

## 研究报告

*AsSlt2* 基因对茄链格孢细胞壁完整性的调控东曼<sup>1</sup>, 王楚媛<sup>1</sup>, 程嘉宁<sup>2</sup>, 范莎莎<sup>1</sup>, 赵冬梅<sup>\*1</sup>, 杨志辉<sup>1</sup>, 朱杰华<sup>\*1</sup>

1 河北农业大学植物保护学院, 河北 保定 071000

2 河北农业大学农商实训创业中心, 河北 保定 071000

东曼, 王楚媛, 程嘉宁, 范莎莎, 赵冬梅, 杨志辉, 朱杰华. *AsSlt2* 基因对茄链格孢细胞壁完整性的调控[J]. 微生物学通报, 2022, 49(1): 115-124

Dong Man, Wang Chuyuan, Cheng Jianing, Fan Shasha, Zhao Dongmei, Yang Zhihui, Zhu Jiehua. Regulation of the cell wall integrity by *AsSlt2* gene in *Alternaria solani*[J]. Microbiology China, 2022, 49(1): 115-124

**摘要:**【背景】由茄链格孢(*Alternaria solani*)引起的马铃薯早疫病被普遍认为是马铃薯生产上的第二大叶部病害, 在马铃薯各产区普遍发生, 给马铃薯生产造成了巨大的经济损失。【目的】明确 *AsSlt2* 基因对茄链格孢细胞壁完整性的影响。【方法】在含有刚果红、细胞壁降解酶和十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)等细胞壁胁迫的培养基上观察  $\Delta AsSlt2$  缺失突变株的生长情况, 计算相对生长抑制率; 通过实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)方法检测  $\Delta AsSlt2$  菌株中细胞壁合成相关基因的表达情况; 进一步检测  $\Delta AsSlt2$  细胞壁中几丁质的含量及胞外酶活性。【结果】 $\Delta AsSlt2$  缺失突变株对 SDS、刚果红、细胞壁降解酶等细胞壁胁迫的敏感性增强, 在加入细胞壁降解酶后突变株原生质体释放量显著增多;  $\Delta AsSlt2$  对外源氧胁迫更敏感, 突变株胞外过氧化物酶和漆酶活性均显著降低; 进一步研究发现,  $\Delta AsSlt2$  细胞壁中几丁质含量减少, 几丁质合成相关基因与漆酶合成相关基因的表达量均明显降低。【结论】*AsSlt2* 基因在茄链格孢细胞壁的完整性及抵御外界胁迫方面发挥重要作用。

**关键词:** *AsSlt2*; 马铃薯早疫病; 茄链格孢; 细胞壁完整性; 实时荧光定量 PCR

基金项目: 河北省教育厅青年基金(QN2019156); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-09-P18)

**Supported by:** Youth Fund of Hebei Province Education Department (QN2019156); Earmarked Fund for Modern Agro-Industry Technology Research System in China (CARS-09-P18)

**\*Corresponding authors:** E-mail: ZHAO Dongmei: zhaodongm03@126.com; ZHU Jiehua: zhujiehua356@126.com

**Received:** 2021-03-26; **Accepted:** 2021-08-06; **Published online:** 2021-09-23

## Regulation of the cell wall integrity by *AsSlt2* gene in *Alternaria solani*

DONG Man<sup>1</sup>, WANG Chuyuan<sup>1</sup>, CHENG Jianing<sup>2</sup>, FAN Shasha<sup>1</sup>, ZHAO Dongmei<sup>\*1</sup>, YANG Zhihui<sup>1</sup>, ZHU Jiehua<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> College of Plant Protection, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

<sup>2</sup> Agricultural Business Training and Entrepreneurship Center, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

**Abstract:** [Background] Potato early blight caused by *Alternaria solani* is generally considered to be the second major potato disease in potato production, which occurs in various potato production areas. Serious disease will lead to large-scale production reduction and potato block decay during storage, causing huge economic losses to potato production. [Objective] In order to clarify the effect of *AsSlt2* gene on the cell wall integrity of *Alternaria solani*. [Methods] Congo red, sodium dodecyl sulfate (SDS) and cell wall degrading enzymes were applied to evaluate the cell wall integrity for the mutant strain, and calculate the relative growth inhibition rate. RT-qPCR was used to analyze the transcription of cell wall-related genes. The chitin content and extracellular enzyme activity in the cell wall of  $\Delta AsSlt2$  were further detected. [Results] The tolerance of  $\Delta AsSlt2$  to cell wall stress factors SDS, Congo red and cell wall degradation enzymes were weaker than that of wild and complementation strain. The protoplast release increased significantly after adding cell wall degrading enzyme. Furthermore, it was found that  $\Delta AsSlt2$  was more sensitive to exogenous peroxide stress. The extracellular peroxidase and laccase activity of  $\Delta AsSlt2$  mutant were significantly reduced, the chitin content in the cell wall of  $\Delta AsSlt2$  mutant were decreased. The expression of laccase related genes and chitin synthase related genes in  $\Delta AsSlt2$  mutant were detected by RT-qPCR. [Conclusion] The *AsSlt2* plays an important role in cell wall integrity and tolerance to external stress in *A. solani*.

**Keywords:** *AsSlt2*; potato early blight; *Alternaria solani*; cell wall integrity; RT-qPCR

茄链格孢(*Alternaria solani*)是引起马铃薯早疫病的主要病原菌,其寄主范围较广,除马铃薯外还可侵染番茄、烟草等多种茄科作物。茄链格孢侵染植物后可引起植株叶片提前干枯死亡。由茄链格孢引起的马铃薯早疫病在马铃薯整个生育期都会发生,对马铃薯的生产造成危害,严重时损失率高达 70%–80%<sup>[1]</sup>。细胞壁是真菌的重要组成部分,可作为重要屏障保护真菌免受一些极端环境的损害,在侵染寄主时对活性氧的防御起到了重要作用。真菌细胞壁由糖蛋白、葡聚糖和几丁质组分交联形成,其

中几丁质是真菌细胞壁结构和功能重要的组成部分,当几丁质合成被破坏时,细胞壁组分排列不规则,真菌细胞畸形。黑色素是细胞外壁的重要结构成分,是分生孢子表面疏水蛋白存在所必需的,并且在抵御外界胁迫方面起着重要作用<sup>[2]</sup>。近年来有研究表明,漆酶基因通过调控漆酶的活性及含量进而影响黑色素的合成<sup>[3]</sup>。如在稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)中,*Moswi6* 通过调控几丁质合成酶相关基因及漆酶合成相关基因的表达,使细胞壁中几丁质含量增加、黑色素合成减少、菌丝畸形<sup>[4]</sup>。Pihet

等<sup>[5]</sup>研究发现黑色素是烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)分生孢子细胞壁完整性的重要组成部分。

在丝状真菌中,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联通路是一类相对保守的细胞信号转导通路,在对病原菌生长、发育、繁殖及致病性的调控方面起着重要作用<sup>[6]</sup>。在模式真菌酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中发现了5条保守的MAPK信号途径,即FUS3、KSS1、SLT2、HOG1和SMK1,分别参与调控有性交配、菌丝生长、细胞壁完整性、细胞适应压力和分生孢子的产生<sup>[7]</sup>。其中SLT2-MAPK信号途径又称细胞壁完整性(cell wall integrity, CWI)途径,主要参与调控丝状真菌细胞壁组分的生物合成,同时在调节细胞增殖、生长和感应外界环境的低渗透压、高温、交配信息素、养分限制等方面起作用<sup>[8-10]</sup>。细胞壁完整性途径包括细胞表面感受器、GTP结合蛋白、核心组分MAPK及其下游的效应器。*Slt2*位于CWI途径核心组分的下游,与真菌细胞壁的完整性、生长发育、分生孢子形成及致病性密切相关<sup>[11-14]</sup>。近年来*Slt2*的功能在多种病原真菌中的作用也得到了研究。如在稻瘟病菌(*M. oryzae*)中,*Slt2*同源基因*Mps1*调控细胞壁的形成,*Mps1*缺失突变株对细胞壁降解酶敏感性增强<sup>[15]</sup>。*Moswi6*是*Slt2*下游转录因子*Swi6*的同源基因,缺失*Moswi6*突变株对十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)等细胞壁胁迫相关耐受性增强,细胞壁中色素含量降低,几丁质含量和分布发生变化,酶解细胞壁后原生质体释放速率减慢,同时胞外过氧化物酶和漆酶活性显著降低<sup>[4]</sup>。在球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)中,*BbSlt2*基因通过影响细胞壁结构和组成调控细胞壁的完整性,缺失*BbSlt2*基因的突变株

对细胞壁合成抑制剂刚果红和真菌细胞壁降解酶的敏感性增加,同时突变株菌丝细胞壁中几丁质和海藻糖含量增加<sup>[16]</sup>。以上研究表明,*Slt2*在对真菌细胞壁完整性调控方面起着重要作用。

本实验室前期在茄链格孢中克隆得到了*Slt2*同源基因*AsSlt2*,并且通过聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的原生质体转化法和抗性筛选获得了茄链格孢*AsSlt2*基因缺失及回复菌株,发现缺失*AsSlt2*基因后茄链格孢生长速率显著下降,致病力严重减弱,同时丧失了产生黑色素和分生孢子的能力<sup>[17]</sup>。在此基础上,为了探明*AsSlt2*基因缺失是否对早疫病病菌细胞壁的完整性产生影响,测定了不同胁迫因子下突变株生长的抑制率、胞外酶活性及细胞壁中几丁质含量,并利用RT-qPCR分析了 $\Delta AsSlt2$ 中漆酶及几丁质合成相关基因表达量的变化,分析了*AsSlt2*基因在茄链格孢细胞壁的完整性及抵御外界胁迫方面的作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

茄链格孢(*A. solani*)野生株HWC-168、*AsSlt2*基因的缺失突变株 $\Delta AsSlt2$ 、*AsSlt2*基因回复株 $\Delta AsSlt2$ -C,均由河北农业大学马铃薯病害研究室分离、构建和保存<sup>[17]</sup>。

### 1.2 主要试剂和仪器及培养基

#### 1.2.1 主要试剂和仪器

崩溃酶(driselase)、裂解酶(lysing enzyme, lyzyme)、蜗牛酶(snailase)、几丁质酶(streptomyces plicatus chitinase-63),生工生物工程(上海)股份有限公司;SDS、刚果红(congo red, CR),北京索莱宝生物科技有限公司;2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate),

ABTS]、二甲胺硼烷(dimethylamine-borane, DMAB)、葡萄糖、琼脂, 国产分析纯; Trizol、2×Magic SYBR Mixture, 北京康为生物技术有限公司; TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA SuperMix, 北京全式金生物技术有限公司。

恒温振荡器, 上海右一仪器有限公司; 高速离心机, 赛默飞世尔科技有限公司; 恒温培养箱, 宁波江南仪器厂; 紫外分光光度计, 上海谱元仪器有限公司; 实时荧光定量 PCR 仪, Bio-Rad 公司。

### 1.2.2 培养基

马铃薯葡萄糖(potato dextrose, PD)液体培养基: 马铃薯 200.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 蒸馏水 1 L。马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)培养基: 马铃薯 200.0 g, 葡萄糖 20.0 g, 琼脂 20.0 g, 蒸馏水 1 L。所有培养基均在  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min 备用。

### 1.3 $\Delta AsSlt2$ 对细胞壁胁迫因子敏感性的测定

将茄链格孢(*A. solani*)野生株 HWC-168、突变株  $\Delta AsSlt2$ 、回复株  $\Delta AsSlt2$ -C 接种在含 0.6 mg/mL SDS、20  $\mu$ g/mL 刚果红和 2 mg/mL 裂解酶的 PDA 平板上, 25 °C 培养 7 d, 测量菌落直径, 计算野生株、突变株  $\Delta AsSlt2$ 、回复株  $\Delta AsSlt2$ -C 的相对生长抑制率(relative growth inhibition, RGI)。RGI<sup>[18]</sup>=(对照菌落直径-处理菌落直径)/(处理菌落直径-菌饼直径)×100%。每个处理设置 3 个重复, 共进行 3 次生物学重复。

### 1.4 $\Delta AsSlt2$ 对茄链格孢氧化应激性的影响

将茄链格孢(*A. solani*)野生株 HWC-168、突变株  $\Delta AsSlt2$  和回复株  $\Delta AsSlt2$ -C 接种在含 20 mmol/L  $H_2O_2$  的 PDA 平板上, 25 °C 培养 7 d, 测量菌落直径, 计算野生株、突变株  $\Delta AsSlt2$  和回复株  $\Delta AsSlt2$ -C 的 RGI。每个处理

设置 3 个重复, 共进行 3 次生物学重复。

### 1.5 $AsSlt2$ 基因对茄链格孢过氧化物酶活性的影响

将茄链格孢(*A. solani*)野生株 HWC-168、突变株  $\Delta AsSlt2$  及回复株  $\Delta AsSlt2$ -C 接种到 80 mL PD 液体培养基中, 25 °C、120 r/min 培养 48 h; 用 4 层无菌纱布过滤收集菌丝, 并用吸水纸除去多余水分, 置于 -80 °C 冷冻 24 h, 冷冻抽干 24 h 后称重。取 1 mL 滤液, 4 °C、3 500 r/min 离心 10 min; 在 2 mL EP 管加入 3.4  $\mu$ L 30%  $H_2O_2$ 、100  $\mu$ L 500 mmol/L 的醋酸、100  $\mu$ L 10 mg/mL 的 ABTS、200  $\mu$ L 滤液和 600  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 室温放置 5 min, 立即移入冰中终止反应, 测定其在 420 nm 处的吸光值, 再将最终单位换算成吸光值/g, 则为  $H_2O_2$  酶的活性。共进行 3 次生物学重复。

### 1.6 $AsSlt2$ 对茄链格孢几丁质含量的影响

将茄链格孢(*A. solani*)野生株 HWC-168、突变株  $\Delta AsSlt2$  及回复株  $\Delta AsSlt2$ -C 接种到 PD 液体培养基中, 25 °C、120 r/min 培养 20 h, 用 4 层无菌纱布过滤收集菌丝, 用无菌水洗涤 2 次后冷冻抽干并捣碎, 取 5 mg 菌丝粉用 6% KOH 悬浮, 80 °C 水浴 90 min 后 2 000×g 离心 10 min, 弃上清, 加入 1 mL 10 mol/L 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)重新悬浮, 2 000×g 离心 10 min。弃上清, 加入 100  $\mu$ L pH 6.0 的 McIlvaine 缓冲溶液(1 000 mL 0.1 mol/L 柠檬酸溶液与 625 mL 0.1 mol/L 磷酸氢二钠溶液混合)及 5  $\mu$ L 几丁质酶 37 °C 酶解 24 h。取 100  $\mu$ L 样品加入等体积 0.27 mol/L 硼酸钠溶液(pH 9.0), PCR 仪中 100 °C 反应 10 min 后立即冷却至室温。加入 1 mL 新配的 DMAB 溶液, 37 °C 反应 20 min 后测定 585 nm 下的吸光值。共进行 3 次生物学重复。

1.7 *AsSlt2* 基因对茄链格孢漆酶活性的影响

漆酶活性测定参照 1.5 中过氧化物酶活性测定, 在 2 mL EP 管中加入 100  $\mu$ L 500 mmol/L 的醋酸、100  $\mu$ L 10 mg/mL 的 ABTS、200  $\mu$ L 滤液、600  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 室温放置 5 min, 立即移入冰中终止反应, 用分光光度计测定其在 420 nm 的吸光值, 将最终单位换算为吸光值/g, 即表示漆酶活性。共进行 3 次生物学重复。

1.8 *AsSlt2* 对茄链格孢几丁质合酶和漆酶合成相关基因表达量的影响

将茄链格孢(*A. solani*)野生株 HWC-168、突变株  $\Delta AsSlt2$  及回复株  $\Delta AsSlt2$ -C 接种在 PDA 平板上, 25  $^{\circ}$ C 培养 7 d, 用 4 层无菌纱布过滤收集菌丝, 用 Trizol 法提取总 RNA 后进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, NanoDrop 2000 检测 RNA 纯度和浓度。利用 TransScript<sup>®</sup> One-Step gDNA Removal and cDNA SuperMix 试剂盒获得 cDNA, 具体操作步骤参照试剂盒说明书。在茄链格孢全基因组数据库中找到几丁质合酶编码基因 *chsC* (GenBank 登录号 CP022032.1)、*chsD* (GenBank 登录号 CP022028.1)、漆酶编码基因 *abr1* (GenBank 登录号 CP022024.1)、*abr2* (GenBank 登录号 CP022024.1)。根据漆酶编码基因及几丁质合酶基因的编码序列(coding sequence, CDS), 利用 Prime3 设计引物, 以茄链格孢 *actin* 基因为内参, 以各菌株的 cDNA 为模板, 使用 *chsC*、*chsD*、*abr1*、*abr2* 基因特异性引物(表 1)进行荧光定量 PCR 检测。PCR 反应体系(20  $\mu$ L): 2 $\times$ Magic SYBR Mixture 10  $\mu$ L, 目的基因 cDNA (25 ng/ $\mu$ L) 1  $\mu$ L, 正、反引物(10  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补足 20  $\mu$ L。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}$ C 30 s; 60  $^{\circ}$ C 30 s; 40 个循环。每个样品进行 3 次生物学重复。利用 2<sup>- $\Delta\Delta C_t$</sup>  法分析基因的相对表达量。用 SPSS 软件进行显著性差异的分析(Student's *t*-test, *n*=3, *P*<0.01 或 *P*<0.05)。

表 1 引物信息

Table 1 Primers information

引物名称	引物序列
Primers name	Primers sequence (5'→3')
RT- <i>actin</i> _F	GTCGTGATCTGACTGACTACCTC
RT- <i>actin</i> _R	GTAGCAGAGCTTCTCCTTGATGT
RT- <i>chsC</i> _F	GCTATGTTAAACGGCGGTAAGAC
RT- <i>chsC</i> _R	GAGATGAAACCAAACGCAGACTC
RT- <i>chsD</i> _F	GAATCTGCTACTACTCGGTGAGG
RT- <i>chsD</i> _R	GACAGCAAGACTTTGAACCTCGTC
RT- <i>abr1</i> _F	CCTCTTATCGTGCATGATCCTGA
RT- <i>abr1</i> _R	GGATTGGCGATGCTAATGAACTC
RT- <i>abr2</i> _F	GGAGTCAATGGCATTACCGAATG
RT- <i>abr2</i> _R	CCGTATAATCATGGGGCCTACAA

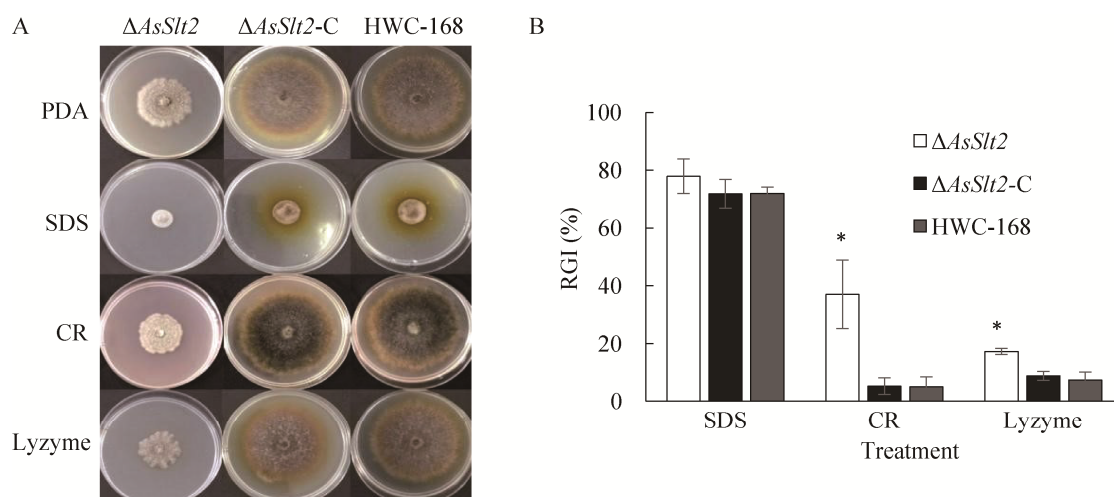
1.9 *AsSlt2* 对茄链格孢原生质体释放速率的影响

将茄链格孢(*A. solani*)野生株 HWC-168、突变株  $\Delta AsSlt2$  及回复株  $\Delta AsSlt2$ -C 接种到 PD 液体培养基中, 25  $^{\circ}$ C、120 r/min 培养 20 h, 用 4 层无菌纱布过滤收集菌丝, 用无菌水和 0.7 mol/L NaCl 各洗涤 2 次。将菌丝置于酶解液中, 每隔 30 min 在显微镜下观察并统计原生质体释放数目。共进行 3 次生物学重复。

2 结果与分析

2.1  $\Delta AsSlt2$  对细胞壁胁迫的耐受性减弱

茄链格孢野生株 HWC-168 和突变株  $\Delta AsSlt2$  在添加 0.6 mg/mL SDS、20  $\mu$ g/mL CR 和 2 mg/mL 裂解酶等细胞壁胁迫因子的 PDA 培养基上生长受到了不同程度的抑制。在 25  $^{\circ}$ C 黑暗条件下培养 7 d 后, 细胞壁胁迫因子对突变株  $\Delta AsSlt2$  的抑制作用高于野生菌株和回复株(图 1A、1B)。与 SDS 相比, 刚果红和细胞壁降解酶对野生株、突变株和回复株的 RGI 差异较大, 其中 20  $\mu$ g/mL 刚果红对野生株 HWC-168、回复株  $\Delta AsSlt2$ -C 和突变株  $\Delta AsSlt2$  的相对生长抑制率分别为 4.97%、5.20%和 37.00%。结果表明, *AsSlt2* 基因的缺失使马铃薯早疫病菌对细胞壁合成抑制剂的耐受性减弱。



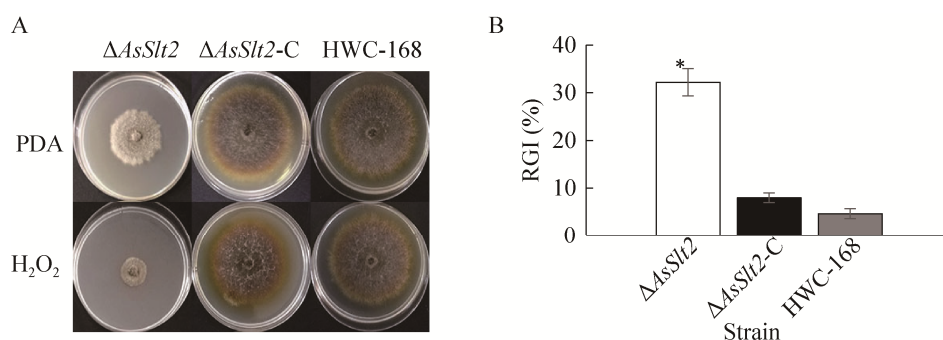
**图 1** 茄链格孢 HWC-168、 $\Delta AsSlt2$  和  $\Delta AsSlt2-C$  对细胞壁胁迫的耐受性 A: *AsSlt2* 突变株对细胞壁胁迫因子敏感; B: 细胞壁胁迫相对抑制率分析。SDS: 十二烷基硫酸钠; CR: 刚果红; Lyzyme: 细胞壁降解酶; 数据代表 3 次独立生物学重复, 统计学分析为 student's *t*-test (\*:  $P < 0.05$ )

Figure 1 The tolerance of *Alternaria solani* HWC-168,  $\Delta AsSlt2$  and  $\Delta AsSlt2-C$  to cell wall stress. A: Sensitivity of *AsSlt2* mutant to cell wall damaging agents; B: Statistical analysis of the relative inhibition rate of the tested strains under cell wall damaging agents. SDS: Sodium dodecyl sulfate; CR: Congo red; Lyzyme: Lysing enzymes; Datas are representative of three independent experiments, \* $P < 0.05$  with a student's *t*-test.

## 2.2 $\Delta AsSlt2$ 对氧化胁迫的耐受性减弱

茄链格孢野生株 HWC-168 和突变株  $\Delta AsSlt2$  在添加 20 mmol/L  $H_2O_2$  的 PDA 培养基上生长受到了抑制。在 25 °C 黑暗条件下培养 7 d 后, 氧胁迫因子 20 mmol/L  $H_2O_2$  对茄链格孢野生株

HWC-168、回复株  $\Delta AsSlt2-C$ 、突变株  $\Delta AsSlt2$  的相对生长抑制率分别为 4.65%、7.97%和 32.18%, 突变株  $\Delta AsSlt2$  的相对生长抑制率显著大于野生株和回复株(图 2)。结果表明, *AsSlt2* 基因的缺失使马铃薯早疫病病菌对外界过氧化物的耐受性减弱。



**图 2** 茄链格孢 HWC-168、 $\Delta AsSlt2$  和  $\Delta AsSlt2-C$  对  $H_2O_2$  的耐受性 A: *AsSlt2* 突变株对氧化胁迫因子敏感; B: 氧化胁迫相对抑制率分析; 数据代表 3 次独立生物学重复, 统计学分析为 student's *t*-test (\*:  $P < 0.05$ )

Figure 2 The tolerance of *Alternaria solani* HWC-168,  $\Delta AsSlt2$  and  $\Delta AsSlt2-C$  to  $H_2O_2$ . A: Sensitivity of *AsSlt2* mutant to oxidative stress; B: Statistical analysis of the relative inhibition rate of the tested strains under oxidative stress; Datas are representative of three independent experiments, \* $P < 0.05$  with a student's *t*-test.

### 2.3 $\Delta AsSlt2$ 过氧化物酶活性降低

为了进一步验证 *AsSlt2* 是否参与调控茄链格孢过氧化物酶的分泌及活性, 检测液体培养  $\Delta AsSlt2$  滤液中过氧化氢酶活性的变化情况, 发现  $\Delta AsSlt2$  分泌到胞外的过氧化氢酶活性显著低于 HWC-168 及  $\Delta AsSlt2$ -C (图 3)。结果表明, *AsSlt2* 基因的缺失使马铃薯早疫病菌胞外过氧化物酶活性降低。

### 2.4 $\Delta AsSlt2$ 漆酶活性及漆酶基因表达量降低

以 ABTS 为底物, 应用分光光度计检测 420 nm 吸光值。结果发现与茄链格孢野生型菌株 HWC-168 和回复株  $\Delta AsSlt2$ -C 相比, 突变株  $\Delta AsSlt2$  胞外漆酶活性显著降低; RT-qPCR 结果显示,  $\Delta AsSlt2$  中漆酶合成相关基因表达量均显著下降(图 4)。结果表明, *AsSlt2* 基因的缺失使马铃薯早疫病菌漆酶活性降低。

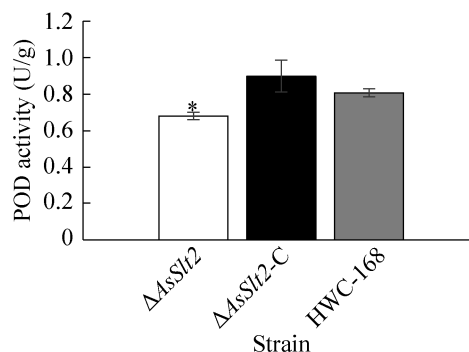


图 3 茄链格孢 HWC-168、 $\Delta AsSlt2$  和  $\Delta AsSlt2$ -C 的过氧化物酶 POD 活性 数据代表 3 次独立生物学重复, 统计学分析为 student's *t*-test (\*:  $P < 0.05$ )

Figure 3 The peroxidase POD activity of *Alternaria solani* HWC-168,  $\Delta AsSlt2$  and  $\Delta AsSlt2$ -C. Datas are representative of three independent experiments, \* $P < 0.05$  with a student's *t*-test.

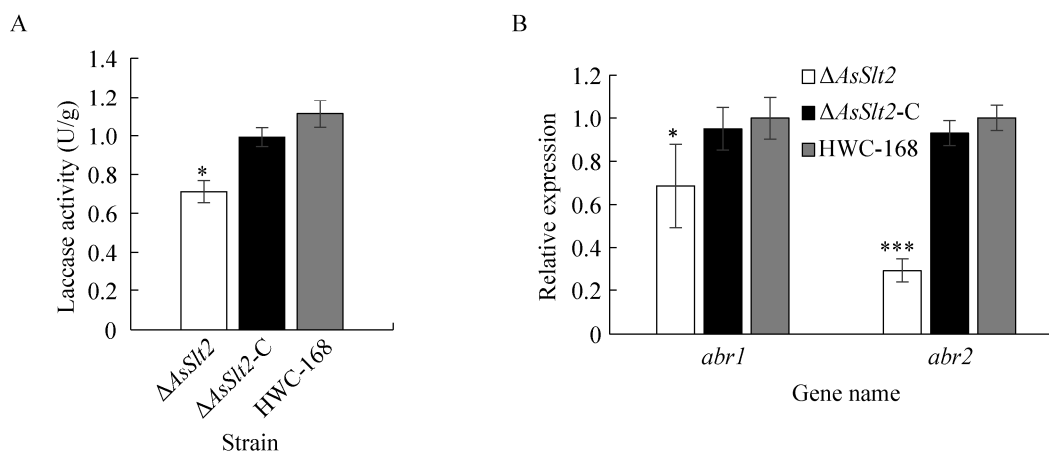


图 4 茄链格孢 HWC-168、 $\Delta AsSlt2$  和  $\Delta AsSlt2$ -C 的漆酶活性检测 A:  $\Delta AsSlt2$  漆酶活性; B:  $\Delta AsSlt2$  漆酶基因表达量; 数据代表 3 次独立生物学重复, 统计学分析为 student's *t*-test (\*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ )

Figure 4 The laccase secretion of *Alternaria solani* HWC-168,  $\Delta AsSlt2$  and  $\Delta AsSlt2$ -C. A: The laccase activity of  $\Delta AsSlt2$ ,  $\Delta AsSlt2$ -C and HWC-168; B: The expression of the laccase synthesizes genes of  $\Delta AsSlt2$ ,  $\Delta AsSlt2$ -C and HWC-168; Datas are representative of three independent experiments, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  with a student's *t*-test.

## 2.5 $\Delta AsSlt2$ 几丁质含量及几丁质合成基因表达量降低

检测了茄链格孢  $\Delta AsSlt2$  突变株中细胞壁中几丁质的含量, 结果发现与茄链格孢野生株和回复株相比, 突变株  $\Delta AsSlt2$  细胞壁中几丁质含量显著降低, 分别是野生株 HWC-168 的 78.00% 和回复株  $\Delta AsSlt2$ -C 的 88.00%。RT-qPCR 结果显示,  $\Delta AsSlt2$  中几丁质合成相关基因表达量均显著下降(图 5)。结果表明,  $AsSlt2$  基

因参与调控马铃薯早疫病菌细胞壁几丁质的合成。

## 2.6 $\Delta AsSlt2$ 原生质体释放量增多

将培养 20 h 的茄链格孢菌丝经过细胞壁降解酶处理, 测定相同时间下原生质体的释放数量。随着细胞壁降解酶作用时间的延长, 原生质体的释放量均增加, 但  $\Delta AsSlt2$  基因缺失突变株的原生质体释放量显著高于 HWC-168 及  $\Delta AsSlt2$ -C (图 6)。

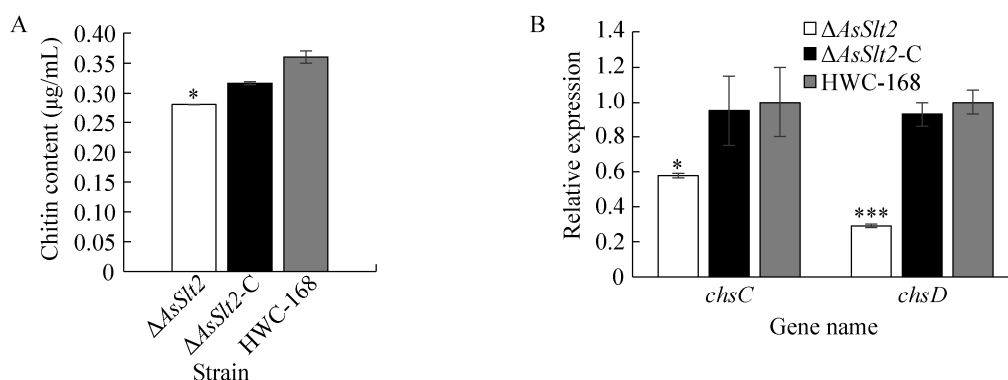


图 5 茄链格孢 HWC-168、 $\Delta AsSlt2$  和  $\Delta AsSlt2$ -C 几丁质含量 A:  $\Delta AsSlt2$  几丁质含量; B:  $\Delta AsSlt2$  几丁质合成基因表达量; 数据代表 3 次独立生物学重复, 统计学分析为 student's *t*-test (\*:  $P<0.05$ ; \*\*:  $P<0.01$ ; \*\*\*:  $P<0.001$ )

Figure 5 The chitin synthesis of *Alternaria solani* HWC-168,  $\Delta AsSlt2$  and  $\Delta AsSlt2$ -C. A: Chitin content of  $\Delta AsSlt2$ ; B: The expression of the chitin synthesis gene of  $\Delta AsSlt2$ ; Datas are representative of three independent experiments, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$  with a student's *t*-test.

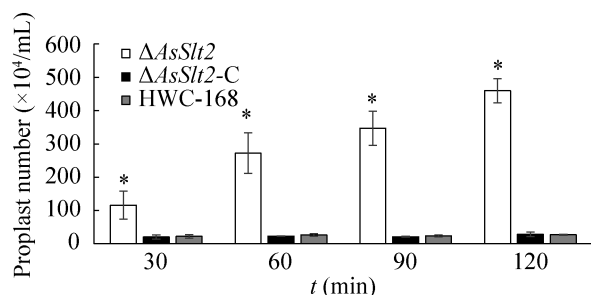


图 6 茄链格孢 HWC-168、 $\Delta AsSlt2$  和  $\Delta AsSlt2$ -C 原生质体释放速率数据代表 3 次独立生物学重复, 统计学分析为 student's *t*-test (\* $P<0.05$ )

Figure 6 The protoplast release rate of *Alternaria solani* HWC-168,  $\Delta AsSlt2$  and  $\Delta AsSlt2$ -C. Datas are representative of three independent experiments, \* $P<0.05$  with a student's *t*-test.

## 3 讨论与结论

SLT2-MAPK 细胞信号转导通路参与调控丝状真菌细胞壁组分的生物合成、分生孢子的形成、致病及响应胁迫等过程<sup>[8-10]</sup>。SLT2 编码基因是 SLT2-MAPK 信号通路的重要组成部分, SLT2 编码基因突变株影响病菌细胞壁的组织及致病性<sup>[11-14]</sup>。实验室前期明确了  $AsSlt2$  参与茄链格孢的生长、发育、致病力及黑色素合成的调控<sup>[17]</sup>。本研究在前期试验的基础上, 通过对  $\Delta AsSlt2$  基因缺失突变株的外界胁迫敏感性和细胞壁中几丁质含量及胞外酶活性测定, 探究  $AsSlt2$  基因对茄链格孢细胞壁完整性的调



控作用。

在稻瘟病菌(*M. oryzae*)中, *Slt2* 同源基因的缺失突变株对细胞壁合成抑制剂刚果红、细胞壁降解酶等敏感性增强<sup>[19]</sup>。在本研究中, *AsSlt2* 缺失突变株对外源氧胁迫和细胞壁胁迫的敏感性显著增强, 对细胞壁降解酶高度敏感, 这与稻瘟病菌(*M. oryzae*)中 *Slt2* 同源基因的研究是一致的, 说明在茄链格孢中, *AsSlt2* 基因调控致病菌对外界胁迫响应。稻瘟病菌(*M. oryzae*) *SLT2* 编码基因 *MoSlt2* 突变后致病力显著降低, 同时突变株细胞壁中几丁质含量增加, 几丁质合酶表达量上升<sup>[19]</sup>。在本研究中, *AsSlt2* 缺失突变株细胞壁中几丁质含量减少, 几丁质合成相关基因表达量下调。这与稻瘟病菌中的研究不同, 推测在不同真菌中, *Slt2* 对几丁质合成相关基因的表达调控是不同的, 几丁质合成的增多或减少均会影响病原真菌对外界胁迫的抵抗能力。

黑色素是细胞外壁的重要结构成分, 是分生孢子表面疏水蛋白存在所必需的, 并且在抵御外界防护方面起着重要作用<sup>[2]</sup>。研究发现漆酶基因通过调控漆酶的活性及含量进而影响黑色素的合成<sup>[3]</sup>。在本研究中, RT-qPCR 检测发现 *AsSlt2* 缺失突变株中漆酶活性显著降低, 漆酶合成基因的表达量减少。推测在茄链格孢中, *AsSlt2* 基因可能通过调控几丁质合成相关基因及漆酶基因的表达影响细胞壁中几丁质含量和黑色素的积累, 进而对茄链格孢细胞壁组成、致病性及对外界胁迫的抵御方面产生影响, 对于 *AsSlt2* 基因具体如何调控茄链格孢细胞壁的完整性, 还需要进一步的研究。

## REFERENCES

- [1] Pasche JS, Piche LM, Gudmestad NC. Effect of the F129L mutation in *Alternaria solani* on fungicides affecting mitochondrial respiration[J]. Plant Disease, 2005, 89(3): 269-278
- [2] Tsai HF, Wheeler MH, Chang YC, Kwon-Chung KJ. A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(20): 6469-6477
- [3] Ma SX, Cao KK, Liu N, Meng C, Cao ZY, Dai DQ, Jia H, Zang JP, Li ZY, Hao ZM, et al. The *StLAC2* gene is required for cell wall integrity, DHN-melanin synthesis and the pathogenicity of *Setosphaeria turcica*[J]. Fungal Biology, 2017, 121(6/7): 589-601
- [4] Qi ZQ, Wang Q, Dou XY, Wang W, Zhao Q, Lv R, Zhang HF, Zheng XB, Wang P, Zhang ZG. MoSwi6, an APSES family transcription factor, interacts with MoMps1 and is required for hyphal and conidial morphogenesis, appressorial function and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*[J]. Molecular Plant Pathology, 2012, 13(7): 677-689
- [5] Pihet M, Vandeputte P, Tronchin G, Renier G, Saulnier P, Georgeault S, Mallet R, Chabasse D, Symoens F, Bouchara JP. Melanin is an essential component for the integrity of the cell wall of *Aspergillus fumigatus* conidia[J]. BMC Microbiology, 2009, 9: 177
- [6] Rispaill N, Soanes DM, Ant C, Czajkowski R, Grünler A, Huguet R, Perez-Nadales E, Poli AN, Sartorel E, Valiante V, et al. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcineurin signalling components in plant and human pathogenic fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 2009, 46(4): 287-298
- [7] 刘帅, 陈晨. 病原真菌中 MAPK 信号通路的研究进展[J]. 湖南农业科学, 2017(11): 119-122  
Liu S, Chen C. Advances in MAPK signaling pathway in pathogenic fungi[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2017(11): 119-122 (in Chinese)
- [8] 齐中强, 杜艳, 沈乐融, 余振仙, 于俊杰, 俞咪娜, 宋天巧, 张荣胜, 刘永锋. 转录因子 MoOaf22 对稻瘟病菌营养生长、细胞壁完整性和胁迫应答的调控[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6): 1242-1248  
Qi ZQ, Du Y, Shen LR, Yu ZX, Yu JJ, Yu MN, Song TQ, Zhang RS, Liu YF. Regulation of transcription factor MoOaf22 in vegetative growth, cell wall integrity and stress response in *Magnaporthe oryzae*[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2017, 33(6): 1242-1248 (in Chinese)
- [9] 郭红, 邱月, 魏建平, 张宇翔, 袁亚宏, 岳田利. 酿酒酵母细胞壁和细胞膜应对高渗胁迫机制研究[J]. 农业机械学报, 2020, 51(6): 346-352  
Guo H, Qiu Y, Wei JP, Zhang YX, Yuan YH, Yue TL. Hyperosmotic stress response of *Saccharomyces*

- cerevisiae* cell wall and cell membrane[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2020, 51(6): 346-352 (in Chinese)
- [10] 张萍, 赵强, 魏东盛, 杨娇, 朱项阳, 朱旭东. 酿酒酵母 Snf1/AMPK 蛋白激酶通过调节细胞壁合成相关基因的表达影响细胞壁完整性[J]. 微生物学报, 2016, 56(7): 1132-1140
- Zhang P, Zhao Q, Wei DS, Yang J, Zhu XY, Zhu XD. Snf1/AMPK affects cell wall integrity through regulating the transcription of cell wall assembly-related genes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2016, 56(7): 1132-1140
- [11] Chen DD, Shi L, Yue SN, Zhang TJ, Wang SL, Liu YN, Ren A, Zhu J, Yu HS, Zhao MW. The Slt2-MAPK pathway is involved in the mechanism by which target of rapamycin regulates cell wall components in *Ganoderma lucidum*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2019, 123: 70-77
- [12] Zhang F, Geng LP, Deng JL, Huang LH, Zhong H, Xin SJ, Fasoyin OE, Wang SH. The MAP kinase AflSlt2 modulates aflatoxin biosynthesis and peanut infection in the fungus *Aspergillus flavus*[J]. International Journal of Food Microbiology, 2020, 322: 108576
- [13] Chen XX, Xu C, Qian Y, Liu R, Zhang QQ, Zeng GH, Zhang X, Zhao H, Fang WG. MAPK cascade-mediated regulation of pathogenicity, conidiation and tolerance to abiotic stresses in the entomopathogenic fungus *Metarhizium robertsii*[J]. Environmental Microbiology, 2016, 18(3): 1048-1062
- [14] Leng G, Song K. Direct interaction of Ste11 and Mkk1/2 through Nst1 integrates high-osmolarity glycerol and pheromone pathways to the cell wall integrity MAPK pathway[J]. FEBS Letters, 2016, 590(1): 148-160
- [15] Xu JR, Staiger CJ, Hamer JE. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses[J]. PNAS, 1998, 95(21): 12713-12718
- [16] Luo XD, Keyhani NO, Yu XD, He ZJ, Luo ZB, Pei Y, Zhang YJ. The MAP kinase Bbslt2 controls growth, conidiation, cell wall integrity, and virulence in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2012, 49(7): 544-555
- [17] Zhang D, He JY, Haddadi P, Zhu JH, Yang ZH, Ma LS. Genome sequence of the potato pathogenic fungus *Alternaria solani* HWC-168 reveals clues for its conidiation and virulence[J]. BMC Microbiology, 2018, 18(1): 176
- [18] Huang SS, He ZJ, Zhang SW, Keyhani NO, Song YL, Yang Z, Jiang YH, Zhang WL, Pei Y, Zhang YJ. Interplay between calcineurin and the Slt2 MAP-kinase in mediating cell wall integrity, conidiation and virulence in the insect fungal pathogen *Beauveria bassiana*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 83: 78-91
- [19] Jeon J, Goh J, Yoo S, Chi MH, Choi J, Rho HS, Park J, Han SS, Kim BR, Park SY, et al. A putative MAP kinase kinase, MCK1, is required for cell wall integrity and pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions®, 2008, 21(5): 525-534