

C₂H₂型转录因子 AflAZF1 在黄曲霉生长发育与毒素合成调控中的作用

林竑翊, 李明智, 郭慧华, 袁军, 汪世华, 王秀娜*

福建农林大学生命科学学院 福建省病原真菌与真菌毒素重点实验室, 福建 福州 350002

摘要: C₂H₂型转录因子 AZF1 在真菌中具有调控生长发育、次级代谢及致病等多种生物学功能, 但其在黄曲霉中的作用尚不明确。同源序列比对发现, AFLA_054800 编码的蛋白与里氏木霉中的 AZF1 蛋白具有 50% 的同源性, 将其命名为 AflAZF1。本研究发现, AflAZF1 基因缺失菌株(Δ AflAZF1) 的菌落大小与野生型无明显差异, 但分生孢子产量显著下降, 且无法形成菌核。同时, Δ AflAZF1 菌株的黄曲霉毒素 AFB₁ 产量明显升高。在以葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、蔗糖和木糖为碳源时, Δ AflAZF1 菌株的产孢能力相较于野生型显著下降, 但在乳糖和甘油中显著上升。此外, 在 pH 5 和 pH 11 条件下, Δ AflAZF1 菌株的分生孢子数量显著少于野生型。研究结果表明, AflAZF1 能够调控分生孢子和菌核的形成及 AFB₁ 的生物合成, 还通过影响产孢能力调节对不同碳源的利用和对极端 pH 条件的适应性。这一发现揭示了 AflAZF1 在黄曲霉生长发育与毒素合成中的关键作用, 为防治黄曲霉污染及制定新型生物防控策略提供了理论依据。

关键词: *Aspergillus flavus*; 锌指蛋白; 黄曲霉毒素; 生长发育; 碳源; 酸碱

[引用本文]

林竑翊, 李明智, 郭慧华, 袁军, 汪世华, 王秀娜, 2026. C₂H₂型转录因子 AflAZF1 在黄曲霉生长发育与毒素合成调控中的作用. 菌物学报, 45(2): 250176

Lin HY, Li MZ, Guo HH, Yuan J, Wang SH, Wang XN, 2026. The role of C₂H₂-type transcription factor AflAZF1 in the growth, development and aflatoxin synthesis regulation of *Aspergillus flavus*. Mycosystema, 45(2): 250176

资助项目: 福建省自然科学基金(2024J01397, 2022J01594); 国家自然科学基金(31800040); 福建农林大学科技创新专项基金(KFB23081, KFB22048XA)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2024J01397, 2022J01594), the National Natural Science Foundation of China (31800040), and the Science and Technology Innovation Special Foundation of Fujian Agriculture and Forestry University (KFB23081, KFB22048XA).

*Corresponding author. E-mail: xiuna0304@163.com

Received: 2025-06-10; Accepted: 2025-07-29

The role of C₂H₂-type transcription factor AflAZF1 in the growth, development and aflatoxin synthesis regulation of *Aspergillus flavus*

LIN Hongyi, LI Mingzhi, GUO Huihua, YUAN Jun, WANG Shihua, WANG Xiuna*

Key Laboratory of Pathogenic Fungi and Mycotoxins of Fujian Province, College of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, Fujian, China

Abstract: The C₂H₂ zinc finger transcription factor AZF1 in fungi has multiple biological functions such as regulating growth and development, secondary metabolism synthesis, and pathogenicity, however, the functions of this homologous protein in *Aspergillus flavus* is still unclear. Homology comparison revealed that the protein encoded by AFLA_054800 shares 50% homology with the AZF1 protein in *Trichoderma reesei*, and it was named AflAZF1. This study found that the colony size of the *AflAZF1* gene deletion strain (Δ *AflAZF1*) was not significantly different from that of the wild type, but the conidiation was significantly reduced, and the sclerotia could not form. The production of aflatoxin AFB₁ in the Δ *AflAZF1* strain was significantly increased. When glucose, arabinose, mannose, sucrose, and xylose were used as carbon sources, the conidiation ability of the Δ *AflAZF1* strain was significantly decreased, but it was significantly increased in lactose and glycerol. Additionally, under pH 5 and pH 11 conditions, the number of conidia in the Δ *AflAZF1* strain was significantly lower than that in the wild type. The results indicate that *AflAZF1* not only regulates conidiation and sclerotial formation and AFB₁ biosynthesis, but also modulates the utilization of different carbon sources and adaptation to extreme pH conditions by affecting conidiation ability. This discovery not only reveals the key role of *AflAZF1* in the growth and development and toxin synthesis of *A. flavus*, but also provides a theoretical basis for the prevention and control of *A. flavus* contamination and the development of new biological control strategies.

Keywords: *Aspergillus flavus*; zinc-finger protein; aflatoxin; growth and development; carbon source; acid-base

黄曲霉 *Aspergillus flavus* Link 作为一种常见的腐生真菌,通常生长在土壤、植物和食品中,能够在生长、采收、加工、运输和储藏的任意一环节污染小麦、玉米和大米等主要粮食作物,是全球谷物最主要的真菌污染源之一。我国是黄曲霉污染的重灾区,抽样调查显示多个省份的储藏玉米和花生中都检出了黄曲霉(Ding *et al.* 2015)。该菌产生的黄曲霉毒素(aflatoxins, AFs)是毒性最强、产量最大、污染范围最广泛的真菌毒素(李丁等 2020)。黄曲霉毒素也是迄今为止发现的理化性质最稳定的真菌毒素之一,一旦发生污染,物理或化学的手段很难将其去除,并且它可以通过代谢和加工过程在食物或饲料中富

集,严重威胁人畜健康(邢福国等 2021)。黄曲霉毒素合成不仅受到内在遗传因素的控制,而且受到温度、光照、水活度等环境因素的影响(王秀娜等 2020)。因此,黄曲霉毒素合成调控机制的揭示对防控黄曲霉及其食品安全至关重要。

C₂H₂型转录因子是真核生物中能够与DNA序列特异性结合的超大家族(张俊等 2021)。在真菌中,C₂H₂型转录因子在调控生长、分生孢子形成、有性生殖、代谢和致病力等方面发挥重要作用。在里氏木霉 *Trichoderma reesei* 中敲除 *TrAZF1* 导致分生孢子形成延迟(Antonieto *et al.* 2019)。酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 中

AZF1 基因的过表达菌株,在以葡萄糖和木糖为碳源时乙醇产量分别增加 1.1 倍和 2.4 倍,而 *AZF1* 缺失突变体乙醇产量分别下降了约 33%和 44% (Semkiv *et al.* 2022)。灰梨孢 *Pyricularia grisea* 中与酿酒酵母 *AZF1* 同源的 *COS1* 在分生孢子梗发育中起着关键作用,且可能直接结合到靶基因的启动子区来调节其表达 (Li *et al.* 2013)。构巢曲霉 *Aspergillus nidulans brlA* 正调控了分生孢子产生,而同类型的 *nsdC* 对无性孢子的形成具有负调控作用 (Kim *et al.* 2009; 鲍龙飞等 2014)。哈茨木霉 *Trichoderma harzianum* 中 C_2H_2 型转录因子 *THA09974* 正调控产孢、菌丝生物量和对病原菌的拮抗能力 (李昕玥等 2019)。产黄头孢霉 *Acremonium chrysogenum* 中 *Acstua* 的缺失导致真菌发育相关基因 *AcbrlA* 和 *AcabaA* 的表达降低,阻碍了分生孢子的产生 (Hu *et al.* 2015)。此外,禾谷镰孢菌 *Fusarium graminearum* 中的 *pcs1* 与大丽轮枝菌 *Verticillium dahliae* 中的 *vdmsn2* 均正调控孢子的形成 (Jung *et al.* 2014; Tian *et al.* 2017)。植物病原菌玉米黑粉菌 *Ustilago maydis* 中 *Rual* 的缺失导致黑粉菌酸合成缺陷 (Teichmann *et al.* 2010)。粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* 的 *Cre1* 缺失菌株产生的淀粉酶和 β -半乳糖苷酶的量均显著高于野生型 (Sun & Glass 2017)。在构巢曲霉中,碳源代谢途径被抑制因子 *CreA* 调控 (Ries *et al.* 2016)。黑曲霉 *Aspergillus niger* 中 *AnAZF1* 通过调节赭曲霉毒素 A (OTA) 合成基因的表达正调控了 OTA 的合成 (Wei *et al.* 2023)。尖孢镰孢菌 *Fusarium oxysporum* 的 *PacC* 负调控了毒力 (Caracuel *et al.* 2003)。在假禾谷镰孢菌 *Fusarium pseudograminearum* 中, *FpCzf7* 缺失突

变体的致病力和脱氧雪腐镰孢菌烯醇的产量比野生型均显著下降 (赵静雅等 2022)。转录因子 *BcCRZ1* 能够提高灰葡萄孢 *Botrytis cinerea* 刺穿寄主表面的能力 (Schumacher *et al.* 2008)。

黄曲霉的生长发育、次级代谢物合成以及致病性也受到多种 C_2H_2 型转录因子的调控。与野生型相比,黄曲霉 *RsrA* 缺失突变株产生的分生孢子数量显著减少,但对 H_2O_2 的抗性增强 (Bok *et al.* 2014)。*AflZKS3* 的缺失导致了黄曲霉毒素的生物合成被完全抑制,同时侵染花生和玉米能力也降低 (Liang *et al.* 2022)。为探究 C_2H_2 型转录因子 *AflAZF1* 的生物学功能,本研究构建了 *AflAZF1* 缺失突变株 ($\Delta AflAZF1$),系统分析了 *AflAZF1* 在黄曲霉营养生长、产孢、致病力、胁迫应答和毒素合成等方面的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 供试菌株

本研究所使用菌株的信息见表 1。

1.1.2 培养基

PDA 培养基(300 mL): 11.7 g 马铃薯葡萄糖琼脂,加单蒸水定容至 300 mL, 121 °C 高温高压灭菌 20 min。YGT 培养基(300 mL): 6 g 葡萄糖, 1.5 g 酵母膏, 4.5 g 琼脂, 300 μ L 微量元素,加单蒸水定容至 300 mL, 121 °C 高温高压灭菌 20 min。YES 培养基(300 mL): 1.5 g 酵母膏, 9 g 蔗糖, 4.5 g 琼脂,加单蒸水定容至 300 mL, 115 °C 高温高压灭菌 15 min。YEPS 培养基 (300 mL): 1.8 g 蛋白胨, 3 g 蔗糖, 1.8 g 酵母膏, 4.5 g 琼脂,加单蒸水定容至 300 mL, 121 °C 高温

表 1 本研究所用菌株的信息

Table 1 The strains used in this study

菌株	描述	来源
Strain	Characterization	Source
<i>Aspergillus flavus</i> CA14 PTS	$\Delta ku70, \Delta pyrG$	美国农业部南方研究中心 Chang PK 惠赠 Donated by Chang PK, Southern Research Center, United States Department of Agriculture
<i>A. flavus</i> wild type (WT)	$\Delta ku70, \Delta pyrG::pyrG$	实验室构建 Laboratory construction
$\Delta AflAZF1$	$\Delta ku70, \Delta pyrG, \Delta AflAZF1::pyrG$	本研究构建 Constructed in this study

高压灭菌 20 min。MM 培养基(300 mL): 1.5 g 葡萄糖, 0.3 g NH₄NO₃, 0.15 g KH₂PO₄, 0.45 g NaH₂PO₄, 0.3 g NaCl, 0.06 g MgSO₄·7H₂O, 加单蒸水定容至 300 mL 并调 pH 至 7.2, 121 °C 高温高压灭菌 20 min。0.5% 复苏上层培养基(300 mL): 10.5 g Czapek dox broth, 3 mL 1 mol/L 酒石酸铵, 102.72 g 蔗糖, 2.25 g 琼脂, 加单蒸水定容至 300 mL, 115 °C 高温高压灭菌 15 min。1.5% 复苏下层培养基(300 mL): 10.5 g Czapek dox broth, 3 mL 1 mol/L 酒石酸铵, 102.72 g 蔗糖, 4.5 g 琼脂, 加单蒸水定容至 300 mL, 115 °C 高温高压灭菌 15 min。

1.1.3 原生质体制备及转化的相关试剂

原生质体酶解液: 先将 4 mL 10 mmol/L NaH₂PO₄ (pH 5.8)、0.8 mL 20 mmol/L CaCl₂ 和 34 mL 无菌水提前量取好, 加入 2.8 g NaCl, 充分混匀后, 加入 0.3 g 溶壁酶(源叶 S10107)、0.3 g 蜗牛酶(索莱宝 S8280)、0.2 g 溶菌酶(麦克林 L812356), 0.45 μm 滤膜过滤除菌。50% PEG 4000 buffer: 25 mL 1 mol/L CaCl₂, 10 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5), 100 mL 3 mol/L KCl, 250 g PEG 4000, 加单蒸水定容至 500 mL, 121 °C 高温高压灭菌 20 min。1.2 mol/L STC buffer: 12.5 mL 1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5), 25 mL 1 mol/L CaCl₂, 109.2 g 山梨醇, 加单蒸水定容至 500 mL, 121 °C 高温高压灭菌 20 min。

1.1.4 其他试剂

孢子洗脱液: 0.05% Tween 80, 121 °C 高温高压灭菌 20 min。微量元素: 0.22 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O, 10 g Na₂EDTA, 2.2 g H₃BO₃, 1 g MnCl₂·4H₂O, 4.4 g ZnSO₄·7H₂O, 0.32 g CoCl₂·5H₂O, 1 g FeSO₄·7H₂O, 0.32 g CuSO₄·5H₂O, 加单蒸水定容至 200 mL。

1.2 系统进化树构建和蛋白结构域分析

将里氏木霉 AZF1 蛋白序列与 NCBI 数据库中黄曲霉 NRRL3357 基因组进行同源比对, 找到其同源的蛋白。然后下载米曲霉 *Aspergillus oryzae*、寄生曲霉 *Aspergillus parasiticus*、烟曲霉 *Aspergillus fumigatus*、黑曲霉 *Aspergillus niger*、构巢曲霉 *Aspergillus nidulans*、禾谷镰孢菌

Fusarium graminearum、酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、里氏木霉 *Trichoderma reesei*、灰梨孢 *Pyricularia grisea* 和拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 等真菌中的 AZF1 蛋白序列。利用软件 MEGA7.0 构建 AZF1 蛋白的系统进化树, 选用 Neighbor-joining 算法, bootstrap 值为 1 000。在 Simple Modular Architecture Research Tool (SMART, <http://smart.emblheidelberg.de/>) 网站上预测上述蛋白的结构域, 最后使用 DOG 2.0 软件绘制结构域可视化图像。

1.3 黄曲霉原生质体的制备和转化

1.3.1 黄曲霉原生质体的制备

将 100 μL 浓度为 1×10⁶ 个/mL 的黄曲霉分生孢子悬液接种在 YGT 液体培养基中, 置于 37 °C 摇床, 在 150 r/min 条件下培养 8–10 h。摇菌结束后, 首先配制酶解液, 待酶完全溶解后, 用 4 层擦镜纸收集菌丝, 将其转移至酶解液中, 置于 29 °C 摇床, 以 70 r/min 振荡裂解菌丝 2 h, 镜检, 若裂解未完成, 则每隔 30 min 镜检一次。待裂解结束后, 用二层擦镜纸过滤菌丝及细胞壁碎片。将收集到的滤液 4 °C、5 000 r/min 离心 15 min 后, 弃上清, 再加入 STC 润洗沉淀, 5 000 r/min 离心 15 min, 弃上清。沉淀重悬于 1 mL 1.2 mol/L STC 溶液, 取 10 μL 镜检。加入 DMSO (终浓度 7%), 放置在 -80 °C 保存。

1.3.2 黄曲霉原生质体转化

将纯化的 DNA 片段和原生质体置于冰上, 向 1.5 mL EP 管中加入质量约 3–5 μg 的 DNA 片段和 200 μL 1.2 mol/L STC, 混匀; 接着加入 200 μL 50% PEG 4000 buffer, 混匀, 置于冰上 2 min 使其充分反应; 最后加入 100 μL 原生质体, 用移液枪轻柔混匀, 置于冰上孵育 30 min。准备复苏下层培养基, 30 min 后, 将上述体系转移至 50 mL 离心管中, 加入 1 mL 50% PEG 4000 buffer, 混匀, 冰上孵育 10 min。孵育结束后, 向 50 mL 离心管中加入 10 mL 复苏上层培养基, 混匀, 倒入已经凝固的复苏下层培养基上, 待其充分凝固后封板, 于 37 °C 培养。每天观察, 将转化子挑至 YGT 培养基中, 以便后续验证实验。

1.4 黄曲霉 AflAZF1 基因敲除菌株的构建及验证
从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载

AflAZF1 基因及其上下游 2 000 bp 的 DNA 序列, 用 Primer Premier 5.0 设计扩增 *AflAZF1* 基因上下游同源臂引物和融合 PCR 的巢式引物。首先扩增目标基因上游和下游以及 *pyrG* 3 个 DNA 片段, 然后利用 PCR 技术将其融合。基于同源重组的原理, 利用 PEG 介导的原生质体转化方法将上述融合片段转化到黄曲霉 CA14 PTS 原生质体中, 得到以烟曲霉中 *pyrG* 基因替换黄曲霉中 *AflAZF1* 基因的 $\Delta AflAZF1$ 菌株。然后采用 PCR 技术对其进行鉴定, 理论上引物 1 (P1, 054800 RT/F 和 054800 RT/R) 在野生型菌株中可以扩增出条带, 而引物 2 (P2, 054800 5F/EF 和 *pyrG*/TR) 和引物 3 (P3, 054800 3F/ER 和 *pyrG*/TF) 分别检测敲除菌株中目的基因上游和下游重组片段, 本研究所用引物见表 2。

1.5 黄曲霉分生孢子悬液的制备

将 WT、 $\Delta AflAZF1$ 菌株接种至培养基上, 于 37 °C 培养 5 d 后, 在超净工作台中, 向培养皿中加入 3 mL 已灭菌的孢子洗脱液, 用枪头轻轻刮下培养基表面成熟的黄曲霉分生孢子, 并用已灭菌脱脂棉制备的滤柱过滤去除菌丝, 得到新鲜孢子液。涡旋混匀孢子悬液, 取 500 μ L 孢子悬液梯度稀释后进行镜检, 计算浓度, 再将孢子液浓度调整为 1×10^6 个/mL。

1.6 黄曲霉生长和产孢的测定

准备 PDA 培养基($\Phi=60$ mm, 10 mL/皿), 分别接种野生型和敲除菌株分生孢子悬液 2 μ L 至 PDA 培养基, 29 °C 黑暗培养, 5 d 后测量菌落直径并拍照。沿着直径打孔, 将培养基及孢子收集在 5 mL EP 管中, 加入 3 mL 孢子洗脱液, 超声 1 h 后涡旋混匀, 通过梯度稀释法配合血球计数板对分生孢子数量进行统计。每个处理 5 次重复, 整个实验重复两次。

1.7 黄曲霉菌核产生情况分析

将 WT 和 $\Delta AflAZF1$ 分生孢子悬液稀释至 1×10^6 个/mL, 分别接种 2 μ L 至 YEPS 培养基, 37 °C 黑暗培养, 7 d 后拍照, 用 75% 乙醇喷洗平板表面的菌丝及分生孢子, 使黄曲霉菌核暴露, 待乙醇挥发后再次拍照记录, 并统计菌核数量。每个处理 5 次重复, 整个实验重复两次。

1.8 黄曲霉在不同碳源培养基的生长

以 MM 培养基为基础配制不同碳源培养基, 分别为 MM+1% 乳糖、MM+1% 甘油、MM+1% 淀粉、MM+1% 蔗糖、MM+1% 阿拉伯糖、MM+1% 葡萄糖、MM+1% 甘露糖、MM+1% 木糖培养基。分别接种 2 μ L WT 和 $\Delta AflAZF1$ 分生孢子悬液 (1×10^5 个/mL) 至不同碳源培养基中, 29 °C 黑暗培养, 5 d 后测量菌落直径并拍照, 同时统计分

表 2 黄曲霉 *AflAZF1* 基因缺失菌株构建中所用引物信息

Table 2 The primers used in this study

引物名称	引物序列	目的
Primer	Oligonucleotide sequence (5'→3')	Use
<i>pyrG</i> /F <i>pyrG</i> /R	GCCAGTACGAGTGTGTGGAG GTCAGACACAGAATAACTCTC	扩增 <i>pyrG</i> 基因片段 Amplification of <i>pyrG</i> gene fragments
054800 5F/F	GGTATGGACTGGCATGGATAC	融合 PCR 正向引物 Fusion PCR forward primers
054800 3F/R	GTAATATCAAGACTGCGACGCG	融合 PCR 反向引物 Fusion PCR reverse primers
054800 5F/EF 054800 5F/R	CATTGAGGAACGATGCCATTAC GGGTGAAGAGCATTGTTGAGGCGTCTTTGCTACTACTCGTCTC	扩增 <i>AflAZF1</i> 上游同源臂片段 Amplification of <i>AflAZF1</i> upstream homology arm fragment
054800 3F/ER 054800 3F/F	CTTCAATTGATCGTGTGACAC GCATCAGTGCTCTCTCAGACGCCGTACTGGTCTTCTGTTCCG	扩增 <i>AflAZF1</i> 下游同源臂片段 Amplification of <i>AflAZF1</i> downstream homology arm fragments
<i>pyrG</i> /TR <i>pyrG</i> /TF	GTCTGAGAGGAGGCACTGATGC GCCTCAAACAATGCTCTTCACCC	$\Delta AflAZF1$ 验证引物 $\Delta AflAZF1$ validation primers
054800 RT/F 054800 RT/R	GCCATTCACCTGTCTGTTGGAC CCTACGATCCTTCCACGAC	<i>AflAZF1</i> -ORF 验证引物 <i>AflAZF1</i> -ORF validation primers

生孢子数量。每个处理 5 次重复, 整个实验重复两次。

1.9 黄曲霉适应不同酸碱环境能力分析

配制 YGT 培养基, 并用 HCl 与 NaOH 溶液将培养基 pH 分别调节至 5、7、9、11。分别接种 2 μ L WT 和 Δ AflAZF1 分生孢子悬液(1×10^5 个/mL)至不同 pH 培养基中, 29 $^{\circ}$ C 黑暗培养, 5 d 后测量菌落直径并拍照, 统计分生孢子数量。每个处理 5 次重复, 整个实验重复两次。

1.10 黄曲霉毒素 AFB₁ 的检测

分别接种 2 μ L WT 和 Δ AflAZF1 分生孢子悬液(1×10^5 个/mL)至 YES 固体培养基($\Phi=60$ mm, 10 mL/皿), 倒置在 29 $^{\circ}$ C 黑暗下培养 5 d。用打孔器沿着培养基直径十字交叉打菌饼, 并将其转移至 50 mL 离心管中, 加入 6 mL 二氯甲烷, 超声振荡 1 h; 吸取下层清液 4 mL 转移至新的 10 mL EP 管中, 风干后采用薄层层析法进行检测。使用分析天平对干燥后的菌饼称重, 按 1 g:1 mL 比例加入 CH₂Cl₂, 通过涡旋振荡实现毒素复溶。提前将硅胶板放入 65 $^{\circ}$ C 烘箱中活化 20 min, 并标记好点样位置。取适量复溶后的毒素溶液点于硅胶板上, 点样时设置标准品作为对照; 按二氯甲烷和丙酮 9:1 的用量配制 50 mL 的层析液。将硅胶板垂直放入层析缸中, 待层析液展开结束后, 使用凝胶成像仪在波长 365nm 紫外光下检测毒素情况并拍照记录。使用 GeneTools 软件进行定量。每个处理 5 次重复, 整个实验重复两次。

1.11 黄曲霉侵染花生

选取外观和成熟程度相近的花生种子, 将其放入锥形瓶中, 加入 75% 乙醇溶液后, 放入 37 $^{\circ}$ C、180 r/min 的摇床内振荡 5 min 进行表面消毒, 用 0.02% 曲拉通水洗涤 3 次, 用滤纸吸干花生表面的液体。将处理好的花生置于铺有两层滤纸的培养皿中, 每皿 8 粒, 每粒花生上点 3 μ L 浓度为 1×10^6 个/mL 孢子悬液, 29 $^{\circ}$ C 黑暗培养 5 d 后拍照, 然后将花生转移到 50 mL 离心管中, 每管加 8 mL 0.02% 曲拉通水, 涡旋振荡 30 s, 吸取 1 mL 分生孢子悬液到 1.5 mL EP 管中, 用于孢子数量的统计。在剩余的孢子悬液中加入 5 mL 二氯甲烷, 180 r/min 摇床振荡

20 min, 静置 30 min, 随后将全部有机相转移到 10 mL EP 管中, 于通风橱中自然风干, 采用薄层层析法进行毒素检测。每个处理 5 次重复, 整个实验重复两次。

1.12 数据处理和分析

利用 IBM SPSS Statistics 26 对试验数据进行处理, 并做显著性分析, 用 GraphPad Prism (version 8) 制图。检测分析方法为独立样本 *t* 检验, 显著性用星号表示 ($P < 0.01$, 用 ** 代表差异极显著; $P < 0.05$, 用 * 表示差异显著)。

2 结果与分析

2.1 黄曲霉中转录因子 AflAZF1 的鉴定及系统发育分析

里氏木霉中 C₂H₂ 型转录因子 TrAZF1 的缺失会导致孢子形成延迟和对极端 pH 变化敏感 (Antonieto *et al.* 2019)。为了研究该转录因子在黄曲霉中的直系同源基因是否调控生长发育、pH 适应等过程, 本研究首先以里氏木霉 TrAZF1 蛋白序列作为模板在 NCBI 中进行同源比对。黄曲霉 NRRL3357 中 AFLA_054800 基因编码的蛋白与 TrAZF1 的同源性为 50%, 将其命名为 AflAZF1。该基因长 1 544 bp, 含 3 个内含子, 编码的蛋白由 443 个氨基酸构成。系统进化树显示 AflAZF1 与米曲霉中 AZF1 亲缘关系最近 (图 1A)。蛋白质结构域分析结果表明 AflAZF1 蛋白质与寄生曲霉 *A. parasiticus*、米曲霉 *A. oryzae*、黑曲霉 *A. niger*、烟曲霉 *A. fumigatus*、构巢曲霉 *A. nidulans*、禾谷镰孢菌 *F. graminearum*、里氏木霉 *T. reesei*、灰梨孢 *P. grisea*、酿酒酵母 *S. cerevisiae* 中均含有 4 个 C₂H₂ 型锌指结构域 (图 1B)。

2.2 黄曲霉 AflAZF1 敲除菌株的构建

根据同源重组原理构建了 AflAZF1 缺失突变株, 突变株筛选中 3 对 PCR 引物的位置见图 2A, P1 引物设计在 AflAZF1 基因内部, 仅在野生型中有条带显示; 引物 P2 的反向引物和引物 P3 的正向引物分别包含了部分 *pyrG* 的上同源臂片段和下同源臂片段, 只能在敲除株中扩增出条带。本研究通过 PEG 介导的转化与 PCR 筛选后得到 4 个转化子, 用 P1 扩增均无条带出现, 但用

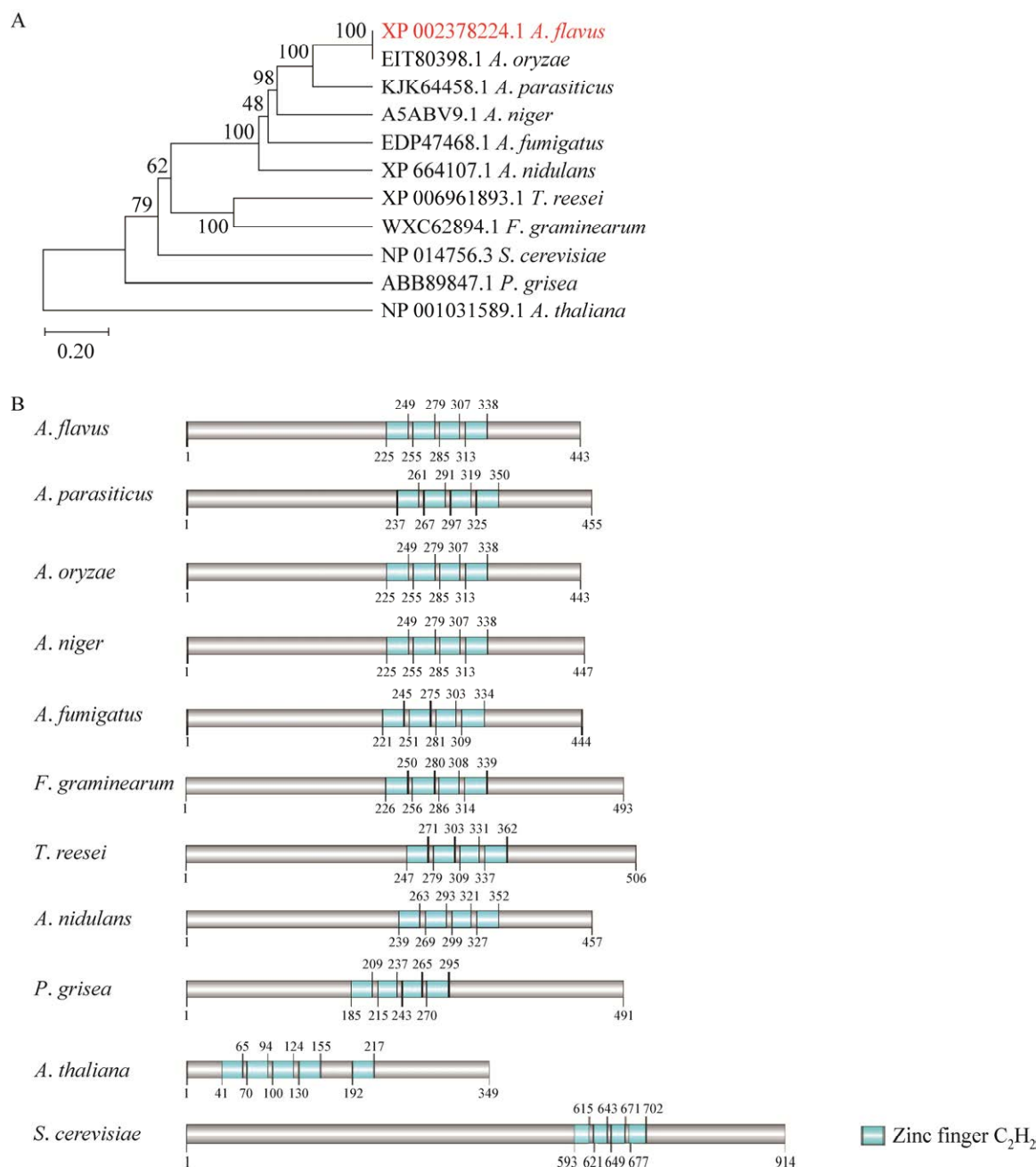


图 1 黄曲霉及其他真菌中 AZF1 蛋白的系统发育树及结构域分析 A: 真菌中 AZF1 蛋白的进化树，其中所用的蛋白信息如下：AflAZF1 (XP_002378224.1, *Aspergillus flavus* NRRL3357); AnAZF1 (A5ABV9.1, *A. niger* CBS 513.88); AfAZF1 (EDP47468.1, *A. fumigatus* A1163); TrAZF1 (XP_006961893.1, *Trichoderma reesei* QM6a); Azf1p (NP_014756.3, *Saccharomyces cerevisiae* S288C); CON1 (ABB89847.1, *Pyricularia grisea*); ApAZF1 (KJK64458.1, *A. parasiticus*); AoAZF1 (EIT80398.1, *A. oryzae*); AnAZF1 (XP_664107.1, *A. nidulans*); FgAZF1 (WXC62894.1, *Fusarium graminearum*); AtAZF1 (GHJ86605.1, *Arabidopsis thaliana*). B: 真菌中 AZF1 蛋白的结构域

Fig. 1 The phylogenetic tree and domain analysis of the AZF1 proteins in *Aspergillus flavus* and other fungi. A: The phylogenetic tree of AZF1 proteins. The phylogenetic tree were constructed using MEGA7.0 software. The protein information is as follow: AflAZF1 (XP_002378224.1, *A. flavus* NRRL3357); AnAZF1 (A5ABV9.1, *A. niger* CBS 513.88); AfAZF1 (EDP47468.1, *A. fumigatus* A1163); TrAZF1 (XP_006961893.1, *Trichoderma reesei* QM6a); Azf1p (NP_014756.3, *Saccharomyces cerevisiae* S288C); CON1 (ABB89847.1, *Pyricularia grisea*); ApAZF1 (KJK64458.1, *A. parasiticus*); AoAZF1 (EIT80398.1, *A. oryzae*); AnAZF1 (XP_664107.1, *A. nidulans*); FgAZF1 (WXC62894.1, *Fusarium graminearum*); AtAZF1 (GHJ86605.1, *Arabidopsis thaliana*). B: The domain of AZF1 proteins.

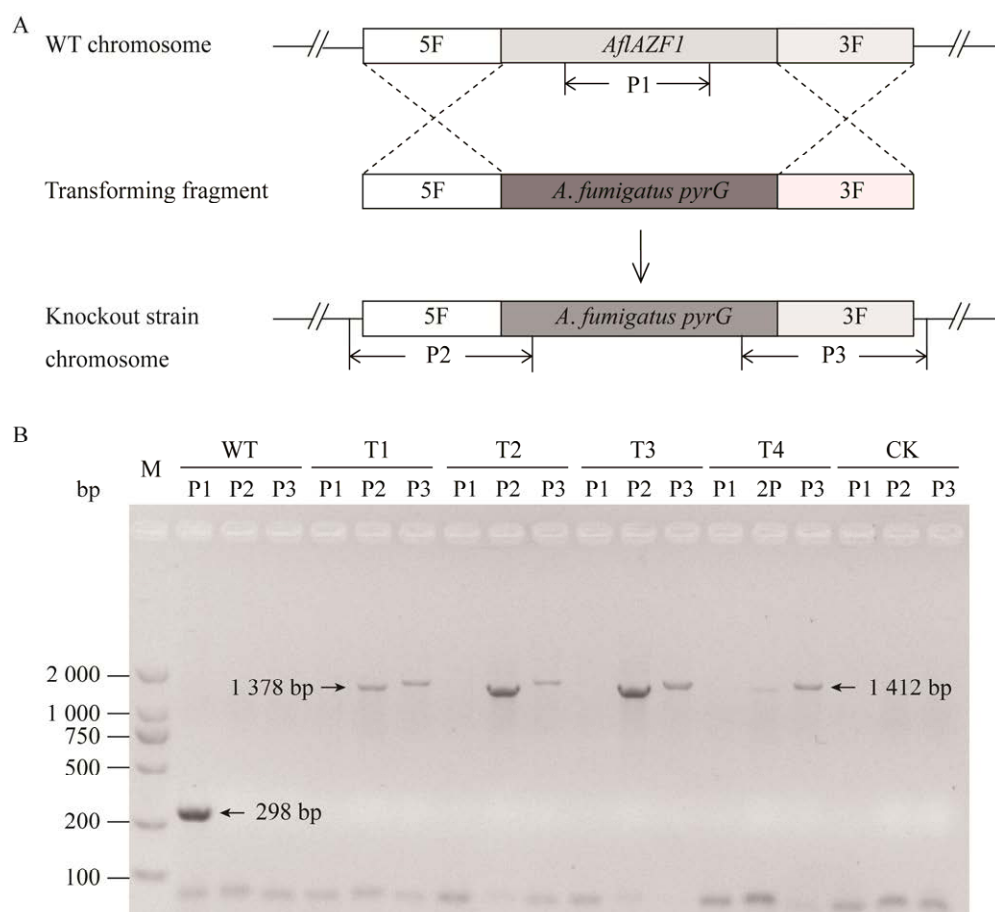


图2 黄曲霉 *AflAZF1* 缺失菌株的构建 A: 黄曲霉 *AflAZF1* 缺失菌株构建原理图; B: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 菌株的 PCR 验证. 疑似敲除株的转化子分别用 T1、T2、T3 和 T4 表示; 野生型菌株 WT 作为阳性对照; CK 以 ddH₂O 为模板, 作为阴性对照; 琼脂糖凝胶孔编号 P1、P2、P3 分别表示用引物 P1、P2 和 P3 的扩增结果. Marker: DL2000

Fig. 2 Construction of *AflAZF1* deletion mutant strain of *Aspergillus flavus*. A: Strategy of the construction of the *AflAZF1* knockout mutant. B: PCR verification of WT (wild type) and $\Delta AflAZF1$ strains. Knockout transformants are represented by T1, T2, T3, and T4; WT strain is the positive control; CK uses ddH₂O as a template, serving as the negative control; Gel wells numbered P1, P2, and P3 represent the amplification results using primers P1, P2, and P3, respectively. Marker: DL2000.

P2 和 P3 扩增则有条带(图 2B)。由此可知, 转化子 T1、T2、T3 和 T4 均为正确的基因敲除菌株。选取 T2 作为后续试验的研究对象。

2.3 *AflAZF1* 正调控黄曲霉分生孢子的产生

黄曲霉的分生孢子不仅是其在生态系统中的主要传播形式, 同时可以长期在恶劣环境中生存(Cho *et al.* 2022)。为了研究 *AflAZF1* 在黄曲霉生长和产孢中的功能, 本试验将 WT 和 $\Delta AflAZF1$ 菌株接种在 PDA 培养基上, 观察菌落生长及分生孢子的情况(图 3A), WT 与 $\Delta AflAZF1$ 菌株的生长没有明显差别, 但前者孢子呈深绿色, 后者呈浅绿色。统计分析发现 WT 与 $\Delta AflAZF1$ 菌株的菌落直径之间无显著差异(图 3B), 但 $\Delta AflAZF1$

菌株产生的分生孢子量显著低于野生型(图 3C)。由此可见, *AflAZF1* 基因对黄曲霉生长没有影响, 但对分生孢子的产生具有正调控作用。

2.4 *AflAZF1* 是黄曲霉菌核形成的正调控因子

菌核是真菌的一种休眠结构, 能够帮助真菌度过恶劣的生存环境(陈彩霞等 2018)。为了探究 *AflAZF1* 是否影响黄曲霉菌核形成, 将 WT 和 $\Delta AflAZF1$ 菌株接种在 YEPS 培养基上观察菌核的产生情况。野生型菌株产生了大量的菌核, 而 $\Delta AflAZF1$ 菌株没有形成肉眼可见的菌核(图 4A)。统计结果显示, $\Delta AflAZF1$ 菌株没有形成菌核(图 4B)。由此可见, *AflAZF1* 正调控了黄曲霉菌核形成并在这个过程中发挥重要作用。

2.5 *AflAZF1* 对碳源利用的调控和其类型相关

黄曲霉生长受到碳水化合物代谢的影响 (Alvarez-Zúñiga *et al.* 2021), 为了研究 *AflAZF1* 是否影响黄曲霉对不同碳源的利用, 本研究将 WT 和 $\Delta AflAZF1$ 菌株分别接种在葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、蔗糖、木糖、淀粉、乳糖和甘油 8 种碳源培养基上, 测量菌落直径并统计孢子产量。WT 和 $\Delta AflAZF1$ 菌株在所有碳源培养基均观察不到明显差异, 直径测量和统计分析结果显示在以甘露糖和淀粉作碳源时 $\Delta AflAZF1$ 菌株的菌落直径显著大于野生型(图 5A, 5B)。分生孢子

数量统计结果表明, 与野生型相比, 在以葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、蔗糖、木糖作为唯一碳源时, $\Delta AflAZF1$ 菌株产生的孢子数量显著下降(图 5A, 5C); 而以乳糖和甘油为碳源时, $\Delta AflAZF1$ 菌株的孢子数量显著增加(图 5C)。综上所述, *AflAZF1* 在黄曲霉对碳源的利用中发挥重要功能, 且对不同碳源利用有明显差别。

2.6 黄曲霉适应酸和碱环境能力受 *AflAZF1* 的调控

为了探究转录因子 *AflAZF1* 在黄曲霉适应不同酸碱环境的功能, 本研究将野生型和 $\Delta AflAZF1$

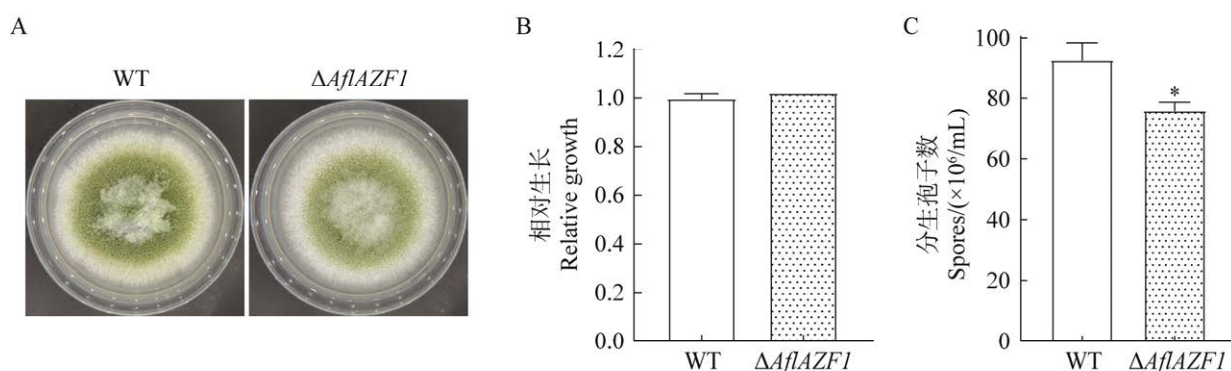


图 3 黄曲霉中 *AflAZF1* 对营养生长和分生孢子形成的影响 A: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 菌株的生长和产孢; B: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 菌落直径的统计分析; 相对生长=菌落直径/野生型菌落直径; C: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 产生的分生孢子统计分析; 误差棒是表示 5 次重复的标准差, *表示 $P < 0.05$ 差异显著, **表示 $P < 0.01$ 差异极显著; 下同

Fig. 3 Effects of *AflAZF1* in *Aspergillus flavus* on growth and conidial formation. A: Growth and conidial formation of the WT and $\Delta AflAZF1$ strains. B: Statistical analysis of the colony diameter of WT and $\Delta AflAZF1$ strains. Relative growth=colony diameter/wild-type colony diameter. C: Statistical analysis of the conidia produced by WT and $\Delta AflAZF1$. Error bars represent the standard deviation of five replicates. * Indicates a significant difference between the WT and $\Delta AflAZF1$ at 0.05 level; ** Indicate an extremely significant difference between the two strains at 0.01 level. The same below.

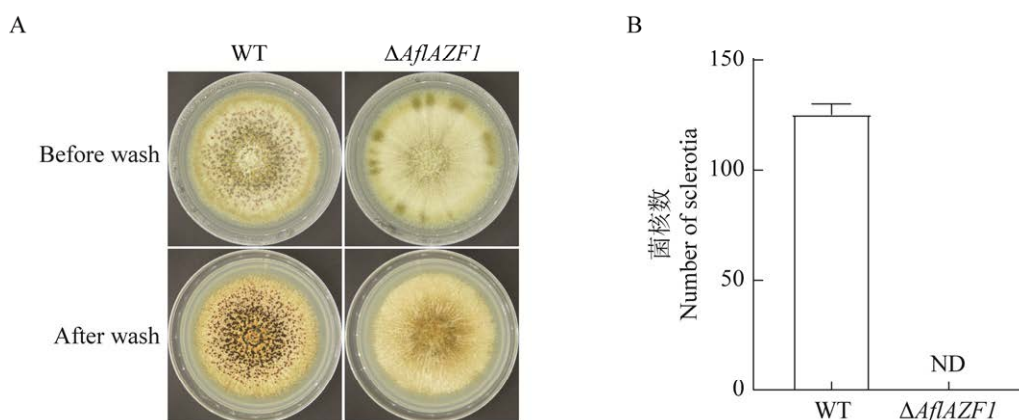


图 4 *AflAZF1* 基因的缺失导致黄曲霉不能形成菌核 A: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 在 YEPS 培养基上菌核形成的情况; B: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 在第 7 天时菌核数量的统计分析. ND 表示检测不到菌核

Fig. 4 Deletion of the *AflAZF1* gene results in the inability of *Aspergillus flavus* to form sclerotia. A: Sclerotia production by WT and $\Delta AflAZF1$ on YEPS culture medium. B: Statistical analysis of sclerotial yield of WT and $\Delta AflAZF1$ on the 7th day. ND indicates that no sclerotia were detected.

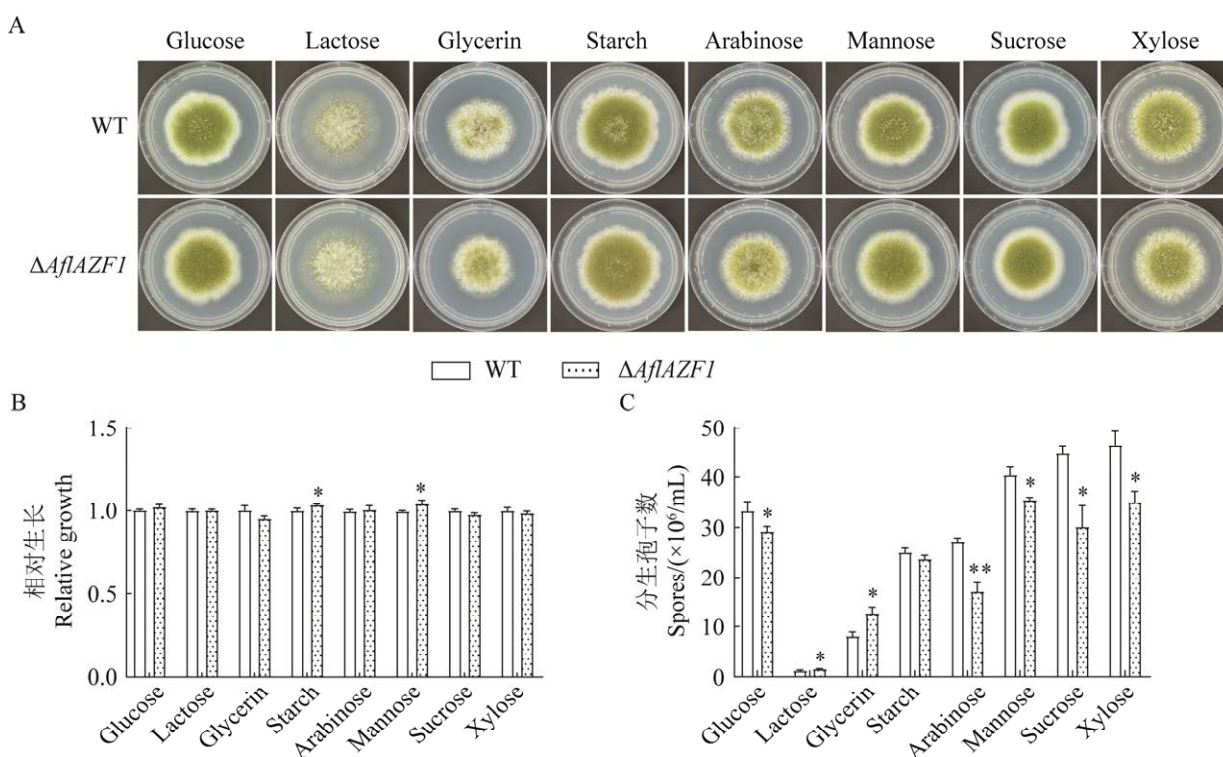


图 5 *AflAZF1* 调控黄曲霉的碳源利用过程 A: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 在不同碳源培养基上的生长情况; B: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 在不同的碳源培养基上第 5 天时菌落直径的统计分析; C: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 分生孢子数量的统计分析

Fig. 5 *AflAZF1* regulates the carbon source utilisation process in *Aspergillus flavus*. A: Growth of WT and $\Delta AflAZF1$ on different carbon source media. B: Statistics analysis of colony diameters of WT and $\Delta AflAZF1$ on eight types of carbon source media on day 5. C: Statistical analysis of conidia produced by WT and $\Delta AflAZF1$.

菌株分别接种在 pH 5、7、9 和 11 的 YGT 培养基上,第 5 天测量菌落直径并统计分生孢子数量。菌落直径分析结果显示在不同 pH 的培养基下 $\Delta AflAZF1$ 菌株和野生型的直径大小相近(图 6A, 6B)。进一步统计分生孢子数量,在 pH 7 和 pH 9 时 $\Delta AflAZF1$ 菌株的孢子量与野生型之间无显著差异,但在 pH 5 和 pH 11 时 $\Delta AflAZF1$ 菌株孢子产量则显著少于野生型(图 6A, 6C)。以上结果表明 *AflAZF1* 基因不影响黄曲霉在中性和弱碱性环境中的生长,但影响其适应酸性和碱性较强的环境。

2.7 *AflAZF1* 负调控黄曲霉毒素 AFB₁ 的合成

黄曲霉毒素是黄曲霉产生的最主要真菌毒素之一,被世界卫生组织认定为 I 类致癌物,具有致癌、致畸和致突变作用,严重威胁人和动物的生命健康,并造成巨大的经济损失(邢福国等 2021)。本研究检测了 WT 和 $\Delta AflAZF1$ 菌株在 YES 固体培养基上培养时 AFB₁ 的产量。结果表

明, $\Delta AflAZF1$ 菌株的毒素光斑亮度明显强于野生型(图 7A)。相对定量分析结果显示 $\Delta AflAZF1$ 菌株的毒素产量显著高于野生型(图 7B)。以上结果表明 *AflAZF1* 负调控了黄曲霉毒素 AFB₁ 的合成。

2.8 *AflAZF1* 调控黄曲霉对花生的致病力

花生是我国重要的经济作物和油料作物,而花生在种植、收获、储藏和加工过程中极易受黄曲霉毒素污染(杨博磊等 2021)。本研究用 WT 和 $\Delta AflAZF1$ 菌株侵染花生,统计分生孢子数量并检测 AFB₁ 产量。与 WT 菌株相比, $\Delta AflAZF1$ 菌株侵染花生时的生物量无明显差异(图 8A)。进一步统计分生孢子数量,结果表明 $\Delta AflAZF1$ 菌株侵染花生产生的孢子数量显著低于野生型(图 8B)。薄层层析法结果显示 $\Delta AflAZF1$ 菌株毒素光斑的亮度强于野生型(图 8C),相对定量分析结果显示 $\Delta AflAZF1$ 菌株的 AFB₁ 产量显著高于野生型(图 8D)。由上述结果可知, *AflAZF1* 参与调控了黄曲霉在花生上的生长和毒素 AFB₁ 的合成。

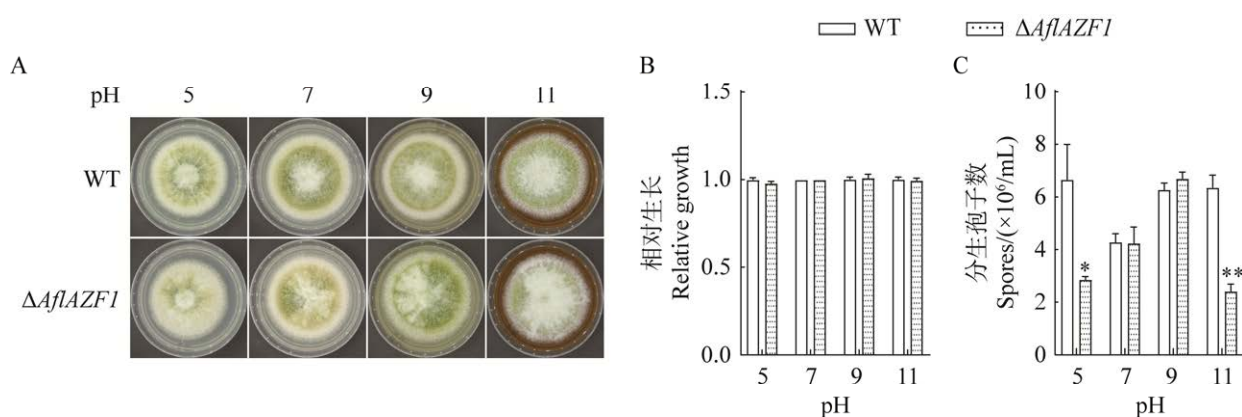


图 6 *AflAZF1* 调控黄曲霉适应酸碱环境的能力 A: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 在不同 pH 培养基上的生长情况; B: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 菌落直径的统计分析; C: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 分生孢子数量的统计分析

Fig. 6 *AflAZF1* mediates *Aspergillus flavus* adaptation to different acidic and alkaline environments. A: Growth of WT and $\Delta AflAZF1$ on different pH media. B: Statistical analysis of the colony diameter of WT and $\Delta AflAZF1$. C: Statistical analysis of the conidia produced by WT and $\Delta AflAZF1$.

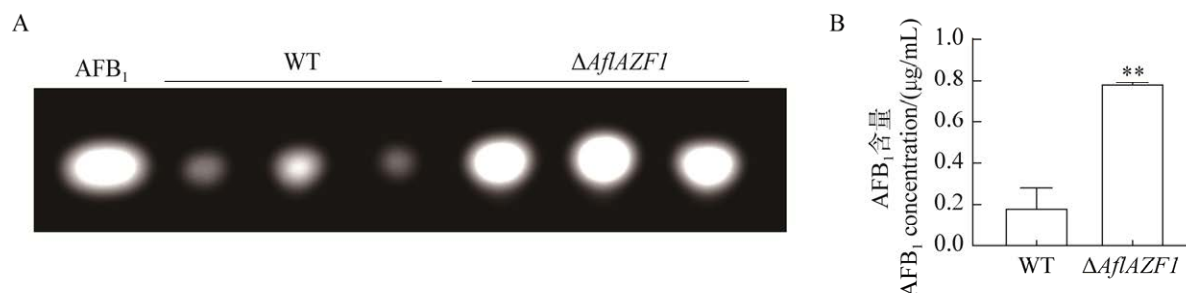


图 7 *AflAZF1* 负调控黄曲霉毒素 AFB₁ 的合成 A: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 在 YES 培养基上产生黄曲霉毒素 AFB₁ 的薄层层析分析, AFB₁ 为黄曲霉毒素标准品; B: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 在 YES 培养基培养时 AFB₁ 含量的定量分析, 将 AFB₁ 标品的浓度调整为 1 μg/mL, 利用 GeneTools 软件对毒素进行相对定量; 下同

Fig. 7 *AflAZF1* negatively regulates the AFB₁ biosynthesis. A: TLC analysis of the production of AFB₁ by WT and $\Delta AflAZF1$ on a YES medium. AFB₁ is the standard aflatoxin. B: Quantitative analysis of the yield of AFB₁ produced by WT and $\Delta AflAZF1$ on YES medium. Concentration of standard AFB₁ is adjusted to 1 μg/mL, then the relative quantification of AFB₁ was analyzed using GeneTools software. The same below.

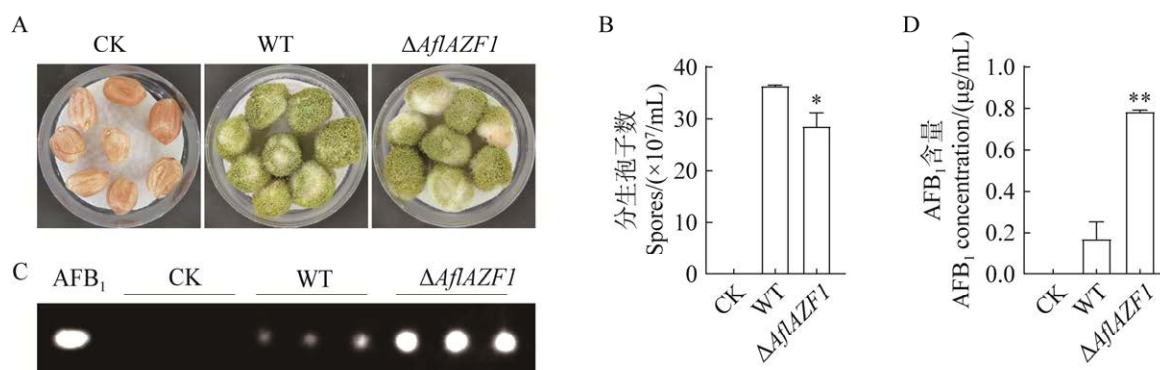


图 8 *AflAZF1* 影响黄曲霉侵染花生的能力 A: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 菌株在花生上的生长情况; B: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 在花生上产生分生孢子数量的定量分析; C: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 产生 AFB₁ 的薄层层析分析; D: WT 和 $\Delta AflAZF1$ 产生 AFB₁ 含量的定量分析

Fig. 8 Effects of *AflAZF1* on the pathogenicity of *Aspergillus flavus*. A: Growth of WT and $\Delta AflAZF1$ strains on peanut. B: Quantitative analysis of the conidia produced by WT and $\Delta AflAZF1$ on peanuts. C: TLC analysis of AFB₁ from WT and $\Delta AflAZF1$. D: Quantitative analysis of AFB₁ produced by WT and $\Delta AflAZF1$.

3 讨论

锌指型转录因子 C₂H₂ 家族中的 AZF1 最早在酿酒酵母中被发现,其在非发酵条件下优先表达(Stein *et al.* 1998)。进一步研究发现酿酒酵母的 AZF1 正调控了葡萄糖诱导细胞 G1 周期蛋白编码基因 *CLN3* 的转录(Newcomb *et al.* 2002)。Slattery *et al.* (2006)发现酿酒酵母中 AZF1 调控基因的类型和碳源的种类相关,当葡萄糖作为碳源时调控了碳源和能量相关基因,当乳酸和甘油作为碳源时调控了细胞壁完整性相关基因。里氏木霉中 *AZF1* 的同源基因 *TrAZF1* 在碳源代谢阻遏(CCR)条件下无法激活纤维素酶基因的表达(Maués *et al.* 2023)。此外, *TrAZF1* 敲除菌株在 PDA 和以乳糖、葡萄糖、木糖、甘露糖、淀粉以及甘油 6 种不同碳源的培养基上菌丝正常生长,而在以阿拉伯糖为碳源的培养基上突变株出现了生长缺陷(Antonieto *et al.* 2019)。黄曲霉中的 *AflAZF1* 的功能与里氏木霉中的 *TrAZF1* 类似,但存在部分差异。与野生型菌株相比,黄曲霉 *AflAZF1* 敲除菌株在 PDA 和以乳糖、甘油、葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、蔗糖 6 种碳源培养基上的菌丝生长没有区别,但在以淀粉和甘露糖为碳源的时 *AflAZF1* 敲除菌株的菌落直径显著增加,与其在里氏木霉中的同源蛋白 *TrAZF1* 的作用不完全相同。*AflAZF1* 敲除菌株在以乳糖和甘油作为碳源的培养基上的分生孢子数量显著多于野生型,而在 PDA 和以葡萄糖、阿拉伯糖、甘露糖、蔗糖以及木糖为碳源的培养基上的分生孢子数量显著少于野生型。这可能是 *AflAZF1* 基因缺失后,在分别以乳糖和甘油为碳源的诱导条件下,解除或改变了对分生孢子形成关键基因(如 *blrA*)抑制,激活了原本受 *AflAZF1* 抑制的促进孢子形成基因,进而促使分生孢子形成数量显著增加。由此可见,真菌中转录因子 AZF1 调控碳源代谢的功能是保守的,但是具体机制与真菌种类相关。

C₂H₂ 型转录因子在分生孢子形成和菌核产生过程中起着关键的调控作用。里氏木霉 *TrAZF1* 敲除菌株的分生孢子形成延迟(Antonieto *et al.* 2019)。C₂H₂ 型转录因子 *Tha09974* 正调控木霉的产孢(李昕玥等 2019)。大丽轮枝菌的 *vdmsn2*

能控制菌丝生长、微菌核形成和毒力(Tian *et al.* 2017)。稻曲病菌 $\Delta UvCGBP1$ 菌株形成的病斑面积和菌核数量均少于野生型菌株(Chen *et al.* 2021)。本研究发现黄曲霉 *AflAZF1* 对分生孢子的产生和菌核的形成具有正调控作用,特别是突变株在 37 °C 条件下生长 7 d 后完全没有产生菌核。因此, C₂H₂ 型转录因子 AZF1 和该类型的其他转录因子一样在产孢和菌核形成中起作用。

C₂H₂ 型转录因子能调控真菌适应酸碱环境的能力。真菌中广泛存在的锌指转录因子 PacC 在调节真菌对环境的适应过程中起作用。烟曲霉和白僵菌的 *pacC* 缺失突变体对碱性条件的敏感性提高(Bertuzzi *et al.* 2014; Luo *et al.* 2017),而扩展青霉的 *pacC* 突变体在酸性和碱性条件下生长和产孢能力均明显下降(Chen *et al.* 2018)。此外,白僵菌中 *pacC* 的缺失导致其对渗透压胁迫和 SDS 的敏感性呈 pH 依赖性增加(Luo *et al.* 2017)。里氏木霉的 *TrAZF1* 敲除菌株对极端 pH 变化敏感(Antonieto *et al.* 2019)。与里氏木霉类似,黄曲霉 *AflAZF1* 基因的缺失导致在酸和强碱环境下分生孢子产生数量显著低于野生型,而 *AflAZF1* 的缺失对所有酸碱条件下的菌丝生长都没有影响。转录因子 AZF1 在真菌适应不同 pH 环境中发挥重要作用,但是其具体功能具有种属特异性。

真菌 C₂H₂ 型转录因子不仅调控生长发育,而且在调控次级代谢产物的合成方面同样发挥作用。哈茨木霉中 *Tha09974* 的敲除显著降低了菌丝的重寄生能力和对病原菌的拮抗能力,而在对峙培养中野生型菌株能够明显抑制病菌生长(李昕玥等 2019)。黑曲霉中 *AnAZF1* 通过调节赭曲霉毒素 A (OTA)合成基因的表达正调控了 OTA 的生物合成(Wei *et al.* 2023)。此外,有研究表明黄曲霉锌簇蛋白[Zn(II)₂Cys₆]转录因子 *AflR* 调节大多数黄曲霉毒素合成基因,*AflR* 的缺失导致毒素合成基因表达下调从而使黄曲霉毒素不再合成(陈茹和刘钟滨 2005; Liang *et al.* 2022)。黄曲霉转录因子 *AflAZF1* 的缺失导致其在 YES 培养基和花生上合成的 AFB₁ 产量显著增加。*AflAZF1* 基因负调控了黄曲霉毒素的合成,这与黑曲霉中 *AZF1* 的功能相反。

4 总结

C₂H₂ 型转录因子是一种锌指蛋白类转录因子,参与调控真菌的生长、产孢、代谢、致毒及对不良环境的耐受性等生命过程,具有多种调控功能(Kim *et al.* 2009; 李慧燕等 2016)。本研究结果显示,黄曲霉中 *AflAZF1* 不仅调控分生孢子和菌核的形成及 AFB₁ 的生物合成,还通过影响产孢能力调节对不同碳源的利用和对极端 pH 条件的适应性。本研究为黄曲霉污染防治及新型生物防控策略的制定奠定了理论依据。

作者贡献

林竑翔: 数据分析, 论文撰写; 李明智、郭慧华: 试验操作; 袁军: 提供实验材料, 试验技术指导; 汪世华: 提供实验材料, 论文修改; 王秀娜: 试验方案设计, 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]

- Alvarez-Zúñiga MT, Castañeda GD, Aguilar OG, 2021. Effect of different carbon sources on the growth and enzyme production of a toxigenic and a non-toxigenic strain of *Aspergillus flavus*. *Preparative Biochemistry Biotechnology*, 51(8): 769-779
- Antonieto CAC, Vieira NKM, de Paula RG, Nora LC, Anzolini CMH, Guazzaroni ME, Almeida F, da Silva TA, Ries LNA, de Assis LJ, Goldman GH, Silva RN, Silva-Rocha R, 2019. A novel Cys₂His₂ zinc finger homolog of AZF1 modulates holocellulase expression in *Trichoderma reesei*. *mSystems*, 4(4): e00161-19
- Bao LF, Qin YQ, Qu YB, 2014. Research progress of Flug-brla pathway involved in asexual development of *Aspergillus nidulans*. *Microbiology China*, 41(1): 104-110 (in Chinese)
- Bertuzzi M, Schrettl M, Alcazar-Fuoli L, *et al.* (more than 20 authors), 2014. The pH-responsive PacC transcription factor of *Aspergillus fumigatus* governs epithelial entry and tissue invasion during pulmonary aspergillosis. *PLoS Pathogens*, 10: e1004413
- Bok JW, Wiemann P, Garvey GS, Lim FY, Haas B, Wortman J, Keller NP, 2014. Illumina identification of RsrA, a conserved C₂H₂ transcription factor coordinating the NapA mediated oxidative stress signaling pathway in *Aspergillus*. *BMC Genomics*, 15(1): 1011
- Caracuel Z, Roncero M, Espeso E, González-Verdejo C, García-Maceira F, Pietro A, 2003. The pH signalling transcription factor PacC controls virulence in the plant pathogen *Fusarium oxysporum*. *Molecular Microbiology*, 48(3): 765-779
- Chen CX, Wang ZH, Feng J, Liang Y, 2018. Research progress on sclerotium of pathogenic fungi. *Chinese Journal of Microbiology*, 45(12): 2762-2768 (in Chinese)
- Chen R, Liu ZB, 2005. Regulation gene *aflR* in the biosynthetic pathway of aflatoxin. *Journal of Cell Biology*, 27(4): 431-434 (in Chinese)
- Chen XY, Li PP, Liu H, Chen XL, Huang JB, Luo CX, Li GT, Hsiang T, Collinge DB, Zheng L, 2021. A novel transcription factor UvCGBP1 regulates development and virulence of rice false smut fungus *Ustilaginoidea virens*. *Virulence*, 12(1): 1563-1579
- Chen Y, Li BQ, Xu XD, Zhang ZQ, Tian SP, 2018. The pH-responsive PacC transcription factor plays pivotal roles in virulence and patulin biosynthesis in *Penicillium expansum*. *Environmental Microbiology*, 20(11): 4063-4078
- Cho HJ, Son SH, Chen W, Son YE, Lee I, Yu JH, Park HS, 2022. Regulation of conidiogenesis in *Aspergillus flavus*. *Cells*, 11(18): 2796
- Ding N, Xing FG, Liu X, Selvaraj JN, Wang LM, Zhao YJ, Wang Y, Guo W, Dai XF, Liu Y, 2015. Variation in fungal microbiome (mycobiome) and aflatoxin in stored in-shell peanuts at four different areas of China. *Frontiers in Microbiology*, 6: 1055
- Hu PJ, Wang Y, Zhou J, Pan YY, Liu G, 2015. AcstA, which encodes an APSES transcription regulator, is involved in conidiation, cephalosporin biosynthesis and cell wall integrity of *Acremonium chrysogenum*. *Fungal Genetics and Biology*, 83: 26-40
- Jung B, Park J, Son H, Lee YW, Seo YS, Lee J, 2014. A putative transcription factor pcs1 positively regulates both conidiation and sexual reproduction in the cereal pathogen *Fusarium graminearum*. *The Plant Pathology Journal*, 30(3): 236-244
- Kim HR, Chae KS, Han KH, Han DM, 2009. The *NsdC* gene encoding a putative C₂H₂-type transcription factor is a key activator of sexual development in *Aspergillus nidulans*. *Genetics*, 182(3): 771-783
- Li D, Qin L, Wang SH, Yuan J, 2020. Omics research progress on *Aspergillus flavus* secondary metabolism. *Mycosystema*, 39(3): 510-520 (in Chinese)
- Li HY, Lin LC, Xiao DG, Tian CG, 2016. Screening of cellulase production in gene knockout mutants of C₂H₂ transcription factor family in *Neurospora crassa*. *Mycosystema*, 35(2): 161-169 (in Chinese)
- Li XY, Han XX, Liu ZQ, He CZ, 2013. The function and properties of the transcriptional regulator COS1 in *Magnaporthe oryzae*. *Fungal Biology*, 117(4): 239-249
- Li XY, Wang LR, Li M, Wu BL, Jiang XL, 2019. Function of the C₂H₂ transcription factor Tha09974 of *Trichoderma*

- harziensis*. Chinese Journal of Biological Control, 35(3): 407-415 (in Chinese)
- Liang LK, Yang HJ, Wei S, Zhang SB, Chen L, Hu YS, Lv YY, 2022. Putative C₂H₂ transcription factor AflZKS3 regulates aflatoxin and pathogenicity in *Aspergillus flavus*. Toxins, 14(12): 883
- Luo ZB, Ren H, Mousa JJ, Rangel DEN, Zhang YJ, Bruner SD, Keyhani NO, 2017. The PacC transcription factor regulates secondary metabolite production and stress response, but has only minor effects on virulence in the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana*. Environmental Microbiology, 19: 788-802
- Maués DB, Maraschin JC, Duarte DÂ, Antoniêto ACC, Silva RN, 2023. Overexpression of the transcription factor Azfl reveals novel regulatory functions and impacts β -glucosidase production in *Trichoderma reesei*. Journal of Fungi, 9(12): 1173
- Newcomb LL, Hall DD, Heideman W, 2002. AZF1 a glucose-dependent positive regulator of CLN3 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cellular Biology, 22(5): 1607-1614
- Ries LN, Beattie SR, Espeso EA, Cramer RA, Goldman G, 2016. Diverse regulation of the CreA carbon catabolite repressor in *Aspergillus nidulans*. Genetics, 203(1): 335-352
- Schumacher J, de Larrinoa IF, Tudzynski B, 2008. Calcineurin-responsive zinc finger transcription factor CRZ1 of *Botrytis cinerea* is required for growth, development, and full virulence on bean plants. Eukaryotic Cell, 7(4): 584-601
- Semkiv MV, Ruchala J, Tsaruk AY, Zazulya AZ, Vasylyshyn RV, Dmytruk OV, Zuo MX, Kang YQ, Dmytruk KV, Sibirny AA, 2022. The role of hexose transporter-like sensor hxs1 and transcription activator involved in carbohydrate sensing azfl in xylose and glucose fermentation in the thermotolerant yeast *Ogataea polymorpha*. Microbial Cell Factories, 21(1): 1-11
- Slattery MG, Liko D, Heideman W, 2006. The function and properties of the Azfl transcriptional regulator change with growth conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic Cell, 5(2): 313-320
- Stein T, Kricke J, Becher D, Lisowsky T, 1998. Azflp is a nuclear-localized zinc-finger protein that is preferentially expressed under non-fermentative growth conditions in *Saccharomyces cerevisiae*. Current Genetics, 34(4): 287-296
- Sun J, Glass NL, 2017. Identification of the *CRE-1* cellulytic regulon in *Neurospora crassa*. PLoS One, 6(9): e25654
- Teichmann B, Liu L, Schink KO, Bölker M, 2010. Activation of the ustilagic acid biosynthesis gene cluster in *Ustilago maydis* by the C₂H₂ zinc finger transcription factor Rual. Applied and Environmental Microbiology, 76(8): 2633-2640
- Tian LY, Yu J, Wang YL, Tian CM, 2017. The C₂H₂ transcription factor VdMsn2 controls hyphal growth, microsclerotia formation, and virulence of *Verticillium dahlia*. Fungal Biology, 121(12): 1001-1010
- Wang XN, Zha WJ, Dong MK, Wang SH, 2020. Research advances in genetic regulation of aflatoxin biosynthesis. Mycosystema, 39(3): 492-508 (in Chinese)
- Wei S, Hu CJ, Zhang YG, Lv YY, Zhang SB, Zhai HC, Hu YS, 2023. AnAzfl acts as a positive regulator of ochratoxin A biosynthesis in *Aspergillus niger*. Applied Microbiology and Biotechnology, 107(7-8): 2501-2514
- Xing FG, Li X, Zhang CX, 2021. Aflatoxin production mechanism and contamination prevention strategies. Journal of Food Science and Technology, 39(1): 13-26, 64 (in Chinese)
- Yang BL, Geng H, Wang G, Zhang CX, Li L, Nie CG, Xing FG, Liu Y, 2021. Distribution of aflatoxigenic *Aspergillus* in peanut soil and its correlation with post-harvest peanut aflatoxin contamination in China. Journal of Nuclear Agriculture Science, 35(4): 863-869 (in Chinese)
- Zhang J, Chi YJ, Gu XZ, 2011. Analysis of C₂H₂ zinc finger gene expression in *Pleura metatulosus*. Journal of Jilin Agricultural University, 43(1): 41-50 (in Chinese)
- Zhao JY, Peng MY, Zhang SY, Shan YX, Xing XP, Shi Y, Li HY, Yang X, Li HL, Chen LL, 2022. The involvement of C₂H₂ zinc finger transcription factor FpCzf7 in the growth and pathogenicity of *Fusarium pseudograminea*. Bulletin of Biotechnology, 38(8): 216-224 (in Chinese)
- ### [附中文参考文献]
- 鲍龙飞, 秦玉琪, 曲音波, 2014. Flug-brla 途径参与构巢曲霉无性发育机制的研究进展. 微生物学通报, 41(1): 104-110
- 陈彩霞, 王泽昊, Feng Jie, 梁月, 2018. 植物病原真菌的菌核研究进展. 微生物学通报, 45(12): 2762-2768
- 陈茹, 刘钟滨, 2005. 黄曲霉毒素生物合成途径调节基因 *aflR*. 细胞生物学杂志, 27(4): 431-434
- 李丁, 秦岭, 汪世华, 袁军, 2020. 黄曲霉菌次级代谢的组学研究进展. 菌物学报, 39(3): 510-520
- 李慧燕, 林良才, 肖冬光, 田朝光, 2016. 粗糙脉孢菌 C₂H₂ 转录因子家族基因敲除突变体产纤维素酶筛选分析. 菌物学报, 35(2): 161-169
- 李昕玥, 王丽荣, 李梅, 吴蓓蕾, 蒋细良, 2019. 哈茨木霉 C₂H₂ 型转录因子 Tha09974 功能研究. 中国生物防治学报, 35(3): 407-415
- 王秀娜, 查文洁, 董明科, 汪世华, 2020. 黄曲霉毒素生物合成的遗传调控研究进展. 菌物学报, 39(3): 492-508
- 邢福国, 李旭, 张晨曦, 2021. 黄曲霉毒素的产生机制及污染防控策略. 食品科学技术学报, 39(1): 13-26, 64
- 杨博磊, 耿海荣, 王刚, 张晨曦, 李丽, 聂呈荣, 邢福国, 刘阳, 2021. 我国花生土壤黄曲霉菌分布与产后花生黄曲霉毒素污染相关性研究. 核农学报, 35(4): 863-869
- 张俊, 池玉杰, 谷新治, 2021. 偏肿革痲菌 C₂H₂ 型锌指基因表达分析. 吉林农业大学学报, 43(1): 41-50
- 赵静雅, 彭梦雅, 张时雨, 单艺轩, 邢小萍, 施艳, 李海洋, 杨雪, 李洪连, 陈琳琳, 2022. C₂H₂ 锌指转录因子 FpCzf7 参与假禾谷镰孢的生长和致病性. 生物技术通报, 38(8): 216-224