



转录组揭示禾谷镰刀菌酸碱胁迫条件下的基因表达模式

尚余平^{1,2#}, 王一唯^{2,3#}, 王冠^{1,2}, 李涵琪^{1,2}, 李鹏锋², 郭杰^{1*}, 张翠军^{2*}

1 山西农业大学 农学院, 农业农村部有机旱作农业重点实验室(部省共建), 山西 晋中 030801

2 中国农业科学院深圳农业基因组研究所, 岭南现代农业科学与技术广东省实验室深圳分中心, 广东 深圳 518120

3 太原理工大学 计算机科学与技术学院, 山西 太原 030024

尚余平, 王一唯, 王冠, 李涵琪, 李鹏锋, 郭杰, 张翠军. 转录组揭示禾谷镰刀菌酸碱胁迫条件下的基因表达模式[J]. 微生物学报, 2024, 64(11): 4271-4289.

SHANG Yuping, WANG Yiwei, WANG Guan, LI Hanqi, LI Pengfeng, GUO Jie, ZHANG Cuijun. Transcriptomics reveals gene expression patterns of *Fusarium graminearum* under pH stress[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(11): 4271-4289.

摘要:【目的】研究不同 pH 胁迫条件下禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)的转录组调控机制, 分析基因表达水平及差异, 探究在酸性或碱性条件下与禾谷镰刀菌细胞抗胁迫反应相关的代谢通路, 揭示禾谷镰刀菌如何主动调节细胞内代谢与合成过程, 以适应细胞外 pH 环境的变化。【方法】在初始 pH 为 4.5、6.5、8.0 的 PDB 培养基中培养禾谷镰刀菌 48 h, 提取菌株的总 RNA, 构建 cDNA 文库。利用转录组测序技术及生物信息学技术鉴定相关差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 进一步分析涉及的代谢通路。采用反转录实时定量 PCR (reverse transcription-quantitative PCR, RT-qPCR)对基因表达水平进行验证。【结果】在酸性条件下, 共有 4 283 个 DEGs, 其中 2 032 个上调 DEGs 和 2 251 个下调 DEGs; 在碱性条件下, 共有 498 个 DEGs, 其中 269 个上调基因和 229 个下调基因。基因本体论(gene ontology, GO)富集分析结果显示, 在酸性条件下上调基因显著富集到的 GO terms 有 211 个, 下调的有 72 个; 碱性条件下上调的 GO terms 有 33 个, 下调的有 40 个。京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集分析结果显示, 在酸性条件下上调 DEGs 显著富集到的通路有 22 个, 下调有 32 个; 在碱性条件下上调通路有 8 个, 下调有 13 个。膜转运蛋白的表达和糖类化合物的水解等相关基因表达上调以及蛋白质代谢相关

资助项目: 中国农业科学院青年英才计划(1102431600011240010)

This work was supported by the Chinese Academy of Agricultural Sciences Elite Youth Program (1102431600011240010).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: GUO Jie, nxgj1115326@sxau.edu.cn; ZHANG Cuijun, zhangcuijun@caas.cn

Received: 2024-05-15; Accepted: 2024-06-28; Published online: 2024-07-04

基因表达下调, 协助禾谷镰刀菌细胞适应外界环境的变化。与此同时, 禾谷镰刀菌在酸性和碱性条件下分别通过降低次生代谢和降低氨基酸代谢来维持自身细胞的内环境平衡, 从而抵抗细胞外 pH 胁迫。【结论】在酸性环境中, 禾谷镰刀菌通过促进核糖蛋白复合体的产生以及次生代谢来适应细胞外环境的变化; 在碱性环境中, 禾谷镰刀菌细胞通过氨基酸代谢来响应和感知外界的胁迫。通过对禾谷镰刀菌细胞代谢相关通路分析为禾谷镰刀菌对不同 pH 环境的响应提供重要的基因表达数据支撑, 研究结果有助于理解禾谷镰刀菌的致病机制。

关键词: 酸碱胁迫; 禾谷镰刀菌; 转录组; 差异表达基因

Transcriptomics reveals gene expression patterns of *Fusarium graminearum* under pH stress

SHANG Yuping^{1,2#}, WANG Yiwei^{2,3#}, WANG Guan^{1,2}, LI Hanqi^{1,2}, LI Pengfeng², GUO Jie^{1*}, ZHANG Cuijun^{2*}

1 Key Laboratory of Sustainable Dryland Agriculture (Co-construction by Ministry and Province), College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, Shanxi, China

2 Shenzhen Branch, Guangdong Laboratory of Lingnan Modern Agriculture, Agricultural Genomics Institute at Shenzhen, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Shenzhen 518120, Guangdong, China

3 College of Computer Science and Technology, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, China

Abstract: [Objective] To study the transcriptome regulation mechanism of *Fusarium graminearum* under different pH stress conditions, analyze the changes in gene expression levels, explore the metabolic pathways involved in the responses of *F. graminearum* cells to acidic or alkaline conditions, and reveal how *F. graminearum* regulates intracellular metabolism and synthesis to adapt to the changes in extracellular pH. [Methods] *F. graminearum* was cultured in the PDB media with initial pH 4.5, 6.5, and 8.0 for 48 h, and the total RNA of the strains was extracted to construct the cDNA library. Transcriptome sequencing and bioinformatics analysis were used to identify the differentially expressed genes (DEGs), and the metabolic pathways involved were analyzed. The expression levels of target genes were determined by RT-qPCR. [Results] Under acidic conditions, a total of 4 283 DEGs were identified, including 2 032 genes with up-regulated expression and 2 251 genes with down-regulated expression. Under alkaline conditions, a total of 498 DEGs were identified, including 269 genes with up-regulated expression and 229 genes with down-regulated expression. Gene ontology (GO) enrichment analysis revealed 211 GO terms for the up-regulated genes and 72 GO terms for the down-regulated genes under acidic conditions. Under alkaline conditions, GO analysis yielded 33 GO terms for the up-regulated genes and 40 GO terms for the down-regulated genes. The results of Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment analysis showed 22 up-regulated pathways and 32 down-regulated pathways under acidic conditions as well as 8 up-regulated pathways and 13

down-regulated pathways under alkaline conditions. The expression of the genes associated with membrane transporters and hydrolysis of carbohydrates was up-regulated, and that of the genes related to protein metabolism was down-regulated, which assisted *F. graminearum* cells to adapt to changes in the external environment. At the same time, *F. graminearum* maintained the internal environment balance by reducing secondary metabolism and amino acid metabolism under acidic and alkaline conditions, respectively, to resist extracellular pH stress. **[Conclusion]** In the acidic environment, *F. graminearum* adapts to the changes in the extracellular environment by promoting the production of ribonucleoprotein complexes and secondary metabolism. In an alkaline environment, *F. graminearum* senses and responds to external stresses via amino acid metabolism. The analysis of the metabolic pathways of *F. graminearum* cells provides gene expression data for studying the responses of *F. graminearum* to different pH environments. The findings of this study are helpful to understand the pathogenic mechanism of *F. graminearum*.

Keywords: pH stress; *Fusarium graminearum*; transcriptome; differentially expressed genes

镰刀菌(*Fusarium*)是一类植物病原真菌^[1-2], 广泛感染禾谷类作物, 包括小麦、大麦、玉米等^[3]。其中禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)可引起小麦赤霉病^[4-6]、玉米穗腐病^[7-8]、水稻恶苗病^[9]等多种重要病害。禾谷镰刀菌不仅会直接导致田间作物减产, 还会在谷物贮存过程中产生多种真菌毒素, 如脱氧雪腐镰刀烯醇(deoxynivalenol, DON)、雪腐镰刀烯醇(nivalenol, NIV)和玉米赤霉烯酮(zearalenone, ZEA)^[10-11]等。其中 DON 毒素合成受到如 *TRI5*、*TRI4*、*TRI11*、*TRI3* 等多个 *TRI* 基因调控^[12]。禾谷镰刀菌在小麦穗部产生的真菌毒素会损害动物和人类的免疫和生殖系统, 对人畜健康构成威胁^[13-14]。这严重威胁粮食生产及食品安全, 因此成为全球重点防控的植物病原真菌^[15-17]。

pH 值对真菌的生长以及毒素的产生都有着重要影响。适当的 pH 值是微生物生长的关键因素, 环境 pH 值的波动对微生物构成巨大挑战, 酸碱胁迫会扰乱细胞内 pH 值的稳定性, 进而影响蛋白质、核酸、脂类和碳水化合物等生物大分子的结构和功能^[18-19]。当外部环境 pH 值偏离最佳范围时, 微生物需要一种或多种有效途径来保

持细胞内 pH 值接近中性, 从而确保其正常生长^[20-21]。pH 值也会影响毒素的产生^[22]。在病原菌与宿主相互作用中, 病原菌为了生存和繁殖, 会通过自身的代谢和基因表达调控以适应环境变化^[23-25]。不同的病原菌对 pH 值的变化具有不同的响应, 从而影响其毒素的产生^[26-27]。如黄曲霉菌^[28]、灰霉病菌(*Botrytis cinerea*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)和禾谷镰刀菌等真菌在较低的 pH 值下(酸性条件)更容易产生毒素, 而在高 pH 值下(碱性条件)会抑制毒素产生减缓病害蔓延^[29-30]。植物病害研究聚焦于病菌侵染致病和寄主抗病机制, 禾谷镰刀菌病害的转录组学研究也是如此, 大多着眼于禾谷镰刀菌侵染致病过程和寄主响应侵染的基因表达调控^[31-32]。虽然已经有一些关于镰刀菌在不同 pH 值环境下的生长发育^[33]和镰刀菌侵染小麦使宿主细胞碱化的相关报道^[34-35], 但其很少关注到镰刀菌自身基因表达量的变化。因此本研究系统地探讨了不同 pH 值诱导禾谷镰刀菌的基因表达途径与生理机制。

本研究从转录组水平探究了不同 pH 值环境下禾谷镰刀菌基因表达量的变化, 在 pH 值为

4.5、6.5、8.0 条件下进行了差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)鉴定、DEGs 的基因本体论(gene ontology, GO)分析、DEGs 的京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)分析、氨基酸和次生代谢通路分析、pH 响应基因分析、DON 毒素合成通路分析等,为禾谷镰刀菌在不同 pH 环境下调控基因表达提供宝贵数据。

1 材料与方法

1.1 菌株

本研究使用引起小麦赤霉病的禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*, 也称禾谷镰孢菌) pH-1 菌株,由中国农业科学院植物保护研究所刘文德实验室惠赠。

1.2 菌株培养方法

将禾谷镰刀菌接种于 PDA 培养基上,28 °C 培养 7 d,用无菌枪头打孔,分别将 5 个菌饼放入 pH 4.5、6.5、8.0 的 PDB 培养基(100 mL)中,在 28 °C 恒温条件下,200 r/min 避光培养 2 d^[36]。

1.3 RNA 提取、文库制备和测序

收集菌丝时,首先用无菌水冲洗菌丝至无培养基颜色,迅速液氮冻存。每种处理均有 3 个生物学重复,所有采集的样本均保存在-80 °C 以便进行进一步分析。

为了进行 RNA 测序分析,将冻存样品用研钵在液氮中研磨至粉末,并使用 RNAPrep Pure Plant Plus Kit (天根生化科技北京有限公司)提取总 RNA,在 1% 琼脂糖凝胶上检测 RNA 是否降解和污染,使用超微量生物检测仪估计 RNA 浓度。总 RNA 样本送深圳华大基因股份有限公司(BGI Genomics Co., Ltd)进行文库构建和测序。使用 MGIEasy RNA 文库制备试剂盒构建文库,并在 DNBSEQ 平台上使用 Paired-end scheme 进行测序。

1.4 测序数据处理

使用 FastQC 软件对测序数据进行质量评估(质检)^[37]。使用 Trimmomatic^[38]对序列(reads)进行过滤,以去除低质量 reads。所有干净的 reads 使用 HISAT2 映射到禾谷镰刀菌的参考基因组上^[39]。

1.5 差异基因鉴定和功能注释

利用 featureCounts 软件对 reads 进行计数。取用每千个碱基的转录每百万映射读取的片段(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads, FPKM)≥1 作为有表达的阈值,利用 DESeq2 对 3 种 pH 处理样品的基因转录水平进行差异表达分析^[40]。 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 \text{fold change}| \geq 1$ 被指定为 DEGs。使用 clusterProfiler 对 DEGs 进行 GO 和 KEGG 富集分析,将 $P\text{-value} < 0.05$ 的通路定义为显著富集的通路^[41-44]。

1.6 基因表达的实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)验证

为了进一步验证 RNA-seq 实验结果的可靠性,提取实验组和对照组的镰刀菌菌丝总 RNA,并用反转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,选取 5 个 DEGs (包括与酸性胁迫下次生代谢通路相关的 2 个基因,以及碱胁迫条件下氨基酸合成通路相关的 3 个基因),根据基因序列用 Primer Premier 5 软件设计基因特异性引物,并由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物名称及引物序列见表 1。引物验证合格后使用 SYBR Green I 荧光定量预混试剂盒(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行 RT-qPCR 分析。反应体系(20 μL): 2 \times ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 10 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.4 μL , cDNA 1 ng, ddH₂O 补至 20 μL 。RT-qPCR 反应参数参考试剂盒说明书。以 Tubulin 为内参基因,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行相对定量。

表 1 定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for quantitative PCR

Genes	Primer names	Primer sequences (5'→3')	Length (bp)
FGSG_09530	FgTubulin-F	GTCAGTGC GGTAACCAAATCG	95
	FgTubulin-R	CTCAGAGGTGCCGTTGTAAAC	
FGSG_08350	FGSG_08350-F	CCCAAGGTCATCGTAGCAGGAA	122
	FGSG_08350-R	AGACCGGAAACGTGAGCCATAT	
FGSG_08351	FGSG_08351-F	CGATGGCAAGACCTGCACAA	179
	FGSG_08351-R	CGACGACGGAACCAGAAACG	
FGSG_08352	FGSG_08352-F	AATGGTCGCACCGAGCACTA	120
	FGSG_08352-R	CTGGATAACAGCAGGAACAAGAG	
FGSG_09704	FGSG_09704-F	AACCTGGTGCCTATGCCTTCT	204
	FGSG_09704-R	TGCCCATGAAGTTGCTAATGAC	
FGSG_10097	FGSG_10097-F	TTCTCGTTCCTGTCTATCCAC	110
	FGSG_10097-R	GAAACGGCATATCGCTTCACC	

2 结果与分析

2.1 不同 pH 的 PDB 条件下菌丝生长状况

将新鲜的禾谷镰刀菌菌饼放入不同 pH 的 PDB 培养液中振荡培养 48 h, pH 6.5 时菌丝非常丰富, pH 8.0 时菌丝略微减少, pH 4.5 时能明显看出菌丝生长受到抑制。结果表明, 禾谷镰刀菌在不同 pH 条件下生长状态不同, 其中最适生长 pH 为中性, 在酸性或者碱性条件下生长受到抑制(图 1)。

2.2 转录组数据质量评估

为了系统地研究不同 pH 值处理下禾谷镰刀菌的转录组变化情况, 分别收集 pH 4.5、6.5 和 8.0 条件下培养的菌丝, 提取总 RNA 进行转录组测序, 设置 3 次生物学重复。测序数据质检表明 Q20 和 Q30 分别超过 97.07%和 90.45%, G+C 含量在 53.09%–54.16% (表 2)。结果表明, 数据质量可靠, 可以进行转录组分析。本研究测序数据已上传 NCBI 公共数据库 (序列号为 GSE267311)。

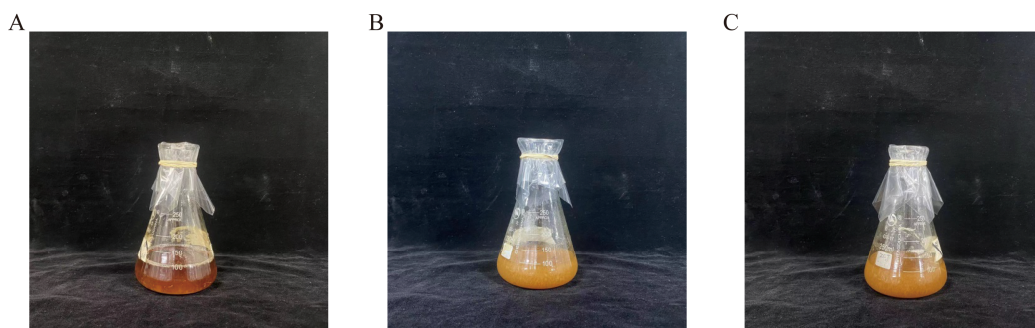


图 1 不同 pH 值条件下禾谷镰刀菌的生长状态

Figure 1 Growth status of *Fusarium graminearum* under different pH conditions. A: pH 4.5. B: pH 6.5. C: pH 8.0.

采用 Pearson 相关系数估计了生物重复样本的相关性, 3 个生物学重复之间相关性系数超过 0.78 (图 2A)。为了进一步考察数据的可信度, 使用了主成分分析(PCA 分析, 图 2B)发现, pH 8.0-1 和 pH 6.5-1 与其余两个重复差异较大, 因此后续分析对这两组数据进行了去除, 剩余样品数据良好, 可用于进一步分析。

2.3 差异表达基因分析

通过计算酸性、中性、碱性条件下各样品的 FPKM, 发现在酸性条件下, 共有 9 341 个基因有表达量; 在中性条件下, 共有 8 974 个基因有表达量; 在碱性条件下, 共有 9 386 个基因有表达量。进一步分析 DEGs 结果表明, 在酸性条件下, 共有 4 283 个 DEGs, 其中包含 2 032 个上调 DEGs 和 2 251 个下调 DEGs (图 3A、附表 S1,

表 2 转录组数据统计

Table 2 Statistics of the transcriptome data

Sample name	Clean reads	Clean base (bp)	Read length	Q20 (%)	Q30 (%)	G+C content (%)
pH 4.5-1	24 024 525	7 207 357 500	PE150	97.13	90.96	53.83
pH 4.5-2	24 026 391	7 207 917 300	PE150	97.16	91.02	53.79
pH 4.5-3	24 148 437	7 244 531 100	PE150	97.07	90.75	54.16
pH 6.5-1	24 137 796	7 241 338 800	PE150	96.98	90.45	53.33
pH 6.5-2	24 018 249	7 205 474 700	PE150	97.08	90.83	53.09
pH 6.5-3	24 122 407	7 236 722 000	PE150	97.33	91.62	53.11
pH 8.0-1	24 037 565	7 211 269 500	PE150	97.14	91.10	53.31
pH 8.0-2	24 035 734	7 210 720 200	PE150	97.43	91.88	53.28
pH 8.0-3	24 145 820	7 243 746 000	PE150	97.28	91.46	53.41

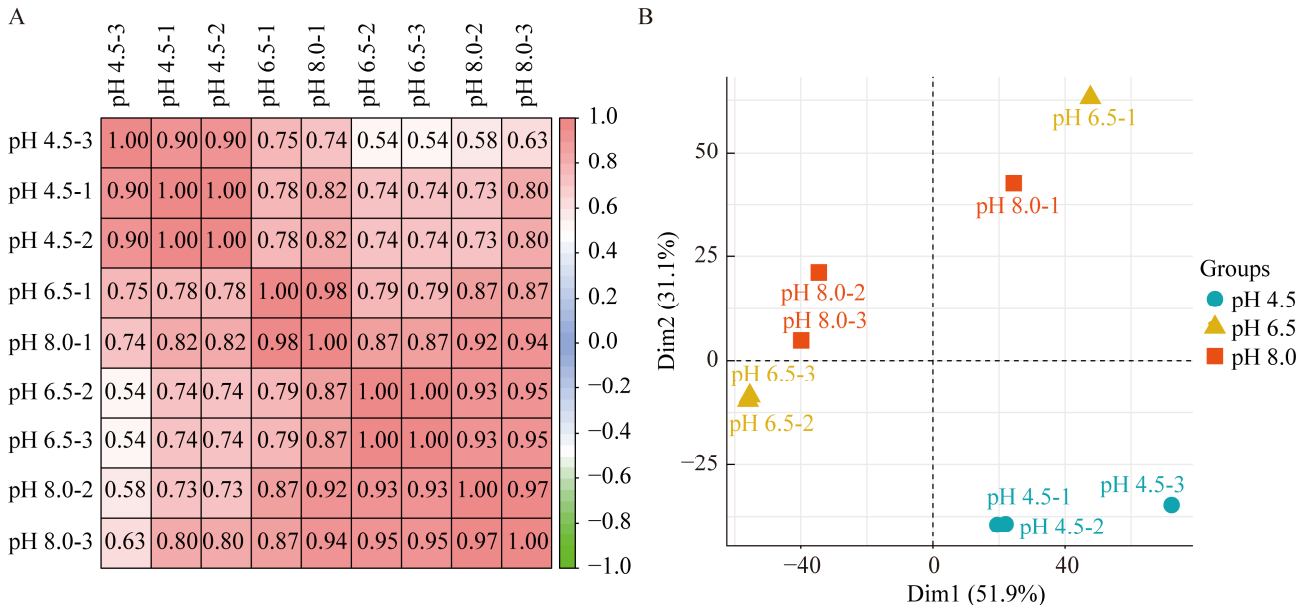


图 2 禾谷镰刀菌在不同 pH 处理下转录组数据重复性

Figure 2 Reproducibility of *Fusarium graminearum* transcriptome data under different pH treatments. A: Heat map of RNA expression values between different samples. Pearson correlation coefficients are represented by color and number. B: PCA shows distances between samples from different groups.

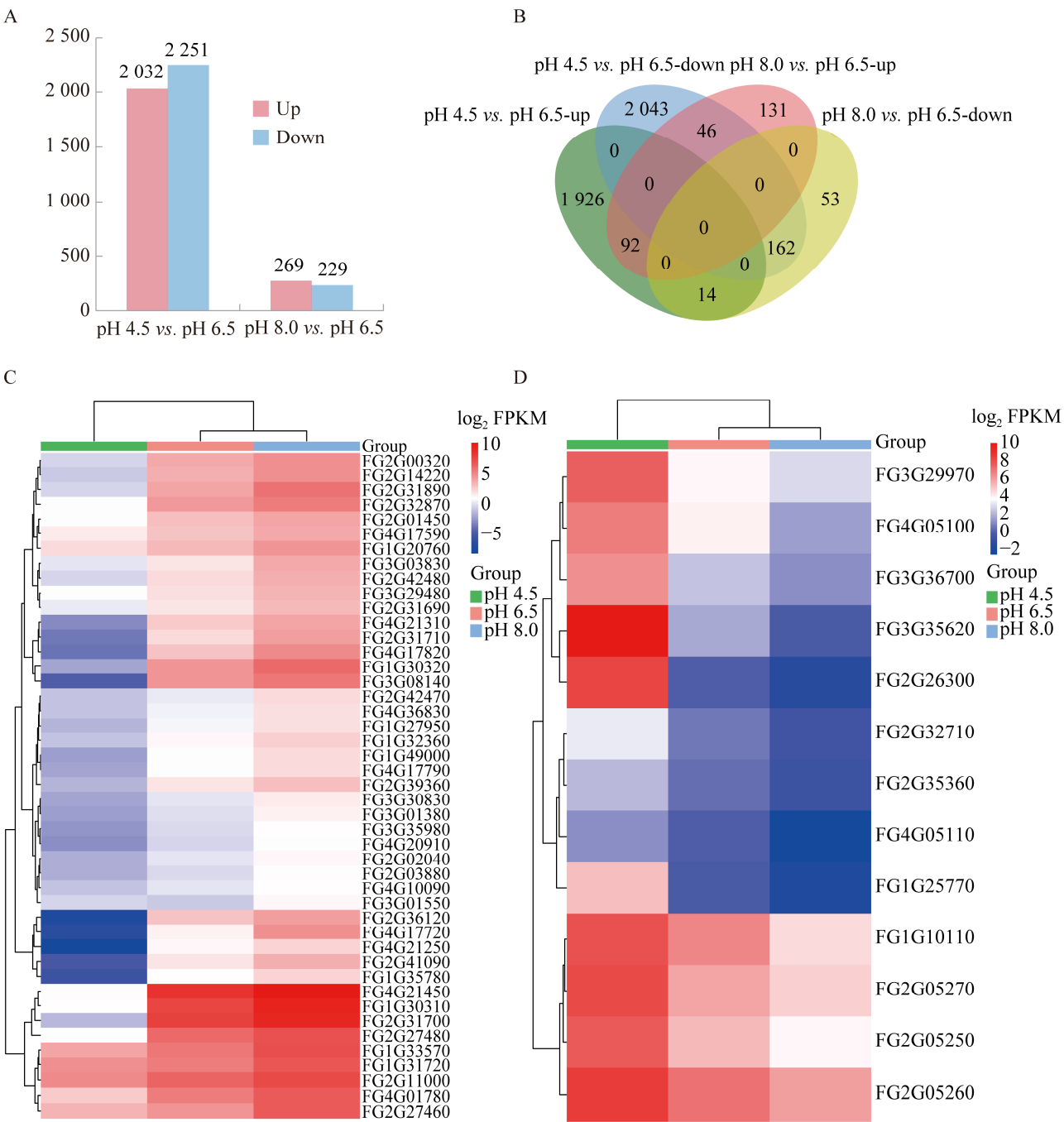


图 3 差异表达基因的分类分析

Figure 3 Classification analysis of differentially expressed genes (DEGs). A: Number of DEGs. B: Venn diagram of up-regulated and down-regulated DEGs at pH 4.5 vs. pH 6.5 and at pH 8.0 vs. pH 6.5. C: The heat map shows the genes whose expression is consistently up-regulated as the pH continues to increase. Red indicates high expression and blue indicates low expression. Color scale indicates normalized FPKM values (\log_2 FPKM). D: The heat map shows the genes whose expression is consistently down-regulated as the pH continues to increase. Red indicates high expression and blue indicates low expression. Color scale indicates normalized FPKM values (\log_2 FPKM).

数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号: NMDCX0000326); 在碱性条件下, 共有 498 个 DEGs, 其中 269 个上调 DEGs 和 229 个下调 DEGs (图 3A、附表 S1, 数据已提交国家微生物科学数据中心, 编号: NMDCX0000326)。另外, 在碱性条件下, 上调 DEGs 的数量多于下调 DEGs, 而在酸性条件下则相反, 下调 DEGs 偏多(图 3A)。

此外, 414 个 DEGs 在酸性条件和碱性条件下均存在差异表达, 其中在酸性条件和碱性条件下有 92 个 DEGs 共同上调, 有 162 个 DEGs 共同下调(图 3B)。其余 60 个 DEGs 在酸性和碱性条件下表现出相反的表达模式(图 3B)。这些 DEGs 的不同可能与禾谷镰刀菌在不同 pH 环境下的生长情况有关。

在适应外界环境变化的过程中, 禾谷镰刀菌能够通过调节自身的变化来应对非生物胁迫, 尤其是温度和 pH 等因素。随着 pH 的持续上升, 与 pH 反应相关的基因也持续发生变化, 数据显示, 持续上调的 DEGs 有 43 个(图 3C), 同时持续下调 DEGs 有 13 个(图 3D)。上调基因主要注释到一些与非生物胁迫相关的膜转运蛋白和糖苷水解酶等, 如钠和氯依赖性 GABA 转运蛋白 1 (sodium and chloride-dependent GABA transporter 1, FGSG_04240)可能与离子转运有关; 抗原 1 (antigen 1, FGSG_03954)可能在应对外界环境变化时发挥作用; 糖苷水解酶家族 76 (glycoside hydrolase family 76, FGSG_04584)可能与糖类化合物的水解有关。下调基因主要注释到与蛋白质代谢相关的脱氢酶和转移酶等, 如 3-羟基丁酰脱氢酶(3-hydroxybutyryl-dehydrogenase, FGSG_13963)可能与脂肪酸代谢有关; 乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, FGSG_03546)可能与醇的代谢有关; 4-氨基丁酸氨基转移酶(4-aminobutyrate aminotransferase, FGSG_06751)可能与氨基酸代谢有关。综上所述, 随着 pH 的

持续上升, 禾谷镰刀菌通过增强膜转运蛋白的表达、促进糖类化合物的水解以及降低脂代谢来适应外界环境的变化。

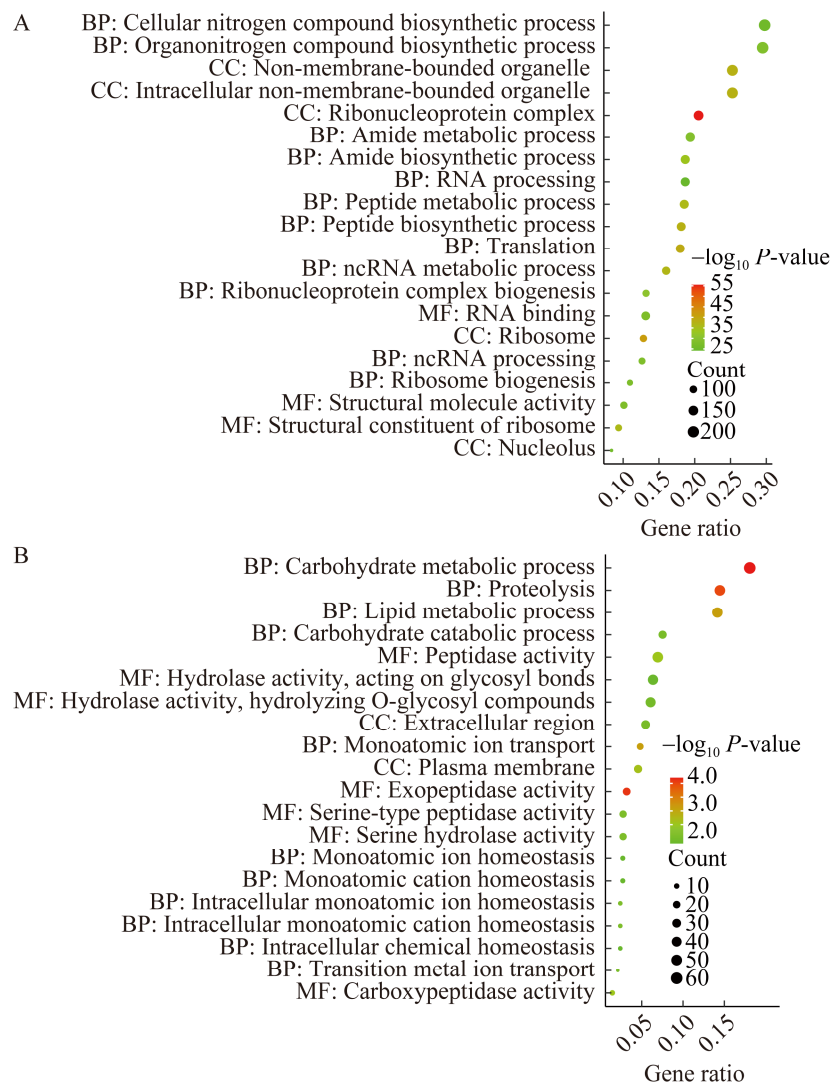
2.4 差异表达基因的 GO 富集分析

为了更好地理解禾谷镰刀菌在不同 pH 条件下转录过程中 DEGs 的功能分类, 分别对上调 DEGs 和下调 DEGs 进行了 GO 功能富集分析, 将这些基因划分为相应的生物过程(biological process, BP)、分子功能(molecular function, MF)和细胞成分(cellular component, CC)。酸性条件下上调 DEGs 显著富集的 GO terms 共有 211 个, 在生物过程中, 高度富集的 terms 包括翻译(translation)、肽生物合成过程(peptide biosynthetic process)和 ncRNA 代谢过程(ncRNA metabolic process); 在分子功能中, 高度富集的 terms 包括核糖体的结构成分(structural constituent of ribosome)、RNA 结合(RNA binding)和结构分子活性(structural molecule activity); 在细胞成分中, 高度富集的 terms 包括核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complex)、核糖体(ribosome)和非膜结合的细胞器(non-membrane-bounded organelle) (图 4A)。下调 DEGs 显著富集的 GO terms 共有 72 个, 其中在生物过程中, 高度富集的 terms 包括碳水化合物代谢过程(carbohydrate metabolic process)、蛋白水解(proteolysis)和单原子离子转运(monoatomic ion transport); 在分子功能中, 高度富集的 terms 包括外肽酶活性(exopeptidase activity)、肽酶活性(peptidase activity)和羧基肽酶活性(carboxypeptidase activity); 在细胞成分中, 高度富集的 terms 包括质膜(plasma membrane)、细胞外区(extracellular region)和细胞外围(cell periphery) (图 4B)。在酸性环境下禾谷镰刀菌的上调基因主要富集到与核糖体的合成和多肽酶活性相关的通路, 这表明在酸性环境中, 禾谷

镰刀菌通过促进核糖蛋白复合体的产生以及降低细胞代谢来适应细胞外环境的变化。

碱性条件下,上调DEGs显著富集的GO terms 共有 33 个,与酸性条件下的上调 DEGs 富集到的 terms 较相似,例如翻译(translation)、核糖体的结构成分(structural constituent of ribosome)和核糖体(ribosome) (图 4C)。下调 DEGs 显著富集的 GO terms 共有 40 个,其中在生物过程中,高度富集的 terms 包括氧酸代谢过程(oxoacid metabolic process)、有机酸代谢过程(organic acid metabolic process)和羧酸代谢过程(carboxylic acid metabolic process);在分子功能中,高度富

集的 terms 包括酰胺跨膜转运蛋白活性(amide transmembrane transporter activity)、外肽酶活性(exopeptidase activity)和外肽酶活性(exopeptidase activity);在细胞成分中,高度富集的 terms 包括核糖体(ribosome)、核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complex)和非膜结合的细胞器(non-membrane-bounded organelle) (图 4D)。在碱性条件下,禾谷镰刀菌的下调 DEGs 主要富集到酸代谢相关途径和跨膜转运蛋白活性相关通路,表明在碱性环境中,禾谷镰刀菌可以促进核糖体合成与翻译并通过抑制蛋白酶活性以减缓代谢,从而更好地应对外界环境胁迫。



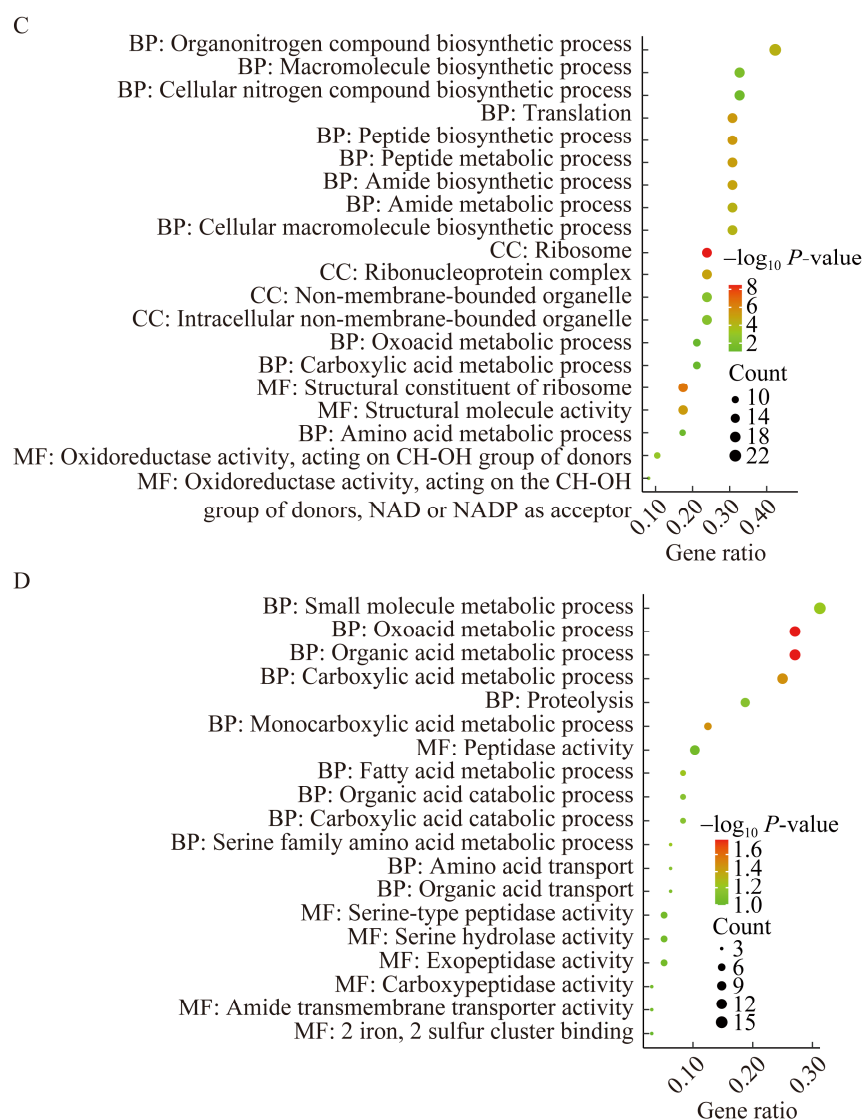


图 4 在酸碱胁迫条件下上调和下调差异表达基因的 GO 富集分析

Figure 4 GO enrichment analysis of DEGs under acidic or alkaline stress. A: GO enrichment analysis of up-regulated DEGs at acid stress. B: GO enrichment analysis of down-regulated DEGs at acid stress. C: GO enrichment analysis of up-regulated DEGs at alkaline stress. D: GO enrichment analysis of down-regulated DEGs at alkaline stress. BP: Biological process; MF: Molecular function; CC: Cellular component.

2.5 差异表达基因的 KEGG 富集分析

为了进一步了解禾谷镰刀菌在不同 pH 条件下 DEGs 参与的代谢通路, 使用 KEGG 数据库进行富集分析。结果表明在酸性胁迫条件下, 上调 DEGs 显著富集到的通路有 22 个, 下调 DEGs 显著富集到的通路有 32 个(图 5A、5B); 在碱性胁迫条件下, 上调 DEGs 显著富集到的通路有 8 个, 下调 DEGs 显著富集到的通路有

13 个(图 5C、5D)。另外, 无论是酸性还是碱性条件下, 上调 DEGs 都富集到了相同的通路, 例如核糖体(ribosome)和氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids)。这表明禾谷镰刀菌在受到酸碱胁迫时会促进核糖体的合成和氨基酸的合成。此外, 无论是酸性条件还是碱性条件下, 下调 DEGs 也都富集到了相同的通路, 例如次生代谢物的生物合成(biosynthesis

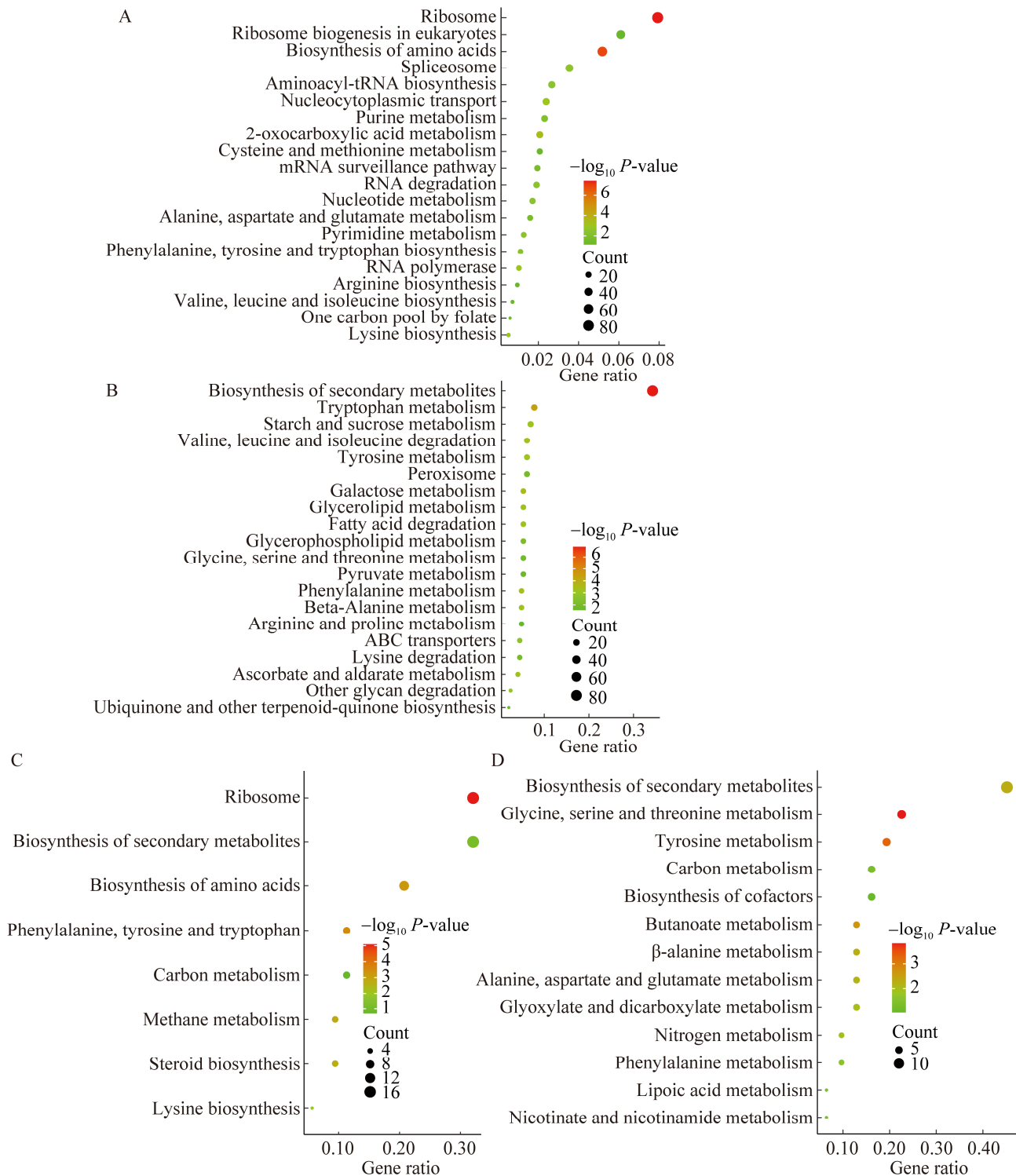


图 5 在酸碱胁迫条件下上调和下调差异表达基因的 KEGG 富集分析

Figure 5 KEGG enrichment analysis of DEGs under acidic or alkaline stress. A: KEGG enrichment analysis of up-regulated DEGs at acid stress. B: KEGG enrichment analysis of down-regulated DEGs at acid stress. C: KEGG enrichment analysis of up-regulated DEGs at alkaline stress. D: KEGG enrichment analysis of down-regulated DEGs at alkaline stress.

of secondary metabolites)、酪氨酸代谢(tyrosine metabolism)以及甘氨酸、苏氨酸和色氨酸代谢(glycine, threonine, and tryptophan metabolism)。因此,推测当禾谷镰刀菌受到高 pH 或低 pH 胁迫时,会通过自身的次生代谢和氨基酸生物合成等途径来适应环境。

2.6 不同 pH 环境中 DON 毒素合成调控基因及致病性相关转录因子表达

禾谷镰刀菌在酸性环境下有 15 个 *TRI* 基因受诱导表达,这些基因协同调控 DON 毒素的合成^[45]。在转录组实验数据中发现 14 个 *TRI* 基因发生了变化(图 6)。具体来说 *TRI5* (FGSG_03537)、*TRI4* (FGSG_03535)、*TRI6* (FGSG_03536)、*TRI10* (FGSG_03538)和 *TRI101* (FGSG_07896)在碱性环境中下调明显。在酸性条件下仅发现 *TRI8* (FGSG_03532)的表达下调明显。这一结果表明,禾谷镰刀菌在碱性环境中, DON 的生物合成受到抑制。

通过转录组数据分析发现,Chen 等^[45]总结

的转录因子中有 20 个在酸碱条件下发生差异表达(图 6B),其中有 2 个转录因子(FGSG_07546 和 FGSG_09524)在酸性或碱性条件下差异表达,有 18 个转录因子仅在酸性条件下差异表达(图 6B)。研究表明转录因子 *FgPacC* (FGSG_12970)作为 pH 响应基因,是碱性宿主环境下禾谷镰刀菌应对高铁胁迫反应的主要调节因子,与致病性紧密相关^[35]。本研究的转录组数据表明,酸性条件下 *FgPacC* 表达被抑制(图 6B),与已有报道结果一致,。

2.7 碱性环境下禾谷镰刀菌氨基酸生物合成与代谢

在不同 pH 条件下,真菌通过各种生理机制响应和感知外界的生物和非生物胁迫。在培养 48 h 后,发现在碱性条件下的下调 KEGG 通路中氨基酸代谢通路显著富集。对 9 个富集基因进行分析(图 7)发现,在色氨酸代谢(tryptophan metabolism)、丙酮酸代谢(pyruvate metabolism)、半胱氨酸和硫氨酸代谢(cysteine and thionine

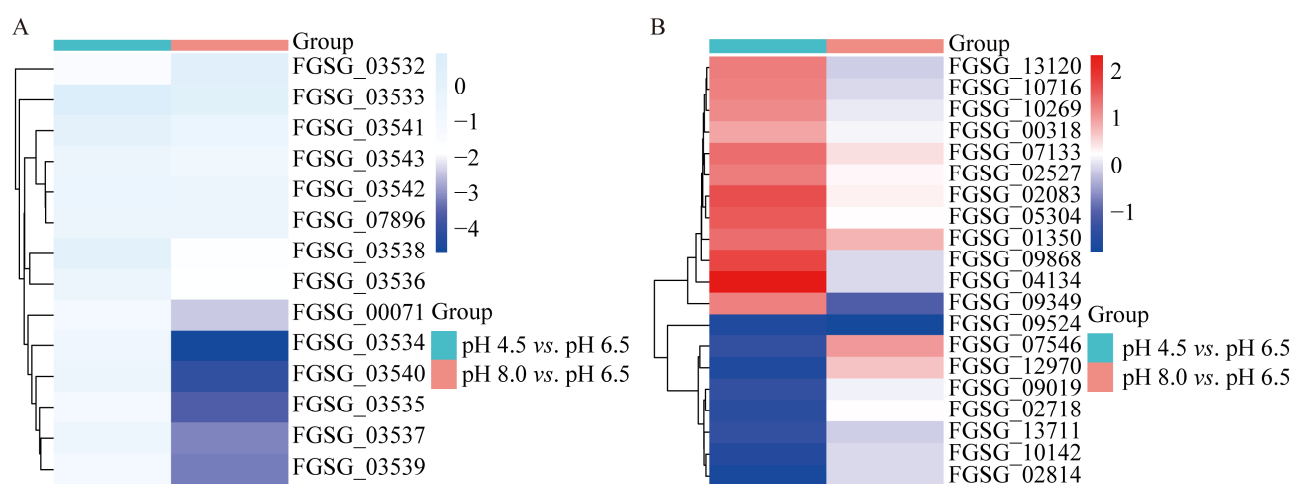


图 6 酸碱胁迫条件下 DON 毒素合成调控基因及致病相关转录因子表达分析

Figure 6 Expression analysis of genes regulating DON synthesis and pathogenicity-related transcription factors under acidic or alkaline stress. A: Expression of *TRI* genes in *Fusarium graminearum* under acidic or alkaline stress. B: Expression of transcription factors regulating DON synthesis or pathogenicity in *Fusarium graminearum* under acidic or alkaline stress.

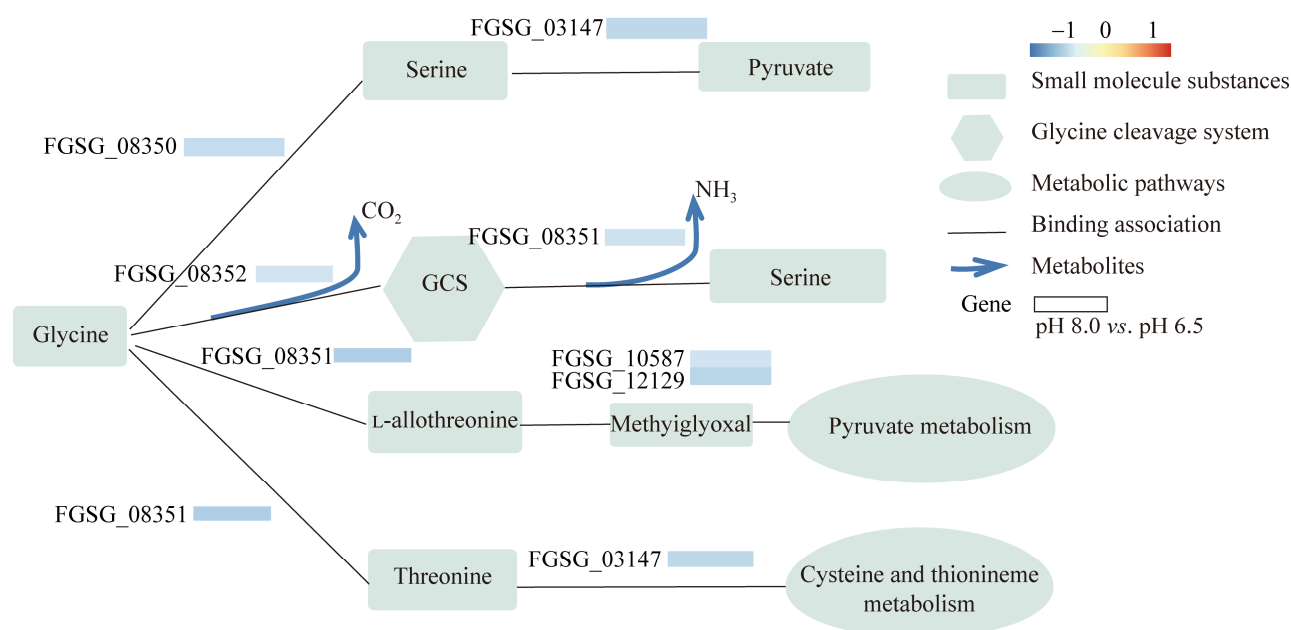


图 7 碱胁迫抑制禾谷镰刀菌甘氨酸、苏氨酸和色氨酸代谢

Figure 7 Inhibition of glycine, threonine and tryptophan metabolism by alkali stress in *Fusarium graminearum*.

metabolism)以及甘氨酸裂解(glycine cleavage system)等过程中,碱性环境会影响与氨基酸合成相关的酶的基因表达。例如,当禾谷镰刀菌处于碱性环境时,与丝氨酸合成相关基因 FGSG_08350、FGSG_08351 和 FGSG_08352 的表达下调,与此同时,在合成甘氨酸时涉及到的甘氨酸脱氢酶以及合成丝氨酸时涉及到的丝氨酸羟基转移酶表达受到抑制,从而减缓甘氨酸的裂解和丝氨酸的合成。这一调节机制有助于通过降低氨基酸代谢来维持自身细胞的内环境平衡,从而抵抗 pH 胁迫。

2.8 酸性环境下禾谷镰刀菌次生代谢物的生物合成

在酸性环境下,禾谷镰刀菌的生长受到抑制(图 1)。在酸性下调的 KEGG 通路中发现,参与禾谷镰刀菌的次生代谢物合成的通路显著富集。进一步分析富集到的 84 个基因,发现其中有 17 个基因参与了氨基酸转换、脂质、糖类的合成与分解相关的次生代谢(图 8)。例如合成海藻糖相

关基因 FGSG_09613 和 FGSG_09704 在细胞糖代谢中起重要作用,当禾谷镰刀菌生长受到抑制时,这些基因的表达下调,从而减少葡萄糖的损耗,以抵抗低 pH 的胁迫;在泛酸的合成过程中,基因 FGSG_00109 的表达下调,降低了细胞的酶促反应;在合成 MVA 通路中,基因 FGSG_10097 的表达下调,减缓了禾谷镰刀菌细胞的生长和发育。此外,还发现了其他基因,例如与脂代谢相关的基因 FGSG_09503,与甾醇生物合成相关基因 FGSG_03443、FGSG_05921、FGSG_13888,以及与光呼吸相关的基因 FGSG_02217、FGSG_02881 和 FGSG_06596,这些基因的表达下调,降低禾谷镰刀菌细胞中的脂肪代谢、甾醇合成、组氨酸合成以及呼吸作用。这些调节机制有助于禾谷镰刀菌在酸性环境中维持细胞内环境平衡,以适应外界的变化。

2.9 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

为了验证 RNA-seq 数据的可靠性,本研究从转录组测序结果选取了 5 个基因进行

RT-qPCR 验证, 包括酸性胁迫下参与次生代谢的 2 个基因(FGSG_09704 和 FGSG_10097)以及碱胁迫条件下参与氨基酸合成的 3 个基因(FGSG_08351、FGSG_08352 和 FGSG_08353)。RT-qPCR 检测结果如图 9A 所示, FGSG_09704

和 FGSG_10097 基因在酸性条件下表达趋势均为下调; FGSG_08351、FGSG_08352 和 FGSG_08353 基因在酸性条件下表达上调, 在碱性条件下表达下调。上述结果与转录组数据一致(图 9B), 验证了 RNA-seq 结果的可靠性。

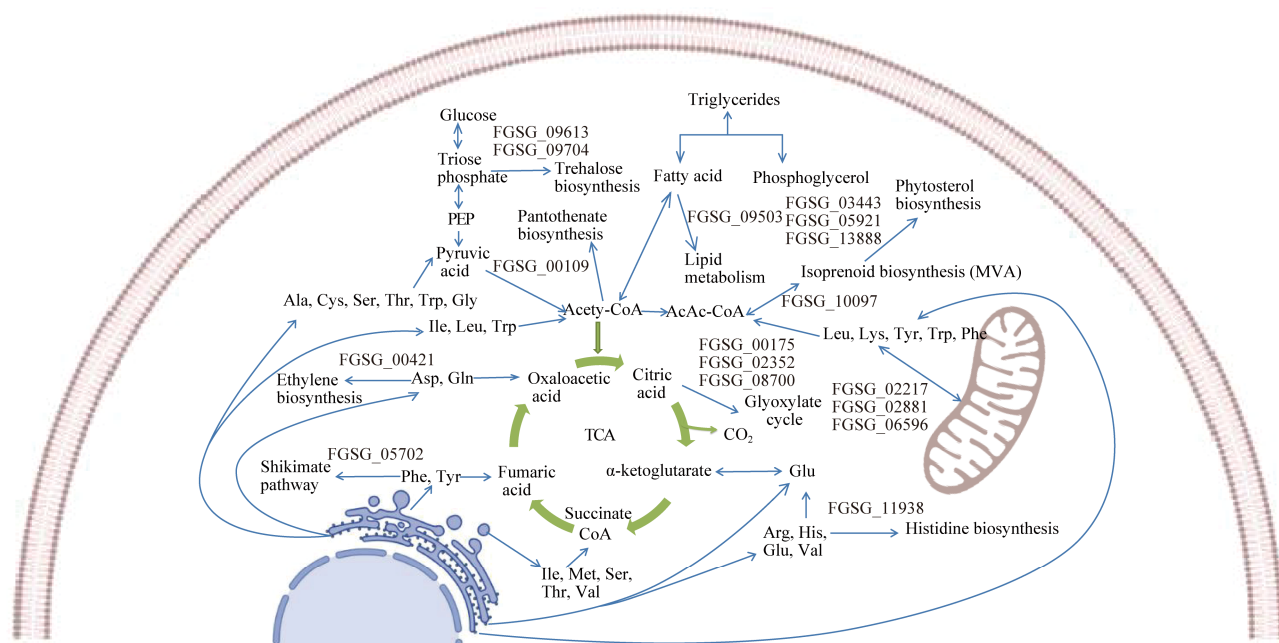


图 8 酸胁迫抑制禾谷镰刀菌次生代谢物的生物合成

Figure 8 Inhibition of secondary metabolite biosynthesis by acid stress in *Fusarium graminearum*.

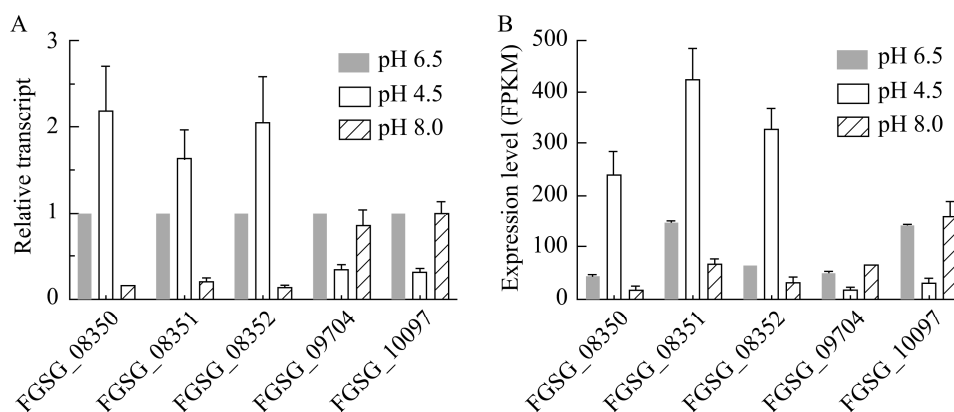


图 9 目的基因表达水平的 RT-qPCR 验证

Figure 9 RT-qPCR verification of target gene expression levels. A: RT-qPCR detection of target gene expression levels in *Fusarium graminearum* under acidic or alkaline stress. B: Target gene expression levels in transcriptome data.

3 讨论

病原菌与宿主相互作用过程中,微生物的生存取决于它们适应和克服环境中以及宿主各种挑战或压力的能力^[25]。病原菌能够在广泛的环境 pH 值范围内生长^[45],但是病原菌的定殖与生长受到宿主条件的影响^[26],如在禾谷镰刀菌感染小麦后,宿主细胞会迅速碱化,以抑制其生长^[34-35]。当宿主 pH 值变化时可以显著影响镰刀菌的生长和次生代谢产物的合成^[23-24]。

病原菌的自适应过程涉及基因表达的调控^[46],它们可以通过激活或抑制特定基因的表达来适应不同的环境条件^[23-24],例如 pH 变化。本研究发现酸性环境很大程度上影响禾谷镰刀菌的转录水平,在酸性条件下,共有 4 283 个差异表达基因,其中 2 032 个上调 DEGs 和 2 251 个下调 DEGs;在碱性条件下,共有 498 个差异表达基因,其中 269 个上调 DEGs 和 229 个下调 DEGs。在酸性条件下差异表达基因的数量相对碱性条件下显著增加(图 3A),表明在禾谷镰刀菌与作物相互作用的过程中,禾谷镰刀菌可能已经进化出适应植物碱性环境的特征,但是对酸性环境无明显的适应性,导致在酸性条件下差异表达基因数量大幅升高。

真菌可产生如镰刀菌酸(fusaric acid, FA)、脱氧雪腐镰刀烯醇(DON)、玉米赤霉烯酮(ZEA)等真菌毒素,这些毒素在病原菌致病过程中具有重要作用^[47-48]。研究表明,与 DON 毒素合成相关的 *TRI* 基因表达受 pH 调控,禾谷镰刀菌在酸性(pH 3.0)环境下能够诱导 *TRI* 基因表达升高,从而产生毒素^[30,36]。黄曲霉在合成毒素的过程中受 pH 影响,与中性(pH 7.0)和碱性(pH 8.0)相比,在酸性(pH 4.0–6.0)条件下更易产生毒素,如黄曲霉毒素(aflatoxin, AFT)和柄曲毒素(sterigmatocystin, ST),酸性条件下这两种毒素含

量是碱性条件下的 5–10 倍^[28]。在本研究中,碱性环境中 *TRI5* (FGSG_03537)、*TRI4* (FGSG_03535)、*TRI6* (FGSG_03536)、*TRI10* (FGSG_03538)以及 *TRI101* (FGSG_07896)等大部分 *TRI* 基因表达下调,与前人的研究一致^[30,36]。表明在碱性条件下抑制禾谷镰刀菌 *TRI* 基因表达。

研究表明,在不同 pH 的 BMS 培养基中培养禾谷镰刀菌,能影响与合成毒素相关的 *TRI* 基因表达,与中性(pH 6.5)和碱性(pH 8.0)相比,在酸性(pH 3.0)条件下更易正向诱导 *TRI* 基因表达^[49]。在本研究中,在酸性条件下发现 *TRI* 基因未上调,猜测这种差异可能是由于使用不同的培养基以及不同程度的酸胁迫导致的,前人使用 BMS 培养基并将 pH 调至 3.0^[49],而本研究采用的是 pH 4.5 的 PDB 培养基。

除此之外,本研究发现随着 pH 的持续上升,43 个基因持续上调表达,13 个基因持续下调表达。上调基因主要包括一些与非生物胁迫相关的膜转运蛋白和糖苷水解酶(FGSG_04240、FGSG_03954、FGSG_04584),下调基因主要包括与蛋白质代谢相关的脱氢酶和转移酶(FGSG_13963、FGSG_03546、FGSG_06751)。这与前人的研究结果一致^[50]。例如,当恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)处于酸性条件下,致病菌能通过上调脱氢酶、脱亚胺酶和阳离子转运相关基因在相对酸性环境中的表达来维持细胞内 pH 稳定性;在碱性条件下,致病菌能通过调控 NADH 脱氢酶、细胞色素、ATP 合酶和氨基酸转运相关基因的表达来维持细胞内酸度,应对碱性环境^[50]。这些结果表明镰刀菌在受到碱性胁迫时能通过增强膜转运蛋白的表达、促进糖类化合物的水解以及降低蛋白质代谢来适应外界环境的变化。Gu 等研究表明转录因子 *FgPacC* (FGSG_12970)的表达受到 pH 调控^[35]。本研究的转录组数据表明,酸性条件下 *FgPacC* 表达被抑

制(图 6B), 这和前期文献报道一致^[35]。除了上述 *FgPacC* 基因, 本研究还发现了其他 19 个毒素产生或致病相关的关键转录因子也受到 pH 调控表达(图 6B)。这些结果表明 pH 能够调控致病性相关转录因子表达, 进而影响禾谷镰刀菌致病过程。

真菌对环境 pH 的适应不仅依赖于细胞内 pH 的稳定性, 还与代谢物的合成有关^[51-53]。组蛋白 E3 连接酶 VdBre1 能够正向调控大丽轮枝菌(*Verticillium dahliae*)脂质代谢, 进而影响病原菌的生长、分生孢子的产生以及次生代谢物的合成, 从而影响致病性^[54]。本研究在酸性下调的 KEGG 通路中发现, 镰刀菌的次生代谢物生物合成显著富集。在进一步分析富集到的 84 个基因中发现其中有 17 个基因, 如合成海藻糖相关基因 FGSG_09613 和 FGSG_09704, 与甾醇生物合成相关基因 FGSG_03443、FGSG_05921 和 FGSG_13888 等, 参与了氨基酸转换、脂质和糖质的合成与分解相关的次生代谢。因此, 推测这些调节机制有助于禾谷镰刀菌在酸性环境中维持细胞内环境平衡, 以适应外界 pH 环境的变化。

总之, 本研究通过转录组测序揭示了禾谷镰刀菌在酸碱胁迫条件下的基因表达模式, 发现了多个致病关键转录因子受 pH 调控表达, 表明 pH 能够调控致病性相关基因表达进而影响禾谷镰刀菌致病性, 研究这些表达变化的基因有利于更好地理解禾谷镰刀菌成功侵染宿主的分子机制。

4 结论

本研究以禾谷镰刀菌为研究对象, 将禾谷镰刀菌分别置于 3 种不同 pH 值的 PDB 培养基中培养 2 d, 通过 RNA-seq 分析禾谷镰刀菌耐酸碱胁迫的机制。研究发现酸性环境很大程度上影响禾谷镰刀菌的转录水平, 在酸性条件下, 共有 4 283 个 DEGs, 其中 2 032 个上调基因和 2 251 个

下调基因; 在碱性条件下, 共有 498 个 DEGs, 其中 269 个上调基因和 229 个下调基因。通过目的基因表达水平的 RT-qPCR 检测验证了 RNA-seq 结果的可靠性。本研究结果表明当禾谷镰刀菌受到酸碱胁迫时, 能调节膜转运蛋白基因的表达、糖类化合物的水解相关通路基因表达以及蛋白质代谢相关基因表达, 从而协助禾谷镰刀菌适应外界 pH 环境的变化。

参考文献

- [1] SU ZQ, BERNARDO A, TIAN B, CHEN H, WANG S, MA HX, CAI SB, LIU DT, ZHANG DD, LI T, TRICK H, ST AMAND P, YU JM, ZHANG ZY, BAI GH. A deletion mutation in TaHRC confers Fhb1 resistance to *Fusarium* head blight in wheat[J]. *Nature Genetics*, 2019, 51: 1099-1105.
- [2] WANG ZH, MA TL, HUANG YY, WANG J, CHEN Y, KISTLER HC, MA ZH, YIN YN. A fungal ABC transporter FgAtm1 regulates iron homeostasis via the transcription factor cascade FgAreA-HapX[J]. *PLoS Pathogens*, 2019, 15(9): e1007791.
- [3] STENGLEIN S. *Fusarium poae*: a pathogen that needs more attention[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2009, 91(1): 25-36.
- [4] BAL G. Scab of wheat: prospects for control[J]. *Plant Disease*, 1994, 78(8): 760.
- [5] FERNANDO WG, PAULITZ TC, SEAMAN WL, DUTILLEUL P, MILLER JD. Head blight gradients caused by *Gibberella zeae* from area sources of inoculum in wheat field plots[J]. *Phytopathology*, 1997, 87(4): 414-421.
- [6] TRAIL F. For blighted waves of grain: *Fusarium graminearum* in the postgenomics era[J]. *Plant Physiology*, 2009, 149(1): 103-110.
- [7] 王银月, 于亭, 庞欣宇. 玉米穗腐病发生规律与防治策略[J]. *新农业*, 2023(23): 12.
WANG YY, YU T, PANG XY. Occurrence regularity and control strategy of maize ear rot[J]. *Modern Agriculture*, 2023(23): 12 (in Chinese).
- [8] 汤振彬. 玉米穗腐病的发生特点及防治方法[J]. *新农业*, 2023(15): 22-23.
TANG ZB. Occurrence characteristics and control

- methods of maize ear rot[J]. *Modern Agriculture*, 2023(15): 22-23 (in Chinese).
- [9] 季芝娟, 曾宇翔, 梁燕, 杨长登. 水稻恶苗病抗性研究进展[J]. *中国水稻科学*, 2021, 35(1): 1-10.
- JI ZJ, ZENG YX, LIANG Y, YANG CD. Research and progress of bakanae disease resistance in rice[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2021, 35(1): 1-10 (in Chinese).
- [10] 周建川, 史东辉, 计成. 玉米赤霉烯酮和脱氧雪腐镰刀菌烯醇对动物毒性的研究进展[J]. *动物营养学报*, 2020, 32(6): 2460-2466.
- ZHOU JC, SHI DH, JI C. Research progress on toxicity of Zearalenone and deoxynivalenol in animals[J]. *Chinese Journal of Animal Nutrition*, 2020, 32(6): 2460-2466 (in Chinese).
- [11] PODGÓRSKA-KRYSZCZUK I, SOLARSKA E, KORDOWSKA-WIATER M. Reduction of the *Fusarium* mycotoxins: deoxynivalenol, nivalenol and Zearalenone by selected non-conventional yeast strains in wheat grains and bread[J]. *Molecules*, 2022, 27(5): 1578.
- [12] 蒋翊宸, 刘馨, 方欣, 冯建茹, 李露, 徐剑宏, 史建荣. 单端孢霉烯族毒素的产生及分子调控机制[J]. *菌物学报*, 2020, 39(3): 521-538.
- JIANG YC, LIU X, FANG X, FENG JR, LI L, XU JH, SHI JR. Recent advances on trichothecene mycotoxins: their biosynthesis and regulation[J]. *Mycosystema*, 2020, 39(3): 521-538 (in Chinese).
- [13] McCORMICK SP, STANLEY AM, STOVER NA, ALEXANDER NJ. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins[J]. *Toxins*, 2011, 3(7): 802-814.
- [14] PESTKA JJ. Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance[J]. *Archives of Toxicology*, 2010, 84(9): 663-679.
- [15] 陈然, 李俊凯, 李黎, 孙正祥. 小麦赤霉病生物防治研究进展[J]. *河南农业科学*, 2014, 43(12): 1-5.
- CHEN R, LI JK, LI L, SUN ZX. Progresses on biological control of wheat head blight[J]. *Journal of Henan Agricultural Sciences*, 2014, 43(12): 1-5 (in Chinese).
- [16] 程顺和, 张勇, 别同德, 高德荣, 张伯桥. 中国小麦赤霉病的危害及抗性遗传改良[J]. *江苏农业学报*, 2012, 28(5): 938-942.
- CHENG SH, ZHANG Y, BIE TD, GAO DR, ZHANG BQ. Damage of wheat *Fusarium* head blight (FHB) epidemics and genetic improvement of wheat for scab resistance in China[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2012, 28(5): 938-942 (in Chinese).
- [17] 张爱民, 阳文龙, 李欣, 孙家柱. 小麦抗赤霉病研究现状与展望[J]. *遗传*, 2018, 40(10): 858-873.
- ZHANG AM, YANG WL, LI X, SUN JZ. Current status and perspective on research against *Fusarium* head blight in wheat[J]. *Hereditas*, 2018, 40(10): 858-873 (in Chinese).
- [18] KRULWICH TA, SACHS G, PADAN E. Molecular aspects of bacterial pH sensing and homeostasis[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2011, 9: 330-343.
- [19] GUPTA P, KHAN FI, ROY S, ANWAR S, DAHIYA R, ALAJMI MF, HUSSAIN A, REHMAN MT, LAI DK, HASSAN MI. Functional implications of pH-induced conformational changes in the sphingosine kinase 1[J]. *Spectrochimica Acta Part A, Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2020, 225: 117453.
- [20] GUO J, MA ZP, GAO JS, ZHAO JH, WEI L, LIU J, XU N. Recent advances of pH homeostasis mechanisms in *Corynebacterium glutamicum*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2019, 35(12): 192.
- [21] MAMO G. Challenges and adaptations of life in alkaline habitats[J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2020, 172: 85-133.
- [22] 张岳平. 镰刀菌真菌毒素产生与调控机制研究进展[J]. *生命科学*, 2011, 23(3): 311-316.
- ZHANG YP. The research advance of biosynthesis and regulation mechanism on *Fusarium* mycotoxins[J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2011, 23(3): 311-316 (in Chinese).
- [23] JIANG LY, WANG PS, SONG XR, ZHANG H, MA SS, WANG JT, LI WW, LV RX, LIU XQ, MA S, YAN JQ, ZHOU HY, HUANG D, CHENG ZH, YANG C, FENG L, WANG L. *Salmonella* Typhimurium reprograms macrophage metabolism via T3SS effector SopE2 to promote intracellular replication and virulence[J]. *Nature Communications*, 2021, 12: 879.
- [24] YIN WB, KELLER NP. Transcriptional regulatory elements in fungal secondary metabolism[J]. *The Journal of Microbiology*, 2011, 49(3): 329-339.
- [25] DONG SM, MA WB. How to win a tug-of-war: the adaptive evolution of *Phytophthora* effectors[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2021, 62: 102027.
- [26] PRUSKY D, YAKOBY N. Pathogenic fungi: leading or led by ambient pH?[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2003, 4(6): 509-516.

- [27] 侯瑞, 金巧军. 禾谷镰刀菌真菌毒素 DON 生物合成途径及调控机制研究进展[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(17): 9-13.
HOU R, JIN QJ. Research progress of biosynthesis approach and regulatory mechanisms of *Fusarium graminearum* mycotoxin DON[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(17): 9-13 (in Chinese).
- [28] KELLER NP, NESBITT C, SARR B, PHILLIPS TD, BUROW GB. pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp.[J]. Phytopathology, 1997, 87(6): 643-648.
- [29] GARDINER DM, OSBORNE S, KAZAN K, MANNERS JM. Low pH regulates the production of deoxynivalenol by *Fusarium graminearum*[J]. Microbiology, 2009, 155(Pt 9): 3149-3156.
- [30] MERHEJ J, BOUTIGNY AL, PINSON-GADAIS L, RICHARD-FORGET F, BARREAU C. Acidic pH as a determinant of *TRI* gene expression and trichothecene B biosynthesis in *Fusarium graminearum*[J]. Food Additives & Contaminants Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment, 2010, 27(5): 710-717.
- [31] FERNANDES TR, SEGORBE D, PRUSKY D, DI PIETRO A. How alkalization drives fungal pathogenicity[J]. PLoS Pathogens, 2017, 13(11): e1006621.
- [32] BOENISCH MJ, SCHÄFER W. *Fusarium graminearum* forms mycotoxin producing infection structures on wheat[J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1): 110.
- [33] SÁNCHEZ-RANGEL D, HERNÁNDEZ-DOMÍNGUEZ EE, PÉREZ-TORRES CA, ORTIZ-CASTRO R, VILLAFÁN E, RODRÍGUEZ-HAAS B, ALONSO-SÁNCHEZ A, LÓPEZ-BUENFIL A, CARRILLO-ORTIZ N, HERNÁNDEZ-RAMOS L, IBARRA-LACLETTE E. Environmental pH modulates transcriptomic responses in the fungus *Fusarium* sp. associated with KSHB *Euwallacea* sp. near *forficatus*[J]. BMC Genomics, 2018, 19(1): 721.
- [34] SUN KW, LI YQ, GAI YP, WANG JR, JIAN YQ, LIU X, WU L, SHIM WB, LEE YW, MA ZH, HAAS H, YIN YN. HapX-mediated H2B deub1 and SreA-mediated H2A.Z deposition coordinate in fungal iron resistance[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(19): 10238-10260.
- [35] GU Q, WANG YJ, ZHAO XZ, YUAN BQ, ZHANG MX, TAN Z, ZHANG XY, CHEN Y, WU HJ, LUO YM, KELLER NP, GAO XW, MA ZH. Inhibition of histone acetyltransferase GCN5 by a transcription factor FgPacC controls fungal adaption to host-derived iron stress[J]. Nucleic Acids Research, 2022, 50(11): 6190-6210.
- [36] ZHANG LN, ZHOU XS, LI PF, WANG YW, HU QY, SHANG YP, CHEN YS, ZHU XY, FENG HJ, ZHANG CJ. Transcriptome profile of *Fusarium graminearum* treated by putrescine[J]. Journal of Fungi, 2022, 9(1): 60.
- [37] CHEN YX, CHEN YS, SHI CM, HUANG ZB, ZHANG Y, LI SK, LI Y, YE J, YU C, LI Z, ZHANG XQ, WANG J, YANG HM, FANG L, CHEN Q. SOAPnuke: a MapReduce acceleration-supported software for integrated quality control and preprocessing of high-throughput sequencing data[J]. GigaScience, 2018, 7(1): 1-6.
- [38] BOLGER AM, LOHSE M, USADEL B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data[J]. Bioinformatics, 2014, 30(15): 2114-2120.
- [39] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nature Methods, 2015, 12: 357-360.
- [40] YU GC, WANG LG, HAN YY, HE QY. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters[J]. Omics, 2012, 16(5): 284-287.
- [41] ARAMAKI T, BLANC-MATHIEU R, ENDO H, OHKUBO K, KANEHISA M, GOTO S, OGATA H. KofamKOALA: KEGG Ortholog assignment based on profile HMM and adaptive score threshold[J]. Bioinformatics, 2020, 36(7): 2251-2252.
- [42] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2000, 28(1): 27-30.
- [43] KANEHISA M. Toward understanding the origin and evolution of cellular organisms[J]. Protein Science, 2019, 28(11): 1947-1951.
- [44] KANEHISA M, FURUMICHI M, SATO Y, KAWASHIMA M, ISHIGURO-WATANABE M. KEGG for taxonomy-based analysis of pathways and genomes[J]. Nucleic Acids Research, 2023, 51(D1): D587-D592.
- [45] CHEN Y, KISTLER HC, MA ZH. *Fusarium graminearum* trichothecene mycotoxins: biosynthesis, regulation, and management[J]. Annual Review of Phytopathology, 2019, 57: 15-39.
- [46] WANG Y, PRUITT RN, NÜRNBERGER T, WANG YC. Evasion of plant immunity by microbial

- pathogens[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2022, 20: 449-464.
- [47] PICAZO I, ETXEBESTE O, REQUENA E, GARZIA A, ESPESO EA. Defining the transcriptional responses of *Aspergillus nidulans* to cation/alkaline pH stress and the role of the transcription factor SltA[J]. *Microbial Genomics*, 2020, 6(8): mgen000415.
- [48] SINGH VK, SINGH HB, UPADHYAY RS. Role of fusaric acid in the development of 'Fusarium wilt' symptoms in tomato: physiological, biochemical and proteomic perspectives[J]. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB*, 2017, 118: 320-332.
- [49] IQBAL N, CZÉKUS Z, ÖRDÖG A, POÓR P. Fusaric acid-evoked oxidative stress affects plant defence system by inducing biochemical changes at subcellular level[J]. *Plant Cell Reports*, 2023, 43(1): 2.
- [50] MERHEJ J, RICHARD-FORGET F, BARREAU C. The pH regulatory factor Pac1 regulates Tri gene expression and trichothecene production in *Fusarium graminearum*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2011, 48(3): 275-284.
- [51] 聂铭, 杨裕然, 李振轮. 结合代谢组学和转录组学分析恶臭假单胞菌 Y-9 主动稳定胞内外 pH 的机制[J]. *微生物学报*, 2024, 64(1): 174-188.
- NIE M, YANG YR, LI ZL. Mechanism of *Pseudomonas putida* Y-9 in actively stabilizing intracellular and extracellular pH: a study based on metabolomics and transcriptomics[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2024, 64(1): 174-188 (in Chinese).
- [52] PEÑALVA MA, JR ARST HN. Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts[J]. *Annual Review of Microbiology*, 2004, 58: 425-451.
- [53] FRANCO-FRÍAS E, RUIZ-HERRERA J, ARÉCHIGA-CARVAJAL ET. Transcriptomic analysis of the role of Rim101/PacC in the adaptation of *Ustilago maydis* to an alkaline environment[J]. *Microbiology*, 2014, 160(Pt 9): 1985-1998.
- [54] WANG H, CHEN B, TIAN J, KONG ZS. *Verticillium dahliae* VdBre1 is required for cotton infection by modulating lipid metabolism and secondary metabolites[J]. *Environmental Microbiology*, 2021, 23(4): 1991-2003.