

## 研究报告

# 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

张莹, 周双针, 王利亚, 韦涵文, 谢俊, 柳志强, 李晓宇\*

海南大学 生命健康学院, 海南 海口 570228

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 Ying, ZHOU Shuangzhen, WANG Liya, WEI Hanwen, XIE Jun, LIU Zhiqiang, LI Xiaoyu. A transcription factor CgrStuA regulates vegetative growth, conidial production, germination, and hyphopodium formation of *Colletotrichum graminicola*[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3020-3031.

**摘要:** 【背景】禾谷炭疽菌 [*Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wilson] 是一种重要的植物病原真菌, 可导致玉米炭疽病的发生。APSES (Asm-1、Phd1、Sok2、Efg1 和 StuA) 型转录因子 StuA 是真菌特有的螺旋-环-螺旋 (helix-loop-helix) 转录因子, 参与调控真菌的营养生长、孢子产量、萌发和致病性等。【目的】在禾谷炭疽菌中鉴定一个 APSES 型转录因子 CgrStuA, 明确其在禾谷炭疽菌生长和发育中的作用。【方法】利用同源重组的原理构建禾谷炭疽菌 *CgrstuA* 基因敲除突变菌株, 并对突变体进行表型分析, 包括营养生长、孢子产量、孢子萌发及致病力等。【结果】*CgrstuA* 编码一个含有 707 个氨基酸的蛋白, 含有一个 Kila-N 结构域。*CgrstuA* 缺失突变体表现为营养生长减缓, 两种类型的孢子产量降低, 卵圆形孢子的萌发率极低, 附着枝的数量明显增加, 但致病性与野生型相比无显著差异。【结论】CgrStuA 在禾谷炭疽菌的营养生长、孢子产量、萌发及附着枝的形成调控中发挥重要作用, 但不影响致病性。

**关键词:** 禾谷炭疽菌; APSES 型转录因子; 分生孢子; 附着枝; 生物学功能

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: 2023-10-18; Accepted: 2023-11-09; Published online: 2023-12-27

# A transcription factor CgrStuA regulates vegetative growth, conidial production, germination, and hyphopodium formation of *Colletotrichum graminicola*

ZHANG Ying, ZHOU Shuangzhen, WANG Liya, WEI Hanwen, XIE Jun, LIU Zhiqiang, LI Xiaoyu\*

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

**Abstract:** [Background] *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wilson is a major pathogenic fungus infecting plants, causing maize anthracnose. The APSES (Asm-1, Phd1, Sok2, Efg1 and StuA) transcription factor StuA, a fungal specific helix-loop-helix transcription factor, regulates the vegetative growth, conidial yield, germination, and pathogenicity of fungi. [Objective] To reveal the role of an APSES transcription factor CgrStuA identified in *C. graminicola* in the growth and development of *C. graminicola*. [Methods] The *CgrstuA*-deleted mutants were constructed by homologous recombination, and the obtained mutants were characterized in terms of the vegetative growth, conidial yield, germination, and pathogenicity. [Results] *CgrstuA* encoded a protein composed of 707 residues and containing a Kila-N domain. The *CgrstuA*-deleted mutants exhibited slow vegetative growth, decreased yields of two types of conidia, an extremely low germination rate of oval conidia, and significantly increased hyphopodia. However, there was no significant difference in the pathogenicity between the wild type and the mutants. [Conclusion] CgrStuA play important roles in the regulation of vegetative growth, conidial yield, germination, and hyphopodium formation of *C. graminicola*, while it did not affect the pathogenicity.

**Keywords:** *Colletotrichum graminicola*; APSES transcription factor; conidia; hyphopodia; biological function

禾谷炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)是一种重要的植物病原真菌, 主要感染玉米、高粱、小麦等禾本科植物<sup>[1]</sup>。禾谷炭疽菌属于子囊菌门(*Ascomycotina*), 其分生孢子具有两种形态, 一种为镰刀形的大型孢子, 另一种呈圆形或椭圆形的小型孢子。两种分生孢子均能造成炭疽病, 而镰刀形孢子是造成该病害的主要侵染源<sup>[2-3]</sup>。禾谷炭疽菌的侵染过程可分为分生孢子的萌发、附着胞的形成、初生菌丝和次生菌丝的形成等过程<sup>[4]</sup>。

转录因子可分为锌指结构、同源异型盒、螺旋-环-螺旋和亮氨酸拉链四大家族<sup>[5]</sup>。APSES转录因子是一种真菌特有的螺旋-环-螺旋类转录因子, 对真菌的发育起关键调控作用, 其具

有的APSES结构域与Kila-N结构域具有较高同源性<sup>[6-7]</sup>。已有的研究表明APSES转录因子主要参与调控真菌的营养生长、孢子萌发、致病性和次级代谢等多个过程<sup>[8]</sup>。

APSES蛋白家族主要包括5个成员, 分别是Asm-1、Phd1、Sok2、Efg1和StuA。在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中, 两个APSES类蛋白Phd1p和Sok2p共同参与调控假菌丝生长的过程, Phd1p的表达能够增强假菌丝生长, 而Sok2p抑制假菌丝的生长<sup>[9-10]</sup>; 在白色念珠菌(*Candida albicans*)中, Efg1和Efh1蛋白在其菌丝形态转变过程中起着关键的作用, 同时Efg1还调控着细胞代谢相关基因的表达<sup>[11]</sup>; StuA最早在构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中被鉴定,

证明其在无性发育和有性发育阶段发挥重要作用,  $\Delta AnstuA$  突变体的菌丝生长减缓、分生孢子发育异常<sup>[12]</sup>。在玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)中, *StuA* 参与菌丝形态转换、孢子发育等过程的调控<sup>[13]</sup>; 在草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)中, *StuA* 正调控分生孢子梗的形成,  $\Delta PostuA$  敲除突变体不能产生分生孢子梗和分生孢子<sup>[14]</sup>; 在烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)中, 转录因子 *StuA* 在调控分生孢子的形成及其萌发过程中发挥着重要作用<sup>[15]</sup>。

尽管 *StuA* 已在多个真菌中得到鉴定, 但在禾谷炭疽菌中少见报道。本研究从禾谷炭疽菌中鉴定 APSES 型转录因子 *CgrStuA*, 并通过构建  $\Delta CgrstuA$  突变菌株分析表型, 旨在明确 *CgrStuA* 在该病菌中的功能, 为进一步研究 *StuA* 在真菌生命周期中的作用提供重要线索, 并为开发新的抗真菌药物提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品

禾谷炭疽菌(*C. graminicola*)菌株 M1.001 为野生型菌株(WT), 由海南大学生命健康学院真菌生物学实验室保存。pUC18 载体(含有潮霉素磷酸转移酶基因 *HPT*)、pUC18 载体(含有遗传霉素 G418)均保存于本实验室。玉米叶片(先玉

335)由本实验室提供。

### 1.2 培养基

快速生长培养基(rapid growth medium, RGM) (上层) (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; RGM 培养基(下层) (g/L): 蔗糖 342.3, 酵母粉 1.0, 酸水解酪蛋白 1.0, 琼脂粉 12.0; 燕麦培养基(oat agar medium, OMA) (g/L): 燕麦粉 50.0, 琼脂粉 18.0。本研究所用的 potato dextrose agar (PDA)、potato dextrose broth (PDB)、complete medium (CM)、minimal medium (MM)、Czapek-Dox medium (CZAPEK)和 LB 等培养基参考文献[16]配制。

### 1.3 主要试剂和仪器

质粒提取和凝胶回收等试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; *rTaq* 酶、*BamH* I、*EcoR* I、*Xba* I 和 *RNase* 等, 宝生物工程(大连)有限公司; 潮霉素磷酸转移酶基因(*HPT*)和遗传霉素(G418), 北京索莱宝科技有限公司。PCR 仪和微型离心机, 艾本德(上海)国际贸易有限公司; 凝胶电泳分析装置, 北京六一生物科技有限公司。

### 1.4 *CgrstuA* 基因的生物信息学分析

根据 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)禾谷炭疽菌数据库中 *CgrstuA* (登录号为 GLRG\_04290)的基因序列, 利用 Primer-BLAST 设计引物 *CgrstuAF/CgrstuAR* 用于扩增所需的目的片段(表 1)。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequence (5'→3')
<i>CgrstuAF</i>	GGTGTGTTCTACGTCATGT
<i>CgrstuAR</i>	GCTGGGAGTAGTATGGCTGG
<i>CgrstuAUF</i>	CGGGATCCCTCTCAGACTCCACCAACC
<i>CgrstuAUR</i>	GCTCTAGATCAGTGGAGTGCAAGTCACC
<i>CgrstuADF</i>	CGGAATTCAGTGCCTTTCGTCACCTTCGT
<i>CgrstuADR</i>	CGGGATCCTTACCCTTACGCAGCACTCG
<i>CgrstuAUU</i>	CACCAGCATCAGCAAAGTGCGGACA
PI	GTCCCTCGTTCCTGTCTGCTAATAAG
<i>CgrstuADD</i>	AGTACTTCGTAGAGCTGCAGTCCAG
PII	GGCACCCAGGCTTTACACTTTATG
<i>CgrstuAhhF</i>	GCTCTAGATCTGCTTCGACCTCACGGTG
<i>CgrstuAhhR</i>	CCGCTCGAGGAAGGCAGACTTGGGTAACG

*CgrStuA* 的蛋白质结构域分析由 SMART (<http://smart.embl-Heidelberg.de/>)在线工具预测。利用 BLASTp 比对获得 *CgrStuA* 在其他真菌中的同源蛋白序列, 通过 BioEdit 软件进行 *CgrStuA* 的蛋白多序列比对分析。

### 1.5 *CgrstuA* 基因敲除菌株及互补菌株的获得

$\Delta CgrstuA$  突变体的构建利用同源重组的原理(图 1), 通过引物 *CgrstuAUF/CgrstuAUR* 和 *CgrstuADF/CgrstuADR* 扩增出禾谷炭疽菌中 *CgrstuA* 基因约 1 000 bp 的片段, 将其克隆到含有潮霉素磷酸转移酶基因(*HPT*)的 pUC18 载体上, 获得敲除载体 pUC18-*CgrstuA*。PCR 反应体系(20  $\mu$ L):  $2\times Fast Taq$  Premix 10  $\mu$ L, DNA 模板 1  $\mu$ L, 正向引物(0.5  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, 反向引物(0.5  $\mu$ mol/L) 0.5  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 57  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。经测序无误后, 将线性化的重组质粒转入禾谷炭疽菌原生质体中, 在含有潮霉素磷酸转移酶基因(*HPT*)的 RGM 培养基上 28  $^{\circ}$ C 恒温培养 5–7 d, 挑取转化子于 PDA 培养基上生长 3–4 d, 用灭菌后的药

匙刮取收集转化子菌丝于含有 2% CTAB 和石英砂的离心管中, 28  $^{\circ}$ C、150 r/min 振荡 12 h 后通过 CTAB 法提取基因组 DNA。利用引物 *CgrstuAF/CgrstuAR*、*CgrstuAUU/PI* 和 *CgrstuADD/PII* 进行 3 轮 PCR 验证, 反应体系不变。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, (*CgrstuAF/CgrstuAR*: 56  $^{\circ}$ C、*CgrstuAUU/PI* 和 *CgrstuADD/PII*: 55  $^{\circ}$ C) 30 s, 72  $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。

为获得互补菌株, 使用引物 *CgrstuAhbF/CgrstuAhbR* 以基因组 DNA 为模板, 反应体系不变。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 3 min; 95  $^{\circ}$ C 30 s, 57  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 3 min, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 10 min。扩增出互补片段后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互补菌株 *C-CgrstuA*。

### 1.6 野生型、突变株和互补菌株在不同培养基上的生长测定

将新鲜的野生型、 $\Delta CgrstuA$  及 *C-CgrstuA* 分别接种在 PDA、CM、CZAPEK 和 MM 这 4 种营养培养基上, 28  $^{\circ}$ C 恒温培养箱中生长 5 d 后统计各菌株菌落直径。

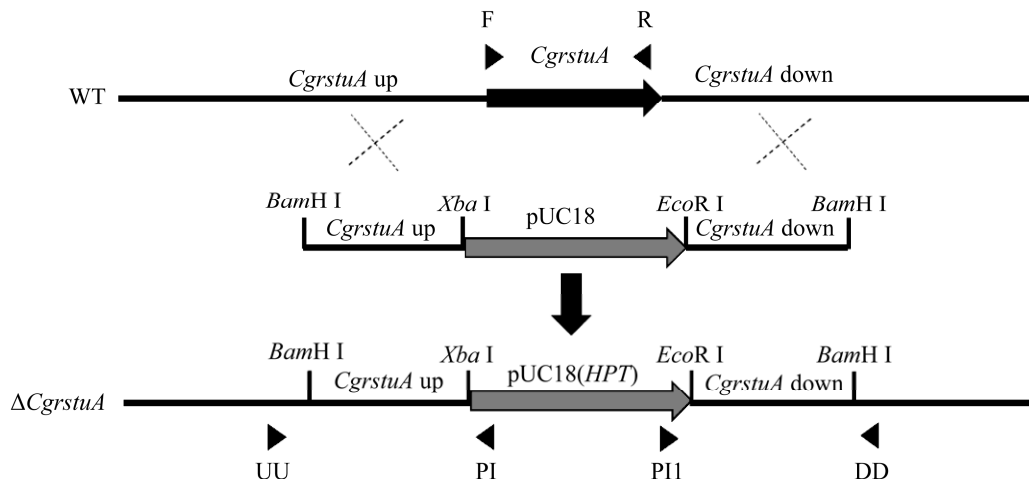


图 1 *CgrstuA* 敲除载体的构建原理

Figure 1 Construction principle of *CgrstuA* knockout vector.

### 1.7 卵圆形孢子的产量测定及萌发

将新鲜的野生型、 $\Delta CgrstuA$  及  $C-CgrstuA$  分别接种至 PDB 培养基中, 28 °C、150 r/min 振荡培养 3、5 和 7 d。用 Miracloth 过滤收集培养液, 统计各菌株的卵圆形孢子产量。取 2 mL 培养液 12 000 r/min 离心 2 min, 用无菌水重悬得到卵圆形孢子悬液。将 20  $\mu$ L 卵圆形孢子悬液(浓度为  $5 \times 10^5$  个/mL)滴加在干净载玻片上, 在 28 °C 条件下保湿培养, 6 h 后在显微镜下观察卵圆形孢子的萌发情况并统计其萌发率。

### 1.8 镰刀形孢子的产量测定

将新鲜的野生型、 $\Delta CgrstuA$  及  $C-CgrstuA$  接种在 OMA 培养基上, 28 °C 恒温培养 14 d, 用 10 mL 无菌水冲洗菌丝, 用 Miracloth 过滤后得到镰刀形孢子悬液, 通过血球计数板统计产量。取 20  $\mu$ L 镰刀形孢子悬液( $5 \times 10^5$  个/mL)滴加在灭菌玻璃纸上, 28 °C 保湿培养 12 h, 观察镰刀形孢子的萌发情况。

### 1.9 附着枝的形成

收集新鲜的野生型、 $\Delta CgrstuA$  及  $C-CgrstuA$  卵圆形孢子的悬液, 将浓度调整为  $1 \times 10^6$  个/mL, 均匀涂布在 PDA 平板上, 并把灭菌后的盖玻片 45° 斜插入 PDA 培养基中, 分别培养 1、2 和 3 d 后取出盖玻片在显微镜下观察附着枝。

### 1.10 致病性分析

采取菌饼接种和镰刀形孢子悬液接种两种方式。菌饼接种: 将在 PDA 培养基上生长 3 d 的各菌株菌饼分别接种到离体、有微伤口的玉米叶片上。镰刀形孢子悬液接种: 将镰刀形孢子悬液( $1 \times 10^6$  个/mL)接种到离体、有微伤口的玉米叶片上。对照组分别采用 PDA 菌饼和无菌水。28 °C 保湿培养 3 d, 观察致病情况并测量病斑大小。

### 1.11 数据处理

所有试验均设置 3 个平行重复。使用 IBM

SPSS Statistics 20.0 软件对数据进行方差分析 ( $P < 0.05$ ), 用 GraphPad Prism 8 软件作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 $CgrstuA$ 基因生物信息学分析

在禾谷炭疽菌中,  $CgrstuA$  编码一个 707 个氨基酸的蛋白(CgrStuA)。SMART 分析发现 CgrStuA 具有 KilA-N 结构域, 属于 APSES 型转录因子(图 2A)。利用 NCBI 中 BLASTp 进行比对发现, 所选的 5 种真菌中都有一个 KilA-N 结构域, 并且 StuA 在这 5 种真菌中是比较保守的, 禾谷炭疽菌 CgrStuA 与暹罗炭疽菌(*Colletotrichum siamense* Prihastuti, L. Cai & K.D. Hyde)、稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae* Cavara)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa* Shear & Dodge)的同源蛋白相似度均大于 60.00%, 与构巢曲霉[*Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter]同源蛋白相似度为 48.18% (图 2B)。

### 2.2 $CgrstuA$ 基因敲除菌株和互补菌株的构建

利用同源重组原理构建 pUC18- $CgrstuA$  敲除载体, 通过原生质体转化挑取转化子, 提取转化子的基因组 DNA 进行 3 轮 PCR 验证: 利用引物  $CgrstuAF/CgrstuAR$  进行扩增时, 野生型菌株可以扩增出 1 000 bp 的目的片段, 而突变株  $\Delta CgrstuA$  不能扩增出目的片段。利用引物  $CgrstuAUU/PI$  和  $CgrstuADD/PI1$  分别进行扩增时, 突变体菌株均能扩增出目的条带, 而野生型菌株不能扩增出目的片段。通过 3 轮 PCR 验证得到 3 个突变体, 分别命名为  $\Delta CgrstuA-1$ 、 $\Delta CgrstuA-5$  和  $\Delta CgrstuA-7$  (图 3)。

将互补载体转入敲除突变体制得的原生质体中, 挑取转化子, 提取其基因组 DNA, 通过 PCR 验证后, 获得互补菌株, 命名为  $C-CgrstuA$  (图 3)。

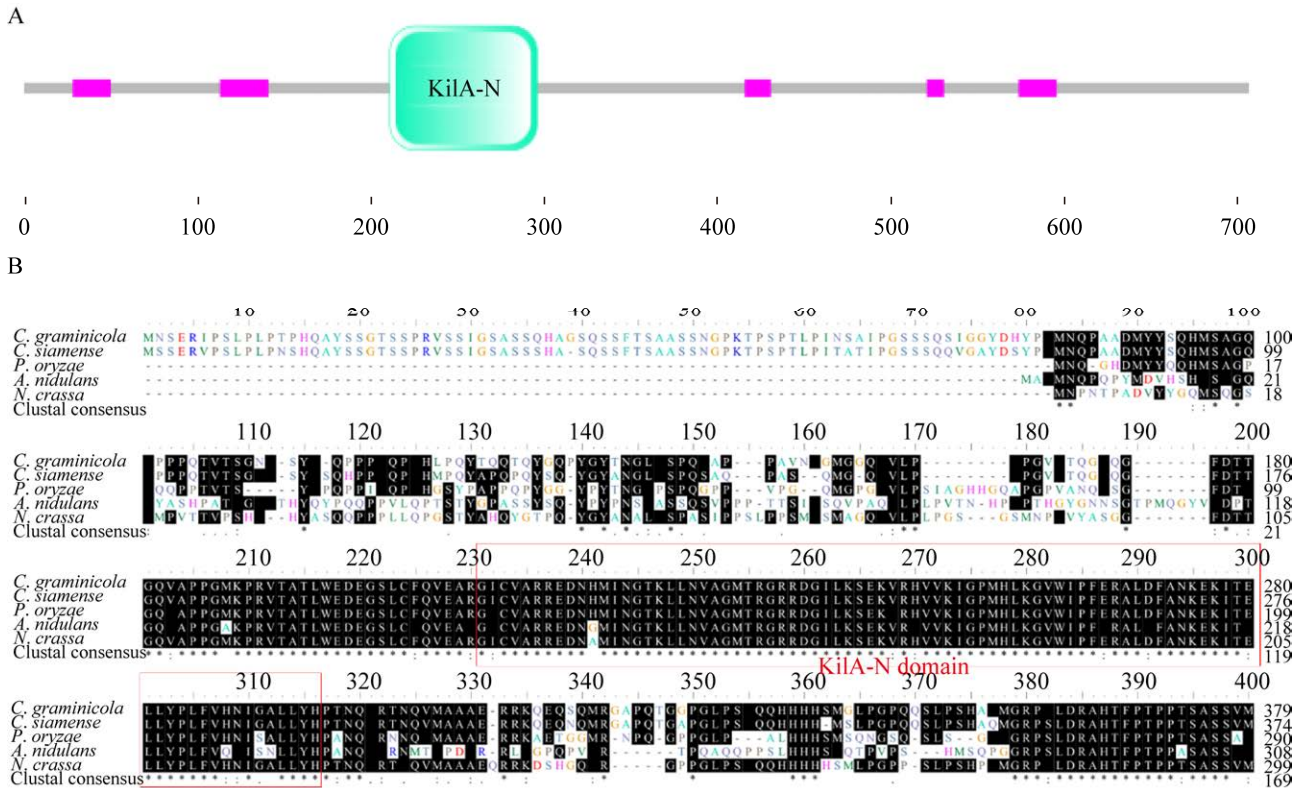


图 2 CgrStuA 的生物信息学分析 A: CgrStuA 蛋白结构域分析. B: 5 种真菌 StuA 蛋白序列比对. *Colletotrichum graminicola* (XP\_008093166.1); *Colletotrichum siamense* (XP\_036490100.1); *Pyricularia oryzae* (XP\_003718315.1); *Aspergillus nidulans* (XP\_050467081.1); *Neurospora crassa* (XP\_960837.1). 括号中的序号为 GenBank 登录号

Figure 2 Bioinformatics analysis of CgrStuA. A: Protein domain analysis of CgrStuA. B: Protein sequence alignment of five fungal StuA. *Colletotrichum graminicola* (XP\_008093166.1); *Colletotrichum siamense* (XP\_036490100.1); *Pyricularia oryzae* (XP\_003718315.1); *Aspergillus nidulans* (XP\_050467081.1); *Neurospora crassa* (XP\_960837.1). The numbers in parentheses are GenBank accession numbers.

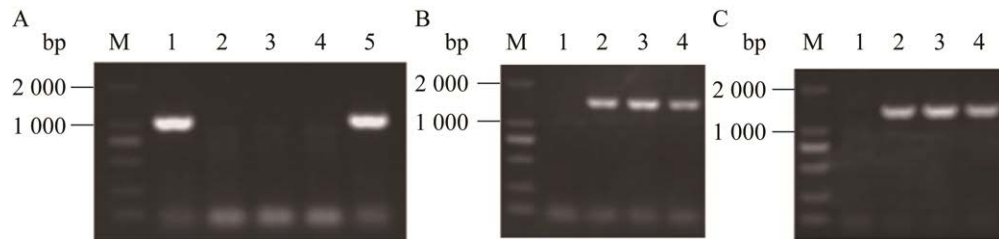


图 3 菌株  $\Delta$ CgrstuA 和 C-CgrstuA 的验证 A: 引物 CgrstuAF/CgrstuAR 检测结果. B: 引物 CgrstuAUU/PI 检测结果. C: 引物 CgrstuADD/PII 检测结果. M: DL2000 DNA Marker; 1: 野生型; 2:  $\Delta$ CgrstuA-1; 3:  $\Delta$ CgrstuA-5; 4:  $\Delta$ CgrstuA-7; 5: C-CgrstuA

Figure 3 Validation of strain  $\Delta$ CgrstuA and C-CgrstuA. A: Detection results of the primers CgrstuAF/CgrstuAR. B: Detection results of the primers CgrstuAUU/PI. C: Detection results of the primers CgrstuADD/PII. M: DL2000 DNA Marker; 1: WT; 2:  $\Delta$ CgrstuA-1; 3:  $\Delta$ CgrstuA-5; 4:  $\Delta$ CgrstuA-7; 5: C-CgrstuA.

### 2.3 CgrStuA 参与调控禾谷炭疽菌的营养生长

由图 4 可以看出,  $\Delta CgrstuA$  在不同的培养基上生长速率较野生型有所降低, 尤其是在 MM 培养基中, 菌落直径仅有 20 mm, 明显小于野生型菌株和互补菌株。同时可以看到突变体菌株的菌落颜色不同于野生型菌株, 在 PDA、CM 培养基上, 突变体菌落呈现灰绿色(图 4A)。由此推测 CgrStuA 参与调控禾谷炭疽

菌的营养生长。

### 2.4 CgrStuA 参与调控禾谷炭疽菌两种类型孢子的形态

突变株  $\Delta CgrstuA$  两种类型的孢子形态都明显不同于野生型。与野生型相比,  $\Delta CgrstuA$  卵圆形孢子变得更加细长。突变株的“镰刀形”孢子形态也发生了改变, 弯曲弧度变小或者平直且孢子两端趋于圆滑(图 5)。由此可见, CgrStuA 参与调控禾谷炭疽菌分生孢子的形态。

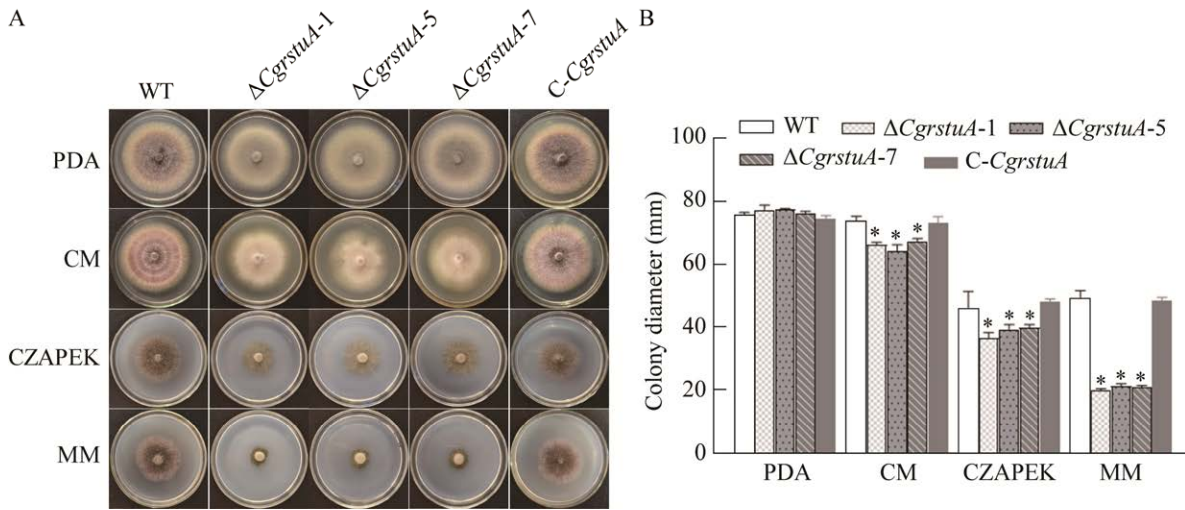


图 4 野生型、 $\Delta CgrstuA$  及 C-CgrstuA 的营养生长 A: 各菌株在不同培养基上培养 5 d 的生长状态. B: 各菌株在不同培养基上菌落直径的差异比较(\*:  $P < 0.05$ )

Figure 4 Vegetative growth of the WT,  $\Delta CgrstuA$  and C-CgrstuA. A: Growth state of the strains on different media for five days. B: Comparison of colony diameter of strains on different media (\*:  $P < 0.05$ ).

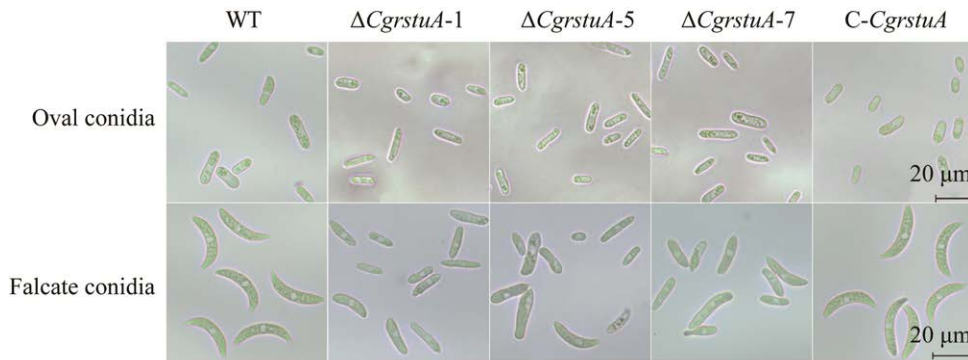


图 5 各菌株两种类型孢子形态

Figure 5 The morphologies of two type conidia of strains.

## 2.5 *CgrStuA* 参与调控禾谷炭疽菌卵圆形孢子的产量和萌发

将野生型、 $\Delta CgrstuA$  及 *C-CgrstuA* 接种在 PDB 培养基中培养, 分别在 3、5 和 7 d 统计卵圆形孢子产量。如图 6A 所示, 突变体菌株卵圆形孢子产量明显下降, 约为野生型和互补菌株

的 50%, 并且随着培养时间的增加, 卵圆形孢子产量一直维持在  $10^6$  个/mL, 而野生型和互补菌株孢子产量在 3 d 时已达到  $10^7$  个/mL。进一步测定卵圆形孢子的萌发情况, 发现突变体卵圆形孢子的萌发率极低, 保湿培养 6 h 萌发率仅为 6%, 而野生型接近 75% (图 6B)。

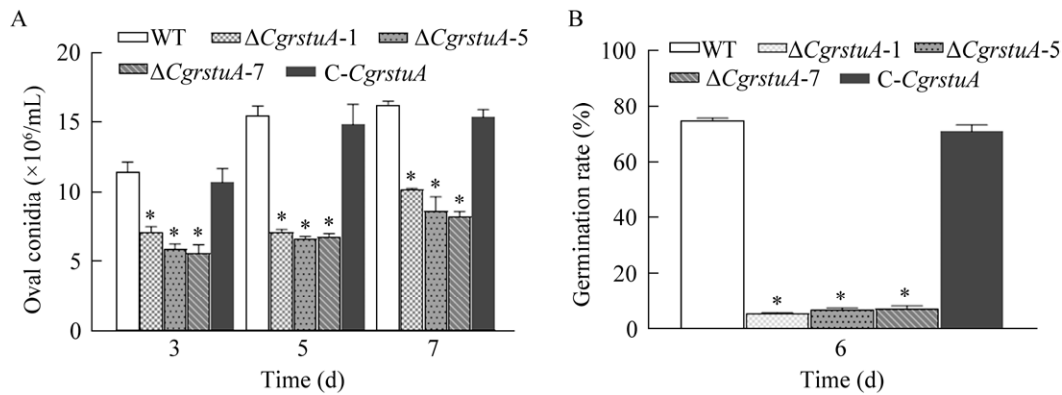


图 6 野生型、 $\Delta CgrstuA$  及 *C-CgrstuA* 卵圆形孢子的产量(A)及萌发(B)

Figure 6 Oval conidial yield (A) and conidial germination (B) of the WT,  $\Delta CgrstuA$  and *C-CgrstuA*. \*:  $P < 0.05$ .

## 2.6 *CgrStuA* 参与调控禾谷炭疽菌镰刀形孢子的产量

通过统计各菌株在 OMA 培养基上镰刀形孢子产量, 发现突变株  $\Delta CgrstuA$  镰刀形孢子的产量也显著下降(图 7)。与野生型菌株一样, 尽管突变株镰刀形孢子的产量减少, 但萌发正常, 能产生芽管、形成褐化的附着胞。综上所述, *CgrStuA* 也参与调控禾谷炭疽菌镰刀形孢子的产生。

## 2.7 *CgrStuA* 对禾谷炭疽菌附着枝形成的影响

附着枝是一些病原真菌的菌丝末端形成的重要结构, 它们能够穿透植物表皮并进一步侵入宿主组织。在显微镜下观察 1、2 和 3 d 不同菌株在盖玻片上的生长状态, 由图 8 可以发现,

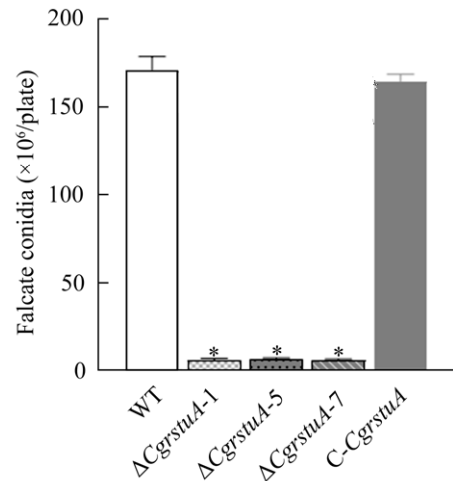


图 7 野生型、 $\Delta CgrstuA$  及 *C-CgrstuA* 在 OMA 培养基中镰刀形孢子的产量

Figure 7 Falcate conidial yield of the WT,  $\Delta CgrstuA$  and *C-CgrstuA* on OMA medium. \*:  $P < 0.05$ .



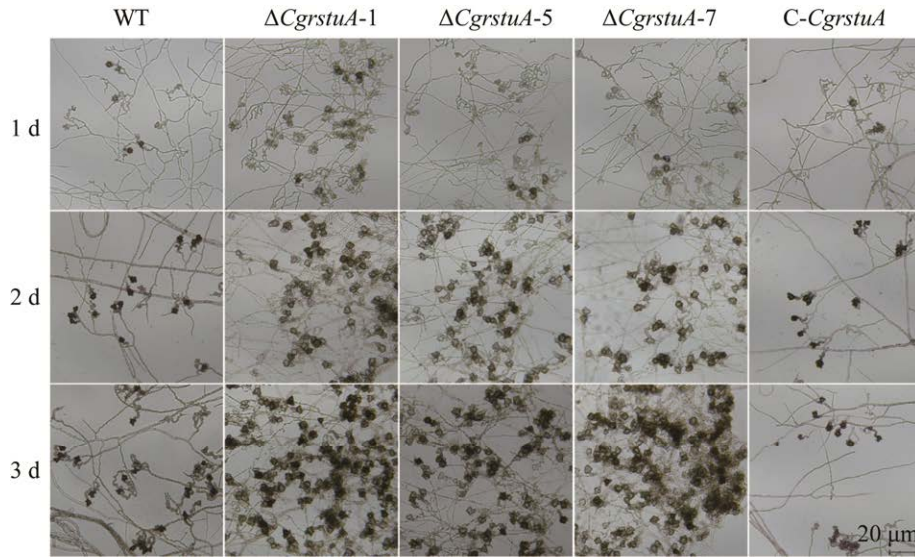


图 8 野生型、 $\Delta CgrstuA$  及  $C-CgrstuA$  的附着枝形成情况  
Figure 8 Hyphopodium formation of the WT,  $\Delta CgrstuA$  and  $C-CgrstuA$ .

突变体的附着枝数量较野生型和互补菌株显著增加，由此推测  $CgrStuA$  调控附着枝的产生。

2.8  $CgrStuA$  不参与调控致病性

由图 9 可知，在有伤玉米叶片上，突变体

菌饼能形成病斑且病斑直径大于野生型，这可能跟突变体附着枝的增加有关。采用孢子悬液接种时，突变体与野生型所形成的病斑大小无显著差异。

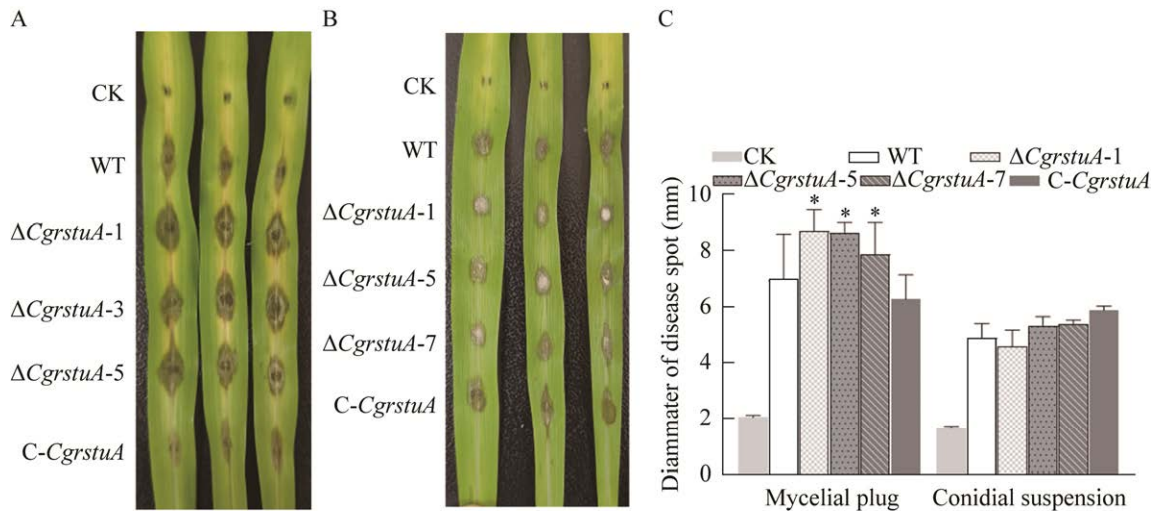


图 9 野生型、 $\Delta CgrstuA$  及  $C-CgrstuA$  的致病性分析 A: 菌饼接种. B: 孢子悬液接种. C: 病斑大小统计图(\*:  $P < 0.05$ )

Figure 9 Pathogenicity analyses of the WT,  $\Delta CgrstuA$  and  $C-CgrstuA$ . A: Mycelial plug inoculation. B: Conidial suspension inoculation. C: Histogram of lesion size (\*:  $P < 0.05$ ).

### 3 讨论

本研究从禾谷炭疽菌中鉴定了一个 APSES 型转录因子 CgrStuA, 含有 KilA-N 结构域。表型分析发现: 突变菌株  $\Delta CgrstuA$  在营养培养基上生长缓慢, 尤其是在 MM 培养基上, 菌丝直径仅为野生型的 42.7%。同时菌落形态也发生改变, 菌落呈现灰绿色。在构巢曲霉<sup>[12]</sup>和稻瘟病菌<sup>[17]</sup>中其 *stuA* 敲除突变体生长也明显慢于野生型菌株。在苹果炭疽菌<sup>[18]</sup>中,  $\Delta GcstuA$  突变体径向生长不变, 但气生菌丝发育不良。在红色毛癣菌中, 野生型菌株菌落蓬松, 同时在 MEA、SAB 和 PDA 培养基上能产生较多的红棕色色素, 而 *stuA* 敲除突变菌株菌落不蓬松, 且不能产生红棕色的色素<sup>[19]</sup>。

CgrStuA 参与调控禾谷炭疽菌的两种类型的孢子形态。在烟曲霉中,  $\Delta AfstuA$  突变株的分生孢子数量大幅度减少且突变菌株的分生孢子的大小约为野生型分生孢子的 2 倍; 进一步进行全基因组转录分析, 发现 AfStuA 调控烟曲霉形态发生相关基因的表达<sup>[15]</sup>。

CgrStuA 参与调控禾谷炭疽菌卵圆形孢子的产量和萌发。在粗糙脉孢菌中, StuA 的同源蛋白 Asm-1 参与无性和有性孢子的产生, 其敲除突变株的分生孢子萌发也异常缓慢, 至少比野生型晚 12 h<sup>[20]</sup>。将粗糙脉孢菌的 *Asm-1* 转入到  $\Delta AnstuA$  敲除突变株中, 能够恢复其产孢, 这说明 StuA 转录因子的功能具有较高的保守性<sup>[21]</sup>。在禾谷镰刀菌中, 也发现  $\Delta FgstuA$  突变菌株的孢子萌发速率减缓, 较野生型晚 4 h 左右<sup>[22]</sup>。

禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)<sup>[22]</sup>、颖枯壳针孢(*Stagonospora nodorum*)<sup>[23]</sup>、玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)<sup>[13]</sup>中 *stuA* 突变体的致病性明显减弱。在本研究中, 采用菌饼接种,  $\Delta CgrstuA$  突变株形成的病斑直径大于野生型, 推测是由

于突变株的附着枝显著增多而引起的。附着枝是一些病原真菌中的重要结构, 它们能够穿透植物表皮并侵入宿主组织, 绝大多数炭疽菌物种可以形成附着枝<sup>[24]</sup>, 如胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)、尖孢炭疽菌(*Colletotrichum acutatum*)<sup>[25]</sup>和草莓炭疽菌(*Colletotrichum fragariae*)<sup>[26]</sup>等。在大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)中, 缺失 MAPK 各级联复合物编码基因 *VdKss1*、*VdSte7* 和 *VdSte11* 均显著降低大丽轮枝菌的附着枝形成和致病能力<sup>[27]</sup>。但采用镰刀形孢子悬液接种时, 野生型和  $\Delta CgrstuA$  突变菌株之间无显著差异, 这是由于突变菌株镰刀形孢子萌发正常且能形成附着胞。

综上所述, StuA 在不同真菌中都起着重要的调控作用, 并且其功能在不同物种中具有较高的保守性。在禾谷炭疽菌中, APSES 型转录因子 StuA 参与调控菌丝生长、分生孢子的产生、萌发及附着枝的产生。这为进一步理解 StuA 在真菌生命周期中的作用提供了重要线索, 并可能为炭疽病病害的防治及特异性靶标药物的开发奠定理论基础。

### 4 结论

APSES 型转录因子 CgrStuA 参与禾谷炭疽菌的营养生长, 分生孢子产生、萌发, 以及附着枝形成的调控, 但不影响致病性。

### REFERENCES

- [1] BERGSTROM GC, NICHOLSON RL. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management[J]. Plant Disease, 1999, 83(7): 596-608.
- [2] PANACCIONE DG, VAILLANCOURT LJ, HANAU RM. Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*[J]. Mycologia, 1989, 81(6): 876-883.
- [3] NICHOLSON RL, MORAES WBC. Survival of *Colletotrichum graminicola*: importance of the spore matrix[J]. Phytopathology, 1980, 70(3): 255.

- [4] VARGAS WA, SANZ MARTÍN JM, RECH GE, RIVERA LP, BENITO EP, DÍAZ-MÍNGUEZ JM, THON MR, SUKNO SA. Plant defense mechanisms are activated during biotrophic and necrotrophic development of *Colletotrichum graminicola* in maize[J]. *Plant Physiology*, 2012, 158(3): 1342-1358.
- [5] SHELEST E. Transcription factors in fungi[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2008, 286(2): 145-151.
- [6] ZHAO Y, SU H, ZHOU J, FENG HH, ZHANG KQ, YANG JK. The APSES family proteins in fungi: characterizations, evolution and functions[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2015, 81: 271-280.
- [7] IYER LM, KOONIN EV, ARAVIND L. Extensive domain shuffling in transcription regulators of DNA viruses and implications for the origin of fungal APSES transcription factors[J]. *Genome Biology*, 2002, 3(3): RESEARCH0012.
- [8] BITENCOURT TA, NEVES-da-ROCHA J, MARTINS MP, SANCHES PR, LANG EAS, BORTOLOSSI JC, ROSSI A, MARTINEZ-ROSSI NM. StuA-regulated processes in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*: transcription profile, cell-cell adhesion, and immunomodulation[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 643659.
- [9] GIMENO CJ, FINK GR. Induction of pseudohyphal growth by overexpression of *PHD1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene related to transcriptional regulators of fungal development[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(3): 2100-2112.
- [10] WARD MP, GIMENO CJ, FINK GR, GARRETT S. SOK<sub>2</sub> may regulate cyclic AMP-dependent protein kinase-stimulated growth and pseudohyphal development by repressing transcription[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1995, 15(12): 6854-6863.
- [11] DOEDT T, KRISHNAMURTHY S, BOCKMÜHL DP, TEBARTH B, STEMPEL C, RUSSELL CL, BROWN AJP, ERNST JF. APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans*[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, 15(7): 3167-3180.
- [12] MILLER KY, WU J, MILLER BL. StuA is required for cell pattern formation in *Aspergillus*[J]. *Genes & Development*, 1992, 6(9): 1770-1782.
- [13] GARCÍA-PEDRAJAS MD, BAEZA-MONTAÑEZ L, GOLD SE. Regulation of *Ustilago maydis* dimorphism, sporulation, and pathogenic development by a transcription factor with a highly conserved APSES domain[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2010, 23(2): 211-222.
- [14] LI YN, HU YY, ZHAO KL, PAN YJ, QU YB, ZHAO J, QIN YQ. The indispensable role of histone methyltransferase *PoDot1* in extracellular glycoside hydrolase biosynthesis of *Penicillium oxalicum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2566.
- [15] SHEPPARD DC, DOEDT T, CHIANG LY, STANLEY KIM H, CHEN D, NIERMAN WC, FILLER SG. The *Aspergillus fumigatus* StuA protein governs the up-regulation of a discrete transcriptional program during the acquisition of developmental competence[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(12): 5866-5879.
- [16] 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).
- [17] NISHIMURA M, FUKADA J, MORIWAKI A, FUJIKAWA T, OHASHI M, HIBI T, HAYASHI N. Mstu1, an APSES transcription factor, is required for appressorium-mediated infection in *Magnaporthe grisea*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2009, 73(8): 1779-1786.
- [18] TONG XZ, ZHANG XW, PLUMMER KM, STOWELL KM, SULLIVAN PA, FARLEY PC. GcSTUA, an APSES transcription factor, is required for generation of appressorial turgor pressure and full pathogenicity of *Glomerella cingulata*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2007, 20(9): 1102-1111.
- [19] LANG EAS, BITENCOURT TA, PERES NTA, LOPES L, SILVA LG, CAZZANIGA RA, ROSSI A, MARTINEZ-ROSSI NM. The *stuA* gene controls development, adaptation, stress tolerance, and virulence of the dermatophyte *Trichophyton rubrum*[J]. *Microbiological Research*, 2020, 241: 126592.
- [20] ARAMAYO R, PELEG Y, ADDISON R, METZENBERG R. *Asm-1+*, a *Neurospora crassa* gene related to transcriptional regulators of fungal development[J]. *Genetics*, 1996, 144(3): 991-1003.
- [21] CHUNG D, UPADHYAY S, BOMER B, WILKINSON HH, EBBOLE DJ, SHAW BD. *Neurospora crassa* ASM-1 complements the conidiation defect in a *stuA* mutant of *Aspergillus nidulans*[J]. *Mycologia*, 2015,

- 107(2): 298-306.
- [22] LYSØE E, PASQUALI M, BREAKSPEAR A, KISTLER HC. The transcription factor FgStuAp influences spore development, pathogenicity, and secondary metabolism in *Fusarium graminearum*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2011, 24(1): 54-67.
- [23] IPCHO SVS, TAN KC, KOH G, GUMMER J, OLIVER RP, TRENGOVE RD, SOLOMON PS. The transcription factor StuA regulates central carbon metabolism, mycotoxin production, and effector gene expression in the wheat pathogen *Stagonospora nodorum*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2010, 9(7): 1100-1108.
- [24] de OLIVEIRA SILVA A, ALIYEVA-SCHNORR L, WIRSEL SGR, DEISING HB. Fungal pathogenesis-related cell wall biogenesis, with emphasis on the maize anthracnose fungus *Colletotrichum graminicola*[J]. *Plants*, 2022, 11(7): 849.
- [25] 林春花, 牟保辉, 刘文波, 缪卫国, 郑服丛. 疏水表面诱导橡胶树炭疽菌侵染结构的发育分化过程[J]. *植物保护学报*, 2018, 45(3): 470-477.
- LIN CH, MOU BH, LIU WB, MIAO WG, ZHENG FC. Development and differentiation of infection structures of *Colletotrichum* spp. from the rubber tree *Hevea brasiliensis* on hydrophobic surfaces[J]. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45(3): 470-477 (in Chinese).
- [26] 赵玳琳, 卯婷婷, 赵兴丽, 刘杏忠, 蔡磊, 陶刚. 草莓炭疽菌初期侵染过程显微观察[J]. *南方农业学报*, 2016, 47(7): 1140-1145.
- ZHAO DL, MAO TT, ZHAO XL, LIU XZ, CAI L, TAO G. Microscopic observation of early infection of *Colletotrichum fragariae* on strawberry leaves[J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2016, 47(7): 1140-1145 (in Chinese).
- [27] 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.