



绿色木霉组蛋白去乙酰化酶编码基因 *TvRpd3* 在木霉生物防治作用中的功能分析

李哲^{1,2*}, 李璇¹, 崔婷婷¹, 任云²

1 齐鲁工业大学(山东省科学院)生物研究所, 山东 济南 250103

2 中国科学院生态环境研究中心 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

李哲, 李璇, 崔婷婷, 任云. 绿色木霉组蛋白去乙酰化酶编码基因 *TvRpd3* 在木霉生物防治作用中的功能分析[J]. 微生物学报, 2023, 63(9): 3560-3573.

LI Zhe, LI Xuan, CUI Tingting, REN Yun. Role of *Trichoderma viride* histone deacetylase gene *TvRpd3* in the biocontrol of *Trichoderma*[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2023, 63(9): 3560-3573.

摘要: 【目的】本文借助基因编辑技术在具有生物防治潜力的绿色木霉(*Trichoderma viride*)中敲除组蛋白去乙酰化酶编码基因 *TvRpd3*, 来研究 *TvRpd3* 基因及其编码蛋白在提高木霉病原菌拮抗能力中的作用。【方法】利用融合 PCR 和同源重组策略构建了 *TvRpd3* 基因缺失的突变菌株, 通过对峙培养、表型观察、免疫组化检测、代谢组学分析等系统比较 *TvRpd3* 基因敲除前后菌株的组蛋白乙酰化修饰水平、次级代谢产物合成、病原菌拮抗能力以及田间防治效果等。【结果】与野生型菌株相比, 缺失 *TvRpd3* 基因的木霉工程菌($\Delta TvRpd3$)对多种病原菌表现出了更强的对峙抑制效果, 其所产的发酵液对小麦白粉病、烟草黑胫病和番茄枯萎病的防治效果分别提高了 62.27%、57.45%和 70.71%。同时, 敲除 *TvRpd3* 基因也显著改变了木霉工程菌所产次级代谢产物的种类和产量, 抗生素物质的产量大幅提高。【结论】绿色木霉 *TvRpd3* 基因及其介导的组蛋白乙酰化修饰在提高绿色木霉生物防治中起着重要作用。

关键词: 绿色木霉; 组蛋白去乙酰化酶; 分子改造; 功能分析; 生物防治

资助项目: 山东省自然科学基金(ZR202102270296, ZR2020QC044); 国家自然科学基金(21607169, 3227010260); 齐鲁工业大学(山东省科学院)重大创新专项项目(2022JBZ01-06); 济南市创新团队项目(2019GXRC033); 齐鲁工业大学(山东省科学院)国际合作项目(2022GH026)

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR202102270296, ZR2020QC044), the National Natural Science Foundation of China (21607169, 3227010260), the Education and Industry Integration Innovation Pilot Project of Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences) (2022JBZ01-06), the Program for Innovation Team in the University of Jinan (2019GXRC033), and the Foundation of International Technology Cooperation Project from Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences) (2022GH026).

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-531-82605911, E-mail: zhel@sdas.org

Received: 2023-01-03; Accepted: 2023-03-10; Published online: 2023-03-15

Role of *Trichoderma viride* histone deacetylase gene *TvRpd3* in the biocontrol of *Trichoderma*

LI Zhe^{1,2*}, LI Xuan¹, CUI Tingting¹, REN Yun²

1 Biology Institute, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Ji'nan 250103, Shandong, China

2 State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

Abstract: [Objective] This paper aimed to analyze the role of *TvRpd3* encoding histone deacetylase in the biocontrol of *Trichoderma viride* Tv-1511 by constructing the engineered strain with *TvRpd3* deleted ($\Delta TvRpd3$). [Methods] Fusion PCR technique and homologous recombination method were employed to delete *TvRpd3* in *T. viride* Tv-1511. Confrontation culture, phenotype observation, immunohistochemistry detection, and metabonomics analysis were carried out to compare the histone acetylation level, secondary metabolite synthesis, antagonism to pathogens, and field biocontrol effect between the engineered and the wild-type strains. [Results] Compared with the wild type, $\Delta TvRpd3$ exhibited enhanced inhibitory effects on pathogens. The biocontrol effects of $\Delta TvRpd3$ fermentation broth on wheat powdery mildew, tobacco black shank, and tomato *Fusarium* wilt increased by 62.27%, 57.45%, and 70.71%, respectively. Meanwhile, the knockout of *TvRpd3* significantly changed the species and yields of secondary metabolites produced by *Trichoderma*. Specifically, the yields of several vital antibiotic substances including trichomycin, sorbicillinoids, and monocillin I produced by $\Delta TvRpd3$ increased compared with those of the wild type. [Conclusion] *TvRpd3* mediates histone deacetylation to play a role in the biocontrol of *T. viride*.

Keywords: *Trichoderma viride*; histone deacetylase; molecular modification; functional analysis; biocontrol

木霉(*Trichoderma* spp.)作为一种广泛存在于土壤和植物根际等生态环境中的多功能丝状真菌,是土壤微生物群落的重要组成部分^[1-2]。作为生防菌株,木霉菌的主要生防机制是重寄生作用^[3]。木霉菌制剂作为活体微生物制剂,以其对环境影响小且不易使病原菌产生抗性、易培养和对环境安全等特点,使其成为安全有效的微生物肥料^[4-5]。随着木霉在生物防治中作用的广泛和深入研究,抗生性代谢产物作为植病生防菌筛选的重要指标越来越受到关注^[6]。自1932年发现胶霉毒素(gliotoxin)到现在,从木霉中分离到

的次级代谢产物已超过了300种,其中已经有超过45种具有杀菌杀虫作用的抗生性代谢产物被鉴定出来,它们与其生产菌株的生物防治有效性直接相关^[7-8]。早期的研究主要集中在不同菌种及其代谢物对植物病原菌的防治效果方面,近期的研究重点一方面集中在如何提高生防菌中已知代谢产物的产量,另一方面是从生防菌中发现具有更广泛活性的新型化合物^[8-9]。

染色质介导的调控在次级代谢产物生物合成基因簇的转录表达中起着重要作用,它通过表观遗传对组蛋白进行修饰来改变染色质的构象,

调控一些基因簇的激活或沉默^[10-11]。其中组蛋白乙酰化与去乙酰化被当作调控基因活化和抑制的主要表观修饰机制^[12]。组蛋白赖氨酸残基的乙酰化修饰是由组蛋白乙酰转移酶(histone acetyltransferase, HAT)和组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylase, HDAC)协同调控的^[12-13]。目前,以组蛋白乙酰化修饰为靶点,通过对组蛋白乙酰化酶/去乙酰化酶的编码基因和酶活性进行精准调控来改变组蛋白乙酰化和去乙酰化之间的动态平衡,是发现新的具有生物活性研究价值的先导化合物的重要手段,越来越得到广泛的应用^[13-14]。

在木霉的表观遗传研究中,通过敲除里氏木霉组蛋白去乙酰化酶基因 *HDAC1* 显著提高了纤维素酶编码基因及其相关调控基因 *cbh1*、*egl1* 和 *xyr1* 的转录水平^[15],而干扰掉组蛋白去乙酰化酶基因 *GCN5* 则导致里氏木霉的生长受到抑制、产纤维素酶的活性下降^[16]。但是目前表观遗传修饰调控木霉抗生性次级代谢产物合成的研究还很少,相关分子调控机制以及基于表观遗传修饰的产物发掘和鉴定工作亟待深入开展。减少钾依赖 3 (reduced potassium dependency 3, *Rpd3*)是人们最早发现的具备 HDAC 活性的蛋白,其通过催化底物组蛋白赖氨酸的去乙酰化来调控基因表达^[17]。将丝状真菌橘青霉(*Penicillium citrinum*)组蛋白去乙酰化酶基因 *Rpd3* 过表达后,其主要次级代谢产物美伐他汀的产量大幅下降,表明 *Rpd3* 蛋白对次级代谢产物的生物合成可能起到负调控作用^[18]。前期工作中,本团队对绿色木霉 Tv-1511 中组蛋白乙酰化酶 *GCN5* 的功能进行了分析,发现过表达 *TvGCN5* 基因有效提高了绿色木霉 Tv-1511 的生长、抗逆以及促生和防病能力^[19-20]。但是作为另一种有效提高组蛋白乙酰化水平方法,敲除组蛋白去乙酰化酶对绿色木霉生长及促生防病功效的影响还未深入研究。

基于木霉丰富的代谢途径和繁多的代谢产物,利用基因编辑和分子改造技术构建高效木霉底盘菌株创制合成菌群并利用发酵调控手段来增加其活性物质的多样性,可发现更多的新型生物活性物质,增强其生物防治效能^[21-23]。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

本实验室分离保存的绿色木霉(*Trichoderma viride*) Tv-1511,已保藏在中国普通微生物菌种保藏中心(保藏号 CGMCC No. 16800)。绿色木霉工程菌株 $\Delta TvRpd3$ 由本研究构建保存,在中国普通微生物菌种保藏中心的保藏号为 CGMCC No. 23516。本研究所用病原真菌[立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani*)、串珠镰刀菌(*Fusarium moniliforme*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、葡萄座腔菌(*Botryosphaeria rhodina*)、层生镰刀菌(*Fusarium proliferatum*)、盾壳霉(*Coniothyrium minitans*)、白绢病菌(*Sclerotium rolfisii*)、棒孢菌(*Corynespora* sp.)、灰葡萄孢菌(*Botrytis Cinerea*)、禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)]均为本实验室分离保藏。

1.1.2 培养基

PDA (马铃薯浸粉 6.0 g/L,葡萄糖 20.0 g/L,琼脂 20.0 g/L)、PDB (马铃薯浸粉 6.0 g/L,葡萄糖 20.0 g/L)和 LB (胰蛋白胨 10.0 g/L,酵母浸粉 5.0 g/L,氯化钠 10.0 g/L,琼脂 15.0 g/L)培养基,均购自青岛海博生物技术有限公司。

1.1.3 试剂

氨苄青霉素溶液和潮霉素溶液均购买于生工生物工程(上海)股份有限公司。溶解酶(lysing enzyme)购于 Sigma 公司。

1.2 绿色木霉 *TvRpd3* 缺失工程菌株构建

本研究利用基于融合 PCR 构建敲除片段、

PEG 介导的原生质体转化以及高效的突变子筛选为核心的基因编辑方法, 来构建 *TvRpd3* 缺失工程菌株。敲除片段的构建如图 1 所示, 敲除片段由 3 部分组成, *TvRpd3* 上游片段、*TvRpd3* 下游片段和 *HygR* 抗性基因表达框。以绿色木霉 Tv-1511 基因组 DNA 为模板, 扩增 *TvRpd3* 基因的上游片段和下游片段, 敲除片段扩增引物分别为: 上游片段扩增引物 *TvRpd3-up-F*: 5'-GATTCGGCGTCTCGAGATAT-3' 和 *TvRpd3-up-R*: 5'-GAGCTACCTTACATCAATATGGCAAGAGGCGCTTTGGCGCA-3'; 下游片段扩增引物 *TvRpd3-down-F*: 5'-GGTACTATGGCTTAGATGGAATACCCGCGATTCAGGAAGCTTGTG-3' 和 *TvRpd3-down-R*: 5'-TGGATGGATGGCTTGTG-3'。以线性化的 pBARGPE1-*Hygro* 质粒为模板, 扩增潮霉素抗性基因(*HygR*), 扩增引物为: *HygR-F*: 5'-GAGCTACCTTACATCAATATGGC-3' 和 *HygR-R*: 5'-GGTACTATGGCTTAGATGGAATACCC-3'。融合 PCR 扩增后纯化回收敲除片段。参照之前的实验方法进行原生质体的制备及转化^[19-20]。挑取菌落至新鲜的抗生素平板上获得 *TvRpd3* 缺失工程菌株 $\Delta TvRpd3$ 。采用 RT-PCR 的方法检测 *TvRpd3* 的转录表达, 扩增引物为: *TvRpd3-F*: 5'-CAAGTTCGGCGGTATGAC-3' 和 *TvRpd3-R*: 5'-TTCTCCTCCTCCTTCTCCT-3'; *TvRpd3* 的蛋白表达则利用蛋白质免疫印迹(Western blotting, WB)的方法进行检测。

1.3 绿色木霉组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化水平检测

在 PDA 平板上活化木霉野生型菌株(wild type)和突变工程菌($\Delta TvRpd3$), 28 °C 避光培养 48–72 h。参照之前的实验方法^[19-20], 利用 EpiQuik 公司试剂盒(Total H3ac Detection Kit, P-4031; Total Histone H4 Acetylation Detection Fast Kit, P-4033)进行出发菌株和突变工程菌中

组蛋白的提取和乙酰化状态检测。

1.4 绿色木霉野生型菌株及工程菌与病原菌平板对峙实验

在 PDA 平板上活化木霉野生型菌株(wild type)和突变工程菌($\Delta TvRpd3$), 利用之前报道的方法^[24]进行木霉菌与病原菌的平板对峙实验, 逐日观察抑制作用, 测量病原菌菌落半径。

1.5 绿色木霉野生型菌株及 *TvRpd3* 缺失工程菌发酵液的平板抑菌实验

利用之前报道的方法^[24]收集木霉菌的发酵液, 发酵液经 0.22 μm 无菌滤膜过滤后置于无菌离心管中备用。随后, 在 40 mL PDA 培养基中加入 10 mL 无菌木霉菌发酵液, 混匀后倒平板, 待其冷却后在平板一侧转接不同病原菌(尖孢镰刀菌、串珠镰刀菌、灰葡萄孢菌、葡萄座腔菌、盾壳霉、立枯丝核菌、白绢病菌、层生镰刀菌、棒孢菌、禾谷镰孢菌), 28 °C 倒置培养, 逐日观察抑制作用。将 10 mL 无菌 PDB 溶液与 40 mL PDA 培养基均匀混合后, 倒平板作为对照组。

1.6 绿色木霉野生型菌株及工程菌的发酵液施用对几种植物病原菌的田间防治效果

试验设 3 个处理, 包括清水对照(A)、绿色木霉 Tv-1511 发酵液处理(B)、绿色木霉 $\Delta TvRpd3$ 发酵液处理(C)。将经过菌体过滤后所收集得到的发酵液进行 10 倍稀释后使用。

烟草黑胫病田间抑制实验: 大田试验在黑胫病高发田地, 分别在移栽后 0、10 和 20 d, 对植株全株特别是茎基部进行全面喷雾, 做到药液可以沿茎基部流渗到根际表土中。移栽 30 d 后观察是否出现病害, 进行防效调查, 采用 5 点取样法, 每点选取 30 株。按照标准方法(GB/T23222—2008)调查烟草黑胫病发病情况。以未处理的烟株为对照, 计算烟株病叶平均严重度、病情指数以及生防菌相对防效。

小麦白粉病田间抑制实验: 大田试验于在白

粉病高发田地进行,在白粉病初发期,采用手动喷雾器喷洒将发酵液均匀喷洒于三叶期小麦的叶片上,间隔 15 d 再喷洒 1 次,共防治 2 次。首次用药后 30 d 进行防效调查,参照《小麦白粉病测报调查范围》评价小麦白粉病发病情况。采用 5 点取样法,每点选取 30 株。

番茄枯萎病田间抑制实验:在番茄 6-7 片真叶时进行移栽,每个处理 20 株,共 3 个重复。利用番茄枯萎病菌孢子悬浮液灌根接种刚移栽的番茄植株。分别在移栽后第 10、25 和 40 天进行 3 次发酵液灌根处理,施用量为 300 mL 发酵液/株。30 d 后调查番茄植株枯萎病发病情况。番茄枯萎病病情分级标准参照《番茄病虫害诊治图册》。

防治效果、病情指数和病叶平均严重度(%)按照以下公式计算:相对防效=(对照病情指数-处理病情指数)/对照病情指数 \times 100%;病情指数= \sum (各级病株数 \times 该病级值)/(调查总株数 \times 最高级值) \times 100;病叶平均严重度(%)= \sum (各严重度级值 \times 各级病叶数)/调查总病叶数 \times 100。

1.7 绿色木霉野生型菌株及工程菌发酵液成分的代谢组学分析

将菌株接于含有 PDB 培养液的摇瓶中,28 °C、180 r/min 发酵 7 d。用滤纸过滤发酵液,然后经 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液,送北京诺禾致源科技股份有限公司进行非靶向代谢组学(Untargeted metabolomics)分析。

1.8 绿色木霉野生型菌株及工程菌发酵液中几种抗生性次级代谢产物含量的检测

将菌株接于含有 PDB 培养液的摇瓶中,28 °C、180 r/min 发酵 7 d。用滤纸过滤发酵液,然后经 10 000 r/min 离心 20 min,乙酸乙酯(ethyl acetate, EtOAc) 500 mL 萃取 3 次。用旋转蒸发仪浓缩萃取液制成发酵浸膏。将 0.5 g 发酵浸膏用 1 mL 乙醇溶解,3 000 r/min 离心 1 min,取上清,用旋转蒸发仪浓缩,经 CHCl_3 和

CH_2Cl_2 +0.5%甲醇溶液浓缩溶解后,高效液相色谱仪测定分析。

Monocillin I 含量检测使用 Agilent C_{18} 色谱柱。用甲醇:水=60:40 (体积比)作流动相,流速 1 mL/min,柱温 20 °C,紫外检测波长 220 nm。

木霉菌素含量检测使用 Agilent C_{18} 色谱柱,流动相为 V(乙腈):V(水)=60:40,流速 1 mL/min,柱温 22 °C,紫外检测波长 193 nm。

Sorbicillinoids 含量检测使用 Agilent C_{18} 色谱柱。用甲醇:水=80:20 (体积比)作流动相,流速 1 mL/min,柱温为 20 °C,紫外检测波长为 370 nm。

1.9 数据处理和分析

运用 SPSS 21.0 统计软件对试验数据进行分析,利用 Origin 9.0 软件进行图表制作,所有数据均采用平均值 \pm 标准误差(mean \pm SE)表示。数据采用方差分析(analysis of variance, ANOVA)法比较不同处理间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 绿色木霉 *TvRpd3* 缺失工程菌株的构建

从绿色木霉 Tv-1511 基因组中克隆 *TvRpd3* 基因的上游片段和下游片段,从质粒 pBARGPE-1-Hygro 中克隆潮霉素基因片段,通过融合 PCR 的方法构建 *TvRpd3* 的敲除基因片段,将构建好的敲除基因片段通过 PEG- CaCl_2 法转入绿色木霉原生质体,通过同源重组的方法敲除 *TvRpd3* 基因,并利用 Hyg-R 抗性,进行菌落 PCR 筛选得到阳性突变子 18 株(图 1)。然后分别采用 RT-PCR 和蛋白质免疫印迹的方法检测 *TvRpd3* 的转录表达,以及 *TvRpd3* 编码蛋白的表达。结果显示,在 *TvRpd3* 缺失工程菌株中检测不到 *TvRpd3* 的转录表达(图 2A、2B)和蛋白表达(图 2C、2D)。

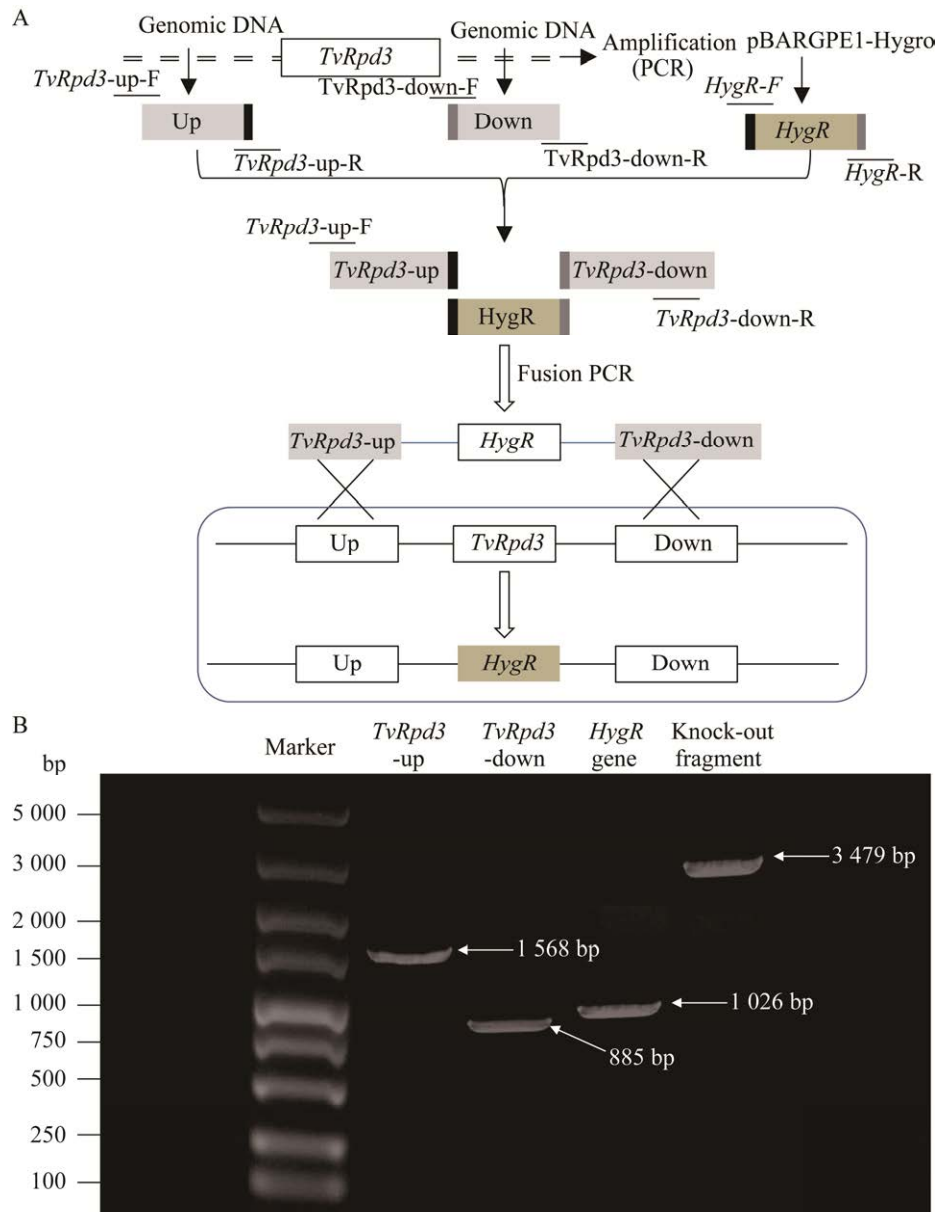


图 1 *TvRpd3* 基因敲除片段的构建及验证

Figure 1 Construction and identification of *TvRpd3* knockout fragment. A: Construction of knockout fragment of *TvRpd3* gene. B: Identification of knockout fragment of *TvRpd3* gene.

2.2 绿色木霉 *TvRpd3* 缺失工程菌株中组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化水平的改变

利用获得的 *TvRpd3* 缺失工程菌株检测了敲除 *TvRpd3* 基因对绿色木霉基因组中组蛋白 H3 和 H4 乙酰化水平的影响。结果表明, *TvRpd3*

缺失工程菌 $\Delta TvRpd3$ 中组蛋白 H3 和 H4 的乙酰化修饰水平, 与野生型菌株相比均明显上升(图 3), 其中组蛋白 H3 乙酰化水平提高了 104.5% (图 3A), 组蛋白 H4 乙酰化水平提高了 62.4% (图 3B)。

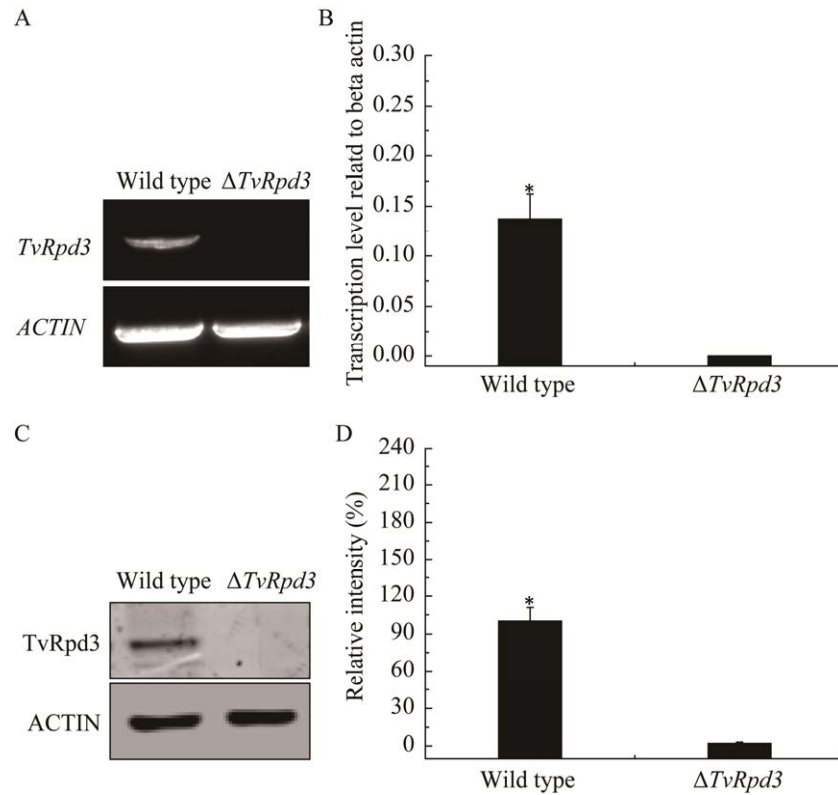


图 2 绿色木霉 *TvRpd3* 敲除工程菌的 RT-PCR 和 WB 验证

Figure 2 Identification of *Trichoderma* engineering strains deleting *TvRpd3* gene by RT-PCR and Western blotting. A, B: Identification of *TvRpd3* gene transcription level in *Trichoderma* engineered strains by RT-PCR. C, D: Identification of *TvRpd3* protein expression in *Trichoderma* engineered strains using Western blotting. Data were mean \pm SE, values were significantly different with * at 0.05 level.

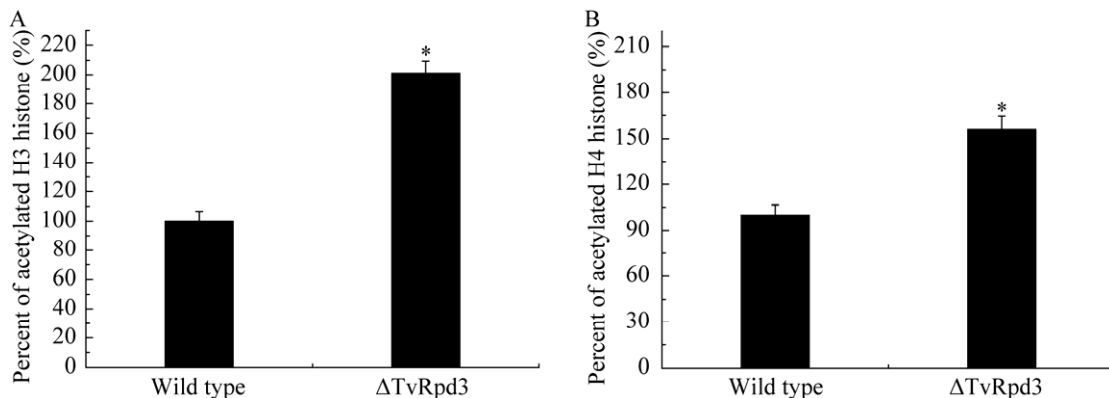


图 3 绿色木霉 *TvRpd3* 敲除工程菌中的组蛋白乙酰化修饰水平

Figure 3 Acetylated level of histone H3 and H4 in *Trichoderma* engineering strains deleting *TvRpd3* gene. A: Acetylated level of H3 in *Trichoderma* engineering strains deleting *TvRpd3* gene. B: Acetylated level of H4 in *Trichoderma* engineering strains deleting *TvRpd3* gene. Data were mean \pm SE, values were significantly different with * at 0.05 level.

2.3 绿色木霉 *TvRpd3* 缺失工程菌株及其发酵液的植物病原菌平板对峙实验

利用绿色木霉 *TvRpd3* 缺失工程菌株进行了木霉菌株与多种植物病原菌的平板对峙实验。结果发现, 与野生型菌株相比, 缺失 *TvRpd3* 基因的木霉工程菌($\Delta TvRpd3$)对不同植物病原菌均表现出了更强的抑制效果(图 4A)。其中, $\Delta TvRpd3$ 工程菌对尖孢镰刀菌、串珠镰刀菌、灰葡萄孢菌、白绢病菌、层生镰刀菌、棒孢菌和禾谷镰孢菌的对峙抑制效果相比野生型菌株明显提高(图 4B)。

同时, 收集 *TvRpd3* 缺失工程菌株的发酵液进行了平板抑菌试验。结果发现, 与野生型菌株相比, *TvRpd3* 基因缺失工程菌株所产生的发酵液对不同病原菌(尖孢镰刀菌、串珠镰刀菌、灰葡萄孢菌、葡萄座腔菌、盾壳霉、立枯丝核菌、白绢病菌、层生镰刀菌、棒孢菌、禾谷镰孢菌)均表现出了更强的抑制效果(图 5A)。其中, $\Delta TvRpd3$ 工程菌发酵液对灰葡萄孢菌、葡萄座腔菌和盾壳霉的抑制效果相比野生型菌株提高最为明显(图 5B)。

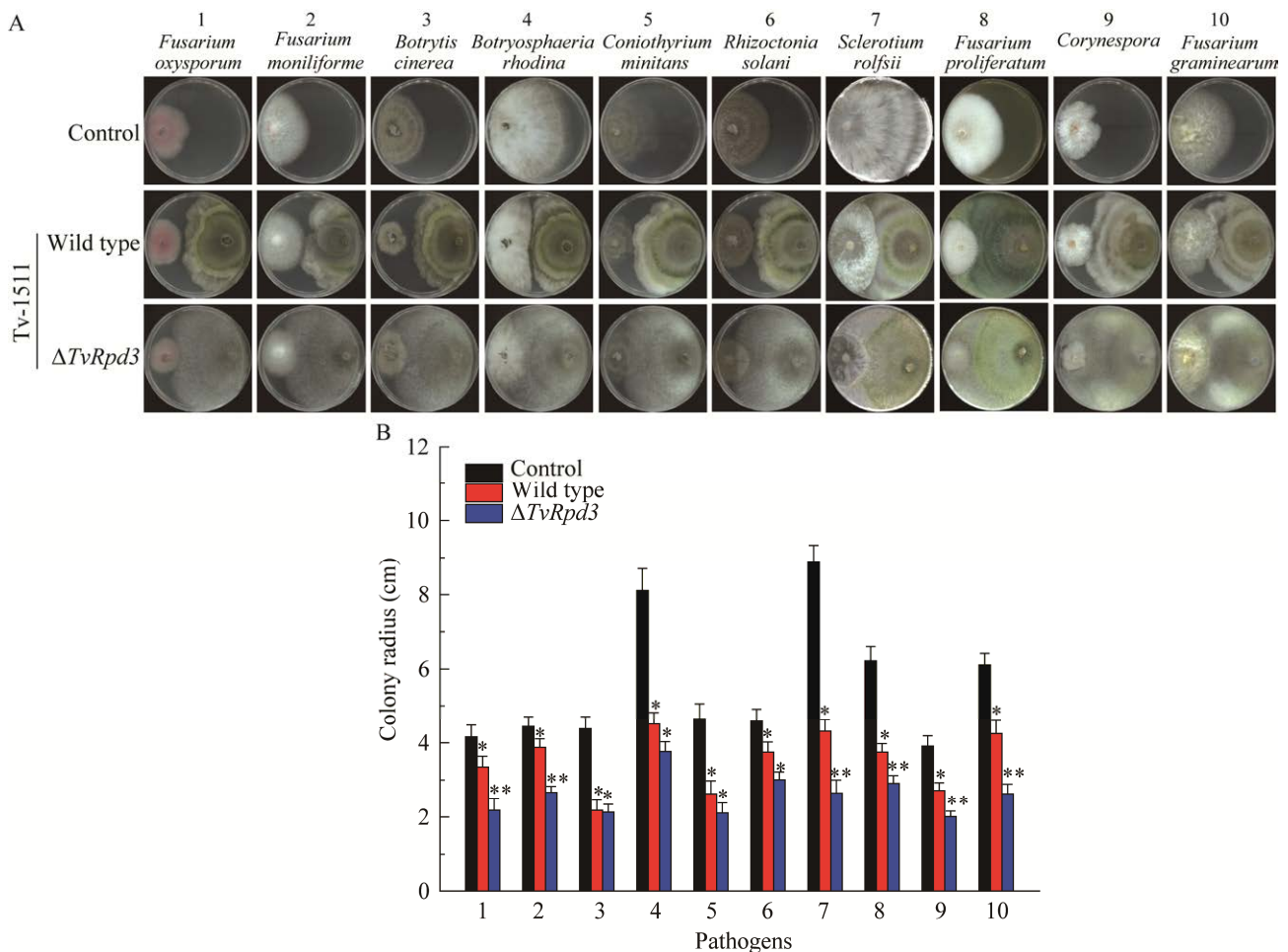


图 4 绿色木霉 *TvRpd3* 敲除工程菌 $\Delta TvRpd3$ 与病原菌平板对峙实验

Figure 4 Plate confrontation experiment between *Trichoderma* engineering strains deleting *TvRPD3* gene and pathogens. A: Phenotype of plate confrontation experiment between *Trichoderma* and pathogens. B: Quantitative statistics of plate confrontation experiment between *Trichoderma* and pathogens. Data were mean \pm SE, values were significantly different with * at 0.05 level, with ** at 0.01 level.

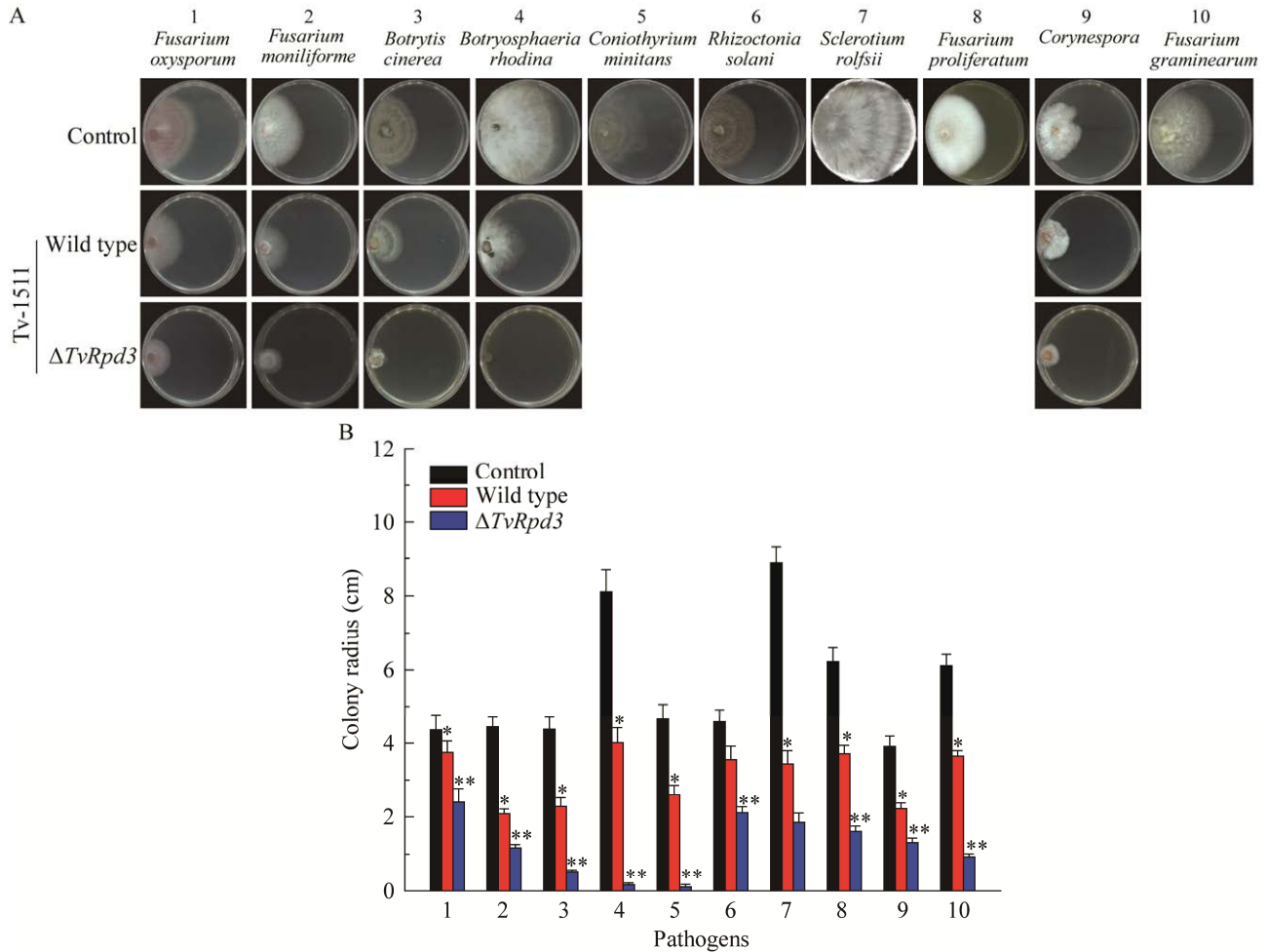


图5 绿色木霉 *TvRpd3* 敲除工程菌 $\Delta TvRpd3$ 发酵液对病原菌的抑制实验

Figure 5 Plate anti-pathogen experiment by fermentation broth of *Trichoderma* engineering strains deleting *TvRpd3* gene. A: Phenotype of plate anti-pathogen experiment by the fermentation broth. B: Quantitative statistics of plate anti-pathogen experiment by the fermentation broth. Data were mean \pm SE, values were significantly different with * at 0.05 level, with ** at 0.01 level.

2.4 绿色木霉 *TvRpd3* 缺失工程菌株发酵液对几种植物病原菌的田间防治效果

为了验证敲除 *TvRpd3* 基因对木霉菌株田间病害防治效果的影响,分别进行了木霉工程菌发酵液对烟草黑胫病、小麦白粉病和番茄枯萎病的田间防治实验。结果显示,施用 $\Delta TvRpd3$ 工程菌株发酵液后,小麦白粉病、烟草黑胫病和番茄枯萎病的发病率显著降低。与野生型菌株相比,工程菌株对小麦白粉病、烟草黑胫病和番茄枯萎

病的防治效果分别提高了 62.27%、57.45%和 70.71% (表 1, 表 2, 表 3)。

2.5 敲除 *TvRpd3* 基因对绿色木霉抗生素次级代谢产物的影响

高效液相色谱的检测结果显示,与野生型菌株 *Tv-1511* 相比(图 6A), $\Delta TvRpd3$ 工程菌株发酵液(图 6B)中代谢物的总离子流(total ion flow, TIC)图呈现明显的峰形差异,表明改变木霉组蛋白乙酰化水平对次级代谢的种类和含量产生了显著影响。

表 1 绿色木霉野生型及 $\Delta TvRpd3$ 工程菌发酵液对小麦白粉病的田间防治效果Table 1 Field control effects of the fermentation broth wild-type and engineering ($\Delta TvRpd3$) strains of *Trichoderma* on wheat powdery mildew

Treatment	Average disease severity (%)	Disease index	Control effect (%)
Control	32.15±4.77a	25.22±2.81a	/
Fermentation broth of Tv-1511	15.66±2.98ab	12.31±1.21ab	51.29±6.88a
Fermentation broth of $\Delta TvRpd3$	5.39±0.71bc	1.56±0.21bc	83.23±8.39b

Data were mean±SE, values with different lowercase letters in the same column were significantly different at 0.05 level. / indicated null.

表 2 绿色木霉野生型及 $\Delta TvRpd3$ 工程菌发酵液对烟草黑胫病的田间防治效果Table 2 Field control effects of the fermentation broth wild-type and engineering ($\Delta TvRpd3$) strains of *Trichoderma* on tobacco black shank

Treatment	Average disease severity (%)	Disease index	Control effect (%)
Control	18.99±2.99a	4.58±1.01a	/
Fermentation broth of Tv-1511	8.32±1.91ab	1.87±0.31ab	56.19±6.33a
Fermentation broth of $\Delta TvRpd3$	2.19±0.51bc	0.59±0.15bc	88.47±6.91b

Data were mean±SE, values with different lowercase letters in the same column were significantly different at 0.05 level. / indicated null.

表 3 绿色木霉 Tv-1511 及 $\Delta TvRpd3$ 工程菌发酵液对番茄枯萎病的田间防治效果Table 3 Field control effects of the fermentation broth wild-type and engineering ($\Delta TvRpd3$) strains of *Trichoderma* on tomato *Fusarium* wilt

Treatment	Average disease severity (%)	Disease index	Control effect (%)
Control	93.21±7.99a	59.66±7.12a	/
Fermentation broth of Tv-1511	48.31±4.78ab	21.88±4.03ab	48.17±5.89a
Fermentation broth of $\Delta TvRpd3$	21.56±3.21bc	11.21±1.78bc	82.23±7.98b

Data were mean±SE, values with different lowercase letters in the same column were significantly different at 0.05 level. / indicated null.

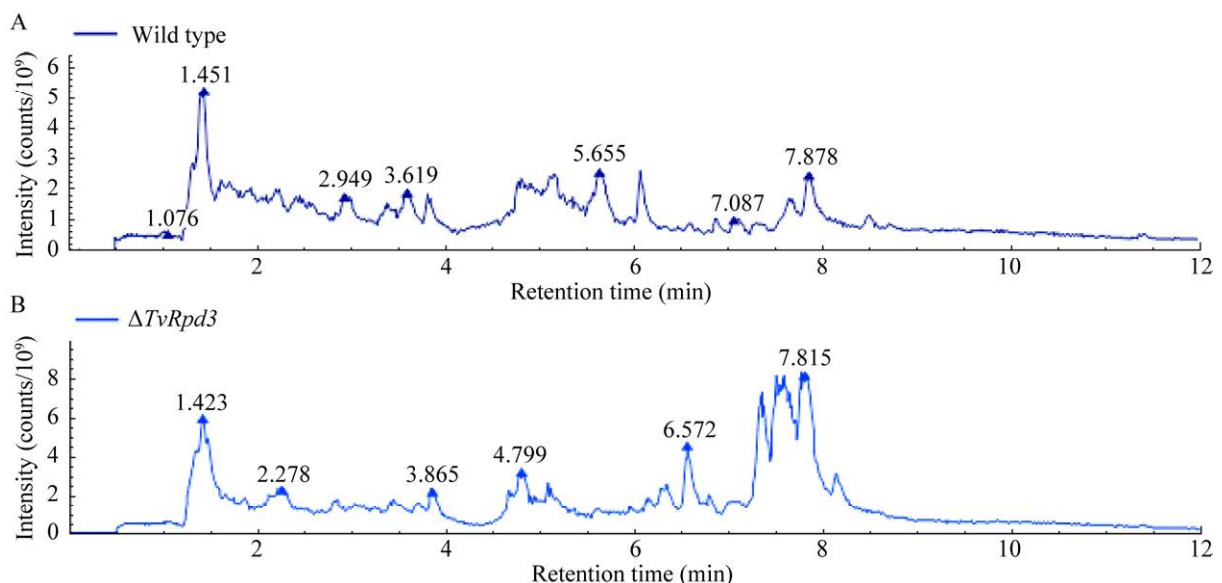


图 6 绿色木霉工程菌株发酵液中代谢物的总离子流图

Figure 6 Total ion flow diagram of metabolites in fermentation broth of wild-type and engineering strains of *Trichoderma*. A: Total ion flow diagram of metabolites in fermentation broth of wild-type *Trichoderma viride*. B: Total ion flow diagram of metabolites in fermentation broth of *Trichoderma* engineering strains deleting *TvRpd3* gene.

因此, 本研究进一步对木霉野生菌株和工程菌株的发酵液进行了代谢组学的差异性分析(图 7), 结果显示, 与野生型菌株相比, $\Delta TvRpd3$ 工程菌株发酵液中筛选出 324 个差异代谢产物, 其中产量上调的代谢产物有 233 个, 产量下调的代谢产物有 91 个, 表明 $\Delta TvRpd3$ 工程菌株发酵液中有 71.9% 的差异代谢产物的含量增加。

随后, 比较了野生菌株与 $TvRpd3$ 缺失工程菌株发酵液中几种重要抗生素次级代谢产物的含量差异。结果发现, 敲除 $TvRpd3$ 基因后, 木霉菌株生产木霉菌素、sorbicillinoids 和 monocillin I 的能力均显著提升。与野生型菌株相比, $\Delta TvRpd3$ 工程菌发酵液中木霉菌素、sorbicillinoids 和 monocillin I 的产量分别提高了 75.11%、95.63% 和 72.26% (表 4)。

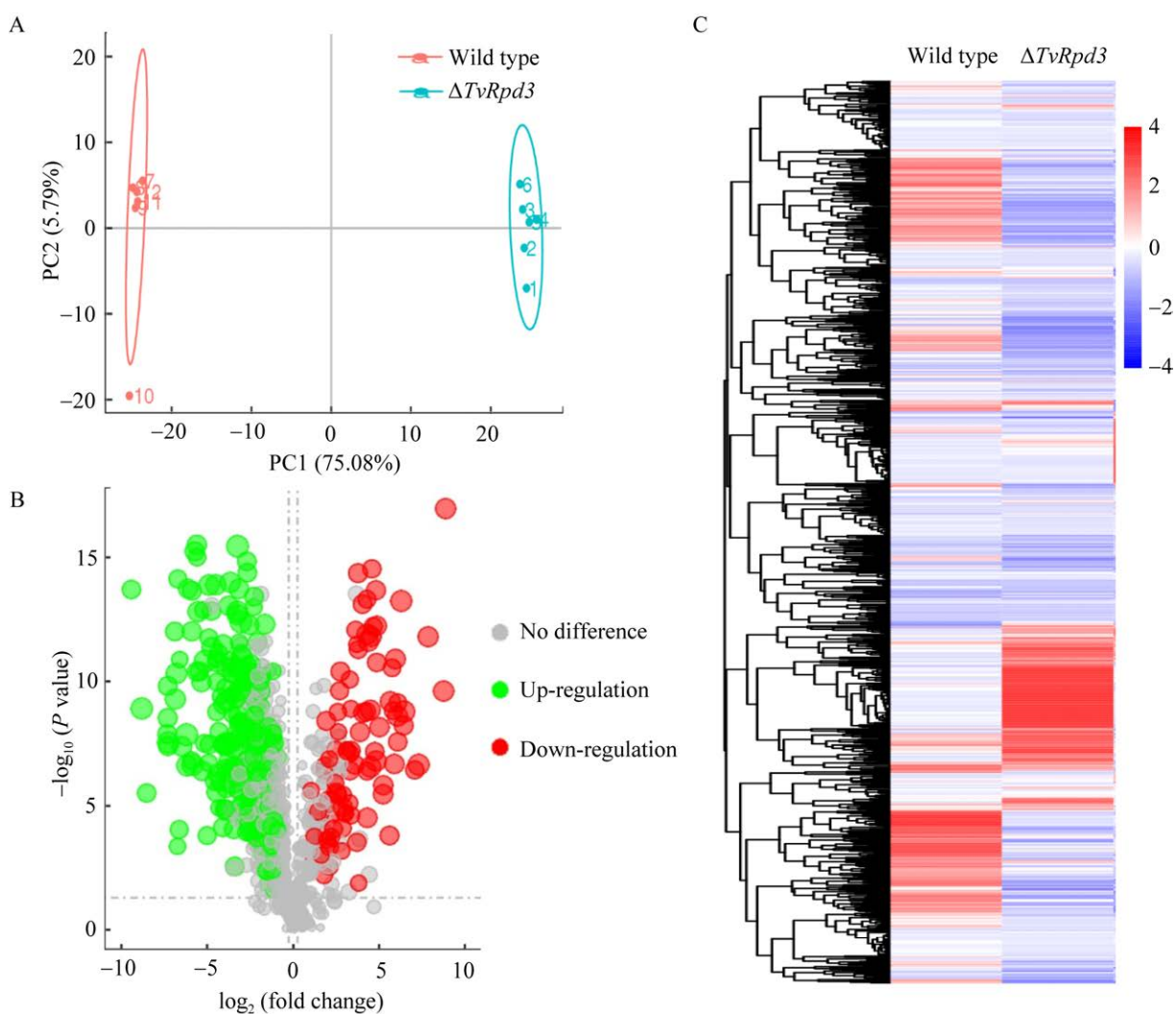


图 7 绿色木霉野生型菌株和工程菌株发酵液成分的代谢组分析

Figure 7 Metabolomic analysis of metabolites in fermentation broth of wild-type and engineering strains of *Trichoderma*. A: The score plot and loading plot of PCA. B: Volcanic map of differential metabolites. C: Cluster analysis of differential metabolites.

表 4 绿色木霉野生型及 $\Delta TvRpd3$ 工程菌发酵液中几种抗生素性次级代谢产物含量的检测Table 4 Detection of several antibiotic secondary metabolites in the fermentation broth of wild-type and engineering ($\Delta TvRpd3$) strains of *Trichoderma*

Samples	Trichodermin (mg/L)	Sorbicillinoids (g/L)	Monocillin I (mg/L)
Fermentation broth of Tv-1511	83.21±3.51a	4.85±0.79a	10.06±0.87a
Fermentation broth of $\Delta TvRpd3$	145.71±6.78b	9.44±1.35b	17.33±2.31b

Data were mean±SE, values with different lowercase letters in the same column were significantly different at 0.05 level.

3 讨论与结论

组蛋白去乙酰化酶介导的组蛋白低乙酰化水平会使染色质的结构变得更紧密^[25], 其介导的低乙酰与抑制基因的表达有关^[26]。Rpd3 作为人们最早发现的具备 HDAC 活性的蛋白, 与特定基因的转录密切相关。Vidal 等^[27]在酵母中证明 Rpd3 蛋白参与基因的转录, Tomimoto 等^[28]在研究组蛋白去乙酰化酶基因对清酒酿酒酵母的发酵特性的影响时发现, 敲除酵母的 *Rpd3s* 基因后, 与乙酸酯合成的相关基因的转录水平上升, 一些相关醇类的产量得到提高。基于已经完成的全基因组测序结果, 本研究从绿色木霉 Tv-1511 中克隆到了组蛋白去乙酰化酶编码基因 *TvRpd3*, 其基因序列和氨基酸序列已提交至 NCBI GenBank (OK335751)。本研究通过构建 *TvRpd3* 缺失的木霉菌株 $\Delta TvRpd3$, 解析了 *TvRpd3* 及其介导的组蛋白去乙酰化修饰在绿色木霉生物防治中的功能。木霉是真菌类生物农药的代表性菌种, 它对植物具有很好的防病、促生作用^[29]。本研究结果表明, 与野生型菌株相比, 缺失 *TvRpd3* 基因的木霉工程菌($\Delta TvRpd3$)对多种病原菌表现出了更强的对峙抑制效果, 木霉工程菌($\Delta TvRpd3$)所产发酵液对多种病原菌和植物病害表现出了更强的抑制和防治效果。

木霉产生的抗生素性次级代谢产物种类繁多, 由于具有新颖的化学结构和显著的生物活性而受到广泛关注, 其中抗生素性代谢产物在生物防治

中的作用至关重要^[30]。大量真菌基因组测序表明, 真菌中超过 90%的次级代谢产物合成基因簇处于沉默状态, 极大地限制了新代谢产物的发现及其合成机制研究^[10]。作为表观遗传调控的重要方式, 组蛋白乙酰化修饰在代谢产物合成及表达调控过程中发挥着重要作用^[31-32]。在互隔交链孢霉 (*Alternaria alternata*) 和扩张青霉 (*Penicillium expansum*) 中, HDAC 抑制剂处理能够有效促进其次级代谢产物的产生^[33-34], 而且进一步的研究发现在齿梗孢霉 (*Calcarisporium arbuscula*) 中敲除 HDAC 编码基因 *HdaA* 显著激活了大约 75%的次级代谢产物合成基因(簇)的表达^[35]。这些研究表明通过表观遗传调控来改变组蛋白乙酰化和去乙酰化动态平衡, 在提高已知代谢产物的产量和激活次级代谢产物生物合成“沉默”基因(簇)方面均有重要调控作用。本研究结果发现, 敲除 *TvRpd3* 基因显著改变了木霉工程菌所产次级代谢产物的种类和产量, 与野生型菌株相比有 300 余种差异代谢产物的含量发生变化, 其中有超过 70%的次级代谢产物的含量上调。未来的工作将基于已测序完成的绿色木霉 Tv-1511 全基因组信息, 结合多组学分析和代谢通路解析, 进一步挖掘组蛋白乙酰化修饰与木霉次级代谢产物生物合成基因(簇)之间的调控机制, 为丰富木霉次级代谢产物的结构与功能多样性提供理论和技术支持。

本研究利用基于同源重组的基因编辑方法敲除了绿色木霉组蛋白去乙酰化酶编码基因

TvRpd3, 构建了 *TvRpd3* 基因缺失菌株 $\Delta TvRpd3$, 并开展了其在木霉生物防治方面的功能研究。缺失 *TvRpd3* 基因的绿色木霉工程菌($\Delta TvRpd3$)及其发酵液具有更强的对不同病原菌和植物病害的抑制和防治效果, 对小麦白粉病、烟草黑胫病和番茄枯萎病的防治效果显著提高。代谢组学分析结果发现 $\Delta TvRpd3$ 工程菌发酵液中次级代谢产物种类和产量均有显著变化, 其中几种重要生防物质包括木霉菌素、sorbicillinoids 和 monocillin I 等的产量明显提高。这些结果表明敲除 *TvRpd3* 基因可以显著提高绿色木霉对病原菌的拮抗能力, 在木霉的生物防治作用中起着重要作用。

参考文献

- [1] HARMAN GE, HOWELL CR, VITERBO A, CHET I, LORITO M. *Trichoderma* species—opportunistic, avirulent plant symbionts[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2(1): 43-56.
- [2] 闫峰, 徐凤花, 顾金刚, 姜瑞波. 木霉属真菌的生物降解及生物转化作用研究进展[J]. *微生物学杂志*, 2009, 29(3): 77-80.
YAN F, XU FH, GU JG, JIANG RB. Research progress of biodegradation and biotransformation with *Trichoderma*[J]. *Journal of Microbiology*, 2009, 29(3): 77-80 (in Chinese).
- [3] 高克祥, 刘晓光, 郭润芳, 高宝嘉, 朱天博. 木霉菌对五种植物病原真菌的重寄生作用[J]. *山东农业大学学报(自然科学版)*, 2002, 33(1): 37-42.
GAO KX, LIU XG, GUO RF, GAO BJ, ZHU TB. Mycoparasitism of *Trichoderma* spp. on five plant pathogenic fungi[J]. *Journal of Shandong Agricultural University (Natural Science Edition)*, 2002, 33(1): 37-42 (in Chinese).
- [4] MUKHERJEE M, MUKHERJEE PK, HORWITZ BA, ZACHOW C, BERG G, ZEILINGER S. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions: advances in genetics of biological control[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2012, 52(4): 522-529.
- [5] HERMOSA R, VITERBO A, CHET I, MONTE E. Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2012, 158(Pt 1): 17-25.
- [6] MUKHERJEE PK, HORWITZ BA, KENERLEY CM. Secondary metabolism in *Trichoderma*: a genomic perspective[J]. *Microbiology (Reading, England)*, 2012, 158(Pt 1): 35-45.
- [7] REINO JL, GUERRERO RF, HERNÁNDEZ-GALÁN R, COLLADO IG. Secondary metabolites from species of the biocontrol agent *Trichoderma*[J]. *Phytochemistry Reviews*, 2008, 7(1): 89-123.
- [8] ZHANG JL, TANG WL, HUANG QR, LI YZ, WEI ML, JIANG LL, LIU C, YU X, ZHU HW, CHEN GZ, ZHANG XX. *Trichoderma*: a treasure house of structurally diverse secondary metabolites with medicinal importance[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 723828.
- [9] VINALE F, SIVASITHAMPARAM K, GHISALBERTI EL, MARRA R, BARBETTI MJ, LI H, WOO SL, LORITO M. A novel role for *Trichoderma* secondary metabolites in the interactions with plants[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2008, 72(1/2/3): 80-86.
- [10] DUTTA A, ABMAYR SM, WORKMAN JL. Diverse activities of histone acylations connect metabolism to chromatin function[J]. *Molecular Cell*, 2016, 63(4): 547-552.
- [11] ZHAO S, ZHANG X, LI HT. Beyond histone acetylation—writing and erasing histone acylations[J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2018, 53: 169-177.
- [12] MARMORSTEIN R, ZHOU MM. Writers and readers of histone acetylation: structure, mechanism, and inhibition[J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2014, 6(7): a018762.
- [13] LEE KK, WORKMAN JL. Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007, 8(4): 284-295.
- [14] HENRIKSON JC, HOOVER AR, JOYNER PM, CICHEWICZ RH. A chemical epigenetics approach for engineering the *in situ* biosynthesis of a cryptic natural product from *Aspergillus niger*[J]. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 2009, 7(3): 435-438.
- [15] MELLO-DE-SOUSA TM, RASSINGER A, PUCHER ME, dos SANTOS CASTRO L, PERSINOTI GF, SILVA-ROCHA R, POÇAS-FONSECA MJ, MACH RL, NASCIMENTO SILVA R, MACH-AIGNER AR. The impact of chromatin remodelling on cellulase expression in *Trichoderma reesei*[J]. *BMC Genomics*, 2015, 16(1): 588.
- [16] XIN Q, GONG YJ, LV XX, CHEN GJ, LIU WF. *Trichoderma reesei* histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal growth, conidiation, and cellulase gene expression[J]. *Current Microbiology*, 2013, 67(5): 580-589.

- [17] NARITA T, WEINERT BT, CHOUDHARY C. Functions and mechanisms of non-histone protein acetylation[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019, 20(3): 156-174.
- [18] 宋臻, 周峰, 胡昌华. 美伐他汀产生菌桔青霉表观遗传调控基因 *RpdA* 的克隆及生物信息学解析[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(6): 160-165.
SONG C, ZHOU F, HU CH. Molecular cloning and bioinformatics analysis of the epigenetic regulation gene *RpdA* in the mevastatin-producing fungus *Penicillium citrinum*[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2013, 35(6): 160-165 (in Chinese).
- [19] 张豪, 李哲, 郭凯, 黄艳华, 郝永任. 绿色木霉 Tv-1511 组蛋白乙酰化酶编码基因 *TvGCN5* 的功能分析[J]. 生物技术通报, 2022, 38(5): 136-148.
ZHANG H, LI Z, GUO K, HUANG YH, HAO YR. Functional analysis of *TvGCN5* gene encoding histone acetylase from *Trichoderma viride* tv-1511[J]. Biotechnology Bulletin, 2022, 38(5): 136-148 (in Chinese).
- [20] LI Z, ZHANG H, CAI CJ, LIN Z, ZHEN Z, CHU J, GUO K. Histone acetyltransferase GCN5-mediated lysine acetylation modulates salt stress adaptation of *Trichoderma*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022, 106(8): 3033-3049.
- [21] MUTLU B, PUIGSERVER P. GCN5 acetyltransferase in cellular energetic and metabolic processes[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2021, 1864(2): 194626.
- [22] CÁNOVAS D, MARCOS AT, GACEK A, RAMOS MS, GUTIÉRREZ G, REYES-DOMÍNGUEZ Y, STRAUSS J. The histone acetyltransferase GcnE (GCN5) plays a central role in the regulation of *Aspergillus* asexual development[J]. Genetics, 2014, 197(4): 1175-1189.
- [23] SEIBOTH B, KARIMI RA, PHATALE PA, LINKE RT, HARTL L, SAUER DG, SMITH KM, BAKER SE, FREITAG M, KUBICEK CP. The putative protein methyltransferase LAE1 controls cellulase gene expression in *Trichoderma reesei*[J]. Molecular Microbiology, 2012, 84(6): 1150-1164.
- [24] 李哲, 张豪, 霍雪雪, 黄艳华, 郝永任. 产褪黑素绿色木霉工程菌的构建及生理特性分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 148-162.
LI Z, ZHANG H, HUO XX, HUANG YH, HAO YR. Construction and characterization of melatonin-producing engineering strain of *Trichoderma viride*[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 148-162 (in Chinese).
- [25] HOLLENDER C, LIU ZC. Histone deacetylase genes in *Arabidopsis* development[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(7): 875-885.
- [26] SHAHBAZIAN MD, GRUNSTEIN M. Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation[J]. Annual Review of Biochemistry, 2007, 76: 75-100.
- [27] VIDAL M, GABER RF. RPD3 encodes a second factor required to achieve maximum positive and negative transcriptional states in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Molecular and Cellular Biology, 1991, 11(12): 6317-6327.
- [28] TOMIMOTO K, AKAO T, FUKUDA H. Histone deacetylases in sake yeast affect fermentation characteristics[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2019, 83(8): 1498-1505.
- [29] ROSIER A, MEDEIROS FHV, BAIS HP. Defining plant growth promoting rhizobacteria molecular and biochemical networks in beneficial plant-microbe interactions[J]. Plant and Soil, 2018, 428(1): 35-55.
- [30] ARJONA-GIRONA I, VINALE F, RUANO-ROSA D, LORITO M, LÓPEZ-HERRERA CJ. Effect of metabolites from different *Trichoderma* strains on the growth of *Rosellinia necatrix*, the causal agent of avocado white root rot[J]. European Journal of Plant Pathology, 2014, 140(2): 385-397.
- [31] TROJER P, BRANDTNER EM, BROSCH G, LOIDL P, GALEHR J, LINZMAIER R, HAAS H, MAIR K, TRIBUS M, GRAESSLE S. Histone deacetylases in fungi: novel members, new facts[J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(14): 3971-3981.
- [32] BAUER I, VARADARAJAN D, PIDRONI A, GROSS S, VERGEINER S, FABER B, HERMANN M, TRIBUS M, BROSCH G, GRAESSLE S. A class 1 histone deacetylase with potential as an antifungal target[J]. mBio, 2016, 7(6): e00831-e00816.
- [33] STUDDT L, SCHMIDT FJ, JAHN L, SIEBER CK, CONNOLLY LR, NIEHAUS EM, FREITAG M, HUMPF HU, TUDZYNSKI B. Two histone deacetylases, FfHda1 and FfHda2, are important for *Fusarium fujikuroi* secondary metabolism and virulence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2013, 79(24): 7719-7734.
- [34] FAN A, MI W, LIU Z, ZENG G, ZHANG P, HU Y, FANG W, YIN WB. Deletion of a histone acetyltransferase leads to the pleiotropic activation of natural products in *Metarhizium robertsii*[J]. Organic Letters, 2017, 19(7): 1686-1689.
- [35] ASAI T, MORITA S, TANIGUCHI T, MONDE K, OSHIMA Y. Epigenetic stimulation of polyketide production in *Chaetomium cancrorideum* by an NAD(+)-dependent HDAC inhibitor[J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2016, 14(2): 646-651.