

DOI: 10.3969/j.issn.0488-5368.2024.07.002

· 育种 · 生理 ·

## 基于 cAMP-PKA 途径研究茶碱影响核盘菌菌核形成的相关机制

赵 帅, 杨大群, 马常瑜, 王一峰, 白伊玲, 吕蕊花

(陕西中医药大学 医学技术学院, 陕西 咸阳 712046)

**摘要:**【目的】菌核在核盘菌生活史中占据核心地位, 茶碱可作用于 cAMP-PKA 途径中的 PDEs 而影响生物体生长发育, 本研究通过外源添加茶碱, 研究茶碱对于核盘菌菌核的产生及其通路中相关因子的影响, 其结果可为新型杀菌剂的开发提供参考。【方法】首先, 通过外源添加不同浓度的茶碱, 检测其对核盘菌菌丝生长抑制率及菌核形成情况的影响, 其次, 通过试剂盒检测茶碱对核盘菌菌丝体内 cAMP 含量的影响, 最后, 通过 qRT-PCR 方法检测外源添加茶碱对于核盘菌 cAMP-PKA 通路中相关因子的变化。【结果】外源添加终浓度为 1~2.5 mmol/L 的茶碱, 对于核盘菌菌丝生长速率和菌核的形成均有抑制作用, 而茶碱终浓度为 0.5 mmol/L 对菌丝生长速率几乎没有影响。外源添加的茶碱主要是在菌核原基形成的 S4 期及菌核成熟的 S5 阶段提升胞内 cAMP 含量, 而在 S1~S3 阶段和对照组胞内 cAMP 含量无差异。茶碱通过抑制 PDE2 的表达水平使得胞内 cAMP 含量升高, 而下游基因 PKA 和 RAS 的表达量也相应减少, 外源添加茶碱后 ATG8 的表达量显著上升。【结论】一定浓度的茶碱对于核盘菌菌丝生长速率和菌核的产生均有抑制作用, 外源添加茶碱可通过抑制 PDE2 的表达而提高胞内 cAMP 含量, 使得下游基因表达量相应减少。

**关键词:**核盘菌; 茶碱; cAMP 含量; 菌核形成

**中图分类号:**S312 **文献标识码:**A **文章编号:**0488-5368(2024)07-0007-05

### Mechanisms of Theophylline on Sclerotial Formation Based on cAMP-PKA Pathway

ZHAO Shuai, YANG Daqun, MA Changyu, WANG Yifeng, BAI Yiling, LÜ Ruihua

(College of Medical Technology, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang, Shaanxi 712046, China)

**Abstract:** Sclerotia play a core role in the life cycle of *Sclerotinia sclerotiorum*. Theophylline can act on PDEs in the cAMP-PKA pathway and affect the growth and development of organisms. This study investigates the effects of exogenous theophylline on the production of sclerotia and related factors in the pathway, with the aim of providing a reference for the development of new fungicides. Different concentrations of theophylline were added externally to evaluate its effect on the growth inhibition rate and sclerotial formation of mycelium, and then the effect of theophylline on the cAMP content in mycelium was investigated using a reagent kit. Finally, the changes in relevant factors in the cAMP-PKA pathway were detected by qRT-PCR. The results showed that the

收稿日期: 2023-06-17 修回日期: 2023-08-15

基金项目: 陕西省大学生创新创业计划训练项目 (S202210716052); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目 (2021JQ-725)。

第一作者简介: 赵帅 (2000-), 男, 本科在读。

通信作者: 吕蕊花。

addition of exogenous theophylline at a final concentration of 1 mmol/L to 2.5 mmol/L inhibited the growth rate of hyphae and the formation of sclerotia, while theophylline at a final concentration of 0.5 mmol/L had almost no effect on the growth rate of hyphae. The exogenous addition of theophylline mainly enhanced the intracellular cAMP content during the S4 stage of sclerotia primordia formation and the S5 stage of sclerotia maturation, while there was no difference in the intracellular cAMP content between the S1~S3 stages and the control group. Theophylline increased the intracellular cAMP content by inhibiting the expression level of PDE2, while the expression levels of the downstream genes PKA and RAS also decreased accordingly. The expression level of ATG8 significantly increased after the exogenous addition of theophylline. In conclusion, a certain concentration of theophylline has an inhibitory effect on the growth rate of *Sclerotinia sclerotiorum* hyphae and the production of sclerotia. Exogenous addition of theophylline can increase the intracellular cAMP content by inhibiting the expression of PDE2, resulting in a corresponding decrease in downstream gene expression.

**Key words:** *Sclerotinia sclerotiorum*; Theophylline; cAMP content; Sclerotial formation

核盘菌是一种危害作物和蔬菜的世界性植物病原菌,核盘菌菌核是菌丝体在生长发育过程中遇到有限的营养环境,发生复杂的生理反应相互缠绕而形成的黑色不规则结构,菌核在核盘菌侵染循环中起核心作用,可在土壤中存活 5 年之久<sup>[1]</sup>。目前农业生产中防控菌核病最有效的方法还是以喷施苯并咪唑类和二甲酰亚胺类农药,以此来防控核盘菌子囊孢子的萌发或者菌丝进一步的生长发育,但长期使用这些药物会存在耐药性的问题,也不符合国家提出的“绿色农业”倡议,因此,新型靶向杀菌剂的开发迫在眉睫。核盘菌菌核形成同时受到外界环境因子的诱导和内部信号分子的调节;外界环境因子主要包括碳源、pH 值、光照周期、活性氧等因素<sup>[2,3]</sup>,它们可通过调节细胞内信号转导途径来调控菌核的生长发育过程;内部信号分子主要涉及 cAMP-PKA 和 cAMP-MAPK 信号通路调控<sup>[4,5]</sup>。cAMP-PKA 途径中,PKA 的表达水平主要由 PDEs 水解 cAMP 的能力决定。核盘菌中共有 8 个 PDEs 基因,其中 PDE1 和 PDE2 在核盘菌受到外界胁迫时表达量较高<sup>[6]</sup>。Ras 作为 cAMP-MAPK 通路中的上游因子,可激活 MAPK 从而介导真菌生长发育、生物或非生物胁迫响应<sup>[7]</sup>,自噬是真核生物进化过程中高度保守的自我保护机制,丝状真菌的自噬与细胞分化、次生代谢及致病性等密切相关<sup>[8,9]</sup>。核盘菌 *SsAtg1* 突变体不能形成菌核<sup>[10]</sup>,说明自噬与菌核的形成密切相关,而 ATG8 是检测核盘菌自噬的核心因子<sup>[11]</sup>。茶碱是茶中生物碱的嘌呤碱类,具有广泛的生物活性和药理作用,已有的研究表明,茶碱在能够通过抑制 PDEs 而发挥抗炎作用<sup>[12]</sup>,也可以诱导膜损伤,通过抑制乙醛酸循

环中的苹果酸合成酶和异柠檬酸裂解酶来阻碍 *C. albicans* 的代谢,达到抗菌感染<sup>[13]</sup>。目前茶碱抑制 PDEs 的作用机制研究大都集中在应对人类疾病方面,而其在核盘菌中对相关通路的影响尚不明确。分析茶碱在 cAMP 相关信号转导途径对核盘菌菌核生长发育的调控过程,明确该通路系统调控的分子机理,对防控核盘菌菌核病新药物研发具有重要意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

菌株:核盘菌(菌株编号:CCTCC AF 2021085 *Sclerotinia sclerotiorum* Ss10715)前期从油菜秸秆中分离并保存于实验室。

溶剂及试剂:cAMP 酶联免疫试剂盒购自 Andy gene, RNA 提取试剂盒、反转录及定量 PCR 所用试剂盒均购自 TaKaRa 公司,预染 EB、琼脂糖、核酸 Marker 均购自生工生物工程(上海)有限公司,茶碱购自阿拉丁。

培养基:马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)培养基,由去皮马铃薯 200 g、琼脂粉 15 g、葡萄糖 20 g、蒸馏水 1 000 mL 制成(pH 自然)。

仪器和其它用品:超净工作台(苏州净化设备有限公司),全自动酶标仪(BioTek Instruments, Inc),qRT-PCR 仪器(ABI),核酸电泳槽(北京君意)。

### 1.2 茶碱对核盘菌生长发育的影响检测

制备一定体积的 PDA 培养基进行分装,121 °C,15 min 高压,冷却至 50 °C 左右添加不同浓度梯度的茶碱,配制成终浓度分别为 0.5 mmol/L、

1 mmol/L、1.5 mmol/L、2 mmol/L、2.5 mmol/L 的 PDA 培养基,放在 25 °C 的光照培养箱中培养,每天观察菌丝的生长状况以及菌核的形成情况,测定并计算菌丝生长抑制率 $[(\text{对照组菌落直径}-\text{实验组菌落直径})/\text{对照组菌落直径}]\times 100$ 。当所有培养皿中的菌核生长成熟,测定每个培养皿中菌核的数目和总质量,以此来明确茶碱对核盘菌菌核生长发育的影响,每组实验至少重复 3 次。

### 1.3 茶碱对核盘菌胞内 cAMP 含量的影响

采用 2.5 mmol/L 的茶碱添加终浓度进行胞内 cAMP 含量的测定,在培养基上面平铺玻璃纸以便取样。分别取菌丝生长旺盛期(S1)、菌丝长至培养皿边缘时期(S2)、菌核原基开始形成时期(S3)、菌核渗出液体时期(S4)、成熟菌核期(S5)共 5 个阶段进行检测,对照组也按照同样的 5 个时期进行取样。称取同样质量的样品,添加一定量的 PBS 于研钵中充分研磨,按照 cAMP 酶联免疫试剂盒说明书测定样品和对照组中的 cAMP 含量,将检测合格的 cDNA 标准品在酶标包被板上进行稀释与加样,用封板膜封板后进行温育、配液、洗涤、加酶、温育、洗涤、显色、终止,最后以空白孔调零,450 nm 波长依序测量各孔的吸光度,通过绘制标准曲线,依据稀释倍数来计算胞内 cAMP 含量。

### 1.4 茶碱抑制 cAMP-PKA 途径相关因子的表达检测

为了探究茶碱对核盘菌菌核形成时 cAMP-PKA 通路中相关基因的表达影响,以外源添加茶碱终浓度为 2 mmol/L 生长 7d 的核盘菌菌丝为材料,按照 TaKaRa 公司 RNA 提取试剂盒说明书提取总 RNA,1.5% 琼脂糖凝胶检测 RNA 提取质量并用微量紫外分光光度计测定浓度。以提取的总 RNA 为模板,将其反转录为 cDNA,以 EF-F/EF-R 为引物检测 cDNA 的质量,检测合格后以此为模板进行 qRT-PCR 表达量检测。对核盘菌菌核形成时 cAMP-PKA 通路中 AC、PDE1、PDE2、PKA、RAS 和 ATG8 的表达量进行测定,用  $\beta$ -actin 作为内参,每组实验重复 3 次,应用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  进行数据分析。

### 1.5 数据处理

采用 Excel 2019 和 SPSS22 软件对数据进行统计处理和显著性差异分析,利用 GraphPad Prism 5 作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 茶碱对核盘菌生长发育的影响

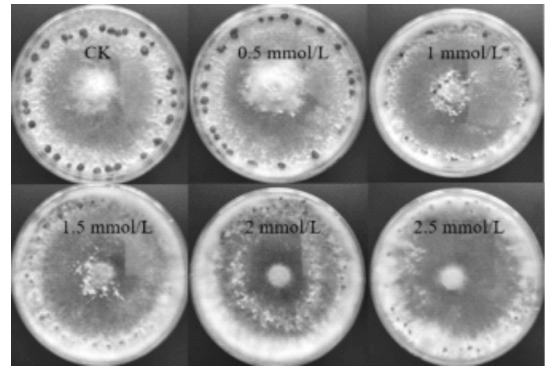


图 1 外源添加茶碱对菌核形成的影响(14 d)

外源添加茶碱对核盘菌菌核形成具有抑制作用,表现为茶碱添加浓度逐渐增大菌核体积明显减少(图 1),当茶碱添加浓度为 1 mmol/L 时,产生的菌核体积明显减少,对菌丝生长速率也有显著影响。我们测定接种第 4 天的菌落直径,茶碱添加浓度为 0.5 mmol/L 对菌丝生长速率几乎没有影响,当茶碱添加浓度为 1 mmol/L 时,菌丝生长速率抑制率为 2.3%,但当茶碱浓度为 2.0 mmol/L 抑制率可达 50%以上,而茶碱浓度为 2.5 mmol/L 时菌丝生长最慢(图 2)。这就说明,茶碱在核盘菌菌丝生长中具有重要作用。

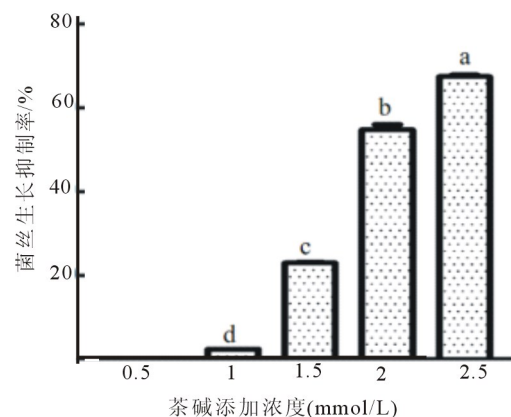


图 2 外源添加茶碱对菌丝生长速率的影响(4 d)

核盘菌在添加茶碱的培养基上生长对菌核产生的数目和质量也有较大影响,总体来讲,添加茶碱后每个培养皿中产生的菌核数目减少,菌核体积和质量也明显下降,当添加茶碱浓度为 1 mmol/L 时,每皿菌核质量为 0.18 g,明显低于对照组,而当茶碱添加浓度为 2.5 mmol/L 时,每皿菌核总质量仅为 0.06 g(图 3)。这进一步说明,一定浓度的茶碱对菌核的生长和发育具有重要作用。



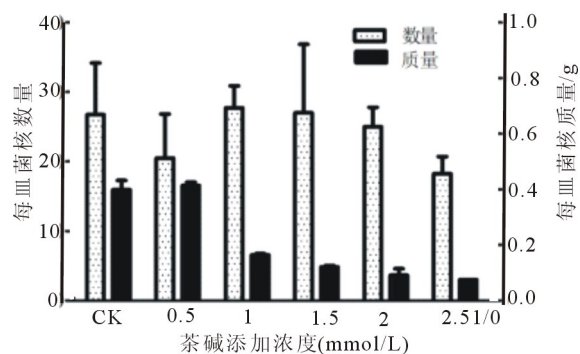


图3 外源添加茶碱对菌核产生数量和质量的影响

## 2.2 茶碱对核盘菌中胞内 cAMP 含量的影响

采用 cAMP 酶联免疫分析 (ELISA) 试剂盒应用双抗体夹心法测定核盘菌样品中 cAMP 水平。从图 4 中可以看出, S1 至 S3 阶段实验组中的 cAMP 含量和对照组几乎没有差别, 在菌核黑色素开始形成的 S4 阶段, 添加茶碱 (2.5 mmol/L) 的核盘菌中 cAMP 含量明显高于对照组, 而在成熟菌核中对照组中的 cAMP 含量为 2.6 pmol/g, 而实验组中 cAMP 含量可高达 4.9 pmol/g。该结果表明, 外源添加的茶碱可通过提高胞内 cAMP 水平来影响菌核的形成。

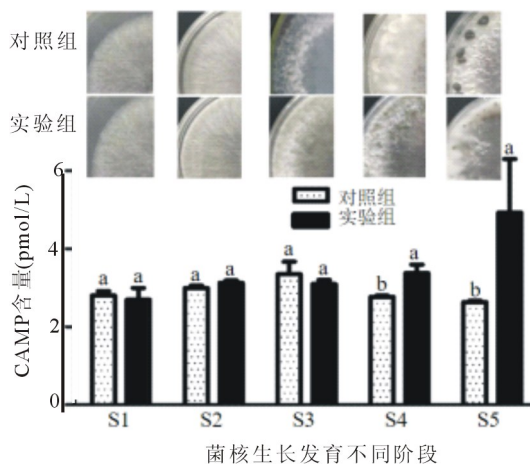


图4 茶碱对核盘菌中 cAMP 含量的影响

## 2.3 茶碱对 cAMP-PKA 途径相关因子的表达影响

收集外源添加茶碱终浓度为 2 mmol/L 生长 7d 的核盘菌菌丝为材料, 检测茶碱对核盘菌菌核形成的影响。由 qRT-PCR 结果可知, cAMP-PKA 通路中相关基因表达趋势不相同, 基因 AC、PDE2、PKA 和 RAS 表达量均下降, PDE1 和 ATG8 表达量上调 (图 5)。结合 2.2 的结果可知, 茶碱通过抑制 PDE2 的表达水平使得胞内 cAMP 含量升高, 而下游基因 PKA 和 RAS 的表达量也相应减少。外源添加茶碱后 ATG8 的表达量上升, 这可能与核盘菌

在受外界胁迫时会通过自噬达到自我修复的目的。

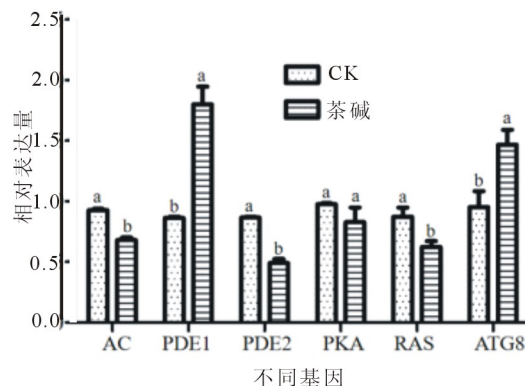


图5 cAMP-PKA 途径相关因子表达量

## 3 讨论

试验中, 随着外源添加茶碱浓度的增加 (0.5~2.5 mmol/L) 产生的菌核数目增多, 但体积明显减少, 菌丝生长速率也逐渐减少。我们推测这可能是外源添加的茶碱影响了菌丝体内某些蛋白质和脂类的合成, 从而影响菌丝生长速率和菌核的体积。挥发性化合物 2-甲基苯并噻唑可通过影响核盘菌菌丝内部脂类合成与代谢影响菌丝生长速率以及菌核的产生数量<sup>[14]</sup>, 化学药剂啶酰菌胺和咪鲜胺杀菌剂联合使用可通过破坏菌丝细胞膜系统达到抑菌的目的<sup>[15]</sup>。外源添加茶碱在 S1~S3 阶段, 实验组和对照组胞内的 cAMP 含量无显著性差异, 但是在 S4 和 S5 阶段实验组中 cAMP 含量明显提高, 这表明在菌核原基开始形成的 S4 阶段, 外源添加的茶碱通过与 PDE 相结合抑制其对胞内 cAMP 的降解, 从而提高胞内 cAMP 的含量。我们前期在外源添加 cAMP 的情况下检测胞内 cAMP 含量, 结果发现菌丝体主要是在 S1~S3 阶段从外源吸收 cAMP, 而在 S4 和 S5 阶段实验组和对照组胞内 cAMP 含量无差别。这可能与外源添加物进入到核盘菌菌丝的方式及其作用通路有关。

本研究从菌核形成的重要途径 cAMP-PKA 出发, 以该通路中限速酶——PDEs 抑制剂茶碱为核心, 检测其对该通路中相关因子的调控作用。茶碱作为一种非选择性 PDE 抑制物, 可增加细胞内 cAMP 和 cGMP 水平<sup>[16]</sup>, 外源添加茶碱 PDE2 表达量明显下调, 但 PDE1 表达量升高, 说明茶碱抑制 PDE2 的表达, 从而使得下游基因 PKA 和 RAS 的表达量也相应减少。在外源添加 cAMP 后, 自噬核心因子 ATG8 含量明显升高, 表明核盘菌在受到茶

碱胁迫后,也会发生自噬反应。自噬和 cAMP-PKA 途径密切相关,酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) cAMP-PKA 途径可通过抑制自噬诱导程序对自噬进行负控调节,与之相反,稻瘟病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 的自噬过程则由 cAMP-PKA 正调控<sup>[17]</sup>。PKA 作为 cAMP-PKA 途径的下游效应物,可能受到 PDEs 水解 cAMP 的调控,并通过自噬影响细胞的生命活动<sup>[18]</sup>。

## 4 结论

外源添加浓度为 1~2.5 mmol/L 的茶碱,对于核盘菌菌丝生长速率和菌核的形成均有抑制作用。外源添加的茶碱主要是在菌核原基形成的 S4 期及菌核成熟的 S5 阶段提升胞内 cAMP 含量,而在 S1~S3 阶段和对照组胞内 cAMP 含量无差异。茶碱通过抑制 PDE2 的表达水平使得胞内 cAMP 含量升高,而下游基因 PKA 和 RAS 的表达量也相应减少,外源添加茶碱后 ATG8 的表达量上升。

## 参 考 文 献:

- [1] Michael PJ, Lui KY, Thomson LL, *et al.* Impact of preconditioning temperature and duration period on carpogenic germination of diverse *Sclerotinia sclerotiorum* populations in southwestern Australia [J]. *Plant Disease*, 2021, 105(6):1 798-1 805.
- [2] Xia S, Xu Y, Hoy R, *et al.* The notorious soilborne pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*: an update on genes studied with mutant analysis [J]. *Pathogens*, 2019, 9 (1) : 27
- [3] Sun X, Liu D, Wang Y, *et al.* Biogenesis of macrofungal sclerotia: influencing factors and molecular mechanisms [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2020, 104(10) : 4 227- 4 234
- [4] Chen C, Harel A, Gorovoits R, *et al.* MAPK regulation of sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum* is linked with pH and cAMP sensing [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2004, 17(4) : 404-413.
- [5] Yu PL, Rollins JA. The cAMP-dependent protein kinase A pathway perturbs autophagy and plays important roles in development and virulence of *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Fungal Biology*, 2022, 126(1) :20-34.
- [6] 吕蕊花,陈萌,赵倩,等. 磷酸二酯酶通过 cAMP-PKA 途径调控核盘菌菌核原基的形成研究 [J]. *河南农业科学*, 2022, 51(9) :99-104.
- [7] YE J, YANG H, SHI H, *et al.* The MAPKKK gene family in cassava: Genome-wide identification and expression analysis against drought stress [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1) :14 939.
- [8] 刘伟,杜春梅. 植物病原真菌的自噬 [J]. *微生物学报*, 2021, 61(11) :3 363-3 376.
- [9] ZHU XM, LI L, WU M, *et al.* Current opinions on autophagy in pathogenicity of fungi [J]. *Virulence*, 2019, 10(1) :481-489.
- [10] Stephan JS, Yeh YY, Ramachandran V, *et al.* The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(40) :17 049-17 054.
- [11] Zhang H, Li Y, Lai W, *et al.* SsATG8 and SsNBR1 mediated-autophagy is required for fungal development, proteasomal stress response and virulence in *Sclerotinia sclerotiorum* [J]. *Fungal Genetics and Biology*. 2021(157) :103 632.
- [12] Rabe KF, Magnussen H, Dent G. Theophylline and selective PDE inhibitors as bronchodilators and smooth muscle relaxants [J]. *European Respiratory Journal*, 1995, 8(4) : 637-642.
- [13] Singh S, Fatima Z, Ahmad K, *et al.* Repurposing of respiratory drug theophylline against *Candida albicans*: mechanistic insights unveil alterations in membrane properties and metabolic fitness [J]. *Journal Of Applied Microbiology*, 2020 ,129(4) :860-875.
- [14] 扈景晗,王东,东保柱,等. 挥发性化合物 2-甲基苯并噻唑对核盘菌和灰葡萄孢的抑制效应 [J]. *植物保护学报*, 2021, 48(4) :781-788.
- [15] 陈柳. 啉酰菌胺与咪鲜胺复配对核盘菌生长及致病的抑制机理研究 [D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学,2022.
- [16] Gupta A, Pandey AN, Sharma A, *et al.* Cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors: possible therapeutic drugs for female fertility regulation [J]. *European Journal Of Pharmacology*, 2020, 15(883) : 173 293.
- [17] Sun G, Qi X, Wilson RA. A feed-forward subnetwork emerging from integrated TOR- and cAMP/PKA-signaling architecture reinforces *Magnaporthe oryzae* appressorium morphogenesis [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2019, 32(5) :593-607.
- [18] Annucci LF, Di Benedetto G, Lefkimmatis K. PRKA/PKA signals and autophagy: space matters [J]. *Autophagy*, 2021,17(6) :1 563-1 564.