

研究报告

禾谷炭疽菌 G 蛋白 α 亚基 CgrGa3 调控营养生长、胁迫响应、孢子产生和致病性

韦涵文，张莹，林少园，周双针，李晓宇，柳志强*

海南大学 生命健康学院，海南 海口 570228

韦涵文，张莹，林少园，周双针，李晓宇，柳志强. 禾谷炭疽菌 G 蛋白 α 亚基 CgrGa3 调控营养生长、胁迫响应、孢子产生和致病性[J]. 微生物学通报, 2025, 52(4): 1462-1474.

WEI Hanwen, ZHANG Ying, LIN Shaoyuan, ZHOU Shuangzhen, LI Xiaoyu, LIU Zhiqiang. G protein α subunit CgrGa3 regulates vegetative growth, stress responses, conidial production, and pathogenicity of *Colletotrichum graminicola*[J]. Microbiology China, 2025, 52(4): 1462-1474.

摘要:【背景】禾谷炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)是危害玉米(*Zea mays*)等作物的一种重要病原真菌。异源三聚体 G 蛋白在丝状真菌信号转导中发挥关键作用，其中 $G\alpha$ 亚基是 G 蛋白的主要组成成分。【目的】鉴定禾谷炭疽菌中的 G 蛋白 III 型 $G\alpha$ 亚基 CgrGa3，探讨其在该菌生长和发育中的功能。【方法】通过基因敲除构建其敲除突变体，开展多层次的表型分析，包括菌丝生长、应激响应、孢子产生与萌发及致病性等方面实验。【结果】*CgrGa3* 编码一个含有 355 个氨基酸的蛋白，包含一个 G_alpha 结构域。*CgrGa3* 缺失突变体表现出菌落生长缓慢，对 NaCl、KCl 和 H_2O_2 更加敏感，卵圆形和镰刀形孢子的产量和萌发率均显著下降，致病力明显减弱；而互补菌株能够恢复以上表型缺陷。【结论】*CgrGa3* 在调控禾谷炭疽菌的营养生长、胁迫响应、无性发育和致病过程中发挥了重要作用。

关键词: 禾谷炭疽菌；G 蛋白 α 亚基；分生孢子；致病性

资助项目：国家自然科学基金(32160041)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32160041).

*Corresponding author. E-mail: liuzhiqiang@hainanu.edu.cn

Received: 2024-07-31; Accepted: 2024-12-13; Published online: 2025-01-20

G protein α subunit CgrGa3 regulates vegetative growth, stress responses, conidial production, and pathogenicity of *Colletotrichum graminicola*

WEI Hanwen, ZHANG Ying, LIN Shaoyuan, ZHOU Shuangzhen, LI Xiaoyu, LIU Zhiqiang*

School of Life and Health Sciences, Hainan University, Haikou 570228, Hainan, China

Abstract: [Background] *Colletotrichum graminicola* is a pathogenic fungus that poses threats to crops such as *Zea mays*. Heterotrimeric guanine nucleotide-binding proteins (G proteins) play a crucial role in signal transduction of filamentous fungi, with the G protein α subunit being a major component. [Objective] This study identified the G protein α subunit (group III) CgrGa3 in *C. graminicola* and investigate its role in the growth and development of this pathogen. [Methods] CgrGa3-deleted mutants were constructed by gene knockout. The phenotypes of the mutants were characterized, including the hyphal growth, stress responses, conidial production, conidial germination, and pathogenicity. [Results] CgrGa3 encoded a protein composed of 355 residues and containing a G_alpha domain. The CgrGa3-deleted mutants exhibited inhibited growth, increased sensitivity to NaCl, KCl and H₂O₂, and reduced production and germination rates of oval and falcate conidia. Additionally, the pathogenicity of the mutants was markedly weakened. The complementation of this gene restored these phenotypic defects. [Conclusion] CgrGa3 plays a critical role in regulating the vegetative growth, stress responses, asexual development, and pathogenicity of *C. graminicola*.

Keywords: *Colletotrichum graminicola*; G protein alpha subunit; conidia; pathogenicity

玉米炭疽病是由禾谷炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*)引起的一种真菌病害^[1]，该菌能够导致叶枯病和茎腐病^[2]。这些病害仅在美国就造成每年约 10 亿美元的经济损失，严重影响全球粮食安全^[3]。禾谷炭疽菌产生 2 种分生孢子，即卵圆形孢子(oval conidia)和镰刀形孢子(falcate conidia)^[4]。卵圆形孢子通常在寄主体内形成芽管和菌丝，参与病菌在寄主细胞内的扩散；镰刀形孢子则在该菌的侵染和繁殖过程中发挥重要作用^[5]。镰刀形孢子通过形成附着胞(appressorium)、初生菌丝(primary hyphae)和次生菌丝(secondary hyphae)入侵寄主细胞，导致细胞死亡^[6]。

近年来，有关植物病原真菌的致病分子机

制的研究取得显著进展。例如病原真菌通过效应蛋白抑制宿主免疫反应或干扰细胞功能来促进其侵染^[7]；G 蛋白及 Mitogen-activated protein kinase (MAPK)信号途径在感知外部信号进而调控真菌生长、发育及侵染过程中起着关键作用^[8]。随着技术的进步，人类对病原真菌致病机制的研究愈加重视，这对于开发抗病品种和制定防治策略具有重要的意义。

信号转导在生物体感知和响应环境变化的过程中起着核心调控作用^[9]。在真核细胞中，异源三聚体鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(heterotrimeric guanine nucleotide-binding protein, G 蛋白)参与了多种生理和生化过程^[10]。G 蛋白由 G α 、G β 和 G γ 这 3 个亚基组成，G 蛋白的 G α 亚基通过

GTP 和 GDP 的交换实现激活，从而与 G $\beta\gamma$ 二聚体分离，各自作用于不同效应器，例如腺苷酸环化酶(adenyl cyclase, AC)和磷脂酶 C(phospholipase C)^[11]。这些效应器随后触发一系列下游信号级联反应，进而调控细胞内多种生理过程。G 蛋白不仅在调控细胞反应中起到关键作用，还在细胞与环境相互作用中帮助细胞感知和应对外部刺激，从而确保生物体的生存与适应能力^[12]。

在真菌中，G 蛋白信号传导途径在营养生长及致病性等重要生物学过程的调控中起关键作用^[13]。根据序列相似性，G α 亚基可分为 I 型、II 型和 III 型。其中，I 型和 III 型 G α 亚基分别与哺乳动物的 G αi 和 G αs 蛋白具有同源性，而 II 型 G α 亚基在哺乳动物中尚未发现其对应蛋白^[14]。其中，III 型 G α 亚基具有典型的 GTPase 结构域和 GTP 结合位点，其 C 端含有一个高度保守的 GTP 水解序列^[15]，并在真菌中得到了很好的表征。例如，桑实杯盘菌(*Ciboria shiraiana*)致病过程中，GPA1 起着关键的作用^[16]；GpaB 通过调节 cAMP 信号在黄曲霉(*Aspergillus flavus*)无性产孢和致病力中发挥重要作用^[17]；在稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)中 MagA (*CgrGa3* 的同源蛋白)的靶向缺失对营养生长、分生孢子形成或附着胞形成没有影响^[18]。哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*) $\Delta ThGa3$ 突变体的菌丝生长减缓、分生孢子产量下降和几丁质酶活性降低^[19]；在黑腐皮壳菌(*Valsa mali*)中，Gvm3 是营养生长的关键调控因子，同时还参与调控无性繁殖和致病力^[20]。然而，G 蛋白的 III 型 G α 亚基(Ga3)在禾谷炭疽菌中的作用仍未被系统研究。

本研究利用 NCBI 禾谷炭疽菌基因组数据库，鉴定禾谷炭疽菌中 G 蛋白的 III 型 G α 亚基的基因，并结合同源重组技术对其生物学功能进行系统研究。

1 材料与方法

1.1 样品

野生型菌株为禾谷炭疽菌(*Colletotrichum graminicola*) M1.001，由中国农业科学院刘文德研究员惠赠。pUC18 [潮霉素磷酸转移酶(hygromycin phosphotransferase, HPT)，用于敲除菌株的构建]和 pUC18 (遗传霉素 G418，用于互补菌株的构建)，由本实验室保存。野生型菌株及其相关突变体均接种在马铃薯葡萄糖(potato dextrose agar, PDA)斜面培养基中，保藏于 4 °C。实验使用的玉米(*Zea mays*)品种为‘甜糯 128’，由北京华耐农业公司提供。

1.2 培养基

PDA 培养基、马铃薯葡萄糖液体((potato dextrose broth, PDB) 培养基、完全培养基(complete medium, CM)、基本培养基(minimal medium, MM)、查氏培养基(Czapek medium, CZ)、燕麦粉(oat meal agar, OMA)培养基、LB 培养基、上层再生培养基(regeneration medium, RGM)和 RGM 下层培养基参照文献[21-22]配制。

1.3 主要试剂和仪器

DNA 凝胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、限制性内切酶及 PCR 试剂等，TaKaRa 公司。凝胶成像系统，北京六一生物科技有限公司；恒温培养箱，上海一恒科学仪器有限公司；Miracloth 滤布，北京索莱宝科技有限公司。

1.4 *CgrGa3* 基因的克隆及序列信息分析

参照 NCBI 禾谷炭疽菌基因组数据库，利用 Primer 5 设计引物 *CgrGa3F/CgrGa3R*，用于扩增 *CgrGa3* 基因的开放阅读框(表 1)。通过 SMART 在线工具(<https://smart.embl.de/>)预测 *CgrGa3* 的蛋白结构域，从 GenBank 数据库中检索其他真菌的 Ga3 蛋白同源序列，使用在线工具 Clustal Omega 进行多序列比对，并用 GeneDoc 软件优化比对结果，分析保守位点和功能区域。

表 1 本实验涉及的引物序列

Table 1 The primer sequences in this experiment

Primer name	Sequence (5'→3')
CgrGa3F	GAGAAAGCGGGAAATCCACA
CgrGa3R	TTGAGTCAGGCTACCGCCT
CgrGa3UF	GCTCTAGACTCTGTCTGCCGCTG
CgrGa3UR	AACTGCAGATGAAGCCGTTGCCGTAAG
CgrGa3DF	GGGGTACCTCGCTTGACACGGTATGGT
CgrGa3DR	GCTCTAGAACCACTCCAAACAAACCAA
CgrGa3UU	TACCCACTGCAACTGTGTACCTCTG
PI	GTCCTCGTCTGTCTGTAATAAG
CgrGa3DD	AGACCGGAGATCTTCCCACGTTG
PI1	GGCACCCAGGCTTACACTTTATG
CgrGa3hbF	TCCCCCGGGCACATGCTATACTGGTACGC
CgrGa3hbR	GCTCTAGAACTCCGCCATCCCGAACAT

1.5 CgrGa3 基因的敲除及互补

菌株基因组 DNA 采用 CTAB 法提取, 以野生型菌株的基因组 DNA 为模板, 分别用引物 CgrGa3UF/CgrGa3UR 和 CgrGa3DF/CgrGa3DR 扩增 CgrGa3 的上游和下游序列(1 011 bp 和 1 078 bp), 然后与 pUC18-HPT 载体连接构建敲除载体。经测序验证后将载体转入野生型菌株的原生质体中, 在添加 50 ng/mL HPT 的 RGM

培养基上筛选转化子, 使用 CgrGa3F/CgrGa3R、CgrGa3UU/PI、CgrGa3DD/PI1 引物进行 PCR 检测(图 1)。PCR 反应条件参照文献[21]。

互补载体构建以野生型菌株基因组 DNA 为模板, 使用引物 CgrGa3hbF/CgrGa3hbR 扩增目的片段, 并将其插入 pUC18-G418 载体。互补载体转化至 Δ CgrGa3 突变体制备的原生质体中, 在 RGM 培养基(含 G418)上挑取转化子, 并用引物 CgrGa3F/CgrGa3R 进行 PCR 验证。能扩增出 CgrGa3 基因片段的初步认定为互补转化子。相关引物见表 1。

1.6 菌株营养生长测定

从野生型菌株及其相关突变体的菌落边缘打取 5 mm 菌饼, 接种于 9 cm 直径的不同培养基(PDA, CM, MM, CZ)中央, 于 28 °C 黑暗培养箱中培养 5 d, 记录菌落直径。

1.7 胁迫因子敏感性分析

从野生型菌株及其相关突变体的菌落边缘取直径 5 mm 的菌饼, 接种至直径 9 cm 的 CM 培养基中央, 培养基中分别含有 0.8 mol/L NaCl、1.0 mol/L KCl 和 5 mmol/L H₂O₂, 于 28 °C

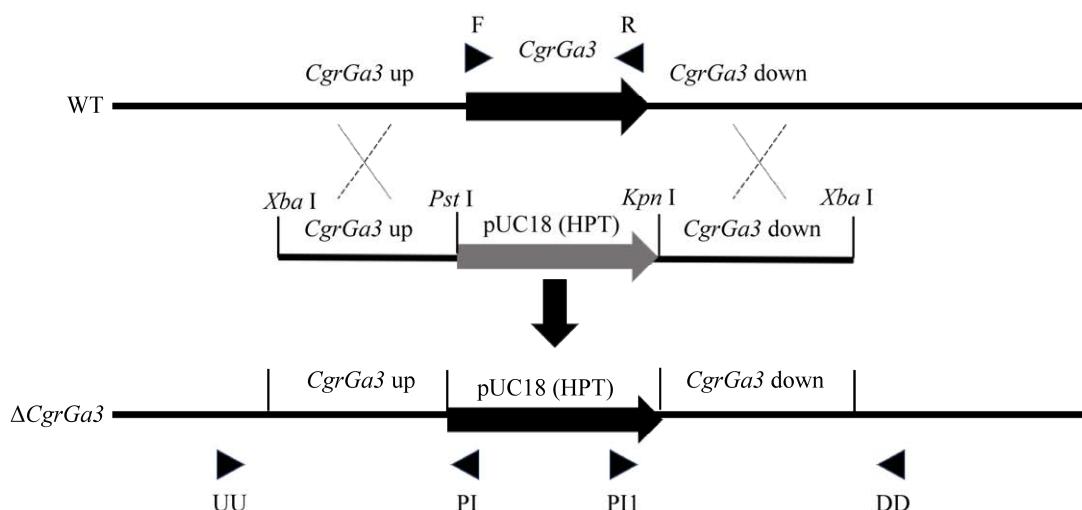


图 1 CgrGa3 基因敲除载体的设计与验证原理

Figure 1 The design and validation principle of the CgrGa3 gene knockout vector.

黑暗培养箱中培养 5 d, 测量菌落直径, 并计算抑制率。

抑制率(%)=(对照组菌落直径-处理组菌落直径)/对照组菌落直径×100。

1.8 卵圆形孢子产量及萌发

从各菌株菌落边缘打取 5 个直径 5 mm 菌饼, 接种至 PDB 培养基, 28 °C、150 r/min 振荡培养 3、5 和 7 d。然后用 Miracloth 滤布过滤, 随后以 12 000 r/min 离心 2 min 获得卵圆形孢子。将卵圆形孢子重悬于灭菌去离子水中, 并使用血细胞计数板测定其产量。

为了观察卵圆形孢子的萌发, 将培养 3 d 的孢子同样通过 Miracloth 滤布过滤并重悬, 调整悬浮液浓度为 1×10^6 个/mL。取 20 μL 卵圆形孢子滴在干净的载玻片上, 将其放入保湿盒中双重保湿, 置于 28 °C 培养 12 h, 每 6 h 测定 1 次萌发率。

1.9 镰刀形孢子产量及附着胞形成

在各菌株菌落边缘打取 5 mm 菌饼, 分别接种至直径 9 cm 的 OMA 和 PDA 培养基中央, 在 28 °C 培养箱培养 14 d。培养结束后, 用灭菌的去离子水洗涤培养基上的孢子, 收集菌悬液, 并通过 Miracloth 滤布过滤去除菌丝。使用血细胞计数板测定镰刀形孢子的产量。

为了观察镰刀形孢子的萌发, 将培养在 OMA 培养基 14 d 的镰刀形孢子过滤并重悬于灭菌去离子水中, 调整悬浮液浓度为 5×10^5 个/mL。选取健康的第二叶玉米叶片(甜糯 128), 确保叶片完整且无病害, 使用含 75% 乙醇的脱脂棉进行消毒处理。取 20 μL 镰刀形孢子悬浮液滴在叶片中脉上, 28 °C 保湿盒中培养 36 h, 随后显微镜观察附着胞和初生菌丝的产生。

1.10 致病性分析

将镰刀型孢子浓度调整为 5×10^5 个/mL, 加

入 10 μL 0.005% 吐温水以增加孢子的悬浮性。选取 2 周龄的玉米第二叶, 在叶脉中央每隔 15 mm 用灭菌针制造伤口, 伤口深度约为叶片厚度的 1/3。取 20 μL 的镰刀形孢子悬液, 依次滴加到叶片伤口处, 使用无菌水作为对照接种。将接种后的叶片放入保湿盒中, 置于 28 °C 培养 3 d 后, 观察玉米叶片致病情况^[22]。

1.11 数据处理

采用 IBM SPSS Statistics R23.0.0.0 软件进行单因素 ANOVA 分析, 显著性水平设定为 $P < 0.05$, 图形制作采用 GraphPad Prism 8.0。

2 结果与分析

2.1 CgrGa3 蛋白结构域分析与蛋白多序列比对

在禾谷炭疽菌中, *CgrGa3* 的开放阅读框(open reading frame, ORF)长度为 1 382 bp, 编码一个 355 个氨基酸的蛋白质, 利用 SMART 对 *CgrGa3* 进行蛋白结构域分析, *CgrGa3* 有一个 G_alpha 结构域(图 2A)。通过多序列比对发现, 多种真菌的 Ga3 蛋白序列中都含有 G_alpha 结构域, 并且相似性较高(图 2B)。*CgrGa3* 在炭疽菌属(*Colletotrichum*)中具有极高的同源性, 与柳枝稷炭疽菌(*Colletotrichum navitas*) (XM_060554416.1) 和白蜡树炭疽菌(*Colletotrichum spaethianum*) (XM_049274946.1) 的相似度分别为 96.25% 和 90.17%。在其他丝状真菌中, *CgrGa3* 与 *Valsa mali* (UXX33815.1) 和构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*) (AAF12813.1) 的相似度分别为 78.87% 和 76.97%。

2.2 *CgrGa3* 基因敲除及互补株系的构建

利用三轮 PCR 验证 *CgrGa3* 基因敲除突变体。用引物 *CgrGa3F/CgrGa3R* 进行 PCR 验证时, 野生型成功扩增出 1 092 bp 目的片段, 而敲除突

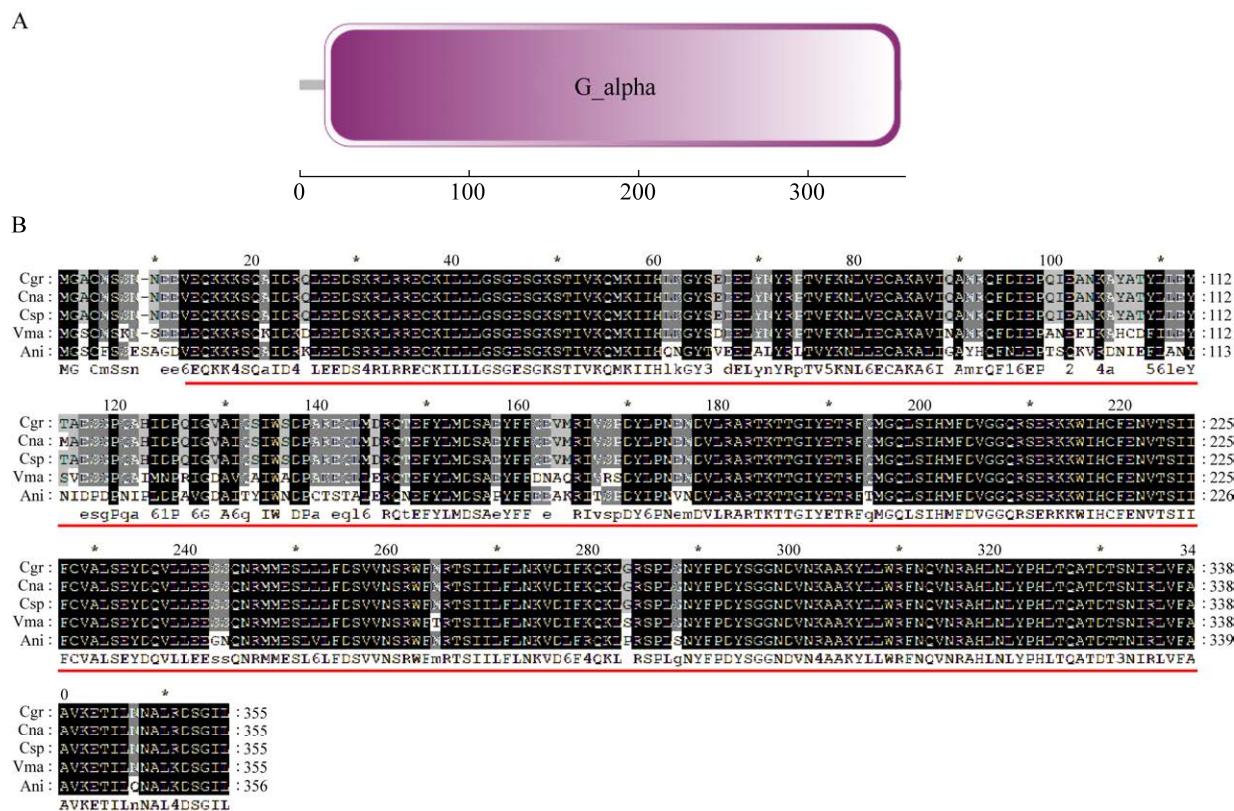


图 2 几种近缘菌种代表性菌株的 Ca3 蛋白的多序列比对 A: 禾谷炭疽菌的 CgrGa3 结构域分析; B: Ga3 蛋白的序列比对, 下划线区域表示 G_alpha 结构域。Cgr: 禾谷炭疽菌 M1.001 (XP_008091667.1); Cna: *Colletotrichum navitas* (XM_060554416.1); Csp: 白蜡树炭疽菌(XM_049274946.1); Vma: 黑腐皮壳菌(UXX33815.1); Ani: 构巢曲霉(AAF12813.1)。括号中的序号为 GenBank 登录号。

Figure 2 Multiple sequence alignment of Ca3 protein in representative strains of several closely related bacterial species. A: Domain analysis of CgrGa3 in *Colletotrichum graminicola*; B: Sequence alignment of Ga3 proteins, the underlined areas indicate G_alpha domain. Cgr: *Colletotrichum graminicola* M1.001 (XP_008091667.1); Cna: *Colletotrichum navitas* (XM_060554416.1); Csp: *Colletotrichum spaethianum* (XM_049274946.1); Vma: *Valsa mali* (UXX33815.1); Ani: *Aspergillus nidulans* (AAF12813.1). The numbers in parentheses are GenBank accession number.

变体未扩增出该片段。利用引物 *CgrGa3UU/PI* 和 *CgrGa3DD/PI1* 进行 PCR 验证时, 敲除突变体能够检测到目的片段, 而野生型未扩增出任何片段。最终通过 PCR 验证获得了 3 个敲除突变体, 分别命名为 $\Delta CgrGa3$ -12、 $\Delta CgrGa3$ -21、 $\Delta CgrGa3$ -26。

互补菌株通过 *CgrGa3F/CgrGa3R* 引物验证, 能扩增出 *CgrMbp1* 基因片段, 初步认定为互补转化子, 并命名为 C- $\Delta CgrGa3$ 。

2.3 CgrGa3 在禾谷炭疽菌营养生长中的调控作用

如图 3 所示, $\Delta CgrGa3$ 突变体在营养缺乏的 CZ 和 MM 培养基中的生长速率明显低于野生型菌株和互补菌株。而在 PDA 和 CM 培养基中, 与野生型无显著差异。这些结果表明 CgrGa3 对禾谷炭疽菌在营养缺乏环境中的生长具有重要作用。

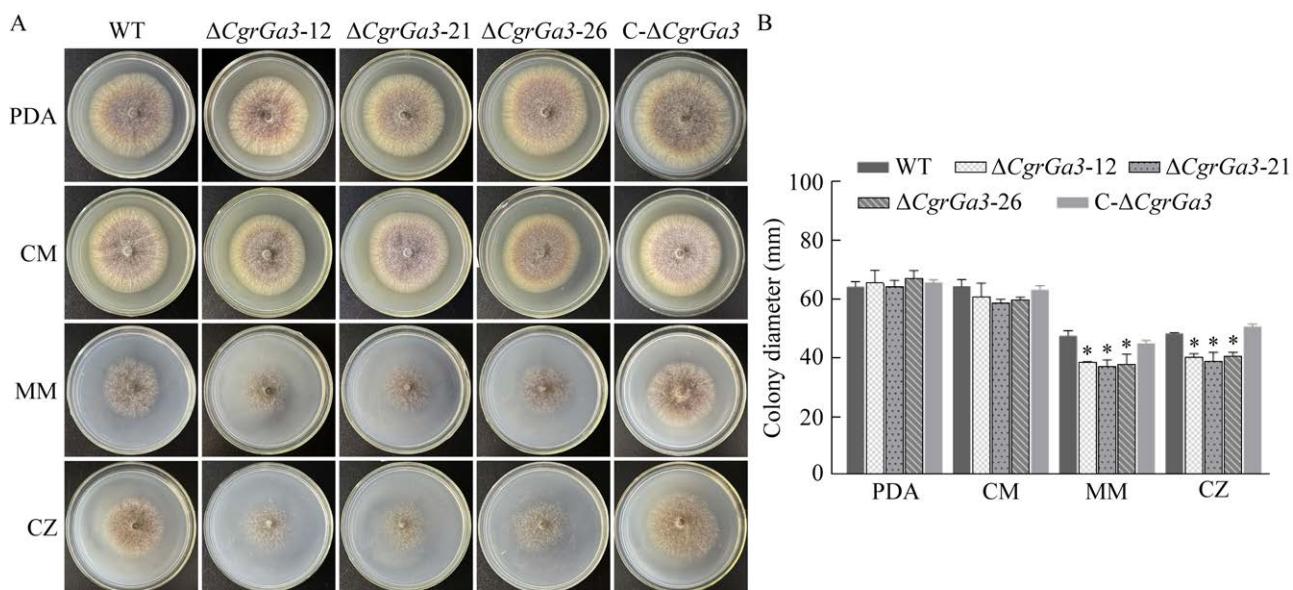


图3 展现野生型、 $\Delta CgrGa3$ 和互补菌株在不同培养基上的生长状态 A:各菌株在4种培养基上28 °C培养5 d的生长情况。B: 不同菌株的菌落生长直径统计分析。

Figure 3 The growth status of the wild-type, $\Delta CgrGa3$, and complement strains on different media. A: Growth performance of each strain after 5 d of incubation at 28 °C on four different media. B: Statistical analysis of colony growth diameters of different strains. *: $P<0.05$. The same below.

2.4 CgrGa3 在禾谷炭疽菌氧化和渗透胁迫响应中的调控作用

在0.8 mol/L NaCl处理下，突变体和野生型的抑制率分别为76%和57%；1.0 mol/L KCl处理时，突变体的平均抑制率为57%，野生型为48%；5 mmol/L H₂O₂处理下，突变体和野生型的抑制率分别达到68%和46%（图4）。相较于野生型， $\Delta CgrGa3$ 突变体对NaCl、KCl和H₂O₂更加敏感，CgrGa3参与调控禾谷炭疽菌氧化应激和渗透响应过程。

2.5 CgrGa3 在禾谷炭疽菌卵圆形孢子形成与萌发中的调控作用

$\Delta CgrGa3$ 的卵圆形孢子产量明显低于野生型菌株，仅为野生型菌株卵圆形孢子产量的50%（图5A）。

$\Delta CgrGa3$ 的卵圆形孢子的萌发发生如下变化： $\Delta CgrGa3$ 的卵圆形孢子萌发率显著低于野

生型菌株。在6 h时，野生型萌发率超过95%，而 $\Delta CgrGa3$ 的萌发率仅约为5%。在12 h时，突变体的萌发率也仅有18%（图5B）。这些结果表明，CgrGa3调控禾谷炭疽菌卵圆形孢子的产生和萌发。

2.6 CgrGa3 在禾谷炭疽菌镰刀形孢子和初生菌丝生成过程中发挥调控作用

$CgrGa3$ 的缺失显著减少了镰刀形孢子的产量。在OMA上， $\Delta CgrGa3$ 的镰刀形孢子产量仅为野生型菌株的10%（图6A）。在PDA上， $\Delta CgrGa3$ 镰刀形孢子产量仅有 2.2×10^5 个，而野生型为 7.4×10^6 个（图6B）。

在玉米叶片的侵染过程中，野生型菌株和互补菌株均能形成附着胞，并且附着胞能进一步形成初生菌丝在寄主细胞内扩张，相比之下， $\Delta CgrGa3$ 的镰刀形孢子虽然能够正常形成附着胞，但是不会进一步形成初生菌丝，导致无法

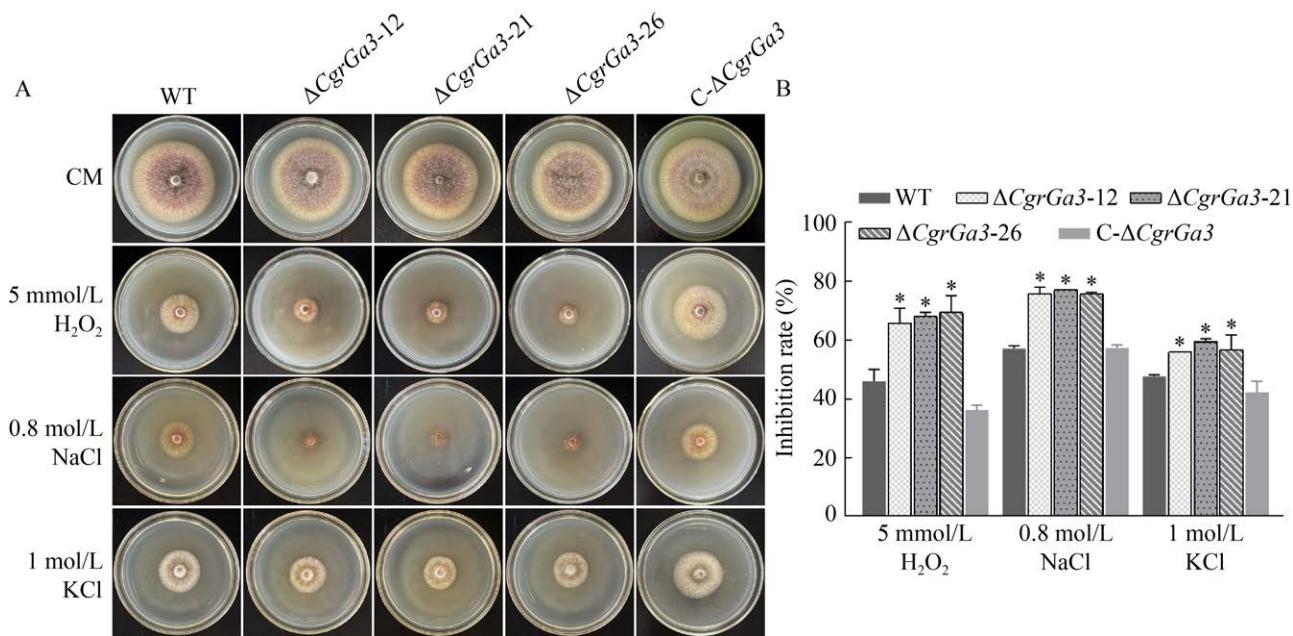


图 4 胁迫因子对野生型、 $\Delta CgrGa3$ 和互补菌株生长的影响 A: 各菌株在含 5 mmol/L H_2O_2 、0.8 mol/L NaCl 和 1 mol/L KCl 的 CM 培养基上 28 °C 培养 5 d 的生长情况; B: 5 mmol/L H_2O_2 、0.8 mol/L NaCl 和 1 mol/L KCl 的对各菌株生长抑制率的统计分析。

Figure 4 Effects of stress factors on the growth of wild-type, $\Delta CgrGa3$, and complementary strains. A: Growth of strains on MM media containing 5 mmol/L H_2O_2 , 0.8 mol/L NaCl and 1 mol/L KCl after 5 days of incubation at 28 °C; B: Statistical analysis of the growth inhibition rates of different strains under 5 mmol/L H_2O_2 , 0.8 mol/L NaCl and 1 mol/L KCl treatment.

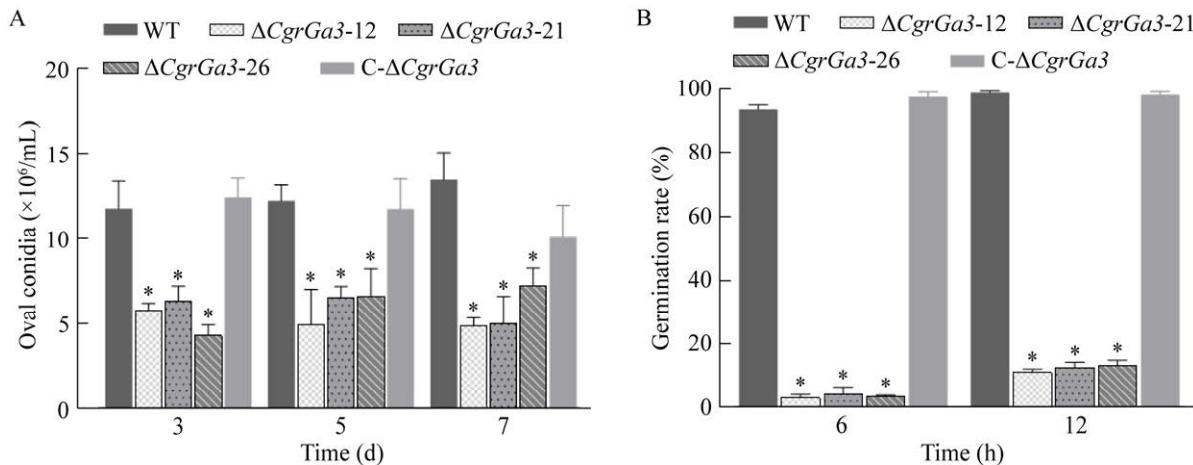


图 5 野生型、 $\Delta CgrGa3$ 和互补菌株卵圆形孢子产量和萌发情况 A: 在 PDB 培养基中培养 3、5、7 d 卵圆形孢子产量; B: 载玻片上萌发 6、12 h 的卵圆形孢子萌发率。

Figure 5 Oval conidia production and germination of wild-type, $\Delta CgrGa3$, and complementary strains. A: Production of oval conidia in PDB medium after 3, 5 and 7 d of cultivation; B: Germination rates of oval conidia at 0, 6 and 12 h.

有效侵入寄主(图 6C)。这些结果表明, CgrGa3 调控镰刀形孢子的产生, 并且对于禾谷炭疽菌初生菌丝的形成是必需的。

2.7 CgrGa3 参与调控禾谷炭疽菌的致病性

野生型和互补菌株的镰刀形孢子悬浮液能够使玉米叶片产生典型的病斑, 而 $\Delta CgrGa3$ 突变体的致病性显著减弱(图 7)。因此, CgrGa3 参与调节禾谷炭疽菌对玉米叶片的致病性。

3 讨论

G 蛋白作为跨膜信号转导的重要调控者, 广泛参与真菌生长、发育及致病性调控。CgrGa3 作为禾谷炭疽菌中的一个关键 G α 亚基, 在无性生殖、应激响应和致病性中表现出显著调控作用。

本研究发现敲除禾谷炭疽菌 G α 亚基 CgrGa3 显著降低了禾谷炭疽菌在贫瘠培养基上的生长速率。然而, 在营养丰富的 PDA 和 CM 培养基上各菌株的营养生长无显著差异(图 3A)。类

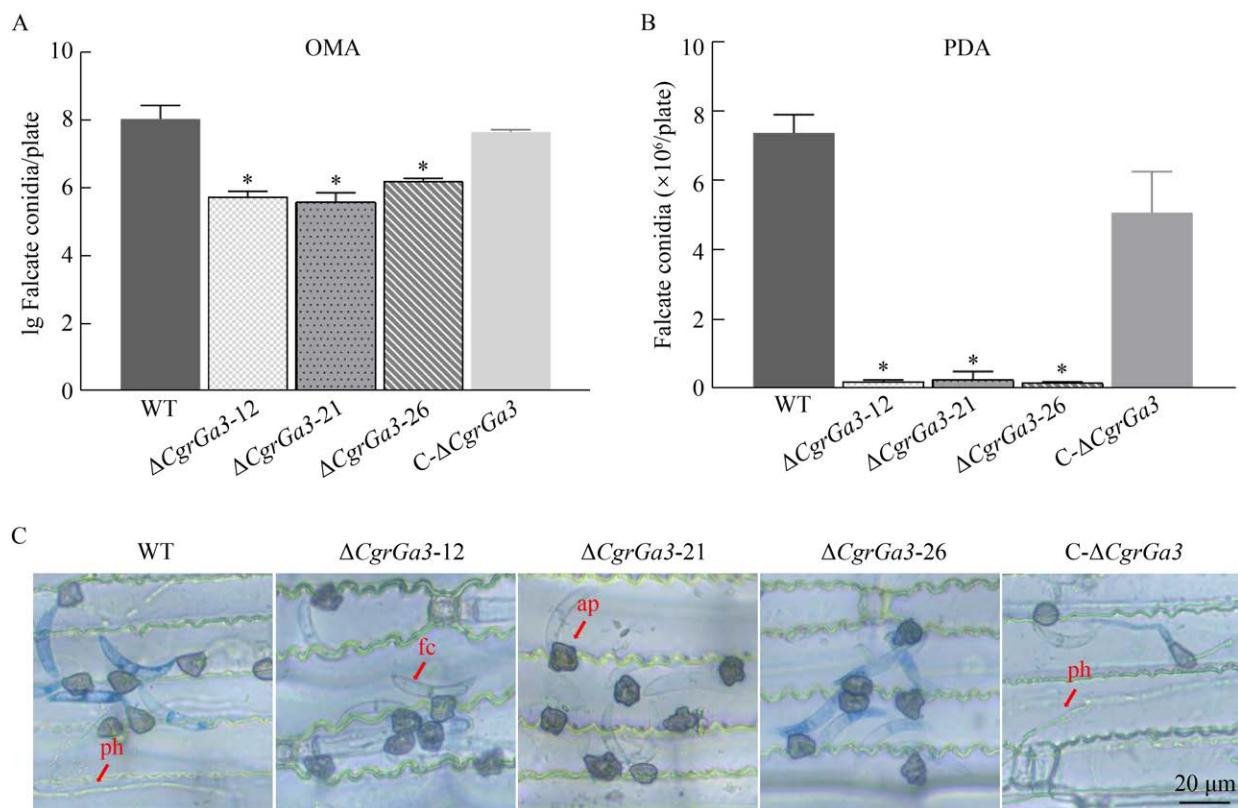


图 6 野生型、 $\Delta CgrGa3$ 和互补菌株镰刀形孢子产量和初生菌丝形成情况 A: 在 OMA 培养基中培养 14 d 镰刀形孢子产量。B: 在 PDA 培养基中培养 14 d 镰刀形孢子产量。C: 镰刀形孢子在 36 h 的附着胞和初生菌丝形成情况。fc: 镰刀形孢子; ap: 附着胞; ph: 初生菌丝。标尺为 20 μm 。

Figure 6 Conidial production and primary hyphae formation in wild-type, $\Delta CgrGa3$, and complementary strains. A: Conidial production on OMA medium after 14 d of cultivation. B: Conidial production on PDA medium after 14 d of cultivation. C: Formation of appressoria and primary hyphae from conidia at 36 h. fc: Falcate conidia; ap: Appressoria; ph: Primary hyphae. Bar: 20 μm .

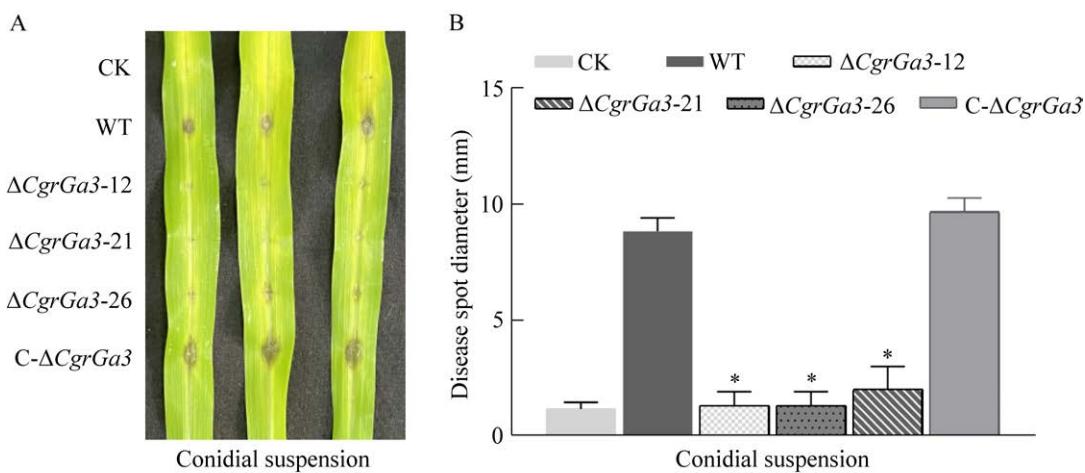


图 7 野生型、 $\Delta CgrGa3$ 和互补菌株的致病性检测 A: 接种不同菌株镰刀形孢子悬液后 3 d 叶片上的病斑大小; B: 病斑直径统计分析。

Figure 7 Pathogenicity analysis of the wild-type, $\Delta CgrGa3$ and complementary strains. A: Disease spot size on leaves 3 days after inoculation with falcate conidial suspensions of different strains; B: Statistical analysis of disease spot diameter.

似的结果在桑实杯盘菌(*C. shiraiana*)^[16]、黄曲霉(*A. flavus*)^[17]、稻瘟病菌^[23]和红色红曲霉(*Monascus ruber*)^[24]中也被报道。与此不同，在烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)^[25]和哈茨木霉(*T. harzianum*)^[19]中，*Ga3* 的缺失导致菌丝在 PDA 培养基中生长速率降低。而在黑腐皮壳菌(*V. mali*)^[20]中，无论营养丰富还是贫瘠的培养基，*Ga3* 的缺失均显著抑制菌丝生长(表 2)。这些结果表明，G 蛋白 α 亚基的功能在不同真菌中并不完全保守。禾谷炭疽菌 III 型 $G\alpha$ 亚基(*CrgGa3*)在营养缺乏环境中的生长调控中起重要作用，但在营养丰富的条件下作用不明显。

在胁迫应激方面， $\Delta CgrGa3$ 突变体较野生型对 NaCl、KCl 和 H₂O₂ 更加敏感，表明 *CgrGa3* 在禾谷炭疽菌中的胁迫响应调控中具有关键作用(图 4A)。在马尔尼菲青霉菌(*Penicillium marneffei*)^[27]中，*GasC* (*CgrGa3* 的同源蛋白)基因敲除突变体对 NaCl、KCl 的敏感性增加。在黄曲霉(*A. flavus*)^[17]和烟曲霉(*A. fumigatus*)^[25]，*GpaB* (*CgrGa3* 的同源蛋白)的缺失突变体也表

现出对 H₂O₂ 敏感性增加。已有研究表明，*Gai* 和 *Gao* 是氧化应激反应的关键组成部分，如细胞外信号相关激酶的激活(extracellular signal-related kinase, ESK)^[28]。由此可见，*Ga3* 蛋白在参与真菌胁迫响应方面具有一定的保守性。

分生孢子是禾谷炭疽菌传播和感染植物的重要结构，它们通过空气传播迅速感染寄主植物^[29]。本研究发现，*CgrGa3* 的缺失显著降低了禾谷炭疽菌卵圆形和镰刀形孢子的产量(图 5A，图 6A)。在黄曲霉(*A. flavus*)中，*GpaB* 的缺失会导致分生孢子形成缺陷^[17]；在哈茨木霉(*T. harzianum*)^[19]、烟曲霉(*A. fumigatus*)^[25]和灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)^[30]中，*Ga3* 蛋白也参与调控孢子产量。*Ga3* 可能通过调控与孢子形成相关的信号转导通路降低孢子产量。孢子产量减少会导致传播能力下降，使病原体在环境中的生存和传播受限，从而影响整体致病性。

此外，*CgrGa3* 的缺失导致禾谷炭疽菌的孢子萌发显著降低(图 5B)，这一结果与构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)^[31]、烟曲霉(*A. fumigatus*)^[25]

表 2 真菌 G 蛋白 III 型 Ga 亚基的功能

Table 2 The function of group III Ga subunit of G protein in fungi

物种名称 Species	基因 Gene	营养生长 Nutritional growth	胁迫应激 Extracellular stress	孢子产生及萌发 Spore production and germination	致病性 Pathogenicity	参考文献 Reference
<i>Colletotrichum graminicola</i>	<i>CgrGa3</i>	生长速率显著降低 Significant growth reduction	敏感性增强 Sensitivity increased	产量降低、萌发率下降 Production reduced, germination rate declined	致病力降低 Pathogenicity reduced	本研究 This study
<i>Aspergillus flavus</i>	<i>GpaB</i>	无显著影响 No significant effect	敏感性增强 Sensitivity increased	产量降低 Production reduced	致病力降低 Pathogenicity reduced	[17]
<i>Magnaporthe oryzae</i>	<i>MagA</i>	无显著影响 No significant effect	敏感性增强 Sensitivity increased	无显著影响 No significant effect	无显著影响 No significant effect	[18]
<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>GpaB</i>	生长速率显著降低 Significant growth reduction	未报道 Not reported	产量降低、萌发率下降 Production and germination rate declined	致病力降低 Pathogenicity reduced	[25]
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Thga3</i>	生长速率显著降低 Significant growth reduction	未报道 Not reported	产量降低 Production reduced	抗寄生能力降低 Antagonistic ability reduced	[19]
<i>Ustilago esculenta</i>	<i>Uegpa3</i>	无显著差异 No significant effect	未报道 Not reported	未报道 Not reported	致病力降低 Pathogenicity reduced	[26]
<i>Valsa mali</i>	<i>Gvm3</i>	生长速率显著降低 Significant growth reduction	敏感性增强 Sensitivity increased	产量降低 Production reduced	致病力降低 Pathogenicity reduced	[20]

和灰葡萄孢(*B. cinerea*)^[30]中的研究一致。在玉米叶片的侵染过程中,附着胞的形成是禾谷炭疽菌成功附着的关键,而初生菌丝的发育则是病原体有效侵入寄主细胞的必要步骤^[32]。尽管 *CgrGa3* 的缺失并不影响附着胞的形成,但会导致禾谷炭疽菌无法形成初生菌丝,从而阻碍其进一步的侵染(图 6C)。同样,在稻瘟病菌(*M. oryzae*)中, *MagA* (*CgrGa3* 的同源蛋白)的缺失不会影响附着胞的形成^[18];而在菰黑粉菌(*Ustilago esculenta*)中, *Gpa3* 则调控侵染菌丝的形成^[26]。综上所述,在多种丝状真菌中, *Ga3* 蛋白和分生孢子的形成、萌发、初生菌丝的形成等有着密切的联系。本研究的数据也显示, *CrgGa3* 在禾谷炭疽菌的无性发育和侵染过程中起着关键作用。

另一方面,禾谷炭疽菌是对禾本科植物具有较强致病性的植物病原真菌。本研究的数据表明,禾谷炭疽菌 M1.001 中 *CgrGa3* 缺失导致该菌株对玉米叶片的致病性显著减弱(图 7A)。在黄曲霉(*A. flavus*)^[17]、桑实杯盘菌(*C. shiraiana*)^[16]、玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)^[33]、新生隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)^[34]、灰葡萄孢(*B. cinerea*)^[30]、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)^[35]和黑腐皮壳菌(*V. mali*)^[20]中, III 型 *Ga* 亚基的缺失均导致了致病力减弱,这些结果与本研究是一致的。初生菌丝是禾谷炭疽菌侵入寄主细胞的关键结构,其无法形成将直接减弱菌株的侵染能力。如在菰黑粉菌(*U. esculenta*)中, *Uegpa3* 的缺失导致其侵染菌丝无法形成,进而无法侵染茭白^[26],因此, $\Delta CgrGa3$ 突变体致病力减弱

可能与其镰刀形孢子无法形成初生菌丝有关(图 6C, 图 7A)。

4 结论

CgrGa3 是禾谷炭疽菌 G 蛋白的 III 型 $G\alpha$ 亚基, 参与调控生长、胁迫应激、分生孢子和初生菌丝的形成, 进一步影响禾谷炭疽菌的致病力。本研究有助于进一步了解 G 蛋白 III 型 $G\alpha$ 亚基在禾谷炭疽菌中的功能, 并为相关研究提供了参考。未来的研究将进一步探索 CgrGa3 下游的信号通路, 为深入解析禾谷炭疽菌的分子致病机制奠定基础。

REFERENCES

- [1] 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.
- [2] De JESUS MIRANDA V, PORTO WF, Da ROCHA FERNANDES G, POGUE R, NOLASCO DO, ARAUJO ACG, COTA LV, de FREITAS CG, DIAS SC, FRANCO OL. Comparative transcriptomic analysis indicates genes associated with local and systemic resistance to *Colletotrichum graminicola* in maize[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 2483.
- [3] BERGSTROM GC, NICHOLSON RL. The biology of corn anthracnose: knowledge to exploit for improved management[J]. *Plant Disease*, 1999, 83(7): 596-608.
- [4] WANG CL, SHIM WB, SHAW BD. The *Colletotrichum graminicola* striatin orthologue Str1 is necessary for anastomosis and is a virulence factor[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2016, 17(6): 931-942.
- [5] PANACCIONE DG, VAILLANCOURT LJ, HANAU RM. Conidial dimorphism in *Colletotrichum graminicola*[J]. *Mycologia*, 1989, 81(6): 876-883.
- [6] De OLIVEIRA SILVA A, FERNANDO DEVASAHAYAM BR, ALIYEVA-SCHNORR L, GLIENKE C, DEISING HB. The serine-threonine protein kinase Snf1 orchestrates the expression of plant cell wall-degrading enzymes and is required for full virulence of the maize pathogen *Colletotrichum graminicola*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2024, 171: 103876.
- [7] DOU DL, ZHOU JM. Phytopathogen effectors subverting host immunity: different foes, similar battleground[J]. *Cell Host & Microbe*, 2012, 12(4): 484-495.
- [8] KISHI-KABOSHI M, OKADA K, KURIMOTO L, MURAKAMI S, UMEZAWA T, SHIBUYA N, YAMANE H, MIYAO A, TAKATSUJI H, TAKAHASHI A, HIROCHIKA H. A rice fungal MAMP-responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis[J]. *The Plant Journal*, 2010, 63(4): 599-612.
- [9] MILLIGAN G, KOSTENIS E. Heterotrimeric G-proteins: a short history[J]. *British Journal of Pharmacology*, 2006, 147(S1): S46-S55.
- [10] NEVES SR, RAM PT, IYENGAR R. G protein pathways[J]. *Science*, 2002, 296(5573): 1636-1639.
- [11] HAMM HE. The many faces of G protein signaling[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(2): 669-672.
- [12] de VRIES L, ZHENG B, FISCHER T, ELENKO E, FARQUHAR MG. The regulator of G protein signaling family[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2000, 40: 235-271.
- [13] LI LD, WRIGHT SJ, KRYSKOFOVA S, PARK G, BORKOVICH KA. Heterotrimeric G protein signaling in filamentous fungi[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2007, 61: 423-452.
- [14] GUO LJ, YANG YH, YANG LY, WANG FY, WANG GF, HUANG JS. Functional analysis of the G-protein α subunits FGA1 and FGA3 in the banana pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2016, 94: 75-82.
- [15] STATECZNY D, OPPENHEIMER J, BOMMERT P. G protein signaling in plants: minus times minus equals plus[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2016, 34: 127-135.
- [16] 朱攀攀. 桑实杯盘菌异三聚体 G 蛋白相关基因功能研究及抗病材料创制[D]. 重庆: 重庆大学博士学位论文, 2022.
- ZHU PP. Functional analyses of heterotrimer G protein related genes in *Ciboria shiraiana* and their application in resistance breeding[D]. Chongqing: Doctoral Dissertation of Chongqing University, 2022 (in Chinese).
- [17] LIU YH, YANG KL, QIN QP, LIN GN, HU TR, XU ZL, WANG SH. G protein α subunit GpaB is required for asexual development, aflatoxin biosynthesis and pathogenicity by regulating cAMP signaling in *Aspergillus flavus*[J]. *Toxins*, 2018, 10(3): 117.
- [18] LIU S, DEAN RA. G protein alpha subunit genes control growth, development, and pathogenicity of *Magnaporthe grisea*[J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1997, 10(9): 1075-1086.
- [19] DING J, MEI J, HUANG P, TIAN Y, LIANG Y, JIANG XL, LI M. Ga3 subunit Thga3 positively regulates conidiation, mycoparasitism, chitinase activity, and hydrophobicity of *Trichoderma harzianum*[J]. *AMB Express*, 2020, 10(1): 221.
- [20] SONG N, DAI QQ, ZHU BT, WU YX, XU M, VOEGELE RT, GAO XN, KANG ZS, HUANG LL. Ga proteins Gvm2 and Gvm3 regulate vegetative growth, asexual development, and pathogenicity on apple in *Valsa mali*[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173141.
- [21] 张莹, 周双针, 王利亚, 韦涵文, 谢俊, 柳志强, 李晓宇. 禾谷炭疽菌转录因子 CgrStuA 调控营养生长、孢子产生、萌发及附着枝形成[J]. 微生物学通报, 2024, 51(8): 3020-3031.
- ZHANG Y, ZHOU SZ, WANG LY, WEI HW, XIE J, LIU ZQ, LI XY. A transcription factor CgrStuA regulates vegetative growth, conidial production, germination, and hyphopodium formation of

- Colletotrichum graminicola*[J]. Microbiology China, 2024, 51(8): 3020-3031 (in Chinese).
- [22] 吴曼莉, 胡坚, 张楠, 柯智健, 柳志强, 李晓宇. CgRGS7 调控胶孢炭疽菌分生孢子产量、附着胞形成及致病性 [J]. 西南农业学报, 2017, 30(8): 1802-1807.
- WU ML, HU J, ZHANG N, KE ZJ, LIU ZQ, LI XY. CgRGS7 regulation of conidium production, appressorium formation and pathogenicity in *Colletotrichum gloeosporioides*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 30(8): 1802-1807 (in Chinese).
- [23] JAIN S, AKIYAMA K, MAE K, OHGUCHI T, TAKATA R. Targeted disruption of a G protein α subunit gene results in reduced pathogenicity in *Fusarium oxysporum*[J]. Current Genetics, 2002, 41(6): 407-413.
- [24] LEI M, LIU J, FANG Y, SHAO YC, LI L, YU JH, CHEN FS. Effects of different G-protein α -subunits on growth, development and secondary metabolism of *Monascus ruber* M7[J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 10: 1555.
- [25] CHOI YH, LEE NY, KIM SS, PARK HS, SHIN KS. Comparative characterization of G protein α subunits in *Aspergillus fumigatus*[J]. Pathogens, 2020, 9(4): 272.
- [26] 于金梦. 蕈黑粉菌中 G 蛋白 α 亚基的功能研究[D]. 杭州: 中国计量大学硕士学位论文, 2020.
- YU JM. Study on the function of G protein α subunit in *Ustilago esculenta*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of China University of Metrology, 2020 (in Chinese).
- [27] ZUBER S, HYNES MJ, ANDRIANOPOULOS A. The G-protein α -subunit GasC plays a major role in germination in the dimorphic fungus *Penicillium marneffei*[J]. Genetics, 2003, 164(2): 487-499.
- [28] NISHIDA M, MARUYAMA Y, TANAKA R, KONTANI K, NAGAO T, KUROSE H. Gai and Gao are target proteins of reactive oxygen species[J]. Nature, 2000, 408: 492-495.
- [29] SUKNO SA, GARCÍA VM, SHAW BD, THON MR. Root infection and systemic colonization of maize by *Colletotrichum graminicola*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(3): 823-832.
- [30] DOEHLEMANN G, BERNDT P, HAHN M. Different signalling pathways involving a Galpha protein, cAMP and a MAP kinase control germination of *Botrytis cinerea* conidia[J]. Molecular Microbiology, 2006, 59(3): 821-835.
- [31] CHANG MH, CHAE KS, HAN DM, JAHNG KY. The GanB Galpha-protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *Aspergillus nidulans*[J]. Genetics, 2004, 167(3): 1305-1315.
- [32] ZHOU SZ, LIU SY, GUO CC, WEI HW, HE ZH, LIU ZQ, LI XY. The C₂H₂ transcription factor con7 regulates vegetative growth, cell wall integrity, oxidative stress, asexual sporulation, appressorium and hyphopodium formation, and pathogenicity in *Colletotrichum graminicola* and *Colletotrichum siamense*[J]. Journal of Fungi, 2024, 10(7): 495.
- [33] REGENFELDER E, SPELLIG T, HARTMANN A, LAUENSTEIN S, BÖLKER M, KAHMANN R. G proteins in *Ustilago maydis*: transmission of multiple signals?[J]. EMBO Journal, 1997, 16(8): 1934-1942.
- [34] HSUEH YP, XUE CY, HEITMAN J. G protein signaling governing cell fate decisions involves opposing Galpha subunits in *Cryptococcus neoformans*[J]. Molecular Biology of the Cell, 2007, 18(9): 3237-3249.
- [35] JAIN S, AKIYAMA K, TAKATA R, OHGUCHI T. Signaling via the G protein α subunit FGA2 is necessary for pathogenesis in *Fusarium oxysporum*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2005, 243(1): 165-172.