

研究报告

灰葡萄孢组蛋白乙酰转移酶 BcGCN5 的功能

张强[#], 李白[#], 刘晓颖, 藏金萍, 曹宏哲, 张康, 邢继红*, 董金皋*

河北农业大学 河北省植物生理与分子病理学重点实验室 真菌毒素与植物分子病理学实验室,
河北 保定 071000

张强, 李白, 刘晓颖, 藏金萍, 曹宏哲, 张康, 邢继红, 董金皋. 灰葡萄孢组蛋白乙酰转移酶 BcGCN5 的功能[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 5078-5089.

ZHANG Qiang, LI Bai, LIU Xiaoying, ZANG Jinping, CAO Hongzhe, ZHANG Kang, XING Jihong, DONG Jingao. Function of histone acetyltransferase BcGCN5 in *Botrytis cinerea*[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 5078-5089.

摘要:【背景】组蛋白乙酰转移酶 general control nonderepressible-5 (GCN5)作为一种重要的表观遗传修饰因子, 参与调控真核生物的多种生命活动。目前, 关于灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)组蛋白乙酰转移酶 GCN5 的功能与机制研究尚未见报道。【目的】明确灰葡萄孢组蛋白乙酰转移酶 GCN5 的编码基因 *BcGCN5* 在病菌生长发育和致病过程中的功能, 为进一步阐明组蛋白乙酰化修饰在病原菌生长发育及致病过程中的功能与调控机制奠定基础。【方法】利用基因敲除技术构建了灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因的敲除突变体 $\Delta BcGCN5$; 以野生型菌株 B05.10 为对照, 对突变体 $\Delta BcGCN5$ 的表型和致病力进行分析。【结果】灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因的敲除突变体 $\Delta BcGCN5$ 的生长速率明显减慢, 菌核数量较少, 分生孢子数量显著降低, 对番茄果实和烟草叶片的致病力减弱, 产酸能力降低。【结论】灰葡萄孢组蛋白乙酰转移酶 BcGCN5 正调控病菌的生长、发育和致病过程。

关键词: 灰葡萄孢; 组蛋白乙酰转移酶; 生长发育; 致病力

资助项目: 国家自然科学基金(32072369); 河北省自然科学基金(C2022204040); 中央引导地方科技发展资金(246Z6506G)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32072369), the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2022204040), and the Central Government Guides Local Science and Technology Development Project (246Z6506G).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: XING Jihong, xingjihong2000@126.com; DONG Jingao, dongjingao@126.com

Received: 2024-06-22; Accepted: 2024-09-20; Published online: 2024-10-09

Function of histone acetyltransferase BcGCN5 in *Botrytis cinerea*

ZHANG Qiang[#], LI Bai[#], LIU Xiaoying, ZANG Jinping, CAO Hongzhe, ZHANG Kang, XING Jihong^{*}, DONG Jingao^{*}

Key Laboratory of Hebei Province for Plant Physiology and Molecular Pathology, Mycotoxin and Molecular Plant Pathology Laboratory of Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

Abstract: [Background] The histone acetyltransferase general control nonderepressible-5 (GCN5) is a key epigenetic modifier that plays a role in regulating biological processes in eukaryotes. At present, little is known about the function and mechanism of GCN5 in *Botrytis cinerea*. [Objective] To analyze the function of BcGCN5 and lay a foundation for elucidating the function and regulatory mechanism of histone acetylation in the growth, development, and pathogenicity of *B. cinerea*. [Methods] The mutant $\Delta BcGCN5$ of *B. cinerea* was successfully constructed by gene knockout. The phenotype and pathogenicity of $\Delta BcGCN5$ were analyzed with the wild-type strain B05.10 as the control. [Results] $\Delta BcGCN5$ showed slow growth, reduced production of sclerotia and conidia, and diminished acid production, which ultimately led to weakened pathogenicity towards tomato fruits and tobacco leaves. [Conclusion] BcGCN5 positively regulated the growth, development, and pathogenicity of *B. cinerea*.

Keywords: *Botrytis cinerea*; histone acetyltransferase; growth and development; pathogenicity

组蛋白乙酰转移酶 general control nonderepressible-5 (GCN5)作为重要的表观遗传修饰因子,能够催化组蛋白的乙酰化。GCN5的N端和C端分别含有保守的HAT结构域和bromodomain结构域,其中bromodomain结构域具有结合乙酰化赖氨酸残基的功能。从酵母到四膜虫及人类的进化中,GCN5蛋白结构高度保守^[1-3]。

GCN5在真菌生长发育和致病过程中发挥重要作用。在白色念珠菌(*Candida albicans*)中,GCN5作为催化亚基调控菌丝生长、胁迫应答和侵染寄主^[4]。GCN5参与真菌对外界环境的适应,促进酵母中应激相关基因的诱导表达^[5];构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)中诱导苔色酸产生,并在适当条件下诱导其他次级代谢产物基因簇的表达^[6]。在粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)中,GCN5同源基因NGF-1缺失后H3K14乙酰

化修饰和光诱导现象缺失,表明GCN5通过调控组蛋白乙酰化修饰参与光信号传导^[7]。在稻瘟病菌(*Magnaporthe grisea*)中,GCN5的同源基因MGG_03677通过乙酰化自噬蛋白ATG7负调节光和氮饥饿诱导的自噬过程,促进稻瘟病菌的无性繁殖,同时调节与分生孢子相关的转录调节基因TFB5的表达^[8]。在里氏木霉菌(*Trichoderma reesei*)中,GCN5对菌丝生长和表型分化起重要的调节作用^[9]。

目前,对于灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)组蛋白乙酰转移酶GCN5的功能与调控机制尚不明确。本研究拟通过生物信息学技术分析鉴定灰葡萄孢组蛋白乙酰转移酶GCN5的编码基因。通过构建BcGCN5基因的敲除突变体,深入研究该基因在病菌生长发育和致病过程中的功能,为阐明组蛋白乙酰化修饰在病原菌生长发育及致病过程中的作用与调控机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 样品

灰葡萄孢野生型菌株 B05.10、供试同源重组载体 pBS-Bar、供试番茄、烟草,均由河北农业大学真菌毒素与植物分子病理学实验室保存。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

PDA 培养基(g/L): 土豆 200, 葡萄糖 20, 琼脂 15。

总 DNA 提取试剂盒, Omega 公司。PCR 仪, Thermo 公司; 光学显微镜, Olympus 公司; 移液器, Eppendorf 公司; 电泳仪和电泳槽, 北京君意东方电泳设备有限公司。

1.3 灰葡萄孢 GCN5 的生物信息学鉴定

利用真菌基因组数据库(fungi.ensembl.org/i) 获得灰葡萄孢(*Botrytis cinerea*)、禾谷镰孢(*Fusarium graminearum*)、水稻恶苗病菌(*Fusarium fujikuroi*)、稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的 GCN5 序列; 通过 Clustal X 软件对 6 种真菌物种 GCN5 的氨基酸序列进行比对分析; 通过 MEGA 7 软件中的邻接法构建真菌物种 GCN5 的系统发育树, 设置 bootstrap 为 1 000。利用 Pfam 软件(<http://pfam.xfam.org/>) 和 SMART 软件(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)分析 GCN5 的结构域, 并使用 IBS 软件对结构域进行绘制。

1.4 灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因敲除载体的构建

依据同源重组技术构建 *BcGCN5* 基因的敲除突变体。利用 *BcGCN5* 基因特异性引物(表 1), PCR 扩增 *BcGCN5* 基因的同源臂 I 和 II。PCR 反应体系: PCR Mix 6 μL , 灰葡萄孢 B05.10 基因组 DNA (1 000 ng/ μL) 2 μL , 引物 I-F/I-R、II-F/II-R 各 0.5 μL (终浓度 5 U/mol), ddH₂O 1 μL 。PCR 反应条件严格参照 TaKaRa 公司 PCR 试剂盒说明书, 退火温度为 58 $^{\circ}\text{C}$ 。克隆测序后将其

分别与 pBS-Bar 载体连接, 阳性克隆进行 PCR 鉴定和酶切鉴定, 获得目的基因的敲除载体 pBS-Bar+I+II。

1.5 灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因敲除突变体的筛选与鉴定

利用原生质体转化的方法, 将载体 pBS-Bar+I+II 转化灰葡萄孢野生型菌株 B05.10, 草铵膦抗性筛选获得转化子后, 进行 PCR 和 RT-qPCR 鉴定。PCR 反应体系: cDNA 2 μL (400 ng/ μL), mix 10 μL , primer-F 0.4 μL , primer-R 0.4 μL , ddH₂O 7.2 μL 。以转化子的 DNA 为模板, 利用 pBS-Bar 载体和 *BcGCN5* 基因同源臂的特异引物 P1、P2、P3、P4、P5、P6、P7 和 P8 进行转化子的检测。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 34 个循环。提取转化子的 cDNA 作为模板, 通过 TRIzol 法提取菌株总 RNA, 使用 Hifair III 1st Strand cDNA Synthesis cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 对 RNA 进行逆转录。首先, 利用 DNA digester Mix 进行残留基因组的去除, 然后加入 Hifair III SuperMix plus 进行逆转录反应。利用 *BcGCN5* 基因的特异引物进行 RT-qPCR 检测, *Tubulin* 基因作为内参基因用于分析表达水平。每个处理 3 个生物学重复。RT-F/RT-R 进行 RT-qPCR 检测, 反应体系: 2 \times PCR mix 10 μL , F+R Primer 2 μL , DNA 2 μL , ROX 0.4 μL , ddH₂O 补足 20 μL 。反应程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 40 个循环, 确定转化子中 *BcGCN5* 基因的表达水平。

1.6 灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因敲除突变体的表型分析

将灰葡萄孢野生型菌株 B05.10 和 *BcGCN5* 基因的敲除突变体 $\Delta BcGCN5$ 分别接种于 PDA 培养基上, 25 $^{\circ}\text{C}$ 黑暗条件下培养 4 d, 并每天观察各菌株的生长速度、菌落颜色、菌落形态、菌核有无和菌丝形态等特征, 并统计细胞长度和宽度。根据十字交叉法, 分别用直尺横着和

竖着测量 2 次菌落的直径, 取平均值记录各菌株的生长大小。同时, 制备同一生长期(PDA 培养基上培养 3 d)的野生型和突变体的分生孢子悬浮液, 利用血球计数板在光学显微镜下进行分生孢子产量的统计, 每个菌株设置 3 个重复。

1.7 灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因敲除突变体的致病力分析

取同一生长时期的野生型和突变体的不同菌株, 定量($\Phi=5$ mm)接种到番茄果实和烟草叶片的表面, 黑暗、保湿处理, 观察各菌株接种部位的发病情况, 发病烟草叶片用台盼蓝染色处理后进行病斑直径统计和拍照记录。每个菌株设置 3 个重复。

1.8 灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因敲除突变体的产酸能力分析

将生长状态为同一时期的野生型和突变体分别接种到含有 0.05%的溴百里酚蓝(弱酸和弱碱的 pH 指示剂)的 PDA 培养基上, 并在 22 °C 完全黑暗孵育 7 d。菌株分泌酸 pH 值下降, 会导致培养基颜色变为黄色。

2 结果与分析

2.1 灰葡萄孢 *GCN5* 的生物信息学鉴定结果

利用生物信息学方法获得了 6 个真菌物种的 *GCN5* 序列, 分别为灰葡萄孢 *BcGCN5* (Bcin13g01660)、稻瘟病菌(*M. oryzae*) MGG_03677、酿酒酵母(*S. cerevisiae*) YGR252W、水稻恶苗病菌(*F. fujikuroi*) FFUJ_00382、禾谷镰孢(*F. graminearum*) FGSG_00280 和粗糙脉孢菌(*N. crassa*) NCU10847。多序列比对分析发现, *BcGCN5* 与稻瘟病菌 MGG_03677 的序列一致性达 45.05%, 与粗糙脉孢菌 NCU10847 的序列一致性达 45.88% (图 1A)。系统发育分析发现, *BcGCN5* 与其他真菌物种的 *GCN5* 序列相似性较高(图 1B)。结构域分析发现, *BcGCN5* 含有 BROMO 结构域, 与其他真菌物种的 *GCN5* 结构域一致(图 1C)。表明灰葡萄孢 *GCN5* 的编码基因为 *BcGCN5*。

2.2 灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因敲除载体的构建结果

依据同源重组原理构建 *BcGCN5* 基因的敲

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

基因名称	引物名称	引物序列
Gene name	Primer name	Primer sequence (5'→3')
<i>BcGCN5</i>	I-F	CTCGAGGATCGAATAGTTGTATGTTGT
	I-R	GAATTCTTAAGAGCCAATGCATAAATCC
<i>BcGCN5</i>	II-F	GCGGCCGCTGACTGCAAATTTGGTGTT
	II-R	GAGCTCTTTTAGAAAGCAAAGAGAAC
<i>BcGCN5</i>	RT-F	AGTGATGCTGTTGTGGCTGA
	RT-R	CCACTGATCTTCCTCTGCGA
<i>Tubulin</i>	Tubulin-F	TCTGGCGAGCACGGTCTTGACGGTT
	Tubulin-R	TGGCTCCAAATCGACGAGGACGGCA
<i>BcGCN5, Basta</i>	P1	AAGCAGTCATATTGTAAG
	P2	CTAAATGAACCATCTTGT
<i>BcGCN5, Basta</i>	P3	CATTTGGCAATAAAGTTT
	P4	ACTTACCCTTGTCAACAA
<i>Basta</i>	P5	ATGAGCCCAGAACGACGC
	P6	TCAGATCTCGGTGACGGGCA
<i>BcGCN5</i>	P7	AACACCTTCCACGTCTCCAAAAA
	P8	CACAACAGCATCCTGCAAAAGTGT

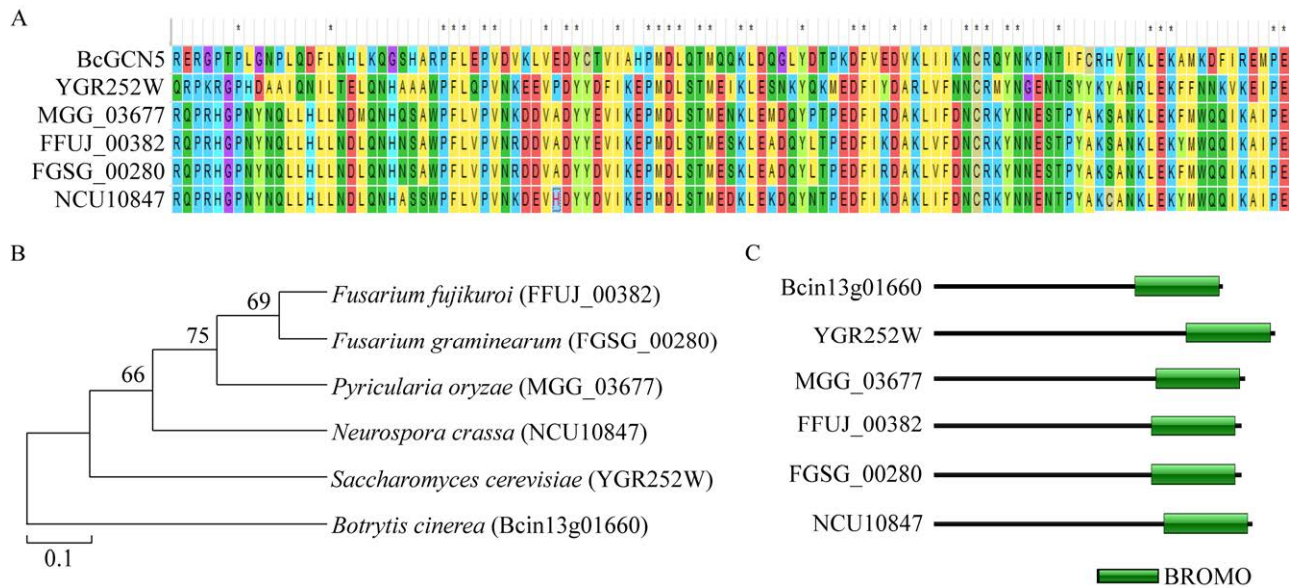


图1 灰葡萄孢 GCN5 的生物信息学分析 A: 氨基酸序列比对. B: 系统发育树分析. 括号中的序号为基因号即菌株在 GenBank 中的登录号; 分支点上的数字为自展支持值. C: 保守结构域分析.

Figure 1 Bioinformatics analysis of GCN5 in *Botrytis cinerea*. A: Amino acid sequences alignment. B: Phylogenetic tree analysis. The serial number in the brackets is the gene number, that is, the accession number of the strain in GenBank, and the number on the branch point is the bootstrap support value. C: Conserved domain analysis.

除载体(图 2A)。利用 *BcGCN5* 基因的特异性引物, 对 *BcGCN5* 基因的同源臂 I 和 II 进行 PCR 扩增, 均获得 800 bp 的目的条带(图 2B)。对同源臂片段进行克隆, 阳性克隆的菌落 PCR 均获得了目的条带(图 2C)。对菌落 PCR 阳性的克隆进行测序鉴定后, 酶切获得目的基因的同源臂 I 和 II, 分别将其与 pBS-Bar 连接, PCR 鉴定均获得了目的条带(图 2D、2E), 表明 *BcGCN5* 基因的敲除载体 pBS-Bar+I+II 构建成功。

2.3 灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因敲除突变体的筛选与鉴定结果

利用原生质体转化技术将 *BcGCN5* 基因的敲除载体 pBS-Bar+I+II 转化至灰葡萄孢菌株 B05.10 中, 使用 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 草铵磷进行抗性筛选, 并经过单胞分离后获得抗性稳定的转化子(图 3A)。其中, 野生型菌株 B05.10 在抗性培养基上的生长受到明显抑制, 培养 5 d 时菌落直

径为 3.35 cm; 而 5 株转化子生长速率明显快于野生型, 生长 5 d 的菌落直径分别达到 5.40、4.50、5.00、4.00 和 5.00 cm (图 3B)。

依据引物设计策略图(图 4A), 使用引物对 P1/P2、P3/P4、P5/P6 (*Basta* 基因的特异性引物)、P1/P7 和 P8/P4 对转化子进行 PCR 检测, 其中, P1/P2、P3/P4 和 P5/P6 均获得了约 500 bp 的目的条带, 而 P1/P7 和 P8/P4 均未获得约 500 bp 的条带(图 4B); 在野生型对照(B05.10)中, P1/P2、P3/P4 和 P5/P6 均无条带被扩增出, 而 P1/P7 和 P8/P4 扩增出了约 500 bp 的条带, 表明转化子中 *BcGCN5* 基因被成功敲除。利用 RT-qPCR 技术, 对野生型和转化子菌株中 *BcGCN5* 基因的转录水平进行检测。结果发现, 转化子中 *BcGCN5* 基因的表达量均显著低于野生型菌株(图 4C)。表明试验所获得的转化子均为目的基因的敲除突变体, 分别命名为 $\Delta BcGCN5-1-\Delta BcGCN5-5$ 。

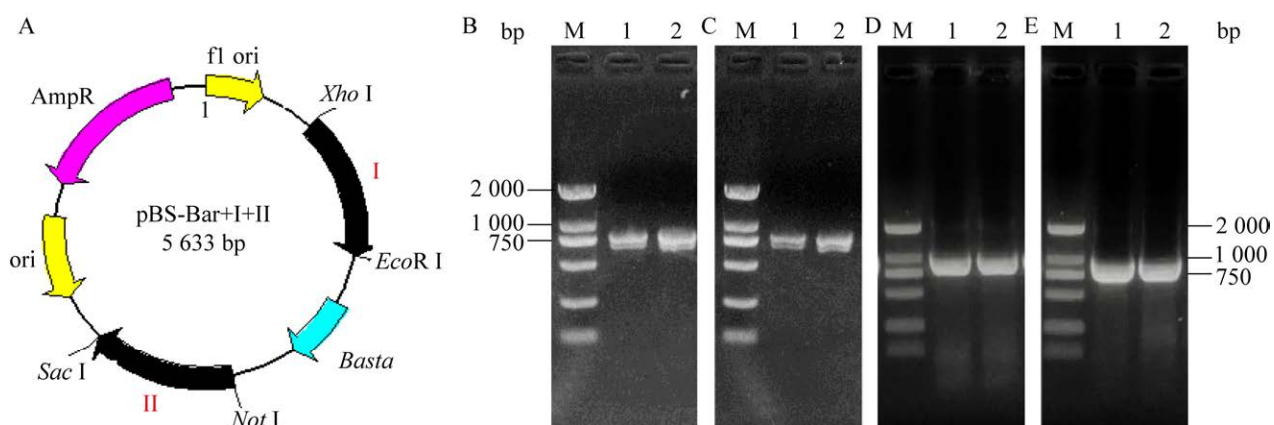


图 2 *BcGCN5* 基因敲除载体的构建 A: *BcGCN5* 基因的敲除载体图谱. B: *BcGCN5* 基因同源臂 I 和 II 的 PCR 扩增. C: pMD19-I 和 pMD19-II 的菌落 PCR 鉴定. D: pBS-Bar+I 和 pBS-Bar+II 的菌落 PCR 鉴定. E: pBS-Bar+I+II 的菌落 PCR 鉴定. M: DNA marker

Figure 2 Construction of the *BcGCN5* knockout vector. A: Knockout vector of *BcGCN5* gene. B: PCR amplification of homologous fragments I and II of *BcGCN5* gene. C: Colony PCR identification of pMD19-I and pMD19-II. D: Colony PCR identification of pBS-Bar+I and pBS-Bar+II. E: Colony PCR identification of pBS-Bar+I+II. M: DNA marker.

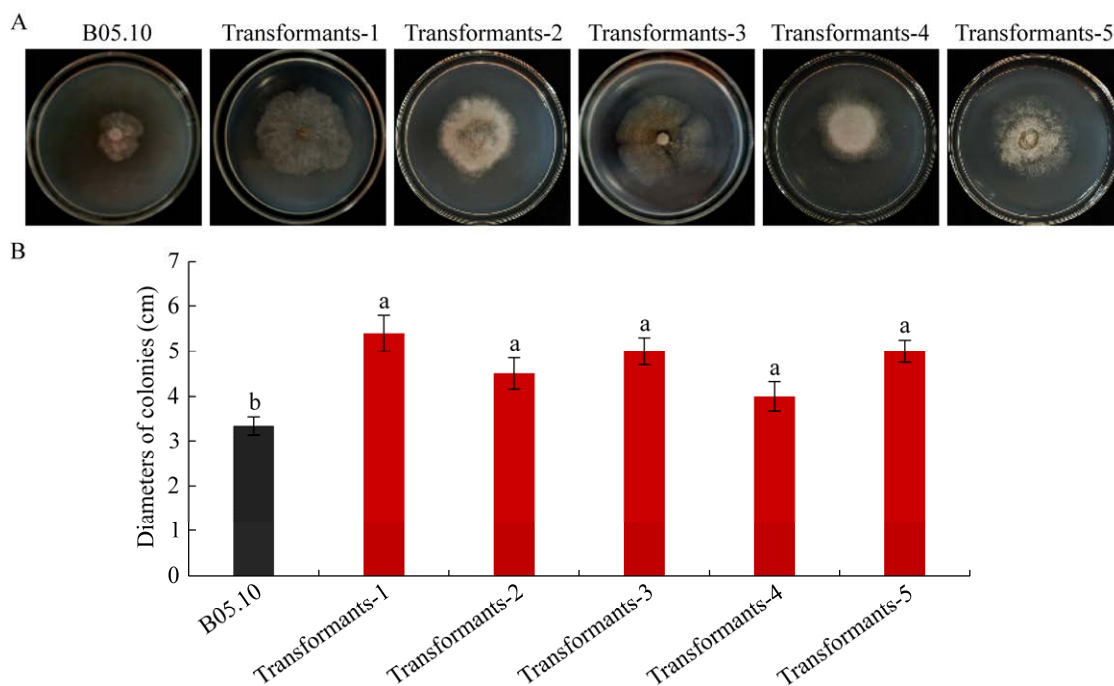


图 3 转化子在草铵膦抗性培养基上的生长情况 A: 转化子的菌落形态. B: 转化子的菌落直径. 不同小写字母表示差异显著

Figure 3 Growth of transformants on glufosinate-resistant medium. A: Colony morphology of transformants. B: Colony diameter of transformants. Different lowercase letters indicate significant differences.

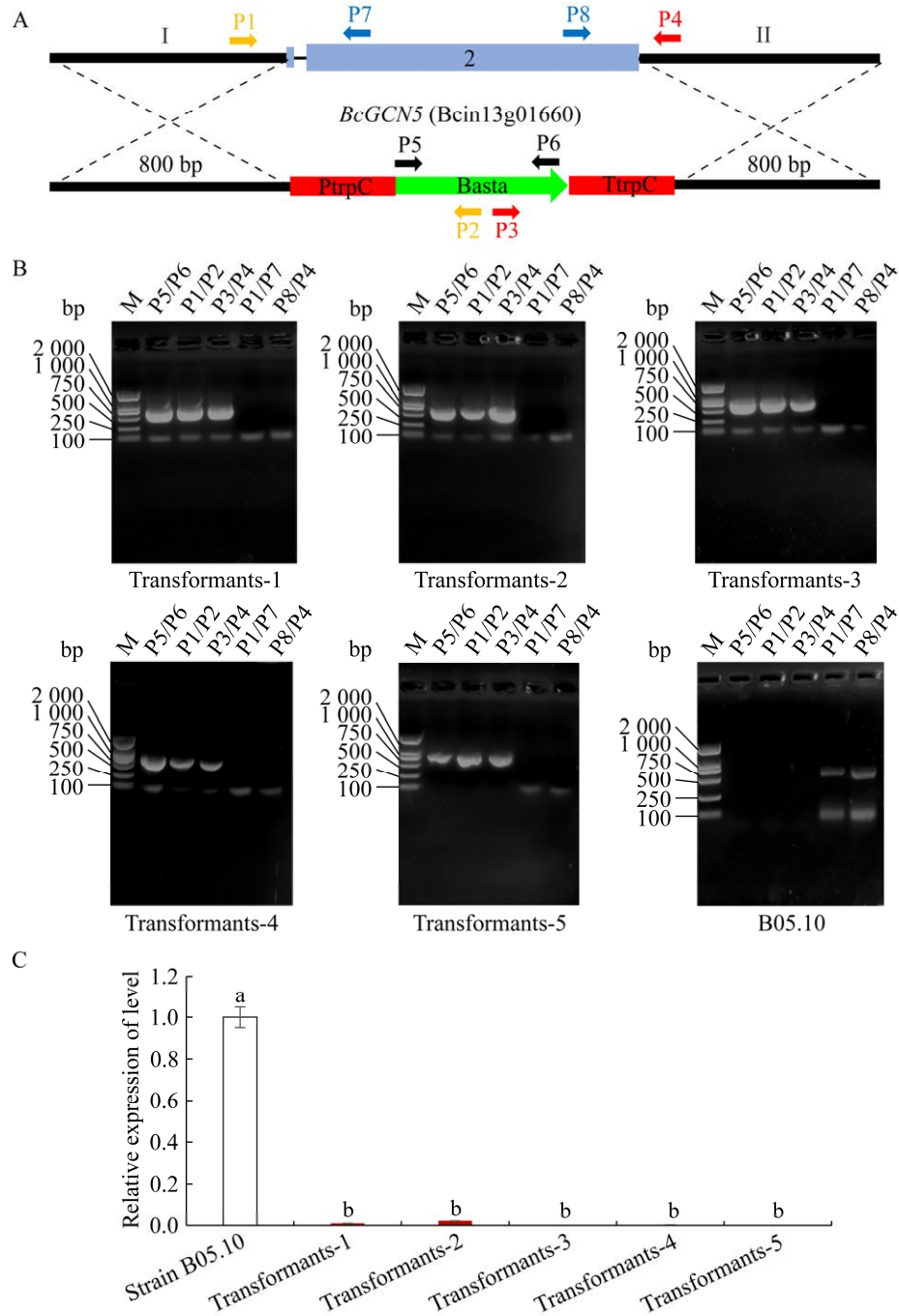


图 4 转化子的分子鉴定 A: 敲除策略与引物设计示意图. B: 采用引物对 P5/P6、P1/P2、P3/P4、P1/P7 和 P8/P4 对转化子和 B05.10 的 PCR 鉴定. C: 转化子的 RT-qPCR 鉴定. M: DNA marker. 不同小写字母表示差异显著

Figure 4 Molecular identification of transformants. A: Knockout strategy and sketch map of primers design. B: PCR identification of transformants 1–5 and B05.10 by using primer pairs P5/P6, P1/P2, P3/P4, P1/P7 and P8/P4. C: RT-qPCR identification of transformants. M: DNA marker. Different lowercase letters indicate significant differences.

2.4 灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因敲除突变体的表型分析结果

对突变体的表型进行分析发现, 突变体的菌落颜色较浅, 菌核产生量明显低于野生型(图 5A); 突变体的菌丝明显细于野生型菌株(图 5B), 突变体的生长速率明显低于野生型(图 5C); 突变体的分生孢子产量显著低于野生型(图 5D), 5 株突变体的产孢量分别为 0.2×10^8 、 0.8×10^8 、 0.0 、 0.2×10^8

和 0.0 个, 而野生型 B05.10 的分生孢子产量为 6.6×10^8 个。结果表明, 灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因正调控病菌的生长发育。

2.5 灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因敲除突变体的致病力测定结果

取同一生长时期(PDA 培养基上培养 3 d)的野生型和突变体的不同菌株分别定量($\Phi=5$ mm)接种于番茄果实和烟草叶片的表面, 测定其对

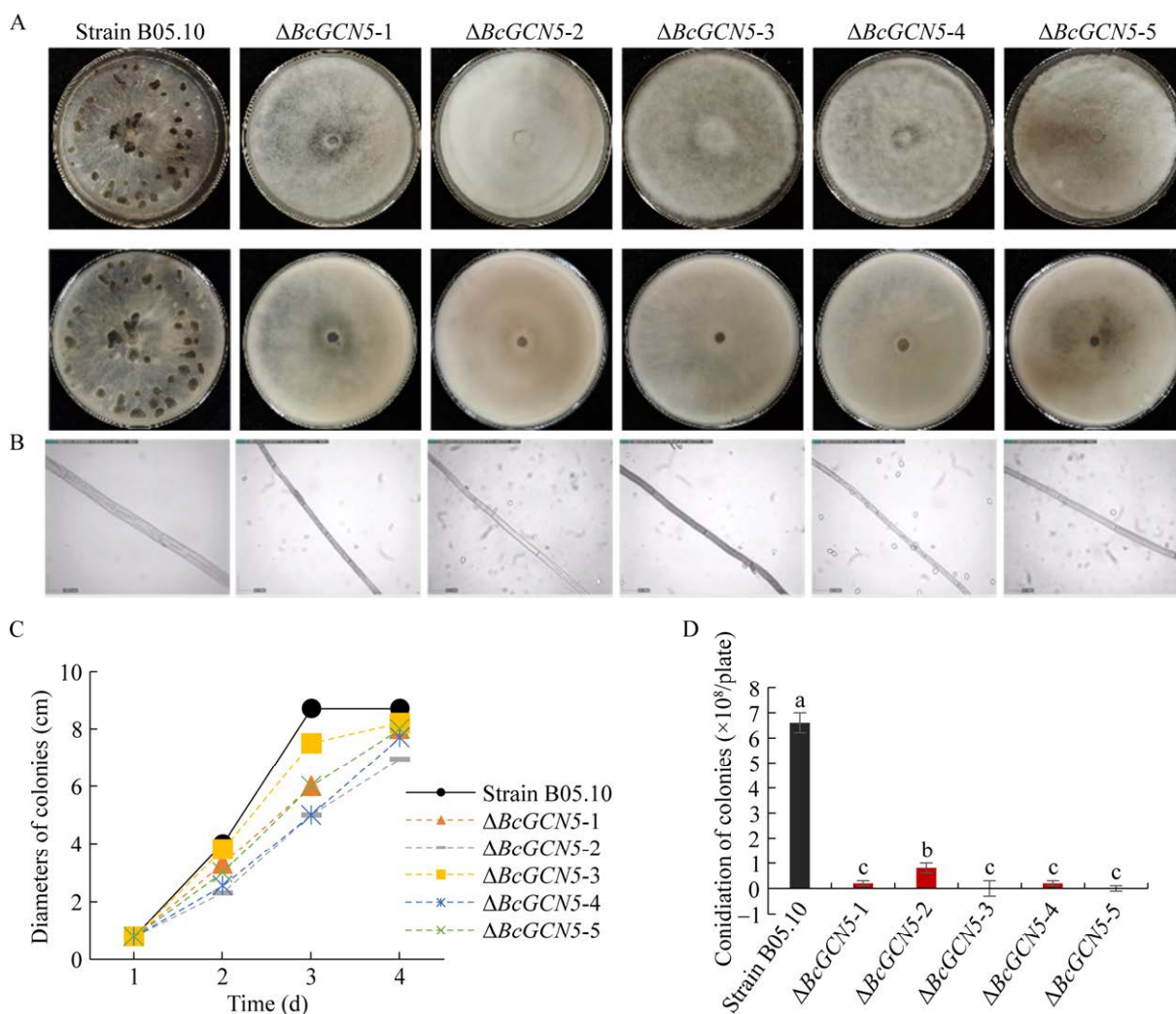


图 5 突变体的表型分析 A: 突变体的菌落形态. B: 突变体的菌丝形态. C: 突变体的生长速率. D: 突变体的分生孢子产量. 不同小写字母表示差异显著

Figure 5 Phenotype of $\Delta BcGCN5$. A: Colony morphology of $\Delta BcGCN5$. B: Mycelium morphology of $\Delta BcGCN5$. C: Growth rate of $\Delta BcGCN5$. D: Conidiation of $\Delta BcGCN5$. Different lowercase letters indicate significant differences.

番茄果实和烟草叶片的致病力。接种 3 d 后观察发现, 在番茄果实上, 接种突变体的病斑明显小于野生型(图 6A), 病斑直径统计发现突变体的病斑面积显著小于野生型(图 6B)。在烟草叶片上, 接种突变体的部位症状明显轻于野生型, 台盼蓝染色显示接种突变体的部位坏死细胞面积明显小于野生型(图 6C); 病斑直径统计显示, 突变体的病斑显著小于野生型(图 6D)。结果表明, *BcGCN5* 基因正调控病菌对番茄果实和烟草叶片的致病力。

2.6 灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因敲除突变体的产酸能力测定结果

产酸能力是灰葡萄孢重要的致病因素, 为了确定 *BcGCN5* 基因影响病菌致病力的机制, 本研究将同一生长时期的野生型和敲除突变体的产酸能力进行分析, 结果发现, 突变体的培养基颜色明显深于野生型, 表明突变体的产酸能力弱于野生型(图 7A)。通过 pH 测定发现, 突变体的 pH 值显著高于野生型(图 7B), 由此可以说明 *BcGCN5* 基因与产酸能力呈正相关。

3 讨论

研究表明, 组蛋白乙酰转移酶 GCN5 在真菌的生长发育和致病过程中具有重要的调控功能^[10]。在里氏木霉菌(*T. reesei*)中, *TrGCN5* 的敲除突变导致生长速率降低、菌丝细胞畸形和孢子分化消失^[11]。在禾谷镰孢(*F. graminearum*)中, *FgGCN5* 基因缺失严重影响有性生殖、无性繁殖、毒素合成和致病力^[12]。在稻瘟病菌(*M. grisea*)中, *GCN5* 作为光诱导基因, 在黑暗条件下乙酰化修饰自噬相关基因 *MoATG8*, 抑制自噬; 在光照条件下, *GCN5* 解除对 *MoATG8* 的转录抑制, 促进稻瘟病菌的无性繁殖和自噬^[13-14]。在球孢白僵菌(*Beauveria bassiana*)中, *GCN5* 的缺失突变

体在菌落生长和孢子耐热性上存在严重缺陷^[15]。在构巢曲霉(*A. nidulans*)中, *GCN5* 通过诱导苔色酸的产生, 在病菌侵染寄主的过程中发挥重要调控作用^[16]。在白色念珠菌(*C. albicans*)中, *GCN5* 基因敲除菌株对细胞壁完整性检测试剂更加敏感, 对寄主组织的侵染能力显著降低^[17]。目前, 关于灰葡萄孢中组蛋白乙酰转移酶 *GCN5* 的功能研究尚未见报道。

为了明确灰葡萄孢 *GCN5* 在病菌生长发育和致病过程中的功能, 本研究通过生物信息学分析确定了灰葡萄孢 *GCN5* 的编码基因 *BcGCN5*。通过同源重组技术我们构建了该基因的敲除突变体 $\Delta BcGCN5$ 。对突变体的表型和致病力进行分析, 发现 $\Delta BcGCN5$ 突变体的菌丝纤细, 生长速度减慢, 菌核和分生孢子的数量显著减少, 致病力显著低于野生型。这表明, *BcGCN5* 基因正调控灰葡萄孢的菌丝生长、分生孢子和菌核的发育及致病力。

研究显示, *GCN5* 不仅通过乙酰化激活基因表达, 还与其他组蛋白修饰相互作用, 共同调控基因转录。在稻瘟病菌(*M. oryzae*)中, *GCN5* 调控的 H3K27ac 参与基因转录激活, 而 *KMT6* 调控的 H3K27me3 则抑制基因转录^[8]。在 $\Delta Mokmt6$ 突变体中, 有 29.5% 的 H3K27me3 标记基因在 *Mokmt6* 和 *Mogcn5* 双缺失突变体中下调, 表明 $\Delta Mokmt6$ 突变体中部分基因的激活需要 *GCN5* 乙酰化; 当 H3K27me3 不存在时, H3K27ac 的重新分布仅发生在原先三甲基化的特定位点上, 而非全基因组范围内普遍增加^[18-19]。另外, *GCN5* 在 SET1 启动子处对 H3K14 进行乙酰化修饰, 从而促进 SET1 转录, 维持正常的 H3K4me3 水平, 这一机制可能与其他染色质因子间接调控基因转录具有更广泛的相关性^[11,20-21]。

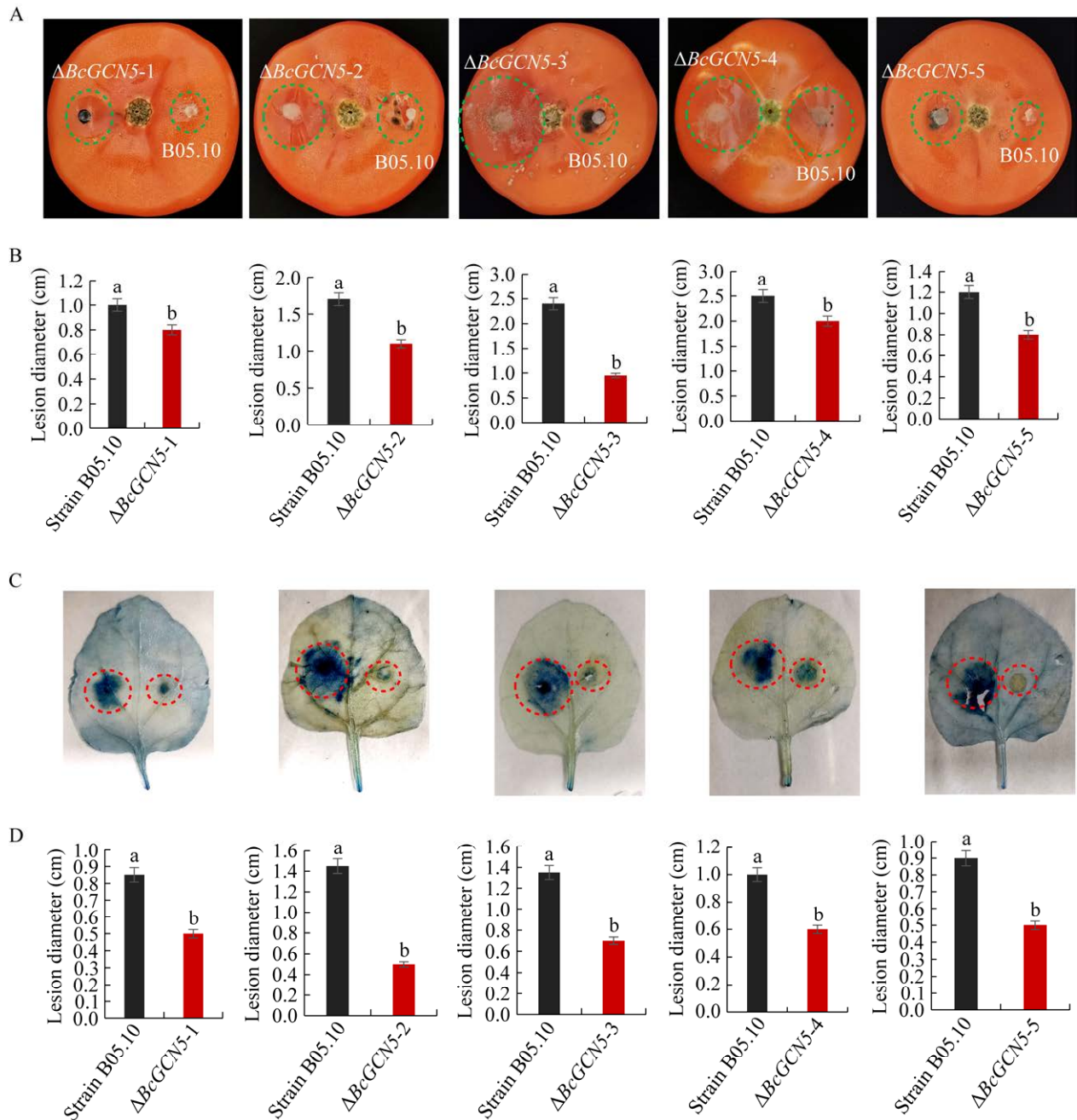


图 6 突变体的致病力测定 A: 突变体对番茄的毒力测定. B: 突变体在番茄上的病斑直径统计. C: 突变体对烟草叶片的毒力测定. 红色虚线圆圈部分为台盼蓝染色后细胞坏死部分. D: 突变体在烟草上的病斑直径统计. 不同小写字母表示差异显著

Figure 6 Pathogenicity of $\Delta BcGCN5$. A: Toxicity determination of mutants to tomato. B: Statistics of lesion diameter of mutants on tomato. C: Statistics of lesion diameter of mutants on tobacco. The red dotted circle part is the cell necrosis part after trypan blue staining. D: Statistics of lesion diameter of mutants on tobacco. Different lowercase letters indicate significant differences.

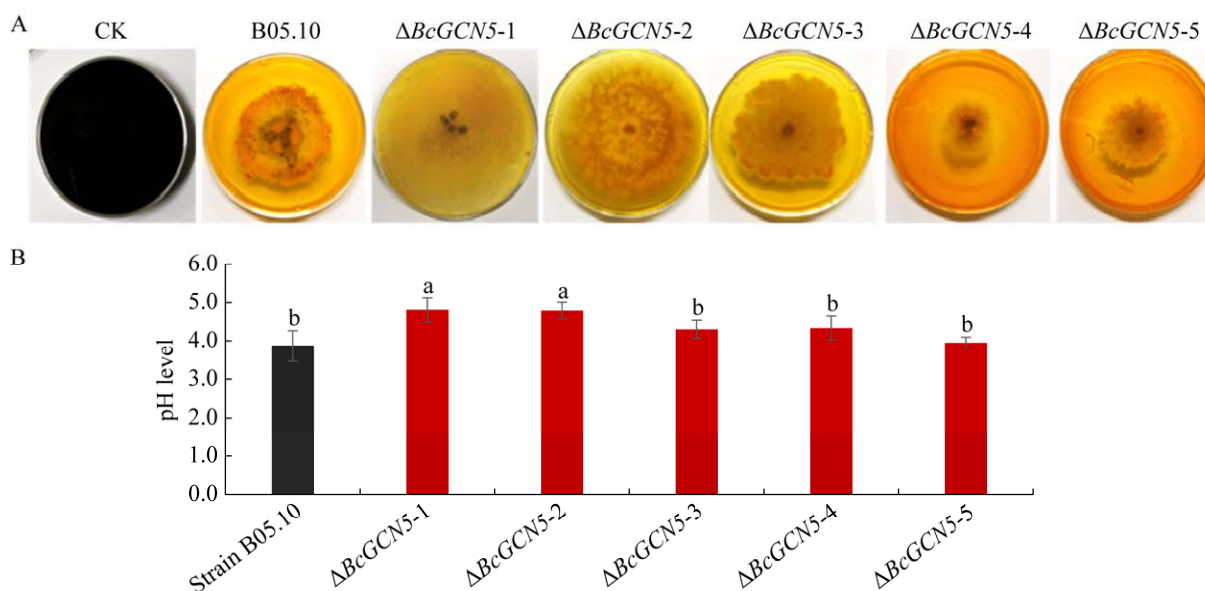


图 7 突变体的产酸能力测定 A: 突变体的菌落颜色变化. B: 菌落培养基 pH 值统计. 不同小写字母表示差异显著

Figure 7 Determination of acid production ability of mutants. A: The color change of the mutant colony. B: Statistics of pH value of colony culture medium. Different lowercase letters indicate significant differences.

4 结论

本研究通过构建灰葡萄孢 *BcGCN5* 基因的敲除突变体, 确定了 *BcGCN5* 在病菌的生长发育和致病过程具有重要功能。然而, *BcGCN5* 调控病菌生长发育和致病力的具体机制尚未明确。后续研究可以利用组蛋白特异性的乙酰化抗体对 *BcGCN5* 基因的突变体进行分析, 明确 *BcGCN5* 对组蛋白乙酰化水平的调控作用。同时, 可以利用 RNA-Seq 技术对突变体进行转录组测序分析, 明确 *BcGCN5* 转录调控的下游靶基因。此外, 可以检测 *BcGCN5* 是否与其他组蛋白修饰存在相互作用, 最终阐明灰葡萄孢 *BcGCN5* 调控病菌生长发育和致病力的机制。

REFERENCES

[1] GRANT PA, DUGGAN L, CÔTÉ J, ROBERTS SM, BROWNELL JE, CANDAU R, OHBA R, OWEN-HUGHES T, ALLIS CD, WINSTON F,

BERGER SL, WORKMAN JL. Yeast Gcn5 functions in two multisubunit complexes to acetylate nucleosomal histones: characterization of an Ada complex and the SAGA (Spt/Ada) complex[J]. *Genes & Development*, 1997, 11(13): 1640-1650.

[2] HELMLINGER D, TORA L. Sharing the SAGA[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 2017, 42(11): 850-861.

[3] ZHANG YD, SU YL, LIU ZW, YU JL, JIN M. A comparative study of the hopanoid hydrocarbons in sediments of two lakes (Fuxian and Changdang) with contrasting environments[J]. *Limnologica*, 2019, 76: 1-10.

[4] MORRIS SA, RAO B, GARCIA BA, HAKE SB, DIAZ RL, SHABANOWITZ J, HUNT DF, ALLIS CD, LIEB JD, STRAHL BD. Identification of histone H3 lysine 36 acetylation as a highly conserved histone modification[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, 282(10): 7632-7640.

[5] 常鹏. 含 LisH 结构域蛋白和组蛋白乙酰转移酶 Gcn5 在白念珠菌菌丝发育中的功能研究[D]. 北京: 中国科学院大学博士学位论文, 2015.

CHANG P. Study on the function of Gcn5 containing LisH domain protein and histone acetyltransferase in the mycelium development of *Candida albicans*[D].

- Beijing: Doctoral Dissertation of University of Chinese Academy of Sciences, 2015 (in Chinese).
- [6] VLACHONASIOS KE, KALDIS A, NIKOLOUDI A, TSEMENTZI D. The role of transcriptional coactivator ADA2b in *Arabidopsis* abiotic stress responses[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2011, 6(10): 1475-1478.
- [7] KIM S, PIQUEREZ SJM, RAMIREZ-PRADO JS, MASTORAKIS E, VELUCHAMY A, LATRASSE D, MANZA-MIANZA D, BRIK-CHAOUCHE R, HUANG Y, RODRIGUEZ-GRANADOS NY, CONCIA L, BLEIN T, CITERNE S, BENDAHMANE A, BERGOUNIOUX C, CRESPI M, MAHFOUZ MM, RAYNAUD C, HIRT H, NTOUKAKIS V, et al. GCN5 modulates salicylic acid homeostasis by regulating H3K14ac levels at the 5' and 3' ends of its target genes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2020, 48(11): 5953-5966.
- [8] XUE-FRANZÉN Y, HENRIKSSON J, BÜRGLIN TR, WRIGHT APH. Distinct roles of the Gcn5 histone acetyltransferase revealed during transient stress-induced reprogramming of the genome[J]. *BMC Genomics*, 2013, 14: 479.
- [9] NÜTZMANN HW, REYES-DOMINGUEZ Y, SCHERLACH K, SCHROECKH V, HORN F, GACEK A, SCHÜMANN J, HERTWECK C, STRAUSS J, BRAKHAGE AA. Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans* requires Saga/Ada-mediated histone acetylation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(34): 14282-14287.
- [10] KROGAN NJ, BAETZ K, KEOGH MC, DATTA N, SAWA CK, KWOK TCY, THOMPSON NJ, DAVEY MG, POOTOOLAL J, HUGHES TR, EMILI A, BURATOWSKI S, HIETER P, GREENBLATT JF. Regulation of chromosome stability by the histone H2A variant Htz1, the Swr1 chromatin remodeling complex, and the histone acetyltransferase NuA4[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101(37): 13513-13518.
- [11] XIN Q, GONG YJ, LV XX, CHEN GJ, LIU WF. *Trichoderma reesei* histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal growth, conidiation, and cellulase gene expression[J]. *Current Microbiology*, 2013, 67(5): 580-589.
- [12] ZHOU SY, YANG QQ, YIN CF, LIU L, LIANG WX. Systematic analysis of the lysine acetylome in *Fusarium graminearum*[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1): 1019.
- [13] DENG YZ, QU ZW, NAQVI NI. Twilight, a novel circadian-regulated gene, integrates phototropism with nutrient and redox homeostasis during fungal development[J]. *PLoS Pathogens*, 2015, 11(6): e1004972.
- [14] YAO ZY, DELORME-AXFORD E, BACKUES SK, KLIONSKY DJ. Atg41/Icy2 regulates autophagosome formation[J]. *Autophagy*, 2015, 11(12): 2288-2299.
- [15] CAI Q, WANG JJ, FU B, YING SH, FENG MG. Gcn5-dependent histone H3 acetylation and gene activity is required for the asexual development and virulence of *Beauveria bassiana*[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(4): 1484-1497.
- [16] DOEHLEMANN G, MOLITOR F, HAHN M. Molecular and functional characterization of a fructose specific transporter from the gray mold fungus *Botrytis cinerea*[J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2005, 42(7): 601-610.
- [17] 蒋伶活, 李西川, 智慧. 白念珠菌菌丝发育的遗传调控[J]. *细胞生物学杂志*, 2006, 28(3): 387-391.
- JIANG LH, LI XC, ZHI H. Genetic regulation of hyphal development in *Candida albicans*[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2006, 28(3): 387-391 (in Chinese).
- [18] GRIMALDI B, COIRO P, FILETICI P, BERGE E, DOBOSY JR, FREITAG M, SELKER EU, BALLARIO P. The *Neurospora crassa* White Collar-1 dependent blue light response requires acetylation of histone H3 lysine 14 by NGF-1[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2006, 17(10): 4576-4583.
- [19] ZHANG SL, LIANG ML, NAQVI NI, LIN CX, QIAN WQ, ZHANG LH, DENG YZ. Phototrophy and starvation-based induction of autophagy upon removal of Gcn5-catalyzed acetylation of Atg7 in *Magnaporthe oryzae*[J]. *Autophagy*, 2017, 13(8): 1318-1330.
- [20] LIANG ML, ZHANG SL, DONG LH, KOU YJ, LIN CX, DAI WJ, ZHANG LH, DENG YZ. Label-free quantitative proteomics of lysine acetylome identifies substrates of Gcn5 in *Magnaporthe oryzae* autophagy and epigenetic regulation[J]. *mSystems*, 2018, 3(6): e00270-18.
- [21] RÖSLER SM, KRAMER K, FINKEMEIER I, HUMPF HU, TUDZYNSKI B. The SAGA complex in the rice pathogen *Fusarium fujikuroi*: structure and functional characterization[J]. *Molecular Microbiology*, 2016, 102(6): 951-974.