

研究报告

暗褐网柄牛肝菌菌核形成相关基因分析

杨天伟¹, 戴利铭¹, 刘静¹, 高峰¹, 许欣景¹, 方艺伟¹, 王文兵¹, 杨瑞恒², 鲍大鹏², 张春霞^{*1}

1 云南省热带作物科学研究所, 云南 景洪 666100

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

杨天伟, 戴利铭, 刘静, 高峰, 许欣景, 方艺伟, 王文兵, 杨瑞恒, 鲍大鹏, 张春霞. 暗褐网柄牛肝菌菌核形成相关基因分析[J]. 微生物学通报, 2023, 50(10): 4583-4597.

YANG Tianwei, DAI Liming, LIU Jing, GAO Feng, XU Xinjing, FANG Yiwei, WANG Wenbing, YANG Ruiheng, BAO Dapeng, ZHANG Chunxia. Genes involved in sclerotium formation of *Phlebopus portentosus*[J]. Microbiology China, 2023, 50(10): 4583-4597.

摘要:【背景】暗褐网柄牛肝菌(*Phlebopus portentosus*)是第一个能够人工栽培的食用牛肝菌, 人工栽培过程中, 不同菌株会形成数量不等的菌核。【目的】探明不同菌株产核差异机制。【方法】采集多菌核(JH1)、寡菌核(JH2)菌株的成熟菌核及无菌核(JH3)菌株培养相同时间的菌丝体进行转录组测序, 分析差异表达基因对菌核形成的作用和功能。【结果】KEGG富集分析显示, JH2 vs. JH1 互比, 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成, 精氨酸和脯氨酸代谢, 半胱氨酸及蛋氨酸代谢显著富集; JH3 vs. JH1 互比, 乙醛酸和二羧酸代谢显著富集; JH3 vs. JH2 互比, 谷胱甘肽、乙醛酸和二羧酸代谢显著富集。菌核形成相关基因分析显示, 从 JH2 vs. JH1、JH3 vs. JH1 和 JH3 vs. JH2 的差异表达基因中分别筛选到 69、118 和 82 条与信号转导、感知刺激、防御、碳水化合物活性酶等有关的基因, 其中碳水化合物活性酶基因数量最多。三个比较组共有的碳水化合物活性酶基因在 JH1 中的表达量高于 JH2、JH3, 表明 JH1 更能充分利用底物营养以形成更多菌核。【结论】本研究从转录组水平初步分析了暗褐网柄牛肝菌不同菌株产核差异的原因, 为后续菌核与出菇及产量相关性研究提供了理论基础。

关键词: 暗褐网柄牛肝菌; 菌核; 转录组; 差异表达基因

资助项目: 国家自然科学基金(32060707); 云南省热带作物科技创新专项资金项目(RF2022-15); 云南省热带作物科学研究所青年人才成长基金项目(QNCZ2020-9)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32060707), the Yunnan Tropical Crop Science and Technology Innovation Special Fund Project (RF2022-15), and the Youth Growth Project of Yunnan Institute of Tropical Crops (QNCZ2020-9).

*Corresponding author. E-mail: zhangchunxia7084@163.com

Received: 2023-02-17; Accepted: 2023-03-08; Published online: 2023-04-12

Genes involved in sclerotium formation of *Phlebopus portentosus*

YANG Tianwei¹, DAI Liming¹, LIU Jing¹, GAO Feng¹, XU Xinjing¹, FANG Yiwei¹,
WANG Wenbing¹, YANG Ruiheng², BAO Dapeng², ZHANG Chunxia^{*1}

¹ Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong 666100, Yunnan, China

² Key Laboratory of Edible Fungal Resources and Utilization (South), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, National Engineering Research Center of Edible Fungi, Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding of Shanghai, Institute of Edible Fungi, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201403, China

Abstract: **[Background]** *Phlebopus portentosus* is the first edible species of *Boletales* that can be cultivated artificially, and the number of sclerotia varies during the artificial cultivation of different strains. **[Objective]** To explore the different mechanisms of sclerotium production of different strains. **[Methods]** The mature sclerotia of the strain with multiple sclerotia (JH1) and the strain with oligo-sclerotia (JH2) and the mycelia of the strain with no sclerotium (JH3) cultivated for the same time period were collected. Transcriptome sequencing was performed to identify the differentially expressed genes (DEGs) in sclerotium formation, and the roles of these DEGs were analyzed. **[Results]** The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment showed that the DEGs between JH2 and JH1 were mainly enriched in the phenylalanine, tyrosine, and tryptophan biosynthesis, arginine, proline metabolism, cysteine and methionine metabolism. The DEGs between JH3 and JH1 were mainly involved in glyoxalate and dicarboxylate metabolism, and those between JH3 and JH2 in glutathione metabolism and glyoxylate and dicarboxylate metabolism. Among the sclerotium formation-associated DEGs between JH2 and JH1, between JH3 and JH1, and between JH3 and JH2, respectively, 69, 118, and 82 genes were associated with signal transduction, sensory stimulation, defense, and carbohydrate active enzymes, and those associated with carbohydrate active enzymes had the highest abundance. The expression of carbohydrate active enzyme genes shared by the three comparison groups in JH1 was higher than that in JH2 and JH3, indicating that JH1 could make full use of the substrate to form more sclerotia. **[Conclusion]** The differences in sclerotium production among different strains of *P. portentosus* were preliminarily analyzed at the transcriptome level, which provided a theoretical basis for the subsequent research on the correlations of sclerotia with fruiting and yield.

Keywords: *Phlebopus portentosus*; sclerotium; transcriptome sequencing; differentially expressed genes

菌核是真菌菌丝体通过细胞分化并相互扭结形成的致密坚硬组织,具有贮藏养分和抵抗低温、干旱等窘迫环境的功能,在适宜条件下可以萌发成菌丝、子实体和分生孢子^[1-2]。菌核在一些真菌的生长发育中具有重要地位和作用,甚至

是一些食药菌的收获部位,如冬虫夏草(*Ophiocordyceps sinensis*)、茯苓(*Wolfiporia cocos*)和猪苓(*Polyporus umbellatus*)^[3-5]。众多学者认为菌核在羊肚菌人工栽培中起重要作用,是羊肚菌子实体发育的必要阶段^[6-7],但也有学者发现并

非所有羊肚菌都有菌核产生^[8-9]。

随着高通量测序技术的发展,转录组测序技术成为食药菌转录组学研究的重要方法^[10-11]。Shu 等^[12]对茯苓菌丝体和成熟菌核进行转录组测序分析发现,菌丝体中三萜类化合物含量及与其合成相关的基因表达量高于菌核。通过转录组测序及 *de novo* 拼接分析,找到茯苓中腺苷酸环化酶相关蛋白、丝裂元活化蛋白及还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的编码基因分别为 *CAP*、*PcWSmk*、*PcWNox*, 这 3 个基因均可加快茯苓菌核形成及产量提高^[13-14]。也有学者认为茯苓线粒体中的一些差异基因在菌核形成中产生作用^[15]。利用 Illumina 高通量测序技术对虎乳灵芝 (*Lignosus rhinocerus*) 进行转录组测序分析发现,虎乳灵芝菌核形成的主要原因为氧化应激,同时伴随着细胞壁的增厚、多糖和蛋白质合成等过程^[16]。对不同时期的猪苓菌核进行转录组分析,研究者认为猪苓菌核的发育由非生物胁迫(温差和缺氧)和生物胁迫(共生菌蜜环菌和伴生菌的入侵)共同诱导^[17]。

暗褐网柄牛肝菌 (*Phlebopus portentosus*) 俗称“黑牛肝菌”,其味道鲜美、营养丰富,是一种珍贵的美味食用菌,已实现工厂化周年栽培及经济果林下仿生栽培^[18-22]。目前暗褐网柄牛肝菌菌核形成机制及不同菌株产菌核差异的原因尚不清楚,人工栽培过程中菌核多寡是否影响暗褐网柄牛肝菌出菇及产量也尚未确定。为探究暗褐网柄牛肝菌菌核的发育机制,本研究采集多菌核、寡菌核菌株在培养皿内形成的成熟菌核及无菌核菌株培养相同时间的菌丝体作为研究对象,采用 Illumina NovaSeq 6000 对样品进行转录组测序,分析不同菌株的差异表达基因,进而对这些差异基因进行基因本体论(gene ontology, GO)功能分析和京都基因与基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)富集

分析,筛选与暗褐网柄牛肝菌菌核发育相关的关键基因,从分子水平了解菌核形成机制,以期为后续菌核与出菇及产量相关性研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株

暗褐网柄牛肝菌多菌核菌株 20139、寡菌核菌株 20019 和无菌核菌株 20134 这 3 个菌株均能够栽培出菇,目前保藏于云南省热带作物科学研究所植物保护与微生物利用研究中心。

1.1.2 培养基

参照 Ji 等^[19]的方法配制 M1 培养基(g/L): 马铃薯 200.0, 葡萄糖 20.0, 酵母膏 2.0, 硫酸镁 1.0, 磷酸二氢钾 1.0, 琼脂 19.0, pH 自然。

1.1.3 主要试剂和仪器

TRIzol 总 RNA 提取试剂盒, Invitrogen 公司; TruSeq RNA 样品制备试剂盒, Illumina 公司; 反转录试剂盒、RT-qPCR 试剂盒, Accurate biology 公司; 所有药品均为国产分析纯, 生工生物工程(上海)股份有限公司。生化培养箱, 上海博迅医疗生物仪器股份有限公司; 电泳仪, 北京六一仪器厂; Agilent 2100 bioanalyzer, 安捷伦科技有限公司; 高速冷冻离心机, Eppendorf 公司。

1.2 方法

1.2.1 菌种培养及样品制备

将供试菌株转接到 M1 培养基中,置于 28 °C 恒温培养箱避光静置培养, 25 d 后多菌核、寡菌核菌株在培养皿内形成暗黑色菌核,菌核表面有褐色液珠和斑点,横切呈暗褐色,菌核成熟。采集多菌核、寡菌核菌株在培养皿内形成的成熟菌核,无菌核菌株采集培养相同时间的菌丝体,为便于分析将多菌核、寡菌核、无菌核菌株采集的样品分别记为 JH1、JH2 和 JH3, 每种样品设计

3个生物学重复,样品采集后用锡箔纸包裹,液氮速冻后置于 -80°C 保存,备用。

1.2.2 RNA提取

采用Invitrogen公司的TRIzol试剂盒分别提取1.2.1制备样品的总RNA。进一步采用琼脂糖凝胶电泳和Agilent 2100 bioanalyzer分析样品RNA的完整性、纯度和浓度。

1.2.3 建库测序

采用Illumina TruSeq RNA样品制备试剂盒制备RNA-Seq配对末端文库,并在北京诺禾致源生物信息科技有限公司完成建库测序,测序平台为Illumina NovaSeq 6000。

1.2.4 转录组数据与参考基因组比对

对原始数据进行过滤,去除含有接头及低质量序列。使用HISAT2(v2.0.5)软件将过滤后的转录组clean reads与暗褐网柄牛肝菌PP17026(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, JAHRG P000000000)的基因组进行比对,统计read count数量,计算FPKM (fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)值。采用EDSeq 2软件倍数变化法筛选2个样本之间的差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs),控制FDR (false discovery rate)来决定P-value的域值;把差异表达基因定义成fold change ≥ 1 且 $P\leq 0.05$ 。得到差异表达基因后,采用cluster profiler对差异表达基因进行GO功能分析和KEGG pathway分析。

1.2.5 新基因预测

新基因预测采用StringTie(v1.3.3b)软件组装新的转录本,将基因间区未知的转录本认定为新基因。设置length ≥ 200 bp且exon number ≥ 2 筛选新基因,对新基因进行功能注释。

1.2.6 实时荧光定量PCR

按反转录试剂盒使用步骤,将9个样品的RNA反转录成cDNA,采用SYBR Green荧光染

料法进行RT-qPCR分析。反应体系:cDNA模板 $1\mu\text{L}$,引物F/R(10mol/L)各 $0.4\mu\text{L}$, $2\times\text{qPCR mix}$ $10\mu\text{L}$, rox($20\mu\text{mol/L}$) $0.4\mu\text{L}$, ddH₂O $7.8\mu\text{L}$ 。反应条件: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 30 s, 40个循环; 72°C 5 min。以暗褐网柄牛肝菌18S rRNA基因为内参基因,采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$ 法进行结果分析。设计基因的引物序列EVM0001450 (F: 5'-GGAATGTCTCTCTGCCTCCG-3', R: 5'-AGCCATGTAGCTCTGGCATC-3'), EVM0001641 (F: 5'-GTTGTCATACTGGGACGGCA-3', R: 5'-CATCAGGGCGTTTCTGAGT-3'), EVM0005624 (F: 5'-GTCCGCTTTTGGTGGTTTCC-3', R: 5'-TATGGCGATTACCCTGTTCGC-3'), EVM0003609 (18S) (F: 5'-CATTCTCGCAAAAACGGGCA-3', R: 5'-GCCTTTTGC GG TGTGAATGT-3'), 委托昆明擎科生物公司合成引物。

2 结果与分析

2.1 不同菌株菌核形成情况

暗褐网柄牛肝菌多菌核菌株20139、寡菌核菌株20019和无菌核菌株20134在相同的营养和环境条件下培养25 d,菌核形成情况如图1所示。由图1可知,菌株20139在培养皿中形成大量暗褐网柄牛肝菌菌核,菌株20019形成少量菌核,菌核表面出现棕褐色至黑色液珠。菌株20134一直处于菌丝生长阶段,无菌核形成。

2.2 转录组测序

对多菌核、寡菌核菌株的成熟菌核及无菌核菌株培养相同时间的菌丝体样品进行高通量测序。原始数据过滤后,对clean reads进行Q20、Q30和GC含量检测。结果显示,来自配对末端读数的Q20百分比均在97.41%以上,Q30百分比均高于92.80%(表1),说明转录组测序数据质量好,可用于后续生物信息学统计分析。测序得到的数据已上传至NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库。

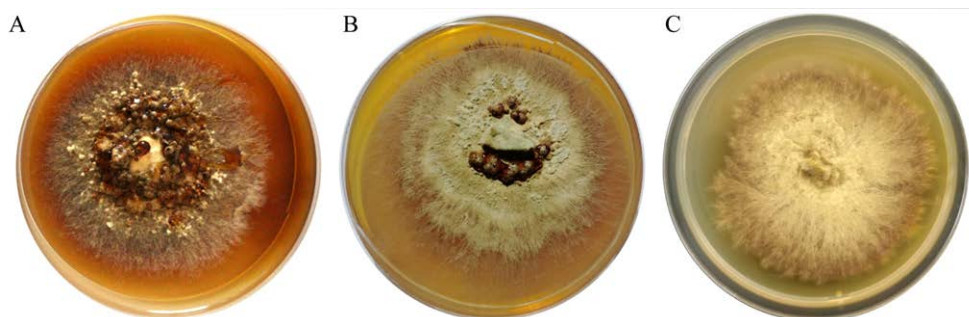


图 1 三个不同菌株菌核形成情况

Figure 1 Sclerotium formation of three different strains. A: Strain 20139. B: Strain 20019. C: Strain 20134.

表 1 转录组测序数据质量分析

Table 1 Analysis of transcriptome sequencing data quality

Sample	Raw reads	Clean reads	Q20	Q30	GC content (%)	NCBI accession No.
JH1-1	41 164 820	39 151 656	98.11	94.56	52.24	SRR17380384
JH1-2	41 028 248	38 648 406	98.31	94.95	52.18	SRR17380383
JH1-3	49 819 872	49 448 452	97.48	92.96	51.85	SRR17380381
JH2-1	43 277 772	40 916 430	98.09	94.51	52.05	SRR17380380
JH2-2	40 601 888	38 348 214	98.33	95.03	52.04	SRR17380379
JH2-3	48 063 990	47 453 862	97.96	94.01	51.88	SRR17380378
JH3-1	47 707 132	46 197 544	98.19	94.51	51.66	SRR17380377
JH3-2	47 470 656	46 991 230	97.49	92.92	51.88	SRR17380376
JH3-3	44 414 386	43 833 708	97.41	92.8	51.93	SRR17380375

2.3 新基因挖掘

采用 StringTie 软件进行新转录本组装, 得到 1 414 个转录本。将新转录本与 GO 数据库进行序列比对, 发现 77 个新基因被注释到 185 个条目中; 与 KEGG 数据库进行序列比对发现, 有 36 个新基因被注释到 20 条 KEGG 代谢通路中。

2.4 差异基因筛选

由图 2 可知, JH2 vs. JH1 互比共筛选出 1 098 个差异表达基因, 其中上调 514 个、下调 584 个; JH3 vs. JH1 互比, 共筛选出 1 661 个差异表达基因, 其中上调 863 个、下调 798 个; JH3 vs. JH2 互比, 共筛选出 1 384 个差异表达基因, 其中上调 797 个、下调 587 个。由此可知, 无菌核与多菌核

或寡菌核菌株的差异表达基因数量高于多菌核与寡菌核菌株之间的差异表达基因。三组样本之间进行比较并绘制韦恩图(图 3)发现共有差异基因 138 条。

2.5 差异表达基因 GO 功能富集分析

对不同比较组 DEGs 的生物过程(biological process, BP)、细胞组分(cellular component, CC)和分子功能(molecular Function, MF)进行 GO 富集分析。由图 4 可知, 生物过程类别中, JH2 vs. JH1、JH3 vs. JH1 和 JH3 vs. JH2 均不存在显著富集条目。细胞组分类别中 JH3 vs. JH2 互比不存在显著富集的条目(图 4A); JH2 vs. JH1 互比有 7 个显著富集的条目(图 4B), 分别为膜整体组成(integral component of membrane) (GO:

0016021)、膜的固有成分(intrinsic component of membrane) (GO: 0031224)、细胞壁(cell wall) (GO: 0005618)、真菌细胞壁(fungal-type cell wall) (GO: 0009277)、外部封装结构(external encapsulating structure) (GO: 0030312)、外周细胞(cell periphery) (GO: 0071944)、膜部分(membrane part) (GO: 0044425); JH3 vs. JH1 互比有 3 个显著富集的条

目(图 4C), 分别为胞外区(extracellular region) (GO: 0005576)、膜整体组成(integral component of membrane) (GO: 0016021)、膜的固有成分(intrinsic component of membrane) (GO: 0031224); 其中 JH2 vs. JH1 和 JH3 vs. JH1 两个互比阶段均显著富集的条目为 GO: 0016021 和 GO: 0031224, 均与膜组成相关。

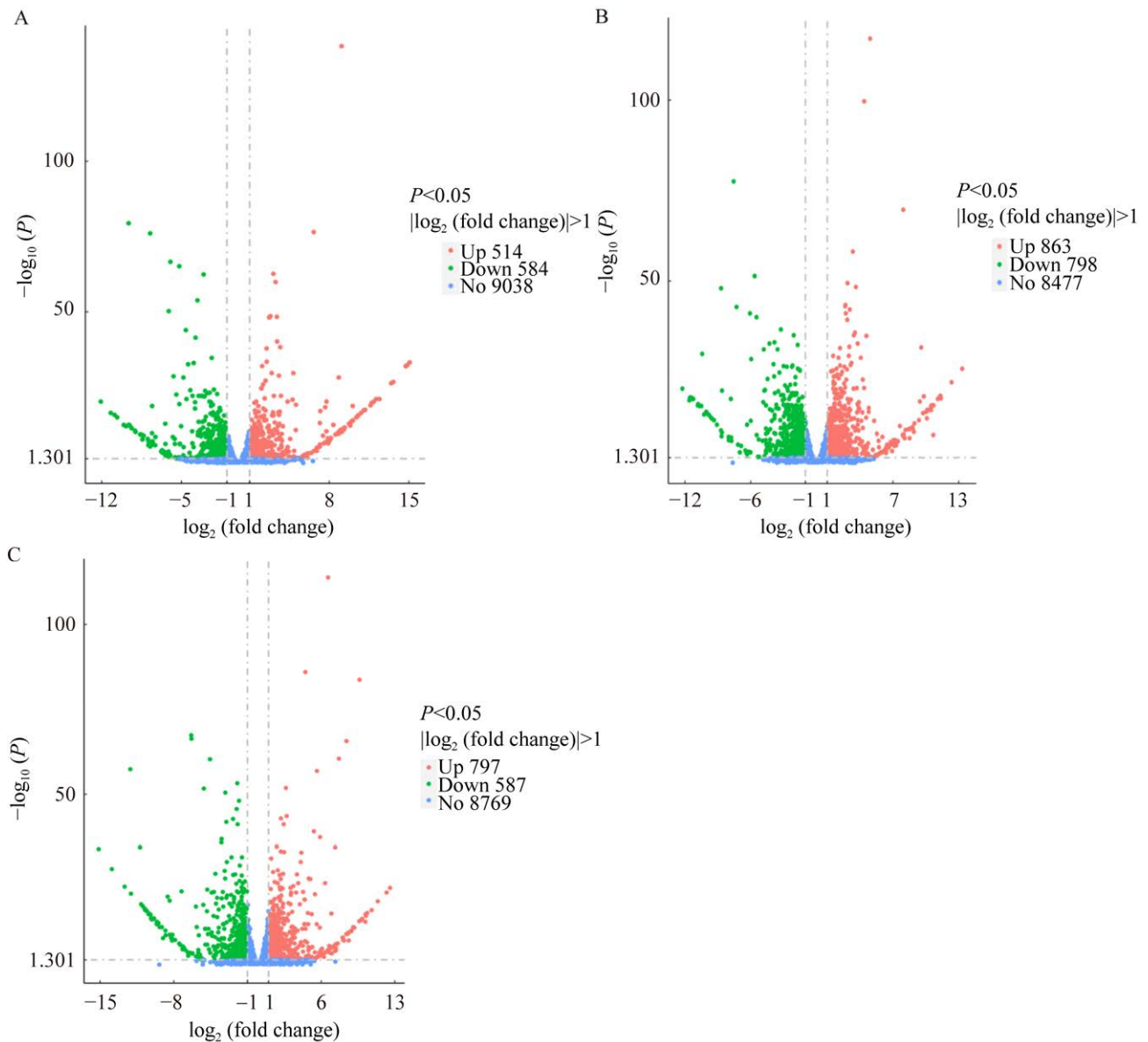


图 2 不同比较组菌核差异表达基因火山图

Figure 2 Volcano diagram of DEGs in different comparison groups. A: JH2 vs. JH1. B: JH3 vs. JH1. C: JH3 vs. JH2.

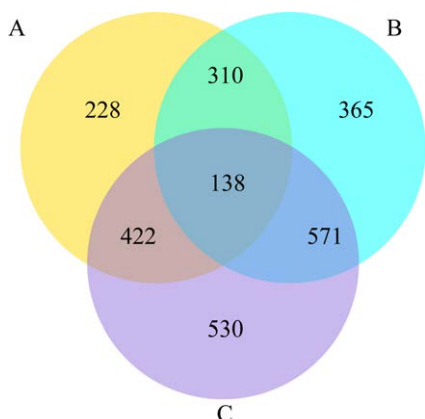
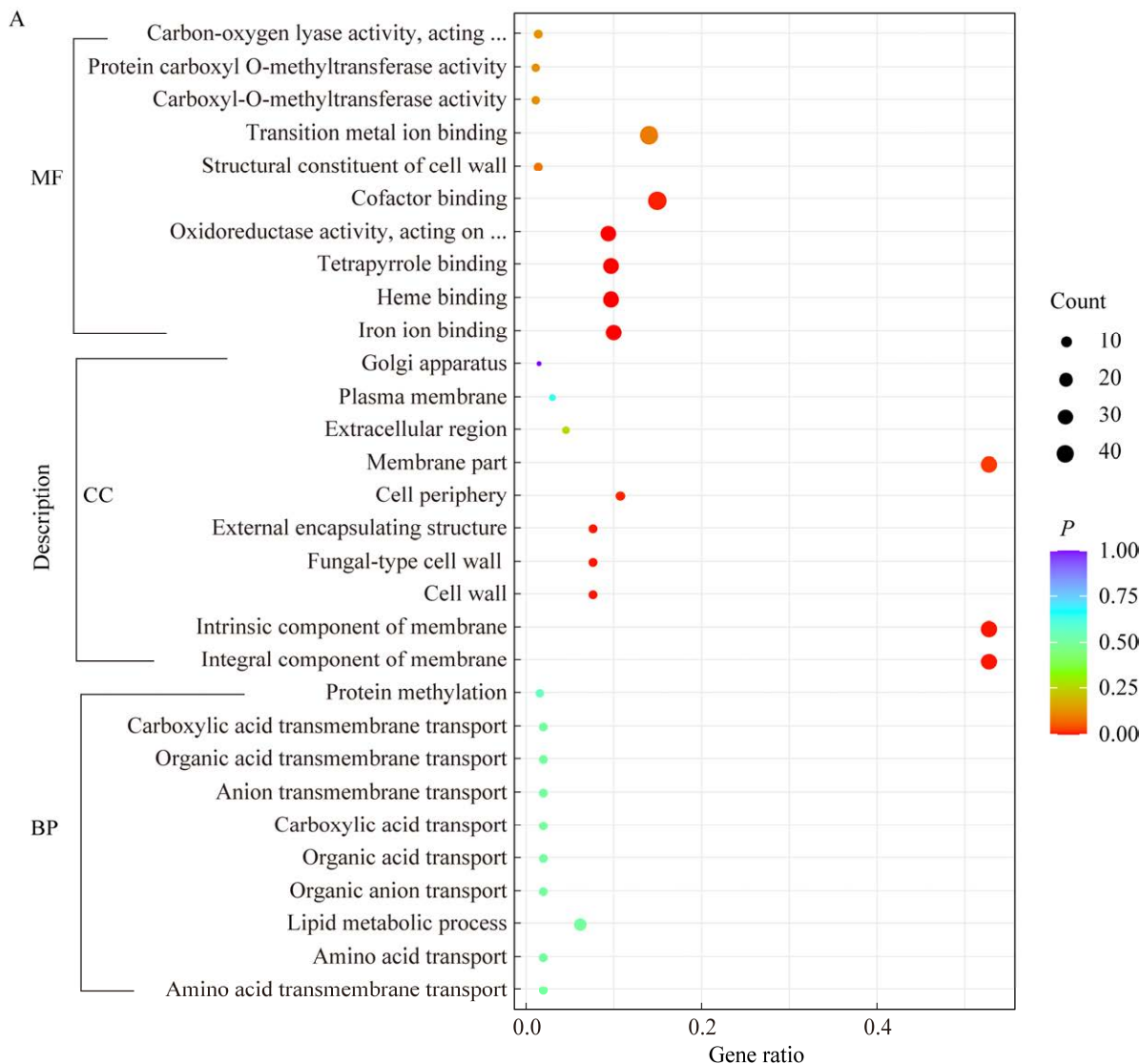


图 3 差异表达基因韦恩图

Figure 3 Venn diagram of differentially expressed genes (DEGs). A: JH2 vs. JH1. B: JH3 vs. JH2. C: JH3 vs. JH1.

分子功能中 JH2 vs. JH1 显著富集的条目有 5 个, 分别是: 铁离子结合(iron ion binding) (GO: 0005506), 血红素结合(heme binding) (GO: 0020037), 四吡咯结合(tetrapyrrole binding) (GO: 0046906), 氧化还原酶活性、作用于配对供体、与分子氧的结合或还原(oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen) (GO: 0016705), 辅助因子结合(cofactor binding) (GO: 0048037)。JH3 vs. JH2 互比存在显著富集的条目有 6 个, 除 JH2 vs. JH1 互比显著富集的 5 个条目外, 还有过渡金属离子结合(transition metal ion binding)



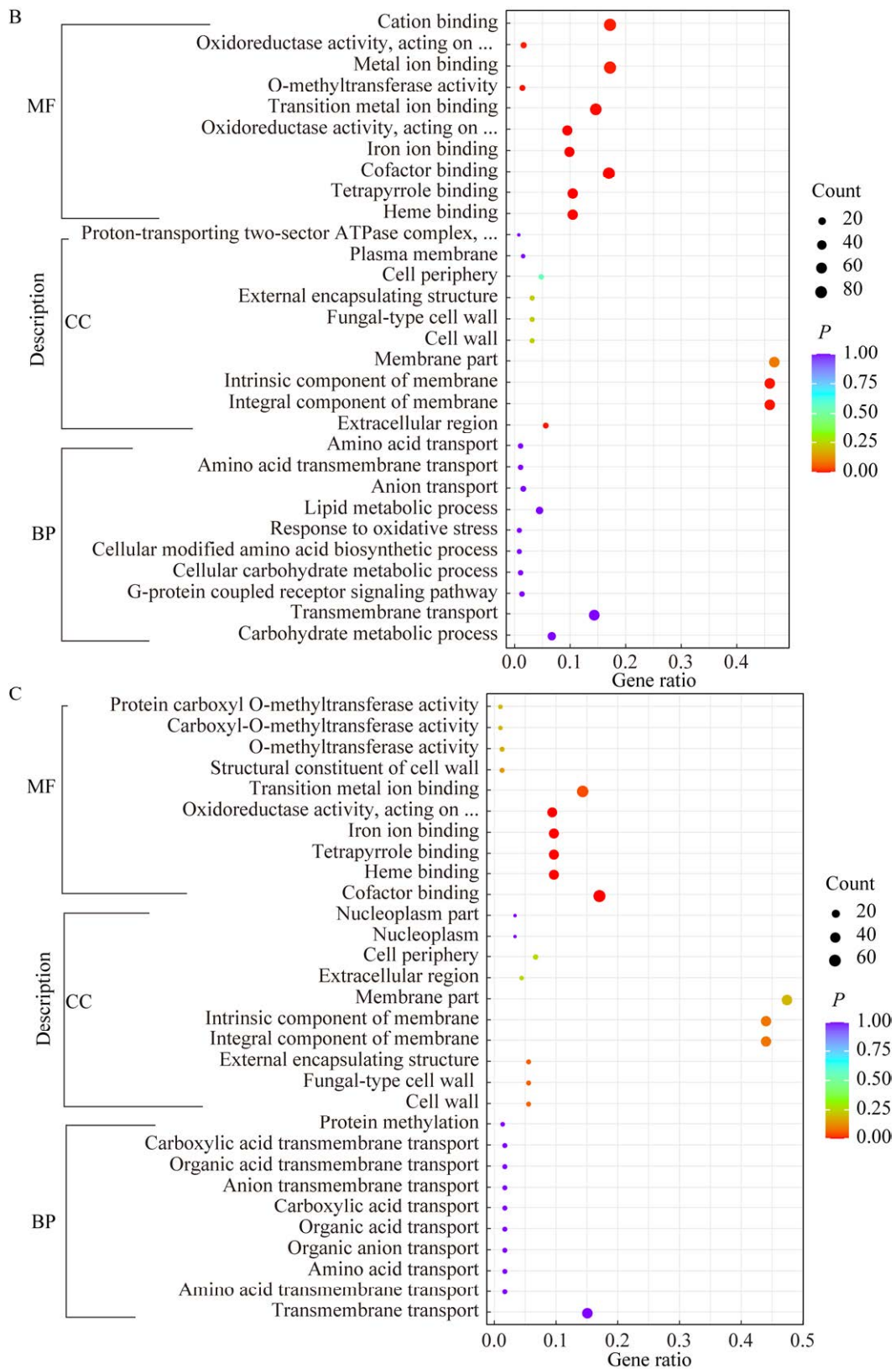


图 4 差异表达基因 GO 功能分类

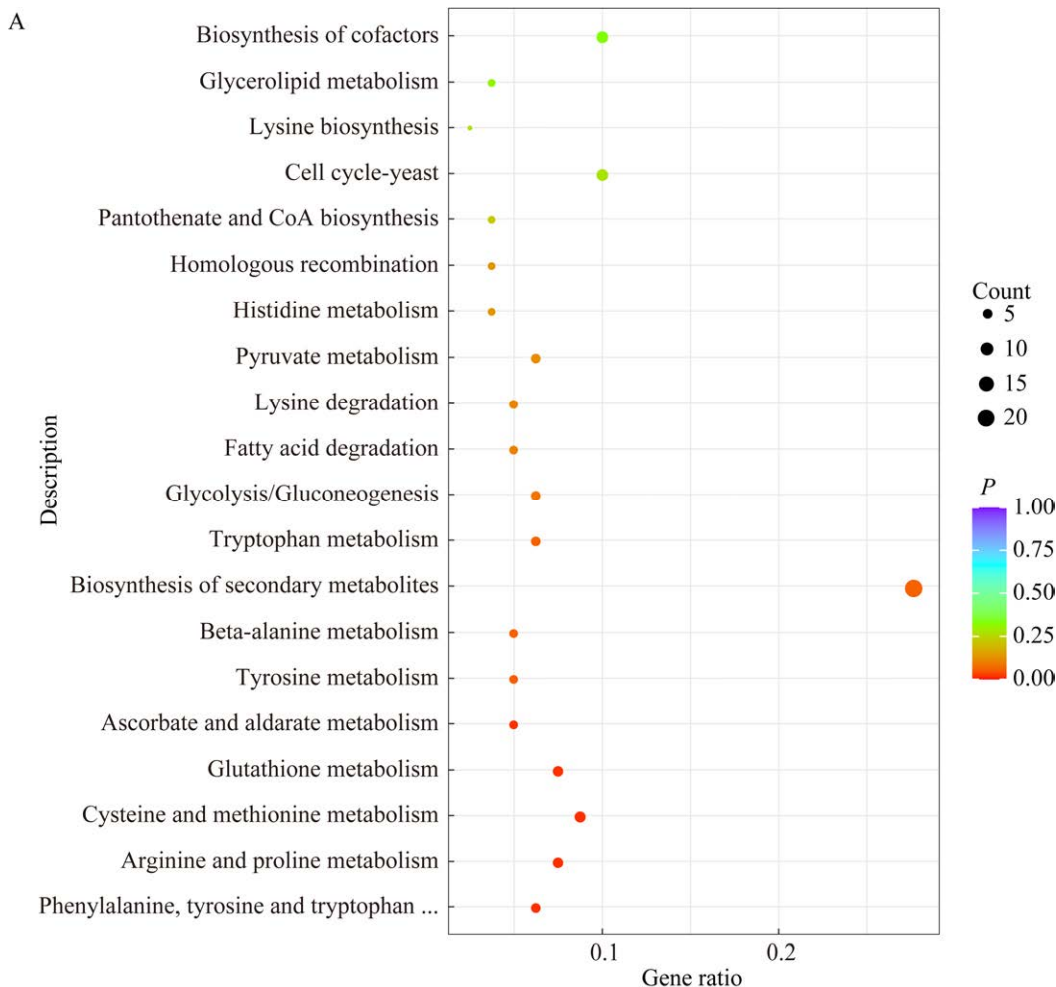
Figure 4 GO classification of differentially expressed genes. A: JH2 vs. JH1. B: JH3 vs. JH1. C: JH3 vs. JH2.

(GO: 0046914)显著富集。JH3 vs. JH1 互比呈显著富集的条目有 12 个; 其中 6 个与 JH3 vs. JH2 互比显著富集的条目相同。此外, 还有邻甲基转移酶活性(O-methyltransferase activity) (GO: 0008171), 金属离子结合(metal ion binding) (GO: 0046872), 氧化还原酶活性、作为受体作用于过氧化物(oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor) (GO: 0016684), 阳离子结合(cation binding) (GO: 0043169), 过氧化物酶活性(peroxidase activity) (GO: 0004601), 铜离子结合(copper ion binding) (GO: 0005507)。另外, 分子功能中 3 个比较组均显著富集的条目 GO 为 0020037、0046906、0048037、0005506 和 0016705, 这些显著富集

条目都与结合相关。

2.6 差异表达基因的通路富集分析

对 JH2 vs. JH1 之间的 DEGs 进行 KEGG 通路分析, 差异基因成功注释到 66 条通路上。选取最显著的 20 个 KEGG 通路绘制散点图(图 5A), 结果在苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成(phenylalanine, tyrosine and tryptophan biosynthesis) (abp00400)、精氨酸和脯氨酸代谢(arginine and proline metabolism) (abp00330)、半胱氨酸和蛋氨酸代谢(cysteine and methionine metabolism) (abp00270)、谷胱甘肽代谢(glutathione metabolism) (abp00480)、抗坏血酸和醛酸盐代谢(ascorbate and aldarate metabolism) (abp00053)这 5 个通路中显著富集, 说明多菌核、寡菌核菌株



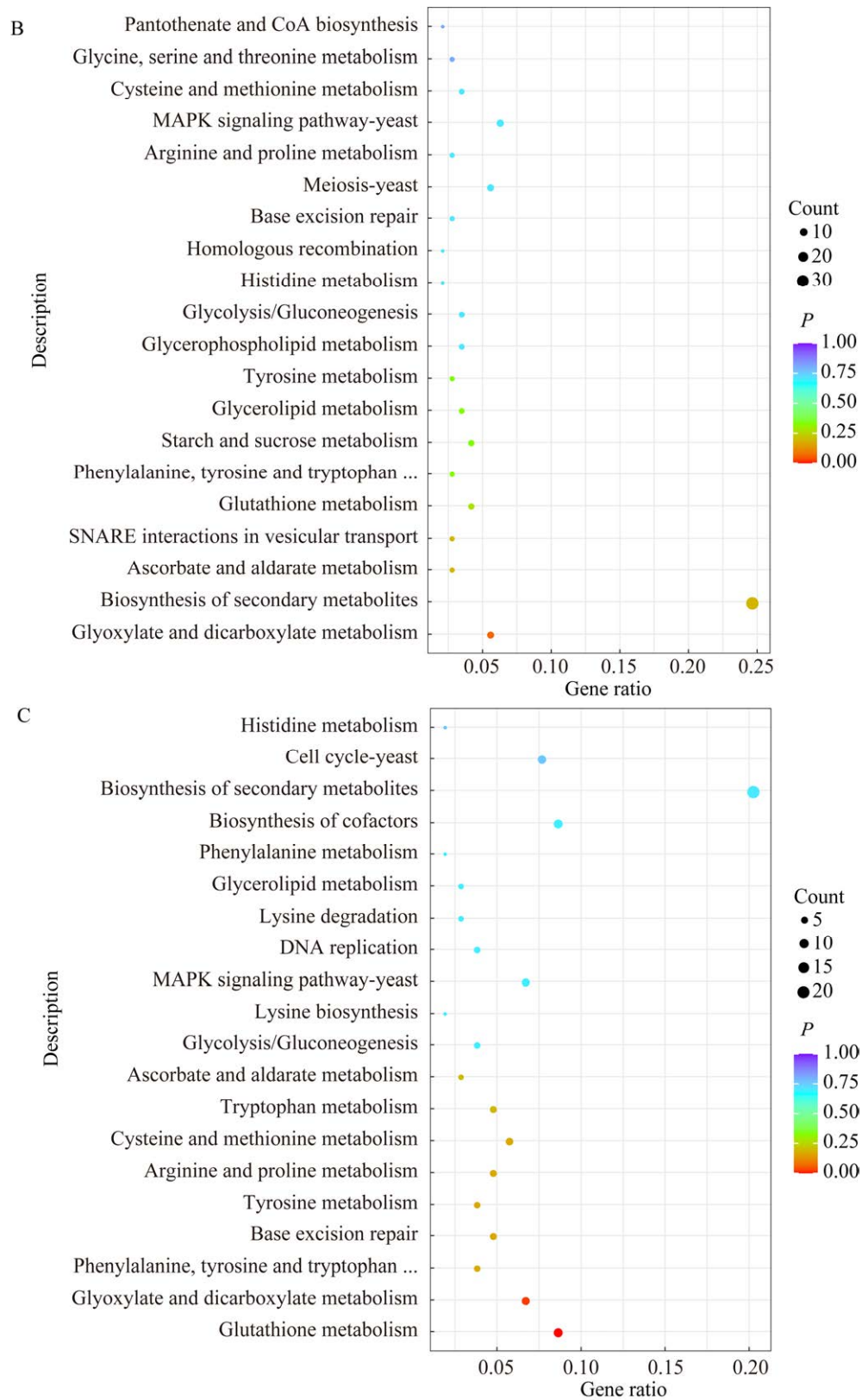


图 5 KEGG 通路富集分析

Figure 5 KEGG pathway analysis of differentially expressed genes. A: JH2 vs. JH1. B: JH3 vs. JH1. C: JH3 vs. JH2.

在菌核形成时期氨基酸代谢活跃。JH3 vs. JH1 之间的 DEGs 注释到 78 条通路上, 在乙醛酸和二羧酸代谢 (glyoxylate and dicarboxylate metabolism) (abp00630) 通路上显著富集(图 5B); JH3 vs. JH2 之间的 DEGs 注释到 69 条通路上, 在谷胱甘肽代谢 (glutathione metabolism) (abp00480)、乙醛酸和二羧酸代谢 (glyoxylate and dicarboxylate metabolism) (abp00630) 通路上显著富集(图 5C)。值得注意的是 3 个比较组中次生代谢物的生物合成 (biosynthesis of secondary metabolites) (abp01110) 是涉及基因数目最多的通路; 其中 JH2 vs. JH1 涉及 21 个、JH3 vs. JH1 涉及 35 个、JH3 vs. JH2 涉及 21 个。

2.7 RT-qPCR 验证转录组测序表达模式

为了证实转录组测序的准确性, 随机挑选了 *EVM0005624*、*EVM0001450* 和 *EVM0001641* 这 3 个差异基因进行 RT-qPCR 定量分析。由图 6 可知, 3 个差异基因在不同菌株的表达量与转录组测序结果一致; 其中与碳水化合物活性酶相关的基因 *EVM0005624* 及与信号转导相关的基因 *EVM0001450* 从 JH1、JH2 到 JH3 表达量依次下调, 而与形态发育相关的基因 *EVM0001641* 表达量上调, 且 3 个基因在 JH1 与 JH3 之间的表达

量差异极显著 ($P < 0.001$)。

3 讨论与结论

菌核形成与信号转导、感官刺激、防御、形态发育、黑色素合成、碳水化合物活性酶等多种基因相关^[23-29]。本文对这些过程中涉及的差异基因进行挖掘和分析, 从 JH2 vs. JH1、JH3 vs. JH1 和 JH3 vs. JH2 的 DEG 中分别鉴定到 69、118 和 82 条与菌核形成相关的差异表达基因。三个比较组中碳水化合物活性酶及形态发育相关的基因数量最为丰富。

3.1 信号转导相关基因分析

丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 1 是真核生物信号传递通路 (MAPK 通路) 的关键酶, 参与信号转导、真菌细胞壁合成等生物学过程^[28,30]。该类蛋白的编码基因在本文的三组样品中均差异表达, JH3 vs. JH2 和 JH3 vs. JH1 存在差异蛋白编码基因 *EVM0001450* (protein kinase wis1); JH2 vs. JH1 存在差异蛋白编码基因 *EVM0006050* (mitogen-activated protein kinase), 推测这 2 个差异基因对暗褐网柄牛肝菌菌核形成具有调控作用。

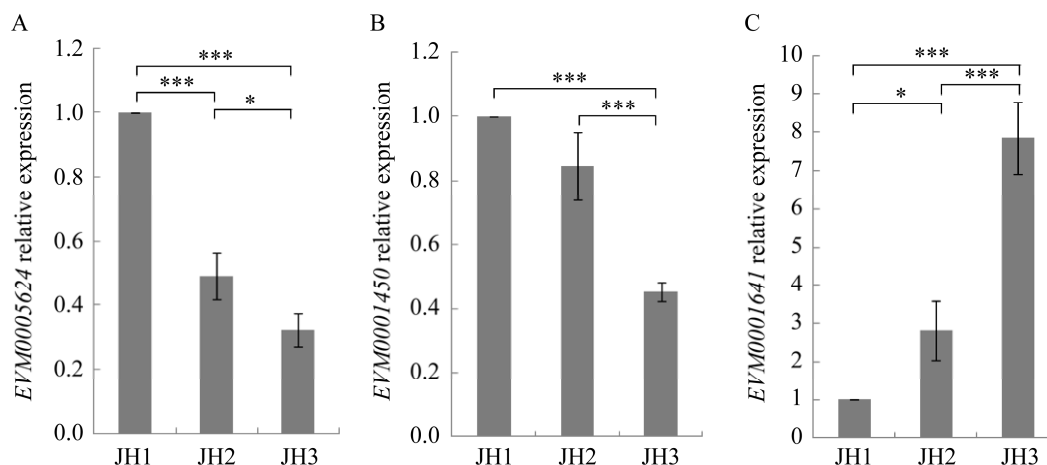


图 6 差异基因 RT-qPCR 验证

Figure 6 Differential genes were verified by RT-qPCR. A: *EVM0005624*. B: *EVM0001450*. C: *EVM0001641*. *: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$.

3.2 感官刺激及防御相关基因分析

JH2 vs. JH1 的差异基因中, 鉴定到 2 个热休克蛋白编码基因 *EVM0004159* (heat shock protein 16) 和 *EVM0008420* (heat shock protein 70); JH3 vs. JH1 和 JH3 vs. JH2 的差异基因中, 鉴定到 3 个热休克蛋白编码基因 *EVM0007378*、*EVM0004159* 和 *EVM0005679* (heat shock protein 16), 值得注意的是这 3 个 DEGs 均呈下调表达。研究报道菌核形成会受到环境胁迫的影响^[31], 本研究中热休克蛋白编码基因的差异表达可能调控了暗褐网柄牛肝菌菌核的形成。猪苓菌核发育过程可通过 WD40 高表达防御和响应逆境胁迫被蜜环菌侵染的猪苓菌核 WD40 表达量显著上调^[17,23]。本研究发现在 JH3 vs. JH1 与 JH2 vs. JH1 的共有差异基因中, 编码 WD40 的基因 *EVM0001419* 呈上调表达, 推测该防御相关基因与多菌核、寡菌核菌株的菌核形成有关。

3.3 与形态发育相关的基因

文献报道 *CYP450* 基因参与调控猪苓菌核的丝状菌丝生长和形态发育^[17]。本研究 JH3 vs. JH1、JH3 vs. JH2 和 JH2 vs. JH1 比较组中与 *CYP450* 相关的差异基因分别有 44、33 和 27 个。三个比较组共有的 *CYP450* 相关基因为 *EVM0007114*、*EVM0000712* 和 *EVM0001641*, 其中基因 *EVM0000712*、*EVM0001641* 在 JH3 中的表达量高于 JH2、JH1, *EVM0007114* 在 JH3 中表达量远低于 JH2、JH1。这些差异基因可能与暗褐网柄牛肝菌从菌丝到菌核的形态转变有关。

3.4 与黑色素合成相关的基因

真菌菌核的发育一般伴随黑色素的沉积, 黑色素可以降低表皮通透性, 保护自身水分及营养, 并具有防御作用^[32]。黑色素生物合成基因 *SCD1* 和 *THR1* 能影响菌核菌中菌核的发育及营养生长^[33]; JH3 vs. JH1 互比有 6 个与黑色素合成相关的基因, 其中 *EVM0002472*、*EVM0006026*、

EVM0001182、*EVM0006485* 和 *EVM0006014* 这 5 个基因上调表达, *EVM0002909* 下调表达; JH3 vs. JH2 互比发现 4 个与黑色素合成相关的差异基因 *EVM0002472*、*EVM0006026*、*EVM0006014* 和 *EVM0001015* 均呈上调表达, 这些上调基因可能与多菌核、寡菌核菌株菌核形成过程中的“吐水”(菌核表面形成的暗黑色液滴)现象有一定关系。

3.5 碳水化合物活性酶相关基因分析

菌核的数量、大小会受底物营养状况影响^[34-35], 碳水化合物活性酶(carbohydrate-active enzymes, CAZy)是真菌分解利用糖类的催化物质, 包括糖苷水解酶(glycosylhydrolase, GH)、多糖裂解酶(pectate lyase, PL)、碳水化合物酯酶(carbohydrate esterase, CE)、辅助酶类(auxiliary activities, AA)、糖苷转移酶(glycosyltransferase, GT)和碳水化合物绑定结构(carbohydrate binding modules, CBM)等。有学者研究发现暗褐网柄牛肝菌的 CAZy 基因数目小于其他真菌, 降解木质纤维素的能力较弱^[36]。本研究中 JH3 vs. JH1、JH3 vs. JH2 和 JH2 vs. JH1 与碳水化合物活性酶相关的差异基因分别有 60、38 和 33 个; 三个比较组均存在的差异基因有 4 个: *EVM0009029* (GH)、*EVM0004552* (AA)、*EVM0009414* (AA) 和 *EVM0005624* (AA), 且这 4 个基因在 JH1 中的表达量均高于 JH2 和 JH3。推测不同菌株中的 CAZy 基因影响了真菌对营养物质的利用, 进而影响菌核的数目。

本研究通过分析多菌核 JH1、寡菌核 JH2、无菌核 JH3 菌株同一时期的转录组数据, 得到 JH3 vs. JH1、JH2 vs. JH1 和 JH3 vs. JH2 互比的差异基因分别为 1 661、1 098 和 1 384 个。GO 功能富集分析发现, 细胞组分类别中 JH2 vs. JH1 和 JH3 vs. JH1 两个互比阶段均显著富集条目与膜组成相关。分子功能类别中 JH2 vs. JH1 和

JH3 vs. JH2 互比的 DEGs 显著富集到了 binding 功能条目, 该条目的基因多数为转录因子。转录因子是可以特异性识别 DNA 序列中顺式作用元件并调节转录过程的蛋白质因子, 对生物发育具有重要的调控作用^[37]。邓冰等^[38]研究报道金针菇 MYB 转录因子可能与子实体的形态相关。Xu 等^[39]报道真核起始因子 5A 可以促进脯氨酸合成, 与植物体抵抗逆境胁迫有关。由此我们推测转录因子相关基因的差异表达会影响菌核的形成与发育。JH3 vs. JH1 互比除显著富集到 binding 功能条目外, 催化活性条目也显著富集, 表明菌核发育过程中, 具有催化活性编码各类酶的基因也有着重要作用。

KEGG 富集分析发现, JH2 vs. JH1 互比显著富集了苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成, 精氨酸和脯氨酸代谢, 半胱氨酸和蛋氨酸代谢, 谷胱甘肽代谢以及抗坏血酸和醛酸盐代谢。JH3 vs. JH1 互比乙醛酸和二羧酸代谢被显著富集。JH3 vs. JH2 之间谷胱甘肽代谢、乙醛酸和二羧酸代谢显著富集, 说明菌核形成过程中氨基酸代谢活跃。

糖苷水解酶是碳水化合物活性酶之一, 在细胞壁组成成分葡聚糖的代谢中起重要作用, 与维持细胞壁的可塑性有关^[40]。本研究中多菌核、寡菌核、无菌核菌株在同一生长时期的 DEGs 中, 碳水化合物活性酶基因数量最为丰富; 另外还存在大量与形态发育、黑色素合成、碳水化合物活性酶、脂质转运与代谢等多种与菌核发育相关的基因, 这些基因在不同暗褐网柄牛肝菌菌株中的差异表达可能共同调控了菌株是否产生菌核及菌核数量。

REFERENCES

- [1] VOLK TJ, LEONARD TJ. Physiological and environmental studies of *Sclerotium* formation and maturation in isolates of *Morchella crassipes*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1989, 55(12): 3095-3100.
- [2] 刘士旺, 梁宗琦, 刘爱英. 羊肚菌生活史中重要的组成部分—菌核[J]. 贵州农业科学, 1997, 25(2): 55-59. LIU SW, LIANG ZQ, LIU AY. Sclerotinia an important part in morchella life cycle[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 1997, 25(2): 55-59 (in Chinese).
- [3] ZHONG X, GU L, WANG HZ, LIAN DH, ZHENG YM, SHA Z, WEI Z, GU JL, ZHANG GR, LIU X. Profile of *Ophiocordyceps sinensis* transcriptome and differentially expressed genes in three different mycelia, sclerotium and fruiting body developmental stages[J]. Fungal Biology, 2018, 122(10): 943-951.
- [4] YUAN TJ, ZHAO YL, ZHANG J, WANG YZ. Application of variable selection in the origin discrimination of *Wolfiporia cocos* (F.A. Wolf) Ryvarden & Gilb. based on near infrared spectroscopy[J]. Scientific Reports, 2018, 8: 89.
- [5] HE PF, HE L, ZHANG AQ, WANG XL, QU L, SUN PL. Structure and chain conformation of a neutral polysaccharide from sclerotia of *Polyporus umbellatus*[J]. Carbohydrate Polymers, 2017, 155: 61-67.
- [6] HE PX, WANG K, CAI YL, HU XL, ZHENG Y, ZHANG JJ, LIU W. Involvement of autophagy and apoptosis and lipid accumulation in sclerotial morphogenesis of *Morchella importuna*[J]. Micron, 2018, 109: 34-40.
- [7] 刘奇正, 董彩虹. 羊肚菌菌核的形成研究进展及其在栽培中应用的探讨[J]. 食用菌学报, 2020, 27(4): 172-178. LIU QZ, DONG CH. Research progress on Sclerotium formation in *Morchella* and reflection on its application in cultivation[J]. Acta Edulis Fungi, 2020, 27(4): 172-178 (in Chinese).
- [8] AMIR R, LEVANON D, HADAR Y, CHET I. Morphology and physiology of *Morchella esculenta* during sclerotial formation[J]. Mycological Research, 1993, 97(6): 683-689.
- [9] 赵永昌, 王芳, 吴毅歆. 羊肚菌菌核的形成研究[J]. 中国食用菌, 1998, 17(1): 5-7. ZHAO YC, WANG F, WU YX. Study on sclerotinia formation of *Morchella esculenta*[J]. Edible Fungi of China, 1998, 17(1): 5-7 (in Chinese).
- [10] 卢园萍, 郭仲杰, 蔡志欣, 陈美元, 廖剑华. 巴氏蘑菇子实体不同发育阶段的转录组分析[J]. 菌物学报, 2019, 38(12): 2161-2173. LU YP, GUO ZJ, CAI ZX, CHEN MY, LIAO JH. Transcriptome analysis of *Agaricus blazei* fruiting bodies at different developmental stages[J]. Mycosystema, 2019,

- 38(12): 2161-2173 (in Chinese).
- [11] 杨驰, 马璐, 肖冬来, 江晓凌, 刘晓瑜, 应正河, 林衍铨. 整合转录组数据鉴定大型真菌原基形成的潜在通路[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 556-568.
YANG C, MA L, XIAO DL, JIANG XL, LIU XY, YING ZH, LIN YQ. Identification of potential pathways in primordium formation of mushroom-forming fungi: based on the analysis of RNA-Seq data[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 556-568 (in Chinese).
- [12] SHU SH, CHEN B, ZHOU MC, ZHAO XM, XIA HY, WANG M. *De novo* sequencing and transcriptome analysis of *Wolfiporia cocos* to reveal genes related to biosynthesis of triterpenoids[J]. PLoS One, 2013, 8(8): e71350.
- [13] 朱闻君, 汪琪, 赵小龙, 汤进, 陈平, 杨涛, 张绍鹏, 李长玲, 邓琛. 茯苓MAPK蛋白编码基因 *Smk1* 及其应用: CN104195120A[P]. 2014-12-10.
ZHU WJ, WANG Q, ZHAO XL, TANG J, CHEN P, YANG T, ZHANG SP, LI CL, DENG C. *Poria cocos* MAPK protein coding gene *Smk1* and application thereof: CN104195120A[P]. 2014-12-10 (in Chinese).
- [14] 朱闻君, 赵小龙, 杨涛, 汤进, 陈平, 张绍鹏, 张西锋, 汪琪, 李长玲, 邓琛. 一种茯苓NADPH氧化酶编码基因 *Nox* 及其应用: CN104232598A[P]. 2016-06-08.
ZHU WJ, ZHAO XL, YANG T, TANG J, CHEN P, ZHANG SP, ZHANG XF, WANG Q, LI CL, DENG C. *Poria cocos* NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) oxidase encoding gene *Nox* and application thereof: CN104232598A[P]. 2016-06-08 (in Chinese).
- [15] CHEN MT, CHEN NY, WU T, BIAN YB, DENG YJ, XU ZY. Characterization of two mitochondrial genomes and gene expression analysis reveal clues for variations, evolution, and large-sclerotium formation in medical fungus *Wolfiporia cocos*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 1804.
- [16] 李甲, 李翁坤, 康华生, 刘利, 赖小平, 张桂芳. 转录组学研究虎乳灵芝菌核发育过程[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(4): 960-964.
LI J, LI WK, KANG HS, LIU L, LAI XP, ZHANG GF. Study on the development of *Lignosus rhinocerotis* sclerotium by transcriptomics[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2021, 32(4): 960-964 (in Chinese).
- [17] 边小禹, 裴天林, 梁宗锁, 常朝阳. 猪苓菌核不同发育时期转录组学差异表达研究[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(17): 3718-3723.
BIAN XY, PEI TL, LIANG ZS, CHANG ZY. A landscape of transcriptome analysis of three sclerotia growth stages in *Polyporus umbellatus*[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(17): 3718-3723 (in Chinese).
- [18] 纪开萍, 曹咏, 何明霞, 刘静, 张春霞, 王文兵. 暗褐网柄牛肝菌人工栽培方法: CN101524035B[P]. 2010-11-03.
JI KP, CAO Y, HE MX, LIU J, ZHANG CX, WANG WB. Artificial cultivation method for *Phlebopus portentosus*: CN101524035B[P]. 2010-11-03 (in Chinese).
- [19] JI KP, CAO Y, ZHANG CX, HE MX, LIU J, WANG WB, WANG Y. Cultivation of *Phlebopus portentosus* in southern China[J]. Mycological Progress, 2011, 10(3): 293-300.
- [20] ZHANG CX, HE MX, LIU J, XU XJ, CAO Y, GAO F, FANG YW, WANG WB, WANG Y. Brief introduction to a unique edible bolete *Phlebopus portentosus* in southern China[J]. Journal of Agricultural Science and Technology B, 2017, 7: 386-394.
- [21] 刘静, 何明霞, 王文兵, 曹咏, 许欣景, 高峰, 方艺伟, 杨天伟, 张春霞. 暗褐网柄牛肝菌仿生栽培研究[J]. 西南农业学报, 2017, 30(5): 1176-1182.
LIU J, HE MX, WANG WB, CAO Y, XU XJ, GAO F, FANG YW, YANG TW, ZHANG CX. Bionic cultivation research of *Phlebopus portentosus*[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2017, 30(5): 1176-1182 (in Chinese).
- [22] 曹咏, 纪光燕, 罗顺珍, 高丽霞, 陶玲, 王秋兰, 杨瑞恒, 鲍大鹏, 纪开萍. 暗褐网柄牛肝菌人工驯化研究的回顾与前瞻[J]. 菌物学报, 2021, 40(12): 3064-3080.
CAO Y, JI GY, LUO SZ, GAO LX, TAO L, WANG QL, YANG RH, BAO DP, JI KP. Domestication and artificially cultivation of *Phlebopus portentosus*: retrospect and prospect[J]. Mycosystema, 2021, 40(12): 3064-3080 (in Chinese).
- [23] LIU MM, XING YM, ZHANG DW, GUO SX. Transcriptome analysis of genes involved in defence response in *Polyporus umbellatus* with *Armillaria mellea* infection[J]. Scientific Reports, 2015, 5: 16075.
- [24] SMITH ME, HENKEL TW, ROLLINS JA. How many fungi make sclerotia?[J]. Fungal Ecology, 2015, 13: 211-220.
- [25] 李兵, 王春兰, 邢咏梅, 曾旭, 田丽霞, 郭顺星. 猪苓菌丝形成菌核差异蛋白质组学研究[J]. 菌物学报, 2017, 36(1): 60-70.
LI B, WANG CL, XING YM, ZENG X, TIAN LX, GUO SX. Differential proteome analysis of sclerotium formation stages of *Polyporus umbellatus*[J].

- Mycosystema, 2017, 36(1): 60-70 (in Chinese).
- [26] 樊荣, 徐小鸿, 曹亚松, 商文静, 朱荷琴, 胡小平. 大丽轮枝菌黑色素合成相关基因与微菌核形成的关系[J]. 菌物学报, 2017, 36(12): 1608-1615.
FAN R, XU XH, CAO YS, SHANG WJ, ZHU HQ, HU XP. The role of DHN melanin biosynthesis genes in microsclerotium formation in *Verticillium dahliae*[J]. Mycosystema, 2017, 36(12): 1608-1615 (in Chinese).
- [27] 边小禹. 基于转录组学研究药用真菌猪苓菌核的发育机制[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2019.
BIAN XY. Exploring the developmental mechanism of the medicinal fungus *Polyporus umbellatus* sclerotia based on transcriptomic[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2019 (in Chinese).
- [28] FRAWLEY D, STROE MC, OAKLEY BR, HEINEKAMP T, STRAßBURGER M, FLEMING AB, BRAKHAGE AA, BAYRAM Ö. The pheromone module SteC-MkkB-MpkB-SteD-HamE regulates development, stress responses and secondary metabolism in *Aspergillus fumigatus*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 811.
- [29] 曹硕. 基因组及转录组学分析探究茯苓菌核形成机制[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2021.
CAO S. Exploring the *Sclerotium* formation mechanism of *Poria cocos* (Schw.) wolf by genomic and transcriptomic analysis[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [30] CHEN CB, HAREL A, GOROVOITS R, YARDEN O, DICKMAN MB. MAPK regulation of sclerotial development in *Sclerotinia sclerotiorum* is linked with pH and cAMP sensing[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI, 2004, 17(4): 404-413.
- [31] BOREHAM DR, MITCHEL RE. Regulation of heat and radiation stress responses in yeast by hsp-104[J]. Radiation Research, 1994, 137(2): 190-195.
- [32] YOUNG N, ASHFORD AE. Changes during development in the permeability of *Sclerotia* of *Sclerotinia minor* to an apoplastic tracer[J]. Protoplasma, 1992, 167(3): 205-214.
- [33] LIANG Y, XIONG W, STEINKELLNER S, FENG J. Deficiency of the melanin biosynthesis genes *SCD1* and *THR1* affects sclerotial development and vegetative growth, but not pathogenicity, in *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Molecular Plant Pathology, 2018, 19(6): 1444-1453.
- [34] WILLETTS HJ. The survival of fungal sclerotia under adverse environmental conditions[J]. Biological Reviews, 1971, 46(3): 387-407.
- [35] PUNJA ZK, GROGAN RG, ADAMS GC. Influence of nutrition, environment, and the isolate, on basidiocarp formation, development, and structure in *Athelia (Sclerotium) rolfsii*[J]. Mycologia, 1982, 74(6): 917-926.
- [36] WAN JN, LI Y, GUO T, JI GY, LUO SZ, JI KP, CAO Y, TAN Q, BAO DP, YANG RH. Whole-genome and transcriptome sequencing of *Phlebopus portentosus* reveals its associated ectomycorrhizal niche and conserved pathways involved in fruiting body development[J]. Frontiers in Microbiology, 2021, 12: 732458.
- [37] 刘澳, 陈宇, 亓春龙, 吕晓萌, 王威. 金针菇成熟期和伸长期菌盖的转录组与蛋白组比较分析[J]. 菌物学报, 2023, 42(1): 312-329.
LIU A, CHEN Y, QI CL, LYU XM, WANG W. Comparison of transcriptomes and proteomes in pilei between maturation and stipe elongation stages of *Flammulina filiformis*[J]. Mycosystema, 2023, 42(1): 312-329 (in Chinese).
- [38] 邓冰, 刘宗奇, 袁学文, 刘靖宇, 孟俊龙, 常明昌, 冯翠萍. 金针菇 MYB 转录因子家族成员鉴定及其在子实体形成中的表达模式分析[J]. 食用菌学报, 2021, 28(5): 1-11.
DENG B, LIU ZQ, YUAN XW, LIU JY, MENG JL, CHANG MC, FENG CP. Identification of MYB transcription factor family members of *Flammulina filiformis* and analysis of their expression pattern during fruiting body development[J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(5): 1-11 (in Chinese).
- [39] XU JY, ZHANG BL, JIANG CH, MING F. RceIF5A, encoding an eukaryotic translation initiation factor 5A in *Rosa chinensis*, can enhance thermotolerance, oxidative and osmotic stress resistance of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Molecular Biology, 2011, 75(1): 167-178.
- [40] ADAMS DJ. Fungal cell wall chitinases and glucanases[J]. Microbiology (Reading, England), 2004, 150(Pt 7): 2029-2035.