

# 玉米大斑病菌 bZIP 基因家族鉴定及 HT-毒素诱导过程中的表达

张淑红<sup>1</sup>, 张运峰<sup>1</sup>, 高凤菊<sup>1</sup>, 武秋颖<sup>1</sup>, 李亚子<sup>1</sup>, 许可<sup>1</sup>, 范永山<sup>1\*</sup>, 刘玉卫<sup>2\*</sup>

1 唐山师范学院 生命科学系, 河北省植物生物技术研究与应用重点实验室, 唐山市农业病原真菌与毒素重点实验室, 河北 唐山 063000

2 河北农业大学 生命科学学院, 河北省农业微生物生物信息利用技术创新中心, 河北 保定 071000

张淑红, 张运峰, 高凤菊, 武秋颖, 李亚子, 许可, 范永山, 刘玉卫. 玉米大斑病菌 bZIP 基因家族鉴定及 HT-毒素诱导过程中的表达[J]. 微生物学报, 2025, 65(1): 283-302.

ZHANG Shuhong, ZHANG Yunfeng, GAO Fengju, WU Qiuying, LI Yazhi, XU Ke, FAN Yongshan, LIU Yuwei. The bZIP gene family in *Setosphaeria turcica*: identification and expression analysis during HT-toxin induction process[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2025, 65(1): 283-302.

**摘要:** 【目的】碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)蛋白是真核生物中最大且最保守的转录因子之一, 参与许多植物病原真菌的生长发育和致病过程。本文旨在对玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*) bZIP 转录因子进行全基因组鉴定, 并探讨它们在 HT-毒素诱导过程中的表达规律。【方法】从玉米大斑病菌基因组数据库中筛选鉴定 bZIP 家族成员, 分析其理化性质、保守结构域、亚细胞定位、顺式作用元件、系统进化关系和蛋白质互作网络, 利用 RNA-seq 数据库分析 bZIP 家族成员在 HT-毒素诱导过程中的表达情况。【结果】从玉米大斑病菌基因组筛选到 14 个 bZIP 家族成员(StbZIP1-14), 其理化性质差异较大, 编码氨基酸 226-613 个, 相对分子量 25.24-66.30 kDa, 等电点 4.66-10.36; 亚细胞定位均为细胞核, 含有非生物因素胁迫、激素诱导、细胞周期调控和增强子、核心启动子等 660 个顺式作用响应元件。与 11 个其他重要植物病原真菌的系统进化分析结果表明, StbZIPs 可分为 10 个类群(groups), 与互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*)的 AabZIPs 存在明显的共线性关系。分析 StbZIPs 在 HT-毒素诱导过程中的表达情况, 发现 StbZIP1、StbZIP5、StbZIP7、StbZIP10、StbZIP11 与 HT-毒素诱导显著相关, 其中 StbZIP5 表达量最高并在 HT-毒素诱导 21 d 和 28 d 时显著上调。分析了 StbZIPs 的蛋白质互作网络, 提供

资助项目: 国家自然科学基金(22078171); 中央引导地方科技发展资金(246Z3610G, 236Z6507G); 唐山师范学院科学研究基金(2024PT06)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (22078171), the Central Guiding Local Science and Technology Development Fund (246Z3610G, 236Z6507G), and the Research Funding of Tangshan Normal University (2024PT06).

\*Corresponding authors. E-mail: FAN Yongshan, fanyongshan@126.com; LIU Yuwei, liuyw@hebau.edu.cn

Received: 2024-07-30; Accepted: 2024-09-29; Published online: 2024-10-08

了3条以 StbZIP5 为中心的 StbZIPs 互作途径。【结论】玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员具有显著的理化性质和结构差异、广泛的遗传多样性和显著的功能分化，并在 HT-毒素诱导过程中发挥重要的转录调控作用。

关键词：玉米大斑病菌；碱性亮氨酸拉链蛋白；系统进化分析；HT-毒素；表达分析

## The bZIP gene family in *Setosphaeria turcica*: identification and expression analysis during HT-toxin induction process

ZHANG Shuhong<sup>1</sup>, ZHANG Yunfeng<sup>1</sup>, GAO Fengju<sup>1</sup>, WU Qiuying<sup>1</sup>, LI Yazhi<sup>1</sup>, XU Ke<sup>1</sup>,  
FAN Yongshan<sup>1\*</sup>, LIU Yuwei<sup>2\*</sup>

1 Tangshan Key Laboratory of Agricultural Pathogenic Fungi and Toxins, Hebei Key Laboratory of Plant Biotechnology Research and Application, Faculty of Life Science, Tangshan Normal University, Tangshan 063000, Hebei, China

2 Hebei Bioinformatic Utilization and Technological Innovation Center for Agricultural Microbes, College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

**Abstract:** [Objective] The basic leucine zipper (bZIP) factors are a group of large and conserved transcription factors in eukaryotes, and they are involved in the growth, development, and infection of pathogenic fungi in plants. This study aims to identify the bZIP transcription factors in the whole genome of *Setosphaeria turcica* and explore their functions during HT-toxin induction. [Methods] The members of the bZIP family were screened and identified from the genome database of *Setosphaeria turcica*, and their physicochemical properties, conserved domains, subcellular localization, *cis*-acting elements, phylogenetic relationship, and protein-protein interaction network were analyzed. The RNA-seq database was used to analyze the expression of bZIP family members during pathogen infection and HT-toxin induction. [Results] Fourteen bZIP family members (StbZIP1–14) were screened from the genome of *Setosphaeria turcica*, with significant differences in physical and chemical properties. These factors had the lengths of 226–613 aa, relative molecular weights of 25.24–66.30 kDa, isoelectric points of 4.66–10.36, and the subcellular localization in the nucleus. These factors carried 660 *cis*-acting elements involved in abiotic stress, hormone induction, cell cycle regulation, enhancers, and core promoters. The phylogenetic analysis with 11 other major pathogenic fungi in plants indicated that StbZIPs were clustered into 10 groups and had a clear co-linear relationship with AabZIPs of *Alternaria alternata*. The expression levels of *StbZIP1*, *StbZIP5*, *StbZIP7*, *StbZIP10*, and *StbZIP11* were significantly correlated with HT-toxin induction, among which *StbZIP5* had the highest expression level and demonstrated upregulated expression after 21 days and 28 days of HT-toxin induction. The protein-protein interaction network of StbZIPs predicted three StbZIPs interaction pathways centered on StbZIP5. [Conclusion] The members of the bZIP family of *Setosphaeria turcica*

have significant physicochemical and structural differences, extensive genetic diversity, and significant functional differentiation, playing an important role in transcriptional regulation during HT-toxin induction.

**Keywords:** *Setosphaeria turcica*; basic leucine zipper protein; phylogenetic analysis; HT-toxin; expression analysis

含有碱性亮氨酸拉链(basic leucine zipper, bZIP)结构域的蛋白是真核生物中分布最广泛、最保守的一类转录因子,在动物、植物和微生物中具有广泛的调控活性,参与生长发育、氨基酸合成、营养利用和各种胁迫反应<sup>[1]</sup>。bZIP 转录因子都具有一段 60–80 个氨基酸残基的高度保守区,称为 bZIP 基序,由碱性区域和亮氨酸拉链区域组成,其中碱性区域具有保守的 N-x7-R/K 模式,负责核信号传导和序列特异性 DNA 结合,而亮氨酸拉链区域在不同蛋白之间差异较大,它包括具有寡聚功能的多种重复亮氨酸和其他疏水性氨基酸,促进 bZIP 转录因子形成异源或同源二聚体<sup>[2]</sup>。在许多植物病原真菌中都发现了 bZIP 转录因子,并具有非常广泛的功能多样性。互隔交链孢霉(*Alternaria alternata*)的 bZIP 转录因子广泛参与胁迫反应调节和致病性<sup>[3]</sup>,构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的 bZIP 转录因子调控次生代谢、有性发育和多种胁迫反应<sup>[4]</sup>;烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*) bZIP 转录因子 flbB 与无性繁殖和胶霉毒素(gliotoxin)的合成有关<sup>[5]</sup>;草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)的 bZIP 转录因子 ClrC 除了参与胁迫反应以外还与孢子发育和纤维素酶基因表达有关<sup>[6]</sup>,稻瘟病菌(*Pyricularia oryzae*)的 bZIP 转录因子 MoAP1 调控氧化应激反应和致病性<sup>[7]</sup>,水稻恶苗病菌(*Fusarium fujikuroi*)的 bZIP 转录因子广泛参与氧化应激、渗透胁迫调节、细胞壁侵入和致病性<sup>[8]</sup>。

玉米大斑病是一种全球性玉米病害,流行

年份可造成玉米大量减产、品质下降。玉米大斑病的发生依赖于玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)及其分泌产生的 HT-毒素(*Helminthosporium turcicum* toxin, HT-toxin),不同生理小种间的致病性差异主要与 HT-毒素的毒性组分及生物学活性有关<sup>[9-10]</sup>。另外,HT-毒素可替代玉米大斑病菌接种进行抗病玉米品种筛选,为玉米抗病育种提供快速准确的抗性鉴定技术<sup>[11]</sup>。丝裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)途径对 HT-毒素的产生和生物学活性具有非常重要的调控作用<sup>[12-13]</sup>。Li 等<sup>[14-15]</sup>利用候选基因法克隆了玉米大斑病菌 Hog1-MAPK 同源基因 *STK1* (*Setosphaeria turcica* mitogen activated protein kinase I, *STK1*),并且 *STK1* 基因敲除突变体( $\Delta$ *STK1*)分泌的 HT-毒素接种感病玉米自交系 OH43,无侵染性病斑产生,且 HT-毒素的毒性组分含量极显著下降。张淑红等<sup>[16-18]</sup>研究发现,*STK1* 不仅具有调控盐胁迫和附着胞发育的能力,而且存在一个寄主选择性毒素合成基因簇参与 HT-毒素诱导过程。因此,*STK1* 基因对玉米大斑病菌 HT-毒素的诱导具有显著的调控作用,但调控机制尚不明确。目前尚无关于玉米大斑病菌 bZIP 转录因子(*Setosphaeria turcica* bZIP transcription factors, *StbZIPs*)的系统研究,它们在 HT-毒素诱导过程中的表达规律未见报道,因此,本研究利用生物信息学方法从玉米大斑病菌基因组数据库中筛选鉴定 *StbZIPs*,分析其结构特征及与其他重要植物病原真菌的系统进化关系,并利用 RNA-seq 转录

组数据库分析 *StbZIPs* 基因在 HT-毒素诱导过程的表达情况,为阐明 *StbZIPs* 在玉米大斑病菌致病过程中的功能提供依据。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 供试菌种

玉米大斑病菌野生型菌株 01-23 (WT)及其 *STK1* 基因敲除突变体( $\Delta$ *STK1*)<sup>[14]</sup>均由唐山市农业病原真菌与毒素重点实验室保存。

### 1.2 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族的鉴定和结构分析

利用 bZIP 转录因子典型结构域 PF00170 搜索玉米大斑病菌基因组数据库(<https://mycocosm.jgi.doe.gov/Settu3/Settu3.home.html>)<sup>[19-20]</sup>,获得 bZIP 基因家族;利用 NCBI CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/bwrpsb/bwrpsb.cgi>)和 Interpro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>)进行结构域分析及验证;利用 CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>)进行亚细胞定位;利用 ProtParam (<https://web.expasy.org/protparam/>)分析理化性质;利用 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>)分析 Motif 特征;利用 SWISS 在线网站(<https://swissmodel.expasy.org/>)预测蛋白质三级结构;选取基因家族起始密码子上游 2 000 bp 启动子片段,利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行顺式作用元件分析;利用 TBtools 软件<sup>[21]</sup>进行染色体定位和可视化基因结构。

### 1.3 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族与重要植物病原真菌的系统进化和共线性分析

检索分子植物病理学的 Top10 病原真菌<sup>[22]</sup>和互隔交链孢霉(*A. alternata*) JGI 基因组数据库中含有典型结构域 PF00170 的 bZIP 转录因子;利用 MEGA 11.0 软件对玉米大斑病菌及其

他 11 种植物病原真菌的 bZIP 转录因子家族进行近邻相接法(neighbor-joining method, NJ)聚类分析,构建系统发育树(bootstrap 重复 1 000 次);利用 TBtools 进行玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族与亲缘关系最近的植物病原真菌的共线性分析。

### 1.4 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员蛋白质互作网络预测

以玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)为筛选物种, Required score: 0.400, false discovery rate (FDR) stringency: 0.05, 利用 String 在线平台 (<https://version-12-0.string-db.org/>)预测玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员的蛋白质互作网络,分析它们之间的关系以及与其他蛋白质之间的相互作用。

### 1.5 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子在 HT-毒素诱导过程中的表达分析

利用改良 Fries 液体培养基<sup>[12]</sup>,在黑暗条件下 25 °C、180 r/min 振荡培养,进行玉米大斑病菌野生型菌株 01-23 (WT)及其 *STK1* 基因敲除突变体( $\Delta$ *STK1*)的 HT-毒素诱导<sup>[12]</sup>。在 HT-毒素诱导 7、14、21 和 28 d 时,用 4 层纱布滤去培养基,菌丝用无菌水清洗 3 次后压干,并用液氮处理后送深圳华大基因科技服务有限公司进行 RNA-seq 转录组测序,分析 *StbZIPs* 的基因表达规律,并对筛选出的关键 bZIP 转录因子进行 RT-qPCR 验证。以  $\beta$ -tubulin 基因为内参,采用 Pangaea 6 实时荧光 PCR 系统。RT-qPCR 反应体系(20  $\mu$ L): 2 $\times$ SYBR Green Abstart PCR Mix 10.0  $\mu$ L, cDNA 1.0  $\mu$ L, 正、反向引物(10  $\mu$ mol/L)各 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 7.0  $\mu$ L。RT-qPCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 53 °C 30 s, 循环 40 次,在退火时采集荧光信号;利用 2<sup>- $\Delta$ C<sub>t</sub></sup>法计算基因相对表达量。RNA-seq 转录组测序和 RT-qPCR 分析均设 3 个生物学重复。

## 1.6 HT-毒素生物学活性测定

将 1.5 中剩余的培养基滤液参照范永山等<sup>[12]</sup>的方法进行 HT-毒素提取, 利用离体叶片法进行生物学活性检测, 以 10% DMSO 为毒素处理的空白对照(CK1), 而以不接种病菌的改良 Fries 培养基提取的 HT-毒素为整体试验的空白对照(CK2), 用病斑面积(长×宽×叶面积系数 0.7)表示 HT-毒素生物学活性的大小。

## 1.7 与玉米大斑病菌 bZIP 转录因子显著相关的基因表达信息挖掘

利用 batchCorrelation.r 软件包计算 HT-毒素诱导显著相关 bZIP 转录因子与 RNA-seq 转录组数据库中其他基因的 Pearson 相关系数, 分别筛选出显著正相关和显著负相关的 10 个基因, 利用生物信息学方法分析它们的功能。

## 1.8 数据统计分析和作图

获得的基因表达数据, 利用 GraphPad Prism 软件进行 two-way ANOVA 显著性分析和作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米大斑病菌 bZIP 基因家族成员的鉴定及其编码蛋白质的理化性质分析

利用玉米大斑病菌基因组数据库的检索功能, 搜索到 14 个含有 bZIP 转录因子典型结构域 PF00170 的蛋白质, 分别命名为 StbZIP1–14。它们位于 9 条 scaffold 上, 其中 scaffold1、11、19、20 和 26 上仅有 1 个 StbZIP 基因, 在 scaffold3、6 和 7 上有 2 个 StbZIP 基因, 在 scaffold4 上有 3 个 StbZIP 基因(图 1)。分析 StbZIPs 的理化性质并进行亚细胞定位预测(表 1), 结果表明, StbZIP1–14 包含氨基酸残基 226 (StbZIP14)–613 (StbZIP9), 平均 363.8 个氨基酸残基; 相对分子量 25.24 kDa (StbZIP14)–66.30 kDa (StbZIP12), 平均 39.4 kDa; 疏水性指数(–1.143)–(–0.617), 均为亲水蛋白; 不稳定性指数 44.80–88.04, 均为不稳定蛋白; 等电点 4.66 (StbZIP12)–10.36 (StbZIP13), 平均 6.86; 亚细胞定位均为细胞核。

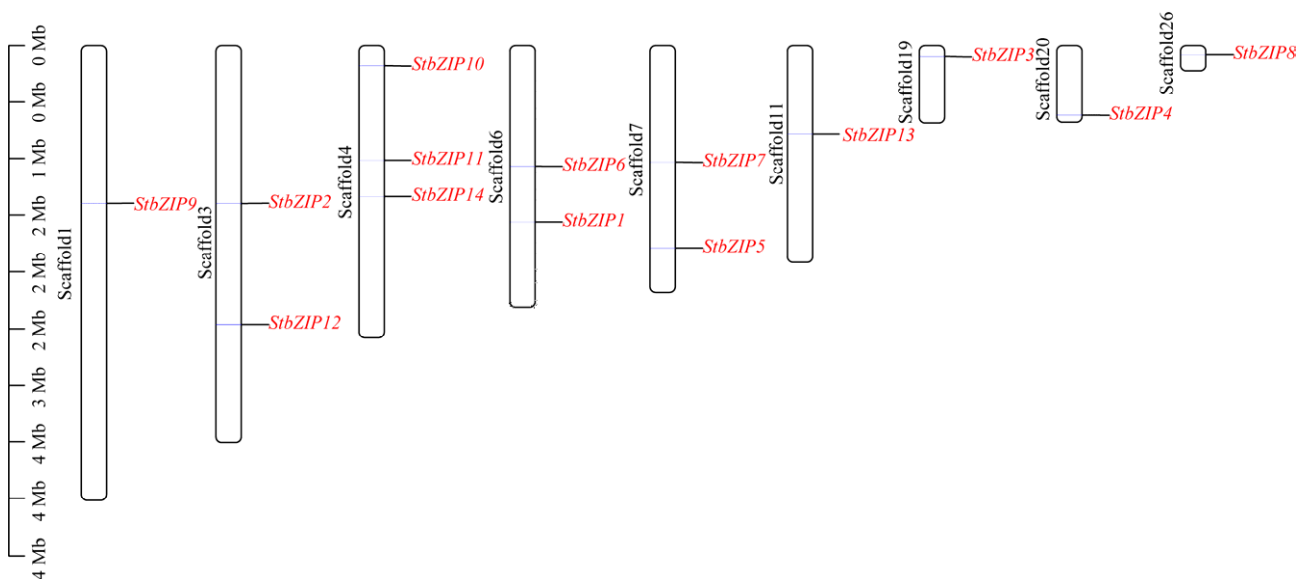


图 1 玉米大斑病菌 bZIP 基因家族的染色体定位

Figure 1 Chromosomal localization of the bZIP gene family of *Setosphaeria turcica*.

表 1 玉米大斑病菌 bZIP 基因家族编码蛋白的理化性质和亚细胞定位

Table 1 Physicochemical properties and subcellular location of the protein encoded by the bZIP gene family of *Setosphaeria turcica*

Gene name	Number of amino acids	Molecular weight (kDa)	Hydropathicity	Instability index	Isoelectric point	Subcellular location
<i>StbZIP1</i>	376	40.97	-0.636	67.89	4.98	Nuclear
<i>StbZIP2</i>	335	37.16	-0.877	58.75	6.71	Nuclear
<i>StbZIP3</i>	536	57.05	-0.911	60.19	7.78	Nuclear
<i>StbZIP4</i>	372	42.25	-0.929	55.50	6.13	Nuclear
<i>StbZIP5</i>	296	32.22	-0.617	48.00	5.64	Nuclear
<i>StbZIP6</i>	298	32.49	-0.988	66.86	6.20	Nuclear
<i>StbZIP7</i>	242	26.71	-0.849	88.04	8.91	Nuclear
<i>StbZIP8</i>	304	32.87	-0.822	56.67	5.81	Nuclear
<i>StbZIP9</i>	613	65.71	-0.857	44.80	4.90	Nuclear
<i>StbZIP10</i>	229	25.68	-0.884	57.85	5.82	Nuclear
<i>StbZIP11</i>	292	31.02	-0.632	64.83	9.43	Nuclear
<i>StbZIP12</i>	604	66.30	-0.633	61.10	4.66	Nuclear
<i>StbZIP13</i>	370	36.33	-1.016	77.85	10.36	Nuclear
<i>StbZIP14</i>	226	25.24	-1.143	48.25	8.69	Nuclear

## 2.2 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员的系统进化与结构分析

利用 MEGA 11.0 软件构建 StbZIP1-14 系统发育树(图 2A), 结果发现 14 个 bZIP 转录因子可以分为 5 组(group A-group E)。其中 group A 有 3 个转录因子: StbZIP4、StbZIP5 和 StbZIP11; group B 有 2 个转录因子: StbZIP2 和 StbZIP7; group C 有 2 个转录因子: StbZIP3 和 StbZIP12; group D 有 2 个转录因子: StbZIP1 和 StbZIP14; group E 有 5 个转录因子: StbZIP6、StbZIP8、StbZIP9、StbZIP10 和 StbZIP13。从图 2A 中可以发现, bootstrap 值较低, 利用 DNAMAN 软件计算 StbZIP1-14 之间的序列相似性仅为 13.83%, 说明 StbZIP1-14 之间存在较强的序列差异性。

利用 MEME 分析 StbZIP1-14 的 Motif 特征(图 2B), 共发现 5 种 Motif, 每一种 StbZIP 含有 1-3 个 Motif, 并且均有 Motif 1 (图 2E)。

StbZIP1、StbZIP7、StbZIP11、StbZIP12 和 StbZIP14 均只有 1 个 Motif 1; StbZIP2、StbZIP3、StbZIP5、StbZIP6、StbZIP10 和 StbZIP13 除了含有 Motif 1 外, 还含有 1 个 Motif 3、Motif 4 或 Motif 5; StbZIP4、StbZIP8 和 StbZIP9 均含有 3 个 Motif。Motif 2 仅出现在 StbZIP8 和 StbZIP9, Motif 4 仅出现在 StbZIP5 和 StbZIP8。利用 MEME 网站的 Tomtom 软件搜索与 Motif 1 匹配的已知 Motif, 结果发现, Motif 1 的 16-27 位存在 CTF/NF-I DNA-binding domain signature (PROSITE entry PS00349)、第 20-39 位含有 bacterial chemotaxis sensory transducers signature (PROSITE entry PS00538)、第 9-16 位含有 ribosomal protein S12 signature (PROSITE entry PS00055)、第 1-6 位含有 nuclear transition protein 1 signature (PROSITE entry PS00541), 表明该 Motif 可能参与 DNA 结合、趋化性、核糖体蛋白组装、核转运等生理活动。

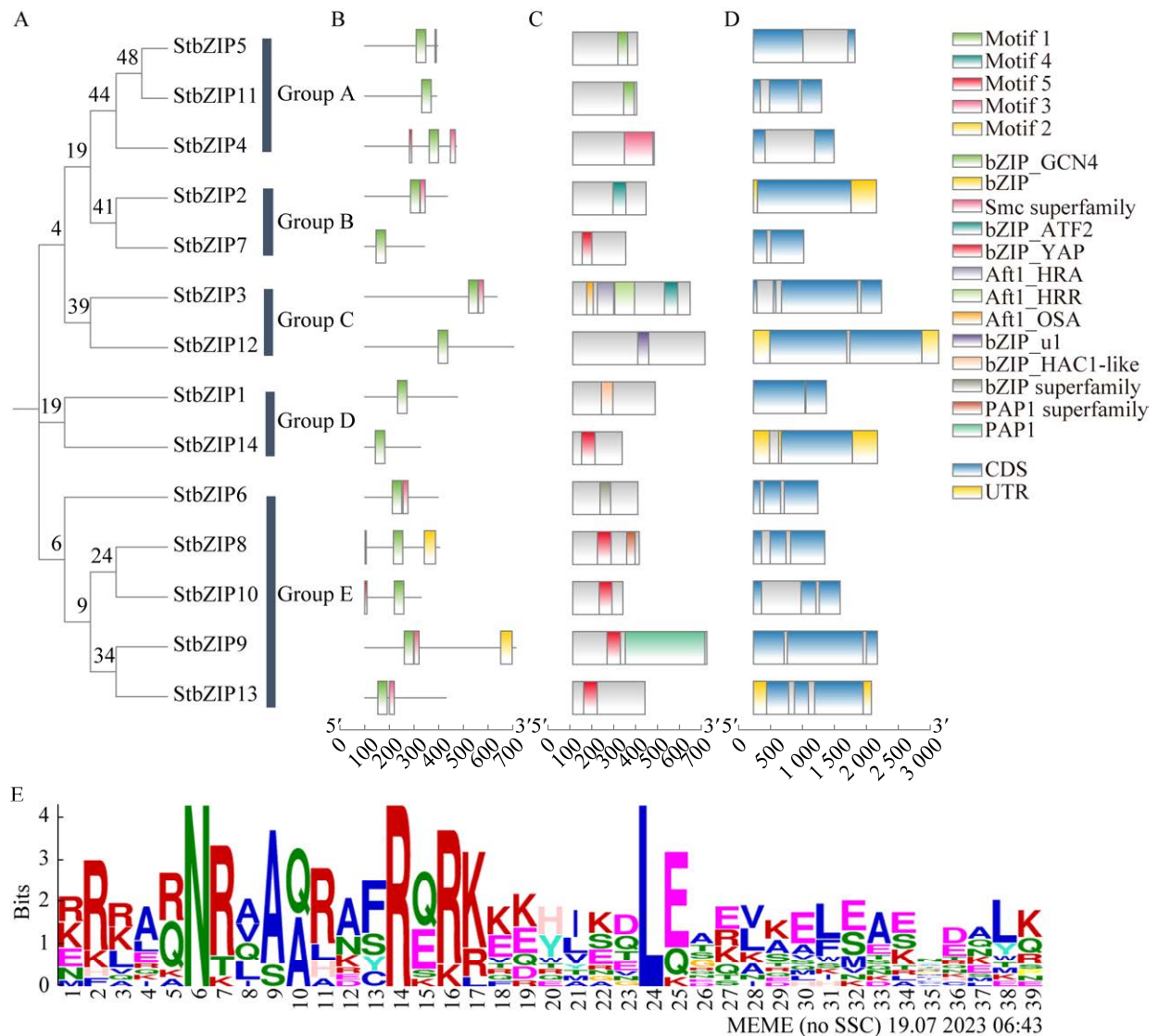


图 2 玉米大斑病菌 bZIP 家族成员的系统进化和结构分析。A: 系统进化树; B: 基序; C: 结构域; D: 基因结构; E: Motif 1。

Figure 2 Phylogenetic and structural analysis of the bZIP family members of *Setosphaeria turcica*. A: Phylogenetic tree; B: Motifs; C: Domains; D: Gene structure; E: Motif 1.

NCBI CDD 和 Interpro 分析 StbZIP1-14 的结构域种类及分布(图 2C), 结果发现除了典型的 bZIP 结构域和 bZIP 超家族(bZIP superfamily)以外, 还有其他 5 种 bZIP 结构域(bZIP\_GCIN4、bZIP\_ATF2、bZIP\_YAP、bZIP\_u1 和 bZIP\_HAC1-like), 3 种 Aft1 结构域(Aft1\_HRA、Aft1\_HRR 和 Aft1\_OSA), 2 种 PAP1 结构域和 1 种 Smc 超家族。除了 StbZIP3

存在 4 种结构域、StbZIP8 和 StbZIP9 含有 2 种结构域以外, 其他 StbZIP 均仅含有 1 种结构域。

利用 TBtools 分析 StbZIP1-14 的基因结构(图 2D), 结果发现 StbZIP2、StbZIP12、StbZIP13 和 StbZIP14 存在 UTR 序列; StbZIP2 和 StbZIP14 基因结构最简单, 仅有 1 个 CDS; StbZIP3 基因结构最复杂, 含有 4 个 CDS; StbZIP1、StbZIP4、

*StbZIP5*、*StbZIP7* 和 *StbZIP12* 含有 2 个 CDS；Group E 中的 *StbZIP* 基因均有 3 个 CDS。

### 2.3 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员的三级结构模型预测

利用 SWISS 在线网站预测 *StbZIP1*–*14* 的三级结构，除了 *StbZIP9* 以玉米小斑病菌(*Bipolaris oryzae*) bZIP 蛋白为模板(Seq identity 87.09%)、*StbZIP10* 以大麦网斑病菌(*Pyrenophora teres*) bZIP 蛋白为模板(Seq identity 87.61%)，其他 *StbZIP* 均以玉米大斑病菌 Et28A 的 bZIP 蛋白为模板(Seq identity 100%)构建三级结构模型(图 3)。全局模型质量估测(global model quality estimation, GMQE)范围为 0.52–0.70，平均为 0.60，表明所建三级结构模型质量较好。

### 2.4 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员的顺式作用元件分析

选取玉米大斑病菌 bZIP 基因家族起始密

码子上游 2 000 bp 启动子片段，利用 PlantCARE 进行顺式作用元件分析(图 4)，共发现了 25 种 660 个顺式作用元件，平均每个 bZIP 转录因子有顺式作用元件 47.1 个，其中 *StbZIP12* 顺式作用元件最多，有 62 个；*StbZIP7* 顺式作用元件最少，有 35 个。*StbZIPs* 的顺式作用元件可分为 4 类：(1) 光、低温、缺水、创伤等非生物因素胁迫反应元件，共有 280 个。其中光反应元件最多，有 222 个，其次为低温反应元件，有 13 个；(2) 茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)、脱落酸(abscisic acid, ABA)、生长素(auxin)和赤霉素(gibberellin)等激素类诱导元件，共有 227 个。其中 MeJA 反应元件最多，有 142 个；其次为 ABA 反应元件，有 65 个；(3) 增强子和核心启动子等元件，共有 151 个，其中增强子有 105 个，核心启动子有 46 个；(4) 细胞周期调控元件，仅有 2 个。

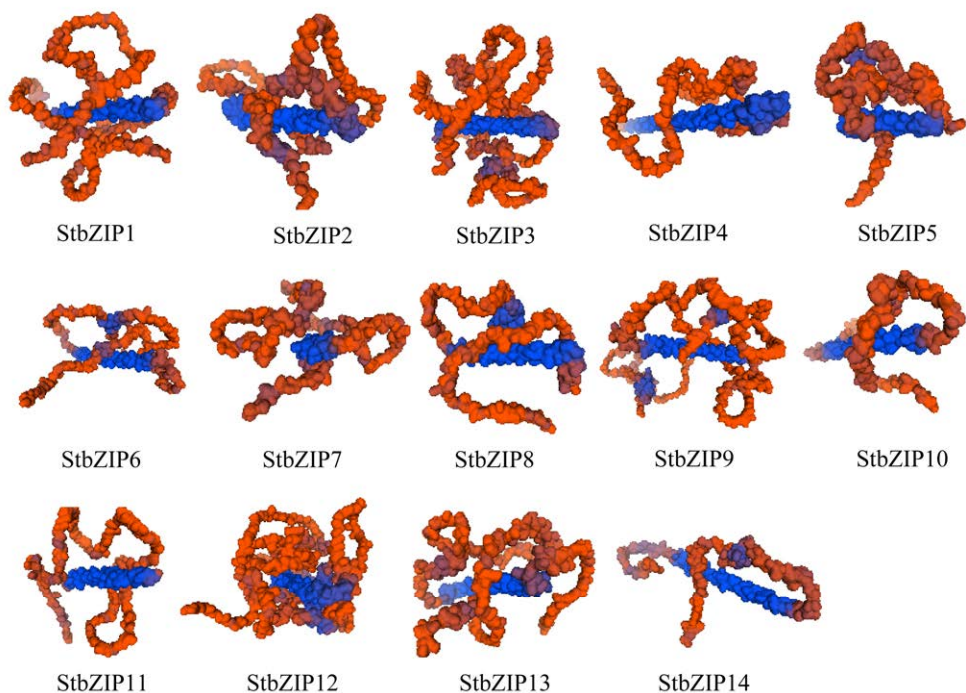


图 3 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员的三级结构模型

Figure 3 Tertiary structure model of bZIP transcription factor family members of *Setosphaeria turcica*.



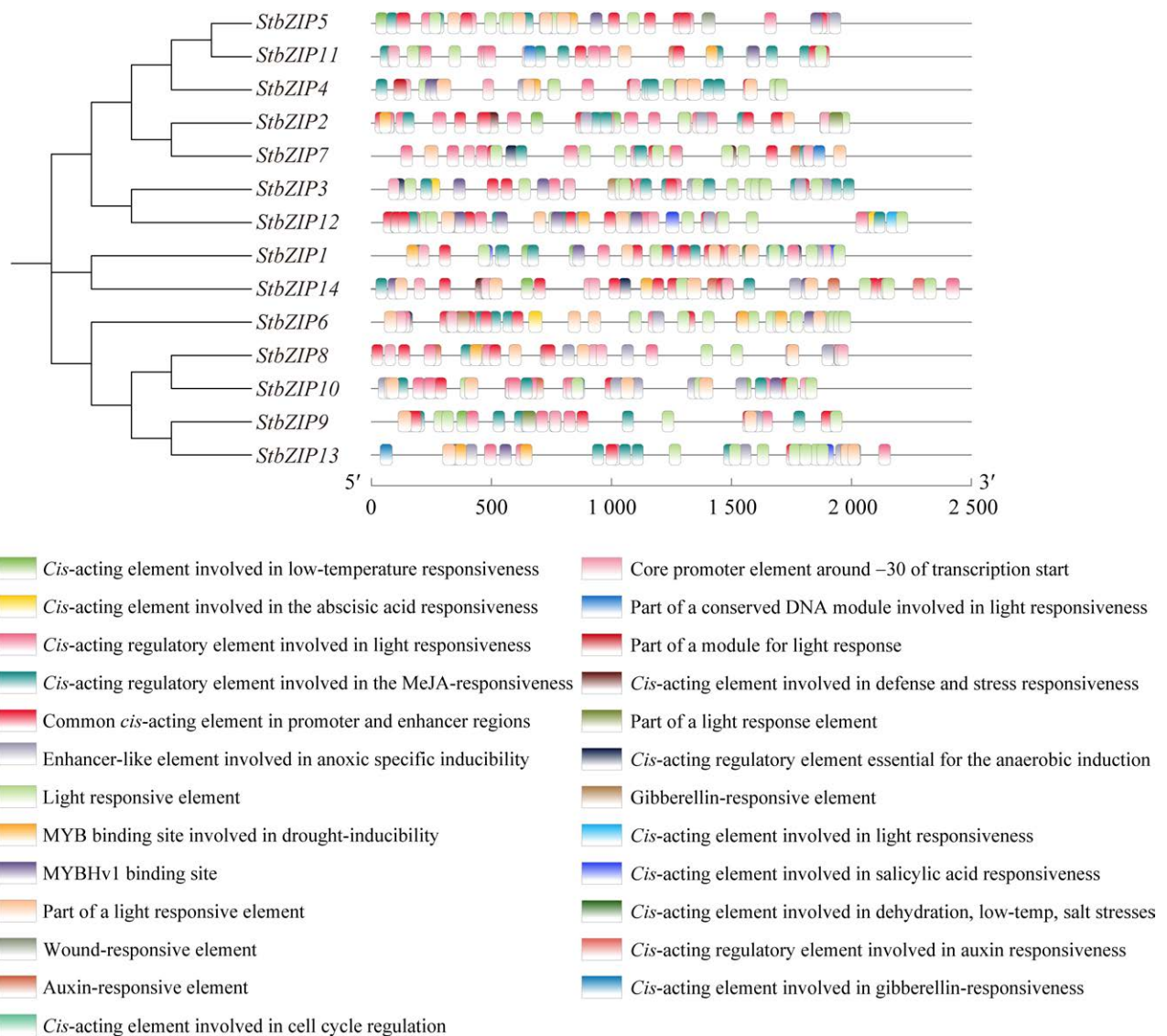


图 4 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员的顺式作用元件分析

Figure 4 Analysis of cis-regulatory element of bZIP transcription factor family members of *Setosphaeria turcica*.

## 2.5 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族与重要植物病原真菌的系统进化和共线性分析

利用 bZIP 转录因子典型结构域 PF00170 搜索互隔交链孢霉(*A. alternata*)等 11 种重要植物病原真菌的 bZIP 转录因子, 结果发现可引起棉花枯萎病菌的尖孢镰孢菌(*Fusarium oxysporum*)的 bZIP 转录因子数量最多, 达到 34 个;

其次为互隔交链孢霉(*A. alternata*)、禾生炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)、稻瘟病菌(*P. oryzae*), 均为 15 个; 亚麻栅锈病菌(*Melampsora lini*)的数量最少, 仅有 3 个。12 种植物病原真菌平均有 bZIP 转录因子基因 13.9 个。玉米大斑病菌有 14 个 bZIP 转录因子家族成员, 排在第 5 位。

对 12 种植物病原真菌的 157 个 bZIP 转录因子家族成员进行系统进化分析(图 5A、5B),

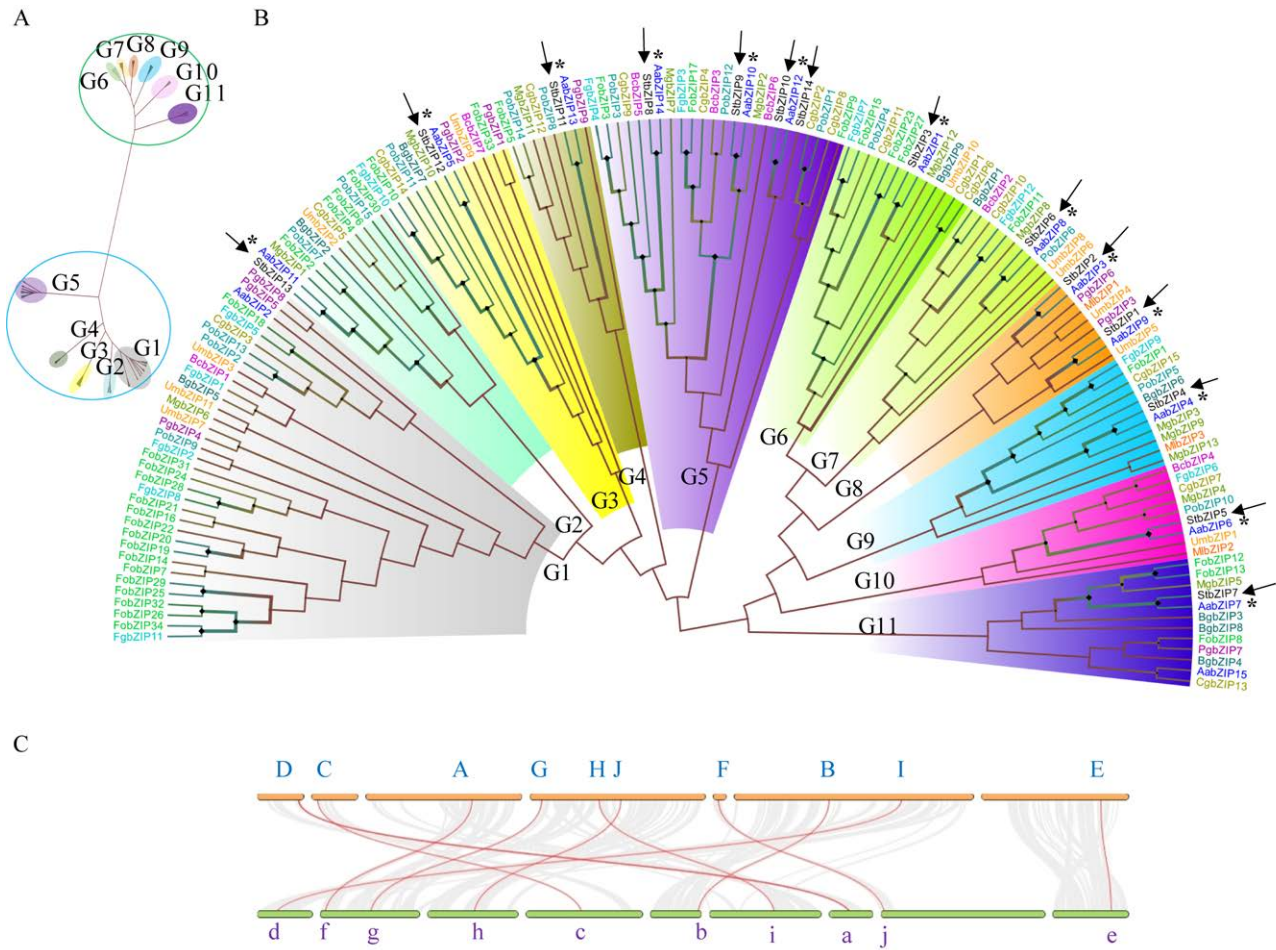


图 5 12 种重要植物病原真菌 bZIP 转录因子家族成员的系统进化和共线性分析

Figure 5 Phylogenetic and synteny analysis of the bZIP transcription factor family members of 12 important plant pathogenic fungi. A: Phylogenetic branched tree (lower groups: G1–G5; upper groups: G6–G11); B: Phylogenetic circle tree (→StbZIP: *Setosphaeria turcica* bZIPs; \*AabZIP: *Alternaria alternata* bZIPs; BgbZIP: *Blumeria graminis* bZIPs; BcbZIP: *Botrytis cinerea* bZIPs; CgbZIP: *Colletotrichum graminicola* bZIPs; FgbZIP: *Fusarium graminearum* bZIPs; FobZIP: *Fusarium oxysporum* bZIPs; MlbZIP: *Melampsora lini* bZIPs; MgbZIP: *Mycosphaerella graminicola* bZIPs; PgbZIP: *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* bZIPs; PobZIP: *Pyricularia oryzae* bZIPs; UmbZIP: *Ustilago maydis* bZIPs); C: Synteny analysis (A–J: *StbZIP1, 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12, 14*; a–j: *AabZIP1, 2, 3, 4, 6, 9, 10, 12, 13, 14*).

结果发现它们可分为两大类 11 个群组。第一大类包括群组 G1–G5，第二大类包括群组 G6–G11。除了 G1 外，其他群组均有玉米大斑病菌 bZIP 转录因子，其中 StbZIP13 位于 G2，StbZIP12 位于 G3，StbZIP11 位于 G4，StbZIP8、

StbZIP9、StbZIP10、StbZIP14 位于 G5，StbZIP3 位于 G6，StbZIP6 位于 G7，StbZIP1、StbZIP2 位于 G8，StbZIP4 位于 G9，StbZIP5 位于 G10，StbZIP7 位于 G11，从而表明玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员具有更广泛的遗传多样性。

另外, 在所有群组中, 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子均与 *A. alternata* 的 AabZIP 亲缘关系最近, 推测具有相似的系统进化规律。

系统进化分析结果表明, StbZIP 转录因子与 *A. alternata* 亲缘关系最接近, 因此利用 NCBI 获得玉米大斑病菌和 *A. alternata* 的基因组信息, 利用 TBtools One Step MCScanX 和 Dual Systemy Plot for MCScanX 进行 StbZIP 转录因子基因的共线性分析(图 5C)。结果表明, 在基因组水平, *StbZIP1*、*StbZIP2*、*StbZIP3*、*StbZIP4*、*StbZIP5*、*StbZIP8*、*StbZIP10*、*StbZIP11*、*StbZIP12* 和 *StbZIP14* 等 10 个玉米大斑病菌 bZIP 转录因子基因与 *A. alternata* 存在共线性关系。

## 2.6 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员蛋白质互作网络预测

玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员的蛋白质互作网络预测结果显示, StbZIP5 与 StbZIP1、StbZIP2、StbZIP3、StbZIP11 之间存在直接的强互作, StbZIP3 与 StbZIP2、StbZIP9 存在直接的强互作, StbZIP2 与 StbZIP9、StbZIP7 与 StbZIP12 存在直接的弱互作; StbZIP9 可通过位于细胞膜上的类固醇 5- $\alpha$  还原酶家族蛋白(steroid 5-alpha reductase family protein, SRD5 $\alpha$ ) R0KQ73 与 StbZIP8、StbZIP10 产生强互作, StbZIP2 和 StbZIP3 可通过 TRAF 型锌指蛋白(TRAF-type zinc finger domain containing protein, TRAFD) R0I9X4 与 StbZIP7 产生强互作、与 StbZIP12 产生弱互作, StbZIP1、StbZIP2、StbZIP3 和 StbZIP11 可通过细胞核内的碱性螺旋环螺旋域蛋白(basic helix-loop-helix protein, BHLH) R0KCG5 与 StbZIP4 产生弱互作, StbZIP6、StbZIP13 和 StbZIP14 未发现直

接或间接互作(图 6)。

通过功能富集, 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族参与的生物过程主要有转录调控、超长链脂肪酸生物合成和细胞代谢调控, 参与的生物学功能主要有转录因子活性、MAPK 活性和杂环化合物结合等, 参与的代谢活动主要有沙门氏菌感染、核苷酸结合寡聚化结构域(nucleotide binding oligomerization domain, NOD)样受体信号通路、不饱和脂肪酸的生物合成和内质网内蛋白质加工等(表 2)。

## 2.7 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子在 HT-毒素诱导过程中的表达分析

分析玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族在 HT-毒素诱导 7、14、21 和 28 d 时的 FPKM 相对基因表达量(图 7), 结果发现 14 个转录因子家族成员中, *StbZIP1*、*StbZIP5*、*StbZIP7*、*StbZIP10*、*StbZIP11*、*StbZIP12* 具有较高的相对基因表达量, 其中 *StbZIP1*、*StbZIP7*、*StbZIP10*、*StbZIP11* 在 HT-毒素诱导过程中均在 *STK1* 基因野生型(WT)和敲除突变体( $\Delta$ *STK1*)间差异显著, *STK1* 基因敲除后, *StbZIP1* 相对基因表达量显著上调( $P < 0.05$ ), *StbZIP7* 极显著上调( $P < 0.01$ ), 而 *StbZIP10* 和 *StbZIP11* 显著下调( $P < 0.05$ )。 *StbZIP12* 在 HT-毒素诱导过程中 WT 和  $\Delta$ *STK1* 间差异均不显著。

*StbZIP5* 在 HT-毒素诱导 7 d 和 14 d 时, WT 和  $\Delta$ *STK1* 间差异不显著, 但 HT-毒素诱导 21 d 和 28 d 时, 相对基因表达量却极显著上调( $P < 0.01$ ), 从而表明 *StbZIP5* 具有与其他 bZIP 转录因子成员显著不同的基因表达规律。另外, 由于 *StbZIP5* 在 14 个转录因子家族成员中具有最高的相对基因表达量, 因此作为玉米大斑病菌关键 bZIP 转录因子进行后续研究。

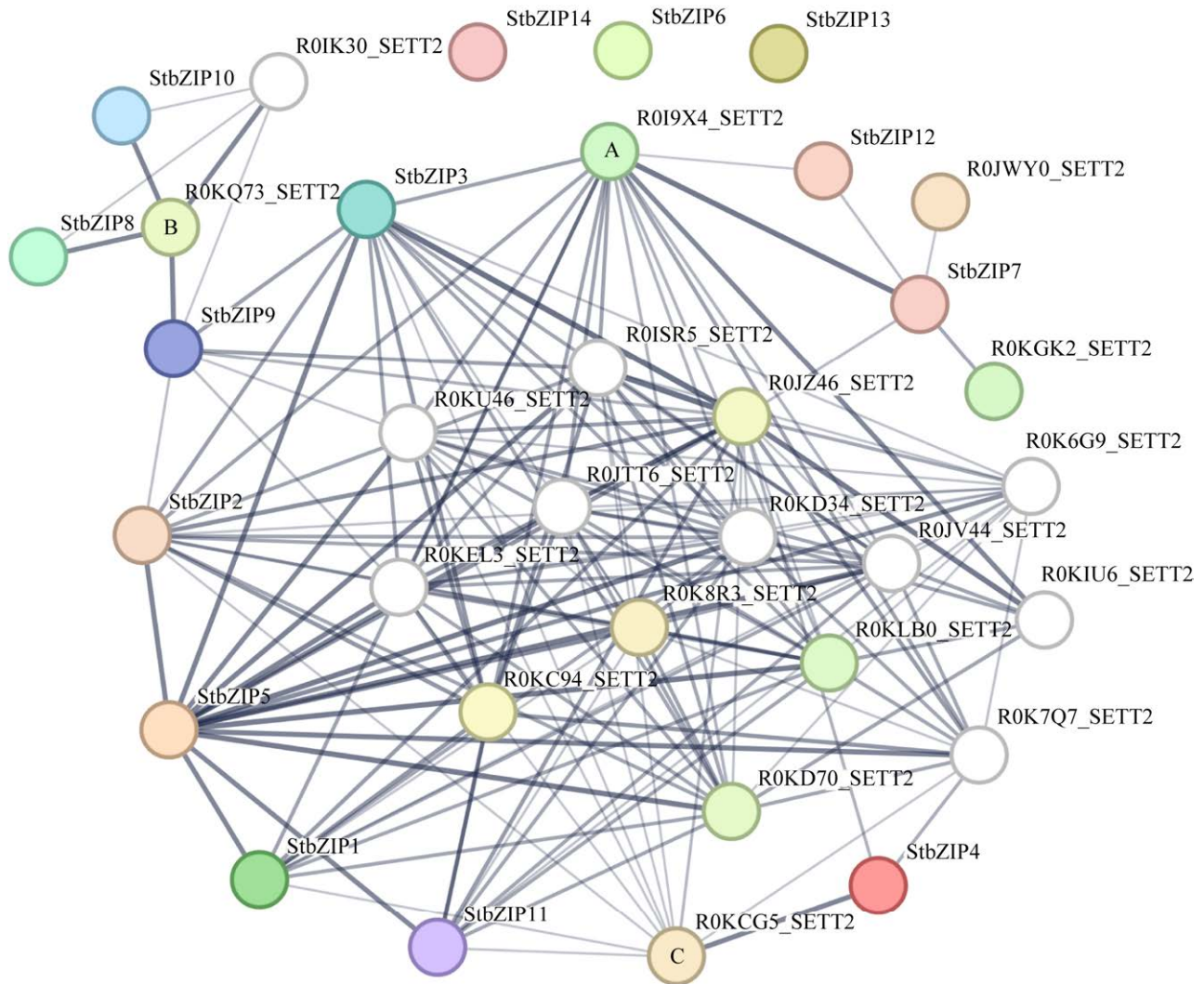


图 6 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族的蛋白质互作网络。节点数: 34; 边数: 156; 平均节点度: 9.18; 平均局部聚类系数: 0.516; 预期边数: 33; 富集  $P$  值:  $<1.0E-16$ ; 线条的粗细代表互作强度, 线条越粗互作强度越大; A: TRAFD; B: SRD5 $\alpha$ ; C: BHLH。

Figure 6 Protein-protein interaction network of bZIP family members in *Setosphaeria turcica*. Number of nodes: 34; Number of edges: 156; Average node degree: 9.18; Average local clustering coefficient: 0.516; Expected number of edges: 33; Enrichment  $P$ -value:  $<1.0E-16$ ; Line thickness indicates the interaction strength; The thicker lines denote stronger interactions; A: TRAFD; B: SRD5 $\alpha$ ; C: BHLH.

## 2.8 玉米大斑病菌 *StbZIP5* 的 RT-qPCR 验证及 HT-毒素生物学活性测定

HT-毒素的生物学活性测定结果表明, CK1 和 CK2 均无病斑产生; HT-毒素诱导第 7 天和第 14 天时 WT 和  $\Delta$ STK1 均未出现明显病斑; WT 在第 21 天时开始出现灰色病斑, 第 28 天时则

形成典型的褐色病斑; 而  $\Delta$ STK1 与 CK 表现基本相同, 未出现典型的侵染性病斑(图 8A), 说明 WT 的致病活性非常高, 而  $\Delta$ STK1 几乎完全丧失了致病活性。在诱导 21 d 后, HT-毒素的生物学活性显著增强, 通过比较病斑面积, 第 28 天的 HT-毒素生物学活性约为第 21 天的 3.00 倍。

表 2 玉米大斑病菌 *bZIP* 转录因子家族蛋白互作网络的功能富集分析Table 2 Functional enrichment analysis of protein-protein interaction network of *bZIP* family members in *Setosphaeria turcica*

Category	Term ID	Term description	Observed gene count	Background gene count	Strength
GO process	GO:0006355	Regulation of transcription, DNA-templated	16	603	0.96
	GO:0031323	Regulation of cellular metabolic process	18	1 003	0.79
	GO:0051171	Regulation of nitrogen compound metabolic process	18	1 010	0.79
	GO:0080090	Regulation of primary metabolic process	18	1 030	0.78
	GO:0060255	Regulation of macromolecule metabolic process	18	1 106	0.75
	GO:0006357	Regulation of transcription by RNA polymerase II	12	440	0.97
	GO:0050794	Regulation of cellular process	19	1 550	0.62
	GO:0042761	Very long-chain fatty acid biosynthetic process	2	5	2.14
GO function	GO:0003700	DNA-binding transcription factor activity	15	242	1.33
	GO:0000976	Transcription <i>cis</i> -regulatory region binding	10	149	1.36
	GO:0000981	DNA-binding transcription factor activity, RNA polymerase II-specific	10	213	1.21
	GO:0003677	DNA binding	14	698	0.84
	GO:0000977	RNA polymerase II transcription regulatory region sequence-specific DNA binding	6	84	1.39
	GO:0000978	RNA polymerase II <i>cis</i> -regulatory region sequence-specific DNA binding	5	63	1.44
	GO:0004707	MAP kinase activity	3	5	2.31
	GO:0097159	Organic cyclic compound binding	18	2 696	0.36
	GO:1901363	Heterocyclic compound binding	18	2 684	0.36
KEGG	map00062	Fatty acid elongation	5	32	1.73
	map05132	Salmonella infection	5	36	1.68
	map04621	NOD-like receptor signaling pathway	4	33	1.62
	map01040	Biosynthesis of unsaturated fatty acids	5	90	1.28
	map04141	Protein processing in endoplasmic reticulum	6	197	1.02
	map01212	Fatty acid metabolism	5	143	1.08

*StbZIP5* 的 RT-qPCR 分析结果与 RNA-seq 转录组基本一致(图 8B、8C)。HT-毒素诱导第 21 天和第 28 天时, *StbZIP5* 在  $\Delta$ *STK1* 的相对基因表达量显著高于 WT, 均达到极显著差异。

## 2.9 与 *StbZIP5* 显著相关的基因表达信息挖掘

利用 batchCorrelation.r 软件包计算 *StbZIP5*

与 HT-毒素诱导转录组数据库中其他基因的 Pearson 相关系数, 分别筛选出显著正相关和显著负相关的 10 个基因(表 3、表 4)。

与 *StbZIP5* 显著正相关的表达基因有细胞周期蛋白 B 及相关激酶激活蛋白、上游转录因子 L-myc-2、核糖核苷二磷酸还原酶、二羧酸氨基酸通透酶、隐球菌甘露糖基转移酶、真菌

单端孢霉烯族毒素外排泵 TRI12、谷氨酰胺 tRNA 合成酶、多药耐药相关蛋白/米托蒽醌耐药蛋白、微小染色体维持蛋白 MCM2 和多梳增强蛋白, 主要与细胞分裂、DNA 复制、氨基酸转运、蛋白质合成和单端孢霉烯族毒素分泌等有关。

与 *StbZIP5* 显著负相关的表达基因有黄素氧化还原酶/12 氧代植物二烯酸还原酶、醇脱氢

酶 III、乙醛酸/羟丙酮酸还原酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、锌结合氧化还原酶、纤维素酶、 $\gamma$ -氨基丁酸渗透酶、葡萄糖-甲醇-胆碱氧化还原酶、泛素融合降解蛋白 UFD1 和货物运输蛋白 ERV29, 主要与茉莉酸合成、关键代谢物转化、氧化磷酸戊糖途径、 $\gamma$ -氨基丁酸转运、蛋白质降解和细胞分泌有关。

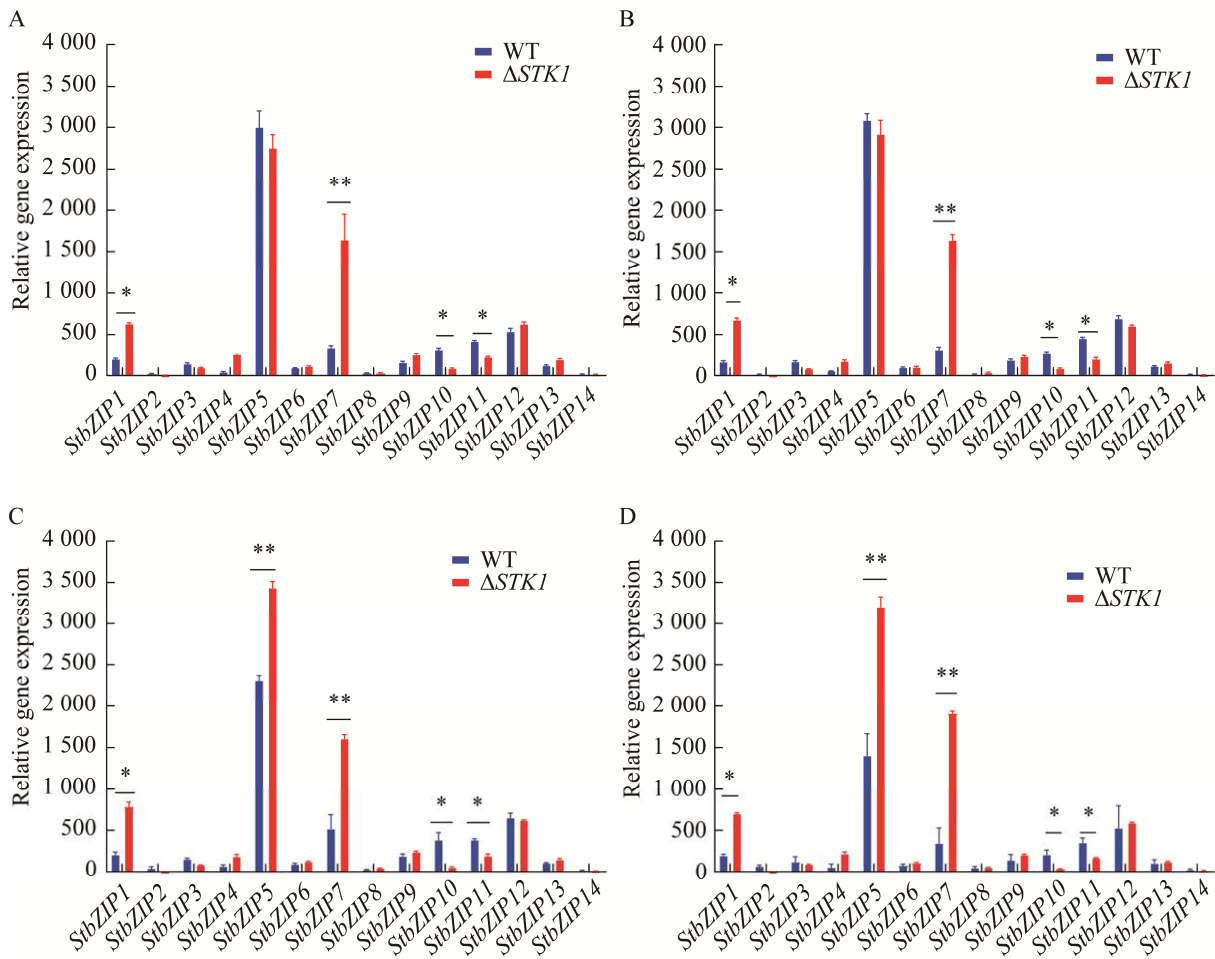


图 7 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员在 HT-毒素诱导过程的基因表达分析。A: HT-毒素诱导 7 d; B: HT-毒素诱导 14 d; C: HT-毒素诱导 21 d; D: HT-毒素诱导 28 d。

Figure 7 Gene expression analyses of bZIP transcription factor family members under HT-toxin induction of *Setosphaeria turcica*. A: HT-toxin induced for 7 days; B: HT-toxin induced for 14 days; C: HT-toxin induced for 21 days; D: HT-toxin induced for 28 days. \*: Significant difference ( $P < 0.05$ ); \*\*: Significant difference ( $P < 0.01$ ).

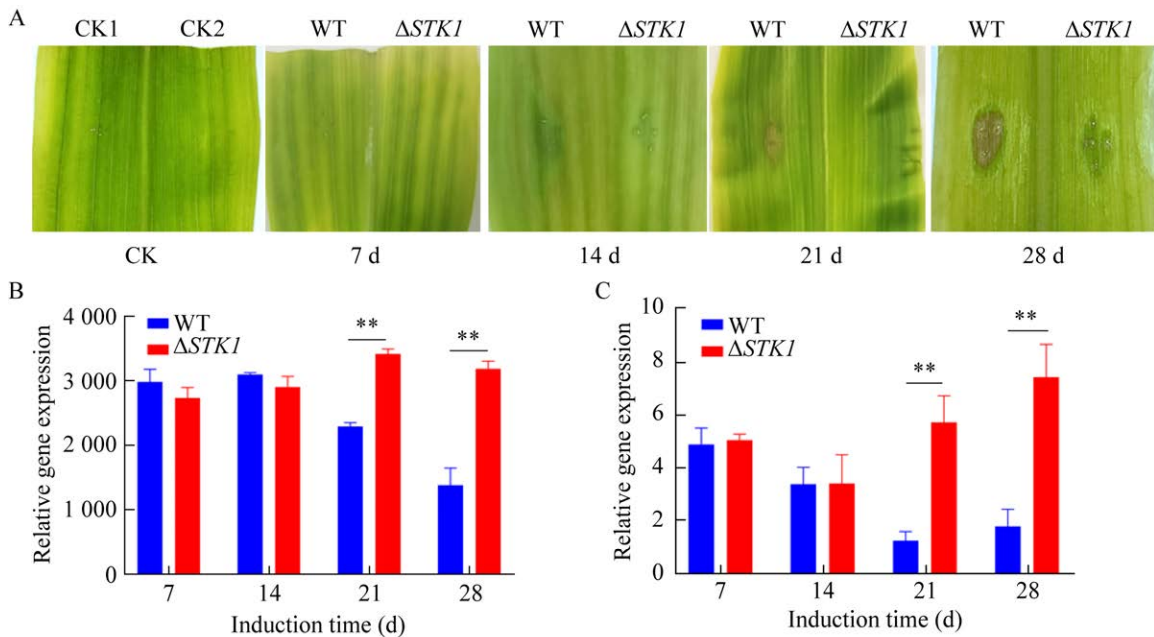


图 8 玉米大斑病菌 *StbZIP5* 基因在 HT-毒素诱导过程中的表达模式及 HT-毒素活性测定。A: HT-毒素活性测定(CK1: 10% DMSO; CK2: 无接种培养基提取毒素; WT: 野生型菌株 01-23;  $\Delta STK1$ : *STK1* 基因敲除突变体; 玉米自交系: B73); B: RNA-seq 转录组分析; C: RT-qPCR 分析。\*\*:  $P < 0.01$ 。

Figure 8 Expression model of *StbZIP5* genes and HT-toxin activity assay during HT-toxin induction in *Setosphaeria turcica*. A: HT-toxin activity assay (CK1: 10% DMSO; CK2: Toxin extraction from medium without inoculation; WT: Wild type strain 01-23;  $\Delta STK1$ : *STK1* gene knockout mutant; Maize inbred line: B73); B: RNA-seq transcriptome analysis; C: RT-qPCR analysis. \*\*: Significant difference ( $P < 0.01$ ).

表 3 与 *StbZIP5* 显著正相关的基因及功能注释

Table 3 Genes and functional annotations significantly positively correlated with *StbZIP5*

Protein ID	Pearson correlation coefficient	P-value	Functional annotations
23404	0.903 309	1.51E-09	KOG0653 细胞周期蛋白 B 及相关激酶激活蛋白 Cyclin B and related kinase-activating proteins
183743	0.884 096	1.01E-08	KOG2483 上游转录因子 L-myc-2 蛋白 Upstream transcription factor L-myc-2 protein
88054	0.871 526	2.96E-08	PF06609 真菌单端孢霉烯族毒素外排泵 TRI12 Fungal trichothecene efflux pump TRI12
170849	0.861 527	6.43E-08	1.17.4.1 核糖核苷二磷酸还原酶 Ribonucleoside-diphosphate reductase
167954	0.859 894	7.25E-08	KOG2261 多梳增强蛋白 Polycomb enhancer protein
120128	0.823 684	7.61E-07	2.A.3.10.13 二羧氨基酸通透酶 Dicarboxylic amino acid permease
173072	0.818 696	1.01E-06	PF11735 隐球菌甘露糖基转移酶 1 Cryptococcal mannosyltransferase 1
31852	0.815 767	1.19E-06	KOG0054 多药耐药相关蛋白/米托蒽醌耐药蛋白 Multidrug resistance associated protein/mitoxantrone resistance protein
90802	0.812 871	1.39E-06	PF12619 微小染色体维持蛋白 2, MCM2 Mini-chromosome maintenance protein 2, MCM2
169347	0.796 459	3.22E-06	KOG1148 谷氨酰胺 tRNA 合成酶 Glutaminyl-tRNA synthetase

表 4 与 *StbZIP5* 显著负相关的基因及功能注释Table 4 Genes and functional annotations significantly negatively correlated with *StbZIP5*

Protein ID	Pearson correlation coefficient	P-value	Functional annotations
169431	-0.938 05	1.33E-11	KOG0134 黄素氧化还原酶/12-氧代植物二烯酸还原酶 Flavin oxidoreductase/12-oxophytodienoate reductase
103699	-0.931 60	3.84E-11	KOG0022 醇脱氢酶 III 类 Alcohol dehydrogenase, class III
168344	-0.930 87	4.30E-11	KOG0069 乙醛酸/羟基丙酮酸还原酶 Glyoxylate/hydroxypyruvate reductase
162784	-0.927 51	7.14E-11	KOG2653 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 6-phosphogluconate dehydrogenase
162878	-0.914 40	4.18E-10	KOG1238 葡萄糖脱氢酶/胆碱脱氢酶/扁桃腈裂合酶 Glucose dehydrogenase/choline dehydrogenase/mandelonitrile lyase
109963	-0.906 43	1.07E-09	KOG1198 锌结合氧化还原酶 Zinc-binding oxidoreductase
167947	-0.901 18	1.90E-09	KOG1816 泛素融合降解蛋白 1 Ubiquitin fusion-degradation protein, UFD1
19810	-0.900 69	2.01E-09	3.2.1.4 纤维素酶 Cellulase
165740	-0.900 11	2.13E-09	KOG3998 货物运输蛋白 ERV29 Putative cargo transport protein ERV29
164621	-0.899 16	2.36E-09	2.A.3.4.2 $\gamma$ -氨基丁酸渗透酶 $\gamma$ -aminobutyric acid permease

### 3 讨论与结论

bZIP 是最具多样性的转录因子家族之一，在许多生物中都发现了 bZIP 转录因子家族。植物中 bZIP 转录因子的数量最多，拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 有 75 个 bZIP 基因<sup>[23]</sup>，玉米 (*Zea mays*) 125 个<sup>[24]</sup>，苹果 (*Malus domestica*) 114 个<sup>[25]</sup>，小麦 (*Triticum aestivum*) 227 个<sup>[26]</sup>，板栗 (*Castanea mollissima* Blume) 59 个<sup>[27]</sup>。动物界的 bZIP 相对较少，智人 (*Homo sapiens*) 中有 56 个<sup>[28]</sup>，黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 有 27 个<sup>[29]</sup>，秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 31 个<sup>[30]</sup>。真菌中的 bZIP 基因数量差距较大，例如 Luo 等<sup>[31]</sup>从 23 种青霉属 (*Penicillium*) 真菌中发现了 454 个 bZIP 基因，平均每种青霉有 19.7 个 bZIP 基因，其中拜赖青霉 (*Penicillium arizonense*) bZIP 基因最多，有 28 个；斜卧青霉

(*Penicillium decumbens*) 的 bZIP 基因最少，仅有 12 个，是拜赖青霉 bZIP 基因数的 42.9%。本研究对 12 个重要植物病原真菌进行 bZIP 基因挖掘，发现平均有 13.9 个 bZIP 基因，但尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*) 的 bZIP 基因多达 34 个，而亚麻栅锈病菌 (*M. lini*) 仅发现 3 个 bZIP 基因。因此，植物病原真菌的 bZIP 基因具有更广泛的遗传多样性，这可能与病菌独特的生理功能和适应机制有关。

细胞定位分析预测结果表明，玉米大斑病菌 *StbZIP* 家族成员均定位于细胞核，主要是由于 *StbZIPs* 蛋白存在核信号肽。*StbZIP* 家族成员均包含一个高度保守的基本基序 Motif 1 和至少一种 bZIP 结构域，但不同家族成员的 Motif 结构组成及结构域种类存在显著区别，具有 1、2 和 3 个 Motif 的 *StbZIP* 家族成员数量分别为 5、6 和 3 个，而具有 1、2 和 4 种结构域的 *StbZIP*



家族成员数量分别为 11、2 和 1 个。根据结构域类型可预测 StbZIP 家族成员的功能。例如 bZIP\_GCIN4 结构域与氨基酸生物合成有关<sup>[32]</sup>, bZIP\_ATF2 与恶性肿瘤发生有关<sup>[33]</sup>, Aft1 和 PAP1 结构域参与减数分裂重组和渗透胁迫调节<sup>[34]</sup>, bZIP\_YAP 在细胞增殖、迁移和分化中起重要作用<sup>[35]</sup>, bZIP\_HAC1-like 参与未折叠蛋白响应途径<sup>[36]</sup>, 而 Smc 超家族具有维持染色体蛋白的作用<sup>[37]</sup>。多数 StbZIP 家族成员仅具有一种结构域, 推测 StbZIP 家族成员在进化过程中形成了较专一的功能特点, 在不同条件下完成不同的生理功能。顺式作用元件分析结果也表明, 玉米大斑病菌的 14 个 StbZIP 家族成员具有 25 种 660 个顺式作用元件, 广泛参与非生物因素胁迫反应、激素诱导反应、细胞周期调控, 说明 StbZIP 家族成员具有广泛的功能独立性。

Dean 等<sup>[22]</sup>统计了全球最重要的 10 种植物病原真菌, 考虑到互隔交链孢霉(*A. alternata*) 在植物病害研究中的重要性, 本文对包括玉米大斑病菌在内的 12 种植物病原真菌的 bZIP 家族成员进行了系统进化分析, 结果发现 StbZIPs 具有更广泛的遗传多样性, 并且与 *A. alternata* 亲缘关系最近, 有 10 个 *StbZIP* 基因与 *A. alternata*

存在共线性。

蛋白质互作分析结果发现, 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员之间存在 3 条互作途径 (图 9): StbZIP5→StbZIP2/StbZIP3→TRAFD→StbZIP7/StbZIP12 (Pathway 1)、StbZIP5→StbZIP2/StbZIP3→StbZIP9→SRD5α→StbZIP8/StbZIP10 (Pathway 2)和 StbZIP5→StbZIP1/StbZIP2/ StbZIP3/StbZIP11→BHLH→StbZIP4 (Pathway 3)。由于 TRAFD 和 BHLH 均具有转录因子活性, 因此 Pathway 1 和 Pathway 3 主要参与转录调控, 而 SRD5α 与类固醇合成有关, 因此 Pathway 2 主要参与超长链脂肪酸生物合成, 与 StbZIPs 互作网络的功能富集结果相符(表 2)。

从图 9 可以看出, StbZIP5 在 StbZIPs 互作网络中处于关键地位, 并且 *StbZIP5* 在 HT-毒素诱导过程中表达量最高, 是 *StbZIP7* 的 6.5 倍, *StbZIP1* 的 12.9 倍, 因此 *StbZIP5* 在 HT-毒素诱导过程中也处于重要的地位。综合分析 *StbZIPs* 在 HT-毒素诱导过程中的表达规律, 在 Pathway 1 中, *StbZIP5* 和 *StbZIP7* 均为显著上调, 因此它们在 HT-毒素诱导过程中可能以正协同方式进行转录调控; 在 Pathway 2 中 *StbZIP5* 显著上调, 而 *StbZIP10* 显著下调, 因此它们可能负协同调控 HT-毒素诱导过程中的超长链脂肪酸生

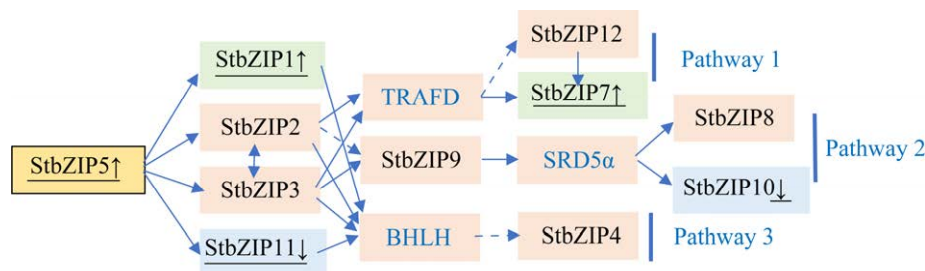


图 9 玉米大斑病菌 bZIP 转录因子家族成员的蛋白质互作途径。↑: HT-毒素诱导过程中表达量显著上调; ↓: HT-毒素诱导过程中表达量显著下调; →: 强相互作用; -→: 弱相互作用。

Figure 9 Protein interaction pathways of the bZIP transcription factor family members in *Setosphaeria turcica*. ↑: Significantly up-regulated during HT-toxin induction; ↓: Significantly down-regulated during HT-toxin induction; →: Strong interaction; -→: Weak interaction.

物合成；在 Pathway 3 中 *StbZIP5* 和 *StbZIP1* 显著上调，而 *StbZIP11* 显著下调，因此它们可能负协同作用于 HT-毒素诱导过程中的转录调控。

分析 HT-毒素诱导过程中与 *StbZIP5* 显著相关的表达基因，发现 *StbZIP5* 与真菌单端孢霉烯族毒素外排泵 TRI12 显著正相关。单端孢霉烯族毒素是由镰刀菌属等真菌产生的倍半萜烯类真菌毒素，其 A 族代表 T-2 毒素是毒性最强的真菌毒素，B 族代表呕吐毒素(deoxynivalenol, DON)是污染最广的真菌毒素。TRI12 在单端孢霉烯族毒素合成、分泌和耐受方面具有重要作用<sup>[38-39]</sup>。与 *StbZIP5* 显著负相关的表达基因多与关键代谢物的合成、转化、运输及分泌有关，该结果与 *StbZIPs* 互作 Pathway 2 的功能及表达分析相符，从而表明 *StbZIP5* 在 HT-毒素诱导过程中参与了广泛的代谢调控作用。

## 作者贡献声明

张淑红：研究方案构思和设计、实验数据整理和分析、论文撰写和修改；张运峰：协助实验操作和数据处理；高凤菊：协助实验操作和软件处理；武秋颖：协助实验方案设计；李亚子：协助数据可视化；许可：实验技术支持；范永山：项目管理；刘玉卫：监督指导。

## 作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

## 参考文献

- [1] STOLZ ML, McCORMICK C. The bZIP proteins of oncogenic viruses[J]. *Viruses*, 2020, 12(7): 757.
- [2] GUO ZL, DZINYELA R, YANG LM, HWARARI D. bZIP transcription factors: structure, modification, abiotic stress responses and application in plant improvement[J]. *Plants*, 2024, 13(15): 2058.
- [3] GAI YP, LI L, LIU B, MA HJ, CHEN YN, ZHENG F, SUN XP, WANG MS, JIAO C, LI HY. Distinct and essential roles of bZIP transcription factors in the stress response and pathogenesis in *Alternaria alternata*[J]. *Microbiological Research*, 2022, 256: 126915.
- [4] YIN WB, REINKE AW, SZILÁGYI M, EMRI T, CHIANG YM, KEATING AE, PÓCSI I, WANG CCC, KELLER NP. bZIP transcription factors affecting secondary metabolism, sexual development and stress responses in *Aspergillus nidulans*[J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt 1): 77-88.
- [5] XIAO P, SHIN KS, WANG TH, YU JH. *Aspergillus fumigatus* flbB encodes two basic leucine zipper domain (bZIP) proteins required for proper asexual development and gliotoxin production[J]. *Eukaryotic Cell*, 2010, 9(11): 1711-1723.
- [6] LEI YF, LIU GD, YAO GS, LI ZH, QIN YQ, QU YB. A novel bZIP transcription factor ClrC positively regulates multiple stress responses, conidiation and cellulase expression in *Penicillium oxalicum*[J]. *Research in Microbiology*, 2016, 167(5): 424-435.
- [7] GUO M, CHEN Y, DU Y, DONG YH, GUO W, ZHAI S, ZHANG HF, DONG SM, ZHANG ZG, WANG YC, WANG P, ZHENG XB. The bZIP transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(2): e1001302.
- [8] ZHAO KH, LIU LM, HUANG SW. Genome-wide identification and functional analysis of the bZIP transcription factor family in rice bakanae disease pathogen, *Fusarium fujikuroi*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(12): 6658.
- [9] DONG JG, FAN YS, GUI XM, AN XL, MA JF, DONG ZP. Geographic distribution and genetic analysis of physiological races of *Setosphaeria turcica* in Northern China[J]. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 2008, 3(1): 389-398.
- [10] ZHANG LH, DONG JG, WANG CH, LI ZP. Purification and structural analysis of a selective toxin fraction produced by the plant pathogen *Setosphaeria turcica*[J]. *Agricultural Sciences in China*, 2007, 6(4): 452-457.
- [11] WATHANEEYAWECH S, SIRITHUNYA P, SMITAMANA P. Study of the host range of northern corn leaf blight disease and effect of *Exserohilum turcicum* toxin on sweet corn[J]. *Journal of Agricultural Technology*, 2015, 11(4): 953-963.
- [12] 范永山, 谷守芹, 董金皋, 董娜. MAPK 途径对玉米大斑病菌 HT-毒素产生和生物学活性的调控作用[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(1): 86-92. FAN YS, GU SQ, DONG JG, DONG N. Regulation of MAPK signal pathway on the production and biological activity of HT-toxin in *Setosphaeria turcica*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(1): 86-92 (in Chinese).

- [13] GONG XD, FENG SZ, ZHAO J, TANG C, TIAN L, FAN YS, CAO ZY, HAO ZM, JIA H, ZANG JP, ZHANG YF, HAN JM, GU SQ, DONG JG. *StPBS2*, a MAPK kinase gene, is involved in determining hyphal morphology, cell wall development, hypertonic stress reaction as well as the production of secondary metabolites in Northern Corn Leaf Blight pathogen *Setosphaeria turcica*[J]. *Microbiological Research*, 2017, 201: 30-38.
- [14] LI P, GONG XD, JIA H, FAN YS, ZHANG YF, CAO ZY, HAO ZM, HAN JM, GU SQ, DONG JG. MAP kinase gene *STK1* is required for hyphal, conidial, and appressorial development, toxin biosynthesis, pathogenicity, and hypertonic stress response in the plant pathogenic fungus *Setosphaeria turcica*[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2016, 15(12): 2786-2794.
- [15] LI P, GU SQ, SHEN S, DONG JG, WU M, WANG MJ, YANG Y, ZHANG CZ, FAN YS, HAN JM. *STK1*, a MAP kinase gene from *Setosphaeria turcica*, confers preferable tolerance to sodium salt stress[J]. *African Journal of Microbiology Research*, 2013, 6(40): 6830-6837.
- [16] 张淑红, 高凤菊, 武秋颖, 张运峰, 范永山. 玉米大斑病菌 HST 生物合成基因簇的结构和表达分析[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2022, 50(7): 84-91.  
ZHANG SH, GAO FJ, WU QY, ZHANG YF, FAN YS. Structure and expression analysis of HST synthetic gene Cluster 397.3 in *Setosphaeria turcica*[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2022, 50(7): 84-91 (in Chinese).
- [17] 张淑红, 张运峰, 范永山. *STK1* 基因对山梨醇高渗透胁迫下玉米大斑病菌菌丝生长和发育的调控[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2018, 46(7): 80-86.  
ZHANG SH, ZHANG YF, FAN YS. Regulation of mycelium growth and development of *Setosphaeria turcica* by *STK1* gene under sorbitol hypertonic stress[J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2018, 46(7): 80-86 (in Chinese).
- [18] 张运峰, 张淑红, 武秋颖, 范永山. *STK1* 对玉米大斑病菌附着胞发育过程中糖原和脂肪积累的影响[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(15): 2928-2935.  
ZHANG YF, ZHANG SH, WU QY, FAN YS. Effects of *STK1* on glycogen and lipid accumulation during the appressorium development of *Setosphaeria turcica*[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2017, 50(15): 2928-2935 (in Chinese).
- [19] OHM RA, FEAU N, HENRISSAT B, SCHOCH CL, HORWITZ BA, BARRY KW, CONDON BJ, COPELAND AC, DHILLON B, GLASER F, HESSE CN, KOSTI I, LaBUTTI K, LINDQUIST EA, LUCAS S, SALAMOV AA, BRADSHAW RE, CIUFFETTI L, HAMELIN RC, KEMA GHJ, et al. Diverse lifestyles and strategies of plant pathogenesis encoded in the genomes of eighteen *Dothideomycetes* fungi[J]. *PLoS Pathogens*, 2012, 8(12): e1003037.
- [20] CONDON BJ, LENG YQ, WU DL, BUSHLEY KE, OHM RA, OTILLAR R, MARTIN J, SCHACKWITZ W, GRIMWOOD J, MohdZAINUDIN N, XUE CS, WANG R, MANNING VA, DHILLON B, TU ZJ, STEFFENSON BJ, SALAMOV A, SUN H, LOWRY S, LaBUTTI K, et al. Comparative genome structure, secondary metabolite, and effector coding capacity across *Cochliobolus pathogens*[J]. *PLoS Genetics*, 2013, 9(1): e1003233.
- [21] CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, THOMAS HR, FRANK MH, HE YH, XIA R. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data[J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1194-1202.
- [22] DEAN R, van KAN JAL, PRETORIUS ZA, HAMMOND-KOSACK KE, Di PIETRO A, SPANU PD, RUDD JJ, DICKMAN M, KAHMANN R, ELLIS J, FOSTER GD. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2012, 13(4): 414-430.
- [23] DRÖGE-LASER W, SNOEK BL, SNEL B, WEISTE C. The *Arabidopsis* bZIP transcription factor family: an update[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2018, 45: 36-49.
- [24] WEI KF, CHEN J, WANG YM, CHEN YH, CHEN SX, LIN YN, PAN S, ZHONG XJ, XIE DX. Genome-wide analysis of bZIP-encoding genes in maize[J]. *DNA Research*, 2012, 19(6): 463-476.
- [25] LI YY, MENG D, LI MJ, CHENG LL. Genome-wide identification and expression analysis of the bZIP gene family in apple (*Malus domestica*)[J]. *Tree Genetics & Genomes*, 2016, 12(4): 82.
- [26] LIANG Y, XIA JQ, JIANG YS, BAO YZ, CHEN HC, WANG DJ, ZHANG D, YU J, CANG J. Genome-wide identification and analysis of bZIP gene family and resistance of *TaABI5 (TabZIP96)* under freezing stress in wheat (*Triticum aestivum*)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(4): 2351.
- [27] ZHANG PL, LIU J, JIA N, WANG M, LU Y, WANG DS, ZHANG JZ, ZHANG HE, WANG X. Genome-wide identification and characterization of the bZIP gene family and their function in starch accumulation in Chinese chestnut (*Castanea mollissima* Blume)[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2023, 14: 1166717.
- [28] RYU T, JUNG J, LEE S, NAM HJ, HONG SW, YOO JW, LEE DK, LEE D. bZIPDB: a database of regulatory information for human bZIP transcription factors[J]. *BMC Genomics*, 2007, 8: 136.
- [29] FASSLER J, LANDSMAN D, ACHARYA A, MOLL JR, BONOVIK M, VINSON C. B-ZIP proteins encoded by the *Drosophila* genome: evaluation of potential dimerization partners[J]. *Genome Research*, 2002, 12(8): 1190-1200.

- [30] ZHENG ZF, AIHEMAITI Y, LIU JQ, AFRIDI MI, YANG SM, ZHANG XM, XU YF, CHEN CH, TU HJ. The bZIP transcription factor ZIP-11 is required for the innate immune regulation in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 744454.
- [31] LUO XJ, ZHAN XR, RUAN RX, XI Y, SHEN CJ, WANG HZ, WANG MS. Genome-wide identification of the *Penicillium digitatum* bZIP gene family and the roles of one key member, PdatfA[J]. *Research in Microbiology*, 2022, 173(8): 103970.
- [32] MARINER BL, FELKER DP, CANTERGIANI RJ, PETERSON J, McCORMICK MA. Multiomics of *GCN4*-dependent replicative lifespan extension models reveals *Gcn4* as a regulator of protein turnover in yeast[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(22): 16163.
- [33] ZHANG L, ZENG SG, YU ZZ, ZHANG GX, XIONG ZF, XIE FY, YOU ZY. Overexpression of activating transcription factor-2 (ATF-2) activates Wnt/ $Ca^{2+}$  signaling pathways and promotes proliferation and invasion in non-small-cell lung cancer[J]. *Disease Markers*, 2022, 2022: 5772089.
- [34] LI LT, BERTRAM S, KAPLAN J, JIA X, WARD DM. The mitochondrial iron exporter genes *MMT1* and *MMT2* in yeast are transcriptionally regulated by Aft1 and Yap1[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2020, 295(6): 1716-1726.
- [35] RODRIGUES-POUSADA C, DEVAUX F, CAETANO SM, PIMENTEL C, Da SILVA S, CORDEIRO AC, AMARAL C. Yeast AP-1 like transcription factors (Yap) and stress response: a current overview[J]. *Microbial Cell*, 2019, 6(6): 267-285.
- [36] FORDYCE PM, PINCUS D, KIMMIG P, NELSON CS, EL-SAMAD H, WALTER P, DeRISI JL. Basic leucine zipper transcription factor Hac1 binds DNA in two distinct modes as revealed by microfluidic analyses[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(45): E3084-E3093.
- [37] MATITYAHU A, SHWARTZ M, ONN I. Identifying functional domains in subunits of structural maintenance of chromosomes (SMC) complexes by transposon mutagenesis screen in yeast[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2019, 2004: 63-78.
- [38] 蒋翊宸, 刘馨, 方欣, 冯建茹, 李露, 徐剑宏, 史建荣. 单端孢霉烯族毒素的产生及分子调控机制[J]. *菌物学报*, 2020, 39(3): 521-538.
- JIANG YC, LIU X, FANG X, FENG JR, LI L, XU JH, SHI JR. Recent advances on trichothecene mycotoxins: their biosynthesis and regulation[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(3): 521-538 (in Chinese).
- [39] ALEXANDER NJ, McCORMICK SP, HOHN TM. TRI12, a trichothecene efflux pump from *Fusarium sporotrichioides*: gene isolation and expression in yeast[J]. *Molecular & General Genetics*, 1999, 261(6): 977-984.