



NaCl 胁迫下哈茨木霉 ACCC32524 的转录组和代谢组分析

向杰, 陈敬师, 夏鑫鑫, 刘快, 李世贵*, 顾金刚*

中国农业科学院农业资源与农业区划研究所, 农业农村部农业微生物资源收集保藏重点实验室, 北京 100081

摘要:【目的】通过分析 NaCl 胁迫下哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*) ACCC32524 转录组和代谢组数据, 研究差异表达基因及次级代谢产物的变化情况, 初步探索响应 NaCl 胁迫的分子机制。【方法】利用 Illumina HiSeq XTen 高通量测序平台完成 0、0.4、0.6 mol/L NaCl 浓度胁迫培养下哈茨木霉 ACCC32524 的转录组测序, GC-TOF-MS 技术完成对 0 mol/L 和 0.6 mol/L NaCl 胁迫培养下的差异次级代谢产物检测, 利用相关软件及数据库对差异表达基因(DEGs)和次级代谢产物的注释、筛选和分类, 并进行 RT-qPCR 验证。【结果】本研究分别得到 0.4 mol/L 和 0.6 mol/L NaCl 胁迫下 417 和 733 条差异表达基因; GO 富集分析显示, 分别有 318 和 582 条差异表达基因注释到生物学过程、分子功能和细胞组分 3 个一级分类和 40 个二级分类; COG 分类结果表明分别有 232 和 414 条转录本为 20 个类别, 涉及差异表达基因最多的分别为氨基酸的转运和代谢、一般功能预测、碳水化合物的转运和代谢; KEGG 代谢途径分析结果表明, 分别有 75 和 96 条基因归到 25 个代谢通路中($P \leq 0.05$), 其中涉及差异基因最多的是氨基酸的生物合成和 2-氧代羧酸代谢通路。从转录组数据中共筛选出与渗透调节、离子转运、活性氧清除等 22 个耐盐相关基因。0 mol/L 和 0.6 mol/L NaCl 胁迫下的代谢组数据中共筛选出 101 个差异次级代谢产物, 包括 8 种积累量上调和 93 种下调物质, 其中 36 个得到定性, 分属于糖类、有机酸和氨基酸等 9 个分类中。RT-qPCR 验证挑选的差异表达基因的表达量变化, 均与 RNA-seq 分析结果一致。【结论】NaCl 胁迫下引起哈茨木霉 ACCC32524 基因及次级代谢产物发生明显变化, 细胞代谢途径发生明显偏移, 这些进程共同作用减少 NaCl 对细胞的毒害作用, 为木霉菌的耐盐机理研究提供重要信息。

关键词: 哈茨木霉, NaCl, 转录组, 代谢组, 耐盐机理

土壤盐渍化是由自然因素或人类活动引起环境风险之一, 严重影响着农业生产的发展, 是世界各国范围内农业发展面临的问题。我国盐碱地

面积约为 3.5×10^7 hm^2 , 占全国可耕作土壤面积的 4.88%, 而且还在不断增加^[1]。研究表明, 土壤盐渍化可使土壤理化性质变差, 导致作物生长不良,

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0200604-5)

*通信作者。顾金刚, Tel: +86-10-82105037, E-mail: gujingang@caas.cn; 李世贵, E-mail: lishigui@caas.cn

收稿日期: 2018-12-17; 修回日期: 2019-03-06; 网络出版日期: 2019-06-17

病虫害发生加剧^[2]。木霉菌(*Trichoderma* spp.)是一类能有效抑制植物病害的生防真菌,部分木霉菌株可定殖于植物根际形成共生体,在一定程度上增加植物根系养分吸收利用率,促进植物生长,提高农作物产量及诱导植物增强抗逆性等^[3]。Kumar等^[4]研究了1.67、6.25、11.25、17.2和22.9 dSm⁻¹盐度胁迫下,接种耐盐木霉对玉米种子的萌发及生长的影响,结果发现木霉菌能在胁迫条件下明显增加种子萌发率、叶片面积和提高根系长度,抑制丙二醛的积累,并增加脯氨酸、酚类等渗透调节物质的含量。Zhang等^[5]研究发现,0.15 mol/L NaCl胁迫下接种 *T. longibrachiatum* T6 使小麦SOD、POD和CAT活性分别提高29%、39%、19%,植物系统抗性SOD、POD、CAT相关基因表达明显上调,增强小麦抗逆性。因此,研究木霉菌对盐离子的耐受机理,对于提高木霉菌的耐盐性、提高对植物病害的防治效果、改善植物根系的微生态环境有重要的意义。

高浓度盐胁迫下,微生物的生长、繁殖及营养代谢过程受到明显抑制。在长期的进化过程中,微生物也形成了一定的防御机制,主要包括离子转运系统和胞内渗透调节系统^[6]。Zou等^[7]发现对0.5%–20.0% NaCl具有较好耐受性的中度嗜盐菌 *Halobacillus aitingensis* AD-6^T的Na⁺/H⁺逆转运蛋白具有很高的活性,在Na⁺/H⁺逆转运蛋白缺失型大肠杆菌KNabc中导入该蛋白编码基因(*nhaH*)可使该菌株能在0.2 mol/L NaCl或10 mmol/L LiCl盐溶液中存活。费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*)在高渗环境下会迅速积累大量的海藻糖作为细胞的渗透调节物质^[8]。鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces rouxii*)是一种耐高渗透压胁迫的子囊酵母,过表达甘油-3-磷酸脱氢酶编码基因(*GPD1*)和沉默甘油转运蛋白编码基因(*FPG1*),

均可增加胞内甘油含量,提高酵母的渗透调节能力^[9]。Duran等^[10]认为哺乳细胞和真菌在高渗环境下主要通过HOG (high osmolarity glycerol)通路合成甘油等渗透保护性物质,此外,还包括细胞骨架的重组、细胞壁再生等。Liu等^[11]发现3 mol/L NaCl胁迫下的 *Aspergillus montevideensis* ZYD4胞内甘油和可溶性糖含量迅速上升,参与甘油、可溶性糖、有机酸和色素积累相关基因均发生不同程度的上调表达。本课题组自盐碱地中筛选得到哈茨木霉菌株ACCC32524,前期实验证明该菌可在8% NaCl胁迫环境下生长,并对烟草黑胫病菌(*Phytophthora nicotianae*)具有一定的防治效果^[12]。因此,本研究采用高通量测序技术及GC-TOF-MS,对耐盐哈茨木霉ACCC32524在NaCl胁迫和无NaCl胁迫条件下的差异转录本和次级代谢产物进行分析,筛选与菌株耐盐调控相关的功能基因及次级代谢产物,初步探讨木霉菌的耐盐机理,为进一步挖掘耐盐相关基因,扩大木霉菌的生防应用领域提供重要信息。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究所用哈茨木霉菌株ACCC32524,保藏于中国农业微生物菌种保藏管理中心(ACCC)。

反转录试剂盒(PrimeScriptTM 1st strand cDNA Synthesis Kit)、qPCR试剂盒(TB GreenTM Premix EX Taq)均购自赛默飞世尔科技有限公司。

1.2 不同钠盐对ACCC32524的菌落形态及生长的影响

将ACCC32524在PDA培养基上活化,4 d后用打孔器($\Phi=6$ mm)打取菌饼,分别接种到含NaCl、Na₃PO₄、Na₂SO₄、NaNO₃和乳酸钠的PDA

培养基中央, 浓度梯度设置为 0%、2%、4% 和 6%, 28 °C 暗室培养, 观察菌落形态变化并测量菌落半径计算抑制率。菌落生长抑制率(%)=(对照菌落直径-处理菌落直径)/对照菌落直径×100%。每个处理 3 个生物学重复。

1.3 NaCl 胁迫下 ACCC32524 转录差异分析

1.3.1 不同浓度 NaCl 胁迫处理: 用无菌水洗下 PDA 平板上 ACCC32524 孢子, 并稀释至 1.0×10^6 孢子/mL, 按 1% 接种量分别接种于含 0、0.4、0.6 mol/L NaCl 液体培养基(葡萄糖 40 g/L、蛋白胨 20 g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 8 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.5 g/L), 28 °C、180 r/min 避光连续培养。培养 5 d 后, 用 8 层纱布过滤, ddH₂O 洗涤、收集菌丝并冻干, -80 °C 保存。参照 DNS 法^[13]分别检测 3 d、5 d 后发酵液中葡萄糖剩余量, 计算形成单位质量菌丝量所消耗的葡萄糖量, 葡萄糖利用率(g/生物量)=(对照液葡萄糖含量-发酵液葡萄糖含量)/生物量。每个处理 3 个生物学重复。

1.3.2 cDNA 文库构建及测序: 收集的各组样品委托北京百迈客生物科技有限公司进行后续处理, 包括总 RNA 提取、纯化、质量分析和 cDNA 文库构建。基于边合成边测序(sequencing by synthesis, SBS)技术, 使用 Illumina HiSeq XTen 高通量测序平台对 cDNA 文库进行测序。

1.3.3 基因注释和表达定量分析: 使用 Illumina HiSeq XTen 测序平台对各样品 cDNA 文库进行测序, 得到原始数据(raw data), 对 Raw Data 进行过滤, 去除其中的接头序列及低质量序列得到 Clean Data。通过 Trinity 软件对 Clean Data 进行组装, 获得 ACCC32524 的 unigenes 库。使用 BLAST 软件将 unigenes 序列与 NR、Swiss-Prot、GO、COG、KOG、eggNOG4.5 和 KEGG 数据库比对, 使用 KOBAS 2.0 得到 unigenes 在 KEGG 中的 KEGG

Orthology 结果, 预测完 unigenes 的氨基酸序列之后使用 HMMER 软件与 Pfam 数据库比对, 获得 unigene 的注释信息。采用 Bowtie 将测序得到的序列与 unigene 库进行比对, 根据比对结果, 结合 RSEM 软件进行表达量水平估计。利用 FPKM (每百万 Reads 中来自比对到某一基因每千碱基长度的 Reads 数目)值表示对应 unigene 的表达丰度。

1.3.4 差异表达基因分析: 不同处理样品间差异表达基因定量分析通过 DESeq2 完成。在筛选过程中, 采用 Benjamini-Hochberg 方法对原有假设检验得到的显著性 *P* 值(*P*-value)进行校正, 并最终得到校正后的 *P* 值, 即 FDR (false discovery rate, 错误发生率), 作为差异表达基因筛选的关键指标。将得到的 FDR 小于 0.01 且差异倍数 FC (fold change, 两样品间表达量的比值)大于等于 2 作为筛选标准。

1.4 NaCl 胁迫下 ACCC32524 代谢组分析

1.4.1 样品准备: 取冻干后样本 50 ± 1 mg 于 2 mL EP 管中, 加入 450 μ L 提取液(甲醇:氯仿=3:1), 再加入 10 μ L L-2-氯苯丙氨酸, 涡旋 30 s; 加入瓷珠, 45 Hz 研磨仪处理 4 min, 超声 5 min(冰水浴), 重复 3 次; 将样本 4 °C 离心, 12000 r/min 离心 15 min; 移取 350 μ L 上清液于 1.5 mL EP 管中; 在真空浓缩器中干燥提取物; 向干燥后的代谢物加入 60 μ L 甲氧胺盐试剂(甲氧胺盐酸盐, 溶于吡啶 20 mg/mL), 轻轻混匀后, 放入烘箱中 80 °C 孵育 30 min; 向每个样品中加入 80 μ L BSTFA (含有 1% TMCS, V/V), 将混合物 70 °C 孵育 1.5 h; 准备上机检测。

1.4.2 GC-TOF-MS 数据处理: 使用 ChromaTOF 软件(V4.3x, LECO)对质谱数据进行峰提取、基线校正、解卷积、峰积分、峰对齐等分析。对物质定性工作中, 使用了 LECO-Fiehn Rtx5 数据库,

包括质谱匹配及保留时间指数匹配。采取将 student's *t* 检验的 *P* 值和 OPLS-DA 模型的 VIP 值相结合的方法来筛选差异代谢物, 筛选的标准为 $P\text{-value} \leq 0.05$ & $VIP > 1$ 。

1.5 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

为检测转录组数据的准确性, 从 NaCl 胁迫下 DEGs 中挑选 9 个差异表达显著的基因, 用 Primer 5.0 设计引物(表 1)。使用 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒合成 cDNA 模板。以 cDNA 链为模板, UCE (泛素结合酶)为内参基因, 使用 TB Green™ Premix EX Taq™ 荧光定量试剂盒、QuantStudio™ Real-Time PCR 软件 (Applied Biosystems 公司)进行荧光定量检测, 采用 $-\Delta\Delta C_t$ 法计算相对表达量, 每个样品 3 个生物学重复。

2 结果和分析

2.1 不同钠盐对 ACCC32524 生长的影响

将 ACCC32524 接种在含不同钠盐的 PDA 培养基上, 暗室培养 60 h, 菌落形态如图 1 所示。无盐胁迫环境下, ACCC32524 菌落生长迅速, 菌

丝呈棉絮状或致密丛束状, 然而随着各种盐浓度的增加, 菌落生长速度减缓, 菌落变薄, 生物量减少。不同钠盐对 ACCC32524 生长的抑制情况从大到小依次为 Na_3PO_4 、NaCl、 NaNO_3 、 Na_2SO_4 、乳酸钠, 4% 盐浓度下菌落生长抑制率分别为 93.75%、74.11%、63.39%、54.46%、46.43%。

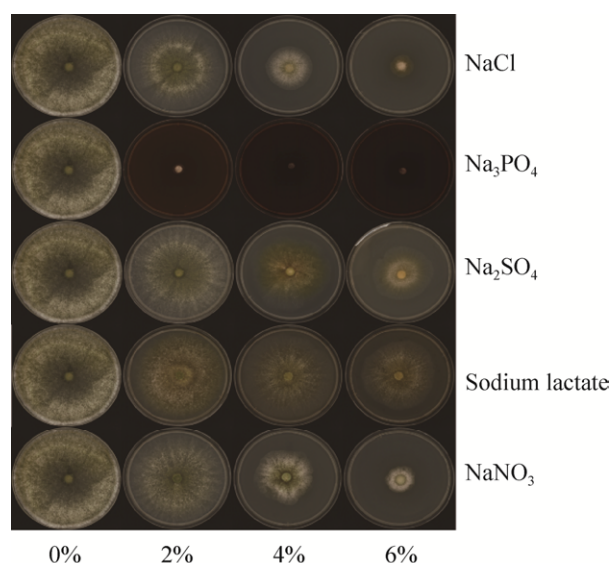


图 1. 不同种类钠盐对 ACCC32524 菌落形态的影响 (PDA, 28 °C, 60 h)

Figure 1. Effect of different kinds of sodium salts on ACCC32524 colony morphology (PDA, 28 °C, 60 h)

表 1. RT-qPCR 验证基因及引物设计

Table 1. Gene selection and primer design for RT-qPCR

Gene ID	Primer sequences (5'→3')	
c56653.graph_c1	F-CCGTTTCGCACCAGTAATA	R-CCTTCACCTCACCTTTTCG
c52103.graph_c0	F-ATGGCTGGTTACAGTGGC	R-ACCGATAAGAAGCGTGGG
c52660.graph_c0	F-CGGGTTACCAGCACAGCA	R-ACAGGCAGCGTCAGTTTCG
c33809.graph_c0	F-TGCCGCTAATCCTGCTGA	R-AGGGCTTCCATCGTGATCT
c56772.graph_c0	F-ACGAATCCGAAGTCTCCA	R-GTGAATGTCAAGGCTCCC
c55592.graph_c0	F-GACAGATGGGGAATGGAG	R-CGAAGTGAAGCCGTTTAT
c23674.graph_c0	R-CGAAGTGAAGCCGTTTAT	R-GTCCTGGTGAATGAGTGGTA
c35128.graph_c0	F-GCTGCTGACTGTAGTGCCG	R-TTGCTGGTCCGCTTTGA
c54849.graph_c0	F-AGGAGAAAGGCGGCAAGA	R-CCACCAAGGGATGGACA
UCE	F-GTGGCGGCAGCACTTGTAT	R-ATGACGAACGAAAAGCACCG

2.2 NaCl 胁迫下 ACCC32524 对葡萄糖利用情况

葡萄糖是活细胞碳素和能量的主要来源, 以葡萄糖为碳源进行液体发酵实验发现, NaCl 虽然在一定程度上抑制了 ACCC32524 的生长速度和生物量的积累, 却同时也促进了菌体对葡萄糖的转运与代谢。0.4、0.6 mol/L NaCl 胁迫培养 3 d 后单位质量生物量消耗的葡萄糖量分别是 4.03 g 和 3.88 g, 分别较对照增加 46.35% 和 40.90%; 培养 5 d 后消耗的葡萄糖分别是 6.10 g 和 7.36 g, 分别较对照提高 30.37% 和 57.15%。相同 NaCl 浓度处理下, 由于生长周期的变化使培养 5 d 后葡萄糖的利用情况分别较培养 3 d 高 69.84%、51.30% 和 89.43%。其中, 0.6 mol/L NaCl 胁迫培养下菌丝体对葡萄糖消耗量最大, 说明在可调节的胁迫范围内, 木霉菌可能通过合成大量可溶性糖或其他中间代谢产物来提高胁迫适应能力。

2.3 盐胁迫下 ACCC32524 转录组分析

2.3.1 转录组测序数据分析:

使用 Illumina HiSeq XTen 对 9 个转录样本进行测序, 各样品 Clean Data 均达到 6.29 Gb, Q30 (1000 个碱基有 1 个会识别出错) 碱基百分比在 89.87% 及以上。经 *de novo* 拼接组装后, 得到 44594 条 unigenes, 平均长度为 1020.47 bp, N50 为 2205 bp。将各样品的 Clean Data 与 Unigene 库进行序列比对, 比对结果统计见表 2, 匹配率均在 68% 以上。计算各样品间皮尔逊相关系数 r (Pearson's correlation coefficient) 作为样品间相关性的评估指标, r^2 越接近 1, 说明 2 个样品的相关性越强^[14]。根据各样品间 r^2 做相关性热图 (图 2), 结果表明 0.6 mol/L NaCl 处理下样品基因表达情况与对照出现差异显著, 而 0.4 mol/L 处理后的样品与对照和 0.6 mol/L NaCl 处理后的样品 r^2 均在 0.75–0.85, 说明 0.4 mol/L NaCl 对于

表 2. 样品测序数据与 unigenes 的比对结果

Table 2. The results of comparison of sample sequencing data with unigenes

Treatment	Clean reads	Mapped reads	Mapped ratio/%
CK	24198839	17790416	73.52
	29402722	20267033	68.93
	24150251	18071516	74.83
0.4 mol/L NaCl	24245469	17792663	73.39
	22586885	16840340	74.56
	21936606	16366016	74.61
0.6 mol/L NaCl	23020968	16733179	72.69
	23088267	17338644	75.10
	21611141	16201354	74.97

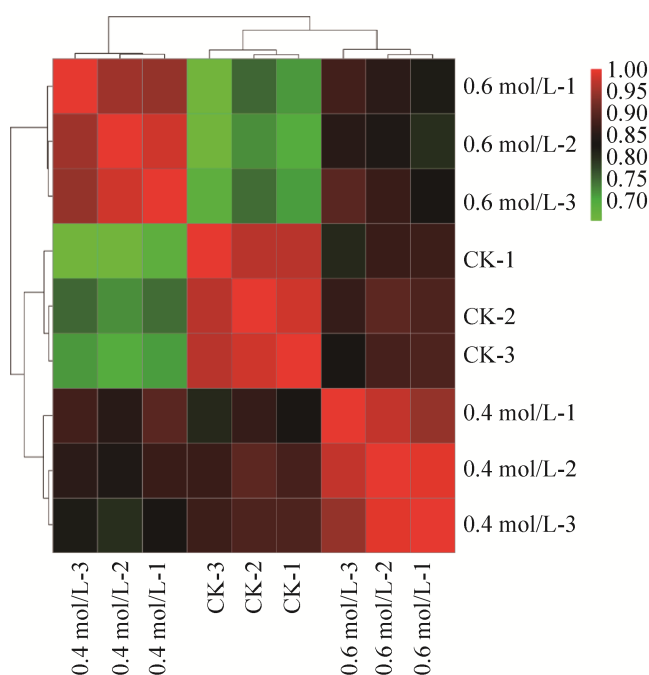


图 2. 各样品相关性热图

Figure 2. The heatmap of samples' correlation.

ACCC32524 的生长胁迫程度较弱, 聚类结果显示各样品的生物学重复之间聚类情况较好。

2.3.2 差异表达基因分析:

分别从 CK vs 0.4 mol/L NaCl、CK vs 0.6 mol/L NaCl 比较组中分别筛选得到 417 和 733 个差异性表达基因 ($FDR \leq 0.01$ & $FC \geq 2$), 其中, 共差异表达基因为 304 个, 特异性基因分别为 106 和 417 个。高浓度 NaCl (0.6 mol/L)

胁迫下 ACCC32524 基因表达上调和表达下调数量较低浓度 NaCl (0.4 mol/L) 分别增加 57.41% 和 109.52%，且差异表达倍数的对数(\log_2FC)多数位于 1–3，各区间范围的数量随 NaCl 浓度的增加而增加。对 0.4 mol/L 和 0.6 mol/L NaCl 胁迫下 ACCC32524 表达上调的基因数量和差异表达倍数进行统计分析发现，当 NaCl 浓度由低浓度升至高浓度时，部分上调基因差异表达倍数出现增大、降低，甚至停止表达。ACCC32524 的基因表达上调数量总计为 490，相对上调、相对下调、表达关闭和开启的基因数量分别有 224、73、50 和 143，其中相对上调基因占主要比例，约为 45.71% (图 3)。

2.3.3 差异表达基因的 GO 富集分析：对 NaCl

处理下的各比较组的转录组测序结果在 GO (gene ontology) 数据库进行显著性富集分析，包括生物学过程(biological process)、分子功能(molecular function)和细胞组分(cellular component) 3 个一级分类和 40 个二级分类。其中，不同浓度 NaCl 胁迫下，参与细胞组分的差异表达基因在细胞(cell)和细胞组分(cell part)所占比例最高，其次为细胞膜(membrane)和细胞膜组分(membrane part)；在分子功能分类中催化活性(catalytic activity)和结合(binding)基因数量则占主要比例，约为 85.21%；参与生物学过程的差异表达基因主要集中在代谢过程(metabolic process)、细胞过程(cellular process)和单组织过程(single-organism process)(图 4)。此

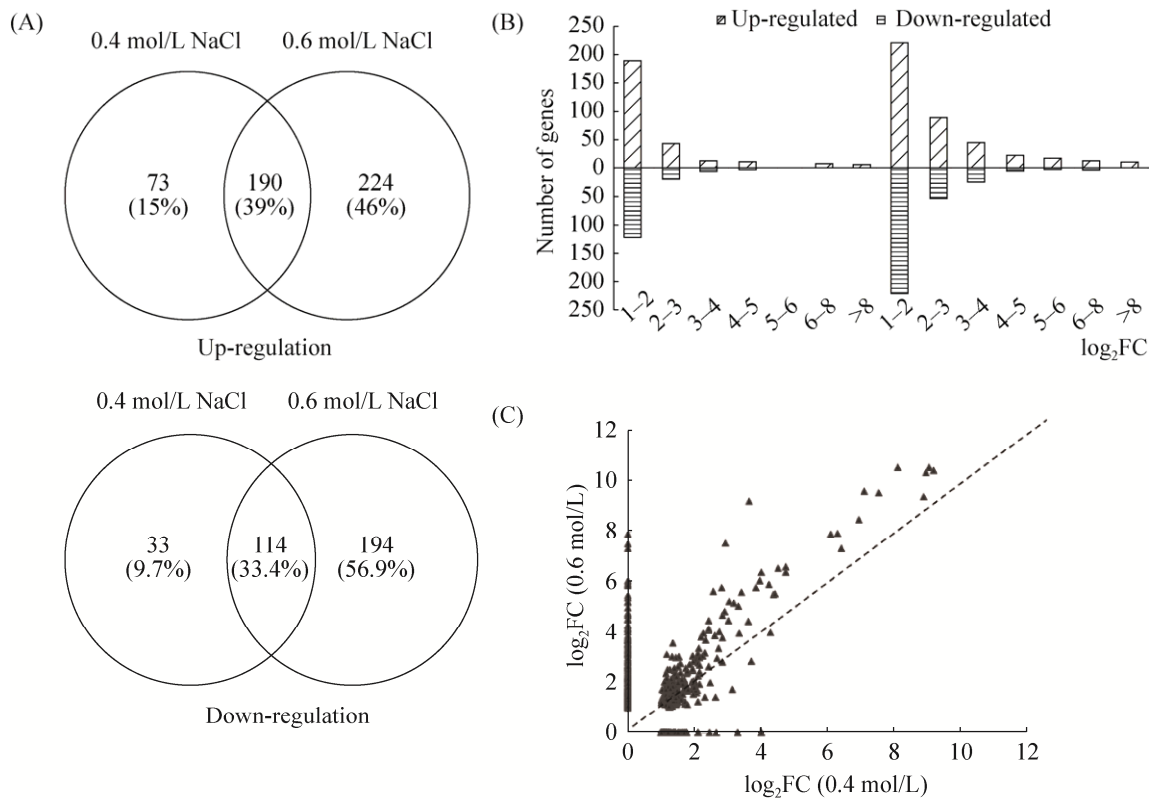


图 3. NaCl 胁迫下 ACCC32524 差异表达基因分析

Figure 3. Global impact of NaCl on ACCC32524 based on RNA-analysis. A: The relationship of significantly up-regulated and down-regulated genes in ACCC32524 treated with 0.4 mol/L or 0.6 mol/L NaCl; B: The multiple of differentially expressed genes; C: Change of expression multiple of up-regulated genes under different NaCl stress.

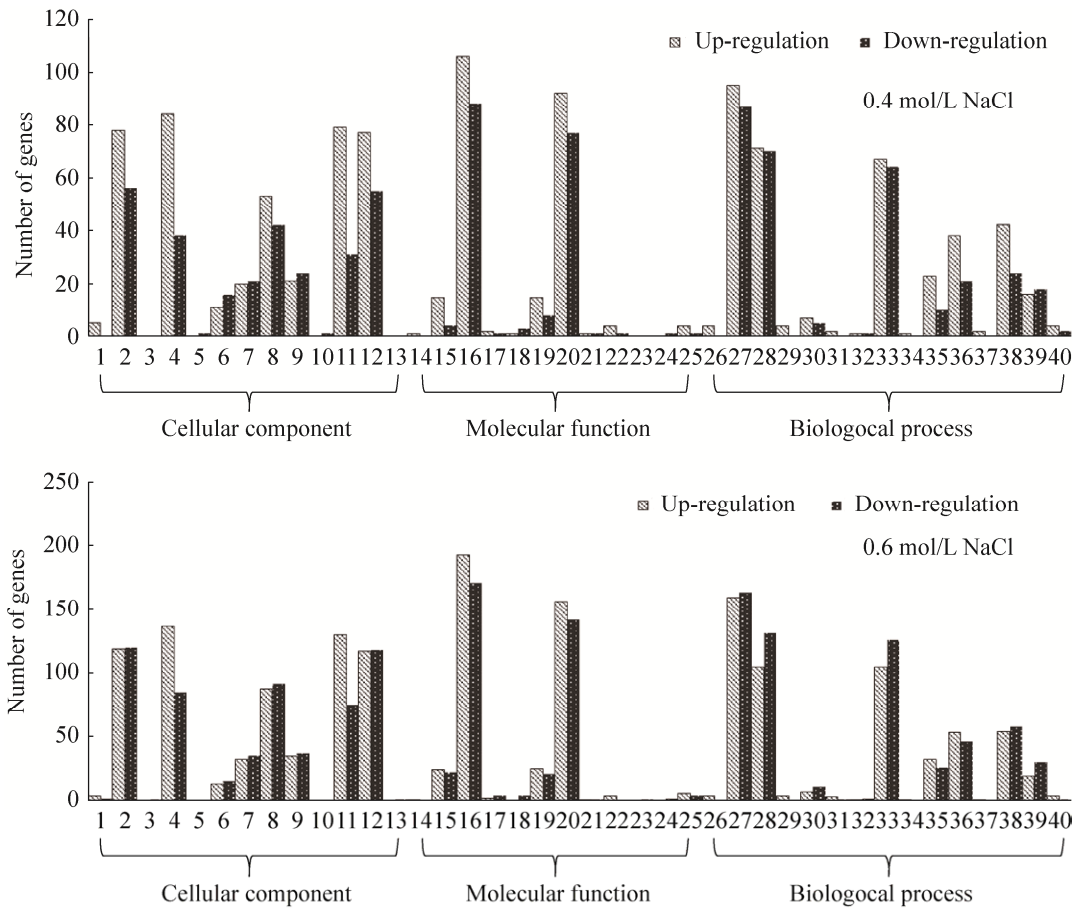


图 4. 差异表达蛋白的 GO 富集分析

Figure 4. Gene ontology analysis of differentially expressed proteins. 1: Extracellular region; 2: Cell; 3: Nucleoid; 4: Membrane; 5: Virion; 6: Membrane-enclosed lumen; 7: Macromolecular complex; 8: Organelle; 9: Organelle part; 10: Virion part; 11: Membrane part; 12: Cell part; 13: Supramolecular complex; 14: Transcription factor activity, protein binding; 15: Nucleic acid binding transcription factor activity; 16: Catalytic activity; 17: Signal transducer activity; 18: Structural molecule activity; 19: Transporter activity; 20: Binding; 21: Electron carrier activity; 22: Antioxidant activity; 23: Nutrient reservoir activity; 24: Molecular transducer activity; 25: Molecular function regulator; 26: Reproduction; 27: Metabolic process; 28: Cellular process; 29: Reproductive process; 30: Signaling; 31: Developmental process; 32: Growth; 33: Single-organism process; 34: Rhythmic process; 35: Response to stimulus; 36: Localization; 37: Multi-organism process; 38: Biological regulation; 39: Cellular component organization or biogenesis; 40: Betoxification.

外, 当 NaCl 胁迫浓度增加时, 差异表达基因 GO 分类基本保持不变, 涉及的基因数量呈不同程度增加, 其中, 催化活性、代谢过程、结合和细胞相关差异基因数量变化较大, 分别为 170、142、130 和 105。

2.3.4 差异表达基因的 COG 注释分析: 将 NaCl 胁迫下 ACCC32524 的差异转录本进行 COG 分类, 共注释到的 646 条转录本被分为 20 小类(图 5)。COG 注释结果表明, 0.4 mol/L 和 0.6 mol/L NaCl 胁迫下 ACCC32524 上调表达的基因主要集中在

碳水化合物转运和代谢(carbohydrate transport and metabolism)及一般功能预测基因(general function prediction only), 其余依次为氨基酸转运和代谢(amino acid transport and metabolism)、脂类的转运和代谢(lipid transport and metabolism)及次级代谢产物的生物合成(secondary metabolites biosynthesis); 而下调的差异表达基因主要与氨基酸转运和代谢(amino acid transport and metabolism)、一般功能预测基因和翻译、核糖体结构、生物合成(translation, ribosomal structure and

biogenesis)相关。当 NaCl 浓度增加时, 上调基因数目中增加最多的是与碳水化合物的转运和代谢、辅酶的转运和代谢(coenzyme transport and metabolism)相关, 而增加的下调表达基因主要集中在氨基酸的转运和代谢、碳水化合物的转运和代谢。

2.3.5 差异表达基因 KEGG 通路注释: 为确定差异表达基因参与的主要代谢途径和信号通路, 对差异基因在有关 Pathway 的主要公共数据库 KEGG 通路富集, 筛选条件为 $P \leq 0.05$, 共

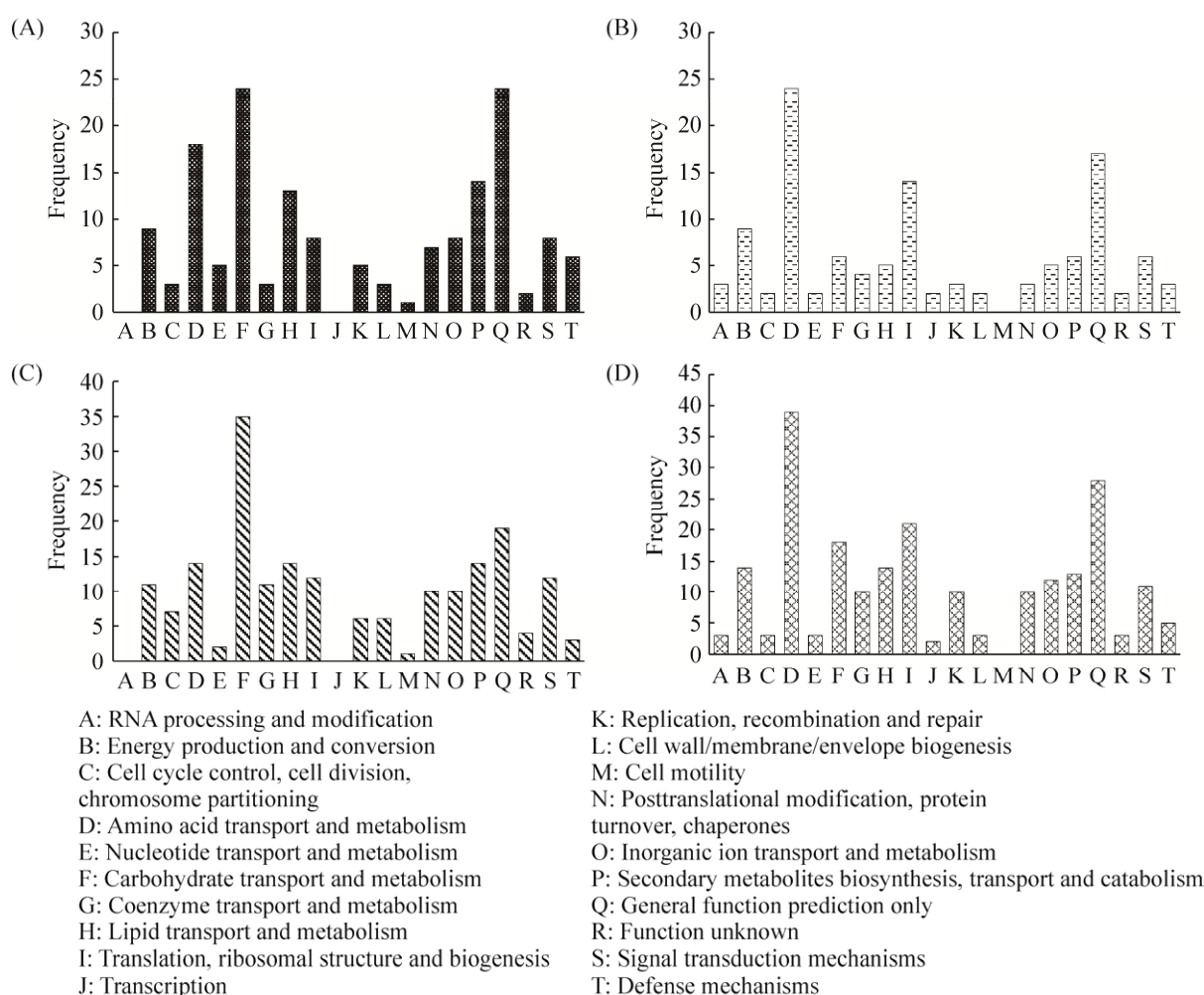


图 5. NaCl 胁迫下差异表达基因的 COG 功能分类

Figure 5. COG analysis of differentially expressed genes under NaCl stress. A: 0.4 mol/L Up-regulation; B: 0.4 mol/L Down-regulation; C: 0.6 mol/L Up-regulation; D: 0.6 mol/L Down-regulation.

筛选到 36 个显著富集 KEGG 标准 Pathway, 结果见表 3。对差异表达基因的注释结果按照 KEGG 通路类型进行分类, 差异基因主要集中在细胞代谢途径上, 如 0.4 mol/L 和 0.6 mol/L NaCl 胁迫下, 分别有 11 个、9 个上调表达基因富集在氨基糖和核苷糖代谢(amino sugar and nucleotide sugar metabolism)、果糖和甘露糖代谢(fructose and mannose metabolism)相关途径; 0.4 mol/L NaCl 胁迫下的下调基因主要集中在 2-氧代羧酸代谢

(2-oxocarboxylic acid metabolism)和氨基酸的生物合成(biosynthesis of amino acids); 而 0.6 mol/L NaCl 胁迫下, 氨基酸的生物合成、2-氧代羧酸代谢和甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸代谢途径(valine, leucine and isoleucine biosynthesis)涉及的下调基因最多。

2.3.6 NaCl 胁迫下渗透调节相关基因的差异表达: 微生物在干旱、高温和盐渍等多种逆境胁迫形成的水分胁迫下, 细胞可主动积累各种有机或无机物质来提高细胞液浓度、降低渗透势, 如脯氨酸、

表 3. ACCC32524 差异表达基因 KEGG 富集通路
Table 3. KEGG pathway enrichment of ACCC32524 DEGs

	Category	KEGG pathway	DEGs number (0.4 mol/L NaCl)	DEGs number (0.6 mol/L NaCl)		
Up-regulated genes	Metabolism	Cyanoamino acid metabolism	–	3		
		Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	6	5		
		Steroid biosynthesis	–	3		
		Fructose and mannose metabolism	5	4		
		Taurine and hypotaurine metabolism	–	2		
		Riboflavin metabolism	–	2		
		Glycerophospholipid metabolism	–	4		
		Other glycan degradation	2	–		
	Cellular processes	Meiosis – yeast	4	–		
Down-regulated genes	Metabolism	Lysine biosynthesis	3	2		
		Vitamin B6 metabolism	2	2		
		Sulfur metabolism	–	3		
		Glycine, serine and threonine metabolism	5	8		
		Thiamine metabolism	–	2		
		Arginine biosynthesis	4	5		
		Selenocompound metabolism	2	–		
		Biosynthesis of amino acids	15	20		
		One carbon pool by folate	–	5		
		2-Oxocarboxylic acid metabolism	18	8		
		Valine, leucine and isoleucine biosynthesis	4	5		
		Atrazine degradation	1	–		
		Genetic information processing		Aminoacyl-tRNA biosynthesis	–	7
				Nucleotide excision repair	–	3
				DNA replication	–	3
Ribosome biogenesis in eukaryotes	5			–		

甜菜碱、海藻糖等亲和性物质(compatible solutes)和从环境中摄取的渗透保护物(osmoprotectants)^[15]。本研究通过转录组分析筛选出 3 个与海藻糖、甜菜碱合成和脯氨酸转运相关的基因。0.4 mol/L 和 0.6 mol/L NaCl 胁迫下筛选出 2 个共上调表达的渗透调节相关基因, 分别与海藻糖的合成和脯氨酸的胞内运输相关, 且上调幅度随 NaCl 浓度增加而变大。此外, 当受到渗透胁迫时, 保持细胞内高 K⁺、低 Na⁺和 Ca²⁺平衡状态是细胞抵御盐害、维持渗透平衡的重要手段。在离子转运系统方面, 注释到 NH₄⁺转运蛋白、K⁺通道、Na⁺/K⁺-ATPase、Ca²⁺-ATPase 和 Cu²⁺-ATPase 共 5 个相关基因。0.4 mol/L 或 0.6 mol/L NaCl 胁迫下上调表达的基因与 Ca²⁺-ATPase、Cu²⁺-ATPase 和 Na⁺/K⁺-ATPase 相关, 下调表达基因与 NH₄⁺转运蛋白和 K⁺通道相关(表 4)。

2.3.7 NaCl 胁迫下与活性氧清除和细胞壁结构相关基因的差异表达情况: NaCl 对细胞生长的影响主要是产生的氧自由基(reactive oxygen species, ROS)造成的生物膜氧化损伤、核酸和蛋白质变性, 从而造成细胞的死亡。因此, 为了减轻 ROS 的伤害, 一套由抗氧化酶和非抗氧化酶组

成的抗氧化体系至关重要。本研究共筛选出 7 个活性氧清除相关基因, 包括过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)。0.4 mol/L NaCl 胁迫下, 筛选出过氧化物酶和过氧化氢酶等 5 个上调表达的活性氧清除相关基因, 而 0.6 mol/L NaCl 胁迫下, 筛选出 4 个上调表达和 1 个下调表达的基因, 共上调表达的基因有 3 个, 涉及过氧化物酶和谷胱甘肽过氧化物酶。另外, 还筛选到与细胞壁或胞外结构相关的 7 个差异基因, 包括高诱导表达的 II 型疏水蛋白在内的 6 个上调基因和一个编码荚膜多糖合成蛋白的下调表达基因(表 5)。

2.4 NaCl 胁迫下 ACCC32524 代谢组分析

2.4.1 NaCl 胁迫后 ACCC32524 PLS-DA 分析:

将 0.6 mol/L NaCl 处理下的处理组和对照组进行 GC-TOF-MS 检测, 利用 SIMCA-P 软件对测得的数据进行 PLS-DA (偏最小二乘法判别分析)分析, 得到两组样品的散点分布图(图 6)。从图 6 中可以看出, 处理组和对照组 3 个重复的数据点检测结果分为两组, 并分别集中在一起, 表明 0.6 mol/L NaCl 胁迫下胞内代谢产物发生明显变化, 可用于后续分析。

表 4. NaCl 胁迫下预测 ACCC32524 渗透保护相关基因

Table 4. The predicted genes related to osmotic protection of ACCC32524 under NaCl stress

Function	Gene ID	log ₂ FC (0.4 mol/L)	log ₂ FC (0.6 mol/L)	Annotation
Osmotic Adjustment	c60822.graph_c0	1.1411	1.4544	Trehalose 6-phosphate synthase
	c45062.graph_c0	-1.5088	-1.6073	Betaine-aldehyde Dehydrogenase
	c60122.graph_c0	1.3681	2.0156	Proline-specific permease
Ion transport system	c57122.graph_c0	-1.5191	-1.7610	Ammonium transporter MEP1
	c60129.graph_c0	2.8439	2.8169	Ca ²⁺ -ATPase
	c38032.graph_c0	-1.5822	-1.8492	K ⁺ Channel
	c60589.graph_c1	-	1.6612	Na ⁺ /K ⁺ -ATPase
	c60318.graph_c1	-	1.8564	Cu ²⁺ -ATPase

表 5. NaCl 胁迫下 ACCC32524 活性氧清除和细胞壁结构相关基因

Table 5. The predicted genes related to osmotic protection and cell wall of ACCC32524 under NaCl stress

Function	Gene ID	log ₂ FC (0.4 mol/L)	log ₂ FC (0.6 mol/L)	Annotation
ROS	c60816.graph_c1	1.0003	–	Catalase
scavenging	c59609.graph_c0	1.2049	1.1412	Peroxidase activity
	c60656.graph_c0	1.4550	1.1063	Glutathione peroxidase
	c57193.graph_c0	2.1239	2.2617	Peroxidase
	c60818.graph_c1	1.4329	–	Peroxidase activity
	c59967.graph_c1	–	2.2727	Peroxidase activity
	c58169.graph_c0	–	–4.4610	Heme peroxidase
Cell wall	c60770.graph_c0	9.0810	10.5133	Class II hydrophobin
	c55592.graph_c0	6.4376	7.3046	Fungal hydrophobin
	c59301.graph_c0	1.7455	2.5484	Fungal hydrophobin
	c54313.graph_c0	–3.4876	–3.9149	Capsular polysaccharide synthesis protein
	c60658.graph_c0	1.0059	1.1923	Chitin synthase
	c60550.graph_c0	1.0007	–	Chitin synthase 1
	c58396.graph_c0	–	1.1331	Chitin synthase

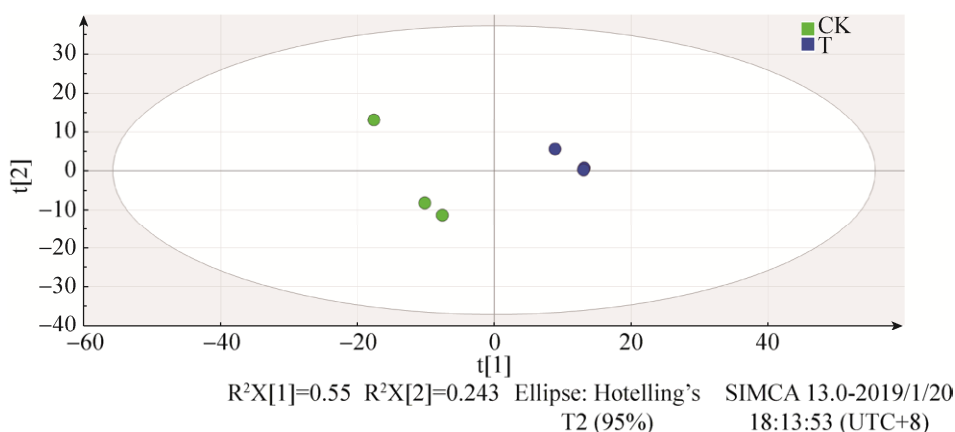


图 6. ACCC32524 处理与对照样品正交 PLS-DA 散点图

Figure 6. PLS-DA scatter plot of treated and compared ACCC32524 samples.

2.4.2 差异代谢物筛选: 基于非靶向代谢组技术共检测到 336 个代谢物, 其中 235 个代谢物累积量保持不变, 93 个代谢物累积量下降和莽草酸和 8 个代谢物累积量上升。在 102 个差异代谢物中仅有 36 个代谢产物(约 35.29%)在 LECO-Fiehn Rtx5 数据库中得到注释, 详情见表 6, 分别包括氨基酸、糖类、有机酸、脂肪酸、核苷、脂类、醇类、胺类和酚类共 9 种。注释后累积量上调的代谢产物分别

是莽草酸、乳果糖、丙烯三甲酸、6-脱氧-D-葡萄糖和 10-羟基十二酸, 可概括为糖类和有机酸两类。

2.5 RT-qPCR 验证

为验证 RNA-seq 数据的准确性, 从 0.6 mol/L NaCl 胁迫下的 DEGs 中选取 9 个差异显著的基因, 包括 5 个上调表达基因和 4 个下调表达基因, 设计引物并利用 qPCR 进行对照组和 NaCl 胁迫下基因的表达量变化分析。因泛素结合酶基因在不同

表 6. 不同处理下发生显著差异的次级代谢产物($P \leq 0.05$)Table 6. Metabolites that were significantly ($P \leq 0.05$) altered in the different conditions

Category	Component	\log_2FC	P -value	VIP	Regulated
Amino acid	Leucine	-0.83630	0.0302	1.2501	Down
	Glycine	-0.97690	0.0003	1.3840	Down
	Alanine	-1.58452	0.0271	1.3305	Down
Carbohydrate	Lactulose	1.99550	0.0145	1.2411	Up
	6-Deoxy-D-glucose	1.78860	0.0077	1.3336	Up
Organic acid	Shikimic acid	1.24490	0.0063	1.3658	Up
	Aconitic acid	0.98580	0.0187	1.3111	Up
	Toluenesulfonic acid	-2.16340	0.0078	1.3195	Down
	Ribose-5-phosphate	-1.76280	0.0498	1.1345	Down
	Pipecolinic acid	-2.15840	0.0444	1.2845	Down
	Malonic acid	-0.91090	0.0257	1.2932	Down
	Maleamate	-1.74690	0.0200	1.2994	Down
	Glucose-6-phosphate	-2.05120	0.0279	1.2158	Down
	4-Aminobutyric acid	-1.38560	0.0266	1.3073	Down
	4-Aminobutyric acid	-1.69310	0.0342	1.3172	Down
	4-Acetylbutyric acid	-2.02720	0.0111	1.2578	Down
	3-Hydroxyphenylacetic acid	-1.23390	0.0027	1.3829	Down
	Cytidine-monophosphate	-2.38350	0.0409	1.3088	Down
	Cyclohexylsulfamic acid	-0.71830	0.0474	1.2981	Down
	Cyclic-GMP	-0.86840	0.0225	1.2652	Down
	Creatine	-1.30020	0.0146	1.3475	Down
	Citraconic acid degr1	-1.26310	0.0026	1.3671	Down
	3-Hydroxybutyric acid	-1.79500	0.0218	1.3532	Down
	3-Cyanoalanine	-1.15970	0.0392	1.3144	Down
	2-Hydroxy-3-isopropylbutanedioic acid	-1.00890	0.0431	1.1945	Down
Fatty acid	10-Hydroxydecanoic acid	1.22540	0.0243	1.3118	Up
Nucleoside	Guanosine	-3.19820	0.0324	1.3437	Down
	5'-Methylthioadenosine	-2.55600	0.0473	1.3120	Down
	2-Deoxyuridine	-1.52320	0.0172	1.3469	Down
	Thymine	-1.73600	0.0108	1.3804	Down
Lipid	Methyl phosphate	-2.31730	0.0260	1.3406	Down
Alcohol	Glycerol	-1.13840	0.0100	1.3287	Down
	5-Dihydrocortisol	-1.25200	0.0132	1.3109	Down
	2-Butyne-1,4-diol	-1.82800	0.0043	1.3732	Down
Amine	5-Aminovaleric acid lactam	-1.52540	0.0024	1.4103	Down
Phenols	1,2,4-Benzenetriol	-1.07190	0.0245	1.3323	Down

环境下细胞中的表达相对恒定，因此在检测基因表达水平变化时常用它来做参照物^[16]，结果显示，Ct (UCE, 处理)=21.819±0.125，Ct (UCE, 对照)=21.819±0.024，内参基因表达稳定，说明样品

浓度及纯度的一致性，消除样品误差。差异表达基因的 qPCR 结果与转录组测序的结果在基因表达幅度上有一定的差异，但基因的表达趋势一致 (图 7)，说明转录组测序的结果是可信的。

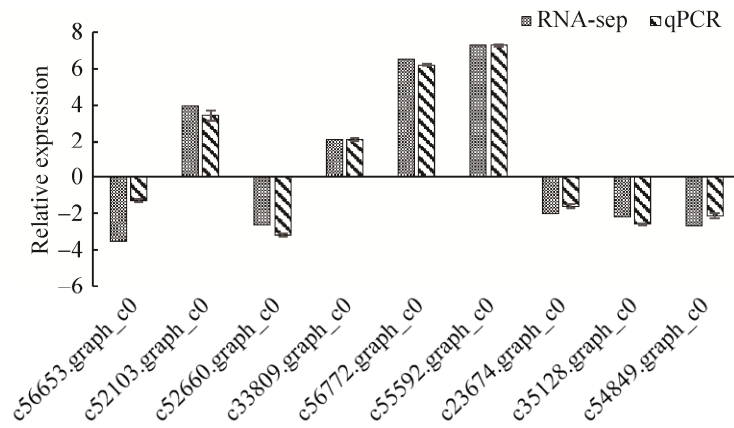


图 7. 差异表达基因的 RT-qPCR 验证

Figure 7. Validation of DEGs using RT-qPCR.

3 讨论

微生物的耐盐机制是一个极其复杂的过程, 对该过程的研究主要可概括为两个方面: 一方面是通过物理或化学方法诱变构建突变体库, 筛选高度耐盐的突变体, 并对突变的基因进行功能分析; 另一方面则是利用组学分析技术对不同盐浓度胁迫下的微生物进行转录及代谢差异分析, 筛选功能型差异表达基因, 全面了解微生物的耐盐机制。目前, 生防木霉的逆境生理研究主要集中在重金属^[17-19]、PAH^[20]、有机酸^[21]等胁迫方面。为了解盐胁迫下木霉的分子调控机制, 本研究采用 RNA-seq 和 GC-TOF-MS 技术, 对 0、0.4、0.6 mol/L NaCl 胁迫下的耐盐哈茨木霉 ACCC32524 进行转录-代谢分析, 共获得 44594 条 unigenes 和 336 个代谢产物信息, 通过与 GO、COG、KEGG、Swiss-Prot、NR 等数据库比对, 发现多条与盐胁迫相关的功能基因及代谢产物, 较前人的研究更能详细地阐述木霉对盐胁迫的适应机制。

早期研究表明, 微生物在低盐和高盐胁迫环境下, 耐盐机制的响应程度存在明显差异^[22]。本

研究对哈茨木霉 ACCC32524 进行胁迫培养时, 同样发现随着 NaCl 胁迫浓度的不同, 菌株的响应机制也随之发生变化, 如 0.4 mol/L 和 0.6 mol/L NaCl 浓度胁迫下的两个比较组获得的差异性表达基因分别为 417 和 733 个, 差异基因数量增加 75.77%, 差异表达基因的变化倍数也随 NaCl 浓度的变化而变化, 表明盐胁迫浓度的选择对研究微生物的耐盐机理、筛选功能基因至关重要。差异表达基因 GO 功能富集分析发现, 0.4 mol/L、0.6 mol/L NaCl 浓度处理下的差异表达基因的 GO 富集条目几乎相同, 多与代谢过程 (metabolic process)、细胞过程 (cellular process)、单组织过程 (single-organism process)、细胞 (cell)、细胞组分 (cell part)、催化活性 (catalytic activity) 和结合 (binding) 等功能相关。该结果与 Cu²⁺胁迫下哈茨木霉 Th-33 差异表达基因 GO 富集结果相似^[17]。然而, 哈茨木霉 Th-33 中有较多的碳水化合物代谢、氨基酸代谢等相关基因发生下调表达; Liu 等^[23]也发现对 0.4 mol/L NaCl 胁迫下的根瘤菌 CCNWXJ12-2 进行转录组分析, COG 注释结果表明盐胁迫下的上调表达基因显著富集在氨基酸的转运和代谢、翻

译、核糖体结构和生物合成。而本实验中对 0.4、0.6 mol/L NaCl 胁迫下的差异表达基因进行 COG、KEGG 注释分析结果和单位质量菌丝体消耗的葡萄糖量结果表明, NaCl 抑制了 ACCC32524 对氨基酸的转运、代谢及合成, 却同时促进了与葡萄糖相关的糖酵解、三羧酸循环等途径, 可能参与合成亲和性物质或改变细胞壁结构的来增强环境耐受性。

渗透调节是微生物适应高盐环境的重要防御机制, 主要通过两个方面来实现: 一是细胞膜上的离子泵(Na^+/K^+ 泵、 Na^+/H^+ antiporter 等)调节胞内外的离子浓度, 维持胞内渗透压; 二是细胞自身合成或从环境中摄取的小分子有机溶质, 包括糖类、醇类、氨基酸及其衍生物, 在盐胁迫环境下维持细胞渗透势和降低盐离子对生物膜的伤害。本研究从 0.4 mol/L 和 0.6 mol/L NaCl 处理后的转录组数据中, 均筛选出 3 个渗透调节相关基因, 其中催化 UDP-葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖合成 6-磷酸海藻糖的海藻糖-6-磷酸合成酶和脯氨酸透性酶相关基因表达上调, 且上调幅度与盐浓度呈正相关, 表明海藻糖和脯氨酸在 ACCC32524 细胞渗透调节过程中起着关键作用。另外, 在离子转运系统方面, 共筛选到 5 个分别涉及 NH_4^+ 离子转运蛋白、 Ca^{2+} -ATPase、 K^+ 通道、 Na^+/K^+ -ATPase、 Cu^{2+} -ATPase 相关基因。其中 Na^+/K^+ -ATPase 相关基因的上调表达, 一方面是在 NaCl 胁迫下维持了细胞 Na^+ 离子的平衡, 抵消了 Na^+ 离子的渗透作用; 二是在建立细胞质膜两侧 Na^+ 离子浓度梯度的同时, 为葡萄糖协同运输泵提供了驱动力, 促进了细胞对碳水化合物的转运和代谢^[24]。相关文献表明, Ca^{2+} 作为细胞内重要的第二信使首先感受到环境的变化, 进而介导细胞内一系列的生理生化反应, 但它在细胞质内的含量是极低的, 而且只有保

持此极低的水平才能发挥其正常的生理功能^[25]。因此, 在维持胞质内低水平 Ca^{2+} 方面, Ca^{2+} -ATPase 起了重要作用。本研究中, NaCl 胁迫下与 Ca^{2+} -ATPase 合成相关基因表达上调, 细胞质 Ca^{2+} 水平降低, 维持胞内离子及水分平衡。

高浓度 NaCl 对细胞造成渗透胁迫的同时, 也可致使细胞积累过量的活性氧, 引发膜脂过氧化自由基链式反应, 产生过量有害自由基, 加剧对细胞的毒害^[26]。微生物在产生过量活性氧的同时, 也启动了活性氧清除系统以及抗胁迫基因的表达。包斯琴等^[27]研究了盐胁迫下 2 株 *Paxillus involutus* 耐盐型真菌(MAJ、NAU)抗氧化酶活性的变化发现, 短期盐胁迫(1 d)能诱导菌株 MAJ 中 SOD、CAT 和 POD 活性提高, 而长期盐胁迫(9 d)下 NAU 菌株能更好地提升并维持多种抗氧化酶活性, 尤其是 APX (抗坏血酸过氧化物酶)、GPX (谷胱甘肽过氧化物酶)和 POD (过氧化物酶)。本研究共筛选出 7 个 0.4 mol/L、0.6 mol/L NaCl 胁迫下与活性氧清除相关酶的基因, 包括过氧化物酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶, 且大部分为上调表达基因, 表明 ACCC32524 抗氧化酶体系能够积极响应盐胁迫造成的氧化损伤。

丝状真菌中几丁质含量高达 10%–20%, 是真菌细胞壁的关键物质^[28]。当真菌受到环境胁迫或自身细胞壁合成受阻时, 细胞会激发包括几丁质酶在内的一系列与细胞壁结构相关的基因的表达, 维持细胞壁结构及功能的完整性^[29]。本研究中发现的 4 个几丁质酶合成相关基因表达全部上调, 增强了细胞壁的稳定性的同时, 同时增强了对 NaCl 胁迫的防卫作用。另外, 在 ACCC32524 差异表达基因中, 有 3 个疏水蛋白编码基因在 0.4 mol/L 和 0.6 mol/L NaCl 胁迫下均被高诱导表达。真菌疏水蛋白(hydrophobins)是一类高等丝状真菌分泌产生

的具有特殊理化性质的小分子量两性蛋白, 在真菌的生长发育和环境交流中起着重要作用^[30]。研究表明, 木霉具有丰富的 class II 疏水蛋白基因^[31]; Huang 等^[32]发现 *Trichoderma asperellum* ACCC30526 class II 疏水蛋白基因 *HFB2-6* 在营养胁迫(碳、氮)下被诱导表达, 并可能参与植物根际定殖过程; Nomura 等^[33]通过原子力显微镜发现, 聚苯乙烯乳胶纳米颗粒(PSL-NPs)包围下, *Aspergillus oryzae* 和 *Aspergillus nidulans* 菌丝表面覆盖大量疏水蛋白, 阻止毒性颗粒进入细胞, 降低致死率。因此, 猜测 ACCC32524 疏水蛋白是构建生物体抵御不良环境的保护屏障的主要成分, 减少毒性离子进入胞内, 在胁迫环境下保护细胞。

在对 ACCC32524 进行代谢组研究时, 注释到的 5 种上调的差异代谢产物分属糖类和有机酸两类, 可能作为亲和性物质参与胞内的渗透调节过程。相比于 Wu 等^[20]使用 GC-TOF-MS、LC-QQQ-MS(+) 和 LC-QQQ-MS(-) 分别检测到 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ DDT 胁迫培养 24 h 后的 *T. asperellum* TJ01 胞内 57、69 和 48 种上调的次级代谢产物, 本研究仍有 64% 的差异代谢产物是未知的。

除此之外, 本研究有将近一半差异表达基因被注释为假定蛋白, 表明在高盐胁迫下, 不仅仅是与耐盐相关的一些基因表达发生变化, 而是大部分细胞的代谢过程都发生改变, 以使细胞在整体水平上适应 NaCl 胁迫。

参 考 文 献

- [1] Wang JL, Huang XJ, Zhong TY, Chen ZG. Review on sustainable utilization of salt-affected land. *Acta Geographica Sinica*, 2011, 66(5): 673–684. (in Chinese)
王佳丽, 黄贤金, 钟太洋, 陈志刚. 盐碱地可持续利用研究综述. *地理学报*, 2011, 66(5): 673–684.
- [2] Jesus J, Castro F, Niemelä A, Borges MT, Danko AS. Evaluation of the impact of different soil salinization

- processes on organic and mineral soils. *Water, Air, & Soil Pollution*, 2015, 226(4): 102.
- [3] Schuster A, Schmoll M. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(3): 787–799.
- [4] Kumar K, Manigundan K, Amaresan N. Influence of salt tolerant *Trichoderma* spp. on growth of maize (*Zea mays*) under different salinity conditions. *Journal of Basic Microbiology*, 2017, 57(2): 141–150.
- [5] Zhang SW, Gan YT, Xu BL. Application of plant-growth-promoting fungi *Trichoderma longibrachiatum* T6 enhances tolerance of wheat to salt stress through improvement of antioxidative defense system and gene expression. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1405.
- [6] Ruppel S, Franken P, Witzel K. Properties of the halophyte microbiome and their implications for plant salt tolerance. *Functional Plant Biology*, 2013, 40(9): 940–951.
- [7] Zou YJ, Yang LF, Wang L, Yang SS. Cloning and characterization of a Na^+/H^+ antiporter gene of the moderately halophilic bacterium *Halobacillus aidingensis* AD-6^T. *The Journal of Microbiology*, 2008, 46(4): 415–421.
- [8] Cardoso FS, Castro RF, Borges N, Santos H. Biochemical and genetic characterization of the pathways for trehalose metabolism in *Propionibacterium freudenreichii*, and their role in stress response. *Microbiology*, 2007, 153(1): 270–280.
- [9] Hou LH, Wang M, Wang C, Wang CL, Wang HY. Analysis of salt-tolerance genes in *Zygosaccharomyces rouxii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 170(6): 1417–1425.
- [10] Duran R, Cary JW, Calvo AM. Role of the osmotic stress regulatory pathway in morphogenesis and secondary metabolism in filamentous fungi. *Toxins*, 2010, 2(4): 367–381.
- [11] Liu KH, Ding XW, Rao MPN, Zhang B, Zhang YG, Liu FH, Liu BB, Xiao M, Li WJ. Morphological and transcriptomic analysis reveals the osmoadaptive response of endophytic fungus *Aspergillus montevidensis* ZYD4 to high salt stress. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1789.
- [12] Cui XL, Li SG, Yang J, Fan XC, Gu JG. Screening and identification of saline-alkali tolerant and tobacco black shank resistant *Trichoderma*. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2014, 16(3): 81–89. (in Chinese)
崔西苓, 李世贵, 杨佳, 樊祥臣, 顾金刚. 耐盐碱抗烟草黑胫病木霉菌株的筛选与鉴定. *中国农业科技导报*, 2014, 16(3): 81–89.
- [13] Yang JH, Zheng L, Ma YH, Zhang LQ, Yang Y. Comparison of different determination of reducing sugar in potato. *Food Research and Development*, 2011, 32(6): 104–108. (in Chinese)
杨俊慧, 郑岚, 马耀宏, 张利群, 杨艳. 马铃薯中还原糖不同测定方法的比较. *食品研究与开发*, 2011, 32(6): 104–108.
- [14] Schulze SK, Kanwar R, Gözlenleuchter M, Therneau TM, Beutler AS. SERE: single-parameter quality control and sample comparison for RNA-Seq. *BMC Genomics*, 2012, 13: 524.

- [15] Gao W, Han X, Zhang LW. Research advances of the osmotic stress-related compatible solutes of lactic acid bacteria and its transport mechanism. *Microbiology China*, 2013, 40(11): 2097–2106. (in Chinese)
高薇, 韩雪, 张兰威. 乳酸菌渗透胁迫相关相容性溶质及其转运机制研究进展. *微生物学通报*, 2013, 40(11): 2097–2106.
- [16] Ding J, Jiang XL, Mei J, Sun Q, Li M. Functions of *Thga3* gene in *Trichoderma harzianum* based on transcriptome analysis. *Chinese Journal of Biological Control*, 2018, 34(1): 124–132. (in Chinese)
丁洁, 蒋细良, 梅杰, 孙青, 李梅. 基于转录组分析的哈茨木霉 *thga3* 基因功能研究. *中国生物防治学报*, 2018, 34(1): 124–132.
- [17] Wang LR, Jiang XL, Tsegaye E, Ding J, Ma J, Chen XL, Li XY, Li M. Transcriptome analysis of *Trichoderma harzianum* Th-33 under copper stress. *Chinese Journal of Biological Control*, 2017, 33(1): 103–113. (in Chinese)
王丽荣, 蒋细良, Tsegaye E, 丁洁, 马景, 陈孝利, 李昕玥, 李梅. 铜胁迫下的哈茨木霉 Th-33 转录组分析. *中国生物防治学报*, 2017, 33(1): 103–113.
- [18] Massaccesi G, Romero MC, Cazau MC, Bucsinzky AM. Cadmium removal capacities of filamentous soil fungi isolated from industrially polluted sediments, in La Plata (Argentina). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2002, 18(9): 817–820.
- [19] Mei J, Wang LR, Jiang XL, Wu BL, Li M. Functions of the C_2H_2 transcription factor gene *thmea1* in *Trichoderma harzianum* under copper stress based on transcriptome analysis. *BioMed Research International*, 2018, 2018: 8149682.
- [20] Wu Q, Ni M, Wang GS, Liu QQ, Yu MX, Tang J. Omics for understanding the tolerant mechanism of *Trichoderma asperellum* TJ01 to organophosphorus pesticide dichlorvos. *BMC Genomics*, 2018, 19: 596.
- [21] Wu XQ, Lü YP, Ren H, Zhao XY, Zhao ZJ, Zhang GZ, Li JS, Zhang XJ, Yang HT. Tolerance and elimination of oxalic acid by *Trichoderma* spp.. *Microbiology China*, 2016, 43(9): 1988–1998. (in Chinese)
吴晓青, 吕玉平, 任何, 赵晓燕, 赵忠娟, 张广志, 李纪顺, 张新建, 杨合同. 木霉对草酸耐受和消除作用的初步分析. *微生物学通报*, 2016, 43(9): 1988–1998.
- [22] Liu LC, Si LF, Meng X, Luo LX. Comparative transcriptomic analysis reveals novel genes and regulatory mechanisms of *Tetragenococcus halophilus* in response to salt stress. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2015, 42(4): 601–616.
- [23] Liu XD, Luo YT, Mohamed OA, Liu DY, Wei GH. Global transcriptome analysis of *Mesorhizobium alhagi* CCNWXJ12-2 under salt stress. *BMC Microbiology*, 2014, 14: 319.
- [24] Scheiner-Bobis G. The sodium pump: its molecular properties and mechanics of ion transport. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(10): 2424–2433.
- [25] Shang XF, Dong ST, Zheng SY, Wang LY. Relationship between changes of Na^+ , K^+ , and Ca^{2+} contents during seed germination and salt tolerance in maize. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(2): 333–336. (in Chinese)
商学芳, 董树亭, 郑世英, 王丽燕. 玉米种子萌发过程中 Na^+ 、 K^+ 和 Ca^{2+} 含量变化与耐盐性的关系. *作物学报*, 2008, 34(2): 333–336.
- [26] Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R. Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal*, 2017, 90(5): 856–867.
- [27] Bao SQ, Li J, Sun J, Ma XJ, Chen SL. Changes of anti-oxidative enzymes activity of *Paxillus involutus* under salt stress. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2012, 40(15): 8401–8403, 8405. (in Chinese)
包斯琴, 李静, 孙健, 马旭君, 陈少良. 盐胁迫下外生菌根菌 *Paxillus* 抗氧化酶活性的变化. *安徽农业科学*, 2012, 40(15): 8401–8403, 8405.
- [28] Latgé JP. The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Molecular Microbiology*, 2007, 66(2): 279–290.
- [29] Walker LA, Gow NAR, Munro CA. Fungal echinocandin resistance. *Fungal Genetics and Biology*, 2010, 47(2): 117–126.
- [30] Wösten HAB, Wessels JGH. Hydrophobins, from molecular structure to multiple functions in fungal development. *Mycoscience*, 1997, 38(3): 363–374.
- [31] Kubicek CP, Herrera-Estrella A, Seidl-Seiboth V, Martinez DA, Druzhinina IS, Thon M, Zeilinger S, Casas-Flores S, Horwitz BA, Mukherjee PK, Mukherjee M, Kredics L, Alcaraz LD, Aerts A, Antal Z, Atanasova L, Cervantes-Badillo MG, Challacombe J, Chertkov O, McCluskey K, Couplier F, Deshpande N, von Döhren H, Ebbole DJ, Esquivel-Naranjo EU, Fekete E, Flippi M, Glaser F, Gómez-Rodríguez EY, Gruber S, Han C, Henrissat B, Hermosa R, Hernández-Oñate M, Karaffa L, Kostı I, Le Crom S, Lindquist E, Lucas S, Lübeck M, Lübeck PS, Margeot A, Metz B, Misra M, Nevalainen H, Omann M, Packer N, Perrone G, Uresti-Rivera EE, Salamov A, Schmoll M, Seiboth B, Shapiro H, Sukno S, Tamayo-Ramos JA, Tisch D, Wiest A, Wilkinson HH, Zhang M, Coutinho PM, Kenerley CM, Monte E, Baker SE, Grigoriev IV. Comparative genome sequence analysis underscores mycoparasitism as the ancestral life style of *Trichoderma*. *Genome Biology*, 2011, 12(4): R40.
- [32] Huang Y, Mijiti G, Wang ZY, Yu WJ, Fan HJ, Zhang RS, Liu ZH. Functional analysis of the class II hydrophobin gene *HFB2-6* from the biocontrol agent *Trichoderma asperellum* ACCC30536. *Microbiological Research*, 2015, 171: 8–20.
- [33] Nomura T, Tani S, Yamamoto M, Nakagawa T, Toyoda S, Fujisawa E, Yasui A, Konishi Y. Cytotoxicity and colloidal behavior of polystyrene latex nanoparticles toward filamentous fungi in isotonic solutions. *Chemosphere*, 2016, 149: 84–90.

Transcriptome-metabolome analysis of *Trichoderma harzianum* ACCC32524 under NaCl stress

Jie Xiang, Jingshi Chen, Xinxin Xia, Kuai Liu, Shigui Li*, Jingang Gu*

Key Laboratory of Microbial Resources Collection and Preservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Institute of Agricultural Resources and Regional Planning, Chinese Academy of Agricultural Science, Beijing 100081, China

Abstract: [Objective] To identify the candidate genes and second metabolites involved in NaCl stress response of *Trichoderma harzianum* ACCC32524, thereby exploring the mechanism of NaCl stress adaptation. [Methods] The transcriptomes of ACCC32524 with the treatment of 0, 0.4, 0.6 mol/L NaCl were compared using Illumina HiSeq XTen high-throughput sequencing and the metabolomes with the treatment of 0, 0.6 mol/L were detected by GC-TOF-MS. The annotation, screening and classification of differentially expressed genes (DEGs) and secondary metabolites were completed by using related softwares and databases. Validation of DEGs using RT-qPCR. [Results] A total of 417 and 733 DEGs were found of ACCC32524 with the treatment of 0.4 or 0.6 mol/L NaCl respectively. GO analysis suggested that total of 318 and 582 DEGs were categorized into three functional classifications (biological process, molecular function, cellular component) and forty sub-categories; COG classification results showed that 232 and 414 transcripts were assigned to the same 20 categories and these transcripts were significantly enriched in various known amino acid transport and metabolism, general function prediction only and carbohydrate transport and metabolism; KEGG pathway analysis revealed that filtered 79 and 96 DEGs were enriched in 25 individual pathways, and those genes were significantly enriched in biosynthesis of amino acids and 2-oxocarboxylic acid metabolism pathways. A total of 22 genes were screened from transcriptome data related with osmotic regulation, ion transport and ROS scavenging. A total of 101 differential secondary metabolites were screened from the metabolome data under 0.6 mol/L NaCl stress, including 8 upregulated and 93 downregulated substances, 36 of which were qualitatively identified and distributed in 9 classifications, such as carbohydrates, organic acids and amino acids. The expression level of selected DEGs was tested with RT-qPCR, and they were consistent with the result of RNA-seq analysis. [Conclusion] Under NaCl stress, a large number of genes and secondary metabolites of *Trichoderma harzianum* ACCC32524 were changed and the metabolic pathway was significantly shifted. These processes together reduced the toxicity of salt ions to cells and enhanced the tolerance of strains to salt stress. This study further provided the gene information for the research of salt tolerance mechanism of *Trichoderma* spp..

Keywords: *Trichoderma harzianum*, NaCl, transcriptome, metabolomic, salt tolerance mechanism

(本文责编: 李磊)

Supported by the National Key Research and Development Plan of China (2017YFD0200604-5)

*Corresponding authors. Jingang Gu, Tel: +86-10-82105037, E-mail: gujingang@caas.cn; Shigui Li, E-mail: lishigui@caas.cn

Received: 17 December 2018; Revised: 6 March 2019; Published online: 17 June 2019