

# *FgPDK1* 调控禾谷镰孢菌响应渗透胁迫研究

李海梅<sup>1</sup>, 王滢莹<sup>1</sup>, 高骏<sup>2</sup>, 徐寸发<sup>3</sup>, 石志琦<sup>2</sup>, 陈健<sup>2</sup>, 许晓风<sup>1</sup>

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

(2. 江苏省农业科学院农产品质量与安全营养研究所, 江苏 南京 210014)

(3. 江苏省农业科学院中心实验室, 江苏 南京 210014)

**[摘要]** 真菌为了应对渗透胁迫进化出包括高渗甘油途径(high osmolarity glycerol, HOG)在内的一系列调控网络,但其上游信号调控因子尚不明确。本文以禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)为研究对象,在盐胁迫下通过遗传学和生理生化手段,研究了一个关键的线粒体能量代谢酶基因丙酮酸脱氢酶激酶(*FgPDK1*)在调控渗透胁迫方面的重要作用。结果显示,(1)菌丝生长测定结果表明 *FgPDK1* 敲除突变体( $\Delta FgPDK1$ )对盐胁迫的敏感性较野生型(PH-1)显著增加;(2)与 PH-1 相比较,盐胁迫下  $\Delta FgPDK1$  表现出更为严重的电解质外渗和更高的胞内甘油累计量;(3)盐胁迫下  $\Delta FgPDK1$  菌丝的活性氧(ROS)累计量、丙二醛含量、细胞死亡量都比 PH-1 显著增加;(4)盐胁迫下  $\Delta FgPDK1$  菌丝的抗氧化酶基因(*SOD* 和 *CAT*)表达量显著低于 PH-1;(5)上述生理生化表现在 *FgPDK1* 功能恢复菌株( $\Delta FgPDK1$ -C)均可恢复到野生型水平。这些结果表明 *F. graminearum* 可能通过 *FgPDK1* 调控 HOG 下游途径并维持抗氧化能力来应对高渗透胁迫。本研究为解析真菌适应渗透胁迫的分子调控机制提供了新证据。

**[关键词]** 禾谷镰孢菌, 丙酮酸脱氢酶激酶, 渗透胁迫, 甘油, 细胞死亡

**[中图分类号]** S432.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1001-4616(2018)01-0076-07

## *FgPDK1* Modulates Osmotic Stress Responses in *Fusarium graminearum*

Li Haimei<sup>1</sup>, Wang Yingying<sup>1</sup>, Gao Tao<sup>2</sup>, Xu Cunfa<sup>3</sup>, Shi Zhiqi<sup>2</sup>, Chen Jian<sup>2</sup>, Xu Xiaofeng<sup>1</sup>

(1. School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

(2. Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing 210014, China)

(3. Central Laboratory, Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing 210014, China)

**Abstract:** Fungi's HOG (high osmolarity glycerol) pathway in response to osmotic stress has been revealed. However, the upstream signaling regulator of the pathway remains unclear. In this study, we investigated the pivotal role of a mitochondrial energy metabolic gene encoding for pyruvate dehydrogenase kinase (*FgPDK1*) in *Fusarium graminearum* in the regulation of NaCl stress by using genetic and physiological-biochemical approaches. The main results have been obtained as follows, (1) Determination of hyphal growth indicated that  $\Delta FgPDK1$  (an *FgPDK1* knock-out mutant) was more sensitive than wild type (PH-1). (2) Compared to PH-1, NaCl stress induced more electrolyte leakage and higher accumulation of glycerol in the hyphae of  $\Delta FgPDK1$ . (3) ROS accumulation, MDA content, and cell death increased significantly in  $\Delta FgPDK1$  as compared to PH-1 under NaCl stress. (4) The relative expression levels of anti-oxidative genes (*SOD* and *CAT*) were significantly lower in  $\Delta FgPDK1$  as compared to PH-1 under NaCl stress. (5) All of the above physiological and biochemical responses could be recovered to the level of PH-1 in  $\Delta FgPDK1$ -C (a gain-of-function complementary strain of  $\Delta FgPDK1$ ). These results suggested that *FgPDK1* played important roles in the regulation of HOG downstream pathway and the maintenance of anti-oxidative capacity in *F. graminearum* under high osmotic stress. This study provides new evidence for understanding the molecular mechanism in fungi's osmotic stress adaption.

**Key words:** *Fusarium graminearum*, *PDK*, osmotic stress, glycerol, cell death

小麦赤霉病是流行性病害中较常见的一种,在世界范围内普遍发生<sup>[1]</sup>。引起小麦赤霉病的病原菌有很多,主要分布在 *Fusarium* 和 *Microdochium* 这两个属中<sup>[2]</sup>,其中禾谷镰孢菌 *Fusarium graminearum* 和黄色镰孢菌 *Fusarium culmorum* 最为常见<sup>[3-4]</sup>。禾谷镰孢菌(*F. graminearum*)又称禾谷镰刀菌,属半知菌亚门真

收稿日期:2017-11-02.

基金项目:国家重点研发计划专项(2017YFD0201105).

通讯联系人:许晓风,教授,博导,研究方向:生理生化调控以及分子遗传学. E-mail: xuxiaofeng@njnu.edu.cn

菌,分生孢子呈镰孢形,有隔膜 2~7 个,顶端钝圆或略微收缩,基部有明显的足细胞。大型分生孢子,分隔明显,多数有 3 个隔膜;小型分生孢子极少或没有,无厚膜孢子<sup>[5]</sup>。随着 *F. graminearum* 全基因组测序的完成和注释,*F. graminearum* 已成为研究丝状真菌生理生化的模式菌种之一<sup>[6]</sup>。

为了应对复杂的外界环境变化,真菌体内进化出了一系列适应性分子调控机制。有研究表明,渗透压在丝状真菌的生长和发育过程中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。外界高盐离子浓度能够影响真菌渗透压,从而引发渗透胁迫,进而表现出细胞膜损伤、细胞内电解质渗漏、细胞死亡。真菌主要通过高渗甘油(high osmolarity glycerol, HOG)途径来响应渗透胁迫,即通过关键基因 *hog1* 介导的一系列激酶信号通路调控甘油合成,进而维持渗透压平衡<sup>[7]</sup>。近年来,通过对模式真菌酵母的深入研究,逐渐明确了真菌 HOG 途径中复杂的信号调控模式,但对于其上游调控因子的研究却相对欠缺<sup>[8]</sup>。从而限制了对真菌响应渗透胁迫信号调控网络的解析。

丙酮酸作为糖酵解的最终产物在生物体中发挥重要作用<sup>[9]</sup>。丙酮酸脱氢酶复合体(pyruvate dehydrogenase complex, PDC)可以通过脱羧作用催化丙酮酸代谢成重要活性物质乙酰 CoA。PDC 主要由以下三部分构成:丙酮酸脱氢酶(pyruvate dehydrogenase, PDH)、二氢硫辛酰胺乙酰转移酶、二氢硫辛酰胺脱氢酶。而对于 PDC 活性的调节,主要是通过对 PDH 上特定丝氨酸残基的磷酸化作用(抑制作用)和去磷酸化作用(激活作用)实现<sup>[10]</sup>。丙酮酸脱氢酶激酶(pyruvate dehydrogenase kinase, PDK)作为一种重要的线粒体酶,通过磷酸化作用选择性抑制 PDH 的活性,进而调控乙酰 CoA 的合成,同时影响葡萄糖氧化过程<sup>[11]</sup>。另外,有研究发现除 PDH 以外,PDK 亦能够磷酸化其他靶标蛋白,证明了 PDK 在调控生理代谢方面的多样性<sup>[12]</sup>。目前,PDK 作为热点的潜在药靶,其在哺乳动物中的生理调控功能得到了广泛深入的研究<sup>[13]</sup>。已知在酵母中发现两个 PDK 蛋白,能够调控 Pda1p 第 133 位丝氨酸残基以及 PDC 中  $\alpha$  亚基的磷酸化<sup>[14-15]</sup>。但目前关于真菌中 PDK 的生理调控作用研究仍十分有限。实验室前期从 *F. graminearum* 中鉴定出一个丙酮酸脱氢酶基因(*FgPDK1*),并发现 *FgPDK1* 敲除突变体对渗透胁迫的敏感性增加<sup>[16]</sup>。鉴于线粒体在真菌响应渗透胁迫中发挥的重要作用<sup>[17]</sup>,挖掘 *FgPDK1* 对渗透胁迫的调控方式及其可能的分子机制,将有助于进一步揭示真菌适应渗透胁迫的分子调控网络。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料与试剂

供试菌株:*F. graminearum* 标准菌株 PH-1(野生型)、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$  均为本实验室前期工作保存的菌株<sup>[16]</sup>。 $\Delta FgPDK1$ : PH-1 中 *FgPDK1* 敲除突变体;  $\Delta FgPDK1-C$ : 将 *FgPDK1* 基因重新导入  $\Delta FgPDK1$  形成突变体恢复菌株。

主要试剂:氯化钠(sodium chloride, NaCl)购于西陇股份有限公司;微量丙二醛(MDA)检测试剂盒购于南京建成生物试剂公司;组织甘油含量测定试剂盒购于南京建成生物试剂公司;PI 荧光染料和 ROS 荧光染料购于碧云天公司;其他常规试剂(分析纯)全部购于中国国药集团。

PDA 培养基:马铃薯 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂粉 16 g,用蒸馏水定容至 1 L,高温高压灭菌后常温保存; YEPD 培养液:葡萄糖 20 g,酵母粉 3 g,胰蛋白胨 10 g,用蒸馏水定容至 1 L,调 pH 7.0,高温高压灭菌后常温保存。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 菌株培养与处理

(1)固体培养基培养:在连续转接培养约 3 d 的菌落边缘用打孔器打取直径为 5 mm 的菌碟接种于 PDA 平板,于恒温培养箱,避光,25 °C 培养 3 d。

(2)液体培养基培养:菌落培养 3 d 后同样用打孔器在边缘打取 5 mm 的菌碟,转接入含有 YEPD 液体培养基的三角瓶中,每 100 mL 培养基接种 5 个菌碟,175 r/min、25 °C 振荡培养 24 h。

(3)采用菌落生长直径法测定野生型菌株 PH-1 对盐胁迫的敏感性。首先采用含不同浓度 NaCl(0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0) mol/L 的 PDA 培养基 25 °C 培养菌株 3 d,每个处理 3 个重复,独立试验重复 3 次。十字交叉法测定菌落直径。根据测定的结果,选取能够抑制菌落生长 50% 的 NaCl 浓度(0.8 mol/L),监测培养 0 h、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h 后的菌落直径动态变化,每个处理 3 个重复,独立试验重复 3 次。

### 1.2.2 不同 NaCl 浓度处理对菌株 PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$ 生长的影响

采用含不同浓度 NaCl (0 mol/L、0.4 mol/L、0.8 mol/L) 的 PDA 培养基培养菌株 PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$ , 25 °C 培养 3 d, 拍照并测定菌落直径, 每个处理 3 个重复, 试验重复 3 次。

### 1.2.3 NaCl 处理 PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$ 后菌丝生理生化测定

采用含不同浓度 NaCl (0 mol/L、0.8 mol/L) 的 YEPD 液体培养基培养菌株 PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$  (25 °C、175 r/min), 用双层纱布过滤菌丝, 剔除菌碟, 用无菌水冲洗 2 次, 收集菌丝进行相关生理生化测定。对于每一种指标测定, 每个处理设置 3 个重复, 试验重复 3 次。

相对电导率采用电导仪测定<sup>[18]</sup>。菌体振荡培养 24 h 后, 称取 0.5 g 菌丝于离心管中, 加入 20 mL 的蒸馏水搅拌均匀, 分别在 (0、5、10、20、40、60、80、100、120、140、160、180) min 测定各个时间段的电导率值, 180 min 后, 将菌丝置于沸水中煮沸 5 min, 冷却后测定最终电导率值, 根据以下公式计算: 相对电导率 (%) = 不同时间电导率/最终电导率 × 100%。

丙二醛 (MDA) 含量测定。菌体振荡培养 3 d 后, 称取 0.1 g 菌丝, 采用微量丙二醛试剂盒测定 (参照说明书)<sup>[19]</sup>。主要基于检测丙二醛与 TBA 和 TCA 反应的生成物在 532 nm 的吸光值并计算。

甘油含量测定。菌体振荡培养 3 d 后, 称取 0.1 g 菌丝, 采用组织甘油含量测定试剂盒测定 (参照说明书)<sup>[20]</sup>。主要基于甘油铜比色法, 检测甘油与铜离子在碱性溶液中反应生成甘油铜络合物在 550 nm 处吸光值。同时制作 50 μmol/L ~ 100 μmol/L 的甘油标准曲线, 用于计算所测样品中甘油含量。

菌丝活性氧 (ROS) 荧光检测。采用特异荧光探针 DCFH-DA 对菌丝细胞中的 ROS 进行原位荧光检测<sup>[21]</sup>。菌体振荡培养 3 d 后, 取少量新鲜菌丝, 加入 1 μmol/L 的 DCFH-DA 中, 避光装载探针 20 min。然后使用无菌水清洗 3 次以洗去菌丝体表面的多余探针, 采用荧光电子显微镜 (激发波长 488 nm/发射波长 525 nm) 观察并拍照。

菌丝细胞死亡荧光检测。采用特异荧光探针 PI 对菌丝的死亡细胞进行原位荧光检测<sup>[22]</sup>。菌体振荡培养 3 d 后, 取少量新鲜菌丝, 加入 2 μmol/L 的 PI 溶液中, 避光装载探针 20 min。然后使用无菌水清洗 3 次以洗去菌丝体表面的多余探针, 采用荧光电子显微镜 (激发波长 535 nm/发射波长 615 nm) 观察并拍照。

### 1.2.4 基因表达分析

处理后菌丝中的基因表达分析采用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)。采用含不同浓度 NaCl (0 mol/L、0.8 mol/L) 的 YEPD 液体培养基培养菌株 PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$  (25 °C、175 r/min) 3 d。收集的菌丝采用 Trizol (Invitrogen) 提取总 RNA, 然后采用 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) 将得到的 RNA 反转录成 cDNA, 作为后续 PCR 的模板。针对每个基因的特异引物, 采用 SYBR Premix Ex Taq™ (TaKaRa) 进行 qRT-PCR (Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Life Technologies™)。qRT-PCR 程序如下: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 40 个循环。采用 ABI 7500 software (v. 2.0.6, Applied Biosystems) 对基因相对表达水平进行分析。被检测基因的特异引物序列如下: *CAT* (FGSG\_06554), 正向引物 5'-AAGGGCAAGGTCAACTACTG-3', 反向引物 5'-CGACAATCTTTG-CAGCGTAATC-3'; *SOD* (FGSG\_02051), 正向引物 5'-CCTAGCATCTCTGCTCAAATCA-3', 反向引物 5'-CGA-TGTCGCTGGATGAAGTAG-3'。采用 *GAPDH* (正向引物 5'-CTTACTGCCTCCACCAACTG-3', 反向引物 5'-TGACGTTGGAAGGAGCGAAG-3') 作为内参基因进行校准。每个基因表达分析进行 3 次重复。

## 1.3 数据统计分析

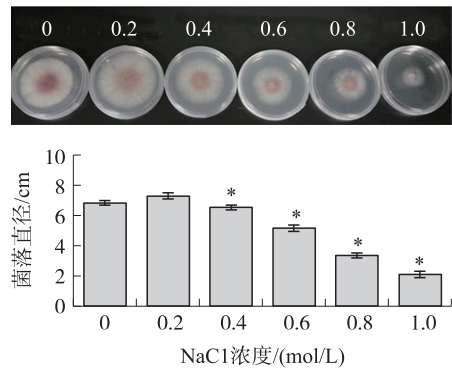
每次试验结果都以至少重复 3 次后的 (平均值 ± 标准差) 表示, 首先采用 SPSS 14.0 对试验数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 然后通过 *F* 检验检测处理组与对照组在 *P* < 0.05 水平的差异显著性。对于任意两个处理组间的多重相互比较, 采用最小显著极差法 (LSD) 分析其在 *P* < 0.05 水平的差异显著性。

## 2 结果

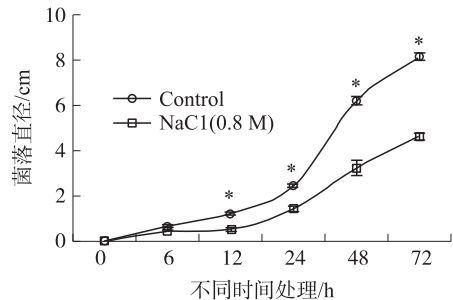
### 2.1 NaCl 处理对 PH-1 生长的影响

不同浓度 NaCl 处理对野生型菌株 PH-1 生长的抑制作用呈现一定的浓度效应。如图 1 所示, 0.2 mol/L 的 NaCl 处理对菌落直径无显著影响, 而 0.4 mol/L、0.6 mol/L、0.8 mol/L、1.0 mol/L NaCl 处理的菌落直径分别比对照下降了 4.39%、24.39%、50.73%、69.27% (图 1)。进一步对 0.8 mol/L 的 NaCl 处理的菌落生长进行了

时间效应研究,发现在 12 h~72 h 的各个时间点,处理后的菌落直径均为对照的 50%左右(图 2). 因此后续实验均采用 0.8 mol/L 的 NaCl 处理进一步研究.



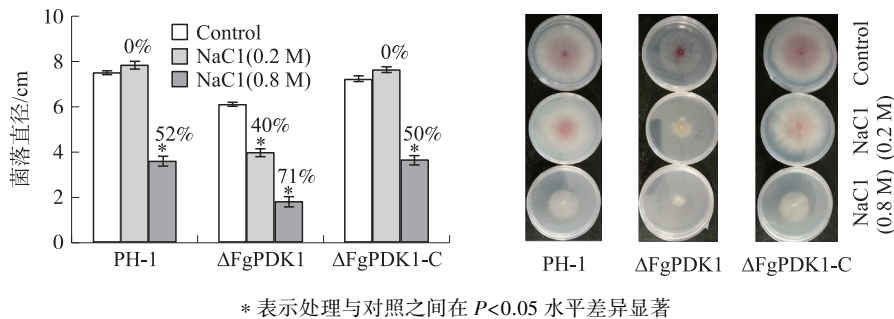
\* 表示处理与对照之间在  $P<0.05$  水平差异显著  
图 1 不同浓度 NaCl 处理对 PH-1 菌落生长的影响  
Fig. 1 The effect of NaCl treatment at different concentrations on colony growth of PH-1



\* 表示处理与对照之间在  $P<0.05$  水平差异显著  
图 2 NaCl(0.8 mol/L) 处理对 PH-1 生长影响的时间效应  
Fig. 2 The time-dependent effect of NaCl(0.8 mol/L) treatment on the colony growth of PH-1

2.2 NaCl 处理对 PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$  生长影响

PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$  在 0.2 mol/L 和 0.8 mol/L 的 NaCl 处理下生长 72 h,测定菌落直径. 结果如图 3 所示,0.2 mol/L 的 NaCl 处理后,PH-1 和  $\Delta FgPDK1-C$  的菌落生长与各自对照无显著差异,而  $\Delta FgPDK1$  则比对照显著下降 40%. 采用浓度 0.8 mol/L 的 NaCl 处理后,PH-1 和  $\Delta FgPDK1-C$  的菌落生长分别比各自对照下降了 52%和 50%,而  $\Delta FgPDK1$  则比对照下降 71%. 这些结果说明:与野生型相比,敲除 *FgPDK1* 基因后该菌对盐胁迫的敏感性增加.



\* 表示处理与对照之间在  $P<0.05$  水平差异显著  
图 3 NaCl 处理对 PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$  生长的影响  
Fig. 3 The effect of NaCl treatment on the colony growth of PH-1,  $\Delta FgPDK1$ , and  $\Delta FgPDK1-C$

2.3 NaCl 处理对 PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$  菌丝细胞膜透性的影响

渗透胁迫胞外溶液电导率升高是细胞膜破裂的典型指示. 如图 4 所示,NaCl(0.8 mol/L)处理后,3 种菌株的相对电导率均明显上升. PH-1、 $\Delta FgPDK1-C$  与各自对照相比,最终电导率变化趋势基本一致,分别上升了 35%、42%;而  $\Delta FgPDK1$  的最终电导率则比对照上升了 96%,明显高于 PH-1 和  $\Delta FgPDK1-C$ . 这说明与野生型(PH-1)和回复体( $\Delta FgPDK1-C$ )相比较,突变体  $\Delta FgPDK1$  在 NaCl 处理后出现了更大程度的细胞膜破损.

2.4 NaCl 处理对 PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$  菌丝甘油含量的影响

当真菌受到外界渗透压力胁迫时,细胞内会累

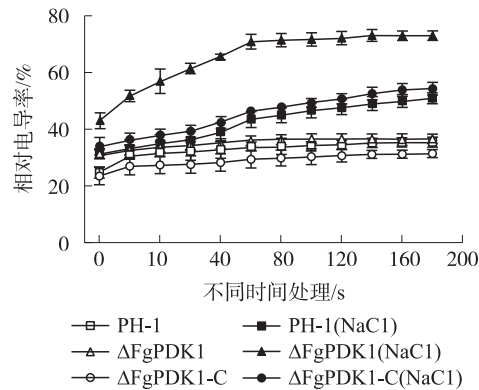
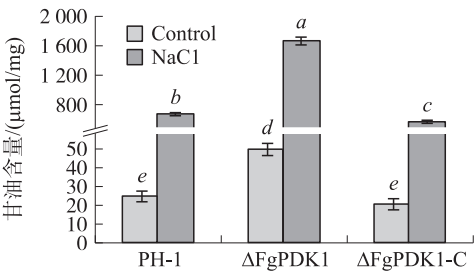


图 4 NaCl(0.8 mol/L) 处理对  $\Delta FgPDK1$  和  $\Delta FgPDK1-C$  菌丝的相对电导率  
Fig. 4 The effect of NaCl(0.8 mol/L) treatment on the relative conductivity of PH-1,  $\Delta FgPDK1$ , and  $\Delta FgPDK1-C$

积甘油来维持细胞内外渗透压的平衡<sup>[23]</sup>. 因此,胞内甘油含量可用于指示菌丝细胞遭受渗透胁迫的程度. 如图 5 所示,虽然 NaCl(0.8 mol/L)处理后,PH-1、 $\Delta FgPDK1$  和  $\Delta FgPDK1-C$  菌丝的甘油含量均显著上升,但  $\Delta FgPDK1$  菌丝的甘油含量分别是 PH-1 和  $\Delta FgPDK1-C$  的 2.51 倍和 2.97 倍.

2.5 NaCl 处理对 PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$  菌丝丙二醛含量的影响

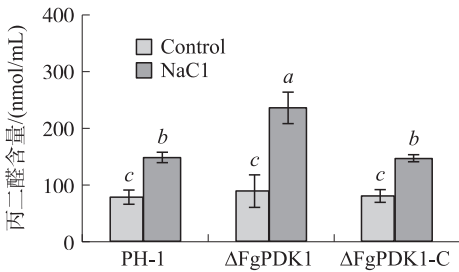
丙二醛作为细胞膜脂过氧化的典型产物,其含量可以反映细胞膜氧化损伤的程度. 由图 6 可看出,NaCl(0.8 M)处理后,PH-1、 $\Delta FgPDK1$  和  $\Delta FgPDK1-C$  菌丝的丙二醛含量均显著增加;PH-1 和  $\Delta FgPDK1-C$  之间无显著差异,而  $\Delta FgPDK1$  菌丝的丙二醛含量则显著高于 PH-1 和  $\Delta FgPDK1-C$ .



不同小写字母表示不同处理间在  $P<0.05$  水平差异显著

图 5 NaCl(0.8 mol/L) 处理对 PH-1、 $\Delta FgPDK1$  和  $\Delta FgPDK1-C$  甘油含量影响

Fig. 5 The effect of NaCl(0.8 mol/L) treatment on glycerol content in PH-1,  $\Delta FgPDK1$ , and  $\Delta FgPDK1-C$



不同小写字母表示不同处理间在  $P<0.05$  水平差异显著

图 6 NaCl(0.8 mol/L) 处理对 PH-1、 $\Delta FgPDK1$  和  $\Delta FgPDK1-C$  菌丝丙二醛含量的影响

Fig. 6 The effect of NaCl(0.8 mol/L) treatment on MDA content in PH-1,  $\Delta FgPDK1$ , and  $\Delta FgPDK1-C$

2.6 NaCl 处理对 PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1-C$  菌丝 ROS 累积和细胞死亡的影响

为研究盐胁迫对菌丝 ROS 累积的影响,本研究采用特异荧光探针 DCFH-DA 对菌丝细胞内 ROS 进行原位检测,绿色荧光强度可反映 ROS 的相对含量. 结果如图 7 所示,NaCl(0.8 mol/L)处理后,PH-1 和  $\Delta FgPDK1-C$  菌丝 ROS 荧光强度略微增强;而  $\Delta FgPDK1$  菌丝 ROS 荧光明显较强. 采用荧光探针 PI 对菌丝细胞死亡进行原位检测,红色荧光强度反映细胞死亡的程度. 结果如图 8 所示,NaCl(0.8 mol/L)处理后,PH-1 和  $\Delta FgPDK1-C$  菌丝红色荧光强度轻微增强;而  $\Delta FgPDK1$  菌丝红色荧光明显增强. 这些结果表明,与野生型 PH-1 比较,突变体  $\Delta FgPDK1$  在盐胁迫后菌丝细胞内 ROS 累积更多,并且呈现出更强烈的细胞死亡现象.

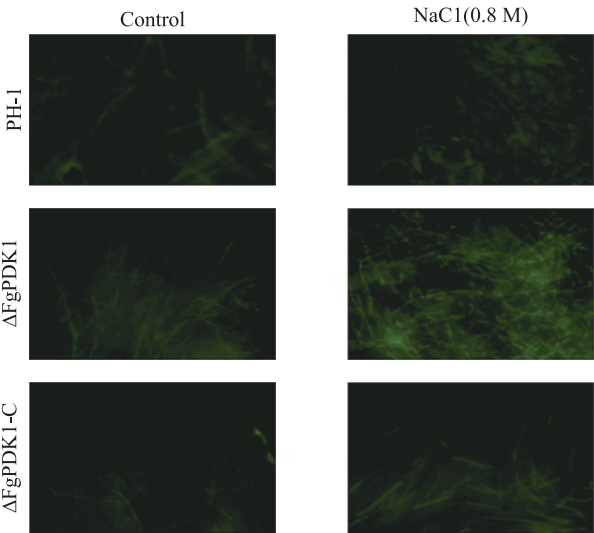


图 7 NaCl(0.8 mol/L) 处理对 PH-1、 $\Delta FgPDK1$  和  $\Delta FgPDK1-C$  菌丝 ROS 累积的影响

Fig. 7 The effect of NaCl(0.8 mol/L) treatment on ROS accumulation in PH-1,  $\Delta FgPDK1$ , and  $\Delta FgPDK1-C$

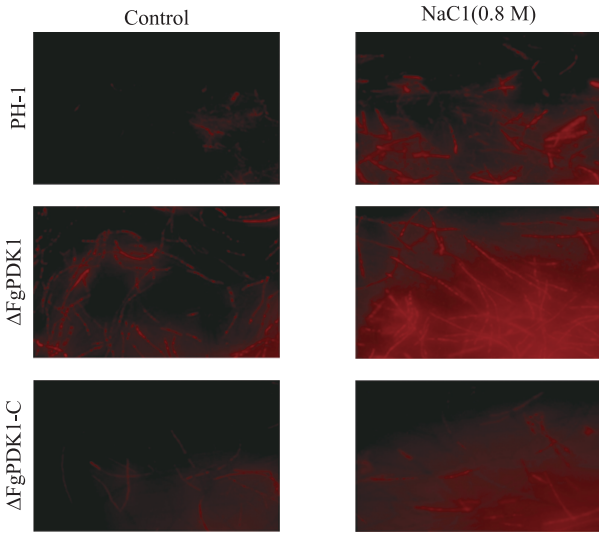


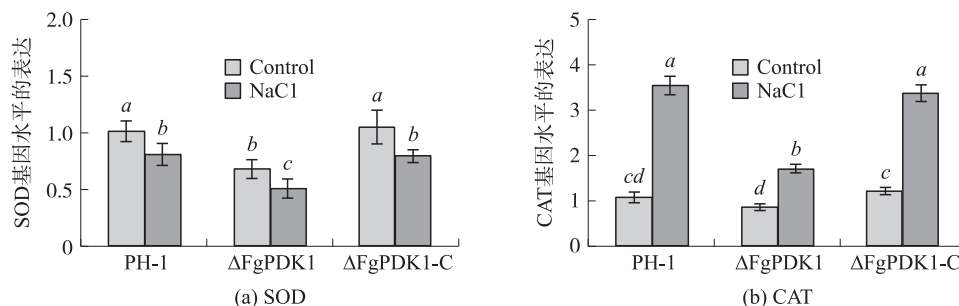
图 8 NaCl(0.8 mol/L) 处理对 PH-1、 $\Delta FgPDK1$  和  $\Delta FgPDK1-C$  菌丝细胞死亡的影响

Fig. 8 The effect of NaCl(0.8 mol/L) treatment on cell death in PH-1,  $\Delta FgPDK1$ , and  $\Delta FgPDK1-C$



## 2.7 NaCl 处理对 PH-1、 $\Delta FgPDK1$ 、 $\Delta FgPDK1$ -C 菌丝 SOD 和 CAT 基因表达的影响

抗氧化酶基因表达分析结果显示,用 0.8 mol/L 的 NaCl 处理后,3 种菌株中的 CAT 基因表达均有所下调,但  $\Delta FgPDK1$  中 CAT 的表达量显著低于 PH-1 和  $\Delta FgPDK1$ -C(图 9a). 对于 SOD 基因,NaCl(0.8 mol/L)处理后,其在 3 种菌株中的表达均上调,但在  $\Delta FgPDK1$  中的表达量显著低于 PH-1 和  $\Delta FgPDK1$ -C(图 9b). 不论 SOD 还是 CAT,两者在 PH-1 和  $\Delta FgPDK1$ -C 中的表达量较为一致(图 9). 这些结果表明,敲除 *FgPDK1* 后 *F. graminearum* 在盐胁迫下的抗氧化能力显著下降.



不同小写字母表示不同处理间在  $P < 0.05$  水平差异显著

图 9 NaCl(0.8 mol/L)处理对 PH-1、 $\Delta FgPDK1$  和  $\Delta FgPDK1$ -C 菌丝 SOD 和 CAT 表达的影响

Fig. 9 The effect of NaCl(0.8 mol/L) treatment on the expression level of SOD and CAT in PH-1,  $\Delta FgPDK1$ , and  $\Delta FgPDK1$ -C

## 3 讨论

高盐环境是诱导真菌产生渗透胁迫响应的重要方式之一<sup>[24]</sup>. 研究结果显示,*F. graminearum* 中的丙酮酸脱氢酶激酶 *FgPDK1* 是响应渗透胁迫的重要调控因子. 一,生长测定结果证实敲除 *FgPDK1* 后的 *F. graminearum* 对盐胁迫的敏感性显著增加;二,盐胁迫下,*FgPDK1* 敲除突变体  $\Delta FgPDK1$  比野生型 PH-1 的细胞膜透性和甘油计量明显增加;三,与野生型 PH-1 相比较,盐胁迫下  $\Delta FgPDK1$  中的 ROS 累积、氧化损伤、细胞死亡明显增强,而抗氧化能力却显著下降;四,上述生理生化表现在  $\Delta FgPDK1$  互补子  $\Delta FgPDK1$ -C 中均可恢复到野生型水平. 这些结果说明,*FgPDK1* 可作为上游因子参与调控渗透胁迫下的 HOG 途径和氧化胁迫代谢.

盐胁迫导致的 ROS 过量累积是影响真菌细胞正常生理代谢的重要因素,而 SOD 和 CAT 是细胞内清除过量 ROS 的关键抗氧化酶. 在本研究中,盐胁迫下  $\Delta FgPDK1$  中上述两种抗氧化酶基因的表达水平均显著低于野生型 PH-1,从而可能导致过量产生的 ROS 不能被及时清除. 这些过量累积的 ROS 可攻击细胞膜,造成膜损伤、胞内物质外漏,进一步导致细胞死亡和生长抑制. 由此可见,盐胁迫下 *FgPDK1* 在维持细胞抗氧化水平方面发挥重要作用. 有报道显示,酵母 *PDK1* 敲除突变体对  $H_2O_2$  的敏感性增强<sup>[25]</sup>. 线粒体中的电子传递链是细胞 ROS 的重要来源之一<sup>[26]</sup>. *PDK1* 作为线粒体中关键的能量代谢调控基因,在人体神经细胞中其对 ROS 的抑制作用很可能是通过抑制平衡线粒体呼吸代谢实现的<sup>[27]</sup>. 那么在渗透胁迫下的真菌细胞中,*FgPDK1* 是否通过类似的作用机制来抑制 ROS 的过量累积还需要进一步的深入研究.

研究发现,盐胁迫下  $\Delta FgPDK1$  中甘油累积量较野生型显著上升. 在中等渗透胁迫和高渗透胁迫条件下,真菌细胞对于 HOG 下游途径的调控方式有所不同. 两种情况下,HOG 的上游途径都会被激活,从而诱导下游甘油合成增加. 但在高渗条件下,Hog1 可进一步调控通道蛋白 Fps1 关闭,从而使真菌细胞内累积更多甘油<sup>[28]</sup>. 本研究中发现  $\Delta FgPDK1$  对 NaCl(0.8 mol/L)的敏感性显著增加,因此 0.8 mol/L 的 NaCl 对于野生型虽然属于中等渗透胁迫,但对于  $\Delta FgPDK1$  则变成了高渗胁迫条件,从而通过调控 Fps1 组织合成的甘油外流. 这说明 *FgPDK1* 作为上游调控因子,精确调控 HOG 途径应对不同程度的渗透胁迫条件. 另外,在酵母中的 *PDK1* 可直接转录后修饰质膜  $H^+$ -ATPase<sup>[29]</sup>,而  $H^+$ -ATPase 通过维持膜电位来适应渗透胁迫方面发挥重要作用<sup>[30]</sup>. 在 *F. graminearum* 应对渗透胁迫过程中,进一步鉴定 *FgPDK1* 的靶标  $H^+$ -ATPase 将有助于解析 *FgPDK1* 调控渗透胁迫的信号作用网络.

综上所述,本研究通过遗传学证据揭示了 *FgPDK1* 在调控真菌渗透胁迫响应方面的关键作用. 不但发现了 *FgPDK1* 新的生理调控作用,也为解析真菌响应渗透胁迫的上游分子机制提供了新证据.

## [参考文献]

- [1] 何家泌. 小麦赤霉菌源种类和禾谷镰刀菌的特性及变异研究综述[J]. 国外农学:植物保护,1992(4):9-11.
- [2] MESTERHAZY A. Types and components of resistance to *Fusarium* head blight of wheat[J]. *Plant breeding*,1995,114(5):377-386.
- [3] PARRY D W, JENKINSON P, MCLEOD L. *Fusarium* head blight (scab) in small grain cereals—a review[J]. *Plant pathology*,1995,44(2):207-238.
- [4] CROMIEY M G, SHORTER S C, LAUREN D R, et al. Cultivar and crop management influences on *Fusarium* head blight and mycotoxins in spring wheat (*Triticum aestivum*) in New Zealand[J]. *New Zealand journal of crop and horticultural science*,2002,30(4):235-247.
- [5] 陈利锋,徐敬友. 农业植物病理学[M]. 北京:中国农业出版社,2007.
- [6] WONG P, WALTER M, LEE W, et al. FGDB:revisiting the genome annotation of the plant pathogen *Fusarium graminearum*[J]. *Nucleic acids research*,2011,39:D637-D639.
- [7] ROCIO D, JEFFREY W C, ANA M C. Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in Filamentous Fungi[J]. *Toxins*,2010,2,367-368.
- [8] SAXENA A, SITARAMAN R. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae* via mechanisms other than the high-osmolarity glycerol pathway[J]. *Microbiology*,2016,162:1 511-1 526.
- [9] PRONK J T, YDE STEENSMA H, van DIJKEN J P. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*,1996,12(16):1 607-1 633.
- [10] HURD T R, COLLINS Y, ABAKUMOVA I, et al. Inactivation of pyruvate dehydrogenase kinase 2 by mitochondrial reactive oxygen species[J]. *Journal of biological chemistry*,2012,287(42):35 153-35 160.
- [11] PIAO L, SIDHU V K, FANG Y H, et al. FOXO1-mediated upregulation of pyruvate dehydrogenase kinase-4(PDK4) decreases glucose oxidation and impairs right ventricular function in pulmonary hypertension:therapeutic benefits of dichloroacetate[J]. *Journal of molecular medicine*,2013,91(3):333-346.
- [12] PEREIRA R R, CASTANHEIRA D, TEIXEIRA J A, et al. Detailed search for protein kinase(s) involved in plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity regulation of yeast cells[J]. *FEMS Yeast Research*,2015,15(2):fov003.
- [13] ZHANG S, HULVER M W, MCMILLAN R P, et al. The pivotal role of pyruvate dehydrogenase kinases in metabolic flexibility[J]. *Nutrition and metabolism*,2014,11:10.
- [14] GEY U, CZUPALLA C, HOFLACK B, et al. Yeast pyruvate dehydrogenase complex is regulated by a concerted activity of two kinases and two phosphatases[J]. *Journal of biological chemistry*,2008,283(15):9 759-9 767.
- [15] YDE S H, TOMASKA L, REUVEN P, et al. Disruption of genes encoding pyruvate dehydrogenase kinases leads to retarded growth on acetate and ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Yeast*,2008,25(1):9-19.
- [16] GAO T, CHEN J, SHI Z. *Fusarium graminearum* pyruvate dehydrogenase kinase 1(*FgPDK1*) is critical for conidiation, mycelium growth, and pathogenicity[J]. *PLoS ONE*,2016,11:e0158077.
- [17] PASTOR M M, PROFT M, PASCUAL A A. Mitochondrial function is an inducible determinant of osmotic stress adaptation in yeast[J]. *Journal of biological chemistry*,2009,284:30 307-30 317.
- [18] 段亚冰. 咯菌腈(适乐时)对油菜菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)的作用机制研究[D]. 南京:南京农业大学,2013.
- [19] YANG Y, FAN F, ZHUO R, et al. Expression of the laccase gene from a white rot fungus in *Pichia pastoris* can enhance the resistance of this yeast to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated oxidative stress by stimulating the glutathione-based antioxidative system[J]. *Appl Environ Microbiol*,2012,78:5 845-5 854.
- [20] YAN J, QIU T. Determination of glycerol by cupric glycerinate colorimetry[J]. *China oils and fats*,2004,1:010.
- [21] FOREMAN J, DEMIDCHIK V, BOTHWELL J H F, et al. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth[J]. *Nature*,2003,422(6 930):442-446.
- [22] KELLERMEIER F, CHARDON F, AMTMANN A. Natural variation of *Arabidopsis* root architecture reveals complementing adaptive strategies to potassium starvation[J]. *Plant physiology*,2013,161(3):1 421-1 432.
- [23] WOJDA. Response to high osmotic conditions and elevated temperature in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by intracellular glycerol and involves coordinate activity of MAP kinase pathways[J]. *Microbiology*,2003,149(5):1 193-1 194.

(下转第96页)

- ulation syndrome in assisted reproduction technology cycles[J]. Hum Reprod, 2008, 23(1): 160–167.
- [26] HAZOUT A, BOUCHARD P, SEIFER D B, et al. Serum antimüllerian hormone/müllerian-inhibiting substance appears to be a more discriminatory marker of assisted reproductive technology outcome than follicle-stimulating hormone, inhibin B, or estradiol[J]. Fertil Steril, 2004, 82(5): 1 323–1 329.
- [27] SOMAYEH A, GHAMARTAJ H, BATOOL H R. Comparing serum basal and follicular fluid levels of anti-Müllerian hormone as a predictor of *in vitro* fertilization outcomes in patients with and without polycystic ovary syndrome[J]. Ann Saudi Med, 2010, 30(6): 442–447.
- [28] EBNER T, SOMMERGRUBER M, MOSER M, et al. Basal level of anti-Müllerian hormone is associated with oocyte quality in stimulated cycles[J]. Hum Reprod, 2006, 21(8): 2 022–2 026.
- [29] TAKAHASHI C, FUJITO A, KAZUKA M, et al. Anti-Müllerian hormone substance from follicular fluid is positively associated with success in oocyte fertilization during *in vitro* fertilization[J]. Fertil Steril, 2008, 89(3): 586–591.
- [30] FANCHIN R, MENDEZ LOZANO D H, FRYDMAN N, et al. Anti-Müllerian hormone concentrations in the follicular fluid of the preovulatory follicle are predictive of the implantation potential of the ensuing embryo obtained by *in vitro* fertilization[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007, 92(5): 1 796–1 802.
- [31] PABUCCU R, KAYA C, CAGLAR G S, et al. Follicular-fluid anti-Müllerian hormone concentrations are predictive of assisted reproduction outcome in PCOS patients[J]. Reprod Biomed Online, 2009, 19(5): 631–637.
- [32] CUPISTI S, DITTRICH R, MUELLER A, et al. Correlations between anti-Müllerian hormone, inhibin B, and activin A in follicular fluid in IVF/ICSI patients for assessing the maturation and developmental potential of oocytes[J]. Eur J Med Res, 2007, 12(12): 604–608.
- [33] DESFORGES B V, GALLO C, LEFEBVRE C, et al. Increased anti-Müllerian hormone and decreased FSH levels in follicular fluid obtained in women with polycystic ovaries at the time of follicle puncture for *in vitro* fertilization[J]. Fertil Steril, 2010, 94(1): 198–204.
- [34] YILMAZ N, UYGUR D, DOGAN M, et al. The effect of follicular anti-Müllerian hormone levels of non-obese, non-hyperandrogenemic polycystic ovary syndrome patients on assisted reproduction outcome[J]. Gynecol Endocrinol, 2012, 28(3): 162–165.

[责任编辑:黄 敏]

(上接第82页)

- [24] 祝文婷, 陈为京, 陈建爱, 等. 丛枝菌根真菌提高植物抗盐碱胁迫能力的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(5): 2 061–2 062.
- [25] ALTINTAS A, MARTINI J, MORTENSEN U H, et al. Quantification of oxidative stress phenotypes based on high-throughput growth profiling of protein kinase and phosphatase knockouts[J]. FEMS Yeast Research, 2016(16): fov101.
- [26] BOLISSETTY S, JAIMES E A. Mitochondria and reactive oxygen species: physiology and pathophysiology[J]. International journal of molecular sciences, 2013, 14: 6 306–6 344.
- [27] NEWINGTON J T, RAPPON T, ALBERS S, et al. Overexpression of pyruvate dehydrogenase kinase 1 and lactate dehydrogenase A in nerve cells confers resistance to amyloid beta and other toxins by decreasing mitochondrial respiration and reactive oxygen species production[J]. J Biol Chem, 2012, 287(44): 37 245–37 258.
- [28] ABHISHEK S, RAMAKRISHNAN S. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae* via mechanisms other than the high-osmolarity glycerol pathway[J]. Microbiology, 2016, 162: 1 511–1 513.
- [29] PEREIRA R R, CASTANHEIRA D, TEIXEIRA J A, et al. Detailed search for protein kinase(s) involved in plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase activity regulation of yeast cells[J]. FEMS Yeast Research, 2015, 15: 15–19.
- [30] PORTILLO F. Regulation of plasma membrane H(+)-ATPase in fungi and plants[J]. Biochimica et biophysica acta(BBA)-reviews on biomembranes, 2000(1 469): 31–42.

[责任编辑:黄 敏]