

## 研究报告

蜜环菌(*Armillaria mellea*)内参基因的筛选

李兵, 刘柳, 单婷婷, 邢咏梅\*, 郭顺星\*

中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

李兵, 刘柳, 单婷婷, 邢咏梅, 郭顺星. 蜜环菌(*Armillaria mellea*)内参基因的筛选[J]. 微生物学通报, 2022, 49(2): 473-482Li Bing, Liu Liu, Shan Tingting, Xing Yongmei, Guo Shunxing. Selection of reference genes for real-time quantitative PCR of *Armillaria mellea*[J]. Microbiology China, 2022, 49(2): 473-482

**摘要:**【背景】蜜环菌属(*Armillaria*)是一类营腐生或寄生生活的药食两用型真菌, 研究其功能基因表达具有重要意义。【目的】筛选并获得蜜环菌(*Armillaria mellea*)最稳定的内参基因。【方法】以蜜环菌(*A. mellea*) 541 为研究对象, 以马铃薯琼脂糖培养基培养的菌丝和菌索为对照组, 以添加还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)氧化酶抑制剂氯化二亚苯基碘鎓(diphenyleneiodonium chloride, DPI)培养的菌丝和菌索为抑制剂组, 以添加木屑培养的菌丝和菌索为诱导剂组, 利用 RT-qPCR 技术和 BestKeeper 程序系统评估候选内参基因 *ACT-1*、*α-TUB*、*β-TUB 1*、*γ-TUB*、*UBQ*、*EF-1γ*、*18S rRNA biogenesis protein* 基因(*18S rRNA BP*)和 *GAPDH* 的表达量稳定性。【结果】内参基因 *EF-1γ* 在对照组、DPI 抑制剂组和木屑诱导剂组中的表达量稳定性最好。【结论】*EF-1γ* 为蜜环菌(*A. mellea*)的最佳内参基因, 为蜜环菌属真菌功能基因表达研究提供了参考。

**关键词:** 蜜环菌; 菌丝; 菌索; 内参基因; 实时荧光定量 PCR

Selection of reference genes for real-time quantitative PCR of *Armillaria mellea*

LI Bing, LIU Liu, SHAN Tingting, XING Yongmei\*, GUO Shunxing\*

Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

**Abstract:** [Background] *Armillaria* are medicinal and edible fungi having a parasitic or saprophytic phase, and it is vital to study the differentially expressed genes in these fungi. However, there are few

基金项目: 国家自然科学基金(81773843, 81803666, 81973425)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (81773843, 81803666, 81973425)

\*Corresponding authors: E-mail: XING Yongmei: meimary@163.com; GUO Shunxing: sxguo1986@163.com

Received: 2021-05-31; Accepted: 2021-10-11; Published online: 2021-11-22

reports on the internal reference genes of them. **[Objective]** To screen out the optimal internal reference genes for *Armillaria mellea* 541 under different experimental conditions. **[Methods]** In this study, *ACT-1*,  $\alpha$ -*TUB*,  $\beta$ -*TUB* 1,  $\gamma$ -*TUB*, *UBQ*, *EF-1 $\gamma$* , *18S rRNA BP*, and *GAPDH* were used as candidate reference genes of *A. mellea* 541. The *A. mellea* 541 hypha (AH) and rhizomorph (AR) cultured on potato dextrose agar (PDA) medium were used as the control group, and those cultured on the PDA medium supplemented with diphenyleneiodonium chloride and sawdust as inhibitor group and inducer group, respectively. The expression levels of the eight genes were evaluated by RT-qPCR and BestKeeper. **[Results]** *EF-1 $\gamma$*  was selected as the optimal reference gene for *A. mellea* 541 because of its stable expression under different experimental conditions. **[Conclusion]** This study provides a reliable reference gene for analyzing the gene expression in *Armillaria* spp..

**Keywords:** *Armillaria mellea*; hypha; rhizomorph; reference gene; RT-qPCR

蜜环菌(*Armillaria mellea*)为伞菌目蜜环菌属的一种兼性腐生或寄生生活的真菌,既可以作为白腐类的真菌有效降解植物细胞壁的成分(如木质素、纤维素等),其降解产物作为土壤的腐殖质为森林中的其他物种提供营养物质<sup>[1]</sup>,又可以作为寄生型真菌,若寄生于经济树种上则会导致根腐病,造成经济损失。已报道的可被蜜环菌属真菌寄生的树种多达 500 多种<sup>[2]</sup>。一些蜜环菌属真菌可与天麻、猪苓形成特殊的共生关系,从而直接影响这两味中药的产量与质量<sup>[3-4]</sup>。蜜环菌属真菌是一类广泛存在、用途多样的食药两用型真菌,其子实体俗称榛蘑,是常见的食用菌;同时具有催眠、镇静、改善心脑血管血液循环等多种生物学活性<sup>[5]</sup>。

蜜环菌属真菌的菌丝和菌索是其生活史中常见的 2 个阶段,菌索是其菌丝特化的组织结构,具有形成菌索网络、侵染宿主、吸收传递营养物质、运输氧气等生物学功能<sup>[2]</sup>。国内相关研究侧重于蜜环菌属真菌与天麻或猪苓间的关系<sup>[3-4]</sup>,国外则将蜜环菌属真菌视为植物病原菌,重点进行病原菌防治和机理的研究<sup>[6]</sup>。随着多种蜜环菌基因组的测序及分析<sup>[7]</sup>,在基因水平上研究蜜环菌使得相关工作逐渐深入。如几丁质酶可能是蜜环菌细胞壁重构及与宿主植物信号传导

的功能蛋白。黄婧雯等<sup>[8]</sup>对高卢蜜环菌的 22 条几丁酶氨基酸序列进行了分析和功能预测,发现该类酶在进化过程中发生了基因重复;此外,基于这些酶在 reads per kilobase per million mapped reads (RPKM)转录水平上的差异比较分析显示,一些几丁质酶可能进化出新的功能,但并未进行实验验证。

实时定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)作为一种反映基因表达水平的高效生物技术,会因不同样品的 RNA 质量、浓度及 cDNA 合成效率等的不同而存在差异,但合适的内参基因能够有效校正这些差异,从而准确地体现目的基因特异性表达的差异性<sup>[9]</sup>。因此,选择稳定表达的内参基因是保证实验准确性的前提条件<sup>[10]</sup>。为探索 *A. mellea* 541 差异基因表达水平,需要筛选在不同实验处理及不同组织中表达稳定的内参基因<sup>[11]</sup>。本文基于 *A. mellea* 541 菌株的转录测序结果(NCBI 登录号 SUB8218370),挑选编码肌动蛋白 1 (actin 1, *ACT-1*)、 $\alpha$ -微管蛋白( $\alpha$ -tubulin,  $\alpha$ -*TUB*)、 $\beta$ -微管蛋白 1 ( $\beta$ -tubulin 1,  $\beta$ -*TUB* 1)、 $\gamma$ -微管蛋白( $\gamma$ -tubulin,  $\gamma$ -*TUB*)、泛素(ubiquitin, *UBQ*)、延伸因子 1 $\gamma$  (elongation factor-1 $\gamma$ , *EF-1 $\gamma$* )、18S rRNA 生物合成蛋白 (18S rRNA biogenesis protein, 18S rRNA BP)和甘

油醛-3-磷酸-脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)编码基因这 8 个常用的内参基因作为候选基因<sup>[12-13]</sup>, 利用 BestKeeper 软件<sup>[14]</sup>分析比较了正常培养、氧化酶抑制剂和木屑诱导等条件下培养的 *A. mellea* 541 菌丝与菌索中的 8 个候选内参基因的表达, 筛选最适内参基因, 以期为蜜环菌属功能基因表达研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试菌株蜜环菌(*A. mellea*) 541 是从猪苓菌核中分离纯化的菌株<sup>[15]</sup>, 保藏于中国医学科学院药用植物研究所菌根研究室。

氯化二亚苯基碘鎓(diphenyleneiodonium chloride, DPI), Aladdin 公司; 真菌 RNA Kit, Omega 公司; 2×Phanta Max Master Mix, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司; PrimeScript RT Reagent Kit 和 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup>, TaKaRa 公司。

NanoDrop 2000 微量紫外分光光度计, Thermo Fisher 公司; T100 Thermal Cycler PCR 仪, Bio-Rad 公司; 7500 Real Time PCR System 荧光定量 PCR 仪, Applied Biosystems 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蜜环菌培养方法与总 RNA 提取

以马铃薯葡萄糖琼脂培养基(potato dextrose agar, PDA)作为基础培养基, 其配方为马铃薯 200 g/L、葡萄糖 10 g/L 和琼脂 12 g/L, 自然 pH 值。取 *A. mellea* 541 的固体菌种分别接种于 PDA、含有  $2 \times 10^{-4}$  mol/L 氯化二亚苯基碘鎓的 PDA 及加入青冈树[*Cyclobalanopsis glauca* (Thunb.) Oerst.]木屑的 PDA 培养基<sup>[16]</sup>中, 室温避光培养。其中, PDA 培养基培养的 *A. mellea* 541

为对照组(control group, CK)、氧化酶抑制剂添加组为 DPI 组; 加入木屑的为木屑诱导组(MX 组)。取培养第 21 天的各组样品, 分别收集培养皿中的菌丝和菌索。液氮速冻研磨提取总 RNA。RNA 的提取参照真菌 RNA Kit 说明书进行。利用紫外分光光度法(微量紫外分光光度计)分析 RNA 的质量和纯度, 并用 1%琼脂糖凝胶电泳检验总 RNA 完整性。

#### 1.2.2 候选内参基因选择和引物设计

根据文献报道的真菌常用内参基因<sup>[12-13]</sup>, 从 *A. mellea* 541 转录组数据(NCBI 登录号 SUB8218370)中筛选出 8 个管家基因作为候选基因, 依次为 *ACT 1*、 $\alpha$ -*TUB*、 $\beta$ -*TUB 1*、 $\gamma$ -*TUB*、*UBQ*、*EF-1 $\gamma$* 、*18S rRNA BP* 和 *GAPDH*。用 Primer Premier V5.0<sup>[17]</sup>设计候选内参基因引物, 如表 1 所示。引物由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

#### 1.2.3 mRNA 反转录

按照 PrimeScript RT Reagent Kit 操作说明逆转录合成 cDNA,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。PCR 反应体系: 5×Prime Script<sup>®</sup> Buffer (for Real Time) 2  $\mu\text{L}$ , PrimeScript RT Enzyme Mix I 0.5  $\mu\text{L}$ , Oligo dT Primer (50  $\mu\text{mol/L}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ , Random 6 mers ( $10^{-4}$  mol/L) 0.5  $\mu\text{L}$ , 总 RNA 溶液适量(即 CK-AH2、CK-AR2、CK-AH20、CK-AR20、DPI-AH16、DPI-AR16、DPI-AH12、DPI-AR12、MX-AH3、MX-AR3、MX-AH8 和 MX-AR8 等各样品反应体系中加入总 RNA 溶液的体积依次为 6.5、2.0、6.0、5.0、6.5、3.5、6.5、4.0、3.0、6.5、5.0、4.0  $\mu\text{L}$ ), RNase Free dH<sub>2</sub>O 补足 10  $\mu\text{L}$ , 以调平各个反应体系的总 RNA 量为  $5 \times 10^{-7}$  g。反应条件:  $37^{\circ}\text{C}$  反转录反应 15 min;  $85^{\circ}\text{C}$  反转录酶失活反应 5 s, 反转录合成 cDNA 第一链。

表 1 候选内参基因及其引物序列

Table 1 Candidate reference genes and their primer sequences

基因	基因描述	引物序列	扩增片段
Gene	Gene description	Primer sequence (5'→3')	Amplified fragment length (bp)
<i>ACT-1</i>	肌动蛋白 1 Actin 1	AGCCGCTGGTATCCACGAGACA TGTTGTGCCACCGAGAGGACA	103
<i>α-TUB</i>	α-微管蛋白 α-tubulin	CCGCTGCTGTCGCAACGATCAA TGCAAGGTCCTCACGAGCCTCA	293
<i>β-TUB 1</i>	β-微管蛋白 1 β-tubulin 1	ACCTCACGGTGGCTGCTGTCTT TGGTCGCTCACACGCTTGAACA	223
<i>γ-TUB</i>	γ-微管蛋白 γ-tubulin	GTCGTCGTGCAGCCGTACAAC TGCTCGGAGTCGTGGAGACCAT	397
<i>UBQ</i>	泛素 Ubiquitin	TCCCGACCAGCAGCGTCTCATT TGCCACCACGAAGCCGAAGAAC	347
<i>EF-1γ</i>	延长因子-1γ Elongation factor-1γ	TGCTCGGCTCGACTCCAGAAGA TGGCACCGCATTGGATGAAGGC	270
<i>18S rRNA BP</i>	18S rRNA 生物合成蛋白 18S rRNA biogenesis protein	ATAGCGGCCACCAGCACTTTCG TGAGGCAGCGTCACCGTTCGTA	388
<i>GAPDH</i>	甘油醛-3-磷酸脱氢酶 Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	TGTTTCGTCGTCGGCGTCAACCT CCTTTGCGGCACCAGTGGAAGA	258

#### 1.2.4 候选内参基因扩增

用 T100 Thermal Cycler PCR 仪对内参基因进行扩增, 内参 PCR 反应体系(25 μL): 2×Phanta Max Master Mix 12.5 μL, Phanta Max Super Fidelity DNA Polymerase (1 U/μL) 0.5 μL, dNTP Mix (10 mol/L) 0.5 μL, cDNA 模板(25 ng/μL) 1 μL, 正、反向引物(10 μmol/L)各 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL。反应条件: 95 °C 3 min; 94 °C 30 s, 62 °C (*α-TUB* 的退火温度为 60 °C) 30 s, 72 °C 30 s, 34 个循环; 72 °C 7 min。

#### 1.2.5 RT-qPCR 扩增效率检测

将反转录产物 cDNA 以 10 倍比梯度稀释, 依次稀释 5 个梯度。以稀释好的 cDNA 为模板, 根据 Light Cycler<sup>®</sup>480II 软件生成的循环和实时荧光定量 PCR 仪进行 RT-qPCR 反应, 每个反应 3 次重复。反应体系及条件参考文献[18], 反应体系: 2×SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 7.5 μL, 正、反向引物(10 nmol/L)各 0.3 μL, cDNA 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足 15 μL。PCR 反应条件: 95 °C 30 s;

95 °C 5 s, 60 °C 20 s, 40 个循环, 反应结束绘制溶解曲线。通过荧光定量 PCR 仪自带软件自动获得交叉点(crossing point, CP)值和解链温度等系列参数。引物扩增效率(*E*)计算公式:  $E=10^{-(1/\text{slope})}$ 。

#### 1.2.6 候选内参基因的 RT-qPCR 及稳定性评价

分别以对照组、抑制剂组和诱导组的菌丝和菌索的 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 反应, 其反应体系和反应条件同 PCR 反应体系和条件, 生物学重复与技术重复均为 3 次, 通过荧光定量 PCR 仪自带软件自动获得 CP 值。

#### 1.2.7 数据分析

利用 BestKeeper 1.0<sup>[14]</sup>程序对各引物在不同样品中的表达量进行统计分析。该程序的算法被嵌入至一个 excel 表中, 将 RT-qPCR 生成的原始数据导入该程序的 excel 表, 程序自主比较得出这些内参基因间 *C<sub>t</sub>* 值产生配对的一些系数, 包括标准偏差(standard deviation, SD)、变异系数(coefficient of variation, CV)和皮尔森相关系



数(Pearson coefficient of correlation,  $\gamma$ )等, 再根据这些参数评价和选取最适内参基因。其评价的原则为:  $C_t$  值在 15–30 之间; 各基因相对表达量的 SD 值为 1.0 设为临界值, 大于临界值则内参基因的表达不稳定, 反之越稳定; CV 越低和  $\gamma$  值越高则基因表达的稳定性越高<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 蜜环菌总 RNA 提取结果

对照组、DPI 组和 MX 组的蜜环菌菌丝与菌

索培养结果如图 1 所示。与对照组(图 1A)相比, DPI 组菌索分支被显著抑制(图 1B), 而当蜜环菌菌索接触木屑后, 在该位点处产生大量的侧向分支菌索, 并向四周延伸(图 1C、1D)<sup>[16]</sup>。

*A. mellea* 541 总 RNA 电泳检测结果如图 2A 所示, 28S、18S 和 5.8S rRNA 条带清晰, 无明显拖尾现象, 表明 RNA 无降解。紫外可见分光光度法测定样品纯度,  $A_{260}/A_{280}$  和  $A_{260}/A_{230}$  均在 2.0 左右, 表明 RNA 纯度良好、无污染, 可进行反转录实验。

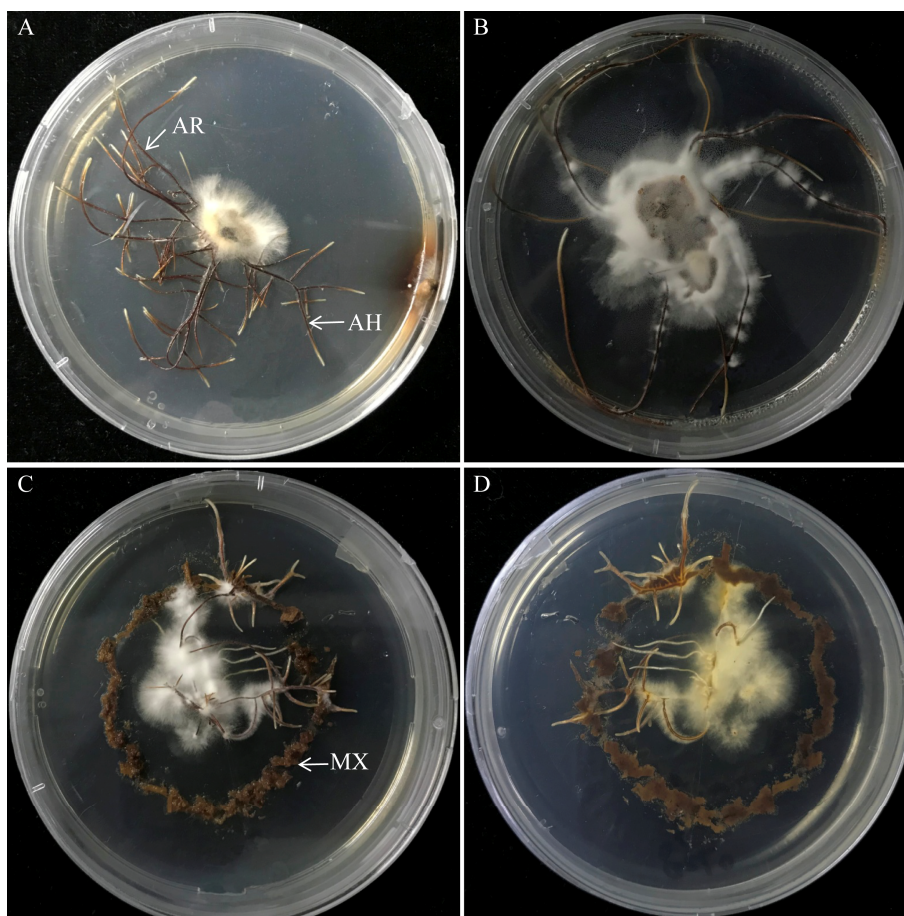
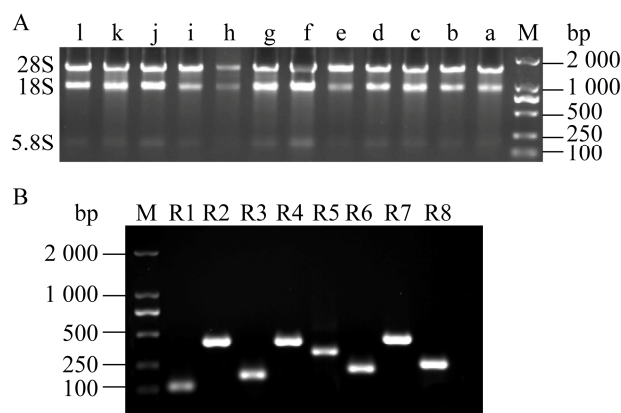


图 1 *A. mellea* 541 在不同培养条件下的菌丝与菌索 A: 对照组; B: DPI 抑制剂组; C: 木屑组(正面); D: 木屑组(反面); AR: 蜜环菌菌索; AH: 蜜环菌菌丝; MX: 木屑

Figure 1 *A. mellea* 541 hypha and rhizomorphs on different culture media. A: control group (CK); B: DPI group; C: MX group (front view); D: MX group (back view); AR: *A. mellea* rhizomorphs; AH: *A. mellea* hypha; MX: sawdust.



**图2** *A. mellea* 541 总 mRNA (A) 和候选内参基因 PCR 电泳图(B) M: DL2000 DNA Marker; a-l: 3 个组别不同生物学样本, 依次为 CK-AH20、CK-AR20、CK-AH2、CK-AR2、DPI-AH12、DPI-AR12、DPI-AH16、DPI-AR16、MX-AH3、MX-AR3、MX-AH8、MX-AR8; R1-R8: 8 个候选内参基因, 依次为 *ACT-1*、*α-TUB*、*β-TUB 1*、*γ-TUB*、*UBQ*、*EF-1γ*、*18S rRNA BP* 和 *GAPDH*

Figure 2 Electrophoresis of total RNA (A) and PCR products of eight reference genes (B) from *A. mellea* 541. M: DL2000 DNA Marker; a-l: Biological samples of CK, DPI and MX groups which included CK-AH20, CK-AR20, CK-AH2, CK-AR2, DPI-AH12, DPI-AR12, DPI-AH16, DPI-AR16, MX-AH3, MX-AR3, MX-AH8, MX-AR8; R1-R8: *ACT-1*, *α-TUB*, *β-TUB 1*, *γ-TUB*, *UBQ*, *EF-1γ*, *18S rRNA BP* and *GAPDH*, respectively.

## 2.2 候选内参基因的 PCR 扩增

对 *A. mellea* 541 的 8 个候选内参基因进行 RT-PCR (reverse transcript PCR), 产物进行凝胶电泳实验均获得单一目的条带, 片段大小与预期结果相一致(图 2B)。表明各个候选内参基因特异性良好, 可进行后续的 RT-qPCR。

## 2.3 候选内参基因的 RT-qPCR

*A. mellea* 541 的 8 个候选内参基因的溶解曲线均为单一的特征峰, 无引物二聚体或非特异性条带(图 3)。

经 RT-qPCR 测定 8 个候选内参基因在 CK、DPI 和 MX 组的菌丝与菌索(共计 12 个生物学样本)中的表达量, 经 BestKeeper 程序处理分析, 结果如图 4 和表 2 所示。所选 8 个候选内参基因 RT-qPCR 的 CP 几何平均数(geometric mean, geo mean)介于 23.38 (*GAPDH*)–28.21 (*α-TUB*)之间, CP 的算数平均数(arithmetic mean, ar mean)介于 23.39 (*GAPDH*)–28.34 (*α-TUB*)之间, 平值均在 15–35 之间, 内参引物设计和试验合理。然而 *α-TUB*、*β-TUB 1*、*γ-TUB* 和 *ACT-1* 这 4 个候选内参基因在所测试样品中表达量的标准差值(SD±CP)较大且均大于 1.0。根据 BestKeeper 程序判定原则, 该 4 条内参基因在蜜环菌菌丝和菌索中为非稳定性表达, 因此剔除。在余下的 4 个候选内参基因中, 变异系数(coefficient of variation, CV)由小到大依次为 *GAPDH*、*EF-1γ*、*UBQ* 和 *18S rRNA BP*。皮尔森相关系数(Pearson coefficient of correlation,  $\gamma$ )检验结果表明, *18S rRNA BP* 的  $\gamma$  值较低, 而且 *P* 值显著高于其余 3 条内参基因, 因此剔除。*UBQ* 的  $\gamma$  值虽然高达 0.923, 但是其 CV 值和 CP 均值均高于 *GAPDH* 和 *EF-1γ*。

*α-TUB*、*β-TUB 1*、*γ-TUB*、*ACT-1*、*UBQ* 和 *18S rRNA BP* 等 6 个候选内参基因经 CP 值标准差、变异系数和皮尔森相关系数检验排除后, 进一步进行了 *EF-1γ* 与 *DAPDH* 扩增效率的比较, 二者标准曲线方程截距(slope)依次为 -2.949 和 -3.696, 回归系数(regression coefficient,  $R^2$ )依次为 0.980 2 和 0.981 5, 扩增效率(PCR efficiency, *E*)依次为 2.183 和 1.865。结合 BestKeeper 计算的相关系数结果, *EF-1γ* 的相关系数值显著优于 *GAPDH*。

综合判定 *EF-1γ* 适合作为蜜环菌研究基因表达的内参基因。

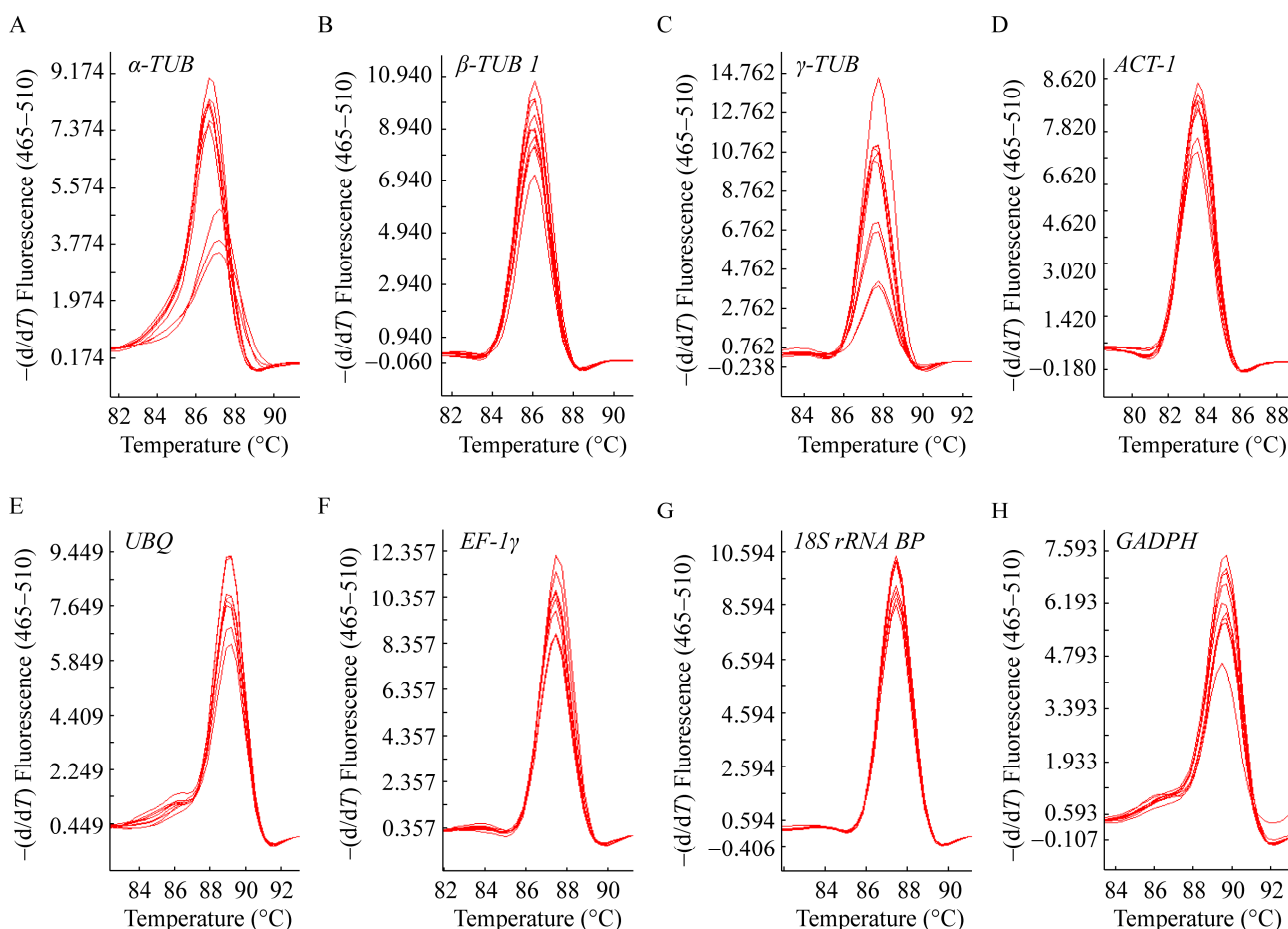


图3 8个内参基因溶解曲线

Figure 3 Melting curves generated for the eight reference genes.

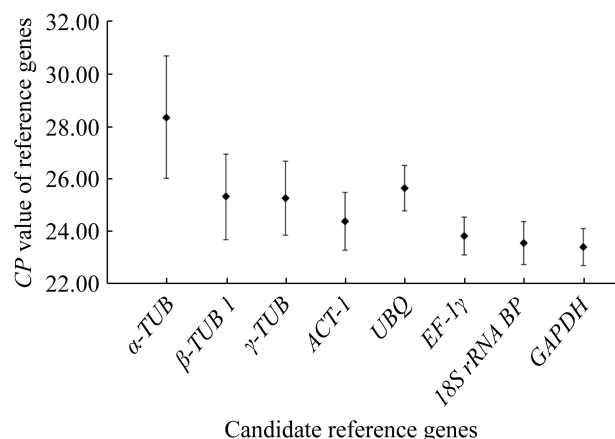


图4 8个内参基因 CP 值分布

Figure 4 CP values of eight reference genes.

### 3 讨论与结论

国内外研究者从生态学、形态学、化学、药理和致病性等多个维度对蜜环菌属真菌进行了相关研究<sup>[2-3,19]</sup>,特别是基因组的测序及分析<sup>[7]</sup>为深入研究蜜环菌属真菌的致病性及其与宿主的相互作用提供了强有力的参考。内参基因是基因表达水平定量的“标准物质”,内参基因的 stable 表达则是研究基因表达模式结果可靠的前提。稳定的内参基因表达不受组织、外界条件等因素影响<sup>[10-11]</sup>。菌丝与菌索均是蜜环菌自然生长状态下存在的组织形式,菌索由菌丝分化形成,菌索产

表 2 *A. mellea* 541 的 8 条候选内参基因 RT-qPCR 参数统计表Table 2 Statistics results of RT-qPCR parameters for the eight candidate internal reference genes of *A. mellea* 541

项目 Item	$\alpha$ -微管蛋白基因 <i><math>\alpha</math>-TUB</i>	$\beta$ -微管蛋白 1 基因 <i><math>\beta</math>-TUB 1</i>	$\gamma$ -微管蛋白基因 <i><math>\gamma</math>-TUB</i>	肌动蛋白 1 基因 <i>ACT-1</i>	泛素基因 <i>UBQ</i>	延长因子 <i>EF-1<math>\gamma</math></i>	18S 核糖体 RNA 合成蛋白基因 <i>18S rRNA BP</i>	甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因 <i>GAPDH</i>
几何平均数 GM (CP)	28.21	25.24	25.18	24.32	25.61	23.79	23.52	23.38
算数平均数 AM (CP)	28.34	25.32	25.25	24.37	25.63	23.81	23.55	23.39
最小值 Min (CP)	25.31	22.46	21.88	21.74	23.14	21.57	20.95	21.36
最大值 Max (CP)	34.33	29.80	29.80	28.45	28.12	26.07	25.73	25.56
标准差 SD ( $\pm$ CP)	2.33	1.65	1.41	1.10	0.86	0.72	0.82	0.70
变异系数 CV (%CP)	8.23	6.50	5.57	4.51	3.37	3.02	3.47	3.01
皮尔森相关系数 Pearson coefficient of correlation ( $\gamma$ )	0.885	0.943	0.928	0.967	0.923	0.858	0.574	0.790
<i>P</i> 值 <i>P</i> -value	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.032	0.001

注: 样品数: 14; CP: 交叉点; GM: 几何平均数; AM: 算数平均数; CV: 变异系数;  $\gamma$ : 皮尔森相关系数Note: Number of samples: 14; CP: Crossing point; GM: Geometric mean; AM: Arithmetic mean; CV: Coefficient of variance;  $\gamma$ : Pearson coefficient of correlation.

生侧向分支侵入猪苓或天麻体内,并为二者提供营养物质<sup>[20-21]</sup>。前期研究结果表明,蜜环菌菌丝与菌索在基因、蛋白表达水平等方面不尽相同<sup>[22-23]</sup>。因此,本研究将菌丝与菌索作为筛选内参基因的组织。菌索分支数量是评价蜜环菌优劣的指标,也影响天麻等的产量<sup>[24]</sup>。NADPH 氧化酶抑制剂 DPI 可以抑制蜜环菌菌索分支(图 1B);而木材作为蜜环菌的消解底物,与蜜环菌共培养后,在接触位点处产生大量分支(图 1C 和 1D)<sup>[16]</sup>。因此,本研究将添加 DPI 或木屑培养的蜜环菌菌丝与菌索作为外界诱因的产物。研究还发现,编码 18S rRNA 的内参基因<sup>[25]</sup>在某些处理的菌丝或菌索中并不能稳定地表达,因此,筛选表达量稳定的蜜环菌内参基因十分必要。

*ACT* 和 *TUB* 是一类常见的管家基因,均高度保守,编码的肌动蛋白和微管蛋白在细胞中的表达量也较高,在球根白丝膜菌(*Leucocortinarius bulbiger*)、稻曲病菌(*Ustilaginoidea virens*)和小麦

条锈病菌(*Puccinia striiformis* sp. *tritici*)等不同发育阶段菌丝中都较稳定地表达,常与 *UBQ* 作为基因表达定量的内参基因<sup>[26-28]</sup>。本研究中,*ACT-1*、 *$\alpha$ -TUB*、 *$\beta$ -TUB 1*、 *$\gamma$ -TUB*、*UBQ* 和 *18S rRNA BP* 的  $\gamma$  值较低的 6 个内参基因在不同处理蜜环菌菌丝和菌索中的表达稳定性不及其余候选内参基因,CP 值标准偏差、变异系数等较大,不适宜作为目标基因定量的内参基因。*GAPDH* 是另一种表达相对稳定的内参基因,赵小龙<sup>[29]</sup>对包括 *GAPDH* 在内的茯苓的 10 个内参基因进行了比较筛选,发现 *GAPDH* 在茯苓的不同生长阶段、不同组织和不同逆境环境下均稳定表达,优于 *TUB*、*ACT* 等其他内参基因。*EF* 基因编码信使 RNA 翻译时的肽链延伸因子在金线莲(*Anoectochilus roxburghii*)、新蚜虫病霉(*Pandora neoaphidis*)等不同组织和不同营养条件下表达稳定<sup>[13,30]</sup>。本研究结果表明,在菌丝与菌索间以及抑制和促进 *A. mellea* 541 生长的环境下,

评价 *GAPDH* 和 *EF-1 $\gamma$*  作为内参稳定性的参数均优于其余候选内参基因, 适宜作为 *A. mellea* 基因表达模式研究的内参基因, 其中以 *EF-1 $\gamma$*  为最优, 这为蜜环菌属真菌功能基因表达研究提供了参考。

## REFERENCES

- [1] Floudas D, Binder M, Riley R, Barry K, Blanchette RA, Henrissat B, Martínez AT, Otillar R, Spatafora JW, Yadav JS, et al. The Paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes[J]. *Science*, 2012, 336(6089): 1715-1719
- [2] Baumgartner K, Coetzee MPA, Hoffmeister D. Secrets of the subterranean pathosystem of *Armillaria*[J]. *Molecular Plant Pathology*, 2011, 12(6): 515-534
- [3] 郭顺星, 徐锦堂. 天麻消化紫萁小菇及蜜环菌过程中细胞超微结构变化的研究[J]. *真菌学报*, 1990, 9(3): 218-225, 249  
Guo SX, Xu JT. Studies on the cell ultrastructure in the course of *Gastrodia elata* digesting *Mycena osmundicola* Lange and *Armillaria mellea* Fr.[J]. *Mycosystema*, 1990, 9(3): 218-225, 249 (in Chinese)
- [4] 刘蒙蒙, 邢咏梅, 郭顺星. 药用真菌猪苓共生的蜜环菌种类研究[J]. *中国药学杂志*, 2015, 50(5): 390-393  
Liu MM, Xing YM, Guo SX. Investigation of symbiotic *Armillaria* species with Chinese traditional medicinal fungus *Polyporus umbellatus*[J]. *Chinese Pharmaceutical Journal*, 2015, 50(5): 390-393 (in Chinese)
- [5] 王锐, 张诗悦, 穆青. 蜜环菌的化学成分及生物活性研究进展[J]. *中草药*, 2016, 47(11): 1992-1999  
Wang R, Zhang SY, Mu Q. Research progress in chemical constituents and biological activities of *Armillaria mellea*[J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2016, 47(11): 1992-1999 (in Chinese)
- [6] Mesanza N, Iturriza E, Patten CL. Native rhizobacteria as biocontrol agents of *Heterobasidion annosum* s.s. and *Armillaria mellea* infection of *Pinus radiata*[J]. *Biological Control*, 2016, 101: 8-16
- [7] Sipos G, Prasanna AN, Walter MC, O'Connor E, Bálint B, Krizsán K, Kiss B, Hess J, Varga T, Slot J, et al. Genome expansion and lineage-specific genetic innovations in the forest pathogenic fungi *Armillaria*[J]. *Nature Ecology & Evolution*, 2017, 1(12): 1931-1941
- [8] 黄靖雯, 刘娟, 周骏辉, 袁媛, 杨全, 黄璐琦. 高卢蜜环菌几丁质酶基因的生物信息学分析与表达[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(6): 1151-1155  
Huang JW, Liu J, Zhou JH, Yuan Y, Yang Q, Huang LQ. Bioinformatics analysis and expression of chitinase genes in *Armillaria gallica*[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2019, 44(6): 1151-1155 (in Chinese)
- [9] 束红梅, 徐筋燕, 何晓兰, 郭书巧. 栝楼实时荧光定量PCR内参基因的筛选与验证[J/OL]. *分子植物育种*, 2021 [2021-05-13]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210513.0903.002.html>  
Shu HM, Xu JY, He XL, Guo SQ. Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in *Trichosanthes kirilowii maxim*[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2021 [2021-05-13]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210513.0903.002.html> (in Chinese)
- [10] 王蕊, 胡绍旺, 刘金凤, 张毓哲, 姜玉石, 刘思言, 史安迪. 大豆不同发育时期及非生物胁迫下实时荧光定量PCR内参基因筛选[J/OL]. *吉林农业大学学报*, 2021 [2021-06-02]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1100.S.20210602.1200.006.html>  
Wang R, Hu SW, Liu JF, Zhang YZ, Jiang YS, Liu SY, Shi AD. Screening of reference genes under abiotic stress and different development stages of soybean by real-time fluorescence quantitative PCR[J/OL]. *Journal of Jilin Agricultural University*, 2021 [2021-06-02]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/22.1100.S.20210602.1200.006.html> (in Chinese)
- [11] Jung M, Ramankulov A, Roigas J, Johannsen M, Ringsdorf M, Kristiansen G, Jung K. In search of suitable reference genes for gene expression studies of human renal cell carcinoma by real-time PCR[J]. *BMC Molecular Biology*, 2007, 8(1): 1-13
- [12] Song Y, Wang Y, Guo DD, Jing L. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in the plant pathogen *Puccinia helianthi* Schw[J]. *BMC Plant Biology*, 2019, 19(1): 20
- [13] Zhang G, Zhao MM, Song C, Luo AX, Bai JF, Guo SX. Characterization of reference genes for quantitative real-time PCR analysis in various tissues of *Anoectochilus roxburghii*[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(5): 5905-5912
- [14] Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-excel-based tool using pair-wise correlations[J]. *Biotechnology Letters*, 2004, 26(6): 509-515
- [15] Liu MM, Xing YM, Zeng X, Zhang DW, Guo SX. Genetic diversity of *Armillaria* spp. symbiotic with



- Polyporus umbellatus* in China[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2015, 61: 524-530
- [16] 李兵, 刘柳, 郭顺星. 蜜环菌菌索形成及分支过程中钙离子流的非损伤微测[J]. 菌物研究, 2021, 19(2): 108-114
- Li B, Liu L, Guo SX. Calcium ion flux characters of *Armillaria mellea* during rhizomorphs differentiation and branching by non-invasive micro-test technique[J]. Journal of Fungal Research, 2021, 19(2): 108-114 (in Chinese)
- [17] Wu JS, Lee C, Wu CC, Shiue YL. Primer design using genetic algorithm[J]. Bioinformatics: Oxford, England, 2004, 20(11): 1710-1717
- [18] 刘思思, 张岗, 陈晓梅, 李淑超, 陈娟, 郭顺星. 铁皮石斛赤霉素 3-氧化酶基因的克隆及表达分析[J]. 中草药, 2016, 47(6): 990-996
- Liu SS, Zhang G, Chen XM, Li SC, Chen J, Guo SX. Cloning and expression analysis of gibberellin 3-oxidase gene in *Dendrobium officinale*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2016, 47(6): 990-996 (in Chinese)
- [19] Muszyńska B, Sułkowska-Ziaja K, Wołkowska M, and Ekiert H. Chemical, pharmacological, and biological characterization of the culinary-medicinal honey mushroom, *Armillaria mellea* (Vahl) P. Kumm. (*Agaricomycetideae*): a review[J]. International Journal of Medicinal Mushrooms, 2011, 13(2): 167-175
- [20] 徐锦堂, 郭顺星. 猪苓与蜜环菌的关系[J]. 真菌学报, 1992, 11(2): 142-145, 170
- Xu JT, Guo SX. The relationship between *Armillariella mellea* and *Grifola umbellata*[J]. Mycosystema, 1992, 11(2): 142-145, 170 (in Chinese)
- [21] 徐锦堂, 牟春. 天麻原球茎生长发育与紫萁小菇及蜜环菌的关系[J]. 植物学报, 1990, 32(1): 26-31, 93
- Xu JT, Mu C. The relation between growth of *Gastrodia elata* protocorms and fungi[J]. Journal of Integrative Plant Biology, 1990, 32(1): 26-31, 93 (in Chinese)
- [22] 李兵, 刘柳, 单婷婷, 郭顺星. 蜜环菌糖苷水解酶家族基因在菌索与菌丝间的差异表达分析[J]. 菌物学报, 2021, 40(6): 1369-1379
- Li B, Liu L, Shan TT, Guo SX. Analyses of the glycoside hydrolase family genes and their differential expressions between rhizomorphs and hypha in *Armillaria mellea*[J]. Mycosystema, 2021, 40(6): 1369-1379 (in Chinese)
- [23] 李兵, 刘柳, 郭顺星. 蜜环菌菌索分化的差异蛋白质组学研究[J]. 菌物学报, 2021, 40(6): 1357-1368
- Li B, Liu L, Guo SX. Differential proteome of *Armillaria mellea* in association with fungal rhizomorph differentiation[J]. Mycosystema, 2021, 40(6): 1357-1368 (in Chinese)
- [24] 陈明义, 李福后, 边银丙. 蜜环菌不同菌株对天麻产量的影响[J]. 食用菌学报, 2004, 11(1): 46-48
- Chen MY, Li FH, Bian YB. Effect of different strains of *Armillariella mellea* on the yield of *Gastrodia elata*[J]. Acta Edulis Fungi, 2004, 11(1): 46-48 (in Chinese)
- [25] 谭戡文, 包焱, 操璟璟, 张恒丽, 陈丽梅, 徐慧妮, 李昆志. 蜜环菌与天麻共生分子机制的转录组分析[J]. 中草药, 2018, 49(17): 4125-4130
- Tan YW, Bao Y, Cao JJ, Zhang HL, Chen LM, Xu HN, Li KZ. Transcriptome analysis on symbiotic molecular mechanism of *Armillaria mellea* and *Gastrodia elata*[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(17): 4125-4130 (in Chinese)
- [26] 黄雪玲, 冯浩, 康振生. 小麦条锈菌实时荧光定量PCR 分析中内参基因的选择[J]. 农业生物技术学报, 2012, 20(2): 181-187
- Huang XL, Feng H, Kang ZS. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR normalization in *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2012, 20(2): 181-187 (in Chinese)
- [27] 张虹, 峥嵘. 球根白丝膜菌  $\gamma$ -actin 基因的克隆及表达分析[J]. 生物技术通报, 2016, 32(7): 131-137
- Zhang H, Zheng R. Cloning and expression analysis of  $\gamma$ -actin gene from *Leucocortinarius bulbiger*[J]. Biotechnology Bulletin, 2016, 32(7): 131-137 (in Chinese)
- [28] 盘林秀, 王娜, 王爱军, 夏园, 付成林, 殷得所, 郑爱萍. 稻粒黑粉病菌实时荧光定量PCR 内参基因筛选[J]. 植物病理学报, 2018, 48(5): 640-647
- Pan LX, Wang N, Wang AJ, Xia Y, Fu CL, Yin DS, Zheng AP. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in *Tilletia horrida*[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 2018, 48(5): 640-647 (in Chinese)
- [29] 赵小龙. 茯苓 qRT-PCR 内参基因筛选的研究[D]. 武汉: 武汉轻工大学硕士学位论文, 2016
- Zhao XL. Selection of reference gene for qRT-PCR in *Wolfiporia cocos*[D]. Wuhan: Master's Thesis of Wuhan Polytechnic University, 2016 (in Chinese)
- [30] 薛承美, 解廷娜, 叶素丹, 陈春. 利用实时荧光定量PCR 筛选新蚜虫病毒内参基因[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(12): 1575-1583
- Xue CM, Xie TN, Ye SD, Chen C. Reference gene selection for quantitative real-time PCR in *Pandora neoaphidis*[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(12): 1575-1583 (in Chinese)