



层出镰刀菌乌头酸酶家族的功能研究

高贻宙[#], 何四明[#], 王艺潼, 李海博, 王雨晴, 吴志宏^{*}

浙江科技学院生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023

高贻宙, 何四明, 王艺潼, 李海博, 王雨晴, 吴志宏. 层出镰刀菌乌头酸酶家族的功能研究[J]. 微生物学报, 2024, 64(4): 1306-1321.

GAO Yizhou, HE Siming, WANG Yitong, LI Haibo, WANG Yuqing, WU Zhihong. Functions of the aconitase family in *Fusarium proliferatum*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2024, 64(4): 1306-1321.

摘要: 【目的】层出镰刀菌是引起苜蓿根腐病的主要病原菌之一, 探究层出镰刀菌中乌头酸酶家族蛋白的功能特性, 为深入认识层出镰刀菌基础生理代谢的分子机制提供依据。【方法】利用 hmmsearch 工具, 对真菌中含有乌头酸酶结构域的蛋白进行检索, 并进行系统进化分析; 通过实时荧光定量 PCR 及 SWISS MODEL 建模技术分别分析 *FpACO* 基因的表达模式与蛋白结构; 利用同源重组双交换方法构建层出镰刀菌乌头酸酶基因敲除突变体; 分析 $\Delta FpACO3$ 、 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 敲除突变体的生长、产孢、孢子形态、环境胁迫响应及致病力等表型变化; 进一步测定敲除突变体中线粒体代谢相关生理生化指标的变化情况。【结果】*FpACO4-1* 与 *FpACO4-2* 在产孢及孢子形态发生中发挥作用; *FpACO3*、*FpACO4-1*、*FpACO4-2* 参与调控层出镰刀菌对细胞壁胁迫及金属离子胁迫的敏感性; *FpACO3*、*FpACO4-1*、*FpACO4-2* 影响线粒体代谢, 包括总乌头酸酶活性、ATP 含量、过氧化氢含量及三羧酸循环关键基因表达等。【结论】乌头酸酶家族参与调控层出镰刀菌产孢、孢子形态分化、细胞壁胁迫及金属离子胁迫响应和线粒体代谢等过程。

关键词: 层出镰刀菌; 苜蓿根腐病; 乌头酸水合酶; 线粒体代谢

资助项目: 浙江科技学院人才引进启动经费(F701103M09); 浙江省教育厅一般科研项目(Y202351867)

This work was supported by the Scientific Research Foundation of Zhejiang University of Science & Technology (F701103M09) and the General Scientific Research Project from the Education Department of Zhejiang Province (Y202351867).

[#]These authors contributed equally to this work.

^{*}Corresponding author. E-mail: wulab_zust@163.com

Received: 2023-11-29; Accepted: 2024-01-25; Published online: 2024-01-26

Functions of the aconitase family in *Fusarium proliferatum*

GAO Yizhou[#], HE Siming[#], WANG Yitong, LI Haibo, WANG Yuqing, WU Zhihong^{*}

School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science & Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China

Abstract: [Objective] *Fusarium proliferatum* is one of the major pathogens causing root rot of alfalfa. This study aims to investigate the function of the aconitase family in *F. proliferatum* and give insights into the molecular mechanisms underlying the physiological metabolism of this pathogen. [Methods] We employed the hmmsearch tool to identify the proteins containing the aconitase domain in *F. proliferatum* and then carried out the phylogenetic analysis. real-time PCR and SWISS-MODEL were employed to analyze the expression profiles of *FpACO* genes and the protein structures, respectively. The homologous recombination method was used to construct the *FpACO*-deleted mutants of *F. proliferatum*. Furthermore, we explored the growth, sporulation, spore morphology, stress responses, and pathogenicity of $\Delta FpACO3$, $\Delta FpACO4-1$, and $\Delta FpACO4-2$ and measured the mitochondrial metabolism indicators of the mutants. [Results] *FpACO4-1* and *FpACO4-2* were involved in sporulation and spore morphogenesis. *FpACO3*, *FpACO4-1*, and *FpACO4-2* were responsible for regulating the sensitivity of *F. proliferatum* to cell wall stress and metal ion stress. Moreover, *FpACO3*, *FpACO4-1*, and *FpACO4-2* affected the mitochondrial metabolism indicators, including the total aconitase activity, the ATP level, the hydrogen peroxide level, and the expression of key genes in the tricarboxylic acid cycle. [Conclusion] The aconitase family members are involved in the regulation of the processes such as sporulation, spore morphogenesis, response to cell wall stress and metal ion stress, and mitochondrial metabolism in *F. proliferatum*.

Keywords: *Fusarium proliferatum*; root rot of alfalfa; aconitase; mitochondrial metabolism

苜蓿(*Medicago sativa*)是一种多年生豆科植物,具有较高的营养价值、良好的耐旱性与环境适应性、产量较高,作为一种优良牧草在畜牧业中具有重要地位,且苜蓿具有固氮效应,可提升土壤肥力,具有显著的生态效益,在国内被广泛种植^[1]。然而,苜蓿根腐病严重影响苜蓿产量,对我国苜蓿种植业造成巨大的经济损失,该病害由镰刀菌(*Fusarium* spp.)、腐霉菌(*Pythium* spp.)及立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)等病原菌引起,其中,层出镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)为优势致病菌^[2-3]。作为一种寄主范围广泛的土传真菌,层出镰刀菌不仅危害苜

蓿,还可侵染其他重要农作物,如水稻、小麦、玉米和大豆等。此外,层出镰刀菌可分泌单端孢霉烯毒素、伏马菌素、串珠镰孢菌素等真菌毒素,污染谷物饲料,危害人畜健康^[4],但关于其致病机理的深入研究相对不足,因此对层出镰刀菌的生物学特性及其致病性分子机制的研究对于制定有效的病害防治策略、保障农业生产和食品安全至关重要。

乌头酸酶(aconitase, ACO)是一种包含[4Fe-4S]簇的铁硫蛋白,具有两种同工酶,分别为细胞质乌头酸酶和线粒体乌头酸酶^[5]。细胞质乌头酸酶在低铁状态下可与铁响应元件

(iron-responsive elements, IRE)结合, 影响编码铁蛋白基因 mRNA 的翻译过程, 而线粒体乌头酸酶是三羧酸循环中的关键酶之一, 负责将柠檬酸转化为异柠檬酸^[6]。乌头酸酶在不同物种中均具有重要的生物学功能, 人体线粒体乌头酸酶缺陷影响小脑和视网膜发育, 且与多种神经退行性疾病有关, 胞质乌头酸酶则参与维持脂肪细胞分化^[7-8]。在梨、柑橘等果实中, 乌头酸酶的活性与果实中柠檬酸含量密切相关, 影响果实酸性风味形成^[9-10]。此外, 在植物抗病信号转导中, 一氧化氮可使乌头酸酶失活, 中断三羧酸循环, 减少活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生, 从而调控植物抗病性^[11-12]。微生物中乌头酸酶的生物学功能也逐步被揭示: 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)乌头酸酶的失活抑制了其指数生长后期的增殖^[13-14]; 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)中乌头酸酶基因 *CitB* 与孢子形成密切相关^[15]; 幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)中乌头酸酶缺陷突变体 $\Delta acnB$ 表现出运动性下降、对氧化胁迫更加敏感等表型变化^[16]; 此外, 植物病原细菌野油菜黄单胞菌(*Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*) *acnB* 敲除突变体诱导寄主细胞坏死的能力下降, 致病力减弱^[17]; 水稻黄单胞菌(*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*) *citB* 的敲除影响其运动性、致病力及氧化胁迫响应能力^[18]。然而, 目前尚无关于乌头酸酶在植物病原真菌中的功能报道, 在基本生物学过程中发挥的作用也不明确。

本研究通过结构域搜索、同源比对等方法筛选出层出镰刀菌中 5 个编码乌头酶的基因, 构建了 3 个敲除突变体, 通过对敲除突变体的表型观察, 明确了乌头酸酶家族在层出镰刀菌产孢、孢子形态分化、环境胁迫响应中发挥的功能, 并分析了其对三羧酸循环、线粒体代谢的影响。本研究结果为深入探究乌头酸酶家族

在真菌中的生物学功能及作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及植物材料

层出镰刀菌野生型菌株 HM19-1-1 由中国农业科学院草原研究所分离鉴定^[2]。用于致病力测定的苜蓿品种为阿尔冈金。

1.1.2 主要试剂

PCR 扩增使用的高保真酶 Phanta Max 及逆转录(HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis)、荧光定量 PCR (ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix)使用的酶均购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 敲除转化子筛选所使用的潮霉素 B 试剂购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 原生质体制备所使用的溶菌酶、蜗牛酶、纤维素酶购自上海瑞永生物科技有限公司; 葡萄糖、NaCl 等其他常规化学试剂均购自中国医药集团有限公司; ATP 测定试剂盒、过氧化氢含量测定试剂盒均购自南京碧云天生物技术有限公司; 乌头酸酶活性测定试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司。

1.2 乌头酸酶家族蛋白的生物信息学分析

从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载 40 种真菌的蛋白数据, 作为蛋白数据库。使用 HMMER3.0 (<http://hmmer.janelia.org/>)软件的 *hmmsearch* 程序, 以乌头酸酶保守结构域 *aconitase family* 的隐马尔可夫模型(PF00330)作为探针, 对 40 种真菌的蛋白数据库进行筛选, *E-value* 设置为 $1e-04$, 在 40 种真菌中筛选具有乌头酸酶结构域的候选蛋白, 并下载候选蛋白的序列。利用 ClustalW 软件对乌头酸酶蛋白进行多重序列比对后, 在 MEGA 7 中使用最大似然法构建系统发育树, 设置进化模型为 JonesTaylor-Thornton, 采用自举法检测, *bootstrap* 值设为 1 000。

1.3 层出镰刀菌乌头酸酶家族蛋白的结构分析

使用 NPS@ : SOPMA SECONDARY STRUCTURE PREDICTION METHOD (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)进行层出镰刀菌 FpACO 蛋白的二级结构分析, 统计 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角结构在 FpACO 蛋白中的比例。使用 SWISS-MODEL 工具(<http://swissmodel.expasy.org/>)进行蛋白三级结构模型构建, 获取蛋白三级结构模型后, 使用 PyMOL4.6 进行可视化处理, 标明各类二级结构在蛋白模型中的位置。

1.4 *FpACO* 家族基因的敲除及回补

基于同源重组双交换原理进行 *FpACO* 家族基因的敲除。首先通过 PCR 技术, 使用特异性引物从基因组 DNA 中扩增出目的基因上、下游各 1 000 bp 左右的同源臂序列, 将其与潮霉素抗性基因片段通过 Double-joint PCR 技术融合为 1 个敲除大片段后^[19], 将回收纯化的敲除大片段采用聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)介导的原生质体转化法转入层出镰刀菌 HM19-1-1 菌株中, 过程参照 Ferrara 等^[20]的方法进行, 将转化混合液加入再生培养基(regeneration medium, RM)中过夜复苏细胞壁后, 使用加有潮霉素的平板对转化子进行筛选并提取转化子 DNA 进行后续 PCR 验证, 引物信息见表 1。回补菌株的构建则通过将启动子片段、mcherry 荧光片段、*FpACO* 家族基因片段及 G418 硫酸盐(G418 sulfate, G418)抗性片段组成的回补大片段转化到相应敲除突变体中, 使用 G418 进行回补转化子的筛选。

1.5 层出镰刀菌基本生物学表型分析

层出镰刀菌营养生长速率的测定采用平板交叉测量法, 将待测菌株的菌块放置于马铃薯葡萄糖琼脂(potato dextrose agar, PDA)平板

上, 于 26 °C 培养箱中倒置培养 7 d 后, 测量菌落直径。层出镰刀菌的产孢培养于羧甲基纤维素(carboxymethyl cellulose, CMC)培养基中进行, 将待测菌株的菌饼加入 CMC 液体培养基后, 26 °C、250 r/min 振荡培养, 于 48 h 时在显微镜下进行孢子计数及形态记录。后续将拍摄的孢子形态图片在 Image J 软件中进行孢子长度统计。层出镰刀菌环境胁迫敏感性测定按照下述方法进行: 将待测菌株分别接种到含有 0.2% 刚果红(congo red, CR)、0.05% 十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)、0.2% 荧光白试剂(calcofluor white, CFW)、2 mol/L NaCl、1.5 mol/L CaCl₂、2 mol/L MgCl₂ 的 PDA 平板上, 同时以不含任何胁迫试剂的 PDA 培养基作为对照, 26 °C 培养 7 d 后统计菌落直径, 计算抑制率。

1.6 层出镰刀菌致病力测定

参照孔前前等^[21]描述的方法测定层出镰刀菌的致病力。将待测菌株的菌饼接种在 1% 水琼脂培养基平板上, 培养约 7–10 d。对苜蓿种子进行 1 次灭菌水冲洗、3 次 75% 乙醇消毒、1 次次氯酸钠溶液消毒和 3 次灭菌水冲洗后, 置于超净工作台中吹干, 夹取种子至水琼脂平板上菌落边缘位置, 围绕菌落边缘均匀排布 1 圈, 置于 26 °C 培养箱内, 10 d 后观察、记录种子及幼苗的发病程度, 计算病情指数。

1.7 层出镰刀菌的基因表达量分析

首先进行样品 RNA 的提取, 将待测菌丝样品收集好后, 液氮研磨成粉末状, 加入 1 mL RNA 提取试剂 TRIzol 中, 混匀后加入 200 μ L 氯仿, 剧烈振荡片刻后于室温静置 10 min, 4 °C、13 200 r/min 离心 10 min 后, 小心吸取上清液至新的离心管中, 加入 200 μ L 氯仿再次抽提 1 次后, 取上清, 加入等体积异丙醇, -20 °C 静置至少 30 min, 再次离心, 弃上清, 使用 70% 乙醇(DEPC 水配制)洗涤沉淀, 晾干, 溶

表 1 本研究所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')
FpACO3-5'UTR	GAAGCAGACATTCGCAGAG	CAAATAGGCATTGATGTGTT GACCTCCTAGTAGGCAACGGCACCA
FpACO3-3'UTR	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTA GAAATGCCGAATGATAGATTG	ACATTGACGAGGAAGCAAA
FpACO3-QC	CGTGCACGATTTCTTCAA	GAGGATAAGGCGACTGTGC
FpACO3-MD	ATGGTTTCAATGGAGGTGC	TTATATGCCCTTAGACAGCA
FpACO4-1-5'UTR	ATTCATAACTGCCGTAACCC	CAAATAGGCATTGATGTGTTGACCT CCTAGCCCCGAAGTACAGAAACC
FpACO4-1-3'UTR	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAG TCGCCATAATCTCACCAAT	ATCGCCTCCAGAACTACCT
FpACO4-1-QC	TTTCCCAGTCTTGATAACCG	TTGCCATTTTCATCTTGTGC
FpACO4-1-MD	ATGCCGCTGACAGCATCAC	TCAAGCCGTGCTGCCCAA
FpACO4-2-5'UTR	AGGACGCTTGCACGGTTAG	CAAATAGGCATTGATGTGTTGACCT CCTGCCGAGCAGGTAAGGATT
FpACO4-2-3'UTR	CGTCCGAGGGCAAAGGAATAGAGTAG GTTGAGCGCCCATGTCTTT	GAATAGCGGCAGCCTTGT
FpACO4-2-QC	TTCATAATGCGGCTTAGAGG	TGGGCACTGAGGAGATACG
FpACO4-2-MD	ATGCTTGCTACACGCCAGGTC	TTAGTTCTTGGTGGCCTTGGC
HPH	GGAGGTCAACACATCAATGCCTATT	GGAGGTCAACACATCAATGCCTATT
FpACO1-1-RT	TTCCTGGCATTCTTCCCC	AAGCGCTCGTCGATAGTGAG
FpACO1-2-RT	TCCAAAGATCGTGGGTGGTG	AGTGCCGAGTCTGACACAAG
FpACO3-RT	GTTGCCACTGTCCGTCTGTA	ACCGCGTGTTTAGTGGGAAT
FpACO4-1-RT	TCTTGGGTGTTTCGTCTCACG	TCGATGACCTTGCCCTTTCC
FpACO4-2-RT	CGTGGAAGAGCTACCTCAA	GTGGACAGTAGTGGGGTTGG
Fpactin-RT	CCCCATTGAGCACGGTGTG	CTCACGGTTGGACTTGGGGT
Promoter	CCCATCAACCAAATTCGAG	ATCCTCCTCGCCCTTGCTCACCATGA CAAATGTTTCGTGAGAATTAA
mcherry	ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGGAT	CTTGTACAGCTCGTCCATGC
G418	GGAGGTCAACACATCAATGCT	TCAGAAGAACTCGTCAAGAAG
FpACO3-C	GCATGGACGAGCTGTACAAGATGGTT TCAATGGAGGTGC	AGCATTGATGTGTTGACCTCCTATGC CCTTAGACAGCA
FpACO4-1-C	GCATGGACGAGCTGTACAAGATGCCG CTGACAGCATCAC	AGCATTGATGTGTTGACCTCCAGCCG TGCTGCCCAA
FpACO4-2-C	GCATGGACGAGCTGTACAAGATGCTT GCTACACGCCAGGTC	AGCATTGATGTGTTGACCTCCGTTCT TGGTGGCCTTGGC
FpIdh-RT	AGCAGATCGAGGTCTCTGGT	GCAGGATACCCTTGAGACCG
FpKgd-RT	GAGAAGGGCCTTGTACCCC	TGTTGTCGCGAGCCTTTTTG
FpScs-RT	CATTGACAATGGGTTCCGC	GCCACCAACACCTTTTTGAC
FpSdh-RT	TGCAGACTGATGTCAGCGTT	TCCAGATCATGCTGCGATCC
FpFum-RT	CTGTTATGCACATCGCTGCC	GCGTCCTGGAGATGAGTACG
FpMdh-RT	TGGTTTCCGATTTGCCGAGA	GAAGAAGTCGGTGCCAGTCA
FpCit-RT	TCCCGCGTACATGAATACCG	GCTCTTCTCGACCAACTGCT

解 RNA 沉淀于 RNAase free 水中。随后立刻进行反转录反应, 反转录操作按照 HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis 试剂盒说明书进行。cDNA 合成后, 按照 ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix 试剂说明, 配制总体积为 20 μ L 的反应体系, 进行荧光定量 PCR 分析。

1.8 层出镰刀菌线粒体代谢相关指标测定

FpACO 家族基因敲除突变体的总乌头酸酶活性的测定参照试剂盒说明书, 将待测菌株的菌丝液氮研磨成粉末状后加入 1 mL 试剂一中, 振荡混匀后于 4 $^{\circ}$ C、13 200 r/min 离心 15 min, 取上清置于冰上, 随后将室温预热的 180 μ L 试剂四与 20 μ L 待测酶液混匀, 静置 5 min 后, 测定 OD_{240} 值。过氧化氢含量测定试验使用过氧化氢检测试剂盒, 使用过氧化氢检测裂解液处理菌丝后, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清 50 μ L, 加入 100 μ L 过氧化氢检测试剂, 吹打混匀后, 室温放置 30 min, 测定 OD_{560} 值。ATP 含量测定试验参照 ATP 检测试剂盒说明书进行, 使用 ATP 检测裂解液处理菌丝, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清待用, 依据样品个数取适量的 ATP 检测试剂, 按照 1:9 的比例用 ATP 检测试剂稀释液稀释 ATP 检测试剂, 在 20 μ L 待测样品中加入 100 μ L ATP 检测工作液, 迅速混匀, 至少间隔 2 s 后, 使用化学发光仪测定相对发光强度值(relative light unit, RLU)。

2 结果与分析

2.1 真菌乌头酸酶家族蛋白的系统进化分析

利用 hmmsearch 工具, 搜索出 40 种真菌中包含乌头酸酶结构域(PF00330)的蛋白, 共筛选到 155 个乌头酸酶蛋白, 通过 NCBI 中 CD-search 功能对筛选出的乌头酸酶蛋白进行验证, 显示所得全部蛋白序列符合乌头酸酶结构域特征。使用 MEGA 7 进一步构建了真菌乌头

酸酶家族的系统发育树, 同时将 CD-search 数据库中的乌头酸酶结构域种类信息体现在系统发育树中, 155 个蛋白的乌头酸酶结构域可分为 3 个类型, 分别为: H_aconitase、Aconitase_mito 及 Aconitase_swivel, 其中 H_aconitase 为高乌头酸酶类型(homoaconitase), 主要参与赖氨酸的生物合成^[22]。Aconitase_mito 为线粒体中参与三羧酸循环的一类乌头酸酶。Aconitase_swivel 为乌头酸酶旋转结构域, 主要分布在蛋白 C 端^[23]。依据进化树中的亲缘关系及结构域类型, 将真菌乌头酸酶分为 4 组: ACO1、ACO2、ACO3 和 ACO4, 其中 ACO1 为高乌头酸酶类型, 其余 3 组为线粒体乌头酸酶类型, ACO2 组的蛋白大多在 C 端具有 Aconitase_swivel 结构域(图 1)。依据上述分类, 层出镰刀菌中的 5 个 ACO 蛋白分别属于 ACO1、ACO3、ACO4 类群, 将其命名为 FpACO1-1 (FPRO_11169)、FpACO1-2 (FPRO_07489)、FpACO3 (FPRO_07808)、FpACO4-1 (FPRO_06900)、FpACO4-2 (FPRO_06391)。

2.2 *FpACO* 基因的表达模式及蛋白结构分析

FpACO 基因在 CM 平板上及侵染苜蓿幼苗过程中的表达量分析结果显示, 这 5 个 *FpACO* 基因均不同程度地受到寄主诱导表达, 在侵染状态下表现出显著上调(图 2)。通过 NPS@SOPMA 工具进行了 FpACO 蛋白的二级结构预测分析, 统计了 α 螺旋、 β 折叠、 β 转角及 coil 卷曲结构的比例分布, 结果显示 3 类 FpACO 蛋白之间各二级结构的比例存在较大差异(图 3A)。进一步通过 SWISS MODEL 工具, 基于比较建模法, 进行了 FpACO 蛋白三级结构分析, 对模型进行了可视化处理(图 3B), 各模型与模板蛋白的一致性均在 80% 以上, 建模质量评价结果也在 0.7 以上, 表明与模板蛋白的匹配度较高, 获取的 FpACO 蛋白结构模型可靠性

较高。结合 FpACO 蛋白三级结构模型及二级结构比例分析可以看出, FpACO1-1 与 FpACO1-2 虽均属于高乌头酸酶, 但结构差异较大, FpACO4-1 与 FpACO4-2 蛋白较为相似, 均属于

线粒体乌头酸酶, 而 FpACO3 与另外 2 类乌头酸酶结构并不相似。以上结果表明, 层出镰刀菌中的 5 个 FpACO 蛋白在结构上归属于不同类型的乌头酸酶, 暗示了其功能的多样性。

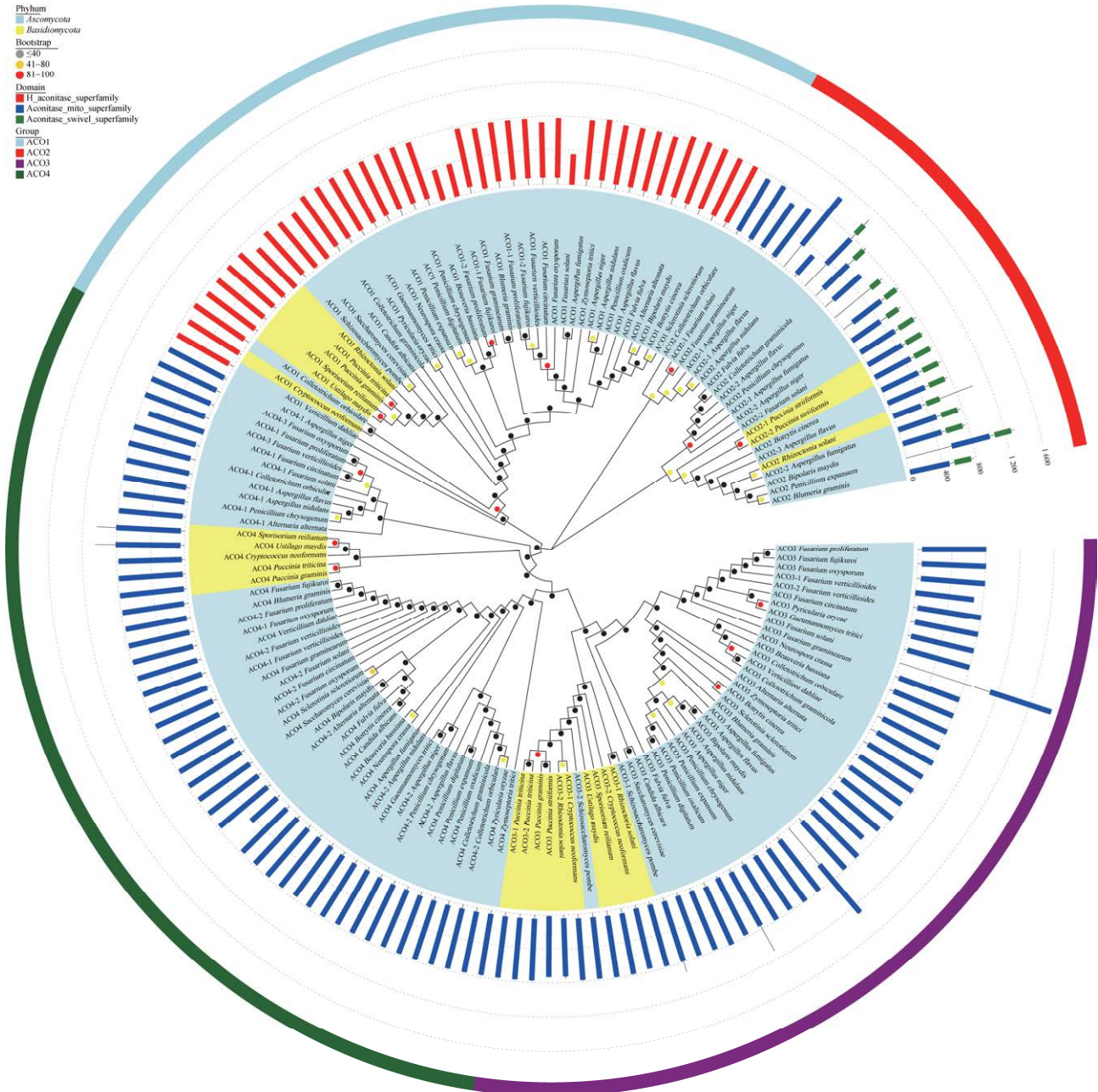


图 1 真菌乌头酸酶家族蛋白系统进化树及保守结构域分析
Figure 1 Phylogenetic tree and conserved domains of the ACO proteins in fungi.

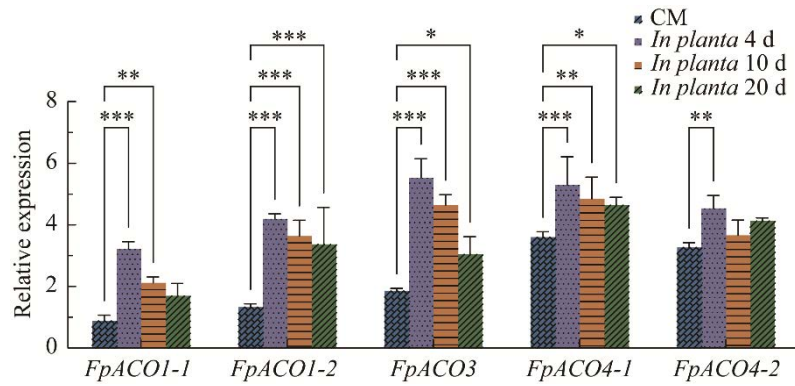


图 2 层出镰刀菌 *FpACO* 家族基因表达模式分析

Figure 2 Expression profiles of *FpACO* genes in *Fusarium proliferatum*. Expression of *FpACO* genes in CM medium and during infection for 4, 10, and 20 days (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$). Error bars indicate the mean \pm SD of three independent replicates.

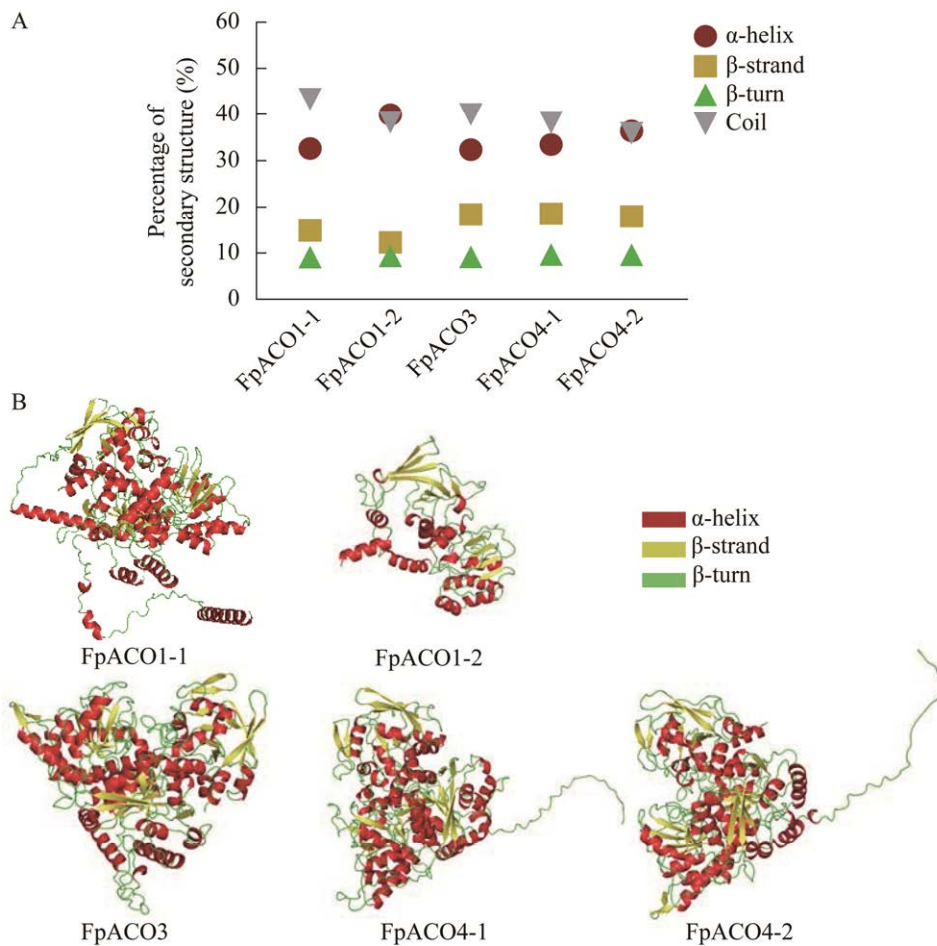


图 3 层出镰刀菌 *FpACO* 蛋白结构分析

Figure 3 Structural analysis of the *FpACO* proteins. A: Percentage of the secondary structures of the ACO proteins. B: The model graphs of the tertiary structures for *FpACO* proteins.

2.3 *FpACO* 基因敲除菌株及回补菌株的构建

为了探究 *FpACO* 家族各成员在层出镰刀菌中的功能，利用同源重组双交换策略构建 *FpACO* 家族基因的敲除突变体，使用位于基因上、下游的同源臂片段内部的验证引物 ID1-F、ID1-R 及位于被敲除基因的开放阅读框(open reading frame, ORF)区内的验证引物 ID2-F、ID2-R 对敲除转化子进行验证(图 4A)。结果显示，成功获得 *FpACO3*、*FpACO4-1*、*FpACO4-2* 基因的敲除转化子(图 4B)。经过 3 次以上独立的敲除试验，验证了 100 个以上转化子后，均未能成功敲除 *FpACO1-1*、*FpACO1-2* 基因，考虑其可能敲除致死。随后，在 $\Delta FpACO3$ 、 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 突变体中转入了由

FpACO 基因启动子片段、mcherry 荧光片段、*FpACO* 基因片段及 G418 抗性片段所组成的回补大片段，使用 G418 筛选出阳性转化子，并进行了 PCR 验证(图 4B)。为了进一步验证敲除菌株与回补菌株，采用 qRT-PCR 方法分析了各 *FpACO* 基因突变体中目的基因的表达水平，结果显示，与野生株(wild type, WT)相比， $\Delta FpACO3$ 、 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 敲除突变体中被敲除的基因表达几乎检测不到，而各回补菌株中，基因的表达恢复到 WT 菌株水平(图 4C)。

2.4 *FpACO* 影响层出镰刀菌基本生物学过程

对 $\Delta FpACO3$ 、 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 菌株进行表型观察，敲除突变体的生长速率与野生型菌株无明显差异，且形态无变化，表明 *FpACO* 基因的单敲不影响菌丝的生长(图 5A)。

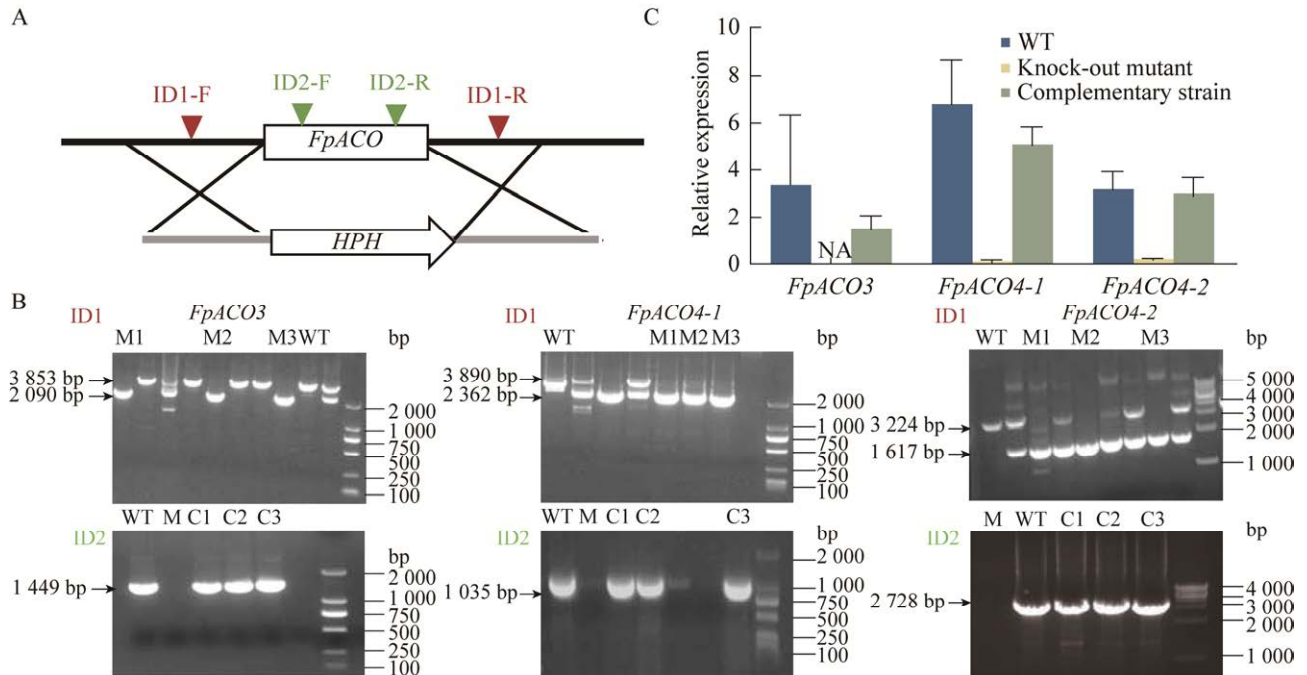


图 4 *FpACO* 基因敲除突变体及回补菌株的构建

Figure 4 Generation and validation of *FpACO* genes-targeted disruption strains and complemented strains. A: Strategy for generation of *FpACO*-targeted disruption strains. B: PCR identification of the $\Delta FpACO$ and $\Delta FpACO$ -C. C: Transcript levels of the *FpACO* genes in WT, $\Delta FpACO$ and $\Delta FpACO$ -C strains. *HPH*: Hygromycin B resistance gene; ID1-F/R, ID2-F/R: Primers used for identification; M1, M2, M3: Deletion mutants; C1, C2, C3: Complemented strains; NA: Not available. Error bars in C indicate the mean \pm SD of three independent replicates.

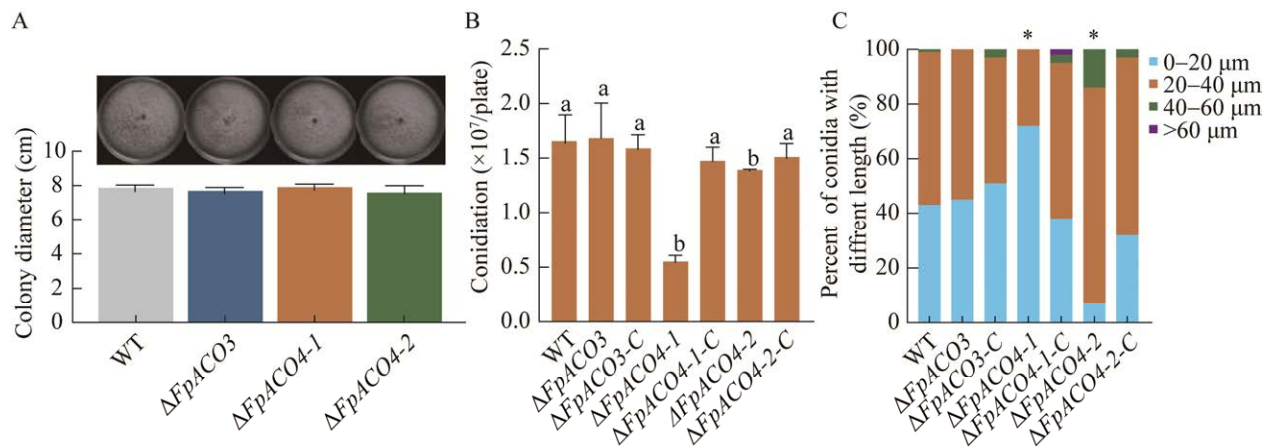


图5 *FpACO* 在层出镰刀菌基本生物学过程中的功能

Figure 5 *FpACO* genes are involved in fundamental biological processes in *Fusarium proliferatum*. A: Colony morphology and growth rates of WT, $\Delta FpACO3$, $\Delta FpACO4-1$, $\Delta FpACO4-2$ on PDA plates. B: Macroconidia production of WT, $\Delta FpACO3$, $\Delta FpACO4-1$, $\Delta FpACO4-2$ strains. C: Length of macroconidia of WT, $\Delta FpACO3$, $\Delta FpACO4-1$, $\Delta FpACO4-2$ and complemented strains. Error bars indicate the mean \pm SD of three independent replicates (*: $P < 0.05$). Values followed by different letters (a, b) are significantly different.

产孢测定实验结果显示, 在 CMC 培养基中培养 48 h 时, $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 菌株的产孢量分别减少了 66.7%、15.7%, 回补菌株 $\Delta FpACO4-1-C$ 、 $\Delta FpACO4-2-C$ 的产孢量则恢复到野生型菌株的产孢水平(图 5B)。显微镜下观察并统计分生孢子长度, $\Delta FpACO4-1$ 所产生的大型分生孢子长度在 0–20 μm 的占 71%, $\Delta FpACO4-2$ 所产大型分生孢子长度在 20–40 μm 的占 79%, 而野生型菌株所产分生孢子长度为 0–20 μm 与 20–40 μm 的比例分别为 43%、56%, 回补菌株 $\Delta FpACO4-1-C$ 、 $\Delta FpACO4-2-C$ 所产生的大型分生孢子长度分布比例与野生型菌株无明显差异(图 5C)。以上结果表明 *FpACO4-1* 与 *FpACO4-2* 基因参与调控层出镰刀菌产孢及孢子形态发育过程。

2.5 *FpACO* 参与调控层出镰刀菌环境胁迫响应过程

环境胁迫敏感性测定试验结果显示, 相较于 WT, $\Delta FpACO3$ 、 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 敲除突变体在细胞壁胁迫因子 CR 及金属离子

$CaCl_2$ 处理下, 生长抑制率降低, 抗性增强, 回补菌株 $\Delta FpACO3-C$ 、 $\Delta FpACO4-1-C$ 及 $\Delta FpACO4-2-C$ 对这两种胁迫的敏感性则与野生型菌株一致。 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 敲除突变体在金属离子 $MgCl_2$ 胁迫处理下的抑制率降低, 表明其对 $MgCl_2$ 胁迫的抗性增强, 而回补菌株对 $MgCl_2$ 胁迫的敏感性恢复到野生型菌株的水平。 $\Delta FpACO3$ 、 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 突变体对另外两种细胞壁胁迫因子 SDS、CFW 以及渗透压胁迫因子 NaCl 的敏感程度无变化(图 6A、6B)。以上结果表明, *FpACO* 家族成员可参与调控层出镰刀菌响应细胞壁胁迫及金属离子胁迫的过程。

2.6 部分 *FpACO* 基因的单独敲除不影响层出镰刀菌致病性

致病力测定结果显示, WT 接种组及 $\Delta FpACO3$ 、 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 菌株接种组的幼苗被菌丝包裹较为明显, 根部褐变严重, 部分种子甚至由于完全被菌丝包裹, 无法萌发, 而对照组中大部分幼苗完全健康(图

7A)。统计结果显示 $\Delta FpACO3$ 、 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 菌株接种组幼苗的病情指数与 WT 接种组无显著差异(图 7B)。以上结果表明, $FpACO3$ 、 $FpACO4-1$ 、 $FpACO4-2$ 基因的单敲并不影响层出镰刀菌致病力。

2.7 FpACO 参与层出镰刀菌线粒体代谢调控

线粒体代谢相关指标测定结果显示,

$\Delta FpACO3$ 、 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 中总鸟头酸酶的活性分别下降了 28%、31%、54% (图 8A)。 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 中 ATP 含量均显著低于野生型, 其能量代谢存在缺陷(图 8B)。 $\Delta FpACO3$ 及 $\Delta FpACO4-2$ 中过氧化氢的含量相比于野生型分别下降了 41%、46% (图 8C)。随后, 检测了 $\Delta FpACO3$ 、 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 中编码 7 个三羧酸循环关键酶的基因表达情况,

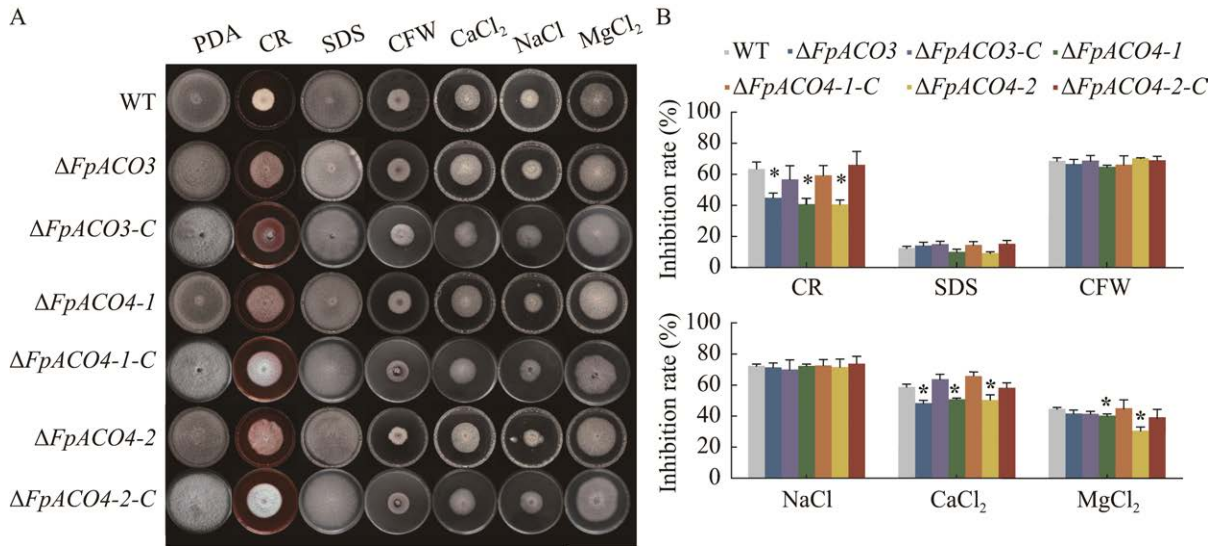


图 6 FpACO 在层出镰刀菌响应环境胁迫过程中的作用

Figure 6 FpACO functions in regulating the response to environmental stress. A: Colony morphology. B: Inhibition rates of WT, $\Delta FpACO3$, $\Delta FpACO4-1$, $\Delta FpACO4-2$ and complemented strains on media containing different stress agents. Error bars indicate the mean \pm SD of three independent replicates (*: $P < 0.05$).

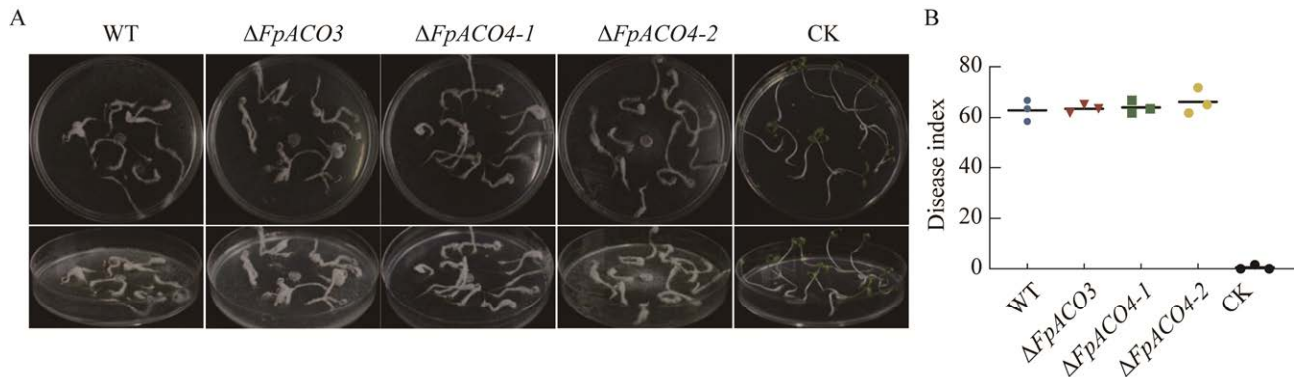


图 7 FpACO 家族基因的敲除不影响层出镰刀菌对苜蓿的致病力

Figure 7 Knockout of $FpACO$ genes show no effect on the virulence of *Fusarium proliferatum* on alfalfa. A: Disease phenotypes of alfalfa seedlings inoculated by WT, $\Delta FpACO3$, $\Delta FpACO4-1$, $\Delta FpACO4-2$ strains. B: Disease index of the WT, $\Delta FpACO3$, $\Delta FpACO4-1$, $\Delta FpACO4-2$ inoculated alfalfa seedlings.

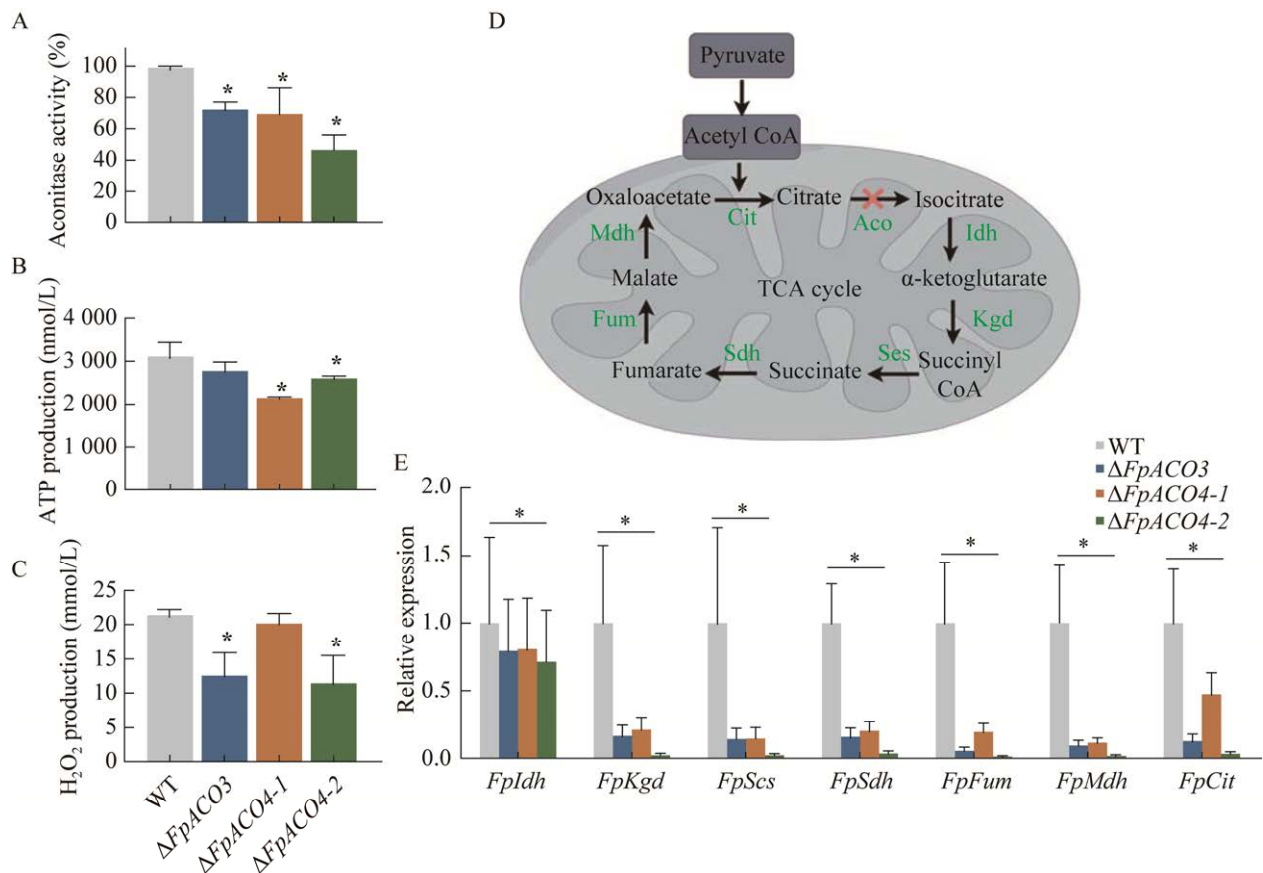


图 8 FpACO 家族参与调控层出镰刀菌线粒体代谢

Figure 8 FpACO proteins are involved in regulating the mitochondrial-related metabolism of *Fusarium proliferatum*. A: Relative total aconitase activity of $\Delta FpACO3$, $\Delta FpACO4-1$, $\Delta FpACO4-2$ strains compared with WT. B: ATP production in WT, $\Delta FpACO3$, $\Delta FpACO4-1$, $\Delta FpACO4-2$ strains. C: H₂O₂ production in WT, $\Delta FpACO3$, $\Delta FpACO4-1$, $\Delta FpACO4-2$ strains. D: Schematic diagram showing the down-regulated TCA cycle genes in $\Delta FpACO3$, $\Delta FpACO4-1$, $\Delta FpACO4-2$ strains. Green font indicates down-regulated genes. E: Relative expression levels of the genes in the TCA cycle mentioned above. Error bars indicate the mean \pm SD of three independent replicates (*: $P < 0.05$).

结果显示, $\Delta FpACO3$ 、 $\Delta FpACO4-1$ 、 $\Delta FpACO4-2$ 中, 编码异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase, FpIdh)、 α 酮戊二酸脱氢酶(α ketoglutarate dehydrogenase, FpKgd)、琥珀酰辅酶 A 合成酶(succinyl-CoA synthetase, FpScs)、琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase, FpSdh)、富马酸酶(fumarate, FpFum)、苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, FpMdh)、柠檬酸合成酶(citrate synthase, FpCit)的基因均显著下调表达, 表明

$FpACO3$ 、 $FpACO4-1$ 、 $FpACO4-2$ 基因的敲除严重影响三羧酸循环中的关键酶(图 8D、8E)。以上结果表明, $FpACO3$ 、 $FpACO4-1$ 、 $FpACO4-2$ 基因在线粒体代谢相关过程中具有调控作用。

3 讨论与结论

乌头酸酶在不同物种中高度保守^[5]。本研究对 40 种真菌中的 155 个包含乌头酸酶结构域

(PF00330)的蛋白进行了系统进化分析, 基于进化关系及保守结构域的亚分类, 将其分为 4 个类型, 每类 ACO 酶中在不同真菌中相对保守, 蛋白结构域的分布及蛋白长度也较为接近(图 1), 其中除 ACO1 为高乌头酸酶类外, 其余 3 类均为线粒体乌头酸酶类型。Makarova 等^[23]曾将乌头酸酶蛋白分为 5 类, 线粒体乌头酸酶、具有铁调节蛋白功能的乌头酸酶类及与甘氨酸合成有关的高乌头酸酶类均为真核生物中广泛存在的类型, 其分类结果与本研究中的系统进化分类结果相似, 表明该分类依据较为可靠。层出镰刀菌中不存在具有 Aconitase_swivel 旋转结构域的 ACO2 类型, 而 Secgin 等^[24]对番茄乌头酸酶蛋白的研究结果中提到, 旋转结构域是乌头酸酶蛋白 C 端的典型特征之一, 而同时具有旋转结构域与乌头酸酶结构域的蛋白属于经典的乌头酸酶。结构域分析结果显示, Aconitase_swivel 旋转结构域在真菌中却并不普遍存在, 推测该结构域可能在不同物种中并不保守, 其功能也有待探究。

为了探究乌头酸酶家族在层出镰刀菌中的生物学功能, 本研究试图对层出镰刀菌中 5 个编码乌头酸酶的基因进行敲除, 然而未能成功敲除 *FpACO1-1*、*FpACO1-2* 基因, 考虑其可能具有不可替代的生化特性, 导致敲除致死。*FpACO4-1*、*FpACO4-2* 的敲除导致层出镰刀菌产孢量减少, 且对产生的分生孢子长度有一定影响(图 5B、5C)。其他微生物中, 乌头酸酶在生长、繁殖过程中也具有类似的调控作用, 乌头酸酶的失活不仅影响金黄色葡萄球菌指数生长期的增殖速度, 还影响其在平台期的存活率^[13]。枯草芽孢杆菌 CitB 蛋白 C 端区域突变后, 菌株出现产孢缺陷^[15]。此外, 本研究发现, *FpACO3*、*FpACO4-1*、*FpACO4-2* 还参与调控层出镰刀菌对细胞壁胁迫、金属离子胁迫的响

应过程(图 6), 而幽门螺杆菌 AcnB 及沙门氏菌 (*Salmonella Pullorum*) CitB 也可参与不同的胁迫响应过程^[16,25]。以上均表明微生物中乌头酸酶家族蛋白在基本生物学过程中发挥重要作用, 且其功能具有一定保守性。

乌头酸酶在病原菌致病过程中发挥的作用已被证实, 烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)中高乌头酸酶基因 *lysF* 的敲除突变体毒力几乎丧失^[26], 而新隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)中高乌头酸酶基因 *lys4* 的敲除突变体对小鼠模型的致病力显著下降^[27]。此外, 植物病原细菌野油菜黄单胞菌中, 乌头酸酶基因 *acnB* 的敲除导致其对辣椒的致病力下降^[17]。水稻黄单胞菌 *citB* 的敲除影响其诱导植物过敏反应的能力, 导致致病力下降^[18]。然而, 本研究发现 *FpACO3*、*FpACO4-1*、*FpACO4-2* 基因的单敲并不影响层出镰刀菌致病力(图 7), 推测可能由于其均属于线粒体乌头酸酶类, 主要负责在三羧酸循环中发挥催化活性, 催化反应类型可能存在重叠, 生化活性类似, 表现出一定的功能冗余, 在后续的研究中, 可通过亚细胞定位观察、体外的乌头酸酶活性测定等手段, 验证 *FpACO3*、*FpACO4-1* 及 *FpACO4-2* 酶的生化功能是否具有相似性, 也可以通过构建双敲突变体、三敲突变体, 深入探究这 3 个线粒体乌头酸酶在致病性调控中发挥的作用。

干扰病原菌的能量代谢是杀菌剂的主要作用机制之一, 糖酵解、脂质氧化、乙酰辅酶 A 合成、三羧酸循环、呼吸链以及旁路氧化呼吸等途径中的许多关键酶, 均为多种杀菌剂的作用靶标, 例如代森类杀菌剂通过与乌头酸酶的辅助因子铁离子结合形成螯合物, 使乌头酸酶活性被抑制, 干扰病原菌呼吸作用^[28]; 琥珀酸脱氢酶抑制剂(succinate dehydrogenase inhibitor, SDHI)类杀菌剂通过靶标线粒体三羧酸循环系

统中的琥珀酸脱氢酶, 抑制真菌的呼吸作用^[29]。植物病原真菌中, 呼吸抑制剂类杀菌剂靶标的生物学功能已有部分研究, 尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)中苹果酸脱氢酶基因的敲除可导致显著的生长、产孢缺陷, Δ Fonmdh2 突变体致病力几乎丧失^[30]。禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)中琥珀酸脱氢酶 *FgSDHC1* 的敲除可导致菌丝生长速率降低、分枝增多、致病力下降等^[31]。稻巨座壳菌(*Magnaporthe oryzae*)中两个编码柠檬酸合酶的基因敲除均可导致产孢缺陷, 且在水稻叶片上的致病力明显减弱^[32]。然而作为代森类杀菌剂的靶标之一, 植物病原真菌中乌头酸酶的生物学功能尚不清楚, 本文对层出镰刀菌乌头酸酶功能的研究, 有助于在杀菌剂靶标的理论层面阐明三羧酸循环关键代谢酶的功能, 从而为探究代森类杀菌剂的抗性机理、新型农药靶标挖掘提供思路。

本研究分析了层出镰刀菌中 5 个乌头酸酶家族基因的表达模式, 明确了其受寄主诱导表达的特性, 并明确 FpACO 蛋白在结构上的多样性与保守性。通过分析 Δ FpACO3、 Δ FpACO4-1、 Δ FpACO4-2 敲除突变体的表型, 明确了 *FpACO4-1* 与 *FpACO4-2* 基因在调控产孢及孢子形态发生中的作用, 此外, FpACO3、FpACO4-1、FpACO4-2 还可影响层出镰刀菌对细胞壁胁迫及金属离子胁迫的敏感性。FpACO3、FpACO4-1、FpACO4-2 在层出镰刀菌三羧酸循环、ATP 产生、过氧化氢含量等线粒体代谢相关过程中发挥作用, 为深入探究其对能量代谢的调控作用奠定了基础。综上, 本研究对乌头酸酶家族的部分成员在层出镰刀菌中的功能进行研究, 提出了其作为基础代谢酶的重要作用, 从而为深入认识层出镰刀菌的致病性分子机制与基础生理代谢分子机制奠定基础, 以期对病害防治、

呼吸抑制剂类杀菌剂的开发提供思路。

致谢

感谢中国农业科学院草原研究所张园园老师所提供的层出镰刀菌 HM19-1-1 菌株。

参考文献

- [1] ABBAS A, MUBEEN M, SOHAIL MA, SOLANKI MK, HUSSAIN B, NOSHEEN S, KASHYAP BK, ZHOU L, FANG X. Root rot a silent alfalfa killer in China: distribution, fungal, and oomycete pathogens, impact of climatic factors and its management[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 961794.
- [2] WANG L, WANG N, YU JL, WU J, LIU H, LIN KJ, ZHANG YY. Identification of pathogens causing alfalfa *Fusarium* root rot in inner Mongolia, China[J]. *Agronomy*, 2023, 13(2): 456.
- [3] 杨剑锋, 王乐, 张园园, 林克剑, 徐林波, 刘爱萍. 呼和浩特市苜蓿根腐病原菌鉴定及致病性测定[J]. *植物保护学报*, 2022, 49(4): 1093-1101. YANG JF, WANG L, ZHANG YY, LIN KJ, XU LB, LIU AP. Identification and pathogenicity test of pathogens causing alfalfa root rot in Hohhot[J]. *Journal of Plant Protection*, 2022, 49(4): 1093-1101 (in Chinese).
- [4] XIE LH, WU YF, WANG Y, JIANG YM, YANG B, DUAN XW, LI TT. Fumonisin B1 induced aggressiveness and infection mechanism of *Fusarium proliferatum* on banana fruit[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 288: 117793.
- [5] LUSHCHAK OV, PIRODDI M, GALLI F, LUSHCHAK VI. Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species[J]. *Redox Report*, 2014, 19(1): 8-15.
- [6] BENJAMIN JM, MASSE E. The iron-sensing aconitase B binds its own mRNA to prevent sRNA-induced mRNA cleavage[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(15): 10023-10036.
- [7] MORENO M, ORTEGA F, XIFRA G, RICART W, FERNANDEZ-REAL JM, MORENO-NAVARRETE JM. Cytosolic aconitase activity sustains adipogenic capacity of adipose tissue connecting iron metabolism and adipogenesis[J]. *The FASEB Journal*, 2015, 29(4): 1529-1539.

- [8] SPIEGEL R, PINES O, TA-SHMA A, BURAK E, SHAAG A, HALVARDSON J, EDVARDSON S, MAHAJNA M, ZENVIRT S, SAADA A, SHALEV S, FEUK L, ELPELEG O. Infantile cerebellar-retinal degeneration associated with a mutation in mitochondrial aconitase, ACO2[J]. *American Journal of Human Genetics*, 2012, 90(3): 518-523.
- [9] LI SJ, YIN XR, WANG WL, LIU XF, ZHANG B, CHEN KS. *Citrus* CitNAC62 cooperates with CitWRKY1 to participate in citric acid degradation *via* up-regulation of CitAco3[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(13): 3419-3426.
- [10] SHA S, LI J, WU J, SHAO LZ. Changes in the organic acid content and related metabolic enzyme activities in developing 'Xinping' pear fruit[J]. *African Journal of Agricultural Research*, 2011, 6: 3560-3567.
- [11] LAUS MN, SOCCIO M. First evidence of a protective effect of plant bioactive compounds against H₂O₂-induced aconitase damage in durum wheat mitochondria[J]. *Antioxidants*, 2020, 9(12): 1256.
- [12] IGAMBERDIEV AU, RATCLIFFE RG, GUPTA KJ. Plant mitochondria: source and target for nitric oxide[J]. *Mitochondrion*, 2014, 19: 329-333.
- [13] DING Y, LIU X, CHEN FF, DI HX, XU B, ZHOU L, DENG X, WU M, YANG CG, LAN LF. Metabolic sensor governing bacterial virulence in *Staphylococcus aureus*[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(46): E4981-E4990.
- [14] SOMERVILLE GA, CHAUSSEE MS, MORGAN CI, FITZGERALD JR, DORWARD DW, REITZER LJ, MUSSER JM. *Staphylococcus aureus* aconitase inactivation unexpectedly inhibits post-exponential-phase growth and enhances stationary-phase survival[J]. *Infection and Immunity*, 2002, 70(11): 6373-6382.
- [15] SERIO AW, PECHTER KB, SONENSHEIN AL. *Bacillus subtilis* aconitase is required for efficient late-sporulation gene expression[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(17): 6396-6405.
- [16] AUSTIN CM, WANG G, MAIER RJ. Aconitase functions as a pleiotropic posttranscriptional regulator in *Helicobacter pylori*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2015, 197(19): 3076-3086.
- [17] KIRCHBERG J, BUTTNER D, THIEMER B, SAWERS RG. Aconitase B is required for optimal growth of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in pepper plants[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e34941.
- [18] SAHEBI M, TAHERI E, TARIGHI S. CitB is required for full virulence of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2015, 31(10): 1619-1627.
- [19] YU JH, HAMARI Z, HAN KH, SEO JA, REYES-DOMINGUEZ Y, SCAZZOCCHIO C. Double-joint PCR: a PCR-based molecular tool for gene manipulations in filamentous fungi[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2004, 41(11): 973-981.
- [20] FERRARA M, HAIDUKOWSKI M, LOGRIECO AF, LESLIE JF, MULE G. A CRISPR-Cas9 system for genome editing of *Fusarium proliferatum*[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 19836.
- [21] 孔前前, 秦丰, 张雨竹, 马占鸿, 刘志龙, 王海光. 苜蓿镰孢菌根腐病病原致病性和毒素化学型测定[J]. *中国农业大学学报*, 2018, 23(5): 74-85.
- [22] KONG QQ, QIN F, ZHANG YZ, MA ZH, LIU ZL, WANG HG. Detection of pathogenicity and mycotoxin chemotypes of *Fusarium* causing alfalfa root rot[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2018, 23(5): 74-85 (in Chinese).
- [23] REMENTERIA A, LOPEZ-MOLINA N, LUDWIG A, VIVANCO AB, BIKANDI J, PONTON J, GARAIZAR J. Genes and molecules involved in *Aspergillus fumigatus* virulence[J]. *Revista Iberoamericana de Micologia*, 2005, 22(1): 1-23.
- [24] MAKAROVA KS, KOONIN EV. Filling a gap in the central metabolism of archaea: prediction of a novel aconitase by comparative-genomic analysis[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2003, 227(1): 17-23.
- [25] SECGIN Z, ULUISIK S, YILDIRIM K, ABDULLA MF, MOSTAFA K, KAVAS M. Genome-wide identification of the aconitase gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*) and CRISPR-based functional characterization of *SIACO2* on male-sterility[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(22): 13963.
- [26] KANG XM, ZHOU X, TANG YT, JIANG ZJ, CHEN JQ, MOHSIN M, YUE M. Characterization of two-component system CitB family in *Salmonella pullorum*[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(17): 10201.
- [27] LIEBMANN B, M HLEISEN TW, M LLER M, HECHT M, WEIDNER G, BRAUN A, BROCK M, BRAKHAGE AA. Deletion of the *Aspergillus fumigatus* lysine biosynthesis gene *lysF* encoding homoaconitase leads to attenuated virulence in a low-dose mouse infection model of invasive

- aspergillosis[J]. Archives of Microbiology, 2004, 181(5): 378-383.
- [27] DO E, PARK M, HU GG, CAZA M, KRONSTAD JW, JUNG WH. The lysine biosynthetic enzyme Lys4 influences iron metabolism, mitochondrial function and virulence in *Cryptococcus neoformans*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2016, 477(4): 706-711.
- [28] 徐汉虹. 植物化学保护学[M]. 5 版. 北京: 中国农业出版社, 2017.
- XU HH. Phytochemical Protection[M]. 5th ed. Beijing: China Agriculture Press, 2017 (in Chinese).
- [29] 吴小美, 王海霞, 云英子, 马忠华. 植物病原真菌对杀菌剂抗性的研究进展[J]. 植物保护, 2023, 49(5): 243-259.
- WU XM, WANG HX, YUN YZ, MA ZH. Research progresses on fungicide resistance in plant pathogenic fungi[J]. Plant Protection, 2023, 49(5): 243-259 (in Chinese).
- [30] HUANG ZL, LOU JJ, GAO YZ, NOMAN M, LI DY, SONG FM. FonTup1 functions in growth, conidiogenesis and pathogenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* through modulating the expression of the tricarboxylic acid cycle genes[J]. Microbiological Research, 2023, 272: 127389.
- [31] 段娟. 禾谷镰刀菌中琥珀酸脱氢酶 FgSdhC 和 FgSdhD 的功能研究[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2020.
- DUAN J. Functional analysis of succinate dehydrogenases FgSdhC and FgSdhD in *Fusarium graminearum*[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2020 (in Chinese).
- [32] 石磊. 稻瘟病菌两个假定柠檬酸合酶基因的功能分析[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2015.
- SHI L. Functional analysis of two putative citrate synthase genes in *Magnaporthe oryzae*[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2015 (in Chinese).