

金针菇单、双核菌丝差异表达基因分析

王威¹ 丑天胜¹ 刘芳¹ 严俊杰¹ 吴塔菊² 李少杰^{2*} 谢宝贵^{1*}

¹ 福建农林大学生命科学学院菌物研究中心 福建 福州 350002

² 中国科学院微生物研究所 北京 100101

摘要: 对金针菇 *Flammulina velutipes* 单核菌丝 W23 的菌丝体以及与 L11 质配后的双核菌丝 H1123 菌丝体进行了转录组测序,以本实验室已获得的 W23 基因组为参考基因组研究两样本间差异基因,并对这些差异基因进行了 GO 功能和 Pathway 显著性富集分析。差异基因分析显示,两个样本中共有显著性差异表达的基因 3 504 个,其中在双核菌丝中上调、下调的基因数分别为 2 151 和 1 353 个。研究发现差异表达基因含有很多的转录因子基因、蛋白激酶以及 WD40 repeat-like 蛋白。Gene Ontology (GO) 功能分析结果表明, extracellular region 和 membrane-enclosed lumen 条目下的差异基因全部为上调表达,而 envelope 下的差异基因全部为下调表达,以利于双核菌丝分裂时锁状联合的形成而便于核的迁移。Pathway 功能富集分析结果表明,脂肪酸、氨基酸以及大部分糖类合成相关基因具有比较活跃的上调表达。说明双核菌丝主要进行营养物质的富集,为下一步在合适条件下分化成原基,进入生殖生长阶段储备物质基础。

关键词: 转录组, 差异表达基因, GO 功能, Pathway 分析

Comparison of gene expression patterns between the monokaryotic and dikaryotic mycelia of *Flammulina velutipes*

WANG Wei¹ CHOU Tian-Sheng¹ LIU Fang¹ YAN Jun-Jie¹ WU Ta-Ju² LI Shao-Jie^{2*} XIE Bao-Gui^{1*}

¹ Mycological Research Center, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002, China

² Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract: Based on the reference genome of monokaryotic strain W23 of *Flammulina velutipes* obtained previously in our laboratory, comparison of gene expression patterns in the monokaryotic and dikaryotic mycelium revealed that 3 504 genes had differences in gene expression. 2 151 genes were up-regulated and 1 353 genes were down-regulated. These genes contained a number of transcription factors, protein kinases and WD40 repeat-like proteins. According to gene ontology (GO) cluster analyses, all the genes belong to the extracellular region. Genes belonging membrane-enclosed lumen item were up-regulated but those belonging to envelope item were down-regulated. This might be involved in the mechanism of the formation of clamp

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 项目)(2014CB138302); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS24)

*Corresponding author. E-mail: mrcfafu@163.com; lisj@im.ac.cn

收稿日期: 2015-02-22, 接受日期: 2015-04-28

connection and nuclear migration. Pathway analyses revealed that genes involving with fatty acid, amino acid and most saccharide synthesis were up-regulated. This suggested that dikaryotic mycelium could store nutrition and prepare for the primordium formation at suitable condition in next sexual development stage.

Key words: transcriptome, differential expression gene, GO function, pathway analyses

食用菌是一种重要的蔬菜作物,近年来,科研工作者对食用菌子实体形成以及发育的研究已有很大进展,从最初的环境因子、外源添加物等对食用菌子实体发育的影响到最近应用分子生物学技术寻找到大量与子实体形成有关的差异表达基因(刘雁英等 2010)。但多数研究集中在异核体菌丝到子实体阶段发育的差异基因的表达以及子实体不同生长发育时期的差异基因的表达,而忽略了大多数食用菌所需要的质配过程。一般食用菌需要质配后的异核体菌株才具有结实性,因此质配后的异核体菌丝中差异表达的基因对菌丝的营养生殖阶段至关重要。在食用菌的生产中,营养生殖阶段即菌丝生长过程在整个生产周期中占用时间较长。所以,有必要对食用菌的异核体菌丝生长进行深入研究。

科研工作者对菌丝质配的研究主要集中在交配型基因以及其多态性方面。由交配型基因决定的可亲和菌株的质配后所形成双核体次生菌丝,决定着菌株的结实性。对食用菌交配型基因的研究比较广泛,并揭示了模式生物裂褶菌 *Schizophyllum commune* Fr. (Ohm *et al.* 2010), 双色蜡蘑 *Laccaria bicolor* (Maire) P.D. Orto (Niculita-Hirzel *et al.* 2008) 的交配型基因座位。金针菇 *Flammulina velutipes* (Curtis) Singer 的交配型基因座位以及相关基因也由 van Peer *et al.* (2011) 通过基因组测序的方法进行了探究。王威(2013)也通过对两株可亲和单核金针菇菌株的基因组测序初步分析了其交配型差异。虽然一些金针菇单核菌株在某些胁迫条件下可以形成子实体(蚁瑞荣等 2007),但由交配型基因所控制启动的下游基因的表达仍然是大多数食用菌主要的形成子实体的启动模式。食用菌的有性发育第一步就是质配,这在模式生物灰盖鬼伞

Coprinus cinereus (Schaeff.) Gray (Swamy *et al.* 1984; Kües *et al.* 2002)和裂褶菌 *S. commune*(Raper *et al.* 1965; Kothe 1999)里已经具有非常详细的研究,并且我们现在对食用菌交配的分子遗传学所形成的理论也主要是基于这两个模式种的研究。

具有不同交配型 A 因子的可亲和菌株所编码的 HD 蛋白异源二聚体进入细胞核,调控基因表达。A 因子可以起到控制锁状细胞形成,同步核分裂,以及分隔作用。A 因子相关基因编码两种不同的 HD 蛋白,这两种蛋白都具有 DNA 结合结构域(Raudaskoski & Kothe 2010)。但对 A 因子下游所启动的相关基因研究较少,在灰盖鬼伞 *C. cinereus* 中的研究表明 A 因子下游可以调控 *Clp* 基因以及 *Pcc1* 基因,从而控制锁状联合的形成并通过 PCC1 与 B 因子通路相互调控(Brown & Casselton 2001)。

在担子菌中,对 B 因子相关的信息素响应途径的下游信息目前还知之甚少,但是与酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Meyen 相比,在玉米黑粉菌 *Ustilago maydis* (DC.) Corda 中已发现各种中间产物的类似物(Banuett & Herskowitz 1994),如 Fuz7 (Ste7p 的类似物)、Prf1 (pheromone response factor, Ste12p 的类似物)等(李莉云等 1999)。在裂褶菌中也发现了一些中间产物的类似物,如 Ste20、Ste11 等(Ohm *et al.* 2010)。首先,不同的可亲和菌株信息素与 *ste3* 所编码的信息素受体结合。然后,信息素受体将信号通过三聚体 G 蛋白、Ste20p 激酶、由 Ste11p、Ste7p 和 Fus3 组成的串联 MAPK 激酶信号级联系统放大传递。最后,激活转录因子 Ste12 (Wendland *et al.* 2011)。MAPK 激酶信号级联放大系统以及 Ste12 同样在生物发育中的形态建成起到一定作用(Gimeno *et al.* 1992),

而对完成激活后的 STE12 下游所调控的基因,目前几乎仍是空白,这给我们研究菌丝结实性带来一定的困难。

本文通过对金针菇单核菌株 W23 的基因组数据进行初步分析,以及对单核和质配后的双核菌丝体的转录组测序分析,筛选了在金针菇质配过程前后的差异表达基因。这对研究食用菌菌丝结实性,以及交配型下游基因响应相关机理提供了数据参考,并对控制食用菌子实体形成相关的基因功能研究提供了候选数据。

1 材料与方法

1.1 供试菌株及菌株配对

单核体可亲和菌株 W23、L11 均由福建食用菌种质资源保藏与管理中心提供。将金针菇单核菌株 W23、L11 分别接种于斜面 PDA 固体培养基上,25℃ 恒温培养,活化转管两代后,将两个单核菌株接种于同一根试管斜面培养基中,相距约 1cm 左右。25℃ 恒温培养,并及时观察菌丝生长状况。当两单核菌丝接触后,在中间接触位置挑取 W23×L11 菌丝转管培养,并镜检锁状联合,命名为 H1123,然后挑取尖端菌丝两次,进行纯化。

1.2 基因组数据

W23 菌株基因组数据由福建农林大学菌物研究中心提供,并已提交至 DDBJ/EMBL/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), accession No. APHZ00000000 (BioProject: 191864)。

1.3 总 RNA 提取以及转录组测序

W23 菌丝以及 1123 菌丝接种至 PDB 培养基中,25℃ 恒温静置培养 15d,使用灭菌纱布收集菌丝体,并立即储存于液氮中。使用 OMEGA 公司植物总 RNA 提取试剂盒提取 W23 以及 1123 菌丝的总 RNA。使用 QIAGEN 公司的 RNeasy Plant Mini Kit 去除基因组 DNA 污染,用 Agilent 2100 对总 RNA 进行浓度以及完整性检测。将检测合格的总 RNA 委托华大基因研究院 (BGI, 深圳) 进行链特异性

RNA-Seq。

1.4 表达量注释以及差异表达基因的筛选

每个样品获得 8G 的 clean reads 后采用 RPKM (reads per kb per million reads) (Mortazavi *et al.* 2008) 方法计算基因表达量。我们使用华大基因研究院 (BGI, 深圳) 基于 Audic & Claverie (1997) 所研究的基于测序的检测差异基因的方法所开发的算法来筛选两个样本之间的差异表达基因。然后采用控制 FDR (false discovery rate) 来决定 P-value 的域值。把差异表达的基因定义成 $FDR \leq 0.001$ 并且表达量的差异倍数 ≥ 2 (即 $|\log_2 \text{Ratio}| \geq 1$) 对差异检验的 P-value 做多重假设的检验与校正。

1.5 GO 功能的聚类分析

将筛选到的差异表达基因委托华大基因研究院 (BGI, 深圳) 进行 GO 功能注释。将注释到的差异基因使用在线 GO 聚类程序 WEGO (<http://wego.genomics.org.cn/cgi-bin/wego/index.pl>) 对其进行聚类分析。

1.6 Pathway 显著性富集分析

本研究将获得的两样本间上调和下调表达的基因使用在线分析程序 KAAS (http://www.genome.jp/kaas-bin/kaas_main), 选取真菌中的大部分模式生物为代表集, 分别在 KEGG 数据库进行注释, 以此来研究差异表达基因所在的 Pathway。

2 结果与分析

2.1 菌株配对检测

将 W23、L11 和配对获得的菌株 H1123 进行镜检, 可以观察到明显锁状联合 (图 1), 这说明我们将两个单核菌株成功地进行了配对。

2.2 差异表达基因筛选与分析

经过差异表达分析并校验后, 两个样本中共有显著性差异表达的基因 3 504 个, 其中在双核菌丝中上调、下调的基因数分别为 2 151 和 1 353 个。上调基因的数目远远多于下调基因的数目。不仅如此, 上调基因的表达量上调倍数也比下调基因的下

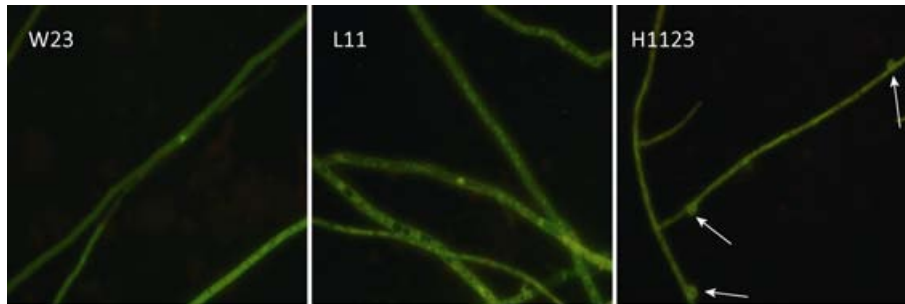


图 1 金针菇单核菌丝以及双核菌丝镜检

Fig. 1 Monokaryotic and dikaryotic mycelium observed under microscope.

调倍数要高。在差异水平 \log_2 比值 3 以上的基因中,上调基因的数目远远多于下调基因数目。尤其是上调基因在 \log_2 比值 9 以上仍然有 94 个基因,而下调倍数在此水平的基因仅有 8 个(图 2)。对高度上调的 94 个以及高度下调的 8 个基因进行 NCBI 在线 BLASTP 同源比对分析表明:上调表达的基因可以在 NCBI 比对到相关功能的基因有 44 个(表 1),其中包含了大量的酶类蛋白,并且一些转录因子基因、蛋白激酶、WD40-repeat 蛋白等可能在异核体生长发育起重要作用。而下调表达的 8 个基因中,仅有 3 个比对到相关功能,其中两个为 M35 family deuterolysin metalloprotease(表 1),从而说明此家族基因与质配后的异核体菌丝生长具有重要的关系。

2.3 GO 功能聚类分析

将差异表达的 3 504 个基因进行 GO 功能聚类分析,有 877 个(上调:495;下调:382)基因注释到 26 个二级 GO 分类单元中。菌丝质配后的基因调控涉及到多个方面的基因上调和下调(图 3)。其中,在胞外区(extracellular region)和膜封闭腔(membrane-enclosed lumen)条目下的差异基因全部为上调表达,而 envelope 下的差异基因全部为下调表达,这些基因与双核菌丝锁状联合的形成以及核迁移过程紧密相关。刘芳(2014)等发现胞外区(extracellular region)单元的基因在双

核体菌丝形成原基过程中全部为下调表达。这证明此单元的基因在双核菌丝时期维持带有锁状联合的菌丝形态方面可能具有重要作用。另外,还发现膜封闭腔(membrane-enclosed lumen)单元的基因在菌丝发育为原基时也全部为上调表达,这说明在质配后金针菇发育到原基产生子实体的过程中,膜封闭腔单元基因持续上调表达,这与其菌丝的不同结构构造以及细胞组分的变化可能相关。

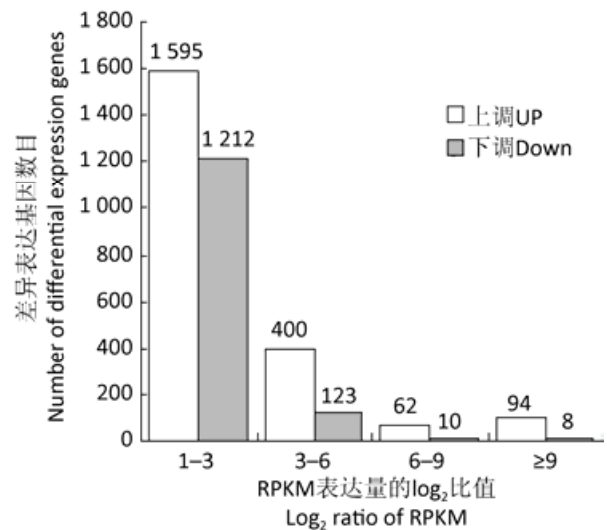


图 2 单核菌丝和双核菌丝差异表达基因数目 RPKM: 将 map 到基因的 read 数除以 map 到基因组的所有 read 数(以百万为单位)与 RNA 长度(以 kb 为单位)。

Fig. 2 Number of differential expression genes between monokaryon and dikaryon. RPKM: Reads per kb per million reads.

表 1 差异表达基因功能注释

Table 1 Function annotation of differential expression genes

基因编号	Log ₂ 比值	上调/下调	同源蛋白	NCBI 登录号	E 值
Gene ID	Log ₂ ratio	Up/down	Homologous protein	NCBI accession number	E-value
gene11059	16.469	Up	含有环氧化物酶结构域蛋白 Epoxide hydrolase domain-containing protein	XP_007772811.1	3e-122
gene5961	15.3079	Up	葡萄糖-1-脱氢酶类似物 Similar to glucose 1-dehydrogenase	CCX33641.1	9e-38
gene3403	15.2925	Up	聚腺苷酸结合蛋白 1 Polyadenylate-binding protein 1	XP_007848161.1	1e-30
gene7332	14.7575	Up	ClpP 巴豆酸酶 ClpP crotonase	XP_007766588.1	1e-113
gene1756	14.6887	Up	多胺氧化酶 Polyamine oxidase	XP_007845132.1	2e-70
gene2551	13.6788	Up	醛固酮/酮类还原酶 Aldo/keto reductase	XP_008038277.1	2e-47
gene8690	13.6144	Up	细胞色素 p450 Cytochrome p450	XP_007846313.1	1e-48
gene9118	13.5543	Up	ATP 依赖性 DNA 解旋酶 ATP-dependent DNA helicase	XP_002911535.1	8e-40
gene9783	13.5467	Up	醛固酮/酮类还原酶 Aldo/keto reductase	XP_007866032.1	0
gene7095	13.4509	Up	other/AgaK1 蛋白激酶 Other/agak1 protein kinase	XP_001835142.1	2e-6
gene8252	13.2412	Up	WD40 repeat 类似蛋白 WD40 repeat-like protein	XP_007311456.1	4e-87
gene10121	13.003	Up	假定激酶蛋白 Putative kinase-(PK-like) protein	KEP48081.1	4e-44
gene3461	12.9099	Up	转录调节因子 CRZ1 Transcriptional regulator CRZ1	XP_009268949.1	5e-6
gene11058	12.4797	Up	UDP-糖基转移酶/糖原磷酸化酶 UDP-glycosyltransferase/glycogen phosphorylase	XP_007870871.1	6e-31
gene10398	12.4726	Up	假定跨膜蛋白 Transmembrane protein, putative	EUC58235.1	3e-43
gene3470	12.4548	Up	金属蛋白酶 Metalloprotease	XP_008041547.1	8e-7
gene5939	12.4522	Up	糖苷水解酶家族 61 蛋白 Glycoside hydrolase family 61 protein	XP_003028465.1	1e-92
gene1337	11.8831	Up	激酶类似蛋白 Kinase-like protein	XP_007386713.1	8e-5

待续

续表 1

gene2659	11.8186	Up	亮氨酸拉链转录因子 Basic-leucine zipper transcription factor	ETW81390.1	6e-05
gene946	11.3555	Up	WD40 repeat 类似蛋白 WD40 repeat-like protein	XP_007311456.1	1e-57
gene9945	11.1986	Up	含 Pkinase 结构域蛋白 Pkinase domain-containing protein	ELU44410.1	4e-34
gene8442	11.1537	Up	糖苷水解酶家族 61 蛋白 Glycoside hydrolase family 61 protein	XP_007854192.1	5e-118
gene990	11.1285	Up	金针菇子实体分化蛋白 16 FVFD16	BAA13612.1	4e-24
gene5521	10.9569	Up	other/HAL 蛋白激酶 Other/HAL protein kinase	XP_001828386.2	2e-10
gene10437	10.9137	Up	多聚蛋白 Polyprotein, partial	AAZ28939.1	0
gene3334	10.6924	Up	环磷酸腺苷依赖性激酶催化亚单位类似蛋白 Camp-dependent kinase-like protein catalytic subunit	ETW74772.1	4e-49
gene4828	10.6448	Up	激酶类似蛋白 Kinase-like protein, partial	XP_008042235.1	2e-22
gene4020	10.5149	Up	b-(1-6)葡聚糖合酶 B-(1-6) glucan synthase	XP_007844777.1	3e-104
gene7756	10.4202	Up	Metacaspase-7	CCO37708.1	5e-59
gene9897	10.3975	Up	天冬氨酸肽酶 a1 Aspartic peptidase a1	XP_007850165.1	1e-62
gene9692	10.3856	Up	velvet 因子 Velvet factor	EUC54060.1	9e-47
gene10346	10.3618	Up	过氧化物氧化还原酶 Peroxiredoxin	XP_007855654.1	2e-52
gene9674	10.2375	Up	cAMP 依赖性调节蛋白 cAMP-independent regulatory protein	XP_001838267.1	1e-39
gene7215	10.2069	Up	An02g14170 类似物 Similar to An02g14170	GAA84240.1	1e-31
gene10735	10.164	Up	含锌指结构域蛋白 Zf-C3HC-domain-containing protein	XP_007383050.1	6e-31
gene10595	10.1214	Up	Cupredoxin	XP_007863537.1	3e-28
gene6910	10.0592	Up	RNA 指导的 DNA 聚合酶, 无 LTR 逆转录转座子 RNA-directed DNA polymerase, non LTR retrotransposon	ELQ74139.1	2e-07
gene4194	9.68349	Up	WD40 repeat 类似蛋白 WD40 repeat-like protein	XP_007311456.1	2e-78
gene4672	9.65509	Up	含 P 环三磷酸核苷水解酶 P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolase protein	XP_007764231.1	4e-59

待续

续表 1					
gene4810	9.53204	Up	菌根诱导的 NACHT/WD-repeat 蛋白 Mycorrhiza-induced NACHT/WD-repeat protein	XP_001878900.1	4e-156
gene10594	9.32196	Up	核糖核酸酶 III Ribonuclease III	XP_007848600.1	9e-12
gene8662	9.0912	Up	菌根上调肽酶 Mycorrhiza-upregulated peptidase	XP_001878363.1	8e-29
gene6665	9.08435	Up	单糖转运体 Monosaccharide transporter	XP_007848870.1	0
gene6024	9.07012	Up	三结构域酶, 腺苷酰化-硫醇化-脱氢酶 Tridomain enzyme adenylation-thiolation-dehydrogenase	ETW74905.1	2e-59
gene9014	10.37507	Down	M35 家族 deuterolysin 金属蛋白酶 M35 family deuterolysin metalloprotease	KEP55275.1	8e-23
gene7404	10.25671	Down	M35 家族 deuterolysin 金属蛋白酶 M35 family deuterolysin metalloprotease	EUC62207.1	4e-06
gene9555	9.514274	Down	芳香族化合物双加氧酶 Aromatic compound dioxygenase	XP_007299760.1	2e-46

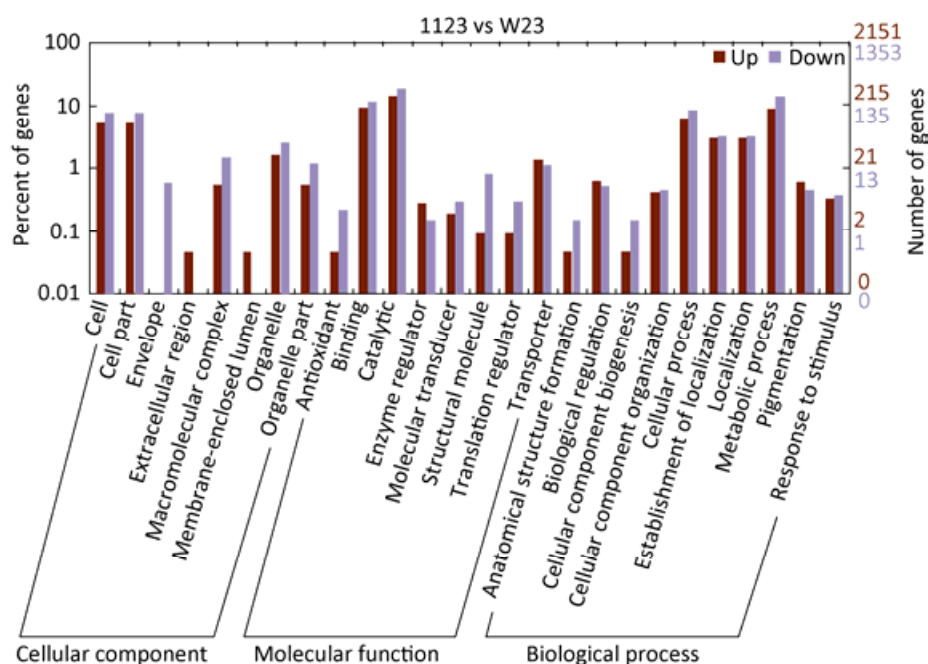


图 3 差异表达基因 GO 聚类分析

Fig. 3 GO cluster analyses of differentially expressed genes.

在抗氧化剂 (antioxidant)、结构分子 (structural molecule)、转运调节器 (transporter regulator)、内部组织构造形成 (anatomical structure formation)、细胞成分合成 (cellular component biogenesis) 单元中的下调基因数量都明显多于上调基因, 说明了质配后这些单元的功能

被显著调整, 尤其是细胞组分以及结构构造方面产生变化。

2.4 Pathway 富集分析

生物体是一个相互联系而统一的整体, 生物体的基因之间通过不同的代谢通路或者信号通路相互调节, 维持正常的生命活动。对单核和双核菌丝

样本差异表达基因的 Pathway 富集分析, 结果表明: 有 1 585 个基因注释到 108 条 Pathway 上面。脂肪酸延长 (fatty acid elongation)、糖基磷脂酰肌醇-锚合成 (glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis) 的所有差异表达基因都为上调。另外, 大多数脂肪酸、氨基酸、糖类的合成途径具有活跃的上调表达。D-精氨酸和 D-鸟氨酸 (D-Arginine and D-ornithine

metabolism) 代谢途径中, 降解这两种氨基酸的 D-氨基酸-氧化酶 (EC: 1.4.3.3) 均都下调表达, 使机体可以保留更多的精氨酸和鸟氨酸。

采用 BRITE 分类 (BRITE hierarchies) 将差异基因所涉及的条目列于表 2。三大蛋白家族都有差异表达基因的分布, 但有些条目里的差异表达基因会全部上调或下调表达 (表 2)。

表 2 差异表达基因 BRITE 分类

Table 2 BRITE classification of differential expression genes

蛋白家族 Protein family	差异表达基因分布 Distribution of different expression genes
新陈代谢 Metabolism	酶类 Enzymes 蛋白激酶 Protein kinases 蛋白磷酸酶及关联蛋白 Protein phosphatases and associated proteins 肽酶 Peptidases 糖基转移酶 Glycosyltransferases 脂类生物合成蛋白 Lipid biosynthesis proteins 异戊烯转移酶 Prenyltransferases 氨基酸相关酶类 Amino acid related enzymes 细胞色素 P450 Cytochrome P450
遗传信息处理 Genetic information processing	转录因子 Transcription factors 转录机 Transcription machinery 剪接体 Spliceosome 核糖体 Ribosome 核糖体生物合成 (全部为上调) Ribosome biogenesis (all genes were up-regulated) 转移核糖核酸生物合成 Transfer RNA biogenesis 翻译因子 Translation factors 分子伴侣和折叠催化剂 (全部为下调) Chaperones and folding catalysts (all genes were down-regulated) SNARE 类 SNAREs 泛素系统 Ubiquitin system 蛋白酶体 (全部为上调) Proteasome (all genes were up-regulated) DNA 复制蛋白 (全部为下调) DNA replication proteins (all genes were down-regulated) 染色体相关蛋白 Chromosome and associated proteins DNA 修复和重组蛋白 DNA repair and recombination proteins 线粒体生物合成 Mitochondrial biogenesis
信号以及细胞过程 Signaling and cellular processes	蛋白质分泌系统 (全部为下调) Secretion system proteins (all genes were down-regulated) 双组分系统 (全部为下调) Two-component system (all genes were down-regulated) 外泌体 Exosome G 蛋白耦联受体 G protein-coupled receptors GTP-结合蛋白 GTP-binding proteins CD 分子 (全部为上调) CD molecules (all genes were up-regulated)

3 讨论

金针菇质配后,上调以及下调表达的基因数量分别为 2 151 个和 1 353 个,表达量差异倍数较大的基因中,上调基因占大多数。这说明了质配后的双核菌丝基因组中的基因总体上是上调表达的。高表达量的表现一方面可能是由于单基因被调控而高表达,也有一部分原因可能是异核增效作用(刘朋虎等 2013)所导致。陈裕新等(2011)在研究灵芝的单核菌丝与双核菌丝的培养条件时发现,单核菌丝在水分、温度、pH 值的适应能力上弱于双核菌丝。金针菇的单核双核菌丝的转录组比较分析也发现双核体菌株的大量酶类蛋白的上调表达,酶类作为一种参与生命活动的重要蛋白,可能使异核体具有更强的环境适应能力。

本研究发现,一些转录因子、蛋白激酶、WD40 repeat-like 蛋白等的基因在双核菌丝上调表达显著。转录因子基因是一类具有分子开关作用的蛋白,可以与基因组 DNA 序列结合并调控一系列基因的表达。蛋白激酶(protein kinases)又称蛋白质磷酸化酶(protein phosphokinase),是一类催化蛋白质磷酸化反应的酶,通过磷酸化反应,激活蛋白的功能。也属于是一种具有分子开关功能的调控蛋白。WD40 repeat-like 蛋白是在所有真核生物中都存在的一类蛋白家族。其功能涉及到在控制细胞周期、细胞自噬、细胞凋亡过程中的信号转导以及转录调节(Stirnemann *et al.* 2010)。这 3 类基因所编码的蛋白因为具有分子开关的功能,能够对一系列的基因的表达进行调控,可能是质配后打开或关闭一系列基因的关键因子。

在高度下调表达的 8 个基因中,仅有 3 个比对到相关功能,其中两个为 M35 family deuterolysin metalloprotease,从而说明此家族基因与质配后的菌丝生长具有重要的关系。鄢淑琴(2011)的研究表明,在草菇采后 1.5h 的菌柄表达谱中的 deuterolysin M35 metalloproteas 会高效上调表达,

推测在草菇贮藏过程中,存在的蛋白降解过程中 deuterolysin M35 metalloprotease 是重要的因素。而在金针菇中双核体中的降低表达也从另一方面印证此家族蛋白的低表达可以减少菌丝体的蛋白降解,从而有利于双核体营养阶段的生长。

Gene Ontology (GO) 是一个关于基因功能的分类体系,它具有国际化、标准化的特点。我们将所有在两样本中差异表达的基因进行 GO 条目的注释,并将这些基因的功能做 GO 功能聚类分析,以此来了解在这两样本间差异表达的基因所处的功能分类。GO 功能聚类分析结果可以看出,extracellular region 和 membrane-enclosed lumen 条目下的差异基因全部为上调表达,而 envelope 下的差异基因全部为下调表达。这种调控方式以利于双核菌丝分裂时锁状联合的形成而利于核的迁移。

Pathway 的显著性富集分析是指以 KEGG Pathway 作为单位,然后利用超几何的检验方法,寻找出和全基因组比较后,能够在差异表达的基因中具有显著性富集特点的 Pathway (Kanehisa *et al.* 2006)。以此确定差异表达基因作用于哪些重要的生化代谢以及信号转导的途径。本研究发现,双核菌丝中的差异基因比较广泛地分布在各个代谢通路,涉及到多种生命活动。但是,仍然展现了一些规律,Pathway 功能富集分析结果表明,脂肪酸、氨基酸以及大部分糖类合成相关基因具有比较活跃的上调表达。说明双核菌丝主要进行营养物质的富集,为下一步在合适条件下分化成原基,进入生殖生长阶段储备物质基础。另外,对精氨酸和 D-鸟氨酸(D-Arginine and D-ornithine metabolism)降解的 D-氨基酸-氧化酶(EC: 1.4.3.3)均都下调表达,以保留更多的精氨酸。精氨酸对于植物的感知以及适应环境的变化具有重要意义(杨洪强和高华君 2007),这种对精氨酸的贮存也使得质配后的双核菌丝具有更好的环境适应能力。鸟氨酸途径是合成脯氨酸的重要途径,脯氨酸的积累使得植物调节渗透压,更好地应对盐胁迫。因此,金针菇的双核菌

丝也可能通过这种方式应对盐胁迫,展现对环境更好的适应性。另外,金针菇子实体除了赖氨酸含量较高以外,精氨酸含量也比较高。这种对精氨酸的积累过程可能从双核菌丝体阶段就已经进行了积累。刘芳等(2014)通过转录组测序发现核糖体基因的活跃与原基的形成具有关联,本研究进一步发现,核糖体基因的活跃在菌丝质配后就已经开始,说明金针菇在双核菌丝与原基时期都需要核糖体基因的活跃表达。

本研究筛选到大量在菌丝质配后差异表达的基因,这些基因为我们下一步研究子实体形成机制提供了思路与参考。未来可以参考模式生物裂褶菌 *S. commune* 的经验(Koltin 1970; Raper *et al.* 1965),将金针菇交配型基因从一株单核体转化进入另外一株可亲和的单核菌株里面,或者通过多代杂交获得含有可亲和的不同交配型基因的纯合子的单核菌株,从而在这种菌株模型材料中对我们筛选到的基因进一步进行功能验证,揭示食用菌子实体形成的相关分子机制。

致谢: 国家食用菌品种改良中心福建分中心、福建省食用菌工程技术研究中心为本研究提供了试验条件,特此致谢。

[REFERENCES]

- Audic S, Claverie JM, 1997. The significance of digital gene expression profiles. *Genome Research*, 7(10): 986-995
- Banuett F, Herskowitz I, 1994. Identification of *fuz7*, a *Ustilago maydis* MEK/MAPKK homolog required for α -locus-dependent and -independent steps in the fungal life cycle. *Genes & Development*, 8: 1367-1378
- Brown AJ, Casselton LA, 2001. Mating in mushrooms: increasing the chances but prolonging the affair. *Trend in Genetics*, 17(7): 393-400
- Chen YX, Xia ZL, Liu DB, Kang XC, Xiong XY, 2011. Comparison for mononuclear and dicaryotic mycelium culture conditions of *Ganoderma lucidum*. *Edible Fungi of China*, 30(3): 18-20 (in Chinese)
- Gimeno CJ, Ljungdahl PO, Styles CA, Fink GR, 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell*, 68(6): 1077-1090
- Kanehisa M, Goto S, Hattori M, Aoki-Kinoshita KF, Itoh M, Kawashima S, Katayama T, Araki M, Hirakawa M, 2006. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research*, 34(1): 354-357
- Koltin Y, 1970. Development of the Amut Bmut strain of *Schizophyllum commune*. *Archiv Für Mikrobiologie*, 74(2): 123-128
- Kothe E, 1999. Mating types and pheromone recognition in the homobasidiomycete *Schizophyllum commune*. *Fungal Genetics and Biology*, 27(2): 146-152
- Kües U, Walser P, Klaus M, Aebi M, 2002. Influence of activated A and B mating-type pathways on developmental processes in the basidiomycete *Coprinus cinereus*. *Molecular Genetics and Genomics*, 268(2): 262-271
- Li LY, Liu GZ, Liu LJ, 1999. Current progress in mating type genes' cloning and functional study of basidiomycete. *Progress in Biotechnology*, 19(1): 19-23 (in Chinese)
- Liu F, Wang W, Xie BG, 2014. Comparison of gene expression patterns in the mycelium and primordia of *Flammulina velutipes*, strain 1123. *Acta Edulis Fungi*, 21(1): 1-7 (in Chinese)
- Liu PH, Xie BG, Deng YJ, Jiang YJ, 2013. Cloning, structural analyses and expression levels of phosphofructokinase gene in different strains of *Volvariella volvacea*. *Mycosystema*, 32(2): 253-260 (in Chinese)
- Liu YY, Li LH, Xie FG, Qiu HL, 2010. Advances of research on fruiting body formation and development of edible fungi. *Journal of Fungal Research*, 8(1): 7-62 (in Chinese)
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B, 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 5(7): 621-628
- Niculita-Hirzel H, Labbe J, Kohler A, le Tacon F, Martin F, Sanders IR, Kües U, 2008. Gene organization of the

- mating type regions in the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* reveals distinct evolution between the two mating type loci. *New Phytologist*, 180(2): 329-342
- Ohm RA, de Jong JF, Lugones LG, Aerts A, Kothe E, Stajich JE, de Vries RP, Record E, Levasseur A, Baker SE, Bartholomew KA, Coutinho PM, Erdmanns, Fowler TJ, Gathman AC, Lombard V, Henrissat B, Knabe N, kües U, Lilly WW, Lindquist E, Lucas S, Magnuson JK, Piumi F, Raudaskoski M, Salamov A, Schmutz J, Schwarze FW, vankuyk PA, Horton JS, Grigoriev IV, Wösten HAB, 2010. Genome sequence of the model mushroom *Schizophyllum commune*. *Nature Biotechnology*, 28(9): 957-963
- Raper JR, Boyd DH, Raper CA, 1965. Primary and secondary mutations at the incompatibility loci in *Schizophyllum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 53(6): 1324-1332
- Raudaskoski M, Kothe E, 2010. Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling. *Eukaryotic Cell*, 9(6): 847-859
- Stirnemann CU, Petsalaki E, Russell RB, Müller CW, 2010. WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(10): 565-574
- Swamy S, Uno I, Ishikawa T, 1984. Morphogenetic effects of mutations at the A and B incompatibility factors in *Coprinus cinereus*. *Journal of General Microbiology*, 130(12): 3219-3224
- van Peer AF, Park SY, Shin PG, Jang KY, Yoo YB, Park YJ, Lee BM, Sung GH, James TY, Kong WS, 2011. Comparative genomics of the mating-type loci of the mushroom *Flammulina velutipes* reveals widespread synteny and recent inversions. *PLoS One*, 6: e22249
- Wang W, 2013. Research on the mating-type of *Flammulina velutipes* based on genome and transcriptome. Master Thesis, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. 1-76 (in Chinese)
- Wendland J, Dunkler A, Walther A, 2011. Characterization of a-factor pheromone and pheromone receptor genes of *Ashbya gossypii*. *FEMS Yeast Research*, 11: 418-429
- Yan SQ, 2011. Analysis of differences of gene expression profiles for stipes of postharvest *Volvariella volvacea*. Master Thesis, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou. 35-72 (in Chinese)
- Yang HQ, Gao HJ, 2007. Physiological function of arginine and its metabolites in plants. *Journal of Plant Physiology and Molecular Biology*, 33(1): 1-8 (in Chinese)
- Yi RR, Cao H, Pan YJ, 2007. Monokaryon's fruiting and fruit body color of *Flammulina velutipes*. *Acta Edulis Fungi*, 14(2): 37-40 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 陈裕新, 夏志兰, 刘东波, 康信聪, 熊兴耀, 2011. 灵芝单核和双核菌丝培养条件的比较研究. 中国食用菌, 30(3): 18-20
- 李莉云, 刘国振, 刘丽娟, 1999. 担子菌交配型基因的克隆及功能研究进展. 生物工程进展, 19(1): 19-23
- 刘芳, 王威, 谢宝贵, 2014. 金针菇菌丝与原基差异表达基因分析. 食用菌学报, 21(1): 1-7
- 刘朋虎, 谢宝贵, 邓优锦, 江玉姬, 2013. 草菇磷酸果糖激酶(PFK)基因克隆、结构及不同菌株中表达量分析. 菌物学报, 32(2): 253-260
- 刘雁英, 李林辉, 谢富刚, 邱慧兰, 2010. 食用菌子实体分化发育研究进展. 菌物研究, 8(1): 7-62
- 王威, 2013. 基于基因组和转录组分析金针菇的交配型. 福建农林大学硕士论文, 福州. 1-76
- 鄢淑琴, 2011. 采后不同时期的草菇菌柄表达谱差异分析. 福建农林大学硕士论文, 福州. 35-72
- 杨洪强, 高华君, 2007. 植物精氨酸及其代谢产物的生理功能. 植物生理与分子生物学学报, 33(1): 1-8
- 蚁瑞荣, 曹晖, 潘迎捷, 2007. 金针菇单核出菇与子实体颜色. 食用菌学报, 14(2): 33-36