

棕榈酰转移酶 StPFA5 参与调控玉米大斑病菌生长发育及致病力

袁伟, 张图, 董广恩, 石金卓, 李海笑, 曹志艳[✉], 刘宁[✉], 董金皋

河北农业大学植物保护学院/河北省植物生理与分子病理学重点实验室, 河北保定 071000

摘要:【目的】棕榈酰化修饰是一种动态可逆的蛋白质翻译后修饰, 在信号转导、代谢稳态、蛋白定位与运输等生物过程中发挥着关键的调控作用, 但在玉米大斑病菌 (*Setosphaeria turcica*) 中的功能及其对病菌致病力的影响尚不清楚。研究棕榈酰转移酶 StPFA5 在玉米大斑病菌生长发育及致病力调控中的作用, 为阐明棕榈酰化修饰介导的玉米大斑病菌生长发育与致病过程的分子机制打下基础。【方法】利用同源比对鉴定 StPFA5 并构建进化树, 通过 RT-qPCR 测定 *StPFA5* 在病菌侵染过程中的表达水平。通过同源重组技术创制 *StPFA5* 的敲除突变体及回补菌株, 针对菌株 WT、 $\Delta StPFA5$ 、C. $\Delta StPFA5$, 测定生长速率及致病力, 观察菌丝形态和菌丝萌发过程, 并通过酸沉碱溶提取菌丝黑色素, RT-qPCR 测定黑色素合成相关基因表达水平。此外, 将各菌株接种在含刚果红和 CFW 的 PDA 平板上, 测定 *StPFA5* 对病菌细胞壁稳定性的影响。通过蛋白组学和棕榈酰化修饰蛋白组学研究, 结合数据库检索, 鉴定 WT 和 $\Delta StPFA5$ 中的差异棕榈酰化修饰位点及所属蛋白, 进行功能分析。【结果】StPFA5 与异旋孢腔菌 (*Cochliobolus heterostrophus*) PFA5 同源性最高, 达 80.35%。与野生型相比, $\Delta StPFA5$ 的菌落生长速率降低、菌丝形态畸形、致病力显著下降, 基因回补后恢复到野生型水平。同时, $\Delta StPFA5$ 的菌丝黑色素含量降低, 黑色素合成相关基因表达显著下调, 细胞壁胁迫敏感性降低。棕榈酰化修饰组学分析发现, 敲除 *StPFA5* 导致 448 个棕榈酰化位点的修饰水平下调, 下调位点所属蛋白富集在氨基酸合成代谢、碳代谢、糖酵解、细胞周期、染色体浓缩等通路。综合 $\Delta StPFA5$ 表型结果发现, *StPFA5* 可能通过调控这些途径相关蛋白的棕榈酰化水平影响玉米大斑病菌生长发育及致病力。【结论】棕榈酰转移酶 StPFA5 通过调控蛋白质的棕榈酰化修饰水平, 促进玉米大斑病菌的生长发育和黑色素合成, 并对该病菌的致病力发挥正向调控作用。

关键词: 玉米大斑病菌; 棕榈酰化修饰; 棕榈酰转移酶; StPFA5; 黑色素; 致病力

Palmitoyl Transferase StPFA5 Regulates the Growth, Development and Pathogenicity of *Setosphaeria turcica*

YUAN Wei, ZHANG Tu, DONG GuangEn, SHI JinZhuo, LI HaiXiao, CAO ZhiYan[✉], LIU Ning[✉], DONG JinGao

College of Plant Protection, Hebei Agricultural University/Hebei Key Laboratory of Plant Physiology and Molecular Pathology, Baoding 071000, Hebei

Abstract:【Objective】S-palmitoylation is a dynamically reversible post-translational protein modification that exerts a key regulatory role in biological processes such as signal transduction, metabolic homeostasis, and protein localization and transport in organisms. However, its function in *Setosphaeria turcica* and its impact on the pathogenicity of this fungus remain unclear. This study aimed to investigate the role of the palmitoyl transferase StPFA5 in regulating the growth, development and pathogenicity of *S. turcica*, and to lay a foundation for elucidating the molecular mechanisms underlying *S. turcica* growth and pathogenic processes mediated by S-palmitoylation.【Method】StPFA5 was identified via homologous alignment and a phylogenetic tree was constructed. RT-qPCR was performed to determine the expression level of *StPFA5* during the fungal infection process. The knockout mutant and

收稿日期: 2026-03-16; 接受日期: 2026-04-16

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFD1401500)、河北省自然科学基金 (C2024204044, C2025204211)、国家玉米产业技术体系 (CARS-02-30)

联系方式: 袁伟, E-mail: 19503278706@163.com. 通信作者刘宁, E-mail: lning121@126.com. 通信作者曹志艳, E-mail: caoyan208@126.com

complementation strain of *StPFA5* were generated using homologous recombination technology. For the WT, Δ *StPFA5* and C. Δ *StPFA5* strains, the growth rate and pathogenicity were determined, and hyphal morphology and hyphal germination were observed. Mycelial melanin was extracted by acid precipitation and alkaline dissolution, and the expression levels of melanin synthesis-related genes were detected by RT-qPCR. In addition, all strains were inoculated on PDA plates containing Congo red and CFW to assess the effect of *StPFA5* on the cell wall integrity of *S. turcica*. Furthermore, proteomic and S-palmitoylomic analyses combined with database retrieval were conducted to identify differentially modified S-palmitoylation sites and their corresponding proteins in the WT and Δ *StPFA5* strains, followed by functional annotation of these proteins. 【Result】 *StPFA5* shared the highest homology (80.35%) with PFA5 from *Cochliobolus heterostrophus*. Compared with the WT strain, Δ *StPFA5* exhibited reduced colony growth rate, abnormal hyphal morphology and significantly decreased pathogenicity, and these phenotypic defects were restored to the WT level in the C. Δ *StPFA5* strain. Meanwhile, the melanin content in the mycelia of Δ *StPFA5* was decreased, the expression of melanin synthesis-related genes was significantly down-regulated, and the sensitivity of Δ *StPFA5* to cell wall stress was reduced. S-palmitoylomic analysis revealed that knockout of *StPFA5* led to the downregulation of modification levels at 448 S-palmitoylation sites, and the proteins containing these downregulated sites were significantly enriched in biological pathways including amino acid anabolism, carbon metabolism, glycolysis, cell cycle and chromosome condensation. Combined with the phenotypic characteristics of Δ *StPFA5*, *StPFA5* may affect the growth, development and pathogenicity of *S. turcica* by regulating the S-palmitoylation levels of proteins associated with these pathways. 【Conclusion】 The palmitoyl transferase *StPFA5* promotes the growth, development and melanin synthesis of *S. turcica* by regulating the S-palmitoylation modification levels of target proteins, and exerts a positive regulatory effect on the pathogenicity of this fungus.

Key words: *Setosphaeria turcica*; S-palmitoylation; palmitoyl transferase; *StPFA5*; melanin; pathogenicity

0 引言

【研究意义】玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)侵染导致的玉米大斑病是一种叶部病害,严重影响玉米产量和品质^[1]。棕榈酰化修饰是一种可逆的脂质翻译后修饰,动态可逆地调节蛋白质功能,在植物病原真菌致病过程中发挥重要作用^[2]。研究玉米大斑病菌中棕榈酰化修饰相关基因的功能及其对致病的调控机制,对植物病原真菌致病机理的理解具有重要意义,并可为玉米大斑病的防治提供新思路。【前人研究进展】玉米大斑病菌主要通过孢子萌发形成附着胞实现侵染^[3]。孢子接触玉米叶片后,在适宜条件下萌发形成极性生长的芽管,芽管感知寄主信号后顶端膨大,形成具有侵染能力的附着胞^[4-5]。附着胞中黑色素的积累是病菌成功侵染的关键。黑色素沉积于胞壁可使附着胞形成高膨压并产生侵染钉,侵染钉通过机械力穿透叶片表皮,促进病菌定殖并引发病害^[6-7]。蛋白质翻译后修饰是细胞调控生命活动的重要分子基础,包括磷酸化、泛素化、糖基化及脂质化等形式^[8-9]。棕榈酰化修饰是一类以棕榈酸为修饰分子的蛋白质翻译后修饰方式,依据连接方式可分为 N-酰化、O-酰化和 S-棕榈酰化 3 类^[10-11]。目前研究报道中所指的棕榈酰化修饰多为 S-棕榈酰化^[12]。棕榈酰化修饰是动物中普遍存在的脂质修饰方式,目前已有上千种哺乳动物蛋白被证实存在棕榈酰化修饰,其参与调控先天免疫、炎

症反应、葡萄糖和脂肪代谢等生理过程,并与多种疾病的发生发展密切相关^[13-14]。在植物中,棕榈酰化修饰同样发挥重要调控作用。研究发现,拟南芥不同组织中 1 094 种蛋白的 1 849 个半胱氨酸残基存在棕榈酰化修饰,这些蛋白参与物质运输、信号转导、代谢调控等细胞生理过程^[15-16]。此外,棕榈酰化修饰在真菌生长繁殖、环境适应及致病过程中的生物学功能也逐步被揭示。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中 Tlg1 的棕榈酰化保证膜转运功能正常^[17-18]。尖孢镰孢西瓜专化型(*Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*)中,棕榈酰化修饰是病菌发挥毒力的必要条件^[19]。棕榈酰化修饰可调控蛋白质的亚细胞定位、分子稳定性、生物学活性及蛋白间的相互作用^[20-21]。该修饰由棕榈酰转移酶(palmitoyl acyltransferase, PAT)和酰基蛋白硫酯酶(acyl-protein thioesterase, APT)/棕榈酰蛋白硫酯酶(palmitoyl-protein thioesterase, PPT)协同调控^[22-23]。其中,棕榈酰转移酶是一类催化蛋白质棕榈酰化修饰的关键酶,其核心特征为保守的 DHHC 结构域^[24-25]。酵母棕榈酰转移酶 Swf1 修饰单跨膜蛋白 SNARE 近膜区半胱氨酸,Swf1 缺失导致内体-高尔基体循环与囊泡运输紊乱,肌动蛋白组装、极性生长异常,此外,Swf1 参与孢子壁组装,缺失影响产孢效率^[26-27]。【本研究切入点】棕榈酰转移酶是真菌致病机制中棕榈酰化调控的关键因子,明确其调控网络对解析病菌致病机制具有重要指导意义。在尖孢镰孢

西瓜专化型中，不同棕榈酰转移酶基因缺失后，菌株在菌丝生长、分生孢子产生、细胞壁完整性维持、渗透胁迫耐受及致病力方面出现不同程度缺陷^[19]；UvPfa4 是稻曲病菌（*Ustilaginoidea virens*）中关键的 S-棕榈酰转移酶，通过棕榈酰化修饰 MAPK 通路核心激酶 UvSlt2，调控稻曲病菌致病力、信号转导与自噬，是真菌致病机制中棕榈酰化调控的重要靶点^[28]。然而，相较于动植物，棕榈酰化修饰在植物病原菌中的功能及调控网络尚未明确。【拟解决的关键问题】通过研究 *StPFA5* 对玉米大斑病菌生长发育、黑色素合成和致病力的影响，并利用棕榈酰化修饰蛋白组学分析其主要修饰蛋白的分子功能和代谢途径，明确棕榈酰化在生长发育及侵染过程中的作用，为探讨病害防治的新方法提供支持。

1 材料与方法

试验于 2024 年 3 月至 2026 年 2 月在河北农业大学植物保护学院/河北省植物生理与分子病理学重点实验室完成。

1.1 菌株及培养条件

以玉米大斑病菌 01-23 为野生型（WT）菌株，获得缺失突变体 $\Delta StPFA5$ 和 $C.\Delta StPFA5$ 菌株，在 25℃ 的 PDA 培养基上进行黑暗培养。

1.2 玉米大斑病菌 PFA5 蛋白的鉴定和序列分析

从 NCBI（<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>）检索并下载稻瘟病菌（*Magnaporthe oryzae*）、禾谷镰孢（*Fusarium graminearum*）、稻曲病菌、番茄匍柄霉（*Stemphylium lycopersici*）、异旋孢腔菌（*Cochliobolus heterostrophus*）、烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）、交链格孢（*Alternaria alternata*）和酿酒酵母的 PFA5 氨基酸序列，并进行多序列比对；比对使用 Clustal Omega 网站（<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>）与 jalview 软件；采用 MEGA 11 软件构建系统发育树^[29]；通过 NCBI 网站获得 StPFA5 蛋白序列，并通过 SMART 网站（<https://smart.embl-heidelberg.de/>）对其编码的氨基酸序列及结构域进行分析。

1.3 基因相对表达水平分析

将浓度为 1×10^4 /mL WT 的孢子悬浮液接种到玉米自交系 B73 的叶片上。分别收集接种病菌 2、4、6、8 d 的 B73 叶片的病健交界处进行 RNA 提取，之后用 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Kit（TransGen Biotech，北京）进行反转录。反转录完成后，采用 cDNA 2 μL、引物各 0.2 μL、荧光定量 Mix 5 μL、H₂O 2.8 μL 的体系进行 RT-qPCR 反应，所用内参为 β -tubulin（表 1），公式为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ，检测 *StPFA5* 在侵染期的表达水平。每组试验重复 3 次。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物名称 Primer name	引物序列 Sequence of primers (5'-3')	用途 Usage
β -tubulin-F	GTGCGCAAGGAGGCTGAGGG	检测 β -tubulin 表达量
β -tubulin-R	CATGAAGAAATGGAGACGGGGGAA	Detect the expression level of β -tubulin
StPFA5-F	GCATCATAGCCGAGTCGACA	检测 <i>StPFA5</i> 表达量
StPFA5-R	TCCTTCGACCGAGGTGTAGT	Detect the expression level of <i>StPFA5</i>
StPFA5-Up-F	CTGCGCATTTGCTCTACT	扩增 <i>StPFA5</i> 上游片段
StPFA5-Up-R	RATGCTCCTTCAATATCATCTTCTGGGGGTCATTGGACGGATGT	Amplify the upstream fragment of <i>StPFA5</i>
StPFA5-HPH-F	ACATCCGTCCAAATGACCCCCAGAAGATGATATTGAAGGAGCAT	扩增 HPH 片段
StPFA5-HPH-R	ACGCCGAACACAGAGCAATAAAAGAAGGATTACCTCTAAACAAG	Amplify the fragment of HPH
StPFA5-Down-F	CTTGTTTAGAGGTAATCCTTCTTTATTGCTCTGTGTTCCGGCGT	扩增 <i>StPFA5</i> 下游片段
StPFA5-Down-R	AACCGACAACCAACCGACC	Amplify the downstream fragment of <i>StPFA5</i>
G418-F	TAAAATCGACAAGCCCGGCG	回复转化子抗性验证
G418-R	CAGCCCGATTTCATTCTC	Resistance verification of complementation transformants
StMR1-F	ACAGCCCCAGTTCATGAT	检测 <i>StMR1</i> 表达量
StMR1-R	TCTACTCGGGGTGTGTGTGTGC	Detect the expression level of <i>StMR1</i>
StPKS18-F	GCGTGAGATCAATGCTGCTG	检测 <i>StPKS18</i> 表达量
StPKS18-R	TCGTTGTCGTACGTCTTGCA	Detect the expression level of <i>StPKS18</i>
StMVP1-F	GGCCTTACCGAATCACCCA	检测 <i>StMVP1</i> 表达量
StMVP1-R	CGGGCTTGTGTGTGGGATTATTG	Detect the expression level of <i>StMVP1</i>
StSCD3-F	TGTCACAGAGAATGGCTCGGTC	检测 <i>StSCD3</i> 表达量
StSCD3-R	TCCATCGTCTCTCCTCTCCAA	Detect the expression level of <i>StSCD3</i>
St3HNR-F	AAGCTCATGGACGACGTTGT	检测 <i>St3HNR</i> 表达量
St3HNR-R	ATGCCATGCACCTGGTAAA	Detect the expression level of <i>St3HNR</i>

将菌株 WT、 $\Delta StPFA5$ 接种于 PD 液体培养基, 25 °C 黑暗培养 7 d。收集菌丝提取 RNA, 之后用 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Kit (TransGen Biotech, 北京) 进行反转录。反转录完成后, 采用 cDNA 2 μ L、引物各 0.2 μ L、荧光定量 Mix 5 μ L、H₂O 2.8 μ L 的体系进行 RT-qPCR 反应, 所用内参为 β -tubulin, 公式为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 检测 WT、 $\Delta StPFA5$ 中黑色素合成相关基因 *StMR1*、*StPKS18*、*St3HNR*、*StSCD3*、*StMVP1* (表 1) 的表达水平。每组试验重复 3 次。

1.4 *StPFA5* 敲除突变体及回补菌株创制

分别扩增 *StPFA5* 的上下游同源臂和带有部分同源臂的潮霉素片段。将 *StPFA5* 的上游和下游与潮霉素片段连接, 构建 *StPFA5* 基因敲除融合片段, 通过 PEG 介导法转化 WT 菌株的原生质体, 获得基因敲除突变体。用潮霉素抗性筛选基因敲除突变体, 并通过 PCR 进行验证。

为了进行互补菌株创制, 以 WT 株的 DNA 为模板, 扩增 *StPFA5* 的全长。用 T4 连接酶将 *StPFA5* 片段连接至 pHZ100 载体, 构建 pHZ100-*StPFA5* 载体。然后, PEG 介导法将其转化到 $\Delta StPFA5$ 菌株的原生质体中, 并进行 PCR 验证。

1.5 表型及生长速率测定

将 WT、 $\Delta StPFA5$ 、 $C.\Delta StPFA5$ 菌盘分别置于 PDA 培养基上 25 °C 黑暗培养 7 d, 测量菌落生长直径, 观察菌落形态, 每菌株进行 3 次重复。

1.6 菌丝形态观察及附着胞形成测定

将 WT、 $\Delta StPFA5$ 、 $C.\Delta StPFA5$ 菌株在 PDA 上培养 7 d, 制备菌丝体悬浮液。取 20 μ L 菌丝悬浮液接种于水琼脂平板培养膜, 在 25 °C 黑暗培养。取 100 个菌丝体, 在 0、12、24、48 h 用光学显微镜观察菌丝体附着胞的形成, 每组试验重复 3 次。

1.7 黑色素含量检测

将 WT、 $\Delta StPFA5$ 、 $C.\Delta StPFA5$ 的菌丝体培养 7 d 后, 通过酸沉碱溶的方法进行黑色素提取^[30]。用 450 nm 处的吸光度进行定量分析, 研究 *StPFA5* 对黑色素合成的影响, 每组试验重复 3 次。

1.8 致病力分析

将 WT、 $\Delta StPFA5$ 、 $C.\Delta StPFA5$ 分别接种于 PDA 培养基上进行致病力测定, 培养 7 d 后刮下菌丝体, 用组织研磨仪研磨, 制成浓度一致的菌丝体悬浮液, 取 10 μ L 菌丝悬浮液接种于玉米 B73 叶片上, 25 °C 培养 7 d, 每组试验重复 3 次。

1.9 细胞壁敏感性测定

将 WT、 $\Delta StPFA5$ 、 $C.\Delta StPFA5$ 接种在含有 100 μ g·mL⁻¹ 刚果红(CR)和 15 μ g·mL⁻¹ 植物细胞壁钙荧光白(CFW)的 PDA 培养基中, 25 °C 黑暗培养 7 d, 用交叉法测定菌落直径, 计算抑制率, 每组试验重复 3 次。

1.10 蛋白组学分析

收集 WT、 $\Delta StPFA5$ 菌丝液氮研磨, 加入 SDT 蛋白裂解液, 沸水浴 3 min, 超声破碎后离心取上清, BCA 法进行蛋白定量。每组样品各取 20 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。每个样品取等量蛋白进行 FASP 酶解 (filter aided sample preparation)。酶解后的肽段使用 C18 固相萃取小柱脱盐, 脱盐后的肽段干燥后用 0.1% 甲酸复溶。每个样品取适量肽段, 使用 Vanquish Neo UHPLC system (Thermo Scientific) 进行色谱分离。样品进样到 Trap Column (PepMap Neo 5 μ m C18 300 μ m×5 mm, Thermo Scientific) 后经过色谱分析柱 (μ PAC Neo High Throughput column, Thermo Scientific) 进行梯度分离。肽段分离后用 Orbitrap Astral Zoom 质谱仪 (Thermo Scientific) 进行 DIA (数据非依赖采集) 质谱分析。

1.11 棕榈酰化修饰蛋白组学分析

收集 WT、 $\Delta StPFA5$ 菌丝进行液氮研磨, 加入裂解缓冲液, 冰浴超声破碎后离心取上清, BCA 法进行蛋白定量。每种样品各取 20 μ g 蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳。每种样品取等量蛋白加入 N-乙基马来酰亚胺 (NEM) (总浓度 0.1 mol·L⁻¹) 4 °C 孵育过夜。三氯乙酸-丙酮沉淀法去除多余的 NEM, 并将蛋白质沉淀物重新溶解在 PBS 中。然后将溶于 DMSO 的生物素-HPDP 加入样品中, 25 °C 下孵育 1.5 h。用 5K 超滤管将每份样品的蛋白质浓缩至 150 μ L, 用 6 倍冷丙酮沉淀过夜。加入适量的胰蛋白酶, 在 37 °C 下进行酶解过夜。之后将多肽溶解在 200 μ L 上样/洗涤缓冲液 (0.2% 十二烷基硫酸钠、0.2% Triton X-100 和 500 mmol·L⁻¹ NaCl) 中, 并加入 100 μ L 链霉亲和素磁珠, 黑暗中翻转反应 2 h, 洗去非特异性吸附的蛋白质。用 0.5 mmol·L⁻¹ Tris (2-carboxyethyl) phosphine (TCEP) 对 S-棕榈酰化肽段进行洗脱, 然后用 C18 固相萃取小柱进行脱盐处理, 最后用 0.1% 甲酸溶解。使用 Vanquish Neo UHPLC 色谱系统联合 Orbitrap Astral Zoom 质谱进行肽段分离及检测分析。将肽段进样到 Trap Column (PepMap Neo 5 μ m C18 300 μ m×5 mm, Thermo Scientific) 后经过色谱分析柱 (μ PAC Neo High Throughput column, Thermo Scientific) 进行梯度分离。

采用 EASY-Spray 源进行 DIA (数据非依赖采集) 质谱分析。

1.12 棕榈酰化修饰蛋白组学数据处理

为了消除蛋白质丰度对棕榈酰化修饰位点表达水平的潜在干扰, 对蛋白组学和棕榈酰化修饰组学原始数据进行标准化预处理。首先, 对两组数据分别执行质量控制与归一化: 剔除在任意试验组中检测阳性率低于 50% 的蛋白或修饰位点; 采用中位数归一化法校正样本间的系统性偏差: 计算每个样本的中位数, 确定所有样本中位数的全局中位数, 将其作为基准计算各样本的归一化因子, 并对原始信号进行校正。对于归一化后数据中的缺失值, 采用数据集内非零最小值的一半进行填充。随后, 进行去本底化处理, 将归一化后的修饰位点信号强度除以其对应蛋白的信号强度, 获得消除蛋白表达背景影响的归一化修饰水平, 用于后续的差异分析。

1.13 生物信息学分析

LC-MS/MS 数据采用 Spectronaut 软件进行 DIA 的蛋白质鉴定与定量分析。数据库搜索以 UniProt_*Setosphaeria turcica* 蛋白质数据库 (<https://www.uniprot.org/proteomes/UP000016935>) 为检索基础, 采用 Target-Reverse 数据库模式进行假阳性率控制。通过 Motif-X 软件 (5.0.2 版本) 鉴定并绘制显著基序的序列标识图; 利用 DAVID 数据库和 STRING

软件 (10.5 版本) 开展 Gene Ontology (GO) 功能注释; 依据 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) 数据库对代谢通路进行层级分类; 采用 WoLF PSORT 软件 (0.2 版本, <https://wolfpsort.hgc.jp>) 预测蛋白质的亚细胞定位。

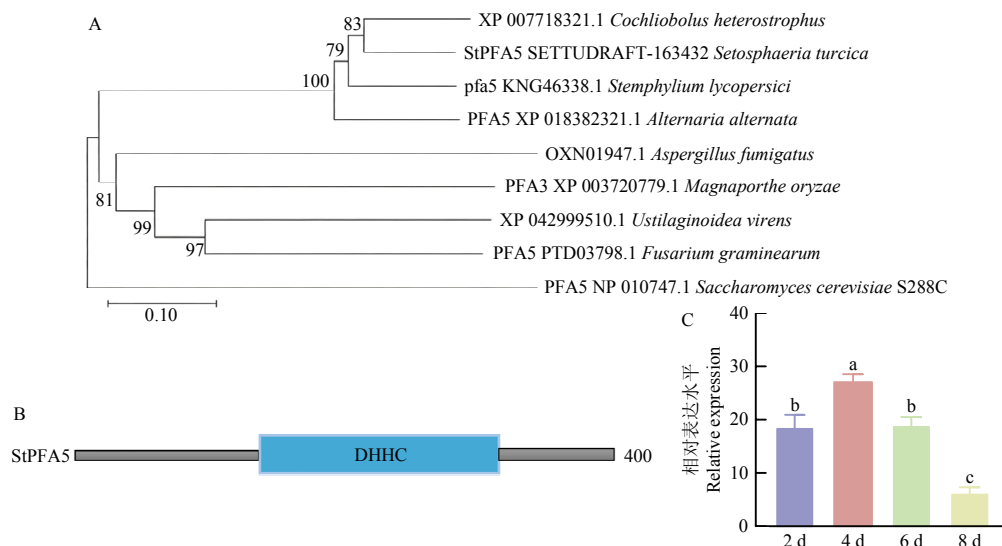
1.14 数据处理与分析

试验原始数据采用 Excel 2021 完成初步整理, 使用 GraphPad Prism 9 软件开展统计分析与可视化。仅两组处理间指标比较采用独立样本 *t* 检验; 3 组及以上多处理组整体差异采用单因素方差分析 (one-way ANOVA), 组间两两多重比较采用 Tukey HSD 法。所有定量数据以均值±标准误表示, 每组生物学重复 $n \geq 3$ 。以 $P < 0.05$ 作为差异具有统计学意义的判定标准, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 StPFA5 系统发育分析及其在侵染过程中的表达

对来自稻瘟病菌、禾谷镰孢、稻曲病菌、番茄匍柄霉、异旋孢腔菌、烟曲霉、交链格孢和酿酒酵母 PFA5 蛋白的氨基酸序列进行分析, 并进一步构建系统发育树。结果显示, StPFA5 (SETUDRAFT_163432) 与异旋孢腔菌、番茄匍柄霉、链格孢中的直系同源物形成一个分支, 而禾谷镰孢、稻瘟病菌、烟曲霉、稻曲病菌中的 PFA5 蛋白聚集在单独的分支中 (图 1-A),



A: PFA5 同源蛋白系统发育树 The phylogenetic tree of PFA5 homologous proteins; B: StPFA5 结构示意图 Schematic representation of the StPFA5 domain structure; C: 玉米大斑病菌侵染过程中 *StPFA5* 的表达量, 柱上不同字母表示均值差异显著 ($P < 0.05$) The gene relative expression of *StPFA5* during the infection process of *S. turcica*, different letters on the bars indicate significant differences in the mean values ($P < 0.05$)

图 1 *StPFA5* 系统发育分析及其在侵染过程中的表达水平

Fig. 1 Phylogenetic analysis of *StPFA5* and its relative expression during the infection process

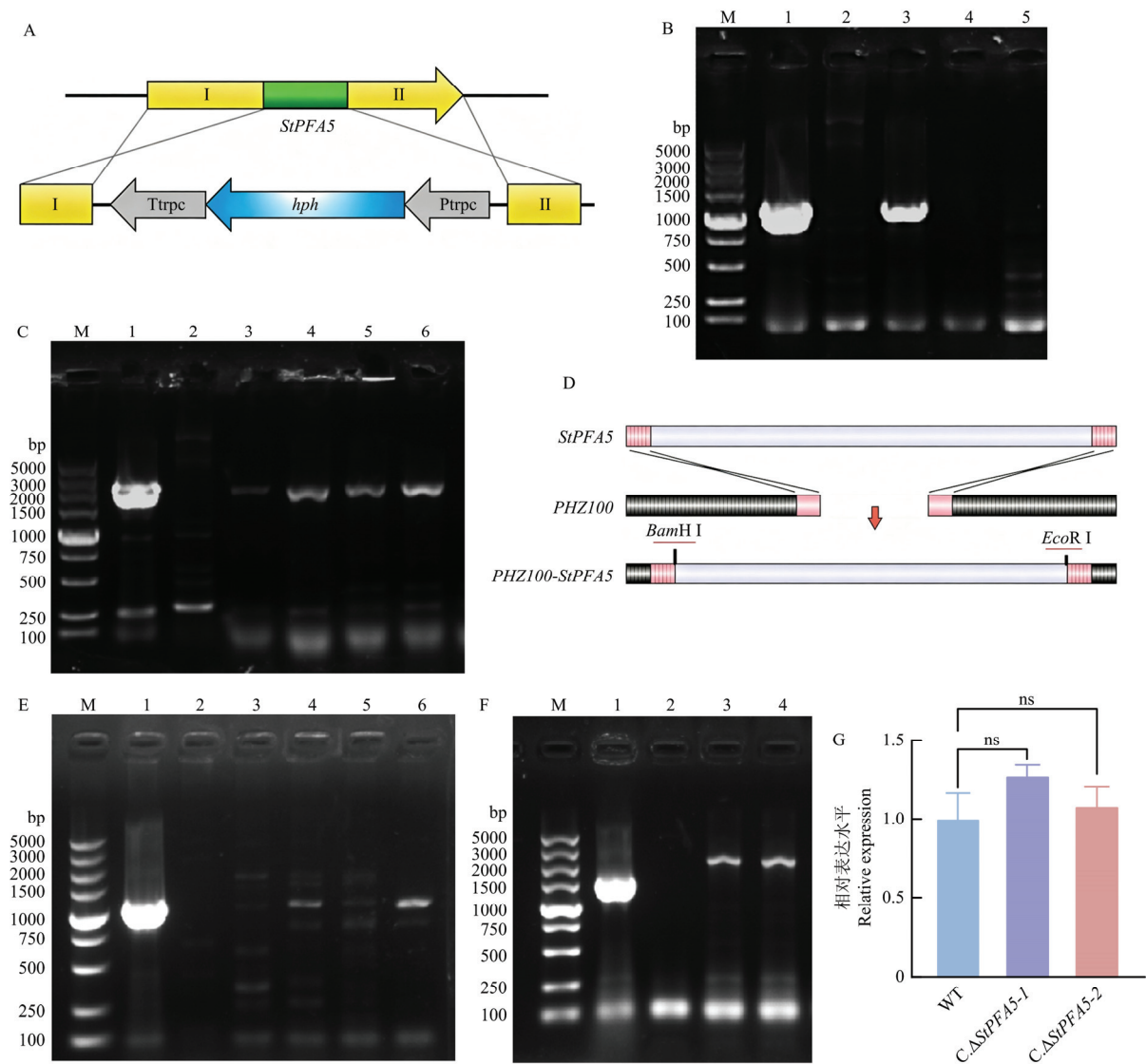
其中, *StPFA5* 与异旋孢腔菌的 *PFA5* 同源性最高, 为 80.35%, 而与酿酒酵母 *PFA5* 的同源性仅为 24.45%。进一步解析 *StPFA5* 的功能结构域, 发现其结构域为 DHHC 半胱氨酸富集域 (图 1-B)。

为了明确 *StPFA5* 在玉米大斑病菌侵染过程中是否发挥作用, 通过 RT-qPCR 检测玉米大斑病菌侵染玉米叶片过程中 *StPFA5* 的表达量。结果表明, 在病菌侵染过程中 *StPFA5* 存在表达, 且表达水平

相对较高。其中, 感染 2—4 d, *StPFA5* 表达水平上升, 4 d 达到高峰, 随后表达水平逐渐降低 (图 1-C)。

2.2 *StPFA5* 敲除及回补菌株创制

为了研究 *StPFA5* 在玉米大斑病菌中的功能, 采用同源重组的策略 (图 2-A), 利用原生质体转化的方法进行 *StPFA5* 敲除突变体创制, 并通过 PCR 对纯化的突变体进行筛选和验证 (图 2-B、2-C), 创制得



A: *StPFA5* 同源重组策略 Homologous recombination strategy for *StPFA5*; B: 转化子 *StPFA5* PCR 验证 PCR verification of *StPFA5* in transformants, 3—5: 转化子 Transformant; C: 转化子潮霉素抗性 PCR 验证 PCR verification of hygromycin resistance in transformants, 3—6: 转化子 Transformant; D: *StPFA5* 回补策略 Complementation strategy for *StPFA5*; E: *C.ΔStPFA5* PCR 验证 PCR verification of *C.ΔStPFA5*, 3—6: 转化子 Transformant; F: 转化子 G418 抗性 PCR 验证 PCR verification of G418 resistance in transformants, 3, 4: 转化子 Transformant; G: 转化子 *StPFA5* 的 RT-qPCR 验证 RT-qPCR verification of *StPFA5* in transformants. M: DL 5000 marker; 1: 阳性对照 Positive control; 2: 阴性对照 Negative control

图 2 *StPFA5* 敲除及回补突变体创制

Fig. 2 Generation of *StPFA5* knockout mutants and complementation mutants

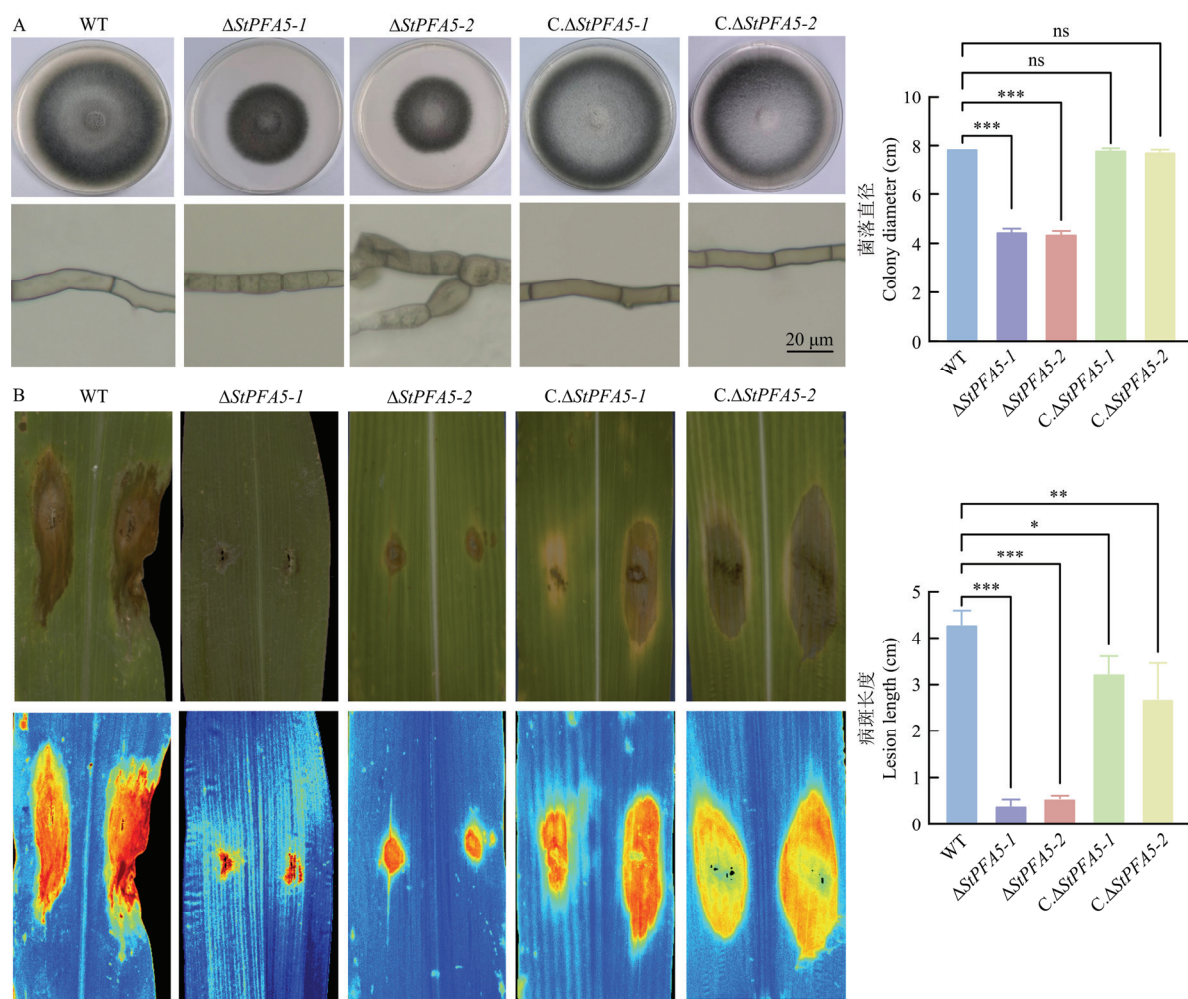
到 2 个缺失突变体 ($\Delta StPFA5-1$ 和 $\Delta StPFA5-2$)。此外, 同样通过同源重组的策略 (图 2-D), 创制了 *StPFA5* 敲除突变体的回补菌株, 通过 PCR (图 2-E、2-F)、RT-qPCR (图 2-G) 筛选和验证, 获得 *C.ΔStPFA5-1* 和 *C.ΔStPFA5-2*。

2.3 *StPFA5* 影响病菌生长及致病力

将 WT、 $\Delta StPFA5$ 、*C.ΔStPFA5* 接种至 PDA 平板, 25 °C 培养 7 d。与 WT 相比, $\Delta StPFA5$ 的生长速率变

慢, *C.ΔStPFA5* 生长速率与 WT 相近。光学显微镜观察菌丝形态发现, $\Delta StPFA5$ 出现菌丝膨大、间隔变短, 而 *C.ΔStPFA5* 的菌丝形态与 WT 相似 (图 3-A)。

将 WT、 $\Delta StPFA5$ 、*C.ΔStPFA5* 分别接种于玉米 B73 叶片, 测定 *StPFA5* 对玉米大斑病菌致病力的影响。结果显示, 接种 WT 和 *C.ΔStPFA5* 的玉米叶片产生明显梭状病斑, 而接种 $\Delta StPFA5$ 的玉米叶片形成的病斑较小 (图 3-B)。



* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. 下同 The same as below

图 3 *StPFA5* 对玉米大斑病菌生长发育 (A) 及致病力 (B) 的影响

Fig. 3 Effect of *StPFA5* on the growth, development (A) and pathogenicity (B) of *S. turcica*

2.4 *StPFA5* 对玉米大斑病菌附着胞形成的影响

对培养 12、24 和 48 h 的 WT、 $\Delta StPFA5$ 、*C.ΔStPFA5* 菌丝进行萌发和附着胞形成观察, 萌发进程分为菌丝、芽管形成、附着胞形成和侵染钉形成 4 个阶段。与 WT 和 *C.ΔStPFA5* 相比, $\Delta StPFA5$

的附着胞发育延迟。在 12 h 时, 38% WT、42% *C.ΔStPFA5-1*、40% *C.ΔStPFA5-2* 已萌发形成芽管, 而 $\Delta StPFA5-1$ 和 $\Delta StPFA5-2$ 仅有 19%、20% 达到这一阶段。至 24 h, 78% WT、75% *C.ΔStPFA5-1*、76% *C.ΔStPFA5-2* 已萌发形成芽管, 而 $\Delta StPFA5-1$ 、

ΔStPFA5-2 均仅有 50%达到这一阶段, 此外, 18% WT 和 13% *C.ΔStPFA5-1*、16% *C.ΔStPFA5-2* 形成成熟的附着胞, 而 *ΔStPFA5* 无成熟的附着胞形成。

48 h, *ΔStPFA5* 有成熟的附着胞形成, 但无侵染钉产生, 而 WT 和 *C.ΔStPFA5* 各有 8%、4%侵染钉形成 (图 4)。

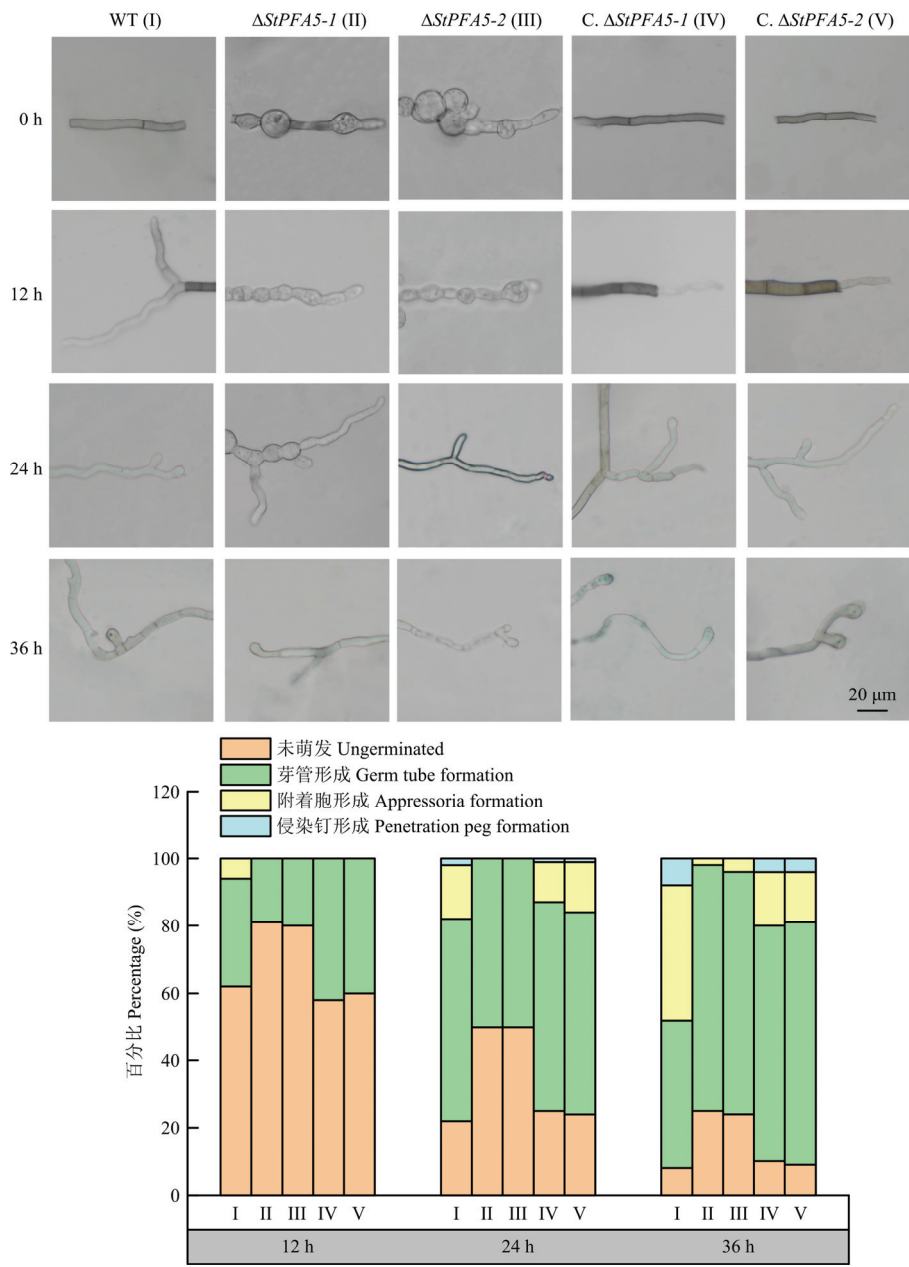


图 4 *StPFA5* 对玉米大斑病菌菌丝萌发和附着胞形成的影响

Fig. 4 Effect of *StPFA5* on mycelial germination and appressoria formation in *S. turcica*

2.5 敲除 *StPFA5* 影响黑色素合成

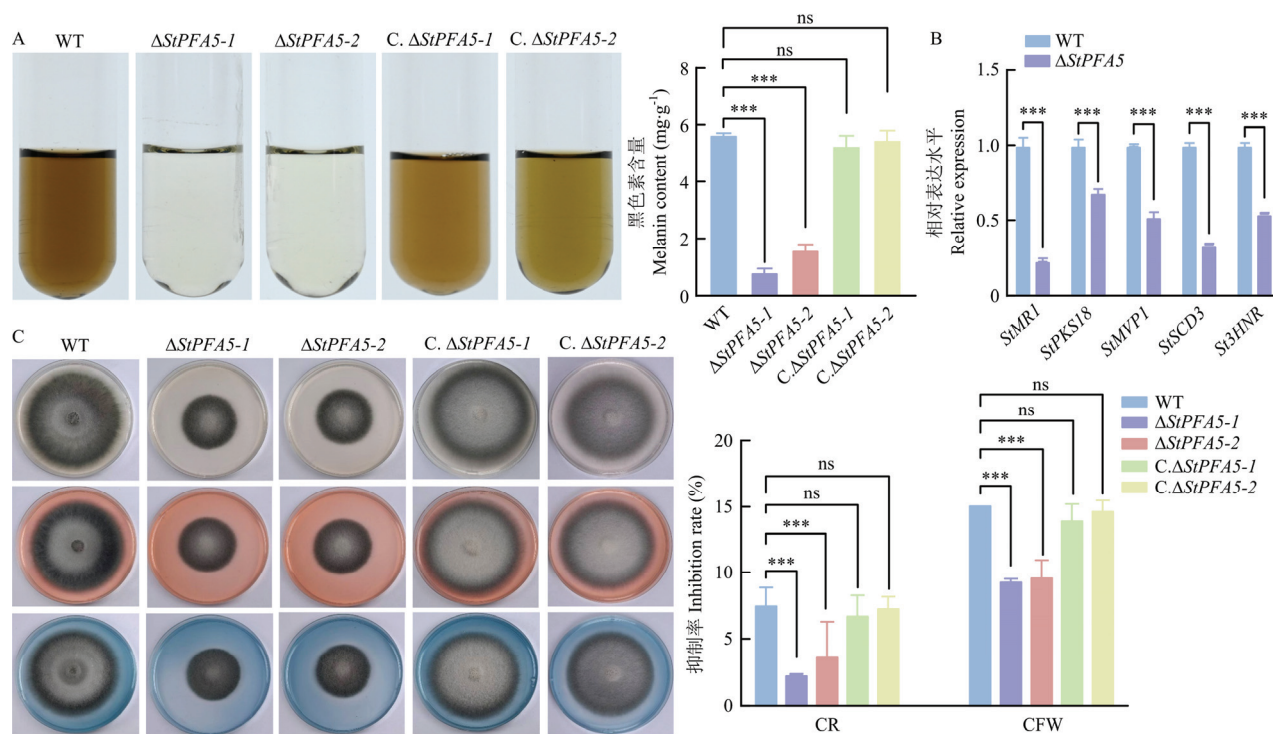
提取 WT、*ΔStPFA5*、*C.ΔStPFA5* 菌丝胞内黑色素发现, *ΔStPFA5* 黑色素含量低于 WT, 而 *C.ΔStPFA5* 恢复到 WT 水平 (图 5-A)。鉴于 *StPFA5* 影响玉米

大斑病菌黑色素合成, 进一步测定了 *ΔStPFA5* 菌株中黑色素合成相关基因的表达情况, 结果显示, 相比 WT, *ΔStPFA5* 中参与黑色素合成的基因 *StMR1*、*StPKS18*、*St3HNR*、*StSCD3*、*StMVP1* 均表达下调 (图

5-B)。

黑色素对维持细胞壁的稳定具有重要作用, 为了测定 *StPFA5* 对玉米大斑病菌细胞壁稳定性的影响, 在含 $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 刚果红 (几丁质抑制剂)、 $15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

CFW (几丁质抑制剂) 的 PDA 平板培养 WT、 $\Delta StPFA5$ 、*C.ΔStPFA5* 菌株, 测定其生长速率。结果显示, 与 WT 和 *C.ΔStPFA5* 相比, $\Delta StPFA5$ 对刚果红、CFW 的敏感性降低 (图 5-C)。



A: *StPFA5* 对玉米大斑病菌黑色素合成的影响 Effect of *StPFA5* on melanin synthesis of *S. turcica*; B: RT-qPCR 测定 *StPFA5* 敲除对玉米大斑病菌黑色素合成相关基因表达的影响 Determination of the effect of *StPFA5* knockout on the expression of melanin biosynthesis-related genes of *S. turcica* by RT-qPCR; C: *StPFA5* 对玉米大斑病菌细胞壁完整性的影响 Effect of *StPFA5* on cell wall integrity of *S. turcica*

图 5 *StPFA5* 对玉米大斑病菌黑色素合成与细胞壁完整性的影响

Fig. 5 Effect of *StPFA5* on melanin biosynthesis and cell wall integrity in *S. turcica*

2.6 *StPFA5* 修饰棕榈酰化位点鉴定

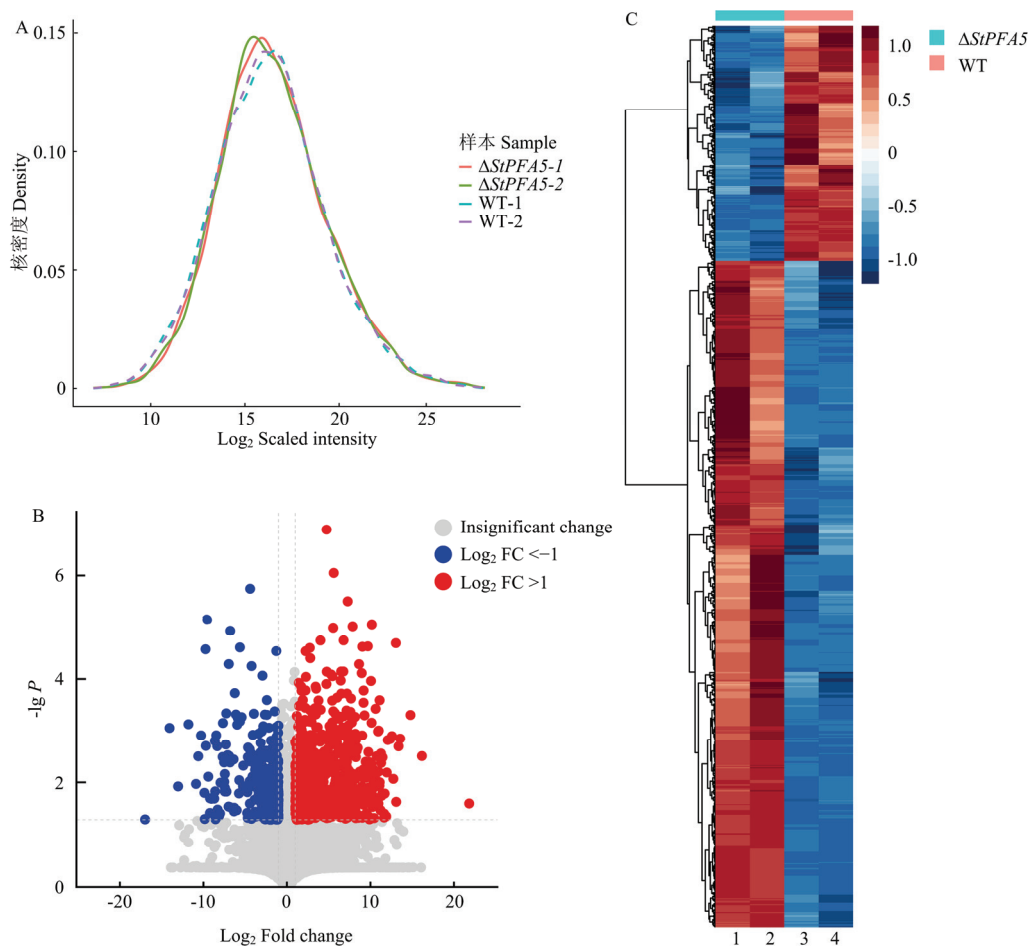
使用亲和定向的 MS 方法进行棕榈酰化位点鉴定, 并对得到的棕榈酰化修饰组学数据进行去蛋白组本底处理, 以排除蛋白本身表达量变化对修饰位点鉴定的影响。数据密度分布显示, $\Delta StPFA5$ 与 WT 两组所有样本均呈现单峰正态分布, 重复性良好, 数据质量可靠 (图 6-A)。鉴定得到 $\Delta StPFA5$ 和 WT 棕榈酰化显著差异位点 1 719 个, 其中 1 271 个上调, 448 个下调 (图 6-B、6-C)。

2.7 *StPFA5* 修饰棕榈酰化蛋白功能分析

对 $\Delta StPFA5$ 中下调的棕榈酰化位点所属蛋白进行 GO 功能富集, 结果显示, 生物学过程层面 (图 7-A) 差异蛋白广泛参与细胞基础生命活动与物质代谢调

控, 高度聚焦于氨基酸生物合成、有机酸代谢等代谢过程。同时, 在染色体浓缩等细胞周期过程存在富集。此外, 差异蛋白参与谷胱甘肽代谢通路。细胞组分层面 (图 7-A、7-B), 差异蛋白的空间分布高度集中在细胞质, 其次是膜结构和线粒体。分子功能层面 (图 7-A), 差异蛋白的核心活性聚焦于催化反应与核苷酸/ATP 结合。

KEGG 通路富集分析显示, 差异显著性前 30 的通路条目中, 差异蛋白主要富集在代谢过程, 如氨基酸合成代谢、碳代谢及辅因子生物合成, 以及糖酵解、丙酮酸代谢等代谢过程。此外, 差异蛋白在细胞周期、减数分裂、泛素介导的蛋白水解、核质运输等通路也存在富集 (图 7-C)。



A: 样本表达分布的核密度图 Nuclear density plot of sample expression distribution; B: $\Delta StPFA5$ vs WT 组的火山图 Volcano plot of the $\Delta StPFA5$ vs WT group; C: $\Delta StPFA5$ vs WT 组下调蛋白表达量 heatmap Heatmap of down-regulated protein expression levels in the $\Delta StPFA5$ vs WT group, 1: $\Delta StPFA5$ -1; 2: $\Delta StPFA5$ -2; 3: WT-1; 4: WT-2

图 6 $StPFA5$ 棕榈酰化修饰位点分析
Fig. 6 Analysis of palmitoylation modification sites of $StPFA5$

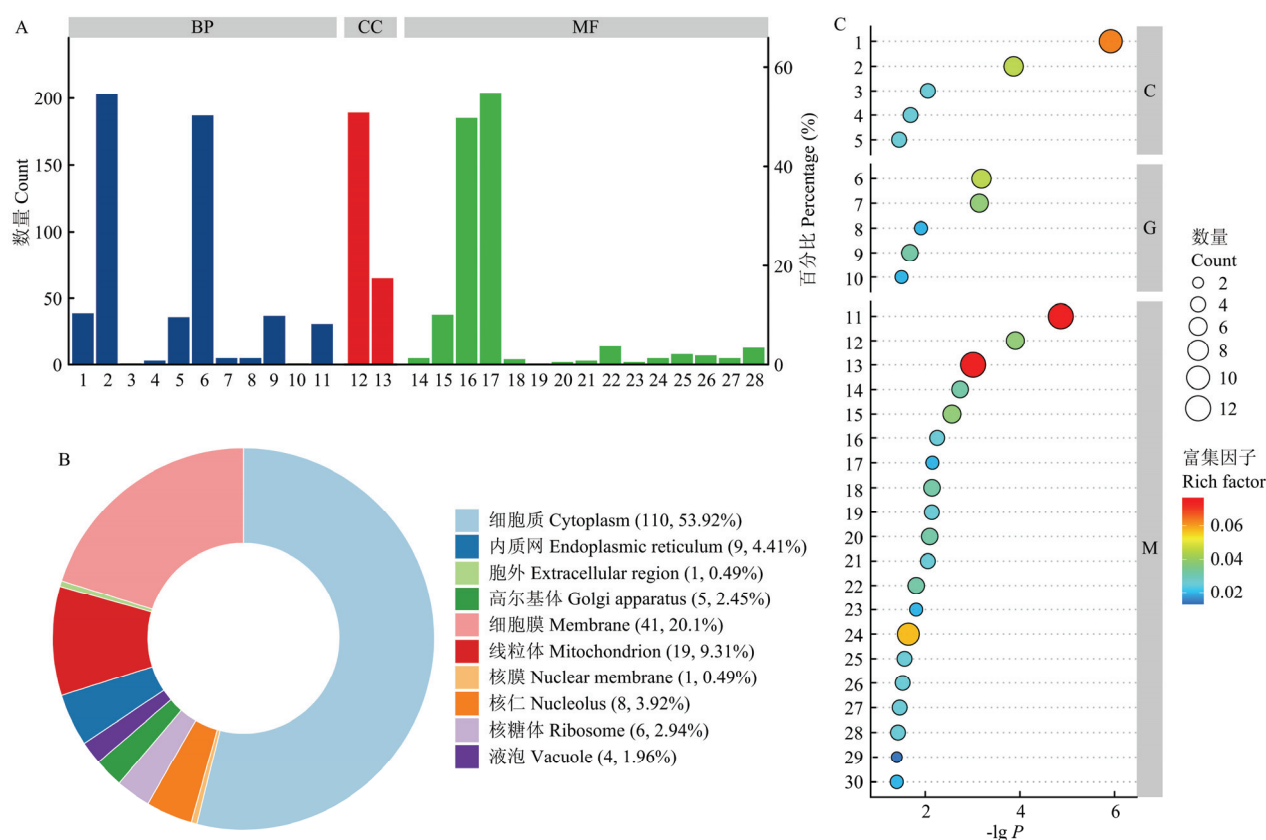
3 讨论

3.1 棕榈酰化修饰影响玉米大斑病菌的生长发育及致病力

棕榈酰化修饰是细胞维持胞内平衡和对细胞外刺激作出充分应答的重要分子机制^[31-32]。近年来,棕榈酰化修饰在植物病原真菌中的调控作用被逐渐揭示^[33]。在稻曲病菌中,棕榈酰转移酶 *UvPfa3* 和 *UvPfa4* 是调控菌丝极性生长的关键因子,敲除 *UvPfa3* 或 *UvPfa4* 后,病菌菌丝生长速率显著减慢,且表现出菌丝顶端膨大、分枝增多且紊乱^[28]。本研究创制了棕榈酰转移酶编码基因 *StPFA5* 的敲除突变体 ($\Delta StPFA5$) 和回补菌株 ($C.\Delta StPFA5$),对野生型、 $\Delta StPFA5$ 和

$C.\Delta StPFA5$ 菌株进行菌落生长速率测定,结果显示,与野生型相比, $\Delta StPFA5$ 生长速率减慢, $C.\Delta StPFA5$ 的生长速率恢复至与野生型相近水平,进一步观察菌丝形态发现, *StPFA5* 的敲除导致病菌菌丝形态畸形膨大。棕榈酰化修饰组学分析结果显示,相比野生型, $\Delta StPFA5$ 中大量代谢相关蛋白棕榈酰化水平显著下调。综上推测, *StPFA5* 的缺失导致细胞代谢异常,破坏了真菌菌丝顶端极性生长的物质供应,进而降低细胞分裂效率、阻碍菌丝延伸,最终导致菌落生长速率下降、菌丝形态畸形。

细胞周期的精准调控是植物病原真菌完成孢子萌发、侵染结构分化及宿主定殖的前提^[34-35]。已有研究表明,尖孢镰孢西瓜专化型中,棕榈酰转移酶 *FonPAT2*



A: ΔStPFA5 vs WT 组下调位点所属蛋白的 GO 功能蛋白统计 GO functional annotation statistics of proteins containing down-regulated sites in the ΔStPFA5 vs WT group; 1: 生物调控 Biological regulation; 2: 细胞过程 Cellular process; 3: 脱毒作用 Detoxification; 4: 稳态过程 Homeostatic process; 5: 定位 Localization; 6: 代谢过程 Metabolic process; 7: 生物过程负调控 Negative regulation of biological process; 8: 生物过程正调控 Positive regulation of biological process; 9: 生物过程调控 Regulation of biological process; 10: 生殖过程 Reproductive process; 11: 刺激响应 Response to stimulus; 12: 细胞解剖实体 Cellular anatomical entity; 13: 含蛋白复合物 Protein-containing complex; 14: 抗氧化活性 Antioxidant activity; 15: ATP 依赖活性 ATP-dependent activity; 16: 结合 Binding; 17: 催化活性 Catalytic activity; 18: 细胞骨架活性 Cytoskeletal motor activity; 19: 电子转移活性 Electron transfer activity; 20: 通用转录起始活性 General transcription initiation activity; 21: 分子衔接蛋白活性 Molecular adaptor activity; 22: 分子功能调节活性 Molecular function regulator activity; 23: 分子转导活性 Molecular transducer activity; 24: 蛋白折叠分子伴侣活性 Protein folding chaperone activity; 25: 结构分子活性 Structural molecule activity; 26: 转录调节活性 Transcription regulator activity; 27: 翻译调节活性 Translation regulator activity; 28: 转运蛋白活性 Transporter activity; B: ΔStPFA5 vs WT 组下调蛋白的细胞组分亚细胞定位 Subcellular localization of cellular component for down-regulated proteins in the ΔStPFA5 vs WT group; C: ΔStPFA5 vs WT 组下调位点所属蛋白的 KEGG 通路富集气泡图, 展示差异位点所属蛋白富集显著性 top 30 的 pathway Bubble plot of KEGG pathway enrichment for proteins containing down-regulated sites in the ΔStPFA5 vs WT group, presenting top 30 significantly enriched pathways of proteins with differential sites; 1: 酵母细胞周期 Cell cycle-yeast; 2: 酵母减数分裂 Meiosis-yeast; 3: 过氧化物酶体 Peroxisome; 4: 吞噬体 Phagosome; 5: 马达蛋白 Motor protein; 6: 泛素介导的蛋白水解 Ubiquitin mediated proteolysis; 7: 核质转运 Nucleocytoplasmic transport; 8: 错配修复 Mismatch repair; 9: 内质网蛋白加工 Protein processing in endoplasmic reticulum; 10: mRNA 监控通路 mRNA surveillance pathway; 11: 氨基酸生物合成 Biosynthesis of amino acids; 12: 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解 Valine, leucine and isoleucine degradation; 13: 辅因子生物合成 Biosynthesis of cofactors; 14: 色氨酸代谢 Tryptophan metabolism; 15: 半胱氨酸和甲硫氨酸代谢 Cysteine and methionine metabolism; 16: 叶酸介导的一碳代谢 One carbon pool by folate; 17: 氰基氨基酸代谢 Cyanoamino acid metabolism; 18: 乙醛酸和二羧酸代谢 Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; 19: 丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 Alanine, aspartate and glutamate metabolism; 20: 2-氧羧酸代谢 2-Oxocarboxylic acid metabolism; 21: 苯丙氨酸代谢 Phenylalanine metabolism; 22: 丙酮酸代谢 Pyruvate metabolism; 23: 赖氨酸生物合成 Lysine biosynthesis; 24: 碳代谢 Carbon metabolism; 25: 丙酸代谢 Propanoate metabolism; 26: 糖酵解/糖异生 Glycolysis/Gluconeogenesis; 27: 氨基糖和核苷酸糖代谢 Amino sugar and nucleotide sugar metabolism; 28: 果糖和甘露糖代谢 Fructose and mannose metabolism; 29: 牛磺酸和亚牛磺酸代谢 Taurine and hypotaurine metabolism; 30: 氮代谢 Nitrogen metabolism

图 7 *StPFA5* 棕榈酰化修饰蛋白功能分析

Fig. 7 Functional analysis of *StPFA5*-mediated palmitoylated proteins

可通过棕榈酰化修饰细胞周期调控因子 AP-2 复合体, 保障病菌致病力的正常发挥^[19]。本研究中, 对野生型、Δ*StPFA5* 和 *C.ΔStPFA5* 的致病力进行测定发现,

StPFA5 的敲除降低了玉米大斑病菌的致病力。进一步测定菌丝萌发速率发现, 相比野生型和 *C.ΔStPFA5*, Δ*StPFA5* 菌丝萌发速率变慢。此外, 棕榈酰化修饰组

学结果显示,相比野生型, $\Delta StPFA5$ 中大量细胞周期相关蛋白的棕榈酰化水平显著下调。综上推测, $StPFA5$ 通过修饰细胞周期相关蛋白的棕榈酰化水平,影响玉米大斑病菌菌丝萌发速率和侵染结构附着胞的形成,进而调控病菌的致病力。

3.2 $StPFA5$ 调控的棕榈酰化修饰通过参与玉米大斑病菌的黑色素合成影响病菌致病力

真菌黑色素是一类高分子量、非均质、暗褐色至黑色的生物色素,是真菌长期进化过程中形成的重要次生代谢产物。黑色素在真菌适应极端环境、抵御外界胁迫及侵染宿主等生理过程中发挥着不可替代的作用^[36-37]。根据合成前体及代谢途径的差异,真菌黑色素主要分为二羟萘(DHN)型和多巴(L-DOPA)型^[38]。其中,植物病原真菌以合成 DHN 型黑色素为主。黑色素是植物病原真菌的关键毒力因子^[39],玉米大斑病菌、稻瘟病菌的附着胞中积累的黑色素可形成致密屏障以维持附着胞内高膨压,为侵入钉穿透叶片表皮提供机械动力。若黑色素合成受阻,病原菌侵染能力则完全丧失^[40-41]。

已有研究表明,在烟曲霉中,棕榈酰化修饰黑色素合成关键酶聚酮合酶 Alb1 和还原酶 ArpR1/2,通过调控这些酶膜定位、活性与稳定性,影响真菌黑色素合成与致病力^[42-43]。本研究, $StPFA5$ 的缺失导致玉米大斑病菌形成病斑面积变小,致病力下降,进一步分析发现,相比野生型, $\Delta StPFA5$ 的菌丝黑色素含量减少,推测玉米大斑病菌致病力下降与黑色素含量减少有关。为探究黑色素含量减少的调控机制,通过 RT-qPCR 测定 $\Delta StPFA5$ 中黑色素合成相关基因的表达水平,结果显示,相比野生型, $\Delta StPFA5$ 中黑色素合成相关基因 $StMR1$ 、 $StPKS18$ 、 $St3HNR$ 、 $StSCD3$ 、 $StMVPI$ 均表达下调。进一步分析棕榈酰化修饰组学结果发现, $\Delta StPFA5$ 中黑色素合成相关基因棕榈酰化水平无明显变化,但大量碳代谢、糖酵解和丙酮酸代谢过程的相关蛋白棕榈酰化水平显著下调。而 DHN-黑色素的核心前体是乙酰-CoA/丙二酰-CoA,由中心碳代谢(糖酵解→丙酮酸→乙酰-CoA)持续供应^[44]。综上推测, $StPFA5$ 通过修饰碳代谢、糖酵解和丙酮酸代谢相关蛋白的棕榈酰化水平调控玉米大斑病菌黑色素的合成,进而影响病菌致病力。

4 结论

棕榈酰转移酶 $StPFA5$ 的突变导致玉米大斑病菌生长速率变慢,菌丝形态畸形,黑色素含量减少,病

菌致病力降低。 $StPFA5$ 通过调控蛋白棕榈酰化水平在玉米大斑病菌的生长、黑色素合成及病菌致病力中发挥重要作用。

参考文献 References

- [1] 邹金鹏, 岳浩峰, 李海笑, 刘峥, 刘宁, 曹志艳, 董金皋. 基于非靶向代谢组学分析 $StLAC2$ 和 $StLAC6$ 差异影响玉米大斑病菌的机制[J]. 中国农业科学, 2023, 56(16): 3110-3123. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2023.16.006.
Zou J P, Yue H F, Li H X, Liu Z, Liu N, Cao Z Y, Dong J G. Mechanism of $StLAC2$ and $StLAC6$ differentially affecting *Setosphaeria turcica* based on non-targeted metabolomics analysis [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2023, 56(16): 3110-3123. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2023.16.006. (in Chinese)
- [2] 张世梅. 稻瘟菌 DHHC 家族棕榈酰化修饰酶功能及其抑制剂处理效果分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2022.
Zhang S M. Functional of DHHC family palmitoyl modification enzymes in *Magnaporthe oryzae* and its inhibitor treatment effects [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2022. (in Chinese)
- [3] Shi T T, Li G H, Zhao P J. Appressoria-small but incredibly powerful structures in plant-pathogen interactions [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(3): 2141.
- [4] Gu S Q, Li P, Wu M, Hao Z M, Gong X D, Zhang X Y, Tian L, Zhang P, Wang Y, Cao Z Y, Fan Y S, Han J M, Dong J G. $StSTE12$ is required for the pathogenicity of *Setosphaeria turcica* by regulating appressorium development and penetration [J]. Microbiological Research, 2014, 169(11): 817-823.
- [5] Zhang Z, Jia H, Liu N, Li H, Meng Q, Wu N, Cao Z, Dong J. The zinc finger protein $StMR1$ affects the pathogenicity and melanin synthesis of *Setosphaeria turcica* and directly regulates the expression of DHN melanin synthesis pathway genes [J]. Molecular Microbiology, 2022, 117(2): 261-273.
- [6] 郝玉彬, 李海笑, 张赛, 刘宁, 刘英姿, 曹志艳, 董金皋. 玉米大斑病菌小柱孢酮脱水酶 $StSCD$ 家族鉴定及其功能分析[J]. 中国农业科学, 2022, 55(16): 3134-3143. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2022.16.006.
Hao Y B, Li H X, Zhang S, Liu N, Liu Y Z, Cao Z Y, Dong J G. Identification and functional analysis of $StSCD$ family in *Setosphaeria turcica* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2022, 55(16): 3134-3143. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2022.16.006. (in Chinese)
- [7] Guo X Y, Liu N, Liu B H, Zhou L H, Cao Z Y, Han J M, Dong J G. Melanin, DNA replication, and autophagy affect appressorium development in *Setosphaeria turcica* by regulating glycerol

- accumulation and metabolism [J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2022, 21(3): 762-773.
- [8] Suskiewicz M J. The logic of protein post-translational modifications (PTMs): Chemistry, mechanisms and evolution of protein regulation through covalent attachments [J]. *BioEssays*, 2024, 46(3): e2300178.
- [9] Kitamura N, Galligan J J. A global view of the human post-translational modification landscape [J]. *Biochemical Journal*, 2023, 480(16): 1241-1265.
- [10] Resh M D. Fatty acylation of proteins: The long and the short of it [J]. *Progress in Lipid Research*, 2016, 63: 120-131.
- [11] 李程, 黄宇兴, 赵雅楠, 鞠振宇, 胡乾. 蛋白质棕榈酰化对小鼠棕色脂肪组织产热功能的影响及其调控机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2026, 42(6): 1081-1091.
- Li C, Huang Y X, Zhao Y N, Ju Z Y, Hu Q. Effects of protein palmitoylation on thermogenic function of brown adipose tissue in mice and its regulatory mechanisms [J]. *Chinese Journal of Pathophysiology*, 2026, 42(6): 1081-1091. (in Chinese)
- [12] Mesquita F S, Abrami L, Linder M E, Bamji S X, Dickinson B C, van der Goot F G. Mechanisms and functions of protein S-acylation [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2024, 25(6): 488-509.
- [13] El-Husseini A E, Bredt D S. Protein palmitoylation: A regulator of neuronal development and function [J]. *Nature Reviews Neuroscience*, 2002, 3(10): 791-802.
- [14] Sanders S S, Martin D D, Butland S L, Lavallée-Adam M, Calzolari D, Kay C, Yates J R, Hayden M R. Curation of the mammalian palmitoylome indicates a pivotal role for palmitoylation in diseases and disorders of the nervous system and cancers [J]. *PLoS Computational Biology*, 2015, 11(8): e1004405.
- [15] Kumar M, Carr P, Turner S R. An atlas of *Arabidopsis* protein S-acylation reveals its widespread role in plant cell organization and function [J]. *Nature Plants*, 2022, 8(6): 670-681.
- [16] Hemsley P A, Weimar T, Lilley K S, Dupree P, Grierson C S. A proteomic approach identifies many novel palmitoylated proteins in *Arabidopsis* [J]. *New Phytologist*, 2013, 197(3): 805-814.
- [17] Valdez-Taubas J, Pelham H. Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation [J]. *The EMBO Journal*, 2005, 24(14): 2524-2532.
- [18] Roth A F, Wan J, Bailey A O, Sun B, Kuchar J A, Green W N, Phinney B S, Yates J R, Davis N G. Global analysis of protein palmitoylation in yeast [J]. *Cell*, 2006, 125(5): 1003-1013.
- [19] Xiong X, Gao Y, Wang J, Wang H, Lou J, Bi Y, Yan Y, Li D, Song F. Palmitoyl transferase FonPAT2-catalyzed palmitoylation of the FonAP-2 complex is essential for growth, development, stress response, and virulence in *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* [J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(1): e0386122.
- [20] 阳晶晶, 马艳, 王悦, 孙阳, 李盼, 郭峰. ACE2 蛋白 Cys141、Cys344 和 Cys498 位点的棕榈酰化修饰促进其在细胞外囊泡的定位[J]. *基础医学与临床*, 2025, 45(9): 1151-1157.
- Yang J J, Ma Y, Wang Y, Sun Y, Li P, Guo F. Palmitoylation of ACE2 at Cys141, Cys344 and Cys498 facilitates its extracellular vesicles localization [J]. *Basic & Clinical Medicine*, 2025, 45(9): 1151-1157. (in Chinese)
- [21] Zhou B, Hao Q, Liang Y, Kong E. Protein palmitoylation in cancer: Molecular functions and therapeutic potential [J]. *Molecular Oncology*, 2023, 17(1): 3-26.
- [22] Malgouyres M I P, Linder M E. Substrate recruitment by zDHHC protein acyltransferases [J]. *Open Biology*, 2021, 11(4): 210026.
- [23] Won S J, Cheung S K M, Martin B R. Protein depalmitoylases [J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2018, 53(1): 83-98.
- [24] Zhang H, Sun Y, Wang Z, Huang X, Tang L, Jiang K, Jin X. ZDHHC20-mediated S-palmitoylation of YTHDF3 stabilizes MYC mRNA to promote pancreatic cancer progression [J]. *Nature Communications*, 2024, 15(1): 4642.
- [25] 暨凯忠, 孔一豪, 支忆清, 金莹莹, 陈建权. 锌指 DHHC 型棕榈酰转移酶 5 在组织稳态和疾病中的作用及机制[J]. *中国组织工程研究*, 2026, 30(17): 4430-4445.
- Ji K Z, Kong Y H, Zhi Y Q, Jin Y Y, Chen J Q. Roles and mechanisms of zinc finger DHHC-type palmitoyl transferase 5 in tissue homeostasis and diseases [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2026, 30(17): 4430-4445. (in Chinese)
- [26] Dighe S A, Kozminski K G. Swf1p, a member of the DHHC-CRD family of palmitoyltransferases, regulates the actin cytoskeleton and polarized secretion independently of its DHHC motif [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2008, 19(10): 4454-4468.
- [27] Enyenihi A H, Saunders W S. Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Genetics*, 2003, 163(1): 47-54.
- [28] Duan Y, Li P, Zhang D, Wang L, Fang Y, Hu H, Mao Q, Zhou X, Zhao P, Li X, Wei J, Tang J, Pan L, Liu H, Chen X, Chen X, Hsiang T, Huang J, Zheng L. S-palmitoylation of MAP kinase is essential for fungal virulence [J]. *mBio*, 2024, 15(12): e0270424.
- [29] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [30] Liu D, Wei L, Guo T, Tan W. Detection of DOPA-melanin in the

- dimorphic fungal pathogen *Penicillium marneffei* and its effect on macrophage phagocytosis *in vitro* [J]. PLoS ONE, 2014, 9(3): e92610.
- [31] Zhang M, Zhou L, Xu Y, Yang M, Xu Y, Komaniecki G P, Kosciuk T, Chen X, Lu X, Zou X, Linder M E, Lin H. A STAT3 palmitoylation cycle promotes T_H17 differentiation and colitis [J]. Nature, 2020, 586(7829): 434-439.
- [32] 吴诗亲, 杨简, 黄萃园, 刘丽, 李文强, 王伟, 张静. 棕榈酰化促进血管衰老相关心血管疾病的研究进展[J]. 实用医学杂志, 2026, 42(9): 1586-1591.
- Wu S Q, Yang J, Huang C Y, Liu L, Li W Q, Wang W, Zhang J. Research progress on palmitoylation promoting vascular senescence-related cardiovascular diseases [J]. The Journal of Practical Medicine, 2026, 42(9): 1586-1591. (in Chinese)
- [33] Martín J F, Liras P. Targeting of specialized metabolites biosynthetic enzymes to membranes and vesicles by posttranslational palmitoylation: A mechanism of non-conventional traffic and secretion of fungal metabolites [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(2): 1224.
- [34] 张博文, 赵丽雯, 徐璐, 李盼, 曾凡力, 孟亚南, 董金皋. 玉米大斑病菌细胞周期蛋白依赖性激酶结构亚基 StCks1 鉴定及其基因功能分析[J]. 中国农业科学, 2024, 57(5): 900-908. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2024.05.006.
- Zhang B W, Zhao L W, Xu L, Li P, Zeng F L, Meng Y N, Dong J G. Identification and gene function analysis of StCks1, a cyclin-dependent kinase subunit of *Setosphaeria turcica* [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2024, 57(5): 900-908. DOI: 10.3864/j.issn.0578-1752.2024.05.006. (in Chinese)
- [35] Fukada F, Kubo Y. *Colletotrichum orbiculare* regulates cell cycle G1/S progression via a two-component GAP and a GTPase to establish plant infection [J]. The Plant Cell, 2015, 27(9): 2530-2544.
- [36] Jacobson E S. Pathogenic roles for fungal melanins [J]. Clinical Microbiology Reviews, 2000, 13(4): 708-717.
- [37] Eisenman H C, Greer E M, McGrail C W. The role of melanins in melanotic fungi for pathogenesis and environmental survival [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(10): 4247-4257.
- [38] Reyes-Fernández E Z, Shi Y M, Grün P, Bode H B, Bölker M. An unconventional melanin biosynthesis pathway in *Ustilago maydis* [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2021, 87(3): e01510-20.
- [39] 曹志艳, 杨胜勇, 董金皋. 植物病原真菌黑色素与致病性关系的研究进展[J]. 微生物学通报, 2006, 33(1): 154-158.
- Cao Z Y, Yang S Y, Dong J G. Research progress on the relationship between melanin and pathogenicity in phytopathogenic fungi [J]. Microbiology Bulletin, 2006, 33(1): 154-158. (in Chinese)
- [40] Jia H, Liu N, Zhang L, Li P, Meng Y, Yuan W, Li H, Tantai D, Qu Q, Cao Z, Dong J. Fungal melanin in plant pathogens: Complex biosynthesis pathways and diverse biological functions [J]. Plants, 2025, 14(14): 2121.
- [41] Huang P, Cao H, Li Y, Zhu S, Wang J, Wang Q, Liu X, Lin F C, Lu J. Melanin promotes spore production in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* [J]. Frontiers in Microbiology, 2022, 13: 843838.
- [42] Tsai H F, Chang Y C, Washburn R G, Wheeler M H, Kwon-Chung K J. The developmentally regulated alb1 gene of *Aspergillus fumigatus*: Its role in modulation of conidial morphology and virulence [J]. Journal of Bacteriology, 1998, 180(12): 3031-3038.
- [43] Upadhyay S, Xu X, Lin X. Interactions between melanin enzymes and their atypical recruitment to the secretory pathway by palmitoylation [J]. mBio, 2016, 7(6): e01925-16.
- [44] Ao J, Bandyopadhyay S, Free S J. Characterization of the *Neurospora crassa* DHN melanin biosynthetic pathway in developing ascospores and peridium cells [J]. Fungal Biology, 2019, 123(1): 1-9.

(责任编辑 岳梅)