

# 胶孢炭疽菌 C2H2 型转录因子 CgGcp1 的生物学功能

张兴媛<sup>1</sup>, 王地广<sup>1</sup>, 高菁<sup>1</sup>, 唐雯<sup>1,2</sup>, 李晓宇<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

张兴媛, 王地广, 高菁, 唐雯, 李晓宇. 胶孢炭疽菌 C2H2 型转录因子 CgGcp1 的生物学功能[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2587-2598

Zhang Xingyuan, Wang Diguang, Gao Jing, Tang Wen, Li Xiaoyu. Biological functions of a C2H2 transcription factor CgGcp1 in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2587-2598

**摘要:**【背景】胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)可以寄生于多种植物, 侵染方式多样, 能够引起严重的农业危害。在胶孢炭疽菌中, CgGcp1 是一个 C2H2 型的转录因子, 关于其生物学功能的研究未见报道。【目的】明确 CgGcp1 的生物学功能, 为深入解析该病菌的致病机制奠定一定的理论依据。【方法】构建 CgGCP1 基因的敲除载体, 利用同源重组得到敲除突变体。通过表型分析, 包括营养生长、胁迫响应、孢子产生、附着胞形成及致病性分析等, 明确该基因的生物学功能。【结果】CgGCP1 基因敲除突变体生长速率较野生型减慢, 对 SDS、刚果红、NaCl 和甘油更加敏感, 孢子产量显著降低, 附着胞的形成率降低且侵入能力减弱, 在橡胶叶片上的致病力明显下降。【结论】CgGcp1 参与调控胶孢炭疽菌营养生长、细胞壁完整性、分生孢子产生、附着胞形成与侵入和致病性。

**关键词:** 胶孢炭疽菌; C2H2 型转录因子; 营养生长; 分生孢子; 致病性

## Biological functions of a C2H2 transcription factor CgGcp1 in *Colletotrichum gloeosporioides*

ZHANG Xingyuan<sup>1</sup>, WANG Diguang<sup>1</sup>, GAO Jing<sup>1</sup>, TANG Wen<sup>1,2</sup>, LI Xiaoyu<sup>\*1,2</sup>

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

2 One Health Institute, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

**Abstract:** [Background] *Colletotrichum gloeosporioides*, featuring a wide range of hosts and diverse infection methods, causes serious agricultural disasters. The biological functions of CgGcp1 in

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: lixiaoyu@hainanu.edu.cn

Received: 2021-11-01; Accepted: 2022-01-19; Published online: 2022-02-08

*C. gloeosporioides*, a C2H2 transcription factor, have not been reported. **[Objective]** This study aims to clarify the biological functions of CgGcp1, which is expected to lay a theoretical basis for clarifying the pathogenic mechanism of the fungus. **[Methods]** The *CgGCPI*-knockout vector was constructed and the knockout mutant was yielded by homologous recombination. The biological functions of *CgGCPI* were identified by pathogenicity analysis and phenotypic analysis, such as the vegetative growth, stress response, conidium production, and appressorium formation. **[Results]** The growth rate of the *CgGCPI*-knockout mutant was lower than that of the wild type, and the mutant was more sensitive to SDS, Congo red, NaCl, and glycerol. The conidium yield, appressorium formation rate, and invasion ability were obviously decreased, and its virulence to rubber leaves was also lowered significantly. **[Conclusion]** CgGcp1 regulates the vegetative growth, cell wall integrity, conidium production, appressorium formation and invasion, and pathogenicity of *C. gloeosporioides*.

**Keywords:** *Colletotrichum gloeosporioides*; C2H2 transcription factor; vegetative growth; conidium; pathogenicity

橡胶是我国重要的战略物资,而橡胶炭疽病是影响橡胶树产胶量的主要原因之一,该病主要是由胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)引起。除了侵染橡胶树,胶孢炭疽菌也可以侵染许多植物,像芒果、西瓜、香蕉、柱花草、核桃和杨树等<sup>[1]</sup>。胶孢炭疽菌分布广泛、寄主众多,不同的寄主侵染方式不同,因此防治也较为困难<sup>[2]</sup>。研究胶孢炭疽菌相关基因在生长发育和致病过程中的生物学功能,有助于深入了解该病菌的分子致病机制,进而为其防治奠定理论基础。

转录因子(transcription factor, TF)是能与基因启动子区域中顺式作用元件特异性相互作用,从而调控目的基因的表达强度,并在特定的时间与空间表达的蛋白质分子<sup>[3-4]</sup>。根据 DNA 结合域的空间结构特征主要分为 4 大类: 锌指蛋白、碱性亮氨酸拉链、碱性螺旋环螺旋和同源异形盒类转录因子<sup>[5]</sup>。锌指蛋白家族又分为 3 类: C2H2、C4 和 C6 等,其中 C2H2 型的成员居多<sup>[6-8]</sup>。在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中,约有 0.8%的基因编码 C2H2 型转录因子,参与调控酿酒酵母的生长、发育和应

激反应等生理过程。在稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)中,已经鉴定出 47 个 C2H2 型转录因子,分别参与稻瘟病菌的生长(20 个)、分生孢子的产生(28 个)、附着胞形成(4 个)和致病性(22 个)等过程<sup>[9]</sup>。在小麦赤霉病菌(*Fusarium graminearum*)中,鉴定出 91 个 C2H2 型转录因子,其中 16 个与毒力相关<sup>[10]</sup>。这些结果都充分表明 C2H2 型转录因子在调控真菌的生长发育和侵染等方面起着重要的作用。

在前期的研究中,从胶孢炭疽菌中鉴定了一个 C2H2 型转录因子,经比对发现,其与稻瘟病菌中的 MoGcp1<sup>[9]</sup>具有同源性,因此将其编号为 CgGcp1。本研究通过同源重组的方法得到敲除突变体  $\Delta CgGCPI$ ,并进行表型分析,明确其生物学功能,为深入研究其侵染机制奠定一定的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 真菌菌株及培养条件

本研究所用的胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)野生型菌株(WT)由本实验室保存,野生型菌株

及其衍生的突变体在 PDA 培养基上 28 °C 培养 5 d 后 4 °C 保存。

### 1.1.2 主要试剂与培养基

凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒, 南京诺唯赞生物科技有限公司; 所用的限制性内切酶 *Pst* I、*Eco*R I 和 *Xba* I, 北京宝日医生物技术有限公司; 引物的合成和测序分别交由上海英骏生物技术有限公司和铂尚生物技术(上海)有限公司完成。

LB、DCM、TB<sub>3</sub>、PDA、CM、MM、CZAPEK 等, 具体配方均参照文献[11]。

## 1.2 方法

### 1.2.1 CgGcp1 生物信息学分析

参考 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 胶孢炭疽菌基因组数据库(参考基因 ID: CGLO\_05044)设计引物 CgGCP1F/CgGCP1R (表 1), 利用 PCR 扩增 *CgGCP1* 基因序列, 利用 SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对 CgGcp1 的蛋白结构域进行分析。通过 BLAST 比对得到 CgGcp1 在不同真菌的同源蛋白序列, 通过 Clustalo (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>)构建蛋白质序列比对图。

### 1.2.2 CgGCP1 突变体获得与鉴定

基因敲除原理如图 1 所示。以胶孢炭疽菌野生型基因组为模板, 用引物 CgGCP1UF 和 CgGCP1UR、CgGCP1DF 和 CgGCP1DR (表 1) PCR 扩增上、下游各 1 000 bp 的片段。把纯化后的上、下游片段连接到载体 pCB1532 上, 经测序无误后得到敲除载体 pKno-CgGCP1。将 pKno-CgGCP1 用 *Pst* I 酶切线性化后进行原生质体转化, 提取转化子的基因组, 通过 3 对引物 CgGCP1F+R、CgGCP1UU+PI、CgGCP1DD+PII (表 1)进行 PCR 验证, 引物的设计位点如图 1 所示, 用引物 CgGCP1F+CgGCP1R 无法得到目的条带, 同时, 用引物 CgGCP1UU+PI、CgGCP1DD+PII 这 2 对引物 PCR 可以得到目的条带的转化子, 初步认为是敲除突变体。

### 1.2.3 C-CgGCP1 互补株的获得

以胶孢炭疽菌野生型基因组为模板, 用 CgGCP1hbF+CgGCP1hbR 引物扩增 *CgGCP1* 基因片段。将互补片段构建到带有潮霉素磷酸转移酶基因的载体(pUC18-HPT)上, 得到 pComp-CgGCP1 (互补载体)。经原生质体转化的方法得到转化子, 并将转化子转接于含有

表 1 引物名称和序列

Table 1 Primer name and sequence

Primer	Primers sequence (5'→3')
CgGCP1UF	AACTGCAGTGGTCCGGTGAACGAACTCTATG
CgGCP1UR	CGGAATTCATCCCGGTGGCTGGGAAAGCTAC
CgGCP1F	TCCCACGTCCGCTTCATCAACAC
CgGCP1R	ACAGCCCTCATCTTCCACCCACT
CgGCP1DF	GCTCTAGACGGGAATCGGAGTTGTTTCATACC
CgGCP1DR	AACTGCAGCCTTTGTCAACCAAGCGACAGAC
CgGCP1UU	TGCTGCTGGTCCATGGTGTCTGATC
PI	CAGGGTTTTCCCAGTCACGACGTTG
PII	GTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
CgGCP1DD	AGGTCCATGTCGCTGTGCGATTAC
CgGCP1hbF	CGGAATTCGTCTGCCTTCTGCTCTGGTGGT
CgGCP1hbR	GCTCTAGAGCGTGGTTTTGCCAATGAGGA

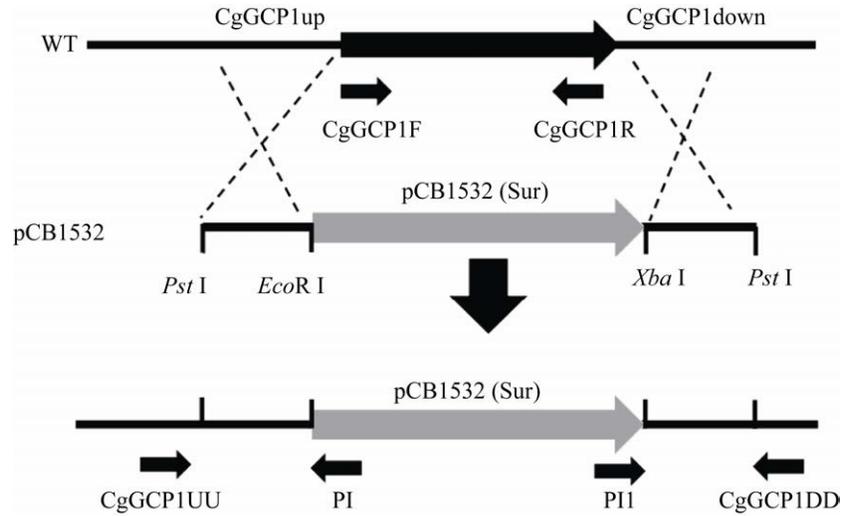


图 1 *CgGCP1* 基因的同源重组原理

Figure 1 Homologous recombination principle of the gene *CgGCP1*.

100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  潮霉素的 PDA 培养基上, 提取其基因组, 用 *CgGCP1F*+*CgGCP1R* 引物进行验证, 能扩增出目的基因片段的转化子初步确定为互补株。

### 1.3 表型分析

#### 1.3.1 野生型、突变株和互补株在不同培养基上生长的比较

在 PDA 平板上, 将菌株 WT、 $\Delta CgGCP1$  和 *C-CgGCP1* 培养 5 d, 用打孔器 ( $d=5\text{ mm}$ ) 在菌落边缘打孔, 将菌饼分别接种于 PDA、CM、CZAPEK 和 MM 培养基上, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 5 d, 测量菌落直径。

配制分别含有 SDS (0.01%) 和刚果红 (200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 MM 培养基, 用于检测敲除突变体的细胞壁完整性; 同时配置分别含有 NaCl (0.8 mol/L) 和甘油 (0.8 mol/L) 的 MM 培养基, 用于检测敲除突变株对渗透压的敏感性。将各菌株分别接种到不同胁迫因子培养基上, 28  $^{\circ}\text{C}$  培养 5 d, 测量菌落直径并计算抑制率。

#### 1.3.2 分生孢子的产生、萌发及附着胞的形成

分别将不同菌株的菌饼接种于 PDB 培养基

中, 28  $^{\circ}\text{C}$ 、150 r/min 培养 2 d, 利用 Mira cloth 过滤除掉菌丝, 取滤液 1 mL, 12 000 r/min 离心 2 min, 弃掉上清液, 用无菌水重悬, 重复 3 次, 利用血球计数板统计分生孢子数量。取 20  $\mu\text{L}$  孢子悬液 ( $5\times 10^5\text{ CFU}/\text{mL}$ ) 滴于载玻片上, 28  $^{\circ}\text{C}$  保湿培养, 分别于 4、8、12 h 后统计分生孢子萌发率和附着胞形成率。

#### 1.3.3 玻璃纸和洋葱表皮的穿透实验

选用新鲜洋葱的内表皮细胞, 用无菌水冲洗 3 次, 平铺在载玻片上, 取 20  $\mu\text{L}$  孢子悬液 ( $5\times 10^5\text{ CFU}/\text{mL}$ ) 滴于洋葱表皮上, 28  $^{\circ}\text{C}$  保湿, 分别培养 8 h 和 12 h, 观察附着胞及侵染结构的形成; 在 PDA 培养基上铺玻璃纸, 取 20  $\mu\text{L}$  孢子悬液 ( $5\times 10^5\text{ CFU}/\text{mL}$ ) 滴在玻璃纸上。28  $^{\circ}\text{C}$  条件下分别培养 2 d 和 3 d 后, 揭去玻璃纸再培养 1 d 后, 测量菌落直径。

#### 1.3.4 致病性分析

将野生型菌株、敲除突变株和互补株的孢子悬液 ( $5\times 10^5\text{ CFU}/\text{mL}$ ) 接种于离体橡胶叶片表面, 28  $^{\circ}\text{C}$  保湿, 5 d 后观察发病情况, 并测量病斑直径。

1.3.5 数据处理

每组试验重复 3 次, 采用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件单因素 ANOVA 检验进行数据统计分析( $P < 0.05$ ), 利用 GraphPad Prism 6.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 CgGcp1 系统发育分析

CgGCP1 基因 ORF 框全长 2 418 bp, 编码 805 aa 的蛋白质, 含有 2 个 C2H2 型锌指

蛋白, 位于 12–272 aa 处(图 2A)。通过 NCBI 中 BLASTp 工具进行比对, 选取 *Neonectria ditissima* (KPM46283.1)、*Pyricularia oryzae* (XP\_003718706.1) 和 *Fusarium graminearum* (XP\_011323930.1) 3 种 CgGcp1 的同源蛋白进行蛋白序列比对, 结果发现 CgGcp1 与其同源蛋白具有较高的同源性, 相似度在 80%以上(图 2B)。

2.2 CgGCP1 基因敲除和互补

构建 CgGCP1 基因的敲除载体, 转化野

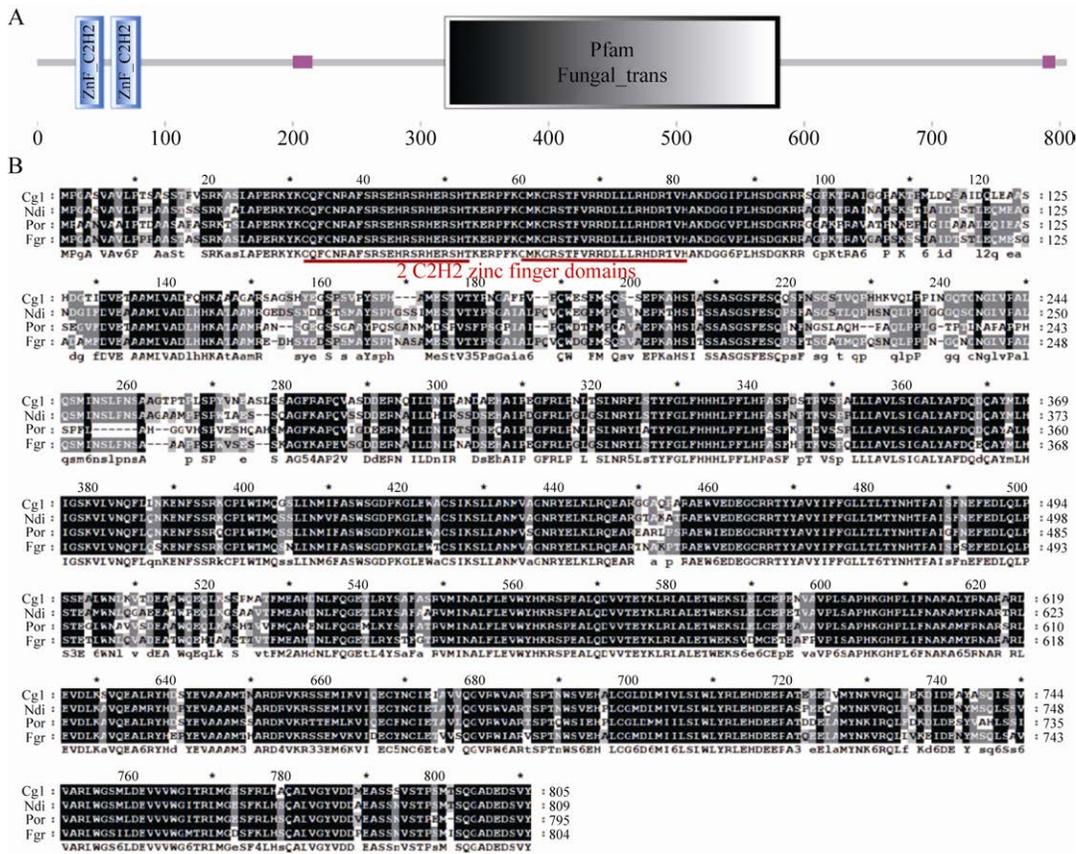


图 2 CgGCP1 蛋白结构域和多序列比对 A: CgGcp1 蛋白结构域分析; B: CgGcp1 及其同源蛋白序列比对。Cgl: *Colletotrichum gloeosporioides* (CgGcp1); Ndi: *Neonectria ditissima* (KPM46283.1); Por: *Pyricularia oryzae* (XP\_003718706.1); Fgr: *Fusarium graminearum* (XP\_011323930.1)

Figure 2 CgGcp1 protein domain and molecular evolutionary tree. A: Protein domain analysis of CgGcp1; B: Protein sequence alignment of CgGcp1 and its homologous protein. Cgl: *Colletotrichum gloeosporioides* (CgGcp1); Ndi: *Neonectria ditissima* (KPM46283.1); Por: *Pyricularia oryzae* (XP\_003718706.1); Fgr: *Fusarium graminearum* (XP\_011323930.1).

生型菌株制备的原生质体。分别提取转化子的基因组 DNA, 用 3 对引物 CgGCP1F+R、CgGCP1UU+PI、CgGCP1DD+PII 进行 PCR 验证。结果如图 3 所示, 其中 7 号和 8 号转化子用引物 CgGCP1F+CgGCP1R 无法得到目的条带, 同时, 用引物 CgGCP1UU+PI、CgGCP1DD+PII 可以得到目的条带, 初步确定 7 号和 8 号转化子为敲除突变体, 编号为  $\Delta$ CgGCP1-7 和  $\Delta$ CgGCP1-8 (图 3A-C)。

构建 pComp-CgGCP1 并将其转入到敲除突变体的原生质体中, 提取转化子的基因组 DNA, 用引物 CgGCP1F+CgGCP1R 进行扩增, 其中 27 号能够扩增出目的片段, 初步确定为互补转化子, 编号为 C-CgGCP1 (图 3A)。

### 2.3 营养生长

在不同的培养基上,  $\Delta$ CgGCP1 生长速度相比于 WT 明显减慢。如图 4 所示, 在 PDA 培养基上, 2 株敲除突变体的菌落直径分别为 6.2 cm 和 6.3 cm, 而野生型的菌落直径为 6.9 cm, 差异显著; 在 CM 培养基上, 敲除突变株的菌落直径分别为 5.7 cm 和 5.8 cm, 也显著小于野生型 WT。同样, 在 MM 和 CZAPEK 培养基上,

突变体的生长速度也明显小于野生型, 而且气生菌丝非常稀少。由此可见, CgGcp1 参与胶孢炭疽菌的营养生长。

### 2.4 胁迫响应

在含有刚果红(200  $\mu$ g/mL)和 0.01% SDS 的胁迫培养基上,  $\Delta$ CgGCP1 的生长速度明显低于 WT, 如图 5A、5B 所示, 刚果红对 2 个突变体的抑制率分别为 45.6%和 45.4%, 而对野生型的抑制率为 13.1%; SDS 对 2 个突变体的抑制率分别为 50.3%和 46.4%, 对野生型的抑制率为 31.7%。由此推测 CgGcp1 参与调控胶孢炭疽菌细胞壁的完整性。

在含有 0.8 mol/L NaCl 培养基上,  $\Delta$ CgGCP1 的生长也明显受到影响, NaCl 对其抑制率显著高于野生型, 如图 5C、5D 所示, NaCl 对 2 株突变体的抑制率分别为 59.8%和 57.7%, 而对野生型的抑制率为 43.0%。在含有 0.8 mol/L 甘油的培养基上, 野生型和互补株的生长基本未受到影响, 而甘油对突变体的生长却有一定程度的抑制作用, 抑制率分别为 17.7%和 15.3%, 由此可见, CgGcp1 参与调控胶孢炭疽菌对高渗的响应。

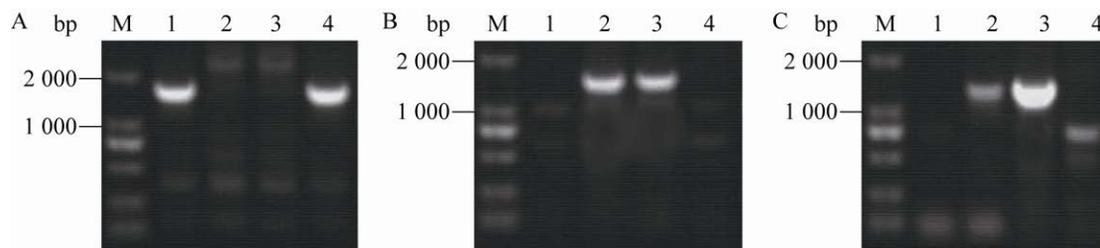


图3 *CgGCP1* 基因的敲除和互补验证 A: 引物 CgGCP1F/CgGCP1R 扩增结果; B: 引物 CgGCP1UU/PI 扩增结果; C: 引物 CgGCP1DD/PII 扩增结果; M: DL2000 DNA Marker; 1: 野生型; 2:  $\Delta$ CgGCP1-7; 3:  $\Delta$ CgGCP1-8; 4: C-CgGCP1

Figure 3 Gene knockout and complementation verification of *CgGCP1*. A: PCR results using primer CgGCP1F/CgGCP1R; B: PCR results using primer CgGCP1UU/PI; C: PCR results using primer CgGCP1DD/PII; M: DL2000 DNA Marker; 1: Wild type; 2:  $\Delta$ CgGCP1-7; 3:  $\Delta$ CgGCP1-8; 4: C-CgGCP1.

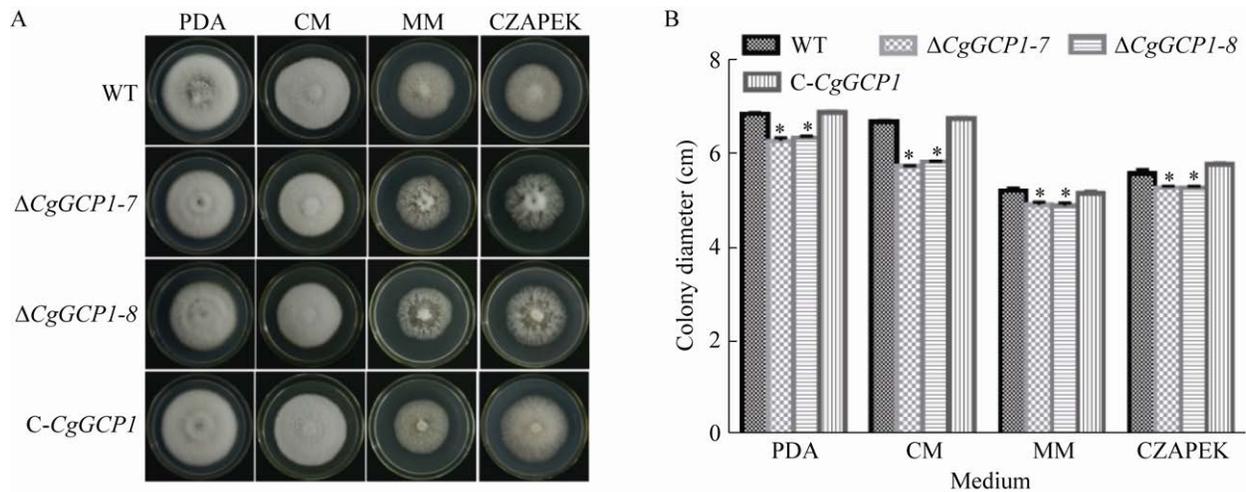


图4 菌株在4种培养基上生长比较 A: 菌株在PDA、CM、MM、CZAPEK培养基上的生长情况; B: 菌落生长直径统计。\*:  $P < 0.05$

Figure 4 Growth comparison of strains on four media. A: Growth of strains on PDA, CM, MM and CZAPEK media; B: Statistics of colony growth diameter. \*:  $P < 0.05$ .

## 2.5 CgGcp1 参与调控分生孢子的产生及附着胞形成

在PDB培养基中分别接种各菌株的菌饼, 28 °C、150 r/min 培养2 d后,  $\Delta CgGCPI$  的分生孢子产量平均为  $5.4 \times 10^5$  CFU/mL, 仅为野生型孢子产量的47.5% (图6A)。进一步的孢子萌发试验发现,  $\Delta CgGCPI$  的附着胞的形成率极低, 在4 h时, 附着胞的形成率仅为5.4%, 而野生型为73.8%; 随着时间的延长, 突变体  $\Delta CgGCPI$  的附着胞形成率略有增加, 在12 h时, 附着胞的形成率为15.1%, 而野生型为80.8%, 突变体的附着胞形成率显著低于野生型 (图6B)。在试验中还发现, 尽管突变体  $\Delta CgGCPI$  也能形成少量的附着胞, 但突变体的附着胞和野生型相比, 极少褐化 (图6C)。由此可见, 在胶孢炭疽菌中 CgGcp1 对于分生孢子及附着胞的形成都非常重要。

## 2.6 CgGcp1 参与调控附着胞侵染结构的分化

敲除突变体的附着胞的形成率极低, 为进

一步了解其附着胞的侵入能力是否受到影响, 将突变体和野生型的孢子悬液滴在铺有玻璃纸的PDA平板上, 培养2 d和3 d后, 发现突变体能够在平板上形成菌落, 但菌落的直径明显小于野生型 (图7A、7B), 推测突变体附着胞的穿透能力较野生型下降。在洋葱表皮细胞上, 突变体  $\Delta CgGCPI$  的孢子能够正常萌发, 但极少能形成附着胞, 洋葱表皮细胞内也未见侵染菌丝。野生型菌株的附着胞在8 h开始分化出侵染结构, 12 h时侵染结构继续发育成侵染菌丝 (图7C)。由此可见, CgGcp1 参与调控胶孢炭疽菌附着胞侵染结构的分化。

## 2.7 CgGcp1 参与调控致病性

将WT、 $\Delta CgGCPI$  及 C-CgGCPI 的孢子悬液 ( $5 \times 10^5$  个/mL) 分别接种到离体的橡胶叶片上。结果发现, 野生型和敲除突变株均能在橡胶叶片上形成病斑, 但突变体形成病斑直径明显小于野生型 (图8)。由此可见, CgGcp1 对于维持胶孢炭疽菌的全毒力是必需的。

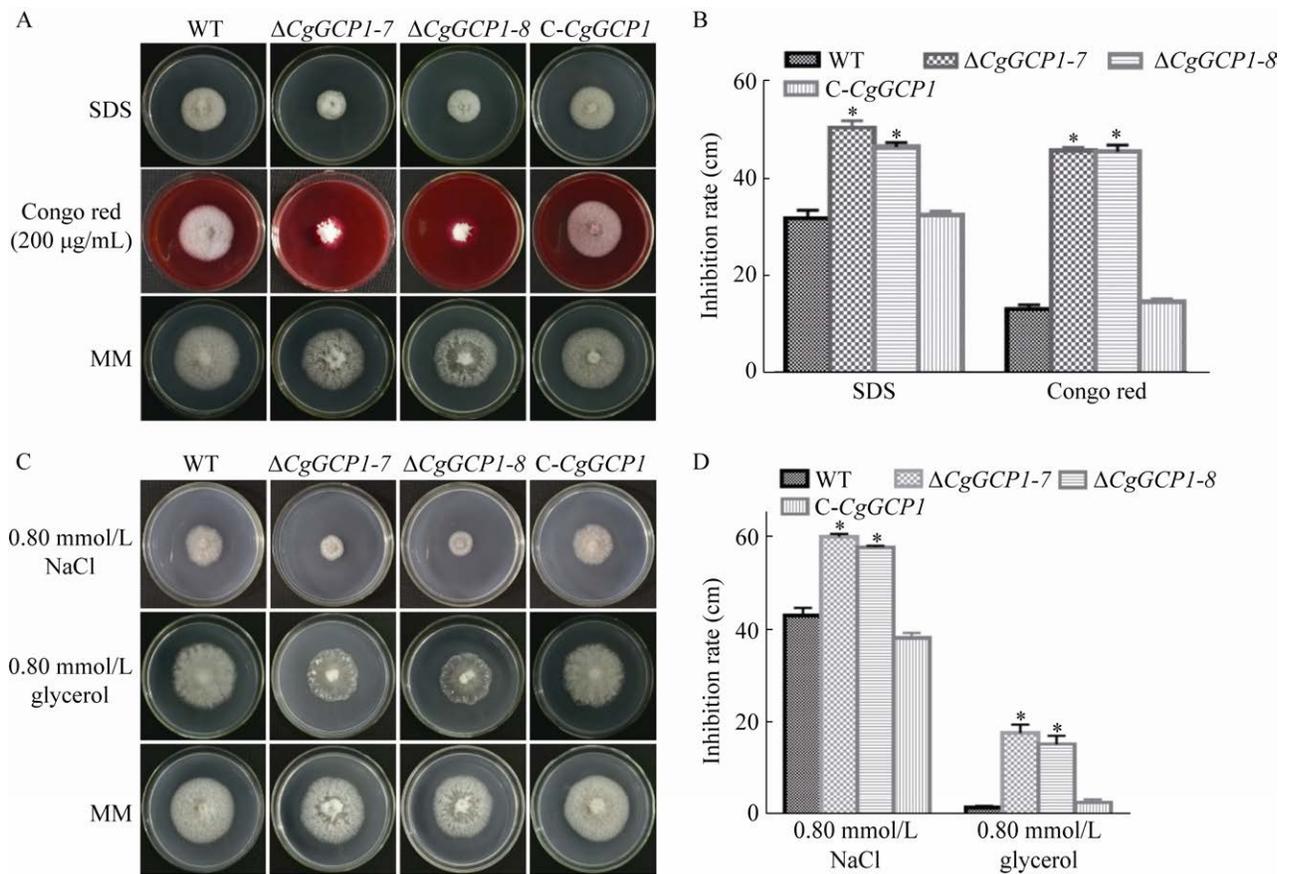


图 5 胁迫因子对菌株生长的影响 A: SDS 和刚果红对菌株生长的影响; B: SDS 和刚果红对菌株生长抑制率统计; C: NaCl 和甘油对菌株生长的影响; D: NaCl 和甘油对菌株生长的抑制率统计; \*代表显著性差异,  $P < 0.05$

Figure 5 Effect of stress factors on the growth of strains. A: The influence of SDS and Congo red on the growth of four strains; B: Statistical analysis of inhibition rates of SDS and Congo against four strains; C: The influence of NaCl and glycerol on the growth of four strains; D: Statistical analysis of inhibition rates of NaCl and glycerol against four strains; \*:  $P < 0.05$  significant difference.

### 3 讨论

C2H2 型转录因子广泛存在于真核生物中, 许多研究表明该类转录因子在调控真菌的生长发育、胁迫应答、分生孢子的产生及萌发和致病性等方面起着重要的作用<sup>[12]</sup>。在胶孢炭疽菌中, *CgGCP1* 编码一个 C2H2 型转录因子, 其突变体  $\Delta CgGCP1$  的生长速率、产孢量及致病性都明显下降。在稻瘟病菌中, *CgGCP1* 的同源基

因为 *MoGCP1*, 敲除突变体  $\Delta MoGCP1$  的生长速率、产孢量和致病性较野生型显著下降: 突变体的生长速率为野生型的 71.0%; 分生孢子的产量是野生型的 9.7%。整体上看, *Gcp1* 在稻瘟病菌和胶孢炭疽菌中的功能比较一致, 主要参与调控营养生长、分生孢子的产生和致病性。通过对 *CgGcp1* 和 *MoGcp1* 蛋白序列的比对, 发现两者的同源性极高, 且与其他丝状真菌的同源性也比较高, 这也许是其生物学功能相对比较保守的重

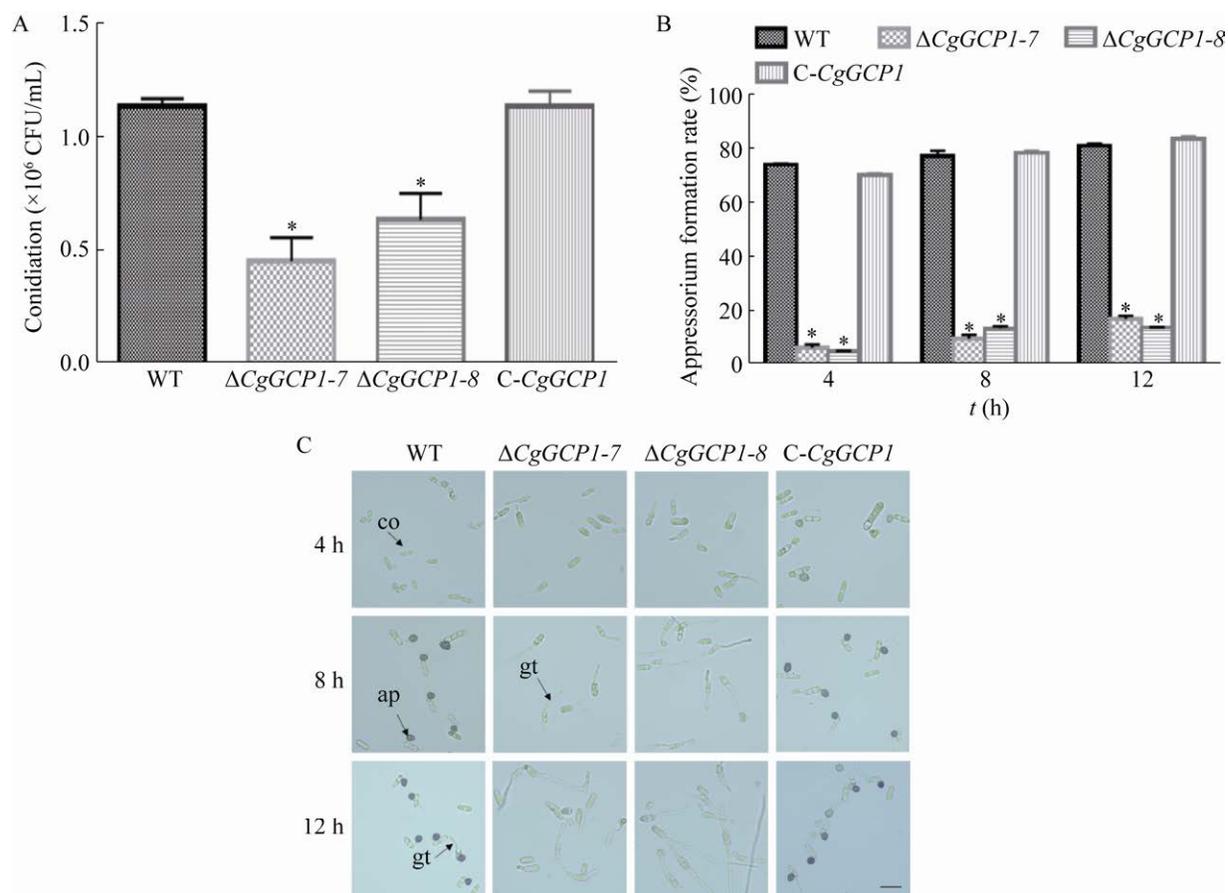


图 6 分生孢子产生、萌发和附着胞形成 A: 分生孢子产量; B: 附着胞形成率; C: 4、8 和 12 h 分生孢子萌发和附着胞形成情况比较。co、gt 和 ap 分别表示分生孢子、芽管和附着胞; \*:  $P < 0.05$

Figure 6 Conidia production, germination and appressorium formation. A: Conidia yield; B: Appressorium formation rate; C: Conidia germination and appressorium formation at 4, 8 and 12 h post-inoculation. Conidium, germ tube and appressorium are expressed as co, gt and ap, respectively; \*:  $P < 0.05$ .

要原因。除了相近的表型外, Gcp1 在 2 种真菌中也有一些不同的表型:  $\Delta MoGCP1$  附着胞的形成率是 95.9%, 比较接近野生型; 但在  $\Delta CgGCP1$  中, 附着胞的形成率却严重降低, 仅为野生型的 18.0%。

在胶孢炭疽菌(*C. gloeosporioides*)中, CgCrzA 是一个 C2H2 型的转录因子, 与野生型菌株相比, 突变体  $\Delta CgCrzA$  的生长速率显著降低, 孢子形态异常, 孢子产量显著减少, 附着胞的形成率和致病性也显著降低<sup>[13]</sup>。CgAzf1 也

是胶孢炭疽菌中的一个 C2H2 型的转录因子, 突变体  $\Delta CgAZF1$  的孢子产量、附着胞的形成率及致病性也较野生型明显下降, 这些表型与  $\Delta CgGCP1$  部分相似<sup>[14]</sup>。在扩展青霉(*Penicillium expansum*)中, BrlA 是一个 C2H2 型的转录因子, 敲除 *brlA* 基因后, 扩展青霉不能形成分生孢子梗和分生孢子<sup>[15]</sup>。构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中的 C2H2 型的转录因子 FlbC 也含有 2 个 C2H2 型结构域, 其敲除突变体  $\Delta flbC$  分生孢子的产量显著减少, 且分生孢子的萌发明显滞后于野

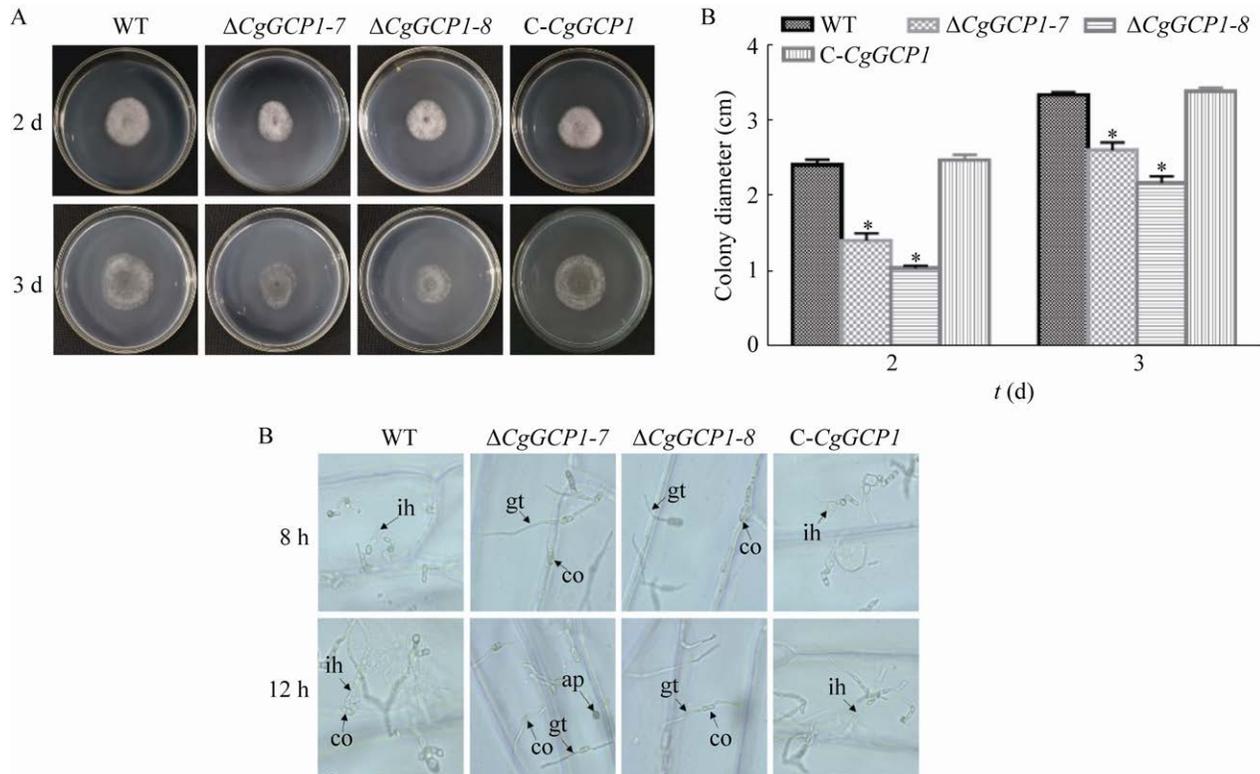


图 7 在洋葱表皮和玻璃纸上的穿透实验 A: 玻璃纸穿透试验; B: 玻璃纸穿透试验中菌落直径统计; C: 洋葱表皮侵染试验。\*:  $P < 0.05$

Figure 7 Infection experiment on onion epidermis and cellophane. A: Cellophane penetration assay; B: Colony diameter statistics in the cellophane penetration assay; C: Onion epidermis infection assay. \*:  $P < 0.05$ .

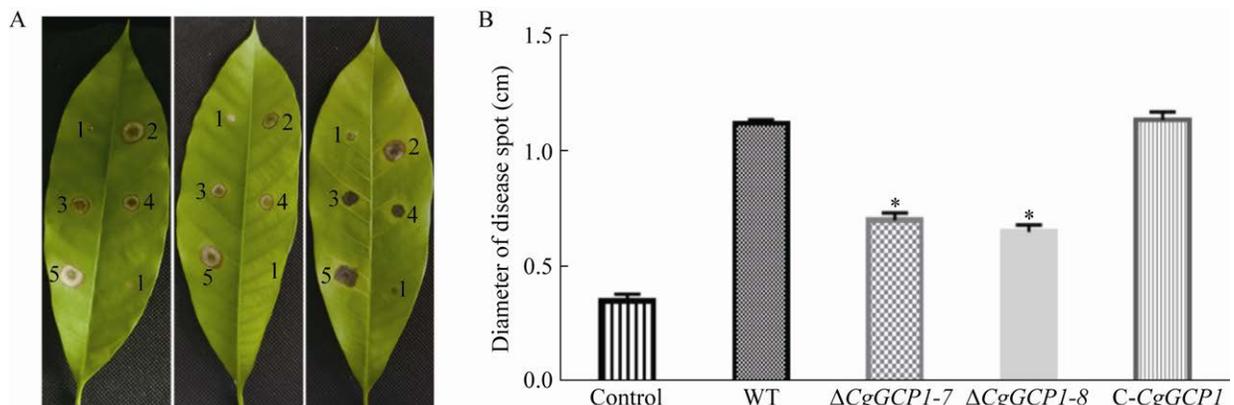


图 8 橡胶叶片毒力测定 A: 接种 5 d 后橡胶叶片发病情况, 1: Control; 2: WT; 3:  $\Delta CgGCP1-7$ ; 4:  $\Delta CgGCP1-8$ ; 5: C-CgGCP1。B: 病斑直径统计; \*:  $P < 0.05$

Figure 8 Virulence assay on rubber leaves. A: Diseases on rubber leaves at 5 d post-inoculation, 1: Control; 2: WT; 3:  $\Delta CgGCP1-7$ ; 4:  $\Delta CgGCP1-8$ ; 5: C-CgGCP1. B: Statistical analysis of spot diameter, \*:  $P < 0.05$ .

生型。RocA 基因同为构巢曲霉中的 C2H2 型的转录因子, 该基因缺失会影响分生孢子的产生, 同时引起有性发育缺陷<sup>[16]</sup>。串珠镰刀菌 (*F. verticillioides*) C2H2 型转录因子 Ada1 与构巢曲霉中 F1bC 具有高度同源性, 敲除 *Ada1* 基因导致分生孢子产量显著降低, 且分生孢子形态异常<sup>[17]</sup>。稻瘟病菌 (*M. oryzae*) 中 ZNF1 中包含 4 个 C2H2 型锌指结构, 其受到 Pmk1-MAPK 途径调控, 参与调控附着胞的形成<sup>[18]</sup>。尖孢镰孢菌 (*F. oxysporum*) 中 FolCzfl 缺失使其生长速率降低, 造成分生孢子形态缺陷, 致病力完全丧失<sup>[4]</sup>。这些研究都表明, C2H2 型的转录因子在丝状真菌的分生孢子产生及萌发过程中起着重要的调控作用<sup>[19]</sup>。

CgGcp1 也参与调控细胞壁的完整性及对高渗的响应: 突变体  $\Delta$ CgGCP1 在含有 SDS、刚果红、NaCl 和甘油的培养基上, 生长受到显著抑制。研究表明, CgCrzA 也参与调控细胞壁的完整性,  $\Delta$ CgcrzA 对刚果红、SDS、CaCl<sub>2</sub> 及 CFW 也非常敏感<sup>[13]</sup>。在禾谷镰孢菌 (*F. graminearum*) 中,  $\Delta$ FgCrz1A 的生长速率显著下降, 并且在含有刚果红和 CFW 胁迫培养基上耐受性显著增强, 敲除突变体对 Na<sup>+</sup>、Li<sup>+</sup>、Mn<sup>2+</sup> 这 3 种阳离子都非常敏感, 其中对 Mn<sup>2+</sup> 极为敏感<sup>[20]</sup>; 此外, C2H2 型转录因子 FgNsfl 敲除突变体对于渗透压、细胞壁和氧化应激相关胁迫因子的耐受性显著增加, 并且对于多菌灵、戊唑菌唑、氟二氧菌腈和异菌酮等不同杀虫剂的耐受性也显著增强<sup>[21]</sup>。SsZfh1 是核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 中的一个 C2H2 型的转录因子, 突变体  $\Delta$ SsZFH1 对高渗非常敏感, 且致病性显著减弱<sup>[22]</sup>。可见, C2H2 型的转录因子在丝状真菌中也参与调控细胞壁完整性及胁迫响应。

综上所述, C2H2 型的转录因子在调控真菌的生长发育、分生孢子的产生、对胁迫的应答

以及致病性等方面起着非常重要的作用。在后续的研究工作中, 将利用 RNA-Seq 技术在转录组水平分析 CgGcp1 所调控的基因, 探讨 CgGcp1 在靶基因上的结合位点, 推测其参与的调控网络, 进一步明确其调控机制。

## 4 结论

CgGcp1 是胶孢炭疽菌中的一个 C2H2 型转录因子, 参与胶孢炭疽菌的生长发育、细胞壁的完整性、分生孢子的产生、附着胞的形成及致病性。

## REFERENCES

- [1] 韦周晓. 我国天然橡胶产业发展的困境及其对策分析[J]. 南方农业, 2020, 14(6): 105-106  
Wei ZX. Difficulties and countermeasures of the development of China's natural rubber industry[J]. South China Agriculture, 2020, 14(6): 105-106 (in Chinese)
- [2] 韩长志. 胶孢炭疽病菌的研究进展[J]. 华北农学报, 2012, 27(S1): 386-389  
Han CZ. Study on progress in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2012, 27(S1): 386-389 (in Chinese)
- [3] Kusuya Y, Hagiwara D, Sakai K, Yaguchi T, Gono T, Takahashi H. Transcription factor Afmacl controls copper import machinery in *Aspergillus fumigatus*[J]. Current Genetics, 2017, 63(4): 777-789
- [4] Yun YZ, Zhou X, Yang S, Wen Y, You HX, Zheng YR, Norvienyeku J, Shim WB, Wang ZH. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* C2H2 transcription factor FolCzfl is required for conidiation, fusaric acid production, and early host infection[J]. Current Genetics, 2019, 65(3): 773-783
- [5] Razin SV, Borunova VV, Maksimenko OG, Kantidze OL. Cys2His2 zinc finger protein family: classification, functions, and major members[J]. Biochemistry Biokhimiia, 2012, 77(3): 217-226
- [6] Gupta S, Malviya N, Kushwaha H, Nasim J, Bisht NC, Singh VK, Yadav D. Insights into structural and functional diversity of Dof (DNA binding with one finger) transcription factor[J]. Planta, 2015, 241(3): 549-562
- [7] Liu QG, Wang ZC, Xu XM, Zhang HZ, Li CH.

- Genome-wide analysis of C2H2 zinc-finger family transcription factors and their responses to abiotic stresses in poplar (*Populus trichocarpa*)[J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0134753
- [8] Sharma R, Mahanty B, Mishra R, Joshi RK. Genome wide identification and expression analysis of pepper C2H2 zinc finger transcription factors in response to anthracnose pathogen *Colletotrichum truncatum*[J]. 3 Biotech, 2021, 11(3): 118
- [9] Cao HJ, Huang PY, Zhang LL, Shi YK, Sun DD, Yan YX, Liu XH, Dong B, Chen GQ, Snyder JH, et al. Characterization of 47 Cys2-His2 zinc finger proteins required for the development and pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. The New Phytologist, 2016, 211(3): 1035-1051
- [10] Son H, Seo YS, Min K, Park AR, Lee J, Jin JM, Lin Y, Cao PJ, Hong SY, Kim EK, et al. A phenome-based functional analysis of transcription factors in the cereal head blight fungus, *Fusarium graminearum*[J]. PLoS Pathogens, 2011, 7(10): e1002310
- [11] 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)
- [12] Schumacher J, De Larrinoa IF, Tudzynski B. Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants[J]. Eukaryotic Cell, 2008, 7(4): 584-601
- [13] 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
- [14] 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
- [15] Zetina-Serrano C, Rocher O, Naylies C, Lippi Y, Oswald IP, Lorber S, Puel O. The *brlA* gene deletion reveals that patulin biosynthesis is not related to conidiation in *Penicillium expansum*[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 21(18): 6660
- [16] Won DC, Kim YJ, Kim DH, Park HM, Maeng PJ. The putative C2H2 transcription factor RocA is a novel regulator of development and secondary metabolism in *Aspergillus nidulans*[J]. Journal of Microbiology: Seoul, Korea, 2020, 58(7): 574-587
- [17] Malapi-Wight M, Kim JE, Shim WB. The N-terminus region of the putative C2H2 transcription factor Ada1 harbors a species-specific activation motif that regulates asexual reproduction in *Fusarium verticillioides*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2014, 62: 25-33
- [18] Yue XF, Que YW, Xu L, Deng SZ, Peng YL, Talbot NJ, Wang ZY. ZNF<sub>1</sub> encodes a putative C2H2 zinc-finger protein essential for appressorium differentiation by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2016, 29(1): 22-35
- [19] Kwon NJ, Garzia A, Espeso EA, Ugalde U, Yu JH. FlbC is a putative nuclear C2H2 transcription factor regulating development in *Aspergillus nidulans*[J]. Molecular Microbiology, 2010, 77(5): 1203-1219
- [20] Chen L, Tong Q, Zhang CQ, Ding KJ. The transcription factor FgCrz1A is essential for fungal development, virulence, deoxynivalenol biosynthesis and stress responses in *Fusarium graminearum*[J]. Current Genetics, 2019, 65(1): 153-166
- [21] Shi DY, Ren WC, Wang J, Zhang J, Mbadianya JI, Mao XW, Chen CJ. The transcription factor FgNsf1 regulates fungal development, virulence and stress responses in *Fusarium graminearum*[J]. Journal of Integrative Agriculture, 2021, 20(8): 2156-2169
- [22] 吕兴明. 核盘菌 C2H2 型锌指蛋白 SsZFH1 的功能研究[D]. 长春: 吉林大学硕士学位论文, 2019
- Lü XM. Functional analysis of C2H2 zinc finger protein SsZFH1 in *Sclerotinia sclerotiorum*[D]. Changchun: Master's Thesis of Jilin University, 2019 (in Chinese)