

糙皮侧耳 AQP_s 基因家族鉴定与表达分析

胡继鹏^{1,2}, 鲍大鹏^{1,2}, 邹根², 高贺宇^{1,2}, 尚俊军^{2*}, 唐利华^{1,2*}

1 上海海洋大学食品学院, 上海 201306

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 201403

摘要: 水通道蛋白(AQP)基因家族在真菌的水分运输及多种生理过程中发挥重要作用。本研究通过生物信息学方法系统鉴定糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus* AQP 家族成员(PoAQPs), 并对其理化性质、亚细胞定位、染色体定位、系统进化关系、保守基序以及启动子顺式作用元件进行分析。同时, 通过 RT-qPCR 检测 PoAQPs 基因在不同生长阶段以及水分过剩胁迫条件下的相对表达量。分析显示, 糙皮侧耳基因组中共鉴定出 5 个 PoAQPs 成员, 分为经典 AQP 和 AQGP 2 个亚家族, 均含有 MIP 超家族结构域和经典的水通道蛋白三级结构特征; 5 个 PoAQPs 基因分布于 4 条染色体上, 亚细胞定位预测结果显示, 这些基因均定位于细胞膜; 同一亚家族的成员具有相似的保守基序; 启动子区域富含大量的激素响应和非生物胁迫相关的调控作用元件; RT-qPCR 结果显示, PoAQPs 基因在不同生长阶段和水分过剩胁迫条件下的表达存在显著差异, 且主要在糙皮侧耳的子实体阶段以及水分过剩胁迫 8 h 中高表达。推测 PoAQPs 在调控糙皮侧耳的生长发育及非生物胁迫响应中发挥作用, 这一发现为深入理解糙皮侧耳的水分调控机制及抗胁迫品种的培育提供了理论支持。

关键词: 糙皮侧耳; 水通道蛋白; 基因家族; 生物信息学; 表达分析

[引用本文]

胡继鹏, 鲍大鹏, 邹根, 尚俊军, 高贺宇, 唐利华, 2025. 糙皮侧耳 AQP_s 基因家族鉴定与表达分析. 菌物学报, 44(3): 240252
Hu JP, Bao DP, Zou G, Shang JJ, Gao HY, Tang LH, 2025. Identification and expression analyses of the aquaporin gene family in *Pleurotus ostreatus*. Mycosystema, 44(3): 240252

资助项目: 国家自然科学基金(32172649); 山东重点研发计划(2022CXGC010610)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32172649) and the Major Innovation Project of Shandong Province (2022CXGC010610).

*Corresponding authors. E-mail: SHANG Junjun, shangjunjun@saas.sh.cn; TANG Lihua, lhtang2007@163.com

Received: 2024-09-04; Accepted: 2024-10-24

Identification and expression analyses of the aquaporin gene family in *Pleurotus ostreatus*

HU Jipeng^{1,2}, BAO Dapeng^{1,2}, ZOU Gen², GAO Heyu^{1,2}, SHANG Junjun^{2*}, TANG Lihua^{1,2*}

¹ College of Food Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

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

Abstract: The aquaporin (AQP) gene family plays a crucial role in water transport and various physiological processes in fungi. In this study, the members of the AQP family in *Pleurotus ostreatus* (PoAQPs) were systematically identified using bioinformatics approaches, and their physicochemical properties, subcellular localization, chromosomal distribution, phylogenetic relationships, conserved motifs, and cis-regulatory elements of the promoters were analysed. The relative expression levels of PoAQPs were evaluated in various growth stages and under waterlogging stress conditions using RT-qPCR. As a result, five members of the aquaporin (PoAQPs) gene family in the genome of *Pleurotus ostreatus* were identified, which were categorized into two subfamilies, classical aquaporins (AQPs) and aquaglyceroporins (AQGPs). All members contained the MIP superfamily domain and exhibited the characteristic tertiary structure of classical water channel proteins. The five PoAQPs genes were distributed among four chromosomes, and subcellular localization predictions indicated that these genes were located at the cell membrane. Members within the same subfamily shared similar conserved motifs. The promoter regions were enriched with numerous regulatory elements related to hormonal responses and abiotic stress. RT-qPCR results revealed significant differences in the expression levels of PoAQPs genes in various growth stages and in response to waterlogging stress, with particularly high expression during the fruiting body stage and after 8 hours of waterlogging stress. It is suggested that PoAQPs are involved in the regulation of the growth, the development of *Pleurotus ostreatus* as well as the responses to abiotic stress. These findings offer valuable theoretical insights into the mechanisms of water regulation in *Pleurotus ostreatus* and give support to the breeding of stress-resistant varieties.

Keywords: *Pleurotus ostreatus*; aquaporins; gene family; bioinformatics; expression analysis

糙皮侧耳 *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P Kumm., 俗称平菇，是全球广泛栽培的重要食用菌，因其极高的经济和营养价值而备受青睐(Ma *et al.* 2018; Özdemir *et al.* 2021; Effiong *et al.* 2024)。

“雨后出蘑菇”这一自然现象揭示了水分在蘑菇形态转变中的关键作用，其对蘑菇子实体产量和品质具有重要影响。随着全球气候变化和环境压力的加剧，作为一种新兴农业生产方式，食用菌

种植的产量和质量正面临严峻挑战(Bennett & Classen 2020; Kumar *et al.* 2021)。因此，深入研究糙皮侧耳对环境胁迫的适应机制显得尤为重要，不仅有助于提高栽培效率，还为开发更具环境适应性的食用菌新品种提供理论依据，从而保障食用菌产业的可持续发展。

水通道蛋白(aquaporins, AQPs)是一类高度保守的跨膜蛋白，主要负责选择性转运水分子

及某些小分子溶质,如甘油、尿素和部分气体(Agre *et al.* 2002)。自1992年首次鉴定出水通道蛋白以来,AQPs已在植物、动物及微生物中被广泛鉴定和研究,显示出其在调节细胞内外水分平衡及响应环境胁迫中起着关键作用(Chevriau *et al.* 2024)。在真菌中,AQPs主要分为两类:经典水通道蛋白(aquaporin, AQP)和水-甘油通道蛋白(aquaglyceroporins, AQGP),它们均属于主要内在蛋白(MIPs)超家族,负责跨膜运输水和中性溶质(Tanghe *et al.* 2006; Verma *et al.* 2014)。已有研究集中在特定真菌中的AQPs功能,包括酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (Xu & Zwiazek 2020)、代氏根霉 *Rhizopus delemar* (Turgeman *et al.* 2016)、灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* (An *et al.* 2016)和沙漠松露 *Terfezia clavaryi* (Navarro-Ródenas *et al.* 2012)。如酿酒酵母中存在两类水通道蛋白:经典水通道蛋白(Aqy1和Aqy2)和水-甘油通道蛋白(Fps1和Yfl054)(Pettersson *et al.* 2005)。其中,Aqy1与孢子形成有关,而Aqy2则参与形态发生过程(Ahmadpour *et al.* 2014)。Fps1在酿酒酵母的渗透压调节中发挥核心作用,通过调控细胞内甘油的水平来适应不同的渗透压条件。在高渗透压条件下,其活性降低以保留甘油,而在低渗透压条件下则恢复活性以释放甘油(Tamás *et al.* 1999)。类似地,菌根真菌“沙漠松露”中的TcAQP1不仅能够转运水分,还能转运CO₂,这一功能与其在半干旱环境中的适应性及其共生机制密切相关(Navarro-Ródenas *et al.* 2012)。

目前,关于丝状真菌AQPs的研究仍然有限,尤其是在糙皮侧耳中,尚未见到关于AQPs基因家族鉴定的报道,特别是AQPs在糙皮侧耳子实体发育及非生物胁迫中的作用尚未得到充分表征。

本研究通过生物信息学方法鉴定PoAQPs家族成员,并对其理化性质、亚细胞定位、染

色体定位、系统进化关系、保守基序以及启动子顺式作用元件进行分析,最后利用RT-qPCR分析PoAQPs基因在不同生长阶段及水分过剩胁迫条件下的表达模式。该研究结果可为食用菌领域的AQPs研究提供新数据,同时对优化食用菌栽培管理、提升子实体产量及品质具有潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂和仪器

糙皮侧耳 ATCC56271 标准菌株取自上海市农业科学院食用菌研究所。TRIzol 和 cDNA 反转录试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司]、ABI 7300 型荧光定量 PCR 仪(Thermo Fisher Scientific 公司)。

1.2 样品处理

按照 87%棉籽壳、12%麸皮和 1%石灰的配方制作出菇栽培料,水分含量控制在 60%,pH 7.0–7.5。每个组培瓶分装 50 g 培养料,121 °C 高压灭菌 3 h 后,置于超净工作台中接入等量糙皮侧耳二级种菌块,放入 25 °C 恒温培养箱中培养,待菌丝长满后移至出菇箱。在水分过剩胁迫处理中,将去离子水均匀等量倒入组培瓶中,确保水分完全浸没菌丝体,水浸处理时间设置为 0、4、8 和 12 h,满足水浸时间后将水倒出。所有水浸操作均在无菌条件下进行,避免外源污染。对糙皮侧耳的菌丝、原基、幼小和成熟子实体阶段的样品进行取样,同时在不同水浸时间下对菌丝进行取样。所有样品均经过液氮速冻处理,并存放于–80 °C 超低温冰箱中,以备后续实验使用。所有实验均设有 3 个生物学重复,以确保结果的可靠性和可重复性。

1.3 PoAQPs 家族成员鉴定

从 InterPro 数据库(<https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/pfam/PF00230/curation/>)下载水通道蛋白 AQPs (PF00230)家族的 hmm 文件,从

Ensembl 数据库下载糙皮侧耳的全基因组 (GCA_000697685.1)、蛋白质、cds 和 GFF3 数据文件。将糙皮侧耳全基因组蛋白文件与种子文件通过 Tbtools 软件中的 simple HMM search 构建的隐马尔可科夫模型进行比对, 得到候选的糙皮侧耳蛋白质序列(Zeng *et al.* 2023)。随后从 NCBI 网站(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载模式真菌 AQPs 同源序列, 并使用 BLAST 工具进行比对。对 HMMER 和 BLAST 结果取交集, 共得到 5 条 PoAQPs 蛋白序列。用 CDD (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)鉴定保守结构域, 每条蛋白都含有 MIP 超家族结构域。

1.4 PoAQPs 家族成员的生物信息学分析

使用 <https://web.expasy.org/protparam/> 预测蛋白的理化性质; 使用 Cell-Ploc2.0 (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Cell-Ploc-2/>)对蛋白进行亚细胞定位预测; 分别使用 SOPMA (https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html)和 SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>)预测各蛋白的二级结构和三级结构。

1.5 PoAQPs 家族成员的系统进化分析

根据已经得到的 5 个蛋白序列, 并结合多个已报道的真菌的水通道蛋白进行进化分析, 构建系统发育树。使用 MEGA11 软件采用最大似然法对 AQPs 家族的蛋白序列构建系统进化树, Bootstrap 设为 1 000 进行自检(Kumar *et al.*

2018)。使用在线工具 iTOL v6 (<https://itol.embl.de/>)和 Adobe Illustrator 2023 软件美化进化树。

1.6 PoAQPs 基因家族成员保守基序、染色体定位分析

通过 MEME 软件将蛋白序列转换成 Mast-out 文件, 再用 Tbtools 软件(Chen *et al.* 2020)对 motif 进行可视化分析。使用 TBTtools 软件, 输入全基因组的 Gff3 文件和 5 个 AQPs 蛋白序列 ID, 可视化得到 PoAQPs 的染色体位置分布。

1.7 PoAQPs 顺式作用元件分析

通过 Tbtools 软件提取 PoAQPs 基因家族的前 2 000 bp 启动子序列, 在 Plantcare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>)中预测顺式作用元件, 整理之后用 Tbtools 进行可视化。

1.8 RT-qPCR 分析

为进一步解析 PoAQPs 基因家族各成员的功能, 本研究采用 RT-qPCR 分析了 5 个 PoAQPs 基因在不同生长阶段及不同水分过剩胁迫时间下的表达模式。使用 RNA 提取试剂盒分别提取糙皮侧耳不同发育时期(菌丝体、原基、幼小子实体和成熟子实体)以及不同水分过剩胁迫时间(0、4、8 和 12 h)下的样本总 RNA, 按照试剂盒说明书反转录为 cDNA。针对 PoAQPs 家族蛋白序列及内参基因设计了特异性引物(表 1), 利用荧光定量 PCR 仪进行扩增。根据扩增所得的 Ct 值, 采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算基因相对表达量(Jozefczuk & Adjaye 2011)。

表 1 糙皮侧耳 PoAQPs 基因的 RT-qPCR 引物

Table 1 Specific primers for RT-qPCR of PoAQPs genes in *Pleurotus ostreatus*

基因 ID	基因名称	上游引物	下游引物
Gene ID	Gene name	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
KDQ32801	PoAQPs1	CCACGCGATCGACATCTTTG	ATAATCCGCCGCGTAGGTAG
KDQ25901	PoAQPs2	TGGTGCCGCTTTGGTCTAC	AAAGAGCCCAGCAGTGTTC
KDQ25940	PoAQPs3	CCGTTGGAGTTGGGTTGAC	CCCAGTACACCCAGTGATGTG
KDQ24900	PoAQPs4	CGGTGCGCAATGAATACTG	GCCAATACACCCAATGGTGC
KDQ28261	PoAQPs5	GGGCTCACACTCTTCGTTGG	CGGGCCGAGCCAATAAATCC
	β-actin	ATCCACGAGACAACATACAAC	GATAGAACCACCAATCCAAA

2 结果与分析

2.1 PoAQP_s 家族成员的鉴定及理化性质分析

结合 HMM 和 BLAST 比对分析,共鉴定出 5 条 PoAQP_s 序列。CDD 结构域分析结果显示,这些蛋白均具有典型的 MIP 结构域,将其依次命名为 PoAQP_s1–PoAQP_s5。PoAQP_s 家族成员的理化性质分析表明(表 2),家族成员的蛋白序列长度较为一致,介于 173–277 aa 之间;PoAQP_s 平均分子量为 27.15 kDa,其中 PoAQP_s3 的分子量最大,为 29.72 kDa, PoAQP_s4 最小,为 20.78 kDa;蛋白质等电点(pI)介于 6.06 (PoAQP_s1)–9.75 (PoAQP_s4)之间;疏水性介于 0.479 (PoAQP_s5)–0.661 (PoAQP_s4);亚细胞定位预测显示, PoAQP_s 均定位于细胞膜。

2.2 PoAQP_s 家族成员二级和三级结构分析

PoAQP_s 中的二级结构占比大致相同(表 3),其中无规则卷曲占比最大(40.56%–50.55%),其次是 α -螺旋(34.44%–41.03%)和延

伸链(15.02%–24.10%)。使用 SWISS-MODEL 成功预测了 PoAQP_s 家族成员的三级结构(图 1)。这些蛋白的核心结构均由 6 个跨膜螺旋(TM1–TM6)组成,并由 5 个连接环(Loop A–E)连接,这种高度保守的结构在所有 PoAQP_s 中均显著保留。所有 5 个 PoAQP_s 蛋白均展示出典型的 NPA 基序(Asn-Pro-Ala),位于 2 个半螺旋(HB 和 HE)的 N 端之间,该基序可能是这些蛋白质功能的关键,尤其是水分子转运及选择性通透性。值得注意的是, PoAQP_s2 和 PoAQP_s5 的细胞外 C 末端环(Loop E)较长, PoAQP_s4 展示了独特的 Loop B 延伸结构, PoAQP_s1 和 PoAQP_s4 在 TM4 和 TM5 之间的相互作用更为紧密,这暗示它们可能存在不同的构象开关机制。

2.3 PoAQP_s 基因家族成员系统发育分析

为了明确糙皮侧耳 AQP 家族成员的进化关系,本研究结合多个已经报道的代表性真菌水通道蛋白序列进行系统发育树的构建。进化分析显示,糙皮侧耳的 PoAQP_s 可分为 2 个亚类:

表 2 PoAQP_s 家族成员的理化性质

Table 2 Physicochemical properties of PoAQP_s family members

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	蛋白序列长度 Protein length (aa)	分子量 Molecular weight (kDa)	等电点 Isoelectric point	疏水性 Hydrophobicity	亚细胞定位 Subcellular location
KDQ32801	PoAQP _s 1	249	26.775 28	6.06	0.600	细胞膜 Plasma membrane
KDQ25901	PoAQP _s 2	272	29.228 09	8.32	0.606	细胞膜 Plasma membrane
KDQ25940	PoAQP _s 3	277	29.724 69	9.40	0.637	细胞膜 Plasma membrane
KDQ24900	PoAQP _s 4	195	20.781 46	9.75	0.661	细胞膜 Plasma membrane
KDQ28261	PoAQP _s 5	173	29.218 93	6.58	0.479	细胞膜 Plasma membrane

表 3 糙皮侧耳 PoAQP_s 二级结构分析

Table 3 Secondary structure analyses of PoAQP_s in *Pleurotus ostreatus*

基因 ID Gene ID	基因名称 Gene name	α -螺旋(Hh) Alpha helix (%)	无规则卷曲(Cc) Random coil (%)	延伸链(Ec) Extended strand (%)
KDQ32801	PoAQP _s 1	35.34	40.56	24.10
KDQ25901	PoAQP _s 2	35.66	42.28	22.06
KDQ25940	PoAQP _s 3	38.27	47.29	14.44
KDQ24900	PoAQP _s 4	41.03	41.03	17.95
KDQ28261	PoAQP _s 5	34.43	50.55	15.02

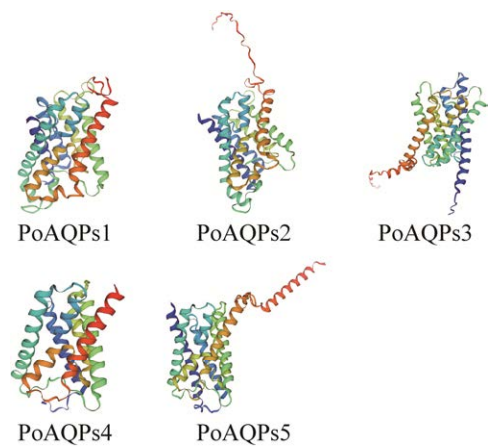


图 1 糙皮侧耳 PoAQPs 三级结构预测

Fig. 1 Prediction of tertiary structure of the PoAQPs in *Pleurotus ostreatus*.

经典水通道蛋白(AQP)和水-甘油通道蛋白(AQGP) (图 2)。其中 PoAQPs3、PoAQPs4 和 PoAQPs5 聚类于经典的 AQP 亚类，表现出与其他真菌 AQP 高度保守的特征，表明其主要参与水分子选择性转运的功能；而 PoAQPs1 和 PoAQPs2 则属于 AQGP 亚类，与众多已知的甘油通道蛋白聚为一簇，暗示它们不仅具有转运水的功能，还可能在甘油及其他小分子溶质的转运过程中发挥重要作用。糙皮侧耳 AQP 的系统发育分析为进一步理解糙皮侧耳水通道蛋白的多样性及其在环境适应性中的特异性功能提供了重要的参考依据。

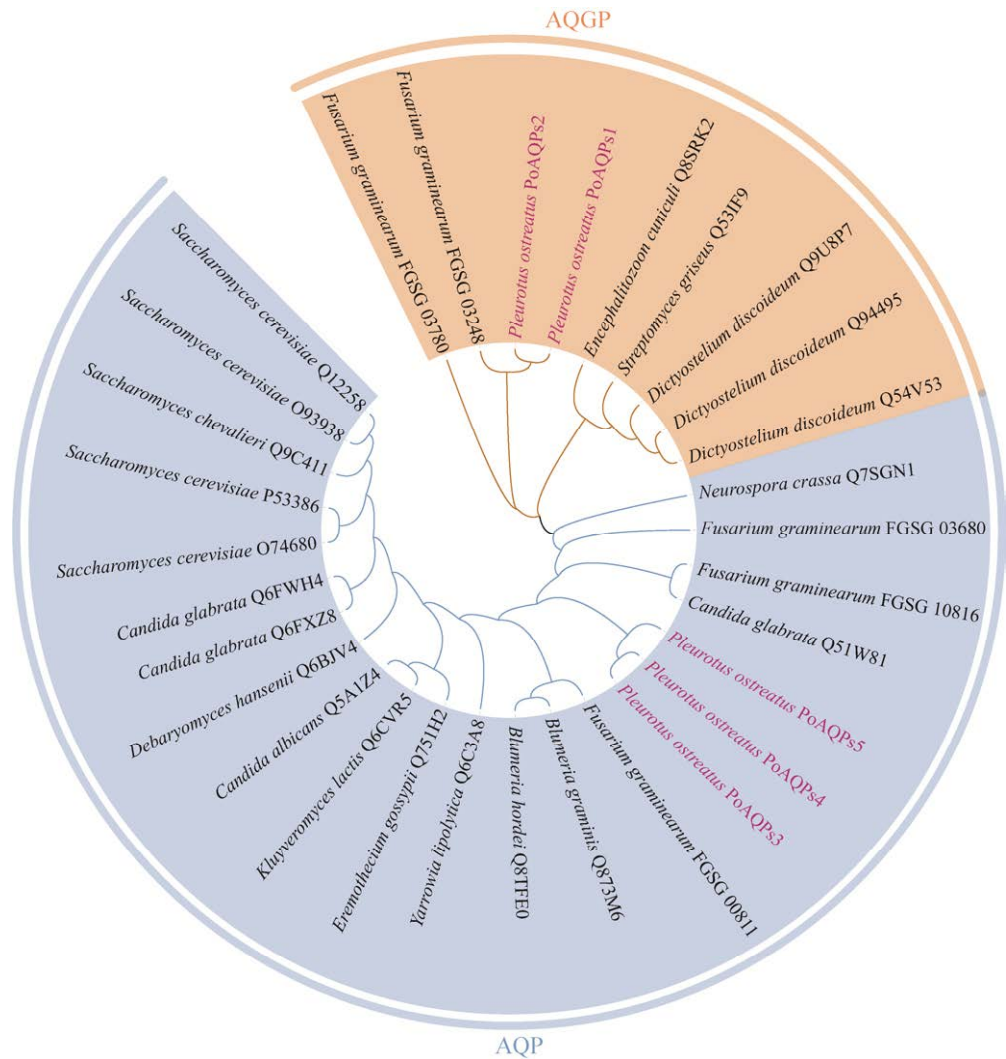


图 2 不同物种 AQPs 系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of AQPs in different species.

2.4 PoAQP_s 家族成员 Motif 分析

通过使用 MEME 和 TBTtools 软件对糙皮侧耳 PoAQP_s 进行 Motif 分析, 共预测出 8 个 Motif (Motif 1–Motif 8) (图 3)。分析结果显示, 每个 PoAQP_s 蛋白序列中均包含 Motif 2、Motif 3 和 Motif 5, 表明这些 Motif 在糙皮侧耳 PoAQP_s 中分布最广泛, 保守性最强。亲缘关系较近的 PoAQP_s 通常具有相似的 Motif, 反映了它们之间密切的亲缘关系。相比之下, Motif 差异较大的 PoAQP_s 往往分属不同的亚族, 具有较远的亲缘关系, 导致它们的蛋白质 Motif 数量和分布存在显著差异, 如 PoAQP_s1 和 PoAQP_s5。此分析揭示了糙皮侧耳 AQP_s 家族中不同成员在结构上的保守性与多样性, 为进一步研究其功能特性提供了重要线索。

2.5 PoAQP_s 染色体定位分析

PoAQP_s 家族成员的染色体定位分析发现 (图 4), 5 个 PoAQP_s 分布于 4 条染色体上, 包括 Chr4、Chr8、Chr10 和 Chr11, 且分布并不均匀。其中, Chr10 上聚集了 2 个 PoAQP_s 基因 (PoAQP_s2 和 PoAQP_s3), 而其余染色体上均只定位了一个 PoAQP_s 基因。PoAQP_s 基因家族的这种不均匀分布可能反映了基因复制或染色体重排在基因进化中的作用, 尤其是 Chr10 上的多基因分布可能代表了相关功能基因的簇群现象, 揭示了其在特定生物过程中的协同作用。这种分布格局的揭示为深入理解糙皮侧耳水通道蛋白基因的演化与功能调控提供了重要线索。

2.6 PoAQP_s 家族成员顺式作用元件分析

PoAQP_s 基因启动子区的顺式作用元件分析揭示了其在基因转录调控及环境响应中的潜在功能。通过 PlantCARE 数据库对 PoAQP_s 基因上游 2 000 bp 区域的顺式作用元件进行预测, 共鉴定出 12 种不同类型的元件, 包括光响应、水杨酸响应、脱落酸响应、厌氧诱导、细胞周期调控、低温响应、分生组织表达、参与

缺氧特异性诱导、参与干旱诱导的 MYB 结合位点、昼夜节律控制、生长素响应以及 MYBHv1 结合位点元件 (图 5)。这些元件在 PoAQP_s 基因的启动子区域内具有较高的一致性, 表明这些基因家族成员可能通过多种生物途径共同调控糙皮侧耳的生长发育及对环境胁迫的应答。这些发现为进一步探索 PoAQP_s 基因在不同环境条件下的调控机制提供了理论依据。

2.7 PoAQP_s 的表达分析

RT-qPCR 分析显示, PoAQP_s 基因在不同生长阶段和水分过剩胁迫条件下的表达存在显著差异。在生长过程中, PoAQP_s1、PoAQP_s2 和 PoAQP_s5 的表达量逐渐增加, 并在成熟子实体阶段达到最高峰 (图 6A)。相比之下, PoAQP_s3 的表达在整个发育过程中变化较小, 仅在成熟子实体阶段显著上调。以上结果表明 PoAQP_s 在糙皮侧耳子实体形成阶段发挥重要作用。在水分过剩胁迫实验中 (图 6B), PoAQP_s1、PoAQP_s2、PoAQP_s4 和 PoAQP_s5 的表达量呈现出先升后降的趋势, 并在 8 h 时达到峰值。尤其是 PoAQP_s5, 在 12 h 时依然保持较高的表达水平, 表明其在长期水分胁迫中的潜在适应性。相反, PoAQP_s3 的表达则呈现出先降后升再降的趋势, 并在 12 h 时达到最低值。这些 PoAQP_s 基因表达水平的变化可能反映了它们在调节细胞内外水势变化和维持细胞膨压中的关键作用, 从而帮助调控细胞内的水分平衡, 避免因水分过量导致的细胞损伤。总的来说, PoAQP_s 家族成员在糙皮侧耳不同生长发育阶段和水分过剩胁迫响应中的表达模式和功能表现出显著差异。这些结果为进一步探讨 PoAQP_s 的生物学功能提供了关键线索。

3 讨论

在动植物和真菌中, AQP_s 不仅参与细胞水分的转运和维持细胞渗透压平衡, 还在细胞应

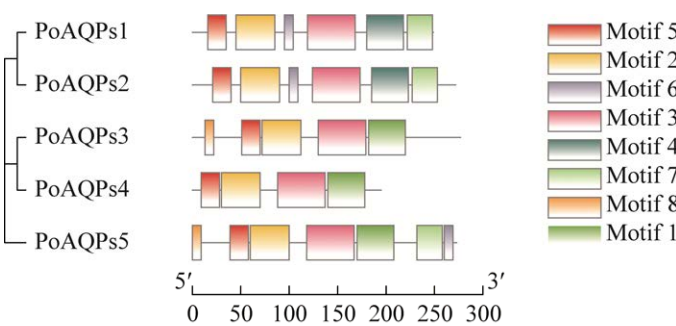


图 3 PoAQPs 基因家族成员的保守基序

Fig. 3 Conserved motif analyses of PoAQPs gene family members.

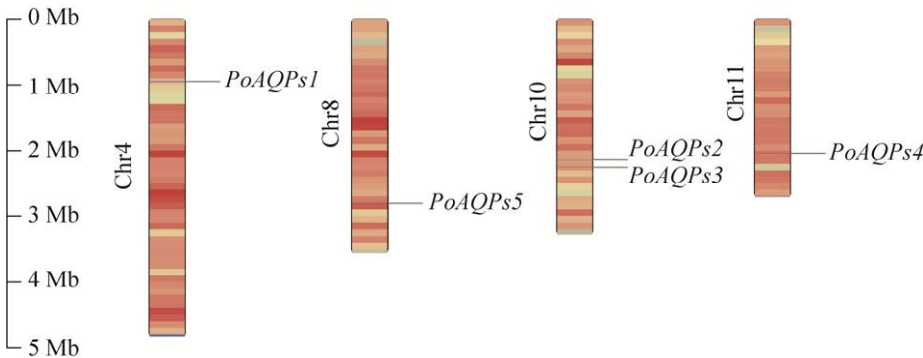


图 4 PoAQPs 基因的染色体定位

Fig. 4 Chromosomal location of PoAQPs genes.

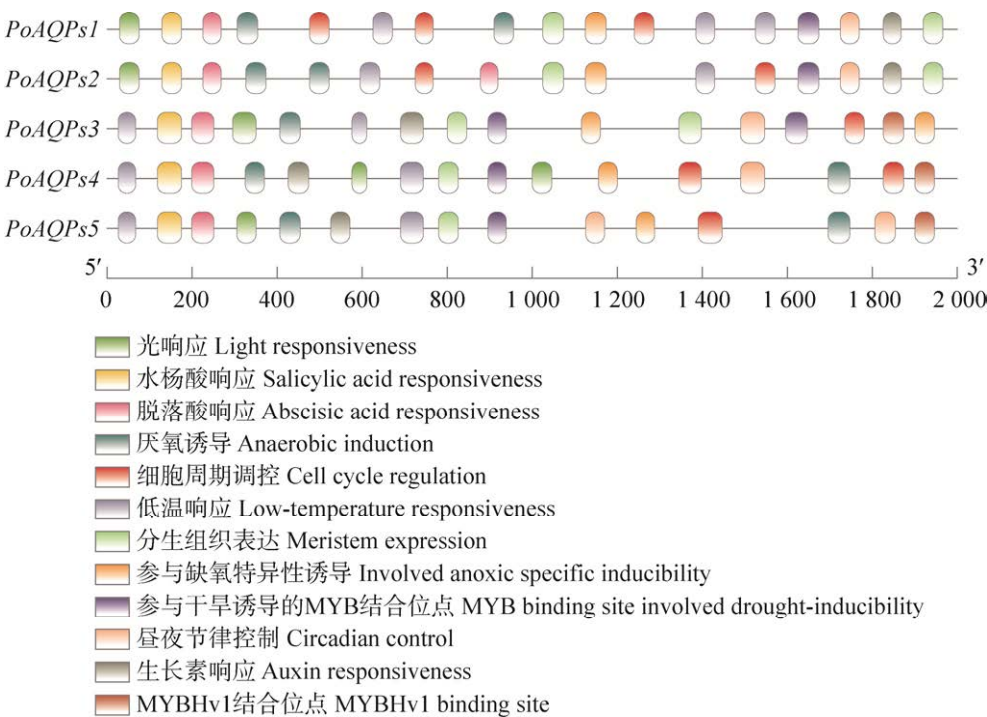


图 5 糙皮侧耳 *PoAQPs* 家族成员的启动子顺式作用元件分析

Fig. 5 Analyses of promoter cis-acting elements of PoAQPs gene family members in *Pleurotus ostreatus*.

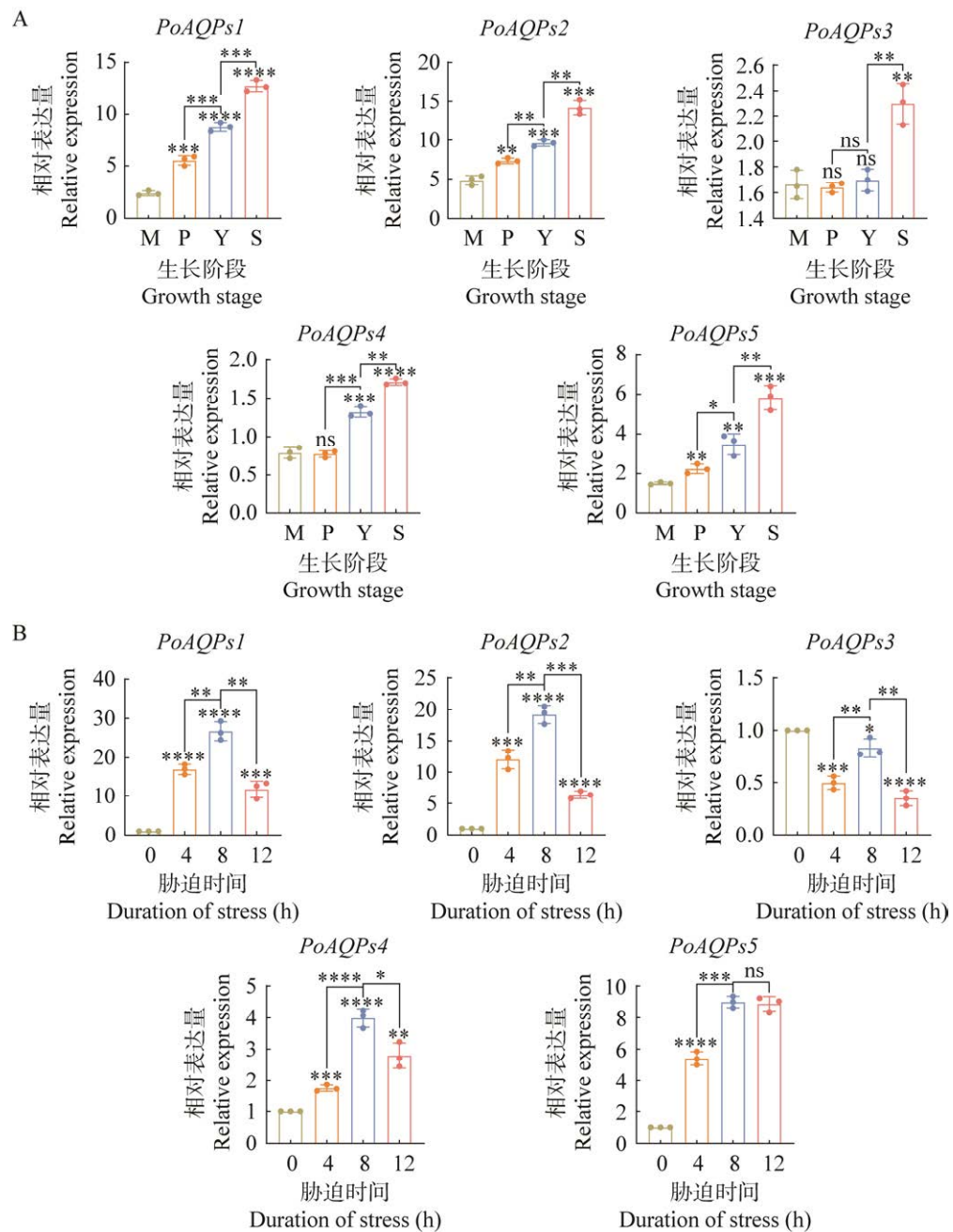


图6 糙皮侧耳不同生长阶段(A)及水分过剩胁迫(B)下 *PoAQP*s 基因的表达模式分析 A: 不同生长阶段下 *PoAQP*s 的相对表达量, M、P、Y、S 分别表示糙皮侧耳的菌丝体、原基、幼小子实体和成熟子实体阶段; B: 不同水分过剩胁迫时间下 *PoAQP*s 的相对表达量. 数据为平均值 $\pm$ 标准差($n=3$), *表示组间有显著性差异, *, **, ***和****分别表示在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 、 $P<0.001$ 、 $P<0.0001$ 水平上差异显著

Fig. 6 Analysis of *PoAQP*s gene expression patterns in *Pleurotus ostreatus* under different growth stages (A) and waterlogging stress (B). A: The relative expression levels of *PoAQP*s at different growth stages, with M, P, Y, and S representing the mycelium, primordium, young fruiting body, and mature fruiting body stages of *Pleurotus ostreatus*, respectively. B: The relative expression levels of *PoAQP*s under different waterlogging stress durations. Data are presented as the mean $\pm$ standard deviation ($n=3$). * Indicates significant differences between groups, with *, **, ***, and **** indicating significance levels of $P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.001$, and $P<0.0001$, respectively.

对外界环境变化、调节生长发育进程中起到重要作用(Maurel & Chrispeels 2001)。研究表明, 过表达 *Aqy1* 和 *Aqy2* 增强了酿酒酵母的冷冻耐受性(Tanghe *et al.* 2002); *AQP8* 调节灰葡萄孢菌 *Botrytis cinerea* 的细胞发育和活性氧生成, 并在致病过程中发挥重要作用(An *et al.* 2016)。由于基因组测序技术的快速发展, 已经在很多真菌中鉴定出 AQPs, 如黑曲霉 *Aspergillus niger* 7 个(Laothanachareon *et al.* 2023)、木霉 *Trichoderma atroviride* 7 个(Amira *et al.* 2021)、灵芝 *Ganoderma lingzhi* 5 个(朱全宇 2022)、禾谷镰孢菌 *Fusarium graminearum* 5 个(丁明玉 2018), 这些结果为 AQPs 在真菌生长发育、环境适应及水分调控等生物学功能的研究奠定了基础。本研究从糙皮侧耳基因组中成功鉴定出 5 个 *PoAQPs* 基因家族成员。系统发育分析将 5 个 *PoAQPs* 基因分为两大类: 经典水通道蛋白(AQP)和水通道-甘油通道蛋白(AQGP), 这种分类与在其他真菌中的报道一致, 表明这些基因在真菌中的进化和功能具有一定的序列保守性(Chevriau *et al.* 2024)。进一步的 Motif 分析揭示了尽管这些基因的序列存在差异, 但其保守的 NPA 基序可能决定了这些蛋白的基本功能, 如水分子运输和选择性通透性(Törnroth-Horsefield *et al.* 2006)。*PoAQPs* 基因启动子区域含有大量与非生物胁迫相关的调控作用元件, 如低温响应和缺氧诱导, 表明 *PoAQPs* 基因家族参与糙皮侧耳非生物胁迫过程。

MIP 超家族结构域是水通道蛋白的关键特征, 负责水分子在细胞膜上的高效选择性运输(Xiong *et al.* 2023)。该结构域的存在表明这些 *PoAQPs* 具有经典的水分运输功能, 确保在不同环境条件下的水分平衡。同时, MIP 超家族结构域的保守性也揭示这些蛋白在进化过程中保留了其核心功能, 可能参与了糙皮侧耳对环境胁迫的响应和适应过程。*PoAQPs* 在三级结构上具有显著保守性, 尤其是 6 个跨膜螺旋和

NPA 基序(图 1), 而 NPA 基序的存在被认为是水通道蛋白能够高效选择性转运水分子的基础, 阻止质子的通过(Murata *et al.* 2000; Hub & de Groot 2008)。这种结构的保守性支持了其在水分子转运中的核心功能, 同时通过特定的电性环境维持选择性通透性。尽管 *PoAQPs* 成员在整体结构上表现出高度的保守性, 但每个成员在关键区域的结构变异可能与其在不同发育阶段或环境胁迫下的功能分化有关。例如, *PoAQPs2* 和 *PoAQPs5* 中细胞外 C 末端环较长的 Loop E 可能反映了其在环境胁迫中的特定功能, 而 *PoAQPs4* 中独特的 Loop B 延伸结构可能赋予其特殊的分子识别或信号传导功能。这些结构上的差异揭示了这些蛋白质在应对不同环境条件和细胞功能需求时的功能多样性(Lee *et al.* 1997)。这些预测的结构不仅揭示了 *PoAQPs* 家族成员的功能多样性, 还为未来的实验验证提供了重要的参考。

在糙皮侧耳的不同生长阶段及水分过剩胁迫条件下, *PoAQPs* 基因的表达量和趋势不同。本研究发现, *PoAQPs* 基因均在子实体阶段高表达, 表明它们可能在子实体的形成和成熟中发挥重要作用, 这与先前在其他真菌中观察到的 AQPs 基因在发育过程中的功能相一致。例如, AQPs 在调控丝状真菌菌丝的生长、菌核和分生孢子的形成及孢子萌发方面发挥重要作用(Li *et al.* 2013; Nehls & Dietz 2014)。同时, AQPs 还与次级代谢物的产生和分子运输过程有关(Turgeman *et al.* 2016; Ding *et al.* 2018)。这种现象可能源于 AQPs 在调控细胞膨压和水分运输中的关键作用, 这对于维持真菌子实体的正常生长发育至关重要。在水分过剩胁迫条件下, *PoAQPs1*、*PoAQPs2*、*PoAQPs4* 和 *PoAQPs5* 的基因表达量呈先升后降的趋势, 并在胁迫 8 h 达到峰值, 其中 *PoAQPs5* 在胁迫 12 h 后依然保持高表达。类似的响应模式在其他真菌(如酿酒酵母)中也有报道, AQPs 通过在

不同环境中维持细胞内适应环境的渗透压,从而防止细胞脱水或过度膨胀(Benga 2009; Xu & Zwiazek 2020)。与此同时,AQP_s在植物病原真菌和共生真菌中也扮演重要角色,其不仅影响真菌自身的生长,还通过调节水分运输来改变真菌与宿主植物的相互作用(Lu *et al.* 2023; Wang *et al.* 2024)。如丛枝菌根(AM)真菌可以通过调控共生植物桑树根系中PIP_s和TIP_s家族基因的表达,促进桑树水分吸收和氮素利用(涂德辉等 2022)。

本研究通过生物信息学方法在糙皮侧耳基因组中鉴定出5个PoAQP_s,系统发育分析显示5个PoAQP_s属于2个不同的亚家族,均含有MIP超家族结构域和经典的AQP_s三级结构特征。同时PoAQP_s基因在糙皮侧耳不同生长阶段和不同水分过剩胁迫时间下存在差异性表达,表明PoAQP_s在糙皮侧耳的子实体成熟及响应非生物胁迫中起到重要作用。研究结果为食用菌AQP_s领域的研究提供了新的见解,为解析糙皮侧耳的水分调控分子机制和培育抗胁迫品种提供理论依据。未来,通过进一步的AQP_s功能验证及更深入的环境适应性研究,有望更好地理解AQP_s在真菌生态学中的作用,从而为食用菌栽培育种及产业发展提供潜在的新策略。

作者贡献

胡继鹏:设计和完成实验、分析数据、撰写和修改文稿;鲍大鹏:提供论文思路;邹根:指导实验;尚俊军:参与设计实验、指导论文写作;高贺宇:参与完成实验、分析数据;唐利华:指导实验和论文写作。

利益冲突

作者声明,该研究不存在任何潜在利益冲突的商业或财务关系。

[REFERENCES]

- Agre P, King LS, Yasui M, Guggino WB, Ottersen OP, Fujiyoshi Y, Engel A, Nielsen S, 2002. Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine. *The Journal of Physiology*, 542(Pt 1): 3-16
- Ahmadpour D, Geijer C, Tamás MJ, Lindkvist-Petersson K, Hohmann S, 2014. Yeast reveals unexpected roles and regulatory features of aquaporins and aquaglyceroporins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1840(5): 1482-1491
- Amira MB, Faize M, Karlsson M, Dubey M, Frac M, Panek J, Fumanal B, Gousset-Dupont A, Julien JL, Chahr H, Auguin D, Mom R, Label P, Venisse JS, 2021. Fungal X-intrinsic protein aquaporin from *Trichoderma atroviride*: structural and functional considerations. *Biomolecules*, 11(2): 338
- An B, Li B, Li H, Zhang Z, Qin G, Tian S, 2016. Aquaporin8 regulates cellular development and reactive oxygen species production, a critical component of virulence in *Botrytis cinerea*. *The New Phytologist*, 209(4): 1668-1680
- Benga G, 2009. Water channel proteins (later called aquaporins) and relatives: past, present, and future. *IUBMB Life*, 61(2): 112-133
- Bennett AE, Classen AT, 2020. Climate change influences mycorrhizal fungal-plant interactions, but conclusions are limited by geographical study bias. *Ecology*, 101(4): e02978
- Chen C, Chen H, Zhang Y, Thomas HR, Frank MH, He Y, Xia R, 2020. TBtools: an integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 13(8): 1194-1202
- Chevriaux J, Zerbetto de Palma G, Jozefkowicz C, Vitali V, Canessa Fortuna A, Ayub N, Soto G, Bienert GP, Zeida A, Alleva KE, 2024. Permeation mechanisms of hydrogen peroxide and water through plasma membrane intrinsic protein (PIP) aquaporins. *The Biochemical Journal*, 481(19): 1329-1347
- Ding M, Li J, Fan X, He F, Yu X, Chen L, Zou S, Liang Y, Yu J, 2018. Aquaporin1 regulates development, secondary metabolism and stress responses in *Fusarium graminearum*. *Current Genetics*, 64(5): 1057-1069
- Ding MY, 2018. Functional characterization of aquaporin genes in *Fusarium graminearum*. MS Thesis, Shangdong Agricultural University, Tai'an. 1-60 (in Chinese)
- Effiong ME, Umeokwochi CP, Afolabi IS, Chinedu SN, 2024. Comparative antioxidant activity and phytochemical content of five extracts of *Pleurotus ostreatus* (oyster mushroom). *Scientific Reports*, 14(1): 3794
- Hub JS, de Groot BL, 2008. Mechanism of selectivity in aquaporins and aquaglyceroporins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(4): 1198-1203
- Jozefczuk J, Adjaye J, 2011. Quantitative real-time PCR-based analysis of gene expression. *Methods in Enzymology*, 500: 99-109
- Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K, 2018. MEGA

- X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547-1549
- Kumar V, Sarma VV, Thambugala KM, Huang JJ, Li XY, Hao GF, 2021. Ecology and evolution of marine fungi with their adaptation to climate change. *Frontiers in Microbiology*, 12: 719000
- Laothanachareon T, Asin-Garcia E, Volkers RJM, Tamayo-Ramos JA, Martins Dos Santos VAP, Schaap PJ, 2023. Identification of *Aspergillus niger* aquaporins involved in hydrogen peroxide signaling. *Journal of Fungi*, 9(4): 499
- Lee MD, King LS, Agre P, 1997. The aquaporin family of water channel proteins in clinical medicine. *Medicine*, 76(3): 141-156
- Li T, Hu YJ, Hao ZP, Li H, Wang YS, Chen BD, 2013. First cloning and characterization of two functional aquaporin genes from an arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices*. *The New Phytologist*, 197(2): 617-630
- Lu Q, Jin L, Wang P, Liu F, Huang B, Wen M, Wu S, 2023. Effects of interaction of protein hydrolysate and arbuscular mycorrhizal fungi effects on citrus growth and expressions of stress-responsive genes (*Aquaporins* and *SOSs*) under salt stress. *Journal of Fungi*, 9(10): 983
- Ma L, Zhao Y, Yu J, Ji H, Liu A, 2018. Characterization of Se-enriched *Pleurotus ostreatus* polysaccharides and their antioxidant effects *in vitro*. *International Journal of Biological Macromolecules*, 111: 421-429
- Maurel C, Chrispeels MJ, 2001. Aquaporins. A molecular entry into plant water relations. *Plant Physiology*, 125(1): 135-138
- Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann JB, Engel A, Fujiyoshi Y, 2000. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 407(6804): 599-605
- Navarro-Ródenas A, Ruiz-Lozano JM, Kaldenhoff R, Morte A, 2012. The aquaporin *TcAQP1* of the desert truffle *Terfezia clavaryi* is a membrane pore for water and CO₂ transport. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 25(2): 259-266
- Nehls U, Dietz S, 2014. Fungal aquaporins: cellular functions and ecophysiological perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(21): 8835-8851
- Özdemir S, Serkan Yalçın M, Kılınç E, 2021. Preconcentrations of Ni(II) and Pb(II) from water and food samples by solid-phase extraction using *Pleurotus ostreatus* immobilized iron oxide nanoparticles. *Food Chemistry*, 336: 127675
- Pettersson N, Filipsson C, Becit E, Brive L, Hohmann S, 2005. Aquaporins in yeasts and filamentous fungi. *Biology of the Cell*, 97(7): 487-500
- Tamás MJ, Luyten K, Sutherland FC, Hernandez A, Albertyn J, Valadi H, Li H, Prior BA, Kilian SG, Ramos J, Gustafsson L, Thevelein JM, Hohmann S, 1999. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Molecular Microbiology*, 31(4): 1087-1104
- Tanghe A, van Dijck P, Dumortier F, Teunissen A, Hohmann S, Thevelein JM, 2002. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast, and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12): 5981-5989
- Tanghe A, van Dijck P, Thevelein JM, 2006. Why do microorganisms have aquaporins? *Trends in Microbiology*, 14(2): 78-85
- Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P, 2006. Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, 439(7077): 688-694
- Tu DH, Zhang F, Mao MM, Xing D, 2022. Influence of arbuscular mycorrhizal fungi on nitrogen accumulation and expression of aquaporins in *Morus alba* root. *Plant Physiology Journal*, 58(8): 1607-1616 (in Chinese)
- Turgeman T, Shatil-Cohen A, Moshelion M, Teper-Bamnolker P, Skory CD, Lichter A, Eshel D, 2016. The role of aquaporins in pH-dependent germination of *Rhizopus delemar* spores. *PLoS One*, 11(3): e0150543
- Verma RK, Prabh ND, Sankaramakrishnan R, 2014. New subfamilies of major intrinsic proteins in fungi suggest novel transport properties in fungal channels: implications for the host-fungal interactions. *BMC Evolutionary Biology*, 14:173
- Wang D, Ni Y, Xie K, Li Y, Wu W, Shan H, Cheng B, Li X, 2024. Aquaporin ZmTIP2;3 promotes drought resistance of maize through symbiosis with arbuscular mycorrhizal fungi. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(8): 4205
- Xiong M, Li C, Wang W, Yang B, 2023. Protein structure and modification of aquaporins. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1398: 15-38
- Xu H, Zwiazek JJ, 2020. Fungal aquaporins in ectomycorrhizal root water transport. *Frontiers in Plant Science*, 11: 302
- Zeng Q, Jia H, Ma Y, Xu L, Ming R, Yue J, 2023. Genome-wide identification and expression pattern profiling of the aquaporin gene family in papaya (*Carica papaya* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 24(24): 17276
- Zhu QY, 2022. Research on the mechanism of aquaporin and NADPH oxidase regulating triterpenoid synthesis of *Ganoderma lucidum* under drought stress. MS Thesis, Nanjing Agricultural University, Nanjing. 1-92 (in Chinese)

[附中文参考文献]

- 丁明玉, 2018. 禾谷镰刀菌水通道蛋白的功能研究. 山东农业大学硕士论文, 泰安. 1-60
- 涂德辉, 张芳, 毛明明, 邢丹, 2022. 丛枝菌根真菌对桑树根系氮积累及水通道蛋白表达的影响. *植物生理学报*, 58(8): 1607-1616
- 朱全宇, 2022. 水通道蛋白与 NADPH 氧化酶调控干旱胁迫下灵芝三萜合成的机制研究. 南京农业大学硕士论文, 南京. 1-92