

研究报告

金针菇几丁质合成酶基因家族鉴定及其表达分析

陈宇, 唐英琪, 王含蕊, 刘澳, 王庆佶*, 王威*

山东农业大学植物保护学院 山东省农业微生物重点实验室, 山东 泰安 271018

陈宇, 唐英琪, 王含蕊, 刘澳, 王庆佶, 王威. 金针菇几丁质合成酶基因家族鉴定及其表达分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(2): 612-625.

CHEN Yu, TANG Yingqi, WANG Hanrui, LIU Ao, WANG Qingji, WANG Wei. Characterization and expression analysis of chitin synthase family in *Flammulina filiformis*[J]. Microbiology China, 2024, 51(2): 612-625.

摘要: 【背景】几丁质是真菌细胞壁的重要成分, 由几丁质合成酶(chitin synthase, CS)催化合成。几丁质合成酶编码基因在大型食用真菌金针菇中的数量及表达规律尚不明确。【目的】探究几丁质合成酶基因在金针菇中存在的数量及其在子实体不同发育时期的表达规律, 为其在大型真菌子实体生长发育过程中的功能研究提供基础。【方法】基于已有的金针菇菌株 L11 基因组数据, 结合 NCBI 其他真菌 CS 序列鉴定金针菇中几丁质合成酶编码基因的数量, 并对其进行生物信息学分析。进一步根据金针菇 F19 转录组数据以及实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 技术分析金针菇 CS 基因家族的表达规律。【结果】在金针菇单核体菌株 L11 的基因组中鉴定到 9 个几丁质合成酶基因, 系统发育分析表明它们在子实体发育过程中的表达模式可分为 4 类(皮尔森相关系数=0.85)。【结论】金针菇 CS 基因家族表达模式在金针菇不同生长发育时期均存在差异, 可能参与了子实体发育不同时期和组织的形态建成。

关键词: 金针菇; 几丁质合成酶; 转录组; 实时荧光定量 PCR; 表达分析

资助项目: 国家自然科学基金(31902086); 山东省现代农业产业技术体系食用菌产业体系(SDAIT-07-06); 山东省自然科学基金(ZR2023QC220)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31902086), the Mushroom Technology System of Shandong Province (SDAIT-07-06), and the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2023QC220).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Qingji, ericwong@sdau.edu.cn; WANG Wei, uniwangwei@sdau.edu.cn

Received: 2023-07-18; Accepted: 2023-08-21; Published online: 2023-09-27

Characterization and expression analysis of chitin synthase family in *Flammulina filiformis*

CHEN Yu, TANG Yingqi, WANG Hanrui, LIU Ao, WANG Qingji*, WANG Wei*

Shandong Provincial Key Laboratory of Agricultural Microbiology, College of Plant Protection, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China

Abstract: [Background] In fungi, chitin is an important component of the cell wall and synthesized under the catalysis of chitin synthase (CS). Its presence and expression pattern in *Flammulina filiformis* remain unclear. [Objective] To investigate the number of CS genes and their expression patterns in *F. filiformis* at different development stages, so as to provide a basis for revealing the roles of these genes in the growth and development of macrofungi. [Methods] The genome data of *F. filiformis* L11 and the CS sequences of other fungi in the NCBI database were employed to identify the CS genes in *F. filiformis*. Bioinformatics analysis and phylogenetic analysis were then carried out for these genes. Furthermore, the transcriptome data of *F. filiformis* F19 and RT-qPCR were employed to analyze the expression patterns of the CS gene family in *F. filiformis*. [Results] In the genome of the single-spore strain L11 of *F. filiformis*, nine chitin synthase genes were identified. Phylogenetic analysis revealed that they belong to four distinct classes. The expression patterns of these genes during fruiting body development can be classified into four categories (Pearson correlation coefficient=0.85). [Conclusion] The expression patterns of the CS gene family in *F. filiformis* show variations at different growth and developmental stages, indicating their potential involvement in morphogenesis of different tissues and developmental stages in the fruiting body formation of *F. filiformis*.

Keywords: *Flammulina filiformis*; chitin synthase; transcriptome; real-time fluorescence quantitative PCR; expression analysis

几丁质广泛存在于自然界的动植物和微生物中^[1], 是地球上丰富度仅次于纤维素的第二大有机物^[2]。在昆虫中, 几丁质是构成外骨骼和肠黏膜的重要成分, 能够起到支撑和保护作用^[3]; 在真菌中, 几丁质是真菌细胞壁的关键组成成分之一, 对真菌的生存能力、形态发生和致病机制起到至关重要的作用^[4]。几丁质是一种由 N-乙酰葡萄糖胺(N-acetylglucosamine)通过 β -1,4 糖苷键^[5]连接而成的线性聚合物^[6], 为细胞提供结构支撑和保护。真菌可以将多种糖类(葡萄糖、海藻糖和糖原等)转化为几丁质。几丁质的生物合成途径在不同物种之间高度保守且其合成过程

复杂。在几丁质合成的过程中, 几丁质合成酶(chitin synthase, CS)起着关键作用, 它能够直接催化 UDP-N-乙酰葡萄糖胺聚合合成几丁质, 从而直接影响几丁质合成的部位和效率。几丁质合成酶基因具有高度保守的结合域——CON1 结构域, 该区域包含保守基序 QXXEY、(E/D) DX 和 Q (R/Q)XRW, 这 3 个基序对于催化活性是必不可少的^[7-9]。真菌中几丁质的合成主要集中在出芽部位和菌丝尖端等生长旺盛的部位^[10-11]。在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中, 几丁质合成酶对细胞损伤修复、初级隔膜形成隔膜环、细胞壁的形成发挥重要作用^[12-14]; 在构巢曲霉

(*Aspergillus nidulans*)中, 部分几丁质合成酶对菌丝生长和隔膜生成起重要作用^[15-16]; 在蕈黑粉菌(*Ustilago esculenta*)中, 几丁质合成酶对其菌丝生长、致病能力和出芽生殖等方面发挥重要作用^[17]。

金针菇(*Flammulina filiformis*)又名冬菇、毛柄金钱菌等, 属于真菌界(Fungi)担子菌门(Basidiomycota)伞菌纲(Agaricomycetes)伞菌目(Agaricales)膨瑚菌科(Physalacriaceae)冬菇属(*Flammulina*)。金针菇在自然界分布较广泛, 是一种著名的食药两用真菌^[18-21]。它不仅含有多种营养物质, 还含有丰富的生物活性物质^[22]。金针菇的氨基酸含量非常丰富, 尤其富含赖氨酸和精氨酸, 能促进儿童智力发育, 在国外被称作“智力菇”^[23], 且经常食用也可防治溃疡病^[24]。在我国, 金针菇栽培历史十分悠久, 目前具有稳定的栽培生产模式与逐步扩大的工厂化栽培规模。我国金针菇年产量已达 240 万 t, 是全球金针菇年生产量最多的国家^[25]。子实体是食用菌的主要商品部位, 也是真菌生长繁殖的重要结构, 其发育受到多基因协同调控。几丁质在子实体不同发育时期和部位的合成规律对揭示食用菌子实体发育的调控机制具有重要参考意义。目前, 真菌几丁质合成酶的研究主要集中在酵母菌和植物致病真菌侵染机制方面, 几丁质合成酶在以金针菇为代表的食用菌中的数量以及在子实体生长发育中的表达规律仍需要深入研究。

转录组学(Transcriptomics)是研究细胞整体的基因转录情况和调控规律, 进而揭示某种特定生物学过程分子机理的一门学科^[26]。换言之, 转录组学是在 RNA 水平上研究全基因组的表达情况^[27-28]。转录组学系统地揭示细胞中基因表达调控规律与生命活动的基本机制, 目前已成为食用菌分子育种研究领域不可或缺的方法之一^[29]。本研究基于金针菇基因组数据, 并对金

针菇 CS 基因家族进行鉴定和分析, 结合转录组数据研究其在子实体发育过程中的表达规律, 并使用实时荧光定量 PCR (real-time fluorescence quantitative PCR, RT-qPCR)进行验证。本研究对真菌几丁质合成酶的功能研究以及食用菌子实体发育的调控机制的解析具有一定参考价值。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

研究菌株为金针菇双核体菌株 F19 (菌种保存编号为 F0030), 由福建省食用菌种质资源保藏与管理中心提供。F19 出菇方法参照文献[30]进行。菌株 F19 使用常规袋栽进行出菇栽培, 培养料配方: 棉籽壳 53.5%, 麸皮 25%, 木屑 20%, 石膏 1%, 石灰 0.5%, 含水量 60%。菌丝在 25 °C 培养 25 d, 长满栽培瓶后 15 °C 进行低温刺激, 空气相对湿度控制在 85%左右, 并适当给予弱光刺激以诱导金针菇出菇^[30]。原基(primordium, PR)、伸长期菌柄(elongation stipe, ES)和菌盖(elongation pileus EP)、成熟期菌柄(maturation stipe, MS)和菌盖(maturation pileus MP)样品^[31]等所有样品(图 1)采集后均立即存放于液氮中备用。

1.2 主要试剂和仪器

葡萄糖、 KH_2PO_4 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 CaSO_4 和 CaO 等试剂, 天津市凯通化学试剂有限公司; DNA 提取试剂盒、植物总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和荧光定量(ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix)试剂盒, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司。超净工作台, 苏净集团苏州安泰空气技术有限公司; 智能生化培养箱, 合肥华德利科学器材有限公司。

1.3 金针菇 CS 家族基因鉴定

金针菇单核体菌株 L11 基因组数据已提交至 GenBank, 登录号为 APIA000000000

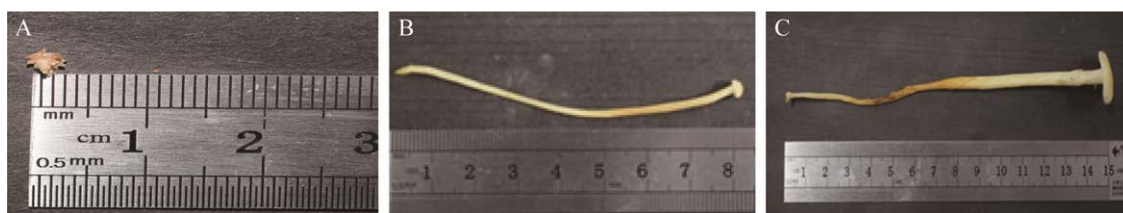


图 1 金针菇子实体不同发育时期组织样品 A: 原基. B: 伸长期. C: 成熟期

Figure 1 Samples of different developmental stages of *Flammulina filiformis*. A: Primordium. B: Elongation. C: Maturation.

(BioProject191865)。菌株 L11 由菌株 F19 通过原生质体单核化方法得到^[32]。先使用 NCBI 在线网站查找到真菌模式生物酿酒酵母(S288C)中 3 种 CS 蛋白序列, 然后通过本地 BLAST 软件($E \leq 10^{-5}$)与菌株 L11 的数据库进行比对。将获得的金针菇 CS 同源基因与 NCBI 中 NR 数据库在线 BLAST 比对确认, 同时对金针菇 CS 基因编码蛋白中保守结构域 CON1 进行鉴定。

1.4 金针菇 CS 家族基因生物信息学分析

根据已得到的金针菇 CS 基因序列, 使用 MOTIF (<https://www.genome.jp/tools/motif/>) 分析其编码蛋白的保守域种类, 然后使用在线程序 MEME (<https://meme-suite.org/meme/>) 对金针菇的 CS 家族蛋白保守基序(motif)进行搜索。使用 DeepTMHMM (<https://dtu.biolib.com/DeepTMHMM>) 进行跨膜域预测。使用在线网站 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_sopma.html) 进行蛋白的二级结构分析[number of conformational states: 4 (helix, sheet, turn, coil); similarity threshold: 8; window width: 17]。使用在线预测软件 WoLF PSORT (<https://wolfsort.hgc.jp/>) 对金针菇 9 个 CS 家族基因编码的蛋白进行亚细胞定位分析。

为进一步探究金针菇 CS 基因之间的遗传亲缘关系, 将金针菇 CS 蛋白序列与 NCBI 的已知 CS 蛋白序列真菌, 即构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、灰葡萄孢

(*Botrytis cinerea*)、白姬松茸(*Leucoagaricus* sp.)、灵芝(*Ganoderma lucidum*)、糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)、香菇(*Lentinula edodes*)、双孢菇(*Agaricus bisporus*)和刺芹侧耳(*Pleurotus eryngii*) 利用本地进化树软件 MEGA 5 中的邻接法 (neighbor-joining method, NJ) 构建进化树, 参数设置为 p-distances Model 和 bootstrap=1 000。

1.5 基因差异表达分析

金针菇不同生长发育时期的样品及转录组测序结果参照吕晓萌^[31]的研究, 转录组数据已提交至 NCBI, 登录号为 PRJNA725643。蛋白编码基因表达量的计算使用 FPKM (fragments per kb per million reads) 法, 即每百万 fragments 中来自某一蛋白编码基因每千碱基长度的 fragments 数目^[33]。使用软件 Origin2021^[34]对金针菇 CS 家族基因表达量进行聚类分析并构建热敏图。

1.6 实时荧光定量 PCR

采用实时荧光定量 PCR 的方法检测金针菇不同时期 CS 基因的表达量。首先进行 RNA 提取, 参考文献[35]描述的方法: F19 菌丝扭结形成原基后 10、25 和 30 d, 用消毒解剖刀取各时期样品进行冷激处理并用锡箔纸进行封存, 置于 -80°C 超低温冰箱进行保藏备用。提取样品总 RNA, 将金针菇各时期样品 RNA 反转录成 cDNA, 置于 -20°C 保存备用。

采用金针菇的 β -Actin (*ACTB*) 和 3-磷酸甘

油醛脱氢酶(*GAPDH*)基因作为 RT-qPCR 的内参基因^[36-37],其基因上、下游引物(表 1)由青岛睿博兴科生物技术有限公司合成。使用配套试剂进行 RT-qPCR,按照其使用说明书进行(两步法) RT-qPCR 反应体系配制及程序设定,退火温度设置为 60 °C,40 个循环反应,每个基因设置 3 个生物学重复及 3 个技术重复。根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算可得基因相对表达量^[38-39]。

2 结果与分析

2.1 金针菇 CS 基因家族结构分析

通过使用本地 BLAST 对金针菇数据与已知

真菌 CS 蛋白同源比对,在金针菇单核体菌株 L11 的基因组 11 526 个预测基因中鉴定到 9 个 CS 蛋白编码基因(表 2),分别编号为 *CS1*–*CS9*。通过 genome 软件对金针菇 9 类 CS 基因的氨基酸序列进行结构域分析,发现 *CS1*、*CS3*、*CS9*、*CS4* 和 *CS5* 都含有催化结构 1 (Chitin_synth_1N)、催化结构域 2 (Chitin_synth_1)和催化结构域 3 (Chitin_synth_2),而 *CS6*、*CS8*、*CS2* 和 *CS7* 只含有催化结构域 3 (Chitin_synth_2)。将下载的蛋白序列利用 MEME 对金针菇 CS 家族蛋白的保守基序进行分析,结果显示金针菇基因组 9 个 CS 基因家族蛋白序列搜索到 3 个保守基序(图 2)。

表 1 荧光定量 PCR 所用引物

Table 1 Primer used for RT-qPCR

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'→3')	产物长度 Product size (bp)
ACTB-F	GATCGTATGCAGAAGGAGTTGACAC	167
ACTB-R	CCACTCTCGTCGTA CTCTTGCTTG	
GAPDH-F	CCTCTGCTCACTTGAAGGGT	127
GAPDH-R	GCGTTGGAGATGACTTTGAA	
CS2-F	GCGACCCGTTTAGTTTTAGGA	282
CS2-R	CGGTGGATACATCATCTGGC	
CS3-F	ATACCGCTTCCGTGCTATCCA	240
CS3-R	TCAACCACCTCTTCTGGGACA	
CS4-F	TCTGGAAGATGCGTCATTTGG	205
CS4-R	AGCAGAAACAATCACAGCCG	

表 2 金针菇基因组中 9 个 CS 蛋白编码基因

Table 2 Nine CS protein-coding genes in the *Flammulina filiformis* genome

基因名称 Gene name	基因编号 Gene ID	特征结构域 Feature domains
<i>CS1</i>	Gene139	Chitin_synth_1N; Chitin_synth_1; Chitin_synth_2
<i>CS2</i>	Gene143	Chitin_synth_2
<i>CS3</i>	Gene925	Chitin_synth_1N; Chitin_synth_1; Chitins_ynth_2
<i>CS4</i>	Gene4164	Chitin_synth_1N; Chitin_synth_1; Chitin_synth_2
<i>CS5</i>	Gene6735	Chitin_synth_1N; Chitin_synth_1; Chitin_synth_2
<i>CS6</i>	Gene7441	Chitin_synth_2
<i>CS7</i>	Gene7610	Chitin_synth_2
<i>CS8</i>	Gene8145	Chitin_synth_2
<i>CS9</i>	Gene8814	Chitin_synth_1N; Chitin_synth_1; Chitin_synth_2

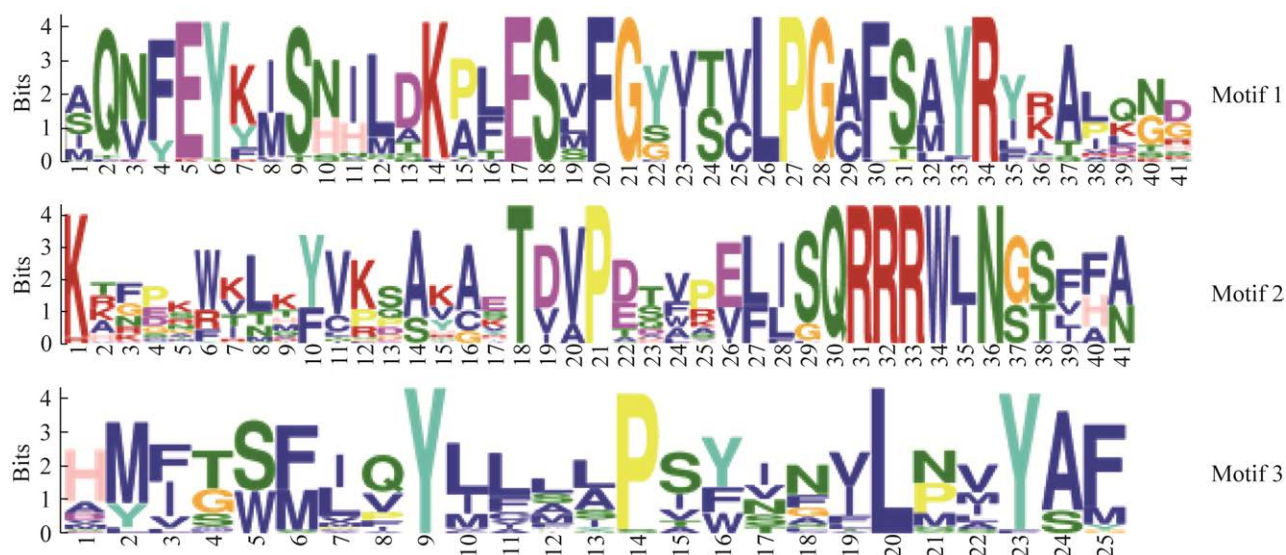


图 2 金针菇 CS 基因家族 3 个保守 motif

Figure 2 Three conserved motif of *Flammulina filiformis* CS gene family.

2.2 金针菇 CS 家族生物信息学分析结果

为了进一步验证金针菇与其他真菌 CS 基因的一致性,对金针菇 CS 蛋白序列与其他真菌中的 CS 蛋白序列均进行了二级结构分析(表 3)。对比结果表明,金针菇 CS 基因编码的蛋白与其他 4 种真菌中 CS 蛋白的二级结构(α -螺旋、延伸链、 β -转角、无规则卷曲)所占比例相似。

进一步对金针菇 CS 基因编码蛋白进行跨膜结构及亚细胞定位分析。结果表明,金针菇 9 个 CS 基因的编码蛋白都有多个跨膜结构的存在,亚细胞定位均在原生质膜上(表 4)。

从系统发育树可知金针菇 CS 蛋白分为 4 类(图 3)。真菌几丁质合成酶家族基因具有较高的相似性,能够分布在 4 个不同进化支上。说明真菌 CS 蛋白家族成员结构较为保守,可能由共同祖先进化而来。金针菇 CS1、CS4 和 CS5 与酿酒酵母 CS2 在同一进化支中(红色),这一进化支的酿酒酵母 CS2 基因所合成的蛋白作用于有丝分裂末期,在母细胞和子细胞之间形成初级隔膜^[40]。金针菇 CS3 和 CS9 与构巢曲霉

CHSB 在同一进化支中(蓝色),这一进化支的构巢曲霉 CHSB 基因所合成的蛋白在控制菌株生长速度、产生孢子、菌丝尖端膨大、侧壁正常生长方面发挥重要作用^[41]。金针菇 CS2 和 CS7 与构巢曲霉 CSmA 在同一进化支中(绿色),这一进化支的构巢曲霉 CSmA 基因所合成的蛋白在低渗透压条件下维持细胞壁的完整性方面发挥重要作用^[42]。金针菇 CS6 和 CS8 与酿酒酵母 CS3 在同一进化支中(黑色),这一进化支的酿酒酵母 CS3 基因所合成的蛋白参与细胞合成过程中大部分几丁质的合成^[43]。

2.3 金针菇 CS 基因家族表达分析

由金针菇基因组中的 9 个 CS 基因在金针菇子实体发育各时期的表达趋势和表达量(图 4)可以看出,这些基因中 CS3 和 CS6 基因各时期表达量较高,CS1、CS2、CS7 和 CS8 相对较高,CS4、CS5 和 CS9 的表达含量相对较低。根据 K-means 分析(皮尔森相关系数),当相关系数为 0.85 时可以将 9 个金针菇 CS 基因为 4 组:第 I 组有 1 个基因,为 CS9;第 II 组有 2 个基因,包含

表 3 金针菇及其他真菌 CS 基因蛋白二级结构分析

Table 3 Analyses of secondary structure of CS gene proteins in *Flammulina filiformis* and other fungi

物种 Species	基因 Gene	α -螺旋 Alpha helix (%)	延伸链 Extended strand (%)	β -转角 Beta turn (%)	无规则卷曲 Random coil (%)
<i>Flammulina filiformis</i>	CS1	35.15	14.21	5.45	45.19
	CS2	37.10	13.54	4.51	44.84
	CS3	38.15	14.24	4.56	43.05
	CS4	35.99	15.01	6.09	42.92
	CS5	37.67	15.21	4.84	42.28
	CS6	28.62	13.69	4.42	52.27
	CS7	33.62	12.24	3.62	50.52
	CS8	24.02	14.37	4.79	56.82
	CS9	38.79	14.46	5.04	41.70
<i>Leucoagaricus</i> sp. SymC.cos	CS1	37.71	15.13	4.45	42.71
	CS2	40.85	16.90	4.87	37.39
	CS3	35.73	15.36	5.45	43.46
	CS4	34.73	16.29	6.91	42.08
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CS1	32.98	12.47	3.54	51.02
	CS2	35.72	13.08	4.05	47.14
	CS3	27.04	16.91	4.89	51.16
<i>Pleurotus ostreatus</i>	CS2	36.34	13.82	4.46	45.38
	CS7	40.91	19.89	7.95	31.25
<i>Agaricus bisporus</i>	CS	38.83	14.30	5.17	41.69

CS4 和 CS5; 第III组有 4 个基因, 包含 CS2、CS3、CS6 和 CS8; 第IV组有 2 个基因, 包含 CS1 和 CS7。基因 CS4 和 CS9 的表达先下调再上调; 基因 CS2 和 CS7 的表达先上调再下调;

表 4 跨膜结构及亚细胞定位分析

Table 4 Transmembrane structures, and subcellular localization analysis

蛋白 Protein	亚细胞定位 Subcellular localization	跨膜结构数量 Number of transmembrane structures
CS1	Plasma membrane	7
CS2	Plasma membrane	6
CS3	Plasma membrane	7
CS4	Plasma membrane	7
CS5	Plasma membrane	7
CS6	Plasma membrane	5
CS7	Plasma membrane	3
CS8	Plasma membrane	7
CS9	Plasma membrane	7

基因 CS3 表达量从原基期的表达明显下调, 在成熟期菌柄含量明显上调后下调; 基因 CS1、CS5、CS6 和 CS8 从原基期到伸长期菌柄的表达明显下调, 到伸长期菌盖上调最后下调。根据皮尔森相关系数分析, 当相关系数为 0.94 时将金针菇 3 个发育时期的 5 个样品组聚类分为 3 组, 第 1 组有 1 个样品(PR), 第 2 组有 3 个样品(ES、MS 和 EP), 第 3 组有 1 个样品(MP)。其中, 伸长期菌柄期和成熟期菌柄的表达相关系数较高, 这 2 个时期与伸长期菌盖的表达相似。

2.4 实时荧光定量 PCR 结果

结合金针菇 CS 基因在金针菇子实体不同发育时期的表达模式, 随机选取 3 个金针菇 CS 基因进一步用 RT-qPCR 验证。结果显示, RT-qPCR 结果趋势与转录组数据表达一致(图 5),

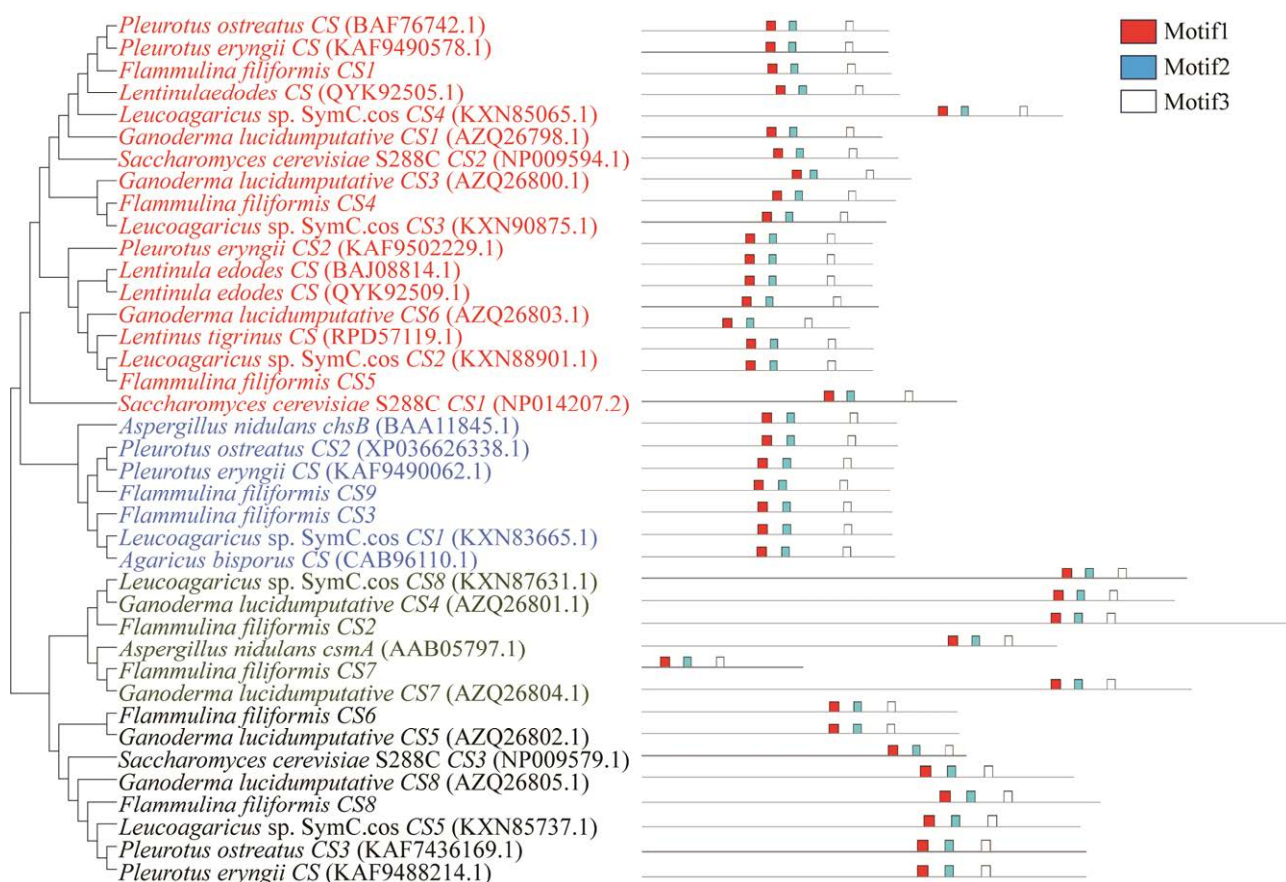


图3 金针菇及其他真菌 CS 基因蛋白发育树及结构比较 不同颜色代表不同进化支，可分为 4 类
Figure 3 Comparison of CS gene protein development tree and structure of and other fungi. Different colors represent different evolutionary branches and can be divided into four categories.

3 个基因 CS2、CS3 和 CS4 分别在伸长期菌盖、原基时期和成熟期菌盖表达量达到了最高峰，并且在不同发育时期表达量也有所差异。

3 讨论与结论

子实体是食用菌的主要食用部分，研究食用菌子实体发育机制具有重要科学意义。金针菇作为我国工厂化栽培较为成熟的食用菌，具有稳定的栽培参数和标准化的培养模式。近年来，科研工作者运用分子生物学技术已经解析了很多与金针菇子实体发育相关的基因功能^[44-47]。

细胞壁被视为真菌细胞的外骨架，能够保

护真菌细胞免受外界环境的影响，并为真菌感染寄主提供穿透力。几丁质是真菌细胞壁的重要组成部分之一，与葡聚糖、甘露聚糖等共同构成细胞外骨架。几丁质合成的关键酶就是几丁质合成酶，真菌几丁质合成酶属于多基因家族。目前对于几丁质合成酶的分类尚未完全统一，主要有两种分类标准^[48-49]，不同学者可能参考的分类标准不同。本研究主要参考 Choquer 的分类标准，根据结构域和进化分析将其分为 4 类^[48]。不同物种中几丁质合成酶的种类和数量有所不同，酿酒酵母中仅存在 3 个 CS 基因^[50]，构巢曲霉中含有 8 个 CS 基因^[51]，但是关于食用菌 CS 基因的研究较少。

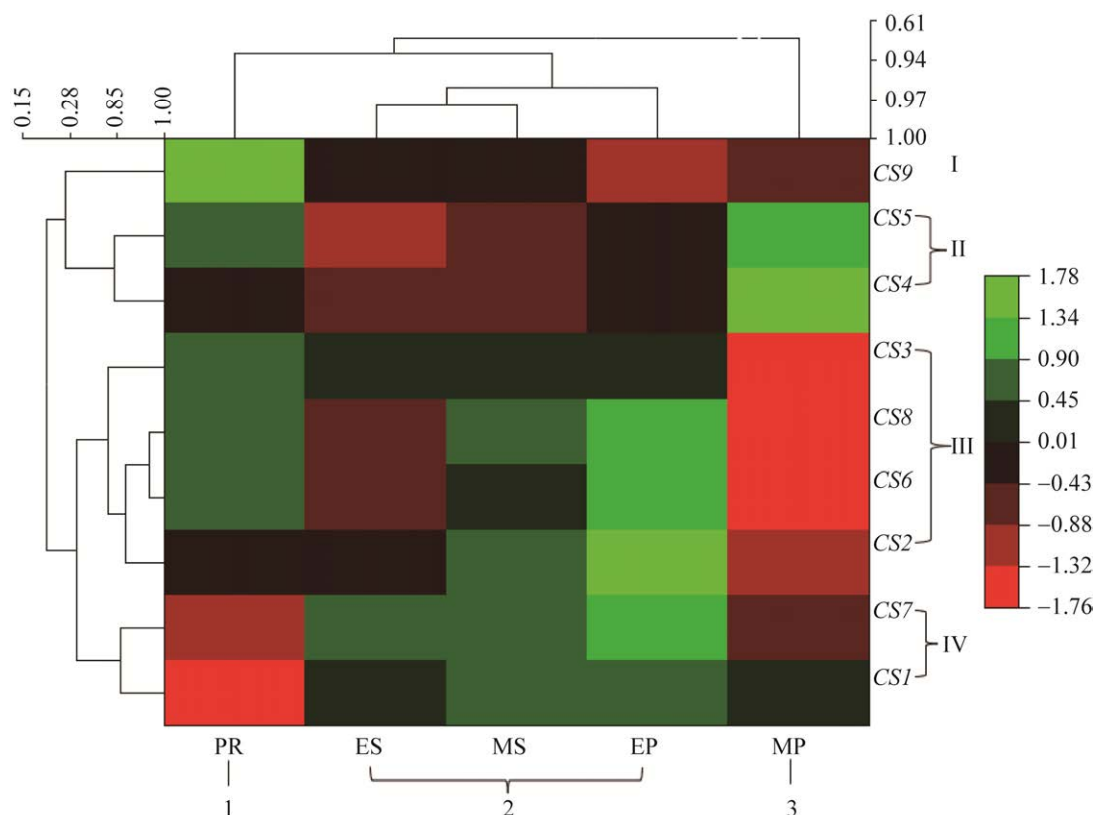


图4 金针菇9个CS基因在金针菇不同生长发育时期的表达热敏图

Figure 4 Heat map of expression of nine CS genes in *Flammulina filiformis* at different growth and development stages.

本研究在金针菇 L11 基因组的基础上,利用本地 BLAST 鉴定金针菇的 CS 基因 CS1–CS9。除含有 CS 基因保守结构域外,CS2 还含有细胞色素 b5 结构域(cyt-b5)、肌球蛋白头结构域(myosin head)^[52]和 DEK 蛋白结构。DEK 蛋白与细胞凋亡密切相关,DEK 蛋白的过表达对细胞凋亡的作用具有双重性,即促进或抑制细胞凋亡^[53];CS4 含有 DUF 蛋白结构域,其参与调控植物生长发育、植物对病虫害的防御反应和植物对非生物胁迫的应答反应等生物学过程^[54];CS8 含有 T2SSI 蛋白结构域,该蛋白负责蛋白质跨膜运输功能^[55]。

利用 DeepTMHMM、MEME 和 SOPMA 等多种生物信息学分析软件和在线网站对金针菇

中的9个CS基因进行生物信息学分析,结果表明所鉴定的这几个基因编码的蛋白与已知真菌中CS基因编码的二级结构比例相似,且均含有跨膜结构。亚细胞定位预测也表明其定位在质膜上。在金针菇生长发育的各个时期鉴定到的金针菇CS基因的表达量均存在显著差异,说明以上CS基因在金针菇生长发育中均发挥一定的作用,但仍需要进行进一步的基因功能验证。

几丁质合成酶广泛分布于真菌和植物细胞中,本研究在金针菇中鉴定到9个几丁质合成酶基因,并初步探究了其表达规律。在金针菇的子实体时期(生殖生长阶段),几丁质合成酶编码基因的表达具有明显的表达差异。在菌柄和菌

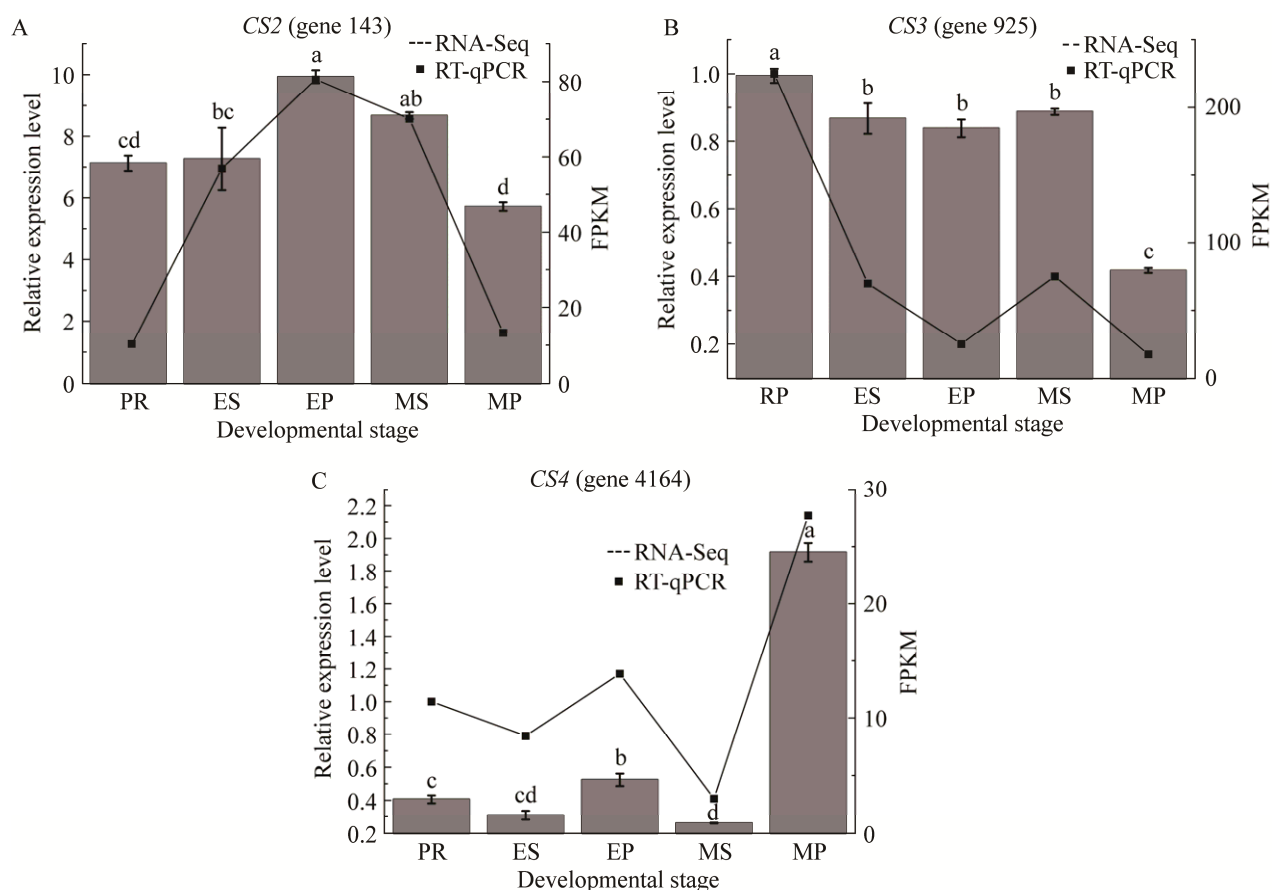


图5 金针菇各发育时期CS基因的表达 A: CS2基因各发育时期FPKM和RT-qPCR. B: CS3基因各发育时期FPKM和RT-qPCR. C: CS4基因各发育时期FPKM和RT-qPCR. PR: 原基; ES: 伸长期菌柄; EP: 伸长期菌盖; MS: 成熟期菌柄; MP: 成熟期菌盖. 数据为平均值±标准误, 不同小写字母表示差异显著($P<0.05$)

Figure 5 Expression of CS genes in various developmental stages of *Flammulina filiformis*. A: FPKM and RT-qPCR of CS2 gene in development stage. B: FPKM and RT-qPCR of CS3 gene in development stage. C: FPKM and RT-qPCR of CS4 gene in development stage. PR: Primordium; ES: Elongation stipe; EP: Elongation pileus; MS: Maturation stipe; MP: Maturation pileus. Data are mean±SE; Different lowercase letters indicate significant differences ($P<0.05$).

盖组织中的表达也具有明显的组织特异性(图4)。由于目前几丁质合成酶基因家族在大型真菌中的研究较少, 结合前人研究分析可知, 几丁质合成酶主要是在维持菌株的正常生长发育、产孢、细胞壁完整性、菌丝体生长速度和其他生理生化特性等方面起着重要的作用^[56]。金针菇几丁质合成酶基因家族中CS2、CS6、CS7和

CS8在伸长期菌盖(EP)中具有其最高的表达水平, 或许在伸长期通过菌盖对某些生理信号进行应答(图4); CS1、CS3在子实体伸长期菌盖(EP)和成熟期菌盖(MP)时期明显下调; CS5和CS9在这两个时期则表现为先下调再上调; CS2、CS6、CS7和CS8表现为先上调后下调; CS4则表现为均上调, 这表明金针菇几丁质合

成酶基因家族可能参与了菌盖伸展以及菌褶和担子的分化过程。*CS2*、*CS7* 在子实体生长发育时期(ES、EP、MS 和 MP)的表达明显高于原基时期(PR), 结合系统发育分析, 这 2 个基因与构巢曲霉 *CsMa* 在同一进化支中, 构巢曲霉 *CsMa* 基因所合成的蛋白在低渗透压条件下维持细胞壁的完整性发挥重要作用^[42], 暗示了 *CS2*、*CS7* 可能在金针菇子实体发育过程中抵抗低渗胁迫重要作用。由于子实体培养适宜温度为 5–12 °C, 而菌丝时期为 20–23 °C, 该基因是否参与到低温胁迫应答也需要进一步探讨。*CS4* 和 *CS5* 在菌盖(EP、MP)的表达量明显高于菌柄(ES、MS), 结合系统发育树结果, 这 2 个基因与酿酒酵母 *CS2* 基因在同一进化支中, 酿酒酵母 *CS2* 基因所编码的蛋白作用于有丝分裂末期, 在母细胞和子细胞之间形成初级隔膜^[40], 说明 *CS4* 和 *CS5* 在金针菇菌盖中参与到细胞分裂过程。*CS3* 和 *CS6* 基因在各个时期均有很高的表达水平, 结合系统发育树结果发现, *CS3* 与构巢曲霉 *CHSB* 在同一进化支中, 构巢曲霉 *CHSB* 基因所合成的蛋白在控制菌株生长速度、产生孢子、菌丝尖端膨大和侧壁正常生长方面发挥重要作用^[41]。*CS6* 与酿酒酵母 *CS3* 在同一进化支中, 酿酒酵母 *CS3* 基因所合成的蛋白参与细胞合成过程中大部分几丁质的合成^[43], 说明 *CS3* 和 *CS6* 基因在金针菇子实体发育时期(生殖生长阶段)发挥重要作用。

在本研究中, 分布在相同进化支上的几丁质合成酶家族基因并未显示相同的表达模式, 系统发育分析主要是根据其保守结构域进行聚类分析, 但基因除保守结构域外的其他区域差异也能影响基因和功能的表达水平^[57]。在几丁质合成酶基因家族的研究中, 对其在模式生物酿酒酵母(S288C)的生长、生殖和病原真菌的感染机制方面研究广泛, 但在可结实的大型真菌

中的报道较少。本研究明确了金针菇中的 9 个几丁质合成酶基因, 并初步表明几丁质合成酶家族的表达与金针菇的子实体形成和发育过程具有相关性。但对其具体参与的生物学过程仍未明确, 下一步将使用分子遗传操作技术, 构建这 9 个基因的过表达和干扰菌株, 明确它们的生物学功能, 从而为深入解析食用菌子实体发育过程中几丁质合成酶基因家族的功能提供一定的参考数据。

致谢

感谢福建省食用菌种质资源保藏与管理中心提供金针菇双核体菌株 F19; 感谢山东省农业微生物重点实验室和山东农业大学菌物实训实践基地为本研究提供试验条件。

REFERENCES

- [1] DAHIYA N, TEWARI R, HOONDAL GS. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 71(6): 773-782.
- [2] 刘兰兰. 昆虫几丁质合成通路的研究进展[J]. 广东蚕业, 2022, 56(5): 96-99, 103.
LIU LL. Research progress of chitin synthesis pathway in insects[J]. Guangdong Canye, 2022, 56(5): 96-99, 103 (in Chinese).
- [3] 杨化恩, 刘守柱, 李友忠, 杜翠敏. 昆虫几丁质合成酶及其抑制剂[J]. 昆虫知识, 2007, 44(5): 769-773.
YANG E, LIU SZ, LI YZ, DU CM. Chitin synthase from insects and its inhibitors[J]. Chinese Bulletin of Entomology, 2007, 44(5): 769-773 (in Chinese).
- [4] 陈丹丹. 真菌几丁质合成酶和 β -(1,3)-葡聚糖合成酶的结构与功能研究[D]. 北京: 北京大学医学部博士学位论文, 2022.
CHEN DD. Study on the structure and function of fungal chitin synthase and β -(1,3)-glucan synthase[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Peking University Health Science Center, 2022 (in Chinese).
- [5] BUETER CL, SPECHT CA, LEVITZ SM. Innate sensing of chitin and chitosan[J]. PLoS Pathogens, 2013, 9(1): e1003080.
- [6] MUZZARELLI RA. Native, industrial and fossil

- chitins[J]. EXS, 1999, 87: 1-6.
- [7] LIU R, XU C, ZHANG QQ, WANG SY, FANG WG. Evolution of the chitin synthase gene family correlates with fungal morphogenesis and adaption to ecological niches[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 44527.
- [8] PACHECO-ARJONA JR, RAMIREZ-PRADO JH. Large-scale phylogenetic classification of fungal chitin synthases and identification of a putative cell-wall metabolism gene cluster in *Aspergillus* genomes[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e104920.
- [9] DORFMUELLER HC, FERENBACH AT, BORODKIN VS, van AALTEN DMF. A structural and biochemical model of processive chitin synthesis[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2014, 289(33): 23020-23028.
- [10] LENARDON MD, MUNRO CA, GOW NAR. Chitin synthesis and fungal pathogenesis[J]. Current Opinion in Microbiology, 2010, 13(4): 416-423.
- [11] MERZENDORFER H. The cellular basis of chitin synthesis in fungi and insects: common principles and differences[J]. European Journal of Cell Biology, 2011, 90(9): 759-769.
- [12] SHAW JA, MOL PC, BOWERS B, SILVERMAN SJ, VALDIVIESO MH, DURÁN A, CABIB E. The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle[J]. The Journal of Cell Biology, 1991, 114(1): 111-123.
- [13] SCHMIDT M. Survival and cytokinesis of *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chitin[J]. Microbiology, 2004, 150(10): 3253-3260.
- [14] SCHMIDT M, BOWERS B, VARMA A, ROH DH, CABIB E. In budding yeast, contraction of the actomyosin ring and formation of the primary septum at cytokinesis depend on each other[J]. Journal of Cell Science, 2002, 115(2): 293-302.
- [15] HORIUCHI H. Functional diversity of chitin synthases of *Aspergillus nidulans* in hyphal growth, conidiophore development and septum formation[J]. Medical Mycology, 2009, 47(S1): S47-S52.
- [16] HORIUCHI H, FUJIWARA M, YAMASHITA S, OHTA A, TAKAGI M. Proliferation of intrahyphal hyphae caused by disruption of *csmA*, which encodes a class V chitin synthase with a myosin motor-like domain in *Aspergillus nidulans*[J]. Journal of Bacteriology, 1999, 181(12): 3721-3729.
- [17] 吴敏. 菰黑粉菌几丁质合成酶家族的功能研究[D]. 杭州: 中国计量大学硕士学位论文, 2019.
- WU M. Functional analysis of chitin synthase family in *Ustilago esculenta*[D]. Hangzhou: Master's Thesis of China Jiliang University, 2019 (in Chinese).
- [18] WANG PM, LIU XB, DAI YC, HORAK E, STEFFEN K, YANG ZL. Phylogeny and species delimitation of *Flammulina*: taxonomic status of winter mushroom in East Asia and a new European species identified using an integrated approach[J]. Mycological Progress, 2018, 17(9): 1013-1030.
- [19] 戴玉成, 杨祝良. 中国五种重要食用菌学名新注[J]. 菌物学报, 2018, 37(12): 1572-1577.
- DAI YC, YANG ZL. Notes on the nomenclature of five important edible fungi in China[J]. Mycosystema, 2018, 37(12): 1572-1577 (in Chinese).
- [20] 王卫国, 张仟伟, 李瑞静, 林强. 金针菇多糖的生理功能及其应用研究进展[J]. 河南工业大学学报(自然科学版), 2016, 37(1): 120-128.
- WANG WG, ZHANG QW, LI RJ, LIN Q. Progress on the physiological function of *Flammulina velutipes* polysaccharides and its applications[J]. Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition), 2016, 37(1): 120-128 (in Chinese).
- [21] 曾旭, 刘芳, 陈娟, 王威, 谢宝贵, 郭顺星. 金针菇基因组测序及萜类合成关键基因分析[J]. 菌物学报, 2015, 34(4): 670-682.
- ZENG X, LIU F, CHEN J, WANG W, XIE BG, GUO SX. Genomic sequencing and analysis of genes related to terpenoid compound biosynthesis of *Flammulina velutipes*[J]. Mycosystema, 2015, 34(4): 670-682 (in Chinese).
- [22] 王文亮, 徐同成, 刘丽娜, 陶海腾, 程安玮, 杜方岭. 金针菇的保健功能及其开发前景[J]. 中国食物与营养, 2011, 17(7): 18-19.
- WANG WL, XU TC, LIU LN, TAO HT, CHENG AW, DU FL. Health function of *Flammulina velutipes* and its development prospects[J]. Food and Nutrition in China, 2011, 17(7): 18-19 (in Chinese).
- [23] 韩秋菊. 金针菇多糖提取方法的比较研究[J]. 湖南农业科学, 2012(10): 45-48.
- HAN QJ. Comparative study on extraction methods of *Flammulina velutipes* polysaccharide[J]. Hunan Agricultural Sciences, 2012(10): 45-48 (in Chinese).
- [24] 向莹, 陈健, 金鑫. 金针菇菌盖与菌柄的营养评价[J]. 食品工业科技, 2012, 33(10): 349-352, 368.
- XIANG Y, CHEN J, JIN X. Nutritional evaluation of *Flammulina* cap and stipe[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(10): 349-352, 368 (in Chinese).
- [25] CHEN J, LI JM, TANG YJ, MA K, LI B, ZENG X, LIU XB, LI Y, YANG ZL, XU WN, XIE BG, LIU HW,

- GUO SX. Genome-wide analysis and prediction of genes involved in the biosynthesis of polysaccharides and bioactive secondary metabolites in high-temperature-tolerant wild *Flammulina filiformis*[J]. BMC Genomics, 2020, 21(1): 1-16.
- [26] 郭圆圆, 孙雅如, 张和平. 微生物转录组学技术研究进展[J]. 生物工程学报, 2022, 38(10): 3606-3615.
- GUO YY, SUN YR, ZHANG HP. Advances in microbial transcriptomics techniques[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2022, 38(10): 3606-3615 (in Chinese).
- [27] THOMPSON GA, GOGGIN FL. Transcriptomics and functional genomics of plant defence induction by phloem-feeding insects[J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57(4): 755-766.
- [28] COSTA FF. Non-coding RNAs: meet thy masters[J]. BioEssays, 2010, 32(7): 599-608.
- [29] 宋媛, 胡秋辉, 苏安祥, 裴斐, 马高兴, 马宁, 杨文建. 转录组学解析茉莉酸甲酯对双孢蘑菇个体大小的影响机制[J]. 食品科学, 2021, 42(4): 130-137.
- SONG Y, HU QH, SU AX, PEI F, MA GX, MA N, YANG WJ. Transcriptomic analysis of the mechanism underlying the effect of methyl jasmonate on the size of *Agaricus bisporus*[J]. Food Science, 2021, 42(4): 130-137 (in Chinese).
- [30] WANG W, LIU F, JIANG YJ, WU GM, GUO LX, CHEN RL, CHEN BZ, LU YP, DAI YC, XIE BG. The multigene family of fungal laccases and their expression in the white rot basidiomycete *Flammulina velutipes*[J]. Gene, 2015, 563(2): 142-149.
- [31] 吕晓萌. 金针菇信息素信号通路注释及 *ste12* 基因功能研究[D]. 泰安: 山东农业大学硕士学位论文, 2022.
- LYU XM. Annotation of *Flammulina velutipes* pheromone signal pathway and study on the function of *ste12* gene[D]. Tai'an: Master's Thesis of Shandong Agricultural University, 2022 (in Chinese).
- [32] 王威. 基于基因组和转录组分析金针菇的交配型[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2013.
- WANG W. Research on the mating-type of *Flammulina velutipes* based on genome and transcriptome[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2013 (in Chinese).
- [33] ROBERTS A, TRAPNELL C, DONAGHEY J, RINN JL, PACHTER L. Improving RNA-Seq expression estimates by correcting for fragment bias[J]. Genome Biology, 2011, 12(3): R22.
- [34] 弓文平, 牟家民, 杜雅梦, 谈国太. 用 Origin 软件探究 HgCdTe 单晶的变温霍尔效应[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2023, 56(3): 358-361.
- GONG WP, MU JM, DU YM, TAN GT. Studying the variable temperature Hall effect of HgCdTe single crystal with Origin software[J]. Journal of Beijing Normal University (Natural Science Edition), 2023, 56(3): 358-361 (in Chinese).
- [35] 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).
- [36] TAO YX, XIE BG, YANG ZY, CHEN ZH, CHEN BZ, DENG YJ, JIANG YJ, van PEER AF. Identification and expression analysis of a new glycoside hydrolase family 55 α -D-glucanase-encoding gene in *Volvariella volvacea* suggests a role in fruiting body development[J]. Gene, 2013, 527(1): 154-160.
- [37] 武晨剑, 袁学文, 宋淋浩, 常明昌, 刘靖宇, 邓冰, 孟俊龙. 金针菇实时荧光定量 PCR 内参基因的筛选[J]. 食用菌学报, 2021, 28(1): 30-39.
- WU CJ, YUAN XW, SONG LH, CHANG MC, LIU JY, DENG B, MENG JL. Screening of reference genes for qRT-PCR amplification in *Flammulina filiformis*[J]. Acta Edulis Fungi, 2021, 28(1): 30-39 (in Chinese).
- [38] LIVAK KJ, SCHMITTGEN TDL. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408.
- [39] 陈辉, 郝海波, 赵静, 王倩, 隗加香, 陈明杰, 冯志勇, 张津京. 漆酶同工酶基因在斑玉蕈生长发育过程中的表达分析[J]. 菌物学报, 2020, 39(6): 1038-1048.
- CHEN H, HAO HB, ZHAO J, WANG Q, JUAN JX, CHEN MJ, FENG ZY, ZHANG JJ. Expression analysis of laccase isozyme gene during *Hypsizygus marmoreus* growth and development[J]. Mycosystema, 2020, 39(6): 1038-1048 (in Chinese).
- [40] BAILEY TL, ELKAN C. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers[J]. Proceedings International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology, 1994, 2: 28-36.
- [41] LEE JI, CHOI JH, PARK BC, PARK YH, LEE MY, PARK HM, MAENG PJ. Differential expression of the chitin synthase genes of *Aspergillus nidulans*, *chsA*, *chsB*, and *chsC*, in response to developmental status

- and environmental factors[J]. Fungal Genetics and Biology, 2004, 41(6): 635-646.
- [42] YAMADA E, ICHINOMIYA M, OHTA A, HORIUCHI H. The class V chitin synthase gene *csmA* is crucial for the growth of the *chsA chsC* double mutant in *Aspergillus nidulans*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2005, 69(1): 87-97.
- [43] MUNRO CA, WHITTON RK, BLEDDYN HUGHES H, RELLA M, SELVAGGINI S, GOW NAR. *CHS₈*: a fourth chitin synthase gene of *Candida albicans* contributes to *in vitro* chitin synthase activity, but is dispensable for growth[J]. Fungal Genetics and Biology, 2003, 40(2): 146-158.
- [44] TAO YX, CHEN RL, YAN JJ, LONG Y, TONG ZJ, SONG HB, XIE BG. A hydrophobin gene, *Hyd9*, plays an important role in the formation of aerial hyphae and primordia in *Flammulina filiformis*[J]. Gene, 2019, 706: 84-90.
- [45] WU TJ, HU CC, XIE BG, ZHANG L, YAN SJ, WANG W, TAO YX, LI SJ. A single transcription factor (PDD1) determines development and yield of winter mushroom (*Flammulina velutipes*)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2019, 85(24): e01735-19.
- [46] van PEER AF, PARK SY, SHIN PG, JANG KY, YOO YB, PARK YJ, LEE BM, SUNG GH, JAMES TY, KONG WS. Comparative genomics of the mating-type loci of the mushroom *Flammulina velutipes* reveals widespread synteny and recent inversions[J]. PLoS One, 2011, 6(7): e22249.
- [47] WANG W, MUKHTAR I, CHOU TS, JIANG SY, LIU XR, van PEER AF, XIE BG. A second HD mating type sublocus of *Flammulina velutipes* is at least di-allelic and active: new primers for identification of HD-a and HD-b subloci[J]. PeerJ, 2019, 7: e6292.
- [48] CHOQUER M, BOCCARA M, GONÇALVES IR, SOULIÉ MC, VIDAL-CROS A. Survey of the *Botrytis cinerea* chitin synthase multigenic family through the analysis of six *Euscomycetes* genomes[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 271(11): 2153-2164.
- [49] MANDEL MA, GALGANI JN, KROKEN S, ORBACH MJ. *Coccidioides posadasii* contains single chitin synthase genes corresponding to classes I to VII[J]. Fungal Genetics and Biology, 2006, 43(11): 775-788.
- [50] CABIB E, ROH DH, SCHMIDT M, CROTTI LB, VARMA A. The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(23): 19679-19682.
- [51] MOTOYAMA T, FUJIWARA M, KOJIMA N, HORIUCHI H, OHTA A, TAKAGI M. The *Aspergillus nidulans* genes *chsA* and *chsD* encode chitin synthases which have redundant functions in conidia formation[J]. Molecular and General Genetics MGG, 1997, 253(4): 520-528.
- [52] WELD RJ, EADY CC, RIDGWAY HJ. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Sclerotinia sclerotiorum*[J]. Journal of Microbiological Methods, 2006, 65(1): 202-207.
- [53] 华颖, 胡红刚, 彭向雷. DEK 蛋白与细胞凋亡的研究进展[J]. 中国科学 C 辑, 2009, 39(5): 434-440.
- HUA Y, HU HG, PENG XL. Research progress of DEK protein and apoptosis[J]. Scientia Sinica (Vitae), 2009, 39(5): 434-440 (in Chinese).
- [54] 罗成科, 肖国举, 李明. 不同未知功能结构域蛋白家族(DUFs)基因在植物中的生物学功能[J]. 植物生理学报, 2015(2): 153-158.
- LUO CK, XIAO GJ, LI M. Biological functions of different domains of unknown function protein families (DUFs) genes in plants[J]. Plant Physiology Journal, 2015(2): 153-158 (in Chinese).
- [55] PEABODY CR, CHUNG YJ, YEN MR, VIDAL-INGIGLIARDI D, PUGSLEY AP, SAIER MH. Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella[J]. Microbiology, 2003, 149(11): 3051-3072.
- [56] LIU HB, KAUFFMAN S, BECKER JM, SZANISZLO PJ. *Wangiella (Exophiala) dermatitidis* WdChs5p, a class V chitin synthase, is essential for sustained cell growth at temperature of infection[J]. Eukaryotic Cell, 2004, 3(1): 40-51.
- [57] 张梦飞, 刘芳, 王庆佶, 严俊杰, 王威, 钱玉翠, 黄清铎. 金针菇小 G 蛋白家族基因鉴定及表达分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2020, 39(12): 5781-5788.
- ZHANG MF, LIU F, WANG QJ, YAN JJ, WANG W, QIAN YC, HUANG QH. Characterization and expression analysis of small GTPases families in *Flammulina velutipes*[J]. Genomics and Applied Biology, 2020, 39(12): 5781-5788 (in Chinese).