

磷酸酶 *Ssppe1* 基因过表达对甘蔗鞭黑粉菌有性配合和致病性的调控作用

仇金凤^{1,3,4}, 胡朱奕², 周皑灵², 吴昊鸣^{1,3,4}, 赵丽九^{1,2,4}, 李茹^{1,2,3*}

1 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广西 南宁

2 广西大学 生命科学与技术学院, 广西 南宁

3 广西甘蔗生物学重点实验室, 广西 南宁

4 广西大学 农学院, 广西 南宁

仇金凤, 胡朱奕, 周皑灵, 吴昊鸣, 赵丽九, 李茹. 磷酸酶 *Ssppe1* 基因过表达对甘蔗鞭黑粉菌有性配合和致病性的调控作用[J]. 微生物学报, 2026, 66(7): 3526-3543.

QIU Jinfeng, HU Zhuyi, ZHOU Ailing, WU Haoming, ZHAO Lijiu, LI Ru. Overexpression of the phosphatase gene *Ssppe1* regulates the sexual mating and pathogenicity of *Sporisorium scitamineum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2026, 66(7): 3526-3543.

摘要: 甘蔗黑穗病是由甘蔗鞭黑粉菌(*Sporisorium scitamineum*)引起的严重真菌病害, 会导致甘蔗减产与经济损失。蛋白可逆磷酸化对甘蔗鞭黑粉菌的有性配合和致病性至关重要。蛋白磷酸酶作为可逆磷酸化的关键调节因子, 其在甘蔗鞭黑粉菌中的作用尚未明确。【目的】揭示磷酸酶 *SsPpe1* 在甘蔗鞭黑粉菌中的生物学功能, 为甘蔗黑穗病的高效防控提供重要靶标。【方法】利用农杆菌介导的遗传转化技术构建甘蔗鞭黑粉菌的 *Ssppe1* 过表达突变体 OE-*Ssppe1*, 系统分析其担孢子形态、有性配合能力、胁迫耐受性及致病性。【结果】OE-*Ssppe1* 过表达株的担孢子呈假菌丝状, 细胞核数目增多, 几丁质分布异常; 其对 NaCl 和 SDS 的耐受性降低; 有性配合能力显著减弱, 致病性明显下降。RT-qPCR 与 RNA-seq 分析表明, *Ssppe1* 过表达影响了信息素响应、丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)和环磷酸腺苷-蛋白激酶 A(cyclic adenosine monophosphate-protein kinase A, cAMP-PKA)信号通路相关基因的表达, 并干扰蛋白质的合成与折叠过程。【结论】磷酸酶 *SsPpe1* 参与调控甘蔗鞭黑粉菌的担孢子形态建成、胁迫响应、有性配合和致病过程, 为深入解析甘蔗鞭黑粉菌的致病机制及开发靶向防控策略提供了理论依据。

关键词: 甘蔗鞭黑粉菌; 蛋白磷酸酶; *SsPpe1*; 有性配合; 致病性

资助项目: 国家自然科学基金(32472510); 广西壮族自治区科技重大专项(GKAA24206010-1)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32472510) and the Guangxi Zhuang Autonomous Region Science and Technology Major Program (GKAA24206010-1).

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

Received: 2025-12-25; Accepted: 2026-02-12; Published online: 2026-02-24

Overexpression of the phosphatase gene *Ssppe1* regulates the sexual mating and pathogenicity of *Sporisorium scitamineum*

QIU Jinfeng^{1,3,4}, HU ZhuYi², ZHOU Ailing², WU Haoming^{1,3,4}, ZHAO Lijiu^{1,2,4}, LI Ru^{1,2,3*}

1 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-Bioresources, Nanning, Guangxi, China

2 College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi, China

3 Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Biology, Nanning, Guangxi, China

4 College of Agriculture, Guangxi University, Nanning, Guangxi, China

Abstract: Sugarcane smut is a severe fungal disease caused by *Sporisorium scitamineum*, resulting in yield reduction and economic losses. Reversible protein phosphorylation plays a crucial role in the sexual mating and pathogenicity of *S. scitamineum*. Protein phosphatases, as key regulators of reversible protein phosphorylation, remain poorly characterized in *S. scitamineum*. **[Objective]** To elucidate the biological functions of the protein phosphatase SsPpe1 in *S. scitamineum*, providing a potential target for effective control of sugarcane smut. **[Methods]** We constructed overexpression mutants OE-*Ssppe1* by *Agrobacterium*-mediated genetic transformation technology and analyzed the sporidium morphology, sexual mating ability, stress tolerance, and pathogenicity. **[Results]** The OE-*Ssppe1* sporidia exhibited pseudohyphal morphology with multiple nuclei and abnormal chitin accumulation. The OE-*Ssppe1* mutants showed reduced tolerance to NaCl and SDS, sexual mating, and pathogenicity. RT-qPCR and RNA-seq analyses revealed that *Ssppe1* overexpression affected the expression of genes related to pheromone response, MAPK, and cAMP-PKA signaling pathways. In addition, *Ssppe1* overexpression affected protein synthesis and folding process. **[Conclusion]** The protein phosphatase SsPpe1 is involved in regulating the sporidium morphology, stress responses, sexual mating, and pathogenicity of *S. scitamineum*. These findings provide a theoretical basis for thoroughly elucidating the pathogenic mechanisms of *S. scitamineum* and developing targeted disease control strategies.

Keywords: *Sporisorium scitamineum*; protein phosphatase; SsPpe1; sexual mating; pathogenicity

甘蔗是一种广泛种植于热带与亚热带地区的重要糖料作物，其蔗糖产量约占全球总糖产量的 80%。中国是仅次于巴西和印度的第三大甘蔗生产国，蔗糖产量占我国食糖总量的 90% 以上^[1]。除用于制糖外，甘蔗收获和加工过程中产生的废弃物也具有工业价值。甘蔗渣被视为微生物燃料电池(microbial fuel cell, MFC)的优势原料^[2-3]。近年来，甘蔗渣纤维因其独特的结构、化学特性及广泛的可用性，成为处理各种污染物的非常合适的吸附剂^[4]。

由甘蔗鞭黑粉菌(*Sporisorium scitamineum*)引起的甘蔗黑穗病严重威胁着甘蔗生产，导致产量下降 20%–50%，糖分损失高达 75%^[1]。该病害最早在南非的纳塔尔地区被发现^[5]，1932 年在我国广东省首次出现，现已蔓延至几乎所有的甘蔗种植区^[6]。甘蔗感染黑穗病初期症状并不明显，直至感染后期病株梢头才会形成一条由植物组织、侵染性菌丝和成熟冬孢子组成的黑色鞭状物。感病甘蔗的有效茎减少，糖分积累降低，再加上较长的潜伏期，严重降低了甘蔗

的经济效益。目前,田间常用的防治措施对甘蔗黑穗病的防控效果有限,亟待开发有效的化学药剂和培育抗黑穗病甘蔗品种来应对甘蔗感染黑穗病造成的产量损失。揭示甘蔗鞭黑粉菌的致病机制可为化学药剂的研发和转基因抗黑穗病品种的培育提供重要的理论基础。

由蛋白激酶和蛋白磷酸酶介导的蛋白质可逆磷酸化,是真核生物中常见的翻译后修饰类型^[7]。它通过调控复杂的信号转导过程来维持细胞稳态,参与调控代谢、细胞周期、转录、有性配合、菌丝形成、细胞壁合成、应激反应及致病性等多种细胞过程^[8-12]。2A型蛋白磷酸酶(protein phosphatase 2A, PP2A)是一种多蛋白复合物,由3个不同的亚基组成:结构亚基(PP2A-A)是容纳其他2个亚基的支架,PP2A-C是催化亚基,调节亚基(PP2A-B)决定酶的底物特异性和细胞内定位^[13]。PP2A能在如此多的不同生物过程中发挥作用,很大程度上归因于其B亚基^[7]。2A-like型蛋白磷酸酶(protein phosphatase 2A-like, PP2A-like)虽与PP2A磷酸酶具有一定的序列相似性,但他们的功能并不完全相同,因而不能归为一类^[14]。在真菌中已鉴定出3种PP2A-like磷酸酶:Sit4、Pph3和Ppg1^[15]。在稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)中,Sit4的同源蛋白MoPpe1被证实参与细胞壁完整性调控及致病过程^[16]。

Qiu等^[17]研究发现,甘蔗鞭黑粉菌中的PP2A-like磷酸酶SsPpe1与MoPpe1具有较高同源性,其编码基因*Ssppel*的缺失会导致真菌有性配合能力下降和致病性缺陷。蛋白激酶在病原真菌的丝状生长、孢子形成和致病性方面发挥着重要作用^[18-21]。在甘蔗鞭黑粉菌中丝裂原活化蛋白激酶SsKpp2和蛋白激酶A、G、C(protein kinase A, G, C, AGC)SsAgc1均能调控有性配合和丝状生长过程,且*Ssagc1*基因缺失会影响真菌致病性^[22-23]。蛋白磷酸酶负责介导底物蛋白的去磷酸化,在磷酸化修饰中发挥与蛋白激酶相反的调控功能。因此,推测蛋白磷酸

酶的稳定表达对甘蔗鞭黑粉菌的有性配合和致病性同样至关重要。为验证该推测,本研究构建了*Ssppel*过表达突变株,并系统分析其在孢子形态、营养生长、胁迫耐受、有性配合能力和致病性等方面的表型变化,以期进一步揭示PP2A-like磷酸酶SsPpe1在甘蔗鞭黑粉菌中的生物学功能,为新型农药的研发和抗甘蔗黑穗病品种培育提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

甘蔗鞭黑粉菌野生型担孢子JG35 (MAT-2)和JG36 (MAT-1)、农杆菌AGL1保存于-80℃冰箱;pEX2质粒保存于-20℃冰箱。

1.1.2 培养基

使用酵母提取物-蛋白胨-蔗糖(yeast extract-peptone-sucrose, YePS)和基础培养基(minimal medium, MM)培养甘蔗鞭黑粉菌;使用LB培养基培养细菌^[17]。诱导培养基(induction medium, IM) (g/L): KH_2PO_4 1.360, MgSO_4 0.241, FeSO_4 0.003, CaCl_2 0.078, MES 8.528, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.528, NaCl 0.146, 葡萄糖 1.802, 甘油 5.000; pH 5.6。

1.2 *Ssppel* 基因过表达菌株的构建

以pEX2质粒为模板,用pEX2-GAP-F/R引物扩增GAP强启动子序列;以甘蔗鞭黑粉菌基因组DNA为模板,使用pEX2-*Ssppel*-F/R引物扩增*Ssppel*序列。将GAP启动子与*Ssppel*融合,并将该融合片段克隆到pEX2载体上,形成重组质粒pEX2-GAP-*Ssppel*,引物序列见表1。利用电脉冲法将pEX2-GAP-*Ssppel*质粒转化到农杆菌AGL1感受态细胞中^[24]。

挑取验证正确的农杆菌转化子接种到5 mL LB培养基中,置于28℃、200 r/min培养至 OD_{600} 为0.8-1.0,25℃、1 000×g离心10 min,弃去培养基,并用含200 μmol/L乙酰丁香酮的

表1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer names	Primer sequences (5'→3')	Purpose
pEX2-GAP-F	CTGATCCAAGCTCAAGCTAAGCTT ATTAGATCTTGCTGATAGGC	Construction of pEX2-GAP- <i>Ssp</i> el vector
pEX2-GAP-R	GGTGAAGAGTGTTTTGG	
pEX2- <i>Ssp</i> el-F	CCAAAACACTCTTCCACC ATGACCGTCGGCAATCCA	
pEX2- <i>Ssp</i> el-R	GTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT TCAGAGGAAGTACTGGCT	
HPT-LB-226	GGTCAAGACCAATGCGGAGC	Verification of the <i>HPT</i> fragment
HPT-RB-225	GCAAGACCTGCCTGAAACCG	
qRT- <i>Ssp</i> el-F	GCATCATCGCACGAGCCC	RT-qPCR
qRT- <i>Ssp</i> el-R	GTGACCGCACCTCCGAAC	
06048-qPCR-F	CAATCGCGCAACAAGACACA	
06048-qPCR-R	GCACCACCACCAATCCAAAC	
06202-qPCR-F	TCGAGCGCAATCATCACCTT	
06202-qPCR-R	TAAGCGCATTCTGACCGAG	
05370-qPCR-F	CAGTTCCTCACCCAGCACAT	
05370-qPCR-R	CCTGCTCACACCAACATCCT	
10005-qPCR-F	TTGGTCGATGCCGTTCTTT	
10005-qPCR-R	TTGGTTGCATTCTGTCACCT	
02973-qPCR-F	CATTGAGACAGCAAAGCCG	
02973-qPCR-R	TGTAGGTGTCGAGGGGTGAA	
03056-qPCR-F	TCTCGCTTGCTCTTCTTGCT	
03056-qPCR-R	CACTCTCGGCGTTGTTGATG	
03937-qPCR-F	GGAATCGCCTCAACTCGACA	
03937-qPCR-R	TGCGTCTCTTGTGGCATCTT	
03733-qPCR-F	GGTCGGTCTAGGCTTTGCTT	
03733-qPCR-R	GGATGTAGGGGAAGAAGCCG	
03734-qPCR-F	GAGGTTTGGAGCTTGCGTTG	
03734-qPCR-R	TGCCTAGCTTGACCTCTGGA	
05350-qPCR-F	TCCGCAACACCGAAATCACT	
05350-qPCR-R	CTTGCGAGTGAGTCTGAACA	

5 mL IM 培养基重悬菌体, 避光诱导 6 h。分别挑取甘蔗鞭黑粉菌 JG35 和 JG36 于 YePS 液体培养基中, 28 °C、200 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.8–1.0。将诱导后的农杆菌分别与等体积的 JG35 和 JG36 菌液混合, 将混合后的菌液涂布在铺有 0.45 μ m 微孔滤膜的 IM 平板上, 28 °C 避光培养 3 d 后, 将微孔滤膜转移到含 200 μ g/mL 潮霉素和 300 μ g/mL 头孢噻肟钠的 YePS 平板上, 28 °C 培养 7–10 d。对长出的转化子进行 3 轮抗性筛选后, 提取转化子基因组 DNA, 再使用 HPT-LB-226/HPT-RB-225 引物对 *HPT* 抗性片段进行

PCR 验证。使用 qRT-*Ssp*el-F/R 引物对转化子的 *Ssp*el 基因表达水平进行 RT-qPCR 验证。

1.3 核酸相关操作

收集甘蔗鞭黑粉菌菌体, 利用液氮研磨, 采用 SDS 碱裂解法提取基因组 DNA。PCR 反应体系(25 μ L): 2 $\times$ Phanta Max Master Mix 12.5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 3 min; 95 °C 变性 15 s, 56 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 °C 终延伸 5 min。使用 *TransZol* 试剂(全式金生物技术有限

公司)提取总 RNA。使用 HiScrip II Q RT SuperMix for qPCR 试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司)将总 RNA 反转录成 cDNA, 使用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix (南京诺唯赞生物科技有限公司)进行 RT-qPCR 分析, 以 *ACTIN* 基因作为内参基因, 所用 RT-qPCR 引物见参考文献[17]。RT-qPCR 反应体系(20 μ L): ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μ L, 上、下游引物(10 μ mol/L)各 0.4 μ L, cDNA 模板 1 μ L, ddH₂O 8.2 μ L。RT-qPCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 共 40 个循环。

1.4 生物学表型测定

1.4.1 担孢子形态观察

挑取 YePS 平板上的甘蔗鞭黑粉菌 JG35、JG36 和过表达突变株的单菌落至含有 0.6 mL YePS 液体培养基的 EP 管中, 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养过夜, 25 $^{\circ}$ C、1 000 $\times$ g 离心 10 min, 弃去培养基, 并用无菌水洗涤 2 次, 最后用 100 μ L 的无菌水重悬, 加入 10 μ L 卡尔科弗卢尔荧光增白剂染色液[calcofluor white stain solution (CFW); 北京酷莱博科技有限公司]或 4',6-二脒基-2-苯基吡啶[4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI); 北京索莱宝科技有限公司], 静置 5 min 后置于荧光显微镜(Olympus 公司)下观察。

1.4.2 生长速率检测

挑取 YePS 平板上的甘蔗鞭黑粉菌 JG35、JG36 和过表达突变株的单菌落至 5 mL YePS 液体培养基中, 培养至 OD_{600} 为 1.0。分别取 1 mL 菌液接种至 100 mL 新鲜的 YePS 液体培养基中, 使其初始 OD_{600} 均为 0.1, 于 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养, 每 8 h 测定 1 次 OD_{600} 值, 直至 40 h 后 OD_{600} 值趋于稳定。

1.4.3 压力耐受性检测

将 OD_{600} 为 1.0 的野生型和过表达株菌液分别梯度稀释至 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 后, 各吸取 1 μ L 滴在分别添加 NaCl (500 mmol/L)、

H₂O₂ (1 mmol/L)、SDS (0.1 mmol/L)、Congo red (0.5 mmol/L)的 YePS 和 MM 平板上, 置于 28 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后拍照观察结果。

1.4.4 有性配合能力检测

将 OD_{600} 为 1.0 的野生型和过表达株菌液根据交配型等量混匀, 吸取 1 μ L 混合菌液点在 YePS 平板上, 28 $^{\circ}$ C 培养 3 d 后观察有性配合和菌丝生长情况。菌落形态的局部放大图使用体式显微镜(Nikon 公司)拍摄, 担孢子及菌丝形态使用光学显微镜(Olympus 公司)拍摄。

1.5 致病性检测

将 OD_{600} 为 1.0 的菌液在 25 $^{\circ}$ C、1 000 $\times$ g 离心 10 min 收集菌体, 并用无菌水洗涤 2 次后用等体积的无菌水重悬菌体。将不同交配型的孢子悬浮液等体积混合后, 采用浸根接种的方法^[25]将混合孢子悬浮液倒进装有甘蔗组培苗的组培瓶中, 置于 28 $^{\circ}$ C 人工气候室明暗交替培养 3 d 后移栽至育苗盆中, 置于室外自然条件下生长。出现第一株发病植株后每 5 d 统计 1 次新增发病植株数量。待统计结束后, 对接种甘蔗的生长点部位进行纵切, 使用 0.4% 台盼蓝染色液对侵染性菌丝进行染色, 显微观察甘蔗鞭黑粉菌的侵染情况。

1.6 RNA-seq 分析

将在 YePS 平板上培养 3 d 并达到对数生长期的野生型 JG36 和过表达株 JG36-OE-*Ssppe1* 的菌落刮下, 送至广州基迪奥公司进行 RNA 提取、文库构建和测序。高通量测序仪测得的图像数据经 CASAVA 碱基识别转化为序列数据(reads), 对原始数据进行过滤, 去掉带接头、含 N 以及低质量的 reads, 得到 clean reads。使用 RSEM 软件计算每个基因的表达水平, 使用 DESeq2 软件确定显著差异表达的基因(differentially expressed genes, DEGs)。使用错误发现率(false discovery rate, FDR) ≤ 0.05 , $\log_2$ |fold change| ≥ 1 作为筛选条件, 控制差异表达基因的假阳性率。RNA-seq 的原始数据已上传至

NCBI, 序列读取归档库(sequence read archive, SRA)号为 PRJNA1256139 和 PRJNA1393594。

1.7 数据分析

数据以 3 次独立实验的平均值 $\pm$ 标准误差(SE)表示。用 GraphPad Prism 6.0 进行统计绘图, 用 *t* 检验来分析 2 个样本间的差异显著性, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$, ****表示 $P<0.0001$, ns 表示无显著差异。所用数据分析软件(GraphPad Prism 6.0 和 Snapgene) 均已在合规授权下使用。

2 结果与分析

2.1 *Ssppe1* 过表达株的构建与验证

利用农杆菌介导 T-DNA 插入的方法构建 *Ssppe1* 基因过表达突变株。首先构建过表达质粒 pEX2-GAP-*Ssppe1*, 将 *Ssppe1* 基因序列与 GAP 强启动子融合后得到 GAP-*Ssppe1* 融合片段, 并克隆到 pEX2 载体(图 1A)。用限制性内切酶 *Hind* III (ThermoFisher Scientific 公司)对重组载体进行酶切验证, 可切出一条 1 762 bp 的条带(图 1B), 表明质粒 pEX2-GAP-*Ssppe1* 构建成功。

将质粒分别转化至甘蔗鞭黑粉菌 JG35 和 JG36, 使用 HPT-LB-226/HPT-RB-225 引物对所得转化子进行 PCR 验证, 成功转入过表达质粒的转化子可扩增出潮霉素抗性基因片段(图 1C)。进一步通过 RT-qPCR 分析 *Ssppe1* 基因在转化子中的表达水平, 与野生型相比, 这些转化子中的 *Ssppe1* 基因表达水平均显著提高(图 1D、1E)。这些结果均表明 *Ssppe1* 过表达株构建成功。后续研究均使用 *Ssppe1* 表达量最高的 JG35-OE-*Ssppe1*-12 和 JG36-OE-*Ssppe1*-12 突变株进行表型观察、有性配合能力和致病性分析。

2.2 *Ssppe1* 过表达影响甘蔗鞭黑粉菌的生长

为检测 *Ssppe1* 过表达对甘蔗鞭黑粉菌生长

的影响, 将野生型和过表达株分别接种于 YePS 液体培养基中培养, 每隔 8 h 测定菌液浓度, 并绘制生长曲线。结果显示, JG35-OE-*Ssppe1* 过表达株的生长与野生型 JG35 相比无显著差异; 而 JG36-OE-*Ssppe1* 过表达株在培养前 16 h 内, 其生长速率低于野生型 JG36 (图 2)。

2.3 *Ssppe1* 过表达影响甘蔗鞭黑粉菌的有丝分裂

为研究 *Ssppe1* 过表达对甘蔗鞭黑粉菌担孢子形态的影响, 分别对野生型和过表达株的担孢子进行显微观察。结果显示, 与野生型相比, JG35-OE-*Ssppe1* 和 JG36-OE-*Ssppe1* 的担孢子长度显著增加(图 3A), JG35-OE-*Ssppe1* 孢子的宽度也显著增加(图 3B)。进一步采用 CFW 染色观察几丁质在野生型和过表达突变体中的分布。结果显示, 野生型担孢子的几丁质主要分布于两端; 而在过表达株中, 几丁质除两端外还在异常延长的孢子中部以及放射状孢子的连接处有明显分布(图 3C), 在 JG35-OE-*Ssppe1* 和 JG36-OE-*Ssppe1* 中这种异常几丁质分布的孢子分别占 8.2% 和 9.6% (图 3E)。为进一步观察野生型和过表达突变体的核分布情况, 采用 DAPI 染色观察细胞核的分布情况。野生型 JG35 和 JG36 中通常包含 1-2 个细胞核, 而在 JG35-OE-*Ssppe1* 和 JG36-OE-*Ssppe1* 中分别有 12.2% 和 8.2% 的担孢子出现 2 个以上细胞核(图 3D、3F)。这些结果表明 *Ssppe1* 过表达干扰了甘蔗鞭黑粉菌的正常有丝分裂, 导致 JG35-OE-*Ssppe1* 和 JG36-OE-*Ssppe1* 突变体的孢子形态异常。

2.4 *Ssppe1* 过表达影响甘蔗鞭黑粉菌对逆境胁迫的耐受

为验证 *Ssppe1* 过表达对甘蔗鞭黑粉菌胁迫耐受性的影响, 本研究比较了野生型和过表达突变体在不同胁迫条件下的生长情况。结果显示, 在添加 SDS 和 NaCl 的培养基上, JG35-

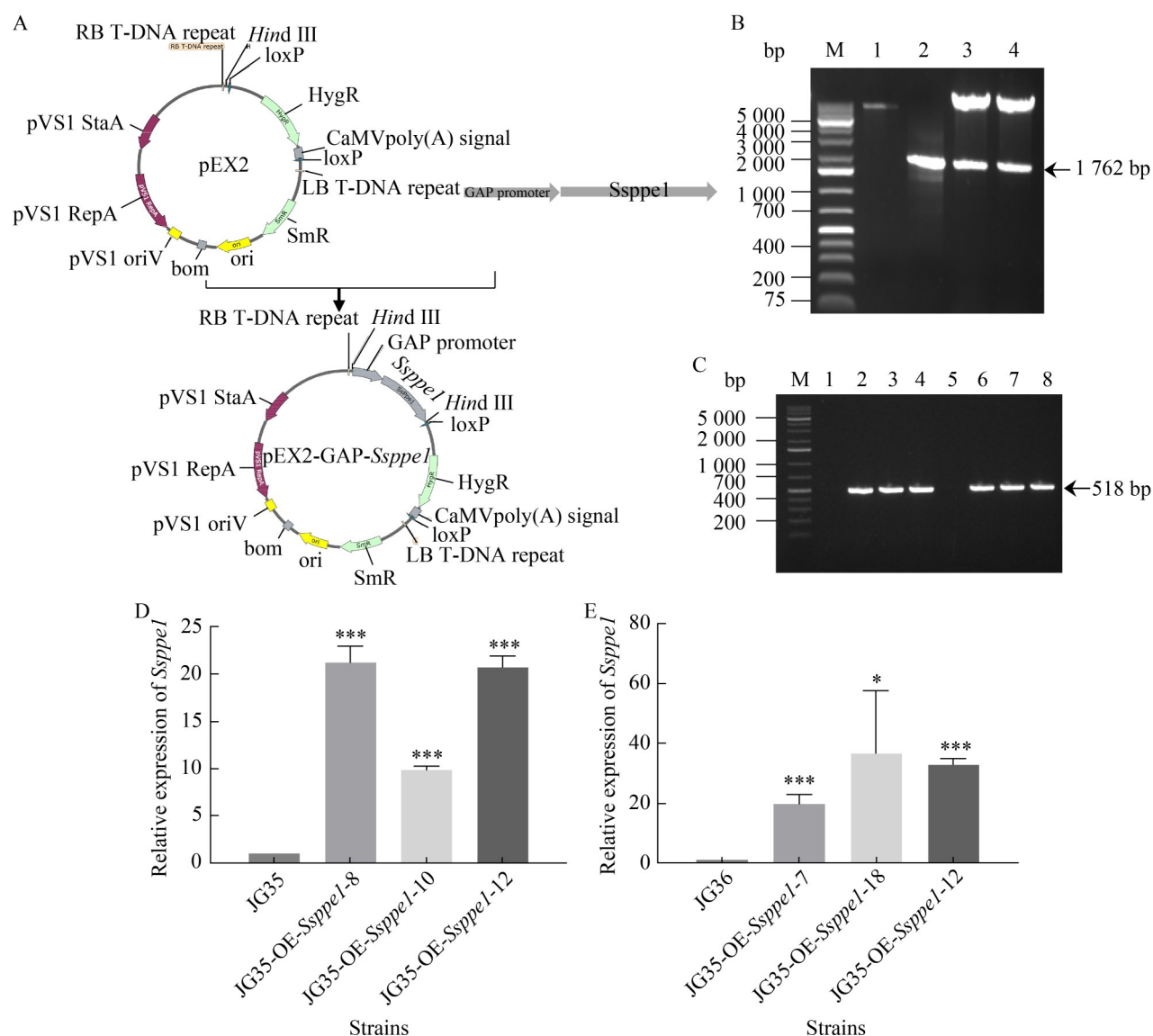


图1 *Ssppe1*过表达突变体的构建

Figure 1 Construction of *Ssppe1* gene overexpression mutants. A: Schematic diagram of the construction of the pEX2-GAP-*Ssppe1* plasmid; B: Restriction enzyme *Hind* III digestion verification of the pEX2-GAP-*Ssppe1* plasmid (Lane M: Marker; Lane 1: pEX2 plasmid after restriction enzyme digestion; Lane 2: GAP-*Ssppe1* fragment; Lanes 3, 4: pEX2-GAP-*Ssppe1* plasmid after restriction enzyme digestion); C: PCR analysis of *Ssppe1* overexpression transformants (Lane 1: JG35; Lanes 2–4: JG35-OE-*Ssppe1* mutants; Lane 5: JG36; Lanes 6–8: JG36-OE-*Ssppe1* mutants); D, E: RT-qPCR analysis of JG35-OE-*Ssppe1* mutants and JG36-OE-*Ssppe1* mutants [The expression level of *Ssppe1* in JG35 or JG36 was set as 1.0. Error bars indicate the standard error of three independent assays; *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$ (Student's *t* test)].

OE-*Ssppe1* 与 JG36-OE-*Ssppe1* 过表达株的生长均较野生型显著减弱(图 4), 表明 *Ssppe1* 过表达

影响了该真菌的细胞壁完整性及对高渗胁迫的耐受能力。

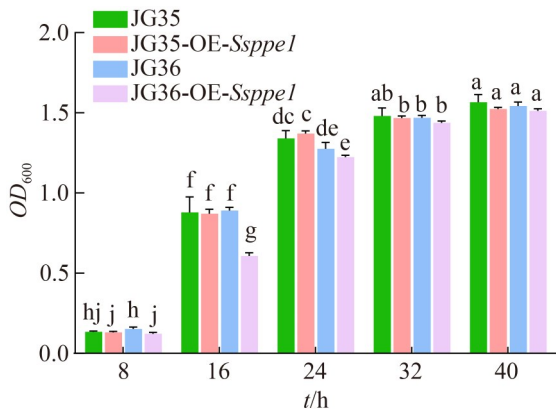


图2 OE-*Ssppe1*突变株的生长情况

Figure 2 The growth status of the OE-*Ssppe1* mutants. Error bars represent the SD from three separate experiments. Distinct letters above the bars denote significant differences in treatment (ANOVA and Tukey's test, $P < 0.05$).

2.5 *Ssppe1* 过表达影响甘蔗鞭黑粉菌的有性配合和丝状生长

为探究 *Ssppe1* 过表达对甘蔗鞭黑粉菌有性配合和菌丝生长的影响, 对 JG35-OE-*Ssppe1* 和 JG36-OE-*Ssppe1* 的有性配合能力进行分析。结果显示, 培养 3 d 后, 野生型 JG35×JG36 交配组合形成白色绒毛状菌落, 而 JG35-OE-*Ssppe1*×JG36、JG35×JG36-OE-*Ssppe1*、JG35-OE-*Ssppe1*×JG36-OE-*Ssppe1* 组合均未形成白色绒毛状菌落(图 5A)。进一步通过体式显微镜局部放大观察和光学显微镜观察均未发现菌丝(图 5B、5C)。这些结果表明 *Ssppe1* 过表达会显著减弱甘蔗鞭黑粉菌的有性配合能力。

2.6 *Ssppe1* 过表达影响信息素响应、MAPK 和 cAMP-PKA 通路相关基因的表达

为探究过表达株 JG35-OE-*Ssppe1* 和 JG36-OE-*Ssppe1* 有性配合缺陷的分子机制, 通过 RT-qPCR 检测甘蔗鞭黑粉菌中有性配合关键基因的表达水平, 包括 a、b 位点基因以及 MAPK 和 cAMP-PKA 信号通路的关键组分。在过表达

株 JG35-OE-*Ssppe1* 中, 信息素前体基因 *mfa2*, 转录因子基因 *bE2*、*bW2*, MAPK 通路关键激酶基因 *kpp2*、*mkk1*, 以及 Rho 家族三磷酸鸟苷酶 (Rho guanosine triphosphatase, Rho GTPase) 基因 *rop1* 的表达水平均显著下调(图 6A); 而在 JG36-OE-*Ssppe1* 中, 除上述基因外, 信息素受体基因 *pral* 和 MAPK 通路激酶基因 *crk1* 的表达水平也显著降低, 同时 cAMP-PKA 通路激酶 *uac1* 和 *adr1* 基因的表达则显著升高(图 6B)。

进一步比较不同交配组合中关键基因的表达模式, 与野生型 JG35×JG36 相比, 在 JG35-OE-*Ssppe1*×JG36 组合中除 *uac1*、*adr1*、*mkk1* 的表达无显著变化外, 其余检测基因的表达水平均显著下降。在 JG35×JG36-OE-*Ssppe1* 组合中, *pral*、*mfa1*、*bE1*、*bW1*、*rop1*、*fuz7*、*uac1*、*adr1*、*crk1*、*mkk1* 的表达水平均显著降低, 而 *pra2*、*mfa2*、*bE2*、*bW2* 的表达水平显著升高。在双过表达组合 JG35-OE-*Ssppe1*×JG36-OE-*Ssppe1* 中, 仅 *fuz7* 和 *adr1* 的表达显著上调, 其余基因均显著下调(图 6C)。上述结果表明, *Ssppe1* 过表达可引起信息素响应、MAPK 和 cAMP-PKA 信号通路相关基因表达的显著改变, 这可能是导致 JG35-OE-*Ssppe1* 和 JG36-OE-*Ssppe1* 有性配合能力缺陷的重要原因。

2.7 *Ssppe1* 过表达影响甘蔗鞭黑粉菌的致病性

为明确 *Ssppe1* 过表达对甘蔗鞭黑粉菌致病性的影响, 采用甘蔗组培苗浸根接种法检测了野生型菌株和 *Ssppe1* 过表达株的致病力。接种 100 d 后统计显示, 野生型 JG35×JG36 组合的甘蔗黑穗病发病率为 90.3%, JG35-OE-*Ssppe1*×JG36 组合为 82.4%, JG35×JG36-OE-*Ssppe1* 组合降至 29.4%, 而双过表达组合 JG35-OE-*Ssppe1*×JG36-OE-*Ssppe1* 的发病率最低, 仅为 14.7% (图 7A)。进一步通过甘蔗组织切片观察发现, 组织内部观察到侵染性菌丝存在(图 7B), 表明发病植株由接种的甘蔗鞭黑粉菌导致。这

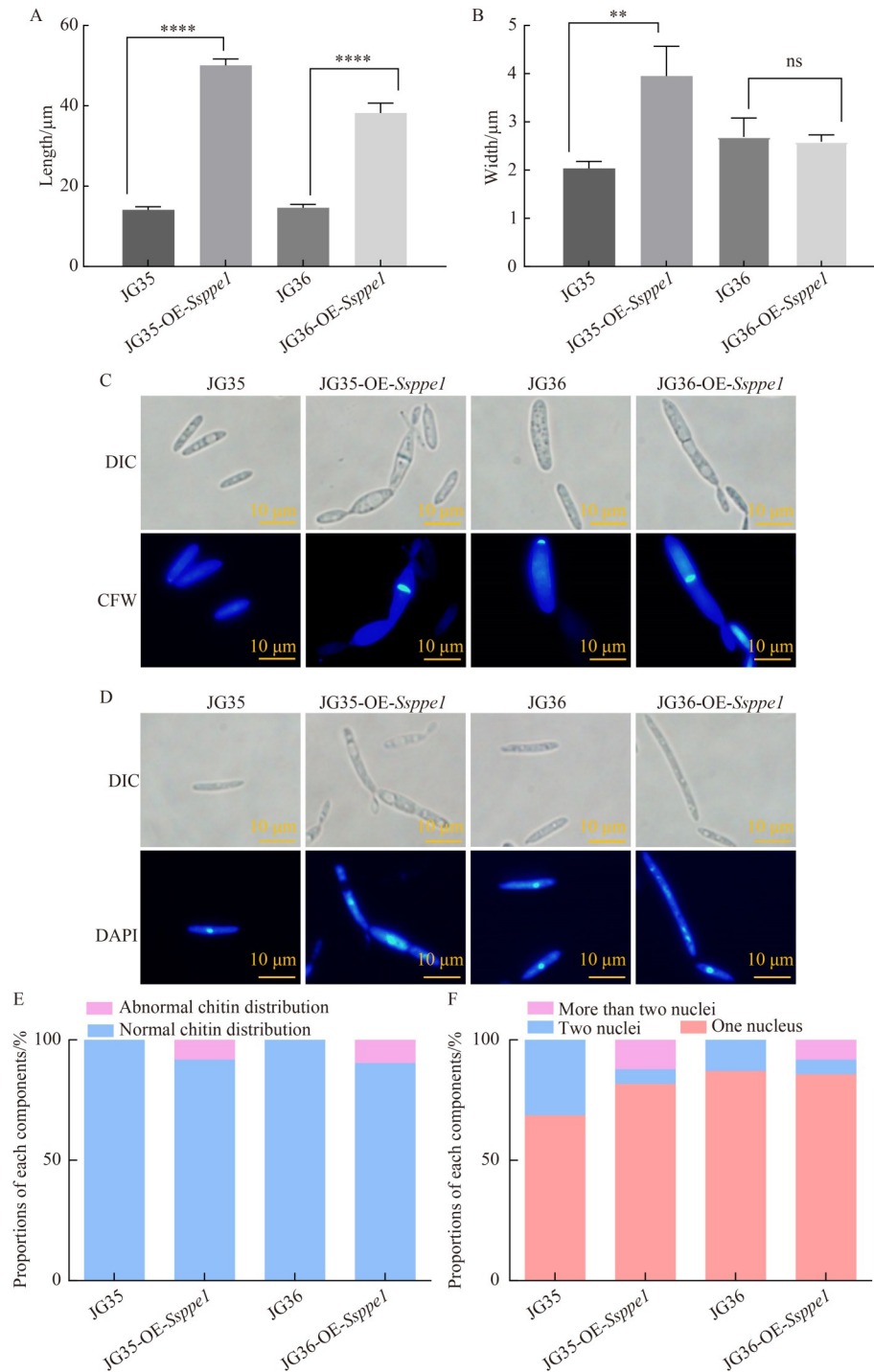


图3 OE-*Ssppe1*菌株的孢子形态

Figure 3 Sporidia morphology of OE-*Ssppe1* strains. A: Statistics of sporidia length for wild-type and OE-*Ssppe1* strains; B: Statistics of sporidia width for wild-type and OE-*Ssppe1* strains; C: Distribution of chitin in different strains; D: Distribution of cell nuclei in different strains; E: Percentage of sporidia with abnormal chitin distribution in different strains; F: Percentage of sporidia with abnormal nuclear numbers in different strains.

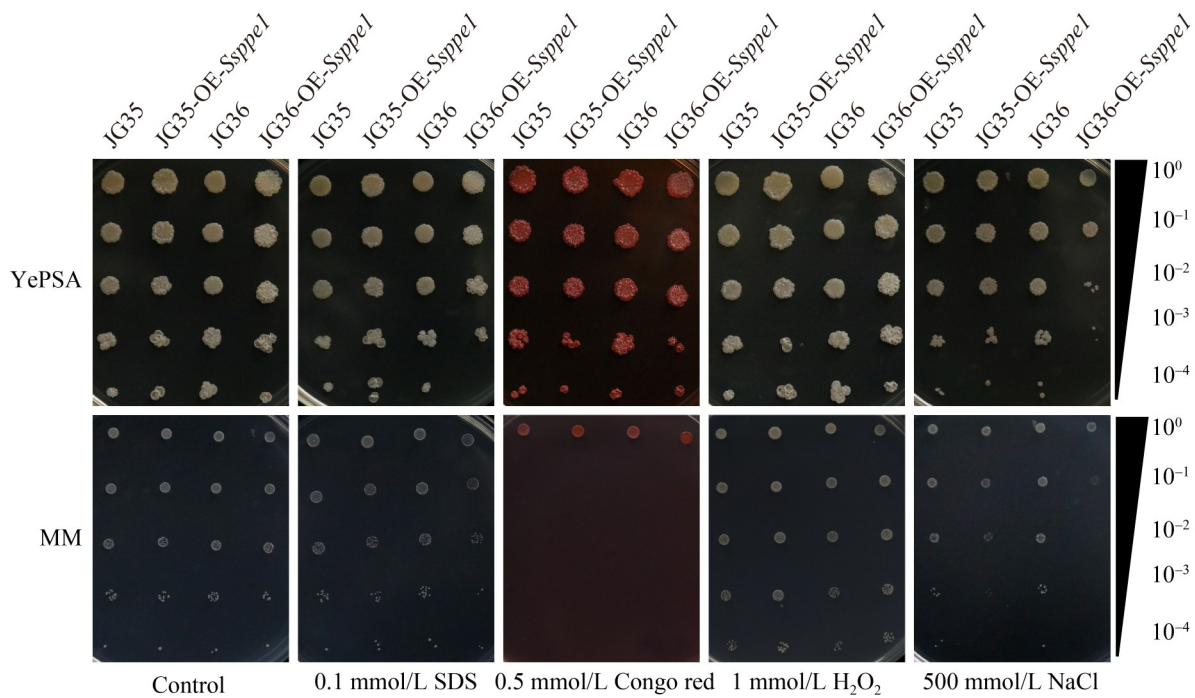


图4 *Ssppe1*过表达突变株的压力耐受性检测

Figure 4 The stress tolerance test of OE-*Ssppe1* mutants.

些结果表明, *Ssppe1* 过表达会显著降低甘蔗鞭黑粉菌的致病性。

2.8 RNA-seq 分析 *Ssppe1* 在甘蔗鞭黑粉菌中的调控机制

为深入揭示 *Ssppe1* 在甘蔗鞭黑粉菌中的调控机制, 利用 RNA-seq 测序技术分析野生型和突变体中的差异基因。相较于 JG35-OE-*Ssppe1* 突变株, JG36-OE-*Ssppe1* 在生长、有性配合和致病方面的缺陷更明显, 因此选取野生型菌株 JG36 及其对应过表达株 JG36-OE-*Ssppe1* 进行 RNA-seq 测序分析。与 JG36 相比, JG36-OE-*Ssppe1* 中共有 664 个差异表达基因, 其中 183 个基因表达显著下调, 481 个显著上调(图 8A)。从这些差异表达基因中随机选取了 10 个进行 RT-qPCR 验证, 结果显示这 10 个基因在 JG36-OE-*Ssppe1* 中的转录趋势与 RNA-seq 结果一致(图 8B), 表明 RNA-seq 结果可信。

对差异表达基因进行 KEGG 通路富集分析

发现, JG36-OE-*Ssppe1* vs. JG36 中的差异基因在分子伴侣与折叠催化剂(chaperones and folding catalysts)和氮代谢(nitrogen metabolism)等通路中显著富集(图 8C)。GO 富集分析进一步显示, JG36-OE-*Ssppe1* vs. JG36 的差异基因主要涉及蛋白质重新折叠(protein refolding)、对温度刺激的响应(response to temperature stimulus)及剪接体构象变化以形成催化构象(spliceosomal conformational changes to generate catalytic conformation)等生物过程(图 8D)。综上所述, *Ssppe1* 过表达主要影响甘蔗鞭黑粉菌的蛋白质合成与加工过程。

3 讨论与结论

甘蔗鞭黑粉菌是引起甘蔗黑穗病的病原菌, 它是一种二态型真菌, 包括酵母状担孢子和双核菌丝 2 种形态。酵母状担孢子不具有侵染能力, 只有不同交配型的担孢子相互识别发生有性配合形成的双核菌丝才能侵染甘蔗^[26], 因而

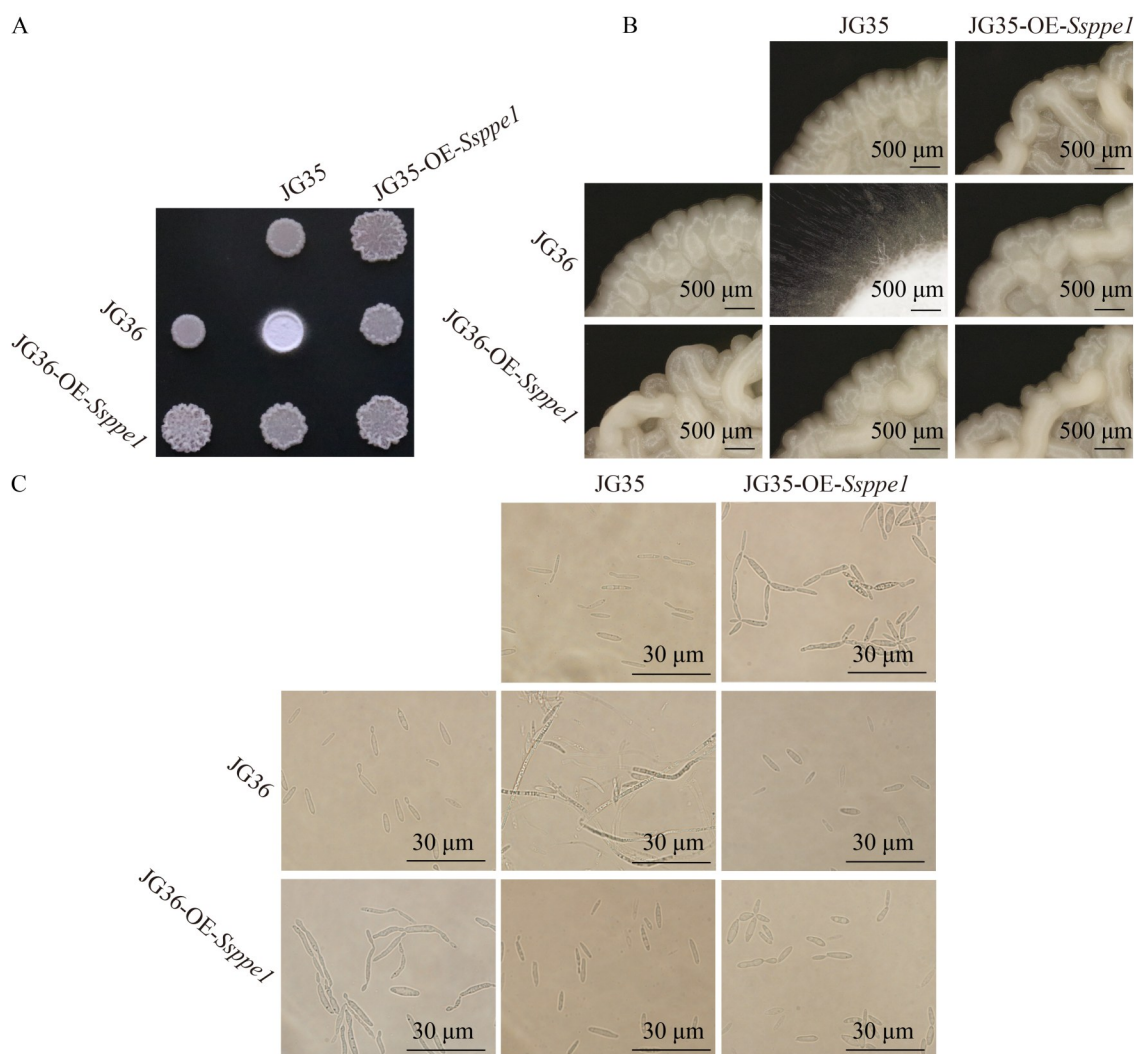


图5 突变株JG35-OE-*Ssppe1*和JG36-OE-*Ssppe1*的配合表型

Figure 5 Mating behavior of the *JG35-OE-Ssppe1* and *JG36-OE-Ssppe1* mutants. A: Global view of colonies; B: Magnified view of colony margin; C: Microscopic observation.

有性配合过程是甘蔗鞭黑粉菌致病的关键。已有研究发现，蛋白激酶对甘蔗鞭黑粉菌的有性配合和致病性十分重要。例如，组氨酸激酶 SsSln1 与 cAMP-PKA 信号通路拮抗调节信息素响应转录因子的表达，从而交叉调控甘蔗鞭黑粉菌的有性配合和致病性^[27]。蛋白磷酸酶和蛋白激酶作为调控底物蛋白磷酸化的 2 个关键因子，对病原真菌的生长和毒力同样重要。有研究发现，稻瘟病菌 2A-like 型蛋白磷酸酶 MoPpg1 通过调节 Rho GTP 酶，在无性发育和

植物感染中起重要作用^[28]；2A 型蛋白磷酸酶调节亚基 MoRts1 是稻瘟病菌生长发育和致病的关键调控因子^[29]；磷酸酶 MoPpe1 对稻瘟病菌的营养生长、分生孢子形成和毒力是不可或缺的^[16]。甘蔗鞭黑粉菌 SsPpe1 蛋白与稻瘟病菌 MoPpe1 同源性较高，具有一个保守的 MPP_PP2A_PP4_PP6 结构域，属于 PP2A-like 磷酸酶家族。之前的研究发现，该磷酸酶编码基因 *Ssppe1* 的缺失会导致甘蔗鞭黑粉菌的有性配合和致病性缺陷^[17]。

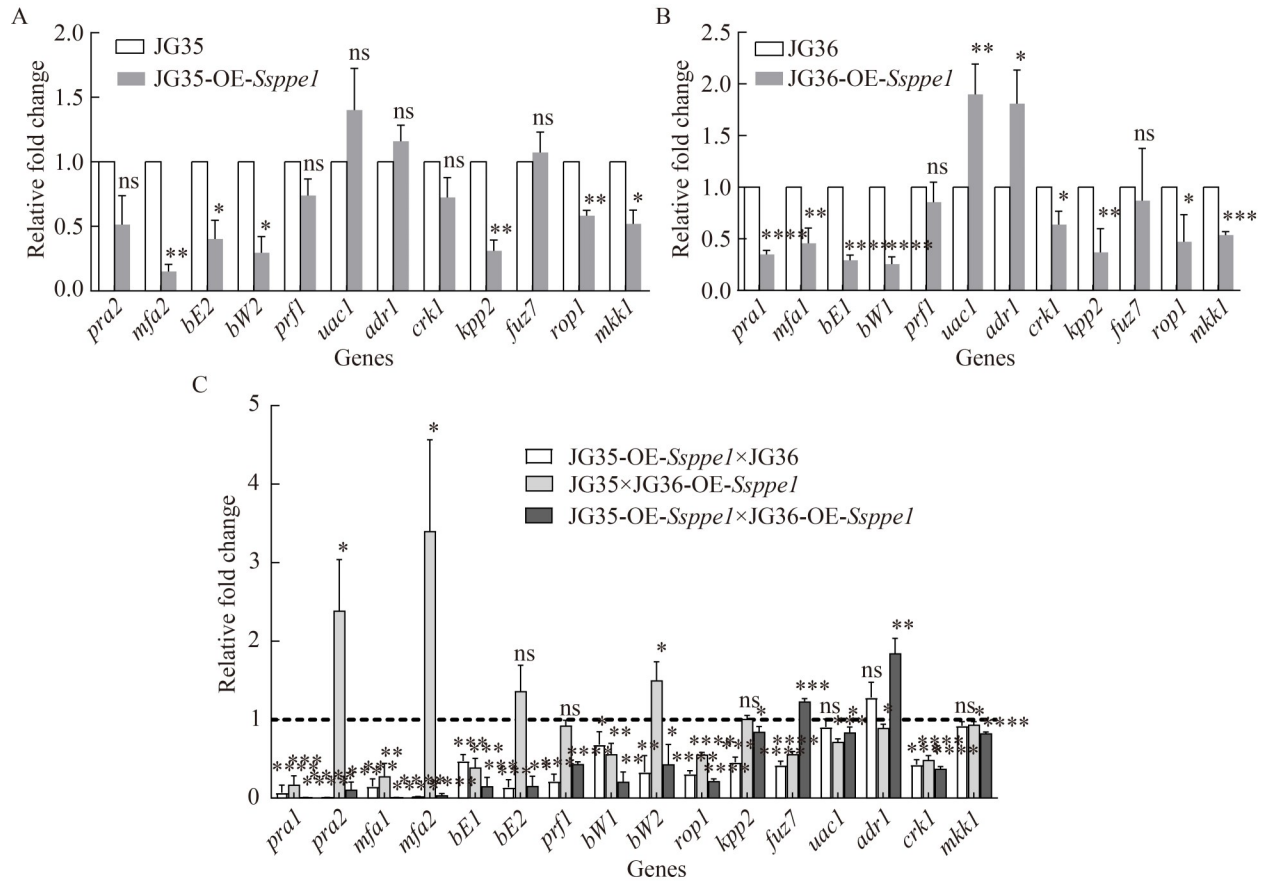


图6 *Ssppe1*过表达对有性配合相关基因表达的影响

Figure 6 Effect of *Ssppe1* overexpression on the expression of genes related to sexual mating. A: RT-qPCR analysis of the expression of these genes in JG35-OE-*Ssppe1* mutants; B: RT-qPCR analysis of the expression of these genes in JG36-OE-*Ssppe1* mutants; C: RT-qPCR analysis of the expression of these genes in different mating colonies. The dotted line indicates the levels of gene expression in the wild-type JG35×JG36 colony were set as 1.0. Error bars indicate the standard error of three independent assays; *: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.0001$ (Student's t test).

为研究 *Ssppe1* 基因过表达是否同样对甘蔗鞭黑粉菌的生长发育及致病性产生影响, 本研究构建了 *Ssppe1* 过表达突变株 JG35-OE-*Ssppe1* 和 JG36-OE-*Ssppe1* (图 1)。对其孢子形态观察发现, *Ssppe1* 过表达导致甘蔗鞭黑粉菌担孢子生长速率减慢, 并出现假菌丝状孢子, 推测这可能是有丝分裂末期胞质分裂失败所致。进一步研究发现, 突变株假菌丝状孢子的中部存在几丁质的异常富集且存在 2 个以上的细胞核(图 3), 这些结果表明 *Ssppe1* 基因过表达影响了甘蔗鞭

黑粉菌的有丝分裂过程, 有丝分裂末期胞质分裂失败, 细胞不能一分为二, 导致担孢子呈假菌丝状。在玉米黑粉菌 *Ustilago maydis* 中, *Umpde1* 编码一种环磷酸二酯酶, 其作为 cAMP 依赖性 PKA 途径的一部分参与 cAMP 周转, 该基因的缺失也会产生这种假菌丝状孢子^[30]; 另外, 甘蔗鞭黑粉菌 cAMP 水解酶编码基因 *Sspde2* 的缺失也会产生类似的假菌丝状孢子^[31]。这些研究表明 cAMP 水平变化影响了 cAMP-PKA 信号通路, 导致孢子形态异常。最近的研

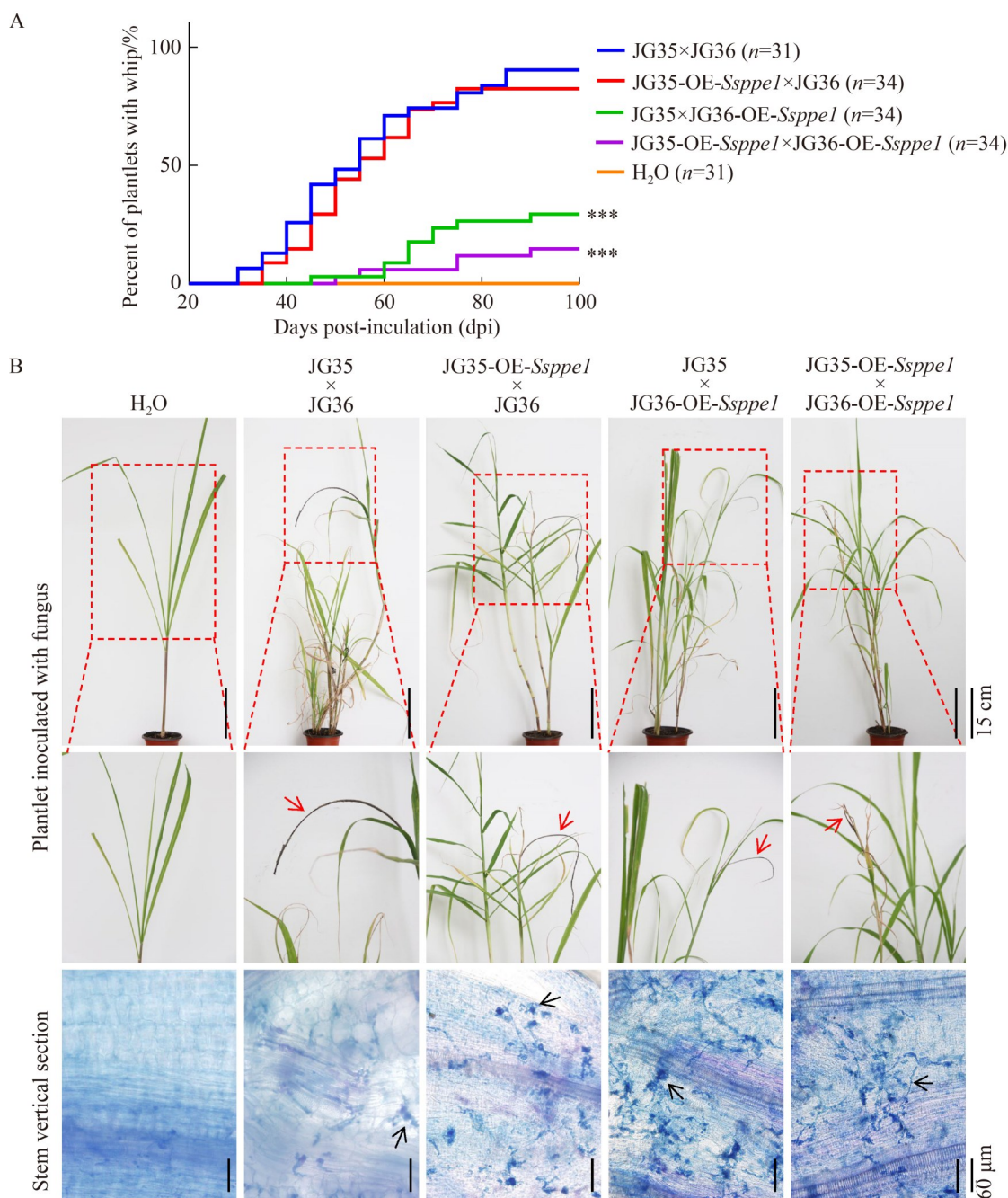


图7 OE-*Ssppe1*突变株的致病性分析

Figure 7 Pathogenicity analysis of the OE-*Ssppe1* mutants. A: Progression of whip development induced by fungal strains [Each treatment combination was inoculated with at least 10 plants, with three biological replicates. ***, $P<0.001$ (Student's t test)]; B: Histopathology analysis of inoculated plantlets (Red arrows indicate whip, black arrows indicate fungal hyphae).

究发现，甘蔗鞭黑粉菌 MAPK-SsHog1 和 MAPKK-SsPbs2 编码基因分别缺失同样会导致

类似的假菌丝状孢子^[32]，而同时缺失 *Sshog1* 基因和 cAMP 合成酶基因 *Ssuac1* 则能弥补

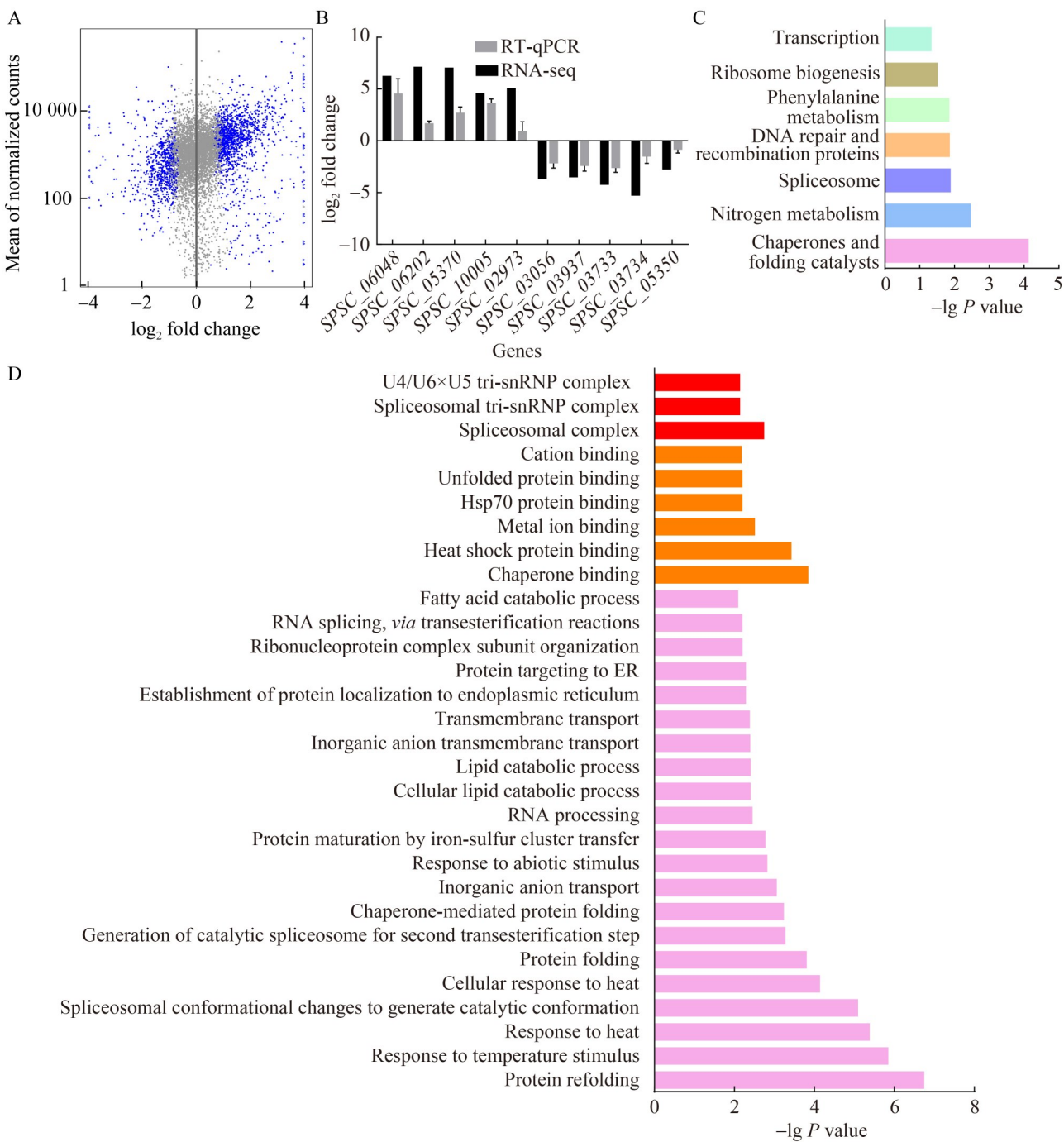


图8 RNA-seq分析*Ssppe1*的调控机制

Figure 8 RNA-seq analysis of the regulatory mechanism of *Ssppe1*. A: Volcano plot of differentially expressed genes between JG36-OE-*Ssppe1* and JG36 (Compared to wild-type, mRNAs with log₂ fold change >1 indicate increased expression; mRNAs with log₂ fold change <-1 indicate decreased expression); B: Verified the expression levels of 10 DEGs in RNA-seq by RT-qPCR; C: KEGG pathway enrichment analysis of the DEGs in JG36-OE-*Ssppe1* vs. JG36 groups; D: DEGs in JG36-OE-*Ssppe1* vs. JG36 were subjected to enrichment analysis based on biological (BP), cellular component (CC), and molecular function (MF).

$\Delta Sshog1$ 突变株的表型缺陷, 使担孢子形态恢复至野生型状态^[33], 表明 MAPK 信号通路和 cAMP-PKA 信号通路交叉调控甘蔗鞭黑粉菌的孢子形态。通过 RT-qPCR 分析发现, JG35-OE-*Ssppe1* 和 JG36-OE-*Ssppe1* 过表达株中 MAPK 通路相关激酶基因 *kpp2*、*rop1* 和 *mkk1* 的表达水平显著降低(图 6A、6B), 推测 *Ssppe1* 过表达可能影响 MAPK 通路和 cAMP-PKA 通路的信号转导, 导致突变株的孢子形态异常。另外, 转录组学分析发现, *Ssppe1* 过表达导致热休克蛋白(heat shock proteins, Hsps)编码基因 *Ssmdj1* 的表达水平显著升高(表 2)。热休克蛋白 PbMDJ1 被报道定位于真菌细胞壁^[34], 推测 *Ssmdj1* 基因在 OE-*Ssppe1* 中过表达使细胞壁增厚, 这可能是导致 OE-*Ssppe1* 突变体几丁质异常堆积的原因之一。

过表达突变株的压力耐受性分析显示, OE-*Ssppe1* 过表达突变体与 $\Delta Ssppe1$ 缺失突变体类似, 均对细胞壁应激源 SDS 和高渗透压应激源 NaCl 的敏感性增加(图 4)。转录因子是 PP2A 的靶标之一, 有研究表明 PP2A 是酵母转录因子 Msn2p 响应热、渗透压以及氮饥饿等压力时核积累所必需的^[35]。Hsps 是应激反应的关键组成部分, 参与泛素化、膜稳定和蛋白质折叠等多种生物过程^[36]。热休克转录因子 Hsf1 受磷酸化激活, 从而增加热休克基因的转录与积累^[37]。*Ssppe1* 过表达可能改变转录因子 Hsf1 的磷酸化

水平, 影响与细胞壁应激和高渗应激相关 Hsps 基因的转录, 导致 OE-*Ssppe1* 突变体对 SDS 和 NaCl 的耐受性降低。

有性配合能力分析显示, JG35-OE-*Ssppe1* 和 JG36-OE-*Ssppe1* 的有性配合能力均减弱(图 5)。致病性分析显示, JG35×JG36-OE-*Ssppe1* 和 JG35-OE-*Ssppe1*×JG36-OE-*Ssppe1* 的致病性降低, 而 JG35-OE-*Ssppe1*×JG36 的致病性与野生型相比无显著改变(图 7A)。RT-qPCR 分析也显示, 与野生型相比, JG36-OE-*Ssppe1* 中与配合有关的 a、b 位点基因的表达水平较 JG35-OE-*Ssppe1* 下降更显著(图 6A、6B)。这可能与 JG35-OE-*Ssppe1* 和 JG36-OE-*Ssppe1* 中 *Ssppe1* 的表达水平有关, 在 JG35-OE-*Ssppe1* 中 *Ssppe1* 基因的表达量是 JG35 的 20 倍, 而 JG36-OE-*Ssppe1* 中 *Ssppe1* 的表达量是 JG36 的 30 倍。这也可能是 JG36-OE-*Ssppe1* 中的其他表型比 JG35-OE-*Ssppe1* 更为明显的原因, 比如 JG36-OE-*Ssppe1* 表现出更为明显的生长缺陷和高渗透压响应缺陷。在 OE-*Ssppe1* 和 $\Delta Ssppe1$ 突变体中信息素相关基因(*pra1/2*、*mfal/2*)的转录水平均显著降低, 表明 *Ssppe1* 的稳定表达对信息素通路的调节和甘蔗鞭黑粉菌的有性配合过程十分重要。有研究发现, Hsps 在真菌的二态型转换过程中发挥重要作用, 例如在巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)和副球孢子菌(*Paracoccidioides lutzi*)的酵母形态中 *hsp70* 的转

表2 KEGG和GO富集中关键差异基因的信息

Table 2 Information of key differentially expressed genes enriched in KEGG and GO pathways

Gene ID	log ₂ fold change	Description
SPSC_04169	3.64	Heat shock protein 80
SPSC_06283	3.27	MDJ1-heat shock protein
SPSC_01646	2.58	Heat shock protein Hsp88
SPSC_03756	4.11	U-snRNP-associated cyclophilin
SPSC_00580	6.25	Heat shock protein HSP104
SPSC_01563	2.28	Heat shock protein 10
SPSC_01562	3.58	Heat shock protein HSP60
SPSC_01292	3.04	YDJ1-mitochondrial and ER import protein

录水平升高^[38]; *hsp90* 在酵母形态的转录水平高于菌丝形态, 且在菌丝体向酵母状转变的早期阶段表达水平上调^[36]。结合 RNA-seq 分析, 推测 OE-*Ssppe1* 突变体中 Hsps 基因的转录水平升高是丝状生长缺陷的原因之一。

Ssppe1 基因敲除和过表达均会导致甘蔗鞭黑粉菌的致病性降低, 这可能与蛋白磷酸酶底物的广泛性有关。在人类基因组中约有 500 个蛋白激酶, 而蛋白磷酸酶仅有 150 个^[39-40]; 在酵母中存在 113 个蛋白激酶, 而仅鉴定到 31 个磷酸酶^[41-42], 这意味着蛋白磷酸酶所催化的底物可能比蛋白激酶更广泛。*Ssppe1* 缺失和过表达可能改变了不同底物蛋白的磷酸化状态或不同基因的转录水平, 这些底物改变均导致了真菌致病力的下降。

综上所述, *Ssppe1* 过表达影响甘蔗鞭黑粉菌的营养生长、胞质分裂、细胞壁完整性和对高渗透压胁迫的响应。此外, *Ssppe1* 过表达会导致有性配合能力减弱, 致病性降低。本研究揭示了磷酸酶编码基因 *Ssppe1* 的稳定表达在甘蔗鞭黑粉菌中的重要作用, 为磷酸化修饰的调控机制提供了新见解。

作者贡献声明

仇金凤: 研究构思和设计、实验操作和论文撰写; 胡朱奕: 实验操作及数据收集; 周皓灵: 数据收集与处理; 吴昊鸣: 参与论文讨论, 协助论文修改; 赵丽九: 转录组学数据分析; 李茹: 论文指导、修改及经费支持。

作者利益冲突公开声明

作者声明绝无任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

[1] 谢芝春, 杨琼, 何美霞, 颜梅新, 龙海丽, 白小梅. 甘蔗黑穗病抗病机制及防治研究进展[J]. 江苏农业科学, 2025, 53(14): 9-17.
Xie ZC, Yang Q, He MX, Yan MX, Long HL, Bai XM. Research progress on resistance mechanism and control

of sugarcane smut disease[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2025, 53(14): 9-17 (in Chinese).

[2] Hoang NV, Furtado A, Botha FC, Simmons BA, Henry RJ. Potential for genetic improvement of sugarcane as a source of biomass for biofuels[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2015, 3: 182.

[3] Bijimol BI, Elias L, Sreelekshmy BR, Shibli SMA. Effective exploitation of sugarcane byproducts and industrial effluents for strategic energy applications: a review on recent developments and approaches with special reference to microbial fuel cells[J]. ACS Applied Bio Materials, 2025, 8(5): 3657-3690.

[4] Ali Mubarak A, Ilyas RA, Nordin AH, Ngadi N, Alkbir MFM. Recent developments in sugarcane bagasse fibre-based adsorbent and their potential industrial applications: a review[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2024, 277: 134165.

[5] Bhuiyan SA, Magarey RC, McNeil MD, Aitken KS. Sugarcane smut, caused by *Sporisorium scitamineum*, a major disease of sugarcane: a contemporary review[J]. Phytopathology®, 2021, 111(11): 1905-1917.

[6] 王长秘, 罗志明, 单红丽, 李银焜, 张荣跃, 李婕, 王晓燕, 尹炯. 甘蔗黑穗病研究状况文献计量分析[J]. 中国糖料, 2024, 46(3): 80-90.
Wang CM, Luo ZM, Shan HL, Li YH, Zhang RY, Li J, Wang XY, Yin J. Bibliometric analysis of the research status of smut disease in sugarcane[J]. Sugar Crops of China, 2024, 46(3): 80-90 (in Chinese).

[7] Albataineh MT, Kadosh D. Regulatory roles of phosphorylation in model and pathogenic fungi[J]. Medical Mycology, 2016, 54(4): 333-352.

[8] Manning G, Plowman GD, Hunter T, Sudarsanam S. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man[J]. Trends in Biochemical Sciences, 2002, 27(10): 514-520.

[9] Suresh K, Subramanyam C. A putative role for calmodulin in the activation of *Neurospora crassa* chitin synthase[J]. FEMS Microbiology Letters, 2006, 150(1): 95-100.

[10] Borgia PT. Roles of the *orlA*, *tsE*, and *bimG* genes of *Aspergillus nidulans* in chitin synthesis[J]. Journal of Bacteriology, 1992, 174(2): 384-389.

[11] Csank C, Makris C, Meloche S, Schröppel K, Rölinghoff M, Dignard D, Thomas DY, Whiteway M. Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a VH1 family-related protein phosphatase mutant of the human Pathogen *Candida albicans*[J]. Molecular Biology of the Cell, 1997, 8(12): 2539-2551.

[12] Andrews PD, Stark MJR. Type 1 protein phosphatase is required for maintenance of cell wall integrity, morphogenesis and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Cell Science, 2000, 113(3): 507-520.

[13] Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases[J]. Annual Review of Biochemistry, 1989, 58: 453-508.

[14] Cohen PTW. Novel protein serine/threonine

- phosphatases: variety is the spice of life[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997, 22(7): 245-251.
- [15] Kamibayashi C, Estes R, Lickteig RL, Yang SI, Craft C, Mumby MC. Comparison of heterotrimeric protein phosphatase 2A containing different B subunits[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1994, 269(31): 20139-20148.
- [16] Qian B, Liu XY, Jia J, Cai YC, Chen C, Zhang HF, Zheng XB, Wang P, Zhang ZG. MoPpe1 partners with MoSap1 to mediate TOR and cell wall integrity signalling in growth and pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(11): 3964-3979.
- [17] Qiu JF, Wu HM, Wei QY, Lu S, Meng JR, Li R, Chen BS. The PP2A-like phosphatase SsPpe1 regulates Ssrot1 to modulate sexual mating and virulence in *Sporisorium scitamineum*[J]. *Phytopathology Research*, 2025, 7: 96.
- [18] Yago JI, Lin CH, Chung KR. The SLT2 mitogen-activated protein kinase-mediated signalling pathway governs conidiation, morphogenesis, fungal virulence and production of toxin and melanin in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(7): 653-665.
- [19] Bashi ZD, Gyawali S, Bekkaoui D, Coutu C, Lee L, Poon J, Rimmer SR, Khachatourians GG, Hegedus DD. The *Sclerotinia sclerotiorum* Slt2 mitogen-activated protein kinase ortholog, *SMK3*, is required for infection initiation but not lesion expansion[J]. *Canadian Journal of Microbiology*, 2016, 62(10): 836-850.
- [20] Xiao JL, Zhang Y, Yang K, Tang YY, Wei L, Liu EM, Liang ZH. Protein kinase Ime2 is associated with mycelial growth, conidiation, osmoregulation, and pathogenicity in *Fusarium oxysporum*[J]. *Archives of Microbiology*, 2022, 204(8): 455.
- [21] Cheng YL, Wang XJ, Yao JN, Voegelé RT, Zhang YR, Wang WM, Huang LL, Kang ZS. Characterization of protein kinase PsSRPKL, a novel pathogenicity factor in the wheat stripe rust fungus[J]. *Environmental Microbiology*, 2015, 17(8): 2601-2617.
- [22] Wang YX, Deng YZ, Cui GB, Huang CW, Zhang B, Chang CQ, Jiang ZD, Zhang LH. The AGC kinase SsAgl1 Regulates *Sporisorium scitamineum* mating/filamentation and pathogenicity[J]. *mSphere*, 2019, 4(3): e00259-19.
- [23] Deng YZ, Zhang B, Chang CQ, Wang YX, Lu S, Sun SQ, Zhang XM, Chen BS, Jiang ZD. The MAP kinase SsKpp2 is required for mating/filamentation in *Sporisorium scitamineum*[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9: 2555.
- [24] Main GD, Reynolds S, Gartland JS. Electroporation protocols for *Agrobacterium*[M]//*Agrobacterium Protocols*. New Jersey: Humana Press, 2003: 405-412.
- [25] Lu S, Wang YK, Shen XR, Guo F, Zhou CL, Li R, Chen BS. SsPEP1, an effector with essential cellular functions in sugarcane smut fungus[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(11): 954.
- [26] Taniguti LM, Schaker PDC, Benevenuto J, Peters LP, Carvalho G, Palhares A, Quecine MC, Nunes FRS, Kmit MCP, Wai A, Hausner G, Aitken KS, Berkman PJ, Fraser JA, Moolhuijzen PM, Coutinho LL, Creste S, Vieira MLC, Kitajima JP, Monteiro-Vitorello CB. Complete genome sequence of *Sporisorium scitamineum* and biotrophic interaction transcriptome with sugarcane[J]. *PLoS One*, 2015, 10(6): e0129318.
- [27] Cai EP, Sun SQ, Deng YZ, Huang PS, Sun X, Wang YT, Chang CQ, Jiang ZD. Histidine kinase Sln1 and cAMP/PKA signaling pathways antagonistically regulate *Sporisorium scitamineum* mating and virulence via transcription factor Prf1[J]. *Journal of Fungi*, 2021, 7(8): 610.
- [28] Du YX, Shi Y, Yang J, Chen XL, Xue MF, Zhou W, Peng YL. A serine/threonine-protein phosphatase PP2A catalytic subunit is essential for asexual development and plant infection in *Magnaporthe oryzae*[J]. *Current Genetics*, 2013, 59(1/2): 33-41.
- [29] Zhang WW, Wang SS, Jiang BX, Guo M. MoRts1, a regulatory subunit of PP2A, is required for fungal development and pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*[J]. *Microbiological Research*, 2023, 269: 127313.
- [30] Agarwal C, Aulakh KB, Edelen K, Cooper M, Wallen RM, Adams S, Schultz DJ, Perlin MH. *Ustilago maydis* phosphodiesterases play a role in the dimorphic switch and in pathogenicity[J]. *Microbiology*, 2013, 159(Pt_5): 857-868.
- [31] 李玲玉. 甘蔗鞭黑粉菌 SsCrz1 和 SsGap1 的鉴定及在有性配合中的功能研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2021.
- Li LY. Identification and functional analysis of *SsCrz1* and *SsGap1* in sexual mating of *Sporisorium scitamineum*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [32] 蔡恩平. 甘蔗鞭黑粉菌 MAP 激酶 Hog1 的功能研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2021.
- Cai EP. Functional analysis of MAP kinase Hog1 in *Sporisorium scitamineum*[D]. Guangzhou: South China Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [33] Cai EP, Yan MX, Sun X, Zeng R, Zheng WQ, Deng YZ, Jiang ZD, Chang CQ. Kinase Hog1 and Adr1 opposingly regulate haploid cell morphology by controlling vacuole size in *Sporisorium scitamineum*[J]. *Journal of Fungi*, 2022, 8(8): 865.
- [34] Batista WL, Matsuo AL, Ganiko L, Barros TF, Veiga TR, Freymüller E, Puccia R. The *PbMDJ1* gene belongs to a conserved *MDJ1/LON* locus in thermotolerant pathogenic fungi and encodes a heat shock protein that localizes to both the mitochondria and cell wall of *Paracoccidioides brasiliensis*[J]. *Eukaryotic Cell*, 2006, 5(2): 379-390.
- [35] Santhanam A, Hartley A, Düvel K, Broach JR, Garrett S. PP2A phosphatase activity is required for stress and *Tor* kinase regulation of yeast stress response factor Msn2p[J]. *Eukaryotic Cell*, 2004, 3(5): 1261-1271.

- [36] Tiwari S, Thakur R, Shankar J. Role of heat-shock proteins in cellular function and in the biology of fungi[J]. *Biotechnology Research International*, 2015, 2015: 132635.
- [37] Veri AO, Robbins N, Cowen LE. Regulation of the heat shock transcription factor Hsf1 in fungi: implications for temperature-dependent virulence traits[J]. *FEMS Yeast Research*, 2018, 18(5): foy041.
- [38] Monteiro JP, Clemons KV, Mirels LF, Collier JA, Wu TD, Shankar J, Lopes CR, Stevens DA. Genomic DNA microarray comparison of gene expression patterns in *Paracoccidioides brasiliensis* mycelia and yeasts *in vitro*[J]. *Microbiology*, 2009, 155(8): 2795-2808.
- [39] Barford D. Molecular mechanisms of the protein serine/threonine phosphatases[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1996, 21(11): 407-412.
- [40] Kobor MS, Archambault J, Lester W, Holstege FCP, Gileadi O, Jansma DB, Jennings EG, Kouyoumdjian F, Davidson AR, Young RA, Greenblatt J. An unusual eukaryotic protein phosphatase required for transcription by RNA polymerase II and CTD dephosphorylation in *S. cerevisiae*[J]. *Molecular Cell*, 1999, 4(1): 55-62.
- [41] Hunter T, Plowman GD. The protein kinases of budding yeast: six score and more[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1997, 22(1): 18-22.
- [42] Stark MJR. Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation[J]. *Yeast*, 1996, 12(16): 1647-1675.