

高 骏, 史建荣. 基于高通量测序技术分析麝香草酚处理禾谷镰孢菌后转录组学的变化[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(6) :1257-1265.

doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.01.009

基于高通量测序技术分析麝香草酚处理禾谷镰孢菌后转录组学的变化

高 骏^{1,2,3}, 史建荣^{1,2,3}

(1. 江苏省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 江苏 南京 210014; 2. 省部共建国家重点实验室培育基地——江苏省食品质量安全重点实验室, 江苏 南京 210014; 3. 农业部农产品质量安全控制技术与标准重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 植物源化合物麝香草酚能够破坏禾谷镰孢菌细胞膜的完整性来抑制病原菌的生长,但其具体的作用靶标尚不明确。为发掘禾谷镰孢菌中麝香草酚潜在作用靶标,本研究以禾谷镰孢菌标准菌株(PH-1)为材料,采用新一代高通量测序技术 Illumina HiSeq 2000 对麝香草酚处理及未处理的禾谷镰孢菌进行转录组测序分析,利用生物信息学方法对差异表达基因的功能进行研究,同时利用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)技术对部分关键基因进行验证。结果表明,禾谷镰孢菌经过 50 μg/ml 麝香草酚处理 12 h 后,共检测到 1 477 个基因的表达量发生了变化,其中下调基因数目为 772 个,上调基因数目为 705 个。这些差异表达基因参与多种代谢途径,表明麝香草酚对禾谷镰孢菌的作用是一个多基因参与的协同调控过程。qRT-PCR 验证部分基因上调下调结果与转录组分析结果一致。本研究通过二代高通量转录组测序技术分析麝香草酚处理后禾谷镰孢菌的差异表达基因,为进一步揭示麝香草酚作用的分子机制,挖掘作用靶标提供基础资料。

关键词: 禾谷镰孢菌; 麝香草酚; 转录组; 高通量测序

中图分类号: S435.121.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)06-1257-09

Transcriptome analysis of *Fusarium graminearum* treated with thymol based on high-throughput sequencing technology

GAO Tao^{1,2,3}, SHI Jian-rong^{1,2,3}

(1. Institute of Food Safety and Nutrition, Jiangsu Academy of Agriculture Science, Nanjing 210014, China; 2. Key Lab of Food Quality and Safety of Jiangsu Province-State Key Laboratory Breeding Base, Nanjing 210014, China; 3. Key Laboratory of Control Technology and Standard for Agro-product Safety and Quality, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

Abstract: Thymol is a kind of phytochemicals, which has antifungal activity against *Fusarium graminearum* by destroying the integrity of cell membrane. However, the specific targets of thymol are not known. In order to define the potential targets of thymol, a new generation of high-throughput sequencing technology Illumina HiSeq 2000 was used for transcriptome sequencing of *F. graminearum* treated with thymol, and bioinformatic methods were used for gene function prediction, then the expression of some important genes was monitored by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). By transcriptome

sequencing, it was found that there were 1 477 differentially expressed genes including 705 up-regulated and 772 down-regulated genes when *F. graminearum* strain PH-1 was treated with thymol. These differentially expressed genes were involved in multiple metabolic pathways, indicating that the effect of thymol on *F. graminea-*

收稿日期:2017-06-12

基金项目:国家自然科学基金项目(21501692)

作者简介:高 骏(1988-),女,江苏盐城人,博士,助理研究员,主要从事植物病理学研究。(E-mail)18551694895@163.com

通讯作者:史建荣,(Tel)025-84391613;(E-mail)jianrong63@126.com

rum was a coordination process. Expression of some genes validated by qRT-PCR was consistent with transcriptome analysis. In this study, the second generation of high-throughput transcriptome sequencing technology was used to research the related genes of *F. graminearum* treated with thymol, which provided theoretical foundation for revealing the molecular mechanism of thymol.

Key words: *Fusarium graminearum*; thymol; transcriptome; high-throughput sequencing technology

由禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)引起的小麦赤霉病是世界范围内广泛发生的一种重要病害。小麦赤霉病发生之后引起小麦减产,严重时造成颗粒无收^[1]。种植抗病的小麦品种是最有效的防治手段,但目前尚未开发出可以商业化种植的抗病品种^[2-3],因此,对于小麦赤霉病的防治主要采取以苯并咪唑类和三唑类杀菌剂为主的化学药剂进行防治^[4-5]。随着化学药剂的广泛使用,禾谷镰孢菌的抗药性问题也日益凸显^[6-7]。此外,长期使用化学药剂引起的高毒性残留对环境和人类健康构成潜在风险。因此,筛选新型、高效、安全的杀菌剂用于防治小麦赤霉病就显得尤为重要。

麝香草酚(5-甲基-2-异丙基酚),别名百里酚,是一种天然的单萜酚,主要发现于百里香、牛至和陈皮中,是百里香属植物挥发油的主要成分^[8]。麝香草酚具有防腐性,且毒性低于苯酚,具有药用价值,其针对病原微生物的研究成果在医药领域应用较为广泛^[9]。已有研究表明,不管是在体内还是体外,麝香草酚均具备抗菌消炎的作用^[10]。美国食品和药物管理局(FDA)已将麝香草酚列为食品添加剂^[11]。麝香草酚还可作为抗氧化剂和防腐剂,抑制水果蔬菜贮藏期间微生物的生长,减少腐烂^[12-14]。张静等^[15]利用麝香草酚处理不同分类地位的10种重要植物病原菌,发现该物质对病原菌的菌丝生长均有一定的抑制作用,前期研究发现,麝香草酚能够破坏细胞膜的完整性进而达到抑菌的作用^[16-18]。Gao等^[19]研究发现,麝香草酚能够破坏禾谷镰孢菌细胞膜的完整性,抑制病原菌的生长,但麝香草酚的具体抑菌机制尚不明确。

新一代高通量测序技术已经广泛应用于转录组的研究(即RNA-Seq),其数据几乎涵盖了特定组织和特定时期的所有转录本^[20],因而可以成为研究病原菌响应麝香草酚处理后差异表达基因变化的重要手段。尽管禾谷镰孢菌基因组序列不全给差异表达基因的注释带来一定困难,但所获得的表达谱信息能够真实反映禾谷镰孢菌胁迫响应调控网络机制。

因此,本研究利用RNA-Seq技术对麝香草酚处理前后的禾谷镰孢菌进行转录组测序,鉴定禾谷镰孢菌响应麝香草酚胁迫的应答基因,分别对差异表达基因进行GO和KEGG注释和富集分析,从转录组水平揭示麝香草酚的作用途径,挖掘麝香草酚的潜在作用靶标,为后续确定麝香草酚的作用机制研究提供良好的基因组学研究平台。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试菌株:禾谷镰孢菌标准菌株PH-1。

供试药剂:99.5%麝香草酚(德国产,南京市恒鑫化工有限公司进口分装)溶于无水乙醇配成100 mg/L母液,4℃保存备用。试剂盒:RNA simple 总RNA提取试剂盒(天根,DP419)用于提取总RNA, Oligod(T)磁珠试剂盒(Wawasye,NA0101)用于纯化分离mRNA。逆转录酶(Invitrogen,18064014)用于反转mRNA获得cDNA第一链,FAST qPCR Kit Master Mix (2X) ABI Prism™试剂盒(KAPA Biosystems, KK4604)合成双链DNA, TruSeq RNA Sample Prepraton Kits (Illumina, RS-122-2001)用于制备RNA测序文库, Agencourt AMPure XP (BECKMAN, A63881)用于测序文库制备过程中的纯化, FlashGel DNA Cassette 2.2%, 12 + 1well, single tier (Lonza, 57023)用于检测文库的大小和纯度, PrimeScript™ RT反转试剂盒(TaKaRa, DRR037A)用于RNA反转成cDNA, SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, DRR820A)用于实时荧光定量PCR。

1.2 试验方法

1.2.1 RNA提取 收集禾谷镰孢菌菌丝,以50 μg/ml麝香草酚处理12 h的禾谷镰孢菌菌丝为处理组,以不加麝香草酚处理的禾谷镰孢菌菌丝为对照组。用真菌RNA提取试剂盒提取这2个样本的禾谷镰孢菌RNA,经电泳检测后用微量紫外分光光度计(Thermo, NanoDrop 1 000)检测其浓度和纯度。

1.2.2 测序文库构建与测序 提取样品总RNA

后,使用 Oligod(T)磁珠试剂盒对 mRNA 进行分离,去除 DNA。随后在高温条件下,利用二价阳离子(Mg^{2+})将 mRNA 打断以选择大小合适的目的片段。使用逆转录酶,根据表 1 中第一步的反应体系和反应程序,使打断的 mRNA 反转录形成 cDNA 第一链,随后以第一链 cDNA 为模板,根据表 1 中第二步的反应体系和反应程序,合成第二链 DNA。根据表 1 中第三步、第四步、第五步、第六步的反应体系和反应程序对反转录合成的双链 cDNA 进行末端修

复,3'末端加 A、连接接头以及富集纯化,每步反应结束后都需要使用 Agencourt AMPure XP 试剂盒进行纯化。

使用 Qubit © 2.0 荧光定量仪 (Invitrogen, Q32872), Qubit™ dsDNA HS Assay Kits (Invitrogen, Q32851) 试剂盒检测文库的浓度,将每个文库摩尔浓度统一调整到 2 nmol/L。FlashGel Dock 系统结合 FlashGel DNA Cassette 检测文库的大小和纯度,随后使用 Illumina HiSeq™ 2000 测序仪进行测序。

表 1 PCR 反应体系及程序

Table 1 PCR reaction system and reaction program

试验操作	试剂	体积(μ l)	PCR 反应程序
第一步	mRNA	17.0	25 °C, 10 min; 42 °C, 50 min;
	First Strand Master Mix(FSM)	7.0	70 °C, 15 min; 4 °C 保存
	Superscript II	1.0	
第二步	First Strand cDNA	25.0	16 °C, 1 h
	Second Strand Master Mix	25.0	
第三步	ds cDNA	50.0	30 °C, 30 min
	Resuspension Buffer	10.0	
	End Repair Mix	40.0	
第四步	A-Tailing Control	2.5	37 °C, 30 min
	A-Tailing Mix	12.5	
	End Repaired DNA	15.0	
第五步	Adenylate 3'Ends DNA	30.0	30 °C, 10 min
	DNA Ligase Mix	2.5	
	Resuspension Buffer	2.5	
	RNA Adapter Index(AR001-AR012) Mix	2.5	
第六步	PCR Primer Cocktail	5.0	98 °C, 30 s; 15 个循环: 98 °C, 10 s; 60 °C, 30 s;
	PCR Master Mix	25.0	72 °C, 30 s; 72 °C, 5 min; 4 °C 保存
	Adaptor Ligated DNA	20.0	
反转 PCR	5 × PrimeScript™ Buffer	2.0	37 °C, 15 min; 85 °C, 5 s 4 °C 保存
	PrimeScript™ RT Enzyme Mix I	0.5	
	Oligo dT Primer (50 μ mol/L)	0.5	
	Random 6 mers (100 μ mol/L)	0.5	
	total RNA	2.0	
	RNase Free dH ₂ O	4.5	
实时荧光定量	SYBR © Premix <i>Ex Taq</i> ™ II	12.5	95 °C, 30 s;
	PCR Forward Primer	1.0	40 个循环: 95 °C, 5 s; 60 °C, 30 s;
	PCR Reverse Primer	1.0	分离阶段: 95 °C, 15 s; 60 °C, 30 s; 95 °C, 15 s
	cDNA	2.0	
	dH ₂ O	8.5	

1.2.3 数据的过滤及组装 将测序所得的原始数据 raw reads 或 raw data 进行质控(QC)过滤,步骤如下:(1)去除含 adaptor 的 reads;(2)去除含 N(表示无法确定碱基信息)比例大于 10%的 reads;(3)去除低质量 reads(质量值 $Q \leq 10$ 的碱基数占整个 read 的 50%以上),得到有效的 Clean reads 用于后续分析。随后利用 Trinity (version 2.0.6) 软件(参数设置:Trinity.pl --seqType fq --JM 50G --left reads_1.fq --right reads_2.fq --SS_lib_type FR-output transcriptome_tissue --CPU 24 --jaccard_clip --inchworm_cpu 24 --group_pairs_distance 500 --bflyCPU 24)对所得到的 Clean reads 进行拼接和组装,通过序列之间的 overlap 信息组装得到重叠群(Contig),然后以两端测序末端片段(paired-end reads),比对已知参考序列禾谷镰孢菌 PH-1 基因组(ASM24013v3https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000240135.3)进行组装,最后得到单基因簇(unigenes)^[21]。

1.2.4 功能注释、分类和代谢途径分析 采用序列比对的方法对 Unigene 进行序列相似性分析,使用 BLASTP 将拼接得到的 Unigene(将核酸序列翻译成蛋白序列)与 NCBI 蛋白质数据库进行比对(E 值 $\leq 1 \times 10^{-5}$),选取最佳的功能注释。蛋白质数据库包括 NCBI 的非冗余核酸数据库(Non-redundant protein database, Nr)和 SwissProt 蛋白质序列数据库。根据 NCBI 数据库的功能注释信息,使用 Blast2 GO 软件(version 2.8.0)(参数设置:java --jar blast2go.jar --in alignment_result.xml --a -v --out annot_result)得到 Unigene 的 GO(Gene Ontology)条目,然后用 WEGO 软件(<http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl>)对所有的 Unigene 进行 GO 功能分类统计^[22-23]。然后对 Unigene 分别进行蛋白质直系同源数据库(Eukaryotic Orthologous Groups of Proteins, KOG)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG>)功能分类和东京基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)(<http://www.kegg.jp/>)代谢途径分析^[24-25]。

1.2.5 差异基因筛选 基因的表达水平通过

RSEM 软件(<http://deweylab.biostat.wisc.edu/rsem/README.html#usage>)计算 FPKM(每 1 百万个 map 上的 reads 中 map 到外显子的每 1×10^3 个碱基上的 reads 个数)。对 2 个样本的基因表达进行差异分析,旨在找出样本间差异表达的基因(Differentially expressed genes, DEGs),并对差异表达基因做后续更深入的功能挖掘。分别计算在对照样品中的平均表达量 Control-avg,处理样品中的平均表达量 Treat-avg,得到该基因的差异倍数,计算公式为: $M = \lg_2[(\text{Control-avg}) / (\text{Treat-avg})]$,按照差异倍数 ≥ 2 的标准筛选差异表达基因。

1.2.6 荧光实时定量 PCR(qRT-PCR) 分别提取处理组和对照组的禾谷镰孢菌 RNA,利用 TaKaRa PrimeScript TM RT 试剂盒反转录得到 cDNA,反转体系及程序见表 1,以 cDNA 为模板进行实时定量 PCR 反应,定量体系及程序见表 1。所用引物见表 2。所有获得的数据以 GAPDH 基因(编号 FG06257.1)进行校准,目的基因的相对表达水平利用 ABI7500 SDS 分析软件生成。每个处理设置 4 个重复,所有试验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 转录组数据的产出与质量监控

采用 Illumina HiSeq 2000 高通量测序技术对禾谷镰孢菌对照组(PH-1)以及麝香草酚处理组(Thymol)转录组进行测序,获得对照组 PH-1 基因组的 clean reads 为 44 690 272,约占总 reads 数的 98.4%;获得麝香草酚(Thymol)处理组 PH-1 基因组的 clean reads 为 44 477 690,约占总 reads 数的 97.93%。将 clean reads 与所选的参考序列进行比对,并统计 reads 与每一个参考序列的比对结果,如表 3 所示:PH-1 样本测序完后的 clean reads 中近 89.08%能比对上参考基因组,10.92%的 clean reads 未能比对到对应的基因;Thymol 样本测序完后的 clean reads 中近 88.34%可比对到参考基因组,11.66%测序完后的 clean reads 未能比对到对应的基因。比对结果说明本次测序情况较为理想,适合后面的深度分析。

表 2 本试验所用引物

Table 2 Primers used in this study

基因 ID	上游引物 (5'→3')	下游引物 (5'→3')
FGSG_07589	CAAGATCCTACCACAGCAGAAG	CTTCTGGATACCAGGCAGATTAG
FGSG_02231	CCATTGTTGTCGAGGCTATCA	GGCCTTGTAGTTGCCGATAA
FGSG_04693	GTGGACACGCCTGGATATTT	GAAATGGGAGGACGAAAGAGTAG
FGSG_03219	CTGGTGCAATCCTGCAAATC	GCGCAACAGCCCAATAATAC
FGSG_13887	TGGGAATACAAGATGGCAGAG	TGCGCATGAGAGTGTGATATAG
FGSG_07177	CTTCCAACGAGAGCAGTTACA	GCAAGGATAGAGGAGGAGATAGA
FGSG_04092	GCCAGCACTCTTCATCTTCT	CCTGGTAGAGTTCTTCGGTAATG
FGSG_05740	CAGGAGAGAACCGACAACATATG	CGCAAAGCGACAGAAATGAA
FGSG_03686	CAGCAAGTGAAGCAAACAAGAG	GCGAGATGTAGTCACCAAAGAA
FGSG_13888	GAAAGTTGTCCAAGGGAGAGAT	TCGGTAAAGTTGGCGACATAG
FGSG_01000	CACCTTTATCCTCCTCGGAAAAG	CTCAGCACACACATCCTTGA
FGSG_02502	CACCTTTATCCTCCTCGGAAAAG	CTCAGCACACACATCCTTGA
FGSG_04994	CCGCGCTCTCGTATTACTTT	CGAAGAACTGGACTGGATCTC
FGSG_11024	ATCGTCCACCCGTTGTATTC	AGCAGTCGCCGTATTTATCTC
FGSG_01959	GACCATCTTCACCTTCCTCTTC	CGGATCTTGATGTTCTCCTCTC
FGSG_04731	GCTCGGAGTACTTGGCTTATTT	CTCTGGTCTGGGTTGCATAAAC
FGSG_01526	CGACACTGCATCGGGTAAA	CCGTCAAATCCCTTCTGGATAG
FGSG_01388	CAGCACTCCTGCAATCAAATC	GAATGTCTACGGTGAGTCTTGG
FGSG_03882	ACCGCCACACACTATAAC	CACAGCTCCTTTGGACTAGAAG
FGSG_06257	CTTACTGCCTCCACCAACTG	TGACGTTGGAAGGAGCGAAG

表 3 样品序列与禾谷镰孢菌参考基因组比对分析

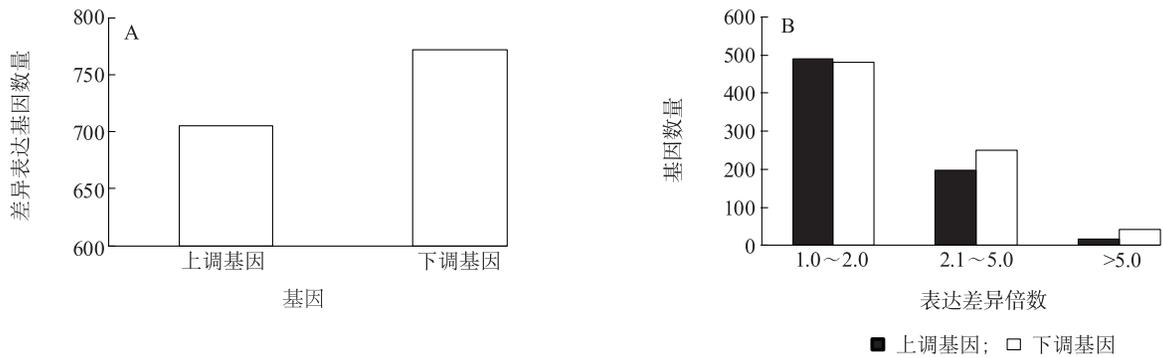
Table 3 Sequence comparison of samples against *F. graminearum* reference genome

Read 分类	对照样本	麝香草酚处理样本
reads 的干净序列数	44 690 272	44 477 690
Clean reads 数与总 reads 数比 (%)	98.40	97.93
匹配上基因组的总 reads 数比 (%)	89.08	88.34
完全匹配序列数比 (%)	72.81	71.97
错配数小于并等于 2 的 reads 数比 (%)	16.27	16.37
特异匹配的序列数比 (%)	88.88	87.94
多位点匹配序列数比 (%)	0.20	0.40
未匹配的总 reads 序列数比 (%)	10.92	11.66

2.2 麝香草酚处理后的差异表达基因分析

分析对照组样品与处理组样品的转录组差

异,以差异检验 FDR 值 ≤ 0.001 且差异倍数不低于 2 倍为差异表达基因,发现 50 $\mu\text{g/ml}$ 麝香草酚处理禾谷镰孢菌后,共检测到 1 477 个基因的表达量发生了显著变化,其中下调基因数目为 772 个,上调基因个数为 705 个(图 1A)。表达量变化在 5 倍以内的基因占差异表达基因总数的 96.07%。其中,表达量变化 1.0~2.0 倍的基因占总数的 65.75%,上调基因占 33.18%,下调基因占 32.57%;表达量变化 2.1~5.0 倍的基因占总数的 30.34%,上调基因占 13.41%,下调基因占 16.93%。表达量在 5 倍以上的基因共有 58 个,其中上调基因 17 个,下调基因 41 个(图 1B)。相比而言,麝香草酚处理禾谷镰孢菌后,表达量变化在 5 倍以上的上调基因与下调基因的数量相当,而表达量变化在 5 倍以上的基因中下调基因数量明显高于上调基因数量。



A: 差异基因数量统计; B: 差异基因表达倍数分布统计。

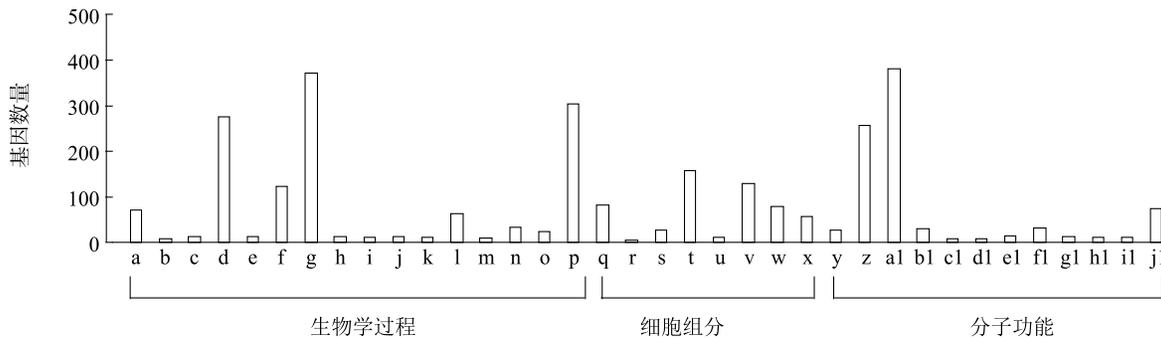
图1 麝香草酚处理后禾谷镰孢菌差异表达基因分布及统计分析

Fig.1 Distribution and statistical analysis of differentially expressed genes treated with thymol

2.3 差异表达基因的 GO 功能显著性富集分析

结合 GO 数据库对差异表达基因进行功能分类,结果(图2)显示,在细胞组分分类信息中,参与细胞膜组分的分类条目富集较为显著;在分子功能

分类的信息中,具备催化活性功能及结合蛋白功能的分类条目富集较为显著;在生物学过程的分类信息中,分类条目较为富集的蛋白主要参与了细胞进程、细胞代谢以及信号传导的过程。



a: 生物调节; b: 细胞死亡; c: 细胞组件; d: 细胞进程; e: 生长进程; f: 细胞定位; g: 代谢过程; h: 多细胞生物进程; i: 多细胞机体进程; j: 生物进程负调控; k: 生物进程正调控; l: 生物进程调控; m: 繁殖; n: 应激反应; o: 信号传导; p: 信号有机体进程; q: 细胞组分; r: 细胞外组分; s: 大分子组分; t: 细胞膜; u: 细胞膜附着调控原件; v: 细胞膜组分; w: 细胞器; x: 细胞器组分; y: 抗氧化活性; z: 细胞结合; a1: 催化活性; b1: 电子载体活性; c1: 酶调控活性; d1: 鸟嘌呤核苷酸交换组件; e1: 分子转运活性; f1: 核酸结合转录因子活性; g1: 营养储存活性; h1: 蛋白质结合转录因子活性; i1: 受体结合活性; j1: 转运活性。

图2 麝香草酚处理后差异表达基因的 GO 分类

Fig.2 GO categories of differentially expressed genes treated with thymol

2.4 差异表达基因的 Pathway 显著性富集分析

对差异表达基因的 Pathway 显著性富集分析,能够更进一步了解基因的相关生物学功能。通过对处理组样品与对照组样品的 Pathway 显著性富集,发现差异表达基因分布在 95 个分类途径中。排名前 20 的显著性差异表达基因富集途径如表 4 所示,这些差异表达基因广泛涉及次生代谢、代谢途径、氨基酸代谢、糖酵解、ABC 转运蛋白及丙酮酸代谢等。

2.5 甾醇类代谢差异表达基因分析

根据差异表达基因的 Pathway 显著性富集分析

发现,麝香草酚处理后,禾谷镰孢菌多个代谢途径的基因表达发生变化。在实验室的前期研究中发现,麝香草酚能够破坏禾谷镰孢菌细胞膜的完整性,进而达到抑菌作用^[19]。真菌细胞质膜的重要组分为麦角甾醇(Ergosterol),它对于维持真菌细胞膜的流动性、完整性以及膜上的一些蛋白功能的正常行使作用很大^[26]。禾谷镰孢菌经过麝香草酚处理后,有 16 个甾醇合成代谢相关基因表达出现差异,其中表达量上调的基因有 6 个,表达量下调的基因有 10 个,且差异表达基因的下调倍数显著高于上调倍数(表 5)。

表 4 麝香草酚处理后差异表达基因富集程度排名前 20 的 Pathway 条目

Table 4 Top 20 enrichment degree pathways of differentially expressed genes under the treatment of thymol

路径	差异表达基因数及所占比例	路径编号
代谢路径	284 (36.69%)	ko01100
次生代谢物质合成	135 (17.44%)	ko01110
酪氨酸代谢	30 (3.88%)	ko00350
氨基糖和核苷酸糖代谢	27 (3.49%)	ko00520
丁酸甲酯代谢	27 (3.49%)	ko00650
脂肪酸代谢	26 (3.36%)	ko00071
色氨酸代谢	25 (3.23%)	ko00380
糖酵解	24 (2.70%)	ko00010
氮代谢	20 (2.58%)	ko00910
缬氨酸,亮氨酸及异亮氨酸降解	19 (2.45%)	ko00280
甘氨酸,丝氨酸及苏氨酸代谢	19 (2.45%)	ko00260
甘油磷脂代谢	18 (2.33%)	ko00564
嘌呤代谢	18 (2.33%)	ko00230
丙氨酸,天冬氨酸及谷氨酸代谢	17 (2.20%)	ko00250
甲烷代谢	17 (2.20%)	ko00680
ABC 转运蛋白	17 (2.20%)	ko02010
丙酸代谢	16 (2.07%)	ko00640
甾醇类生物合成	16 (2.07%)	ko00100
丙酮酸代谢	15 (1.94%)	ko00620

表 5 麝香草酚处理后甾醇类代谢差异表达基因

Table 5 Expression level of sterol metabolism genes under the treatment of thymol

基因	lg2 比值
FGSG_07589	2.818 553 129
FGSG_04693	2.215 411 745
FGSG_02231	1.693 200 002
FGSG_03219	1.623 457 601
FGSG_13887	1.327 995 642
FGSG_07177	1.190 188 070
FGSG_04092	-6.577 719 313
FGSG_05740	-5.446 063 123
FGSG_03686	-5.403 548 744
FGSG_13888	-3.353 771 553
FGSG_01000	-2.860 567 847
FGSG_02502	-2.237 181 534
FGSG_04994	-2.086 342 823
FGSG_11024	-1.955 092 839
FGSG_01959	-1.486 080 474
FGSG_04731	-1.297 604 842

2.6 差异表达基因的 qRT-PCR 分析

对甾醇类代谢的 16 个差异表达基因进行 qRT-PCR 验证,以禾谷镰孢菌 *GAPDH* 为内参。由图 3 可知,这 16 个基因在麝香草酚处理后发生不同程度的表达,尽管 qRT-PCR 分析得到的表达差异倍数与表达谱分析的表达差异倍数不一致,但胁迫诱导表达的变化趋势相同,说明基因表达谱的分析结果是可靠的。

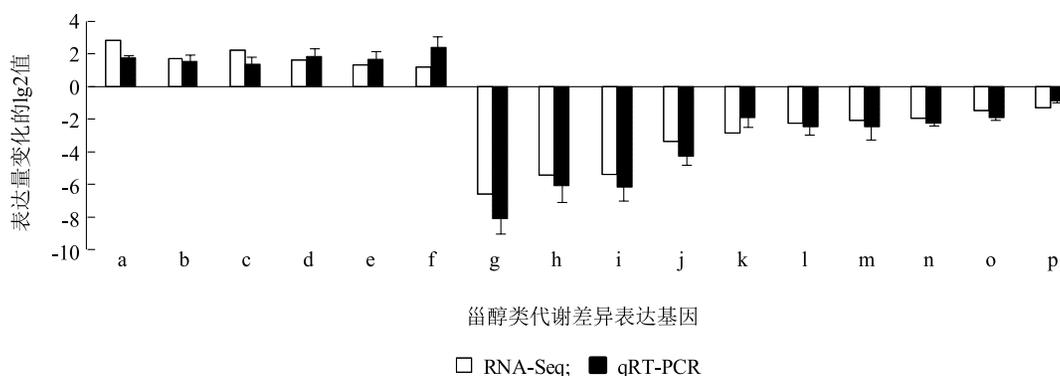
3 讨论

一般来说,药物分子可以特异性结合靶标蛋白,从而实现其生物学功能^[27],基因敲除是用于发现并鉴定药物靶标的主要方法。丝状真菌禾谷镰孢菌全基因组序列的可利用性,使得基因敲除成为研究基因功能或修改细胞表型最有力的工具之一。但是,需要进行更多的工作来明确病原菌中哪些基因是杀菌剂的作用靶标,而病原菌转录组测序的目的就是筛选出相关基因并进一步研究。生物体中的转录组将基因组遗传信息与生物功能的蛋白质组信息连接起来^[28],对转录组的研究目前已经广泛应用于基础研究、医学诊断及试剂研发等领域。通过新一代高通量测序技术,转录组测序能够全面快速地获得某一物种特定组织和器官在特定状态下的几乎所有转录本序列信息,为分子生物学的研究开辟了新的途径。本研究采用高通量转录组测序平台 Illumina Hiseq 2000,对麝香草酚处理及未处理的禾谷镰孢菌转录组进行测序和功能分析,2 个样本测序后的 clean reads 均有 80% 以上能够与参考序列进行匹配,随后利用 KOG、GO、KEGG 等数据库对样本中的差异表达基因进行功能预测,qRT-PCR 验证结果中甾醇类差异表达基因上调下调趋势与转录组分析结果一致。这些结果为进一步研究麝香草酚对禾谷镰孢菌的作用途径及作用靶标等方面提供基础依据。

植物源酚类化合物具备较强的疏水性,可以破坏细胞膜的完整性,导致膜内物质渗透,进而影响细胞的生长^[29]。钟少枢等^[30]采用麝香草酚等 7 种单离食用香料对食品腐败菌的抑菌活性进行了研究,结果表明麝香草酚对细菌、霉菌和酵母菌均具有一定的抑制能力。鉴于麝香草酚高安全性及广谱抑菌性的特点,若能将其开发成为农业上应用的新型生物农药,可能会有巨大的应用潜力。在酵母细胞中,使用 64~500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度的麝香草酚处理后,发现细胞膜受到了破坏^[31]。Chauhan 等的研究结果表明麝香草酚在 750

$\mu\text{g/ml}$ 的浓度下能够破坏沙门氏菌的细胞膜^[32];同时本实验室前期研究也发现麝香草酚能够破坏禾谷镰孢

菌细胞膜的完整性,抑制禾谷镰孢菌的生长^[19]。这就表明麝香草酚的作用机制应与病原菌的细胞膜有关。



a: *FGSG_07589*; b: *FGSG_02231*; c: *FGSG_04693*; d: *FGSG_03219*; e: *FGSG_13887*; f: *FGSG_07177*; g: *FGSG_04092*; h: *FGSG_05740*; i: *FGSG_03686*; j: *FGSG_13888*; k: *FGSG_01000*; l: *FGSG_02502*; m: *FGSG_04994*; n: *FGSG_11024*; o: *FGSG_01959*; p: *FGSG_04731*。

图3 差异表达基因的qRT-PCR验证

Fig.3 Validation of differentially expressed genes by qRT-PCR

本研究发现,经过药剂处理后,禾谷镰孢菌中多个代谢途径发生变化,其中差异表达基因主要富集在氨基酸代谢、丙酮酸代谢、糖酵解、ABC转运及甾醇类生物合成等过程。当真菌受到外来药物作用时,ABC转运蛋白可以将有毒有害物质运输至细胞外,保护真菌细胞的生长^[33]。麦角甾醇是真菌细胞质膜的重要组成成分,对细胞膜流动性、完整性以及膜蛋白功能的维持有很重要的作用^[34],所以甾醇类生物合成代谢过程中基因表达的变化会直接导致病原菌细胞膜的完整性受到破坏。而糖酵解、丙酮酸代谢过程中基因表达的变化也会引起细胞膜受到破坏,例如丙酮酸代谢的中间产物乙酰CoA是麦角甾醇的合成前体,能够影响麦角甾醇的形成进而引起细胞膜的变化,但麝香草酚具体通过何种途径影响禾谷镰孢菌细胞膜的完整性,它的实际作用靶标是什么还需要对差异表达基因进行进一步的研究。

本研究通过对50 $\mu\text{g/ml}$ 麝香草酚处理组和不加麝香草酚处理组这2个样本进行高通量转录组测序,分别获得44 477 690个clean reads以及44 690 272个clean reads。分析2个样本间的差异表达基因,发现有1 477个基因表达量发生了变化,其中下调基因数目为772个,占总差异基因的52.27%,上调基因数目为705个,占总差异基因的47.73%,这些差异表达基因参与多种代谢途径。结果说明,麝香草酚处理调控了禾谷镰孢菌的生理生化代谢过程,影响禾谷镰孢菌的生长。本研究为进一步揭示麝香草酚作用的分子

机制,挖掘作用靶标提供了参考。

参考文献:

- [1] STARKEY D E, WARD T J, AOKI T, et al. Global molecular surveillance reveals novel *Fusarium* head blight species and trichothecene toxin diversity [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2007, 44(11): 1191-1204.
- [2] 陈士强,陈秀兰,张容,等.小麦赤霉病抗性与其株高的相关性研究[J].*江苏农业科学*,2015,43(12):144-147.
- [3] DE ACKERMANN M D, KOHIL M M. Chemical control of *Fusarium* head blight of wheat [M]. //ALCONADA-MAGLIANO T M, CHULZE S N. *Fusarium* Head Blight in Latin America. Dordrecht: Springer Netherlands, 2013: 175-189.
- [4] LIU N, FAN F, QIU D, et al. The transcription cofactor FgSwi6 plays a role in growth and development, carbendazim sensitivity, cellulose utilization, lithium tolerance, deoxynivalenol production and virulence in the filamentous fungus *Fusarium graminearum* [J]. *Fungal Genetics and Biology*, 2013, 58: 42-52.
- [5] SUN H Y, ZHU Y F, LIU Y Y, et al. Evaluation of tebuconazole for the management of *Fusarium* head blight in China [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2014, 43(6): 631-638.
- [6] DUAN Y, ZHANG X, GE C, et al. Development and application of loop-mediated isothermal amplification for detection of the F167Y mutation of carbendazim-resistant isolates in *Fusarium graminearum* [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 7094.
- [7] HOU Y, LUO Q, CHEN C, et al. Application of tetra primer ARMS-PCR approach for detection of *Fusarium graminearum* genotypes with resistance to carbendazim [J]. *Australasian Plant Pathology*, 2013, 42(1): 73-78.
- [8] BENSIMIRA M, JIANG B, NSABIMANA C, et al. Effect of lavender and thyme incorporation in sunflower seed oil on its resistance

- to frying temperatures[J]. *Food Research International*, 2007, 40(3): 341-346.
- [9] AKTHAR M S, DEGAGA B, AZAM T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review[J]. *Issues in Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, 2014, 2(1): 1-7.
- [10] LIANG D, LI F, FU Y, et al. Thymol inhibits LPS-stimulated inflammatory response via down-regulation of NF- κ B and MAPK signaling pathways in mouse mammary epithelial cells[J]. *Inflammation*, 2014, 37(1): 214-222.
- [11] HORVATHOVA E, NAVAROVA J, GALOVA E, et al. Assessment of antioxidative, chelating, and DNA-protective effects of selected essential oil components (eugenol, carvacrol, thymol, borneol, eucalyptol) of plants and intact *Rosmarinus officinalis* oil [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, 62(28): 6632-6639.
- [12] NAVARRO D, DIAZ-MULA H M, GUILLEN F, et al. Reduction of nectarine decay caused by *Rhizopus stolonifer*, *Botrytis cinerea* and *Penicillium digitatum* with Aloe vera gel alone or with the addition of thymol[J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2011, 151(2): 241-246.
- [13] CASTILLO S, PEREZ -ALFONSO C O, MARTINEZ -ROMERO D, et al. The essential oils thymol and carvacrol applied in the packing lines avoid lemon spoilage and maintain quality during storage[J]. *Food Control*, 2014, 35(1): 132-136.
- [14] GONZALEZ-AGUILAR G A, ANSORENA M R, VIACAVA G E, et al. Plant essential oils as antifungal treatments on the postharvest of fruit and vegetables[M] // ABYANEH M R, RAI M. *Antifungal metabolites from plants*. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 2013: 429-446.
- [15] 张 静,冯 岗,袁旭超,等.百里香酚抑菌活性初探[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(21): 277-280.
- [16] AHMAD A, KHAN A, AKHTAR F, et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2011, 30(1): 41-50.
- [17] CHAUHAN A K, KANG S C. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella ser. typhimurium in vitro* and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model[J]. *Research in Microbiology*, 2014, 165(7): 559-565.
- [18] DE LIRA MOTA K S, DE OLIVEIRA PEREIRA F, DE OLIVETRA W A, et al. Antifungal activity of *Thymus vulgaris* L. essential oil and its constituent phytochemicals against *Rhizopus oryzae*: interaction with ergosterol [J]. *Molecules*, 2012, 17(12): 14418-14433.
- [19] GAO T, ZHOU H, ZHOU W, et al. The fungicidal activity of thymol against *Fusarium graminearum* via inducing lipid peroxidation and disrupting ergosterol biosynthesis[J]. *Molecules*, 2016, 21(6): 770.
- [20] 李小白,向 林,罗 洁,等.转录组测序(RNA-seq)策略及其数据在分子标记开发上的应用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(5): 720-726.
- [21] GRABHERR M G, HAAS B J, YASSOUR M, et al. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(7): 644-652.
- [22] CONESA A, GOTZ S, GARCIA -GOMEZ J M, et al. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21(18): 3674-3676.
- [23] TATUSOV R L, GALPERIN M Y, NATALE D A, et al. The COG database: a tool for genome-scale analysis of protein functions and evolution[J]. *Nucleic Acids Research*, 2000, 28(1): 33-36.
- [24] KANEHISA M, GOTO S, KAWASHIMA S, et al. The KEGG resource for deciphering the genome[J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(S1): 277-280.
- [25] 马养民,赵 洁,周雪宁.植物内生真菌抗植物病原真菌活性物质的研究[J]. *化学进展*, 2010, 22(2): 440-448.
- [26] IMMING P, SINNING C, MEYER A. Drugs, their targets and the nature and number of drug targets[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2006, 5(10): 821-834.
- [27] 许 波,张伟强,冯晓曦,等.转录组测序技术在玉米中的应用研究进展[J]. *玉米科学*, 2014, 22(1): 67-72.
- [28] UENO K, NAGANO M, SHIMIZU S, et al. Lipid droplet proteins, Lds1p, Lds2p, and Rrt8p, are implicated in membrane protein transport associated with ergosterol[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 475(4): 315-321.
- [29] BURT S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94(3): 223-253.
- [30] 钟少枢,吴克刚,柴向华,等.七种单离食用香料对食品腐败菌抑菌活性的研究[J]. *食品工业科技*, 2009(5): 68-71.
- [31] CHAVAN P S, TUPE S G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts[J]. *Food Control*, 2014, 46: 115-120.
- [32] CHAUHAN A K, JAKHAR R, PAUL S, et al. Potentiation of macrophage activity by thymol through augmenting phagocytosis [J]. *International Immunopharmacology*, 2014, 18(2): 340-346.
- [33] REES D C, JOHNSON E, LEWINSON O. ABC transporters: the power to change [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10(3): 218-227.
- [34] UENO K, NAGANO M, SHIMIZU S, et al. Lipid droplet proteins, Lds1p, Lds2p, and Rrt8p, are implicated in membrane protein transport associated with ergosterol[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 475(4): 315-321.

(责任编辑:陈海霞)