

# 自噬蛋白 CfAtg7 在果生刺盘孢中的功能

陈妍, 王伊玲, 罗晶, 张盛培\*

中南林业科技大学 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 木本油料资源利用全国重点实验室, 湖南 长沙 410004

**摘要:** 油茶炭疽病广泛发生于全国各大油茶产区, 严重危害油茶产量和品质, 果生刺盘孢 *Colletotrichum fructicola* 是其优势致病菌, 解析该病菌的致病机制是防治油茶炭疽病的基础。真核生物的细胞自噬是一种保守的胞内降解途径, 是降解大分子蛋白与各受损细胞器的主要途径。Atg7 作为自噬核心蛋白, 在很多植物病原真菌中发挥着重要功能。然而, 目前暂不清楚 Atg7 在果生刺盘孢中发挥的生物学功能。本实验构建了 *CfATG7* 基因敲除突变体  $\Delta Cfatg7$  及其互补菌株  $\Delta Cfatg7/CfATG7$ , 并对其进行了生物学表型及致病力测定。研究结果表明 *CfAtg7* 参与调控油茶果生刺盘孢的细胞自噬、营养生长、分生孢子和附着胞形成, 也参与对内质网压力胁迫、细胞壁完整性胁迫以及氧化胁迫的应答, 揭示了自噬相关蛋白 *CfAtg7* 在果生刺盘孢中所发挥的多效作用。本研究阐明了 *CfAtg7* 在果生刺盘孢中的生物学功能, 为以该蛋白为靶标的新型杀菌剂的开发提供了实验依据。

**关键词:** 油茶; 果生刺盘孢; 自噬相关蛋白; *CfAtg7*

## [引用本文]

陈妍, 王伊玲, 罗晶, 张盛培, 2026. 自噬蛋白 *CfAtg7* 在果生刺盘孢中的功能. 菌物学报, 45(3): 250178

Chen Y, Wang YL, Luo J, Zhang SP, 2026. Functions of autophagy protein *CfAtg7* in *Colletotrichum fructicola*. *Mycosystema*, 45(3): 250178

## Functions of autophagy protein *CfAtg7* in *Colletotrichum fructicola*

CHEN Yan, WANG Yiling, LUO Jing, ZHANG Shengpei\*

Key Laboratory of Forest Bio-Resources and Integrated Pest Management for Higher Education in Hunan Province, State Key Laboratory of Utilization of Woody Oil Resource, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004, Hunan, China

**Abstract:** Anthracnose is prevalent in major oil-tea production regions across the country, severely compromising yield and quality of oil-tea *Camellia oleifera*. *Colletotrichum fructicola* is the dominant

资助项目: 湖南省自然科学基金(2023JJ20100); 国家自然科学基金(32001317); 国家重点研发计划(2023YFD1401301)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2023JJ20100), the National Natural Science Foundation of China (32001317), and The National Key Research & Development Program of China (2023YFD1401301).

\*Corresponding author. E-mail: zsp@csuft.edu.cn

Received: 2025-06-10; Accepted: 2025-08-07

pathogenic fungus responsible for this disease, and understanding its pathogenic mechanisms is fundamental for controlling *Ca. oleifera* anthracnose. In eukaryotes, autophagy is a conserved intracellular degradation pathway and serves as the primary route for degrading macromolecular proteins and damaged organelles. Atg7, a core autophagy protein, plays crucial roles in many plant-pathogenic fungi. However, its biological functions in *Co. fructicola* remains unclear. In this study, the *CfATG7* gene knockout mutant  $\Delta Cfatg7$  and its complementary strain  $\Delta Cfatg7/CfATG7$  were constructed, and their phenotype and pathogenicity were assayed. The results demonstrate that CfAtg7 is involved in regulating autophagy, vegetative growth, conidiation, and appressorium formation. It also participates in the responses to endoplasmic reticulum stress, cell wall integrity stress, and oxidative stress, revealing the pleiotropic roles of the autophagy protein CfAtg7 in *Co. fructicola*. This study elucidated the biological functions of CfAtg7 in *Co. fructicola*, providing experimental evidence for the development of novel fungicides targeting this protein.

**Keywords:** *Camellia oleifera*; *Colletotrichum fructicola*; autophagy-related protein; CfAtg7

油茶 *Camellia oleifera* 是我国优质的经济木本食用油料树种,其果实油茶籽经压榨可制成营养价值高且耐贮藏的茶油,具有巨大的生产潜力(谭晓风 2023)。油茶产业的不断扩大为我国粮食安全、乡村振兴和国际竞争提供保障,是国家政策重点扶持的产业之一(邓海艳和陶丽萍 2023)。

油茶炭疽病是油茶最主要的病害之一,导致油茶严重减产,造成巨大经济损失。该病害的主要病原菌有果生刺盘孢 *Colletotrichum fructicola* Prihast., L. Cai & K.D. Hyde、盘长孢状刺盘孢 *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.、暹罗刺盘孢 *Colletotrichum siamense* Prihast., L. Cai & K.D. Hyde、山茶刺盘孢 *Colletotrichum camelliae* Masee 和卡斯特刺盘孢 *Colletotrichum karsti* You L. Yang, Zuo Y. Liu, K.D. Hyde & L. Cai 等,其中果生刺盘孢是其优势致病菌(李河等 2016)。课题组前期对果生刺盘孢的致病机制开展了持续研究,但其致病分子机制仍不十分清楚。阐明该病菌致病的分子机理,可为研发绿色新型杀菌剂提供更多新的药物靶标。

果生刺盘孢与寄主接触初期处于营养匮乏状态,丝状病原真菌在营养匮乏阶段可以通过细胞自噬(autophagy)回收利用被降解的营养物质以维持能量来源,平衡细胞稳态,从而使自身新陈代谢处于正常水平(叶青和郑民华 2007; Mizushima & Komatsu 2011)。细胞自噬是真核生物的一种高度保守的胞内降解途径,具有维持胞内生理平衡及抵抗逆境的重要作用(Naqvi *et al.* 2012)。细胞自噬过

程复杂,其中自噬小体的形成尤为重要。Atg8-磷脂酰乙醇胺(phosphatidylethanolamine, PE)功能组和 Atg5-Atg12 复合体功能组是自噬小体形成的 2 个主要偶联系统(Kuma *et al.* 2007; Liu *et al.* 2010)。自噬关键蛋白 Atg7 属于一种 E1 类泛素激活酶,负责类泛素化分子的激活与转移,可同时促进上述 2 个偶联系统的形成,从而启动细胞自噬(Collier *et al.* 2021; Yao *et al.* 2023)。

作为自噬关键蛋白,Atg7 在许多常见植物病原真菌中发挥重要作用。例如,Atg7 调控灰葡萄孢和禾谷镰孢菌的生长,Atg7 介导的细胞自噬调控稻巨座壳 *Magnaporthe oryzae* 的致病过程(刘小红等 2008; Ren *et al.* 2018; 吕务云 2019)。近年来,本课题组解析了部分自噬相关蛋白调控果生刺盘孢生长、产孢及致病力的机制(郭源等 2021; Chen *et al.* 2023; Guo & Zhang 2024)。但在果生刺盘孢中尚未报道自噬核心蛋白 Atg7 的研究。本试验拟研究 Atg7 的生物学功能,为以该基因及其调控网络为靶标开发新型杀菌剂提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试菌株

野生型菌株(WT) CFLH16 分离自感病的油茶叶片,保存在中南林业科技大学经济林培育与保护教育部重点实验室。酵母转化所需的酵母感受态细胞 XK125 由本实验室保存。大肠杆菌转化所需的感受态大肠杆菌 Treliel™5 $\alpha$  菌株采购自擎科生物公司。

## 1.2 CfAtg7 系统发育分析

依照酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* ScAtg7 的氨基酸序列在果生刺盘孢的基因库中鉴定到其同源蛋白 CfAtg7。在 SMART 网站上传 CfAtg7 的氨基酸序列预测其结构域。同时,使用 Mega7.0 软件中的邻接法(Neighbor-Joining Algorithm)构建 CfAtg7 的系统发育树。

## 1.3 CfATG7 基因敲除突变体的获得

以野生型 DNA 为模板,利用引物 ATG7UF/ATG7UR 和 ATG7DF/ATG7DR 扩增目的基因前后各 1 000 bp。将其与利用引物 Hyg-F/Hyg-R 扩增的 HPH (hygromycin B, 潮霉素 B)抗性基因连接成融合片段,根据 PEG 介导的原生质体转化法将融合片段转入 WT 的原生质体中,原生质体制备参照 Zhang *et al.* (2022)的方法。利用基因内引物 ATG7NBF/ATG7NBR 和臂外引物 ATG7BWF/H855R 对转化子 DNA 进行 PCR 扩增,通过琼脂糖电泳验证 CfATG7 基因敲除突变体  $\Delta$ Cfatg7。本文涉及引物见表 1。

## 1.4 $\Delta$ Cfatg7/CfATG7 回补菌株的获得

回补载体构建方法参照高亚兰等(2020)所述方法。用引物 ATG7NGFP1F/ATG7NGFP1 和 ATG7NGFP3F/ATG7NGFP3R 以 WT 的 DNA 为模板分别扩增得到 ATG7NGFP1 和 ATG7NGFP3 片段。将其与引物 NGFPF/NGFPR 扩增得到 GFP 片段融合后与 pYF11 线性化质粒共转入酵母

XK125 感受态细胞中,在 SD-Trp 培养基上进行筛选得到 ATG7NGFP::CfATG7,并用引物 ATG7NBF/ATG7NGFP3R 进行 PCR 鉴定阳性克隆。提取其质粒转入 Trelief™5 $\alpha$  中,在 LB 培养基筛选。鉴定阳性克隆后测序。随后,将测序无误的质粒转入  $\Delta$ Cfatg7 原生质体中,在添加 Bleomycin 的培养基上培养 2–3 d,初步筛选出候选  $\Delta$ Cfatg7/CfATG7 回补菌株,挑选菌丝在荧光显微镜下观测其荧光强度。

## 1.5 生物学表型测定

### 1.5.1 菌落生长和产孢量测定

切取 WT、 $\Delta$ Cfatg7 和  $\Delta$ Cfatg7/CfATG7 的菌块分别接种于 CM 和 MM 培养基表面,倒置于 28 °C 培养箱中黑暗培养 3 d 后用十字法测量生长直径并对所得数据进行统计分析,试验重复 3 次。将以上相同大小的菌块放入 50 mL 液体 CM 中,并于 28 °C、180 r/min 摇床上培养。滴加 10  $\mu$ L 培养 2–3 d 后的菌液于血球计数板上,分别统计分生孢子数,试验重复 3 次,每个样本至少计数 3 个视野。

### 1.5.2 突变体致病力测定

将以上菌块分别接种于无伤和有伤的离体油茶叶片边缘上以及同一苹果上,在 28 °C 培养箱中密封保湿且黑暗培养一段时间后观察发病情况,试验重复 3 次。拍照记录并用 ImageJ 软件测量病斑大小,制作出柱形统计图。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	引物序列 Sequence (5'→3')
ATG7KOUF	TGGTGCTCGACAAGGTACTGC
ATG7KOUR	TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCCTTGGGCTTTTCGAAAGGTT
ATG7KODF	CAAAGGAATAGAGTAGATGCCGACCGGCTCAGGTTTAGAGTCAAAG
ATG7KODR	AGACGGCGGACAAAGGTGC
Hyg-F	GGCTTGGCTCCAGCTAGTGGAGGT
Hyg-R	CTCTATTCCCTTGCCCTCG
ATG7BWF	CGGGCGAGAAGCCAAAAAT
H855R	GCTGATCTGACCAAGTTGC
ATG7NBF	CTCGCTTCTGTCTCGTTTG
ATG7NBR	CAAGTCCAGGTTGGGTGAAA
ATG7NGFP1F	ACTCACTATAGGGCGAATTGGGTACTCAAATTGGTTCCATTGACGGTATTGATGGTA
ATG7NGFP1R	CCTCGCCCTTGCTCACCATCTTGGGCTTTTCGAAAGGTT
ATG7NGFP3F	GCATGGACGAGCTGTACAAGATGATGGCTGCAATCCAATACGC
ATG7NGFP3R	CACCACCCCGGTGAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACTTAAAGCAGCTCTCCGTCTCC
NGFPF	ATGGTGAGCAAGGGCGAGG
NGFPR	CTTGACAGCTCGTCCATGC

### 1.5.3 附着胞形成率测定

富集培养 3 d 后的分生孢子并调整其浓度至  $1 \times 10^5$  个/mL, 在疏水玻片上于 28 °C 培养箱保湿放置 12 h, 利用光学显微镜观察附着胞的形成情况, 并拍摄附着胞照片。

### 1.5.4 自噬水平的测定

将自噬标记蛋白 GFP-CfAtg8 分别转入野生型和突变体原生质体中标记自噬小体。菌株在液体 CM 中 180 r/min 振荡培养 36 h, 用 ddH<sub>2</sub>O 洗涤后转移至 MM-N 培养基中 28 °C、60–80 r/min 诱导 2–5 h。GFP-CfAtg8 是观察细胞自噬的标记蛋白, 当启动自噬时, GFP-CfAtg8 会从细胞质中逐渐转移至液泡内。因此, 可通过荧光显微镜观察液泡中的绿色荧光, 评价自噬水平。同时, 进入液泡中的 GFP-CfAtg8 会在蛋白酶的作用下发生降解, 由于降解产生的 GFP 蛋白相对耐蛋白酶水解, 因此, 也可通过免疫印迹检测 GFP 的相对含量从而评价自噬水平。

### 1.5.5 突变体应对外界胁迫敏感性的测定

从 WT、 $\Delta Cfatg7$  及  $\Delta Cfatg7/CfATG7$  菌落边缘分别接种至含 25  $\mu\text{mol/L}$  雷帕霉素(rapamycin)、10 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 氧化胁迫剂、0.1% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)和 400  $\mu\text{g/mL}$  刚果红(congo red, CR)细胞壁完整性胁迫剂、7.5 mmol/L 二硫苏糖醇(DL-dithiothreitol, DTT)内质网胁迫剂的 CM 培养基表面, 于 28 °C 倒置黑暗培养 3 d。测量菌落直径并统计分析。

### 1.6 蛋白质提取和免疫印迹分析

使用含蛋白酶抑制剂(0.1 g/mL)的 1 mL RIPA 裂解液裂解细胞, 涡旋振荡混匀后, 将裂解液置于 4 °C 孵育 10 min, 重复 3 次, 随后 12 000 r/min 离心 10 min 去除细胞碎片。收集上清裂解液作为总蛋白样本, 经 SDS-PAGE 分离后, 采用特异性抗体进行 Western blot 检测。

### 1.7 数据分析

数据以均值 $\pm$ 标准差表示, 采用 GraphPad9.0 软件对试验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。显著性水平设定为\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , 差异极显著。所有实验均包含 3 次生物学重复, 且每次生物学重复至少含 3 次技术重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 CfAtg7 系统发育树及结构域分析

构建 CfAtg7 的系统发育树和结构域图, 发现 CfAtg7 由 705 个氨基酸组成, 其氨基酸序列和盘长孢状刺盘孢 *Co. gloeosporioides* 的序列一致性为 98.72%, 同源性较高, 但与酿酒酵母的一致性相对较低(图 1A)。SMART 蛋白质结构域预测显示, CfAtg7 包括 ATG7\_N 结构域、ThiF 结构域和一个低复杂度结构域(图 1B)。这说明 CfAtg7 在丝状真菌中高度保守, 并有保守的 ATG7 结构域与泛素化结构域。

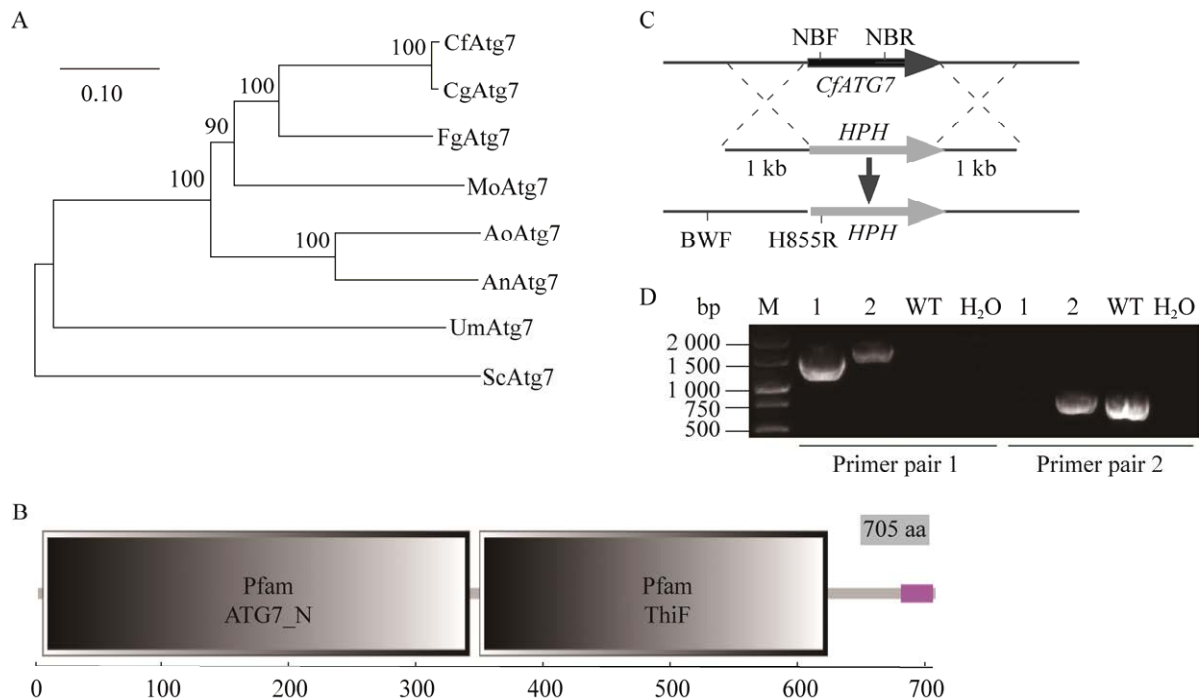
### 2.2 $\Delta Cfatg7$ 及 $\Delta Cfatg7/CfATG7$ 的获得

为了研究 CfAtg7 是否影响果生刺盘孢生物学功能的正常发挥, 利用反向遗传学方法和同源重组原理, 参照 1.3 的方法, 将潮霉素 B 抗性基因 *HPH* 替换 *CfATG7* 编码区, 获得突变体  $\Delta Cfatg7$ , 基因敲除策略见图 1C。参照 1.4 的方法将具有博莱霉素抗性且包含基因自身启动子区域的目的片段回补到  $\Delta Cfatg7$  中, 通过绿色荧光筛选获得回补菌株  $\Delta Cfatg7/CfATG7$ , 并对所得的基因敲除突变体和回补菌株进行电泳验证(图 1)。

### 2.3 CfAtg7 参与调控果生刺盘孢生长和分生孢子形成过程

为了研究 CfAtg7 是否参与调控果生刺盘孢菌丝的营养生长过程, 将菌块接种于 CM 和 MM 培养基。在 CM 培养基上,  $\Delta Cfatg7$  菌落直径仅为(4.68 $\pm$ 0.07) cm, 显著小于野生型的菌落直径(5.50 $\pm$ 0.05) cm。在 MM 培养基上, WT 的菌落直径(4.70 $\pm$ 0.09) cm,  $\Delta Cfatg7$  的菌落直径则只有(3.92 $\pm$ 0.06) cm, 两者具有极显著差异(图 2)。上述结果表明 CfAtg7 参与调控果生刺盘孢菌丝的营养生长过程。

进一步研究 CfAtg7 是否参与调控果生刺盘孢分生孢子的形成。培养 2 d,  $\Delta Cfatg7$  的产孢量为(16 $\pm$ 2) $\times 10^4$  个/mL, 显著小于野生型(78 $\pm$ 5) $\times 10^4$  个/mL 的产孢量(图 2B)。培养 3 d,  $\Delta Cfatg7$  的产孢量为(717 $\pm$ 15) $\times 10^4$  个/mL, 也显著小于野生型(953 $\pm$ 87) $\times 10^4$  个/mL 的产孢量。这表明 CfAtg7 参与调控果生刺盘孢形成无性分生孢子。



**图 1** CfAtg7 结构域预测、系统发育分析和敲除突变体及回补菌株的获得 A: CfAtg7 的系统发育进化树, 氨基酸替代率为 0.10, 数字代表支持率; 物种及其对应的 GenBank 登录号如下: *Co. gloeosporioides* (EQB55638.1)、*Fusarium graminearum* (XP\_011319173.1)、*Magnaporthe oryzae* (XP\_003715525.1)、*Aspergillus oryzae* (KDE85504.1)、*A. nidulans* (XP\_050467950.1)、*Ustilago maydis* (XP\_011391717.1)、*Saccharomyces cerevisiae* (NP\_012041.1); B: CfAtg7 的结构域预测, 灰色区域分别代表 ATG7 和 ThiF 结构域; C: *CfATG7* 基因敲除策略图; D: 突变菌株和回补菌株的电泳验证; M, DNA marker DL2000; 1,  $\Delta Cfatg7$ ; 2,  $\Delta Cfatg7/CfATG7$ ; WT 作阳性对照; H<sub>2</sub>O 作阴性对照; 引物对 1, *ATG7*BWF/H855R; 引物对 2, *ATG7*NBF/*ATG7*NBR

Fig. 1 Domain prediction and phylogenetic analysis of CfAtg7, and generation of knockout mutants and complemented strains. A: Phylogenetic tree of CfAtg7 with an amino acid substitution rate of 0.10; the data indicate bootstrap value. Species and their corresponding GenBank accession numbers are as follows: *Co. gloeosporioides* (EQB55638.1, CgAtg7), *Fusarium graminearum* (XP\_011319173.1, FgAtg7), *Magnaporthe oryzae* (XP\_003715525.1, MoAtg7), *Aspergillus oryzae* (KDE85504.1, AoAtg7), *A. nidulans* (XP\_050467950.1, AnAtg7), *Ustilago maydis* (XP\_011391717.1, UmAtg7), *Saccharomyces cerevisiae* (NP\_012041.1, ScAtg7). B: Domain prediction of CfAtg7; the gray regions indicate the ATG7 and ThiF domains, respectively. C: Schematic diagram of *CfATG7* gene knockout strategy. D: Verification of Knockout mutant and complemented strain; M, DNA marker DL2000; 1,  $\Delta Cfatg7$ ; 2,  $\Delta Cfatg7/CfATG7$ ; Wild-type is positive control; H<sub>2</sub>O is negative control; Primer pair 1, *ATG7*BWF/H855R; Primer pair 2, *ATG7*NBF/*ATG7*NBR.

#### 2.4 CfAtg7 参与调控果生刺盘孢的致病力

将上述菌株分别接种到表面无明显伤口的油茶叶片上和利用针孔处理后有伤口的油茶叶片上, 置于 28 °C 培养箱中黑暗保湿培养 2-3 d, 拍摄同一画面中存在叶片和标尺的图片, 利用软件 ImageJ 来测量病斑面积, 并用 GraphPad9.0 软件对试验数据进行单因素方差分析(one-way ANOVA)。在无伤叶片上, 野生型和回补菌株形成的病斑面积为(44.3±10.5) mm<sup>2</sup>和(44.9±7.6) mm<sup>2</sup>,  $\Delta Cfatg7$  则只形成(1.5±1.2) mm<sup>2</sup>的病斑, 显著减小。在有伤叶片上  $\Delta Cfatg7$  形成的病斑面积为(10.10±6.58) mm<sup>2</sup>, 而 WT 和  $\Delta Cfatg7/CfATG7$  则

产生较  $\Delta Cfatg7$  显著增大的炭疽病病斑(图 3A, 3B)。同时, 我们将上述菌株接种于已消毒且无明显病斑的苹果上。结果表明,  $\Delta Cfatg7$  在苹果上形成的病斑直径为(1.67±0.58) cm, 显著小于 WT 和  $\Delta Cfatg7/CfATG7$  的病斑直径(图 3C, 3D)。上述实验结果说明 CfAtg7 蛋白参与调控果生刺盘孢的致病力。

#### 2.5 CfAtg7 参与调控果生刺盘孢附着胞的形成

附着胞是植物病原菌一种高度特化的感染细胞, 对寄主侵染起关键作用(林福呈 2001)。在疏水玻片上滴加分生孢子悬浮液进行保湿培养, 在显微镜下观察附着胞形成情况(图 4)。

28 °C黑暗培养 12 h 后, WT 孢子萌发率为(59±2)%,  $\Delta Cfatg7$  的孢子萌发率为(61±4)%, 两者无显著差异。但  $\Delta Cfatg7$  的附着胞的形成率

仅为(2±2)%, 极显著低于 WT 的(37±6)%。这表明  $Cfatg7$  蛋白参与调控果生刺盘孢附着胞的形成。

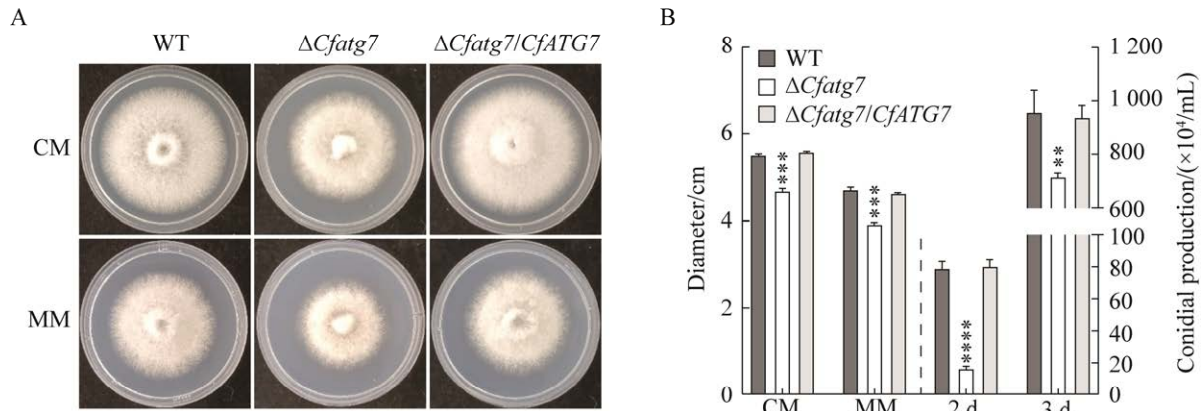


图 2  $\Delta Cfatg7$  菌丝生长和产孢量 A: 菌株在两种培养基上的菌落; B: 菌落直径和分生孢子产量的数据分析; 误差线表示标准差, \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ 。下同

Fig. 2 Mycelial growth and conidiation level in  $\Delta Cfatg7$  strain. A: Colony of three strains on two culture media; B: Data analysis of colony diameter and conidial production. Error bars represent standard deviation (SD). \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ; \*\*\*\* $P < 0.0001$ . The same below.

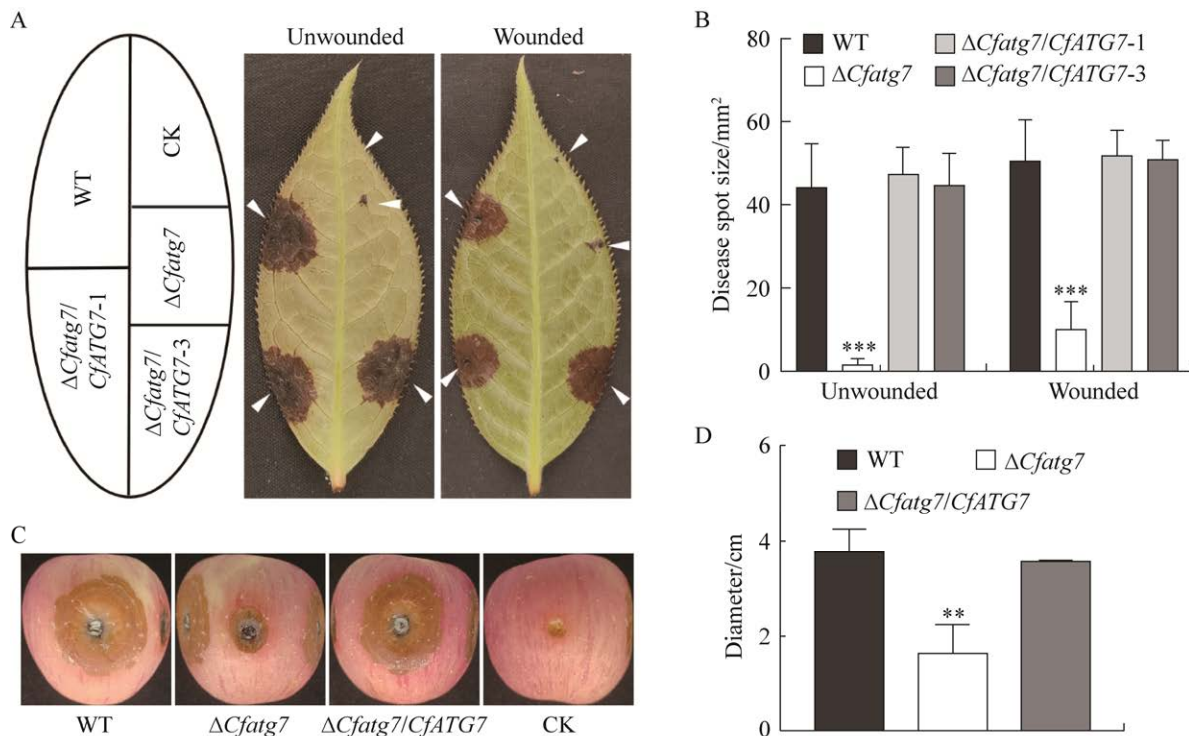


图 3 菌株在无伤和有伤油茶叶片以及苹果上的致病情况 A: 菌株接种 2 d 后, 在油茶叶片上的致病情况; B: 菌株在油茶叶片上致病情况的单因素方差分析; C: 菌株接种 5 d 后, 在苹果上的致病情况; D: 菌株在苹果上致病情况的单因素方差分析

Fig. 3 Pathogenicity of the three strains on wounded/unwounded *Camellia oleifera* leaves and apples. A: Pathogenic symptoms on *Ca. oleifera* leaves; B: Statistical analysis (One-way ANOVA) of pathogenicity on *Ca. oleifera* leaf; C: Pathogenic symptoms on apples caused by the three strains at 5 days post-inoculation (dpi); D: Statistical analysis (One-way ANOVA) of pathogenicity on apples.

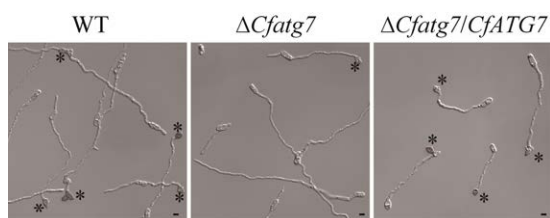


图4 附着胞形成 \*附着胞, 标尺=10 μm  
Fig. 4 Appressorial formation. \*Appressoria; Bars=10 μm.

## 2.6 CfAtg7 调控果生刺盘孢的自噬过程

在真核生物中, 雷帕霉素靶蛋白(target of rapamycin, TOR)信号通路调节细胞的生长代谢。TOR 通路和细胞自噬之间的功能关系复杂, 雷帕霉素通常作为一种自噬诱导剂使用(陈淳媛 2007)。CfAtg7 作为自噬蛋白, 我们首先关注其对雷帕霉素的响应。结果显示该胁迫剂对  $\Delta Cfatg7$  突变体的抑制率显著降低(图 5A, 5B)。这说明 CfAtg7 参与调控果生刺盘孢对自噬诱导剂雷帕霉素的响应。

随后, 我们在 WT 和  $\Delta Cfatg7$  突变体中转入自噬标记蛋白 GFP-CfAtg8。在营养匮乏条件 MM-N 诱导自噬时, GFP-Atg8 会转运至液泡降解以实现营养循环(Liu *et al.* 2015)。未诱导时(0 h), WT 菌株液泡中几乎无绿色荧光; 诱导 2 h 后,  $\Delta Cfatg7$  菌株液泡完全无绿色荧光, WT 的 GFP 阳性液泡比例显著高于  $\Delta Cfatg7$ , 直至 5 h,  $\Delta Cfatg7$  菌株液泡仍完全无绿色荧光, WT 中绿色荧光几乎全部进入菌株液泡(图 5C, 5D)。由于从 GFP-Atg8 上切割的完整 GFP 片段不会被液泡蛋白酶解, 可通过观察游离 GFP 评估自噬活性。通过免疫印迹分析 GFP-CfAtg8 的降解情况发现,  $\Delta Cfatg7$  无游离 GFP (图 5E), 表明其丧失自噬水平。以上结果证实 CfAtg7 是自噬所必需的。

## 2.7 CfAtg7 参与调控果生刺盘孢对环境胁迫的耐受性

病原真菌在侵染寄主植物的过程中, 会引起植物的一系列生理生化反应来抵抗其侵染。真菌细胞壁作为真菌和周围环境的分界, 是一层坚硬的屏障(东曼等 2022)。在刚果红处理下, 胁迫剂对  $\Delta Cfatg7$  的抑制率达(30±3)%, 显著高于其对 WT 的抑制率(8%); 在 SDS 处理下, 胁迫剂对

$\Delta Cfatg7$  的抑制率为 65%, 对 WT 的抑制率为(59±1.7)%, 统计学差异极显著, 表明  $\Delta Cfatg7$  对细胞壁完整性胁迫剂敏感性更高(图 6), 说明 CfAtg7 参与果生刺盘孢应对细胞壁完整性胁迫应答的过程。

内质网是胞内蛋白质的修饰场所, 蛋白质的正常修饰是细胞发挥生物学功能的基础(杨正婷和刘建祥 2016)。在内质网胁迫剂 DTT 处理下, 其对野生型抑制率为(31.7±2.3)%, 对  $\Delta Cfatg7$  的抑制率为(24.7±0.6)%, 显著低于 WT 和  $\Delta Cfatg7/CfATG7$  [抑制率为(31.3±1.5)%] (图 6), 表明 CfAtg7 参与调控果生刺盘孢应对寄主植物的内质网压力。

在侵染过程中, 真菌需要和活性氧做斗争, 过量的活性氧会破坏生物膜系统, 影响细胞多种生理功能, 造成细胞损伤(刘欢等 2019)。氧化胁迫剂  $H_2O_2$  对  $\Delta Cfatg7$  的抑制率为(56±1.7)%, 对  $\Delta Cfatg7/CfATG7$  和野生型抑制率约为(18±1.0)%,  $\Delta Cfatg7$  敏感性显著高于 WT 和回补菌株(图 6), 表明 CfAtg7 蛋白参与调控果生刺盘孢对氧化胁迫的应答。

## 3 讨论

本研究在果生刺盘孢 *Co. fructicola* 中鉴定了一个自噬关键蛋白 CfAtg7, 并分析了其生物学功能。我们发现 CfAtg7 对自噬过程至关重要, 并参与果生炭疽菌的生长、分生孢子形成、附着胞发育、胁迫响应及致病性。

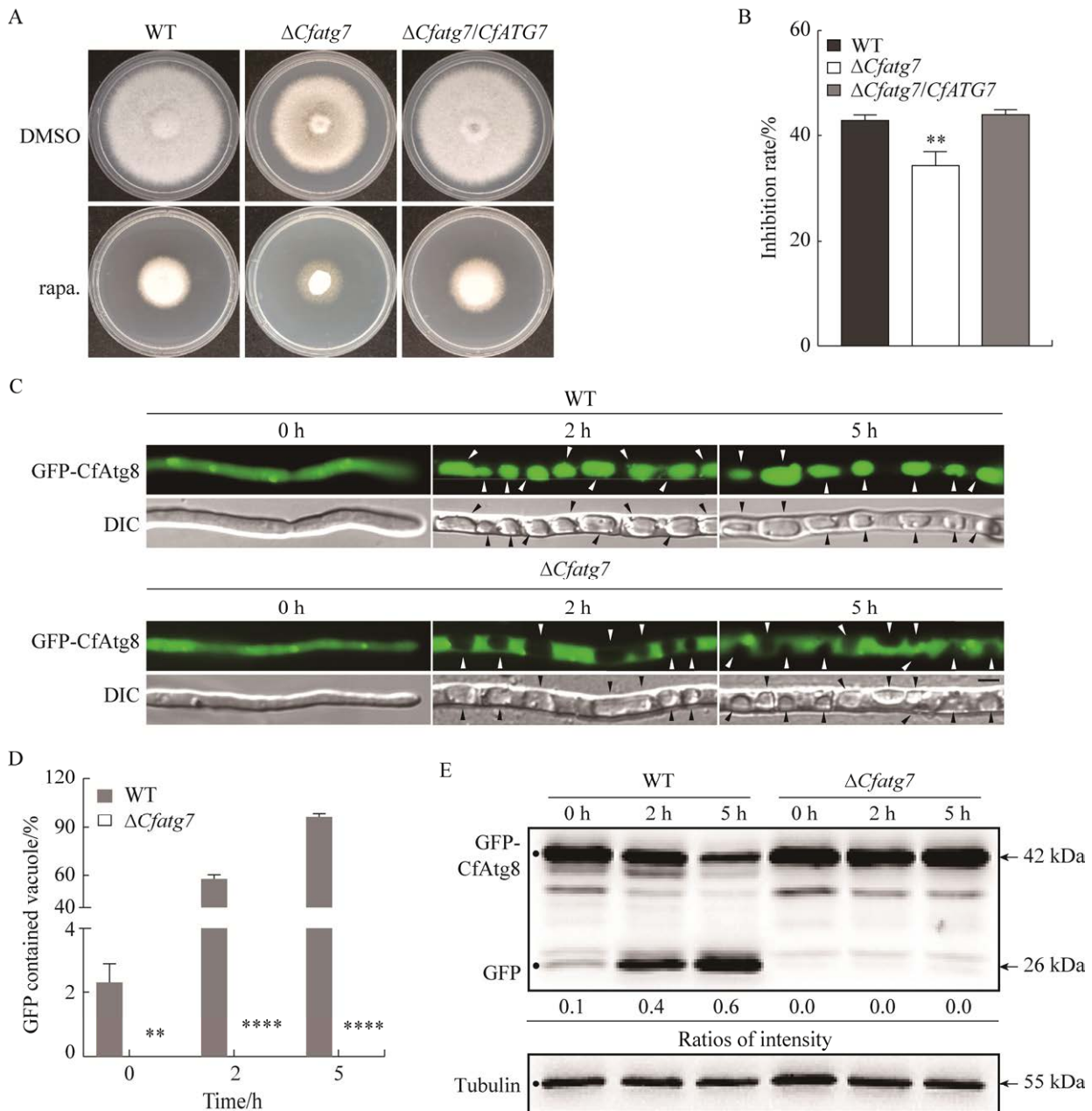
*CfATG7* 基因缺失导致菌株生长速率下降, 表明 CfAtg7 对生长具有正向调控作用, 这与 Atg7 蛋白调控灰葡萄孢和禾谷镰孢菌的营养生长结果一致(Ren *et al.* 2018; 吕务云 2019)。上述研究暗示 Atg7 调控生长的过程在物种间具有保守性。

自噬是真核生物对胞内物质进行重复利用所特有的一种保守过程。我们发现  $\Delta Cfatg7$  在氮饥饿诱导条件下自噬过程被阻断, 这与已证明的植物病原菌的研究结果相符。该结果进一步印证了 Atg7 在自噬过程中的保守性。

近年来, 越来越多的研究表明细胞自噬参与植物病原真菌的致病过程。稻巨座壳中细胞自噬

可分别协同细胞壁完整性通路和脂质代谢从而控制致病过程(Zhu *et al.* 2023; Guo *et al.* 2024)。禾谷镰孢菌中去泛素化介导的细胞自噬调控病

菌的致病力(Chen *et al.* 2024)。我们前期的研究也初步揭示了细胞自噬在果生炭疽菌致病过程中的作用,  $\Delta Cfatg7$  突变体的自噬缺陷可能预示



**图 5 CfAtg7 是自噬所必需的** A: WT、 $\Delta Cfatg7$  及回补菌株在含 DMSO 或雷帕霉素的 CM 培养基上的菌落形态, rapa. 代表雷帕霉素; B: 雷帕霉素对各菌株抑制率的单因素方差分析; C: 通过荧光显微镜检测自噬水平, 箭头指示液泡位置, 比例尺=5  $\mu$ m; D: 含 GFP 信号液泡的占比统计; E: Western blot 检测自噬水平, 泳道下方的数值为 GFP/(GFP+GFP-CfAtg8), •标记目的蛋白

**Fig. 5 CfAtg7 is essential for autophagy.** A: Colony morphology of WT,  $\Delta Cfatg7$ , and  $\Delta Cfatg7/CfATG7$  on CM containing either DMSO or rapamycin. rapa. indicates rapamycin. B: Statistical analysis (one-way ANOVA) of rapamycin inhibition rates for each strain. C: Autophagy levels analyzed by fluorescence microscopy. Arrows indicate vacuoles. Scale bars=5  $\mu$ m. D: Quantification of vacuoles containing GFP signals. E: Autophagy levels analyzed by Western blot. The numbers underneath the blot indicate GFP/(GFP+GFP-CfAtg8); • Target protein.

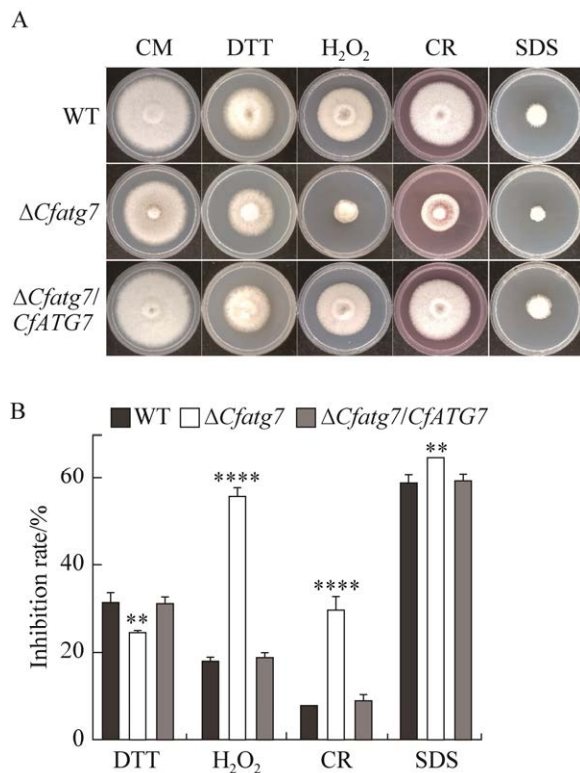


图 6  $\Delta Cfatg7$  对环境胁迫(细胞壁 CR、SDS; 内质网 DTT; 氧化压力 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)的应答 A: 3 个菌株分别接种于 CM 和添加各种胁迫剂的培养基上菌丝生长情况; B:  $\Delta Cfatg7$  生长抑制率的数据分析

Fig. 6 Response of  $\Delta Cfatg7$  to environmental stresses (cell wall stressors: CR, SDS; ER stress: DTT; oxidative stress: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A: Mycelial growth of the three strains on CM medium supplemented with different stress agents. B: Statistical analysis of growth inhibition rates in  $\Delta Cfatg7$ .

其致病力受损。通过实验,我们发现  $\Delta Cfatg7$  在油茶叶片上的致病力显著减弱,这也与 Atg7 在稻巨座壳中的研究结果(刘小红等 2008)一致。

我们通过实验证明 *CfATG7* 基因缺失仍形成极少数附着胞,但形成率显著降低。推测附着胞形成率的降低是突变体致病力下降的主要原因。同时,  $\Delta Cfatg7$  对细胞壁完整性胁迫和氧化胁迫更为敏感。考虑到细胞壁是真菌与寄主间的第一道屏障,且病原菌必须抵御寄主迸发的 ROS 才能成功感染寄主植物,我们认为  $\Delta Cfatg7$  对这两种胁迫的响应缺陷也可能导致其致病力下降。

综上所述,本研究不仅揭示了 *CfAtg7* 在自噬中的作用,还阐明了其在果生炭疽菌生长、产孢、附着胞形成、胁迫响应及致病性中的多效性功能。

## 作者贡献

陈妍: 实验操作、数据分析、论文撰写; 王伊玲: 实验操作、数据分析; 罗晶: 实验操作; 张盛培: 实验设计、论文修改。

## 利益冲突声明

该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

## [REFERENCES]

- Chen A, Han X, Liu C, Zhou Y, Ren Y, Shen X, Shim WB, Chai Y, Ma Z, Chen Y, 2024. Profiling of deubiquitinases that control virulence in the pathogenic plant fungus *Fusarium graminearum*. *The New Phytologist*, 242(1): 192-210
- Chen CY, 2007. Empirical study of rapamycin inhibiting fibrosis of viral myocarditis by blocking mTOR signal pathway. PhD Dissertation, Central South University, Changsha. 1-104 (in Chinese)
- Chen Y, Jin J, Li Y, Jiao H, Luo L, Chen Q, Li H, Zhang S, 2023. The *CfAtg5* regulates the autophagy and pathogenicity of *Colletotrichum fructicola* on *Camellia oleifera*. *Agronomy*, 13(5): 1237
- Collier JJ, Suomi F, Oláhová M, McWilliams TG, Taylor RW, 2021. Emerging roles of ATG7 in human health and disease. *EMBO Molecular Medicine*, 13(12): e14824
- Deng HY, Tao LP, 2023. Study on the coupling of oil-tea *Camellia* in industry and rural revitalization: talking in Shaoyang country, Hunan Province as an example. *Journal of Wuhan Polytechnic University*, 42(6): 27-36 (in Chinese)
- Dong M, Wang CY, Cheng JN, Fan SS, Zhao DM, Yang ZH, Zhu JH, 2022. Regulation of the cell wall integrity by *AsSl2* gene in *Alternaria solani*. *Microbiology China*, 49(1): 115-124 (in Chinese)
- Gao YL, He YH, Li H, 2020. Biological function bZIP-type transcription factor *CfAp1* in *Colletotrichum fructicola*. *Scientia Silvae Sinicae*, 56(9): 30-39 (in Chinese)
- Guo P, Wang Y, Xu J, Yang Z, Zhang Z, Qian J, Hu J, Yin Z, Yang L, Liu M, Liu X, Li G, Zhang H, Rumsey R, Wang P, Zhang Z, 2024. Autophagy and cell wall integrity pathways coordinately regulate the development and pathogenicity through MoAtg4 phosphorylation in *Magnaporthe oryzae*. *PLoS Pathogens*, 20(1): e1011988
- Guo S, Zhang S, 2024. The cysteine protease *CfAtg4* interacts with *CfAtg8* to govern the growth, autophagy and pathogenicity of *Colletotrichum fructicola*. *Journal of*

- Fungi, 10(6): 431
- Guo Y, Li H, Zhou GY, Liu JA, Zhang SP, 2021. Functional analysis of the autophagy-related protein CfAtg8 in *Colletotrichum fructicola*. Mycosystema, 40(3): 592-602 (in Chinese)
- Kuma A, Matsui M, Mizushima N, 2007. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. Autophagy, 3(4): 323-328
- Li H, Li Y, Xu JP, Zhou GY, 2016. Population genetic structure of *Colletotrichum fructicola* from oil-tea and other host plants in Hainan Province. Scientia Silvae Sinicae, 52(10): 80-88 (in Chinese)
- Lin FX, 2001. Cell biology of appressorium formation of *Magnaporthe grisea*. Acta Phytopathologica Sinica, 31(2): 97-101 (in Chinese)
- Liu H, Yang YC, Liu C, Liu SP, Xue YH, 2019. Oxidative stress response mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresources, 41(4): 298-304 (in Chinese)
- Liu T, Liu X, Lu J, Zhang L, Min H, Lin F, 2010. The cysteine protease MoAtg4 interacts with MoAtg8 and is required for differentiation and pathogenesis in *Magnaporthe oryzae*. Autophagy, 6(1): 74-85
- Liu X, Chen S, Gao H, Ning G, Shi H, Wang Y, Dong B, Qi Y, Zhang D, Lu G, Wang Z, Zhou J, Lin F, 2015. The small GTPase MoYpt7 is required for membrane fusion in autophagy and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. Environmental Microbiology, 17(11): 4495-4510
- Liu XH, Lu SL, Lin FC, 2008. Gene regulation of autophagy and its relationship with rice blast disease. Journal of Cellular Biology, 30(6): 737-741 (in Chinese)
- Lü WY, 2019. Functional analysis of autophagy-related genes in *Fusarium graminearum*. PhD Dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. 1-180 (in Chinese)
- Mizushima N, Komatsu M, 2011. Autophagy: renovation of cells and tissues. Cell, 147(4): 728-741
- Naqvi NI, Qu Z, Deng Y, 2012. Role of macroautophagy in nutrient homeostasis during fungal development and pathogenesis. Cells, 1(3): 449-463
- Ren W, Sang C, Shi D, Song X, Zhou M, Chen C, 2018. Ubiquitin-like activating enzymes BcAtg3 and BcAtg7 participate in development and pathogenesis of *Botrytis cinerea*. Current Genetics, 64(4): 919-930
- Tan XF, 2023. Research progress in molecular breeding of *Camellia oleifera*. Journal of Central South University of Forestry and Technology, 43(1): 1-24 (in Chinese)
- Yang ZT, Liu JX, 2016. Endoplasmic reticulum stress response in plants. Biotechnology Bulletin, 32(10): 84-96 (in Chinese)
- Yao H, Li J, Liu Z, Ouyang C, Qiu Y, Zheng X, Mu J, Xie Z, 2023. Ablation of endothelial Atg7 inhibits ischemia-induced angiogenesis by upregulating Stat1 that suppresses Hif1a expression. Autophagy, 19(5): 1491-1511
- Ye Q, Zheng MH, 2007. Molecular mechanism and pathophysiological significance of autophagy. International Journal of Pathological Sciences and Clinical Medicine, 27(4): 358-362 (in Chinese)
- Zhang S, Guo Y, Li S, Li H, 2022. Histone acetyltransferase CfGcn5-mediated autophagy governs the pathogenicity of *Colletotrichum fructicola*. mBio, 13(5): e01956-01922
- Zhu XM, Li L, Bao JD, Wang JY, Liang S, Zhao LL, Huang CL, Yan JY, Cai YY, Wu XY, Dong B, Liu XH, Klionsky DJ, Lin FC, 2023. MoVast2 combined with MoVast1 regulates lipid homeostasis and autophagy in *Magnaporthe oryzae*. Autophagy, 19(8): 2353-2371

#### [附中文参考文献]

- 陈淳媛, 2007. 雷帕霉素阻断 mTOR 信号通路抑制病毒性心肌炎心肌纤维化的实验研究. 中南大学博士论文, 长沙. 1-104
- 邓海艳, 陶丽萍, 2023. 油茶产业与乡村振兴的耦合研究: 以湖南邵阳县为例. 武汉轻工大学学报, 42(6): 27-36
- 东曼, 王楚媛, 程嘉宁, 范莎莎, 赵冬梅, 杨志辉, 朱杰华, 2022. *AsSlt2* 基因对茄链格孢细胞壁完整性的调控. 微生物学通报, 49(1): 115-124
- 高亚兰, 何苑晔, 李河, 2020. 调控油茶果生刺盘孢 bZIP 转录因子 CfAp1 的生物学功能. 林业科学, 56(9): 30-39
- 郭源, 李河, 周国英, 刘君昂, 张盛培, 2021. 自噬相关蛋白 CfAtg8 在果生刺盘孢中的功能分析. 菌物学报, 40(3): 592-602
- 李河, 李杨, 徐建平, 周国英, 2016. 海南省油茶及其他寄主植物果生刺盘孢菌群遗传结构分析. 林业科学, 52(10): 80-88
- 林福呈, 2001. 稻瘟病菌附着胞形成的细胞生物学. 植物病理学报, 31(2): 97-101
- 刘欢, 杨宇纯, 刘超, 刘士平, 薛艳红, 2019. 酿酒酵母氧化胁迫应答反应机制. 生物资源, 41(4): 298-304
- 刘小红, 鲁书玲, 林福呈, 2008. 细胞自噬的基因调控及其与稻瘟病的关系. 细胞生物学杂志, 30(6): 737-741
- 吕务云, 2019. 禾谷镰刀菌细胞自噬途径相关基因的功能分析. 浙江大学博士论文, 杭州. 1-180
- 谭晓风, 2023. 油茶分子育种研究进展. 中南林业科技大学学报, 43(1): 1-24
- 杨正婷, 刘建祥, 2016. 植物内质网胁迫应答研究进展. 生物技术通报, 32(10): 84-96
- 叶青, 郑民华, 2007. 自噬的分子机制与病理生理意义. 国际病理科学与临床杂志, 27(4): 358-362