

抗真菌肽 AG-AFP 的原核表达及其对甘蔗鞭黑粉菌的抑制作用

徐嘉鸿^{1,2}, 李超燕¹, 张明阳¹, 张思源¹, 徐益², 贾燕涛^{1*}

1 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

2 广西大学 生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004

徐嘉鸿, 李超燕, 张明阳, 张思源, 徐益, 贾燕涛. 抗真菌肽 AG-AFP 的原核表达及其对甘蔗鞭黑粉菌的抑制作用[J]. 生物工程学报, 2026, 42(1): 133-146.

XU Jiahong, LI Chaoyan, ZHANG Mingyang, ZHANG Siyuan, XU Yi, JIA Yantao. Antifungal peptide AG-AFP: prokaryotic expression and evaluation of its inhibitory effect on *Sporisorium scitamineum*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2026, 42(1): 133-146.

摘要: 甘蔗鞭黑粉菌(*Sporisorium scitamineum*)引起的黑穗病是甘蔗重要病害之一, 抗菌肽是能够有效防控真菌病害的绿色抗菌剂。抗菌肽 AG-AFP 来源于巨大曲霉(*Aspergillus giganteus*), 具有稳定性高、生物安全风险低等优点, 本研究通过体外检测该抗菌肽对甘蔗鞭黑粉菌抑制效果, 旨在为甘蔗抗病应用提供生防资源。本研究通过原核表达纯化该抗菌肽, 检测其对甘蔗鞭黑粉菌细胞生长的抑制及对细胞膜完整性、流动性的影响, 验证抗菌肽 AG-AFP 对甘蔗鞭黑粉菌防控的有效性。研究表明, 原核表达的 AG-AFP 对甘蔗鞭黑粉菌具有较好的抑制效果, 对单倍体孢子 JG35/JG36 的最小抑菌浓度为 23.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 且能够增强甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子细胞膜流动性, 破坏细胞膜完整性, 并抑制双核菌丝生长。抗菌肽 AG-AFP 对甘蔗鞭黑粉菌抑菌效果显著, 为利用该抗菌肽的甘蔗抗病应用奠定了基础。

关键词: 甘蔗黑穗病; 抗菌肽; 抗菌肽原核表达; 抗真菌活性; 巨大曲霉

资助项目: 中国科学院战略性先导科技专项(XDA0450300)

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of the Chinese Academy of Sciences (XDA0450300).

*Corresponding author. E-mail: jiayt@im.ac.cn

Received: 2025-06-19; Accepted: 2025-07-14; Published online: 2025-08-01

Antifungal peptide AG-AFP: prokaryotic expression and evaluation of its inhibitory effect on *Sporisorium scitamineum*

XU Jiahong^{1,2}, LI Chaoyan¹, ZHANG Mingyang¹, ZHANG Siyuan¹, XU Yi², JIA Yantao^{1*}

1 Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, Guangxi, China

Abstract: Sugarcane smut caused by *Sporisorium scitamineum* is one of the major diseases of sugarcane. Antimicrobial peptides are eco-friendly agents that can effectively control fungal diseases. The antimicrobial peptide AG-AFP is derived from *Aspergillus giganteus* and has the advantages of high stability and low biosafety risk. We tested the inhibitory effect of AG-AFP on *Sporisorium scitamineum* aiming to provide biocontrol resources for diseases in sugarcane. AG-AFP was obtained through prokaryotic expression. We examined the inhibition of AG-AFP on the cell growth of *Sporisorium scitamineum* and its effects on the integrity and fluidity of the cell membrane to verify the effectiveness of this antimicrobial peptide in the prevention and control of *Sporisorium scitamineum*. AG-AFP obtained by prokaryotic expression had a good inhibitory effect on *Sporisorium scitamineum*, with a minimum inhibitory concentration of 23.5 $\mu\text{g/mL}$. Moreover, it enhanced the cell membrane fluidity, destroyed the cell membrane integrity, and inhibited the dikaryotic hyphae of *Sporisorium scitamineum*. AG-AFP demonstrates a significant antifungal effect and potential application value for controlling diseases in sugarcane.

Keywords: sugarcane smut; antimicrobial peptide; prokaryotic expression of antimicrobial peptide; antifungal activity; *Aspergillus giganteus*

甘蔗黑穗病是甘蔗生产过程中危害极为严重的真菌性病害,在重病区(如巴西、印度、中国、泰国等主产国),甘蔗产量损失可达20%–50%^[1]。感染黑穗病的植株生长发育受阻,茎顶部长出形似“鞭子”的黑穗,不但使甘蔗产量大幅下降,还严重影响其品质,给甘蔗产业造成巨大经济损失^[2]。甘蔗黑穗病的病原菌甘蔗鞭黑粉菌(*Sporisorium scitamineum*)是担子菌亚门、孢堆黑粉菌属真菌,甘蔗鞭黑粉菌生活史始于冬孢子萌发产生单倍体孢子,酵母状单倍体孢子不具有侵染性,2种单倍体细胞融合产生具有感染力的双核菌丝,感染寄主后在寄主体内形成冬孢子,完成其生命周期^[3]。

在甘蔗抗黑穗病研究与实践中,传统杂交育种一直是培育甘蔗抗病品种的重要方式,但由于

许多甘蔗栽培品种为异源非整倍体,F1后代分离,抗病性状与其他主要农艺性状难以完美组合,需要大量杂交组合和筛选工作才能培育出目标品种,这无疑增大了选育的难度^[4]。随着分子生物学技术的发展,虽然通过RNA混池分组分析(bulked segregation RNA-seq,BSR-seq)等技术有助于确定甘蔗黑穗病抗性关联的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism,SNP)分子标记及抗性候选区域^[5],但后续的抗病研究仍面临挑战。现阶段较常用的防治手段为化学防治,例如,使用三唑酮、代森锰锌等药剂,通过对种苗进行消毒、喷雾等方式控制病害发生和传播,但长期使用化学药剂易导致致病菌产生耐药性,同时农药残留造成的污染会给生态环境和人体健康造成风险。因此,开发和应用低毒、高效的生防

产品符合农业绿色发展的理念和需求。

抗菌肽在 20 世纪 30 年代被发现,其通常由 10–50 个氨基酸组成,多数带正电荷(+2–+9),具有两亲性^[6]。抗菌肽广泛存在于自然界的动植物及微生物中,具有分子量小、热稳定性好、水溶性强等特点,多数具备广谱抗菌活性,对细菌、真菌、病毒等病原微生物有抑制效果,不易使病原体产生耐药性^[7],是一类绿色高效且稳定的抗菌剂。在植物病害防治中,通过基因工程技术培育抗病转基因植物是重要的应用方向之一,例如,将天蚕素 B、Shiva1 等抗菌肽的编码基因转入马铃薯、水稻、泡桐等多种植物,能够显著提高转基因植株对相应病原菌的抗性^[8–10]。通过转基因技术可以获得新型植物品种,使抗病性状在后代中稳定遗传,因此成为了一种对生态环境友好的防治手段,但尚未见将抗菌肽基因用于甘蔗抗黑穗病的研究。

目前,抗菌肽数据库(Antimicrobial Peptide Database, APD)中有 4 664 多种抗菌肽,而具有抗真菌活性的肽只有 1 594 种。虽然抗菌肽登录条目每年以 100 种左右的速度增加,但抗真菌肽的数量远少于抗菌肽。因此,研究与开发新型抗真菌肽或发现抗真菌肽的新功能,对于解决真菌污染具有重要的研究意义。巨大曲霉(*Aspergillus giganteus*)抗真菌肽 AG-AFP 是由 94 个氨基酸经过前原蛋白酶酶切后获得的 60 个氨基酸的抗菌肽,其 N 端的 9 个氨基酸残基组成分泌信号肽,成熟的抗菌肽包含 51 个氨基酸,在分泌出胞外后发挥作用^[11]。AG-AFP 的主要特点是其对丝状真菌的生长有抑制作用,而对细菌、酵母、植物和哺乳动物细胞无毒性^[12–13]。抗菌肽主要通过 2 种机制发挥其抗菌作用:(1) 靶向膜的抗菌肽能够破坏细胞膜结构的完整性;(2) 非膜靶向的抗菌肽则主要通过抑制核酸、酶和其他功能蛋白的合成发挥作用^[14]。推测 AG-AFP 通过多种方式发挥抑菌作用:(1) AFP 通过直接或间接干扰真菌细胞壁生物合成干扰丝状真菌的生长^[15–16];(2) 通过影响质膜通

透性干扰真菌生长^[17];(3) 与 DNA 结合使 DNA 浓缩抑制真菌生长^[18]。

本研究利用原核表达系统制备抗真菌肽 AG-AFP,发现 AG-AFP 对甘蔗鞭黑粉菌的生长具有抑制作用,并对 AG-AFP 抗真菌肽抑制甘蔗鞭黑粉菌的机制进行了初步解析,以期为进一步利用抗菌肽在转基因甘蔗抗黑穗病中的应用奠定基础,助力甘蔗产业发展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 载体、菌株和细胞

本研究所用大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 和 *E. coli* BL21(DE3)菌株、pET21b 质粒为本实验室保存。野生型甘蔗鞭黑粉菌 JG35、JG36 为中国科学院微生物研究所单淳敏实验室惠赠。

1.1.2 主要试剂

载体构建相关试剂:Phanta 高保真 *Taq* 酶、2 \times *Taq* 酶、一步克隆重组酶试剂盒,均购自南京诺维赞生物科技股份有限公司;Star Marker (D2000),购自 GenStar 公司;DNA 限制性内切酶,购自兰博利德生物科技股份有限公司;羧苄青霉素(carbenicillin disodium),购自莫克林生化科技股份有限公司。

蛋白提取、鉴定相关试剂:蛋白提取琼脂糖凝胶珠 Ni-NTA Agarose,购自北京启迪利泰科技有限公司;蛋白酶抑制剂 Cocktail、二硫苏糖醇(1,4-dithiothreitol, DTT)、6 \times SDS Loading Buffer、预染蛋白 marker,购自兰博利德生物科技股份有限公司;0.2 μ m 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜、增强型化学发光(enhanced chemiluminescence, ECL)显影液,购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

免疫印记相关试剂:His-Tag Mouse Mixture Monoclonal Antibody、Goat Anti-Mouse IgG+IgM (H+L)-HRP Conjugated,购自柏奥易杰(北京)科技有限公司;10 kDa 超滤管、0.22 μ m 滤

膜, 购自 Merck millipore 公司; Tricine-SDS-PAGE 彩色(红色)凝胶配制试剂盒, 购自 Servicebio 公司。

其他试剂: SYTOXTM Green dead-cell stain, 购自 ABP Biosciences 公司; 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH), 购自 Yeasen 公司; 苯胺蓝, 购自 Biotopped 公司。

1.2 方法

1.2.1 构建重组质粒

根据 Wnendt 等^[19]报道的 AG-AFP 核苷酸序列合成 AG-AFP DNA 片段, 经 PCR 扩增后在 5' 端和 3' 端分别引入 20 bp 与 pET21b 载体酶切末端同源的序列, 利用同源重组的方法将合成的目的基因片段与经 *Xba* I 和 *Hind* III 酶切的 pET21b 载体进行重组, 并在多肽阅读框 C 端融合 His 标签, 构建抗菌肽的原核表达载体 pET21b-AG-AFP-His。将原核表达质粒转入 BL21(DE3)感受态细胞, 涂布在羧苄青霉素抗性平板上, 37 °C 培养过夜, 挑取单克隆, 利用测序引物(AG-AFP-F: 5'-GATAACAATTCCCCTC TAGAATGCAAGAGATGAGAGCGCG-3'; AG-AFP-R: 5'-TCGAGTGC GGCCGCAAGCTTGCA GTAGCACTTCCCCTTGT-3')进行菌落 PCR, 并测序验证。

1.2.2 蛋白表达及检测

挑取单克隆至 100 mL LB 液体培养基中, 37 °C、220 r/min 培养至 OD_{600} 为 0.6–0.8, 加入 0.1 mol/L IPTG, 15 °C、150 r/min 过夜培养。离心收集菌体, 重悬于 10 mL 10 mmol/L PBS 溶液(8 g/L NaCl, 0.2 g/L KCl, 1.44 g/L Na_2HPO_4 , 0.24 g/L KH_2PO_4 , pH 7.4)中, 高压破碎, 利用 Ni 亲和柱纯化, 依次用含 20 mmol/L 和 40 mmol/L 咪唑的 10 mmol/L PBS (pH 7.4)洗去杂蛋白, 以含 600 mmol/L 咪唑的 PBS 溶液(pH 7.4)进行蛋白洗脱, 用 10 kDa 超滤管, 2 800 r/min、4 °C 离心浓缩至 200 μ L。利用 BSA 蛋白浓度试剂盒绘制标准曲线, 并检测浓缩后的 AG-AFP 样品浓度用

于后续实验。取 10 μ L 浓缩后的样品与 6 \times SDS Loading Buffer 混合后煮沸 10 min, 进行 Tricine-SDS-PAGE 电泳、考马斯亮蓝染色, 并利用 His 抗体进行 Western blotting 检测。

1.2.3 抗真菌活性实验

用 0.22 μ m 的一次性针头滤器将抗菌肽过滤除菌, 随后进行抑菌功能检测。将 600 μ L 过夜培养的甘蔗鞭黑粉菌单倍体酵母型孢子 JG35 与 JG36 菌液分别涂布在 YEPSA (酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 蔗糖 20 g/L, 1.5% 琼脂)板上, 并将无菌牛津杯放置于培养基上, 并向牛津杯中依次加入 50、100、200 μ L 浓度为 300 μ g/mL 的抗菌肽, 将平板置于 28 °C 条件下培养, 1–2 d 后观察有无抑菌圈出现。

挑取酵母型孢子 JG35、JG36 的单克隆菌落接种于 20 mL 液体 YEPS 培养基(酵母提取物 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 蔗糖 20 g/L)中, 28 °C、220 r/min 过夜培养。将 500 μ L 的抗菌肽加入到 2.5 mL YEPS 培养基中, 同时接种 15 μ L 的 JG35、JG36 种子液(1×10^6 CFU/mL), 28 °C、220 r/min 培养 48 h, 观察抑菌效果。

由于甘蔗鞭黑粉菌只有在两性单倍体孢子配合后才能够形成双核菌丝, 因此本研究将过夜培养的甘蔗鞭黑粉菌野生型单倍体孢子 JG35、JG36 各 300 μ L 混合后, 取 50 μ L 混合样本滴在 YEPSA 平板上, 正置在 28 °C 培养箱中培养 2 d。待样品长出白色菌丝后, 取牛津杯放在培养基上, 并向牛津杯中分别加入 200 μ L 和 400 μ L 浓度为 300 μ g/mL 的抗菌肽 AG-AFP, 将平板置于 28 °C 培养。上述实验均设置至少 3 次重复。

1.2.4 最小抑菌浓度

采用梯度稀释法^[20]测定 AG-AFP 对甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子作用的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。利用 YEPS 培养基采用二倍稀释法稀释 AG-AFP 溶液, 取 100 μ L 加入 96 孔板各孔中, 同时接种 100 μ L 的 JG35、JG36 种子液(1×10^6 CFU/mL), 28 °C、220 r/min 培养 24 h, 利用酶标仪测定

OD_{600} 值, 以肉眼看不见细菌生长的最小稀释浓度作为 MIC。

1.2.5 生长曲线

将甘蔗鞭黑粉菌 JG35、JG36 细胞在 YEPS 液体培养基中培养至对数生长期, 调整细胞浓度为 1×10^6 CFU/mL, 分别加入 AG-AFP 至终浓度为 100、50、25、12.5 $\mu\text{g/mL}$, 振荡均匀后, 放入全自动生长曲线仪(Bioscreen C 公司)中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 每隔 60 min 测定 OD_{600} 值, 以未加入 AG-AFP 的甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子培养物作为空白对照, 实验设置 3 次重复, 绘制生长曲线。

1.2.6 扫描电子显微镜观察

将甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子 JG35、JG36 细胞培养至对数生长期, 调整细胞浓度为 1×10^6 CFU/mL, 加入 AG-AFP 至终浓度分别为 50 $\mu\text{g/mL}$ 和 100 $\mu\text{g/mL}$, 28 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后收集菌体。利用 2.5% 的戊二醛固定过夜, 0.1 mol/L PBS 缓冲液(pH 7.2)漂洗 3 次, 10 min/次, 依次用 50%、70%、85%、95% 乙醇进行梯度脱水, 15 min/次, 100% 乙醇脱水 3 次, 15 min/次。使用二氧化碳临界点干燥仪(Leica 公司)、喷金-离子溅射仪(Hitachi 公司)制备样品, 扫描电镜观察细胞形态。

1.2.7 细胞膜通透性检测

参照 Almeida 等^[21]的方法进行 SytoxTM Green 染色, 检测细胞膜通透性。将待测真菌单倍体孢子培养至 $OD_{600}=0.4$, 各取 150 μL 菌液加入 96 孔板中, 加入 SytoxTM Green 至终浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$, AG-AFP 的终浓度为 0.1–100 $\mu\text{g/mL}$ 。使用多功能酶标仪(TECAN 公司), 设置激发光波长为 485 nm, 发射光波长为 520 nm, 检测荧光强度, AG-AFP 孵育 12 h 期间每隔 0.5 h 测定荧光强度, 实验设置 3 次重复, 绘制细胞膜通透性和时间/剂量的关系曲线。

1.2.8 细胞膜流动性检测

参考 Liao 等^[22]的方法进行 1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene, DPH)染色

实验, 用 PBS 将对数期的甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子 JG35、JG36 细胞调至 $OD_{600}=0.4$, 与不同浓度的 AG-AFP (0–50 $\mu\text{g/mL}$) 混合后, 室温静置 20 h, 无 AG-AFP 处理组作为对照。为了标记细胞, 加入终浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 的 DPH, 37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 用 PBS 洗涤细胞去除过量的探针并以 PBS 重悬细胞。采用多功能酶标仪, 设置激发光波长为 360 nm, 发射光波长为 430 nm, 检测荧光强度, 通过减去未标记对照细胞的荧光强度校正数据, 绘制曲线。

1.2.9 细胞壁完整性检测

用 PBS 缓冲液将对数期的甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子 JG35、JG36 细胞调至 $OD_{600}=0.4$, 与不同浓度的 AG-AFP (0–50 $\mu\text{g/mL}$) 混合后, 室温静置孵育 20 h, 无 AG-AFP 处理组作为对照。取 1 mL 样品收集菌体, 用 PBS 洗涤细胞 2 次并重悬, 各组加入终浓度为 0.1% 的苯胺蓝溶液。30 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 5 min 后, 用 PBS 洗涤细胞去除过量的苯胺蓝并重悬。使用多功能酶标仪, 设置激发光波长为 398 nm, 发射光波长为 508 nm, 检测荧光强度, 以检测真菌细胞壁的完整性。

2 结果与分析

2.1 不同来源抗菌肽的筛选及 AG-AFP 抗真菌肽的表达与纯化

2.1.1 重组质粒与表达菌株的构建

AG-AFP 编码区长度为 180 bp, 将合成的 AG-AFP 核苷酸片段通过末端同源重组插入到 pET21b 载体中, 抗菌肽 C-末端融合 6 \times His 标签, 获得 pET21b-AG-AFP-His 原核表达载体(图 1A)。重组质粒转入 BL21(DE3)感受态细胞, 进行菌落 PCR 扩增 AG-AFP-His 片段(Teq-F: 5'-T AATACGACTCACTATAGGGG-3'; Teq-R: 5'-TT TGTTAGCAGCCGG-3'), 菌落 PCR 扩增结果见图 1B, 经测序验证, 获得阳性克隆。

2.1.2 蛋白表达检测及 Western blotting 分析

挑取上述阳性克隆接种于 LB 液体培养基中, 0.1 mol/L IPTG 诱导蛋白表达, Ni 亲和柱纯

化, Tricine-SDS-PAGE 电泳结果显示, AG-AFP-His 融合蛋白为可溶性蛋白, 蛋白大小为 8.4 kDa (图 2A); 用 His 抗体进行 Western blotting 检测, 结果如图 2B 所示, 检测到了

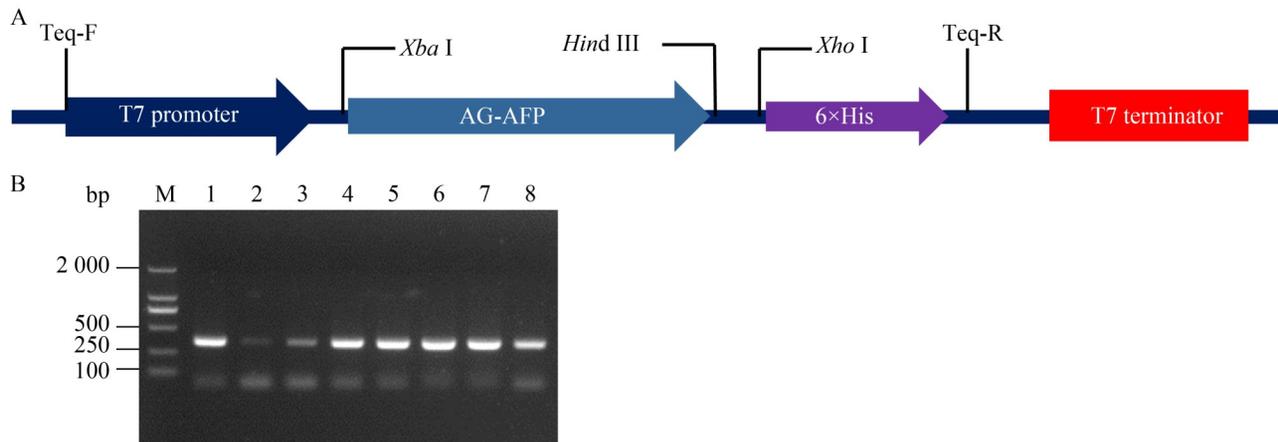


图1 构建重组质粒与表达菌株 A: 载体元件示意图。编码AG-AFP的核苷酸序列与6×His标签序列融合, 基因表达由T7启动子驱动。B: AG-AFP表达菌株的构建。M: DNA marker; 泳道1–8: pET21b-AG-AFP-His菌落PCR验证。

Figure 1 Construction of recombinant plasmids and expression strains. A: Schematic diagram of the vector containing expression elements. The nucleotide sequence encoding AG-AFP is fused with the 6×His tag sequence, and the gene expression is driven by the T7 promoter. B: Construction of AG-AFP expressing strains. M: DNA marker; Lane 1–8: PCR verification of pET21b-AG-AFP-His colonies.

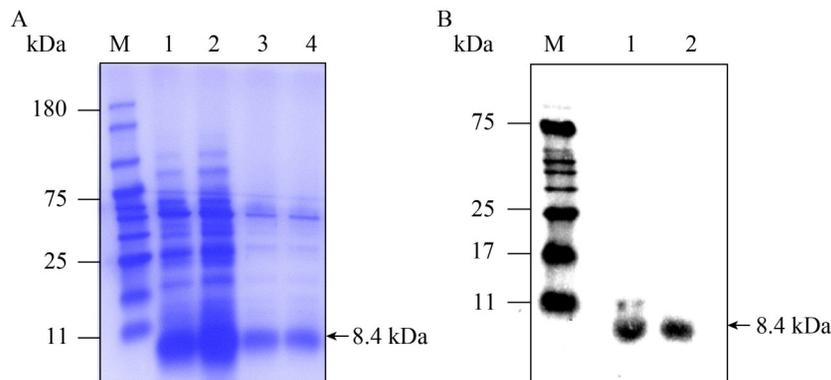


图2 蛋白表达及Western blotting检测 A: AG-AFP蛋白表达检测。泳道M: 蛋白marker; 泳道1–2: 10 kDa超滤管浓缩后蛋白; 泳道3–4: 600 mmol/L咪唑梯度洗脱。B: 用抗His抗体免疫印迹法检测AG-AFP-His。泳道1–2: 10 kDa超滤管浓缩后蛋白。图中箭头所指位置为目的蛋白条带。

Figure 2 Protein expression and Western blotting detection. A: Detection of AG-AFP protein expression. Lane M: Protein marker; Lane 1–2: Concentrated protein filtered by 10 kDa ultra-centrifugal filter units; Lane 3–4: 600 mmol/L imidazole gradient elution. B: Anti-His antibody immunoblot was used to detect AG-AFP-His. Lane 1–2: Concentrated protein in a 10 kDa ultrafiltration tube. The positions indicated by the arrows in the figure are the positions of the target protein bands.

AG-AFP-His 的特异性条带。

2.2 AG-AFP 的抗甘蔗鞭黑粉菌活性分析

2.2.1 AG-AFP 对甘蔗鞭黑粉菌的抑菌活性

采用牛津杯扩散法及液体培养法进行抑菌实验。使用浓缩并过滤除菌的抗菌肽 AG-AFP (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理单倍体孢子 JG35、JG36, 抑菌圈的测定结果见图 3A, JG35 的 50 μL 组为 (1.2 \pm 0.5) cm、100 μL 组为 (2.0 \pm 0.3) cm、200 μL 组为 (2.5 \pm 0.5) cm; JG36 的 50 μL 组为 (1.2 \pm 0.4) cm、100 μL 组为 (2.1 \pm 0.4) cm、200 μL 组为 (2.9 \pm 0.3) cm。液体培养抑菌实验(终浓度 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)结果显示, 实验组与对照组存在明显差异(图 3B)。实验结果表明, AG-AFP 对甘蔗鞭黑粉菌的单倍体孢子 JG35、JG36 均表现出体外

抑菌活性, 使用 AG-AFP (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)处理双核菌丝, 2 d 后观察, 抑菌圈的测定结果如图 3C 所示, 加入 200 μL 与 400 μL 的抗菌肽对双核菌丝均有抑制效果, 且使用量越多效果越明显。将距离牛津杯最近与最远的菌丝分别放大 50 倍观察 400 μL 抗菌肽处理后的菌丝, 实验结果如图 3D 所示, 与对照组相比, AG-AFP 处理后, 菌丝生长受到抑制并造成菌丝卷曲且不规则重叠。上述结果表明, AG-AFP 可有效抑制甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子及双核菌丝的生长。

2.2.2 AG-AFP 对甘蔗鞭黑粉菌的最小抑菌浓度测定

最小抑菌浓度(MIC)是衡量和评价物质抑菌能力的主要指标之一。以 188 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为起始最高浓度, 对 AG-AFP 进行 2 倍梯度稀释, 如图

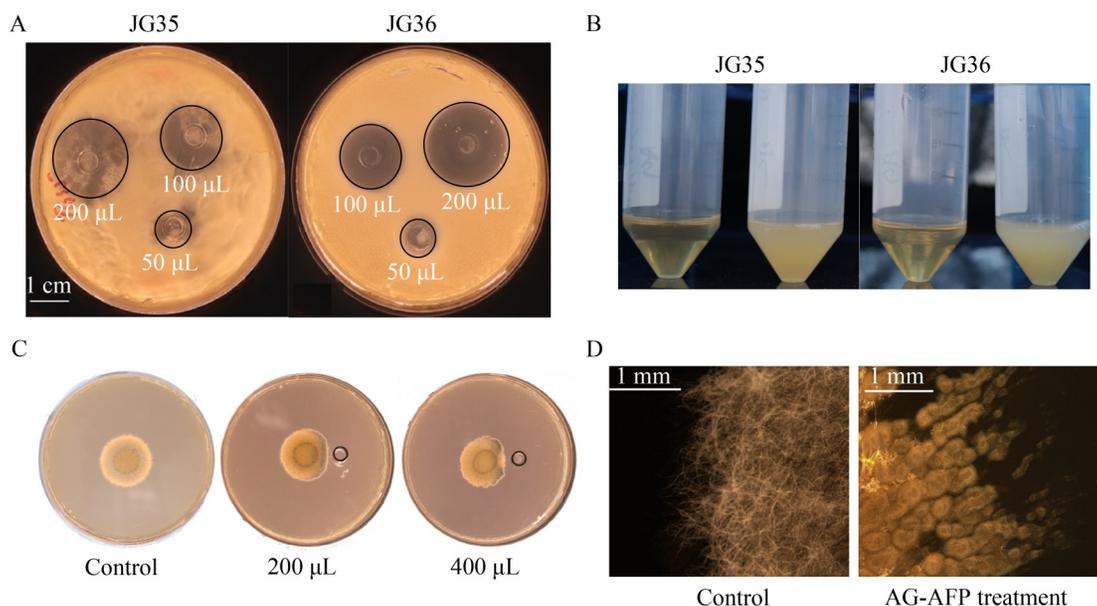


图3 AG-AFP对甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子和双核菌丝体的抑制 A: 牛津杯法平板抑菌实验。B: 液体培养法抑菌实验。C: AG-AFP对甘蔗鞭黑粉菌双核菌丝的抑制。从左到右依次为: 对照、加入200 μL 和400 μL AG-AFP的处理组。D: 显微镜下的正常菌丝(左侧)、AG-AFP抗菌肽抑制菌丝(右侧)。

Figure 3 Inhibition of AG-AFP on haploid sporidia and dikaryotic hyphae of *Sporisorium scitamineum*. A: Oxford cup method plate bacteriostatic experiment. B: Liquid culture method bacteriostatic experiment. C: Inhibition of AG-AFP on the dikaryotic hyphae of *Sporisorium scitamineum*. From left to right: control, add 200 μL or 400 μL of AG-AFP for treatment. D: Normal mycelia (left), mycelia inhibited by AG-AFP antimicrobial peptide (right).

4A 所示, 甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子 JG35、JG36, 两者的 MIC 浓度相近, 且抑菌效果随 AG-AFP 浓度的增大而增强, 23.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AG-AFP 作用下培养 24 h, 肉眼未见明显病原菌生长。OD₆₀₀ 值测定结果显示, 与肉眼观察结果一致, AG-AFP 对甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子 JG35、JG36 的 MIC 为 23.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (图 4B)。

2.3 AG-AFP 对甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子生长的影响

微生物的生长曲线可以直观反映其生长情况及生长速率。为研究 AG-AFP 对甘蔗鞭黑粉菌生长的影响, 测定了甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子的生长曲线。结果如图 5 所示, 对照组(CK)的细胞生长呈现典型的 S 型生长: 经过一段时

间的延滞期, OD₆₀₀ 值显著增高, 进入快速生长的对数期; 实验组培养基中加入 AG-AFP 的浓度为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对 JG35、JG36 抑制效果不明显; AG-AFP 浓度为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞生长受到明显抑制; 而加入 AG-AFP 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的实验组 OD₆₀₀ 值基本不变, 细胞生长受到严重抑制。

2.4 扫描电镜观察 AG-AFP 对菌体表面形态的影响

如图 6 所示, 未经 AG-AFP 处理的甘蔗鞭黑粉菌孢子 JG35、JG36 细胞形态完整, 表面饱满, 无破损(图 6A、6D); 细胞经 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ AG-AFP 处理 24 h 后, JG35、JG36 细胞表面均出现凹陷、褶皱(图 6B、6E)。AG-AFP 浓度提高至

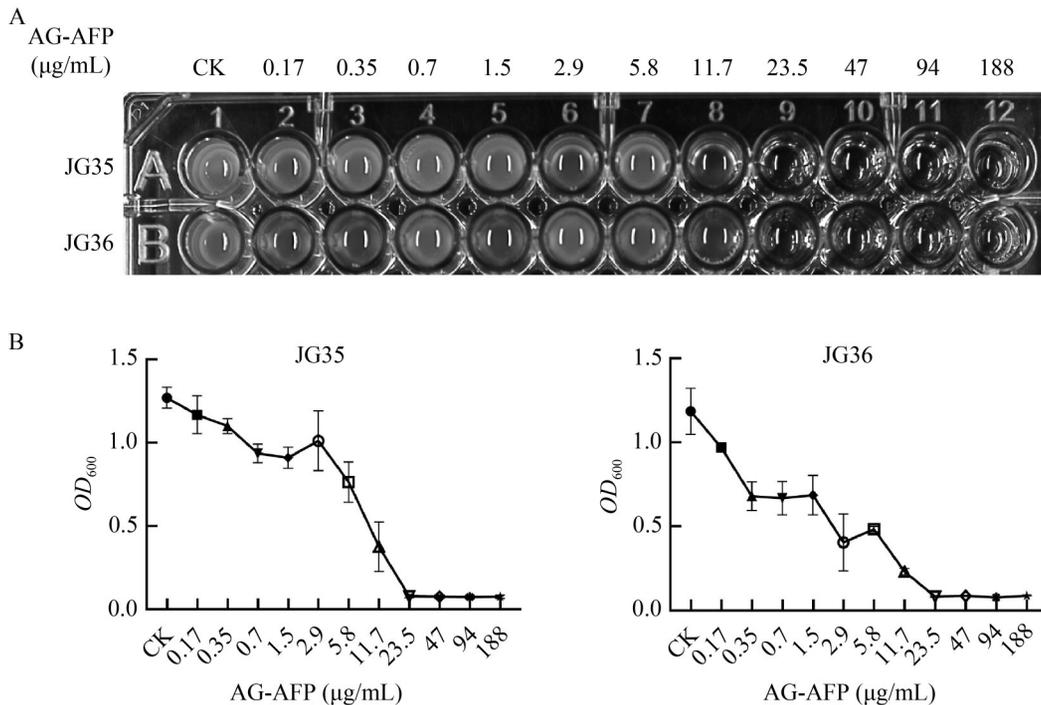


图4 不同浓度AG-AFP对甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子JG35、JG36的抑菌活性 A: 在96孔板中用不同浓度AG-AFP处理病原菌; B: 不同浓度的AG-AFP处理24 h后, 测定菌液OD₆₀₀值。CK为对照组。

Figure 4 The antibacterial activities of different concentrations of AG-AFP against haploid sporidia JG35 and JG36 of *Sporisorium scitamineum*. A: Pathogenic bacteria were treated with different concentrations of AG-AFP in 96-well plates; B: OD₆₀₀ values of the bacterial solutions treated with different concentrations of AG-AFP were determined after 24 hours of culture. CK is the control.

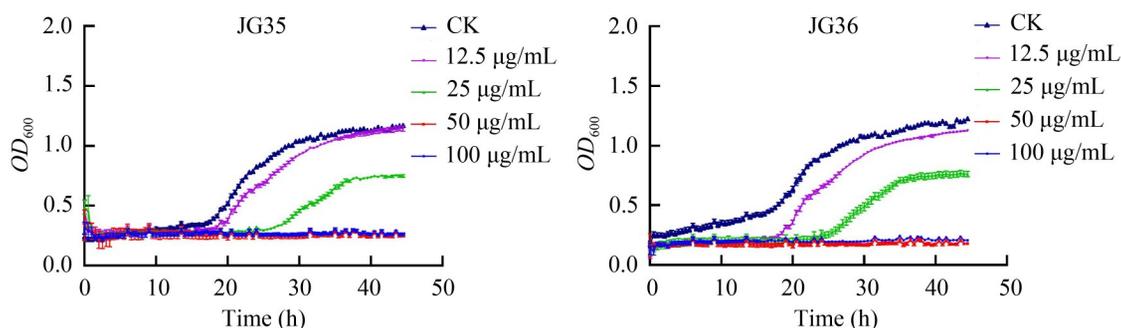


图5 不同浓度AG-AFP对甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子JG35、JG36生长的影响

Figure 5 Effects of different concentrations of AG-AFP on the growth of haploid sporidia JG35 and JG36 of *Sporisorium scitamineum*.

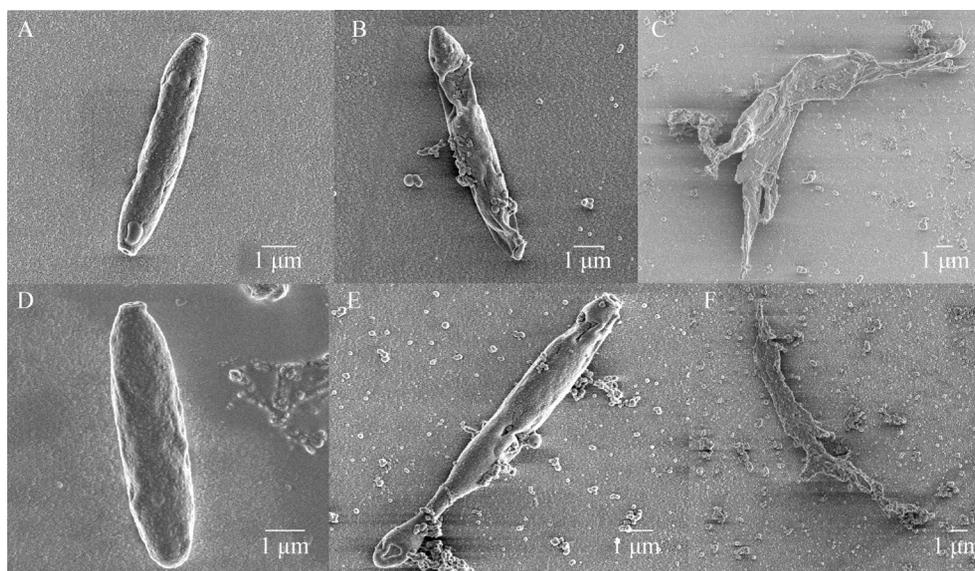


图6 不同浓度AG-AFP对甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子JG35、JG36菌体表面形态的影响 A: 野生型JG35对照; B: 50 µg/mL AG-AFP处理JG35; C: 100 µg/mL AG-AFP处理JG35; D: 野生型JG36对照; E: 50 µg/mL AG-AFP处理JG36; F: 100 µg/mL AG-AFP处理JG36。

Figure 6 Effects of different concentrations of AG-AFP on the surface morphology of haploid sporidia JG35 and JG36 of *Sporisorium scitamineum*. A: Wild type JG35; B: JG35 treated with 50 µg/mL AG-AFP; C: JG35 treated with 100 µg/mL AG-AFP; D: Wild type JG36; E: JG36 treated with 50 µg/mL AG-AFP; F: JG36 treated with 100 µg/mL AG-AFP.

100 µg/mL 时, 细胞破坏严重, 细胞表面严重皱缩、形状变扁、内容物消失(图 6C、6F)。

2.5 细胞膜通透性增加

SytoxTM Green 染料能够穿透细胞膜受损的细胞, 并与 DNA 结合发出荧光, 通过 AG-AFP 处理以检测真菌膜损伤情况(图 7)。JG35、

JG36 与 50 µg/mL 的 AG-AFP 和 0.2 µmol/L 的 SytoxTM Green 染料共孵育, 时间-反应曲线显示, JG35、JG36 实验组荧光强度的差值呈现上升趋势, 且显著高于未处理的对照组。实验结果表明, AG-AFP 抗菌肽可以作用于细胞膜, 造成细胞膜通透性增加。利用 0.1、1、

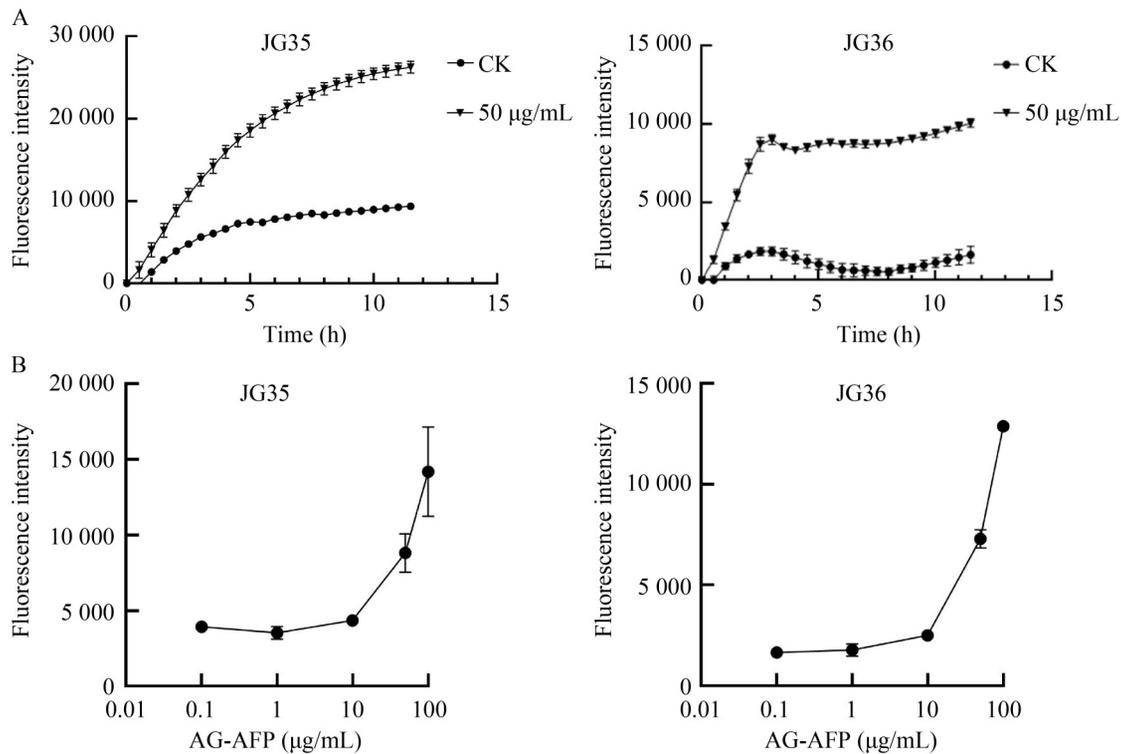


图7 AG-AFP使甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子JG35、JG36细胞膜通透性增加 A: JG35、JG36在50 µg/mL的AG-AFP处理下Sytox™ Green时间-剂量曲线; B: JG35、JG36在不同浓度的AG-AFP处理下Sytox™ Green浓度-剂量曲线。CK为对照组。

Figure 7 AG-AFP increases the cell membrane permeability of haploid sporidia JG35 and JG36 of *Sporisorium scitamineum*. A: Sytox™ Green time-dose curves of JG35 and JG36 treated with 50 µg/mL AG-AFP; B: Sytox™ Green concentration-dose curves of JG35 and JG36 treated with different concentrations of AG-AFP. CK is the control.

10、100 µg/mL的AG-AFP处理,在作用2 h后染色观察,剂量-反应曲线表明,抗菌肽浓度越高对JG35、JG36细胞膜通透性的影响越大。

2.6 细胞膜流动性增加

细胞膜的流动性与多种重要的生理活动密切相关,如信号转导、能量转换和营养物质运输。DPH具有疏水性,能够与细胞膜的亲脂尾部结合发出荧光,而不破坏膜的结构,能够用于定量测量细胞膜动态的相对变化。实验结果显示,与对照组相比,AG-AFP处理组的荧光强度随抗菌肽浓度的增加显著增强(图8),AG-AFP可以使甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子JG35、

JG36的质膜脂质部分发生扰动,增加细胞膜的流动性。

2.7 细胞壁完整性变化

苯胺蓝能够选择性地与真菌细胞壁上的β-1,3-葡聚糖特异性结合而产生荧光,通过苯胺蓝荧光试剂检测葡聚糖的暴露量来检测AG-AFP对甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子JG35、JG36细胞壁的干扰。结果显示,随着AG-AFP浓度的升高,荧光强度增强(图9),表明AG-AFP能够增加β-1,3-葡聚糖的暴露量,推测AG-AFP可以破坏病原菌细胞壁的结构,从而抑制细胞生长。

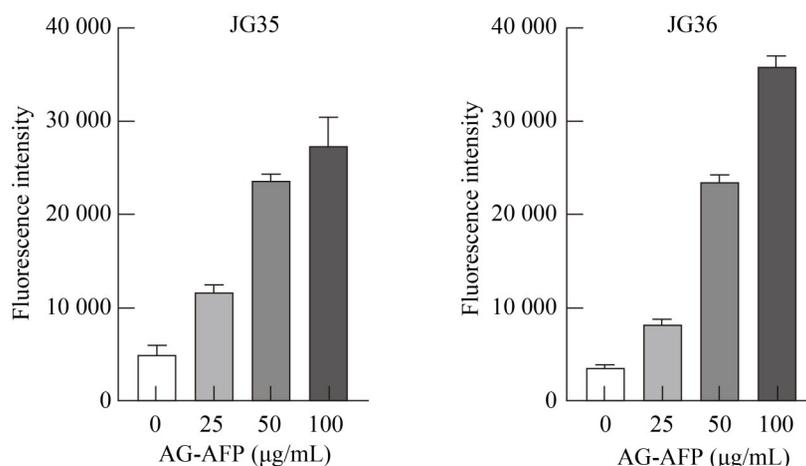


图8 AG-AFP使甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子JG35、JG36细胞膜流动性增加

Figure 8 AG-AFP increases the cell membrane fluidity of haploid sporidia JG35 and JG36 of *Sporisorium scitamineum*.

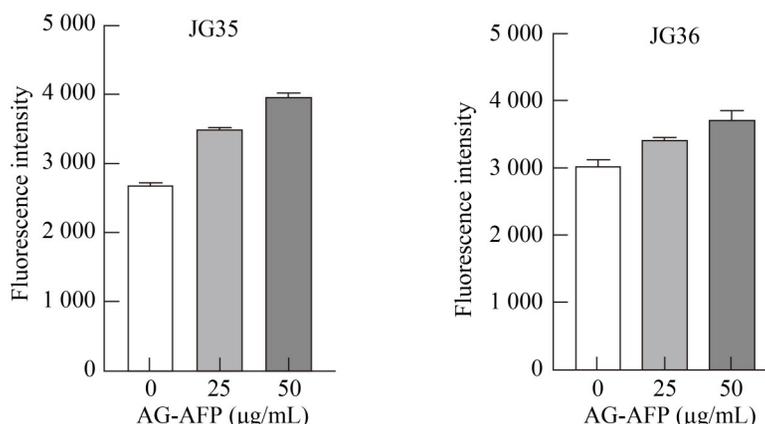


图9 AG-AFP使甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子JG35、JG36细胞壁完整性变化

Figure 9 Changes in the integrity of the cell walls of haploid sporidia JG35 and JG36 of *Sporisorium scitamineum* caused by AG-AFP.

3 讨论与结论

巨大曲霉分泌的抗菌肽 AG-AFP 具有持久、高效、有限毒性等优点，是抗真菌的理想候选药物。AG-AFP 为真菌源抗菌肽，其结构稳定性显著优于植物源防御素，AG-AFP 在 80 °C 孵育后仍保留大部分活性^[13]，而来自蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 的植物防御素 MtDef4 在相同条件下活性下降至 50% 以下^[23]。AG-AFP 在微摩尔级浓度下即可对许多丝状真菌产生较高

的抗真菌活性，包括人类条件致病菌烟曲霉菌 (*Aspergillus fumigatus*)、黑曲霉菌 (*Aspergillus niger*)，以及植物致病菌尖孢镰刀菌 (*Fusarium oxysporum*)、串珠镰刀菌 (*Fusarium moniliforme*)、稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*)、白粉病菌 (*Erysiphe graminis*) 和致病疫霉菌 (*Phytophthora infestans*) 等^[11]。AG-AFP 针对不同真菌的最小抑菌浓度不同，涵盖从对尖孢镰刀菌的 0.1 µg/mL 到对构巢曲霉菌 (*Aspergillus nidulans*) 的 200 µg/mL 的较大范围^[17]，可见不同真菌对 AG-AFP 的敏

感性存在差异。甘蔗鞭黑粉菌也属于丝状真菌,生活史可分为单倍体酵母型孢子、双核菌丝和二倍体冬孢子等3个阶段。本研究发现 His 标签融合抗菌肽 AG-AFP-His 可以在大肠杆菌中表达,说明该抗菌肽对大肠杆菌没有毒性,与 AG-AFP 对细菌无毒性的报道一致^[12-13]。平板抑菌圈实验及液体添加 AG-AFP 实验中,AG-AFP 有效抑制甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子生长,最小抑菌浓度为 23.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2.8 $\mu\text{mol}/\text{L}$);在平板对峙实验中,分别取 50 μL 和 200 μL 的 AG-AFP (浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)可明显抑制单倍体孢子和双核菌丝的生长,与其他丝状真菌相比,甘蔗鞭黑粉菌对 AG-AFP 较为敏感。

成熟的 AG-AFP 分子形成 β 桶状结构,具有 2 个 γ -core 保守结构域,其作用方式为覆盖于细胞膜上而非插入细胞膜中。因此,AG-AFP 增强甘蔗鞭黑粉菌细胞膜通透性及流动性,与阳离子抗菌肽在细胞膜上形成孔道从而破坏细胞通透性的机制不同^[24],而 AG-AFP 抑制甘蔗鞭黑粉菌的作用机理需要进一步阐明。AG-AFP 保守的 GXC(X3-9)C γ -核心基序(GKCYKKNIC)不仅存在于抗菌肽中,也存在于其他宿主防御多肽中^[24]。已有研究表明,AG-AFP 与敏感真菌(如 *Aspergillus niger*)的细胞壁和质膜紧密结合,但不与 AG-AFP 耐受真菌如产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)、棒曲霉(*Aspergillus clavatus*)的质膜结合^[25]。AG-AFP 在其 C 端含有第 2 个 γ -核心基序 C-GXC,AG-AFP 通过促进酸性磷脂囊泡的聚集引起膜拉伸和渗透,该 γ -核心基序在植物防御素中介导抗真菌活性^[24]。另外,AG-AFP 通过几丁质结合域与真菌细胞壁重要组分几丁质结合并附着在细胞壁上,锚定在几丁质上的 AG-AFP 利用其 γ -核心基序与真菌细胞膜紧密结合。由于真菌中几丁质合酶定位在细胞膜上,AG-AFP 可能通过干扰几丁质合酶与邻近的质膜成分的相互作用,影响几丁质合酶在质膜中的适当嵌入;AG-AFP 也有可能通过黏附到几丁质前体或新合成的几丁质上,影响几丁质

合成或干扰几丁质的运输和其在细胞壁上的整合过程。无论 AG-AFP 是直接或间接地与膜结合的几丁质合酶相互作用,这种相互作用均会导致细胞壁的畸形,反过来会使质膜拉伸,并最终导致膜通透性改变和细胞壁完整性的丧失^[11]。

甘蔗鞭黑粉菌单倍体孢子无致病能力,单倍体细胞融合产生双核菌丝才能侵染甘蔗组织。在黑粉菌属中,与甘蔗鞭黑粉菌类似具有二性态特征的植物病原真菌,如模式真菌玉米瘤黑粉菌(*Ustilago maydis*)也能通过有性配合产生具有侵染能力的菌丝^[26-27],甘蔗鞭黑粉菌基因组序列分析也揭示了其与玉米瘤黑粉菌较近的亲缘关系^[28]。AG-AFP 通过直接或间接干扰真菌细胞壁生物合成干扰丝状真菌的生长,AG-AFP 也可以干扰几丁质合酶的活性,从而破坏真菌细胞壁的完整性^[16],苯胺蓝染色及扫描电镜观察(图 6 和图 9)发现,随着 AG-AFP 浓度提高,细胞壁破坏程度逐渐加重。葡萄糖神经酰胺作为简单形式鞘脂普遍存在于真菌质膜和脂质微结构域中,由鞘氨醇碱基、脂肪酸和葡萄糖或半乳糖组成,不同真菌中其脂肪酸链的不饱和程度和长度存在差异。对 AG-AFP 高敏感的黑曲霉(*Aspergillus niger*)含有不饱和脂肪酸链的葡萄糖神经酰胺,不敏感的构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)含有饱和脂肪酸链的葡萄糖神经酰胺,耐受 AG-AFP 的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)则没有葡萄糖神经酰胺^[29]。推测葡萄糖神经酰胺可以直接与 AG-AFP 相互作用,或者葡萄糖神经酰胺对几丁质合酶嵌入具有重要作用^[30]。因此,AG-AFP 可能是通过直接或间接作用于敏感真菌中不饱和脂肪酸链的葡萄糖神经酰胺,直接或间接影响了细胞膜上几丁质合酶的活性,继而造成 AG-AFP 对不同真菌抑制效果不同。

AG-AFP 对植物和哺乳动物细胞无毒性,成为该抗菌肽在植物转基因应用中的巨大优势,如 AG-AFP 转基因小麦抗小麦白粉菌(*Erysiphe*

graminis)和小麦秆锈病菌(*Puccinia recondita*)^[31], 水稻中表达 AG-AFP 可以有效控制稻瘟病害^[32-33], 以及转基因油橄榄可以抵抗大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)造成的黄萎病和褐座坚壳菌(*Rosellinia necatrix*)造成的白纹羽病等^[34]。可见, AG-AFP 不但能够在双子叶植物中发挥作用, 也能在单子叶植物中表达, 并有效控制病原真菌。由农杆菌介导转化获得的转基因水稻组成型表达 *afp* 基因, 无论是 *afp* cDNA 序列或化学合成的密码子优化的 *afp* 基因均能在水稻中稳定整合和遗传, 对植物形态无影响, T2 代纯合子 *afp* 转基因株系对稻瘟病菌表现出不同程度的抗性^[33]。病原诱导型启动子 *ZmPR4* 驱动 *afp* 基因表达, 并获得抗稻瘟病水稻植株, 则为 AG-AFP 在抗真菌病害的应用提供了可能性^[32]。本研究证实原核表达的 AG-AFP 抗菌肽能够有效抑制甘蔗鞭黑穗病菌的生长, 为 AG-AFP 抗菌肽在转基因甘蔗的抗病应用奠定了基础。

作者贡献声明

徐嘉鸿: 方案设计、实验操作、数据管理、稿件写作与修改; 李超燕、张明阳: 实验设计、实验操作; 张思源: 实验设计、实验操作、实验指导; 徐益: 实验设计、实验指导; 贾燕涛: 方案设计、经费支持、监督指导及稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有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。

REFERENCES

- [1] WU QB, ZHANG C, XU F, ZANG SJ, WANG DJ, SUN TT, SU YC, YANG SL, DING YH, QUE YX. Transcriptional regulation of sugarcane response to *Sporisorium scitamineum*: insights from time-course gene coexpression and Ca²⁺ signaling[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2024, 72(18): 10506-10520.
- [2] 李楠, 孙大智, 王紫薇, 曹晶晶, 汪志琴, 赵盼, 仲乃琴. 甘蔗鞭黑粉菌拮抗菌鉴定及特性研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(10): 3685-3701.
LI N, SUN DZ, WANG ZW, CAO JJ, WANG ZQ, ZHAO P, ZHONG NQ. Identification and characterization of sugarcane *Sporisorium scitamineum* antagonists[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(10): 3685-3701 (in Chinese).
- [3] 沈万宽, 姜子德, 邓海华, 刘睿. 甘蔗黑穗病及其病原菌研究进展[J]. 热带作物学报, 2013, 34(10): 2063-2068.
SHEN WK, JIANG ZD, DENG HH, LIU R. Research progress on sugarcane smut disease and *Sporisorium scitamineum*[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2013, 34(10): 2063-2068 (in Chinese).
- [4] 韦金菊, 宋修鹏, 魏春燕, 张小秋, 黄伟华, 颜梅新. 甘蔗黑穗病及其防治研究进展[J]. 广东农业科学, 2019, 46(4): 81-88.
WEI JJ, SONG XP, WEI CY, ZHANG XQ, HUANG WH, YAN MX. Research progress on sugarcane smut and its control[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2019, 46(4): 81-88 (in Chinese).
- [5] WU QB, SU YC, PAN YB, XU F, ZOU WH, QUE BB, LIN PX, SUN TT, GRISHAM MP, XU LP, QUE YX. Genetic identification of SNP markers and candidate genes associated with sugarcane smut resistance using BSR-Seq[J]. Frontiers in Plant Science, 2022, 13: 1035266.
- [6] YAN YH, LI YZ, ZHANG ZW, WANG XH, NIU YZ, ZHANG SH, XU WL, REN CG. Advances of peptides for antibacterial applications[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2021, 202: 111682.
- [7] ZHANG YM, YE DX, LIU Y, ZHANG XY, ZHOU YL, ZHANG L, YANG XL. Peptides, new tools for plant protection in eco-agriculture[J]. Advanced Agrochem, 2023, 2(1): 58-78.
- [8] OSUSKY M, ZHOU GQ, OSUSKA L, HANCOCK RE, KAY WW, MISRA S. Transgenic plants expressing cationic peptide chimeras exhibit broad-spectrum resistance to phytopathogens[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(11): 1162-1166.
- [9] CAMPO S, MANRIQUE S, GARCÍA-MARTÍNEZ J, SAN SEGUNDO B. Production of cecropin A in transgenic rice plants has an impact on host gene expression[J]. Plant Biotechnology Journal, 2008, 6(6): 585-608.
- [10] DU T, WANG Y, HU QX, CHEN J, LIU S, HUANG WJ, LIN ML. Transgenic *Paulownia* expressing *shiva-1* gene has increased resistance to *Paulownia* witches' broom disease[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2005, 47(12): 1500-1506.
- [11] MEYER V. A small protein that fights fungi: AFP as a new promising antifungal agent of biotechnological value[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(1): 17-28.
- [12] SZAPPANOS H, SZIGETI GP, PÁL B, RUSZNÁK Z, SZÚCS G, RAJNAVÖLGYI É, BALLA J, BALLA G, NAGY E, LEITER É, PÓCSI I, HAGEN S, MEYER V, CSERNOCH L. The antifungal protein AFP secreted by *Aspergillus giganteus* does not cause detrimental effects on certain mammalian cells[J]. Peptides, 2006, 27(7): 1717-1725.
- [13] LACADENA J, MARTÍNEZ del POZO A, GASSET M, PATIÑO B, CAMPOS-OLIVAS R, VÁZQUEZ C, MARTÍNEZ-RUIZ A, MANCHEÑO JM, OÑADERRA M, GAVILANES JG. Characterization of the antifungal protein secreted by the mould *Aspergillus giganteus*[J].

- Archives of Biochemistry and Biophysics, 1995, 324(2): 273-281.
- [14] ZHANG QY, YAN ZB, MENG YM, HONG XY, SHAO G, MA JJ, CHENG XR, LIU J, KANG J, FU CY. Antimicrobial peptides: mechanism of action, activity and clinical potential[J]. Military Medical Research, 2021, 8(1): 48.
- [15] BINDER U, BENCINA M, EIGENTLER A, MEYER V, MARX F. The *Aspergillus giganteus* antifungal protein AFPNN5353 activates the cell wall integrity pathway and perturbs calcium homeostasis[J]. BMC Microbiology, 2011, 11: 209.
- [16] HAGEN S, MARX F, RAM AF, MEYER V. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* inhibits chitin synthesis in sensitive fungi[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(7): 2128-2134.
- [17] THEIS T, WEDDE M, MEYER V, STAHL U. The antifungal protein from *Aspergillus giganteus* causes membrane permeabilization[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2003, 47(2): 588-593.
- [18] MARTINEZ DEL POZO A, LACADENA V, MANCHENO JM, OLMO N, ONADERRA M, GAVILANES JG. The antifungal protein AFP of *Aspergillus giganteus* is an oligonucleotide/oligosaccharide binding (OB) fold-containing protein that produces condensation of DNA[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2002, 277(48): 46179-46183.
- [19] WNENDT S, ULBRICH N, STAHL U. Cloning and nucleotide sequence of a cDNA encoding the antifungal-protein of *Aspergillus giganteus* and preliminary characterization of the native gene[J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18(13): 3987.
- [20] LÜ X, YI LH, DANG J, DANG Y, LIU BF. Purification of novel bacteriocin produced by *Lactobacillus coryniformis* MXJ 32 for inhibiting bacterial foodborne pathogens including antibiotic-resistant microorganisms[J]. Food Control, 2014, 46: 264-271.
- [21] ALMEIDA CV, DE OLIVEIRA CFR, ALMEIDA LHO, RAMALHO SR, GUTIERREZ CO, SARDI JCO, FRANCO OL, CARDOSO MH, MACEDO MLR. Computer-made peptide RQ18 acts as a dual antifungal and antibiofilm peptide through membrane-associated mechanisms of action[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2024, 753: 109884.
- [22] LIAO SL, YANG G, HUANG S, LI B, LI AJ, KAN JQ. Chemical composition of *Zanthoxylum schinifolium* Siebold & Zucc. essential oil and evaluation of its antifungal activity and potential modes of action on *Malassezia restricta*[J]. Industrial Crops and Products, 2022, 180: 114698.
- [23] LI H, KALUNKE R, TETORYA M, CZYMMEK KJ, SHAH DM. Modes of action and potential as a peptide-based biofungicide of a plant defensin MtDef4[J]. Molecular Plant Pathology, 2024, 25(4): e13458.
- [24] UTESCH T, de MIGUEL CATALINA A, SCHATTEBERG C, PAEGE N, SCHMIEDER P, KRAUSE E, MIAO YL, McCAMMON JA, MEYER V, JUNG S, MROGINSKI MA. A computational modeling approach predicts interaction of the antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* with fungal membranes via its γ -core motif[J]. mSphere, 2018, 3(5): e00377-18.
- [25] BARAKAT H, SPIELVOGEL A, HASSAN M, EL-DESOUKY A, EL-MANSY H, RATH F, MEYER V, STAHL U. The antifungal protein AFP from *Aspergillus giganteus* prevents secondary growth of different *Fusarium* species on barley[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(2): 617-624.
- [26] HARTMANN HA, KAHMANN R, BÖLKER M. The pheromone response factor coordinates filamentous growth and pathogenicity in *Ustilago maydis*[J]. The EMBO Journal, 1996, 15(7): 1632-1641.
- [27] BÖLKER M. *Ustilago maydis*: a valuable model system for the study of fungal dimorphism and virulence[J]. Microbiology, 2001, 147(Pt 6): 1395-1401.
- [28] QUE YX, XU LP, WU QB, LIU YF, LING H, LIU YH, ZHANG YY, GUO JL, SU YC, CHEN JB, WANG SS, ZHANG CG. Genome sequencing of *Sporisorium scitamineum* provides insights into the pathogenic mechanisms of sugarcane smut[J]. BMC Genomics, 2014, 15(1): 996.
- [29] PAEGE N, WARNECKE D, ZÄUNER S, HAGEN S, RODRIGUES A, BAUMANN B, THIESS M, JUNG S, MEYER V. Species-specific differences in the susceptibility of fungi to the antifungal protein AFP depend on C-3 saturation of glycosylceramides[J]. mSphere, 2019, 4(6): e00741-19.
- [30] AMARAL VSG, FERNANDES CM, FELÍCIO MR, VALLE AS, QUINTANA PG, ALMEIDA CC, BARRETO-BERGTER E, GONÇALVES S, SANTOS NC, KURTENBACH E. Psd2 pea defensin shows a preference for mimetic membrane rafts enriched with glucosylceramide and ergosterol[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 2019, 1861(4): 713-728.
- [31] OLDACH KH, BECKER D, LÖRZ H. Heterologous expression of genes mediating enhanced fungal resistance in transgenic wheat[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2001, 14(7): 832-838.
- [32] MORENO AB, PEÑAS G, RUFAT M, BRAVO JM, ESTOPÀ M, MESSEGUER J, SAN SEGUNDO B. Pathogen-induced production of the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* confers resistance to the blast fungus *Magnaporthe grisea* in transgenic rice[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2005, 18(9): 960-972.
- [33] COCA M, BORTOLOTTI C, RUFAT M, PEÑAS G, ERITJA R, THARREAU D, del POZO AM, MESSEGUER J, SAN SEGUNDO B. Transgenic rice plants expressing the antifungal AFP protein from *Aspergillus giganteus* show enhanced resistance to the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 54(2): 245-259.
- [34] NARVAEZ I, KHAYREDDINE T, PLIEGO C, CERESO S, JIMÉNEZ-DÍAZ RM, TRAPERO-CASAS JL, LÓPEZ-HERRERA C, ARJONA-GIRONA I, MARTÍN C, MERCADO JA, PLIEGO-ALFARO F. Usage of the heterologous expression of the antimicrobial gene *afp* from *Aspergillus giganteus* for increasing fungal resistance in olive[J]. Frontiers in Plant Science, 2018, 9: 680.