

黄志睿, 廖至雯, 罗红丽. 橡胶树胶孢炭疽菌自噬相关基因 *ATG20* 的功能[J]. 江苏农业学报, 2024, 40(4) : 636-644.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2024.04.007

橡胶树胶孢炭疽菌自噬相关基因 *ATG20* 的功能

黄志睿¹, 廖至雯², 罗红丽¹

(1.海南大学三亚南繁研究院, 海南 三亚 572000; 2.海南省崖州湾种子实验室, 海南 三亚 572000)

摘要: 胶孢炭疽菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)是引起橡胶树炭疽病的优势小种, 橡胶树感染后会大量减产。自噬现象是植物病原真菌中普遍存在的生理过程, 自噬过程会受到多个自噬相关基因(*ATG*)的调控, 在病原真菌对逆境的响应、生长发育和致病性方面具有重要作用。本研究克隆了橡胶树胶孢炭疽菌的 *ATG20* 同源基因 *CgATG20*, 构建了该基因的敲除突变株 Δ CgATG20, 并对其致病性、孢子产量、组织侵染情况和自噬情况等进行分析。结果显示, 与野生型相比, Δ CgATG20 的致病性、分生孢子产量和对植物的入侵率显著降低。在缺氮条件下, Δ CgATG20 菌丝体中自噬小体的数量显著少于野生型。以上结果表明 *ATG20* 在胶孢炭疽菌的生长发育、致病性和自噬中发挥重要作用, 这为寻找有效阻断病原真菌发育和侵染途径的防治策略提供了新的靶点。

关键词: 橡胶树; 胶孢炭疽菌; 自噬; *ATG20*; 致病力

中图分类号: S432.4⁺4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2024)04-0636-09

Function of the autophagy-related gene *ATG20* in *Colletotrichum gloeosporioides* in *Hevea brasiliensis*

HUANG Zhi-rui¹, LIAO Zhi-wen², LUO Hong-li¹

(1. Sanya Institute of Breeding and Multiplication, Hainan University, Sanya 572000, China; 2. Hainan Yazhou Bay Seed Laboratory, Sanya 572000, China)

Abstract: *Colletotrichum gloeosporioides* is the dominant race that causes anthracnose on rubber trees, resulting in substantial reduction in rubber production. Autophagy is a common physiological process in plant pathogenic fungi, which is regulated by multiple autophagy related genes (*ATG*) and plays an important role in stress response, growth and pathogenicity of pathogenic fungi. In this study, the *ATG20* homologous gene in *C. gloeosporioides* of rubber tree was cloned and named as *CgATG20*, and the *CgATG20* gene knockout mutant Δ CgATG20 was constructed. The pathogenicity, spore production, tissue infection and autophagy of the mutant Δ CgATG20 were analyzed. The results showed that the pathogenicity, conidium production and plant invasion rate of Δ CgATG20 were significantly reduced compared with wild type. Under the condition of nitrogen deficiency, the number of autophagosomes in Δ CgATG20 mycelium was significantly less than that of wild type. The above results indicate that *ATG20* plays an important role in the growth and development, pathogenicity and autophagy of *C. gloeosporioides*, which provides a new target for finding control strategies that can effectively block the development and infection pathways of pathogenic fungi.

Key words: rubber tree; *Colletotrichum gloeosporioides*; autophagy; *ATG20*; pathogenicity

收稿日期: 2023-09-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(32260716, 32060591)

作者简介: 黄志睿(2000-), 男, 河南许昌人, 硕士研究生, 主要从事胶孢炭疽菌的自噬相关基因功能研究。(E-mail) 1657072859@qq.com

通讯作者: 罗红丽, (E-mail) hlluo@hainanu.edu.cn

细胞自噬是真核细胞中在进化上高度保守的、用于降解并利用细胞内过多或异常的蛋白质或细胞器的过程^[1]。当自噬被诱导后, 首先自噬膜在自噬

体组装位点(PAS)处延伸形成自噬泡,随后多种蛋白质和膜材料参与自噬膜的延伸、融合和扩张,最终形成双层膜的自噬体,自噬体捕获需降解的蛋白质、细胞器等物质,将其内容物运送至溶酶体腔降解成小分子物质^[2]。

根据对降解底物的选择性的不同,自噬可分为非选择性自噬和选择性自噬,其中非选择性自噬随机对底物进行降解,而选择性自噬是与特定的底物结合并将其降解,有利于维持细胞器的完整性和数量^[3]。细胞质空泡靶向(Cvt)途径、线粒体自噬、内质网自噬、过氧化物酶体自噬、核糖体自噬等都属于选择性自噬^[4]。在选择性自噬中,一类具有磷酸肌醇结合PX(Phox结构域同源)结构域的蛋白质被称为分选连接蛋白质(SNX),该蛋白质对于货物蛋白质的识别和运输起着重要作用^[5]。在酵母中,自噬相关基因(*ATG*)*ATG20*编码一种分选连接蛋白质,在该蛋白质的缺失突变体中几乎检测不到成熟的氨基肽酶(*Ape1*),导致Cvt途径缺陷^[6-7]。而且,酵母的*ATG20*与*ATG24*蛋白存在功能冗余,不仅影响内质网自噬和线粒体自噬过程中的液泡运输^[8],还影响非选择性自噬的液泡运输和自噬小体的形成^[9-10]。在稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)中*MoSnx41*与酵母*ATG20*同源,*MoSnx41*缺失突变体表现出产孢能力减弱、致病性减弱和过氧化物酶体自噬缺陷^[11]。在禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)中,*FgATG20*被证明不仅参与自噬小体的形成和Cvt途径,而且调控病菌的生长、孢子产量和致病性^[12]。在玉米小斑病原菌异旋孢腔菌(*Cochliobolus heterostrophus*)中,*ChATG20*参与病菌正常无性生长和致病力的调控^[5]。由此可见,不同真菌中*ATG20*的功能存在差异。

天然橡胶是重要的工业原料和战略资源,由胶孢炭疽菌引起的橡胶树炭疽病是导致橡胶减产的重要因素之一^[13]。自噬对植物病原真菌的生长发育和致病性具有重要影响,深入研究自噬的机制和影响因素能为研发可有效阻断病原真菌发育和侵染途径的防治策略提供新的靶点^[14-15],但是目前对于胶孢炭疽菌自噬机理和自噬相关基因的研究不多,仅对*CgAtg4*和*CgATG8*进行了克隆和初步的功能分析^[16-17]。本研究拟克隆和分析胶孢炭疽菌中的*CgATG20*基因,构建该基因的2个敲除突变株 Δ CgATG20-1和 Δ CgATG20-2,分析*CgATG20*对胶孢炭疽菌致病力、分生孢子产量和附着胞生长发育以及

自噬的影响,为解析胶孢炭疽菌自噬机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

胶孢炭疽菌菌株由本实验室分离保存;致病性分析所用的巴西橡胶树品种为热研7-33-97。

试验中用于进行目的片段扩增的高保真酶购自北京全式金生物技术有限公司;用于目的片段检测的2×*Taq* Master Mix 购自近岸蛋白质科技股份有限公司;用于原生质体转化试验的PEG4000、氯喹磺隆和用于自噬染色的单丹磺酰尸胺(MDC)购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基购自北京双旋微生物培养基制品厂;羧苄青霉素(Car)和卡那霉素(Kan)购自赛国生物科技有限公司;钙荧光白(CFW)购自源叶生物科技有限公司;十二烷基硫酸钠(SDS)购自北京美莱博医学科技有限公司;刚果红(CR)购自北京索莱宝科技有限公司;苯甲基磺酰氟(PMSF)购自兰杰柯科技有限公司。

CM培养基:葡萄糖10 g、微量元素1 ml、维生素1 ml、硝酸盐50 ml、蛋白胨2 g、酵母提取物1 g、酸水解酪蛋白1 g,加ddH₂O定容到1 L,121℃高压灭菌20 min。MM培养基:氯化钾0.50 g、硝酸钠2.00 g、磷酸二氢钾1.00 g、七水硫酸镁0.50 g、七水硫酸亚铁0.01 g、蔗糖30.00 g、微量元素200 μl,加ddH₂O定容到1 L,121℃高压灭菌20 min。在MM培养基配方的基础上去除硝酸钠即为MM-N缺氮培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 生物信息学分析 引物设计采用Primer Premier 5.0软件,引物合成由北京擎科生物科技股份有限公司完成。使用美国国家生物技术信息中心蛋白质注释资源(NCBI CDD)分析蛋白质的保守结构域,使用在线工具NovoPro(<https://novopro.cn/tools/signalp.html>)和DeepTMHMM(<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>)预测蛋白质信号肽和跨膜结构域,使用DNAMAN软件对蛋白质进行序列对比,使用MEGA 4.0软件进行系统进化树的构建。

1.2.2 敲除突变体的构建 根据同源重组敲除原理,利用融合PCR扩增目的基因的上下游同源臂和抗性基因的融合片段,使用聚乙二醇(PEG)介导的转化法将融合片段转入到胶孢炭疽菌的原生质体中^[18],对获得的抗性转化子进行单孢分离和PCR检测。PCR

检测结果显示上游、下游片段扩增结果呈阳性而目的基因扩增结果呈阴性的转化子为纯合的敲除突变株。

1.2.3 生长速率分析 参照 Liu 等^[19]的方法进行。将生长状况一致的待测菌株用无菌打孔器打出相同大小的菌块,将其分别接种在 PDA 培养基中央,置于 28 ℃ 培养 6 d,用十字交叉法测量菌落直径并拍照,对数据进行生物统计学分析。试验独立重复 3 次且每次有 3 个以上重复。

1.2.4 分生孢子产量分析 参照 Liu 等^[19]的方法进行。将待测菌株置于完全培养基(CM 培养基)中,在 28 ℃ 120 r/min 条件下培养 2 d,用滤膜过滤 1 ml 新鲜孢子悬浮液,8 000 r/min 离心 1 min 获得橙黄色分生孢子沉淀,倒掉上清液,加入 1 ml ddH₂O 振荡混匀,重复以上步骤,清洗 2 遍分生孢子后加 1 ml ddH₂O 振荡混匀,使用显微镜计数,将孢子含量调整到 1 ml 1×10^3 个,往 30 ml CM 培养基中加入羧苄青霉素、卡那霉素和 1 ml 稀释好的孢子液,在 28 ℃ 120 r/min 条件下培养 3 d,过滤孢子液,使用血球计数板在显微镜下对分生孢子计数。试验独立重复 3 次且每次有 3 个以上重复。

1.2.5 致病性分析 参照 Gao 等^[20]的方法进行。将重悬于 CM 培养基的新鲜的菌液孢子含量调整至 1 ml 2×10^5 个,采集生长状态相对一致的橡胶树苗叶片,接种 5 μ l 菌液在完整叶片或预先刺伤的叶片上,保湿并做好标记,在 28 ℃ 黑暗条件下培养 3 d 后拍照留存并测量病斑直径进行统计分析。试验独立重复 3 次且每次有 3 个以上重复。

1.2.6 细胞壁应激分析 参照 Liu 等^[19]的方法进行。将待测菌株培养 5~6 d,用无菌打孔器打出相同大小的菌块,将菌块分别转接于添加了 SDS (0.005%)、CFW (200 μ g/ml) 和 刚果红 (250 μ g/ml) 的 PDA 培养平板中央,置于 28 ℃ 培养 6 d。测量菌落直径并拍照,计算并分析生长抑制率。每个样品至少设置 3 个重复。

1.2.7 附着胞形成分析 参照 Gao 等^[20]的方法进行。将重悬于新鲜的 CM 液体培养基中的菌液孢子含量调整至 1 ml 5×10^5 个,接种 5 μ l 在聚苯乙烯板上,置于 28 ℃ 恒温培养箱中保湿培养,于不同时间点在显微镜下观察,拍照并进行附着胞形成率的统计分析。试验独立重复 3 次。

1.2.8 洋葱表皮穿透力分析 参照 Gao 等^[20]的方法进行。将新鲜的孢子悬浮液稀释至 1 ml 2.5×10^5

个的孢子含量,小心揭下洋葱内表皮,将其置于培养皿中,接种 5 μ l 稀释的孢子悬浮液在洋葱内表皮上,于 28 ℃ 保湿培养 12 h 后观察并拍照,统计穿透洋葱内表皮的附着胞比例。试验独立重复 3 次。

1.2.9 氮饥饿诱导自噬 参照廖至雯等^[21]改良的 Veneault-Fourrey 等^[22]的方法进行。用 CM 液体培养基培养获得新鲜的孢子悬浮液,稀释至 1 ml 5×10^5 个,将 20 ml 孢子液在 28 ℃ 120 r/min 的条件下培养 24 h 获得菌丝体,将培养获得的菌丝体吸取出来平均分装到不同离心管中,然后加入 1 ml ddH₂O 轻摇混匀,重复以上步骤,用离心水洗 2 遍以洗去 CM 培养基营养,再将菌丝体加入到不同培养基中进行处理,并加入 PMSF 溶液(终浓度 4 mmol/L)使其发生氮饥饿诱导的自噬,在 28 ℃ 120 r/min 条件下培养 3 h 后,加入 MDC 染液(终浓度 100 μ mol/L)避光染色 30 min,洗去营养和 MDC 染液,在荧光显微镜下观察和统计自噬小体的数目。试验独立重复 3 次。

1.3 数据统计与分析

使用 Graphpad prism 软件进行数据统计及差异分析,单变量数据采用单因素方差分析,采用 Duncan's 多重范围检验。在 $P < 0.05$ 时的差异被认为是显著的。

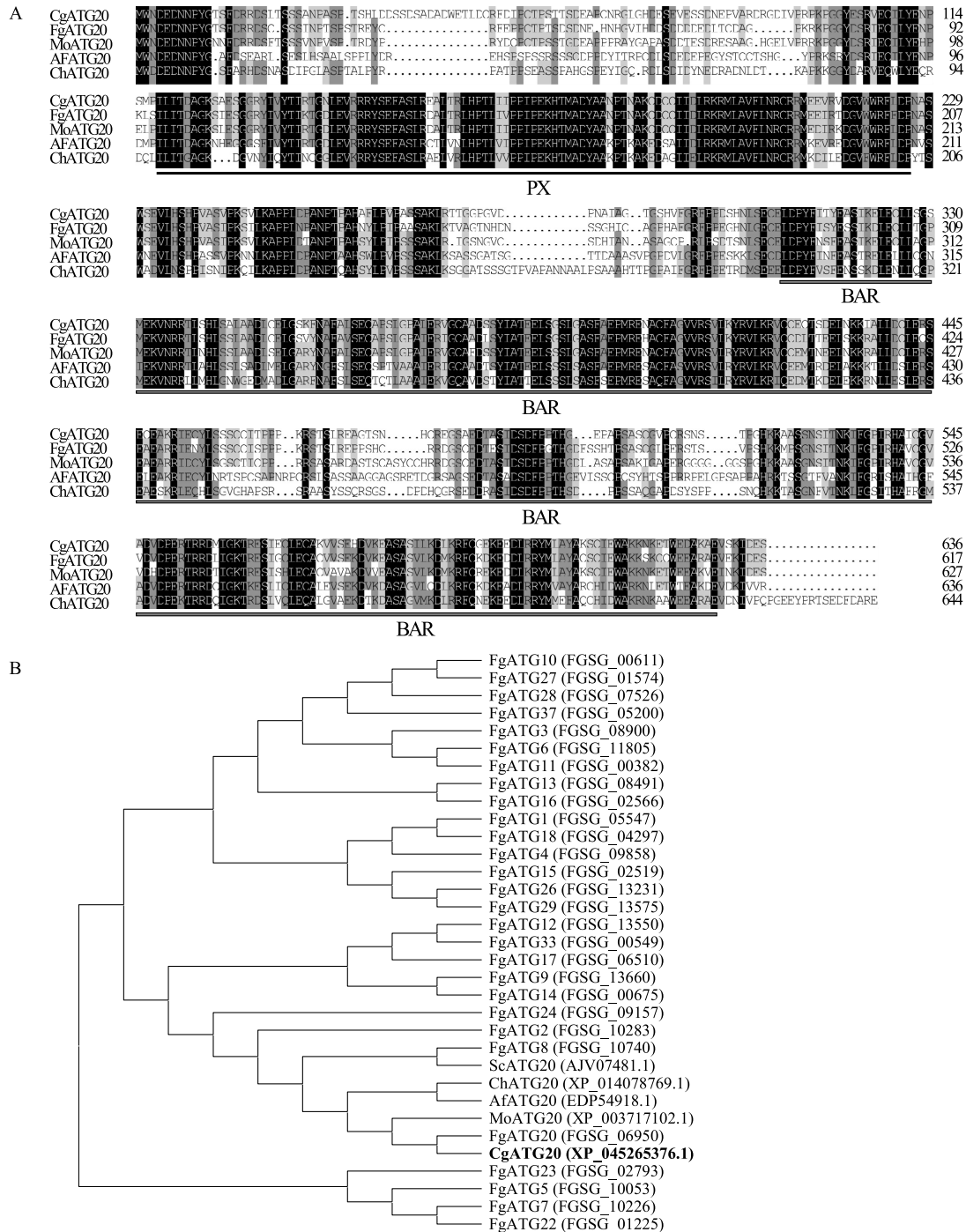
2 结果与分析

2.1 CgATG20 的基因扩增和生物信息学分析

在胶孢炭疽菌的转录组中,我们发现了一个编码自噬相关蛋白质 ATG20 的基因(XP_045265376.1),将其命名为 CgATG20。通过 RT-PCR 技术扩增了该基因的编码区并进行了测序验证,结果表明该基因编码了 1 条含有 636 个氨基酸的多肽链,相对分子质量约为 70 300,等电点(pI)为 5.41。该蛋白质序列与酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) ScATG20(AJV07481.1)、稻瘟病病菌(*Magnaporthe oryzae*) MoATG20(MGG_12832)和禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*) FgATG20(FGSG_06950)的一致性分别为 28.65%、75.08% 和 75.31%。NCBI CDD 分析结果显示,CgATG20 蛋白含有位于第 117~227 aa 处的 PX 保守结构域和第 308~629 aa 处的 BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) 保守结构域。使用在线工具 NovoPro 和 DeepTMHMM 预测,结果表明,CgATG20 蛋白不含信号肽和跨膜结构域。利用 DNAMAN 软件对 CgATG20 和其他几个主要植物病原真菌的 ATG20 进行多序列对比,结果显示,CgATG20 与其他

同源蛋白质在结构域 PX 和 BAR 处高度保守(图 1A)。利用 MEGA 4.0 软件对 CgATG20 与其他同源蛋白质和禾谷镰刀菌的 28 个 ATG 蛋白的氨基酸序列进行系统进化树的构建,结果(图 1B)显示,CgATG20 与来自稻

瘟病病菌的 MoATG20、禾谷镰刀菌的 FgATG20 和烟曲霉菌的 AfATG20 位于同一分支,其中与禾谷镰刀菌 FgATG20 的亲缘关系最近。以上结果表明,CgATG20 是胶孢炭疽菌中 ATG20 的同源蛋白质。



A: CgATG20 和其他几个植物病原真菌的同源 ATG20 的多序列对比分析。PX: phox 同源结构域; BAR: Bin/Amphiphysin/Rvs 结构域。B: CgATG20 与其他同源蛋白质和禾谷镰刀菌的 28 个 ATG 蛋白的氨基酸序列的系统发育关系。Cg: 胶孢炭疽菌; Fg: 禾谷镰刀菌; Mo: 稻瘟病菌; Af: 烟曲霉; Ch: 异旋孢腔菌。

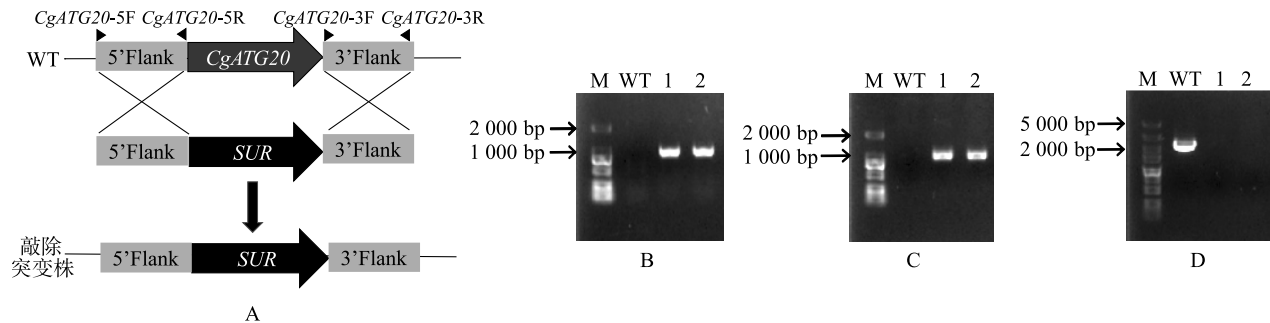
图 1 CgATG20 的生物信息学分析

Fig.1 Bioinformatics analysis of CgATG20

2.2 *CgATG20* 敲除突变体的构建

为了研究 *CgATG20* 的生物学功能,我们根据同源重组原理构建胶孢炭疽菌的敲除突变株(图 2A)。利用 PCR 技术分别扩增了 *CgATG20* 的上游同源臂(702 bp)、下游同源臂(804 bp)和氯喹磺隆抗性基因 *SUR*(2 807 bp),用融合 PCR 的方法得到带有氯喹磺隆的片段,使用 PEG 介导法将片段转入

胶孢炭疽菌野生型的原生质体中,利用抗性筛选出阳性转化子并进行单孢分离,获得 2 个纯合株系,通过 PCR 技术检测,在 2 个纯合株系的基因组中均可以检测到上游片段(图 2B)和下游片段(图 2C),但检测不到目的基因的存在(图 2D),说明 *CgATG20* 基因已经被成功敲除。将这 2 个纯合株系分别命名为 $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2。



A:同源重组敲除原理;B:上游同源臂检测;C:下游同源臂检测;D:基因检测;WT:野生型;1:*CgATG20*的1号敲除突变株;2:*CgATG20*的2号敲除突变株;5' Flank:上游同源臂;3' Flank:下游同源臂;*SUR*:氯喹磺隆抗性基因;M:DNA maker。

图2 *CgATG20* 敲除突变株的构建与分子鉴定

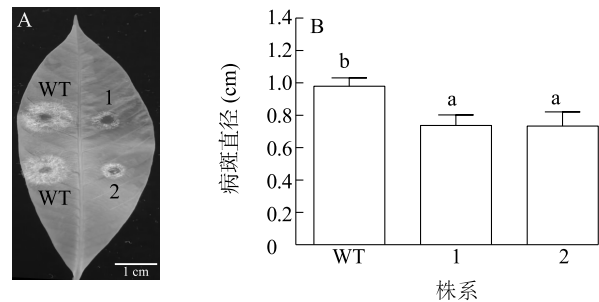
Fig.2 Construction and molecular characterization of *CgATG20* knockout mutant

2.3 *CgATG20* 对胶孢炭疽菌致病力影响

为了探究 *CgATG20* 对胶孢炭疽菌致病力的影响,用野生型(WT)、 $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2 的孢子悬浮液分别接种离体橡胶树叶片,3 d 后观察到 WT、 $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2 都能够引起典型的病斑,且 $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2 引起的病斑明显小于 WT 引起的病斑(图 3A),进一步测量并统计分析病斑直径,结果显示, $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2 引起的病斑直径显著小于 WT 引起的病斑直径(图 3B),说明 *CgATG20* 的缺失导致胶孢炭疽菌对橡胶树叶片的致病能力显著降低, *CgATG20* 能够影响胶孢炭疽菌对橡胶树的致病力。

2.4 *CgATG20* 对菌落生长和产孢能力的影响

为了探究 *CgATG20* 是否影响胶孢炭疽菌的生长发育,将 WT 和 $\Delta CgATG20$ 接种在 PDA 培养基上,6 d 后观察到 $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2 的菌落形态与 WT 没有明显差异(图 4A),菌落直径统计分析结果显示, $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2 的菌落直径分别比 WT 减少了 11.5% 和 12.3%,具有显著差异(图 4B)。对孢子产量的统计结果表明, $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2 的孢子产量显著低于 WT 的孢子产量(图 4C)。以上结果说明 *CgATG20* 参与



A: WT 和 $\Delta CgATG20$ 在完整橡胶树叶子上接种 3 d 的病斑情况,标尺为 1 cm;B:对叶片上的病斑直径进行统计分析。WT、1 和 2 见图 2 注;不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图3 *CgATG20* 对橡胶树叶片的致病性分析

Fig.3 Pathogenicity analysis of *CgATG20* on rubber tree leaves

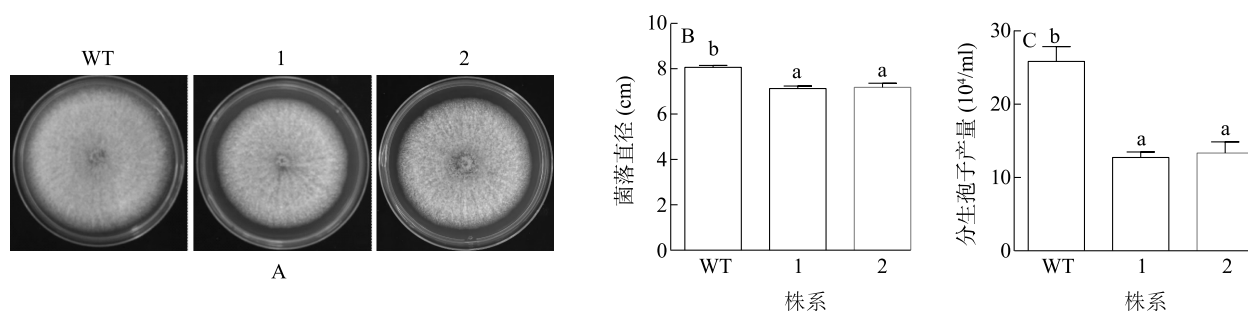
调控病菌的产孢能力和菌落的放射性生长。

2.5 *CgATG20* 对细胞壁完整性的影响

为了探究 *CgATG20* 对细胞壁完整性的影响,我们将 WT 和 $\Delta CgATG20$ 接种在添加了 SDS (0.005%)、CFW (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 和 CR (250 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 PDA 培养基上进行培养,6 d 后观察,结果显示, $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2 的菌落形态与 WT 没有明显差异(图 5A)。抑制率分析结果显示,这几种药剂对 $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2 的生长抑制

率与对 WT 的生长抑制率也没有明显差异(图 5B)。以上结果说明, *CgATG20* 不参与细胞壁应激反应,与

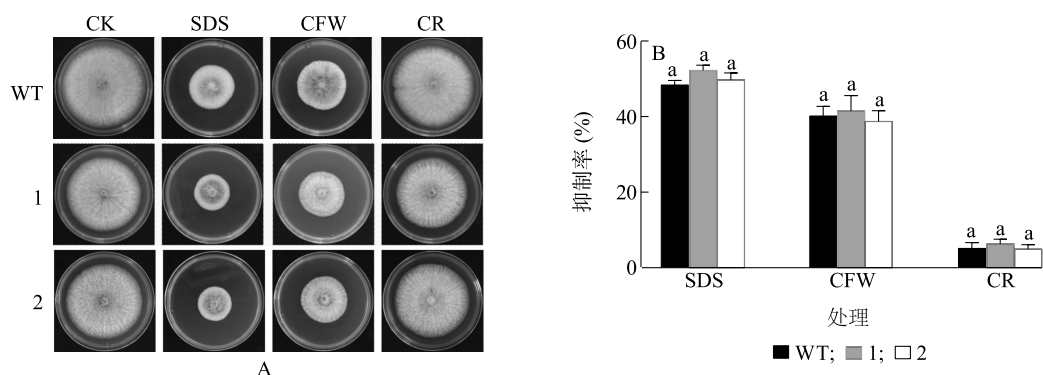
胶孢炭疽菌的细胞壁完整性无关。



A:不同菌株在马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上培养6 d的菌落形态;B:不同菌株在PDA培养基上培养6 d的菌落直径的统计分析结果;C:不同菌株的分生孢子产量分析结果;WT、1和2见图2注;不同的小写字母表示差异显著($P < 0.05$)。

图4 $\Delta CgATG20$ 的菌落生长和产孢能力分析

Fig.4 Colony growth and spore production analysis of $\Delta CgATG20$



A:不同菌株在添加了不同药剂的马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基上培养6 d的菌落形态;B:不同菌株在不同培养基上培养6 d的抑制率的统计分析结果。WT、1和2见图2注;CK:马铃薯葡萄糖琼脂培养基;SDS、CFW、CR分别表示在添加了十二烷基磺酸钠(0.005%)、钙荧光白(200 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和刚果红(250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的PDA培养基上培养的菌株。小写字母相同表示差异不显著($P < 0.05$)。

图5 $\Delta CgATG20$ 的细胞壁应激分析

Fig.5 Cell wall stress analysis of $\Delta CgATG20$

2.6 *CgATG20* 对胶孢炭疽菌侵染结构形成的影响

为了探究 *CgATG20* 是否影响胶孢炭疽菌侵染结构的形成,我们观察并分析了分生孢子在疏水聚苯乙烯板表面形成附着胞的过程(图 6A)和对洋葱表皮的侵染过程。结果表明,WT、 $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2 的孢子形态和附着胞形成率没有显著差异(图 6B、图 6C)。洋葱表皮接种试验结果显示,在侵染过程中附着胞存在 2 种类型,我们将其分为 Type I 和 Type II,其中 Type I 可以形成正常的侵染菌丝,Type II 不能形成侵染菌丝(图 6D)。在 WT 菌株侵染过程中,约有 80% 的附着胞可以形成正常的侵染菌丝(Type I),而在 $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2 菌株侵染过程中,形成正常侵染菌丝的附着胞只占不到 20%,大部分为 Type II(图 6C、图

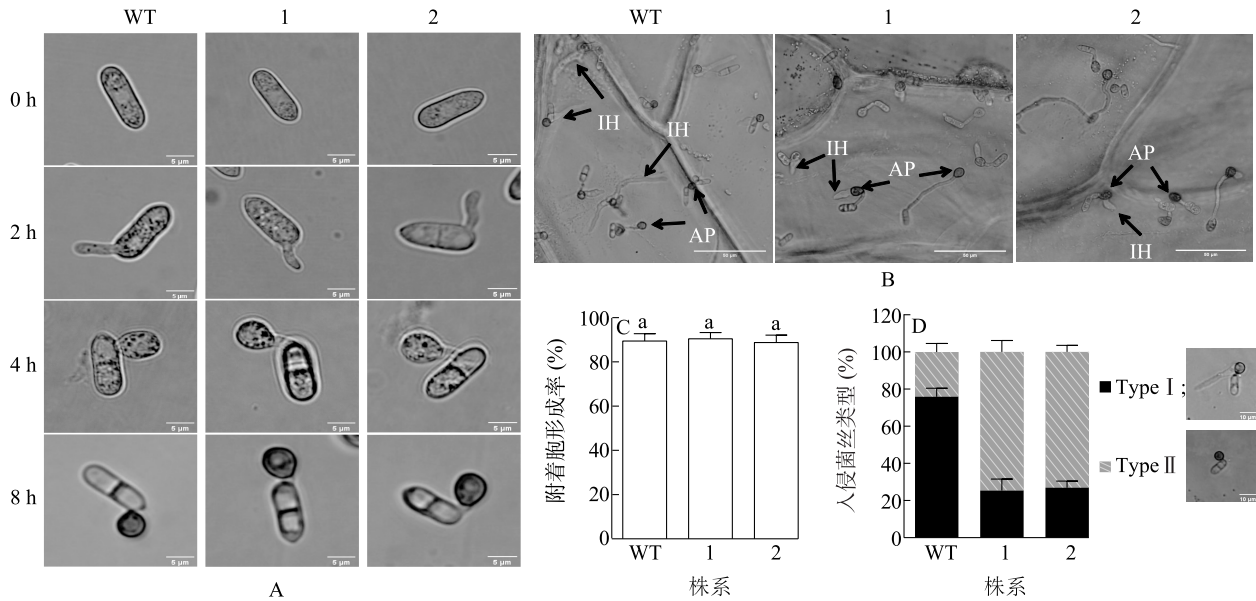
6D)。以上结果表明, *CgATG20* 并不影响附着胞的形成,但在侵染过程中发挥重要作用。

2.7 *CgATG20* 参与氮饥饿诱导的自噬

根据文献报道,禾谷镰刀菌中 *ATG20* 在自噬过程中参与了自噬小体的形成^[12]。为了探究 *CgATG20* 是否参与胶孢炭疽菌自噬小体的形成,我们将 WT 和 $\Delta CgATG20$ 菌株的菌丝在氮缺失培养基中培养 3 h 后进行 MDC 染色。结果显示,WT 菌株在 CM 培养基培养条件下,菌丝体中荧光强度较弱且几乎观察不到自噬小体,在基本培养基(MM 培养基)和氮饥饿条件下,WT 菌株荧光亮度增强且形成明显的自噬小体;而 $\Delta CgATG20$ -1 和 $\Delta CgATG20$ -2 菌丝体中荧光强度普遍弱于 WT 且没有明显的自噬小体形成(图 7A)。进一步对不同菌株中自噬小体

的数目进行统计分析,结果表明,2 个突变体菌株中的自噬小体数量显著低于野生型中的自噬小体数量

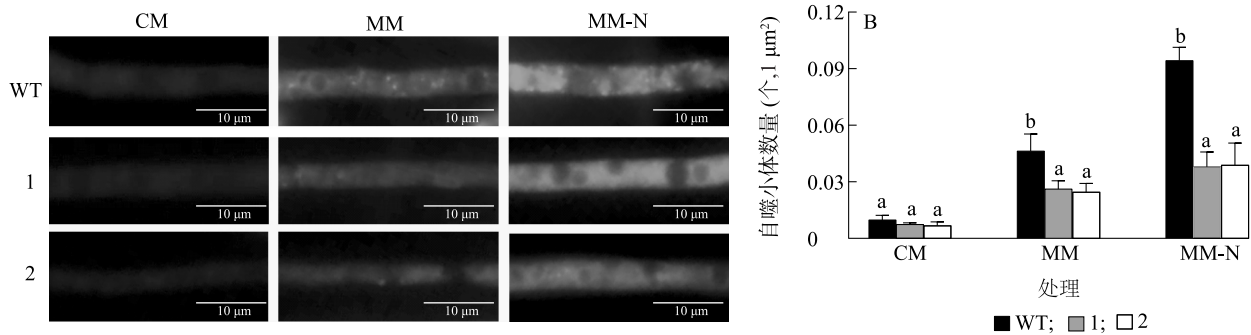
(图 7B)。以上结果说明 *CgATG20* 参与了自噬小体的形成。



A: 疏水聚苯乙烯表面附着胞形成过程观察 (标尺为 5 μm); B: 疏水聚苯乙烯表面 8 h 附着胞形成率统计分析结果; C: 不同菌株接种洋葱表皮 12 h 观察结果 (标尺为 50 μm), AP: 附着胞; IH: 入侵菌丝; D: 不同菌株接种洋葱表皮入侵菌丝分类统计。WT、1 和 2 见图 2 注; Type I 和 Type II 为附着胞的 2 种类型。小写字母相同表示差异不显著 ($P < 0.05$)。

图 6 $\Delta\text{CgATG20}$ 在疏水聚苯乙烯板上的附着胞形成率分析和对洋葱表皮的入侵分析

Fig.6 Analysis of appressorium formation rate of $\Delta\text{CgATG20}$ on hydrophobic polystyrene plate and invasion on onion epidermis



A: 不同菌株在不同培养基上的 MDC 染色分析; B: 不同菌株自噬小体数量统计分析; WT、1 和 2 见图 2 注; 不同的小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。CM、MM、MM-N 表示 CM 培养基、MM 培养基、MM-N 缺氮培养基处理,培养基的具体配方见方法 1.1。

图 7 $\Delta\text{CgATG20}$ 在氮饥饿条件下的单丹磺酰尸胺 (MDC) 染色分析

Fig.7 Monodansylcadaverine (MDC) staining analysis of $\Delta\text{CgATG20}$ under nitrogen starvation condition

3 讨论

自噬现象是植物病原真菌中普遍存在的生理过程,该过程由多个自噬相关基因参与。*ATG20* 原名 *Cvt20*,因从酵母 *Cvt* 途径缺陷突变体中筛选出来而得名,后来被统一命名为 *ATG20*^[6]。目前,真菌中已

经被鉴定的 *ATG20* 蛋白并不多,主要包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 和禾谷镰刀菌 (*Fusarium graminearum*)、玉米旋孢腔菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) 和烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 的同源蛋白质,这些不同真菌的 *ATG20* 同源蛋白质结构中都含有保守的 PX 和 BAR

结构域^[5,10-11,23-24]。本研究的生物信息学分析结果表明,CgATG20 蛋白同样含有 PX 和 BAR 保守结构域,同时系统进化树的分析结果也显示 CgATG20 与来自其他真菌的 ATG20 位于同一分支,与禾谷镰刀菌 *FgATG20* 的亲缘关系最近。因此,从蛋白质结构和进化关系上来说 CgATG20 应该就是胶孢炭疽菌中 ATG20 的同源蛋白质。

已有的研究结果证明,自噬相关基因在植物病原真菌的生长发育和致病性中起着关键作用,而且同一自噬相关同源基因在不同病原真菌中的功能也存在差异^[25]。例如:在稻瘟病病菌中,*MoATG20* 的缺失导致分生孢子的形成缺陷和致病力减弱,说明 *MoATG20* 与稻瘟病病菌的分生孢子的产生和致病力有关^[11];在禾谷镰刀菌中,*FgATG20* 的敲除突变体表现为病菌营养生长缓慢、病菌在寄主组织中的传播和症状的发展受阻,但无性孢子的形成率没有改变,证明 *FgATG20* 在病菌的营养生长和致病性调控中发挥重要作用,但对有性孢子的发育影响不大^[23];在玉米旋孢腔菌中,*ChATG20/ChSNX41* 的缺失影响病菌的营养生长和分生孢子的产量,同时导致病菌对玉米的致病力显著降低,而且病菌对氧化胁迫、细胞壁完整性应激、杀菌剂和异硫氰酸酯的敏感性显著增强^[5];在烟曲霉中,*AfATG20* 受到蛋白激酶 A (PKA) 的磷酸化调节,对烟曲霉生长、病菌细胞壁应激反应和病菌毒力有重要影响^[24]。我们发现 CgATG20 与其他病原真菌中的同源蛋白质一样影响病菌营养生长、分生孢子产量和对寄主的致病性,尽管 CgATG20 对胶孢炭疽菌的附着胞形成和发育没有影响,但能调控侵染菌丝的产生和入侵,说明 CgATG20 影响胶孢炭疽菌的侵染过程,但其对侵染过程的调控机制还需要进一步的解析。

如前所述,CgATG20 的蛋白质结构中存在 PX 和 BAR 保守结构域。已有的研究表明,PX 结构域是一个磷酸肌苷结合结构域,含有该类结构域的蛋白质在与分泌和内吞作用相关的膜运输、细胞信号转导和脂质代谢中具有多种功能,多被称为分类连接蛋白质 (SNX)^[26-27]。ATG20 的 PX 结构域能够与磷脂酰肌醇 3-单磷酸 (PI3P) 结合参与前自噬体结构的形成^[28]。BAR 结构域是一种存在于多种蛋白质中的膜脂结合结构域,它不仅与脂质双分子层结合,还具有膜雕刻能力,能够直接控制生物膜的拓扑结构,诱导膜弯曲^[5,29]。ATG20 与同属于分类

连接蛋白质的 ATG24 可以通过 BAR 结构域相互作用组装成异源二聚体,是内吞体循环所必需的^[8,30]。因此,自噬相关蛋白质 ATG20 是分类连接蛋白质家族的关键成员,其中的 PX 和 BAR 结构域均参与自噬和膜重塑过程^[10],在细胞质-液泡靶向 (Cvt) 途径介导的选择性自噬过程中发挥重要作用^[7,31-32]。在本研究中,我们通过 MDC 染色的方法分析了 *CgATG20* 对胶孢炭疽菌自噬的影响,发现在经过氮饥饿诱导自噬的 WT 菌丝体中,形成自噬小体的数量显著多于 *CgATG20* 敲除突变体中形成的自噬小体的数量,证明了 *CgATG20* 参与自噬小体的形成,与胶孢炭疽菌的自噬过程有关。在酵母和禾谷镰刀菌中的研究结果已经证明 Atg20 与 Atg24、Atg11 和 Atg17 直接相互作用形成蛋白质复合物参与自噬起始系统^[6,12,33-34],那么 CgATG20 是否以同样的作用方式发挥作用? 这还需要进一步的试验证明。

参考文献:

- [1] YAO W J, LI Y X, CHEN Y C, et al. Atg1-mediated Atg11 phosphorylation is required for selective autophagy by regulating its association with receptor proteins[J]. *Autophagy*, 2023, 19(1): 180-188.
- [2] LI H, LIU Z Y, WU N Y, et al. PARP inhibitor resistance: the underlying mechanisms and clinical implications[J]. *Molecular Cancer*, 2020, 19(1): 107.
- [3] KIRKIN V, ROGOV V. A diversity of selective autophagy receptors determines the specificity of the autophagy pathway[J]. *Molecular Cell*, 2019, 76(2): 268-285.
- [4] LIU X M, SUN L L, HU W, et al. ESCRTs cooperate with a selective autophagy receptor to mediate vacuolar targeting of soluble cargos[J]. *Molecular Cell*, 2015, 59(6): 1035-1042.
- [5] YU H L, JIA W T, LI Z X, et al. The sorting nexin genes *ChSNX4* and *ChSNX41* are required for reproductive development, stress adaptation and virulence in *Cochliobolus heterostrophus* [J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(8): 855.
- [6] NICE D C, SATO T K, STROMHAUG P E, et al. Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy [J]. *Biological Chemistry*, 2002, 277(33): 30198-30207.
- [7] KLIONSKY D J, CREGG J M, DUNN W A J R, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes[J]. *Developmental Cell*, 2003, 5(4): 539-545.
- [8] ZHAO D, LIU X M, YU Z Q, et al. Atg20- and Atg24-family proteins promote organelle autophagy in fission yeast [J]. *Journal of Cell Science*, 2016, 129(22): 4289-4304.

- [9] OHASHI Y, MUNRO S. Membrane delivery to the yeast autophagosome from the golgi-endosomal system[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2010, 21:3998-4008.
- [10] POPELKA H, DAMASIO A, HINSHAW J E, et al. Structure and function of yeast Atg20, a sorting nexin that facilitates autophagy induction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(47):E10112-E10121.
- [11] DENG Y Z, QU Z, NAQVI N I. The role of snx41-based pexophagy in *Magnaporthe* development[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79128.
- [12] LYU W Y, XU Z, TALBOT N J, et al. The sorting nexin FgAtg20 is involved in the Cvt pathway, non-selective macroautophagy, pexophagy and pathogenesis in *Fusarium graminearum*[J]. *Cellular Microbiology*, 2020, 22(8): e13208.
- [13] 梁晨, 周芸, 安邦, 等. 胶孢炭疽菌特有效应蛋白基因 *CgE23* 对产孢能力的影响[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(19): 6377-6384.
- [14] 朱信霖, 扈东营, 陈显振, 等. 作用于细胞壁的抗真菌药物研究进展[J]. *菌物学报*, 2022, 41(6): 871-877.
- [15] 段灵涛, 祝一鸣, 何九卿, 等. 真菌细胞自噬的研究进展[J]. *热带生物学报*, 2021, 12(2): 253-260.
- [16] 翟李刚, 林春花, 蔡志英, 等. 橡胶树胶孢炭疽菌细胞自噬相关基因 *CgAtg4* 的克隆与序列分析[J]. *湖北农业科学*, 2014, 53(9): 2189-2191, 2223.
- [17] 李超萍, 林春花, 翟李刚, 等. 橡胶树胶孢炭疽菌致病相关基因 *CgATG8* 的功能分析[J]. *热带作物学报*, 2013, 34(11): 2172-2178.
- [18] WANG Q N, AN B, HOU X R, et al. Dicer-like proteins regulate the growth, conidiation, and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis*[J]. *Front Microbiol*, 2018, 8: 2621.
- [19] LIU N, WANG Q N, HE C Z, et al. CgMFS1, a major facilitator superfamily transporter, is required for sugar transport, oxidative stress resistance, and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* from *Hevea brasiliensis*[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2021, 43(3): 1548-1557.
- [20] GAO X S, WANG Q N, FENG Q D, et al. Heat shock transcription factor CgHSF1 is required for melanin biosynthesis, appressorium formation, and pathogenicity in *Colletotrichum gloeosporioides* [J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(2): 175.
- [21] 廖至雯, 黄志睿, 罗红丽. 胶孢炭疽菌自噬诱导和 MDC 染色方法的建立和条件优化[J/OL]. *分子植物育种*, 2023: 1-12[2023-03-14]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230313.1851.010.html>.
- [22] VENEALUT-FOURREY C, BAROOAH M, EGAN M, et al. Autophagic fungal cell death is necessary for infection by the rice blast fungus[J]. *Science*, 2006, 312(5773): 580-583.
- [23] 吕务云. 禾谷镰刀菌细胞自噬途径相关基因的功能分析[D]. 杭州: 浙江大学, 2019.
- [24] SHWAB E K, JUVVADI P R, SHAHEEN S K, et al. Protein kinase a regulates autophagy-associated proteins impacting growth and virulence of *Aspergillus fumigatus* [J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(4): 354.
- [25] 刘伟, 杜春梅. 植物病原真菌的自噬[J]. *微生物学报*, 2021, 61(11): 3363-3376.
- [26] TEASDALE R D, COLLINS B M. Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease[J]. *Biochem Journal*, 2012, 441(1): 39-59.
- [27] CHANDRA M, COLLINS B M. The phox homology (PX) domain [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1111: 1-17.
- [28] RATHOD J, YEN H C, LIANG B, et al. YPIBP: a repository for phosphoinositide-binding proteins in yeast[J]. *Comput Struct Biotechnol Journal*, 2021, 19: 3692-3707.
- [29] ASPENSTRÖM P. BAR domain proteins regulate rho GTPase signaling [J]. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2019, 1111: 33-53.
- [30] ZHENG W H, LIN Y H, FANG W Q, et al. The endosomal recycling of FgSnx1 by FgSnx41-FgSnx4 heterodimer is essential for polarized growth and pathogenicity in *Fusarium graminearum* [J]. *New Phytologist*, 2018, 219(2): 654-671.
- [31] LYNCH-DAY M A, KLIONSKY D J. The Cvt pathway as a model for selective autophagy [J]. *Febs Letters*, 2010, 584(7): 1359-1366.
- [32] MA M, KUMAR S, PURUSHOTHAMAN L, et al. Lipid trafficking by yeast Snx4 family SNX-BAR proteins promotes autophagy and vacuole membrane fusion[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2018, 29(18): 2190-2200.
- [33] KABEYA Y, KAMADA Y, BABA M, et al. Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(5): 2544-2553.
- [34] YORIMITSU T, KLIONSKY D J. Atg11 links cargo to the vesicle forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(4): 1593-1605.

(责任编辑: 陈海霞)