NADPH 氧化酶相关基因对盾壳霉代谢的影响

孙 池1 蒋 静1 胡先文1 付艳苹2 姜道宏2

1.华中农业大学理学院,武汉 430070; 2.华中农业大学植物科学技术学院,武汉 430070

摘要 基于液质联用(LC-MS)的代谢组学分析手段,通过突变株 Qnox1-6 与野生株 zs-1 的代谢比较,研究 NADPH 氧化酶相关基因对盾壳霉代谢的影响。筛选得到 14 个重要的代谢差异物质,主要是羧酸类和苷类物质。特别是 7 个仅在突变株中出现的物质为:苯二酚、松柏苷、甾体皂苷类物质、3 个羧酸类物质及其他物质,这些代谢物与盾壳霉寄生核盘菌紧密相关。

关键词 盾壳霉; NOX; 突变株; 寄生能力; LC-MS; 差异代谢物; 代谢组学 中图分类号 S 476 文献标识码 A 文章编号 1000-2421(2019)05-0079-06

基因组学研究采用基因的改变来阐明相关基因 的功能,利用相应突变株的表型分析,将相关功能分 配到相应的基因上^[1-3]。由于基因的多效性,单个基 因突变可能会导致代谢水平上多个生物化学路径的 扰动。因此,全面分析代谢物有助于理解这种体 系^[4-6],代谢组学可为功能基因组研究提供帮助^[7-8]。

相关的盾壳霉研究集中于分子生物学水平上分 生孢子的产生及生长机制^[9]。研究显示:多种基因 调控盾壳霉的产孢^[10-11]。NADPH 氧化酶(NOX) 氧化得到活性氧,是诱导不同细胞过程的信号因子, 主要参与调控寄主的防御反应及细胞分化过程^[12]。 Lalucqued 等^[13]在盾壳霉中发现 CmNOX1 在产孢 过程中起着关键作用。Wei 等^[14]获得了 CmNOX1 的敲除转化子 Qnox1-6,发现 Qnox1-6 突变株丧失 了产孢及寄生能力。盾壳霉野生株与突变株对照的 代谢研究,可以从物质水平反映 NOX 对盾壳霉寄生 能力的影响。

本研究通过对照盾壳霉野生株与突变株,基于 LC-MS手段进行代谢组学分析,分析敲除 NOX 相关 基因对盾壳霉代谢的影响,确定差异代谢物类别,在 代谢物水平上分析 NOX 对盾壳霉寄生能力的影响。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与培养基

盾壳霉(C. minitans)野生菌株 zs-1、突变菌株

Qnox1-6 由华中农业大学作物病害监测和安全控制 重点实验室保存。

PDA 培养基:称取 100 g 去皮的马铃薯,加适 量水,煮沸,过滤,再加入 10 g 葡萄糖和 5 g 琼脂粉, 充分溶解后定容至 500 mL。经 121 ℃蒸汽灭菌, 备用。

1.2 试剂与仪器

试剂:甲醇、二氯甲烷、乙酸乙酯、甲酸、乙腈(均 为色谱纯,国药集团);葡萄糖(分析纯,国药集团)。

仪器:高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用 仪 1260 Q-TOF 6540(Agilent)。

1.3 菌株培养

将直径 5 mm 的盾壳霉菌丝接种到 PDA 培养 基中,在 20 ℃下恒温培养。每组平行 3 份。分别在 培养 6、8、10 d时,取相应位置直径 5 mm 的琼脂块 4 块,保存在 2 mL EP 管中。样品经液氮灭活处理, 置于-80 ℃下保存。

1.4 样品提取

每份样品中加1 mL 萃取剂,萃取剂采用甲醇、 二氯甲烷、乙酸乙酯混合液(体积比1:2:3),并加 入1%的甲酸。水浴中超声1h,溶剂转移到2 mL EP管中,在氮吹仪下去除溶剂。再加入 500 μL 甲 醇,水浴超声20 min 使之充分溶解。采用 PTFE 过 滤器(0.45 μm)处理样品,置于2 mL 进样瓶中 -20℃下保存。

收稿日期: 2019-03-31

基金项目:国家自然科学基金项目(31572048);湖北省自然科学基金项目(2014CFB936);中央高校基本科研业务费专项(2662019YJ009、 2662015PY055)

孙 池,硕士研究生.研究方向:微生物代谢组学分析. E-mail: sun19931215@163.com

通信作者: 胡先文,博士,副教授. 研究方向: 天然产物分析. E-mail: hxw@mail.hzau.edu.cn

1.5 LC-MS 分析

试样在液质联用仪下检测。

液相色谱条件如下:色谱柱采用 Agilent Poroshell 120 EC-C18 column。柱温设置为 40 ℃。流 动相分别采用 0.1% 甲酸水溶液(溶液甲)与 90%乙 腈水溶液(溶液乙)。流速设置为 0.300 mL/min,进 样量定为 5 µL。采用梯度洗脱方式进行:0.01~ 0.10 min 时 80%溶液甲;0.10~8.00 min 时 80%~ 30%溶液甲;8.00~11.00 min 时 30%~20%溶液 甲;11.00~14.00 min 时 20%~5%溶液甲;14.00~ 18.00 min 时5%溶液甲;18.00~18.01 min 时 5%~ 80%溶液甲;18.01~25.00 min 时 80%溶液甲,进样 前运行 8 min,分析耗时 25 min。

质谱条件为:采用连续注入的质谱溶液(m/z: 121.050 873 和 m/z:922.009 798)作内标校正精准 分子质量,正离子模式扫描。采集范围为 m/z: 50~1 700。

1.6 数据处理

统 计 学 分 析:利用 Agilent MassHunter B.05.00软件将数据转换为(mz Data)格式,使用 XCMS 进行预处理^[15]。通过 CAMERA 注释分析 离子类型,识别同位素峰、加合物峰、碎片峰。选用 Welch's *t*-test 统计检验,筛选重要的差异代谢物。 利用代谢组专用分析网站 MetaboAnalyst 3.0 进行 多元统计学分析^[16]。

差异代谢物定性分析:利用公共数据库 KNAp-SAcK,结合文献中盾壳霉次级代谢物信息,建立有 关盾壳霉的本地代谢物数据库。用于初步归属鉴定 差异代谢物,由准分子离子质荷比确定待归属代谢 物的精确分子质量,结合数据库(Metlin、KEGG、 PubChem、MassBank和ChemSpider)处理^[17-18]。

2 结果与分析

2.1 盾壳霉突变株 Qnox1-6 与野生株 zs-1 生长形 态及代谢组差异

盾壳霉野生株的表面出现了黑色分生孢子,而 突变株表面没有发现成熟的分生孢子器和分生孢子 生成(图 1)。



左图为野生株 zs-1,右图为突变株 Qnox1-6。The left one is zs-1,the right one is Qnox1-6.

图 1 盾壳霉的生长形态图

Fig.1 Morphology of the growth of C. mintans

对照盾壳霉野生株 zs-1 与突变株 Qnox1-6,不 同培养天数的代谢物样品进行 LC-MS 分析。培养 时间序列上差异代谢云图(图 2,FC≥2,P≤0.05) 显示:培养 6、8、10 d 3 个时间点下,两者代谢物对 照,差异显著的特征峰分别有 215、113、143 个。在 培养第 6 天时,有 213 个差异代谢物上调、2 个下调 (图 2A);培养第 8 天时,93 个差异代谢物上调、20 个 下调(图 2B);培养第 10 天时,76 个差异代谢物上调, 67 个下调(图 2C)。表明敲除 NOX 相关基因会引起 盾壳霉代谢出现显著变化,且在培养前期大量物质显 著上调。



绿色表示上调,红色表示下调。Green for up and red for down.

图 2 突变株与野生株培养时间序列上的差异代谢云图

Fig.2 Differential metabolic cloud plot about mutant and wild strain under culture time sequences

对不同菌株和不同培养时间的代谢数据进行统 C)显示:不同培养时间下,突变株 Qnox1-6 与野生 计分析,主成分分析(PCA)二维得分图(图 3A、B、 株 zs-1 样品聚集在各自的置信区间内,分布在两 侧,组间没有交集。表明:在不同培养时间点,两者 都存在明显的代谢差异,且组内代谢样品重复性较 好。PCA 三维得分图(图 3D)显示,Qnox1-6 与 zs-1 代谢样品分布在左上和右下两侧,进一步证明两者 的整体代谢差异明显。 同时,层次聚类树状图(图 4)进一步证明: Qnox1-6与zs-1代谢样品分成两大簇,分别对应不 同时间点的代谢样品,相同时间点的平行样品也聚 成一簇。表明:两者代谢差异显著,且这种差异显著 程度明显高于培养时间的影响。



A:培养 6 d 的 PCA 图; B:培养 8 d 的 PCA 图; C:培养 10 d 的 PCA 图; D:三维得分图。Q 为突变株 Qnox1-6; Z 为野生株 zs-1。 A:PCA under 6 days; B:PCA under 8 days; C:PCA under 10 days; D:3D-PCA. Q:Qnox1-6; Z:zs-1.

图 3 不同培养时间下野生组与突变组的 PCA 主成分得分图





图 4 不同培养时间下的突变株和野生株代谢树状图

Fig.4 Dendrogram of metabolism about mutant and wild group on different culture time 2.2 盾壳霉突变株 Qnox1-6 代谢产物的筛选与 鉴定

对培养 6、8、10 d 的代谢样品进行成对差异比 较分析,在显著性 P≤0.05、FC≥2 的条件下,得到 韦恩图(图 5A)。显示有 18 个差异显著的代谢物出 现在各培养时间内。选取培养 8 d 的这 18 个差异 显著的代谢组分进行热图分析。如图 5B 所示,红 色代表上调倍数,蓝色代表下调倍数。突变株与野 生株的代谢样品分别聚成一类,并且这 18 种代谢组 分在突变株中都显著上调。

对这 18 个显著差异代谢组分进行鉴定及种类 分析,除去 4 种同位素,重复出现的 14 个代谢物主 要是羧酸类和苷类物质,见表 1。仅在突变株中出 现的 7 种代谢物为:苯二酚(Benzenediol)、松柏苷 (Coniferin)、甾体皂苷类物质(Chinenoside \mathbb{N})、3 个羧酸类物质((Z)-2,4-Dihydroxy-6-(8-pentadecenyl) benzoic acid; 3,12-Dioxochola-1,4-dien-24oic acid; 7alpha-Hydroxy-3,12-Dioxocholal-4-en-

24-oic acid)及其他物质((1S)-Hydroxy-(2S)-Nacetyl-L-cysteinyl-1,2-dihydronaphthalene)。



1:5-Hydroxy-8, 8-dimethyl-6-(3-methyl-1-oxobutyl)-4-pentyl-2H, 8H-benzo[1, 2-b: 3, 4-b'] dipyran-2-one; 2:7 alpha-Hydroxy-3, 12-dioxocholal-4-en-24-oic acid; 3:3.12-Dioxochola-1, 4-dien-24-oic acid; 4:Chinenoside <math>V[:5:(Z)-2, 4-Dihydroxy-6-(8-pentadecenyl)) benzoic acid; 6:3, 7-Dimethyl-2-thiochroman-2-yl-9-(2, 6, 6-trimethylcyclohexen-1-yl) nona-2, 4, 6, 8-tetraenoic acid; 7: Benzenediol; 8:Macrosphelide A; 9:Hinokitiol glucoside; 10:Ethyl 2-[4-(2-aminoacetyl)-2-(2-ethoxy-2-oxo-ethoxy)-3-hydroxy-phenoxy] acetate; 11:3, 7-Dimethyl-2-thiochroman-2-yl-9-(2, 6, 6-trimethylcyclohexen-1-yl) nona-2, 4, 6, 8-tetraenoic acid; 12:3, 7-Dimethyl-2-thiochroman-2-yl-9-(2, 6, 6-trimethylcyclohexen-1-yl) nona-2, 4, 6, 8-tetraenoic acid; 12:3, 7-Dimethyl-2-thiochroman-2-yl-9-(2, 6, 6-trimethylcyclohexen-1-yl) nona-2, 4, 6, 8-tetraenoic acid; 12:3, 7-Dimethyl-2-thiochroman-2-yl-9-(2, 6, 6-trimethylcyclohexen-1-yl) nona-2, 4, 6, 8-tetraenoic acid; 12:3, 7-Dimethyl-2-thiochroman-2-yl-9-(2, 6, 6-trimethylcyclohexen-1-yl) nona-2, 4, 6, 8-tetraenoic acid; 13: (15)-Hydroxy-(2S)-N-acetyl-L-cysteinyl-1, 2-di-hydronaphthalene; 14:Coniferin; 15:4-Hydroxy-3-(2-hydroxyethyl) acetophenone 4-glucoside; 16:Butyl (S)-3-hydroxybutyrate [arabinosyl-(1→6)-glucoside]; 17:4-Hydroxy-3-(2-hydroxyethyl) acetophenone 4-glucoside; 18:3, 12-Dioxochola-1, 4-dien-24-oic acid. Q:突变株 Qnox1-6; Z:野生株。Q means Qnox1-6; Z means zs-1.

图 5 成对比较韦恩图和重复出现的代谢物热图

Fig.5 Venn diagram of comparison and heat map of overlapped metabolite

表 1 重复出现的显著差异代谢物分析

Table 1 Identification of overlappe	l significantly	different	metabolites
---	-----------------	-----------	-------------

质荷比 <i>m/z</i>	保留时间/mi RT	in 加合物 Adducts	分子式 Molecular formula	代谢物名称(类型) Name/types of metabolites
111.043 3	11.81	$[M+H]^+$	$C_6H_6O_2$	苯二酚 Benzenediol
325.126 6	11.81	$[M\!+\!NH_4]^+$	$C_{15}H_{17}NO_4S$	其他(1S)-Hydroxy-(2S)-N-acetyl-L-cysteinyl-1,2-dihydronaphthalene
343.137 2	11.82	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{22}O_8$	松柏苷 Coniferin
344.169 0	14.10	$[M\!+\!NH_4]^+$	$C_{16}H_{22}O_7$	葡萄糖苷类 Hinokitiol glucoside
356.132 3	16.33	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{21}NO_8$	乙酸类 Ethyl 2-[4-(2-aminoacetyl)-2-(2-ethoxy-2-oxo-ethoxy)-3-hydroxy-phenoxy]acetate
360.164 0	11.81	$[M\!+\!NH_4]^+$	$C_{16}H_{22}O_8$	葡萄糖苷类 4-Hydroxy-3-(2-hydroxyethyl)acetophenone 4-glucoside
363.251 4	18.69	$[M+H]^+$	$C_{22}H_{34}O_4$	苯甲酸类 (Z)-2,4-Dihydroxy-6-(8-pentadecenyl) benzoic acid
365.119 4	11.81	$[M+H]^+$	$C_{16}H_{22}O_8$	生物碱 10-Hydroxycamptothecin
385.233 4	18.70	$[M+H]^+$	$C_{24}H_{32}O_4$	羧酸类 3,12-Dioxochola-1,4-dien-24-oic acid
399.212 3	15.35	$[M+H]^+$	$C_{24}H_{30}O_5$	苯丙酯类 5-Hydroxy-8,8-dimethyl-6-(3-methyl-1-oxobutyl)-4-pentyl-2H, 8H-benzo[1,2-b:3,4-b]dipyran-2-one
401.228 2	15.66	$[M + H]^+$	$C_{24}H_{34}O_5$	羧酸类 7alpha-Hydroxy-3,12-dioxocholal-4-en-24-oic acid
466.278 5	19.15	$[M+NH_4]^+$	$C_{21}H_{32}N_6O_5$	四双链酸 3,7-Dimethyl-2-thiochroman-2-yl-9-(2,6,6-trimethylcyclohex- en-1-yl)nona-2,4,6,8-tetraenoic acid
472.237 1	19.12	$[M\!+\!NH_4]^+$	$C_{19}H_{34}O_{12}$	葡萄糖苷类 Butyl (S)-3-hydroxybutyrate [arabinosyl-(1→6)-glucoside]
920.481 5	19.13	$[M\!+\!NH_4]^+$	$C_{44}H_{70}O_{19}$	甾体皂苷类 Chinenoside VI

3 讨 论

本研究基于 LC-MS 的代谢组学手段,分析了 NOX 相关基因对盾壳霉的代谢影响,筛选出与 盾壳霉寄生核盘菌紧密相关的代谢物,为盾壳霉 相关基因的功能及其寄生特性的分析提供理论 依据。

通过对照分析盾壳霉野生株 zs-1 及突变株 Qnox1-6 代谢产物,发现敲除 NOX 相关基因能 引起盾壳霉代谢的显著变化,突变株中出现大量 代谢物显著上调。分析发现 18 个差异代谢组分 在培养 6、8、10 d时都表现显著上调。除去同位 素后,初步分析差异代谢物主要为羧酸类物质与 苷类物质。

其中仅在突变株中出现的7种代谢物分别为: 苯二酚、松柏苷、甾体皂苷类物质、3个羧酸类物质 及其他物质。苯二酚是苯二酚内酯类物质的前体物 质,而苯二酚内酯是具有细胞毒性、激酶抑制性和抗 炎活性的真菌代谢物^[19]。松柏苷有抗氧化性^[20], 与具有抗氧化作用的苯丙烷类物质的合成有关[21]。 该代谢路径还涉及一些与细胞壁降解有关的物质。 甾体皂苷类物质主要来自细胞质和细胞膜,充当膜 稳定剂、能量来源以及信号分子,某些甾体皂苷被认 为具有细胞毒性和抗真菌作用。NOX 主要参与细 胞分化和调控寄主的防御反应等过程[12],其产生的 活性氧,充当诱导细胞过程的信号因子^[13]。NOX 相关基因被敲除后,盾壳霉代谢产生抗氧化类、苷 类及羧酸类物质,并失去产孢和寄生能力。分析 认为:这些物质影响盾壳霉的寄生过程,涉及盾壳 霉细胞的分化和分生孢子,其生物学功能有待进 一步研究。

上述差异代谢物中苯二酚、松柏苷、葡萄糖苷 类、生物碱及其他物质的保留时间相同,有待进一步 结合其他检测手段,确定化合物结构。

参考文献

- [1] ARBONA V, IGLESIAS D J, TALON M, et al. Plant phenotype demarcation using nontargeted LC-MS and GC-MS metabolite profiling[J].J Agric Food Chem, 2009, 57(16): 7338-7347.
- [2] RAAMSDONK L M, TEUSINK B, BROADHURST D, et al. A

functional genomics strategy that uses metabolome data to reveal the phenotype of silent mutations [J]. Nat Biotechnol, 2001,19(1):45-50.

- [3] GOLDMAN B S,NIERMAN W C,KAISER D,et al.Evolution of sensory complexity recorded in a myxobacterial genome[J]. Proc Natl Acad Sci,2006,103(41):15200-15205.
- [4] HERTWECK C. Hidden biosynthetic treasures brought to light [J].Nat Chem Biol,2009,5(7):450-452.
- [5] RAMANA P, ADAMS E, AUGUSTIJINS P, et al. Metabonomics and drug development[J]. Methods Mol Biol, 2015, 1277: 195-207.
- [6] KRUG D, MULLER R.Secondary metabolomics, the impact of mass spectrometry-based approaches on the discovery and characterization of microbial natural products [J]. Nat Prod Rep,2014,31(6):768-783.
- [7] NGUYEN Q T, MERLO M E, MEDEMA M H, et al. Metabolomics methods for the synthetic biology of secondary metabolism[J].FEBS Lett, 2012, 586(15):2177-2183.
- [8] 贺珍,胡先文,付艳苹,等.重寄生真菌盾壳霉与核盘菌对峙培养的差异代谢物分析[J].华中农业大学学报,2017,36(1):35-41.
- [9] 张姝,张永杰.植病生防菌盾壳霉的分子生物学研究进展[J]. 微生物学通报,2008,35(9):1485-1489.
- [10] WEI W,ZHU W,CHENG J, et al.CmPEX6, a gene involved in peroxisome biogenesis, is essential for parasitism and conidiation by the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*[J].Appl Environ Microbiol, 2013, 79(12): 3658-3666.
- [11] QIN L,GONG X,XIE J,et al.Phosphoribosylamidotransferase, the first enzyme for purine *de novo* synthesis, is required for conidiation in the sclerotial mycoparasite *Coniothyrium minitans*[J].Fungal Genet Biol,2011,48(10):956-965.
- [12] YANG X, CUI H, CHENG J, et al. A HOPS protein, Cm-Vps39, is required for vacuolar morphology, autophagy, growth.conidiogenesis and mycoparasitic functions of *Coniothyrium minitans*[J].Environ Microbiol, 2016, 18(11): 3785-3797.
- [13] LALUCQUE H, SILAR P. NADPH oxidase: an enzyme for multicellularity[J].Trends Microbiol, 2003, 11(1):9-12.
- [14] WEI W, ZHU W, CHENG J, et al. Nox complex signal and MAPK cascade pathway are cross-linked and essential for pathogenicity and conidiation of mycoparasite *Conioth yrium* minitans[J/OL].Sci Rep.2016.6:24325[2019-03-31].http:// www.nature.com/articles/srep24325.pdf.
- [15] GOWDA H.IVANISEVIC J.JOHNSON C H.et al.Interactive XCMS online: simplifying advanced metabolomic data processing and subsequent statistical analyses[J]. Anal Chem. 2014.86 (14):6931-6939.
- [16] XIA J, WISHART D S.Using Metabo Analyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis[J/OL].Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 55: 14. 10. 1-14. 10. 91 [2019-03-07]. https://

www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27603023.

- [17] GUIJAS C. MONTENEGRO-BURKE J R. DOMINGO-AL-MENARA X, et al.METLIN: a technology platform for identifying knowns and unknowns [J]. Anal Chem, 2018, 90 (5): 3156-3164.
- [18] BOUHIFD M, HARTUNG T, HOGBERG H T, et al. Review: toxicometabolomics[J]. J Appl Toxicol, 2013, 33 (12): 1365-1383.
- [19] SHEN W, MAO H, HUANG Q, et al. Benzenediol lactones: a

class of fungal metabolites with diverse structural features and biological activities[J].Eur J Med Chem,2015,97:747-777.

- [20] 王慧,张红歧,邬吴洋,等.筒鞘蛇菰提取物及松柏苷的抗氧化 作用研究[J].三峡大学学报(自然科学版),2009(3):99-101.
- [21] CUONG D M, KWON S, JEON J, et al. Identification and characterization of phenylpropanoid biosynthetic genes and their accumulation in bitter melon (*Momordica charantia*) [J/OL]. Molecules, 2018,23(2): e469[2019-03-07]. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pubmed/29466305.doi:10.3390/molecules23020469.

Effect of NADPH oxidase-related genes on metabolism of *Coniothyrium minitans*

SUN Chi¹ JIANG Jing¹ HU Xianwen¹ FU Yanping² JIANG Daohong²

College of Science, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract To investigate the metabolic effects of NOX-related genes on *Coniothyrium mintans*, LC-MS-based metabolomics analysis was applied to detect the metabolites of mutant Qnox1-6 and the wild strain zs-1. The study shows that fourteen substances are significantly different between the two strains, most of which are carboxylic acids and glycosides. And seven metabolites only exist in the mutant strain, including hydroquinone, coniferine, saponin, three carboxylic acids and one other substance. These metabolites, which are closely related to the parasitism of *C. mintans* against *S. sclerotiorum*.

Keywords Coniothyrium minitans; NOX; mutant; parasitism ability; LC-MS; differential metabolites; metabolomics

(责任编辑:赵琳琳)