

网络出版时间:2024-11-07

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20241107.1343.002

禾谷镰刀菌 NuA4 组蛋白乙酰转移酶复合体 亚基 FgEaf7 的功能研究

江航¹, 马立国¹, 祁凯¹, 张悦丽¹, 张博¹, 马国苹¹, 曾凤², 齐军山¹

(1. 山东省农业科学院植物保护研究所/山东省农业有害生物绿色防控重点实验室, 山东济南 250100;

2. 齐河县农业农村局, 山东齐河 251100)

摘要:由禾谷镰刀菌引起的小麦赤霉病和茎基腐病在中国发生严重,威胁着国家的粮食安全。NuA4 组蛋白乙酰转移酶复合体可调控真菌的多种发育过程,但在植物病原真菌中,有关 NuA4 中多个亚基的功能尚不清楚。为明确 NuA4 中亚基 Eaf7 在植物病原真菌中的功能,本研究以禾谷镰刀菌为研究对象,敲除基因 *FgEAF7*,发现 *Fgeaf7* 突变体的生长速率显著低于野生型菌株,但基因 *FgEAF7* 的缺失不影响分生孢子的产生、对小麦的致病力以及 DON 毒素的生物合成。*Fgeaf7* 突变体对刚果红和 SDS 的敏感性下降,表明基因 *FgEAF7* 的缺失影响细胞壁的发育。对 FgEaf7 的结构域进行分析,发现 FgEaf7 中含有一个保守的 Eaf7 结构域,将 Eaf7 结构域敲除后,发现 *FgEAF7*^{ΔEaf7} 突变体和 *Fgeaf7* 突变体的缺陷一致,表明 Eaf7 结构域对于 FgEaf7 发挥完整功能是必需的。转录组分析显示,与野生型菌株相比,*Fgeaf7* 突变体中有 1 800 多个基因差异表达,其中,多个对生长发育有重要作用的基因在 *Fgeaf7* 突变体中下调表达。推测 FgEaf7 主要调控禾谷镰刀菌营养生长和细胞壁的发育等过程。

关键词:小麦赤霉病;禾谷镰刀菌;NuA4 复合体;基因表达

中图分类号:S512.1;S435.12

文献标识码:A

文章编号:1009-1041(2025)04-0536-11

Functional Study of the NuA4 Histone Acetyltransferase Complex Subunit FgEaf7 in *Fusarium graminearum*

JIANG Hang¹, MA Ligu¹, QI Kai¹, ZHANG Yueli¹, ZHANG Bo¹,
MA Guoping¹, ZENG Feng², QI Junshan¹

(1. Institution of Plant Protection, Shandong Academy of Agricultural Sciences/Shandong Key Laboratory for Green Prevention and Control of Agricultural Pests, Jinan, Shandong 250100, China; 2. Qihe Agricultural and Rural Bureau, Qihe, Shandong 251100, China)

Abstract: *Fusarium* head blight and *Fusarium* crown rot caused by *Fusarium graminearum* occurs severely in China, posing a threat to national food security. The NuA4 histone acetyltransferase complex regulates various developmental processes in fungi, but the functions of multiple subunits within the NuA4 complex in plant pathogenic fungi are currently unclear. To elucidate the function of Eaf7 subunit in plant pathogenic fungi, this study used *F. graminearum* as a model organism. Through knocking out the *FgEAF7* gene, it was found that the growth rate of the *Fgeaf7* mutant was significantly lower than that of the wild-type strain. However, the deletion of *FgEAF7* gene did not affect conidiation, pathogenicity to wheat, and DON biosynthesis. Additionally, we found that the *Fgeaf7* mutant showed decreased sensitivity to Congo red and SDS, indicating that the deletion of *FgEAF7* gene affects cell wall development. Analysis of the FgEaf7 domain revealed a conserved Eaf7 domain within FgEaf7. Upon deletion of the Eaf7 domain, the *FgEAF7*^{ΔEaf7} mutant exhibited similar defects

收稿日期:2024-06-03 修回日期:2024-09-13

基金项目:国家自然科学基金项目(32102181);山东省自然科学基金项目(ZR2021QC059);山东省现代农业产业技术体系小麦创新团队项目(SDAIT-01-10)

第一作者 E-mail:jhfor724@163.com(江航)

通讯作者 E-mail:qi999@163.com(齐军山)

to the *Fgeaf7* mutant, suggesting that the Eaf7 domain is essential for the full function of FgEaf7. Transcriptomic analysis showed that over 1 800 genes were differentially expressed in the *Fgeaf7* mutant, compared to the wild type, with several genes important for growth and development being downregulated. These findings indicate that FgEaf7 regulates various processes, such as vegetative growth and cell wall development in *F. graminearum*.

Keywords: Fusarium head blight; *F. graminearum*; NuA4 complex; Gene expression

赤霉病和茎基腐病是世界上重要的小麦真菌病害,可导致严重的小麦产量损失^[1]。2012年中国小麦赤霉病大流行,导致小麦减产两百万吨,造成了严重的经济损失^[2]。近年来,小麦赤霉病在中国的大流行频率和发生面积显著增加^[3-4],小麦茎基腐病在黄淮海麦区也发生严重,小麦的产量和品质受到严重影响^[5]。小麦赤霉病由镰刀菌属的多种病原菌单独或复合侵染发病^[6],中国小麦赤霉病的主要病原菌是禾谷镰刀菌(*F. graminearum*),但在多个省份的小麦赤霉病病穗中已分离到假禾谷镰刀菌(*F. pseudograminearum*)^[7-10]。小麦赤霉病在造成小麦减产的同时,还产生 B 型单端孢霉烯族毒素雪腐镰刀菌烯醇(NIV)和脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)及其 3 乙酰(3AcDON)和 15 乙酰(15AcDON)衍生物,这些物质进入食物链后会严重威胁人畜健康^[11]。近年来,由于抗病品种推广面积不足、气候变暖、秸秆还田等耕作制度的变化以及抗药菌株的出现,小麦赤霉病流行呈现加重趋势^[12-15]。目前,小麦赤霉病在长江流域的四川省、湖北省、江苏省、安徽省、浙江省和上海市等地区发生严重,在山东省、河南省、辽宁省、陕西省、甘肃省和云南省等地区也时有发生,呈现西移北扩的趋势。

组蛋白乙酰化与基因的表达关系密切,由组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferases)和组蛋白去乙酰转移酶(histone deacetylases)调控,在细胞中处于动态变化中^[16]。在稻瘟菌(*Magnaporthe oryzae*)中,组蛋白乙酰转移酶基因 *MoSAS3* 和 *MoGCN5* 在营养生长、无性孢子的产生和侵染等过程中具有重要作用^[17]。在玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)中,组蛋白乙酰转移酶基因 *UmGCN5* 的缺失导致其对玉米的致病力严重下降^[18]。在尖孢镰刀菌(*F. oxysporum*)中,*FoGcn5* 调控生长、产孢及其对香蕉树的致病性^[19]。在禾谷镰刀菌中,组蛋白乙酰转移酶基因 *FgGCN5*、*FgRTT109*、*FgSAS2* 和 *FgSAS3* 的缺失导致营养生长减慢和产孢量下降;突变体 *Fggcn5* 和 *Fgsas3*

的致病力降低,DON 的合成量下降,组蛋白 H3 乙酰化水平降低^[20]。这说明组蛋白乙酰转移酶对植物病原真菌的生长和侵染等过程具有重要作用。

大多数组蛋白乙酰转移酶和组蛋白去乙酰转移酶是以复合体的形式发挥作用,比如 NuA3、NuA4、SAGA 等组蛋白乙酰转移酶复合体^[21-24]以及 RPD3S、RPD3L 等组蛋白去乙酰转移酶复合体^[25-26]。NuA4 在真菌、植物和动物中较保守^[27]。在禾谷镰刀菌中,NuA4 的核心亚基 *Fng1* 调控组蛋白 H4 乙酰化以及 DON 和镰刀菌素 A 合成相关基因的表达;*fng1* 突变体在营养生长、菌丝分枝、有性生殖、致病性、侵染垫的形成和侵染菌丝的扩展等方面存在严重缺陷^[28]。目前,除了基因 *FNG1*,有关 NuA4 其他基因在植物病原真菌中的功能尚未见报道。

本研究以禾谷镰刀菌的 NuA4 一个亚基 FgEaf7 为研究对象,在禾谷镰刀菌中构建基因 *FgEAF7* 缺失突变体 *Fgeaf7* 和基因 *FgEAF7* 缺失 Eaf7 结构域突变体 *FgEAF7* Δ^{Eaf7} ,并测定突变体 *Fgeaf7* 和 *FgEAF7* Δ^{Eaf7} 在生长、产孢、对寄主植物的致病力、DON 毒素生物合成过程以及对不同细胞压力和杀菌剂敏感性等方面的表型,并通过转录组测序分析受基因 *FgEAF7* 调控的基因,以明确该基因在禾谷镰刀菌不同生长发育过程中的功能。

1 材料与方法

1.1 禾谷镰刀菌基因 *FgEAF7* 及其结构域的鉴定

在酵母基因组数据库 *Saccharomyces genome database* (SGD) (<https://www.yeastgenome.org/>)中查询并下载 Eaf7 (YNL136W) 的氨基酸序列,与 EnsemblFungi (fungi.ensembl.org/index.html) 中禾谷镰刀菌菌株 PH-1 的基因组数据库进行 blastp 比对分析,获得禾谷镰刀菌的 *EAF7* 基因;下载禾谷镰刀菌 *EAF7* 基因的氨基酸序列,在 SGD 数据库中进行 blastp 比对验证。FgEaf7 蛋白结构域在 Pfam (www.pfam.)

xfam.org) 数据库中进行预测。

1.2 菌株培养

供试菌株为分离自美国密歇根州的禾谷镰刀菌野生型菌株 PH-1 及其突变体^[29]。将供试菌株在 PDA(potato dextrose agar)培养基上 25 °C 黑暗培养 3 d 后,观察菌落形态并测量菌落直径^[30];在 CMC(carboxymethyl cellulose)液体培养基中 25 °C、175 r·min⁻¹ 振荡培养 5 d 后,观察分生孢子的形态并统计其产量^[31]。

1.3 基因 *FgEAF7* 及其 *Eaf7* 结构域缺失突变体的构建

在 EnsemblFungi 数据库中下载基因 *FgEAF7* (FGSG_09792) 的 DNA 序列,利用软件 Premier 5.0 分别设计基因 *FgEAF7* 及该基因结构域 *Eaf7* 的敲除引物(表 1)。通过 split marker 的方法^[32] 构建 *FgEAF7* 的基因敲除载体和 *Eaf7* 结构域敲除载体。以野生型菌株 PH-1 的 DNA 为模板,分别用引物 *FgEAF7*-1F/*FgEAF7*-2R 和 *FgEAF7*-

3F/*FgEAF7*-4R(表 1) 通过 PCR (polymerase chain reaction) 扩增基因 *FgEAF7* 的上游和下游同源重组片段 *FgEAF7*A 和 *FgEAF7*B,利用重叠 PCR 分别用引物 *FgEAF7*-1F/HYG-R 和 HYG-F/*FgEAF7*-4R 将片段 *FgEAF7* A 和 *FgEAF7* B 与基因 *hph* (hygromycin phosphotransferase) 进行连接,并通过 PEG 介导的原生质体转化将连接后的片段转入野生型 PH-1 的原生质体中,用终浓度为 300 μg·mL⁻¹ 的潮霉素 B 筛选转化子,并进行 PCR 验证^[28]。以野生型菌株 PH-1 的 DNA 为模板,分别用引物 *FgEAF7* ED-1F/ Δ *Eaf7*-R、 Δ *Eaf7*-F/*FgEAF7* ED-2R 和 *FgEAF7* ED-3F/*FgEAF7* ED-4R(表 1) 通过 PCR 扩增基因 *FgEAF7* *Eaf7* 结构域缺失的上游和下游同源重组片段 *FgEAF7* ED A1、*FgEAF7* ED A2 和 *FgEAF7* ED B,用上述方法构建 *FgEAF7* 的 *Eaf7* 结构域缺失突变体,并对结构域缺失部分进行测序验证。

表 1 本研究中使用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列(5'-3') Sequences (5'-3')
<i>FgEAF7</i> -1F	GTCTTGTGTTCCGGTGGATTCTC
<i>FgEAF7</i> -2R	TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCGGAACAGTATTTGTTGTCTTCTGAG
<i>FgEAF7</i> -3F	GAATAGAGTAGATGCCGACCGGGTTGAGAGCGGAACACAAGTGTCCAA
<i>FgEAF7</i> -4R	AAGAAGAGCCACCAAGTAACGAC
<i>FgEAF7</i> -5F	GCTTCGATCCAGATTTATACC
<i>FgEAF7</i> -6R	ATGAACCGTCACTTTCCTCCT
<i>FgEAF7</i> -7F	TGTCTTCCTGTTGGTGTGC
<i>FgEAF7</i> -8R	ATTTCCACTCCTTAGCGGTCT
HYG-F	GGCTTGGCTGGAGCTAGTGGAGGTCAA
HY-R	GTATTGACCGATTCTTGCGGTCCGAA
HYG-R	AACCCGCGGTCCGCATCTACTCTATTC
YG-F	GATGTAGGAGGGCGTGGATATGTCCT
H855-R	GCTGATCTGACCAGTTGC
H856-F	GTCGATGCGACGCAATCGT
H850	TTCCTCCCTTTATTTTCAGATTCAA
H852	ATGTTGGCGACCTCGTATTGG
<i>FgEAF7</i> ED-1F	GTCTTGTGTTCCGGTGGATTCTC
Δ <i>Eaf7</i> -R	GCGCTCCATCATCGCGTCGAATACCTGGTTCGTCCTCCGTTCCAAAGGT
Δ <i>Eaf7</i> -F	ACCTTTGGACGCGACACCAGGTATTTCGACGCGATGATGGAGCGC
<i>FgEAF7</i> ED-2R	TTGACCTCCACTAGCTCCAGCCAAGCCCAATACGAATAACGCACATGTTTCCC
<i>FgEAF7</i> ED-3F	GAATAGAGTAGATGCCGACCGGGTTAATATATATCCAAGCCTCCTGGTGAG
<i>FgEAF7</i> ED-4R	TTCGTCTATTCTAGCGAGAAGT
<i>FgEAF7</i> ED-5F	GAAGAGAGCGGAACACAAGT
<i>FgEAF7</i> ED-6R	GAATGGGAGCAGGAATAAAG
<i>FgEAF7</i> ED-7F	TGTCTTCCTGTTGGTGTGC
<i>FgEAF7</i> ED-8R	GGACTATTCAACCTCCATAC
<i>FgEAF7</i> N-F	AGGGAACAAAAGCTGGGTACCAACACAGCAGCAGGGTCTTCTTG
<i>FgEAF7</i> G-R	GCCCTTGCTCACCATTAAGCTTACGTCTCCTTTTGGTTCGCGCCT

1.4 Fgeaf7 突变体互补菌株的构建

以野生型菌株 PH-1 的 DNA 为模板,用引物 FgEAF7 N-F/FgEAF7 G-R 通过 PCR 扩增包含启动子区域的 FgEAF7 全长基因片段;用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切载体 pKNT-GFP (载体序列中包含一个氨苄青霉素抗性基因和遗传霉素抗性基因,用于构建突变体互补菌株),用一步克隆试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)将酶切后的载体和 FgEAF7 全长基因片段进行连接,利用 1.3 中描述的原生质体转化方法将连接后的载体转入 Fgeaf7 突变体的原生质体中,用终浓度为 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的遗传霉素筛选转化子,对具有遗传霉素抗性的转化子进行 PCR 验证,得到互补菌株 Fgeaf7/FgEAF7。

1.5 菌株致病性测定

以济麦 22 幼苗为材料,将待测菌株的菌饼接种至小麦幼苗的茎基部,于接种后第 7 天调查小麦幼苗茎基部发病情况并拍照^[8]。在济麦 22 扬花期,将待测菌株分生孢子悬浮液的浓度调至 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,利用单花滴注法将待测菌株 $10 \mu\text{L}$ 分生孢子悬浮液接种至自下向上第 3 个小穗中,接种后喷水套袋保湿 48 h,于接种后第 14 天调查小麦穗部发病情况并拍照^[33];成熟期收集接种点小穗籽粒用于 DON 含量的测定^[34]。在田间采集玉米品种郑单 958 的幼嫩须,将待测菌株的菌饼接种至玉米须形态学上端,在培养皿中保湿培养,于接种后第 7 天调查玉米须发病情况并拍照^[35]。

1.6 对细胞压力和杀菌剂的敏感性测定

将刚果红、NaCl、SDS(十二烷基磺酸钠)、多菌灵、咯菌腈、氰烯菌酯和戊唑醇加入 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右的 PDA 培养基中,使其终浓度分别为 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 0.02% 、 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,对照为加相应量溶剂的平板。将菌株 PH-1 预培养 3 d,在菌落边缘打取直径 5 mm 菌饼,分别接种至上述培养基平板中央,每处理 3 个重复。于 $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中黑暗培养 3 d,待对照菌落长至平板边缘时,以十字交叉法测量菌落直径。其中,刚果红和 SDS 模拟细胞壁胁迫,NaCl 模拟渗透压胁迫。

1.7 转录组测序分析

将野生型菌株 PH-1 和突变体 Fgeaf7 的分生孢子接种至 YEPD (yeast extract peptone dextrose) 液体培养基中, $25 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $175 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 振荡培养,24 h 后收集菌丝,吸干菌丝表面的水份,立即

放入液氮中。将样品送至北京诺禾致源科技股份有限公司利用 Illumina HiSeq 2500 进行转录组测序($2 \times 150 \text{ bp}$),每个菌株重复两次。利用软件 salmon 将 RNA-seq 数据比对到野生型菌株 PH-1 的参考基因组上^[36],用 edgeRun 包分析突变体的差异表达基因^[37], $|\log_2 \text{FC}(\text{fold change})|$ 大于 1、FDR(false discovery rate) 小于 0.05 的为差异表达基因。利用软件 Blast2GO 对差异表达基因进行 GO 功能富集分析^[38]。本研究使用的 RNA-seq 数据已存储在 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 的 SRA(sequence read archive) 数据库中,登录号为 PRJNA1119246。

2 结果与分析

2.1 禾谷镰刀菌中基因 FgEAF7 的鉴定

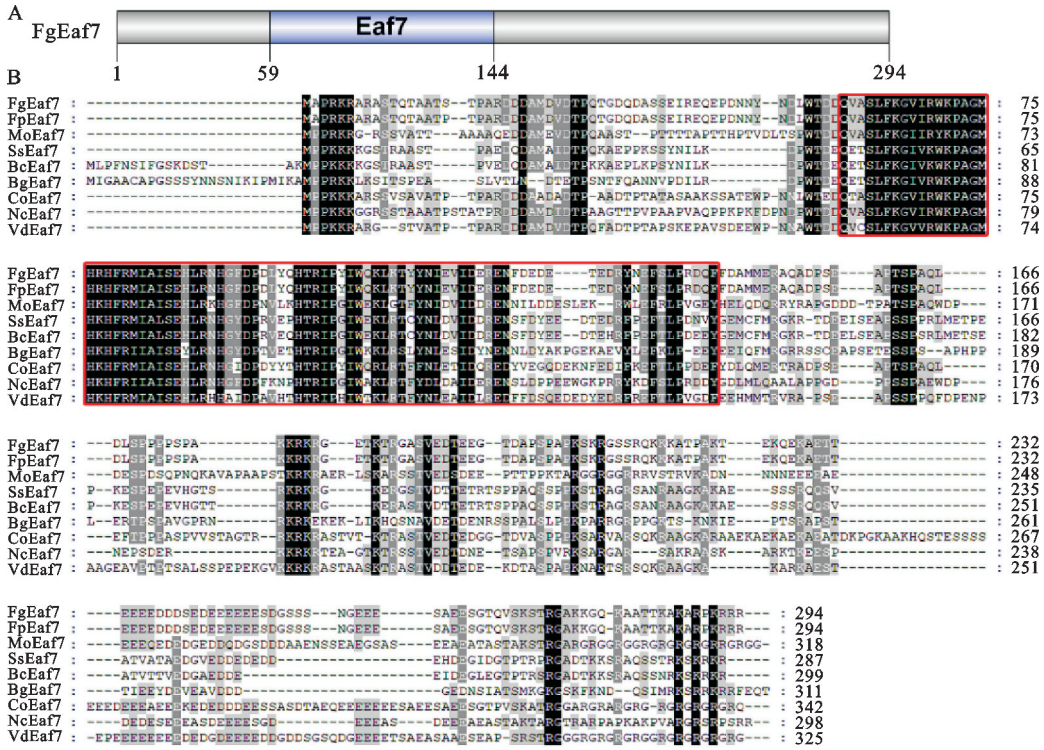
通过比对分析,在禾谷镰刀菌中鉴定出乙酰转移酶复合体 NuA4 亚基 Eaf7 的相应基因为 FGSG_09792,将该基因命名为 FgEAF7。FgEaf7 共编码 294 个氨基酸,分子量为 33 kDa。将其氨基酸序列在 Pfam 数据库中进行结构域预测,发现 FgEaf7 中含有一个保守的 Eaf7 结构域(图 1A)。

为明确 FgEaf7 的序列保守性和进化情况,在 EnsemblFungi 网站分别下载假禾谷镰刀菌 (*F. pseudograminearum*)、稻瘟病菌 (*M. oryzae*)、核盘菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*)、灰霉病菌 (*Botrytis cinerea*)、小麦白粉病菌 (*Blumeria graminis*)、炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) 和大丽轮枝菌 (*Verticillium dahliae*) 等物种的 FgEaf7 蛋白,比对分析发现,Eaf7 结构域具有很高保守性(图 1B)。

2.2 Fgeaf7 突变体的营养生长和产孢量表型测定

为明确禾谷镰刀菌中基因 FgEAF7 的功能,我们利用 split-marker 的方法敲除基因 FgEAF7 (图 2A),用 4 对引物对所有具有潮霉素抗性的转化子 DNA 进行 PCR 检测,最终得到 FgEAF7 基因缺失突变体(图 2B)。

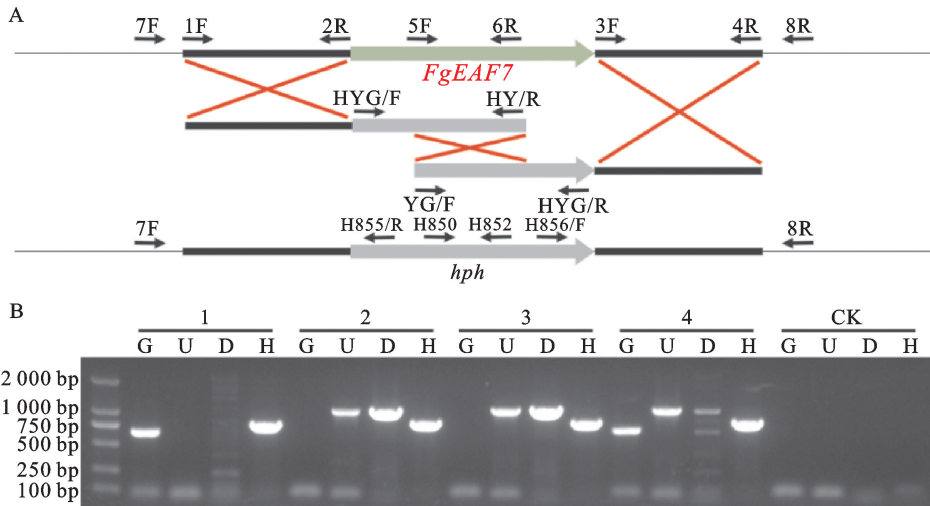
将野生型和突变体菌株接种至 PDA 培养基中,培养 3 d 后,与野生型相比,突变体的生长速率显著降低(图 3A 和 B)。将突变体在 CMC 液体培养基中摇培,发现突变体的产孢量与野生型相比无显著性差异(图 3C)。对分生孢子的长度进行测量,发现突变体分生孢子的大小与野生型相比也无显著性差异(图 3D)。研究表明,基因 FgEAF7 调控禾谷镰刀菌的营养生长,但不影响孢子发育过程。



红色长方形中的序列是保守的 Eaf7 结构域。

Sequences within the red rectangle is the conserved Eaf7 domains.

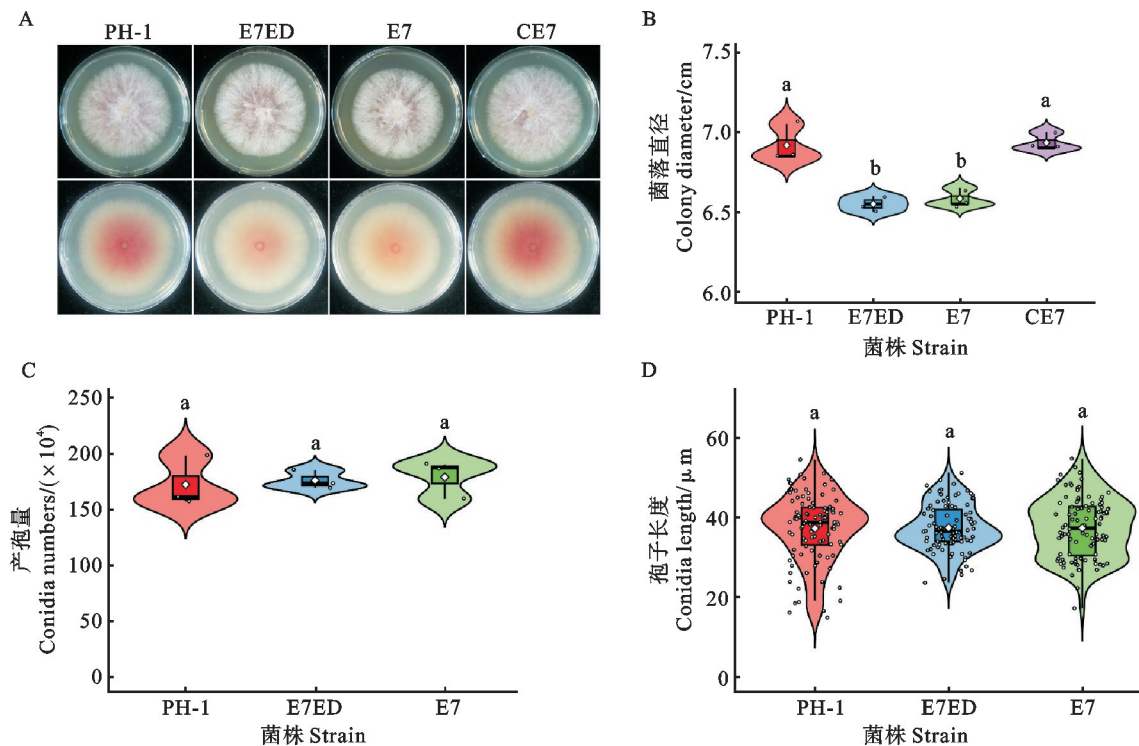
图 1 禾谷镰刀菌 FgEaf7 结构域 (A) 及其与其他真菌中同源蛋白氨基酸序列 (B) 分析
Fig. 1 Analysis of the FgEaf7 domain in *F. graminearum* (A) and alignment of amino acid sequences of homologous proteins in other fungi (B)



A: 构建 FgEAF7 基因敲除突变体的引物示意图; 目标基因 FgEAF7 和潮霉素磷酸转移酶基因 (hph) 分别用绿色和灰色箭头标记; 敲除突变体通过三次同源重组构建。B: FgEAF7 基因缺失突变株 PCR 验证, 泳道 G、U、D 和 H 分别代表引物对 FgEAF7-5F/FgEAF7-6R、FgEAF7-7F/H855-R、H856-F/FgEAF7-8R 和 H850/H852 扩增产物。

A: Schematic image of the primers used to generate FgEAF7 gene replacement constructs. The target gene FgEAF7 and hygromycin phosphotransferase (hph) cassette are marked with green and gray arrows, respectively. Knockout mutants were generated by three homologous recombination events. B: The FgEAF7 gene replacement mutant strains were verified by PCR with primer pairs FgEAF7-5F/FgEAF7-6R (lane G), FgEAF7-7F/H855-R (lane U), H856-F/FgEAF7-8R (lane D), and H850/H852 (lane H).

图 2 基因 FgEAF7 的敲除及验证
Fig. 2 Knockout and verification of the FgEAF7 gene



PH-1:野生型;E7ED:*FgEAF7* Δ *Eaf7* 突变体;E7:*Fgeaf7* 突变体;CE7:*Fgeaf7*/*FgEAF7* 互补菌株。

A: 菌株 PH-1、E7ED、E7 和 CE7 在 PDA 上培养 3 d 的生长情况;B: 菌株 PH-1、E7ED 和 E7 在 PDA 培养基中培养 3 d 的菌落直径;C: 菌株 PH-1、E7ED 和 E7 在 CMC 培养基中培养 3 d 的产孢量;D: 菌株 PH-1、E7ED 和 E7 在 CMC 培养基中培养 3 d 的分生孢子长度。图 B、C、D 中不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

PH-1: Wild type strain; E7ED: *FgEAF7* Δ *Eaf7* mutant; E7: *Fgeaf7* mutant; CE7: *Fgeaf7*/*FgEAF7* complementary strain.

A: Three-day-old PDA cultures of PH-1, E7ED, E7 and CE7 strains; B: Colony diameters of PH-1, E7ED, and E7 strains after 3 days of culture on PDA cultures; C: Conidia numbers harvested from 3-day-old CMC cultures of PH-1, E7ED and E7 strains; D: Conidia length harvested from 3-day-old CMC cultures of PH-1, E7ED, and E7 strains. Different letters indicate significant differences with Duncan's pair-wise comparison ($P < 0.05$) in B, C and D. The same in figure 4.

图 3 *Fgeaf7* 和 *FgEAF7* Δ *Eaf7* 突变体的营养生长和产孢量

Fig. 3 Situation of growth and conidiation in *Fgeaf7* and *FgEAF7* Δ *Eaf7* mutants

2.3 基因 *FgEAF7* 在禾谷镰刀菌侵染寄主中的功能

对野生型及其突变体菌株进行致病力测定发现,突变体对小麦幼苗茎基部的致病力与野生型相比无显著性差异(图 4A 和 B);对小麦穗部的致病力与野生型也无显著性差异(图 4C 和 D)。测定小麦穗部接种点单籽粒 DON 毒素含量结果表明,突变体合成 DON 的能力不存在缺陷(图 4E)。将野生型及其突变体菌株接种至玉米须上,发现突变体 *Fgeaf7* 对玉米须的致病力与野生型相比显著降低(图 4F 和 G)。说明 *FgEAF7* 基因的缺失可导致禾谷镰刀菌对玉米须的致病力降低,但不影响对小麦的致病力和 DON 毒素的合成。

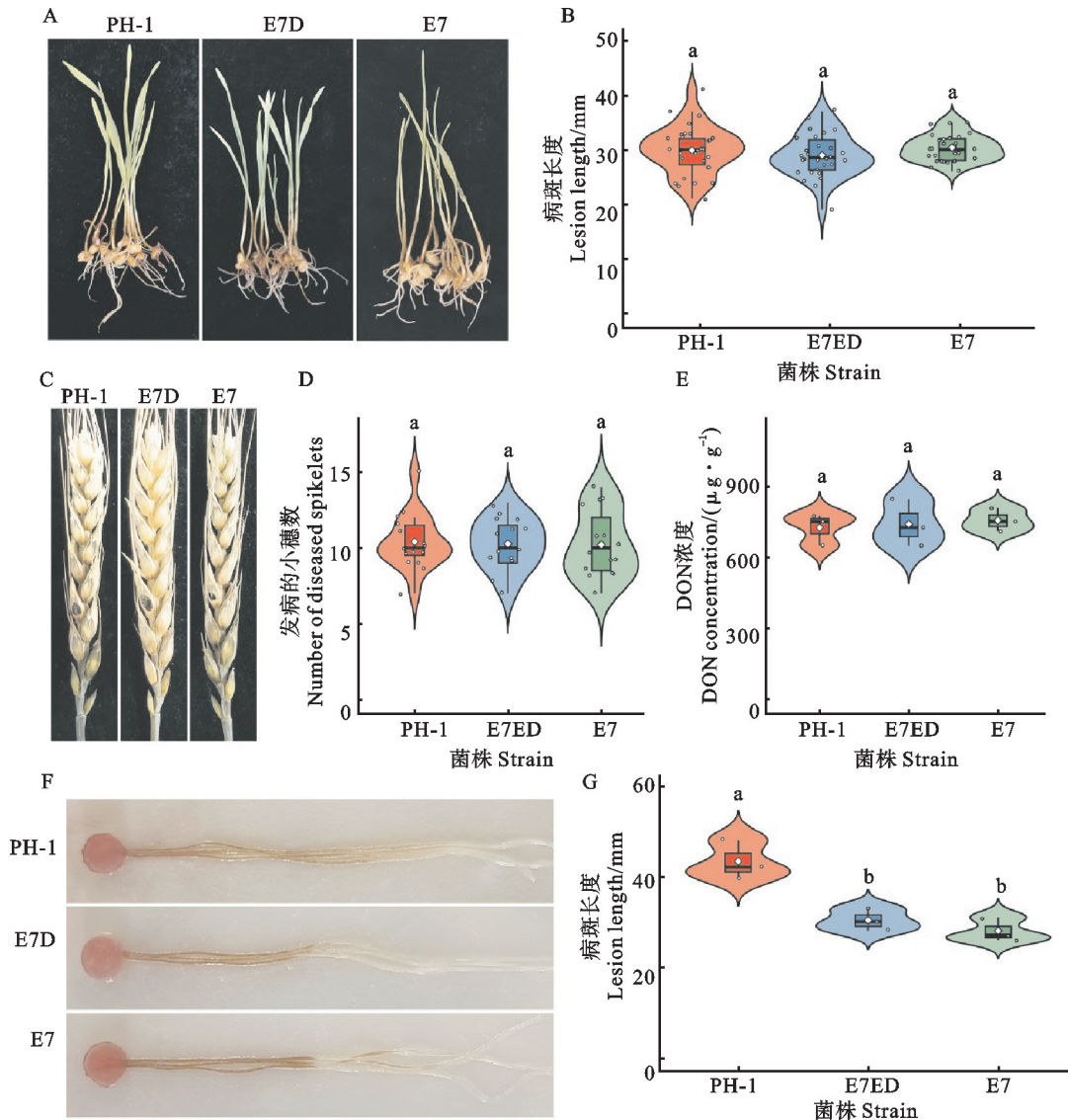
2.4 *Fgeaf7* 突变体对不同细胞压力和杀菌剂的敏感性

将野生型和突变体 *Fgeaf7* 接种至含 $300 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 刚果红、 $1.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl、0.02% SDS、 $0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 多菌灵、 $0.08 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 咯菌腈、

$0.25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 氰烯菌酯和 $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 戊唑醇的 PDA 培养基培养 3 d 的生长状态如图 5A, 计算不同处理菌株的菌丝生长抑制率,发现 *Fgeaf7* 突变体对刚果红、NaCl、多菌灵、咯菌腈、氰烯菌酯和戊唑醇的敏感性与野生型相比无显著性差异(图 5B),对 SDS 的敏感性显著低于野生型(图 5B)。推测 *Fgeaf7* 突变体对细胞壁胁迫的敏感性降低。

2.5 Eaf7 结构域对 FgEaf7 功能的影响

FgEaf7 中包含一个保守的 Eaf7 结构域,利用 split-marker 的方法敲除野生型菌株 PH-1 的 Eaf7 结构域(图 6A),并经测序验证,得到 *FgEAF7* Δ *Eaf7* 结构域缺失突变体(图 6B)。对 *FgEAF7* Δ *Eaf7* 突变体的生长、产孢、致病性和对不同压力及杀菌剂的敏感性等表型进行测定,发现其表型与突变体 *Fgeaf7* 的表型无显著性差异(图 3~图 5)。因此,结构域 Eaf7 对于禾谷镰刀菌 *FgEaf7* 发挥完整的功能是必需的。



A: 菌株 PH-1、E7ED 和 E7 接种小麦幼苗第 7 天图; B: 菌株 PH-1、E7ED 和 E7 接种引起的小麦幼苗茎部病斑长度; C: 菌株 PH-1、E7ED 和 E7 扬花期接种小麦穗后第 14 天图; D: 菌株 PH-1、E7ED 和 E7 接种小麦穗后的病穗数; E: 菌株 PH-1、E7ED 和 E7 接种点单籽粒中 DON 毒素含量; F: 菌株 PH-1、E7ED 和 E7 接种玉米须后第 7 天图; G: 菌株 PH-1、E7ED 和 E7 接种引起的碎米须病斑长度。

A: Wheat seedlings inoculated with PH-1, E7ED, and E7 strains were photographed at 7 dpi; B: The lesion size on wheat seedling stems caused by PH-1, E7ED, and E7 strains; C: Flowering wheat spikes inoculated with PH-1, E7ED, and E7 strains were photographed at 14 dpi; D: The number of diseased spikelets caused by PH-1, E7ED, and E7 strains; E: DON levels in diseased wheat spikelets inoculated with PH-1, E7ED, and E7 strains; F: Corn silks were inoculated with culture blocks of PH-1, E7ED, and E7 strains and examined at 7 dpi; G: Lesion size on corn silks caused by PH-1, E7ED, and E7 strains.

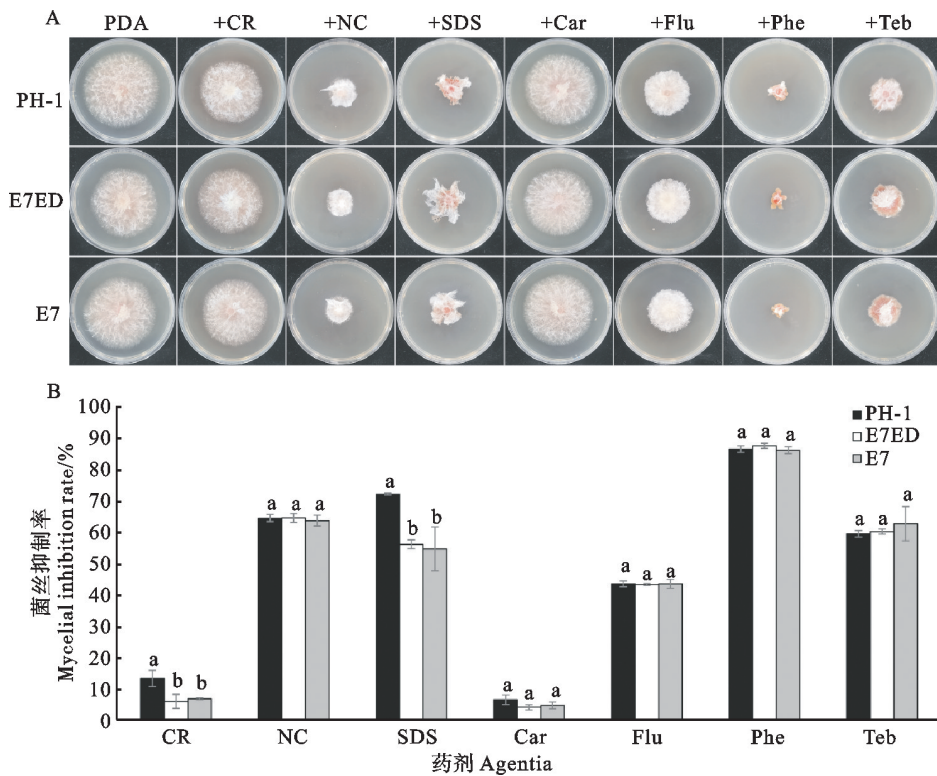
图 4 *Fgeaf7* 和 *FgEAF7* $\Delta Eaf7$ 突变体对植物的致病力

Fig. 4 Pathogenicity of *Fgeaf7* and *FgEAF7* $\Delta Eaf7$ mutants on plants

2.6 *FgEaf7* 在基因转录过程中的作用

转录组测序结果表明,与野生型相比,*Fgeaf7* 中分别有 1 157 和 693 个上调和下调差异表达基因。对差异表达基因进行 GO 功能富集分析,发现上调基因主要富集到孢子形成、细胞发育与分化和细胞壁生物合成等过程(图 7A),下调基因主要富集到氨基酸的生物合成与代谢过程、小分子物质的生物合成与代谢过程、转氨酶活性和有机酸的生物合成与代谢等过程(图 7B)。一些与生长

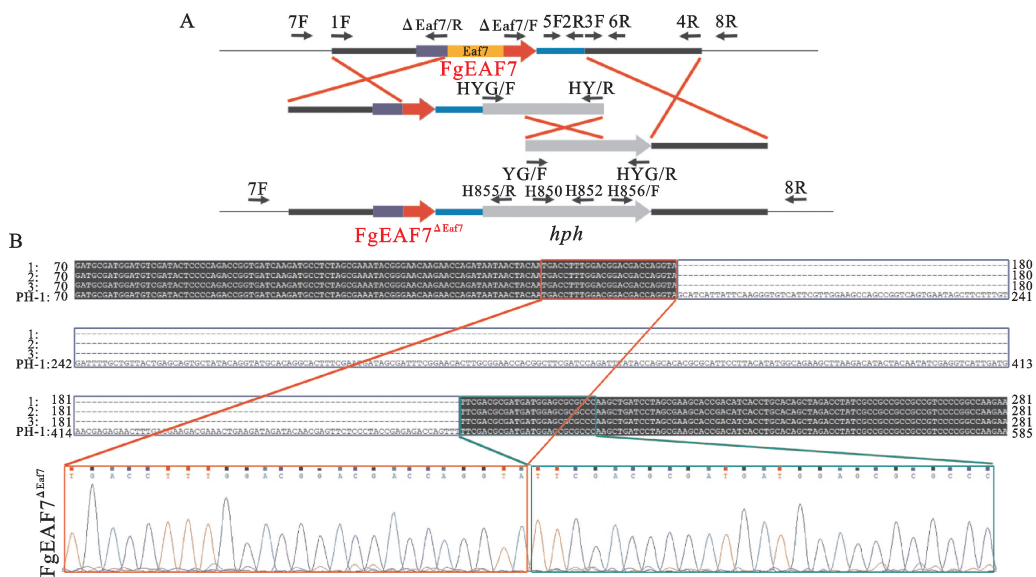
密切相关的基因在*Fgeaf7* 突变体中下调表达,比如 FGSG_00296 (*FgILV1*)、FGSG_02056 (*FgILV3A*)、FGSG_10118 (*FgILV5*)、FGSG_01092 (*FgRRD2*)、FGSG_06963 (*FgTIP41*) 和 FGSG_04220 (*Fg-SWI6*);此外,还有一些敲除致死的基因 FGSG_01137 (*FgMPS1*)、FGSG_01271 (*FgCDC5*)、和 FGSG_09408 (*FgKIN3*) 也在*Fgeaf7* 突变体中下调表达。这些基因的下调表达可能与*Fgeaf7* 突变体的生长缺陷相关。



A: 菌株 PH-1、E7ED 和 E7 在含有刚果红、NaCl、SDS、多菌灵、咯菌腈、氟烯菌酯和戊唑醇的 PDA 培养基上培养 3 d 的生长情况；B: 在含有刚果红、NaCl、SDS、多菌灵、咯菌腈、氟烯菌酯和戊唑醇的 PDA 培养基上，菌株 PH-1、E7ED 和 E7 菌丝抑制率。图柱上不同字母表示菌株之间差异在 0.05 水平上显著。

A: Three-day-old cultures of PH-1, E7ED, and E7 strains grown on regular PDA supplemented with congo red(CR), NaCl(NC), SDS tebuconazole(Teb), fludioxonil(Flu), phenamacril(Phe), and carbendazim(Car); B: The percentage of mycelial growth inhibition of PH-1, E7ED, and E7 strains in PDA cultures with CR, NC, SDS, Car, Flu, Phe, and Teb compared to that in PDA cultures without stresses. Different letters on the columns indicate significant difference among different strains at 0.05 level.

图 5 *FgEaf7* 和 *FgEAF7* Δ_{Eaf7} 突变体对不同细胞压力和杀菌剂的敏感性
Fig. 5 Sensitivity of the *FgEaf7* and *FgEAF7* Δ_{Eaf7} mutants to different cellular stresses and fungicides



A: 构建 *FgEAF7* Δ_{Eaf7} 突变体的引物示意图；Eaf7 结构域和潮霉素磷酸转移酶基因分别用橙色和灰色箭头标记；敲除结构域突变体通过三次同源重组构建。B: 通过测序分析比较野生型和 *FgEAF7* Δ_{Eaf7} 突变体，确定 Eaf7 结构域的缺失；红色和绿色方框表示 Eaf7 结构域上游和下游的 DNA 序列，蓝色方框表示编码 Eaf7 结构域的 DNA 序列。

A: Schematic representation of primer design for generating *FgEAF7* Δ_{Eaf7} mutation constructs. The Eaf7 domain and hygromycin phosphotransferase cassette are marked with orange and gray arrows, respectively. Knockout of domain deletion mutants were generated by three homologous recombination events. B: Sequencing analysis was performed to identify deletion of Eaf7 in *FgEAF7* Δ_{Eaf7} mutants compared to the wild type. The red and green boxes represent the upstream and downstream DNA sequences of the Eaf7 domain, respectively, while the blue box represents the DNA sequence encoding the Eaf7 domain.

图 6 基因 *FgEAF7* 的 Eaf7 结构域敲除及验证
Fig. 6 Knockout and verification of the Eaf7 domain of gene *FgEAF7*

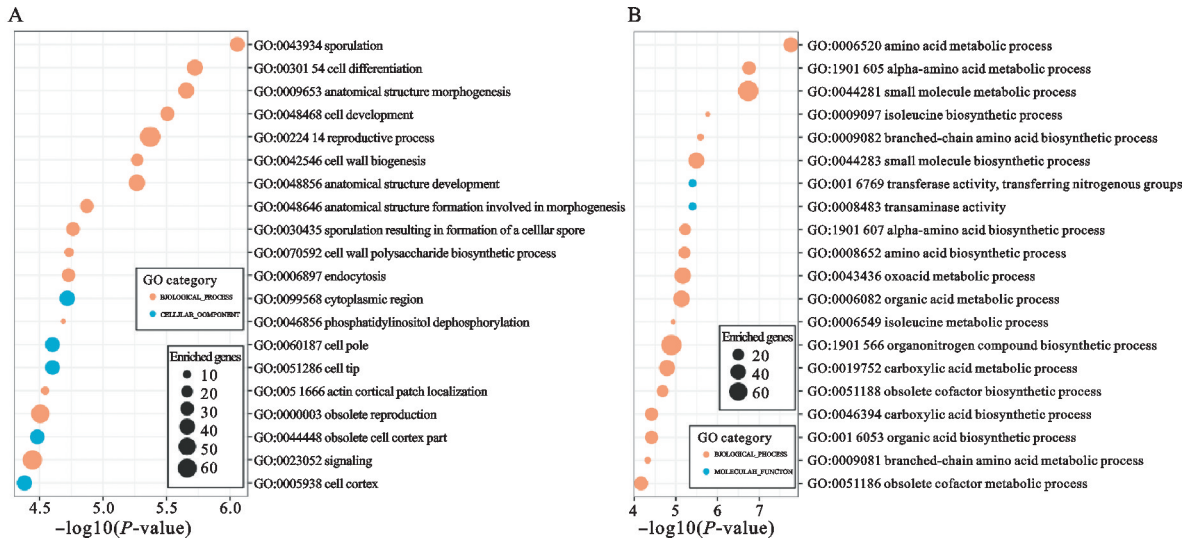


图 7 *Fgef7* 突变体中上调基因(A)和下调基因(B)的GO富集分析

Fig. 7 GO enrichment analysis of the upregulated genes(A) and downregulated genes(B) in *Fgef7* mutant

3 讨论

研究发现,在酿酒酵母中,乙酰转移酶复合体 NuA4 由 Act1、Arp4、Eaf1、Eaf3、Eaf5、Eaf6、Eaf7、Epl1、Esa1、Swc4、Tra1、Yaf9 和 Yng2 共 13 个亚基组成^[39]。酿酒酵母 *eaf7* 突变体在富营养培养基中能够正常生长,但对温度较野生型敏感,在甲磺酸甲酯、雷帕霉素和甲酰胺存在的情况下生长出现明显缺陷^[40-41]。在禾谷镰刀菌中,敲除酿酒酵母中 *YNG2* 的同源基因 *FNG1*, *fng1* 突变体的生长速率相较于野生型降低 90%,失去了产生分生孢子的能力^[28]。本研究敲除禾谷镰刀菌的基因 *FgEAF7* 后,其突变体的生长速率下降了 5.3%,对刚果红和 SDS 的敏感性下降;但并未对分生孢子的产生、致病力以及 DON 毒素的生物合成产生显著影响。这些结果表明, *FgEAF7* 基因可能主要参与调控禾谷镰刀菌的营养生长和细胞壁发育过程。突变体 *Fgef7* 对小麦穗部和茎基部的致病力与野生型无显著性差异,但对玉米须的致病力显著低于野生型。这可能与寄主和接种方式不同有关。

对 *FgEaf7* 的氨基酸序列分析发现, *FgEaf7* 中存在一个 *Eaf7* 结构域,该结构域在真菌中保守存在。本研究对 *FgEaf7* 的 *Eaf7* 结构域进行敲除,发现 *FgEAF7* Δ^{Eaf7} 突变体的表型与 *Fgef7* 突变体相似,表明 *Eaf7* 结构域是该基因功能不可或缺的组成部分。转录组分析显示, *FgEAF7* 的缺失导致大量基因差异表达,在下调表达的基因中,

包括 3 个必需的蛋白激酶 *FgMPS1*、*FgCDC5* 和 *FgKIN3* ^[42];对生长、产孢、DON 毒素生物合成和侵染非常重要的苏氨酸脱氢酶 *FgILV1* ^[43]、二羧酸脱氢酶 *FgILV3a* ^[44] 以及酮酸还原异构酶 *FgILV5* ^[45] 也都在 *Fgef7* 突变体中下调表达;此外,下调表达基因 2A 型磷酸酶激活子 *FgRRD2* 和 *FgTIP41* ^[46,47] 以及转录辅因子 *FgSWI6* ^[48] 在生长和侵染过程都具有关键作用。由于基因 *FgEAF7* 对许多关键基因表达有重要作用,这可能是导致 *Fgef7* 突变体在生长等过程出现缺陷的原因。综上所述,禾谷镰刀菌中 NuA4 组蛋白乙酰转移酶复合体的 *FgEaf7* 亚基对其生长和细胞壁形成有调控作用, *Eaf7* 结构域是其功能必要组成部分。这些发现为进一步研究植物病原真菌的发病机制和病害防控提供了理论基础。

参考文献:

[1]夏腾飞,熊子君.小麦赤霉病及其防治策略概况与展望[J].分子植物育种,2021,19(19):6460.
XIA T F, XIONG Z J. Overview and perspective on Fusarium head blight in wheat and its control strategies [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2021, 19(19): 6460.

[2]刘万才,刘振东,黄冲,等.近 10 年农作物主要病虫害发生危害情况的统计和分析[J].植物保护,2016,42(5):1.
LIU W C, LIU Z D, HUANG C, et al. Statistics and analysis of crop yield losses caused by main diseases and insect pests in recent 10 years [J]. *Plant Protection*, 2016, 42(5): 1.

[3]黄冲,姜玉英,吴佳文,等.2018 年我国小麦赤霉病重发特点及原因分析[J].植物保护,2019,45(2):160.
HUANG C, JIANG Y Y, WU J W, et al. Occurrence characteristics and reason analysis of wheat head blight in 2018 in

- China [J]. *Plant Protection*, 2019, 45(2):160.
- [4] MA H, ZHANG X, YAO J, *et al.* Breeding for the resistance to *Fusarium* head blight of wheat in China [J]. *Frontiers of Agricultural Science and Engineering*, 2019, 6(3):251.
- [5] SCUDAMORE K. Fate of *Fusarium* mycotoxins in the cereal industry: Recent UK studies [J]. *World Mycotoxin Journal*, 2008, 1(3):315.
- [6] PARRY D W, JENKINSON P, MCLEOD L. *Fusarium* ear blight(scab) in small grain cereals—A review [J]. *Plant Pathology*, 1995, 44(2):207.
- [7] 闫书味, 白尼玛, 潘鑫, 等. 2022年河南省小麦茎基腐病和赤霉病病原种群分离鉴定[J]. 麦类作物学报, 2024, 44(5):667. YAN S W, BAI N M, PAN X, *et al.* Separation and identification pathogen populations of *Fusarium* crown rot and *Fusarium* head blight in Henan province in 2022 [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2024, 44(5):667.
- [8] 江航, 祁凯, 马立国, 等. 小麦茎基腐病病原假禾谷镰刀菌与赤霉病之间的关系[J]. 麦类作物学报, 2022, 42(11):1429. JIANG H, QI K, MA L G, *et al.* Relationship between *Fusarium pseudograminearum* causal agent of *Fusarium* crown rot and wheat scab [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2022, 42(11):1429.
- [9] XU F, SONG Y L, YANG G Q, *et al.* First report of *Fusarium pseudograminearum* from wheat heads with *Fusarium* head blight in north China plain [J]. *Plant Disease*, 2015, 99(1):156.
- [10] JI L, KONG L, LI Q, *et al.* First report of *Fusarium pseudograminearum* causing *Fusarium* head blight of wheat in Hebei Province, China [J]. *Plant Disease*, 2016, 100(1):220.
- [11] MA Z, XIE Q, LI G, *et al.* Germplasm, genetics and genomics for better control of disastrous wheat *Fusarium* head blight [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2020, 133(5):1541.
- [12] 陈云, 王建强, 杨荣明, 等. 小麦赤霉病发生危害形势及防控对策[J]. 植物保护, 2017, 43(5):11. CHEN Y, WANG J Q, YANG R M, *et al.* Current situation and management strategies of *Fusarium* head blight in China [J]. *Plant Protection*, 2017, 43(5):11.
- [13] MESTERHAZY A. What is *Fusarium* head blight(FHB) resistance and what are its food safety risks in wheat? Problems and solutions—A review [J]. *Toxins*, 2024, 16(1):31.
- [14] ZHOU F, HAN A, JIAO Y, *et al.* Exploring the potential mechanism of prothioconazole resistance in *Fusarium graminearum* in China [J]. *Journal of Fungi*, 2023, 9(10):1001.
- [15] ALISAAC E, MAHLEIN A K. *Fusarium* head blight on wheat: Biology, modern detection and diagnosis and integrated disease management [J]. *Toxins*, 2023, 15(3):192.
- [16] JIANG H, YUAN L, MA L, *et al.* Histone H3 N-terminal lysine acetylation governs fungal growth, conidiation, and pathogenicity through regulating gene expression in *Fusarium pseudograminearum* [J]. *Journal of Fungi*, 2024, 10(6):379.
- [17] DUBEY A, LEE J, KWON S, *et al.* A MYST family histone acetyltransferase, MoSAS3, is required for development and pathogenicity in the rice blast fungus [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2019, 20(11):1491.
- [18] GONZÁLEZ-PRIETO J M, ROSAS-QUIJANO R, DOMÍNGUEZ A, *et al.* The *UmGcn5* gene encoding histone acetyltransferase from *Ustilago maydis* is involved in dimorphism and virulence [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2014, 71:86.
- [19] LIU J, AN B, LUO H, *et al.* The histone acetyltransferase FocGCN5 regulates growth, conidiation, and pathogenicity of the banana wilt disease causal agent *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 [J]. *Research in Microbiology*, 2022, 173(3):103902.
- [20] KONG X, VAN DIEPENINGEN A D, VAN DER LEE T A J, *et al.* The *Fusarium graminearum* histone acetyltransferases are important for morphogenesis, DON biosynthesis, and pathogenicity [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2018, 9:654.
- [21] PAPAI G, FRECHARD A, KOLESNIKOVA O, *et al.* Structure of SAGA and mechanism of TBP deposition on gene promoters [J]. *Nature*, 2020, 577(7792):711.
- [22] WANG H, DIENEMANN C, STÜTZER A, *et al.* Structure of the transcription coactivator SAGA [J]. *Nature*, 2020, 577(7792):717.
- [23] XU H, YE M, XIA A, *et al.* The Fng3 ING protein regulates H3 acetylation and H4 deacetylation by interacting with two distinct histone-modifying complexes [J]. *New Phytologist*, 2022, 235(6):2350.
- [24] QU K, CHEN K, WANG H, *et al.* Structure of the NuA4 acetyltransferase complex bound to the nucleosome [J]. *Nature*, 2022, 610(7932):569.
- [25] DONG S, LI H, WANG M, *et al.* Structural basis of nucleosome deacetylation and DNA linker tightening by Rpd3S histone deacetylase complex [J]. *Cell Research*, 2023, 33(10):790.
- [26] PATEL A B, QING J, TAM K H, *et al.* Cryo-EM structure of the *Saccharomyces cerevisiae* Rpd3L histone deacetylase complex [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1):3061.
- [27] SMITH, E R, EISEN A, GU W, *et al.* ESA1 is a histone acetyltransferase that is essential for growth in yeast [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(7):3564.
- [28] JIANG H, XIA A, YE M, *et al.* Opposing functions of Fng1 and the Rpd3 HDAC complex in H4 acetylation in *Fusarium graminearum* [J]. *PLoS Genetics*, 2020, 16(11):e1009185.
- [29] CUOMO C A, GÜLDENER U, XU J R, *et al.* The *Fusarium graminearum* genome reveals a link between localized polymorphism and pathogen specialization [J]. *Science*, 2007, 317(5843):1400.
- [30] JIANG C, CAO S, WANG Z, *et al.* An expanded subfamily

- of G-protein-coupled receptor genes in *Fusarium graminearum* required for wheat infection [J]. *Nature Microbiology*, 2019, 4(9):1582.
- [31]JIANG C, ZHANG C, WU C, *et al.* TRI6 and TRI10 play different roles in the regulation of deoxynivalenol (DON) production by cAMP signalling in *Fusarium graminearum* [J]. *Environmental Microbiology*, 2016, 18(11):3689.
- [32]LI C, ZHANG Y, WANG H, *et al.* The PKR regulatory subunit of protein kinase A (PKA) is involved in the regulation of growth, sexual and asexual development, and pathogenesis in *Fusarium graminearum* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(4):918.
- [33]JIANG C, HEI R, YANG Y, *et al.* An orphan protein of *Fusarium graminearum* modulates host immunity by mediating proteasomal degradation of TaSnRK1 α [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1):4382.
- [34]YIN T, ZHANG Q, WANG J, *et al.* The cyclase-associated protein FgCap1 has both protein kinase A-dependent and-independent functions during deoxynivalenol production and plant infection in *Fusarium graminearum* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2018, 19(3):552.
- [35]LIU H, ZHANG S, MA J, *et al.* Two Cdc2 kinase genes with distinct functions in vegetative and infectious hyphae in *Fusarium graminearum* [J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(6):e1004913.
- [36]PATRO R, DUGGAL G, LOVE M I, *et al.* Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression [J]. *Nature Methods*, 2017, 14(4):417.
- [37]DIMONT E, SHI J, KIRCHNER R, *et al.* edgeRun: An R package for sensitive, functionally relevant differential expression discovery using an unconditional exact test [J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(15):2589.
- [38]CONESA A, GÖTZ S, GARCÍA-GÓMEZ J M, *et al.* Blast2GO: A universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(18):3674.
- [39]WANG X, AHMAD S, ZHANG Z, *et al.* Architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* NuA4/TIP60 complex [J]. *Nature Communications*, 2018, 9(1):1147.
- [40]ROSSETTO D, CRAMET M, WANG A Y, *et al.* Eaf5/7/3 form a functionally independent NuA4 submodule linked to RNA polymerase II-coupled nucleosome recycling [J]. *The EMBO Journal*, 2014, 33(12):1397.
- [41]SATHIANATHAN A, RAVICHANDRAN P, LIPPI J M, *et al.* The Eaf3/5/7 subcomplex stimulates NuA4 interaction with methylated histone H3 Lys-36 and RNA polymerase II [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291(40):21195.
- [42]WANG C, ZHANG S, HOU R, *et al.* Functional analysis of the kinome of the wheat scab fungus *Fusarium graminearum* [J]. *PLoS Pathogens*, 2011, 7(12):e1002460.
- [43]LIU X, XU J, WANG J, *et al.* Involvement of threonine deaminase FgIlv1 in isoleucine biosynthesis and full virulence in *Fusarium graminearum* [J]. *Current Genetics*, 2015, 61(1):55.
- [44]LIU X, JIANG Y, ZHANG Y, *et al.* FgIlv3a is crucial in branched-chain amino acid biosynthesis, vegetative differentiation, and virulence in *Fusarium graminearum* [J]. *Journal of Microbiology*, 2019, 57(8):694.
- [45]LIU X, WANG J, XU J, *et al.* FgIlv5 is required for branched-chain amino acid biosynthesis and full virulence in *Fusarium graminearum* [J]. *Microbiology*, 2014, 160(Pt 4):692.
- [46]YU F, GU Q, YUN Y, *et al.* The TOR signaling pathway regulates vegetative development and virulence in *Fusarium graminearum* [J]. *The New Phytologist*, 2014, 203(1):219.
- [47]LIU Z, LIU N, JIANG H, *et al.* The activators of type 2A phosphatases (PP2A) regulate multiple cellular processes via PP2A-dependent and-independent mechanisms in *Fusarium graminearum* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2018, 31(11):1121.
- [48]SON M, LEE Y, KIM K H. The transcription cofactor Swi6 of the *Fusarium graminearum* is involved in *Fusarium graminearum* virus 1 infection-induced phenotypic alterations [J]. *The Plant Pathology Journal*, 2016, 32(4):281.