

# 橡胶树暹罗炭疽菌 $Zn_2Cys_6$ 型转录因子 CsGcc1 的生物学功能

王地广<sup>1</sup>, 张兴媛<sup>1</sup>, 刘沙玉<sup>1</sup>, 唐雯<sup>1,2</sup>, 柳志强<sup>\*1,2</sup>

1 海南大学生命科学学院, 海南 海口 570228

2 海南大学全健康研究院, 海南 海口 570228

王地广, 张兴媛, 刘沙玉, 唐雯, 柳志强. 橡胶树暹罗炭疽菌  $Zn_2Cys_6$  型转录因子 CsGcc1 的生物学功能[J]. 微生物学通报, 2022, 49(10): 4255-4268

Wang Diguang, Zhang Xingyuan, Liu Shayu, Tang Wen, Liu Zhiqiang. Biological functions of the  $Zn_2Cys_6$  transcription factor CsGcc1 in *Colletotrichum siamense*[J]. Microbiology China, 2022, 49(10): 4255-4268

**摘要:**【背景】暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)是一种重要的病原真菌, 可以引起炭疽病, 给全球橡胶产业带来巨大的经济损失。 $Zn_2Cys_6$ 型转录因子是真菌特有的锌指类转录因子, 通常参与调控真菌的生长发育过程。【目的】在暹罗炭疽菌中鉴定了一个与稻瘟病菌 Gcc1 同源的  $Zn_2Cys_6$  型转录因子 CsGcc1, 并研究其功能。【方法】根据同源重组原理构建 CsGCCI 的基因敲除突变体, 并通过营养生长、 $H_2O_2$  敏感性、分生孢子产生及萌发、玻璃纸试验和致病性分析, 明确 CsGcc1 的功能。【结果】CsGcc1 编码一个含有 646 个氨基酸的蛋白, 而且含有一个 GAL4 结构域。CsGCCI 基因在培养 36 h 的菌丝及分生孢子中具有较高的表达量。CsGCCI 基因敲除突变株营养生长速率降低且对  $H_2O_2$  更加敏感。相较于野生型菌株, 突变株的分生孢子产量、萌发率及附着胞形成率均降低。此外, CsGCCI 的敲除可以明显降低分生孢子的穿透能力, 突变株对橡胶叶片的致病力减弱。【结论】 $Zn_2Cys_6$ 型转录因子 CsGcc1 参与调控暹罗炭疽菌的营养生长、氧化应激、分生孢子发育及致病性等过程。

**关键词:** 暹罗炭疽菌;  $Zn_2Cys_6$ 型转录因子; 分生孢子; 致病性

基金项目: 国家自然科学基金(31860480)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31860480)

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

Received: 2022-02-23; Accepted: 2022-03-08; Published online: 2022-04-02

# Biological functions of the Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> transcription factor CsGcc1 in *Colletotrichum siamense*

WANG Diguang<sup>1</sup>, ZHANG Xingyuan<sup>1</sup>, LIU Shayu<sup>1</sup>, TANG Wen<sup>1,2</sup>, LIU Zhiqiang<sup>\*1,2</sup>

<sup>1</sup> School of Life Sciences, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

<sup>2</sup> One Health Institute, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

**Abstract:** [Background] *Colletotrichum siamense* (*C. siamense*) is a major fungal pathogen causing rubber anthracnose, which has led to substantial economic loss to the world rubber industry. The fungi-specific Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> transcription factor regulates the growth and development of fungi. [Objective] A Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> transcription factor CsGcc1 was identified from *C. siamense*, which is homologous to Gcc1 in *Magnaporthe oryzae*, and its functions were studied. [Methods] The *CsGCC1*-knockout mutant was developed by homologous recombination, and the functions of CsGcc1 were clarified based on the vegetative growth, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sensitivity, conidial production and germination, cellophane assay and pathogenicity analysis. [Results] *CsGcc1* encoded a protein of 646 amino acids and the protein had a GAL4 domain. *CsGCC1* was highly expressed in the mycelia and conidia after 36 h culture. The *CsGCC1*-knockout mutant had slow vegetative growth and low tolerance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The conidium yield, conidium germination rate, and appressorium formation rate of the mutant were lower than those of the wild type. Cellophane assay showed that deletion of *CsGcc1* could weaken the penetration ability of conidia. The virulence of the mutant to rubber leaves was attenuated. [Conclusion] The Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> transcription factor CsGcc1 is involved in regulating vegetative growth, oxidative stress, conidium development, and pathogenicity in *C. siamense*.

**Keywords:** *Colletotrichum siamense*; Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> transcription factor; conidium; pathogenicity

橡胶炭疽病是一种由暹罗炭疽菌 (*Colletotrichum siamense*) 侵染引起的病害<sup>[1]</sup>。暹罗炭疽菌是一种普遍存在的植物病原真菌, 属于胶孢炭疽菌复合群<sup>[2-3]</sup>。暹罗炭疽菌的分生孢子在适宜的环境下会萌发和形成附着胞, 附着胞形成侵染结构穿透植物叶片的角质层, 进而形成坏死病斑, 导致橡胶树产胶量降低<sup>[4-5]</sup>。

转录因子(transcription factor, TF)是一类能够和特定目的基因 5'端上游序列特异性结合的反式作用因子, 其能够使目的基因在一定的空间和时间按照特定的强度进行表达, 从而调控生物的生长发育和胁迫应答<sup>[6-7]</sup>。常见的转录因子一般具有 4 个结构域: DNA 结合域、核定位信号、转录调节结构域和寡聚化位点<sup>[8]</sup>。常

见的 DNA 结合蛋白包括: 锌指(zinc finger motif)、碱性螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)、螺旋-转折-螺旋(helix-turn-helix, HTH)、同源结构域(homeodomain, HD)和碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)<sup>[9]</sup>。锌指蛋白是真核生物中最大的转录因子家族之一, 基于锌指结合基序可以分为三大类, 即 Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>)、Cys<sub>4</sub> (C<sub>4</sub>)和 Cys<sub>6</sub> (C<sub>6</sub>)<sup>[10]</sup>。Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型转录因子是真菌特有的一类锌指蛋白, 主要由 6 个半胱氨酸残基围绕 2 个锌原子组成, 构成了类似“四叶草”的立体交叉结构<sup>[11-12]</sup>。许多研究表明 Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型转录因子参与真菌生长发育(*TPC1*、*GCC1*、*EBR1*)及致病性(*Zt107320*、*PnPf2*)的调控<sup>[13-16]</sup>。例如: *Tpc1* 参与稻瘟病菌的极性生长

过程, 突变株  $\Delta tpc1$  的分生孢子产量明显减少<sup>[13]</sup>; PnPf2 与小麦叶枯病菌的致病性有关, PnPf2 的敲除降低了该菌对小麦的致病力<sup>[16]</sup>。

转录因子在植物病原真菌中的调控机制较为复杂, 研究转录因子的功能和调控机制对于解析暹罗炭疽菌的致病机理具有重要意义, 也可有效防治该病害提供理论基础。本研究从暹罗炭疽菌中克隆了一个  $Zn_2Cys_6$  型转录因子基因  $CsGCCI$ , 其与稻瘟病菌  $GCCI$  (growth, conidiation and cell wall regulatory factor 1, MGG\_07063)同源<sup>[6]</sup>, 本研究通过基因敲除及表型分析研究  $CsGCCI$  在暹罗炭疽菌生长发育过程中的功能。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

暹罗炭疽菌野生型菌株(WT178)保存于海南大学生命科学学院, 菌株在 PDA 培养基于 28 °C 培养, 保存于 4 °C 斜面培养基。

#### 1.1.2 培养基、主要试剂

实验所用载体为 pCB1532 和 pUC18。所用培养基有 PDA、CM、MM、CZAPEK、PDB、LB、DCM 和 TB3 等, 培养基具体配方参照文献[17]。质粒提取试剂盒和凝胶回收试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司; RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和实时荧光定量 PCR 试剂盒, 北京宝日医生物科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 $CsGCCI$ 基因的克隆及序列信息分析

参照 NCBI 暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)基因组数据库, 利用 Protein-BLAST 获得  $CsGCCI$  基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)序列。用Primer 5设计引物对CsGCC1F/CsGCC1R 并扩增目的片段(表 1)。用 SMART (<http://smart.embl-Heidelberg.de/>)在线工具预测 CsGcc1 的蛋白结构域。在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中获取  $CsGCCI$  基因的同源序列, 用 MEGA 6.0 构建系统发育树, 方法为邻近法(neighbor-joining method)<sup>[18]</sup>。使用在线工

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primers and sequences

Primer	Primer sequence (5'→3')
CsGCC1F	ATGACGAGCATGTCACCCTCAAG
CsGCC1R	TTACCGTTTCCTCTTCTTGTCT
CsGCC1upF	CGGAATTCTACTGCGTAGGTAAGGTAGGCTG
CsGCC1upR	GGGGTACCATGGAGGGTGGTCGTGAACCTGG
CsGCC1downF	CGGGATCCACGGCTGCAGTATGAGGTGGAGG
CsGCC1downR	CGGAATTCCTGTGCTGAGGAACCGCCGTCT
CsGCC1UU	GAATTACTGGCCAGGGCCCTGTATC
PI	CAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG
PII	GTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
CsGCC1DD	GAGTGCGGGGTTCTCTCGACAAATG
CsGCC1hbF	CGGAATTCCTTACCTTACCTACCTACCTCC
CsGCC1hbR	CGGGATCCTAACAGTCTCTCGCCTGCAAGT
$\beta$ -tublinqF	AAGAGCAGATTCGGGGTGTG
$\beta$ -tublinqR	GACGCTAAACTGGTCCCAA
CsGCC1qF	GAGGACAAGGATGTGGCTATC
CsGCC1qR	GAAGGTATCGTCGAGGGTAGAA

具 Clustal Omega 和 MEME 及 GeneDoc 软件进行 CsGcc1 蛋白多序列比对。

### 1.2.2 实时荧光定量 PCR

野生型菌株的菌饼接种于 PDB 培养基中, 28 °C、150 r/min 振荡培养 2 d, 用滤纸过滤除去菌丝, 取 10 mL 滤液 4 000 r/min 离心 10 min 收集分生孢子沉淀。取适量分生孢子悬浮液与 100 mL 的 CM 液体培养基混匀, 28 °C 分别培养 4、8、12、24、36 和 48 h 后收集对应时间段的菌丝。利用 RNA 提取试剂盒提取不同时间段的菌丝和初始分生孢子的总 RNA, 通过反转录试剂盒反转录成 cDNA, 采用 TB Green 嵌合荧光法, 使用 Light Cycler 96 仪器进行实时荧光定量 PCR<sup>[19]</sup>, 检测 *CsGCC1* 基因在野生型菌株不同时间段菌丝及分生孢子中的相对表达量, 以  $\beta$ -*tublin* 为内参基因, 通过  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法计算分析试验数据<sup>[20]</sup>。

### 1.2.3 *CsGCC1* 基因敲除及互补

根据同源重组原理(图 1), 用引物对 CsGCC1UF/ CsGCC1UR 和 CsGCC1DF/ CsGCC1DR 分别扩增目的基因的上、下游片段, 将经过酶切回收的上、下游片段和 pCB1532 载体相连, 获得敲除载体 pKno-*CsGCC1*。将敲除载体转入野生型菌株的原生质体中<sup>[19]</sup>, 在含有氯嘧磺隆的 PDA 培养基上挑取转化子, 用引物对 CsGCC1F/ CsGCC1R、

CsGCC1UU/PI、PII/ CsGCC1DD 进行 PCR 验证。

以 CsGCC1hbF/ CsGCC1hbR 为引物利用 PCR 扩增互补片段, 将片段回收纯化、酶切后与带有潮霉素磷酸转移酶基因(*HPT*)抗性标记的 pUC18 载体相连, 获得互补载体。互补载体转化由突变体制备的原生质体, 在含有 300  $\mu$ g/mL 潮霉素的 PDA 培养基上挑取转化子并进行 PCR 验证, 将互补菌株编号为  $\Delta$ CsGCC1/*GCC1*。

### 1.2.4 野生型、突变株和互补菌株的营养生长比较

将活化 7 d 的野生型、突变株及互补菌株分别接种于 PDA、CM、CZAPEK 和 MM 这 4 种营养培养基中, 28 °C 培养 7 d, 拍照、测量菌落直径, 每个处理设 3 个重复。

### 1.2.5 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 敏感性分析

将菌块接种于 PDB 液体培养基中, 28 °C、150 r/min 振荡培养 3 d。过滤除掉菌丝, 取 1 mL 滤液 12 000 r/min 离心 1 min 收集分生孢子沉淀, 用 1 mL 无菌水重悬沉淀并把分生孢子浓度调至  $1 \times 10^5$  个/mL, 取 100  $\mu$ L 分生孢子悬浮液和 PDA 培养基颠倒混匀后倒于平板中, 待平板凝固, 将沾有 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的滤纸片放置于 PDA 平板中央, 28 °C 培养 2 d, 测量抑菌圈直径, 试验重复 3 次。

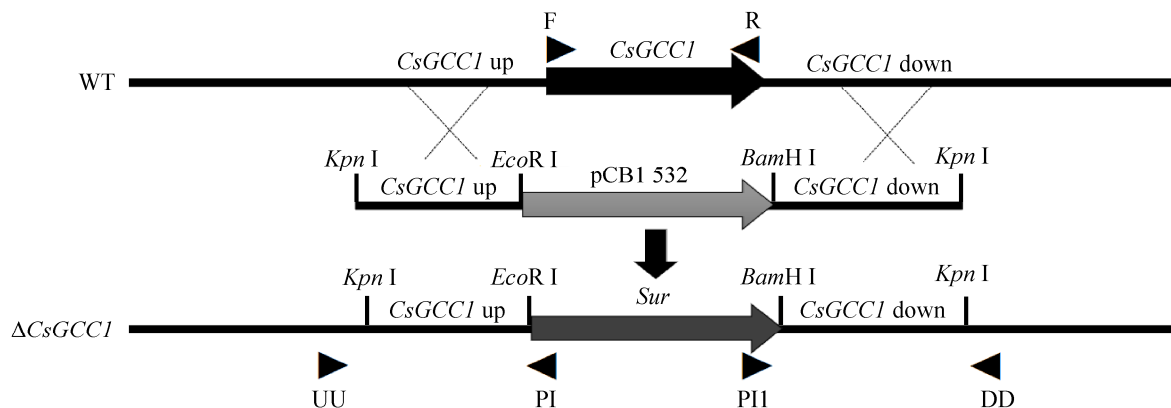


图 1 *CsGCC1* 基因同源重组原理 *Sur* 为氯嘧磺隆抗性基因

Figure 1 Homologous recombination principle of the gene *CsGCC1*. *Sur* is the chlorimuron-ethyl resistance gene.

### 1.2.6 分生孢子产量、萌发及附着胞的形成

将菌块接种于 PDB 液体培养基中, 28 °C、150 r/min 分别振荡培养 2、3 和 4 d。用滤纸过滤除去菌丝, 取 1 mL 滤液 12 000 r/min 离心 1 min, 无菌水重悬分生孢子沉淀, 用血球计数板统计各菌株的分生孢子产量。将 20  $\mu$ L 浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL 的分生孢子悬浮液滴于载玻片中央, 保湿条件下 28 °C 分别培养 4、8 和 12 h, 观察并统计菌株的分生孢子萌发率及附着胞的形成率, 试验重复 3 次。

### 1.2.7 玻璃纸穿透试验

准备 PDA 平板, 将大小合适并灭菌的玻璃纸平铺于平板中央, 吸取 20  $\mu$ L 浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL 的分生孢子悬浮液缓慢接种于玻璃纸中央, 防止液滴流动, 28 °C 分别培养 3 d 和 4 d 后揭掉玻璃纸继续培养 2 d, 观察菌株穿透情况, 测量菌落直径, 每个处理设 3 个重复。

### 1.2.8 菌株致病性分析

摘取大小适宜、无病斑的橡胶叶片, 用酒精擦拭叶片表面并制造伤口。将直径为 5 mm 的菌饼和 20  $\mu$ L 浓度为  $1 \times 10^6$  个/mL 的分生孢子悬浮液分别接种在叶片伤口处, 保湿条件下 28 °C 培养 4 d, 测量叶片病斑大小, 每个处理设 3 个重复。

### 1.2.9 数据处理

实验数据以平均值 $\pm$ 标准差来表示, 用 IBM SPSS 25.0 软件进行方差分析, 显著差异分析用单因素 ANOVA 检验和邓肯多重比较( $P < 0.05$ ), 作图软件用 GraphPad Prism 6.0。

## 2 结果与分析

### 2.1 $CsGCC1$ 基因序列分析

暹罗炭疽菌  $CsGCC1$  基因的 ORF 框全长 2 014 bp, 总共编码 646 个氨基酸, 含有一个 GAL4 蛋白结构域, 属于  $Zn_2Cys_6$  型转录因子(图 2A)。通过 NCBI 中 BLAST 在线比对工具, 选取与

$CsGCC1$  基因同源的蛋白质序列构建系统发育树(图 2B), 发现  $CsGcc1$  与稻瘟病菌(*M. oryzae*)同源蛋白 Gcc1 的序列相似度为 62.9%。蛋白多序列比对结果显示  $CsGcc1$  与 *Pyricularia oryzae* (XP003715244.1)、*Aspergillus nidulans* (XP659740.1)、*Colletotrichum graminicola* (XP008092145.1) 和 *Fusarium graminearum* (XP011326843.1) 中的同源蛋白均含有一个保守的 GAL4 蛋白结构域(图 2C)。

### 2.2 $CsGCC1$ 基因表达分析

提取了野生型菌株不同时间段的菌丝和分生孢子的总 RNA 进行实时荧光定量 PCR 分析。由结果可知(图 3), 随着培养时间的增加,  $CsGCC1$  基因的表达量基本呈现上升趋势; 在 36 h 时表达量达到最高, 而后开始降低; 在分生孢子中,  $CsGCC1$  基因的表达量也较高, 与 36 h 菌丝阶段的表达水平相当。由此可见,  $CsGCC1$  在暹罗炭疽菌营养生长及分生孢子阶段可能发挥一定的作用。

### 2.3 $CsGCC1$ 基因敲除及互补验证

将  $CsGCC1$  基因的敲除载体转入暹罗炭疽菌野生型菌株的原生质体, 共挑取了 80 个转化子, PCR 验证结果表明 61、62 和 63 号转化子在引物对  $CsGCC1F/CsGCC1R$  扩增中无特异性条带, 在引物对  $CsGCC1UU/PI$  和  $PI1/CsGCC1DD$  扩增中有特异性条带, 因此确定 61、62 和 63 号转化子为  $CsGCC1$  基因的敲除突变体, 分别编号为  $\Delta CsGCC1-61$ 、 $\Delta CsGCC1-62$  和  $\Delta CsGCC1-63$  (图 4)。互补载体原生质体转化共挑取了 36 个转化子, 通过提取基因组 DNA 进行 PCR 验证, 发现 28 号转化子能扩增出  $CsGCC1$  基因的 ORF 框条带, 因此确定 28 号转化子为互补菌株(图 4A)。

### 2.4 $CsGcc1$ 参与暹罗炭疽菌的营养生长

野生型菌株、突变株  $\Delta CsGCC1$  和互补菌株在 4 种营养培养基上生长 7 d, 结果发现(图 5),

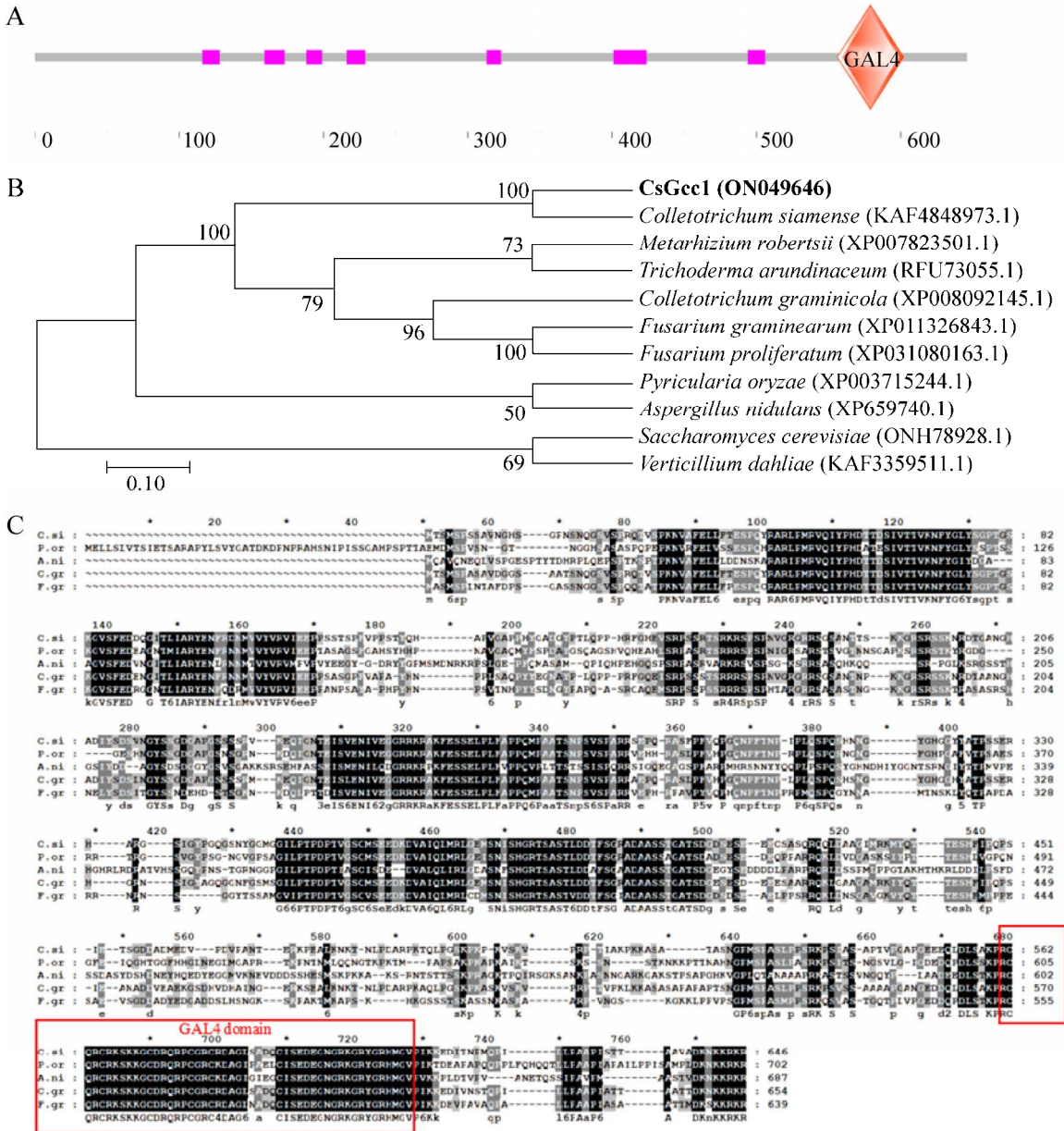


图 2 CsGcc1 蛋白序列分析 A: CsGcc1 蛋白质结构域分析; B: CsGcc1 系统发育树分析; C: CsGcc1 蛋白多序列比对; 系统发育树中分支点上的数字为 bootstrap 值; 括号中的序号为 GenBank 登录号; 标尺代表核苷酸替换率; C.si: *Colletotrichum siamense* (ON049646); P.or: *Pyricularia oryzae* (XP003715244.1); A.ni: *Aspergillus nidulans* (XP659740.1); C.gr: *Colletotrichum graminicola* (XP008092145.1); F.gr: *Fusarium graminearum* (XP011326843.1)

Figure 2 Protein sequence analysis of CsGcc1. A: Protein domain analysis of CsGcc1; B: Phylogenetic tree analysis of CsGcc1; C: Protein multiple sequence alignment of CsGcc1. The numbers at the branch points represent the bootstrap values in phylogenetic tree; The numbers in parentheses are GenBank accession numbers; Scale bar represent the nucleotide substitution rate. C.si: *Colletotrichum siamense* (CsGcc1); P.or: *Pyricularia oryzae* (XP003715244.1); A.ni: *Aspergillus nidulans* (XP659740.1); C.gr: *Colletotrichum graminicola* (XP008092145.1); F.gr: *Fusarium graminearum* (XP011326843.1).



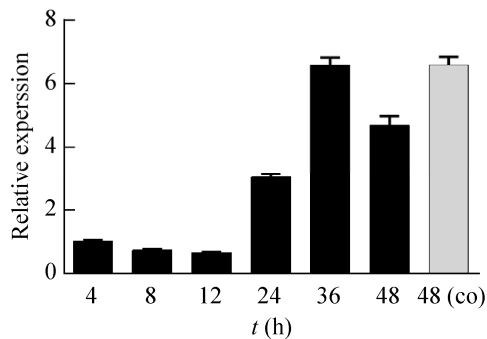


图 3  $CsGCC1$  在不同时间段的菌丝和分生孢子中的表达量 co: 分生孢子

Figure 3 The expression levels of  $CsGCC1$  in mycelia in different periods and conidia. co: Conidium.

突变株  $\Delta CsGCC1$  在 4 种营养培养基中的生长速率低于野生型菌株,  $\Delta CsGCC1$  的菌落直径小于野生型, 尤其在营养较为贫瘠的 CZAPEK 和 MM 培养基中, 在 CZAPEK 培养基中突变株的菌落直径大约为 50 mm, 而野生型的菌落直径超过 70 mm。因此,  $CsGCC1$  基因的缺失减缓了暹罗炭疽菌的营养生长。

## 2.5 $CsGcc1$ 参与调控暹罗炭疽菌对 $H_2O_2$ 的敏感性

活性氧(reactive oxygen species, ROS)是植物抵御病害的关键介质。如图 6 所示, 滤纸片

在野生型菌株平板上形成的抑菌圈直径约为 40 mm, 然而在突变株平板上形成的抑菌圈直径达到 60 mm 左右, 显著大于野生型菌株。由此可见,  $CsGcc1$  的缺失造成突变株对  $H_2O_2$  更加敏感。

## 2.6 $CsGcc1$ 影响分生孢子的产生、萌发和附着胞的形成

将野生型、突变株和互补菌株分别接种于 PDB 液体培养基中, 培养 2 d 后, 突变株的分生孢子产量很低, 约为  $1 \times 10^4$  个/mL, 然而野生型和互补菌株的分生孢子产量达到  $1 \times 10^6$  个/mL; 在培养 3–4 d 时, 各菌株的分生孢子产量逐渐增加, 但是野生型和互补菌株的分生孢子产量增加更为显著(图 7A)。在分生孢子萌发方面, 培养 4 h 时野生型和互补菌株的分生孢子萌发率均达到 75%以上, 而突变株的萌发率仅有 30%左右。随着培养时间的延长, 在 8 h 和 12 h 时野生型菌株的分生孢子萌发率达到 90%以上, 突变株的萌发率在 50%–60%之间(图 7B)。此外, 与野生型菌株相比, 突变株的附着胞形成率明显降低(图 7C)。因此,  $CsGcc1$  参与暹罗炭疽菌分生孢子的产生、萌发及附着胞形成过程。

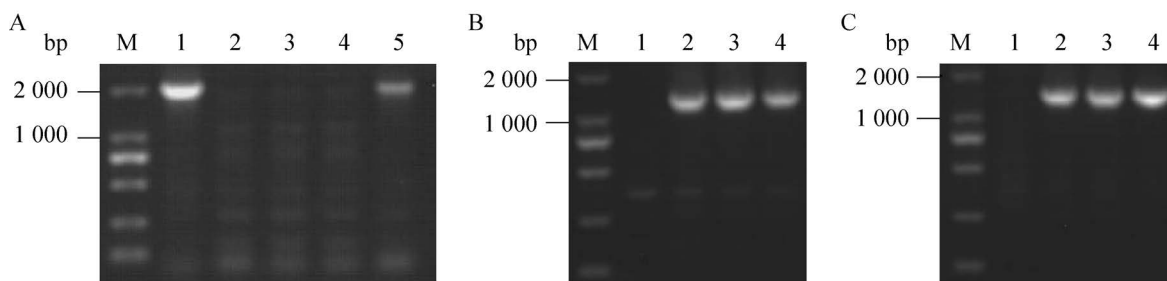


图 4  $CsGCC1$  基因敲除及互补载体的验证 A: 引物对  $CsGCC1F/CsGCC1R$  扩增结果; B: 引物对  $CsGCC1UU/PI$  扩增结果; C: 引物对  $PII/CsGCC1DD$  扩增结果。M: DL2000 DNA Marker; 1: 野生型; 2:  $\Delta CsGCC1-61$ ; 3:  $\Delta CsGCC1-62$ ; 4:  $\Delta CsGCC1-63$ ; 5:  $\Delta CsGCC1/GCC1$

Figure 4 Knockout and complementary vector verification of  $CsGCC1$  gene. A: PCR results of  $CsGCC1F/CsGCC1R$ ; B: PCR results of  $CsGCC1UU/PI$ ; C: PCR results of  $PII/CsGCC1DD$ . M: DL2000 DNA Marker; 1: Wild type; 2:  $\Delta CsGCC1-61$ ; 3:  $\Delta CsGCC1-62$ ; 4:  $\Delta CsGCC1-63$ ; 5:  $\Delta CsGCC1/GCC1$ .

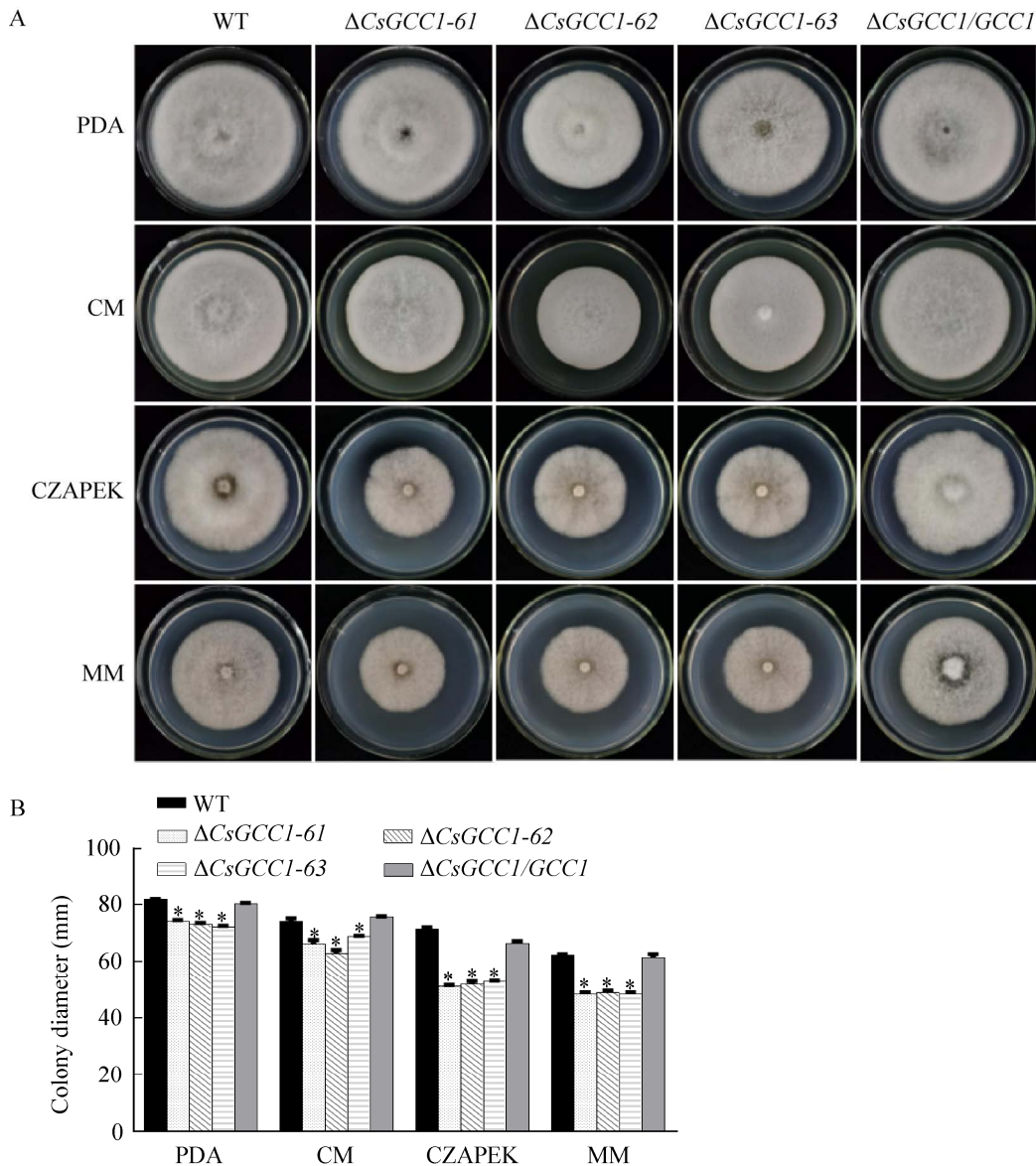


图 5 野生型、突变株和互补菌株的营养生长 A: 菌株在 4 种营养培养基中的生长情况; B: 菌落直径统计分析。\*:  $P < 0.05$

Figure 5 Growth of the wild type, mutants and the complementary strain. A: Growth comparison of strains on four media; B: Statistical analysis of colony diameters. \*:  $P < 0.05$ .

## 2.7 CsGcc1 影响暹罗炭疽菌的穿透能力

由玻璃纸穿透实验结果可知, 突变株在平板上形成的菌落直径明显小于野生型菌株。在培养 3 d 时突变株的菌落直径大约为 1.5 cm, 野生型和互补菌株的菌落直径达到 3.5 cm; 培养 4 d 时菌株的菌落直径进一步增大, 突

变株的菌落直径大约为 2.5 cm, 野生型和互补菌株的菌落直径达到 4.5 cm, 二者的菌落直径差异达到显著水平(图 8)。由此可知, CsGcc1 与暹罗炭疽菌附着胞的穿透能力有关, CsGcc1 的缺失导致暹罗炭疽菌穿透玻璃纸的能力减弱。



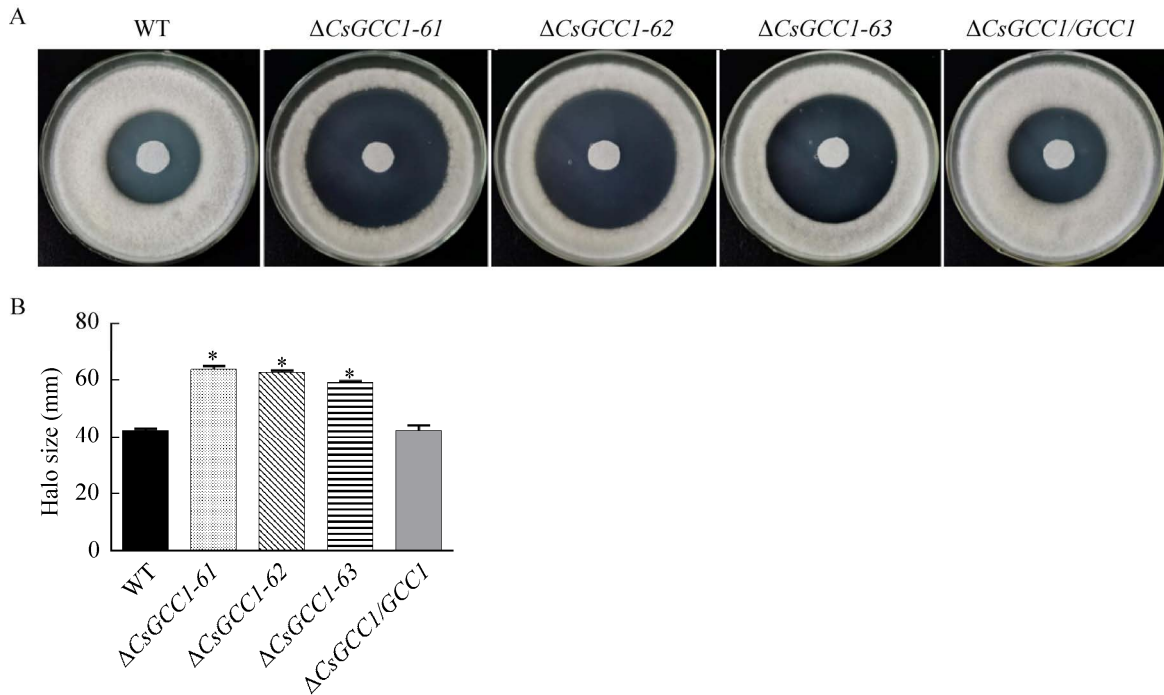


图 6  $H_2O_2$  敏感性试验 A:  $H_2O_2$  对菌株生长的影响; B: 抑菌圈直径统计。\*:  $P < 0.05$

Figure 6 Sensitivity tests to  $H_2O_2$ . A: Effects of  $H_2O_2$  on the growth of strains; B: Statistical analyses of diameters of inhibition zones. \*:  $P < 0.05$ .

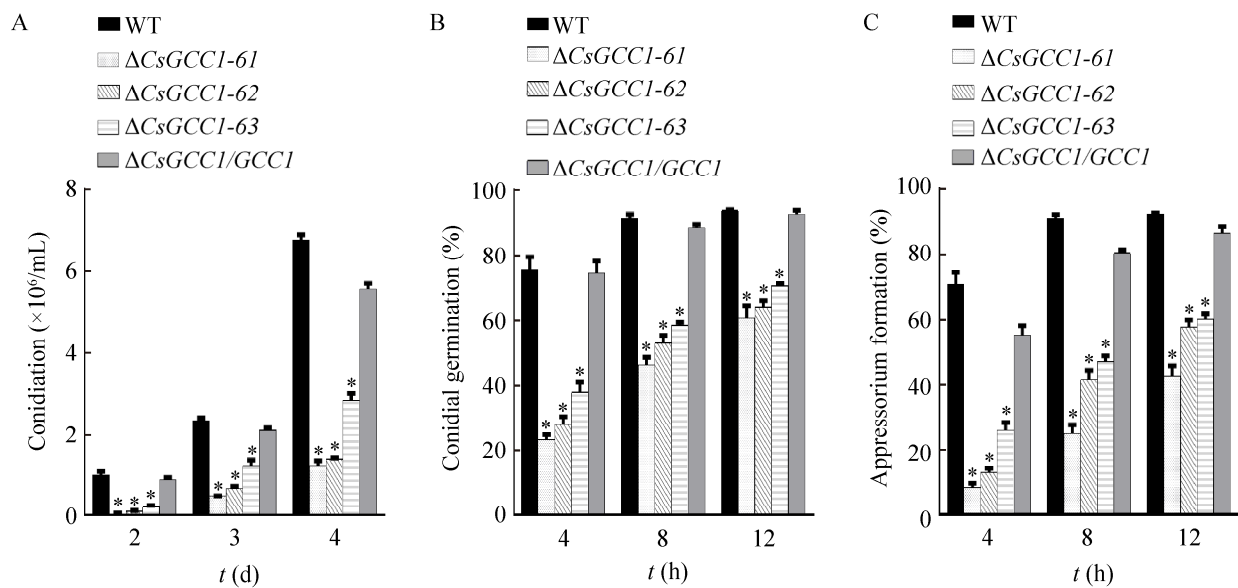


图 7 分生孢子产量、萌发率和附着胞形成率 A: 分生孢子产量统计; B: 分生孢子萌发率统计; C: 附着胞形成率统计。\*:  $P < 0.05$

Figure 7 Conidium production, germination rates and appressorium formation rates. A: Statistical analyses of conidium yields; B: Statistical analyses of conidial germination rates; C: Statistical analyses of appressorium formation rates. \*:  $P < 0.05$ .

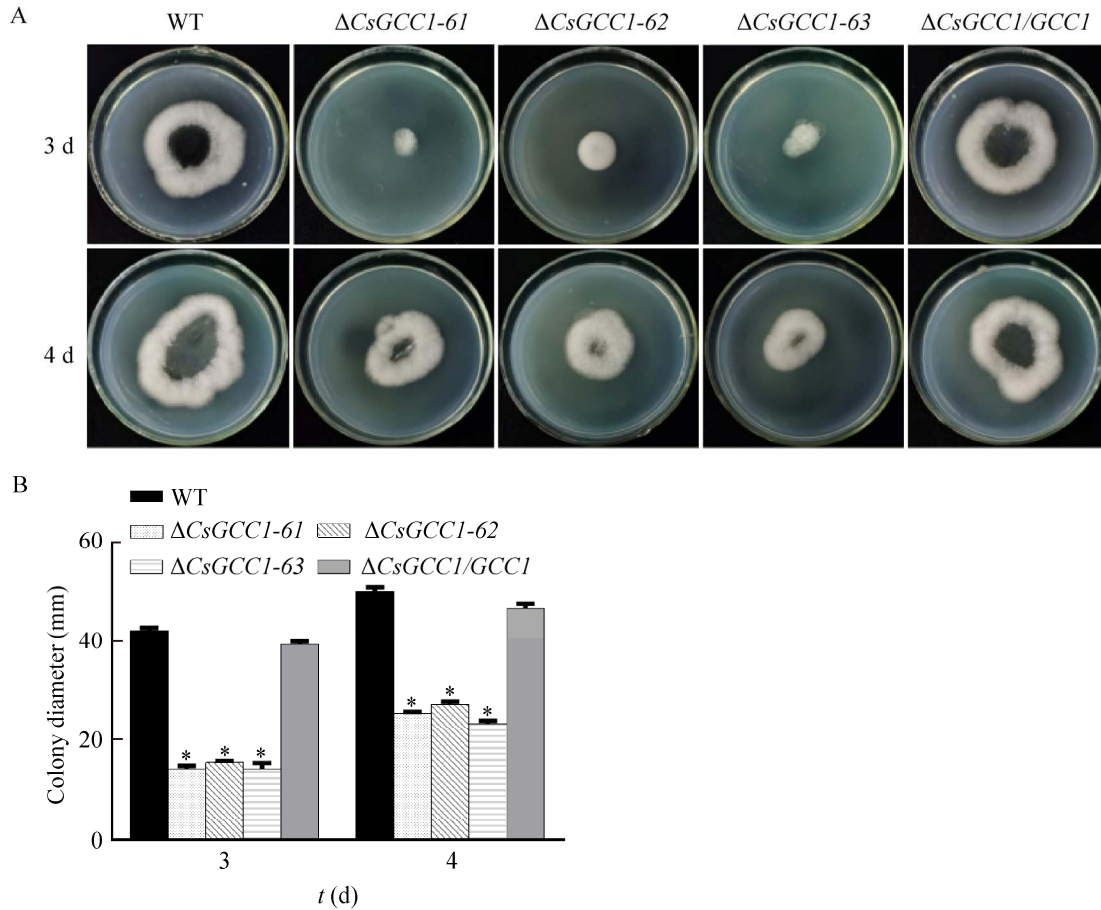


图8 暹罗炭疽菌玻璃纸穿透试验 A: 在分生孢子悬浮液接种下菌株生长情况; B: 菌落直径统计。  
\*:  $P < 0.05$

Figure 8 Cellophane penetration assay of *C. siamense*. A: Strain growth under inoculation of conidial suspension; B: Statistical analysis of colony diameter. \*:  $P < 0.05$ .

## 2.8 CsGcc1 的敲除减弱了菌株的致病力

由橡胶叶片致病结果可知: 用菌饼接种时野生型菌株形成的病斑直径达到 12 mm, 然而突变株形成的病斑直径只有 7 mm 左右(图 9A、9B)。用分生孢子悬液接种时野生型菌株形成的病斑直径为 6 mm, 突变株形成的病斑直径为 4 mm 左右(图 9C、9D)。因此, 无论是菌饼接种还是分生孢子悬液接种, 突变株都能形成病斑, 但是突变株形成的病斑直径均小于野生型菌株。综上可知, CsGcc1 与暹罗炭疽菌的致病性有关。

## 3 讨论与结论

$Zn_2Cys_6$  型转录因子是真菌特有的锌指类转录因子, 探索  $Zn_2Cys_6$  型转录因子在真菌中的调控通路有助于解析真菌的生长发育及侵染机制<sup>[21]</sup>。本研究敲除了一个  $Zn_2Cys_6$  型转录因子 CsGcc1, CsGcc1 的缺失影响暹罗炭疽菌的营养生长且对  $H_2O_2$  的耐受性降低, 突变株  $\Delta CsGCC1$  的分生孢子产量、萌发率及附着胞形成率与野生型菌株相比均降低, CsGcc1 的敲除减弱了突变株的穿透能力和对橡胶树叶片的致病力。

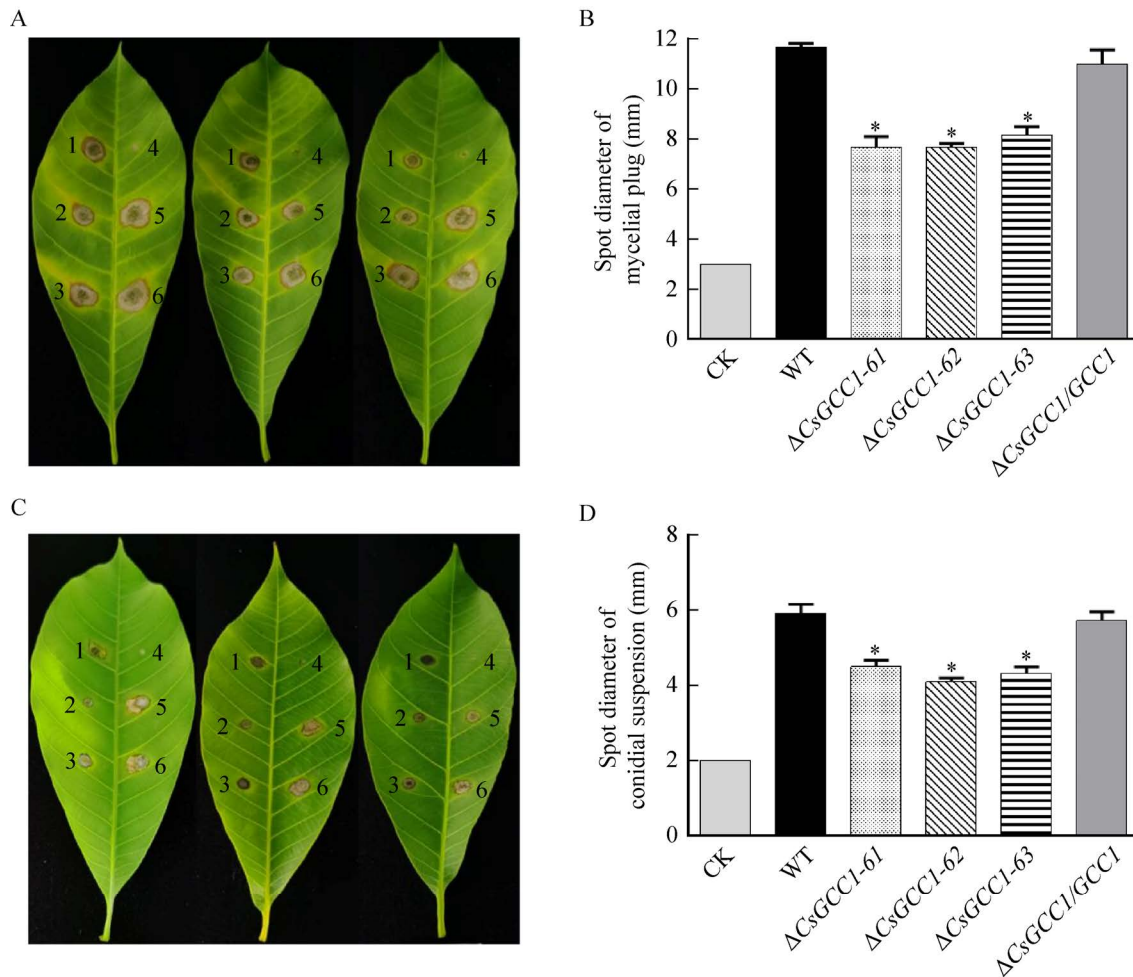


图 9 暹罗炭疽菌橡胶叶片致病试验 A: 菌饼接种叶片形成的病斑结果; B: 菌饼接种病斑直径统计分析; C: 分生孢子悬浮液接种叶片形成的病斑结果; D: 分生孢子悬浮液接种病斑直径统计分析。1:  $\Delta CsGCC1-61$ ; 2:  $\Delta CsGCC1-62$ ; 3:  $\Delta CsGCC1-63$ ; 4: 空白对照(A 图为 PDA 培养基, C 图为 PDB 培养基); 5: 野生型; 6:  $\Delta CsGCC1/GCC1$ ; \*:  $P < 0.05$

Figure 9 Virulence analysis on rubber tree leaves of *C. siamense*. A: Disease symptoms using mycelial plug inoculation; B: Statistical analysis of lesion diameter for mycelial plug inoculation; C: Disease symptoms at using conidial suspension inoculation; D: Statistical analysis of lesion diameter for conidial suspension inoculation. 1:  $\Delta CsGCC1-61$ ; 2:  $\Delta CsGCC1-62$ ; 3:  $\Delta CsGCC1-63$ ; 4: CK (PDA medium for A, PDB medium for C); 5: WT; 6:  $\Delta CsGCC1/GCC1$ , \*:  $P < 0.05$ .

$Zn_2Cys_6$  型转录因子对病原真菌的生长发育及分生孢子形态具有重要的调控作用, 探索病原真菌的生长规律有利于防治真菌病害<sup>[22]</sup>。 $Zn_2Cys_6$  型转录因子在真菌中的功能并不是保守的。本研究中突变株  $\Delta CsGCC1$  在营养培养基中的生长速率小于野生型菌株, 在 CZAPEK

和 MM 培养基中的差异更为显著。Gcc1 对稻瘟病菌的营养生长同样起到正调控作用,  $\Delta GCC1$  突变株在 CM 培养基中的生长速率仅为野生型的 24.7%。除了 Gcc1,  $Zn_2Cys_6$  型转录因子 GPF1 和 GTA1 对稻瘟病菌的生长同样具有重要作用<sup>[6]</sup>。 $Zn_2Cys_6$  型转录因子也可以

参与调控真菌的代谢,在一定程度上影响真菌的生长发育<sup>[23]</sup>。

CsGcc1 参与暹罗炭疽菌分生孢子的产生、萌发及附着胞的形成过程。在稻瘟病菌中,  $\Delta GCCI$  突变株失去了产生分生孢子的能力<sup>[6]</sup>。与稻瘟病菌 Gcc1 不同的是,  $\Delta CsGCCI$  突变株可以产生分生孢子, 但是分生孢子产量显著低于野生型菌株, 突变株的分生孢子萌发率及附着胞形成率相较于野生型菌株也出现降低。C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型转录因子 CgCrzA 参与调控胶孢炭疽菌分生孢子的形成和形态, 突变株  $\Delta CgCrzA$  形成异常的分生孢子, 其分生孢子的产量、萌发率和附着胞形成率也降低<sup>[24]</sup>。在果生炭疽菌 (*Colletotrichum fructicola*) 中, 锌指蛋白 CfSte12 的缺失导致分生孢子的萌发、附着胞形成及侵染出现缺陷, 这类似于 CsGcc1 的功能<sup>[25]</sup>。

病原真菌要在植物中定殖和繁殖, 需要克服寄主固有的防御机制, 植物最早的免疫反应之一是活性氧在侵染部位的快速积累<sup>[26]</sup>。活性氧主要有超氧化物(O<sup>2-</sup>)和过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 活性氧可以引发机体损伤, 最终导致细胞死亡<sup>[27]</sup>。ROS 在植物寄主与病原真菌的相互作用中起着重要作用<sup>[28]</sup>。在 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 实验中滤纸片在突变株平板中形成的抑菌圈直径明显大于野生型菌株, 说明 CsGcc1 的缺失造成突变株对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 更加敏感, 但是在稻瘟病菌 Gcc1 中无相关报道<sup>[6]</sup>。在杨树胶孢炭疽菌中, Rho GTPase CgCdc42 的缺失导致突变体  $\Delta CgCdc42$  对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 更加敏感, 并且 CgCdc42 参与和 ROS 相关基因 *CgAPI*、*Cat1* (catalase 1) 及 *Des1* (L-cysteine desulphhydrase) 的表达调控<sup>[29]</sup>。果生炭疽菌中的 CfSte50 及胶孢炭疽菌中的转录因子 CgCmr1 和 CgPks1 参与调节菌株对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的敏感性, CfSte50、CgCmr1 和 CgPks1 的缺失突变株对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的耐受性均降低<sup>[30-31]</sup>。

许多 Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型转录因子在真菌的侵染过程中发挥着重要的作用。稻瘟病菌中大约有 104 个 Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型转录因子, 其中有 8 个基因 *CNF1*、*CCAI*、*CONx1*、*CNF2*、*GTA1*、*GPF1*、*PCF1* 和 *MoCOD1* 与致病性有关<sup>[6]</sup>。*GCCI* 敲除突变株无法产生分生孢子, 而利用稻瘟病菌菌丝接种水稻离体叶片可以出现病斑, 说明可能和菌丝可以形成功能正常的附着胞侵染寄主植物有关<sup>[6]</sup>。在叶片致病试验中, 无论是用菌饼还是分生孢子悬浮液接种, 突变株  $\Delta CsGCCI$  在叶片上形成的病斑直径均小于野生型菌株, CsGcc1 的敲除减弱了暹罗炭疽菌对橡胶叶片的致病性, 说明 CsGcc1 对于维持暹罗炭疽菌的全毒力是必需的。基于表型分析, 暹罗炭疽菌 ROS 解毒能力的缺陷以及分生孢子产量、萌发率及附着胞形成率的降低, 还有穿透能力的减弱可能是导致突变株  $\Delta CsGCCI$  致病性减弱的主要原因。

CsGcc1 属于真菌特有的 Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型转录因子, 参与调节橡胶树暹罗炭疽菌的营养生长、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 敏感性、分生孢子产生及萌发和致病性。本研究可以为深入了解暹罗炭疽菌 Zn<sub>2</sub>Cys<sub>6</sub> 型转录因子的功能奠定一定基础。

## REFERENCES

- [1] 林春花, 张宇, 刘文波, 李潇, 缪卫国. 我国巴西橡胶树炭疽病的研究进展[J]. 热带生物学报, 2021, 12(3): 393-402, 268  
Lin CH, Zhang Y, Liu WB, Li X, Miao WG. Research advances on *Colletotrichum* leaf fall disease of rubber trees in China[J]. Journal of Tropical Biology, 2021, 12(3): 393-402, 268 (in Chinese)
- [2] Liu X, Li B, Cai J, Zheng X, Feng Y, Huang G. *Colletotrichum* species causing anthracnose of rubber trees in China[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 10435
- [3] Liao XM, Long XP, He QG, Song M, Li X, Liu WB, Zhang Y, Lin CH, Miao WG. Screening of binding proteins that interact with two components of the HOG MAPK pathway by the yeast two-hybrid method in

- Colletotrichum siamense*[J]. European Journal of Plant Pathology, 2021, 159(4): 949-958
- [4] Prusky D, Lichter A. Mechanisms modulating fungal attack in post-harvest pathogen interactions and their control[J]. European Journal of Plant Pathology, 2008, 121(3): 281-289
- [5] Li XY, Ke ZJ, Yu XJ, Liu ZQ, Zhang CH. Transcription factor CgAzf1 regulates melanin production, conidial development and infection in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2019, 112(7): 1095-1104
- [6] Lu JP, Cao HJ, Zhang LL, Huang PY, Lin FC. Systematic analysis of  $Zn_2Cys_6$  transcription factors required for development and pathogenicity by high-throughput gene knockout in the rice blast fungus[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(10): e1004432
- [7] Qiu L, Zhang J, Song JZ, Hu SJ, Zhang TS, Li Z, Wang JJ, Cheng W. Involvement of BbTpc1, an important  $Zn(II)_2Cys_6$  transcriptional regulator, in chitin biosynthesis, fungal development and virulence of an insect mycopathogen[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2021, 166: 1162-1172
- [8] Yanagisawa S, Sheen J. Involvement of maize dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression[J]. The Plant Cell, 1998, 10(1): 75-89
- [9] Chang PK, Ehrlich KC. Genome-wide analysis of the  $Zn(II)_2Cys_6$  zinc cluster-encoding gene family in *Aspergillus flavus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2013, 97(10): 4289-4300
- [10] MacPherson S, Laroche M, Turcotte B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR, 2006, 70(3): 583-604
- [11] Gardner KH, Pan T, Narula S, Rivera E, Coleman JE. Structure of the binuclear metal-binding site in the GAL4 transcription factor[J]. Biochemistry, 1991, 30(47): 11292-11302
- [12] Pan T, Coleman JE. GAL4 transcription factor is not a "zinc finger" but forms a  $Zn(II)_2Cys_6$  binuclear cluster[J]. PNAS, 1990, 87(6): 2077-2081
- [13] Galhano R, Illana A, Ryder LS, Rodríguez-Romero J, Demuez M, Badaruddin M, Martínez-Rocha AL, Soanes DM, Studholme DJ, Talbot NJ, et al. Tpc1 is an important  $Zn(II)_2Cys_6$  transcriptional regulator required for polarized growth and virulence in the rice blast fungus[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(7): e1006516
- [14] Zhao CZ, Waalwijk C, De Wit PJGM, Van der Lee T, Tang DZ. EBR1, a novel  $Zn(2)Cys_6$  transcription factor, affects virulence and apical dominance of the hyphal tip in *Fusarium graminearum*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2011, 24(12): 1407-1418
- [15] Habig M, Bahena-Garrido SM, Barkmann F, Hauelsen J, Stukenbrock EH. The transcription factor Zt107320 affects the dimorphic switch, growth and virulence of the fungal wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*[J]. Molecular Plant Pathology, 2020, 21(1): 124-138
- [16] Rybak K, See PT, Phan HTT, Syme RA, Moffat CS, Oliver RP, Tan KC. A functionally conserved  $Zn_2Cys_6$  binuclear cluster transcription factor class regulates necrotrophic effector gene expression and host-specific virulence of two major *Pleosporales* fungal pathogens of wheat[J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(3): 420-434
- [17] 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)
- [18] Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipinski A, Kumar S. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729
- [19] Li XY, Wu YT, Liu ZQ, Zhang CH. The function and transcriptome analysis of a bZIP transcription factor CgAP1 in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Microbiological Research, 2017, 197: 39-48
- [20] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [21] John E, Singh KB, Oliver RP, Tan KC. Transcription factor control of virulence in phytopathogenic fungi[J]. Molecular Plant Pathology, 2021, 22(7): 858-881
- [22] Song TQ, Zhang X, Zhang Y, Liang D, Yan JL, Yu JJ, Yu MN, Cao HJ, Yong ML, Pan XY, et al. Genome-wide identification of  $Zn_2Cys_6$  class fungal-specific transcription factors (ZnFTFs) and functional analysis of UvZnFTF<sub>1</sub> in *Ustilago indica* virens[J]. Rice Science, 2021, 28(6): 567-578
- [23] Brown DW, Villani A, Susca A, Moretti A, Hao GX, Kim HS, Proctor RH, McCormick SP. Gain and loss of a transcription factor that regulates late trichothecene biosynthetic pathway genes in *Fusarium*[J]. Fungal

- Genetics and Biology, 2020, 136: 103317
- [24] Wang P, Li B, Pan YT, Zhang YZ, Li DW, Huang L. Calcineurin-responsive transcription factor CgCrzA is required for cell wall integrity and infection-related morphogenesis in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. The Plant Pathology Journal, 2020, 36(5): 385-397
- [25] Liu WK, Liang XF, Gleason ML, Cao MY, Zhang R, Sun GY. Transcription factor CfSte12 of *Colletotrichum fructicola* is a key regulator of early apple *Glomerella* leaf spot pathogenesis[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 87(1): e02212-e02220
- [26] Chi MH, Park SY, Kim S, Lee YH. A novel pathogenicity gene is required in the rice blast fungus to suppress the basal defenses of the host[J]. PLoS Pathogens, 2009, 5(4): e1000401
- [27] Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures[J]. Physiological Reviews, 1998, 78(2): 547-581
- [28] Zhang ZQ, Chen Y, Li BQ, Chen T, Tian SP. Reactive oxygen species: a generalist in regulating development and pathogenicity of phytopathogenic fungi[J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2020, 18: 3344-3349
- [29] Wang XL, Xu X, Liang YM, Wang YL, Tian CM. A Cdc42 homolog in *Colletotrichum gloeosporioides* regulates morphological development and is required for ROS-mediated plant infection[J]. Current Genetics, 2018, 64(5): 1153-1169
- [30] 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[J]. Journal of Plant Pathology, 2020, 102(2): 335-342
- [31] Wang XL, Lu DX, Tian CM. Analysis of melanin biosynthesis in the plant pathogenic fungus *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Fungal Biology, 2021, 125(9): 679-692