

## 研究报告

## 禾谷炭疽菌 Velvet 蛋白 CgrVosA 的生物学功能

王利亚, 张莹, 周双针, 唐雯, 李晓宇, 柳志强\*

海南大学生命健康学院, 海南 海口 570228

王利亚, 张莹, 周双针, 唐雯, 李晓宇, 柳志强. 禾谷炭疽菌 Velvet 蛋白 CgrVosA 的生物学功能[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 2922-2933.

WANG Liya, ZHANG Ying, ZHOU Shuangzhen, TANG Wen, LI Xiaoyu, LIU Zhiqiang. Biological function of a Velvet protein CgrVosA in *Colletotrichum graminicola*[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 2922-2933.

**摘要:** 【背景】禾谷炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)是侵染玉米的主要病原菌之一, 每年造成严重的经济损失, 直接威胁全球粮食安全。Velvet 蛋白是真菌特有的一种保守性功能蛋白, 它们在调控真菌生长及发育过程中发挥着重要作用。【目的】从禾谷炭疽菌中鉴定 Velvet 蛋白 CgrVosA, 并分析其生物学功能。【方法】利用同源重组的方法构建禾谷炭疽菌 *CgrvosA* 敲除突变株和互补菌株, 通过测定其营养生长、胁迫因子响应、分生孢子产量及萌发、致病性等明确其功能。【结果】*CgrvosA* 编码一个含有 425 个氨基酸的蛋白, 有一个典型的 Velvet 蛋白结构域。与野生型菌株相比, 敲除突变株  $\Delta CgrvosA$  生长速度减慢, 并且对 NaCl 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 敏感;  $\Delta CgrvosA$  卵圆形分生孢子的产量和萌发率显著降低, 并且形态明显大于野生型菌株。【结论】禾谷炭疽菌 Velvet 蛋白 CgrVosA 参与调控菌株营养生长、对高渗和氧化应激的响应、卵圆形分生孢子的产生和萌发等过程。

**关键词:** 禾谷炭疽菌; Velvet 蛋白; 生物学功能

## Biological function of a Velvet protein CgrVosA in *Colletotrichum graminicola*

WANG Liya, ZHANG Ying, ZHOU Shuangzhen, TANG Wen, LI Xiaoyu, LIU Zhiqiang\*

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

**Abstract:** [Background] *Colletotrichum graminicola*, one of the main pathogens infecting maize, causes serious economic losses and directly threatens the global food security every year. Velvet proteins are fungal unique proteins with conserved functions, playing a role in regulating the growth and development of fungi. [Objective] To study the biological functions of a Velvet

资助项目: 国家自然科学基金(32160041)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160041).

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

Received: 2023-10-26; Accepted: 2023-12-05; Published online: 2024-01-16

protein CgrVosA identified from *C. graminicola*. **[Methods]** The *CgrvosA*-knockout mutant and complementary strain were constructed by homologous recombination. The vegetative growth, stress response, conidial yield, germination, and pathogenicity of the strains were determined and compared to reveal the functions of CgrVosA. **[Results]** *CgrvosA* encoded a 425-residue protein with a typical Velvet protein domain. Compared with the wild type,  $\Delta CgrvosA$  exhibited slow growth, high sensitivity to NaCl and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enlarged oval conidia, and reduced yield and germination rate of oval conidia. **[Conclusion]** The Velvet protein CgrVosA is involved in the regulation of vegetative growth, response to hyperosmotic and oxidative stress, and oval conidial production and germination of *C. graminicola*.

**Keywords:** *Colletotrichum graminicola*; Velvet protein; biological functions

在玉米生产中,玉米病害一直是困扰全世界的难题。禾谷炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)是侵染玉米的一种重要病原真菌,除玉米外,还能侵染小麦、高粱等许多禾本科植物<sup>[1]</sup>。禾谷炭疽菌(*C. graminicola*)属于半活体营养型真菌,通常通过孢子侵染寄主,该菌有卵圆形和镰刀形两种类型的分生孢子,其中卵圆形的分生孢子可能有助于寄主中病原真菌的扩散,而镰刀形孢子在侵染过程中起着重要的作用<sup>[2-4]</sup>。

Velvet 蛋白是一类丝状真菌所特有的蛋白,该蛋白家族成员具有典型的 Velvet 结构域,这是一个含有约 150 个氨基酸组成且具有 DNA 结合能力的特殊氨基酸区域<sup>[5-7]</sup>,该蛋白家族共有 4 个成员,分别为 VosA (viability of spores A)、VelB (Velvet like B)、VeA (Velvet A)和 VelC (Velvet like C)<sup>[8-9]</sup>。Velvet 蛋白在调控真菌的生长发育、无性产孢、有性生殖及致病性等过程中发挥着重要的作用。

在模式真菌构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中,VosA 已被证明参与调控其子囊孢子胁迫反应、孢子活力及次生代谢产物的形成<sup>[10-12]</sup>。在禾旋孢腔菌(*Cochliobolus sativus*)中,*vosA* 突变株分生孢子的产量高于野生型菌株,分生孢子的体积大于野生型菌株<sup>[13]</sup>;在异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*)中<sup>[14-15]</sup>,*vosA* 突变

株分生孢子的产量增多,但分生孢子的体积却小于野生型菌株。在产黄青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)和球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)中,*vosA* 突变株的生长速度变慢,且突变株的分生孢子产量明显低于野生型菌株<sup>[16-17]</sup>。在少孢节丛孢菌(*Arthrotrichum oligospora*)中,尽管 *vosA* 的缺失并不影响孢子产量,但是其分生孢子萌发率严重下降<sup>[18]</sup>。

VosA 在很多真菌中都获得了较为深入的研究,但在禾谷炭疽菌中少见报道。本研究通过构建 *CgrvosA* 敲除菌株和互补菌株并进行表型分析,明确其生物学功能,为进一步研究其侵染机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

禾谷炭疽菌(*C. graminicola*) M1.001 为野生型菌株(WT)、质粒载体 pUC18 和试验玉米品种先玉 335,均保存于本实验室。

### 1.2 培养基

马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基、PDB、燕麦培养基(oat meal medium, OMA)、完全培养基(complete medium, CM)、基础培养基(minimal medium, MM)和溶菌肉汤 LB 等培养基配方参照文献[19]配制。

### 1.3 主要试剂和仪器

质粒提取和胶回收试剂盒, Vazyme 公司; 限制性内切酶, 宝生物工程(大连)有限公司。凝胶成像分析仪和紫外仪, 北京六一生物科技有限公司; PCR 仪, 艾本德公司。

### 1.4 *CgrvosA* 基因生物信息学分析

从 NCBI 数据库获得禾谷炭疽菌(*C. graminicola*) 的 *CgrvosA* 基因序列。用 Primer 5 设计引物, 用引物 CgrVosAF/CgrVosAR 分别从 cDNA 中扩增 *CgrvosA* 的开放阅读框(open reading frame, ORF) (表 1)。用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 在线工具进行 CgrVosA 蛋白结构域的分析, 使用在线工具 MEME (<https://meme-suite.org/meme/doc/meme.html>) 及 MEGA、GeneDoc 软件进行多种真菌中 VosA 蛋白的多序列比对。

### 1.5 *CgrvosA* 基因敲除与互补

利用同源重组的原理构建  $\Delta CgrvosA$  突变株(图 1)。通过 CTAB 法提取野生型菌株的基因组, 并以其 DNA 为模板, 利用引物 CgrVosAUF/CgrVosAUR 和 CgrVosADF/CgrVosADR 进行

PCR 扩增。PCR 反应体系(20  $\mu$ L): 2 $\times$ Premix Taq 10  $\mu$ L, 去离子水 7  $\mu$ L, 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L) 各 1  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 5 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 退火(CgrVosAUF/CgrVosAUR: 57  $^{\circ}$ C, CgrVosADF/CgrVosADR: 56  $^{\circ}$ C) 1 min, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。分别得到 *CgrvosA* 的上游片段和下游片段, 回收上、下游片段并分别用 *Bam*H I+*Xba* I 和 *Kpn* I+*Bam*H I 进行酶切, 连接到含有潮霉素磷酸转移酶基因(*HPT*)的 pUC18, 通过转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  后得到敲除载体 pUC18-*CgrvosA*, 经测序无误后, 将线性化的载体进行原生质体转化。将得到的转化子进行三轮 PCR 验证。

互补菌株的构建: 以野生型菌株的基因组 DNA 为模板, 使用引物 CgrVosAhbF/CgrVosAhbR 扩增出互补片段, 并连接到带有遗传霉素(G418)的 pUC18 载体上, 通过原生质体转化获得转化子, 并通过 PCR 验证, 反应体系同上, 反应条件中退火(CgrVosAF/CgrVosAR: 56  $^{\circ}$ C, CgrVosAUU/PI: 57  $^{\circ}$ C, PI1/CgrVosADD: 57  $^{\circ}$ C) 1 min, 其余同上, 所用引物详见表 1。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primer name and sequence

Primer name	Sequence (5'→3')
CgrVosAF	CCCATTGTCAGGCTCATTGTTG
CgrVosAR	TTGGGGTGAACCATATCAGG
CgrVosAUF	CGGGATCCCGGACAAGAGCCAGCCCAGTGA
CgrVosAUR	GCTCTAGAGAAAGATGTGCCGAGAAGCG
CgrVosADF	GGGGTACCGCGGCATTCGCTGAGTGTA
CgrVosADR	CGGGATCCCGCCCTTCCTGGTTTGATGTTG
CgrVosAUU	CTCGAAGCATCGAGTTCGCGTCCAT
PI	GTCTCGTTCCTGTCTGCTAATAAG
PI1	GGCACCCAGGCTTTACACTTTATG
CgrVosADD	AGACCCGAGAGCCTTCCTAGATGAC
CgrVosAhbF	GCTCTAGACGACTCTCTGCTTTACTCCG
CgrVosAhbR	GCGTCGACATACCTGGACAAGAGCACCC

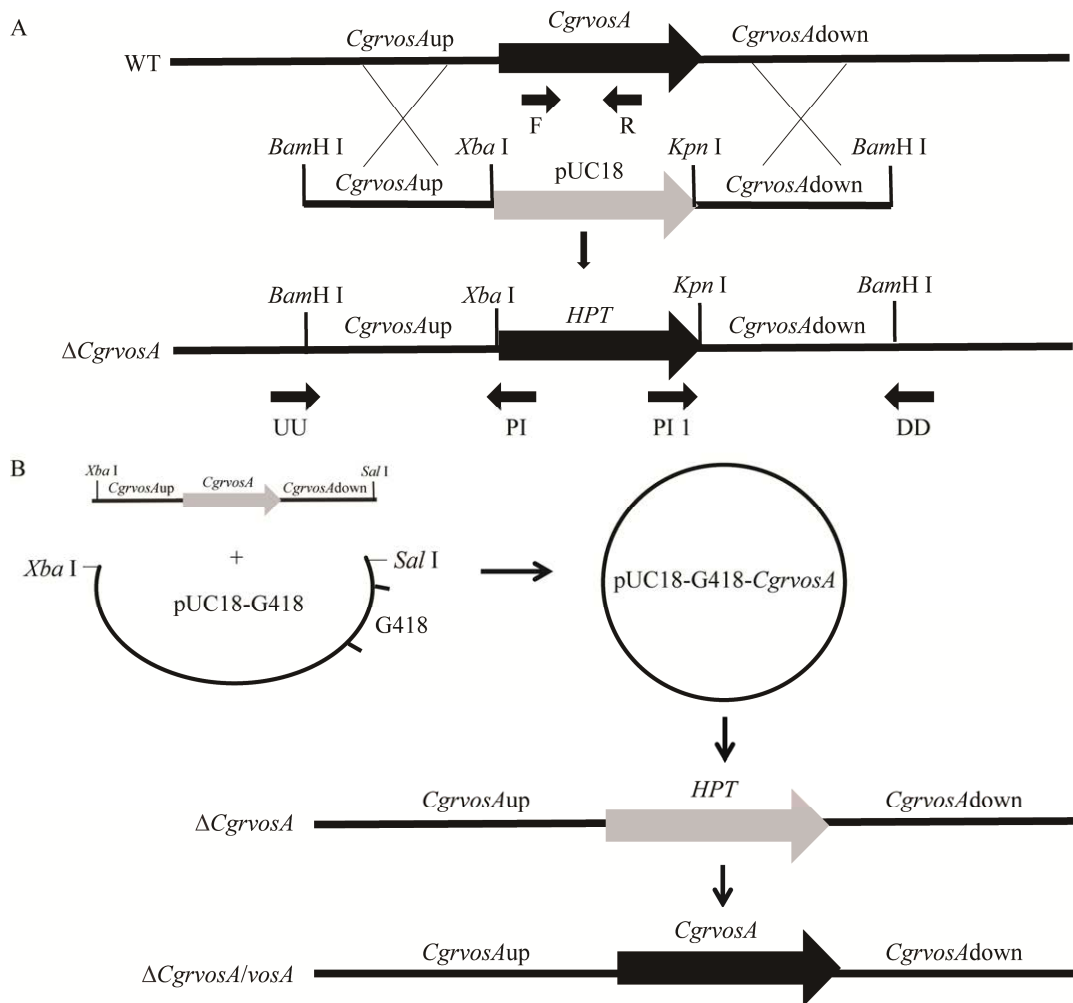


图 1 *CgrvosA* 基因敲除(A)及互补(B)示意图

Figure 1 The gene deletion (A) and complementation (B) diagram of *CgrvosA* gene.

### 1.6 野生型菌株、突变株和互补菌株的营养生长比较

将野生型菌株、突变株及互补菌株分别接种到 PDA、OMA、CM 和 MM 这 4 种不同的营养培养基上, 28 °C 培养 5 d 后统计菌落生长直径。

### 1.7 胁迫因子敏感性分析

将各菌株分别接种到含有 0.8 mol/L NaCl、1.0 mol/L NaCl 和 5 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的 CM 培养基上, 同时以接种到 CM 培养基为对照, 28 °C 培养 5 d, 统计菌落直径并计算抑制率。

抑制率(%)=(对照组菌落直径-处理组菌落

直径)/对照组菌落直径×100。

### 1.8 分生孢子产量、形态及萌发

将各菌株分别接种于 PDB 和 CM 培养基中 28 °C、150 r/min 培养 3-7 d 后经两层滤布过滤, 除去菌丝, 收集卵圆形分生孢子悬液, 通过血球计数板统计孢子产量, 同时将 20 μL 卵圆形分生孢子悬液(5×10<sup>5</sup> 个/mL)滴于玻璃载玻片中央, 28 °C 保湿培养 6 h, 观察卵圆形分生孢子的萌发情况。

将各菌株接种在 OMA 培养基上, 28 °C 恒温生长 14 d, 用 10 mL 无菌水冲洗菌丝, 通过

单层滤布过滤后得到镰刀形孢子悬液, 通过血球计数板统计孢子产量。取 20  $\mu\text{L}$  镰刀形孢子悬液( $5 \times 10^5$  个/mL)滴加在灭菌玻璃纸上, 28  $^{\circ}\text{C}$  保湿培养 12 h, 观察镰刀形孢子的萌发情况。

钙荧光白(calcofluor white, CFW)染色用于分析菌株几丁质的分布。将孢子悬液滴加到玻璃载玻片上, 用含 1 g/L CFW 和 1 mol/L NaOH (体积比为 1:1)的 CFW 染色液黑暗条件下染色 5 min 后, 荧光显微镜下进行观察, 试验均重复 3 次。

### 1.9 叶片致病性的分析

选取新鲜的玉米叶片, 先用无菌水擦拭 3 次, 然后用灭菌针头在玉米叶片上制造轻微的伤口, 再将各菌株的菌饼和 20  $\mu\text{L}$  镰刀形孢子悬液( $5 \times 10^6$  个/mL)分别接种到玉米叶片的微伤口处, 28  $^{\circ}\text{C}$  保湿培养 3 d 后观察玉米叶片的发病情况。

### 1.10 数据分析

通过 GraphPad Prism8、IBM SPSS Statistics 20 等软件进行统计分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 CgrVosA 生物信息学分析

禾谷炭疽菌中 *CgrvosA* 编码一个由 425 个氨基酸组成的蛋白(CgrVosA), 含有一个典型的 Velvet 蛋白结构域(图 2A)。蛋白多序列比对结果显示 CgrVosA 相对比较保守, 与暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense*)、果生炭疽菌(*Colletotrichum fructicola*) 和构巢曲霉(*A. nidulans*)中同源蛋白的相似度分别为 50%、45.54%和 44.97%(图 2B)。

### 2.2 CgrvosA 敲除菌株及互补菌株的构建

原生质体转化后得到转化子, 分别提取其基因组 DNA 并进行 3 轮 PCR 验证, 结果显示: 当使用引物 CgrVosAF/CgrVosAR 扩增时, 转化子 23、24、25 号未能扩增出目的条带(图 3A), 野生型菌株可以扩增出 1 000 bp 的目的片段。利用引物 CgrVosAUU/PI 和 PI1/CgrVosADD 扩增时, 转

化子 23、24、25 号可以扩增出目的条带, 而野生型菌株却不能扩增出目的片段, 初步认为这 3 个转化子为敲除突变株(图 3B、3C), 分别命名为  $\Delta\text{CgrvosA-23}$ 、 $\Delta\text{CgrvosA-24}$  和  $\Delta\text{CgrvosA-25}$ 。互补菌株的构建是将互补载体转化到敲除突变株的原生质体中, 挑选转化子进行 PCR 验证得到的, 将验证正确的菌株初步确定为互补菌株  $\Delta\text{CgrvosA}/\text{vosA}$  (图 3A)。

### 2.3 CgrVosA 对禾谷炭疽菌营养生长的影响

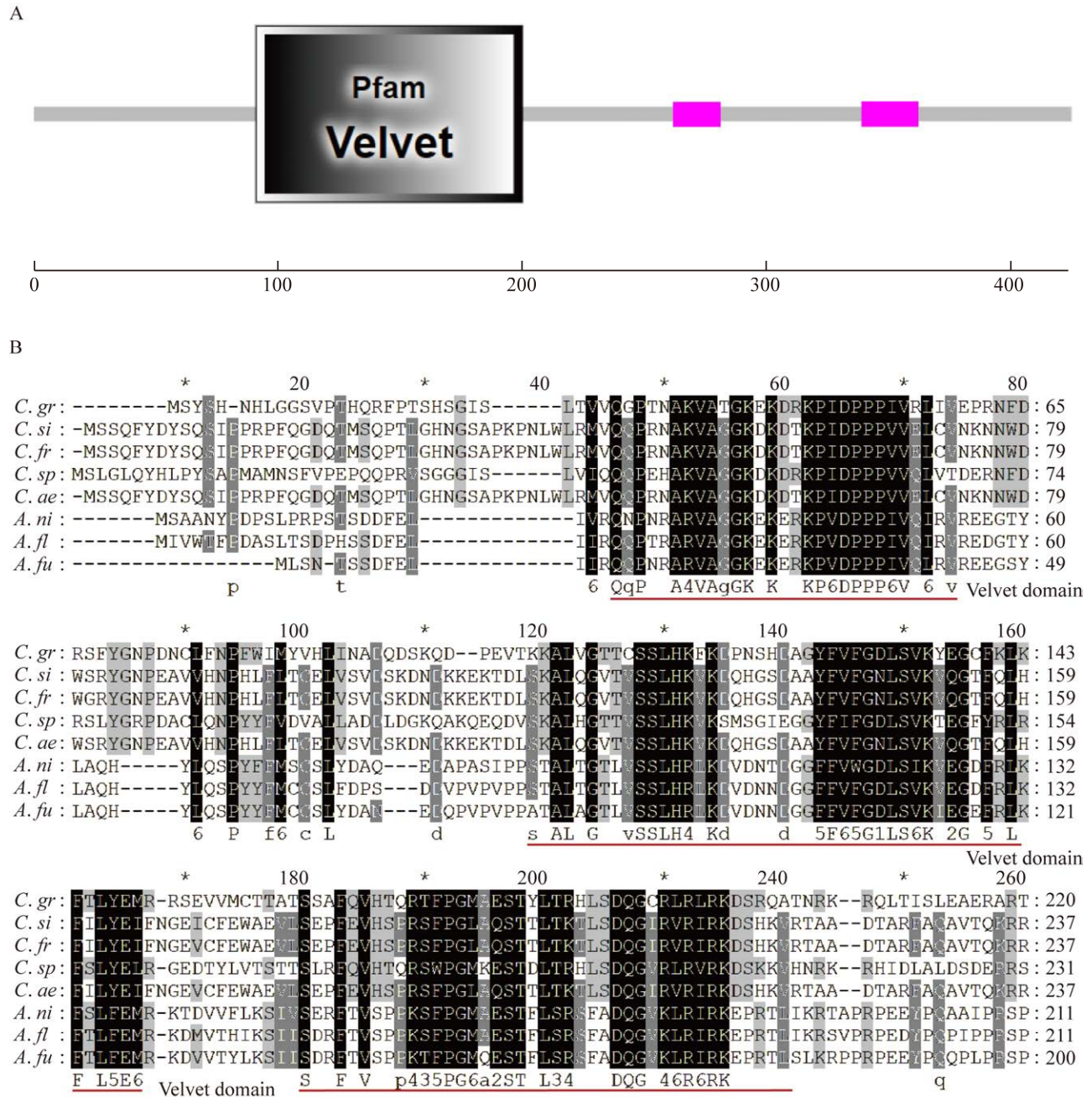
在 PDA、OMA、CM 和 MM 培养基上, 各突变株生长速度均低于野生型菌株, 具有显著差异(图 4)。在 PDA 培养基中, 野生型菌株的菌落直径平均为 64 mm, 而突变株菌落直径平均只有 58 mm, 且  $\Delta\text{CgrvosA}$  突变株的菌落形态不同于野生型菌株, 呈现“年轮状”生长, 互补菌株生长规律与野生型无明显差异。由此可以推测, CgrVosA 参与调控禾谷炭疽菌的营养生长。

### 2.4 CgrVosA 对禾谷炭疽菌在高渗和氧化应激下的影响

由图 5 可知, NaCl 对突变株  $\Delta\text{CgrvosA}$  的生长有明显的抑制作用, 尤其是在 1.0 mol/L NaCl 培养基上更为明显, 野生型菌株生长抑制率为 79%, 突变株菌落生长抑制率达到 89%, 两者存在显著性差异。 $\text{H}_2\text{O}_2$  对突变株  $\Delta\text{CgrvosA}$  的生长也有明显的抑制作用, 5 mmol/L  $\text{H}_2\text{O}_2$  对野生型菌株的抑制率为 51%, 而对突变株的抑制率平均为 73%。互补菌株  $\Delta\text{CgrvosA}/\text{vosA}$  能够回复以上表型缺陷。综上所述结果表明 CgrVosA 参与调控禾谷炭疽菌对高渗和氧化应激的响应。

### 2.5 CgrVosA 对卵圆形分生孢子的形态和产量的影响

在 PDB 和 CM 液体培养基中, 尽管各菌株都能产生卵圆形的孢子, 但突变株所产生的卵圆形分生孢子的体积明显大于野生型和互补菌株(图 6A)。



**图 2 CgrVosA 的生物信息学分析** A: CgrVosA 蛋白质结构域分析, Pfam 表示蛋白质家族数据库, 粉色方框表示低复杂度区域. B: CgrVosA 蛋白多序列比对

Figure 2 Bioinformatics analyses of CgrVosA. A: Protein domain analysis of CgrVosA; The pink boxes indicate the low-complexity regions. B: Multiple sequence alignment of CgrVosA. *C. gr*: *Colletotrichum graminicola*; *C. si*: *Colletotrichum siamense*; *C. fr*: *Colletotrichum fructicola*; *C. sp*: *Colletotrichum spinosum*; *C. ae*: *Colletotrichum aenigma*. *A. ni*: *Aspergillus nidulans*; *A. fl*: *Aspergillus flavus*; *A. fu*: *Aspergillus fumigatus*.

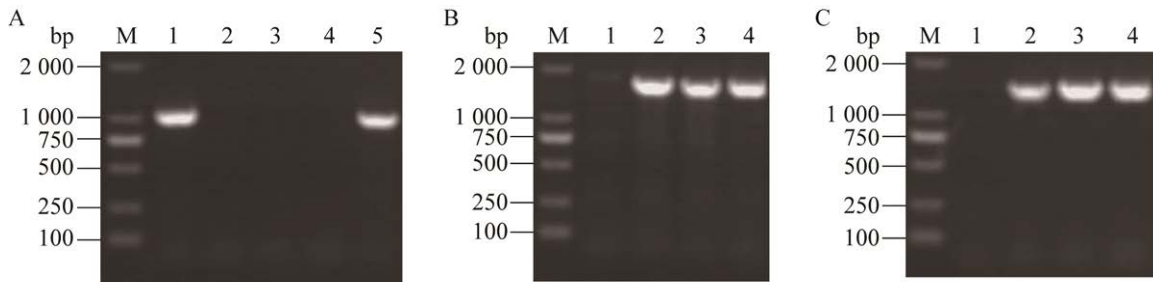


图 3 *CgrvosA* 基因敲除及互补菌株的验证 A: 引物 CgrVosAF/CgrVosAR 扩增结果; B: 引物 CgrVosAUU/PI 扩增结果; C: 引物 PI1/CgrVosADD 扩增结果. M: DL2000 DNA Marker; 1: 野生型菌株; 2:  $\Delta CgrvosA-23$ ; 3:  $\Delta CgrvosA-24$ ; 4:  $\Delta CgrvosA-25$ ; 5:  $\Delta CgrvosA/vosA$

Figure 3 Validation of *CgrvosA* knockout and complementary strains. A: Amplification results of the primers CgrVosAF/CgrVosAR; B: Amplification results of the primers CgrVosAUU/PI; C: Amplification results of the primers PI1/CgrVosADD. M: DL2000 DNA Marker; 1: Wild type; 2:  $\Delta CgrvosA-23$ ; 3:  $\Delta CgrvosA-24$ ; 4:  $\Delta CgrvosA-25$ ; 5:  $\Delta CgrvosA/vosA$ .

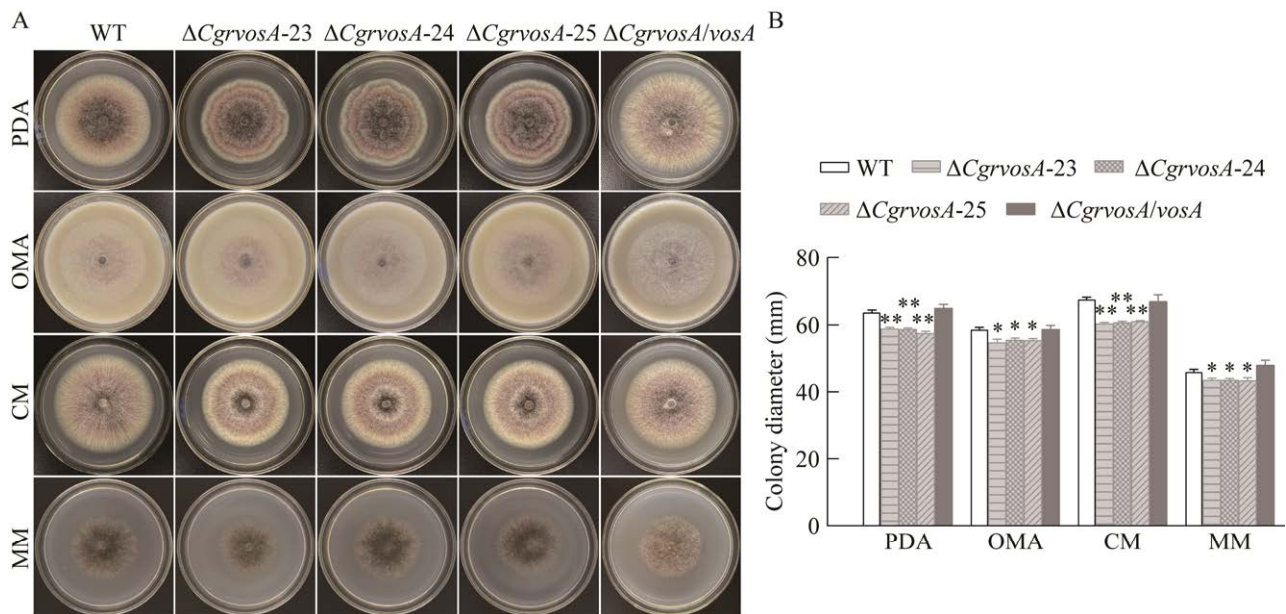


图 4 野生型菌株、突变株和互补菌株的营养生长 A: 菌株在 PDA、OMA、CM 和 MM 培养基上的生长情况. B: 菌落直径的统计(\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ )

Figure 4 Vegetative growth of the wild type, mutants and the complementary strain. A: Vegetative growth of the strains on PDA, OMA, CM and MM media. B: Statistics of colony diameters (\*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ ).

此外, 当在 PDB 和 CM 培养基中培养时, 突变株  $\Delta CgrvosA$  的卵圆形分生孢子产量显著低于野生型菌株(图 6B、6C): 在 PDB 中培养 5 d, 野生型菌株的孢子产量为  $1.8 \times 10^7$  个/mL, 而突变

株平均为  $9.7 \times 10^6$  个/mL, 为野生型菌株的 54%; 在 CM 中培养 5 d, 野生型菌株的孢子产量为  $1.1 \times 10^7$  个/mL, 而突变株平均为  $5.6 \times 10^6$  个/mL, 为野生型菌株的 51%。这说明 *CgrvosA* 的敲除

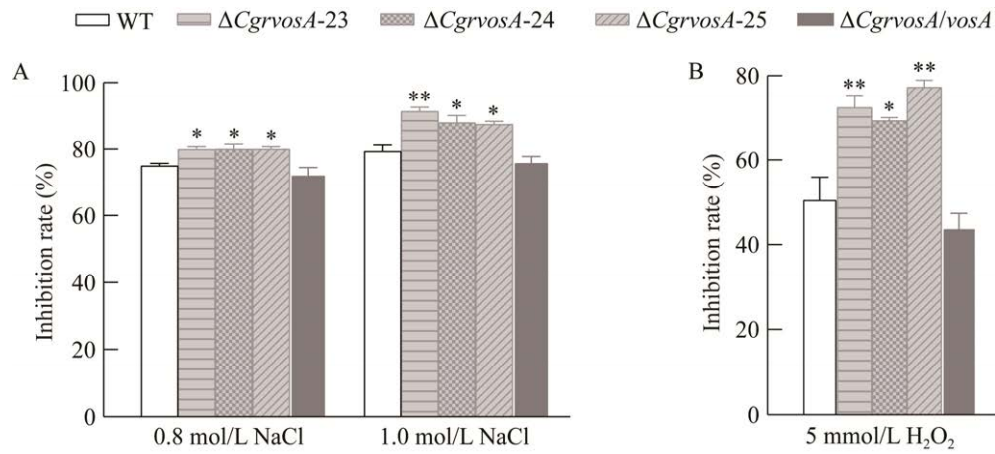


图 5 NaCl (A)和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B)对各菌株生长的影响

Figure 5 Effects of NaCl (A) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (B) on the growth of strains. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ .

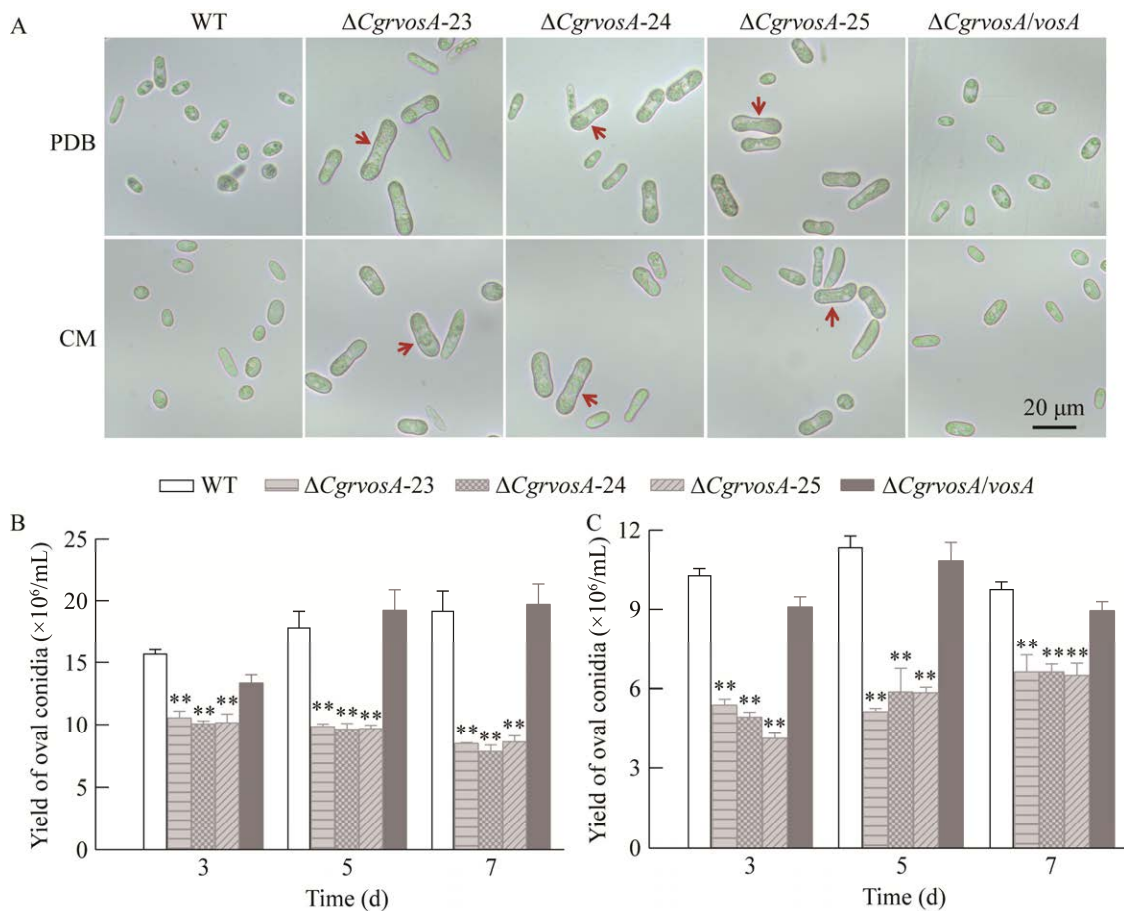


图 6 卵圆形分生孢子形态(A)及在 PDB 培养基(B)和 CM 培养基(C)中的产量 箭头表示形态异常的孢子

Figure 6 The morphology of oval conidia (A) and their yield in PDB medium (B) and CM medium (C). The arrows indicate the abnormal conidia. \*\*:  $P < 0.01$ .



显著抑制了卵圆形分生孢子的产生。与野生型菌株相比, 突变株镰刀形孢子的形态和产量无显著差异。

## 2.6 CgrVosA 对卵圆形分生孢子萌发的影响

将各菌株在 PDB 液体培养基中分别培养 3、5 和 7 d, 收集不同培养时间的卵圆形分生孢子悬液, 在玻璃载玻片上进行孢子萌发试验, 结果发现: 随着培养时间的增加,  $\Delta CgrvosA$  突变株的卵圆形分生孢子萌发率呈现递减趋势, 尤其是培养到第 7 天, 突变株  $\Delta CgrvosA$  的孢子萌发率仅有 52%, 而野生型菌株为 95%, 互补菌株能恢复到野生型菌株的水平(图 7A)。然而  $\Delta CgrvosA$  镰刀形孢子的萌发率并未受到影响。

进一步对各菌株卵圆形分生孢子进行 CFW 染色发现, 相较于野生型菌株, 突变株  $\Delta CgrvosA$  卵圆形分生孢子几丁质分布不均匀(图 7B)。几丁质是真菌细胞壁的主要组成成分之一, 几丁质的分布不均可能在一定程度上影响了突变株孢子的萌发率。

## 2.7 CgrVosA 对禾谷炭疽菌致病性的影响

由图 8 可以看出, 不管是菌饼接种还是镰刀

型孢子悬液接种, 野生型菌株、突变株  $\Delta CgrvosA$  和互补菌株都能在玉米叶片上形成病斑且病斑大小无显著性差异。由此可见 CgrVosA 不参与调控禾谷炭疽菌的致病性。

## 3 讨论

Velvet 蛋白作为真菌特有的转录因子, 最早在构巢曲霉中发现, 因其突变株的菌落呈现丝绒状, 因此将其命名为“Velvet”, 包括 VosA、VelB、VeA 和 VelC 4 个成员, 它们在调控构巢曲霉的生长发育、无性产孢和有性生殖过程及次级代谢产物的形成等生理过程中发挥着重要的作用<sup>[20-23]</sup>。本研究针对禾谷炭疽菌 CgrVosA 的生物学功能进行了研究, 发现其生物学功能具有一定的保守性。

CgrVosA 参与调控禾谷炭疽菌的营养生长。在暹罗炭疽菌中, 突变株  $\Delta CsvosA$  在 PDA、CM 和 MM 培养基上菌落生长直径均显著低于野生型菌株<sup>[24]</sup>。在产黄青霉菌中, *vosA* 敲除后突变株也表现出营养生长迟缓<sup>[16]</sup>。在球孢白僵菌中, *vosA* 突变株在萨氏培养基(Sabouraud dextrose

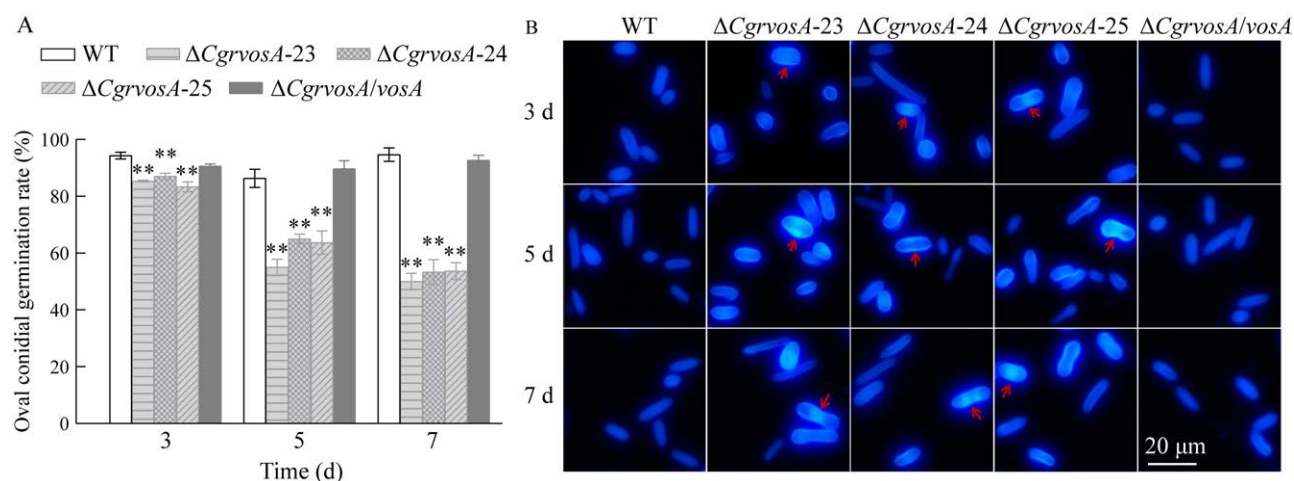


图 7 卵圆形分生孢子萌发率(A)及 CFW 染色(B) 红色箭头表示几丁质分布不均匀的孢子. \*\*:  $P < 0.01$

Figure 7 Oval conidial germination rates (A) and CFW dyeing (B). Red arrows indicate the conidia with uneven chitin distribution. \*\*:  $P < 0.01$ .

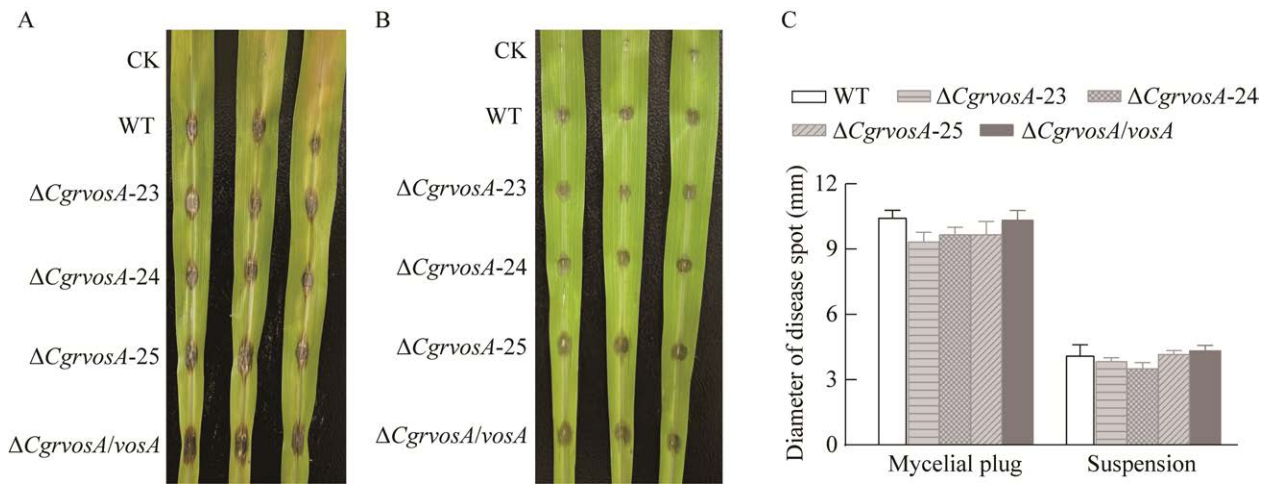


图 8 野生型菌株、突变株及互补菌株的致病性分析 A: 菌饼接种. B: 镰刀型孢子悬液接种. C: 病斑直径统计

Figure 8 Pathogenicity analysis of the wild type, mutants and the complementary strain. A: Mycelial plug inoculation. B: Falcate conidial suspension inoculation. C: Statistical analyses of lesion diameters.

agar with yeast extract, SDAY)和查氏培养基(Czapek yeast autolysate agar, CZA)上培养 7 d 后, 菌落直径明显小于野生型菌株<sup>[17]</sup>。这些研究结果表明在多种真菌中 VosA 均参与调控营养生长。

CgrVosA 参与调控禾谷炭疽菌对高渗和氧化应激的响应。在构巢曲霉中, *vosA* 的敲除突变株对  $H_2O_2$  敏感, 用 0.125 mol/L  $H_2O_2$  处理子囊孢子, *vosA* 突变株子囊孢子的存活率只有野生型的 50%<sup>[10]</sup>。在异旋孢腔菌中, 突变株的分生孢子对  $H_2O_2$  比野生型菌株更敏感, 4 mmol/L 的  $H_2O_2$  能完全抑制其孢子萌发<sup>[15]</sup>。球孢白僵菌在含有 1.2 mol/L NaCl 的培养基中, 突变株分生孢子萌发率减少近一半<sup>[25]</sup>。

CgrVosA 参与调控禾谷炭疽菌卵圆形分生孢子的形态。在禾旋孢腔菌中, 野生型菌株的分生孢子大小均匀, 隔膜间隔规则, 而 *vosA* 突变株分生孢子大小不一, 无隔膜或隔膜不规整<sup>[13]</sup>。在异旋孢腔菌中 VosA 也参与调控分生孢子的形态, 野生型菌株的分生孢子大小较一致、有规则的隔膜, 而 *vosA* 突变株的分生孢子大小相

差悬殊, 分生孢子无隔膜或隔膜不规则<sup>[15]</sup>。

CgrVosA 参与调控禾谷炭疽菌卵圆形分生孢子的萌发。暹罗炭疽菌中,  $\Delta CsvosA$  突变株分生孢子随着培养时间的增加其萌发率呈下降趋势<sup>[24]</sup>。在异旋孢腔菌中, *vosA* 的敲除导致孢子活力显著降低, 野生型菌株在完全培养基 (complete medium, CM) 培养基中培养 5–16 d, 分生孢子的萌发率维持在 80% 以上, 而 *vosA* 突变株孢子萌发率显著低于野生型菌株, 在第 10 天下降到 30% 以下<sup>[14]</sup>。在禾旋孢腔菌中, *vosA* 突变株分生孢子的萌发明显比野生型菌株滞后<sup>[13]</sup>。在球孢白僵菌中, *vosA* 突变株随着培养时间的增加, 分生孢子的萌发率极显著下降, 该菌株的野生型在培养 30、40 和 50 d 时, 分生孢子萌发率分别为 98%、95% 和 85%, 而 *vosA* 突变株萌发率分别是 23%、10% 和 3%<sup>[25]</sup>。在少孢节丛孢菌中, *vosA* 敲除后, 突变株的分生孢子萌发率只有野生型菌株孢子萌发率的 1/3<sup>[18]</sup>。这些结论都表明 VosA 参与调控分生孢子的萌发。

暹罗炭疽菌中,  $\Delta CsvosA$  突变株分生孢子

的产量显著降低。在产黄青霉中, *vosA* 敲除后, 突变株产孢量减少约 70%<sup>[24]</sup>。球孢白僵菌中, 在 7 d 的 SDAY 培养中, *vosA* 缺失突变株的分生孢子产量都大幅降低, 与野生型菌株相比, 其中第 3 天时敲除突变株的分生孢子产量减少 56%, 第 4-6 天减少 95%-98%, 第 7 天减少 88%<sup>[16]</sup>。

*CgrVosA* 不参与调控禾谷炭疽菌的致病性。对于禾谷炭疽菌来说, 附着胞是其成功侵染玉米植株的关键, 镰刀形分生孢子可以产生附着胞, 在侵染过程中起主要作用; 而卵圆形分生孢子不能形成附着胞, 其主要在菌丝扩散过程中起作用<sup>[26-27]</sup>。 $\Delta CgrvosA$  突变株和野生型菌株相比, 镰刀形孢子的产量、形态和萌发均与野生型菌株无明显差异, 这些可能是  $\Delta CgrvosA$  突变株也能正常侵染玉米叶片的原因。在罗伯茨绿僵菌 (*Metarhizium robertsii*) 中, *vosA* 的缺失同样不影响菌株毒力<sup>[28]</sup>, 而在禾旋孢腔菌中敲除 *vosA* 后突变株致病性明显减弱。由此可以看出, 在不同真菌中 *VosA* 对致病性的影响不同。

## 4 结论

在禾谷炭疽菌中 Velvet 蛋白 *CgrVosA* 参与调控营养生长、对渗透胁迫和氧化应激的响应、卵圆形分生孢子的产生及萌发等过程。本研究为深入认识禾谷炭疽菌 Velvet 蛋白在生长发育中的功能奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] WU F, GUCLU H. Global maize trade and food security: implications from a social network model[J]. Risk Analysis, 2013, 33(12): 2168-2178.
- [2] KANKANALA P, CZYMMEK K, VALENT B. Roles for rice membrane dynamics and plasmodesmata during biotrophic invasion by the blast fungus[J]. The Plant Cell, 2007, 19(2): 706-724.
- [3] LUDWIG N, LÖHRER M, HEMPEL M, MATHEA S, SCHLIEBNER I, MENZEL M, KIESOW A, SCHAFFRATH U, DEISING HB, HORBACH R. Melanin is not required for turgor generation but enhances cell-wall rigidity in appressoria of the corn pathogen *Colletotrichum graminicola*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2014, 27(4): 315-327.
- [4] CROUCH JA, CLARKE BB, WHITE JF Jr, HILLMAN BI. Systematic analysis of the falcate-spored graminicolous *Colletotrichum* and a description of six new species from warm-season grasses[J]. Mycologia, 2009, 101(5): 717-732.
- [5] PARK HS, NI M, JEONG KC, KIM YH, YU JH. The role, interaction and regulation of the Velvet regulator VelB in *Aspergillus nidulans*[J]. PLoS One, 2012, 7(9): e45935.
- [6] AHMED YL, GERKE J, PARK HS, BAYRAM Ö, NEUMANN P, NI M, DICKMANN A, KIM SC, YU JH, BRAUS GH, FICNER R. The Velvet family of fungal regulators contains a DNA-binding domain structurally similar to NF- $\kappa$ B[J]. PLoS Biology, 2013, 11(12): e1001750.
- [7] AKHBERDI O, ZHANG Q, WANG D, WANG HC, HAO XR, LIU YJ, WEI DS, ZHU XD. Distinct roles of Velvet complex in the development, stress tolerance, and secondary metabolism in *Pestalotiopsis microspora*, a taxol producer[J]. Genes, 2018, 9(3): 164.
- [8] 何霞, 黄汇惠, 马鹏, 王丽玲. VeA、VelB 蛋白在真菌中的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2023, 44(7): 163-168.
- [9] HE X, HUANG HH, MA P, WANG LL. Research progress of VeA and VelB in fungi[J]. Food Research and Development, 2023, 44(7): 163-168 (in Chinese).
- [10] EL HAJJ ASSAF C, SNINI SP, TADRIST S, BAILLY S, NAYLIES C, OSWALD IP, LORBER S, PUEL O. Impact of *veA* on the development, aggressiveness, dissemination and secondary metabolism of *Penicillium expansum*[J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(8): 1971-1983.
- [11] PERFECT JR, TENOR JL, MIAO Y, BRENNAN RG. Trehalose pathway as an antifungal target[J]. Virulence, 2017, 8(2): 143-149.
- [12] KIM MJ, LEE MK, PHAM HQ, GU MJ, ZHU BH, SON SH, HAHN D, SHIN JH, YU JH, PARK HS, HAN KH. The Velvet regulator VosA governs survival and secondary metabolism of sexual spores in *Aspergillus nidulans*[J]. Genes, 2020, 11(1): 103.
- [13] KRIJGSHELD P, BLEICHRODT R, van VELUW GJ, WANG F, MÜLLER WH, DIJKSTERHUIS J, WÖSTEN HAB. Development in *Aspergillus*[J]. Studies in Mycology, 2013, 74: 1-29.

- [13] WANG R, LENG YQ, ZHONG SB. The regulatory gene *VosA* affects conidiogenesis and is involved in virulence of the fungal cereal pathogen *Cochliobolus sativus*[J]. *Fungal Biology*, 2015, 119(10): 884-900.
- [14] WANG W, WU D, PAN H, TURGEON BG. Vel2 and Vos1 hold essential roles in ascospore and asexual spore development of the heterothallic maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2014, 70: 113-124.
- [15] WU DL, OIDE S, ZHANG N, CHOI MY. ChLae1 and ChVel1 regulate T-toxin production, virulence, oxidative stress response, and development of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(2): e1002542.
- [16] KOPKE K, HOFF B, BLOEMENDAL S, KATSCHOROWSKI A, KAMEREWERD J, KÜCK U. Members of the *Penicillium chrysogenum* Velvet complex play functionally opposing roles in the regulation of penicillin biosynthesis and conidiation[J]. *Eukaryotic Cell*, 2013, 12(2): 299-310.
- [17] WANG DY, TONG SM, GUAN Y, YING SH, FENG MG. The Velvet protein VeA functions in asexual cycle, stress tolerance and transcriptional regulation of *Beauveria bassiana*[J]. *Fungal Genetics and Biology: FG&B*, 2019, 127: 1-11.
- [18] ZHANG GS, ZHENG YQ, MA YX, YANG L, XIE MH, ZHOU DX, NIU XM, ZHANG KQ, YANG JK. The Velvet proteins VosA and VelB play different roles in conidiation, trap formation, and pathogenicity in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1917.
- [19] 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).
- [20] SON YE, CHO HJ, CHEN WP, SON SH, LEE MK, YU JH, PARK HS. The role of the VosA-repressed *dnjA* gene in development and metabolism in *Aspergillus* species[J]. *Current Genetics*, 2020, 66(3): 621-633.
- [21] ETXEBESTE O, GARZIA A, ESPESO EA, UGALDE U. *Aspergillus nidulans* asexual development: making the most of cellular modules[J]. *Trends in Microbiology*, 2010, 18(12): 569-576.
- [22] KIM H, HAN K, KIM K, HAN D, JAHNG K, CHAE K. The *veA* gene activates sexual development in *Aspergillus nidulans*[J]. *Fungal Genetics and Biology: FG & B*, 2002, 37(1): 72-80.
- [23] LEE MK, KWON NJ, LEE IS, JUNG S, KIM SC, YU JH. Negative regulation and developmental competence in *Aspergillus*[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 28874.
- [24] GAO J, ZHOU SZ, TANG W, WANG JH, LIU HQ, ZHANG Y, WANG LY, LI XY, LIU ZQ. The Velvet proteins CsVosA and CsVelB coordinate growth, cell wall integrity, sporulation, conidial viability and pathogenicity in the rubber anthracnose fungus *Colletotrichum siamense*[J]. *Microbiological Research*, 2023, 268: 127290.
- [25] LI F, SHI HQ, YING SH, FENG MG. WetA and VosA are distinct regulators of conidiation capacity, conidial quality, and biological control potential of a fungal insect pathogen[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(23): 10069-10081.
- [26] BERGSTROM GC, NICHOLSON RL. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management[J]. *Plant Disease*, 1999, 83(7): 596-608.
- [27] DANIELA EN, ALINA S, LUIS A, ANJA R, HOLGER BD, STEFANIE P. Specialized infection strategies of falcate and oval conidia of *Colletotrichum graminicola*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2019, 133: 103276.
- [28] ZHANG JG, ZHANG K, XU SY, YING SH, FENG MG. Essential role of WetA, but No role of VosA, in asexual development, conidial maturation and insect pathogenicity of *Metarhizium robertsii*[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(2): e0007023.