



邓懿祯

华南农业大学研究员，从事植物病原真菌致病分子机制研究与病害防控策略开发，目前主持国家自然科学基金优秀青年科学基金项目、面上项目、青年科学基金项目各1项，发表学术论文40余篇。

核转运蛋白 SsKapJ 调控甘蔗鞭孢堆黑粉菌有性配合与菌丝生长

陈金辉，甘永健，崔国兵，邓懿祯*

华南农业大学植物保护学院 广东省微生物信号与病害防控重点实验室 群体微生物研究中心，广东 广州 510642

摘要：为了研究核转运蛋白 SsKapJ 在甘蔗鞭孢堆黑粉菌中发挥的作用，本研究利用 PEG 介导的原生质体转化方法获得基因敲除突变体，并进行了相关生物学表型分析。结果显示潜在核转运蛋白基因 *SsKapJΔ* 突变体有性配合和菌丝生长显著减弱，转录组分析 SsKapJ 参与环磷酸腺苷/蛋白激酶 A (cAMP/PKA) 和丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号途径调控。另一方面，*SsKapJΔ* 突变体担孢子对吡唑醚菌酯杀真菌剂敏感性增强，但突变体对苯菌灵杀真菌剂敏感性以及环境胁迫测试(渗透压、细胞壁抑制剂、氧化还原和乙醇)中较野生型没有明显变化。本研究结果揭示了 SsKapJ 核转运蛋白在甘蔗鞭孢堆黑粉菌的有性配合和菌丝生长过程中具有重要调控作用，为后续开展核运输途径调控真菌有性配合/二态型转变研究提供基础。

关键词：甘蔗鞭孢堆黑粉菌；有性配合；核转运蛋白；杀真菌剂；菌丝生长

[引用本文] 陈金辉，甘永健，崔国兵，邓懿祯，2022. 核转运蛋白 SsKapJ 调控甘蔗鞭孢堆黑粉菌有性配合与菌丝生长. 菌物学报, 41(3): 478-491

Chen JH, Gan YJ, Cui GB, Deng YZ, 2022. Karyopherin SsKapJ regulates mating and filamentation in *Sporisorium scitamineum*. Mycosystema, 41(3): 478-491

基金项目：广州市科技计划重点项目：甘蔗鞭黑穗病生物防治技术的研发与应用(201904020010)

Supported by the Key Projects of Guangzhou Science and Technology Plan (201904020010).

*Corresponding author. E-mail: dengyz@scau.edu.cn

ORCID: DENG Yizhen (0000-0002-3572-1559)

Received: 2021-08-11, accepted: 2021-09-13

Karyopherin SsKapJ regulates mating and filamentation in *Sporisorium scitamineum*

CHEN Jinhui, GAN Yongjian, CUI Guobing, DENG Yizhen*

College of Plant Protection, Guangdong Province Key Laboratory of Microbial Signals and Disease Control, Integrate Microbiology Research Center, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China

Abstract: In order to study the role of karyopherin SsKapJ in the sugarcane smut fungus *Sporisorium scitamineum*, the deletion mutant was generated by using the PEG-mediated protoplast transformation method, and the mutant phenotypes were characterized. The results showed that the putative karyopherin gene deletion mutant *SsKapJΔ* displayed a significant reduction in sexual mating and filamentation. Transcriptome analysis revealed that SsKapJ was involved in regulation of cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A (cAMP/PKA) and mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. The haploid sporidia of *SsKapJΔ* mutant was hypersensitive to pyraclostrobin fungicide, but no difference was found in sensitivity towards benomyl fungicide or the tested stressful conditions (osmotic pressure, cell wall, redox and ethanol) as compared with the wild-type. This study suggests that SsKapJ karyopherin may play an important regulatory role in sexual mating and filamentation of *S. scitamineum*, providing a basis for further study on regulation of fungal dimorphic switch via nuclear transport pathway.

Keywords: *Sporisorium scitamineum*; sexual mating; karyopherin; fungicide; filamentation

甘蔗黑穗病是影响甘蔗产量的全球性病害，高感染种植地区每年因此造成的经济损失可达46%以上(张志新和岩伦 2019)。其病原甘蔗鞭孢堆黑粉菌 *Sporisorium scitamineum*，是典型的二态型真菌，与其他黑粉菌具有相似的生活史，包括3个重要阶段：酵母状担孢子、双核菌丝和二倍体冬孢子(韦金菊等 2019)。其中，甘蔗鞭孢堆黑粉菌不同配合型 *MAT-1* 和 *MAT-2* 进行有性配合形成菌丝是侵染甘蔗导致发病的关键，主要受交配型基因 *a* 位点和 *b* 位点调节，*a* 位点与信息素的产生和识别有关，*b* 位点控制双核菌丝生长和致病力侵染(Yan *et al.* 2016)。双核菌丝形成早期需要信号传导、基因调节和生物活性分子靶定位，主要通过 cAMP/PKA 和 MAPK 信号通路调节(Kijpornyongpan & Aime 2020)。活化的 MAPK 途径进一步激活下游转录因子与其他效应蛋白，参与环境抗逆胁迫响应、细胞壁完整性、

群体感应信号、致病力等过程(Deng *et al.* 2018; Chang *et al.* 2019; Cai *et al.* 2021)。因此，阻碍甘蔗鞭孢堆黑粉菌有性配合，是预防或治理甘蔗黑穗病的有力途径之一。

核转运蛋白(karyopherins, Kaps)是真核生物核质运输非常重要的载体蛋白，参与真核细胞的复制、转录和翻译环节(Oka & Yoneda 2018)。一般来说，分子量小于 40kDa 的生物分子可自由通过核孔复合体进出细胞核，而分子量大于 40 kDa 的生物大分子则需要核转运蛋白介导主动运输进出核(An *et al.* 2017)。研究比较清楚的核转运蛋白是经典 α 和 β 超家族蛋白，在酵母中有 14 种 β 超家族核转运蛋白，只有 4 种核转运蛋白是必不可少的，其他核转运蛋白表现出功能冗余的特点(Fiserova & Goldberg 2010)。目前，已发现多种核转运蛋白在其他方面发挥重要作用，如 Zhang *et al.* (2020)研究发现 Kap119 协助 MoCks 入核从

而影响稻瘟菌的致病力。Liao *et al.* (2020)验证酿酒酵母 Kap114 调节核糖体基因表达控制耐盐胁迫响应。Sydorsky *et al.* (2003)、Ptak *et al.* (2009)和 Martinez-Bono *et al.* (2010)研究发现酿酒酵母 Kap123 与细胞完整性、微管稳定性和核糖体出入核有关。核转运蛋白在真菌的生命活动中发挥重要作用,但是否影响真菌有性配合以及相关调控机制尚不清楚。

为了阐明核转运蛋白在甘蔗鞭孢堆黑粉菌有性配合中发挥的作用,本研究通过比对构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* 编码核转运蛋白 KapJ 的基因,获得甘蔗鞭孢堆黑粉菌中 KapJ 的同源基因序列,并将其命名为 SsKapJ。利用原生质体敲除技术分别得到野生型 *MAT-1* 和 *MAT-2* 背景下的 *SsKapJ* 敲除突变体,在此基础上比较分析 *SsKapJ* 突变体与野生型的有性配合能力,发现 *SsKapJ* 敲除突变体生长速率降低,有性配合/菌丝生长能力显著减弱,转录组测序证明 SsKapJ 调控 cAMP/PKA 和 MAPK 通路的基因表达。此外,突变体担孢子对不同杀真菌剂的敏感程度不同,对吡唑醚菌酯杀真菌剂更加敏感,但在苯菌灵杀真菌剂和外界环境胁迫(渗透压、细胞壁、氧化还原和乙醇)下,与野生型对比无明显差别。因此,推断 SsKapJ 参与甘蔗鞭孢堆黑粉菌有性配合与菌丝生长的调控途径,并可能在吡唑醚菌酯对真菌的线粒体抑制作用中扮演重要角色。

1 材料与方法

1.1 菌种及培养条件

甘蔗鞭孢堆黑粉菌野生型 *MAT-1* 和 *MAT-2* 由 Yan *et al.* (2016)分离鉴定并保存在本实验室。甘蔗鞭孢堆黑粉菌培养条件参照 Wang *et al.* (2019)等的方法。

1.2 核转运蛋白 SsKapJ 基因序列获得及进化树构建

以构巢曲霉 *A. nidulans* 编码核转运蛋白

KapJ 的基因 (AN2120)在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)网站上对甘蔗鞭孢堆黑粉菌基因组进行比对(Markina-Iñárraegui *et al.* 2011),下载比对结果对应基因序列(SPSC_05651),将其命名为 *SsKapJ*,经过 BLAST-X 比对,下载玉米丝孢堆黑粉菌 *Sporisorium reilianum*、玉米黑粉菌 *Ustilago maydis*、构巢曲霉 *A. nidulans*、稻梨孢菌 *Pyricularia oryzae*、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 和白色念珠菌 *Candida albicans* 等物种的蛋白同源序列,用 MEGA-X 对蛋白同源序列进行 ClustalW 比对,邻近法(neighbor-joining method, NJ)构建系统进化树(默认参数)。用在线网站 SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<http://smart.embl.de>)预测蛋白功能结构域(默认参数)。

1.3 基因敲除片段构建及原生质体转化

从 NCBI 网站上下载 *SsKapJ* 基因序列,以野生型基因组 DNA 为模板,分别用引物 651up-F/651up-R 和 651down-F/651down-R 扩增该基因的上、下游各 1 kb 左右的 DNA 序列作为同源重组的左、右两臂;以 pEX2 质粒(本实验室保存)为模板,用引物 651p2up-F/651p2down-R 扩增潮霉素基因(*HPT*)作为抗性筛选基因。采用 Double-joint PCR 方法对左臂、右臂和 *HPT* 片段进行融合 PCR (Yu *et al.* 2004)。将融合好的基因敲除片段进行 PEG 介导的原生质体转化,原生质体制备及转化条件方法参照蔡恩平等(2020)的报道。用于扩增目标基因敲除片段的引物序列见表 1。

1.4 突变体筛选和验证

原生质体转化后在含有潮霉素的 YePSA 培养基上筛选,连续培养 3 代获得稳定转化子,提取转化子 DNA 后用目的基因引物 651test-F/651test-R 和潮霉素抗性基因引物 HPT-F/HPT-R 验证,再用引物 651-probe-F/651-probe-R 合成探针进行 Southern blot,进一步验证 *MAT-1* 和 *MAT-2* 背景下的敲除突变体。用于验证敲除突变体的引物序列和探针引物序列见表 1。

表 1 本研究所用引物序列
Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')
651up-F	AAGATGTTAGGCGGCAGTG
651up-R	CCTGCCTATCAGCAAGATCTTTCTCGCAATGATGTGTCG
651down-F	ATACATTATACGAAGTTATTGCGATAGGAAGATTGCCTG
651down-R	GAACCTGTTGCTGAACCTGA
651p2up-F	CGACACATCATTGCGAGAAAGATCTTGCTGATAGGCAGG
651p2down-R	CAGGCAATCTTCCTATCGCAATAACTTCGTATAATGTAT
651test-F	TCAAGCCTTTCCTCACCCCT
651test-R	CCACAGATGAATGGCAAATG
HPT-F	GCAAGACCTGCCTGAAACCG
HPT-R	GGTCAAGACCAATGCGGAGC
651-probe-F	CTGTGATGGAAGGAAGGATGT
651-probe-R	ATGAGGTGAACGACTTGCG

1.5 担孢子生长速率测定

将野生型 *MAT-1*、*MAT-2* 和突变体 *MAT-1-SsKapJΔ*、*MAT-2-SsKapJΔ* 分别接种到 YePS 液体培养基中，以 28 ℃、200 r/min 培养 16 h，调节菌液浓度为 $OD_{600} \approx 1$ ，用 YePS 液体培养基按比例稀释菌液浓度为 $OD_{600} \approx 0.01$ ，分别吸取 200 μL 菌液到培养板内，样品设 5 个重复，上机培养测定(全自动生长曲线分析仪 Bioscreen FP-1100-C)。

1.6 有性配合/菌丝生长、外界环境胁迫、杀真菌剂测定

将菌液 $OD_{600} \approx 1$ 的突变体 *MAT-1-SsKapJΔ*、*MAT-2-SsKapJΔ* 和野生型 *MAT-1*、*MAT-2* 分别等体积混匀，吸取 2 μL 接种在 PDA 培养基上，28 ℃ 培养 3 d，观察比较野生型和突变体有性配合/菌丝生长情况。

将菌液 $OD_{600} \approx 1$ 的野生型 *MAT-1*、*MAT-2* 和突变体 *MAT-1-SsKapJΔ*、*MAT-2-SsKapJΔ* 担孢子用 YePS 液体培养基连续稀释浓度为 $OD_{600} \approx 1$ 、0.1、0.01 和 0.001，吸取 2 μL 接种在含有不同浓度的氯化钠、山梨醇、十二烷基硫酸钠、刚果红、过氧化氢和乙醇的 PDA 培养基中，以空白 PDA 为对照，28 ℃ 培养 3 d，观察比较野生型和突变体对外界胁迫的响应。

外源配置不同浓度的 97% 苯菌灵(购自上海

阿拉丁生化科技股份有限公司，B197283)和 97% 吡唑醚菌酯(购自广西化工研究院)杀真菌剂测定甘蔗鞭孢堆黑粉菌担孢子、有性配合/菌丝生长的方法同上。

1.7 RNA 提取和转录组测序分析

将菌液 $OD_{600} \approx 1$ 的野生型 *MAT-1*、*MAT-2* 和突变体 *MAT-1-SsKapJΔ*、*MAT-2-SsKapJΔ* 等体积混匀，分别将 200 μL 混合菌液在 PDA 培养基上涂均匀，28 ℃ 培养 1 d，分别收集野生型和突变体菌丝，采用 TRIzol 方法提取 RNA，实验设 3 个重复，将合格的 RNA 送往广州基迪奥生物科技有限公司进行 Illumina HiSeq™ 4000 测序。对测序完成的 raw reads 利用 fastp (Chen *et al.* 2018)进行质控，过滤低质量数据，获得高质量序列(clean reads)进行下一步分析。数据提交到 NCBI (PRJNA753009)。

数据组装后采用 Hisat2 将 spliced reads 比对到甘蔗鞭孢堆黑粉菌参考基因组上(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCA_900002365.1)，对原始 reads count 进行校正，采用 FPKM (fragments per kilobase million)方法计算每个注释基因的表达量。差异表达基因定义为 FDR (false discovery rate)<0.05 且 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 的基因。将筛选的差异表达基因向 GO (gene ontology)数据库

(<http://www.geneontology.org/>)的各 term 映射,并计算每个类别的差异基因数。将筛选的差异表达基因比对 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库进行 Pathway 富集分析,推测基因参与行使的生物学功能及代谢途径。

2 结果与分析

2.1 SsKapJ 的功能域预测和系统进化树分析

甘蔗鞭孢堆黑粉菌 SsKapJ 蛋白序列号为 CDR88819.1,其编码基因全长 3 677 bp,包含 2 个内含子和 3 个外显子,CDS 全长 3 228 bp。SsKapJ

蛋白由 1 075 个氨基酸组成,包含 1 个 N 端 β 核输入结构域(importin-beta N-terminal domain)和 3 个 HEAT (huntingtin, elongation factor 3, protein phosphatase 2A and TOR1)重复序列(图 1A),基于保守的 β 核输入结构域推测 SsKapJ 参与底物蛋白核输入过程,多个 HEAT 重复序列可能介导多种蛋白相互作用。

SsKapJ 系统进化树分为两大组,酿酒酵母 *S. cerevisiae* (AJU49744.1)和白色念珠菌 *C. albicans* (KHC85149.1)为一大组;另一大组又有两个分支,SsKapJ 与玉米丝孢堆黑粉菌 *S. reilianum* (CBQ68976.1)、玉米黑粉菌 *U. maydis* (XP_

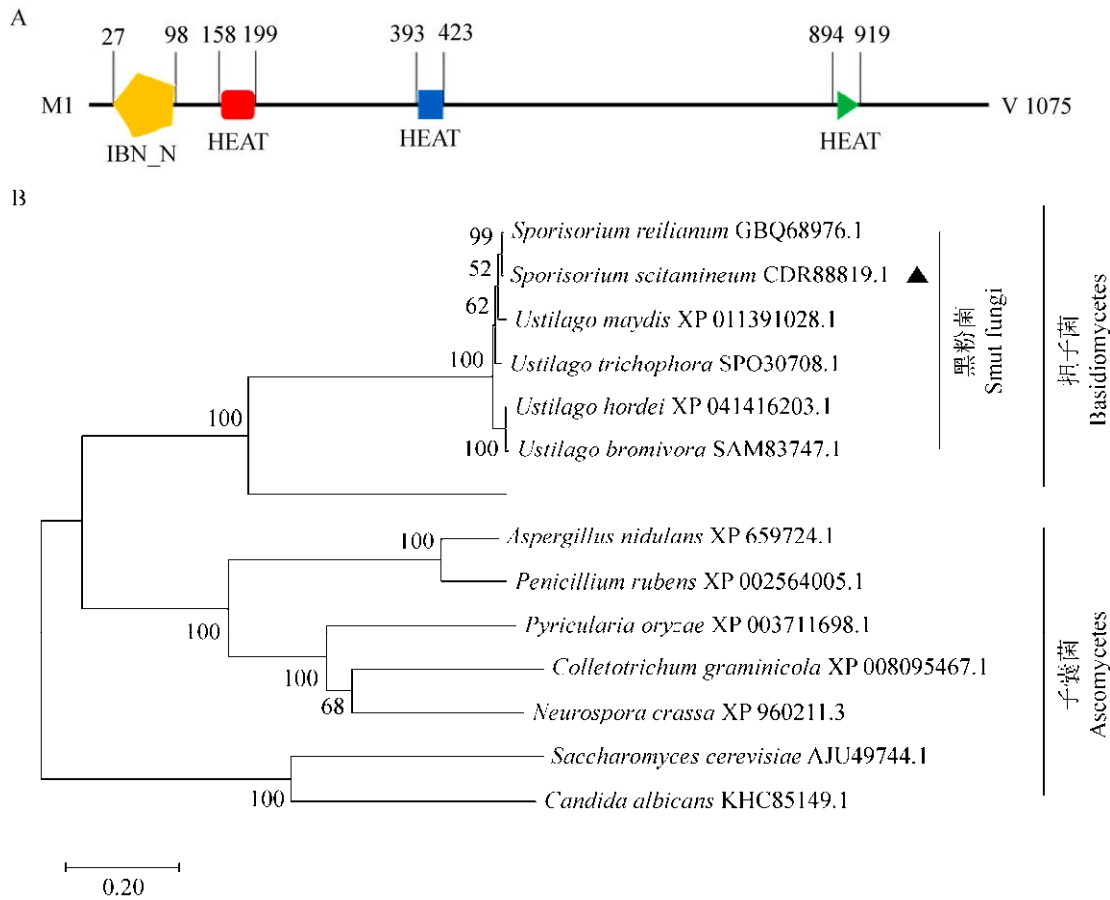


图 1 SsKapJ 蛋白功能域预测和系统进化树 A: 甘蔗鞭孢堆黑粉菌 SsKapJ 蛋白预测的功能结构域; B: 用 MEGA-X 软件 neighbor-joining 方法构建的 SsKapJ 系统进化树
Fig. 1 The SsKapJ protein domain prediction and the phylogenetic tree. A: The predicted functional protein domain of SsKapJ in *Sporisorium scitamineum*; B: The phylogenetic tree of SsKapJ was constructed using MEGA-X based on neighbor-joining method.

011391028.1)以及其他黑粉病蛋白序列为一个分支,另一个分支为以构巢曲霉 *A. nidulans* (XP_659724.1)和稻梨孢菌 *P. oryzae* (XP_003711698.1)为代表的子囊菌(图 1B),说明 *SsKapJ* 序列在黑粉菌中高度保守,而在其他物种中不保守,可能导致不同物种 *KapJ* 的功能不一样。

2.2 *SsKapJ* 影响甘蔗鞭孢堆黑粉菌担孢子生长、有性配合和菌丝生长

为了研究 *SsKapJ* 基因的功能,在 *MAT-1*、*MAT-2* 背景下分别获得了 *SsKapJ* 敲除突变体(图 2A, 2B)。首先通过全自动生长曲线分析仪测定突变体与野生型在 YePS 液体培养基下的生长速率,结果显示 *MAT-1-SsKapJΔ* 和 *MAT-2-SsKapJΔ* 生长速率均显著低于野生型 *MAT-1* 和 *MAT-2*,不同配合型突变体之间生长速率也有一定差别(图 3A),表明 *SsKapJ* 参与甘蔗鞭孢堆黑粉菌担孢子生长发育调控。

为了比较 *SsKapJ* 突变体与野生型 *MAT-1*、

MAT-2 的有性配合和菌丝生长能力,将对应配合型菌液混合后接种在 PDA 培养基上,培养 3 d 后,结果显示 *MAT-1-SsKapJΔ*×*MAT-2-SsKapJΔ* 与野生型 *MAT-1*×*MAT-2* 的有性配合和菌丝生长差异显著,突变体有性配合能力明显减弱,菌落菌丝变短。而 *MAT-1-SsKapJΔ*×*MAT-2* 和 *MAT-1*×*MAT-2-SsKapJΔ* 与野生型 *MAT-1*×*MAT-2* 相比有性配合和菌丝生长能力也有一定程度降低(图 3B)。进而在显微镜下观察野生型 *MAT-1*×*MAT-2* 和突变体 *MAT-1-SsKapJΔ*×*MAT-2-SsKapJΔ* 之间的配合与菌丝生长情况,发现野生型 *MAT-1*×*MAT-2* 配合产生大量长菌丝,而突变体 *MAT-1-SsKapJΔ*×*MAT-2-SsKapJΔ* 担孢子混合培养后,产生的菌丝之间夹杂大量未配合的担孢子(图 3C),这一结果证实突变体的配合缺陷是造成其菌落菌丝比野生型短的主要原因,而不是由于担孢子生长缓慢间接造成的。综上,*SsKapJ* 参与调节甘蔗鞭孢堆黑粉菌有性配合和菌丝生长。

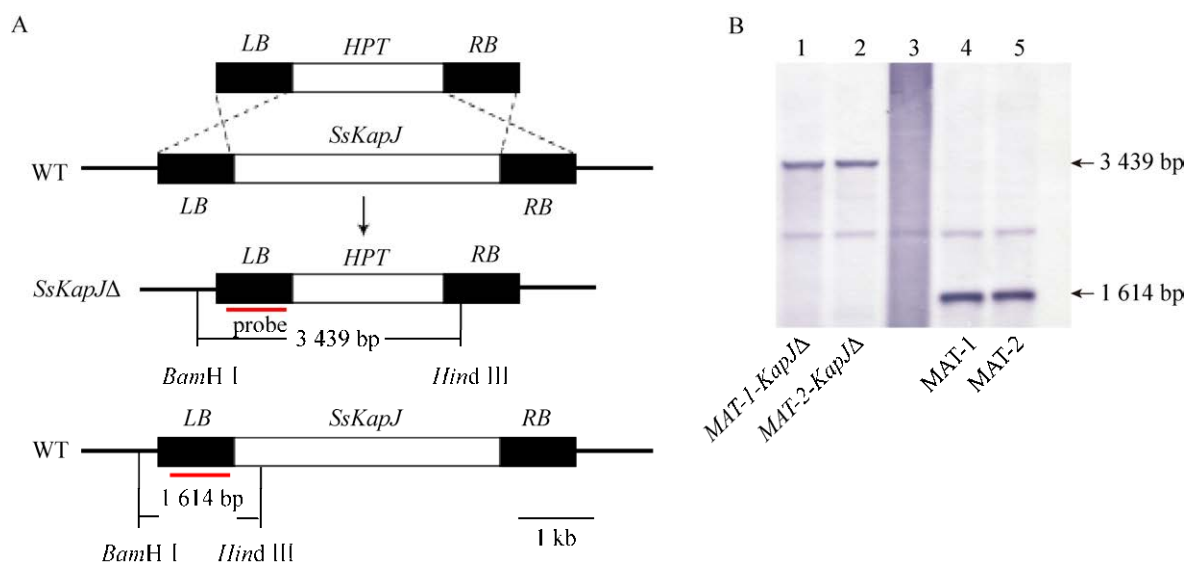


图2 同源重组敲除 *SsKapJ* 设计示意图及 Southern blot 设计验证 A: 同源重组敲除 *SsKapJ* 及 Southern blot 探针设计原理; B: *SsKapJ* 敲除突变体 Southern blot 验证; 1: *MAT-1-KapJΔ*; 2: *MAT-2-KapJΔ*; 3: *MAT-2-KapJΔ* (No test result); 4: *MAT-1*; 5: *MAT-2*

Fig. 2 Schematic map design for homologous recombination knockout *SsKapJ* and Southern blot of *SsKapJ*. A: Design principle of homologous recombination knockout *SsKapJ* and Southern blot probes; B: Southern blot of *SsKapJ* deletion mutants. 1: *MAT-1-KapJΔ*; 2: *MAT-2-KapJΔ*; 3: *MAT-2-KapJΔ* (No test result); 4: *MAT-1*; 5: *MAT-2*.

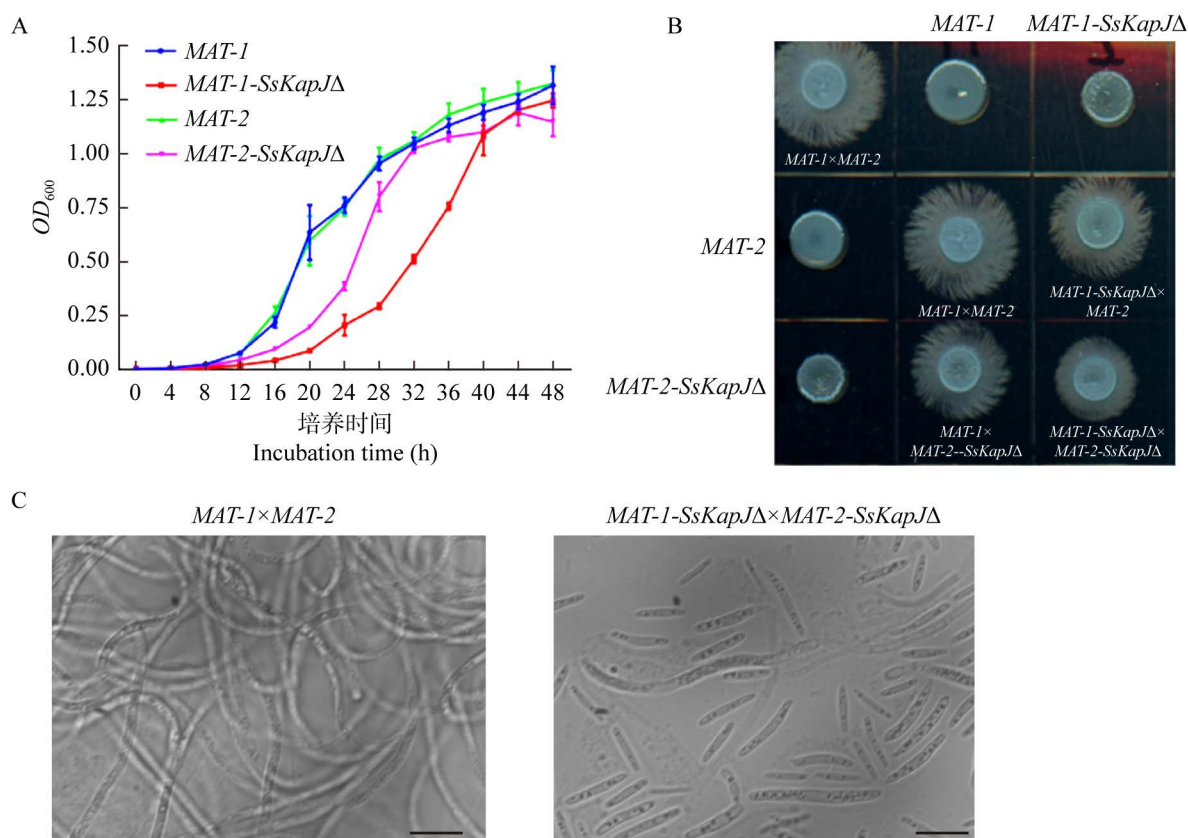


图 3 *SsKapJ* 影响甘蔗鞭孢堆黑粉菌担孢子生长和有性配合 A: 野生型 *MAT-1*、*MAT-2* 和突变体 *MAT-1-SsKapJΔ*、*MAT-2-SsKapJΔ* 担孢子的生长速率; B: 在 PDA 培养基上测定野生型和突变体的有性配合和菌丝生长; C: 显微观察野生型与突变体的有性配合和菌丝生长, 标尺=10 μm

Fig. 3 The *SsKapJ* regulates *Sporisorium scitamineum* sporidial growth and mating. A: Sporidial growth on wild-type *MAT-1*, *MAT-2* and *MAT-1-SsKapJΔ*, *MAT-2-SsKapJΔ* mutant; B: Mating and filamentation of WT and mutant was assessed on PDA medium; C: Microscopic observation of mating between wild-type or *SsKapJΔ* sporidia of opposite mating-type, and the formation of dikaryotic hyphae. Scale bars=10 μm.

2.3 *SsKapJ* 突变体对外界环境胁迫敏感性测定

为了测定 *SsKapJ* 突变体对外界环境胁迫耐受性, 将突变体 *MAT-1-SsKapJΔ*、*MAT-2-SsKapJΔ* 和野生型 *MAT-1*、*MAT-2* 的担孢子连续稀释后分别接种到含有不同浓度的氯化钠、山梨醇、十二烷基硫酸钠、刚果红、过氧化氢和乙醇的 PDA 培养基中, 培养 3 d 后, 观察突变体和野生型担孢子生长情况。结果显示, *SsKapJ* 基因敲除突变体在渗透压胁迫(氯化钠和山梨醇)、细胞壁抑制剂胁迫(SDS 和刚果红)、氧化还原胁迫(过氧化氢)和乙醇胁迫条件下, 担孢子生长情况与野生型相

差不多(图 4), 说明 *SsKapJ* 没有参与甘蔗鞭孢堆黑粉菌对外界胁迫的应答过程。

2.4 转录组测序分析 *SsKapJ* 有性配合基因表达差异

为了从全基因组转录水平分析 *SsKapJ* 基因在有性配合中发挥的作用, 将突变体 *MAT-1-SsKapJΔ* 和 *MAT-2-SsKapJΔ* 有性配合 1 d 后进行转录组测序分析, 以相同条件的野生型 *MAT-1* 和 *MAT-2* 配合为对照。结果显示, *SsKapJ* 突变体与野生型比较共有 1 355 个基因表达差异, 上调表达的基因有 478 个, 下调表达的基因有 877 个(图 5A)。对差异基因进行 GO 功能注释, 发现差异表达基

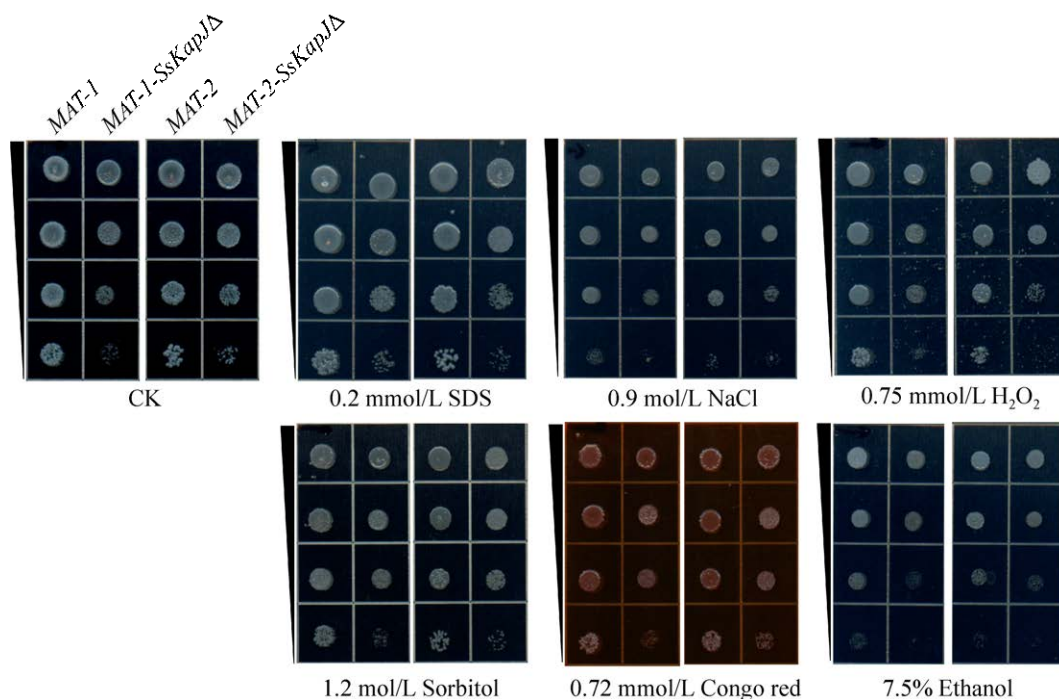


图 4 野生型和 *SsKapJ* 突变体的胁迫耐受性比较 连续稀释后的野生型 *MAT-1*、*MAT-2* 和突变体 *MAT-1-SsKapJΔ*、*MAT-2-SsKapJΔ*担孢子分别接种在含有 0.2 mmol/L SDS、0.9 mol/L NaCl、0.75 mmol/L H_2O_2 、1.2 mol/L 山梨醇、0.72 mmol/L 刚果红和 7.5%乙醇的 PDA 培养基上

Fig. 4 Comparison of tolerance toward stressful conditions between WT and *SsKapJ* mutant. Serially diluted haploid sporidia of *MAT-1*, *MAT-2* (WT) or *MAT-1-SsKapJΔ*, *MAT-2-SsKapJΔ* mutant were spotted onto PDA medium supplemented with SDS (0.2 mmol/L), NaCl (0.9 mol/L), H_2O_2 (0.75 mmol/L), sorbitol (1.2 mol/L), Congo red (0.72 mmol/L) and ethanol (7.5%).

因在生物学过程分布最多，主要集中在代谢过程 (metabolic process)、单组织生物过程 (single-organism process) 和细胞过程 (cellular process) 等类别 (图 5B)。在 14 种核转运蛋白基因表达量中，只有 *KapD* 和 *KapF* 显著上调 (图 5C) (Markina-Iñarrairaegui *et al.* 2011)。在 cAMP/PKA 和 MAPK 通路中，除 *Rak1* 基因上调表达外 (Wang *et al.* 2011)，通路上游有表达量差异的基因都是下调表达，交配型基因 a 位点的 *Pra* 基因、b 位点的 *bE* 和 *bW* 基因、*Prf1*、*Kpp2* 和 *Kpp6* 等基因表达下调 2 倍以上 (图 5D) (Eliás-Villalobos *et al.* 2011; Kijpornyongpan & Aime 2020)；通路下游差异基因中，*Rbf1* 基因表达下调最多 (Heimel *et al.* 2010)，下调 2^6 倍 (图 5E)。KEGG 富集表明，在 *MAT-1-SsKapJΔ*×*MAT-2-SsKapJΔ* 条件下，涉及有

性配合与菌丝生长的 MAPK 信号通路较野生型显著下调 (图 6)。转录组测序分析结果揭示 *SsKapJ* 可能通过调控 cAMP/PKA 和 MAPK 通路中关键信号传导蛋白入核及其下游基因的表达从而调控甘蔗鞭孢堆黑粉菌有性配合和菌丝生长。

2.5 两种杀真菌剂对 *SsKapJ* 突变体的影响

为了比较杀真菌剂对 *SsKapJ* 突变体与野生型 *MAT-1*、*MAT-2* 的影响，将 *SsKapJ* 突变体与野生型的担孢子以及 *MAT-1-SsKapJΔ*×*MAT-2-SsKapJΔ* 和 *MAT-1*×*MAT-2* 接种到含有不同浓度苯菌灵和吡唑醚菌酯的 PDA 平板中，测定 *SsKapJ* 突变体与野生型对杀真菌剂敏感性。结果显示，随着苯菌灵浓度增加，*SsKapJ* 突变体担孢子和有性配合和菌丝生长与野生型变化差异不明显；

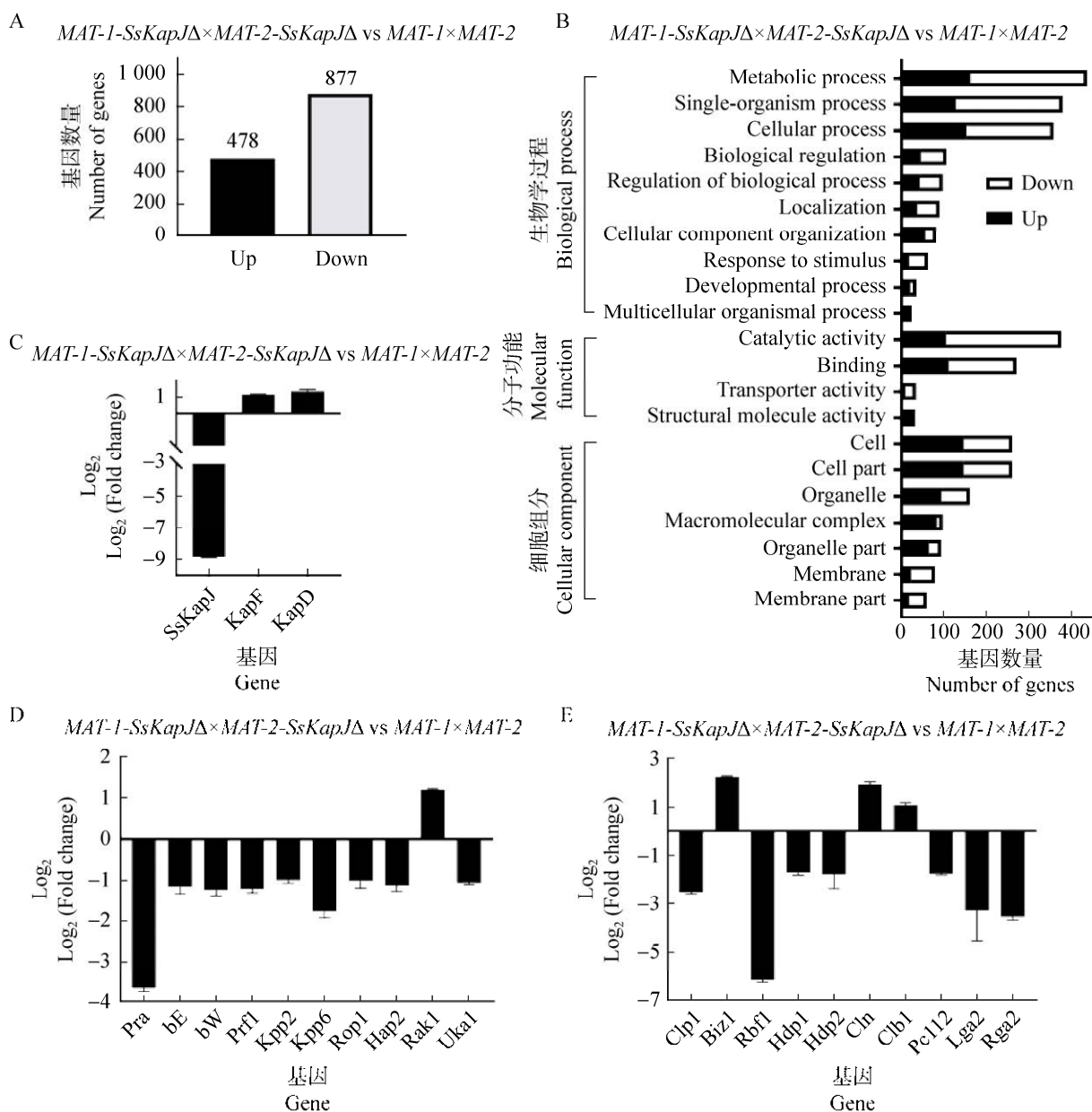


图5 转录组 *MAT-1-SsKapJΔ×MAT-2-SsKapJΔ*和 *MAT-1×MAT-2*的差异基因表达谱(差异倍数的 Log₂ 值>1)
A: *MAT-1-SsKapJΔ×MAT-2-SsKapJΔ*和 *MAT-1×MAT-2* 相比的差异基因数量; B: 差异基因 GO 类别柱状图;
C: *MAT-1-SsKapJΔ×MAT-2-SsKapJΔ*和 *MAT-1×MAT-2* 相比的核转运蛋白差异基因分析; D: *MAT-1-SsKapJΔ×MAT-2-SsKapJΔ*和 *MAT-1×MAT-2* 相比的上游差异基因分析; E: *MAT-1-SsKapJΔ×MAT-2-SsKapJΔ*和 *MAT-1×MAT-2* 相比的下游差异基因分析

Fig. 5 Differential gene expression profiles between *MAT-1-SsKapJΔ×MAT-2-SsKapJΔ* and *MAT-1×MAT-2* as measured by RNA-Seq (Log₂ fold-change>1). A: A number of genes up-regulated and down-regulated in *MAT-1-SsKapJΔ×MAT-2-SsKapJΔ* compared with *MAT-1×MAT-2*; B: The GO classification of DEGs; C: Analysis of the karyopherins genes that showed differential expression in *MAT-1-SsKapJΔ×MAT-2-SsKapJΔ* compared with the *MAT-1×MAT-2*; D: Analysis of the up-stream genes that showed differential expression in *MAT-1-SsKapJΔ×MAT-2-SsKapJΔ* compared with the *MAT-1×MAT-2*; E: Analysis of the down-stream genes that showed differential expression in *MAT-1-SsKapJΔ×MAT-2-SsKapJΔ* compared with the *MAT-1×MAT-2*.



而随着吡唑醚菌酯浓度增加, *SsKapJ* 突变体担孢子敏感性增加, *MAT-1-SsKapJΔ*×*MAT-2-SsKapJΔ* 相比于野生型 *MAT-1*×*MAT-2* 有性配合没有长气生菌丝, 说明 *SsKapJ* 与吡唑醚菌酯的作用机理存在一定联系(图 7)。

甘蔗黑穗病是我国大陆甘蔗生产威胁最大的病害之一,研究有性配合和菌丝生长致病机制有助于从开发黑穗病防控新靶标。

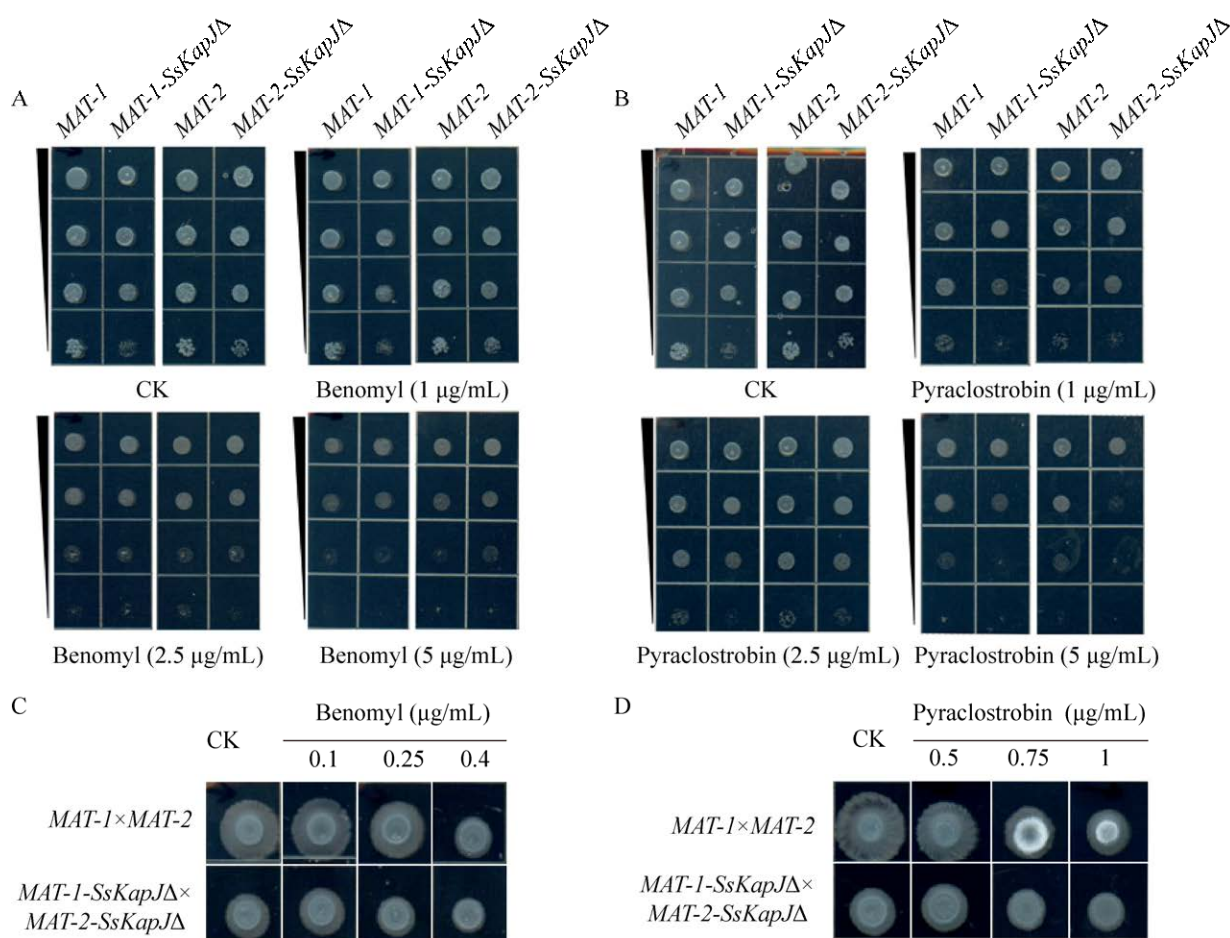


图7 *SsKapJ* 突变体和野生型杀真菌剂敏感性比较 A: *MAT-1-SsKapJΔ*、*MAT-2-SsKapJΔ*、*MAT-1* 和 *MAT-2* 担孢子在含有不同浓度苯菌灵的 PDA 培养基中的生长情况; B: *MAT-1-SsKapJΔ*、*MAT-2-SsKapJΔ*、*MAT-1* 和 *MAT-2* 担孢子在含有不同浓度吡唑醚菌酯的 PDA 培养基中的生长情况; C: 在含有不同浓度苯菌灵的 PDA 培养基中, 测定野生型和 *SsKapJ* 突变体的有性配合和菌丝生长能力; D: 在含有不同浓度吡唑醚菌酯的 PDA 培养基中, 测定野生型和 *SsKapJ* 突变体的有性配合和菌丝生长能力

Fig. 7 Comparison of sensitivity to fungicides between *SsKapJ* mutant and WT. A: Haploid sporidial growth of *MAT-1-SsKapJΔ*, *MAT-2-SsKapJΔ*, *MAT-1* and *MAT-2* on PDA medium supplemented with benomyl of different concentrations; B: Haploid sporidial growth of *MAT-1-SsKapJΔ*, *MAT-2-SsKapJΔ*, *MAT-1* and *MAT-2* on PDA medium supplemented with pyraclostrobin of different concentrations; C: Mating/filamentation of WT and *SsKapJ* mutant was assessed on PDA medium supplemented with benomyl of different concentrations; D: Mating/filamentation of WT and *SsKapJ* mutant was assessed on PDA medium supplemented with pyraclostrobin of different concentrations.

本研究表明 *SsKapJ* 核转运蛋白参与调控甘蔗鞭孢堆黑粉菌有性配合和菌丝生长的基因表达, 结合 *SsKapJ* 含有的核输入结构域, 进一步明确有性配合和菌丝生长存在核转运蛋白协助的入核调控途径。Baccarini *et al.* (2015)在酿酒酵母中发现当 cAMP/PKA 途径被激活时,

cAMP 结合 PKA 的调节亚基后, PKA 不同的催化亚基识别对应的核转运蛋白入核, 激活下游基因表达。而 *SsKapJ* 突变体有性配合转录组分析 cAMP/PKA 途径中, PKA 中 *Uka1* 亚基表达量有显著差异(图 5D), 因此推测甘蔗鞭孢堆黑粉菌 PKA 的 *Uka1* 亚基通过 *SsKapJ* 核转运蛋白进入细

胞核从而调控下游基因表达,但两者具体互作机制有待进一步验证。*Rbfl* 是 b 位点全局调控基因,亚细胞定位在细胞核,编码锌指蛋白转录因子,通过 *Kpp6*、*Biz1* 和 *Hdp1* 调控菌丝生长、生长周期停滞和致病性(Heimel *et al.* 2010)。在 *SsKapJ* 和野生型的转录组测序分析中, *Rbfl* 基因表达显著下调 2⁶ 倍,并且与之相关的 *Kpp6*、*Biz1* 和 *Hdp1* 基因表达也有显著差异(图 5D, 5E),因此推测甘蔗鞭孢堆黑粉菌 *SsKapJ* 与 *Rbfl* 可能存在一定互作机制,将来可进一步验证 *SsKapJ* 在有性配合和菌丝生长和致病性中发挥的调控作用。

酿酒酵母中 14 种 β 超家族核转运蛋白运输特异底物进出核,同一种底物可以被多种核转运蛋白识别, *Kap123* 基因缺失下, *Kap121*、*Kap108* 和 *Kap119* 可以补偿核质运输所需,因此核转运蛋白会因功能补偿出现功能冗余(Fiserova & Goldberg 2010)。从 *SsKapJ* 和野生型的转录组测序分析结果得知,在 *SsKapJ* 基因缺失下,只有 *KapD* 和 *KapF* 两种核转运蛋白基因显著上调,它们都是负责核输入的核转运蛋白(图 5C) (Markina-Iñarrairaegui *et al.* 2011)。而从实验结果得知 *SsKapJ* 突变体有性配合和菌丝生长比野生型弱,并不是完全缺失有性配合的能力(图 3B),可能是 *SsKapJ* 基因缺失后,通过上调 *KapD* 和 *KapF* 基因表达来维持 *SsKapJ* 运输底物入核调控下游基因表达的需要。

酿酒酵母的 *Kap123* 突变体被证实对苯菌灵更敏感,主要原因是添加苯菌灵去稳定剂后, *Kap123* 突变体不能保持微管稳定,有丝分裂过程中核分裂更易受阻,核酸物质比野生型更难合成(Ptak *et al.* 2009)。酿酒酵母 *Kap123* 与 *SsKapJ* 具有相同的 N 端 β 核输入蛋白结构域,因此推测 *SsKapJ* 与 *Kap123* 对苯菌灵具有相似效果。但实验结果显示, *SsKapJ* 突变体与野生型相比,担孢子生长和有性配合能力在苯菌灵作用下均无明显差异(图 7A, 7C)。酿酒酵母 *Kap123* 与 *SsKapJ*

虽然存在同源结构域,但蛋白功能不同,可能不是由同源的结构域引起 *Kap123* 微管维稳缺失,而是 *Kap123* 其他功能结构域发挥的作用。从 *SsKapJ* 系统进化树可知,酿酒酵母的同源蛋白 AJU49744.1 (*Kap123*)属于 *SsKapJ* 进化树的另一大分支, *Kap123* 与 *SsKapJ* 可能存在一定的功能差异(图 1B)。

吡唑醚菌酯能抑制甘蔗鞭孢堆黑粉菌冬孢子萌发、担孢子增殖和菌丝生长,其作用机制为阻断细胞色素电子传递链抑制线粒体呼吸作用,使线粒体无法保证黑粉菌正常代谢所需能量(朱桂宁等 2014; 刘景坤等 2017),结合突变体对吡唑醚菌酯更敏感的结果, *SsKapJ* 可能影响线粒体呼吸过程。在有性配合和菌丝生长测定中,野生型形成气生菌丝, *SsKapJ* 没有形成气生菌丝,野生型可能通过形成气生菌丝的方法减少吡唑醚菌酯的影响。研究表明,线粒体的 *Lga2* 和 *Rga2* 受 *Kpp2*、*Kpp6* 和 *Prf1* 调控,线粒体参与有性配合的菌丝生长(Kretschmer *et al.* 2018)。而 *SsKapJ* 转录组测序结果显示 *Lga2*、*Rga2*、*Kpp2*、*Kpp6* 和 *Prf1* 表达量都有显著差异(图 5D, 5E),因此 *SsKapJ*、有性配合/菌丝生长和线粒体三者之间存在一定的联系,可能由于 *SsKapJ* 突变体中 MAPK 通路相关基因下调表达,导致线粒体功能活性降低,进而影响有性配合菌丝生长。

SsKapJ 作为甘蔗鞭孢堆黑粉菌入核转运蛋白,在有性配合和菌丝生长核质运输中发挥重要作用,但 *SsKapJ* 识别互作蛋白并调控其核运输的机制,以及 *SsKapJ* 介导的蛋白入核运输如何调控甘蔗鞭孢堆黑粉菌的生命活动,还需进一步研究阐明。

[REFERENCES]

- An S, Yoon J, Kim H, Song JJ, Cho U, 2017. Structure-based nuclear import mechanism of histones H3 and H4 mediated by Kap123. *eLife*, 6: e30244
- Baccarini L, Martínez-Montañés F, Rossi S, Proft M, Portela

- P, 2015. PKA-chromatin association at stress responsive target genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1849(11): 1329-1339
- Cai EP, Li LY, Deng YZ, Sun SQ, Jia H, Wu RR, Zhang LH, Jiang ZD, Chang CQ, 2021. MAP kinase Hog1 mediates a cytochrome P450 oxidoreductase to promote the *Sporisorium scitamineum* cell survival under oxidative stress. *Environmental Microbiology*, 23: 3306-3317
- Cai EP, Mei D, Zhang XM, Sun X, Li LY, Wu RR, Deng YZ, Jiang ZD, Chang CQ, 2020. A gene knockout method based on protoplast transformation with two PCR fragments in *Sporisorium scitamineum*. *Mycosystema*, 39(12): 2314-2327 (in Chinese)
- Chang CQ, Cai EP, Deng YZ, Mei D, Qiu SX, Chen BS, Zhang LH, Jiang ZD, 2019. cAMP/PKA signalling pathway regulates redox homeostasis essential for *Sporisorium scitamineum* mating/filamentation and virulence. *Environmental Microbiology*, 21(3): 959-971
- Chen SF, Zhou YQ, Chen YR, Gu J, 2018. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17): i884-i890
- Deng YZ, Zhang B, Chang CQ, Wang YX, Lu S, Sun SQ, Zhang XM, Chen BS, Jiang ZD, 2018. The MAP kinase SsKpp2 is required for mating/filamentation in *Sporisorium scitamineum*. *Frontiers in Microbiology*, 9: 2555
- Eliás-Villalobos A, Fernández-álvarez A, Ibeas JI, Tyler B, 2011. The general transcriptional repressor Tup1 is required for dimorphism and virulence in a fungal plant pathogen. *PLoS Pathogens*, 7(9): e1002235
- Fiserova J, Goldberg MW, 2010. Nucleocytoplasmic transport in yeast: a few roles for many actors. *Biochemical Society Transactions*, 38(1): 273-277
- Heimel K, Scherer M, Vranes M, Wahl R, Pothiratana C, Schuler D, Vincon V, Finkernagel F, Flor-Parra I, Kamper J, 2010. The transcription factor Rbfl is the master regulator for b-mating type controlled pathogenic development in *Ustilago maydis*. *PLoS Pathogens*, 6(8): e1001035
- Kijpornyongpan T, Aime MC, 2020. Investigating the smuts: common cues, signaling pathways, and the role of MAT in dimorphic switching and pathogenesis. *Journal of Fungi*, 6(4): 368
- Kretschmer M, Lambie S, Croll D, Kronstad JW, 2018. Acetate provokes mitochondrial stress and cell death in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 107(4): 488-507
- Liao CC, Shankar S, Pi WC, Chang CC, Ahmed GR, Chen WY, Hsia KC, 2020. Karyopherin Kap114p-mediated trans-repression controls ribosomal gene expression under saline stress. *Embo Reports*, 21(7): e48324
- Liu JK, Jia MM, Wu CY, Deng X, Zou YK, Li Y, Li QF, 2017. The degradation dynamics of three types of common fungicides in sugarcane leaves composting. *Chinese Journal of Tropical Crops*, 38(1): 131-135 (in Chinese)
- Markina-Iñarrairaegui A, Etchebeste O, Herrero-García E, Araújo-Bazán L, Fernández-Martínez J, Flores JA, Osmani SA, Espeso EA, 2011. Nuclear transporters in a multinucleated organism: functional and localization analyses in *Aspergillus nidulans*. *Molecular Biology of the Cell*, 22(20): 3874-3886
- Martinez-Bono B, Quilis I, Zalve E, Igual JC, 2010. Yeast karyopherins Kap123 and Kap95 are related to the function of the cell integrity pathway. *FEMS Yeast Research*, 10(1): 28-37
- Oka M, Yoneda Y, 2018. Importin α : functions as a nuclear transport factor and beyond. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 94(7): 259-274
- Ptak C, Anderson AM, Scott RJ, Van de Vosse D, Rogers RS, Sydorsky Y, Aitchison JD, Wozniak RW, 2009. A role for the karyopherin Kap123p in microtubule stability. *Traffic*, 10(11): 1619-1634
- Sydorsky Y, Dilworth DJ, Yi EC, Goodlett DR, Wozniak RW, Aitchison JD, 2003. Intersection of the Kap123p-mediated nuclear import and ribosome export pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 23(6): 2042-2054
- Wang L, Berndt P, Xia X, Kahnt J, Kahmann R, 2011. A seven-WD40 protein related to human RACK1 regulates mating and virulence in *Ustilago maydis*. *Molecular Microbiology*, 81(6): 1484-1498
- Wang YX, Deng YZ, Cui GB, Huang CW, Zhang B, Chang CQ, Jiang ZD, Zhang LH, 2019. The AGC kinase SsAgc1 regulates *Sporisorium scitamineum* mating/filamentation and pathogenicity. *mSphere*, 4(3): e219-e259
- Wei JJ, Song XP, Wei CY, Zhang XQ, Huang WH, Yan MX, 2019. Research progress on sugarcane smut and its control. *Guangdong Agricultural Sciences*, 46(4): 81-88 (in Chinese)
- Yan MX, Zhu GN, Lin SY, Xian XY, Chang CQ, Xi PG, Shen WK, Huang WH, Cai EP, Jiang ZD, Deng YZ, Zhang LH, 2016. The mating-type locus b of the sugarcane smut *Sporisorium scitamineum* is essential for mating, filamentous growth and pathogenicity. *Fungal Genetics and Biology*, 86: 1-8
- Yu J, Hamari Z, Han K, Seo J, Reyes-Domínguez Y, Scazzocchio C, 2004. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous

- fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 41(11): 973-981
- Zhang SL, Lin CX, Zhou T, Zhang LH, Deng YZ, 2020. Karyopherin MoKap119-mediated nuclear import of cyclin-dependent kinase regulator MoCks1 is essential for *Magnaporthe oryzae* pathogenicity. *Cellular Microbiology*, 22(1): e13114
- Zhang ZX, Yan L, 2019. Integrated control of sugarcane diseases. *New Rural Technology*, 2019(2): 21-23 (in Chinese)
- Zhu GN, Lin SY, Xian XY, Yan MX, Huang FX, Qin BX, 2014. Bioactivities of eight fungicides against *Sporisorium scitaminea*. *Journal of Southern Agriculture*, 45(6): 989-994 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 蔡恩平, 梅丹, 张小萌, 孙贤, 李玲玉, 吴熔熔, 邓懿祯, 姜子德, 常长青, 2020. 甘蔗鞭孢堆黑粉菌原生质体转化 DNA 双片段的基因敲除方法的建立. *菌物学报*, 40(12): 2314-2327
- 刘景坤, 贾明明, 武春媛, 邓晓, 邹雨坤, 李怡, 李勤奋, 2017. 甘蔗叶堆肥中 3 种常用杀菌剂的降解动态研究. *热带作物学报*, 38(1): 131-135
- 韦金菊, 宋修鹏, 魏春燕, 张小秋, 黄伟华, 颜梅新, 2019. 甘蔗黑穗病及其防治研究进展. *广东农业科学*, 46(4): 81-88
- 张志新, 岩伦, 2019. 甘蔗病害的综合防治. *农村新技术*, 2019(2): 21-23
- 朱桂宁, 林珊宇, 贤小勇, 颜梅新, 黄福新, 秦碧霞, 2014. 8 种杀菌剂对甘蔗黑穗病菌的室内毒力测定. *南方农业学报*, 45(6): 989-994