

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54(9):992–997; 4 September 2014
ISSN 0001–6209; CN 11–1995/Q
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.09.004

基于全基因组系统发生的草菇基因家族显著扩增

龚明, 谭琦, 陈明杰, 鲍大鹏, 汪虹*

国家食用菌工程技术研究中心, 农业部南方食用菌资源利用重点实验室, 上海市农业遗传育种重点开放实验室, 上海市农业科学院食用菌研究所, 上海 201403

摘要:【目的】从基因组层次研究草菇低温自溶异常代谢的分子特征。【方法】对 21 个真菌物种进行全基因组系统发生分析, 进而选取其中具有代表性的物种进行比较基因组学分析, 系统研究草菇异常代谢分子特征。【结果】全基因组系统发生分析结果显示草菇位于草腐菌所形成簇的底端。基于全基因组系统发生树, 由于担子菌和子囊菌属于完全不同的演化路径, 所以选取担子菌中具有代表性的 9 个物种进行比较基因组学分析, 结果显示相比于其它草腐菌, 草菇基因家族具有一定的收缩趋势。进一步对不同范畴的基因家族数目进行比较, 结果显示 3 个大于 200 的草菇基因家族(fam1、fam4 和 fam6)分别发生了显著扩增, 且在总数上也显著高于其它物种, 表明草菇的这一分子特征与其异常代谢相关。【结论】3 个草菇基因家族(>200)显著扩增提示其特定基因家族功能加强, 很可能与草菇低温自溶密切相关。

关键词:草菇, 自溶, 基因扩增, 全基因组, 异常代谢

中图分类号:Q933 **文章编号:**0001-6209(2014)09-0992-06

草菇 (*Volvariella volvacea*) 是一种重要的食用菌, 不仅营养丰富, 味道鲜美, 具有重要的医疗保健作用, 迄今已有 300 多年的栽培历史。草菇属于高温菇类, 不耐低温冷藏, 即使在常规低温 4℃ 下, 菌丝也会迅速自溶, 子实体会软化、液化甚至腐烂。草菇的低温自溶有别于高温诱导酶活引起的自溶, 例如海参的自溶^[1]。这就提示草菇低温自溶并不简单是由酶的降解作用诱导, 而是一种异常的复杂代谢活动。

目前, 已有相关研究主要通过分子生物学技术, 例如 mRNA 差别显示技术, 以及单酶切 cDNA-AFLP 改良法克隆分离得到的低温特异 DNA 片段^[2–3], 进

而从其它物种借鉴冷诱导基因, 例如植物冷诱导 COR 基因^[4], 对这些基因进行表达分析^[5–6]。这一研究路径由于缺乏对草菇分子特征的研究, 从而很难揭示草菇异常代谢的分子机制。随着多种食用菌特别是草菇全基因组测序完成^[7], 使得利用比较基因组学技术和分子演化手段系统研究草菇异常代谢分子特征成为可能。

1 材料和方法

1.1 材料

双孢蘑菇 (*Agaricus bisporus*)、黑曲霉

基金项目:上海市农科发 2013(10); 上海市科委重点项目(10dz2212400); 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字[2011]第 1-2 号)

* 通信作者。Tel: +86-21-62200747; Fax: +86-21-62201337; E-mail: lilysearch@163.com

作者简介:龚明(1978-), 男, 江西人, 助理研究员, 博士, 主要从事微生物遗传学的研究。E-mail: gming501@aliyun.com

收稿日期:2013-12-24; **修回日期:**2014-02-25

(*Aspergillus niger*)、皱木耳(*Auricularia delicata*)、灵芝(*Ganoderma alucidum*)、双色蜡蘑(*Laccaria bicolor*)、稻瘟菌(*Magnaporthe grisea*)、黄孢原平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)、糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)、绵腐卧孔菌(*Postia placenta*)、秆锈病菌(*Puccinia graminis*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、裂褶菌(*Schizophyllum commune*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、黑孢块菌(*Tuber melanosporum*)，数据取自 JGI (DOE Joint Genome Institute) 数据库。

白色念珠菌(*Candida albicans*)、粗球孢子菌(*Coccidioides immitis*)、灰盖鬼伞(*Coprinopsis cinerea*)、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)、玉米黑粉菌(*Ustilago maydis*)，数据取自 Broad Institute 数据库。

草菇基因组序列，由上海市农业科学院食用菌研究所提供。

1.2 全基因组系统发生分析

对包括草菇在内的 21 种代表性真菌基因组进行全基因组系统发生分析。将盘基网柄菌 *Dictyostelium discoideum* 作为外群构建系统发生树。使用 perl 语言从 22 个基因组进行单拷贝直系同源家族序列提取的程序编译。将所获得的单拷贝直系同源家族序列进行联合，从而构成超级序列，以此构建全基因组系统发生史，进而使用 MEGA 软件(版本 5) MEGA 5.0^[8] 的 neighbor-joining 方法(Bootstrap = 1000, JTT matrix)构建全基因组系统发生树的拓扑结构。

采用 PAML 软件(版本 4)^[9] 的 codeml^[10] 程序进行物种分化时间估计。使用 550 百万年 (million years ago, Myr) 以前分化的 *Ustilago maydis*^[11] 作为物种分化时间估计的校准点。利用全局钟和局域钟方法^[12] 对物种分化时间进行估计。使用线性回归来检测基于全局钟和局域钟方法获得结果的一致性。

1.3 蛋白家族分类和尺寸变化分析

使用 InterProScan (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) 对全基因组蛋白家族进行分类。对每个物种的蛋白序列与同一物种基因组的其它蛋白序列进行 BLASTP 比较来获得每个物种全部氨基酸序列相似百分比。使用 SCPS 软件^[13] 对全基因组的多基因家族进行识别(参数为默认设置)。使用 CAFE

软件^[14] 对获得的多基因家族进行基因家族尺寸分析。使用 perl 语言编译基因家族复制事件检测程序，接受标准为来自于 1 个基因复制事件的直系同源亚家族至少包含 3 个物种。

2 结果和分析

2.1 草菇的系统分类地位

真菌的系统发生树表明担子菌和子囊菌各自具有独立的演化轨迹(图 1)。担子菌的系统发生树显示草腐菌(*C. cinerea*, *A. bisporus* 和 *V. volvacea*)和木腐菌(*G. lucidum*, *P. placenta* 和 *P. chrysosporium*)聚成两个簇(图 1)，草菇位于草腐菌的底端，与木腐菌靠近。从构建的系统发生树上看，糙皮侧耳(*P. ostreatus*)位于草腐菌和木腐菌之间(图 1)，符合糙皮侧耳对腐质生物物质同时利用的特性。结合木腐菌的分化时间较草腐菌早(图 1)，这就提示腐质(草腐和木腐)小生境直接影响了担子菌的物种演化，与木本植物比草本植物更古老的结果是一致的^[15]。进一步，对这些物种进行全局钟和局域钟估计，结果显示两种方法所获得的物种分化时间具有良好的相关性($R = 0.978$, $P < 0.001$)。其中，草菇分化于大约在 2 亿年前，与主要由草本植物构成的单子叶植物的分化时间区间相吻合^[16]。这些都在一定程度上证明以所选取的担子菌代表性物种来构建的担子菌系统发生树具有可靠性。

2.2 草菇基因家族的收缩趋势

基于真菌的系统发生树(图 1)，对不同小生境中的代表性担子菌物种进行氨基酸序列百分比相似性分析，结果表明与活体寄生小生境中的致病担子菌(*C. neoformans* 和 *U. maydis*)相比，腐生担子菌(草腐和木腐菌)在演化过程中产生了大量的基因扩增。其中，木腐菌有平均 406 对高相似性(> 80%)氨基酸序列，而草腐菌只有平均 326 对。这就提示，与木腐菌相比，草腐菌的基因扩增数目较少，具有一定的收缩趋势。进而，对担子菌进行基因复制事件检测，结果显示腐生担子菌物种仅出现了 148 个基因复制事件。可见，腐生担子菌所形成的只是大量基因扩增并没有形成大规模连续性的基因家族复制事件，提示腐生担子菌基因家族数目在演化中相对稳定。对担子菌代表性物种的基因家族尺寸进行分析，结果表明与致病担子菌发生的较强的

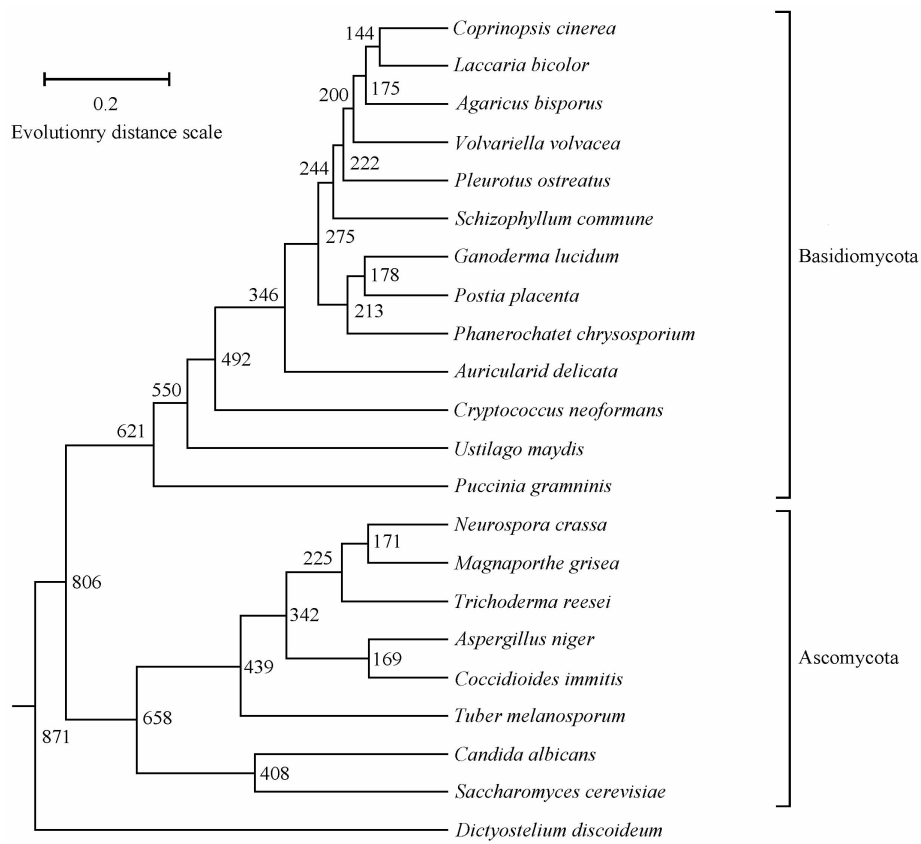


图 1. 真菌的全基因组系统发生

Figure 1. The phylogenomic analysis of fungi. Divergence time of species was located at each node, respectively; Time scale was showed by Myr; Bootstrap values of each node were equal to 100.

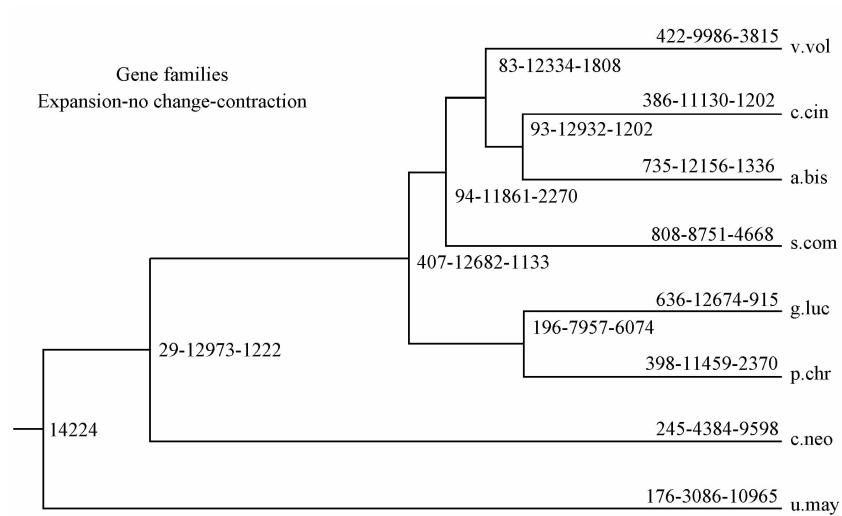


图 2. 担子菌的基因家族尺寸分析

Figure 2. Analysis of size change in Basidiomycota. Gene families in Basidiomycota were used for the analysis. Abbreviations are as follows: v. vol = *V. volvacea*, c. cin = *C. cinerea*, a. bis = *A. bisporus*, s. com = *S. commune*, g. luc = *G. lucidum*, p. chr = *P. chrysosporium*, c. neo = *C. neoformans*, u. may = *U. maydis*.

基因丢失不同,腐生担子菌只发生了较弱的基因丢失(图2)。进而,与其它草腐菌不显著的基因丢失相比(709),草菇具有相对较强的基因丢失(3393),表明草菇基因家族具有一定的收缩趋势(图2)。

2.3 草菇 3 个基因家族显著扩增

在获得了草菇基因家族具有收缩趋势的基础上,对担子菌的不同范畴的基因家族数目进行比较,结果显示在大于 161 的基因家族中,草腐菌却发生了显著的扩增(图 3-A)。其中,相比于木腐菌的 5 个基因家族(包括 1416 个基因),草腐菌有 11 个基因家族(包括 2176 个基因)发生了扩增。进一步对 11 个基因家族分别进行研究,结果显示草腐菌的 fam1 和 fam4 具有显著的上升趋势。例如,fam4 在草腐菌中具有平均 193 个基因数,显著高于木腐菌的平均 45 个和致病菌的 21 个。特别是,在大于

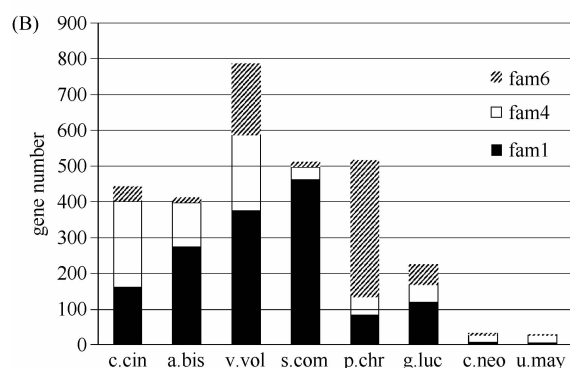
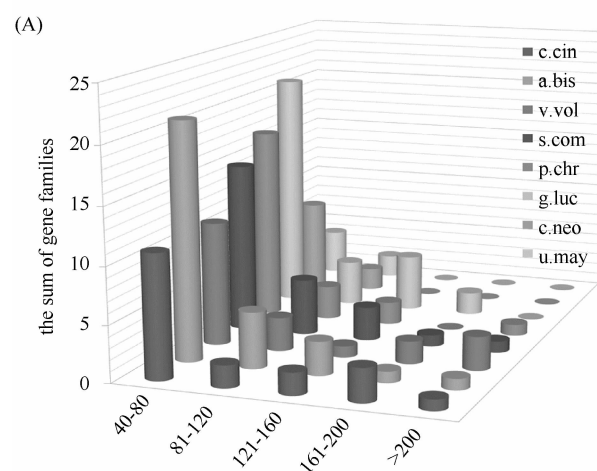


图 3. 担子菌的基因家族数目比较

Figure 3. Comparison among the number of gene families in Basidiomycota. A: Comparison among the number of gene families on a different scale; B: Comparison of gene number of gene families (>200).

200 的基因家族中,草菇发生了显著扩增,分别为 fam1, fam4 和 fam6(图 3-A)。对所形成的这 3 个基因家族进行基因数目统计,fam1, fam4 和 fam6 在草菇中都分别发生了显著扩增,且在总数上也显著高于其它物种(图 3-B)。进而,对草菇大尺寸基因家族进行 InterproScan 功能注释分析,结果显示草菇的 fam1 主要由 F-box 域, cyclin-like 组成;fam4 主要是由 NACHT 核苷三磷酸酶构成;fam6 主要由逆转录酶构成。

3 讨论

草菇在现代生产环节中出现的低温自溶现象,展现了其特有的生理特征。草菇基因家族的显著扩增表明草菇的某些基因家族功能获得了加强,这很可能与草菇低温自溶密切相关。例如,由于 F-box 域相关功能蛋白能够通过靶向不同的底物,对蛋白的稳定性进行控制,从而调节大规模的细胞信号反应过程^[17],提示草菇所加强的 fam1 基因家族功能与较强的细胞信号反应能力相关,与草菇低温自溶异常代谢需要具有快速应答机制吻合;草菇异常扩增的 fam4 主要是由 NACHT 核苷三磷酸酶构成,且有研究表明 NACHT 家族在凋亡中起到重要作用^[18],鉴于草菇具有较短的生长周期(大约 2 周),进一步暗示了草菇 fam4 异常扩增可能是为了适应生存环境而主动死亡的结果;Fam6 主要由与基因片段自我复制和转移中密切相关的逆转录酶^[19]构成,暗示了草菇低温自溶很可能存在基因片段的大量自我复制和转移。当然,这 3 个基因家族在草菇异常代谢中的具体功能机制还有待进一步地探索。

参考文献

- [1] Eakpetch P, Benjakul S, Visessanguan W, Kijroongrojana K. Autolysis of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) meat: characterization and the effects of protein additives. *Journal of Food Science*, 2008, 73(2): S95-103.
- [2] Chen M, Tan Q, Cao H, Wang N, Huang W, Pan Y. Isolation of cold induced gene from *Volvariella volvacea* by mRNA differential display. *Mycosystema*, 2001, 20(3): 342-346. (in Chinese)

陈明杰, 谭琦, 曹晖, 王南, 黄为一, 潘迎捷. mRNA 差别显示技术分离草菇低温诱导基因. 菌物系统,

- 2001, 20(3): 342-346.
- [3] Guo L, Lin J, Yang L, Liu R. Isolation of cold induced genes by modified cDNA-AFLP with single enzyme digestion from *Volvariella volvacea*. *Mycosystema*, 2004, 23(2): 241-247. (in Chinese)
郭丽琼, 林俊芳, 杨丽卿, 刘瑞瑞. 单酶切 cDNA-AFLP 改良法分离草菇冷诱导基因. 菌物学报, 2004, 23(2): 241-247.
- [4] Artus NN, Uemura M, Steponkus PL, Gilmour SJ, Lin C, Thomashow MF. Constitutive expression of the cold-regulated Arabidopsis thaliana COR15a gene affects both chloroplast and protoplast freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93(23): 13404-13409.
- [5] Sun X, Feng A, Chen M, Pan Y. Cloning and sequence analysis of cold induced genes in Chinese straw mushroom *Volvariella volvacea*. *Mycosystema*, 2006, 25(1): 88-93. (in Chinese)
孙晓红, 冯爱萍, 陈明杰, 潘迎捷. 草菇冷诱导相关基因的克隆及序列分析. 菌物学报, 2006, 25(1): 88-93.
- [6] Qiao N, Wang H, Chen M. Expression of cold-induced gene Cor1 in *Volvariella volvacea* during low temperature treatment. *Mycosystema*, 2009, 28(2): 213-219. (in Chinese)
乔娜, 汪虹, 陈明杰. 草菇冷诱导基因 Cor1 在低温下表达变化的研究. 菌物学报, 2009, 28(2): 213-219.
- [7] Bao D, Gong M, Zheng H, Chen M, Zhang L, Wang H, Jiang J, Wu L, Zhu Y, Zhu G, Zhou Y, Li C, Wang S, Zhao Y, Zhao G, Tan Q. Sequencing and comparative analysis of the straw mushroom (*Volvariella volvacea*) genome. *PloS One*, 2013, 8(3): e58294.
- [8] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [9] Yang Z. PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24(8): 1586-1591.
- [10] Goldman N, Yang Z. A codon-based model of nucleotide substitution for protein-coding DNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 1994, 11(5): 725-736.
- [11] Martin F, Aerts A, Ahren D, Brun A, Danchin EG, Duchaussoy F, Gibon J, Kohler A, Lindquist E, Pereda V, Salamov A, Shapiro HJ, Wuyts J, Blaudez D, Buee M, Brokstein P, Canback B, Cohen D, Courty PE, Coutinho PM, Delaruelle C, Detter JC, Deveau A, DiFazio S, Duplessis S, Fraissinet-Tachet L, Lucic E, Frey-Klett P, Fourrey C, Feussner I, Gay G, Grimwood J, Hoegger PJ, Jain P, Kilaru S, Labbe J, Lin YC, Legue V, Le Tacon F, Marmeisse R, Melayah D, Montanini B, Muratet M, Nehls U, Niculita-Hirzel H, Oudot-Le Secq MP, Peter M, Quesneville H, Rajashekar B, Reich M, Rouhier N, Schmutz J, Yin T, Chalot M, Henrissat B, Kues U, Lucas S, Van de Peer Y, Podila GK, Polle A, Pukkila PJ, Richardson PM, Rouze P, Sanders IR, Stajich JE, Tunlid A, Tuskan G, Grigoriev IV. The genome of *Laccaria bicolor* provides insights into mycorrhizal symbiosis. *Nature*, 2008, 452(7183): 88-92.
- [12] Yang Z, Yoder AD. Comparison of likelihood and Bayesian methods for estimating divergence times using multiple gene Loci and calibration points, with application to a radiation of cute-looking mouse lemur species. *Systems Biology*, 2003, 52(5): 705-716.
- [13] Paccanaro A, Casbon JA, Saqi MA. Spectral clustering of protein sequences. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(5): 1571-1580.
- [14] De Bie T, Cristianini N, Demuth JP, Hahn MW. CAFE: a computational tool for the study of gene family evolution. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 2006, 22(10): 1269-1271.
- [15] Hedges SB. The origin and evolution of model organisms. *Nature Review Genetics*, 2002, 3(11): 838-849.
- [16] Wikstrom N, Savolainen V, Chase MW. Evolution of the angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 2001, 268(1482): 2211-2220.
- [17] Ho MS, Tsai PI, Chien CT. F-box proteins: the key to protein degradation. *Journal of Biomedical Science*, 2006, 13(2): 181-191.
- [18] Koonin EV, Aravind L. The NACHT family - a new group of predicted NTPases implicated in apoptosis and MHC transcription activation. *Trends in Biochemical Sciences*, 2000, 25(5): 223-224.
- [19] Dombroski BA, Feng Q, Mathias SL, Sassaman DM, Scott AF, Kazazian HH, Jr., Boeke JD. An in vivo assay for the reverse transcriptase of human retrotransposon L1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 1994, 14(7): 4485-4492.

Phylogenomic analysis reveals the significant expansion of gene families of *Volvariella volvacea*

Ming Gong, Qi Tan, Mingjie Chen, Dapeng Bao, Hong Wang*

Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences; Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding; Key Laboratory of Edible Fungi Resources and Utilization (South); National Engineering Research Center of Edible Fungi, Shanghai 201403, China

Abstract:[**Objective**] Cryogenic autolysis of *Volvariella volvacea* is an unusual phenomenon of abnormal metabolism. The aim of this study was to describe this molecular feature of abnormal metabolism at the genome-level. [**Methods**] We used 21 fungal species for the phylogenomic analysis and then selected 9 representative species in basidiomycetes for the comparative genomic analysis. [**Results**] The phylogenomic analysis shows that *V. volvacea* was located at the bottom of the cluster consisting of grass-degrading fungi. Phylogenetic tree shows that basidiomycetes and ascomycetes fungi have independent evolutionary trajectories. Therefore, nine representative species in basidiomycetes were chosen for the comparative genomic analysis. The result shows that compared to other grass-degrading fungi, *V. volvacea* has the tendency of contraction. The comparison of the number of gene families on a different scale shows that there was a significant expansion of 3 large size (>200) gene families (fam1 , fam4 and fam6) in *V. volvacea* with their total number significantly more than other species, representing that the molecular feature of *V. volvacea* is correlated with its abnormal metabolism. [**Conclusion**] The significant expansion of 3 gene families (> 200) in *V. volvacea* indicates the enhancement of their function in specific gene families, which is most likely associated with cryogenic autolysis of *V. volvacea*.

Keywords: *Volvariella volvacea* , autolysis , gene expansion , genome , abnormal metabolism

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Grants from Shanghai Municipal Science and Technology Commission (10DZ2212400) , by the Shanghai Agriculture Committee (Hu Nong Ke Gong Zi [2011] 1-2) and by the Shanghai Agricultural Science Development 2013(10)

* Corresponding author. Tel: +86-21-62200747; Fax: +86-21-62201337; E-mail: lilysearch@163.com

Received: 24 December 2013/ Revised: 25 February 2014

1953 年创刊以来所有文章全文上网

从 2008 年 1 月开始《微生物学报》的所有文章开始全文上网了。欢迎广大读者登陆本刊主页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>) 浏览、查询、免费下载全文! 由于《微生物学报》历史久远, 为方便读者查阅, 将刊期变化作以下统计。

《微生物学报》刊、卷、期统计表

2014 年 9 月统计

时间	刊期	卷号	期号
1953 – 1956	半年刊	1 – 4	1 – 2
1957 – 1958	季刊	5 – 6	1 – 4
1959	季刊	7	1 – 2
1959 – 1962	停刊 3 年		
1962	季刊	8	3 – 4
1963 – 1965	季刊	9 – 11	1 – 4
1966	季刊	12	1 – 2
1966 – 1972	停刊 6 年半		
1973 – 1988	季刊	13 – 28	1 – 4
1989 – 2007	双月刊	29 – 47	1 – 6
2008 – 2013	月刊	48 – 53	1 – 12
2014	月刊	54	1 – 9