

研究报告

暹罗炭疽菌同源异型盒转录因子 CsHtf1 的生物学功能

刘欢庆, 周双针, 高菁, 王金泓, 唐雯, 柳志强, 李晓宇*

海南大学生命科学学院, 海南 海口 570228

刘欢庆, 周双针, 高菁, 王金泓, 唐雯, 柳志强, 李晓宇. 暹罗炭疽菌同源异型盒转录因子 CsHtf1 的生物学功能[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5350-5362.

LIU Huanqing, ZHOU Shuangzhen, GAO Jing, WANG Jinhong, TANG Wen, LIU Zhiqiang, LI Xiaoyu. Biological function of a homeobox transcription factor CsHtf1 in *Colletotrichum siamense*[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5350-5362.

摘要: 【背景】暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)是橡胶炭疽病害的主要致病菌, 严重制约着天然橡胶产量。在植物致病真菌中广泛存在同源异型盒转录因子, 其参与调控真菌无性生殖、侵染和代谢等诸多方面。【目的】明确在暹罗炭疽菌中鉴定的一个同源异型盒转录因子 CsHtf1 的生物学功能。【方法】利用同源重组的方法获得 *Cshtf1* 基因的敲除突变株, 并对其营养生长、孢子产生和致病性等表型进行分析。【结果】*Cshtf1* 基因编码 600 个氨基酸且含有 1 个 HOX 结构域; 与野生型相比, *Cshtf1* 敲除突变株营养生长和致病性无显著差异, 而突变株分生孢子产量显著降低且黑色素产量增加。【结论】CsHtf1 参与调控暹罗炭疽菌的分生孢子及黑色素产生。

关键词: 暹罗炭疽菌; 同源异型盒转录因子; 分生孢子; 黑色素; 致病性

Biological function of a homeobox transcription factor CsHtf1 in *Colletotrichum siamense*

LIU Huanqing, ZHOU Shuangzhen, GAO Jing, WANG Jinhong, TANG Wen, LIU Zhiqiang, LI Xiaoyu*

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

Abstract: [Background] *Colletotrichum siamense* was the main pathogen of rubber anthracnose, which seriously restricted the yield of natural rubber. Homeobox transcription factors were widely found in plant-pathogenic fungi and involved in asexual reproduction,

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: 2023-04-20; Accepted: 2023-06-13; Published online: 2023-07-24

infection, and metabolism of fungi. **[Objective]** To determine the biological function of a homeobox transcription factor CsHtf1 identified in *Colletotrichum siamense*. **[Methods]** The gene-knockout mutant of *Cshtf1* was obtained by homologous recombination, and its phenotypes such as vegetative growth, conidial production, and pathogenicity were analyzed. **[Results]** The *Cshtf1* gene encoded 600 amino acids and contained a HOX domain. Compared with the wild type, the *Cshtf1* knockout mutant showed no significant difference in vegetative growth and pathogenicity, whereas the conidial production of the mutant was significantly reduced, and the production of melanin increased. **[Conclusion]** CsHtf1 was involved in the regulation of conidiation and melanin production in *Colletotrichum siamense*.

Keywords: *Colletotrichum siamense*; homeobox transcription factors; conidia; melanin; pathogenicity

天然橡胶被广泛用于工业、农业等领域,是关系到国家战略的重要物资,目前橡胶树是最主要的天然橡胶植物^[1-2]。暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)是引起橡胶炭疽病主要的致病菌,作为胶孢炭疽菌复合种的优势种严重影响着橡胶树的健康生长和产胶量^[3]。目前对于暹罗炭疽菌的防治主要为化学防治,但由于病原菌易产生抗药性和对环境造成不利影响,因此,寻找替换化学农药的防治手段十分必要^[4]。深入解析暹罗炭疽菌生长发育及致病过程中关键基因的功能及调控机制,可以为炭疽菌的防治提供一定的理论依据。

转录因子能与基因上游的特定顺式作用元件发生专一性结合,通过调控基因表达决定细胞的发育和分化^[5]。转录因子根据 DNA 结合域的保守性,一般可分为同源异型盒(homeobox)、碱性亮氨酸拉链、锌指蛋白和碱性螺旋-环-螺旋 4 类^[6]。同源异型盒转录因子通常含有一个 180 个氨基酸的 homeobox 结构域^[7]。在真菌中主要参与菌丝生长、次级代谢、致病性、无性生殖和胁迫反应等过程。例如,在稻瘟病菌中鉴定出 8 个 homeobox 蛋白,其中 MoHox1 的缺失导致营养生长减慢、黑色素增加,MoHox2 的缺失降低了分生孢子产量,MoHox7 的缺失不影响分生

孢子的产生,但丧失了附着胞的分化能力^[8-9]。在假禾谷镰刀菌中鉴定出 11 个同源异型盒蛋白,其中 6 个 FpHtfs 蛋白参与侵染过程中的调控,特别是 FpHtf3 的缺失导致该病菌的致病性减弱^[10]。在葫芦科刺盘孢菌中,CoHox1 参与侵染菌丝的分化和侵入性生长,CoHox3 参与分生孢子萌发以及附着胞成熟过程,两个转录因子的缺失均可降低菌株致病力^[11]。构巢曲霉中,HbxA 的敲除导致分生孢子的数量严重减少,敲除 HbxB 导致有性子实体数量增加,但分生孢子数量减少^[12]。在黄曲霉中,Hbx1 的缺失会减少分生孢子和菌核的形成,而且不能产生黄曲霉毒素^[13]。

在前面的研究中,我们从暹罗炭疽菌中鉴定了一个 homeobox 转录因子,其为稻瘟病菌中 MoHtf1 的同源蛋白,命名为 CsHtf1^[9]。本研究通过基因敲除及表型分析,探究转录因子 CsHtf1 的生物学功能,以期炭疽菌的防治提供科学的理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 真菌菌株

研究所用暹罗炭疽菌(*C. siamense*)的野生

型(wild type, WT)菌株由本实验室保存。菌株接种在 PDA 培养基上, 在 28 °C 恒温培养箱中培养 5 d 后保存到 4 °C 斜面培养基。

1.1.2 培养基

PDB 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0; OMA 燕麦培养基(g/L): 燕麦片 40.0, 琼脂 18.0; PDA、OMA、CM、MM、Czapek、DCM、TB3 和 LB 等培养基参照文献[14]进行配制。

1.1.3 主要试剂和仪器

凝胶回收试剂盒, 南京喆唯赞生物公司; 酶切相关试剂, 大连宝生物公司。电泳及凝胶成像系统, 北京六一生物科技有限公司; PCR 仪, 艾本德公司; 紫外分光光度计, 岛津公司。

1.2 方法

1.2.1 *CsHtf1* 基因的克隆和序列分析

从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 暹罗炭疽菌数据库获得 *Cshtf1* (CGCS363_v009499) 序列, 设计引物对 *Cshtf1*upF/*Cshtf1*upR 并扩增 *Cshtf1* 片段(表 1)。使用 SMART 平台(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)在线分析 *CsHtf1* 的蛋白质结构域。利用 NCBI 中 BLASTp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)以及在线平台 Clustal omega

(<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)对 *CsHtf1* 的氨基酸序列进行同源性分析。使用 MEGA 6.0 软件以邻接法构建系统发育树。

1.2.2 *Cshtf1* 基因敲除与互补

根据基因敲除原理(图 1), 分别使用引物对 *Cshtf1*upF/*Cshtf1*upR 和 *Cshtf1*downF/*Cshtf1*downR 扩增 *Cshtf1* 基因的上游序列(1 046 bp)和下游序列(1 061 bp), 并将这两个纯化后的序列与载体 pCB1532 相连, 经限制性内切酶 *Xba* I/*Hind* III 酶切验证无误后即获得敲除载体 pCB1532-*Cshtf1*。将所得重组质粒线性化后转化到暹罗炭疽菌 WT 制备的原生质体中, 在含有 100 mg/mL 氯喹磺隆的 DCM 培养基上进行初步筛选后, 通过 CTAB 法提取抗性转化子的基因组, 并用 3 对引物 *Cshtf1*F/*Cshtf1*R、*Cshtf1*UU/PI 和 PI1/*Cshtf1*DD (引物序列见表 1)进行 PCR 验证。PCR 反应体系: TaKaRa Premix *Taq* 10 μL, DNA 模板 1 μL, 引物 1 (10 mmol/L) 0.5 μL, 引物 2 (10 mmol/L) 0.5 μL, 去离子水 8 μL。PCR 反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 退火(*Cshtf1*F/*Cshtf1*R: 52 °C; *Cshtf1*UU/PI: 56 °C; PI1/*Cshtf1*DD: 55 °C) 30 s, 72 °C 90 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

表 1 本研究所用引物信息

Table 1 Primers information in this study

Primer name	Sequence (5'→3')	Product length (bp)
<i>Cshtf1</i> F	CTGAGCAGATGGGAGTGGATGT	1 101
<i>Cshtf1</i> R	TGGCGTGTTAGGAGTTGGAGGC	
<i>Cshtf1</i> upF	AACTGCAGCTCGGCGGCGTCTAGCTGTATG	1 046
<i>Cshtf1</i> upR	CCCAAGCTTCAAGGGACGTTTCGGTTCGATGTG	
<i>Cshtf1</i> downF	GCTCTAGACGGGCAACTGAATGTCGTCAGC	1 061
<i>Cshtf1</i> downR	AACTGCAGATTCCCTCGTCGCCCCGTCTGCTC	
<i>Cshtf1</i> UU	GCTGACTCTGGTTCTGACATGGAGC	1 269
PI	CAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG	
<i>Cshtf1</i> DD	GTTTCCTTGACCTCAGGGACTGCGT	1 417
PI1	CAACAAGTCTGGTTCTCTATCCGTA	
<i>Cshtf1</i> hbF	CGAGCTCTGTGCTGTGCTGGACTGGAG	4 125
<i>Cshtf1</i> hbR	AACTGCAGGTCCAAATGTGGTTCGGTCTACT	

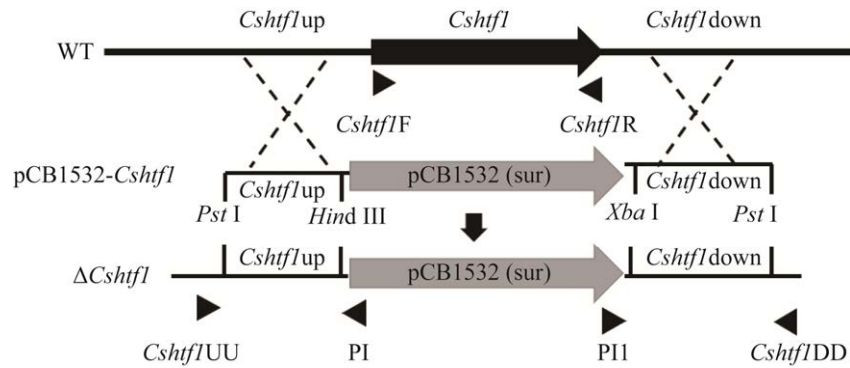
图1 *CsHtf1* 基因的敲除原理

Figure 1 Knocking principle of the *CsHtf1* gene.

为了构建 *CsHtf1* 的互补菌株, 用引物对 *CsHtf1*hbF/*CsHtf1*hbR 扩增出含有上游启动子和下游终止子的 *CsHtf1* 完整编码序列, 并插入到含有潮霉素磷酸转移酶(hygromycin phosphotransferase, HPT)基因的 pUC18 载体中。得到的重组质粒转化到相应突变体制备的原生质体中。筛选抗性转化子, 提取抗性转化子的基因组, 使用引物对 *CsHtf1*F/*CsHtf1*R 进行 PCR 验证。

1.3 表型分析

1.3.1 野生型、突变菌株和互补菌株在多种培养基上生长的比较

将菌株 WT、 Δ *CsHtf1* 和 Δ *CsHtf1*-C 分别接种于 CM、PDA、MM 和 Czapek 这 4 种培养基中, 28 °C 培养 5 d, 十字交叉法测量菌落直径。

1.3.2 分生孢子产量及萌发率

分别采用固体和液体两种培养方式统计分生孢子产量, 对于液体培养, 将不同菌株的菌饼接种到 PDB 培养基中, 28 °C、150 r/min 摇床振荡培养 2 d 后用滤纸去除菌丝, 取 1 mL 滤液 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清液, 无菌水重悬分生孢子, 使用血球计数板进行计数, 每个处理设 3 个重复。取 20 μ L 的孢子悬液(10^5 个/mL)滴在载玻片上, 在 28 °C 培养 8 h, 统计萌发率和附着胞形成率。

对于固体培养基培养, 将菌饼分别接种到 PDA 培养基和 OMA 培养基上, 28 °C 分别培养 7 d 和 14 d, 向培养基平板中加入 10 mL 蒸馏水, 用涂布棒充分刮取菌丝并用 miracloth 过滤除去菌丝, 使用血球计数板对分生孢子进行计数, 每个处理设 3 个重复。

1.3.3 黑色素测定

分别将野生型、突变株及互补菌株接种于 PDB 液体培养基中 28 °C、150 r/min 振荡培养 5 d, 对发酵液过滤除菌丝后, 加入等量 1 mol/L 的 NaOH 溶液, 60 °C 水浴 4 h, 7 000 r/min 离心 20 min 后收集上清, 用 6 mol/L HCl 调至 pH 2.0, 60 °C 水浴 3 h, 7 000 r/min 离心 15 min 收集沉淀, 用无菌水洗涤沉淀 3 次后 70 °C 烘干, 即得到黑色素提取物^[15]。将所得的黑色素提取物重溶于 1 mol/L NaOH 溶液中, 在 221 nm 波长下测其吸光值, 参照黑色素标准曲线 $Y=0.052 2X+0.006 9$ (X 为 OD_{221} 值, Y 为黑色素含量)计算黑色素含量^[16]。每个处理设 3 个重复。

1.3.4 致病性分析

将各菌株的菌饼(5 mm)及其 20 μ L 分生孢子悬液(1×10^6 个/mL)分别接种在有伤或完整的离体橡胶叶片表面, 28 °C 保湿培养 3–5 d, 每天观察病斑变化并记录病斑直径。

1.3.5 数据分析

每组试验设3次重复,使用IBM SPSS 25.0单因素ANOVA检验对数据进行方差分析($P < 0.05$),作图软件为GraphPad Prism 8。

2 结果与分析

2.1 CsHtf1 生物信息学分析

Cshtf1 基因(GenBank 登录号为OQ927980)编码一个600个氨基酸的蛋白CsHtf1,SMART分析显示在58–118位氨基酸位点处有一个保守的HOX蛋白结构域,为homeobox转录因子(图2A)。系统发育分析显示CsHtf1蛋白在炭疽菌属内比较保守(图2B),CsHtf1与*Colletotrichum gloeosporioides*、*Colletotrichum fructicola*的同源蛋白相似性均超过95%,与*Colletotrichum graminicola* (XP_008092788.1)、*Verticillium dahliae* (XP_009649398.1)同源蛋白的相似性分别为59.32%、48.17%;与*Pyricularia oryzae* (XP_003718936.1)、*Saccharomyces cerevisiae* (NP_010177.1)同源蛋白的相似性分别为32.37%、27.17%。进一步对CsHtf1及其同源蛋白序列进行比对,CsHtf1与*Colletotrichum graminicola* (XP_008092788.1)、*Pyricularia oryzae* (XP_003718936.1)和*Aspergillus nidulans* (XP_658821.1)均含有一个HOX结构域(图2C)。

2.2 Cshtf1 基因敲除及互补结果

将获得的pCB1532-*Cshtf1*敲除载体线性化后转入到野生型制备的原生质体中,对挑选的转化子提取基因组并进行3轮PCR验证,如图3所示,初步得到3个缺失突变体,命名为 $\Delta Cshtf1-9$ 、 $\Delta Cshtf1-10$ 和 $\Delta Cshtf1-19$ 。

为了构建互补菌株,将含有*Cshtf1*互补序列的载体重新转入 $\Delta Cshtf1-10$ 突变体制备的原生质体中,挑选转化子,提取基因组,3号转

化子经引物对*Cshtf1F/Cshtf1R*扩增出的片段可以在电泳检测中发现,片段大小与目的片段一致(1 101 bp),因此初步得到互补菌株,命名为 $\Delta Cshtf1-C$ 。

2.3 营养生长

由图4可知,菌株WT、 $\Delta Cshtf1$ 和 $\Delta Cshtf1-C$ 在4种培养基上的生长情况基本一致,菌落直径无显著差异。由此可见,CsHtf1不参与调控暹罗炭疽菌的营养生长。

2.4 CsHtf1 参与调控分生孢子产生

将各菌株分别接种到PDB、CM和MM液体培养基中,培养5 d后测定分生孢子产量。由图5A可见,在PDB培养基中培养5 d,菌株 $\Delta Cshtf1$ 的分生孢子产量为 1.66×10^5 个/mL,为野生型分生孢子产量的6.3%;在CM液体培养基中, $\Delta Cshtf1$ 的分生孢子产量极低,约为 8.6×10^2 个/mL,仅占野生型分生孢子产量的0.03%(图5B);在MM液体培养基中,野生型的分生孢子量为 6.30×10^5 个/mL,而 $\Delta Cshtf1$ 在MM液体培养基中不产生分生孢子(图5C)。在3种液体培养基中,菌株 $\Delta Cshtf1$ 的分生孢子产量均显著低于野生型。

将3种菌株分别接种在PDA和OMA固体培养基中,培养7 d时,在OMA和PDA培养基上,突变体菌株均未观察到分生孢子,而野生型的分生孢子产量均超过 1.0×10^5 个/plate;在培养14 d时,OMA培养基中 $\Delta Cshtf1$ 的分生孢子平均为 4.40×10^3 个/plate,约占野生型分生孢子产量的0.1%,PDA培养基中 $\Delta Cshtf1$ 分生孢子产量平均为 3.3×10^3 个/plate,约占野生型分生孢子产量的0.15%(图5D、5E)。由此可见, $\Delta Cshtf1$ 突变体不管用液体培养还是固体培养,孢子产量都显著低于野生型菌株,且孢子产生显著滞后于野生型。

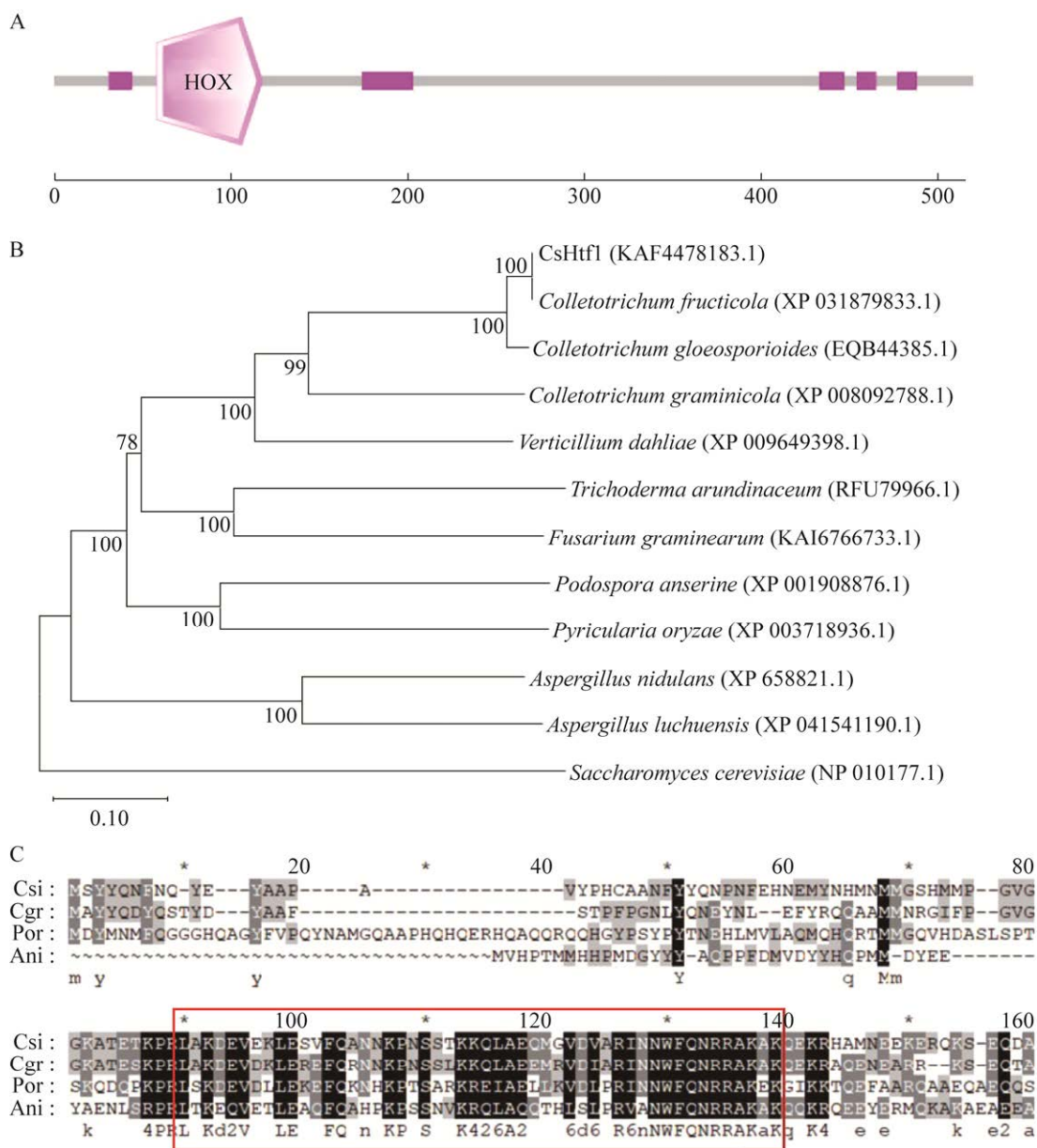


图 2 CsHtf1 的蛋白序列分析 A: CsHtf1 的蛋白质结构域分析. B: CsHtf1 的系统发育树分析. 系统发育树括号中的序号为 GenBank 登录号, 分支节点处的数值为自展值, 标尺以及分支长度代表碱基替换率. C: CsHtf1 及其同源蛋白序列比对. 多序列比对图中的方框表示 HOX 结构域序列, Csi: *Colletotrichum siamense*; Cgr: *Colletotrichum graminicola*; Por: *Pyricularia oryzae*; Ani: *Aspergillus nidulans*

Figure 2 Protein sequence analysis of CsHtf1. A: Protein domain analysis of CsHtf1. B: Phylogenetic tree analysis of CsHtf1. The sequence number in the phylogenetic tree brackets is the GenBank entry number, the value of the branch node division is the bootstrap value, and the scale and branch length represent the base replacement rate. C: Protein sequence alignment of CsHtf1 and its homologous protein. The box in the multiple sequence alignment diagram represents the HOX domain sequence, Csi: *Colletotrichum siamense*; Cgr: *Colletotrichum graminicola*; Por: *Pyricularia oryzae*; Ani: *Aspergillus nidulans*.

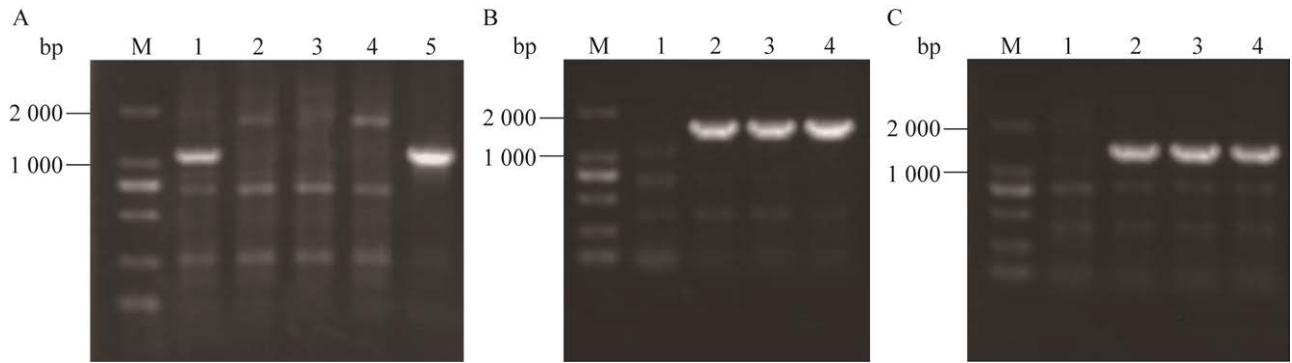


图3 *Csh1* 基因敲除及互补的验证 A: 引物对 *Csh1F/Csh1R* 的扩增结果. B: 引物对 *Csh1IUU/PI* 的扩增结果. C: 引物对 *PI1/Csh1DD* 的扩增结果. M: DL2000 DNA Marker; 1: WT; 2: $\Delta Csh1-9$; 3: $\Delta Csh1-10$; 4: $\Delta Csh1-19$; 5: $\Delta Csh1-C$

Figure 3 Verification of *Csh1* gene knockout and complementary. A: PCR result of primer pair *Csh1F/Csh1R*. B: PCR result of primer pair *Csh1IUU/PI*. C: PCR result of primer pair *PI1/Csh1DD*. M: DL2000 DNA Marker; 1: WT; 2: $\Delta Csh1-9$; 3: $\Delta Csh1-10$; 4: $\Delta Csh1-19$; 5: $\Delta Csh1-C$.

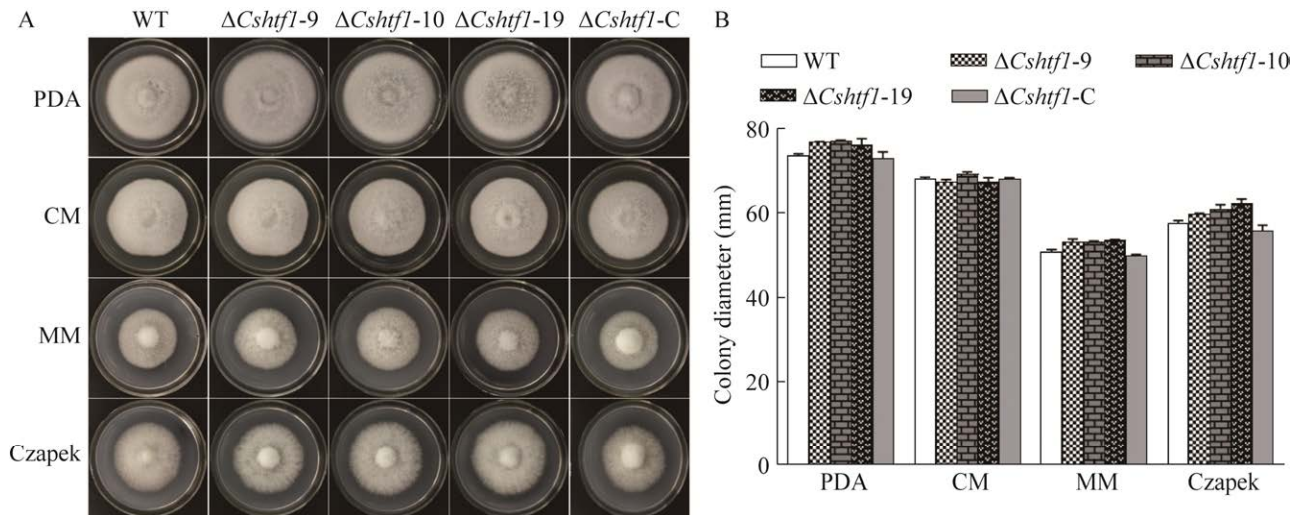


图4 菌株 WT、 $\Delta Csh1$ 和 $\Delta Csh1-C$ 的营养生长比较 A: 菌株在 4 种培养基上的营养生长. B: 菌落直径统计

Figure 4 Compare the vegetative growth of the strain WT, $\Delta Csh1$ and $\Delta Csh1-C$. A: Vegetative growth of the strains on four media. B: Colony diameter statistics.

将菌株 $\Delta Csh1$ 与 WT 的孢子悬浮液滴在载玻片培养 8 h, 发现两者之间的孢子萌发及附着胞形成率无明显差异. 这些结果说明, *CsHtf1* 参与调控暹罗炭疽菌的分生孢子产生, 但不参与分生孢子的萌发.

2.5 *CsHtf1* 参与黑色素产生

将各菌株接种 PDB 培养基振荡培养 5 d. 如图 6A 所示, 相较于野生型, $\Delta Csh1$ 突变株在 PDB 培养基中明显变黑. 进一步提取了各菌株的黑色素, 测定其在 221 nm 处的吸光值. 根据黑

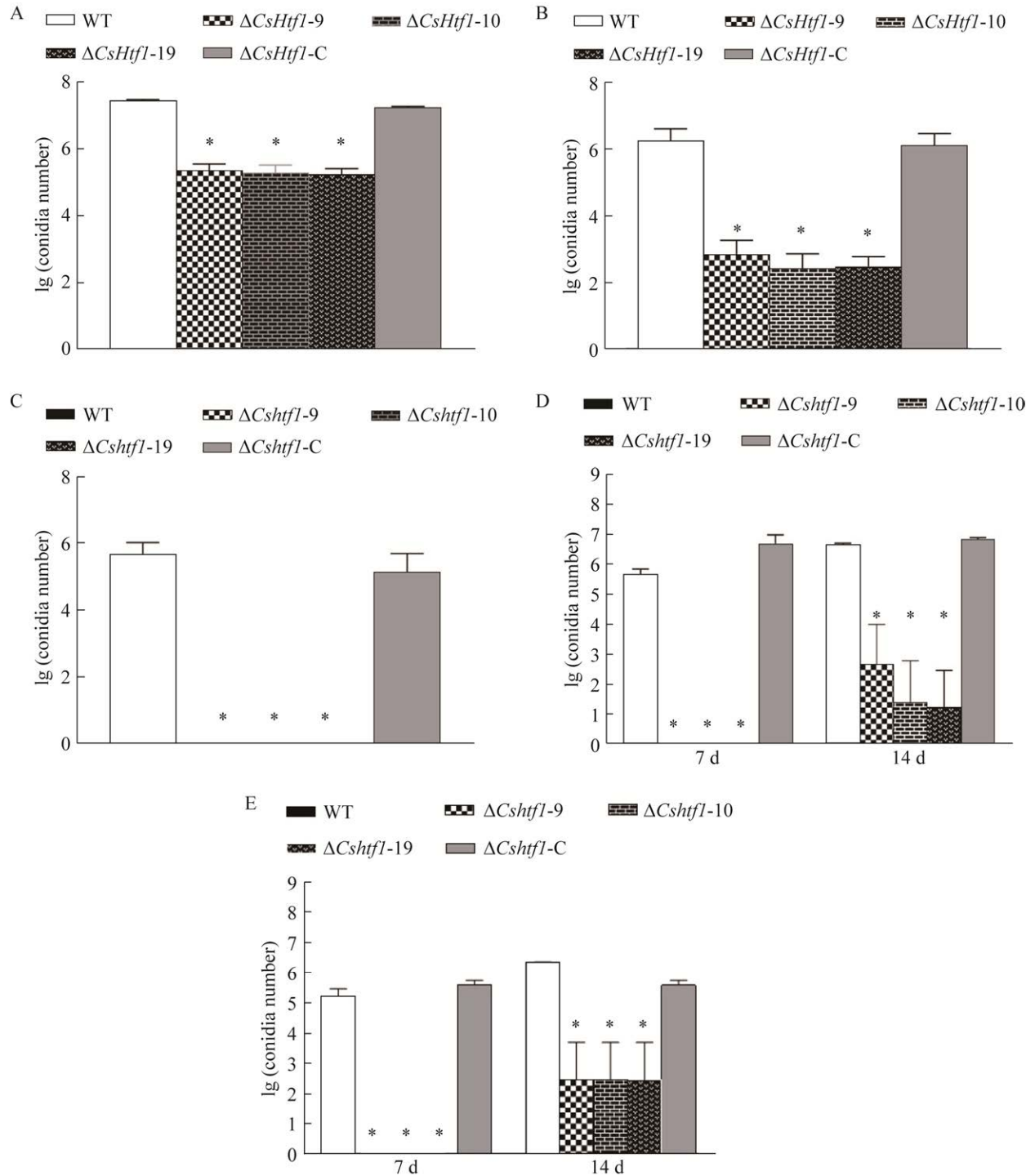


图5 各菌株在5种培养基上的产孢量比较 A: PDB培养基培养5 d. B: CM培养基培养5 d. C: MM培养基培养5 d. D: OMA培养基. E: PDA培养基. *: $P < 0.05$

Figure 5 Comparison of conidial production of strains on 5 media. A: PDB medium, 5 d. B: CM medium, 5 d. C: MM medium, 5 d. D: OMA medium. E: PDA medium. *: $P < 0.05$.

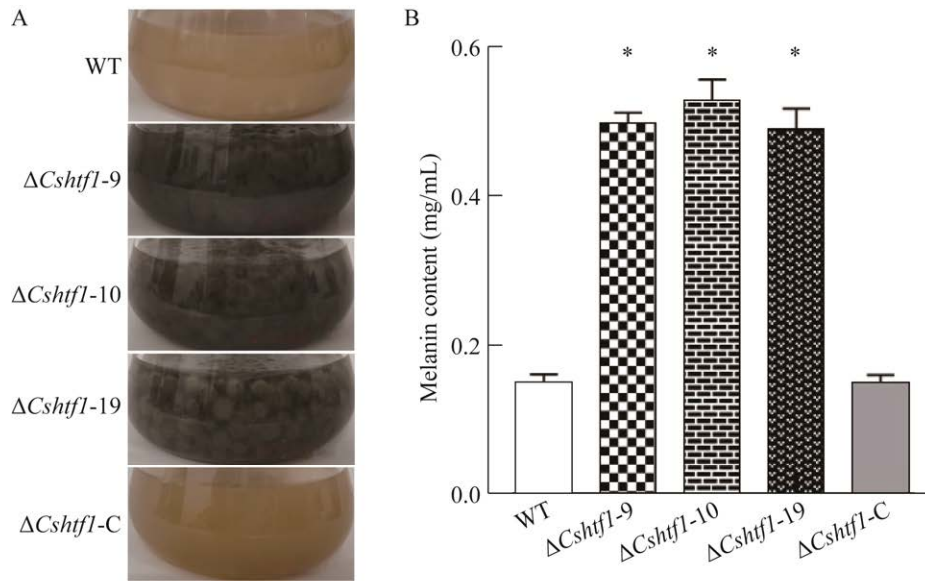


图6 菌株黑色素产量测定 A: 菌株在PDB中的黑色素产生情况. B: 黑色素含量测定

Figure 6 Melanin determination of strains. A: Melanin production of strains in PDB medium. B: Determination of melanin content. *: $P < 0.05$.

色素标准曲线得出, 野生型产生的黑色素含量为 0.14 mg/mL, 3 个突变体菌株的胞外黑色素产量分别为 0.48、0.53 和 0.46 mg/mL, 均显著高于野生型菌株(图 6B)。由此可见, CsHtf1 参与调控暹罗炭疽菌黑色素的产生。

2.6 致病性分析

将菌株 WT、 $\Delta Csh1$ 和 $\Delta Csh1-C$ 及其分生孢子悬液分别接种到橡胶树叶片上, 如图 7 所示, 无论在有伤或完整的叶片上突变体和野生型都能形成病斑, 病斑直径无显著性差异。由此可见, CsHtf1 不影响暹罗炭疽菌的致病性。

3 讨论

本研究从暹罗炭疽菌中鉴定了一个同源异型盒转录因子 CsHtf1, 其氨基酸序列含有一个典型的 HOX 结构域。目前 CsHtf1 同源蛋白的功能已在很多真菌中得到鉴定, 如在辣椒炭疽菌中, 缺失 CsHox2 可以产生正常的分生孢子梗, 但不能产生分生孢子, 而菌丝顶端发育的附着

胞仍可以侵染致病^[17]。在稻瘟病菌中, MoHtf1 的缺失不影响菌丝生长, 但会导致菌株不产生分生孢子, 而该病菌仍然可以从菌丝顶端发育出黑化的附着胞并感染植物, 分生孢子产量的降低与 Arc1 的显著下调有关^[9]。在草酸青霉菌中, PoHtf1 通过调节下游 BrlA 转录因子的表达参与分生孢子的形成, 并抑制纤维素酶表达^[18]。在尖孢镰刀菌中, FoHtf1 缺失导致大分生孢子显著减少, 而小孢子略有减少, 但不参与尖孢镰刀菌产生厚壁孢子; 禾谷镰刀菌中缺失 FgHtf1 可使大分生孢子产量显著降低并且孢子形态异常, 但是异常孢子依然可以萌发并侵染致病^[19]。此外, 有研究证明 FgHtf1 不但可以调控自身的表达, 还可以直接调控产孢基因 FgCon7 的表达^[20-21]。然而在暹罗炭疽菌中, *Csh1* 不参与调控暹罗炭疽菌的营养生长, 但严重影响了分生孢子产生。 $\Delta Csh1$ 突变体在 MM 液体培养基中不产生分生孢子; 在 CM 液体培养基中, 产生极少量的分生孢子; 即使在 PDB 培养基中发

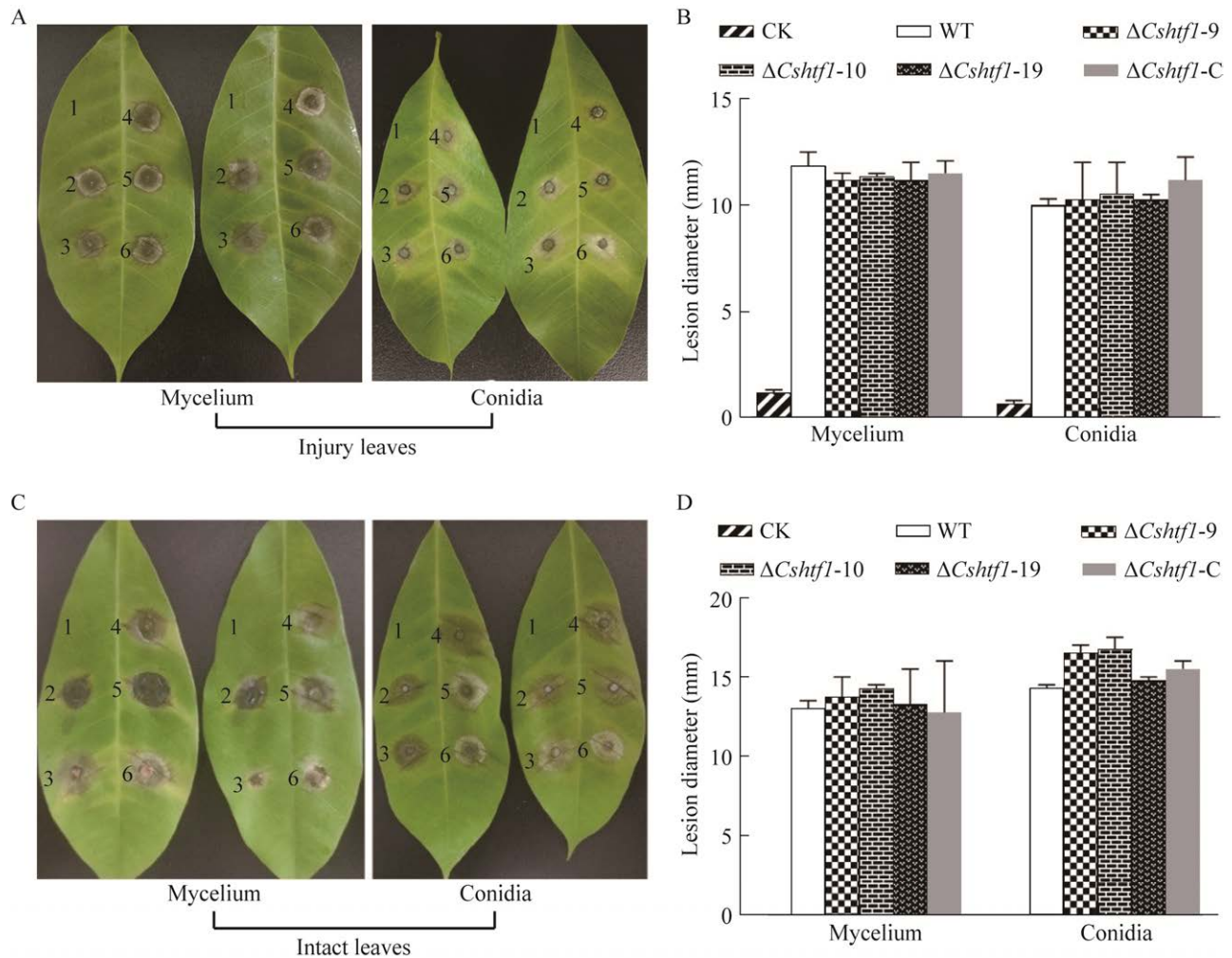


图7 菌株在橡胶叶片上的毒力测定 A: 菌饼和孢子悬液接种有伤叶片的发病情况. B: 有伤叶片的病斑直径柱状图. C: 菌饼和孢子悬液接种完整叶片的发病情况. D: 完整叶片的病斑直径柱状图. 1: CK; 2: WT; 3: $\Delta CsHtf1-C$; 4: $\Delta CsHtf1-9$; 5: $\Delta CsHtf1-10$; 6: $\Delta CsHtf1-19$

Figure 7 Virulence assays of strains on rubber tree leaves. A: Disease symptoms on injured leaves using mycelial plug and conidial suspension inoculation. B: Histogram of lesion diameters on injured leaves. C: Disease symptoms on intact leaves using mycelial plug and conidial suspension inoculation. D: Histogram of lesion diameters on intact leaves. 1: CK; 2: WT; 3: $\Delta CsHtf1-C$; 4: $\Delta CsHtf1-9$; 5: $\Delta CsHtf1-10$; 6: $\Delta CsHtf1-19$.

现突变株的分生孢子需要多次离心富集才能观测到, 而野生型的分生孢子数量可以达到 1×10^7 个/mL。在 PDA、OMA 固体培养基上, 突变体孢子量也显著低于野生型。总而言之, *CsHtf1* 基因在调控真菌分生孢子产生方面比较保守, 但调控机制可能存在差异。

CsHtf1 不参与暹罗炭疽菌的致病性, 虽然突变体的分生孢子产量显著降低, 但已产生的分生孢子形态正常, 可以正常萌发并产生黑化的附着胞, 能够成功穿透叶片表面定殖在宿主细胞内。在上述的同源蛋白辣椒炭疽菌 *CsHox2*、稻瘟病菌 *MoHtf1* 和禾谷镰刀菌 *FgHtf1* 中, 不

论突变体分生孢子是否出现畸形,都可以正常侵染造成病斑,与野生型一致。但是在稻曲病菌中,UvHox2 缺失突变体虽然完全不能产生厚垣孢子,分生孢子减少,但也导致了突变体致病力降低,对氧化胁迫、渗透胁迫和细胞壁胁迫高度敏感^[22]。

另外,CsHtf1 参与调控暹罗炭疽菌的黑色素产生,相较于野生型,突变体菌株产生了更多的黑色素。这并未在稻瘟病菌 MoHtf1 突变体中报道,不过黄曲霉中的同源蛋白 Hbx1 参与了菌株的孢子形成和次级代谢,Hbx1 的缺失抑制了分生孢子和黄曲霉毒素的产生^[23]。在胶孢炭疽菌中,G 蛋白信号调控因子 CgRgs3 缺失导致分生孢子产量减少,漆酶活性降低、黑色素产量降低^[24]; C2H2 型转录因子 CgAzf1 缺失导致黑色素产量减少^[25]。因此 *Cshtf1* 的敲除可能影响了调控黑色素产生的一些基因。另外有文章报道黑色素与分生孢子形成的两个调控途径在上游独立,在下游可能存在交叠^[26]。由此推测 CsHtf1 缺失导致的分生孢子量降低、黑色素产量增多,并不是影响了黑色素和分生孢子形成的下游途径,而是影响了两个独立的 upstream 途径,这与上述基因可能存在差别。

暹罗炭疽菌主要通过其分生孢子寄生在宿主表面,在合适的条件下便萌发形成芽管和附着胞,附着胞进一步发育并在尖端形成一种特殊的感染结构(侵染钉)^[27]。在这个过程中附着胞壁会沉积一层黑色素,阻止甘油的渗出以维持侵染钉的膨压,这对穿透宿主表面角质层并使宿主致病至关重要^[28]。同源异型盒转录因子 CsHtf1 与暹罗炭疽菌分生孢子及黑色素的产生密切相关,解析 CsHtf1 的功能及调控机制不仅有助于深入认识该病菌的分子致病机制,而且对于寻找新的作用靶标、开发新型药剂、减少橡胶炭疽病的危害也具有重要的意义。

4 结论

在暹罗炭疽菌中,CsHtf1 是一个重要的同源异型盒转录因子,参与调控该病菌分生孢子产生及黑色素形成。

REFERENCES

- [1] 陈明文. 我国天然橡胶产业发展形势与因应策略[J]. 农业经济问题, 2016(10): 91-94, 112.
CHEN MW. Development situation and countermeasures of natural rubber industry in China[J]. Issues in Agricultural Economy, 2016(10): 91-94, 112 (in Chinese).
- [2] 佟金鹤, 张卫红, 刘少军, 李伟光, 陈小敏. 中国橡胶树大风、寒害的时空分布分析[J]. 生态科学, 2023, 42(2): 43-48.
TONG JH, ZHANG WH, LIU SJ, LI WG, CHEN XM. Temporal and spatial distribution analysis of gale damage and chilling injure of *Hevea brasiliensis* in China[J]. Ecological Science, 2023, 42(2): 43-48 (in Chinese).
- [3] 徐从英, 王萌, 梁晓宇, 马腾, 杨叶, 张宇. 云南西双版纳地区橡胶树炭疽病菌的系统进化分析和室内药剂筛选[J]. 西南农业学报, 2021, 34(12): 2653-2658.
XU CY, WANG M, LIANG XY, MA T, YANG Y, ZHANG Y. Phylogenetic analysis and fungicide screening for *Colletotrichum* causing rubber anthracnose in Xishuangbanna, Yunnan[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2021, 34(12): 2653-2658 (in Chinese).
- [4] 杨春霞, 哈佳欣, 徐克, 王建寰, 吴秀丽, 刘成. 胶孢炭疽菌生物防治研究进展[J]. 北方园艺, 2023(5): 132-139.
YANG CX, HA JX, XU K, WANG JH, WU XL, LIU C. Research progress on biological control of *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Northern Horticulture, 2023(5): 132-139 (in Chinese).
- [5] LI R, LI Y, XU WY, ZHANG M, JIANG QQ, LIU YX, LI L, BI Y, PRUSKY DB. Transcription factor *AacmrA* mediated melanin synthesis regulates the growth, appressorium formation, stress response and pathogenicity of pear fungal *Alternaria alternata*[J]. Fungal Biology, 2022, 126(10): 687-695.
- [6] TRAVEN A, JELICIC B, SOPTA M. Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited[J]. EMBO Reports, 2006, 7(5): 496-499.

- [7] TEBDER W. Homeotic gene products as growth factors[J]. *Cell*, 1985, 43(3): 559-560.
- [8] KIM S, PARK SY, KIM KS, RHO HS, CHI MH, CHOI J, PARK J, KONG S, PARK J, GOH J, LEE YH. Homeobox transcription factors are required for conidiation and appressorium development in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *PLoS Genetics*, 2009, 5(12): e1000757.
- [9] LIU WD, XIE SY, ZHAO XH, CHEN X, ZHENG WH, LU GD, XU JR, WANG ZH. A homeobox gene is essential for conidiogenesis of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, 23(4): 366-375.
- [10] MA YM, ZHAO JY, CHEN WB, GENG XJ, HE TL, DING SL, SUN BJ, LI HL, CHEN LL. Identification and characterization of the homeobox gene family in *Fusarium pseudograminearum* reveal their roles in pathogenicity[J]. *Biochemical Genetics*, 2022, 60(5): 1601-1614.
- [11] AYA Y, KOSUKE I, TOSHIKAZU I, KAZUMI S. The homeobox transcription factor CoHox1 is required for the morphogenesis of infection hyphae in host plants and pathogenicity in *Colletotrichum orbiculare*[J]. *Mycoscience*, 2019, 60(2): 110-115.
- [12] SON SH, SON YE, CHO HJ, CHEN WP, LEE MK, KIM LH, HAN DM, PARK HS. Homeobox proteins are essential for fungal differentiation and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 6094.
- [13] CARY JW, ENTWISTLE S, SATTERLEE T, MACK BM, GILBERT MK, CHANG PK, SCHARFENSTEIN L, YIN YB, CALVO AM. The transcriptional regulator Hbx1 affects the expression of thousands of genes in the aflatoxin-producing fungus *Aspergillus flavus*[J]. *G3 Genes Genomes Genetics*, 2019, 9(1): 167-178.
- [14] 柯智健, 张月凤, 艾莹飞, 李晓宇, 柳志强. 胶孢炭疽菌 G 蛋白 α 亚基 CgGa2 的生物学功能[J]. *植物保护*, 2018, 44(1): 37-44.
KE ZJ, ZHANG YF, AI YF, LI XY, LIU ZQ. Biological function of the G protein α -subunit CgGa2 in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Plant Protection*, 2018, 44(1): 37-44 (in Chinese).
- [15] 柯冠群. 高产黑色素菌株的筛选及其发酵条件与黑色素结构的初步研究[D]. 成都: 中国科学院研究生院(成都生物研究所)硕士学位论文, 2005.
KE GQ. The screening of the high-melanin-producing strains and studies on the fermentation and the structure of the melanin[D]. Chengdu: Master's Thesis of University of Chinese Academy of Sciences (Chengdu Institute of Biology), 2005 (in Chinese).
- [16] 毛莹, 任佐华, 王娜, 白珍安, 虞选杰, 刘二明. 稻曲病菌厚垣孢子壁黑色素提取方法研究[J]. *微生物学杂志*, 2011, 31(1): 6-9.
MAO Y, REN ZH, WANG N, BAI ZA, YU XJ, LIU EM. Melanin extraction from chlamydospore wall in *Ustiloginoidea virens*[J]. *Journal of Microbiology*, 2011, 31(1): 6-9 (in Chinese).
- [17] FU T, HAN JH, SHIN JH, SONG H, KO J, LEE YH, KIM KT, KIM KS. Homeobox transcription factors are required for fungal development and the suppression of host defense mechanisms in the *Colletotrichum scovillei*-pepper pathosystem[J]. *mBio*, 2021, 12(4): e162021.
- [18] GUO H, XU G, WU RM, LI ZG, YAN MD, JIA ZL, LI ZH, CHEN M, BAO XM, QU YB. A homeodomain-containing transcriptional factor PoHtf1 regulated the development and cellulase expression in *Penicillium oxalicum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 671089.
- [19] ZHENG WH, ZHAO X, XIE QR, HUANG QP, ZHANG CK, ZHAI HC, XU LP, LU GD, SHIM WB, WANG ZH. A conserved homeobox transcription factor Htf1 is required for phialide development and conidiogenesis in *Fusarium* species[J]. *PLoS One*, 2012, 7(9): e45432.
- [20] FAN GL, ZHENG HW, ZHANG K, DEVI GANESHAN V, OPIYO SO, LIU D, LI MY, LI GP, MITCHELL TK, YUN YZ, WANG ZH, LU GD. FgHtf1 regulates global gene expression towards aerial mycelium and conidiophore formation in the cereal fungal pathogen *Fusarium graminearum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(9): e03024-e03019.
- [21] 樊改丽. 转录因子 FgHtf1 调控禾谷镰刀菌产孢途径研究[D]. 福州: 福建农林大学博士学位论文, 2016.
FAN GL. Study on the pathway of transcription factor FgHtf1 regulating *Fusarium graminearum* sporulation[D]. Fuzhou: Doctoral Dissertation of Fujian Agriculture and Forestry University, 2016 (in Chinese).
- [22] YU JJ, YU MN, SONG TQ, CAO HJ, PAN XY, YONG ML, QI ZQ, DU Y, ZHANG RS, YIN XL, LIU YF. A homeobox transcription factor UvHOX2 regulates

- chlamyospore formation, conidiogenesis, and pathogenicity in *Ustilaginoidea virens*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1071.
- [23] CARY JW, HARRIS-COWARD P, SCHARFENSTEIN L, MACK BM, CHANG PK, WEI QJ, LEBAR M, CARTER-WIENTJES C, MAJUMDAR R, MITRA C, BANERJEE S, CHANDA A. The *Aspergillus flavus* homeobox gene, *hbx1*, is required for development and aflatoxin production[J]. *Toxins*, 2017, 9(10): 315.
- [24] 徐爽, 柯智健, 张凯, 柳志强, 李晓宇. 胶孢炭疽菌 G 蛋白信号调控因子 CgRGS3 的生物学功能[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(4): 827-835.
- XU S, KE ZJ, ZHANG K, LIU ZQ, LI XY. Biological function of a regulator of G-protein signaling CgRGS3 in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45(4): 827-835 (in Chinese).
- [25] 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.
- [26] 樊荣, 王春生, 赵蕊, 潘勇宏, 龙友华, 赵志博. 植物病原真菌 1,8-间苯二酚黑色素研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(11): 3671-3677.
- FAN R, WANG CS, ZHAO R, PAN YH, LONG YH, ZHAO ZB. Advances in 1,8-dihydroxynaphthalene melanin of plant fungal pathogens[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(11): 3671-3677 (in Chinese).
- [27] PERES NA, TIMMER LW, ADASKAVEG JE, CORRELL JC. Lifestyles of *Colletotrichum acutatum*[J]. *Plant Disease*, 2005, 89(8): 784-796.
- [28] HE P, WANG YL, WANG XL, ZHANG XL, TIAN CM. The mitogen-activated protein kinase CgMK1 governs appressorium formation, melanin synthesis, and plant infection of *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 2216.