

基因 *CfATG6* 和 *CfATG14* 参与调控果生刺盘孢细胞自噬和致病力

姚权, 李河*

中南林业科技大学 南方人工林病虫害防控国家林业和草原局重点实验室 森林有害生物防控湖南省重点实验室 森林生物资源与有害生物综合管理湖南省普通高等学校重点实验室, 湖南 长沙 410004

姚权, 李河. 基因 *CfATG6* 和 *CfATG14* 参与调控果生刺盘孢细胞自噬和致病力[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1289-1305.
YAO Quan, LI He. *CfATG6* and *CfATG14* regulate the autophagy and pathogenicity of *Colletotrichum fructicola*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1289-1305.

摘要:【目的】炭疽病是油茶的主要病害, 由刺盘孢属的多种真菌引起, 其中果生刺盘孢分布范围最广、分离率最高, 是油茶炭疽病的主要致病菌。研究自噬相关蛋白 *CfAtg6* 和 *CfAtg14* 的生物学功能, 为进一步揭示果生刺盘孢通过细胞自噬调控致病的分子机制, 并为油茶炭疽病的防治提供理论基础。【方法】根据同源重组原理, 通过聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的方法, 在果生刺盘孢中敲除基因 *CfATG6* 和 *CfATG14*, 并进一步获得回补菌株 $\Delta Cfatg6-C$ 和 $\Delta Cfatg14-C$ 。【结果】酵母双杂交试验结果显示, 果生刺盘孢蛋白 *CfAtg6* 和 *CfAtg14* 可能存在互作关系。生物学表型测定结果表明, 相较于野生型和回补菌株, 突变体 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 均表现出营养生长速率显著减慢, 附着胞形成率分别只有野生型的 5%和 18%; 突变体 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 致病力均极显著减弱, 造成的油茶叶片病斑面积少于野生型和回补菌株的 1/3; *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因缺失突变体均丧失转运和降解 *CfAtg8* 蛋白的能力, 并对细胞壁胁迫更敏感。突变体 $\Delta Cfatg6$ 的分生孢子产量显著降低, 仅为野生型的 20%左右; 氧化胁迫试验结果表明, 相较于野生型和回补菌株, 过氧化氢对突变体的生长抑制率升高 10%左右。内质网压力胁迫试验表明, $\Delta Cfatg14$ 对二硫苏糖醇抑制率升高 5%以上。【结论】自噬相关基因 *CfATG6* 和 *CfATG14* 参与调控了果生刺盘孢生长发育、细胞自噬和致病力。

关键词: 果生刺盘孢; 细胞自噬; *CfATG6*; *CfATG14*; 致病力

资助项目: 国家自然科学基金(32071765)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32071765).

*Corresponding author. E-mail: csuftlihe@163.com

Received: 2023-11-15; Accepted: 2024-01-23

CfATG6 and *CfATG14* regulate the autophagy and pathogenicity of *Colletotrichum fructicola*

YAO Quan, LI He*

Key Laboratory of National Forestry and Grassland Administration on Control of Artificial Forest Diseases and Pests in South China, Hunan Provincial Key Laboratory for Control of Forest Diseases and Pests, Key Laboratory of Forest Bio-resources and Integrated Pest Management for Higher Education in Hunan Province, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China

Abstract: [Objective] Anthracnose is a major disease attacking *Camellia oleifera* plants. *Colletotrichum fructicola* with a wide distribution scope and a high isolation rate is the major pathogen causing anthracnose in *C. oleifera*. This study explored the roles of autophagy-related proteins *CfAtg6* and *CfAtg14* and the molecular mechanism for the pathogenicity of *C. fructicola*, aiming to provide a theoretical basis for the prevention and control of anthracnose in *C. oleifera*. [Methods] The homologous recombination principle and polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation method were employed to construct the gene-deleted strains $\Delta CfATG6$ and $\Delta CfATG14$ and the complemented strains $\Delta Cfatg6-C$ and $\Delta Cfatg14-C$. [Results] The yeast two-hybrid assay results showed that $\Delta Cfatg6$ and $\Delta Cfatg14$ might interact with each other. Compared with the wild type and complemented strains, $\Delta Cfatg6$ and $\Delta Cfatg14$ demonstrated significantly slow vegetative growth, and their appressorium formation rates were only 5% and 18% that of the wide type. In addition, $\Delta Cfatg6$ and $\Delta Cfatg14$ showed significantly weakened pathogenicity, causing the lesion areas only 1/3 of the wild type and complemented strains on *C. oleifera* leaves. In addition, $\Delta Cfatg6$ and $\Delta Cfatg14$ lost the ability of transporting and degrading *CfAtg8* protein and became more sensitive to the cell wall stress. The conidium production of $\Delta Cfatg6$ decreased significantly, being only 20% that of wild type. The inhibition rate of hydrogen peroxide on the growth of the deleted strains was 10% higher than those on the wild type and complemented strains. $\Delta Cfatg14$ showed increased sensitivity to dithiothreitol stress. [Conclusion] The autophagy-related genes *CfATG6* and *CfATG14* are involved in the regulation of the growth, autophagy, and pathogenicity of *C. fructicola*.

Keywords: *Colletotrichum fructicola*; autophagy; *CfATG6*; *CfATG14*; pathogenicity

油茶(*Camellia oleifera*)属于山茶科(*Theaceae* Mirb)山茶属(*Camellia*)植物,作为我国南方特有的木本食用油料树种,它不仅可以提供富含不饱和脂肪酸的茶油,还可以保持水土、涵养水源,在我国区域经济发展中具有重要地位^[1]。炭疽病是油茶的主要病害,给林农带来了严重的经济损失。果生刺盘孢(*Colletotrichum fructicola*)是油茶炭疽病的主要致病菌,其分生孢子形成附着胞进而产

生侵入钉侵染寄主引起病害。姚权等^[2]和李河等^[3-6]前期研究发现,*CfHAC1*、*CfMKK1*、*CfRAB7*等基因通过调控果生刺盘孢附着胞的形成进而影响致病力,并发现果生刺盘孢组蛋白乙酰转移酶 *CfGcn5* 负调控细胞自噬从而调控附着胞的膨压进而影响致病力。自噬相关蛋白基因 *CfATG6* 在 *CfGcn5* 基因缺失突变体中表达水平显著上调,但其功能尚不清楚^[7]。

细胞自噬是一种亚细胞降解途径, 在真核生物中高度保守, 它对于维持细胞内生理平衡和帮助细胞抵抗逆境有重要作用^[8-9]。细胞自噬通过自噬小体的形成, 将细胞内被破坏的大分子蛋白质以及受损的细胞器包裹, 然后与液泡融合, 将大分子蛋白质和细胞器降解并循环再利用, 以维持细胞正常功能^[10-13]。许多致病力相关的关键生理过程都受到细胞自噬的调控, 如 *MoATG1* 基因缺失后, 稻瘟病菌细胞自噬过程被阻断进而降低附着胞膨压, 使突变体丧失穿透和侵染寄主的能力^[14-15]; 在果生刺盘孢中自噬相关基因 *CfATG8* 和 *CfATG9* 缺失后, 细胞自噬进程同样受到影响, 降低了附着胞膨压并影响致病过程^[7]。

磷脂酰肌醇-3-激酶 III 型(phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, PI3KC3)复合物磷酸化磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)产生自噬体膜主要成分磷脂酰肌-3-磷酸(phosphatidylinositol-3-phosphate, PI3P)^[16-18]。Atg6/Vps30、Atg14、Vps34 和 Vps15 形成的 PI3P 激酶(PI3P kinase, PI3K)复合体是 PI3KC3 两种复合物中的一种, 主要在自噬过程中发挥功能^[19-20]。在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中, 缺失自噬相关基因 *ATG6* 及 *ATG14* 后, 酿酒酵母表现出自噬缺陷, 并在 $\Delta Scat6$ 中无法测定到蛋白 Atg14^[19]。在禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)中, 自噬相关基因 *FgATG6* 和 *FgATG14* 对菌株的生长发育、无性繁殖及侵染过程极其重要^[21]。在稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)中, 缺失 *MoATG6* 及 *MoATG14* 后, 突变体菌株无法侵染水稻叶片, 且 *MoATG14* 缺失后, 自噬能力也随之丧失^[22-23]。灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)自噬相关基因 *BcATG6* 缺失后, 表现出生长、致病和无性繁殖能力的降低, 其自噬过程也表现出极显著减弱^[24]。这些研究表明, 自噬相关基因的功能在病原真菌中较为保守且非常重要。自噬相关基因

CfATG6 及 *CfATG14* 在油茶炭疽病的优势致病菌果生刺盘孢中尚无相关研究, 它们的生物学功能也不清楚。本研究以这 2 个基因为研究对象, 阐明它们在果生刺盘孢中的生物学功能, 为油茶炭疽病的防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

本研究所用果生刺盘孢野生型菌株 CFHL16、酵母菌株 XK125 和酵母双杂交菌株 AH109 由实验室保存, 大肠杆菌 *Trelief 5a* 购自北京擎科生物科技股份有限公司。

1.2 CfAtg6 和 CfAtg14 蛋白系统发育树构建

在果生刺盘孢的全基因组中通过 BLASTp 比对, 鉴定到酿酒酵母 Atg6 (NP 015205.1) 和 Atg14 (NP 009686.1) 同源蛋白氨基酸序列, 分别命名为 CfAtg6 (KAE9577198) 和 CfAtg14 (KAE9577180), 参考姚权等^[2]描述的方法构建邻接(neighbor-joining, N-J)系统发育树。

1.3 CfAtg6 和 CfAtg14 酵母双杂交试验

以 cDNA 为模板, 分别使用 CfAtg6-AD-F/CfAtg6-AD-R、CfAtg14-BD-F/CfAtg14-BD-R 为引物扩增 *CfATG6* 基因和 *CfATG14* 基因片段, 将 *CfATG6* 基因片段与 pGADT7 (AD) 质粒形成载体 1, *CfATG14* 基因片段与 pGBKT7 (BD) 质粒形成载体 2, 共转入酵母菌株 AH109 内, 在 SD-Trp-Leu 培养基平板上 30 °C 培养 3-5 d 后, 用绒布影印至 SD-Trp-Leu-His 培养基和 SD-Trp-Leu-His-Ade 培养基上, 继续培养观察。阳性对照为 ADRecT 和 BD(+), 阴性对照为 ADRecT 和 BD(-)。

1.4 CfATG6 和 CfATG14 基因敲除载体构建及突变体的筛选

CfATG6、*CfATG14* 基因载体构建和敲除方法参考姚权等^[2]描述的方法。本研究涉及的引物序列详见表 1。

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primer used in this study

Primer	Sequence (5'→3')	Purpose
CfAtg6-1F	TACTTGATAGACTCGGGCGT	Amplify <i>CfATG6</i> 5' flank sequence
CfAtg6-2R	TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCCCTATCGTTGCGCGCATGCT	
CfAtg6-3F	CAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGGTGTGACGCTCACTGCCTTC	Amplify <i>CfATG6</i> 3' flank sequence
CfAtg6-4R	ACCTCCTCGTAGCTAACCGT	
CfAtg6-5F	GACTTGACAGTCGCTGCTCT	Validation of <i>CfATG6</i> gene deletion
H855R	GCTGATCTGACCAGTTGC	
CfAtg6-7F	CAAGGCTGGTTCAAAAGGCCAGGA	Amplify <i>CfATG6</i> gene sequence
CfAtg6-8R	CATATCGAACGATCTTGGAGGTGC	
CfAtg6-9F	ACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACTCAAATTGGTTGATCTCCAGTCGATGTTGGT	Amplify complemented sequence
CfAtg6-10R	CACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACGTTGTTGGCATTCTTGCTG	
HYG-F	GGCTTGGCTCCAGCTAGTGGAGGT	Amplify <i>HPH</i> sequence
HYG-R	CTCTATTCCTTTGCCCTCG	
GFPR	GACACGCTGAACTTGTGGCCGTT	Validation of complemented sequenced
CfAtg14-1F	CTAGATGCATGGTCAGTTGG	Amplify <i>CfATG14</i> 5' flank sequence
CfAtg14-2R	TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCCTTGGCGGCATGCGGCGAGT	
CfAtg14-3F	CAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGTCTAACAAAGAAATGAAACA	Amplify <i>CfATG14</i> 3' flank sequence
CfAtg14-4R	TACCAACGTCTTCACCGTCA	
CfAtg14-5F	GACTGCACGCTCATTGTCAT	Validation of <i>CfATG14</i> gene deletion
H855R	GCTGATCTGACCAGTTGC	
CfAtg14-7F	GCTAAAGCGGGAAATCGCTG	Amplify <i>CfATG14</i> gene sequence
CfAtg14-8R	AAGAGCGAATGCGTGACAGA	
CfAtg14-9F	ACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACTCAAATTGGTTTGGGACTTCTGGTCGTTTGT	Amplify complemented sequence
CfAtg14-10R	CACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACCCCTGTTCTTCAGCTTCGTCC	
CfAtg6-AD-F	TGGGCATCGATACGGGATCATGTACTGCCAAAAGTGTCG	Construct pGADT7- <i>CfAtg6</i>
CfAtg6-AD-R	TGCAGCTCGAGCTCGATGGATCCTTAGTTGTTGGCATTCTTG	
CfAtg14-BD-F	AGGCCGAATTCCCAGGGATCATGAACTGCGACATTGCCA	Construct pGBKT7- <i>CfAtg14</i>
CfAtg14-BD-R	CGCTGCAGGTCGACGGATCC TTACCTGTTCTTCAGCTTCG	

1.5 *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因缺失突变体回补菌株的获得

以野生型 CFHL16 基因组 DNA 为模板, 参照姚权等^[2]描述的方法构建 *CfATG6* 基因回补质粒和回补菌株, 并对其进行相关表型测定。*CfATG14* 基因敲除突变体回补菌株的获得同 *CfATG6* 基因。

1.6 *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因缺失突变体表型分析

1.6.1 生长表型测定

试验菌株在 CM 和 MM 培养基上 28 °C 培养 3 d, 之后参考姚权等^[25]描述的方法进行 *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因缺失突变体表型分析。

1.6.2 敲除突变体产孢及附着胞形态观察

试验菌株于CM液体培养基中28 °C、180 r/min培养2 d, 之后参考姚权等^[2]描述1.6.5的方法进行敲除突变体产孢及附着胞形态观察。

1.6.3 突变体细胞壁胁迫敏感性试验

使用细胞壁胁迫剂为400 µg/mL刚果红(congo red, CR)、0.01%十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS), 试验参考郭源等^[26]描述的方法进行突变体细胞壁胁迫敏感性试验。

1.6.4 突变体氧化胁迫敏感性试验

采用终浓度10.0 mmol/L的H₂O₂, 参考高亚兰等^[27]描述的方法进行突变体氧化胁迫敏感性试验。

1.6.5 突变体内质网胁迫敏感性试验

采用终浓度为2.5 mmol/L和5.0 mmol/L的二巯苏糖醇(dithiothreitol, DTT), 参考李司政等^[28]描述的方法进行突变体内质网胁迫敏感性试验。

1.6.6 突变体致病力测定

试验菌株分别接种于苹果和离体油茶叶片, 28 °C培养, 参考郭源等^[26]的方法测定突变体致病力。

1.7 CfATG6 和 CfATG14 基因缺失突变体自噬研究

1.7.1 表达 GFP-CfAtg8 突变体菌株的构建

将CfATG8基因片段与pYF11质粒连接, 构建CfATG8::pYF11载体成功后, 使用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导法将载体导入ΔCfatg6、ΔCfatg14菌株原生质体中, 并对后续转化子进行筛选, 选取成功导入CfATG8::pYF11载体并稳定表达的菌株进行下一步试验。

1.7.2 突变体自噬研究

采用CM液体培养基28 °C、180 r/min培养36 h后, 无菌水清洗去除CM液体培养基, 使用MM-N液体培养基饥饿诱导处理菌丝球4 h, 显微观察绿色荧光变化情况, 进一步提取菌丝球蛋白进行Western blotting试验检测CfAtg8蛋白降解情况。

2 结果与分析

2.1 CfAtg6/CfVps30 及 CfAtg14 的鉴定及系统发育分析

从*C. fructicola*鉴定到一个与酿酒酵母ScAtg6同源的CfAtg6蛋白序列及一个与酿酒酵母ScAtg14同源的CfAtg14蛋白序列。

其中CfATG6基因编码491个氨基酸, 含有1个Pfam APG6识别域和2个未知结构域。进一步分析发现果生刺盘孢内的CfAtg6氨基酸序列与胶孢刺盘孢(*C. gloeosporioides*)的亲缘关系较近, 与构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)和*S. cerevisiae*的亲缘关系较远。

CfATG14基因编码466个氨基酸, 含有1个Pfam Atg14识别域和2个未知结构域。进一步分析发现果生刺盘孢内的CfAtg14氨基酸序列与*C. gloeosporioides*和*C. siamense*的亲缘关系较近, 与*A. nidulans*和*S. cerevisiae*的亲缘关系较远。

2.2 CfAtg6 和 CfAtg14 在酵母双杂试验中具有相互作用

在酿酒酵母中, 蛋白Atg6/Vps30和Atg14存在互作关系^[19]。为验证在果生刺盘孢中蛋白CfAtg6和CfAtg14是否存在相互作用, 我们构建了相关载体进行酵母双杂交试验。结果表明在果生刺盘孢中自噬相关蛋白CfAtg6和CfAtg14可能也存在互作关系(图1), 与酿酒酵母中这2个蛋白互作的结果一致, 说明自噬相关蛋白Atg6和Atg14的功能可能比较保守。为了进一步验证CfAtg14与CfAtg6在果生刺盘孢中是否具有相似的生物学功能, 本文对2个基因的功能进行了研究。

2.3 ΔCfatg6、ΔCfatg14 同源重组、回复互补的筛选及分子验证

为了进一步阐明基因CfATG6和CfATG14的生物学功能, 基于同源重组的原理, 参考姚权等^[2]试验方法获得回补菌株。敲除策略如图2A所示; 分子验证如图2B、2C所示。

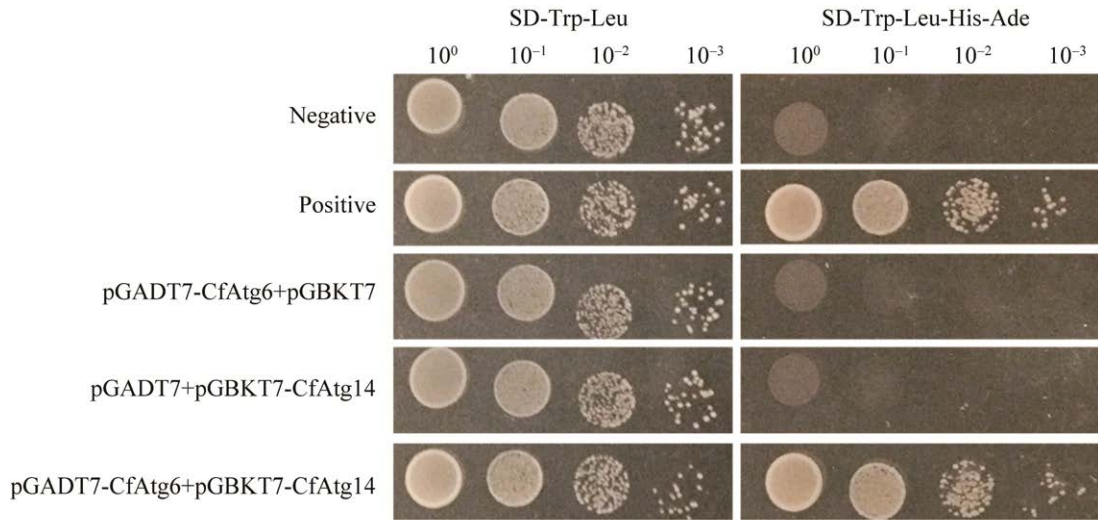


图 1 酵母双杂交试验分析 *CfAtg6* 与 *CfAtg14* 之间的相互作用
Figure 1 Yeast two hybrid assays between *CfAtg6* and *CfAtg14*.

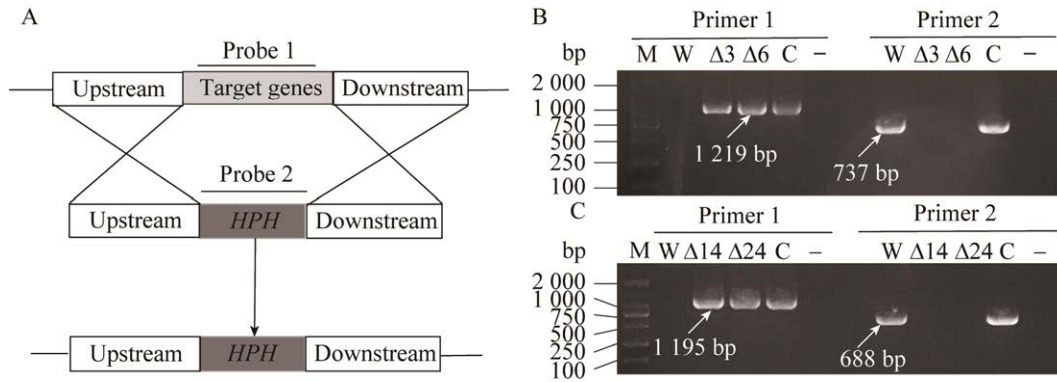


图 2 $\Delta Cfatg6$ 、 $\Delta Cfatg14$ 突变体的获得

Figure 2 Acquisition of the $\Delta Cfatg6$, $\Delta Cfatg14$ mutants of *Colletotrichum fructicola*. A: The $\Delta Cfatg6$, $\Delta Cfatg14$ mutant knockout strategy diagram. B: The confirmation of $\Delta Cfatg6$ mutants. Primer 1: *CfAtg6*-5F/H855R; Primer 2: *CfAtg6*-7F/*CfAtg6*-8R. C: The confirmation of $\Delta Cfatg14$ mutants. Primer 1: *CfAtg14*-5F/H855R; Primer 2: *CfAtg14*-7F/*CfAtg14*-8R; M: DL2000 DNA marker; W: CFLH16 positive control. Δ : Mutant. C: Complemented strain; -: Negative control.

2.4 *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因参与果生刺盘孢营养生长

在 CM 和 MM 培养基上, 突变体 $\Delta Cfatg6$ 菌落生长直径分别为 4.2 cm 和 3.0 cm 左右, $\Delta Cfatg14$ 菌落生长直径分别为 5.7 cm 和 4.0 cm

左右, 对生长菌落直径进行统计分析, 发现 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 菌落直径均小于 CFLH16 和其回补菌株 ($P < 0.01$, 图 3)。结果表明 *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因均调控果生刺盘孢的营养生长过程。

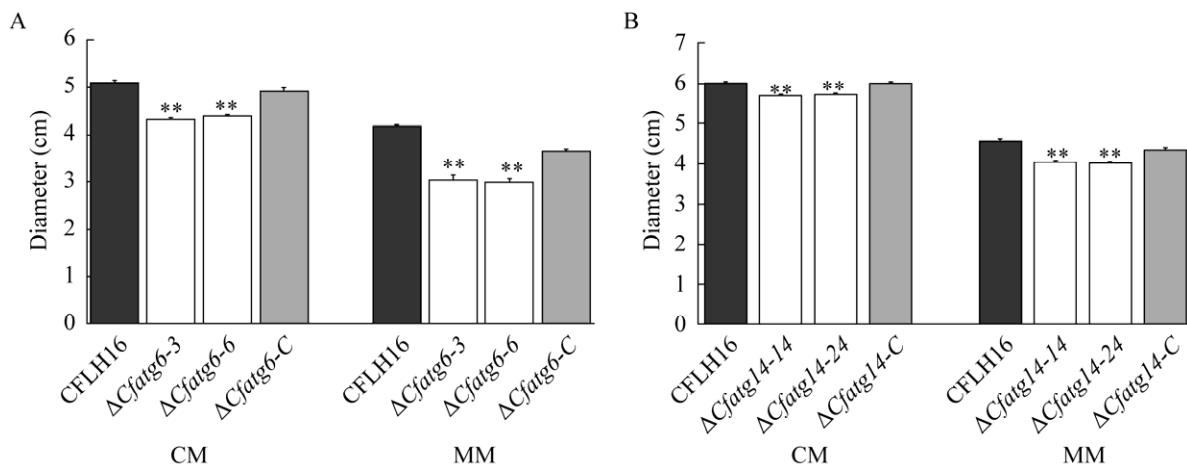


图 3 不同菌株的生长测定试验 A: CFLH16、 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg6-C$ 生长统计分析. B: CFLH16、 $\Delta Cfatg14$ 和 $\Delta Cfatg14-C$ 生长统计分析. **表示差异极显著($P < 0.01$)

Figure 3 Growth analysis of different strain. A: Statistical analysis of CFLH16, $\Delta Cfatg6$ mutant, and $\Delta Cfatg6-C$ diameter. B: Statistical analysis of CFLH16, $\Delta Cfatg14$ mutant, and $\Delta Cfatg14-C$ diameter. Error bars are standard deviation and ** represent extremely significance at $P < 0.01$.

2.5 *CfATG6* 基因参与调控果生刺盘孢分生孢子形成

在真菌侵染植物的过程中,分生孢子是初侵染和再侵染主要侵染来源,在病害循环中起着十分重要的作用^[26]。我们研究了 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 突变体的分生孢子形成过程,结果显示突变体 $\Delta Cfatg6$ 产生少量分生孢子,仅为野生型和回补菌株的 20%左右(图 4),统计分析差异显著;同时我们对突变体 $\Delta Cfatg14$ 进行多次分生孢子形成试验,发现突变体试验结果存在较大误差,无法确定基因 *CfATG14* 是否参与调控果生刺盘孢分生孢子形成过程。结果表明, *CfATG6* 基因参与调控了果生刺盘孢分生孢子的形成,而 *CfATG14* 基因是否参与这一过程仍需进一步研究。

2.6 *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因参与调控果生刺盘孢附着胞形成

刺盘孢属真菌在侵染寄主时会形成附着胞刺破寄主表皮,对病原菌侵染寄主有着至关重要的作用^[4],因此我们进一步研究了上述菌株的附着胞形成情况。野生型、 $\Delta Cfatg14-C$ 附着

胞形成率可达 75%,回补菌株 $\Delta Cfatg6-C$ 相对野生型略低,为 60%,而 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 突变体的附着胞形成率均显著下降,其中 $\Delta Cfatg6$ 附着胞形成率不足 5%, $\Delta Cfatg14$ 的附着胞形成率不足 20%(图 5C、5D),数据分析显

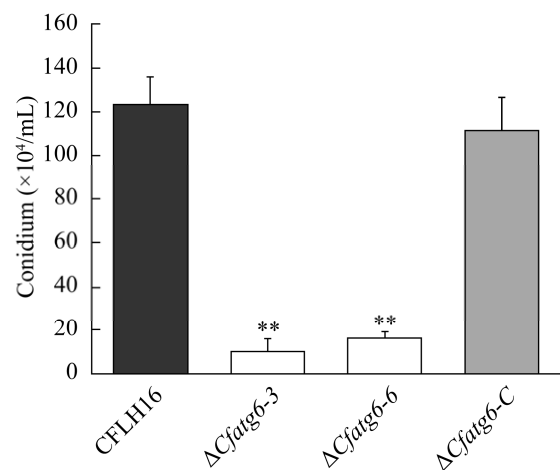


图 4 $\Delta Cfatg6$ 分生孢子产量统计分析

Figure 4 Conidiation production statistics of $\Delta Cfatg6$. Asterisks indicate the difference is significant ($P < 0.01$).

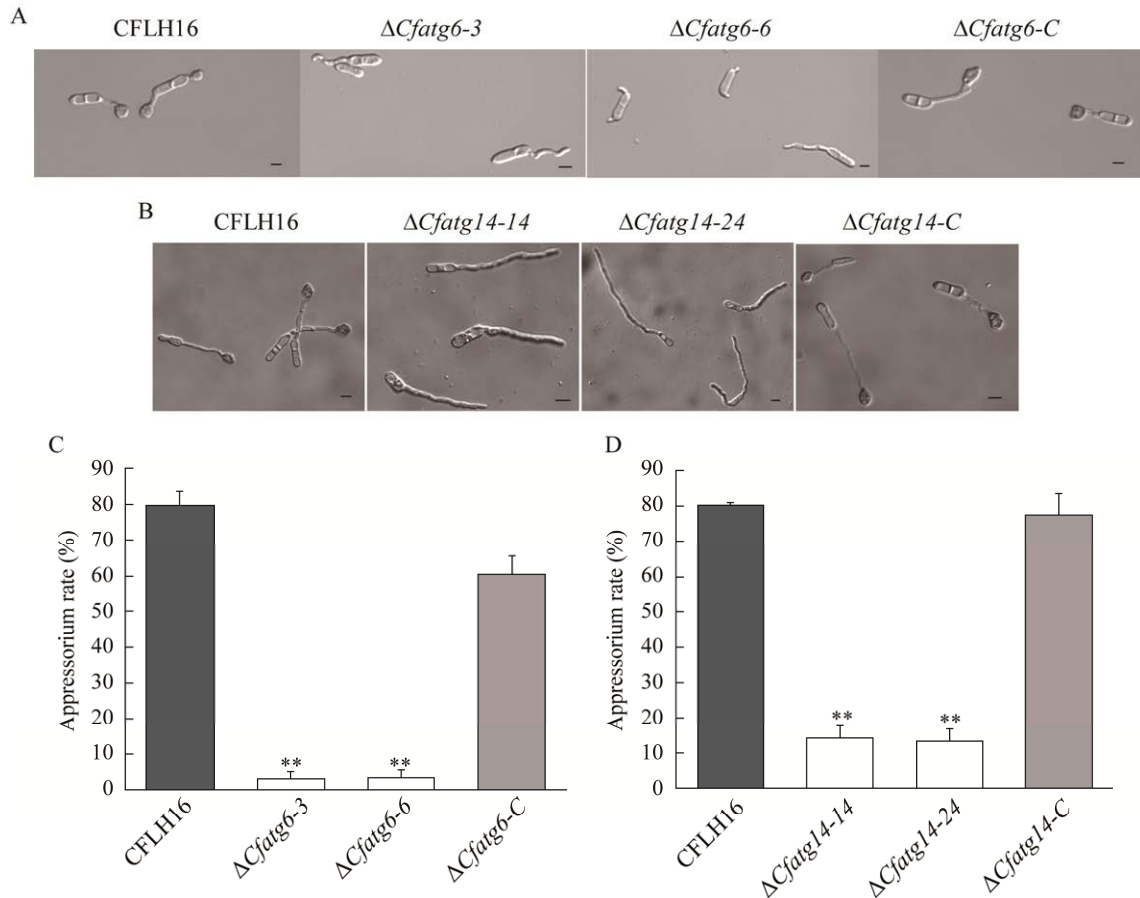


图5 附着胞统计分析

Figure 5 The statistical analysis of appressorium. A: The mutant $\Delta Cfatg6$ can form a small amount of appressorium. B: The conidia of CFLH16, $\Delta Cfatg14$, $\Delta Cfatg14-C$ strains were cultured on hydrophobic glasses and appressoria formation were observed. C: Statistical analysis of the appressorial formation rate of the mutant $\Delta Cfatg6$. D: Statistical analysis of the appressorial formation rate of the mutant $\Delta Cfatg14$. Asterisks indicate the difference is significant ($P < 0.01$). Bars=5 μm .

示差异显著(图 5A、5B)。结果表明 *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因参与调控果生刺盘孢附着胞的形成。

2.7 *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因参与果生刺盘孢应对细胞壁胁迫

细胞壁作为真菌最外侧的结构,是真菌抵抗外界环境压力的第一层屏障,而细胞壁的完整性对真菌致病过程有重大的影响^[29]。为了探究 *CfATG6*、*CfATG14* 是否响应细胞壁胁迫应答,

将 CFLH16、 $\Delta Cfatg6$ 、 $\Delta Cfatg6-C$ 、 $\Delta Cfatg14$ 、 $\Delta Cfatg14-C$ 菌株分别接种于含有 0.01% SDS 和 400 $\mu\text{g/mL}$ CR 细胞胁迫剂的 CM 培养基上,培养 3 d 后比较生长情况。结果表明,在含有细胞壁胁迫剂的培养基上突变体 $\Delta Cfatg6$ 、 $\Delta Cfatg14$ 的抑制率均相较于 CFLH16 和回补菌株抑制率升高 5%以上(图 6),说明 *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因参与调控果生刺盘孢对细胞壁胁迫的应答。

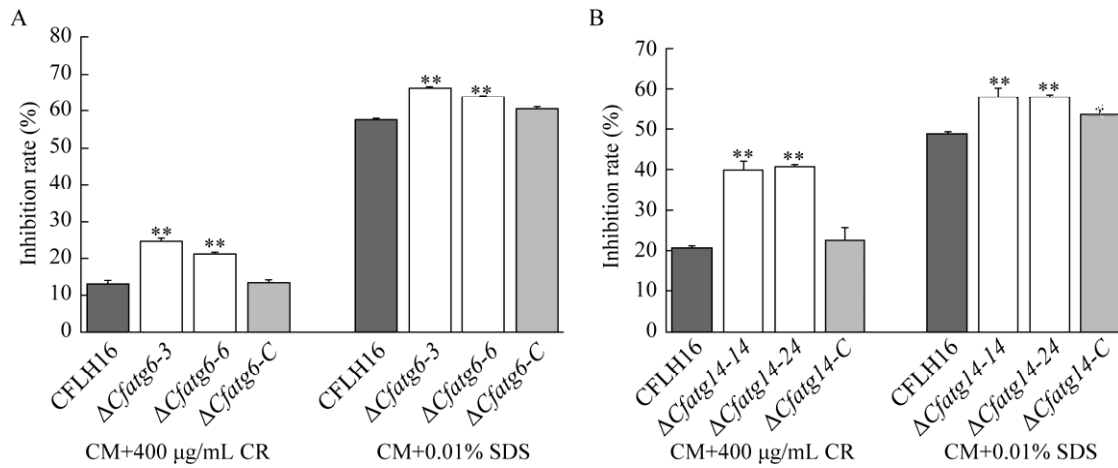


图 6 细胞壁胁迫的敏感性测定

Figure 6 Cell wall stress sensitivity test. A: Statistical analysis of the inhibition rate of the related strains of the mutant $\Delta Cfatg6$. B: Statistical analysis of the inhibition rate of the related strains of the mutant $\Delta Cfatg14$. Asterisks indicate the difference is significant ($P < 0.01$).

2.8 *CfATG6* 基因参与果生刺盘孢应对氧化胁迫

为了探究 *CfATG6*、*CfATG14* 是否参与果生刺盘孢应对氧化胁迫过程, 将 CFLH16、 $\Delta Cfatg6$ 、 $\Delta Cfatg6-C$ 、 $\Delta Cfatg14$ 、 $\Delta Cfatg14-C$ 菌株接种于含有 10.0 mmol/L 的 H_2O_2 的 CM 培养基上, 培

养 3 d 后比较生长情况。结果表明, 突变体 $\Delta Cfatg6$ 对 H_2O_2 的抑制率相较于 CFLH16 和回补菌株升高 10% 以上, 统计分析差异显著; 对突变体 $\Delta Cfatg14$ 则无显著影响(图 7), 这表明 *CfATG6* 基因参与了果生刺盘孢应对氧化胁迫过程, 而基因 *CfATG14* 不参与调控这一过程。

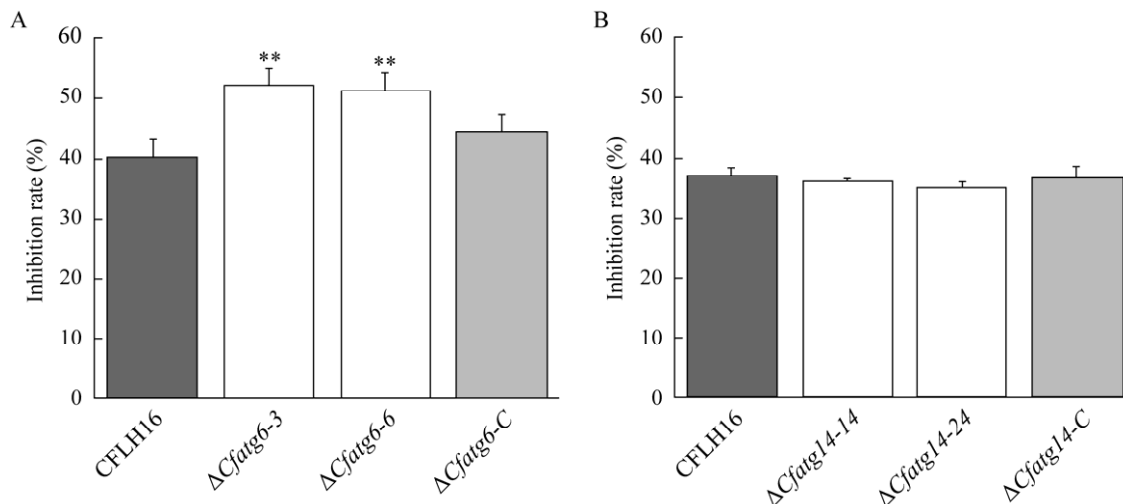


图 7 $\Delta Cfatg6$ 、 $\Delta Cfatg14$ 对氧化胁迫的敏感性测定

Figure 7 Oxygen stress sensitivity test of $\Delta Cfatg6$, $\Delta Cfatg14$. A: Statistical analysis of the inhibition rate of the related strains of the mutant $\Delta Cfatg6$. B: Statistical analysis of the inhibition rate of the related strains of the mutant $\Delta Cfatg14$. Asterisks indicate the difference is significant ($P < 0.01$).

2.9 *CfATG14* 基因参与果生刺盘孢应对内质网压力胁迫

二硫苏糖醇是一种小分子有机还原剂,可影响肽链间二硫键的生成,致使错误折叠蛋白增多,造成内质网压力,引起内质网的应激反应^[30]。为了探究 *CfATG6*、*CfATG14* 是否参与果生刺盘孢应对内质网压力胁迫,将 CFLH16、 $\Delta Cfatg6$ 、 $\Delta Cfatg6-C$ 、 $\Delta Cfatg14$ 、 $\Delta Cfatg14-C$ 菌株分别接种于含有终浓度为 2.5 mmol/L 和 5.0 mmol/L DTT 的 CM 平板上,培养 3 d 后比较生长情况。结果表明,在含有 DTT 的培养基上, $\Delta Cfatg14$ 突变体的生长抑制率相较于 CFLH16 和回补菌株显著升高 5% 以上,但突变体 $\Delta Cfatg6$ 的生长则无显著影响(图 8),上述结果表明 *CfATG14* 响应了果生刺盘孢的内质网压力胁迫应答,基因 *CfATG6* 不参与调控该过程。

2.10 *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因参与调控果生刺盘孢致病力

果生刺盘孢为油茶炭疽病的优势致病菌,其致病能力直接影响着经济损失,因此致病力是其最重要的表型特征。本文对突变体 $\Delta Cfatg6$ 和

$\Delta Cfatg14$ 进行致病力测定。结果表明,在离体的油茶叶片上, $\Delta Cfatg6$ 突变体菌株形成的病斑显著小于 CFLH16 和回补菌株形成的病斑面积,不足 CFLH16 和回补菌株的 1/3; 突变体 $\Delta Cfatg14$ 在有伤的油茶叶片上形成的病斑面积显著减少,仅为 CFLH16 和回补菌株 1/4 左右,且在无伤叶片上无法形成病斑(图 9A–9H, $P < 0.01$)。以苹果为寄主分别接种果生刺盘孢野生型菌株、 $\Delta Cfatg6$ 、 $\Delta Cfatg14$ 突变体和回补菌株 $\Delta Cfatg6-C$ 、 $\Delta Cfatg14-C$, 结果发现 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 突变体在苹果上造成的病斑面积同样显著小于野生型和回补菌株(图 9I–9L, $P < 0.01$)。这些结果表明 *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因参与调控果生刺盘孢的致病力。

2.11 *CfATG6* 和 *CfATG14* 基因参与调控果生刺盘孢自噬过程

细胞自噬对维持真核生物的代谢平衡和生存能力是必需的^[31]。营养缺乏(MM-N 诱导)是诱导自噬的一种常用方式^[7]。本文对 GFP-*CfAtg8* 标记的 CFLH16、 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 菌株进行荧光观察发现,在营养充足条件下, CFLH16、

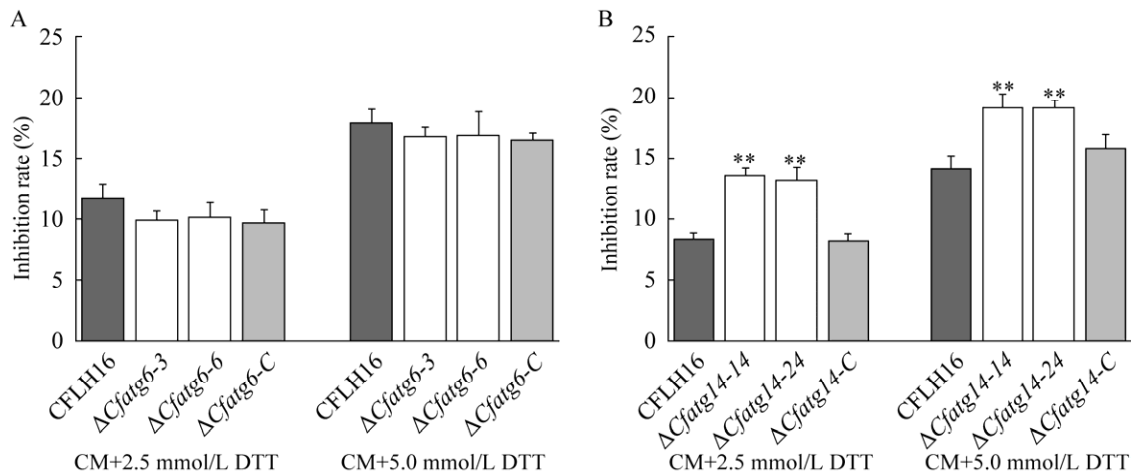
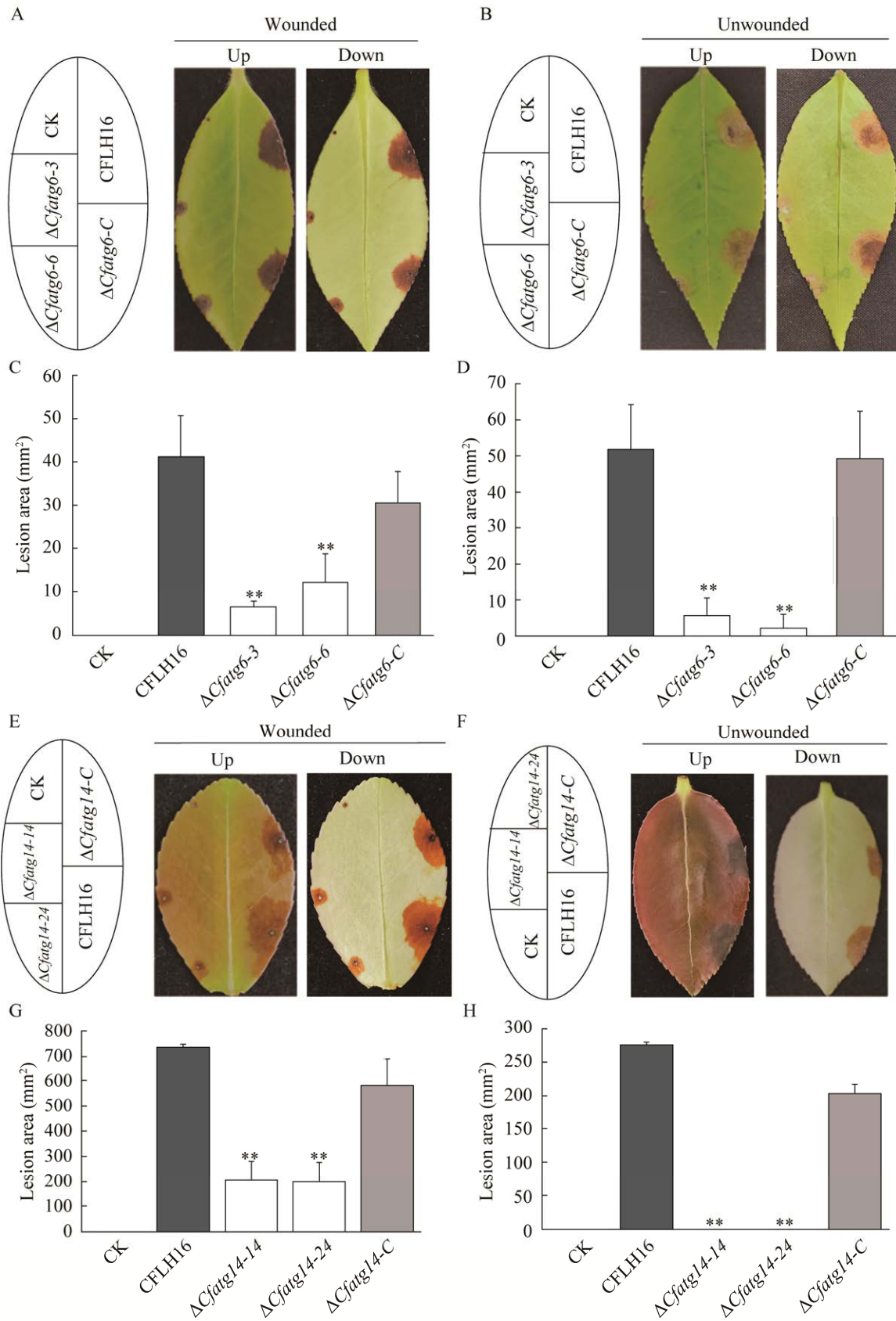


图 8 基因缺失突变体对 DTT 的敏感性测定

Figure 8 DTT stress sensitivity test of gene-deletion mutants. A: Statistical analysis of the inhibition rate of the related strains of the mutant $\Delta Cfatg6$. B: Statistical analysis of the inhibition rate of the related strains of the mutant $\Delta Cfatg14$. Asterisks indicate the difference is significant ($P < 0.01$).



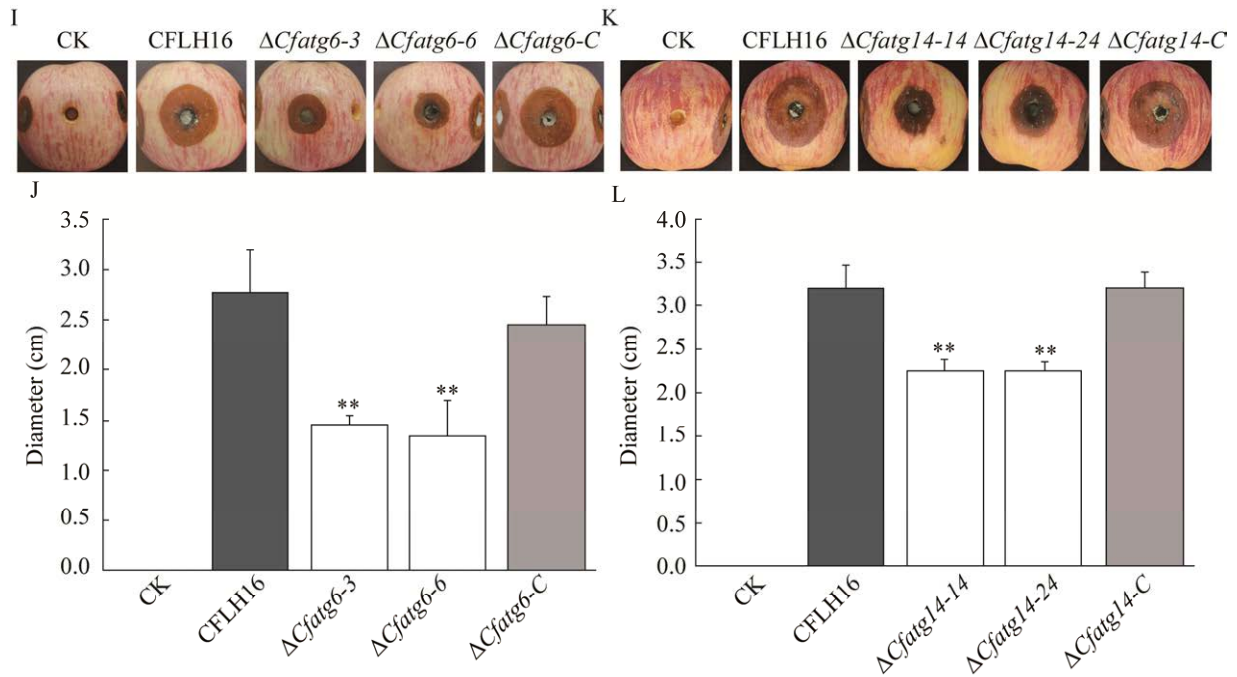


图 9 突变体 $\Delta Cfatg6$ 、 $\Delta Cfatg14$ 的致病力测定

Figure 9 Testing of mutant $\Delta Cfatg6$ and $\Delta Cfatg14$ pathogenicity. A: Wounded *Camellia oleifera* leaves were inoculated with mycelial plugs of CFLH16, $\Delta Cfatg6$ and $\Delta Cfatg6-C$. B: Unwounded *C. oleifera* leaves were inoculated with mycelial plugs of CFLH16, $\Delta Cfatg6$ and $\Delta Cfatg6-C$. C: Statistical analysis of lesion area on wounded *C. oleifera* of the mutant $\Delta Cfatg6$. D: Statistical analysis of lesion area on unwounded *C. oleifera* of the mutant $\Delta Cfatg6$. E: Wounded *Camellia oleifera* leaves were inoculated with mycelial plugs of CFLH16, $\Delta Cfatg14$ and $\Delta Cfatg14-C$. F: Unwounded *C. oleifera* leaves were inoculated with mycelial plugs of CFLH16, $\Delta Cfatg14$ and $\Delta Cfatg14-C$. G: Statistical analysis on the difference of lesion area on wounded *C. oleifera* of the mutant $\Delta Cfatg14$. H: Statistical analysis on the difference of lesion area on unwounded *C. oleifera* of the mutant $\Delta Cfatg14$. I: The apples were inoculated with mycelial plugs of CFLH16, $\Delta Cfatg6$ and $\Delta Cfatg6-C$. J: Statistical analysis of disease lesion size on apple of the mutant $\Delta Cfatg6$. K: The apples were inoculated with mycelial plugs of CFLH16, $\Delta Cfatg14$ and $\Delta Cfatg14-C$. L: Statistical analysis of disease lesion size on apple of the mutant $\Delta Cfatg14$. Asterisks indicate the difference is significant ($P < 0.01$).

$\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 菌株的细胞质中均可以观察到荧光，在液泡中未观察到荧光。MM-N 处理 4 h 后，在 CFLH16 细胞质中几乎观测不到荧光，但可以在液泡中观察到荧光；在 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 中，荧光仍定位在细胞质中，液泡中仍不能观测到荧光(图 10A)。接下来，我们通过免疫印迹试验来监测自噬的发生情况，发现在 CFLH16、 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 突变体中都可以检测到完整的 GFP-CfAtg8 (46 kDa)和游离 GFP

(26 kDa)的蛋白条带。通过计算游离 GFP 与完整 GFP-CfAtg8 和游离 GFP 蛋白总量的比值来评估自噬程度，在 MM-N 处理 4 h 后，CFLH16 中游离 GFP 蛋白的比例相较于处理前升高 40%左右，而在 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 中，游离 GFP 的蛋白水平未发生变化(图 10B)，这说明在 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 中，自噬相关蛋白 CfAtg8 的转运和降解受到阻碍。以上试验表明 *Cfatg6* 和 *Cfatg14* 基因正调控果生刺盘孢的细胞自噬过程。

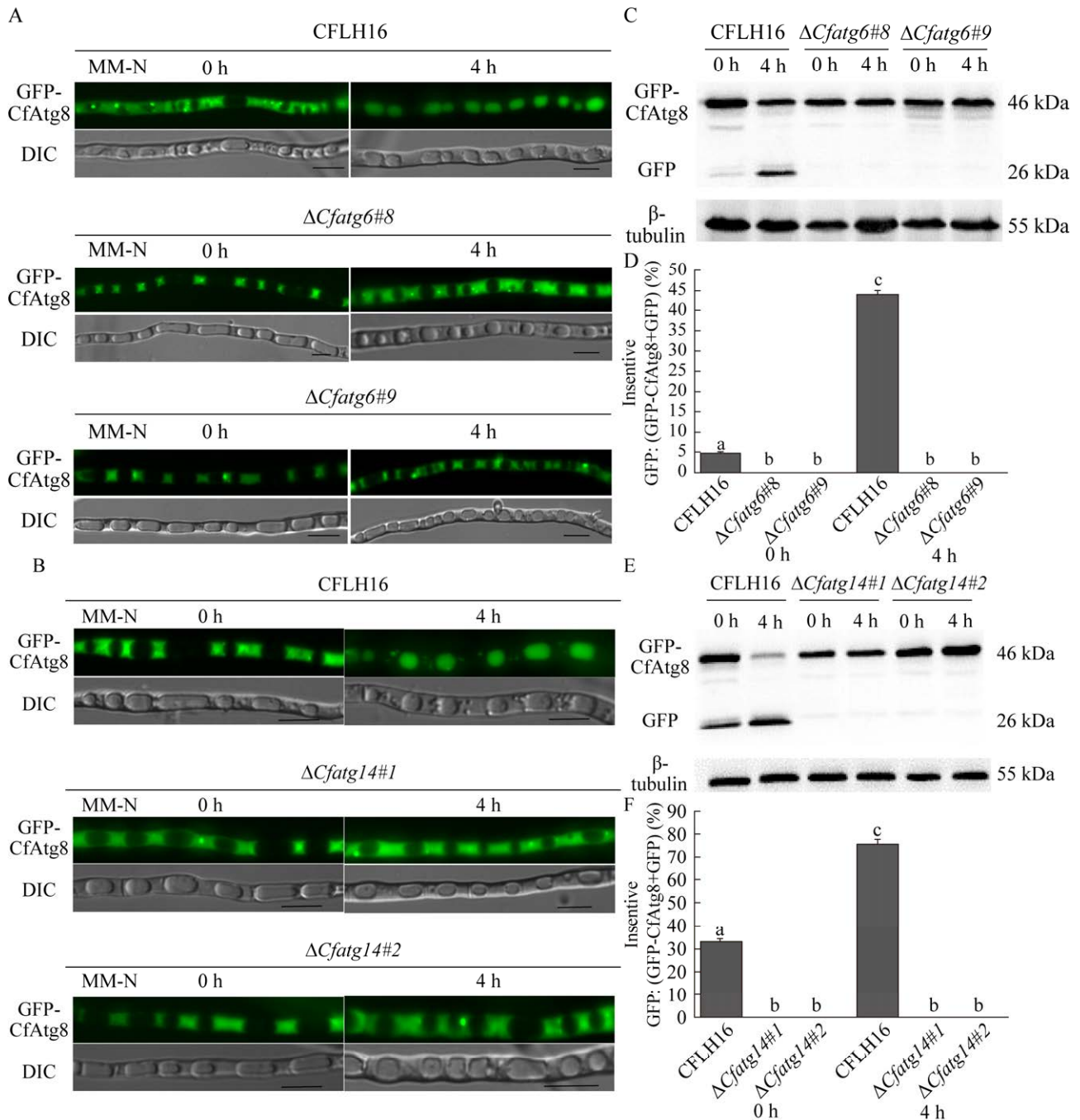


图 10 *CfatG6*、*CfatG14* 正调控自噬

Figure 10 *CfatG6*, *CfatG14* positive regulates autophagy. A: The CFLH16 and $\Delta Cfatg6$ mutant strains, transformed with GFP-CfAtg8, were incubated in MM-N for 4 h. Then, the autophagy was observed with a microscope. B: The CFLH16 and $\Delta Cfatg14$ mutant strains, transformed with GFP-CfAtg8, were incubated in MM-N for 4 h. C: Immunoblot analysis of GFP-CfAtg8 proteolysis in CFLH16 and $\Delta Cfatg6$. The upper and lower lanes point to the intact GFP-CfAtg8 (46 kDa) and free GFP (26 kDa), respectively. D: The level of autophagy was estimated by calculating the amount of free GFP relative to the total amount of intact GFP-CfAtg8 plus free GFP of CFLH16 and $\Delta Cfatg6$. E: Immunoblot analysis of GFP-CfAtg8 proteolysis in CFLH16 and $\Delta Cfatg14$. F: The level of autophagy of CFLH16 and $\Delta Cfatg14$. Bars=5 μ m. Error bars represent the standard deviation with three replicates, and different letters represent statistically significant differences ($P < 0.01$).

3 讨论与结论

PI3K 是细胞内一类重要的信号调控分子,通过对膜上的磷脂酰肌醇进行磷酸化修饰而控制细胞的生长、分化、胞内物质运输等过程^[32]。在酵母中, Vps15、Atg6/Vps30、Vps34、Atg14 和 Atg38 形成自噬特异性的 III 型 PI3K 复合物 I, 即 PI3KC3-I, 并定位于自噬前体组装位点 (phagophore assembly site, PAS)^[19,33-34]。PI3K 复合物 I 相关蛋白 *ATG6* 和 *ATG14* 基因在稻瘟病菌、禾谷镰刀菌和灰葡萄孢中都被证明与致病过程相关联^[21-24,35]。本研究从果生刺盘孢中鉴定到两个自噬相关蛋白 CfAtg6 和 CfAtg14, 它们都参与调控果生刺盘孢的营养生长、附着胞形成、自噬过程和致病过程。酵母双杂试验结果表明 CfAtg6 和 CfAtg14 在果生刺盘孢中可能存在互作关系, 但仍需使用免疫共沉淀 (co-immunoprecipitation, Co-IP) 等试验进一步验证。

分生孢子对于植物病原真菌的侵染循环十分重要。在灰葡萄孢 *B. cinerea* 中, *BcATG6* 基因缺失后, 病菌分生孢子产量下降且形态异常, 而缺失 *BcATG14* 基因后分生孢子不能形成。在 *M. oryzae* 和 *F. graminearum* 中, 敲除基因 *ATG6* 后, 虽然会导致致病菌分生孢子产量下降, 但对分生孢子形态不会产生影响; 基因 *ATG14* 敲除后, 分生孢子产量均不足野生型的 5%^[21,23,35-36]。本研究发现, *CfATG6* 基因的敲除导致果生刺盘孢分生孢子产量相较于野生型极显著下降, 但分生孢子形态无明显变化, 这与基因 *FgATG6* 和 *MoATG6* 的研究结果相一致; *CfATG14* 基因敲除后, 突变体 $\Delta Cfatg14$ 产孢量经多次试验, 结果误差较大, 不能确定基因 *CfATG14* 是否参与调控分生孢子形成, 需进一步研究。

植物病原真菌分生孢子萌发后形成的附着胞是侵染寄主的关键结构^[37]。本实验室前期研

究发现, 果生刺盘孢 *CfPMK1*、*CfSNF1* 和 *CfMKK1* 基因的缺失导致菌株不能正常形成附着胞进而影响其致病力^[4,38-39]。在本研究中, 突变体 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 致病力均降低, 这可能是 *CfATG6* 或 *CfATG14* 基因缺失之后, 降低了果生刺盘孢附着胞的形成。

病原菌侵染寄主时会诱导产生活性氧等物质, 阻止病菌的侵入, 而病原菌则会清除 H_2O_2 来应对寄主的防御机制^[40]。在灰葡萄孢中, 缺失基因 *BcATG14*, 会导致灰葡萄孢对高于 4 mmol/L H_2O_2 耐受性降低^[35]。在果生刺盘孢中, 敲除 *CfATG14* 基因后, 相较于 CFLH16 和回补菌株, 10 mmol/L H_2O_2 对突变体抑制率无明显差异, 不参与 H_2O_2 胁迫应答, 另外研究发现, $\Delta Cfatg14$ 对 2.5 mmol/L 内质网胁迫剂 DTT 十分敏感; 缺失 *CfATG6* 基因的突变体对 10.0 mmol/L H_2O_2 抑制率相较于 CFLH16 和回补菌株显著升高, 对 DTT 胁迫则不敏感。这表明基因 *CfATG6* 和 *CfATG14* 虽然都参与调控果生刺盘孢响应外界胁迫, 但调控的生物学过程有所不同。

自噬相关蛋白 GFP-Atg8 作为自噬过程的一个标记蛋白, 常被用来辅助研究自噬的进程^[7]。在 *B. cinerea* 中, 使用 GFP-BcAtg8 作为标记蛋白对自噬进程进行研究, 发现缺失基因 *BcATG6* 后, 突变体自噬进程被严重阻碍。在 *M. oryzae* 中, 突变体 $\Delta Moatg14$ 在饥饿诱导后, GFP-MoAtg8 标记蛋白无法被降解, 自噬进程无法正常进行^[23-24]。本研究发现在饥饿诱导 4 h 后, 突变体 $\Delta Cfatg6$ 和 $\Delta Cfatg14$ 的自噬进程被阻碍, 无法降解 GFP-CfAtg8 蛋白, 说明果生刺盘孢缺失 *CfATG6* 或 *CfATG14* 基因影响细胞自噬过程, 这与稻瘟病菌、禾谷镰刀菌和灰葡萄孢的研究结果一致, 同时证实了 GFP-CfAtg8 也可以作为一个标记蛋白用于果生刺盘孢细胞自噬研究。

本研究从果生刺盘孢中鉴定到两个自噬相

关蛋白 CfAtg6 和 CfAtg14, 研究结果表明它们参与调控了果生刺盘孢的营养生长、附着胞形成、应对外界胁迫、自噬和致病过程。试验结果为进一步揭示果生刺盘孢的致病分子机理提供理论依据。

参考文献

- [1] 谭晓凤. 油茶分子育种研究进展[J]. 中南林业科技大学学报, 2023, 43(1): 1-24.
TAN XF. Advances in the molecular breeding of *Camellia oleifera*[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2023, 43(1): 1-24 (in Chinese).
- [2] 姚权, 郭源, 魏丰园, 李司政, 张盛培, 李河. bZIP 转录因子 CfHac1 参与调控果生刺盘孢菌的生长发育和致病力[J]. 菌物学报, 2019, 38(10): 1643-1652.
YAO Q, GUO Y, WEI FY, LI SZ, ZHANG SP, LI H. A bZIP-type transcription factor CfHac1 is involved in regulating development and pathogenesis in *Colletotrichum fructicola*[J]. Mycosystema, 2019, 38(10): 1643-1652 (in Chinese).
- [3] 李河, 李杨, 蒋仕强, 刘君昂, 周国英. 湖南省油茶炭疽病原鉴定[J]. 林业科学, 2017, 53(8): 43-53.
LI H, LI Y, JIANG SQ, LIU JA, ZHOU GY. Pathogen of oil-tea trees anthracnose caused by *Colletotrichum* spp. in Hunan Province[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2017, 53(8): 43-53 (in Chinese).
- [4] 肖宇, 李河. 丝裂原活化蛋白激酶基因 CfMKK1 调控果生炭疽菌的生长发育和致病力[J]. 微生物学报, 2021, 61(1): 141-151.
XIAO Y, LI H. MAPKK-encoding gene *CfMKK1* in *Colletotrichum fructicola* is required for its growth and pathogenicity[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2021, 61(1): 141-151 (in Chinese).
- [5] 吴泳仪, 李琳, 李河. 油茶果生炭疽菌小分子 GTP 酶 Rab7 的功能研究[J]. 微生物学报, 2022, 62(7): 2509-2520.
WU YY, LI L, LI H. Function of small GTPase Rab7 in *Colletotrichum fructicola*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2022, 62(7): 2509-2520 (in Chinese).
- [6] LI H, ZHOU GY, LIU JN, XU JP. Population genetic analyses of the fungal pathogen *Colletotrichum fructicola* on tea-oil trees in China[J]. PLoS One, 2016, 11(6): e0156841.
- [7] ZHANG SP, GUO Y, LI SZ, LI H. Histone acetyltransferase CfGcn5-mediated autophagy governs the pathogenicity of *Colletotrichum fructicola*[J]. mBio, 2022, 13(5): e0195622.
- [8] NAKATOGAWA H, SUZUKI K, KAMADA Y, OHSUMI Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2009, 10(7): 458-467.
- [9] XIE ZP, KLIONSKY DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations[J]. Nature Cell Biology, 2007, 9(10): 1102-1109.
- [10] MUNZ C. Antigen processing via autophagy—not only for MHC class II presentation anymore?[J]. Current Opinion in Immunology, 2010, 22(1): 89-93.
- [11] CECCONI F, LEVINE B. The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death[J]. Developmental Cell, 2008, 15(3): 344-357.
- [12] JING KP, LIM K. Why is autophagy important in human diseases?[J]. Experimental & Molecular Medicine, 2012, 44(2): 69-72.
- [13] MIZUSHIMA N, LEVINE B, CUERVO AM, KLIONSKY DJ. Autophagy fights disease through cellular self-digestion[J]. Nature, 2008, 451(7182): 1069-1075.
- [14] LIU XH, LU JP, ZHANG L, DONG B, MIN H, LIN FC. Involvement of a *Magnaporthe grisea* serine/threonine kinase gene *MgATG1* in appressorium turgor and pathogenesis[J]. Eukaryotic Cell, 2007, 6(6): 997-1005.
- [15] ZHANG Y, WEI Y, WU M, LIU M, LIANG S, ZHU X, LIU X, LIN F. Cand2 inhibits CRL-mediated ubiquitination and suppresses autophagy to facilitate pathogenicity of phytopathogenic fungi[J]. Plant Communications, 2023: 100720.
- [16] FENG YC, HE D, YAO ZY, KLIONSKY DJ. The machinery of macroautophagy[J]. Cell Research, 2014, 24(1): 24-41.
- [17] OBARA K, NODA T, NIIMI K, OHSUMI Y. Transport of phosphatidylinositol 3-phosphate into the vacuole via autophagic membranes in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Genes to Cells, 2008, 13(6): 537-547.
- [18] OBARA K, OHSUMI Y. Dynamics and function of PtdIns(3)P in autophagy[J]. Autophagy, 2008, 4(7): 952-954.
- [19] KIHARA A, NODA T, ISHIHARA N, OHSUMI Y. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase

- complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2001, 152(3): 519-530.
- [20] MILLER S, TAVSHANJIAN B, OLEKSY A, PERISIC O, HOUSEMAN BT, SHOKAT KM, WILLIAMS RL. Shaping development of autophagy inhibitors with the structure of the lipid kinase Vps34[J]. *Science*, 2010, 327(5973): 1638-1642.
- [21] 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: 浙江大学博士学位论, 2018.
- LÜ WY. Functional analysis of genes related to autophagy pathway in *Fusarium graminearum* cells[D]. Hangzhou: Doctoral Dissertation of Zhejiang University, 2018 (in Chinese).
- [22] KERSHAW MJ, TALBOT NJ. Genome-wide functional analysis reveals that infection-associated fungal autophagy is necessary for rice blast disease[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(37): 15967-15972.
- [23] LIU XH, ZHAO YH, ZHU XM, ZENG XQ, HUANG LY, DONG B, SU ZZ, WANG Y, LU JP, LIN FC. Autophagy-related protein MoAtg14 is involved in differentiation, development and pathogenicity in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40018.
- [24] LIU N, ZHOU SY, LI BH, REN WC. Involvement of the autophagy protein Atg6 in development and virulence in the gray mold fungus *Botrytis cinerea*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 798363.
- [25] 姚权, 李司政, 王成玉, 李河. CfNop12 参与调控果生刺盘孢生长发育、低温胁迫响应和致病力[J]. *菌物学报*, 2023, 42(11): 2257-2268.
- YAO Q, LI SZ, WANG CY, LI H. CfNop12 regulates the development, cold stress response and pathogenicity of *Colletotrichum fructicola*[J]. *Mycosystema*, 2023, 42(11): 2257-2268 (in Chinese).
- [26] 郭源, 李河, 周国英, 刘君昂, 张盛培. 自噬相关蛋白 CfAtg8 在果生刺盘孢中的功能分析[J]. *菌物学报*, 2021, 40(3): 592-602.
- GUO Y, LI H, ZHOU GY, LIU JA, ZHANG SP. Functional analysis of the autophagy-related protein CfAtg8 in *Colletotrichum fructicola*[J]. *Mycosystema*, 2021, 40(3): 592-602 (in Chinese).
- [27] 高亚兰, 何苑皋, 李河. 调控油茶果生刺盘孢 bZIP 转录因子 CfAp1 的生物学功能[J]. *林业科学*, 2020, 56(9): 30-39.
- GAO YL, HE YG, LI H. Biological function bZIP-type transcription factor CfAp1 in *Colletotrichum fructicola*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, 56(9): 30-39 (in Chinese).
- [28] 李司政, 李河. 果生刺盘孢 CfHAC1 调控应答二硫苏糖醇胁迫的转录组分析[J]. *菌物学报*, 2020, 39(10): 1886-1896.
- LI SZ, LI H. Genome-wide transcriptome analysis of *Colletotrichum fructicola* CfHAC1 regulation of the response to dithiothreitol stress[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(10): 1886-1896 (in Chinese).
- [29] YIN ZY, FENG WZ, CHEN C, XU JY, LI Y, YANG LN, WANG JZ, LIU XY, WANG WH, GAO CY, ZHANG HF, ZHENG XB, WANG P, ZHANG ZG. Shedding light on autophagy coordinating with cell wall integrity signaling to govern pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*[J]. *Autophagy*, 2020, 16(5): 900-916.
- [30] 冯若, 张妮, 杨继要, 刘国红, 张钦宪. 二硫苏糖醇诱导 Eca109 细胞凋亡及 P38 磷酸化检测[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2005, 40(5): 833-834.
- FENG R, ZHANG W, YANG JY, LIU GH, ZHANG QX. Detection of phosphorylated P38 MAP kinase in human esophageal carcinoma Eca109 apoptotic cells induced by DTT[J]. *Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences)*, 2005, 40(5): 833-834 (in Chinese).
- [31] 李秀芝. 氨基酸缺失诱导细胞自噬过程中关键调控蛋白质的鉴定和功能分析[D]. 武汉: 华中农业大学博士学位论文, 2021.
- LI XZ. Identification and functional analysis of key regulatory protein in autophagy induced by amino acid deletion[D]. Wuhan: Doctoral Dissertation of Huazhong Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [32] 王海燕, 倪涛, 谢志平. 酵母中细胞自噬的研究进展[J]. *中国细胞生物学学报*, 2010, 32(6): 829-839.
- WANG HY, NI T, XIE ZP. Current knowledge of autophagy in yeasts[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2010, 32(6): 829-839 (in Chinese).
- [33] OBARA K, SEKITO T, OHSUMI Y. Assortment of phosphatidylinositol 3-kinase complexes: Atg14p directs association of complex I to the pre-autophagosomal structure in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2006, 17(4): 1527-1539.
- [34] ARAKI Y, KU WC, AKIOKA M, MAY AI, HAYASHI Y, ARISAKA F, ISHIHAMA Y, OHSUMI Y. Atg38 is required for autophagy-specific

- phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity[J]. *The Journal of Cell Biology*, 2013, 203(2): 299-313.
- [35] 余秋玉. 灰葡萄孢细胞自噬相关基因 *BcATG26*、*BcATG17* 和 *BcATG14* 的功能研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2017.
- YU QY. Functional study on autophagy-related genes *BcATG26*, *BcATG17* and *BcATG14* of *Botrytis cinerea*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [36] ZHU XM, LI L, WU M, LIANG S, SHI HB, LIU XH, LIN FC. Current opinions on autophagy in pathogenicity of fungi[J]. *Virulence*, 2019, 10(1): 481-489.
- [37] BECHINGER C, GIEBEL KF, SCHNELL M, LEIDERER P, DEISING HB, BASTMEYER M. Optical measurements of invasive forces exerted by appressoria of a plant pathogenic fungus[J]. *Science*, 1999, 285(5435): 1896-1899.
- [38] 李河. 油茶炭疽病菌群体遗传及 MAPK 基因 *CfPMK1* 功能研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学博士学位论文, 2018.
- LI H. Population inheritance of *Colletotrichum gloeosporioides* in *Camellia oleifera* and study on the function of MAPK gene *CfPMK1*[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Central South University of Forestry & Technology, 2018 (in Chinese).
- [39] ZHANG SP, GUO Y, LI SZ, ZHOU GY, LIU JN, XU JP, LI H. Functional analysis of *CfSnf1* in the development and pathogenicity of anthracnose fungus *Colletotrichum fructicola* on tea-oil tree[J]. *BMC Genetics*, 2019, 20(1): 94.
- [40] ZHANG N, LV FJ, QIU FH, HAN DH, XU Y, LIANG WX. Pathogenic fungi neutralize plant-derived ROS via *Srpk1* deacetylation[J]. *The EMBO Journal*, 2023, 42(9): e112634.