

抗真菌剂三峡肽素抑制指状青霉的转录组学研究

权雯婧, 刘超, 李奥, 薛艳红, 刘士平

Transcriptomics Study of Sanxapeptin against *Penicillium digitatum* as an Antifungal

QUAN Wenjing, LIU Chao, LI Ao, XUE Yanhong, and LIU Shiping

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021060047>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

利用转录组学分析三峡肽素生物合成的基因簇

Analysis of Gene Clusters for Sanxapeptin Biosynthesis by Transcriptomic Sequencing

食品工业科技. 2021, 42(13): 156–162

γ-辐照对指状青霉的抑制作用及在柑果实保鲜中的应用

Inhibition Effect of Gamma Irradiation on *Penicillium digitatum* and Its Application in Ponkan Fruit Perservation

食品工业科技. 2019, 40(14): 127–133

草酸诱导哈密瓜采后耐冷性的转录组构建与分析

Transcriptome Construction and Analysis of Cold-resistant Induced by Oxalic Acid in Postharvest Hami Melon Fruit

食品工业科技. 2019, 40(17): 103–109

内蒙古绒山羊不同部位骨骼肌的转录组分析

The transcriptomic analysis of different skeletal muscles of Cashmere goats

食品工业科技. 2017(10): 173–177

柑橘类胡萝卜素累积机制、分析方法及其加工稳定性研究进展

Research Progress on Accumulation Mechanism, Analysis Method and Processing Stability of Carotenoids in Citrus

食品工业科技. 2020, 41(5): 319–327

UPLC-MS/MS分析牛肉红朱橘成熟果实多酚类化合物积累特征

Polyphenolic Compounds Analysis in Fruits of ‘Niurouhong’ Tangerine by UPLC-MS/MS

食品工业科技. 2021, 42(22): 11–17



关注微信公众号，获得更多资讯信息

权雯婧, 刘超, 李奥, 等. 抗真菌剂三峡肽素抑制指状青霉的转录组学研究 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(6): 109–117. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060047

QUAN Wenjing, LIU Chao, LI Ao, et al. Transcriptomics Study of Sanxiapeptin against *Penicillium digitatum* as an Antifungal [J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(6): 109–117. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060047

· 生物工程 ·

抗真菌剂三峡肽素抑制指状青霉的转录组学研究

权雯婧, 刘超, 李奥, 薛艳红, 刘士平*

(三峡大学生物与制药学院, 中国轻工业功能酵母重点实验室, 湖北宜昌 443002)

摘要:为了分析三峡肽素(Sanxiapeptin)对柑橘类水果的主要采后致腐菌指状青霉(*Penicillium digitatum*)的抑制机理, 本研究首先利用显微技术观察了指状青霉随三峡肽素的形态变化, 并分析了细胞壁的保护剂山梨醇与细胞膜的保护剂麦角固醇在三峡肽素在抑制真菌过程中的作用, 然后通过BGISEQ-500研究平台, 对三峡肽素处理后的指状青霉进行了转录组测序, 对测序产生的6.38 Gb序列数据进行了无参转录组分析。结果表明, 经三峡肽素处理后, 指状青霉的细胞表面形态发生了明显变化。与正对照膜靶点杀菌剂百可得不一样, 细胞膜的保护剂麦角固醇可以明显缓解三峡肽素的抑制效果, 而细胞壁保护剂山梨醇却会促进其抑菌能力。转录组序列相互比对率为93.66%, 显示出较高的测序质量。指状青霉经三峡肽素处理后, 超过2000个基因发生了表达变化, 主要涉及细胞膜、细胞壁组分、自噬和糖代谢等途径。鉴于三峡肽素与百可得的作用途径不同, 本研究选取了仅由三峡肽素引起的530个差异表达基因进行分析, 发现这些基因主要与疏水蛋白、麦角固醇合成、聚糖合成及GPI(糖基磷脂酰肌醇, Glycosylphosphatidylinositol)的代谢相关, 在17个候选基因中, 有8个基因的RT-PCR半定量表达检测与转录组测序结果完全一致。上述结果说明三峡肽素可能通过影响细胞壁或细胞膜等细胞表面的功能, 从而起到抑制柑橘采后致腐真菌的作用。

关键词:三峡肽素, 指状青霉, 抗真菌, 转录组, 柑橘, 采后致腐

中图分类号: Q939.92

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)06-0109-09

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021060047

本文网刊:



Transcriptomics Study of Sanxiapeptin against *Penicillium digitatum* as an Antifungal

QUAN Wenjing, LIU Chao, LI Ao, XUE Yanhong, LIU Shiping*

(Key Laboratory of Functional Yeast (China National Light Industry), College of Life Science and Pharmacy,
Three Gorges University, Yichang 443002, China)

Abstract: To analyze the inhibitory mechanism of Sanxiapeptin on the main postharvest spoilage fungus *P. digitatum* of citrus fruits, the morphology responded to Sanxiapeptin was observed by microscopy. The cell wall protective agent sorbitol and cell membrane protective agent ergosterol were used to analyze the inhibitory effects of Sanxiapeptin on the fungi. Through BGISEQ-500 research platform, the transcriptome of *P. digitatum* treated by Sanxiapeptin was sequenced, and the 6.38 Gb data were analyzed by non-parameter method. The results showed that the cell surface morphology changed significantly after treatment by Sanxiapeptin. Unlike the positive control Bellkute, a membrane-target antifungal, the cell membrane protector of ergosterol significantly alleviated the inhibitory effect of Sanxiapeptin, while the cell wall protector of sorbitol promoted the antifungal ability. The transcriptome alignment rate reached 93.66%, showing high sequencing quality. Sanxiapeptin affected the expression of more than 2000 genes in *P. digitatum*, which mainly involved in the

收稿日期: 2021-06-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31270389, 31540065)。

作者简介: 权雯婧(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学, E-mail: 18409166061@163.com。

* 通信作者: 刘士平(1974-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 微生物代谢工程, E-mail: shipingliu@zju.edu.cn。

components of cell membrane and cell wall, autophagy and sugar metabolism. In view of the different pathway from Bellkute, 530 differentially expressed genes caused by Sanxiapeptin alone were analyzed, and these genes were mainly related to the metabolism of hydrophobin, ergosterol, glycan and GPI (glycosylphosphatidylinositol). 17 candidate genes were selected for semi-quantitative expression verification by RT-PCR, among them, 8 genes were completely consistent with the transcriptome sequencing. All the results indicated that Sanxiapeptin could inhibit the postharvest decay fungi in citrus mediated by cell walls or cell membranes.

Key words: Sanxiapeptin; *Penicillium digitatum*; antifungal; transcriptome; citrus; postharvest decay

柑橘是我国南方地区农村经济的支柱产业之一^[1],每年都有大量的柑橘因指状青霉(*P. digitatum*)等采后致腐真菌的影响而发生腐败和品质劣变^[2],造成巨大经济损失^[3]。化学杀菌剂百可得、咪鲜胺等虽对柑橘的防腐有一定的效果^[4],但处理后的果品品质发生劣变,糖份降低,而且对人体有毒副作用,残留时间长且对环境有污染,许多国家已禁止化学杀菌剂在果蔬采后处理中使用^[5-6]。因此,开发出一种绿色健康的保鲜剂显得极为紧迫^[7-8]。

近年来抗真菌肽(Antifungal Peptide, AFP)因其抑菌能力强、结构多样、无毒副作用受到了人们的广泛关注,如表面活性素、芬莽素、伊枯草菌素、杆菌霉素和羊毛硫肽等^[9],在医药、食品、农业和饲料添加剂等领域中发挥着越来越大的作用^[10]。这类物质因其作用的靶点多与传统的抗生素不一样,因此微生物不易产生抗药性,如羊毛硫肽通过在质膜上形成膜孔而达到杀菌的效果^[11]。抗真菌肽的作用机制比较复杂,其可能的作用靶点为:a.影响细胞壁上的几丁质或者聚糖代谢,阻碍细胞壁的功能^[12];b.作用于细胞膜,使细胞膜通透性增加,内容物流出^[13];c.作用于细胞内的细胞器或物质(如线粒体、蛋白质、核酸等),使细胞生长和繁殖受到抑制,从而达到抑菌的目的^[14-15]。

在前期研究中,本实验室从三峡河岸地区分布的草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)中分离到一种新型的线性五肽,命名为三峡肽素(Sanxiapeptin),研究发现它在离体条件下或柑橘体内均对柑橘的主要采后致腐菌指状青霉具有强烈的抑制作用^[16],而且其抑菌能力远优于目前市场上广泛应用的化学杀菌剂百可得^[17]。为了明确三峡肽素的抑菌机理,本研究通过形态学观察、保护剂的抑菌效果以及转录组测序的方法,初步确定了三峡肽素可能的抑菌靶点。本研究不仅有助于丰富抗真菌肽的作用机理,还将有助于新型绿色健康的柑橘保鲜剂的研发,对促进我国农业经济的发展具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

新鲜土豆 市售;葡萄糖 科密欧化学试剂有限公司;琼脂、麦角固醇、山梨醇 金燕海洋生物股份有限公司;色谱级乙腈 美国天地有限公司;真菌 RNA 提取试剂盒 美国 Omega Bio-Tek 公司;百可得

上海日曹达贸易有限公司;反转录试剂 Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit Ver.2、T3 Super PCR Mix 北京擎科新业生物技术有限公司。

BS-224s 电子天平 德国赛多利斯有限责任公司;SW-CJ-2FD 型双人实验操作台 苏州净化设备厂;XPX-9052 MBE 数显培养箱 上海博讯实业有限公司医疗设备厂;ZQZY-85BN 全自动控温摇床 上海知楚仪器有限公司;Master-s15 纯水仪 上海和泰仪器有限公司;MyCycler™ Thermal PCR 仪 美国 BIO-RAD 公司;GDS-8000 凝胶成像系统 美国 UVP 公司;Allegra 64R 台式高速冷冻离心机 美国 BECKMAN 公司;DYCP-31DN 水平电泳仪 北京市六一仪器厂;YM30F 不锈钢智能型立式电热蒸汽消毒器 上海三申医疗器械有限公司;光学显微镜下观察 奥林巴斯株式会社;S3000N 扫描电子显微镜、H-7500 透射电子显微镜 Hitachi 日本。

1.2 菌株及培养条件

本实验所使用的菌株为指状青霉 *P. digitatum* (CICC 41633),本实验室自行分离鉴定^[18-19]。菌株保藏于 4 ℃ 的 PDA 固体培养基斜面中,培养基配方:土豆 200 g,葡萄糖 20 g,琼脂 15~20 g,水 1000 mL, pH 自然,121 ℃ 灭菌 20 min。菌株经活化后,采用不加琼脂的 PDA 液体培养基进行培养,培养温度为 28 ℃,摇床转速控制在 120 r/min。

1.3 三峡肽素对菌株形态的影响

将指状青霉在上述条件下培养 3 d 后,分别添加 0~50 μg/mL 的三峡肽素和正对照百可得,继续培养 12 h^[20]。在光学显微镜观察时,将培养物在 5000 r/min 离心 5 min 后,收集菌丝制备玻片进行观察^[21]。扫描电子显微镜和透射电子显微镜的观察委托百奥生物科技有限公司(湖北,武汉)按照文献所示方法完成^[22],每次试验重复 3 次。

1.4 麦角固醇和山梨醇的补偿分析

为了初步判断三峡肽素抑制指状青霉的可能作用靶点,本研究分别采用丝状真菌细胞膜的保护剂麦角固醇和细胞壁的保护剂山梨醇进行补偿实验。将 0、31.25、62.5、125、250、500、1000 μg/mL 的麦角固醇或山梨醇添加在 PDA 固体培养基中,在培养皿中央放置含有 1 mg/mL 的三峡肽素或百可得的牛津杯^[23-24],在 28 ℃ 的培养箱中培养 3 d 后测定抑菌圈直径,通过抑菌圈大小的变化判断可能的补偿效应。每次试验设置 4 个重复。

1.5 转录组学分析

将指状青霉在 1.2 所述培养条件下培养 3 d 后, 分别添加 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的正对照百可得(PD-2)和三峡肽素(PD-3), 继续培养 6 h, 同时设置相同时长生长的指状青霉作为正常组(PD-1)。将培养物在 5000 r/min 离心 5 min 后, 收集菌丝提取 RNA 后, 送至华大基因进行转录组测序。将获得的转录组数据使用华大基因自主研发的过滤软件 SOAPnuke(v1.4.0)进行统计, 使用 Trimmomatic 进行过滤, 得到 clean reads, 并将过滤后的数据中大于 20 个碱基的序列所占的比例数进行统计; 使用 Bowtie2(v2.2.5)软件将 clean reads 进行比对, 并将能相互比对上的净数据比例进行统计。根据比对结果, 利用 RSEM(RNA-Seq by Expectation Maximization, v1.2.8)软件进行定量分析, 并以 FPKM(Fragments Per Kilobase Per Million reads)计算基因的表达水平, 差异表达基因默认定义为 FDR(False Discovery Rate) ≤ 0.001 且倍数差异在 1 倍以上的基因。将筛选到的差异表达基因, 采用 GO(Gene Ontology)和 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库对结果进行注释分类, 同时使用 R 软件中的 phyper 函数进行富集分析, 同时将检测到的基因进行在 NR(Nucleotide Sequence Database)和 NT(Non-Redundant Protein Sequence Database)数据库中进行注释和归类, 判断基因可能的功能^[25]。

1.6 RT-PCR 验证

使用 Oligo7 软件设计引物, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 使用反转录试剂盒 Goldenstar™ RT6 cDNA Synthesis Kit Ver.2 将所提 RNA 反转录成 cDNA, 测定并调整 cDNA 浓度之后, 采用半定量 RT-PCR 结合电泳条带的亮度进行验证^[26], 所用的引物序列见表 1。PCR 反应体系为模板 DNA: 2 μL , T3 Super PCR Mix: 20 μL , 上游和下游引物各 1 μL ,

总体积 50 μL 。PCR 程序 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 然后是 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s, 依据各引物的不同将退火温度设置为 T_m+5 $^{\circ}\text{C}$, 复性 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s, 经过 30~35 循环后再在 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min。将 PCR 产物采用 1.2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

2 结果与分析

2.1 三峡肽素对指状青霉菌丝的形态影响

在培养条件下, 三峡肽素可以显著抑制指状青霉的生长(图 1), 而且在同等浓度下其抑制能力优于市场上广泛使用的农药百可得(双胍三辛烷苯基磺酸盐, 一种以细胞膜为靶点的杀真菌剂)^[27~28]。为了进一步了解三峡肽素对指状青霉菌丝形态的影响, 本实验采用百可得为阳性对照, 设置了 0~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓

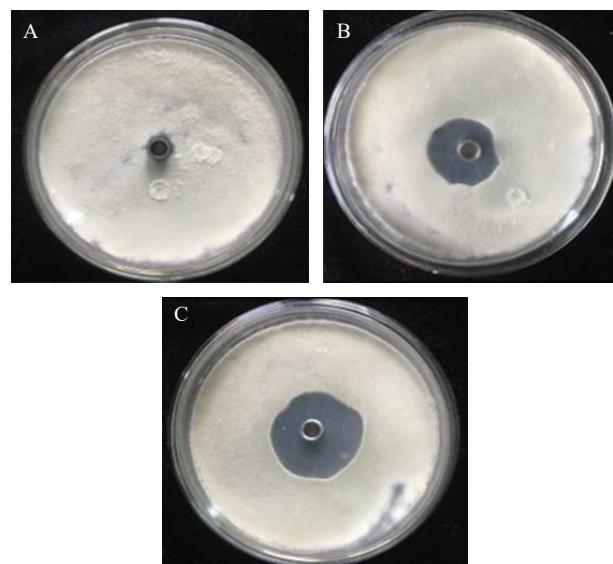


图 1 三峡肽素对指状青霉的拮抗作用

Fig.1 Antagonistic effect of Sanxiaopeptin on *P. digitatum*
注: A: 牛津杯中添加蒸馏水; B: 1 mg/mL 百可得; C: 1 mg/mL 的三峡肽素。

表 1 实验中所用的引物序列
Table 1 Primer sequences in the experiment

基因编号	序列(5' to 3')	基因	序列(5' to 3')
CL279.Contig2 F	TTGCTTCTCCCCAACACCT	CL2658.Contig2 F	GCAAATGCCTATGAGTCGAC
CL279.Contig2 R	GCGTATCTTATGGTTCCCGTTC	CL2658.Contig2 R	GTCTGTTTGACGTGTTCCC
CL2786.Contig6 F	TCGACTTCCCAACGACA	CL3292.Contig1 F	TACGAGCACACATTACTAGCC
CL2786.Contig6 R	CCTATGTTGAGTTGCGCTCT	CL3292.Contig1 R	CCTTGCTGCATTACATGTCA
CL1025.Contig2 F	CGAAAGAGCTGAACAATCCG	CL2611.Contig2 F	AAATCTCGTTGGCCGTT
CL1025.Contig2 R	CTGGTAAAGCCTTGTGATTCCC	CL2611.Contig2 R	TTGTATCTGTACCTCGCCAGT
CL3.Contig4 F	TTGACACTTGGCTTCACT	CL2658.Contig1 F	GCAAATGCCTATGAGTCGAC
CL3.Contig4 R	CCTACTAGTTGATATCCGCTT	CL2658.Contig1 R	GTCTGTTTGACGTGTTCCC
CL486.Contig1 F	AAGCTCCCGCATGACCCA	CL2616.Contig1 F	GTATAATTCCCCACAGTCCGAAG
CL486.Contig1 R	CAGTAGTCAAATACCGTCGACA	CL2616.Contig1 R	TCTATTCTCCGGCCATCGTT
CL2898.Contig2 F	ATCGACTTACGTGGCCCTT	CL254.Contig3 F	GCAGCAAGAACAGACCTT
CL2898.Contig2 R	TCCAACGTCGCATAATCCCT	CL254.Contig3 R	TTGAACCGTTGATCCCCCTT
CL168.Contig10 F	ATGCACGAACACAAGTAGCTC	CL2193.Contig3 F	AACCTCGATACCGTTAATGCC
CL168.Contig10 R	ATCAGGCCAGAATATGACAC	CL2193.Contig3 R	CATCGATTCCGCATAGCAAG
CL2032.Contig3 F	CCTCGGAAGAAACATTATCAGA	CL277.Contig8 F	ATCGAATCAACCGTAAGGGAC
CL2032.Contig3 R	AAGATGATTCCACGGTTTGC	CL277.Contig8 R	AGAGCCCAAATTGCGACGAA
CL276.Contig4 F	TCCAACACCGTCACTACCACT	CL1226.Contig2 F	CGAAGCCCAGATCAAAGTCAC
CL276.Contig4 R	TCCACGACCATCTCATTCCC	CL1226.Contig2 R	CGCCCATGTGTAATATGCCCT

度梯度,光学显微镜观察显示,三峡肽素和百可得在浓度超过 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时均会导致指状青霉的菌丝发生消融,在 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,不同组别的菌丝的形态变化是最为明显的,因此选用此浓度处理后的菌丝进行扫描电子显微镜和透射电子显微镜的观察。观察结果显示:三峡肽素和百可得两者都使指状青霉的菌丝明显变粗,但经三峡肽素处理后,菌丝体明显形成结节扭曲状(图 2A~图 2C)。

为了进一步了解指状青霉的显微形态变化,在相同浓度处理后分别进行了扫描电镜和透射电镜观察。扫描电镜结果发现,在添加百可得后,菌丝体的扭曲程度和正常生长的指状青霉没有明显形态差异,而三峡肽素可以明显导致菌丝体发生结节和扭曲(图 2D~图 2F)。透射电镜观察结果显示,经三峡肽素处理后的指状青霉细胞内部出现了空腔,细胞边缘发生破裂、不完整,而作用于细胞膜的物质百可得处理后细胞边缘仍然较为完整,细胞内部也没有出现空腔(图 2G~图 2L)。上述结果表明,三峡肽素与百可得的作用机理可能不一样,可能通过破坏细胞壁,造成渗透压紊乱,使得胞内物质外流,从而导致胞内空腔的形成。

2.2 麦角固醇和山梨醇对三峡肽素介导的抑菌作用的补偿作用

麦角固醇是真菌细胞膜的重要组成成分,该化

合物的结构稳定,专一性强;山梨醇是一种渗透保护剂,可以用于稳定真菌的原生质体,这两种物质在许多研究中分别用作细胞膜和细胞壁的保护剂^[29]。为了明确三峡肽素抑制指状青霉的可能靶点,本研究分析了麦角固醇和山梨醇在不同浓度下对其抑菌能力的影响。实验结果表明:在低浓度下上述物质均没有明显的效果,但是 1 mg/mL 浓度下的山梨醇对三峡肽素的抑菌能力不仅没有补偿效应,反而会促进三峡肽素的抑菌能力(图 3A)。而麦角固醇则相反,在 1 mg/mL 的浓度下,会显著($P<0.05$)缓解三峡肽素对指状青霉的抑制程度,表现出一种明显的补偿效应(图 3B)。相比正对照百可得,在同浓度下,山梨醇和麦角固醇均未对百可得的抑菌能力造成影响(图 3C~图 3D)。以上结果表明,三峡肽素与百可得的作用机理不一致,但可能通过影响细胞膜中麦角固醇的变化来达到抑制真菌的能力;同时,细胞壁及渗透压的变化也会影响到三峡肽素的抑菌能力。

2.3 转录组测序质量分析

将测序产生的原始数据(raw reads)中低质量、接头污染以及未知碱基含量过高的数据过滤后,平均每个菌株产生了 4253 万条净序列(clean reads),平均容量达 6.38 兆碱基(Gb),高质量数据约 96%。将所获得的的 clean reads 使用 HISAT 进行参考基因组序列比对,平均比对率达到 93.66%。上述结果表

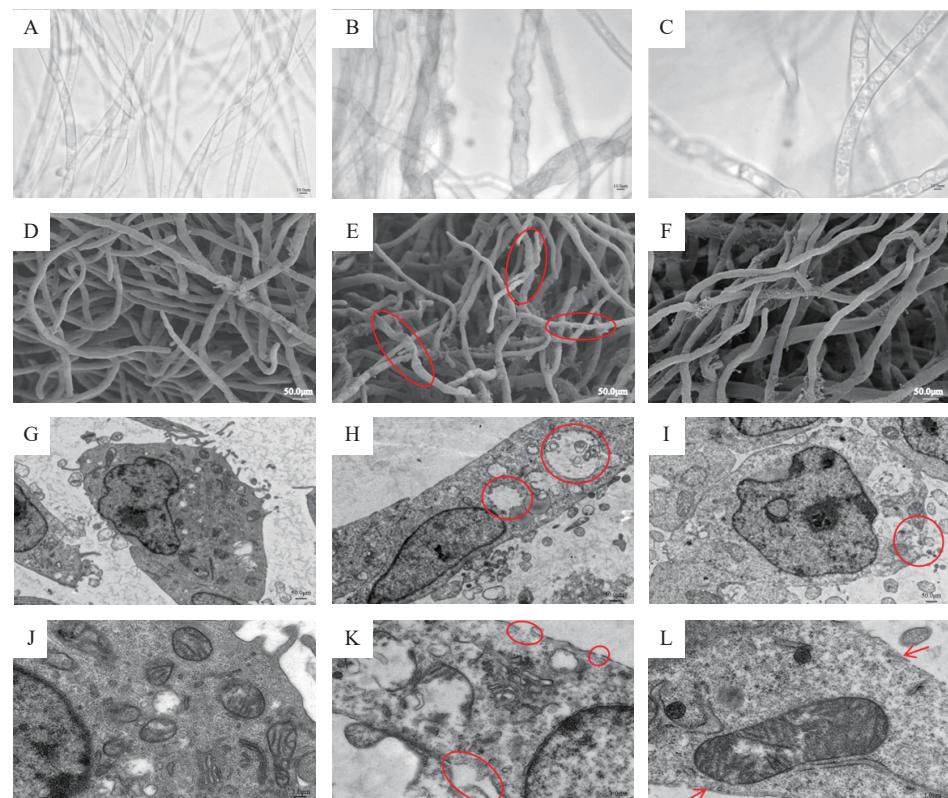


图 2 三峡肽素对指状青霉的形态变化影响

Fig.2 Morphological responses of *P. digitatum* induced by Sanxiaopeptin

注: A~C: 光学显微镜下(400 \times)的正常指状青霉(A),三峡肽素处理 12 h 后(B),百可得处理 12 h(C); D~F: 扫描电子显微镜下(180 \times)的正常指状青霉(D),三峡肽素处理(E)和百可得处理(F); G~I: 透射电子显微镜下(1200 \times)的正常指状青霉(G),三峡肽素处理(H)和百可得处理(I); J~L: 透射电子显微镜下(6000 \times)的正常指状青霉(J),三峡肽素处理(K)和百可得处理(L)。

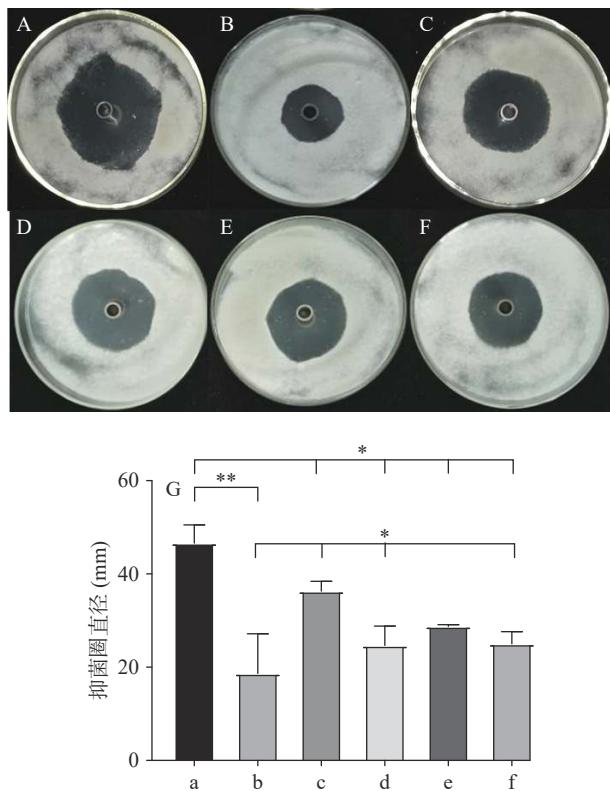


图 3 山梨醇和麦角固醇对三峡肽素抑菌能力的补偿效应
Fig.3 Compensatory effect of sorbitol and ergosterol on the antifungal ability of Sanxiapeptin

注: 上图显示不同物质对指状青霉的抑菌圈大小, 其中 A: 山梨醇+三峡肽素; B: 麦角固醇+三峡肽素; C: 三峡肽素; D: 山梨醇+百可得; E: 麦角固醇+百可得; F: 百可得, 上述物质浓度均为 1 mg/mL。右图显示山梨醇和麦角固醇对三峡肽素抑菌能力的统计分析, a、b、c、d、e、f 分别与左图的 A、B、C、D、E、F 对应; *和**分别表示 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 的显著性差异; $n=3$ 。

明(表 2), 此次测序的质量有保证, 结果可靠^[30]。

2.4 差异表达基因分析

为了进一步分析三峡肽素抑菌作用的分子机理, 按照差异的倍数 $|\log_2(\text{FoldChange})|$ 和错误发现率(FDR)来筛选差异表达基因, 分析中将同时满足 $|\log_2(\text{FoldChange})| \geq 1$ 且 $\text{FDR} \leq 0.001$ 的转录本确定为差异表达基因^[31]。三个转录组中的表达发生显

著变化的基因数如表 3。

上述结果表明, 加入三峡肽素处理后的菌株(PD-3)和正常生长的菌株(PD-1)相比, 其差异表达的基因数有 13.07%, 该结果与百可得处理后的菌株结果非常接近, 即 PD-1 对 PD-2 的差异基因为 13.27%, 从数量上反映二者作用的趋同性。但是这些差异表达的基因大多数并不相同(图 4), 且由于二者作用后的显微观察结果及麦角固醇和山梨醇的补偿实验存在明显差异, 说明二者的作用途径明显不同, 因此, 我们对于差异基因的研究集中在两者的交集($\{\text{PD-1 对 PD-3}\} \cap \{\text{PD-3 对 PD-2}\}$)包含的 530 个基因中, 即聚焦在仅由三峡肽素引起的表达差异的基因上。

2.5 差异表达基因的功能注释

对不同处理下差异表达的基因, 分别采用 GO 和 KEGG 分类富集分析。对照百可得处理后的指状青霉(PD-2)和正常生长的菌株(PD-1)相比, 糖类、脂质的代谢、能量代谢、遗传过程和细胞自噬等途径发生了变化(图 5A~图 5B)。三峡肽素处理后的菌株(PD-3), 其差异基因也主要集中在上述途径(图 5C~图 5D), 不管是基因的数量还是基因可能的功能, 暗示三峡肽素和百可得在抑制真菌的代谢通路上可能有部分重叠。

为了深入分析三峡肽素和百可得抑菌机理的差异, 根据三峡肽素所导致的指状青霉的形态变化以及相关保护剂的补偿实验结果, 将仅由三峡肽素影响的 530 个基因进行了代谢通路分析, 结果发现很多基因与聚糖、鞘脂类物质、固醇、疏水蛋白及 GPI(糖基磷脂酰肌醇, Glycosylphosphatidylinositol)的代谢相关(图 5E~图 5F, 表 4), 说明了三峡肽素有可能影响了细胞膜和细胞壁等细胞表面的功能。

2.6 差异表达基因的验证分析

为了验证上述转录组测序分析的准确性, 本研究选取了三峡肽素影响指状青霉表达变化的 17 个候选基因(表 5)进行 RT-PCR 半定量表达验证, 这些基因的功能大多与细胞表面的代谢相关。在进行 RT-PCR 之前, 先选择 P450 基因 CL1226.Contig2 作

表 2 转录组测序数据概况
Table 2 Overview of transcriptome sequencing data

样品	净数据(百万)	高质量数据(%)	净碱基数(兆碱基)	比对率(%)
PD-1	42.62	96.29	6.39	93.62
PD-2	42.42	96.18	6.36	93.92
PD-3	42.54	96.36	6.38	93.45

表 3 差异表达的基因数
Table 3 Number of differentially expressed genes

比较组	上调基因数	下调基因数	总数	差异基因数占总基因数比例(%)
PD-1对PD-2	1373	1179	2552	13.27
PD-1对PD-3	1078	1435	2513	13.07
PD-3对PD-2	995	657	1652	5.59
$\{\text{PD-1对PD-3}\} \cap \{\text{PD-3对PD-2}\}$	189	341	530	2.76

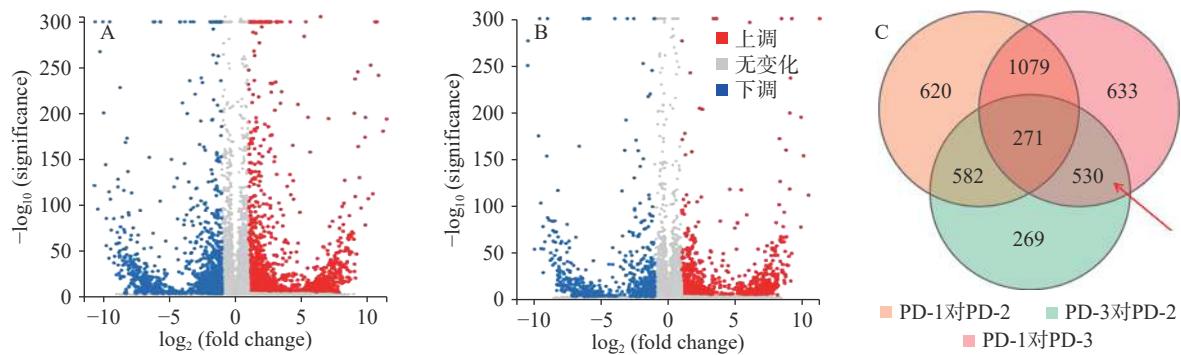


图 4 差异表达基因的火山图分布

Fig.4 Volcano figure of differentially expressed genes

注: A: PD-1 对 PD-2 的比较分析, B: PD-3 对 PD-2 的比较分析; 横坐标为 $\log_2(\text{fold change})$, 代表基因在不同样本中表达倍数变化; 纵坐标为 $-\log_{10}(\text{Significance})$, 代表基因表达量变化差异的统计学显著性, 不同的颜色表示基因表达的变化; C: 转录组分析中差异表达基因的数量, 箭头表示的 530 个基因只由三峡肽素调控, 而不受百可得的影响。

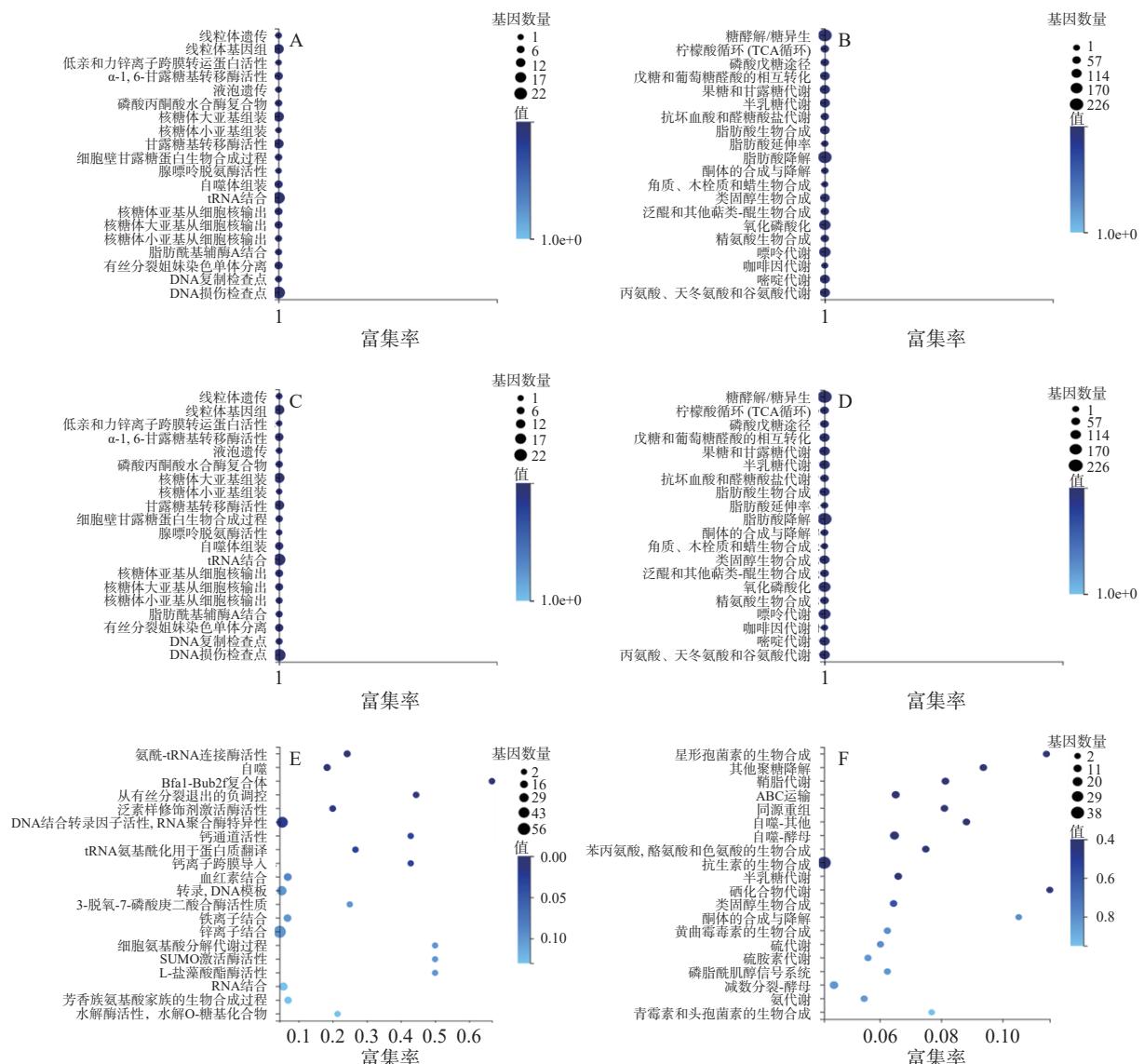


图 5 差异表达基因的注释分析

Fig.5 Annotation of differentially expressed genes

注: A: PD-1 对 PD-2 的 GO 分类分析; B: PD-1 对 PD-2 的 KEGG 分类分析; C: PD-1 对 PD-3 的 GO 富集分析; D: PD-1 对 PD-3 的 KEGG 富集分析; E: 仅由三峡肽素调控的基因 GO 富集分析; F: 仅由三峡肽素调控的基因 KEGG 富集分析。其中 X 轴为富集比例, 表示选定的基因集中注释到某一条目的基因数与本物种注释到该条目总基因数的比值, 计算公式为 $\text{Rich Ratio} = \text{Term Candidate Gene Num} / \text{Term Gene Num}$; Y 轴表示确定的代谢路径, 气泡的大小表示差异基因数目, 颜色的深浅代表差异显著性大小。

表 4 部分可能参与细胞表面功能的差异表达的基因
Table 4 Some differentially expressed genes possibly involved in cell surface metabolism

功能注释	注释的基因总数 ^a	三峡肽素致上调的基因数	百可得致上调的基因数	三峡肽素致下调的基因数	百可得致下调的基因数
GPI合成	27	4	3	9	3
聚糖代谢	52	17	8	11	12
细胞壁及组分	99	12	5	10	4
细胞膜及组分	146	21	20	17	35
麦角固醇合成	17	4	0	5	2
疏水蛋白	9	3	1	2	3

注: a注释的基因总数来自于GO、KEGG、NR、NT、Pfam、SwissProt等数据库的基因总和。

表 5 指状青霉中候选基因的表达量及注释
Table 5 Expression and annotation of candidate genes in *P. digitatum*

基因名称	PD-1	PD-2	PD-3	基因功能注释	基因名称	PD-1	PD-2	PD-3	基因功能注释
<i>CL168.Contig10</i>	1.08	1.3	0.28	β -半乳糖苷酶	<i>CL2658.Contig2</i>	0	0	2.69	β -半乳糖苷酶
<i>CL2032.Contig3*</i>	0.97	0.9	0	β -N-乙酰基己糖苷酶	<i>CL2193.Contig3*</i>	1.11	2.16	0.49	UDP-N-乙酰氨基葡萄糖-磷酸二烷基酯 N-乙酰氨基葡萄糖磷酸转移酶
<i>CL3292.Contig1</i>	7.71	6.41	2.98	甘露糖寡糖 α -1,2-甘露糖苷酶	<i>CL277.Contig8*</i>	2.64	2.63	0.01	α -L-岩藻糖苷酶
<i>CL1025.Contig2*</i>	3.19	2.47	0	α -淀粉酶	<i>CL276.Contig4</i>	3.83	6.38	22.81	天冬酰胺基tRNA合成酶
<i>CL2611.Contig2*</i>	0	0	0.84	山梨糖还原酶	<i>CL2658.Contig1</i>	3.11	3.26	0	β -半乳糖苷酶
<i>CL486.Contig1</i>	5.17	4.82	73.61	几丁质酶	<i>CL2898.Contig2</i>	1.27	1.09	0	肌动蛋白细胞骨架调节复合蛋白PAN1
<i>CL279.Contig24*</i>	0.02	0	3.36	β -半乳糖苷酶	<i>CL3.Contig4*</i>	0.87	1.1	4.63	磷脂酰肌醇聚糖
<i>CL254.Contig3*</i>	4.95	8.39	0.9	水解酶活性	<i>CL2786.Contig6</i>	4.07	3.3	1.8	二烷基磷酸酯 β -葡萄糖基转移酶
<i>CL2616.Contig1</i>	5.69	8.72	0.02	丝氨酸/苏氨酸激酶活性					

注: *表示与RT-PCR的表达验证一致。

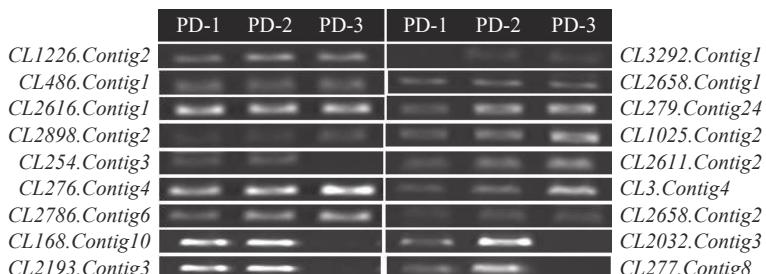


图 6 候选基因的 RT-PCR 表达验证
Fig.6 RT-PCR expression verification of the candidate genes

为管家基因, 因为它在不同时期、不同条件下均可稳定的表达, 是一种较为理想的内参基因^[32-33]。

半定量 RT-PCR 结果显示, 有 8 个参与细胞表面代谢的基因 *CL254.Contig3*、*CL279.Contig24*、*CL1025.Contig2*、*CL2611.Contig2*、*CL3.Contig4*、*CL2032.Contig3*、*CL2193.Contig3*、*CL277.Contig8* 基因的表达与转录组测序结果完全一致(表 5、图 6)。功能预测结果表明, 这些基因大部分位于细胞壁或细胞膜中, 可能与细胞表面的磷脂酰肌醇聚糖的合成和代谢的生物活动相关, 从而影响了细胞表面的完整性, 导致细胞内溶物外溢, 从而起到抑菌的作用。

3 结论

本研究分析了三峡肽素对指状青霉的形态学影响, 明确了细胞膜保护剂麦角固醇及细胞壁保护剂山梨醇对三峡肽素抑菌作用的补偿效应, 同时基于 BGISEQ-500 测序平台, 分析比较了指状青霉在三峡

肽素处理后的无参转录组测序数据, 并对差异表达基因进行了分析, 将可能的抑菌代谢途径初步聚焦在 530 个差异基因中。重点对影响细胞表面的候选基因进行了分析和验证, 初步确定三峡肽素通过影响疏水蛋白、麦角固醇合成酶、聚糖及 GPI 代谢途径相关的蛋白等细胞膜及细胞壁等细胞表面的功能蛋白来发挥作用, 所有这些尝试为明确其抑菌真菌的机理奠定了基础。后续工作的主要内容将集中在对上述候选基因在草酸青霉中进行超表达或者基因敲除以构建突变体, 在明确基因功能的基础上, 通过分析突变体对三峡肽素敏感程度的变化解析其作用机理, 进一步确定三峡肽素的作用靶点。

参考文献

- [1] 赵莹, 梁克力, 贾纪春, 等. 不同时期的柑橘果实中真菌种类分析[J]. 植物病理学报, 2017, 47(3): 389-397. [ZHAO Y, LIANG K L, JIA J C, et al. Fungal community diversity in citrus fruit at different ripening stage[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2017,

47(3): 389–397.]

[2] 解淑慧, 邵兴锋, 王可, 等. 柑橘采后腐烂主要致病菌的分离鉴定及丁香精油对其抑制作用研究 [J]. 果树学报, 2013, 30(1): 134–139. [XIE S H, SHAO X F, WANG K, et al. Isolation and identification of dominant pathogen on citrus fruit and the anti-fungal effect of clove oil on these fungi [J]. Journal of Fruit Science, 2013, 30(1): 134–139.]

[3] 闵晓芳. 柑橘采后致病青霉的分离鉴定及其生物学特性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2007. [MIN X F. Study on separation, identification and biological characteristics of *Penicillium* spp causing diseases of citrus [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2007.]

[4] 孔玉珊, 秦田明, 薛艳红, 等. 疏花水柏枝内生真菌对三峡地区柑橘致腐菌的拮抗作用研究 [J]. 食品工业科技, 2015, 36(8): 175–177. [KONG Y S, QIN T M, XUE Y H, et al. Antimicrobial effect of endophytes from *Myricaria laxiflora* on the fungus causing citrus rot in Three Gorges area [J]. Science and Technology of Food Industry, 2015, 36(8): 175–177.]

[5] SONG Y Y, HE L M, CHEN L L, et al. Baseline sensitivity and control efficacy of antibiosis fungicide tetracycline against *Botrytis cinerea* [J]. European Journal of Plant Pathology, 2016, 146(2): 337–347.

[6] SMITS T H M, DUFFY B, BLOM J, et al. Pantocin A, a peptide-derived antibiotic involved in biological control by plant-associated *Pantoea* species [J]. Archives of Microbiology, 2019, 201: 713–722.

[7] 潘园园, 刘钢. 中国丝状真菌次级代谢分子调控研究进展 [J]. 遗传, 2018, 40(10): 874–887. [PAN Y Y, LIU G. Research advances on molecular regulation of filamentous fungal secondary metabolism in China [J]. Hereditas (Beijing), 2018, 40(10): 874–887.]

[8] YANG L P, XIE J T, JIANG D H, et al. Antifungal substances produced by *Penicillium oxalicum* strain PY-1—potential antibiotics against plant pathogenic fungi [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2008, 24(7): 909–915.

[9] 金清, 肖明. 新型抗菌肽-表面活性素、伊枯草菌素和丰原素 [J]. 微生物与感染, 2018, 13(1): 56–64. [JIN Q, XIAO M. Novel antimicrobial peptides: Surfactin, iturin and fengycin [J]. Journal of Microbes and Infections, 2018, 13(1): 56–64.]

[10] 甄阳光. 抗菌肽研究进展及应用 [J]. 饲料博览, 2018(7): 8–11. [ZHEN Y G. Research progress and application of antimicrobial peptides [J]. Feed Review, 2018(7): 8–11.]

[11] 孙榕壑. 抗菌肽与类抗菌肽研究 [J]. 当代化工研究, 2018(5): 176–177. [SUN R H. Study on antimicrobial peptides and antimicrobial peptide-like [J]. Chemical Intermediate, 2018(5): 176–177.]

[12] 张景翔, 阎润, 姜远英, 等. 新的抗真菌药物靶点研究进展 [J]. 菌物学报, 2018, 37(10): 1378–1390. [ZHANG J X, YAN L, JIANG Y Y, et al. The research progress of novel antifungal drug targets [J]. Mycosistema, 2018, 37(10): 1378–1390.]

[13] MA Y, YU H, LIU W, et al. Integrated proteomics and metabolomics analysis reveals the antifungal mechanism of the C-coordinated O-carboxymethyl chitosan Cu(II) complex [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 155(15): 1491–1509.

[14] 陈颐, 曹国颖, 傅得兴, 等. 辣白霉素类抗真菌药的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2007(14): 1082–1087. [CHEN D, CAO G Y, FU D X, et al. Advances in research of echinocandins drugs as antifungal agents [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2007(14): 1082–1087.]

[15] 杨炜华, 高培基. 青霉源抗菌肽类霉肽素的体外抑菌活性研究 [J]. 中国医药生物技术, 2009, 4(3): 190–192. [YANG W H, GAO P. In vitro activity of an antibacterial peptide AF generated by *Penicillium* [J]. Chin Med Biotechnol, 2009, 4(3): 190–192.]

[16] 杨宇纯, 肖梅, 刘呈雄, 等. 草酸青霉中新型线性五肽的发现及对柑橘采后致腐菌拮抗活性研究 [J]. 微生物学通报, 2019(10): 481–490. [YANG Y C, XIAO M, LIU C X, et al. A novel linear pentapeptide from *Penicillium oxalicum* and its antagonism against postharvest decay mold of citrus [J]. Microbiology China, 2019(10): 481–490.]

[17] 张俊. 丙环唑对核盘菌和指状青霉菌抑制作用的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2019. [ZHANG J. Inhibitory effects of propiconazole on *Sclerotinia sclerotiorum* and *Penicillium digitatum* [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2019.]

[18] 熊琪, 杨书珍, 曹正清. 毛霉诱导脐橙产抗病物质对指状青霉和酸腐菌的抑制 [J]. 农业工程学报, 2020, 36(6): 315–321. [XIONG Q, YANG S Z, CAO Z Q, et al. Inhibition of induced citrus peel disease-resistant components against *Penicillium digitatum* and *Geotrichum citri-aurantii* [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering, 2020, 36(6): 315–321.]

[19] 潘顺, 刘雷, 王为民, 等. 哈茨木霉发酵液中 peptaibols 抗菌肽的鉴定及活性研究 [J]. 中国生物防治学报, 2012, 28(4): 528–536. [PAN S, LIU L, WANG W W, et al. Identification of antibiotic peptaibols from fermentation broth of *Trichoderma harzianum* [J]. Chinese Journal of Biological Control, 2012, 28(4): 528–536.]

[20] 倪密. 人工合成抗菌肽抑制棉花黄萎病菌的机制及应用研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2012. [NI M. Mechanism of synthetic antifungal peptides against *Verticillium dahliae* and its application in cotton breeding [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2012.]

[21] 夏小双. 壳聚糖对扩展青霉的抑制作用及其机理的初步研究 [D]. 镇江: 江苏大学, 2019. [XIA X S. Studies on the control of chitosan on alternaria rot of pingguoli pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd) fruits and its antifungal mechanism [D]. Zhenjiang: Jiangsu University, 2019.]

[22] 戚雯雯, 沈玉婷, 陈楚英, 等. 江香薷活性成分香芹酚对指状青霉的抑菌作用 [J]. 现代食品科技, 2018, 34(11): 65–69. [QI W W, SHEN Y T, CHEN C Y, et al. Antifungal mechanisms of the active ingredients carvacrol of *Mosla chinensis* 'Jiangxiangru' against *Penicillium digitatum* [J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(11): 65–69.]

[23] 颜志秀. 螺旋藻抗真菌肽的分离纯化及其对柑橘腐败真菌的抑制活性研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2019. [YAN Z X. Isolation, purification and inhibitory activity against citrus spoilage fungi of antifungal peptide from *Spirulina platensis* [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2019.]

[24] VELIVELLI S L S, CZYMMEK K J, LI H, et al. Antifungal

symbiotic peptide NCR044 exhibits unique structure and multifaceted mechanisms of action that confer plant protection[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, 117(27): 16043–16054.

[25] 刘超, 宋瑾怡, 薛艳红, 等. 草酸青霉线性五肽生物合成的比较转录组分析[J]. *食品与生物技术学报*, 2021, 40(5): 37–44.

[26] LIU C, SONG J Y, XUE Y H, et al. Comparative transcriptome analysis of linear pentapeptide biosynthesis in *Penicillium oxalicum* [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2021, 40(5): 37–44.]

[27] 刘超, 李坤, 白晓轩, 等. 利用转录组学分析三峡肽素生物合成的基因簇[J]. *食品工业科技*, 2021, 42(13): 156–162. [LIU C, LI K, BAI X X, et al. Analysis of gene clusters for Sanxiapeptin biosynthesis by transcriptomic sequencing[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2021, 42(13): 156–162.]

[28] SONG X, HAN M, HE F, et al. Antifungal mechanism of dipicolinic acid and its efficacy for the biocontrol of pear valsa canker[J]. *Front Microbiol*, 2020, 20(11): 958.

[29] REDDY G K K, NANCHARAIAH Y V. Alkylimidazolium ionic liquids as antifungal alternatives: Antibiofilm activity against *Candida albicans* and underlying mechanism of action[J]. *Front Microbiol*, 2020, 21(11): 730.

[30] 张美红, 王萌, 杨书珍, 等. β -蒎烯抑制柑橘意大利青霉作用机制初步研究[J]. *华中农业大学学报*, 2018, 37(6): 91–97.

[31] ZHANG M H, WANG M, YANG S Z, et al. Possible action mode of β -pinene against *Penicillium italicum*[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2018, 37(6): 91–97.]

[32] 王玉书, 王欢, 范震宇, 等. 基于转录组测序的羽衣甘蓝叶色相关基因分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2020, 39(1): 200–206. [WANG Y S, WANG H, FAN Z Y, et al. Identifying genes associated with leaf color in kale (*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.) based on transcriptome analysis[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2020, 39(1): 200–206.]

[33] 刘伟, 王俊琰, 李萌, 等. 基于转录组测序的银杏类黄酮生物合成关键基因表达分析[J]. *中草药*, 2018, 49(23): 5633–5639.

[34] LIU W, WANG J Y, LI M, et al. Transcriptome sequencing analysis of gene expression of flavonoid biosynthesis in *Ginkgo biloba*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2018, 49(23): 5633–5639.]

[35] RODRÍGUEZ GARCÍA A, SOLA LANDA A, BARREIRO C. RNA-Seq-based comparative transcriptomics: RNA preparation and bioinformatics[J]. *Methods in Molecular Biology*, 2017, 1645: 59–72.

[36] HRDLICKOVA R, TOLOUE M, TIAN B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis[J]. *Wiley Interdisciplinary Reviews-RNA*, 2017, 8(1): 10.