

蛋白激酶 FgBud32 参与禾谷镰刀菌的生长发育、致病和胁迫应答

刘倩倩[#], 胡登辉[#], 祝金栋, 王光辉^{*}

西北农林科技大学植物保护学院 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西 杨凌 712100

摘要: 由禾谷镰刀菌引起的小麦赤霉病是一种毁灭性的小麦真菌病害, 在世界范围内造成小麦产量和质量的巨大损失。实验室前期在禾谷镰刀菌中共鉴定到 116 个蛋白激酶, 其中 *FgBUD32* 基因的缺失会造成营养生长和有性生殖方面的严重缺陷, 但其在禾谷镰刀菌中的详细功能尚未报道。本研究通过系统比较 *Fgbud32* 突变体与野生型 PH-1 及互补菌株的表型差异, 对 FgBud32 在禾谷镰刀菌中的生物学功能进行了解析。研究结果显示 *Fgbud32* 突变体在多个表型方面存在缺陷, 与野生型菌株以及互补菌株相比, 其生长速率急剧下降, 菌丝弯曲且分支减少; 分生孢子的产量显著降低, 形态变短, 隔膜减少, 萌发率降低且萌发速率延迟; 在有性生殖时期不能产生子囊壳或子囊壳前体; 对小麦穗和胚芽鞘的致病力以及 DON 毒素的合成能力均显著下降。进一步胁迫试验表明, *FgBUD32* 基因的缺失导致禾谷镰刀菌对氧化胁迫(H_2O_2)以及 DNA 损伤胁迫(羟基脲和甲磺甲酯)的敏感性增加。此外, 我们还发现 FgBud32 在细胞核和细胞质中均有定位, 且在一定时期或条件下会从细胞质向细胞核内聚集。综上所述, *FgBUD32* 基因参与了禾谷镰刀菌的营养生长、极性生长、无性/有性生殖、DON 毒素合成、致病以及对氧化胁迫和 DNA 损伤胁迫的应答等多种生命活动, 但其具体的作用机制还有待深入研究。

关键词: 禾谷镰刀菌; 有性生殖; 致病力; 氧化胁迫; DNA 损伤修复

[引用本文] 刘倩倩, 胡登辉, 祝金栋, 王光辉, 2022. 蛋白激酶 FgBud32 参与禾谷镰刀菌的生长发育、致病和胁迫应答. 菌物学报, 41(9): 1483-1497

Liu QQ, Hu DH, Zhu JD, Wang GH, 2022. Protein kinase FgBud32 is involved in fungal development, pathogenicity and stress responses in *Fusarium graminearum*. Mycosystema, 41(9): 1483-1497

基金项目: 陕西省自然科学基金(2020JM-157); 中央高校基本科研业务费专项资金(2452019217); 大学生创新创业训练计划(S202010712103)

Supported by the Natural Science Foundation of Shaanxi Province, China (2020JM-157), Chinese Universities Scientific Fund (2452019217), and National Undergraduate Training Program for Innovation and Entrepreneurship (S202010712103).

*Corresponding author. E-mail: wgh2891458@163.com

#Co-first author.

Received: 2022-02-14, accepted: 2022-03-16

Protein kinase FgBud32 is involved in fungal development, pathogenicity and stress responses in *Fusarium graminearum*

LIU Qianqian[#], HU Denghui[#], ZHU Jindong, WANG Guanghui^{*}

State Key Laboratory of Crop Stress Biology for Arid Areas, College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China

Abstract: *Fusarium* head blight (FHB) caused by *Fusarium graminearum* is a highly destructive disease of wheat, causing major reductions in yield and quality worldwide. Our laboratory identified 116 protein kinases in *F. graminearum* in previous study, among which deletion of *FgBUD32* gene could cause serious defects in vegetative growth and sexual reproduction, while detailed function of the gene in *F. graminearum* has not been reported. In this study, the biological functions of FgBud32 were revealed by systematically comparing the phenotypic difference among the wild-type PH-1, *Fgbud32* mutant and complemented transformant. It was found that *Fgbud32* mutant was defective in vegetative growth, polarized growth, conidiogenesis, conidial germination and sexual reproduction. The *Fgbud32* mutant also failed to form any perithecia. In addition, the *Fgbud32* mutant exhibited a significant reduction in DON biosynthesis and pathogenicity toward wheat heads and coleoptiles. Moreover, deletion of *FgBUD32* gene increased the sensitivity of *F. graminearum* to oxidative stress (H_2O_2) and DNA damage stresses (HU and MMS). The FgBud32 was localized in both cytoplasm and nucleus, and accumulated in nucleus under certain stages or conditions. Taken together, the protein kinase FgBud32 was involved in vegetative growth, polarized growth, asexual/sexual reproduction, DON biosynthesis, infection, and responses to oxidative and DNA damage stresses of *F. graminearum*. Its underlying mechanism needs to be investigated.

Keywords: *Fusarium graminearum*; sexual reproduction; pathogenicity; oxidative stress; DNA damage repair

由禾谷镰刀菌引起的小麦赤霉病(*Fusarium* head blight, FHB)是一种世界性流行病害。作为对小麦生产危害最严重的真菌病害之一,该病害不仅会对小麦的产量造成巨大损失,还严重影响着小麦的品质。禾谷镰刀菌在侵染小麦穗部时会分泌多种真菌毒素,如脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)、玉米赤霉烯酮(ZEN)等,对食品和饲料的安全构成巨大威胁(Motaung *et al.* 2017)。DON毒素是禾谷镰刀菌中第一个被鉴定的毒力因子,其可帮助病原菌穿过小穗轴,促进其在小麦穗部的扩展(Proctor *et al.* 1995; Jansen *et al.* 2005)。

蛋白激酶是生物体内一大类重要的蛋白酶,

可以将 ATP 的末位磷酸基团转移至底物蛋白的 Ser、Thr 和 Tyr 等氨基酸残基上(Hanks & Hunter 1995)。有研究表明,在真核细胞中,30%的蛋白存在磷酸化修饰(Cohen 2000)。此外,编码蛋白激酶的基因在高等真核生物体内大约占 1% (Manning *et al.* 2002),其调控的蛋白可逆磷酸化,不仅参与生物体的生长、发育,还参与对外界环境刺激的应答等多种生命活动(Miranda-Saavedra & Barton 2007)。在真核生物体内,存在 2 大类蛋白激酶,一类是典型的蛋白激酶,另一类是非典型的蛋白激酶。与典型的蛋白激酶相比,非典型的蛋白激酶也具有保守的蛋白激酶结

构域,但其与典型的蛋白激酶无序列同源性。

Bud32 是一个非典型的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,在古生菌和真核生物中普遍存在(Dzikowska *et al.* 2015),与其他典型的蛋白激酶相比 Bud32 缺少一些保守的结构域(Briza *et al.* 2002; Facchin *et al.* 2002)。Bud32 与人类的 p53 相关蛋白激酶(PRPK)高度同源且二者具有功能上的保守性(Lopreiato *et al.* 2004),在酿酒酵母中过表达 PRPK 可部分回补 *bud32* 突变体的表型缺陷(Facchin *et al.* 2003)。在古生菌和真核生物中, Bud32 为 KEOPS/EKC 复合体的核心亚基。该复合体由 Bud32、Kae1、Cgi121、Pcc1 和 Gon7 组成,除 Gon7 为真菌所特有外,其余 4 个亚基在古生菌和真核生物中均普遍存在(Downey *et al.* 2006; Kisseleva-Romanova *et al.* 2006; Daugeron *et al.* 2011)。有研究表明 KEOPS 复合体参与了端粒长度的维持(Liu *et al.* 2018)、tRNA 的修饰(T⁶A) (Lauhon 2012; Perrochia *et al.* 2013)以及同源重组介导的 DNA 损伤修复(He *et al.* 2019),还参与了 RNA 剪接(Kisseleva-Romanova *et al.* 2006)、基因转录调控(Dzikowska *et al.* 2015)、出芽(Kato *et al.* 2011)和染色体分离(Shay *et al.* 2008)等细胞过程。此外, Bud32 还具有一些不依赖于 KEOPS 复合体的功能,例如,在酿酒酵母中 Bud32 被 Sch9 (与哺乳动物 Akt/PKB 同源)磷酸化后,会促进 Grx4 的磷酸化和入核(Peggion *et al.* 2008),而 Grx4 在维持细胞核内氧化还原平衡状态方面具有重要的作用。目前,关于 Bud32 的功能和作用机制的研究主要集中在哺乳动物和酿酒酵母中,在其他真菌中尚无深入报道。

实验室前期在禾谷镰刀菌中共鉴定到 116 个蛋白激酶,其中 20 个蛋白激酶是生命活动所必需的,不能被敲除。对其余 96 个蛋白激酶基因进行了成功地敲除,并系统检测了突变体在菌落生长、无性/有性生殖、胁迫应答、DON

毒素合成以及植物侵染等方面的表型缺陷(Wang *et al.* 2011)。其中 *FgBUD32* 基因的缺失突变体在菌落生长和有性生殖等方面存在严重的表型缺陷。为了进一步探究禾谷镰刀菌中 *FgBud32* 蛋白激酶的功能,本研究将 *FgBUD32* 基因片段重新导入到 *Fgbud32* 突变体中获得其互补转化子,随后系统地比较分析了 *Fgbud32* 突变体与野生型菌株以及互补转化子的表型差异。研究结果显示, *FgBUD32* 基因的缺失不仅影响了禾谷镰刀菌的营养生长、极性生长和无性/有性生殖,而且降低了病原菌的 DON 毒素合成能力以及对寄主的致病能力。此外, *Fgbud32* 突变体对氧化胁迫和 DNA 损伤胁迫都十分敏感。研究结果有助于进一步解析禾谷镰刀菌调控生长发育和致病性的分子机制,同时对其他病原真菌中 Bud32 蛋白激酶的研究也具有一定的借鉴意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验菌株

本研究所用禾谷镰刀菌的野生型菌株 PH-1 为美国普度大学植物与植物病理系许金荣教授馈赠, *Fgbud32* 突变体菌株为实验室前期构建并保存,本研究所用禾谷镰刀菌菌株见表 1。大肠杆菌感受态细胞为 DH5 α , 骨架载体有 pKNTG 和 pJNARLG。小麦品种选用小偃 22。

1.1.2 常用试剂

限制性内切酶(Fermentas 公司); Fast *Pfu* 高保真酶、*Taq* 酶(TransGen Biotech); P505 高保真酶、ClonExpress[®] II One Step Cloning Kit (Vazyme 公司); DNA poly I Klenow 酶(Promega 公司); DAPI (Sigma 公司)、Calcofluor White (CFW, Sigma 公司)、过氧化氢(hydrogen peroxide, 广东光华公司)、羟基脲(HU, Sigma 公司)、甲磺甲酯(MMS, Macklin 公司)等。

表 1 本研究所用的禾谷镰刀菌菌株

Table 1 The strains of *Fusarium graminearum* used in this study

菌株 Strains	菌株介绍 Descriptions	来源 Source
PH-1	Wild type	Purdue University
BM-9	<i>Fgbud32</i> deletion mutant of PH-1	Northwest A&F University
BM-15	<i>Fgbud32</i> deletion mutant of PH-1	Northwest A&F University
BM-18	<i>Fgbud32</i> deletion mutant of PH-1	Northwest A&F University
BC-2	<i>FgBUD32-C</i> transformant of BM-18	This study
BG-6	Native- <i>FgBUD32</i> -GFP transformant of PH-1	This study
BR-1	RP27- <i>FgBUD32</i> -GFP transformant of PH-1	This study

1.1.3 培养基

YEPD 培养基：葡萄糖 20 g，蛋白胨 10 g，酵母提取物 3 g，加水至 1 L；PDA 培养基：PDA 粉末(奥博星) 38 g，加水至 1 L；CMC 液体培养基：羧甲基纤维素钠 15 g，酵母提取物 1 g，磷酸二氢钾 1 g，七水合硫酸镁 0.5 g，硝酸铵 1 g，加水至 1 L；胡萝卜培养基：胡萝卜 200 g，琼脂粉 10 g，加水至 1 L。

1.2 方法

1.2.1 Bud32 同源蛋白的获得和分析

在酿酒酵母数据库(<https://yeastgenome.org/>)中下载 Bud32 的蛋白序列，然后在真菌基因组数据库 Ensembl Fungi 中利用 BlastP 功能比对查找禾谷镰刀菌中对应的同源蛋白序列(FGRAMPH1_01TO7133，命名为 FgBud32)，将获得的 FgBud32 蛋白序列在酿酒酵母数据库中通过反向 BlastP 进行确认。在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中以 FgBud32 的蛋白序列作为参照序列，利用 BlastP 的方法，查找其他物种中的同源序列。本研究选用的菌株有子囊菌门物种酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (Desm.) Meyen、尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* Schltdl.、粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge、核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary、构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter 和裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* Lindner；担子菌门物

种玉米黑粉菌 *Ustilago maydis* (DC.) Corda 和新型隐球菌 *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill.；毛霉菌门物种横腰孢菌 *Lobosporangium transversale* (Malloch) M. Blackw. & Benny 和长孢被孢霉 *Linnemannia elongata* (Linnem.) Vandepol & Bonito；接合菌门物种冠状耳霉 *Conidiobolus coronatus* (Costantin) A. Batko 和裂孢蛙粪霉菌 *Basidiobolus meristosporus* Drechsler。将查找到的同源序列通过 Clustal X 软件进行多序列比对分析，并使用 MEGA 5.0 软件构建系统进化树。

1.2.2 菌株表型检测

(1) 菌落生长速率测量及形态观察：先将待测菌株在 PDA 平板上活化 3 d，随后用直径为 5 mm 的打孔器在菌落边缘(活力旺盛)处打孔，将菌饼倒置接种于 PDA 培养皿上，25 ℃倒置培养 3 d 后进行数据测量并拍照。每个菌株设置 3 个重复。

(2) 分生孢子产量测定及形态观察：在活化 3 d 的待测菌株平板上挑取 3 个直径为 5 mm 的菌饼，将其转移至装有 50 mL CMC 培养基的三角瓶中，25 ℃、175 r/min 摇培 5 d。用无菌滤布过滤收集分生孢子，再用血球计数板计数并统计产孢量。每个菌株设置 3 个重复，每瓶样品计数 3 次。吸取分生孢子悬浮液，置于显微镜下观察分生孢子形态并拍照。

(3) 分生孢子萌发率测定：将获得的分生孢

子转移至含有 50 mL YEPD 液体培养基的三角瓶中, 25 °C、175 r/min 摇培 6 h。将培养物用无菌滤布过滤收集菌体, 并用无菌水进行重悬浮, 吸取少量悬浮液置于显微镜下进行观察。

(4) 有性生殖表型检测: 将活化 3 d 的待测菌株接种于胡萝卜培养基上, 置于 25 °C 恒温培养箱中黑暗培养 7 d 后, 滴加 1 mL 0.1% 吐温于气生菌丝表面并用涂布器将菌丝压平后晾干。随后将培养皿置于 25 °C 培养箱中, 用黑光灯进行光暗交替(12 h:12 h)继续培养, 7 d 后观察子囊壳和子囊孢子的形成情况。各菌株分别设置 3 个重复。

(5) 禾谷镰刀菌致病力检测: 小麦穗接种法: 将待测菌株的分生孢子调节浓度至 2×10^5 个/mL。在小麦扬花期, 将 10 μ L 的孢子悬浮液接种至小麦穗中间位置的小花上, 并用记号笔标记接种点。接种小麦选用感病品种小偃 22, 每个菌株至少接种 10 个小麦穗。待接种 14 d 后, 统计小麦穗的发病情况并拍照; 小麦胚芽鞘接种法: 将小麦种子置于铺有 3 层润湿滤纸的培养皿中室温培养 2–3 d, 待长出 1 cm 左右的胚芽鞘后用剪刀将其顶端剪掉。吸取 10 μ L 浓度为 2×10^5 个/mL 的孢子悬浮液滴到切口处, 25 °C 保湿培养 5–7 d 后统计坏死病斑的长度并拍照。DON 毒素检测方法参考 Bluhm *et al.* (2007) 的报道。

1.2.3 小穗轴半薄切片及染色

(1) 小麦穗接种: 将待测菌株的分生孢子调节浓度至 2×10^5 个/mL。将 10 μ L 的孢子悬浮液接种至扬花期小麦穗的小花上; (2) 取样: 在禾谷镰刀菌接种 5 d 后取样, 将小穗轴部位从小麦穗上分离下来; (3) 样品处理: 用刀片将小穗轴横切成 0.5 cm $\times$ 0.2 cm $\times$ 0.2 cm 的小块, 置于 4% 戊二醛固定液中抽真空 3 次, 30 min/次, 随后用 0.1 mol/L PBS (pH 6.8) 漂洗 4–5 次。分别使用 30%、50%、70%、80%、90% 和 100% 的乙醇梯度脱水, 30 min/次。再分别用 1:3、1:1、3:1 (白

胶:乙醇)和纯胶进行置换与包埋, 50 °C 干燥 48 h 后保存备用; (4) 切片与染色: 用 Leica EM UC7 超薄切片机进行切片(厚度约为 100–200 μ m), 再置于载玻片上用 1% 甲苯胺蓝进行染色, 无菌水漂洗后置于显微镜下观察并拍照。

1.2.4 DAPI 和 Calcofluor White 染色

将 DAPI 和 Calcofluor White 染料分别溶于 PBS 溶液和无菌水中, 分别配制成浓度为 10 和 40 μ g/mL 的母液, 避光保存备用。吸取 40 μ L 待测菌株的分生孢子或菌丝悬浮液, 分别加入等体积的 DAPI 或 Calcofluor White 母液混匀, 静置 5–10 min。随后吸取样品制片, 在荧光显微镜 (Olympus BX53) 下进行观察并拍照。

1.2.5 *FgBUD32-C*、*Native-FgBUD32-GFP* 和 *RP27-FgBUD32-GFP* 载体构建

本研究构建互补载体 *FgBUD32-C* 和荧光表达载体 *Native-FgBUD32-GFP* 时所用的骨架载体为 pKNTG, 而构建过表达荧光载体 *RP27-FgBUD32-GFP* 时所用的骨架载体为 pJNARLG。为构建 *FgBUD32-C* 互补载体, 首先用引物 BUD32/CF+BUD32/CR 扩增含有 *FgBUD32* 开放阅读框(ORF)及其上游 1.7 kb 和下游 0.5 kb 的片段, 然后通过 ClonExpress® II One Step Cloning Kit 构建到 *Kpn* I 与 *Xho* I 双酶切线性化的 pKNTG 载体上。利用相同的体外同源重组法构建 *Native-FgBUD32-GFP* 和 *RP27-FgBUD32-GFP* 载体。在构建 *Native-FgBUD32-GFP* 时用引物 BUD32-GFP/F+BUD32-GFP/R 扩增只含有 *FgBUD32* ORF (不含终止密码子 TAA) 及其上游 1.7 kb 的片段, 然后克隆到 pKNTG 载体上 (*Kpn* I 与 *Hind* III 双酶切线性化)。而在构建 *RP27-FgBUD32-GFP* 时用引物 RP27-BUD32-GFP/F+RP27-BUD32-GFP/R 扩增只含有 *FgBUD32* ORF (不含终止密码子 TAA) 的片段, 然后克隆到 pJNARLG 载体上 (*Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切线性化)。所用引物序列见表 2。

表 2 *FgBUD32*-C、Native-*FgBUD32*-GFP 以及 RP27-*FgBUD32*-GFP 载体构建所用引物
Table 2 Primers used for generation of *FgBUD32*-C, Native-*FgBUD32*-GFP and RP27-*FgBUD32*-GFP constructs

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')
BUD32/CF	<u>AGGGAACAAAAGCTGGGTACCGTCCTCGCGCAAATCATCAC</u>
BUD32/CR	<u>GAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACTCGACCAAATCAACCTGCGA</u>
BUD32-GFP/F	<u>AGGGAACAAAAGCTGGGTACCGTCCTCGCGCAAATCATCAC</u>
BUD32-GFP/R	<u>GAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACTCCAAGCATGCTTCGTTTGC</u>
RP27-BUD32-GFP/F	<u>TTTCGTAGGAACCCAATCTTCAAAATGACGACAACCACGGCTACG</u>
RP27-BUD32-GFP/R	<u>GAACAGCTCCTCGCCCTTGCTCACTCCAAGCATGCTTCGTTT</u>

注：下划线标注序列为载体同源序列
Note: The underlined sequence is homologous to the vector ends.

2 结果与分析

2.1 禾谷镰刀菌中 Bud32 同源蛋白及系统进化分析

为了探索 FgBud32 在真菌系统进化中的保守性以及其在禾谷镰刀菌中潜在的功能,我们将其与子囊菌门物种酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (Desm.) Meyen、尖孢镰刀菌 *Fusarium oxysporum* Schltdl.、粗糙脉孢菌 *Neurospora crassa* Shear & B.O. Dodge、核盘菌 *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary、构巢曲霉 *Aspergillus nidulans* (Eidam) G. Winter 和裂殖酵母 *Schizosaccharomyces pombe* Lindner;担子菌门物种玉米黑粉菌 *Ustilago maydis* (DC.) Corda 和新型隐球菌 *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuill.; 毛霉菌门物种横腰孢菌 *Lobosporangium transversale* (Malloch) M. Blackw. & Benny 和长孢被孢霉 *Linnemannia elongata* (Linnem.) Vandepol & Bonito; 接合菌门物种冠状耳霉 *Conidiobolus coronatus* (Costantin) A. Batko 和裂孢蛙粪霉菌 *Basidiobolus meristosporus* Drechsler 中的 Bud32 同源蛋白进行多序列比对分析。FgBud32 由 262 个氨基酸组成,其中 36–223 aa 处含有一个较为保守的蛋白激酶结构域(图 1A)。除此外,在 Bud32 同源蛋白碳末端还存在一个约 20 aa 的保

守序列,推测其具有十分重要的功能。利用 MEGA 5.0 对 Bud32 同源蛋白进行系统进化分析。系统进化树的分支和节点数值分析表明 Bud32 在丝状真菌中非常保守,且其进化关系符合物种间的亲缘关系(图 1B)。

2.2 *FgBUD32* 基因对营养生长和极性生长都具有重要作用

实验室前期获得了 3 个 *FgBUD32* 基因的敲除突变体,分别命名为 BM-9、BM-15 和 BM-18 (表 1)。3 个 *Fgbud32* 突变体表型一致,因而本文仅选用 BM-18 菌株用于结果的展示。本研究将 *FgBUD32* 基因克隆到 pKNTG 载体上得到 *FgBUD32*-C 融合载体,随后将其通过 PEG 介导的原生质体转化法导入到 *Fgbud32* 突变体中得到了互补菌株 BC-2 (表 1)。在 PDA 培养基上,互补菌株 BC-2 与野生型菌株的生长速率没有显著性差异,但 *Fgbud32* 突变体的生长速率显著降低,仅为野生型 PH-1 菌株的 13.6% (图 2A,表 3)。此外,相较于野生型菌株 PH-1 和互补转化子 BC-2, *Fgbud32* 突变体气生菌丝稀疏且短小(图 2A);在显微镜下观察其菌落的边缘,发现 *Fgbud32* 突变体的菌丝较为弯曲且分支减少(图 2B)。以上结果表明, *FgBUD32* 基因的缺失严重影响禾谷镰刀菌的营养生长和极性生长。

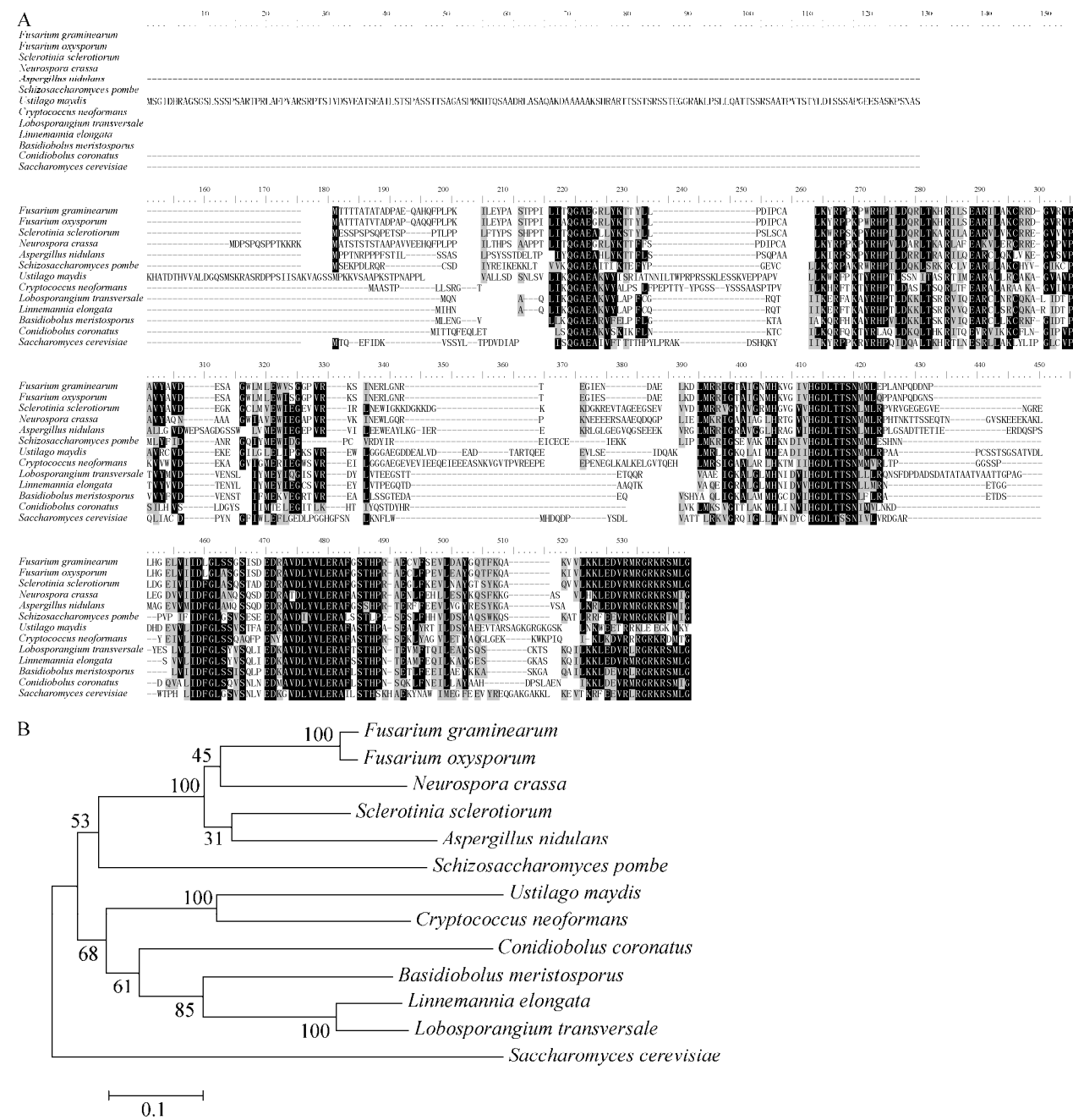


图 1 禾谷镰刀菌与代表性真菌中 Bud32 同源蛋白的多序列比对(A)以及系统进化分析(B)
Fig. 1 Multiple sequence alignment (A) and phylogenetic analysis (B) of FgBud32 orthologs from representative fungal species.

2.3 *FgBUD32* 基因参与分生孢子的产生、形态建成和萌发

通过对菌株进行产孢量统计发现,野生型菌株的产孢量为 11.55×10^5 个/mL;而 *Fgbud32* 突变体的产孢量为 0.64×10^5 个/mL,仅为野生型菌

株产孢量的 5.54%;而互补菌株的产孢量则回复到野生型菌株的水平(表 3)。在分生孢子形态方面,野生型菌株 PH-1 产生的分生孢子呈镰刀状,具有 4-6 个隔膜,而 *Fgbud32* 突变体的分生孢子则较为短小且隔膜数量显著减少,每个分生孢子

隔膜数多为 0–3 个(图 3A)。将待测菌株的分生孢子在 YEPD 培养基中培养 6 h 后,发现 *Fgbud32* 突变体的萌发率仅为 63.41%,显著低于野生型菌株的 94.05% (表 3),其芽管长度也明显更短(图 3B)。以上结果表明, *FgBUD32* 基因参与了禾谷镰刀菌分生孢子的产生、形态建成和萌发。

2.4 *FgBUD32* 基因缺失导致有性生殖能力丧失

禾谷镰刀菌有性生殖产生的子囊孢子是小麦赤霉病的主要初侵染源,因而我们检测了 *FgBUD32* 基因在有性生殖过程中的作用。结果显示,在胡萝卜培养基上黑光灯诱导 7 d 后, *Fgbud32* 突变体不能产生子囊壳或子囊壳前体(图 4A),而野生型菌株 PH-1 能够产生大量黑色、成熟的子囊壳且部分子囊壳顶部吐出黄色的鞭须。互补转化子同野生型菌株一样,不但能够产生大量成熟的子囊壳并吐出黄色的鞭须,其子囊壳内部也能产生大量成熟的子囊和子囊孢子(图 4B)。以上结果表明, *FgBUD32* 基因参与了禾谷镰刀菌子囊壳的形成。

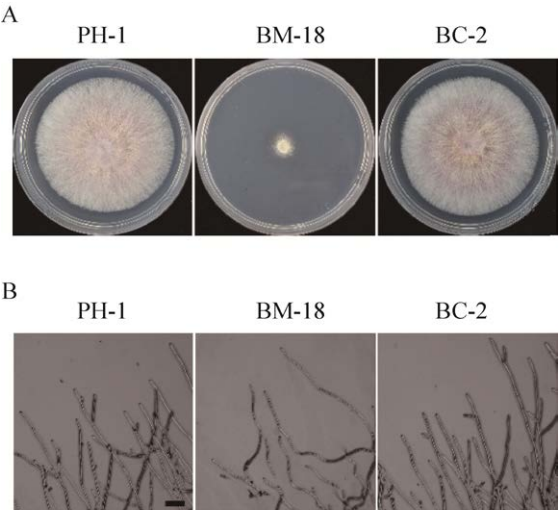


图 2 *Fgbud32* 突变体的菌落形态及生长缺陷 A: 野生型 PH-1、*Fgbud32* 突变体(BM-18)及互补菌株(BC-2)在 PDA 上培养 3 d; B: 相同的菌株在 PDA 上培养 24 h 后的菌落边缘. 标尺=100 μm

Fig. 2 Colony morphology and growth defects of the *Fgbud32* mutant. A: Three-day-old PDA cultures of PH-1, BM-18 and BC-2; B: Hyphal growth at the colony edge of the same set of strains on PDA after incubation for 24 h. Bar=100 μm.

表 3 *Fgbud32* 突变体在生长、产孢、萌发、植物侵染以及 DON 毒素合成方面的表型缺陷

Table 3 Defects of the *Fgbud32* deletion mutant in growth, conidiation, germination, infection and DON production of *Fusarium graminearum*

菌株 Strains	生长速率 Growth rate (mm/d) ^A	产孢量 Conidiation (10 ⁵ conidia/mL) ^B	孢子萌发率 Conidial germination rate (%) ^C	病情指数 Disease index ^D		脱氧雪腐镰刀菌烯醇 DON (mg/L) ^E
				小麦穗 Wheat head	胚芽鞘 Coleoptile (mm)	
PH-1	10.79±0.01 ^{a*}	11.55±1.27 ^a	94.05±0.54 ^a	7.75±1.83 ^a	15.95±3.04 ^a	2 080.50±23.71 ^a
BM-18	1.47±0.06 ^b	0.64±0.12 ^b	63.41±5.33 ^b	0.44±0.18 ^b	1.42±0.44 ^b	23.69±0.09 ^b
BC-2	10.22±0.36 ^a	11.76±0.70 ^a	92.09±0.92 ^a	7.63±1.41 ^a	15.55±2.73 ^a	1 999.95±20.87 ^a

注: ^A菌株在 PDA 培养皿上的生长速率; ^B在 CMC 培养基中培养 5 d 后的产孢情况; ^C分生孢子在 YEPD 培养基中培养 6 h 后的萌发率; ^D以接种 14 d 后的小麦穗的病情指数以及接种 7 d 后胚芽鞘上的病斑长度来统计发病情况,至少统计 10 株小麦穗以及胚芽鞘; ^E对侵染后小麦籽粒进行 DON 毒素检测. 差异显著性根据 Fisher 的最小显著性差异(LSD)法计算,相同的上标字母代表着无显著差异($P\geq0.05$)

Note: ^AThe growth rate of the strains of *Fusarium graminearum* on PDA plate; ^BConidiation after 5 d of culture in CMC medium; ^CConidial germination rate at 6 h in YEPD medium; ^DThe disease incidence was detected by the disease index of wheat spikelets 14 dpi (days post-inoculation) and the infection length of coleoptile at 7 dpi, at least 10 wheat heads and wheat coleoptiles were examined; ^EDON toxin production was detected in infected wheat kernels. Data were analyzed according to the LSD test. The same superscript letters represented no significant difference ($P\geq0.05$).

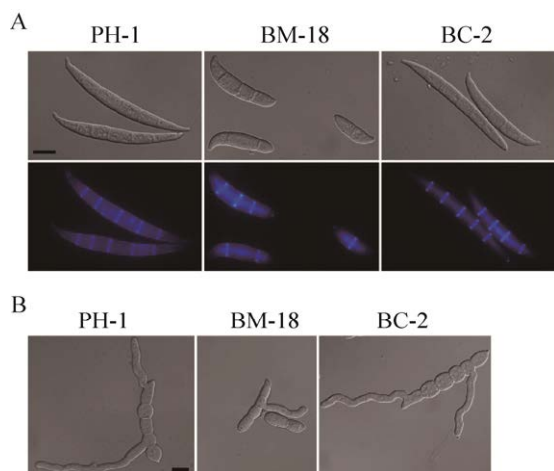


图3 *Fgbud32* 突变体分生孢子的形态以及萌发缺陷 A: 对野生型(PH-1)、*Fgbud32* 突变体(BM-18)和互补菌株(BC-2)的分生孢子进行 CFW (calcofluor white)染色, 并通过微分干涉以及荧光显微镜进行观察; B: 将相同菌株的分生孢子置于液体 YEPD 中培养 6 h, 观察其萌发以及芽管生长情况. 标尺= 10 μ m

Fig. 3 Defects of the *Fgbud32* mutant of *Fusarium graminearum* in conidium morphology and germination. A: Conidia harvested from PH-1, BM-18 and BC-2 were stained with CFW and observed by DIC and epifluorescence microscopy; B: Conidia of the same set of strains were incubated in liquid YEPD for 6 h and examined for germination and germ tube growth. Bar=10 μ m.

2.5 *FgBUD32* 基因是病原菌侵染寄主和 DON 毒素合成所必需的

用分生孢子接种扬花期小麦穗部, 14 d 后野生型菌株 PH-1 可以从接种点向上下两侧扩展造成明显的白穗症状, 而 *Fgbud32* 突变体仅能使接种点发病却无法扩展至邻近小穗(图 5A)。统计分析显示, 野生型菌株的病情指数为 7.75, 而 *Fgbud32* 突变体的病情指数仅为 0.44 (表 3)。另外, 我们也检测了 *Fgbud32* 突变体在小麦胚芽鞘上的致病力。接种胚芽鞘 7 d 后, 野生型菌株 PH-1 导致胚芽鞘产生明显的褐色坏死病斑, 病斑长度约为 15.95 mm, 而 *Fgbud32* 突变体只能造成接种点组织的轻微坏死(图 5B, 表 3)。互补

转化子在小麦穗部和胚芽鞘上的侵染能力均回复至野生型 PH-1 的水平(图 5A, 5B, 表 3)。另外, 本研究还检测了接种点小麦籽粒中 DON 毒素的含量。与野生型菌株相比, *Fgbud32* 突变体侵染的小麦籽粒中 DON 毒素的含量显著下降, 仅为野生型菌株的 1.1% (表 3)。以上结果表明, *FgBUD32* 基因的缺失导致禾谷镰刀菌致病力和 DON 毒素合成能力显著降低。

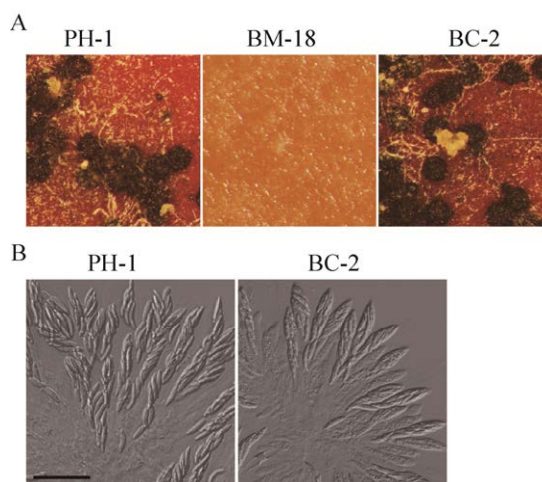


图4 *Fgbud32* 突变体的有性生殖缺陷 A: 野生型(PH-1)、*Fgbud32* 突变体(BM-18)以及互补菌株(BC-2)有性诱导 7 d 后的平板. *Fgbud32* 突变体不能产生子囊壳; B: 在有性诱导 7 d 后, PH-1 以及互补菌株 BC-2 的子囊和子囊孢子形态观察. 标尺= 50 μ m

Fig. 4 Defects of the *Fgbud32* mutant of *Fusarium graminearum* in sexual reproduction. A: Self-crossing plates of PH-1, BM-18 and BC-2 at 7 dpf (days post-fertilization). The *Fgbud32* mutant failed to produce perithecia; B: Asci and ascospores formed by PH-1 and complemented transformant BC-2 were examined at 7 dpf. Bar=50 μ m.

为了进一步探究 *Fgbud32* 突变体致病力丧失的原因, 我们在小麦穗接种 5 d 后剪取靠近接种点的小穗轴进行半薄切片和染色。在野生型菌株 PH-1 接种的小穗轴中, 有大量的侵染菌丝分布在小麦穗轴组织的胞间和胞内, 而在 *Fgbud32* 突变体接种的小穗轴的胞间和胞内均未发现侵

染菌丝的存在(图 5C)。因而, *Fgbud32* 突变体的侵染菌丝在植物体内无法扩展可能是致病力降低的主要原因。

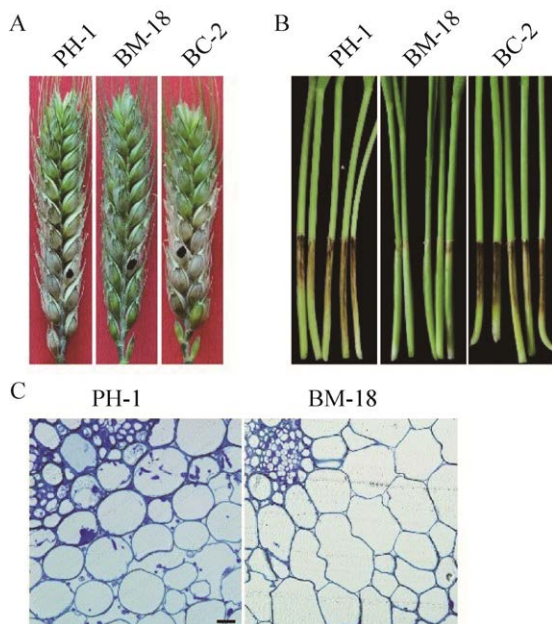


图 5 *Fgbud32* 突变体致病力分析 A: 用野生型 (PH-1)、*Fgbud32* 突变体 (BM-18) 以及互补菌株 (BC-2) 的分生孢子悬液接种小麦穗部, 黑色标记指示接种点; B: 用上述菌株的分生孢子对小麦胚芽鞘进行滴注接种, 侵染 7 d 后进行拍照; C: 侵染 5 d 后, 对接种点下方的小穗轴进行观察. 标尺=50 μ m. 在接种野生型 PH-1 的植物组织中有大量的侵染菌丝, 而在接种 *Fgbud32* 突变体 BM-18 的小穗轴组织中未发现侵染菌丝的存在

Fig. 5 The pathogenicity test of *Fgbud32* mutant of *Fusarium graminearum*. A: The conidia of PH-1, BM-18 and BC-2 were inoculated on wheat spikes, and the black marker indicates the inoculation point; B: Wheat coleoptiles were drop-inoculated with conidia from the indicated strains and examined at 7 dpi; C: The rachises directly beneath the inoculated spikelets were examined at 5 dpi. Bar=50 μ m. Invasive hyphae were abundant in plant tissues inoculated with the wild-type PH-1 but absent in samples inoculated with the *Fgbud32* mutant BM-18.

2.6 FgBud32 参与了氧化胁迫应答

为了明确 *FgBUD32* 基因是否参与氧化胁迫

应答, 本研究将野生型菌株、*Fgbud32* 突变体和互补转化子分别接种到含有 0.05% H_2O_2 的 PDA 平板上, 25 $^{\circ}C$ 培养 3 d 后测量菌落直径并拍照。结果显示, 野生型 PH-1 和互补转化子的生长抑制率分别为 46.8% 和 49.8%, 而 *Fgbud32* 在相同条件下却完全不能生长, 即生长抑制率为 100% (图 6)。以上结果表明, *FgBud32* 参与了禾谷镰刀菌对氧化胁迫的应答。

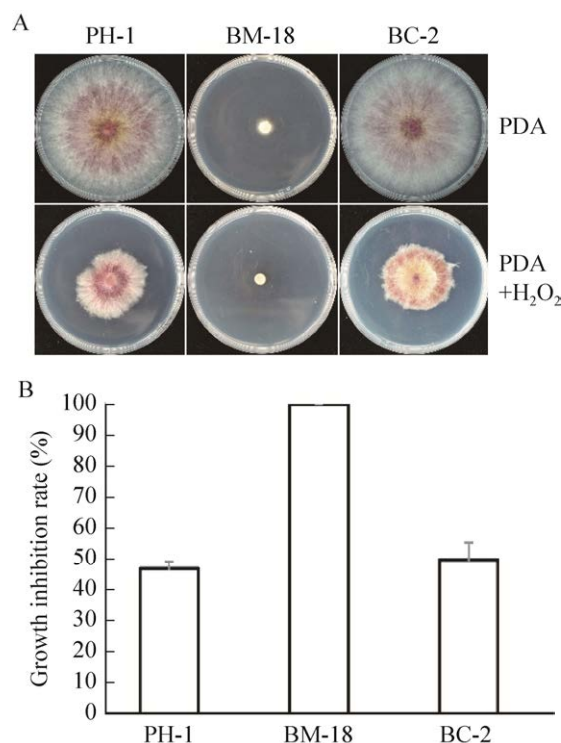


图 6 *Fgbud32* 突变体对氧化胁迫更加敏感 A: 野生型 (PH-1)、*Fgbud32* 突变体 (BM-18) 和互补菌株 (BC-2) 在未添加/添加 0.05% H_2O_2 的 PDA 培养基上的菌落形态, 25 $^{\circ}C$ 培养 3 d; B: 菌株在添加了 0.05% H_2O_2 的 PDA 培养基上的生长抑制率. 至少进行 3 次生物学重复

Fig. 6 The *Fgbud32* mutant of *Fusarium graminearum* is more sensitive to oxidative stress. A: The colony morphology of PH-1, BM-18 and BC-2 grown on regular PDA or PDA with 0.05% H_2O_2 at 25 $^{\circ}C$ for 3 days; B: The growth inhibition rate of the indicated strains on PDA supplemented with 0.05% H_2O_2 . The experiment was performed at least three biological repeats.

2.7 FgBud32 参与了禾谷镰刀菌的 DNA 损伤修复

为了探究 *FgBUD32* 基因在禾谷镰刀菌 DNA 损伤修复中的作用,本研究检测了 *FgBud32* 突变体在分别含有 5 mmol/L 羟基脲(HU)和 0.3% 甲磺甲酯(MMS)两种 DNA 损伤试剂的 CM 平板上的生长情况。结果显示,在 HU 胁迫条件下野生型菌株和互补转化子的生长抑制率分别为 16.7%和 18.1%,但是在相同条件下 *Fgbud32* 突变体的生长抑制率却高达 53.1% (图 7A, 7B)。在 MMS 胁迫条件下,野生型菌株和互补转化子的生长基本不受影响,而 *Fgbud32* 突变体的生长抑制率却高达 20% (图 7A, 7B)。另外,本研

究还检测了 HU 和 MMS 对 *Fgbud32* 突变体分生孢子萌发率的影响。在 YEPD 中摇培 6 h 后, PH-1、*Fgbud32* 突变体和互补菌株的孢子萌发率分别为 94.05%、63.41%和 92.09% (表 3),在加入 HU 或 MMS 的 YEPD 培养基中野生型菌株 PH-1 和互补菌株的萌发率变化不大,而 *Fgbud32* 突变体的孢子萌发率在 HU 和 MMS 胁迫条件下从 63.4%分别下降到 27.0%和 33.5% (图 7C)。综合以上结果, HU 和 MMS 两种 DNA 损伤胁迫对 *Fgbud32* 突变体的营养生长和孢子萌发的抑制作用均显著高于野生型和互补菌株。因而, *FgBud32* 可能参与了禾谷镰刀菌的 DNA 损伤修复。

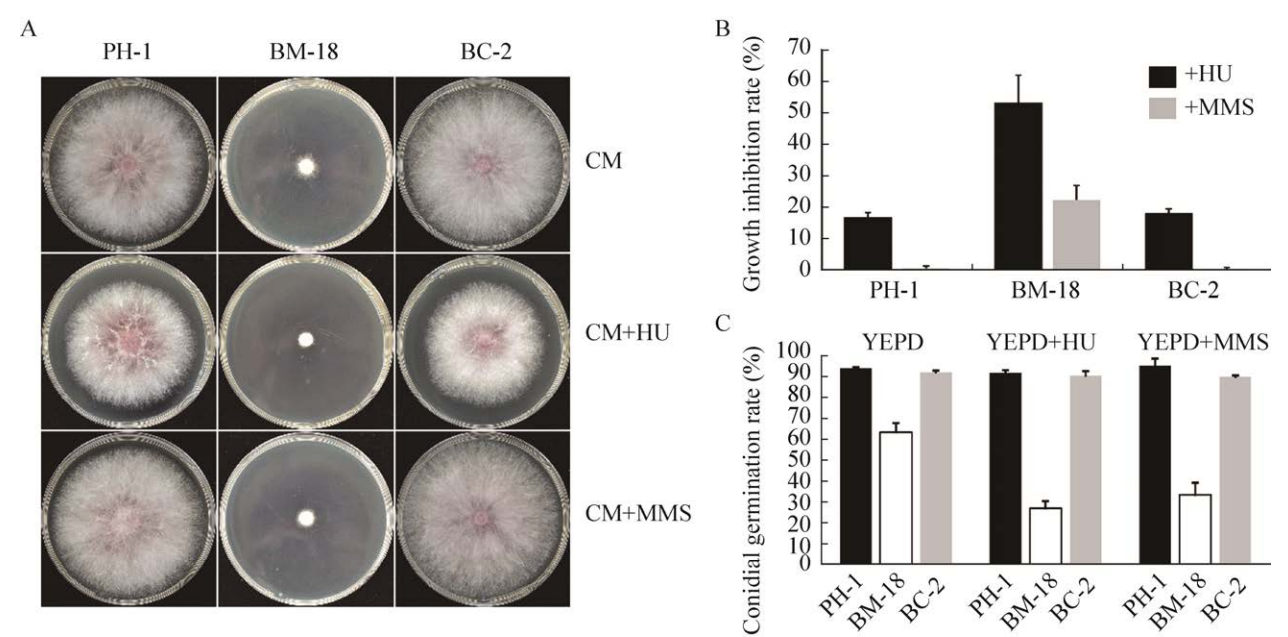


图 7 *Fgbud32* 突变体对 DNA 损伤试剂的敏感性 A: 野生型(PH-1)、*Fgbud32* 突变体(BM-18)和互补菌株(BC-2)在 CM 培养基以及分别添加 5 mmol/L HU 和 0.3% MMS 的 CM 培养基上的菌落形态, 25 °C 培养 3 d; B: 相同菌株在分别添加 5 mmol/L HU 和 0.3% MMS 的 CM 培养基上 25 °C 培养 3 d 后的生长抑制率; C: 将分生孢子置于 YEPD 液体培养基或分别添加 1 mmol/L HU 及 0.1% MMS 的 YEPD 中, 25 °C 培养 6 h, 在 DIC 显微镜下观察萌发率; 至少进行 3 次生物学重复

Fig. 7 Sensitivity of the *Fgbud32* mutant of *Fusarium graminearum* to DNA damage stresses. A: The colony morphology of PH-1, BM-18 and BC-2 grown on regular CM or CM supplemented with 5 mmol/L HU and 0.3% MMS at 25 °C for 3 days; B: The growth inhibition rates of the same set of strains on CM supplemented with 5 mmol/L HU and 0.3% MMS at 25 °C for 3 days; C: Conidia of the indicated strains were incubated in liquid YEPD or YEPD with 1 mmol/L HU and 0.1% MMS at 25 °C for 6 h and examined for conidial germination rates under DIC microscopy. All experiment were performed at least three biological repeats.

2.8 FgBud32 在细胞核和细胞质中均有定位

为了明确 FgBud32 的亚细胞定位, 本研究将构建的 Native-*FgBUD32*-GFP 载体(含有自身启动子)转入到野生型菌株 PH-1 中。然而, 遗憾的是在分生孢子和萌发 12 h 的菌丝中只能观察到微弱的 GFP 荧光信号, 推测其可能为自发荧光(图 8A, 8B)。因而我们又构建了含有强启动子 RP27 的荧光载体 RP27-*FgBUD32*-GFP, 并将其转入到野生型菌株 PH-1 中。在分生孢子中,

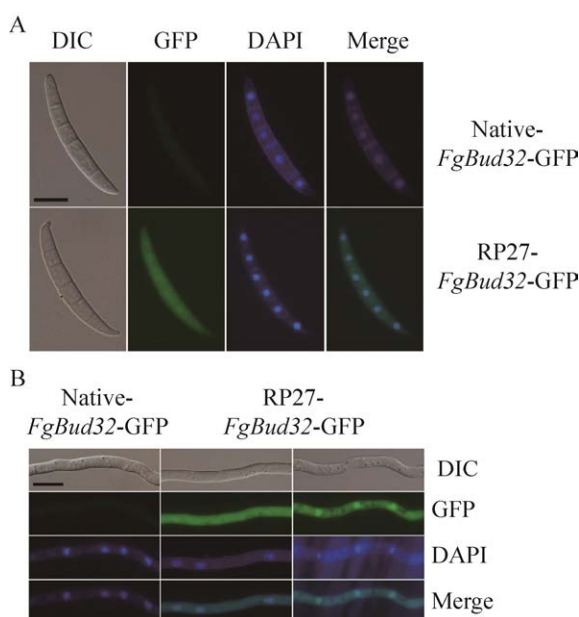


图 8 FgBud32-GFP 融合蛋白的亚细胞定位
A: 将表达 Native-*FgBUD32*-GFP 和 RP27-*FgBUD32*-GFP 的 PH-1 菌株的新鲜分生孢子用 DAPI 染色, 并通过 DIC 和荧光显微镜观察 FgBud32-GFP 融合蛋白的亚细胞定位; B: 用 DAPI 对相同菌株培养 12 h 后的菌丝进行染色, 并用 DIC 和荧光显微镜进行观察. 标尺=10 μm

Fig. 8 Subcellular localization of the FgBud32-GFP fusion protein. Fresh conidia of the PH-1 transformants expressing Native-*FgBUD32*-GFP and RP27-*FgBUD32*-GFP constructs were stained with DAPI and examined by DIC and epifluorescence microscopy for the subcellular localization of FgBud32-GFP fusion protein; B: The 12 hpi hyphae of the same set of transformants were stained with DAPI and examined by DIC and epifluorescence microscopy. Bar=10 μm.

FgBud32-GFP 的荧光信号在细胞质和细胞核中均有分布, 且无显著差异(图 8A)。在萌发 12 h 的菌丝中, FgBud32-GFP 的荧光信号在细胞质和细胞核中也均有定位, 但是在一部分菌丝中, 细胞质和细胞核中的荧光信号强度无显著差异, 而在另一部分菌丝中细胞核中的荧光信号强度显著高于细胞质中的荧光信号(图 8B)。以上结果表明, FgBud32 在细胞质和细胞核中均有定位, 但是在一定时期或条件下其会从细胞质向细胞核内聚集。

3 讨论

本研究通过蛋白多序列比对发现 Bud32 在真菌中较为保守, 暗示其在真菌中具有保守的功能。在植物病原真菌中, 本课题组前期在系统研究禾谷镰刀菌蛋白激酶组时对 FgBud32 蛋白激酶的功能开展了初步研究(Wang *et al.* 2011), 但仍缺乏深入系统的研究。

本研究发现 *Fgbud32* 突变体在营养生长方面存在严重的缺陷, 相似地, 在酿酒酵母和新型隐球菌中 *BUD32* 同源基因的缺失也会造成严重的生长缺陷(Facchin *et al.* 2003; Lee *et al.* 2016)。在构巢曲霉中 *BUD32* 同源基因 *PIPA* 为致死基因, 但该基因的沉默或者过表达都会显著减慢菌落的生长(Kempf *et al.* 2013)。因而 *BUD32* 同源基因在调控真菌生长方面, 可能具有十分保守的功能。在人体中, PRPK 可以通过磷酸化癌症抑制蛋白 p53 调控细胞的增殖(Abe *et al.* 2001), 然而在真菌中并未发现 p53 的同源基因, 因而在真菌中 Bud32 通过其他途径调控了细胞的生长, 例如通过 KEOPS 复合体介导的途径。在酿酒酵母中, 其他 KEOPS 复合体亚基的缺失均会严重影响细胞的生长(Downey *et al.* 2006)。另外, 在禾谷镰刀菌中 *FgBUD32* 基因的缺失还会导致菌丝的弯曲和分支减少, 在构巢曲霉中 *PIPA* 基因的沉默也会导致菌丝出现弯曲的现象(Kempf

et al. 2013), 因而 Bud32 同源蛋白参与了真菌细胞的极性生长。相似地, 在酿酒酵母中 *bud32* 突变体会发生随机出芽的现象, 这是因为细胞极性蛋白 Bud9 的亚细胞定位受到 KEOPS 复合体的调控(Kato *et al.* 2011)。

本研究结果显示, *FgBUD32* 基因不但参与禾谷镰刀菌分生孢子的产生和形态建成, 也参与了有性发育过程中子囊壳的形成。在构巢曲霉中, PipA 在菌丝、分生孢子梗和分生孢子的细胞核与细胞质中均有分布, 但其与 PtkA (Cdk9 同源蛋白) 的互作只发生在分生孢子梗和分生孢子中(Lee *et al.* 2016), 暗示其参与了分生孢子的产生与形态建成。有趣的是, *FgBud32-GFP* 在菌丝和分生孢子的细胞核与细胞质中也均有定位, 与构巢曲霉类似。在真核生物中 Cdk9 不参与细胞周期的调控, 而是通过磷酸化 RNA 聚合酶 II 大亚基的 CTD 结构域调控一系列基因的转录(Marshall *et al.* 1996)。鉴于禾谷镰刀菌与构巢曲霉中 Bud32 同源蛋白在进化上关系较近且二者具有相似的亚细胞定位, 我们推测二者可能通过相似的分子机制调控分生孢子的形成。在酿酒酵母和新型隐球菌中 Bud32 蛋白也均参与了有性生殖过程(Lee *et al.* 2016), 但具体的分子机制尚不清楚。

在禾谷镰刀菌中 *Fgbud32* 突变体的致病力基本丧失, 而在新型隐球菌中 *BUD32* 基因的缺失也会造成致病力的严重下降(Lee *et al.* 2016), 二者致病力的降低可部分归因于生长上的严重缺陷。另外, 在植物病原菌侵染植物过程中, 病原菌对寄主产生的活性氧的清除和耐受能力, 也是决定其能否成功定殖和扩展的关键因素(Gao *et al.* 2021)。在酿酒酵母中 Bud32 介导了 Grx4 的磷酸化, 而 Grx4 在抗活性氧胁迫方面具有重要作用(Pujol-Carrion & de la Torre-Ruiz 2010)。因此, *Fgbud32* 突变体对活性氧胁迫敏感性的增加, 可能是其不能在小麦穗轴和胚芽鞘组织中扩

展的重要原因。但 *FgBud32* 如何调控活性氧的胁迫应答以及该调控过程是否与 Grx4 有关, 仍需进一步地解析。此外, 考虑到 DON 毒素是禾谷镰刀菌侵染的关键毒力因子(Proctor *et al.* 1995; Jansen *et al.* 2005), 以及 DNA 损伤修复在稻瘟菌等病原真菌的侵染过程中也发挥着重要作用(Narukawa-Nara *et al.* 2015), 我们推测 *Fgbud32* 突变体中 DON 毒素合成能力的下降及其对 DNA 损伤胁迫的敏感性也可能是其致病力降低的重要原因。

Bud32 在调控基因转录方面具有重要功能, 但其具有依赖于 KEOPS 复合体以及不依赖于 KEOPS 复合体两种不同的分子机制(Daniel *et al.* 2008)。在禾谷镰刀菌中, *FgBud32* 对生长、分生孢子形成、有性发育、DON 毒素合成、植物侵染以及活性氧应答等的调控是否依赖于其基因转录调控功能, 以及该调控是否依赖于 KEOPS 复合体, 仍需要进一步的探究。此外, KEOPS 复合体依赖的端粒长度维持以及 tRNA 的 t^6A 修饰是否存在于禾谷镰刀菌中以及二者与 *Fgbud32* 突变体表型缺陷的关系, 也需要进一步地明确。本研究结果有望为其他植物病原真菌中 Bud32 蛋白激酶的研究提供一定的参考。

致谢: 感谢西北农林科技大学植物保护学院孙代轶博士在实验技术上的指导, 以及本科生任欢同学在实验上给予的协助。

[REFERENCES]

- Abe Y, Matsumoto S, Wei SM, Nezu K, Miyoshi A, Kito K, Ueda N, Shigemoto K, Hitsumoto Y, Nikawa JI, Enomoto Y, 2001. Cloning and characterization of a p53-related protein kinase expressed in interleukin-2-activated cytotoxic T-cells, epithelial tumor cell lines, and the testes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(47): 44003-44011
- Bluhm BH, Zhao X, Flaherty JE, Xu JR, Dunkle LD, 2007. RAS2 regulates growth and pathogenesis in *Fusarium graminearum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(6): 627-636

- Briza P, Bogengruber E, Thür A, Rützler M, Münsterkötter M, Dawes IW, Breitenbach M, 2002. Systematic analysis of sporulation phenotypes in 624 non-lethal homozygous deletion strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 19(5): 403-422
- Cohen P, 2000. The regulation of protein function by multisite phosphorylation – a 25 year update. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(12): 596-601
- Daniel YLM, Dante N, Michael D, Stephen O, Yosr ZH, Derek FC, Jenny SLH, Rachel KS, Wei Z, Cynthia SH, Leo W, Christophe F, Sigrun R, Igor K, Cheryl HA, Daniel D, Frank S, 2008. Atomic structure of the KEOPS complex: an ancient protein kinase-containing molecular machine. *Molecular Cell*, 32(2): 259-275
- Daugeron MC, Lenstra TL, Frizzarin M, El Yacoubi B, Liu XP, Baudin-Baillieu A, Lijnzaad P, Decourty L, Saveanu C, Jacquier A, Holstege FCP, de Crécy-Lagard V, van Tilbeurgh H, Libri D, 2011. Gcn4 misregulation reveals a direct role for the evolutionary conserved EKC/KEOPS in the t⁶A modification of tRNAs. *Nucleic Acids Research*, 39(14): 6148-6160
- Downey M, Houlsworth R, Maringe L, Rollie A, Brehme M, Galicia S, Guillard S, Partington M, Zubko MK, Krogan NJ, Emili A, Greenblatt JF, Harrington L, Lydall D, Durocher D, 2006. A genome-wide screen identifies the evolutionarily conserved KEOPS complex as a telomere regulator. *Cell*, 124(6): 1155-1168
- Dzikowska A, Grzelak A, Gawlik J, Szewczyk E, Mrozek P, Borsuk P, Koper M, Empel J, Szczesny P, Piłsyk S, Pękala M, Weglenski P, 2015. KAEA (SUDPRO), a member of the ubiquitous KEOPS/EKC protein complex, regulates the arginine catabolic pathway and the expression of several other genes in *Aspergillus nidulans*. *Gene*, 573(2): 310-320
- Facchin S, Lopreiato R, Ruzzene M, Marin O, Sartori G, Götz C, Montenarh M, Carignani G, Pinna LA, 2003. Functional homology between yeast piD261/Bud32 and human PRPK: both phosphorylate p53 and PRPK partially complements piD261/Bud32 deficiency. *FEBS Letters*, 549(1-3): 63-66
- Facchin S, Lopreiato R, Stocchetto S, Arrigoni G, Cesaro L, Marin O, Carignani G, Pinna LA, 2002. Structure–function analysis of yeast piD261/Bud32, an atypical protein kinase essential for normal cell life. *The Biochemical Journal*, 364(2): 457-463
- Gao M, He Y, Yin X, *et al.*, 2021. Ca²⁺ sensor-mediated ROS scavenging suppresses rice immunity and is exploited by a fungal effector. *Cell*, 184(21): 5391-5404
- Hanks SK, Hunter T, 1995. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *The FASEB Journal*, 9(8): 576-596
- He M, Liu J, Lu Y, Wu Z, Liu Y, Wu Z, Peng J, Zhou J, 2019. KEOPS complex promotes homologous recombination via DNA resection. *Nucleic Acids Research*, 47(11): 5684-5697
- Jansen C, von Wettstein D, Schäfer W, Kogel KH, Felk A, Maier FJ, 2005. Infection patterns in barley and wheat spikes inoculated with wild-type and trichodiene synthase gene disrupted *Fusarium graminearum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46): 16892-16897
- Kato Y, Kawasaki H, Ohyama Y, Morishita T, Iwasaki H, Kokubo T, Hirano H, 2011. Cell polarity in *Saccharomyces cerevisiae* depends on proper localization of the Bud9 landmark protein by the EKC/KEOPS complex. *Genetics*, 188(4): 871-882
- Kempf C, Bathe F, Fischer R, 2013. Evidence that two Pcl-like cyclins control Cdk9 activity during cell differentiation in *Aspergillus nidulans* asexual development. *Eukaryotic Cell*, 12(1): 23-36
- Kisseleva-Romanova E, Lopreiato R, Baudin-Baillieu A, Rousselle JC, Ilan L, Hofmann K, Namane A, Mann C, Libri D, 2006. Yeast homolog of a cancer-testis antigen defines a new transcription complex. *The EMBO Journal*, 25(15): 3576-3585
- Lauhon CT, 2012. Mechanism of N6-threonylcarbamoyladenonsine (t⁶A) biosynthesis: isolation and characterization of the intermediate threonylcarbamoyl-AMP. *Biochemistry*, 51(44): 8950-8963
- Lee K, So Y, Yang D, *et al.*, 2016. Systematic functional analysis of kinases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Nature Communications*, 7(1): 12766
- Liu YY, He MH, Liu JC, Lu YS, Peng J, Zhou JQ, 2018. Yeast KEOPS complex regulates telomere length independently of its t⁶A modification function. *Journal of Genetics and Genomics*, 45(5): 247-257
- Lopreiato R, Facchin S, Sartori G, Arrigoni G, Casonato S, Ruzzene M, Pinna LA, Carignani G, 2004. Analysis of the interaction between piD261/Bud32, an evolutionarily conserved protein kinase of *Saccharomyces cerevisiae*, and the Grx4 glutaredoxin. *The Biochemical Journal*, 377(2): 395-405
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S, 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600): 1912-1934
- Marshall NF, Peng JM, Xie Z, Price DH, 1996. Control of RNA polymerase II elongation potential by a novel carboxyl-terminal domain kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(43): 27176-27183

- Miranda-Saavedra D, Barton GJ, 2007. Classification and functional annotation of eukaryotic protein kinases. *Proteins: Structure Function and Bioinformatics*, 68(4): 893-914
- Motaung TE, Saitoh H, Tsilo TJ, 2017. Large-scale molecular genetic analysis in plant-pathogenic fungi: a decade of genome-wide functional analysis. *Molecular Plant Pathology*, 18(5): 754-764
- Narukawa-Nara M, Sasaki KH, Ishii A, Baba K, Amano K, Kuroki M, Saitoh K, Kamakura T, 2015. Identification and characterization of a novel gene encoding the NBS₁ protein in *Pyricularia oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 79(7): 1183-1190
- Peggion C, Lopreiato R, Casanova E, Ruzzene M, Facchin S, Pinna LA, Carignani G, Sartori G, 2008. Phosphorylation of the *Saccharomyces cerevisiae* Grx4p glutaredoxin by the Bud32p kinase unveils a novel signaling pathway involving Sch9p, a yeast member of the Akt/PKB subfamily. *The FEBS Journal*, 275(23): 5919-5933
- Perrochia L, Guetta D, Hecker A, Forterre P, Basta T, 2013. Functional assignment of KEOPS/EKC complex subunits in the biosynthesis of the universal t⁶A tRNA modification. *Nucleic Acids Research*, 41(20): 9484-9499
- Proctor RH, Hohn TM, McCormick SP, 1995. Reduced virulence of *Gibberella zeae* caused by disruption of a trichothecene toxin biosynthetic gene. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8(4): 593-601
- Pujol-Carrion N, de la Torre-Ruiz MA, 2010. Glutaredoxins Grx4 and Grx3 of *Saccharomyces cerevisiae* play a role in actin dynamics through their Trx domains, which contributes to oxidative stress resistance. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(23): 7826-7835
- Shay B, Candice C, Teresa K, Kathryn AO, Jef DB, Philip H, 2008. Toward a comprehensive temperature-sensitive mutant repository of the essential genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cell*, 30(2): 248-258
- Wang C, Zhang S, Hou R, Zhao Z, Zheng Q, Xu Q, Zheng D, Wang G, Liu H, Gao X, Ma JW, Kistler HC, Kang Z, Xu JR, 2011. Functional analysis of the kinome of the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathogens*, 7(12): e1002460