

俞咪娜, 于俊杰, 曹慧娟, 等. 稻曲病病菌 $Zn_2(II)$ Cys6 型转录因子 UvZC1 基因的克隆及功能分析[J]. 江苏农业学报, 2021, 37(6): 1400-1408.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2021.06.006

稻曲病病菌 $Zn_2(II)$ Cys6 型转录因子 UvZC1 基因的克隆及功能分析

俞咪娜, 于俊杰, 曹慧娟, 潘夏艳, 宋天巧, 刘永锋

(江苏省农业科学院植物保护研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为明确 $Zn_2(II)$ Cys6 型转录因子 UvZC1 在稻曲病病菌中的功能, 利用 CRISPR-Cas9 结合同源片段双交换的方法, 诱导野生型菌株 Jt209 发生 UvZC1 基因缺失突变。结果显示, 与 Jt209 相比, UvZC1 基因缺失突变体的生长速率和分生孢子量均显著下降, 且突变体中部分与稻曲病病菌其他产分生孢子相关基因表达量发生变化; 此外, 该基因的缺失导致突变体对十二烷基硫酸钠(SDS)更敏感, 而对氧化胁迫的耐受性增强; 在稻曲病病菌接种水稻后 24 h、48 h 的侵染早期, UvZC1 基因的表达量明显上升, 但基因缺失突变体接种水稻后形成的稻曲球数量与野生型之间没有差异。综上所述, UvZC1 基因参与稻曲病病菌营养生长、分生孢子产生和侵染水稻过程, 还与稻曲病病菌细胞壁的完整性和响应氧化胁迫相关。

关键词: 稻曲病病菌; $Zn_2(II)$ Cys6 转录因子 UvZC1; 基因敲除; 基因功能; 致病性

中图分类号: S511.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2021)06-1400-09

Clone and functional research of $Zn_2(II)$ Cys6 transcription factor UvZC1 gene in *Ustilaginoidea virens*

YU Mi-na, YU Jun-jie, CAO Hui-juan, PAN Xia-yan, SONG Tian-qiao, LIU Yong-feng

(Institute of Plant Protection, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to clarify the function of $Zn_2(II)$ Cys6 transcription factor UvZC1 in *Ustilaginoidea virens*, gene deletion mutation was carried out by the CRISPR-Cas9-based homologous recombination system. Compared with the wild-type strain Jt209, the growth rate and conidia production of $\Delta UvZC1$ mutants were significantly decreased, and the expression levels of genes related to the sporulation of *U. virens* were also changed. In addition, the UvZC1 deletion mutants showed more sensitivity to sodium dodecyl sulfate (SDS), and the tolerance to oxidative stress was enhanced. At the early stage of infection (24 h and 48 h after inoculation), the expression of UvZC1 gene increased significantly. However, no significant difference in the number of rice false smut balls between the wild type and the $\Delta UvZC1$ mutants was found. Overall, UvZC1 gene has roles in regulating hyphal growth, conidiation, cell wall integrity and oxidative stress response in *U. virens*. Furthermore, UvZC1 gene is also involved in the infection process of *U. virens*.

Key words: *Ustilaginoidea virens*; $Zn_2(II)$ Cys6 transcription factor UvZC1; gene knocking-out; gene function; pathogenicity

收稿日期: 2021-02-18

基金项目: 江苏省自然科学基金项目(BK20180296); 国家自然科学基金

基金项目(31401700)

作者简介: 俞咪娜(1985-), 女, 浙江杭州人, 硕士, 副研究员, 主要研究方向为水稻真菌病害致病机制等。(E-mail) zjpsyu@163.com

通讯作者: 刘永锋, (E-mail) liuyf@jaas.ac.cn

稻曲病(Rice false smut)是由稻曲病病菌[*Ustilaginoidea virens* (Cooke) Tak.]侵染引起的一种世界性水稻穗部病害, 在世界各水稻主产区均有发生。近年来, 稻曲病在中国逐渐成为水稻的主要病害之

一,年平均发病面积达 $3.06 \times 10^6 \text{ hm}^2$,造成水稻年减产 $1.586 \times 10^8 \text{ kg}$,尤其在长江中下游地区,稻曲病重发的水稻种植面积占水稻总种植面积的 19%~40%^[1]。稻曲病的发生会影响谷粒的营养运输和正常发育,造成空秕率升高、千粒质量下降^[2-3];而稻曲球中含有的稻曲菌素更能抑制微管蛋白的组装,并干扰细胞骨架形成,引起人畜病变^[4-5]。深入研究稻曲病病菌致病相关基因功能,对解析稻曲病病菌致病机制、选择防治策略具有重要意义。

转录因子是一类调控基因转录起始的重要蛋白质,稻曲病病菌转录因子 $UvHOX2$ 的基因敲除突变体菌株不产生厚垣孢子,且分生孢子产量下降,致病力减弱^[6]。转录因子 $UvCmo1$ 、 $UvHog1$ 参与稻曲病病菌响应非生物胁迫、致病等多个重要生物学过程^[7-8]。 $Zn_2(\text{II})\text{Cys}_6$ 型转录因子是子囊菌中最大的一类转录因子,其结构中包含 1 个 $CX_2CX_6CX_{5-12}CX_2CX_{6-8}C$ 基序,可以与 2 个锌离子结合,该类蛋白质只存在于真菌界^[9]。Zhang 等^[10]用稻曲病病菌接种水稻孕穗期的穗部,在转录组水平分析接种的水稻穗部发现,编码 $Zn_2(\text{II})\text{Cys}_6$ 型转录因子 1 (*Ustilaginoidea virens* $Zn_2\text{Cys}_6$ transcription factors 1, KDB18664)的 $UvZC$ 基因在侵染早期的表达量显著升高,据此推测,该基因与稻曲病病菌侵染相关。目前 $UvZC1$ 基因在稻曲病病菌中的生物学功能尚不明确,本研究通过分析该基因敲除突变体菌株的表型,对稻曲病病菌中 $UvZC1$ 基因的功能进行解析,以期对稻曲病病菌致病机制研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

Jt209 菌株分离自 2018 年从江苏金坛田间采集的稻曲病病株标样,经单孢纯化和测序鉴定为稻曲病病菌后保存^[11]。供试水稻品种为稻曲病感病品种两优培九。在田间用 Jt209 菌株接种两优培九后表现出强致病力。敲除载体 pCas9-gRNA 由南京农业大学张海峰教授惠赠,回补载体 pKO1-Neo 由笔者所在实验室保存。稻曲病病菌用马铃薯蔗糖琼脂 (PSA) 培养基活化和培养, YT 培养基用于稻曲病病菌生物学特性的观察分析^[8,12]。稻曲病病菌的培养条件为 28℃、避光。

1.2 稻曲病病菌 $UvZC1$ 基因的克隆与分析

将新活化的 Jt209 菌株在 YT 培养液中摇动培

养 5 d,过滤并收集菌丝。用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取 Jt209 总基因组;用 RNA 提取试剂盒 (Bioteke, PR1202) 提取 Jt209 总 RNA,用反转录试剂盒 (TaKaRa, RR047) 将 RNA 反转录成 cDNA。参考稻曲病病菌 $Uv8b$ 菌株的全基因组序列,设计 $UvZC1$ 基因的全长扩增引物 $UvZC1\text{ F}$ 、 $UvZC1\text{ R}$,以 Jt209 基因组和 cDNA 为模板,通过 PCR 扩增分别获得 $UvZC1$ 基因及 cDNA 全长序列并测序。将序列在美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 网站上进行 BLAST 同源比对,用 CDART 进行基因编码蛋白的结构域分析,用 MEGA 7 构建系统进化树。

1.3 稻曲病病菌 $UvZC1$ 基因敲除和回补突变体的获得

通过 1F/1R 引物对、2F/2R 引物对对 Jt209 基因组进行扩增,分别获得 964 bp $UvZC1$ 基因上游片段和 998 bp 下游片段;用引物对 hyg1.4F/hyg1.4R 从质粒 pSK044 中扩增获得潮霉素抗性基因 (*HPH*) 片段,通过多片段重组酶 (C113-02) 连接获得基因敲除载体 pMD19T-*HPH-UvZC1*。CRISPR 载体构建和稻曲病病菌原生质体转化参考 Liang 等^[13]的方法。经潮霉素抗性初筛获得转化子,通过 RT- $UvZC1\text{ F}$ /RT- $UvZC1\text{ R}$ 、hyg1.4F/yzR 和 hyg1.4R/yzF 特异性引物对扩增转化子基因组进行再次扩增,并对扩增片段进行测序和序列比对。利用地高辛标记的 Southern 杂交方法对 $UvZC1$ 基因敲除突变体菌株的基因组 DNA 进行分析, Jt209 和突变体基因组 DNA 的提取参照方法 1.2 进行;探针的制备采用 hyg1.4F/hyg1.4R 引物对经 PCR 扩增获得的 *HPH* 基因片段;利用 *Xho* I 单酶切基因组 DNA,按照 Roche DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒的说明书进行 Southern 杂交,明确 $UvZC1$ 基因敲除突变体菌株中 *HPH* 基因的插入拷贝数。

为了获得基因回补突变体,用引物对 CF/CR 扩增 Jt209 基因组,获得包含基因上游 1.9 kb 的片段、基因全长和基因下游 0.5 kb 的片段,连接获得回补载体 pKO1-Neo- $UvZC1$,测序正确后,用农杆菌介导的稻曲病病菌转化方法将目的基因转化至 $UvZC1$ 基因敲除突变体菌株上^[11],用遗传霉素 G418 筛选转化子,再用 RT- $UvZC1\text{ F}$ /RT- $UvZC1\text{ R}$ 引物对进行转化子中 $UvZC1$ 基因表达量的测定,筛选回补菌株。所用引物序列见表 1。

1.4 稻曲病病菌生物学表型的测定

将稻曲病病菌菌株在 PSA 培养基上培养 15 d 后,在菌落生长边缘处取菌碟(直径为 5 mm),用于生物学表型的测定。每个菌设 3 个重复,每个试验重复 3 次。

表 1 *UvZCI* 基因克隆和获取突变体所用的引物

Table 1 Primers applied for *UvZCI* gene cloning and mutants obtaining

| 引物 | 引物序列(5'→3') |
|--------------------|--|
| hyg1.4 F | ACAGAAGATGATATTGAAGGAGC |
| hyg1.4 R | TACTCTATTCTTTTGGCCTCG |
| yz F | ACCAGTCTACCCGACCGTA |
| yz R | GAACCAGCCACTCTCTCTCGG |
| 1 F | GCAACGCTACAGCAAGCTC |
| 1 R | ACAGAAGATGATATTGAAGGAGCCGGGATACGGATATC-TGGGC |
| 2 F | CGGGATAGCGATATCTGGGC |
| 2 R | TACTCTATTCTTTTGGCCTCGCGC-CTCGTCCGTGAAAAGTG |
| <i>UvZCI</i> F | ATGGCGCCACCGTGTGAGGTG |
| <i>UvZCI</i> R | CTAGCCAGCCAGGCCCTTG |
| RT- <i>UvZCI</i> F | CACCTCGACCGGTGGCGCCAT |
| RT- <i>UvZCI</i> R | CGGCTTCTATGGACAGGTAG |
| C F | TTCTGACCCGGGATCCGGAAGGACATCAACACCGAAC |
| C R | GGCCAGTGGCAAGCTTAATTACCGAGGCAGATTGAGC |
| <i>UvZCI</i> CrF | ACCTGCTGAACAGCTCGAAGCTGT |
| <i>UvZCI</i> CrR | AAACACAGCTTCGAGCTGTTACGC |

引物 *UvZCI* CrF 和 *UvZCI* CrR 用于获得 *UvZCI* 基因敲除突变体菌株的 guide RNA。

1.4.1 菌丝生长速率的测定 将菌碟接种至 YTA 培养基上,于 28 ℃ 避光培养 12 d 后观察菌落形态,测量菌落直径。

1.4.2 菌丝对非生物胁迫的响应试验 分别将菌碟接种至含 0.3 mol/L NaCl、0.3 mol/L KCl、0.8 mol/L D-山梨醇(Sorbitol)、70 μg/ml 刚果红(Congo Red)、0.005% 十二烷基硫酸钠(SDS)和 3 mmol/L H₂O₂的 YTA 培养基上,28 ℃ 避光培养 12 d 后测量菌落直径。

1.4.3 分生孢子产生量的测定 取菌碟后将其接至含有 50 ml YTS 培养液的 100 ml 三角瓶中,每瓶接种 5 粒菌碟,于 28 ℃、160 r/min 摇动培养 7 d,用血球计数板统计分生孢子数量。

1.5 致病力的测定

稻曲病病菌致病力的检测参考张君成等^[13]的

方法,将摇动培养 7 d 的培养液作为接种体(分生孢子含量为 1 ml 1×10⁶个)。在两优培九孕穗期(破口前 5~7 d),用注射器将菌液注入穗苞,每个菌株接种 12 穗,每穗接种 1 ml 接种体。接种 28 d 后调查每穗稻曲球数,重复 3 次。

1.6 *UvZCI* 基因表达的测定

1.6.1 分生孢子不同萌发阶段 *UvZCI* 基因的表达

用单层 Miracloth (Calbiochem, La Jolla CA, USA) 过滤摇动培养 5 d 的稻曲病病菌 YT 培养液,收集分生孢子。分生孢子用无菌水洗涤后,稀释至终含量为 1 ml 1×10⁶个,取 40 μl 孢子液并将其涂布于铺在 YTA 培养基上的玻璃纸上,于 28 ℃ 避光培养,分别于涂布培养后 12 h、18 h、24 h、48 h 和 72 h 取样,以收集的未涂布的分生孢子作为对照。提取样品 RNA,用于测定 *UvZCI* 基因在孢子不同萌发阶段的表达量,基因的相对表达量通过荧光定量反应(qPCR)分析获得(TaKaRa, RR820)。qPCR 反应在 QuantStudio 3 荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher)中完成。以 α -tubulin-1 作为内参基因,基因表达量的计算参照 2^{- $\Delta\Delta Ct$} 方法。3 次重复。

1.6.2 H₂O₂ 胁迫下 *UvZCI* 基因的表达 收集分生孢子,按照终含量为 1 ml 1×10⁶个接种至 YT 培养液中,避光摇动培养 2 d 后,加入终浓度为 3 mmol/L 的 H₂O₂ 继续摇动培养,分别于处理后 0.5 h、1.0 h 收集菌丝,以处理前收集的菌丝为对照。按照方法 1.6.1 的基因表达量检测方法分析菌丝用 H₂O₂ 处理后的 *UvZCI* 基因表达情况。

1.6.3 接种水稻后侵染初期 *UvZCI* 基因的表达 参照方法 1.5 用 Jt209 菌株接种两优培九,分别于接种后 24 h、48 h 取接种的稻穗,以接种前收集的菌丝为对照。参照方法 1.6.1 提取接种稻穗的 RNA,用荧光定量方法分析 *UvZCI* 在 2 个侵染时间点的表达情况。

1.7 其他产分生孢子相关基因在 *UvZCI* 基因敲除突变体菌株中表达量的测定

各取 5 粒 Jt209 和 *UvZCI* 敲除突变体菌碟,分别接种至含有 50 ml YTS 培养液的 100 ml 三角瓶中,28 ℃、160 r/min 避光摇动培养 5 d 后,收集菌丝用于 RNA 提取。按照 1.6.1 的方法分析其他产分生孢子相关基因在 *UvZCI* 基因敲除突变体菌株中的表达情况。每个反应设 3 个重复,同时本试验重复 3 次。被检测的其他产分生孢子相关基因及其引物见表 2。

表 2 其他产分生孢子相关基因及其表达量分析所用引物

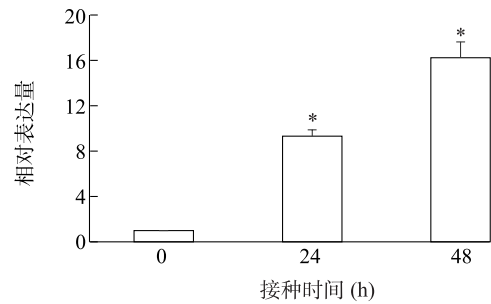
Table 2 The primers of sporulation-related genes applied in this study

| 基因 | 引物 | 引物序列(5'→3') |
|------------------------------------|---------------------------|------------------------------|
| <i>UvCom1</i> ^[7] | <i>qUvCom1</i> F | GGCGGTCCCTTGGCTAT |
| | <i>qUvCom1</i> R | CGATTGACAGTACGATAAAC |
| <i>UvHOG1</i> ^[8] | <i>qUvHOG1</i> F | GGTACGGAGCAAGATATTCG |
| | <i>qUvHOG1</i> R | TCATCAACACCATCGCAAG |
| <i>UvSLT2</i> ^[13] | <i>qUvSLT2</i> F | GCGTTGCCATCAAGAAAGTCAC |
| | <i>qUvSLT2</i> R | CGCAAAGAATCTGTTAAATAAACG-ACT |
| <i>UvAc1</i> ^[14] | <i>qUvAc1</i> F | TGCTATGCAGCACTCTGGAGTGCCT |
| | <i>qUvAc1</i> R | CGAAAGAGTCAAGAATCAGAGCCAT |
| <i>UvCDC2</i> ^[15] | <i>qUvCDC2</i> F | CGTCACTTCATACCCCGACT |
| | <i>qUvCDC2</i> R | AGTAGCCATTTCATGCGGCCAA |
| <i>UvBI-1</i> ^[16] | <i>qUvBI-1</i> F | AGCACCACCAACCCCAAGTAC |
| | <i>qUvBI-1</i> R | ACGCTGCTCCTCGTCTGGTC |
| α -tubulin-1 ^[8] | UV- α -tubulin-1 F | AGGTTGCGTTGAAGAGGTT |
| | UV- α -tubulin-1 R | GAGGTGAGTTGCCGATAAA |

2 结果与分析

2.1 $UvZC1$ 基因在稻曲病病菌侵染早期的表达模式

由图 1 可以看出, $UvZC1$ 基因在 Jt209 接种两优培九 24 h 和 48 h 后均有表达, 且基因表达量在接种后随着接种时间的延长显著上升, 接种 24 h、48 h 时分别为接种起始阶段的 9.1 倍、16.2 倍, 表明该基因参与稻曲病病菌早期侵染水稻的过程。

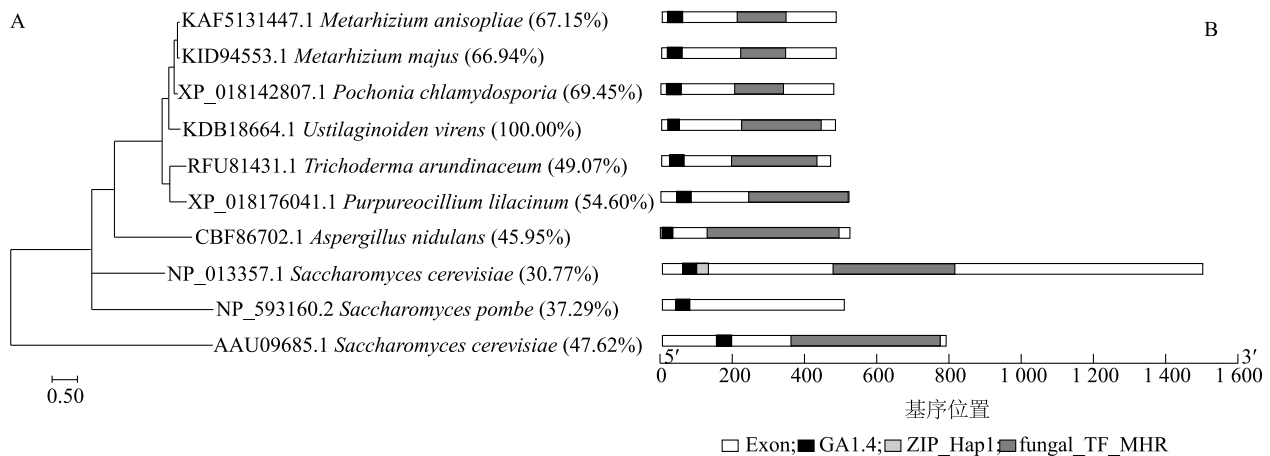


* 表示接种后基因表达量与接种起始阶段存在显著差异 ($P < 0.05$)。

图 1 $UvZC1$ 基因在侵染早期的表达模式Fig.1 Expression pattern of $UvZC1$ gene in early stage of infection

2.2 稻曲病病菌 $UvZC1$ 基因的克隆与序列分析

序列分析结果显示, $UvZC1$ 基因全长 1 458 bp, 不含内含子, 编码 485 个氨基酸。 $UvZC1$ 的预测编码蛋白质含有 1 个 GAL4 (smart00066) 基序和 1 个 Fungal _ TF _ MHR (cl23766) 基序, 与其他 $Zn(II)_2Cys_6$ 型转录因子相似。蛋白质同源性比较结果显示, $UvZC1$ 与金龟子绿僵菌 (*Metarhizium anisopliae*)、大孢绿僵菌 (*Metarhizium majus*) 等子囊菌的 $Zn(II)_2Cys_6$ 型转录因子的相似度超过 65%, 与其他丝状真菌 $Zn(II)_2Cys_6$ 蛋白的相似度也为 50% 左右 (图 2)。因此确定 $UvZC1$ 基因编码的蛋白质属于 $Zn(II)_2Cys_6$ 型转录因子。



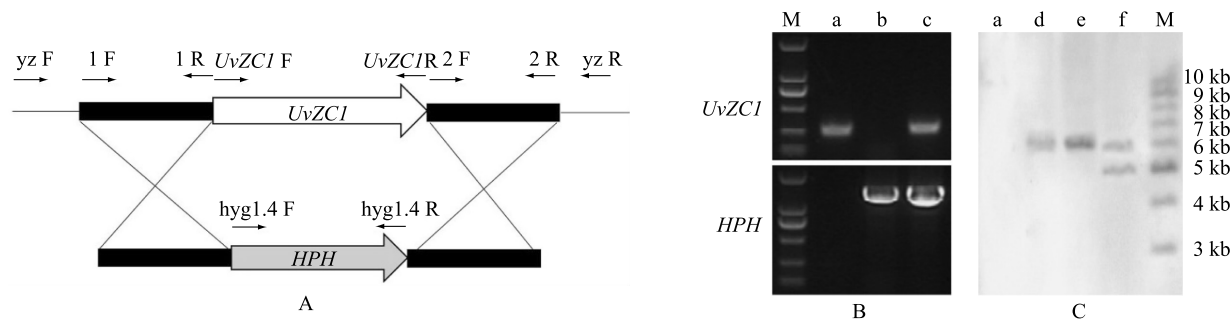
A; $UvZC1$ 与其他真菌中 $Zn(II)_2Cys_6$ 转录因子 (括号内数值表示 $UvZC1$ 与其他蛋白质同源比较的 identity 值) 的系统发育树分析; B; $UvZC1$ 与其他真菌中 $Zn(II)_2Cys_6$ 转录因子的蛋白质结构分析。

图 2 $UvZC1$ 蛋白与其他真菌中同源蛋白的系统发育树和结构比较Fig.2 Phylogenetic analysis, protein structures and motif composition of $UvZC1$ protein and its homologous proteins in other fungi

2.3 *UvZC1* 基因敲除和回补突变体的获得

以野生型菌株 Jt209 为对照,经抗性筛选、特异性引物 PCR 鉴定和 Southern 杂交分析,共获得 2 个基因敲除突变体菌株($\Delta UvZC1$ -19 和 $\Delta UvZC1$ -20)。再以敲除突变体菌株 $\Delta UvZC1$ -19 为初始菌株,回补 *UvZC1* 基因,获得 2 个基因回补菌株(*UvZC1* c-1 和 *UvZC1* c-2)。用 RT-*UvZC1* F/RT-*UvZC1* R 扩增 Jt209、敲除突变

体和回补菌株的 cDNA,发现 *UvZC1* 在 Jt209 和回补菌株中表达,而在敲除突变体菌株中不表达。用 *HPH* 基因特异性引物 hyg1.4 R/hyg1.4 F 只能从敲除突变体和回补菌株的基因组中扩增到目的片段,而在 Jt209 基因组中不能扩增到目的片段(图 3)。上述结果表明,敲除突变体菌株中的 *UvZC1* 基因已经被潮霉素抗性基因成功替换,回补菌株中的 *UvZC1* 基因得到了回补。



A: *UvZC1* 基因敲除载体构建; B: Jt209 菌株、*UvZC1* 基因敲除突变体和回补菌株中 *UvZC1* 和 *HPH* 基因 PCR 检测; C: Southern 杂交检测基因敲除突变体菌株中 *HPH* 基因拷贝数。a: Jt209; b: $\Delta UvZC1$; c: $\Delta UvZC1$ c; d: $\Delta UvZC1$ -19; e: $\Delta UvZC1$ -20; f: $\Delta UvZC1$ -66; M: Marker。

图 3 稻曲病菌 Jt209 菌株的 *UvZC1* 基因敲除

Fig.3 Knockout of *UvZC1* in *Ustilagoidea virens* Jt209 strain

2.4 *UvZC1* 基因对稻曲病菌生长的影响

由图 4A、图 4B 可以看出,在 YTA 培养基上, $\Delta UvZC1$ -19、 $\Delta UvZC1$ -20 的菌落直径分别为 (33.44 ± 0.25) mm、 (33.75 ± 0.27) mm,与 Jt209 的 (35.55 ± 0.46) mm 和回补菌株的 (35.77 ± 0.32) mm 相比显著下降,但各菌落间的形态没有明显差异,表明 *UvZC1* 基因敲除会影响稻曲病菌的生长速率,但不影响菌落形态。

由图 4C 可以看出,在 0.3 mol/L NaCl、0.3 mol/L KCl、0.8 mol/L D-山梨醇和 70 μ g/ml 刚果红等非生物胁迫下, Jt209、*UvZC1* 基因敲除突变体菌株和回补菌株在生长抑制效果上没有显著差异,然而 0.005% SDS 对 *UvZC1* 基因敲除突变体菌株的抑制率明显高于 Jt209 菌株和回补菌株,表明 *UvZC1* 基因参与调节稻曲病菌细胞壁的完整性。

2.5 *UvZC1* 基因对稻曲病菌响应氧化胁迫的影响

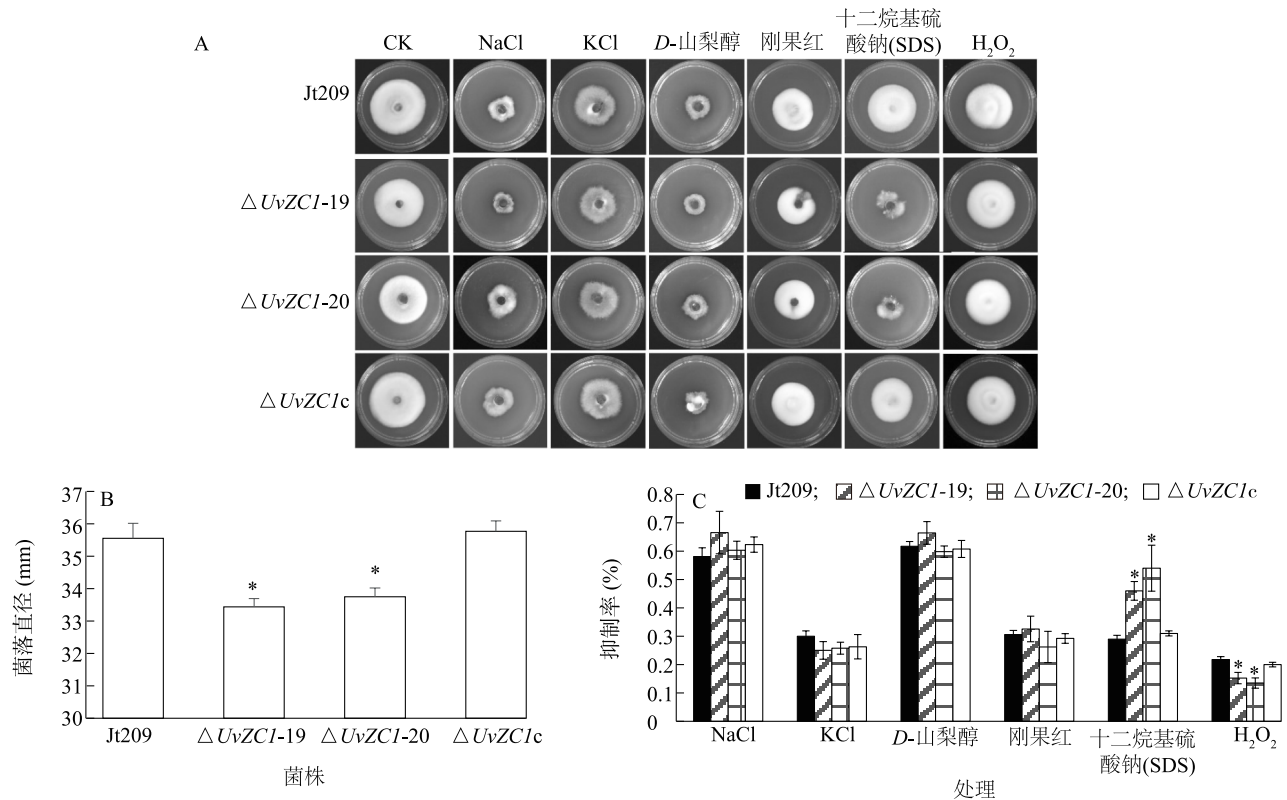
分析 Jt209、*UvZC1* 基因敲除突变体菌株和回补菌株在含 3 mmol/L H_2O_2 培养基上的生长抑制率发现, *UvZC1* 基因敲除突变体对氧化胁迫的耐受性高于 Jt209 菌株和回补菌株(图 4A、图 4C);而 Jt209 菌株中 *UvZC1* 基因的表达量在 3 mmol/L H_2O_2 处理 1.0 h 时显著上升(图 5),表明 *UvZC1* 可能参与调控稻曲病菌响应氧化胁迫的过程。

2.6 *UvZC1* 基因对稻曲病菌产分生孢子的影响

由图 6A 可以看出, Jt209、*UvZC1* 基因敲除突变体菌株和回补菌株摇动培养产生的分生孢子在形态、大小、萌发率等方面没有显著差异,但 *UvZC1* 基因敲除突变体菌株 $\Delta UvZC1$ -19 和 $\Delta UvZC1$ -20 产分生孢子数量较 Jt209 分别减少 91.1% 和 89.4%。

由图 6B 可以看出,进一步分析 *UvZC1* 在稻曲病菌分生孢子萌发和菌丝生长、分生孢子产生等不同阶段的基因表达情况发现, *UvZC1* 在孢子萌发产生芽管及芽管伸长(萌发时间 18 h)、菌丝伸长(萌发时间 24 h)阶段的表达量与分生孢子时期没有显著差异;随着萌发的菌丝顶端新分生孢子的产生(萌发时间 48 h、72 h), *UvZC1* 相对表达量与分生孢子时期相比逐渐上升,表明 *UvZC1* 参与了稻曲病菌产分生孢子的过程。

此外,检测已报道的稻曲病菌产分生孢子其他相关基因的表达量发现,与 Jt209 相比, *UvZC1* 基因敲除突变体菌株中 *UvAC1*、*UvSLT2* 基因的相对表达量显著上升, *UvCDC2*、*UvCom1* 和 *UvHog1* 基因的相对表达量显著下降, *UvBI-1* 基因的相对表达量变化不显著(图 6C)。上述结果表明, *UvZC1* 可能通过调节稻曲病菌多个产分子孢子相关基因,从而参与调控稻曲病菌分生孢子的产生。



A: Jt209 菌株、 $UvZC1$ 基因敲除突变体菌株和回补菌株在不同非生物胁迫下的菌落形态; B: 在 YTA 培养基上的菌落直径; C: 在 YTA 培养基上不同非生物胁迫对菌株生长的抑制率。* 表示突变体菌株与其野生型菌株间存在显著差异 ($P < 0.05$)。

图 4 $UvZC1$ 基因敲除突变体菌株的生长表型

Fig.4 Growth phenotype of $UvZC1$ gene knockout mutant strain

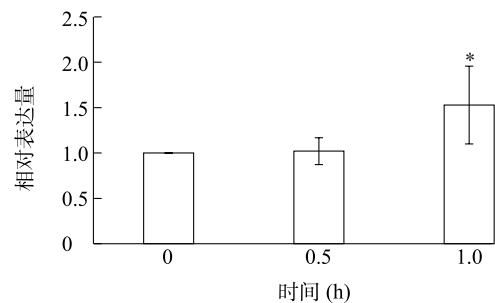
2.7 $UvZC1$ 基因对稻曲病菌致病性的影响

田间接种试验结果显示, Jt209、 $UvZC1$ 基因敲除突变体菌株和回补菌株在接种稻穗上产生的稻曲球数量无显著差异, 稻曲球形态也无明显差异 (图 7), 表明 $UvZC1$ 基因不影响稻曲球的产生。

3 讨论

本研究从稻曲病病菌中克隆到 $UvZC1$ 基因, 其编码蛋白质与其他真菌中的 $Zn(II)_2Cys_6$ 型转录因子在序列和结构域上有很高的相似性, 均具有包含 6 个半胱氨酸的 GAL4 基序, 可以结合 2 个锌离子, 表明 $UvZC1$ 蛋白是典型的 $Zn(II)_2Cys_6$ 型转录因子^[9]。 $Zn(II)_2Cys_6$ 转录因子为仅存于真菌中的锌簇蛋白, 在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中, 含 $Zn(II)_2Cys_6$ 基序的 Moc3 蛋白可以与其他蛋白质互作, 参与调控酵母有性生殖和 DNA 完整性^[17-18]。在丝状真菌中, 这类蛋白质参与真菌菌丝生长、产分生孢子、致病力及对不良环境的响应等过程, 具有多

种调节功能, 但在不同真菌中的功能存在差异^[19-24]。

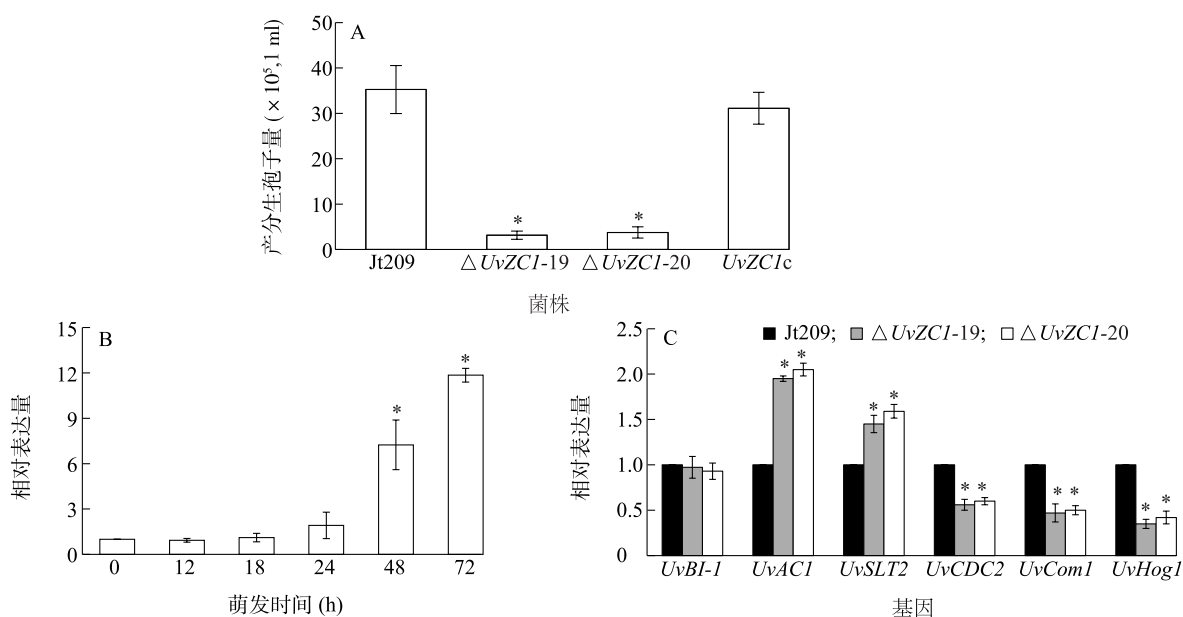


* 表示 3 mmol/L H_2O_2 处理 Jt209 菌株后 $UvZC1$ 基因表达量与处理前存在显著差异 ($P < 0.05$)。

图 5 稻曲病病菌在 3 mmol/L H_2O_2 胁迫下 $UvZC1$ 基因的表达

Fig.5 Expression of $UvZC1$ gene under 3 mmol/L H_2O_2 stress in *U. virens*

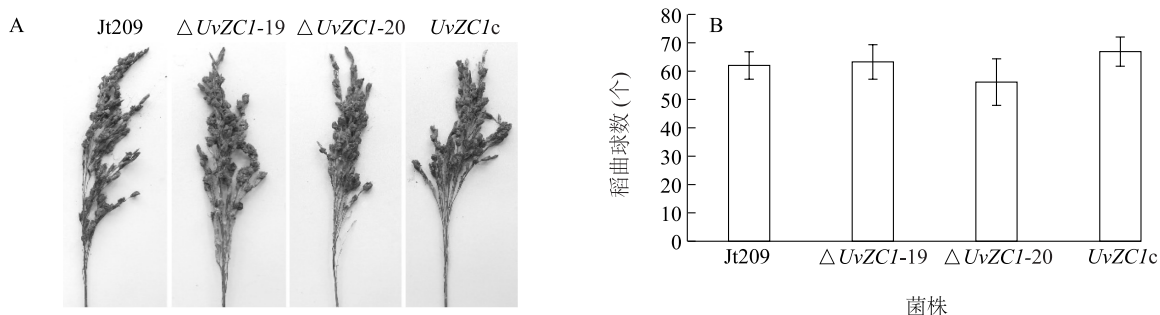
稻曲病病菌 $UvZC1$ 基因敲除突变体菌株与野生型菌株相比, 菌丝生长速度减慢, 产分生孢子量减少, 表明 $UvZC1$ 基因参与了稻曲病病菌生长和产分



A:不同菌株的产孢量;B:*UvZC1* 基因在分生孢子不同萌发阶段的表达量;C:*UvZC1* 基因敲除突变体菌株中稻曲病菌其他产分生孢子相关基因表达量。*表示在突变体菌株与野生型菌株间存在显著差异($P<0.05$)。

图6 *UvZC1* 基因敲除对稻曲病菌产分生孢子的影响

Fig.6 Effects of *UvZC1* gene knockout on conidial production of *U. virens*



A:接种后稻穗产稻曲球症状;B:每穗平均稻曲球数。

图7 *UvZC1* 基因敲除对稻曲病菌致病力的影响

Fig.7 Effects of *UvZC1* gene knockout on pathogenicity of *U. virens*

生孢子过程。真菌产分生孢子是多基因参与的过程,在稻曲病菌中,已有报道显示,编码腺苷酸环化酶(*UvAc1*)、蛋白激酶(*UvSLT2* 和 *UvCDC2*)、转录因子(*UvCOM1* 和 *UvHOG1*)、效应因子(*UvBI-1*)等蛋白质的基因敲除均导致稻曲病菌的产分生孢子量下降^[7-8,13-14,16]。本研究发现,*UvZC1* 基因正调控基因 *UvAc1* 和 *UvSLT2* 的表达,负调控基因 *UvCDC2*、*UvCom1* 和 *UvHog1* 的表达,可见稻曲病菌产分生孢子也是多基因参与的过程,*UvZC1* 作为转录因子参与调节多个稻曲病菌产分生孢子相关基因的表达。此外,*UvZC1* 基因敲除突变体菌株对由 NaCl、KCl 和 Sorbitol 等引起的盐胁迫和渗透压胁迫的响

应与野生型没有显著差异,表明 *UvZC1* 不参与调节稻曲病菌对盐胁迫和渗透压胁迫的响应^[11]。刚果红通过阻止细胞壁葡聚糖链之间的横向作用来影响细胞壁的完整性,而 SDS 能使细胞壁变脆弱,从而裂解细胞。*UvZC1* 基因敲除突变体菌株对 SDS 的耐受性降低,表明 *UvZC1* 参与调控稻曲病菌细胞壁的完整性,但不影响稻曲病菌细胞壁葡聚糖链之间的互作。

病原菌侵染寄主植物时会诱导其产生一系列防卫反应来抵御病原菌的侵染^[25-26],活性氧是侵染早期寄主的重要防卫反应物质之一^[27]。本研究中, H_2O_2 可以诱导稻曲病菌 *UvZC1* 基因的表达,同时

$UvZC1$ 敲除突变体菌株对 H_2O_2 的耐受性较野生型增强, 表明 $UvZC1$ 蛋白参与稻曲病病菌响应氧化胁迫的过程。通过检测侵染阶段 $UvZC1$ 基因的表达量发现, $UvZC1$ 基因表达量在接种后 24 h 和 48 h 即侵染早期显著上升。然而 Jt209、 $UvZC1$ 敲除突变体菌株和回补菌株在水稻上产生的稻曲球数量和形态没有明显差异, 说明该基因不影响稻曲病病菌稻曲球的产生。可能由于从稻曲病病菌基因组中已经预测到 90 多个 C6 转录因子^[1], 它们之间存在功能冗余现象, 即在 $UvZC1$ 缺失时, 稻曲病病菌的其他 C6 转录因子基因能够部分替代 $UvZC1$ 行使功能, 导致最终表现为致病力无明显改变^[28-29]。综上所述, $UvZC1$ 参与了稻曲病病菌生长、分生孢子产生、响应氧化胁迫和细胞壁完整性建成、侵染水稻等过程, 这对认识稻曲病病菌 $Zn(\text{II})_2\text{Cys}_6$ 型转录因子功能具有重要意义。

参考文献:

- [1] SUN W X, FAN J, FANG A F, et al. *Ustilagoideae virens*: insights into an emerging rice pathogen[J]. Annual Review of Phytopathology, 2020, 58: 363-385.
- [2] FAN J, YANG J, WANG Y Q, et al. Current understanding on *Villosiclava virens*, a unique flower-infecting fungus causing rice false smut disease[J]. Molecular Plant Pathology, 2016, 17(9): 1321-1330.
- [3] 李小娟, 刘二明, 肖启明, 等. 水稻对稻曲病抗性的分级及相应级别的产量损失[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2011, 37(3): 275-279.
- [4] MENG J J, GU G, DANG P Q, et al. Sorbicillinoids from the fungus *Ustilagoideae virens* and their phytotoxic, cytotoxic, and antimicrobial activities[J]. Frontiers in Chemistry, 2019, 7: 435.
- [5] LI Y J, WANG M, LIU Z H, et al. Towards understanding the biosynthetic pathway for ustilaginoidin mycotoxins in *Ustilagoideae virens*[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(8): 2629-2643.
- [6] YU J J, YU M N, SONG T Q, et al. A homeobox transcription factor $UvHOX_2$ regulates chlamydospore formation, conidiogenesis, and pathogenicity in *Ustilagoideae virens*[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1071.
- [7] CHEN X, HAI D, TANG J, et al. $UvCom1$ is an important regulator required for development and infection in the rice false smut fungus *Ustilagoideae virens*[J]. Phytopathology, 2020, 110(2): 483-493.
- [8] ZHENG D W, WANG Y, HAN Y, et al. $UvHOG1$ is important for hyphal growth and stress responses in the rice false smut fungus *Ustilagoideae virens*[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24824.
- [9] MACPHERSON S, LAROCHELLE M, TURCOTTE B. A fungal family of transcriptional regulators: the zinc cluster proteins[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2006, 70(3): 583-604.
- [10] ZHANG Y, ZHANG K, FANG A, et al. Specific adaptation of *Ustilagoideae virens* in occupying host florets revealed by comparative and functional genomics[J]. Nature Communications, 2014, 5: 3849.
- [11] YU M N, YU J J, HU J K, et al. Identification of pathogenicity-related genes in the rice pathogen *Ustilagoideae virens* through random insertional mutagenesis[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 76: 10-19.
- [12] 张君成, 陈志谊, 张炳欣, 等. 稻曲病的接种技术研究[J]. 植物病理学报, 2004, 34(5): 463-467.
- [13] LIANG Y F, HAN Y, WANG C F, et al. Targeted deletion of the $USTA$ and $UvSLT2$ genes efficiently in *Ustilagoideae virens* with the CRISPR-Cas9 system[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 699.
- [14] GUO W W, GAO Y X, YU Z M, et al. The adenylate cyclase $UvAc1$ and phosphodiesterase $UvPdeH$ control the intracellular cAMP level, development, and pathogenicity of the rice false smut fungus *Ustilagoideae virens*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2019, 129: 65-73.
- [15] TANG J T, BAI J, CHEN X Y, et al. Two protein kinases $UvPmk1$ and $UvCDC2$ with significant functions in conidiation, stress response and pathogenicity of rice false smut fungus *Ustilagoideae virens*[J]. Current Genetics, 2020, 66(10): 409-420.
- [16] XIE S L, WANG Y F, WEI W, et al. The Bax inhibitor $UvBI-1$, a negative regulator of mycelial growth and conidiation, mediates stress response and is critical for pathogenicity of the rice false smut fungus *Ustilagoideae virens*[J]. Current Genetics, 2019, 65(5): 1185-1197.
- [17] GOLDAR M M, JEONG H T, TANAKA K, et al. $Moc3$, a novel Zn finger type protein involved in sexual development, ascus formation, and stress response of *Schizosaccharomyces pombe*[J]. Current Genetics, 2005, 48(6): 345-355.
- [18] CAMPBELL R N, LEVERTZ M K, RYAN L A, et al. Metabolic control of transcription: paradigms and lessons from *Schizosaccharomyces cerevisiae*[J]. Biochemical Journal, 2008, 414(2): 177-187.
- [19] LU J P, CAO H J, ZHANG L L, et al. Systematic analysis of $Zn_2\text{Cys}_6$ transcription factors required for development and pathogenicity by high-throughput gene knockout in the rice blast fungus[J]. PLoS Pathogens, 2014, 10(10): e1004432.
- [20] HAGIWARA D, MIURA D, SHIMIZU K, et al. A novel $Zn_2\text{Cys}_6$ transcription factor $AtrR$ plays a key role in an azole resistance mechanism of *Aspergillus fumigatus* by co-regulating $cyp51A$ and $cdr1B$ expressions[J]. PLoS Pathogens, 2016, 13(1): e1006096.
- [21] SON H, SEO Y S, MIN K, et al. A phenome-based functional a-

- analysis of transcription factors in the cereal head blight fungus *Fusarium graminearum* [J]. PLoS Pathogens, 2011, 7 (10): e1002310.
- [22] LONG N B, ORASCH T, ZHANG S Z, et al. The Zn₂Cys₆-type transcription factor LeuB cross-links regulation of leucine biosynthesis and iron acquisition in *Aspergillus fumigatus* [J]. PLoS Genetics, 2018, 14(10): e1007762.
- [23] ZHAO C Z, WAALWIJK C, DE WIT P J G M, et al. EBR1, a novel Zn₂Cys₆ transcription factor, affects virulence and apical dominance of the hyphal tip in *Fusarium graminearum* [J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24(12):1407-1418.
- [24] GARG A, GOLDGUR Y, SCHWER B, et al. Distinctive structural basis for DNA recognition by the fission yeast Zn₂Cys₆transcription factor Pho7 and its role in phosphate homeostasis [J]. Nucleic Acids Research, 2018, 46(21): 11262-11273.
- [25] 罗丽芬,江冰冰,邓琳梅,等. 三七根系分泌物中几种成分对根腐病原菌生长的影响[J].南方农业学报,2020,51(12):2952-2961.
- [26] 刘一贤,蔡志英,施玉萍,等. 辣木果腐病原菌兰生炭疽菌 (*Colletotrichum chlorophyti*)生物学特性及其防治药剂室内毒力测定[J].江苏农业科学,2019,47(20):133-137.
- [27] RHEE S G. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling [J]. Science, 2006, 312(5782): 1882-1883.
- [28] WAGNER A. Genetic redundancy caused by gene duplications and its evolution in networks of transcriptional regulators [J]. Biological Cybernetics, 1996, 74(6):557-567.
- [29] WAGNER A. Redundant gene functions and natural selection [J]. Journal of Evolutionary Biology, 1999, 12(1):2646-2658.

(责任编辑:徐 艳)