

短密木霉降解咪唑乙烟酸候选基因的筛选

刘 晴 刘宇彤 邓世林 鲍 彤 董爱荣

东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040

摘要 为探明短密木霉(*Trichoderma brevicompactum*)降解咪唑乙烟酸的分子机制,通过转录组学和蛋白质组学数据整合分析筛选降解咪唑乙烟酸的候选基因。结果显示:以 500 mg/kg 咪唑乙烟酸驯化后的短密木霉为材料,分别在基础培养基和以咪唑乙烟酸为单一碳源的培养基中培养至降解效率最高的第 7 天,在转录组学中差异表达的基因 1 329 个,其中上调 703 个,下调 626 个。用 ITRAQ 进行蛋白质组学分析,共鉴定到 21 883 条肽段和 4 003 个蛋白质。关联分析中,鉴定出 24 个在转录组和蛋白质组中均差异表达的基因,其中 14 个基因上调,10 个基因下调。定量蛋白质和基因的表达关联系数为 $-0.047 2$,显著差异蛋白质和显著差异基因表达关联系数为 $-0.142 0$,蛋白质和表达变化趋势相同的基因关联系数为 $-0.741 3$,蛋白质和表达变化趋势相反的基因关联系数为 $-0.791 6$ 。关联分析鉴定的 24 个基因中,有 2 个基因具有功能注释,分别为 *TBU3981A* (NCBI nr:绿色木霉 Gv29-8 糖苷水解酶 16 家族部分 mRNA)和 *TBU1425A* (NCBI nr:HEX-1),可作为降解咪唑乙烟酸的候选基因。

关键词 短密木霉;咪唑乙烟酸;转录组;蛋白质组学;关联分析

中图分类号 X 592 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)04-0063-08

随着除草剂在农业生产中的广泛应用,其给生态环境带来的负面影响也越来越大。咪唑乙烟酸(英文通用名 imazapyr,商品名有 arsenal、assaul、灭草烟和阿时拉等)是农业生产中常用的除草剂,具有杀草种类多、活性高、选择性强等优点。咪唑乙烟酸被广泛应用于大豆、花生和苜蓿等农作物的杂草防治,多用于我国大豆产区防治杂草^[1]。但因其残留期较长,易对后茬作物产生药害,给粮食安全带来潜在威胁。咪唑乙烟酸使用量仍在逐年增加,对我国农业可持续发展也将产生重大威胁,同时也将带来严重的食品安全问题。因此,筛选降解咪唑乙烟酸的基因,揭示咪唑乙烟酸降解机制,从而为减轻咪唑乙烟酸对我国农业生态环境的影响尤为重要。

目前对咪唑乙烟酸降解的研究仅停留在降解菌株鉴定和降解条件的分析上。丁伟等^[2]分离鉴定出 1 株碱菌属(*Alcaligenes* sp.)的高效降解菌并探究其降解的最适条件。陈玉洁等^[3]分离鉴定出哈夫尼希瓦氏菌(*Shewanella hafniensis*)对咪唑乙烟酸有降解能力并对其降解特性进行了研究。曹知平等^[4]

研究了黑曲霉 LZ1 降解咪唑乙烟酸的条件。吕翻洋等^[5]从大豆田块土壤样品中分离到 1 株高效咪唑乙烟酸降解菌表皮短杆菌(*Brevibacterium epidermidis*)。金雷等^[6]研究发现投加芽孢杆菌(*Bacillus* sp.)QC-13 对咪唑乙烟酸污染土壤的修复有较好的效果。咪唑乙烟酸的降解过程是一个复杂的生命活动过程,全面探究该过程,需要同步检测 mRNA 和蛋白质的表达量,并进行数据整合分析。但目前多数文献报道蛋白质与 mRNA 之间表达的一致性并不高,因此,将蛋白质组和转录组联合分析对了解基因表达调控情况尤为重要^[7]。

如何从大量转录组数据中挖掘关键基因也是一个值得考虑的问题。目前,并未见将定量蛋白质组学技术和转录组测序结合筛选咪唑乙烟酸降解相关基因的研究报道。本研究以咪唑乙烟酸为单一碳源,运用同位素标记相对/绝对定量技术(ITRAQ)和转录组测序分别鉴定短密木霉降解咪唑乙烟酸差异表达的蛋白和基因,并对组学数据进行关联分析,获得降解咪唑乙烟酸的候选基因,以期揭示咪唑

收稿日期: 2019-01-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(31670494)

刘 晴,硕士研究生. 研究方向: 森林病理学. E-mail: 401339721@qq.com

通信作者: 董爱荣,副教授. 研究方向: 森林病理学. E-mail: darlmy@163.com

乙烟酸的降解机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 菌株的驯化

在黑龙江省某药厂排污渠污泥中分离纯化出短密木霉作为原始菌种,原始菌种在富集培养基中活化培养 3 d 后,移至咪唑乙烟酸含量为 100 mg/kg 的无机盐培养基中,按 $V_{\text{菌液}} : V_{\text{培养基}} = 1 : 9$ 的比例配制无机盐培养基,培养基以咪唑乙烟酸为单一碳源,25 °C、160 r/min 培养 3 d,同样方法和培养条件循环操作,分别用 200、300、400 mg 和 500 mg 驯化短密木霉,获得最终驯化后的短密木霉。计算出驯化后的降解率^[8]。

1.2 样品的制备

将驯化后的高效降解短密木霉在富集培养基中活化 3 d,移至无机盐培养基(无碳源)和咪唑乙烟酸浓度为 100 mg/kg 的无机盐培养基中培养($V_{\text{菌液}} : V_{\text{培养基}} = 1 : 9$),分别作为对照组和处理组,3 组生物学重复,培养基 pH 值为 8,转速 160 r/min,温度 25 °C 培养至第 7 天,-4 °C 离心去上清,PBS 缓冲液清洗菌丝体,所得沉淀即为本试验样品,于 -80 °C 保存。

1.3 降解率的测定

参照文献[9]采用液相色谱法测定咪唑乙烟酸降解率,采用 Waters2695 液相色谱仪与 Waters2996 紫外检测器,流动相 A 液:冰乙酸+乙腈, B 液:冰乙酸+纯水, $V_A : V_B = 40 : 60$;分离分析柱为 Agilent ZORBAX Extend-C18 柱(250 mm,4.6 mm,5 m);进样条件:柱温室温,进样量 10 μL ,检测波长 254 nm。

咪唑乙烟酸降解率 = $[(\text{CK 残留浓度} - \text{加发酵液残留浓度}) / \text{CK 残留浓度}] \times 100\%$ 。

1.4 转录组测序分析差异表达基因

将驯化后的短密木霉分别在基础培养基和加入咪唑乙烟酸的培养基中培养至第 7 天,提取样品总 RNA,用带有 Oligo (dT)^[10] 的磁珠富集^[11] 真核生物 mRNA,由华大基因构建文库,构建完成后的文库质检合格后进行测序。由于缺乏基因组测序参考,使用 Trinity^[12] 进行 de novo 组装。使用 Blast2GO^[13] 软件将比对上 NR 数据库的 Unigene 结果注释到 GO 数据库和 KEGG 数据库。

1.5 ITRAQ 联合 2DLC-MS/MS 分析差异表达蛋白
向对照组和试验组分别加入 2 mL PBS 混匀,

4 °C 离心 2 min,弃上清。向样品管中加入适量无 SDS 的 L3,终浓度为 1 倍 Cocktail、2 mmol/L 的 EDTA,置于冰上 5 min 后加入终浓度 10 mmol/L 的 DTT,用 Tissue Lyser 充分研磨,4 °C 离心 15 min,取上清;加终浓度 10 mmol/L 的 DTT,30 °C 水浴 1 h;加终浓度 55 mmol/L 的 IAM,暗室放置 45 min;4 °C 离心 15 min,上清即为蛋白质溶液。将对对照组和试验组样品分别取 100 μg 蛋白溶液,按 $V_{\text{Trypsin 酶}} : V_{\text{蛋白}} = 1 : 40$ 的比例加入 Trypsin 酶 2.5 μg ,37 °C 酶解 4 h,按上述比例再补加 Trypsin 酶 1 次,37 °C 酶解 8 h,用 Strata X 柱将 Trypsin 酶酶解后的肽段除盐后真空抽干,将样品送往华大基因进行肽段标记、肽段分离、ITRAQ 联合 2DLC-MS/MS 分析和蛋白质的信息分析。

1.6 蛋白质组与转录组关联分析

将转录组数据和蛋白质组数据进行整合分析,采用 Lan 等^[14] 方法计算在蛋白质和转录水平的皮尔逊相关系数,从而确定蛋白和 mRNA 的相关性。

1.7 实时荧光定量 PCR

分别提取对照组和咪唑乙烟酸处理的短密木霉菌丝中总 RNA,qRT-PCR 反转录合成 cDNA 采用日本 TaKaRa 公司的 Prime-Script RT reagent Kit With gDNA Eraser 的试剂盒(RR047A),作为实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)的模板。利用 Primer5.0 软件设计 qRT-PCR 引物,绿色木霉 Gv29-8 糖苷水解酶 16 家族部分 mRNA 的引物为 (5'-AGG-GAGTTACGACCAGGGAA-3') 和 (5'-TCTAT-CAGAACCAGGCTAATGCTA-3'), HEX-1 基因的引物为 (5'-AGCCTCTTCGTCGTAGTAACCC-3') 和 (5'-CCGTCCCAACTTCCGTGA-3')。以 Actin 基因为内参,引物为 (5'-GGCTCAGTCTA-AGCGTGGTATCC-3') 和 (5'-ACAGAACGGCCT-GGATGGAGA-3')^[15]。各处理均做 3 次重复,计算基因的相对表达量。

2 结果与分析

2.1 短密木霉的降解率

研究结果显示:在咪唑乙烟酸初始质量分数 100 mg/kg、pH 8、25 °C 的条件下培养至第 7 天的短密木霉降解咪唑乙烟酸的作用最强,降解效率为 78.38%。咪唑乙烟酸初始质量色谱图如图 1 所示,短密木霉处理后咪唑乙烟酸色谱图如图 2 所示。

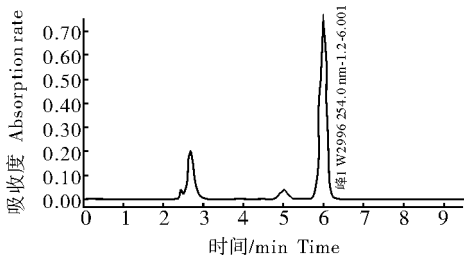


图 1 咪唑乙烟酸初始质量分数色谱图

Fig.1 Imidazolium nicotinic acid initial concentration chromatogram imazethapyr

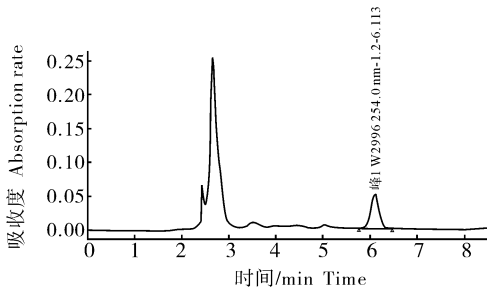


图 2 处理后咪唑乙烟酸色谱图

Fig.2 Chromatogram of imidazolium concentration after treatment

2.2 转录组测序数据

使用 Illumina HiSeq 平台一共获得 40.3 Gb 数据, 组装并去冗余后得到 28 268 个 Unigene, 总长度为 57 020 571 bp, 将其比对到七大功能数据库进行注释, 最终分别有 21 416 (NR: 75.76%)、16 932 (NT: 59.90%)、14 278 (SwissProt: 50.51%)、13 249

(KOG: 46.87%)、15 263 (KEGG: 53.99%)、14 584 (GO: 51.59%) 以及 15 762 (InterPro: 55.76%) 个 Unigene 获得功能注释。使用 Transdecoder 检测出 33 583 个 CDS(蛋白质编码区)。

1) 总基因。共有 84 848 个 Unigene 注释到 GO 3 个方面, 生物过程占比 6 641.37%, 细胞组分占比 38.74%, 分子功能占比 19.88%。与 KEGG 数据库对比, 共有 17 656 个 Unigene 被注释, 根据基因参与的 KEGG 代谢通路分为 5 个分支: 遗传信息处理占比 34.03%, 环境信息处理占比 6.95%, 细胞过程占比 11.95%, 代谢占比 61.19%, 有机系统占比 0.62%。

2) 差异基因。获得显著差异表达的基因 1 329 个(上调 703 个, 下调 626 个)。如图 3 所示, 对这些差异基因进行 GO 注释分析, 属于分子功能的有 10 个分类, 占比 25.64%; 属于细胞组分的有 11 个分类, 占比 28.20%; 属于生物学过程的组分最多, 共有 18 个, 占比 46.15%。如图 4 所示, KEGG 代谢通路分析中有 1 191 个差异基因被注释, 参与 5 个 KEGG 代谢通路, 代谢通路包括: 环境信息处理 115 个, 占比 9.65%; 细胞过程 146 个, 占比 12.25%; 遗传信息处理 205 个, 占比 17.21%; 代谢 714 个, 占比 59.94%; 有机系统 11 个, 占比 0.92%。其中 977 个差异基因可被富集在 109 个途径中, 15 个途径可被显著富集, 其中包括 ABC 转运体、脂肪酸代谢和脂肪酸降解等。

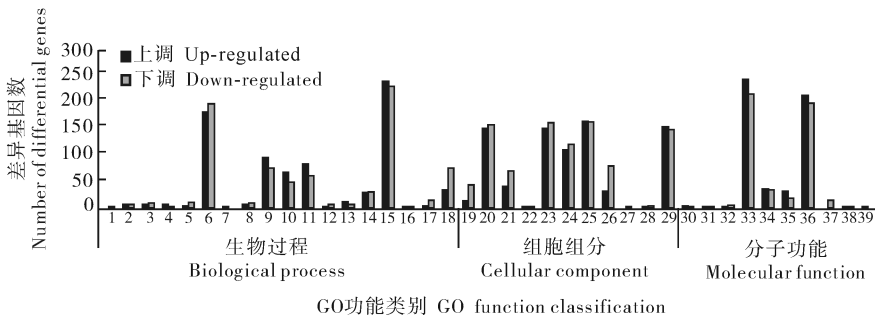


图 3 差异基因上下调 GO 功能分类

Fig.3 GO classification of up-regulated and down-regulated genes

1. Nitrogen utilization; 2. Multi-organism process; 3. Reproduction; 4. Developmental process; 5. Positive regulation of biological process; 6. Cellular process; 7. Carbon utilization; 8. Reproductive process; 9. Localization; 10. Regulation of biological process; 11. Biological regulation; 12. Detoxification; 13. Negative regulation of biological process; 14. Response to stimulus; 15. Metabolic process; 16. Growth; 17. Signaling; 18. Cellular component organization or biogenesis; 19. Membrane-enclosed lumen; 20. Cell part; 21. Organelle part; 22. Extracellular region; 23. Cell; 24. Organelle; 25. Membrane; 26. Macromolecular complex; 27. Nucleoid; 28. Supramolecular complex; 29. Membrane part; 30. Molecular transducer activity; 31. Signal transducer activity; 32. Molecular function regulator; 33. Catalytic activity; 34. Transporter activity; 35. Transcription regulator activity; 36. Binding; 37. Structural molecule activity; 38. Translation regulator activity; 39. Nutrient reservoir activity.

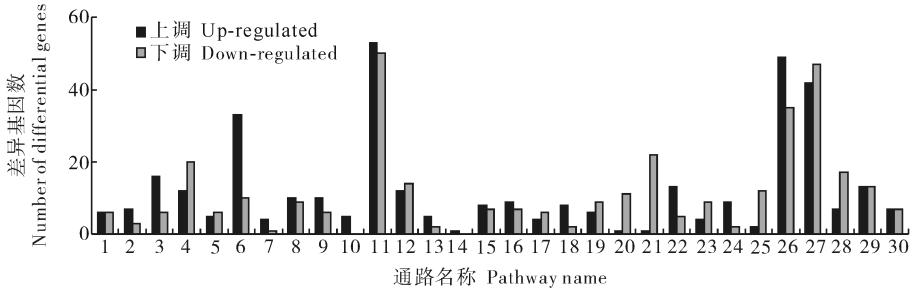


图 4 差异基因上下调的富集通路

Fig.4 Pathway functional enrichment result for up/down-regulated genes

1.Inositol phosphate metabolism; 2.Non-homologous end-joining; 3.ABC transporters; 4.Ribosome biogenesis in eukaryotes; 5.Longevity regulating pathway-multiple species 6.Peroxisome; 7.Alpha-linolenic acid metabolism; 8.Fatty acid degradation; 9.Glycerolipid metabolism; 10.Ascorbate and aldarate metabolism; 11.Biosynthesis of secondary metabolites; 12.Tryptophan metabolism; 13.Lysine biosynthesis; 14.Beta-lactam resistance; 15.Glyoxylate and dicarboxylate metabolism; 16.Cysteine and methionine metabolism; 17.Biosynthesis of unsaturated fatty acids; 18.Homologous recombination; 19.Valine, leucine and isoleucine degradation; 20.Aflatoxin biosynthesis; 21.Ribosome; 22.Phenylalanine metabolism; 23.Propanoate metabolism; 24.Folate biosynthesis; 25.Fatty acid biosynthesis; 26.Biosynthesis of antibiotics; 27.MAPK signaling pathway-yeast; 28.Fatty acid metabolism; 29.Mitophagy-yeast; 30.Tyrosine metabolism.

2.3 iTRAQ 定量蛋白质组数据

1)总蛋白。共鉴定到 21 883 条肽段和 4 003 个蛋白。用 Blast2GO 软件进行 GO 注释分析,本试验鉴定到的蛋白在 GO 功能注释的结果是:在细胞组分中有 11 个,占比 29.62%;分子功能中有 15 个,占比 26.46%;生物过程有 20 个,占比 43.90%。同样,进行 KEGG 生物数据库通路富集分析,与咪唑乙烟酸作用途径相关的 3 116 种蛋白在 127 条途径中被注释到。

2)差异蛋白。以 Fold change > 1.2 和 Q-value < 0.05 两个条件来鉴定处理组和对照组之间差异表达的蛋白质,共检测到 353 个差异表达蛋白;其中 184 个上调,169 个下调。本研究鉴定到的差异蛋白在 GO 功能注释的结果是:细胞组分中鉴定到 129 个差异蛋白,富集在 62 个功能中,其中 13 个功能被显著注释到;分子功能中鉴定到 220 个差异蛋白,富集在 157 个功能中,其中 6 个功能被显著注释到;生物过程中鉴定到 195 个差异蛋白,富集在 351 个功能中,其中 32 个功能被显著注释到。同样,KEGG 生物数据库的通路富集分析结果显示:258 个差异表达蛋白富集在 105 条通路中,仅有 2 条途径被显著富集到,分别是核糖体代谢和基础转录因子代谢。差异蛋白显著富集的代谢通路如图 5 所示。

2.4 蛋白质组与转录组关联

1)蛋白质组与转录组关联数量关系。由表 1 可

以看出,3 941 个基因在 mRNA 和蛋白质水平均可鉴定到,同时有 3 941 个基因在 mRNA 和蛋白质水平均可表达,其中蛋白质组和转录组均差异表达的有 24 个基因。

2)蛋白质组与转录组的相关性。用咪唑乙烟酸处理短密木霉培养至第 7 天后,2 个样品显著差异蛋白质和显著差异基因呈负相关关系,相关系数为

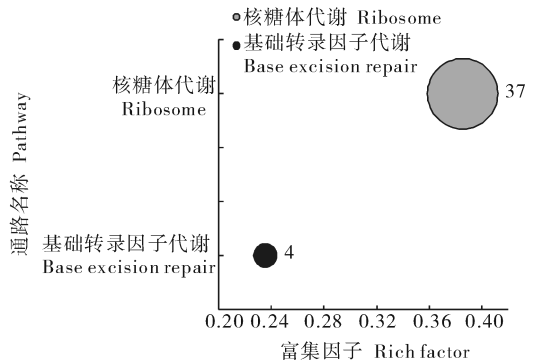


图 5 差异蛋白显著富集通路的统计图

Fig.5 Statistics of pathway enrichment of differentially expressed proteins in each pairwise

注释到该 Pathway 的差异蛋白数目/注释到该 Pathway 的所有鉴定到的蛋白为富集因子 (rich factor), 该值越大, 说明在该 Pathway 中差异蛋白比例越大。圆点大小表示该 Pathway 差异蛋白的数目。Rich factor is the ratio of differentially expressed protein number annotated in this pathway term to all protein number annotated in this pathway term. Greater richfactor means greater intensiveness. The dot size indicates the number of pathway differential proteins.

表 1 关联转录组和蛋白质组数量

Table 1 Number of correlation transcriptomics and proteomics

类型 Type	蛋白质数量 Number of proteins	基因数量 Number of genes	关联数量 Number of correlation
鉴定 Identification	4 003	24 621	3 941
定量 Quantitative	4 003	24 621	3 941
差异表达 Differentially expressed	353	1 331	24

-0.142 0,如图 6 所示;蛋白质和变化趋势相同的 mRNA 呈正相关,相关系数为 0.741 3,如图 7A 所示;蛋白质和变化趋势相反的基因呈负相关关系,相关系数为-0.791 6,如图 7B 所示。

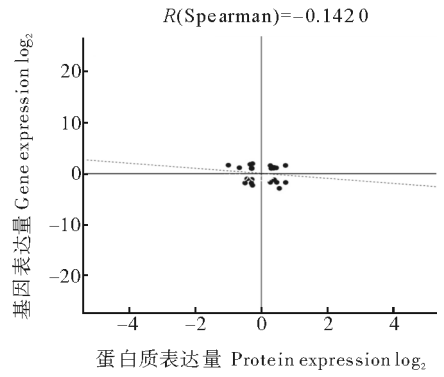
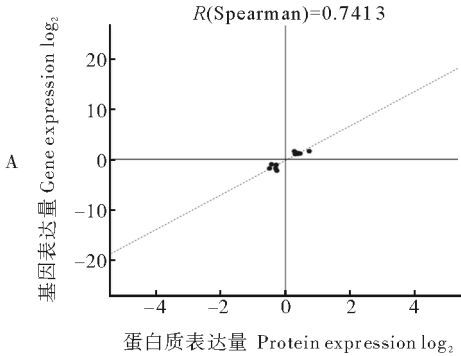
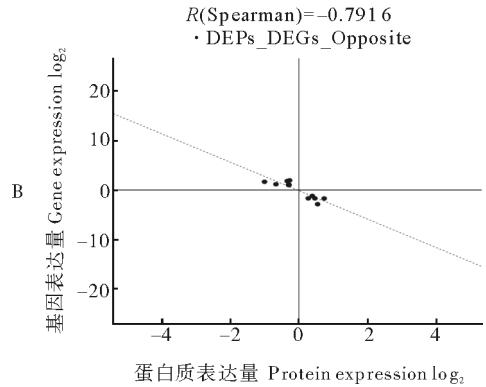


图 6 显著差异蛋白质和显著差异基因表达关联图

Fig.6 Correlation for significantly differential proteins and significant differential genes



A:蛋白质和基因表达变化趋势相同; B:蛋白质和基因表达变化趋势相反。A:Protein and gene expression trends are similar;B:Protein and gene expression trends are opposite.

图 7 蛋白质和基因表达变化趋势的关联图

Fig.7 Correlation for trend expression proteins and genes

3)关联到差异基因。咪唑乙烟酸处理后,得到了在转录组和蛋白质组中均差异表达的基因 24 个,其中 14 个基因上调,10 个基因下调。上调基因包括 *TBU3981A*(NCBIInr: *T. virens* Gv29-8 糖苷水解酶家族 16 部分蛋白, glycoside hydrolase family 16 protein, partial)、*TBU1425A* (NCBIInr: 深绿木霉, *HEX-1*), *TBC4387C2A*(哈茨木霉 IOC-38 菌株克隆 *EGL3BAC* 全序列, *T. harzianum* strain IOC-3844 clone *egl3BAC*, complete sequence)、*TBC1576C11A*(NCBIInr: 绿色木霉 Gv29-8 糖基转移酶 1 家族蛋白部分 mRNA, *T. virens* Gv29-8 glycosyltransferase family 1 protein partial mRNA)以及功能未知的假定蛋白;下调基因包括 *TBC1810C1A*(NCBIInr: 里氏木霉 QM6a 硫酸盐腺苷酰转移酶 mRNA, *T. reesei* QM6a sulfate adenylyltransferase mRNA)以及一些功能未知的

假定蛋白基因。差异基因在 9 条代谢通路上与蛋白质变化趋势相同,这 9 条代谢通路是过氧化物酶体、长寿调节途径-多物种、精氨酸生物合成、 α -亚麻酸代谢、RNA 降解、阿特拉津降解、氨基糖和核苷酸糖代谢、泛酸和辅酶 A 生物合成及烟酸和烟酰胺代谢。

24 个基因中表达趋势一致且同时上调的 7 个基因,无论基因水平还是蛋白质水平,受到咪唑乙烟酸刺激均增加表达量。7 个基因在 NCBIInr 数据库中已知功能的基因有 2 个,分别为 *TBU3981A* (NCBIInr: *T. virens* Gv29-8 糖苷水解酶家族 16 部分蛋白, glycoside hydrolase family 16 protein, partial)和 *TBU1425A*(NCBIInr: 深绿木霉, *HEX-1*),将这 2 个基因作为短密木霉降解咪唑乙烟酸的候选基因,候选基因的相关信息如表 2 所示。

表 2 转录组和蛋白质组关联分析中均差异表达的基因

Table 2 Differentially expressed genes both in correlation analysis of transcriptome and proteome

NCBI 登记号 NCBI ID	基因名称 Name of gene	NCBI nr 数据库 Number of proteins	P 值 P-value	转录组中表达情况 DEPs	蛋白质组中表达情况 DEGs
XM_014105040.1	TBU3981A	绿色木霉 Gv29-8 糖苷水解酶 16 家族部分 mRNA Glycoside hydrolase family 16 protein, partial	1.70E-04	+	+
XM_006967399.1	TBU1425A	HEX-1	7.33E-09	+	+

注: P 值是指差异检验的 P 值, 该值越小越显著; 蛋白质倍数大于 1.2 表示表达上调, 小于 0.833 表示表达下调; “+”表示表达上调。

Note: P -value is the difference test value, the smaller the value, the more significant; Protein ratio greater than 1.2 indicates expression up, less than 0.833 indicates expression down; “+” indicates that the expression is up.

2.5 差异表达基因的荧光定量验证

对联合分析筛选得到的降解候选基因 *TBU3981A* 和 *TBU1425A* 进行 qRT-PCR 验证 (t 检验, $P < 0.05$, $n = 3$)。由图 8 可知, 2 个基因在蛋白质组中表达差异倍数分别为 1.25 和 1.23, 转录组表达差异倍数分别为 1.27 和 1.04, qRT-PCR 分析得到的表达差异倍数分别为 1.03 和 0.99, 虽然 qRT-PCR 与组学表达差异倍数不一致, 但咪唑乙烟酸处理后表达的变化趋势相同, 说明转录组分析结果可靠^[16]。

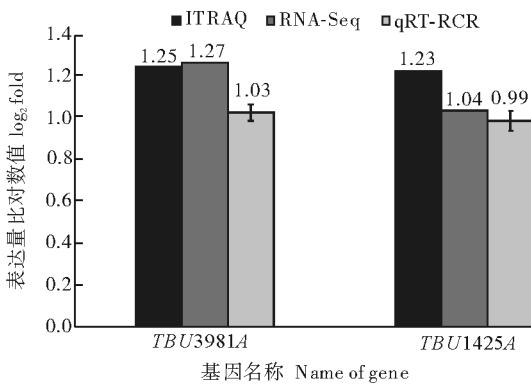


图 8 差异表达基因的 qRT-PCR 验证

Fig.8 Validation of DEGs data by qRT-PCR

3 讨论

本研究将蛋白质组与转录组学数据进行关联分析, 结果显示: 当短密木霉在以咪唑乙烟酸为单一碳源的培养基中培养至降解效率最高的第 7 天后, 定量蛋白和基因的表达呈现负相关关系, 这可能是翻译的蛋白质和 mRNA 表达水平不一致所导致^[18]。

本研究获得蛋白质组和转录组均差异表达的 24 个基因, 其中, NCBI 数据库中功能已知的基因有 2 个: *TBU3981A* 和 *TBU1425A*。若这 2 个基因中

没有和降解相关的基因, 我们将继续研究其他 23 个基因。以下对这 2 个基因的具体功能进行探讨。

TBU3981A 基因编码绿色木霉 Gv29-8 糖苷水解酶 16 家族部分 mRNA。Kubicek 等^[19] 推测该基因可以改进生物防治菌株, 与木霉保护植物相关。绿色木霉和短密木霉的亲缘性很近, 绿色木霉产生的新型次级代谢产物除了在制药和农业防治上被广为利用之外, 还具有降解有害化合物如杀虫剂、多酚和多环芳烃以及螯合重金属的能力。微生物合成 β -1,3-1,4-*D*-葡聚糖酶属于糖苷水解酶 16 家族, 降解存在于真菌和植物中的 β -葡聚糖。王圆等^[20] 报道在动物饲料中添加 β -1,3-1,4-*D*-葡聚糖酶可以消除 β -葡聚糖的抗营养作用, 提高消化酶活力, 促进动物对营养物质的消化吸收, 改善饲料的转化率, 促进动物的生长发育。本试验将短密木霉在以咪唑乙烟酸为单一碳源的培养基中培养, 提高短密木霉对咪唑乙烟酸的利用率, 从而达到降解咪唑乙烟酸的目的。

TBU1425A 基因可编码形成 HEX-1 蛋白。HEX-1 蛋白是构成伏鲁宁体的主要蛋白^[21], 伏鲁宁体是一种特化的过氧化物酶体, 存在于真菌中的细胞器中, 当菌丝体受伤时, 伏鲁宁体可与菌丝隔膜形成孔塞, 防止原生质流失, 保持丝状真菌细胞的完整。目前已经从构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)^[22]、里氏木霉 (*T. reesei*)^[23]、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)^[24] 和稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*)^[25] 中分离出 HEX-1 基因。有研究显示, 将粗糙脉孢菌 HEX-1 基因敲除后, 可导致细胞受伤、原生质外流, 表明在真菌细胞受损后该基因可通过封闭隔膜孔, 防止细胞质流失^[24]。Soudararajan 等^[26] 曾对缺失 HEX-1 基因的稻瘟病菌 (*Magnaporthe grisea*) 进行研究, 发现稻瘟病菌细胞形态发生改变, 侵染或定殖能力下降, 进而使其致病能力下

降。唐俊等^[27]将康氏木霉 *HEX-1* 基因在原核中纯化和表达,在其前期试验研究中发现, *HEX-1* 蛋白在敌敌畏处理后表达量明显上调,推测 *HEX-1* 基因可能调控木霉菌的隔膜系统,使其增强耐受敌敌畏胁迫的能力^[28]。本研究中无论是进行转录组分析还是蛋白质组分析 *HEX-1* 基因均有差异表达,推断 *HEX-1* 基因在短密木霉耐受咪唑乙烟酸时作用机制与 *HEX-1* 基因在其他木霉中耐受敌敌畏机制相似。

综上,短密木霉(*T. brevicompactum*)可在以咪唑乙烟酸为唯一碳源的培养基中生长,有降解土壤中咪唑乙烟酸的能力,可减缓除草剂污染土壤的生态压力,具有潜在的应用价值。利用转录组和蛋白质数据整合分析,可筛选降解咪唑乙烟酸的候选基因,为揭示咪唑乙烟酸的降解机制提供新线索。

参 考 文 献

- [1] SINGH B K, STIDHAM M A, SHANER D L. Assay of aceto-hydroxyacid synthase [J]. Analytical biochemistry, 1988, 171(1): 173-179.
- [2] 丁伟,白鹤,程苗,等. 咪唑乙烟酸降解菌的分离、鉴定及其降解特性研究[J].环境科学,2008(5): 1359-1362.
- [3] 陈玉洁,束长龙,刘新刚,等. 咪唑乙烟酸降解菌的分离、鉴定及降解特性研究[J].农药学学报,2011(4): 387-393.
- [4] 曹知平,许景钢,李淑芹,等. 黑曲霉 LZ1 降解咪唑乙烟酸的特性[J]. 东北农业大学学报,2010(7): 66-70.
- [5] 吕翻洋,许泽华,毛晓洁,等. 咪唑乙烟酸降解菌的分离鉴定及降解条件优化[J]. 生物技术通报, 2017(10): 163-168.
- [6] 金雷,成明根,孙斌,等. 芽孢杆菌 QC-13 对咪唑乙烟酸污染土壤的生物修复[J]. 江苏农业科学,2015(6): 300-303.
- [7] MAIER T, GUELL M, SERRANO L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples[J]. Febs letters, 2009, 583(24): 3966-3973.
- [8] 王青玲. 一株乙羧草醚高效降解菌的分离鉴定、降解特性及其应用研究[D].南京:南京农业大学, 2012.
- [9] 靳颖华. 液相色谱法测定燕窝中唾液酸含量研究[J].中国医药导刊,2011(6): 1071-1072.
- [10] CANOVAS A, RINCON G, ISLAS-TREJO A, et al. SNP discovery in the bovine milk transcriptome using RNA-Seq technology[J]. Mammalian genome,2010, 21(11/12): 592-598.
- [11] LI X, SUN H, PEI J, et al. De novo sequencing and comparative analysis of the blueberry transcriptome to discover putative genes related to antioxidants[J]. Gene, 2012, 511(1): 54-61.
- [12] 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.
- [13] CONESA A, GÖTZ S, GARCÍA-GÓMEZ J M. Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research[J]. Bioinformatics, 2005, 21(18): 3674-3676.
- [14] LAN P, LI W, SCHMIDT W. Complementary proteome and transcriptome profiling in phosphate-deficient arabidopsis roots reveals multiple levels of gene regulation[J]. Molecular & cellular proteomics,2012,11:1156-1166.
- [15] HUANG Y, MIJITI G, WANG Z, et al. Functional analysis of the class II hydrophobin gene HFB2-6 from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum* ACCC30536[J]. Microbiological research,2015, 171: 8-20.
- [16] 马进,郑钢.利用转录组测序技术鉴定紫花苜蓿根系盐胁迫应答基因[J].核农学报, 2016(8): 1470-1479.
- [17] LACKNER D H, SCHMIDT M W, WU S, et al. Regulation of transcriptome, translation, and proteome in response to environmental stress in fission yeast[J]. Genome biology,2012, 13(4): 1-14.
- [18] 吴松峰,朱云平,贺福初. 转录组与蛋白质组比较研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,2005(2): 99-105.
- [19] KUBICEK C P, HERRERA-ESTRELLA A, SEIDL-SEIBOTH V, et al. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma* [J/OL]. Genome biology, 2011, 12R40 [2018-08-10].<http://doi.org/10.1186/gb-2011-12-4-r40>.
- [20] 王圆,张朝晖,王蓓,等. 细菌产 β -1,3-1,4-葡聚糖酶的结构、功能及应用的研究进展[J]. 饲料工业,2005, 26(2): 18-20.
- [21] TENNEY K, HUNT I, SWEIGARD J, et al. *HEX-1*, a gene unique to filamentous fungi, encodes the major protein of the Woronin body and functions as a plug for septal pores[J]. Fungal genetics and biology : FG & B,2000, 31(3): 205-217.
- [22] JEDD G, CHUA N H. A new self-assembled peroxisomal vesicle required for efficient resealing of the plasma membrane[J]. Nature cell biology,2000, 2(4): 226-231.
- [23] CURACH N C, TE' O V, GIBBS M D, et al. Isolation, characterization and expression of the *HEX-1* gene from *Trichoderma reesei* [J]. Gene, 2004, 331: 133-140.
- [24] YUAN P, JEDD G, KUMARAN D, et al. A *HEX-1* crystal lattice required for Woronin body function in *Neurospora crassa* [J]. Nature structural biology, 2003, 10(4): 264-270.
- [25] ASIEGBU F O, CHOI W, JEONG J S, et al. Cloning, sequencing and functional analysis of *Magnaporthe grisea* MVP1 gene, a hex-1 homolog encoding a putative 'Woronin body' protein[J]. Fems microbiology letters, 2004, 230(1): 85-90.
- [26] SOUNDARARAJAN S, JEDD G, LI X L, et al. Woronin body function in *Magnaporthe grisea* is essential for efficient pathogenesis and for survival during nitrogen starvation stress

- [J]. *Plant cell*, 2004, 16(6): 1564-1574.
- [27] 唐俊, 陆娟, 许惠芬, 等. 康氏木霉 HEX-1 蛋白的原核表达及纯化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2014(10): 147-151.
- [28] TANG J, LIU L, HUANG X, et al. Proteomic analysis of *Trichoderma atroviride* mycelia stressed by organophosphate pesticide dichlorvos [J]. *Canadian journal of microbiology*, 2010, 56(2): 121-127.

Screening candidate genes of degradating imazethapyr by *Trichoderma brevicompactum*

LIU Qing LIU Yutong DENG Shilin BAO Tong DONG Airong

College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

Abstract The candidate genes of degradating imazethapyr were screened with integration analyses of transcriptomics and proteomics data to explore the molecular mechanism of degradating imazethapyr in *Trichoderma brevicompactum*. The results showed that when the basal medium with 500 mg/kg imazethapyr was used as the sole carbon source to cultivate *T. brevicompactum* for seven days, the highest degradation efficiency was obtained. There were 1 329 genes with significant transcriptomic differences, of which 703 were up-regulated and 626 were down-regulated. 21 883 peptides and 4 003 proteins were identified by proteome analyses performed with ITRAQ. The results of association analyses showed that 24 genes with differential expression and protein abundance were correspondingly changed, of which 14 were up-regulated and 10 were down-regulated. The association coefficient between quantitative protein and gene expression was $-0.047\ 2$. The association coefficient between significant difference protein and genes with significantly differential expression was $-0.142\ 0$, with the similar trend of expression change. The association coefficient between protein and gene expression was $-0.741\ 3$. The association coefficient between protein and genes with the opposite trend of expression change was $-0.791\ 6$. Two of the 24 genes identified by association analysis had functional annotations. They are *Trichoderma vi-rens* Gv29-8 glycoside hydrolase family 16 protein partial mRNA and HEX-1 gene, respectively. They can be used as candidate genes of degradating imazethapyr. It is indicated that the candidate genes of degradating imazethapyr by *T. brevicompactum* can be effectively screened with the association analyses of transcriptome and proteome.

Keywords *Trichoderma brevicompactum*; imazethapyr; transcriptome; proteome; association analysis

(责任编辑:张志钰)