

研究报告

金针菇信息素信号通路基因在子实体发育过程中的差异表达

刘澳, 吕晓萌, 王庆佶, 王祥锋, 李壮, 张继月, 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

刘澳, 吕晓萌, 王庆佶, 王祥锋, 李壮, 张继月, 王威. 金针菇信息素信号通路基因在子实体发育过程中的差异表达[J]. 微生物学通报, 2022, 49(7): 2563-2574

Liu Ao, Lyu Xiaomeng, Wang Qingji, Wang Xiangfeng, Li Zhuang, Zhang Jiyue, Wang Wei. Differential expression of key genes in pheromone signaling pathway in fruiting body development of *Flammulina filiformis*[J]. Microbiology China, 2022, 49(7): 2563-2574

摘要:【背景】子实体是食用菌的主要商品部位,也是真菌生殖生长的重要结构,其发育受到多种信号途径的调控。【目的】以金针菇(*Flammulina filiformis*)为材料,对转录组和基因组数据的信息素信号通路基因进行分析获得差异表达的基因,并对其在菌丝生长和子实体发育过程中的表达情况进行分析,以期为研究食用菌子实体发育提供参考。【方法】基于已有的金针菇基因组数据,注释了金针菇信息素信号通路。进一步通过转录组测序鉴定了该通路中参与金针菇子实体发育的关键基因,并对关键基因进行荧光定量 PCR 验证。【结果】*cdc24* 和 *stel2* 基因在子实体发育不同时期的 5 个样品(原基、伸长期菌柄、伸长期菌盖、成熟期菌柄和成熟期菌盖)中的表达具有显著差异,使用荧光定量 PCR 技术进行验证与上述结果一致。【结论】*cdc24* 和 *stel2* 这 2 个关键基因可能参与了金针菇子实体发育过程中的组织分化调控机制。

关键词: 金针菇; MAPK 信号通路; 荧光定量 PCR; 差异表达; 子实体

基金项目: 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)

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31902086); Mushroom Technology System of Shandong Province (SDAIT-07-06)

*Corresponding author: E-mail: uniwangwei@sdau.edu.cn

Received: 2021-11-22; Accepted: 2022-01-29; Published online: 2022-03-31

Differential expression of key genes in pheromone signaling pathway in fruiting body development of *Flammulina filiformis*

LIU Ao, LYU Xiaomeng, WANG Qingji, WANG Xiangfeng, LI Zhuang, ZHANG Jiyue, WANG Wei*

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

Abstract: [Background] Fruiting body is the important structure for fungal reproduction and growth and its development is regulated by a variety of signaling pathways. [Objective] In this study, we analyzed the genes in pheromone signaling pathway in *Flammulina filiformis* on the basis of the transcriptome and genome data to obtain differentially expressed genes, and then determined their expression during mycelia growth and fruiting body development, hoping to provide a reference for studying the fruiting body development of edible fungi. [Methods] We annotated the pheromone signaling pathway of *F. filiformis* based on genomic data. The key genes involved in the development of *F. filiformis* fruiting body in this pathway were further identified through transcriptome sequencing. Finally, we verified the key genes by real-time fluorescent quantitative PCR. [Results] The expression of *cdc24* and *ste12* gene was significantly different in the five samples (primordium, stipe at the elongation stage, pileus at the elongation stage, stipe at the mature stage, and pileus at the mature stage) collected during fruiting body development. PCR results supported the above conclusion. [Conclusion] The key genes *cdc24* and *ste12* may be involved in the regulation of tissue differentiation during fruiting body development of *F. filiformis*.

Keywords: *Flammulina filiformis*; MAPK signaling pathway; real-time quantitative PCR; differential expression; fruiting body

金针菇(*Flammulina filiformis*), 别名冬菇、朴蕈、绒毛柄金钱菌等, 是一种著名食药真菌^[1-3]。金针菇中含有多种人体必需氨基酸和微量元素, 其中赖氨酸和精氨酸尤为丰富, 有利于儿童智力发育^[4], 且经常食用可防治溃疡病^[5]。金针菇以营养丰富、味美适口而广受大众的喜爱。其在全球各地均有分布, 并在我国已实现工厂化栽培。据报道, 中国目前是世界上最大的金针菇生产国, 年产量为 240 万 t^[6], 且具有稳定的栽培生产模式与逐步扩大的工厂化栽培规模。子实体是食用菌的主要商品部位, 也是真

菌生殖生长的重要结构, 其发育受到多种信号途径的调控。因此, 金针菇子实体的发育具有很大研究价值。

有研究表明, 真菌的子实体发育受交配型因子、转录因子、漆酶、蛋白激酶、疏水蛋白等因素的影响^[7]。金针菇是典型的四极性异宗结合的食用菌, 其中可亲和的交配型 A 位点和可亲和的交配型 B 位点编码的基因共同打开 A 和 B 交配型通路才能发育出正常子实体, 完成其有性生殖^[8]。交配型 A 位点和 B 位点都具有各自的信号转导通路。B 交配型位点包含一个或多个亚位

点, 这些亚位点都含有一个信息素受体基因(*PR*)及侧翼的一个或多个信息素前体基因(*Pp*)。信息素可以激活另一可亲和菌株的相同亚位点编码的 G 蛋白偶联的信息素受体, 继而激活 B 位点下游丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号转导通路^[9]。

MAPK 是一组能被不同的胞外刺激激活的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, 是金针菇信号通路的重要组成部分。细胞外信号传递到细胞内的目标是通过相互作用的蛋白质网络调节大量的细胞过程。在过去的十年里, 许多实验室的累积努力已经阐明了这样一种信号机制, 它涉及到几个膜信号分子的激活, 随后是几个细胞质蛋白激酶的连接刺激, 统称为丝裂原活化蛋白激酶信号级联。MAPK 级联激活是多种信号路的中心, 是接收膜受体转换与传递的信号并将其带入细胞核内的一类重要分子, 在许多细胞增殖相关信号通路中具有关键作用^[10]。该级联多达 6 层, 有助于传递信号的放大和特异性, 最终激活细胞质和细胞核中的若干调节分子, 从而启动细胞过程, 如增殖、分化和发育^[11]。MAPK 链由 3 类蛋白激酶 MAP3K-MAP2K-MAPK 组成, 通过依次磷酸化将上级信号传递至下游应答分子。MAPK 信号通路包括: MAPK 激酶激酶(MAP kinase kinase kinase, MKKK)、MAPK 激酶(MAP kinase kinase, MKK)和 MAPK。

目前, 已经从酿酒酵母中鉴定出 4 种 MAPK 通路: 信息素应答(pheromone response)、丝状生长、高渗透压应答和细胞壁重建^[12-14]。Paoletti 等研究发现, 同宗结合的子囊菌构巢曲霉在有性生殖过程中交配型基因和调控交配反应的 MAPK 级联途径关键酶基因的表达量都显著增加, 并且调控交配反应的信号通路不受交配型基因的调控, 而且 MAPK 基因突变会导致菌株不育^[15]。陈天赐等发现, 草菇 B 因子下游的 MAPK 信号

途径中关键基因表达水平下降不利于草菇菌丝生长和出菇^[16]。汪虹等研究发现, MAPK 级联反应可能与调控生物体交配反应有关的基因表达构巢曲霉的形态分化以及其次生代谢物合成有关^[17]。吕晓萌等发现, 在金针菇菌柄发育过程中 MAPK 信号通路在转录组和蛋白组的 kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG)富集分析中均为差异通路^[18]。吴雪兰发现在斑玉蕈菌丝发育过程中, MAPK 信号通路中的 CWI (cell wall integrity, CWI)信号通路与 HOG (high-osmolarity glycerol pathway, HOG)信号通路具有分别参与调控斑玉蕈菌丝细胞壁的形成及适应环境变化的作用, 共同调节斑玉蕈的生长发育过程^[19]。解凡等发现 MAPK 通路在肺形侧耳低温胁迫响应中具有重要作用^[20]。综上所述, MAPK 信号通路在真菌多种生命活动中具有非常重要的作用。

食用菌子实体发育过程中, 信息素信号通路也起到至关重要的作用。信息素(应答)信号通路中的同源基因在酵母和植物病原真菌中具有调控菌丝生长、菌落形态发育、无性繁殖和有性生殖、菌株致病性等功能^[21-22]。有研究已经表明信息素启动的信号级联反应能够诱导双核菌丝的发育、子实体的形成和减数分裂过程中孢子的产生^[23]。陈辉等对斑玉蕈菌丝由营养生长到生殖生长的整个过程中的信息素信号通路基因的差异表达进行分析, 还监测了菌丝不同生长时间出菇对产量和品质的影响, 从而对斑玉蕈中的信息素信号通路基因的功能进行系统分析^[24]。然而在金针菇中, 由信息素所启动的整条信息素信号通路基因的作用仍然研究较少。

在酵母中, *cdc24* 基因突变后发现 Cdc24 对菌丝形态发生和生长是必不可少的^[25]。同时, 研究还表明 Ste12 是生长发育的关键调控因子, 在营养缺乏的条件下, 酵母细胞分化成能交配的

细胞类型,并向丝状生长转变^[21]。因此,MAPK 反应途径下游的基因大都涉及细胞的增殖分化,以进一步实现有性生殖过程。然而 MAPK 信号通路中的信息素信号通路基因调控金针菇子实体形成和发育的机制仍然不清楚。

金针菇基因组测序结果已公布^[26],本研究基于金针菇转录组测序和实时荧光定量 PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR) 技术,对金针菇信息素信号通路中相关基因在子实体不同发育阶段的表达进行分析,为进一步解析信息素信号通路在金针菇生长发育过程中的生物学功能提供一定的数据基础。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

金针菇双核体菌株 F19 由福建省食用菌种质资源保藏与管理中心提供。该菌株能够发育正常的黄色子实体^[26]。

1.2 信息素信号通路基因注释

单核体 L11 菌株是由 F19 菌株通过原生质体单核化方法而得到,L11 基因组数据来自 DDBJ/EMBL/GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),登录号为 APIA00000000 (BioProject191865)。L11 基因组注释数据由福建农林大学菌物研究中心提供。将注释到的信息素信号通路中的基因提交至 NCBI 的 NR 数据库在线 BLAST 比对。

1.3 总 RNA 提取及转录组测序

F19 出菇过程参照文献^[26]的方法。在 F19 菌丝扭结形成原基后 10 d 和 25 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(图 1)。此后使用植物总 RNA 提取试剂盒(E.Z.N.A.TM Plant RNA Kit, OMEGA 公司)提取样品总 RNA,提取过程按照说明书操作。使用 Agilent 2100 对建库用总 RNA 进行浓度和完整性检测。

委托上海欧易生物医学科技有限公司将检

测合格的总 RNA 进行建库后,使用 Illumina HiSeqTM 2500 测序仪进行测序,产生 2×125 bp 的双末端数据。每个样品设置 3 个生物学重复。使用 fragments per kilobase of exon model per million mapped fragments (FPKM) 方法计算 MAPK 信号通路中各基因的表达量^[27]。

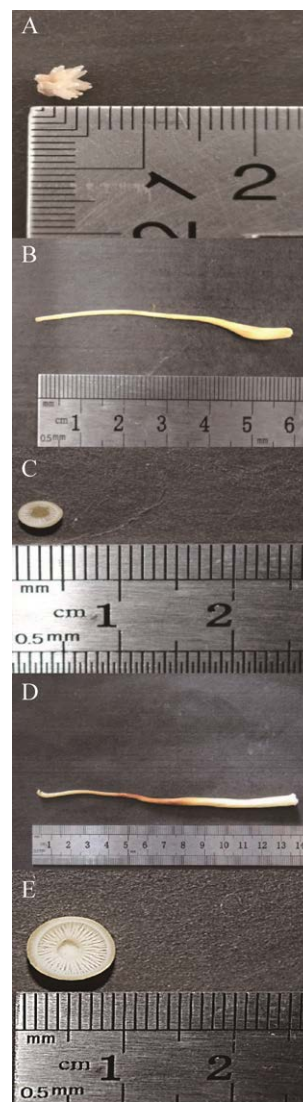


图 1 金针菇子实体不同发育时期组织样品 A: 原基; B: 伸长期菌柄; C: 伸长期菌盖; D: 成熟期菌柄; E: 成熟期菌盖

Figure 1 Samples of different developmental stages of *Flammulina filiformis*. A: Primordium; B: Elongation stipe; C: Elongation pileus; D: Maturation stipe; E: Maturation pileus.

1.4 实时荧光定量 PCR

采用 RT-qPCR 的方法检测金针菇在不同生长发育时期信息素信号通路关键基因的表达量。RNA 提取方法参照 1.3, 然后将金针菇各时期样品 RNA 根据 HiScript[®] III RT SuperMix for RT-qPCR (诺唯赞, 南京)的说明书, 反转录成 cDNA, -20 °C 保存备用。

本研究所用的 RT-qPCR 内参基因是金针菇的 β -actin 基因(*ACTB*)和甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因(*GAPDH*)^[28], 引物(表 1)由青岛睿博兴科生物技术有限公司合成。采用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 试剂, RT-qPCR 反应体系及程序按照定量荧光试剂盒的使用说明书进行(两步法), 退火温度设置为 60 °C, 循环数设为 40, 每个反应进行 3 个平行试验。基因相对表达量依据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法进行计算^[29-30]。

2 结果与分析

2.1 注释 MAPK 通路

基于金针菇单核体菌株 L11 基因组数据对信息素信号通路进行注释分析(表 2)。通过 NCBI 注释了 8 个信息素信号通路相关基因, 与其他真菌的同源基因都具有较高的一致性。其中 *gene8607* 与 *Coprinopsis cinerea* GTP 结合蛋白 Cdc42 一致性为 82%; *gene1088* 与 *Flammulina*

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 RT-qPCR primer sequences

基因名称	引物序列
Gene No.	Primer sequence (5'→3')
<i>ACTB-F</i>	GATCGTATGCAGAAGGAGTTGACAC
<i>ACTB-R</i>	CCACTCTCGTCGTACTIONCTTGTCTTG
<i>GAPDH-F</i>	CCTCTGCTCACTTGAAGGGT
<i>GAPDH-R</i>	GCGTTGGAGATGACTTTGAA
<i>cdc24-F</i>	ATCGTCTTCGTCCGCTATCA
<i>cdc24-R</i>	TGAACTTCTGGGAACCATTTT
<i>ste12-F</i>	GTGGGTGGACCTGGGATGAC
<i>ste12-R</i>	ATGCTGCTGGTGGTGCTGAT

filiformis 鸟嘌呤核苷酸交换因子 Cdc24 一致性高达 99%; *gene8083* 与 *Flammulina filiformis* 极性蛋白 Bem1 一致性高达 99%; *gene7282* 与 *Schizophyllum commune* H4-8 ste20-like 蛋白一致性为 84%; *gene9504* 与 *Volvariella volvacea* STE11 蛋白一致性为 85%; *gene4683* 与裂褶菌 H4-8 ste7-like 蛋白一致性高达 92%; *gene32* 与 *Aspergillus homomorphus* 激酶蛋白一致性为 80%; *gene186* 与 *Aureobasidium melanogenum* 同源结构域家族转录因子 STE12 mRNA 一致性为 74%。由于 MAPK 通路的保守性, 所以该通路相关基因在金针菇不同菌株中也极为相似, 而金针菇不同菌株间一致性的极小差异(约 1%)是由于不同菌株之间核苷酸序列上存在着自然界生物中广泛存在的 SNP 位点而产生的^[31]。

表 2 MAPK 信号通路基因注释

Table 2 Annotation of MAPK signaling pathway genes

基因 ID	GenBank 登录号	描述	物种	E 值	一致性
gene ID	GenBank accession No.	Description	Species	E-value	Identity (%)
<i>gene8607</i>	XM_001833721.2	GTP binding protein Cdc42	<i>Coprinopsis cinerea</i>	9e-123	82
<i>gene1088</i>	MN661161.1	Guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 gene	<i>Flammulina filiformis</i>	0	99
<i>gene8083</i>	MN661160.1	Polarity protein Bem1 gene	<i>Flammulina filiformis</i>	0	99
<i>gene7282</i>	XM_003032752.2	H4-8 ste20-like protein	<i>Schizophyllum commune</i>	2e-43	84
<i>gene9504</i>	KC748447.1	STE11 protein gene	<i>Volvariella volvacea</i>	8e-26	85
<i>gene4683</i>	XM_003034025.1	H4-8 ste7-like protein	<i>Schizophyllum commune</i>	1e-06	92
<i>gene32</i>	XM_025690173.1	Pkinase-domain-containing protein	<i>Aspergillus homomorphus</i>	3e-06	80
<i>gene186</i>	MN086872.1	Homeodomain family transcription factor STE12 mRNA	<i>Aureobasidium melanogenum</i>	2e-21	74

2.2 金针菇信息素信号通路基因表达分析

转录组测序每个样品数据过滤后得到 clean bases 为 2.5 G。每个样品定位到参考基因组的总 reads 均达到 88.35%以上(表 3)。测序质量较好,能够用于后期的数据分析。转录组数据已提交至 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 登录号为 PRJNA725643 (BioProject)。

基于转录组数据分析金针菇信息素信号通路基因在子实体各个发育时期的表达模式(图 2)。*cdc42* (*gene8607*) 在伸长期菌柄中上调表达, 在成熟期菌柄中下调表达; *cdc24* (*gene1088*) 在原基时期表达量最高, 于伸长期菌柄下调表达, 在成熟期菌柄上调表达; *bem1* (*gene8083*) 在原基时期表达高; *ste20* (*gene7282*) 在伸长期菌盖下调表达; *ste11* (*gene9504*) 在伸长期菌柄下调表达; *ste7* (*gene4683*) 在各个时期表达稳定, 可作为金

针菇内参基因候选; *ste7* (*gene32*) 在成熟期菌柄下调表达; *ste12* (*gene186*) 在伸长期菌盖上调表达。

其中, 基因 *cdc24* 和 *ste12* 在不同发育时期表达差异显著, 表明这 2 个基因可能参与子实体发育过程的调控。进一步使用 RT-qPCR 技术对这 2 个基因的表达模式进行了验证。

2.3 实时荧光定量 PCR

结合信息素信号通路中的基因在金针菇子实体不同发育时期的表达模式, 进一步用 RT-qPCR 验证。结果显示, RT-qPCR 与转录组数据表达一致(图 3), 2 个基因(*cdc24* 和 *ste12*) 分别在原基时期和伸长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。因此, 推断该基因可能在金针菇的子实体形成中起到重要作用。

表 3 Reads 与参考基因组比对率统计

Table 3 Comparison rate between reads and reference genome

样品 Sample		总 reads 数 Total reads	总定位 reads 数 Total mapped reads
原基 Primordium	PR-1	13 180 000	11 730 394 (89.00%)
	PR-2	14 060 270	12 474 939 (88.72%)
	PR-3	15 534 922	13 871 588 (89.29%)
伸长期菌柄 Elongation stipe	ES-1	16 136 676	14 262 342 (88.38%)
	ES-2	16 949 982	15 068 103 (88.90%)
	ES-3	18 445 804	16 297 184 (88.35%)
伸长期菌盖 Elongation pileus	EP-1	16 559 622	14 848 028 (89.66%)
	EP-2	16 848 370	15 114 392 (89.71%)
	EP-3	17 714 844	15 907 489 (89.80%)
熟期菌柄 Mature stipe	MS-1	17 193 950	15 290 110 (88.93%)
	MS-2	15 340 044	13 670 715 (89.12%)
	MS-3	15 959 110	14 233 650 (89.19%)
熟期菌盖 Mature pileus	MP-1	16 496 902	14 642 491 (88.76%)
	MP-2	15 554 088	13 786 641 (88.64%)
	MP-3	14 682 558	13 033 496 (88.77%)

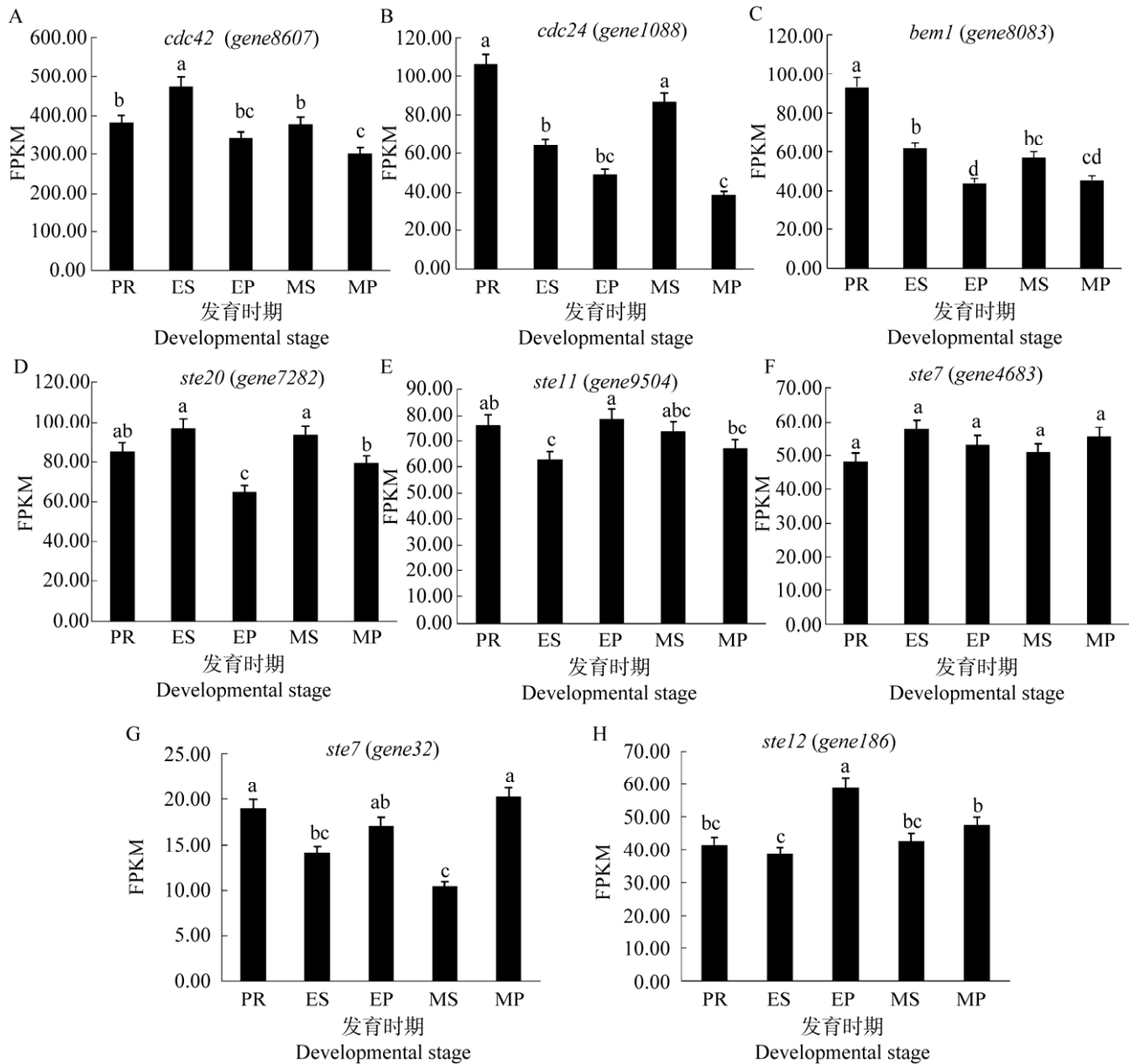


图2 信息素信号通路基因在子实体各发育时期表达模式 A: *cdc42* 基因各发育时期 FPKM; B: *cdc24* 基因各发育时期 FPKM; C: *bem1* 基因各发育时期 FPKM; D: *ste20* 基因各发育时期 FPKM; E: *ste11* 基因各发育时期 FPKM; F: *ste7* (*gene4683*) 基因各发育时期 FPKM; G: *ste7* (*gene32*) 基因各发育时期 FPKM; H: *ste12* 基因各发育时期 FPKM。PR: 原基; ES: 伸长期菌柄; EP: 伸长期菌盖; MS: 成熟期菌柄; MP: 成熟期菌盖。数据为平均值±标准误, 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 2 Expression of the pheromone signal pathway genes in different developmental stages of fruiting body. A: FPKM of *cdc42* genes in development stage; B: FPKM of *cdc24* genes in development stage; C: FPKM of *ste20* genes in development stage; D: FPKM of *bem1* genes in development stage; E: FPKM of *ste11* genes in development stage; F: FPKM of *ste7* (*gene4683*) genes in development stage; G: FPKM of *ste7* (*gene32*) genes in development stage; H: FPKM of *ste12* genes in development stage. Data are mean±SE, different lowercase letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

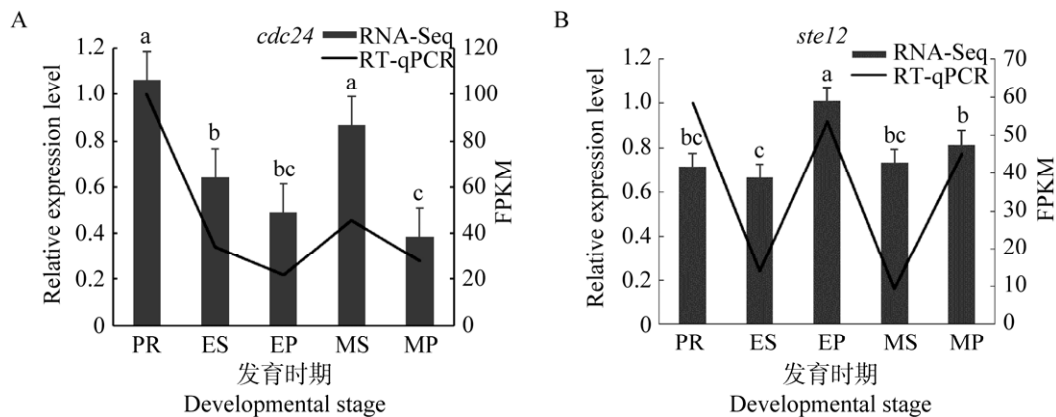


图3 信息素信号通路基因各发育时期 FPKM 与 RT-qPCR A: *cdc24* 基因各发育时期 FPKM 和 RT-qPCR; B: *ste12* 基因各发育时期 FPKM 和 RT-qPCR。PR: 原基; ES: 伸长期菌柄; EP: 伸长期菌盖; MS: 成熟期菌柄; MP: 成熟期菌盖。数据为平均值±标准误, 不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

Figure 3 FPKM and RT-qPCR of the pheromone signal pathway genes in developmental stage. A: FPKM and RT-qPCR of *cdc24* genes in development stage; B: FPKM and RT-qPCR of *ste12* genes 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 ($P < 0.05$).

3 讨论与结论

绝大多数食用菌以子实体作为主要食用部分, 因此关于食用菌子实体发育机制的研究具有重要科学意义。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。此外, 金针菇具有清晰的遗传背景和完善的基因组数据, 遗传操作技术也已经成功在金针菇上运用。因此, 金针菇比较适宜作为食用菌生长发育机制研究的模式材料。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。Tao 等研究表明, 金针菇疏水蛋白编码基因 *Hyd9* 过表达后, 会产生更多的气生菌丝, 并且原基数量明显增多^[32]。HMG-box 转录因子 PDD1 促进金针菇子实体的发育并显著提高其产量^[33], 然而同为 HMG-box 家族的转录因子 FvHmg1 抑制了金针

菇子实体发育^[34]。一个 WD40 编码基因 *Fvcpc2* 正调控金针菇的子实体发育, 提高了其产量^[35]。金针菇 *Fvclp1* 基因能够抑制菌丝的生长速度, 但能促进子实体发育的过程^[36]。这些重要基因功能的解析为金针菇生长发育过程研究提供了很多参考, 但仍需进一步阐明金针菇对环境应答和子实体发育的信号调控网络。MAPK 级联激活是多种信号通路的中心, 参与到细胞的分裂、分化、凋亡等多种生命过程^[37-38]。这一途径广泛存在于各种真核生物(酵母、植物、哺乳动物)中, 起到承上启下及整合、放大和传递信号的作用^[39]。金针菇由单核菌丝质配为可结实的双核菌丝受到交配位点 A 和 B 的控制^[40-41]。交配型位点 B 下游的信息素信号通路属于 MAPK 信号通路的一部分。信息素信号通路中的相关基因已经被证实能够参与调节酵母和丝状真菌的交配、生长发育和形态建成等生命活动^[42-45]。本研究通过分析

金针菇信息素信号通路各时期的转录组数据,筛选到了 *cdc24* 和 *ste12* 为显著差异表达的基因。

Cdc24 与 Ste12 在真菌形态建成中至关重要。Si 等研究发现 Cdc24 是建立菌丝极性所必需的并定位于菌丝尖端,还发现 Rga1h 在分生孢子梗发育过程中抑制分枝是必要的^[46]。Song 等在莱氏绿僵菌(*Metarhizium rileyi*)中克隆了 *Mrcdc24* 基因,通过沉默突变体菌株发现突变体菌丝生长表型发生显著变化,分生孢子产量、微生物核产量和毒力均降低^[47]。*ste12* 基因最早是在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中被发现的,是 MAPK 通路下游一个关键的调控因子^[22],其功能主要是调控酵母细胞的交配反应、假菌丝发育及侵入生长^[48-49]。Madhani 等已经证实 *ste12* 基因也存在于丝状真菌,以及人类和植物的一些病原菌中^[50]。庄淼等通过双分子荧光互补技术证实蛋白质 Fus3 和 Ste12 在无性繁殖菌株米曲霉(*Aspergillus oryzae*)体内发生互作,暗示它们通过互作可能参与除了有性生殖之外的其他细胞功能,并为米曲霉蛋白互作功能研究提供了一种新的检测技术和方法^[51]。刘文魁综合试验结果认为,果生刺盘孢转录因子 CfSte12 参与分生孢子萌发、附着胞形成及其对寄主的穿透和定殖等致病过程,并且参与调控子囊壳、子囊及子囊孢子产生等有性器官的发育^[52]。张运峰等的研究表明, *ste12* 基因不仅调控玉米大斑病菌的分生孢子发育和致病力形成,而且参与玉米大斑病菌的渗透胁迫调控^[53]。通过转录组数据对 MAPK 信号通路中的信息素信号通路基因进行分析发现,在信息素信号通路中,基因 *cdc24* 和 *ste12* 表达差异显著且与金针菇发育时期的变化存在明显相关性。陈辉等对斑玉蕈生长发育过程中信息素信号通路基因的研究表明,大多数基因在原基时期表达量最高,在子实体成熟期这些基因表达量下降,其中 *cdc24* 基因在原基形成前不

断上调表达,至原基时期表达量达到高峰,随后在子实体时期表达量下调, *ste12* 基因表达量变化与 *cdc24* 基因表达基本一致^[24]。在本研究中, *cdc24* 基因在金针菇原基时期表达量也达最高峰,而在子实体形成后的伸长期、成熟期菌柄菌盖中表达量降低,而 *ste12* 基因在伸长期菌柄中达到最高。结合他人研究结果与我们的转录组测序和实时荧光定量 PCR,我们得出,从金针菇菌丝扭结形成原基到子实体发育过程中, *ste12* 与 *cdc24* 基因表达量在原基时期表达较高并且不同发育时期表达量也有所差异。因此, *ste12* 与 *cdc24* 基因可能在金针菇的子实体形成过程中起到重要作用。下一步将使用遗传操作技术,构建这 2 个基因的过表达和敲低表达金针菇突变体菌株,明确它们的生物学功能。从而为深入探究金针菇和其他食用菌的子实体的生长发育机制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了金针菇双核体菌株 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了试验条件。

REFERENCES

- [1] Ge ZW, Liu XB, Zhao K, Yang ZL. Species diversity of *Flammulina* in China: new varieties and a new record[J]. *Mycosystema*, 2015, 34(4): 589-603
- [2] 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)
- [3] 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
- [4] 付英宾, 崔文甲, 王文亮, 张剑, 宋莎莎. 金针菇营养成分及产品开发研究进展[J]. *食品科技*, 2021, 46(06):

- 73-77
Fu YB, Cui WJ, Wang WL, Zhang J, Song SS. Research progress on nutrient composition and product development of *Flammulina Velutipes*[J]. Food Science and Technology, 2021, 46(06): 73-77 (in Chinese)
- [5] 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)
- [6] Chen J, Li JM, Tang YJ, Ma K, Li B, Zeng X, Liu XB, Li Y, Yang ZL, Xu WN, et al. 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): 719
- [7] 郑鹏, 王成树. 真菌有性生殖调控与进化[J]. 中国科学: 生命科学, 2013, 43(12): 1090-1097
Zheng P, Wang CS. Sexuality control and sex evolution in fungi[J]. Scientia Sinica: Vitae, 2013, 43(12): 1090-1097 (in Chinese)
- [8] 雍明丽, 于俊杰, 刘永锋. 交配型基因在真菌有性生殖中的作用研究进展[J]. 江苏农业学报, 2019, 35(5): 1254-1261
Yong ML, Yu JJ, Liu YF. Research advances in the role of mating type genes in sexual reproduction of fungi[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2019, 35(5): 1254-1261 (in Chinese)
- [9] Wang W, Lian LD, Xu P, Chou TS, Mukhtar I, Osakina A, Waqas M, Chen BZ, Liu XR, Liu F, et al. Advances in understanding mating type gene organization in the mushroom-forming fungus *Flammulina velutipes*[J]. G3 Genes Genomes Genetics, 2016, 6(11): 3635-3645
- [10] Ichimura K, Shinozaki K, Tena G, Sheen J, Henry Y, Champion A, Kreis M, Zhang SQ, Hirt H, Wilson C, et al. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(7): 301-308
- [11] Seger R, Wexler S. The MAPK signaling cascades[A]. Encyclopedia of Cell Biology[M]. Amsterdam: Elsevier, 2016: 122-127
- [12] Deng FS, Lin CH. Cpp1 phosphatase mediated signaling crosstalk between Hog1 and Cek1 mitogen-activated protein kinases is involved in the phenotypic transition in *Candida albicans*[J]. Medical Mycology, 2017, 56(2): 242-252
- [13] Li Y, Roberts J, AkhavanAghdam Z, Hao N. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) dynamics determine cell fate in the yeast mating response[J]. Journal of Biological Chemistry, 2017, 292(50): 20354-20361
- [14] Tatjer L, Sacristán-Reviriego A, Casado C, González A, Rodríguez-Porrata B, Palacios L, Canadell D, Serra-Cardona A, Martín H, Molina M, et al. Wide-ranging effects of the yeast Ptc1 protein phosphatase acting through the MAPK kinase Mkk1[J]. Genetics, 2016, 202(1): 141-156
- [15] Paoletti M, Seymour FA, Alcocer MJC, Kaur N, Calvo AM, Archer DB, Dyer PS. Mating type and the genetic basis of self-fertility in the model fungus *Aspergillus nidulans*[J]. Current Biology, 2007, 17(16): 1384-1389
- [16] 陈天赐, 陈娟钦, 杨国辉, 谢宝贵, 江玉姬, 陈炳智. 草菇 *Vvri1* 基因 RNAi 转化子的筛选及其转录组分析[J]. 菌物学报, 2021(12): 3265-3275
Chen TC, Chen JQ, Yang GH, Xie BG, Jiang YJ, Chen BZ. Transformation and transcriptomics analyses of *Volvariella volvacea* after RNA interference of the *Vvri1* gene[J]. Mycosystema, 2021(12): 3265-3275 (in Chinese)
- [17] 汪虹, 鲍大鹏, 陈明杰, 陈辉, 林楠, 茅文俊. 草菇丝裂原活化蛋白质激酶编码基因 *VV-MAPK* 的克隆和序列分析[J]. 菌物学报, 2010, 29(2): 310-313
Wang H, Bao DP, Chen MJ, Chen H, LIN N, Mao WJ. Cloning and sequence analysis of mitogen-activated protein kinase from *Volvariella volvacea* (*VV-MAPK*)[J]. Mycosystema, 2010, 29(2): 310-313 (in Chinese)
- [18] 吕晓萌, 刘澳, 王庆佶, 王祥锋, 丑天胜, 王威. 金针菇菌柄发育的转录组与蛋白组分析[J]. 菌物学报, 2021, 40(12): 3231-3245
Lyu XM, Liu A, Wang QJ, Wang XF, Chou TS, Wang W. Transcriptome and proteome analyses of *Flammulina filiformis* during stipe development[J]. Mycosystema, 2021, 40(12): 3231-3245 (in Chinese)
- [19] 吴雪兰, 郝海波, 黄建春, 王倩, 陈明杰, 冯志勇, 陈辉, 张津京. CWI 和 HOG 信号通路基因在斑玉蕈不同发育阶段的表达模式[J]. 菌物学报, 2021, 40(6): 1388-1399
Wu XL, Hao HB, Huang JC, Wang Q, Chen MJ, Feng ZY, Chen H, Zhang JJ. The expression pattern of CWI and HOG signal pathway genes during the growth and development of *Hypsizygos marmoreus*[J]. Mycosystema, 2021, 40(6): 1388-1399 (in Chinese)
- [20] 解凡, 赵丽丽, 叶丽云, 吴小平. 肺形侧耳低温胁迫时期的转录组分析[J]. 菌物学报, 2018, 37(12): 1598-1607
Xie F, Zhao LL, Ye LY, Wu XP. Transcriptome analyses of *Pleurotus pulmonarius* after cold stress challenge[J].

- Mycosystema, 2018, 37(12): 1598-1607 (in Chinese)
- [21] Wong Sak Hoi, Dumas B. Ste12 and Ste12-like proteins, fungal transcription factors regulating development and pathogenicity[J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(4): 480-485
- [22] Zhao XH, Mehrabi R, Xu JR. Mitogen-activated protein kinase pathways and fungal pathogenesis[J]. Eukaryotic Cell, 2007, 6(10): 1701-1714
- [23] Raudaskoski M, Kothe E. Basidiomycete mating type genes and pheromone signaling[J]. Eukaryotic Cell, 2010, 9(6): 847-859
- [24] 陈辉, 郝海波, 赵静, 王倩, 隗加香, 陈明杰, 冯志勇, 张津京. 信息素信号通路基因在斑玉蕈生长发育过程中的差异表达[J]. 菌物学报, 2020, 39(12): 2304-2313
Chen H, Hao HB, Zhao J, Wang Q, Juan JX, Chen MJ, Feng ZY, Zhang JJ. Differential expression of pheromone signal pathway genes during *Hypsizygus marmoreus* growth and development[J]. Mycosystema, 2020, 39(12): 2304-2313 (in Chinese)
- [25] Takemoto D, Kamakura S, Saikia S, Becker Y, Wrenn R, Tanaka A, Sumimoto H, Scott B. Polarity proteins Bem1 and Cdc24 are components of the filamentous fungal NADPH oxidase complex[J]. PNAS 2011, 108(7): 2861-2866
- [26] 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
- [27] Zhao YD, Li MC, Konaté MM, Chen L, Das B, Karlovich C, Williams PM, Evrard YA, Doroshov JH, McShane LM. TPM, FPKM, or normalized counts? A comparative study of quantification measures for the analysis of RNA-seq data from the NCI patient-derived models repository[J]. Journal of Translational Medicine, 2021, 19: 269
- [28] 施乐乐. 一个与金针菇子实体形成相关的 HMG-box 转录因子的功能研究[D]. 福州: 福建农林大学硕士学位论文, 2015
Shi LL. The function study of a HMG-box transcription factor, which related with the fruiting body formation of *Flammulina velutipes*[D]. Fuzhou: Master's Thesis of Fujian Agriculture and Forestry University, 2015 (in Chinese)
- [29] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [30] 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)
- [31] 何凯, 张琴, 赵胜. 单核苷酸多态性研究进展[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2004, 30(5): 619-623
He K, Zhang Q, Zhao S. The research development of single nucleotide polymorphism[J]. Journal of Southwest University for Nationalities: Natural Science Edition, 2004, 30(5): 619-623 (in Chinese)
- [32] 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
- [33] 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-e01719
- [34] Meng L, Lyu XM, Shi LL, Wang QJ, Wang L, Zhu MJ, Mukhtar I, Xie BG, Wang W. The transcription factor FvHmg1 negatively regulates fruiting body development in winter mushroom *Flammulina velutipes*[J]. Gene, 2021, 785: 145618
- [35] Wu TJ, Zhang ZY, Hu CC, Zhang L, Wei SL, Li SJ. A WD40 protein encoding gene *Fvcpc2* positively regulates mushroom development and yield in *Flammulina velutipes*[J]. Frontiers in Microbiology, 2020, 11: 498
- [36] Lyu XM, Jiang SY, Wang L, Chou TS, Wang QJ, Meng L, Mukhtar I, Xie BG, Wang W. The *Fvclp1* gene regulates mycelial growth and fruiting body development in edible mushroom *Flammulina velutipes*[J]. Archives of Microbiology, 2021, 203(9): 5373-5380
- [37] 牟金叶, 陈晓光. 促分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)信号传导通路的研究进展[J]. 生命科学, 2002, 14(4): 208-211, 203
Mu JY, Chen XG. The progress of the study on the mitogen-activated protein kinase pathways[J]. Chinese Bulletin of Life sciences, 2002, 14(4): 208-211, 203 (in Chinese)
- [38] Hagiwara D, Sakamoto K, Abe K, Gomi K. signaling pathways for stress responses and adaptation in *Aspergillus* species: stress biology in the post-genomic era[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2016, 80(9): 1667-1680

- [39] 杨系玲, 姜述君, 马婧, 戴凌燕, 邓本良, 孔祥森, 范文艳. 水稻纹枯病菌 MAPK 级联信号途径分析及信号通路模型预测[J]. 中国农业科技导报, 2017, 19(12): 24-33
Yang XL, Jiang SJ, Ma J, Dai LY, Deng BL, Kong XS, Fan WY. Identification of MAPK cascade signal pathway and prediction of the model in rice sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani*[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2017, 19(12): 24-33 (in Chinese)
- [40] 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
- [41] 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
- [42] Cervantes-Chávez JA, Ruiz-Herrera J. STE11 disruption reveals the central role of a MAPK pathway in dimorphism and mating in *Yarrowia lipolytica*[J]. FEMS Yeast Research, 2006, 6(5): 801-815
- [43] Palacios L, Dickinson RJ, Sacristán-Reviriego A, Didmon MP, Marín MJ, Martín H, Keyse SM, Molina M. Distinct docking mechanisms mediate interactions between the Msg5 phosphatase and mating or cell integrity mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(49): 42037-42050
- [44] Kitade Y, Sumita T, Izumitsu K, Tanaka C. MAPKK-encoding gene *Ste7* in *Bipolaris maydis* is required for development and morphogenesis[J]. Mycoscience, 2015, 56(2): 150-158
- [45] Leng G, Song K. Direct interaction of Ste11 and Mkk1/2 through Nst1 integrates high-osmolarity glycerol and pheromone pathways to the cell wall integrity MAPK pathway[J]. FEBS Letters, 2016, 590(1): 148-160
- [46] Si HY, Rittenour WR, Harris SD. Roles of *Aspergillus nidulans* Cdc42/Rho GTPase regulators in hyphal morphogenesis and development[J]. Mycologia, 2016, 108(3): 543-555
- [47] Song ZY, Jiang W, Yin YP, Wang ZK. Polarity proteins Mrcdc24 and Mrbem1 required for hypha growth and microsclerotia formation in *Metarhizium rileyi*[J]. Biocontrol Science and Technology, 2016, 26(6): 733-745
- [48] Zeitlinger J, Simon I, Harbison CT, Hannett NM, Volkert TL, Fink GR, Young RA. Program-specific distribution of a transcription factor dependent on partner transcription factor and MAPK signaling[J]. Cell, 2003, 113(3): 395-404
- [49] Pitoniak A, Birkaya B, Dionne HM, Vadaie N, Cullen PJ. The signaling mucins Msb2 and Hkr1 differentially regulate the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway and contribute to a multimodal response[J]. Molecular Biology of the Cell, 2009, 20(13): 3101-3114
- [50] Madhani HD, Fink GR. Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling[J]. Science, 1997, 275(5304): 1314-1317
- [51] 庄森, 张智敏, 王宝腾, 金锋杰. 应用双分子荧光互补技术分析米曲霉 Fus3 与 Ste12 之间的蛋白互作[J]. 微生物学通报, 2019, 46(2): 269-277
Zhuang M, Zhang ZM, Wang BT, Jin FJ. Interaction between Fus3 and Ste12 in *Aspergillus oryzae* analysed by bimolecular fluorescence complementation[J]. Microbiology China, 2019, 46(2): 269-277 (in Chinese)
- [52] 刘文魁. 苹果炭疽叶枯病菌果生刺盘孢转录因子 *Ste12* 基因的功能研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2017
Liu WK. Functional analysis of transcription factor *Ste12* in *Colletotrichum fructicola* that caused *Glomerella* leaf spot[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2017 (in Chinese)
- [53] 张运峰, 张淑红, 范永山, 董金皋. *Ste12* 基因对玉米大斑病菌渗透胁迫的调控作用[J]. 河北农业大学学报, 2016, 39(2): 91-95
Zhang YF, Zhang SH, Fan YS, Dong JG. Regulation of *Ste12* on osmotic stress of *Setosphaeria turcica*[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2016, 39(2): 91-95 (in Chinese)