

APSES 转录因子 *PeXbp1* 参与扩展青霉生长发育、致病性及棒曲霉素生物合成

王艳玲*, 朱锦芬

(兰州理工大学生命科学与工程学院, 甘肃兰州 730050)

摘要: 扩展青霉 (*Penicillium expansum*) 是重要的果蔬采后致病真菌可产生真菌毒素棒曲霉素 (Patulin, PAT), 对食品安全造成严重威胁。为了明确 APSES 家族转录因子 *Xbp1* 在扩展青霉生长发育、致病性及 PAT 生物合成过程中的作用, 本研究通过全基因组比对鉴定获得 *PeXbp1* 基因, 并采用同源重组技术构建其缺失突变株, 结合表型分析、胁迫响应测定、致病性分析、反转录实时荧光定量聚合酶链式反应和高效液相色谱法等方法对其功能进行解析。结果表明, 与野生型 (WT) 相比, $\Delta PeXbp1$ 菌株培养 7 d 后菌落直径下降约 5.93%, 生物量下降约 16.67%, 产孢量下降约 9.29%; 孢子萌发 12 h 时萌发率下降约 23.47%, 同时 *LaeA* 和 *WetA* 表达量分别下调 33.33% 和 23.34% ($P < 0.05$)。在不同化学胁迫条件下, $\Delta PeXbp1$ 菌株对渗透胁迫 (NaCl 和 KCl)、细胞壁/细胞膜胁迫 (CR 和 SDS) 的耐受性与 WT 相比无显著差异。随后, 在苹果和梨果实中, $\Delta PeXbp1$ 菌株接种 7 d 的病斑直径分别下降 12.27% 和 30.76%。此外, 苹果和梨果实中的 PAT 含量分别下降 22.52% 和 33.69%, 液体培养 7 d 时 PAT 积累量下降 16.94%, PAT 生物合成关键基因 *PatH* 和 *PatJ* 表达量分别下降 45.11% 和 45.80% ($P < 0.05$)。综上, *PeXbp1* 在扩展青霉生长发育、无性发育、致病过程及 PAT 生物合成中发挥重要调控作用, 为扩展青霉病害绿色防控及 PAT 毒素污染控制提供理论依据。

关键词: APSES 转录因子; 扩展青霉; 棒曲霉素; 胁迫响应

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2027.8.0849

The APSES Transcription Factor *PeXbp1* Is Involved in Growth, Development, Pathogenicity, and Patulin Biosynthesis in *Penicillium expansum*

WANG Yanling*, ZHU Jinfen

(College of Life Sciences and Engineering, Lanzhou University of Technology, Lanzhou 730050, China)

Abstract: *Penicillium expansum* is an important postharvest pathogenic fungus of fruits and vegetables and is capable of producing the mycotoxin patulin (PAT), posing a serious threat to food safety. To clarify the role of the APSES family transcription factor *Xbp1* in the growth, development, pathogenicity, and PAT biosynthesis of *P. expansum*, the *PeXbp1* gene was identified through whole-genome sequence analysis. A *PeXbp1* deletion mutant was constructed by homologous recombination, and its biological functions were characterized through phenotypic analysis, stress response assays, pathogenicity tests, Reverse Transcription Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR), and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). The results showed, compared with the wild-type (WT) strain, the colony diameter, biomass, and conidial production of the $\Delta PeXbp1$ mutant decreased by approximately 5.93%, 16.67%, and 9.29%, respectively, after 7 d of cultivation. In addition, the spore germination rate of the mutant was approximately 23.47% lower than that of the WT strain at 12 h, while the expression levels of *LaeA* and *WetA* were decreased by 33.33% and 23.34%, respectively ($P < 0.05$). Under different chemical stress conditions, the $\Delta PeXbp1$ mutant showed no significant differences in tolerance to osmotic stress (NaCl and KCl) or cell wall/membrane stress (CR and SDS) compared with the WT strain. The lesion diameters caused by the $\Delta PeXbp1$ mutant on apple and pear fruits were 12.27% and 30.76% smaller, respectively, than those caused by the WT strain, at 7 d post-inoculation. Furthermore, PAT contents in infected apple and pear fruits showed reductions of 22.52% and 33.69%, respectively, and PAT accumulation in liquid culture decreased by 16.94% after 7 d of incubation. Meanwhile, the expression levels of the key PAT biosynthetic genes *PatH* and *PatJ* were down-regulated by 45.11% and 45.80%, respectively ($P < 0.05$).

收稿日期: 2026-06-03; 修回日期: 2026-08-27; 接受日期: 2026-08-28

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31760494; 32660875); 兰州市青年科技人才创新项目 (2023-QN-64)

作者简介: 王艳玲 (1985-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 园艺采后生物学, 采后病害发生机制与调控, E-mail: wangyanling2003359@126.com

These results indicate that *PeXbp1* plays an important regulatory role in the growth and development, asexual development, pathogenicity, and PAT biosynthesis of *P. expansum*, providing a theoretical basis for the development of environmentally friendly strategies to control *P. expansum* and mitigate PAT contamination.

Keywords: APSES transcription factor; *Penicillium expansum*; patulin; stress response

扩展青霉 (*Penicillium expansum*) 是一种广泛分布的子囊菌门真菌导致果蔬采后腐败的重要病原菌之一, 主要侵染苹果、梨和草莓等果实, 引起青霉病, 并在贮藏运输过程中造成严重的经济损失^[1,2]。*P. expansum* 通常通过果实采后产生的机械损伤或天然裂口侵入组织, 在适宜的温度和水分条件下迅速侵染与扩展, 分泌多种细胞壁降解酶 (如果胶酶、纤维素酶等) 破坏果实组织结构, 导致细胞解体和组织软化, 从而形成典型的水浸状腐烂病斑, 并逐渐扩展至整个果实^[3,4]。同时, *P. expansum* 具有较强的环境适应能力, 尤其在低温贮藏条件下仍能生长和侵染, 使其在冷链贮藏过程中难以控制^[5]。除组织破坏外, *P. expansum* 在侵染过程中还可产生棒曲霉素 (Patulin, PAT) 等次级代谢产物, 进一步加剧果实品质劣变并带来潜在的食品安全风险^[6,7]。

APSES 家族转录因子是一类真菌特异性的转录调控蛋白, 在真菌细胞分化、形态建成、营养代谢及致病过程中发挥重要调控作用^[8,9]。APSES 蛋白普遍含有保守的 APSES DNA-binding domain, 该结构域具有真菌特异性, 其核心区域形成类似 basic helix-loop-helix (bHLH) 的 DNA 结合结构, 可识别特定 DNA 序列并调控下游基因转录^[10,11]。作为 APSES 家族的重要成员, *Xbp1* 在多种真菌中参与细胞周期调控、环境应答及生长发育等生物学过程。已有研究表明, *Xbp1* 在不同真菌中具有多样的功能, 主要涉及细胞周期调控、应激响应及生长发育等过程。在 *Saccharomyces cerevisiae* 中, *Xbp1* 作为应激诱导型转录抑制因子, 通过抑制 G1 期细胞周期蛋白基因 (如 CLN1、CLN3) 表达延缓细胞周期进程, 促进细胞进入静止状态^[12-14]。同时, *Xbp1* 及其同源蛋白同样参与环境适应及致病相关过程, 例如在 *Candida albicans*、*Aspergillus nidulans* 及 *Magnaporthe oryzae* 中均被证实影响菌体生长与侵染能力^[15-17]。此外, 在 *Pleurotus eryngii* 中, *PeXbp1* 对菌丝生长及孢子发育发挥着重要作用^[18]。目前 *Xbp1* 在真菌中的研究较为有限, 尤其在采后病原真菌 *P. expansum* 中的作用机制仍有待深入解析。

本研究通过全基因组扫描从 *P. expansum* 中筛选获得 1 个 *Xbp1* 同源基因, 并将其命名为 *PeXbp1*。为明确该基因的生物学功能, 首先基于同源重组原理, 结合农杆菌介导转化 (ATMT) 方法, 构建 *PeXbp1* 基因敲除突变体, 进而分析其对 *P. expansum* 生长发育、胁迫响应及 PAT 合成的影响, 并进一步检测 PAT 合成相关基因的表达量变化。该研究不仅为后续解析 *P. expansum* PAT 生物合成的分子机制提供了可靠的研究基础, 也为深化真菌中 *PeXbp1* 的功能认知提供了理论依据。

1 材料与方法

1.1 苹果、梨与菌株

苹果和梨果实分别选用红富士苹果和皇冠梨, 购自中国甘肃省兰州市七里河区彭家坪市场。选择采收成熟度一致、大小均匀、无明显机械损伤及病害症状的健康果实作为实验材料。供试菌株 *P. expansum* Md8 由甘肃农业大学食品科学与工程学院惠赠。基因敲除所用载体 pCAMBIA1300-HPH (含潮霉素抗性标记) 由本课题组保存。大肠杆菌 DH5 α 及农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 均由本课题组长期保存并用于分子克隆及遗传转化实验。

1.2 *PeXbp1* 基因敲除菌株的构建与鉴定

根据 NCBI 数据库中 *P. expansum* Md8 基因组序列信息, 利用 Primer-BLAST 在线工具设计 *PeXbp1* 基因上下游同源臂扩增引物。以 *P. expansum* Md8 基因组 DNA 为模板, 分别扩增 *PeXbp1* 基因上游约 1 kb 和下游约 1 kb 同源臂片段。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后回收纯化, 并与线性化 pCAMBIA1300-HPH 载体通过重组酶连接, 构建 *PeXbp1* 基因敲除载体。

将构建完成的重组载体转入 *Agrobacterium tumefaciens* 菌株中, 采用农杆菌介导的真菌转化法 (*Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation, ATMT) 将其导入 *P. expansum* Md8。转化后利用含潮霉素 B (hygromycin B, HYG) 的筛选培养基进行抗性筛选, 获得候选转化子。提取候选转化子的基因组 DNA, 利用 *PeXbp1* 基因鉴定引

物和潮霉素抗性基因 (HPH) 鉴定引物进行 PCR 验证, 通过扩增结果确认 *PeXbp1* 基因缺失突变株 ($\Delta PeXbp1$)。经鉴定正确的菌株的于无菌水中保存, 并置于 -20°C 备用。

1.3 菌落形态、产孢量及生物量测定

为评价 *P. expansum* 菌株的生长发育特征, 分别采用马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (Potato Dextrose Agar, PDA) 和察氏酵母浸膏培养基 (Czapek Yeast Extract Medium, CY) 进行培养。(PDA 培养基配方为: 马铃薯 $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、葡萄糖 $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和琼脂 $15\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。CY 液体培养基配方为: 酵母浸膏 $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 NaNO_3 $3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 K_2HPO_4 $1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 KCl $0.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $0.01\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。) 其中, PDA 培养基主要用于真菌菌落生长速率及菌落形态观察; CY 液体培养基富含酵母浸膏, 可为青霉属真菌菌丝生长提供适宜的营养条件, 常用于菌丝培养、生物量测定以及次生代谢产物分析。WT 菌株和 $\Delta PeXbp1$ 突变株均采用相同培养基和培养条件进行培养, 以确保观察到的表型差异来源于 *PeXbp1* 基因缺失, 而非培养条件差异。

菌落生长测定: 将野生型 (WT) 及 $\Delta PeXbp1$ 菌株孢子悬液 ($1\times 10^6\text{ conidia}\cdot\text{mL}^{-1}$) 各 $10\text{ }\mu\text{L}$ 接种于 PDA 培养基, 于 25°C 黑暗条件下培养 7 d。分别于第 3、5、7 d 采用十字交叉法测量菌落直径。产孢量的测定: 将 WT 和 $\Delta PeXbp1$ 菌株接种于 PDA 固体培养基, 于 25°C 黑暗条件下培养 7 d。加入 10 mL 无菌水后, 用无菌涂布棒轻轻刮取菌落表面孢子, 制备孢子悬液。充分混匀后进行适当倍数稀释, 取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 孢子悬液进行显微计数, 根据计数结果和稀释倍数计算产孢量。孢子萌发测定: 将孢子接种于 PDA 培养基圆片 (直径 5 mm) 表面, 于 25°C 培养。在 3、6、9 及 12 h 取样观察萌发情况, 以芽管长度大于孢子短半径为萌发标准, 随机统计不少于 200 个孢子, 计算萌发率及测量芽管长度。用以下公式计算孢子萌发率:

$$S = \frac{N}{200} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

S——孢子萌发率, %;

N——孢子萌发数。

菌丝生物量测定: 取 $1\times 10^6\text{ conidia}\cdot\text{mL}^{-1}$ 孢子悬液 $500\text{ }\mu\text{L}$ 接种于 50 mL CY 液体培养基中, 于 25°C 静置培养 7 d。收集菌丝体并去除培养基残留后, 于 60°C 烘干 48 h 至恒重, 测定菌丝干重。(以上实验均重复 3 此)。

1.4 不同化学胁迫处理下的生长分析

为测定 *PeXbp1* 在化学胁迫响应中的作用, 配置不同的培养基。基础 PDA (对照)、渗透胁迫 (PDA+ $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 或 KCl)、细胞膜/细胞壁胁迫 (PDA+ $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 刚果红 (Congo red, CR 和 PDA+ $0.2\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ SDS) 将 WT 及 $\Delta PeXbp1$ 孢子悬液 ($1\times 10^6\text{ conidia}\cdot\text{mL}^{-1}$) 各 $10\text{ }\mu\text{L}$ 接种于培养基中央, 于 25°C 黑暗培养 7 d。采用十字交叉法测定菌落直径, 每个处理设置 3 个生物学重复。

1.5 $\Delta PeXbp1$ 对苹果和梨果实侵染能力测定

选取无损伤的苹果和梨, 经 1% NaClO 溶液表面消毒 3 min 后, 用无菌水冲洗并室温晾干备用。在苹果和梨赤道部位使用无菌打孔器制造 3 个伤口, 每个伤口接种 $10\text{ }\mu\text{L}$ 孢子悬液 ($1\times 10^6\text{ conidia}\cdot\text{mL}^{-1}$, WT 或 $\Delta PeXbp1$)。接种后静置 20 min 促进孢子附着, 用保鲜膜包裹果实并保持通气, 于 25°C , 相对湿度为 85% 的黑暗条件下培养。分别于第 3、5、7 d 测量病斑直径并记录表型, 并计算病斑腐烂扩展速率。每组设 3 个生物学重复, 每组重复 6 个果实。其中病斑腐烂扩展速率公式如下:

$$V = \frac{D_2 - D_1}{t} \quad (2)$$

式中:

V——腐烂速率, $\text{mm}\cdot\text{d}^{-1}$;

D_1 ——接种初期病斑直径, mm; (0、3、5 d)

D_2 ——培养结束时病斑直径, mm;

t ——培养间隔天数, d。

1.6 棒曲霉素 (PAT) 含量测定

液体培养条件下 PAT 含量测定: 将 1×10^6 conidia $\cdot$ mL $^{-1}$ WT 及 Δ PeXbp1 孢子悬液接种于 50 mL CYA 培养基 (500 μ L/瓶), 25 $^{\circ}$ C 避光培养。在 3、5、7 d 取 5 mL 培养液, 0.22 μ m 滤膜过滤后用于 HPLC 分析。色谱条件: 色谱柱: Agilent ZORBAX SB-C8, 流动相: 10%乙腈 (平衡液为 90%水) 流速: 1 mL $\cdot$ min $^{-1}$ 、柱温: 30 $^{\circ}$ C、检测波长: 276 nm。

苹果和梨组织 PAT 测定: 取 10 g 病变组织, 加入 10 mL 蒸馏水及果胶酶 20 μ L (酶活 3 000 U $\cdot$ g $^{-1}$), 室温静置过夜后离心取上清。用乙酸乙酯萃取 (10 mL $\times$ 3 次), 1.5% NaHCO₃ 洗涤并反萃取, 合并有机相后于 40 $^{\circ}$ C 浓缩干燥。残渣用 pH 4.0 乙酸-乙酸钠缓冲液复溶, 经 0.22 μ m 滤膜过滤后进行 HPLC 检测。每个处理 3 个生物学重复。

1.7 转录水平分析 (RT-qPCR)

采用 TRNzol 试剂 (TIANGEN, 中国) 提取总 RNA, 并使用 TaKaRa 反转录试剂盒 (TaKaRa, 中国) 按照说明书合成 cDNA。根据目标基因序列设计 RT-qPCR 引物, 采用 TB Green $^{\circledR}$ Premix Ex Taq $^{\text{TM}}$ (TaKaRa, 中国) 进行荧光定量 PCR 分析, 以检测孢子萌发及 PAT 生物合成相关基因的表达水平。PCR 反应体系共 20 μ L, 包括 2 $\times$ TB Green Premix 10 μ L、上下游引物 (10 μ mol $\cdot$ L $^{-1}$) 各 0.4 μ L、cDNA 模板 2 μ L 及无核酸酶水 7.2 μ L。扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s, 共 40 个循环; 扩增结束后进行熔解曲线分析, 以验证扩增产物的特异性。以 β -tubulin 作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算相对表达量。(每个样品设置 3 个生物学重复)。

1.8 统计分析

采用 IBM SPSS Statistics 27 软件 (IBM 公司) 进行单因素方差分析 (one-way ANOVA), 随后通过最小显著差法 Tukey 多重比较法进行差异检验, 显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果分析与讨论

2.1 PeXbp1 的生物信息的分析和敲除菌株的构建

通过对 *P. expansum* Md8 进行全基因组扫描。我们找到了 1 个含有 HTH APSES 结构域 (48-162aa) 的蛋白 (XP_016600960.1), 命名为 PeXbp1 (图 1a)。为了进一步分析在 PeXbp1 真菌基因组中的进化关系, 利用 MEGA11.0 软件构建了 PeXbp1 同源物的最大似然系统发育树 (图 1b)。在青霉菌属 (*Penicillium*) 和曲霉菌属 (*Aspergillus*) 中亲缘关系比较, 发现与 *A. udagawae* 有较高的同源性。

利用同源重组的方法, 构建 PeXbp1 敲除突变菌株 (Δ PeXbp1), 并通过 PCR 鉴定, 结果如图 (1c、d) 所示: 使用引物 PeXbp1-up F/HPH-F 和 PeXbp1-down R/HPH-R 进行 PCR 扩增, Δ PeXbp1 应出现上下游同源臂扩增条带, 大小均约为 1 000 bp, WT 无条带; 此外, 通过 RT-qPCR 进一步验证: Δ PeXbp1 的敲除突变菌株构建成功。

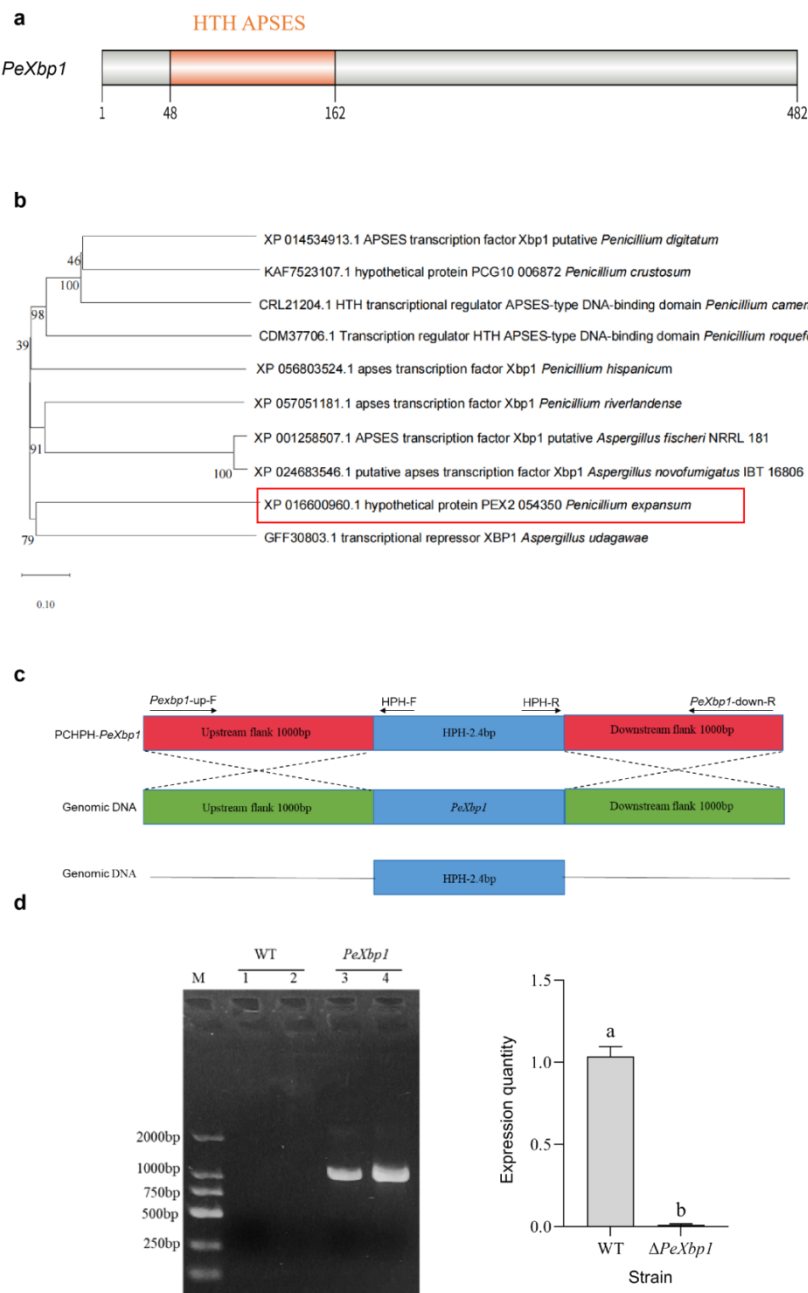


图 1 *PeXbp1* 生信分析及敲除菌株的构建

Fig.1 Bioinformatic Analysis of *PeXbp1* and Construction of the Deletion Mutant

注: (a) 结构域分析; (b) 进化树分析; (c) 同源重组 (d) PCR 和 RT-qPCR 鉴定 $\Delta PeXbp1$ 。误差线表示标准差 (SD); 不同小写字母 (a、b) 表示组间差异显著 ($P<0.05$)。下图同。

2.2 *PeXbp1* 对扩展青霉菌表型的影响

为探究 *PeXbp1* 对 *P. expansum* 生长发育的影响, 将 WT 与 $\Delta PeXbp1$ 菌株孢子悬浮液接种于 PDA 培养基, 于 25 ℃ 黑暗条件下培养 7 d。首先, 对菌落形态进行观察, 结果显示 (图 2a), $\Delta PeXbp1$ 菌株与 WT 菌落形态无明显差异, 均表现为边缘白色、中间绿色。进一步对菌落生长进行测定 (图 2b), 培养 3 d 时两者菌落直径基本一致, 而培养 5 d 和 7 d 时, $\Delta PeXbp1$ 菌株菌落直径较 WT 分别下降约 9.53% 和 5.93% ($P<0.05$)。与此同时, 生物量测定结果 (图 2c) 显示, $\Delta PeXbp1$ 菌株生物量为 0.10 mg, 较 WT (0.12 mg) 降低约 16.67% ($P<0.05$)。随后, 对菌丝微观形态进行观察 (图 2d), 结果发现 WT 菌株菌丝生长均匀、分支清晰且延伸规则, 而 $\Delta PeXbp1$ 菌株菌丝则出现局部膨大、弯曲、分支减少等异常现象, 部分区域伴随菌丝聚集。上述

结果表明, *PeXbp1* 缺失对 *P. expansum* 菌落生长、生物量积累及菌丝形态均产生明显影响。

近年来研究表明, APSES 类转录因子及其相关发育调控网络在真菌营养生长过程中发挥重要作用。本研究中, $\Delta PeXbp1$ 菌株在培养早期与 WT 差异较小, 而在培养中后期逐渐表现出生长受限和菌丝结构异常等表型, 说明 *PeXbp1* 主要参与持续性营养生长过程的调控。类似现象在多种丝状真菌中已有报道, 例如 *Aspergillus flavus* 中 APSES 相关因子缺失导致菌丝及分生孢子发育异常^[19], *Aspergillus fumigatus* 中 *RgdA* 突变显著抑制菌落扩展与无性繁殖^[20], *Acremonium chrysogenum* 中 APSES 基因敲除导致菌丝形态改变及产孢能力下降^[21], 而 *FlbA* 缺失同样影响菌丝生长与侵染结构形成^[22]。

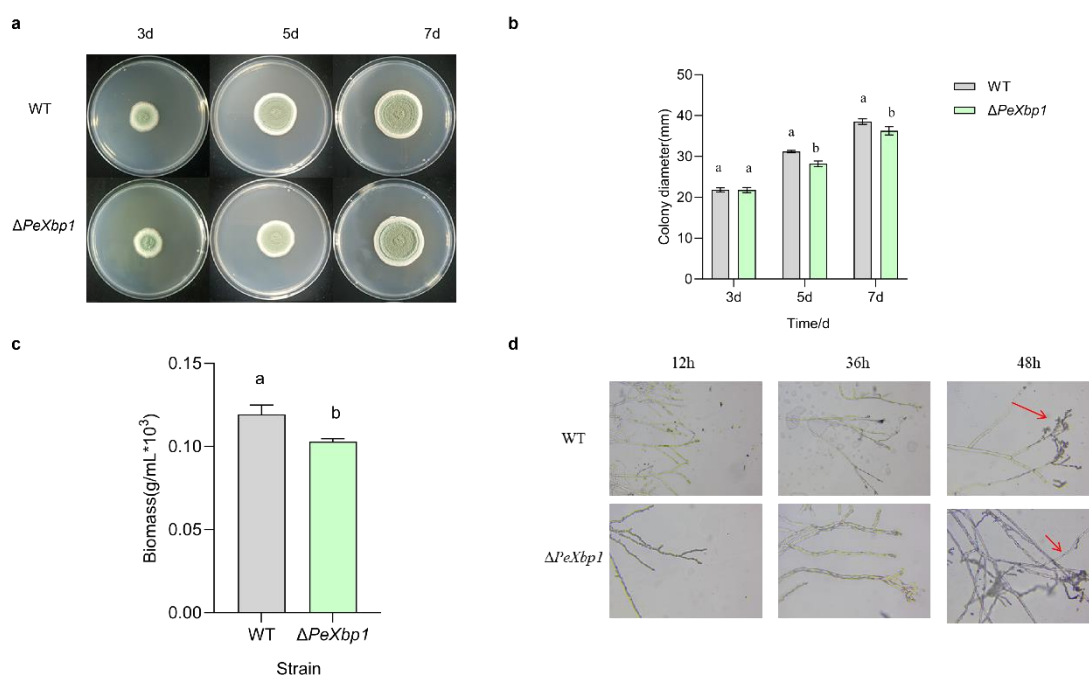


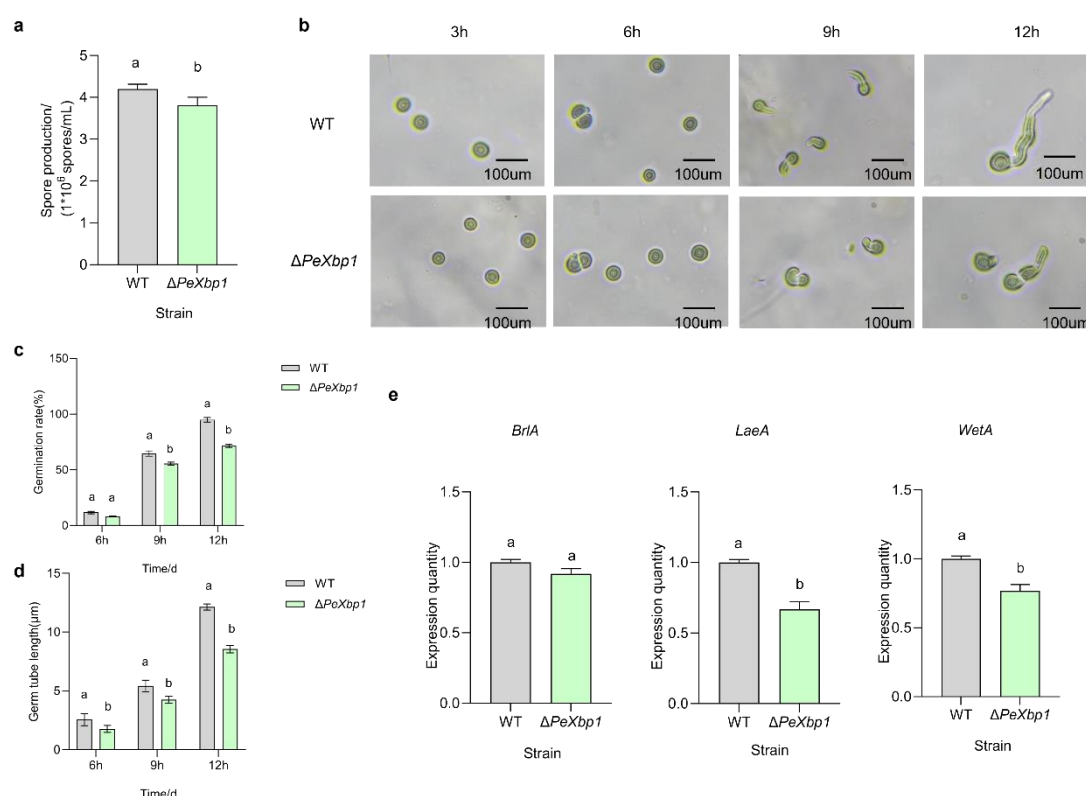
图2 *PeXbp1* 对扩展青霉生长表型的影响

Fig.2 Effects of *PeXbp1* on the Growth Phenotype of *Penicillium expansum*

注: (a) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 的菌落形态; (b) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 菌落直径; (c) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 生物量; (d) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 菌丝生长形态显微观察 (40 $\times$); 误差线表示标准差 (SD)。

2.3 *PeXbp1* 对扩展青霉孢子发生的影响

为进一步分析 *PeXbp1* 在 *P. expansum* 无性发育中的作用, 对其产孢及孢子萌发相关表型进行了测定。结果显示 (图 3a), $\Delta PeXbp1$ 菌株产孢量为 3.81×10^6 conidia, 较 WT (4.20×10^6 conidia) 下降约 9.29%。显微观察结果 (图 3b) 表明, WT 菌株孢子形态规则, 而 $\Delta PeXbp1$ 菌株部分孢子出现不规则或轻微变形, 芽管形成不均一, 并伴随弯曲及发育迟缓现象。孢子萌发分析结果 (图 3c、d) 显示, 在 6、9 和 12 h 时, $\Delta PeXbp1$ 菌株孢子萌发率分别较 WT 降低了 3.59%、9.01% 和 23.47%; 芽管长度亦显著低于 WT。转录水平分析结果 (图 3e) 显示, 与 WT 相比, $\Delta PeXbp1$ 中孢子发生关键调控基因 *LaeA* 和 *WetA* 表达量分别下调约 33.33% 和 23.34% ($P < 0.05$)。上述结果表明, *PeXbp1* 缺失显著影响 *P. expansum* 的产孢能力及孢子萌发过程。已有研究表明, *BrlA*-*AbaA*-*WetA* 级联是分生孢子形成的核心调控通路, 而 *LaeA* 作为全局调控因子协调发育与次级代谢过程^[23,24]。此外, 研究发现, APSES 类蛋白可通过调控上述关键发育网络影响孢子形成与菌丝分化^[25,26]。在 *Aspergillus flavus* 中 APSES 转录因子缺失导致无性繁殖严重受阻^[19], 在其他丝状真菌中 *Acremonium chrysogenum* 和 *Magnaporthe oryzae* 也观察到类似现象^[21,22]。

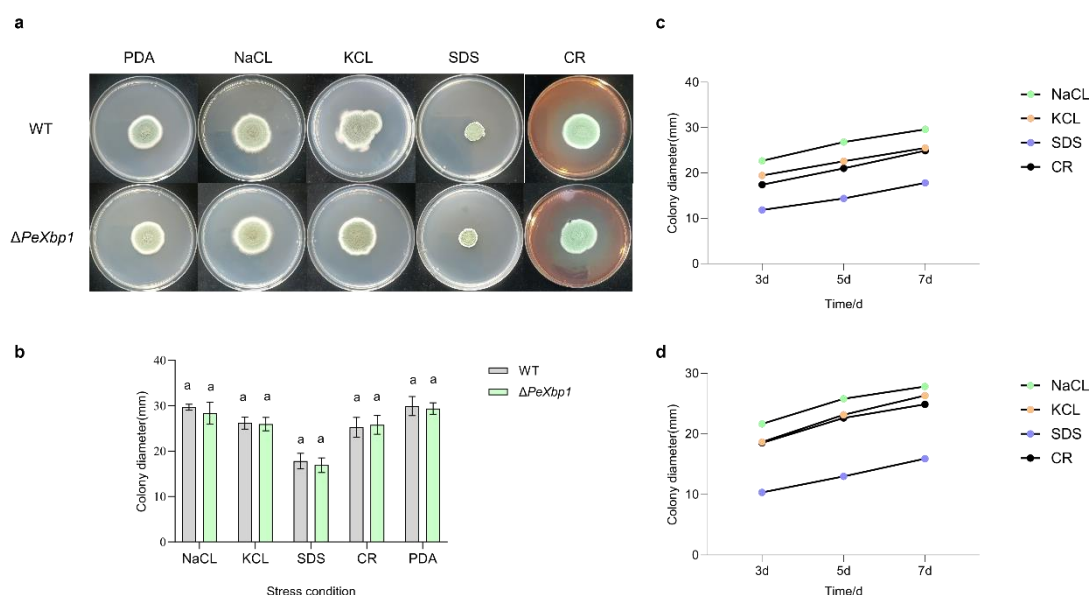
图3 *PeXbp1* 对扩展青霉孢子发生的影响Fig.3 Effects of *PeXbp1* on Conidiation in *Penicillium expansum*

注: (a) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 产孢量 (b) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 孢子萌发显微图 ($40\times$); (c) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 孢子萌发率; (d) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 芽管长度; (e) 孢子萌发相关基因表达量; 误差线表示标准差 (SD)。

2.4 *PeXbp1* 对扩展青霉化学胁迫耐受性的影响

为了探究 *PeXbp1* 对 *P. expansum* 胁迫耐受性的影响, 将 WT 与 $\Delta PeXbp1$ 菌株的分生孢子悬液分别接种于含不同化学胁迫试剂的 PDA 培养皿中央, 于 25 °C 黑暗条件下培养 7 d, 分析菌株生长差异图。结果显示: 与 WT 相比, 在细胞膜/细胞壁胁迫剂 (CR 和 SDS) 和盐胁迫 (NaCl、KCl 处理) 条件下, 两菌株的菌落颜色和直径无显著差异 (图 4a、b)。图 4c 为 WT 菌株在 4 种胁迫条件下的菌落生长曲线, 图 4d 为 $\Delta PeXbp1$ 突变株的生长曲线。随着培养时间的延长, WT 与 $\Delta PeXbp1$ 菌株在不同胁迫条件下的菌落直径均逐渐增大, 且两菌株整体呈现相似的生长趋势 (图 4c、d)。上述结果表明, *PeXbp1* 对 *P. expansum* 细胞膜/细胞壁完整性及渗透压胁迫耐受能力影响较小。

已有研究表明, 不同真菌中的相关基因参与细胞膜、细胞壁完整性维持以及渗透胁迫响应。例如, 在 *Cryptococcus neoformans* 中, 敲除铁氧化酶基因 *CFO1* 后, 突变株在 1.5 M NaCl 和 KCl 处理下的生长受到严重抑制; 同时, $\Delta CFO1$ 突变株对 SDS 也表现出较高敏感性^[27]。在 *Aspergillus fumigatus* 中, *hog1/sakA* 基因缺失突变株对 SDS 诱导的细胞膜损伤表现出敏感性^[28]; *Candida albicans* 缺失 *HOG1* 编码的应激激活蛋白激酶后, 同样表现出对 SDS 的敏感性^[29]。此外, *A. fumigatus* *hog1* 基因缺失突变株对 CR 诱导的细胞壁胁迫也表现出较高敏感性^[28]。这些研究说明, 上述基因在不同真菌的细胞膜、细胞壁完整性维持以及渗透胁迫适应过程中具有一定作用。与上述研究结果相比, 本研究中 $\Delta PeXbp1$ 在 SDS、CR、NaCl 和 KCl 处理条件下均未表现出明显的生长缺陷, 表明 *PeXbp1* 缺失对 *P. expansum* 上述胁迫耐受能力的影响较小。

图4 *PeXbp1* 对不同化学胁迫的影响Fig.4 Effects of *PeXbp1* on Responses to Different Chemical Stresses

注: (a) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 在不同化学胁迫试剂的表型 (b) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 在不同化学胁迫试剂的菌落直径; (c) WT 菌株不同时间点的菌落直径变化图; (d) $\Delta PeXbp1$ 菌株不同时间点的菌落直径变化图; 误差线表示标准差 (SD)。

2.5 *PeXbp1* 对果实致病性的影响

为探究 *PeXbp1* 对 *P. expansum* 致病性的影响,将 WT 与 $\Delta PeXbp1$ 菌株分别接种于苹果和梨果实(损伤接种),并在接种后 3、5 和 7 d 测定病斑直径。结果显示:与 WT 相比, $\Delta PeXbp1$ 菌株在两种果实上的病斑颜色明显变浅,组织褐变程度减弱(图 5a 和 5d)。在苹果果实上, $\Delta PeXbp1$ 菌株在 3、5 和 7 d 的病斑直径分别较 WT 降低 18.24%、11.51%和 12.27%,病斑腐烂扩展速率分别降低 12.92%、5.65%和 7.66% ($P < 0.05$) (图 5b 和 5c);在梨果实上,病斑直径分别降低 61.67%、20.65%和 30.76%,病斑腐烂扩展速率分别降低 61.66%、12.75%和 46.70% ($P < 0.05$) (图 5e 和 5f)。其中, $\Delta PeXbp1$ 菌株在梨果实中的致病能力下降幅度明显高于苹果果实,表明 *PeXbp1* 缺失显著削弱 *P. expansum* 的果实侵染能力,且对不同宿主果实的影响存在差异。

已有研究表明,不同病原菌中的功能基因参与植物组织侵染及病斑扩展。例如, *Fusarium graminearum* 中,敲除内切-1,4- β -D-木聚糖酶基因 *FgXYLD* 后,会导致菌株致病性减弱^[30]; *Erwinia amylovora* 中 sRNA 基因 *hrs21* 缺失后,突变株在梨果实上的病斑直径显著减小^[31]; *Colletotrichum fructicola* 转录因子 *CfSte12* 缺失后,突变株对无伤苹果叶片和果实的致病能力丧失,有伤接种时病斑面积也明显减小^[32]。上述研究与本研究结果一致,表明特定功能基因缺失可显著削弱植物病原菌的侵染和组织扩展能力。此外,在 *P. expansum* 中,类似研究表明, $\Delta PeveA$ 及 $\Delta PeAtg2$ 突变体均表现出致病性下降^[33,34]。本研究中, $\Delta PeXbp1$ 在苹果和梨果实上的病斑直径及腐烂扩展速率均明显降低,进一步表明 *PeXbp1* 可能参与 *P. expansum* 的果实侵染过程。

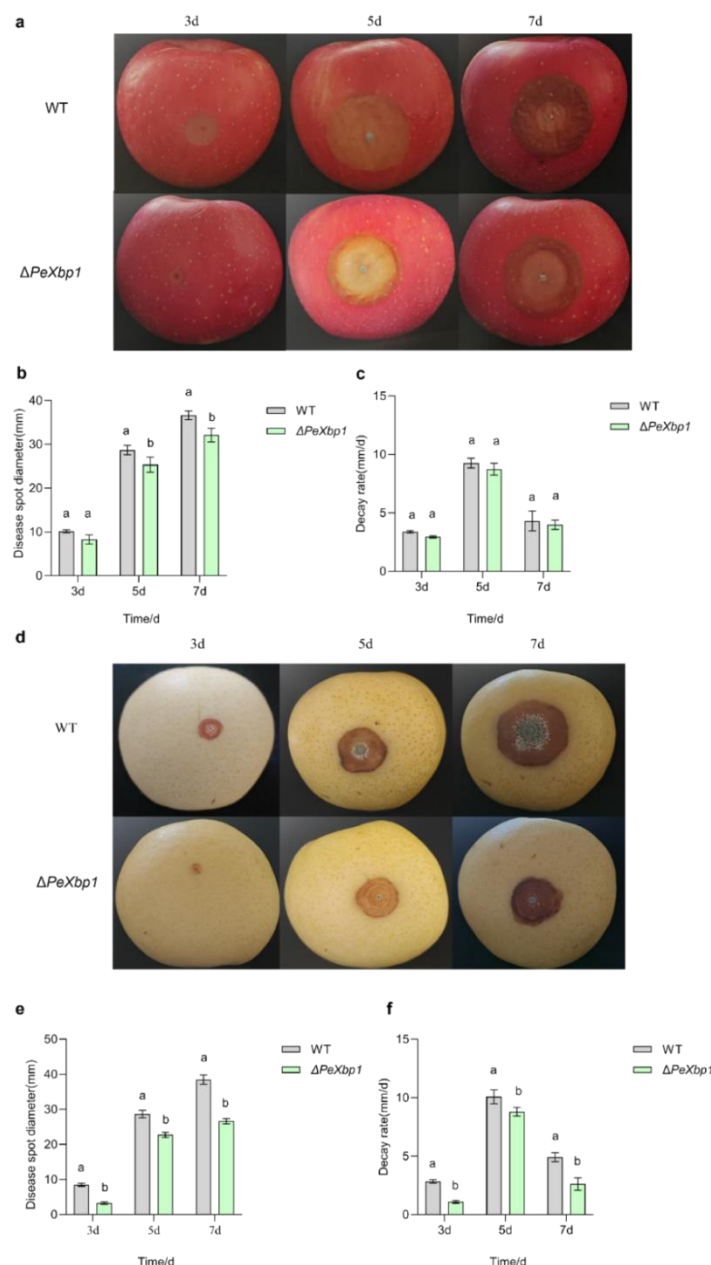


图5 *PeXbp1* 缺失对扩展青霉侵染果实致病力的影响

Fig.5 Effect of *PeXbp1* deletion on the virulence of *Penicillium expansum* during fruit infection

注: (a) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 在苹果中的致病性; (b、c) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 在苹果中病斑直径和病斑腐烂扩展速率; (d) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 在梨中的致病性; (e、f) WT 和 $\Delta PeXbp1$ 在梨中病斑直径和病斑腐烂扩展速率; 误差线表示标准差 (SD)。

2.6 *PeXbp1* 对 PAT 的合成影响

在毒素合成方面, 通过 HPLC 检测 WT 和 $\Delta PeXbp1$ 菌株在苹果、梨果实侵染及离体培养条件下的 PAT 含量变化。结果显示, 培养 7 d 后, 与 WT 菌株相比, $\Delta PeXbp1$ 菌株在苹果腐烂组织中的 PAT 含量降低了 22.52%; 在梨腐烂组织中, $\Delta PeXbp1$ 菌株 PAT 含量显著低于 WT 菌株, 其平均含量由 WT 菌株的 16.09 mg/kg 下降至 10.67 mg/kg, 降低了 33.69% ($P < 0.05$) (图 6a、b)。在液体培养条件下, $\Delta PeXbp1$ 菌株培养 3、5 和 7 d 时的 PAT 积累量分别较 WT 菌株降低约 28.55%、20.49% 和 16.94% ($P < 0.05$), 且随着培养时间延长, WT 菌株中 PAT 含量持续增加, 而 $\Delta PeXbp1$ 菌株始终保持较低水平 (图 6c)。上述结果表明, *PeXbp1* 缺失显著降低了扩展青霉在不同培养条件下 PAT 的合成与积累能力。

为进一步探究 *PeXbp1* 调控 PAT 生物合成的分子机制, 采用 RT-qPCR 分析 PAT 生物合成基因簇中相关基因的

转录水平。结果显示,与 WT 菌株相比, $\Delta PeXbp1$ 突变株中多数 PAT 生物合成相关基因表达水平整体下调,其中关键基因 *PatE*、*PatH*、*PatI* 和 *PatJ* 的表达量分别降低约 34.16%、45.11%、30.23%和 45.80% ($P < 0.05$),而 *PatC*、*PatF* 和 *PatL* 的表达量无显著差异(图 6d)。这表明 *PeXbp1* 缺失并未对 PAT 生物合成基因簇中的所有基因产生一致的转录调控作用。*PatC*、*PatF* 和 *PatL* 表达变化不明显,可能与 PAT 生物合成途径中不同基因所受转录调控程度存在差异有关;*PeXbp1* 可能主要参与部分关键 PAT 生物合成基因的转录调控,而其他基因的表达可能受到其他转录因子或调控网络的共同调节。此外,已有研究表明, *PatK* (6-MSAS) 作为 PAT 生物合成途径的起始关键酶,其表达变化与 PAT 合成水平密切相关;同时,参与后续合成步骤的 *PatM* 等基因表达变化也会影响 PAT 产量^[33,35]。因此, *PeXbp1* 缺失可能通过抑制 PAT 生物合成基因簇的转录表达,进而削弱扩展青霉的 PAT 合成能力。

在丝状真菌中,次级代谢产物的合成通常受到基因簇水平转录调控。例如,在 *Aspergillus flavus* 中, *aflR/aflS* 调控体系是黄曲霉毒素生物合成的核心调控,其中 *AflR* 作为主要转录激活因子, *AflS* 作为共激活因子,二者表达下调可直接导致毒素产量显著降低^[36,37]。在 *Fusarium graminearum* 中, DON 毒素的生物合成依赖 TRI 基因簇,其中 TRI5 编码关键酶,而 TRI6 和 TRI10 作为重要转录调控因子,其转录受抑会显著降低 DON 的积累^[38,39]。

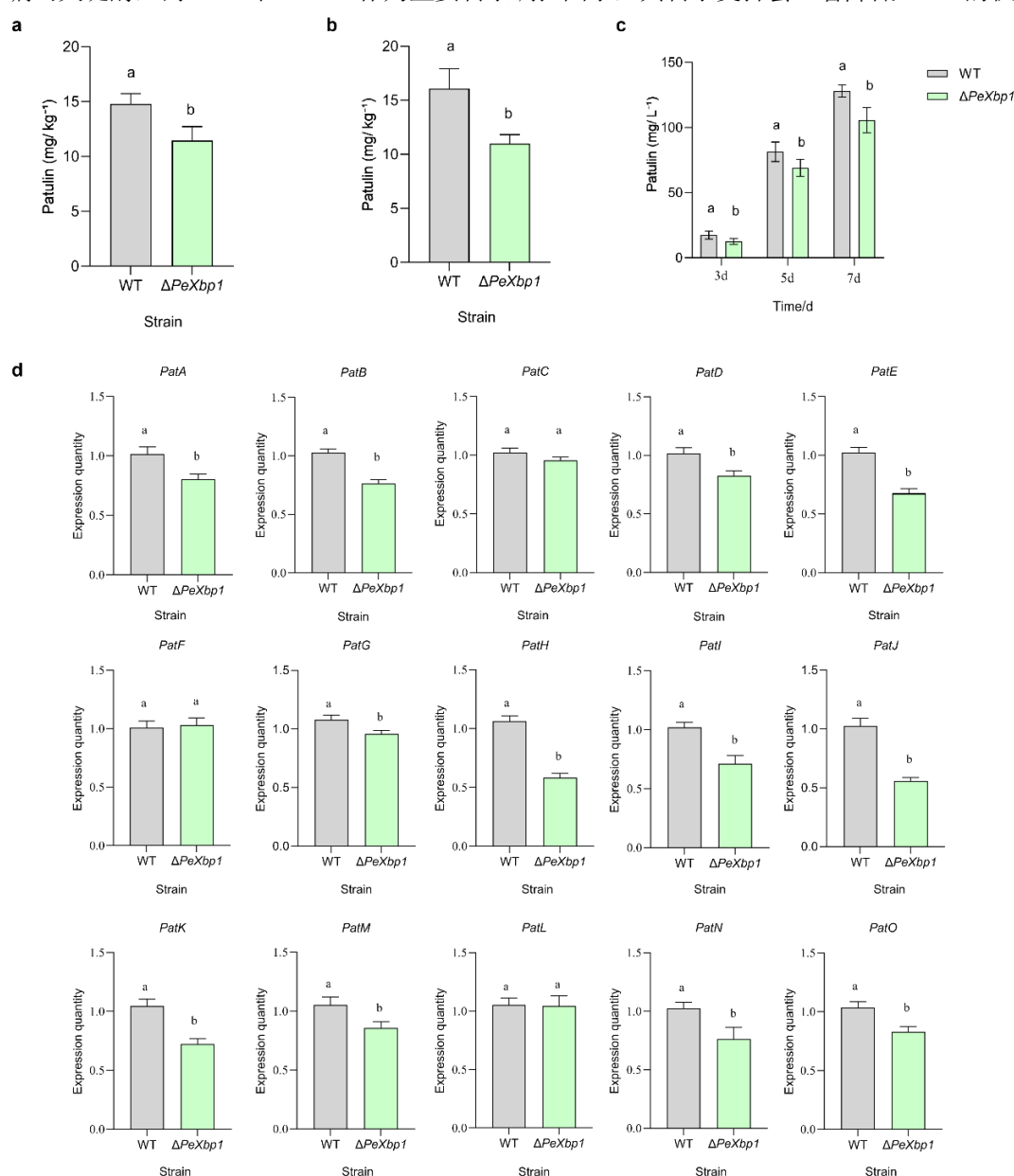


图 6 *PeXbp1* 的缺失对扩展青霉棒曲霉素的影响

Fig.6 Effects of *PeXbp1* Deletion on Patulin Production in *Penicillium expansum*

注: (a) 苹果腐烂组织的 PAT 含量测定; (b) 梨腐烂组织的 PAT 含量测定; (c) 离体菌液种 PAT 含量测定; (d) PAT 合成相关

基因表达量的检测; 误差线表示标准差 (SD)。

3 结论

本研究通过全基因组筛选获得 *P. expansum* 中 *PeXbp1* 同源基因, 并采用同源重组结合农杆菌介导转化 (ATMT) 构建其缺失突变株。结果表明, *PeXbp1* 缺失显著抑制菌丝持续生长及无性繁殖能力, 并导致发育相关基因表达下降。在细胞膜/细胞壁及渗透胁迫条件下, $\Delta PeXbp1$ 与 WT 差异不明显。在致病性与 PAT 合成方面, *PeXbp1* 缺失显著削弱对果实的侵染能力, 并降低 PAT 积累及其生物合成相关基因表达。综上, *PeXbp1* 在 *P. expansum* 生长发育、致病性及次级代谢中具有重要作用。

参考文献

- [1] HAN Z, ZONG Y, ZHANG X, et al. *Erg4* is involved in ergosterol biosynthesis, conidiation and stress response in *Penicillium expansum* [J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(5): 568.
- [2] NADAI C, FERNANDES W J L, FAVARON F, et al. Biocontrol activity of *Starmerella bacillaris* yeast against blue mold disease on apple fruit and its effect on cider fermentation [J]. *PLOS ONE*, 2018, 13(9): e0204350.
- [3] MORALES H, MARÍN S, ROVIRA A, et al. Patulin accumulation in apples by *Penicillium expansum* during postharvest stages [J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2007, 44(1): 30-35.
- [4] HABIB W, MASIELLO M, CHAHINE-TSOVALAKIS H, et al. Occurrence and characterization of *Penicillium* species isolated from post-harvest apples in Lebanon [J]. *Toxins*, 2021, 13(10): 730.
- [5] ABDELAZIZ A M, SHARAF M H, HASHEM A H, et al. Biocontrol of Fusarium wilt disease in pepper plant by plant growth promoting *Penicillium expansum* and *Trichoderma harzianum* [J]. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 2023, 51(3): 13302.
- [6] VICO I, DUDUK N, VASIĆ M, et al. Identification of *Penicillium expansum* causing postharvest blue mold decay of apple fruit [J]. *Pesticidi i Fitomedicina*, 2014, 29(4): 257-266.
- [7] KHAN I H, JAVAID A, NAQVI S F. Molecular characterization of *Penicillium expansum* isolated from grapes and its management by leaf extract of *Chenopodium murale* [J]. *International Journal of Phytopathology*, 2021, 10(1): 29-35.
- [8] PIŠKUR J, LANGKJAER R B. Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics [J]. *Molecular Microbiology*, 2004, 53(2): 381-389.
- [9] DOEDT T, KRISHNAMURTHY S, BOCKMUHL D P, et al. APSES proteins regulate morphogenesis and metabolism in *Candida albicans* [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, 15(7): 3167-3180.
- [10] KANG E H, Kim J, Oh H W, et al. LAMMER kinase LkhA plays multiple roles in the vegetative growth and asexual and sexual development of *Aspergillus nidulans* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58762.
- [11] CHEN Y, CAO Y, JIAO C, et al. The *Alternaria alternata* *StuA* transcription factor interacting with the pH-responsive regulator *PacC* for the biosynthesis of host-selective toxin and virulence in citrus [J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(6): e02335-23.
- [12] MAI B, BREEDEN L. *Xbp1*, a stress-induced transcriptional repressor of the *Saccharomyces cerevisiae* Swi4/Mbp1 family [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(11): 6491-6501.
- [13] MAI B, BREEDEN L. *CLN1* and its repression by *Xbp1* are important for efficient sporulation in budding yeast [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(2): 478-487.
- [14] MAI B, BREEDEN L L. Identification of target genes of a yeast transcriptional repressor [M]//*Differential Display Methods and Protocols*. Totowa, NJ: Humana Press, 2006: 267-277.
- [15] GECILI E, SIVAGANESAN S, ASAR O, et al. Bayesian regularization for a nonstationary Gaussian linear mixed effects model [J]. *Statistics in Medicine*, 2022, 41(4): 681-697.
- [16] JOSHI A S, CASTILLO M B, DA SILVA M T, et al. Single-nucleus transcriptomic analysis reveals the regulatory circuitry of myofiber *XBPI* during regenerative myogenesis [J]. *iScience*, 2024, 27(12): 111372.
- [17] SRIBURI R, JACKOWSKI S, MORI K, et al. *XBPI*: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2004, 167(1): 35-41.
- [18] MILES S, LI L, DAVISON J, et al. *Xbp1* directs global repression of budding yeast transcription during the transition to quiescence and is

- important for the longevity and reversibility of the quiescent state [J]. PLOS Genetics, 2013, 9(10): e1003854.
- [19] GOLD S E, PAZ Z, GARCÍA-PEDRAJAS M D, et al. Rapid deletion production in fungi via *Agrobacterium-mediated* transformation of OSCAR deletion constructs [J]. Journal of Visualized Experiments, 2017, 124: 55239.
- [20] YAO G, ZHANG F, NIE X, et al. Essential APSES transcription factors for mycotoxin synthesis, fungal development, and pathogenicity in *Aspergillus flavus* [J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2277.
- [21] JUN S C, CHOI Y H, LEE M W, et al. The putative APSES transcription factor RgdA governs growth, development, toxigenesis, and virulence in *Aspergillus fumigatus* [J]. mSphere, 2020, 5(6): e00653-20.
- [22] HU P, WANG Y, ZHOU J, et al. AcstuA, which encodes an APSES transcription regulator, is involved in conidiation, cephalosporin biosynthesis and cell wall integrity of *Acremonium chrysogenum* [J]. Fungal Genetics and Biology, 2015, 83: 26-40.
- [23] MATHEIS S, YEMELIN A, SCHEPS D, et al. Functions of the *Magnaporthe oryzae* Flb3p and Flb4p transcription factors in the regulation of conidiation [J]. Microbiological Research, 2017, 196: 106-117.
- [24] BAYRAM Ö, BRAUS G H. Coordination of secondary metabolism and development in fungi: the velvet family of regulatory proteins[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2012, 36(1): 1-24.
- [25] ZHAO J-Y, XIA H-Q, PENG M-Y, et al. Identification and functional analysis of transcription factors FpAPSES in *Fusarium pseudograminearum* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2021, 54(16): 3428-3439.
- [26] GARCÍA-ESTRADA C, DOMÍNGUEZ-SANTOS R, KOSALKOVÁ K, et al. Transcription factors controlling primary and secondary metabolism in filamentous fungi: the β -lactam paradigm [J]. Fermentation, 2018, 4(2): 47.
- [27] LEE K T, LEE J W, LEE D, et al. A ferroxidase, *Cfo1*, regulates diverse environmental stress responses of *Cryptococcus neoformans* through the HOG pathway [J]. Mycobiology, 2014, 42(2): 152-157.
- [28] MATSUMOTO Y, SUGIYAMA Y, NAGAMACHI T, et al. Hog1-mediated stress tolerance in the pathogenic fungus *Trichosporon asahii* [J]. Scientific Reports, 2023, 13(1): 13539.
- [29] AY A M, CAO M, DANTAS A S, et al. Stress contingent changes in Hog1 pathway architecture and regulation in *Candida albicans* [J]. PLoS Pathogens, 2024, 20(12): e1012314.
- [30] 左宏旭,巩寒茹,雷琼,等.禾谷镰孢菌中 β -1,4-D-内切木聚糖酶基因 FgXYLD 的生物学功能[J].菌物学报,2024,43(7):1.
- [31] ZENG Q, SUNDIN G W. Genome-wide identification of Hfq-regulated small RNAs in the fire blight pathogen *Erwinia amylovora* discovered small RNAs with virulence regulatory function [J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 414.
- [32] 刘文魁.苹果炭疽叶枯病病菌果实刺盘孢转录因子 *Ste12* 基因的功能研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2017.
- [33] EL HAJJ ASSAF C, SNINI S P, TADRIST S, et al. Impact of *veA* on the development, aggressiveness, dissemination and secondary metabolism of *Penicillium expansum* [J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(8): 1971-1983.
- [34] WANG X, ZHU Y, GONG D, et al. *PeAtg2*-mediated autophagy coordinates development, secondary metabolism and pathogenicity in *Penicillium expansum* [J]. Postharvest Biology and Technology, 2026, 234: 114097.
- [35] KUMAR D, BARAD S, CHEN Y, et al. *LaeA* regulation of secondary metabolism modulates virulence in *Penicillium expansum* and is mediated by sucrose [J]. Molecular Plant Pathology, 2017, 18(8): 1150-1163.
- [36] 陈茹,刘钟滨.黄曲霉毒素生物合成途径调节基因 *aflR*[J].细胞生物学杂志,2005,(4):431-434.
- [37] 王晓燕,梁柳柯,魏闪,等.*AflbasR* 基因对储粮霉菌黄曲霉生长发育和毒素合成的影响[J].河南工业大学学报(自然科学版),2024,45(6):45-53.
- [38] HUANG P, YU X, LIU H, et al. Regulation of TRI5 expression and deoxynivalenol biosynthesis by a long non-coding RNA in *Fusarium graminearum* [J]. Nature Communications, 2024, 15(1): 1216.
- [39] LI P, FU Z, WANG M, et al. Functional characterization of *FgAsp*, a gene coding an aspartic acid protease in *Fusarium graminearum* [J]. Journal of Fungi, 2024, 10(12): 879.