

玉米大斑病菌分生孢子形成的影响因素及 GATA 转录因子家族的表达分析

冯胜泽¹, 刘星晨¹, 王海祥², 赵洁¹, 赵立卿¹, 郑亚男¹, 巩校东¹, 韩建民¹, 谷守芹¹, 董金皋¹

(¹河北农业大学真菌毒素与植物分子病理学实验室, 河北保定 071001; ²保定学院, 河北保定 071000)

摘要:【目的】玉米大斑病 (northern leaf blight of corn) 是由玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*) 引起的一种威胁玉米生产的重要叶部病害。本研究旨在确定影响玉米大斑病菌分生孢子产量的主要因素; 明确 GATA 家族成员基因在分生孢子形成时期的表达特征, 为深入解析调控病菌发育及致病的分子机制打下基础。【方法】以玉米大斑病菌野生型菌株 01-23 为试材, 探索 13 种不同培养基 (乳糖酪蛋白琼脂培养基、马铃薯葡萄糖琼脂培养基、玉米茎秆葡萄糖琼脂培养基、玉米茎秆琼脂培养基、玉米叶片葡萄糖琼脂培养基、玉米叶片琼脂培养基、玉米籽粒葡萄糖琼脂培养基、玉米籽粒琼脂培养基、玉米粉葡萄糖琼脂培养基、玉米粉琼脂培养基、查氏培养基、基本培养基、水琼脂培养基)、5 种碳源 (乳糖、葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖)、以乳糖酪蛋白琼脂培养基为基础培养基, 以 5 g·L⁻¹ 的量分别添加不同的氮源 (牛肉膏、蛋白胨、NH₄Cl、KNO₃、(NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃)、pH (4、5、6、7、8、9)、温度 (15、20、25、30、35℃) 及光照强度 (1 500、3 000、6 000、9 000 lx) 等条件对分生孢子产量的影响; 进一步利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 技术, 分析病菌菌丝形成时期和分生孢子形成时期 GATA 家族 5 个成员基因的表达量。【结果】利用单因素分析法确定了影响玉米大斑病菌分生孢子产量的主要因素, 发现产孢量最大的培养条件为玉米叶片葡萄糖琼脂培养基, 碳源为乳糖, 培养温度为 25℃, pH 8, 光照条件为光暗交替各 12 h, 光照强度为 6 000 lx。另外, 还发现在培养基中添加 KNO₃ 可显著提高分生孢子产量。对 GATA 家族 5 个基因的相对表达水平分析表明, 与菌丝时期相比, 在分生孢子形成时期 *GATA2* 的表达量明显上调, 其他基因 (*GATA1*、*GATA3*、*GATA4*、*GATA5*) 表达量均显著下调。【结论】利用单因素分析法确定了影响玉米大斑病菌分生孢子产量的最佳培养条件; 根据 GATA 家族 5 个基因相对表达分析结果, 推测 *GATA2* 可能参与了玉米大斑病菌的分生孢子形成。

关键词: 玉米大斑病菌; 分生孢子; 产孢条件; GATA 家族; 基因表达

Influencing Factors of Conidiospore and Expression Analysis of GATA Transcription Factor Gene Family in *Setosphaeria turcica*

FENG ShengZe¹, LIU XingChen¹, WANG HaiXiang², ZHAO Jie¹, ZHAO LiQing¹, ZHENG YaNan¹, GONG XiaoDong¹, HAN JianMin¹, GU ShouQin¹, DONG JinGao¹

(¹Mycotoxin and Molecular Plant Pathology Laboratory, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, Hebei; ²Baoding University, Baoding 071000, Hebei)

Abstract: 【Objective】 Northern leaf blight of corn is an important leaf disease and its agent is *Setosphaeria turcica*. The objectives of this study are to determine the main influencing factors in conidium yield and the expression characteristics of GATA transcription factor gene family at conidium formation stage in *S. turcica*. The research will lay a foundation for further illuminating

收稿日期: 2016-08-22; 接受日期: 2016-12-13

基金项目: 国家自然科学基金 (31371897, 31271997)、河北省自然科学基金 (C2014105067)

联系方式: 冯胜泽, E-mail: 635079576@qq.com。刘星晨, E-mail: 1552788293@qq.com。冯胜泽和刘星晨为同等贡献作者。通信作者谷守芹, Tel: 0312-7528876; E-mail: gushouqin@126.com。通信作者董金皋, Tel: 0312-7528876, E-mail: dongjingao@126.com

the molecular mechanism of regulating growth, development and pathogenicity in *S. turcica*. 【Method】 *S. turcica* wild-type strain 01-23 was used as test material in the study. The main factors which affecting conidium yield was analyzed as follows. The media were lactose casein agar, potato dextrose agar, corn stalk dextrose agar, corn stalk agar, corn leaf dextrose agar, corn leaf agar, corn niblet dextrose agar, corn niblet agar, corn starch dextrose agar, corn starch agar, czapek, minimal medium, and water agar. The carbons were lactose, glucose, sucrose, fructose, and maltose. Nitrogen sources were beef jelly, peptone, NH_4Cl , KNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4NO_3 , which were added in lactose casein agar medium respectively and the content was 5 g in per liter medium. The pHs were 4, 5, 6, 7, 8, and 9. The temperatures were 15, 20, 25, 30, and 35°C. The light intensities were 1 500, 3 000, 6 000, and 9 000 lx, respectively. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) technology was employed to analyze the expression characteristics of GATA family members during conidium formation period. 【Result】 The optimum conditions for conidia yield in *S. turcica* based on single factor method were as follows. The most appropriate medium was maize leaf dextrose agar medium, pH was 8, 25°C, 6 000 lx light intensity (12 hours light and 12 hours dark). In addition, it was found that the addition of KNO_3 in lactose casein agar medium significantly increased conidial yield. *GATA2* significantly enhanced its expression level while other GATA family members, such as *GATA1*, *GATA3*, *GATA4*, *GATA5*, cut down their expression level at conidium formation stage compared with mycelium development stage. 【Conclusion】 The optimum culture condition of *S. turcica* conidium yield was determined based on single factor method in the study. According to the relative expression analysis of 5 genes in GATA family, it was speculated that *GATA2* may be involved in the formation of conidia in *S. turcica*.

Key words: *Setosphaeria turcica*; conidium; sporulation condition; GATA gene family; gene expression

0 引言

【研究意义】玉米大斑病 (northern leaf blight of corn) 是玉米上的重要叶部病害, 现已遍布美洲、欧洲、亚洲、非洲和大洋洲等玉米产区。在中国以东北、华北、西北和南方山区的冷凉玉米产区较易流行, 发生严重的年份感病品种减产可达 50% 以上^[1-3]。该病害由玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*) 引起, 病菌可通过分生孢子实现病害的远距离传播^[4], 其分生孢子具有抵抗高温、低温、干燥和营养缺乏等不良环境的能力, 当遇到适宜的环境和寄主条件时分生孢子可以萌发并感染寄主, 导致病害的发生^[5-7]。因此, 探索影响分生孢子产生的外界条件、分析调控分生孢子产生的分子机制对于病害防治具有重要意义。【前人研究进展】在实验室培养条件下, 不同的培养条件对分生孢子的产生具有显著的影响。如在辣椒炭疽病菌 (*Gloeosporium piperatum*) 中, 在 PDA 培养基上 25°C 左右菌丝生长旺盛, 30°C 有利于其分生孢子的产生; 光照培养或黑暗培养对菌落直径的影响不大, 而光照培养有利于分生孢子的产生^[8]。烟草赤星病菌 (*Alternaria alternata*) 中, 葡萄糖是最好的碳源, 有机氮远比无机氮好, Czapek 培养基对孢子形成最适宜^[9]。笔者实验室前期研究表明, 在玉米大斑病菌中, 分生孢子萌发的适宜 pH 为 5.0—7.0, 蔗糖、葡萄糖、D-果糖、玉米叶汁均能促进分生孢子萌发, 光对分生孢子萌发影响并不显著^[10], 但对影响分生孢子产生的因素未做系统研究。GATA 转录因子家族

是一类含有锌指结构的基因家族, 可特异性识别 DNA 分子中的 GATA motif, 从而启动靶基因的转录过程。研究发现, GATA 转录因子家族广泛存在于动物、植物及真菌中并影响许多生物过程。如在脊椎动物中发现了 6 种 GATA 结合蛋白, 分为 GATA1/2/3 和 GATA4/5/6 两大类, 前者参与红细胞、淋巴组织及性腺的发育, 后者控制心脏、肠及外胚等组织器官的分化及发育过程^[11]; 在植物中 GATA 转录因子广泛参与了光响应调控、叶绿素合成以及碳氮代谢等与作物产量密切相关的生物学过程^[12]; 在植物病原真菌中有关 GATA 的报道较少, 如在水稻稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 研究中发现, GATA 转录因子家族基因 0349D2 的敲除突变体 MGG-01426.6 中分生孢子产量显著降低, 表明该基因与分生孢子产生密切相关^[13]。【本研究切入点】近年来, 笔者课题组一直致力于利用 RNAi (RNA interference)、ATMT (*Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation) 农杆菌介导的基因敲除技术分析玉米大斑病菌 MAPK (mitogen activated protein kinase) 级联途径关键基因的功能^[14-16]。在研究过程中以分生孢子作为转化的起始材料, 发现分生孢子产生的数量及活力对遗传转化的效率至关重要。但该病菌在人工培养条件下特别是在经过继代培养后出现生长缓慢、分生孢子产量大大降低等现象, 这已成为制约研究工作的瓶颈^[17]。而在玉米大斑病菌中发现 GATA 转录因子家族含有 5 个基因, 且其蛋白结构均含有锌指结构, 但该家族基因

是否与分生孢子形成相关尚不明确。【拟解决的关键问题】明确影响玉米大斑病菌分生孢子产生的关键因素,并探索 GATA 转录因子家族在病菌分生孢子形成时期的表达特征。为玉米大斑病菌功能基因的研究提供分生孢子材料,并为深入研究调控病菌分生孢子产生的分子机制打下基础。

1 材料与amp;方法

试验于 2015—2016 年在河北农业大学真菌毒素与植物分子病理学实验室完成。

1.1 供试菌株

玉米大斑病菌野生型菌株 01-23,由河北农业大学真菌毒素与植物分子病理学实验室保存。

1.2 野生型菌株菌种的培养

将玉米大斑病菌野生型菌株 01-23 接种至马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA),于 25℃恒温培养箱中培养 8—10 d 备用(均 25 mL/皿)。用于分生孢子产生条件探究的试验均设定 3 个重复。

1.3 不同培养条件对分生孢子产量的影响

1.3.1 培养基对分生孢子产生的影响 选用乳糖酪蛋白琼脂培养基(lactose casein agar, LCA)、马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)、玉米茎秆葡萄糖琼脂培养基(corn stalk dextrose agar, CTDA)(玉米茎秆 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 15 g,纯净水定容至 1 L)、玉米茎秆琼脂培养基(corn stalk agar, CTA)、玉米叶片葡萄糖琼脂培养基(corn leaf dextrose agar, CLDA)(玉米叶片 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 15 g,纯净水定容至 1 L)、玉米叶片琼脂培养基(corn leaf agar, CLA)、玉米籽粒葡萄糖琼脂培养基(corn niblet dextrose agar, CDA)(玉米籽粒 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 15 g,纯净水定容至 1 L)、玉米籽粒琼脂培养基(corn niblet agar, CA)、玉米粉葡萄糖琼脂培养基(corn starch dextrose agar, CSDA)(玉米粉 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 15 g,纯净水定容至 1 L)、玉米粉琼脂培养基(corn starch agar, CSA)、查氏培养基(Czappek)、基本培养基(minimal medium, MM)、水琼脂培养基(water agar, WA),共 13 种培养基,25℃恒温黑暗培养 15—20 d^[18]。

1.3.2 碳源对分生孢子产量的影响 以 LCA 为基础培养基,分别用等量的碳源替换乳糖,碳源依次为葡萄糖、蔗糖、果糖、麦芽糖,共 5 种碳源,25℃恒温黑暗培养 20 d^[19-20]。

1.3.3 氮源对分生孢子产量的影响 以 LCA 为基础培养基,以 5 g·L⁻¹的量分别添加不同氮源:牛肉膏、蛋白胨、NH₄Cl、KNO₃、(NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃,共 7 种培养基,25℃恒温黑暗培养 20 d^[21]。

1.3.4 温度对分生孢子产量的影响 以 LCA 为基础培养基,分别在 15、20、25、30、35℃共 5 个温度梯度下黑暗培养 20 d^[22]。

1.3.5 光照对分生孢子产量的影响 以 LCA 为基础培养基,分别使用 24 h 黑暗,12 h 黑暗 12 h 光照(1 500、3 000、6 000、9 000 lx 共 4 种不同光照强度梯度),24 h 光照(最佳光照强度 6 000 lx 下),在这 3 种不同光照方式处理下 25℃恒温培养 20 d^[19]。

1.3.6 pH 对分生孢子产量的影响 以 LCA 为基础培养基(pH 为 6),用 HCl 和 NaOH 将 LCA 培养基 pH 依次调至 4、5、6、7、8、9,25℃恒温黑暗培养 20 d^[22]。

1.4 分生孢子产量的测定

取出已培养好的病菌平板,在每个培养皿中加入 10 mL 无菌水,制备分生孢子悬浮液,运用血球计数法测定分生孢子的量并计算每毫升中分生孢子数量,每个试验设定 3 个重复。

1.5 与分生孢子产生相关基因相对表达量

材料的收集:将病菌野生型菌株 01-23 接种在 PDA 培养基上,培养 7 d 后用去尖枪头刮取培养基表面,并收集菌丝;将病菌野生型菌株 01-23 接种于 LCA 培养基,25℃ 6 000 lx 光照强度下 12 h 黑暗 12 h 光照培养 20 d,之后在平皿中加入 10 mL 无菌水,用去尖枪头轻刮培养基表面,将孢悬液经 3 层纱布过滤,除去菌丝体,收集分生孢子。

总 RNA 的提取及第一链 cDNA 的合成:利用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 提取试剂盒提取玉米大斑病菌菌丝及 LCA 培养基上所产生的分生孢子的总 RNA,按照张鑫等^[23]的方法合成第一链 cDNA。

qRT-PCR 分析:用 Roche Light Cycler 96 实时荧光定量 PCR 仪对菌丝及分生孢子时期 cDNA 为材料对 GATA 转录因子家族 5 个基因进行 qRT-PCR 分析^[24],PCR 反应的扩增体系(20 μL)为 Template (cDNA) 2.0 μL; 2×TransStart Top Green qPCR SuperMix 10 μL; 引物 F (10 μmol·L⁻¹) 0.4 μL; 引物 R (10 μmol·L⁻¹) 0.4 μL; ddH₂O 7.2 μL。PCR 程序:①95℃ 5 min; ②95℃ 10 s, 58℃ 20 s, 72℃ 15 s (45 个循环)。引物设计见表 1。

表 1 GATA 转录因子家族基因表达水平分析所用引物

Table 1 Primers used in GATA family of transcription factors relative gene expression analysis in *S. turcica*

引物 Primer	正向引物序列 Sequence of sense primer (5'-3')	反向引物序列 Sequence of anti-sense primer (5'-3')
GATA1	AAGTGCCATCCCTGCGT	GGTGAGTGCCGGAAGTTTG
GATA2	AGTTGCCAATGCTGAG	TGTCGCTGCTCTGTGTG
GATA3	GCCTGAGTGGCGAAAAG	TGTGCCTTGCTGCTTCT
GATA4	AACGCCTACTCGTCAACC	ACGACAAACGCACAGGA
GATA5	CCAGGCGGACGCAAGAG	CCGTCTGCATCGGGGTG
18S	GCAATTGCCAAGGATGTTT TC	GACGGTATCTGATCGTCTT CGAT

2 结果

2.1 不同培养基对病菌分生孢子产生的影响

将病菌菌株 01-23 分别接种在 13 种不同培养基上, 培养 15 d 后观察发现在每种培养基上均有分生孢子产生, 但其产量不同。其中 LCA、PDA、CLDA、CTDA 等 4 种培养基分生孢子产量相对较多, 依次为 9.22×10^4 、 8.56×10^4 、 6.00×10^4 、 5.56×10^4 个/mL。其余 9 种培养基 CLA、MM、Czapek、CTA、CSDA、CDA、CA、CSA、WA 产孢量较少, 依次为 4.00×10^4 、 3.11×10^4 、 2.22×10^4 、 1.67×10^4 、 1.22×10^4 、 7.78×10^3 、 6.67×10^3 、 5.56×10^3 、 1.11×10^3 个/mL。进一步培养 20 d 后观察发现, 在 PDA、LCA、CTDA、CLDA 4 种培养基中分生孢子产量显著增加且均产生黑色分生孢子团, 产孢量依次分别为 1.32×10^5 、 1.41×10^5 、 1.59×10^5 、 1.63×10^5 个/mL; 而其余 9 种培养基 CLA、MM、Czapek、CTA、CSDA、CDA、CA、CSA、WA 产孢量无显著增加 (图 1)。因此, CLDA 为玉米大斑病菌分生孢子产生的最佳培养基。

2.2 碳源、氮源对病菌分生孢子产生的影响

用不同碳源等量替换 LCA 培养基中的乳糖, 分别用不同碳源培养基培养菌株 01-23, 结果发现以乳糖为碳源的 LCA 培养基产孢量最多, 培养 20 d 后产孢量为 1.42×10^5 个/mL, 果糖次之 (图 2)。在 LCA 中添加不同氮源培养后发现添加 KNO_3 的培养基中产孢量高达 1.88×10^5 个/mL (图 3)。

2.3 温度对病菌分生孢子产生的影响

培养温度过低或过高都不利于分生孢子的产生, 在 15、35℃ 均不产生分生孢子, 仅在 20、25、30℃ 能够产生孢子; 其中在 20、30℃ 的产孢量较少, 分别为

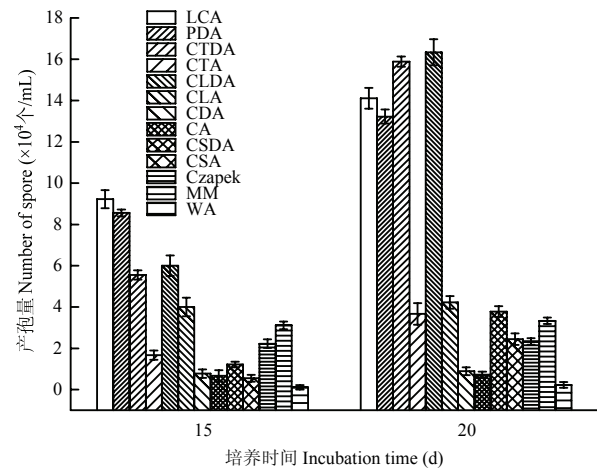
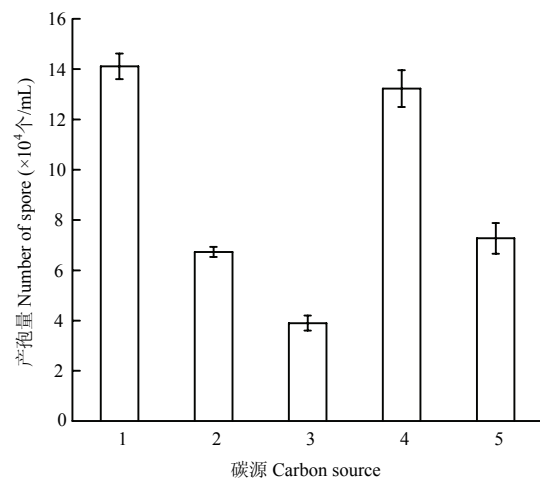


图 1 不同培养基对玉米大斑病菌分生孢子产生的影响

Fig. 1 Effect of different media on conidium yield in *S. turcica*

1: 乳糖 Lactose; 2: 葡萄糖 Dextrose; 3: 蔗糖 Sucrose; 4: 果糖 Fructose; 5: 麦芽糖 Maltose

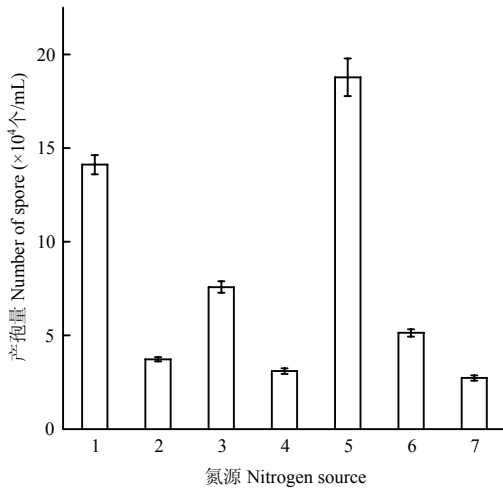
图 2 碳源对玉米大斑病菌分生孢子产生的影响

Fig. 2 Effect of carbon sources on conidium yield in *S. turcica*

4.00×10^4 、 2.22×10^3 个/mL, 在 25℃ 时产孢量较多, 可达 1.41×10^5 个/mL (图 4)。因此, 25℃ 为病菌分生孢子产生的最适温度。

2.4 光照对病菌分生孢子产生的影响

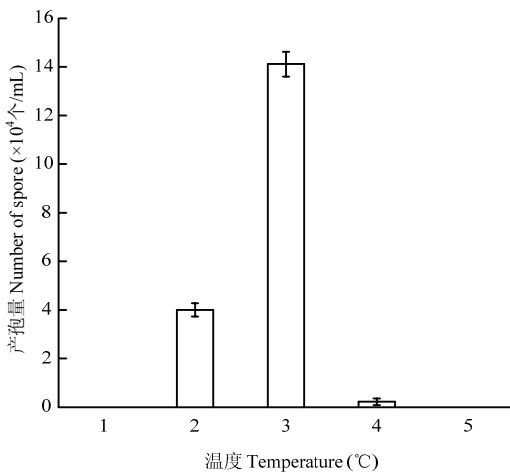
在全部光照培养条件下 (6 000 lx) 显著抑制分生孢子的产生, 分生孢子产量为 2.23×10^4 个/mL; 在全部黑暗培养条件下分生孢子的产量为 1.42×10^5 个/mL; 在 12 h 黑暗、12 h 光照培养条件下, 1 500、3 000 lx 光照条件分生孢子的产量分别为 1.48×10^5 、 $1.51 \times$



1: 不添加 No add; 2: 牛肉膏 Beef extract; 3: 蛋白胨 Peptone; 4: NH_4Cl ; 5: KNO_3 ; 6: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 7: NH_4NO_3

图 3 氮源对分生孢子产生的影响

Fig. 3 Effect of nitrogen sources on conidium yield in *S. turcica*

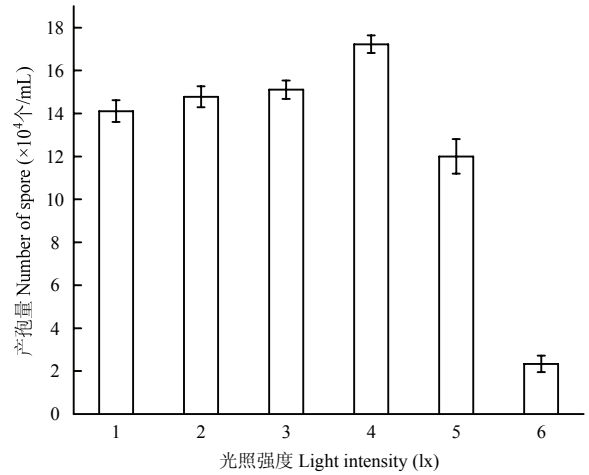


1: 15°C; 2: 20°C; 3: 25°C; 4: 30°C; 5: 35°C

图 4 不同温度对分生孢子产生的影响

Fig. 4 Effect of temperature on conidium yield in *S. turcica*

10^5 个/mL; 12 h 光暗交替培养, 光照强度为 6 000 lx 条件下病菌分生孢子产量为 1.72×10^5 个/mL, 与完全黑暗培养条件相比分生孢子的产量显著增加; 同样在 12 h 黑暗、12 h 光照培养条件下光照强度为 9 000 lx 时分生孢子的产量仅为 1.20×10^5 个/mL (图 5)。结果表明, 光照不是分生孢子产生的必要因素, 但 12 h 光照 12 h 黑暗且光照强度为 6 000 lx 能显著提高分生孢子产量。



1: 24 h 黑暗 24 h dark; 2—5: 12 h 黑暗 12 h 光照 (光照强度依次为 1 500、3 000、6 000、9 000 lx) 12 h dark and 12 h light (light intensity were 1 500, 3 000, 6 000, 9 000 lx); 6: 24 h 光照 (最佳光强下 6 000 lx) 24 h light (under optimum light intensity 6 000 lx)

图 5 光照对分生孢子产生的影响

Fig. 5 Effect of light treatment on conidium yield in *S. turcica*

2.5 pH 对病菌分生孢子产生的影响

将玉米大斑病菌接种到 6 种不同 pH 下的 LCA 培养基上, 25°C 恒温培养 20 d 后, 测定 pH 为 4、5、6、7、8、9 的培养条件下分生孢子的产量, 分别为 1.78×10^4 、 1.31×10^5 、 1.41×10^5 、 1.53×10^5 、 1.69×10^5 、 9.22×10^4 个/mL, 其中 pH 为 8 时产孢量最多, 表明弱碱性有益于玉米大斑病菌分生孢子的产生 (图 6)。

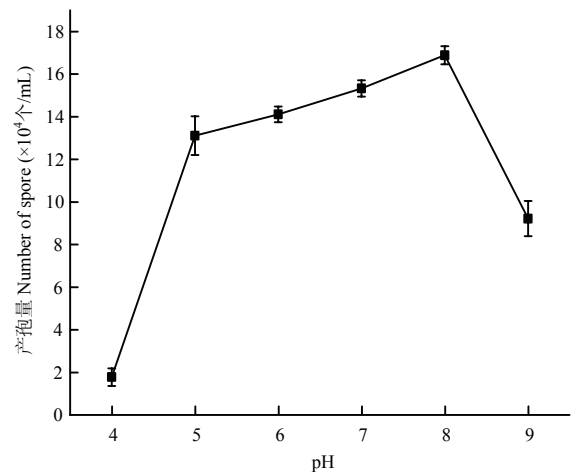


图 6 pH 对分生孢子产生的影响

Fig. 6 Effect of pH on conidium yield in *S. turcica*

2.6 GATA 转录因子家族基因相对表达量分析

利用 qRT-PCR 技术比较 GATA 家族基因在分生孢子形成时期与菌丝时期的表达水平变化。设定菌丝时期基因的表达量为 1, 分析分生孢子形成时期基因的相对表达水平。结果发现, 在分生孢子形成时期 *GATA2* 表达水平明显上调, 是菌丝形成时期表达量的 30.6 倍 ($P < 0.05$); 其余 4 个基因相对表达量均显著降低, *GATA1*、*GATA3*、*GATA4*、*GATA5* 的表达水平分别降低了 92%、100%、97%、97% (图 7)。

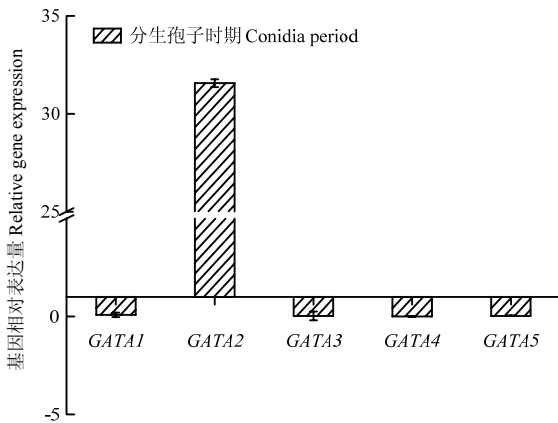


图 7 GATA 转录因子家族基因相对表达量

Fig. 7 GATA transcription factor family gene relative expression level analysis in *S. turcica*

3 讨论

在对西瓜炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*) 分生孢子产生条件的研究中发现, 西瓜茎叶煎汁培养基是病菌产孢的最佳培养基, 可使产孢量达到 7.15×10^9 个/mL, 是 PSA 等传统培养基产孢量的 10^4 倍左右^[18]。本研究选用 13 种不同培养基诱导玉米大斑病菌分生孢子的产生, 发现使用玉米籽粒葡萄糖琼脂培养基 (CDA)、玉米籽粒琼脂培养基 (CA) 及水琼脂培养基 (WA) 3 种培养基产孢量较低, $\leq 8.89 \times 10^3$ 个/mL, PDA 培养基产孢量为 1.32×10^5 个/mL, 而玉米叶片葡萄糖琼脂培养基 (CLDA) 最有利于分生孢子的产生, 产孢量达到 1.63×10^5 个/mL, 使用含有玉米叶片的 CLDA 培养基与使用普通 PDA 培养基相比产孢量差异显著。在西瓜炭疽病菌及玉米大斑病菌的分生孢子诱导中均发现类似的现象, 即使用含有寄主材料的培养基可以显著提高分生孢子的产量, 推测寄

主中可能含有某种特殊成分, 如某些维生素、激素、碳源、氨基酸或无机盐离子等是分生孢子产生所需要的。

光对病菌分生孢子的产生具有重要影响, 如在苹果轮纹病菌 (*Physalospora piricola*) 中发现, 完全黑暗条件下不能形成分生孢子器; 12 h 光照 12 h 黑暗交替培养只能形成分生孢子器, 不能形成分生孢子; 完全光照下既能形成孢子器又能产生分生孢子, 且仅在完全光照条件下才能够产生分生孢子^[25]。对中国被毛孢 (*Hirsutella sinensis*) 的研究发现, 蓝光照射下分生孢子产量最多, 显著高于其他光照条件, 而红光对产孢影响不明显^[26]。本研究发现, 在全光照培养条件下 (6 000 lx) 显著抑制分生孢子的产生; 12 h 黑暗 12 h 光照培养条件与全黑暗培养相比, 9 000 lx 抑制分生孢子的产生, 6 000 lx 促进分生孢子的产生, 表明在玉米大斑病菌中不同光照强度对分生孢子产生具有不同的影响。由此可见, 在不同的植物病原真菌中, 光照时间、光照强度、光质对病菌分生孢子的产生均具有不同程度的影响。

在酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中, 通过 4 个 GATA-因子蛋白在转录及调控氮源利用过程中起重要作用。如 NCR (nitrogen catabolite repression) 是酿酒酵母对环境氮源选择性的基础, 而 GATA 转录因子家族成员基因 *GAT1* 的表达使 NCR 处于敏感状态, *Gat1p* 通过参与 NCR 敏感基因的转录, 从而影响病菌对氮源的选择^[27-28]; 粗糙脉孢 (*Neurospora crassa*) 中 GATA 转录因子家族成员 *WC1/WC2* 是一种光感测因子, 参与染色体重塑和基因的激活, 从而影响该病菌的生长发育及生理过程^[29]; 在稻瘟病菌中, GATA 转录因子家族成员基因 *0349D2* 的突变菌株 (MGG-01426.6) 分生孢子产量显著降低^[13]。本研究发现, 在玉米大斑病菌分生孢子形成时期, GATA 转录因子家族成员 *GATA2* 表达量为菌丝时期表达量的 30.6 倍, 说明该基因参与调控病菌的分生孢子形成, 这与在稻瘟病菌中的研究结果相一致。另外, 通过文献查询结合本试验结果, 笔者发现在植物、动物及真菌等不同的物种中, GATA 家族成员数目不同, 其成员所参与的代谢过程也不尽相同, 目前尚不能仅仅根据基因的结构对基因的功能进行系统分类, 因此需深入研究并积累更多的试验数据才可以阐明这类基因家族具体功能。从本研究结果来看, 在玉米大斑病菌中 *GATA2* 与病菌分生孢子产生的关系较为密切, 其余该家族基因主要参与病菌的菌丝发育过程, 但基因

的具体功能还不清晰,因此下一步将创制该家族基因的敲除突变体,通过比较突变体与野生型基因的差异来明确基因的功能。

4 结 论

利用单因素分析法确定了影响玉米大斑病菌分生孢子产量的最佳因素为玉米叶片葡萄糖琼脂培养基,乳糖,25℃,pH 8.0,光暗交替各 12 h,光照强度为 6 000 lx,在培养基中添加 KNO₃ 可显著提高分生孢子产量。根据 GATA 转录因子家族 5 个基因相对表达分析结果,推测 *GATA2* 可能主要参与病菌的分生孢子形成,其余家族成员(*GATA1*、*GATA3*、*GATA4*、*GATA5*) 主要参与病菌的菌丝发育。

References

- [1] VAN INGHELANDT D, MELCHINGER A E, MARTINANT J P, STICH B. Genome-wide association mapping of flowering time and northern corn leaf blight (*Setosphaeria turcica*) resistance in a vast commercial maize germplasm set. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 56.
- [2] XUE C S, WU D L, CONDON B J, BI Q, WANG W W, TURGEON B G. Efficient gene knockout in the maize pathogen *Setosphaeria turcica* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Phytopathology*, 2013, 103(6): 641-647.
- [3] 申坤, 王晶晶, 佟亚萌, 李坡, 郝志敏, 董金皋. 玉米大斑病菌腺苷酸环化酶基因的克隆与功能分析. *中国农业科学*, 2013, 46(5): 881-888.
SHEN S, WANG J J, TONG Y M, LI P, HAO Z M, DONG J G. Cloning and functional analysis of *StAC* gene in *Setosphaeria turcica*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(5): 881-888. (in Chinese)
- [4] 唐秀丽, 范洁茹, 周益林, 马占鸿, 邹亚飞, 段霞瑜. 小麦白粉菌分生孢子离体后存活时间与温度的定量关系研究. *植物病理学报*, 2015, 45(6): 670-674.
TANG X L, FAN J R, ZHOU Y L, MA Z H, ZOU Y F, DUAN X Y. The correlation between temperature and survival time of conidia of *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* in vitro. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2015, 45(6): 670-674. (in Chinese)
- [5] 张海涛, 殷丽华, 柯希望, 台莲梅, 左豫虎. 绿豆叶斑病菌分生孢子的产生和萌发条件研究. *农学报*, 2016, 6(10): 78-82.
ZHANG H T, YIN L H, KE X W, TAI L M, ZUO Y H. Conidia production and germination conditions of mung bean leaf spot pathogen. *Journal of Agriculture*, 2016, 6(10): 78-82. (in Chinese)
- [6] 崔亚忠, 陶岚, 孙晨浩, 刘平, 李桂华, 秦庆明. ABC 转运蛋白 BcAtm1 参与灰葡萄孢分生孢子萌发及对寄主植物的侵染. *植物病理学报*, 2016, 46(5): 614-623.
CUI Y Z, TAO L, SUN C H, LIU P, LI G H, QIN Q M. The ABC transporter, BcAtm1, is involved in conidial germination and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2016, 46(5): 614-623. (in Chinese)
- [7] 高芬, 褚建梅, 李静虹, 王梦亮. 植物病原真菌致病机理研究进展. *江苏农业学报*, 2014, 30(5): 1174-1179.
GAO F, CHU J M, LI J H, WANG M L. Research progress in the pathogenesis of plant pathogenic fungi. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 30(5): 1174-1179. (in Chinese)
- [8] 马荣群, 岳文辉, 宋正旭, 黄粤, 李梅. 温度及光照条件对辣椒炭疽病菌分生孢子产生的影响. *山东农业科学*, 2007(2): 67-68.
MA R Q, YUE W H, SONG Z X, HUANG Y, LI M. Effect of different temperatures and light on *Gloeosporium piperatum* sporulation. *Shandong Agricultural Sciences*, 2007(2): 67-68. (in Chinese)
- [9] 马贵龙, 王丽, 高洁, 华致甫. 烟草赤星病菌分生孢子产生条件的研究. *吉林农业大学学报*, 2006, 28(6): 610-612, 618.
MA G L, WANG L, GAO J, HUA Z F. Studies on sporulation conditions of *Alternaria alternata* in tobacco. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2006, 28(6): 610-612, 618. (in Chinese)
- [10] 宋文静, 董金皋. 玉米大斑病菌孢子萌发和附着孢形成的影响因素研究. *植物病理学报*, 2008, 38(5): 536-539.
SONG W J, DONG J G. Factors of influence on conidium germination and appressorium formation of *Setosphaeria turcica*. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2008, 38(5): 536-539. (in Chinese)
- [11] 何远清, 储明星, 刘荣志, 王金玉. GATA 家族与哺乳动物繁殖. *中国畜牧兽医*, 2007, 34(11): 42-45.
HE Y Q, CHU M X, LIU R Z, WANG J Y. GATA family in mammalian reproduction. *China Animal Husbandry and Veterinary Medicine*, 2007, 34(11): 42-45. (in Chinese)
- [12] 敖涛, 廖晓佳, 徐伟, 刘爱忠. 蓖麻 GATA 基因家族的鉴定和特征分析. *植物分类与资源学报*, 2015, 37(4): 453-462.
AO T, LIAO X J, XU W, LIU A Z. Identification and characterization of GATA gene family in castor bean (*Ricinus communis*). *Plant Diversity and Resources*, 2015, 37(4): 453-462. (in Chinese)
- [13] PARK S Y, CHOI J, LIM S E, LEE G W, PARK J, KIM Y, KONG S, KIM S R, RHO H S, JEON J, CHI M H, KIM S, KHANG C H, KANG S, LEE Y H. Global expression profiling of transcription factor genes provides new insights into pathogenicity and stress responses in the rice blast fungus. *PLoS Pathogens*, 2013, 9(6): e1003350.
- [14] GU S Q, LI P, WU M, HAO Z M, GONG X D, ZHANG X Y, TIAN L, ZHANG P, WANG Y, CAO Z Y, FAN Y S, HAN J M, DONG J G.

- StSTE12* is required for the pathogenicity of *Setosphaeria turcica* by regulating appressorium development and penetration. *Microbiological Research*, 2014, 169: 817-823.
- [15] SHEN S, HAO Z M, GU S Q, WANG J J, CAO Z Y, LI Z Y, WANG Q, LI P, HAO J, DONG J G. The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase A *StPKA-c* contributes to conidiation and early invasion in the phytopathogenic fungus *Setosphaeria turcica*. *FEMS Microbiology Letters*, 2013, 343: 135-144.
- [16] GU S Q, YANG Y, LI P, FAN Y, ZHANG C Z, HAO Z M, CAO Z Y, GONG X D, FAN Y S, HAN J M, DONG J G. STK2, a MAP kinase gene from *Setosphaeria turcica*, specifically complements the functions of yeast FUS3/KSS1 genes of *Saccharomyces cerevisiae* in filamentation, invasive growth, and mating behavior. *Journal of Integrative Agriculture*, 2013, 12(12): 2209-2216.
- [17] 陈曲, 翟慧者, 胡同乐, 王树桐, 曹克强. 苹果树腐烂病菌分生孢子产生条件研究. *安徽农业科学*, 2011, 39(25): 15337-15338, 15351.
- CHEN Q, ZHAI H Z, HU T L, WANG S T, CAO K Q. Research on the condition of conidiospore of apple tree canker. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2011, 39(25): 15337-15338, 15351. (in Chinese)
- [18] 刘志恒, 唐爽爽, 杨璐, 郑川, 安心, 赵廷昌. 西瓜炭疽病菌圆刺盘孢分生孢子产生条件的研究. *菌物学报*, 2015, 34(1): 75-81.
- LIU Z H, TANG S S, YANG L, ZHENG C, AN X, ZHAO T C. Sporulating conditions of *Colletotrichum orbiculare* causing anthracnose of watermelon. *Mycosystema*, 2015, 34(1): 75-81. (in Chinese)
- [19] 杨迎青, 兰波, 胡水秀, 常冬冬, 张顺梁, 李湘民. 几种因素对芦笋茎枯病菌分生孢子器和分生孢子产生量的影响. *植物保护学报*, 2015, 42(4): 517-522.
- YANG Y Q, LAN B, HU S X, CHANG D D, ZHANG S L, LI X M. Effects of several factors on the production of pycnidia and conidia in asparagus stem blight pathogen. *Journal of Plant Protection*, 2015, 42(4): 517-522. (in Chinese)
- [20] 解溥, 李鹏, 穆娟微. 碳源对水稻褐变穗病原菌分生孢子萌发的影响. *北方水稻*, 2011, 41(5): 21-22.
- XIE B, LI P, MU J W. Effects of carbon source on conidia germination of the pathogen of rice browning ear. *North Rice*, 2011, 41(5): 21-22. (in Chinese)
- [21] 王军, 旷文丰, 陈晨, 王承芳, 毛伟力. 液体发酵因子对棘孢木霉 Tr148c 分生孢子产量的影响. *安徽农业大学学报*, 2015, 42(4): 595-599.
- WANG J, KUANG W F, CHEN C, WANG C F, MAO W L. Effect of liquid fermentation factors on conidial production of *Trichoderma asperellum* strain Tr148c. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2015, 42(4): 595-599. (in Chinese)
- [22] 刘静, 李国华, 周明, 许丽月, 肖春云. 橡胶树白粉菌分生孢子萌发条件及存活时间的研究. *西南农业学报*, 2014, 27(1): 151-155.
- LIU J, LI G H, ZHOU M, XU L Y, XIAO C Y. Study on conditions of conidial germination and survival time of *Oidium heveae*. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2014, 27(1): 151-155. (in Chinese)
- [23] 张鑫, 曹志艳, 刘士伟, 郭丽媛, 董金泉. 玉米大斑病菌聚酮体合成酶基因 *StPKS* 功能分析. *中国农业科学*, 2011, 44(8): 1603-1609.
- ZHANG X, CAO Z Y, LIU S W, GUO L Y, DONG J G. Functional analysis of polyketide synthase gene *StPKS* in *Setosphaeria turcica*. *Scientia Agricultura Sinica*, 2011, 44(8): 1603-1609. (in Chinese)
- [24] SU Z X, DONG X J, ZHANG B, ZENG Y W, FU Y, YU J, HU S N. Gene expression profiling in porcine mammary gland during lactation and identification of breed- and developmental-stage-specific genes. *Sciences in China: Series C Life Sciences*, 2006, 49(1): 26-36.
- [25] 陈功友. 苹果轮纹病菌分生孢子产生条件的研究. *植物病理学报*, 1993, 23(4): 366.
- CHEN G Y. The conditions for production of conidia of *Phylospora piricola* on apple. *Acta Phytopathologica Sinica*, 1993, 23(4): 366. (in Chinese)
- [26] 张宗耀, 梁关海, 梁蕾, 吕延华, 李文佳, 谢俊杰. 培养基及培养条件对中国被毛孢固体发酵产生孢子的影响. *菌物学报*, 2016, 35(4): 1-10.
- ZHANG Z Y, LIANG G H, LIANG L, LÜ Y H, LI W J, XIE J J. Effects of medium and environmental conditions on the sporulation of *Hirsutella sinensis* in solid fermentation. *Mycosystema*, 2016, 35(4): 1-10. (in Chinese)
- [27] MILIAS-ARGEITIS A, OLIVEIRA A P, GEROSA L, FALTER L, SAUER U, LYGEROS J. Elucidation of genetic interactions in the yeast GATA-factor network using Bayesian model selection. *PLoS Computational Biology*, 2016, 12(3): e1004784.
- [28] COFFMAN J A, RAI R, CUNNINGHAM T, SVETLOV V, COOPER T G. Gat1p, a GATA family protein whose production is sensitive to nitrogen catabolite repression, participates in transcriptional activation of nitrogen-catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 1996, 16(3): 847-858.
- [29] SANCAR C, HA N, YILMAZ R, TESORERO R, FISHER T, BRUNNER M, SANCAR G. Combinatorial control of light induced chromatin remodeling and gene activation in *Neurospora*. *PLoS Genetics*, 2015, 11(3): e1005105.

(责任编辑 岳梅)