

研究报告

禾谷炭疽菌 C2H2 型转录因子 CgrFlbC 的生物学功能

林少园, 韦涵文, 郭晨晨, 唐雯, 柳志强, 李晓宇*

海南大学 生命健康学院, 海南 海口 570228

林少园, 韦涵文, 郭晨晨, 唐雯, 柳志强, 李晓宇. 禾谷炭疽菌 C2H2 型转录因子 CgrFlbC 的生物学功能[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1507-1519.

LIN Shaoyuan, WEI Hanwen, GUO Chencheng, TANG Wen, LIU Zhiqiang, LI Xiaoyu. Biological functions of a C2H2-type transcription factor CgrFlbC in *Colletotrichum graminicola*[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1507-1519.

摘要:【背景】禾谷炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)是一种既能够在寄主活体细胞内汲取养分,也能通过破坏寄主细胞获得养分的病原真菌。其主要寄生于禾本科植物,可以对这些植物进行侵染从而引起炭疽病。C2H2 型转录因子在真菌生长发育过程中起着关键作用。【目的】鉴定禾谷炭疽菌中一个 C2H2 型转录因子 CgrFlbC, 阐明其在该菌中的生物学功能, 为进一步解析 FlbC 在禾谷炭疽菌中的侵染机制提供理论支撑。【方法】采用同源重组技术分别获得禾谷炭疽菌 *CgrflbC* 基因敲除突变株及其互补菌株, 对其多种表型特征进行系统分析, 包括: 不同营养条件下菌丝的生长、非生物胁迫因子响应、产孢及分生孢子发育情况、毒力分析等。【结果】*CgrflbC* 编码的蛋白质由 399 个氨基酸组成, 含有 2 个 C2H2 的锌指结构域。相较于野生型菌株, 敲除突变株 $\Delta CgrflbC$ 生长速度减慢, 对十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)和 H_2O_2 更敏感, 卵圆形孢子产量增加, 萌发率降低, 镰刀形孢子产量降低, 不能形成附着枝。【结论】CgrFlbC 在禾谷炭疽菌中参与调控菌丝生长、细胞壁完整性、氧化应激响应、产孢及孢子萌发以及附着枝的形成, 为深入解析禾谷炭疽菌侵染机制奠定了理论基础。

关键词: 禾谷炭疽菌; C2H2 型转录因子; 营养生长; 致病性

资助项目: 国家自然科学基金(32160371)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160371).

*Corresponding author. E-mail: lixiaoyu@hainanu.edu.cn

Received: 2024-07-31; Accepted: 2024-09-12; Published online: 2024-10-22

Biological functions of a C2H2-type transcription factor CgrFlbC in *Colletotrichum graminicola*

LIN Shaoyuan, WEI Hanwen, GUO Chenchen, TANG Wen, LIU Zhiqiang, LI Xiaoyu*

School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

Abstract: [Background] *Colletotrichum graminicola* is a pathogenic fungus that can absorb nutrients from host's living cells or by destroying host's cells. It mainly parasitizes on gramineae plants and can infect these plants, causing anthracnose. [Objective] To identify a C2H2-type transcription factor CgrFlbC and elucidate its biological functions in *C. graminicola*, thus laying a theoretical foundation for further understanding the infection mechanism of FlbC in this pathogen. [Methods] Homologous recombination was employed to construct the *CgrflbC*-deleted strain and complementation strain. The phenotypes of the strains were analyzed, including hyphal development, the integrity of the cell wall, the response to the oxidation stress, the generation of conidial and germination, and the formation of attached branches. [Results] *CgrflbC* encoded a protein composed of 399 amino acid residues with two C2H2 zinc finger domains. Compared with the wild-type strain, $\Delta CgrflbC$ exhibited slow growth and increased sensitivity to sodium dodecyl sulfate (SDS) and H_2O_2 . In addition, $\Delta CgrflbC$ displayed increased oval conidial production, decreased germination rate and falcate conidial production, and inability of forming hyphopodia. [Conclusion] CgrFlbC is involved in regulating the vegetative growth, cell wall integrity, oxidative stress response, conidial production, germination, and hyphopodium formation of *C. graminicola*. The findings lay a theoretical foundation for in-depth research on the infection mechanism of *C. graminicola*.

Keywords: *Colletotrichum graminicola*; C2H2-type transcription factor; vegetative growth; pathogenicity

炭疽菌属(*Colletotrichum*)是一类大型的子囊菌属,其中禾谷炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)被认为是这一属中具有重要经济意义的植物病原真菌。禾谷炭疽菌(*C. graminicola*)既能够在寄主活体细胞内汲取养分,也能通过破坏寄主细胞获得养分,其主要寄生于禾本科植物,可以对这些植物进行侵染从而引起炭疽病。该病害属于真菌侵染性疾病,对多种禾本科作物造成严重危害,通常会导致植株枯萎、干腐等症状,进而引发产量损失,严重威胁世界粮食安全^[1]。分生孢子是禾谷炭疽菌(*C. graminicola*)侵染循环和扩散传播的主要形态,其分生孢子

呈现2种不同的形态,一种为镰刀形,而另一种为卵圆形,二者都能够引起禾谷炭疽病^[2]。镰刀形孢子是主要的感染性孢子,能产生附着胞并侵入宿主细胞;而卵圆形分生孢子则有利于病原体在寄主体内的深入扩散,最终导致严重的病害^[2-4]。

分生孢子的形成是大多数丝状真菌无性繁殖的主要方式,模式真菌构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)分生孢子发育的调控机制已较为清晰,涉及一系列基因和蛋白质的精细调控网络。Fluffy 家族蛋白是分生孢子发育激活途径中的参与者,包括 FlbA、FlbB、FlbC、FlbD 及 FlbE^[5-7]

(Flb 是 Fluffy low *brlA* 的简称^[8])。在构巢曲霉(*A. nidulans*)中, *BrlA*、*AbaA* 和 *WetA* 组成了分生孢子发育的中心调控路径^[9-10], 而 *BrlA* 又受控于上游发育激活因子 *FlbA*–*FlbE*^[11]。Fluffy 家族最早在构巢曲霉(*A. nidulans*)中被发现, 任何一个缺失都会影响 *brlA* 的表达, 并导致“蓬松”菌落形态^[5,12-13]。除此以外, 它们还参与调控营养生长、胁迫响应及致病性^[7,11,14]。

在真菌的生长发育中, 转录因子具有关键的调控作用。转录因子是一类可以与 DNA 特定序列(如启动子)结合, 调控基因转录的蛋白质。转录因子主要可分为几大家族, 包括锌指(zinc finger)、螺旋-环-螺旋(helix-loop-helix, HLH)、同源异形盒(homeobox)等家族^[15]。其中, 锌指蛋白在真核生物中研究得较为清楚, 在丝状真菌中主要分为 C2H2、C4 和 C6 型^[16]。在病原真菌中, C2H2 型锌指蛋白是种类最多并且研究最为广泛的转录因子。已有研究指出, C2H2 型转录因子调控真菌的多个生物学过程, 涵盖菌丝生长、无性发育、有性生殖、非生物胁迫响应和次级代谢物的产生, 以及致病性等方面^[17-19]。

FlbC 是一种 C2H2 型转录因子, 其在病原真菌的生长发育及致病性中发挥着重要作用。在构巢曲霉(*A. nidulans*)中, *flbC* 的引发产孢过程延迟且孢子数减少的现象, 同时导致分生孢子萌发及营养生长均出现滞后^[20]。在黑曲霉(*Aspergillus niger*)中, *FlbC* 参与调控分生孢子的形成, 其敲除突变体对十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)更加敏感^[21]。*flbC* 在轮状镰刀菌(*Fusarium verticillioides*)中的同源基因为 *ada1*, 在敲除突变体($\Delta ada1$)中, 分生孢子的产量大幅下降, 分生孢子形态呈现异常^[22]。在稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)中, $\Delta MoflbC$ 分生孢子产量显著低于野生型, 致病性减弱^[23]。

尽管在一些真菌种类中, *FlbC* 的研究已相

当深入, 但目前在禾谷炭疽菌这一特定菌种中的具体生物学作用尚未明确。本研究利用同源重组原理构建 *CgrflbC* 敲除突变菌株与互补菌株, 通过对表型的系统分析明确该转录因子在禾谷炭疽菌中的生物学功能, 以期为深入解析禾谷炭疽菌的分子致病机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体

本研究中的野生型菌株(WT)为禾谷炭疽菌(*C. graminicola*) M1.001、含有潮霉素磷酸转移酶基因(*HPT*)的 pUC18 质粒载体和携带遗传霉素抗性基因(*G418*)的 pUC18 基因互补载体, 本实验室保存。

1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、燕麦粉琼脂(oatmeal agar, OMA)培养基、完全培养基(complete medium, CM)、基本培养基(minimal medium, MM)、察氏(Czapek, CZ)培养基、马铃薯葡萄糖肉汤(potato dextrose broth, PDB)培养基参照文献[24]配制。用于原生质体转化的快速生长培养基(rapid growth medium, RGM): 上层培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 酵母粉 1.0, 酸水解酪蛋白 1.0, 琼脂粉 15.0; 下层培养基(g/L): 蔗糖 342.3, 酵母粉 1.0, 酸水解酪蛋白 1.0, 琼脂粉 12.0。

1.3 主要试剂和仪器

胶回收试剂盒与质粒提取试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 酶切相关试剂, TaKaRa 公司。PCR 仪, Eppendorf 公司; 凝胶成像系统, 北京六一生物科技有限公司; 恒温培养摇床, 上海一恒科学仪器。

1.4 *CgrflbC* 基因序列获取与生物信息学分析

搜索 NCBI 网页(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),

下载禾谷炭疽菌 *CgrflbC* (GLRG_10389)基因序列,用 Primer Premier 5.0 引物设计软件进行引物的设计和酶切位点的选择。利用引物 *CgrflbCF* 和 *CgrflbCR* (表 1)进行 PCR 扩增,获得 *CgrflbC* 的开放阅读框(open reading frame, ORF) (从起始密码子开始,结束于终止密码子连续的碱基序列);利用 SMART (<https://smart.embl.de/>)在线工具对 *CgrFlbC* 蛋白结构域进行预测,使用在线工具 BLAST 和 GeneDoc 软件进行多种真菌中的 *FlbC* 蛋白序列比对。

1.5 *CgrflbC* 基因敲除及互补菌株的构建

基于同源重组原理实现对 *CgrflbC* 的靶向基因敲除(图 1),以 CTAB 方法从禾谷炭疽菌 WT 中提取基因组 DNA 作为模板,利用 2 对引物 *CgrflbCUF/CgrflbCUR* 和 *CgrflbCDF/CgrflbCDR* 进行 PCR。反应条件:95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 1 min, 30 个循环。扩增得到 *CgrflbC* 基因的上游及下游序列,将 2 个序列与 pUC18-HPT 载体相连,即得到敲除载体 pUC18-*CgrflbC*。经 *Kpn* I 酶切和测序结果比对无误后,将重组质粒单酶切变成线性化再转化到禾谷炭疽菌 WT 制备的原生质体中,在含有

表 1 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>CgrflbCF</i>	TTCCTACGCACACTCTTCCG
<i>CgrflbCR</i>	ACAACATACGCTTCTCGCCA
<i>CgrflbCUF</i>	GGGGTACCTCTGCGGTTTCGTCACATC AA
<i>CgrflbCUR</i>	CGGGATCCCGAGGTAGGCCGTCAAA CAA
<i>CgrflbCDF</i>	CGAGCTCAAACGTGTGGAGGGCAGTG AG
<i>CgrflbCDR</i>	GGGGTACCTGTGATATCCGGGTCCGT CT
<i>CgrflbCUU</i>	ATTGCGACGCATTGCGCCCAAGTCT
PI	GTCCTCGTTCCTGTCTGCTAATAAG
<i>CgrflbCDD</i>	CCTTCTCGGTTGTCCCTTTGTATTAT
PI1	GGCACCCCAGGCTTTACACTTTATG
<i>CgrflbChbF</i>	CGAGCTCTGCTTGTTCCTTCCTCCTGA
<i>CgrflbChbR</i>	GGGGTACCTTATTGGCAACCCTTCTC GG

潮霉素 B 的 RGM 培养基上筛选带有抗性的菌株,通过 3 对引物 *CgrflbCF/CgrflbCR*、*CgrflbCUU/PI* 和 *CgrflbCDD/PI1* 进行 PCR 验证筛选出正确的突变株。PCR 反应体系(20 μL): 2×Premix Taq 10 μL, DNA 模板 1 μL, 正、反向引物(0.5 μmol/L)各 0.5 μL, ddH₂O 8 μL。

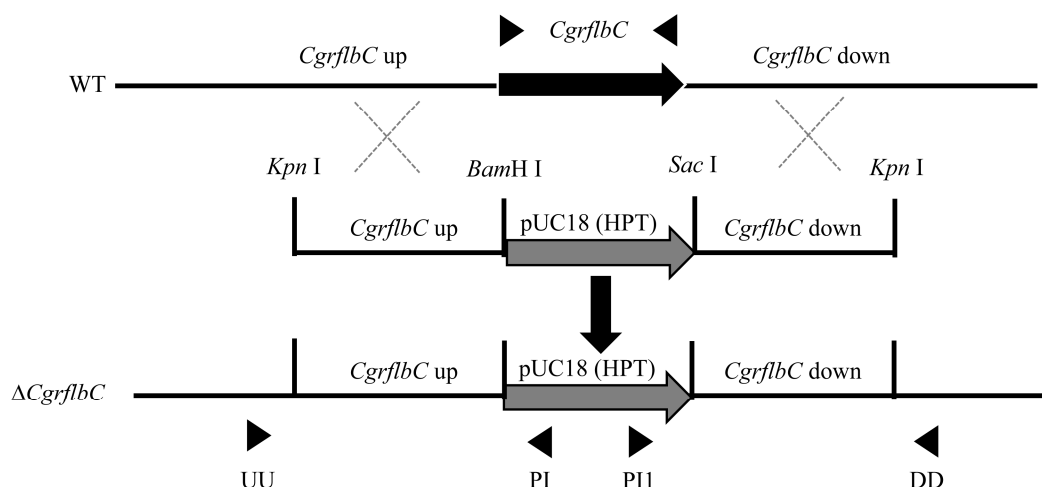


图 1 *CgrflbC* 基因敲除的原理

Figure 1 Principle of *CgrflbC* knockout.

互补载体构建方法：使用引物 *CgrflbChbF*/*CgrflbChbR*，在反应体系不变的情况下，改变 PCR 反应条件扩增出互补片段。PCR 反应条件：95 °C 3 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 3 min, 30 个循环。随后，将扩增得到的互补片段插入到 pUC18-G418 载体上，得到重组质粒转到突变体制备的原生质体中。提取抗性菌株的基因组进行验证，用引物 *CgrflbChbF*/*CgrflbChbR* 扩增出的目的片段即为互补菌株。

1.6 不同培养基上野生型、突变株和互补菌株的生长

用打孔器打取相同大小的禾谷炭疽菌野生型 (WT)、突变株 (Δ *CgrflbC*) 及互补菌株 (Δ *CgrflbC*/*flbC*) 菌块，用灭菌的接种针逐一将菌块置于 PDA、CM、OMA、Czapek 和 MM 这 5 种不同培养基的中央，在 28 °C 培养 5 d 后用十字交叉法测量各菌株的菌落直径。

1.7 非生物胁迫响应分析

用打孔器打取相同大小的禾谷炭疽菌野生型、突变株及互补菌株的菌块，接种到含有不同胁迫因子的 CM 培养基中，分别为 0.005% SDS、0.010% SDS 和 5 mmol/L H₂O₂、7 mmol/L H₂O₂。在 28 °C 恒温培养箱中培养 5 d，测量菌株的菌落直径并根据公式(1)计算菌株的生长抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = (D_{\text{ck}} - D_{\text{t}}) / D_{\text{ck}} \times 100 \quad (1)$$

D_{ck} 为对照组菌落直径， D_{t} 为处理组菌落直径。

1.8 卵圆形孢子的产量测定及萌发分析

用打孔器打取相同大小的野生型、突变株及互补菌株的菌块，每个菌株挑取 5 个菌块接种至 PDB 和 CM 液体培养基。28 °C、150 r/min 振荡培养 3 d 后使用三层滤布过滤，以有效移除菌丝体，从而获取孢子悬液。12 000 r/min 离心 1 min 进一步提取分生孢子，在无菌环境下离心冲洗共 3 次，确保样本纯净，用血球计数

板对孢子产量进行精确统计。将孢子悬液浓度调整为 5×10^5 个/mL，使用移液枪吸取 20 μ L 孢子悬液，并将其滴加到清洁的载玻片上，28 °C 恒温条件下保湿培养。每隔特定时间(4 h 和 6 h)利用显微镜细致观察孢子分生萌发状态并据公式(2)计算萌发率。

$$\text{萌发率}(\%) = (\text{萌发孢子数} / \text{总孢子数}) \times 100 \quad (2)$$

1.9 镰刀形孢子产量的测定

用打孔器打取相同大小的禾谷炭疽菌野生型菌株、突变株及互补菌株菌饼分别接种在 OMA 培养基上，28 °C 分别培养 14 d 和 21 d。用移液枪吸取 5 mL 无菌水冲洗菌丝，用涂布棒刮取菌丝，Miracloth 滤布过滤收集孢子悬液。12 000 r/min 离心 1 min 获得分生孢子，用无菌水反复冲洗，用血细胞计数板对所获得的孢子悬液进行数量统计。将孢子悬液浓度调整为 5×10^5 个/mL，用移液枪吸取 20 μ L 孢子悬液滴在玉米叶片表面上，28 °C 保持适宜湿度培养 12 h，在显微镜下观察镰刀形孢子在玉米叶片上的萌发情况。

1.10 附着枝的形成

制备各菌株的卵圆形分生孢子悬液，并调整浓度至 1×10^6 个/mL，与 25 mL PDA 培养基混匀后倒入培养皿中，待其冷却凝固后将事先灭菌处理的盖玻片插入 PDA 平板中，在 28 °C 恒温培养箱中培养。分别在 2、3、4 d 用灭菌的镊子从平板中取出盖玻片，置于载玻片上用显微镜观察各菌株附着枝。

1.11 菌株致病力的分析

将各菌株的新鲜菌块分别接种到玉米叶片(已用无菌水对其清洁处理，并用灭菌针头在叶片上精确地形成尺寸相仿的小伤口)的微伤口处，在 28 °C 保持适宜湿度培养 3 d 后分析不同菌株对玉米叶片的侵染效果。

1.12 数据处理与分析

采用 IBM SPSS Statistics 26 进行显著性差异的分析, 数据的可视化呈现采用 GraphPad Prism 8。

2 结果与分析

2.1 CgrFlbC 序列分析

CgrflbC 开放阅读框序列全长 1 274 bp, 该序列编码 399 个氨基酸(aa)。蛋白结构域预测分析表明, *CgrFlbC* 在 331–353 和 359–383 处含

有 2 个高度保守的 C2H2 型锌指结构域(图 2A)。利用 Protein-BLAST 工具进行多个序列比对显示, 所有 *CgrflbC* 同源基因都含有高度保守的 C2H2 锌指结构域。*CgrFlbC* 与暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)和果生炭疽菌(*Colletotrichum fructicola*)等同源蛋白具有很高的相似性, 分别为 94.04%和 83.13%。与稻瘟病菌(*M. oryzae*)和构巢曲霉(*A. nidulans*)的同源蛋白的相似性分别为 53.97%和 43.35% (图 2B)。

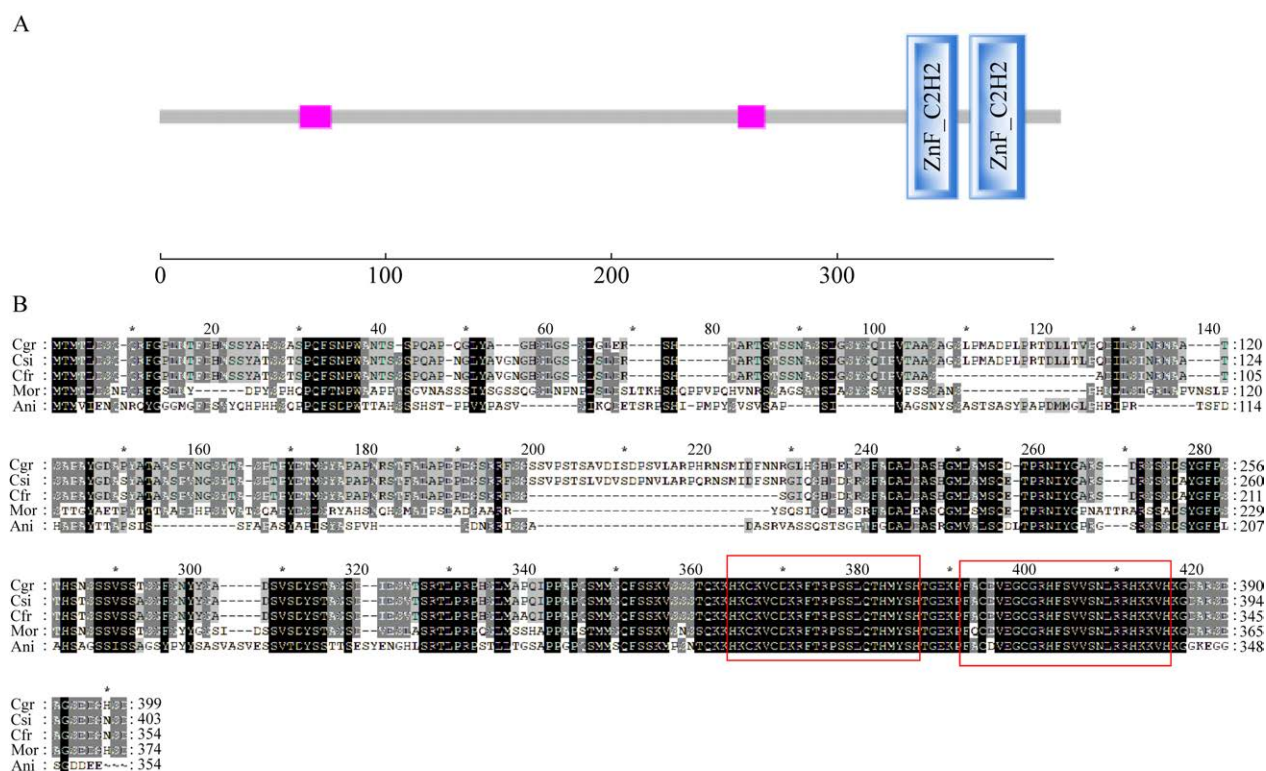


图 2 CgrFlbC 的蛋白序列分析 A: *CgrFlbC* 蛋白结构域分析。B: *CgrFlbC* 蛋白序列比对结果。图中方框代表 C2H2 型锌指结构域; Cgr: 禾谷炭疽菌(XP_008099265.1); Csi: 暹罗炭疽菌(XP_036502067.1); Cfr: 果生炭疽菌(XP_031888606.1); Mor: 稻瘟病菌(XP_003713682.1); Ani: 构巢曲霉(XP_660025.1); 括号中的序号为 GenBank 登录号。

Figure 2 Protein sequence analysis of *CgrFlbC*. A: Protein domain analysis of *CgrFlbC*. B: Multiple sequence alignment of *CgrFlbC*. The box in the diagram represents the C2H2-type zinc finger domain; Cgr: *Colletotrichum graminicola* (XP_008099265.1); Csi: *Colletotrichum siamense* (XP_036502067.1); Cfr: *Colletotrichum fructicola* (XP_031888606.1); Mor: *Magnaporthe oryzae* (XP_003713682.1); Ani: *Aspergillus nidulans* (XP_660025.1); The numbers enclosed in parentheses represent GenBank accession numbers.

2.2 *CgrflbC* 基因敲除菌株和互补菌株的验证

将 *CgrflbC* 基因敲除载体进行原生质体转化, 挑取转化子后进行基因组提取。用引物 *CgrflbCF/CgrflbCR*、*CgrflbCUU/PI* 和 *CgrflbCDD/PI1* 进行三轮 PCR 验证。结果表明, 使用特定引物 *CgrflbCF/CgrflbCR* 进行 PCR 扩增时, 通过电泳检测野生型菌株能够得到 1 019 bp 的 DNA 片段, 而 3 个突变菌株未出现特异性 DNA 片段(图 3A)。当使用引物 *CgrflbCUU/PI* 和 *CgrflbCDD/PI1* 进行 PCR 扩增时, 3 个突变菌株则可以得到特异性 DNA 片段, 与此形成鲜明对比的是, 野生型菌株并未产生任何特异性 DNA 片段(图 3B 和 3C)。因此, 共获得 3 个突变株, 分别命名为 $\Delta CgrflbC$ -3、 $\Delta CgrflbC$ -7 和 $\Delta CgrflbC$ -9。

为了实现 $\Delta CgrflbC$ 的互补, 其互补序列被引入到以突变株制备的原生质体中, 提取菌株的基因组并用引物 *CgrflbChbF+CgrflbChbR* 进行 PCR 验证, 验证正确的菌株即为互补菌株, 命名为 $\Delta CgrflbC/flbC$ 。

2.3 *CgrFlbC* 参与调控禾谷炭疽菌的营养生长

菌落直径统计分析结果显示, 突变株在 OMA、PDA、CM、Czapek 和 MM 培养基上的生长速度均明显低于野生型, 具有显著性差异(图 4A 和图 4B)。特别是在 PDA 培养基中, 突变体的平均直径比野生型减少了约 23%。相较于野生型菌株, 敲除突变株的菌落形态也明显不同, 尤其是在 PDA、CM 及 OMA 培养基上, $\Delta CgrflbC$ 的气生菌丝明显稀薄。由此可见, *CgrFlbC* 参与调控禾谷炭疽菌的营养生长过程。

2.4 *CgrFlbC* 参与调控细胞壁完整性和氧化应激响应

在含有不同浓度的 SDS 和 H_2O_2 培养基上, 相较于野生型, 敲除突变株 $\Delta CgrflbC$ 的生长显著受到抑制。结果显示: 0.005% SDS 对突变株和野生型的抑制率分别是 80%和 66%, 0.010% SDS 对突变株的抑制率仍然显著高于野生型(图 5A)。此外, $\Delta CgrflbC$ 对 H_2O_2 也很敏感, 7 mmol/L H_2O_2 对突变株抑制率为 84%, 显著高于野生型

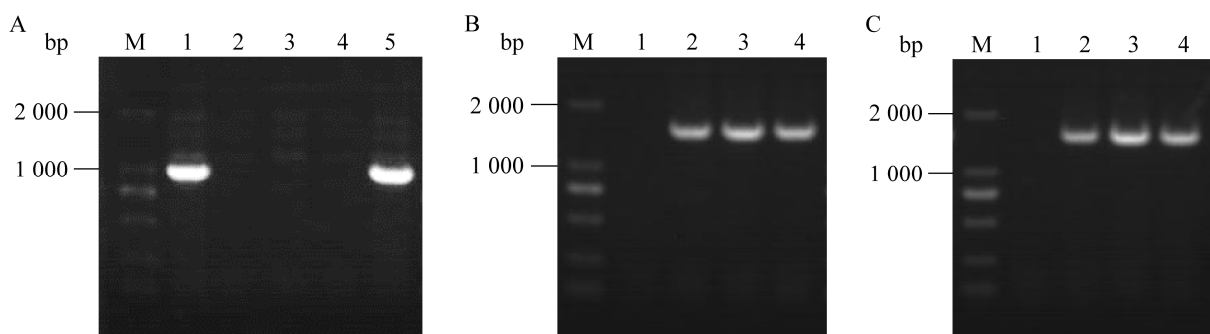


图 3 *CgrflbC* 基因敲除及互补电泳检测图 A: PCR 扩增引物 *CgrflbCF/CgrflbCR* 电泳图; B: PCR 扩增引物 *CgrflbCUU/PI* 电泳图; C: PCR 扩增引物 *CgrflbCDD/PI1* 电泳图。M: DL2000 DNA marker; 1: WT; 2: $\Delta CgrflbC$ -3; 3: $\Delta CgrflbC$ -7; 4: $\Delta CgrflbC$ -9; 5: $\Delta CgrflbC/flbC$ 。

Figure 3 *CgrflbC* gene knockout and complementary electrophoresis detection. A: Electrophoresis of PCR amplification primers *CgrflbCF/CgrflbCR*; B: Electrophoresis of PCR amplification primer *CgrflbCUU/PI*; C: Electrophoresis of PCR amplification primer *CgrflbCDD/PI1*. M: DL2000 DNA marker; 1: Wild type; 2: $\Delta CgrflbC$ -3; 3: $\Delta CgrflbC$ -7; 4: $\Delta CgrflbC$ -9; 5: $\Delta CgrflbC/flbC$.

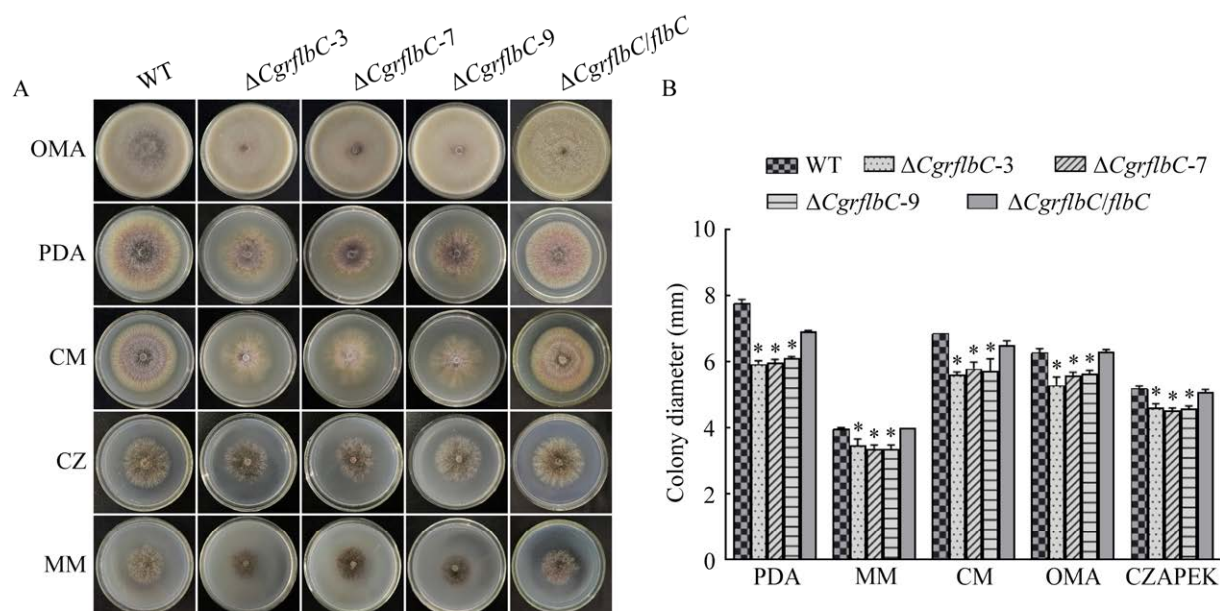


图4 各菌株营养生长的测定 A: 比较菌株在5种培养基上的生长。B: 菌落直径柱状图。

Figure 4 Vegetative growth assay of each strain. A: Comparison of the growth of strains on five different media. B: Colony diameter histogram. *: $P < 0.05$.

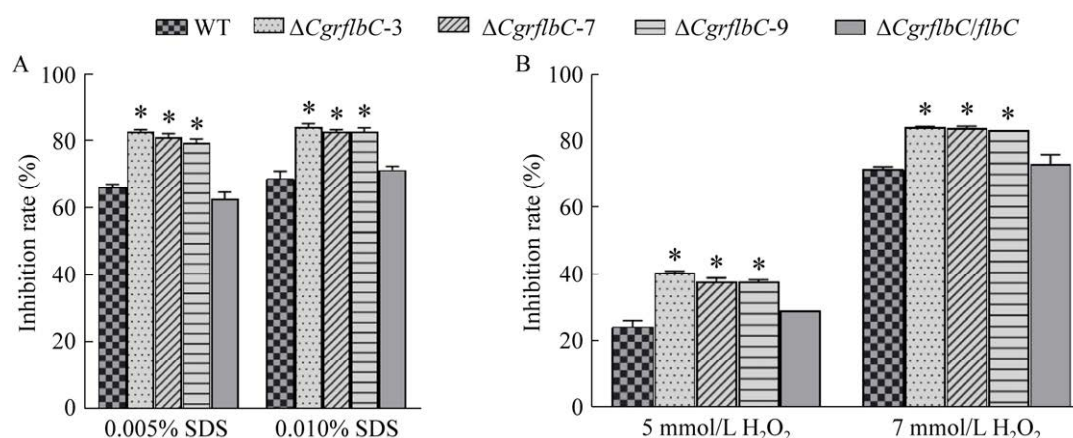


图5 各菌株非生物胁迫的测定 A: SDS对菌株生长抑制率统计。B: H₂O₂对菌株生长抑制率统计。

Figure 5 Abiotic stress assay of each strain. A: Statistics of SDS inhibition rate on bacterial growth. B: Statistics of H₂O₂ inhibition rate on bacterial growth. *: $P < 0.05$.

(图5B)。因此, CgrFlbC参与调控禾谷炭疽菌细胞壁完整性和氧化应激响应。

2.5 CgrFlbC参与调控禾谷炭疽菌卵圆形孢子的形成和萌发

将WT、ΔCgrflbC以及ΔCgrflbC/flbC接种

到含有100 mL的PDB、CM液体培养基的锥形瓶中, 28 °C、150 r/min振荡培养3 d, 统计各菌株在不同培养基中卵圆形孢子的产量。结果显示, 在PDB培养基中突变株的卵圆形孢子产量约为野生型的1.6倍; 在CM培养基中, 野

生型卵圆形孢子产量约为 7.95×10^6 个/mL, 而突变株达到 1.50×10^7 个/mL (图 6A)。在 2 种培养基中, 突变株的孢子产量均高于野生型菌株。

将孢子悬液进行保湿培养 4 h 和 6 h, 突变株在 6 h 时萌发率仅有 24%, 而野生型接近 95% (图 6B 和图 6C)。由此可见, CgrFlbC 参与调控

卵圆形孢子的产生和萌发。

2.6 CgrFlbC 参与调控禾谷炭疽菌镰刀形孢子的形成

将 3 种菌株分别接种在 OMA 固体培养基中, 28 °C 培养 14 d, 野生型和互补菌株的镰刀形孢子产量平均为 1.1×10^7 个/皿, 而突变株没

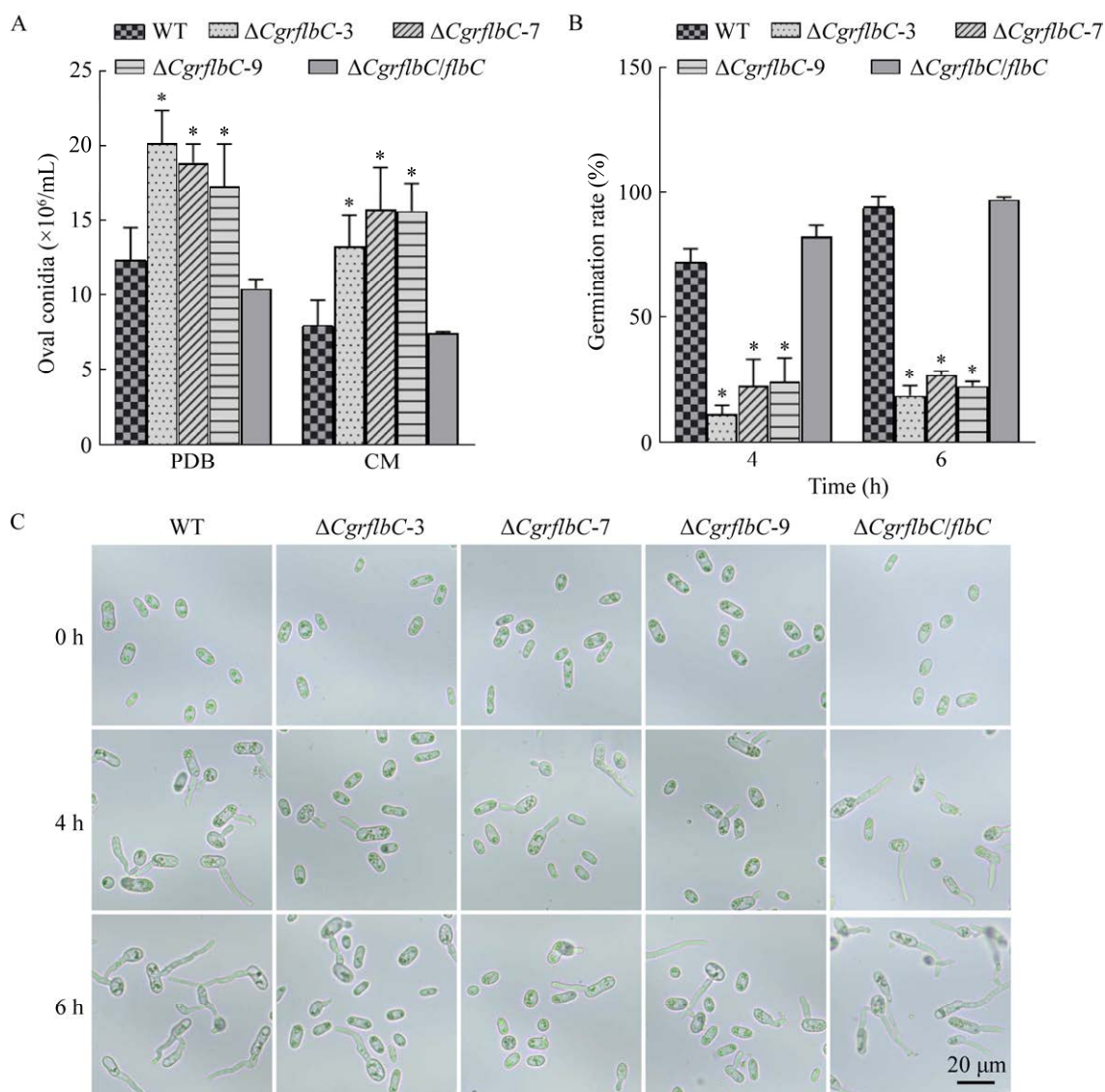


图 6 各菌株卵圆形孢子产量及萌发情况 A: 卵圆形孢子产量统计柱状图; B: 卵圆形孢子萌发率统计柱状图; C: 卵圆形孢子萌发显微图像。

Figure 6 Oval conidial production and germination of each strain. A: Oval conidial production statistics bar graph; B: Statistical bar graph of oval conidial germination rate; C: Microscopic image of oval conidial germination. *: $P < 0.05$.

有镰刀形孢子产生。培养 21 d, 野生型镰刀形孢子产量达到了 1×10^8 个/皿, 而突变株平均为 5×10^5 个/皿, 仅为野生型的 0.5% (图 7)。虽然突变株的镰刀形孢子产量较野生型极显著降低, 但其萌发正常。结果说明 CgrFlbC 参与调控禾谷炭疽菌镰刀形孢子的产生。

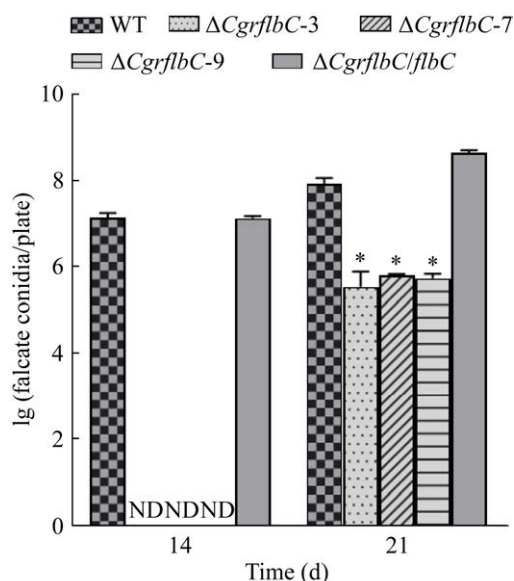


图 7 野生型、突变株、互补株镰刀形孢子的产量
ND: 未检测到。

Figure 7 The yield of falcate conidia of wild type, mutant and complemented strains. ND: Not detected; *: $P < 0.05$.

2.7 CgrFlbC 参与调控禾谷炭疽菌附着枝的形成

附着枝是某些真菌菌丝体顶端产生的特殊结构, 起到附着和穿透植物表皮的作用^[25]。从图 8 可以看出, 突变株不能形成附着枝, 而野生型和互补菌株均能正常产生附着枝。

2.8 CgrFlbC 参与调控禾谷炭疽菌的致病性

由图 9 所示, 野生型和突变株均能在玉米叶片上形成病斑, 野生型的病斑直径为 6 mm, 而突变株的病斑直径平均为 4 mm, 突变株较

野生型致病力显著下降。表明 CgrFlbC 在调控禾谷炭疽菌的致病性中起着重要作用。

3 讨论

C2H2 型锌指转录因子在病原真菌的生长、分生孢子产生、附着胞的形成和致病等过程中发挥重要作用^[23,26]。本研究在禾谷炭疽菌中鉴定了一个 C2H2 型锌指转录因子 CgrFlbC, 表型分析发现: 敲除突变体在 5 种培养基上生长速率均低于野生型菌株, 并且菌丝稀薄, 尤其是在 PDA、CM 和 OMA 培养基。在构巢曲霉(*A. nidulans*)中, *flbC* 敲除突变体菌丝生长速率降低^[20]。在稻瘟病菌(*M. oryzae*)中 $\Delta Moflbc$ 菌株生长速率高于野生型^[23], 并且气生菌丝减少^[27]。在红色红曲霉(*Monascus ruber*)中, $\Delta Mrflbc$ 在 PDA 上表现出菌落平坦, 气生菌丝稀少^[28]。在草酸青霉菌(*Penicillium oxalicum*)中, $\Delta Poflbc$ 菌株径向生长不变, 但菌落形态发生变化, 形成了“白色蓬松”的外观^[29]。在粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)中, *flbC* 同源基因 *flb3* 的缺失导致气生菌丝无法正常生长^[30]。以上结果表明 FlbC 在多种真菌中都参与调控真菌的营养生长。

$\Delta Cgrflbc$ 突变体对 SDS 非常敏感。在黑曲霉(*A. niger*)中, $\Delta Anflbc$ 菌株对 SDS 也很敏感^[21]。在烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)中, 菌株 A1141 和 A1159 *flbC* 敲除突变株在刚果红培养基上生长速度显著低于野生型^[31], 由此可见, FlbC 在多种真菌中都参与调控细胞壁的完整性。

FlbC 是分生孢子中心调控路径的上游激活因子之一, 对分生孢子的产生和成熟尤为重要。本研究中, CgrFlbC 参与调控禾谷炭疽菌 2 种类型分生孢子的产生及卵圆形孢子的萌发。在构巢曲霉(*A. nidulans*)中, *flbC* 缺失导致产孢延迟并减少, 分生孢子萌发率降低, 野生型在

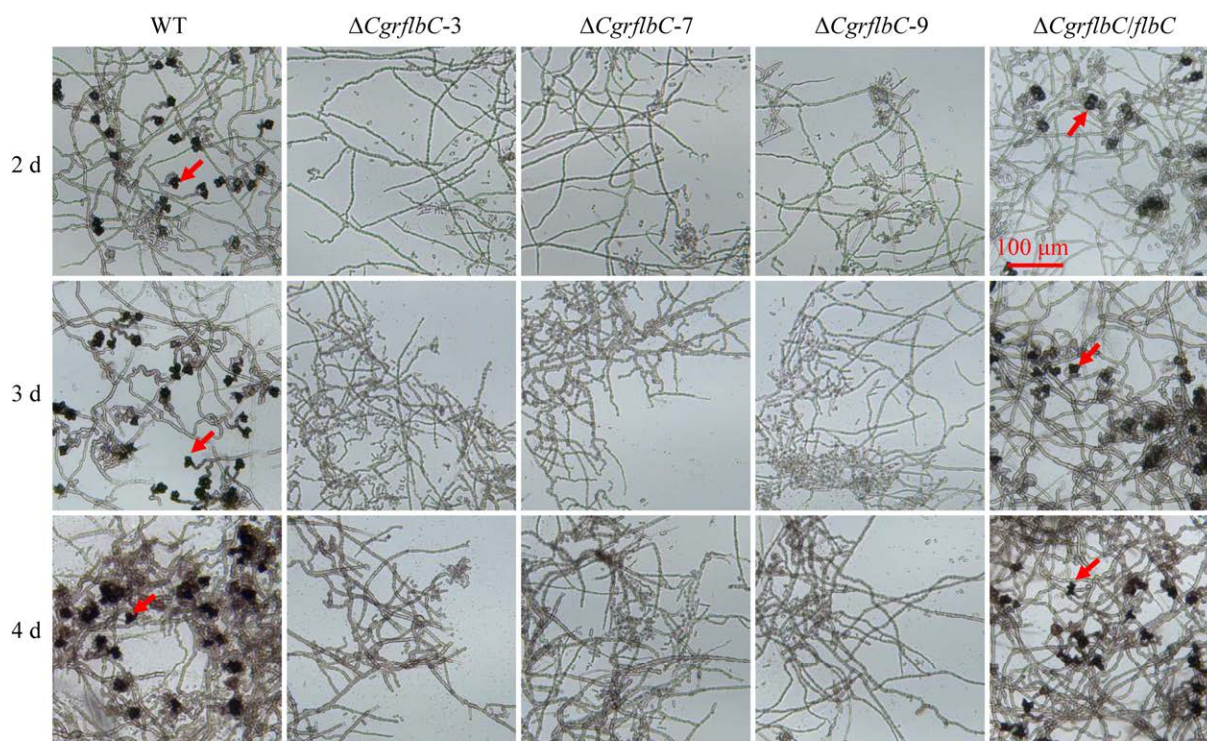


图 8 附着枝形成的显微观察图 箭头：附着枝。

Figure 8 Microscopic observation of hyphopodium formation. Arrows: Hyphopodium. Bar: 100 μ m.

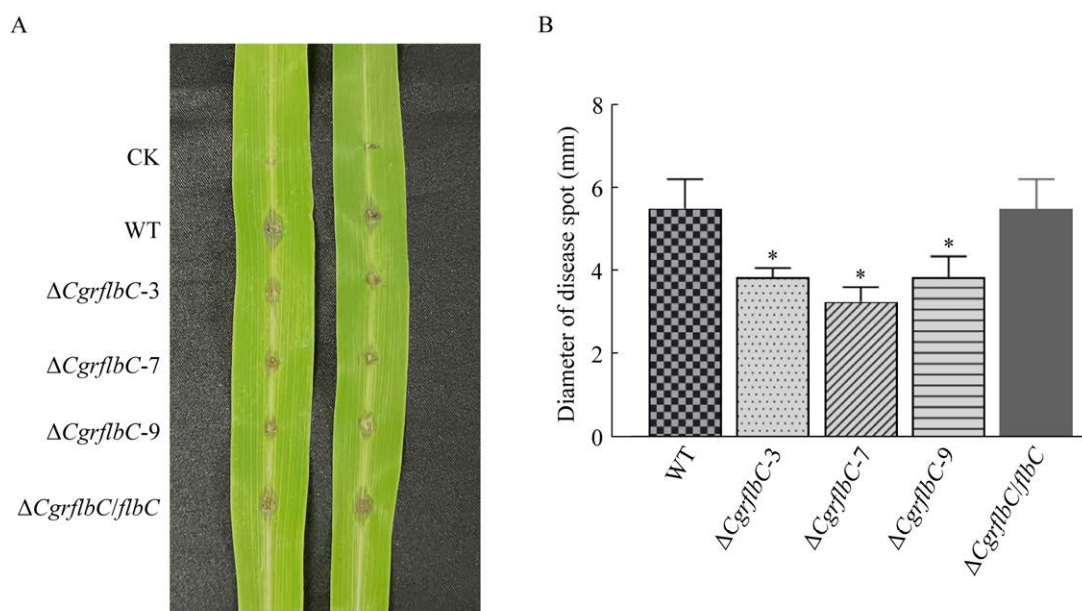


图 9 野生型、突变株、互补株致病性实验 A：玉米叶片上各菌株致病情况；B：玉米叶片病斑直径。

Figure 9 Pathogenicity experiments on wild type, mutant strain, and complementary strain. A: Pathogenicity of various strains on corn leaves; B: Diameter of corn leaf lesions. *: $P < 0.05$.

6 h 萌发率接近 100%，而突变体的萌发率只有 30%–40%^[20]。在稻瘟病菌(*M. oryzae*)中，*flbC* 缺失突变株的分生孢子产量仅为野生型的 18%，萌发延迟^[23]。在禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)中，*FgflbC* 缺失突变株产生的大分生孢子数量约为野生型菌株的 50%^[32]。在粗糙脉孢菌(*N. crassa*)中，*NcflbC* 缺失导致大型分生孢子产量减少^[30]。以上结果表明，*FlbC* 在参与调控孢子的产生及萌发方面的功能相对比较保守。

CgrFlbC 参与调控禾谷炭疽菌的致病性。采用菌饼接种时，突变株形成的病斑比野生型小，这可能是该突变株不能正常形成附着枝导致。多数真菌的菌丝形成的附着枝顶端会膨大，从而紧密地吸附在植物的表面上。一些附着枝的基部还可以分化形成穿透钉，通过这些穿透钉进一步侵入植物体内^[33-34]。在禾谷炭疽菌中， $\Delta CgrstuA$ 突变株的附着枝显著增多，致病性增强^[35]。在大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)中，*VdKss1*、*VdSte7* 和 *VdSte11* 的缺失都破坏了附着枝的形成，导致其致病性减弱^[25]。在球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)^[36]和稻瘟病菌(*M. oryzae*)中，*flbC* 基因的敲除都导致其致病性减弱^[23]。

4 结论

在禾谷炭疽菌中，C2H2 型的转录因子 *CgrFlbC* 参与调控多个生物学过程，包括菌丝生长、细胞壁完整性、氧化应激响应、产孢及分生孢子萌发、附着枝形成和致病性，相关研究结果对于深入解析禾谷炭疽菌致病的分子机制具有重要意义。

REFERENCES

- [1] CUEVAS-FERNÁNDEZ FB, ROBLEDO-BRIONES AM, BARONCELLI R, TRKULJA V, THON MR, BUHINICEK I, SUKNO SA. First report of *Colletotrichum graminicola* causing maize anthracnose in Bosnia and Herzegovina[J]. Plant Disease, 2019, 103(12): 3281.
- [2] PANACCIONE DG, VAILLANCOURT LJ, HANAU RM. Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*[J]. Mycologia, 1989, 81(6): 876-883.
- [3] DUAN CX, GUO C, YANG ZH, SUN SL, ZHU ZD, WANG XM. First report of anthracnose leaf blight of maize caused by *Colletotrichum graminicola* in China[J]. Plant Disease, 2019, 103(7): 1770.
- [4] MIRANDA VJ, PORTO WF, FERNANDES GDR, POGUE R, NOLASCO DO, ARAUJO ACG, COTA LV, FREITAS CG, DIAS SC, FRANCO OL. Comparative transcriptomic analysis indicates genes associated with local and systemic resistance to *Colletotrichum graminicola* in maize[J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 2483.
- [5] GUO CT, LUO XC, YING SH, FENG MG. Differential roles of five fluffy genes (*flbA-flbE*) in the lifecycle *in vitro* and *in vivo* of the insect-pathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Journal of Fungi, 2022, 8(4): 334.
- [6] ETXEBESTE O, NI M, GARZIA A, KWON NJ, FISCHER R, YU JH, ESPESO EA, UGALDE U. Basic-zipper-type transcription factor *FlbB* controls asexual development in *Aspergillus nidulans*[J]. Eukaryotic Cell, 2008, 7(1): 38-48.
- [7] CHO HJ, SON SH, CHEN W, SON YE, LEE I, YU JH, PARK HS. Regulation of conidiogenesis in *Aspergillus flavus*[J]. Cells, 2022, 11(18): 2796.
- [8] WIESER J, LEE BN, FONDON JW 3rd, ADAMS TH. Genetic requirements for initiating asexual development in *Aspergillus nidulans*[J]. Current Genetics, 1994, 27(1): 62-69.
- [9] ADAMS TH, BOYLAN MT, TIMBERLAKE WE. *brlA* is necessary and sufficient to direct conidiophore development in *Aspergillus nidulans*[J]. Cell, 1988, 54(3): 353-362.
- [10] MIRABITO PM, ADAMS TH, TIMBERLAKE WE. Interactions of three sequentially expressed genes control temporal and spatial specificity in *Aspergillus* development[J]. Cell, 1989, 57(5): 859-868.
- [11] YU JH. Regulation of Development in *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*[J]. Mycobiology, 2010, 38(4): 229-237.
- [12] LEE BN, ADAMS TH. The *Aspergillus nidulans* *fluG* gene is required for production of an extracellular developmental signal and is related to prokaryotic glutamine synthetase I[J]. Genes & Development, 1994, 8(6): 641-651.
- [13] LEE BN, ADAMS TH. Overexpression of *flbA*, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of *brlA* and premature initiation of development[J]. Molecular Microbiology, 1994, 14(2): 323-334.
- [14] van MUNSTER JM, NITSCHKE BM, AKEROYD M, DIJKHUIZEN L, van der MAAREL MJEC, RAM AFJ. Systems approaches to predict the functions of glycoside hydrolases during the life cycle of *Aspergillus niger* using developmental mutants $\Delta brlA$ and $\Delta flbA$ [J]. PLoS One, 2015, 10(1): e0116269.
- [15] SHELEST E. Transcription factors in fungi[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 286(2): 145-151.

- [16] MACPHERSON S, LAROCHELLE M, TURCOTTE B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006, 70(3): 583-604.
- [17] SCHUMACHER J, DE LARRINOA IF, TUDZYNSKI B. Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants[J]. Eukaryotic Cell, 2008, 7(4): 584-601.
- [18] YUE XF, QUE YW, XU L, DENG SZ, PENG YL, TALBOT NJ, WANG ZY. ZNF1 encodes a putative C₂H₂ zinc-finger protein essential for appressorium differentiation by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2016, 29(1): 22-35.
- [19] LIANG LK, YANG HJ, WEI S, ZHANG SB, CHEN L, HU YS, LV YY. Putative C₂H₂ transcription factor *AflZKS3* regulates aflatoxin and pathogenicity in *Aspergillus flavus*[J]. Toxins, 2022, 14(12): 883.
- [20] KWON NJ, GARZIA A, ESPESO EA, UGALDE U, YU JH. FlbC is a putative nuclear C₂H₂ transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*[J]. Molecular Microbiology, 2010, 77(5): 1203-1219.
- [21] CHEN XY, MORAN TORRES JP, WÖSTEN HAB. The role of the Flb protein family in the life cycle of *Aspergillus niger*[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2024, 117(1): 58.
- [22] MALAPI-WIGHT M, KIM JE, SHIM WB. The N-terminus region of the putative C₂H₂ transcription factor Adal harbors a species-specific activation motif that regulates asexual reproduction in *Fusarium verticillioides*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2014, 62: 25-33.
- [23] CAO HJ, HUANG PY, ZHANG LL, SHI YK, SUN DD, YAN YX, LIU XH, DONG B, CHEN GQ, SNYDER JH, LIN FC, LU JP. Characterization of 47 Cys2-His2 zinc finger proteins required for the development and pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. New Phytologist, 2016, 211(3): 1035-1051.
- [24] 吴曼莉, 胡坚, 张楠, 柯智健, 柳志强, 李晓宇. CgRGS7 调控胶孢炭疽菌分生孢子产量、附着胞形成及致病性[J]. 西南农业学报, 2017, 30(8): 1802-1807.
- WU ML, HU J, ZHANG N, KE ZJ, LIU ZQ, LI XY. CgRGS7 regulation of conidium production, appressorium formation and pathogenicity in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 30(8): 1802-1807 (in Chinese).
- [25] YE ZQ, QIN J, WANG Y, ZHANG JH, WU XY, LI XG, SUN LF, ZHANG J. A complete MAP kinase cascade controls hyphopodium formation and virulence of *Verticillium dahliae*[J]. aBIOTECH, 2023, 4(2): 97-107.
- [26] SON H, SEO YS, MIN K, PARK AR, LEE J, JIN JM, LIN Y, CAO PJ, HONG SY, KIM EK, LEE SH, CHO A, LEE S, KIM MG, KIM Y, KIM JE, KIM JC, CHOI GJ, YUN SH, LIM JY, et al. A phenome-based functional analysis of transcription factors in the cereal head blight fungus, *Fusarium graminearum*[J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(10): e1002310.
- [27] MATHEIS S, YEMELIN A, SCHEPS D, ANDRESEN K, JACOB S, THINES E, FOSTER AJ. Functions of the *Magnaporthe oryzae* Flb3p and Flb4p transcription factors in the regulation of conidiation[J]. Microbiological Research, 2017, 196: 106-117.
- [28] JIA LL, HUANG YY, YU JH, STADLER M, SHAO YC, CHEN WP, CHEN FS. Characterization of key upstream asexual developmental regulators in *Monascus ruber* M7[J]. Food Bioscience, 2022, 50: 102153.
- [29] YAO GS, LI ZH, WU RM, QIN YQ, LIU GD, QU YB. *Penicillium oxalicum* PoFlbC regulates fungal asexual development and is important for cellulase gene expression[J]. Fungal Genetics and Biology, 2016, 86: 91-102.
- [30] BONI AC, AMBRÓSIO DL, CUPERTINO FB, MONTENEGRO-MONTERO A, VIRGILIO S, FREITAS FZ, CORROCHER FA, GONÇALVES RD, YANG A, WEIRAUCH MT, HUGHES TR, LARRONDO LF, BERTOLINI MC. *Neurospora crassa* developmental control mediated by the FLB-3 transcription factor[J]. Fungal Biology, 2018, 122(6): 570-582.
- [31] TANAKA Y, ASAGIRI I, KOMIYA R, YAMAZAKI H, YAGI A, UCHIDA R, SASAKI M. The FlbC transcription factor contributes to the generation of strain heterogeneity in Fumagillin mycotoxin production in *Aspergillus fumigatus*[EB/OL]. 2024-06-04. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4435109/v1>.
- [32] SON H, KIM MG, CHAE SK, LEE YW. FgFlbD regulates hyphal differentiation required for sexual and asexual reproduction in the ascomycete fungus *Fusarium graminearum*[J]. Journal of Microbiology, 2014, 52(11): 930-939.
- [33] 李颖超. 茄子黄萎病致病菌侵染结构及棉花 miR171 抗黄萎病机制研究[D]. 保定: 河北大学硕士学位论文, 2022.
- LI YC. Study on the infection structure of eggplant verticillium wilt pathogen and the mechanism of cotton miR171 against verticillium wilt[D]. Baoding: Master's Thesis of Hebei University, 2022 (in Chinese).
- [34] ZHAO P, ZHAO YL, JIN Y, ZHANG T, GUO HS. Colonization process of *Arabidopsis thaliana* roots by a green fluorescent protein-tagged isolate of *Verticillium dahliae*[J]. Protein & Cell, 2014, 5(2): 94-98.
- [35] 张莹, 周双针, 王利亚, 韦涵文, 谢俊, 柳志强, 李晓宇. 禾谷炭疽菌转录因子 CgrStuA 调控营养生长、孢子产生、萌发及附着枝形成[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3020-3031.
- ZHANG Y, ZHOU SZ, WANG LY, WEI HW, XIE J, LIU ZQ, LI XY. A transcription factor CgrStuA regulates vegetative growth, conidial production, germination, and hyphopodium formation of *Colletotrichum graminicola*[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3020-3031 (in Chinese).
- [36] 郭崇韬. 球孢白僵菌中心发育通路疑似上游调控因子的功能及调控作用解析[D]. 杭州: 浙江大学博士学位论文, 2022.
- GUO CT. Function and regulation of suspected upstream regulatory factors in the central development pathway of *Beauveria bassiana*[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2022 (in Chinese).