论文

中国知名大学及研究院所专栏 中国农业科学院植物保护研究所专辑

转录组分析揭示玉米大斑病菌对解淀粉芽孢杆菌胁迫响应机制

田雪亮^{①②}, 张恺^①, 王国梁^①, 刘文德^{①*}^① 中国农业科学院植物保护研究所, 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193;^② 河南科技学院, 新乡 453003

* 联系人, E-mail: liuwende@caas.cn

收稿日期: 2015-12-20; 接受日期: 2016-02-26; 网络版发表日期: 2016-05-25

植物病虫害生物学国家重点实验室开放课题(批准号: SKLOF201508)资助

摘要 在植物病害生物防治系统中, 生防微生物的生物防治机制是关注的重点, 而植物病原物如何响应并抵抗或缓解生防微生物胁迫的机制往往被忽略. 本文以解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)和玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)为生防互作系统, 利用 RNA-seq 技术研究 *S. turcica* 对 *B. amyloliquefaciens* 生防胁迫响应的分子机制, 结果表明, 与对照 *S. turcica* 样品比较, *B. amyloliquefaciens* 发酵液处理的 *S. turcica* 样品中共有 393 个基因显著差异表达, 其中 168 个基因上调表达, 225 个基因下调表达. 已知解淀粉芽孢杆菌的抗菌物质一般作用于真菌细胞壁、细胞膜, 通过破坏细胞壁及细胞膜的结构抑制真菌生长, 因此, 本研究在差异表达基因中重点分析 *S. turcica* 细胞壁、细胞膜结构相关基因, 发现 *S. turcica* 上调表达细胞壁组分蛋白(1-6)-beta-D 葡聚糖生物合成途径基因、麦角固醇合成途径 Delta(14)甾醇还原酶基因、脂肪酸合成酶基因、抗氧化相关的抗坏血酸过氧化物酶基因、谷胱甘肽硫转移酶基因、腺苷三磷酸结合盒转运蛋白基因; 下调表达调控细胞凋亡的 Metacaspase 基因. 这说明 *S. turcica* 通过调节芽孢杆菌抗菌活性物质的靶标蛋白或合成途径的基因表达, 以缓解 *B. amyloliquefaciens* 的生防胁迫作用, 是一种涉及多个基因和多个信号途径共同参与调控的复杂网络. 该研究结果将为研究病原真菌对生防微生物胁迫的抗性机制奠定基础.

关键词 玉米大斑病菌, 解淀粉芽孢杆菌, 转录组分析, 生物防治

植物病害生物防治是指利用有益微生物或微生物代谢产物对植物病原微生物进行有效防治的技术与方法. 在植物病害生物防治互作系统中, 生防微生物与植物病原微生物是拮抗的生态关系. 在生物防

治领域, 人们关注的重点集中在生防微生物抑菌活性物质生物合成和抑菌机制, 而忽略了植物病原微生物在生防微生物胁迫压力下的应答反应. 在杀菌剂的胁迫压力下, 植物病原微生物可以通过多种途

引用格式: 田雪亮, 张恺, 王国梁, 等. 转录组分析揭示玉米大斑病菌对解淀粉芽孢杆菌胁迫响应机制. 中国科学: 生命科学, 2016, 46: 627–636
Tian X L, Zhang K, Wang G L, et al. Comparative transcriptome analysis of *Setosphaeria turcica* revealed its response mechanisms to the biological control agent *Bacillus amyloliquefaciens*. Sci Sin Vitae, 2016, 46: 627–636, doi: 10.1360/N052016-00166

径缓解杀菌剂毒害, 从而产生抗药性^[1], 同样, 植物病原微生物在生防微生物的持续胁迫下, 可能会产生一定的抗性, 然而, 其抗性机制目前还是未知, 需要进一步深入研究.

解淀粉芽孢杆菌(*B. amyloliquefaciens*)是优良防微生物, 因其具有广谱高效的抑菌特性而备受关注. 已知, *B. amyloliquefaciens* 能够产生环脂肽类抑菌活性物质. 环脂肽由非核糖体肽合成酶催化合成^[2], 能够抑制多种植物病原细菌、真菌和病毒的生长^[3-5]. 环脂肽类物质主要包括脂肽、伊枯草菌素和丰原素^[6]. 脂肽具有较强的生物表面活性、乳化和发泡特性. 由于脂肽具有两亲特性, 能够锚定入脂质层中, 在一定剂量下破坏生物膜的完整性^[7]. 伊枯草菌素 A 和 C, 芽孢菌霉素 D, F, L 和 LC 以及抗霉枯草菌素属于伊枯草菌素家族, 具有较强的抗真菌活性, 其作用机制是增加细胞膜渗透^[8]. 丰原素分为 A 和 B 两种类型, 也具有较强的抗真菌活性, 它能够与脂质层互作, 在一定程度上改变细胞膜结构和渗透性^[9].

玉米大斑病菌(*Setosphaeria turcica*)是危害严重的植物病原微生物, 引起的玉米大斑病是我国玉米(*Zea mays*)生产上第一大病害. 近年来, 随着我国玉米种植面积扩大, 先玉 335、郑单 958 等品种大面积单一化种植造成玉米品种对大斑病抗性不断丧失, 导致该病在我国东北及黄淮海玉米产区逐年加重^[10]. 本实验室从玉米叶片分离到一株 *B. amyloliquefaciens*, 经测定对 *S. turcica* 具有较高的抑制效果. 在其发酵液处理下, *S. turcica* 菌丝生长受到抑制, 变为“气球状”. 这种形态改变可能是 *B. amyloliquefaciens* 产生的环脂肽类物质对 *S. turcica* 作用的结果, 而 *S. turcica* 如何响应或应答芽孢杆菌环脂肽的毒害并不清楚.

本研究以 *B. amyloliquefaciens* 和 *S. turcica* 作为生防微生物和植物病原微生物互作系统, 采用转录组测序技术比较分析 *S. turcica* 野生型菌株和经 *B. amyloliquefaciens* 发酵液处理后菌株的基因表达特征, 从而在转录组水平上揭示 *S. turcica* 对 *B. amyloliquefaciens* 胁迫的响应机制.

1 材料与方法

1.1 材料

(1) 供试菌株. *S. turcica* 菌株 Et28A 由吉林大

学潘洪玉教授惠赠. *B. amyloliquefaciens* 菌株 D1 分离自河南新乡大田采集的玉米叶片表面, 经形态、生理生化特性和 16S rDNA 鉴定为解淀粉芽孢杆菌.

(2) 主要试剂及培养基. PDA(potato dextrose agar)培养基用于 *S. turcica* 固体培养, PD(potato dextrose)培养液用于液体培养 *S. turcica* 和 *B. amyloliquefaciens* 发酵液处理 *S. turcica* 菌丝. LB 液体培养基用于培养 *B. amyloliquefaciens*. *B. amyloliquefaciens* 在 30℃ 培养 24 h, 8000×g 离心 5 min, 经细菌过滤器(0.22 μm)过滤, 所得滤液为发酵液.

1.2 *B. amyloliquefaciens* 对 *S. turcica* 菌丝生长的抑制

在 PDA 平板距边缘 3 cm 接种 *S. turcica* 菌饼(直径 5 mm), 距离菌饼中心 3 cm 处接种 5 μL *B. amyloliquefaciens* 菌液. 无菌水为对照. 28℃ 培养 7 天后观察结果. 接种 5 皿, 试验重复 3 次.

1.3 *B. amyloliquefaciens* 发酵液对 *S. turcica* 菌丝基因表达的影响

在 100 mL PD 培养液中接入 1 mL 浓度为 1×10^4 个/mL *S. turcica* 分生孢子, 25℃, 200 r/min 振荡培养 4 天, 然后加入 *B. amyloliquefaciens* 发酵液, 终浓度为 5%, 继续振荡培养 12 h, 光学显微镜(OLYMPUS CX23, 日本)镜检菌丝形态, 当菌丝为“气球状”后收集菌丝, 置于液氮中速冻, 保存于-80℃超低温冰箱. 发酵液处理样品标记为 St_D. 对照处理只加入 LB 培养液, 终浓度为 5%. 对照样品标记为 St_CK. 每个处理各收集 5 份菌丝样品.

1.4 *S. turcica* 菌丝转录组测序

采用 TRIzol 法(Invitrogen, 美国)提取 *S. turcica* 菌丝总 RNA, 检测合格的总 RNA 用带有 Oligo(dT) 的磁珠富集 mRNA, 随后加入 fragmentation buffer 将 mRNA 打断成短片段. 以 mRNA 为模板, 用六碱基随机引物合成一链 cDNA, 然后加入缓冲液、dNTPs 和 DNA polymerase I 和 RNase H 合成二链 cDNA, 再用 AMPure XP beads 纯化双链 cDNA. 纯化的双链 cDNA 先进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头, 再用 AMPure XP beads 进行片段大小选择. 最后进行 PCR 扩增, 并用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物, 得到最终的文库. 文库构建完成后, 先使用 Qubit 2.0 进

行初步定量, 稀释文库至 1.5 ng/ μ L, 随后使用 Agilent 2100 生物芯片分析系统(Agilent, 美国)对文库的 insert size 进行检测, insert size 符合预期后, 使用 Q-PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度 >2 nmol/L), 以保证文库质量. 库检合格后, 把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后进行 Illumina HiSeq 测序.

1.5 测序数据过滤

为了保证信息分析质量, 必须对 raw reads 过滤, 除去含有带接头的、低质量的 reads, 得到 clean reads. 采用 Trinity(r20140413p1)软件^[11]对 clean reads 进行拼接. 将拼接得到的转录本序列作为后续分析的参考序列. 取每条基因中最长的转录本作为 Unigene, 以此进行后续的分析. 为获得全面的基因功能信息, 利用 Nr, KOG/COG, GO(gene ontology), KEGG(kyoto encyclopedia of genes and genomes)等数据库对 Unigene 进行基因功能注释.

1.6 基因差异表达分析

利用 HTSeq 软件(v0.5.4p3)^[12]统计匹配到每个基因上的读长数量. 通过基因长度和匹配到该基因上的读长数量计算每个基因的 FPKM(expected number of fragments per kilobase of transcript sequence per millions base pairs sequenced). FPKM 能同时考虑测序深度和基因长度对读长数量的影响, 是当前评估基因表达模式的最常用方法^[13]. 用 DESeq(v1.10.1)软件包的负二项分布模型分析 *S. turcica* 对照样品和处理样品基因表达的差异^[14], 筛选阈值为 $\text{padj} < 0.05$.

1.7 GO 分类注释和 KEGG 注释富集分析

采用 GSeq(v1.10.0)软件包对差异表达的基因进行 GO 富集分析^[15], 并对基因长度偏好进行校正. GO 分析将校正 P 值小于 0.05 的基因归为差异表达. 采用 KOBAS(v2.0.12)软件对差异表达基因进行路径显著性富集分析^[16], 以 KEGG 途径为单位, 应用超几何检验, 找出差异基因相对于所有注释基因显著富集的路径.

2 结果分析

2.1 *B. amyloliquefaciens* 对 *S. turcica* 生长的抑制

B. amyloliquefaciens 和 *S. turcica* 在 PDA 培养基

上对峙培养 7 天, *B. amyloliquefaciens* 产生了抑菌圈, 明显抑制 *S. turcica* 菌落扩展(图 1). 这表明 *B. amyloliquefaciens* 产生了能够有效抑制 *S. turcica* 生长的代谢产物.

利用 *B. amyloliquefaciens* 发酵液处理 *S. turcica* 菌丝, 显微镜检发现, 在对照 PD 培养液中生长 4 天的 *S. turcica* 菌丝形态正常, 为有隔菌丝(图 2A), 而加入发酵液处理 12 h 后, *S. turcica* 菌丝膨大, 顶端为“气球状”, 直径 50~100 μ m(图 2B 和 C), 不能进一步延伸生长. 新生菌丝均变为“气球状”, 老化的菌丝的形态并未改变(图 2C). 这表明 *B. amyloliquefaciens* 产生的抑菌活性物质造成了 *S. turcica* 菌丝形态改变.

图 1 对照和处理条件下 *S. turcica* 菌落

图 2 对照和处理条件下 *S. turcica* 菌丝形态

A: 对照(CK); B 和 C: *B. amyloliquefaciens* 发酵液处理 12 h

另外, 100℃热处理 10 min 的发酵液与过滤处理的发酵液对 *S. turcica* 生长抑制率无显著差别(数据未显示), 表明抑菌活性物质具有较高的热稳定性, 并非蛋白类物质, 可能为芽孢杆菌环脂肽类, 具体成分有待进一步分离鉴定。

2.2 *S. turcica* 受 *B. amyloliquefaciens* 胁迫的基因表达特征

为了揭示 *S. turcica* 受到 *B. amyloliquefaciens* 胁迫后基因表达特征的变化, 本研究收集 *B. amyloliquefaciens* 发酵液处理 12 h 的 *S. turcica* 菌丝样品(St_D)和相同培养条件的未处理的 *S. turcica* 菌丝对照样品(St_CK), 分别提取总 RNA, 反转录成 cDNA, 构建文库后进行转录组测序。

比较发酵液处理和对照条件下 *S. turcica* 样品转录组的 FPKM 分布和 FPKM 密度分布发现, St_D 样品和 St_CK 样品的基因总体表达量在离散度和总体分布度上存在一定差异(图 3), 表明 *S. turcica* 在胁迫处理下, 部分基因的表达发生了改变。

St_CK 样品共检测到 16565 个基因表达, 而 St_D 样品共计 15594 个基因表达, 其中两个样品间共同表达的基因为 14208 个。St_CK 样品特异表达的基因为 2357 个, St_D 样品特异表达的基因为 1386 个(图 4)。按照差异显著性标准进行筛选, 统计基因显著性差异表达上、下调情况。相比 St_CK 样品, St_D 样品中

393 个基因差异表达显著, 其中 168 个基因上调表达, 225 个基因下调表达(图 5)。使用 GO 程序将差异基因按照其功能进行 GO 分类。在上调基因中, 参与 3-beta-hydroxy-delta5-类固醇脱氢酶活性、C21 类固醇类代谢、类固醇脱氢酶活性、氧化还原酶活性等的基因表达较显著(网络版附表 1)。类固醇主要包括胆固醇、羊毛固醇、谷甾醇、豆甾醇、麦角甾醇, 其中羊毛固醇和麦角固醇是细胞膜合成的主要组分。这意味着 *S. turcica* 可能通过增加细胞膜合成途径相关酶类基因的表达, 以应对 *B. amyloliquefaciens* 胁迫。下调表达基因主要参与蛋白异构化活性、核小体装配、染色体装配、核小体组织等过程(网络版附表 1)。

2.3 转录组差异表达基因比较分析

(1) *S. turcica* 细胞壁合成相关基因。芽孢杆菌环脂肽能够作用于真菌细胞壁, 抑制细胞壁合成, 造成细胞壁强度减弱, 细胞在内含物渗透压作用下形成“气球状”^[17]。本研究中 St_D 样品的菌丝变为“气球状”(图 2B 和 C), 表明 *S. turcica* 菌丝细胞壁受到了破坏, 可能与 *B. amyloliquefaciens* 分泌的环脂肽类抗菌物质有关。St_D 样品中上调表达的基因 *c17189_g1*($P=7.54 \times 10^{-7}$), 注释为视黄醇脱氢酶, 与葡聚糖合成相关(网络版附表 2)。该基因与酵母细胞壁合成蛋白亲缘关系较近, 参与酵母菌细胞壁 1-6-*D* 葡聚糖的生物合成^[18], 因此推测该基因可能参与 *S.*

图3 处理和对照样品的基因表达水平比对

A: FPKM 分布; B: FPKM 密度分布

图4 基因表达维恩图

每个圆圈中的数字之和代表该样品检测表达的基因总数, 圆圈交叠的部分表示在两个样品中检测均表达的基因

图5 基因差异表达分析火山图

散点代表各个基因, 蓝色圆点表示无显著性差异的基因, 红色圆点表示有显著性差异的上调基因, 绿色圆点表示有显著性差异的下调基因

turcica 菌丝细胞壁的合成. 上述结果表明, *S. turcica* 可能通过上调葡聚糖合成途径的基因, 提高葡聚糖或细胞壁的稳定性, 应对 *B. amyloliquefaciens* 环脂肽类抗菌物质的胁迫.

(2) *S. turcica* 细胞膜合成和稳定性相关基因. 麦角固醇是真菌细胞膜重要组成成分, 多种抗真菌药物的作用靶点是麦角固醇合成途径的酶类, 因此麦角固醇合成途径相关基因是本研究关注的重点. 在 St_D 样品中 *c17089_g1* 基因上调表达 ($P=3\times 10^{-4}$), 该基因与腐皮镰刀菌 (*Fusarium solani*) Delta(14)甾醇还原酶基因具有较高同源性 (网络版附表 2). Delta(14)甾醇还原酶具有甾醇 C-24 (28) 还原酶结构域, 属于麦角固醇生物合成基因 ERG4(ergosterol biosynthesis gene 4)/ERG24 家族蛋白^[19]. 该家族蛋白是麦角固醇生物合成途径的关键酶, 因此推测 *S. turcica* 的 Delta(14)甾醇还原酶在麦角固醇合成中起

着重要作用. 该基因上调表达, 可能是 *S. turcica* 通过调整细胞膜的流动性, 以抵抗芽孢杆菌环脂肽类抗菌物质的伤害作用.

脂肪酸与磷脂结合形成质膜的重要组成部分, 维持细胞膜的流动性. St_D 样品中与脂肪酸合成的 2 个相关基因 *c1609_g1* ($P=1.19\times 10^{-8}$) 和 *c1062_g1* ($P=2.64\times 10^{-5}$) 表达量显著升高 (网络版附表 1). *c1609_g1* 注释为脂肪酸合成酶 alpha 亚基与脂肪酸合成酶基因 FAS2(fatty acid synthetase)同源性较高; *c1062_g1* 为脂肪酸合成酶 beta 亚基, 与 FAS1 同源性较高. FAS1 和 FAS2 基因是酵母脂肪酸合成酶基因, 参与膜质的生物合成^[20]. 这两个基因在发酵液处理的 *S. turcica* 上调表达可能也是协同缓解芽孢杆菌环脂肽类抗菌物质对细胞膜的伤害. 此外, KEGG 注释的差异表达基因中参与脂肪酸合成途径的最显著 (rich_factor 为 0.086; Q 值为 0.093) (网络版附图 1). 这反映出脂肪酸可能在 *S. turcica* 抵抗芽孢杆菌环脂肽类抗菌物质伤害中起着重要作用.

(3) *S. turcica* 抗氧化胁迫类基因. 抗真菌药物两性霉素 B 能够对真菌细胞产生氧化性伤害, 导致真菌细胞死亡^[21]. 芽孢杆菌环脂肽作用机制类似于两性霉素 B, 因此 *S. turcica* 抗氧化作用的酶类也是关注的重点. *c13055_g1* 基因编码抗坏血酸过氧化物酶, *c41_g1* 基因与动物血红素过氧化物酶相似度高. 这两个基因上调表达, 其中 *c13055_g1* 基因在 St_D 样品表达量为 224.199 FPKM, 对照样品的表达量为 59.846 FPKM, 上调表达倍数为 1.906 ($P=5.32\times 10^{-12}$) (网络版附表 2). *c41_g1* 基因 St_D 样品表达量为 1644.413 FPKM, 对照样品的表达量为 698.721 FPKM, 上调表达倍数 1.235 ($P=0.001$). 这两个基因可能参与 *S. turcica* 抗氧化作用, 它们的上调表达是 *S. turcica* 消除自由氧胁迫作用的方式.

此外, 抗氧化胁迫的基因还包括谷胱甘肽结合反应和 ABC 转运器蛋白. St_D 样品中 *c7163_g1* 编码谷胱甘肽硫转移酶, 该基因显著上调表达 ($P=1.09\times 10^{-7}$). St_D 样品中显著上调表达的 ABC 转运器相关基因包括 *c4235_g1*, *c3878_g1*, *c9454_g1*, *c632_g1* 和 *c2212_g1* 编码 ABC 转运器蛋白 (网络版附表 2), *c4257_g1* 和 *c9284_g1* 编码 ABC-2 转运器蛋白, 其中 *c9284_g1*, *c632_g1* 和 *c4257_g1* 被 KOG 注释为多药抗性 PDR1-15 蛋白. ABC 转运器蛋白具有外排泵功能, 能够将有毒物质排出细胞外. 这些酶类具有

抗氧化和解毒作用. *S. turcica* 通过上调表达这些基因, 消除活性氧和解毒, ABC 转运器蛋白还能将环脂肽释放到细胞外, 进一步减轻芽孢杆菌环脂肽类抗菌物质对 *S. turcica* 菌丝细胞产生氧胁迫伤害.

(4) *S. turcica* 细胞凋亡相关基因. *B. amylo-liquefaciens* WH1 产生的脂肽 WH1fungin 低浓度下能够诱导真菌细胞凋亡^[22]. *S. turcica* 转录组中 12 个基因与细胞凋亡有关, 主要编码抗细胞凋亡转录因子、细胞凋亡阻遏蛋白、Bcl-2 修饰因子、细胞因子诱导抗凋亡抑制子等. 这些基因中仅 *c15392_g1* 显著下调表达($P=3\times10^{-4}$)(网络版附表 2), 其他基因表达差异不显著或表达量很低. *c15392_g1* 编码 Metacaspase-1, 具有半胱天冬酶结构域, 能够调节细胞凋亡. Metacaspase 在细胞凋亡中起着重要作用, 其活性降低, 能够抑制细胞凋亡, 保障细胞正常生长^[23]. *S. turcica* 下调该基因可能抑制环脂肽类抗菌物质诱导的真菌细胞凋亡, 以维持细胞正常的生长周期.

(5) *S. turcica* 对 *B. amyloliquefaciens* 胁迫的响应模式. *B. amyloliquefaciens* 对 *S. turcica* 胁迫影响包括抑制细胞壁、细胞膜合成, 破坏细胞膜稳定性, 并诱导产生活性氧造成细胞氧化伤害和导致细胞凋亡. 为了应对环脂肽类抗菌物质的逆境胁迫, *S. turcica* 也运用多种响应手段. 本研究综合 *S. turcica* 各类型基因表达状况, 绘制了响应模式图(图 6). 从图中可以看出, *S. turcica* 上调表达细胞壁组分蛋白(视黄醇脱氢酶)、麦角固醇合成途径酶(Delta(14)甾醇还原酶), 维持细胞壁和细胞膜正常合成. *S. turcica* 上调表达脂肪酸合成酶以应对芽孢杆菌抗菌物质对细胞膜的破

坏, 从而增加细胞膜流动性, 维持细胞的正常生理活性. 芽孢杆菌抗菌物质进入细胞后诱导产生活性氧(O_2^-), 对细胞造成伤害, 因此 *S. turcica* 大量表达抗坏血酸过氧化物酶和谷胱甘肽硫转移酶来消除活性氧, 减轻伤害. 同时, 上调表达的 ABC 转运蛋白也能在一定程度上缓解抗菌物质造成伤害, 并将抗菌物质运送出细胞外. *S. turcica* 下调表达 Metacaspase 以抑制芽孢杆菌抗菌物质诱导的细胞凋亡. 由此可见, *S. turcica* 通过调节相应基因的表达以响应芽孢杆菌环脂肽类抗菌物质的胁迫作用.

3 讨论

本研究利用转录组测序技术分析了 *S. turcica* 受到 *B. amyloliquefaciens* 胁迫后基因表达特征的变化. 从结果来看, *S. turcica* 通过改变 *B. amyloliquefaciens* 环脂肽类抗菌物质作用位点基因的表达来缓解或减轻胁迫伤害.

3.1 *S. turcica* 细胞壁和细胞膜相关基因的响应

芽孢杆菌抗菌物质包括环脂肽和其他脂肽类, 其抗真菌作用机理包括抑制细胞壁合成^[24]、抑制细胞膜合成^[25]、对细胞膜氧化伤害^[21]等. 芽孢杆菌环脂肽抑制真菌的 1,3- β -葡聚糖合成酶活性, 阻断细胞壁合成, 造成细胞壁破裂^[24]. 黑曲霉(*A. niger*)抗性菌株可通过上调表达 1,3- β -葡聚糖合成酶基因, 表达大量的葡聚糖合成酶来缓解卡泊芬净对其的毒害作用^[26]. 另外一个与细胞壁合成相关的基因 *c17189_g1* 在 *S. turcica* 中上调表达. 该基因与酵母菌细胞壁 1-6-D 葡聚糖的基因同源性高, 参与细胞壁生物合成^[18], 可能在缓解细胞壁伤害中起一定作用. 然而, 该基因的上调表达并未改变 *S. turcica* 细胞壁合成被抑制的状况, 导致菌丝高度畸形膨大. 这症状类似于纽莫康定对烟曲霉(*A. fumigatus*)菌丝造成的形态改变^[17], 但是本研究中 *S. turcica* 菌丝顶端为“气球状”, 并未出现烟曲霉菌丝顶端高度分枝化特征. 此外, *B. amyloliquefaciens* 产生的环脂肽造成立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)细胞壁胼质合成减少^[22], 也并未出现“气球”症状. 这种差别可能由于不同真菌对环脂肽类物质的响应机制不同或者真菌对芽孢杆菌环脂肽类抗菌物质的敏感性差异造成的.

麦角固醇是真菌细胞质膜的主要组成成分, 维

图 6 *S. turcica* 对 *B. amyloliquefaciens* 胁迫响应模式图

持细胞膜的流动性和渗透性^[27]。芽孢杆菌环脂肽具有生物表面活性剂和两亲特性,能够锚定在细胞膜脂质层,在一定剂量下破坏生物膜完整性^[28]。真菌可上调表达麦角固醇合成途径的某些基因来缓解抑制麦角固醇类抗真菌药物对细胞膜的伤害。烟曲霉(*A. fumigatus*)受到两性霉素 B 处理后,麦角固醇合成途径的 *ERG11* 基因上调表达^[29]。白色念珠菌(*Candida albicans*)上调表达麦角固醇合成途径的 *ERG16*, 念珠菌耐药性基因 *CDR1*(candida drug resistance)和多抗性基因 *MDR1*(multidrug resistance)的 mRNA,以抵抗唑类药物的抑制作用^[30]。本研究中, *S. turcica* 麦角固醇生物合成途径 *ERG4/ERG24* 家族蛋白 Delta(14)甾醇还原酶基因上调表达,可能是 *S. turcica* 努力维持细胞膜的合成,改善细胞膜的流动性,以缓解芽孢杆菌环脂肽类抗菌物质的毒害作用。这与他人研究结果较为一致。

芽孢杆菌环脂肽与细胞膜脂质层结合,破坏细胞膜结构,诱导真菌细胞膜通透性增加^[8,31]。*B. amyloliquefaciens* 产生的脂肽类物质 WH1fungin 高浓度时诱导真菌细胞膜产生孔洞,导致细胞内含物泄漏,导致真菌死亡^[22]。本研究并未发现 *S. turcica* 菌丝内含物泄漏,可能由于 *B. amyloliquefaciens* 发酵液浓度低,环脂肽类抗菌物质少,并未对 *S. turcica* 细胞膜造成孔洞。

高浓度脂肽可导致脂质双分子层完全破坏,细胞膜形成微团^[7],细胞膜失去流动性。某些真菌可通过上调表达脂肪酸合成途径的某些基因来维持细胞膜的流动性,以减轻细胞膜受到的伤害。黑曲霉(*A. niger*)受到拮抗微生物活性草酸杆菌(*Collimonas fungivorans*)胁迫后,上调表达 D9 硬脂酸去饱和酶基因,产生不饱和脂肪酸,提高细胞膜的流动性,减轻草酸杆菌产生的活性物质的伤害^[32]。St_D 样品中上调表达的 *c1609_g1* 和 *c1062_g1* 基因与脂肪酸合成酶同源,参与细胞膜质的生物合成。*S. turcica* 上调表达这两个基因可能缓解芽孢杆菌环脂肽类抗菌物质对细胞膜的伤害,维持细胞膜的流动性和完整性。这与黑曲霉抵抗机制类似。代谢途径富集分析发现参与脂肪酸合成途径的基因差异表达最显著(网络版附图 1),这表明 *S. turcica* 通过调整脂肪酸合成途径基因的表达来应对解芽孢杆菌环脂肽类抗菌物质的胁迫。

3.2 *S. turcica* 抗氧化和细胞凋亡相关基因的响应

两性霉素 B 能够对白色念珠菌细胞造成活性氧胁迫,从而抑制真菌生长^[21]。在卡泊芬净和丁苯吗啉胁迫下,黑曲霉上调表达抗氧化胁迫方面的基因,如谷氧还蛋白、ABC 转运器蛋白和谷胱甘肽硫转移酶,从而保护细胞免受活性氧的伤害^[26]。本研究中 St_D 样品中抗氧化相关基因上调表达,如抗坏血酸过氧化物酶基因(*c13055_g1*),谷胱甘肽硫转移酶基因(*c7163_g1*)和 ABC 转运器基因(*c4235_g1*, *c3878_g1*, *c9454_g1*, *c632_g1*, *c2212_g1*, *c4257_g1* 和 *c9284_g1*)等。这与 Sokol-Anderson 等人^[21]的结果较为一致。抗坏血酸过氧化物酶是生物抗氧化防御系统中重要的酶,消除自由氧对生物的伤害,在生物抗逆中起着重要作用^[33]。谷胱甘肽硫转移酶是一大类解毒酶,在真核生物抗药性和解毒方面起着重要作用^[34]。ABC 转运器蛋白在真菌抗药性、压力反应和细胞解毒方面具有重要功能^[35]。真菌的 ABC 转运器蛋白具有膜外排泵功能,能够将药物排到细胞外,提高抗药性^[36]。裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*)大量表达 ABC 转运器蛋白 *Pmd1p* 基因,显著增加对来普霉素 B 及其他真菌药物的抗性,而 *Pmd1p* 基因缺失突变体对药物敏感^[37]。*S. turcica* 上调这 3 类蛋白基因的表达,以缓解芽孢杆菌环脂肽类抗菌物质造成的氧胁迫伤害和其他方面的毒害作用,也说明芽孢杆菌环脂肽类抗菌物质对细胞膜造成过氧化伤害。

在弱酸、氧化、盐、药物和紫外线胁迫条件下,真菌细胞出现凋亡^[38]。Metacaspase 在真菌内广泛存在,与细胞凋亡有关,敲除该基因可抑制不同因素引起的细胞凋亡^[39]。白色念珠菌的 metacaspase 基因缺失后,氧胁迫诱导的细胞凋亡率降低,且细胞膜积累的内源活性氧浓度也降低^[40]。*B. amyloliquefaciens* 脂肽 WH1fungin 诱导真菌细胞凋亡^[22]。*S. turcica* 的 metacaspase 基因下调表达,可能在一定程度上抑制环脂肽类抗菌物质诱导的细胞凋亡,维持细胞的正常生命周期。活性氧积累也能导致细胞凋亡,因此抗氧化胁迫的酶类基因上调表达也会降低细胞内活性氧含量,从而减少细胞凋亡。

3.3 *S. turcica* 对芽孢杆菌环脂肽胁迫的响应模式

微生物在自然界中受到各种条件的胁迫。微生物通过改变基因表达来响应胁迫,缓解伤害。抗真菌

药物对真菌也是一种胁迫,对真菌造成的伤害是多方面的,而真菌抵抗药物胁迫机制也是复杂的.酿酒酵母(*S. cerevisiae*)的多抗药性由一个复杂的多基因网络控制,该网络由 Pdr1p 和 Pdr3p 转录因子调控,可激活多个蛋白,如 ABC 转运蛋白、主要协同转运蛋白超家族(major facilitator superfamily)透性酶、脂类代谢途径蛋白以及其他一些直接参与抗药性调控的蛋白^[41],通过钝化药物、外排药物或替换药物靶标等实现对药物的抗性.*S. turcica* 调节多个途径的多个基因表达来响应 *B. amyloliquefaciens* 发酵液中芽孢杆菌环脂肽类抗菌物质的胁迫,从而缓解或降低环脂肽类抗菌物质的毒害作用.这种模式类似于酿酒

酵母多药物抗性模式,可能是真菌抗药性普遍机制.目前,在农业生产中已经出现抗药性植物病原菌菌株,如灰葡萄孢^[42]、古巴假霜霉^[43]等.虽然目前未发现植物病原真菌对生防微生物的抗性报道,但在持续的生防微生物抑菌活性物质胁迫下,植物病原真菌可能在响应或缓解的基础上发展出对生防的抗性.鳞翅目昆虫对生防微生物苏云金杆菌(*B. thuringiensis*)抗性^[44]提示,应密切关注植物病原真菌对生防微生物的抗性发展.

本研究在转录组水平揭示的 *S. turcica* 对 *B. amyloliquefaciens* 胁迫的响应模式,将为后续进一步验证抗性相关基因的功能奠定基础.

参考文献

- Kontoyiannis D P, Lewis R E. Antifungal drug resistance of pathogenic fungi. *Lancet*, 2002, 9312: 1135–1144
- Finking R, Marahiel M A. Biosynthesis of nonribosomal peptides 1. *Annu Rev Microbiol*, 2004, 58: 453–488
- Idris E E, Bochow H, Ross H, et al. Use of *Bacillus Subtilis* as biocontrol agent. Vi. phytohormonelike action of culture filtrates prepared from plant growth-promoting *Bacillus Amyloliquefaciens* Fzb24, Fzb42, Fzb45 and *Bacillus Subtilis* Fzb37. *J Plant Dis Protect*, 2004, 6: 583–597
- Idriss E E, Makarewicz O, Farouk A, et al. Extracellular phytase activity of *Bacillus Amyloliquefaciens* Fzb45 contributes to its plant-growth-promoting effect. *Microbiology*, 2002, 7: 2097–2109
- Lisboa M P, Bonatto D, Bizani D, et al. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus Amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian Atlantic forest. *Int Microbiol*, 2010, 2: 111–118
- Nihorimbere V, Cawoy H, Seyer A, et al. Impact of rhizosphere factors on cyclic lipopeptide signature from the plant beneficial strain *Bacillus Amyloliquefaciens* S499. *FEMS Microbiol Ecol*, 2012, 1: 176–191
- Heerklotz H, Seelig J. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J*, 2007, 4–5: 305–314
- Bonmatin J-M, Laprévote O, Peypoux F. Diversity among microbial cyclic lipopeptides: iturins and surfactins. Activity-structure relationships to design new bioactive agents. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2003, 6: 541–556
- Deleu M, Paquot M, and Nylander T. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface-implications for the effect of fengycin on biological membranes. *J Colloid Interface Sci*, 2005, 2: 358–365
- 王梅娟, 李坡, 吴敏, 等. 玉米大斑病菌 *Atmt* 突变体库的构建及其分析. *中国农业科学*, 2012, 12: 2384–2392
- Grabherr M G, Haas B J, Yassour M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat Biotechnol*, 2011, 7: 644–652
- Anders S, Pyl P T, Huber W. HTSeq—a python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, 2015, 31:166–169
- Trapnell C, Williams B A, Pertea G, et al. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol*, 2010, 28: 511–515
- Anders S, Huber W. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol*, 2010, 10: R106
- Young M D, Wakefield M J, Smyth G K, et al. Method gene ontology analysis for RNA-Seq: accounting for selection bias. *Genome Biol*, 2010, 11: R14
- Xie C, Mao X, Huang J, et al. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39: W316–W322
- Kurtz M, Heath I, Marrinan J, et al. Morphological effects of lipopeptides against *Aspergillus Fumigatus* correlate with activities against (1, 3)-Beta-D-Glucan Synthase. *Antimicrob Agents Chemother*, 1994, 7: 1480–1489
- Meaden P, Hill K, Wagner J, et al. The yeast *Kre5* gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1-6)-Beta-D-glucan synthesis and normal cell growth. *Mol Cell Biol*, 1990, 6: 3013–3019

- 19 Santos A C, Lehmann R. Isoprenoids control germ cell migration downstream of HMGCoA reductase. *Dev Cell*, 2004, 2: 283–293
- 20 Schüller H, Hahn A, Tröster F, et al. Coordinate genetic control of yeast fatty acid synthase genes *FAS1* and *FAS2* by an upstream activation site common to genes involved in membrane lipid biosynthesis. *EMBO J*, 1992, 1: 107–114
- 21 Sokol-Anderson M L, Brajburg J, Medoff G. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida Albicans*. *J Infect Dis*, 1986, 1: 76–83
- 22 Qi G, Zhu F, Du P, et al. Lipopeptide induces apoptosis in fungal cells by a mitochondria-dependent pathway. *Peptides*, 2010, 11: 1978–1986
- 23 Hamann A, Brust D, Osiewacz H D. Apoptosis pathways in fungal growth, development and ageing. *Trends Microbiol*, 2008, 6: 276–283
- 24 Kurtz M, Douglas C. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. *Med Mycol*, 1997, 2: 79–86
- 25 Raaijmakers J M, De Bruijn I, Nybroe O, et al. Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics. *FEMS Microbiol Rev*, 2010, 6: 1037–1062
- 26 Meyer V, Damveld R A, Arentshorst M, et al. Survival in the presence of antifungals genome-wide expression profiling of *Aspergillus Niger* in response to sublethal concentrations of caspofungin and fenpropimorph. *J Biol Chem*, 2007, 45: 32935–32948
- 27 Nes W R, Sekula B C, Nes W D, et al. The functional importance of structural features of ergosterol in yeast. *J Biol Chem*, 1978, 17: 6218–6225
- 28 Carrillo C, Teruel J A, Aranda F J, et al. Molecular mechanism of membrane permeabilization by the peptide antibiotic surfactin. *Biochim Biophys Acta*, 2003, 1: 91–97
- 29 Gautam P, Shankar J, Madan T, et al. Proteomic and transcriptomic analysis of *Aspergillus Fumigatus* on exposure to amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*, 2008, 12: 4220–4227
- 30 White T C. Increased mRNA levels of ERG16, CDR, and MDR1 correlate with increases in azole resistance in *Candida Albicans* isolates from a patient infected with human immunodeficiency virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 1997, 7: 1482–1487
- 31 Hofemeister J, Conrad B, Adler B, et al. Genetic analysis of the biosynthesis of non-ribosomal peptide- and polyketide-like antibiotics, iron uptake and biofilm formation by *Bacillus Subtilis* A1/3. *Mol Genet Genomics*, 2004, 4: 363–378
- 32 Mela F, Fritsche K, de Boer W, et al. Dual transcriptional profiling of a bacterial/fungal confrontation: *Collimonas Fungivorans* Versus *Aspergillus Niger*. *ISME J*, 2011, 9: 1494–1504
- 33 Schomburg D, Salzmann M, Stephan D. L-ascorbate peroxidase, Volume 7. In: *Enzyme Handbook*. Berlin: Springer, 1994. 771–774
- 34 Jakoby W B. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1978, 46: 383–414
- 35 Wolfger H, Mamnun Y M, Kuchler K. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Res Microbiol*, 2001, 3: 375–389
- 36 Vanden B H, Dromer F, Improvisi I, et al. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Med Mycol*, 1997: 119–128
- 37 Nishi K, Yoshida M, Nishimura M, et al. A leptomycin B resistance gene of *Schizosaccharomyces pombe* encodes a protein similar to the mammalian P-glycoproteins. *Mol Microbiol*, 1992, 6: 761–769
- 38 Phillips A J, Sudbery I, Ramsdale M. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida Albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 24: 14327–14332
- 39 Madeo F, Herker E, Wissing S, et al. Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol*, 2004, 6: 655–660
- 40 Cao Y, Huang S, Dai B, et al. *Candidaalbicans* cells lacking CaMCA1-encoded metacaspase show resistance to oxidative stress-induced death and change in energy metabolism. *Fungal Genet Biol*, 2009, 2: 183–189
- 41 Le Crom S, Devaux F, Marc P, et al. New insights into the pleiotropic drug resistance network from genome-wide characterization of the *YRR1* transcription factor regulation system. *Mol Cell Biol*, 2002, 8: 2642–2649
- 42 Hahn M. The rising threat of fungicide resistance in plant pathogenic fungi: *Botrytis* as a case study. *J Chem Biol*, 2014, 4: 133–141
- 43 Blum M, Waldner M, Olaya G, et al. Resistance mechanism to carboxylic acid amide fungicides in the cucurbit downy mildew pathogen *Pseudoperonospora Cubensis*. *Pest Manag Sci*, 2011, 10: 1211–1214
- 44 Zago H B, Siqueira H Á, Pereira E J, et al. Resistance and behavioural response of *Plutella Xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) populations to *Bacillus thuringiensis* formulations. *Pest Manag Sci*, 2014, 3: 488–495

Comparative Transcriptome Analysis of *Setosphaeria turcica* Revealed its Responses Mechanisms to the Biological Control Agent *Bacillus amyloliquefaciens*

TIAN XueLiang^{1,2}, ZHANG Kai¹, WANG GuoLiang¹ & LIU WenDe¹

1 Institute of Plant Protection, CAAS, the State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Beijing 100193, China;

2 Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China

The mechanisms of biological control of plant diseases have been intensively studied; however, how plant pathogens respond to and resist or alleviate biocontrol agents remain largely unknown. In the present study, comparative transcriptome analysis was performed to elucidate how the northern corn leaf blight pathogen, *Setosphaeria turcica*, responds to and resists the biocontrol agent, *Bacillus amyloliquefaciens*. The results showed that, compared with the control sample of *S. turcica*, a total of 393 genes were differentially expressed in the sample of *S. turcica* that was treated with *B. amyloliquefaciens* fermentation broth. Among these genes, 168 were up-regulated and 225 were down-regulated. Further analysis indicates that various genes related to the fungal cell wall were significantly up-regulated, including (1-6)-beta-D glucan biosynthetic pathway genes, delta(14)-sterol reductase ergosterol biosynthesis pathway genes, fatty acid synthase genes, L-ascorbate peroxidase genes related to oxidative stress, glutathione S-transferase genes, and ABC transporter genes. In contrast, metacaspase genes that regulate apoptosis were significantly down-regulated. These results suggested that *S. turcica* recruit numerous genes to respond to or resist the biocontrol of *B. amyloliquefaciens*. The present study provides a valuable resource on the mechanisms of fungal pathogen resistance to biocontrol agents.

***Setosphaeria turcica*, *Bacillus amyloliquefaciens*, transcriptome analysis, biological control**

doi: 10.1360/N052016-00166