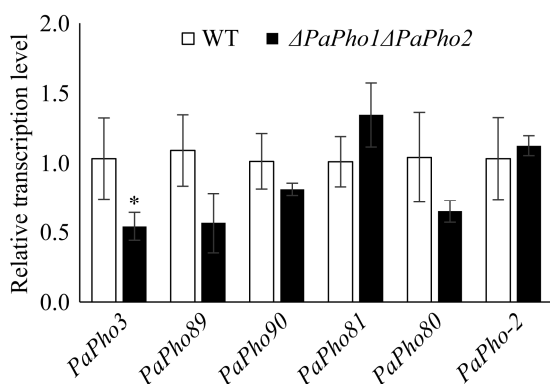


图 9 野生型和双重突变菌株磷代谢相关基因的表达情况

Figure 9 Expression of phosphorous metabolism related genes in WT strain and double mutant. Error bars shown are standard deviations of triplicate samples. *: $P < 0.05$.

3 讨论与结论

作为维持生物生长的关键元素之一, 磷对生物的生长发育是必需的。磷酸盐代谢信号通路中转录因子 *PaPho1* 和 *PaPho2* 的共同敲除对 *P.*

anserina 的生长是有影响的。在 M2 培养基上, 单重突变菌株 $\Delta PaPho1$ 和 $\Delta PaPho2$ 与野生型菌株表型一致, 并没有对 *P. anserina* 的生长产生影响, 说明 *PaPho1* 和 *PaPho2* 可能相互协调调控磷酸盐代谢, 一个基因缺失时, 另一个基因能够补充它的功能。而双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 在 M2 培养基上完全不生长, 双重突变使得转录因子 *PaPho* 完全沉默, 阻断了 *P. anserina* 吸收无机磷的途径。通过生物信息学分析, 本研究初步验证 *PaPho1* 和 *PaPho2* 是调控磷酸盐代谢信号通路的转录因子, 但仍需通过染色质免疫共沉淀(chromatin immunoprecipitation, ChIP)或凝胶迁移实验(electrophoretic mobility shift assay, EMSA)进一步确认。

在添加大豆磷脂的 M2 液体培养基上检测菌株的无机磷含量。由于 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 阻断 *P. anserina* 吸收无机磷的途径, 所有的磷元素都是通过吸收有机磷转化而来, 部分有机磷可转变成无机磷, 供菌体利用。因此, 在检测时, 虽可以检测到无机磷, 但由于 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 的无机磷吸收功能缺陷, 其体内的无机磷含量比野生型菌株的少。 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 中无机磷含量相比野生型降低了 25.0%, 进一步表明转录因子 *PaPho1* 和 *PaPho2* 影响 *P. anserina* 的正常生长。双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 在无机磷作为磷来源的 M2 培养基上无法生长, 但在同时含有有机磷和无机磷的培养基中 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 可以生长。在含有 10 g/L 大豆磷脂的培养基上, $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 与野生型菌株表型一致(图 6)。在含有 10 g/L 葵花磷脂和卵磷脂的培养基上, $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 比野生型菌株生长缓慢(图 7)。在含有有机磷的培养基中可生长的现象表明, 转录因子 *PaPho* 的缺失仅影响无机磷的吸收途径。

PHO 信号通路的转录因子作为调控磷代谢

过程的一种关键因子,对维持生物体磷酸盐稳态具有重要意义。在双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 中,无机磷吸收途径被阻断,与无机磷酸盐转运相关的基因表达下调(图 10)。在其他真核微生物中,PHO 信号通路转录因子的缺失对磷代谢信号通路的功能有重要影响,Toh-e 等^[3]在新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)中敲除 *CnPho4*,发现该突变体影响 PHO 信号通路相关基因表达,同时不能产生酸性磷酸酶。Kerwin 等^[17]在 *C. glabrata* 中敲除 *CgPHO4*,发现该突变体的酸性磷酸酶活性降低,编码磷酸盐转运蛋白基因 *CgPHO84* 和 G 蛋白偶联受体激酶结合蛋白 1 基因 *CgGIT1* 的转录水平下降。目前,只有无机磷条件下 PHO 信号通路的相关研究,尚未发现有机磷补偿 PHO 信号通路的文献报道。本研究发现,双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 的转录因子 *PaPho* 缺失,导致无机磷吸收途径受阻,但可通过有机磷进行补偿,从而恢复生长(图 6 和图 7)。关于浮游植物有机磷的利用调控机制研究表明,在无机磷缺乏时,浮游植物优先吸收溶解无机磷,但在寡磷海域可通过相关酶类协助利用溶解有机磷来抵御无机磷的缺乏^[18]。模式硅藻三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)的转录组学分析和生化研究表明,低磷胁迫可导致碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AP)上调,在细胞表面裂解磷酸单酯,从而通过利用有机磷源来克服低磷胁迫的问题^[19]。通过蛋白质组学分析 *P. tricornutum* 对低磷胁迫的代谢反应结果表明,与无机磷吸收相关的蛋白表达下调,而与有机磷吸收相关的蛋白(如碱性磷酸酶)表达上调^[20]。无机磷缺乏时,链状亚历山大藻(*Alexandrium catenella*)可通过诱导表达或高表达磷酸酶,转而利用有机磷及非磷脂类(如鞘糖脂)代替磷脂,减少细胞对磷的需求来应对环境中磷的缺乏^[21]。以上研究结果为无机磷缺乏条件下细胞利用有

机磷的研究提供了线索。对磷缺乏的 *A. catenella* 补充有机磷源后, *A. catenella* 可快速吸收,且对其生长没有显著的影响^[21]。此外,在 *A. catenella* 的有机磷源添加组的生物学过程变化较无机磷源添加组显著,如核酸代谢等显著上调,推测细胞对有机磷源有特殊利用机制,可能直接用于核酸等物质合成^[21]。因此,生物体内存在一套吸收和利用有机磷源的机制,具体机制尚待进一步研究。

无机磷缺乏时,微生物可用非磷元素(如硫、氮、砷)代替磷元素,以减少细胞对磷的需求^[20,22]。研究发现,蓝藻细菌(*Cyanobacteria*)^[23]和微型蓝藻细菌(picocyanobacteria)^[24]可用硫合成硫代异鼠李糖甘油二酯替代磷脂酰甘油;一种硅藻假微型海链藻(*Thalassiosira pseudonana*)用氮合成甜菜碱脂替代卵磷脂来构成膜脂^[23]。Fekry 等^[25]发现一株盐单胞菌(*Halomonadaceae bacteria*) GFAJ-1 甚至可以用砷代替磷来合成 DNA。此外, Feng 等^[20]研究表明,藻类细胞在缺磷状态下可能会利用胞内磷供给后代,导致后代磷含量降低。*P. anserina* $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 的无机磷含量降低,可能由于 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 使用非磷脂取代磷脂或利用胞内磷供给后代,从而导致 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 中无机磷含量降低,影响 *P. anserina* 的正常生长。

酸性磷酸酶是 PHO 信号通路的转录因子调控编码的主要产物,其活性情况可作为检测 PHO 信号通路的转录因子调控程度的指标。Toh-e 等^[3]研究发现, *C. neoformans* $\Delta CnPho4$ 在无磷酸培养基中生长时会出现酸性磷酸酶 Aph1 (对应 *S. cerevisiae* Pho5)活性受损。Lev 等^[16]使用 ACP 活性在 *C. neoformans* 中筛选参与磷酸盐稳态的转录因子。双重突变菌株 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 中 ACP 活性降低,表明 *PaPho1* 和 *PaPho2* 编码 *P. anserina* PHO 信号通路的转录因子,具有调控 *P. anserina* PHO 信号通路下游蛋白表达的作

用。但 $\Delta PaPho1\Delta PaPho2$ 未完全失去酸性磷酸酶活性, 推测 *P. anserina* 体内还有其他途径调控酸性磷酸酶活性, 共同调控磷代谢途径, 这需进一步研究。

作为生物生长发育的必需元素之一, 磷参与信号转导、能量储存和物质代谢等生物过程。PHO 信号通路的转录因子作为调控磷代谢过程的一种关键因子, 对维持生物体磷酸盐稳态具有重要意义。本研究初步确定 PaPho1 和 PaPho2 是调控磷酸盐代谢信号通路的转录因子, 同时敲除 PaPho1 和 PaPho2 后, 无机磷酸盐转运蛋白

(PaPho3、PaPho89 和 PaPho90)和酸性磷酸酶(PaPho5)表达降低, 导致 *P. anserina* 在只含无机磷的培养基上无法生长, 而在含有有机磷的培养基上可生长, 这表明 *P. anserina* 无机磷吸收途径受阻, 但可通过吸收有机磷进行补偿, 有机磷在体内可被水解释放无机磷酸盐, 供菌体生长利用(图 10)。

综上所述, 转录因子 PaPho 对 *P. anserina* 无机磷的吸收过程具有重要作用, 并不参与有机磷的代谢调控, 该研究结果可为进一步阐明 *P. anserina* 无机磷的调控机制提供理论参考。

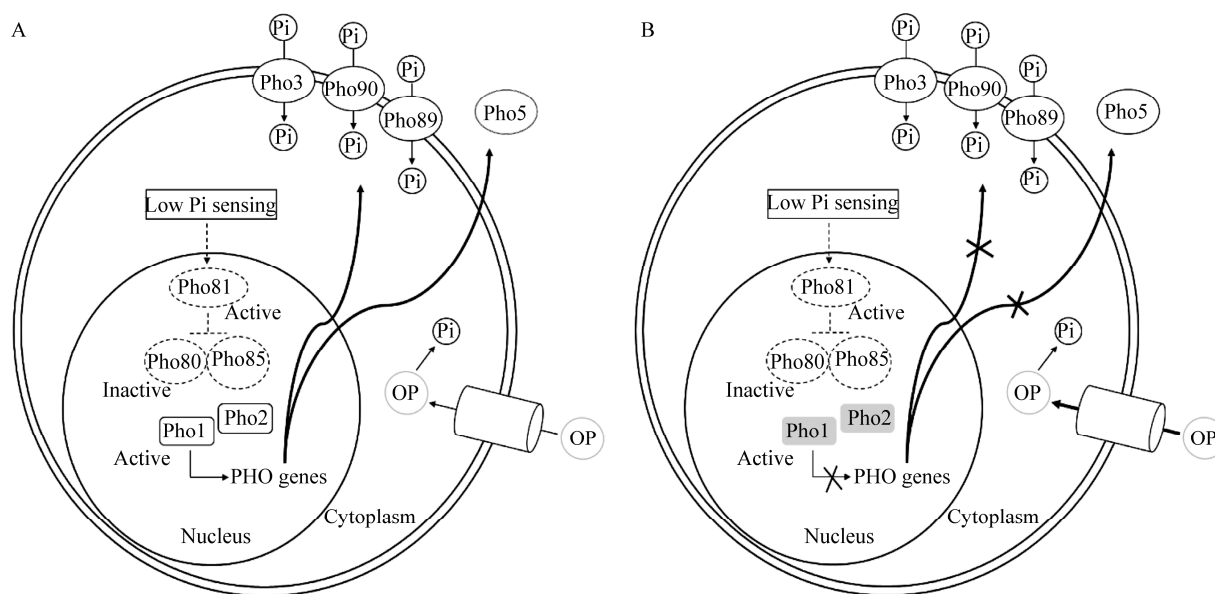


图 10 *Podospora anserina* PHO 信号通路示意图

Figure 10 Schematic representation of PHO pathway in *Podospora anserina*. A: PHO pathway in *P. anserina*. B: PHO pathway of knocking out PaPho1 and PaPho2 in *P. anserina*. Dashed lines indicate unconfirmed pathways in *P. anserina*. Shaded areas indicate PaPho1 and PaPho2 were knocked out. Pi: Inorganic phosphate; OP: Organic phosphate.

参考文献

- [1] GUPTA R, LAXMAN S. Cycles, sources, and sinks: conceptualizing how phosphate balance modulates carbon flux using yeast metabolic networks[J]. eLife, 2021, 10: e63341.
- [2] KRITMETAPAK K, KUMAR R. Phosphate as a signaling molecule[J]. Calcified Tissue International, 2021, 108(1): 16-31.
- [3] TOH-E A, OHKUSU M, LI HM, SHIMIZU K, TAKAHASHI-NAKAGUCHI A, GONOI T, KAWAMOTO S, KANESAKI Y, YOSHIKAWA H, NISHIZAWA M. Identification of genes involved in the phosphate metabolism in *Cryptococcus neoformans*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 80: 19-30.
- [4] GESSLER NN, SERDYUK EG, ISAKOVA EP, DERYABINA YI. Phytases and the prospects for their application (review)[J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2018, 54(4): 352-360.

- [5] 王旺. 毕赤酵母工程菌产植酸酶的发酵优化及放大[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2019.
WANG W. Optimization and scale-up of phytase production by recombinant *Pichia pastoris*[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [6] 赵丹丹. 蓝细菌磷酸酶基因多样性及其对磷素的响应[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2015.
ZHAO DD. Cyanobacteria phosphatase gene diversity and its response to phosphorus[D]. Guangzhou: Master's Thesis of South China University of Technology, 2015 (in Chinese).
- [7] DICK CF, DOS-SANTOS ALA, MEYER-FERNANDES JR. Inorganic phosphate as an important regulator of phosphatases[J]. *Enzyme Research*, 2011, 2011: 103980.
- [8] AUSTIN S, MAYER A. Phosphate homeostasis—vital metabolic equilibrium maintained through the INPHORS signaling pathway[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1367.
- [9] TOMAR P, SINHA H. Conservation of PHO pathway in ascomycetes and the role of Pho84[J]. *Journal of Biosciences*, 2014, 39(3): 525-536.
- [10] DICK CF, DOS-SANTOS ALA, MEYER-FERNANDES JR. Inorganic phosphate uptake in unicellular eukaryotes[J]. *Biochimica et Biophysica Acta: BBA-General Subjects*, 2014, 1840(7): 2123-2127.
- [11] SILAR P. *Podospora anserina*: from Laboratory to Biotechnology[M]. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2013.
- [12] GROGNET P, BIDARD F, KUCHLY C, TONG LCH, COPPIN E, BENKHALI JA, COULOUX A, WINCKER P, DEBUCHY R, SILAR P. Maintaining two mating types: structure of the mating type locus and its role in heterokaryosis in *Podospora anserina*[J]. *Genetics*, 2014, 197(1): 421-432.
- [13] SCHECKHUBER CQ, OSIEWACZ HD. *Podospora anserina*: a model organism to study mechanisms of healthy ageing[J]. *Molecular Genetics and Genomics: MGG*, 2008, 280(5): 365-374.
- [14] GOSWAMI RS. Targeted gene replacement in fungi using a split-marker approach[J]. *Plant Fungal Pathogens*, 2012, 835: 255-269.
- [15] LI YJ, YAN PF, LU XJ, QIU YL, LIANG S, LIU G, LI SF, MOU L, XIE N. Involvement of PaSNF₁ in fungal development, sterigmatocystin biosynthesis, and lignocellulosic degradation in the filamentous fungus *Podospora anserina*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1038.
- [16] LEV S, KAUFMAN-FRANCIS K, DESMARINI D, JUILLARD PG, LI C, STIFTER SA, FENG CG, SORRELL TC, GRAU GER, BAHN YS, DJORDJEVIC JT. Pho4 is essential for dissemination of *Cryptococcus neoformans* to the host brain by promoting phosphate uptake and growth at alkaline pH[J]. *mSphere*, 2017, 2(1): e00381-e00316.
- [17] KERWIN CL, WYKOFF DD. *Candida glabrata* PHO₄ is necessary and sufficient for Pho2-independent transcription of phosphate starvation genes[J]. *Genetics*, 2009, 182(2): 471-479.
- [18] 金杰, 刘素美. 海洋浮游植物对磷的响应研究进展[J]. *地球科学进展*, 2013, 28(2): 253-261.
JIN J, LIU SM. Advances in studies of phosphorus utilization by marine phytoplankton[J]. *Advances in Earth Science*, 2013, 28(2): 253-261 (in Chinese).
- [19] YANG ZK, ZHENG JW, NIU YF, YANG WD, LIU JS, LI HY. Systems-level analysis of the metabolic responses of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* to phosphorus stress[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(6): 1793-1807.
- [20] FENG TY, YANG ZK, ZHENG JW, XIE Y, LI DW, MURUGAN SB, YANG WD, LIU JS, LI HY. Examination of metabolic responses to phosphorus limitation via proteomic analyses in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 10373.
- [21] 陈颖. 链状亚历山大藻对环境磷缺乏和添加的蛋白质组响应[D]. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 2017.
CHEN Y. Proteomic response of *Alexandrium catenella* to ambient phosphorus depletion and resupplement[D]. Xiamen: Master's Thesis of Xiamen University, 2017 (in Chinese).
- [22] MARTIN P, van MOOY BA, HEITHOFF A, DYHRMAN ST. Phosphorus supply drives rapid turnover of membrane phospholipids in the diatom *Thalassiosira pseudonana*[J]. *The ISME Journal*, 2011, 5(6): 1057-1060.
- [23] van MOOY BA, FREDRICKS HF, PEDLER BE, DYHRMAN ST, KARL DM, KOBLÍZEK M, LOMAS MW, MINCER TJ, MOORE LR, MOUTIN T, RAPPÉ MS, WEBB EA. Phytoplankton in the ocean use non-phosphorus lipids in response to phosphorus scarcity[J]. *Nature*, 2009, 458(7234): 69-72.
- [24] van MOOY BAS, ROCAP G, FREDRICKS HF, EVANS CT, DEVOL AH. Sulfolipids dramatically decrease phosphorus demand by picocyanobacteria in oligotrophic marine environments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103(23): 8607-8612.
- [25] FEKRY MI, TIPTON PA, GATES KS. Kinetic consequences of replacing the internucleotide phosphorus atoms in DNA with arsenic[J]. *ACS Chemical Biology*, 2011, 6(2): 127-130.